

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4934258号  
(P4934258)

(45) 発行日 平成24年5月16日(2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/15 (2006.01)	C O 7 K 14/15	
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
請求項の数 22 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2001-518660 (P2001-518660)  
 (86) (22) 出願日 平成12年6月30日(2000.6.30)  
 (65) 公表番号 特表2003-507050 (P2003-507050A)  
 (43) 公表日 平成15年2月25日(2003.2.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/018279  
 (87) 国際公開番号 W02001/000829  
 (87) 国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)  
 審査請求日 平成19年6月29日(2007.6.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/141,626  
 (32) 優先日 平成11年6月30日(1999.6.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 502137178  
 ザ アドミニストレイターズ オブ ザ  
 テューレイン エデュケイショナル ファ  
 ンド  
 アメリカ合衆国 ルイジアナ州 7011  
 2-2699 ニュー オリーンズ テュ  
 ーレイン アベニュー 1430  
 (74) 代理人 100059959  
 弁理士 中村 稔  
 (74) 代理人 100067013  
 弁理士 大塚 文昭  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100086771  
 弁理士 西島 孝喜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌のヒト内在性レトロウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、3、4、5、6、7、8、21、23、25、27、若しくは 29 を含む単離 DNA 分子。

【請求項 2】

さらに検出部分を含む請求項 1 に記載の単離 DNA 分子。

【請求項 3】

希釈剤に懸濁又は溶解されている請求項 1 に記載の単離 DNA 分子。

【請求項 4】

前記希釈剤が緩衝水溶液である請求項 3 に記載の単離 DNA 分子。

10

【請求項 5】

前記 DNA 分子が 0.1ng/μl ~ 100 μg/μl の濃度で存在する請求項 3 に記載の単離 DNA 分子。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の DNA 分子によってコードされる精製ポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 12、13、14、15、16、17、18、22、24、26、28、若しくは 30 である請求項 6 に記載の精製ポリペプチド。

【請求項 8】

医薬組成物中に存在する請求項 6 又は 7 に記載の精製ポリペプチド。

20

## 【請求項 9】

抗体の調製における抗原として請求項 6 又は 7 に記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 10】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項 9 に記載の使用。

## 【請求項 11】

請求項 1 記載の DNA 分子に対応する RNA。

## 【請求項 12】

ベクターに組み込まれている請求項 1 に記載の単離 DNA 分子であって、前記 DNA 断片が異種プロモーターの転写調節下にある単離 DNA 分子。

## 【請求項 13】

以下の細胞型の少なくとも 1 種内で前記断片の DNA 配列を発現する請求項 12 に記載のベクター：昆虫細胞、細菌細胞、鳥類細胞、イースト細胞、又は哺乳類細胞。

## 【請求項 14】

前記ベクターが、以下の細胞型の少なくとも 1 種内でエピソーム複製又は染色体組込み可能である請求項 12 に記載のベクター：昆虫細胞、細菌細胞、鳥類細胞、イースト細胞、又は哺乳類細胞。

## 【請求項 15】

以下の工程を含む乳癌ウイルス DNA の存在を検出するインビトロ方法：

- i) 請求項 1 記載の DNA 分子を含む疑いのある生体試料を、ポリメラーゼ鎖反応を行い DNA 分子を増幅し、それによりアンプリコンを生成することにより解析する工程、及び
- ii) 前記アンプリコンの配列を決定するか、又はそうでなくても特徴づけて、前記試料中に前記 DNA 分子が存在するか否かを決定する工程。

## 【請求項 16】

1 種以上の乳癌ウイルスポリペプチドを認識する抗体の存在を検出するインビトロ方法であって、以下の工程を含む方法：

- i) 少なくとも 1 種の請求項 6 又は 7 記載の精製ポリペプチドを得る工程、
- ii) 前記ポリペプチドと乳癌ウイルスポリペプチドに対して特異的な抗体を含む疑いのある試料を用いて、免疫化学的解析を行う工程、及び
- iii) 工程 ii) の結果を解析して、前記試料中に前記ポリペプチドと特異的に相互作用する抗体が存在するか否かを決定する工程。

## 【請求項 17】

工程 ii) の免疫化学的解析がウェスタンブロット解析である請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

工程 ii) の免疫化学的解析がエンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイ (ELISA) である請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記抗体が以下のポリペプチド配列番号 12、13、14、15、16、17、18、22、24、26、28、若しくは 30 の 1 種以上に特異的である請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 20】

乳癌ウイルスから DNA 又は RNA を検出するための診断用キットであって、請求項 1 記載の DNA 分子を含む試薬を包含する前記キット。

## 【請求項 21】

乳癌ウイルスに対する抗体を検出するための診断用キットであって、以下の 1 つ又は両方を含む試薬を包含する前記キット：

- i) 1 種以上の請求項 6 又は 7 記載のポリペプチド、又は
- ii) 請求項 6 又は 7 記載のポリペプチドに特異的な抗体。

## 【請求項 22】

以下の工程を含む、試料中の乳癌ウイルス RNA の検出のためのインビトロ方法：

- i) 請求項 1 記載の 1 種以上の DNA 配列によりコードされる RNA を含む疑いのある試

10

20

30

40

50

料を使用してRNAアーゼ保護アッセイ(RPA)を行う工程、及び  
ii) 前記RPAの結果を解析して、前記試料中に工程i)で定義されるようなRNAが存在するかを決定する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本出願は1999年6月30日に提出された米国仮特許出願番号60/141,626の優先権を得ており、この仮出願の全文は参照によって本明細書に明確に取り込まれる。

1. 発明の分野

本発明は、発癌性障害、特に乳癌の検出、予後評価、及び治療のための組成物及び方法に関する。

10

詳細には、本発明は、ヒト、ネコ、及び非ヒト霊長類のサブセット中に存在する新規に同定された内在性レトロウイルスに関連する障害を同定及び治療するのに有用な組成物を提供する。

【0002】

2. 本発明で提言される技術的課題

公知の感受性遺伝子の変異が、すべての乳癌の理由とはならない

乳癌(BC)は、女性の癌死亡の主な理由の1つである。BCの誘発は、宿主の遺伝的、ホルモンの、免疫学的及び生理的状态、並びに食生活及び化学薬品、放射性又は感染性物質への曝露を含むいくつかの因子の相互作用に関わると考えられる。現在、BRCA-1及びBRCA-2を含むいくつかの遺伝子の変異が、BCの発生の非常に高いリスクをもたらす得ることは明らかである。しかし、公知のBC感受性遺伝子の欠陥は、BC、いわゆる家族性症例のたった約5%の理由ではない(Armstrongら,2000;Gaytherら,1998)。

20

他のタイプの癌におけると同様に、散発的に生じるBCにウイルスが病原学的に關与する可能性は取り除かれていない。その結果、何らかのウイルスがBCの発生に時折つながらとしたら、それを決定することが長い間要望されている。このようなウイルスの同定は、おそらくBC医学における次の分野：予防、診断、予後の判定、及び治療に貴重な助けを与えるだろう。

【0003】

3. 関連技術の説明

マウスにおける乳癌のレトロウイルス誘発

マウス乳癌ウイルス(MMTV)、B型レトロウイルスは、1930年代にジャクソン研究所でマウスの遺伝性癌の研究中に発見された(Bittner,1936)。遅発性癌化レトロウイルスのプロトタイプのように、MMTVはマウス内でBCを生じさせることが決定的に示された。先行研究は、MMTVが内在性プロウイルスとして生殖系列内で、また乳汁を介して外因的に、両方で伝播されることを確証した。内在性要素として、MMTVプロウイルスはゲノム中の他の配列と同様にメンデル遺伝のパターンに従う(Cohenら,CeIl,1979;Cohen及びVarmus,1979,1980;Trainaら,1981;Traina-Dorge及びCohen,1983;Traina-Dorgeら,1985;Varmusら,1978)。MMTVの水平伝播は、典型的には感染ダムの乳汁中に存在するMMTVビリオンによるマウスの子の感染によって起こる。このように、授乳によってマウスにMMTVを伝播できる。内在性MMTVの30以上の特異的プロウイルス組込み部位が同定されている。しかし、いずれの内在性MMTVプロウイルスも運ばない野生マウスもいる(Cohen及びVarmus,1979;Cohenら,1982)。この結果は、多くの内在性MMTVプロウイルスが比較的最近マウスゲノムに加わったことを示唆している。最も有望な説明は、Mus属のいろいろな種及び亜種間の進化的分割後の複数機会にMMTVが特定のマウス(他のマウスではなく)の生殖系列に入ったということである。特定の内在性MMTVはホルモンによって活性化され、長い潜伏期間後に乳癌を誘発できる感染性ビリオンを形成することができる。ほとんどの内在性MMTVプロウイルスは不完全で、感染性ビリオンをコードしない。

30

40

50

## 【 0 0 0 4 】

MMTV遺伝子と発癌性の細胞性遺伝子の役割

MMTV O r f タンパク質は、スーパー抗原 ( S A ) として機能しうる。胎児性 / 初期発生の際に胸腺内で発現されると、それは S A 反応性の T 細胞の完全又は不完全な欠失を媒介できる。 S A 発現は、育児している子の腸関連リンパ系組織内で M M T V の B 細胞標的を活性化するために必要である。従って、 S A 応答性クローンの完全な欠失はマウスに腸内 M M T V 感染に対する抵抗性を与え、ひいては M M T V 誘発型腫瘍の発生率を低くする。他方、リンパ系細胞の部分的にのみ欠失された応答性クローンを有するマウスでは、 S A 活性化は標的の拡大及び M M T V の伝播を刺激する。雌の感染動物が思春期に達すると、エストロゲンホルモンがそのホルモン応答性要素 ( H R E ) を通じて M M T V ロングターミナルリピート ( L T R ) を発現させる。これは、 M M T V の生産と構築及び乳房及び卵巣を含む他のホルモン感受性組織へのウイルスの伝播を可能にする。 M M T V L T R s をプロト癌遺伝子 Int、Wnt 及び Fgf のような特定の細胞性遺伝子に隣接して組込むと、これら遺伝子の発現を増大し、その結果 B C 及び他の癌になりうる。

10

## 【 0 0 0 5 】

MMTV間の分子遺伝相互作用、そのマウス宿主の免疫系、及びこのレトロウイルスによって悪性に形質転換された乳房や他のホルモン感受性細胞について広範に研究されている。 M M T V は、挿入突然変異誘発によってマウスの乳腺癌の成長を促進する ( Varmus ら, 1978 ; Varmus ら, 1985 ) 。 M M T V プロウイルス L T R 要素は、 Wnt、 Fgf 及び Int を含む種々の細胞性発癌遺伝子のステロイドホルモン依存性トランス活性化を方向づけし、それによって腫瘍細胞のクローン拡大を促進する ( Shackelford 及び Varmus, 1987, Shackelford ら, 1993 ; Jakobovits ら, 1986 ; Nusse, 1991 ; Nusse ら, 1985 ) 。生産的な持続性感染及びその複製サイクルの完成のため、 M M T V はスーパー抗原を含み、かつ機能的な宿主免疫系と相互作用しなければならない ( Golovkina ら, 1995 ; Luther 及び Acha-Orbea, 1996 ; Coffin, 1992 ) 。

20

## 【 0 0 0 6 】

ヒト乳癌ウイルスの検索

発癌遺伝子 M M T V の発見は、多くの研究者がヒトの B C に対するレトロウイルス病因学を探求するのを促した ( Sarkar, 1980 ) 。過去 5 0 年にわたって収集されたデータは、 M M T V のヒト相同体の存在を示唆している。 1971 年、 Moore と共同研究者らは、一般的集団の 5 % と比較して B C 患者由来のヒト乳汁試料の 60 % が電子顕微鏡で M M T V と識別不能な B 型粒子を含有していることを報告した ( Moore ら, 1971 ) 。この研究者らは、インドの 39 % の Parsi 女性、すなわち B C の発生率が 2 倍多い近交系集団が彼女たちの乳汁中に B 型粒子を有することをも報告した ( Das ら, 1972 ; Moore, 1971 ) 。いくつかの研究によって、 B C 細胞は、すべてのレトロウイルスに付随する酵素である逆転写酵素 ( R T ) をも含有するが、正常組織由来の細胞は含有しないことが示された。正常組織由来でない細胞を除き、多くの研究者は、 M M T V と反応性の抗体の存在について血清及び母乳を調査した。これら研究のほとんどが、プレ A I D S 段階で、献血中の H I V 抗体の検出に必要とされる抗レトロウイルス抗体を検出するための高感度かつ特異な技術が出現する前に行われた。

30

40

## 【 0 0 0 7 】

ヒト乳癌組織、乳汁、患者の血清、及び M M T V のヒト相同体の存在を示唆する乳癌細胞系に関する多くの電子顕微鏡、生化学及び免疫学的研究にもかかわらず、このような物質が存在するという証拠は依然として排他的なままである ( Andersson ら, 1996 ; Ziegler, 1997 ) 。ほとんどの著者は、多くのヒト内在性レトロウイルス ( H E R V s ) の存在という理由から M M T V のヒト相同体の証拠を示すことを主張する先行研究の重要性を退けた ( Larsson ら, 1994 ; Li ら, 1996 ; Lower ら, 1996 ; Meese ら, 1996 ; Ono, 1986 ; Patience ら, 1996 ; Faff ら, 1992 ) 。ヒトゲノムには約 50,000 の H E R V s 又は H E R V 関連配列があり、そのいくつかは M M T V に対して 60 % までの相同性を有することがわかっている。このことについては、 H E R V - K 1 0 に対する当該血清反応性に注目することは重要であり、

50

この点で、MMTVに最も親密に関連すると考えられるHERVは、乳癌患者の血清及び健康な個体の少数に存在するMMTV反応性抗体の理由とはなりえない(Vogetsederら, 1995)。さらに、我々は、これらMMTV関連配列の存在がMMTVのヒト相同体が分子技法によって確証的に以前には示されなかったまさにその理由であると考え。これら関連するが異なる配列の存在が、サザンブロット法のようなあまり感受性でない技法を用いていた以前の研究者による、より密接に関連した配列の検出を世に埋もれさせたのだろう。

#### 【0008】

最近になってMMTVの配列に対してかなり高度な相同性(>90%)を有する配列がヒトBC組織から単離された(Wangら, 1995, 1998; )。MMTV envと95~99%同様の配列がPCRによって314個の非選択性乳癌腫瘍試料の121個(38.5%)で増幅された。MMTV様の配列は、整復乳房形成由来の107個の検体のたった2個だけで(1.8%)検出され、また正常組織又は非乳房腫瘍由来の試料では0/80だった。MMTV-env様RNAは(RT-PCRによって決定されるように)66%のDNA PCR陽性の乳房腫瘍で発現された(Wangら, 1998)。MMTVに対して94%の類似性を有する完全な9.9kbプロウイルスが2個の乳房腫瘍内で検出された。FISH(蛍光インサイツハイブリッド形成法)は、BC腫瘍由来のDNAの数部位における組込みを明らかにしたが、正常の乳房細胞では見られなかった(Wangら, 1999 ACR mtg. アブストラクツ#2933, 2944)。Wangらは、感染の内在性ルートで伝播される(水平伝播)ヒト乳癌ウイルス(HMTV)の存在を示唆した。これら及び他の研究者らによるMMTV関連ウイルスの他の領域を、BCを持っていない被検者のゲノムDNA又はcDNAから増幅するという試みは、MMTVに対して約60%の相同性しか有していないHERV配列(HERV-K10のような)を与えた。このように、BC組織は、MMTVの配列と高度に類似する配列が今までに見出されている唯一の組織である。従って、正常な乳房組織及び他の組織はMMTVに高度な相同性を有するウイルスの発現に対して陰性であると考えられる。

#### 【0009】

MMTVは水平に或いは垂直に伝達されうる

レトロウイルス複製サイクルは、ピリオン関連逆転写酵素(RT)の多酵素活性による一本鎖RNAウイルスゲノムの二本鎖プロウイルスDNAへの転換を特徴とする。他のレトロウイルスの場合と同様に、ウイルスタンパク質の発現及び感染子孫の産生のため、MMTVプロウイルスDNAを宿主細胞のゲノムへ組込む必要がある。感染マウス乳腺のみならず異種細胞の両方で、MMTVプロウイルスDNAは多数の明らかにランダムな部位に組み込まれる。Int、Wnt、及びFgfのようないくつかの細胞性遺伝子(プロト-発癌遺伝子)の近傍に転写的に活性なLTRを含有するMMTVプロウイルスを組込むと、その結果、これら遺伝子の過剰発現、細胞形質転換及び腫瘍細胞のクローン拡大となりうる(Varmus, 1985; Shackelfordら, 1993; Jakobovitsら, 1986; Cohen, 1980; Breznik及びCohen, 1982)。MMTV誘発発癌の長い潜伏は、部分的にはプロウイルスのこれら特定部位への組込みの必要性によって説明される。

#### 【0010】

MMTVのウイルス株間の遺伝的相違は、部分的にはマウスの多種多様な株でBCの発生率が変わることによって説明できる。C3H系統のマウスは、BALB/cマウスのBC発生率が<1%であるのに比し、90%より多いBC発生率を有する。C3Hの雌に授乳されたBALB/cマウスは、高いBC発生率を有し、C3Hの腫瘍化MMTVが乳汁内で水平に伝達されうることを示唆している(Bittner, 1936)。逆に、C3HマウスがBALB/cの雌に授乳された場合、BCの発生率は顕著に低減するが(22~55%)、低発生率のマウス系統ほど低くはない。この後者の観察は、高発生率系統の水平伝播される乳汁由来ウイルスの重要性を強調しているが、内在性MMTVプロウイルス間の腫瘍化の可能性における実質的な相違をも示している。高低の腫瘍発生率を有する種々のマウスのプロウイルスは、溶液ハイブリダイゼーション反応速度論及び制限エンドヌクレアーゼ消化パターンの相違によって区別できるだろう(Cohenら, Cell, 1979; Cohen及びVarmus, 1979, 1980; Trai

na-Dorge及びCohen,1983;Breznikら,1984)。低メチル化DNAとメチル化DNAとを区別する制限酵素を用いて、ほとんどの内在性プロウイルスが大量の5-メチルシトシンを含有するのに対して、乳汁由来MMTVのプロウイルスが低メチルであることも示された(Cohen,1980;Breznik及びCohen,1982;Breznikら,1984)。低メチル化は遺伝子発現の増加と関連するので、この観察はBCの高発生率を有するマウス系統中の水平伝播される乳汁由来MMTVの重要性を説明できる。内在性MMTVプロウイルス特有の低メチル化は、BALB/cマウスの授乳中乳腺の1.6kb転写物の発現に関連していた(Traina-Dorgeら,1985)。

#### 【0011】

他の研究では、内在性MMTVプロウイルスは、同系交配時に安定な遺伝ユニットとして分離し、特定のこれら内在性プロウイルスが転写的に活性であることが示された(Cohenら,Cell,1979;Cohen及びVarmus,1979,1980;Trainaら,1981;Traina-Dorge及びCohen,1983;Traina-Dorgeら,1985;Varmusら,1978)。組換え型近交(RI)系統のマウスを使用してMMTVプロウイルス組成物及び染色体位置を定義した(Trainaら,1981;Traina-Dorge及びCohen,1983)。RI系統は、2匹の高度な近交系由来マウスを交雑し、ランダムにそのF2世代の兄弟と姉妹を番わせて別個の系としてそれぞれ維持することによって発生された。多くの遺伝子座はこれら系統の特異的な染色体に配置された。これら遺伝的マーカーを有する種々のMMTVプロウイルスの分離パターンを制限エンドヌクレアーゼ解析及びザンプロット法で解析することによって、これら系統の多数のMMTVプロウイルスの染色体位置を決定し、かつメンデル遺伝の法則によってこれらプロウイルスが分離することを確証することができる。これら及び他の解析によって、これら動物内のいくつかは全長でいくつかは不完全な10の別個のMMTVユニット(プロウイルス)が定義された。ほとんどのMMTVプロウイルスについての遺伝の割合は単純な単一遺伝子遺伝と一致したが、3つのMMTVユニットはいくつかの変化を示した。最も注目すべきは、解析された26種のRI系統のうち23種に存在していた1匹の親に寄与するユニットの存在だった。転写的に活性かつ腫瘍産生の増加に関連する特有のプロウイルスユニットが同定された(Traina-Dorgeら,1985)。重要なことに、病気が進行している宿主遺伝子の関与を示すウイルス発現にかなり関連している細胞性遺伝子が同定された(Traina-Dorgeら,1985)。

#### 【0012】

いくつかの系の証拠は、比較的最近に種々の系統のマウスの生殖系列で内在性MMTVプロウイルスが組込まれたことを示している(Cohen及びVarmus,1979;Varmusら,1978)。MMTVがハツカネズミ(実験マウス)の前駆体に存在する要素から進化されたとすれば、すべての個々のマウスは同様のMMTVプロウイルスを有すると予想されるだろう。しかし、実験マウスと野生マウスの両方ともMMTVプロウイルスに対してかなり変化する数と分布の生殖系列組込み部位を有するいくつかの場所で捕捉した(Cohen及びVarmus,1979)。これら結果で最も衝撃的な発見は、内在性MMTVプロウイルスを何も含有しない野生動物が存在することだった。これら結果の最も可能性のある説明は、内在性MMTVプロウイルスが、マウスの進化した前駆体中に存在する遺伝的要素から生じるのではなく、むしろMus属の特異化後に胚芽細胞のDNA中への多数の独立した組込みによって生じたということである。

#### 【0013】

(発明の概要)

本発明は、MMTVの配列に対して相同性の内在性レトロウイルスである1種以上の乳癌ウイルス由来の組換えDNA分子を提供する。詳細には、本発明の配列は、配列番号2、3、4、5、6、7、8、21、23、25、27、若しくは29の全部若しくは一部と少なくとも99%の同一性、又は配列番号10と少なくとも92%の同一性を有する。

また、本発明は上述のDNAの転写によって生成されるRNA分子を提供する。さらに、本発明は本発明のMTVDNAから転写されたRNAのインフレーム翻訳の結果生じるポリペプチドを提供する。本発明により、限定するものではないが、ヒト、ネコ、及びア

10

20

30

40

50

カゲザルを含むソースのようないずれかの適切なソースから、関連DNA配列が誘導できる。

【0014】

本発明は、乳癌ウイルス(MTV)DNA、配列番号2、3、4、5、6、7、8、10、21、23、25、27、若しくは29の配列、又はそれらと少なくとも99%の同一性を有する配列を含む組換えDNAプラスミド(ベクター)をも提供する。すなわち、前記DNA配列がベクターに取り込まれる。

本発明の一実施形態では、ベクターはさらにMTV配列に作用可能に連結される(すなわち、機能性MTV RNA及び/又はタンパク質のインピボ及びインピトロ生成が可能なように適切な読み枠に結合される)異種プロモーターを含む。本発明のこの実施形態の10  
局面では、MTV DNAを含むベクターは、以下の細胞型の少なくとも1種内でエピソード複製又は染色体組込みが可能である:細菌細胞、イースト細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、及び哺乳類細胞(この細胞型のリストは代表であり、網羅されていると考えるべきでない)。本発明のこの実施形態の別の局面では、異種プロモーターが1種以上の細胞型内でMTV DNA配列を発現させる。本発明のこの局面の一部として有用と考えられる細胞型としては、限定するものではないが、細菌細胞、イースト細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、及び哺乳類細胞が挙げられる。

【0015】

本発明の別の実施形態により、上述のMTV DNA配列を使用して、(血清その他のような生物学的起源の)試料中のMTV DNA又はRNAの存在を検出する方法を提供で 20  
きる。

本発明の別の実施形態は、試料が上記MTV DNA配列(例えば、配列番号2、3、4、5、6、7、8、10、21、23、25、27、若しくは29の転写及び翻訳から誘導されるポリペプチド配列)由来のタンパク質を認識する抗体を含むかどうかを決定する方法を提供する。この局面に対する結果として、本発明は本発明の1種以上のポリペプチドを特異的に検出する抗体をも提供する。

【0016】

本発明の別の実施形態は、生物学的又は他タイプの試料中の乳癌ウイルス由来のDNA、RNA、又はポリペプチドを検出するのに有用な診断用キットを提供する。

本発明の別の実施形態は、宿主動物内のMTVの活性を弱め又は取り除く方法を提供する 30  
。この実施形態の種々の局面によって、MTV逆転写酵素、プロテアーゼ、又はインテグラーゼ酵素の活性を破壊する物質を含む医薬組成物が提供される。この実施形態の別の局面によって、宿主動物内の免疫応答を誘発可能な医薬組成物が提供される。

【0017】

以下の図面は本明細書の一部を構成し、かつ本発明の特定の局面をさらに説明することを意図している。本発明は、本明細書に提示された特定の実施形態の詳細な説明と共にこれら図面の1つ以上を参照することにより、さらに良く理解することができる。

図1は、ヒト乳癌組織由来のMMTVに関連する配列の増幅結果を示す。パネルA:DNAはヒト乳癌(Michael Press, M.D., USC, Los Angeles又はDerrick Beech M.D., TMC/UT Memphisの好意によって提供された)から抽出され、該ヒトMMTV env-関連遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。プロット法によってPCR生成物をニトロセルロースに伝達し、MMTV関連生成物を1.8kbのMMTV envプローブへのハイブリダイゼーションによって検出した。レーンa:非放射性マーカー、示さず;レーンb~d、f~h、j:乳癌DNA;レーンe及びi:DNAなし;レーンk:水の対照;レーンl 40  
正の対照:pBluescript™内でクローン化されたMMTV env断片。パネルB:臨床試料由来のDNAの組込みの試験として、Griffithsら(1997)によって開発されたPCR条件を用いてHERV-3プロウイルスDNA、単一コピーヒト内在性レトロウイルスを増幅した。臭化エチジウム検出(マーカーはレーンaに見える)。レーン1以外パネルAと同一試料:正の対照、pBluescript™(Stratagene)内でクローン化されたHERV3 pol断片。可視バンドがレーンcとgに存在したが、うまく複製しない。

10

20

30

40

50

## 【0018】

図2は、健康な対照の血液由来のMMTVに関連する配列の増幅の例を示す。パネルA：DNAは健康な対照被験者の全血から抽出し、ヒトMMTV env関連遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行って、PCR生成物をサザンハイブリダイゼーション法によって検出した。レーンa：マーカー；レーンb～k：健康な対照の全血由来のDNA；レーンl：水の対照；レーンm正の対照：pBluescript™ (Stratagene)内のMMTV env断片。パネルB：HERV-3のPCR増幅。臭化エチジウム検出（マーカーはレーンaに見える）。レーンm：正の対照、pBluescript™ (Stratagene)内のHERV3 pol断片以外はパネルAと同一試料。

## 【0019】

図3は、HMTV mRNAのリボヌクレアーゼ保護アッセイによる検出の例を示す。RNAは3種のHMTV PCR陽性乳癌腫瘍又はイースト細胞から抽出し、HMTVに特異的な189塩基プローブか、 $\beta$ -アクチン用の245塩基プローブのどちらかにハイブリダイズした。そして、試料をRNAアーゼA/T1で消化した。ハイブリダイズされたRNAによって検出された標識プローブの断片を可視化し、変性ポリアクリルアミドゲル上で分離後解析した。3つの腫瘍試料のうち2つは、HMTVプローブで予期した大きさの保護断片を与えたが（矢印）（レーン1～3）、 $\beta$ -アクチンプローブですべての3つの腫瘍RNAsが保護断片を与えた（レーン5～7）。予想どおり、どのプローブもイーストRNAによっては特異的に保護されなかった（レーン4、8）。

## 【0020】

（発明の詳細な説明）

本発明は、マウス乳癌ウイルスに高度の配列相同性のウイルスである乳癌ウイルス（MTV）由来の単離DNA、RNA、及びポリペプチドを提供する。さらに、本発明はこれら巨大分子を用いた診断方法を提供する。また、本発明は、この開示された方法に従って使用可能なMTV DNA、RNA、及び/又はポリペプチドを含む医薬組成物及び診断キットをも提供する。

## 【0021】

本発明の種々の実施形態は、少なくとも以下の1つに対応するMTV核酸を提供する：以下の1つと少なくとも99%の同一性を有するDNA配列：

a) 配列番号2、3、4、5、7、8、21、25、若しくは27と少なくとも99%の同一性；又は

b) 以下の1つ以上と少なくとも99%の同一性：配列番号2の少なくとも340個の相接塩基、配列番号3のヌクレオチド1～380で表される配列の少なくとも150個の相接ヌクレオチド、配列番号4のヌクレオチド1～400で表される配列の少なくとも140個の相接ヌクレオチド、配列番号5のヌクレオチド1～360で表される配列の少なくとも130個の相接ヌクレオチド、配列番号6の少なくとも130個の相接ヌクレオチド、配列番号7のヌクレオチド1～380で表される配列の少なくとも140個の相接ヌクレオチド、配列番号8のヌクレオチド20～462で表される配列の少なくとも210個の相接ヌクレオチド、配列番号21のヌクレオチド97～462で表される配列の少なくとも160個の相接ヌクレオチド、配列番号23の少なくとも170個の相接ヌクレオチド、配列番号25のヌクレオチド337～462で表される配列の少なくとも100個の相接ヌクレオチド、配列番号27のヌクレオチド85～462で表される配列の少なくとも300個の相接ヌクレオチド、若しくは配列番号29の少なくとも200個の相接ヌクレオチド；又は

c) 配列番号10と少なくとも92%の同一性。

## 【0022】

好ましくは、配列は配列番号2、3、4、5、6、7、8、21、23、25、27、若しくは29の200、250、300、350若しくは400個より多くのヌクレオチドと99%より高い同一性を有する。別の好ましい実施形態では、配列は配列番号10と93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%より高い同一性を有する。さらに好ましくは、これら核酸はヒト、ネコ、又はアカゲザルMTVの核酸由来である。最も好ましくは、DNAは、配列番

10

20

30

40

50

号2、3、4、5、6、7、8、10、21、23、25、27、若しくは29の全部又は一部と同一である。

本発明のこの実施形態の一局面では、上述のMTV DNA配列はベクターに組み込まれる。本発明の種々の関連した局面では、MTV配列は、異種プロモーターの転写調節下にある。本発明に有用と考えられるベクターは、以下の細胞型の少なくとも1種内でMTV DNA配列を発現できる：昆虫細胞、細菌細胞、鳥類細胞、イースト細胞、又は哺乳類細胞。さらに、本発明のこの局面のベクターは、リストされた細胞型の少なくとも1種内でエピソーム複製及び/又は染色体組込みが可能である。

#### 【0023】

この実施形態の別の局面では、DNA配列は1つ以上の検出部分を含む。本発明に好適と考えられる検出部分としては、限定するものではないが、蛍光染料、及び亜リン酸、イオウ、酸素、炭素、若しくは水素の放射性同位体が挙げられる。

本発明のこの実施形態のさらに別の局面では、単離DNA分子が本発明に適合する希釈剤に懸濁又は溶解される。好適な希釈剤は本発明の種々の実施形態によるDNAの使用を妨げない。本発明のこの実施形態により有用な希釈剤は当業者には周知である。それらは、限定するものではないが、緩衝水溶液を含む。これらは本発明と適合するいずれの化合物とも緩衝させることができる。例示的な緩衝剤としては、ホスフェート緩衝液及びトリスヒドロキシアミノメタン(Tris)を含む緩衝液が挙げられる。このような緩衝水溶液は、さらに本発明の実施を妨げない塩化ナトリウムのようないずれの他の化合物をも含んでよい。本発明のこの局面により、MTV DNAはいずれの適切な濃度でも存在しうる。約0.1ng/μl~100μg/μlの濃度が好ましい。

#### 【0024】

本発明の他の実施形態は、上述の核酸によってコードされるRNA転写物及び/又はポリペプチドを提供する。この実施形態の種々の局面で、これらRNA転写物及びポリペプチドは上記DNA配列のいずれによってもコードされる。これらRNA転写物及びポリペプチドはMMTV env、gag、又はpol遺伝子によってコードされるRNA転写物及びポリペプチドの相同体である。この実施形態の一局面では、RNA転写物は上述のDNA配列によってコードされる。このようなRNA転写物は該RNAがチミジンの代わりにウリジンを含むこと以外開示されたDNA配列と同一の配列を有する。この実施形態の別の好ましい局面では、精製ポリペプチドは、ヒト、ネコ、又はアカゲザル乳癌ウイルス由来のタンパク質生成物であるenv、gag、又はproの全部又は一部と配列で一致する。ペプチドは精製されたポリペプチドであることが好ましい。本発明の好ましい局面では、精製ポリペプチドは、上述のいずれのMTV DNA配列のインフレーム転写及び翻訳から生じる配列の全部又は一部からも構成される。本発明のさらに好ましい局面では、ポリペプチドは、配列番号2、3、4、5、6、7、8、10、21、23、25、27、若しくは29のインフレーム翻訳の生成物に配列で一致する。最も好ましくは、本発明のポリペプチド配列は、配列番号12、13、14、15、16、17、18、20、22、24、26、若しくは28の全部又は少なくとも80個のアミノ酸に一致する。用語「MTV DNAに由来する」とは、該RNA又はペプチドが、それぞれMTV DNAの転写によって、又は転写とインフレーム翻訳によって産生されたRNA又はペプチドに配列で一致することを表す意である。

#### 【0025】

「精製ポリペプチド」とは、試料中のポリペプチドの過半数(50%より多く)がMTVポリペプチドであることを意味する。好ましくは、MTVポリペプチドが精製ポリペプチド試料中の70%より多くのポリペプチドを構成する。さらに好ましくは、MTVポリペプチドが試料中のポリペプチドの90%より多くを構成する。さらにもっと好ましくは、MTVポリペプチドが試料中のポリペプチドの95%より多くを構成する。さらに、用語「精製ポリペプチド」は、試料が本発明の実施を妨げる物質を含有しないことを示す。本発明によって得られる精製ポリペプチドは、本発明に適合するいずれの適切なソース由来でもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

本発明の別の実施形態は、上述のようなM T Vポリペプチドに対する抗体を提供する。本発明のこの局面による抗体は、1種以上の本発明のポリペプチドを抗原性物質として使用して生成される。このような抗体は事実上モノクロナール又はポリクロナールのどちらかでよい。好ましくは、抗体はモノクロナールである。一旦M T Vが供給されると、本発明のこの局面の抗体は当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、ポリクロナール抗体は、一般に抗原性物質を（完全なフロイントのアジュバントのような免疫応答促進剤の存在下で）ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギ、又はウサギのような動物に注射することによって産生される。

## 【 0 0 2 7 】

本発明のこの局面のモノクロナール抗体は、ハイブリドーマ融合法又はエプスタイン・バーウイルス（E B V）を利用する技術 - ここで述べるように改変された当業者には周知であるような不死化技術（ヒトmAbsを生成するための）によって調製することができる。本発明の方法において、これら技法は、当該動物内で所望の免疫応答を誘発する（すなわち、抗体の産生）ように免疫原、この場合精製M T Vポリペプチドを注射することを含む。実験動物（例えば、マウス）は同一の不死化細胞系の反復注射（ブースト）を投与される。最終段階で、動物は選択された細胞型の一次細胞の注射が投与される。

## 【 0 0 2 8 】

ここで、巨核球細胞に対するアゴニストモノクロナール抗体の生産についての説明用実施例では、C M K細胞調製品及びC M S細胞調製品を第1免疫原として使用した；しかし、M o 7 e又はD A M I細胞のような別の不死化巨核球細胞を使用することができる。本発明のアゴニスト抗体に類似する別のモノクロナール抗体B A H - 1は、特異的にC - M p 1レセプターを認識するが、免疫原として膜結合c - M p 1レセプタータンパク質を用いて生成できる。他の細胞型に対するアゴニストモノクロナール抗体を生成するため、造血系系列の他の細胞、例えば幹細胞、B細胞、T細胞が選択される。第1免疫化段階では、幹細胞は、例えば不死化細胞系C T Sによって表すことができ；不死化細胞系A R H - 77、S B又はN a 1 - 6によってB細胞；また不死化細胞系ジャーカット細胞又はH 9によってT細胞を表すことができる。

## 【 0 0 2 9 】

十分な時間の後、動物は犠牲にされ、体細胞性の抗体産生細胞が初回刺激を受けた動物のリンパ節、脾臓及び末梢血液から得られる。脾臓細胞が好ましい。マウスリンパ球は、後述するマウス骨髄腫との安定融合を高パーセンテージで与える。ラット、ウサギ、カエル、ヒツジ及び他の哺乳類の体細胞性細胞を使用することもできる。所望の免疫グロブリンをコードする脾臓細胞染色体は、脾臓を骨髄腫細胞と、通常ポリエチレングリコール（P E G）のような融合剤の存在下で融合することによって不死化される。標準法の融合相手として多くの骨髄腫細胞系のいずれも使用できる；例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653又はSp2/0-Ag14骨髄腫系。これら骨髄腫系は、American Type Culture Collection（A T C C）、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209から入手可能である。

## 【 0 0 3 0 】

その結果の細胞は所望のハイブリドーマを含んでおり、H A T培地のような選択培地で成長し、融合されない親の骨髄腫又はリンパ球細胞は最終的に死ぬ。ハイブリドーマ細胞だけが生き残り、限界希釈条件下で成長して単離クローンを得ることができる。このハイブリドーマの上清を所望の特異性の抗体が存在するかについて、例えば本明細書で述べるようなイムノアッセイ法によって、免疫原用に使用されている抗原を用いてスクリーニングする。そして、陽性クローンを限界希釈条件下でサブクローニングし、産生されたモノクロナール抗体を単離することができる。他のタンパク質や他の混入物を無くすようにモノクロナール抗体を単離及び精製するために種々の慣習的な方法がある。モノクロナール抗体の精製に一般に使用される方法としては、硫酸アンモニウム沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、及びアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。これら方法によって生成されるハイブリドーマは、技術的に公知の技法によってインビトロ又はインビボ（腹

10

20

30

40

50

水中で)増殖させることができる(一般的には、Harlowら, *Antibodies*. 実験室マニュアル, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.1-726, 1988参照)。

【0031】

本発明の他の実施形態は、生物学的及び/又は他のタイプの試料中のMTVからDNA、RNA及び/又はタンパク質を検出する方法を提供する。

本発明のこの実施形態の一局面は、以下の工程を含む、試料中のMTV DNAの検出方法を提供する：

i) 1種以上の上記MTV DNA配列を含有する疑いのある試料を得る工程； ii) 工程i)で定義されるようなDNA配列を増幅するためにポリメラーゼ鎖反応(PCR)を行う工程；及び

iii) 工程ii)で生成されたアンプリコン(amplicon)(PCR増幅されたDNA)の配列を決定するか、又はそうでなくても特徴づけて、前記試料中に工程i)で定義されるようなDNA配列が存在するか否かを決定する工程。

【0032】

この実施形態の別の局面は、以下の工程を含む、試料中のMTV RNAの検出方法を提供する：

i) 1種以上の上記MTV DNA配列によってコードされるRNAを含有する疑いのある試料を得る工程；

ii) RNAアーゼタンパク質アッセイ(RPA)を行う工程；及び

iii) 前記RPAの結果を解析して、前記試料中に工程i)で定義されるようなRNAが存在するかを決定し、任意に前記RNAを定量化する工程。

これら方法の工程を最適化するために必要なパラメータの選択は、十分に当業者の能力内であることは当業者によって認められるだろう。これらパラメータ、例えば、PCR条件(例えば、アニーリング温度、伸長時間、及びプライマーの選択)及びDNA配列決定法は、このような分子生物学法が利用される研究室で日常的に決定される。

【0033】

本発明のこの実施形態の別の局面は、試料がMTVポリペプチドを認識する抗体を含有するかどうかを決定するために試料を解析する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：

i) 乳癌ウイルス抗体に特異的な抗体を含有する疑いのある試料を得る工程；

ii) 少なくとも1種の精製MTVポリペプチドを得る工程；

iii) 工程i)の試料と工程ii)のポリペプチドとを用いて、ウェスタンイムノブロット解析を行う工程；及び

iv) 工程iii)の結果を解析して、前記試料中に工程ii)のポリペプチドと特異的に相互作用する抗体が存在するか否かを決定する工程。

【0034】

本発明のこの実施形態の別の局面は、試料がMTVタンパク質を含有するかを決定するために1種以上の免疫組織化学的方法によって細胞培養又は組織試料を解析する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：

i) 乳癌ウイルスタンパク質を含有する疑いのある試料を得る工程；

ii) 工程i)の試料を免疫化学的解析用に調製する工程；

iii) 工程ii)の試料を、1種以上の上記MTV DNA配列によってコードされるMTVポリペプチドに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体の1種又は2種以上の組合せとインキュベートする工程であって、前記抗体が任意にそれらの特異的検出を可能にする部分を有する工程；

iv) 前記試料を洗浄して、特異的に結合されない抗体を除去する工程；

v) 前記試料を選択された検出法に適するように加工する工程；及び

vi) 工程v)の結果を解析して、前記試料中にMTVタンパク質が存在するか否かを決定する工程。

【0035】

免疫化学的解析は、限定するものではないが、ウェスタンブロットング又はエンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイによる解析が含まれると考えられる。これら方法の実施を最適化するために必要なパラメータの選択は当業者の能力内であることが認められる。解析は直接的な免疫化学（抗体が検出可能な部分で標識されている場合）又は間接的な免疫化学によって行うことができる。

【0036】

本発明の他の実施形態は、上述のMTV DNA、RNA及びタンパク質を含有する医薬組成物を提供する。これら組成物は、さらに製薬的に許容される賦形剤、キャリアー、又は希釈剤を含んでよく、いかなる生物学的に有害な物質も含まない。本発明の医薬組成物は、当業者によって処方されうる。好適な製薬的処方は、本分野の標準テキストであるRe 10  
imington's Pharmaceutical Sciencesに記載されており、これは参照によって本明細書に取り込まれる。

【0037】

医薬組成物は、さらに着色若しくは安定剤、浸透圧剤、抗菌剤、又は該組成物の機能を妨げない限りいずれの他の物質も含んでよい。本発明の医薬組成物は、製薬的に許容される非経口的媒体と共に、例えば溶液、懸濁液、又はエマルジョンとして調製することができる。このような媒体の例は、水、食塩水、リンガー溶液、ブドウ糖溶液、及び5%ヒトアルブミンである。リポソームも使用できる。媒体は等張性（例えば、塩化ナトリウム又はマンニトール）を及び化学的安定性（例えば、緩衝液及び保存剤）を維持する添加剤を含有してよい。内毒素コンタミネーションは安全レベル、例えば0.5ng/mgタンパク質未満に 20  
保持されるべきであることは明らかである。さらにヒト投与のためには、調製品は、生物学標準の米国食品医薬品局によって要求される無菌性、発熱性、一般的な安全性及び純度基準に応じるべきである。製剤はる過のような一般的に使用される技法で無菌にすることができる。

【0038】

フレーズ「製薬的に許容される」とは、動物、又はヒトに適切に投与された場合、有害な、アレルギー性の、又はそうでなくても都合の悪い反応を生じない物質及び組成物を意味する。これら有害な効果を引き起こす物質は、本発明の範囲内で「生物学的に有害」として分類される。製薬的に許容される物質及び組成物としては、限定するものではないが、 30  
溶剤、分散媒、被覆物、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤が挙げられる。本発明に不適合でない限り、いずれの通常成分の使用も考慮される。さらに、いくつかの他の製薬的に都合のよい目的に役立つ補助活性成分も本組成物に取り入れることができる。

【0039】

上述の方法及び組成物は、患者の組織内にMTV又はMTVウイルス成分が存在するか否かの決定を助けるのに甚大な利益を与えられられる。この知見は、病原学的にMTVに由来する癌に対する患者の罹患率を予測する助けになるだろう。本方法は、患者のウイルス負荷（その人の組織に存在するウイルスの量）を決定する手段を提供する。この点で、本明細書で述べる方法を一般集団の広範囲のスクリーニング、特にすべての成人した女性のスクリーニングに採用することによって莫大な利益がもたらされると予想される。 40  
本発明の種々の実施形態の一部として考えられる他の組成物は、ヒト又は他の動物に存在するウイルスの量を安定化又は低減する手段を提供する。

【0040】

上述の種々の方法は、MTV DNA、RNA、及び/又はポリペプチドの存在を検出するための診断用キットを調製するのに容易に適応可能である。結果として、本発明の臨床プラクティスのため、本発明のさらなる別の実施形態が考慮され、診断用キットが提供される。このようなキットは試料中に存在するMTV DNA、RNA、及び/又はポリペプチドを検出し、かつできればその量を決定するために試料を定性及び定量分析するのに有用である。本発明のこの実施形態の一面では、キットはその成分の一部として、1種以上の上記MTV DNA配列を含む1種以上の組換えDNA分子を含有する。また本発明のこの局面に従い、キットは組換えMTV DNAに加え（又はそれに代えて）、これ 50

ら M T V D N A 配列の P C R 増幅に有用な 1 種以上の合成オリゴヌクレオチドプライマー対を含むことができる。

【 0 0 4 1 】

本発明のこの実施形態の別の局面は、乳癌ウイルスタンパク質を特異的に認識する抗体を検出するためのキットを提供する。その成分の一部として、このキットは、上記 M T V D N A 配列によってコードされる 1 種以上のポリペプチドを含む試薬を含有する。

また、免疫細胞化学によって、少なくとも 1 種の M T V ポリペプチドに特異的である 1 種以上の抗体（モノクロナール又はポリクロナールのどちらか）を含む M T V タンパク質の存在を検出するのに有用なキットが考慮される。任意に、これら抗体は検出部分（例えば、蛍光染料又は<sup>35</sup>S のような放射性同位体）を含むように修飾してよい。

10

【 0 0 4 2 】

本発明のこれら実施形態のキットは、パッケージを含み、それぞれ個々の診断試験を行うのに必要な 1 種以上のいろいろな試薬（典型的には濃縮形態で）を含有することができる。本発明のこれら実施形態のキットは、生物学的（又は他のタイプの）試料中の M T V D N A、R N A、及び/又はタンパク質を検出及び/又は定量するのに役立つように考慮される。このような試料は、限定するものではないが、以下から選択することができる：血漿又は血清、全血、尿、痰、結腸流出液、脳脊髄液、リンパ液、骨髓、組織試料（直視下生検由来のような）、又はこれら生物学的分子を含有する疑いのある他の試料。

さらに、キットは 1 種以上の基準 (fiduciary) 結果を含んでもよい。本明細書で使用する場合、「基準結果」は、ある試験結果を比較して定性及び/又は定量の面から該結果を判断する参考基準を指す。「基準系列」は、定性又は定量スケールに沿う点を表すような複数の基準である。この点で、結果を解釈するための基準系列を包含するキットが好ましい。基準は 1 つ以上の写真の形態でよく、又は文書の説明書を含む他の方法で示されてもよい。

20

【 0 0 4 3 】

このように、本発明のこの局面に従い、基準はキットの一部として開発され、結果の解釈を導くことができる。この点で、生体試料由来の R N A 又はポリペプチド濃度は前述のとおりの特徴づけられる。試料は、病気のいろいろな段階（無症候性又は本質的に病気でない状態を含む）の患者の代表的な断面から採取して基準系列を調製することができる。この点についての特徴づけは、患者が診断、治療を受け、その後も続けるとき、患者の新生物発達の実際の経過に従うことによって、後になって利益を得ることができる。上述したように、公知の乳癌状態のいろいろな患者と最終結果、及びこれら値の結果として起こる連関についてのウイルス負荷の決定は（M T V D N A、R N A、又はポリペプチドの量によって決定されるような）、計り知れない予後の値である。これは、患者により正確な予知を与えるのに役立ち、かつそれはこのような処置が必要な場合、治療的処置の最良のコースを決定するのに患者及び腫瘍学者を助ける。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の別の実施形態は、動物内で M T V に対する免疫応答を誘発する組成物を提供する。この発明の特に熟考した局面は、ヒト内でヒト乳癌ウイルスタンパク質に対する免疫応答を誘発する組成物である（実施例 7 参照）。このように誘発された免疫は、ホルモン感受性組織に対するウイルスの拡散を遮断することによって、内在性 M T V を保有する個体内の乳癌を阻止することができる。

40

動物内でウイルス D N A 及び/又は R N A に対する免疫応答を引き起こす方法も公知であり、例えば参照によって本明細書に取り込まれる、米国特許第 5,990,091 号及び第 6,004,799 号を参照されたい。

【 0 0 4 5 】

他の実施形態は、ヒト乳癌ウイルスの活性及び存在を減少させる治療組成物を提供する。全レトロウイルスの一般的な特徴は、ウイルス複製サイクルの種々の段階に参与する 3 つの酵素、逆転写酵素 (R T)、プロテアーゼ (P R)、及びインテグラーゼ (I N) の存在である。ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、すなわち M T V と離れた関係のレトロウイ

50

ルスのRT及びPRを標的にする種々の医薬品が開発されている。さらに、選択的にHIV INを阻害する薬品が同定され、この酵素を標的にするプロトタイプ薬が開発中である (Hongら, 1998; Mathe, 1999; Robinson, 1998; Singhら, 2000)。本発明の一局面により、1種又は2種以上のレトロウイルスインヒビターを本発明のMTVのレトロウイルスの活性又は拡散を阻害するのに有効量で含有する医薬組成物が提供される。

#### 【0046】

この実施形態の医薬組成物用の薬剤又は複数薬剤の同定は、当業者に公知の方法を用いて行うことができる。プロテアーゼと逆転写酵素インヒビター及びレトロウイルスとしてのこのような薬剤の有効性を決定する方法の例については、米国特許第5,858,738号、第6,017,928号及び第6,046,228号を参照されたい。これら特許は参照によって本明細書に取り込まれる。本発明のこの実施形態の種々の組成物は、例えば、現在公知のHIVインテグラーゼ、プロテアーゼ、又は逆転写酵素インヒビターを含み；代わりに、このようなインヒビターを修飾してMTVウイルスに対する特異性を高めることができる。同様に、膜貫通糖タンパク質の類似体であるペプチドのような別分類のHIVインヒビターは、プロドラッグとして役立ち、ヒト及び他の種内でMTVの活性及び存在を低減する特異的な薬剤を開発できる。これら組成物は、内在性遺伝的要素としてこれらウイルスを保有するヒト及び他の種内におけるMTVの活性及び拡散を阻害するのに有用であると考えられる。このような薬剤を使用してMTVに冒された乳癌患者を治療でき、また病気の重大度を寛解させ、かつ再発を減少させることが期待される。さらに、このような薬剤を予防的に使用して、病気を発生する高い危険性のある個体の出現を予防することができるだろう。

#### 【0047】

##### 【実施例】

以下の実施例は本発明の好ましい実施形態を説明するために挙げられる。以下の実施例で開示される方法は、本発明の実施でうまく機能するように本発明者らによって発見された方法を表し、従って本発明の実施に好適な態様を構成するとみなすことができることは、当業者に理解されるべきである。しかし、本発明の開示に照らし、開示された特定の実施形態に多くの変更を為すことができ、なおかつ本発明の精神及び範囲から逸脱することなく同等又は同様の結果を得ることができることを当業者は認めるべきである。

#### 【0048】

##### 実施例1：ヒトのMMTV関連配列

BC (乳癌) 組織と非BC組織の両方のサブセットを含有するヒトDNA試料から、PCRによってMMTV env遺伝子に高度に類似する (>95%) 配列を増幅した。MMTV関連配列は、PCR及び高感度プロッティング法によって、乳癌腫瘍内のみならず (図1参照)、健康な対照 (図2参照)、及び乳癌ではなく全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血液サブセット内でも見出された。我々の結果は、Wangと共同研究者らの研究 (1995) とは異なっており、彼らはほとんど例外なく、乳房腫瘍内だけでMMTV様配列を検出できた。ヒトDNA由来の配列は、対照として用いたMMTV配列とははっきりと識別され、これらのPCR反応は我々の結果がコンタミネーションのため単純でないことを示している。リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、非PCRベースの方法でPCR陽性BC組織の大多数がmRNAレベルでこの配列を発現するが、PCR陰性組織は何も発現しないことを決定し、これら結果を確認した。これらPCR反応からの多くの生成物を配列決定した。これら配列の解析は、PCRコンタミネーションが観察結果について見込みのない説明であるというさらに有力な証拠を与える。同一のPCR実験で導かれた異なる個体由来のMMTV env様配列は、相互に区別された。この結果は、種々の反応チューブ内で同一であるべき (又はほとんど同一であるべき) より一貫性の配列を生成したであろうユービキタスPCR混入物の欠如を示している。さらに、個々の被験者のDNAは、PCR実験ごとに内部的に一貫したMMTV env様配列を産生した。所定患者由来のMMTV関連配列内の変異は、Taqエラー数が少ないことを示しているかもしれないが、複製レトロウイルスと予想される変異 (逆転写酵素エラー) の示唆でもある。

#### 【0049】

**実施例 2 : M T V R N A レベルの R N アーゼ保護アッセイ決定**

リボヌクレアーゼ保護アッセイ ( R P A ) は P C R 増幅ではなく特定の R N A 種のレベルを決定するために本技術の当業者によって頻繁に用いられる定量的アッセイである。簡単には、それは本発明の転写物について以下のように行う：均一長さのプローブをクローン化鋳型のインビトロ転写によって合成し、高度に特異的な活性に標識化する。150~400bp 範囲の大きさのクローン化 M T V 断片を含有するプラスミドから<sup>[35]</sup>S 標識リボプローブを調製した。そのプローブをハイブリダイズして R N A を検定し、ハイブリダイズされないままの R N A 断片は R N アーゼ A / T 1 による消化から保護されない。ハイブリダイズされた R N A によって保護された標識化リボプローブの断片を可視化し、変性ポリアクリルアミドゲル上で分離後解析した。各試料中の M T V 関連 m R N A のレベルを アクチン 10 遺伝子、「ハウスキープ」遺伝子によって産生された m R N A のレベルと比較して、R N A 試料の統合性を確実にした (すなわち、R N A は分解されなかった)。R P A は、3 つの P C R 陽性乳房腫瘍のうち 2 つで R N A を検出した (図 3 参照)。R P A は、レアなメッセンジャー R N A の検出用の「ノーザン」解析よりも 10~15 倍の感受性である。R P A 解析は、定量解析にエラーをもたらさういづれの前操作もせずに、全 R N A について直接行われる。

【 0 0 5 0 】

**実施例 3 : M T V R N A レベルの R T - P C R 決定**

M T V m R N A s は、リアルタイム R T - P C R ( 逆転写酵素連結ポリメラーゼ鎖反応 ) を用いても検出できる。例えば、I -Cycler ( BioRad ) は、蛍光検出設備で、P C R 反応 20 の対数直線期の P C R 生成物を定量化することによって P C R 増幅生成物のリアルタイム反応速度論を決定することができる。この方法によって、リアルタイム熱サイクルは、再現性のある様式で、少量の公知ヌクレオチド鋳型と確実に比較できる。

【 0 0 5 1 】

**実施例 4 : ウェスタンブロット解析による血液中の抗 M T V 抗体の検出**

よく特徴づけられたバキュロウイルス発現系と同様の方法で昆虫細胞内における組換えタンパク質の安定した生産を可能にする InsectSelect<sup>TM</sup>系 ( Invitrogen ) を用いて組換え M T V タンパク質を生成できる。これは、持続的に高品質のタンパク質を産生する安定な細胞系の創製を可能にするウイルスの無い系である。約 9 日で産生される安定な細胞系は、組換えタンパク質の持続的な長期生産に使用できる。InsectSelect<sup>TM</sup>発現系は、安定的に 30 に発現する昆虫細胞系を選択するための抗生物質抵抗性遺伝子を保有するプラスミドベクターに基づいている。この発現ベクターは、遺伝子発現用の Douglas Fir Tussock moth OpMN PV バキュロウイルス由来の速効性初期プロモーター、OpIE2 を使用する。OpIE2 は、蚊及び双翅類細胞系のみならず鱗翅目 ( Sf9, 5121, High Five<sup>TM</sup> ( Invitrogen ) ) 内で強い転写プロモーターである。発現ベクター pIZ/V5-His ( Invitrogen ) は、複数のクローニング部位と、昆虫細胞内の組換えタンパク質の生産及び解析を単純にするいくつかの特徴とを有する。それは、安定的に形質移入される細胞、V5 エピトープをコードする C 末端タグ、及び C 末端ポリヒスチジン ( 6xHis ) 配列の迅速な選択を可能にする Zeocin 抵抗性遺伝子を包含する。これら後者の特徴は、抗 V5 抗体 ( Invitrogen ) による迅速なタンパク質検出 40 及びポリヒスチジンに結合する樹脂によるタンパク質精製を容易にする。M M T V 関連タンパク質用のこれとは別の真核生物発現系は、インビトロ転写されかつキャップされた m R N A を有するインビトロウサギ網状赤血球ライセート系 ( Promega ) 又は Sindbis ウイルス発現系 ( Invitrogen ) である。

【 0 0 5 2 】

M M T V 関連遺伝子は、p G E X ベクター ( Pharmacia ) にクローン化され、かつ細菌内で発現されてイムノブロット研究用グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T ) タンパク質で組換え融合タンパク質を構成することもできる。この系は、組換えタンパク質の生産、単離、及び精製の容易さが少しもない、タンパク質発現の他の方法論と比べていくつかの利点を有する。G S T タンパク質で生成される融合タンパク質は通常可溶性で、細胞ライセートからの回収を可能にする。精製時に変性条件が必要ないので、該タンパク質 50

の抗原及び酵素特性が維持されることが多い。さらに、GST融合タンパク質は、グルタチオン被覆ビーズ又はカラム上にGSTを固定化することによって効率的かつ迅速に精製し、還元型グルタチオンで溶出することができる。

#### 【0053】

ウェスタンイムノブロットを行うため、MTVタンパク質を溶解緩衝液に(0.25M トリス塩基、pH 6.8、4% ドデシル硫酸ナトリウム、10% ジチオスレイトール、20% グリセロール、及び0.01% w/v プロモフェノールブルー含有)に溶解し、3分間100 に加熱し、10% ポリアクリルアミドゲル上でドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供する。これらタンパク質を、20% メタノールを有するトリス-グリシン(pH 8.3)緩衝液中のニトロセルロース膜(Protran™; Schleicher & Schuell)に電気泳動的に移動させてよい。ブロットを遮断緩衝液内で(0.02M トリス、0.1M NaCl、熱失活ヤギ血清、0.01% チメロサル、及び5% 脱脂粉乳)、試験するヒト又は動物由来の血清又は血漿と共に一晩中インキュベートしてよい(1:100希釈又は最適希釈)。第2の抗体、すなわち遮断緩衝液中1:500又は1:1,000希釈されたビオチン化抗ヒト(又は他の種)IgGヤギ抗体と、アビジン-西洋わさびペルオキシダーゼとのインキュベーションを2時間室温で行ってよい。イムノブロットは、7.8mM 4-クロロ-1-ナフトール及び0.03% 過酸化水素で展開させることができる。MTVタンパク質に相当するバンドを走査して定量化し、かつ画像解析ソフトウェア(NIH Image)で処理する。

#### 【0054】

##### 実施例5: エンザイムリンクドイムノアッセイによる抗MTV抗体の検出

MTVタンパク質に特異的に結合する抗体は、該抗体用標的としてMTVタンパク質又は複数のMTVタンパク質によるエンザイムリンクドイムノアッセイを用いて検出することができる。この方法では、パキユロウィルス/昆虫細胞培養系のような発現系で産生された或いはウイルス調製品から精製されたMTVタンパク質を、複数ウェルのプラスチック製微量定量プレート内のウェル底部に結合する。ヒト又は他の種由来の血清又は血漿を、経験的に決定された最適希釈度に希釈し、かつ1時間から一晩中約25 (室温)でインキュベートする。Tween(登録商標)20 (Aldrich) 又はNP-40 (Igepal™ CA-630として容易に入手可能、Sigma) 清浄剤を含有する食塩水内で自動化プレートウォッシャーを用いてウェルを3回洗浄する。MTVタンパク質に結合された抗体は、ウェルを経時的にビオチン化されたヤギの抗ヒト免疫グロブリンを含有する緩衝液、次いで西洋わさびペルオキシダーゼに結合されたアビジン、最後に西洋わさびペルオキシダーゼ用の着色反応生成物を生成する基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと反応させることによって検出することができる。各工程間に、典型的にTween(登録商標)20又はNP-40清浄剤を含有する食塩水内で自動化プレートウォッシャーを用いてウェルを3回洗浄する。各ウェル内で起こる着色反応は、分光光度計プレートリーダーを用いて定量化される。着色反応生成物の量は、元の試料中に存在するMTVに対する抗体の量に比例する。

#### 【0055】

##### 実施例6: 免疫組織化学を用いたMTVレトロウイルスタンパク質の現場検出

MTVレトロウイルスタンパク質は、免疫組織化学的アッセイによって組織試料内で検出することができる。この方法では、パキユロウィルス/昆虫細胞培養系のような発現系内で産生され、或いはウイルス調製品から精製されたMTVタンパク質を用いて、本技術の当業者には周知の方法でモノクロナール又はポリクロナール抗体を生成できる。これら抗体をビオチン、フルオレッセイン、西洋わさびペルオキシダーゼ又はこの目的で使用される他の標識のような検出部分で標識化することができる。標識化された抗体調製品を経験的に決定された最適希釈度に希釈し、固定若しくは凍結された薄切片又はMTVタンパク質の存在を試験すべき試料由来の細胞調製品と共にインキュベートする。用いる標識のタイプによって指示されるように試料を処理し、MTVレトロウイルスタンパク質に対する抗体の結合性は、顕微鏡、オートラジオグラフィ、フローサイトメトリー等によって、この場合もやはり標識部分のアイデンティティによって指示されるように検出することができる。

## 【 0 0 5 6 】

実施例 7：ヒト内でヒト乳癌ウイルスに対する免疫応答を誘発可能な医薬組成物の調製  
ヒト又は動物内で M T V タンパク質に対する免疫応答を誘発するために使用される医薬組成物は、以下のように開発することができる。上述のパキウイルス / 昆虫細胞培養系発現系内で産生され、或いはウイルス調製品から精製された M T V タンパク質は、カラムクロマトグラフィー及び / 又は当業者によって通常利用されるいずれの他の方法論によっても広範囲に精製することができる。精製された M T V タンパク質は、適宜のアジュバント調製品（現在、ミョウバンがヒト用に承認されている唯一のアジュバントである）と混合し或いはエマルジョンにしてワクチンを製造する。この免疫原性組成物を標的動物中に皮下又は皮内注射することができる。

10

## 【 0 0 5 7 】

本明細書で開示及び特許請求の範囲に記載されているすべての組成物及び方法は、本開示に照らして過度の実験を行うことなく製造かつ実施することができる。この発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態というかたちで記述されているが、当業者には本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された組成物と方法及び該方法の工程又は工程の順序に変化を加えうることは明らかである。さらに詳細には、同一若しくは同様の結果を達成しながら、本明細書に記載された物質を化学的及び生理学的の両方で関連する特定の物質と置換できることは明白である。本技術の当業者にとって明らかこのような同様の置換及び変形のすべては、特許請求の範囲によって定義されるように、本発明の精神、範囲及び概念内にあると考えられる。

20

## 【 0 0 5 8 】

（参考文献）

以下の参考文献は、ここに示した参考文献に、例示的な手続上の又は他の補足的な詳細を提供する範囲に、参照によって明確にここに組み込まれる。

## 【 0 0 5 9 】

- Andersson, M. L., Medstrand, P., Yin, H., and Blomberg, J. (1996). Differential expression of human endogenous retroviral sequences similar to mouse mammary tumor virus in normal peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 833-40.
- Armstrong, K., Eisen, A., and Weber, B. (2000). Assessing the Risk of Breast Cancer. *NEJM* **342**, 564-571.
- Eitner, J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice., *Science* **84**, 162-166, 1936
- Breznik, T. and Cohen, J.C. (1982). Altered methylation of endogenous viral promoter sequences during mammary carcinogenesis. *Nature* **295**, 255-257. 10
- Breznik, T., Traina-Dorge V., Gama-Sosa M., Gehrke C.W., Ehrlich M., Medina D., Butel, J.S., Cohen, J.C. (1984). Mouse mammary tumor virus DNA methylation: tissue-specific variation, *Virology*. **136**, 69-77.
- Coffin, J. M. (1992). Superantigens and endogenous retroviruses: a confluence of puzzles, *Science* **255**, 411-3.
- Cohen, J. C. (1980). Methylation of milk-borne and genetically transmitted mouse mammary tumor virus proviral DNA, *Cell*. **19**, 653-62., 1980.
- Cohen, J.C. and Varmus, H.E. (1979). Endogenous mammary tumor virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. *Nature* **278**, 418-423.
- Cohen, J.C. and Varmus, H.E. (1980). Proviruses of mouse mammary tumor virus in normal and neoplastic tissues from GR and C3Hf mouse strains. *J. Virology* **35**, 298-305. 20
- Cohen, J.C., Majors, J.E., and Varmus, H.E. (1979). Organization of mouse mammary tumor virus-specific DNA endogenous to BALB/c mice. *J Virology* **32**, 483-496.
- Cohen, J.C., Shank, P.R., Morris, V.L., Cardiff, R., and Varmus, H.E. (1979). Integration of the DNA of mouse mammary tumor virus in virus-infected normal and neoplastic tissue of the mouse. *Cell* **16**, 333-345
- Cohen, J.C., Traina, V.L., Breznik, T., Gardner, M. (1982). Development of an MMTV negative strain: a new system for the study of mammary carcinogenesis. *J. Virology* **44**, 882-885.
- Das, M. R., Vaidya, A. B., Sirsat, S. M., and Moore, (1972). D. H. Polymerase and RNA studies on milk virions from women of the Parsi community, *J Natl Cancer Inst.* **48**, 1191-6. 30
- Faff, O., Murray, A. B., Schmidt, J., Leib-Mosch, C., Erfle, V., and Hehlmann, R. (1992). Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin *J Gen Virol.* **73**, 1087-97.

- Gayther, S.A., Pharoah P.D., and Ponder B.A. (1998). The genetics of inherited breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, :365-76.
- Golovkina, T. V., Dudley, J. P., Jaffe, A. B., and Ross, S. R. (1995). Mouse mammary tumor viruses with functional superantigen genes are selected during in vivo infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4828-32.
- Hong, H., Meamati, N., Winslow, H.E., Christensen, J.L., Orr, A., Pommier, Y., and Milne, G.W. (1998) Identification of HIV-1 integrase inhibitors based on a four-point pharmacophor. *Antivir. Chem. Chemother.* **9**, 461-72.
- Jakobovits, A., Shackelford, G. M., Varmus, H. E., and Martin, G. R. (1986). Two proto-oncogenes implicated in mammary carcinogenesis, int-1 and int-2, are independently regulated during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7806-10. 10
- Kitajewski, J., Mason, J. O., and Varmus, H. E. (1992). Interaction of Wnt-1 proteins with the binding protein BiP, *Mol Cell Biol* **12**, 784-90.
- Kitamura, Y., Ayukawa, T., Ishikawa, T., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J. Virol.* **70**, 3302-6.
- Larsson, E., Andersson, A. C., and Nilsson, B. O. (1994). Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic tissues--evidence for a function for envelope gene products. *Ups J Med Sci.* **99**, 113-20.
- Li, J. M., Fan, W. S., Horsfall, A. C., Anderson, A. C., Rigby, S., Larsson, E., and Venables, P. J. (1996). The expression of human endogenous retrovirus-3 in fetal cardiac tissue and antibodies in congenital heart block *Clin Exp Immunol.* **104**, 388-93. 20
- Lower, R., Lower, J., and Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5177-84.
- Luther, S. A. and Acha-Orbea, H. (1996). Immune response to mouse mammary tumour virus, *Curr Opin Immunol.* **8**, 498-502.
- Mathe, G. (1999) Why have ten or so nontoxic, retrovirus integrase inhibitors not been made available for AIDS treatment? A ten-year experience [correction of experiment] must liberate them, *Biomed. Pharmacother.* **53**, 484-86.
- May, F. E. and Westley, B. R. (1986). Structure of a human retroviral sequence related to mouse mammary tumor virus, *J. Virol.* **60**, 743-9. 30
- Meese, E., Gottert, E., Zang, K. D., Sauter, M., Schommer, S., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10): chromosomal localization by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization *Cytogenet Cell Genet.* **72**, 40-2.
- Moore, D. H. (1971). Evidence for a human breast cancer virus, *Indian J Cancer* **8**, 80-3.
- Moore, D. H., Charney, J., Kramarsky, B., Lasfargues, E. Y., Sarkar, N. H., Brennan, M. J., Burrows, J. H., Sirsat, S. M., Paymaster, J. C., and Vaidya, A. B. (1971). Search for a human breast cancer virus, *Nature* **229**, 611.

- Nusse, R. (1991). Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis, *Curr Top Microbiol Immunol.* **171**, 43-65.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., and Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family *Cell* **64**, 231.
- Nusse, R., van Ooyen, A., Rijsewijk, F., van Lohuizen, M., Schuurin, E., and van't Veer, L. (1985). Retroviral insertional mutagenesis in murine mammary cancer, *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **226**, 3-13.
- Ono, M. (1986). Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes, *J Virol.* **58**, 937-44. 10
- Patience, C., Simpson, G. R., Colletta, A. A., Welch, H. M., Weiss, R. A., and Boyd, M. T. (1996). Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47D mammary carcinoma cell line *J Virol.* **70**, 2654-7.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, Alfonso R. Gennaro Ed., 16<sup>th</sup> Edition, 1980.
- Robinson, W.E. Jr. (1998) L-chicoric acid, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase, improves on the in vitro anti-HIV-1 effect of Zidovudine plus a protease inhibitor (AG1350), *Antiviral Res.* **39**, 101-11.
- Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. 20
- Sarkar, N. H. (1980). B-type virus and human breast cancer. *In: G. Giraldo and E. Beth (eds.), The role of viruses in human cancer*, pp. 207-235. New York: Elsevier.
- Shackleford, G. M. and Varmus, H. E. (1987). Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to postmeiotic male germ cells and the neural tube of mid-gestational embryos, *Cell* **50**, 89-95.
- Shackleford, G. M., MacArthur, C. A., Kwan, H. C., and Varmus, H. E. (1993). Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in Wnt-1 transgenic mice by insertional activation of int-2/Fgf-3 and hst/Fgf-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 740-4.
- Sing, S.B., Felock, P., and Hazuda, D.J. (2000) Chemical and enzymatic modifications of integrase and HIV-1 integrase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 235-38. 30
- Traina, V. L., Taylor, B. A., and Cohen, J. C. (1981). Genetic mapping of endogenous mouse mammary tumor viruses: locus characterization, segregation, and chromosomal distribution, *J. Virology* **40**, 735-44.
- Traina-Dorge, V. and Cohen, J. C. (1983). Molecular genetics of mouse mammary tumor virus, *Curr Top Microbiol Immunol.* **106**, 35-56.
- Traina-Dorge, V. L., Carr, J. K., Bailey-Wilson, J. E., Elston, R. C., Taylor, B. A., and Cohen, J. C. (1985). Cellular genes in the mouse regulate in trans the expression of endogenous mouse mammary tumor viruses, *Genetics* **111**, 597-615.

- Varmus, H. E. (1985). Viruses, genes, and cancer. I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia, *Cancer* **55**, 2324-8.
- Varmus, H. E., Cohen, J. C., Shank, P. R., Ringold, G. M., Yamamoto, K. R., Cardiff, R., and Morris, V. L. (1978). The endogenous and acquired proviruses of mouse mammary tumor virus. pp. 161-79, In: Stevens Jg, et al., ed. *Persistent viruses*. New York, Academic Press. *11*: 161-79.
- Vogetseder, W., Denner, J., Boller, K., Kurth, R., and Dierich, M. P. (1995). Human endogenous retrovirus K does not encode mouse mammary tumor virus-related antigens in human breast carcinomas *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 869-72.
- Wang, Y., Go, V., Holland, J.F., Melana, S.M., and Pogo, B.G. (1998) Expression of mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2565-2568.
- Wang, Y., Holland, J.F., Bleiweiss, I.J., Melana, S., Liu, X., Pelisson, I., Cantarella, A., stellrecht, K., Mani, S., and Pogo, B.G. (1995). Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res.* **55**, 5173-5179
- Ziegler, J. (1997). An unlikely link? Researchers probe viral role in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **89**, 608-10.

10

## 【図面の簡単な説明】

20

- 【図1】 ヒト乳癌組織由来のMMTVに関連する配列の増幅結果を示す。
- 【図2】 健康な対照の血液由来のMMTVに関連する配列の増幅の例を示す。
- 【図3】 HMTV mRNAのリボヌクレアーゼ保護アッセイによる検出の例を示す。
- 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Garry, Robert F.

<120> Human Endogenous Retrovirus in Breast Cancer

<130> TUMC:012

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 461

<212> DNA

<213> Mouse mammary tumor virus

<400> 1

```
tcccttcct cgctagtgt agatcagtca gatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagatatct tattctcaaa 240
aggccaggat ttcaagaaca tgacatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atctctgtt cttctttag attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcatcatag tcaagaggcc gccatcctg ctgctacctg t 461
```

<210> 2

<211> 461

<212> DNA

<213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 2

```
tcccttcct cgctagtgt agatcagtca gatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagatatct tattctcaaa 240
aggccaggat ttcaagaaca tgacatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaaa aaagaggatc tacttttcat 360
atctctgtt cttctttag attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcatcatag tcaagaaggc gccatcctg ctgctacctg t 461
```

<210> 3

<211> 461

<212> DNA

<213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 3

```
tcccttcct cgctagtgt agatcagtca gatcagatta aaaacaaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctactt ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
```

10

20

30

```

aagccaggat ttcaagaaca tgagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atctctgttt cttcttgttg attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatacgtg ctgctacctg t 461

```

```

<210> 4
<211> 461
<212> DNA
<213> Human Mammary Tumor Virus

```

```

<400> 4
tccttccct cgcttagtat agaacagtca aatcagatta aaagcaaaaa ggatctactt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctactt ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
aggccaggat ttcaagaaca tgagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga agagaggatc tacttttcat 360
atctctgttt cttcttgtag attgactaat tgttttagact cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatacgtg ctgctacctg t 461

```

10

```

<210> 5
<211> 461
<212> DNA
<213> Rhesus Mammary Tumor Virus

```

```

<400> 5
tccttccct cgcttagtgt agatcagtca aatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctactt ggttctggga aaattctcct aaagatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
aagccaggat ttcaagaaca tgagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atctctgttt cttcttgtag attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatacgtg ctgctacctg t 461

```

20

```

<210> 6
<211> 461
<212> DNA
<213> Rhesus Mammary Tumor Virus

```

```

<400> 6
tccttccct cgcttagtgt agatcagtca aatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataaagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctactt ggttctggga aaattctcct aaagatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
aagccaggat ttcaagaaca tgagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atctctgttt cttcttgtag accgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatacgtg ctgctacctg t 461

```

30

```

<210> 7
<211> 461
<212> DNA

```

<213> Cat Mammary Tumor Virus

<400> 7

```

tcccttcct cgctagtgt agaacagtca gatcagatta aaagcaaaaa ggatctactt 60
ggaattata ctccccctgt caataaagag gtccatcgat ggatgaagc aggatgggta 120
gaacctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttattgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
aagccaggat ttcaagaaca taagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atttcctggt cttctttag attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatcctg ctgctacctg t 461

```

<210> 8

<211> 461

<212> DNA

<213> Cat Mammary Tumor Virus

10

<400> 8

```

tcccttcct cgctagtgt agaacagtca gatcagatta aaagcaaaaa ggatctactt 60
ggaattata ctccccctgt caataaagag gtccatcgat ggatgaagc aggatgggta 120
gaacctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaaa 240
aagccaggat ttcaagaaca taagatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taagattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atttcctggt cttctttag attgactaat tgttttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gcgatcatag tcaagaggcc gccatcctg ctgctacctg t 461

```

<210> 9

<211> 104

<212> DNA

<213> Mouse mammary tumor virus

20

<400> 9

```

atgatgccga gaggagaagg gtcagatata ttgatcaagc aattggcatg ggaaaatgca 60
aattcattgt gtcaggatct catccgccca atacgaaaaa cagg 104

```

<210> 10

<211> 104

<212> DNA

<213> Cat Mammary Tumor Virus

<400> 10

```

atgatgccga gaggagaagg gtcagatata ttgatcaaac aattggcgta aaaaaatgca 60
aattcattgt gccaatgctc tatccgtcca atacgaaaaa cagg 104

```

30

<210> 11

<211> 153

<212> PRT

<213> Mouse mammary tumor virus

<400> 11

```

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys
  1             5             10             15

```

Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30

Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg Tyr Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Arg Pro Gly Phe Gln Glu His Asp Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125

Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140

Lys Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Pro  
 145 150

10

<210> 12  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

20

<400> 12  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Leu Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15

Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30

Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg Tyr Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Arg Pro Gly Phe Gln Glu His Asp Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu

30

115 120 125  
 Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140  
 Lys Lys Ala Pro Tyr Val Leu Leu Pro  
 145 150

<210> 13  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 13  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ile Lys Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30  
 Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60  
 Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg His Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Lys Pro Gly Phe Gln Glu His Glu Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95  
 Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Leu Thr  
 115 120 125  
 Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val Lys  
 130 135 140  
 Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Pro  
 145 150

10

20

<210> 14  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 14  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Ile Glu Gln Ser Asn Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Leu Leu Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30

30

Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg His Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Arg Pro Gly Phe Gln Glu His Glu Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125

Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140

Lys Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Pro  
 145 150

10

<210> 15  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Rhesus Mammary Tumor Virus

20

<400> 15

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Gln Ser Asn Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15

Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30

Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg His Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Lys Pro Gly Phe Gln Glu His Glu Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125

Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val

30



Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg His Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Lys Pro Gly Phe Gln Glu His Lys Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Arg Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125

Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140

Lys Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Pro  
 145 150

10

<210> 18  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Cat Mammary Tumor Virus

<400> 18  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Glu Gln Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15

Lys Asp Leu Leu Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30

Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60

Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg His Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

Lys Pro Gly Phe Gln Glu His Lys Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95

Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Arg Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110

Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125

Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140

Lys Arg Pro Pro Tyr Val Leu Leu Pro

20

30

145 150

<210> 19  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Mouse mammary tumor virus

<400> 19  
Met Met Pro Arg Gly Glu Gly Ser Asp Ile Leu Ile Lys Gln Leu Ala  
1 5 10 15  
Trp Glu Lys Cys Lys Phe Ile Val Ser Gly Ser His Pro Pro Asn Thr  
20 25 30

Lys Asn Arg  
35

10

<210> 20  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Cat Mammary Tumor Virus

<400> 20  
Met Met Pro Arg Gly Glu Gly Ser Asp Ile Leu Ile Lys Gln Leu Ala  
1 5 10 15  
Tyr Lys Lys Cys Lys Phe Ile Val Pro Arg Ser Tyr Pro Ser Asn Thr  
20 25 30

Lys Asn Arg  
35

20

<210> 21  
<211> 460  
<212> DNA  
<213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 21  
tccttccct cgcctagtgt agatcagtc gatcagatta aaagcaaaag gatctatttg 60  
gaaattatac tccccctgtc aataaagagg ttcacgggtg gtatgaagca ggatgggtag 120  
aacctacatg gttctgggaa aattctccta aggatcccaa tgatagagat ttactgctc 180  
tagttcccca tacagaattg tttcgcttag ttgcagcctc aagatatctt attctcaaaa 240  
ggccaggatt tcaaggacat gacatgattc ctacatctgc ctgtgttact tacccttatg 300  
ccatattatt aggattacct cagctaatag atatagaaaa aagaggatct acttttcata 360  
tttctgttc ttcttgtaaa ttgactaatt gtttagattc ttctgcctac gactatgcag 420  
cgatcatagt caagaaggcg ccatatgtgc tgctacctgt 460

30

<210> 22  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 22

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Arg Ile Tyr Leu Glu Ile Ile Leu Pro Leu Ser Ile Lys Phe Ile Gly  
 20 25 30  
 Gly Met Lys Gln Asp Gly  
 35

<210> 23  
 <211> 461  
 <212> DNA  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

10

<400> 23  
 tcccttcct cgcctagtgt agatcagtc gatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60  
 ggaaattata ctccccctgt caataaagg gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120  
 gagcctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga tttactgct 180  
 ctagtccccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagatatct tattctcaaa 240  
 aggccaggat ttcaaggaca tgacatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300  
 gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaaa aaagaggatc tacttttcat 360  
 atttcctgtt cttcttgtaa attgactaat ttgtttagat cttctgccta cgaatatgca 420  
 gcgatcatag tcaagaaggc gccatatgtg ctgctacctg t 461

<210> 24  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

20

<400> 24  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Leu Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30  
 Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60  
 Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg Tyr Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Gly Phe Gln Glu His Asp Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95  
 Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125  
 Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Asp Tyr Ala Ala Ile Ile Val

30



<210> 27  
 <211> 460  
 <212> DNA  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 27  
 tcccttccct cgcctagtgt agatcagtc gatcagatta aaagcaaaaa ggatctattt 60  
 ggaaattata ctccccctgt caataaaggg gtccatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120  
 gagcctacat ggttctggga aaattctcct aaggatccca atgatagaga ttttactgct 180  
 ctagtcccc atacagaatt gtttcgctta gttgcagcct caagatatct tattctcaa 240  
 aggccaggat ttcaagaaca tgacatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300  
 gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaaa aaagaagatc tacttttcat 360  
 atttccctgtt cttctttag taggactaat ttgttttagat cttctgccta cgaatatgca 420  
 gcgatcatag tcaagaaggg ccatatgtgc tgctacctgt 460

10

<210> 28  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> Human Mammary Tumor Virus

<400> 28  
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Leu Ser Asp Gln Ile Lys Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His  
 20 25 30  
 Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr Trp Phe Trp Glu Asn  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Asp Pro Asn Asp Arg Asp Phe Thr Ala Leu Val Pro His  
 50 55 60  
 Thr Glu Leu Phe Arg Leu Val Ala Ala Ser Arg Tyr Leu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Gly Phe Gln Glu His Asp Met Ile Pro Thr Ser Ala Cys Val  
 85 90 95  
 Thr Tyr Pro Tyr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Arg Gly Ser Thr Phe His Ile Ser Cys Ser Ser Cys Arg Leu  
 115 120 125  
 Thr Asn Cys Leu Asp Ser Ser Ala Tyr Glu Tyr Ala Ala Ile Ile Val  
 130 135 140  
 Lys Lys Gly His Met Cys Cys Leu  
 145 150

20

30

<210> 29  
 <211> 461

<212> DNA  
<213> Human Mammary Tumor Virus

```

<400> 29
tcccttcct cgcctagtgt agatcagtc gatcagatta aaaacaaaa ggatctattt 60
ggaaattata ctccccctgt caataagag gttcatcgat ggtatgaagc aggatgggta 120
gaacctactt gattctggga aaattctect aaagatoccca atgatagaga ttttactgct 180
ctagttcccc atacagaatt gttccgctta gttgcagcct caagacatct tattctcaa 240
aagccaggat ttcaagaaga tgacatgatt cctacatctg cctgtgttac ttacccttat 300
gccatattat taggattacc tcagctaata gatatagaga aaagaggatc tacttttcat 360
atttcctggt cttctgttag attgactaat tgtttagatt cttctgccta cgactatgca 420
gogatcatag tcaagaagge gccatacgtg ctgctacctg t 461

```

```

<210> 30
<211> 43
<212> PRT
<213> Human Mammary Tumor Virus

```

```

<400> 30
Ser Leu Pro Ser Pro Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ile Lys Asn Lys
 1           5           10          15
Lys Asp Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Pro Pro Val Asn Lys Glu Val His
 20          25          30
Arg Trp Tyr Glu Ala Gly Trp Val Glu Pro Thr
 35          40

```

10

【 図 1 】

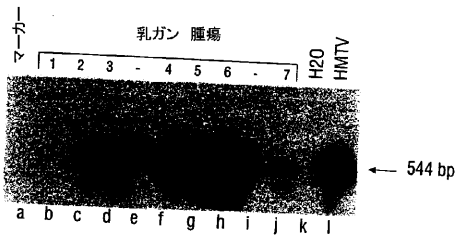


FIG. 1A

【 図 2 】

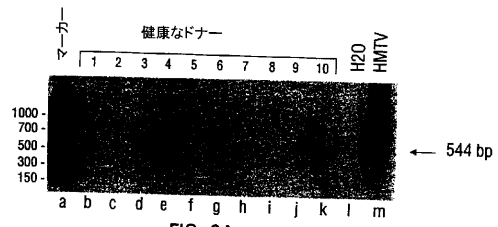


FIG. 2A

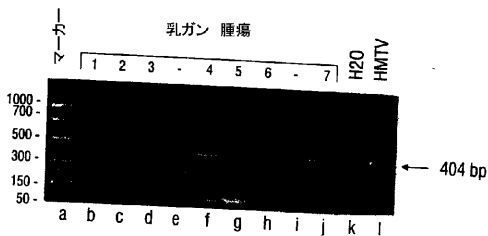


FIG. 1B

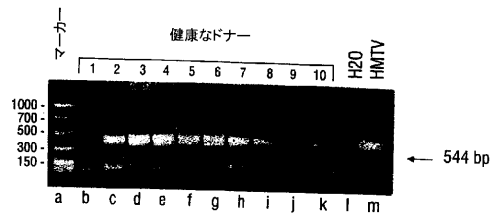


FIG. 2B

【 図 3 】

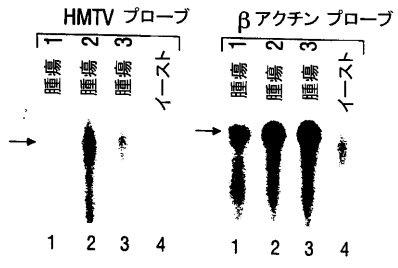


FIG. 3

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>		C 1 2 Q 1/68	A
<b>C 1 2 Q 1/70 (2006.01)</b>		C 1 2 Q 1/70	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	N
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/574	C

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)復代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(72)発明者 ゲイリー ロバート エフ

アメリカ合衆国 ルイジアナ州 7 0 1 1 2 ニュー オーリンズ トゥレーン アヴェニュー  
1 4 3 0 トゥレーン メディカル スクール

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第 9 7 / 0 1 7 4 7 0 ( WO , A 1 )

Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 8 7 年 , Vol.84 , P.4298-4302

Cancer Res. , 1 9 9 5 年 , Vol.55 , P.5173-5179

Clin. Cancer Res. , 1 9 9 8 年 , Vol.4 , P.2565-2568

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09

C07K 14/15

C07K 16/10

C12N 5/10

C12N 1/19

C12N 1/21

C12P 21/08

C12Q 1/68

C12N 7/00

PubMed

WPI

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	人内源性乳腺癌逆转录病毒		
公开(公告)号	<a href="#">JP4934258B2</a>	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	JP2001518660	申请日	2000-06-30
申请(专利权)人(译)	当局流浪焦油的Teyurein教育家Ishonaru基金		
当前申请(专利权)人(译)	当局流浪焦油的Teyurein教育家Ishonaru基金		
[标]发明人	ゲイリーロバートエフ		
发明人	ゲイリー ロバート エフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/15 C07K16/10 C12P21/08 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/574 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 C07K14/47 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/12 G01N33/566		
CPC分类号	A61K39/00 A61P15/00 A61P35/00 C07K14/005 C07K14/47 C12N2740/10022 C12N2740/12022 Y10S435/975 Y10S530/826		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/15 C07K16/10 C12P21/08 C12N5/00.102 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.N G01N33/574.C		
代理人(译)	中村稔 西岛隆义		
审查员(译)	铃木隆行		
优先权	60/141626 1999-06-30 US		
其他公开文献	JP2003507050A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及乳腺肿瘤病毒 (MTV)。MTV代表一组逆转录病毒，其与小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 具有非常高的同源性，MMTV是一种已知在小鼠中引起肿瘤性乳腺疾病的病毒。如本文所述，已经在人，猫和恒河猴中鉴定出MTV。本发明特别提供了衍生自这些MTV的重组核酸和多肽以及使用这些生物分子的方法。

