

(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2005-508154

(P2005-508154A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/15	C O 7 K 14/15	4 B O 2 4
C O 7 K 16/10	C O 7 K 16/10	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 142 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-521800 (P2003-521800)	(71) 出願人	592130699
(86) (22) 出願日	平成14年8月15日 (2002.8.15)		ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月16日 (2004.2.16)		ィ・オブ・カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/026249		The Regents of The
(87) 国際公開番号	W02003/016491		University of Calif
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		ornia
(31) 優先権主張番号	60/312, 686		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(32) 優先日	平成13年8月15日 (2001.8.15)		607 オークランド フランクリン ス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		トリート 1111 12ス フロア
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外套細胞リンパ腫の外套組織球から単離されたレトロウイルス

## (57) 【要約】

本発明は、ヒトリンパ腫に関連し、本明細書において外套組織球レトロウイルス (MHRV) と称される外套細胞リンパ腫から最初に単離された、単離されたおよび無傷のウイルスを特徴とする。本発明はさらに、MHRVを検出するための組成物および方法、ならびにインビトロにおけるMHRVの増殖、抗MHRV薬剤のスクリーニング、および弱毒化MHRV株の作製のための方法を特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

単離された外套組織球レトロウイルス（MHRV）粒子。

## 【請求項2】

配列番号：8のアミノ酸残基1～22のアミノ酸配列を含むGAGポリペプチドをコードするRNAゲノムを含む、請求項1記載の単離されたMHRV粒子。

## 【請求項3】

配列番号：2を含む第1のプライマーおよび配列番号：3を含む第2のプライマーを使用するPCR増幅により、約304bpの増幅産物を産生することで特徴づけられるRNAゲノムを含む、請求項1記載の単離されたMHRV粒子。

10

## 【請求項4】

304bp増幅産物が配列番号：1の配列を含む、請求項3記載の単離されたMHRV粒子。

## 【請求項5】

粒子が、感染およびウイルスの逆転写酵素の活性に続いて、高いストリンジェンシーの条件下で配列番号：1の核酸配列にハイブリダイズするcDNAを生成するRNAゲノムを含む、請求項1記載の単離されたMHRV粒子。

## 【請求項6】

配列番号：1に対応する配列を含むRNA分子を含む、請求項1記載の単離されたMHRV粒子。

## 【請求項7】

ヒトリンパ腫から単離できること；

20

約90nmから110nmの粒径を有すること；

膜脂質二重層を有すること；

電子顕微鏡法によって円錐形の偏心性ヌクレオイドとして見えるRNAゲノムを有すること；および

配列番号：8のアミノ酸配列のアミノ酸残基1～22を含むGAGエンベロープポリペプチドを有すること、

によって特徴づけられる単離されたMHRV粒子。

## 【請求項8】

ヒトリンパ腫から単離できること；

30

約90nmから110nmの粒径を有すること；

膜脂質二重層を有すること；および

電子顕微鏡法によって円錐形の偏心性ヌクレオイドとして見えるRNAゲノムを有すること；および

RNAゲノムが配列番号：7のヌクレオチド残基1～66に対応する核酸配列を含むこと、  
によって特徴づけられる単離されたMHRV粒子。

## 【請求項9】

請求項1記載のウイルスに感染した、単離された哺乳類細胞。

## 【請求項10】

細胞がマクロファージである、請求項9記載の単離された哺乳類細胞。

## 【請求項11】

40

請求項8記載のウイルスに感染した、単離された哺乳類細胞。

## 【請求項12】

細胞がマクロファージである、請求項11記載の単離された哺乳類細胞。

## 【請求項13】

マクロファージがMHRV粒子を産生する、請求項10または12記載の単離された哺乳類マクロファージ。

## 【請求項14】

配列番号：8のアミノ酸残基1～22の少なくとも4つの隣接するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項15】

50

ポリヌクレオチドが、配列番号：8のアミノ酸残基1～22の少なくとも10個の隣接するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む、請求項14記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項16】

配列番号：7の核酸残基1～66の少なくとも12個の隣接する残基の配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項17】

ポリヌクレオチドが、配列番号：7の核酸残基1～66の少なくとも33個の隣接する残基の配列を含む、請求項16記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項18】

ポリヌクレオチドが、配列番号：7の核酸残基1～66の少なくとも50個の隣接する残基の配列を含む、請求項17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項19】

ポリヌクレオチドの長さが約1kb未満である、請求項14～18のいずれか一項記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項20】

ポリヌクレオチドが、異種性プロモーターエレメントに機能的に連結された、請求項14～18のいずれか一項記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項21】

高ストリンジェンシーの条件下で、少なくとも配列番号：7のヌクレオチド1～66のポリヌクレオチド配列の一部とハイブリダイズする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド

【請求項22】

配列番号：7の核酸残基1～66の少なくとも12個の隣接するヌクレオチドに、少なくとも65%の同一性を有する配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項23】

請求項14～22のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、単離された組換え宿主細胞

【請求項24】

請求項14～22のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、単離されたベクター。

【請求項25】

単離されたMHRV GAGポリペプチド。

【請求項26】

請求項14～22のいずれか一項記載のポリヌクレオチドによってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項27】

請求項25の単離されたMHRV GAGポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項28】

請求項14～22のいずれか一項記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項29】

試料における外套組織球レトロウイルス(MHRV)を検出するための方法であって、本方法は

MHRVを含むことが疑われる生物学的試料を、MHRV特異的なプローブと接触させる工程であり、該接触は、MHRV特異的なプローブが試料に結合して、プローブとプローブ標的との間の複合体を形成するために十分な時間である工程；および

試料におけるMHRV特異的なプローブとプローブ標的の複合体の有無を検出する工程；を含み、

ここで試料における複合体の検出は、MHRVが試料に存在することを示す方法。

【請求項30】

10

20

30

40

50

請求項29記載の方法であって、MHRV特異的なプローブおよびプローブ標的は核酸であり、ならびにMHRV特異的なプローブは配列番号：1の少なくとも8つの隣接するヌクレオチド残基を含む方法。

【請求項31】

請求項29記載の方法であって、MHRV特異的なプローブおよびプローブ標的は核酸であり、ならびにMHRV特異的なプローブは配列番号：7の残基1～66の少なくとも8つの隣接するヌクレオチド残基を含む方法。

【請求項32】

請求項29記載の方法であって、MHRV特異的なプローブはMHRV特異的な抗体であり、およびプローブ標的はMHRV GAGポリペプチドである方法。

10

【請求項33】

請求項29記載の方法であって、プローブ標的は抗MHRV抗体であり、およびMHRV特異的なプローブは配列番号：8のアミノ酸残基1～22を含むポリペプチドである方法。

【請求項34】

生物学的試料が血液、血液由来産物、血漿、および血清からなる群より選択される、請求項29記載の方法。

【請求項35】

生物学的試料がマクロファージまたはマクロファージから派生した腫瘍細胞を含む組織を含む、請求項29記載の方法。

【請求項36】

試料における外套組織球レトロウイルス（MHRV）を検出するための方法であって、本方法は

20

MHRVを含むことが疑われる生物学的試料を、第1のMHRV特異的な核酸プローブおよび第2のMHRV特異的な核酸プローブと接触させる工程であり、ここで第1のプローブおよび第2のプローブは、それぞれ配列番号：7の核酸配列またはその相補体の少なくとも15個の隣接するヌクレオチドを含み、該接触は、増幅されたDNA産物を産生するために有効な条件下であり；および

増幅されたDNA産物の有無を検出する工程；

を含み、

ここで、配列番号：7を含む核酸配列から予想される増幅されたDNA産物に対応する増幅されたDNA産物の検出は、試料にMHRVが存在することを示す方法。

30

【請求項37】

第1のプローブがHERV-9およびHERV-10からなる群より選択される配列を含む、請求項36記載の方法。

【請求項38】

第2のプローブがHERV-8、HERV-11、およびHERV-12からなる群より選択される配列を含む、請求項36記載の方法。

【請求項39】

第1のプローブがHERV-8であり、第2のプローブがHERV-9である、請求項36記載の方法であって、約304bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す方法。

40

【請求項40】

第1のプローブがHERV-9であり、第2のプローブがHERV-12である、請求項36記載の方法であって、約1321bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す方法。

【請求項41】

第1のプローブがHERV-10であり、第2のプローブがHERV-11である、請求項36記載の方法であって、約1966bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す方法。

【請求項42】

外套組織球レトロウイルス（MHRV）の検出のためのキットであって、キットにはMHRV特異的なプローブを含み、ここでプローブは、

MHRV GAGポリペプチドをコードする配列に特異的にハイブリダイズするMHRV特異的な核酸

50

プローブ；

MHRV特異的なGAG抗体；および

抗MHRV GAGポリペプチドに特異的に結合するMHRVポリペプチド；

からなる群より選択されるキット。

【請求項43】

抗MHRV抗ウイルス剤をスクリーニングするための方法であって、本方法は

候補薬剤を、MHRVに感染した哺乳類細胞であって、ウイルス粒子を産生する細胞を含む培養液と接触させる工程；および

培養上清中のMHRVウイルス粒子を検出する工程；を含み、

ここで、上清中のMHRVウイルス粒子の減少は、候補薬剤が抗MHRV抗ウイルス剤と同様の活性があることを示す方法。 10

【請求項44】

MHRVに関連した疾患を検出するための方法であって、本方法は

生物学的試料をMHRV特異的なプローブと接触させる工程、ここで、生物学的試料は、MHRVに関連した疾患を有することが疑われる被検者から得られ、該接触する工程は、MHRV特異的なプローブが試料に結合して、試料中のプローブとプローブ標的との間の複合体が形成されるために十分な時間行われる；および

試料中のMHRV特異的なプローブとプローブ標的の複合体を検出する工程；を含み、

ここで、試料中の複合体の検出は、MHRVが試料に存在することを示し、これは、被検者がMHRVに関連した疾患を有する可能性があることを示す方法。 20

【請求項45】

MHRVに関連した疾患がMHRVに関連したリンパ腫である、請求項44記載の方法。

【請求項46】

MHRVに関連した疾患が奇形癌腫、多発性硬化症、自己免疫性リウマチ疾患、および精神分裂症からなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項47】

請求項25記載のMHRV GAGポリペプチドを作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

a) ポリペプチドの発現に適した条件下で、組換えMHRV GAGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞を培養する工程；および

b) 宿主細胞培養からポリペプチドを回収する工程。 30

【請求項48】

免疫原性のポリペプチドが、外套組織球レトロウイルス(MHRV)のGAGポリペプチドのアミノ酸残基1~22のアミノ酸配列を含む免疫原性のポリペプチドを含む、免疫原性の組成物。

【請求項49】

免疫原性のポリペプチドをコードする配列を有する核酸分子を含む免疫原性の組成物であって、免疫原性のポリペプチドは、外套組織球レトロウイルス(MHRV)のGAGポリペプチドのアミノ酸残基1~22のアミノ酸配列を含み、核酸配列は、哺乳類細胞において発現させるために適応している免疫原性の組成物。

【請求項50】 40

単離された組換えMHRVベクターであって、

請求項14~22のいずれか一項記載のMHRVポリヌクレオチド；

異種性核酸の挿入のために適した少なくとも1つの制限部位；および

MHRVポリヌクレオチドに対して異種性の配列を含む関心対象の核酸を含むベクター。

【請求項51】

制限部位がMHRVゲノムにおいて天然に存在しない、請求項50記載の単離された組換えMHRVベクター。

【請求項52】

請求項14~22のいずれか一項記載のMHRVポリヌクレオチドを含み、異種性核酸の挿入に適 50

した少なくとも1つの制限部位をさらに含む組換えMHRVゲノムを含む、単離された組換えMHRV粒子。

【請求項53】

請求項52記載の単離された組換えMHRV粒子であって、組換えMHRVゲノムはMHRVポリヌクレオチドに対して異種性の配列を含む核酸をさらに含み、核酸は、宿主細胞へのMHRVベクターの導入において、宿主における発現のために機能的に挿入されている、組換えMHRV粒子。

【請求項54】

MHRV粒子が複製欠損である、請求項52記載の単離された組換えMHRV粒子。

【請求項55】

MHRV粒子が複製適格性である、請求項52記載の単離された組換えMHRV粒子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦によって後援された調査に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号U01: CA66529の下に政府支援を伴ってなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有し得る。

【0002】

発明の技術分野

本発明は、ヒトレトロウイルス、特に、ヒトの、非ホジキンリンパ腫、特に外套細胞リンパ腫から単離されたヒトレトロウイルスに関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ヒトは年をとるにつれて、様々な慢性疾患を発症し始めるが、その病因は現時点では依然として不明である。これらの慢性疾患は、実質的に体の全ての器官系統に影響を及ぼす。慢性疾患のいくつかの動物モデルは、ウイルス感染、特にレトロウイルスの感染を含む。たとえば、マウス白血病ウイルスは、リンパ腫、自己免疫疾患、および免疫不全疾患を引き起こすことに関与している。これらのタイプの動物モデルの研究では、レトロウイルスがこれらの疾病状態に有意な役割を演ずることが示唆された。しかし、動物モデルにおける所見のヒトへの外挿では、HTLV(リンパ腫で)、HIV(AIDSで)、およびHuLAV(ヒトB細胞、非ホジキンリンパ腫で(米国特許第5,108,920号))以外の慢性免疫学疾患に関連した十分に感染性のレトロウイルスの同定がうまく成功したことは証明されていない。

【0004】

その他の慢性疾患に関連した潜在的な薬剤の探索において、ヒト内在性のレトロウイルスエレメントの膨大なアレイが発見され特徴づけられた(Lowerら、Proc Natl Acad Sci 93: 5177-5184 (1996); Tonjesら、J Virol 73 (11): 9187-9195 (1999); Sverdlov Bioessays 22 (2): 161-171 (2000)。マウス疾患モデルにおける慢性疾患と関連ものであることがヒトにおいて同定された内在性のレトロウイルスエレメントの最新の分類は、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)である(Wilierら、Virus Genes 15 (2): 123-133 (1997))。HERV関連遺伝子の発現またはHERVエレメントに対する抗体についての証拠は、奇形癌腫(Bollerら、J Virol 71: 4581-4588 (1997); Bollerら、Virology 196: 349-353 (1993))、リンパ腫(上記Lowerら、(1996))、多発性硬化症(Clericiら、J Neuroimmunol 99 (2): 173-182 (1999); Trabattoniら、J Neurovirol 6 (Suppl 2): S38-41 (2000))、自己免疫性リウマチ疾患(Nelsonら、Immunol Invest 28 (4): 277-289 (1999))、および最も最近の精神分裂症(Yolkenら、Brain Res Rev 31 (2-3): 193-199 (2000))などの様々な慢性疾患において同定されている。しかし、ヒト内在性レトロウイルスエレメントは、ヒトゲノムのほぼ1%を構成し、これらのエレメントのそれぞれは、その他の内在性エレメントに非常に関連しているため、疾患の発症におけるこれらの役割を評価することは困難であった。

10

20

30

40

50

## 【0005】

レトロウイルスおよび疾患に関連したその他の薬剤の同定における進歩にもかかわらず、多くの疾患の原因となる薬剤または関連した薬剤の同定は達成しにくいままである。あるタイプの悪性リンパ系は、このような疾患の1つである。形態および細胞の系統に基づいて3つの主なカテゴリーの悪性リンパ球：B細胞腫瘍、T細胞/ナチュラルキラー（NK）細胞腫瘍、およびホジキンリンパ腫が、認識されている。B細胞およびT細胞/NK腫瘍は、非ホジキンリンパ腫と称することが多い。多くのリンパ系の腫瘍が固体段階および循環段階で存在しているので、リンパ腫およびリンパ性白血病は、これらの分類法の範囲内に含まれる。BおよびT細胞カテゴリー内には、2つの細別：分化の最も初期の段階に対応する前駆体腫瘍、およびより成熟した分化した腫瘍が認識されている。活動的なリンパ腫は、主にこれらが初めは無症候であるという性質のために、初期段階で診断することが特に困難である。したがって、活動的な非ホジキンリンパ腫の診断は、通常、疾患期間の遅い段階であり、予後は通常芳しくない。

10

## 【0006】

外套細胞リンパ腫は、活動的な非ホジキンリンパ腫の例である。外套細胞リンパ腫は、リンパ節、脾臓、骨髄、血液、および時に胃腸系（リンパ腫のポリポーシス）において見出される。外套細胞リンパ腫は、CD5陽性の濾胞性外套B細胞、染色体11および14の転座、ならびにサイクリンD1タンパク質の過剰発現によって一般に特徴づけられる。軽度のリンパ腫と同様、外套細胞リンパ腫は、アンスラサイクリンに基づく化学療法では不治であると思われ、老齢の患者では、一般に無症候の進行期疾患を生じる。しかし、平均生存期間は、その他のリンパ腫のもよりも有意に短く（3～5年）、それゆえにこの組織は現在活動的なリンパ腫であると考えられている。散在性パターンおよび芽球様細胞の変異体では、生存が短い活動的な経過を有するが、外套帯型では、より無痛性の経過を有する。どの化学療法アプローチがこの臨床病理学的な実体において最も長期生存をもたらすかは不明であり、化学療法に対する不応性は通常の特徴である。多くの調査者が、幹細胞/骨髄を補助する高投与量治療法またはCHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニソン）化学療法後の、インターフェロンもしくは抗CD20抗体の使用を探索している。

20

## 【0007】

癌などの慢性疾患の薬剤の同定は、発症した患者の診断および抗癌剤の開発のためだけでなく、原因因子が、たとえば輸血、感染組織の移植、針の共有または再使用、性的接触などを介して伝染される慢性疾患の蔓延を防止するためにも重要である。ドナーからレシピエントへのリンパ腫の伝染は、ウイルスに直接感染することにより生じ得る。

30

## 【0008】

当技術分野において、未知の病因の癌に関連する（およびしたがって、マーカーとして機能することができる）か、または引き起こす因子を同定する必要がある。さらに、癌などの慢性疾患に関連する因子の同定により、使用前に関連する因子について生物物質をスクリーニングすることができる（たとえば、血液、血液製剤、組織などをスクリーニングする）。本発明はこの要求に取り組む。

## 【発明の開示】

40

## 【0009】

## 発明の概要

本発明は、ヒトリンパ腫と関連した、単離された無傷のウイルス、およびもともと外套細胞リンパ腫から単離されたウイルス（本明細書において外套組織球レトロウイルス（MHRV）と称される）を特徴とする。また、本発明は、MHRVを検出するための組成物および方法、ならびにインビトロにおいてMHRVを増殖するため、抗MHRV薬剤をスクリーニングするため、および弱毒化したMHRV株の作製するための方法および組成物を特徴とする。

## 【0010】

1つの側面において、本発明は、単離された外套組織球レトロウイルス（MHRV）粒子を特徴とする。特定の態様において、MHRV粒子は、配列番号：8のアミノ酸残基1～22のアミノ

50

酸配列を含むGAGポリペプチドをコードするRNAゲノムを含む。その他の特定の態様において、MHRV粒子は、配列番号：2を含む第1のプライマーおよび配列番号：3を含む第2のプライマーを使用するPCR増幅により、約304bpの増幅産物を産生することで特徴づけられるRNAゲノムを含む。なおさらなる特定の態様において、MHRV粒子は、粒子が、感染およびウイルスの逆転写酵素の活性化に続いて、高いストリンジェンシーの条件下で配列番号：1の核酸配列にハイブリダイズするcDNAを生成するRNAゲノムを含む。もう一つの態様において、MHRVウイルス粒子は、配列番号：1に対応する配列を含むRNA分子を含む。さらに別の態様において、MHRV粒子は、ヒトリンパ腫から単離できること；約90nmから110nmの粒径を有すること；膜脂質二重層を有すること；電子顕微鏡法によって円錐形の偏心性ヌクレオイドとして見えるRNAゲノムを有すること；および配列番号：8のアミノ酸配列のアミノ酸残基1~22を含むGAGエンベロープポリペプチドを有すること、または代わりに、もしくは加えて、配列番号：7のヌクレオチド残基1~66に対応する核酸配列を含むRNAゲノムを有することによって特徴づけられる。

10

20

30

40

50

**【0011】**

関連した側面において、本発明は、MHRVウイルス粒子に感染した単離された哺乳類細胞（たとえばマクロファージ）を特徴とする。選択的に、感染細胞は、MHRV粒子を産生する。

**【0012】**

もう一つの側面において、本発明は配列番号：8のアミノ酸残基1~22の少なくとも4つの隣接するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド（本明細書においてMHRVポリヌクレオチドと称するが、限定されない）を特徴とする。関連した側面において、本発明は、配列番号：7の核酸残基1~66の少なくとも12個の隣接する残基の配列を含む単離されたMHRVポリヌクレオチド；高ストリンジェンシーの条件下で、少なくとも配列番号：7のヌクレオチド1~66のポリヌクレオチド配列の一部とハイブリダイズする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；配列番号：7の核酸残基1~66の少なくとも12個の隣接するヌクレオチドに、少なくとも65%の同一性を有する配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを特徴とする。

**【0013】**

関連した側面において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む単離された組換え宿主細胞および単離されたベクターを特徴とする。

**【0014】**

もう一つの側面において、本発明は、単離されたMHRV GAGポリペプチドを特徴とする。関連した側面において、単離されたポリペプチドは、上記記載のようなMHRV GAGポリヌクレオチドによってコードされる。さらに関連した側面において、本発明は、単離されたMHRV GAGポリペプチドを特異的に結合する単離された抗体を特徴とする。

**【0015】**

もう一つの側面において、本発明は、MHRVを検出するための方法であって、MHRVを含むことが疑われる生物学的試料をMHRV特異的なプローブと、MHRV特異的なプローブが試料に結合してプローブとプローブの標的との間の複合体が形成されるために十分な時間接触させる工程；および試料におけるMHRV特異的なプローブとプローブ標的との複合体の有無を検出する工程を含む方法を特徴とする。試料における複合体の検出は、MHRVが試料に存在することを示す。

**【0016】**

上記のMHRV検出方法の特定の態様において、プローブ標的は核酸であり、MHRV特異的なプローブは核酸であり、配列番号：1の少なくとも8つの隣接するヌクレオチド残基；または配列番号：7の残基1~66の少なくとも8つの隣接するヌクレオチド残基を含む。その他の態様において、MHRV特異的なプローブはMHRV特異的な抗体であり、およびプローブ標的はMHRV GAGポリペプチドである。さらにその他の態様において、プローブ標的は抗MHRV抗体であり、およびMHRV特異的なプローブは配列番号：8のアミノ酸残基1~22を含むポリペプチドである。関連した態様において、生物学的試料は、血液、血液由来産物、血漿、血清、またはマクロファージもしくはマクロファージから派生した腫瘍細胞を含む組織である

。

【0017】

もう1つの側面において、本発明は試料におけるMHRVを検出するための方法であって、本方法は、MHRVを含むことが疑われる生物学的試料を、第1のMHRV特異的な核酸プローブおよび第2のMHRV特異的な核酸プローブと接触させる工程であり、ここで第1のプローブおよび第2のプローブは、それぞれ配列番号：7の核酸配列またはその相補配列の少なくとも15個の隣接するヌクレオチドを含み、この接触は、増幅されたDNA産物を産生するために有効な条件下である工程；ならびに増幅されたDNA産物の有無を検出する工程を含む方法を特徴とする。配列番号：7を含む核酸配列から予想される増幅されたDNA産物に対応する増幅されたDNA産物の検出は、試料にMHRVが存在することを示す。

10

【0018】

本発明のMHRV検出方法の特異的な態様において、第1のプローブは、HERV-9およびHERV-10からなる群より選択される配列を含む。その他の特異的な態様において、第2のプローブはHERV-8、HERV-11、およびHERV-12からなる群より選択される配列を含む。さらにその他の態様において、第1のプローブがHERV-8であり、第2のプローブがHERV-9であって、約304bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す；第1のプローブがHERV-9であり、第2のプローブがHERV-12であって、約1321bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す；または第1のプローブがHERV-10であり、第2のプローブがHERV-11であって、約1966bpの増幅産物の検出は、MHRVが試料に存在することを示す。

【0019】

もう一つの側面において、本発明は、外套組織球レトロウイルス（MHRV）の検出のためのキットであって、キットにはMHRV特異的なプローブを含み、プローブは、MHRV GAGポリペプチドをコードする配列に特異的にハイブリダイズするMHRV特異的な核酸プローブ；MHRV特異的なGAG抗体；または抗MHRV GAGポリペプチドに特異的に結合するMHRVポリペプチドであるキットを特徴とする。

20

【0020】

もう1つの側面において、本発明は抗MHRV抗ウイルス剤をスクリーニングするための方法であって、本方法は、候補薬剤をMHRVに感染した哺乳類細胞であってウイルス粒子を産生する細胞を含む培養液と接触させる工程；および培養上清中のMHRVウイルス粒子を検出する工程を含む方法を特徴とする。上清中のMHRVウイルス粒子の減少は、候補薬剤が抗MHRV

30

【0021】

さらにもう1つの側面において、本発明はMHRVに関連した疾患を検出するための方法であって、本方法は、生物学的試料をMHRV特異的なプローブと接触させる工程であり、ここで、この生物学的試料はMHRVに関連した疾患を有することが疑われる被検者から得られ、この接触は、MHRV特異的なプローブを試料に結合してプローブとプローブ標的との間の複合体が形成されるのに十分な時間行われる工程；および試料中のMHRV特異的なプローブとプローブ標的の複合体を検出する工程を含む方法を特徴とする。試料中の複合体の検出はMHRVが試料に存在することを示し、これは、被検者がMHRVに関連した疾患を有する可能性があることを示す。関連した態様において、MHRVに関連した疾患は、MHRVに関連したリンパ腫、奇形癌腫、多発性硬化症、自己免疫性リウマチ疾患、または精神分裂症である。

40

【0022】

もう一つの側面において、本発明は、MHRV GAGポリペプチドを作製する方法を特徴とし、この方法は、ポリペプチドの発現に適した条件下で、組換えMHRV GAGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞を培養する工程；および宿主細胞培養からポリペプチドを回収する工程を含む。

【0023】

もう一つの側面において、本発明は、免疫原性のポリペプチドが、外套組織球レトロウイルス（MHRV）のGAGポリペプチドのアミノ酸残基1～22のアミノ酸配列を含む免疫原性のポリペプチドを含む、免疫原性の組成物を特徴とする。

50

## 【0024】

もう一つの側面において、本発明は、免疫原性のポリペプチドをコードする配列を有する核酸分子を含む免疫原性の組成物であって、免疫原性のポリペプチドは、外套組織球レトロウイルス（MHRV）のGAGポリペプチドのアミノ酸残基1～22のアミノ酸配列を含み、核酸配列は、哺乳類細胞において発現するために適応している免疫原性の組成物を特徴とする。

## 【0025】

もう1つの側面において、本発明は、MHRVポリヌクレオチドを含むウイルスゲノム（たとえば、配列番号：8の1～22の少なくとも4つの隣接するアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチド）、異種性核酸の挿入のために適した少なくとも1つの制限部位、およびMHRVポリヌクレオチドに異種性配列を含む関心対象の核酸を含む単離された組換えMHRVベクターであって、核酸は、宿主細胞にMHRVベクターを導入することにより、宿主における発現のために機能的に挿入されているベクターを特徴とする。特定の態様において、制限部位は、MHRVゲノムにおいて天然に存在しない。

## 【0026】

もう1つの側面において、本発明は、MHRVポリヌクレオチドを含む組換えMHRVゲノム（たとえば、配列番号：8の1～22の少なくとも4つの隣接するアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチド）、および異種性核酸の挿入のために適した少なくとも1つの制限部位を含む単離された組換えMHRV粒子を特徴とする。特定の態様において、組換えMHRV粒子は、MHRVポリヌクレオチドに対して異種性の配列を有する核酸をさらに含み、かつ核酸は、宿主細胞にMHRVベクターを導入することにより、宿主における発現のために機能的に挿入されている。その他の特定の態様において、MHRV粒子は、複製欠損であるか、または複製適格性である。

## 【0027】

発明の詳細な記載

本発明および本発明の特定の例示的な態様を記載する前に、本発明が記載された特定の態様に限定されず、従って当然ながら変更してもよいことは理解されるべきである。また、本明細書において使用される専門用語が特定の態様のみを記載するために存在し、限定されることは企図されないことが、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲のみに限定されると考えられという理由から理解されるはずである。

## 【0028】

値の範囲が提供される場合、文脈から明らかに他に指示していない限り、下限ユニットの10分の1までの、その範囲の上限と下限の間のそれぞれの介在値、および任意の他に指定した値または範囲を指定した介在値も本発明の範囲に包含される。よりせまい範囲に独立して含まれ得るこれらのよりせまい範囲の上限および下限は、指定した範囲で特に除外した限界に従って本発明の範囲内に包含される。指定した範囲が限界の一方または両方を含む場合、これらの含まれる限界の両者のいずれかを除外した範囲も、本発明に含まれる。

## 【0029】

他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、通常は、本発明が属する技術分野の当業者によって理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと同様または等価ないずれの方法および物質も本発明の実施または試験において使用することができ、好ましい方法および物質は本明細書に記載してある。本明細書において言及した全ての刊行物は、刊行物が引用している方法および/または物質を開示および記載するために、本明細書に組み入れられる。

## 【0030】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される、単数の形態「a」、および「the」は、文脈から明らかに他に指示していない限り、複数の参照を含む。したがって、たとえば「ウイルス粒子」に関しては、複数のこのようなウイルス粒子を含み、「細胞」に関しては、1つまたは複数の細胞および当業者に既知のその等価物などに関するものを含む。

## 【0031】

本明細書において議論される刊行物は、単に本出願の出願日の前のこれらの開示に関して提供される。また、本明細書においては、従来の発明によって本発明がこのような刊行物に先だって権利が与えられていないと認めるものとは解釈されない。さらに、刊行物が提供された日は、実際の日付とは異なっている可能性があり、それぞれ確認することが必要であると考えられる。

## 【0032】

## 定義

本明細書において使用される「外套組織球レトロウイルス」(MHRV)という用語は、本明細書に記載されたヒトレトロウイルスをいい、これは、一般に以下のいずれか1つまたは複数によって特徴づけることができる：1) ヒト外套細胞リンパ腫から単離できること(本明細書に記載されたとおりに)；2) 電子顕微鏡法によって観察される直径約90nm~110nmのビリオン粒子；3) 膜脂質二重層を有すること；4) RNAゲノムを含む偏心性の円錐形のヌクレオイド。タンパク質レベルでは、MHRVは、ウイルス粒子が配列番号：8のアミノ酸配列のアミノ酸残基1~22を含むGAGコアポリペプチドを有することで特徴づけられる。核酸配列レベルでは、MHRVは、RNAゲノムが、MHRVに特有のGAGをコードする配列の一部である配列番号：7のヌクレオチド残基1~66に対応する核酸配列を含むという点で特徴づけられる。「ヌクレオチド残基に対応する」とは、これに関して、RNAが、デオキシリボヌクレオチドチミン(T)がリボヌクレオチドウラシル(U)と置換されることを除いて、提供されたDNA配列の配列を有することを意味する。MHRVがヒト外套細胞リンパ腫から単離されることの言及では、この供与源から単離されたMHRVのみに限定することは企図されず、むしろ本発明のウイルスを単離して記載する手段だけであることに留意されたい。

## 【0033】

「単離されたウイルス核酸」または「単離されたウイルスポリペプチド」という用語は、本発明によって提供されたMHRVウイルスタンパク質またはペプチドが、天然に存在し、天然に結合しているタンパク質および有機の分子を少なくとも60重量%含まないことを意味する。好ましくは、調製物は、MHRVポリペプチドの少なくとも7重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、および最も好ましくは少なくとも99重量%である。単離されたウイルスタンパク質またはペプチドは、たとえばヒト外套細胞リンパ腫のマクロファージから得ることができるMHRVウイルス粒子から抽出することによって；MHRVウイルスタンパク質もしくはペプチドをコードする組換え核酸の発現によって；または、タンパク質もしくはペプチドを化学的に合成することによって得てもよい。純度は、任意の適切な方法によって、たとえばカラムクロマトグラフィ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析によって測定することができる。

## 【0034】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、任意の長さの、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれかのヌクレオチドの重合体形態をいう。したがって、これらの用語は、1本鎖、2本鎖、もしくは多重鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリンおよびピリミジン塩基もしくはその他の天然の、化学的にもしくは生化学的に修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを含むが、これらに限定されない。これらは、イントロン配列およびエキソン配列を含む(たとえばNiwaら、(1999) Cell 99 (7) : 691-702を参照されたい)。

## 【0035】

ポリヌクレオチドのバックボーンは、糖およびリン酸基(RNAまたはDNAにおいて典型的に見出されるであろうもの)、または修飾もしくは置換された糖もしくはリン酸基を含むことができる。または、ポリヌクレオチドのバックボーンは、ホスホラミダイトなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、したがって、アミド亜リン酸オリゴデオキシヌクレオチドまたは混合されたアミド亜リン酸エステル-リン酸ジエステルオリゴマーであることもできる。Peyrottesら、(1996) Nucl. Acids Res. 24: 1841-1848 ; Chaturv

10

20

30

40

50

ediら、(1996) Nucl. Acids Res. 24: 2318-2323。ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾されたヌクレオチド、ウラシル、糖、ならびにフルオロリボースおよびチオアートなどのその他の結鎖基、ならびにヌクレオチド分岐物を含んでいてもよい。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。ポリヌクレオチドは、ラベリング成分と結合することなどによって、重合後にさらに修飾されていてもよい。この定義に含まれるその他の改変のタイプは、cap、1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの類似体による置換、ポリヌクレオチドをタンパク質、金属イオン、標識成分、その他のポリヌクレオチド、または支持体（たとえば、固体または半固体支持体、アレイとして使用するための支持体などに）に取り付けるための手段の導入を含む。ポリヌクレオチドは、様々な形態で、たとえばアレイに結合して提供することができ、またはポリヌクレオチドのライブラリー（たとえば、関心対象のポリヌクレオチドを含むベクターのライブラリー、このようなベクターを含む組換え宿主細胞のライブラリーなど）の一部として提供することができる。

10

**【0036】**

RNAウイルスMHRV、およびその他のRNAウイルスにおいてのDNAに関してはゲノムRNAから産生されるDNA配列を意味し、DNA配列を作製する方法に関して限定されないことが理解される。同様に、MHRV配列およびその他のRNAウイルスのDNA配列は、ウラシル(U)がチミン(T)で置換された対応するRNAを包含し、さらに相補鎖およびその対応するRNA配列を包含する。

**【0037】**

「ポリペプチド」および「タンパク質」のという用語は、本明細書において交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸の重合形態をいい、コードおよび非コードアミノ酸、化学的もしくは生化学的に修飾（たとえば、グリコシル化などの翻訳後修飾）または誘導体化されたアミノ酸、重合性ポリペプチド、および修飾されたペプチドバックボーンを有するポリペプチドを含むことができる。本用語は、融合タンパク質を含む異種性アミノ酸配列との融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有するもしくは有さない異種性および同種のリーダー配列を有する融合体；免疫学的にタグを付けられたタンパク質；などを含むが、これらに限定されない。また、ポリペプチドは、支持体への（たとえば、固体または半固体支持体への、アレイとして使用するための支持体などへの）付着を容易にするために修飾することもできる。

20

30

**【0038】**

本明細書において使用される、指定された配列に「由来する」ポリヌクレオチドは、指定されたヌクレオチド配列の領域に対応するおよそ少なくとも約6つの隣接するヌクレオチド、少なくとも約8つのヌクレオチド、少なくとも約10~12個の隣接するヌクレオチド、および少なくとも約15~20個の隣接するヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチド配列をいう。「対応する」は、指定された配列に相同的または相補的なことを意味する。好ましくは、ポリヌクレオチドが由来する領域の配列は、MHRVゲノムに特有の配列に相同的または相補的である。

**【0039】**

配列がMHRVに特有であるか否かにかかわらず、当業者に既知の技術によってゲノムを決定することができる。たとえば、配列は、データバンク、たとえばGenBankの配列と比較して、感染していない宿主またはその他の生物に存在するかどうかを決定することができる。また、配列は、その他のレトロウイルス、特にヒト内在性レトロウイルスを含むその他の既知のウイルス性因子の配列をレトロウイルス科のメンバーと比較することができる。また、その他の配列に対して誘導された配列が対応するか、または対応しないかは、適切なストリンジェンシーの条件下におけるハイブリダイゼーションによって決定することができる。核酸配列の相補性を決定するためのハイブリダイゼーション技術は、当業者に既知であり、以下に議論してある。また、たとえばManiatisら(1982)を参照されたい。さらにハイブリダイゼーションによって形成される二体鎖ポリヌクレオチドのミスマッチは、たとえば、特異的に二体鎖ポリヌクレオチドの一本鎖領域を消化するS1などのヌクレア

40

50

ーゼによる消化を含む既知の技術によって決定することができる。典型的なDNAに「由来する」であろう領域は、たとえば、特異的なエピトープをコードする領域、ならびに非転写領域および/または非翻訳領域を含むが、これらに限定されない。

【0040】

由来するポリヌクレオチドは、示されたヌクレオチド配列から必ずしも物理的に由来するというわけではなく、たとえば、化学合成、DNA複製、逆転写、または転写を含むいかなる方法で生成されてもよい。さらに、指定された配列のものに対応する領域の組み合わせは、当技術分野において既知の方法で修飾して、企図される使用で処方されてもよい。

【0041】

同様に、指定した核酸配列に「由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、配列においてコードされるポリペプチド、またはその一部分と一致するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、この部分は、少なくとも3~5つの隣接するアミノ酸、およびより好ましくは少なくとも8~10個の隣接するアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも11~15個の隣接するアミノ酸からなるか、またはこの配列でコードされるポリペプチドと免疫学的に同定可能なポリペプチドをいう。また、この専門用語は、指定された核酸配列から発現されるポリペプチドを含む。

10

【0042】

組換えポリペプチドまたは由来するポリペプチドは、必ずしも指定された核酸配列、たとえば、配列番号：7に記載したようなMHRV GAGポリペプチドをコードする配列から、またはMHRVゲノムから翻訳されるというわけではなく；たとえば、化学合成、組換え発現系における発現、または変異MHRVを含むMHRVからの単離を含むいかなる方法で作製されてもよい。組換えポリペプチドまたは由来するポリペプチドは、その配列に1つもしくは複数のアミノ酸の類似体または非天然アミノ酸を含んでいてもよい。配列にアミノ酸の類似体を挿入する方法は、当業者に既知である。また、これは、1つまたは複数の標識を含んでいてもよく、これは当業者に既知である。

20

【0043】

本明細書において使用される、「組換えポリヌクレオチド」という用語は、その起源または操作によって、：(1)天然において結合するポリヌクレオチドの全てまたは一部には結合しないもの、(2)天然において連結するもの以外のポリペプチドに連結するもの、または(3)天然には存在しないが、ゲノム、cDNA、半合成の、または合成起源のポリヌクレオチドを企図する。

30

【0044】

「機能的に連結された」は、このように記載された成分が、その成分の企図された方法でそれらを機能させる関係で近位であることをいう。コード配列に「機能的に連結された」対照配列は、コード配列の発現が対照配列に適合した条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。

【0045】

「オープン・リーディング・フレーム」(ORF)は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の領域であり、この領域は、一部のコード配列または全コード配列を表してもよい。

40

【0046】

「コード配列」は、適切な調節配列の制御下で配置されたときに、mRNAに転写される、および/またはポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列は、mRNA、cDNA、および組換えポリヌクレオチド配列を含むが、これらに限定されない。

【0047】

たとえば、「MHRV GAGポリペプチドに対して異種性のプロモーターエレメント」という用語において使用される、「異種性の」という用語は、結合した2つのエレメントが天然において共に結合していることが見出されていないこと、たとえば、異なった供与源である

50

(たとえば、プロモーターエレメントは、天然に見出されるMHRV GAGポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに結合されていない)ことを意味する。

【0048】

本明細書において使用される、「形質転換」という用語は、挿入のために使用される方法、たとえば、直接取込み、トランスダクション、f-交差、またはエレクトロポレーションであるかにかかわらず、宿主細胞に外因性のポリヌクレオチドを挿入することをいう。外因性のポリヌクレオチドは、組込まれていないベクター、たとえば、プラスミドとして維持されていてもよく、または代わりに宿主ゲノムに組み込まれていてもよい。

【0049】

MHRVポリヌクレオチド(たとえば、核酸プローブ)またはポリペプチド(たとえば、特異的にポリペプチドを結合する抗体を使用して検出されるもの)に関して使用される、「特異的に結合する」という用語は、MHRVポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、MHRVを非MHRVポリヌクレオチドまたは非MHRVポリペプチドから区別するために検出されるようなMHRVのマーカーとして使用することができることを意味する。たとえば、特異的なMHRVポリヌクレオチドは、非MHRV核酸からMHRV核酸を区別するために、MHRV核酸を特異的に検出するのに(たとえば、核酸増幅に基づいたアッセイ法またはハイブリダイゼーションに基づいたアッセイ法において)使用することができるものである。同様に、特異的なMHRVポリペプチドは、試料におけるMHRVを特異的に検出して、非MHRVポリペプチドからMHRVポリペプチドを区別するために検出することができる(たとえば、抗体に基づくアッセイ法によって)ポリペプチドである。同様に、MHRV特異的な抗体は、試料におけるMHRVを特異的に検出して非MHRVポリペプチドからMHRVポリペプチドを区別するために、MHRV特異的なポリペプチドまたはMHRV特異的なエピトープの検出に使用することができる抗体である。

【0050】

本明細書において使用される「MHRVマーカー」は、試料において検出することができ、MHRVに対する試料の供与源に存在すること、または前に存在すること(たとえば、暴露の前に)を示す生物学的分子をいう。MHRVマーカーの例は、MHRVウイルス粒子、MHRVに特異的なMHRV核酸、MHRVに特異的なMHRVポリペプチド、および抗MHRV抗体を含む。

【0051】

特にMHRVの検出に関して使用される、「生物学的試料」という用語は、被検者、一般にヒト被験者から得られる任意の生物学的物質をいう。このような物質は、血液、血液由来産物、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、呼吸管、腸管、および尿生殖器管の外部切片、涙、唾液、乳汁、血液細胞、細胞(たとえば、マクロファージ、骨髄、リンパ腫の癌細胞、腫瘍細胞、前癌の細胞(たとえば、形成異常細胞)など)、腫瘍、器官を含む(しかし、これらに限定されない)個体から単離された組織または液の試料、ならびにインビトロにおける細胞培養成分(ウイルスに感染した細胞、組換え細胞、および細胞成分の細胞培地において、細胞の増殖によって生じる培養上清を含むが、これらに限定されない)を含むが、これらに限定される必要はない。

【0052】

本明細書において使用される、「被験者」または「患者」という用語は、本発明の方法、たとえば、診断方法を適用できる任意の被検者または患者を包含することを意図する。哺乳類の被検者および患者、特にヒトの被験者または患者は、特に関心対象である。

【0053】

本明細書において使用される、「マクロファージ」および「単球」という用語は、交換可能に使用され、当技術分野において、「単球」という用語はCD14細胞表面マーカーを発現する循環単核細胞を記載するために使用されることが多く、および組織においては、この細胞はマクロファージとして分類されることも多いことが理解される。

【0054】

当技術分野において、および本明細書において使用される「増殖するマクロファージ」という用語は、分裂しているマクロファージを示すと理解される用語である。通常、マクロファージは、さらに分裂することができない最終分化細胞である。本発明の目的では、「

10

20

30

40

50

増殖するマクロファージ」は、さらに分裂することができるか、または末期もしくは最終段階であるとみなされない細胞周期の一部である。増殖は、クローン、すなわち単一の細胞に由来してもよい。

【0055】

本明細書において使用される、「増殖するマクロファージの存在」を検出することは、増殖するマクロファージのレベルを検出することを一般に意味する。絶対的または相対的レベルでさえも決定される必要はないことは理解され、検出可能な増殖するマクロファージの観測で十分である。

【0056】

「マイクロアレイ」および「アレイ」は、本明細書において交換可能に使用され、生化学的試料(標的)(これは、未決定の特徴を有することが多い)のための推定結合部位(たとえば、ハイブリダイゼーションによる)のアレイ、好ましくは規則正しいアレイを有する表面を含む。好ましい態様において、マイクロアレイは、基質の定義された部位に固定された異なったポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプローブの構築をいう。アレイは、紙、ガラス、プラスチック(たとえば、ポリプロピレン、ナイロン)、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、シリコン、光ファイバー、またはその他の任意の適切な固体もしくは半固体支持体などの物質で製造され、平面(たとえば、ガラス板、シリコンチップ)、または3次元(たとえば、ピン、繊維、ビーズ、粒子、マイクロタイターウェル、キャピラリー)の配置に配置された基質に形成される。

【0057】

アレイを形成するプローブは、(i) フォトリソグラフィ技術を使用するインサイチュールにおける合成(たとえば、高密度オリゴヌクレオチドアレイ)(Fodorら、*Science* (1991), 251: 767-773; Peaseら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994), 91: 5022-5026; Lockhartら、*Nature Biotechnology* (1996), 14: 1675; 米国特許第5,578,832号; 第5,556,752号; および第5,510,270号を参照されたい); (ii) 中程度から低い密度(たとえば、cDNAプローブ)でのガラス、ナイロン、またはニトロセルロースに対するスポットティング/印刷(Schenaら、*Science* (1995), 270: 467-470、DeRisiら、*Nature Genetics* (1996), 14: 457-460; Shalonら、*Genome Res.* (1996), 6: 639-645; およびSchenaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995), 93: 10539-11286); (iii) マスキングにより(Maskos および Southern, *Nuc. Acids. Res.* (1992), 20: 1679-1684)、および(iv) ナイロンまたはニトロセルロースハイブリダイゼーション膜に対するドットプロットティングにより(たとえばSambrookら、Eds., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y.)を参照されたい)を含む任意の数の方法によって、基質に取り付けられてもよい。また、プローブは、マグネチックビーズによって、またはマイクロタイターウェルもしくはキャピラリー中などの液相において、アンカーにハイブリダイゼーションすることによって基質に非共有結合で固定してもよい。プローブ分子は、一般にDNA、RNA、PNA、およびcDNAなどの核酸であるが、タンパク質、ポリペプチド、オリゴ糖、細胞、組織、および特異的に標的分子を結合することができるこれらのいずれかの組み合わせを含んでいてもよい。

【0058】

本明細書において使用される、「治療」という用語は、予防法および/または治療法をいう。

【0059】

本明細書において使用される、「精製されたMHRV」という用語は、MHRVが濃縮された調製物、または単離されたMHRVを有する調製物をいい、この調製物は、ウイルスが正常に結合する細胞の成分、および感染した組織に存在するであろうその他のタイプのウイルスから得られた。ウイルスを単離するための技術は当業者に既知であり、たとえば、遠心、アフィニティークロマトグラフィなどを含む。

【0060】

本明細書において使用される「MHRV粒子」という用語は、完全なビリオンならびにビリオン形成の中間体であろう粒子を含む。MHRV粒子は、一般にMHRV核酸に関連した1つまたは複数のMHRVポリペプチドを有する。

【0061】

本明細書において使用される、「プローブ」という用語は、MHRVの特異的な検出に有用な分子をいう。従って、「プローブ」は、プローブの少なくとも1つの配列が標的領域の配列と相補的であるために、標的領域のMHRVポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。特に言及しない限り、プローブは、プライマー（たとえば、標的領域に隣接した領域のPCRに基づいた増幅に使用されるプライマー）を包含する。また、「プローブ」は、MHRVポリペプチドを特異的に結合する抗体、ならびに抗MHRV抗体を特異的に結合するMHRVポリペプチドを含む。プローブの意味は、本用語の使用の状況から当業者には容易に明らかであろう。

10

【0062】

「MHRV特異的なプローブ」は、MHRV特異的なプローブ標的に特異的に結合する分子（たとえば、核酸、抗体、ポリペプチド）である。MHRV特異的なプローブの例は、MHRVの独特な配列に特異的にハイブリダイズする核酸、MHRV特異的な核酸配列の増幅を容易にする核酸プライマー対；MHRVのGAGを特異的に結合する抗MHRV GAGポリペプチド、および抗MHRV GAG抗体を特異的に結合するMHRV GAGポリペプチドを含む。

【0063】

本明細書において使用される、核酸プローブに関して使用される「標的領域」という用語は、増幅され、および/または検出される核酸の領域をいう。抗体-ポリペプチド（抗体-抗原）複合体形成に関して使用される、「標的領域」という用語は、抗体が特異的に結合するエピトープを形成するポリペプチドの領域をいう。

20

【0064】

本明細書において使用される、「プローブ標的」という用語は、MHRV特異的なプローブが特異的に結合する分子をいう。プローブ標的は、核酸（RNAもしくはDNA）、抗体、またはポリペプチドであることができる。本明細書に記載されたプローブおよびプローブ標的の組み合わせは、当業者であれば、本明細書を読むと直ちに明らかとなるであろう。

【0065】

本明細書において使用される、MHRV核酸を含む「ウイルス核酸」という用語は、ウイルスゲノム由来の核酸、その断片、その転写産物、およびこれらに由来する突然変異体配列をいう。ウイルスの核酸は、たとえば、細胞、合成産生技術、組換え発現技術などの、任意の供与源に由来することもできる。

30

【0066】

「MHRVに関連した疾患」は、ゲノムに統合されたMHRV核酸を有する細胞に関連した疾患を意味する。MHRVに関連したリンパ腫は、このようなMHRVに関連した疾患の例である。

【0067】

「MHRVに関連したリンパ腫」は、MHRV核酸がゲノムに統合された細胞を有するリンパ腫を意味する。リンパ腫は、その主要な原因因子としてMHRVを有するもの、または一般にMHRVが見出されるかもしくは関連するものを有するが、主にMHRVによって引き起こされないものであってもよい。

40

【0068】

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養」、およびその他の単細胞の実体として培養される微生物または高等真核細胞を示すような用語は、組換えベクターまたはその他の導入DNAのためのレシピエントとして使用することができ、または使用されている細胞をいい、トランスフェクトしたオリジナルの細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、天然の、偶発の、またはゆっくりとした変異のために、もとの親株と形態において、ゲノムにおいて、または全DNA相補において、必ずしも完全に同一でなくてもよいことが理解される。

【0069】

50

## 概要

本発明は、本明細書において外套組織球レトロウイルス（MHRV）と称される新規レトロウイルスの発見に基づく。MHRVは、ヒトリンパ腫と関連しており、ヒト内在性レトロウイルス（HERV）、特にHERV-K109と共有する有意なエレメントを有する、最初の複製適格性ヒトレトロウイルスである。本発明のウイルスは最初に外套細胞リンパ腫のマクロファージから単離され、したがって、これを反映してMHRVという名前をつけられた。しかし、本発明者らは、AIDSの大細胞リンパ腫および非AIDS濾胞性リンパ腫を含むその他のリンパ腫においても、MHRVを検出した。したがって、MHRVの名は、これらの所見がリンパ腫などのヒト癌と関連することを示すことから、MHRVが外套細胞リンパ腫を含むことに限定されることを企図しない。

10

### 【0070】

動物モデルにおいてMHRVが単離された細胞がリンパ腫を生じる能力によって示されるとおりMHRVは伝播性であり、レシピエントにおいてリンパ腫を引き起こすことができる。このような観点からみて、本発明は、生物学的試料におけるMHRVを検出するための方法および組成物も提供し、これは、診断ならびに予防（たとえば、レシピエントに導入する前に血液、血液製剤、および組織をスクリーニングする際に）に関して使用することができる。

### 【0071】

本発明の種々の態様を、これからさらに詳細に記載する。

### 【0072】

外套組織球レトロウイルス（MHRV）

20

外套組織球レトロウイルス（本明細書においてMHRVと略記される）は、元々ヒト外套細胞リンパ腫から単離された。MHRV粒子は、電子顕微鏡法によって直径約90nm～110nmとして観察され、およびRNAゲノムを含む円錐形の偏心性のヌクレオイドをカプセル化する膜脂質二重層を有する。観察されたレトロウイルスの形態は、B/D-タイプのものであった。5'LTR（末端反復配列）、pro、poly、env、および3'LTR領域に対応するMHRVゲノム領域は、HERV-K109と命名されたヒト内在性レトロウイルス（HERV）と約98～100%の相同性を占めた（図1を参照されたい）。対照的に、MHRVのgag領域は、HERV-K109のgagに対して93%のみ相同性である。この観測は、MHRVがHERV-K109および別の外因性のウイルスとの組換え事象の結果として生じたことを示唆する。その結果、ヌクレオチド残基約1246～ヌクレオチド残基約3445におよぶMHRVゲノム領域、GAGコード配列に対応する領域、ならびにGAGポリペプチド自体は、MHRVのマーカースとして役立つ。

30

### 【0073】

本発明はさらに、MHRVなどのマクロファージ向性ウイルスを同定するための方法を包含する。一般に、これらの方法は、MHRVを同定する方法に基づき、これは、以下の実施例の節において詳述する。たとえば、最初に、病原性の、増殖性のマクロファージ（たとえば、CD68およびPCNAの発現によって定義される）を有する組織を、組織学的な目視検査によって同定する。次いで、これらの組織または病原性のマクロファージを、適切な培地中で初代マクロファージと共に約1ヵ月間共培養する。次いで、細胞の電子顕微鏡法によって、ウイルスの存在について培養を検討することができる。さらに、または代わりに、培養細胞からの核酸は、本明細書に記載されたMHRV特異的なプライマーを使用して、スクリーニングまたは増幅（たとえば、PCRによって）することができる。MHRVの単離およびクローニングのために本明細書に記載されたものと同様の方法を使用して、ウイルス核酸をクローニングすることができる。

40

### 【0074】

単離されたMHRVおよびMHRVの同定に基づいた本発明の種々の側面は、以下にさらに詳細に議論される。

### 【0075】

MHRV核酸、ポリペプチド、およびポリペプチド特異的抗体

本発明は、MHRVの核酸、ならびにMHRVポリペプチドおよびこのようなポリペプチドを特異的に結合する抗体を特徴とする。以下、本発明のこれらのそれぞれの側面を詳細に説明す

50

る。

【0076】

MHRV核酸

一つの側面において、本発明は、MHRVのポリヌクレオチドを特徴とする。本明細書に使用される、「MHRVポリヌクレオチド」という用語は、一般に、特定の関心対象であるMHRVを特異的に同定するために使用することができるポリヌクレオチドをいう（たとえば、ハイブリダイゼーションによる検出における核酸プローブ、または配列解析におけるもの）。このようなポリヌクレオチドの例は、MHRVのGAG遺伝子の配列の少なくとも一部を有するものであり、この配列は、MHRV核酸（たとえば、生物学的試料中のもの）の特異的な検出に有用である。本発明によって包含されるMHRV GAGポリヌクレオチド配列例は、配列番号：1および7を含むが、必ずしも限定されない。したがって、本発明のポリヌクレオチドの例は、また、隣接する配列として、MHRV GAGコード配列の5'隣接配列（たとえば、GAGオープン・リーディング・フレーム（ORF））を有するものを包含し、MHRV GAGコード領域の5'部分内の配列も、本発明によって想定される。同様に、本発明のポリヌクレオチドの例は、隣接する配列として、MHRV GAGコード領域の3'部分内の配列およびMHRV GAGコード領域の3'隣接配列を有するポリヌクレオチドを含む。

10

【0077】

本発明によって想定されるその他の特定のMHRVポリヌクレオチドの例は、MHRV GAGポリペプチド（長さ約112アミノ酸）、たとえば、配列番号：8のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチド分子またはその部分に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。特定の関心対象のMHRVポリヌクレオチドは、MHRV GAGポリペプチドの5'部分のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を含むもの、たとえば、配列番号：8の隣接するアミノ酸残基1~22のアミノ酸配列の少なくともN末端領域を有するポリペプチド、たとえば、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の少なくとも約1~4個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の少なくとも約2~5個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の少なくとも約4~10個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の少なくとも約8~15個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の少なくとも約12~20個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1~22由来の22個までの隣接するアミノ酸残基を有するものである。さらにMHRVポリヌクレオチドの特定の例は、配列番号：7の少なくとも約10個の、少なくとも約15個の、少なくとも約20個の、少なくとも約50個の隣接するヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを含む。

20

30

【0078】

本発明はさらに、本明細書に記載されたポリヌクレオチドの配列に配列相補性を有するポリヌクレオチド；本明細書に記載されたDNA配列に対応する配列を有するRNA；提供されたポリヌクレオチドに対応するウイルス遺伝子；本明細書に記載された生物学的物質またはその他の生物学的供与源（特にヒト供与源）から（たとえば、ストリンジェントな条件、特に高いストリンジェンシーの条件下のハイブリダイゼーションによって）得られたポリヌクレオチド；提供されたポリヌクレオチドおよびこれらに対応する遺伝子の変異体、特にこれらの遺伝コードの縮重のために存在する変異体（本明細書において「縮重変異体」という）および本発明のMHRVに特異的であるか、または本明細書において特異的に記載されたポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物の生物学的活性を保持するその他の変異体（たとえば、GAGポリペプチドの生物学的活性、たとえばMHRV GAG特異的な抗体のその反応性を保持する）を包含する。本発明によって、および本発明の範囲内において想定されるその他の核酸組成物は、本明細書の開示と共に提供された場合は当業者には直ちに明らかであると考えられる。

40

【0079】

本発明のポリヌクレオチドは、実質的な純度で、一般に完全な染色体または無処理のウイルス粒子以外として単離し、得ることができる。通常、DNAまたはRNAのいずれかとしてのポリヌクレオチドは、実質的に、その他の天然に存在する核酸配列がなく、一般に少なく

50

とも約50%、通常少なくとも約90%純粋であり、天然に存在する染色体では通常結合してない1つまたは複数のヌクレオチドの側面に位置した「組換え」であることもできる。

#### 【0080】

本発明のポリヌクレオチドは、線状分子として、または環状分子内に提供することもでき、自律的に複製する分子（ベクター）内に、または複製配列のない分子内に提供することができる。ポリヌクレオチドの発現は、当業者に既知のそれら自体の、またはその他の調節配列によって調節することができる。本発明のポリヌクレオチドは、トランスフェリンポリカチオンを媒介したDNA導入による感染、裸のまたは被包性の核酸によるトランスフェクション、リボソームを媒介したDNA導入、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、遺伝子銃、リン酸カルシウムを媒介したトランスフェクションなどの、当技術分野において利用できる様々な技術を使用して適切な宿主細胞に導入することができる。

10

#### 【0081】

組換え宿主細胞の産生のために適した宿主細胞は、たとえば、MHRV核酸を含むベクターの維持および/または複製に適しているか、またはMHRVウイルス粒子の複製および産生に適した任意の原核細胞または真核細胞であることができる。宿主細胞の例は、細菌、酵母、および哺乳類の宿主細胞を含むが、必ずしも限定されない。MHRV核酸を含む単離された組換え宿主細胞は、また、本発明において想定される。MHRV核酸を含む単離された組換えベクターまたは構築物も、同様に本発明において想定される。このようなベクターは、MHRV核酸（たとえば、プロモーターエレメント、転写終結エレメント、エンハンサーなど）によってコードされるポリペプチドの発現のためのその他の成分、ならびに宿主細胞における構築物の維持、複製、または（選択的に）ゲノム組込みのためのエレメント（たとえば、複製開始点など）を含むこともできる。

20

#### 【0082】

本発明の単離されたMHRVポリヌクレオチドは、5'、3'、または5'および3'の両方のフランキング配列と共に提供することができる。適切なフランキング配列は、プロモーター配列、エンハンサー配列、転写開始部位および/または停止部位、構築物またはベクターの配列（たとえば、構築物またはベクターの複製および維持のための配列、選択のために提供する遺伝子産物をコードする配列（たとえば、抗生物質の抵抗性または感受性、補充物を含むかまたは含まない培地中における増殖に影響を与える因子など）を含む（しかし必ずしもこれらに限定されない）直鎖状または環状の分子（たとえば、プラスミド）内のポリヌクレオチドの操作のために提供する配列）、ポリヌクレオチドおよび異種性ポリペプチドとの融合タンパク質の産生を提供する配列（すなわち、これが機能的に連結されたポリヌクレオチド以外の供与源に由来するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド）などを含むが、必ずしもこれらに限定されない。

30

#### 【0083】

本発明のポリヌクレオチドは、配列類似性または配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む。配列類似性を有する核酸は、低いストリンジエンシー、たとえば50 および10× SSC（0.9Mの塩類溶液 / 0.09Mのクエン酸ナトリウム）の条件下のハイブリダイゼーションによって検出され、55 において1× SSCで洗浄に供した場合に、結合したままである。配列同一性は、ストリンジエントな条件下、たとえば50 またはそれ以上において、0.1× SSC（9mMの塩類溶液 / 0.9mMのクエン酸ナトリウム）でのハイブリダイゼーションによって決定することができる。

40

#### 【0084】

このような配列のハイブリダイゼーションは、ストリンジエントな条件下で実行されていてもよい。「ストリンジエントな条件」または「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブがその標的配列に、他の配列よりも検出可能に強い程度でハイブリダイズすると考えられる条件が企図される（たとえば、背景よりも少なくとも2倍以上）。ストリンジエントな条件は、配列依存的であり、異なる状況においては異なる。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄のストリンジエンシーを制御することによって、

50

プローブに対して100%の相補的である標的配列を同定することができる（相長的プロービング）。または、ストリンジェントな条件は、類似性の程度の低いものが検出されるように、配列にいくつかのミスマッチが可能ないように調整することもできる（非相長的プロービング）。通常、プローブは、長さが約1000未満のヌクレオチド、好ましくは長さが500未満のヌクレオチドである。

#### 【0085】

典型的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3において塩濃度が約1.5M未満のNaイオン、典型的には約0.01~1.0MのNaイオン濃度（または、その他の塩）であり、温度は、短いプローブ（たとえば10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃、および長いプローブ（たとえば50を超えるヌクレオチド）については少なくとも約60℃であるものと考えられる。また、ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって達成してもよい。低いストリンジェンシー条件の例は、37℃において30~35%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）緩衝液中でのハイブリダイゼーション、および50~55℃において1×~2×SSCでの洗浄を含む（20×SSC=3.0MのNaCl/0.3Mのクエン酸三ナトリウム）。中程度のストリンジェンシーの条件の例は、37℃において、40~45%のホルムアミド、1.0MのNaCl、1%のSDSにおけるハイブリダイゼーション、および55~60℃における0.5×~1×SSCにおける洗浄を含む。高ストリンジェンシーの条件の例は、37℃における50%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDSにおけるハイブリダイゼーション、および60~65℃における0.1×SSCでの洗浄を含む。

10

#### 【0086】

特異性は、典型的にはハイブリダイゼーション後の洗浄における機能であり、最終的な洗浄溶液のイオン強度および温度が重要な因子である。DNA-DNAハイブリッドについては、 $T_m$ は、MeinkothおよびWahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284:  $T_m=81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\% GC) - 0.61 (\% \text{ホルム}) - 500/L$ ; の方程式から概算することができ、式中Mは、一価カチオンの容量モル濃度であり、%GCは、DNA中のグアノシンおよびシトシンヌクレオチドの割合であり、%ホルムは、ハイブリダイゼーション溶液におけるホルムアミドの割合であり、%は、塩基対におけるハイブリッドの長さである。 $T_m$ は、相補的な標的配列の50%が完全にマッチしたプローブにハイブリダイズする温度（イオン強度およびpHで定義されている）である。 $T_m$ は、それぞれ1%のミスマッチについて約1℃減少させ、したがって、 $T_m$ 、ハイブリダイゼーション、および/または洗浄条件は、所望の同一性の配列にハイブリダイズするように調整することができる。

20

30

#### 【0087】

たとえば、約90%までの、および約90%を含む同一性を有する配列を探索する場合、 $T_m$ は、10℃減少することができる。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度およびpHにおいて、特異的な配列およびその相補体の温熱融点（ $T_m$ ）よりも約5℃低く選択される。しかし、過酷にストリンジェントな条件は、温熱融点（ $T_m$ ）よりも1、2、3、または4℃低くして、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができる；中程度にストリンジェントな条件は、温熱融点（ $T_m$ ）よりも6、7、8、9、または10℃低くして、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができる；低いストリンジェントな条件は、温熱融点（ $T_m$ ）よりも11、12、13、14、15、または20℃低くして、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用することができる。

40

#### 【0088】

方程式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、ならびに所望の $T_m$ を使用して、当業者であれば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程の長さのバリエーション（たとえば、分（たとえば、15分~30分）~時間（たとえば、1~2時間から一晩））としてのハイブリダイゼーションおよび/または洗浄溶液のストリンジェンシーのバリエーションは、本開示の範囲内であることを理解すると考えられる。所望のミスマッチの程度が、45℃（水溶液）または32℃（ホルムアミド溶液）よりも低い $T_m$ となる場合、高い温度を使用することができるようにSSC濃度を増大させることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションについての広範なガイドは、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry

50

and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); および Ausubelら編、(1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)に見られる。Sambrookら、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)を参照されたい。

#### 【0089】

特に関心対象となる核酸は、実質的に提供されたポリヌクレオチド配列と同一のものである(たとえば、遺伝子の遺伝的に改変したバージョンなど)。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において提供されたポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする核酸(配列番号:1または7)も、特に関心対象のものである。核酸プローブ、特にDNA配列の標識されたプローブは、相同的なまたは関連したMHRVポリヌクレオチドを単離するために使用することができる。相同的な核酸の供与源は、任意の種、たとえば霊長類種、特にヒト;ラットおよびマウスなどの齧歯類;イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、酵母、ネマトーダなどであり得る。

10

#### 【0090】

一般に、核酸ハイブリッド形成は、本明細書において提供されるポリヌクレオチドの少なくとも15個の隣接するヌクレオチド(nt)を使用して行われる。少なくとも15個の隣接するntの核酸プローブは、相補的な配列を含む核酸と優先してハイブリダイズし、選択されたプローブに唯一ハイブリダイズする核酸の検出、同定、および回収を可能にする。15ntよりも長いプローブ、たとえば長さが約18nt~約100ntのプローブを使用することができるが、15ntは、唯一の同定のために十分な配列を表す。

20

#### 【0091】

また、配列類似性および配列同一性は、配列解析によって決定することができる。一般に、配列同一性は、参照配列に基づいて算出され、これは、保存されたモチーフ、コード領域、フランキング領域、その他同種のものなどの、より大きい配列のサブセットであってもよい。参照配列は、通常少なくとも約18個の隣接するntの長さ、より通常には少なくとも約30ntの長さであると考えられ、比較される配列の全体に及んでもよい。配列解析のためのアルゴリズムは、たとえばAltschulら、Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402に記載されるギャップドBLASTなど、当業者に既知である。配列解析は、MPSRCHプログラム(Oxford Molecular)において実行されるスミス-ウォーターマン相同性サーチアルゴリズムを使用して行うことができる。本発明の目的のためには、同一性の割合(%)を算出する好ましい方法は、以下の検索パラメータのアフィン・ギャップ・検索を使用するMPSRCHプログラム(Oxford Molecular)において実行されるスミス-ウォーターマン相同性サーチアルゴリズムによって決定される:ギャップ・オープン・ペナルティ、12;およびギャップ・エクステンション・ペナルティ、1。

30

#### 【0092】

本発明のもう一つの態様は、本明細書に記載されたとおりの本発明のポリヌクレオチドと少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する単離されたポリヌクレオチドを提供する。一つの態様では、表1に示した配列と、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する単離されたポリヌクレオチドを提供する。その他の態様において、単離されたポリヌクレオチドは、加えて、配列番号:7の配列と85%、83%、80%、75%、70%未満の配列同一性を有する。

40

#### 【0093】

本発明の核酸は、cDNA、またはゲノムDNAの成分として単離されたもの(たとえば、患者単離体)、ならびにその断片、特に本明細書に開示された方法において有用である断片(たとえば、診断において、MHRV核酸のユニークな識別子などとして)であることもできる。本明細書において使用される「cDNA」という用語は、スプライスバリエーションを含む、天然の成熟mRNA種に見出すことができる配列エレメントの配置を共有する全ての核酸を含む

50

ことを企図する。

【0094】

本発明の核酸組成物は、MHRVポリペプチド、たとえばMHRV GAGポリペプチドの全てもしくは一部をコードすることができ、またはMHRVポリペプチドをコードする領域のフランキング配列であることもできる。二重鎖または単一鎖の断片は、従来法に従ってオリゴヌクレオチドを化学的に合成することによって、限定酵素消化によって、PCR増幅によってなどにより、DNA配列から得ることができる。本発明の単離されたポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド断片は、配列番号：7で示すポリヌクレオチド配列から選択される少なくとも約10、約15、約20、約35、約50、約100、約150～約200、約250～約300、または約350の隣接するntを含む。一般に、断片は、少なくとも15nt、通常は少なくとも18ntまたは25ntであり、少なくとも約50の隣接するntの長さ以上であると考えられる。特定の関心対象の核酸断片は、約304の隣接するntであり、MHRV GAG遺伝子のPCR産物に対応するポリヌクレオチドを含む（たとえば、配列番号：1を参照されたい）。

10

【0095】

本核酸組成物は、MHRV mRNA、または生物学的試料に存在するであろうものから（たとえばヒト細胞抽出物）得られるmRNAなどから作製されるcDNAの検出のための1本鎖もしくは2本鎖のプローブまたはプライマーとして使用することができる。また、本発明のMHRVポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのさらなるコピーを作製するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを作製するために、および3本鎖形成オリゴヌクレオチドとして使用することができる。これらのおよびその他の使用を、以下にさらに詳細に記載する。

20

【0096】

MHRVに特異的な核酸プローブは、本明細書に開示されたポリヌクレオチド配列を使用して作製することができる。プローブは、好ましくは配列番号：7の隣接する配列の少なくとも約12、15、16、18、20、22、24、または25ntの断片、またはMHRV GAGポリペプチドをコードするその他のポリヌクレオチド配列である。核酸プローブは、約200bp、150bp、100bp、75bp、50bp、60bp、40bp、30bp、25bp、2kb、1.5kb、1kb、0.5kb、0.25kb、0.1kb、または0.05kb未満の長さであることができる。プローブは、たとえば、化学合成、PCR増幅、限定酵素を使用するより長いポリヌクレオチドからの作製、または当該技術において周知のその他の方法によって作製することができる。

【0097】

本発明のポリヌクレオチドは、特に診断アッセイ法においてプローブとして使用される場合、検出可能に標識することができる。検出可能標識の例は、放射標識、蛍光色素（たとえば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、Texas Red、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオレセイン（6-FAM）、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）、またはN,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA））、放射性標識（たとえば、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、および<sup>3</sup>H）などを含むが、これらに限定されない。検出可能な標識は、2段階の系（たとえば、ビオチン-アビジン、ハプテン-抗ハプテン抗体など）を含み得る。

30

40

【0098】

また、本発明は、本明細書に記載されたポリヌクレオチドのいずれかを具備するアレイなどの固体基質を含む。ポリヌクレオチドは、当業者に既知の方法を使用してアレイに固定される。アレイは、1つまたは複数の異なるポリヌクレオチドを有していてもよい。

【0099】

MHRVポリペプチド

本発明のポリペプチドは、開示されたMHRVポリヌクレオチド、ならびに遺伝コードの縮重によって開示されたポリヌクレオチドと同一ではないが、同じポリペプチドをコードする核酸によってコードされるものを含む。特に関心対象のものは、配列番号：8に提供されるようなMHRV GAGポリペプチド、およびたとえば配列番号：8の配列を有するが、保存的

50

アミノ酸置換を有するポリペプチドのような、ポリペプチドの変異体である。

【0100】

「MHRVポリペプチド」は、一般にMHRVウイルス粒子、特にMHRVウイルスの特異的な検出のための基礎となり得るポリペプチドから得ることができるポリペプチドを意味する。MHRVに特異的な特定の関心対象のMHRVポリペプチドの例は、MHRV GAGポリペプチド（長さが約112アミノ酸）、たとえば配列番号：8のポリペプチドおよびその断片である。特定の関心対象のMHRVポリペプチドは、MHRV GAGポリペプチドの5'部分のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、たとえば、配列番号：8の隣接するアミノ酸残基1～22のアミノ酸配列の少なくともN末端領域を有するポリペプチド、たとえば、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約2～4個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約2～5個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約4～10個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約8～15個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約12～20個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の22個までの隣接するアミノ酸残基、ならびにこのような領域を含むポリペプチドである。

10

【0101】

一般に、本発明のMHRVポリペプチドは、これらの天然に存在する環境から分離される。ある態様において、本タンパク質は、対照と比較してタンパク質が富んだ組成物に存在する。このように、精製されたポリペプチドが提供され、この場合、「精製された」とは、一般にタンパク質が非特異的に発現したポリペプチドを実質的に含まない組成物に存在することを意味し、ここで、実質的に含まないとは、組成物の90%未満、通常は60%未満、およびより通常には50%未満が、非特異的に発現されたポリペプチドからなることを意味する。

20

【0102】

本発明のMHRVポリペプチドは、天然に存在するMHRVタンパク質の変異体を含み、このような変異体は、相同的または実質的に天然に存在するタンパク質と同じであり、本明細書に記載されたMHRVと同じかまたは異なる種の起源であることもできる（たとえば、詳述したポリペプチドを天然に発現するヒト、ネズミ、またはその他の一部の種、通常は哺乳類種）。一般に、上記パラメータを使用してBLAST2.0によって測定されるものとして、変異体ポリペプチドは、本発明の特異的に発現されたポリペプチドと、少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%、およびより通常には少なくとも約98%の配列同一性を有する配列を有する。変異体ポリペプチドは、天然にまたは非天然にグリコシル化することができる、すなわち、ポリペプチドは、対応する天然に存在するタンパク質において見出されたグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する。または、ポリペプチドは、配列番号：8の隣接する以下の数のいずれかのアミノ酸を含んでいてもよい：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、および22のアミノ酸。

30

【0103】

本発明のMHRVポリペプチドはさらに、MHRVポリペプチドのアミノ酸配列またはその断片を有する断片および融合タンパク質を含む。特定の関心対象のMHRVポリペプチド断片は、MHRVに特異的なものである。特定の関心対象のポリペプチド断片は、MHRV GAGポリペプチドの5'部分のアミノ酸配列を有するポリペプチド、たとえば配列番号：8の隣接するアミノ酸残基1～22のアミノ酸配列の少なくともN末端領域を有するポリペプチド、たとえば配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約1～4個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約2～5個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約4～10個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約8～15個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の少なくとも約12～20個の隣接するアミノ酸残基、配列番号：8のアミノ酸残基1～22由来の22個までの隣接するアミノ酸残基を有するポリペプチドである。

40

50

## 【0104】

突然変異体、断片、および融合物を含むポリペプチドの変異体のような変異体も、本発明の範囲内である。突然変異体は、アミノ酸の置換、付加、または欠失を含むことができる。アミノ酸の置換は、保存的アミノ酸置換またはグリコシル化部位、リン酸化部位、もしくはアセチル化部位の変化、または機能的に必要な1つまたは複数のシステイン残基の置換もしくは欠失によって誤った折り畳みを最小にするためなどの、非必須アミノ酸を除去するための置換を含むことができる。保存的アミノ酸置換は、総電荷、疎水性/親水性、および/または置換したアミノ酸の立体的な大きさを保存するものである。

## 【0105】

また、MHRVポリペプチド断片、特に抗原性に有効なポリペプチド断片、ならびにMHRVポリペプチドに特異的な抗体が結合し得るエピトープを定義する断片は、本発明に包含される。ポリペプチドは、単独またはキャリアタンパク質と組み合わせて、ポリペプチドを特異的に結合する抗体の産生を誘発するために有効である場合、「抗原性に有効な」ポリペプチドである。本明細書において使用される、「エピトープ」という用語は、ポリペプチドの抗原決定基をいう。エピトープは、エピトープに特有な空間コンホメーションの約3つ以上のアミノ酸を含み得る。通常、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸をからなり、より通常には、少なくとも8~10個のこのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間コンホメーションを決定する方法は、当技術分野において既知であり、たとえばX線結晶学および2次元核磁気共鳴分析法を含む。

10

## 【0106】

「ポリペプチド」は、ポリペプチド内に含まれる特異的エピトープの抗体認識により、ポリペプチドが抗体に結合する場合、抗体との「抗原反応性」がある。抗原反応性は、抗体結合によって、より詳細には抗体結合速度によって、および/またはエピトープに対する抗体のそのエピトープを含む既知のポリペプチドを競合物として使用する競合結合によって決定されていてもよい。ポリペプチドが抗体と抗原反応性かどうかを決定するための技術は、当技術分野において既知である。

20

## 【0107】

関心対象のポリペプチド断片は、典型的には、少なくとも約10aa、少なくとも約15aa、通常は、少なくとも約20aa~22aa、または少なくとも約50aaの長さであると考えられ、長さが100aa以上であることもできる。

30

## 【0108】

特定の関心対象のポリペプチド断片は、少なくともMHRV GAGポリペプチドのN末端部分を有するものであり、たとえばポリペプチドは、少なくともMHRV GAGポリペプチドのアミノ酸残基1~22によって定義されるポリペプチドの一部を有する(たとえば、配列番号:8のアミノ酸残基1~22)。以下の実施例においてさらに詳細に議論したとおり、MHRV GAGポリペプチドのこのN末端部分は、その他のレトロウイルスと比較してMHRVに特有であり、したがって、試料におけるMHRVの存在の特異的なマーカーとして役立ち得る。

## 【0109】

抗MHRV抗体

さらにもう一つの態様において、本発明は、MHRVポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供し、このポリペプチドは、MHRVウイルス粒子と結合しているか、またはこれから分離されていてもよい。抗体は、単離された無処理のMHRVウイルス粒子、ウイルスの抗原性部分、単離されたMHRVポリペプチド、または単離されたMHRVポリペプチドの抗原性部分を使用して作製することができる。このような抗体は、本明細書において一般に抗MHRV抗体と称される。

40

## 【0110】

本明細書において使用される、「抗体」という用語は、ポリペプチドまたは少なくとも1つの抗体結合部位を含むポリペプチドの群をいう。「抗体結合部位」または「結合ドメイン」は、抗体分子の可変ドメインの折りたたみによって形成され、抗原のエピトープの特徴に補足的な内部表面空間および電荷分布を有する三次元結合空間を形成して、これが抗

50

原との免疫反応を可能にする。抗体結合部位は、抗原結合に寄与する高頻度可変性のループを形成する重鎖および/または軽鎖ドメイン（それぞれ $V_H$ および $V_L$ ）から形成されていてもよい。「抗体」という用語は、たとえば、脊椎動物抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、変質された抗体、一価抗体、Fabタンパク質、および単一ドメイン抗体を含む。

【0111】

タンパク質の免疫原性の測定およびウイルスまたはタンパク質に対する抗体の作製は、当技術分野において周知の技術である（たとえば、上記HarlowおよびLane、1988を参照されたい）。「免疫原性部分」または「免疫原性に有効な部分」は、動物に注射されたときに、免疫応答を引き起こして、免疫原性部分に結合する抗体を生成するのに十分な大きさおよび/またはコンホメーションのウイルスまたはウイルスのポリペプチドの部分を意味する。

10

【0112】

選択した抗原を特異的に結合する抗体を産生するための方法は、当技術分野において周知である。抗体を産生するための免疫原は、MHRVポリペプチドをアジュバントと混合することによって、および/またはより大きな免疫原性タンパク質との融合タンパク質を作製することによって調製することができる。また、MHRVポリペプチドを、キーホールリンペットヘモシニアンなどの、その他のより大きな免疫原性のタンパク質に共有結合させることもできる。抗体を作製するために、免疫原は、典型的にはウサギ、ヒツジ、およびマウスなどの実験動物に対して、皮内に、皮下に、または筋肉内に投与される。モノクローナル抗体は、脾臓細胞および融合骨髄腫細胞を単離してハイブリドーマを形成することによって作製することができる。

20

【0113】

選択されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製は、当技術分野において既知の標準的な方法を使用してなされる。典型的には、エピトープを形成するために、少なくとも6、8、10、または12個の隣接するアミノ酸を必要とする。隣接しないアミノ酸を含むエピトープは、より長いポリペプチド、たとえば少なくとも15、25、または50個のアミノ酸を必要とすると考えられる。MHRVポリペプチドに特異的に結合する抗体は、一般には、ウエスタンブロットまたはその他の免疫化学的なアッセイ法において使用されるときに、非MHRVタンパク質で提供される検出シグナルよりも、少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルを提供するものである。好ましくは、本発明のポリペプチドを特異的に結合する抗体は、免疫化学的なアッセイ法において検出可能なレベルでその他のタンパク質に結合せず、特定のポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

30

【0114】

上述したとおり、「抗体」は、天然に存在する抗体、単一ドメイン抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、抗原結合特異性を保持する抗体断片、ヒト抗体、ヒト化された抗体などを含む（しかし、必ずしもこれらに限定されない）種々の抗体を包含する。MHRVポリペプチドに、特にMHRV GAGポリペプチドに特異的な天然に存在する抗体は、当技術分野において周知の方法に従って得ることができる。たとえば、ヒト個体群における本発明のポリペプチドに対する血清抗体を、当技術分野において周知の方法によって、たとえばMHRVウイルス粒子、または対応する選択したポリペプチドもしくは融合タンパク質が結合されたカラム上に抗血清を通すことによって精製することができる。次いで、結合した抗体は、たとえば高塩濃度の緩衝液を使用してカラムから溶出させることができる。

40

【0115】

また、本発明は、単一ドメイン抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、および抗原結合特異性を保持する抗体断片を包含する。本明細書において使用される、「単一ドメイン抗体」（dAb）という用語は、指定された抗原と免疫学的に反応する $VH$ ドメインを含む抗体である。dAbは、 $V_L$ ドメインを含まないが、抗体に存在することが知られているその他の抗原結合ドメイン、たとえばカッパドメインおよびラムダドメインを含んでいてもよい。dAbsを調製するための方法は、当業者に既知である。たとえばWardら（1989）を

50

参照されたい。また、抗体は、 $V_H$ および $V_L$ ドメイン、ならびにその他の既知の抗原結合ドメインを含んでいてもよい。これらのタイプの抗体およびこれらを調製するための方法の例は、当技術分野において既知であり（たとえば、米国特許第4,816,467号を参照されたい、これは、参照として本明細書に組み入れられる）、以下を含む。

【0116】

「脊椎動物抗体」は、通常「Y」配位において凝集された軽鎖および重鎖であって、鎖間の共有結合性結合を有してもよく、または有していなくてもよい、四量体またはその凝集体である抗体をいう。脊椎動物抗体において、特定の抗体の全ての鎖のアミノ酸配列は、インサイチュード、またはインビトロで（たとえば、ハイブリドーマにおいて）その抗体を産生するリンパ球によって産生される1つの抗体に見出される鎖と相同である。脊椎動物抗体は、典型的には、天然の抗体、たとえば精製したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。これらの抗体を調製するための方法の例は、以下に記載してある。

10

【0117】

「ハイブリッド抗体」は、重鎖および軽鎖の一方の対は第1の抗体のものと相同であるが、重鎖および軽鎖の他方の対は異なる第2の抗体のものと相同である抗体である。典型的には、これらの2対のそれぞれは、特に、異なる抗原上の異なるエピトープに結合する。この結果、「2価」の性質、すなわち、2つの抗原に同時に結合する能力を生じる。また、このようなハイブリッドは、後述のようにキメラ鎖を使用して形成されていてもよい。

【0118】

「キメラ抗体」は、重鎖および/または軽鎖が融合されたタンパク質である抗体である。典型的には、鎖の不変領域は、1つの特定の種および/または綱に由来し、可変ドメインは、異なる種および/または綱に由来する。また、重鎖もしくは軽鎖のいずれかまたは両方が異なる供与源の抗体の配列を模倣する配列の組み合わせからなるあらゆる抗体が含まれ、これらの供与源は、起源の異なる綱かまたは異なる種であり、融合点は、可変/定常の境界であるか否かのいずれかである。したがって、抗体は、定常領域または可変領域のいずれの既知の抗体配列も模倣せずに産生することができ、したがって、特定の抗原に対してより高い特異的な親和性を有する可変領域を有するか、または補体固定の増強を誘発することができる定常領域を有するか、または特定の定常領域が備えている性質にその他の改良をなされた抗体を提供する。

20

【0119】

また、本発明は、「変質された抗体」を包含し、これは脊椎動物抗体の天然に存在するアミノ酸配列が変化された抗体をいう。組換えDNA技術を利用して、抗体を再設計して所望の特徴を得ることができる。起こりうるバリエーションは、多くの、1つまたは複数のアミノ酸の変化から、領域、たとえば定常領域の完全な再設計の範囲に及ぶ。一般に、所望の細胞プロセスの特徴を達成するための定常領域の変化、たとえば、補体結合、膜との相互作用、およびその他のエフェクター機能における変化である。可変領域における変化は、抗原結合の特徴を変更するためになされていてもよい。また、抗体は、特異的な細胞または組織部位に、分子または物質の特異的なデリバリーを援助するように設計されていてもよい。所望の変化は、分子生物学における既知の技術、たとえば、組換え技術、部位特異的突然変異誘発、およびその他の技術によってなされていてもよい。

30

40

【0120】

さらに抗体の例は、「一価の抗体」含み、これは、第2の重鎖のFc（すなわち、定常）領域に結合した重鎖/軽鎖二量体で構成される凝集物である。この種の抗体は、抗原修飾を逃れる。たとえば、Glennieら（1982）を参照されたい。

【0121】

また、抗体の「Fab」断片も抗体の定義の範囲内に含まれる。「Fab」領域は、重鎖および軽鎖の分岐部分を含む配列とおおよそ同等か、または類似する重鎖および軽鎖の部分指し、これは、特定の抗原に対し免疫学的に結合するが、エフェクターFc部を欠いていることが示されている。「Fab」は、1つの重鎖および1つの軽鎖（一般にFab'として知られている）、ならびに2H鎖および2L鎖を含む四量体の凝集物を含み（F(ab).sub.2ともいう

50

)、指定された抗原または抗原ファミリーと選択的に反応することができる。「Fab」抗体は、上記したもの、すなわち「脊椎動物Fab」、「ハイブリッドFab」、「キメラFab」、および「変質したFab」に類似したサブセットに分けてもよい。抗体の「Fab」断片を調製する方法は、当技術分野において既知であり、たとえば、タンパク質分解、組換え技術による合成を含む。

#### 【0122】

試料中のMHRVを検出するためのアッセイ法

また、本発明は、MHRV配列を含むことが疑われる生物学的試料をスクリーニングする方法を想定する。このようなスクリーニング法は、一般にMHRV核酸の検出、MHRVポリペプチドの検出、または抗MHRV抗体の検出に基づくアッセイ法を含む。

10

#### 【0123】

本明細書に記載されたアッセイ法が、インビトロまたはインビボにおけるアッセイ法として行うこと、または修飾することができることは、本明細書を読むことにより容易に理解できる考えられ、細胞を含まないもの(たとえば、生物学的試料の核酸から単離され、もしくは産生されたポリヌクレオチドを使用するインビトロ結合アッセイ法)または細胞に基づいたもの(たとえば、MHRVに感染したことが疑われる全細胞のスクリーニング)のいずれであってもよい。一般に、全てのアッセイ法は、たとえば背景以上の検出可能レベルでMHRVプローブ標的の検出を提供するために、MHRV特異的なプローブ(たとえば、核酸プローブ、抗体プローブ、ポリペプチドプローブ)をMHRVプローブ標的に特異的に結合させるために十分な条件下、および期間で行われる。アッセイ法は、種々の陽性対象および/または陰性対照を含むことができ、その性質は、本明細書を読むことにより、当業者には容易に理解できると考えられる。

20

#### 【0124】

検出のためのアッセイ法の種々の側面は、以下により詳細に記載してある。

#### 【0125】

検出アッセイ法のための生物学的試料

任意の適切な試料は、MHRVウイルス粒子、MHRVに感染した細胞、MHRV核酸、MHRVポリペプチド、抗MHRV抗体などを含むことが疑われる。スクリーニングのための関心対象の試料の例は、血液、血液派生物、血清、血漿、血小板、哺乳類細胞(関心対象のヒト細胞である、特に哺乳類リンパ球、より詳細には哺乳類マクロファージ)、組織(たとえば、もう1人の被検者に対する移植またはその他の移動の前のもの)、などの生物学的試料を含むが、必ずしもこれらに限定されない。スクリーニングのための関心対象のその他の試料の例は、非生物学的試料、特に医療機器上のまたはそれらから得られる試料を含み、たとえば手術器具は、血液およびその他の組織とこれらが接触するために、ウイルスをうまく死滅または除去せずに再利用した場合、容易にウイルスを伝播し得る。

30

#### 【0126】

当業者であれば容易に認識すると考えられるが、選択される特異的なアッセイ法は、検出される試料および実体の供与源(たとえば、ウイルス粒子、核酸、ポリペプチド、抗体)によって変化すると考えられる。種々のタイプのアッセイ法の例は、以下で提供される。特別な手段または検出機器を必要とせずに、診療所において、または現場において容易に行うことができるアッセイ法は、特に関心対象のものである。

40

#### 【0127】

生物学的試料中のMHRVマーカーの検出は、試料を得た被検者がMHRVにさらされたことを示し、したがって、MHRV感染を有し得る。また、被検者におけるMHRVの検出は、被検者が、MHRVに関連したリンパ増殖性疾患、たとえばリンパ腫などのMHRVに関連した疾患を有するか、または発症の危険性があることを示し得る。

#### 【0128】

MHRVのためのスクリーニングに適していると考えられ、かつMHRVに関連していると考えられるリンパ増殖性疾患の例は以下のものを含むが、必ずしもこれらに限定されない：1) プラズマ細胞障害(たとえば、MGUS、プラズマ細胞腫(骨および延髄外のプラズマ細胞腫

50

を含む)、多発性骨髄腫、およびアミロイドーシス); 2) ホジキン病; 3) 無痛性のリンパ腫/白血病(濾胞中心細胞リンパ腫および濾胞性(濾胞性リンパ腫)を含む)(たとえば、グレードI濾胞性小非正円形細胞; グレードII濾胞性混合; および散在性小非正円形細胞のリンパ腫)、散在性小リンパ性/慢性リンパ性白血病; リンパ球プラズマ細胞腫/ワルデンストーム(Waldenstrom's)、周縁帯リンパ腫(たとえば、MALT(結節外)、単球様B細胞リンパ腫(結節)、および絨毛リンパ球での脾臓リンパ腫)、有毛細胞白血病、および菌状息肉腫/セザリー症候群; 4) 活動的(aggressive)リンパ腫/白血病(散在性大細胞リンパ腫(散在性混合細胞、散在性大細胞、免疫芽細胞を含む)を含む)、パーキットリンパ腫/散在性小正円形細胞リンパ腫、リンパ芽球リンパ腫、CNSリンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫、外套細胞リンパ腫、移植後リンパ球増殖障害、AIDSに関連したリンパ腫(たとえば、真性組織球リンパ腫、原発性浸出液リンパ腫)。リンパ球増殖の分類法は、国立癌研究所によって提供されるREAL分類法のPDQの改変に基づいている。

10

#### 【0129】

被検者におけるMHRVの検出はさらに、被検者がMHRVに関連した疾患、特にMHRVに関連した慢性疾患を有するか、または発症の危険性があることを示し得る。このような疾患の例は、奇形癌腫、多発性硬化症、自己免疫性リウマチ病、および精神分裂症を含み得るが、必ずしもこれらに限定されない。

#### 【0130】

生物学的試料におけるMHRVの検出はさらに、生物学的試料を得た生物学的物質を別の被検者へ移動する目的では、このような移動はレシピエントの感染を生じてしまうため、使用

20

#### 【0131】

本発明に従った核酸およびポリペプチドMHRVマーカーの検出のための方法の例について、以下に記載する。

#### 【0132】

##### MHRV核酸を検出するための方法

特定のMHRV核酸(たとえば、RNAまたはDNA)を検出するための当技術分野において既知のいずれの適切な定性的または定量的な方法を使用することができる。MHRV核酸は、たとえば、組織切片におけるインサイチュハイブリダイゼーションで、ハイブリダイズする核酸間の単一塩基対相違を検出する方法(たとえば、米国特許第5,846,717号に記載されたInvader(登録商標)技術を使用する)を使用して、逆転写酵素PCRによって、またはポリA + mRNAを含むノーザンプロットにおいて、および当技術分野において周知のその他の方法で検出することができる。血液または血液由来の試料におけるMHRVポリヌクレオチドの検出のためには、単一塩基対のミスマッチを検出することができる方法を使用することが好ましい。

30

#### 【0133】

MHRV核酸を、特定の関心対象であるMHRV GAGポリペプチドをコードする核酸と共に、基礎として使用して、組換えポリヌクレオチドからの切除によって、または合成的に、核酸プローブ(たとえば、少なくとも約8ヌクレオチド以上のオリゴマーを含む)を調製することができる。このプローブは、MHRV核酸とハイブリダイズし、したがって、試料中のMHRVウイルスの検出、および感染個体の同定、ならびにウイルスゲノムのさらなる特徴付けにおいて有用である。MHRVポリヌクレオチド(天然のまたは由来するもの)のためのプローブは、ハイブリダイゼーションによって特有のウイルス配列の検出が可能な長さまたは配列を有する。たとえば、約6~8ヌクレオチドが有用であるが、より長い配列、たとえば約10~12ヌクレオチド、または約20ヌクレオチド以上の配列も好ましいと考えられる。好ましくは、これらの配列は、MHRVウイルス単離体間で異種性のない領域に由来する。

40

#### 【0134】

核酸プローブは、自動化オリゴヌクレオチド合成法を含むルーチン方法を使用して調製することができる。たとえば試料に存在する可能性のあるその他のウイルスからMHRVを識別することができるMHRVゲノムの部分(たとえば、HERV-K109などの内在性のレトロウイル

50

スからMHRVウイルスを識別するため)のような、MHRVゲノムの任意の特有な部分の相補物が満足のできるものである。プローブとしての用途のためには完全な相補性が望ましいが、断片の長さが増加するにつれてそれは不要である。

#### 【0135】

診断としてこのようなプローブを使用するためには、必要に応じて血液または血清などの解析される生物学的試料を処理し、これに含まれる核酸を抽出してもよい。試料から生じる核酸は、ゲル電気泳動またはその他のサイズ分離技術に供されていてもよく；または、核酸試料は、サイズ分離をせずにドットプロットされてもよい。プローブは、通常、検出可能な標識で標識する。プローブを標識するための適切な標識および方法は当技術分野において既知であり、たとえばニクトランレーションまたはキナーゼ処理(kinasing) 10  
することによって組み入れられる放射性標識、ビオチン、蛍光プローブ、および化学発光プローブを含む。次いで、適切なストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下において、試料から抽出した核酸を標識されたプローブで処理する。

#### 【0136】

プローブは、MHRVゲノムまたはその一部分に(たとえば、MHRV GAGポリペプチドをコードする全てまたは一部の配列に)完全に相補的に作製することができる。したがって、偽陽性を予防または少なくとも最小にするために、通常、高ストリンジェンシーの条件が望ましい。しかし、高ストリンジェンシーの条件は、プローブがMHRVウイルス単離体間で異種性がないウイルスゲノムの領域に相補的な場合にのみ使用するべきである。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーションの間、および洗浄手順の間の温度、イオン強度、時間の長さ、およびホルムアミドの濃度を含む多くの因子によって決定される。これらの因子は、たとえば、Sambrookら、(1989), 「Molecular Cloning; A Laboratory Manual」, Second Edition (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に概説されている。 20

#### 【0137】

通常、MHRV配列は感染個体から得られた生物学的試料(たとえば、血液、細胞、および同様のもの)に比較的低いレベルで、たとえば $10^6$ 細胞につき約 $10^2 \sim 10^4$  MHRV配列で存在するであろうことが予想される。このレベルは、ハイブリダイゼーションアッセイ法において使用される増幅技術を必要としうる。このような技術は、当技術分野において既知である。 30

#### 【0138】

たとえば、Enzo Biochemical Corporationの「Bio-Bridge」系では、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを使用して、修飾されていない3'-ポリ-dT尾部をDNAプローブに付加する。ポリdT-尾部を付加されたプローブを標的ヌクレオチド配列に、次いでビオチン修飾されたポリAにハイブリダイズさせる。PCT国際公開公報第84/03520号および欧州特許出願第124221号では、DNAハイブリダイゼーションアッセイ法が記載されており、そこでは：(1)検体は、酵素標識したオリゴヌクレオチドに相補的な一本鎖DNAプローブにアニールされ；および(2)生じる尾部の付加された二体鎖は、酵素標識したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。欧州特許出願第204510号では、DNAハイブリダイゼーションアッセイ法が記載されており、そこでは検体DNAはポリ-dT尾部などの尾部、ポリA配列などのプローブの尾部にハイブリダイズする配列を有する増幅因子鎖を有し、複数の標識された鎖に結合することができるプローブと接触される。 40

#### 【0139】

MHRV配列を検出するために、非PCRに基づいた配列特異的なDNA増幅技術を本発明に使用することもできる。このような技術の例は、Invaderアッセイ法を含むが、必ずしもこれらに限定されず、たとえばKwiatkowskiら、Mol Diagn. 1999 Dec; 4 (4) : 353-64.を参照されたい。また、米国特許第5,846,717号を参照されたい。

#### 【0140】

特に望ましい技術は、最初に血清中の標的MHRV配列の約10,000倍、たとえば約10配列/mLに増幅することを含んでもよい。これは、たとえばSaikiら、(1986)によって、Mullis 50

、米国特許第4,683,195号によって、およびMullisら米国特許第4,683,202号によって記載されたポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)技術によって達成されうる。その他の増幅方法は、当技術分野において周知である。

#### 【0141】

プローブ、あるいは試料からの核酸は、このようなアッセイ法のための溶液中に提供されていてもよく、または支持体(たとえば、固体もしくは半固体支持体)に付着されていてもよい。使用することができる支持体の例は、ニトロセルロース(たとえば、膜またはマイクロタイターウェル形態において)、ポリ塩化ビニル(たとえば、シートまたはマイクロタイターウェルにおいて)、ポリスチレンラテックス(たとえば、ビーズまたはマイクロタイタープレートにおいて)、ポリフッ化ビニリデン、ジアゾ化された紙、ナイロン膜、活性ビーズ、およびProteinAビーズである。

10

#### 【0142】

一つの態様において、プローブ(または試料核酸)は、検出のためのアレイ上に提供される。アレイは、たとえば、二次元のマトリックスまたはアレイにおいて基質(たとえば、ガラス、ニトロセルロースなど)上へポリヌクレオチドプローブをスポットティングすることによって作製することができる。プローブは、共有結合によって、または疎水的相互作用などの非特異的相互作用によって、のいずれかで基質に結合することができる。ポリヌクレオチド試料は、検出可能に標識し(たとえば、放射性または蛍光性の標識を使用して)、次いで、プローブにハイブリダイズさせることができる。二重鎖ポリヌクレオチドは、プローブポリヌクレオチドに結合された標識試料ポリヌクレオチドを含み、一旦試料の未結合部分を洗い流して検出することができる。アレイを構築するための技術およびこれらのアレイを使用する方法は、欧州特許第799897号;国際公開公報第97/29212号;国際公開公報第97/27317号;欧州特許第785280号;国際公開公報第97/02357号;米国特許第5,593,839号;米国特許第5,578,832号;欧州特許第728520号;米国特許第5,599,695号;欧州特許第721016号;米国特許第5,556,752号;国際公開公報第95/22058号;および米国特許第5,631,734号に記載されている。アレイは、たとえば単一の試料で2つ以上の核酸標的領域の存在を解析する場合に、それぞれの標的領域に対するプローブ、ならびに対照(陽性および陰性の両方)を単一のアレイにおいて提供することができるので、特に有用である。したがって、アレイにより、迅速かつ便利な解析が容易になる。

20

#### 【0143】

##### MHRVポリペプチドを検出する方法

一つの態様において、本発明は、試料におけるMHRVポリペプチドの検出を行い、これが試料におけるMHRV粒子の存在を示し得ることによって、試料におけるMHRVを検出するための方法の特徴とする。試料は、生物学的試料、またはたとえば医療機器から得た試料であることもできる。生物学的試料は、特定の関心対象のものである。配列番号:8によって例示されるようなMHRV GAGポリペプチドの検出は、特に関心対象のものである。MHRVのポリペプチドに基づく検出は、受容体(リガンド-結合受容体断片を含む)または標的MHRVポリペプチドに特異的に結合する抗体(たとえば、抗MHRV GAGポリペプチド抗体)(抗原-結合抗体断片を含む)を使用して達成することができる。

30

#### 【0144】

MHRVのポリペプチドに基づいた検出は、様々な生物学的試料、たとえば血液または血液派生物(たとえば、血清、血漿など)、細胞、組織などを使用して達成することができる。抗MHRV抗体は、感染した宿主細胞の表面、MHRVウイルス粒子の表面、または(たとえば、ウイルス粒子もしくは感染した宿主細胞の溶解によって試料中に存在するような、宿主細胞またはウイルス粒子のいずれとも結合していない)遊離型のポリペプチドとしてのMHRVポリペプチドを検出するように作製することができる。

40

#### 【0145】

一つの態様において、本発明は、生物学的試料、たとえば細胞または体液試料におけるMHRVポリペプチド(ウイルス粒子に存在するMHRVポリペプチドを含む)の存在を決定するための免疫アッセイ法であって、抗体(通常、モノクローナル抗体であるが、必ずしもこれ

50

に限定されない)と試料を接触させる工程;試料における抗体とMHRVウイルス粒子および/またはMHRVポリペプチドとの間の免疫複合体の形成を可能にする時間および条件下で、試料および抗体を反応させる工程;および免疫複合体を検出することによる免疫アッセイ法を特徴とする。免疫複合体の存在は、試料におけるMHRVポリペプチドの存在を示す。

**【0146】**

免疫アッセイ法の設計は、多くのバリエーションを受けやすく、多くの形式が当業者に既知である。免疫アッセイ法は、MHRVに由来する少なくとも1つのウイルスのエピトープを利用する。一つの態様において、免疫アッセイ法は、MHRVに由来するウイルスのエピトープの組み合わせを使用する。これらのエピトープは、同じウイルスのポリペプチドから、または異なるウイルスのポリペプチドから由来してもよく、組換えまたは天然のポリペプチドを別々に、または同じ組換えポリペプチド中に一緒であってもよい。免疫アッセイ法は、たとえばウイルスのエピトープに向けられたモノクローナル抗体、1つのウイルス抗原のエピトープに向けられたモノクローナル抗体の組み合わせ、異なるウイルスの抗原のエピトープに向けられたモノクローナル抗体、同じウイルスの抗原に向けられたポリクローナル抗体、または異なるウイルスの抗原に向けられたポリクローナル抗体を使用してもよい。

10

**【0147】**

プロトコルは、たとえば競合、または直接反応、またはサンドイッチ型アッセイ法に基づいてもよい。また、プロトコルは、たとえば固体支持体を使用してもよく、または免疫沈降によるものであってもよい。大部分のアッセイ法は、標識された抗体またはポリペプチドの使用を含み;標識は、たとえば、酵素、蛍光性、化学発光、放射性、または染色分子であってもよい。プローブからのシグナルを増幅するアッセイ法も、既知であり、これらの例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ法、ならびにELISAアッセイ法などの酵素結合および媒介免疫アッセイ法である。

20

**【0148】**

免疫アッセイは、異種または同種の形式であってもよく、標準的もしくは競争的タイプであっても良いが、これに限定されない。異種性の形式では、インキュベーション後におけるMHRVポリペプチドからの試料の分離を容易にするために、典型的には抗MHRV抗体を固体支持体に結合させる。これを含む固体支持体は、典型的には、結合した抗体の検出前に、抗体-抗原複合体形成を可能にするために十分な時間(たとえば、約10分)の反応後に洗

30

**【0149】**

同種の形式では、溶液中で抗MHRV抗体と試験試料をインキュベートする。たとえば、形成されたあらゆる抗原-抗体複合体を沈殿させると考えられる条件下でなされる。これらのアッセイ法のための標準的および競争的な形式は、当技術分野において既知である。

**【0150】**

標準的な形式では、MHRVポリペプチド抗体複合体のレベルを直接モニターする。これは、たとえば抗MHRV抗体のエピトープを認識する、標識された抗異種性固体(たとえば、抗ヒト)抗体が複合体形成によって結合するかどうかを決定することによって達成されてもよい。競合的形式において、試料中のMHRVポリペプチドの量は、複合体中の標識されたMHRVポリペプチド(またはその他の競合するリガンド)の既知の量の結合に対する競争的効果をモニターすることによって推測される。結合または複合体形成の量は、定性的にまたは定量的に決定することができる。

40

**【0151】**

MHRVポリペプチドおよび抗MHRV抗体を含む形成された複合体は、形式に依存して、既知の多くの技術のいずれかによって検出される。たとえば、複合体中の標識のないMHRV抗体は、標識(たとえば、酵素標識)と複合体を形成した抗異種性固体Igの複合物を使用して検出されてもよい。

**【0152】**

MHRVポリペプチドを検出するための免疫アッセイ法における抗体は、支持体(たとえば、

50

固体または半固体)上で提供されていてもよく;または、試料中のポリペプチドを支持体上に固定することもできる。使用することができる支持体の例は、ニトロセルロース(たとえば、膜またはマイクロタイターウェル形態において)、ポリ塩化ビニル(たとえば、シートまたはマイクロタイターウェルにおいて)、ポリスチレンラテックス(たとえば、ビーズまたはマイクロタイタープレートにおいて)、ポリフッ化ビニリデン、ジアゾ化された紙、ナイロン膜、活性ビーズ、およびProteinAビーズである。ビーズに基づく支持体は、一般にアッセイ法における抗体の固定化に有用である。

#### 【0153】

一つの態様において、生物学的試料は、細胞(たとえば、総細胞)を含み、検出は、試料を、標識された抗体と反応させることによって、従来法に従って行われる。一般に、本発明のMHRVポリペプチドに特異的に結合する抗体を試料に添加して、エピトープに結合させるために十分な期間(通常、少なくとも約10分)インキュベートする。抗体は、直接検出のために検出可能に標識することができ(たとえば、放射性同位元素、酵素、蛍光剤、化学発光などを使用して)、または2段階抗体もしくは結合を検出するための試薬と組み合わせ(たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合アビジンとビオチン、蛍光性化合物、たとえばフルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドなどに結合した二次抗体)使用することができる。抗体結合の不存在または存在は、解離細胞のフローサイトメトリー、顕微鏡観察、放射線写真法、およびシンチレーション計数を含む種々の方法によって決定することができるが、これらに限定されない。特異に発現されたポリペプチドのレベルまたは量の定性的もしくは定量的検出は、任意の適切な代替方法、たとえばELISA法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、放射線免疫アッセイ法などを使用することもできる。

10

20

#### 【0154】

このアッセイ法のもう一つの態様において、免疫複合体は、抗MHRV抗体を、試料および抗体が特異的に結合することが既知である競合抗原、たとえば検出可能に標識されたMHRV抗原、または単離されたウイルスタンパク質などの固定された競合抗原と反応させることによる競合的免疫アッセイ法によって検出することができる。競合抗原は、標識または固定することができる。

#### 【0155】

または、免疫アッセイ法は、たとえばMHRVウイルス粒子または1次モノクローナル抗体のいずれかにも結合し、2つの抗体のうちの1つは固定されており、他方は標準的な技術を使用して標識されている、モノクローナル抗体などの二次抗体を使用するサンドイッチ免疫アッセイ法である。サンドイッチ免疫アッセイ法の手順において、MHRVウイルス粒子を結合する抗体は、不溶解性の物質に付着された捕獲抗体であることができ、および第2のMHRVウイルス粒子を結合する抗体は、検出器または標識抗体であり得る。

30

#### 【0156】

##### 抗MHRV抗体を検出する方法

もう一つの側面において、宿主におけるMHRVの存在は、抗MHRV抗体について、宿主由来の適切な生物学的試料をアッセイすることによって検出可能であってもよい。特に関心が持たれるのは、抗MHRV GAGポリペプチド抗体の検出の場合である。生物学的試料における抗MHRV抗体の検出のための種々の方法は、当技術分野において周知である。

40

#### 【0157】

抗MHRV抗体は、たとえば、MHRV感染を有するかまたは疑われ(たとえば、MHRV関連リンパ腫を有することが疑われる)、この生物学的試料がMHRVに特異的に結合する抗体を含むことが疑われる患者からの生物学的試料を得ることによって検出することができる。患者の生物学的試料を、単離されたMHRV粒子と、またはMHRV GAGポリペプチドもしくはその抗原性の断片と接触させる。抗体-ウイルス粒子または抗体-ポリペプチド複合体の形成を標準的な技術によってモニターする(たとえば、Harlow および Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照されたい)。

#### 【0158】

50

典型的には、抗MHRV抗体に対する免疫アッセイ法は、生物学的試料などの、抗体を含むことが疑われる試験試料を選択して調製し、次いでこれを抗原-抗体複合体の形成を可能にする条件下で、抗原性の（たとえば、エピトープ含有）MHRVポリペプチドとインキュベートし、このような複合体の形成を検出する工程を含む。適切なインキュベーション条件は、当技術分野において周知である。

【0159】

非MHRV粒子または非MHRVポリペプチドと交差反応する試験試料中の抗体は、望ましい場合は、標準的な対照スクリーニング工程を使用して試験試料から減少させることができる。抗MHRV抗体を検出する方法における変更は、MHRVウイルス粒子および/またはMHRVポリペプチドの検出のために上記したものと同様の、ならびに本明細書を読むことにより当業者には直ちに分かると思われるその他の変更である。

10

【0160】

抗MHRVポリペプチド抗体の検出のための免疫アッセイ法は、支持体（たとえば、固体または半固体）上のMHRVポリペプチドを使用して行うことができ；または、試料中の抗体は、MHRVポリペプチドと接触させるための支持体に固定することもできる。使用することができる支持体の例は、ニトロセルロース（たとえば、膜またはマイクロタイターウェル形態において）、ポリ塩化ビニル（たとえば、シートまたはマイクロタイターウェルにおいて）、ポリスチレンラテックス（たとえば、ビーズまたはマイクロタイタープレートにおいて）、ポリフッ化ビニリデン、ジアゾ化された紙、ナイロン膜、活性ビーズ、およびProt einAビーズである。ビーズに基づく支持体は、本発明のこの態様におけるMHRVポリペプチドの固定化にさらに有用である。

20

【0161】

例示的な態様において、試料中の抗MHRV抗体のスクリーニングは、単離されたMHRVポリペプチドと生物学的試料を接触させることによって達成される。試料中の抗体とMHRVタンパク質との間の相互作用は、標準的な技術によってモニターされる（たとえば、上記Harlow および Lane, 1988を参照されたい）。抗体-MHRVポリペプチド複合体の検出は、試料が抗MHRV抗体を含むこと、および患者がMHRVに対する液性の反応を生じたことを示し、その結果として患者がMHRVに感染しているか、または少なくともMHRVにさらされたことを示す。

30

【0162】

薬学的組成物

本発明は、MHRVポリペプチドまたはMHRVポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つを含む薬学的組成物をさらに想定し、これは薬学的に許容される賦形剤中に提供される。種々の薬学的に許容される賦形剤は、当技術分野において周知である。本明細書において使用される、「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、組成物の活性成分と組み合わせた場合に、成分の生物学的活性度を保持することができ、被験者の免疫系と分裂的な反応を引き起こさないあらゆる物質を含む。

【0163】

例示的な薬学的キャリアは、非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンの無菌溶液を含む。例として、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、および様々なタイプの湿潤剤などの、標準的な薬学的賦形剤を含むが、これらに限定されない。非水系溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性のキャリアは、水、アルコール性/水性の溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含み、塩類および緩衝化された媒体を含む。非経口的な媒体は、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル油または不揮発性油を含む。経静脈媒体は、液体および栄養素補液、電解質補充薬（リンゲルのデキストロースに基づくものなど）などを含む。また、MHRVポリペプチドまたはMHVEポリヌクレオチドの組成物は、本発明に従ってその後の再構成および使用のために、当技術分野において周知の手段を使用して凍結乾燥されていてもよい。また、リポソームによるデリバリーのための製

40

50

剤、およびマイクロカプセル化されたMHRVポリペプチドまたはMHRVポリヌクレオチドを含む製剤も重要である。このような賦形剤を含む組成物は、周知の従来の方法によって処方される（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Chapter 43, 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton PA 18042, USAを参照されたい）。

#### 【0164】

一般に、薬学的組成物は、顆粒、タブレット、ピル、坐薬、カプセル（たとえば、経口デリバリーのために適合されたもの）、マイクロビーズ、マイクロスフィア、リポソーム、懸濁液、軟膏、ローションその他同種のものなどの種々の形態で調製することができる。薬学的等級の有機もしくは無機のキャリアおよび/または経口および局所の使用のために適した希釈液は、治療的に活性な化合物を含む組成物を作製するために使用することができる。当技術分野において既知の希釈液は、水性媒体、野菜および動物の油脂、安定化剤、湿潤剤、および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩、または適切なpH値を固定するための緩衝液を含む。

10

#### 【0165】

##### キット

MHRVポリヌクレオチド、MHRVウイルス粒子、MHRVポリペプチド、および/または抗MHRV抗体に特異的な試薬は、生物学的試料中のMHRVポリヌクレオチド、またはMHRVの発現産物の有無を検出するためのキットに供給することができる。このような試薬は、たとえば、試料中のMHRV核酸の検出のためのヌクレオチドプローブまたはプライマー、MHRVウイルス粒子および/またはポリペプチドの検出のための抗MHRV抗体、ならびに抗MHRV抗体の検出のためのMHRVポリペプチドを含み得る。試薬は、標識されたバイアルに提供することができる。また、キットは、緩衝液または標識成分、ならびに生物学的試料における標的核酸、ポリペプチド、または抗体を（定性的にまたは定量的に）検出するための試薬を使用するための説明書を含むこともできる。キットは、適切な陽性対照、陰性対照、または両方をさらに含むこともできる。

20

#### 【0166】

たとえば、核酸プローブは、診断キットにパックすることができる。診断キットは、1つまたは複数のポリヌクレオチドプローブ（たとえば、DNAまたはRNA）を含むことができ（これは標識されていてもよい）；または、ポリヌクレオチドプローブは、標識されていなくてもよく、標識するための成分は、キットにおいて別々の容器内に含まれていてもよい。また、キットは、特定のハイブリダイゼーションプロトコル、たとえば、標準的なものに必要その他の適切にパックされた試薬および物質、ならびに試験を行うための説明書を含んでいてもよい。

30

#### 【0167】

免疫診断に適したキットおよび含有する適切な標識された試薬は、適切な容器にMHRVエピトープを含む本発明のポリペプチドまたはMHRVエピトープに対する抗体を含む適切な材料を、アッセイ法を行うために必要な残りの試薬および物質とともに、ならびにアッセイ法説明書の適切なセットとともに、パッケージングすることによって作製される。キットを使用するアッセイ法は、インビトロおよび無細胞で行われてもよく（たとえば、インビトロ結合実験）、または細胞に基づいたものであってもよい。

40

#### 【0168】

##### MHRV複製のための細胞培養系および動物モデル系

MHRVは、ヒト内在性レトロウイルスに対する類似性を有するという所見により、MHRVを伝播するための方法についての情報がもたらされる。MHRVは、以下で詳細を記載したように、配列解析に基づいてHERVと類似していると考えられる。通常、MHRVを培養するための適切な細胞または細胞系は、特定の関心対象であるマクロファージと同系統の細胞および細胞株と共に、レトロウイルスの複製を助けることが知られているものを含んでいてもよい。MHRV増殖のために有用な細胞または細胞株は、ヒト細胞および細胞株、ならびに非ヒト細胞および細胞株を含み得る（たとえば、ブタ、ラットなど）。この点に関して有用な細胞の例は、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、ミクログリア細胞などのマクロファージ誘導

50

細胞群、ならびにこれらの初代細胞群のいずれかに由来する細胞株を含むが、必ずしもこれらに限定されない。また、腫瘍株様のマクロファージ（たとえば、THP-1細胞）MHRVの培養に有用であろう。

#### 【0169】

また、MHRVは、培養をMHRVで感染させることができるマクロファージの初代培養において増殖してもよい。または、マクロファージ培養は、感染した個体に由来することもできる。後者の場合は、インビボで感染して、インビトロで継代される細胞の例である。さらに、マクロファージ培養に由来する細胞株を得るために、種々の不活化方法を使用することができる。たとえば、初代マクロファージ培養（所望の個体群の栄養強化の前後で）は、安定性を維持するために、様々な細胞に融合させてもよい。または、培養は、永久的もしくは半永久的な細胞株を作製するために、形質転換ウイルスで感染してもよく、または形質転換遺伝子をトランスフェクトしてもよい。MHRVは、リンパ腫の発生と関連しているため、MHRVは、単独で細胞を形質転換させて、培養における安定細胞系を産生する可能性があることに留意されたい。

10

#### 【0170】

上述したように、MHRVはレトロウイルスである。したがって、細胞系のMHRV感染が、その他のレトロウイルスで細胞を感染させるための分野において既知の技術によって達成される可能性がありうる。これらは、たとえばウイルスが細胞に侵入することを可能にする条件下で、ウイルスの調製物と細胞をインキュベートすることを含む。さらに、単離されたウイルスのポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクションさせることにより、ウイルスの産生を得てもよい。ウイルスのゲノム核酸、またはこのようなウイルスのゲノム核酸に由来するcDNAを培養細胞にトランスフェクションさせるための方法は、当技術分野において既知であり、たとえば、エレクトロポレーション、およびDEAEデキストランまたはリン酸カルシウムでの沈降を使用する技術を含む。MHRV RNAの豊富な供与源は、完全なゲノムに対応するMHRV cDNAのインビトロ転写を行うことによって得ることができる。この材料での、またはクローニングされたMHRV cDNAのトランスフェクションは、ウイルスにおけるウイルス複製およびインビトロにおける増殖を生じるはずである。

20

#### 【0171】

培養細胞に加えて、動物モデル系をウイルスの複製のために使用してもよく、動物系におけるレトロウイルスは、当業者に既知である。scidマウスは、動物モデルの例である。さらにモデルの例には、霊長類（たとえば、サル、チンパンジー、オランウータン、その他同種のもの）を含むが、必ずしもこれらに限定されない。

30

#### 【0172】

##### 抗MHRV薬剤の同定

本発明はさらに、MHRVのための抗ウイルス剤を同定する方法を指向する。MHRV抗ウイルス因子の例は、ウイルスを不活性化するもの（たとえば、使用前に機器または生物学的材料（たとえば、血液）を処理することによる）、宿主細胞へのMHRV侵入機構を阻害するもの、MHRV複製を阻害するもの、または他のMHRV病原を混乱もしくは干渉するものを含む。関心対象である細胞が死亡に至るまでおよびの死亡を含む感染細胞の増殖の阻害を容易にする薬剤と共に、ウイルスの複製を阻害する一方感染細胞の成長および増殖を可能にする薬剤は特に関心対象のものである。MHRVはリンパ腫と関連しているため、これらがMHRVに与える影響によって抗癌剤として作用する薬剤は、また重要である。

40

#### 【0173】

本明細書において使用される「薬剤」という用語は、任意の分子、たとえば、抗MHRV活性のスクリーニングに順応するタンパク質または医薬品（たとえば、複製、感染、またはMHRV感染および伝播のその他の側面を阻害する活性）を表す。通常、アッセイ混合液の多くは、種々の濃度に特異な反応を検出するために異なる薬剤濃度で並列に行われる。典型的には、これらの濃度のうちの1つは陰性対照として働き、すなわちゼロ濃度または検出レベル以下である。

#### 【0174】

50

候補薬剤は、典型的にはこれらが有機の分子であるにもかかわらず、多くの化学的分類を包含し、一般に50より大きく約2,500ダルトン未満の分子量を有する小さな有機化合物である。候補薬剤は、タンパク質との構造上の相互作用、特に水素結合のために必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基、好ましくは官能基のうちの少なくとも2つを含む。候補薬剤は、上記の官能基の一つまたは複数で置換された環状の炭素構造もしくは複素環式構造および/または芳香族もしくはポリ芳香族構造を含むことが多い。また、候補薬剤は、以下のものを含む生体分子中に見出されるが、これらに限定されない：ペプチド、サッカライド、脂肪酸、ステロイド、フェロモン、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、またはこれらの組み合わせ。

10

**【0175】**

候補薬剤は、合成または天然の化合物のライブラリーを含む多種多様な供与源から得られる。たとえば、多くの手段は、ランダム化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、多種多様な有機化合物および生体分子のランダム合成および定方向合成に利用できる。または、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の形態の天然の化合物のライブラリーも、利用でき、または容易に産生される。その上、天然のまたは合成的に作製されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段を介して容易に修飾され、コンビナトリアル・ライブラリーを作製するために使用してもよい。既知の薬理的薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミジン化、構造類似体を産生するその他のものなどの、定方向またはランダムな化学修飾に供されてもよい。

20

**【0176】**

本発明に有用な種々のスクリーニング法は、当業者には既知である。通常、抗ウイルス剤は、ウイルスの複製を補助する細胞培養系において、ウイルスの複製の阻止に対するこれらの効果について様々な濃度で試験され、次いで動物モデル系において、感染性またはウイルスの病原性の阻害（および低レベルでの毒性）について、試験される。方法の例には、ウイルスのID<sub>50</sub>によるか、または細胞プラーク形成の誘導に対するウイルスの能力による薬剤の効果を決定するためのアッセイ法を含むが、必ずしもこれらに限定されない。

**【0177】**

本明細書において提供されるMHRVポリペプチドおよびMHRVポリヌクレオチドを検出するための方法および組成物は、これらが細胞プラークアッセイ法またはID<sub>50</sub>アッセイ法以外の別の感受性のあるウイルス複製に対する薬剤の効果を検出するための手段を提供するという点で、抗ウイルス剤のスクリーニングのために有用である。

30

**【0178】**

たとえば、本明細書に記載されたMHRV-ポリヌクレオチドプローブは、細胞培養において産生されるウイルス核酸の量を定量するために使用してもよい。これは、たとえば、標識されたMHRVポリヌクレオチドプローブと感染細胞の核酸のハイブリダイゼーションまたは競合ハイブリダイゼーションによって達成することができる。たとえば、また、抗MHRV抗体は、本明細書に記載された免疫アッセイ法を利用して、細胞培養におけるMHRV抗原の同定および定量のために使用してもよい。さらに、競合アッセイ法によって感染細胞培養中のMHRV抗原を定量することが望ましたので、本明細書に記載されたMHRV cDNA内にコードされるポリペプチドは、これらの競合アッセイ法において有用である。通常、MHRV cDNAに由来する組換えMHRVポリペプチドは標識されていると考えられ、MHRVポリペプチドに対するこの標識されたポリペプチドの結合の阻害は、細胞培養系において産生される抗原によりモニターされると考えられる。さらに、これらの技術は、MHRVが細胞死を引き起こさずに細胞株において複製することができると考えられる場合に、特に有用である。

40

**【0179】**

これらの方法による有効性について試験されると考えられる抗ウイルス剤は、当技術分野において既知であり、たとえば、ウイルスの結合および/または複製に必要なピリオン成分および/または細胞成分と相互作用するものを含む。典型的な抗ウイルス剤は、たとえば、ピリオンポリメラーゼ阻害剤および/または前駆体ポリペプチドの切断に必要なプロ

50

テアーゼを含んでいてもよい。その他の抗ウイルス剤は、核酸と作用してウイルスの複製を阻止するもの、たとえばアンチセンスポリヌクレオチドなどを含んでいてもよい。

【0180】

アンチセンスのポリヌクレオチド分子は、これらがゲノムまたはRNAの指定された領域に特異的にハイブリダイズすることができる相補的なヌクレオチド配列から構成され、本発明のアッセイ法をスクリーニングを介して同定することができる関心対象の抗MHRVウイルス剤の例である。アンチセンスポリヌクレオチドは、たとえば結合することによってmRNAにタンパク質翻訳を遮断すると考えられる分子を含んでいてもよく、またはトランスクリプターゼによってウイルスRNAの複製を阻止する分子であってもよい。これらはまた、たとえばウイルスRNAの切断を引き起こすことにより、ウイルスのRNAを不活性にする薬剤を保有する（非共有結合による付着または共有結合）分子を含んでいてもよい。また、これらはウイルスの感染性、複製能力、または慢性を増強し、および/または必要とされる細胞のポリヌクレオチドに結合してもよい。MHRV誘導されたRNAにハイブリダイズするであろうアンチセンス分子は、本明細書に提供されるMHRV cDNAの配列情報に基づいて設計されていてもよい。MHRVのアンチセンスポリヌクレオチドに基づく抗ウイルス剤は、高い特異性で結合するように、溶解性が増大するように、安定するように、および低い毒性を有するように設計されてもよい。それゆえに、これらは特定化した系、たとえばリポソームにおいて、または遺伝子治療によって送達されていてもよい。さらにこれらは、類似体、付着したタンパク質、塩基間の結合が置換または変化されたものなどを含んでいてもよい。

10

20

【0181】

抗MHRV活性を有するその他のタイプの薬剤は、MHRVゲノムの重要な制御領域を「模倣」するポリヌクレオチドに基づいてもよく、これはウイルスの感染性または複製の原因となる系の鍵となる成分とこれらが相互作用することにより、治療的でありうる。

【0182】

MHRV薬剤の使用

本明細書に記載されたとおりに同定された抗MHRV薬剤、またはその他の抗MHRV薬剤は、被験者におけるMHRV感染を治療するために使用することができ、この場合「被験者」には、特定の関心対象の哺乳類、特にヒトでのMHRV感染に感受性の全ての宿主を包含する。MHRVは、逆転写酵素およびプロテアーゼ酵素を保有するため、これらの双方ともが抗HIV治療のための成功した標的であり、同様の方法で作用する薬剤は、MHRV感染の治療における特定の使用が見出され得る。さらに、MHRVに関連した外套細胞リンパ腫を有する患者から単離した血液マクロファージは異常であり（増殖と一致してPCNAを発現する）、インビトロにおいてポリアミン類似体によって死滅される。

30

【0183】

「ポリアミン」は、一般に生合成によりアミノ酸に由来する一群の脂肪族直鎖アミン化合物のいずれかをいう。ポリアミンはMartonら、(1995) Ann. Rev. Pharm. Toxicol. 35: 55-91において概説されている。ポリアミンは、たとえば天然に存在するポリアミンまたは真核細胞において天然に産生される天然のポリアミンであることができる。ポリアミンの例は、プトレッシン、スペルミジン、スペルミン、およびカダベリンを含む。「ポリアミン類似体」は、一般にスペルミンおよび/またはスペルミジン、ならびにこれらの前駆体のジアミンプトレッシンなどの天然に存在するポリアミンと構造的に同様であるが、同一ではない有機カチオンをいう。ポリアミン類似体は、分岐もしくは非分岐、または組み込まれた環状部分であることもできる。ポリアミン類似体の例としては、 $N^1, N^{14}$ -ジエチルホモ-スペルミン (DEHSPM) および  $N^1, N^{12}$ -ジエチルスペルミン (DESPM) が挙げられるが、これに限定されない。たとえば、一級アミノ基を含むポリアミンを開示する国際公開公報第98/17624号および米国特許第5,541,230号、米国特許第5,037,846号、および第5,242,947号を参照されたい。ポリアミン類似体であって、ポリアミン類似体の全ての窒素原子が独立して二級、三級、または四級アミノ基であるものが特に好ましい。

40

【0184】

50

MHRVの治療において使用に適したポリアミン類似体、ならびに製剤、組成物、およびデリバリーの方法の考察については、たとえばPCT国際公開広報第99/21542号を参照されたい。いずれの適切なポリアミン類似体、またはその立体異性体、塩もしくは被保護誘導体（またはポリアミン類似体の有効な量を含む組成物、またはその立体異性体、塩もしくは被保護誘導体）も、一般に製造業者の/供給者の説明書に従って投与してもよい。通常、ポリアミン類似体は、皮下または静脈の注射によって投与される。また、これらは、経口的に投与されていてもよい。

**【0185】**

投与されるポリアミン類似体（またはその立体異性体、塩もしくは被保護誘導体）の量は、使用される特定の類似体（または立体異性体、塩もしくは保護薬誘導体）、投与の時間経過、固体の症状、所望の目的、疾患の程度、どの程度の用量が投与されるか、およびその他の物質が投与されているどうかなどのいくつかの変数に依存すると考えられる。通常、使用される量は、製造業者によって推奨されるもの、および/または経験的な研究に基づいたものであると考えられる。ポリアミン類似体（またはその立体異性体、塩、もしくは被保護誘導体）の場合、量は、一般に約1~約300mg/m<sup>2</sup>/日、可能ならば約15~約150mg/m<sup>2</sup>/日であると考えられる。投与は、一般に間欠性であり、類似体（またはその立体異性体、塩、もしくは被保護誘導体）が、少なくとも1~2日の期間あたりに投与され、次いで少なくとも1~2日の期間は投与されず、このサイクルが示されたとおりに繰り返される。一つの態様において、ポリアミン類似体（またはその立体異性体、塩、もしくは誘導体）は、3週ごとに6日間である。

10

20

**【0186】**

投与の経路は、一般に使用される特定のポリアミン類似体（または、立体異性体、塩もしくは被保護誘導体）の性質に依存すると考えられ、たとえば、経口または注射（皮下または静脈内）によってであってもよい。投与は、一般に静脈または皮下注射によってなされる。

**【0187】**

通常、ポリアミン類似体（または立体異性体、塩もしくは被保護誘導体）、またはポリアミン合成経路、ポリアミン代謝、および/またはスペルミンの細胞内濃度維持を妨げるその他の適切な薬剤は、適切な薬学的賦形剤を含む組成物において投与される。薬学的賦形剤は、当技術分野において既知であり、Remington's' Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing (1990)に記載されている。また、ポリアミン類似体は、マクロファージに対する薬剤デリバリーを容易にするか、またはマクロファージに対する薬剤の特異性を増大する別の物質と結合されていてもよい。たとえば、薬剤は、リポソームに結合されていてもよい。リポソームは、当技術分野において既知である。そしてまた、リポソームは、IgGFc受容体などのターゲティング物質と結合されてもよい。ザイモサンまたはテトラクロロデカオキシジェン(TCDO)などのマクロファージ食作用および/またはMCSF、GMCSF、もしくはIL-3などの活性化を増大させる物質は、抗増殖剤の取込みを増大させるために使用してもよい。

30

**【0188】**

抗MHRV薬剤の投与と組み合わせて（投与の前、投与と共に、または投与後に）、その他の薬剤を投与することもできる。

40

**【0189】**

MHRVの弱毒化された株の調製

上記に加えて、組織培養系および/または動物モデル系を利用して、MHRVの弱毒化株を構築および/または単離することができる。これらの株は、ワクチンのために、またはウイルス抗原の単離のために適していると考えられる。

**【0190】**

弱毒化株は、細胞培養および/または動物モデルにおける多数の継代後に単離することができる。感染細胞または感染個体における弱毒化株の検出は、当技術分野において既知の技術によって達成することができ、たとえば、プローブとしてMHRVにおいてコードされる

50

1つまたは複数のエピトープに対する抗体を使用すること、またはプローブとして少なくとも約8ヌクレオチドのMHRV配列を含むポリヌクレオチドを使用することを含みうる。

【0191】

または、もしくはさらに、弱毒化株は、本明細書に提供したMHRVのゲノム情報を利用して、および組換え技術を利用して構築されてもよい。通常、たとえば病原性に関連したポリペプチドをコードするゲノム領域を欠失させることによって、MHRVの欠失突然変異体が生成されると考えられるが、ワクチン注射した宿主にMHRV抗原に対する有効な免疫応答を生じさせるために、少なくともあるレベルのウイルス複製ができるようにする。さらに、ゲノム構築により、MHRVに対する中和抗体を引き起こすエピトープを発現することができると考えられる。次いで、変質されたゲノムを、細胞を形質転換させるために利用することができ、これによりMHRV複製が可能となり、ウイルス複製を可能にする条件下で細胞を培養した。

10

【0192】

ワクチンとしてのこれらの使用に加えて、弱毒化MHRV株は、ウイルス抗原の商業的に産生するための供与源として使用することもできる。ワクチン目的のための弱毒化ウイルスは、たとえば初代マクロファージに感染する形態で、MHRVに感染した、病気にかかった個体、対病気にかかっていない個体の研究によって定義された抗原性部位を含み得る。次いで、このような抗原構造を、ワクチンに使用するために、発現させて単離することができる。

【0193】

MHRVに基づくウイルスベクター

MHRVゲノムは、ウイルスベクター、たとえば関心対象の遺伝子産物をコードする組換え核酸の操作および移動のための組換えMHRVベクターを作製するために使用できるシャトルベクターのベースとして使用することができる。一つの態様において、本発明のMHRVベクターは、関心対象の核酸の挿入およびライゲーションを容易にするために、クローニングサイト、好ましくはマルチクローニングサイトを含むように修飾された全てまたは一部のMHRVゲノムを含み、これにより制限部位、好ましくは独特の制限部位が提供される。本明細書において使用される「制限部位」は、限定酵素によって認識および切断される核酸配列をいう。一つの態様において、関心対象の遺伝子産物をコードする核酸は、この核酸はMHRVゲノムとは異種性（すなわち、核酸は、MHRVゲノムにおいて通常見出されない）であり、天然に存在し、好ましくはMHRVゲノムに独特な制限部位に挿入される。好ましくは、関心対象の核酸は、宿主細胞にMHRVベクターを導入することにより、宿主細胞（インビトロまたはインビボ）においてコードする遺伝子産物の発現をもたらすために、ベクターに機能的に挿入される。

20

30

【0194】

一つの態様において、適切な宿主細胞における組換えMHRVベクターの発現により、複製適格性組換えMHRVウイルス粒子を提供し、これにより、関心対象の遺伝子産物をコードする配列を含むように修飾される。関心対象の核酸が導入されたクローニングサイトおよび/または組換え体は、任意の適切な部位でMHRVゲノムに挿入することができる。特定の態様において、クローニングサイトおよび/または組換え核酸は、MHRVゲノムpol領域に隣接して挿入される。

40

【0195】

もう一つの態様において、MHRVベクターは、たとえば、欠失またはその他の修飾によってGagエンベロープタンパク質をコードする配列、ポリメラーゼ（pol）をコードする配列、または両方ともを機能させて複製欠損にされている。特定の態様において、クローニングサイトおよび/または組換え核酸は、ポリメラーゼをコードする配列を破壊するようにMHRVゲノムのpol領域に挿入される。次いで、遺伝子産物をコードする配列を含むように、複製欠損ベクターを修飾する。次いで、MHRVウイルス粒子の産生のために必要とされる必要なウイルス成分を発現（構成的に、または誘導的に）するように修飾されたパッケージング細胞（一般に哺乳類細胞）、たとえば、組換えMHRVベクターの修飾されたエレメント

50

を補うために必要なものとしてMHRV gag、MHRV pol、または両方共を発現する細胞に、複製欠損MHRVベクターを導入することによって、組換えMHRV粒子をインビトロにおいて産生させる。この修飾された組換え宿主細胞におけるMHRVベクターの共発現により、ウイルス粒子の産生を生じ、次いでこれを単離して(たとえば、上清から)、標的細胞を感染させるために使用することができる。

【0196】

組換えMHRVベクターに挿入するための組換え核酸は、関心対象の任意の遺伝子産物をコードする関心対象の任意の核酸であり得る。MHRVベクターまたはMHRVウイルス粒子は、インビトロ(たとえば、エキソピボ治療法)またはインピボのいずれかにおいて宿主細胞を修飾するために使用することができる。たとえば、本発明の組換えMHRVウイルス粒子は、インピボにおいて、患者が欠損しているか、または患者が治療的な利益を得られるであろう任意の可溶性タンパク質を長期間分泌する目的で、宿主細胞における産生のための分泌されたポリペプチドを送達するために使用することができる。たとえば、自己血から調製したマクロファージに血液凝固(たとえば、第VIII因子)をコードする遺伝子を送達するために組換えMHRV粒子を使用することができ、この修飾されたマクロファージを第VIII因子の供与源を提供するために宿主へ注入して戻し、これにより血友病を軽減することができる。

10

【0197】

組換えMHRVベクターおよび組換えMHRVウイルス粒子は、現在遺伝子治療において使用されている大多数のレトロウイルスでは共有しない特徴である、非分裂細胞、たとえば非分裂マクロファージにMHRVが効率的に感染するという点で、特に遺伝子デリバリー媒体として魅力的である。したがって、組換えMHRVベクターおよび組換えMHRVウイルス粒子は、このような非分裂細胞、たとえばマクロファージ、幹細胞などに対する、または非分裂細胞を経た遺伝子産物のデリバリーにおける特定の使用が見出されると考えられる。

20

【0198】

寄託

以下のウイルスの生物学的に純粋な培養物の寄託は、本出願の出願日の期日もしくは期日以前にブタベスト条約の規定のもとに、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 University Blvd., Manassa, VA 201110-2209でなされた。示したアクセッション番号が、生存率検定が成功した後に割り当てられ、必要な手数料を支払った。前記培養物へのアクセスは、特許出願の係属する間、このような37 C.F.R. § 1.14および35 U.S.C. § 122の下で、長官によって権利が与えられることが決定されたものに利用できる。公衆に対するこの培養の有効性における全ての制限は、本出願に基づいた特許の付与の際に、取り消しできないように除去される。さらに、指定された寄託は、寄託の日から30年間、もしくは寄託の最後の要請の後の5年間;または、米国特許の実施可能な期間のいずれか長い期間維持されるであろう。培養物は、成育不能になるか、もしくは不注意に破壊されるか、またはプラスミドを含有する株の場合、そのプラスミドを失われた場合、同じ分類学上の記載の生存可能な培養物と置換されるであろう。

30

【0199】

これらの寄託は単に当業者に対する便宜のみとして提供され、寄託が必要であることの承認ではない。寄託する物質を作製する、使用する、または販売するためにライセンスを必要としてもよく、このようなライセンスは、本明細書によっては付与されない。以下の寄託は、ATCCによって本出願の出願日の期日もしくは期日以前に受け取られた。

40

説明	株の名称	ATCCアクセッション番号
1 mlのアンフルにおけるMHRV培養物 (-80°Cにおいて貯蔵)	MRV-med-6/01	

【0200】

50

## 実施例

以下の実施例は、本発明を製作し使用する方法的完全な開示および説明を、当業者に提供するために提示され、これらの発明に関して本発明の範囲を限定することは企図されず、または、これらは以下の実験が全てであること、もしくは行った実験のみであることを表すことは企図されない。使用した数（たとえば、量、温度、分子量）に関して、正確さを保証するための努力をしたが、一部の実験誤差および偏差は予期されるべきである。一方、示されない限り、部は、重量部であって、分子量は、重量平均分子量であり、温度は、摂氏度であり、圧力は大気圧または大気圧に近い圧力である。

### 【0201】

実施例1：循環する活性化されたマクロファージを有する、リンパ腫を有する患者  
AIDS痴呆の患者の血液において、活性化されたマクロファージが以前に同定されている（Pulliamら、Lancet 349: 692-695（1997））。予備研究において、リンパ腫の患者は、高側面分散（CD14発現細胞の流動細胞光散乱）およびCD69などの活性化マーカーによって「活性化された」ように見える異常な循環マクロファージを有することにも留意されたい。これらのマクロファージの研究では、これらが活性化かつ増殖していたことが示され、増殖マーカーPCNA、Ki-67で染色された。また、これらの細胞は増殖する細胞の特徴である、プロモデオキシウリジンの取り込みをした。

### 【0202】

AIDSリンパ腫および非AIDSリンパ腫の患者に由来する末梢血CD14細胞のPCNA染色の割合（%）の概要を、実験室の研究者に由来する血液と比較して図2に示す。PCNA染色は、AIDSおよび非AIDSリンパ腫の患者から得られた全血形態、ならびに実験室の研究者対照によって達成した。末梢血単核細胞を試料から単離し、当技術分野において周知の方法にしたがって細胞を固定し、透過処理し、抗PCNA抗体で染色した。細胞上のCD14の染色を対照として使用した。CD14の細胞の背景以上のPCNAの割合（%）を、算出してプロットした。対照（n=13）、HIV非ホジキンリンパ腫（NHL）（n=16）、非HIV-NHL（n=18）について得られる値をそれぞれ算出した。陽性値を与えるためのカットオフとして、30%のPCNA+値を使用した。図2に示したように、AIDSおよび非AIDSリンパ腫の患者は、これらの血液において、対照（年齢25~45）実験室研究者よりも高頻度でPCNA+CD14細胞が上昇した（>30%、それぞれp=0.03、0.006）。最も高いレベルのPCNA+CD14細胞の患者の研究では、彼らが無痛性の慢性リンパ腫（濾胞性リンパ腫、外套細胞リンパ腫、菌状息肉腫）を有することが明らかとなった。また、これらのPCNA+マクロファージは、AIDSリンパ腫組織検体においても観察された。

### 【0203】

マクロファージまたはマクロファージ様細胞が増殖の証拠を示したかどうかを決定するために、非AIDS濾胞性リンパ腫検体において研究を行った。

### 【0204】

図3は、有糸分裂を経ている低級濾胞性リンパ腫における濾胞樹状細胞を含む組織切片を示し、病原体の増殖に対するこの細胞群の能力を示唆している。さらに、有糸分裂の図は悪性の症候であると考えられる異常の三極である。これらのデータは、潜在的にマクロファージ様細胞は非AIDSリンパ腫において同定され得ることを示唆する。

### 【0205】

実施例2：新規ヒトレトロウイルスのMHRVの特徴づけ

AIDSリンパ腫において記載されたものと一致する特徴を有するマクロファージを含む非ホジキンリンパ腫のインデックスケースを、ウイルス単離の試みにおいて利用した。この外套細胞リンパ腫の組織学は図4に示す。ウイルスの単離および培養のためのプロトコルは、以下の通りであった。

### 【0206】

#### ヒトマクロファージにおけるMHRV培養

外套組織球レトロウイルス（MHRV）は、ヒトマクロファージにおいて培養し、解析のために培養細胞および培地から回収した。使用したプロトコルは、以下に記載する。

10

20

30

40

50

## 【0207】

1) オリジナルの材料：オリジナルの外殻細胞リンパ腫物質は、Herndier博士によって同定され、彼は、HIVリンパ腫と関連したマクロファージと比較して、この組織において観察される超微細構造の類似に基づいて、候補組織の可能性のあるものとしてMCL-1(患者LL)を同定した。患者は、HIV、HBV、およびHCVに対して陰性の51歳の老人であった。

## 【0208】

2) マクロファージ調製物：血液は、スタンフォード血液センターから得た。血液を抜き、調製して、室温で一晩貯蔵した。次いで、翌朝、マクロファージを次のように血液から得た。バッグを開けて、同体積のDPBS(30ml)を血液に添加した。希釈血液を50mlの遠心管に入れ、14mlのパーコール(1.087g/ml)を血液下にピペットで移した。次いで、これを1800 RPMで30分間遠心分離した。 10

## 【0209】

一番上の血漿層を捨て、中間の細胞層を除去して清潔な50mlの遠心管に配置した。DPBS(ダルベッコのリン酸緩衝食塩水)を50mlの総容積に添加して、調製物を1400 RPMで10分間室温において遠心分離した。上清を除去して、細胞ペレットを清潔なチューブに配置し、10%のウシ胎児血清を含む25mlのIMDM培地に再懸濁した。次いで、再懸濁した細胞をウシ胎児血清と1時間インキュベートして150mmのガラスペトリプレートに配置した。細胞は、ペトリプレート上で1.5~2時間、加湿したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で37 °Cにおいてインキュベートした。 20

## 【0210】

インキュベーション後、培地を吸引して、接着細胞をペトリ皿においてDPBSで3回洗浄した。次いで、接着細胞を10mlのDPBS中で搔爬して、清潔な50mlの遠心管へ移した。DPBSの体積を50mlに増加して、細胞を1200 RPMで10分間遠心分離した。遠心後、細胞ペレットを25mlの培地に再懸濁してT75フラスコへ移した。次いで、細胞を加湿したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で37 °Cにおいて培養した。それぞれ30mlの血液から、2つのT75フラスコにマクロファージをまいた。 30

## 【0211】

3) MHRV生殖：外殻細胞リンパ腫(MCL-1)の患者のLL由来の凍結組織を3回凍結融解し、マクロファージをまいてから1~2日後のT75フラスコに可溶化液(約10<sup>7</sup>細胞)を添加した。可溶化液は、直接細胞上の培地に添加して、細胞と共に24時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、細胞をDPBSで洗浄し、次いで15mlの培地を細胞上に入れた。培地は、毎週交換した。 30

## 【0212】

MHRV増殖のための物質を得るために、培地を細胞から吸引し、5mlの新しい培地を細胞上に添加して、細胞スクレーパーを使用してフラスコ表面の細胞を搔爬した。次いで、これらの細胞を解析のために、または新規なマクロファージ培養にMHRVを導入するために、凍結融解を3~4回行った後に使用した。また、増殖性に感染した初代共培養からの細胞を含まない上清は、0.22ミクロンのフィルターを通した濾過の後にMHRV伝染のために効率よく使用された。 40

## 【0213】

4) 試料調整および貯蔵：細胞培養上清は、毎週置換して、解析までは-80 °Cに貯蔵した。搔爬した細胞は、解析のために、または増殖のために使用するまで液体窒素中で貯蔵した。 40

## 【0214】

5) 細胞増殖および維持：細胞は、(1)50%のMyelocult H5100(Stem Cell Technologies)、(2)10%のウシ胎児血清(Hyclone)、グルタミン(Biowhittaker)、およびPenstrep溶液(Biowhittaker)を補った25%のIMDM(Biowhittaker)、(3)コンフルエントな状態のヒトジプロイド繊維芽細胞を含むフラスコにおいてインキュベートされた25%のIMDM条件培地、で構成される培地中で培養した。培地は、M-CSF(1マイクログラム/ml、Sigma)、IL-3(1マイクログラム/ml、Sigma)、および抗生剤の抗真菌剤(Life Science Te 50

chnologies)を補った。

【0215】

6) 実験試料：マクロファージ培養の調製後、細胞をMHRVを含む可溶化液に24時間さらした。次いで、培地を約1週に一回細胞上から除去して、-80 に保存した。6～8週間の実験の終わりに、細胞単層をフラスコ中で搔爬して、液体N<sub>2</sub>において10%のDMSO/培地中で凍結させた。これらの細胞を電子顕微鏡法のために使用した。

【0216】

MHRV感染した初代マクロファージの電子顕微鏡法：上記の通りに、1ヵ月間MHRVに感染した細胞において、透過型電子顕微鏡法を行った。レトロウイルス粒子が観察された多くの場合において、これらは細胞内液胞に存在し、B/D型レトロウイルスの特徴的な形態を有した。このレトロウイルスにおいて再現的に観察される古典的な形態は図5に示す。同様の粒子は、並行して行った、同じ初代マクロファージドナーからの感染していないマクロファージ培養では観察されなかった。

10

【0217】

実施例3：MHRVのクローニング

MHRVゲノムをクローニングするために使用したクローニングストラテジーは図6に提供される。当技術分野において周知の方法に従った初期polプロテアーゼ遺伝子断片のシーケンシングの後、相同検索を行い、プロテアーゼ (pro) およびポリメラーゼ (pol) 遺伝子の両者は、ウイルスのヒト内在性レトロウイルス-Kサブファミリーについて以前に記載されたものと同様の無処理のタンパク質をコードする、完全なオープン・リーディング・フレームを有することが見出された。初期の最も近い相同性では、HERV-K109ウイルスに関連した。

20

【0218】

次のクローニングストラテジーでは、初期polプロテアーゼ遺伝子由来の5-プライムおよび3-プライムを伸長するMHRV特異的なプライマーを使用した。このストラテジーにより、ピリオンの全長をコードするDNAの配列を得た。BLAST解析では、MHRV配列が、HERV-K109ゲノムと最も高い相同性を有することを示した。事実上完全な相同性がpol遺伝子の5'末端で観察されたが、gag領域には異種性領域が存在した。

【0219】

MHRVゲノム配列においてORF発見手段 (NCBI) を使用するオープン・リーディング・フレーム解析により、MHRV GAGタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームが示された。GAG遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列 (配列番号：7) および予測されたアミノ酸配列 (配列番号：8) は、以下の通りである：

30

```

1301 atggtttccagaacaaggaacttttagatctaaaagaagactggaa
      M V S R T R N F R S K R R L E
1346 aagaattggcaaggaactaaagcaggttaggaagggtaatatcatt
      K N W Q G T K A G R K G N I I
1391 ccacttacagtatggaatgattgggccattattaaagcagcttta
      P L T V W N D W A I I K A A L
1436 gaaccatttcaaagagaagaagatagtggtttcagtttctgatgcc
      E P F Q R E E D S V S V S D A
1481 cctggaagctgtgtaatagattgtaaagacaagacagggaaaaaa
      P G S C V I D C K D K T G K K
1526 tcccagaaagaaacggaaagtttacattgcaaatatgtagcagag
      S Q K E T E S L H C K Y V A E
1571 ccagtaatggctcagtcacgcaaaatggttgactataatcaatca
      P V M A Q S T Q N V D Y N Q S
1616 attacaggggttgatatatcc 1636
      I T G V D I S

```

40

【0220】

50

ヌクレオチド残基番号は、予備的なMHRVゲノム配列（1～9182）内のヌクレオチドの位置に基づく。304bpのPCR産物の5'末端はこの配列内で見出され、上記番号付けを使用するとヌクレオチド残基1325で開始する。これらの配列は、本明細書において、MHRV 5' GAG核酸およびポリペプチド配列と称される。

#### 【0221】

HERV-K109に関する相同性は図1に示す。MHRVゲノムのヌクレオチド残基3548の後方付近において、MHRVゲノムとHERV-K109ゲノムとの間で高い相同性が観察され、ちょうど5'からこの領域に有意な程度で非相同性が生じ、MHRVの全てのgag遺伝子を包含する。MHRV gag遺伝子の配列解析では、観察されたHERV-K109 gag遺伝子との93%の相同性よりも高い相同性は全く示されなかった。この領域に類似するその他のウイルスgagエレメントは、全て、HERVファミリーに該当するが、HERV-K109よりもより遠い関係であった。したがって、MHRVゲノム配列は、未知のgag含有外因性レトロウイルスエレメントとHERV-K109との間の組換え事象と、その後の感染性レトロウイルスの産生が起こり得ることを示唆する。大きなオープン・リーディング・フレームには、ウイルスの複製のために必要な全ての遺伝子（gag、pol、env）が存在していた。

10

#### 【0222】

実施例4：MHRV DNAは、オリジナルの外套細胞リンパ腫DNAにおいて検出されるが、正常なドナーまたはHIV+ AIDSリンパ腫DNA検体のいずれかから単離されたDNAでは検出されないMHRVがオリジナルの外套細胞リンパ腫に存在する候補の独特なウイルスであるかどうかを試験するために、独特のgag遺伝子配列に基づいてプライマーを構築し、オリジナルの外套細胞リンパ腫DNAまたはAIDS関連リンパ腫の患者からのDNAから調製したDNA検体を増幅するために利用した。使用したプライマーの配列（HERV-8、HERV-9、HERV-10、HERV-11、およびHERV-12）は、図1に提供される。HERV-10およびHERV-11プライマー対を使用する増幅（試料AおよびB、図7のレーン3）では、約1966bpのPCR産物を生じるはずであり；HERV-9およびHERV-12のプライマー対（試料AおよびB、図7のレーン2）を使用する増幅では、約1321bpのPCR産物を生じるはずであり；ならびに、HERV-8およびHERV-9のプライマー対（試料AおよびB、図7のレーン1）を使用する増幅では、約304bpのPCR産物を生じるはずである。PCR増幅は、オリジナルの外套細胞リンパ腫（MCL-1 DNA）から、およびAIDS非ホジキンのリンパ腫（AIDS-NHL DNA）から単離されたDNAを使用して行った。PCRは、当技術分野において周知の方法に従って、65 °CのT<sub>m</sub>で行った。具体的には、21 μl（約100ng DNA以下の範囲で）のDNA試料を、5 μlの10×緩衝液中で、1 μlの200 μM dNTP、3 μlの1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1 μlのそれぞれのプライマー（それぞれ400nM）、および0.3 μlの1.5 μM AmpliTaq DNAポリメラーゼと、36.7 μlの水と共にインキュベートした。PCRサイクルは、以下の通り、94 °Cで3分；94 °Cで30秒に続いて65 °Cで1分を40サイクル；68 °Cで2分；および68 °Cで10分であった。

20

30

#### 【0223】

図7はこの解析の結果を示す。レーン1～3（B、MCL-1 DNA）に示すように、gag-特異的なPCRプライマーの3つのセットの全てにおいて、最初のMHRVシーケンシング解析に基づいて予測されたとおりの分子量の特異的な遺伝子産物が生じた。これらのサイズは右軸に示す。同じセットのプライマーでは、HIV+ AIDSリンパ腫DNA（A、AIDS-NHL DNA）から単離されたDNA由来のいずれを増幅することもできなかった。HERV-8/-9のプライマー対では、HIV+ AIDSリンパ腫DNAからいずれの検出可能なPCR産物も増幅することができず；HERV-9/-12プライマー対を使用するとかすかなバンドが存在し、またHERV-10/-11プライマー対（A、1～3）を使用すると、全長（1966bp）PCR産物が検出された。したがって、MHRV特異的なプライマーは、正常ヒトゲノム（Aレーン）に存在する配列を検出しなかった。これらのデータは、患者のオリジナルの腫瘍のDNA（Bレーン）からの特異的なMHRVの検出と一致する。

40

#### 【0224】

リンパ腫が寛解傾向であった場合の、この患者からの血液検体における次の研究では、図7にて説明したように、同じ大きさのMHRV特異的なDNAを示した。これらのデータは、MHRV

50

がオリジナルの腫瘍内に存在し、血液検体において観察されるためには、腫瘍細胞が存在することは必要とされないことを示す。

【0225】

実施例5：MHRV GAG配列の解析

実施例3に記載した上記MHRV全長GAGポリペプチド配列は、GenBankのBLAST解析における照会配列（配列番号：9）として使用した。GenBankアクセス番号AF164609（配列番号：10）およびY08032（配列番号：11）は、以下に示す。

>gb|AAD51791.1| (AF164609) Gag-Pro-Pol タンパク質 [ホモサピエンス]  
長さ = 1177; スコア = 162 ビット (409), 予測 = 4e-39  
一緻性 = 79/100 (79%), ポジティブ = 88/100 (88%), ギャップ = 2/100 (2%)

10

クエリー: 5  
TRNFRSKRRLEKNWQGTKAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQREEDSVSVSDAPGSC 64  
T + + +R+ K + +AGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQ  
EEDSVSVSDAPGSC  
サブジェクト: 54 TLDLKDWKRIGKELK--  
QAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSC111

クエリー: 65 VIDCKDKTGKKSQKETESLHCKYVAEPVMAQSTQNVNDYNQ 104  
+IDC +KT KKSQKETESLHC+YVAEPVMAQSTQNVNDYNQ  
サブジェクト: 112 IIDCNEKTRKKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYNQ 151

>emb|CAA69289.1| (Y08032) gag [ヒト内在性レトロウイルス K]  
長さ = 666; スコア = 161 ビット (407), 予測 = 6e-39  
一緻性 = 79/100 (79%), ポジティブ = 88/100 (88%), ギャップ = 2/100 (2%)

20

クエリー: 5  
TRNFRSKRRLEKNWQGTKAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQREEDSVSVSDAPGSC 64  
T + + +R+ K + +AGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQ  
EEDSVSVSDAPGSC  
サブジェクト: 54 TLDLKDWKRIGKELK--  
QAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSC111

クエリー: 65 VIDCKDKTGKKSQKETESLHCKYVAEPVMAQSTQNVNDYNQ 104  
+IDC +KT KKSQKETESLHC+YVAEPVMAQSTQNVNDYNQ  
サブジェクト: 112 IIDCNEKTRKKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYNQ 151

30

【0226】

それぞれの例において、ポリペプチドは、照会MHRV GAGアミノ酸配列の最初の4アミノ酸にマッチしなかった。MHRV GAGポリペプチドの残基22までおよび残基22を含むN末端部分は、既知のgagポリペプチドに対してほとんど相同性を示さなかった。

【0227】

実施例6：MHRVに感染したマクロファージは、完全なウイルス粒子を産生する

インビトロにおける初代マクロファージのMHRVによる感染がウイルス粒子を生じるかどうかを試験するために、上記した方法に従って以下の実験を行った。初代マクロファージドナーをMHRVに感染させ、感染していないままにした同細胞を並行して培養した。方法は上記のとおりに行った。

40

【0228】

感染開始の6週間後に、感染した培養および感染していない培養物、細片ペレット、および25/45%のシヨ糖段階的勾配上の上清層から上清を得た。超遠心分離を90,000Gで2時間行い、勾配を4部分に分別した。上層の培地を含む部分（AおよびB、レーン1、図8）、25%のシヨ糖部分（AおよびB、レーン2、図8）、25/45%バンドの物質（AおよびB、レーン3、図8）、およびペレット（AおよびB、レーン4、図8）を全DNase1で処理し、RNAを抽出した。同じ手順を、感染した細胞および感染していない細胞からの上清に対して行った。それぞれの勾配選択された検体に対する逆転写酵素PCR実験において、MHRV特異的なプライマー（HERV-K8およびHERV-K9）を利用した。

50

## 【0229】

図8に示すように、MHRV感染した培養の25/45%界面からの検体のみが、検出されるMHRV特異的なRNAを含んだ。感染した上清からのその他のいずれの画分においても、RNAに結合した検出可能なMHRV粒子はなく、また感染していない対照上清からも検出できる増幅可能な配列はなかった。これらのデータは、解析の6週前にMHRVの供与源に感染した初代マクロファージによって産生されたMHRV RNAに結合した粒子の検出と一致する。同様の実験を、8つの異なった初代マクロファージドナーにおいて行い、図5において示されるものと同様に細胞内にウイルス粒子が存在することを示す電子顕微鏡法によって感染を確認した。

## 【0230】

単離されたMHRVがインビトロにおいて細胞に感染する能力は、ウイルスが血液中で伝染する可能性があることを示唆し、したがって、MHRVについて血液供給（血漿および血清などの血液製剤を含むこと）をスクリーニングすることは、MHRV感染性核酸を含みうる組織およびその他の生物学的物質をスクリーニングするものであることが保証される。

## 【0231】

実施例7：MHRVのウエスタンブロット解析

オリジナルの外殻細胞リンパ腫患者が、MHRV特異的なタンパク質に対して免疫学的反応を示すかどうかを試験するために、患者が完全寛解（骨髄移植後）した際にこの患者から血漿を得た。任意のMHRV特異的なタンパク質を観察することができるかどうかを決定するために、この血漿を、感染した細胞および感染していない細胞（上記の通りの）から得られた細胞可溶化液に対して試験するための抗体の供与源とした。当技術分野において周知の方法に従ってウエスタンブロットを行った。

## 【0232】

感染したおよび感染していない正常ドナー末梢血に由来するマクロファージの一定分量（ $2 \times 10^6$ 細胞）を、0.5mlの試料緩衝液（25%グリセロール、SDS、2%および0.01%ブロムフェノールブルーを含む62.5マイクロモル濃度のトリス-HCl、pH6.8）中で4分間沸騰した。30マイクロリットルの試料は、4~15%ポリアクリルアミドゲル（BIO-RAD、Richmond、CA）に充填して、本質的に以前に記載される方法に従って処理した（Ngら、Jimmunol 143:2501-2507（1989））。簡潔に述べると、試料を、100vにおいて、25マイクロモル濃度のトリス、192マイクロモル濃度のグリシン、0.1%のSDS、pH8.3中で1時間泳動した。タンパク質を、90ボルトで1時間、25マイクロモル濃度のトリス、192マイクロモル濃度のグリシン、20%のメタノール転写緩衝液中でニトロセルロース（Scheicher and Schuell, Keene, NH）へ転写した。4で一晚、2%の乳汁/PBSでブロッキング後、膜を1/100希釈の患者血漿と30分間反応させ、次いでPBSで洗浄した。次いで、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼのPBS溶液（Zymed, San Francisco, CA）を30分間添加して、ブロットをPBSで洗浄した。ピオチン-分子量マーカー（BIO-RAD）の検出は、アビジン-AP（Zymed）とインキュベーションすることによって達成した。タンパク質-抗体バンドの検出は、BCIP/NBT基質（Zymed）を添加することによって行った。

## 【0233】

図9は、感染していない初代マクロファージと比較して、感染したものに特異的に存在するバンドを示す予備的なウエスタンブロット結果を示す。試料は、左から右に次のような順番である：感染した細胞可溶化液プラス検出可能な標識された二次抗体の抗IgG-AP（C（対照のため）、MHRV感染したもの）；感染した細胞可溶化液、患者血漿、および抗IgG-AP（LL）；抗IgG-APおよび感染していない細胞（C、感染していないMHRV）；ならびに、感染していない細胞、患者血漿（LL）、および抗IgG-AP（LL、感染していないMHRV）。

## 【0234】

患者の血漿は、MHRV感染細胞とのみ反応した。観察されたタンパク質バンド（68kDおよび80kD）の大きさは、タンパク質のグリコシル化によるものであると考えられる。骨髄移植後数か月経過した患者における免疫応答は、一般に全てT細胞非依存的であるので、観察されるウエスタンブロットバンドは、MHRVタンパク質のグリコシル化された形態（すなわち、エンベロープ）の可能性はある。

10

20

30

40

50

## 【0235】

## 実施例8：ウイルス培養

MHRVは、上記したものと同様の方法で、凍結した組織および/または新しい組織から単離する。原発腫瘍物質/血液に由来するCD14+を1月間(細胞選別から)共培養した後、接着したマクロファージを組織培養フラスコから搔爬し、ペレットにして、電子顕微鏡分析のために調製する。これらの細胞からの上清を凍結して、25-45%のショ糖段階勾配のショ糖密度のバンドである、DNA-ase耐性RNAに結合した粒子の存在を評価する。MHRVを同定するためにプライマーを利用し、図1にて説明したような、粒子に結合したビリオンの存在を同定するために、代表する一般的なプロテアーゼおよびポリメラーゼ縮重プライマーセットを使用した。上清は、陽性の結果が得られるいずれかの共培養から単離して、上清を0.22のミクロンフィルターに通して濾過し、初代培養に再接種して、1ヵ月培養した。同様のEMおよびウイルスRNAの特徴を、潜在的な新規レトロウイルスエレメントのさらなる特徴づけ/クローニングの前に記録する。

10

## 【0236】

## 実施例9：MHRVに基づいた配列を使用する分子疫学

MHRV gag遺伝子はMHRVのみを認識する特異的なPCRプライマーセットの開発が可能な独特な配列を有するため、広範な慢性疾患状態の患者からの血液においてMHRV特異的な配列を同定するための分子疫学研究がなされている。発見されるその他の新規のレトロウイルス因子は、MHRVのために以下に定義したとおりの特徴づけ研究と同様の方法で、特徴づけられる。

20

## 【0237】

患者材料の供与源：患者に由来する検体において、MHRV特異的な配列および/または抗体反応性の存在を評価する。分子疫学研究の初期の焦点は、一連のリンパ腫患者組織ならびにMHRV特異的な配列の存在する患者に由来する血液細胞の評価である。MHRV特異的な配列がリンパ腫の患者のサブセット内にあると同定される場合は、MHRVの役割およびその伝播能についての広範な研究を行う。

## 【0238】

MHRV特異的な配列について評価したその他の検体における分類は、過去10年以上にわたる様々な刊行物において見出されるHERV特異的な配列に関連した疾患を含む。これらは、多発性硬化症、奇形癌腫、乳癌、および様々な自己免疫性疾患の患者からの検体を含む。これらの材料の分類の全てが現在利用でき、利用できる場合は組織、ならびにPBMCを、MHRV特異的な配列の存在について評価する。正常なドナーからの対照検体は血液バンクから得られる。この初期スクリーンの結果を解析した後、その他の疾患状態からのさらなる対照検体を評価する。また、これらの原発性病理組織は、潜在的なその他のMHRV関連配列の供与源として役立ち、種々の慢性疾患環境におけるMHRV異種性の程度を決定するために、これをクローニングして配列決定を行う。

30

## 【0239】

## 実施例10：インビトロにおけるMHRV増殖特徴の特徴づけ

MHRVは原発性外套細胞リンパ腫腫瘍組織から最初に単離された。もっぱら腫瘍関連マクロファージに関連していると思われる発現(電子顕微鏡法、示さず)は、初代マクロファージ培養においてインビトロで最初に単離された。上記のように、感染した培養のみが、粒子結合RNA単離体ショ糖結合アッセイ法において、MHRV特異的な配列を産生する証拠を示した。このアッセイ法は、典型的には完全なウイルス粒子にパックされていない内在性レトロウイルスRNAが混入することと比較して、実際にビリオンに結合したパックされたMHRV配列間を区別することができる。

40

## 【0240】

様々な細胞タイプにおけるMHRVの詳細な宿主範囲解析を行う。宿主範囲研究は、ヒト起源の様々な腫瘍株、正常細胞(リンパ球、繊維芽細胞、血管内皮細胞)、およびマウス、ラット、ウサギ、ウシを含む様々な動物細胞群、ならびに非ヒト細胞群のいずれかにおいてMHRV複製するはずであるその他の種々の動物種の細胞株に感染させる試みにおいて、陽性

50

対照として初代培養マクロファージを使用することを含む。

【0241】

最終目的は、将来の研究のための疾患モデルを開発するために、MHRVが非ヒト細胞に感染させることができるかどうかを決定することである。MHRVウイルスの産生は、PCRによってウイルス特異的なgag配列をトラッキングすることによってモニターされる。インビトロにおける増殖目的のために、MHRVを初代ヒトマクロファージ中で培養し続け、全てのウイルス単離研究は、同じドナーからの感染させたマクロファージ 対 感染していないマクロファージにおいて、精製処理中にMHRV特異的なタンパク質を追跡するために並行して処理した調製物を用いて行われる。

【0242】

実施例11：MHRVタンパク質の特徴づけ

MHRVは、ヒト内在性レトロウイルスに非常に関連する。MHRV特異的なタンパク質の研究により、潜在的な複製適格性ヒト内在性レトロウイルス・タンパク質プロファイルがどのように見え得るかについての第1の見解が得られるものと考えられる。上記のように、HERV-K109関連のプロテアーゼ、ポリメラーゼ、およびエンベロープ遺伝子においてオープン・リーディング・フレームが観察された。

【0243】

慢性的に感染したマクロファージにおいて産生されるMHRVを放射性アミノ酸で標識して、これらの細胞によって産生されたレトロウイルスを、ショ糖勾配精製技術を介して単離した。MHRV特異的なタンパク質は、非特異的な対照として機能する同じドナーの非感染細胞由来の粒子に結合した放射性タンパク質を用いる、2次元ゲル電気泳動を利用して視覚化される。

【0244】

これは、MHRV由来の成熟したレトロウイルス・タンパク質産物の可視化を提供し、HIVもしくはHTLV-1などの様々なその他のレトロウイルスに感染した患者、または単に広く交差反応する能力のある抗体を有する患者（様々な自己免疫性疾患の患者など）と比較した、MHRVに感染した患者（MHRV特異的なプライマーを使用するDNA PCR増幅研究によって検出）における抗体反応性を研究するための地図として役立つと考えられる。また、このアプローチは、これらがパッケージ複製適格性形態で存在するので、これらの転写/翻訳後修飾を有する天然のレトロウイルス・タンパク質のための潜在的な精製スキームとして役立つ。

【0245】

実施例12：リンパ腫におけるMHRVの検出

304塩基対のプライマーを使用して、上記の通りに、患者から単離した一連の検体からDNAを増幅した。以下のものは陰性であった：

- a) 異なる正常な血液バンクドナー（Stanford）由来の6つの正常マクロファージ培養、全て感染していない；
- b) 2つのAIDSリンパ腫組織およびこれらの未関与の脾臓（4標本）；
- c) 4つの正常な末梢血DNA調製物、HIV陰性；および、
- d) 2つの非AIDS濾胞性リンパ腫。

【0246】

以下の5つの標本は、陽性であった：

- 1) MT：AIDS腹水大細胞リンパ腫；
- 2) S93-268102：非AIDS濾法性リンパ腫；
- 3) UV：オリジナルのMHRV RNA配列；
- 4) S92-4336：非AIDS濾胞性リンパ；および、
- 5) BR：AIDS大細胞リンパ腫。

【0247】

特に、ソートされたCD14細胞を使用し、マウスリンパ腫細胞をインビボにおいて拡大し、MT（MHRV+）リンパ腫マクロファージによって部分的に促進することにより、SCIDマウス

10

20

30

40

50

において高純度リンパ腫を確立するために、MTリンパ腫（前段落の1）を前もって使用した。

【0248】

上記のそれぞれの1~5から増幅されたGAG配列を配列決定し、これらの配列をMHRV GAG (UV)の配列と比較した。LL組織のMHRV GAG配列は、MHRVが元々同定された外套細胞リンパ腫組織DNAを表す。配列のアラインメントを図10に提供する。

【0249】

LL組織、MTリンパ腫、およびS93-268102の304bpのPCR産物のDNA配列は、同一であった。UV、S92-4336、およびBR単離体の304bpのPCR産物のDNA配列は、それぞれ1ヌクレオチドがLL配列とは異なる（それぞれ、304のセグメントのヌクレオチド232（Aに対するG）；ヌクレオチド89（ヌクレオチド89、Aに対するG）；およびヌクレオチド168（Cに対するT））。

10

【0250】

これらのデータは、MHRVが、個々の腫瘍結合単離体間で保存された独特の遺伝的配列を含むヒトリンパ腫関連ウイルスであることを示す。

【0251】

本発明は、その特異的な態様に関して記載されているが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく種々の変化がなされていてもよいこと、および等価物が置換されてもよいことは、当業者により理解されるはずである。さらに、特定の状況、物質、化合物、工程、工程段階、または段階に対し、本発明の目的、趣旨、および範囲に適応させるために多くの改変がなされていてもよい。全てのこのような改変は、本明細書に添付した請求項の範囲内であることが企図される。

20

【図面の簡単な説明】

【0252】

【図1】MHRVゲノム配置、ならびにHERV-K109に対して相同年領域、MHRV GAGをコードする領域を増幅するために使用したプライマーの相対的な位置、ならびにプライマーの配列およびHERV-8およびHERV-9プライマーを使用して作製された304bpのPCR増幅産物を示す概略図である。MHRVゲノム配置および相同年領域を示す概略図に沿った数は、MHRVゲノムにおける対応するヌクレオチド残基部位を示す。

【図2】対照（Normals）、AIDSリンパ腫（HIV非ホジキンリンパ腫）、および非HIVリンパ腫の被検者から単離された末梢血単核細胞におけるPCNAレベルを示すグラフである。

30

【図3】非HIVリンパ腫を有する被検者の濾胞樹状細胞であると推定される細胞の非定型の有糸分裂の図と共に、濾胞性リンパ腫を示す写真である。

【図4】MHRVを単離した外套細胞リンパ腫の組織を示す写真である。

【図5】感染したマクロファージにおけるMHRVの透過型電子顕微鏡像の写真である。

【図6】MHRVゲノムをクローニングするために使用した方法を詳述する概略図である。

【図7】MHRV GAG特異的なプライマーおよびAIDS非ホジキンのリンパ腫（AIDS-NHL）および陽性対照としてのもとの外套細胞リンパ腫DNA（MCL-1）に由来する核酸を使用する、PCR増幅の結果を示す写真である。A=AIDS NHL DNA；B=MCL-1DNA。

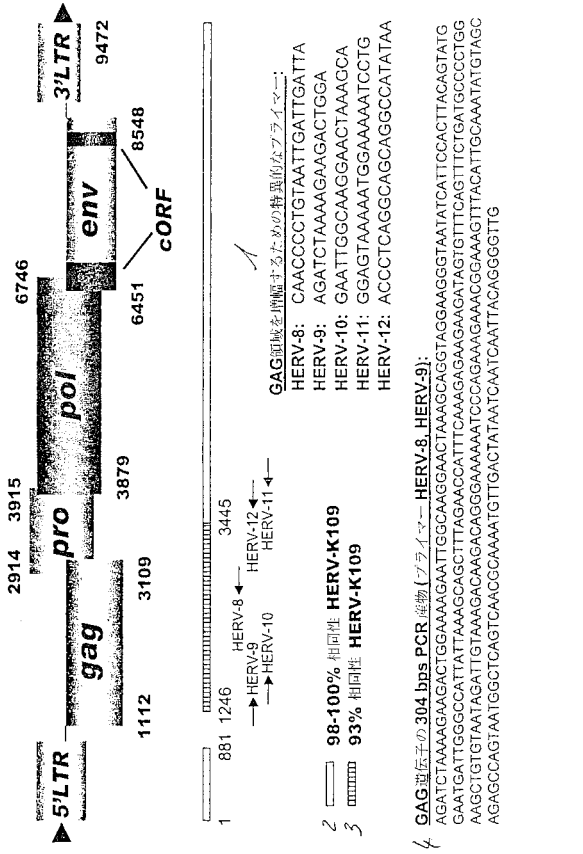
【図8】単離されたMHRV粒子を感染した初代マクロファージ培養から単離したRNAに対する、MHRV GAG特異的なプライマーを使用したPCR増幅の結果を示す写真である。

40

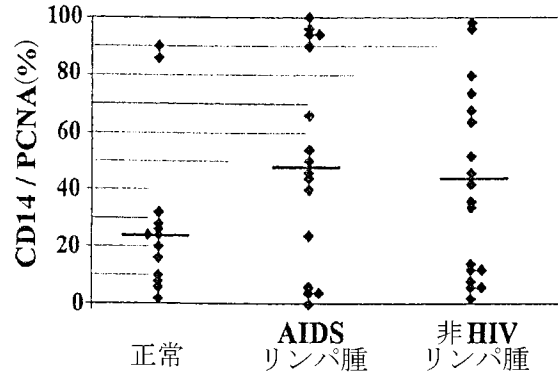
【図9】MHRV感染患者からの血漿抗体を用いない（C=対照）および用いる（LL）、MHRV感染細胞およびMHRV非感染細胞のウエスタンブロットを示す。血漿抗体の結合を検出するために、抗IgG-AP抗体を使用した。

【図10】304bp MHRV gagセグメント内の異なるリンパ腫から生じたPCR産物のDNA配列のアラインメント（配列番号：12~14）。

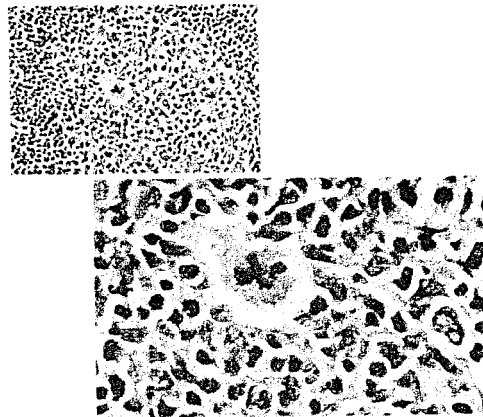
【 図 1 】



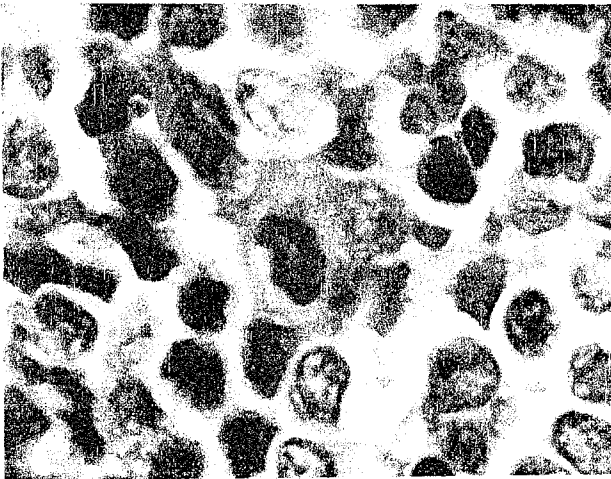
【 図 2 】



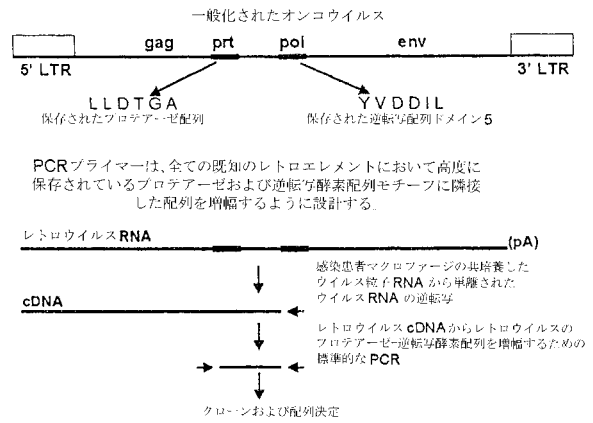
【 図 3 】



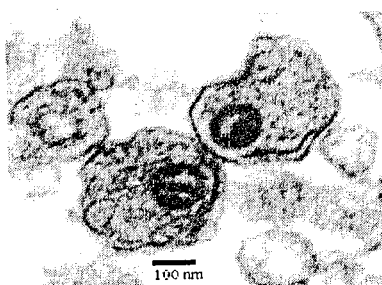
【 図 4 】



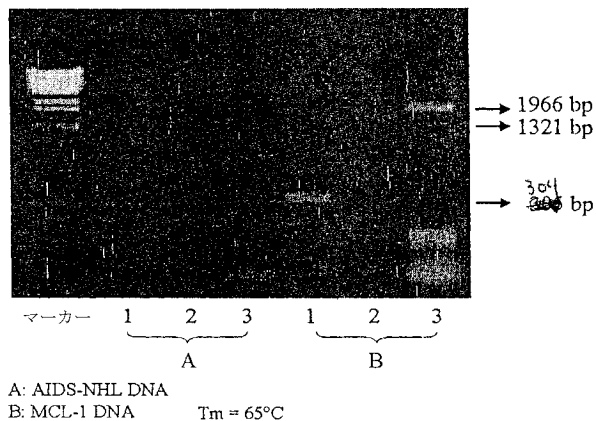
【 図 6 】



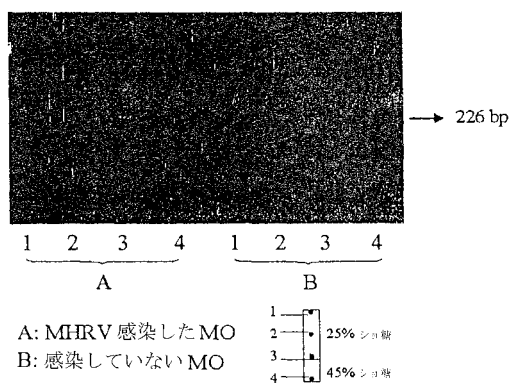
【 図 5 】



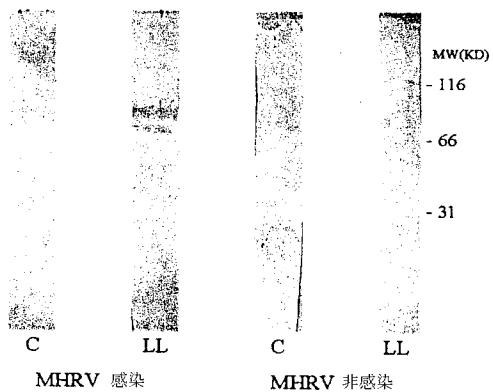
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】

```

1 50
LL AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG
MT AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG
S93-268102 AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG
UV AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG
S92-4336 AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG
BR AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAAC TA AAGCAGGTAG

51 100
LL GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
MT GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
S93-268102 GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
UV GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
S92-4336 GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
BR GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA

101 150
LL AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT
MT AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT
S93-268102 AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT
UV AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT
S92-4336 AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT
BR AAGCAGCTTT AGAACCATT CAAAGAGAAG AAGATAGTGT TTCAGTTTCT

151 200
LL GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA
MT GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA
S93-268102 GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA
UV GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA
S92-4336 GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA
BR GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAGAAA

201 250
LL ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
MT ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
S93-268102 ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
UV ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
S92-4336 ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
BR ATCCCGAATA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG

251 300
LL TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
MT TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
S93-268102 TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
UV TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
S92-4336 TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
BR TAATGGCTCA GTCAACGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG

301
LL GTTG (配列番号: )
MT GTTG (配列番号: )
S93-268102 GTTG (配列番号: )
UV GTTG (配列番号: 14 )
S92-4336 GTTG (配列番号: 13 )
BR GTTG (配列番号: 14 )

```



**WO 03/016491 A2** 

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 03/016491

PCT/US02/26249

## RETROVIRUS ISOLATED FROM MANTLE HISTIOCYTES IN MANTLE CELL LYMPHOMA

## STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH

This invention was made with government support under grant no. U01:CA 66529  
5 awarded by the National Institutes of Health. The government may have certain rights in  
this invention.

## FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a human retrovirus, particularly to a human  
10 retrovirus isolated from a human , non-Hodgkins lymphoma, specifically a mantle cell  
lymphoma.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

As human beings age, they begin to develop a variety of chronic diseases the  
15 etiologies of which remain unclear at this time. These chronic diseases affect virtually all  
organ systems of the body. Several animal models of chronic disease involve viral infection,  
especially retroviral infection. For example, murine leukemia viruses have been implicated  
in causing lymphoma, autoimmune and immunodeficiency diseases. The study of these  
types of animal models suggested that retroviruses play significant roles in those disease  
20 states. However, the extrapolation of findings within animal models to humans have not  
proven very successful in the identification of fully infectious retroviruses associated with  
chronic immunologic diseases outside of HTLV (with lymphoma), HIV (with AIDS), and  
HuLAV (with human B-cell, non-Hodgkins lymphoma (U.S. Pat. No. 5,108,920).

In searching for potential agents associated with other chronic diseases a vast array of  
25 human endogenous retroviral elements were discovered and characterized (Lower et al. Proc  
Natl Acad Sci 93:5177-5184 (1996); Tonjes et al. J Virol 73(11):9187-9195 (1999);  
Sverdlov Bioessays 22(2):161-171 (2000)). The closest class of endogenous retroviral  
element identified in humans to those associated with chronic disease in mouse disease  
models are the human endogenous retroviruses (HERV) (Wilier et al. Virus Genes  
30 15(2):123-133 (1997)). Evidence for expression of HERV related genes or antibodies to  
HERV elements have been identified in a variety of chronic diseases such as terato  
carcinoma (Boller et al. J Virol 71:4581-4588 (1997); Boller et al. Virology 196:349-353  
(1993)), lymphoma (Lower et al., (1996) supra), multiple sclerosis (Clerici et al. J  
Neuroimmunol 99(2):173-182 (1999); Trabattoni et al. J Neurovirol 6(Suppl 2):S38-41

WO 03/016491

PCT/US02/26249

(2000)), autoimmune rheumatic diseases (Nelson et al. *Immunol Invest* 28(4):277-289 (1999)), and most recently schizophrenia (Yolken et al. *Brain Res Rev* 31(2-3):193-199 (2000)). However, as human endogenous retroviral elements make up almost 1% of the human genome and each of these elements is highly related to other endogenous elements, their role in the pathogenesis of disease has been difficult to assess.

Despite the advances in identification of retroviruses and other agents associated with disease, identification of the causative or associated agents of many diseases remains elusive. Certain types of lymphoid malignancies are among such diseases. Three major categories of lymphoid malignancies have been recognized based on morphology and cell lineage: B-cell neoplasms, T-cell/natural killer (NK)-cell neoplasms, and Hodgkins lymphoma. B-cell and T-cell/NK neoplasms are often referred to as non-Hodgkins lymphomas. Both lymphomas and lymphoid leukemias are included in within these classifications because both solid and circulating phases are present in many lymphoid neoplasms. Within the B- and T-cell categories, two subdivisions are recognized: precursor neoplasms, which correspond to the earliest stages of differentiation, and more mature differentiated neoplasms. The aggressive lymphomas are particularly difficult to diagnose at an early stage, largely due to their primarily asymptomatic nature. Thus, diagnosis of the aggressive non-Hodgkins lymphomas is normally at a stage late in the course of disease, and the prognosis is normally poor.

Mantle cell lymphoma is an example of an aggressive, non-Hodgkins lymphoma. Mantle cell lymphoma is found in lymph nodes, the spleen, bone marrow, blood, and sometimes the gastrointestinal system (lymphomatous polyposis). Mantle cell lymphoma is generally characterized by CD5-positive follicular mantle B cells, a translocation of chromosomes 11 and 14, and an overexpression of the cyclin D1 protein. Like the low-grade lymphomas, mantle cell lymphoma appears incurable with anthracycline-based chemotherapy and occurs in older patients with generally asymptomatic advanced-stage disease. However, the median survival is significantly shorter (3-5 years) than that of other lymphomas; hence this histology is now considered to be an aggressive lymphoma. A diffuse pattern and the blastoid variant have an aggressive course with shorter survival, while the mantle zone type may have a more indolent course. It is unclear which chemotherapeutic approach offers the best long-term survival in this clinicopathologic entity; refractoriness to chemotherapy is a usual feature. Many investigators are exploring high-dose therapy with stem cell/marrow support or the use of interferon or anti-CD20 antibodies after CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Identification of agents of chronic disease such as cancer are important, not only for diagnosis of affected patients and development of anti-cancer drugs, but also in the prevention of the spread of chronic disease where causative agent is transmissible, e.g., through blood transfusion, transplant of infected tissues, sharing or re-use of needles, sexual contact, and the like. Transmission of lymphoma from a donor to a recipient can occur due to direct infection with the virus.

There is a need in the field for identification of agents that are associated with (and thus can serve as a marker for) or cause cancers of unknown etiology. Furthermore, identification of agents associated with chronic diseases, such as cancer, allow for screening of biological materials for the associated agent prior to use (e.g., screening of blood, blood products, tissues, and the like). The present invention addresses this need.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention features an isolated, intact virus associated with human lymphoma, and originally isolated from a mantle cell lymphoma, referred to herein as a mantle histiocyte retrovirus (MHRV). The invention also features compositions and methods for detecting MHRV, as well as methods and compositions for propagating MHRV *in vitro*, screening for anti-MHRV agents, and generation of attenuated MHRV strains.

In one aspect the invention features, an isolated mantle histiocyte retrovirus (MHRV) particle. In specific embodiments, the MHRV particle comprises an RNA genome encoding a GAG polypeptide comprising an amino acid sequence of amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8. In other specific embodiment, the MHRV particle comprises an RNA genome characterized in that PCR amplification using a first primer comprising SEQ ID NO:2 and a second primer comprising SEQ ID NO:3 produces an amplification product of about 304 bp, which amplification product may comprise the sequence of SEQ ID NO:1. In still further specific embodiments, the MHRV particle contains an RNA genome that, following infection and activity of viral reverse transcriptase, generates a cDNA that hybridizes under conditions of high stringency to a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1. In another embodiment, the MHRV viral particle comprises an RNA molecule comprising a sequence corresponding to SEQ ID NO:1. In still another embodiment, the MHRV particle is characterized by being isolatable from a human lymphoma; having a particle diameter of from about 90 nm to 110 nm; having a membrane lipid bilayer; having an RNA genome visible by electron microscopy as a conical eccentric nucleoid; and having a GAG envelope polypeptide comprising amino acid residues 1-22 of the amino acid sequence of SEQ ID

WO 03/016491

PCT/US02/26249

NO:8 or, alternatively or in addition, having an RNA genome comprising a nucleic acid sequence corresponding to nucleotide residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

In related aspects, the invention features an isolated mammalian cell (*e.g.*, a macrophage) infected with an MHRV viral particle. Optionally, the infected cell produces  
5 MHRV particles.

In another aspect, the invention features an isolated polynucleotide (referred to herein without limitation as an MHRV polynucleotide) comprising a sequence encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 4 contiguous amino acid residues of amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8. In related aspects, the invention features an  
10 isolated MHRV polynucleotide comprising a sequence of at least 12 contiguous residues of nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7; an isolated polynucleotide comprising a sequence that hybridizes under conditions of high stringency to at least a portion of the polynucleotide sequence of nucleotides 1-66 of SEQ ID NO:7; an isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 65% identity to at least 12 contiguous nucleotides of  
15 nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

In related aspects, the invention features an isolated recombinant host cells and isolated vectors containing the polynucleotide of the invention.

In another aspect, the invention features an isolated MHRV GAG polypeptide. In related aspects, the isolated polypeptide is encoded by an MHRV GAG polynucleotide as  
20 described above. In further related aspects, the invention features an isolated antibody that specifically binds an isolated MHRV GAG polypeptide.

In another aspect the invention features a method for detecting MHRV by contacting a biological sample suspected of containing MHRV with an MHRV-specific probe for a time sufficient for binding of the MHRV-specific probe to the sample to form complexes between  
25 the probe and a probe target; and detecting complexes of the MHRV-specific probe and the probe target in the sample. Detection of complexes in the sample indicates MHRV is present in the sample.

In specific embodiments of the MHRV detection methods above, the probe target is nucleic acid, and the MHRV-specific probe is a nucleic acid and comprises at least 8  
30 contiguous nucleotide residues of SEQ ID NO:1; or at least 8 contiguous nucleotide residues of residues 1-66 of SEQ ID NO:7. In other embodiments, the MHRV-specific probe is an MHRV-specific antibody and the probe target is an MHRV GAG polypeptide. In still other embodiments, the probe target is an anti-MHRV antibody and the MHRV-specific probe is a polypeptide comprising amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8. In related embodiments,

WO 03/016491

PCT/US02/26249

the biological sample is blood, a blood-derived product, plasma, serum, or tissue containing a macrophage or a macrophage-derived tumor cell.

In another aspect, the invention features a method for detecting MHRV in a sample comprising: contacting a biological sample suspected of containing MHRV with a first MHRV-specific nucleic acid probe and with a second MHRV-specific nucleic acid probe, wherein the first probe and the second probe each comprise at least 15 contiguous nucleotides of a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:7 or complement thereof, and where contacting is under conditions effective to produce an amplified DNA product; and detecting the amplified DNA product. Detection of amplified DNA product corresponding to an amplified DNA product expected from a nucleic acid sequence comprising SEQ ID NO:7 indicates the MHRV is present in the sample.

In specific embodiments of the MHRV detection methods of the invention, the first probe comprises a sequence selected from the group consisting of HERV-9 and HERV-10. In other specific embodiments; the second probe comprises a sequence selected from the group consisting of HERV-8, HERV-11, and HERV-12. In still other embodiments, the first probe is HERV-8, the second probe is HERV-9, wherein detection of an amplified product of about 304 bp indicates MHRV is in the sample; the first probe is HERV-9 the second probe is HERV-12, wherein detection of an amplified product of about 1321 bp indicates MHRV is in the sample; or the first probe is HERV-10 the second probe is HERV-11, wherein detection of an amplified product of about 1966 bp indicates MHRV is in the sample.

In another aspect the invention features a kit for detection of mantle histiocyte retrovirus (MHRV), the kit comprising an MHRV-specific probe, wherein the probe is an MHRV-specific nucleic acid probe that specifically hybridizes to a sequence encoding an MHRV GAG polypeptide; an MHRV-specific GAG antibody; or an MHRV polypeptide that specifically binds an anti-MHRV GAG polypeptide.

In another aspect, the invention features a method of screening for anti-MHRV antiviral agents, the method comprising: contacting a candidate agent with a culture comprising a mammalian cell infected with MHRV, which cell produces viral particles; and detecting MHRV viral particles in supernatant of the culture. Detection of a decrease in MHRV viral particles in the supernatant indicates that the candidate agent has activity as an anti-MHRV antiviral agent.

In still another aspect the invention features a method for detecting an MHRV-associated disease, the method comprising: contacting a biological sample with an MHRV-

WO 03/016491

PCT/US02/26249

specific probe, wherein the biological sample was obtained from a subject suspected of having an MHRV-associated disease, said contacting being for a time sufficient for binding of the MHRV-specific probe to the sample to form complexes between the probe and a probe target; and detecting complexes of the MHRV-specific probe and the probe target in the sample. Detection of complexes in the sample indicates MHRV is present in the sample, and that the subject may have an MHRV-associated disease. In related embodiments, the MHRV-associated disease is an MHRV-associated lymphoma, teratocarcinoma, multiple sclerosis, autoimmune rheumatic diseases, or schizophrenia.

In another aspect the invention features a method for producing an MHRV GAG polypeptide, the method comprising the steps of culturing a recombinant host cell containing a recombinant MHRV GAG polypeptide-encoding polynucleotide sequence under conditions suitable for the expression of the polypeptide; and recovering the polypeptide from the host cell culture.

In another aspect the invention features an immunogenic composition comprising an immunogenic polypeptide, wherein the immunogenic polypeptide comprises an amino acid sequence of amino acid residues 1-22 of a GAG polypeptide of mantle histiocyte retrovirus (MHRV).

In another aspect the invention features an immunogenic composition comprising a nucleic acid molecule having a sequence encoding an immunogenic polypeptide, wherein the immunogenic polypeptides comprises an amino acid sequence of amino acid residues 1-22 of a GAG polypeptide of mantle histiocyte retrovirus (MHRV), and wherein the nucleic acid sequence is adapted for expression in a mammalian cell.

In another aspect, the invention features an isolated recombinant MHRV vector comprising a viral genome comprising an MHRV polynucleotide (*e.g.*, a polynucleotide encoding at least 4 contiguous amino acid residues of 1-22 of SEQ ID NO:8), at least one restriction site suitable for insertion of a heterologous nucleic acid, and a nucleic acid of interest comprising a sequence heterologous to the MHRV polynucleotide, wherein the nucleic acid is operably inserted for expression in a host upon introduction of the MHRV vector into the host cell. In specific embodiments, the restriction site is non-naturally occurring in the MHRV genome.

In another aspect, the invention features an isolated recombinant MHRV particle comprising a recombinant MHRV genome comprising an MHRV polynucleotide (*e.g.*, a polynucleotide encoding at least 4 contiguous amino acid residues of 1-22 of SEQ ID NO:8), and at least one restriction site suitable for insertion of a heterologous nucleic acid. In

WO 03/016491

PCT/US02/26249

specific embodiments, the recombinant MHRV particle comprises a nucleic acid having a sequence heterologous to the MHRV polynucleotide, wherein the nucleic acid is operably inserted for expression in a host upon introduction of the MHRV vector into the host cell. In other specific embodiments, the MHRV particle is replication-defective or replication  
5 competent.

## BRIEF DESCRIPTIONS OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a schematic showing the arrangement of the MHRV genome, as well as the regions of homology to HERV-K109, the relative positions of primers used to amplify the  
10 MHRV GAG-encoding region, and the sequences of the primers and the amplified 304 bp PCR product generated using the HERV-8 and HERV-9 primers. Numbers along the schematics showing the MHRV genomic arrangement and the regions of homology refer to corresponding nucleotide residue positions in the MHRV genome.

Fig. 2 is a graph showing the levels of PCNA in peripheral blood mononuclear cells  
15 isolated from control (Normals), AIDS lymphoma (HIV-non-Hodgkin's lymphoma), and non-HIV lymphoma subjects.

Fig. 3 is a photograph showing a follicular lymphoma with atypical mitotic figure in presumed follicular dendritic cells in a subject having a non-HIV lymphoma.

Fig. 4 is a photograph showing the histology of the mantle cell lymphoma from  
20 which MHRV was isolated.

Fig. 5 is a photograph of a transmission electron microscopy image of MHRV in infected macrophages.

Fig. 6 is a schematic detailing the strategy used to clone the MHRV genome.

Fig. 7 is a photograph showing the results of PCR amplification using MHRV GAG-  
25 specific primers and nucleic acid from an AIDS-Non-Hodgkin's lymphoma (AIDS-NHL) and the original mantle cell lymphoma DNA (MCL-1) as a positive control. A = AIDS-NHL DNA; B = MCL-1 DNA.

Fig. 8 is a photograph showing the results of PCR amplification using MHRV GAG-  
30 specific primers on RNA isolated from a primary macrophage culture infected with isolated MHRV particles.

Fig. 9 is a Western blot of MHRV-infected and MHRV-uninfected cells without (C = control) and with (LL) plasma antibody from an MHRV-infected patient. Anti-IgG-AP antibody was used to detect plasma antibody binding.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Fig. 10 is an alignment of DNA sequences of PCR products (SEQ ID NO: 12-14) generated from different lymphomas within the 304 bp MHRV gag segment.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 Before the present invention and specific exemplary embodiments of the invention are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular embodiments described, as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by  
10 the appended claims.

Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates otherwise, between the upper and lower limit of that range and any other stated or intervening value in that stated range is encompassed within the invention. The upper and lower limits of these  
15 smaller ranges may independently be included in the smaller ranges is also encompassed within the invention, subject to any specifically excluded limit in the stated range. Where the stated range includes one or both of the limits, ranges excluding either both of those included limits are also included in the invention.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same  
20 meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference to disclose and describe the methods and/or materials in  
25 connection with which the publications are cited.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a viral particle" includes a plurality of such viral particles and reference to "the cell" includes reference to one or more cells and equivalents thereof  
30 known to those skilled in the art, and so forth.

The publications discussed herein are provided solely for their disclosure prior to the filing date of the present application. Nothing herein is to be construed as an admission that the present invention is not entitled to antedate such publication by virtue of prior invention.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Further, the dates of publication provided may be different from the actual publication dates which may need to be independently confirmed.

## DEFINITIONS

5 "Mantle histiocyte retrovirus" (MHRV) as used herein is meant to refer to a human retrovirus described herein, which can be generally characterized by any one or more of the following characteristics: 1) being isolatable from a human mantle cell lymphoma (as described herein); 2) virion particles of about 90 nm to 110 nm in diameter as observed by electron microscopy; 3) having a membrane lipid bilayer; 4) a conical eccentric nucleoid  
10 containing an RNA genome. At the protein level, MHRV is characterized in that the viral particle has a GAG core polypeptide comprising amino acid residues 1-22 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:8. At the nucleic acid sequence level, MHRV is characterized in that the RNA genome comprises a nucleic acid sequence corresponding to nucleotide  
15 residues 1-66 of SEQ ID NO:7, which is a portion of a GAG-encoding sequence that is unique to MHRV. By "corresponding to nucleotide residues" in this context is meant that the RNA has the sequence of the provided DNA sequence, except that the deoxyribonucleotides thymine (T) is replaced with ribonucleotide uracil (U). It is noted that reference to MHRV as being isolated from a human mantle cell lymphoma is not intended to  
20 limit the definition to only MHRV isolated from this source, but is rather only a means of isolating and describing the virus of the invention.

By "isolated viral nucleic acid" or "isolated viral polypeptide" is meant that the MHRV viral protein or peptide provided by the invention is at least 60%, by weight, free from the proteins and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably, the preparation is at least 75%, more preferably at least 90%, and  
25 most preferably at least 99%, by weight, MHRV polypeptide. An isolated viral protein or peptide may be obtained, for example, by extraction from an MHRV virus particle, which can be obtained from a macrophage of a human mantle cell lymphoma,; by expression of a recombinant nucleic acid encoding an MHRV viral protein or peptide; or by chemically synthesizing the protein or peptide. Purity can be measured by any appropriate method, e.g.,  
30 column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis.

The terms "polynucleotide" and "nucleic acid", used interchangeably herein, refer to a polymeric forms of nucleotides of any length, either ribonucleotides or deoxynucleotides. Thus, these terms include, but are not limited to, single-, double-, or multi-stranded DNA or RNA, genomic DNA, cDNA, DNA-RNA hybrids, or a polymer comprising purine and

WO 03/016491

PCT/US02/26249

pyrimidine bases or other natural, chemically or biochemically modified, non-natural, or derivatized nucleotide bases. These comprise intronic and exonic sequences (see, *e.g.*, Niwa et al. (1999) Cell 99(7):691-702).

5 The backbone of the polynucleotide can comprise sugars and phosphate groups (as may typically be found in RNA or DNA), or modified or substituted sugar or phosphate groups. Alternatively, the backbone of the polynucleotide can comprise a polymer of synthetic subunits such as phosphoramidites and thus can be an oligodeoxynucleoside phosphoramidate or a mixed phosphoramidate-phosphodiester oligomer. Peyrottes et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:2318-10 2323. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and nucleotide analogs, uracyl, other sugars, and linking groups such as fluororibose and thioate, and nucleotide branches. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. Other types of modifications included in 15 this definition are caps, substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, and introduction of means for attaching the polynucleotide to proteins, metal ions, labeling components, other polynucleotides, or a support (*e.g.*, to a solid or semi-solid support, to a support for use as an array, and the like). Polynucleotides can be provided in a variety of forms, *e.g.*, associated with an array or provided as part of a library of 20 polynucleotides (*e.g.*, a library of vectors containing polynucleotides of interest, a library of recombinant host cells containing such vectors, and the like).

It is understood that reference to DNA in the context of the RNA virus MHRV, and other RNA viruses, is meant to refer to a DNA sequence as it would be produced from the genomic RNA, without limitation as to the method of making the DNA sequence. Similarly, 25 its is understood that DNA sequences of MHRV sequences, and other RNA viruses, encompasses the corresponding RNA, where uracil (U) is substituted for thymine (T), and further encompasses the complementary strand and its corresponding RNA sequence.

The terms "polypeptide" and "protein", used interchangeably herein, refer to a polymeric form of amino acids of any length, which can include coded and non-coded amino 30 acids, chemically or biochemically modified (*e.g.*, post-translational modification such as glycosylation) or derivatized amino acids, polymeric polypeptides, and polypeptides having modified peptide backbones. The term includes fusion proteins, including, but not limited to, fusion proteins with a heterologous amino acid sequence, fusions with heterologous and homologous leader sequences, with or without N-terminal methionine residues;

WO 03/016491

PCT/US02/26249

immunologically tagged proteins; and the like. Polypeptides can also be modified to, for example, facilitate attachment to a support (e.g., to a solid or semi-solid support, to a support for use as an array, and the like).

As used herein, a polynucleotide "derived from" a designated sequence refers to a  
5 polynucleotide sequence which is comprised of a sequence of approximately at least about 6  
contiguous nucleotides, at least about 8 nucleotides, at least about 10-12 contiguous  
nucleotides, and at least about 15-20 contiguous nucleotides corresponding to a region of the  
designated nucleotide sequence. "Corresponding" means homologous to or complementary  
to the designated sequence. Preferably, the sequence of the region from which the  
10 polynucleotide is derived is homologous to or complementary to a sequence which is unique  
to an MHRV genome.

Whether or not a sequence is unique to the MHRV genome can be determined by  
techniques known to those of skill in the art. For example, the sequence can be compared to  
sequences in databanks, e.g., GenBank, to determine whether it is present in the uninfected  
15 host or other organisms. The sequence can also be compared to the known sequences of  
other viral agents, including other retroviruses, particularly human endogenous retroviruses,  
and to members of Retroviridae. The correspondence or non-correspondence of the derived  
sequence to other sequences can also be determined by hybridization under the appropriate  
stringency conditions. Hybridization techniques for determining the complementarity of  
20 nucleic acid sequences are known in the art, and are discussed infra. See also, for example,  
Maniatis et al. (1982). In addition, mismatches of duplex polynucleotides formed by  
hybridization can be determined by known techniques, including for example, digestion with  
a nuclease such as S1 that specifically digests single-stranded areas in duplex  
polynucleotides. Regions from which typical DNA sequences may be "derived" include but  
25 are not limited to, for example, regions encoding specific epitopes, as well as non-  
transcribed and/or non-translated regions.

The derived polynucleotide is not necessarily physically derived from the nucleotide  
sequence shown, but may be generated in any manner, including for example, chemical  
synthesis or DNA replication or reverse transcription or transcription. In addition,  
30 combinations of regions corresponding to that of the designated sequence may be modified  
in ways known in the art to be formulated with an intended use.

Similarly, a polypeptide or amino acid sequence "derived from" a designated nucleic  
acid sequence refers to a polypeptide having an amino acid sequence identical to that of a  
polypeptide encoded in the sequence, or a portion thereof wherein the portion consists of at

WO 03/016491

PCT/US02/26249

least 3-5 contiguous amino acids, and more preferably at least 8-10 contiguous amino acids, and even more preferably at least 11-15 contiguous amino acids, or which is immunologically identifiable with a polypeptide encoded in the sequence. This terminology also includes a polypeptide expressed from a designated nucleic acid sequence.

5 A recombinant or derived polypeptide is not necessarily translated from a designated nucleic acid sequence, for example, the sequence encoding MHRV GAG polypeptide as set forth in SEQ ID NO:7, or from an MHRV genome; it may be generated in any manner, including for example, chemical synthesis, or expression of a recombinant expression system, or isolation from MHRV, including mutated MHRV. A recombinant or derived  
10 polypeptide may include one or more analogs of amino acids or unnatural amino acids in its sequence. Methods of inserting analogs of amino acids into a sequence are known in the art. It also may include one or more labels, which are known to those of skill in the art.

The term "recombinant polynucleotide" as used herein intends a polynucleotide of genomic, cDNA, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or  
15 manipulation: (1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature, (2) is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature, or (3) does not occur in nature.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence  
20 "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences.

An "open reading frame" (ORF) is a region of a polynucleotide sequence which encodes a polypeptide; this region may represent a portion of a coding sequence or a total coding sequence.

25 A "coding sequence" is a polynucleotide sequence which is transcribed into mRNA and/or translated into a polypeptide when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus. A coding sequence can include, but is not limited to mRNA, cDNA, and recombinant polynucleotide sequences.

30 By "heterologous", as used in, for example, the phrase "promoter element heterologous to a MHRV GAG polynucleotide" is meant that the two elements joined are not normally found joined together in nature, e.g., are from different sources (e.g., the promoter element is not joined to the polynucleotide encoding an MHRV GAG polypeptide found in nature).

WO 03/016491

PCT/US02/26249

"Transformation", as used herein, refers to the insertion of an exogenous polynucleotide into a host cell, irrespective of the method used for the insertion, for example, direct uptake, transduction, F-mating or electroporation. The exogenous polynucleotide may be maintained as a non-integrated vector, for example, a plasmid, or alternatively, may be  
5 integrated into the host genome.

By "specifically binds" as used in the context of an MHRV polynucleotide (*e.g.*, nucleic acid probe) or polypeptide (*e.g.*, as detected using an antibody that specifically binds the polypeptide) means that the MHRV polynucleotide or polypeptide can be used as a marker for MHRV so that MHRV is detected so as to be distinguished from non-MHRV  
10 polynucleotides or non-MHRV polypeptides. For example, a specific MHRV polynucleotide is one that can be used to specifically detect MHRV nucleic acid (in, *e.g.*, nucleic acid amplification- or hybridization-based assays) so as to differentiate MHRV nucleic acid from non-MHRV nucleic acid. Similarly, a specific MHRV polypeptide is a polypeptide that can be detected (*e.g.*, by antibody-based assay) so as to specifically detect  
15 MHRV in a sample and differentiate MHRV polypeptide from non-MHRV polypeptides. Similarly, an MHRV-specific antibody is an antibody that can be used in detection of an MHRV-specific polypeptide or MHRV-specific epitope so as to specifically detect MHRV in a sample and differentiate MHRV polypeptide from non-MHRV polypeptides.

"MHRV marker" as used herein is meant to refer to a biological molecule that can be  
20 detected in a sample, and which indicates the presence, or prior presence (*e.g.*, prior exposure), of the source of the sample to MHRV. Exemplary MHRV markers include MHRV viral particles, MHRV nucleic acid that are specific for MHRV, MHRV polypeptides that are specific for MHRV, and anti-MHRV antibodies.

"Biological samples", particularly as used in the context of detection of MHRV,  
25 refers to any biological material obtained from a subject, generally a human subject. Such material includes, but is not necessarily limited to, a sample of tissue or fluid isolated from an individual, including but not limited to, for example, blood, blood-derived products, plasma, serum, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, milk, blood cells, cells (*e.g.*, macrophages,  
30 bone marrow, cancerous cells of a lymphoma, tumor cells, pre-cancerous cells (*e.g.*, dysplastic cells), and the like), tumors, organs, and also samples of in vitro cell culture constituents (including but not limited to conditioned medium resulting from the growth of cells in cell culture medium, putatively virally infected cells, recombinant cells, and cell components).

WO 03/016491

PCT/US02/26249

"Subjects" or "patients" as used herein is meant to encompass any subject or patient amenable to application of the methods of the invention, e.g., diagnostic methods. Mammalian subjects and patients, particularly human subjects or patients are of particular interest.

5 As used herein, the terms "macrophage" and "monocyte" are used interchangeably, as it is understood that in the art the term "monocyte" is often used to describe a circulating mononuclear cell that expresses the CD14 cell surface marker, and when in a tissue this cell is also classified as a macrophage.

10 A "proliferating macrophage" is a term understood in the art and as used herein denotes a macrophage which is dividing. Normally a macrophage is a terminally differentiated cell incapable of further division. For purposes of this invention, a "proliferating macrophage" is capable of further division or is in a portion of the cell cycle not considered to be terminal or end stage. Proliferation may be clonal, i.e., is derived from a single cell.

15 As used herein, detecting the "presence of proliferating macrophages" generally means detecting the level of proliferating macrophages. It is understood that an absolute or even relative level need not be determined; an observation of detectable proliferating macrophages is sufficient.

20 "Microarray" and "array," as used interchangeably herein, comprise a surface with an array, preferably ordered array, of putative binding (e.g., by hybridization) sites for a biochemical sample (target) which often has undetermined characteristics. In a preferred embodiment, a microarray refers to an assembly of distinct polynucleotide or oligonucleotide probes immobilized at defined positions on a substrate. Arrays are formed on substrates fabricated with materials such as paper, glass, plastic (e.g., polypropylene, nylon), polyacrylamide, nitrocellulose, silicon, optical fiber or any other suitable solid or semi-solid support, and configured in a planar (e.g., glass plates, silicon chips) or three-dimensional (e.g., pins, fibers, beads, particles, microtiter wells, capillaries) configuration.

25 Probes forming the arrays may be attached to the substrate by any number of ways including (i) *in situ* synthesis (e.g., high-density oligonucleotide arrays) using photolithographic techniques (see, Fodor et al., *Science* (1991), 251:767-773; Pease et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994), 91:5022-5026; Lockhart et al., *Nature Biotechnology* (1996), 14:1675; U.S. Pat. Nos. 5,578,832; 5,556,752; and 5,510,270); (ii) spotting/printing at medium to low-density (e.g., cDNA probes) on glass, nylon or nitrocellulose (Schna et al., *Science* (1995), 270:467-470, DeRisi et al., *Nature Genetics* (1996), 14:457-460; Shalon

WO 03/016491

PCT/US02/26249

et al., *Genome Res.* (1996), 6:639-645; and Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995), 93:10539-11286); (iii) by masking (Maskos and Southern, *Nuc. Acids. Res.* (1992), 20:1679-1684) and (iv) by dot-blotting on a nylon or nitrocellulose hybridization membrane (see, e.g., Sambrook et al., Eds., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y.)). Probes may also be noncovalently immobilized on the substrate by hybridization to anchors, by means of magnetic beads, or in a fluid phase such as in microtiter wells or capillaries. The probe molecules are generally nucleic acids such as DNA, RNA, PNA, and cDNA but may also include proteins, polypeptides, oligosaccharides, cells, tissues and any permutations thereof which can specifically bind the target molecules.

"Treatment" as used herein refers to prophylaxis and/or therapy.

As used herein, "purified MHRV" refers to a preparation that is enriched for MHRV, or a preparation having isolated MHRV, which preparation has been obtained from the cellular constituents with which the virus is normally associated, and from other types of viruses which may be present in the infected tissue. The techniques for isolating viruses are known to those of skill in the art, and include, for example, centrifugation, affinity chromatography, and the like.

The term "MHRV particle" as used herein include entire virion as well as particles which may be intermediates in virion formation. MHRV particles generally have one or more MHRV polypeptides associated with MHRV nucleic acid.

As used herein, the term "probe" refers to a molecule useful in specific detection of MHRV. "Probes" thus include, a polynucleotide that specifically hybridizes to an MHRV polynucleotide in a target region, due to complementarity of at least one sequence in the probe with a sequence in the target region. Unless specifically noted otherwise, probes encompass primers (e.g., primers used in PCR-based amplification of a region adjacent a target region). "Probes" also include antibodies that specifically bind an MHRV polypeptide, as well as MHRV polypeptides that specifically bind anti-MHRV antibodies. The meaning of probe will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan from the context of the use of the term.

An "MHRV-specific probe" is a molecule (e.g., nucleic acid, antibody, polypeptide) that specifically binds an MHRV-specific probe target. Exemplary MHRV-specific probes include nucleic acid that specifically hybridizes to a unique sequence of MHRV, nucleic acid primer pairs that facilitate amplification of an MHRV-specific nucleic acid sequence; an

WO 03/016491

PCT/US02/26249

anti-MHRV GAG polypeptide that specifically binds the GAG of MHRV, and an MHRV GAG polypeptide that specifically binds an anti-MHRV GAG antibody.

As used herein, the term "target region" as used in the context of a nucleic acid probe refers to a region of the nucleic acid which is to be amplified and/or detected. "Target region" as used in the context of antibody-polypeptide (antibody-antigen) complex formation refers to a region of the polypeptide that forms the epitope specifically bound by the antibody.

"Probe target" as used herein is meant to refer to a molecule to which an MHRV-specific probe specifically binds. The probe target can be nucleic acid (RNA or DNA), an antibody, or a polypeptide. Combinations of probes and probe targets described herein will be readily apparent to one of ordinary skill in the art upon reading the present specification.

As used herein, the term "viral nucleic acid", which includes MHRV nucleic acid, refers to nucleic acid from the viral genome, fragments thereof, transcripts thereof, and mutant sequences derived therefrom. Viral nucleic acid can be derived from any source, e.g., cells, synthetic production techniques, recombinant expression techniques, and the like.

By "MHRV-associated disease" is meant a disease associated with cells having genomically integrated MHRV nucleic acid. MHRV-associated lymphomas are an example of such MHRV-associated diseases.

By "MHRV-associated lymphoma" is meant a lymphoma having cells in which MHRV nucleic acid is genomically integrated. The lymphoma may be one which has MHRV as its primary causative agent, or one in which MHRV is commonly found or associated, but which is not primarily caused by MHRV.

"Recombinant host cells", "host cells", "cells", "cell lines", "cell cultures", and other such terms denoting microorganisms or higher eukaryotic cells cultured as unicellular entities refer to cells which can be, or have been, used as recipients for recombinant vector or other transfer DNA, and include the progeny of the original cell which has been transfected. It is understood that the progeny of a single parental cell may not necessarily be completely identical in morphology or in genomic or total DNA complement as the original parent, due to natural, accidental, or deliberate mutation.

30

#### OVERVIEW

The present invention is based on the discovery of a novel retrovirus, referred to herein as mantle histiocyte retrovirus (MHRV). MHRV is associated with human lymphoma, and is the first replication competent human retrovirus having significant

WO 03/016491

PCT/US02/26249

elements shared with a human endogenous retrovirus (HERV), specifically HERV-K109. The virus of the invention was initially isolated from macrophages of a mantle cell lymphoma, and thus was named MHRV to reflect such. However, the inventors have detected MHRV in other lymphomas, including AIDS large cell lymphoma and non-AIDS follicular lymphoma. Thus, the name MHRV is not intended to be limiting, as these findings indicate that MHRV is associated with human cancers such as lymphomas, inclusive of mantle cell lymphoma.

MHRV is transmissible and can cause lymphoma in the recipient as demonstrated by the ability of cells from which MHRV was isolated to produce lymphoma in an animal model. In view of such, the invention also provides methods and compositions for detection of MHRV in biological samples, which can be used in the context of diagnosis as well as in prevention (e.g., in screening of blood, blood products, and tissues prior to transfer to a recipient).

Various aspects of the invention will now be described in more detail.

#### MANTLE HISTIOCYTE RETROVIRUS (MHRV)

Mantle histiocyte retrovirus (abbreviated herein as MHRV) was originally isolated from a human mantle cell lymphoma. MHRV particles are approximately 90 nm to 110 nm in diameter as observed by electron microscopy, and have a membrane lipid bilayer encapsulating a conical eccentric nucleoid containing the RNA genome. Retroviral morphology observed was of the B/D-type. The regions of the MHRV genome corresponding to the 5'LTR (long terminal repeat), pro, poly, env, and 3'LTR regions share approximately 98-100% homology with the human endogenous retrovirus (HERV) designated HERV-K109 (see Fig. 1). The gag region of MHRV is, by contrast, only 93% homologous to the gag of HERV-K109. This observation suggests the MHRV is a result of a recombination event with HERV-K109 and another exogenous virus. As a result, the region of the MHRV genome extending from about nucleotide residue 1246 to about nucleic residue 3445, the region corresponding to the GAG-encoding sequence, as well as the GAG polypeptide itself, serve as markers for MHRV.

The invention also encompasses methods for identifying macrophage-tropic viruses such as MHRV. In general, these methods are based upon the methods that led to the identification of MHRV, which are described in detail in the Examples section below. For example, tissues are first identified by histologic inspection as having pathogenic, proliferative macrophages (as defined by, for example, expression of CD68 and PCNA).

WO 03/016491

PCT/US02/26249

These tissues or pathogenic macrophages are then cocultivated with primary macrophages in a suitable culture medium for about one month. The culture can then be examined by electron microscopy of the cells for the presence of viruses. In addition, or alternatively, nucleic acid from the cultured cells can be screened or amplified (*e.g.*, by PCR) using the MHRV-specific primers described herein. The viral nucleic acid can be cloned using methods similar to those described herein for isolation and cloning of MHRV.

Various aspects of the invention based upon the isolated and identification of MHRV are discussed below in more detail.

10 MHRV NUCLEIC ACID, POLYPEPTIDES, AND POLYPEPTIDE-SPECIFIC ANTIBODIES

The invention features nucleic acid of MHRV, as well as MHRV polypeptides and antibodies that specifically bind such polypeptides. Each of these aspects of the invention is described in more detail below.

MHRV Nucleic Acid

15 In one aspect, the invention features polynucleotides of MHRV. "MHRV polynucleotides" as used herein generally refers to polynucleotides that can be used to specifically identify MHRV (*e.g.*, as in a nucleic acid probe in detection by hybridization or by sequence analysis) are of particular interest. Exemplary of such polynucleotides are those having at least a portion of a sequence of the GAG gene of MHRV, which sequence is useful in specific detection of MHRV nucleic acid (*e.g.*, in a biological sample). Exemplary MHRV GAG polynucleotide sequences encompassed by the invention include, but are not necessarily limited to, SEQ ID NOS: 1 and 7. Exemplary polynucleotides of the invention thus also encompass those having, as a contiguous sequence, a sequence immediately 5' of the MHRV GAG-encoding sequence (*e.g.*, a GAG open reading frame (ORF)) and a sequence within a 5' portion of the MHRV GAG-encoding region are also contemplated by the invention. Likewise, exemplary polynucleotides of the invention include polynucleotides having, as a contiguous sequence, a sequence within a 3' portion of the MHRV GAG-encoding region and a sequence immediately 3' of the MHRV GAG-encoding region.

30 Other specific, exemplary MHRV polynucleotides contemplated by the invention are those polynucleotides that encode an MHRV GAG polypeptide (about 112 amino acids in length), *e.g.*, the polypeptide of SEQ ID NO:8, as well as polynucleotide that specifically hybridizes to such a polynucleotide molecule or a portion thereof. An MHRV polynucleotide of particular interest is one comprising a sequence encoding a polypeptide

WO 03/016491

PCT/US02/26249

having an amino acid sequence of a 5' portion of an MHRV GAG polypeptide, *e.g.*, a polypeptide having at least an N-terminal region of the amino acid sequence of the contiguous amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, *e.g.*, at least about 1-4 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 2-5  
5 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 4-10 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 8-15 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 12-20 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, up to 22 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of  
10 SEQ ID NO:8. Further specific exemplary MHRV polynucleotides include polynucleotides having at least about 10 contiguous nucleotides, at least about 15 contiguous nucleotides, at least about 20 contiguous nucleotides, at least about 50 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:7.

The invention also encompasses polynucleotides having sequence complementary to  
15 the sequence of the polynucleotides described herein; RNA having a sequence corresponding to DNA sequences described herein; viral genes corresponding to the provided polynucleotides; polynucleotides obtained from the biological materials described herein or other biological sources (particularly human sources) (*e.g.*, by hybridization under stringent conditions, particularly conditions of high stringency); variants of the provided  
20 polynucleotides and their corresponding genes, particularly those variants that are present due to the degeneracy of the genetic code (referred to herein as "degenerate variants") and other variants that are specific to MHRV of the invention or retain a biological activity of the gene product encoded by a polynucleotide specifically described herein (*e.g.*, retain the biological activity of the GAG polypeptide in, for example, its reactivity of MHRV GAG-specific antibodies). Other nucleic acid compositions contemplated by and within the scope  
25 of the present invention will be readily apparent to one of ordinary skill in the art when provided with the disclosure here.

The polynucleotides of the subject invention can be isolated and obtained in substantial purity, generally as other than an intact chromosome or intact viral particle.  
30 Usually, the polynucleotides, either as DNA or RNA, will be obtained substantially free of other naturally-occurring nucleic acid sequences, generally being at least about 50%, usually at least about 90% pure and can be "recombinant", *e.g.*, flanked by one or more nucleotides with which it is not normally associated on a naturally occurring chromosome.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

The polynucleotides of the invention can be provided as a linear molecule or within a circular molecule, and can be provided within autonomously replicating molecules (vectors) or within molecules without replication sequences. Expression of the polynucleotides can be regulated by their own or by other regulatory sequences known in the art. The

5 polynucleotides of the invention can be introduced into suitable host cells using a variety of techniques available in the art, such as infection with transferrin polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated DNA transfer, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, protoplast fusion, viral infection, electroporation, gene gun, calcium phosphate-mediated transfection, and the like.

10 The host cells suitable for use in production of recombinant host cells can be any prokaryotic or eukaryotic cell suitable for, for example, maintenance and/or replication of vectors containing MHRV nucleic acid, or for replication and production of MHRV viral particles. Exemplary host cells include, but are not necessarily limited to, bacterial, yeast, and mammalian host cells. Isolated recombinant host cells containing MHRV nucleic acid  
15 are also contemplated by the invention. Isolated recombinant vectors or constructs containing MHRV nucleic acid are likewise contemplated by the invention. Such vectors can include other components for expression of polypeptides encoded by the MHRV nucleic acid (e.g., promoter elements, transcription termination elements, enhancers, and the like), as well as element for the maintenance, replication, or (optionally) genomic integration of the  
20 construct in the host cell (e.g., origin of replication, and the like).

The isolated MHRV polynucleotides of the invention can be provided with 5', 3' or both 5' and 3' flanking sequences. Suitable flanking sequences include, but are not necessarily limited to, promoter sequence, enhancer sequences, transcriptional start and/or stop sites, construct or vector sequences (e.g., sequences that provide for manipulation of the  
25 polynucleotide within a linear or circular molecule (e.g., plasmid), including, but not necessarily limited to, sequences for replication and maintenance of the construct or vector, sequences encoding gene products that provide for selection (e.g., antibiotic resistance or sensitivity, factors that affect growth in media with or without supplements, and the like)), sequences that provide for production of a fusion protein with the polynucleotide and a  
30 heterologous polypeptide (i.e., a polypeptide encoded by a polynucleotide that originates from a source other than the polynucleotide to which it is operably linked), and the like.

The polynucleotides of the invention include polynucleotides having sequence similarity or sequence identity. Nucleic acids having sequence similarity are detected by hybridization under low stringency conditions, for example, at 50°C and 10XSSC (0.9 M

WO 03/016491

PCT/US02/26249

saline/0.09 M sodium citrate) and remain bound when subjected to washing at 55°C in 1XSSC. Sequence identity can be determined by hybridization under stringent conditions, for example, at 50°C or higher and 0.1XSSC (9 mM saline/0.9 mM sodium citrate).

Hybridization of such sequences may be carried out under stringent conditions. By "stringent conditions" or "stringent hybridization conditions" is intended conditions under which a probe will hybridize to its target sequence to a detectably greater degree than to other sequences (e.g., at least 2-fold over background). Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. By controlling the stringency of the hybridization and/or washing conditions, target sequences that are 100% complementary to the probe can be identified (homologous probing). Alternatively, stringency conditions can be adjusted to allow some mismatching in sequences so that lower degrees of similarity are detected (heterologous probing). Generally, a probe is less than about 1000 nucleotides in length, preferably less than 500 nucleotides in length.

Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.5 M Na ion, typically about 0.01 to 1.0 M Na ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30°C for short probes (e.g., 10 to 50 nucleotides) and at least about 60°C for long probes (e.g., greater than 50 nucleotides). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. Exemplary low stringency conditions include hybridization with a buffer solution of 30 to 35% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) at 37°C., and a wash in 1X to 2XSSC (20.XSSC=3.0 M NaCl/0.3 M trisodium citrate) at 50 to 55°C. Exemplary moderate stringency conditions include hybridization in 40 to 45% formamide, 1.0 M NaCl, 1% SDS at 37°C., and a wash in 0.5X to 1XSSC at 55 to 60°C. Exemplary high stringency conditions include hybridization in 50% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37°C, and a wash in 0.1 X SSC at 60° to 65°C.

Specificity is typically the function of post-hybridization washes, the critical factors being the ionic strength and temperature of the final wash solution. For DNA-DNA hybrids, the  $T_m$  can be approximated from the equation of Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284:  $T_m=81.5^{\circ}\text{C}+16.6(\log M)+0.41(\% \text{GC})-0.61(\% \text{form})-500/L$ ; where M is the molarity of monovalent cations, % GC is the percentage of guanosine and cytosine nucleotides in the DNA, % form is the percentage of formamide in the hybridization solution, and L is the length of the hybrid in base pairs. The  $T_m$  is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of a complementary target

WO 03/016491

PCT/US02/26249

sequence hybridizes to a perfectly matched probe.  $T_m$  is reduced by about 1°C for each 1% of mismatching; thus,  $T_m$ , hybridization, and/or wash conditions can be adjusted to hybridize to sequences of the desired identity.

For example, if sequences with up to and including about 90% identity are sought, the  $T_m$  can be decreased 10°C. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ) for the specific sequence and its complement at a defined ionic strength and pH. However, severely stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 1, 2, 3, or 4°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ); moderately stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 6, 7, 8, 9, or 10°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ); low stringency conditions can utilize a hybridization and/or wash at 11, 12, 13, 14, 15, or 20°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ).

Using the equation, hybridization and wash compositions, and desired  $T_m$ , those of ordinary skill will understand that variations in the stringency of hybridization and/or wash solutions are within the scope of the present disclosure, as are variations in the lengths of the hybridization and wash steps (e.g., from minutes (e.g., 15 min to 30 min) to hours (e.g., 1-2 hrs to overnight). If the desired degree of mismatching results in a  $T_m$  of less than 45°C (aqueous solution) or 32°C (formamide solution), it is preferred to increase the SSC concentration so that a higher temperature can be used. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); and Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). See Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Nucleic acids of particular interest are those that are substantially identical to the provided polynucleotide sequences (e.g., genetically altered versions of the gene, and the like). Nucleic acids that hybridize to the provided polynucleotide sequences (SEQ ID NOS:1 or 7) under stringent hybridization conditions are also of particular interest. Nucleic acid probes, particularly labeled probes of DNA sequences, can be used to isolate homologous or related MHRV polynucleotides. The source of homologous nucleic acid can be any species, e.g. primate species, particularly human; rodents, such as rats and mice; canines, felines, bovines, ovines, equines, yeast, nematodes, and the like.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Generally, nucleic acid hybridization is performed using at least 15 contiguous nucleotides (nt) of a polynucleotide provided herein. Nucleic acid probes of at least 15 contiguous nt preferentially hybridize with a nucleic acid comprising the complementary sequence, allowing the detection, identification and retrieval of the nucleic acids that uniquely hybridize to the selected probe. Probes of more than 15 nt can be used, e.g., probes of from about 18 nt to about 100 nt in length, but 15 nt represents sufficient sequence for unique identification.

Sequence similarity and sequence identity can also be determined by sequence analysis. In general, sequence identity is calculated based on a reference sequence, which may be a subset of a larger sequence, such as a conserved motif, coding region, flanking region, and the like. A reference sequence will usually be at least about 18 contiguous nt long, more usually at least about 30 nt long, and may extend to the complete sequence that is being compared. Algorithms for sequence analysis are known in the art, such as gapped BLAST, described in Altschul, et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402. Sequence analysis can be performed using the Smith-Waterman homology search algorithm as implemented in MPSRCH program (Oxford Molecular). For the purposes of this invention, a preferred method of calculating percent identity is determined by the Smith-Waterman homology search algorithm as implemented in MPSRCH program (Oxford Molecular) using an affine gap search with the following search parameters: gap open penalty, 12; and gap extension penalty, 1.

Another embodiment of the invention provides an isolated polynucleotide having at least 85%, at least 88%, at least 90%, at least 92%, at least 94%, at least 96 %, at least 98%, or at least 99% sequence identity with the polynucleotides of the invention as described herein. One embodiment provides an isolated polynucleotide having at least 85%, at least 88%, at least 90%, at least 92%, at least 94%, at least 96 %, at least 98%, or at least 99% sequence identity with the sequence shown in Table 1. In other embodiments, isolated polynucleotides additionally have less than 85%, 83%, 80%, 75%, 70 % sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:7.

The nucleic acids of the invention can be cDNAs or isolated as a component of a genomic DNA (e.g., from a patient isolate), as well as fragments thereof, particularly fragments that are useful in the methods disclosed herein (e.g., in diagnosis, as a unique identifier of MHRV nucleic acid, and the like). The term "cDNA" as used herein is intended to include all nucleic acids that share an arrangement of sequence elements that can found in a native mature mRNA species, including splice variants.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

The nucleic acid compositions of the invention can encode all or a part of an MHRV polypeptide, e.g., MHRV GAG polypeptide, or can be flanking sequences of the MHRV-polypeptide-encoding region. Double or single stranded fragments can be obtained from the DNA sequence by chemically synthesizing oligonucleotides in accordance with conventional  
5 methods, by restriction enzyme digestion, by PCR amplification, and the like. Isolated polynucleotides and polynucleotide fragments of the invention comprise at least about 10, about 15, about 20, about 35, about 50, about 100, about 150 to about 200, about 250 to about 300, or about 350 contiguous nt selected from the polynucleotide sequences as shown in SEQ ID NO:7. In general, fragments will be of at least 15 nt, usually at least 18 nt or  
10 25 nt, and up to at least about 50 contiguous nt in length or more. Nucleic acid fragments of particular interest include a polynucleotide of about 304 contiguous nts and corresponding to a PCR product of an MHRV GAG gene (see, e.g., SEQ ID NO:1).

The subject nucleic acid compositions can be used as single- or double-stranded probes or primers for the detection of MHRV mRNA or cDNA generated from such mRNA,  
15 as obtained may be present in a biological sample (e.g., extracts of human cells). The MHRV polynucleotides of the invention can also be used to generate additional copies of the polynucleotides, to generate antisense oligonucleotides, and as triple-strand forming oligonucleotides. These and other uses are described in more detail below.

Nucleic acid probes specific to MHRV can be generated using the polynucleotide  
20 sequences disclosed herein. The probes are preferably at least about 12, 15, 16, 18, 20, 22, 24, or 25 nt fragment of a contiguous sequence of SEQ ID NO:7 or other polynucleotide sequence encoding an MHRV GAG polypeptide. Nucleic acid probes can be less than about 200 bp, 150 bp, 100 bp, 75 bp, 50 bp, 60 bp, 40 bp, 30 bp, 25 bp, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 0.5 kb, 0.25 kb, 0.1 kb, or 0.05 kb in length. The probes can be produced by, for example, chemical  
25 synthesis, PCR amplification, generation from longer polynucleotides using restriction enzymes, or other methods well known in the art.

The polynucleotides of the invention, particularly where used as a probe in a diagnostic assay, can be detectably labeled. Exemplary detectable labels include, but are not limited to, radiolabels, fluorochromes, (e.g. fluorescein isothiocyanate (FITC),  
30 rhodamine, Texas Red, phycoerythrin, allophycocyanin, 6-carboxyfluorescein (6-FAM), 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescein, 6-carboxy-X-rhodamine (ROX), 6-carboxy-2',4',7',4,7-hexachlorofluorescein (HEX), 5-carboxyfluorescein (5-FAM) or N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA)), radioactive labels, (e.g. <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S,

WO 03/016491

PCT/US02/26249

and  $^3\text{H}$ ), and the like. The detectable label can involve two stage systems (*e.g.*, biotin-avidin, hapten-anti-hapten antibody, and the like).

The invention also includes solid substrates, such as arrays, comprising any of the polynucleotides described herein. The polynucleotides are immobilized on the arrays using  
5 methods known in the art. An array may have one or more different polynucleotides.

#### MHRV Polypeptides

The polypeptides of the invention include those encoded by the disclosed MHRV polynucleotides, as well as nucleic acids that, by virtue of the degeneracy of the genetic  
10 code, are not identical in sequence to the disclosed polynucleotides but encode the same polypeptide. Of particular interest is the MHRV GAG polypeptide, such as that provided in SEQ ID NO:8, as well as variants of such polypeptides, *e.g.*, a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:8, but with conservative amino acid substitutions.

By "MHRV polypeptide" is generally meant a polypeptide that can be obtained from  
15 an MHRV viral particle, particularly a polypeptide that can be the basis for specific detection of MHRV virus. Exemplary MHRV polypeptides of particular interest that is specific for MHRV is an MHRV GAG polypeptide (about 112 amino acids in length), *e.g.*, the polypeptide of SEQ ID NO:8 and fragments thereof. An MHRV polypeptide of particular interest is a polypeptide having an amino acid sequence of a 5' portion of an MHRV GAG  
20 polypeptide, *e.g.*, a polypeptide having at least an N-terminal region of the amino acid sequence of the contiguous amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, *e.g.*, at least about 2-4 contiguous amino acid residues, from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 2-5 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 4-10 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID  
25 NO:8, at least about 8-15 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 12-20 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, up to 22 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, as well as polypeptides containing such regions.

In general, the MHRV polypeptides of the subject invention are separated from their  
30 naturally occurring environment. In certain embodiments, the subject protein is present in a composition that is enriched for the protein as compared to a control. As such, purified polypeptide is provided, where "purified" generally means that the protein is present in a composition that is substantially free of non-differentially expressed polypeptides, where by

WO 03/016491

PCT/US02/26249

substantially free is meant that less than 90%, usually less than 60% and more usually less than 50% of the composition is made up of non-differentially expressed polypeptides.

The MHRV polypeptides of the invention include variants of the naturally occurring MHRV protein, where such variants are homologous or substantially similar to the naturally occurring protein, and can be of an origin of the same or different species as the MHRV described herein (e.g., human, murine, or some other species that naturally expresses the recited polypeptide, usually a mammalian species). In general, variant polypeptides have a sequence that has at least about 80%, usually at least about 90%, and more usually at least about 98% sequence identity with a differentially expressed polypeptide of the invention, as measured by BLAST 2.0 using the parameters described above. The variant polypeptides can be naturally or non-naturally glycosylated, i.e., the polypeptide has a glycosylation pattern that differs from the glycosylation pattern found in the corresponding naturally occurring protein. Alternatively, a polypeptide may contain any of the following number of contiguous amino acids of SEQ ID NO:8: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, and 22 amino acids.

The MHRV polypeptides of the invention also include fragments and fusion proteins having an amino acid sequence of an MHRV polypeptide or a fragment thereof. Of particular interest is an MHRV polypeptide fragment that is specific for MHRV A polypeptide fragment of particular interest is a polypeptide having an amino acid sequence of a 5' portion of an MHRV GAG polypeptide, e.g., a polypeptide having at least an N-terminal region of the amino acid sequence of the contiguous amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, e.g., at least about 1-4 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 2-5 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 4-10 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 8-15 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, at least about 12-20 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8, up to 22 contiguous amino acid residues from amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8.

Also within the scope of the invention are variants; variants of polypeptides include mutants, fragments, and fusions. Mutants can include amino acid substitutions, additions or deletions. The amino acid substitutions can be conservative amino acid substitutions or substitutions to eliminate non-essential amino acids, such as to alter a glycosylation site, a phosphorylation site or an acetylation site, or to minimize misfolding by substitution or deletion of one or more cysteine residues that are not necessary for function. Conservative

WO 03/016491

PCT/US02/26249

amino acid substitutions are those that preserve the general charge, hydrophobicity/hydrophilicity, and/or steric bulk of the amino acid substituted.

MHRV polypeptide fragments are also encompassed by the present invention, particular antigenically effective polypeptide fragments, as well as fragments defining an epitope that can be bound by an antibody that is specific for the MHRV polypeptide. A polypeptide is "antigenically effective" where the polypeptide is effective, either alone or in combination with a carrier protein, to elicit production of antibodies that specifically bind the polypeptide. As used herein, "epitope" refers to an antigenic determinant of a polypeptide. An epitope can comprise about 3 or more amino acids in a spatial conformation which is unique to the epitope. Generally an epitope consists of at least about 5 such amino acids, and more usually, consists of at least about 8-10 such amino acids. Methods of determining the spatial conformation of amino acids are known in the art, and include, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance.

A polypeptide is "antigenically reactive" with an antibody when it binds to an antibody due to antibody recognition of a specific epitope contained within the polypeptide. Antigenic reactivity may be determined by antibody binding, more particularly by the kinetics of antibody binding, and/or by competition in binding using as competitor(s) a known polypeptide(s) containing an epitope against which the antibody is directed. The techniques for determining whether a polypeptide is antigenically reactive with an antibody are known in the art.

Polypeptide fragments of interest will typically be at least about 10 aa, at least about 15 aa, usually at least about 20 aa to 22 aa, or at least about 50 aa in length, and can be as long as 100 aa in length or longer.

A polypeptide fragment of particular interest is one having at least the N-terminal portion of an MHRV GAG polypeptide, *e.g.*, a polypeptide having at least a portion of a polypeptide defined by amino acid residues 1-22 of an MHRV GAG polypeptide (*e.g.*, amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8). As discussed in more detail in the Examples below, this N-terminal portion of the MHRV GAG polypeptide is unique to MHRV relative to other retroviruses, and thus can serve as a specific marker for the presence of MHRV in a sample.

#### Anti-MHRV Antibodies

In yet another embodiment, the invention provides an antibody that specifically binds to an MHRV polypeptide, which polypeptide may be associated with or separate from an MHRV viral particle. The antibody can be generated using isolated, intact MHRV viral

WO 03/016491

PCT/US02/26249

particles, an antigenic portion of the virus, an isolated MHRV polypeptide or an antigenic portion of an isolated MHRV polypeptide. Such antibodies are generally referred to herein as anti-MHRV antibodies.

As used herein, the term "antibody" refers to a polypeptide or group of polypeptides which are comprised of at least one antibody combining site. An "antibody combining site" or "binding domain" is formed from the folding of variable domains of an antibody molecule(s) to form three-dimensional binding spaces with an internal surface shape and charge distribution complementary to the features of an epitope of an antigen, which allows an immunological reaction with the antigen. An antibody combining site may be formed from a heavy and/or a light chain domain ( $V_H$  and  $V_L$ , respectively), which form hypervariable loops which contribute to antigen binding. The term "antibody" includes, for example, vertebrate antibodies, hybrid antibodies, chimeric antibodies, altered antibodies, univalent antibodies, the Fab proteins, and single domain antibodies.

Determination of immunogenicity of a protein and generation of an antibody to a virus or a protein are techniques well known in the art (see, for example Harlow and Lane, 1988, supra). By "immunogenic portion" or "immunogenically effective portion" is meant a portion of a virus or viral polypeptide, which is of sufficient size and/or conformation that when injected into an animal causes an immune response and antibodies are generated which bind to the immunogenic portion.

Methods for production of antibodies that specifically bind a selected antigen are well known in the art. Immunogens for raising antibodies can be prepared by mixing an MHRV polypeptide with an adjuvant, and/or by making fusion proteins with larger immunogenic proteins. MHRV polypeptides can also be covalently linked to other larger immunogenic proteins, such as keyhole limpet hemocyanin. Immunogens are typically administered intradermally, subcutaneously, or intramuscularly to experimental animals such as rabbits, sheep, and mice, to generate antibodies. Monoclonal antibodies can be generated by isolating spleen cells and fusing myeloma cells to form hybridomas.

Preparations of polyclonal and monoclonal antibodies specific for polypeptides encoded by a selected polynucleotide are made using standard methods known in the art. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. Epitopes that involve non-contiguous amino acids may require a longer polypeptide, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids. Antibodies that specifically bind to MHRV polypeptides are generally those that provide a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with non-MHRV proteins when used in Western blots or other

WO 03/016491

PCT/US02/26249

immunochemical assays. Preferably, antibodies that specifically bind polypeptides of the invention do not bind to other proteins in immunochemical assays at detectable levels and can immunoprecipitate the specific polypeptide from solution.

As noted above, "antibodies" encompasses various kinds of antibodies, including, but not necessarily limited to, naturally occurring antibodies, single domain antibodies, hybrid antibodies, chimeric antibodies, single-chain antibodies, antibody fragments that retain antigen binding specificity, human antibodies, humanized antibodies, and the like. Naturally occurring antibodies specific for MHRV polypeptides, particular for MHRV GAG polypeptides, can be obtained according to methods well known in the art. For example, serum antibodies to a polypeptide of the invention in a human population can be purified by methods well known in the art, e.g., by passing antiserum over a column to which MHRV viral particle, or the corresponding selected polypeptide or fusion protein is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column, for example using a buffer with a high salt concentration.

The invention also encompasses single domain antibodies, hybrid antibodies, chimeric antibodies, single-chain antibodies, and antibody fragments that retain antigen binding specificity. As used herein, a "single domain antibody" (dAb) is an antibody which is comprised of an VH domain, which reacts immunologically with a designated antigen. A dAb does not contain a V<sub>L</sub> domain, but may contain other antigen binding domains known to exist in antibodies, for example, the kappa and lambda domains. Methods for preparing dAbs are known in the art. See, for example, Ward et al. (1989). Antibodies may also be comprised of V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains, as well as other known antigen binding domains. Examples of these types of antibodies and methods for their preparation are known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,816,467, which is incorporated herein by reference), and include the following.

"Vertebrate antibodies" refers to antibodies which are tetramers or aggregates thereof, comprising light and heavy chains which are usually aggregated in a "Y" configuration and which may or may not have covalent linkages between the chains. In vertebrate antibodies, the amino acid sequences of all the chains of a particular antibody are homologous with the chains found in one antibody produced by the lymphocyte which produces that antibody in situ, or in vitro (for example, in hybridomas). Vertebrate antibodies typically include native antibodies, for example, purified polyclonal antibodies and monoclonal antibodies. Examples of the methods for the preparation of these antibodies are described infra.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

"Hybrid antibodies" are antibodies wherein one pair of heavy and light chains is homologous to those in a first antibody, while the other pair of heavy and light chains is homologous to those in a different second antibody. Typically, each of these two pairs will bind different epitopes, particularly on different antigens. This results in the property of "divalence", i.e., the ability to bind two antigens simultaneously. Such hybrids may also be formed using chimeric chains, as set forth below.

"Chimeric antibodies", are antibodies in which the heavy and/or light chains are fusion proteins. Typically the constant domain of the chains is from one particular species and/or class, and the variable domains are from a different species and/or class. Also included is any antibody in which either or both of the heavy or light chains are composed of combinations of sequences mimicking the sequences in antibodies of different sources, whether these sources be differing classes, or different species of origin, and whether or not the fusion point is at the variable/constant boundary. Thus, antibodies can be produced in which neither the constant nor the variable region mimic known antibody sequences, thus providing for antibodies having a variable region that has a higher specific affinity for a particular antigen, or having a constant region that can elicit enhanced complement fixation, or to make other improvements in properties possessed by a particular constant region.

The invention also encompasses "altered antibodies", which refers to antibodies in which the naturally occurring amino acid sequence in a vertebrate antibody has been varied. Utilizing recombinant DNA techniques, antibodies can be redesigned to obtain desired characteristics. The possible variations are many, and range from the changing of one or more amino acids to the complete redesign of a region, for example, the constant region. Changes in the constant region, in general, to attain desired cellular process characteristics, e.g., changes in complement fixation, interaction with membranes, and other effector functions. Changes in the variable region may be made to alter antigen binding characteristics. The antibody may also be engineered to aid the specific delivery of a molecule or substance to a specific cell or tissue site. The desired alterations may be made by known techniques in molecular biology, e.g., recombinant techniques, site directed mutagenesis, and other techniques.

Further exemplary antibodies include "univalent antibodies", which are aggregates comprised of a heavy chain/light chain dimer bound to the Fc (i.e., constant) region of a second heavy chain. This type of antibody escapes antigenic modulation. See, e.g., Glennie et al. (1982).

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Included also within the definition of antibodies are "Fab" fragments of antibodies. The "Fab" region refers to those portions of the heavy and light chains which are roughly equivalent, or analogous, to the sequences which comprise the branch portion of the heavy and light chains, and which have been shown to exhibit immunological binding to a  
5 specified antigen, but which lack the effector Fc portion. "Fab" includes aggregates of one heavy and one light chain (commonly known as Fab'), as well as tetramers containing the 2H and 2L chains (referred to as F(ab).sub.2), which are capable of selectively reacting with a designated antigen or antigen family. "Fab" antibodies may be divided into subsets analogous to those described above, i.e., "vertebrate Fab", "hybrid Fab", "chimeric Fab", and  
10 "altered Fab". Methods of producing "Fab" fragments of antibodies are known within the art and include, for example, proteolysis, and synthesis by recombinant techniques.

#### ASSAYS FOR DETECTION OF MHRV IN A SAMPLE

The invention also contemplates methods of screening biological samples suspected  
15 of containing an MHRV sequence. Such screening methods generally involve assays that are based upon detection of MHRV nucleic acid, detection of MHRV polypeptides, or detection of anti-MHRV antibodies.

It will be readily apparent upon reading of the present specification that the assays described herein can be conducted as, or modified to be conducted as, *in vitro* or *in vivo*  
20 assays, and may be either cell-free (*e.g.*, *in vitro* binding assays using polynucleotides isolated from or produced from nucleic acid of a biological sample) or cell-based (*e.g.*, screening of whole cells suspected of being infected with MHRV). In general, all assays are conducted under conditions, and for a period of time, sufficient to allow for specific binding of an MHRV-specific probe (*e.g.*, nucleic acid probe, antibody probe, polypeptide probe) to  
25 an MHRV probe target, *e.g.*, to provide for detection of MHRV probe target at a detectable level above background. The assays can include various positive and/or negative controls, the nature of which will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan upon reading the present specification.

Various aspects of the assays for detection are described below in more detail

#### 30 Biological samples for detection assays

Any suitable sample suspected of containing an MHRV viral particle, an MHRV-infected cell, MHRV nucleic acid, MHRV polypeptide, anti-MHRV antibody, and the like. Exemplary samples of interest for screening include, but are not necessarily limited to, biological samples such as blood, blood derivatives, serum, plasma, platelets, mammalian

WO 03/016491

PCT/US02/26249

cells (particularly mammalian lymphocytes, more particularly mammalian macrophages, with human cells being of particular interest), tissues (*e.g.*, prior to transplant or other transfer to another subject), and the like. Other exemplary samples of interest for screening include non-biological samples, particularly samples that are on or obtained from a medical instrument, *e.g.*, surgical instruments that, due to their contact with blood and other tissues, could facilitate virus spread if re-used without successfully killing or removing virus.

As will be readily appreciated by the ordinarily skilled artisan, the specific assay selected will vary according to the source of sample and the entity to be detected (*e.g.*, viral particle, nucleic acid, polypeptide, antibody). Examples of various types of assays are provided below. Of particular interest are assays that can be readily conducted in a clinic or in the field, without the need for special tools or detection instruments.

Detection of an MHRV marker in a biological sample indicates that the subject from which the sample was obtained is has been exposed to MHRV, and thus can have an MHRV infection. Detection of MHRV in a subject can also indicate that the subject has, or is at risk of developing, an MHRV-associated disease, such as an MHRV-associated lymphoproliferative disease, *e.g.*, a lymphoma.

Exemplary lymphoproliferative diseases which may be suitable for screening for MHRV, and which may be associated with MHRV include, but are not necessarily limited to: 1) plasma cell disorders (*e.g.*, MGUS, plasmacytoma (including bone and extramedullary plasmacytoma), multiple myeloma, and amyloidosis); 2) Hodgkin's disease; 3) indolent lymphoma/leukemia (including follicle center cell lymphoma and follicular (follicular lymphoma) (*e.g.*, Grade I follicular small cleaved cell; Grade II follicular mixed; and diffuse small cleaved cell lymphoma), diffuse small lymphocytic/chronic lymphocytic leukemia; lymphoplasmacytoid/Waldenstrom's, marginal zone lymphoma (*e.g.*, MALT (extranodal), monocytoid B-cell lymphoma (nodal), and splenic lymphoma with villous lymphocytes), Hairy cell leukemia, and mycosis fungoides/Sezary syndrome; 4) aggressive lymphoma/leukemia (including diffuse large cell lymphoma (includes diffuse mixed cell, diffuse large cell, immunoblastic), Burkitt's lymphoma/diffuse small non-cleaved cell lymphoma, Lymphoblastic lymphoma, CNS lymphoma, Adult T-cell leukemia/lymphoma, Mantle cell lymphoma, Post-transplantation lymphoproliferative disorder, AIDS-related lymphoma (*e.g.*, True histiocytic lymphoma, Primary effusion lymphoma). The classification of the lymphoproliferative is based upon the PDQ modification of the REAL classification as provided by the National Cancer Institute.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Detection of MHRV in a subject can also indicate that the subject has, or is at risk of developing, an MHRV-associated disease, particularly an MHRV-associated chronic disease. Examples of such diseases can include, but are not necessarily limited to terato carcinoma, multiple sclerosis, autoimmune rheumatic diseases, and schizophrenia.

5 Detection of MHRV in a biological sample also indicates that the biological material from which the biological sample was obtained should not be used for the purpose of transfer to another subject, as such transfer may result in infection of the recipient.

Exemplary methods for detection of nucleic acid and polypeptide MHRV markers according to the invention are described below.

10 Methods of detecting MHRV nucleic acid

Any suitable qualitative or quantitative methods known in the art for detecting specific MHRV nucleic acid (e.g., RNA or DNA) can be used. MHRV nucleic acid can be detected by, for example, in situ hybridization in tissue sections, using methods that detect single base pair differences between hybridizing nucleic acid (e.g., using the Invader®  
15 technology described in, for example, U.S. Pat. No. 5,846,717), by reverse transcriptase-PCR, or in Northern blots containing poly A+ mRNA, and other methods well known in the art. For detection of MHRV polynucleotides in blood or blood-derived samples, the use of methods that allow for detection of single base pair mismatches is preferred.

Using the MHRV nucleic acid as a basis, with MHRV GAG polypeptide-encoding  
20 nucleic acid being of particular interest, nucleic acid probes (e.g., including oligomers of at least about 8 nucleotides or more) can be prepared, either by excision from recombinant polynucleotides or synthetically, which probes hybridize with the MHRV nucleic acid, and thus are useful in detection of MHRV virus in a sample, and identification of infected  
25 individuals, as well as further characterization of the viral genome(s). The probes for MHRV polynucleotides (natural or derived) are of a length or have a sequence which allows the detection of unique viral sequences by hybridization. While about 6-8 nucleotides may be useful, longer sequences may be preferred, e.g., sequences of about 10-12 nucleotides, or about 20 nucleotides or more. Preferably, these sequences will derive from regions which lack heterogeneity among MHRV viral isolates.

30 Nucleic acid probes can be prepared using routine methods, including automated oligonucleotide synthetic methods. A complement to any unique portion of the MHRV genome will be satisfactory, e.g., a portion of the MHRV genome that allows for distinguishing MHRV from other viruses that may be present in the sample (e.g., to distinguish the MHRV virus from an endogenous retrovirus such as HERV-K109. For use

WO 03/016491

PCT/US02/26249

as probes, complete complementarity is desirable, though it may be unnecessary as the length of the fragment is increased.

For use of such probes as diagnostics, the biological sample to be analyzed, such as blood or serum, may be treated, if desired, to extract the nucleic acids contained therein. The resulting nucleic acid from the sample may be subjected to gel electrophoresis or other size separation techniques; alternatively, the nucleic acid sample may be dot blotted without size separation. The probes are usually labeled with a detectable label. Suitable labels, and methods for labeling probes are known in the art, and include, for example, radioactive labels incorporated by nick translation or kinasing, biotin, fluorescent probes, and chemiluminescent probes. The nucleic acids extracted from the sample are then treated with the labeled probe under hybridization conditions of suitable stringencies.

The probes can be made completely complementary to the MHRV genome or portion thereof (e.g., to all or a portion of a sequence encoding an MHRV GAG polypeptide). Therefore, usually high stringency conditions are desirable in order to prevent or at least minimize false positives. However, conditions of high stringency should only be used if the probes are complementary to regions of the viral genome which lack heterogeneity among MHRV viral isolates. The stringency of hybridization is determined by a number of factors during hybridization and during the washing procedure, including temperature, ionic strength, length of time, and concentration of formamide. These factors are outlined in, for example, Sambrook et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Generally, it is expected that the MHRV sequences will be present in a biological sample (e.g., blood, cells, and the like) obtained from an infected individual at relatively low levels, e.g., at approximately  $10^2$  -  $10^4$  MHRV sequences per  $10^6$  cells. This level may require that amplification techniques be used in hybridization assays. Such techniques are known in the art.

For example, the Enzo Biochemical Corporation "Bio-Bridge" system uses terminal deoxynucleotide transferase to add unmodified 3'-poly-dT-tails to a DNA probe. The poly dT-tailed probe is hybridized to the target nucleotide sequence, and then to a biotin-modified poly-A. PCT Publication No. WO84/03520 and European application no. EPA124221 describe a DNA hybridization assay in which: (1) analyte is annealed to a single-stranded DNA probe that is complementary to an enzyme-labeled oligonucleotide; and (2) the resulting tailed duplex is hybridized to an enzyme-labeled oligonucleotide. EPA 204510 describes a DNA hybridization assay in which analyte DNA is contacted with a probe that

WO 03/016491

PCT/US02/26249

has a tail, such as a poly-dT tail, an amplifier strand that has a sequence that hybridizes to the tail of the probe, such as a poly-A sequence, and which is capable of binding a plurality of labeled strands.

5 Non-PCR-based, sequence specific DNA amplification techniques can also be used in the invention to detect MHRV sequences. An example of such techniques include, but are not necessarily limited to the Invader assay, see, *e.g.*, Kwiatkowski et al. *Mol Diagn.* 1999 Dec;4(4):353-64. See also U.S. Pat. No. 5,846,717.

A particularly desirable technique may first involve amplification of the target MHRV sequences in sera approximately 10,000 fold, *e.g.*, to approximately 10  
10 sequences/mL. This may be accomplished, for example, by the polymerase chain reactions (PCR) technique described which is by Saiki et al. (1986), by Mullis, U.S. Pat. No. 4,683,195, and by Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,202. Other amplification methods are well known in the art.

The probes, or alternatively nucleic acid from the samples, may be provided in  
15 solution for such assays, or may be affixed to a support (*e.g.*, solid or semi-solid support). Examples of supports that can be used are nitrocellulose (*e.g.*, in membrane or microtiter well form), polyvinyl chloride (*e.g.*, in sheets or microtiter wells), polystyrene latex (*e.g.*, in beads or microtiter plates, polyvinylidene fluoride, diazotized paper, nylon membranes, activated beads, and Protein A beads.

20 In one embodiment, the probe (or sample nucleic acid) is provided on an array for detection. Arrays can be created by, for example, spotting polynucleotide probes onto a substrate (*e.g.*, glass, nitrocellulose, and the like) in a two-dimensional matrix or array. The probes can be bound to the substrate by either covalent bonds or by non-specific interactions, such as hydrophobic interactions. Samples of polynucleotides can be detectably labeled  
25 (*e.g.*, using radioactive or fluorescent labels) and then hybridized to the probes. Double stranded polynucleotides, comprising the labeled sample polynucleotides bound to probe polynucleotides, can be detected once the unbound portion of the sample is washed away. Techniques for constructing arrays and methods of using these arrays are described in EP 799 897; WO 97/29212; WO 97/27317; EP 785 280; WO 97/02357; USPN 5,593,839;  
30 USPN 5,578,832; EP 728 520; USPN 5,599,695; EP 721 016; USPN 5,556,752; WO 95/22058; and USPN 5,631,734. Arrays are particularly useful where, for example a single sample is to be analyzed for the presence of two or more nucleic acid target regions, as the probes for each of the target regions, as well as controls (both positive and negative) can be provided on a single array. Arrays thus facilitate rapid and convenience analysis.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Methods of detecting MHRV polypeptides

In one embodiment, the invention features methods for detecting an MHRV in a sample by detection of an MHRV polypeptide in a sample, which in turn can indicate the presence of MHRV particles in the sample. The sample can be a biological sample, or a sample obtained from, for example, a medical instrument. Biological samples are of particular interest. Of particular interest is detection of an MHRV GAG polypeptide, such as that exemplified by SEQ ID NO:8. Polypeptide-based detection of MHRV can be accomplished by use of a receptor (including ligand-binding receptor fragments) or an antibody (including antigen-binding antibody fragments) that specifically binds the target MHRV polypeptide (*e.g.*, an anti-MHRV GAG polypeptide antibody).

Polypeptide-based detection of MHRV can be accomplished using a variety of biological samples, *e.g.*, blood or blood derivatives (*e.g.*, serum, plasma, and the like), cells, tissues, and the like. The anti-MHRV antibody can be generated so as to detect the MHRV polypeptide on a surface of an infected host cell, on the surface of an MHRV viral particle, or as free polypeptide (*e.g.*, not associated with either a host cell or a viral particle, such as may be present in a sample due to lysis of the viral particle or infected host cell).

In one embodiment, the invention features immunoassays to determine the presence of MHRV polypeptide (including MHRV polypeptide present on viral particles) in a biological sample, *e.g.*, a cell or a body fluid sample, by contacting the sample with an antibody (usually, but not necessarily, a monoclonal antibody); reacting the sample and the antibody for a time and under conditions that allow the formation of an immunocomplex between the antibody and MHRV virus particles and/or MHRV polypeptide in the sample; and detecting the immunocomplex. The presence of an immunocomplex indicates the presence of MHRV polypeptide in the sample.

Design of the immunoassays is subject to a great deal of variation, and many formats are known in the art. The immunoassay will utilize at least one viral epitope derived from MHRV. In one embodiment, the immunoassay uses a combination of viral epitopes derived from MHRV. These epitopes may be derived from the same or from different viral polypeptides, and may be in separate recombinant or natural polypeptides, or together in the same recombinant polypeptides. An immunoassay may use, for example, a monoclonal antibody directed towards a viral epitope(s), a combination of monoclonal antibodies directed towards epitopes of one viral antigen, monoclonal antibodies directed towards epitopes of different viral antigens, polyclonal antibodies directed towards the same viral antigen, or polyclonal antibodies directed towards different viral antigens.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Protocols may be based, for example, upon competition, or direct reaction, or sandwich type assays. Protocols may also, for example, use solid supports, or may be by immunoprecipitation. Most assays involve the use of labeled antibody or polypeptide; the labels may be, for example, enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, radioactive, or dye  
5 molecules. Assays which amplify the signals from the probe are also known; examples of which are assays which utilize biotin and avidin, and enzyme-labeled and mediated immunoassays, such as ELISA assays.

The immunoassay may be, without limitations, in a heterogeneous or in a homogeneous format, and of a standard or competitive type. In a heterogeneous format, the  
10 anti-MHRV antibody is typically bound to a solid support to facilitate separation of the sample from MHRV polypeptide after incubation. The solid support containing the is typically washed after reaction for a time sufficient to allow for antibody-antigen complex formations (e.g., about 10 min) prior to detection of bound antibodies. Both standard and competitive formats are known in the art.

In a homogeneous format, the test sample is incubated with anti-MHRV antibody in  
15 solution. For example, it may be under conditions that will precipitate any antigen-antibody complexes which are formed. Both standard and competitive formats for these assays are known in the art.

In a standard format, the level of MHRV polypeptide-antibody complex is directly  
20 monitored. This may be accomplished by, for example, determining whether labeled anti-xenogenic (e.g., anti-human) antibodies which recognize an epitope on anti-MHRV antibodies will bind due to complex formation. In a competitive format, the amount of MHRV polypeptide in the sample is deduced by monitoring the competitive effect on the binding of a known amount of labeled MHRV polypeptide (or other competing ligand) in the  
25 complex. Amounts of binding or complex formation can be determined either qualitatively or quantitatively.

Complexes formed comprising MHRV polypeptide and anti-MHRV antibody are detected by any of a number of known techniques, depending on the format. For example, unlabeled MHRV antibodies in the complex may be detected using a conjugate of  
30 anti-xenogenic Ig complexed with a label, (e.g., an enzyme label).

The antibody in the immunoassays for detection of MHRV polypeptides may be provided on a support (e.g., solid or semi-solid); alternatively, the polypeptides in the sample can be immobilized on a support. Examples of supports that can be used are nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form), polyvinyl chloride (e.g., in sheets or microtiter

WO 03/016491

PCT/US02/26249

wells), polystyrene latex (e.g., in beads or microtiter plates, polyvinylidene fluoride, diazotized paper, nylon membranes, activated beads, and Protein A beads. Bead-based supports are generally more useful for immobilization of the antibody in the assay.

In one embodiment, the biological sample contains cells (e.g., whole cells) and  
5 detection is by reacting the sample with labeled antibodies, performed in accordance with conventional methods. In general, antibodies that specifically bind an MHRV polypeptide of the invention are added to a sample, and incubated for a period of time sufficient to allow binding to the epitope, usually at least about 10 minutes. The antibody can be detectably labeled for direct detection (e.g., using radioisotopes, enzymes, fluorescers,  
10 chemiluminescers, and the like), or can be used in conjunction with a second stage antibody or reagent to detect binding (e.g., biotin with horseradish peroxidase-conjugated avidin, a secondary antibody conjugated to a fluorescent compound, e.g. fluorescein, rhodamine, Texas red, and others). The absence or presence of antibody binding can be determined by various methods, including, but not limited to, flow cytometry of dissociated cells,  
15 microscopy, radiography, and scintillation counting. Any suitable alternative methods of qualitative or quantitative detection of levels or amounts of differentially expressed polypeptide can be used, for example ELISA, western blot, immunoprecipitation, radioimmunoassay, and the like.

In another embodiment of this assay, the immunocomplex can be detected by a  
20 competitive immunoassay by reacting the anti-MHRV antibody with the sample and with a competing antigen to which the antibody is known to specifically bind, e.g., a detectably labeled MHRV antigen or an immobilized competing antigen such as an isolated viral protein. The competing antigen can be labeled or immobilized.

Alternatively, the immunoassay is a sandwich immunoassay that uses a second  
25 antibody, e.g., a monoclonal antibody, that either also binds MHRV viral particles or binds to the first monoclonal antibody, one of the two antibodies being immobilized and the other being labeled using standard techniques. In the sandwich immunoassay procedures, the MHRV viral particle-binding antibody can be a capture antibody attached to an insoluble material, and the second MHRV viral particle-binding antibody can be a detector or labeling  
30 antibody.

#### Methods of detecting anti-MHRV antibodies

In another aspect, the presence of MHRV in a host may be detectable by assaying an appropriate biological sample from the host for anti-MHRV antibodies. Of particular

WO 03/016491

PCT/US02/26249

interest if the detection of anti-MHRV GAG polypeptide antibodies. Various methods for detection of an anti-MHRV antibody in a biological sample are well known in the art.

Anti-MHRV antibodies are can be detected by , for example, obtaining a biological sample from a patient having or suspected of having an MHRV infection (e.g., suspected of  
5 having an MHRV-associated lymphoma), and which biological sample is suspected of containing an antibody that specifically binds to MHRV. The biological sample of the patient is contacted with an isolated MHRV particle or with an MHRV GAG polypeptide or antigenic fragment thereof. Formation of antibody-viral particle or antibody-polypeptide complexes is monitored by standard techniques (see, for example, Harlow and Lane, 1988,  
10 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Typically, an immunoassay for an anti-MHRV antibody(s) will involve selecting and preparing the test sample suspected of containing the antibodies, such as a biological sample, then incubating it with an antigenic (e.g., epitope-containing) MHRV polypeptide(s) under  
15 conditions that allow antigen-antibody complexes to form, and then detecting the formation of such complexes. Suitable incubation conditions are well known in the art.

Antibodies in the test sample that cross react with non-MHRV particles or non-MHRV polypeptides can be depleted from the test sample using standard control screening steps where desired. Variations on methods of detecting anti-MHRV antibodies are similar  
20 to those described above for detection of MHRV viral particles and/or MHRV polypeptides and other variations that will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan upon reading the present specification.

The immunoassays for detection of anti-MHRV polypeptide antibodies may be conducted using an MHRV polypeptide on a support (e.g., solid or semi-solid); alternatively,  
25 the antibodies in the sample can be immobilized on a support fro contacting with an MHRV polypeptide. Examples of supports that can be used are nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form), polyvinyl chloride (e.g., in sheets or microtiter wells), polystyrene latex (e.g., in beads or microtiter plates, polyvinylidene fluoride, diazotized paper, nylon membranes, activated beads, and Protein A beads. Bead-based supports are generally more  
30 useful for immobilization of the MHRV polypeptide in this embodiment of the invention.

In an exemplary embodiment, screening for anti-MHRV antibodies in a sample is accomplished by contacting a biological sample with an isolated MHRV polypeptide. An interaction between an antibody in the sample and the MHRV protein is monitored by standard techniques (see, for example, Harlow and Lane, 1988, supra). Detection of

WO 03/016491

PCT/US02/26249

antibody-MHRV polypeptide complexes indicates that the sample contains anti-MHRV antibodies, and in turn that the patient has generated a humoral response against MHRV, which in turn indicates that the patient is infected with or at least has been exposed to MHRV.

5

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The invention further contemplates pharmaceutical compositions comprising at least one of an MHRV polypeptide or an MHRV polynucleotide, which is provided in a pharmaceutically acceptable excipient. Various pharmaceutically acceptable excipients are well known in the art. As used herein, "pharmaceutically acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient of a composition, allows the ingredient to retain biological activity and without causing disruptive reactions with the subject's immune system.

Exemplary pharmaceutically carriers include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical excipients such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/ aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. A composition of an MHRV polypeptide or MHRV polynucleotide may also be lyophilized using means well known in the art, for subsequent reconstitution and use according to the invention. Also of interest are formulations for liposomal delivery, and formulations comprising microencapsulated MHRV polypeptides or MHRV polynucleotides. Compositions comprising such excipients are formulated by well known conventional methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, Chapter 43, 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton PA 18042, USA).

In general, the pharmaceutical compositions can be prepared in various forms, such as granules, tablets, pills, suppositories, capsules (*e.g.* adapted for oral delivery), microbeads, microspheres, liposomes, suspensions, salves, lotions and the like. Pharmaceutical grade organic or inorganic carriers and/or diluents suitable for oral and

WO 03/016491

PCT/US02/26249

topical use can be used to make up compositions comprising the therapeutically-active compounds. Diluents known to the art include aqueous media, vegetable and animal oils and fats. Stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying the osmotic pressure or buffers for securing an adequate pH value.

5

## KITS

Reagents specific for MHRV polynucleotides, MHRV viral particles, MHRV polypeptides, and/or anti-MHRV antibodies can be supplied in a kit for detecting the presence or absence of an MHRV polynucleotide, or an expression product of an MHRV, in a biological sample. Such reagents can include, for example, nucleotide probes or primers for detection of MHRV nucleic acid, anti-MHRV antibodies for detection of MHRV viral particles and/or polypeptides, and MHRV polypeptides for detection of anti-MHRV antibodies in the sample. The reagents can be provided in labeled vials. The kit can also include buffers or labeling components, as well as instructions for using the reagents to detect (either qualitatively or quantitatively) the target nucleic acid, polypeptide, or antibody in the biological sample. The kit can further include appropriate positive controls, negative controls, or both.

For example, nucleic acid probes can be packaged into diagnostic kits. Diagnostic kits can include one or more polynucleotide probes (*e.g.*, DNA or RNA) which may be labeled; alternatively, the polynucleotide probe may be unlabeled and the ingredients for labeling may be included in the kit in separate containers. The kit may also contain other suitably packaged reagents and materials needed for the particular hybridization protocol, for example, standards, as well as instructions for conducting the test.

Kits suitable for immunodiagnosis and containing the appropriate labeled reagents are constructed by packaging the appropriate materials, including the polypeptides of the invention containing MHRV epitope(s) or antibodies directed against MHRV epitope(s) in suitable containers, along with the remaining reagents and materials required for the conduct of the assay, as well as a suitable set of assay instructions. Assays using the kits may be performed *in vitro* and cell-free (*e.g.*, *in vitro* binding assays) or may be cell-based.

30

## CELL CULTURE SYSTEMS AND ANIMAL MODEL SYSTEMS FOR MHRV REPLICATION

The finding that MHRV has similarities to a human endogenous retrovirus provides information on methods for propagating MHRV. MHRV is thought to be similar to HERVs based on sequence analysis, as described in more detail below. Generally, suitable cells or

WO 03/016491

PCT/US02/26249

cell lines for culturing MHRV may include those known to support retroviral replication, with cells and cell lines of the same lineage as macrophages being of particular interest. Useful cells or cell lines for MHRV propagation can include human cells and cell lines, and non-human cells and cell lines (e.g., porcine, rat, and the like). Exemplary cells useful in this regard include, but are not necessarily limited to, macrophage derived cell populations such as dendritic cells, Langerhans cells, microglial cells, as well as cell lines derived from any of these primary cell populations. Macrophage like tumor cell lines (e.g., THP-1 cells) may also be useful in culturing MHRV.

MHRV may also be propagated in primary cultures of macrophages, which cultures can be infected with MHRV. Alternatively, the macrophage cultures can be derived from the infected individuals. The latter case is an example of a cell which is infected in vivo being passaged in vitro. In addition, various immortalization methods can be used to obtain cell-lines derived from macrophage cultures. For example, primary macrophage cultures (before and after enrichment of the desired population) may be fused to a variety of cells to maintain stability. Alternatively, cultures may be infected with transforming viruses, or transfected with transforming genes in order to create permanent or semipermanent cell lines. It is noted that since MHRV is associated with development of lymphoma, MHRV may alone effect transformation of the cells to produce stable cell lines in culture.

As discussed above, MHRV is a retrovirus. Therefore, it is probable that MHRV infection of cell lines may be accomplished by techniques known in the art for infecting cells with other retroviruses. These include, for example, incubating the cells with viral preparations under conditions which allow viral entry into the cell. In addition, it may be possible to obtain viral production by transfecting the cells with isolated viral polynucleotides. Methods for transfecting tissue culture cells with viral genomic nucleic acid, or cDNA derived from such viral genomic nucleic acid, are known in the art, and include, for example, techniques which use electroporation, and precipitation with DEAE-Dextran or calcium phosphate. An abundant source of MHRV RNA can be obtained by performing in vitro transcription of an MHRV cDNA corresponding to the complete genome. Transfection with this material, or with cloned MHRV cDNA should result in viral replication and the in vitro propagation of the virus.

In addition to cultured cells, animal model systems may be used for viral replication; animal systems in which retroviruses are known to those of skill in the art. On exemplary animal model is the scid mouse. Further exemplary models include, but are not necessarily limited to, primates (e.g., monkeys, chimpanzees, orangutans, and the like).

WO 03/016491

PCT/US02/26249

## IDENTIFICATION OF ANTI-MHRV AGENTS

The invention is also directed to methods for identifying anti-viral agents for MHRV. Exemplary MHRV anti-viral agents include those that inactivate the virus (*e.g.*, by treatment of an instrument or biological material (*e.g.*, blood) prior to use), inhibit MHRV entry into a host cell, inhibit MHRV replication, or otherwise disrupt or interfere with MHRV pathogenesis. Those agents that allow growth and proliferation of the infected cell while inhibiting viral replication are of particular interest, with agents that facilitate inhibition of growth of infected cells, up to and including death of such cells, also being of interest. Since MHRV is associated with lymphoma, agents that act as anti-cancer agents by virtue of their affect upon MHRV are also of interest.

The term "agent" as used herein describes any molecule, *e.g.*, protein or pharmaceutical, which is amenable for screening for anti-MHRV activity (*e.g.*, activity in inhibiting replication, infection, or other aspect of MHRV infection and propagation). Generally, pluralities of assay mixtures are run in parallel with different agent concentrations to detect differential responses to the various concentrations. Typically, one of these concentrations serves as a negative control, *i.e.*, at zero concentration or below the level of detection.

Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, and are generally small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and less than about 2,500 daltons. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including, but not limited to: peptides, saccharides, fatty acids, steroids, pheromones, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides and oligopeptides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means, and

WO 03/016491

PCT/US02/26249

may be used to produce combinatorial libraries. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, *etc.*, to produce structural analogs.

Various screening methods useful in the present invention are known by those of skill in the art. Generally, the anti-viral agents are tested at a variety of concentrations, for their effect on preventing viral replication in cell culture systems which support viral replication, and then for an inhibition of infectivity or of viral pathogenicity (and a low level of toxicity) in an animal model system. Exemplary methods include, but are not necessarily limited to, assays to determine the effect of the agent upon viral ID<sub>50</sub> or upon the ability of the virus to induce cell plaque formation.

The methods and compositions provided herein for detecting MHRV polypeptides and MHRV polynucleotides are useful for screening of anti-viral agents in that they provide an alternative, and sensitive, means for detecting the agent's effect on viral replication than the cell plaque assay or ID<sub>50</sub> assay.

For example, the MHRV-polynucleotide probes described herein may be used to quantitate the amount of viral nucleic acid produced in a cell culture. This could be accomplished, for example, by hybridization or competition hybridization of the infected cell nucleic acids with a labeled MHRV-polynucleotide probe. For example, also, anti-MHRV antibodies may be used to identify and quantitate MHRV antigen(s) in the cell culture utilizing the immunoassays described herein. In addition, since it may be desirable to quantitate MHRV antigens in the infected cell culture by a competition assay, the polypeptides encoded within the MHRV cDNAs described herein are useful in these competition assays. Generally, a recombinant MHRV polypeptide derived from the MHRV cDNA would be labeled, and the inhibition of binding of this labeled polypeptide to an MHRV polypeptide due to the antigen produced in the cell culture system would be monitored. Moreover, these techniques are particularly useful in cases where the MHRV may be able to replicate in a cell line without causing cell death.

The anti-viral agents which may be tested for efficacy by these methods are known in the art, and include, for example, those which interact with virion components and/or cellular components which are necessary for the binding and/or replication of the virus. Typical anti-viral agents may include, for example, inhibitors of virion polymerase and/or protease(s) necessary for cleavage of the precursor polypeptides. Other anti-viral agents may include those which act with nucleic acids to prevent viral replication, for example, anti-sense polynucleotides, *etc.*

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Antisense polynucleotides molecules, which are comprised of a complementary nucleotide sequence which allows them to hybridize specifically to designated regions of genomes or RNAs, is an example of an anti-MHRV viral agent of interest that can be identified through screening assays according to the invention. Antisense polynucleotides  
5 may include, for example, molecules that will block protein translation by binding to mRNA, or may be molecules which prevent replication of viral RNA by transcriptase. They may also include molecules which carry agents (non-covalently attached or covalently bound) which cause the viral RNA to be inactive by causing, for example, scissions in the viral RNA. They may also bind to cellular polynucleotides which enhance and/or are  
10 required for viral infectivity, replicative ability, or chronicity. Antisense molecules which are to hybridize to MHRV derived RNAs may be designed based upon the sequence information of the MHRV cDNAs provided herein. The antiviral agents based upon antisense polynucleotides for MHRV may be designed to bind with high specificity, to be of increased solubility, to be stable, and to have low toxicity. Hence, they may be delivered in  
15 specialized systems, for example, liposomes, or by gene therapy. In addition, they may include analogs, attached proteins, substituted or altered bonding between bases, and the like.

Other types of drugs having anti-MHRV activity may be based upon polynucleotides which "mimic" important control regions of the MHRV genome, and which may be  
20 therapeutic due to their interactions with key components of the system responsible for viral infectivity or replication.

#### USE OF MHRV AGENTS

The anti-MHRV agents identified as described herein, or other anti-MHRV agents,  
25 can be used to treat MHRV infections in a subject, where "subject" encompasses all host susceptible to MHRV infection, with mammals, particularly humans, being of particular interest. Since, MHRV carries a reverse transcriptase and protease enzyme, both of which have been successful targets for anti-HIV therapeutics, agents that act in a similar manner may find particular use in treatment of MHRV infection. In addition, blood macrophages  
30 isolated from patients with MHRV associated mantle cell lymphoma are abnormal (express PCNA, consistent with proliferation) and are killed by polyamine analogues *in vitro*.

"Polyamines" generally refer to any of a group of aliphatic, straight-chain amines derived biosynthetically from amino acids; polyamines are reviewed in Marton et al. (1995) *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* 35:55-91. Polyamines can be, for example, a naturally-occurring

WO 03/016491

PCT/US02/26249

polyamine or natural polyamine, which are naturally produced in eukaryotic cells. Examples of polyamines include putrescine, spermidine, spermine and cadaverine. "Polyamine analogs" generally refer to an organic cation structurally similar but non-identical to naturally-occurring polyamines such as spermine and/or spermidine and their precursor,

5 diamine putrescine. Polyamine analogs can be branched or un-branched, or incorporate cyclic moieties. Examples of polyamine analogs include, without limitation, N<sup>1</sup>, N<sup>14</sup>-diethylhomo-spermine (DEHSPM) and N<sup>1</sup>, N<sup>12</sup>-diethylspermine (DESPM). See, for example, WO 98/17624 and U.S. Pat. 5,541,230. U.S. Patent Nos. 5,037,846 and 5,242,947 disclose polyamines comprising primary amino groups. Especially preferred are polyamine  
10 analogs wherein all nitrogen atoms of said polyamine analogs are independently secondary, tertiary, or quaternary amino groups.

For a discussion of polyamine analogs that may be suitable for use in treatment of MHRV, as well as formulations, compositions, and methods of delivery, see, e.g., PCT publication no. WO 99/21542. Any suitable polyamine analog, or stereoisomers, salts or  
15 protected derivatives thereof (or a composition comprising an effective amount of a polyamine analog, or stereoisomers, salts or protected derivatives thereof) may be administered, generally according to the manufacturer's/supplier's instructions. Generally, polyamine analogs are administered by subcutaneous or intravenous injection. They may also be administered orally.

20 The amount of a polyamine analog (or stereoisomers, salts or protected derivatives thereof) administered will depend on several variables, such as the particular analog (or stereoisomer, salt or protective derivative) used, the time course of administration, the condition of the individual, the desired objective, the extent of disease, how many doses will be administered, and whether any other substances are being administered. Generally, the  
25 amount used will be as recommended by the manufacturer and/or based on empirical studies. In the case of polyamine analogs (or stereoisomer, salt, or protected derivative thereof), the amount will generally be between about 1 to about 300 mg/m<sup>2</sup>/day, possibly between about 15 to about 150 mg/m<sup>2</sup>/day. Administration is generally intermittent, meaning that analog (or stereoisomer, salt, or protected derivative thereof) is administered per a period of at least  
30 one to two days and then not administered for a period of at least one to two days, with the cycle repeated as indicated. In one embodiment, the polyamine analog (or stereoisomer, salt, or derivative thereof) for 6 days every three weeks.

Routes of administration will generally depend on the nature of the particular polyamine analog (or stereoisomer, salt or protective derivative) used, and may be, for

WO 03/016491

PCT/US02/26249

example, oral or by injection (subcutaneous or intravenous). Administration is generally by intravenous or subcutaneous injection.

Generally, a polyamine analog (or stereoisomer, salt or protected derivative), or other suitable agent that interferes with the polyamine synthetic pathway, polyamine metabolism, and/or the intracellular concentration maintenance of spermine) is administered in a composition comprising a suitable pharmaceutical excipient. Pharmaceutical excipients are known in the art and are set forth in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, Mack Publishing (1990). The polyamine analog may also be associated with another substance that facilitates agent delivery to macrophages, or increases specificity of the agent to macrophages. For example, an agent(s) may be associated into liposomes. Liposomes are known in the art. The liposomes in turn may be conjugated with targeting substance(s), such as IgGFc receptors. Substances that increase macrophage phagocytosis such as zymosan or tetrachlorodecaoxygen (TCDO) and/or activation such as MCSF, GMCSF or IL-3 may be used to increase uptake of anti-proliferative agent(s).

Other agents can be administered in conjunction with (either prior to, with, or after) administration of an anti-MHRV agent.

#### PREPARATION OF ATTENUATED STRAINS OF MHRV

In addition to the above, utilizing the tissue culture systems and/or animal model systems, attenuated strains of MHRV can be constructed and/or isolated. These strains would be suitable for vaccines, or for the isolation of viral antigens.

Attenuated strains are isolatable after multiple passages in cell culture and/or an animal model. Detection of an attenuated strain in an infected cell or individual can be accomplished by techniques known in the art, and could include, for example, the use of antibodies to one or more epitopes encoded in MHRV as a probe or the use of a polynucleotide containing an MHRV sequence of at least about 8 nucleotides as a probe.

Alternatively, or in addition, an attenuated strain may be constructed utilizing the genomic information of MHRV provided herein, and utilizing recombinant techniques. Generally, deletion mutants of MHRV would be generated by deleting a region of the genome encoding, for example, a polypeptide related to pathogenicity, but which allows for at least some level of viral replication so as to effect an effective immune response to MHRV antigens to the vaccinated host. In addition, the genome construction would allow the expression of an epitope which gives rise to neutralizing antibodies for MHRV. The altered

WO 03/016491

PCT/US02/26249

genome could then be utilized to transform cells which allow MHRV replication, and the cells grown under conditions to allow viral replication.

In addition to their uses as vaccines, attenuated MHRV strains can also be used as sources for the commercial production of viral antigens. An attenuated virus for vaccine purposes can, for example, contain antigenic sites defined by study of diseased versus non-diseased-MHRV infected individuals in a form that infects primary macrophages. Such antigenic structures can then be expressed and isolated for use in vaccines.

#### MHRV-BASED VIRAL VECTORS

The MHRV genome can be used as the basis of a viral vector, *e.g.*, a shuttle vector, which can be used to generate recombinant MHRV vectors for manipulation and transfer of a recombinant nucleic acid encoding a gene product of interest. In one embodiment, the MHRV vectors of the invention comprise all or a portion of an MHRV genome which is modified to comprise a cloning site, preferably a multiple cloning site, which provides for a restriction site, preferably a unique restriction site, so as to facilitate insertion and ligation of a nucleic acid of interest. "Restriction site" as used herein is meant to refer to a nucleic acid sequence that is recognized and cleaved by a restriction enzyme. In another embodiment, a nucleic acid encoding a gene product of interest, which nucleic acid is heterologous to the MHRV genome (*i.e.*, is a nucleic acid not normally found in an MHRV genome), is inserted in a naturally-occurring, preferably unique, restriction site in the MHRV genome. Preferably, the nucleic acid of interest is operably inserted in the vector so as to provide for expression of the encoded gene product in a host cell (*in vitro* or *in vivo*) upon introduction of the MHRV vector into the host cell.

In one embodiment, expression of the recombinant MHRV vector in a suitable host cell provides for a replication competent recombinant MHRV viral particle, which is modified to contain a sequence encoding a gene product of interest. The cloning site and/or the recombinant, introduced nucleic acid of interest, can be inserted into the MHRV genome at any suitable site. In a specific embodiment, the cloning site and/or recombinant nucleic acid is inserted adjacent the MHRV genome *pol* region.

In another embodiment, the MHRV vector is rendered replication defective, *e.g.* by deletion or other modification to render the Gag envelope protein-encoding sequence, the polymerase (*pol*)-encoding sequence, or both nonfunctional. IN a specific embodiment, the cloning site and/or recombinant nucleic acid is inserted in the MHRV genome *pol* region so as to disrupt the polymerase-encoding sequence. The replication defective vector is then

WO 03/016491

PCT/US02/26249

modified to include a sequence encoding a gene product. Recombinant MHRV particles are then produced *in vitro* by introducing the recombinant, replication-defective MHRV vector into a packaging cell (generally a mammalian cell) that is modified to express (either constitutively or inducibly) the necessary viral components required for production of the MHRV viral particle, *e.g.*, a cell that expresses the MHRV gag, MHRV pol, or both as necessary to complement the modified elements of the recombinant MHRV vector. Co-expression of the MHRV vector in this modified recombinant host cell results in production of viral particles, which can then be isolated (*e.g.*, from the supernatant) and used to infect target cells.

10 The recombinant nucleic acid for insertion in the recombinant MHRV vector can be any nucleic acid of interest encoding any gene product of interest. The MHRV vector or MHRV viral particles can be used to modify a host cell either *in vitro* (*e.g.*, for *ex vivo* therapy) or *in vivo*. For example, the recombinant MHRV viral particles of the invention can be used to deliver a secreted polypeptide for production in a host cell *in vivo* for purposes of long term secretion of any soluble protein in which the patient is deficient or from which the patient would derive a therapeutic benefit. For example, recombinant MHRV particles can be used to deliver a gene encoding a blood clotting (*e.g.*, factor VIII) into macrophages prepared from autologous blood, which modified macrophages can be infused back into the host to provide a source of factor VIII, thereby alleviating hemophilia.

20 Recombinant MHRV vectors and recombinant MHRV viral particles are particularly attractive as gene delivery vehicles, in that MHRV efficiently infect non-dividing cells, *e.g.*, non-dividing macrophages, a characteristic not shared by the majority of retroviruses currently used in gene therapy. Thus recombinant MHRV vectors and recombinant MHRV viral particles may find particular use in delivery of gene products to or via such non-dividing cells, *e.g.*, macrophages, stem cells, and the like.

#### DEPOSITS

A deposit of biologically pure cultures of the following viruses was made with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, under the provisions of the Budapest Treaty, on or before the filing date of the present application. The accession number indicated is assigned after successful viability testing, and the requisite fees were paid. Access to said cultures will be available during pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be entitled to such under 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. All restriction on availability of said cultures to the

WO 03/016491

PCT/US02/26249

public will be irrevocably removed upon the granting of a patent based upon the application. Moreover, the designated deposits will be maintained for a period of thirty (30) years from the date of deposit, or for five (5) years after the last request for the deposit; or for the enforceable life of the U.S. patent, whichever is longer. Should a culture become nonviable  
 5 or be inadvertently destroyed, or, in the case of plasmid-containing strains, lose its plasmid, it will be replaced with a viable culture(s) of the same taxonomic description.

These deposits are provided merely as a convenience to those of skill in the art, and are not an admission that a deposit is required. A license may be required to make, use, or sell the deposited materials, and no such license is hereby granted. The deposit below was  
 10 received by the ATCC on or before the filing date of the present application.

Description	Strain Designation	ATCC Accession No.
MHRV culture in 1 ml ampules (stored at -80 °C)	MRV-med-6/01	

## EXAMPLES

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the present invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention nor are they intended to represent that the experiments below are all or the only experiments  
 15 performed. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g. amounts, temperature, molecular weights) but some experimental errors and deviations should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, molecular weight is weight average molecular weight, temperature is in degrees Centigrade, and  
 20 pressure is at or near atmospheric.

## EXAMPLE 1: PATIENTS WITH LYMPHOMA HAVE CIRCULATING ACTIVATED MACROPHAGES

Activated macrophages have been previously identified in the blood of patients with AIDS dementia (Pulliam et al. Lancet 349:692-695 (1997)). In preliminary studies, it was noted that patients with lymphoma also had unusual circulating macrophages that appeared  
 25 "activated" by virtue of high side scatter (flow cytometric light scattering of CD14 expressing cells) and activation markers such as CD69. Studies of these macrophages showed that they were both activated and proliferating, staining with the proliferation  
 30

WO 03/016491

PCT/US02/26249

markers PCNA, Ki-67. These cells also took up bromodeoxyuridine, a characteristic of proliferating cells.

5 A summary of percent PCNA staining on peripheral blood CD14 cells derived from patients with AIDS lymphoma and non-AIDS lymphoma as compared to blood from laboratory workers is shown in Fig. 2. PCNA staining was accomplished by obtained whole blood from AIDS and non-AIDS lymphoma patients, and laboratory worker controls. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the samples, and the cells fixed, permeabilized, and stained with anti-PCNA antibodies according to methods well known in the art. Staining for CD14 on the cells served as a control. Percent PCNA above 10 background of CD14 cells was calculated and plotted. Values obtained for controls (n=13), HIV-non-Hodgkin's lymphoma (NHL) (n=16), non-HIV-NHL (n=18) were each calculated. A 30% PCNA+ value served as a cutoff for conferring a positive value. As shown in Fig. 2, both AIDS and non-AIDS lymphoma patients had a higher frequency of elevated PCNA+CD14 cells (>30%, p=.03, .006 respectively) in their blood than did control (age 25- 15 45) laboratory workers. Studies of patients with the highest levels of PCNA+ CD14 cells revealed them to have chronic lymphomas of an indolent nature (follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, mycosis fungoides). These PCNA+ macrophages were also observed in AIDS lymphoma tissue specimens.

20 Studies were performed on a non-AIDS follicular lymphoma specimen to determine whether macrophages or macrophage like cells showed evidence for proliferation.

Fig. 3 shows a histological section containing a follicular dendritic cell in a low grade follicular lymphoma undergoing mitosis, suggesting the capability of this cell population for pathogenic proliferation. Furthermore, the mitotic figure is tripolar an abnormality thought to be diagnostic of malignancy. These data suggest that potentially pathogenic macrophage 25 like cells can be identified in non-AIDS lymphoma.

#### EXAMPLE 2: CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RETROVIRUS, MHRV

An index case of non-Hodgkin's lymphoma containing macrophages with characteristics consistent with those described in AIDS lymphoma was utilized in a virus 30 isolation attempt. The histology of this mantle cell lymphoma is shown in Fig. 4. The protocol for virus isolation and cultivation was as follows:

WO 03/016491

PCT/US02/26249

MHRV cultivation in human macrophages

The mantle histiocyte retrovirus (MHRV) was cultivated in human macrophages, and recovered from the cultured cells and medium for analysis. The protocols used are described below.

- 5       1) Original material: The original mantle cell lymphoma material was identified by Dr. Herndier who identified MCL-1 (patient LL) as a likely candidate tissue based on ultrastructural similarities observed in this tissue as compared to HIV lymphoma associated macrophages. The patient was a 51 year old man who was negative for HIV, HBV and HCV.
- 10       2) Macrophage preparations: Blood was obtained from the Stanford Blood center. Blood was drawn, prepared, and stored overnight at room temperature. Macrophages were then obtained from the blood the following morning as follows. The bags were cut open and an equal volume of DPBS (30 mls) was added to the blood. The diluted blood was placed into a 50 ml centrifuge tube, and 14 ml of Percoll (1.087 g/ml) was pipetted under the
- 15       blood. This was then centrifuged for 30 min at 1800 RPM.
- The top plasma layer was discarded and the cell layer at the interface was removed and placed into a clean 50 ml centrifuge tube. DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) was added to a total volume of 50 ml and the preparation was centrifuged at 1400
- 20       RPM for 10 min at room temperature. The supernatant was removed and the cell pellet was placed in a clean tube and resuspended in 25 ml of IMDM medium with 10% fetal bovine serum. The resuspended cells were then placed on a 150mm glass petri plate which had been incubated for 1 hour with fetal bovine serum. The cells were incubated on the petri plate for 1.5-2 hours at 37 degrees in a humidified CO<sub>2</sub> incubator.
- After the incubation, the medium was aspirated off and the attached cells were
- 25       washed 3 times in the petri dish with DPBS. The attached cells were then scraped off in 10 mls of DPBS and transferred to a clean 50 ml centrifuge tube. The volume of DPBS was increased to 50 mls, and the cells were centrifuged at 1200 RPM for 10 minutes. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 25 ml of medium and transferred to a T75 flask. The cells were then grown at 37 C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator. From each 30 ml
- 30       of blood, two T75 flasks were plated with macrophages.
- 3) MHRV propagation: Frozen tissue from LL, the patient with mantle cell lymphoma (MCL-1), was frozen and thawed three times and lysate (approx. 10<sup>7</sup> cells) was added to a T75 flask of macrophages 1 to 2 days after they were plated. The lysate was added directly to the medium over the cells, and incubated with the cells for 24 hours. After

WO 03/016491

PCT/US02/26249

the incubation period, the cells were washed with DPBS and then 15 mls of medium was placed over the cells. Medium was changed weekly.

To obtain material for MHRV propagation, the medium was aspirated from the cells, 5 ml of fresh medium was added over the cells, and the cells were scraped off of the flask surface using a cell scraper. These cells were then used for analysis, or to introduce the MHRV to new macrophage cultures after freezing and thawing 3-4 times. Cell free supernatants from productively infected primary co-cultures were also successfully used for MHRV transmission after filtration through a 0.22 micron filter.

4) Sample preparation and storage: Cell culture supernatants were replaced weekly and stored at -80°C until analyzed. Scraped cells were stored in liquid nitrogen until used for analysis or for propagation.

5) Cell growth and maintenance: Cells were grown in medium composed of (1) 50% Myelocult H5100 (Stem Cell Technologies), (2) 25% IMDM (Biowhittaker) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone), glutamine (Biowhittaker), and a Pen-strep solution (Biowhittaker), (3) 25% IMDM conditioned medium which had been incubated in a flask containing confluent human diploid fibroblasts. The medium was supplemented with M-CSF (1 microgram/ml, Sigma), IL-3 (1 micrograms/ml, Sigma), and an antibiotic-antimycotic supplement (Life Science Technologies).

6) Experimental samples: After preparation of the macrophage cultures, the cells were exposed to lysates containing the MHRV for 24 hours. The medium was then removed from over the cells approximately once a week, and stored at -80°C. At the end of the experiment, which was between 6 and 8 weeks, the cell monolayers were scraped off of the flasks and frozen in 10% DMSO/medium in liquid N<sub>2</sub>. These cells were used for electron microscopy.

Electron microscopy of MHRV infected primary macrophages: Transmission electron microscopy was performed on cells infected with MHRV for 1 month as described above. In the majority of cases where retroviral particles were observed, they were present in intracellular vacuoles and had characteristic morphology of a B/D type retrovirus. The classical morphology reproducibly observed for this retrovirus is shown in Figure 5. No similar particles were observed in parallel uninfected macrophage cultures from the same primary macrophage donors.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

## EXAMPLE 3: CLONING OF MHRV

The cloning strategy used to clone the MHRV genome is provided in Fig. 6. After sequencing of the initial *pol* protease gene fragment according to methods well known in the art, a homology search was performed and both the protease (*pro*) and the polymerase (*pol*) gene were found to have complete open reading frames encoding intact proteins similar to those previously described for the human endogenous retrovirus-K subfamily of viruses.

The initial closest homology was related to the HERV-K109 virus.

The subsequent cloning strategy employed MHRV specific primers extending both 5-prime and 3-prime from the initial *pol* protease gene. This strategy yielded stretches of DNA encoding for the entire length of the virion. BLAST analysis revealed that the MHRV sequence had the highest homology with the HERV-K109 genome. Virtual complete homology was observed at the 5' end in the *pol* gene, but with a heterologous region present in the *gag* region

Open reading frame analysis using the ORF finder tool (NCBI) of the MHRV genome sequence revealed an open reading frame encoding the MHRV GAG protein. The nucleotide sequence (SEQ ID NO:7) and predicted amino acid sequence (SEQ ID NO:8) of the 5' end of the GAG gene are as follows:

```

1301 atggtttccagaacaaggaactttagatctaaaagaagactggaa
      M V S R T R N F R S K R R L E
1346 aagaattggcaaggaactaaagcaggtaggaggtaatatcatt
      K N W Q G T K A G R K G N I I
1391 ccacttacagtatggaatgatggccattattaagcagcttta
      P L T V W N D W A I I K A A L
1436 gaaccatttcaagagaagaagatagtgtttcagtttctgatgcc
      E P F Q R E E D S V S V S D A
1481 cctggaagctgtgtaataagattgtaagacaagcagggaaaaaa
      P G S C V I D C K D K T G K K
1526 tcccagaagaaacggaagtttacattgcaaatatgtagcagag
      S Q K E T E S L H C K Y V A E
1571 ccagtaatggctcagtcacgcaaaatgttgactataatcaatca
      P V M A Q S T Q N V D Y N Q S
1616 attacaggggttgatatatcc 1636
      I T G V D I S

```

The nucleotide residue numbering is based on the position of the nucleotide within the preliminary MHRV genomic sequence (1-9182). The 5' end of the 304 bp PCR product is found within this sequence, beginning at nucleotide residue 1325 using the numbering set out above. These sequences are referred to herein as the MHRV 5' GAG nucleic acid and polypeptide sequences.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

The homologies related to the HERV-K109 are shown in Fig. 1. A High degree of homology was observed between the MHRV genome and the HERV-K109 genome after about nucleotide residue 3548 of the MHRV genome, with a significant degree of non-homology occurring just 5' to this region and encompassing the entire *gag* gene of the MHRV. Sequence analysis of the MHRV *gag* gene did not reveal any greater homology than the observed 93% homology with the HERV-K109 *gag* gene. Other viral *gag* elements similar to this region all fell within the HERV family, but were, however, much more distantly related than the HERV-K109. The sequence of the MHRV genome thus suggests a possible recombinational event between an unknown *gag*-containing exogenous retroviral element and HERV-K109, with subsequent production of an infectious retrovirus. Large open reading frames were present for all genes (*gag*, *pol*, *env*) required for viral replication.

EXAMPLE 4: MHRV DNA IS DETECTED IN THE ORIGINAL MANTLE CELL LYMPHOMA DNA, BUT NOT IN DNA ISOLATED FROM EITHER NORMAL DONORS OR AN HIV+ AIDS LYMPHOMA DNA SPECIMEN:

In order to test whether the MHRV would be a candidate unique virus present in the original mantle cell lymphoma, primers were constructed based on unique *gag* gene sequences and utilized to amplify DNA specimens prepared from the original mantle cell lymphoma DNA or DNA from a patient with AIDS related lymphoma. The sequence of the primers used (HERV-8, HERV-9, HERV-10, HERV-11, and HERV-12) are provided in Fig. 1. Amplification using the HERV-10 and HERV-11 primer pair (samples A and B, lane 3 of Fig. 7) should result in production of a PCR product of approximately 1966 bp; amplification using the HERV-9 and HERV-12 primer pair (samples A and B, lane 2 of Fig. 7) should result in an approximately 1321 bp PCR product; and amplification using the HERV-8 and HERV-9 primer pair (samples A and B, lane 1 of Fig. 7) should result in an approximately 304 bp PCR product. PCR amplification was carried out using DNA isolated from the original mantle cell lymphoma (MCL-1 DNA) and from an AIDS-Non-Hodgkin's lymphoma (AIDS-NHL DNA). PCR was carried out according to methods well known in the art, with a  $T_m$  of 65°C. Specifically, a DNA sample in 2 $\mu$ l (in the range of about 100ng DNA or less) was incubated in 5 $\mu$ l 10X buffer, with 1 $\mu$ l of 200 $\mu$ M dNTP, 3 $\mu$ l 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$ l of each of the primers (each at 400 nM), and 0.3 $\mu$ l of 1.5 $\mu$ M AmpliTaq DNA Polymerase, with 36.7 $\mu$ l water. The PCR cycles were as follows 3 min at 94°C; 40 cycles of 30sec at 94°C followed by 1min at 65°C; 2min at 68°C; and 10min at 68°C.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Fig. 7 shows the results of this analysis. As shown in lanes 1-3 (B, MCL-1 DNA), the three sets of gag-specific PCR primers all yielded specific gene products of a molecular weight as predicted based on the initial MHRV sequencing analysis. These sizes are shown on the right axis. The same sets of primers failed to amplify anything from DNA isolated from an HIV+ AIDS lymphoma DNA (A, AIDS-NHL DNA). The HERV-8/-9 primer pair failed to amplify any detectable PCR product from the HIV+ AIDS lymphoma DNA; a faint band was present using the HERV-9/-12 primer pair, and no full-length (1966 bp) PCR product was detected using the HERV-10/-11 primer pair (A, 1-3). Therefore MHRV specific primers did not detect sequence present in the normal human genome (A lanes). These data are consistent with detection of MHRV specifically from DNA in the patient's original tumor (B lanes).

Subsequent studies on blood specimens from this patient at a time when the lymphoma was in remission revealed MHRV specific DNA of the same sizes as described in Fig. 7. These data indicate that MHRV is present within the original tumor, and does not require the presence of tumor cells in order to be observed in blood specimens.

#### EXAMPLE 5: ANALYSIS OF THE MHRV GAG SEQUENCE

The MHRV full-length GAG polypeptide sequence described in Example 3 above was used as a query sequence (SEQ ID NO:9) in a BLAST analysis of GenBank. Exemplary results GenBank Accession Nos. AF164609 (SEQ ID NO:10) and Y08032 (SEQ ID NO:11) are shown below.

```

>gb|A051791.1| (AF164609) Gag-Pro-Pol protein [Homo sapiens]
      Length = 1177; Score = 162 bits (409), Expect = 4e-39
      Identities = 79/100 (79%), Positives = 88/100 (88%), Gaps = 2/100
25 (2%)
      Query: 5
      TRNFRSKRRLEKNWQGTKAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQREEDSVSDAPGSC 64
      T + + +R+ K + +AGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQ
30 EEDSVSDAPGSC
      Sbjct: 54 TLDLKDWRIGKELK--
      QAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSDAPGSC111

      Query: 65 VIDCKDKTGKKSQKQKTESLHCKYVAEPVMAQSTQNVVDYQ 104
      +IDC +RT KKSQKQKTESLHC+YVAEPVMAQSTQNVVDYQ
35 Sbjct: 112 IIDCNEKTRKKSQKQKTESLHCEYVAEPVMAQSTQNVVDYQ 151

```

WO 03/016491

PCT/US02/26249

```

>emb|CAA69289.1| (Y08032) gag [Human endogenous retrovirus K]
      Length = 666; Score = 161 bits (407), Expect = 6e-39
      Identities = 79/100 (79%), Positives = 88/100 (88%), Gaps = 2/100
(28)
5   Query: 5
      TRNFRSKRRLEKNWQGTGAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQREEDSVSDAPGSC 64
      EEDSVSDAPGSC      T + + +R+ K + +AGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQ
      Sbjct: 54  TLDLKDWRIGKELK--
10  QAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSDAPGSC111
      Query: 65  VIDCKDKTGKKSQKETESLHCKYVAEPVMAQSTQNVQ 104
      +IDC +KT KKSQKETESLHC+YVAEPVMAQSTQNVQ
15  Sbjct: 112  LIDCNEKTRKKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVQ 151

```

In each instance, no polypeptide matched the first four amino acids of the query MHRV GAG amino acid sequence. The N-terminal portion up to and including residue 22 of the MHRV GAG polypeptide showed little homology to known gag polypeptides.

20

EXAMPLE 6: MACROPHAGES INFECTED WITH MHRV PRODUCE INTACT VIRAL PARTICLES:

In order to test whether *in vitro* infection of primary macrophages with MHRV would yield viral particles, the following experiments were performed in accordance with the methods described above. Primary macrophage donors were infected with MHRV with parallel cultures of the same cells left uninfected. Methods were followed as above.

25

At 6 weeks after the initiation of infection, supernatants were obtained from the infected and uninfected cultures, debris pelleted, and the supernatant layered over a 25/45% sucrose step gradient. Ultracentrifugation was performed at 90,000G for 2 hours, and the gradient was fractionated into 4 sections. The upper medium containing section (A and B, lane 1, Fig. 8), the 25% sucrose section (A and B, lane 2, Fig. 8), the 25/45% banded material (A and B, lane 3, Fig. 8), and the pellet (A and B, lane 4, Fig. 8) were all treated with DNaseI and RNA was extracted. The same procedure was followed for supernatants from both infected and uninfected cells. MHRV specific primers (HERV-K8 and HERV-K9) were utilized in a reverse transcriptase PCR experiment on each of the gradient selected specimens.

30

As shown in Fig. 8, only the specimen from the MHRV infected culture 25/45% interface contained MHRV specific RNA as detected. There was no detectable MHRV particle associated RNA in any of the other fractions from the infected supernatant, neither were there detectable, amplifiable sequences from the uninfected control supernatants. These data are consistent with the detection of particle associated MHRV RNA produced by primary macrophages infected 6 weeks prior to analysis with a source of MHRV. Similar

35

WO 03/016491

PCT/US02/26249

experiments have been performed in 8 different primary macrophage donors with a confirmation of infection provided by electron microscopy showing the existence of viral particles within cells similar to those shown in Fig. 5.

The ability of isolated MHRV to infect cells in vitro suggest that the virus is likely to be transmissible in blood, and thus screening of the blood supply (including blood products such as plasma and serum) for MHRV is warranted, as is the screening of tissues and other biological materials that may contain MHRV infectious nucleic acid.

10 EXAMPLE 7: WESTERN BLOT ANALYSIS OF MHRV:

In order to test whether the original mantle cell lymphoma patient had shown an immunologic response against the MHRV specific proteins, plasma was obtained from this patient at a time when the patient was in complete remission (after bone marrow transplant). This plasma was a source of antibodies for testing against cell lysates obtained from infected and uninfected cells (as described above) to determine whether any MHRV specific proteins could be observed. Western blot was performed according to methods well known in the art.

Aliquots ( $2 \times 10^6$  cells) of infected and non-infected normal donor peripheral blood derived macrophages were boiled for 4 minutes in 0.5 ml of sample buffer (62.5 micromolar Tris-HCl, pH 6.8, with glycerol 25%, SDS, 2% and 0.01% bromophenol blue). 30 microliters of sample were loaded into 4-15% polyacrylamide gels (BIO-RAD, Richmond, CA) and processed essentially according to methods previously described (Ng et al. J Immunol 143:2501-2507 (1989)). Briefly, samples were run at 100v for 1 hour in 25 micromolar Tris, 192 micromolar glycine, 0.1% SDS, pH 8.3. Proteins were transferred to nitrocellulose (Scheicher & Schuell, Keene, NH) for 1 hour at 90 volts in 25 micromolar Tris, 192 micromolar glycine, 20% methanol transfer buffer. After overnight, 4°C, blocking with 2% milk/PBS, membranes were reacted with 1/100 dilution of patient plasma for 30 minutes, then washed with PBS. Anti-Human IgG alkaline phosphatase in PBS (Zymed, South San Francisco, CA) was then added for 30 minutes, then blots were washed with PBS. Detection of biotin-molecular weight markers (BIO-RAD) was accomplished by incubation with avidin-AP (Zymed). Detection of protein-antibody bands was by addition BCIP/NBT substrate (Zymed).

Fig. 9 shows a preliminary Western blot result showing specific bands present in infected as compared to uninfected primary macrophages. The samples are ordered as follows, from left to right: infected cell lysate plus the detectably labeled secondary

WO 03/016491

PCT/US02/26249

antibody anti-IgG-AP (C (for control), MHRV infected); infected cell lysate, patient plasma, and anti-IgG-AP (LL); anti-IgG-AP and uninfected cells (C, MHRV uninfected); and uninfected cells, patient plasma (LL), and anti-IgG-AP (LL, MHRV uninfected).

5 The patient plasma only reacted with the MHRV infected cells. The size of the observed protein bands (68kD and 80kD) may be due to glycosylation of the protein. Since the immune response in patients several months post bone marrow transplant is generally all T cell independent, the Western blot bands observed are likely to be the glycosylated forms (i.e., envelope) of MHRV proteins.

10 EXAMPLE 8: VIRAL CULTIVATION:

MHRV is isolated from frozen and/or fresh tissues in the same manner as described above. After cocultivation of primary tumor material/blood derived CD14+ (from cell sorting) for 1 month, adherent macrophages are scraped from the tissue culture flask, pelleted and prepared for electron microscopic analysis. Supernatants from those cells are frozen and evaluated for the presence of particle associated DNA-ase resistant RNA that bands at a sucrose density in a step gradient of 25-45% sucrose. Primers utilized for identification of MHRV representing universal protease and polymerase degenerative primer sets are used to identify the presence of particle associated virions as described in Fig. 1. Supernatant is isolated from any coculture that yields a positive result, the supernatant filtered through a 0.22 micron filter, and primary cultures reinoculated followed by a 1 month culture. The same EM and viral RNA characteristics are scored prior to further characterization/cloning of a potential novel retroviral element.

EXAMPLE 9: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY USING MHRV-BASED SEQUENCES

25 Because the MHRV gag gene has unique sequences which have allowed the development of specific PCR primer sets recognizing only MHRV, a molecular epidemiology study is performed to identify MHRV specific sequences in blood from patients with a broad range of chronic disease states. Other novel retroviral agents as they are discovered will be characterized in a manner similar to characterization studies as defined below for MHRV.

30 Source of patient material: Patient derived specimens are evaluated for the presence of MHRV specific sequences and/or antibody reactivities. The initial focus of molecular epidemiological studies is the evaluation of a series of lymphoma patient tissues as well as blood cells derived from those patients for the presence of MHRV specific sequences. A

WO 03/016491

PCT/US02/26249

broader study on the role of MHRV and its transmission capabilities is performed if MHRV specific sequences are identified within subsets of patients with lymphoma.

5 Other classes of specimen evaluated for MHRV specific sequences will include diseases which have been associated with finding HERV specific sequences in a variety of publications over the past 10 years. These include specimens from patients with multiple sclerosis, teratocarcinoma, breast cancer, and a variety of autoimmune diseases. All of these classes of material are currently available; tissue, where available, as well as PBMCs is evaluated for the presence of MHRV specific sequences. Control specimens from normal donors are obtained through a blood bank. After analysis of the results of this initial screen, 10 further control specimens from other disease states are evaluated. These primary pathologic tissues will also serve as a source of potential other MHRV related sequences, which are cloned and sequenced so as to determine degree of MHRV heterogeneity within different chronic disease settings.

15 EXAMPLE 10: CHARACTERIZATION OF MHRV GROWTH CHARACTERISTICS *IN VITRO*:

MHRV which was initially isolated from a primary mantle cell lymphoma tumor tissue. Expression appeared exclusively related to tumor associated macrophages (electron microscopy, not shown) was initially isolated in primary macrophage cultures *in vitro*. As discussed above, only infected cultures showed evidence for MHRV specific sequence 20 production in particle associated RNA isolation sucrose banding assays. This assay allows differentiation between actual virion associated packaged MHRV sequences as compared to contaminating endogenous retroviral RNAs, which are not typically packaged into intact viral particles.

A detailed host range analysis of MHRV in a variety of cell types is performed. Host 25 range studies include the use of primary cultured macrophages as a positive control, with attempts to infect a variety of tumor cell lines of human origin, normal cells (lymphocytes, fibroblasts, endothelial cells) and a variety of animal cell populations including mouse, rat, rabbit, bovine, as well as any other cell lines of different animal species should MHRV replicate in any non-human cell population.

30 An ultimate goal is to determine whether MHRV can infect non-human cells in order to develop a disease model for future study. MHRV viral production is monitored by tracking viral specific *gag* sequences by PCR. For *in vitro* propagation purposes, MHRV will continue to be grown in primary human macrophages and all virus isolation studies will

WO 03/016491

PCT/US02/26249

be performed on infected vs. uninfected macrophages from the same donor with preparations processed in parallel so as to track MHRV specific proteins during purification processes.

EXAMPLE 11: CHARACTERIZATION OF MHRV PROTEINS:

5 MHRV is highly related to human endogenous retrovirus. The study of MHRV specific proteins will yield the first view of what a potential replication competent human endogenous retrovirus protein profile could look like. As discussed above, open reading frames were observed in the HERV-K109 related protease, polymerase, and envelope genes.

10 MHRV produced in chronically infected macrophages are labeled with radioactive amino acids, and retroviruses produced by those cells isolated through sucrose gradient purification techniques. MHRV-specific proteins are visualized utilizing 2-dimensional gel electrophoresis with particle associated radioactive proteins from uninfected cells of the same donors serving as nonspecific control.

15 This will provide visualization of mature retroviral protein products from MHRV, and will also serve as a map for studying antibody reactivity in patients infected with MHRV (detected by DNA PCR amplification studies using MHRV specific primers) as compared to patients who are infected with a variety of other retroviruses such as HIV or HTLV-1 or simply have antibodies with broadly cross-reactive capabilities (such as patients with a variety of autoimmune diseases). This approach can also serve as a potential purification  
20 scheme for native retroviral proteins with their post-transcriptional/translational modifications as they occur in a package replication competent form.

EXAMPLE 12: DETECTION OF MHRV IN LYMPHOMAS

25 Using the 304 base pair primers DNA was amplified from a series of specimens isolated from patients as described above. The following were negative:

- a) 6 normal macrophage cultures, all uninfected, from different normal blood bank donors(Stanford);
- b) 2 AIDS lymphoma tissues and their uninvolved spleens (4 specimens);
- c) 4 normal peripheral blood DNA preparations, HIV negative; and
- 30 d) 2 non AIDS follicular lymphomas.

Five specimen were positive, as follows:

- 1) MT: AIDS ascites large cell lymphoma;
- 2) S93-268102: Non AIDS follicular lymphoma;
- 3) UV: The original MHRV RNA sequence;

WO 03/016491

PCT/US02/26249

- 4) S92-4336: Non-AIDS follicular lymphoma; and
- 5) BR: AIDS large cell lymphoma.

Notably, the MT lymphoma (1) immediately above) was previously used to establish high grade lymphomas in SCID mice by use of sorted CD14 cells; mouse lymphoma cells expanded *in vivo*, driven in part by the MT (MHRV+) lymphoma macrophages.

The amplified GAG sequence from each of 1-5 above was sequenced, and the sequences compared to that of the MHRV GAG (UV). The sequence of the MHRV GAG of the LL tissue represents the mantle cell lymphoma tissue DNA in which MHRV was originally identified. The alignment of the sequences are provided in Fig. 10.

The DNA sequence of the 304 bp PCR product of the LL tissue, the MT lymphoma, and the S93-268102 were identical. The DNA sequences of the 304 bp PCR product of the UV, S92-4336, and BR isolates each differ from the LL sequence by one nucleotide (nucleotide 232 of the 304 segment(G to A); nucleotide 89 (nucleotide 89, G to A); and nucleotide 168 (T to C), respectively.

These data indicate that MHRV is a human lymphoma associated virus, containing unique genetic sequences conserved between individual tumor associated isolates..

While the present invention has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

25

WO 03/016491

PCT/US02/26249

## CLAIMS

That which is claimed is:

1. An isolated mantle histiocyte retrovirus (MHRV) particle.  
5
2. The isolated MHRV particle of claim 1, comprising an RNA genome encoding a GAG polypeptide comprising an amino acid sequence of amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8.
- 10 3. The isolated MHRV particle of claim 1, comprising an RNA genome characterized in that PCR amplification using a first primer comprising SEQ ID NO:2 and a second primer comprising SEQ ID NO:3 produces an amplification product of about 304 bp.
- 15 4. The isolated MHRV particle of claim 3, wherein the 304 bp amplification product comprises the sequence of SEQ ID NO:1.
5. The isolated MHRV particle of claim 1, wherein the particle contains an RNA genome that, following infection and activity of viral reverse transcriptase, generates a cDNA that hybridizes under conditions of high stringency to a nucleic acid sequence of SEQ  
20 ID NO:1.
6. The isolated MHRV particle of claim 1 comprising an RNA molecule comprising a sequence corresponding to SEQ ID NO:1.
- 25 7. An isolated MHRV particle characterized by:  
being isolatable from a human lymphoma;  
having a particle diameter of from about 90 nm to 110 nm;  
having a membrane lipid bilayer;  
having an RNA genome visible by electron microscopy as a conical eccentric  
30 nucleoid; and  
having a GAG envelope polypeptide comprising amino acid residues 1-22 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.
8. An isolated MHRV particle characterized by:

WO 03/016491

PCT/US02/26249

- being isolatable from a human lymphoma;  
having a particle diameter of from about 90 nm to 110 nm;  
having a membrane lipid bilayer; and  
having an RNA genome visible by electron microscopy as a conical eccentric  
5 nucleoid; and  
wherein the RNA genome comprises a nucleic acid sequence corresponding to  
nucleotide residues 1-66 of SEQ ID NO:7.
9. An isolated mammalian cell infected with the virus of claim 1.
- 10 The isolated mammalian cell of claim 9, wherein the cell is a macrophage.
11. An isolated mammalian cell infected with the virus of claim 8.
- 15 12. The isolated mammalian cell of claim 11, wherein the cell is a macrophage.
13. The isolated mammalian macrophage of claim 10 or 12, wherein the macrophage  
produces MHRV particles.
- 20 14. An isolated polynucleotide comprising a sequence encoding a polypeptide  
comprising an amino acid sequence of at least 4 contiguous amino acid residues of amino  
acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8.
15. The isolated polynucleotide of claim 14, wherein the polynucleotide comprises a  
25 sequence encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 10  
contiguous amino acid residues of amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8.
16. An isolated polynucleotide comprising a sequence of at least 12 contiguous  
residues of nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7.
- 30 17. The isolated polynucleotide of claim 16, wherein the polynucleotide comprises a  
sequence of at least 33 contiguous residues of nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

18. The isolated polynucleotide of claim 17, wherein the polynucleotide comprises a sequence of at least 50 contiguous residues of nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

19. The isolated polynucleotide of claims 14-18, wherein the polynucleotide is less than about 1 kb in length.

20. The isolated polynucleotide of claims 14-18, wherein the polynucleotide is operably linked to a heterologous promoter element.

21. An isolated polynucleotide comprising a sequence that hybridizes under conditions of high stringency to at least a portion of the polynucleotide sequence of nucleotides 1-66 of SEQ ID NO:7.

22. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 65% identity to at least 12 contiguous nucleotides of nucleic acid residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

23. An isolated recombinant host cell containing the polynucleotide of any one of claims 14-22.

24. An isolated vector containing the polynucleotide of any one of claims 14-22.

25. An isolated MHRV GAG polypeptide.

26. An isolated polypeptide encoded by the polynucleotide of claims of any one of claims 14-22.

27. An isolated antibody that specifically binds the isolated MHRV GAG polypeptide of claim 25.

28. An isolated antibody that specifically binds the a polypeptide encoded by the polynucleotide of any one of claims 14-22.

29. A method for detecting mantle histiocyte retrovirus (MHRV) in a sample, the method comprising:

WO 03/016491

PCT/US02/26249

contacting a biological sample suspected of containing MHRV with an MHRV-specific probe, said contacting being for a time sufficient for binding of the MHRV-specific probe to the sample to form complexes between the probe and a probe target; and

5 detecting the presence or absence of complexes of the MHRV-specific probe and the probe target in the sample;

wherein detection of complexes in the sample indicates MHRV is present in the sample.

30. The method of claim 29, wherein the MHRV-specific probe and the probe target  
10 are nucleic acid, and wherein the MHRV-specific probe comprises at least 8 contiguous nucleotide residues of SEQ ID NO:1.

31. The method of claim 29, wherein the MHRV-specific probe and the probe target  
15 are nucleic acid, and wherein the MHRV-specific probe comprises at least 8 contiguous nucleotide residues of residues 1-66 of SEQ ID NO:7.

32. The method of claim 29, wherein the MHRV-specific probe is an MHRV-specific antibody and the probe target is an MHRV GAG polypeptide.

20 33. The method of claim 29, wherein the probe target is an anti-MHRV antibody and the MHRV-specific probe is a polypeptide comprising amino acid residues 1-22 of SEQ ID NO:8.

25 34. The method of claim 29, wherein the biological sample is selected from the group consisting of blood, blood-derived products, plasma, and serum.

35. The method of claim 29, wherein the biological sample comprises a tissue containing a macrophage or a macrophage-derived tumor cell.

30 36. A method for detecting a mantle histiocyte retrovirus (MHRV) in a sample, the method comprising:

contacting a biological sample suspected of containing MHRV with a first MHRV-specific nucleic acid probe and with a second MHRV-specific nucleic acid probe, wherein the first probe and the second probe each comprise at least 15 contiguous nucleotides of a

WO 03/016491

PCT/US02/26249

nucleic acid sequence of SEQ ID NO:7 or complement thereof, said contacting being under conditions effective to produce an amplified DNA product; and

detecting the presence or absence amplified DNA product;

5 wherein detection of amplified DNA product corresponding to an amplified DNA product expected from a nucleic acid sequence comprising SEQ ID NO:7 indicates the MHRV is present in the sample.

10 37. The method of claim 36, wherein the first probe comprises a sequence selected from the group consisting of HERV-9 and HERV-10

38. The method of claim 36, wherein the second probe comprises a sequence selected from the group consisting of HERV-8, HERV-11, and HERV-12.

15 39. The method of claim 36, wherein the first probe is HERV-8, the second probe is HERV-9, wherein detection of an amplified product of about 304 bp indicates MHRV is in the sample.

20 40. The method of claim 36, wherein the first probe is HERV-9 the second probe is HERV-12, wherein detection of an amplified product of about 1321 bp indicates MHRV is in the sample.

25 41. The method of claim 36, wherein the first probe is HERV-10 the second probe is HERV-11, wherein detection of an amplified product of about 1966 bp indicates MHRV is in the sample.

42. A kit for detection of mantle histiocyte retrovirus (MHRV), the kit comprising an MHRV-specific probe, wherein the probe is selected from the group consisting of:  
an MHRV-specific nucleic acid probe that specifically hybridizes to a sequence encoding an MHRV GAG polypeptide;

30 an MHRV-specific GAG antibody; and  
an MHRV polypeptide that specifically binds an anti-MHRV GAG polypeptide.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

43. A method of screening for anti-MHRV antiviral agents, the method comprising:  
contacting a candidate agent with a culture comprising a mammalian cell infected  
with MHRV, which cell produces viral particles; and  
detecting MHRV viral particles in supernatant of the culture;  
5 wherein a decrease in MHRV viral particles in the supernatant indicates that the  
candidate agent as activity as an anti-MHRV antiviral agent.
44. A method for detecting an MHRV-associated disease, the method comprising:  
contacting a biological sample with an MHRV-specific probe, wherein the biological  
10 sample was obtained from a subject suspected of having an MHRV-associated disease, said  
contacting being for a time sufficient for binding of the MHRV-specific probe to the sample  
to form complexes between the probe and a probe target; and  
detecting complexes of the MHRV-specific probe and the probe target in the sample;  
wherein detection of complexes in the sample indicates MHRV is present in the  
15 sample, which indicates the subject may have an MHRV-associated disease.
45. The method of claim 44, wherein the MHRV-associated disease is an MHRV-  
associated lymphoma.
- 20 46. The method of claim 44, wherein the MHRV-associated disease is selected from  
the group consisting of teratocarcinoma, multiple sclerosis, autoimmune rheumatic diseases,  
and schizophrenia.
47. A method for producing an MHRV GAG polypeptide of claim 25, the method  
25 comprising the steps of:  
a) culturing a recombinant host cell containing a recombinant MHRV GAG  
polypeptide-encoding polynucleotide sequence under conditions suitable for the expression  
of the polypeptide; and  
b) recovering the polypeptide from the host cell culture.  
30
48. An immunogenic composition comprising an immunogenic polypeptide, wherein  
the immunogenic polypeptide comprises an amino acid sequence of amino acid residues 1-  
22 of a GAG polypeptide of mantle histiocyte retrovirus (MHRV).

WO 03/016491

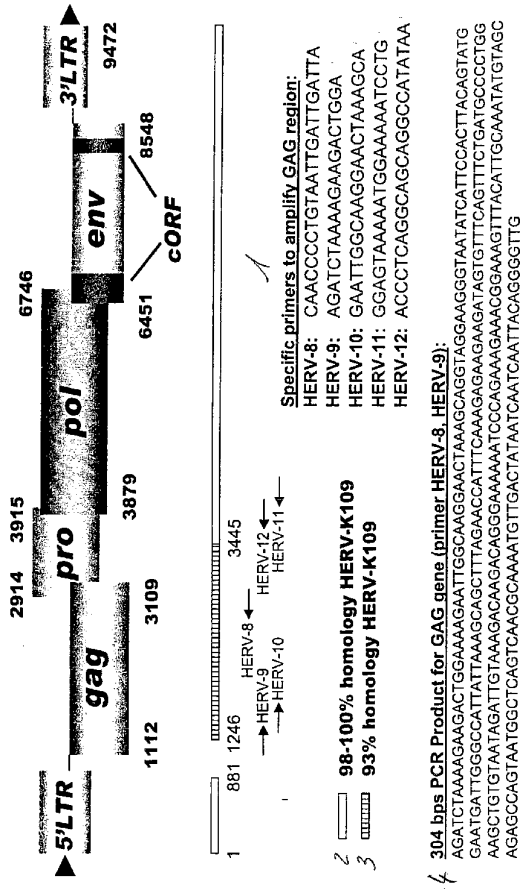
PCT/US02/26249

49. An immunogenic composition comprising a nucleic acid molecule having a sequence encoding an immunogenic polypeptide, wherein the immunogenic polypeptides comprises an amino acid sequence of amino acid residues 1-22 of a GAG polypeptide of mantle histiocyte retrovirus (MHRV), and wherein the nucleic acid sequence is adapted for expression in a mammalian cell.
50. An isolated recombinant MHRV vector, the vector comprising:  
the MHRV polynucleotide of any one of claims 14-22;  
at least one restriction site suitable for insertion of a heterologous nucleic acid; and  
a nucleic acid of interest comprising a sequence heterologous to the MHRV polynucleotide.
51. The isolated recombinant MHRV vector of claim 50, wherein the restriction site is non-naturally occurring in the MHRV genome.
52. An isolated recombinant MHRV particle comprising:  
a recombinant MHRV genome comprising the MHRV polynucleotide of any one of claims 14-22 and further comprising at least one restriction site suitable for insertion of a heterologous nucleic acid.
53. The isolated recombinant MHRV particle of claim 52, wherein the recombinant MHRV genome further comprises a nucleic acid comprising a sequence heterologous to the MHRV polynucleotide, wherein the nucleic acid is operably inserted for expression in a host upon introduction of the MHRV vector into the host cell.
54. The isolated recombinant MHRV particle of claim 52, wherein the MHRV particle is replication-defective.
55. The isolated recombinant MHRV particle of claim 52, wherein the MHRV particle is replication competent.

WO 03/016491

PCT/US02/26249

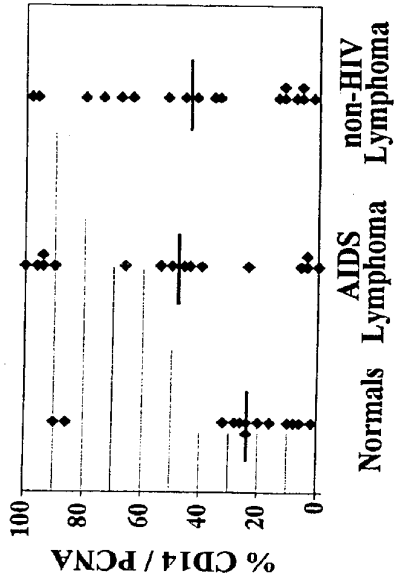
FIG. 1



WO 03/016491

PCT/US02/26249

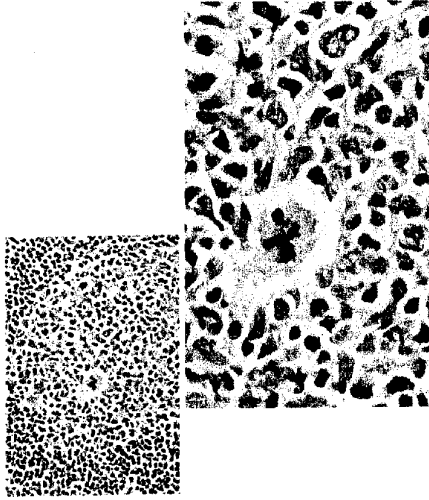
FIG. 2



WO 03/016491

PCT/US02/26249

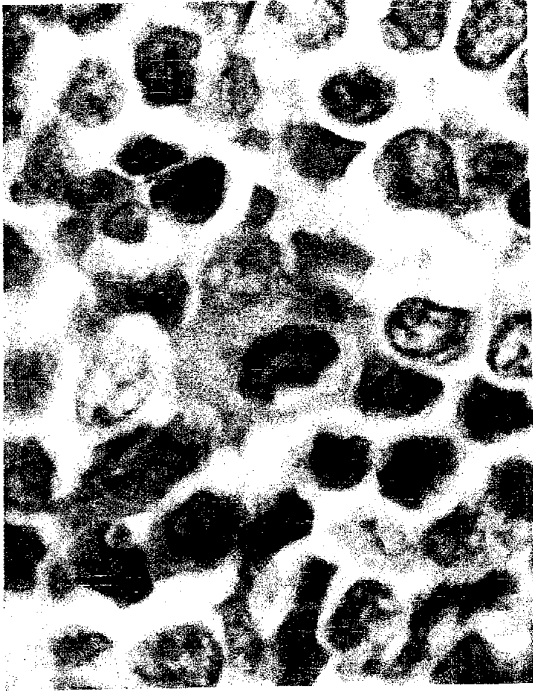
FIG. 3



WO 03/016491

PCT/US02/26249

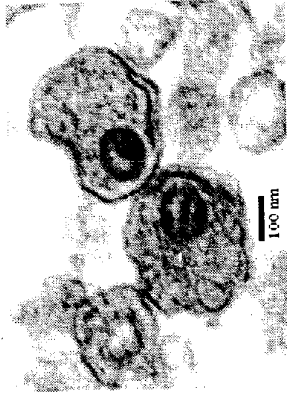
FIG. 4c



WO 03/016491

PCT/US02/26249

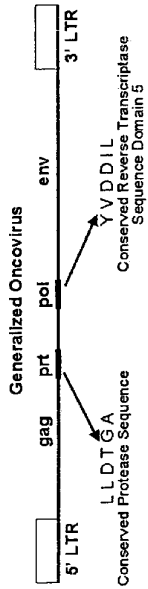
FIG. 5



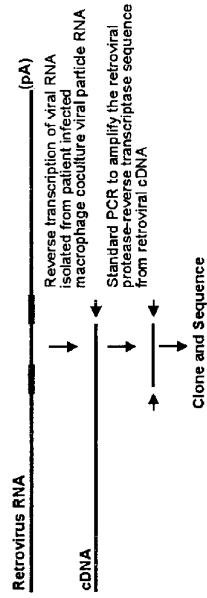
WO 03/016491

PCT/US02/26249

FIG. 6



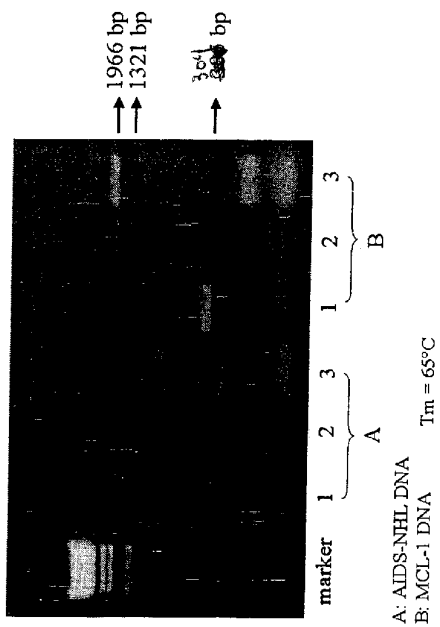
PCR primers are designed to amplify sequence flanked by the protease and the reverse transcriptase sequence motifs which are highly conserved in all known retroelements



WO 03/016491

PCT/US02/26249

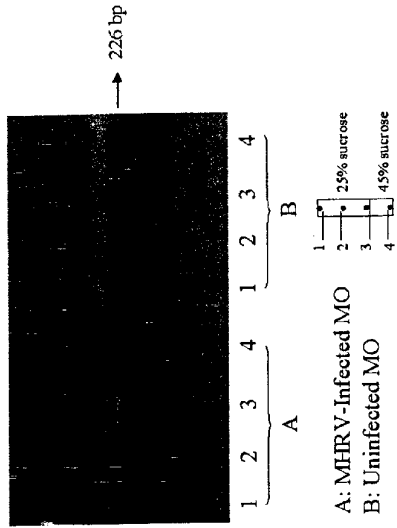
FIG. 7



WO 03/016491

PCT/US02/26249

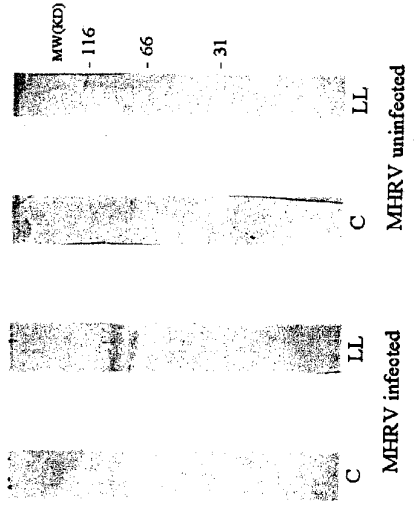
Fig. 8



WO 03/016491

PCT/US02/26249

FIG. 9



WO 03/016491

PCT/US02/26249

Figure 10

```

1                               50
LL AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG
MT AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG
S93-268102 AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG
UV AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG
S92-4336 AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG
BR AGATCTAAAA GAAGACTGGA AAAGAATTGG CAAGGAACTA AAGCAGGTAG

51                               100
LL GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
MT GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
S93-268102 GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
UV GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
S92-4336 GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA
BR GAAGGGTAAT ATCATTCCAC TTACAGTATG GAATGATTGG GCCATTATTA

101                              150
LL AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT
MT AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT
S93-268102 AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT
UV AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT
S92-4336 AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT
BR AAGCAGCTTT AGAACCATTT CAAAGAGAAG AAGTAGTGT TTCAGTTTCT

151                              200
LL GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA
MT GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA
S93-268102 GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA
UV GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA
S92-4336 GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA
BR GATGCCCTCG GAAGCTGTGT AATAGATTGT AAAGACAAGA CAGGGAAAAA

201                              250
LL ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
MT ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
S93-268102 ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
UV ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
S92-4336 ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG
BR ATCCCGAAAA GAAACGGAAA GTTTACATTG CGAATATGTA GCAGAGCCAG

251                              300
LL TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
MT TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
S93-268102 TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
UV TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
S92-4336 TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG
BR TAATGGCTCA GTCACCGCAA AATGTTGACT ATAATCAATC AATTACAGGG

301
LL GTTG (SEQ ID NO: )
MT GTTG (SEQ ID NO: )
S93-268102 GTTG (SEQ ID NO: )
UV GTTG (SEQ ID NO: 12 )
S92-4336 GTTG (SEQ ID NO: 13 )
BR GTTG (SEQ ID NO: 14 )

```

WO 03/016491

PCT/US02/26249

## SEQUENCE LISTING

<110> McGrath, Michael S.  
Herndier, Brian

<120> Retrovirus Isolated From Mantle  
Histiocytes In Mantle Cell Lymphoma

<130> UCSF-237W0

<140> To Be Assigned

<141> 2002-08-15

<150> 60/312,686

<151> 2001-08-15

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 304

<212> DNA

<213> Mantle histiocyte retrovirus

```

<400> 1
agatctaaaa gaagactgga aaagaattgg caaggaacta aagcaggtag gaagggtaat 60
atcattccac ttacagtatg gaatgattgg gccattatta agcagcttt agaaccattt 120
caagagaag agatagtggt ttcagtttct gatgcccttg gaagctgtgt aatagattgt 180
aaagacaaga aagggaaaaa stcccagaaa gaaacggaaa gtttacattg caaatatgta 240
gcagagccag taatggctca gtcaacgcaa aatgttgact ataatcaatc aattacaggg 300
gttg                                     304

```

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HERV-8 primer

```

<400> 2
caaccctgt aattgattga tta                                     23

```

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HERV-9 primer

```

<400> 3
agatctaaaa gaagactgga                                     20

```

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 03/016491

PCT/US02/26249

<223> HERV-10 primer

<400> 4  
gaattggcaa ggaactaaag ca 22

<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> HERV-11 primer

<400> 5  
ggagtaaaaa tggaaaaatc ctg 23

<210> 6  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> HERV-12 primer

<400> 6  
accctcaggc agcaggccat ataa 24

<210> 7  
<211> 336  
<212> DNA  
<213> Mantle histiocyte retrovirus

<400> 7  
atgggttcca gaacaaggaa ctttagatct aaaagaagac tggaaaagaa ttggcaagga 60  
actaaagcag gtaggaaggg taatatcatt ccacttacag tatggaatga ttgggccatt 120  
attaaagcag ctttagaacc atttcaaga gaagaagata gtgttcagtt ttctgatgcc 180  
cctggaagct gtgtaataga ttgtaagac aagacagggg aaaaatccca gaaagaaacg 240  
gaaagtttac atgcaaaata tgtagcagag ccagtaatgg ctcaagtcac gcaaaatggt 300  
gactataatc aatcaattac aggggttgat atatec 336

<210> 8  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mantle histiocyte retrovirus

<400> 8  
Met Val Ser Arg Thr Arg Asn Phe Arg Ser Lys Arg Arg Leu Glu Lys  
1 5 10 15  
Asn Trp Gln Gly Thr Lys Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu  
20 25 30  
Thr Val Trp Asn Asp Trp Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe  
35 40 45  
Gln Arg Glu Glu Asp Ser Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys  
50 55 60  
Val Ile Asp Cys Lys Asp Lys Thr Gly Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr  
65 70 75 80  
Glu Ser Leu His Cys Lys Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser  
85 90 95  
Thr Gln Asn Val Asp Tyr Asn Gln Ser Ile Thr Gly Val Asp Ile Ser  
100 105 110

WO 03/016491

PCT/US02/26249

<210> 9  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Mantle histiocyte retrovirus

<400> 9  
 Thr Arg Asn Phe Arg Ser Lys Arg Arg Leu Glu Lys Asn Trp Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu Thr Val Trp Asn  
 20 25 30  
 Asp Trp Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe Gln Arg Glu Glu  
 35 40 45  
 Asp Ser Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys Val Ile Asp Cys  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Thr Gly Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr Glu Ser Leu His  
 65 70 75 80  
 Cys Lys Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser Thr Gln Asn Val  
 85 90 95  
 Asp Tyr Asn Gln  
 100

<210> 10  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 Thr Leu Asp Leu Lys Asp Trp Lys Arg Ile Gly Lys Glu Leu Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu Thr Val Trp Asn Asp Trp  
 20 25 30  
 Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe Gln Thr Glu Asp Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys Ile Ile Asp Cys Asn Glu  
 50 55 60  
 Lys Thr Arg Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr Glu Ser Leu His Cys Glu  
 65 70 75 80  
 Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser Thr Gln Asn Val Asp Tyr  
 85 90 95  
 Asn Gln

<210> 11  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Human endogenous retrovirus K

<400> 11  
 Thr Leu Asp Leu Lys Asp Trp Lys Arg Ile Gly Lys Glu Leu Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu Thr Val Trp Asn Asp Trp  
 20 25 30  
 Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe Gln Thr Glu Asp Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys Leu Ile Asp Cys Asn Glu  
 50 55 60  
 Lys Thr Arg Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr Glu Ser Leu His Cys Glu  
 65 70 75 80  
 Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser Thr Gln Asn Val Asp Tyr  
 85 90 95

WO 03/016491

PCT/US02/26249

Asn Gln

```
<210> 12
<211> 304
<212> DNA
<213> Mantle histiocyte retrovirus (UW)

<400> 12
agatctaaaa gaagactgga aaagaattgg caaggaacta aagcaggtag gaagggtaat 60
atcattccac ttacagtatg gaatgattgg gccattatta aagcagcttt agaaccattt 120
caaagagaag aagatagtgt ttcagtttct gatgcccctg gaagctgtgt aatagattgt 180
aaagacaaga cagggaaaaa atcccagaaa gaaacggaaa gtttacattg caaatatgta 240
gcagagcccag taatggotca gtcaacgcaa aatgttgact ataatcaatc aattacaggg 300
gttg 304

<210> 13
<211> 304
<212> DNA
<213> Mantle histiocyte retrovirus (S92-4336)

<400> 13
agatctaaaa gaagactgga aaagaattgg caaggaacta aagcaggtag gaagggtaat 60
atcattccac ttacagtatg gaatgattag gccattatta aagcagcttt agaaccattt 120
caaagagaag aagatagtgt ttcagtttct gatgcccctg gaagctgtgt aatagattgt 180
aaagacaaga cagggaaaaa atcccagaaa gaaacggaaa gtttacattg cgaatatgta 240
gcagagcccag taatggotca gtcaacgcaa aatgttgact ataatcaatc aattacaggg 300
gttg 304

<210> 14
<211> 304
<212> DNA
<213> Mantle histiocyte retrovirus (Braggs)

<400> 14
agatctaaaa gaagactgga aaagaattgg caaggaacta aagcaggtag gaagggtaat 60
atcattccac ttacagtatg gaatgattgg gccattatta aagcagcttt agaaccattt 120
caaagagaag aagatagtgt ttcagtttct gatgcccctg gaagctgcgt aatagattgt 180
aaagacaaga cagggaaaaa atcccagaaa gaaacggaaa gtttacattg cgaatatgta 240
gcagagcccag taatggotca gtcaacgcaa aatgttgact ataatcaatc aattacaggg 300
gttg 304
```

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/016491 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 7/00, C12Q 1/68, 1/70
- (21) International Application Number: PCT/US02/26249
- (22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/312,686 15 August 2001 (15.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607-5200 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MCGRATH, Michael, S. [US/US]; 1452 Benito Avenue, Burlingame, CA 94010 (US). HERNIER, Brian [US/US]; 12816 Camino del Valle, Poway, CA 92064-1812 (US).
- (74) Agent: FRANCIS, Carol L.; Boskovic, Field & Francis LLP, 200 Middlefield Road, Suite 200, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 4 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/016491 A3

(54) Title: RETROVIRUS ISOLATED FROM MANTLE HISTIOCYTES IN MANTLE CELL LYMPHOMA

(57) Abstract: The present invention features an isolated, intact virus associated with human lymphoma, and originally isolated from a mantle cell lymphoma, referred to herein as a mantle histiocyte retrovirus (MHRV). The invention also features compositions and methods for detecting MHRV, as well as methods and compositions for propagating MHRV *in vitro*, screening for anti-MHRV agents, and generation of attenuated MHRV strains.

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月31日(2003.1.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

連邦によって後援された調査に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号U01: CA66529およびCA67381の下に政府支援を伴ってなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有し得る。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/26249															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>																	
IPC(7) : C12N 7/00; C12Q 1/68, 1/70 US CL : 435/ 5, 6, 69.1, 235.1, 320.1; 530/ 300, 350; 536/23.1, 23.72 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>																	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/ 5, 6, 69.1, 235.1, 320.1; 530/ 300, 350; 536/23.1, 23.72																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 6,242,201 A (LANE et al.) 05 June 2001 (05.06.2001), See SEQ ID# 28residues 13-17 for match of SEQ ID#8 positions 10-14 in claim 14.	14															
X	NETO, E. D. et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. Proceedings of the National Academy of Science. March 2000, Vol. 97, No. 7, pages 3491-3496, see Accession# BQ380133 bases 267-326.	16-19, 21															
A	BOLLER, K. et al. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. Journal of Virology. June 1997, Vol. 71, No. 6, pages 4581-4588.	1-22, 24-25, 26-27, 32-33, 40-41, 44-46															
A	SUGIMOTO, J. et al. Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. Genomics. 2001, Vol 72, No. 2, pages 137-144.	1-22, 24-27, 32-33, 40-41, 44-46															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:33%">*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</td> <td style="width:33%">*I* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> <td style="width:33%"></td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*&amp;* document member of the same patent family</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	*I* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	*I* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																
*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family																
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 30 April 2003 (30.04.2003)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2003															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Myron G. Hill</i> Myron G. Hill Telephone No. 703-308-0196															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US02/26249
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>	
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 23, 26, 28, and 50-55 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1- 22, 25, 29- 31, 34- 35, 36- 39, 42, 43, 47- 49
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26249

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

Claims 23, 24, 26, 28, and 50-55 are not being considered because they are improper multiple dependent claims.

Group I, claim(s) 1-22, 25, 29-31, 34-35, 36-39, 42, 43, 47-49 drawn to an isolated MHRV particle comprising nucleic acid and polypeptide, method of making, method of using and detecting using PCR, peptide or nucleic acid.

Group II, claim(s) 27, drawn to an antibody.

Group III, claim(s) 29, 32-35, and 42, drawn to a method to detect MHRV in a sample using an antibody or in a kit with antibody.

Group IV, claim(s) 36 and 39-41, drawn to a method for detecting MHRV using HERV probes.

Group V, claim(s) 44-46, drawn to a method for detecting MHRV associated disease.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I is directed to an isolated MHRV particle, which is the first product. The special technical feature is the specific particle comprising nucleic acid and peptide. Groups II-V are drawn to structurally different products (antibodies) and different methods (methods to detect using any specific MHRV probe) which do not require each other for their practice and do not share the same or a corresponding technical feature. Group IV is drawn to a method of detecting using HERV probes which are not part of the special technical feature of Group I. Note that PCT Rule 13 does not provide for multiple products or methods within a single application. Group V is drawn to a method detecting a disease associated with MHRV and it requires individuals suspected of having an associated disease and does not require the special technical feature of group I, it could use an antibody. Since the special technical feature of the Group I invention is not present in the Group II-V claims, and the special technical features of the Group II-V inventions are not present in the Group I claims, unity of invention is lacking.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST- USPAT, PG PUB, abstracts - EPO, JPO, Derwent  
terms- retrovirus, mantle, histocytes, lymphoma, MHRV, HERV

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	H
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マクグラス ミカエル エス .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 バーリングゲーム ベニート アベニュー 1 4 5 2

(72) 発明者 ヘルンデル ブライアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ポーウェイ カミノ デル バレ 1 2 8 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA32 BA51 CA04 CA09 EA02 GA11 HA12 HA15  
 4B063 QA12 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ10 QQ13 QQ42 QQ52 QQ79  
 QR55 QR59 QR62 QR77 QR79 QR80 QS24 QS25 QS33 QS34  
 QX01  
 4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72  
 FA74

专利名称(译)	从地幔细胞淋巴瘤的地幔细胞小球中分离出的逆转录病毒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005508154A</a>	公开(公告)日	2005-03-31
申请号	JP2003521800	申请日	2002-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	该Rejentsu大学加州		
[标]发明人	マクグラスミカエルエス ヘルンデルブライアン		
发明人	マクグラス ミカエル エス. ヘルンデル ブライアン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 C07K14/15 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/01 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33 /569		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 C12N7/00 C12N2740/10021 C12N2740/10022 G01N33/56983 G01N2333/15 Y10S435/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/15 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33 /569.H C12N5/00.B C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063 /QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065 /AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065 /CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/312686 2001-08-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的特征在于与人淋巴瘤相关的分离的完整病毒，其最初从套细胞淋巴瘤中分离，在本文中称为套细胞组织细胞逆转录病毒（MHRV）。本发明还涉及用于检测MHRV的组合物和方法，以及用于体外繁殖MHRV，筛选抗MHRV剂和产生减毒MHRV毒株的方法和组合物。

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.)

(5) Int. Cl. <sup>7</sup>	FI	テーマコード(参考)
<b>C12N 15/09</b>	C12N 15/00	ZNA A 2G045
<b>C07K 14/15</b>	C07K 14/15	4B024
<b>C07K 16/10</b>	C07K 16/10	4B063
<b>C12N 1/15</b>	C12N 1/15	4B065
<b>C12N 1/19</b>	C12N 1/19	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 142 頁) 最終頁に付	
(2) 出願番号	特願2003-521800(P2003-521800)	(7) 出願人
(8) (2) 出願日	平成14年8月15日(2002.8.15)	ザ・レジェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
(8) 翻訳文提出日	平成16年2月16日(2004.2.16)	ィ・オブ・カリフォルニア
(8) 国際出願番号	PCT/US2002/026249	The Regents of The
(8) 国際公開番号	W02003/016491	University of Cali
(8) 国際公開日	平成15年2月27日(2003.2.27)	ornia
(3) 優先権主張番号	60/312,686	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9
(3) 優先日	平成13年8月15日(2001.8.15)	607 オークランド フランクリン
(3) 優先権主張国	米国(US)	トリート 1111 12ス フロア
		(7) 代理人 100102978
		弁理士 清水 初志
		(7) 代理人 100103774
		弁理士 橋本 一彦
		(7) 代理人 100128048
		弁理士 新見 浩一