[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 14/16
C07K 19/00
G01N 33/53
G01N 33/569
G01N 33/68

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98805202.4

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1215082C

[22] 申请日 1998.4.6 [21] 申请号 98805202.4
[30] 优先权
[32] 1997. 4. 9 [33] FR [31] 97/04356
[32] 1998. 2.24 [33] FR [31] 98/02212
[86] 国际申请 PCT/FR1998/000691 1998.4.6
[87] 国际公布 WO1998/045323 法 1998.10.15
[85] 进入国家阶段日期 1999.11.17
[71] 专利权人 比奥 - 拉德 巴斯德公司
地址 法国马恩科奎特
[72] 发明人 D·M·B·彻耐保克斯
J - F·H·戴拉格尼尤
S·J·X·加戴尔
F·Y·瑞尤尼尔
审查员 杜金萍
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 陈文平

权利要求书 9 页 说明书 38 页

[54] 发明名称 可用于检测 O 组 HIV - 1 病毒感染的生物试验的合成肽

[57] 摘要

本发明涉及在检测 O 组 HIV - 1 病毒感染的生物试验中使用的合成肽，制备它们的方法，包含这些肽的组合物和试剂盒以及使用这些肽的生物试验。

ISSN1008-4274

1.线性形式或通过半胱氨酸之间二硫键环化的具有13-33个氨基酸的单体类型或具有 26-66 个氨基酸的二聚体类型的合成肽，其对应于通式(I)：

Δ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ω (I)

其中

-Δ代表生物素残基、生物胞素残基、氢原子、乙酰基(CH_3CO-)、可含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，该脂族链优选为 1 至 6 个碳原子的烷基链或 2 至 6 个碳原子的链烯基链，或 2 至 6 个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z 代表式(II)-(X)之一的肽序列：

-Ξ_1-Ser-Ξ_2-	(II)
-Ser-Ξ_2-	(III)
-Ξ_1-Ser-	(IV)
-Ξ_1-Gln-Ξ_2-	(V)
-Gln-Ξ_2-	(VI)
-Ξ_1-Gln-	(VII)
-Ξ_1-Asn-Ξ_2-	(VIII)
-Asn-Ξ_2-	(IX)
Ξ_1-Asn-	(X)

其中

-Ξ_1 代表 0-9 个氨基酸的肽序列，和

-Ξ_2 代表 0-5 个氨基酸的肽序列，

-Θ代表式(XI)的肽序列：

-(AA_1)-(AA_2)- (AA_3) -(AA_4)-(AA_5)- (XI)

其中：

•(AA_1)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，

•(AA_2)代表甘氨酸残基或天冬酰胺残基，

•(AA_3)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，

•(AA_4)代表亮氨酸残基，或异亮氨酸残基或谷氨酰胺残基，

•(AA_5)代表异亮氨酸残基，或缬氨酸残基或亮氨酸残基或苏氨酸残基，或正亮氨酸残基或正缬氨酸残基，

前提是(AA_1)(AA_2)(AA_3)(AA_4)和(AA_5)不一起形成肽序列-LysGlyLysLeuIle和-LysGlyLysLeuVal-，

与丝氨酸的-CO-基团相连的Ω代表：

-羟基(-OH)基团或氨基($-NH_2$)基团，

-包含1-6碳原子的烷氧基基团，

-式(XII)的肽序列：

-Val-Σ-Ψ (XII)

其中Σ代表式(XIII)或式(XIV)序列

-(AA_6)-Trp Asn-(AA_7)-(AA_8) (XIII)

-(AA_6)-Trp His-(AA_7)-(AA_8) (XIV)

其中：

•(AA_6)代表不同于赖氨酸的氨基酸，

•(AA_7)代表一个氨基酸，

•(AA_8)代表丝氨酸或苏氨酸残基，且

与游离AA_8氨基酸的-CO-残基相连的Ψ代表OH或NH_2基团或包含1-6个碳原子的烷氧基基团，

-式(XV)的肽序列：

-Val-Ψ (XV)

其中与缬氨酸-CO-残基相连的Ψ具有如式(XII)中相同的含义，

-或式(XV)-(XVIII)之一的肽序列：

-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ψ (XVI)

Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVII)

Val-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Ψ (XVIII)

其中 Z 和Θ具有式(I)给定的定义，Σ具有式(XII)给定的定义，与丝氨酸的-CO-残基、AA_8 氨基酸的-CO-残基或缬氨酸的-CO-残基相连的Ψ具有如式(XII)中相同的含义。

2.根据权利要求 1 的式(I)合成肽，其中(AA_5)代表缬氨酸残基，或亮氨酸残基或苏氨酸残基，并且当Ω对应于式(XII)或(XIV)的肽序列时，(AA_6)代表谷氨酰胺或精氨酸残基。

3.根据权利要求 1 的式(I)合成肽，其中

-Δ代表生物素残基、氢原子、可包含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，该脂族链优选为 1 至 6 个碳原子的烷基链，或 2 至 6 个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z 代表式(II)或(V)的肽序列—其中$Ξ_1$代表两个氨基酸的肽序列和$Ξ_2$代表一个氨基酸，或式(IV)的序列—其中$Ξ_1$代表三个氨基酸，或式(VIII)的肽序列—其中$Ξ_1$代表九个、八个或三个氨基酸的肽序列和Ξ2 代表五个氨基酸的肽序列，

-Θ代表下式的肽序列：

-Lys Gly Arg Leu Val-,

或 - Arg Gly Arg Leu Val-,

且

-Ω代表羟基、肽序列(XV)或对应于式(XII)的肽序列的下列序列之一：

- Val Arg Trp Asn Glu Thr-Ψ,

- Val Gln Trp Asn Glu Thr-Ψ

或

- Val Gln Trp Asn Ser Thr-Ψ。

4.根据权利要求 1 的 20-50 个氨基酸的合成肽：其具有式(Ia)

Δ-Z_a-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ω_a (Ia)

其中 Za 代表式 IIa-Xa 的基团：

$\Xi1_a$-Ser-$\Xi2_a$ (IIa)
-Ser-$\Xi2_a$ (IIIa)
-$\Xi1_a$-Ser (IVa)
$\Xi1_a$-Gln-$\Xi2_a$ (Va)
-Gln-$\Xi2_a$ (VIa)
$\Xi1_a$-Gln- (VIIa)
$\Xi1_a$-Asn-$\Xi2_a$ (VIIIa)
-Asn-$\Xi2_a$ (IXa)
-$\Xi1_a$-Asn (Xa)

其中

-Ξ_{1a} 代表 1－5 个氨基酸的肽序列，和

-Ξ_{2a} 为一个氨基酸，

-Ωa 如式(I)所定义代表式(XII)的肽序列，或式(XVIIa)的肽序列：

Val-Σ-Z_a-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVIIa)

且Δ、Θ、Σ和Ψ具有如式(I)中相同的含义。

5.线性形式或通过半胱氨酸之间二硫键环化的具有 13-33 个氨基酸的单体类型或具有 26-66 个氨基酸的二聚体类型的合成肽，其对应于通式(I)：

Δ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ω (I)

其中

-Δ代表生物素残基、生物胞素残基、氢原子、乙酰基(CH_3CO-)、可含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，该脂族链优选为 1 至 6 个碳原子的烷基链或 2 至 6 个碳原子的链烯基链，或 2 至 6 个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z 代表式(II)-(X)之一的肽序列：

-Ξ_1-Ser-Ξ_2- (II)

-Ser-Ξ_2- (III)

-Ξ_1-Ser- (IV)

-Ξ_1-Gln-Ξ_2- (V)

-Gln-Ξ_2- (VI)

-Ξ_1-Gln- (VII)

-Ξ_1-Asn-Ξ_2- (VIII)

-Asn-Ξ_2- (IX)

Ξ_1-Asn- (X)

其中

-Ξ_1 代表 0-9 个氨基酸的肽序列，和

-Ξ_2 代表 0-5 个氨基酸的肽序列，

-Θ代表式(XI)的肽序列：

-(AA_1)-(AA_2)- (AA_3) -(AA_4)-(AA_5)- (XI)

其中：

•(AA_1)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，

•(AA_2)代表甘氨酸残基或天冬酰胺残基，

•(AA_3)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，

•(AA_4)代表亮氨酸残基，或异亮氨酸残基或谷氨酰胺残基，

•(AA_5)代表异亮氨酸残基，或缬氨酸残基或亮氨酸残基或苏氨酸残基，或正亮氨酸残基或正缬氨酸残基，

前提是$(AA_1)(AA_2)(AA_3)(AA_4)$和(AA_5)不一起形成肽序列-LysGlyLysLeuIle和-LysGlyLysLeuVal-,

与丝氨酸的-CO-基团相连的Ω代表:

-羟基(-OH)基团或氨基($-NH_2$)基团,

-包含1-6碳原子的烷氧基基团,

-式(XV)的肽序列:

-Val-Ψ (XV)

其中与缬氨酸-CO-残基相连的Ψ代表OH,或NH_2基团,或具有1-6个碳原子的烷氧基,

-或式(XVI)-(XVIII)之一的肽序列:

-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ψ (XVI)

Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVII)

Val-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Ψ (XVIII)

其中Z和Θ具有式(I)给定的定义,Σ具有式(XIII)或式(XIV)给定的定义:

$-(AA_6)$-Trp Asn-(AA_7)-(AA_8) (XIII)

$-(AA_6)$-Trp His-(AA_7)-(AA_8) (XIV)

其中

•(AA_6)代表不同于赖氨酸的氨基酸,

•(AA_7)代表一个氨基酸,

•(AA_8)代表丝氨酸或苏氨酸残基,

且,与丝氨酸的-CO-残基、AA_8氨基酸的-CO-残基或缬氨酸的-CO-残基相连的Ψ具有如式(XV)中相同的含义。

6. 根据权利要求5的式(I)的合成肽,其中(AA_5)代表缬氨酸残基或亮氨酸残基或苏氨酸残基,且Ω相应于式(XIV)的肽序列,(AA_6)代表谷氨酰胺残基或精氨酸残基。

7．根据权利要求5的式(I)的合成肽，其中：

-Δ代表生物素残基、氢原子、可含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，该脂族链优选为1至6个碳原子的烷基链，或2至6个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z代表式(II)或(V)的肽序列，其中-Ξ_1代表2个氨基酸的肽序列，和-Ξ_2代表1个氨基酸的肽序列；或代表式(IV)的肽序列，其中-Ξ_1代表3个氨基酸的肽序列；或代表式(VIII)的肽序列，其中-Ξ_1代表9，8或3个氨基酸的肽序列，和；-Ξ_2代表5个氨基酸的肽序列；

-Θ代表如下式的肽序列：

-Lys Gly Arg Leu Val-,

或

- Arg Gly Arg Leu Val-,

和

-Ω代表羟基或式(XV)的肽序列。

8．根据权利要求5的20－50个氨基酸的合成肽，其具有式(Ia)；

Δ-Z_a-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ω_a (Ia)

其中

-Za代表式(IIa)-(Xa)之一的基团：

$\Xi1_a$-Ser-$\Xi2_a$ (IIa)
-Ser-$\Xi2_a$ (IIIa)
-$\Xi1_a$-Ser (IVa)
$\Xi1_a$-Gln-$\Xi2_a$ (Va)
-Gln-$\Xi2_a$ (VIa)
$\Xi1_a$-Gln- (VIIa)
$\Xi1_a$-Asn-$\Xi2_a$ (VIIIa)
-Asn-$\Xi2_a$ (IXa)
-$\Xi1_a$-Asn (Xa)

其中

-Ξ_1代表1-5个氨基酸的肽序列，和

-Ξ_2代表1个氨基酸的肽序列，

Ω_a代表式（XVIIa）的肽序列：

且Δ，Θ，Σ和Ψ具有式(I)给定的定义。

9. 根据权利要求1－3或5－7中任一项的式（I）的合成肽，其中Z代表如下的肽序列：

- -Leu Leu Ser Ser-
- -Leu Leu Asn Ser-
- -Arg Leu Asn Ser-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile-
- -Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-

或

- -Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-。

10.根据权利要求1的式(I)的合成肽，选自：

序列 No.9:

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

序列 No.10:

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

序列 No.14:

-LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

序列 No.15:

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

和序列 No.16:

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-。

11. 根据权利要求1-4或9任一项的式(I)的合成肽，选自：

序列 No.2:

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

序列 No.3:

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

序列 No.4:

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

序列 No.5:

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

序列 No.8:

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

序列 No.11:

-ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

序列 No.12:

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-

和序列 No.13:

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-。

12. 包含一种或多种根据权利要求 1-11 任一项的式(I)合成肽的组合物。

13.根据权利要求 12 的组合物，其包含肽 No.3。

14.包含一种或多种根据权利要求 1 或 5 的式(I)合成肽和一种或多种 O 组 HIV-1 重组肽的组合物。

15.包含一种或多种根据权利要求 1 或 5 的式(I)合成肽和一种或多种 HIV-1 和/或 HIV-2 的重组或合成肽的组合物。

16.一种用于体外检测 O 组 HIV－1 病毒感染的免疫分析方法，其方法包括使用一种或多种根据权利要求 1-11 任一项的式(I)合成肽。

17.一种用于体外检测 O 组 HIV－1 病毒感染的免疫分析方法，其方法包括使用根据权利要求 12-15 任一项的组合物。

18.一种诊断试剂盒，其包括至少一种根据权利要求 1-11 任一项的式(I)合成肽或根据权利要求 12-15 任一项的组合物。

可用于检测O组HIV-1病毒感染的生物试验的合成肽

本发明涉及可用于检测 O 组 HIV-1 病毒感染的生物试验的合成肽，它们的制备方法，包含这些肽的组合物和试剂盒以及使用这些肽的生物试验。

现有技术已知 O 组 HIV-1 逆转录病毒。专利 EP0,345,375 和专利申请 EP0,657,532 描述了从卡麦隆病人分离的 ANT 70 和 ANT 70 NA 分离物。这些文献更具体地描述了和包含这些分离物的裂解物或蛋白的抗原和抗原组合物，对应于基因组 RNA 的核酸，使用这些核酸的杂交方法，制备上述分离物的方法以及制备这些逆转录病毒的p12、p16、p25、gp41和gp120蛋白的方法。

申请 EP0,591,914 描述了 MVP5180/91 分离物。如以前的分离物，通过蛋白质印迹表征的该分离物显示与已知很长时间的 HIV-1 逆转录病毒分离物有差异。申请EP0,591,914精确地描述了MVP5180/91分离物的DNA序列并精确地定位了 gag，pol 和 env 基因。申请 EP 0,591,914 进一步描述了 V3 环的合成肽以及免疫显性区(gp41)。它们可用于生物试验，尤其是用于体外检测组O HIV-1抗体。

申请 EP 0,673,948 描述了由 15-50 个氨基酸(AA)组成并包含序列-VWGIRQLRARLQALETLIQNQQRLNLWGXKGKLIXYTSVKWNTSWSGR-的合成或重组肽，其中 X 代表半胱氨酸残基或丝氨酸残基。这些肽可用于诊断领域，用于检测一些O组HIV-1逆转录病毒分离物的感染。

还已知申请 EP0,727,483 描述了形成属于 O 组 HIV-1 家族的逆转录病毒一部分的 MVP2901/94 分离物。该申请描述了一些具有充分确定的肽序列的抗原。这些肽序列对应于 MVP2901/94 分离物的 gp120 序列的一部分和 gp41 的一部分(免疫显性区)。

申请 WO96/12809 描述了两种属于 O 组 HIV-1 家族的新的分离物。它们为 VAU 和 DUR 分离物。该申请描述了一些来自上述两种病毒的可用于

检测识别 HIV-1 VAU 或 DUR 肽序列的抗体的肽序列。

申请 WO96/32293 描述了来自 ANT 70 分离物序列的两种抗原。它们为 gp41 的免疫显性区的被称为 MDL061 的抗原和抗原 MDL056。根据本发明，为了检测 100% 的来自被 O 组 HIV-1 病毒感染的病人的有限血清收集物的样品，必须使用包含这两种肽的组合物，因为每种分离的肽其本身不能获得满意的结果。

的确，根据 O 组病毒分离物显示的遗传可变性，通过使用来自相同和唯一分离物的抗原保证感染个体的血清学筛选几乎是不可能的。这意味着不可能获得保证 100% 灵敏度的试剂。因此，O 组首次成为重要问题；即某血清学试剂不能充分识别被特别不同的组或亚类感染的个体。对于 O 组 HIV-1 病毒尤其是这种情况。

申请 WO96/40763 还强调 O 组的很大的差异性。该申请描述了将一些较小的修饰(一个或两个氨基酸置换)掺入至天然 B 型 HIV-1 序列中的肽。根据该申请，这些杂合肽能与抗 O 组抗体反应。

申请 WO96/27013 描述了一系列被称为 BCF01、BCF02、BCF03、BCF06、BCF07、BCF08、BCF09、BCF11、BCF12、BCF13 和 BCF14 的新的 O 组 HIV-1 病毒以及一系列被称为 ESS/BCF02、FAN/BCF01、LOB/BCF06、MAN/BCF07、NKO/BCF08、POC/BCF03、NAM/BCF11、BCF09、BCF12、BCF13 和 BCF14 的相应的 gp41 免疫显性区的肽。由于其低溶解性，尤其是肽 BCF13，许多这些肽难于在诊断中应用。

出乎意料地，现发现一些合成肽为具有优异品质的诊断试剂，它们使得能满意地筛选被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的病人。这些肽由在高度保守的短序列周围连接的可变序列组成，所述保守序列存在于O组HIV-1逆转录病毒所有分离物中。本发明的肽使得能获得优于用带有一些 O 组 HIV-1 分离物的 gp41(env)的免疫显性表位的合成肽所获得的结果。

以下将使用三字母命名法来命名氨基酸。

本发明的合成肽对应于通式(I)：

Δ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ω (I)

其中

-Δ代表生物素残基、生物胞素残基、氢原子、乙酰基(CH_3CO-)、可含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，脂族链优选为 1 至 6 个碳原子的烷基链或 2 至 6 个碳原子的链烯基链，或 2 至 6 个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z 代表式(II)-(X)之一的肽序列:

$-\Xi_1$-Ser-Ξ_2- (II)

-Ser-Ξ_2- (III)

$-\Xi_1$-Ser- (IV)

$-\Xi_1$-Gln-Ξ_2- (V)

-Gln-Ξ_2- (VI)

$-\Xi_1$-Gln- (VII)

$-\Xi_1$-Asn-Ξ_2- (VIII)

-Asn-Ξ_2- (IX)

Ξ_1-Asn- (X)

其中

$-\Xi_1$ 代表 0-9 个氨基酸的肽序列，和

$-\Xi_2$ 代表 0-5 个氨基酸的肽序列，

-Θ代表式(XI)的肽序列:

$-(AA_1)-(AA_2)-(AA_3)-(AA_4)-(AA_5)-$ (XI)

其中:

- (AA_1)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，
- (AA_2)代表甘氨酸残基或天冬酰胺残基，
- (AA_3)代表赖氨酸或精氨酸残基，或鸟氨酸残基，
- (AA_4)代表亮氨酸残基，或丙氨酸残基或异亮氨酸残基或谷氨酰胺残基，

●(AA_5)代表异亮氨酸残基，或缬氨酸残基或亮氨酸残基或苏氨酸残基，或正亮氨酸残基或正缬氨酸残基，

前提是(AA_1)、(AA_2)、(AA_3)、(AA_4)和(AA_5)不一起形成肽序列-LysGlyLysLeuIle和-LysGlyLysLeuVal-，

与丝氨酸的-CO-基团相连的Ω代表：

-羟基(-OH)基团或氨基($-NH_2$)基团，

-包含1-6碳原子的烷氧基基团，

-式(XII)的肽序列：

-Val-Σ-Ψ (XII)

其中Σ代表式(XIII)或式(XIV)序列

-(AA_6)-Trp Asn-(AA_7)-(AA_8) (XIII)

-(AA_6)-Trp His-(AA_7)-(AA_8) (XIV)

其中：

●(AA_6)代表不同于赖氨酸的氨基酸，

●(AA_7)代表一个氨基酸，

●(AA_8)代表丝氨酸或苏氨酸残基，

与游离 AA_8 氨基酸的-CO-残基相连的Ψ代表 OH 或 NH_2 基团或包含 1-6 个碳原子的烷氧基基团，

-式(XV)的肽序列：

-Val-Ψ (XV)

其中与缬氨酸-CO-残基相连的Ψ具有如式(XII)中相同的含义，

-或式(XVI)-(XVIII)之一的肽序列：

-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ψ (XVI)

Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVII)

Val-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Ψ (XVIII)

其中 Z 和Θ具有式(I)给定的定义，Σ具有式(XII)给定的定义，与丝氨酸的-CO-残基、AA_8 氨基酸的-CO-残基或缬氨酸的-CO-残基相连的Ψ具有如式(XII)中相同的含义。

当Ω代表式(XVI)-(XVIII)之一的肽序列时，式(I)的肽变为其大小可从 26 变化至 66 个氨基酸的二聚体。当Ω不代表式(XVI)-(XVIII)之一的肽序列时，式(I)的肽为单体类型并且其大小可从 13 个氨基酸变化为 33 个。

本发明的肽可为线性形式或为通过半胱氨酸之间的二硫桥环化的形式。

优选其中(AA_5)代表缬氨酸残基，或亮氨酸残基或苏氨酸残基的式(I)化合物，并且当Ω对应于式(XII)的肽序列时，(AA_6)代表谷氨酰胺或精氨酸残基。

优选式(I)的肽，其中

-Δ代表生物素残基、氢原子、可包含一个或两个巯基、醛或胺官能基团的脂族链，脂族链优选为 1 至 6 个碳原子的烷基链，或 2 至 6 个碳原子的氨基烷基羰基链，

-Z 代表式(II)或(V)的肽序列—其中$Ξ_1$ 代表两个氨基酸的肽序列和$Ξ_2$ 代表一个氨基酸，或式(IV)的序列—其中$Ξ_1$ 代表三个氨基酸，或式(VIII)的肽序列—其中$Ξ_1$ 代表九个、八个或三个氨基酸的肽序列和$Ξ_2$ 代表五个氨基酸的肽序列，

-Θ代表下式的肽序列:

-Lys Gly Arg Leu Val-,

-Arg Gly Lys Ala Val-,

- Arg Gly Arg Leu Val-,

或

-Arg Gly Arg Ala Val-,

和

-Ω代表羟基、肽序列(XV)或对应于式(XII)肽序列的下列序列之一:

- Val Arg Trp Asn Glu Thr-Ψ,

- Val Gln Trp Asn Glu Thr-Ψ

或

- Val Gln Trp Asn Ser Thr-Ψ.

优选地，Z代表下式的肽序列：

- -Leu Leu Ser Ser-
- -Leu Leu Asn Ser-
- -Leu Leu Gln Ser-
- -Arg Leu Asn Ser-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu-
- -Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile-
- -Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-

或

- -Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-

同样形成本发明一部分的是包含 20 至 50 个氨基酸并对应于式(Ia)的合成肽：

$$\Delta\text{-}Z_a\text{-TrpGlyCys-}\Theta\text{-CysTyrThrSer-}\Omega_a \qquad \text{(Ia)}$$

其中Za代表式IIa-Xa的基团：

Ξ_{1a}-Ser-Ξ_{2a}	(IIa)
-Ser-Ξ_{2a}	(IIIa)
-Ξ_{1a}-Ser	(IVa)
Ξ_{1a}-Gln-Ξ_{2a}	(Va)
-Gln-Ξ_{2a}	(VIa)
Ξ_{1a}-Gln-	(VIIa)
Ξ_{1a}-Asn-Ξ_{2a}	(VIIIa)
-Asn-Ξ_{2a}	(IXa)
-Ξ_{1a}-Asn	(Xa)

其中

-Ξ_{1a}代表 1－15 个氨基酸的肽序列，和

-Ξ_{2a}为一个氨基酸，

-Ωa 如式(I)所定义代表式(XII)的肽序列，或式(XVIIa)的肽序列：

Val-Σ-Z_a-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ (XVIIa)

其中 Za 具有式(Ia)指定的含义，及

Δ、Θ、Σ和Ψ具有如式(I)的相同含义。

优选包含下面序列的式(I)或(Ia)的肽(这些肽可为如上所定义的二聚体形式或单体形式)。根据一字母和三字母命名法给出序列。

序列 No. 1

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

或

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Ser Thr-
22

序列 No. 5

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

或

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Ser Thr-
22

序列 No. 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 8

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

或

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

序列 No. 9：

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

或

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
1 5 10 15

序列 No. 10：

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

或

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
1 5 10 15

序列 No. 11：

-ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

或

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

序列 No. 12：

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-

或

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

序列 No. 13：

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-

或

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

序列 No. 14：

-LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

或

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr
1 5 10 15
Thr Ser Val-
20

序列 No. 15：

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

或

- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys
1 5 10 15
Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-
20 25

序列 No. 16：

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

或

- Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-
1 5 10 15

下列合成肽是特别优选的肽：

肽 No. 1 (2B) : SEQ ID No. 1

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20

Glu Thr
22

肽 No. 2 (3B) : SEQ ID No. 2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20

Glu Thr
22

肽 No. 3 (4B) : SEQ ID No. 3

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20

Glu Thr
22

肽 No. 4 (5B) : SEQ ID No. 4

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

或

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20

Ser Thr
22

肽 No. 5 (6B) : SEQ ID No. 5

LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

或

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Ser Thr

22

肽 No. 6 : SEQ ID No. 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

肽 No. 7 : SEQ ID No. 7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

肽 No. 8 (7B) : SEQ ID No. 8

LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

肽 No. 9 (12B) : SEQ ID No. 9

LLSSWGCKGRLVCYTS

或

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

1 5 10 15

肽 No. 10 (14B) : SEQ ID No. 10

LLNSWGCKGRLVCYTS

或

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser

1 5 10 15

肽 No. 11 (18B) : SEQ ID No. 11

ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET

或

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

肽 No. 12 (19B) : SEQ ID No. 12

ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET

或

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

肽 No. 13 (20B) : SEQ ID No. 13

ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET

或

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

1 5 10 15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr

20 25 30

肽 No. 14 (21B) : SEQ ID No. 14

LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

或

Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1 5 10 15

Thr Ser Val

20

肽 No. 15 (22B) : SEQ ID No. 15

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

或

Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1 5 10 15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

20 25

肽 No. 16 (23B) : SEQ ID No. 16

RLNSWGCKGRLVCYTSV

or

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val

1 5 10 15

可按照常规方法通过固相合成获得作为本发明主题的式(I)的合成肽: R.B.Merrifield,美国化学协会杂志(1963), 85, pp.2149-2154; R.C.Sheppard,"肽 1971", Nesvadba H.(编)北荷兰,阿姆斯特丹, pp.111; E. Atherton和R.L.Sheppard,"固相肽合成,实用方法", IRL PRESS (1989), Oxford University Press, pp.25-34. 作为自动合成仪, 可使用来自Millipore的合成仪"9050 Plus Pep Synthesizer"或等同的合成仪.

用于合成的固相载体应与所使用的技术和化学性质相容. 例如, 对于在合成仪"9050 Plus Pep. Synthesizer"上合成, 推荐使用适宜于所谓的"连续流动"技术的树脂; PEG PS 树脂满足这些标准. 这些载体由位于聚苯乙烯珠功能团和第一个氨基酸的连接点之间的基于聚乙二醇(PEG)的臂(间隔臂)组成. 该锚定点的特性可根据所选择的 C-末端官能基团而变化. 在本发明的情况下, 使用各种PEG-PS树脂.

起始树脂和作为原料使用的氨基酸为有商业供应的产品(PerSeptive-Biosystem, 或 Néosystem).

对于肽合成, 使用了下面的侧链保护基团:

氨基酸	保护基团
精氨酸	2,2,4,6,7-五甲基-二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)
天冬酰胺, 谷氨酰胺	三苯甲基(Trt)
半胱氨酸	三苯甲基(Trt)或乙酰氨基甲基(Acm)
丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸	叔丁基醚(tBu)
赖氨酸, 色氨酸	叔丁氧羰基(Boc)

所用氨基酸的α位的伯胺官能基团的暂时的保护为 9-芴基甲氧羰基(Fmoc)基团. 用20%的哌啶/二甲基甲酰胺溶液进行去保护.

为了偶联, 优选使用过量的二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)和 1-羟基苯并三唑(HOBt).

合成后, 将树脂用有机溶剂(二甲基甲酰胺, 接着是二氯甲烷)洗涤, 真空干燥并接着用冷却至 0℃并包含适宜"清除剂"的三氟乙酸(TFA)溶

液处理。可使用例如包含 82% 三氟乙酸、5% 苯酚、5% 水、5% 苯甲硫醚和 3% 乙二硫醇的 K 试剂。

过滤树脂后，沉淀合成的肽并用乙醚漂洗。

通过反向液相色谱纯化合成的肽，通过质谱测定其纯度。作为固定相，可使用例如 Bondapak C-18 相。通过在两种缓冲液中形成线性梯度来洗脱肽，第一种本质上为水溶液(例如水-0.1% TFA)，第二种近乎有机溶液(例如包含 60% 乙腈，39.92%水和 0.08%TFA 的混合物)。混合收集的纯的级分，真空浓缩并冷冻。

为了环化，将纯化的合成肽溶解在乙酸铵溶液(10mM)中。通过加入 1M 氢氧化铵将 pH 调至 8.5。剧烈搅拌溶液。18 小时后完成环化。通过加入乙酸将 pH 降至 6。将环化的肽冷冻干燥，接着如上所述通过反向液相色谱纯化。

借助于主要为卡麦隆来源的被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的病人的血清来评价本发明肽的免疫反应性。进行的各种试验表明，本发明的肽单独或结合(肽的组合物)使得能检测 100% 的被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的血清。

因此本发明的合成肽在用于检出 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的免疫试验中找到了应用。还可使用一些式 I 的合成肽的组合。可包含两种或多种式 I 肽的这些组合也组成本发明的一部分。优选包含肽 No.1(2B)和 No.3(4B)的组合。

还可与可通过常规方法获得的并具有例如申请 EP0,591,914 中描述的序列的 O 组 HIV-1 重组肽(重组蛋白)结合使用本发明式(I)的合成肽。这些组合物也在本发明的范围内。

本发明的合成肽还可与其它 HIV-2 和/或 HIV-1 重组(重组蛋白)或合成肽，如专利申请或专利 EP0,387,914，EP0,239,425，EP0,220,273 或 EP0,267,802 中描述的肽结合使用。这些专利申请或专利不是穷举性的，只是给出作为实例。

包含一种或多种式(I)合成肽和一种或多种 HIV-1 或 HIV-2 重组或合成肽的组合物在用于检出被各种 HIV 逆转录病毒感染的病人的诊断中找

到了应用. 这些组合物也构成本发明的一部分。

单独或与 O 组 HIV-1 重组肽或 HIV-1 和/或 HIV-2 重组或合成肽结合使用一种或多种式(I)的合成肽的免疫分析也构成本发明的一部分。

本发明还涉及用于进行免疫分析的包括式(I)肽的试剂盒或包含至少一种式(I)肽的组合物。

下面的实施例说明本发明但并是不限制性的.

实施例 1:

本发明的化合物的制备: 肽 No.2(3B)

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

或

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

在固相上合成该肽. 由 Merrified 于 1963 年开发的技术(美国化学协会杂志(1963)85,pp.2149-2154)是将第一个氨基酸通过其酸官能团连接至聚合物固体载体(树脂)上, 以及从该第一个氨基酸延伸肽序列, 合成中的肽保持锚定在树脂上.

对于肽 No.2 的合成, 作为合成仪, 使用了合成仪“9050 Plus Pep Synthesizer”, 并且用树脂 Fmoc Thr(OtBu)PEG PS 作为树脂.

合成的各步骤总结在下面表 1 中:

表 I

氨基酸残基	NH_2 保护	侧链保护	偶联方法	当量数－偶联时间
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min

在合成的最后，将树脂用二甲基甲酰胺洗涤并接着用二氯甲烷洗涤并真空干燥。

接着，将树脂用 K 试剂(82％三氟乙酸；5％苯酚；5％水；5％苯甲硫醚，3％乙二硫醇)处理。通过用乙醚沉淀分离肽 No.2(3B)，接着用相同溶剂漂洗。由此获得 140mg 肽 No.2(3B)。

然后将肽 No.2(3B)通过反相液相色谱纯化。使用 Bondapak C-18 柱作为固定相。在两种缓冲溶液之间形成线性梯度来洗脱该肽，第一种基本为水溶液（例如水－0.1%TFA），第二种近于有机溶液（例如含 60％乙腈、39.92%水和 0.08%TFA 的混合物）。合并所收集的纯级分，真空浓缩并冷冻干燥。

为了进行环化，将如此得到的纯化肽溶解在乙酸铵溶液（10mM）中。加入 1M 氢氧化铵调 pH 至 8.5。剧烈搅拌该溶液，18 小时后完成了环化。然后加入乙酸将 pH 降至 6。将环化的肽冻干，然后如上所述通过反相液相色谱纯化。

本发明化合物的制备：肽 No.15(22B)

如肽 No.2(3B)那样合成了该肽，但使用树脂 FmocPAL PEG-PS。

合成的各个步骤总结在下表 II 中：

表 II

氨基酸残基	NH_2 保护	侧链保护	偶联方法	当量数－偶联时间
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Lys	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ala	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn

在合成的最后，用二甲基甲酰胺，然后用二氯甲烷洗涤树脂，并真空干燥。

随后，用 K 试剂（82% 三氯乙酸、5% 苯酚、5% 水、5% 苯甲硫醚、3% 乙二硫醇）处理该树脂。用乙醚沉淀分离后，肽 No.7(22B)用相同溶剂漂洗。这样得到 140mg 肽 No.15(22B)。

接着通过反向液相色谱纯化肽No.15(22B)，接着如上对于肽No.2(3B)所述进行环化、冷冻干燥并纯化。

以相同方式，并且使用适宜的树脂和氨基酸合成了其他的本发明化合物。

表 III 表示通过质谱测定的非环化形式的一些式(I)肽的分子量。

表 III

肽序号	分子量（道尔顿）
1 (2B)	2512
2 (3B)	2583
3 (4B)	2528
4 (5B)	2586
5 (6B)	2527
9 (12B)	1772
10 (14B)	1799
11 (18B)	3752
12 (19B)	3778
13 (20B)	3780
14 (21B)	2538
15 (22B)	3222
16 (23B)	1941

实施例 2:

通过免疫酶试验对本发明肽的免疫反应性的评价: 试验 No.1

使用的 ESS、DUR、VAU 和 HAD 血清为来自被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的法国病人的血清。其它被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染病人的血清样品通过卡麦隆的 Yaoundé Pasteur 中心获得并根据“爱滋病杂志(AIDS)”(1977), 11, pp.445-453 中描述的血清学方法血清分型为 O 组。

从健康的自愿者中获得 HIV-阴性血清(n=48)

将使用的合成肽以 1mg/ml 的浓度溶解在水中(贮液)。为了固相敏化步骤(包被), 将 110μl 的 2μg/ml 各种肽(通过将贮液用 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释获得)加入至微量滴定平板 Microtiter™(NUNC)的各孔中。在室温下保温过夜后, 首先将微量平板用包含 0.1%Tween®20 和 0.001%硫柳汞钠的 Tris-NaCl 缓冲液溶液(pH7.4)洗涤, 接着用包含 0.5% Regilait™(干脱脂奶粉)的 PBS 溶液饱和。在抽出饱和溶液后, 50℃下将平板加热 10 分钟。

将血清样品用脱脂奶粉溶液(补充有 0.01%苯酚红, 0.25%氯仿和 0.25% Kathon®的柠檬酸缓冲液中)以 1/5 进行稀释, 沉积在平板的各孔中并在 40℃下保温 30 分钟。

在用包含 0.1% Tween®20 和 0.001%硫柳汞钠的 Tris-NaCl 缓冲液溶液(pH7.4)洗涤后, 将 100μl 由辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 和 IgM 山羊抗体偶联物的包含 0.01%硫柳汞钠作为保存剂的柠檬酸缓冲液溶液加入至各孔中, 接着在 40℃下将平板保温 30 分钟, 其中该柠檬酸缓冲液中补充有 30%甘油和 25%正常胎牛血清。

在用包含 0.1% Tween®20 和 0.001%硫柳汞钠的 Tris-NaCl 缓冲液溶液(pH7.4)洗涤后, 通过向各孔中加入 100μl 邻苯二胺的过氧化氢溶液显色。接着将微量平板在室温以及黑暗中保温 30 分钟。通过加入 100μl 4N 硫酸终止产色反应。在 490nm 和 620nm 测定吸光率(A)。

各孔中读取的相对吸光率(A490-A620)与各肽的免疫反应性成正比。它表明各肽与进行试验的生物样品反应的能力。阈值被确定为等于 0.15 的吸光度。它相当于阴性值的平均值(n=48)加上 12 个标准偏差。

将本发明肽(肽 No.3(4B), 肽 No.2(3B)和肽 No.1(2B), 均为环化形式)的反应性与具有 VAU 分离物(O 组 HIV-1 逆转录病毒)的被膜(env)天然

序列一部分并包含 gp 41 的免疫显性表位的两种合成肽的反应性进行了比较。

这两种肽具有下面的序列:

VAU 22 AA

Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn
1 5 10 15 20
Lys Thr
22

VAU 35 AA

Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Phe Ile Glu Glu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys
1 5 10 15 20
Lys Asn Arg Ala Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Lys Thr
25 30 35

为了该研究，使用环化形式的这些肽。研究结果示于表 IV 中。

表 IV

血清	吸光度				
	肽 No. 3 (4B)	肽 No. 2 (3B)	肽 No. 1 (2B)	VAU 22 AA	VAU 35 AA
ESS*	>**	>	2.494	>	>
DUR*	>	>	>	0.118	0.872
HAD	>	0.518	0.041	0.789	0.871
VAU*	1.342	>	>	>	>
3935	>	0.893	0.307	0.138	0.227
6891	>	0.614	0.062	0.359	0.496
6512*	0.746	0.785	>	0.120	0.174
1105*	1.421	1.031	>	0.099	0.129
4021*	0.430	0.119	>	0.050	1.957
5969*	>	0.282	>	2.491	>
2700	>	0.274	>	>	>
5453	0.555	0.081	>	1.267	1.482
5931	>	>	>	0.202	2.225
3136	>	0.992	0.302	>	>
3653	1.352	>	0.044	1.441	1.322
2352	>	>	0.205	>	>
3016	>	>	0.243	>	>
3302	>	>	0.386	>	>
2294	>	>	0.447	>	>
3771	>	>	0.544	>	>
1581	>	>	>	1.112	0.894
5373	>	>	>	1.359	0.856
7443	>	>	>	0.920	0.574
3637	>	>	>	0.779	1.647
6295*	1.718	1.063	>	0.972	>
6689*	0.710	>	>	>	>
1754	>	>	>	1.263	1.948
4489*	>	>	>	1.318	1.718
4364	>	>	1.382	>	>
3884*	>	>	1.839	>	>
3529	>	>	1.803	>	>
3482	2.402	>	1.473	>	>
1702	>	>	1.162	>	>
6487	>	1.017	2.687	2.889	2.891
5164	>	>	>	>	>
5766*	>	>	>	>	>
3945	>	>	>	>	>

* 血清型/基因型

**>表示信号大于分光光度计的读程。

表 IV（续）

血清	吸光度				
	肽 No. 3 (4B)	肽 No. 2 (3B)	肽 No. 1 (2B)	VAU-22 AA	VAU 35 AA
4434	>	>	>	2.273	>
4288*	>	>	2.802	2.337	N.T.***
6782	>	2.091	2.462	2.190	2.214
2313	>	>	>	>	>
2312	>	>	>	>	>
1062	>	>	>	>	>
402	>	>	>	>	>
134	>	>	>	>	>
7120	>	>	>	>	>
7212	>	>	>	>	>
6976*	>	>	>	>	>
3600*	>	>	2.743	>	>
3236	>	>	>	>	>
3235	>	>	>	>	>
2551	>	>	>	>	>
5270*	>	>	>	>	>
5210	>	>	>	>	>
5149*	>	>	>	>	>
4477	>	>	>	2.511	>
3891	>	>	2.780	>	>
3627*	>	>	2.910	>	>
7258*	>	>	2.477	>	>
7007	2.136	2.334	>	>	2.151
6697	>	>	>	>	>
6998	>	>	>	>	>
6627	>	>	>	>	>
6198*	>	>	>	>	>
6165	>	>	2.714	>	>
7439	>	>	>	>	>
7297*	>	>	>	>	>
6111	>	>	>	>	>
625	>	>	>	>	2.885

* 血清型/基因型

** >表示信号大于分光光度计的读程。

*** 未测

表 IV 结果表明根据对其它肽的观察，肽 No.3(4B)显示最好的性能。与具有对应于 gp41 的免疫显性表位的 VAU 分离物部分序列的两种肽比较，该肽使得能最好地辨别被 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染的病人血清。而且，本发明的肽No.2(3B)和No.1(2B)比包含相同数目氨基酸的VAU 22 AA肽免疫反应性高。

实施例 3:

通过免疫酶试验对根据本发明的肽的免疫反应性的评价: 试验 No.2

来自 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染病人的血清样品通过卡麦隆的 Yaounde Pasteur 中心获得，并根据“爱滋病”(1977)，11，pp.445-453 中描述的血清学方法被血清分型为 O 组。从美国获得基因分型的样品(Maryland)。为了对于不同的免疫反应性试验具有足够体积，事先将这些样品以表 V 给出的稀释度稀释在阴性人血清中。

将使用的合成肽以 1mg/ml 的浓度溶解在水中(贮液)。对于固相敏化步骤(包被)，如对实施例 2 所描述的进行该过程。

将血清样品用脱脂奶粉溶液(补充有 0.01%苯酚红，0.25%氯仿和 0.25% Kathon®的柠檬酸缓冲液中)以 1/5 进行稀释，沉积在平板的各孔中并在 40℃下保温 30 分钟。

在用包含 0.1% Tween®20 和 0.001%硫柳汞钠的 Tris-NaCl 缓冲液溶液(pH7.4)洗涤后，将 100μl 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 和 IgM 山羊抗体偶联物的包含 0.01%硫柳汞钠作为保存剂的柠檬酸缓冲液溶液加入至各孔中，接着在 40℃下将平板保温 30 分钟，其中该柠檬酸缓冲液中补充有 30％甘油和 25％正常胎牛血清。

在用包含 0.1% Tween®20 和 0.001%硫柳汞钠的 Tris-NaCl 缓冲液溶液（pH7.4）洗涤后，如实施例 2 所描述进行显色。

各孔中读取的相对吸光度(OD)(A490-A620)与各肽的免疫反应性成正比。它表明各肽与进行试验的生物样品反应的能力。

将环化形式的本发明的肽：肽 No.10(14B)、NO.11(18B)、No.12(19B)、No.14(21B)、NO.15(22B)、No.16(23B)的反应性与具有 O 组 HIV-1 逆转录病毒的被膜(env)天然序列一部分序列的三种同源合成序

列比较. 这些肽为来自 VAU 分离物的两种肽-肽 VAU22AA 和肽 VAU35AA-和肽 MVP5180(在表 V 中称为“MVP5180”). 肽 VAU22AA 和 VAU35AA(其结构示于实施例 2 中)和肽 MVP5180 包含 gp41 的免疫显性表位.

所有这些肽以环化形式使用. MVP5180 肽的序列如下:

MVP 5180

Arg Leu Gln Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Arg Leu Asn Leu Trp Gly Cys
1 5 10 15 20
Lys Gly Lys Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Thr Ser
25 30 35

研究结果示于表 V 中.

表 V

血清	肽*								
	No. 10	No. 11	No. 12	No. 14	No. 15	No. 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	吸光度(OD)								
4280 1/50	0.022	0.686	0.201	0.286	0.689	0.033	0.382	0.013	0.021
NGO 1/50	0.067	0.335	0.193	0.157	0.315	0.110	0.184	0.055	0.040
NJEM 1/100	0.032	0.811	0.391	0.277	0.939	0.025	0.146	0.159	0.024
MBASSI 1/100	1.217	1.150	0.747	2.134	2.010	2.683	0.248	0.120	0.257
WANG 1/50	0.698	0.234	0.124	2.397	2.680	1.290	0.075	0.025	0.041
258 OUDI 1/100	0.587	0.373	0.226	0.764	1.184	1.692	0.116	0.058	0.100
DO15 1/100	1.613	0.859	1.286	3.357	3.693	3.038	0.673	0.036	0.075
DJOU 1/100	1.268	0.482	0.419	1.998	2.088	2.166	0.203	0.022	0.042
3600 1/100	0.482	0.360	0.249	0.716	0.801	0.933	0.206	0.025	0.058
3613 1/100	1.108	0.837	0.773	1.508	1.627	1.679	0.478	0.250	0.396
6111 1/100	0.596	0.348	0.202	0.850	1.207	1.009	0.226	0.087	0.180
625 1/50	0.838	0.338	0.264	2.045	2.122	1.791	0.202	0.069	0.165
Maryland 1/100	0.524	0.370	0.285	0.734	0.844	1.229	0.241	0.054	0.168
3653 1/10	0.347	0.337	0.247	0.072	0.380	0.406	0.401	0.021	0.310

固相*: 2μg/ml 肽

对于各种试验的肽，根据在波长 A492－A620 处读取的各种相对吸光度水平将样品分成 4 类(a, b, c, d)：

- - a : OD < 0.100,
- - b : 0.100 < OD < 0.500,
- - c : 0.500 < OD < 1.000,
- - d : OD > 1.000,

这样就可评价肽的免疫反应性的程度。免疫反应性最大的肽为在对应于最高吸光度值的类型中发现的最高样品数的那些。

结果示于表 VI 中。

表 VI

分类	肽*								
	No. 10	No. 11	No. 12	No. 14	No. 15	No. 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	样品数								
A	3	0	0	1	0	2	1	11	7
B	2	9	11	3	2	2	12	3	7
C	5	4	2	4	4	1	1	0	0
D	4	1	1	6	8	9	0	0	0

固相*： 2μg/ml 肽

结果表明试验的本发明所有肽比来自天然分离物(MVP5180, VAU)的现有技术的参考肽在免疫反应性上具有更好的性能。本发明的肽 No. 15(22B)、No. 14(21B)和 No. 16(23B)显示为免疫反应性最大的。

实施例 4

通过免疫酶试验对包含多个本发明肽的组合的免疫反应性的评价

对于本试验，根据实施例 2 描述的方法进行操作，使用相同的血清。用环化的肽 No. 1(2B)、环化的肽 No. 3(4B)或包含这两种肽(1:1w/w)的组合物敏化所用的微量平板。向各孔沉积 100μl 包含 2μg/ml 肽 No. 1(2B)的溶液，或 100μl 包含肽 No. 3(4B)的溶液，或包含 1μg/ml 肽 No. 1(2B)和 1μg/ml 肽 No. 3(4B)的溶液。

本试验结果示于表 VII.

表 VII

血清	吸光度		
	肽 No. 1 (2B) (2 μg/ml)	肽 No. 3 (4B) (2 μg/ml)	肽 No. 1 (2B) (1μg/ml) + 肽 No. 3 (4B) (1 μg /ml)
3529	1.803	>*	>
1105	>	1.421	>
3891	2.780	>	>
3235	>	>	>
2700	>	>	>
5931	>	>	>
3935	0.307	>	>
7443	>	>	>
1062	>	>	>
1754	>	>	>
3136	0.302	>	>
6891	0.062	>	>
5149	>	>	>
5270	>	>	>
2551	>	>	>
3600	2.743	>	>
6976	>	>	>
4489	>	>	>
6165	2.714	>	>
6198	>	>	>
6627	>	>	>
6998	>	>	>
6697	>	>	>
7258	2.477	>	>
3627	2.910	>	>
4477	>	>	>
3771	0.544	>	>
1702	1.016	>	>
2294	0.447	>	>
2352	0.205	>	>
3016	0.243	>	>
3302	0.386	>	>
3482	1.473	>	>
3653	0.044	1.322	1.105
4364	1.382	>	>
3637	>	>	>
4288	2.802	>	>
5969	>	>	>
258	>	>	>

* >表示信号大于分光光度计的读程。

表 VII（续）

血清	吸光度		
	肽 No. 1 (2B) (2 μg/ml)	肽 No. 3 (4B) (2 μg/ml)	肽 No. 1 (2B) (1 μg/ml) + 肽 No.° 3 (4B) (1 μg /ml)
6111	>	>	>
625	>	>	>
6853	>	2.769	>
3136	0.302	>	>
6689	>	0.710	>
6295	>	1.718	>
4021	>	0.430	2.381
3884	1.839	>	>
6512	>	0.746	>
6487	2.687	>	>
ESS	2.494	>	>
HAD	0.041	>	>
DUR	>	>	>

* >表示信号大于分光光度计的读程.

表 VII 的结果表明当用于诊断时，本发明的肽组合使得能检测所有来自 O 组 HIV-1 逆转录病毒感染病人的血清.

序列表

(1)一般信息:

(i)申请人:

(A) 姓名: Pasteur Sanofi Diagnostics

(B) 街道: 3 boulevard Raymond Poincare

(C) 城市: Marnes la Coquette

(E) 国家: 法国

(F) 邮编(ZIP): 92430

(G)电话: 0153774000

(H)电传: 0153774133

(ii)发明名称: 可用于检测O组HIV-1病毒感染的生物试验的合成肽

(iii)序列数目: 16

(iv)计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0,版本#1.25(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

```
Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 2的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

```
Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 3的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3:

```
Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 4的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:

```
Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Ser Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 5的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5:

```
Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Ser Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 6的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6:

```
Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO:7的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

```
Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15
```

```
Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 8的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

```
Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
            20
```

(2) SEQ ID NO: 9的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 16个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:9:

```
Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15
```

(2) SEQ ID NO: 10的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 16个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:10:

```
Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15
```

(2) SEQ ID NO: 11的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 32个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:11:

```
Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly
1               5                  10                  15

Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
            20                  25                  30
```

(2) SEQ ID NO: 12的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 32个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:12:

```
Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly
1               5                  10                  15

Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
            20                  25                  30
```

(2) SEQ ID NO: 13的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 32个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:13:

```
Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly
1               5                  10                  15

Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
            20                  25                  30
```

(2) SEQ ID NO: 14的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 22个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:14:

```
Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu
1               5                  10                  15

Val Cys Tyr Thr Ser Val
            20
```

(2) SEQ ID NO: 15的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 28个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 15:

```
Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp
1               5                  10                  15

Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val
            20                  25
```

(2)SEQ ID NO: 16的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 17个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO.16:

```
Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1               5                  10                  15

Val
```