

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4278174号
(P4278174)

(45) 発行日 平成21年6月10日(2009.6.10)

(24) 登録日 平成21年3月19日(2009.3.19)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
A 6 1 K	39/21	(2006.01)	A 6 1 K	39/21
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
C 0 7 K	14/16	(2006.01)	C 0 7 K	14/16
C 0 7 K	16/10	(2006.01)	C 0 7 K	16/10

請求項の数 26 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-513692
(86) (22) 出願日	平成7年10月20日(1995.10.20)
(65) 公表番号	特表平10-509587
(43) 公表日	平成10年9月22日(1998.9.22)
(86) 国際出願番号	PCT/FR1995/001391
(87) 国際公開番号	W01996/012809
(87) 国際公開日	平成8年5月2日(1996.5.2)
審査請求日	平成14年8月7日(2002.8.7)
(31) 優先権主張番号	94/12554
(32) 優先日	平成6年10月20日(1994.10.20)
(33) 優先権主張国	フランス(FR)
(31) 優先権主張番号	95/02526
(32) 優先日	平成7年3月3日(1995.3.3)
(33) 優先権主張国	フランス(FR)

(73) 特許権者	596009674
	アンステイテュ・パストゥール
	フランス国、75724 パリ・セデクス
	15、リュ・ドゥ・ドクトゥール・ルー
	25-28
(74) 代理人	100058479
	弁理士 鈴江 武彦
(74) 代理人	100108855
	弁理士 蔵田 昌俊
(74) 代理人	100091351
	弁理士 河野 哲
(74) 代理人	100088683
	弁理士 中村 誠
(74) 代理人	100109830
	弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-1 の O グループ (またはサブグループ) レトロウイルス性抗原のヌクレオチド配列

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の HIV-1_{VAU} の env 遺伝子の配列 (配列 (1) または配列番号 5) を含む、HIV-1_{VAU} の検出を可能にする、ポリヌクレオチド。

【表 1】

ATGACAGCGATTATGAAAGCAATGGGGAAGAGGAACAGGAAGTTAGGGATCTGGTGCTTG
 ATTTTGGCTTTGATAATCCCATGTTTGAGCTGTAACCACTATATGCCACAGTCTATTCT
 GGGGTACCTGTATGGGAAGATGCAAACCAACATTGTTCTGTGCTTCAGATGCTAACTTG
 ACAAGCACTGAACAGCATAATATTTGGGCAACACAAGCCTGTGTTCCACAGACCCCAGT
 CCAAATGAATATGAGCTAAAAAATGTGACAGGTAAATTCATATATGGAAAAATTATATA
 GTAGACCAAATGCACGAAGACATTATAGATTTGTGGGACCAGAGTTTAAAACCTTGTT
 CAAATGACTTTCTTGTGTGTACAAATGAATTGTACAGATATCAAAAATAGTATTAATACC
 ACAAACAGTCCCTTAAACTCAAACAATACAAAAGAGGTGAAACAGTGTGACTTTAATGTA
 ACTACAGTGTCTCAAAGACAAACAGGAGAAAAAACAGGCTCTATTCTATGTGACAGATTTG
 GTTAAGATTAACGCCACATCAAATGAAACAATGTATAGATTAATTAATTGTAACCTCACA
 ACCATCAGGCAGGCCTGTCCAAAGGTATCTTTTGAGCCATTCCCATACACTATTGTGCT
 CCAGCGGGATGTGCCATCTTTAAGTGTAATGAAACAGGATTTAATGGAACAGGTCTCTGT
 AAAACGTTACAGTAGTTACTTGTACACATGGCATCAAACCAACAGTAAGTACCCAATA
 ATACTAAATGGGACACTCTCTAAAGGAAATATAACAATCATGGGAAAGAATATTTTCAGAC
 AGTGGGAGAACATCCTAATAACCCTAAATACTAATATAACAATAGCATGTGAGAGACCA
 GGAAATCAGACAATACAAAAGATAATGGCAGGTCCAATGGCTTGGTACAGCATGGCCCTT
 AGTAATACAAAGGGGGATACAAGGGCAGCTTATTGTAATTATAGTGCCACTGACTGGAAC
 AAAGCCTTAAAAAACATAACTGAAAGATATTTAGAACTTGTAAGTATAATCAAACCTGAT
 GTTACCATGAAATTCGGTAATCACAGTGGTGAAGATGCAGAAGTAACAAATTTCTTTTTT
 AACTGTCATGGAGAATTCTTTTATTGTAACACAAATCGGCTGTTTAAATCATACCTTTTCC
 TGCAAGAAGAATATGACCAATAACAAGATCAATTGTACTAATATTAGCAATAATAGCAAT
 GGCCTCAGGCAATACCTTGCAGGTTGAGACAAGTAGTAAGGGACTGGATGAGGGGAGGA
 TCGGGACTTTATGCACCTCCCATCCCAGGAAACCTAGTATGCAGGTCAAACATAACTGGA
 ATGATTCTACAATTGGACACGCCATGGAATAAAACACATCCTAACAGCACCACCCTTAGA
 CCAGGAGGGGGAGATATGAAAGATATATGGAGAACTCAATTGTTCAAATATAAAGTAGTA
 AGAGTAAACCTTTTAGTGTAGCACCAACAAAAATTGCAAGGCCAACTATAGGAACTAGA
 TCTCATAGAGAGAAAAGAGCAGCAGGTTGGCAATGCTATTCTTGGGGATTCTAAGTGCA
 GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGGCAACAGCGCTGACGGTACGGACCCAGCATCTGATA
 AAGGGTATAGTGCAACAGCAGGATAACCTGCTAAGAGCAATACAGGCCCAGCAACACTTG
 CTGAGGCCATCTGTATGGGGTATTAGACAACCTCCGAGCTCGCCTGCTAGCCTTAGAAACC
 TTTATACAGAATCAGCAACTCCTTAACCTGTGGGGCTGCAAGAATAGACTAATCTGCTAC
 ACATCAGTAAAGTGAATAAAACATGGGGAGGAGATAATGAATCAATTTGGGATGAGTTA
 ACATGGCAGCAGTGGGATCAACAGATAAACAACGTAAGCTCCTTCATATATGAAAAATA
 CAAGAGGCACAAGAACAACAGGAGAAAAATGAGAAAGAATTGCTGGAGTTAGATGAATGG
 GCCTCTATTTGGAATTGGCTTGACATAACTAAATGGTTGTGGTATATAAAAAATAGCTATA
 ATCATAGTAGGAGCACTAATAGGTGTAAGAGTAGTTATGATAGTACTTAATCTAGTAAAG
 AACATTAGGCAGGATATCAACCCCTCTCGTTACAGATCCCCATCCAACAACAAGCGGAA
 GTAGGAACGCCAGGAGGAACAGGAGAAGGAGGTGGAGACGAAGACAGGCGCAGGTGGACT
 CCATTGCCGCAAGGGTTCTTGCATCTGTTGTACACGGACCTCAGGACAATAATCTTGTGG
 ATTTACCACCTCTTGAGCAACTTAGCCTCAGAGATCCAGAAGTTGATCAGACACCTGGGA
 CTTGGACTATGGATCATAGGGCAGAGGACAATTGAAGCTTGCAGACTCTTTAAAGCTATA
 ATACAATACTGGCTACAAGAATTGCAAACAGTGCTACAAATCTACTAGATACTGTTGCA
 GTGGCAGTTGCTAATTGGACTGACAGCACAATCTTAGGCATACAAAGCATAGGGAGAGGG
 ATTCTTAACATACCAAGAAGGATTAGACAGGGCCTTGAACGACTCCTGTTA

【請求項 2】

プライマー-Th2 (5'-GCT CTA GAT GGG GAT CTC CCA TGG CAG G-3') およびUH2 (5'-GCT
 CTA GAT CAG GGA AGA ATC CCT GAG TGT-3') を用いて、HIV-1_{VAU}のゲノム内において増
 幅された配列で構成される、請求項 1 に記載のプロープとして使用可能なポリヌクレオチ
 ド。

【請求項 3】

化学合成により得られる、請求項 1 または 2 に記載のプロープとして使用可能なポリヌク
 レオチド。

【請求項 4】

以下の (i) または (ii) のアミノ酸配列からなるエンベロープタンパク質のポリペプチドをコードする、プローブとして使用可能なポリヌクレオチド：

(i) RLLALETFIQNQQLLNLDWGCKNRLICYTSVKWNKT；または

(ii) HIV-1_{VAU} のエンベロープタンパク質のアミノ酸残基 527 ~ 877 からなる以下の配列：

【表 2】

AAGLAMLFLGILSAAGSTMGAAATALTVRTQHLLIKGIVQQDNLLRAIQAOQHLLRPSVW
GIRQLRARLLALETFIQNQQLLNLDWGCKNRLICYTSVKWNKTWGGDNESIWDELTWQOWD
QQINNVSSFIYEKIQEAQEQQEKNEKELLELDEWASIWNWLDITKWLWYIKIAIIIVGAL
IGVRVVMIVLNLVKNIRQGYQPLSLQIPIQQQAEVGTGGTGGGGDEDRRRWTPLPQGF
LHLLYTDLRTIILWYHLLSNLASEIQKLRHLGLGLWIIIGQRTIEACRLFKAI IQYWLQ
ELQTSATNLLD TVAVAVANWTDSTILG IQSIGRILNIPRRIRQGLERLLL

10

【請求項 5】

標識されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のプローブとして使用可能なポリヌクレオチド。

【請求項 6】

放射性標識、酵素標識または蛍光標識で標識されていることを特徴とする、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

HIV-1_{VAU} レトロウイルスのキャリアであることが疑われている患者から得た、血清またはその他の生物学的流体もしくは組織の試料中に、HIV-1_{VAU} レトロウイルスが存在するか否かを検出するための組成物であって、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の少なくとも一つのポリヌクレオチドを含むことを特徴とする組成物。

20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドによりコードされるペプチドまたはポリペプチド。

【請求項 9】

HIV-1_{VAU} レトロウイルスのエンベロープタンパク質であって、配列番号 5 の配列 (1) のポリヌクレオチドを宿主細胞で発現させることにより得ることができること、
該タンパク質が、HIV-1_{VAU} のエンベロープタンパク質のアミノ酸残基 527 ~ 877 の以下のアミノ酸配列：

30

【表 3】

AAGLAMLFLGILSAAGSTMGAAATALTVRTQHLLIKGIVQQDNLLRAIQAOQHLLRPSVW
GIRQLRARLLALETFIQNQQLLNLDWGCKNRLICYTSVKWNKTWGGDNESIWDELTWQOWD
QQINNVSSFIYEKIQEAQEQQEKNEKELLELDEWASIWNWLDITKWLWYIKIAIIIVGAL
IGVRVVMIVLNLVKNIRQGYQPLSLQIPIQQQAEVGTGGTGGGGDEDRRRWTPLPQGF
LHLLYTDLRTIILWYHLLSNLASEIQKLRHLGLGLWIIIGQRTIEACRLFKAI IQYWLQ
ELQTSATNLLD TVAVAVANWTDSTILG IQSIGRILNIPRRIRQGLERLLL

からなること

40

を特徴とする、HIV-1_{VAU} レトロウイルスのエンベロープタンパク質。

【請求項 10】

ポリペプチドの配列が、以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド：

RLLALETFIQNQQLLNLDWGCKNRLICYTSVKWNKT。

【請求項 11】

合成ペプチドであることを特徴とする、請求項 10 に記載のポリペプチドまたはペプチド。

【請求項 12】

ヒト生物学的試料中に抗HIV-1_{VAU}抗体が存在することを in vitro で検出するための組成物であって、請求項 8 ~ 11 の何れか 1 項で規定される HIV-1_{VAU} レトロウイルスのエンベロ

50

ープタンパク質のポリペプチドまたはペプチドを含む少なくとも一の抗原を含む組成物。

【請求項 1 3】

〇グループに属さないHIV-1ウイルスおよび/またはHIV-2ウイルスのペプチドを更に含むことを特徴とする、請求項 1 2に記載の組成物。

【請求項 1 4】

〇グループに属さないHIV-1および/またはHIV-2のペプチドが、GAGまたはPOLタンパク質、またはその断片であることを特徴とする、請求項 1 3に記載の組成物。

【請求項 1 5】

〇グループに属さないHIV-1および/またはHIV-2のペプチドが、エンベロープ糖タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 3に記載の組成物。

10

【請求項 1 6】

請求項 8 ~ 1 1の何れか 1 項に記載のタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドを認識することが可能な抗体。

【請求項 1 7】

HIV-1_{VAU}ウイルスに対して特異的な抗体をin vitroで検出するための方法であって、検出の対象となる被検体から得た血清または別の生物学的媒質を、請求項 8 ~ 1 1の何れか 1 項に記載のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの少なくとも一つ、または

請求項 1 2 ~ 1 5の何れか 1 項に記載の組成物

と接触させること、および免疫学的反応を検出することを含む方法。

20

【請求項 1 8】

ウェスタンブロット（免疫ブロッティング）またはELISA反応に必要な試薬であって、請求項 8 ~ 1 1の何れか 1 項に記載のタンパク質、ペプチドもしくはポリペプチド、または

請求項 1 2 ~ 1 5の何れか 1 項に記載の組成物

を含む試薬。

【請求項 1 9】

請求項 1に記載のポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドによりコードされる抗原に対する抗体をin vivoで合成誘導する際に使用するためのポリヌクレオチド。

30

【請求項 2 0】

動物内で抗体を誘導することが可能である、請求項 1 2 ~ 1 5の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

生物学的試料について、HIV-1_{VAU}レトロウイルスをin vitroで検出するためのキットであって、プローブとして、請求項 1 ~ 6の何れか 1 項に記載の少なくとも一つのポリヌクレオチド、または請求項 7に記載の組成物を含むことを特徴とするキット。

【請求項 2 2】

請求項 5に記載の別のプローブを更に含む、請求項 2 1に記載の検出キット。

40

【請求項 2 3】

前記プローブが固相支持体に固定化されていることを特徴とする、請求項 2 1または2 2に記載の検出キット。

【請求項 2 4】

ハイブリダイゼーションを行うために必要な試薬を更に含むことを特徴とする、請求項 2 1 ~ 2 3の何れか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 5】

HIV-1_{VAU}のキャリアであることが疑われる患者から得た、血清試料またはその他の流体もしくは生物学的組織中に、HIV-1_{VAU}ウイルスが存在するか否かを検出するための方法であって、

50

請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを、生物学的流体中に含有される細胞から得た核酸またはこれら流体自体の何れかと、これら核酸がこれらプローブとのハイブリダイゼーションにアクセス可能にされている条件で、これらプローブとこれら核酸とのハイブリダイゼーションを許容する条件下で、接触させること、および起こり得るハイブリダイゼーションを検出することを含む方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現により、抗原、ポリペプチドまたはペプチドを作成する方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ヌクレオチド配列の発現、または化学合成（例えば、Applied Biosystemsブランドの合成機を使用したもの）により、得られる抗原であって、HIV-1グル-プ（またはサブグル-プ）変異体、より特にはウイルス粒子より単離することができるものに相当する抗原に関する。HIV-1ウイルスの0サブグル-プの例を挙げて、HIV-1_(VAU)単離体、及びHIV-1_(DUR)単離体に言及する。

本発明はまた、上記抗原により誘導される、モノクロナ-ル、またはポリクロナ-ル抗体に関する。

本発明はまた、上記したウイルスのゲノムRNAに対して相補的か相同である配列を有する、クロナ-ル化DNA配列に関する。本発明は更に上記のクロナ-ル化DNA配列を調製するための方法に関する。本発明は更に上記したクロナ-ル化DNA配列によりコードされるアミノ酸配列を含んだポリペプチドに関する。

更に本発明は、上記した抗原を、ある種のAIDSの形態にある危険な状態の人における、in vitroでの検出に適用することと、前記の人の一部に対しては、このレトロウイルスに対する免疫原性組成物とワクチン用組成物の産生へ適用することに関する。同様に本発明は、同じ目的のための上記した抗体の適用に関し、また、その目的の一部のため、ヒトAIDSに対する医薬品の活性素の産生への適用にも関する。

本発明はまた、クロナ-ル化したDNA配列と、遺伝子増幅用プライマまたはプローブとしての上記配列に由来するポリペプチドの、診断キット中での適用に関する。

本発明は更に、化学合成、または組み換え宿主細胞内での発現によって得られる抗原性組成物であって、これにより、HIV-1、またはHIV-2のサブタイプに関わらず、HIV型のヒトレトロウイルスによる感染の診断が可能になるものに関する。このような組成物は、HIV-1、HIV-2、HIV-1_(DUR)、及びHIV-1_(VAU)ウイルス、または同様の免疫原性特徴を有する抗原性ペプチドの変異体に共通する抗原性ペプチドより選択した、少なくとも一つのペプチドを具備している。

本発明は更に、HIV-1型のヒトレトロウイルス、より特にはHIV-1、Mグル-プ、HIV-2、または0グル-プ（またはサブグル-プ）のHIV-1による感染の特異的診断を可能にする組成物であって、HIV-1ウイルスに特異的な抗原性ペプチド、HIV-2ウイルスに特異的な抗原性ペプチド、HIV-1の0グル-プ（またはサブグル-プ）に特異的な抗原性ペプチド、または同様の免疫原性特徴を有するこれらの抗原性ペプチドの変異体の少なくとも一つを具備している組成物に向けられている。より特には、上記抗原性ペプチドは、HIV-1のMグル-プと、HIV-2と、HIV-1の0グル-プ（サブグル-プ）のウイルスのエンベロ-プタンパク質に由来している。

本発明は更には、従来技術のペプチドでは必ずしも検出することができなかった抗HIV抗体の検出を可能にするペプチドに向けられていて、これは特には新規のHIV-1株であるHIV-1DURの発見に基づいている。それに対する抗血清は、必ずしも、現在使用されているようなHIVのコンセンサスペプチドとの反応性を有しているわけではない。「HIVのコンセンサス」という用語は、単離体間で保存されている領域を意味し、この証明は診断試薬の設計にとって必須であり、またこれが変異すると抗ウイルス医薬に対する抵抗性が付与される。本願で使用する「ペプチド」という用語は、オリゴペプチドとポリペプチドの両方を意味する。

10

20

30

40

50

従来技術

LAS及びAIDSの進展の起因である2つのタイプのヒト免疫不全症ウイルス(HIV)が単離されていて、また特徴付けられている。LAV-1、またはHIV-1として知られる第一のウイルスは、単離されていて、GB特許出願8324,800、及び特許出願EP 84401,834(1984年09月14日)に記載されている。このウイルスはまた、エフ・バ - レ - シノッシ(F.Barre-Sinoussi)らにより記載されている(Science,1983,220:868-871)。

2型のHIVレトロウイルスは別のクラスに属し、1型のHIVレトロウイルスとの免疫原性の関係は非常に限られている。HIV-2レトロウイルスは、ヨ - ロッパ特許出願番号、87,400,151,4(発行番号は239,425)に記載されている。

HIV-1レトロウイルスは最も一般的であり、世界中の複数の地域では主要な存在となっている。HIV-2レトロウイルスに関しては、西アフリカではよく見られるものであるが、グレズ(Grez)らにより、最近になってこの地域から外への伝播が報告されている(J.Virology,68:2161-2168)。

1型及び2型のヒト免疫不全症ウイルスはもちろん、ヒト以外の霊長類ウイルスを具備した、霊長類の免疫不全症レトロウイルス全体は、そのサイズ及び複雑さにおいて増大している。これらのウイルスで最も一般的なHIV-1は、現在、全世界的に流行しており、公衆衛生の主要な問題となっている。このウイルスの同定と分子的特徴付けのすぐ後で、このウイルスは非常に多様性があることが認識され、現在では幾つかのサブタイプを具備している(Myers,1994,Louwagie,et al.,1993,Louwagie et al.,1992,Myers G.1994 "HIV-1 Subtypes and phylogenetics trees: Human Retrovirus and AIDS; Myers,G.,Korber,B.,Wain-Hobson,S.,Smith,R.F.and Pavlakis,G.N.,Eds.Los Alamos National Laboratory,Los Alamos,NM.III-2-III-9)。このサブタイプの分化は主に、gagとenv遺伝子の多様性に基づいている。少なくとも6つのサブタイプが同定されていて、AからFと命名されているが、幾つかは、HIV-1の単離体に関して進行中の世界的な集中的調査より出現する可能性がある。これらの種々のサブタイプはそれぞれ、スタ - システムと呼ばれているシステムにおいて等距離であることが判明して、種々のHIV-1サブタイプは共通の祖先より同調して進化及び分化したことを示唆している。

最近、HIV-1に関するこのグループの2つの別個のウイルスが単離されて特徴付けされた。この2つのウイルスは、西中央アフリカのカメル - ン在住の患者より得られた(Gurter et al.,1994,Vanden Heesevelde et al.,1994)。これらの配列、より特にはそのenv(エンペロ - プ)遺伝子は、このウイルスがHIV-1関連ウイルス(HIV-1の0グループと呼ばれるもの)の別個の範疇に属することを明らかに示している(Nkengasong et al.,1993)。

しかしながら、HIV-1関連ウイルスのこのグループ内での単離体の多様性は知られておらず、またはアフリカから外への伝播も報告されてはいない。

HIV-1の血清学的試験における一般的な制約は、疑似陽性結果と疑似陰性結果の両方を避けることであり、また同時に、以前の試験で可能であった、陽性血清の検出における感度を保持するか、または改善することも制約である。

「env」遺伝子に必然的に由来する、コンセンサスペプチド(群)の使用に基づく試験は、HIV-1-0変異体の発見が、疑似陰性結果の可能性を明るみに出されるまでは、最も理想的な解決であると認識されていた(Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate.J.Virology.1994;68:1586-96;a new subtype of human immunodeficiency virus type 1(MPV-5180) from Cameroon.J.Virology.1994;68:1581-85)。

「env」ペプチド抗原との反応性が、ある種の試験ではないのに、患者において、AIDSの臨床的特徴やそれより前に起きるリンパ節腫脹症候群が見られるのは、現在ではHIV-1-0グループによるとされることがしばしばある(HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype 0 infected patients,Lancet 1994;343:1393-94;New HIV-1 subtype in Switzerland.Lancet 1994;344:270-271)。

発明の記載

10

20

30

40

50

本発明の目的は、診断実験室に対して、方法、特に特異的ペプチドであって、これまでは検出されにくかった抗HIV-1抗体の検出を可能にするものを提供することにある。本発明は更に、「疑似陰性結果」の可能性を避けるための、HIV-1_(DUR)のペプチドと、他のHIV群からの、それに対応したペプチドとの混合物に関する。

本発明は更には、生物学的試料中の、HIV-1-Mタイプレトロウイルスに特徴的な抗体と、HIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)レトロウイルスの検出と、それらの間での区別をつけるための方法に関する。

本発明は、在カメル-ンの陽性血清の女性であって、ウェスタンブロットング技術で確認された複数の試験中において、非定型な血清学的反応性を示した女性における観察より由来している。

この非定形の血清学的反応性を説明するため、特に、Oタイプに対して修飾されてさえある、ある種の第三世代試験に対する反応性の欠如を説明するため、発明者らは、このHIV-1_(DUR)株のゲノムのある特定の部分、より特異的にはGAGとENV遺伝子の配列を決定することに興味を抱いた。

しかしながら、Mグル-プ由来のプライマと、Oグル-プの既知のプライマとを用いたPCRによる遺伝子増幅は、gp120のVP3ル-プをコードしている部分と、gp41の免疫優性領域に対しては、うまくいかなかった。GAG領域のみが、従来技術の既知のプライマを使用して増幅することが可能であった(Loussert-Ajaka I, Lancet 1994;343:1393)。本発明の別の目的は、この問題を解決するプライマを決定することにある。

リンパ球DNAより、糖タンパク質gp41とgp120の部分配列を、カプシドタンパク質(GAG遺伝子)とともに決定し、このHIV-1DUR株が、その一部に関してHIV-1-Oグル-プに属し、また、特にgp41とgp120に関してはMグル-プとはかなり異なっていることが示された。

故に、特にHIV-1_(DUR)のGAG配列に関して、Mグル-プの同じ領域のコンセンサス配列とは異なっている、Oグル-プ中のコンセンサス配列の存在を、幾つかの領域に証明することが可能であった。

HIV-1_(DUR)のGAG、gp41、gp120をコードする配列のクローニングは、PST1部位を有する、Bluescript(登録商標)を利用して行った。増幅産物は、T3及びT7ユニバ-サルプライマを使用した標準的な手法でクローニングするか、または先立つ(preceding)増幅のプライマを利用して直接的に配列を決定した。次いで配列を、アプライド・バイオシステムズの373A自動配列決定機(EDGD Montigny le Bretonneux, France)を利用して決定した。

ヨ-ロッパ以外を旅行したことがなく、1992年にAIDSで死亡したフランス人患者より得られた、Oグル-プ単離体であるHIV-1_(VAU)のenv遺伝子を、発明者らは本発明の面において単離して、配列を決定した。そのエンペロ-プ配列によると、HIV-1_(VAU)は、最近特徴付けられた二つのカメル-ンウイルスである、HIV-1_{ANT}、及びHIV-1_{MVP5180}に関連している。env配列の系統樹的分析により、3つのウイルスが、以後本願ではHIV-1のOグル-プと呼ぶ、一つの独立したグル-プを構成していることが明らかになった。この患者からHIV-1_(VAU)を単離したことはまた、アフリカ以外でHIV-1のOグル-プの、ある程度の広がりが見られていることを示している。

HIV-1_(VAU) ウイルスの単離

HIV-1_(VAU)は、1992年に41歳のフランス人のAIDS患者より単離された。この患者は、1986年に、子宮頸部の癌に関連した重度のロイコ好中球減少症(leuconutropenia)を発症している。しかしながらこの患者は次第に、日和見感染の症状を示し、循環しているCD4⁺のT細胞の数が減少して、1992年にAIDSで死亡した。抗-HIV-1抗体は、ELISA(Elavia, Sanofi Diagnostis Pasteur and Abbott test)により、1990年に最初に検出された。

ヨ-ロッパ以外を旅行したことの無い該患者は、静脈性の医薬を使用したことがなく、また如何なる輸血もされていなかった。アフリカ系の性交パートナーは、全く同定されていない。この患者は、1971年に健常な子供を出産しているが、1980年に出生した男子は、新生児性のAIDSを強く示唆する、症状を発症した後に、1歳で死亡した。該患者の三番目の

10

20

30

40

50

子供は、1983年に出生しており、患者の配偶者（男）は現在も健常であって、感染していない。

このウイルスの単離は、次のようにして行った。患者のPBMC（末梢血リンパ球）に存在するCD8⁺細胞をIOT8抗体（Immunotech）でコ-ティングされたビ-ズを使用して除去する。残りのPBMCをPHAで刺激し、次いで健常なドナ-より得て、PHAで刺激済みのCD8枯渇済みPBMCと共培養した。共培養中のウイルス増殖を、上清中の逆転写（RT）活性をアッセイすることと、HIV-1のp24のELISA試験（Dupont de Nemoursにより販売の、診断キット）によりモニタ-した。初期の共培養より得られたウイルスを、CD8-枯渇済み、及びPHA刺激済みのPBMC培養で、継代を数回行った。MT4細胞（Harada, et al., 1985）、及びCEM細胞（Rey et al., 1989）はもちろん、HeLa-CD4-LTRLacZ細胞株P4-2（Clavel and Charneau 1994）が含まれる形質転換細胞株の、HIV-1_(VAU)による感染を幾度が試みた。

HIV-1_(VAU)の生物学的特徴付け

患者のCD8-枯渇済み、PHA刺激済みPBMCと、健常なドナ-からの同様の細胞との共培養後2週間で、培養上清中のRT活性のピ-クを示して、ウイルス産生が検出された。次いでこのウイルスをCD8-枯渇済み、PHA刺激済みPBMCを使用して、連続した継代を行うことができた。図1においてプレ-トAは、HIV-1_(VAU)の、感染済みPBMC培養上清中での産生を表し、これはRTアッセイ（黒丸）と、HIV-1p24捕獲ELISA（中抜き丸）とで確認した。HIV-1のp24の濃度は、ng/mlで表され、RT活性はcpm/ μ lで表されている。プレ-トBでは、同じ実験を、AIDS患者からの標準的なHIV-1初代分離体で行った。

HIV-1_(VAU)の増殖は、RTアッセイにより容易に検出できるが、HIV-1p24 ELISAによる、培養上清中のウイルス検出は、実質的に感度がよくない。図1は、RT、またはp24でアッセイしたときの、HIV-1_(VAU)、またはAIDS患者からの初代HIV-1単離体での、PBMCの増殖性感染の特徴の比較を示している。アッセイ上清中のRT活性のアッセイで決定した、等量の粒子に対しては、他のHIV-1単離体の場合に比べてHIV-1_(VAU)の場合に、約25分の1のp24が検出された。この差異は、ELISAプレ-トのコ-ティングに使用される、HIV-1p24に特異的なモノクローナル抗体には、HIV-1_(VAU)のgag産物に対する弱い親和性しかないという事実による可能性がある。

HIV-1に感受性である、形質転換済みのヒトT細胞株で、HIV-1_(VAU)を繁殖させる試みが幾つか行なわれたが、成功しなかった。特に、MT4細胞、またはCEM細胞の何れかと、HIV-1_(VAU)感染済みPBMCとの間の共培養を行っても、ウイルスは繁殖しなかった。さらにこのウイルスは、tat遺伝子で誘導可能なlacZ遺伝子を有する、CD4⁺HeLa細胞（P4-2）を感染することができないことも判明した（Clavel and Charneau 1994）。同様に、HIV-1_(VAU)の複製も、複数のチンパンジ-から由来の、活性化した末梢血リンパ球で検出することができなかった。

以下に詳細に記載する、HIV-1_(VAU)のエンペロ-プ配列の分析、及び最近記載された2つのカメル-ン単離体との比較により、3つのウイルス全てはHIV-1関連ウイルスの同じグループに属することが示されている。更に、この比較により、該ウイルスの3つの変異体はそれぞれ、系統樹でほぼ等しく離れていることが示されている。結果的に、3つのウイルス変異体のそれぞれは、それ自身で、現在、0グループと呼ばれているグループの内、異なるサブタイプを構成している。このグループは、現在までに同定されていて、発明者らがMグループと本願で呼んでいる、そのほかのHIV-1単離体のグループとは異なっている。

この新規のグループの出現は、その起源に関する疑問を投げかけている：0グループはMグループウイルスより発生したのか、（またはこれとは逆か？）、あるいはそれぞれのグループは異なる歴史を有するのか？。Mグループと0グループの両方に関しては、同様の内部分岐の特徴を有しており、それぞれは、ヒトの異なるポピュレーションで、分岐した異なるウイルス祖先に相当していると、発明者らは考えている。現時点で入手可能な系統学的、及びウイルス学的データによって、上記の2つのグループのそれぞれが、自然にヒトに影響したのか、それとも他の種よりヒトに導入されたのかどうかを調べることはできない。ヒト以外の霊長類に存在する、HIV-1と同様の唯一のウイルスは、明らかに自然的に

10

20

30

40

50

感染したチンパンジ - より単離した、SIVCPZGAB単離体 (Huet et al., 1990) であるが、これは明らかにMグル - プ、及びOグル - プからも異なっていて、これに相当するものはヒトでは発見されていない。HIV-1_(VAU) のチンパンジ - リンパ球での複製が成功していない限り、Oグル - プのウイルスが最近になってチンパンジ - のウイルスより進化したとは考えにくい。

Mグル - プよりも15から20年後になって、現在のみ、Oグル - プの流行が現れたのであろうか？ 3つの可能な説明がある。第一には、Oグル - プウイルスの祖先の、ヒトへの導入は、Mグル - プのものよりもより最近であると考えられる。第二には、それぞれの起源の地域では社会的条件が異なっていたので、Mグル - プはOグル - プよりも速く伝播することができた。そして第三には、Oグル - プウイルスは、Mグル - プに比べてその伝播能力が低かった。このような性質は、感染患者でのより少ないウイルス負荷が低減した伝播性と関連しているHIV-2の全世界的伝播が顕著に起きていないことを説明すると、提案されている (De Cock et al., 1993)。この点に関して、HIV-1のOグル - プに感染した患者でのウイルス負荷に関するデータは入手できないが、これらのウイルスの病原性は、HIV-1のものとは異なっているとはいえないようである。HIV-1_(VAU) が単離された患者は、HIV-1_{MVP5180}Oグル - プ単離体を得られた患者のようにして、死亡した。

しかしながら、HIV-1_(VAU) 患者の自然な感染歴はいまだ不明であるが、AIDSに似た症候群の第二子の死亡日から示唆されるように、この患者は1980以前に感染したという幾つかの兆候がある。

本発明は、図6に記載の配列で、配列認識番号5にも記載の、「vau」とよばれる配列を具備したenv遺伝子によりコードされる構造タンパク質と同等の免疫学的特徴を有する構造タンパク質を有する、HIV-1_(VAU) ウイルスの核酸配列の如何なる変異体、またはOグル - プの同等の、如何なるウイルスに関する。

本発明は更に、本発明による抗原、あるいは本発明による抗原を、一方において、一つ以上のHIV-1のOグル - プウイルス若しくはそのほかの変異体ウイルスと、また他方において、一つ以上の、HIV-2、及び/またはHIV-1、に由来する抽出物と組み合わせた混合物の何れかを含む組成物であって、該組成物が、適宜標識されている、組成物に関する。如何なるタイプの適切な標識 (酵素性、蛍光性、放射性等) も使用することが可能である。

核酸

本発明は、DNA、またはDNA断片に関し、特にPCRやそのほかの遺伝子増幅法に使用可能な、RNA、cDNA、またはプライマ由来の、クローン化したDNAとDNA断片で、HIV-1_(VAU) レトロウイルスのRNA、またはDNA由来のものに関する。本発明は、より特異的には、等価なDNA全てに関し、特にHIV-1_(VAU) DNA、特に図6に記載され、「vau」と呼ばれている配列に相当する配列を具備したHIV-1_(VAU) 株のenv領域をコードする配列と、相同な配列を有するDNAに関する。HIV-1のMグル - プとの相同性は少なくとも50%、好ましくは70%、更に有益には90%である。概して本発明は、HIV-1のOグル - プのレトロウイルスのDNAまたはRNAとハイブリダイズすることができる、等価なDNA (またはRNA) に関する。

本発明は更に上記したDNA配列に相当する、RNA配列に関する。

本発明は更に、配列認識番号7に記載の配列か、配列認識番号7の配列にハイブリダイズする配列を具備した、HIV-1_(VAU) ウイルスのインテグラ - ゼ遺伝子に関する。本発明はまた、上記のDNAに相当するRNAに関する。

本発明の主題はまた、上記したDNA、またはDNA断片にコードされるペプチド、またはポリペプチドである。

VAU配列あるいはHIV-1_(VAU) ウイルスのインテグラ - ゼ遺伝子、特に少なくとも9つのヌクレオチドを具備したオリゴヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドは、PCR技術やそのほかの遺伝子増幅技術により、生物学的試料中、培養細胞中、または細胞抽出物中の、HIV-1のOグル - プウイルスDNAまたはRNAの検出に使用することが可能である。これらの配列は遺伝子増幅用のプライマとして、または遺伝子増幅産物の特異的な検出用のプロ - プの何れかに使用することが可能である。さらにハイブリダイゼーションプロ -

10

20

30

40

50

ブとして利用されることが可能なものには、増幅産物、またはそれに相当する、化学合成 (Applied Biosystems) により得られる合成配列がある。

本発明はまた、ハイブリダイゼーション反応にプロ - ブとして使用可能で、高濃度条件下での HIV-1_(VAU) 変異体のゲノムの一部との反応を許容する、少なくとも 100ヌクレオチドの、如何なる断片をも含んでいる。

HIV-1_(VAU) env 遺伝子のクロ - ニングと配列決定

HIV-1_(VAU) DNA に関する、初回の PCR 増幅に対しては、全 DNA を HIV-1_(VAU) 感染 PBMC より抽出し、以下の縮重したプライマを利用して、po1 遺伝子のセグメント (インテグレーション領域) を増幅した：

プライマ 4506 : 5'AGTGGAT(A/T)(T/C)ATAGAAGCAGAAGT3' ; (配列認識番号 1) ;

プライマ 5011 : 5'ACTGC(C/T)CCTTC(A/C/T)CCTTTCCA3' ; (配列認識番号 2)。

反応液は、50 mM KCl、10 mM トリス - HCl (pH8.9)、1.5 mM MgCl₂、0.1 mM ゲラチン、0.2 mM dNTP、1 単位の Taq ポリメラーゼ (Amersham) を含有している。PCR は、92 10 秒、50 1 分、72 40 秒、を 43 回の熱サイクルで実行した。

得られた増幅産物を pBluescript ベクタにクロ - ニングして、ph4 クロ - ンを作成し、1994 年 10 月 20 日に CNCM へ、番号 I-1486 の下に寄託し、次いでこれをプロ - ブとして使用して、HIV-1_(VAU) 感染細胞より得られ、また EcoRI で消化済みの、低分子量 DNA のラムダライ

ブラリ - のスクリーニングを行った。簡潔にいうと、HIV-1_(VAU) 感染済み PBMC を、PHA で刺激済み且つ、CD8⁺ 枯渇済みの細胞と 24 時間共培養し、その後で高い細胞病変効果 (CPE) が見られた。次いで低分子量 DNA をハ - トの方法 (Hirt, 1967) により抽出して、酵素 EcoRI で消化した。この DNA に対して行った、以前のサザンロット分析では実際に、HIV-1_(VAU) ゲノムにはただ一つの EcoRI 部位があることが示されており、全ウイルスゲ

ノムを表す、非インテグレート型の環状 DNA 種のクロ - ニングが可能である。得られる消化産物をアガロ - スゲル電気泳動にかけて、約 8 - 12 kb のサイズの DNA のポピュレーションを精製して、EcoRI で消化済みのラムダ Zap DNA (Stratagene) に連結した。

カプシド形成後、プレ - ティングと、³²P で標識した ph4 DNA でのハイブリダイゼーションによるスクリーニングで、クロ - ン、H34 が陽性として同定されて、増幅にかけら

れた。EcoRI 挿入物を精製して、超音波処理し、「ショットガン」技術により、酵素 Sma I 消化済みの、リン酸塩処理済みベクタ M13mp18 内でクロ - ニングした。得られた 150 クロ - ンを 373A DNA 配列決定機 (Applied Biosystems) で配列決定し、得られた配列を

ウィスコンシン GCG DNA 分析パッケージを使用して単一の配列に組み立てた。この配列を分析して、多くのナンセンスコドン、全てのタンパク質読み取り枠内に見出したが、これは過度に変異したゲノムを強く示唆している (Vartanian, et al., 1991)。

この配列は不安定であるため、結果的には HIV-1_(VAU) 感染済み PBMC 由来の全 DNA と、H34 配列より由来した以下のオリゴヌクレオチドプライマを使用して、PCR により、HIV-1_(VAU) の env 遺伝子を増幅させた：

プライマ TH2 : 5'GCTCTAGATGGGGATCTCCCATGGCAGG3' (配列認識番号 3) ;

プライマ UH2 : 5'GCTCTAGATCAGGGAAGAATCCCTGAGTGT3' (配列認識番号 4)。

PCR 増幅を、92 15 秒、52 1 分、60 2 分、72 2 分、を 35 回の熱サイクルにより行った。サイズが 3.5 kb の、得られた増幅産物を M13mp18 ベクタへクロ - ニングして、連続反応により、すなわち M13 ユニバ - サルシ - ケンシングプライマを一回目に使用し、次いで上流配列より推定したプライマを使用して、配列決定を行った。ヌクレオチドとペプチドの配列分析は、ウィスコンシン GCG DNA 分析パッケージを使用して行った。

10

20

30

40

50

HIV-1_(VAU)のenv遺伝子は、シグナルペプチドを含む、全877アミノ酸をコードしている。HIV-1_(VAU)のenv遺伝子のヌクレオチド配列は、配列認識番号5の配列に相当している(図3参照)。

プロ-ブとしての核酸の利用

本発明はまた当然のこととして、HIV-1_(VAU)ウイルスのキャリア-であることが疑われている患者に由来する、血清試料、その他の生物学的液体、または組織中に、HIV-1_(VAU)ウイルスが存在すること、あるいはその逆を検出するために、DNA、cDNA、若しくはその断片、または組み換えプラスミド、若しくはその断片を含んだ、他の等価なベクタのいずれかをプロ-ブとして利用することにも関している。これらのプロ-ブは、適宜標識されている(放射性、酵素性、または蛍光性のような標識)。HIV-1_(VAU)ウイルス、またはHIV-1_(VAU)の変異体を検出するための方法を実行するために極めて有益であるプロ-ブは、HIV-1_(VAU)ウイルスゲノムに相補的なDNA全体、またはその一部、あるいは特に種々のクローンに含まれる断片を具備することを特徴としていてもよい。env領域の全て、または一部を含む、HIV-1_(VAU)のcDNA断片について、より特異的に言及する。

HIV-1_(VAU)ウイルスの検出のためのこの方法、または診断キットにおいて使用されるプロ-ブは、すでに記載されているプロ-ブのみには決して限定されない。該プロ-ブは、HIV-1_(VAU)ウイルス、HIV-1_(VAU)の変異体、または構造的に同等のウイルス、の何れかのゲノム由来のヌクレオチド配列を具備しているが、ただしAIDSの可能性のある人に由来する生物学的液体を使用して、HIV-1_(VAU)のDNA、またはRNAとのハイブリダイゼーションにより、HIV-1のOグル-ブウイルス、特にHIV-1_(VAU)を検出することが可能なものでなくてはならない。

特に有益なのは、HIV-1とハイブリダイズしたときに、Oグル-ブに属するHIV-1と強く反応し、Mグル-ブに属するHIV-1と弱く反応するプロ-ブである。限定するためのものではない例を挙げると、HIV-1_(VAU)ウイルスのインテグラーゼ遺伝子配列(配列認識番号7)より構築されたプロ-ブは、特許EP 178 978等に記載されているハイブリダイゼーション条件下でHIV-1とハイブリダイズすると、Oグル-ブのHIVとは強く反応し、Mグル-ブのHIVとは弱く反応する。

検出はすでに知られている方法自体で行えるが、特に次のようである：

まずプロ-ブを、生物学的液体(例えば髄液、唾液等)に含まれる細胞より由来した核酸、または上記の液体自体と接触させることにより行う。ただし、後者の場合には、当該核酸は、上記プロ-ブとのハイブリダイゼーションを許容する条件下で、上記プロ-ブとハイブリダイゼーションするようにされている。そして、産生するかもしれないハイブリダイゼーションを検出する。

ハイブリダイゼーション反応が関わる、上記の診断はまた、それぞれHIV-1_(VAU)、HIV-1、及びHIV-2より由来したプロ-ブの混合物を使用して行うことができる。ただし、望むHIVウイルスのタイプを区別する必要は、必ずしもない。

本発明の主題はまた、HIV-1のエンベロ-プタンパク質をコードした配列、またはインテグラーゼをコードした配列を含む、発現ベクタでもある。

本発明はHIV-1_(VAU)ウイルスの存在、またはその逆を、HIV-1_(VAU)ウイルスのキャリア-であることが疑われている患者より由来した血清試料中、またはそのほかの生物学的液体や組織中に検出するための組成物を具備している。これらの組成物は、HIV-1_(VAU)ウイルスゲノム、特にHIV-1_(VAU)ウイルス、若しくはHIV-1_(VAU)の変異体のenvタンパク質をコードする領域、若しくはその一部を含んだDNA断片より得られるか、または誘導されるヌクレオチド配列に由来したプロ-ブを、少なくとも一つ具備することを特徴とする。有益には、上記した組成物はまた、HIV-1、またはHIV-2に由来する配列から得られるプロ-ブを具備している。

そのほかの診断組成物は、Oサブグル-ブのレトロウイルス、またはこのレトロウイルスの変異体を遺伝子増幅する際に使用することが可能な、本発明のプライマを具備する。

抗原、特にタンパク質及び糖タンパク質

本発明は、HIV-1のOグル-ブ(またはサブグル-ブ)のレトロウイルス性タンパク質、ま

10

20

30

40

50

たは該タンパク質の少なくとも一部を具備した天然若しくは合成の、ペプチド、若しくはポリペプチドであって、HIV-1の0グル - プのVAU株、またはHIV-1の0グル - プのDUR株での感染後に得られる血清より単離することが可能な抗体によって認識されうるものに関する。

本発明は、HIV-1_(VAU)レトロウイルスの外部エンペロ - プタンパク質で、配列認識番号5に相当する配列を具備した遺伝子でコードされているものに関する。本発明の好ましい態様では、このタンパク質は更に、配列認識番号6に相当し、図3に記載され、アミノ酸残基の1から526を具備したアミノ酸配列を具備することで特徴付けられる。本発明の主題はまた、如何なるポリペプチド、または該配列より由来の変異体であって、HIV-1_(VAU)ウイルスにより誘導される抗体により認識されうるエピト - プを有するものでもある。

10

上記のタンパク質は糖付加型、または非糖付加型の形態で得られる。

本発明の主題はまた、配列認識番号8に相当し、図3に記載され、アミノ酸残基527から877の間のアミノ酸を具備した、エンペロ - プ膜貫通型タンパク質でもある。この膜貫通型タンパク質は、本発明の範囲内においては、糖付加型、または非糖付加型である。

本発明は、HIV-1_(VAU)ゲノムのコード配列の発現により得られ、HIV-1_(VAU)のものと同等の免疫学的特徴を有する、全ての抗原、特にタンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに関する。該抗原は、本発明の範囲内においては、同等であるといわれる。ただしこれらは、同じ抗体、特にHIV-1_(VAU)に感染した患者より得られた血清より単離されうる抗体により認識されうるものであること。

特に、本発明の主題は、化学的に合成されるペプチド、またはポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が、図3に表示の配列であるか、または同等のペプチド若しくはポリペプチドである、HIV-1_(VAU)エンペロ - プタンパク質のものに含まれるものである。

20

前記の同等なペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または糖タンパク質の中には、由来する元の抗原との免疫学的交差反応性があるかぎり、化学的合成、または遺伝子工学的に調製される上記の抗原の断片、またはペプチドが含まれるべきである。言い換えると、本発明は、上記した抗原のエピト - プに相当するか同等であるエピト - プを有し、また同じ抗体により認識されうる、どのようなペプチド、またはポリペプチドにも関する。上記したポリペプチド、または抗原をコードするDNA配列に相当するDNA配列の発現産物は、前記の後者のタイプのポリペプチドの一部を形成している。

より特に、HIV-1_(VAU)ウイルスに由来するか、または遺伝子工学的、若しくは通常の化学合成により産生され、本発明の前後関係において非常に興味をもたれる上記抗原は、本発明のHIV-1_(VAU)ウイルスと、HIV-1及びHIV-2のグル - プのウイルスとを明確に区別することを可能にする、抗原である。この点に関して、HIV-1_(VAU)ウイルスのエンペロ - プタンパク質レベルにおいてはもちろん、PMタンパク質の外部の免疫優性エピト - プのレベルにおいても、かなりの差異が見られている。gag及びpolタンパク質は、エンペロ - プタンパク質よりも、HIV-1とのより高い類似度を示しているようである。

30

本発明は更に、HIV-1_(VAU)のエンペロ - プの膜貫通型の糖タンパク質に免疫優性領域と同一であるペプチド、またはポリペプチドに関する。この領域は図3に表示されている。

この領域の好ましいポリペプチドは例えば、配列CKNRLICを含むか、またはこの配列に相当したものを含むものである。これらは配列

40

RLLALETFIQNWLLNWLWGCKNRLICに相当しているか、この配列を具備したペプチド、またはポリペプチドであってもよい。

以下で「vau」という名前と呼ばれる、別の好ましいペプチドは以下の配列に相当するか、またはこの配列、若しくはこの配列の一部であって、HIV-1_(VAU)レトロウイルスのRRLALETFIQNQLLNWLWGCKNRLICYTSVKWNKTに対する抗体により認識されうるものを具備している。

この配列のポリペプチド変異体は例えば、HIV-1_(MVP5180)、及びHIV-1_(ANT70)単離体のポリペプチドに対して図4に表示されているものである。これらのポリペプチドはまた、例えばアミノ酸残基による保存性の置換のような、挿入、及び/または欠失、及び/または置換による、先行物に由来するものであってもよい。

50

本発明は、照会番号I-1542の下、1995年2月23日にCNCMに寄託されたHIV-1-0 DURウイルス由来のペプチド、あるいは、アミノ酸の置換、欠失、または付加により、配列が上記のものとは異なっているペプチドであるが、上記のものの抗原性の特徴を保持しているペプチドに関する。

本発明の範囲に含まれるその他のペプチドを、以下に定義している。

故に、本発明の好ましいペプチドは、図8に表示のGAG配列中か、またはGAG配列と免疫学的に同等な配列でHIV-1-0 DURウイルスの変異体由来のものの中に含まれる、少なくとも4つの連続したアミノ酸を有するペプチドであって、該免疫学的に同等な配列が、図8のGAG配列に含まれる配列、AHPQQA, LWTTRAGNPのうち少なくとも一つをも特異的に認識する抗体により認識されるものである、ペプチドである。

好ましくは、このペプチドは、アミノ酸配列が以下の配列、

SPRTLNAWVKAVEEKAFNPEIIPMFALSEGA (1)、

MLNAIGGHQGALQVLKEVIN (2)、

GPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQI (3)、

IPVGDYRKYIWLGLNKMVMKMYSPVSILDI (4)、

QGPKEPFRDYVDRFYKTKLAE (5)、

AHPQQA (5 a)、

LWTTRAGNP (5 b)、

のうちの一つか、

相当する免疫学的に同等の配列

の何れかの中に含まれるペプチドであって、このペプチドは、上記配列のうちの一つの、少なくとも4つの連続したアミノ酸配列を含んでいる、ペプチドからなっている。

また好ましくは、このペプチドは、アミノ酸配列が以下の配列、

SPRTLNAWVK (6)、

GSDIAGTTST (7)、

QGPKEPFRDYVDRF (8)、

のうち一つか、または

相当する免疫学的に同等の配列

の何れかに含まれるペプチドであって、このペプチドは、上記配列のうちの一つの、少なくとも4つの連続したアミノ酸配列を含んでいる、ペプチドからなっている。

本発明において特に好ましいペプチドは、

アミノ酸配列NPEI (9)、または

アミノ酸配列AVEEKAFNPEIIPMFM (10)を含むペプチドであって、より特には、アミノ酸配列が、

IGGHQGALQ (23)、

REPTGSDI (24)のうちの一つ、または

相当する免疫学的に同等の配列

のなかに含まれる、ペプチドであって、このペプチドは、上記配列のうちの一つの、少なくとも4つの連続したアミノ酸配列を含んでいる、ペプチドはもちろん、アミノ酸配列が以下の配列、

INDEAADWD (25)、

または相当する免疫学的に同等の配列

の何れかの中に含まれるペプチドであって、このペプチドは、上記配列の少なくとも4つの連続するアミノ酸を含んでいる、ペプチドである

本発明は、ペプチド (23)、 (24)、及び (25) はもちろん、免疫学的に同等の配列をコードする核酸配列だけでなく、これらの核酸配列の少なくとも一つを具備した組成物にも関する。

本発明は更に、HIV-1のMゲル - プ株とHIV-1のOゲル - プ株とに関する検出と区別のための、少なくとも一つの上記核酸の使用に関する。

上に定義した、HIV-1-0 DURウイルス由来のペプチドはまた、本発明の範囲に含まれるが

10

20

30

40

50

、該ペプチドは、HIV-1-0 DURウイルスに由来する、図9に表示のgp120のVP3ル-プ、または相当する免疫学的に同等な配列の、少なくとも4つの連続するアミノ酸を含んでいるが、該免疫学的に同等な配列は、以下の配列、

KEIKI (12)、

EREGKGAN (13)、

CVRPGNNSVKEIKI (14)、

QIEREGKGANSR (15)、

のうち少なくとも一つをも特異的に認識する抗体により認識される。

このペプチドは好ましくは、

(a) 配列CVRPGNNSVKEIKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAFC (11)、またはこの配列の一部であって少なくとも4つのアミノ酸を含むもの、の何れか、または、

(b) 1以上のアミノ酸が1以上のアミノ酸で置換されていて、(a)の配列とは別個である、アミノ酸配列(ただし、当該ペプチドには、上記ペプチドに対する血清との反応性が保持されていること)；または、

(c) 1以上のアミノ酸が欠失、または付加されていて、(a)または(b)とは別個である、アミノ酸配列(ただし当該ペプチドには、(a)のペプチドに対する血清との反応性が保持されていること)；または、

(d) 相当する、免疫学的に同等な配列、若しくはその一部；

のうち何れかを含んでいる。

また好ましくは、このペプチドは、

配列KEIKI (12)、または配列EREGKGAN (13)、または配列GPMWYSM (16)の何れかを含んでいる。

特に好ましい方法においては、上に定義されるペプチドには、アミノ酸配列CVRPGNNSVKEIKI (14)、またはQIEREGKGANSR (15)の何れか一つが含まれる。

上に定義した、HIV-1-0 DURウイルスより由来するペプチドはまた、本発明の範囲に含まれるが、該ペプチドは、その全アミノ酸配列が、HIV-1-0 DURウイルスの変異体より由来する、図9に表示のgp41の免疫優性領域内の配列、または相当する免疫学的に同等の配列内に含まれる、少なくとも4つの連続するアミノ酸を含むが、該免疫学的に相同な配列は、以下の配列、

RLLALETLMQNQQL (17)、

LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18)、

CRGKAI (19)、

SVQWN (20)、

RLLALETLMONQQLLNLWGCRGKAICYTS (21)、

QNQQLLNLWGCRGKAICYTSVQWN (22)、

の少なくとも何れか一つをも特異的に認識する抗体により認識される。

このペプチドは好ましくは、配列RLLALETLMQNQQL (17)、配列LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18)、またはこのペプチド(18)の一部で以下を含むもの、を含んでいるペプチドである：

(a) 配列CRGKAI (19)、またはQが、適切な場合には、K以外の異なるアミノ酸で置換された配列SVQWN (20)、あるいはこの二つの配列両方、

(b) 1以上のアミノ酸が2つのアミノ酸で置換されていて、(a)の配列とは異なるアミノ酸配列(ただし当該ペプチドは、(a)のペプチドに対する血清との反応性を保持していること)、

(c) 1以上のアミノ酸が欠失、または付加されていて、(a)または(b)とは異なるアミノ酸配列(ただし当該ペプチドは、(a)のペプチドに対する血清との反応性を保持していること)、または、

(d) 相当する免疫学的に同等な配列、若しくはその一部。

また好ましくは、このペプチドは、以下の特徴のうち一方、または他方を有している：

・少なくとも8つのアミノ酸配列を含む、そのN末端配列は、HIV-1-LAI株のgp41の免疫優

10

20

30

40

50

性領域内に含まれるRILAVERY配列に対して形成された抗体により免疫学的に認識されない；

- ・ HIV-1-LAI株のSGKLICペプチドに対して形成された抗体により認識されない；
- ・ 以下の二つの配列の何れかを含んでいる：

RLLALETLMONQQLLNWLCRGKAI CYTS (21)、

QNQQLLNWLCRGKAI CYTSVQWN (22)。

VAUペプチドの合成

「連続フロ - (continuous flow)」Fmoc法を利用した、通常の固相ペプチド合成技術により、VAUペプチドを調製した。このペプチドは、Milligen9050 PEP合成機と、「Millipore」PEG PALレジンとを使用して、最初のC末端アミノ酸を置換して調製した。アミノ酸側鎖は、以下の基で保護した：アルギニンに対してはPmc；アスパラギン、グルタミン、及びシステインに対してはTrt；リジンに対してはBoc；グルタミン酸に対してはtBuエステル；セリン、スレオニン、及びチロシンに対してはtBuエ - テル。一過性のFmoc基は、DMF中の20%ピペリジン溶液で除去した。それぞれのアミノ酸のカップリング反応は、6等量のDIPCDI及びHOBTで行った。残基の中には、特にアルギニン(1位及び23位)、システイン(19位及び26位)、アスパラギン(11位)、グルタミン(10位、12位、及び13位)、アラニン(4位)、イソロイシン(9位)、及びロイシン(2位、3位、14位、及び15位)は、二重のカップリングが必要であった。

カップリング後、レジンを真空下で乾燥した。ペプチドを、室温で4時間K試薬による処理で支持体より開裂させた。粗ペプチドを沈殿させ、エチルエ - テルで洗浄した。産物を高圧液体クロマトグラフィ - (HPLC:high pressure liquid chromatography)で精製した(WATERS LC PREP 4000装置、WATERS Delta Pak C18 40 X 100mmカ - トリッジ、流速30ml / 分、アセトニトリル / 0.1%TFAのグラジエント)。該ペプチドを含む画分を合わせて、ロ - タリ - エバポレ - タ - で濃縮後、凍結乾燥した。

環状化

ペプチド(0.025mM)を10mMの酢酸アンモニウム溶液に溶解した。1Mの水酸化アンモニウム溶液で、pHを8.5に調節した。pHは、3または4時間後に再び調節した。環状化は、HPLC(WATERS Delta Pak C18 5µカラム、アセトニトリル / 0.1%TFAのグラジエント)で、214nm、及び280nmでモニターした。15時間で環状化は完了した。97 - 100%の酢酸を使用して、pHを6にして、この溶液を凍結乾燥し、ついで粗ペプチドと同じ条件下で精製した。

このペプチドをHPLCと、エレクトロスプレ - 技術(FISON VG Trio 2000分光器)を利用したマスペクトロスコーピ - により検査した。

Fmoc: 9 - フルオロエニルメチルオキシカルボニル；

Pmc: 8 - メチルペンタン - 6 - スルフォニルクロマン；

Trt: トリトリル；

Boc: Tertブチルオキシカルボニル；

tBu: tertブチル；

DMF: ジメチルホルムアミド；

DIPCDI: ジイソプロピルカルボジイミド；

HOBT: 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾ - ル；

TFA: トリフルオロ酢酸

試薬K: フェノ - ル / 水 / チオアニソ - ル / エタンジチオ - ル / TFA ; 2 . 5 ml / 2 . 5 ml / 2 . 5 ml / 1 . 5 ml / 4 1 ml。

HIV-1_(VAU)エンベロ - プタンパク質のアミノ酸と、その他のHIVの相当する配列との比較HIV-1_(VAU)に感染した患者由来の、一連の血清試料の、ウェスタン - プロット分析を図2に示してある。HIV粒子(LAV, BLOT, SANOFI DIAGNOSTIC PASTEUR)由来のタンパク質で、電気泳動により分離されたものを有して、ニトロセルロ - スのストライプを、同じ血清試料でインキュベ - ションし、その反応性を、製造業者推奨の方法により評価した。得られた結果は以下のものであった：

10

20

30

40

50

ステップ 1 : HIV-1_(VAU) 患者から、1992年2月に得た血清試料と反応させた、HIV-2特異的タンパク質；

ステップ 2 - 7 : HIV-1陽性血清；

2 : HIV-1_(VAU) 患者より、1990年11月に得た血清；

3 : HIV-1_(VAU) 患者より、1990年12月に得た血清；

4 : HIV-1_(VAU) 患者より、1991年2月に得た血清；

5 : HIV-1_(VAU) 患者より、1992年2月に得た血清；

6 : 陰性の対照；

7 : 陽性の対照 (HIV-1に感染した人より得た血清)。

タンパク質の名前とサイズ (kD) を余白に示した。

10

図 3 は HIV-1_(VAU) のエンペロ - プのアミノ酸配列を、HIV-1-LAI 参照用単離体 (Wain-Hobson, et al., 1985) の相当するものと整列させたものである。シグナルペプチド、VP3ル - プ、及び gp41 免疫優性エピト - プを網掛けで示した。外部エンペロ - プ糖タンパク質 gp120 と、膜貫通型 gp41 との間の開裂部位を矢印で示した。アミノ酸の間の垂直な線は完全な一致を示し、コロロン (:) は高い相同性を示し、また点 (.) はそれぞれのアミノ酸間での限られた相同性を示す。ウイスコンシン の GCG パッケージ の GAP プログラムを使用して、整列を行った。

GAP と BESTFIT プログラムの元のバージョン (1.0) は、ニ - ドルマン と バンシュ (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)) と、スミス と ウォ - タ - マン (Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)) の詳細な研究報告に基づき、ポ - ル・ヒバ - リ (Paul Haeberli) が記載したものである。この限定整列はポ - ル・ヒバ - リにより開発されて、バージョン 3.0 に組み込まれた。そしてこれはフィリップ・マルケス (Philip Marquess) による単一のプログラムに融合されて、バージョン 4.0 になった。整列中のギャップ欠失のペナルティ - は、文献 (Rechid, Vingron and Argos CABIOS 5:107-113 (1989)) で示唆されているようにして修飾した。

20

図 3 の整列は、2、3 のドメインがあちらこちらで保持されている、より高い分岐度の、数多くの領域を示している。この保持領域は、通常 HIV-1 単離体でも保持されている領域にほぼ対応する (Alizon et al., 1986, Benn et al., 1985)。分岐したドメインの中では、中和決定基とも呼ばれる (Javaherian et al., 1990, Javaherian et al., 1989, Matsushita et al., 1988) VP3ル - プが、明らかに最も分岐している (ただし、ル - プを限定している二つのシステインは保持されている)。HIV-1-LAI では GPGRAPH である、ル - プのキャップ配列は、HIV-1_(VAU) では GPMWY である。キャップのこのユニットは、カメル - ンの O グル - プ単離体 (HIV_(ANT70)) のものに相当しているが (Van den Heesevelde et al., 1994)、該モチ - フが GPMRWR である、その他の O グル - プ単離体 (HIV_{MVP5180}) のものとは異なっている。

30

エンペロ - プ全体においては、全部で 29 の、可能性のある N-糖付加部位が同定され、このうちの 13 が、その他の HIV-1 エンペロ - プタンパク質と比較して、保持されている。全部で 19 のシステインが見られ、該タンパク質の全体の折畳み構造が保持されていることを示しているが、5 つの非保持システインが見られている。

図 4 は種々の HIV-1 単離体における、膜貫通型エンペロ - プ糖タンパク質の外部領域中の免疫優性ペプチドの、マルチプル整列を示している。配列は全て、HIV-1-LAI 参照用配列と比較してある。ハイフンは HIV-1-LAI との相同性を示す。整列は、ウイスコンシン GCG パッケージの PILEUP プログラムを使用して行った。

40

PILEUP プログラムでは、樹状図で表示される組み立て戦略を UPGMA とよんでいて、これは代数的平均を利用した、「非偏重 (unweighted)」ペア - グル - プ法を意味している (Smith, P.H.A. Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy (pp.230-234), W.H. Freeman and Company, San Francisco, California, USA)。PILEUP でのそれぞれのペア - の整列には、ニ - ドルマン と バンシュ の方法を使用した (Needleman and Wunsch, Journal of Molecular Biology 48:443-453 (1970))。

図 4 に示されるように、TM タンパク質の外部領域の免疫優性エピト - プのアミノ酸配列は

50

、その他のHIV-1やHIV-2の単離体のものとは、実質的に異なっている。しかしながら、HIV-1とHIV-2ウイルスの間で保存されている多くのアミノ酸は保持されていた。

ある特定のアミノ酸が、Oグル - プ間のみで保存されていることが判明したが、26アミノ酸のペプチド中の21位のリジン、7位のスレオニン、及び11位のアスパラギンがそうである。HIV-1_(VAU)患者由来の血清の一つ、そしておそらくはその他のOグル - プウイルスに感染した患者由来の血清によっては、通常HIV-1エンベロ - プ抗原の検出がされないことが、上記の差異により説明がつく。全体では、HIV-1-LAIと、HIV-1_(VAU)のエンベロ - プ配列の比較では、50%の相同性が示された。HIV-1_(VAU)のエンベロ - プ配列はまた、その他の代表的なHIV(報告済みで配列が決定されている、HIV-1のOグル - プの2つのメンバ - である、HIV-1_{ANT70}、及びHIV-1_{MVP5180})、並びに代表的なSIVとも比較した。この分析の結果を表1に示したが、これによりHIV-1_(VAU)がOグル - プに属することが確立された。HIV-1_(VAU)のエンベロ - プはHIV-1_{ANT70}のエンベロ - プとは70%相同で、HIV-1_{MVP5180}とは71%相同である。

一般的なHIV-1のサブタイプのほとんどでは、エンベロ - プのレベルでの相同性は、同等であり、74%から80%の範囲であった。

5 は、HIV-1_(VAU) が他の 2 つの 0 グル - プとはほぼ等しく離れていることと、全体では上記の 3 つのウイルスがそれぞれほぼ等しく離れていることを示している。実際には、HIV-1 MVP5180 と、HIV-1_(VAU) との間のヌクレオチドの変化は、分析したゲノムの断片中では 1 8 3 であり、HIV-1_{ANT70} と HIV-1_(VAU) との間では 2 1 3 である。この分岐の特徴は、その他の HIV-1 のサブタイプ全てに存在するものと同様であり、二つの異なるサブタイプ間での単一のヌクレオチドの変化は 1 5 7 (サブタイプ E からサブタイプ F) から 2 1 9 (サブタイプ A からサブタイプ D) の範囲であった。

表 1 は、HIV-1 に関連した、異なるウイルスのエンベロ - プ配列の比較である。番号は、GAP プログラムを利用して計算した、エンベロ - プ配列間でのアミノ酸相同性の割合を示す：HIV-1 ANT70 の場合には、外部エンベロ - プタンパク質のみを比較に使用した。

HIV-1_(VAU) 抗原を具備した組成物

概して本発明は、生物学的試料、特に HIV-1_(VAU)、または HIV-1_(VAU) 抗原の少なくとも一つに対する抗体と接触させられた人に由来する生物学的試料中での、存在を *in vitro* で検出するために使用可能な、如何なる組成物にも関する。この組成物は、特許出願 EP 844 01,834 及び EP 87400,1514 に記載の診断技術を使用して、HIV-1 の 0 グル - プによる感染の選択的診断に適用することが可能である。本発明の背景事情の範囲内で、HIV-1_(VAU) に対して産生された抗体により認識されることが可能な抗原性決定基を具備した如何なる組成物 (例えば組み換え抗原、ペプチド、または HIV-1_(VAU) のエンベロ - プの配列で定義される、化学的に合成されたペプチド) も使用可能である。この点に関して、本発明はより特に、少なくとも一つの HIV-1_(VAU) エンベロ - プタンパク質を有する組成物に関する。例として、HIV-1_(VAU) の gp41 タンパク質の 5 9 0 - 6 2 0 の全領域に対応する、エンベロ - プタンパク質に由来する、タンパク質、糖タンパク質、若しくはペプチド、あるいは上記領域の一部であって、ペプチド-TFIQN-または-WGCKNR-のような HIV-1_(VAU) 特異的なものがあるであろう。

本発明は更に、

組み換え型、若しくは合成の、HIV-1_(VAU) タンパク質、及び/または糖タンパク質、及び/またはペプチドと、

抽出、溶解、組み換え、または化学合成で得られる、HIV-1、及び/または HIV-2、及び/または別の、HIV-1 の 0 グル - プに由来した、タンパク質、及び/または糖タンパク質、及び/またはペプチド、及び/または

上記のタンパク質、または糖タンパク質由来であって、HIV-1、及び/または HIV-2、及び/または HIV-1 の 0 グル - プにより誘導される抗体により認識されうるペプチド、とを組み合わせた組成物に関する。

診断用組成物であって、HIV-1_(VAU) に対して向けられた抗体により認識されうる抗原決定基を有するもの、特にペプチド組成物は、すでに入手可能である、HIV-1 及び/または HIV-2 レトロウイルスによる感染検出用のキットまたは組成物中に含めるか、あるいはこれらと組み合わせ、キットの検出範囲を HIV-1 の 0 グル - プにまで伸長することが可能である。

以下の例があるが、これらは限定するためのものではない：

コアタンパク質、特に gag、pol、HIV-1 及び HIV-2 のタンパク質、若しくはそのペプチド、並びに HIV-1_(VAU) のエンベロ - プタンパク質、若しくはそのペプチド、

HIV-1 のエンベロ - プ糖タンパク質、HIV-2 のエンベロ - プ糖タンパク質、及び HIV-1_(VAU) のエンベロ - プ糖タンパク質、または

HIV-1 タンパク質、及び/または糖タンパク質、HIV-2 のタンパク質、及び/または糖タンパク質、並びに HIV-1_(VAU) のエンベロ - プタンパク質、及び/または糖タンパク質、の何れか。

HIV-1 の 0 グル - プのウイルスに感染した患者から由来の抗体は、HIV-1 の M グル - プのウイルス由来の gag、及び pol 抗原と強く反応するが、M グル - プのエンベロ - プ抗原との反応性は全くないことに注目するのは重要である。よって、本発明の組成物は、少なくとも一つの、HIV-1 エンベロ - プタンパク質、若しくはペプチドを具備して、このウイルス

10

20

30

40

50

が確信をもって検出されるようになってきていることが重要である。

このような組成物は、診断に用いると、結果的にAIDSの診断や、それに関連した症状の診断に役立ち、これはより広い病原体のスペクトラムにまで拡張される。HIV-1_(VAU)エンベロ-プタンパク質、及び/または糖タンパク質のみを含む診断用組成物の使用は、それでもなお、該疾患を引き起こすかもしれないレトロウイルスの範疇の、より選択的な検出にとって有益であることはいうまでもない。

特にHIV-1_(VAU)ウイルスにより引き起こされる感染の診断用の方法とキット

本発明は、AIDS、及び関連した症候群の病原体であるHIV-1ウイルスにより引き起こされる感染の、in vitroでの診断用の方法であって、診断する患者由来の血清、または生物学的液体を、HIV-1_(VAU)由来のタンパク質、糖タンパク質、またはペプチドを少なくとも一

10

つ含む組成物と接触させる工程と、可能な免疫学的反応を検出する工程とを具備した、方法に関する。このような組成物の例は上に記載してある。

好ましい方法には、例えば、免疫蛍光、またはELISA型の免疫酵素反応が関わる。検出は、

直接、若しくは間接的な免疫蛍光の測定、または直接的、若しくは間接的な免疫酵素的アッセイにより影響されうる。

このような検出には、例えば、マイクロプレ-トのウェルの中に、本発明に準じて、一定量の抽出物、または所望の抗原性組成物をいれる工程；

それぞれのウェルの中に、抗体を含むことが可能であってその存在をin vitroで検出する、希釈済み、または非希釈の血清を導入する工程；

20

該マイクロプレ-トをインキュベーションする工程；

適切な緩衝液でマイクロプレ-トを注意深く洗浄する工程；

該マイクロプレ-トのウェルの中に、ヒト免疫グロブリンに対する、特異的に標識した抗体を導入する工程であって、上記標識は、基質を加水分解し、後者の放射の吸収を、少なくとも決められた波長のバンドにおいて修飾することが可能なものより選択される酵素である、工程、そして、

好ましくは対照との比較において基質の加水分解の程度を測定して検出し、感染の危険性の目安、または実際の感染の事実とする、工程を具備する。

本発明はまた、以下を特に具備した、HIV-1_(VAU)感染の検出用キット、またはボックス (boxes) に関する：

30

抽出物、より精製された画分、または上記したタイプのウイルスから派生した合成抗原 (この抽出画分、または抗原は、例えば放射性、酵素性、蛍光性、若しくはその他の、標識がされている)；

ヒト免疫グロブリンに対する抗体、またはプロテインA (これは例えばアガロ-スビ-ズ、マイクロプレ-トなどのような、水に不溶の支持体に有益に固定される)；

適宜、陰性対照の検体より得た、同じ生物学的液体、若しくは細胞；

緩衝液、及び、適切であれば標識可視化基質。

本発明の主題はさらに、化学合成、または組み換えにより得られる抗原を認識する抗体の形成を誘導することが可能な、免疫原性組成物である。

血清学

40

HIV-1_(VAU)に感染した患者由来の血清抗体が、HIV-1の抗原性調製物と反応する能力を、商業的に入手可能な種々のキット (Sanofi Diagnostic Pasteur, (GeneLAVAI Mixt) Abbot, Wilcome, およびBehring) を利用して評価した。これらの抗体の、種々のHIV-1タンパク質との反応性を、サノフィ-診断パスツ-ル・ウェスタン-プロット・キットを製造業者推奨の方法で使用して調べた。

より正確には、患者の血清を、HIV-1特異的ELISAキットを使用して数回調べた。最初に試験されて1990年に陽性であると証明されたものは、(測定したODの、バックグラウンドODに対する比で) 7.33 (サノフィ-診断パスツ-ルキット使用時)、3.50 (アボットキット使用時)、及び2.70 (ウェルカムキット使用時)であった。HIV-1とHIV-2の両方に特異的な試薬の使用中には、1.42 (ベ-リングキット使用時)、4.40 (ウェルカムキット使用時

50

)であった。

患者の血清の、異なる日における、異なるHIV-1構造タンパク質との反応性を、HIV-1 LAV BLOT免疫ブロットアッセイ(サノフィ-診断パスツールで販売されている)を使用して調べた。図5に示されるように、調べた血清試料全てにおいて、envタンパク質gp160およびgp120との弱い反応性のみが見られた。しかしながら、該血清はHIV-1のgagタンパク質p55(gag前駆体)、及びp24(CA)、並びにpol産物p66(RT)、及びp34(IN)とは強く反応した。HIV-2免疫ブロットティングにより、非常に弱い反応性がgag p26に関して検出された。

これは、Oグル-プに特異的な抗体に関しての、商業的に入手可能な血清診断キットでの検出は、注意深く制御すべきであることを例示している。Oグル-プウイルスに感染した患者からの血清抗体は、Mグル-プのgag、及びpol抗原との強い交差性を示すが、それらはMグル-プのエンベロ-プ抗原とはほとんど反応しないか、全く反応しない。結果として、Mグル-プに基づくキットの中には、上記患者のかなりの割合を検出しないものがあると推定できる。実際に、Oグル-プに感染した患者由来の、幾つかの血清を使った最近の予備的研究により、Oグル-プに特異的な抗体を検出する能力は、使用する検出キットにより、かなり異なっていることが明らかになった(Loussert-Ajaka, I., Ly, T.D., Chaux, M.L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courrouce, A.M., Brun-Vezinet, F., and Simon, F., (1994) HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients)。これは、多くのOグル-プ血清の、市場で入手可能な診断キット全てとの反応性を、注意深く且つ徹底的に調べる必要があることを示唆している。

HIV-1_(VAU) ウイルス由来で、組み換え、若しくは合成抗原より調製した、ポリクロ-ナル、若しくはモノクロ-ナル抗体を具備した組成物

本発明は、HIV-1_(VAU)、特にHIV-1_(VAU)の抗原性エピト-プ、より特にはHIV-1_(VAU)のエンベロ-プタンパク質の抗原性エピト-プを動物に接種して、該動物内で産生される血清に関する。本発明はより特には、それぞれの抗原、特に該ウイルスのタンパク質、または糖タンパク質に向けられたポリクロ-ナル抗体に関する。更には、種々の技術により産生されるモノクロ-ナル抗体であって、それぞれ種々のHIV-1_(VAU)タンパク質、特にHIV-1_(VAU)のエンベロ-プタンパク質に向けられている抗体、より特には該タンパク質に対する抗体に関する。

上記のポリクロ-ナル、またはモノクロ-ナル抗体を、種々の適用において使用することができる。本質的には、相当するタンパク質の中和のための使用であり、またはウイルス全体の感染性の阻害のための使用でもよいであろう。例えば、生物学的調製物中の、ウイルス抗原の検出、または相当するタンパク質、及び/または糖タンパク質の精製工程(例えばアフィニティ-クロマトグラフィ-カラムでの使用)を行うのに使用してもよい。

例を挙げると、抗エンベロ-プ抗体、または抗gag抗体は、診断に使用可能な試薬であり、特にHIV-1のOグル-プを、抗原捕獲ELISAにより検出するための試薬である。

本発明は、1以上のHIV-1_(VAU)のアミノ酸配列より産生される、HIV-1_(VAU)のウイルス抗原に向けられる抗体に関する。本発明のHIV-1_(VAU)ウイルスの抗原性エピト-プと同等の抗原性エピト-プから、抗体を得る技術は、すでに記載されている。

当業者は、アルマ-(Ulmer et al., 1993)らにより報告済みの抗体調整用技術を使用して、本発明の抗体を調製することができるが、本発明の抗原に適應させることが可能な修飾は、当業者の知識の一部を形成する。

vauペプチドの免疫反応性の調査

抗HIV抗体のスクリーニングに対して確立されている方法にそって、ELISAプレ-トを調製して、vauペプチドの免疫反応性が確認された。この試験は、HIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)であるVAU株のエンベロ-プ糖タンパク質の免疫優性エピト-プを模倣するペプチドで調製した固相の検出に基づいている。該試験の実行は、Genelavia(登録商標) Mixtキットで提案されている方法により、該キットでの試薬を使用してモデル化された。

図21及び図22の二つの表で照合される実験データは以下のことを示している：

- (a) HIV-1のOグル - プ (またはサブグル - プ) ウイルスで汚染されている患者からの 4 つの血清は、vauペプチドと強く反応する；
- (b) Pasteur Institute of Yaoundeから送られてきた 19 の血清のうち、HIV-1のO (グル - プ、またはサブグル - プ) ウイルスで汚染されている患者からと見られる 10 の血清もまた、同じペプチドとの高い反応性を示す；
- (c) HIV-1のBサブタイプウイルスで汚染された人 (急性期) からの血清 (4 つの試料) は、vauペプチドとの反応性は示さない；
- (d) 無症候性の血液ドナ - より得られた血清 (48 の試料を試験した) は、vauペプチドとの反応性は示さない；

これらの実験データは、(HIV-1のOグル - プ (またはサブグル - プ) の抗体陽性試料が不足 (paucity) しているが) 選択したペプチドの感受性と特異性に関する証拠となる。

上記のテキストからは、本発明は更に、上記した抗体を、種々の段階を有する方法で使用することにより、HIV-1_(VAU) ウイルス、または変異体を検出することに関していると分かるが、前記の段階は特にHIV-1_(VAU) ウイルスの特徴的性質を明らかにすることを目的としている。

本発明はまた、分子ハイブリダイゼーションによる、HIV-1_(VAU) ウイルスの検出に関する。

概して、HIV-1_(VAU) ウイルスのキャリア - であると思われる患者由来の、生物学的試料、またはその他の生物学的液体若しくは組織中に、HIV-1_(VAU) ウイルス、または変異体を検出するこの方法は、以下の段階を具備している：

適宜標識された少なくとも一つのプロ - プを製造する段階；

疑いのある患者の試料中の核酸を前記の標識プロ - プと接触させて、適宜該複合体を適切な固相支持体上に固定化する段階；

適切であれば、該固相支持体を適切な洗浄溶液で洗浄する段階；

該複合体を検出し、よってHIV-1_(VAU) の存在、または非存在を当業者に知られる適切な検出方法により検出する段階。

本発明のこの方法に関する、別の好ましい態様においては、上記したハイブリダイゼーションは、非厳密な条件下で行なわれ、且つ、膜はハイブリダイゼーション用に適応した条件下で洗浄される。

血清学、またはポリメラ - ゼ連鎖反応 (PCR) のような遺伝子増幅技術を使用して、HIV-1のOグル - プの流行度が正確に評価される。カメル - ンの、5 から 10 % の HIV-1 感染患者は実際にOグル - プのウイルスに感染していることが判明した。しかしながら、本願で記載したウイルス単離体とは別に、西中央アフリカの外での、Oグル - プの伝播は記録に残っていない。HIV-1_(VAU) が単離された前記の患者は、フランスにずっと居住していてアフリカには一度も旅行したことがない。現在までには、該患者の感染源に関する正確な証拠は全くないが、このケースはOグル - プウイルスのある程度の伝播がヨーロッパですでに起きていることを示す。

本発明はまた、生物学的試料中の、HIV-1のOグル - プ (またはサブグル - プ) レトロウイルスに特徴の抗体と、HIV-1-Mタイプのレトロウイルスに特徴の抗体とを、検出、及び区別するための方法であって、該生物学的試料を、HIV-1-Mタイプのレトロウイルスに特徴的である抗体とは反応しないペプチド、特に上記した、ペプチド (1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9) 及び (10) から選択した一つと、接触させることを特徴とする、方法に関する。

更に本発明は、生物学的試料中の、HIV-1のOグル - プ (またはサブグル - プ) レトロウイルスに特徴の抗体と、HIV-1-Mタイプのレトロウイルスに特徴の抗体とを、検出、及び区別するための方法であって、図 8 及び 9 で考慮に入れた HIV-1 の M ウイルスの中の一つに由来し、尚且つペプチド (1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9) 及び (10) から選択したペプチドと相同性であるものと、上記生物学的試料を接触させることを特徴とし、またこの相同性ペプチドの配列は、図 8 または 9 に記載される、該配列自

10

20

30

40

50

身がHIV-1のMウイルスの対応した適切なペプチド配列中に含まれる、独自の連続したアミノ酸の垂直整列より得られるものであり、図8または9からもまた、該ペプチドの連続したアミノ酸配列が選択される、上記の方法に関する。

本発明によると、HIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)レトロウイルスによる感染と、HIV-1のMサブグル-プレトロウイルスによる感染とを検出、及び区別する方法はAIDSの診断試験にかけられる患者に由来する血清を、特にペプチドRILAVERYと接触させることで特徴付けられる。

更に、HIV-1のOサブグル-プまたはHIV-1のMサブグル-プレトロウイルスによる感染の検出方法は、二つの範疇のペプチドの混合物、すなわちその一方の範疇が、ペプチド(1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9)、及び(10)に相当するものを使用することにより特徴付けられる。

10

更に、HIV-1-O DURレトロウイルスによる感染と、HIV-1-Oの別のタイプのレトロウイルスによる感染とを区別する方法は、生物学的試験試料を、ペプチド(11)から(15)、またはペプチド(17)から(20)の何れかと接触させることにより特徴付けられる。あるいは、本発明は、HIV-1のOグル-プ(又はサブグル-プ)のレトロウイルスによる感染と、HIV-1のMサブグル-プレトロウイルスによる感染とを区別する方法であって、開裂作用部位がSRジペプチドであるセリンペプチダ-ゼを使用することと、このレトロウイルスがHIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)のレトロウイルスであるか、HIV-1のMサブグル-プのレトロウイルスであるかに応じて、該レトロウイルスのgp120のVP3の開裂、または非開裂を検出することを具備している方法である。

20

本発明は更に、生物学的試料中の、HIV-1のMサブグル-プレトロウイルスによる感染と、HIV-1のOグル-プ(サブグル-プ)による感染とを検出、及び区別するための組成物であって、一方が特に、(1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9)、及び(10)である、二つの範疇のペプチドの混合物を具備している、組成物に関する。ペプチド(1)から(20)のそれぞれに特異的なモノクローナル抗体もまた、本発明の範囲に含まれる。

本発明は更に照会番号I-1548, I-1549, I-1550の下に、1995年2月24日にCNCMに寄託されたもののなかより選択したプラスミドにも関する。

本発明は更に、本発明で定義されるペプチド(1)から(20)のそれぞれをコードする配列を有する核酸に向けられている。

30

好ましい核酸配列の中では、図10、11、または12に表示のものが選択されるであろう。

本発明は更に、上で定義した核酸を含むベクタにも関する。

本発明は更に、前記核酸、または前記ベクタの何れか一つを含むと考えられる細胞に向けられている。

本発明は更に、照会番号I-1542の下に1995年2月23日にCNCMに寄託されたもののようなウイルスに関する。

本発明の範囲にも含まれるウイルスは、上記と同じグル-プのウイルスであって、このウイルスのコンセンサスペプチドが、上記したペプチド、またはポリペプチドを特異的に認識する抗体により認識されることを特徴とするものである。

40

このウイルスのゲノムRNAもまた、本発明の範囲に入る。

更に本発明の範囲に入るものには、HIV-1タイプのヒトレトロウイルスに感染したと思われる患者からの血清、またはその他の生物学的試料中にある、抗体を検出するためのキット、またはボックスがあるが、これは以下を具備することを特徴としている：

配列が、特に上記した(1)から(20)の配列の一つを有する、少なくとも一つのペプチド、またはポリペプチド；

上記のペプチド、または上記のポリペプチドと、試験する試料中に存在するかもしれない抗体との間の免疫複合体の形成反応を許容する手段(例えば、必要であるならば1以上のインキュベーション用緩衝液)；

陰性対照試料；

50

形成される、抗原/抗体複合体を可視化する手段。

更に本発明によると、このキットには、

HIV-1株より由来する少なくとも一つのコンセンサスペプチド若しくはポリペプチド、あるいは、

このポリペプチド若しくはペプチドの配列とは別個であり、その中の1以上のアミノ酸がその他のアミノ酸で置換されているアミノ酸配列(ただし、当該ペプチドには、コンセンサスペプチド若しくはポリペプチドに対する血清との反応性が保持されている)、または、

1以上のアミノ酸が欠失、付加されているアミノ酸配列(ただし、当該ペプチド、またはポリペプチドには、コンセンサスペプチド若しくはポリペプチドに対する血清との反応性が保持されている)、

の何れかを具備したペプチド、若しくはポリペプチドに由来する少なくとも一つのコンセンサスペプチド若しくはポリペプチドを更に有している。

好ましくは本発明のキットは更に、別のHIV株、好ましくはHIV-1-LAI株に由来する、少なくとも一つのペプチド、またはペプチドを有する。

本発明は更に、本発明のレトロウイルスによる感染の、in vitroでの診断用の、ポリペプチド組成物、またはその変異体の一つに関するが、この診断は、上記の感染後に形成される抗体を含んでいると思われる生物学的試料に対して行なわれる。この組成物は、ペプチド(1)から(20)のうち、少なくとも一つを具備していることを特徴とする。

生物学的試料は、特に血液、血漿、血清、またはその他の生物学的抽出物からなる。上記の組成物は、上記の生物学的試料のうちの一つの中の抗体を検出するのに使用することが可能である。

よって本発明は更に、特にHIVタイプのレトロウイルスによる感染の、in vitroでの診断方法であって、以下の工程で特徴付けられるものに向けられている：

HIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)レトロウイルスに対する抗体を含むと思われる生物学的試料を、上に定義したペプチド、または上に定義したペプチド組成物と、抗原/抗体型の免疫複合体の形成を許容する適切な条件下で、接触させる工程；

存在する可能性のある上記の複合体を検出する工程。

本発明は更に、ワクチン作成に許容される薬学的媒介物(vehicle)と組み合わせられた、少なくとも一つのペプチドを具備することを特徴とする、免疫学的組成物に関する。

本発明は更に、以下の工程を具備することを特徴とする、本発明のカプシドタンパク質、gp41、gp120の調製方法に関する：

本発明のHIV-1レトロウイルスに感染した細胞を溶解して、上清と感染細胞とを分離するか、または遠心により調製したウイルス沈殿物を溶解する工程；

細胞抽出物、及び/またはウイルス抽出物を、精製済み抗体を含む免疫吸着剤(immunosorbant)にかける工程(該抗体は、本発明のレトロウイルスに感染した人の血清より得られ、また有益には適切な支持体に固定されていて、感染者の該血清は、本発明のウイルスのエンペロ-プタンパク質と強く反応する能力がある)；

緩衝液の存在下で、抗原/抗体の免疫複合体の形成が起きるのに十分な時間だけ、インキュベーションする工程；

上記の免疫吸着剤を緩衝液で洗浄して、該支持体に保持されていない分子を除去する工程；

所望の抗原性タンパク質を回収する工程。

この調製方法の第一の態様によると、HIV-1 DURのカプシドタンパク質、並びに糖タンパク質gp41、及びgp120の分離と回収は、電気泳動法と、該タンパク質の電氣的還元法により行える。

この調製方法の別の態様によると、該タンパク質は以下の工程により回収できる：

上記の免疫吸着剤に付着したタンパク質を溶出させる工程；

上記のように溶出された産物を、分離支持体に付着された抗体であって、HIV-1のOグル-プ(またはサブグル-プ)DURのカプシドタンパク質、糖タンパク質gp41及びgp120を認識

10

20

30

40

50

するものを有する、クロマトグラフィ - カラムにより精製する工程。

本発明の範囲に更に含まれるものには、本発明のペプチド、またはポリペプチドであって、以下のようにして産生される方法が含まれる：

本発明の核酸を発現する；または、

アミノ酸を付加して、該ペプチド、または該ポリペプチドが得られるまで化学合成する。

遺伝子工学の標準的な原理と方法を使用することが可能である (Molecular Cloning, Sambrook, Fritsch, Maniatis, CSH 1989)。

本発明の範囲に含まれるものにはまた、上記した核酸の産生方法があるが、これは本発明のウイルスより単離するか、化学合成か、または特異的プライマからの、核酸の *in vitro* 増幅の技術により行なわれる。

本発明によるオリゴヌクレオチドプライマはまた、以下のヌクレオチド配列中の、少なくとも8つの連続するヌクレオチドを具備した配列を有する：

ATT CCA ATA CAC TAT TGT GCT CCA-3'

AAA GAA TTC TCC ATG ACT GTT AAA-3'

GGT ATA GTG CAA CAG CAG GAC AAC-3'

AGA GGC CCA TTC ATC TAA CTC-3'。

上記のプライマは、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列に関して、例えばPCRのような遺伝子増幅や、相当する技術において使用することが可能である。上記のプライマを使用して行った試験で、決定的な結果が得られた。

更に、本発明はPCRや上記した相当する技術にによる増幅を許容するキットに関する。

更に本発明の範囲には、本発明によるレトロウイルスを含んでいる、HIV-1の0グル - プ (またはサブグル - プ) DURレトロウイルスに特徴的である核酸の、生物学的試料中での存在を検出する方法が含まれる。この方法は、上記の生物学的試料中に含まれるRNAより形成したcDNAを、このcDNAとレトロウイルスゲノムとのハイブリダイゼーションを許容する条件下で接触させる工程と、このウイルス試料の遺伝子増幅を実行する工程とを具備している。

本発明はまた、本発明のウイルスで感染した細胞の溶解により得られるウイルス溶解物にも関する。

特に上記したペプチド、またはポリペプチドを含む、HIV-1_(DUR) (またはHIV-1_(VAU)) 株もまた、本発明の範囲に含まれる。

本発明は、HIV-1の0グル - プ (またはサブグル - プ) DURの構造、またはこのレトロウイルスの変異体より得られる、特異的ペプチドであって、以下を可能にするものに関する：状況に応じて、

地球規模で0のカテゴリ - のHIV-1と、Mのカテゴリ - のHIV-1とを区別するか、または、より特異的には、HIV-1の0グル - プ (またはサブグル - プ) DURと、0サブグル - プのその他のウイルスとを区別するか、あるいは、

一方で、全てではないにしろほとんどのレトロウイルスで、0グル - プ (またはサブグル - プ) 及びMサブグル - プの両方を認識する。

更に本発明の範囲に含まれるものには、HIV-1の0グル - プ (またはサブグル - プ)、またはHIV-1のMサブグル - プの、対応する構造タンパク質に由来の、相当するペプチドであって、特にGAG、gp120、およびgp41より由来する構造タンパク質でその一部が図に示されているものがあるが、上記の相同的なペプチドは整列により得られ、更にまたHIV-1の0グル - プ (またはサブグル - プ) DUR、より特異的には本願で同定したものに由来するペプチドの図からも得られるものである。

同様に、ある種の相同性ペプチドは上記した区別を可能にする試験で使用することが可能であり、この場合にはGAG、gp120、及びgp41の構造タンパク質由来の、対応するペプチドにかわって使用される。

10

20

30

40

50

0グル - プ特異的なオリゴヌクレオチドの決定

VAU配列、並びにMVP5180、及びANT70配列との相関関係を使用して、全体がVP3領域及びgp41領域に対して0サブグル - プ特異的であるようにしたプライマを決めた。これらのプライマにより、DUR株を増幅することが可能になり、結果としてぶちあたっていた増幅の問題の一つの解決となった。これらのHIVの0サブグル - ププライマの配列と部位を、図13に記載してある。これらのプライマにより、臭化エチジウム染色で可視化できる増幅バンドを、30サイクルの単一ステップのPCRで得ることが可能になる、部分配列が得られた

：
GAG:513塩基対(171アミノ酸) = 配列認識番号9；

gp120 VP3ル - プ:525塩基対(75アミノ酸) = 配列認識番号10；

gp41免疫優性領域:312塩基対(104アミノ酸) = 配列認識番号11。

DUR配列に関して、ヌクレオチド(図15)、及びタンパク質(図16)の比較を0サブグル - プのMVP5180、ANT、及びVAU配列、HIV-1のコンセンサス配列、代表的なアフリカンHIV-1のMAL配列であるLAI、ガボンチンパンジ - のCIVのCPZで行うと、その他の報告済みのHIV-1の0グル - プ(またはサブグル - プ)株同士が遠縁であるのと同じように、DURも、その他の報告済みのHIV-1の0グル - プ(またはサブグル - プ)株から離れている。

差異はGAG領域でより少なく、またgp120のVP3領域で最大であり、このタンパク質の比較では差異が40%にまで達する(図16)。系統樹により、DUR株が0サブグル - プの一部を形成することが一方で確認され、また記載された種々の0株間での差異の受容性が他方では証明されたが、明らかなサブタイプの枝分かれは起きていなかった(図17)。

GAG配列の比較

得られたGAG配列とその他の報告済みの2つの0株(ANT70、及びMVP5180)との比較はもちろぬ、Mグル - プの代表的な配列(図8)との比較により、0のコンセンサス配列が複数の領域内に存在し、これが同じ領域のMのコンセンサス配列とは異なっていることが判明した。Mよりも0に対しての方がより多様である、2つの超可変領域、及び一方または他方における、2、3の部位変異もまた判明した。しかしながら、SPRT・・・SEGA、MLNAI・・・KEVIN、GPLPP・・・QQEQI、及びVGD・・・SPVの領域は、0のコンセンサス配列と、Mのコンセンサス配列との間では異なっているようである。

QQA及びLWTRAGNPの領域は超可変領域である。HIV-1の0グル - プ(またはサブグル - プ)DUR株は、M及び0のコンセンサス配列に対して、3つの部位で明らかに異なっていて(1に対してL、Eに対して2回)、単離された3つの超可変部位に特異的なアミノ酸を有する(L9にV、A77にA、110にL)。

更に、GAG領域内に、例えばSPRTLNAWVK、GSDIAGTTST、及びQGPKEPFRDYVDRFのような、0グル - プと、Mグル - プに共通な断片を決めることは可能である。

VP3ル - プ配列の比較

この比較実験では、HIV-1のMサブグル - プのコンセンサス配列とは、最高で56%までのタンパク質の差異が見られ、またHIV-1の0グル - プ(またはサブグル - プ)のコンセンサス配列とは、35から42%のタンパク質の差異が見られた。

gp120中のVP3ル - プ領域中、及びgp41中の免疫優性領域中のペプチド配列の整列を、図9に示してある。DUR株のVP3ル - プの内部の配列は、HIV-1のMサブグル - プのコンセンサス配列のものとはかなり異なっている。VAU及びANT70株とは、GPMWYSMモチ - フを共有しているが、2つの置換(Aに対してR、及びYに対してR)があるMVP株とは共有していない。VP3ル - プの残りの左右部分は、他の既知のHIV全てとはかなり異なっていて、他の交差性を有するとは想像できないほどであった。更にDURのVP3ル - プは他の0コンセンサス配列よりも1アミノ酸だけ長く、これはHIV-1のMグル - プの配列よりも1アミノ酸だけ長い。

gp41の免疫優性領域に関する、整列の比較

配列CRGKAICを有する、DUR株の「ミニル - プ」はこの株に非常に特異的であることが証明された：これはエピト - プを構成するかもしれない(図9を参照)。更に、この配列は、gp41糖タンパク質のアンフォ - ルディングの状態の修飾に関わる可能性があり、結果的には該株の感染に関わる。

10

20

30

40

50

このル - プを挟む 11 アミノ酸長の長い配列は、VAU配列と同じである。DUR株の多型性は、分析したクローンでは、SまたはTの部位で見ることが可能である。

他の既知のレトロウイルス株より得た、対応するペプチドもまた、図 9 に示してある。DUR株は更に、HIVのOサブグル - プの、gp41領域に関するコンセンサス配列の決定を可能にし、その中の幾つかの十分に長い相同性領域を使用することができる。これらの相同性領域は、とりわけ、RL^{*}ALET, QNQQ, LWGL, 及び CYTV (^{*}は可変アミノ酸を意味する) である。

血清学的相関関係

抗DUR血清は、HIV-1-Mのコンセンサス配列、HIV-1 MAL、HIV-1 CPZ、またはHIV-1のOグル - プ (またサブグル - プ) のMVP5180、の中のVP3ル - プのペプチドとは反応しないが、しかし、HIV-1-O ANT70のVP3ル - プのペプチドとは反応する。gp41の免疫優性領域に関しては、これは「標準的な」HIV-1のMサブグル - プのコンセンサス配列とは反応しないが、しかしながら驚くことに弱いながらも、HIV-1のMサブグル - プの右に伸長しているコンセンサス配列とは反応する。

10

参考文献

Agut, H., Candotti, D., Rabanel, B., Huraux, J., Remy, G., Ingrand, D., Tabary, T., Chippaux, C., Chamaret, S., Guétard, D., Dauguet, C. and Montagnier, L. (1992).

Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient. *Lancet*. 340, 681-682.

20

Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. and Sonigo, P. (1986). Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell*. 46, 63-74.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220, 868-871.

30

Benn, S., Rutledge, R., Folks, T. et al, e. (1985). Genomic heterogeneity from AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*. 230, 949-951.

Clavel, F. and Charneau, P. (1994). Fusion from without directed by Human immunodeficiency virus particles. *J. Virol*. 68, 1179-1185.

40

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L. and Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 233, 343-346.

De Cock, K.M., Adjorlolo, G., Epkini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doorly, R. and Gayle, H. (1993). Epidemiology and transmission of HIV-2: why there is no HIV-2 epidemic. *JAMA*. 270, 2083-2086.

De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P. and Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol*. 64, 1207-1216.

10

Gnann, J., Cormick, J., Michell, S., Nelson, J. and Oldstone, M. (1987). Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and type 2 infections. *Science* 237, 1346-1349.

Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., von Briesen, H., Maniar, J., Mahambre, G., Delwart, E., Mullins, J. and Rubsamen-Waigmann, H. (1994). Genetic analysis of Human Immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J. Virol*. 68, 2161-2168.

20

Gürtler, L. G., Hauser, P.H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M. and Kaptue, L. (1994). A new subtype of Human Immunodeficiency Virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol*. 68, 1581-1585.

30

Harada, S., Koyanagi, Y. and Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science*. 229, 563-566.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365-369.

Huct, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. 345, 356-359.

Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A.T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. and Matthews, T. J. (1990). Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science.* 250, 1590-1593.

10

Javaherian, K., Langlois, A. J., Mc Danal, C., Ross, K.L., Eckler, L. I., Jellis, C.L., Profy, A.T., Rusche, J.R., Bolognesi, D.P., Putney, S.D. and Matthews, T.J. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6768-6772.

20

Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E., Eddy, G., van der Groen, G., Franssen, K., Gershy-Damet, G. and Deleys, R. (1993). Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS.* 7, 769-80.

Louwagie, J., McCutchan, F., Van der Groen, G., Peeters, M., Franssen, K., Piot, P., Gershy-Damet, G., Roelants, G., Van Heuverswyn, II. and Eddy, G. (1992). Genetic comparison of HIV-1 isolates from Africa, Europe, and North America. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 8, 1467-9.

30

Matsushita, S. M., Robert-Guroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K. and Putney, S. (1988). Characterization of a Human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. *J. Virol* 62, 2107-2114.

NKENGASONG, J.N. et al., *AIDS* 1993, Vol. 7, No. 11, pp. 1536-1538.

10

Rey, M.A., Krust, B., Laurent, A. G., Montagnier, L. and Hovanessian, A. G. (1989). Characterization of human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoproteins: dimerization of the glycoprotein precursor during processing. *J. Virol.* 63, 647-658.

ULMER J.B. et al., *Science* Vol. 259, March 1993, pp. 1745-1749.

20

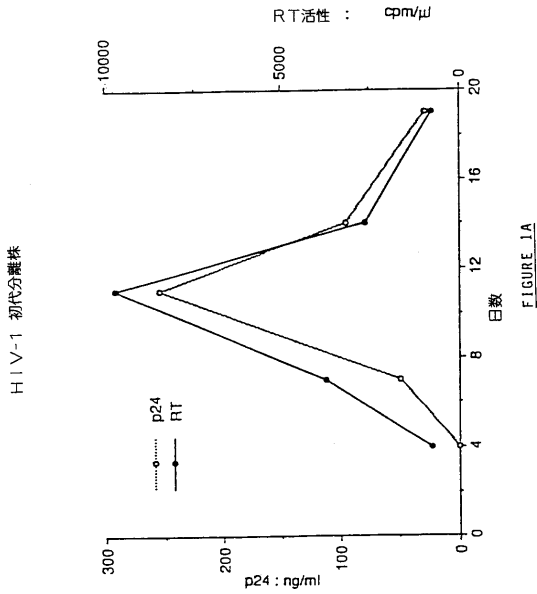
Vanden Heasevelde, M., Decourt, J.L., de Leys, R.J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H. and Saman, E. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African Human Immunodeficiency Virus isolate. *J. Virol.* 68, 1586-1596.

Vartanian, J.-P., Meyerhans, A., Asjö, B. and Wain-Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G→A hypermutation of HIV-1 genomes. *J. Virol.* 65, 1779-1788.

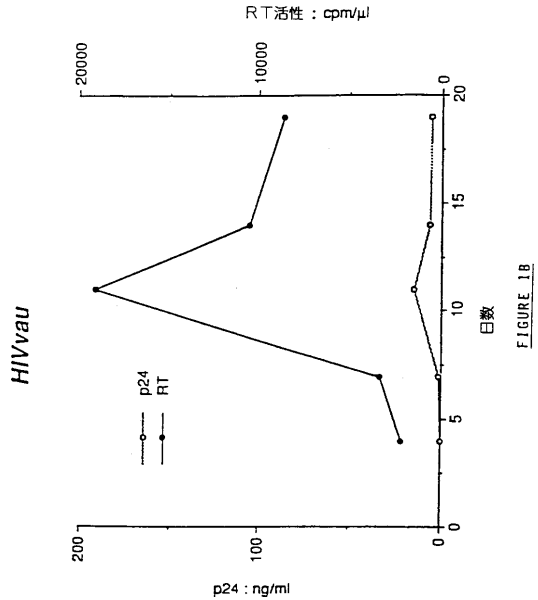
30

Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40, 9-17.

【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2】

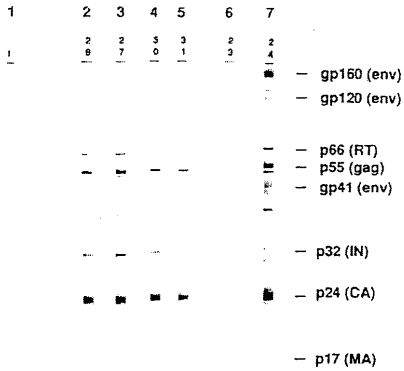


FIGURE 2

【図 3 A】

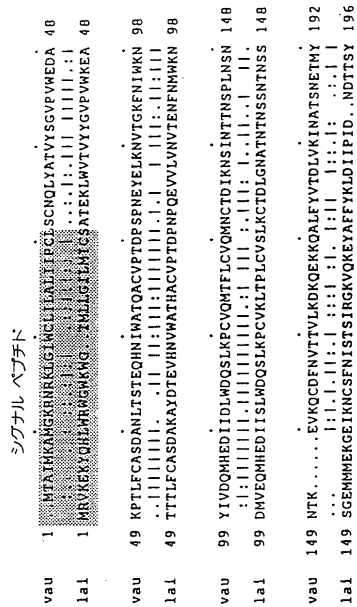


FIGURE 3A

193 RLINCSSTIHOACPKVSEFPIHYCAPAGCAFEKCNKTEGNETGKLN 242
 197 TLTSNTSIVTOACPKVSEFPIHYCAPAGFALKCNKNTENGTEGCTN 246
 243 VVWTCFHGIRPTVSTOLILNGLSKGNITIMKNIISDSEGENILITUNT 292
 247 VSTVOCTHIGIRPVVSTOLLNGLSABEEVIRSANFTDNAKTIIVQLNOS 296
 293 ITIACGERSNCTIQKIMAGEMAHYMAISHTKGTAKAYENYSATDNKA 342
 297 VEINCTIRNNKLSIRIQHGFIAEVYIGKIEHROAHCNISRAKKNAT 346
 343 LKNITERVLELVENOTDYTHKEGHSGEDAEVTFNFFENGHEFEYCNTN 392
 347 LKQIASLAREFGNKKTI...FAQSSGODEIVTHSNFCGGEFFYCNST 393
 393 RLFNHTSCKKNMTNKNKINCTNINSNNGTOAI...PCRLRQVVRDMRG 440
 394 QLENSTMF.....NSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRIKOFINHWQEVG 436

FIGURE 3B

441 SCLYRPIPGNLVCRSNITGMILQDTPKNTKHPNSTLPRGGGMDKI 490
 437 KAHYAPPISGOIRCSNITGLLTDGNNNN...GSEIFRGGGDRDNN 484
 491 RTOLFVKYVRKPFVAPTKIAREFTIGTRSHREKRAAGLAMELGLLSA 540
 485 RSELYKYVKVIEPLGVAPTKAKRVV...QREKRAVIGALFELGLGA 530
 541 AGSTMGAATALTVRTOHLKIGVQODNLLRAIOAOHLLRPSVYRGIQ 590
 531 AGSTMGARSMTLVQARQLLSGLVQODNLLRAIEAOHLLQJLVYGIQ 580
 591 LRALLAETITONCOLLIMGCKNHLCTYTSVKWNKTMGDN...ESIMDE 639
 581 LOALDAVENLADQDLGIMGCKLCTTAVFPHASNSKNSLEQIANN 630

FIGURE 3C

640 LTHOQDQDINNVSFTYEKTOEAOEOEKNEKELLEDEHASIWNKLOJ 609
 631 WTHMHRREINNYTSLIHSLEESONQOEKNEGELLELOKMASLWNNFI 600
 690 TKWHTYIKIATIIIVGALIGVRVVMIVLWKNIRQGYOPLSLQIPIOQA 739
 681 TNMLWYIKIETIIVGGLVGRVFAVLSIVNVRQGYSPLSFQTHLPTPR 730
 740 EVGTRGGTGGEGDEDRRRTPLQGFHLHLYDTLRLTIIMYHLLSMLA 789
 731 GPDRPEGIEEGGENDRDRSIRLVNGSLALIMDDLASLCLFSYHRLDRL 780
 780 SEIOKLRHLGLGLHILGORTIEACRFLKAIIOYHQLQTSATNLLDTV 839
 781 LIVTRIVE.....LLGRGHEALYRNLLQYWSQELKNSAVSLNAT 823
 840 AVAVANWTDSTILGIGSIGRILNIRRIROGLERLL 877
 824 ALAVAEGTORVIEVVOGACRAIRIRRIROGLERILL 861

FIGURE 3D

HIV-1lai RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC
 HIV-1Z321 -----I-----
 HIV-1eli -----H-----
 HIV-1JRCSEF -----M-----
 HIV-1WMJ -----R-----
 HIV-1NDK -----RH-----
 HIV-1mal -----Q-R-M-H-----
 SIVCPZGAB -----L-Q-I-L-AV-----
 vau -----L-L-TFIQN---NL---KNR---
 mvp5180 -----LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----
 ant70 -----L-L-TL-QN---SL---K---V-----
 HIV-2rod -----VT-I-K--Q--AR-NS---AFRQV-
 HIV-2D194 -----VT-I-K-----AQ-NS---AFRQV-

FIGURE 4

【 5 A 】

サブタイプ

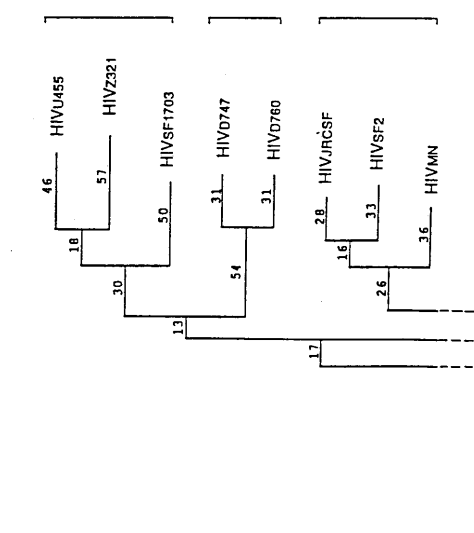


FIGURE 5A

【 6 】

DNA配列 2611 b-p. ATGACAGCCGATT ... CGACTCTCTGTTA 直鎖状

1 ATGACAGCA TTATGAAAGC AATGGGGAG AGGACACAGGA AGTTAGGGAT 100
 101 TATATGCCNC AGTCTATCT GGGTACCAC TATGGGAGTA TGCNAAACCA 90
 201 TATTTGGGCA ACACAGCCCT GGTTCACCAC AGACCCCACTG CCAATATGAT 80
 301 GTRAGCCAAA TCGAGGAGGA CATTATAGT TGTGGGACC AGATTTTAA 70
 401 TCAAAATGAG TATATATGTC AGAAMAGTC CTTNAACTC AATACAEACA 60
 501 ACAGGAGAAA AAMAGGCTC TATTCATGTC GACAGATTC GTTAGAGTAA 50
 601 ACCATGACC AGGCCTCTG AAMAGTATC TTGAGAGCCA TTCCCATACA 40
 701 TTAGAGGAC AGGCCTCTG AAMAGTATC CAGTAGTAC CATTGACACAT 30
 801 TTAGAGGAC AGGCCTCTG AAMAGTATC CAGTAGTAC CATTGACACAT 20
 901 GGGATGAGC ATACACATCA TGGGAGAGA TATTTCAGC AGTGGGGAG 10
 1001 TACTGCGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1101 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1201 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1301 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1401 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1501 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1601 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1701 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1801 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 1901 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2001 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2101 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2201 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2301 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2401 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2501 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0
 2601 TCGAGTGGC TACTGCGGC ATACACATCA TATTTCAGC AGTGGGGAG 0

FIGURE 6

【 5 B 】

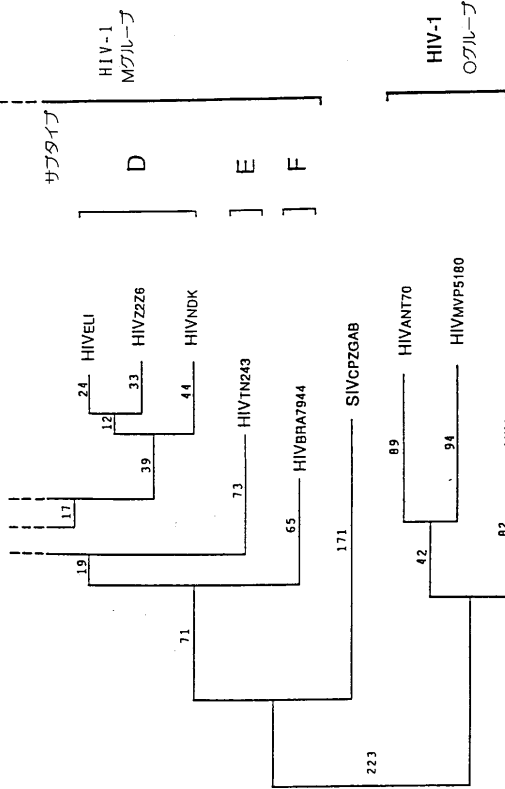


FIGURE 5B

【 7 】

1 GCAGAGACAG GACAGGAAAC TGCCTACTTC 40
 81 TGGGCGCTAAC TTTACAAATG CAGCCATGAA AGCTGCAATGT 80
 161 ATCCACACAAAG TCAAGAGGTA GTAGAAAGCCA TGAACACAGGA 70
 241 TTAAGAGACAG CAGTACAAT GGCAGTATTT GTTCACAAAT 60
 321 GAGATTAAATA GACATATATAG CATCACAAAT AGACACACAA 50
 401 TCTATATTACAG AGACAGAGAG GACCTCTATTT GGAAGAGACC 40
 GGCACAGCTTC CTG

FIGURE 7

GP41の免疫寛容性領域

【 9 B 】

```

MAD  [-----]
LAI  [-----]
OXI  [-----]
ELI  [-----]
MAL  [-----]
455  [-----]
CPZ  [-----]

```

```

-L-L-TL-QN---SL---K---V-Y-S-K--RT-I
-LQ-L-TLION--R-NL--K---Y-S-K--RT-I
-L-L-TFIQN---NL---KNR---Y-S-K--KT-G
-L-L-TLQIN---NL---R-A--Y-S-Q--ET-G
RL*ALET**QNCQ*L*LVGC***CITSV**MN*TM*
RLLALETLMNQQLNLNLVGCGRKAICTYSVQVNETWG

```

FIGURE 9B

HIV-O コンセンサス

DUR

【 1 0 】

```

CAGGACAAATGGTACATCAGGCCATCTCCCCAGAACTTATATGTATGGGTAAAGCA
GTAGAAAGAAAGGGCCCTTACCCCTGAAATATCCCTAIGITTTATGGCACTACAGCA
GCTCCCTATGATATCAATGTATGCTAAATGCCATAGGAGCAACACAGGGCTTA
CAAGTATTAAGAAAGTAAATCAATGAGGACGACAGCTGGGATAGGCTCAGCA
CAGCGGGCCCTTACCACAGGGGACGATAAAGGAAACCAACAGGAGTGCATTCGCA
CACTAGCCACACAGGCAAGGCAAAATCTCTGGACTCTAGGGAGGTAACTTATGCA
GCTCCTATAGGAAATGGATAGTGTGGTCTAAACCAAAATGGTAAAAAATGAT
AGTCAGTCTTAGATATAGGCGGACCAAAAGAACCCATTTAGAGATATGTA
GACAGGTTCTACAAAACATTAAGAGCTGAGGAC

```

HIV1-OのDUR株のGAG領域: 513 塩基対

=配列認識番号9

```

QGQVHQALSPRLNAYVKAVEKAFNPEIPFMALBEGAVFYDINVMNLAIGHQAL
QVLKEVNDDEAADWIRLUPQQAGPLFPQREPTGSDIAGITSTQEQQLWTRAGNRP
VGDITREWIVLGLNKAIVGRTSPVILDIRQPKPEFRDYVDRFYKTLRAEQ

```

HIV-OのDUR株のGAG領域: 171 アミノ酸

FIGURE 10

【 1 1 】

```

ATTCCAACTACTATTGTGTCAGGAGGATATGCTATCTTTAAATGCCAACACGAGGAG
TTATCGGAAAAGGCCCATTAACAATTCAGTAGITACCTGTACACAGGGTATCAAG
CCACAGTAAGCACTCTAATATTCGATGGGCACTCTCGMAAGAAAATAAGAAAT
ATGGAAAGAACTCTCGCAACTCAGGTAATATCTAGTGACCTTAATCTCTACTATA
RACATGCTGTGTGAGCCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TCTACTATANTGCCAGGACTCGGAGAAAGCTTGCAGGGATTCAGAAAGGATTTA
GAAGTGTAAATAAACAAGGCTCGACTGAAATATGTTCAATAAAGCAATGGGTGAGAT
GCAGAAATAACCCGTTTGCATTTTACTGTCATGGAGAAATCTTT

```

DUR株sp120のVP3ループ: 525 塩基対

=配列認識番号10

```

PHIVCAPAGYAFKCNHEEFTKPCGNNSVCTQKIKFTVSTHLENGTSEKRLI
MKNVSSGNLTLNSTRNFCYFNNKMQEKIPKMANYSMLHREKGNKNSRTAF
CTYHATDWRKTLQIMERTLELWRTSPEIMFRKNSNGDASTHLEHNSCEFT

```

DUR株sp120のVP3ループ: 175 アミノ酸

FIGURE 11

【 1 2 】

```

ATAGTGCACACAGCAGGACACCTGCTGAGGACATAGAGGCCACGCAACACTCTGCTGAGG
TTATCTGTATGGGGTATTAGACAACTCCGAGCTCGCCTGCTAGCCITAGAAAACCCCTATG
CAGAACTCAGCAACTCTAAACCTGTGGGGTGTAGAGGAAAGAAAGCACTCTGACACATCA
GTACATGGAAATGAAACATGGGGGAAATGACTCAAATTTGGGACAGGTTAACATGGCAG
CAATGGGATCAACAGATAGCCAAATGTAAAGCTGTTTTATATATGACAAAAATACAAGAAAGCA
CAGACAAACACA

```

HIV1-O DURのGP41の免疫寛容性領域のDNA配列: 312 塩基対

=配列認識番号11

```

IVQQDNLRAIQAQQLHLRLSVWGIQRLBARLLALETLMQNLQQLNHWGRGKALCYTS
VQVNETWGNDSIWDRLTWQQWDRQIANVSSFTYDKQEQEQEQ

```

HIV1-O DURのGP41の免疫寛容性領域のDNA配列

一塩定のタンパク質: 104 アミノ酸

FIGURE 12

HIV-Oタイプの特異的プライマ

【 図 1 3 A 】

ATT-CCA-ATA-CAC-TAT-TGT-GCT-CCA-3'
 AAA-GAA-TTC-TCC-ATG-ACT-GTT-AAA-3'
 GGT-ATA-GTG-CAA-CAG-CAG-GAC-AAC-3'
 AGA-GGC-CCA-TTC-ATC-TAA-CTC-3'

FIGURE 13A

【 図 1 3 B 】

プライマの位置:

HIV MVP5180 中	
dur V3a	6896 à 6919
dur V3r	7400 à 7423
dur 41a	7934 à 7957
dur 41r	8292 à 8302
HIV ANT70 中	
dur V3a	6896 à 6920
dur V3r	7392 à 7415
dur 41a	7917 à 7940
dur 41r	8256 à 8276
HIV1 VAU 中	
dur V3a	640 à 663
dur V3r	1138 à 1161
dur 41a	1684 à 1707
dur 41r	2026 à 2046

FIGURE 13B

【 図 1 4 】

V3	
HIV1-M コンセンサス	陰性
HIV1-M MAL (アフリカ)	陰性
HIV1-M CIV-CFZ (チンパンジー)	陰性
HIV1-O MVP5180	陰性
HIV1-O ANT70	陽性

【 図 1 5 A 】

ヌクレオチドの比較

割合の差での表示

GP41	
HIV1-M コンセンサス	
- パスツール標準	陰性
- Innogenetics 右伸張	弱陽性
HIV1-O MVP5180:	
- innogenetics	陰性
- Behring 左伸張	陽性
HIV1-O VAU	陽性

GP41 (330塩基中)							
	LAI	MAL	CFZ	MVP5180	ANT70	VAU	DUR
LAI	0						
MAL	11	0					
CFZ	33	31	0				
MVP5180	39	38	38	0			
ANT70	36	39	37	15	0		
VAU	39	38	38	14	14	0	
DUR	38	36	37	13	15	11	0
	LAI	MAL	CFZ	MVP5180	ANT70	VAU	DUR
				5180	70		

FIGURE 15A

FIGURE 14

【 図 15 B 】

V3 (558塩基中)

LAI	0						
MAL	19	0					
CPZ	37	34	0				
MVP5180	46	43	45	0			
ANT70	45	44	43	23	0		
VAU	44	41	41	24	24	0	
DUR	46	43	42	25	22	24	0
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

gag (520塩基中)

LAI	0						
MAL	9	0					
CPZ	21	25	0				
MVP5180	24	26	25	0			
ANT70	25	25	24	10	0		
DUR	25	26	25	9	10	0	
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

FIGURE 15B

【 図 16 A 】

タンパク質の比較

割合の差で表示

GP41 (109アミノ酸中)

LAI	0						
MAL	17	0					
CPZ	33	28	0				
MVP5180	42	40	41	0			
ANT70	42	45	39	22	0		
VAU	44	47	45	19	21	0	
DUR	44	42	39	17	17	14	0
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

FIGURE 16A

【 図 16 B 】

V3 (186アミノ酸中)

LAI	0						
MAL	31	0					
CPZ	46	39	0				
MVP5180	55	50	59	0			
ANT70	55	50	55	36	0		
VAU	55	51	55	39	36	0	
DUR	56	51	56	39	35	42	0
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

gag (174アミノ酸中)

LAI	0						
MAL	6	0					
CPZ	11	14	0				
MVP5180	21	23	18	0			
ANT70	21	24	19	6	0		
DUR	22	22	19	7	9	0	
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

FIGURE 16B

【 図 17 】

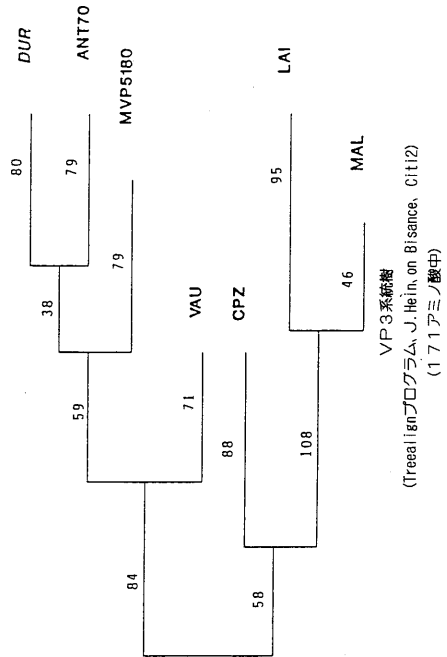


FIGURE 17

【 図 18 A 】

- (1) 試料名: Vau7101550
- (2) 方法名: VauRepMet 3
- (3) 工程: FvauPrcMet 3D
- (4) 注入時間: 45.0分
- (5) 容量: 50.00 ml
- (6) キット: MSHV15_5030mlml

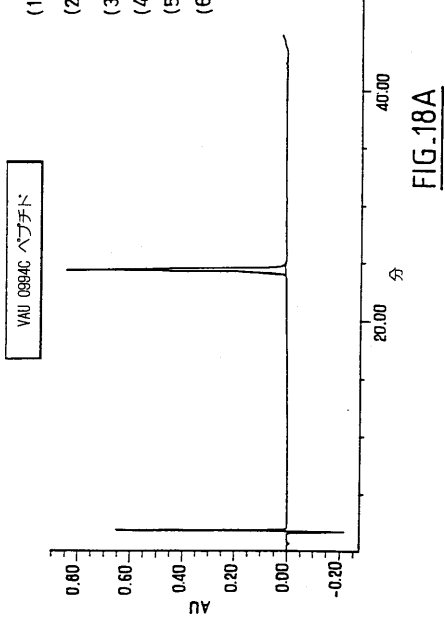


FIG.18A

【 図 18 B 】

クロマトグラフィーの結果

保持時間 (分)	初期時間 (分)	最終時間 (分)	表面の領域 (%)	Intのタイプ
24.482	23.898	24.932	100.00	BB

FIGURE 18B

【 図 19 】

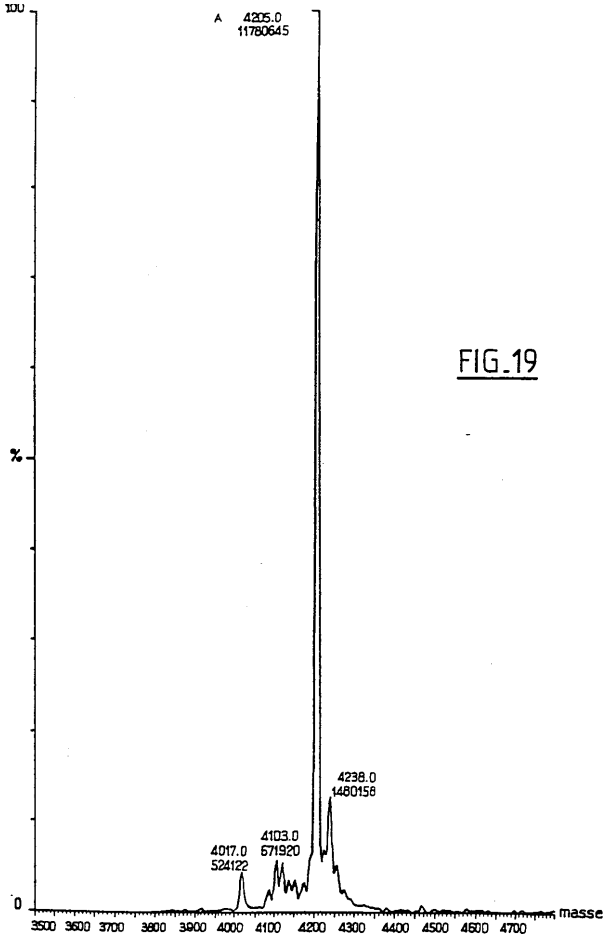


FIG.19

【 図 20 】

VAU ペプチド

レファレンス: F Vau 0994 C 710

配列: RLLALETFIQNQQLLN¹LGCKNRLICYTSVKWNKT

長さ: 35

分子量: 4210

分析コントロール: HPLCとマスマスペクトロメトリーで>95%

FIGURE 20

【図 2 1 A】

GP160VAU配列(Oサブタイプ)の免疫優性なエピトープを模倣するペプチドの免疫反応性に関する研究

VS=04 RATIO	VAU ペプチド 2µg/ml
HIV1血清(バネルBBI)	
	B01N12 0.80
	B01N13 0.40
	B01N15 0.80
	PRB914 K6 0.20
HIV1血清(レーマニア)	
	3989 9.50
	5116 8.60
HIV1血清(バネルAFM) Oサブタイプ	
	MAA >30
	LOB >30
	HAM >30
	DUR 12.50
HIV1血清(Reims) Mサブタイプ?	
	MAD 0.20

FIGURE 21A

【図 2 1 B】

Oサブタイプの無い (Centre Pasteur Yaoundé)	
950	0.60
3372	>30
3361	28.80
1507	28.70
3167	>30
2628	28.10
1060	0.60
4020	0.30
4783	0.30
5322	0.40
6661	0.50
5527	0.30
5863	25.00
5969	>30
6487	>30
6509	0.70
6782	>30
5453	27.30
3826	1.50
HIV2血清	
BERT	0.30
PAOL	4.50
RIV	15.80

間接EIA法; 3 X 30min type Genelavia Mixt

陰性の血清	
N=48	
平均	0.022
DS	0.007
平均	
+12DS	0.107
VS	0.100

FIGURE 21B

【図 2 2 A】

SYNTHESE DI アフリカンの血清より得た結果の要約

	WB1 結果									
	GP 160	GF 120	P 68	P 55	GP 41	P 40	P 34	P 25	P 18	
3361	++	+	+				++	+	+	POS
1507	+	+					+	++	++	POS
2628	+		++	++		+	+	++	++	POS
3167	++	+	++	++	+	+	++	++	++	POS
3372	++	+	+	++	+	+	++	++	+	POS
5453	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS
5863	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS
5969	+		+	+			+	+	+	IND
6487	++		+	+			+	+	+	IND
6782	++		+	+	+	+	+	+	+	POS
950	+		+				+	+	+	IND
1060	+						+	+	+	IND
5527										?
6509	++		+				+			IND
6661	+							+		IND
4020	+							+		IND
SEMT										
4783	+							+	+	IND
5322								+	+	IND
3826								+	+	IND
MAD	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS
DUR										
MAA										
LOB	+		++	+			++	++		IND
HAM			+				+	+		IND

=Ratio<1
=Ratio>2

FIGURE 22A

【図 2 2 B】

	スクリーニング試験(比: DO/VS)				
	Clonated ind HIV1+2	GEM ind HIV1+2	Abbott sdw HIV1+2	Murex sdw HIV1+2	Murex comp HIV1
3361	0.10	18.00	0.56	0.72	1.40
1507	0.97	14.25	3.03	5.35	0.98
2628	0.70	18.00	4.84	1.71	1.34
3167	0.38	18.30	11.89	>6	0.88
3372	0.19	16.80	11.63	3.76	0.47
5453	2.50	>20			1.70
5863	2.30	>20			1.90
5969	2.30	15.20			2.25
6487	0.32	19.70			1.90
6782	0.07	13.40			2.85
950	1.20	6.00	5.76	>6	0.68
1060	0.60	18.00	0.46	1.25	0.67
5527	0.27	2.40			0.52
6509	0.32	>16			2.14
6661	8.10	10.10			1.54
4020	0.23	6.30	1.03	4.98	4.12
SEMT					
4783	0.19	8.10	0.41		0.55
5322		10.90			0.52
3826		3.93		1.64	0.72
MAD	-	+	+		
DUR		>8	2.00	0.80	
MAA					
LOB		>19	2.00	2.70	1.50
HAM		>19	1.80	7.80	2.70

FIGURE 22B

【 図 2 2 C 】

EIAヘブチド								
	Clonatec rap HIV1	39D6 HIV1B	FER HIV1B	39A HIV1B	VAU HIV1O	MVPP 5180 HIV1O	BNR 19 HIV1O	PEPTI- LAV1-2
3361	+				28.8	25.80	NT	
1507	疑わしい			8.4	28.7	28.80	1.7	
2628				3.6	28.1	19.30	1.2	
3167	+			>30	>30	>30	1.6	
3372	+/-			2.8	>30	24.00	4.9	
5453	-	4.36	1.37	3.6	27.3		1.6	-
5863	-	1.42	0.40	1.4	25		0.5	-
5969	-	0.94	1.90	19.4	>30		0.6	+
6487	+	25.75	5.76	>30	>30		0.7	
6782	-	0.64	0.49	0.8	>30		10.3	-
950					0.6		0.4	
1060	疑わしい			1.9	0.6	0.40	0.6	
5527	-			4.5	0.3		0.2	+/-
6509	+			16.9	0.7		0.2	
6661	+			2.8	0.5		0.4	
4020=	?Ag-			1.15	0.3		0.5	
SEMT				1.2	0.7		0.9	
4783=				2.5	0.3		0.3	
5322				4	0.4		0.3	
3826				1.6	1.5		0.7	
MAD		0.66	2.72	26.7	0.2		>30	-
DUR		>30	>30	>30	12.5		0.2	
MAA				NT	>30		NT	
LOB		1.02	5.62	12.5	>30		>30	
HAM		0.73	0.41	13.3	>30		0.7	

FIGURE 22C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	A
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/70	(2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569	H
C 1 2 R 1/92	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		C 1 2 R 1:92	

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 シャルノー、 ピエール

フランス国、75005 パリ、リュ・デ・エコル 6ビス

(72)発明者 クラベル、 フランソワ

フランス国、75016 パリ、リュ・ドゥ・ラソンプション 94

(72)発明者 ボルマン、 アンドレウ

フランス国、28210 ノンジャン - ル - ロワ、リュ・デ・ムーラン 14

(72)発明者 キーラン、 カロリーヌ

フランス国、92120 モントルージュ、リュ・ドゥ・バーヌー 110

(72)発明者 ゲタル、 ドニーズ

フランス国、75015 パリ、リュ・アンセルム・ベイエン 4ビス

(72)発明者 モンターニエ、 リュック

フランス国、92000 ル・プレシ・ロバンソン、リュ・ドゥ・マラブリ 21

(72)発明者 ドンジョン・ドゥ・サン - マルタン、 ジャクリーヌ

フランス国、92140 クラマル、アブニュー・ピクトール - ユゴー 65

(72)発明者 コエン、 ジャック・アーシュ・エム

フランス国、51100 ラーンズ、リュ・ドゥ・シュリー 17

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 J.Virol.(Mar 1994), Vol.68, No.3, p.1581-1585

AIDS (Oct 1, 1994), Vol.8, p.1405-1412

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

C07K 1/00 - 19/00

BIOSIS(STN)

CA(STN)

REGISTRY(STN)