

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4166940号
(P4166940)

(45) 発行日 平成20年10月15日(2008.10.15)

(24) 登録日 平成20年8月8日(2008.8.8)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569	H
CO 7 K 14/16	(2006.01)	CO 7 K 14/16	
C 1 2 Q 1/70	(2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
CO 7 K 7/00	(2006.01)	CO 7 K 7/00	
CO 7 K 14/00	(2006.01)	CO 7 K 14/00	

請求項の数 13 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-505338 (P2000-505338)	(73) 特許権者	591099809
(86) (22) 出願日	平成10年7月31日 (1998.7.31)		バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2001-512037 (P2001-512037A)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
(43) 公表日	平成13年8月21日 (2001.8.21)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/016160		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W01999/006599	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成11年2月11日 (1999.2.11)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成14年2月20日 (2002.2.20)	(74) 代理人	100087871
審査番号	不服2005-11555 (P2005-11555/J1)		弁理士 福本 積
審査請求日	平成17年6月20日 (2005.6.20)	(74) 代理人	100087413
(31) 優先権主張番号	08/904,826		弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成9年8月1日 (1997.8.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIVウイルスに対して免疫反応性である抗体の検出用の合成抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液中の HIV に対する抗体の存在を測定する方法であって、以下のステップ：

(a) 免疫特異的結合を可能にする条件下で、上記体液と、下記のアミノ酸配列：

(IV) BRU124F3X

W-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-
Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-
Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-
Gln-Asp-Asn-Z

{ 上記配列中、Wはポリペプチドのアミノ末端 NH₂ 基の H であるか、又は当該ポリペプチドのアミノ末端 NH₂ 基に結合した 1 若しくは複数の追加のアミノ酸であり、当該追加のアミノ酸は担体タンパク質又は支持体への当該ポリペプチドの結合を促進するために選択され；そして Z は OH 又は NH₂ である。} から成るポリペプチドを含有する組成物とを、接触させて反応混合物を形成せしめ；及び

(b) 当該ポリペプチドと当該体液中の抗体成分との間に免疫特異的結合が生じたかどうかを測定し、ここで免疫複合体が形成されそして当該免疫複合体の検出が当該体液中の HIV に対する抗体の存在を指標とする；

を含む前記方法。

【請求項2】

配列中、Wがアミノ末端 NH₂ 基の H であり、そして Z が OH である、請求項1に記載

10

20

の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが担体巨大分子に結合されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが固定化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫特異的結合が免疫沈降により検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組成物が、H I V - 2 のポリメラーゼ・タンパク質から選ばれる少なくとも 1 つのポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記組成物が、H I V - 1 のエンベロープ・タンパク質から選ばれる少なくとも 1 のポリペプチド、及び H I V - 2 のエンベロープ・タンパク質から選ばれる少なくとも 1 のポリペプチドをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリペプチドと前記液体中の抗体成分との間の免疫特異的結合が、以下の：

(i) 前記免疫反応混合物中に形成された免疫複合体から未結合成分を除去し；

(ii) 前記免疫反応混合物に標識抗体を添加し、ここで前記標識抗体が免疫複合体の成分に免疫特異的に結合することができそして前記標識が検出可能なシグナルを提供し；
そして

20

(iii) 前記標識抗体が前記免疫複合体に結合するかどうかを測定するより検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記標識が、酵素基質の添加により検出される酵素を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記標識が、放射性標識を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記標識が、蛍光標識を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

H I V 抗体に対して免疫反応性であるポリペプチド組成物であって、当該ポリペプチドが、下記アミノ酸配列：

30

(IV) BRU124F3X

W-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-
Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-
Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-
Gln-Asp-Asn-Z

{ 上記配列中、W はポリペプチドのアミノ末端 NH_2 基の H であるか、又は当該ポリペプチドのアミノ末端 NH_2 基に結合した 1 若しくは複数の追加のアミノ酸であり、当該追加のアミノ酸は担体タンパク質又は支持体への当該ポリペプチドの結合を促進するために選択され；そして Z は OH 又は NH_2 である。 } により表される、前記組成物。

40

【請求項 13】

前記配列中、W は、アミノ末端 NH_2 基の H であり、そして Z は OH である、請求項 12 に記載のポリペプチド組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (H I V - 1) および / または 2 型 (H I V - 2) (本明細書中で用いる時、型を言及しないで使用する「H I V」はいずれか一方または両方の型を意味する) に関連する抗体を検出するのに有用な合成ポリペプチド、組換えポリペプチドおよびそれをコードする組換えポリヌクレオチド配列に関し、そして特に H I V

50

ポリメラーゼ領域の遺伝子産物の抗原エピトープを模倣した合成ポリペプチドに関する。

【0002】

発明の背景

この出願は、1997年8月1日出願の米国特許出願第08/904,826号明細書の一部係属出願であり、前記出願の開示は参考として本明細書中に組み込まれる。

【0003】

ヒト免疫不全ウイルス1型と2型(HIV-1とHIV-2)は後天性免疫不全症候群(AIDS、エイズ)を引き起こすことが知られている。両ウイルスとも見かけ上は同様な感染形態を示す。HIV-1とHIV-2は共にアフリカのエイズ患者から1980年代初めに単離された。その後、世界中のほとんどの国で症例が見つかっている。HIVウイルスは急速な遺伝的浮動を示すので、広範囲に多様性の株が出現し続けている。よって、変異株の検出と治療は挑戦的であり且つ困難であるとわかった。

10

【0004】

HIV-1および/またはHIV-2に対して反応性の抗体を有する個体は、常用のサンドイッチELISA方式のイムノアッセイにより決定される。それらのアッセイは、ウイルス溶解物、レトロウイルスタンパク質または天然もしくは合成ポリペプチドから構成される固定化ウイルス抗原を含んで成り、その抗原をHIV抗体を含む疑いのある血液または血清成分と接触させる。現存する商業ベースの試験は、血液製剤中へのHIVウイルスの伝染をかなり低減したけれども、各試験の構成は幾つかの欠点を有する場合がある。

【0005】

ウイルス溶解物試験の考えられる欠点としては次のものが挙げられる：大量の生存している感染性ウイルスを増殖させそして処理する必要があること；生存ウイルスが試験材料中に混入する可能性があること；得られるウイルス溶解物の性質が変動的であること；そして追加の確認試験を必要とする相当数の偽陽性結果や偽陰性結果を生じること。これらの欠点は抗原として単離されたウイルスタンパク質を使用する場合にも伴い得る。

20

【0006】

HIVウイルスの抗原エピトープを免疫学的に模倣するように作製することができる合成ポリペプチド(本明細書中で使用する「合成ポリペプチド」および「ポリペプチド」は、合成ポリペプチド、組換えポリペプチドまたはポリペプチドのいずれか1つ、全部または任意の組合せを意味する)の使用は、上記欠点の幾つかを回避することができる。診断アッセイにおける合成ポリペプチド(長さが60残基以下)の使用に伴う一種の懸念は、おそらくウイルスエピトープの限定された提示のために、ウイルス抗原の遺伝的浮動がそれらのアッセイを使ったHIV-1またはHIV-2感染血清の検出の失敗を引き起こし得るという考えである。そのような現象に対して保護する1つの方法は、ウイルスゲノムの異なる免疫優性領域由来のポリペプチドを含めることである。よって、HIV-1およびHIV-2のpol遺伝子産物の免疫優性領域を免疫学的に模倣した合成ポリペプチドは、HIV-1とHIV-2のenv, gagおよびpolタンパク質を模倣した既に記載されているポリペプチドへの重要な付加物である。米国特許第4,629,783号および同第5,075,211号明細書は、HIV-1の抗原決定基を模倣した合成ポリペプチドを記載している。Cosand米国特許第5,075,211号明細書は、pol領域由来のHIV-1タンパク質の抗原エピトープを免疫学的に模倣した合成ポリペプチドを記載しており、そのうちの2つのポリペプチドが本発明のポリペプチドと類似している。血液スクリーニングアッセイでは、アッセイ法に使用する抗原の免疫反応性が大きければ大きいほど、患者試料中に存在するHIV-1またはHIV-2の新規変異体または亜型に対する抗体が未検出のままである可能性がより低くなる。

30

40

【0007】

米国特許第5,306,466号明細書は、HIV-1およびHIV-2とは異なり且つ別個のものであると最初は信じられていた「HIV-3レトロウイルス」を記載している。研究者がHIV-3レトロウイルスが単にHIV-1の特定の亜型であることを決定して以来、今はO亜型またはO群と呼ばれている[R. De Leys他, J. Virol. 1207-1216 (1990) ;

50

L.G. Gurtler 他, J. Virol. 1581-1585 (1994)]。

【0008】

様々なHIV-1分離株を比較することにより、研究者らはゲノムには高度に可変性である領域もあり、または適度に十分保存されている領域もあることを証明した。HIV-2にも同様な多形性が観察されている。

【0009】

HIV-1とHIV-2ウイルスの伝染および病気状態にて見かけ上の類似点があるにもかかわらず、それらの遺伝的多様性に基づいて両ウイルス型は区別されている。今日、HIV-1とHIV-2はHIV系統樹の2本の主枝を構成している。DNAハイブリダイゼーション研究は、HIV-1とHIV-2の間には広範囲に渡り相同性領域が存在するが、他の領域は非常に多様に見えることを示唆している〔Clavel他, Science 233:343 (1986)〕。実際、HIV-2はHIV-1と全体で約40%の相同性しか持たないことが示されており、エンペロープ糖タンパク質間でほとんど免疫交差反応性を示さないことも実験により証明されている。それらのウイルス間での限定された血清学的交差反応性のため、HIV-1抗原に基づいたスクリーニングアッセイではヒト血清におけるHIV-2感染のスクリーニングや診断には不十分である。

10

【0010】

発明の要約

ポリメラーゼ領域中にコードされるHIV-1またはHIV-2タンパク質の免疫優性領域を模倣することができるポリペプチド配列を同定した。それらの合成ポリペプチド、組換えポリペプチドおよびそれをコードする組換えポリヌクレオチド配列は、HIVウイルスへの暴露についての血液および血液製剤のスクリーニング用の試薬の調製に有用である。これらのポリペプチドは、HIV-1および/またはHIV-2ウイルスに対する抗体の検出のための様々な特異的結合アッセイにおいて利用でき、またはワクチン組成物中での免疫原として利用できる。

20

【0011】

特定の実施形態の具体的説明

それぞれHIV-1またはHIV-2レトロウイルスによりコードされるタンパク質、特にウイルスゲノムのポリメラーゼ領域中にコードされるタンパク質、を免疫学的に模倣した新規ポリペプチドが提供される。本発明の各ポリペプチドは、ポリペプチド中に保存的または非保存的置換を導入することにより変更されてもよく、普通は数で20%未満、より普通には10%未満のアミノ酸が置換されてもよい。その領域が構造的に多形性であると認められるような状況では、異なるレトロウイルス株の異なるエピトープを一層効果的に模倣するように1または複数の特定アミノ酸を変更することが望ましいかもしれない。多くの場合、化学的安定性を提供するために、メチオニンをノルロイシン (Nor)に置き換えることができる。

30

【0012】

本発明のポリペプチド中に適当なアミノ酸置換を選択するのに特に有用な一手段は、1または複数のウイルス分離株中に天然に存在する置換であろう。

一般に、「ポリペプチド」または「ペプチド」という語は、生物活性を有するアミノ酸分子の連続鎖を意味する。この用語は何か特定の長さの生成物に関連づけられるわけではない。

40

【0013】

本発明において使用するポリペプチドは、その化合物がHIV-1またはHIV-2レトロウイルスの少なくとも1つの株のpol領域のエピトープを免疫学的に模倣できる限り、ある特定のHIV-1またはHIV-2ポリペプチド配列と同一である必要はない。従って、本発明のポリペプチドは、上述したように様々な変更、例えば挿入、削除および保存的または非保存的置換を含むように変更することができ、そのような変更はそれらの使用に際して何らかの有利性に備えるかもしれない。保存的置換とは、gly, ala ; val, ile, leu ; asp, glu ; asn, gln ; ser, thr ; lys, arg ; phe, tyr および nor, met とい

50

ったグループ内での置換を意味する。通常、配列は、本発明のポリペプチドを便利に固定化できる「アーム」を提供する目的でいずれかの末端に追加のアミノ酸が付加される場合を除いて、H I V - 1またはH I V - 2レトロウイルスの少なくとも1つの株の配列から20%以上は異ならないであろう。このアームは通常は長さが少なくとも1アミノ酸であるが50以上のアミノ酸であってもよく、しばしば1~10アミノ酸であろう。アミノ酸配列がアミノ酸残基の置換、付加または削除により変更されているポリペプチドは、未変更のポリペプチドの免疫反応性の実質上全部を保持すべきであり、免疫反応性は放射性免疫沈澱法、免疫蛍光法またはエンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ法により便利に測定することができる。

【0014】

10

更に、ポリペプチドを互いに連結する際の容易性、支持体または大きなポリペプチドへの結合、ポリペプチドまたはオリゴペプチドの物理的または化学的性質の変更等に備えて、オリゴペプチドまたはポリペプチドの末端に1または複数のアミノ酸を付加してもよい。

【0015】

結合に有用な官能基を提供するためにチロシン、システイン、リジン、グルタミン酸またはアスパラギン酸などのアミノ酸をポリペプチドのC末端またはN末端に導入してもよい。別のポリペプチドへの共有結合を促進するため、または例えば酸化により二量体を形成させるためにはシステインが特に好ましい。ポリマーを形成させるためには、分子中に少なくとも2つのシステイン残基を存在させるのが好ましく、好ましくはポリペプチドの末端部分に付加されたシステイン残基を利用することによりそれらを結合させる。介在アミノ酸スパーサーとシステインとの組合せも有用である。例えば、2つのシステイン残基を1または複数のアミノ酸残基により互いに隔てることことができる。グリシン残基が特に有用であり、アミノ酸間に1~3個のグリシン残基を使用することことができる。リジン残基もリンカーとして有用であることがわかっており、1~3個のリジン残基を単独でまたは他のアミノ酸と組み合わせて使用してポリペプチドを固相に結合させることができる。

20

【0016】

その上、本発明のポリペプチド配列は、安定性を提供するため、支持体もしくは別の分子への連結もしくは結合に備えて疎水性を増加させるため、または重合のため、末端NH₂のアシル化により、例えばアセチル化もしくはチオグリコール酸アミド化により、末端カルボキシのアミド化により、例えばアンモニアもしくはメチルアミンを使ったアミド化により変更した後に、天然の配列を異なってもよい。

30

【0017】

H I V - 1のポリメラーゼ領域から誘導した本発明のポリペプチドを下記に記載する。H I V - 1ポリペプチドファミリーは、塩基対 (bp) 4448 ~ (bp) 4584 (GenBank HIVBRUCGの番号付け法; 受入れ番号 K02013, BRU分離株) を包含するゲノムポリヌクレオチド配列 (LAI またはBRU 分離株) によりコードされるか、またはアミノ酸残基番号約940 ~ 約985のpol 転写解読枠中にコードされる。

【0018】

ポリペプチドIは次のポリペプチド配列を有する:

【化20】

40

(I) BRU124E

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-
Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-
Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

【0019】

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポ

50

リペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である）。

【0020】

本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドII (BRU124EXとも称する)は次のポリペプチド配列を有する：

【化21】

(II) BRU124EX

W-X-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-
Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-
Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

【0021】

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である）。

【0022】

本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドIII (BRU124F1Xとも称する)は次のポリペプチド配列を有する：

【化22】

(III) BRU124F1X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Y-Z

【0023】

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である）。

【0024】

本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドIV (BRU124F3Xとも称する)は次のポリペプチド配列を有する：

【化23】

10

20

30

40

(IV) BRU124F3X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-
 Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-
 Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-
 Gln-Asp-Asn-Y-Z

【 0 0 2 5 】

10

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のいずれかのHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【 0 0 2 6 】

HIV-2のポリメラーゼ領域から誘導した本発明のポリペプチドを下記に記載する。ROD124E1とも称するポリペプチドVは、塩基対(bp)4694~(bp)4861(GenBank HIV2RODの番号付け法；受入れ番号M15390, HIV-2ROD分離株)を包含するHIV-2ゲノムのポリヌクレオチド配列によりコードされるか、またはアミノ酸残基番号約956~1001のpol転写解読枠中にコードされる。

20

【 0 0 2 7 】

ポリペプチドVは次のポリペプチド配列を有する：

【 化 2 4 】

(V) ROD124E1

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
 Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
 Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
 Glu-Gly-Ala-Y-Z

30

【 0 0 2 8 】

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

40

【 0 0 2 9 】

ROD124EXとも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドVIは次のポリペプチド配列を有する：

【 化 2 5 】

(VI) ROD124EX

W-X-Leu-Gln-Ala-Lys-Asn-Ser-Lys-
 Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-Tyr-Phe-Arg-Glu-
 Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Gly-
 Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

【 0 0 3 0 】

10

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【 0 0 3 1 】

ROD124C2X とも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドVII は次のポリペプチド配列を有する：

【 化 2 6 】

20

(VII) ROD124C2X

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
 Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
 Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
 Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Thr-
 Asp-Ile-Lys-Y-Z

【 0 0 3 2 】

30

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【 0 0 3 3 】

ROD124C1X とも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドVIIIは次のポリペプチド配列を有する：

【 化 2 7 】

40

(VIII) ROD124C1X

W-X-Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Gly-
 Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-
 Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Y-Z

【 0 0 3 4 】

50

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【0035】

ROD123C3X とも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドIXは次のポリペプチド配列を有する：

【化28】

10

(IX) ROD123C3X

X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-Tyr-Phe-Arg-
Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-
Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-
Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Y-Z

【0036】

(上記配列中、Xは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【0037】

POL2A1とも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドXは次のポリペプチド配列を有する：

【化29】

20

30

(X) POL2A1

W-X-Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-
Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-
Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Ile-Ile-Pro-Arg-
Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Y-Z

【0038】

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され；Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり；Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり；そしてZはOHまたはNH₂である)。

【0039】

POD124C5X とも称する本発明の別のポリペプチドであるポリペプチドXIは次のポリペプチド配列を有する：

【化30】

40

(XI) ROD124C5X

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Y-Z

【 0 0 4 0 】

10

(上記配列中、Wは前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基のHであるか、または前記ポリペプチドのアミノ末端NH₂基に結合した1もしくは複数の追加のアミノ酸であり、前記追加のアミノ酸は担体タンパク質または支持体への前記ポリペプチドの結合を促進するために選択され; Xは存在しないか、Cys-Gly-Gly またはLys-Lys であり; Yは存在しないか、Cys であるか、または結合を促進するために付加された1もしくは複数のアミノ酸であり; そしてZはOHまたはNH₂である)。

【 0 0 4 1 】

特に着目されるのは、ジスルフィド結合または更に長い結合による2つのポリペプチドもしくはオリゴペプチドまたはその組合せを連結させるために、末端アミノ基等をアシル化するのに使われるシステインもしくはチオグリコール酸のメルカプト基を使用することである。これを達成するために、ビス-ハロアセチル基を有する化合物、ニトロアリアルハライド、または試薬がチオ基に特異的である同様の他の化合物などを使用することができる。よって、異なるポリペプチドまたはオリゴペプチドの2つのメルカプト基の間の結合は単結合であるか、または少なくとも2個、通常は少なくとも4個であり且つ約16個以下、通常は約14個以下の炭素原子を有する連結基であることができる。

20

【 0 0 4 2 】

あるいは、本発明のポリペプチドをコードするウイルスゲノム領域を、常用の組換えDNA技術によりクローニングしそして発現させることができる。この技術としては、PCR媒介クローニングの他に、着目のポリペプチドをコードする一本鎖ポリヌクレオチド鎖の合成が挙げられる。一般に Maniatis 他, Molecular Cloning, A Laboratory Manual CSH

30

【 0 0 4 3 】

ポリペプチド断片の発現にはポリヌクレオチド配列からの断片を使用することができ、変更された1もしくは複数のコドンが同一アミノ酸をコードするような保存的塩基置換を行うことができ、またはアミノ酸配列中に得られるアミノ酸が保存的もしくは非保存的置換であるようなコード配列中の非保存的置換を行うことができる(上述)。

【 0 0 4 4 】

コード配列を5'末端もしくは3'末端または両末端のところで延長して、エピトープ部位を維持しながらポリペプチドを延長することができる。この延長は例えば酵素のような標識への結合のため、このペプチドと別のポリペプチドとを同じ鎖中に一緒に連結せしめるため、抗原活性を提供するため、等に用いられるアームを提供する。

40

【 0 0 4 5 】

発現に備えて、コード配列には開始および終止コドン、プロモーターおよびターミネーター領域並びに普通は複製系が提供され、細胞宿主、例えば原核生物もしくは真核生物、細菌、酵母、哺乳動物などでの発現のための発現ベクターが提供されるだろう。

【 0 0 4 6 】

DNA配列それ自体、その断片、またはそれより長い配列、通常は少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも18塩基の配列を、レトロウイルスRNAまたはプロウイルスDNAの検出用のプローブとして使用することができる。多数の技術、例えばGrunstein-Hogness技術、サザン技術、ノーザン技術、ドットプロット、それらの改良法、並びに他の方法論

50

が記載されている。例えば、WO 83/02277 および Berent 他, Biotechniques (1985) 3:208を参照のこと。

【 0 0 4 7 】

ポリペプチドは融合タンパク質として調製することができるが、ポリペプチドは融合ポリペプチドのN末端であってもC末端であってもよい。一般に、着目のポリペプチドは「翻訳融合体」として発現される。翻訳融合体は、発現されるタンパク質のアミノ末端がE. コリまたは別の既知発現系中で容易に発現される「パートナー」タンパク質に結合していることを意味する。融合体は精製用標識または「ハンドル」を含んでもよい。

【 0 0 4 8 】

そのような融合系の一例は、グルタチオン - アガロース樹脂上でのアフィニティー精製に使用できるタンパク質をコードするグルタチオン S - トランスフェラーゼ遺伝子の一部分の使用である。この融合系は市販されているpGEXプラスミド(Pharmacia) の中に見つられる。第二の例は、融合パートナーとしてのジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子の一部分とハンドルとしての6個のヒスチジン残基をコードする配列の使用である。この「His 標識」は、発現された融合タンパク質をNi - NTA (ニッケル) クロマトグラフィーにより精製可能にする。この融合系は市販されている pQE42プラスミド(QIAGEN)中に見つられる。同様に、チオレドキシソコード配列中に作製された3つのヒスチジン残基から成る「His パッチ」を有するE. コリのチオレドキシソ遺伝子の一部分も、発現されたタンパク質をNi - NTA クロマトグラフィーにより精製できるようにする。この融合系は市販のpThioHis A プラスミド (Invitrogen) 中に見つられる。

【 0 0 4 9 】

得られた融合タンパク質はそれ自体で試薬としてそのまま使用できるし、本発明のポリペプチドを融合タンパク質中の残りの配列の全部もしくは一部から開裂させることもできる。内部メチオニンを全く含まないポリペプチドでは、融合部位のところにメチオニンを導入することにより、臭化シアンを使って該ポリペプチドを開裂させることができる。内部メチオニンが存在する場合には、タンパク質分解開裂部位に例えばポリリジンおよび/またはアルギニンまたはその組合せを提供する必要があるだろう。あるいは、内部メチオニンをロイシンのようなアミノ酸により置き換え、そして臭化シアン開裂用にN末端メチオニンを付加することができる。ジペプチダーゼを含む多種多様なプロテアーゼが周知であり、適当なプロセッシングシグナルを適切な位置に導入することができる。1または複数の無関係のアミノ酸の存在は本発明のポリペプチドの有用性を害さないであろうから、開裂を確実にするためにプロセッシングシグナルが縦列の反復を有してもよい。

【 0 0 5 0 】

H I V - 1 のポリメラーゼ領域由来の多数のポリペプチドをコードする本発明の組換えポリヌクレオチドを下記に記載する。これらの配列は、H I V - 1 ウイルス溶解物に確認される、塩基対 (bp) 2549 ~ (bp) 3139および塩基対 (bp) 4391 ~ (bp) 4648を包含するH I V - 1 ゲノムポリヌクレオチド配列 (L A I 分離株) から誘導される。

【 0 0 5 1 】

pol23 としても知られるポリヌクレオチド配列 I は次の配列を有する :

【 化 3 1 】

10

20

30

40

(I) *pol23*

CCA GGG ATT AGA TAT CAG TAC AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG
 AAA GGA TCA CCA GCA ATA TTC CAA AGT AGC ATG ACA AAA ATC
 TTA GAG CCT TTT AGA AAA CAA AAT CCA GAC ATA GTT ATC TAT
 CAA TAC ATG GAT GAT TTG TAT GTA GGA TCT GAC TTA GAA ATA
 GGG CAG CAT AGA ACA AAA ATA GAG GAG CTG AGA CAA CAT CTG
 TTG AGG TGG GGA CTT ACC ACA CCA GAC AAA AAA CAT CAG AAA
 GAA CCT CCA TTC CTT TGG ATG GGT TAT GAA CTC CAT CCT GAT
 AAA TGG ACA GTA CAG CCT ATA GTG CTG CCA GAA AAA GAC AGC
 TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AAG TTA GTG GGA AAA TTG AAT
 TGG GCA AGT CAG ATT TAC CCA GGG ATT AAA GTA AGG CAA TTA
 TGT AAA CTC CTT AGA GGA ACC AAA GCA CTA ACA GAA GTA ATA
 CCA CTA ACA GAA GAA GCA GAG CTA GAA CTG GCA GAA AAC AGA
 GAG ATT CTA AAA GAA CCA GTA CAT GGA GTG TAT TAT GAC CCA
 TCA AAA GAC TTA ATA GCA GAA ATA CAG AAG CAG GGG CAA GGC
 CAA

10

【 0 0 5 2 】

この配列は下記のアミノ酸をコードする。(この教示により縛られずに、イタリック体で示したアミノ酸は生成ポリペプチドの免疫反応性にとって特に重要な残基を表すと思われる。)

20

ポリヌクレオチド配列 (I) *pol23*によりコードされる (XII)*pol23-aa*ポリペプチド

【 化 3 2 】

Pro-Gly-Ile-Arg-Tyr-Gln-Tyr-Asn-Val-Leu-Pro-Gln-Gly-Trp-Lys-Gly-Ser-Pro-Ala-Ile-
 Phe-Gln-Ser-Ser-Met-Thr-Lys-Ile-Leu-Glu-Pro-Phe-Arg-Lys-Gln-Asn-Pro-Asp-Ile-Val
 Ile-Tyr-Gln-Tyr-Met-*Asp-Asp*-Leu-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leu-Glu-Ile-Gly-Gln-His-Arg-
 Thr-Lys-Ile-Glu-Glu-Leu-Arg-Gln-His-Leu-Leu-Arg-Trp-Gly-Leu-Thr-Thr-Pro-Asp-Lys-
 Lys-His-Gln-Lys-Glu-Pro-Pro-Phe-Leu-Trp-Met-Gly-Tyr-Glu-Leu-His-Pro Asp-Lys-Trp-
 Thr-Val-Gln-Pro-Ile-Val-Leu-Pro-Glu-Lys-Asp-Ser-Trp-Thr-Val-Asn-Asp-Ile-Gln-Lys-
 Leu-Val-Gly-Lys-Leu-Asn-Trp-Ala-Ser-Gln-Ile-Tyr-Pro-Gly-Ile-Lys-Val-Arg-Gln-Leu-
 Cys-Lys-Leu-Leu-Arg-Gly-Thr-Lys-Ala-Leu-Thr-Glu-Val-Ile-Pro-Leu-Thr-Glu-Glu-Ala-
 Glu-Leu-Glu-Leu-Ala-Glu-Asn-Arg-Glu-Ile-Leu-Lys-Glu-Pro-Val-His-Gly-Val-Tyr-Tyr-
 Asp-Pro-Ser-Lys-Asp-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys-Gln-Gly-Gln-Gly-Gln

30

【 0 0 5 3 】

*pol17*とも称する本発明の別のポリヌクレオチド配列であるポリヌクレオチド配列IIは次の配列を有する：

【 化 3 3 】

40

TAC AGT GCA GGG GAA AGA ATA GTA GAC ATA ATA GCA ACA GAC
 ATA CAA ACT AAA GAA TTA CAA AAA CAA ATT ACA AAA ATT CAA
 AAT TTT CGG GTT TAT TAC AGG GAC AGC AGA GAT CCA CTT TGG
 AAA GGA CCA GCA AAG CTC CTC TGG AAA GGT GAA GGG GCA GTA
 GTA ATA CAA GAT AAT AGT GAC ATA AAA GTA GTG CCA AGA AGA
 AAA GCA AAG ATC ATT AGG GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT
 GAT GAT

50

【 0 0 5 4 】

この配列は下記のアミノ酸配列をコードする。(イタリック体で示したアミノ酸は本明細書中に開示するポリペプチドBRU124F3Xを表す。)

ポリヌクレオチド配列 (II) pol17によりコードされる (XIII)pol17-aaポリペプチド

【 化 3 4 】

Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-
Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-
Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-
Ser-Asp-Ile-Lys-Val-Val-Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-Lys-Gln-
Met-Ala-Gly-Asp-Asp

10

【 0 0 5 5 】

本発明のポリペプチドは可溶性巨大分子(例えば5 kDa以上)に連結して使用することができる。便利には、担体は、それに対する抗体がヒト血清中におそらく見つからないであろう天然のまたは合成のポリ(アミノ酸)であることができる。代表的なポリペプチドとしてはポリ-L-リジン、ウシ血清アルブミン、アオガイヘモシアニン、ウシグロブリンなどが挙げられる。主として便利性と入手可能性により選択される。

【 0 0 5 6 】

そのような接合体には、少なくとも1つの本発明のポリペプチドが巨大分子あたり少なくとも1分子存在し且つ巨大分子0.5 kDaあたり約1以下、通常は巨大分子2 kDaあたり約1以下の分子が存在するだろう。複数の異なるポリペプチドが同じ巨大分子に連結されてもよい。

20

【 0 0 5 7 】

結合方式は、通常のものであり、p-マレイミド安息香酸、p-メチルジチオ安息香酸、無水マレイン酸、無水コハク酸、グルタルアルデヒド等のような試薬を使用する。結合はN末端、C末端、または分子の末端から中間的な部位のいずれかで起こる。本発明のポリペプチドは連結により誘導体化することができ、または支持体に結合した状態で連結させることができる。

30

【 0 0 5 8 】

本発明のポリペプチドは、HIV-1もしくはHIV-2またはその抗原に対する抗体を検出するためのアッセイ試薬として使用することができる。ポリペプチドはそれらの用途に依存して標識したまたは未標識の試薬として使用することができる(標識とは、直接または間接的に検出可能なシグナルを提供する分子を意味する)。様々な標識が使用でき、例えば放射性核種、酵素、蛍光体、化学発光体、酵素基質、酵素補因子もしくは阻害剤、粒子、例えば磁性粒子、リガンドとレセプターの組合せ、例えばビオチンとアビジンの組合せなどを使用できる。その上、ポリペプチドを表面、例えばマイクロウエルプレート、ガラスビーズ、クロマトグラフィー表面、例えば紙、セルロース、シリカゲルなどへの結合のために様々な方法で変更することができる。ポリペプチドを別の分子にまたは表面に結合せしめる特定の方法は常法であり、文献中にその実例が見つかる。例えば、米国特許第4,371,515号、同第4,487,715号明細書およびその中に引用された特許明細書を参照のこと。

40

【 0 0 5 9 】

様々なアッセイプロトコルをレトロウイルスタンパク質に対する抗体またはレトロウイルスタンパク質それ自体の存在を検出するために使用できる。特に着目されるのは、検出可能なシグナルに備える標識を有する標識された試薬としてポリペプチドを使用するもの、またはポリペプチドを直接または間接的に表面に結合させ、そこで試料中の抗体またはポリペプチドが表面上の前記ポリペプチドに結合するようになるというものである。次いで、ヒト免疫グロブリンに特異的な異種抗体、通常はヒトIgMとIgGの両方を使用すること

50

により、または免疫複合体に特異的な標識タンパク質、例えば R F 因子もしくは S . アウレウス (*S. aureus*) プロテイン A を使用することにより、該ポリペプチドに結合したヒト抗体の存在を検出することができる。

【 0 0 6 0 】

様々な不均一プロトコル、例えば競合型または非競合型不均一プロトコルを使用できる。ポリペプチドを表面または支持体（総称的に「支持体」）に結合させ、そして標識抗体を限定量の結合したポリペプチドを目当てに試料中の抗体と競争させる。支持体に結合した標識の量が試料中の競合抗体の量に関連づけられる。

【 0 0 6 1 】

異種抗ヒト抗体、例えば IgG と IgM の F c 領域に対する抗体（免疫グロブリン）を支持体に結合できる。試料を免疫グロブリンおよび標識ポリペプチドと接触させ、それにより支持体に結合した標識ポリペプチドの量が同族の (cognate) 抗体の存在を示すことになる。

10

【 0 0 6 2 】

あるいは均一アッセイを使用できる。均一アッセイでは、ポリペプチドを酵素、蛍光体または他の標識に結合させ、前記ポリペプチドへの抗体の結合が、特異的結合ペア複合体に関係する標識と前記複合体に関係しない標識とを区別することができるようになる。そのような技術を用いたアッセイについては、例えば米国特許第 3,817,837 号；同第 3,850,752 号；同第 3,901,654 号；同第 3,935,074 号；同第 3,984,533 号；同第 3,996,345 号；同第 4,034,074 号および同第 4,098,876 号明細書を参照のこと。これらの開示は参考として本明細書中に組み込まれる。

20

【 0 0 6 3 】

本発明の一例として、本発明のポリペプチドを蛍光分子、例えばフルオレセイン、ローダミンまたはウンベリフェロンに接合させることができる。このアッセイでは、蛍光偏光が複合体形成したポリペプチド接合体と複合体未形成のポリペプチド接合体とで異なる。蛍光偏光の変化を測定する装置が利用可能であり、例えば Abbott Laboratories, Chicago, Illinois により供給される TDx が利用可能である。

【 0 0 6 4 】

アッセイ技術の典型は、試料容器、例えばマイクロウエルプレートウエルの使用であり、本発明のポリペプチドまたはその接合体が容器の底および/または壁に共有結合によりまたは非共有結合により付着する。試料、通常は適当に緩衝化された媒質中に希釈したヒト血液または血清試料を容器に添加し、そしてポリペプチドと試料中のいずれかの同族抗体との間の複合体形成を可能にするのに十分な時間維持する。上清を除去し、そして容器を洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去する。

30

【 0 0 6 5 】

前記複合体に特異的に結合する標識特異的結合タンパク質が検出に使われる。適当に緩衝化された培地中のヒト免疫グロブリンに対する異種抗血清、特に抗（ヒト IgM および IgG）を前記容器に添加する。異種抗血清は通常は検出可能な標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ）で標識されるだろう。次いで標識を検出する。例えば、酵素を使用する場合、非特異的に結合した酵素標識を除去した後、現像液を添加する。現像液は酵素基質と恐らく酵素補因子、色素原などを含み、それらは反応すると比色法により、蛍光測定法によりまたは光子計数測定法によりそれぞれ検出することができる着色生成物、蛍光生成物または化学発光生成物を提供するだろう。

40

【 0 0 6 6 】

ポリペプチドは様々な方法で調製することができる。ポリペプチドは、その比較的短い長さのために、既知プロトコルに従って溶液中でまたは固体支持体上で合成することができる。例えば、Stewart & Young, Solid Phase Polypeptide Synthesis, 第 2 版, Pierce Chemical Co., 1984 ; および Tam 他, J. Am. Chem. Soc. (1983) 105: 6442 を参照のこと。

【 0 0 6 7 】

あるいは、本明細書中で検討するように、組換え DNA 技術を使用して、ポリペプチドを

50

コードする一本鎖またはそれに実質的に相補的な鎖を使って組換えポリペプチド配列を調製することができる（例えば、Maniatis他，前掲を参照のこと）。

【0068】

アッセイの性質に依存して、生理学的試料、例えば唾液、血液、血漿または血清をアッセイ媒質（通常は様々な緩衝液、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液などの1つを使った水性緩衝培地であろう）中への希釈により予め調製しておくことができる。好ましい希釈剤は150 mMクエン酸ナトリウム中の5 %w/v 脱脂粉乳、0.01% Proclin 300、0.005 % Antiform A である。通常、pHは約6～9の範囲内であろう。次いで適当なプロトコルに従って試料を試薬と混合し、結合を考慮した十分な時間の間維持する。不均一系を用いる時には、一般に結合段階の後で洗浄を行って非特異的結合を最少にする。この手順の終わりに常法に従って標識を検出する。

10

【0069】

アッセイにおける本発明のポリペプチドおよびその類似体の使用の他に、本発明のポリペプチドはそれ自体でまたはワクチンへ組合せて用途を見つけることができる。該ポリペプチドは、一般に1 μg ~ 20 mg / kg宿主の範囲の濃度で、常法により製剤化することができる。生理学的に許容される媒質、例えば無菌蒸留水、食塩水、リン酸緩衝化食塩水などを担体として使用してもよい。水酸化アルミニウムゲルなどのようなアジュバントを使用してもよい。投与は注射、例えば筋肉内、腹腔内、皮下、静脈内注射によることができる。投与は1回または複数回であり、普通は1～4週間間隔で行われる。

【0070】

8つの既知HIV-1陽性血清（即ちGS91-[034,037,042,046,049,052,056 および067], 11230, 11424, 11527, 11532および11535；ウエスタンブロット全バンド陽性）に対する、HIV-1抗原を免疫学的に模倣した上記ポリペプチドI～IVの免疫反応性を調べた。その結果を実施例2の第1A表に示す。上記に挙げたポリペプチドの全てがそれらの試料に対して高度に免疫反応性であった。

20

【0071】

同様に、5つの既知HIV-2陽性血清（即ち92099,92100,P-83,P-84 およびp-86；ウエスタンブロット全バンド陽性）に対する、HIV-2抗原を模倣した上記ポリペプチドの各々の免疫反応性も調べ、その結果を実施例2の第1B表に示す。糖タンパク質（gp）ポリペプチド41-2-3GC（同時係属米国特許出願第08/268,388号の主題である非グリコシル化ポリペプチド）は、5つの試料全てに対して高度に反応性であった。最大反応性のポリペプチドはROD 124C2XとROD 124C5Xであった。それらは5つの試料全部に反応性であった。

30

【0072】

実施例1 - HIV_{pol}ポリペプチドの合成

0.35ミリモルのp-メチルベンゾヒドリルアミン樹脂（Applied Biosystems Inc., Foster City, CA）上にt-ブチルオキシカルボニル保護アミノ酸を連続カップリングすることにより一連のHIV_{pol}ポリペプチドを合成した。標準ベンジル型基によりアミノ酸側鎖の保護を行った。トリプトファン残基はホルミル成分により保護した。合成が完了したポリペプチドを脱保護し、そして標準のHF法またはTam他の低-高HF法（J. Amer. Chem. Soc. 105:6442, 1993）により樹脂から開裂させた。開裂させたポリペプチドを50%酢酸中で樹脂から抽出し、そして溶出溶媒として20%酢酸を使ってSephadex G-25 クロマトグラフィーにかけた。ポリペプチドを含有する画分をプールし、凍結乾燥させた。

40

【0073】

実施例2 - polポリペプチドの免疫反応性

本発明のポリペプチドを米国特許第4,629,783号明細書に既に記載された通りにELISAによって免疫反応性について試験した。簡単に言えば、本発明のポリペプチドの0.5 mg/ml原液を2 M尿素 / 5 %酢酸中に調製した。12 mlの1.2 %酢酸を15 mlポリプロピレン試験管に入れ、その試験管に48 μlの前記ポリペプチド原液を添加し、そして混合した（「コーティング溶液」）。マイクロウエルプレートのウエルを前記ポリペプチドのコーテ

50

ィング液 100 μ l で満たし、そこに100 μ l / ウエルの0.24 M 炭酸塩 / 0.2 N NaOHを添加し、コーティング溶液のpHをアルカリ性pHに高めた。プレートにカバーをし、そして室温で一晩放置しておいた。コーティング溶液を吸引により取り除いた後、300 μ l / ウエルのプレートブロック溶液 (1L あたり25 gの脱脂粉乳、14.7 gのクエン酸ナトリウム二水和物、8.47 gの塩化ナトリウムおよび0.05 ml のAntiform A、1.0 ml Kathon GC/ICPを含有する) を添加し、室温で1時間インキュベートした。ブロック溶液を吸引により取り除いた後、プレートをすぐに使用するかまたは風乾して後の使用のために保存した。イムノアッセイを実施するためには、血漿試料を被検体希釈剤 [1L あたり44.1 gのクエン酸ナトリウム二水和物、1.2 mlのTween 20、50 gの脱脂粉乳、0.05 ml のAntiform A、50 ml のヤギ血清、58.6 gの2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸、92.9 gのトリエタノールアミン塩酸塩、1 mlのProclin 300 を含む] 中に20倍希釈し、その希釈液100 μ l を各ウエルに添加した。試料を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、次いで除去し、そしてウエルを0.1 M NaCl / 0.05% Tween 20 (350 μ l / 回) で5回洗浄した。1%正常ヤギ血清を含むクエン酸緩衝液 pH 7.0 中に希釈したヤギ抗ヒトIg - 西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体 100 μ l を37 $^{\circ}$ Cで30分間各ウエルに添加した後、上記と同様に5回洗浄した。室温で30分間100 μ l / ウエルの基質溶液 (クエン酸 / リン酸緩衝液、pH 6.0中の80 μ g/mlテトラメチルベンジジン、0.0015%過酸化水素) を添加することにより、ELISA アッセイを開始した。ウエルあたり100 μ l の1 N H₂SO₄ を添加することにより反応を停止させ、そして自動ELISA リーダーにより450 nmと630 nmの光学濃度の比を測定した。陽性結果に関するカットオフ値は、少なくとも3つの既知の陰性試料から得られた平均吸光度を0.200 上回る吸光単位に設定した。

10

20

【 0 0 7 4 】

第1 A表の結果は、本発明のポリペプチドとH I V - 1 陽性および陰性試料との反応性を示す。ここでH I V - 1 陽性試料はGS91-(034, 037, 042, 046, 049, 052, 056, 067), 11230, 11424, 11527, 11532 および11535 であり、そして陰性試料はPS1059 ~ PS1062, PS1068, PS1071およびD21 ~ D25 である。

【 0 0 7 5 】

【 表 1 】

第1A表

吸光度 (450 nm/630 nm) **

試料*	BRU124E	BRU124F1X	BRU124F3X	BRU124EX***	
GS91-034	0.606	1.000	0.945	n.d.	
GS91-037	0.507	1.584	1.551	n.d.	
GS91-042	1.860	1.899	1.888	n.d.	
GS91-046	1.598	1.848	1.831	n.d.	
GS91-049	1.034	1.955	1.991	n.d.	10
GS91-052	1.606	1.852	1.917	n.d.	
GS91-056	1.848	1.966	1.957	n.d.	
GS91-067	1.960	2.110	2.110	n.d.	
PS1071	0.036	0.040	0.046	n.d.	
PS1062	0.041	0.047	0.046	n.d.	
PS1070	0.034	0.039	0.043	n.d.	
PS1061	0.020	0.023	0.021	n.d.	
PS1069	0.034	0.039	0.039	n.d.	
PS1060	0.027	0.052	0.044	n.d.	
PS1068	0.028	0.039	0.037	n.d.	20
PS1059	0.043	0.046	0.049	n.d.	
11535	n.d.	n.d.	n.d.	1.652	
11527	n.d.	n.d.	n.d.	2.595	
11532	n.d.	n.d.	n.d.	2.912	
11424	n.d.	n.d.	n.d.	2.676	
11230	n.d.	n.d.	n.d.	0.759	
D21	n.d.	n.d.	n.d.	0.096	
D22	n.d.	n.d.	n.d.	0.045	
D23	n.d.	n.d.	n.d.	0.053	
D24	n.d.	n.d.	n.d.	0.044	30
D25	n.d.	n.d.	n.d.	0.034	

【0076】

* 試料は異なるポリペプチド間で吸光度を比較できるようにするために、1/20の代わりに1/40希釈した。GS-91-(034, 037, 042, 046, 049, 052, 056, 067), 11230, 11424, 11527, 11532および11535は既知のHIV-1陽性試料であり；試料PS1059～PS1062, PS1068, PS1071およびD21～D25は既知のHIV-1陰性試料である。

** 強調した値は、0.200 + 陰性平均値により設定されたカットオフ値に基づいて陽性である値を示す。カットオフ値 = 0.238 (BRU124EXを除く)。BRU124EXのカットオフ値 = 0.254。

*** BRU124EXの反応性についての試験は、別の日に異なる試料を使って別個に行った。
n.d. = 実施せず (または試験せず)。

【0077】

第1B表の結果は、本発明のポリペプチドとHIV-2陽性および陰性試料との反応性を示す。ここでHIV-2陽性試料は92099, 92100, P-83, P-84およびP-86であり、そして陰性試料はNBD1, NBD2, NBD3およびNBD4である。

【0078】

【表2】

第2 A表

吸光度 (450 nm/630 nm) **

試料*	41-2-3GC	E1	EX	C1X	C2X	C3X	C5X	2A1
92099	>3.00	0.41	0.73	0.24	1.61	0.78	1.77	1.91
92100	>3,00	0.47	0.75	0.26	1.91	0.88	1.82	1.86
P-83	2.82	0.44	1.05	0.10	1.02	0.45	1.06	0.08
P-84	>3.00	0.47	1.04	0.27	0.75	0.40	0.73	0.18
P-86	>3.00	0.16	0.23	0.16	0.35	0.20	0.34	0.13
NBD1	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.09
NBD2	0.11	0.11	0.12	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11
NBD3	0.04	0.03	0.05	0.03	0.03	0.05	0.03	0.03
NBD4	0.07	0.05	0.06	0.05	0.04	0.05	0.07	0.05

10

20

【 0 0 7 9 】

強調した値は0.200 + 陰性平均値により設定されたカットオフ値に基づいて陽性である値である。カットオフ値 = 0.256。

既知の陽性試料は92099, 92100, P-83, P-84およびP-86であり、既知の陰性試料はNBD1, NBD2, NBD3およびNBD4である。

【 0 0 8 0 】

pol ポリペプチドを含めることによるH I V - 1およびH I V - 2抗体検出の特異性の改善は、第1 C表に示す実験結果により証明される。この実験では、米国特許第5,439,792号明細書(その開示は参考として本明細書中に組み込まれる)に開示されたように、pol ポリペプチドを個別にまたはエンベロープ特異的ポリペプチドと一緒にマイクロウエルプレート上にコーティングした。個別のpol ポリペプチドによるプレートコーティングの場合、前記ポリペプチドを1.0 μg/mlの濃度でコーティングした。H I V - 1およびH I V - 2ポリペプチドとの混合物のプレートコーティングの場合、前記ポリペプチドをコーティング緩衝液中に次の濃度で一緒に混合した: H I V - 1エンベロープポリペプチド(MN GCと命名)を1.23 μg/ml、H I V - 2エンベロープポリペプチド(41-2-3GCと命名)を0.64 μg/ml、BRU124F3Xを0.25 μg/ml、およびROD124C5Xを0.125 μg/ml。ポリペプチドコーティング手順は前の「免疫反応性」の項目に記載したのと同じであった。試験した試料は既知のH I V - 1試料(ウエスタンブロット全バンド陽性試料)(即ち、SAL040, SAL041, SAL059, SAL063, SAL064)、既知のH I V - 2試料(ウエスタンブロット全バンド陽性試料)(即ち、52, GB92000128, GB92000152, GB92000154, GB92000158)、H I V - 1不確定試料(即ち、B3113, B5813, B5885, B7045, C000127, C000214, C000455)およびH I V - 2不確定試料(即ち、B3123, B5605, B5810, B5826, B5832, B5875, B6312)である。Genetic Systems(商標)HIV-1/HIV-2 Peptide EIA Kit(Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Redmond, Washingtonより入手可能)において使われる対照試料、即ちH I V - 1陽性対照(PC-1)、H I V - 2陽性対照(PC-2)および陰性対照(NC)も含めた。既知の陽性試料と不確定試料の両方を市販のウイルス溶解物試験であるGenetic Systems(商標)HIV-1/HIV-2 EIA(Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Redmond, Washington)

30

40

50

においても試験した。

【 0 0 8 1 】

【 表 3 】

第 1 C 表

p01 のみをコーティングしたプレートと4つのペプチドをコーティングしたプレートを使ったELISAにおける、HIV-1/2ウエスタンブロット

全バンド陽性試料と不確定試料の反応性の比較

試料	4バンド*		HIV-1 p01(BRU124F3X) のみ		HIV-2 p01 (ROD124C5X) のみ		HIV-1/2カイル溶解物**		
	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	S/CO	Pos/Neg**	A450/A630	S/CO	S/CO	Pos/Neg**
PC-1	1.610	4.8	P	3.0	P	0.441	0.8	N.A.	N.A.
	1.639	4.9	P	3.1	P	0.451	0.9	N.A.	N.A.
	1.259	3.8	P	0.6	N	0.438	0.8	N.A.	N.A.
PC-2	1.221	3.7	P	0.6	N	0.560	1.1	N.A.	N.A.
	0.093	0.3	N	0.5	N	0.279	0.5	N.A.	N.A.
NC	0.091	0.3	N	0.5	N	0.302	0.6	N.A.	N.A.
	0.332	N.A.	N	N.A.	N	0.531	N.A.	N.A.	N.A.
カットオフ									
HIV-1 WB Pos.									
SAL040	2.985	9.0	P	5.9	P	2.709	5.1	>8.0	P
SAL041	3.028	9.1	P	5.8	P	2.555	4.8	>8.0	P
SAL059	2.957	8.9	P	5.6	P	2.238	4.2	>8.0	P
SAL063	3.009	9.1	P	5.6	P	2.714	5.1	>8.0	P
SAL064	2.934	8.8	P	5.8	P	2.865	5.4	>8.0	P
HIV-2 WB Pos.									
52	2.972	9.0	P	5.5	P	2.669	5.0	>8.0	P
GB92000128	2.939	8.9	P	5.4	P	2.872	5.4	>8.0	P
GB92000152	2.904	8.7	P	5.3	P	2.743	5.2	>8.0	P
GB92000154	3.011	9.1	P	5.4	P	2.857	5.4	>8.0	P
GB92000158	3.061	9.2	P	5.5	P	2.930	5.5	>8.0	P

【 0 0 8 2 】

【 表 4 】

10

20

30

40

第1C表 (続き)

polのみをコーティングしたプレートと4つのペプチドをコーティングしたプレートを使ったELISAにおける、HIV-1/2ウエスタンブロット

全バンド陽性試料と不確定試料の反応性の比較

試料	4ペプチド*				HIV-1 pol (BRU124F3X)のみ		HIV-2 pol (ROD124C5X)のみ		HIV 1/2 ウィルス溶解物***	
	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	A450/A630	S/CO	S/CO	Pos/Neg**
HIV-1 不確定										
B3113	0.094	0.3	N	0.346	0.7	N	0.253	0.5	3.2	FP
B5813	0.063	0.2	N	0.303	0.6	N	0.244	0.5	3.0	FP
B5885	0.063	0.2	N	0.152	0.3	N	0.154	0.3	3.1	FP
B7045	0.062	0.2	N	0.241	0.5	N	0.208	0.4	3.5	FP
C000127	0.050	0.2	N	0.172	0.3	N	0.177	0.3	3.1	FP
C000214	0.056	0.2	N	0.157	0.3	N	0.155	0.3	5.4	FP
C000455	0.065	0.2	N	0.136	0.3	N	0.179	0.3	5.4	FP
HIV-2 不確定										
B3123	0.051	0.2	N	0.142	0.3	N	0.188	0.4	3.2	FP
B5805	0.074	0.2	N	0.203	0.4	N	0.276	0.5	3.8	FP
B5810	0.053	0.2	N	0.204	0.4	N	0.205	0.4	4.3	FP
B5826	0.049	0.1	N	0.145	0.3	N	0.177	0.3	3.0	FP
B5832	0.057	0.2	N	0.183	0.4	N	0.195	0.4	3.2	FP
B5875	0.056	0.2	N	0.254	0.5	N	0.286	0.5	3.8	FP
B6312	0.027	0.1	N	0.150	0.3	N	0.155	0.3	2.8	FP

【 0 0 8 3 】

* 4ペプチド = MNGC (1.23 µg/ml); 41-2-3GC (0.64 µg/ml); BRU124F3X (0.25 µg/ml); ROD124C5X (0.125 µg/ml)

HIV-1pol (BRU124F3X)のみとHIV-2pol (124C5X)のみ = 各々1.0 µg/ml

HIV-1 & HIV-2 WB Pos. = 全バンドウエスタンブロット陽性試料

HIV-1 & HIV-2 不確定 = ウエスタンブロット不確定試料

** Pos/Neg欄中、P = 陽性 ; N = 陰性 ; FP = 偽陽性

*** Genetic Systems (商標) HIV-1/2 EIA (FDA承認)

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

第 1 C 表は、単独の pol1 ポリペプチドをコーティングしたプレートまたは 4 つのポリペプチド全部をコーティングしたプレートを使った時、既知の HIV - 1 および HIV - 2 陽性試料の全てが陽性結果を示したことを証明する。HIV - 1 および HIV - 2 不確定試料はいずれも、単独の pol1 ポリペプチドをコーティングしたプレートまたは 4 つのポリペプチド全部をコーティングしたプレートを使った時、陰性結果を示した。ウイルス溶解物を使用する HIV - 1 / HIV - 2 EIA を使って試験すると、不確定試料は高度に陽性の結果を示した。これらの結果は、本発明の pol1 ポリペプチドを含めたポリペプチド EIA が HIV 陽性試料を検出するのに高感度であり且つ特異的であることを非常に明確に証明する。

10

【 0 0 8 5 】

実施例 3 - pol23 と pol17 のクローニング

pol23 および pol17 組換え体の両者をまず pGEX 系 (Pharmacia) 中でクローニングした。次いでクローニングした挿入断片を、遺伝子発現の分析を単純化するために「精製ハンドル」を提供する別の発現ベクターに移した。

【 0 0 8 6 】

組換え体 : pGEX/pol23

HIV - 1 LAI 株ウイルス溶解物より単離した HIV - 1 ウイルス DNA を鋳型として使ってそして次のプライマー対 :

5' AGCACCATGGGGATCCCAGGGATTAGATATCAGTACAATG 3' および

5' AGTCAGAATTCATTGGCCTTGCCCTGCTT 3'

を使って PCR 生成物を作製した。PCR 反応は、ポリメラーゼの誤りによる突然変異の可能性を最少にするために UI Tma DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer) を使った。PCR 生成物を制限酵素 BamHI と EcoRI で消化し、そして BamHI と EcoRI で消化した pGEX 5X-1 (Pharmacia) 中に挿入した。連結混合物を用いて E. コリ DH11S を形質転換せしめ、そしてアンピシリン耐性コロニーを選択した (Maniatis, 前掲を参照のこと)。

20

【 0 0 8 7 】

挿入断片含有コロニーをまずコロニー - PCR により同定した。この後、増殖、プラスミド単離¹⁾ および制限分析を行って、候補のクローンが推定通りの制限部位を含むことを証明した (Maniatis, 前掲を参照のこと)。得られたクローンのプラスミド地図を図 1 に与える。

30

¹⁾ L プロス + 100 mg/ml アンピシリン中で 37 °C で一晩増殖させた組換え細菌培養物から、QIAwell 8 Plus Plasmid Kit (QIAGEN) を使ってプラスミド DNA を調製した。

【 0 0 8 8 】

組換え体 : pGEX/pol17.0

上述したのと同様に、HIV - 1 ウイルス DNA 鋳型と次のプライマー対 :

5' AGCACCATGGGGATCCCCTACAGTGCAGGGGAAAGAATA 3' および

5' GACTAGTCGACTCAATCATCACCTGCCATCTG 3'

を使って PCR 生成物を作製した。PCR 反応は、ポリメラーゼの誤りによる突然変異の可能性を最少にするために UI Tma DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer) を使った。PCR 生成物を制限酵素 BamHI と SalI で消化し、そして BamHI と SalI で消化した pGEX 5X-1 中に挿入した。連結混合物を用いて E. コリ DH11S を形質転換せしめ、そしてアンピシリン耐性コロニーを選択した。

40

【 0 0 8 9 】

挿入断片含有コロニーをまずコロニー - PCR により同定した。この後、増殖、プラスミド単離および制限分析を行って、候補のクローンが推定通りの制限部位を含むことを証明した。得られたクローンのプラスミド地図を図 2 に与える。

【 0 0 9 0 】

発現ベクター pQE42 および pThioHisA 中への pGEX/pol23 および pGEX/pol17.0 のサブクローニング

50

BamHI とSalI 酵素での消化により、pGEX/pol23およびpGEX/pol7.0 から挿入断片DNAを調製した。市販の発現ベクター pThioHisA (Invitrogen) とpQE42 (QIAGEN)を各々 BglII²⁾およびSalI 酵素で消化した。別々の連結反応として、各挿入断片を各ベクターに連結せしめた (Maniatis, 前掲)。再び E. コリ宿主株DH11S 中でアンピシリン耐性形質転換体を選択した。クローンの素性をコロニー - PCRと精製プラスミドDNAの制限分析により確認した。得られた組換え体をpQE/pol23, pQE/pol7.0, pThioHis/pol23 および pThioHis/pol7.0と命名した (得られたクローンのプラスミド地図をそれぞれ図3~6に与える)。

²⁾BamHI とBglII 酵素は連結によって接合できる粘着末端を生じることに注目。

【0091】

実施例4 - 実施例3クローンのタンパク質発現

tac プロモーターを使う3つのプラスミド発現系 pGEX, pThioHisAおよびpQE42 は全て、グルコースにより負に調節され (シャットオフ) そしてラクトース類似体IPTGにより正に調節される (ターンオン)。

【0092】

600 nmの光学濃度が2~6に達するまで、各組換え体pQE/pol23, pQE/pol7.0, pThioHis/pol23 および pThioHis/pol7.0の25 ml 培養物を完全Tブロス+100 mg/ml アンピシリン, 1.0 %グルコース中で37 °Cで (振盪しながら) 増殖させた。次いで細胞をペレットにし、組換え融合タンパク質の発現を誘導するために1 mM IPTG を含む新鮮なグルコース不含有培地中に再懸濁した。更に2時間インキュベーション後、誘導した培養物を2000 rpmで10分間の遠心により収得した。得られた上清培地を捨て、細胞ペレットを-70 °Cで凍結させた。

【0093】

凍結したペレットを解凍しそして20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.8と500 mM NaCl から成る水性媒質 2.0 ml 中に再懸濁した。ドライアイス/エタノール浴中での凍結と湯中での解凍の2サイクルおよび10回の連続した短い音波処理により細胞を溶解させた。得られた溶解物を、ペレットになるまでエッペンドルフ遠心管中で最高速度で遠心した。溶解物の上清とペレットを次の精製に使った。

【0094】

pQE/pol23, pQE/pol7.0 : Ni-NTA精製

これらの組換え体については、20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.8と8 M尿素を含む水性緩衝液中に溶解物ペレットを溶かした。この懸濁液を同緩衝液で予め平衡化しておいた Ni-NTA アガロース(QIAGEN)に結合させた。同緩衝液を使って未結合材料を洗い落とした。次いで結合したタンパク質を、20 mM リン酸ナトリウム, 6.4 M尿素および100 mM EDTA を含む水性緩衝液を用いて溶出させた。得られた精製融合タンパク質をSDS-PAGEにより分析した。

【0095】

溶解物上清も下記に示す方法を使って精製した。しかしながら、組換えタンパク質は溶解物ペレット中により高レベルで観察された。

【0096】

pThioHis/pol23, pThioHis/pol7.0 : Ni-NTA精製

これらの組換え体については、溶解物上清を20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.8と500 mM NaCl を含む水性緩衝液中で予め平衡化しておいた Ni-NTA に結合させた。同緩衝液を使って未結合材料を洗い落とし、次に水性洗浄緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0, 500 mM NaCl) を使って再洗浄した。

【0097】

洗浄緩衝液中の増加する濃度のイミダゾール (50 mM, 200 mM, 350 mM, 500 mM) を使って、連続する4段階において結合したタンパク質を溶出させた。SDS-PAGE分析は、350 mM イミダゾールがこれらの組換え体に最適な溶出条件であることを示した。

【0098】

10

20

30

40

50

SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析

標準実験プロトコルを使って、得られた部分精製融合タンパク質の試料をSDS-PAGEにより分離した。Novex 4 ~ 20% ポリアクリルアミド勾配ゲルを使った。

どの場合でも、第2表に示すように、組換え融合タンパク質は推定サイズの近くに移動することが観察された。

【0099】

【表5】

第2表

組換え体	推定融合タンパク質分子量	精製形態
pQE/pol23	46 kD	溶解物ペレット
pQE/pol7.0	33.5 kD	溶解物ペレット
pThioHis/pol23	37 kD	溶解物上清
pThioHis/pol7.0	24 kD	溶解物上清

10

20

【0100】

分離したタンパク質をウエスタンブロット分析用にニトロセルロース支持体へと移行させた。電気泳動したタンパク質をニトロセルロース膜へと移行させるのには半乾式電気泳動移行法 (Harlow & Lane, Antibodies, a laboratory manual, 488-489 頁) を使った。

【0101】

移行後、膜をBlotto (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5.0 % 脱脂粉乳, 0.1 % Tween-20) を使って4 で一晩かまたは室温で1時間のいずれかでブロックした。ブロック剤を除去した後、Blotto中に希釈した第一抗体³⁾と共に膜をインキュベートした。次いで第一抗体溶液を捨て、Blottoを使ってプロットを5分間ずつ4回洗浄した。第二抗体-酵素接合体⁴⁾を添加し、室温で30分間インキュベートした。30分後、第二抗体を捨て、そしてプロットを前と同様に4回洗浄した。この後、水ですすぎ、そして発色基質溶液⁵⁾を添加した。

30

【0102】

バンドが出現した後で水洗することにより色の発色を停止させた。pQE/pol23 とpThioHis/pol23の両タンパク質バンドがウエスタンブロット上で一方のマウスモノクローナル抗体を使った時に反応し、pQE/pol7.0とpThioHis/pol7.0の両タンパク質バンドは他方のマウス抗体と反応した。ヒトHIV-1陽性血清を使った場合には4つのバンド全部が検出された。

【0103】

³⁾ HIV polに対する2つのマウスモノクローナル抗体を1:4000希釈倍率で使用した。HIVに対して陽性のヒト血清を1:500希釈倍率で使用した。

⁴⁾ 第二抗体接合体は、第一抗体がマウスモノクローナル抗体である場合にはBlotto中の西洋ワサビペルオキシダーゼ接合ヤギ抗マウス抗体(1:2000)であり、第一抗体がヒト血清である場合にはBlotto中のアルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ヒト抗体(1:2000)であった。

⁵⁾ 西洋ワサビペルオキシダーゼ第二抗体接合体と共に使用した基質はテトラメチルベンジジン(TMB)(Vector Labs)であり、アルカリホスファターゼ第二抗体接合体と共に使用した基質はBCIP/NBT一成分基質(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.)であった。

40

50

【0104】

実施例5 - 酵素イムノアッセイ (EIA) 試験

EIA プレート を部分精製済組換え融合タンパク質でコーティングした。各試料は15 mM 炭酸 / 35 mM 重炭酸コーティング緩衝液 pH 9.6 中の 1 : 500 の希釈倍率で室温で一晩コーティングした。コーティングしたプレートを「オン/オフ」ブロックし (2.5 % 脱脂粉乳)、4 % ショ糖溶液を使って「オン/オフ」コーティングし、そして一晩風乾した。調製したら、プレートをシールパウチ中で乾燥保存することができる。

【0105】

各組換え融合タンパク質を16個の HIV - 1 陽性試料、8 個の正常提供者試料および4 個の E . コリ反応性試料について試験した。E . コリ反応性試料は、E . コリ溶解物からのタンパク質に対して高い反応性を有することが以前に証明されている試料である。本発明者らが観察した HIV - 1 陽性試料との反応性が、組換えポリペプチドに特異的であり且つ混入した E . コリタンパク質に対して向けられたものでないことを保証するためにそれらを含めた。

10

【0106】

簡単に言えば、試料を試料希釈剤 [1 L あたり 44.1 g のクエン酸ナトリウム二水和物, 1.2 ml の Tween 20, 50 ng の脱脂粉乳, 0.05 ml の Antiform A, 50 ml のヤギ血清, 58.6 g の 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸, 92.9 g のトリエタノールアミン塩酸塩, 1 ml の Proclin 300 を含有する] 中に 1 : 101 希釈し、生じた混合物の 200 μ l を予め調製しておいたプレートの各ウエルに添加した。プレートにカバーをし、 37 ± 1 で 60 分間インキュベートした。各ウエルから液体を吸引し、プレートを洗浄溶液 (0.1 M NaCl / 0.05 % Tween 20) で最低 5 回洗浄した。

20

【0107】

100 ml の接合体溶液 (1 % 正常ヤギ血清を含むクエン酸緩衝液 pH 7.0 中に希釈したヤギ抗ヒト Ig - 西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体) を各ウエルに添加した。次いでプレートにカバーをし、 37 ± 1 で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、各ウエルから液体を吸引し、そしてプレートを洗浄溶液で最低 5 回洗浄した。

【0108】

色原体溶液 (クエン酸 / リン酸緩衝液 pH 6.0 中、80 μ g/ml のテトラメチルベンジジン, 0.0015 % 過酸化水素) 100 μ l を各ウエルに添加した。次いでプレートにカバーをし、遮光下で室温で 30 分間インキュベートした。カバーを取り、100 μ l の停止試薬 (1N H₂SO₄) を添加した後、プレートの 450 nm の吸光度と、比較参照として 615 nm ~ 630 nm の吸光度を読み取った。450 nm 対 630 nm の光学濃度の比を計算した。陽性結果のカットオフ値は、少なくとも 3 つの既知の陰性試料から得られた平均吸光度を 0.200 上回る吸光単位に設定した。これらの実験の結果を第 3 表に与える。

30

【0109】

【表 6】

第3表

試料	コーティングプレート			
	pQE/pol23	pQE/pol7.0	pTH/pol23	pTH/pol7.0
B7095	2.122	1.903	0.557	1.68
C000218	1.553	2.11	0.046	2.042
C000582	1.557	1.618	0.208	1.219
B3137	2.075	2.155	0.949	1.933
B5878	2.142	0.107	0.732	0.064
B5879	2.255	2.13	1.075	2.14
B5847	0.042	0.132	0.01	0.049
C000024	0.051	2.278	0.018	2.225
B5853	1.671	2.212	0.509	2.154
B3138	0.916	1.732	0.2	1.295
B5895	0.944	0.717	0.027	0.587
C000130	0.438	0.598	0.021	0.299
C000136	0.947	1.622	0.08	1.385
B5889	1.438	1.139	0.25	0.649
B5822	0.331	0.05	0.051	0.031
SAL054	2.044	1.802	0.955	1.771
PSBC1171	0.07	0.021	0.019	0.014
PSBC1265	0.033	0.019	0.014	0.018
PSBC1341	0.014	0.01	0.009	0.01
PSBC1398	0.028	0.015	0.013	0.013
PSBC1481	0.027	0.017	0.014	0.016
PSBC1521	0.021	0.023	0.013	0.014
PSBC1657	0.028	0.017	0.014	0.011
PSBC1566	0.017	0.012	0.011	0.01
EC+1	0.039	0.028	0.015	0.025
EC+2	0.046	0.074	0.021	0.03
EC+3	0.048	0.024	0.014	0.03
EC+4	0.022	0.015	0.011	0.023

【0110】

上記結果から、本発明のポリペプチドの1つまたは組合せを使うことにより、HIVに対する抗体の存在についての高感度で且つ高精度の試験が提供されることは明らかである。本発明のポリペプチドをそれ自体でまたはスクリーニングアッセイや確認試験と組み合わせて使用でき、一方で完全溶解物または完全抗原を独立した手順として使用することができる。本発明のポリペプチドは、スクリーニングアッセイや確認試験においてHIV-1またはHIV-2のエンベロープ領域またはgag領域から誘導されたポリペプチドまたはタンパク質と組み合わせて使用することもできる。更に、該ポリペプチドの特異性のために、該ポリペプチドをコードするDNA配列もDNAハイブリダイゼーションアッセイにおいて同様な特異性を示すだろうと期待できる。

【0111】

本発明を十分記載してきたが、特許請求の範囲および精神より逸脱することなくそれに多くの変更や改良を行えることは当業者に明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pGEX/pol23 のプラスミド地図を示す。

【図 2】 図 2 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pGEX/pol17 のプラスミド地図を示す。

【図 3】 図 3 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pQE/pol23 のプラスミド地図を示す。

【図 4】 図 4 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pQE/pol17 のプラスミド地図を示す。

【図 5】 図 5 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pThioHis/pol23 のプラスミド地図を示す。

【図 6】 図 6 は、本発明の組換え構成物の 1 つ、より詳しくは pThioHis/pol17 のプラスミド地図を示す。

10

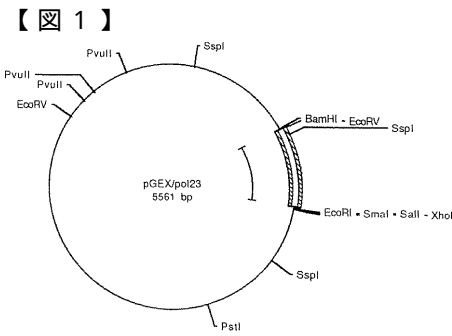


Figure 1

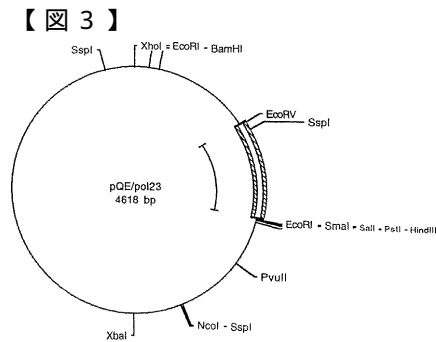


Figure 3

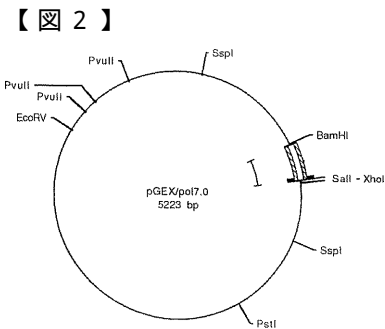


Figure 2

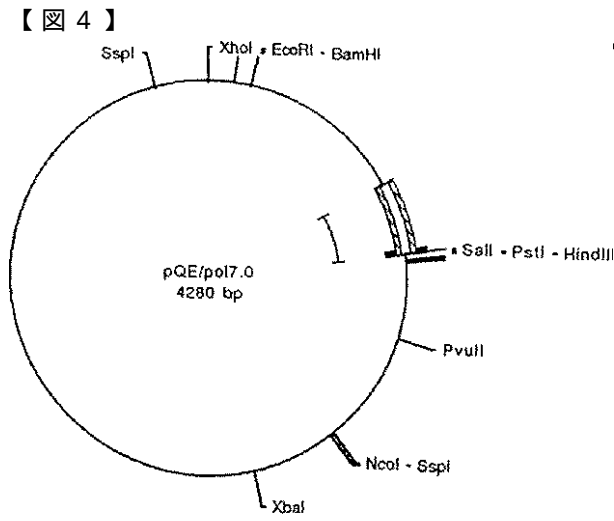


Figure 4

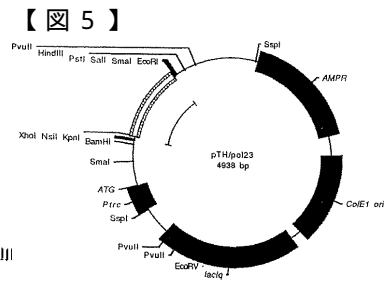


Figure 5

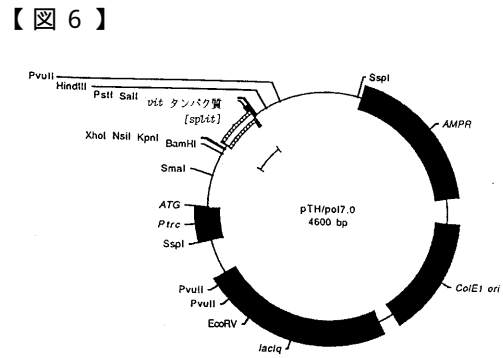


Figure 6

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/10 (2006.01) C 0 7 K 16/10
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
- (74)代理人 100108903
 弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也
- (72)発明者 コールマン, パトリック エフ.
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 2 6 , エドモンズ, セブンティセブンス アベニュー ウェスト 1 7 2 1 1
- (72)発明者 チョン-ダグ スー, ピーター
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 4 0 , マーサー アイランド, エイティフォース アベニュー サウス イースト 6 0 0 1
- (72)発明者 モンジ, ノブオ
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, ノース イースト ナインティエイス ストリート 3 5 4 5
- (72)発明者 コール, キャロル-アン
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 2 , シアトル, エイティーンズ アベニュー イースト 1 1 1 6
- (72)発明者 ゴション, アリス カンプ
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 7 7 , シアトル, セブンティーンズ アベニュー ノース ウェスト 2 0 3 0 9

合議体

審判長 種村 慈樹
 審判官 光本 美奈子
 審判官 鈴木 恵理子

- (56)参考文献 特開昭63-221247(JP,A)
 特表平63-502242(JP,A)
 Nature、326、6114、p.662-669(1987)
 Clin.Chem.、37(10)、pt1、p.1700-1707(1991)
 Cell、vol.40、no.1、p.9-17(1985)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N33/569, C07K14/16, C07K16/10, C12Q1/70