

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6436919号  
(P6436919)

(45) 発行日 平成30年12月12日(2018.12.12)

(24) 登録日 平成30年11月22日(2018.11.22)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 H
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
CO 7 K 7/08 (2006.01)	CO 7 K 7/08 Z N A
CO 7 K 14/00 (2006.01)	CO 7 K 14/00

請求項の数 18 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-562242 (P2015-562242)	(73) 特許権者	518071268
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		ヴィラヴァックス アーゲー
(65) 公表番号	特表2016-511411 (P2016-511411A)		オーストリア, 1090 ウィーン, マリアンネンガッセ 14/9
(43) 公表日	平成28年4月14日 (2016.4.14)	(74) 代理人	110000338
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055194		特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(87) 国際公開番号	W02014/140332	(72) 発明者	ヴァレンタ, ルードルフ
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		オーストリア, セレシオンフェルド アー-2604, ベートーヴェンストラッセ 18
審査請求日	平成29年2月16日 (2017.2.16)	(72) 発明者	ガレラーノ, ダニエラ
(31) 優先権主張番号	13159417.8		オーストリア, ウィーン アー-1210, ミュールシュッテルガッセ 43
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 ウイルス感染を診断する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象のサンプル中のヒト免疫不全ウイルス (HIV) 特異的抗体を検出および/または定量する方法であって、

前記サンプル中の、

a) アミノ酸配列AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または

b) KINCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYA (配列番号 43)、PINCTRPNNNTRKSIRIFGPGQAFYT (配列番号 44)、EINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYA (配列番号 45)、QINCTRPNNNTRKSIRIGPGQSFYA (配列番号 46)、TIKIRPNNNTRKSIRIGPGQAFYA (配列番号 47)、LITCIRPNNNTRKSIRIFPGQAFYT (配列番号 48)、EIMCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYA (配列番号 49)、KINCTRPNNNTRK GIRIGPGQTFYT (配列番号 50)、NITCIRPNNNTRKSVRIGPGQTFYA (配列番号 51)、KINCTRPNNNTRTSIRIGPGQSFHA (配列番号 52)、TINCTRPNNNTRRSVRIGPGQTFYA (配列番号 53)、EINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRFVFT (配列番号 54)、EINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYA (配列番号 55)、EITCTRPSNNTRESIRIGPGQTFYA (配列番号 56)、QINCTRPNNNTRKRISLGPGRVFYT (配列番号 57)、QINCTRPNNNTRKSIHLGPGQAFYA (配列番号 58)、EINCTRPNNNTRRSVAIGPGQAFYT (配列番号 59)、EINCTRPNNNTRKSIPIGPGQAFYA (配列番号 60)、QINCTRTGNNTRKSIRIGPGQAFYA (配列番号 61)、EIVCTRPNNNTRKGIHMGPGQVLYA (配列番号 62)、QINCTRPNNNTRKSIHMGPGKAFYT (配列番号 63)、EINCTRPNNYTRKRITMGPGRVYYT (配列番号 64)、QINCTRPNNNTRKGIHLGPGQTFYA (配列番号 65)、IIDCRRPNNNTRKSIRIGPGQTFYA (配列番号 66)

、KINCTRPNNTRRSIHIGPGRAFYA (配列番号 67)、AINCTRPTNITRRSMRIGPGRVFYA (配列番号 68)、PITCARPSNNTRKSIRFGPGQAFYA (配列番号 69)、EITCTRPNNTRKGIHFGPGQAFYA (配列番号 70)、EIVCYRPNNTRKGIHMGPGQVLYA (配列番号 71) および EINCTRPNNTRKSIHIGPGRAFYA (配列番号 72) からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および / または量を決定する工程を含んでいる、方法。

【請求項 2】

前記対象のサンプル中の、

a) アミノ酸配列 LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号 2) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 に記載の方法

10

【請求項 3】

個体のサンプル中の、

a) アミノ酸配列 NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN (配列番号 3) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記個体のサンプル中の、

a) アミノ酸配列 GIKQLQARVLAIERYLKQQLLGLW (配列番号 4) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記個体のサンプル中の、

a) アミノ酸配列 WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR (配列番号 5) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 32 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記個体のサンプル中の、HIV カプシドタンパク質 p24 に結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記個体のサンプル中の、HIV インテグラーゼ、HIV 逆転写酵素 + RNAse H、HIV プロテアーゼおよび HIV マトリクスタンパク質 p17 からなる群から選択される少なくとも 1 つのポリペプチドと結合している抗体の存在および / または量がさらに決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

サンプル中のペプチドまたはポリペプチドと結合している抗体の存在および / または量は、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、ラジオイノムアッセイ (RIA)、ウェス

50

タンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、ペプチドチップおよびポリペプチドチップからなる群から選択される方法を使用して決定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象の前記サンプルは血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、唾液、涙液、尿、鼻分泌物、生殖器分泌物、糞便、および/または母乳からなる群から選択されるサンプルである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

決定および/または定量される前記抗体は、IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgMからなる群から選択され、特に好ましくはIgGである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

固体担体であって、  
前記固体担体上に固定化された、

a) アミノ酸配列AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または  
b) KINCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYA (配列番号 43)、PINCTRPNNNTRKSIRIFGPGQAFYT (配列番号 44)、EINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYA (配列番号 45)、QINCTRPNNNTRKSIRIGPGQSFYA (配列番号 46)、TIKIRPNNNTRKSIRIGPGQAFYA (配列番号 47)、LITCIRPNNNTRKSIRIFGPGQAFYT (配列番号 48)、EIMCTRPDNNTRKSIRIGPGQTFYA (配列番号 49)、KINCTRPNNNTRK GIRIGPGQTFYT (配列番号 50)、NITCIRPNNNTRKSVRIGPGQTFYA (配列番号 51)、KINCTRP NNNTRTSIRIGPGQSFHA (配列番号 52)、TINCTRPNNNTRRSVRIGPGQTFYA (配列番号 53)、E INCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRFVY (配列番号 54)、EINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYA (配列番号 55)、EITCTRPSNNTRESIRIGPGQTFYA (配列番号 56)、QINCTRPNNNTRKRISLGPGRVYFY (配列番号 57)、QINCTRPNNNTRKSIHLGPGQAFYA (配列番号 58)、EINCTRPNNNTRRSVAIGPGQAF Y (配列番号 59)、EINCTRPNNNTRKSIPIGPGQAFYA (配列番号 60)、QINCTRTGNNTRKSIRI GPGQAFYA (配列番号 61)、EIVCTRPNNNTRKGIHMGPGQVLYA (配列番号 62)、QINCTRPNNNT RKSIMHMGPKAFYT (配列番号 63)、EINCTRPNNYTRKRITMGPGRVYYT (配列番号 64)、QINCT RPNNTRKGIHLGPGQTFYA (配列番号 65)、IIDCRPNNNTRKSIRIGPGQTFYA (配列番号 66) 、KINCTRPNNNTRRSIHIGPGRAFYA (配列番号 67)、AINCTRPNTITRRSMRIGPGRVYFY (配列番号 68)、PITCARPSNNTKSIIRIFGPGQAFYA (配列番号 69)、EITCTRPNNNTRKGIHFGPGQAFYA (配列番号 70)、EIVCYRPNNNTRKGIHMGPGQVLYA (配列番号 71) およびEINCTRPSNNTKSIHIGP GRAFYA (配列番号 72) からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片を含んでいる、固体担体。

【請求項 12】

前記固体担体上に、

a) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号 2) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項 11 に記載の固体担体。

【請求項 13】

前記固体担体上に、

a) アミノ酸配列NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN (配列番号 3) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項 11 または 12 に記載の固体担体。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

前記固体担体上に、

a) アミノ酸配列GIKQLQARVLAIERYLKDDQQLLGLW (配列番号4) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項11~13のいずれか1項に記載の固体担体。

## 【請求項 15】

前記固体担体上に、

a) アミノ酸配列WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR (配列番号5) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~32個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項11~14のいずれか1項に記載の固体担体。

## 【請求項 16】

カプシドタンパク質p24が、前記固体担体上にさらに固定化されている、請求項11~15のいずれか1項に記載の固体担体。

## 【請求項 17】

HIVインテグラーゼ、HIV逆転写酵素+RNase H、HIVプロテアーゼおよびHIVマトリクスタンパク質p17からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドが、前記固体担体上にさらに固定化されている、請求項11~16のいずれか1項に記載の固体担体。

## 【請求項 18】

前記固体担体は、カラム、ビーズ、試験管、マイクロタイターディッシュ、固体粒子、マイクロチップまたはメンブレンの形態である、請求項11~17のいずれか1項に記載の固体担体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を診断する手段および方法に関する。

## 【0002】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、エンベロープRNAウイルスであり、後天性免疫不全症候群(AIDS)の代表的な病因因子である。この疾患の経過において、免疫システムは徐々に崩壊し、その結果、前々からの軽い微生物学的感染が致命的な結果をもたらす。HIV感染の早期診断が、早期の抗ウイルス治療の開始のために重要であることが広く知られている。これにより、病気に侵された対象の予後を(疾病率および死亡率に関して)改善し、ウイルスの感染の進行を抑えることが期待される。さらに、病気の進行および治療の効果をモニターすることも有効である。HIVに対する抗体の検出は、感染を推測する証拠になるが、通常、ウエスタンブロット法、またはRT-PCRによるウイルスRNAの検出若しくはウイルスタンパク質の検出によって確認される。

## 【0003】

Casseb et al. (Braz J Med Biol Res 35(2002):369-375)には、HIV-1 gp120タンパク質のV3領域由来の合成ペプチドが記載されている。

## 【0004】

Novitsky et al. (J Virol 76(2002):10155-10168)には、HIV-1 C型の免疫ドミナント領域の同定について記載されている。

## 【0005】

Riabina et al. (Mol Gen Mikrobiol Virusol 3(2007):33-36)に

10

20

30

40

50

おいては、H I V - 1 C型のg p 1 2 0のV 3領域に対応するペプチドが最も高い免疫活性を示したことが見出されている。

【 0 0 0 6 】

Cardozo et al. (AIDS Res Human Retrovir 25(2009):441-450) は、ヒト抗V 3モノクローナル抗体により認識されるH I V 1型エピトープの世界分布を調査している。

【 0 0 0 7 】

Brennan et al. (J Medi Virol 78(2006):S24-S29) は、個々のH I V感染の検出に用いられ得る有益な分析を開発することの困難性に関する総論である。

【 0 0 0 8 】

H I V残基を検出する抗体の検出を困難にしているのは、H I Vが高い遺伝的可変性を有しているという事実である。例えば、最も一般的なウイルスの病原型であるH I V 1型(H I V - 1)は、いくつかの群に分割され得、これらのグループはさらに、グレードとしても知られている種々の型に分割される(例えば、グループMはA ~ Kの型を含む)。この遺伝的多様性が、H I V感染した対象の1つ以上のH I Vの型を診断可能にする診断ツールの提供を困難にしている。このことは、ある試験システムは、H I V A型感染を診断するために有効であるかもしれないが、H I V D型感染を診断するためには使用できないことを意味している。

【 0 0 0 9 】

それゆえに、本発明の目的は、1つ以上の型のH I V感染を診断するための方法および手段を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス(H I V)感染を診断する方法に関し、当該方法は、対象のサンプル中の、

a) アミノ酸配列AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT(配列番号1)からなるペプチド、または

b) a)のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a)若しくはb)のペプチド断片、

に結合している抗体の存在を決定する工程と、上記サンプル中にそのような抗体の存在を確認したときに、上記対象におけるH I V感染を診断し、または、上記サンプル中にそのような抗体の不在を確認したときに、上記対象におけるH I V非感染を診断する工程と、を含む。

【 0 0 1 1 】

H I V C型のエンベロープタンパク質g p 1 2 0由来のペプチド断片およびそのホモログが、1つ以上、好ましくは2つ以上、好ましくは3つ以上、好ましくは4つ以上、好ましくは5つ以上、好ましくは6つ以上、好ましくは7つ以上、好ましくは8つ以上、の型のH I V感染の診断に使用できるという驚くべきことが見出された。その理由は、これらの型の全てのg p 1 2 0に対する抗体であって、H I Vに感染した対象から得られる抗体が、アミノ酸配列AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT(配列番号1)からなるペプチドまたはそのホモログまたは15 ~ 24個のアミノ酸残基からなるその断片と結合するからである。

【 0 0 1 2 】

本発明の方法は、H I V感染の診断と、他の確立された従来の分析では失敗した、個々における抗体検出とを可能にする(実施例および図4を参照のこと)。従来のH I V感染の診断方法の個々における使用は、実際に完全には信頼できないことが示されているので、これは予想以上に驚くべき知見である。

【 0 0 1 3 】

本発明の方法は、上述した抗体が対象のサンプル中に確認できない場合に、対象がH I

10

20

30

40

50

Vに感染していないと診断するためにも使用可能である。

【0014】

本発明で用いられる、AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号1) および/またはLLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号2) の適した断片、または、配列番号1 および/または2と少なくとも70%の同一性を有するホモログは、それぞれ、配列番号1 および/または2の15~24個、好ましくは16~24個のアミノ酸残基からなる。これらのフラグメントは、配列番号1 および/または2の1~23、1~22、1~21、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、2~24、2~23、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、3~24、3~23、3~22、3~21、3~20、3~19、3~18、3~17、4~24、4~23、4~22、4~21、4~20、4~19、4~18、5~24、5~23、5~22、5~21、5~20、5~19、6~24、6~23、6~22、6~21、6~20、7~24、7~23、7~22、7~21、8~24、8~23、8~22、9~24、9~23、2~25、3~25、4~25、5~25、6~25、7~25、8~25、9~25、または10~25のアミノ酸残基からなり得る。

10

【0015】

サンプル中の抗体の存在は、当該技術分野において公知の方法を用いて確定することができる(例えば、ELISAのような免疫アッセイ)。例えば、本発明の1つ以上のペプチドを、固体担体上に固定化することができる。固体担体を、それから、UIV感染が疑われる対象の抗体を含むサンプルと接触させる。本発明のペプチドに結合可能な抗体を、固体担体上に固定化してもよい。この固定化された抗体は、例えば、IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 および/またはIgMの1つ以上の抗体アイソタイプに対する抗体のような、他の抗体により検出できる。

20

【0016】

対象のサンプル中の、HIV由来ペプチドおよび/またはポリペプチドに対する抗体の存在は、この対象がHIV感染していることを示す。対象のサンプル中の、HIV由来ペプチドおよび/またはポリペプチドに対する抗体の不在は、この対象がHIVに感染していないことを示す。IgM抗体は、急性感染中により多くの量が生じ、ヒトサンプル(例えば、血清、血漿)中のその存在を、感染早期の診断に使用する。IgG抗体は感染の初期段階は少ないが、感染が確立した対象で生じる。ほとんどの抗体に基づくHIV診断試験は、ヒトサンプル(例えば、血清、血漿)中のHIV特異的IgGの存在を検出する。IgAは粘膜免疫のマーカーであり、血清と同様に、唾液、涙液等のヒトの分泌物中において検出される。このような抗体は、当業者に公知である。

30

【0017】

本発明のポリペプチドおよびペプチドの固体担体上への固定化を円滑に行うために、このポリペプチドおよびペプチドのC末端および/またはN末端にシステイン残基または他の成分(例えば、リンカーまたはキャリアタンパク質、ビオチン、核酸)を付加することが有益である。これにより、固体担体上のペプチドおよび/またはポリペプチドの円滑な取り付けが可能である。ペプチド分子の固体担体上への取り付け方法および手段は、当業者に公知である。

40

【0018】

本明細書において使用する場合、「ヒト免疫不全ウイルス(HIV)」は、HIV 1型(HIV-1)に関する。

【0019】

本明細書において使用する場合、「対象」は、「ヒト個体」、「ヒト」または「個体」と交換可能に使用できる。

【0020】

本明細書において使用する場合、「ペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ」または「ホモログ」は、例えば、AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号1) またはLLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号2) のアミノ酸配列からなるペプチドのような

50

、本明細書中で定義したアミノ酸配列（配列番号1から41のいずれか1つ）からなるペプチドと、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも85%または90%または95%の同一性を有するペプチドに関する。配列の同一性は、BLOSUM62マトリクス、ギャップ存在ペナルティ1、およびギャップ伸長ペナルティ1を利用したBLASTアライメント (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul SF et al J. Mol. Biol. 215(1990): 403-410) により決定する。

【0021】

本明細書において使用する場合、「ホモログ」は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40または41のアミノ酸配列のいずれか1つを有する、他の関連するペプチドと、1つ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を有する、本発明のペプチドの「変異体」とみなされる。「変異体」または「ホモログ」は、置換されたアミノ酸が同様の構造または化学的特性を有するような、「保存的」アミノ酸置換であり得る。保存的アミノ酸置換の1つの形式は、同様の側鎖を有する残基の交換可能性に関する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸グループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり、脂肪族炭化水素側鎖を有するアミノ酸グループは、セリンおよびスレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸グループは、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸グループは、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり、塩基側鎖を有するアミノ酸グループは、リジン、アルギニンおよびヒスチジンであり、硫黄含有側鎖は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換グループは、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンである。よりまれであるが、「変異体」または「ホモログ」は、「非保存的」変異（例えば、トリプトファンによるグリシンの置換）を含んでもよい。

【0022】

本発明の「ホモログ」または「変異体」は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40または41のアミノ酸配列のいずれか1つを有するペプチドと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つのアミノ酸変異（置換または欠失）を含み得る。本発明の「ホモログ」または「変異体」は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは7つのアミノ酸変異の最大数を有し得る。

【0023】

本発明の好ましい実施形態において、ここに記載したペプチド断片（配列番号1から41）は、15～24個、好ましくは、16～24個、17～24個、18～24個、19～24個、20～24個、21～24個、22～24個、23～24個、16～23個、17～23個、18～23個、19～23個、20～23個、21～23個、22～23個、16～22個、17～22個、18～22個、19～22個、20～22個、21～22個、16～21個、17～21個、18～21個、19～21個、20～21個、16～20個、17～20個、18～20個、19～20個、16～19個、17～19個、18～19個、16～18個、または17～18個のアミノ酸残基、特に15、16、17、18、19、20、21、22、23または24個のアミノ酸残基からなる。

【0024】

本発明の他の局面は、対象のサンプル中のヒト免疫不全ウイルス（HIV）特異的抗体を検出および/または定量化する方法に関し、当該方法は、

a) アミノ酸配列AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT（配列番号1）からなるペプチド、または

10

20

30

40

50

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または  
 c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片  
 と結合している抗体の存在および/または量を決定する工程を含む。

## 【0025】

対象のサンプル中の HIV 由来ペプチドおよび/またはポリペプチドに対する抗体の存在は、その対象が HIV に感染していることを示す。対象のサンプル中の HIV 由来ペプチドおよび/またはポリペプチドに対する抗体の不在は、その対象が HIV に感染していないことを示す。

## 【0026】

本発明のさらに他の局面は、対象のサンプル中のヒト免疫不全ウイルス (HIV) 特異的抗体を検出および/または定量化する方法に関し、当該方法は、

a) アミノ酸配列 AIVCTRPNNTRKSI RIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または  
 c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片  
 と結合している抗体の存在および/または量を決定する工程を含む。

## 【0027】

本発明のさらに他の局面は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス (HIV) の進行をモニターする方法に関し、当該方法は、

a) アミノ酸配列 AIVCTRPNNTRKSI RIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または  
 c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片  
 と結合している抗体の量を決定する工程を含む。

## 【0028】

本発明のさらに他の局面は、抗 HIV 薬による対象の治療効果をモニターする方法に関し、当該方法は、

(i) 抗 HIV 薬の投与前の対象のサンプルにおいて、

a) アミノ酸配列 AIVCTRPNNTRKSI RIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または  
 c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片  
 と結合している抗体の量を決定する工程；

(ii) 対象の 1 回以上の投与後のサンプル中の、対象のサンプルにおいて、

a) アミノ酸配列 AIVCTRPNNTRKSI RIGPGQVFYT (配列番号 1) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログ、または  
 c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片  
 と結合している抗体の量を決定する工程；

(iii) 抗 HIV 薬の投与前の対象のサンプルにおける決定された抗体の量と、1 回以上の投与後のサンプルにおける決定された抗体の量とを比較する工程；および

(iv) 抗 HIV 薬が、対象における HIV 特異的抗体のレベルおよび/またはアイソタイプに影響するか否かを決定する工程を含む。

## 【0029】

本発明のペプチドを、抗 HIV 薬 (例えば、抗レトロウイルス薬) により治療された対象における HIV 特異的抗体の存在を決定するために用いてもよい。これにより、抗 HIV 薬が、対象における HIV 特異的抗体のレベルおよび/またはアイソタイプに影響するか否かをモニターおよび決定することができる。例えば、工程 (ii) で決定した HIV 特異的抗体の量が、工程 (i) でと比較して (例えば、少なくとも 10%、少なくとも 2

10

20

30

40

50

0%、少なくとも50%、少なくとも80%)より低い場合、HIVの負荷量の減少を示し得るため、抗HIV薬は、疾患の経過に正に影響し得る。しかしながら、工程(i i)で決定したHIV特異的抗体の量が、工程(i)と比較して(例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも100%)より高い場合、抗HIV薬は疾患の経過になんら影響せず、HIV感染の治療において有用であるとは最も考えにくい。

【0030】

本発明の方法の情動的価値を高めるために、HIVゲノムによりコードされた他のポリペプチドまたはそのペプチド断片(例えば、配列番号1~41のいずれか1つからなるペプチド)と結合され得る他の抗体の存在をさらに決定することが有用である。

10

【0031】

本発明の好ましい実施形態において、対象のサンプル中の

a) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN(配列番号2)からなるペプチド、または

b) a)のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a)またはb)のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

【0032】

アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN(配列番号2)を有するペプチドは、HIVエンペロープタンパク質複合体の一部であるHIVポリペプチドgp41(C型)由来である。驚くべきことに、HIVに感染した対象は、このペプチドまたはその断片と結合する抗体を顕著な量生成する。それゆえに、そのような抗体のさらなる検出および/または定量化は、HIVに感染した対象のさらに強力な診断を可能にする。

20

【0033】

HIV C型のエンペロープタンパク質gp41由来のペプチド断片もまた、1つ以上、好ましくは2つ以上、好ましくは3つ以上、好ましくは4つ以上、好ましくは5つ以上、好ましくは6つ以上、好ましくは7つ以上、好ましくは8つ以上のHIVの型のHIV感染を診断するために使用できることは、予想外の発見である。このことは、これらの型の全てのgp41を対象とする抗体であって、HIVに感染した対象から得られる抗体が、アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN(配列番号2)またはホモログまたは15~24個のアミノ酸残基からなるその断片、からなるペプチドと結合するからである。それゆえに、本発明の方法は、HIV A型、B型、C型、D型、F型、G型、H型、J型および/またはK型のHIV感染を診断可能であり、HIV B型およびC型の診断に特に好ましい。

30

【0034】

それゆえに、本発明のさらなる局面は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を診断するための方法に関し、当該方法は、対象のサンプル中の

a) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN(配列番号2)からなるペプチド、または

b) a)のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a)またはb)のペプチド断片と結合している抗体の存在を決定する工程と、対象中にそのような抗体の存在を確認したときに、対象におけるHIV感染を診断し、または、対象中にそのような抗体の不在を確認したときに、対象におけるHIV非感染を診断する工程と、を含む。本発明のさらなる局面によれば、LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN(配列番号2)は、そのホモログおよびその断片も同様に、上述したような抗HIV薬による対象の治療効果をモニターするための方法に使用することもできる。そのような方法は、上述したように、アミノ酸配列AIVCTRPNNNTRKSIRIGPQVIFYT(配列番号1)またはホモログまたは15~24個のアミノ酸残基からなるその断片からなるペプチドと結合している抗体の存在を決定する工程と組み合わせて使用することもできる。

40

50

## 【 0 0 3 5 】

本発明の他の局面は、対象のサンプルにおけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）特異的抗体を検出および/または定量化するための方法に関し、当該方法は、サンプル中の、

a ) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c ) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a ) またはb ) のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量を決定する工程を含む。

## 【 0 0 3 6 】

本発明のさらなる局面は、対象のサンプルにおけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）特異的抗体を検出および/または定量化するための方法に関し、当該方法は、サンプル中の、

a ) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c ) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a ) またはb ) のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量を決定する工程を含む。

## 【 0 0 3 7 】

本発明のさらに他の局面は、対象におけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）の進行をモニターする方法に関し、当該方法は、サンプル中の、

a ) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c ) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a ) またはb ) のペプチド断片と結合している抗体の量を決定する工程を含む。

## 【 0 0 3 8 】

本発明のさらに他の局面は、抗H I V薬による対象の治療効果をモニターする方法に関し、当該方法は、

( i ) 抗H I V薬の投与前の対象のサンプルにおいて、

a ) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c ) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a ) またはb ) のペプチド断片と結合している抗体の量を決定する工程；

( i i ) 対象の1回以上の投与後のサンプル中の、対象のサンプルにおいて、

a ) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c ) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a ) またはb ) のペプチド断片と結合している抗体の量を決定する工程；

( i i i ) 抗H I V薬の投与前の対象のサンプルにおける決定された抗体の量と、1回以上の投与後のサンプルにおける決定された抗体の量とを比較する工程；および

( i v ) 抗H I V薬が、対象におけるH I V特異的抗体のレベルおよび/またはアイソタイプに影響するか否かを決定する工程を含む。

## 【 0 0 3 9 】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

a ) アミノ酸配列NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN（配列番号3）からなるペプチド、または

b ) a ) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

10

20

30

40

50

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

【0040】

アミノ酸配列NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN (配列番号3) を有するペプチドは、HIVポリペプチドgp120 (C型) 由来である。

【0041】

本発明の好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

a) アミノ酸配列GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLGLW (配列番号4) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

10

【0042】

アミノ酸配列GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLGLW (配列番号4) を有するペプチドは、HIVポリペプチドgp120 (C型) 由来である。

【0043】

これらのペプチドの断片またはこれらのペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログは、配列番号1 ~ 41のアミノ酸残基1 ~ 24、1 ~ 23、1 ~ 22、1 ~ 21、1 ~ 20、1 ~ 19、1 ~ 18、1 ~ 17、1 ~ 16、1 ~ 15、2 ~ 24、2 ~ 23、2 ~ 22、2 ~ 21、2 ~ 20、2 ~ 19、2 ~ 18、2 ~ 17、2 ~ 16、3 ~ 24、3 ~ 23、3 ~ 22、3 ~ 21、3 ~ 20、3 ~ 19、3 ~ 18、3 ~ 17、4 ~ 24、4 ~ 23、4 ~ 22、4 ~ 21、4 ~ 20、4 ~ 19、4 ~ 18、5 ~ 24、5 ~ 23、5 ~ 22、5 ~ 21、5 ~ 20、5 ~ 19、6 ~ 24、6 ~ 23、6 ~ 22、6 ~ 21、6 ~ 20、7 ~ 24、7 ~ 23、7 ~ 22、7 ~ 21、8 ~ 24、8 ~ 23、8 ~ 22、9 ~ 24、9 ~ 23、2 ~ 25、3 ~ 25、4 ~ 25、5 ~ 25、6 ~ 25、7 ~ 25、8 ~ 25、9 ~ 25、または、10 ~ 25 からなり得る。

20

【0044】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

a) アミノ酸配列WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR (配列番号5) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチド断片と結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

30

【0045】

アミノ酸配列WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR (配列番号5) を有するペプチドは、HIVポリペプチドgp120 (C型) 由来である。

【0046】

このペプチドの断片またはこのペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログは、配列番号5のアミノ酸残基1 ~ 31、1 ~ 30、1 ~ 29、1 ~ 28、1 ~ 27、1 ~ 26、1 ~ 25、1 ~ 24、1 ~ 23、1 ~ 22、1 ~ 21、1 ~ 20、1 ~ 19、1 ~ 18、1 ~ 17、1 ~ 16、1 ~ 15、2 ~ 32、2 ~ 31、2 ~ 30、2 ~ 29、2 ~ 28、2 ~ 27、2 ~ 26、2 ~ 25、2 ~ 24、2 ~ 23、2 ~ 22、2 ~ 21、2 ~ 20、2 ~ 19、2 ~ 18、2 ~ 17、2 ~ 16、3 ~ 32、3 ~ 31、3 ~ 30、3 ~ 29、3 ~ 28、3 ~ 27、3 ~ 26、3 ~ 25、3 ~ 24、3 ~ 23、3 ~ 22、3 ~ 21、3 ~ 20、3 ~ 19、3 ~ 18、3 ~ 17、4 ~ 32、4 ~ 31、4 ~ 30、4 ~ 29、4 ~ 28、4 ~ 27、4 ~ 26、4 ~ 25、4 ~ 24、4 ~ 23、4 ~ 22、4 ~ 21、4 ~ 20、4 ~ 19、4 ~ 18、5 ~ 32、5 ~ 31、5 ~ 30、5 ~ 29、5 ~ 28、5 ~ 27、5 ~ 26、5 ~ 25、5 ~ 24、5 ~ 23、5 ~ 22、5 ~ 21、5 ~ 20、5 ~ 19、6 ~ 32、6 ~ 31、6 ~ 30、6 ~ 29、6 ~ 28、6 ~ 27、6 ~ 26、6 ~ 25、6 ~ 24、6 ~ 23、6 ~ 22、6 ~ 21、6 ~ 20、7 ~ 32、7

40

50

~ 3 1、7 ~ 3 0、7 ~ 2 9、7 ~ 2 8、7 ~ 2 7、7 ~ 2 6、7 ~ 2 5、7 ~ 2 4、7 ~ 2 3、7 ~ 2 2、7 ~ 2 1、8 ~ 3 2、8 ~ 3 1、8 ~ 3 0、8 ~ 2 9、8 ~ 2 8、8 ~ 2 7、8 ~ 2 6、8 ~ 2 5、8 ~ 2 4、8 ~ 2 3、8 ~ 2 2、9 ~ 3 2、9 ~ 3 1、9 ~ 3 0、9 ~ 2 9、9 ~ 2 8、9 ~ 2 7、9 ~ 2 6、9 ~ 2 5、9 ~ 2 4、9 ~ 2 3、1 0 ~ 3 2、1 0 ~ 3 1、1 0 ~ 3 0、1 0 ~ 2 9、1 0 ~ 2 8、1 0 ~ 2 7、1 0 ~ 2 6、1 0 ~ 2 5、1 0 ~ 2 4、1 1 ~ 3 2、1 1 ~ 3 1、1 1 ~ 3 0、1 1 ~ 2 9、1 1 ~ 2 8、1 1 ~ 2 7、1 1 ~ 2 6、1 1 ~ 2 5、1 2 ~ 3 2、1 2 ~ 3 1、1 2 ~ 3 0、1 2 ~ 2 9、1 2 ~ 2 8、1 2 ~ 2 7、1 2 ~ 2 6、1 3 ~ 3 2、1 3 ~ 3 1、1 3 ~ 3 0、1 3 ~ 2 9、1 3 ~ 2 8、1 3 ~ 2 7、1 4 ~ 3 2、1 4 ~ 3 1、1 4 ~ 3 0、1 4 ~ 2 9、1 4 ~ 2 8、1 5 ~ 3 2、1 5 ~ 3 1、1 5 ~ 3 0、1 5 ~ 2 9、1 6 ~ 3 2、1 6 ~ 3 1、1 6 ~ 3 0、1 7 ~ 3 2、1 7 ~ 3 1、2 ~ 3 3、3 ~ 3 3、4 ~ 3 3、5 ~ 3 3、6 ~ 3 3、7 ~ 3 3、8 ~ 3 3、9 ~ 3 3、1 0 ~ 3 3、1 1 ~ 3 3、1 2 ~ 3 3、1 3 ~ 3 3、1 4 ~ 3 3、1 5 ~ 3 3、1 6 ~ 3 3、1 7 ~ 3 3、1 8 ~ 3 3または1 9 ~ 3 3からなり得る。

#### 【 0 0 4 7 】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の方法は、本明細書で定義したペプチド、ホモログまたはフラグメントの1つ以上と結合している抗体の存在および/または量の決定を含む。好ましい組み合わせには、以下のペプチド、およびこれに対応する上述したホモログおよび断片が含まれる：配列番号1および配列番号2；配列番号1および配列番号3；配列番号1および配列番号4；配列番号1および配列番号5；配列番号2および配列番号3；配列番号2および配列番号4；配列番号2および配列番号5；配列番号1、配列番号2および配列番号3；配列番号1、配列番号2および配列番号4；配列番号1、配列番号2および配列番号5；配列番号2、配列番号3および配列番号4；配列番号2、配列番号3および配列番号5；配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号4；配列番号1、配列番号2、配列番号3および配列番号5；配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5。この組み合わせと、配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40または41を有するペプチドの少なくとも1個、2個、3個、5個、6個、7個、8個、9個または10個とを組み合わせることも、もちろん可能である。

#### 【 0 0 4 8 】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、個体のサンプルにおいてH I Vカプシドタンパク質 p 2 4 と結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

#### 【 0 0 4 9 】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、個体のサンプルにおいて、H I Vインテグラーゼ、H I V逆転写酵素 + R N a s e H、H I VプロテアーゼおよびH I Vマトリクスタンパク質 p 1 7 からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドと結合している抗体の存在および/または量をさらに決定する。

#### 【 0 0 5 0 】

サンプルにおいてペプチドまたはポリペプチドと結合している抗体の存在および/または量は、種々の方法により決定することができる。酵素結合免疫吸着検定法 ( E L I S A )、ラジオイノムアッセイ ( R I A )、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、ビーズアッセイ、ペプチドアレイおよびポリペプチドアレイからなる群から選択される方法を用いることが特に好ましい。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、対象のサンプルは、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、唾液、涙液、尿、鼻分泌物、生殖器分泌物、糞便、および/または母乳からなる群から選択されるサンプルであり、血液、血清または血漿サンプルが特に好ましい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

H I V 感染が疑われるまたは判明した患者から得たサンプルは、H I V のポリペプチドおよびペプチドの種々のエピトープに対する種々の型の抗体のプールを含む。それゆえに、本発明の好ましい実施形態によれば、決定および/または定量化される抗体は、I g G、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A および I g M からなる群から選択され、特に好ましくは I g G および I g M である。

## 【 0 0 5 3 】

対象のサンプルにおける抗体の存在および/または量は、本明細書で定義した単一のペプチド若しくはポリペプチドの1つを用いて、または、上述したペプチドまたはポリペプチドの1つ以上、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上、さらにより好ましくは4つ以上を用いて、決定することができる。これにより、異なる抗原およびエピトープと結合している抗体の存在および/または量を同時に決定することができる。

## 【 0 0 5 4 】

本発明のペプチドおよびタンパク質を、さらなる診断およびまたは予後情報を得る目的で、エピトープ特異性、ペプチドに対する抗体の部分、ペプチド総量、または、ペプチドとタンパク質との総量を決定するために、血清に含まれる抗体を前吸着するように、個体の血清の液相に添加することができ、この抗体は、少なくとも1個（好ましくは、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、10個またはそれ以上）の本明細書で定義したペプチドおよび/またはタンパク質に特異的または結合した後、ウイルスの完全にグリコシル化された抗原に対する残りの遊離抗体に続いて結合する。

## 【 0 0 5 5 】

本発明の他の局面は、AIVCTRPNNNTRKSI RIGPGQVFYT (配列番号1)、LLGLWGCSGKLICTTAVVHWNSSWSN (配列番号2)、RVRGILRNWPQWWIWGILGFWMIII (配列番号6)、WMIIICRGEENSWVTVYYGVPVWTE (配列番号7)、PVWTEAKTTLFCASDAKAYEKEVHN (配列番号8)、KEVHNWATHACVPTDPSQELVLE (配列番号9)、ELVLENTESFNWENDMVDQMHEDE (配列番号10)、QMHEDEIIGLWDESLKPCVKLTPLCV (配列番号11)、TPLCVTLNCNTTSHNNSPSPMTNC (配列番号12)、PMTNCSEFNATTEL RDKTQKVNALFY (配列番号13)、NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN (配列番号3)、LINCNTSTITQACPKVSDPIPIHY (配列番号14)、IPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTG (配列番号15)、FNGTGPCSNVSTVQCTHG I KPVVST (配列番号16)、PVVSTQLLLNGSLAEGEIIIRSENL (配列番号17)、RSENLTDNAKTIIVHLNKSVAIVCT (配列番号18)、QVFYTNEIIGNIRQAHCNISRELWN (配列番号19)、RELWNNTLEQVKKKLKEHFQNKTI (配列番号20)、NKTIEFQPPAGGDLEVTTHSFNCRG (配列番号21)、FNCRGEFFYCNTSNLFNITASNASD (配列番号22)、SNASDANNNTITLPCIKQIINMWQ (配列番号23)、INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCNSS (配列番号24)、TCNSSITGLLLTRDGGNNNDTGNNN (配列番号25)、TGNNDTEIFRPGGGMKDNWRSEL (配列番号26)、AVGLGAVLLGFLGTAGSTMGAASIT (配列番号27)、AASITLVQARQLLSGIVQQSNLL (配列番号28)、QSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQL (配列番号29)、GIKQLQARVLAIERYLKQQLLGLW (配列番号4)、SSWSNKSQDIWGNMTWMQWDREIN (配列番号30)、DREINNYTDIITYLLEESQSQQEKN (配列番号31)、QQEKNEKDLLALDSWNNLWNWFSIT (配列番号32)、WFSITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLR (配列番号33)、LIGLRIILGVLSIVKRVRRQGYSPLS (配列番号34)、YSPLSFQTLPPNPRGPDRLRGIEE (配列番号35)、GIEEEGGEQDKDRSIRLVSGFLALV (配列番号36)、FLALVWEDLRSLCLFSYHRLRDFIL (配列番号37)、RDFIL IAGRAAELLGRSSLRGLQTG (配列番号38)、GLQTGWQALKYLGSLVQYWGLELKK (配列番号39) およびLELKKSAINLFDTTAIVVAEGTDRL (配列番号40) からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、または15~24個のアミノ酸残基からなるその断片、またはアミノ酸配列WRSELYKYKVV EIKPLGIAPTAKRRVVEREKR (配列番号5) からなるペプチドもしくは15~32個のアミノ酸残基からなるその断片、または、アミノ酸配列GTDRLIEGLQGIGRAIYNIPRRIRQGFEAALL (配列番号41) からなるペプチドもしくは15~31個のアミノ酸残基からなるその断片に係る。

## 【 0 0 5 6 】

本発明のペプチドは、当該技術分野において公知の化学的合成法を使用して合成的に生産することができる。また、ペプチドは安定性を増すためにポリペプチド担体（例えばスカシガイヘモシアニン）と結合していてもよい。加えて、ペプチドを担体分子と共に組み

10

20

30

40

50

換え融合タンパク質として合成し、または既知の相互作用により担体分子と結合させてもよい（ビオチン - ストレプトアビジン - アビジン）。

【 0 0 5 7 】

ポリペプチドは微生物中で生産され、その後単離され、必要ならばさらに精製されてもよい。ポリペプチドは微生物、例えば細菌、酵母もしくは真菌中で、真核細胞、例えば哺乳類もしくは昆虫細胞中で、または組み替えウイルスベクター、例えばアデノウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、シムリキ森林ウイルス、バキュロウイルス、バクテリオファージ、シンドビスウイルスもしくはセンダイウイルス中で生産されてもよい。化合物 / ペプチドを生産するのに適した細菌は、E.coli、B.subtilisまたはペプチドを発現することができる他の任意の細菌を包含する。前記の化合物 / ペプチドを発現するのに適した酵母のタイプは、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Candida、Pichia pastorisまたはペプチドを発現することができる他の任意の酵母を包含する。対応する方法は当該技術分野において公知である。組み換えにより生産されたポリペプチドを単離および精製する方法もまた当該技術分野において公知であり、例えばゲルろ過、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を包含する。

10

【 0 0 5 8 】

ポリペプチドの単離を容易にするため、異種ペプチドまたはアフィニティクロマトグラフィーにより単離することを可能とするポリペプチドを融合（共有結合により結合）し、翻訳的にポリペプチドを製造する、融合ポリペプチドを製造してもよい。典型的な異種ペプチドまたはポリペプチドはヒスチジンタグ（例えばHis6；6ヒスチジン残基）、GSTタグ（グルタチオンSトランスフェラーゼ）等である。融合ポリペプチドは精製を容易にするのみならず、精製中に前記ペプチドが分解されにくくすることもできる。精製後に異種ペプチドを除去することが望まれる場合には、融合ポリペプチドは、ポリペプチドと異種ペプチドまたはポリペプチド間の接合部に切断サイトを含んでいてもよい。切断サイトは、その部位の配列におけるアミノ酸配列特異的な酵素（例えばプロテアーゼ）により切断されるアミノ酸配列からなる。

20

【 0 0 5 9 】

本発明の方法において使用されるポリペプチド（例えばHIVカプシドタンパク質p24、HIVインテグラーゼ、HIV逆転写酵素 + RNaseH、HIVプロテアーゼおよびHIVマトリクスタンパク質p17）は、当該技術分野において既知の手法を使用して組み換え生産されることが好ましい。

30

【 0 0 6 0 】

本発明の他の局面は、本明細書に開示された1つ以上のペプチドを含んでいる固体担体に関しており、当該固体担体は、当該固体担体上に固定化された、

a) アミノ酸配列AIVCTRPNNTRKSIIRIGPGQVFYT（配列番号1）からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片を含んでいる。

40

【 0 0 6 1 】

本発明の選択的な局面は、本明細書に開示されている1つ以上のペプチドを含む固体担体に関しており、当該固体担体は、当該固体担体上に固定化された、

a) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15 ~ 24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片を含んでいる。

【 0 0 6 2 】

本発明の選択的な局面は、サンプル中のヒト免疫不全ウイルス（HIV）に結合した抗体の存在もしくは不在および / または量を決定するための、本明細書に開示される1つ以

50

上のペプチドを含んでいる、固体担体に関しており、当該固体担体上に固定化された、

a) アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号2) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または  
c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片  
を含んでいる。

【0063】

これらの固体担体は本発明に係る方法、例えば、特に  
サンプル中のヒト免疫不全ウイルス(HIV)に結合している抗体の存在もしくは不在  
および/または量を決定する

対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染を診断する

対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染の経過および進行をモニターする

対象における抗HIV薬を用いた処置の効果をモニターする

または他の任意のHIVと結合している抗体の決定に関連する方法において使用することができる。

【0064】

本発明に係る固体担体は、ガラス、ポリスチレン、PDVFメンブレン、ナイロン、ニ  
トロセルロース、セファロースおよびアガロースからなる群より選択することができる。

【0065】

本発明に係るペプチドおよびポリペプチドの固定担体への固定化は、直接的にペプチド  
またはポリペプチドを固体担体に固定化することで達成してもよい。あるいは、ペプチド  
を、システイン残基、または分子を固体担体に固定化可能な他の既知の部分によりC末端  
および/またはN末端修飾しもよい。前記固定化は共有結合または非共有結合により行わ  
れてもよい。固体担体への前記共有結合または非共有結合は当該技術分野において公知の  
方法および試薬の使用により行ってもよい。

【0066】

本発明の好ましい実施形態によれば、アミノ酸配列LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列  
番号2) もしくはAIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVYFT (配列番号1) それぞれからなるペプチド、  
または上記で規定したホモログ、またはその15~24個のアミノ酸残基からなる断片が  
当該固体担体にさらに固定化される。

【0067】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、

a) アミノ酸配列NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN (配列番号3) からなるペプチド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片  
がさらに固体担体上に固定化されている。

【0068】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、

a) アミノ酸配列GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLGLW (配列番号4) からなるペプチド、また

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片  
が当該固体担体上にさらに固定化されている。

【0069】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、

a) アミノ酸配列WRSELYKYKVEIKPLGIAPTAKRRVVEREKR (配列番号5) からなるペプチ  
ド、または

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~32個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片

10

20

30

40

50

が当該固体担体上にさらに固定化されている。

【0070】

本発明に係る固体担体は、当該固体担体に固定化される、上記で規定されている、1つ以上のペプチド、ホモログまたは断片が固定化されていてもよい。当該分子の好ましい組み合わせは、以下のペプチドおよびそれぞれのホモログおよび断片である：配列番号2を伴う配列番号1；配列番号3を伴う配列番号1；配列番号4を伴う配列番号1；配列番号5を伴う配列番号1；配列番号3を伴う配列番号2；配列番号4を伴う配列番号2；配列番号5を伴う配列番号2；配列番号2および配列番号3を伴う配列番号1；配列番号2および配列番号4を伴う配列番号1；配列番号2および配列番号5を伴う配列番号1；配列番号3および配列番号4を伴う配列番号2；配列番号3および配列番号5を伴う配列番号2；配列番号2、配列番号3および配列番号4を伴う配列番号1；配列番号2、配列番号3および配列番号5を伴う配列番号1；配列番号3、配列番号4および配列番号5を伴う配列番号2；配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5を伴う配列番号1。もちろん配列番号6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40または41を有するペプチドのうち、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個と、この組み合わせとを組み合わせることも可能である。

10

【0071】

本発明に係る固体担体は、HIVに由来するポリペプチドを含んでいてもよい。それゆえ、好ましい実施形態によれば、カプシドタンパク質p24が当該固体担体にさらに固定化される。

20

【0072】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、HIVインテグラーゼ、HIV逆転写酵素+RNAseH、HIVプロテアーゼおよびHIVマトリクスタンパク質p17からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドが当該固体担体上にさらに固定化される。

【0073】

固体担体は本発明に係る1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを固定化するのに使用される。固体担体のさらなる使用に依存して、固体担体は様々な形態をとり得る。固体担体は好ましくはカラム、ビーズ、試験管、マイクロタイターディッシュ、固体粒子、マイクロチップまたは膜の形態において提供される。当該固体担体は様々なイムノアッセイに使用することができる。

30

【0074】

本発明は以下の図および実施例によりさらに説明されるが、これらに限定されない。

【0075】

図1は抗体がHIV-1クレードC gp120およびgp120由来のペプチドに反応することを示す。(A)アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、組み換えgp120および24個の重複するgp120ペプチド(x軸:ペプチド1~24)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。(B)最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株(クレードC\_\_ZA)および参考株HXB2(クレードB\_\_HXB2)のgp120における重複するgp120ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp120におけるギャップ(欠落しているアミノ酸の数を表示)を示す。gp120クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメインを示す(SP:シグナルペプチド、V1-V5:可変領域1-5。)(C)HIV-1クレードC南アフリカ株(Ref.C.ZA)のペプチド120/15と、対応するHIV-1参考株由来のペプチドとの多重配列アラインメント。右端にRef.C.ZAペプチドとの配列の同一性のパーセンテージを示す。点線は保存されたアミノ酸である。破線はギャップである。N結合型グリコシル化サイトに下線を引いている。番号付けの方式はHIV-1株HXB2(Ref.B.FR)を参照する。aaはアミノ酸を意味する。

40

50

## 【0076】

図2は抗体がHIV-1クレードC gp41由来のペプチドに反応することを示す。(A)アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、17個の重複するgp41ペプチド(x軸:ペプチド1~17)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。(B)最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株(クレードC\_\_ZA)および参考株HXB2(クレードB\_\_HXB2)のgp41における重複するgp41ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp41におけるギャップ(欠落しているアミノ酸の数を表示)を示す。gp41クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメイン/エピトープを示す(F:融合タンパク質、TM:トランスメンブレンタンパク質、ID:免疫優性領域、IS:免疫抑制領域、MPER:膜近位外部領域)。

10

## 【0077】

図3は、組み換えHIV-1クレードC構造、補助およびpol由来タンパク質の純度および免疫反応性を示す。(A)組み換えマトリクス(MA)、カプシド(CA)、ヌクレオカプシド(NC)、NEF、TAT、VIF、プロテアーゼ(PR)、逆転写酵素+RNAseH(PR)、インテグラーゼ(IR)および分子量マーカー(M)を含むクマシー染色されたSDS PAGE。分子量(kDa)を左に示す。(B)アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、構造、補助およびpol由来タンパク質(x軸)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。

20

## 【0078】

図4は、規定された従来の診断試験において陰性の結果を有する2個体の、gp120由来タンパク質およびペプチドに対するIgGおよびIgMの反応プロファイルを示す。IgGおよびIgM抗体の、HIV-1クレードC抗原(rgp120、MA:マトリクス;NEF、TAT、PR:プロテアーゼ、PR:逆転写酵素+RNAseH、IN:インテグラーゼ)およびペプチドに対する陽性反応が示される。InnoLIA IgGイムノプロットで得られた、HIV抗原gp120、gp41、インテグラーゼ(IN)、カプシド(CA)、マトリクス(MA)およびHIV-2抗原gp105、gp36陰性の試験結果を右端に示す。

30

## 【0079】

図5Aは、同一のアミノ酸を(\*)、置換を(.)およびギャップを(-)で表すアミノ酸配列アラインメントを示す。ペプチドの長さをアミノ酸の数として右端に示す。図5AにおけるペプチドアラインメントはAIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT(配列番号1)およびNTRKSIRIGPGQTFY(配列番号42;Casseb et al. Braz J Med Biol Res 35(2002):369-375を参照)である。図5Bは、図5Aにおける2つのペプチドの、アフリカ人およびヨーロッパ人のHIVに感染した患者におけるIgG血清反応性を、ネガティブコントロールに対する反応を差し引いた、光学濃度(OD)として表す。さらに、アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の、配列番号1および42を有するペプチドに対するIgG反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)を図5Cに示す。

40

〔実施例〕

(実施例1)

&lt;材料および方法&gt;

HIV-1クレードCエンベロープと重複するペプチドの合成

南アフリカのHIV-1クレードCの参照用株(分離株ZA.04.04ZASK146、Los Alamos HIV 配列データベース承認番号AY772699)由来のgp120およびgp41の完全長アミノ酸配列をカバーする24個および17個のペプチドを、CEM-Liberty(CEM、アメリカ合衆国)、またはApplied Biosystem peptide synthesizer(Life technologies、アメリカ合衆国)において、固相合成により生成した。それぞれ33個および32個のアミノ酸を含んでおりgp120およびgp41のC末端ペプチドを除き、全ての

50

ペプチドはアミノ酸 25 個の長さであり、5 個のアミノ酸の重複を有している（次の表を参照）。HIV-1 クレード C エンベロープペプチド：

【0080】

【表1】

gp120 ペプチド			
ペプチド	アミノ酸配列	配列番号	溶媒
120/1	RVRGILRNWPQWWIWGILGFWMIII	6	10% DMF
120/2	WMIIICRGEENSWVTVYYGVPVWTE	7	2% DMSO, 1mM DTE
120/3	PVWTEAKTTLFCASDAKAYEKEVHN	8	PBS, 1mM DTE
120/4	KEVHNVWATHACVPTDPSQELVLE	9	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/5	ELVLENTESFNMWENDMVDQMHD	10	H <sub>2</sub> O, 9mM NaOH
120/6	QMHEDIIGLWDESLKPCVKLTPLCV	11	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/7	TPLCVTLNCNTTSHNNSPSPMTNC	12	5% ACN, 1mM DTE
120/8	PMTNCSFNATTELDRKTQKVNALFY	13	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/9	NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN	3	2% DMSO, 3mM NaOH, 1mM DTE
120/10	LINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHY	14	5% DMSO, 1mM DTE
120/11	IPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTG	15	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/12	FNGTGPCSNVSTVQCTHGKIPVST	16	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/13	PVVSTQLLNGSLAEGEIIRSENL	17	3mM NaOH
120/14	RSENLTDAKTIIVHLNKSVAIVCT	18	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/15	AIVCTRPNNTTRKSIIRIGPGQVFT	1	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/16	QVFTNEIIGNIRQAHCNISRELWN	19	5% DMF, 1mM DTE
120/17	RELWNTLEQVKKLKEHFQNKTE	20	H <sub>2</sub> O
120/18	NKTIEFQPPAGGLEVTTHSFNCRG	21	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/19	FNCRGEFFYCNTSNLFNITASNASD	22	PBS, 2mM NaOH, 1mM DTE
120/20	SNASDANNNTITLPCIKQIINMWQ	23	H <sub>2</sub> O
120/21	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCNSS	24	10% ACN, 1mMDTE
120/22	TCNSSITGLLLTRDGGNNNDTGNNN	25	H <sub>2</sub> O, 1mM DTE
120/23	TGNNNDTEIFRPGGGMKDNWRSEL	26	H <sub>2</sub> O
120/24	WRSELYKYKVEIKPLGIAPTAKRRVVEREKR	5	H <sub>2</sub> O
gp41 ペプチド			
41/1	AVGLGAVLLGFLGTAGSTMGAASIT	27	5% ACN
41/2	AASITLTVQARQLLSGIVQQSNLL	28	5% DMF, 1mM 酢酸
41/3	QSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQL	29	H <sub>2</sub> O
41/4	GIKQLQARVLAIERYLKDQQLGLW	4	H <sub>2</sub> O
41/5	LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN	2	5% DMSO, 1mM DTE
41/6	SSWSNKSQDYIWGNMTWMQWDREIN	30	H <sub>2</sub> O, 3mM NaOH
41/7	DREINNYTDIIYTLLEESQSQQEKN	31	H <sub>2</sub> O, 6mM NaOH
41/8	QQEKNEKDLLALDSWNNLWNWFSIT	32	H <sub>2</sub> O, 3mM NaOH
41/9	WFSITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLR	33	2% DMSO
41/10	LIGLRIILGVLSIVKRVRGYSPLS	34	10% ACN

10

20

30

40

41/11	YSPLSFQTLPPNPRGPDRRLRGIEEE	35	H <sub>2</sub> O
41/12	GIEEEGGEQDKDRSIRLVSGFLALV	36	H <sub>2</sub> O
41/13	FLALVWEDLRSLCLFSYHRLRDFIL	37	5% DMF
41/14	RDFILIAGRAAEELGRSSLRGLQTG	38	H <sub>2</sub> O
41/15	GLQTGWQALKYLGLSLVQYWGLELKK	39	5% ACN
41/16	LELKKSAINLFDTTAIVVAEGTDRL	40	2% DMSO, 2mM NaOH
41/17	GTDRLEIQLQGIGRAIYNIPRRIRQGFEEALL	41	2% DMF

## 【 0 0 8 1 】

合成を、PEG - PSをプレロードしたレジンを用いた9 - フルオレニル1 - メトキシ - カルボニル ( F m o c ) 法により行った。合成されたペプチドを、ジクロロメタンで洗浄し、19 mlのトリフルオロ酢酸、500 μlのシランおよび500 μlのH<sub>2</sub>Oの混合物中で樹脂から分離され、tert - ブチルメチルエーテル中に沈殿させた。ペプチドはアセトニトリルグラジエント ( U l t i M a t e 3 0 0 0 P u m p , D i o n e x , アメリカ合衆国 ) における逆相HPLCにより90%より高い純度で副生成物から単離され、質量スペクトル ( M i c r o f l e x M A L D I - T O F , B r u k e r , アメリカ合衆国 ) により同定した。ペプチドの化学的性質は、Expasy proteomics serverのProt Paramにより予測し、可溶化の条件の最適化を検討した。疎水性の高いペプチドはジメチルホルムアミド ( D M F ) 、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) またはアセトニトリル ( A C N ) 中で可溶化し、システインを豊富に含むペプチドにはジチオエリトール ( D T E ) 等の還元剤を、添加し、強度の酸性のペプチドにはNaOHを添加した。

## 【 0 0 8 2 】

< HIV - 1クレードCタンパク質の発現および精製 >

組み換えマトリクス ( M A ) 、カプシド ( C A ) 、ヌクレオカプシド ( N C ) タンパク質、ならびにNEF、TATおよびVIF、およびpol由来プロテアーゼ ( P R ) 、逆転写酵素 + R N a s e H ( R P ) およびインテグラーゼ ( I N ) をEscherichia coli ( E . coli ) において発現した。端的には、構造タンパク質および補助タンパク質ならびにプロテアーゼのcDNA配列は、南アフリカのHIV - 1クレードC参照用株 ( 分離株ZA.04.04ZASK146、Los Alamos HIV配列データベース承認番号AY772699 ) に由来する。逆転写酵素 - R N a s e Hおよびインテグラーゼコンストラクトは、エチオピアのHIV - 1クレードC分離株 ( Los Alamos HIV 配列データベース承認番号U46016 ) に由来する。タンパク質のcDNAはヘキサヒスチジンタグがその後続いており、細菌による発現のためにコドン最適化され、pET17bベクター ( ATG : biosynthetics、ドイツ ) にクローニングした。100 mg / lアンピシリンを添加したLB培地においてOD<sub>600</sub> = 0.4 - 0.6まで培養された、E.coli BL21 ( DE3 ) 細胞における組み換えタンパク質の発現を0.5 ~ 1.0 mMのイソプロピル - β - チオガラクトピラノシド ( IPTG ) の添加により誘導し、タンパク質をニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより、未変性または変性の条件下で精製した。マトリクス、カプシドおよびヌクレオカプシドの未変性の条件下での精製については、50 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mMのNaCl、10 mMのイミダゾール pH 8.0、PMSF ( 1 μl / ml ) 、リゾチーム ( 1 mg / ml ) 中における連続的な凍結および融解のサイクルにより細胞を溶解し：DNAを5 μg / ml DNase Iで開裂させ ( 20分間、室温 ) ：細胞の破片を除去 ( 18000 rpm、20分間、4 で遠心 ) した後、透明な可溶化液をニッケルアガロース ( QIAGEN、ドイツ ) で2 ~ 4時間、4 でインキュベートした。ヒスチジンタグ付加したタンパク質の溶出を、50 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mMのNaCl pH 8.0中の、イミダゾール勾配 ( 20、50、100、250 mMのイミダゾール ) を用いて実施した。NEF、TATおよびプロテアーゼの、変性条件下における精製については、細胞を8 Mの尿素または6 Mの塩化グアニジウムバッファー中で少なくとも2時間または一晩室温で溶解した。細胞の破片を除去 ( 18000 rpm、20分間、4 で遠心 ) し、透明な可溶化液をニッケルア

10

20

30

40

50

ガロース (QIAGEN、ドイツ) でインキュベート (室温で 2 ~ 4 時間、または 4 で一晩) した後、pH 勾配 (pH 6.3、5.6、4.5) を使用して組み換えタンパク質を 8 M の尿素、100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM のトリス中に溶出させた。組み換えインテグラーゼの精製については、細胞をまず上述の未変性の状態で溶解し、タンパク質は遠心 (18000 rpm、20 分間、4 ) の後、不溶性画分に見られるため、この不溶性画分を不溶性画分は再度 8 M の尿素、100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM のトリス、pH 8.0 に懸濁し、一晩室温でインキュベートした。細胞の破片を除去 (第 2 の工程の 18000 rpm、20 分間、4 の遠心により) した後、組み換えインテグラーゼを、変性条件下で 8 M の尿素中で上述のとおり精製した。VIF および逆転写酵素 + RNase H の精製は、封入体調製のプロトコルに従い達成した。変性条件下で精製された組み換えタンパク質の尿素的除去およびリフォールディングを、連続透析の工程により達成した。

10

## 【 0 0 8 3 】

タンパク質の同一性を、SDS-PAGE およびクマシー染色 (図 3 A) ならびにウエスタンブロットおよび質量分析により確認した。これらのタンパク質の二次構造および熱安定性を、Jasco J-810 分光偏光計 (Japan Spectroscopic、日本) において、円偏光二色性スペクトルにより解析した。組み換え HIV-1 クレード C タンパク質の生化学的性質は、ExPASy proteomics server の ProtParam ソフトウェアにより予測し、上述のように実験的に評価し、以下の表に概説した。

組み換え HIV-1 クレード C タンパク質の生化学的性質

20

## 【 0 0 8 4 】

## 【表 2】

タンパク質 <sup>1</sup>	MW <sup>2</sup>	泳動 SDS-PAGE	pI <sup>4</sup>	二次構造 <sup>4</sup>	熱安定性 <sup>5</sup>
	<i>kDa</i>	<i>kDa</i>			
MA	15.5	17.5	9.1	$\alpha$ -ヘリカル > $\beta$ -シート	T <sub>m</sub> = 65°C
CA	26.5	24.0	6.6	$\alpha$ -ヘリカル	T <sub>m</sub> = 66°C
NC	7.2	11.0	10.2	$\beta$ -シート < ランダムコイル	n.d.
NEF	24.6	30.0	6.2	$\alpha$ -ヘリカル & $\beta$ -シート	n.d.
TAT	12.2	17.0	9.0	ランダムコイル	n.d.
VIF	23.7	24.0	10.5	$\beta$ -シート > $\alpha$ -ヘリカル	T <sub>m</sub> > 95°C
PR	11.7	12.0	8.7	$\beta$ -シート & ランダムコイル	T <sub>m</sub> = 55°C
RR	65.1	65.0	6.8	$\alpha$ -ヘリカル & $\beta$ -シート	T <sub>m</sub> > 95°C
IN	33.2	33.5	7.4	$\alpha$ -ヘリカル & $\beta$ -シート	n.d.

30

## 【 0 0 8 5 】

<sup>1</sup> タンパク質の略称：MA：マトリクス、CA：カプシド、NC：ヌクレオカプシド、PR：プロテアーゼ、VIF：逆転写酵素 + RNase H、IN：インテグラーゼ。<sup>2</sup> MW：ProtParam で予測し、および質量スペクトルで確認した分子量 (kDa) <sup>3</sup> pI：ProtParam で予測した等電点。<sup>4</sup> 二次構造：円偏光二色性スペクトルにより決定される、 $\alpha$ -ヘリカルまたは  $\beta$ -シートいずれかの要素の優性。<sup>5</sup> 熱安定性：円偏光二色性スペクトルにより決定される；T<sub>m</sub>：融点；n.d.：実施せず。

40

< 研究の対象およびルーチン免疫ノアッセイ >

14 人のアフリカ人の HIV に感染した患者、2 人の高度に曝露されたアフリカ人の個人、15 人のヨーロッパ人の HIV に感染した患者、および 10 人の感染していない個体から血清が採取された。各被験者の HIV 血清学的陽性および陰性は、ルーチン分析により確認した。HIV 特異的 IgG 免疫ノブロットはライン免疫ノアッセイ (InnoLIA, Inn

50

ogenetics、ベルギー)により実施され、また無症候の被験者をさらにAbbott Murex HIV Ag/Ab combination (Abbott、アメリカ合衆国)により試験した。

【0086】

<ELISAによるHIV-1クレードCタンパク質特異的IgG、IgAおよびIgMの決定>

ELISAプレート(Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific、アメリカ合衆国)を、100mMの重炭酸ナトリウムバッファーpH9.6で希釈したHIV-1クレードC由来ペプチドおよびタンパク質(2µg/ml)を用いて4℃で一晩、被覆した。PBS0.05%v/vTween20中で洗浄し、2%w/vBSA、PBS,0.05%v/vTween20中で少なくとも4時間室温でブロッキングした後、プレートを0.5%w/vBSA、PBS、0.05%v/vTween20で1:200に希釈した血清を用いて4℃で一晩インキュベートした。結合した抗体をマウス抗ヒトIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA、IgM(BD、1:1000、室温で2時間)またはマウス抗ヒトIgG<sub>3</sub>(1:5000、室温で2時間、Sigma Aldrichst. Louis、MO)、およびセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合したヒツジ抗マウスIgG(1:2000、室温で1時間、GE Healthcare, Waukesha, WI)を用いて検出した。全IgG抗体は直接的に標識されたHRP-抗ヒトIgG(1:5000、室温で1時間、GE Healthcare、アメリカ合衆国)を用いて検出した。呈色反応を2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩によって誘導し、光学濃度(OD<sub>405nm</sub>-OD<sub>490nm</sub>)をSpectra Max 分光光度計(Molecular Devices、アメリカ合衆国)において測定した。エンベロープ特異的反応性の分析のためのコントロール抗原として、293個の細胞(#11233-V08H, Sino Biological、中国)で発現した、HIV-1クレードC由来の組み換えヒスチジンタグgp120、単離CN54を使用した。プレート間の標準化のために、各プレートにおいて、各抗体のアイソタイプ/サブクラスに特異的なポジティブコントロール血清を分析した。加えて、ヒト血清アルブミン(HSA)に対する各血清サンプルの反応性を、ネガティブコントロールとして試験した。抗原のコーティングを、ヒスチジンタグタンパク質の、マウス抗ヒスチジンタグ抗体(Dianova、ドイツ)を用いた検出、ならびにタグ付されていないタンパク質およびペプチドの、HIV感染血清のプールを用いた検出によって確認した。コーティングされた抗原に対する検出抗体の非特異的結合を、バッファーのコントロールの分析によって排除した。全ての決定は2回行っており、結果はネガティブコントロール抗原に対する反応性を引いた生データの標準化された平均値として表される。閾値は、各抗体のアイソタイプ/サブクラスごとに、および各抗原について、HIVに感染していない被験者の結果の平均値+3SDとして計算した。

【0087】

多重配列アラインメントのため、アミノ酸配列の同一性をEMBL-EBIサーバー上のClustalW2を用いて計算し、GeneDocプログラム(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>)を用いてアラインメントを生成した。配列は、国際的なHXB2のナンバリングスキーム(<http://www.hiv.lanl.gov/>)に従い、連続した文字が後に続く最後の対応するHXB2のアミノ酸の番号を有するアミノ酸の挿入によってナンバリングされる。

【0088】

<結果>

ほぼ同一のIgG、IgAおよびIgMは、アフリカおよびヨーロッパのHIVに感染した患者におけるHIV-1クレードC由来のgp120エピトープに反応する。

【0089】

gp120の詳細なエピトープマッピングのために、HIV-1に感染した、クレードCがHIV-1の主なサブタイプである、ジンバブエの患者由来の血清を試験し、また組み換えgp120および24個の重複するgp120由来ペプチドとの抗体の反応性について、他のクレードのHIV-1株に感染したヨーロッパ人の患者由来の血清を試験した

。これらのペプチドは、南アフリカのH I V - 1サブタイプC参照用株に由来するg p 1 2 0の完全長アミノ酸配列をカバーした(図1 A、B)。I g G、I g A、I g MおよびI g G<sub>1-4</sub>サブクラスの反応性を測定した。

#### 【0090】

興味深いことに、I g G、I g Gサブクラス、I g AおよびI g Mの、ペプチドに対する反応プロファイルは、アフリカ人のH I Vに感染した患者(図1 A左パネル)およびヨーロッパ人のH I Vに感染した患者(図1 A右パネル)においてほぼ同一であった。ペプチドの認識パターンは、全ての抗体クラスおよびI g Gサブクラスで類似であった。しかしながら、抗体レベルおよび認識の頻度の分析により、I g G、特にI g G<sub>1</sub>の反応がどちらの集団においても支配的であることが示された。ペプチド1 2 0 / 1 5は、アフリカ人およびヨーロッパ人の患者について、認識の頻度および強度の観点において主たる抗体反応性ペプチドであった。(図1 A)。ペプチド1 2 0 / 2 4もまた、試験された個体の大多数によって認識された。g p 1 2 0の全体像(図1 B)は、ペプチド1 2 0 / 1 5が、C D 4細胞上のコレセプターC C R 5 / C X C R 4のための結合サイトを含んでいると考えられるV 3ドメインに存在していることを示す。ペプチド1 2 0 / 2 4はg p 1 2 0のちょうどC末端に位置している。

10

#### 【0091】

図1 Cは、ペプチド1 2 0 / 1 5と、異なる大陸からの様々なH I V - 1参照用株における対応するペプチドとの配列アラインメントを含んでいる。ペプチド1 2 0 / 1 5に対応する領域の相当程度の配列変異が、8 8 ~ 7 2 %の配列同一性の範囲で、前記株の間で発見された。株に依存して、ペプチド1 2 0 / 1 5と定義される領域は、1つまたは2つのN結合型グリコシル化サイトを含んでいる。

20

#### 【0092】

<アフリカ人およびヨーロッパ人の患者はH I V - 1クレードC由来のg p 4 1上の高度に類似したエピトープを認識する>

次に、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者の、H I V - 1クレードCのg p 4 1由来のオーバーラップする17個のペプチドに対するI g G、I g AおよびI g Mの反応を分析した(図2 A、2 B)。再び、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者が類似のペプチドを認識し、免疫反応においてI g G、および特にI g G<sub>1</sub>抗体が支配的であることがわかった。認識の頻度および強度の両方が、g p 4 1ペプチドに対するものよりも、g p 1 2 0由来ペプチドに対するものの方が低かった。I g G抗体およびI g G<sub>1</sub>抗体は、主にペプチド4 1 / 4 - 8に定義される領域に向けられた(図2 A)。この領域は、「免疫抑制的」かつ「免疫優性」ドメインと呼ばれてきた、予測されるg p 4 1のN結合型グリコシル化サイトの大部分を含んでいる領域を包含する(図2 A、B)。興味深いことに、ペプチド4 1 / 1 4 - 1 7に定義される他の抗体反応性領域は、いわゆる「細胞質顆粒ドメイン」の一部である、g p 4 1のC末端部分に位置していた。

30

#### 【0093】

<アフリカ人およびヨーロッパ人のH I Vに感染した患者はp o 1由来構造タンパク質に一次応答するが、補助タンパク質には一次応答しない>

表面抗原以外のウイルスタンパク質に対する抗体反応を特徴づけるために、H I V - 1クレードCのp o 1由来構造タンパク質および補助タンパク質をE.coliにおいて発現させて精製し、タンパク質特異的抗体のレベルをアフリカ人の血清(図3 B、左パネル)およびヨーロッパ人の血清(図3 B、右パネル)において測定した。エンベロープタンパク質と同様、免疫応答はI g G抗体、特にI g G<sub>1</sub>抗体が支配的であった。再び、両方の集団の患者は類似の認識プロファイルを示した：プロテアーゼ、逆転写酵素+ R N A s e H、インテグラーゼ、ならびにカプシドタンパク質およびマトリクスタンパク質が最も高頻度かつ強力に認識される抗体であった。ヌクレオカプシドタンパク質および補助タンパク質に対する抗体の反応はまれで低いものであった。

40

#### 【0094】

<H I Vタンパク質およびペプチドのI g Gサブクラス認識はT h 1 / T h 2混合免疫

50

応答の徴候である>

I g Gサブクラスの、g p 1 2 0およびg p 4 1ペプチドに対する反応ならびにp o l由来構造タンパク質および補助タンパク質に対する反応の測定を、同一の血清希釈物を使用して実施した。I g G<sub>1</sub>は支配的なI g Gサブクラスであるので、I g G<sub>1</sub>の反応はI g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>およびI g G<sub>4</sub>の反応よりも強力で高頻度であった。しかしながら、抗原およびエピトープ認識プロファイルは、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者において、全てのサブクラスで類似していた。I g G<sub>2</sub>およびI g G<sub>4</sub>の反応の頻度および強度は、T h 1 / T h 2混合免疫応答の徴候であり、同等であった。

【 0 0 9 5 】

<クレードCプロテオームを構成する組み換えタンパク質およびペプチドに基づく診断試験の高い感度および特異度>

抗体反応の包括的な分析により、H I V - 1クレードC由来の抗原およびペプチドのパネルが、H I Vに感染しているアフリカおよびヨーロッパの患者それぞれにおいて、特異的I g G抗体の確実な検出を可能にすることが示された。感染していない個体由来の血清を試験した場合に、偽陽性の試験結果が得られることはなかった。ペプチド1 2 0 / 1 5は、I g Gに基づくH I V感染患者の診断について、2 9人の患者のうち2 9人を同定することができたため、事実上完全なr g p 1 2 0であった。同様に、ペプチド1 2 0 / 2 4が2 9人の患者のうち2 1人で陽性であったのに対し、ペプチド4 1 / 5は2 9人の患者を同定することができた。カプシドタンパク質に対するI g G反応性試験は2 9 / 2 9の患者を同定し、逆転写酵素+ R N A s e Hに対するI g G反応性試験は2 7 / 2 9の患者を同定し、インテグラーゼは2 7 / 2 9、プロテアーゼに対するI g G反応性試験は2 6 / 2 9の患者を同定した。それゆえ、ペプチド1 2 0 / 1 5および4 1 / 5は、単独で個体におけるH I V感染の診断に利用することができる。ペプチド1 2 0 / 1 5、1 2 0 / 2 4、r g p 1 2 0、カプシドタンパク質およびp o l由来タンパク質のパネルを用いて、各感染患者をI g G試験によって診断した。

【 0 0 9 6 】

加えて、H I Vに高度に曝露され感染しているアフリカ人の個体は、通常の抗原 / I g G + I g M判定 (Abbott Murex HIV Ag/Ab combination、Abbott、アメリカ合衆国)ならびにイムノプロットに基づくアッセイ (InnoLIA、Innogenetics、ベルギー；図4右端に示す)において陰性であったが、H I V - 1クレードC由来抗原およびペプチドのパネルに対するI g GおよびI g M試験によって診断することができた (図4)。

【 0 0 9 7 】

(実施例2)

本実施例において、アミノ酸配列AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号1 ; 1 2 0 / 1 5)を有するペプチドおよびNTRKSIRIGPGQTFY (配列番号4 2 ; C o n c C、Casseb et al. Braz J Med Biol Res 35(2002):369-375を参照)を有するペプチドの、H I Vに感染した個体の血清との反応を検査する。この検査の結果を図5に示す。

【 0 0 9 8 】

図5 Aは、ペプチド1 2 0 / 1 5と、Casseb et al. 2002に使用されたコンセンサスペプチドC o n C (多くのサブタイプC配列に類似させるために1 3番目にスレオニンが組み込まれている (1 2 0 / 1 5においてはバリンが含まれている))との比較を示す。多くのサブタイプC配列に類似させるためにコンセンサスペプチドの配列が修正されているにも関わらず、2 9個のうち1 1個のH I V陽性血清サンプルがこのペプチドと反応せず、それゆえ診断テストにおいて偽陰性であった。一方、ペプチド1 2 0 / 1 5は、2 9個の各H I V陽性血清サンプルを同定することができた (図5 C参照)。

【 0 0 9 9 】

<材料および方法>

Casseb et al. 2002に使用されたペプチド「C o n s C」を、g p 1 2 0由来ペプチドについて説明した (実施例1を参照)のと同様に、固相ペプチド合成を用いて製造した。E L I S A実験のため、ペプチドをH<sub>2</sub>Oに可溶化し、g p 1 2 0由来ペプチドについ

10

20

30

40

50

て説明したのと同様に免疫学的アッセイを行った。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1A】抗体がHIV-1クレードC gp120およびgp120由来のペプチドに反応することを示す。アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、組み換えgp120および24個の重複するgp120ペプチド(x軸:ペプチド1~24)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。

【図1B】抗体がHIV-1クレードC gp120およびgp120由来のペプチドに反応することを示す。最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株(クレードC\_\_ZA)および参考株HXB2(クレードB\_\_HXB2)のgp120における重複するgp120ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp120におけるギャップ(欠落しているアミノ酸の数を表示)を示す。gp120クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメインを示す(SP:シグナルペプチド、V1-V5:可変領域1-5)。

【図1C】抗体がHIV-1クレードC gp120およびgp120由来のペプチドに反応することを示す。HIV-1クレードC南アフリカ株(Ref.C.ZA)のペプチド120/15と、対応するHIV-1参考株由来のペプチドとの多重配列アラインメント。右端にRef.C.ZAペプチドとの配列の同一性のパーセンテージを示す。点線は保存されたアミノ酸である。破線はギャップである。N結合型グリコシル化サイトに下線を引いている。番号付けの方式はHIV-1株HXB2(Ref.B.FR)を参照する。aaはアミノ酸を意味する。

【図2A】抗体がHIV-1クレードC gp41由来のペプチドに反応することを示す。アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、17個の重複するgp41ペプチド(x軸:ペプチド1~17)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。

【図2B】抗体がHIV-1クレードC gp41由来のペプチドに反応することを示す。最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株(クレードC\_\_ZA)および参考株HXB2(クレードB\_\_HXB2)のgp41における重複するgp41ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp41におけるギャップ(欠落しているアミノ酸の数を表示)を示す。gp41クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメイン/エピトープを示す(F:融合タンパク質、TM:トランスメンブレンタンパク質、ID:免疫優性領域、IS:免疫抑制領域、MPER:膜近位外部領域)。

【図3A】組み換えHIV-1クレードC構造、補助およびpol由来タンパク質の純度および免疫反応性を示す。組み換えマトリクス(MA)、カプシド(CA)、ヌクレオカプシド(NC)、NEF、TAT、VIF、プロテアーゼ(PR)、逆転写酵素+RNaseH(PR)、インテグラーゼ(IR)および分子量マーカー(M)を含むクマシー染色されたSDS PAGE。分子量(kDa)を左に示す。

【図3B】組み換えHIV-1クレードC構造、補助およびpol由来タンパク質の純度および免疫反応性を示す。アフリカ人(左)およびヨーロッパ人(右)の患者の、構造、補助およびpol由来タンパク質(x軸)に対するIgG、IgGサブクラスIgAおよびIgMの反応の頻度(y軸:反応性の血清の数)。

【図4】図4は、規定された従来の診断試験において陰性の結果を有する2個体の、gp120由来タンパク質およびペプチドに対するIgGおよびIgMの反応プロファイルを示す。IgGおよびIgM抗体の、HIV-1クレードC抗原(r gp120、MA:マトリクス; NEF、TAT、PR:プロテアーゼ、PR:逆転写酵素+RNaseH、IN:インテグラーゼ)およびペプチドに対する陽性反応が示される。InnoLIA IgGイムノプロットで得られた、HIV抗原gp120、gp41、インテグラーゼ(IN)、カプシド(CA)、マトリクス(MA)およびHIV-2抗原gp105、gp3

10

20

30

40

50

6 陰性の試験結果を右端に示す。

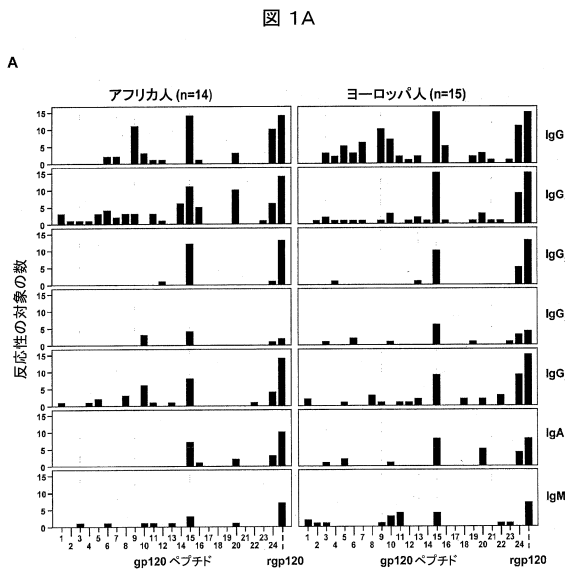
【図 5 A】同一のアミノ酸を ( \* )、置換を ( . ) およびギャップを ( - ) で表すアミノ酸配列アラインメントを示す。ペプチドの長さをアミノ酸の数として右端に示す。図 5 A におけるペプチドアラインメントはAIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT ( 配列番号 1 ) およびNTRKSI RIGPGQTFY( 配列番号 4 2 ; Casseb et al. Braz J Med Biol Res 35(2002):369-375を参照 ) である。

【図 5 B】図 5 A における 2 つのペプチドの、アフリカ人およびヨーロッパ人の HIV に感染した患者における I g G 血清反応性を、ネガティブコントロールに対する反応を差し引いた、光学濃度 ( O D ) として表す。

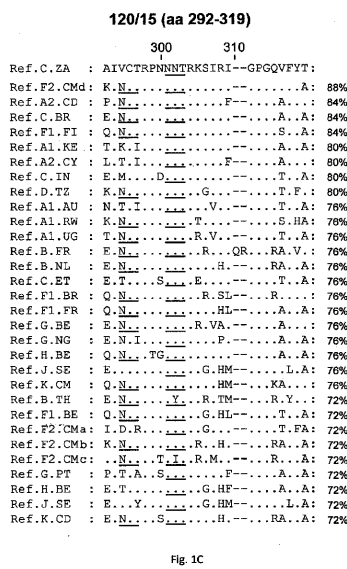
【図 5 C】アフリカ人 ( 左 ) およびヨーロッパ人 ( 右 ) の、配列番号 1 および 4 2 を有するペプチドに対する I g G 反応の頻度 ( y 軸 : 反応性の血清の数 ) を図 5 C に示す。

10

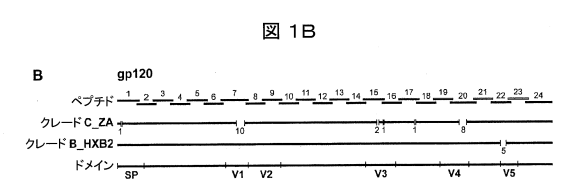
【 図 1 A 】



【 図 1 C 】

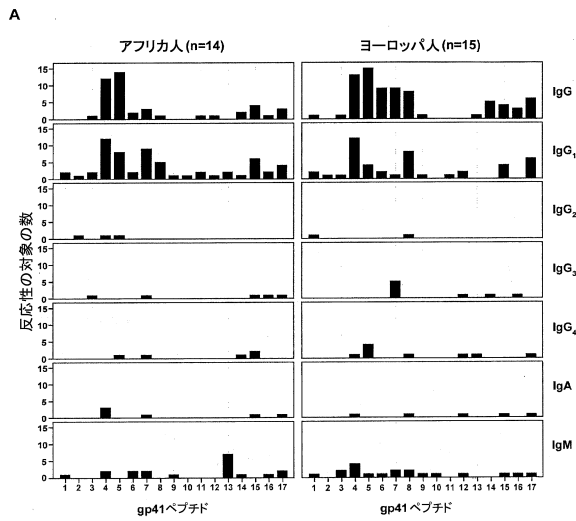


【 図 1 B 】



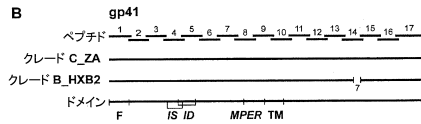
【 図 2 A 】

図 2A



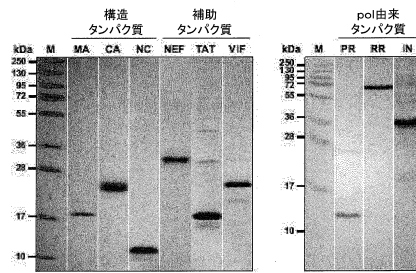
【 図 2 B 】

図 2B



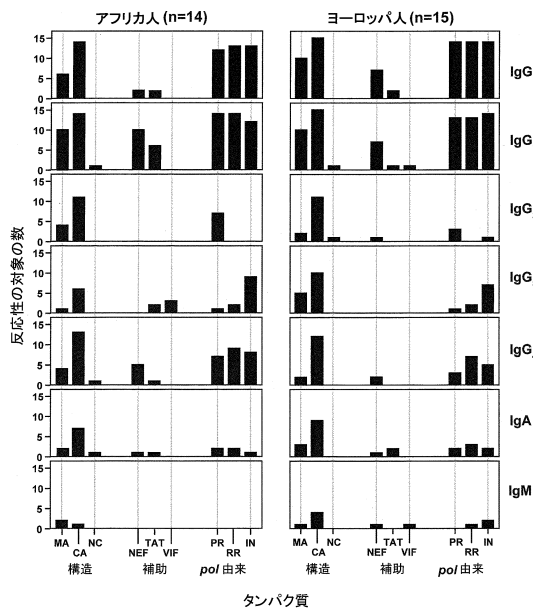
【 図 3 A 】

図 3A



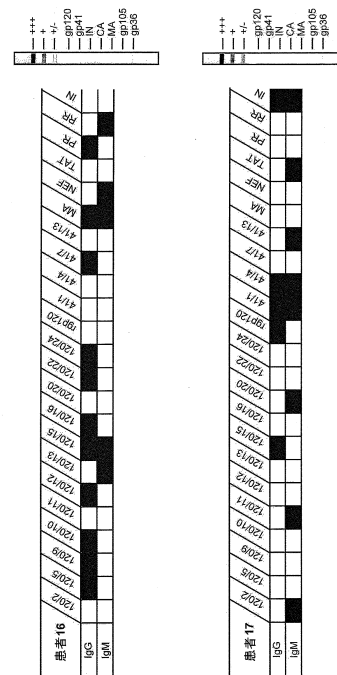
【 図 3 B 】

図 3B



【 図 4 】

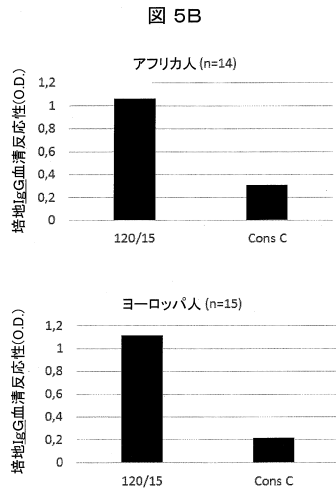
図 4



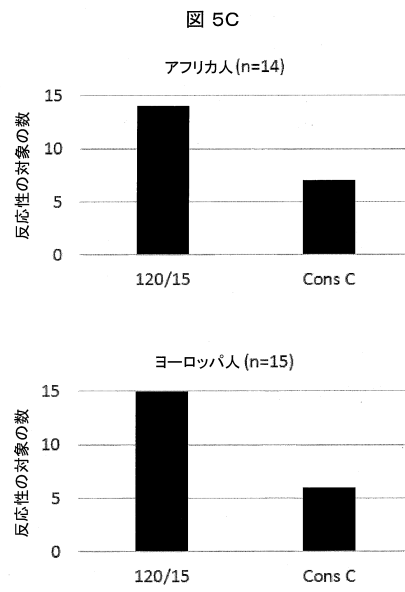
【 図 5 A 】

120/15 AIVCTRPNNTTRKSIRIGPGQVFYI 25  
 Cons C -----NTRKSIRIGPGQIFY- 15  
 \*\*\*\*\* \*\*

【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



【 配列表 】

0006436919000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/005 (2006.01) C 0 7 K 14/005  
C 0 7 K 17/04 (2006.01) C 0 7 K 17/04  
C 0 7 K 17/14 (2006.01) C 0 7 K 17/14  
C 1 2 N 11/02 (2006.01) C 1 2 N 11/02  
C 1 2 N 11/14 (2006.01) C 1 2 N 11/14

(72)発明者 シバンダ, エロピー, エヌ.  
ジンバブウェ, ハラレ, マウント プレザント, スタッフォード ロード 12

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開平02-160800(JP, A)  
国際公開第2012/114272(WO, A1)  
特開2001-055400(JP, A)  
CASSEB J, BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH, BR, 2002年, V35 N3  
, P369-375

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

專利名稱(譯)	如何診斷病毒感染		
公開(公告)號	<a href="#">JP6436919B2</a>	公開(公告)日	2018-12-12
申請號	JP2015562242	申請日	2014-03-14
[標]申請(專利權)人(譯)	碧歐美公司		
申請(專利權)人(譯)	Biomai股份公司		
[標]發明人	ヴァレンタルドルフ ガレラーノダニエラ シバンダエロピーエヌ		
發明人	ヴァレンタルドルフ ガレラーノダニエラ シバンダエロピーエヌ		
IPC分類號	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/005 C07K17/04 C07K17/14 C12N11/02 C12N11/14		
CPC分類號	G01N33/56988 G01N2333/162 C07K14/005 C07K14/162 C12N7/00 C12N2740/16122 G01N33/54366 G01N2333/16 G01N2469/20		
FI分類號	G01N33/569.H G01N33/53.N G01N33/543.545.A C07K7/08.ZNA C07K14/00 C07K14/005 C07K17/04 C07K17/14 C12N11/02 C12N11/14		
優先權	2013159417 2013-03-15 EP		
其他公開文獻	JP2016511411A		
外部鏈接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(譯)

本發明提供了一種檢測和/或定量目的樣品中人免疫缺陷病毒 ( HIV ) 特异性抗體的方法，所述方法包括a) 提供由氨基酸序列 AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVYFT ( SEQ ID NO : 1 ) 組成的肽。或 b ) 與a ) 的肽具有至少70%同一性的同源物，或c ) 與a ) 或b ) 的肽片段結合的抗體，其由15至24個氨基酸殘基組成，和和/或確定樣品的量。

(19) 日本國特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6436919号 (P6436919)
(45) 発行日 平成30年12月12日 (2018. 12. 12)	(24) 登録日 平成30年11月22日 (2018. 11. 22)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/569 (2006. 01)	GO 1 N 33/569 H	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
CO 7 K 7/08 (2006. 01)	CO 7 K 7/08 Z N A	
CO 7 K 14/00 (2006. 01)	CO 7 K 14/00	
請求項の数 18 (全 28 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-562242 (P2015-562242)	(73) 特許権者 518071268 ヴィラヴァックス アーゲー	
(86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)	オーストリア、1090 ウィーン、マリ	
(65) 公表番号 特表2016-511411 (P2016-511411A)	アンネンガッセ 14/9	
(43) 公表日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)	(74) 代理人 110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2014/055194	LD PATENT & TRADEMA	
(87) 国際公開番号 W02014/140332	R K	
(87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)	(72) 発明者 ヴァレンタルドルフ	
審査請求日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)	オーストリア、セレシオンフェルト アー	
(31) 優先権主張番号 13159417.8	-2604, ベートーヴェンストラッセ	
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	18	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者 ガレラーノ、ダニエラ	
	オーストリア、ウィーン アー-1210	
	, ミュールシュッテルガッセ 43	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 ウイルス感染を診断する方法		