

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4113318号
(P4113318)

(45) 発行日 平成20年7月9日(2008.7.9)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 P 21/02	(2006.01)
C 12 Q 1/68	(2006.01)
C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 P 21/02	C
C 12 Q 1/68	A

請求項の数 3 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2000-45662 (P2000-45662)	(73) 特許権者	398032751 デイド・ペーリング・マルブルク・ゲゼル シヤフト・ミツト・ペシユレンクテル・ハ フツング ドイツ連邦共和国 マルブルク／ラーン (
(22) 出願日	平成12年2月23日 (2000.2.23)	(74) 代理人	100091731 弁理士 高木 千嘉
(62) 分割の表示	特願平5-249605の分割	(74) 代理人	100080355 弁理士 西村 公佑
原出願日	平成5年10月5日 (1993.10.5)	(72) 発明者	ルーツ・ゲー・ギュルトラー ドイツ連邦共和国 81249 ミュンヒエン トイフェルスベルクシユトラーセ 15
(65) 公開番号	特開2000-312592 (P2000-312592A)		
(43) 公開日	平成12年11月14日 (2000.11.14)		
審査請求日	平成12年2月23日 (2000.2.23)		
審査番号	不服2003-24796 (P2003-24796/J1)		
審査請求日	平成15年12月24日 (2003.12.24)		
(31) 優先権主張番号	P4233646:5		
(32) 優先日	平成4年10月6日 (1992.10.6)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		
(31) 優先権主張番号	P4235718:7		
(32) 優先日	平成4年10月22日 (1992.10.22)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V-グループの免疫不全ウイルスの R N A に対して相補的な c D N A

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列 RLQALETI1QNQQQLNLWGCKGKL1CYTSVKWNTS またはその少なくとも 9 個の連続するアミノ酸を有するその部分配列から成り、免疫不全の原因となるレトロウイルスに対する抗体を検出することができるペプチドをコードする D N A。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の D N A を用いるペプチドの製造方法。

【請求項 3】

アミノ酸配列 RLQALETI1QNQQQLNLWGCKGKL1CYTSVKWNTS またはその少なくとも 9 個の連続するアミノ酸から成るペプチドをコードし、配列番号 44 の 252 番目～356 番目の塩基配列またはその部分配列を有する D N A を用いる、免疫不全の原因となるレトロウイルスの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、H I V 群由来の新規レトロウイルスおよびそのウイルスの本質的性質を有する変異株の R N A またはその部分に対して相補的である c D N A に関する。そのレトロウイルスの培養方法も説明される。さらに本発明は、このレトロウイルスの取得のほか、そのウイルス、その部分または抽出物の、医学目的、診断のための、また接種素調製の際における使用にも関する。

いわゆる H I V 群に属すレトロウイルスはそれに感染した人間に免疫不全またはエイズ (

先天性免疫不全症候群) という集合概念で総括される症状を招く。

【0002】

疫学的研究により、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) がエイズ (先天性免疫不全症候群) 症例の圧倒的多数の病因であることが実証されている。1983年にある患者から単離され特性評価されたレトロウイルスに HIV-1 という名称が与えられた (Barre-Sinoussi, F. et al., Science 220, 868-871 [1983])。HIV-1 の一変異株が WO 86/02383 に記載されている。

第2のヒト免疫不全ウイルス群は 1985 年に西アフリカで同定され (Clavel, F. et al., Science 233, 343-346 [1986])、そしてヒト免疫不全ウイルス・タイプ2 (HIV-2) と名付けられている (EP-A-0239425)。HIV-2 レトロウイルスは、明らかに HIV-1 とは区別されるが、なおもサル免疫不全ウイルス (SIV-2) と近縁関係をも示す。HIV-1 と同様、HIV-2 もエイズ症状を生じる。

免疫不全レトロウイルスのもう一つの変異株が EP-A-0345375 に記載されており、そこでは HIV-3 レトロウイルスと名付けられている (ANT 70)。

【0003】

Lancet Vol. 340, Sept. 1992, pp. 681-682 には免疫不全ウイルスのもう一つの変異株の単離が記載されている。

高い変異性を示すことがヒト免疫不全ウイルスの一特徴であり、これが様々な単離物の比較の可能性を明らかにめんどうにしている。様々な HIV-1 - 単離物を比較すると、他のゲノム領域は比較的保存されたままであるのに、いくつかのゲノム領域では高い変異性が認められる (Benn, S. et al. Science 230, 949-951 [1985])。本質的により大きい多形態性は HIV-2 についても観察することができた (Clavel, F. et al., Nature 324, 691-695 [1986])。構造的および酵素的に不可欠なタンパク質をコードしている gag および pol 遺伝子は大きな遺伝安定性を有し；env 遺伝子および調節タンパク質をコードする遺伝子 (vif, vpr, tat, rev, nef) は高い変異度を示す。さらに HIV-1 に対する抗血清がほんのわずかな配列相同性しかなくても、HIV-2 の gag および pol 遺伝子産生物とも交叉反応することも示すことができた。同様に、あまり厳しくない条件を用いなければ両ウイルス間のハイブリダイゼーションはほとんど有意でなかった (Clavel, F. et al., Nature 324, 691-695 [1986])。

【0004】

HIV 群由来レトロウイルスが広く伝播していることから、そして感染時点と、病理学的变化の明らかな徵候が認められるまでの時点との間に数年乃至多年 (2 ~ 20 年) の間隔があることから、HIV 群レトロウイルスをできるだけ早くそしてとりわけ確実に測定することは疫学的に極めて重要なことである。これは免疫不全の徵候を示す患者の診断の際だけでなく供血者の検査においても役割を果す。HIV-1 または HIV-2 タイプのレトロウイルスまたはそれらの構成部分をヒト血清の検出系に用いた場合、それら血清が由来する患者に免疫不全の徵候が現われているのに、抗体を全く検出できないかあるいは弱い検出しかなされないことがわかっている。本発明による HIV 群由来レトロウイルスを用いれば一定の場合にそのような検出が可能である。

【0005】

1991 年に免疫不全の徵候を示した 34 才のカメリーンの女性患者の末梢リンパ球から単離された、以下 M V P - 5180 / 91 と称する新規ヒト免疫不全ウイルスの単離および特性評価を記述する。地理的には、このレトロウイルスは、HIV-2 および HIV-1 ウィルス感染の伝播を特色とする西アフリカと、ほぼもっぱらに HIV-1 が伝播している東中央アフリカとの間に位置するアフリカの地域に由来している。さらに本発明の対象は、M V P - 5180 / 91 と称される HIV 群の新規レトロウイルスおよびその変異株のほか、それより導かれる DNS 配列およびアミノ酸配列または部分配列、およびこれらを含むテストキットである。レトロウイルス M V P - 5180 / 91 はブダペスト条約の条件に従って European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) に V92092318 の番号の下に寄託された。

10

20

30

40

50

【0006】

HIV-1およびHIV-2と同様に、本発明によるMVP-5180/91は次の細胞系統、HUT78、Jurkat-細胞、C8166-細胞およびMT-2-細胞で増殖する。ウイルスの単離および増殖は“Viral Quantitation in HIV Infection (HIV感染におけるウイルス定量)、Jean-Marie Andrien編、John Libbey Eurotext発行、1991年”、という本に詳述されている。そこに記述されている操作方法を引用により本出願の開示の一部とする。

さらに、本発明ウイルスはマグネシウム依存性ではあるがマンガン依存性ではない逆転写酵素を有する。このことは、ウイルスHIV-1およびHIV-2とのもう一つの一致点である。

10

【0007】

本発明によるMVP-5180/91ウイルスとレトロウイルスHIV-1およびHIV-2の相違をよく理解してもらうために、免疫不全の原因となるレトロウイルスの構築をまず簡単に説明する。ウイルスの内部には、p24 (pはprotein(タンパク質)のpである)の呼称を有するサブユニットより組成された円錐状コアにRNAが存在する。この内部コアは、タンパク質p17で構築されたタンパク質外被(外部コア)で囲まれ、そして宿主細胞に由来する脂質のほかにトランスメンブレン(transmembrane)タンパク質gp41および外被タンパク質120(gp120)を含む糖タンパク質外被により囲まれている。このgp120は次いで宿主細胞のCD-4-レセプターと結合することができる。

【0008】

20

知られている限り、HIV-ウイルスのRNAは(簡略化して記述した場合)次の遺伝子領域を示す:両末端にいわゆるロングターミナルリピート、および次の遺伝子領域、すなわちgag、pol、envおよびnef。gag遺伝子はとりわけ中核(コア)-タンパク質であるp24およびp17をコードし、pol遺伝子はとりわけ逆転写酵素、RNエース(リボヌクレアーゼ)Hおよびインテグラーゼをコードし、そしてenvはウイルス外被の糖タンパク質であるgp41およびgp120をコードする。nef遺伝子は調整機能を有するタンパク質をコードする。HIV型のレトロウイルスのゲノム配置の概略図を図1に示す。

【0009】

レトロウイルスHIV-1とHIV-2との間の区別は、ウイルス抗原がAbbott社のテストキット(HIVAG-1 Monoclonal)として商業的に入手されるモノクローナル抗体を用いてテストしそして(HIV-1)p24に指向させることにより可能になる。ウイルス型HIV-1およびHIV-2における逆転写酵素含量が略等しいことは知られている。そこで可溶化されたウイルスの希釈液について抗原抗体反応によって得られる吸光度(E490nm)を逆転写酵素の活性に対してプロットすると大体図2に相当するグラフが得られる。ここでわかることは、HIV-1における逆転写酵素含量に比例して使用モノクローナル抗体にはp24に対する極めて高い結合親和性が存在することである。それに対し、HIV-2については、モノクローナル抗体をこの場合も逆転写酵素含量に関係させて用いた場合極めてわずかな対p24結合親和性しか認められない。この測定をMVP-5180/91について行うとかなり正確にHIV-1およびHIV-2の曲線の中間にくる、すなわちモノクローナル抗体の結合親和性はHIV-1よりも低下している。図2はこれらの事実を図示したものであり、ここでRTは逆転写酵素を意味し、そして抗原(Ag)としては、Abbott社より購入されるテストキットに存在するモノクローナル抗体がそれに対して指向するタンパク質p24が用いられる。

30

【0010】

多面的に利用可能な遺伝子工学系はいわゆるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)であり、その場合、この方法の実施に必要な成分は購入することができる。この方法を用いれば、増幅すべき配列のDNA領域が知られていればDNA配列を増幅することができる。その際、増幅すべき核酸配列の短い領域に付着する短い相補DNA断片(オリゴヌクレオチド=プライマー)を合成する必要がある。テストの実施には、そのほかにポリメラーゼとヌクレオチドトリホスフェートを含有する反応混合物中でHIV-核酸をそのプライマーと混

40

50

合する。重合(DNA合成)を一定の時間行った後、核酸鎖を加温により分離させる。冷却後、重合を改めて開示させる。従って本発明によるレトロウイルスにおいてHIV-1またはHIV-2ウイルスが問題とされる場合には、HIV-1およびHIV-2ウイルスの既知配列内で保存されたプライマーを用いて核酸を増幅し得たはずであろう。そのようなプライマーは一部報告されている(po13およびpo14についてはLaure, F. et al., Lancet ii, (1988) 538-541、またはsk38/39、sk68/69についてはOu C.Y. et al., Science 239 (1988) 295-297)。

【0011】

今般次の配列を示す一定のプライマー対、すなわち

【化1】

10

HIV-1

gaga : CTA CT AGTAC CCTTC AGG

gagb : CGGTC TACAT AGTCT CTAAA G

sk38 : CCACC TATCC CAGTA GGAGA A

sk39 : CCTTT GGTCC TTGTC TTATG TCCAG AATGC または

po13 : TGGGA AGTTC AATTA GGAAT ACCAC

20

po14 : CCTAC ATAGA AATCA TCCAT GTATT G

po13n : TGGAT GTGGG TGATG CATA

po14n : AGCAC ATTGT ACTGA TATCT A および

SK 145 : AGTGG GGGGA CATCA AGCAG CC

SK 150 : TGCTA TGTCA CTTCC CCTTG GT

145-P : CCATG CAAAT GTTAA AAGAG AC

30

150-P : GGCCT GGTGC AATAG GCCC

【0012】

またはpo13およびpo14と

UNI-1 : G T G C T T C C A C A G G G A T G G A A

UNI-2 : A T C A T C C A T G T A T T G A T A

(Donehower L.A. et al. (1990) J. Virol. Methods 28, 33-46)

との組合せを用い、そしてネスティド・プライマー(nested primer)を用いたPCRを行うとMVP-5180/91-DNAの弱い増幅物が得られることがわかった。

40

【0013】

次のプライマー配列

【化2】

tat 1 AATGG AGCCA GTAGA TCCTA
 tat 2 TGTCT CCGCT TCTTC CTGCC

 tat 1P GAGCC CTGGA AGCAT CCAGG
 tat 2P GGAGA TFCCT AAGGC TTTTG

 enva : TGTTC CTTGG GTTCT TG
 envb : GAGTT TTCCA GAGCA ACCCC
 sk68 : AGCAG CAGGA AGCAC TATGG
 sk69 : GCCCC AGACT GTGAG TTGCA ACAG

 5v3e : GCACA GTACA ATGTA CACAT GG
 3v3e : CAGTA GAAAA ATTCC CCTCC AC
 5v3degi : TCAGG ATCCA TGGGC AGTCT AGCAG AAGAA G
 3v3degi : ATGCT CGAGA ACTGC AGCAT CGATT CTGGG TCCCC TCCTG AG
 3v3longdegi : CGAGA ACTGC AGCAT CGATG CTGCT CCCAA GAACC CAAGG
 3v3longext : GGAGC TGCTT GATGC CCCAG A

 gagdi : TGATG ACAGC ATGTC AGGGA GT
 pol e : GCTGA CATTG ATCAC AGCTG GCTAC

を用いると、増幅物は全く得られなかつたが、HIV-1に比べ弱い増幅物しか得られなかつたが、これは場合によつては汚染によるかもしれない。

【0014】

gag c : TATCA CCTAG AACTT TAAAT GCATG GG
 gag d : AGTCC CTGAC ATGCT GTCAT CA
 env a : GTGGA GGGGA ATTTT TCTAC TG
 env d : CCTGC TGCTC CCAAG AACCC AAGG

を用いるとHIV-1に比べ弱いが使用HIV-2単離物(MVP-11971/87)と同じ強さを示す増幅物が得られた。

【0015】

広く普及しているHIV-抗体の検出方法は、いわゆるウエスタンプロット(免疫プロット)である。その場合、ウイルスタンパク質はゲル電気泳動的に分離された後、膜に移される。その移されたタンパク質を有する膜は次に検査すべき患者の血清を結合させる。ウイルスタンパク質に対する抗体が存在すれば、これはそのタンパク質に結合する。洗浄後はウイルスタンパク質に対する特異的抗体のみが残る。その抗体は次に、呈色反応を触媒する酵素と規則的にカップリングされた抗抗体により視認可能にできる。この方法により、ウイルスタンパク質のバンドを可視化することができる。

【0016】

本発明によるウイルスMVP-5180/91はウイルスHIV-1およびHIV-2に対し、ウエスタンプロットにおいて二つの著しい本質的相違点を示す。HIV-1は、タンパク質p24に対応する強いバンドと、p23に対応する極めて弱い、しばしばほと

10

20

30

40

50

んど視認できないバンドを規則的に示す。HIV-2はタンパク質p25に対応する強力なバンドを、そして多くの場合にp23に対応する弱いバンドを示す。これとは対照的に、本発明によるMVP-5180/91ウイルスはタンパク質p24およびp25に相当するほぼ同じ強さの二本のバンドを示す。

【0017】

もう一つの著しい相違点は逆転写酵素に対応するバンドに存在する。HIV-1は逆転写酵素に相当する一本のバンド(p53)とRNエースHと結合した逆転写酵素に相当する一本のバンド(p66)を示す。HIV-2ではその逆転写酵素はタンパク質p55に相当し、またそれがRNエースHと結合している場合はタンパク質p68に相当する。それに対し本発明によるMVP-5180/91は、タンパク質p48のところに逆転写酵素に相当する一本のバンド、およびタンパク質p60のところにRNエースHと結合した逆転写酵素に相当する一本のバンドを示す。

これらの結果から、MVP-5180/91の逆転写酵素はHIV-1またはHIV-2の逆転写酵素よりも約3～約7キロダルトン小さい分子量を有すると結論することができる。MVP-5180の逆転写酵素は従ってHIV-1またはHIV-2の逆転写酵素よりも約4,500～約5,500ダルトン小さい分子量を示す。

【0018】

本発明によるウイルスMVP-5180/91を用いた場合、抗-env-抗体は免疫不全の徵候を示すドイツの患者の血清中にはほんの弱くに検出され得るにすぎないが、本発明によるウイルスに代えてHIV-1ウイルスを用いるとそれらの血清が強く反応することが見出された。この強力な検出反応はとりわけgp41タンパク質に局在した。これらの試験では、一方はドイツの患者に由来し、そして他方は免疫不全の徵候を示すアフリカの患者に由来する血清パネルを対比した。

前述の諸特徴が本発明によるMVP-5180/91に相当するようウイルス変異株を特徴付ける。従って、免疫不全徵候を示しそして好ましくはアフリカに由来する人々に由来するヘパリン加供血者血液から免疫不全ウイルスが単離されれば、この方法により本発明によるウイルスまたはその変異株を得ることができる。

【0019】

前述の性質を示すウイルスが単離されたのでcDNAのクローニングを次の方法により行うことができる：そのウイルスを相応の量(約1リットル)の培養液から沈殿させ、そしてホスフェート緩衝食塩水にとる。次に(20%)サッカロース-パッドを通してペレット化を行う。そのウイルスペレットは、20mMジチオトレイトールおよび0.5%Nonidet p40中の6Mグアニジニウムクロライド中に懸濁することができる。CsClを2M濃度になるまで添加しそしてその破碎されたウイルスを含有する溶液を塩化セシウムパッドに適用する。次いでウイルスRNAを遠心分離によりペレット化し、溶解し、フェノール抽出し、そしてエタノールおよび塩化リチウムを用いて沈殿させる。オリゴ(T)-プライマーを用いて第一cDNA鎖の合成をウイルスRNAまたはその一部で行う。逆転写酵素を添加しての合成は購入により入手されるキットを用いて行うことができる。第二鎖の合成にはRNA/DNAハイブリッドのRNA鎖をRNエースHで希釈しそして大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼIを用いて合成される。次いでT4DNAポリメラーゼ平滑末端を作ることができ、そしてこれを制限切断部位に適したリンカーと結合させる。適切な制限エンドヌクレアーゼによる制限消化の後、cDNA断片をアガロースゲルから単離し、そして予め適切な方法で切断されたベクターに結合する。cDNA-インサートを有するそのベクターを次いでコンピテント大腸菌細胞の形質転換に用いることができる。得られたコロニーを次いで膜に移動し、溶菌させそして変性させ、そして最後にハイブリダイゼーションにより、ジゴキシゲニンまたはビオチンで標識された核酸と結合させる。相当するcDNAの遺伝子工学的調製後、レトロウイルスに由来する目的とするDNA断片の単離が可能である。適切な発現ベクター中でこの断片を構築することにより、次いで目的とするタンパク質またはタンパク質断片を発現させ、そして診断テストに適用することができる。

10

20

30

40

50

【0020】

前述の方法とは別の選択肢として、免疫不全ウイルスをPCR法を用いてクローン化でき、その際前述のプライマーを用いることができる。

様々なウイルス単離物の間の類似性を核酸またはタンパク質配列の相同度により絞り出すことができる。例えば50%相同性は配列中の100のヌクレオチド-またはアミノ酸-位のうち50が一致することを意味している。タンパク質の相同性は配列分析により決定される。相同DNA配列はハイブリダイゼーション法によっても調べることができる。

【0021】

本発明によれば、まず外被タンパク質の一部について配列決定がされたところ、この配列がHIV型のウイルスの相当する配列に対して比較的わずかな相同性しか示さないことが確認された。特にgp41領域に関しては、データバンクを利用して行われたHIV-配列との比較によって高々66%（核酸配列）の相同性が見出されたにすぎない。

更に、gp41をコードする領域も配列決定された。この配列を第1表または第3表に示す。

【0022】

従って本発明の主題は、第1表および/または第3表のヌクレオチド配列に関し、本発明によるHIVウイルス、MVP 5180/91に対して66%以上、好ましくは75%以上、そして特に好ましくは85%以上の相同性を示すようなウイルスである。

更に本発明の主題は、少くとも50、好ましくは100、ヌクレオチド長の第3表に記載の核酸配列の部分配列に対して66%以上、好ましくは75%以上、そして特に好ましくは85%以上の相同性を示すようなウイルスである。これは、少くとも16、そして好ましくは33、のアミノ酸のアミノ酸長に相当する。

【0023】

本発明によるウイルスはその配列によって従来より知られるウイルスとは区別される。従って本発明の主題は、相同度により相違度を確認した場合に本発明によるウイルスの配列に広範に対応するようなウイルスおよび相当する核酸またはアミノ酸配列である。従って例えば85%以上の相同性は、100のヌクレオチドまたはアミノ酸のうち少くとも85において同じヌクレオチドまたはアミノ酸を示し残りは異なっていてもよいような配列が包含されることを意味する。相同性を確認するにあたって、両配列はできるだけ多くの相互に対応するヌクレオチドまたはアミノ酸が相互に一致するように対応される。

【0024】

本発明によるウイルスのDNA配列として記載された（ほぼ）完全な配列を第7表に示す。ここで本発明の主題は第7表による配列を示すウイルス、および第7表の配列に対し高い相同性を示すそれらの変異株、およびそれより導かれる、診断的に使用できるかまたは接種素として通用できるタンパク質、ポリペプチドおよびオリゴペプチドである。

【0025】

単離された配列に基づき免疫支配エピトープ（ペプチド）を調製し（konfektioniert）合成することができる。ウイルスの核酸配列がわかっているので当業者はそれよりアミノ酸配列を導くことができる。アミノ酸配列の部分領域を第3表に記述する。従って本発明の主題は、第7表または第4表に開示された情報を用いて調製することができる抗原、すなわちタンパク質、オリゴペプチドまたはポリペプチドもある。これらの抗原、タンパク質、ポリペプチドおよびオリゴペプチドは、第7表から導き得る、または第3表に記載されているアミノ酸配列を示す。それら抗原またはペプチドは第3表に記載されているかまたは第7表より導き得るアミノ酸配列の比較的短い部分配列を示すことができる。このアミノ酸配列は、少くとも6アミノ酸長、好ましくは少くとも10アミノ酸長、そして特に好ましくは15アミノ酸長である。これらのペプチドは組換え法によるだけでなく合成法によって調製することもできる。適当な調製方法の一つはMerrifield型の固相合成である。この方法の異なる記述および他の従来技術として知られる方法は文献、例えばM. Bodansky, et al., Peptide Synthesis, John Weeley & Sons, 第二版, 1976にみることができる。

10

20

30

40

50

【0026】

診断テストにおいては、検査すべき人の血清検体をMVP-5180/91に由来する一以上のタンパク質または糖タンパク質（それらは真核細胞系統において発現させることができる）のタンパク鎖またはその一部と混合する。好ましいテスト方法には免疫蛍光または免疫酵素テスト法（例えばELISA、イムノプロット）が包含される。

免疫酵素テスト（ELISA）においては、例えばMVP-5180/91またはその変異株に由来する抗原をミクロタイタープレートの壁面に結合することができる。その際に用いられる用量はテストシステムおよびミクロタイタープレートの操法に本質的に依存する。次いで検査すべき人に由来する血清または血清希釈液をそのミクロタイタープレートの穴に添加する。一定のインキュベーション時間の後、そのプレートを洗浄する。特異免疫複合体は、ヒト免疫グロブリンに特異的に結合しそして予め酵素例えは西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどに結合しておいた抗体により、あるいは酵素標識抗原を用いて検出される。この酵素は無色基質を強く発色した生成物に変えることができ、次いでその色の強さで特異抗-HIV-抗体の存在を読み取ることができる。テストシステムにおける本発明ウイルス利用のもう一つの可能性はウェスタンプロットへの利用である。

【0027】

たとえ、免疫不全疾患に対する接種素の調製が極端に困難であるとわかっても、このウイルスまたはその一部、すなわち免疫支配エピトープおよび細胞性免疫のインデューサー、あるいは遺伝子工学的に調製された抗原は接種素の開発および調製に用いることができる。

【0028】

実施例1

本発明による免疫不全ウイルスMVP-5180/91を免疫不全徵候を伴う女性患者の血液から単離した。そのために、HIVに感染していない供血者の血液からの末梢リンパ球（*peripheral blood lymphocytes, PBL*）および末梢単核細胞（末梢血リンパ球、PBL）を植物性血球凝集素（フィトヘマグルチニン）で刺激しそして培養液に保った。そのために、10%牛胎仔血清含有の普通培地 RPMI 1640を用いた。培養条件はLanday A. et al., J. Inf. Dis., 161 (1990) pp. 706-710、に記載されている。次いで巨細胞（*Riesenzenellen*）の形成を顕微鏡観察した。HIVウイルスの生産をAbbott社から購入できるテストを用いたp24-抗原の測定により測定した。ウイルス増殖測定のためのもう一つのテストは粒子結合逆転写酵素を用いたテストであった（Eberle J., Seibl R., J. Virol. Methods 40, 1992, pp. 347-356）。すなわち、ウイルス生産を監視するためにウイルス増殖を培養上清中の酵素活性に基づいて週1~2回測定した。1週間に1回新たな供血者リンパ球を添加した。

【0029】

HIVウイルス増殖が確認できた後、HIVで感染されていない健常供血者の血液からの新鮮末梢リンパ球（PBL）を初代培養液上清で感染させた。この段階を反復した後その上清でH9またはHUT78細胞を感染させた。この方法により免疫不全ウイルスの永続的生産が可能であった。そのウイルスはEACCにNo. V 920 92 318の番号で寄託された。

【0030】

実施例2

HIV感染の検出には、現在のところいわゆるウェスタンプロットまたはイムノプロットが標準的方法である。J. Virol. Meth. 15 (1987) pp. 11-23にGuertlerらが記載している手順に従って様々な血清を検査した。その際に、ドイツの患者の血清をアフリカの患者から得られた血清と対比させた。その際に得られた結果は次のとおりであった。

ウイルス型：ドイツの患者から単離されたHIV-1ウイルス

ドイツの血清　　強い反応

アフリカの血清　g p 41と強い反応

10

20

30

40

50

ウイルス型：MVP-5180/91

ドイツの血清 g p 41 と無反応乃至弱い反応

アフリカの血清 強い反応

【0031】

前述の結果は、ドイツの患者から単離されたHIV-1型ウイルスをHIV-感染の検出に用いる場合、患者が本発明によるMVP-5180/91に相当するウイルスに感染しているときは、一義的結果は多分全く得られないことを示している。さらにそれによって、本発明によるウイルスを用いればゲノム全体に関し少くとも約85%相同性を本発明ウイルスに対して示すようなウイルスを検出できると結論される。

【0032】

10

実施例3

実施例2に記載の手順に従ってさらなるウェスタンプロットを行った。その結果を添付した図3に示す。このテストでは、本発明による免疫不全ウイルスMVP-5180/91のウイルスタンパク質、およびHIV-1型ウイルス(MVP-899)のウイルスタンパク質をそれぞれ、ゲル電気泳動分離した後セルロースフィルターに移した。これらフィルター片を様々な患者の血清と共にインキュベートした後特異抗体を呈色反応により視認できるようにした。MVP-5180の標題のある図の左半分は本発明による免疫不全ウイルスを示す。図の右半分は、HIV-1ウイルスに関係する、ドイツの供血者から単離されたウイルス(MVP-899)を示す。

それら個々のフィルター片を今度は様々な患者の血清と共にインキュベートした。図3からわかるように、それぞれ同じ(ドイツの患者の)血清を各々2つのフィルター片と反応させた。8と26；9と27；10と28；11と29；13と30；13と31；14と32；15と33および16と34の番号は同じ血清を表示している。17および18番のウェスタンプロットでは、アフリカの患者の血清を適用した。右側余白の数値は概ねの分子量を1000(KD)単位で記述したものである。

20

【0033】

図3は、本発明による免疫不全ウイルスを有するドイツの患者の血清がウェスタンプロットにおいてg p 41とは極めて弱くしか反応しないことを明らかに示している。これに対し、アフリカの患者の血清は本発明による免疫不全ウイルスと極めて強く反応する。従って図3は、本発明による免疫不全ウイルスを用いればHIV-1またはHIV-2ウイルスを用いた場合には不確かな、すなわち一義的でない陽性結果しか得られないような免疫不全感染を検出できることを明らかにしている。この検出可能性は遠大な診断上の意義を有し得る。何故ならば、ウェスタンプロットで不確かな結果しか得られない場合は、免疫不全ウイルスによる感染が関係しているかどうかを明確な確実さをもって確認することができないからである。しかしながら本発明による免疫不全ウイルスを用いてかかる不確かな結果が本発明によるタイプのウイルスによる感染と相關させることができることろ、これは診断上大変な進歩である。

30

【0034】

実施例4

HIV-単離物MVP-5180/91のゲノム断片のDNA単離、増幅および構造的特徴評価

40

MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞よりのゲノムDNAを標準的方法により単離した。

単離物MVP-5180/91のゲノム領域の特徴評価をするためにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)実験を外被タンパク質領域g p 41からのプライマー対を用いて行った。そのPCR実験の実施は次の改変を加えたSaikiら(Saiki et al., Science 239: 487-491, 1988)の方法により行った:HIV-特異的DNA領域を増幅するために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの5μlのゲノムDNAを100μlの反応混合物(0.25mM dNTP、各1μMのプライマー1およびプライマー2、10mM Tris HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、2.5

50

単位の T a q ポリメラーゼ (Perkin Elmer社)) にピペットで取り、そして次の温度プログラムに従って増幅した： 1 . 初期変性： 3 分 9 5 、 2 . 増幅： 9 0 秒 9 4 、 6 0 秒 5 6 、 9 0 秒 7 2 (3 0 サイクル) 。

【 0 0 3 5 】

前記 P C R およびヌクレオチド配列決定に用いたプライマーは Bioresearch 社のオリゴヌクレオチド合成装置 8 7 5 0 で合成された。

プライマー 1 : A G C A G C A G G A A G C A C T A T G G

(H I V 単離物 H × B 2 からの座標 (コーディネート) : 塩基 7 7 9 5 - 7 8 1 4 、 プライマー s k 6 8 に相当)

プライマー 2 : G A G T T T T C C A G A G C A A C C C C

10

(H I V 1 単離物 H × B 2 からの座標 : 塩基 8 0 0 3 - 8 0 2 2 、 プライマー env b に相当) 。

【 0 0 3 6 】

増幅した D N A を 3 % " Nusieve " アガロースゲル (Biozyme 社) で分離し、増幅した断片を切り取りそして等容の緩衝液 (1 × T B E (0 . 0 9 M Tris ボレート、 0 . 0 0 2 M E D T A 、 pH 8 . 0) と混合した。その D N A - アガロースゲル混合物を 7 0 で 1 0 分間インキュベートし、次いでフェノール抽出した後、その D N A を水性相から 1 / 10 容の 3 M N a A c (pH 5 . 5) および 2 容のエタノールを添加することにより - 2 0 で 1 5 分間沈殿させ、次いで遠心分離機 (Eppendorf 社) でペレット化した (1 3 0 0 0 rpm 、 1 0 分、 4) 。ペレット化した D N A を乾燥し、水にとり、そして分光光度計 (Beckman 社) において 2 6 0 nm での D N A 濃度を光度計測定した後、 Sanger (F. Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci., 74 : 5463, 1977) の方法により配列決定した。 Klenow D N A ポリメラーゼを用いた配列決定に代えて Applied Biosystems 社のキット (" T a q Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing " 、 注文番号 (Best. - Nr.) : 401150) を用いて配列決定反応を行った。 プライマーとしては別々の配列決定反応にプライマー 1 またはプライマー 2 (各 1 μ M) を適用した。配列決定反応系の分析は D N A 配列決定装置 3 7 3 A (Applied Biosystems 社) で、装置製造元の指示に従って行われた。

増幅された D N A 領域のヌクレオチド配列およびそれより導かれたアミノ酸配列を第 1 表に示す。

【 0 0 3 7 】

【 表 1 】

20

30

第 1 表

GCGCAGCGGCAACAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCACAC
 CGCGTCGCCGTTGTCGCGACTGCCATGCCTGGGTGTCACATGACTTCCCATATCACGTTG
 A A A T A L T V R T H S V L K G I V Q Q
 AGCAGGACAACCTGCTGAGAGCGATAACAGGCCAGCAACACTTGCTGAGGTTATCTGTAT 10
 TCGTCCTGTTGGACGACTCTCGCTATGTCCGGTGTGAACGACTCCAATAGACATA
 Q D N L L R A I Q A Q Q H L L R L S V W
 GGGGTATTAGACAACCTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTAGAAACCCCTATACAGAACAGC
 CCCCATATACTGTTGAGGCTCGAGCGGACGTTGGAAATCTTGGGAATATGTCTTAGTCG
 G I R Q L R A R L Q A L E T L I Q N Q Q
 AACGCCTAAACCTAT 20
 TTGCGGATTTGGATA
 R L N L -

【0038】

実施例5

確認された第1表記載のヌクレオチド配列の相同配列をG E N E B A N K データバンク(リリース72、1992年6月)でG C G - コンピュータープログラム(Genetic Computer Group, Inc.社、米国ワイスクンシン州、バージョン7.1、1992年3月)を用いて調べた。このデータバンクには1992年7月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスおよび靈長類からの単離物のヌクレオチド配列のほとんどが含まれている。

【0039】

第1表のヌクレオチド配列は最良の場合にはチンパンジーからの単離物に対し66%の相同意を示す。H I V 1 単離物に対して、M V P 5 1 8 0 / 9 1 は調べたDNA配列において最良の場合に64%相同である。H I V 2 単離物に対し第1表のDNAは56%相同である。チンパンジーからの単離物の外には第1表のヌクレオチド配列と靈長類からの単離物(S I V: サル免疫不全ウイルス)からのDNA断片の間の最良の相同意は、単離物S I V(アフリカ産オナガザル)T Y O - 1 の外被タンパク質の部分領域をコードするDNA配列に存在する。その相同意は61.5%である。

【0040】

実施例6

確認された第1表に記載のアミノ酸配列の相同配列をS W I S S P R O T タンパク質データバンク(リリース22、1992年6月)においてG C G - コンピュータープログラムを用いて調べた。このデータバンクには1992年6月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスおよび靈長類からの単離物のタンパク質配列のほとんどが含まれている。

【0041】

第1表記載のアミノ酸配列は前述のチンパンジーからの単離物の外被タンパク質断片に対し最良の場合62.5%相同である。H I V 1 - 外被タンパク質の下では、第1表のアミノ酸配列との最良の相同意は単離物H I V 1 M a 1に認められる。その相同意は59%

10

20

30

40

50

である。HIV-2-外被タンパク質に対しては第1表のアミノ酸配列との相同性は最良の場合52%（単離物HIV-2 Rod）である。HIV-1およびHIV-2-単離物も最良の場合対応するタンパク質断片においてわずか64%が一致するに過ぎないことから、単離物MVP-5180/91の場合はHIV-1およびHIV-2とは明らかに構造的に区別され従ってそれらから独立したHIVウイルス群の代表であるHIV変異株が関係していると思われる。

【0042】

HIV単離物MVP-5180/91の増幅されたDNA領域のアミノ酸配列（第1表）は、HIV-1の外被タンパク質の免疫診断的に重要な領域（アミノ酸584-618*）とオーバーラップする（第2表）(Gnann et al., J. Inf. Dis. 156: 261-267, 1987; Norrby et al., Nature, 329: 248-250, 1987)。

HIV-2およびSIVの外被タンパク質の対応するアミノ酸領域も同様に免疫診断的に保存されている(Gnann et al., Science, pp. 1346-1349, 1987)。従ってHIV-1およびHIV-2のこの外被タンパク質領域からのペプチドは多くの商業的に入手し得るHIV-1/2抗体スクリーニングテストに固相抗原として適用される。それによって約99%の抗HIV-1および抗HIV-2陽性血清を捕捉することができる。

【0043】

MVP-5180/91-外被タンパク質のアミノ酸領域（第1表）は、gp41の免疫診断的に重要な領域とオーバーラップしていることから、血清診断的に重要であり得る。特に、HIV感染した患者の抗血清が商業的に入手される抗体スクリーニングテストのいずれとも陽性に反応しない場合にはそうである。これらの場合には、MVP-5180/91と密接な関係にあるウイルスによる感染が存在し得る。

【0044】

【表2】

第 2 表

..... RILAVERYLKDQQQLLGIGCGSGKLICTTAVPWNAS
|:|:|.:|:|||.|:
WGIRQLRARLQALETLIQNQQQLNL.....

【0045】

実施例7

(gp41をコードする) HIV単離物MVP-5180/91のゲノム診断のDNA単離、増幅および構造的特徴評価

MVP-5180/91に感染したHUT78細胞からのゲノムDNAを前述の如く単離した。

単離物MVP-5180/91のゲノム領域の特徴評価を行うために、外被タンパク質領域gp41からのプライマー対を用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）実験を行った。

PCR(Saiki et al., Science 239: 487-491, 1988)および逆PCR(Triglia et al., Nucl. Acids, Res. 16: 8186, 1988)は次の改変を加えて行われた：

【0046】

1. PCR

HIV-特異的DNA領域を増幅するために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの5μl(218μg/ml)のゲノムDNAを100μlの反応混合物(0.25mM dNTP、各1μMのプライマー-163envおよびプライマー-envend、1.0mM Tris HCl(pH8.3)、5.0mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、2.5単位のTaqポリメラーゼ(Perkin Elmer社))にピペットでとりそして次の温度プログラムに従って増殖した：1. 初期変性：3分間95℃、2. 増幅：90秒間94℃、

10

20

30

40

50

60秒間56、90秒間72（30サイクル）。

【0047】

2. g p 4 1 の 5 領域 (N-末端) および g p 1 2 0 の 3 配列を “逆 P C R” により增幅した。そのために、M V P - 5 1 8 0 / 9 1 に感染させた H U T 7 8 細胞からの 1 0 0 μ l のゲノム D N A 調製物 (2 1 8 μ g / ml) を 1 0 単位の制限エンドヌクレアーゼS a u3aを含む 2 0 0 μ l の最終容量中 3 7 で 1 時間消化した。その D N A を次にフェノール処理し、そして酢酸ナトリウム（最終濃度 3 0 0 mM）および 2.5 容エタノールを用いて - 7 0 で 1 0 分間沈殿させ、エッペンドルフ遠心分離機で遠心分離し、そしてそのペレットを乾燥しそして 8 9 0 μ l の蒸留水に再懸濁した。1 0 0 μ l のリガーゼ緩衝液 (5 0 mM Tris H C l 、pH 7.8、1 0 mM M g C l₂、1 0 mM D T T、1 mM A T P、2 5 μ g / ml 牛血清アルブミン) および 1 0 μ l の T 4 D N A - リガーゼ (Boehringer社、マンハイム) を添加した後、それら D N A 断片を室温で 3 時間結合し、改めてフェノール処理し、そして前述の如く酢酸ナトリウムおよびエタノールを用いて沈殿させた。遠心分離および乾燥後、その D N A を 4 0 μ l の蒸留水に再懸濁し、そして 1 0 単位の制限エンドヌクレアーゼS a c I (Boehringer社、マンハイム) を用いて 1 時間消化した。次に 5 μ l のこの混合物を “1. P C R” に記載の如く P C R 実験に適用した。プライマー 1 6 3 env および envend に代えてプライマー 1 6 8 ; および 1 6 9 ; を逆 P C R に用いた。

【0048】

それらプライマー 1 6 3 env 、 1 6 8 ; および 1 6 9 ; は、 H I V - 单離物 M V P - 5 1 8 0 のすでに確認されている部分配列から選択した（実施例 4）。

P C R / 逆 P C R およびヌクレオチド配列決定に用いられたプライマーは BioResearch 社のオリゴヌクレオチド合成装置 8 7 5 0 で合成したところ、該プライマーは次の配列を示す：

プライマー 1 6 3 env : 5' C A G A A T C A G C A A C G C C T A A A C C 3'

プライマー envend : 5' G C C C T G T C T T A T T C T T C T A G G 3'

(H I V 1 单離物 B H 1 0 での位置：塩基 8 1 2 9 - 8 1 0 9)

プライマー 1 6 8 i : 5' G C C T G C A A G C C T T A G A A A C C 3'

プライマー 1 6 9 i : 5' G C A C T A T A C C C T T C A G T A C A C T G 3'

【0049】

增幅された D N A を 3 % “Nusieve” - アガロースゲル (Biozyme 社) で分離し、增幅された断片を切り取りそして等容の緩衝液 (1 \times T B E (0.09 M Trisボレート、0.002 M E D T A、pH 8.0) と混合した。その D N A - アガロースゲル混合物を 7 0 で 1 0 分間インキュベーションし次いでフェノール抽出した後、D N A を水性相から 1 / 10 容の 3 M N a A c 、pH 5.5 および 2 容のエタノールを用いて - 2 0 で 1 5 分間沈殿させ、次いでエッペンドルフ遠心分離機でペレット化した (1 3 0 0 0 rpm、1 0 分間、4)。そのペレット化された D N A を乾燥し、水にとり、そして分光光度計 (Beckman 社) により 2 6 0 nm での D N A 濃度を光度計測定した後、Sanger (F. Sanger, Proc. Natl. A cad. Sci., 74 : 5463, 1977) の方法に従って配列決定した。Klenow D N A ポリメラーゼを用いた配列決定に代えて Applied Biosystems 社のキット (“Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing”、注文番号：4 0 1 1 5 0) を用いて配列決定反応を行った。プライマーとしては別々の配列決定反応にプライマー 1 6 3 env またはプライマー envend (各 1 μ M) を適用した。この逆 P C R 実験で増幅された D N A をプライマー 1 6 8 ; および 1 6 9 ; を用いて配列決定した。配列決定反応の分析は D N A 配列決定装置 3 7 3 A (Applied Biosystems 社) で装置製造元の指示に従って行われた。

増幅された D N A 領域のヌクレオチド配列およびそれより導かれたアミノ酸配列を第 3 表に示す。

【0050】

10

20

30

40

50

【表3】

第3表

1	AAATGTCAAGACCAATAATAAACATTACACACCCCTCACAGGGAAAAAGAGCAGTAGGAT	60
	TTTACAGTTCTGGTTATTATTTGTAAGTGTGGGGAGTGTCCCTTTCTCGTCATCCTA	
	M S R P I I N I H T P H R E K R A V G L	
	gp120 ← → gp41	
61	TGGGAATGCTATTCTGGGGTGCTAAGTGCAGCAGGTAGCACTATGGCGCAGCGGCAA	120
	ACCCTTACGATAAGAACCCCCACGATTACGTCCATCGTGTACCGCGTCGCCGTT	10
	G M L F L G V L S A A G S T M G A A A T	
121	CAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTCAACAGCAGGACAACC	180
	GTCGCGACTGCCATGCCTGGGTGTACATGACTTCCCATATCACGTTGTCGTCCCTGTTGG	
	A L T V R T H S V L K G I V Q Q Q D N L	
181	TGCTGAGAGCGATAACAGGCCACAGCAACACTTGCTGAGGTTATCTGTATGGGTATTAGAC	240
	ACGACTCTCGCTATGTCCGGGTCGTTGTGAACGACTCCAATAGACATAACCCATAATCTG	
	L R A I Q A Q Q H L L R L S V W G I R Q	20
241	AACTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTAGAAACCTTATACAGAATCAGCAACGCCCTAAACC	300
	TTGAGGCTCGAGCGGACGTTCGGAATCTTGGAATATGTCTTAGTCGTTGGGATTTGG	
	L R A R L Q A L E T L I Q N Q Q R L N L	
301	TATGGGGCTGTAAAGGAAAACAAATCTGTTACACATCAGTAAAATGGAACACATCATGGT	360
	ATACCCCGACATTTCTTTGATTAGACAATGTGTAGTCATTTACCTTGTGTAGTACCA	
	W G C K G K L I C Y T S V K W N T S W S	
361	CAGGAGGATATAATGATGACAGTATTGGGACAACCTTACATGGCAGCAATGGGACCAAC	420
	GTCCTCCTATATTACTACTGTCTAAACCTGTTGGAAATGTACCGTCGTTACCTGGTTG	30
	G G Y N D D S I W D N L T W Q Q W D Q H	
421	ACATAAACAAATGTAAGCTCCATTATATGATGAAATACAAGCAGCACAAAGACCAACAGG	480
	TGTATTGTTACATTGAGGTAATATACTACTTTATGTTCGTCGTGTTGGTTGTCC	
	I N N V S S I I Y D E I Q A A Q D Q Q E	
481	AAAAGAATGTAAAAGCATTGTTGGAGCTAGATGAATGGCCTCTCTTGGATTGGTTG	540
	TTTCTTACATTTCTGTAACAAACCTCGATCTACTTACCCGGAGAGAAACCTTAACCAAAC	40
	K N V K A L L E L D E W A S L W N W F D	
541	ACATAACTAAATGGTTGTGGTATATAAAATAGCTATAATCATAGTGGAGCACTAATAG	600
	TGTATTGATTACCAACACCATATTTTATCGATATTAGTATCACCCCTCGTGTATTATC	
	I T K W L W Y I K I A I I I V G A L I G	

【0051】

【表4】

第3表 (続き)

601	GTATAAGAGTTATCATGATAGTACTTAATCTAGTGAAGAACATTAGGCAGGGATATCAAC -----+-----+-----+-----+-----+ CATATTCTCAATAGTACTATCATGAATTAGATCACTTCTGTAAATCCGTCCTATAGTTG I R V I M I V L N L V K N I R Q G Y Q P	660
661	CCCTCTCGTTGCAGATCCCTGTCCCACACCGGCAGGAAGCAGAAACGCCAGGAAGAACAG -----+-----+-----+-----+-----+ GGGAGAGCAACGTCTAGGGACAGGGTGTGGCGTCCTCGTCTTGCGGTCCCTTGT L S L Q I P V P H R Q E A E T P G R T G	720 10
721	GAGAAGAAGGTGGAGAAGGAGACAGGCCAAGTGGACAGCCTGCCACCAGGATTCTGC -----+-----+-----+-----+-----+ CTCTTCTTCCACCTCTTCTCTGTCCGGTTCACCTGTGCGAACGGTGGTCTAACG E E G G E G D R P K W T A L P P G F L Q	780
781	AACAGTTGTACACGGATCTCAGGACAATAATCTTGTGGACTTACCACTCTTGAGCAACT -----+-----+-----+-----+-----+ TTGTCAACATGTGCCTAGACTCTGTATTAGAACACCTGAATGGTGGAGAACTCGTTGA Q L Y T D L R T I I L W T Y H L L S N L	840
841	TAATATCAGGGATCCGGAGGCTGATCGACTACCTGGACTGGACTGTGGATCCTGGAC -----+-----+-----+-----+ ATTATAGTCCCTAGGCCTCCGACTAGCTGATGGACCCCTGACACCTAGGACCCCTG I S G I R R L I D Y L G L G L W I L G Q	900 20
901	AAAAGACAATTGAAGCTTAGACTTTGTGGAGCTGTAATGCAATATTGGCTACAAGAAT -----+-----+-----+-----+ TTTCTGTTAACCTCGAACATCTGAAACACCTCGACATTACGTTATAACCGATGTTCTTA K T I E A C R L C G A V M Q Y W L Q E L	960
961	TGAAAAAATAGTGCTACAAACCTGCTTGATACTATTGCAGTGTCAAGTTGCCATTGGACTG -----+-----+-----+-----+ ACTTTTATCACGATGTTGGACGAACATATGATAACGTCACAGTCACAGGTTAACCTGAC K N S A T N L L D T I A V S V A N W T D	1020 30
1021	ACGGCATCATCTTAGGTCTACAAAGAACATTAGGACAAGG -----+-----+-----+-----+ TGCGTAGTACAATCCAGATGTTCTTATCCTGTTCC G I I L G L Q R I G Q	1057

【0052】

実施例8

確認された第3表記載のヌクレオチド配列の相同配列をG E N E B A N K - データーバンク(リリース72、1992年6月)においてG C G - コンピュータープログラム(Genetic Computer Group, Inc.社、米国ウイスコンシン州、バージョン7.1、1992年3月)を用いて調べた。このデータバンクには1992年7月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスのおよび靈長類からの単離物のヌクレオチド配列のほとんどが含まれている。

第3表記載のヌクレオチド配列はH I V 1 - 単離物に対して最良の場合62%相同性を示す。H I V 2 単離物に対して第5表記載のD N Aは50%相同である。

第3表のヌクレオチド配列から導かれるアミノ酸配列の相同配列をS W I S S P R O Tタンパク質データバンク(リリース22、1992年6月)においてG C G - コンピュータープログラムを用いて調べた。このデータバンクには1992年6月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスのおよび靈長類からの単離物のタンパク質配列のほとんどが含

まれている。

【0053】

第3表記載のアミノ酸配列はチンパンジーからの単離物CIV(SIVcpz)の相当する外被タンパク質断片に対し最良の場合54%相同であり、そしてHIV1単離物Ma1に対して54.5%相同である。HIV2-外被タンパク質に対する第3表記載のアミノ酸配列の相同性は最良の場合34%（単離物HIV2-D194）である。

それに対し、HIV1のgp41-アミノ酸配列をSWISSPOT-データバンクに存在するHIV1 gp-41配列と比較すると期待されたとおり最良の場合ほぼ100%の相同性、そして最悪の場合に78%の相同性が得られる。

第3表記載の配列領域とHIV1およびHIV2の対応する断片との間にこのような明らかな構造的相違があることから、単離物MVP-5180/91の場合は、HIV1およびHIV2とは明らかに構造的に区別されるHIV変異株が関係していると思われる。おそらくMVP-5180/91はHIV1およびHIV2とは区別される特別なHIVウイルス群に帰属すると思われる。

【0054】

HIV1-外被タンパク質領域のアミノ酸584-618のペプチドは血清診断的に特に重要である（番号付けは次による：Wain Hobson et al., Cell 40: 9-17, 1985, Gnann et al., J. Inf. Dis. 156: 261-267, 1987; Norrby et al., Nature, 329: 248-250, 1987）。HIV2およびSIVの外被タンパク質の相当するアミノ酸領域も同じく免疫診断的に保存されている（Gnann et al., Science, pp. 1346-1349, 1987）。従ってHIV1およびHIV2のこの外被タンパク質領域からのペプチドは多くの商業的に入手し得るHIV1/2抗体スクリーニングテストに固相抗原として適用される。それによって約99%の抗-HIV1および抗-HIV2陽性血清を捕捉することができる。

MVP-5180/91外被タンパク質の相当するアミノ酸領域（第4表）およびこの単離物のgp41全体は、HIV感染患者の抗血清が商業的に入手される抗体スクリーニングテストにおいてほんの弱くしかあるいはそもそも全く反応しない場合に特に血清診断的に重要であり得る。これらの場合には、MVP-5180/91と密接な関係にあるウイルスによる感染が存在し得る。

【0055】

【表5】

10

20

30

第4表

1 RILAVERYLKDQQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

2 LQ L TLIQN R NL K Y S K T

1 gp41由来のHIV1アミノ酸配列

2 gp41由来のMVP-5180配列。HIV1配列と相違して

40

いるところだけが記されている。

【0056】

MVP5180に由来する情報を用いて確認されたペプチドは従って次のアミノ酸配列を有する：RLQALETLIQNQQRNLWGCCKGKLICYTSVKWNTS。従って本発明の主題は、組換えまたは合成により調製することができ、そして前述の配列または、少くとも6個の連続するアミノ酸、好ましくは9個そして特に好ましくは12個の連続するアミノ酸を示す部分配列を示すペプチドである。

【0057】

50

実施例 9

H I V 単離物 M V P 5 1 8 0 の全ゲノムのクローニング

a) ゲノムライブラリーの調製

M V P 5 1 8 0 感染 H U T 7 8 細胞由来のゲノム D N A を前述の如く単離した。

3 0 0 μ g のこの D N A を 7 7 0 μ l の容量として 0 . 2 4 U の制限酵素 Sau3A と共に 4 5 分間インキュベートした。それによって部分的にのみ切断された D N A を次いで 0 . 7 % アガロース (低融点アガロース、 Nusieve) でサイズ分画し、そして 1 0 kb と 2 1 kb の間の断片を切り取った。そのアガロースを 7 0 で 1 0 分間溶融し、そして等容の緩衝液 (1 \times T B E 、 0 . 2 M N a C l) と混合した。次いでフェノールで 2 回、そしてクロロホルムで 1 回抽出した後、 1 / 10 容の 3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5 . 9) および 2 . 5 容のエタノールの添加により - 7 0 で 1 0 分間 D N A を沈殿させた。沈殿した D N A を遠心分離し、乾燥しそして 1 μ g / μ l 濃度で水に溶解した。 10

【 0 0 5 8 】

サイズ分画された D N A の収量は約 6 0 μ g であった。 5 μ g のこの D N A を 1 U アルカリ性ホスファターゼと共に相当する緩衝液中、 3 7 で 2 0 分間インキュベートした。 5

- 末端ホスフェート残基を分離することによってサイズ分画された D N A の過度の多重な挿入を減少させた。そのホスファターゼ処理をフェノール処理により停止し、 D N A を前述の如く沈殿させ、 1 μ g のベクター (2 D A S H 、 B a m H I 切断 Stratagene No. : 247611) と、全容量を 6 μ l として 2 Weiss 単位のラムダ T 4 リガーゼを用いて 1 5 で 1 2 時間結合した。結合が行われた後、その D N A をパッキングキット (Gigapack II Gold, Stratagene No. : 247611) を用いて製造元の指示に正しく従ってファージ外被にパッキングした。 20

【 0 0 5 9 】

b) D N A プローブの放射性標識

標識には Boehringer Mannheim 社の “ ラムダ・プライムド・ D N A ・ラベリング・キット (Random Primed DNA Labeling Kit) ” (No. : 713 023) を適用した。実施例 3 に記載の如くプライマー sk6 8 および envb を用いて得られた P C R 生成物を標識した。 1 μ g のこの D N A を 2 \times 5 分間煮沸した後氷水中で冷却することにより変性した。標識のために 5 0 mCi [- 32 P] - d C T P (N E N , No. : N E X - 0 5 3 H) を添加した。その他の添加物質を製造元の指示に従ってピペットで添加した。 3 7 で 3 0 分間インキュベーションした後、放射性標識済みの D N A を沈殿させた。 30

【 0 0 6 0 】

c) ファージ - ライブラリーのスクリーニング

2 0 0 μ l の 3 0 で一夜培養した培養液 (1 0 mM M g S O ₄ のほか 0 . 2 % マルトースを含有する L B 培地中の S R B (P 2) 株 [Stratagene, No. : 247611]) に、 1 0 0 μ l の S M 緩衝液 (5 . 8 g の N a C l 、 2 g の M g S O ₄ 、 5 0 ml の 1 M Tris, pH 7 . 5 、および 5 ml の 2 % ゼラチン溶液を 1 リットルの H ₂ O に溶解) 中の 2 0 0 0 0 pfu (プラーク形成単位) のライブラリーを添加し、ファージを 2 0 分間 3 7 で細菌に吸着させ、 7 . 5 ml の 5 5 に冷却した Top - アガロースと混合しそして予め加温した直径 1 4 cm の L b - 寒天プレートで分別した。約 8 時間後にプラークが全面に及んだ。そこでプレートに二トロセルロースフィルターを数分間重ねそして非対称的マーキングを設けた。注意深く取り除いた後そのフィルターを 2 分間変性し (0 . 5 M N a O H 、 1 . 5 M N a C l) そして次に 5 分間中和した (0 . 5 M Tris, pH 8 、 1 . 5 M N a C l) 。そのフィルターを次に 8 0 で 6 0 分間ベーキング後プローブとハイブリダイズさせることができた。 40

【 0 0 6 1 】

プレハイブリダイゼーションを行うべき、そのフィルターをフィルター 1 枚あたり 1 5 ml のハイブリダイゼーション溶液 (5 0 % ホルムアミド、 0 . 5 % S D S 、 5 \times S S P E 、 5 \times Denhardt 溶液および 0 . 1 mg / ml サケ精子 D N A) 中、 4 2 で振盪しながら 2 ~ 3 時間インキュベートした。 [32 P] 標識 D N A プローブを 2 ~ 5 分間 1 0 0 で変性し、氷冷し、プレハイブリダイゼーション溶液を添加しそして 1 2 時間 4 2 でハイブリダイ 50

ズした。次にそのフィルターを 60° で、まず $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ で、次に $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ で洗浄した。そのフィルターを乾燥後、ハイブリダイゼーションシグナルをレントゲンフィルム X-O M A TTH A R (Kodak社) を用いて検出した。あるシグナルを帰属させることができたブラークを SM 緩衝液で溶出後さらなる希釈段階で分離した。

2×10^6 ブラークのスクリーニング後、下記のクローンを確認することができた。

【0062】

d) ファージ DNA の単離およびサブクローニング

SM 緩衝液中のファージ溶出液 $10 \mu\text{l}$ を用いて宿主株 S R B (P 2) の一夜培養物を、培養物の最初の濃密な増殖の後、約 6 ~ 8 時間後に溶解 (Lyse) が行われるように感染させた。その溶解培養物から、 9000 g で 2 回 10 分間遠心分離することにより細胞残渣を分離した。次にファージを遠心分離 (35000 g 、1 時間) によりペレット化し、 $700 \mu\text{l}$ の 10 mM MgSO_4 にとり、そしてタンパク質中間相 (インターフェーズ) がもはやみられなくなるまでフェノール処理した。そこでファージ DNA を沈殿させ、制限酵素 Eco RI で切断し、そしてそれによって得られた Eco RI 断片をベクター Bluescript KS⁻ (Strategene, No. : 212208) にサブクローン化した。全部で 4 つのクローンが得られた：

【0063】

【表 6】

第 5 表

プラスミド	最初 ¹	最後 ¹
p S P 1	1	1785
p S P 2	1786	5833
p S P 3	5834	7415
p S P 4	7660	9793

1) 下記の全配列に関して

【0064】

不足している塩基 7416 と 7659 の間の断片はプライマー 157 (CCATAAAT AT TCA GCA GAA CTA G) および 226 (GCT GATTCT GTATAA GGG) を用いた PCR により得た。DNA 鑄型としてはクローンのファージ DNA を用いた。PCR の条件は次のとおりとした：1) 初期変性：94°、3 分間、2) 増幅：1.5 分間 94°、1 分間 56° および 1 分間 72° (30 サイクル)。

DNA の配列決定は実施例 4 に記載の如く行った。全ゲノムからその鎖のほかに対向鎖も配列決定した。すべての Eco RI 切断部位の場合に、クローンのファージ DNA を鑄型として用いた PCR によって、サブクローン移行時点で各々単一の Eco RI 切断部位が関係していることが確認された。

【0065】

【表 7】

10

20

30

40

第 6 表

MvP5180の全配列におけるウイルスタンパク質
GAG、POLおよびENVの遺伝子の位置

遺伝子	開 始 ¹	停 止 ¹
GAG	817	2310
POL	2073	5153
ENV	6260	8887

10

1) 数値はMvP5180/91の全配列における塩基位置

MvP5180 / 91 の全配列は次の第7表に示されている。

【0066】

【表8】

第7表 M v P 5180 の配列

1	CTGGATGGGT TAATTTACTC CCATAAGAGA GCAGAAATCC TGGATCTCTG	
51	GATATATCAC ACTCAGGGAT TCTCCCTGA TTGGCAGTGT TACACACCGG	
101	GACCAGGACC TAGATTCCA CTGACATTTG GATGGTTGTT TAAACTGGTA	
151	CCAGTGTCA GAGAAGAGGC AGAGAGACTG GGTAATACAA ATGAAGATGC	10
201	TAGTCTTCTA CATCCAGCTT GTAATCATGG AGCTGAGGAT GCACACGGGG	
251	AGATACTAAA ATGGCAGTTT GATAGATCAT TAGGCTTAAC ACATATAGCC	
301	CTGCAAAAGC ACCCAGAGCT CTTCCCAAG TAACTGACAC TGCGGGACTT	
351	TCCAGACTGC TGACACTGCG GGGACTTTCC AGCGTGGGAG GGATAAGGGG	
401	CGGTTGGGG AGTGGCTAAC CCTCAGATGC TGCATATAAG CAGCTGCTTT	
451	CCGCTTGTAC CGGGCTTAG TTAGAGGACC AGGTCTGAGC CCGGGAGCTC	
501	CCTGGCCTCT AGCTGAACCC GCTGCTTAAC GCTCAATAAA GCTTGCCTTG	
551	AGTGAGAACG AGTGTGTGCT CATCTGTTCA ACCCTGGTGT CTAGAGATCC	20
601	CTCAGATCAC TTAGACTGAA GCAGAAAATC TCTAGCAGTG GCGCCCGAAC	
651	AGGGACGCGA AAGTGAAAGT GGAACCAGGG AAGAAAACCT CCGACGCAAC	
701	GGGCTCGGCT TAGCGGAGTG CACCTGCTAA GAGGCGAGAG GAACTCACAA	
751	GAGGGTGAGT AAATTGCTG GCGGTGGCCA GACCTAGGGG AAGGGCGAAG	
801	TCCCTAGGGG AGGAAGATGG GTGCGAGAGC GTCTGTGTTG ACAGGGAGTA	
851	AATTGGATGC ATGGGAACGA ATTAGTTAA GGCCAGGATC TAAAAAGGCA	
901	TATAGGCTAA AACATTTAGT ATGGCAAGC AGGGAGCTGG AAAGATACGC	30
951	ATGTAATCCT GGTCTATTAG AAACCTGCAGA AGGTACTGAG CAACTGCTAC	
1001	AGCAGTTAGA GCCAGCTCTC AAGACAGGGT CAGAGGACCT GAAATCTCTC	
1051	TGGAACGCAA TAGCAGTACT CTGGTGCCTT CACAACAGAT TTGACATCCG	
1101	AGATACACAG CAGGCAATAC AAAAGTTAAA GGAAGTAATG GCAAGCAGGA	
1151	AGTCTGCAGA GGCGCTAAC GAAGAAACAA GCCCTAGGCA GACAAGTCAA	
1201	AATTACCTA TAGTAACAAA TGACAGGGG CAAATGGTAC ATCAAGCCAT	40
1251	CTCCCCCAGG ACTTTAAATG CATGGGTAAA GGCAGTAGAA GAGAAGGCCT	
1301	TTAACCCCTGA AATTATTCCCT ATGTTTATGG CATTATCAGA AGGGGCTGTC	
1351	CCCTATGATA TCAATACCAT GCTGAATGCC ATAGGGGGAC ACCAAGGGC	

【0067】

【表9】

第7表 (続き)

1401	TTTACAAGTG TTGAAGGAAG TAATCAATGA GGAAGCAGCA GAATGGGATA	
1451	GAACTCATCC ACCAGCAATG GGGCGTTAC CACCAGGGCA GATAAGGGAA	
1501	CCAACAGGAA GTGACATTGC TGGAACAACT AGCACACAGC AAGAGCAAAT	
1551	TATATGGACT ACTAGAGGGG CTAACCTAT CCCAGTAGGA GACATCTATA	10
1601	GAAAATGGAT AGTGCTAGGA CTAAACAAAA TGGTAAAAAT GTACAGTCCA	
1651	GTGAGCATCT TAGATATTAG GCAGGGACCA AAAGAACCAT TCAGAGATTA	
1701	TGTAGATCGG TTTTACAAAA CATTAAGAGC TGAGCAAGCT ACTCAAGAAG	
1751	TAAAGAATTG GATGACAGAA ACCTTGCTTG TTCAGAATTG AAACCCAGAT	
1801	TGTAAACAAA TTCTGAAAGC ATTAGGACCA GAAGCTACTT TAGAAGAAAT	
1851	GATGGTAGCC TGTCAAGGAG TAGGAGGGCC AACTCACAAG GCAAAATAC	
1901	TAGCAGAACG AATGGCTTCT GCCCAGCAAG ATTAAAAGG AGGATACACA	
1951	GCAGTATTCA TGCAAAGAGG GCAGAATCCA AATAGAAAAG GGCCCATAAA	20
2001	ATGCTTCAAT TGTGGAAAAG AGGGACATAT AGCAAAAAC TGTCGAGCAC	
2051	CTAGAAAAAG GGGTTGCTGG AAATGTGGAC AGGAAGGTCA CCAAATGAAA	
2101	GATTGCAAAA ATGGAAGACA GGCAAATTTT TTAGGGAAGT ACTGGCCTCC	
2151	GGGGGGCACG AGGCCAGGCA ATTATGTGCA GAAACAAGTG TCCCCATCAG	
2201	CCCCACCAAT GGAGGAGGCA GTGAAGGAAC AAGAGAATCA GAGTCAGAAG	
2251	GGGGATCAGG AAGAGCTGTA CCCATTTGCC TCCCTCAAAT CCCTCTTGG	
2301	GACAGACCAA TAGTCACAGC AAAGGTTGGG GGTCACTAT GTGAGGCTT	30
2351	ACTGGATACA GGGCAGATG ATACAGTATT AAATAACATA CAATTAGAAG	
2401	GAAGATGGAC ACCAAAAATG ATAGGGGTA TAGGAGGCTT TATAAAAGTA	
2451	AAAGAGTATA ACAATGTGAC AGTAGAAGTA CAAGGAAAGG AAGTACAGGG	
2501	AACAGTATTG GTGGGACCTA CTCCGTAA TATTCTGGG AGAAACATAT	
2551	TGACAGGATT AGGATGTACA CTAAATTCC CTATAAGTCC CATAGCCCCA	
2601	GTGCCAGTAA AGCTAAAACC AGGAATGGAT GGACAAAAG TAAAACAATG	40
2651	GCCCCCTATCT AGAGAGAAAA TAGAAGCACT AACTGCAATA TGTCAAGAAA	
2701	TGGAACAGGA AGGAAAAATC TCAAGAATAG GACCTGAAAA TCCTTATAAT	
2751	ACACCTATTT TTGCTATAAA AAAGAAAGAT AGCACTAAGT GGAGAAAATT	

【0068】

【表10】

第7表 (続き)

2801	GGTAGACTTC AGAGAATTAA ATAAAAGAAC ACAAGATTTC TGGGAGGTGC	
2851	AATTAGGTAT TCCACATCCA GGGGGTTAA AGCAAAGGCA ATCTGTTACA	
2901	GTCTTAGATG TAGGAGATGC TTATTTCTCA TGCCCTTAG ATCCAGACTT	
2951	TAGAAAATAC ACTGCCTTCA CTATTCCTAG TGTGAACAAT GAGACCCAG	
3001	GAGTAAGATA CCAGTACAAT GTCCTCCGC AAGGGTGGAA AGGTTCACCA	10
3051	GCCATATTTC AGAGTTCAAT GACAAAGATT CTAGATCCAT TTAGAAAAAG	
3101	CAACCCAGAA GTAGAAATT ATCAGTACAT AGATGACTTA TATGTAGGAT	
3151	CAGATTTACC ATTGGCAGAA CATAGAAAGA GGGTCGAATT GCTTAGGGAA	
3201	CATTTATATC AGTGGGGATT TACTACCCCT GATAAAAAGC ATCAGAAGGA	
3251	ACCTCCCTTT TTATGGATGG GATATGAGCT CCACCCAGAC AAGTGGACAG	
3301	TACAGCCCCT CCAATTGCCT GACAAAGAAG TGTGGACAGT AAATGATATA	
3351	CAAAAATTAG TAGGAAAATT AAATTGGCA AGTCAAATCT ATCAAGGAAT	20
3401	TAGAGTAAAA GAATTGTGCA AGTTAATCAG AGGAACCAAA TCATTGACAG	
3451	AGGTAGTACC TTTAAGTAAA GAGGCAGAAC TAGAATTAGA AGAAAACAGA	
3501	GAAAAGCTAA AAGAGCCAGT ACATGGAGTA TATTACCAGC CTGACAAAGA	
3551	CTTGTGGTT AGTATTAGA AGCATGGAGA AGGGCAATGG ACTTACCAGG	
3601	TATATCAGGA TGAACATAAG AACCTTAAAA CAGGAAAATA TGCTAGGCAA	
3651	AAGGCCTCCC ACACAAATGA TATAAGACAA TTGGCAGAAC TAGTCCAGAA	
3701	GGTGTCTCAA GAAGCTATAG TTATATGGGG GAAATTACCT AAATTCAAGC	30
3751	TGCCAGTTAC TAGAGAAACT TGGGAAACTT GGTGGGCAGA ATATTGGCAG	
3801	GCCACCTGGA TTCCTGAATG GGAATTGTC AGCACACCCC CATTGATCAA	
3851	ATTATGGTAC CAGTTAGAAA CAGAACCTAT TGTAGGGCA GAAACCTTT	
3901	ATGTAGATGG AGCAGCTAAT AGGAATACAA AACTAGGAAA GGCGGGATAT	
3951	GTTACAGAAC AAGGAAAACA GAACATAATA AAGTTAGAAC AGACAACCAA	
4001	TCAAAAGGCT GAATTAATGG CTGTATTAAT AGCCTTGCAG GATTCCAAGG	
4051	AGCAAGTAAA CATACTAAC AACTCACAAT ATGTATTGGG CATCATATCC	40
4101	TCCCAACCAA CACAGAGTGA CTCCCTATA GTTCAGCAGA TAATAGAGGA	
4151	ACTAACAAAA AAGGAACGAG TGTATCTTAC ATGGGTTCT GCTCACAAAG	

【0069】

【表11】

第7表 (続き)

4201	GCATAGGAGG AAATGAAAAA ATAGATAAAAT TAGTAAGCAA AGACATTAGA	
4251	AGAGTCCTGT TCCTGGAAGG AATAGATCAG GCACAAGAAG ATCATGAAAA	
4301	ATATCATAGT AATTGGAGAG CATTAGCTAG TGACTTGGA TTACCACCAA	
4351	TAGTAGCCAA GGAAATCATT GCTAGTTGTC CTAAATGCCA TATAAAAGGG	
4401	GAAGCAACGC ATGGTCAAGT AGACTACAGC CCAGAGATAT GGCAAATGGA	10
4451	TTGTACACAT TTAGAAGGCA AAATCATAAT AGTTGCTGTC CATGTAGCAA	
4501	GTGACTTTAT AGAAGCAGAG GTGATACCAG CAGAAACAGG ACAGGAAACT	
4551	GCCTATTTCG TGTTAAAATT AGCAGCAAGA TGGCCTGTCA AAGTAATACA	
4601	TACAGACAAT GGACCTAATT TTACAAGTGC AGCCATGAAA GCTGCATGTT	
4651	GGTGGACAGG CATAAACAT GAGTTGGGA TACCATATAA TCCACAAAGT	
4701	CAAGGAGTAG TAGAAGCCAT GAATAAAGAA TTAAAATCTA TTATACAGCA	
4751	GGTGAGGGAC CAAGCAGAGC ATTTAAAAAC AGCAGTACAA ATGGCAGTCT	20
4801	TTGTTCACAA TTTAAAAGA AAAGGGGGGA TTGGGGGGTA CACTGCAGGG	
4851	GAGAGACTAA TAGACATACT AGCATCACAA ATACAAACAA CAGAACTACA	
4901	AAAACAAATT TTAAAATCA ACAATTTCG GGTCTATTAC AGAGATAGCA	
4951	GAGACCTAT TTGGAAAGGA CCGGCACAAC TCCTGTGGAA AGGTGAGGGG	
5001	GCAGTAGTCA TACAAGATAA AGGAGACATT AAAGTGGTAC CAAGAAGAAA	
5051	GGCAAAATA ATCAGAGATT ATGGAAAACA GATGGCAGGT ACTGATAGTA	
5101	TGGCAAATAG ACAGACAGAA AGTGAAGCA TGGAACAGCC TGGTCAAATA	30
5151	CCATAAATAC ATGTCTAAGA AGGCCCGAA CTGGCGTTAT AGGCATCATT	
5201	ATGAATCCAG GAATCCAAA GTCAGTCGG CGGTGTATAT TCCAGTAGCA	
5251	GAAGCTGATA TAGTGGTCAC CACATATTGG GGATTAATGC CAGGGAAAG	
5301	AGAGGAACAC TTGGGACATG GGGTTAGTAT AGAATGGCAA TACAAGGAGT	
5351	ATAAAACACA GATTGATCCT GAAACAGCAG ACAGGATGAT ACATCTGCAT	
5401	TATTCACAT GTTTACAGA ATCAGCAATC AGGAAGGCCA TTCTAGGGCA	
5451	GAGAGTGCTG ACCAAGTGTG AATACCTGGC AGGACATAGT CAGGTAGGGGA	40
5501	CACTACAATT CTTAGCCTTG AAAGCAGTAG TGAAAGTAAA AAGAAATAAG	
5551	CCTCCCCTAC CCAGTGTCCA GAGATTAACA GAAGATAGAT GGAACAAGCC	

【0070】

【表12】

第7表 (続き)

5601	CTGGAAAATC AGGGACCAGC TAGGGAGCCA TTCAATGAAT GGACACTAGA	
5651	GCTCCTGGAA GAGCTGAAAG AAGAACAGT AAGACATTTC CCTAGGCCTT	
5701	GGTTACAAGC CTGTGGCAG TACATTTATG AGACTTATGG AGACACTTGG	
5751	GAAGGAGTTA TGGCAATTAT AAGAATCTTA CAACAACTAC TGTTTACCCA	
5801	TTATAGAATT GGATGCCAAC ATAGTACAAT AGGAATTCTC CCATCTAAC	10
5851	CAAGAGGAAG AGGAAGAAGA AATGGATCCA GTAGATCCTG AGATGCC	
5901	TTGGCATTACAC CCTGGGAGCA AGCCCCAAC CCCTTGTAAAT AATTGCTATT	
5951	GCAAAAGATG CTGCTATCAT TGCTATGTTT GTTTCACAAA GAAGGGTTG	
6001	GGAATCTCCC ATGGCAGGAA GAAGCGAAGA AGACCAGCAG CTGCTGCAAG	
6051	CTATCCAGAT AATAAAGATC CTGTACCAAGA GCAGTAAGTA ACGCTGATGC	
6101	ATCAAGAGAA CCTGCTAGCC TTAATAGCTT TAAGTGCTTT GTGTCTTATA	
6151	AATGTACTTA TATGGTTGTT TAACCTTAGA ATTTATTTAG TGCAAAGAAA	20
6201	ACAAGATAGA AGGGAGCAGG AAATACTTGA AAGATTAAGG AGAATAAAGG	
6251	AAATCAGGGA TGACAGTGAC TATGAAAGTA ATGAAGAAGA ACAACAGGAA	
6301	GTCATGGAGC TTATACATAG CCATGGCTTT GCTAATCCC TGTTGAGTT	
6351	ATAGTAAACA ATTGTATGCC ACAGTTTATT CTGGGGTACC TGTATGGAA	
6401	GAGGCAGCAC CAGTACTATT CTGTGCTTCA GATGCTAAC TAACAAGCAC	
6451	TGAACAGCAT AATATTTGGG CATCACAAGC CTGCGTTCT ACAGATCCC	
6501	ATCCACATGA ATTTCCACTA GGCAATGTGA CAGATAACTT TGATATATGG	30
6551	AAAAATTACA TGGTGGACCA AATGCATGAA GACATCATTA GTTTGTGGGA	
6601	ACAGAGTTA AAGCCTTGTG AGAAAATGAC TTTCTTATGT GTACAAATGA	
6651	ACTGTGTAGA TCTGCAAACA AATAAACAG GCCTATTAAA TGAGACAATA	
6701	AATGAGATGA GAAATTGTAG TTTAATGTA ACTACAGTCC TCACAGACAA	
6751	AAAGGAGCAA AAACAGGCTC TATTCTATGT ATCAGATCTG AGTAAGGTTA	
6801	ATGACTCAA TGCAGTAAAT GGAACAACAT ATATGTTAAC TAATTGTAAC	40
6851	TCCACAATTAA TCAAGCAGGC CTGTCCGAAG GTAAGTTTG AGCCCATTCC	
6901	CATACACTAT TGTGCTCCAA CAGGATATGC CATCTTAAG TGTAATGACA	
6951	CAGACTTTAA TGGAACAGGC CTATGCCACA ATATTCAGT GGTTACTTGT	

【0071】

【表13】

第7表 (続き)

7001	ACACATGGCA TCAAGCCAAC AGTAAGTACT CAACTAATAC TGAATGGGAC	
7051	ACTCTCTAGA GAAAAGATAA GAATTATGGG AAAAAATATT ACAGAATCAG	
7101	CAAAGAATAT CATACTAACCT CAAACACTC CTATAAACAT GACCTGCATA	
7151	AGAGAAGGAA TTGCAGAGGT ACAAGATATA TATACAGGTC CAATGAGATG	
7201	GCGCAGTATG ACACTTAAA GAAGTAACAA TACATCACCA AGATCAAGGG	10
7251	TAGCTTATTG TACATATAAT AAGACTGTAT GGGAAAATGC CCTACAACAA	
7301	ACAGCTATAA GGTATTTAAA TCTTGTAAAC CAAACAGAGA ATGTTACCAT	
7351	AATATTCAAGC AGAACTAGTG GTGGAGATGC AGAAGTAAGC CATTACATT	
7401	TTAACTGTCA TGGAGAATTC TTTTATTGTA ACACATCTGG GATGTTAAC	
7451	TATACTTTA TCAAACGTAC AAAGTCCGGA TGCCAGGAGA TCAAAGGGAG	
7501	CAATGAGACC AATAAAAATG GTACTATACC TTGCAAGTTA AGACAGCTAG	
7551	TAAGATCATG GATGAAGGGA GAGTCGAGAA TCTATGCACC TCCCATCCCC	20
7601	GGCAACTTAA CATGTCATTCAACATAACT GGAATGATTCA TACAGTTAGA	
7651	TCAACCATGG AATTCCACAG GTGAAAATAC ACTTAGACCA GTAGGGGAG	
7701	ATATGAAAGA TATATGGAGA ACTAAATTGT ACAACTACAA AGTAGTACAG	
7751	ATAAAACCTT TTAGTGTAGC ACCTACAAA ATGTCAAGAC CAATAATAAA	
7801	CATTCACACC CCTCACAGGG AAAAAAGAGC AGTAGGATTG GGAATGCTAT	
7851	TCTTGGGGT GCTAAGTGCA GCAGGTAGCA CTATGGCGC AGCGGCAACA	
7901	GCGCTGACGG TACGGACCCA CAGTGTACTG AAGGGTATAG TGCAACAGCA	30
7951	GGACAAACCTG CTGAGAGCGA TACAGGCCA GCAACACTTG CTGAGGTTAT	
8001	CTGTATGGGG TATTAGACAA CTCCGAGCTC GCCTGCAAGC CTTAGAAACC	
8051	CTTATACAGA ATCAGCAACG CCTAACCTA TGGGGCTGTA AAGGAAAAC	
8101	AATCTGTTAC ACATCAGTAA AATGGAACAC ATCATGGTCA GGAAGATATA	
8151	ATGATGACAG TATTGGGAC AACCTTACAT GGCAGCAATG GGACCAACAC	
8201	ATAAACAAATG TAAGCTCCAT TATATATGAT GAAATACAAG CAGCACAAAGA	
8251	CCAACAGGAA AAGAATGTAA AAGCATTGTT GGAGCTAGAT GAATGGGCCT	40
8301	CTCTTGGAA TTGGTTGAC ATAACAAAT GGTTGTGGTA TATAAAAATA	
8351	GCTATAATCA TAGTGGGAGC ACTAATAGGT ATAAGAGTTA TTATGATAAT	

【0072】

【表14】

第7表 (続き)

8401	ACTTAATCTA GTGAAGAAC A TTAGGCAGGG ATATCAACCC CTCTCGTTGC	
8451	AGATCCCTGT CCCACACCGG CAGGAAGCAG AAACGCCAGG AAGAACAGGA	
8501	GAAGAAGGTG GAGAAGGAGA CAGGCCAAG TGGACAGCCT TGCCACCAGC	
8551	ATTCTTGCAA CAGTTGTACA CGGATCTCAG GACAATAATC TTGTGGACTI	
8601	ACCACCTCTT GAGCAACTTA ATATCAGGG A TCCGGAGGCT GATCGACTAC	10
8651	CTGGGACTGG GACTGTGGAT CCTGGGACAA AAGACAATTG AAGCTTGTAG	
8701	ACTTTGTGGA GCTGTAATGC AATATTGGCT ACAAGAATTG AAAAATAGTG	
8751	CTACAAACCT GCTTGATACT ATTGCAGTGT CAGTTGCCAA TTGGACTGAC	
8801	GGCATCATCT TAGGTCTACA AAGAATAGGA CAAGGATTCC TTCACATCCC	
8851	AAGAAGAATT AGACAAGGTG CAGAAAGAAT CTTAGTGTAA CATGGGAAT	
8901	GCATGGAGCA AAAGCAAATT TGCAGGATGG TCAGAAGTAA GAGATAGAAT	
8951	GAGACGATCC TCCTCTGATC CTCAACAAACC ATGTGCACCT GGAGTAGGAG	20
9001	CTGTCTCCAG GGAGTTAGCA ACTAGAGGGG GAATATCAAG TTCCCACACT	
9051	CCTCAAAACA ATGCAGCCCT TGCAATTCTA GACAGCCACA AAGATGAGGA	
9101	TGTAGGCTTC CCAGTAAGAC CTCAAGTGCC TCTAAGGCCA ATGACCTTTA	
9151	AAGCAGCCTT TGACCTCAGC TTCTTTAA AAGAAAAGGG AGGACTGGAT	
9201	GGGTTAATT ACTCCCATAA GAGAGCAGAA ATCCTGGATC TCTGGATATA	
9251	TCACACTCAG GGATTCTTCC CTGATTGGCA GTGTTACACA CCGGGACCAG	
9301	GACCTAGATT CCCACTGACA TTTGGATGGT TGTTAAACT GGTACCAGTG	30
9351	TCAGCAGAAG AGGCAGAGAG ACTGGGTAAT ACAAATGAAG ATGCTAGTCT	
9401	TCTACATCCA GCTTGTAATC ATGGAGCTGA GGATGCACAC GGGGAGATAC	
9451	TAAAATGGCA GTTTGATAGA TCATTAGGCT TAACACATAT AGCCCTGCCA	
9501	AAGCACCCAG AGCTCTTCCC CAAGTAACTG AACTGCGGG ACTTCCAGA	
9551	CTGCTGACAC TGCAGGGACT TTCCAGCGTG GGAGGGATAA GGGCGGGTTC	
9601	GGGGAGTGGC TAACCCTCAG ATGCTGCATA TAAGCAGCTG CTTCCGCTT	
9651	GTACCGGGTC TTAGTTAGAG GACCAGGTCT GAGCCCGGGA GCTCCCTGGC	40
9701	CTCTAGCTGA ACCCGCTGCT TAACGCTCAA TAAAGCTTGC CTTGAGTGAG	
9751	AAGCAGTGTG TGCTCATCTG TTCAACCCTG GTGTCTAGAG ATC	

【0073】

実施例 10

M v P 5 1 8 0 / 9 1 の全配列の他の H I V 1 単離物からの区別

以下の配列比較の基礎は、遺伝子バンク・リリース 75 (1993年2月)、EMBL 33 (1992年12月) および Swissprot 24 (1993年1月) といったデータバンクであった。相同性比較は G C G ソフトウェア (バージョン 7.2、1992年10月、Gen

etics-Computer Group. ウィスコンシン) を用いて行われた。

【0074】

まずアミノ酸レベルで G A G、P O L および E N V の配列をプログラム "Wordsearch" を用いてデータバンクと比較した。50の最良の相同性をプログラム "Pileup" を用いて各々相互比較した。その結果、M v P 5 1 8 0 / 9 1 が H I V 1 系統に属するが極めて早い時期に、それどころか更にチンパンジーウイルス S I V c p z より前に分岐し、H I V 1 の新しい亜科(サブファミリー)を代表していることが明らかにわかる。相同性の数値を得るためにプログラム "Gap" を用いて M v P 5 1 8 0 を各々最も適切な H I V 1、H I V 2 および S I V 配列そして更に S I V c p z 配列と比較した。

【0075】

【表15】

第 8 表
M v P 5 1 8 0 / 9 1 単離物の G A G、P O L および
E N V のアミノ酸配列の相同性値

GAG	SIVcpz	70.2% 83.6%	HIV1u ²	69.9% 81.2%	HIV2d ³	53.6% 71.3%	SIV1a ⁴	55.1% 71.3%
POL	SIVcpz	78.0% 88.0%	HIV1u ²	76.1% 86.8%	HIV2d ³	57.2% 71.9%	SIVgb ⁵	57.7% 74.6%
ENV	SIVcpz	53.4% 67.1%	HIV1h ¹	50.9% 67.2%	HIV2d ³	34.4% 58.7%	SIVat ⁶	34.4% 57.8%

¹h=hz321/ザイール、²u=u455/ウガンダ、³d=jrcst、⁴a=agm155、
⁵gb=gb1、⁶at=agm

【0076】

上側の数値は両配列の同一性を、下側は類似性を示す。更に、そのデータバンクを "Word search" および "Gap" を用いてヌクレオチドレベルで徹底的に調べた。各々最良の " 符合 (matches) " についての相同性値を第9表にまとめる。

【0077】

【表16】

第 9 表
M v P 5 1 8 0 / 9 1 のヌクレオチド配列の相同性値

	H I V 1		H I V 2	
gag	HIVelicg	70.24%	HIV2bihz	60.0%
pol	HIVmal	75.0 %	HIV2cam2	62.9%
env	HIVsimi84	59.7 %	HIV2gha	49.8%

【0078】

実施例 1 1

H I V 5 1 8 0 単離物の g a g 遺伝子の P C R 増幅、クローニングおよび配列決定の概要説明

10

20

30

40

50

ウイルス増幅の過程で生じる自然突然変異を明示するためにウイルスゲノムの一部を P C R 法によりクローニングし、そしてそのように得られた D N A 配列を第 7 表による配列と比較した。

g a g 配列を M v P 5 1 8 0 ゲノムの左端の L T R (“ロング・ターミナル・リピート”、 L T R 1 プライマー) から pol (ポリメラーゼ遺伝子、 pol 1 3 . 5 ; プライマー) まで内部をオーバーラップさせながらクローニングした。クローニング手法は図 4 に概略図で示されている。

それら P C R 反応は、 H I V - 1 コンセンサス配列から導かれた配列を有する下記の D N A プライマーを用いて行われた。配列決定はジデオキシ連鎖中断法を用いて行われた。

M v P 5 1 8 0 g a g 遺伝子をコードする配列は、ヌクレオチド 8 1 7 (A T G 開始コドンの A) からヌクレオチド 2 3 0 0 (最後のコドンの A) まで延びる。 10

【 0 0 7 9 】

LTR1 : 5' - CTA GCA GTG GCG CCC GAA CAG G -3'
 gag3.5 : 5' - AAT GAG GAA GCU GCA GAU TGG GA -3' (U=A/T)
 gag3.5i : 5' - TCC CAU TCT GCU GCT TCC TCA TT -3' (U=A/T)
 gag5 : 5' - CCA AGG GGA AGT GAC ATA GCA GGA AC -3'
 gag959 : 5' - CGT TGT TCA GAA TTC AAA CCC -3'
 gag11i : 5' - TCC CTA AAA AAT TAG CCT GTC -3'
 pol3.5i : 5' - AAA CCT CCA ATT CCC CCT A -3'

【 0 0 8 0 】

P C R 法により得られた D N A 配列を第 7 表に示された D N A 配列と対比した。両 D N A 配列の比較を図 5 ~ 7 に示す。その際、同じウイルスを問題としているのにヌクレオチドが約 2 % 相互に違っていることが確認された。図 5 ~ 7 において各々上列は第 7 表に示されている D N A 配列を表わし、そして下列は P C R 法で得られた D N A 配列を表わしている。

更に、 P C R 法により調査されたタンパク質 g a g のアミノ酸配列を第 7 表から導かれる相当するタンパク質のアミノ酸配列と対比した。その際約 2 . 2 % のアミノ酸相違が認められた。その比較を図 8 に示すが、図において下列は各々 P C R 法により得られた配列から導かれたアミノ酸配列を表わす。 30

【 0 0 8 1 】

実施例 1 2

本発明によるウイルス M v P 5 1 8 0 の配列を H I V 1 および H I V 2 と、そして知られている限り A N T - 7 0 (W O 8 9 / 1 2 0 9 4) の配列と比較した。

その際に次の結果が得られた：

【表 1 7 】

第 10 表

遺伝子座	相違するヌ クレオチド	ヌクレオチド数	%相同性 (近似値)
LTR	207	630	HIV-1 67%
	308		HIV-2 51%
	115		ANT 70 82%
GAG	448	1501	HIV-1 70%
	570		HIV-2 62%
POL	763	3010	HIV-1 74%
	1011		HIV-2 66%
VIF	183	578	HIV-1 68%
	338		HIV-2 42%
ENV	1196	2534	HIV-1 53%
	1289		HIV-2 49%
NEF	285	621	HIV-1 54%
	342		HIV-2 45%
全体	3082	8874	HIV-1 65%
	3858		HIV-2 56%

【 0 0 8 2 】

前記の表において、“HIV-1”はHIV-1ウイルスのコンセンサス配列を意味し；
“HIV-2”はHIV-2ウイルスのコンセンサス配列を意味し；ANT-70はWO
89/12094より知られたHIV-3と表示されるウイルスの部分配列を意味する。

【 0 0 8 3 】

従って本発明の主題は、遺伝子座(Genort)に関し第7表に示された配列に対し、%値で表わした場合、高々第11表に記載の割合が異なるような相同性を示すウイルス、DNA配列、アミノ酸配列およびそれらの部分配列である。

【 0 0 8 4 】

【表18】

10

20

30

第 11 表

最大相違率として表わされた遺伝子座に関する相同性

<u>遺伝子座</u>	<u>相 違</u>	<u>好ましい相違</u>	<u>特に好ましい相違</u>	
L T R	1 7 %	1 5 %	1 0 %	
G A G	2 9 %	2 8 %	1 4 %	
P O L	2 5 %	2 4 %	1 2 %	10
V I F	3 1 %	3 0 %	1 5 %	
E N V	4 6 %	4 5 %	2 2 %	
N E F	1 6 %	1 2 %	1 0 %	

【 0 0 8 5 】

第 11 表に記載の % 単位の相同性値は、第 7 表による配列を別のウイルスの配列と比較した場合に高々前述の % 値に相当する配列割合だけ異なっていてもよいことを意味している。

【 0 0 8 6 】

実施例 1 3

V 3 - ループ / V 3 - シュラウフェ (Schlaufe)

このシュラウフェは H I V における主に中和性の領域であり、そしてその領域の免疫特異性を示したものが図 9 に要約してある。これは Peter Nara (1990) の研究によるエイズからのコピーである。次に V 3 - シュラウフェをアミノ酸レベルで記述し、そして I I B ウイルス (現在の L A I) および最初の H I V - 2 単離物 (R O D) と比較した。シスチン架橋の個々のアミノ酸は保存されている。H I V - 1 のクローンは G P G R または G P G Q であり、そして H I V - 2 のクローンは G H V F であるのに対し、M v P 5 1 8 0 / 9 1 のクローンはアミノ酸 G P M R から形成されている。メチオニンを用いたモチーフはこれまで報告されてなく、M v P 5 1 8 0 / 9 1 の個性を強めている。

【 0 0 8 7 】

ウイルスの核酸配列を調べた後、その V 3 - ループ領域を適切なプライマーを用いた P C R 法により増幅した。その際に、突然変異、特にメチオニンコドン (A T G) からロイシンコドン (C T G) への変化をみることができた。

【 0 0 8 8 】

次いでクローン化された核酸から導かれたアミノ酸配列と P C R 法を用いた増幅により得られた配列とを比較した：

M v P 5 1 8 0 (クローン化) :

C I R E G I A E V Q D I Y T G P M R W R S M T L K R S N N T S P R S R V A Y C

【 0 0 8 9 】

M v P 5 1 8 0 (P C R 法) :

C I R E G I A E V Q D L H T G P L R W R S M T L K K S S N S H T Q P R S K V A Y C

【 0 0 9 0 】

実施例 1 4

本発明によるウイルス M v P 5 1 8 0 またはそれにより導かれる抗原を用いれば、通常の H I V - 1 + 2 スクリーニングテストを用いたのでは把握できないような血清も H I V - 1 として陽性に検出できることを示すために、カメリーンからの患者の様々な血清を検査した。

10

20

30

40

50

【0091】

カメリーンでの研究において156の抗-HIV-1-陽性血清が検査された。二つのこれらの血清において、相当な、診断上重要な相違が認められた。次の第12表に吸光度測定値を記す。CAM-AまたはCAM-Bは異なる患者の血清を表わしている。

【0092】

【表19】

第12表

患者血清	MvP5180-EIA	HIV-1+HIV-2 EIA
CAM-A	2.886	1.623
CAM-B	1.102	0.386

10

【0093】

両テストのカットオフ値は0.300であった。

カメリーンからの47の抗-HIV-1陽性血清を用いたもう一つの研究において二つの血清が特に目立った。そのうちの一つ(93-1000)はわずかに症候を示す患者、もう一つ(93-1001)はエイズ病患者に由来する。次の第13表において、両EIAテストの吸光度値を相互に比較する：

20

【0094】

【表20】

第13表

患者血清	MvP5180-EIA	HIV-1+HIV-2 EIA
93-1000	>2.5	1.495
93-1001	0.692	0.314

30

【0095】

この場合にもカットオフ値は0.3であった。患者93-1001の吸光度値は、通常のHIV-1+HIV-2 EIAでは失敗し得るのに対し本発明による抗原を適用することにより明瞭な検出が可能であることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】HIV型レトロウイルスのゲノム配置概略図。

【図2】HIV-1、HIV-2、MVP-5180ウイルスの希釈液について市販テストキットを用いた抗原抗体反応により得られる吸光度と逆転写酵素活性の関係図。

40

【図3】MVP-5180およびMVP-899ウイルスのウェスターんプロット図。

【図4】HIV5180の遺伝子のPCR增幅、クローニングおよび配列決定の手法図。

【図5】PCR法により得られたMVP-5180のDNA配列と第7表に示されたDNA配列の比較図。

【図6】PCR法により得られたMVP-5180のDNA配列と第7表に示されたDNA配列の図5に続く比較図。

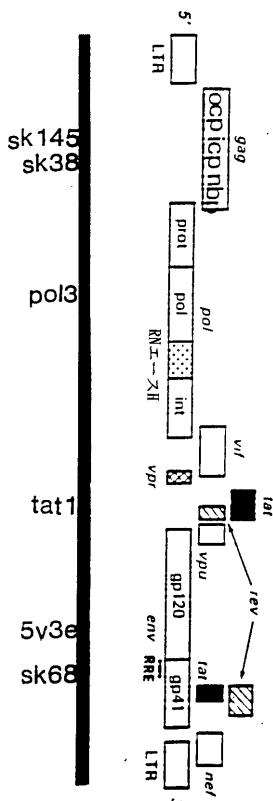
【図7】PCR法により得られたMVP-5180のDNA配列と第7表に示されたDNA配列の図6に続く比較図。

【図8】gagタンパク質の比較図(一つは第7表に従って(各々上列)、一つはPCR法で(各々下列)確認)。

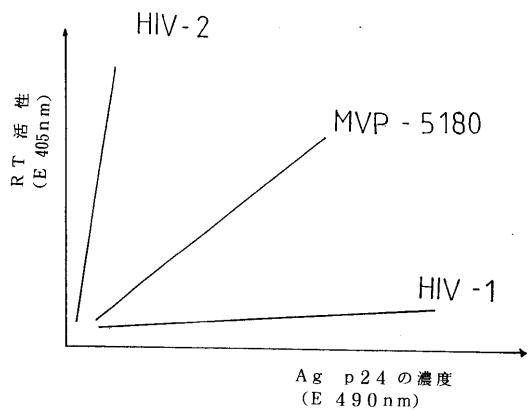
【図9】HIV-1(LAI)、HIV5180およびHIV-2(ROD)のV3-シユラウフェを示す図。

50

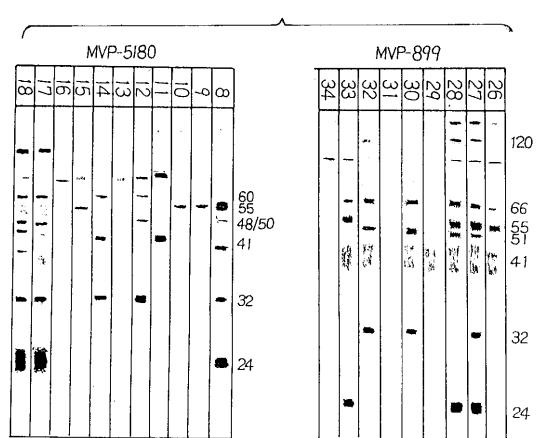
【図1】



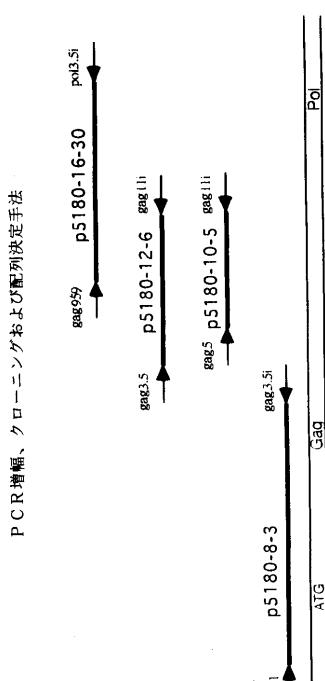
【 図 2 】



〔 3 〕



〔 4 〕



【図5】

上列は表7に相当し、下列はPCR法で確認

MvP5180 685 AACCTCCGACGCAACGGGCTGGCTTAGGGAGTGCACCTGCTAAGAGG 734
 1 aaacctccaacgcacggcgtcgcttgcggatgtgcacccgtcaagagg 50
 735 CGAGAGGAACCTACAAGAGGGTGAGTAAATTGCTGGCGGTGGCCAGACC 784
 51 cgagagggactcacaagagggtgagtaaattgtcgccgtggccagacc 160
 785 TAGGGGAAGGGCGAAGTCCCTAGGGGAGAAGATGGGTGGAGAGCGCT 834
 101 taggggaaggcgaaatggctcgaggagatgggtgcgagacggct 150
 835 GTGTTGACAGGGAGTAATTGGATGCATGGAACTTGGTTAAGGCC 884
 151 gtgttgcacaggagtaatggatgcacggaaacttgggtttaaggcc 200
 885 AGGATCTAAAAGGCATATAAGGCTAAAACATTAGTATGGCAAGCAGGG 934
 201 aggatctaaaaggcatatacgctaaaacatttagtatggcaagcagg 250
 935 AGCTGGAAAGATACGCATGTAATCCCTGGCTATTAGAAACTGCAGAGGT 984
 251 agctggaaagatagcgcataatacctggctactagaaactgcagagg 300
 985 ACTGAGCAACTGCTACAGCAGTTAGAGGCCAGCTCTCAAGACAGGGTCAGA 1034
 301 actgaaacactgtcatacagcagtttagccgcactctcaagacagggtcaga 350
 1035 GGACCTGAAATCTCTGGAAAGCCAAATCGAGCTACTCTGGGGGTCA 1084
 351 ggacctgaaatccctgtggaaacgcataagcgtactctgggtcaca 400
 1085 ACAGATTGACATCCGAGATAACACAGCAGCAATACAAAAGTTAAGGAA 1134
 401 acagatttgcacatccgcatacagcaggcaataaaaaatggaa 450
 1135 GAAATGGCAGGGAAACTCTGCAGAGGCCGCTAAGGAAGAACAGGCC 1184
 451 gtaatggcaagcaggaaatctgcagggccgttaaggaaacaaatggctc 500
 1185 TAGGCAGACAACTCAAAATTAACCTCTAGTAACAAATGCAAGGGACAAA 1234
 501 aaggcaggcaagtcacaaatccctatagtaacaaatgcacaggacaaa 550

【図6】

1235 TGGTACATCAAGCCATCTCCCGAGACTTAATGCATGGTAAAGGCA 1284
 551 tggtacatcaagccatatacccttagacttaatgcacggtaaaggca 600
 1285 GTAGAAAGAGAAGGGCTTTAACCCCTGAAATTATTCCTATGTTATGGCATT 1334
 601 gttagaaagaaaaggcttaaaccctgaaattatccctatgtttatggcatt 650
 1335 ATCGAAAGGGCTGTCCTTATGATATCAATACCATGCTGAATGCCATAG 1384
 651 atcagaagggtcgccctatgatataatccatgtgaatgccatag 700
 1385 GGGGACACCAAGGGCTTACAACTGTTAGGAAGGAGTAATCAATGAGGA 1434
 701 gggggacaccaagggttacaaatgtgtgaaggaaatcaatgaggaa 750
 1435 GCACCGAGAAATGGGATAGAACTCATCCACAGCAATGGGCCGTACCC 1484
 751 gcacggacatggatagaactcatccacccaggcaatggggccgttaccacc 800
 1485 AGGGCAGATAAGGGAAACACAGGAAGTGCACATTGCTGGAAACAATGAGCA 1534
 801 agggcagatggaaacacaggaaatgtgcacattgtgtggaaacaatgagca 850
 1535 CACAGCAAGAGCAAAATTATGGACTACTAGAGGGCTAACTCTATCCCA 1584
 851 cacacaagacaaatattatggactactagagggtcaactctatccca 900
 1585 CTAGGAGACATCTATGAAATGGGATAGTGTGCTAGGACTAAACAAAATGGT 1634
 901 gttagagacatctatgaaaatggatagttggactaaacaaaatgg 950
 1635 AAAATGTACAGTCAGTGCAGCATCTTAGATATTAGCAGGGACAAAAG 1684
 951 aaaatgtacagtcagtgacatcttagatattaggcagggacaaaag 1000
 1685 AACCAATTAGGAGATTATGATCGTTTACAAAACATTAGAGCTGAG 1734
 1001 aaccattcagagatattatgttagatcggtttacaaaacattaaagagctgag 1050
 1735 CAAGCTACTCAAGAGTAAAGAATTGGATGACAGAAACCTTGCTGTTCA 1784
 1051 caagctactcaagaatgttagatcggtttacaaaacattaaagagctgag 1100
 1785 GAATTCAAACCCAGATTGTAACAAATCTGAAAGCATTAGGACAGAG 1834
 1101 gaattcaacccaggatgttaacaaatctgtaaagcattaggaccaggag 1150

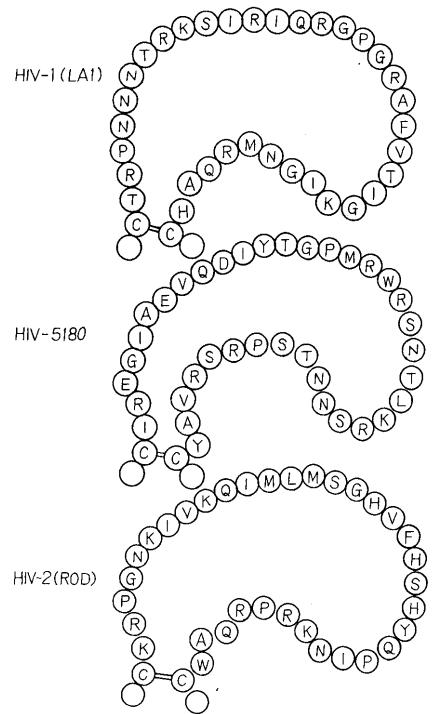
【図7】

1835 CTACTTTAGAAGAAATGATGGTAGCCGTCAAGGGTAGGGGGCAACT 1884
 1151 ctacttttagaagaaatgtgttagccgtcaaggatgtggggccact 1200
 1885 CACAAGGCAAAAATACTAGCAGAGCAATGGCTCTGCCAGCAAGATT 1934
 1201 cacaaggcaaaaatactagcagaagcaatggctctgcgcagatggatt 1250
 1935 AAAAGGAGGATACACAGCAGTATTATGCAGGAGGGCAGAATCCAAATA 1984
 1251 aaaggaggatatacagcagttatcatgcacggcggcaatccaaata 1300
 1985 GAAAAGGCCATAAAATGCTCAATTGTGAAAGAGGGACATATAGCA 2034
 1301 gaaaaggccataaaatgttcaattgtggaaaaggggacatatacgca 1350
 2035 AAAAACCTGAGCACCTAGAAAAGGGGTGCTGGAAATGTGACAGGA 2084
 1351 aaaaactgtcgcacccatggaaagggttactggaaatgtggacaggaa 1400
 2085 AGGTACACAAATGAAAGATGCCAAAATGGAAAGACAGGCAATTGGTGCAGAA 2134
 1401 aggtacccaaatggaaatgtggaaatggaaacagggcttatttttag 1450
 2135 GGAAGTACTGGCTCCGGGGGGACAGGGCCAGGAATTATGTGCAGAA 2184
 1451 ggaagtactggccctccggggggacggggccaggcaatattgtgcagaa 1500
 2185 CAAGTGTCCCCATCAGCCCCACCAATGGAGGGAGCTGAAGGAACAGA 2234
 1501 caagtgtccccatcagccccaccaatggggggcggcgtgtacccatggc 1550
 2235 GAATCAGAGTCAGAAGGGGATCAGGAAGGCTGTACCCATTGGCTCCC 2284
 1551 gaatcagaatcaaaggggatcaggaaatggggatgtacccatggc 1600
 2285 TCAAATCCCTTGGGAGACGACCAATAGTACAGCAGGAAAGGGTGGGGTC 2334
 1601 tcaaattcccttggggatcaggaaatggggatgtacccatggc 1650
 2335 ATCTATGTGAGGCCATTACTGGATACAGGGCAGATGATACAGTATTAAT 2384
 1651 atctatgtgaggcttactggatcaggccaggatgtacccatggc 1700
 2385 AACATACAAATAGAAGGAAGATGGACACAAAAA 2417
 1701 aacatacaatagaagggatggacacccaaa 1733

【図8】

MvP5180 MGARASVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELEERYACNPGL
 PCR MGARRSVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELEERYAYNPGL
 LETAEGTEQLLQLQLEPALKTGSEDLKSLWNIAVLWCVHNRFDIRDTQQA
 LETAEGTEQLLQLQLEPALKTGSEDLKSLWNIAVLWCVHNRFDIRDTQQA
 IQLKEVMASRKSAAKEETSPRQTSQNYPIVTNAQGOMVHQAIISPRTL
 IQLKEVMASRKSAAKEETTSQASQNYPIVTNAQGOMVHQAIISPRTL
 NAWVKAVEEKAFNPEIIPMFMALESEGAVPYDINTMLNAIGGHQGALQVLK
 NAWVKAVEEKAFNPEIIPMFMALESEGAVPYDINTMLNAIGGHQGALQVLK
 EVINEEEADWDRTHPPAMGPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQIWIWTR
 EVINEEEADWDRTHPPAMGPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQIWIWTR
 GANSIPVGDYIRKWLVLGLNKMVKMSPVSIIDIRQGPKEPPRDYVDRFY
 GANSIPVGDYIRKWLVLGLNKMVKMSPVSIIDIRQGPKEPPRDYVDRFY
 KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCQKILKALGPEATLEEMMVACQ
 KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCQKILKALGPEATLEEMMVACQ
 GVGGPTHAKILAEAMASAQDLKGGYTAVFMRQGQNPNRKGPIKCFNCG
 GVGGPTHAKILAEAMASAQDLKGGYTAVFMRQGQNPNRKGPIKCFNCG
 KEGHIAKNCRAPRKRGCWKCGQEGHOMKDCNKGQANPLGKYWPPGTRP
 KEGHIAKNCRAPRKRGCWKCGQEGHOMKDCNKGQANPLGKYWPPGTRP
 GNYVQKQVSPSAPPMEAVKEQENQSQKGQDQEELYPFASLKSLSLFGTDQ
 ANYVQKQVSPSAPPMEAVKEQENQNQKGQDQEELYPFASLKSLSLFGTDQ

〔 四 9 〕



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 P4244541:8
(32)優先日 平成4年12月30日(1992.12.30)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号 P4318186:4
(32)優先日 平成5年6月1日(1993.6.1)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(72)発明者 ヨーゼフ・エーベルレ
　　ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 6 フライジング . ゾネンシユトラーセ 7 ツエー
(72)発明者 アルブレヒト・ファウ・ブルン
　　ドイツ連邦共和国 8 6 1 5 4 アウクスブルク . シューマンシユトラーセ 1 7
(72)発明者 シュテファン・クナブ
　　ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク - ヴエールスハウゼン . ヴエールスホイザーシュトラーセ
　　6
(72)発明者 ハンス - ペーター・ハウザー
　　ドイツ連邦共和国 3 5 0 3 7 マルブルク . ヴアンコプフシユトラーセ 1 2

合議体

審判長 種村 慶樹
審判官 高堀 栄二
審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特表平1 - 5 0 3 4 6 2 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA(STN)
REGISTRY(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	CDNA与HIV组免疫缺陷病毒的RNA互补		
公开(公告)号	JP4113318B2	公开(公告)日	2008-07-09
申请号	JP2000045662	申请日	2000-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	日德白令maru堡ゲゼルシヤフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡 , Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡 , Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ルーツゲーギュルトラー ヨーゼフエーベルレ アルブレヒトファウブルン シュテフアンクナブ ハンスペーターハウゼ		
发明人	ルーツ・ゲー・ギュルトラー ヨーゼフ・エーベルレ アルブレヒト・ファウ・ブルン シュテフアン・クナブ ハンス-ペーター・ハウゼ		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 A61K39/21 A61K39/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/00 C07K14/155 C07K14/16 C12N5/02 C12N7/00 C12N7/01 C12N15/48 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/005 C12N2740/16021 C12N2740/16022 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12Q1/703 G01N33/56988		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K39/21 A61P31/18 C07K14/155 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N7/00 C12N7/01 G01N33/569.H		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR84 4B063/QS05 4B063/QS15 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C085/AA02 4C085/AA06 4C085/AA08 4C085/BA69 4C085/BB23 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	P4233646:5 1992-10-06 DE P4235718:7 1992-10-22 DE P4244541:8 1992-12-30 DE P4318186:4 1993-06-01 DE		
其他公开文献	JP2000312592A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得免疫缺陷病毒的新RNA或cDNA，其显示存在于ECACC中的逆转录病毒的实质形态学和免疫学特性，并称为MVP-5180/91，并用于检测等。HIV组衍生的病毒。解决方案：这种新型RNA或cDNA与属于人类免疫缺陷病毒（HIV）组的免疫缺陷病毒突变株中的RNA互补，显示出在欧洲动物保藏中保藏号为No.92092318的逆转录病毒具有显着的形态学和免疫学特性。细胞培养物（ECACC）并称为MVP-5180/91，并且可用于HIV组衍生的逆转录病毒的检测等。从喀麦隆女性患者的外周淋巴细胞中分

离RNA或cDNA，其发展出免疫缺陷症状，并通过蛋白质印迹从病毒中提取，该病毒与HIV-1和HIV-2显示出显着差异。