

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 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
(22) 出願日	平成12年2月23日 (2000.2.23)		デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル
(62) 分割の表示	特願平5-249605の分割		シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
原出願日	平成5年10月5日 (1993.10.5)		フツング
(65) 公開番号	特開2000-312592 (P2000-312592A)		ドイツ連邦共和国 マルブルク／ラーン (
(43) 公開日	平成12年11月14日 (2000.11.14)		番地なし)
審査請求日	平成12年2月23日 (2000.2.23)	(74) 代理人	100091731
審査番号	不服2003-24796 (P2003-24796/J1)		弁理士 高木 千嘉
審査請求日	平成15年12月24日 (2003.12.24)	(74) 代理人	100080355
(31) 優先権主張番号	P4233646:5		弁理士 西村 公佑
(32) 優先日	平成4年10月6日 (1992.10.6)	(72) 発明者	ルーツ・ゲー・ギユルトラー
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国 8 1 2 4 9 ミュンヘン
(31) 優先権主張番号	P4235718:7		・ トイフエルスベルクシュトラッセ 1 5
(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RNAに対して相補的なcDNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列RLQALETLIQNQQRLNLWGCKGKLICYTSVKWNTS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DNA。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のDNAを用いるペプチドの製造方法。

【請求項 3】

アミノ酸配列RLQALETLIQNQQRLNLWGCKGKLICYTSVKWNTS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DNA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、HIV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RNAまたはその部分に対して相補的であるcDNA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HIV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、なおモザイク免疫不全ウイルス(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ろにしている。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、病理学的変化の明らかな徴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。これは免疫不全の徴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たす。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徴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される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年に免疫不全の徴候を示した34才のカメルーンの女性患者の末梢リンパ球から単離された、以下MVP-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ウイ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、MVP-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MVP-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。

【 0 0 0 6 】

H I V - 1 および H I V - 2 と同様に、本発明による M V P - 5 1 8 0 / 9 1 は次の細胞系統、H U T 7 8、Jurkat - 細胞、C 8 1 6 6 - 細胞および M T - 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 (H I V 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 H I V - 1 および H I V - 2 とのもう一つの一致点である。

10

【 0 0 0 7 】

本発明による M V P - 5 1 8 0 / 9 1 ウイルスとレトロウイルス H I V - 1 および H I V - 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、p 2 4 (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 R N A が存在する。この内部コアは、タンパク質 p 1 7 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 gp 4 1 および外被タンパク質 1 2 0 (gp 1 2 0) を含む糖タンパク質外被により囲まれている。この gp 1 2 0 は次いで宿主細胞の C D - 4 - レセプターと結合することができる。

【 0 0 0 8 】

知られている限り、H I V - ウイルスの R N A 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 p 2 4 および p 1 7 をコードし、pol 遺伝子はとりわけ逆転写酵素、R N 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 gp 4 1 および gp 1 2 0 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。H I V 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。

20

【 0 0 0 9 】

レトロウイルス H I V - 1 と H I V - 2 との間の区別は、ウイルス抗原が Abbott 社のテストキット (H I V A G - 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 (H I V - 1) p 2 4 に指向させることにより可能になる。ウイルス型 H I V - 1 および H I V - 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 (E 4 9 0 nm) 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、H I V - 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 p 2 4 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、H I V - 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 p 2 4 結合親和性しか認められない。この測定を M V P - 5 1 8 0 / 9 1 について行うとかなり正確に H I V - 1 および H I V - 2 の曲線の間にくる、すなわちモノクローナル抗体の結合親和性は H I V - 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 R T 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 p 2 4 が用いられる。

30

40

【 0 0 1 0 】

多面的に利用可能な遺伝子工学系はいわゆる P C R (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 D N A 領域が知られていれば D N A 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 D N A 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 H I V - 核酸をそのプライマーと混

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（pol 3およびpol 4についてはLaure, F. et al., Lancet ii, (1988) 538-541、またはsk 38 / 39、sk 68 / 69についてはOu C.Y. et al., Science 239 (1988) 295-297）。

【 0 0 1 1 】

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 : C T A C T A G T A C C C T T C A G G

gagb : C G G T C T A C A T A G T C T C T A A A G

sk38 : C C A C C T A T C C C A G T A G G A G A A

sk39 : C C T T T G G T C C T T G T C T T A T G T C C A G A A T G C または

pol 3 : T G G G A A G T T C A A T T A G G A A T A C C A C

20

pol 4 : C C T A C A T A G A A A T C A T C C A T G T A T T G

pol 3n : T G G A T G T G G G T G A T G C A T A

pol 4n : A G C A C A T T G T A C T G A T A T C T A および

SK 145 : A G T G G G G G A C A T C A A G C A G C C

SK 150 : T G C T A T G T C A C T T C C C C T T G G T

145-P : C C A T G C A A A T G T T A A A A G A G A C

30

150-P : G G C C T G G T G C A A T A G G C C C

【 0 0 1 2 】

またはpol 3およびpol 4と

U N I - 1 : G T G C T T C C A C A G G G A T G G A A

U N I - 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、そしてネステッド・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

【 0 0 1 3 】

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 CATTT ATCAC AGCTG GCTAC

を用いると、増幅物は全く得られなかったが、H I V - 1 に比べ弱い増幅物しか得られなかったが、これは場合によっては汚染によるかもしれない。

【 0 0 1 4 】

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H I V - 1 に比べ弱いが使用H I V - 2 単離物 (M V P - 1 1 9 7 1 / 8 7) と同じ強さを示す増幅物が得られた。

【 0 0 1 5 】

広く普及しているH I V - 抗体の検出方法は、いわゆるウエスタンブロット (免疫ブロット) 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とができる。

【 0 0 1 6 】

本発明によるウイルスM V P - 5 1 8 0 / 9 1 はウイルスH I V - 1 およびH I V - 2 に対し、ウエスタンブロットにおいて二つの著しい本質的相違点を示す。H I V - 1 は、タンパク質 p 2 4 に対応する強いバンドと、p 2 3 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。H I V - 2 はタンパク質 p 2 5 に対応する強力なバンドを、そして多くの場合に p 2 3 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 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 ウイルスはタンパク質 p 2 4 および p 2 5 に相当するほぼ同じ強さの二本のバンドを示す。

【 0 0 1 7 】

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。H I V - 1 は逆転写酵素に相当する一本のバンド (p 5 3) と R N 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 (p 6 6) を示す。H I V - 2 ではその逆転写酵素はタンパク質 p 5 5 に相当し、またそれが R N エース H と結合している場合はタンパク質 p 6 8 に相当する。それに対し本発明による M V P - 5 1 8 0 / 9 1 は、タンパク質 p 4 8 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 p 6 0 のところに R N 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。

10

これらの結果から、M V P - 5 1 8 0 / 9 1 の逆転写酵素は H I V - 1 または H I V - 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。M V P - 5 1 8 0 の逆転写酵素は従って H I V - 1 または H I V - 2 の逆転写酵素よりも約 4 , 5 0 0 ~ 約 5 , 5 0 0 ダルトン小さい分子量を示す。

【 0 0 1 8 】

本発明によるウイルス M V P - 5 1 8 0 / 9 1 を用いた場合、抗 - env - 抗体は免疫不全の徴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 H I V - 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 g p 4 1 タンパク質に局在した。それらの試験では、一方はドイツの患者に由来し、そして他方は免疫不全の徴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。

20

前述の諸特徴が本発明による M V P - 5 1 8 0 / 9 1 に相当するようウイルス変異株を特徴付ける。従って、免疫不全徴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。

【 0 0 1 9 】

前述の性質を示すウイルスが単離されたので c D N A 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 (2 0 %) 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、2 0 m M ジチオトレイトールおよび 0 . 5 % Nonidet p 4 0 中の 6 M グアニジニウムクロライド中に懸濁することができる。C s C l を 2 M 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 R N A 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 c D N A 鎖の合成をウイルス R N A 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 R N A / D N A ハイブリッドの R N A 鎖を R N エース H で希釈しそして大腸菌 (E . coli) D N A ポリメラーゼ I を用いて合成される。次いで T 4 D N A 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、c D N A 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。c D N A - 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 c D N A 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 D N A 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。

30

40

50

【 0 0 2 0 】

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。

【 0 0 2 1 】

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。

【 0 0 2 2 】

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、少なくとも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、少なくとも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。

【 0 0 2 3 】

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なくとも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。

【 0 0 2 4 】

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、およびそれらより導かれる、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。

【 0 0 2 5 】

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でもある。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、少なくとも6アミノ酸長、好ましくは少なくとも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。この方法の更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。

【 0 0 2 6 】

診断テストにおいては、検査すべき人の血清検体を M V P - 5 1 8 0 / 9 1 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 E L I S A、イムノプロット）が包含される。

免疫酵素テスト（E L I S A）においては、例えば M V P - 5 1 8 0 / 9 1 またはその変異株に由来する抗原をマイ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マイ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マイ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ば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 - H I V - 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ブロットへの利用である。

10

【 0 0 2 7 】

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いても、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ス、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。

20

【 0 0 2 8 】

実施例 1

本発明による免疫不全ウイルス M V P - 5 1 8 0 / 9 1 を免疫不全徴候を伴う女性患者の血液から単離した。そのために、H I V 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 R P M I 1 6 4 0 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（Reisenzellen）の形成を顕微鏡観察した。H I V ウイルスの生産を Abbott 社から購入できるテストを用いた p 2 4 - 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。

30

【 0 0 2 9 】

H I V ウイルス増殖が確認できた後、H I V 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（P B L）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 H 9 または H U T 7 8 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 E C A C C に No. V 920 92 318 の番号で寄託された。

40

【 0 0 3 0 】

実施例 2

H I V 感染の検出には、現在のところいわゆるウェスタンブ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 H I V - 1 ウイルス

ドイツの血清 強い反応

アフリカの血清 g p 4 1 と強い反応

50

ウイルス型：MVP - 5180 / 91

ドイツの血清 gp41 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】

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ブロットを行った。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 番のウェスタンブロットでは、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。

【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ブロットにおいて gp41 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、ウェスタンブ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関連させることができること、これは診断上大変な進歩である。

【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

MVP - 5180 / 91 に感染させた HUT 78 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 gp41 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 HUT 78 細胞からの 5 µl のゲノム DNA を 100 µl の反応混合物 (0.25 mM dNTP、各 1 µM のプライマー 1 およびプライマー 2、10 mM Tris HCl pH8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.001 % ゼラチン、2.5

10

20

30

40

50

単位のTaq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95℃、2. 増幅：90秒94℃、60秒56℃、90秒72℃(30サイクル)。

【0035】

前記PCR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8750で合成された。

プライマー1：AGC AGC AGG AAG CAC TAT GG

(HIV単離物HxB2からの座標(コーディネート)：塩基7795 - 7814、プライマーsk68に相当)

プライマー2：GAG TTT TCC AGA GCA ACC CC

(HIV1単離物HxB2からの座標：塩基8003 - 8022、プライマーenv bに相当)。

【0036】

増幅したDNA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×TBE(0.09M Trisボレート、0.002M EDTA、pH8.0)と混合した。そのDNA-アガロースゲル混合物を70℃で10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DNAを水性相から1/10容の3M NaAc(pH5.5)および2容のエタノールを添加することにより-20℃で15分間沈殿させ、次いで遠心分離機(Eppendorf社)でペレット化した(13000rpm、10分、4℃)。ペレット化したDNAを乾燥し、水にとり、そして分光光度計(Beckman社)において260nmでのDNA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 DNA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(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1μM)を適用した。配列決定反応系の分析はDNA配列決定装置373A(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DNA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。

【0037】

【表1】

10

20

30

第 1 表

```

GCGCAGCGGCAACAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCGTCGCCGTTGTTCGCGACTGCCATGCCTGGGTGTCACATGACTTCCCATATCACGTTG

  A  A  A  T  A  L  T  V  R  T  H  S  V  L  K  G  I  V  Q  Q

AGCAGGACAACCTGCTGAGAGCGATACAGGCCAGCAACACTTGCTGAGGTTATCTGTAT
-----+-----+-----+-----+-----+
TCGTCTGTGTTGGACGACTCTCGCTATGTCCGGGTCGTTGTGAACGACTCCAATAGACATA

  Q  D  N  L  L  R  A  I  Q  A  Q  Q  H  L  L  R  L  S  V  W

GGGGTATTAGACAACTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTTAGAAACCCTTATACAGAATCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+
CCCCATAATCTGTTGAGGCTCGAGCGGACGTTTCGGAATCTTTGGGAATATGTCTTAGTCG

  G  I  R  Q  L  R  A  R  L  Q  A  L  E  T  L  I  Q  N  Q  Q

AACGCCTAAACCTAT
-----+----- 195
TTGCGGATTTGGATA

  R  L  N  L  -

```

10

20

【 0 0 3 8 】

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 7 2、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霊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。

30

【 0 0 3 9 】

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% の相同性を示す。H I V 1 単離物に対して、M V P 5 1 8 0 / 9 1 は調べた D N A 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 D N A 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霊長類からの単離物 (S I V : サル免疫不全ウイルス) からの D N A 断片の間の最良の相同性は、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 D N A 配列に存在する。その相同性は 61.5% である。

40

【 0 0 4 0 】

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 タンパク質データベース (リリース 2 2、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霊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。

【 0 0 4 1 】

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性は単離物 H I V 1 M a 1 に認められる。その相同性は 59%

50

である。H I V 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 5 2 % (単離物 H I V 2 R o d) である。H I V 1 および H I V 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 6 4 % が一致するに過ぎないことから、単離物 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 の場合は H I V 1 および H I V 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 H I V ウイルス群の代表である H I V 変異株が関係していると思われる。

【 0 0 4 2 】

H I V 単離物 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 の増幅された D N A 領域のアミノ酸配列 (第 1 表) は、H I V 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 5 8 4 - 6 1 8 *) とオーバーラップする (第 2 表) (Gnann et al., J. Inf. Dis. 156 : 261-267, 1987; No

10

rrby et al., Nature, 329 : 248-250, 1987) 。
H I V 2 および S I V 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 H I V 1 および H I V 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 H I V 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 9 9 % の抗 H I V 1 および抗 H I V 2 陽性血清を捕捉することができる。

【 0 0 4 3 】

M V P - 5 1 8 0 / 9 1 - 外被タンパク質のアミノ酸領域 (第 1 表) は、g p 4 1 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、H I V 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

20

【 0 0 4 4 】

【表 2】

第 2 表

```

.....RILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNAS
          |: |:| .: .: || |:|
WGIRQLRLRLQALETLIQNQQRLNL.....

```

30

【 0 0 4 5 】

実施例 7

(g p 4 1 をコードする) H I V 単離物 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 のゲノム診断の D N A 単離、増幅および構造的特徴評価

M V P - 5 1 8 0 / 9 1 に感染した H U T 7 8 細胞からのゲノム D N A を前述の如く単離した。

単離物 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 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 g p 4 1 からのプライマー対を用いて P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 実験を行った。

40

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

【 0 0 4 6 】

1 . P C R

H I V - 特異的 D N A 領域を増幅するために、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 5 μ l (2 1 8 μ g / ml) のゲノム D N A を 1 0 0 μ l の反応混合物 (0 . 2 5 mM d N T P 、各 1 μ M のプライマー 1 6 3 env およびプライマー-envend、1 0 mM Tris H C l (pH 8 . 3) 、5 0 mM K C l 、1 . 5 mM M g C l ₂ 、0 . 0 0 1 % ゼラチン、2 . 5 単位の T a q 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 9 5 、2 . 増幅 : 9 0 秒間 9 4 、

50

60秒間56、90秒間72（30サイクル）。

【0047】

2. gp41の5'領域（N-末端）およびgp120の3'配列を“逆PCR”により増幅した。そのために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの100μlのゲノムDNA調製物（218μg/ml）を10単位の制限エンドヌクレアーゼSau3aを含む200μlの最終容量中37℃で1時間消化した。そのDNA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300mM）および2.5容エタノールを用いて-70℃で10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890μlの蒸留水に再懸濁した。100μlのリガーゼ緩衝液（50mM Tris HCl、pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、25μg/ml牛血清アルブミン）および10μlのT4 DNA-リガーゼ（Boehringer社、マンハイム）を添加した後、それらDNA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DNAを40μlの蒸留水に再懸濁し、そして10単位の制限エンドヌクレアーゼSac I（Boehringer社、マンハイム）を用いて1時間消化した。次に5μlのこの混合物を“1. PCR”に記載の如くPCR実験に適用した。プライマー163 envおよびenvendに代えてプライマー168；および169；を逆PCRに用いた。

【0048】

それらプライマー163 env、168；および169；は、HIV-単離物MVP-5180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）。PCR/逆PCR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8750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163 env： 5' CAG AAT CAG CAA CGC CTA AAC C 3'

プライマーenvend： 5' GCC CTG TCT TAT TCT TCT AGG 3'

（HIV1単離物BH10での位置：塩基8129-8109）

プライマー 168 i： 5' GCC TGC AAG CCT TAG AAA CC 3'

プライマー169 i： 5' GCA CTA TAC CCT TCA GTA CAC TG 3'

【0049】

増幅されたDNAを3%“Nusieve”-アガロースゲル（Biozyme社）で分離し、増幅された断片を切り取りそして等容の緩衝液（1×TBE（0.09M Trisボレート、0.002M EDTA、pH8.0）と混合した。そのDNA-アガロースゲル混合物を70℃で10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、DNAを水性相から1/10容の3M NaAc、pH5.5および2容のエタノールを用いて-20℃で15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（13000rpm、10分間、4℃）。そのペレット化されたDNAを乾燥し、水にとり、そして分光光度計（Beckman社）により260nmでのDNA濃度を光度計測定した後、Sanger（F. Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463, 1977）の方法に従って配列決定した。Klenow DNA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：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163 envまたはプライマーenvend（各1μM）を適用した。この逆PCR実験で増幅されたDNAをプライマー168；および169；を用いて配列決定した。配列決定反応の分析はDNA配列決定装置373A（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DNA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	AAATGTCAAGACCAATAATAAACATTACACCCCTCACAGGGAAAAAGAGCAGTAGGAT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ TTTACAGTTCTGGTTATTATTTGTAAGTGTGGGGAGTGTCCCTTTTTTCTCGTCATCCTA	60	
	M S R P I I N I H T P H R E K R A V G L gp120←-----→gp41		
61	TGGGAATGCTATTCTTGGGGGTGCTAAGTGCAGCAGGTAGCACTATGGGCGCAGCGGCAA -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ACCCCTTACGATAAGAACCCCCACGATTCACGTCGTCCATCGTGATACCCGCGTCGCCGTT	120	10
	G M L F L G V L S A A G S T M G A A A T		
121	CAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCAACAGCAGGACAACC -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ GTCGCGACTGCCATGCCTGGGTGTCACATGACTTCCCATATCACGTTGTCGTCTCTGTTGG	180	
	A L T V R T H S V L K G I V Q Q Q D N L		
181	TGCTGAGAGCGATACAGGCCCAGCAACACTTGCTGAGGTTATCTGTATGGGGTATTAGAC -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ACGACTCTCGCTATGTCCGGGTCGTTGTGAACGACTCCAATAGACATACCCCATAACTCTG	240	
	L R A I Q A Q Q H L L R L S V W G I R Q		20
241	AACTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTTAGAAACCCTTATACAGAATCAGCAACGCCTAAACC -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ TTGAGGCTCGAGCGGACGTTTCGGAATCTTTGGGAATATGTCTTAGTCGTTGCGGATTTGG	300	
	L R A R L Q A L E T L I Q N Q Q R L N L		
301	TATGGGGCTGTAAAGGAAAACTAATCTGTTACACATCAGTAAATGGAACACATCATGGT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ ATACCCCGACATTTCTTTTTGATTAGACAATGTGTAGTCATTTTACCTTGTGTAGTACCA	360	
	W G C K G K L I C Y T S V K W N T S W S		
361	CAGGAGGATATAATGATGACAGTATTTGGGACAACCTTACATGGCAGCAATGGGACCAAC -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ GTCCTCCTATATTACTACTGTCATAAACCTGTTGGAATGTACCGTCGTTACCCTGGTTG	420	30
	G G Y N D D S I W D N L T W Q Q W D Q H		
421	ACATAACAATGTAAGCTCCATTATATATGATGAAATACAAGCAGCACAAGACCAACAGG -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ TGTATTTGTTACATTCGAGGTAATATATACTACTTTATGTTTCGTCGTGTTCTGGTTGTCC	480	
	I N N V S S I I Y D E I Q A A Q D Q Q E		
481	AAAAGAATGTAAAAGCATTGTTGGAGCTAGATGAATGGGCCTCTCTTTGGAATTGGTTTG -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ TTTTCTTACATTTTCGTAACAACCTCGATCTACTTACCCGGAGAGAAACCTTAACCAAAC	540	40
	K N V K A L L E L D E W A S L W N W F D		
541	ACATAACTAAATGGTTGTTGGTATATAAAAAATAGCTATAATCATAGTGGGAGCACTAATAG -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ TGTATTGATTTACCAACACCATATATTTTATCGATATTAGTATCACCCCTCGTGATTATC	600	
	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	660
	CATATTCTCAATAGTACTATCATGAATTAGATCACTTCTTGTAATCCGTCCTATAGTTG	
	I R V I M I V L N L V K N I R Q G Y Q P	
661	CCCTCTCGTTGCAGATCCCTGTCCCACACCGGCAGGAAGCAGAAACGCCAGGAAGAACAG	720
	GGGAGAGCAACGTCTAGGGACAGGGTGTGGCCGTCCTTCGTCTTTGCGGTCCTTCTTGTC	
	L S L Q I P V P H R Q E A E T P G R T G	10
721	GAGAAGAAGGTGGAGAAGGAGACAGGCCCAAGTGGACAGCCTTGCCACCAGGATTCTTGTC	780
	CTCTTCTTCCACCTCTTCCTCTGTCCGGGTTACCTGTGCGAACGGTGGTCCTAAGAACG	
	E E G G E G D R P K W T A L P P G F L Q	
781	AACAGTTGTACACGGATCTCAGGACAATAATCTTGTGGACTTACCACCTCTTGAGCAACT	840
	TTGTCAACATGTGCCTAGAGTCCTGTTATTAGAACACCTGAATGGTGGAGAACTCGTTGA	
	Q L Y T D L R T I I L W T Y H L L S N L	
841	TAATATCAGGGATCCGGAGGCTGATCGACTACCTGGGACTGGGACTGTGGATCCTGGGAC	900
	ATTATAGTCCCTAGGCCTCCGACTAGCTGATGGACCCTGACCCTGACACCTAGGACCCTG	20
	I S G I R R L I D Y L G L G L W I L G Q	
901	AAAAGACAATTGAAGCTTGTAGACTTTGTGGAGCTGTAATGCAATATTGGCTACAAGAAT	960
	TTTTCTGTAACTTCGAACATCTGAAACACCTCGACATTACGTTATAACCGATGTTCTTA	
	K T I E A C R L C G A V M Q Y W L Q E L	
961	TGAAAAATAGTGCTACAAACCTGCTTGATACTATTGCAGTGTGAGTTGCCAATTGGACTG	1020
	ACTTTTTATCACGATGTTTGGACGAACTATGATAACGTCACAGTCAACGGTTAACCTGAC	30
	K N S A T N L L D T I A V S V A N W T D	
1021	ACGGCATCATCTTAGGTCTACAAAGAATAGGACAAGG	1057
	TGCCGTAGTAGAATCCAGATGTTTCTTATCCTGTTCC	
	G I I L G L Q R I G Q	

【 0 0 5 2 】

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 - データバンク (リリース 7 2、1 9 9 2 年 6 月) において G C G - コンピュータープログラム (Gene 40
tic Computer Group, Inc. 社、米国ウイスコンシン州、バージョン 7.1、1 9 9 2 年 3
月) を用いて調べた。このデータバンクには 1 9 9 2 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霊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 6 2 % 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 5 0 % 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 2 2、1 9 9 2 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 1 9 9 2 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霊長類からの単離物のタンパク質配列のほとんどが含 50

まれている。

【 0 0 5 3 】

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 C I V (S I V c p z) の相当する外被タンパク質断片に対し最良の場合 5 4 % 相同であり、そして H I V 1 単離物 M a l に対して 5 4 . 5 % 相同である。H I V 2 - 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 3 4 % (単離物 H I V 2 D 1 9 4) である。

それに対し、H I V 1 の g p 4 1 - アミノ酸配列を SWISSRPOT - データバンクに存在する H I V 1 g p - 4 1 配列と比較すると期待されたとおり最良の場合ほぼ 1 0 0 % の相同性、そして最悪の場合に 7 8 % の相同性が得られる。

第 3 表記載の配列領域と H I V 1 および H I V 2 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 M V P - 5 1 8 0 / 9 1 の場合は、H I V 1 および H I V 2 とは明らかに構造的に区別される H I V 変異株が関係していると思われる。おそらく M V P - 5 1 8 0 / 9 1 は H I V 1 および H I V 2 とは区別される特別な H I V ウイルス群に帰属すると思われる。

【 0 0 5 4 】

H I V 1 - 外被タンパク質領域のアミノ酸 5 8 4 - 6 1 8 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) 。 H I V 2 および S I V 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 H I V 1 および H I V 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 H I V 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 9 9 % の抗 - H I V 1 および抗 - H I V 2 陽性血清を捕捉することができる。

M V P - 5 1 8 0 / 9 1 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 g p 4 1 全体は、H I V 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、M V P - 5 1 8 0 / 9 1 と密接な関係にあるウイルスによる感染が存在し得る。

【 0 0 5 5 】

【 表 5 】

第 4 表

1 RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

2 LQ L TLIQN R NL K Y S K T

1 g p 4 1 由来の H I V 1 アミノ酸配列

2 g p 4 1 由来の M V P - 5 1 8 0 配列。H I V 1 配列と相違して
いるところだけが記されている。

【 0 0 5 6 】

M V P 5 1 8 0 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 : R L Q A L E T L I Q N Q Q R L N L W G C K G K L I C Y T S V K W N T S 。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かでき、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 1 2 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。

【 0 0 5 7 】

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。

【 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。

【 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 sk 6 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 [γ - 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。

【 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。そこでプレートにニ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。

【 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

10

20

30

40

50

ズした。次にそのフィルターを60 で、まず2 × S S C / 0.1 % S D S で、次に0.2 × S S C / 0.1 % S D S 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 T TH 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プラークを S M 緩衝液で溶出後さらなる希釈段階で分離した。

2 × 10⁶ プ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ニング

S M 緩衝液中のファージ溶出液10 μl を用いて宿主株 S R B (P2) 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 μl の10 mM M g S O₄ 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 E c o R I で切断し、そしてそれによって得られた E c o R I 断片をベクター Bluescript KS⁻ (Stratagene, No.: 212208) にサブクロン化した。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 (C C A T A A T A T T C A G C A G A A C T A G) および226 (G C T G A T T C T G T A T A A G G G) を用いた P C R により得た。DNA 鋳型としてはクローンのファージDNAを用いた。P C R 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 E c o R I 切断部位の場合に、クローンのファージDNAを鋳型として用いた P C R によって、サブクローン移行時点で各々単一の E c o R I 切断部位が関係していることが確認された。

【0065】

【表7】

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

<u>遺伝子</u>	<u>開 始 ¹</u>	<u>停 止 ¹</u>
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 TCTTCCCTGA TTGGCAGTGT TACACACCGG
 101 GACCAGGACC TAGATTCCCA CTGACATTG GATGGTTGTT TAAACTGGTA
 151 CCAGTGTCTAG CAGAAGAGGC AGAGAGACTG GGTAATACAA ATGAAGATGC
 201 TAGTCTTCTA CATCCAGCTT GTAATCATGG AGCTGAGGAT GCACACGGGG
 251 AGATACTAAA ATGGCAGTTT GATAGATCAT TAGGCTTAAC ACATATAGCC
 301 CTGCAAAAGC ACCCAGAGCT CTTCCCCAAG TAACTGACAC TGCGGGACTT
 351 TCCAGACTGC TGACACTGCG GGGACTTTCC AGCGTGGGAG GGATAAGGGG
 401 CGGTTTCGGG AGTGGCTAAC CCTCAGATGC TGCATATAAG CAGCTGCTTT
 451 CCGCTTGCTAC CGGGTCTTAG TTAGAGGACC AGGTCTGAGC CCGGGAGCTC
 501 CCTGGCCTCT AGCTGAACCC GCTGCTTAAC GCTCAATAAA GCTTGCCTTG
 551 AGTGAGAAGC AGTGTGTGCT CATCTGTTCA ACCCTGGTGT CTAGAGATCC
 601 CTCAGATCAC TTAGACTGAA GCAGAAAATC TCTAGCAGTG GCGCCCGAAC
 651 AGGGACGCGA AAGTGAAAGT GGAACCAGGG AAGAAAACCT CCGACGCAAC
 701 GGGCTCGGCT TAGCGGAGTG CACCTGCTAA GAGGCGAGAG GAACTCACAA
 751 GAGGGTGAGT AAATTTGCTG GCGGTGGCCA GACCTAGGGG AAGGGCGAAG
 801 TCCCTAGGGG AGGAAGATGG GTGCGAGAGC GTCTGTGTTG ACAGGGAGTA
 851 AATTGGATGC ATGGGAACGA ATTAGGTTAA GGCCAGGATC TAAAAAGGCA
 901 TATAGGCTAA AACATTTAGT ATGGGCAAGC AGGGAGCTGG AAAGATACGC
 951 ATGTAATCCT GGTCTATTAG AAAGTGCAGA AGGTACTGAG CAACTGCTAC
 1001 AGCAGTTAGA GCCAGCTCTC AAGACAGGGT CAGAGGACCT GAAATCTCTC
 1051 TGGAACGCAA TAGCAGTACT CTGGTGCGTT CACAACAGAT TTGACATCCG
 1101 AGATACACAG CAGGCAATAC AAAAGTTAAA GGAAGTAATG GCAAGCAGGA
 1151 AGTCTGCAGA GGCCGCTAAG GAAGAAACAA GCCCTAGGCA GACAAGTCAA
 1201 AATTACCCTA TAGTAACAAA TGCACAGGGA CAAATGGTAC ATCAAGCCAT
 1251 CTCCCCCAGG ACTTTAAATG CATGGGTAAA GGCAGTAGAA GAGAAGGCCT
 1301 TTAACCCTGA AATTATTCCT ATGTTTATGG CATTATCAGA AGGGGCTGTC
 1351 CCCTATGATA TCAATACCAT GCTGAATGCC ATAGGGGGAC ACCAAGGGGC

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

【 表 9 】

第7表 (続き)

1401	TTTACAAGTG	TTGAAGGAAG	TAATCAATGA	GGAAGCAGCA	GAATGGGATA	
1451	GAACTCATCC	ACCAGCAATG	GGGCCGTTAC	CACCAGGGCA	GATAAGGGAA	
1501	CCAACAGGAA	GTGACATTGC	TGGAACAAC	AGCACACAGC	AAGAGCAAAT	
1551	TATATGGACT	ACTAGAGGGG	CTAACTCTAT	CCCAGTAGGA	GACATCTATA	
1601	GAAAATGGAT	AGTGCTAGGA	CTAAACAAAA	TGGTAAAAAT	GTACAGTCCA	
1651	GTGAGCATCT	TAGATATTAG	GCAGGGACCA	AAAGAACCAT	TCAGAGATTA	10
1701	TGTAGATCGG	TTTTACAAAA	CATTAAGAGC	TGAGCAAGCT	ACTCAAGAAG	
1751	TAAAGAATTG	GATGACAGAA	ACCTTGCTTG	TTCAGAATTC	AAACCCAGAT	
1801	TGTAAACAAA	TTCTGAAAGC	ATTAGGACCA	GAAGCTACTT	TAGAAGAAAT	
1851	GATGGTAGCC	TGTCAAGGAG	TAGGAGGGCC	AACTCACAAG	GCAAAAATAC	
1901	TAGCAGAAGC	AATGGCTTCT	GCCCAGCAAG	ATTTAAAAGG	AGGATACACA	
1951	GCAGTATTCA	TGCAAAGAGG	GCAGAATCCA	AATAGAAAAG	GGCCCATAAA	20
2001	ATGCTTCAAT	TGTGGAAAAG	AGGGACATAT	AGCAAAAAAC	TGTCGAGCAC	
2051	CTAGAAAAAG	GGGTGCTGG	AAATGTGGAC	AGGAAGGTCA	CCAAATGAAA	
2101	GATTGCAAAA	ATGGAAGACA	GGCAAATTTT	TTAGGGAAGT	ACTGGCCTCC	
2151	GGGGGGCAG	AGGCCAGGCA	ATTATGTGCA	GAAACAAGTG	TCCCCATCAG	
2201	CCCCACCAAT	GGAGGAGGCA	GTGAAGGAAC	AAGAGAATCA	GAGTCAGAAG	
2251	GGGGATCAGG	AAGAGCTGTA	CCCATTGCCC	TCCCTCAAAT	CCCTCTTTGG	
2301	GACAGACCAA	TAGTCACAGC	AAAGGTTGGG	GGTCATCTAT	GTGAGGCTTT	30
2351	ACTGGATACA	GGGGCAGATG	ATACAGTATT	AAATAACATA	CAATTAGAAG	
2401	GAAGATGGAC	ACCAAAAATG	ATAGGGGGTA	TAGGAGGCTT	TATAAAAGTA	
2451	AAAGAGTATA	ACAATGTGAC	AGTAGAAGTA	CAAGGAAAGG	AAGTACAGGG	
2501	AACAGTATTG	GTGGGACCTA	CTCCTGTAA	TATTCTTGGG	AGAAACATAT	
2551	TGACAGGATT	AGGATGTACA	CTAAATTTCC	CTATAAGTCC	CATAGCCCCA	
2601	GTGCCAGTAA	AGCTAAAACC	AGGAATGGAT	GGACCAAAAG	TAAAACAATG	40
2651	GCCCCTATCT	AGAGAGAAAA	TAGAAGCACT	AACTGCAATA	TGTCAAGAAA	
2701	TGGAACAGGA	AGGAAAAATC	TCAAGAATAG	GACCTGAAAA	TCCTTATAAT	
2751	ACACCTATTT	TTGCTATAAA	AAAGAAAGAT	AGCACTAAGT	GGAGAAAATT	

【 0 0 6 8 】

【 表 1 0 】

第7表 (続き)

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

【 0 0 6 9 】

【 表 1 1 】

第7表 (続き)

4201	GCATAGGAGG	AAATGAAAAA	ATAGATAAAT	TAGTAAGCAA	AGACATTAGA	
4251	AGAGTCCTGT	TCCTGGAAGG	AATAGATCAG	GCACAAGAAG	ATCATGAAAA	
4301	ATATCATAGT	AATTGGAGAG	CATTAGCTAG	TGACTTTGGA	TTACCACCAA	
4351	TAGTAGCCAA	GGAAATCATT	GCTAGTTGTC	CTAAATGCCA	TATAAAAGGG	
4401	GAAGCAACGC	ATGGTCAAGT	AGACTACAGC	CCAGAGATAT	GGCAAAATGGA	
4451	TTGTACACAT	TTAGAAGGCA	AAATCATAAT	AGTTGCTGTC	CATGTAGCAA	10
4501	GTGACTTTAT	AGAAGCAGAG	GTGATACCAG	CAGAAACAGG	ACAGGAAACT	
4551	GCCTATTTCC	TGTTAAAATT	AGCAGCAAGA	TGGCCTGTCA	AAGTAATACA	
4601	TACAGACAAT	GGACCTAATT	TTACAAGTGC	AGCCATGAAA	GCTGCATGTT	
4651	GGTGGACAGG	CATACAACAT	GAGTTTGGGA	TACCATATAA	TCCACAAAGT	
4701	CAAGGAGTAG	TAGAAGCCAT	GAATAAAGAA	TTAAAATCTA	TTATACAGCA	
4751	GGTGAGGGAC	CAAGCAGAGC	ATTTAAAAAC	AGCAGTACAA	ATGGCAGTCT	20
4801	TTGTTCACAA	TTTTAAAAGA	AAAGGGGGGA	TTGGGGGGTA	CACTGCAGGG	
4851	GAGAGACTAA	TAGACATACT	AGCATCACAA	ATACAAACAA	CAGAACTACA	
4901	AAAACAAATT	TTAAAAATCA	ACAATTTTCG	GGTCTATTAC	AGAGATAGCA	
4951	GAGACCCTAT	TTGGAAAGGA	CCGGCACAAC	TCCTGTGGAA	AGGTGAGGGG	
5001	GCAGTAGTCA	TACAAGATAA	AGGAGACATT	AAAGTGGTAC	CAAGAAGAAA	
5051	GGCAAAAATA	ATCAGAGATT	ATGGAACA	GATGGCAGGT	ACTGATAGTA	
5101	TGGCAAATAG	ACAGACAGAA	AGTGAAAGCA	TGGAACAGCC	TGGTGAAATA	30
5151	CCATAAATAC	ATGTCTAAGA	AGGCCGCGAA	CTGGCGTTAT	AGGCATCATT	
5201	ATGAATCCAG	GAATCCAAAA	GTCAGTTCGG	CGGTGTATAT	TCCAGTAGCA	
5251	GAAGCTGATA	TAGTGGTCAC	CACATATTGG	GGATTAATGC	CAGGGGAAAG	
5301	AGAGGAACAC	TTGGGACATG	GGGTTAGTAT	AGAATGGCAA	TACAAGGAGT	
5351	ATAAACACA	GATTGATCCT	GAAACAGCAG	ACAGGATGAT	ACATCTGCAT	
5401	TATTTACAT	GTTTTACAGA	ATCAGCAATC	AGGAAGGCCA	TTCTAGGGCA	
5451	GAGAGTGCTG	ACCAAGTGTG	AATACCTGGC	AGGACATAGT	CAGGTAGGGA	40
5501	CACTACAATT	CTTAGCCTTG	AAAGCAGTAG	TGAAAGTAAA	AAGAAATAAG	
5551	CCTCCCCTAC	CCAGTGTCCA	GAGATTAACA	GAAGATAGAT	GGAACAAGCC	

【 0 0 7 0 】

【 表 1 2 】

第7表 (続き)

5601	CTGGAAAATC	AGGGACCAGC	TAGGGAGCCA	TTCAATGAAT	GGACACTAGA	
5651	GCTCCTGGAA	GAGCTGAAAG	AAGAAGCAGT	AAGACATTTC	CCTAGGCCTT	
5701	GGTTACAAGC	CTGTGGGCAG	TACATTTATG	AGACTTATGG	AGACACTTGG	
5751	GAAGGAGTTA	TGGCAATTAT	AAGAATCTTA	CAACAACTAC	TGTTTACCCA	
5801	TTATAGAATT	GGATGCCAAC	ATAGTAGAAT	AGGAATTCTC	CCATCTAACA	
5851	CAAGAGGAAG	AGGAAGAAGA	AATGGATCCA	GTAGATCCTG	AGATGCCCCC	10
5901	TTGGCATCAC	CCTGGGAGCA	AGCCCCAAAC	CCCTTGTAAT	AATTGCTATT	
5951	GCAAAAGATG	CTGCTATCAT	TGCTATGTTT	GTTTCACAAA	GAAGGGTTTG	
6001	GGAATCTCCC	ATGGCAGGAA	GAAGCGAAGA	AGACCAGCAG	CTGCTGCAAG	
6051	CTATCCAGAT	AATAAGATC	CTGTACCAGA	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	GCTAATCCCA	TGTTTGAGTT	
6351	ATAGTAAACA	ATTGTATGCC	ACAGTTTATT	CTGGGGTACC	TGTATGGGAA	
6401	GAGGCAGCAC	CAGTACTATT	CTGTGCTTCA	GATGCTAACC	TAACAAGCAC	
6451	TGAACAGCAT	AATATTTGGG	CATCACAAGC	CTGCGTTCCT	ACAGATCCCA	
6501	ATCCACATGA	ATTTCCACTA	GGCAATGTGA	CAGATAACTT	TGATATATGG	30
6551	AAAAATTACA	TGGTGGACCA	AATGCATGAA	GACATCATT	GTTTGTGGGA	
6601	ACAGAGTTTA	AAGCCTTGTG	AGAAAATGAC	TTTCTTATGT	GTACAAATGA	
6651	ACTGTGTAGA	TCTGCAAACA	AATAAAACAG	GCCTATTAAA	TGAGACAATA	
6701	AATGAGATGA	GAAATTGTAG	TTTTAATGTA	ACTACAGTCC	TCACAGACAA	
6751	AAAGGAGCAA	AAACAGGCTC	TATTCTATGT	ATCAGATCTG	AGTAAGGTTA	
6801	ATGACTCAAA	TGCAGTAAAT	GGAACAACAT	ATATGTTAAC	TAATTGTAAC	40
6851	TCCACAATTA	TCAAGCAGGC	CTGTCCGAAG	GTAAGTTTTG	AGCCCATTCC	
6901	CATACACTAT	TGTGCTCCAA	CAGGATATGC	CATCTTTAAG	TGTAATGACA	
6951	CAGACTTTAA	TGGAACAGGC	CTATGCCACA	ATATTTTCAGT	GGTTACTTGT	

【 0 0 7 1 】

【 表 1 3 】

第7表 (続き)

7001	ACACATGGCA	TCAAGCCAAC	AGTAAGTACT	CAACTAATAC	TGAATGGGAC	
7051	ACTCTCTAGA	GAAAAGATAA	GAATTATGGG	AAAAAATATT	ACAGAATCAG	
7101	CAAAGAATAT	CATAGTAACC	CTAAACACTC	CTATAAACAT	GACCTGCATA	
7151	AGAGAAGGAA	TTGCAGAGGT	ACAAGATATA	TATACAGGTC	CAATGAGATG	
7201	GCGCAGTATG	ACACTTAAAA	GAAGTAACAA	TACATCACCA	AGATCAAGGG	
7251	TAGCTTATTG	TACATATAAT	AAGACTGTAT	GGGAAAATGC	CCTACAACAA	10
7301	ACAGCTATAA	GGTATTTAAA	TCTTGTA AAC	CAAACAGAGA	ATGTTACCAT	
7351	AATATTCAGC	AGAACTAGTG	GTGGAGATGC	AGAAGTAAGC	CATTTACATT	
7401	TTAACTGTCA	TGGAGAATTC	TTTTATTGTA	ACACATCTGG	GATGTTTAAC	
7451	TATACTTTTA	TCAACTGTAC	AAAGTCCGGA	TGCCAGGAGA	TCAAAGGGAG	
7501	CAATGAGACC	AATAAAAATG	GTACTATACC	TTGCAAGTTA	AGACAGCTAG	
7551	TAAGATCATG	GATGAAGGGA	GAGTCGAGAA	TCTATGCACC	TCCCATCCCC	20
7601	GGCAACTTAA	CATGTCATTC	CAACATAACT	GGAATGATTC	TACAGTTAGA	
7651	TCAACCATGG	AATTCCACAG	GTGAAAATAC	ACTTAGACCA	GTAGGGGGAG	
7701	ATATGAAAGA	TATATGGAGA	ACTAAATTGT	ACAACTACAA	AGTAGTACAG	
7751	ATAAAACCTT	TTAGTGTAGC	ACCTACAAAA	ATGTCAAGAC	CAATAATAAA	
7801	CATTACACACC	CCTCACAGGG	AAAAAAGAGC	AGTAGGATTG	GGAATGCTAT	
7851	TCTTGGGGGT	GCTAAGTGCA	GCAGGTAGCA	CTATGGGCGC	AGCGGCAACA	
7901	GCGCTGACGG	TACGGACCCA	CAGTGTACTG	AAGGGTATAG	TGCAACAGCA	30
7951	GGACAACCTG	CTGAGAGCGA	TACAGGCCCA	GCAACACTTG	CTGAGGTTAT	
8001	CTGTATGGGG	TATTAGACAA	CTCCGAGCTC	GCCTGCAAGC	CTTAGAAACC	
8051	CTTATACAGA	ATCAGCAACG	CCTAAACCTA	TGGGGCTGTA	AAGGAAAAC	
8101	AATCTGTTAC	ACATCAGTAA	AATGGAACAC	ATCATGGTCA	GGAAGATATA	
8151	ATGATGACAG	TATTTGGGAC	AACCTTACAT	GGCAGCAATG	GGACCAACAC	
8201	ATAACAATG	TAAGCTCCAT	TATATATGAT	GAAATACAAG	CAGCACAAGA	
8251	CCAACAGGAA	AAGAATGTAA	AAGCATTGTT	GGAGCTAGAT	GAATGGGCCT	40
8301	CTCTTTGGAA	TTGGTTTGAC	ATAACTAAAT	GGTTGTGGTA	TATAAAAATA	
8351	GCTATAATCA	TAGTGGGAGC	ACTAATAGGT	ATAAGAGTTA	TTATGATAAT	

【 0 0 7 2 】

【 表 1 4 】

第7表 (続き)

8401	ACTTAATCTA GTGAAGAACA TTAGGCAGGG ATATCAACCC CTCTCGTTGC	
8451	AGATCCCTGT CCCACACCGG CAGGAAGCAG AAACGCCAGG AAGAACAGGA	
8501	GAAGAAGGTG GAGAAGGAGA CAGGCCCAAG TGGACAGCCT TGCCACCAGC	
8551	ATTCTTGCAA CAGTTGTACA CGGATCTCAG GACAATAATC TTGTGGACTT	
8601	ACCACCTCTT GAGCAACTTA ATATCAGGGA TCCGGAGGCT GATCGACTAC	
8651	CTGGGACTGG GACTGTGGAT CCTGGGACAA AAGACAATTG AAGCTTGTAG	10
8701	ACTTTGTGGA GCTGTAATGC AATATTGGCT ACAAGAATTG AAAAATAGTG	
8751	CTACAAACCT GCTTGATACT ATTGCAGTGT CAGTTGCCAA TTGGACTGAC	
8801	GGCATCATCT TAGGTCTACA AAGAATAGGA CAAGGATTCC TTCACATCCC	
8851	AAGAAGAATT AGACAAGGTG CAGAAAAGAT CTTAGTGTA CATGGGGAAT	
8901	GCATGGAGCA AAAGCAAATT TGCAGGATGG TCAGAAGTAA GAGATAGAAT	
8951	GAGACGATCC TCCTCTGATC CTCAACAACC ATGTGCACCT GGAGTAGGAG	20
9001	CTGTCTCCAG GGAGTTAGCA ACTAGAGGGG GAATATCAAG TTCCCACACT	
9051	CCTCAAAACA ATGCAGCCCT TGCATTCCCTA GACAGCCACA AAGATGAGGA	
9101	TGTAGGCTTC CCAGTAAGAC CTCAAGTGCC TCTAAGGCCA ATGACCTTTA	
9151	AAGCAGCCTT TGACCTCAGC TTCTTTTTAA AAGAAAAGGG AGGACTGGAT	
9201	GGGTTAATTT ACTCCCATAA GAGAGCAGAA ATCCTGGATC TCTGGATATA	
9251	TCACACTCAG GGATTCTTCC CTGATTGGCA GTGTTACACA CCGGGACCAG	
9301	GACCTAGATT CCCACTGACA TTTGGATGGT TGTTTAAACT GGTACCAGTG	30
9351	TCAGCAGAAG AGGCAGAGAG ACTGGGTAAT ACAAATGAAG ATGCTAGTCT	
9401	TCTACATCCA GCTTGTAATC ATGGAGCTGA GGATGCACAC GGGGAGATAC	
9451	TAAAATGGCA GTTTGATAGA TCATTAGGCT TAACACATAT AGCCCTGCAA	
9501	AAGCACCAG AGCTCTTCCC CAAGTAACTG ACACTGCGGG ACTTTCCAGA	
9551	CTGCTGACAC TGCGGGGACT TTCCAGCGTG GGAGGGATAA GGGGCGGTTC	
9601	GGGGAGTGGC TAACCCTCAG ATGCTGCATA TAAGCAGCTG CTTTCCGCTT	
9651	GTACCGGGTC TTAGTTAGAG GACCAGGTCT GAGCCCGGGA GCTCCCTGGC	40
9701	CTCTAGCTGA ACCCGCTGCT TAACGCTCAA TAAAGCTTGC CTTGAGTGAG	
9751	AAGCAGTGTG TGCTCATCTG TTCAACCCTG GTGTCTAGAG ATC	

【 0 0 7 3 】

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 7 5 (1 9 9 3 年 2 月)、E M B L 3 3 (1 9 9 2 年 1 2 月) および Swissprot 2 4 (1 9 9 3 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、1 9 9 2 年 1 0 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GAG、POLおよびENV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、MvP5180/91がHIV1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SIVcpzより前に分岐し、HIV1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MvP5180を各々最も適切なHIV1、HIV2およびSIV配列そして更にSIVcpz配列と比較した。

【0075】

10

【表15】

第 8 表

MvP5180/91単離物のGAG、POLおよびENV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%

20

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

【0076】

30

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“Wordsearch”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

MvP5180/91のヌクレオチド配列の相同性値

	<u>HIV1</u>		<u>HIV2</u>	
gag	HIVelicg	70.24%	HIV2bihz	60.0%
pol	HIVmal	75.0 %	HIV2cam2	62.9%
env	HIVsimi84	59.7 %	HIV2gha	49.8%

40

【0078】

実施例11

HIV5180単離物のgag遺伝子のPCR増幅、クローニングおよび配列決定の概要説明

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PCR法によりクローン化しそしてそのように得られたDNA配列を第7表による配列と比較した。

gag配列をMvP5180ゲノムの左端のLTR(“ロング・ターミナル・リピート”、LTR1プライマー)からpol(ポリメラーゼ遺伝子、pol 13.5;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ン化した。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PCR反応は、HIV-1コンセンサス配列から導かれた配列を有する下記のDNA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。

MvP5180 gag遺伝子をコードする配列は、ヌクレオチド817(ATG開始コドンのA)からヌクレオチド2300(最後のコドンのA)まで延びる。

10

【0079】

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'

20

pol3.5i: 5'-AAA CCT CCA ATT CCC CCT A -3'

【0080】

PCR法により得られたDNA配列を第7表に示されたDNA配列と対比した。両DNA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DNA配列を表わし、そして下列はPCR法で得られたDNA配列を表わしている。

更に、PCR法により調査されたタンパク質gag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PCR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

【0081】

実施例12

本発明によるウイルスMvP5180の配列をHIV1およびHIV2と、そして知られている限りANT-70(WO89/12094)の配列と比較した。

その際に次の結果が得られた:

【表17】

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	207 308 115	630	HIV-1 67% HIV-2 51% ANT 70 82%
GAG	448 570	1501	HIV-1 70% HIV-2 62%
POL	763 1011	3010	HIV-1 74% HIV-2 66%
VIF	183 338	578	HIV-1 68% HIV-2 42%
ENV	1196 1289	2534	HIV-1 53% HIV-2 49%
NEF	285 342	621	HIV-1 54% HIV-2 45%
全体	3082 3858	8874	HIV-1 65% HIV-2 56%

10

20

【 0 0 8 2 】

前記の表において、“H I V - 1”はH I V - 1ウイルスのコンセンサス配列を意味し；
“H I V - 2”はH I V - 2ウイルスのコンセンサス配列を意味し；A N T - 7 0はW O
8 9 / 1 2 0 9 4より知られたH I V - 3と表示されるウイルスの部分配列を意味する。

30

【 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、D N A
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】

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

遺伝子座	相 違	好ましい相違	特に好ましい相違
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 %
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もよいことを意味している。

【 0 0 8 6 】

実施例 13

V3 - ループ / V3 - シュラウフェ (Schlaufe)

このシュラウフェは HIV 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 V3 - シュラウフェをアミノ酸レベルで記述し、そして HIB ウイルス (現在の LAI) および最初の HIV - 2 単離物 (ROD) 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。HIV - 1 のクローンは G P G R または G P G Q であり、そして HIV - 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 V3 - ループ領域を適切なプライマーを用いた PCR 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 PCR 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 (PCR 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 14

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 HIV - 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 HIV - 1 として陽性に検出できることを示すために、カメルーンからの患者の様々な血清を検査した。

【 0 0 9 1 】

カメルーンでの研究において 1 5 6 の抗 - H I V - 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 1 2 表に吸光度測定値を記す。C A M - A または C A M - B は異なる患者の血清を表わしている。

【 0 0 9 2 】

【表 1 9】

第 1 2 表

患者血清	M v P 5 1 8 0 - E I A	H I V - 1 + H I V - 2 E I A
CAM-A	2.886	1.623
CAM-B	1.102	0.386

10

【 0 0 9 3 】

両テストのカットオフ値は 0.300 であった。

カメルーンからの 4 7 の抗 - H I V - 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 (9 3 - 1 0 0 0) はわずかに症候を示す患者、もう一つ (9 3 - 1 0 0 1) はエイズ病患者に由来する。次の第 1 3 表において、両 E I A テストの吸光度値を相互に比較する：

20

【 0 0 9 4 】

【表 2 0】

第 1 3 表

患者血清	M v P 5 1 8 0 - E I A	H I V - 1 + H I V - 2 E I A
93-1000	>2.5	1.495
93-1001	0.692	0.314

30

【 0 0 9 5 】

この場合にもカットオフ値は 0.3 であった。患者 9 3 - 1 0 0 1 の吸光度値は、通常の H I V - 1 + H I V - 2 E I A 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】H I V 型レトロウイルスのゲノム配置概略図。

【図 2】H I V - 1、H I V - 2、M V P - 5 1 8 0 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。

【図 3】M V P - 5 1 8 0 および M V P - 8 9 9 ウイルスのウェスタンブロット図。

【図 4】H I V 5 1 8 0 の遺伝子の P C R 増幅、クローニングおよび配列決定の手法図。

40

【図 5】P C R 法により得られた M V P - 5 1 8 0 の D N A 配列と第 7 表に示された D N A 配列の比較図。

【図 6】P C R 法により得られた M V P - 5 1 8 0 の D N A 配列と第 7 表に示された D N A 配列の図 5 に続く比較図。

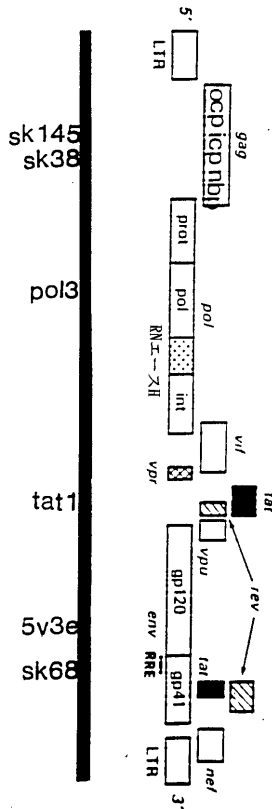
【図 7】P C R 法により得られた M V P - 5 1 8 0 の D N A 配列と第 7 表に示された D N A 配列の図 6 に続く比較図。

【図 8】g a g 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 P C R 法で（各々下列）確認）。

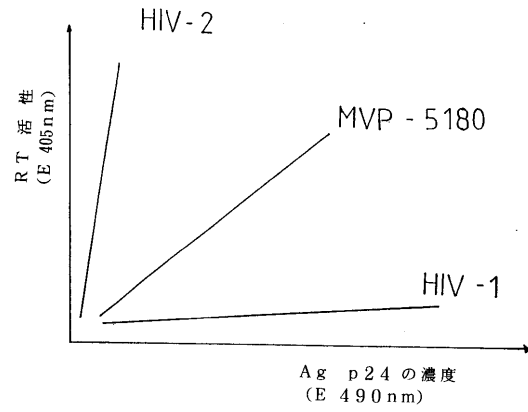
【図 9】H I V - 1 (L A I)、H I V 5 1 8 0 および H I V - 2 (R O D) の V 3 - シュラウフェを示す図。

50

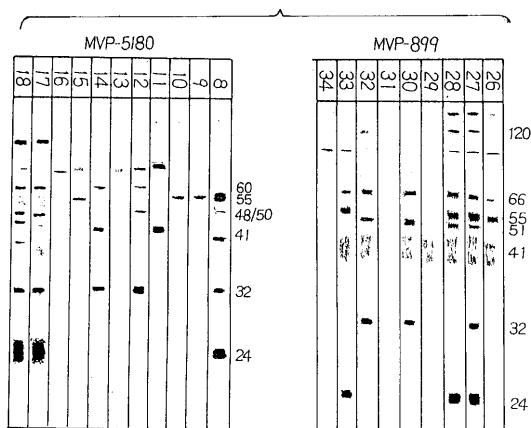
【図 1】



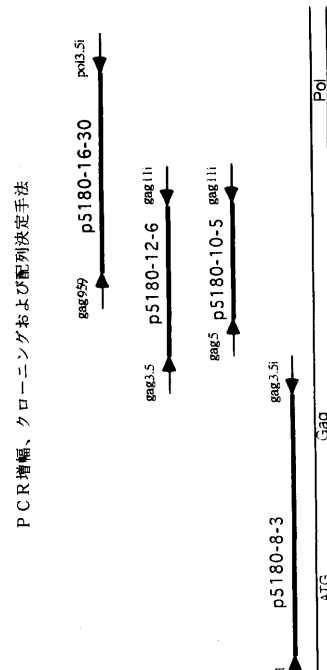
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

上列は表 7 に相当し、下列は PCR 法で確認

MvP5180

685 AAACCTCCGACGCAACGGGCTCGGCTTAGCGGAGTGCACCTGCTAAGAGG 734
1 aaacctccaacgcaacgggctcggttagcgagtgacacctgctaagagg 50

735 CGAGAGGAACCTACAAGAGGGTGAATAATTTGCTGGGGTGGCCAGACC 784
51 cgagaggaactcacaagagggtagtaaatctgctggcggtggccagacc 160

785 TAGGGGAAGGGCGAAGTCCCTAGGGGAGGAAGATGGGTGCGAGAGCGTCT 834
101 taggggaaggcggaagtccctaggggaggaagatgggtgacgagacgggtct 150

835 GTGTTGACAGGGAGTAAATTTGGATGCATGGGAACGAATTAGTTAAGGCC 884
151 gtgttgacagggagtagaatgtgatgcattgggaacgaattagtttaagggc 200

885 AGGATCTAAAAAGGCATATAGGTAAAAACATTTAGTATGGGCAAGCAGGG 934
201 aggatctaaaaaggcatataggctaaaacatttagtatgggcaagcaggg 250

935 AGCTGGAAGATACGCATGTAATCCTGGTCTATTAGAACTGCAGAAGGT 984
251 agctggaagatacgcataataatcctggctactagaaactgcagaaggt 300

985 ACTGAGCAACTGCTACAGCAGTTAGAGCCAGCTCTCAAGACAGGGTCAAG 1034
301 actgaacaactgctacagcagttagagccagctctcaagacagggtcaga 350

1035 GGACCTGAAATCTCTCTGGAAACGCAATAGCAGTACTCTGGTGGTTCACA 1084
351 ggacctgaaatccctctggaaacgcaatagcagtagctctggtggttcaca 400

1085 ACAGATTGACATCCGAGATACACAGCAGGCAATACAAAAGTTAAAGGAA 1134
401 acagattgacatccgagatacacagcaggaatataaaagttaagggaa 450

1135 GTAATGGCAAGCAGGAAGTCTGCAAGGGCGCTAAGGAAGAAACAAGCCC 1184
451 gtaatggcaagcaggaagtctgcaagggcgctaaaggaagaaacaagctc 500

1185 TAGGCAGACAACTCAAAAATACCCCTATAGTAACAAATGCACAGGGACAAA 1234
501 taggcagacaaactcaaaaataccctatagtaacaaatgcacagggacaaa 550

【図 7】

1835 CTACTTTAGAGAAATGATGGTAGCCTGTCAAGGAGTAGAGGGCCAACT 1884
1151 ctactttagaagaaatgatggtagcctgtcaaggagtaggagggccaact 1200

1885 CACAAGGCCAAAATACTAGCAGAAAGCAATGGCTTCTGCCAGCAAGATT 1934
1201 cacaaggccaaaatactagcagaagcaatggcttctgccagcaagattt 1250

1935 AAAAGGAGGATACACAGCAGTATTATGCAAGAGGGCAGAAATCCAAATA 1984
1251 aaaggagagatcacacagcagattatgcaagagggcagaatccaata 1300

1985 GAAAAGGCCCAATAAATGCTTCAATTTGGAAAGAGGGACATATAGCA 2034
1301 gaaaaggccataaaaatgttcaatttggaaagagggacatatagca 1350

2035 AAAAAGTGTGAGCAGCACTAAGAAAAGGGGTTGCTGGAATGTGGACAGGA 2084
1351 aaaaactgtgagcagcactaagaaaaggggttactggaatgtggacagga 1400

2085 AGGTACCAAAATGAAAGATTGCAAAAATGGAAGCAGGCAAAATTTTATAG 2134
1401 aggtaccaaataaagattgcaaaaatggaagcagggcaaaatTTTTATAG 1450

2135 GGAAGTACTGGCTCCGGGGGGCAGGAGGCCAGGCAATATGTGCAAGAA 2184
1451 ggaagtactggctccggggggcagagggcagggcaaatatgtgcaagaa 1500

2185 CAAGTGTCCCATCAGCCCCACCAATGGAGGAGGAGTGAAGGAACAAGA 2234
1501 caagtgtcccatcagccccaccaatggaggagggcagtggaaggaacaaga 1550

2235 GAATCAGAGTCAGAAAGGGGATCAGGAAGAGCTGTACCCATTTGCTCCCT 2284
1551 gaatcagaatcaaaaggggagtaggaagagctgtaccatttgctctcc 1600

2285 TCAATCCCTCTTTGGGACAGACCAATAGTCACAGCAAGGTTGGGGGTC 2334
1601 tcaatccctctttgggacagaccaatagtcacagcaaaagttgggggccc 1650

2335 ATCTATGTGAGGCTTACTGATACAGGGCAGATGATACAGTATTAAT 2384
1651 atctatgtgaggcttactgatacagggcagatgatcagattataat 1700

2385 AACATACAATTAGAAGGAAGATGGACACCAAAA 2417
1701 aacatacaattagaaggaagatggacacccaaa 1733

【図 6】

1235 TGGTACATCAAGCCATCTCCCCAGGACTTTAAATGCATGGGTAAAGGCA 1284
551 tggtagatcaagccatatccccctaggactttaaatgcattgggttaagggca 600

1285 GTAGAAGAGAAAGCCCTTTAAACCTGAAATTTATTCCTATGTTTATGGCATT 1334
601 gtagaagaaaaggcctttaaacctgaaattatctctatgtttattggcatt 650

1335 ATCAGAAGGGGCTGTCCCTATGATATCAATACCATGCTGAATGCCATAG 1384
651 atcagaaggggctgtccctatgatatacaataccatgctgaatgccatag 700

1385 GGGGACACCAAGGGGCTTTAAACCTGTTGAAGGAAGTAATCAATGAGGAA 1434
701 ggggacaccaagggctttacaagtgttgagggaagtaatcaatgaggaa 750

1435 GCAGCAGAAATGGGATAGAACTCATCCACAGCAATGGGGCCGTACCAACC 1484
751 gcagcagaatgggatagaactcatccaccagaatggggccgttaccacc 800

1485 AGGGCAGATAAGGGAACCAACAGGAAGTGACATTGCTGGAACTAGCA 1534
801 agggcagataagggaaccaacaggaagtgcattgctggaacactagca 850

1535 CACAGCAAGAGCAAAATATATGAGTACTAGAGGGGCTAACTCTATCCCA 1584
851 cacagcaagagcaaatatattggactacagaggggctactctatccca 900

1585 GTAGGAGACATCTATAGAAAATGGATAGTGTAGGACTAAACAAATGGT 1634
901 gtaggagacatctatagaaaatggatagtgtaggactaaacaaatgg 950

1635 AAAAAATGTACAGTCCAGTGAGCATCTTAGATATTAGGCAAGGACCAAAAG 1684
951 aaaaatgtacagtcagtgagcatcttagatattaggcaggagcaaaaag 1000

1685 AACCATTAGAGATTATGTAGTCCGTTTACAAAACATTAGAGCTAG 1734
1001 aaccattagagattatgtagatcggttttacaacacattagagcttag 1050

1735 CAAGTACTCAAGAAAGTAAAGAAATGGATGACAGAAACCTTGCTGTGTTCA 1784
1051 caagtactcaagaagtaagaatggatgacagaaacccctgctgttca 1100

1785 GAATTCAACCCAGATTGTAAACAAATTTGAAAGCATTAGGACAGAAAG 1834
1101 gaattcaacccagattgtaaacaaattctgaagcattaggaccaggag 1150

【図 8】

MvP5180 MGARASVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELEERYACNPGL
PCR MGARRSVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELEERYAYNPGL

LETAEGTEQLLQLEPALKTGSEDLKSLWNAIVLWCVHNRFDIRDQQAA
LETAEGTEQLLQLEPALKTGSEDLKSLWNAIVLWCVHNRFDIRDQQAA

IQKLKEVMSRKSAAEAKEETSPRQTSQNYPIVINAQQGMVHQAIISPTL
IQKLKEVMSRKSAAEAKEETSSQASQNYPIVINAQQGMVHQAIISPTL

NAWVKAVEEKAFNPEIIPMFALSEGAVPYDINTMLNAGGHQCALQVLK
NAWVKAVEEKAFNPEIIPMFALSEGAVPYDINTMLNAGGHQCALQVLK

EVINEEAAEWDRTHPPAMGPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQOEQIIWTR
EVINEEADWDRTHPPAMGPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQOEQIIWTR

GANSIPVGDIIYRKWIVLGLNKMVMKSPVSIIDIRQGPKEFRDYVDRFY
GANSIPVGDIIYRKWIVLGLNKMVMKSPVSIIDIRQGPKEFRDYVDRFY

KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCKQILKALGPATLEEMMVACQ
KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCKQILKALGPATLEEMMVACQ

GVGGPTHKAKILAEAMASAQDQDKGGYTAVFMQRGQNPNRKGPICFCMG
GVGGPTHKAKILAEAMASAQDQDKGGYTAVFMQRGQNPNRKGPICFCMG

KEGHIKNCRAPRKRGCWKCGQEGHQMCKNQRQANFLKGYWPPGGTRP
KEGHIKNCRAPRRRGYWKCGQEGHQMCKNQRQANFLKGYWPPGGTRP

GNVYQKQVSPSAPPMEEAQKQENQSQKQDQEEYLPFASLKSFLGTDQ
ANYVQKQVSPSAPPMEEAQKQENQSQKQDQEEYLPFASLKSFLGTDQ

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・ゾネンシュトラッセ 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・シューマンシュトラッセ 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ッセ
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・ヴァンコプフシュトラッセ 1 2

合議体

審判長 種村 慈樹

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 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 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堡ゲゼルシャフトミッ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	ルーツゲーギユルトラー ヨーゼフエーベルレ アルブレヒトフアウブルン シュテファンクナプ ハンスペーターハウザー		
发明人	ルーツ・ゲー・ギユルトラー ヨーゼフ・エーベルレ アルブレヒト・フアウ・ブルン シュテファン・クナプ ハンス・ペーター・ハウザー		
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著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显示出显著差异。