

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-2379

(P2004-2379A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00	C07K 14/00 ZNA	4C085
A61K 39/21	A61K 39/21	4H045
A61K 39/29	A61K 39/29	
A61P 31/14	A61P 31/14	
A61P 31/18	A61P 31/18	
	審査請求 有 請求項の数 18 O L (全 102 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-107716 (P2003-107716)	(71) 出願人	596178419
(22) 出願日	平成15年4月11日 (2003.4.11)		エヌ・ブイ・インノジェネティクス・ソシ
(62) 分割の表示	特願平5-515334の分割		エテ・アノニム
原出願日	平成5年3月8日 (1993.3.8)		N. V. INNOGENETICS S.
(31) 優先権主張番号	92400598.6		A.
(32) 優先日	平成4年3月6日 (1992.3.6)		ベルギー国、ビー-9710 ゲント、ボ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ックス 4、インダストリーパーク・ツウ
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者	ド・レイス, ロベルト
			ベルギー国、ビー-1850、フリムベル
			ヘン、ディーベカンテン 20
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドの決定方法、及び免疫学的に重要なエピトープに相当するピオチニル化ペプチド又は抗体の決定のための方法におけるその利用、その調製方法

(57) 【要約】

本発明の基礎にある技術的問題は、細菌及びウイルス性タンパク質上の免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチド、及び診断用又は免疫原性組成物における該ペプチドの用途を提供することにある。本発明は、抗体のインピトロ決定方法であって、用いられるペプチドが、ピオチニル化されたペプチド、特にストレプトアビジン - ピオチニル化ペプチド又はアビジン - ピオチニル化ペプチドの複合体の形態であることを特徴とする方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドのインビトロ決定のための方法において、

(a) 隣接しているか又は好ましくは少なくともアミノ酸 3 個ずつ重複している、分析すべきタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列の部分に相当するペプチドを調製する工程；

(b) 前記ペプチドをビオチニル化する工程；

(c) このビオチニル化されたペプチドを、ビオチニル化された基とストレプトアビジン又はアビジンとの相互作用により固相に結合させる工程；及び

(d) 個々のペプチドに結合する抗体を測定する工程を含む方法。

10

【請求項 2】

前記アミノ酸が、約 6 個 ~ 12 個のアミノ酸ずつ重複している、請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 3】

以下の式：

(A) - (B) - (X) - Y - [アミノ酸]_n - Y - (X) - Z 式中、

- [アミノ酸]_n は、n が、約 4 ~ 約 50、好ましくは約 35 未満、さらに好ましくは約 30 未満、そして有利には約 4 ~ 約 25 の整数である残基の数である、ペプチド鎖の長さを示し；

20

- B は、ビオチンを表わし；

- X は、合成プロセス中に取り込まれるビオチニル化された化合物を表わし；

- Y は、ビオチニル部分 B 又は X からペプチド自体のアミノ酸を分離するリンカーアームを単独で又は一緒になって形成し、しかもアビジン又はストレプトアビジンに対するビオチニル部分 B 又は X の結合と干渉しうる立体障害を最小限にするという機能をもつ単数又は複数の化学的単位又は共有結合を表わし、Y が共有結合でない場合、有利には少なくとも 1 つの化学的単位であり、30 個もの化学的単位から構成されていてよいが、最も頻繁には 1 ~ 10 個の同一の又は異なっているよい化学的単位、より好ましくはグリシン残基、 α -アラニン、4-アミノブチル酸、5-アミノ吉草酸、6-アミノヘキサン酸（カプロン酸）で構成されており；

30

- B 及び X は、カッコ内に囲まれているのは、これらの位置でのビオチン又はビオチニル化された化合物の存在が任意のものであり、唯一の規定要件は B 又は X が示された位置のうち少なくとも 1 つにおいて存在していることであることを表わしており；

- A は、カッコで表わされているように存在する場合、アミノ酸（単数又は複数）、アミノ基又はペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾を表わし；

- Z は、単数又は複数のアミノ酸、1 つの OH 基、1 つ NH₂-基又はこれら 2 つの基のいずれかが関与するリンケージを表わし、ここで該アミノ酸は、大きな割合の真性陽正血清によって認識されるか又は試験においてその他の抗原を補完して検出率を増大させることのできる免疫優性エピトープとなるべく選択的に選ばれ、B は選択されたアミノ酸と相互作用して、より大きい診断上の感度をもつ化合物を生成する；

40

で表すことができる物質の組成物。

【請求項 4】

以下のもの：

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Trp - Gly - Cys - Ser - Gly - Lys - Ile - Cys - Y - (X) - Z (1a.1)

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Trp - Gly - Cys - Ser - Gly - Lys - Leu - Ile - Cys - Thr - Thr - Ala - Val - Pro - Trp - Asn - Ala - Ser - Y - (X) - Z (1a.2)

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Arg - Tyr - Leu - Lys - Asp - Gln - Gln - Leu - Leu - Gly - Ile - Trp - Gly - Cys - Ser - Gl

50

y - Lys - Leu - Ile - Y - (X) - Z (1 a . 3)
 (A) - (B) - (X) - Y - Leu - Gln - Ala - Arg - Ile - Leu - Ala - Val - Glu - Arg - Tyr - Leu - Lys - Asp - Gln - Gln - Leu - Y - (X) - Z (1 a . 4)
 (A) - (B) - (X) - Y - Leu - Trp - Gly - Cys - Lys - Gly - Lys - Leu - Val - Cys - Y - (X) - Z (1 a . 5)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asp - Gln - Gln - Leu - Leu - Gly - Ile - Trp - Gly - Cys - Ser - Gly - Lys - His - Ile - Cys - Thr - Thr - Asn - Val - Pro - Trp - Asn - Y - (X) - Z (1 a . 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Thr - Thr - Gly - Glu - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 1)
 (A) - (B) - (X) - Y - Cys - Thr - Arg - Pro - Asn - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Thr - Thr - Gly - Glu - Ile - Ile - Gly - Asp - Ile - Arg - Gln - Ala - His - Cys - Y - (X) - Z (1 b . 1 a)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - Tyr - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - His - Thr - Thr - Gly - Arg - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Thr - Arg - Ser - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Ala - Thr - Gly - Asp - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 3)
 (A) - (B) - (X) - Y - Tyr - Asn - Lys - Arg - Lys - Arg - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Thr - Thr - Lys - Asn - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 4)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - Thr - Lys - Gly - Pro - Gly - Arg - Val - Ile - Tyr - Ala - Thr - Gly - Gln - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 5)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Arg - Gly - Ile - His - Phe - Gly - Pro - Gly - Gln - Ala - Leu - Tyr - Thr - Thr - Gly - Ile - Val - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - Arg - Ile - Gln - Arg - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Val - Thr - Ile - Gly - Lys - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 7)
 (A) - (B) - (X) - Y - Gln - Asn - Thr - Arg - Gln - Arg - Thr - Pro - Ile - Gly - Leu - Gly - Gln - Ser - Leu - Tyr - Thr - Thr - Arg - Ser - Arg - Ser - Y - (X) - Z (1 b . 8)
 (A) - (B) - (X) - Y - Gln - Ile - Asp - Ile - Gln - Glu - Met - Arg - Ile - Gly - Pro - Met - Ala - Trp - Tyr - Ser - Met - Gly - Ile - Gly - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 9)
 (A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Arg - Gly - Ile - His - Met - Gly - Trp - Gly - Arg - Thr - Phe - Tyr - Ala - Thr - Gly - Glu - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z (1 b . 1 0)

10

20

30

40

50

(A) - (B) - (X) - Y - A r g - A s p - A s n - T r p - A r g - S e r - G l
u - L e u - T y r - L y s - T y r - L y s - V a l - V a l - L y s - I l e - G l
u - P r o - L e u - G l y - V a l - A l a - P r o - T h r - L y s - A l a - L y
s - A r g - A r g - V a l - V a l - G l n - A r g - G l u - L y s - A r g - Y -
(X) - Z (1 b . 1 1)

(A) - (B) - (X) - Y - S e r - T r p - G l y - C y s - A l a - P h e - A r
g - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z (2 a)

(A) - (B) - (X) - Y - L y s - T y r - L e u - G l n - A s p - G l n - A l
a - A r g - L e u - A s n - S e r - T r p - G l y - C y s - A l a - P h e - A r
g - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z (2 b) 10

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - L y s - T h r - V a l - L e u - P r o - I l
e - T h r - P h e - M e t - S e r - G l y - P h e - L y s - P h e - H i s - S e
r - G l n - P r o - V a l - I l e - A s n - L y s - Y - (X) - Z (2 c)

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - L y s - T h r - V a l - V a l - P r o - I l
e - T h r - L e u - M e t - S e r - G l y - L e u - V a l - P h e - H i s - S e
r - G l n - P r o - I l e - A s n - L y s - Y - (X) - Z (2 d)

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - L y s - T h r - V a l - L e u - P r o - V a
l - T h r - I l e - M e t - S e r - G l y - L e u - V a l - P h e - H i s - S e
r - G l n - P r o - I l e - A s n - A s p - Y - (X) - Z (2 e)

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - T r p - G l y - C y s - S e r - G l y - L y 20
s - A l a - V a l - C y s - Y - (X) - Z (3 a)

(A) - (B) - (X) - Y - S e r - T r p - G l y - C y s - A l a - T r p - L y
s - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z . (4 a)

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - T r p - G l y - C y s - S e r - T r p - A l
a - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z (4 b)

(A) - (B) - (X) - Y - V a l - L e u - T y r - S e r - P r o - A s n - V a
l - S e r - V a l - P r o - S e r - S e r - S e r - S e r - T h r - L e u - L e
u - T y r - P r o - S e r - L e u - A l a - Y - (X) - Z (I - g p 4 6 - 3
)

(A) - (B) - (X) - Y - T y r - T h r - C y s - I l e - V a l - C y s - I l 30
e - A s p - A r g - A l a - S e r - L e u - S e r - T h r - T r p - H i s - V a
l - L e u - T y r - S e r - P r o - Y - (X) - Z (I - g p 4 6 - 5)

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - S e r - L e u - I l e - L e u - P r o - P r
o - P h e - S e r - L e u - S e r - P r o - V a l - P r o - T h r - L e u - G l
y - S e r - A r g - S e r - A r g - A r g - Y - (X) - Z (I - g p 4 6 - 4
)

(A) - (B) - (X) - Y - A s p - A l a - P r o - G l y - T y r - A s p - P r
o - I l e - T r p - P h e - L e u - A s n - T h r - G l u - P r o - S e r - G l
n - L e u - P r o - P r o - T h r - A l a - P r o - P r o - L e u - L e u - P r
o - H i s - S e r - A s n - L e u - A s p - H i s - I l e - L e u - G l u - Y - 40
(X) - Z (I - g p 4 6 - 6)

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - T y r - A l a - A l a - G l n - A s n - A r
g - A r g - G l y - L e u - A s p - L e u - L e u - P h e - T r p - G l u - G l
n - G l y - G l y - L e u - C y s - L y s - A l a - L e u - G l n - G l u - G l
n - C y s - A r g - P h e - P r o - Y - (X) - Z (I - p 2 1 - 2)

(A) - (B) - (X) - Y - P r o - P r o - P r o - P r o - S e r - S e r - P r
o - T h r - H i s - A s p - P r o - P r o - A s p - S e r - A s p - P r o - G l
n - I l e - P r o - P r o - P r o - T y r - V a l - G l u - P r o - T h r - A l
a - P r o - G l n - V a l - L e u - Y - (X) - Z (I - p 1 9)

(A) - (B) - (X) - Y - L y s - L y s - P r o - A s n - A r g - G l n - G l 50

y - L e u - G l y - T y r - T y r - S e r - P r o - S e r - T y r - A s n - A s
 p - P r o - Y - (X) - Z (I I - g p 5 2 - 1)
 (A) - (B) - (X) - Y - A s p - A l a - P r o - G l y - T y r - A s p - P r
 o - L e u - T r p - P h e - I l e - T h r - S e r - G l u - P r o - T h r - G l
 n - P r o - P r o - P r o - T h r - S e r - P r o - P r o - L e u - V a l - H i
 s - A s p - S e r - A s p - L e u - G l u - H i s - V a l - L e u - T h r - Y -
 (X) - Z (I I - g p 5 2 - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - T y r - S e r - C y s - M e t - V a l - C y s - V a
 l - A s p - A r g - S e r - S e r - L e u - S e r - S e r - T r p - H i s - V a
 l - L e u - T y r - T h r - P r o - A s n - I l e - S e r - I l e - P r o - G l 10
 n - G l n - T h r - S e r - S e r - A r g - T h r - I l e - L e u - P h e - P r
 o - S e r - Y - (X) - Z (I I - g p 5 2 - 3)
 (A) - (B) - (X) - Y - P r o - T h r - T h r - T h r - P r o - P r o - P r
 o - P r o - P r o - P r o - P r o - S e r - P r o - G l u - A l a - H i s - V a
 l - P r o - P r o - P r o - T y r - V a l - G l u - P r o - T h r - T h r - T h
 r - G l n - C y s - P h e - Y - (X) - Z (I I - p 1 9)
 (A) - (B) - (X) - Y - M e t - S e r - T h r - I l e - P r o - L y s - P r
 o - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s n - T h r - A s n - A r
 g - A r g - P r o - G l n - Y - (X) - Z (I)
 (A) - (B) - (X) - Y - P r o - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r 20
 g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - A s p - V a l - L y
 s - P h e - P r o - G l y - Y - (X) - Z (I I)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s
 n - T h r - A s n - A r g - A r g - Y - (X) - Z . (I I a)
 (A) - (B) - (X) - Y - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r
 o - G l n - A s p - V a l - L y s - P h e - P r o - G l y - G l y - G l y - G l
 n - I l e - V a l - G l y - Y - (X) - Z (I I I)
 (A) - (B) - (X) - Y - L e u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r
 g - L e u - G l y - V a l - A r g - A l a - T h r - A r g - L y s - T h r - S e
 r - G l u - A r g - S e r - Y - (X) - Z (I V) 30
 (A) - (B) - (X) - Y - V a l - G l y - G l y - V a l - T y r - L e u - L e
 u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r g - L e u - G l y - V a l - A r
 g - A l a - T h r - A r g - Y - (X) - Z (I V a)
 (A) - (B) - (X) - Y - T h r - A r g - L y s - T h r - S e r - G l u - A r
 g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l
 e - P r o - L y s - V a l - Y - (X) - Z (V)
 (A) - (B) - (X) - Y - A r g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r
 g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y s - V a l - A r g - A r g - P r
 o - G l u - G l y - A r g - Y - (X) - Z (V a)
 (A) - (B) - (X) - Y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y 40
 s - V a l - A r g - A r g - P r o - G l u - G l y - A r g - T h r - T r p - A l
 a - G l n - P r o - G l y - Y - (X) - Z (V I)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - A r g - T h r - T r p - A l a - G l n - P r
 o - G l y - T y r - P r o - T r p - P r o - L e u - T y r - G l y - A s n - G l
 u - G l y - C y s - G l y - Y - (X) - Z (V I I)
 (A) - (B) - (X) - Y - M e t - S e r - T h r - I l e - P r o - G l n - A r
 g - L y s - T h r - L y s -
 A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - A s p - V a l -
 L y s - P h e - P r o - G l y - G l y - G l y - G l n - I l e - V a l - G l y -
 Y - (X) - Z (コア 1 2 3) 50

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Gly - Val - Tyr - Leu - Leu - Pro
 o - Arg - Arg - Gly - Pro - Arg - Leu - Gly - Val - Arg - Ar
 g - Ala - Thr - Arg - Lys - Thr - Ser - Gly - Arg - Ser - Gl
 n - Pro - Arg - Gly - Arg - Arg - Gln - Pro - Ile - Pro - Ly
 s - Val - Arg - Arg - Y - (X) - Z (コア 7910)

(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Ser - Gly - Lys - Pro - Ala - Il
 e - Ile - Pro - Asp - Arg - Glu - Val - Leu - Tyr - Arg - Gl
 u - Phe - Asp - Glu - Y - (X) - Z (VIII)

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Ile - Pro - Asp - Arg - Glu - Va
 l - Leu - Tyr - Arg - Glu - Phe - Asp - Glu - Met - Glu - Gl 10
 u - Cys - Ser - Gln - Y - (X) - Z (IX)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Leu - Tyr - Arg - Glu - Phe - As
 p - Glu - Met - Glu - Glu - Cys - Ser - Gln - His - Leu - Pr
 o - Tyr - Ile - Glu - Y - (X) - Z (HCV3)

(A) - (B) - (X) - Y - Asp - Glu - Met - Glu - Glu - Cys - Se
 r - Gln - His - Leu - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Gly - Me
 t - Met - Leu - Ala - Y - (X) - Z (X)

(A) - (B) - (X) - Y - Ser - Gln - His - Leu - Pro - Tyr - Il
 e - Glu - Gln - Gly - Met - Met - Leu - Ala - Glu - Gln - Ph 20
 e - Lys - Gln - Lys - Y - (X) - Z (XI)

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Glu - Gln - Gly - Met - Met - Le
 u - Ala - Glu - Gln - Phe - Lys - Gln - Lys - Ala - Leu - Gl
 y - Leu - Leu - Gln - Y - (X) - Z (XII)

(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Ala - Glu - Gln - Phe - Lys - Gl
 n - Lys - Ala - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Thr - Ala - Se
 r - Arg - Gln - Ala - Y - (X) - Z (XIII)

(A) - (B) - (X) - Y - Gln - Lys - Ala - Leu - Gly - Leu - Le
 u - Gln - Thr - Ala - Ser - Arg - Gln - Ala - Glu - Val - Il
 e - Ala - Pro - Ala - Y - (X) - Z (XIV)

(A) - (B) - (X) - Y - Ser - Gen - His - Leu - Pro - Tyr - Il 30
 e - Glu - Gln - Glu - Met - Leu - Ala - Glu - Gen - Phe - Ly
 s - Gln - Lys - Ala - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Thr - Al
 a - Ser - Arg - Gln - Ala - Y - (X) - Z (NS4-27)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Glu - Gly - Ala - Val - Gln - Tr
 p - Met - Asn - Arg - Leu - Ile - Ala - Phe - Ala - Ser - Ar
 g - Gly - Asn - His - Y - (X) - Z (NS4-e)

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Asp - Glu - Arg - Glu - Ile - Se
 r - Val - Pro - Ala - Glu - Ile - Leu - Arg - Lys - Ser - Ar
 g - Arg - Phe - Ala - Y - (X) - Z (XV)

(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Arg - Lys - Ser - Arg - Arg - Ph 40
 e - Ala - Gln - Ala - Leu - Pro - Val - Trp - Ala - Arg - Pr
 o - Asp - Tyr - Asn - Y - (X) - Z (XVI)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Ty
 r - Asn - Pro - Pro - Leu - Val - Glu - Thr - Trp - Lys - Ly
 s - Pro - Asp - Tyr - Y - (X) - Z (XVII)

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Thr - Trp - Lys - Lys - Pro - As
 p - Tyr - Glu - Pro - Pro - Val - Val - His - Gly - Cys - Pr
 o - Leu - Pro - Pro - Y - (X) - Z (XVIII)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pr 50
 o - Pro - Pro - Lys - Ser - Pro - Pro - Val - Pro - Pro - Pr

o - A r g - L y s - L y s - Y - (X) - Z (X I X)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l u - A s p - G l u - A r g - G l u - I l e - S e
 r - V a l - P r o - A l a - G l u - I l e - L e u - A r g - L y s - S e r - A r
 g - L y s - S e r - A r g - A r g - P h e - A l a - G l n - A l a - L e u - P r
 o - V a l - T r p - A l a - A r g - P r o - A s p - T y r - A s p - T y r - A s
 n - Y - (X) - Z (N S 5 - 2 5 2 7)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - G l u - T h r - T y r - T h r - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - S e r - H i s - T h r - T h r - S e r - T h r - L e
 u - A l a - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - A r g - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (10
 X X a)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - G l u - T h r - T y r - T h r - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - S e r - H i s - T h r - T h r - S e r - T h r - L e
 u - A l a - S e r - L e u - P h e - S e r - Y - (X) - Z (X X a - 1)
 (A) - (B) - (X) - Y - S e r - H i s - T h r - T h r - S e r - T h r - L e
 u - A l a - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - A r g - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (20
 X X a - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - S e r - A l a - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (30
 X X b)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - Y - (X) - Z (X X b - 1)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - S e r - A l a - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (40
 X X b - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - T h r - G l
 y - G l y - V a l - G l n - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (50
 X X c)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - T h r - G l
 y - G l y - V a l - G l n - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - Y - (X) - Z (X X c - 1)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (40
 X X c - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A r g - V a l - A l a - S e r - S e r - T h r - G l n - S e r - L e
 u - V a l - S e r - T r p - L e u - S e r - G l n - G l y - P r o - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z (50
 X X d)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A r g - V a l - A l a - S e r - S e r - T h r - G l n - S e r - L e
 u - V a l - S e r - T r p - L e u - S e r - Y - (X) - Z (X X d - 1)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Ser - Ser - Thr - Gln - Ser - Leu - Val - Ser - Trp - Leu - Ser - Gln - Gly - Pro - Ser - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Val - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXd - 2)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Asp - Thr - His - Val - Thr - Gly - Gly - Ala - Gln - Ala - Lys - Thr - Thr - Asn - Arg - Leu - Val - Ser - Met - Phe - Ala - Ser - Gly - Pro - Ser - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXe)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Asp - Thr - His - Val - Thr - Gly - Gly - Ala - Gln - Ala - Lys - Thr - Thr - Asn - Arg - Leu - Val - Ser - Met - Phe - Ala - Y - (X) - Z (XXe - 1) 10

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Lys - Thr - Thr - Asn - Arg - Leu - Val - Ser - Met - Phe - Ala - Ser - Gly - Pro - Ser - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Ile - Agn - Thr - Y - (X) - Z (XXe - 2)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Asn - Ala - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Pro - Gly - Pro - Lys - Gln - Asn - Val - His - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXf) 20

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Asn - Ala - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Y - (X) - Z (XXf - 1)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Pro - Gly - Pro - Lys - Gln - Asn - Val - His - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXf - 2)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Ile - Val - Ser - Gly - Gly - Gln - Ala - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Pro - Gly - Ala - Lys - Gln - Asn - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXg) 30

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Ile - Val - Ser - Gly - Gly - Gln - Ala - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Y - (X) - Z (XXg - 1)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Pro - Gly - Ala - Lys - Gln - Asn - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXg - 2) 40

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Thr - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Arg - Gly - Ala - Lys - Gln - Asp - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z (XXh)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Thr - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Y - (X) - Z (XXh - 1)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Arg - Gly - Ala - Lys - Gln 50

n - A s p - I l e - G l n - L e u - I l e - A s n - T h r - Y - (X) - Z (X X h - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - G l n - T h r - H i s - T h r - V a l - G l y - G l y - S e r - T h r - A l a - H i s - A s n - A l a - A r g - T h r - L e u - T h r - G l y - M e t - P h e - S e r - L e u - G l y - A l a - A r g - G l n - L y s - I l e - G l n - L e u - I l e - A s n - T h r - Y - (X) - Z (X X / 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - G l n - T h r - H i s - T h r - V a l - G l y - G l y - S e r - T h r - A l a - H i s - A s n - A l a - A r g - T h r - L e u - T h r - G l y - M e t - P h e - S e r - Y - (X) - Z (X X / 2 - 1) 10
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - H i s - A s n - A l a - A r g - T h r - L e u - T h r - G l y - M e t - P h e - S e r - L e u - G l y - A l a - A r g - G l n - L y s - I l e - G l n - L e u - I l e - A s n - T h r - Y - (X) - Z (X X / 2 - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - V a l - A s n - G l n - A r g - A l a - V a l - V a l - A l a - P r o - A s p - L y s - G l u - V a l - L e u - T y r - G l u - A l a - P h e - A s p - G l u - Y - (X) - Z (V I I I - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - V a l - A l a - P r o - A s p - L y s - G l u - V a l - L e u - T y r - G l u - A l a - P h e - A s p - G l u - M e t - G l u - G l u - C y s - A l a - S e r - Y - (X) - Z (I X - 2) 20
 (A) - (B) - (X) - Y - A s p - G l u - M e t - G l u - G l u - C y s - A l a - S e r - A r g - A l a - A l a - L e u - I l e - G l u - G l u - G l y - G l n - A r g - I l e - A l a - Y - (X) - Z (X - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - S e r - A r g - A l a - A l a - L e u - I l e - G l u - G l u - G l y - G l n - A r g - I l e - A l a - G l u - M e t - L e u - L y s - S e r - L y s - Y - (X) - Z (X I - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - I l e - G l u - G l u - G l y - G l n - A r g - I l e - A l a - G l u - M e t - L e u - L y s - S e r - L y s - I l e - G l n - G l y - L e u - L e u - G l n - Y - (X) - Z (X I I - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - I l e - A l a - G l u - M e t - L e u - L y s - S e r - L y s - I l e - G l n - G l y - L e u - L e u - G l n - G l y - L e u - L e u - G l n - A l a - S e r - L y s - G l n - A l a - Y - (X) - Z (X I I I - 2) 30
 (A) - (B) - (X) - Y - S e r - L y s - I l e - G l n - G l y - L e u - L e u - G l n - G l n - A l a - S e r - L y s - G l n - A l a - Y - (X) - Z (X I V - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - A r g - S e r - A s p - L e u - G l u - P r o - S e r - I l e - P r o - S e r - G l u - T y r - M e t - L e u - P r o - L y s - L y s - A r g - P h e - P r o - (X) - Y - Z (X V - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - M e t - L e u - P r o - L y s - L y s - A r g - P h e - P r o - P r o - A l a - L e u - P r o - A l a - T r p - A l a - A r g - P r o - A s p - T y r - A s n - Y - (X) - Z (X V I - 2) 40
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - T r p - A l a - A r g - P r o - A s p - T y r - A s n - P r o - P r o - L e u - V a l - G l u - S e r - T r p - L y s - A r g - P r o - A s p - T y r - Y - (X) - Z (X V I I - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l u - S e r - T r p - L y s - A r g - P r o - A s p - T y r - G l n - P r o - A l a - T h r - V a l - A l a - G l y - C y s - A l a - L e u - P r o - P r o - Y - (X) - Z (X V I I I - 2)
 (A) - (B) - (X) - Y - V a l - A l a - G l y - C y s - A l a - L e u - P r o - P r o - P r o - L y s - L y s - T h r - P r o - T h r - P r o - P r o - P r o - A r g - A r g - A r g - Y - (X) - Z (X I X - 2) 50

から成るグループの中から選択される1アミノ酸配列を有する少なくとも1つのペプチド；

又はGly及び/又はSer残基によって分離されるHCVコア(表9)、HCV NS4(表10)又はHCV NS5(表11)領域のコアエピトープの組合せから成るハイブリッドHCVペプチド配列、

そして好ましくは以下のハイブリッドHCV配列：

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Pro - Asp - Arg - Glu - Val - Leu - Tyr - Arg - Gly - Gly - Lys - Lys - Pro - Asp - Tyr - Glu - Pro - Pro - Val - Gly - Gly - Arg - Arg - Pro - Gln - Asp - Val - Lys - Phe - Pro - Y - (X) - Z (Epi - 152) 10

(A) - (B) - (X) - Y - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Pro - Pro - Gly - Gly - Gln - Phe - Lys - Gln - Lys - Ala - Leu - Gly - Leu - Gly - Ser - Gly - Val - Tyr - Leu - Leu - Pro - Arg - Arg - Gly - Y - (X) - Z (Epi - 33B3A)

(A) - (B) - (X) - Y - Arg - Gly - Arg - Arg - Gln - Pro - Ile - Pro - Lys - Gly - Gly - Ser - Gln - His - Leu - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ser - Gly - Pro - Val - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pro - Y - (X) - Z (Epi - 4B2A6)

；又は上述の免疫学的に重要な領域のいずれかから誘導され、天然の分離株に見られる全てのアミノ酸を各位置に含むペプチドから成るビオチニル化された合成配列(図14参照)、 20

を含み、A、B、X、Y及びZが請求の範囲第3項に記載のとおりである、ペプチド組成物。

【請求項5】

A. II、III、IVa、Va、IX、XI、XIII、XV、XVI、XVII、1a.3、1a.4、1a.b、1b.1a、2b、2d、

B. II、III、IVa、Va、IX、IX-2、XI、XI-2、XIII、XIII-2、XV、XV-2、XVI、XVI-2、XVII、XVII-2、1a.3、1a.4、1a.b、1b.1a、2b、2d

から選択されるビオチニル化されたペプチドの組合せから成る、請求の範囲第4項に記載のペプチド組成物。 30

【請求項6】

1a.3、1a.4、1b.1、2b、2c、2d、I-gp46-3、I-gp46-4、I-gp46-5、I-gp46-6、II-gp52-2、II-gp52-3、I-p21-2、I-p19、II-p19を含むビオチニル化されたペプチドの組合せから成る、請求の範囲第4項に記載のペプチド組成物。

【請求項7】

1a.3、1a.4、1a.6、1b.1a、2d、II、III、IVa、Va、IX、XI、XIII、XV、XVI、XVII、XXa-2、XXc-2、XXg-2、XXh-2、I-gp46-3、I-gp46-4、I-gp46-5、I-gp46-6、II-gp52-3、I-p21-2、I-p19、II-p19を含むビオチニル化されたペプチドの組合せから成る、請求の範囲第4項に記載のペプチド組成物。 40

【請求項8】

HCVを検出するか又はHCVに対して免疫するための請求の範囲第4項に記載のペプチド組成物であって、以下のグループ：

A. I、III、IVa、Va、

B. II、III、IVa、Va、

C. IX、XI、XIII、

D. XV、XVI、XVII、XIX、

E. XXc-2、XXa-1、XXa-2、XXh-1、XXh-2、 50

X X g - 2、X X / 2 - 2、
 F . I X - 2、X I - 2、X I I I - 2、
 G . X V - 2、X V I - 2、X V I I I - 2、X I X - 2、
 H . I X、I X - 2、X I、X I - 2、X I I I、X I I I - 2、
 I . X V、X V - 2、X V I、X V I - 2、X V I I I、X V I I I - 2、X I X、X I
 X - 2、
 J . I I、I I I、I V a、V a、I X、I X - 2、X I、X I - 2、X I I I、X I I
 I - 2、X V、
 X V - 2、X V I、X V I - 2、X V I I I、X V I I I - 2、
 K . I I、I I I、I V a、V a、I X、X I、X I I I、X V、X V I、X V I I I、 10
 L . I I、I I I、I V、V、I X、X I、X I I I、X V、X V I、X V I I I、
 M . I I、I I I、I V a、V a、I X、X I、X I I I、X V、X V I、X V I I I、
 X X a - 2、
 X X c - 2、X X g - 2、X X h - 2、
 N . E p i - 1 5 2、E p i - 3 3 B 3 A、E p i - 4 B 2 A 6 から選択されたアミノ酸
 配列を有するペプチドを含む組成物。

【請求項 9】

H I V を検出するか又は H I V に対して免疫するための請求の範囲第 4 項に記載のペプチド組成物であって、

1 型については： 20

A . 1 a . 3、1 a . 4、1 a . 5、1 a . b
 B . 1 a . 3、1 a . 4、1 b . 1、1 b . 3、1 b . 6、1 b . 1 0、
 C . 1 b . 1、1 b . 2、1 b . 3、1 b . 4、1 b . 5、1 b . 6、
 1 b . 7、1 b . 8、1 b . 9、1 b . 1 0
 D . 1 b . 1、1 b . 2、1 b . 3、1 b . 4、1 b . 6、1 b . 1 0、
 E . 1 a . 3、1 a . 4、1 a . 5、1 a . b、1 b . 1 a

2 型については：

A . 2 b、2 c、2 d、2 e

1 型及び 2 型については：

A . 1 a . 3、1 a . 4、1 b . 1、2 b、2 c、2 d、 30
 B . 1 a . 3、1 a . 4、1 b . 1 a、2 b、2 d

から成るグループの中から選択されたアミノ酸配列を有するペプチドを含む組成物。

【請求項 10】

H T L V を検出するか又は H T L V に対して免疫するための請求の範囲第 4 項に記載のペプチド組成物であって、

ヒト T リンパ球栄養性ウイルス I 型については：

ペプチド I - g p 4 6 - 3、I - g p 4 6 - 4、I - g p 4 6 - 5、I - g p 4 6 - 6、
 I - p 2 1 - 2、I - p 1 9

ヒト T リンパ球栄養性ウイルス II 型については：

ペプチド II - g p 5 2 - 1、II - g p 5 2 - 2、II - g p 5 2 - 3、I - g p 4 6 40
 - 4、II - p 1 9、I - p 2 1 - 2、

ヒトリンパ球栄養性ウイルス I 型及び II 型については：

ペプチド I - g p 4 6 - 3、I - g p 4 6 - 4、I - g p 4 6 - 5、I - g p 4 6 - 6、
 II - g p 5 2 - 1、II - g p 5 2 - 2、II - g p 5 2 - 3、I - p 2 1 - 2、I -
 p 1 9、II - p 1 9 から成るグループの中から選択されたアミノ酸配列を有するペプチドを含む組成物。

【請求項 11】

免疫検定手順において請求の範囲第 4 項～第 10 項のいずれか 1 項に記載のペプチド組成物を用いることによって、H C V、及び/又は H I V、及び/又は H T L V - I もしくは I I に対する抗体をインビトロ決定するための方法であって、使用されるビオチニル化さ 50

れたペプチドが、ストレプトアビジン - ビオチニル化ペプチド又はアビジン - ビオチニル化ペプチドの複合体の形態であることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

免疫検定手順において請求の範囲第 4 項、5 項、6 項、7 項又は 9 項に記載のペプチド組成物を用いることによって、H I V に対する抗体のインビトロ決定又は H I V 感染の診断を行なうための方法であって、使用されるビオチニル化されたペプチドが、ストレプトアビジン - ビオチニル化ペプチド又はアビジン - ビオチニル化ペプチドの複合体の形態であることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

免疫検定手順において請求の範囲第 4 項、5 項、6 項、7 項又は 8 項に記載のペプチド組成物を用いることによって、H C V に対する抗体のインビトロ決定又は H C V 感染の診断を行なうための方法であって、使用されるビオチニル化されたペプチドが、ストレプトアビジン - ビオチニル化ペプチド又はアビジン - ビオチニル化ペプチドの複合体の形態であることを特徴とする方法。

10

【請求項 1 4】

免疫検定手順において請求の範囲第 4 項、5 項、6 項、7 項又は 1 0 項に記載のペプチド組成物を用いることによって、H T L V - I もしくは I I に対する抗体のインビトロ決定又は H T L V - I もしくは I I の感染の診断を行なうための方法であって、使用されるビオチニル化されたペプチドが、ストレプトアビジン - ビオチニル化ペプチド又はアビジン - ビオチニル化ペプチドの複合体の形態であることを特徴とする方法。

20

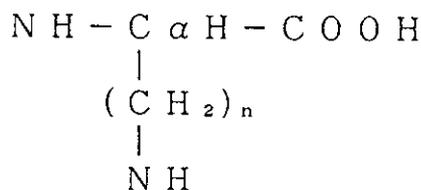
【請求項 1 5】

H I V、及び / 又は H C V、及び / 又は H T L V - I もしくは I I による感染に対して免疫するための、請求の範囲第 4 項 ~ 第 1 0 項のいずれか 1 項に記載のペプチド組成物の用途。

【請求項 1 6】

請求の範囲第 4 項 ~ 第 1 0 項のいずれか 1 項に記載のビオチニル化されたペプチドを得るための方法であって、中間生成物として N - - F m o c - X (N - y - ビオチン) 又は N - - F m o c - X (N - y - ビオチン) 誘導体を使用され、ここで X は、

【化 1】



30

を表わし、n は、1 以上 1 0 未満、好ましくは 3 ~ 6 の間であり、C 原子に 1 つのアミノ基が付着している一方、その他のアミノ基は側鎖中で最も遠くの炭素である炭素 C y に付着しているか；又はアルコール R O H を用いて得られるそのエステル、より特定的にはペンタフルオロフェニルエステルであり；

40

- y は、ラジカル内で C O O H 基を担持する炭素原子との関係に おける y の位置を表わす方法。

【請求項 1 7】

N - - F m o c - X (N - y - ビオチン) が、N - - F m o c - L y s (N - - ビオチン) 又は N - - F m o c - オルニチニル (N - - ビオチン) である、請求の範囲第 6 項に記載の方法。

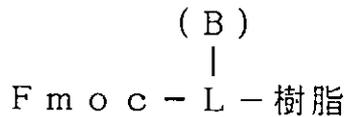
【請求項 1 8】

カルボキシ末端ビオチニル化ペプチドを調製するための方法において、以下の工程：

- 樹脂に付着した開裂可能なリンカーに対してカルボキシ活性化形態の上述の中間生成物をカップリングし、例えば以下の化合物：

50

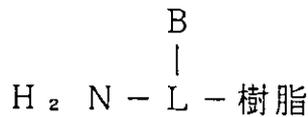
【化 2】



を得る工程；

- 例えばピペリジンを用いて、中間化合物の アミノ基を脱保護して、

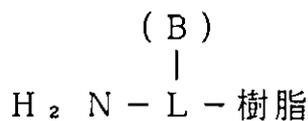
【化 3】



10

を得る工程；

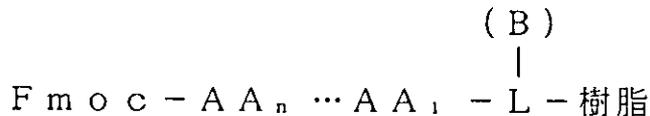
【化 4】



20

上に適切に保護された次に続くアミノ酸 $\text{AA}_1 \dots \text{AA}_n$ を連続的に付加して、

【化 5】

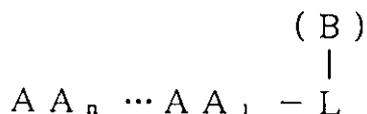


を得る工程；

- 例えばピペリジンを用いて、 NH_2 - 末端を脱保護する工程；
- 得られた化合物を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのカルボキシ末端でビオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及び開裂工程が同時又は別々に行なわれる可能性もあり、特に、例えばピペリジンを用いて、 NH_2 - 末端を脱保護する工程；
- エタンジチオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャーの存在下で、例えばトリフルオロ酢酸などを用いて樹脂から開裂させる工程；
- 酸及びスカベンジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出する工程；
- HPLCなどを用いて精製して、

30

【化 6】



40

を得る工程、

を含むことを特徴とする方法。

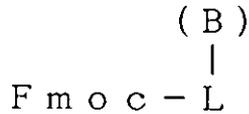
【請求項 19】

N末端ビオチニル化ペプチドを調製するための方法において、以下の工程：

50

- 適切に保護された連続したアミノ酸を樹脂に付加して、
Fmoc-AA₁...AA_n-樹脂
を得る工程；
- 例えばピペリジンを用いて、NH₂-末端を脱保護する工程；
- 中間生成物：

【化7】



10

を、そのCOOHを通してNH₂-末端に付加して、

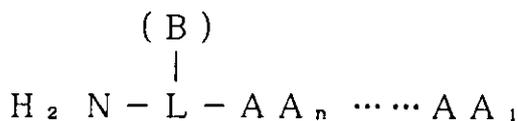
【化8】



を得る工程；

- 得られた化合物のNH₂-末端基を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのアミノ末端で
ピオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及びペプチド開裂工
程が同時又は別々に行なわれる可能性もあり、特に、例えばピペリジンを用いて、
中間基のNH-末端基を脱保護する工程；
- エタンジオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャーの存在下で
、例えばトリフルオロ酢酸などの酸を用いて樹脂から開裂させる工程； - 酸及びスカベン
ジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出す
る工程；
- HPLCなどを用いて精製して、

【化9】



30

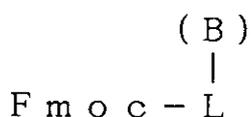
を得る工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】

内部的にピオチニル化されたペプチドを調製するための方法において、以下の工程：

- 適切に保護された連続したアミノ酸を樹脂に付加して、
Fmoc-AA_n...AA₁-樹脂
を得る工程、
- NH₂-末端を脱保護する工程、
- 中間生成物：

【化10】



を、そのCOOHを通してNH₂-末端に付加して、

40

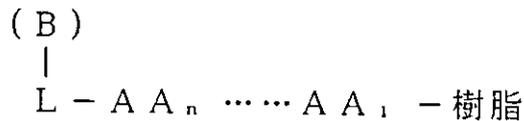
【化 1 1】



を得る工程、

- 例えばピペリジンを用いて、中間化合物の アミノ基を脱保護して、

【化 1 2】

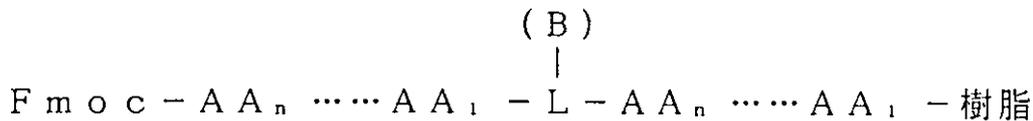


10

を得る工程、

- 適切に保護された次に続くアミノ酸を樹脂に付加して、

【化 1 3】



20

を得る工程、

- 得られた化合物の NH_2 末端基を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのアミノ末端でピオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及び開裂工程が同時又は別々に行なわれる可能性もあり、特に、例えばピペリジンを用いて、ペプチドの NH_2 末端基を脱保護する工程；

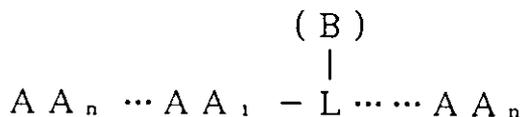
- エタンジチオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャーの存在下で、例えばトリフルオロ酢酸などを用いて樹脂から開裂させる工程；

30

- 酸及びスカベンジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出する工程；

- HPLC などを用いて精製して、

【化 1 4】



を得る工程を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 2 1】

式：

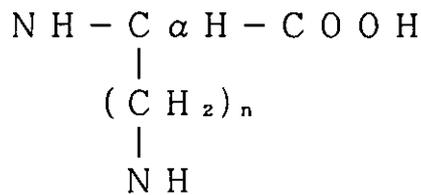
N - - Fmoc - X (N - y - ビオチン)

又は N - - Fmoc - X (N - y - ビオチン)

で示される化合物であって、

X は、

【化 1 5】



を表わし、 n は、1以上10未満、好ましくは3～6の間であり、1つのアミノ基がC原子に付着している一方、その他のアミノ基は側鎖中で最も遠くの炭素である炭素Cyに付着しているか；又は、アルコールROHを用いて得られるそのエステル、より特定的にはペンタフルオロフェニルエステルであり；

- y は、ラジカル内でCOOH基を担持する炭素原子との関係における y の位置を表す化合物、

【請求項 2 2】

請求の範囲第 2 1 項に記載の化合物を調製するための方法において、以下の工程：

- 前述のジアミノ - 、モノカルボキシル酸を、入念に制御されたpH条件下でフルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート又はフルオレニルメチルクロホルメートと反応させて、単独で保護されたN - - Fmoc誘導体を得る工程、
 - 又は代替的には、アミノ基を保護するために使用されたFmoc基とは異なる保護基を側鎖アミノ基が有している場合、側鎖アミノ基の保護はN - - Fmoc基を無傷状態に残す条件下で選択的に除去されやすいことから、市販のN - - Fmocで保護されたジアミノ - モノカルボキシル酸を使用する工程、
 - 選択的抽出及びクロマトグラフィにより、モノ保護N - - Fmoc - ジアミノ - モノカルボキシル酸誘導体を精製する工程；
 - N - ヒドロキシスクシンイミドピオチンのようなピオチンのカルボキシ活性化誘導体と、得られた誘導体とを反応させ、望ましい中間生成物である(N - - Fmoc) - (N - y - ピオチン)誘導体を得る工程、
 - 選択的抽出、沈殿又はクロマトグラフィにより中間生成物を精製する工程、
- を含むことを特徴とする方法。

【表 1】

表 1 : ビオチニル化及び非ビオチニル化 HIV-1 及び HIV-2 ペプチドの抗体認識

血清		TM-HIV-1	TM-HIV-1 Bio	TM-HIV-2	TM-HIV-2 Bio
HIV-1 陽性	0724	0.174	2.570	0.000	0.000
	mm	0.051	2.579	0.000	0.000
	YEMO	0.162	2.357	0.000	0.000
	PL	0.000	1.559	0.000	0.000
	VE	0.052	2.551	0.000	0.000
HIV-2 陽性	1400	0.000	0.000	0.000	1.982
	AG	0.000	0.000	0.000	2.323
	5J-3	0.000	0.000	0.000	2.365
血清陰性ドナー	194	0.000	0.000	0.000	0.000
	195	0.000	0.000	0.000	0.000
	180	0.000	0.005	0.000	0.000
	204	0.000	0.001	0.000	0.000

10

20

30

40

【 表 2 】

表 2 : 分離株 H I V - 1 m n の V 3 配列からのヒオチニル化及び非ヒオチニル化ペプチドの
抗体認識の比較

試料アイデンティティ	V3-mn	V3-mn Bio
陰性対照	0.063	0.069
ブランク	0.053	0.051
YS	1.442	2.784
DV	1.314	2.881
VE	1.717	オ-ハ-70-*
OOST 6	1.025	2.855
OOST 8	1.389	オ-ハ-70-*
3990	1.442	オ-ハ-70-*
PL	0.531	2.351
MM	0.791	2.542
4436	0.388	2.268
4438	0.736	2.554
266	0.951	2.591
OOST 4	1.106	オ-ハ-70-*

* : 吸光度値が 3 0 0 0 を超える

10

20

30

【表 3】

表 3 : ストレプトアビジン及びアビジンに結合されたビオチニル化 V 3 mn ペプチドの
抗体認識の比較

血清	ストレプトアビジン	アビジン
YS	1.236	1.721
DV	1.041	1.748
PL	0.222	0.983
3990	1.391	1.854
VE	1.526	1.908
4456	0.596	1.519
Control	0.050	0.063

【表 4】

表 4 : ビオチニル化及び非ビオチニル化 H C V ペプチドの抗体認識の比較

表 4 A
H C V ペプチド XI に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド XI	ペプチド XI
2	0.090	1.971
3	0.443	2.086
4	0.473	1.976
6	0.053	0.518
8	1.275	2.624
10	0.764	2.321
11	0.569	2.378
23	0.775	2.503
31	0.497	2.104
77	0.093	0.159
33	0.832	1.857
49	0.515	2.180
陰性血清	0.053	0.095

10

20

30

【表 5】

表 4 B : H C V ペプチド XVI に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド XVI	ペプチド XVI
1	1.038	2.435
2	0.616	1.239
6	0.100	1.595
8	0.329	1.599
10	1.033	2.847
26	0.053	1.522
83	0.912	2.221
88	1.187	2.519
89	0.495	1.530
91	0.197	2.169
95	0.109	1.484
99	0.814	2.045
100	0.474	1.637
104	0.205	0.942
105	0.313	2.186
110	0.762	1.484
111	0.193	1.465
112	0.253	1.084
113	0.833	2.535
116	0.058	1.918
120	0.964	2.332
11476	0.068	2.197
24758	0.071	0.062
266	0.712	2.262
8247	0.059	0.618
陰性血清	0.063	0.067

10

20

30

【表 6】

表 4 C : H C V ペプチド II に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド II	ペプチド II
8241	0.444	0.545
8242	1.682	2.415
8243	2.181	2.306
8247	1.518	1.975
8250	0.110	0.357
8271	0.912	1.284
8273	2.468	2.769
8274	2.700	2.943
8275	1.489	2.030
8276	2.133	2.348
8277	1.771	2.572
8278	1.907	2.022
陰性血清	0.047	0.070

10

20

【表 7】

表 4 D
H C V ペプチド III に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド III	ペプチド III
8241	1.219	2.066
8242	1.976	2.197
8243	1.859	2.368
8247	1.072	2.398
8248	2.742	2.918
8250	2.471	2.626
8271	1.471	2.066
8272	2.471	2.638
8273	1.543	2.697
8274	2.503	2.905
8275	1.595	2.640
8276	1.976	2.674
8277	0.735	2.327
陰性血清	0.050	0.06

30

40

【表 8】

表 4 E
H C V ペプチド V に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド V	ペプチド V
8272	0.589	1.220
8273	0.294	1.026
8274	1.820	2.662
8275	1.728	1.724
8276	2.194	2.616
8277	0.770	1.796
8278	1.391	1.746
8284	0.040	0.757
陰性血清	0.047	0.070

10

【表 9】

表 4 F
H C V ペプチド IX に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド IX	ペプチド IX
8315	2.614	2.672
8316	0.133	0.367
8317	0.855	1.634
8318	1.965	2.431
8320	0.721	0.896
8321	0.283	0.457
8326	2.219	2.540
陰性血清	0.052	0.005

30

【表 10】

表 4 G
H C V ペプチド XVIII に対する抗体結合

血清	非ビオチニル化ペプチド XVIII	ペプチド XVIII
79	1.739	2.105
83	1.121	1.232
88	0.972	1.858
89	2.079	2.309
91	2.202	2.132
99	1.253	1.526
104	1.864	1.998
105	1.522	2.053
110	1.981	2.065
111	1.363	1.542
112	1.172	1.408
116	1.534	1.978
120	1.599	2.031
1	2.523	2.691
33	1.463	1.813
39	0.068	0.213
47	2.117	2.611
陰性血清	0.001	0.001

10

20

30

【表 1 1】

表 5

ペプチド濃度		3.0		1.0		0.3		0.1		0.03		0.01	
コーティング方法		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
非ビオチニル化H C V ペプチド II 及び H C V ペプチド II													
陽性試料													
8320	2.718	2.278	2.684	2.163	2.684	2.004	2.718	1.828	2.757	1.272	2.519	0.479	0.479
8242	1.427	0.539	1.368	0.408	1.365	0.234	1.399	0.058	1.481	0.048	1.176	0.051	0.051
8243	1.668	1.341	1.652	1.221	1.608	0.831	1.639	0.181	1.597	0.057	1.088	0.056	0.056
8318	2.016	0.791	1.993	0.626	1.958	0.317	2.001	0.181	2.181	0.095	2.002	0.048	0.048
陰性試料													
1747	0.064	0.049	0.071	0.046	0.046	0.041	0.045	0.044	0.045	0.043	0.045	0.041	0.041
1781	0.057	0.053	0.055	0.053	0.051	0.045	0.047	0.046	0.049	0.053	0.053	0.046	0.046
非ビオチニル化H C V ペプチド IX 及び H C V ペプチド IX													
陽性試料													
8320	1.779	0.129	0.802	0.093	1.798	0.122	1.244	0.063	1.007	0.057	0.461	0.059	0.059
8326	2.284	0.084	2.271	0.068	2.271	0.078	2.281	0.068	2.193	0.051	1.812	0.049	0.049
8342	0.791	0.059	0.777	0.052	0.795	0.048	0.911	0.046	0.496	0.047	0.215	0.049	0.049
8243	1.939	0.063	1.953	0.053	1.892	0.051	1.834	0.051	1.421	0.051	0.639	0.054	0.054
陰性試料													
1747	0.051	0.046	0.049	0.046	0.046	0.044	0.042	0.045	0.044	0.045	0.043	0.045	0.045
1781	0.053	0.053	0.051	0.052	0.051	0.051	0.047	0.052	0.048	0.049	0.049	0.051	0.051
非ビオチニル化H C V ペプチド XⅧ 及び H C V ペプチド XⅧ													
陽性試料													
8326	2.315	0.052	2.331	0.053	2.331	0.053	2.331	0.047	2.219	0.051	1.848	0.051	0.051
8242	0.749	0.053	0.839	0.049	0.873	0.048	0.946	0.047	1.188	0.049	1.185	0.048	0.048
8243	0.671	0.057	0.627	0.053	0.629	0.054	0.661	0.051	0.611	0.053	0.462	0.053	0.053
8318	2.391	0.051	2.396	0.045	2.392	0.047	2.409	0.047	2.308	0.047	1.711	0.048	0.048
陰性試料													
1747	0.047	0.048	0.042	0.043	0.061	0.046	0.044	0.045	0.058	0.044	0.042	0.047	0.047
1781	0.053	0.055	0.048	0.054	0.048	0.051	0.048	0.051	0.051	0.051	0.045	0.053	0.053

・ 1 ミリリットルあたりのマイクログラムで示す

・ 1. ストレプトアビジンコーティングの施されたプレート上のビオチニル化ペプチド

2. 直接コーティングされた非ビオチニル化ペプチド

【表 1 2】

表 6 : N-及びC-末端ビオチニル化TM-HIV-1ペプチドの比較

	血清	TM-HIV-1 C末端ビオチン	TM-HIV-1 N末端ビオチン
H I V陽性	VE	2.079	2.240
	OOST 6	1.992	2.003
	MM	2.097	2.308
	0724	2.322	2.291
	DV	0.903	1.579
	PL	1.893	1.849
	2049	1.780	2.058
	3990	1.959	1.870
	4438	1.622	1.697
	4436	2.190	2.110
	OOST 7	1.728	2.027
	OOST 8	2.117	2.237
	OOST 9	2.119	2.222
	VCM	2.131	2.263
	1164	1.865	1.919
	1252	2.244	2.356
0369:87	2.059	2.042	
血清陰性血液ドナー	1784	0.000	0.000
	1747	0.000	0.000
	1733	0.014	0.000

10

20

30

【表 1 3】

表 7

H C V 抗体 陽 性 血 清	H C V ペ プ チ ド I (直接コーティング)	H C V ペ プ チ ド I カルボキシ-ビオチニル化 (ストレプトアビジンでコーティング されたウェルに結合)
8316	2.394	2.541
8318	2.385	2.404
8320	2.760	2.762
8326	0.525	1.775
8329	2.633	2.672
8333	2.143	2.545
8334	2.271	2.549
8336	1.558	2.016
8344	1.878	2.010
8248	2.042	2.493
8244	0.077	1.399
8243	2.211	2.541
8242	1.367	2.389
8364	2.705	2.705
8374	1.070	2.151
8378	2.161	2.531
8330	1.985	2.651
8387	1.427	2.628
H C V 抗体 陰 性 血 清		
F88	0.000	0.026
F89	0.017	0.001
F76	0.000	0.022
F136	0.006	0.002
F8	0.000	0.000

10

20

30

【表 1 4】

表 8 : 抗体検出のためのビオチニル化ペブプロドの混合物の使用

血清	1H-11V-1-010 アビジン	1H-11V-2-010 アビジン	V3-001-010 アビジン	HCVv77F II -B10 アビジン	HCVv77F IX -B10 アビジン	HCVv77F X -B10 アビジン	混合物A アビジン	混合物B アビジン	混合物A 接合 コート	混合物B 接合 コート
11CV	8243 0.108	0.109	0.114	1.430	1.213	0.118	1.590	1.638	0.542	0.184
	8247 0.042	0.048	0.052	1.356	0.756	0.046	0.840	1.149	0.049	0.049
	8248 0.043	0.046	0.048	2.287	0.047	0.045	1.859	2.154	0.407	0.31
	8269 0.053	0.049	0.056	1.213	0.051	1.513	0.923	1.268	0.078	0.067
	8290 0.045	0.047	0.050	0.060	0.048	2.323	1.210	1.761	0.559	0.717
	8278 0.046	0.045	0.053	1.878	0.074	0.052	1.806	1.944	0.540	0.152
	8273 0.053	0.050	0.056	2.017	0.053	0.052	2.037	2.113	0.773	0.185
	8285 0.134	0.163	0.143	1.592	0.270	0.146	1.746	1.822	0.908	0.401
	8291 0.048	0.050	0.053	1.539	0.052	0.049	1.591	1.809	0.335	0.048
11V-2	AG 0.054	2.065	0.068	0.081	0.064	0.058	1.833	1.880	0.054	0.056
	1400 0.051	1.781	0.055	0.121	0.052	1.362	1.692	2.031	0.214	0.326
11V-1	YS 0.046	0.046	2.201	0.048	0.049	0.049	2.045	1.845	0.200	0.052
	PL 1.974	0.051	1.321	0.052	0.056	0.052	1.587	1.776	0.052	0.055
	DV 1.329	0.048	2.340	0.047	0.049	0.047	1.969	1.742	0.100	0.049
	3990 1.602	0.054	2.319	0.054	0.066	0.056	2.217	1.926	0.390	0.31
血液	1785 0.046	0.047	0.048	0.045	0.050	0.047	0.047	0.049	0.045	0.049
ドナー	1794 0.124	0.090	0.091	0.153	0.098	0.104	0.152	0.161	0.050	0.058
	1781 0.044	0.046	0.046	0.045	0.050	0.047	0.047	0.047	0.045	0.048
	1782 0.052	0.057	0.059	0.057	0.062	0.053	0.057	0.059	0.049	0.056

10

20

30

40

【表 15】

表9：HCVコアタンパク質のコアエピトープの配列

HCVコアタンパク質アミノ酸1-90
コアエピトープの位置

エピトープ 1A:	<pre> I P K P O R K T K R P K P O R K T K R K P O R K T K R R H P O R K T K R N T </pre>	<pre> M S T I P K P O R K T K R N T N R R P O P O R K T K R N T N R R P O D V K F P G </pre>	<p>27 1</p> <p>27 2</p>
エピトープ 1B:	<pre> O P K T K R N T N K T K R N T N R K T K R N T K R R </pre>	<pre> M S T I P K P O R K T K R N T N R R P O P O R K T K R N T N R R P O D V K F P G </pre>	<p>27 1</p> <p>27 2</p>
エピトープ 2:	<pre> R F P O D V K F P P O D V K F P G P O D V K F P C C </pre>	<pre> P O R K T K R N T N R R P O D V K F P G R N T N R R P O D V K F P G C C C O I V G </pre>	<p>27 2</p> <p>27 3</p>
エピトープ 2A:	<pre> C G V T L L P R R G V T L L P R R G V T L L P R R C P T L L P R R C P R </pre>	<pre> P G C C O I V C G Y L L P R R C P R L </pre>	<p>27 5</p>
エピトープ 2B:	<pre> L L P R R C P R L L P R R C P R L G P R R C P R L G Y </pre>	<pre> P G C C O I V C G Y L L P R R C P R L L P R R C P R L C Y R A T R K T S E R S </pre>	<p>27 5</p> <p>27 7</p>
エピトープ 3:	<pre> G F R L C Y R A T F R L C Y R A T R R L C Y R A T R K </pre>	<pre> L P R R C P R L C Y R A T R K T S E R S </pre>	<p>27 7</p>
エピトープ 4A:	<pre> E E S O P R G R R R S O P R G R R O S O P R G R R O P </pre>	<pre> T R K T S E R S O P R G R R O P I P K Y </pre>	<p>27 8</p>
エピトープ 4B:	<pre> R C R R O P I P K C R R O P I P K Y R R O P I P K Y R </pre>	<pre> T R K T S E R S O P R G R R O P I P K Y R R R P E C R T W A O P G </pre>	<p>27 9</p> <p>27 11</p>
エピトープ 5A:	<pre> P E G R T W A O P E C R T W A O P G C R T W A O P C T R T W A O P C T P </pre>	<pre> R R O P I P K Y R R P E C R T W A O P G C R T W A O P C T P W P L T C N E G C C </pre>	<p>27 11</p> <p>27 13</p>
エピトープ 5B:	<pre> A O P C T P W P L O P C T P W P L T </pre>	<pre> C R T W A O P C T P W P L T C N E G C C </pre>	<p>27 13</p>

10

20

30

表10: HCV NS4タンパク質のコアエヒトープの配列

HCV NS4タンパク質
コアエヒトープの位置

IEH-711	<pre> A I I P D R C V L I I I P D R E V L I T I I P D R E V L I T R P D R E V L I T R E </pre>	<pre> L S G K P A I I P D R E V L I T R E F D E I I P D R E V L I T R E F D E M E E C S D </pre>	HCV1 HCV2
IEH-724	<pre> C S C K L P T I L L S G H L P T I L L D G H L P T I L L D G I I P V I L F I O G M </pre>	<pre> V L Y T R E F D E M E E C S O H L P Y I F D E M E E C S O H L P Y I F O G M M L A S O H L P Y I F O G M M L A E E G F K K K </pre>	HCV3 HCV4 HCV5
IEH-728 747	<pre> P T I E C G M M L V I E C G M M L A </pre>	<pre> D E M E E C S O H L P Y I F O G M M L A S O H L P Y I F O G M M L A E O F K K K </pre>	HCV4 HCV5
IEH-734	<pre> V L I E G F K G K A L I E G F K O K I A I E G F V G F A L </pre>	<pre> S O H L P T I E C G M M L A E O F K K K I E C G M M L A E G F V G F A L G L I O L I E G F K G F A L G L I C T A S R O A </pre>	HCV5 HCV6 HCV7
IEH-738	<pre> E G F K G K A L C G F K O K A L C R F K O K A L C L L V O K A L C L L O </pre>	<pre> I E O G M M L A E O F K O K A L G L I O L A E O F K G F A L G L I O T A S R O A </pre>	HCV6 HCV7
IEH-741	<pre> K A L G L L O T A A L G L L O T A S L G L L O T A S R </pre>	<pre> L A E O F K O K A L G L I G T I S R O A O K A L G L I G T I S R O A E V I A P A </pre>	HCV7 HCV8

10

20

30

【表 17】

表 11 : HCV NS5 タンパク質のコアエビトープの配列
HCV NS5 タンパク質
コアエビトープの位置

IEI-1A	SVPAEILLRK VPAEILLRK	EDEREI <u>SVPALILPVSRRTA</u>	NS5-25
IEI-1B	PAEILLRKSR AEILLRKSR EILLRKSRF	EDEREI <u>SVPALILPVSRRTA</u>	NS5-25
IEI-1C	FALGALPVWA LQALPVWA CALPVWAIRP	LRRSERF <u>ALILPVVLEFPDYN</u>	NS5-27
IEI-1D	WAEIPDYNPF LEIPDYNPP EIPDYNPP DDYNPELVE	VWAE <u>EDYNPELVETWKKFDY</u>	NS5-29
IEI-1E 747-	FILVETWKP FILVETWKP LVEVWKP IPD	VWAE <u>PDYNPELVETWKKFDY</u>	NS5-29
IEI-1S	KKFIDTEFPV KFDTEFPV FDTEFPV DTEFPV DTEFPV DTEFPV VHG	ETWKK <u>PDYEFPPVVMGCCPLPP</u>	NS5-31
IEI-16	PPVVMGCCPLP PPVVMGCCPLP YVMGCCPLP VMGCCPLP VMGCCPLP PPPK	ETWKK <u>PDYTEFPVVMGCCPLPP</u> VMGCCPLPPPKSPPPPKK	NS5-31 NS5-33

表 12 : 10 個の供試血清によるさまざまなコア、NS4 及び NS5 ビオチニル化
20-mers の抗体結合

RUM	ペプチド ELISA (O.D.)									
	17-2	17-3	17-7	17-9	HCV-2	HCV-5	HCV-7	HSS-25	HSS-27	HSS-31
142	2.415	2.197	0.632	2.315	2.114	1.625	1.252	0.260	2.310	2.453
148	2.441	2.910	1.529	2.021	0.142	0.102	1.963	0.054	0.300	1.511
152	1.977	2.054	1.387	1.455	0.392	0.575	0.945	0.047	2.130	2.290
159	2.030	2.765	0.166	2.598	2.497	0.043	0.041	1.495	2.359	2.757
150	1.982	2.135	0.357	0.085	1.779	0.623	0.590	0.069	2.249	0.102
177	2.101	2.368	0.221	0.076	2.360	2.227	1.829	1.092	2.336	1.370
178	2.140	2.369	1.089	1.220	1.859	1.449	2.006	0.279	1.602	2.337
183	2.463	2.463	0.970	2.162	2.300	1.018	2.504	0.055	2.390	2.350
141	0.545	2.066	0.448	0.274	2.421	2.200	0.960	0.050	2.456	0.273
3	2.306	2.360	1.251	1.370	2.203	2.260	2.251	0.062	1.444	0.127

10

20

30

40

【表 19】

表 13 : 個々の E2 / NS1 ペプチドの抗体認識
(陽性反応を与える全ての血清の百分率)

CL14-A	7(51)	13.7%
B	36(51)	70.6%
KATO-A	2(51)	3.92%
B	26(51)	50.98%
HCH4-A	32(51)	62.74%
B	41(51)	80.39%
FRENCH-A	30(51)	58.8%
B	42(51)	82.35%
YEK-A	7(51)	13.72%
B	49(51)	96.07%
TAMI-A	12(51)	23.52%
B	36(51)	70.58%
18CH1-A	5(51)	9.8%
B	30(51)	58.82%
CHIR-A	32(51)	62.7%
B	40(51)	78.43%

10

20

【表 20】

表 14 : V3 ループレブチドの全体的認識

	CON	SC	MN	SF2	BH	RF	MAL	ELI	70
合計	287	261	275	258	108	146	140	24	6
SUM COUNT SP120 陽性	326	326	326	326	326	326	326	326	326
反応性 (%)	88	80	84	79	33	45	43	7	2
合計	287	261	275	258	108	146	140	24	6
SUM COUNT HIV-V3 陽性	307	307	307	307	307	307	307	307	307
反応性 (%)	93	85	90	84	35	48	46	8	2

10

20

30

【表 2 1】

表 1 5 : 地理的地域に応じたベブチアの認識

ヨーロッパ	%	アフリカ	%	ブラジル	%
コンセンサス	98	コンセンサス	89	コンセンサス	82
HIV-1 (SC)	98	HIV-1 (MN)	85	HIV-1 (MN)	78
HIV-1 (SF2)	98	HIV-1 (SF2)	79	HIV-1 (SC)	75
HIV-1 (MN)	97	HIV-1 (SC)	73	HIV-1 (SF2)	72
HIV-1 (RF)	75	HIV-1 (MAL)	60	HIV-1 (RF)	38
HIV-1 (MAL)	68	HIV-1 (RF)	34	HIV-1 (MAL)	30
HIV-1 (IIIB)	61	HIV-1 (IIIB)	27	HIV-1 (IIIB)	26
HIV-1 (ELI)	8	HIV-1 (ELI)	13	HIV-1 (ELI)	5
ANT 70	2	ANT 70	2	ANT 70	2

10

20

30

【表 2 2】

表 1 6 : H I V - 1 V 3 ループペプチド V 3 - c o n 及び V 3 - 3 6 8 に対する
ヨーロッパ産、アフリカ産及びブラジル産 H I V - 1 抗体陽性血清の認識

ヨーロッパ産血清

	V3-con	V3-368	V3con - V3-368
供試数	36	36	36
陽性数	33	4	33
陰性数	0	12	0
境界数	3	20	3
陽性 (%)	92	11	92
陰性 (%)	0	33	0
境界 (%)	8	56	8

10

アフリカ産血清

	V3-con	V3-368	V3con - V3-368
供試数	45	45	45
陽性数	40	5	40
陰性数	4	31	2
境界数	1	9	3
陽性 (%)	89	11	89
陰性 (%)	9	69	4
境界 (%)	2	20	7

20

30

ブラジル産血清

	V3-con	V3-368	V3con - V3-368
供試数	36	36	36
陽性数	30	16	35
陰性数	1	5	1
境界数	5	15	0
陽性 (%)	83.3	44.4	97.2
陰性 (%)	2.8	13.9	2.8
境界 (%)	13.9	41.7	0

40

【表 2 3】

表 1 7 : H I V - 2 の V 3 ループ領域からのペプチドに対する H I V - 2 陽性血清の認識

	V3-GB12	V3-239
供試数	21	21
陽性数	21	19
陰性数	0	0
境界数	0	2
陽性 (%)	100	90.5
陰性 (%)	0	0
境界 (%)	0	9.5

10

20

【表 2 4】

表 1 8 : ハイブリッドペプチドの抗体認識

くい違い

A.

血清	NS4 Iピト-71	NS5 Iピト-75	J7 Iピト-72	LIA Epi-i52
B241	-	-	-	- 弱
B242	-	-	-	-
B243	-	-	-	-
B246	-	-	-	-
B332	-	-	-	-
B339	-	-	-	-
B358	-	-	-	-
B377	-	-	-	-
B378	-	-	-	-
B383	-	-	-	-

10

B.

血清	NS3 Iピト-73	NS4 Iピト-73B	J7 Iピト-73A	LIA Epi-33334
B241	-	-	-	-
B242	-	-	-	-
B243	-	-	-	-
B246	-	-	-	-
B332	-	-	-	-
B339	-	-	-	-
B358	-	-	-	-
B377	-	-	-	-
B378	-	-	-	-
B383	-	-	-	-

20

C.

血清	J7 Iピト-74B	NS4 Iピト-72A	NS5 Iピト-76	LIA Epi-4E215
B241	-	-	-	-
B242	-	-	-	-
B243	-	-	-	-
B246	-	-	-	-
B332	-	-	-	- 弱
B339	-	-	-	-
B358	-	-	-	-
B377	-	-	-	-
B378	-	-	-	-
B383	-	-	-	-

30

?

-

40

【表 2 5】

表 1 9 : H T L V ペプチドの抗体認識

血清数	光学密度
1	0.302
2	3.001
3	0.644
4	1.262
6	3.001
7	2.623
9	2.607 (HTLV-I)
10	3.001
11	0.058 (陰性)
13	3.001
14	3.001
15	0.850
16	0.278
19	1.048
20	3.001
21	0.805
22	0.812
23	3.001
24	0.405
25	1.521

10

20

30

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明の基礎にある技術的問題は、細菌及びウイルス性タンパク質上の免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチド、及び診断用又は免疫原性組成物における該ペプチドの用途を提供することにある。

【0002】

【従来技術】

本発明の基礎にある技術的問題は、細菌及びウイルス性タンパク質上の免疫学的に重要な

50

エピトープに相当するペプチド、及び診断用又は免疫原性組成物における該ペプチドの用途を提供することにある。

【0003】

遺伝子工学ならびに固相ペプチド合成化学における最近の発達により、生化学及び免疫学において合成ペプチドが増々広く用いられるに至った。分子クローニング技術の結果として利用可能になったタンパク質配列を、構造、機能及び免疫学的研究のために化学的に大量に合成することが可能である。ウイルス及び細菌のタンパク質上に見られる免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドも同様に、抗体の検出及び感染の診断のために用いることができる、きわめて特異的な試薬であることが立証されてきた。

【0004】

合成ペプチドが提供する数多くの利点にもかかわらず、その使用に関連した欠点も多く存在する。その比較的短いサイズのため（一般に、長さがアミノ酸50個未満）、その構造は、全長タンパク質に存在する分子内相互作用の安定化の影響が無い状態で、数多くの異なるコンホメーションの間で変動しうる。その上、これらのペプチドの小さなサイズは、すなわち、その化学特性及び可溶性が往々にしてその全長タンパク質のものとかなり異なるものであり、ペプチドの全体的化学特性を決定するに向けてのペプチド配列内の個々のアミノ酸の貢献は、それに比例して大きくなるということを意味している。

【0005】

多くの免疫検定では、抗体検出のために用いられる抗原を固体支持体上に固定化することを必要としている。ほとんどの酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）は、固相としてポリスチレンを使用している。多くのタンパク質が固相に安定した形で吸着され得、抗体との次に続く相互作用のためにアクセス可能である配列を呈する。そのサイズが小さいため、固相に対するペプチドの直接的吸着は、往々にして数多くの理由のうちのいずれかのために不十分な結果を生み出す。

【0006】

第1に、ペプチドは、それが固相に結合できるようにする適正な全体的電荷又はアミノ酸組成を有しない可能性がある。第2に、固相への結合に必要とされるのと同じアミノ酸残基が抗体認識のためにも必要とされる可能性があり、従って抗体結合のためには利用できない。第3に、ペプチドは、固相への結合時点で不利なコンホメーションで固定された状態となり、かくして抗体分子にとって認識不可能となる可能性がある。数多くの場合において、これらの可能性を区別することは可能でもないし、また必要でもない。まず最初にペプチドを大きな担体分子に結合させることにより、固相に対する結合を増大させ、ペプチドの特異的化學特性に対する感受性を低くすることが可能である。標準的には、担体分子はタンパク質である。

【0007】

固相に結合するペプチドの量は、たとえ間接的にであれ、ある種のケースにおいてこの方法によって増大され得るが、このアプローチは、ペプチドと担体分子の間のリンケージには、往々にして抗体による認識にとってその完全性が必要不可欠である内部三官能性アミノ酸の側鎖が関与しているという事実で悩まされている。内部的に修飾されたペプチドに対する抗血清の結合活性は、往々にして非修飾ペプチド又は未変性タンパク質と比較してかなり減少している。

【0008】

合成ペプチドに対する抗血清の生成にもまた、大部分の場合において、ペプチドが担体にカップリングされることが必要である。ここでも又、ペプチドの内部三官能性アミノ酸と担体との間のカップリング反応は、ペプチドの免疫原性を変える可能性がある。

【0009】

カップリング反応を行なうには数多くの方法が存在し、現在使用されている手順の大部分が、Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. P., Muller, S., 及び Plaue, S.; 生化学及び分子生物学における実験

10

20

30

40

50

室技術、第19巻、抗原としての合成ポリペプチド、Elsevier Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1988年に詳述されている。これらの手順に加えて、未保護ペプチドは、同様にN-ヒドロキシスクシンイミドピオチン又はカプロン酸ピオチンアミドN-ヒドロキシスクシンイミドエステルのような市販の試薬を用いてピオチニル化することができる。これらの試薬の多くは、Billingsley, M.L., Pennypacker, K.R., Hoover, C.G.及びKincaid, R.L., Biotechniques (1987) 5 (1): 22-31に論述されている。ピオチニル化されたペプチドは、ピオチンに対して並外れて高い親和性結合を示す2つのタンパク質であるストレプトアビジン及びアビジンによって結合される能力をもつ。

10

【0010】

ある種の例においては、ピオチンを未保護のペプチドに又は未保護のペプチドを担体に、選択的にカップリングすることが可能である。このことは、カップリング反応に参加することのできる一方の端部に加えられた付加的な三官能性アミノ酸を有するペプチドを合成することによって達成できる。しかしながら、このアプローチは、このアミノ酸が問題の免疫原性配列内の重要な残基でないかぎりにおいて、そして選択されたカップリング剤が十分な選択性をもつかぎりにおいてのみ成功する。そのアミノ酸組成の如何に関わらず、未保護の全てのペプチドに適用可能な単一の技術は存在しない。

【0011】

非A非B型肝炎の原因である病因学的作用物質が同定され、C型肝炎ウイルス(HCV)と名付けられた。特許出願明細書EP-A-0 318 216は、このウイルスゲノムの約80%に相当する配列を開示している。これらの配列が利用可能になったことにより、残りのコーディング配列、特にゲノムの5'末端に位置するものが迅速に解明されるに至った(Okamoto; J. Exp. Med. 60, 167-177, 1990)。HCVゲノムは、約9,400ヌクレオチドの長さをもつ線状プラス鎖RNA分子である。末端におけるやや短い非翻訳領域を除いて、ゲノムは、約3,000アミノ酸のポリタンパク質をコードする、大きくしかも中断されていない1つのオープンリーディングフレームで構成されている。このポリタンパク質は、翻訳と同時に個々のウイルス構造領域及び非構造(NS)領域へと切断されることが立証されている。この構造タンパク質領域は、さらにカプシド(コア)及びエンベロープ(E1及びE2)タンパク質へと分割される。NS領域は、NS-1~NS-5の領域に分割される。

20

30

【0012】

数多くの個別の特許出願明細書が、診断上重要なアミノ酸配列の位置を決定するためにさまざまな戦略を利用してきており、多くのこれらの研究により、HCVポリタンパク質の類似の領域が同定されるに至った。

【0013】

NS4領域は、主としてEP-A-0 318 216、EP-A-0 442 394、US-5,106,726、EP-A-0 489 986、EP-A-0 484 787及びEP-A-0 445 801において検討されている。残念なことに、HCVに感染した患者の70%だけがNS4に対する抗体を産生し、この領域からの配列を含む合成又は組換え型のいずれのタンパク質も全ての感染した血清試料を同定するには適していない。ヌクレオカプシド又はコア領域については、特許出願明細書EP-A-0 442 394、US-5,106,726、EP-A-0 489 986、EP-A-0 445 801、EP-A-0 451 891及びEP-A-0 479 376において検討されている。往々にして混合物として用いられるこれらのペプチドは、NS4から誘導されたペプチドに比べさらに頻繁に、慢性的に感染した患者からの血清中の抗体によって認識される(85~90%)ということがわかった。NS5領域については、特許出願明細書EP-A-0 489 986及びEP-A-0 468 527において検討されている。使用される血清パネルに応じて、60%を超えるNANB(非A非B)肝炎がこれらのペプチドに対して向けられた抗体を含むことを立証することができ

40

50

る。NS3領域も同様に特許出願明細書EP-A-0 468 527において検討されている。全ての利用可能な証拠は、NS3の最も優勢なエピトープは元来不連続的なものであり、合成ペプチドによって適切に表わすことができない、ということを示唆している。ウイルス粒子の外表面(考えられる免疫原性エピトープ)からの一領域として潜在的に興味深いE1領域については、EP-A-0 468 527及びEP-A-0 507 615の両特許出願明細書中で検討されている。E1と同じ理由で、E2/NS1領域が検討された。異なるHCV変異体からのこの領域を比較することによって、このタンパク質が、gp120エンベロプタンパク質のHIV V3ループ領域を想起させるさまざまな領域を含んでいるということが解明された。EP-A-0 468 527では、比較的低頻度で認識されるエピトープを含むことがわかっている4つのペプチドが見い出された。最後に、HCVのNS2領域は、EP-A-0 486 527において分析された。しかしながら、この領域の診断上の価値はまだ明確ではない。抗体検出のための診断上有用な合成ペプチドに関するほぼ全ての特許出願明細書が、ペプチドの好ましい組合せについて記載している。これらの大部分は、HCVコアタンパク質及びNS4からのペプチドを含んでいる。いくつかのケースでは、NS5からのペプチド(EP-A-0 489 968及びEP-A-0 468 527)、及びE1とE2/NS1が含まれている(EP-A-0 507 615及びEP-A-0 468 527)。

【0014】

さまざまな特許出願明細書が、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の診断上有用なエピトープを発見するという問題に取り組んでいる。環状HIV-1及びHIV-2ペプチドを含む重要な免疫優性領域は、特許出願明細書EP-A-0 326 490において見出された。EP-A-0 379 949では、この領域は、ビオチン分子がこれらの環状HIVペプチドにカップリングされた場合に、HIV特異抗体との反応性がさらに高いことが明らかにされた。SU-A-161 22 64も同様に、HIV抗体の検出のため固相免疫検定においてビオチニル化されたペプチドを使用することを記載している。

【0015】

その他の出願は、gp120の超可変性V3ループ領域における有用なHIVエピトープを探し求めている(例えばEP-A-0 448 095及びEP-A-0 438 332)。

【0016】

米国特許第4,833,071号は、HTLV-I抗体の検出のためのペプチド組成物を提供している。

【0017】

1つのエピトープが診断上有用であるか否かを決定することは、必ずしも容易ではなく、ある程度は、それが取り入れられる試験の具体的な形態によって左右される。それは、理想的には、高いパーセンテージの真性陽性血清により認識される免疫優性エピトープであるべきであり、あるいは試験においてその他の抗原を補うことができ、検出率を増大させなくてはならない。頻繁に認識されないエピトープは、真性陽性血清中の抗体の検出率を増大させることに向けてそれらが果たす貢献度、及びその他のさらに強いエピトープの希釈により試験の感度に対してこれらのエピトープの取り入れが及ぼす不利な影響の程度に応じて、診断上有用であることもできるし、又役に立たない場合もある。

【0018】

かくして、感染又は免疫の結果として産生された抗体によって特異的に認識されるタンパク質の領域を同定するために、ペプチドを利用することが可能である。一般に、従うことのできる戦略としては2つある。これらの戦略のうちの1つは、Geysen, H. M., Meloen, R. H.及びBarteling, S. J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984), 81: 3998-4002に記載されている。このアプローチは、問題のタンパク質又はタンパク質フラグメントの全長が表わされるように、開裂不可能なリンカーで誘導されたポリエチレンロッド

上に大きな一連の短い重複ペプチドを合成することに係わっている。

【0019】

ロッドを、抗血清と共にインキュベートし、抗体結合を抗免疫グロブリン-酵素コンジュゲートを用いて検出する。陽性反応が、タンパク質配列内に存在するエピトープの位置及び配列を直ちに同定する。この技術は、全てのペプチドがそのカルボキシ末端を介して固体支持体に均等に連結されるという利点をもつ。この方法は、線状エピトープのきわめて精確なマッピングを可能にするものの、ロッド上に高い信頼性で合成できるペプチドの長さは制限されている。このことは、エピトープの長さが合成されたペプチドの長さを上回る場合に、時として問題をひき起す可能性がある。

【0020】

エピトープマッピングに対する第2のアプローチには、一般に長さがアミノ酸15個~30個である、分析すべきタンパク質の配列に沿ったより大きいペプチドの合成が係わっている。連続するペプチドは隣接していてもよいが、好ましくは重複している。切断に続いて、個々のペプチドに対する抗体結合の評価を行ない、エピトープのおおよその位置を同定することができる。このアプローチの一例は、Neurath, A. R., Strick, N., 及びLee, E. S. Y.; J. Gen. Virol. (1990) 71: 85-95に示されている。このアプローチは、未変性タンパク質の相同な配列とおそらくより密接に類似し、抗体結合のためのより優れたターゲットを提供する、さらに長いペプチドを合成することが可能であるという利点を有している。このアプローチの欠点は、各々のペプチドが化学的に固有の(ユニークな)ものであり、免疫学的評価のため各ペプチドを固相上に最適にコーティングできる条件が、pH、イオン強度及び緩衝液組成といった要因について大幅に変動しうるということにある。固相上に吸着できるペプチドの量も、各ペプチドに固有で、制御されない要因である。

【0021】

本発明の主要な目的は、その非修飾バージョンに比べて優れた免疫学的特性をもつ状態で、免疫学的に有用なエピトープに相当する修飾されたペプチドを提供することにある。

【0022】

本発明のもう1つの目的は、従来のエピトープマッピング技術を用いて同定することのできなかつた免疫学的に有用なエピトープに相当する修飾されたペプチドを提供することにある。

【0023】

本発明のもう1つの目的は、実施しやすくかつ標準化に導きうる、前記ペプチドを用いる抗体のインビトロ決定のための方法を提供することにある。

本発明のもう1つの目的は、細菌及びウイルス性タンパク質上の免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドを決定するための方法を提供することにある。

【0024】

本発明のもう1つの目的は、前記方法のいずれかにおいて用いられるタンパク質配列を調製する方法を提供することにある。

【0025】

本発明のもう1つの目的は、そのエピトープを決定するための方法又は抗体をインビトロで決定するための方法において用いることのできるタンパク質配列を調製する方法を提供することにある。

【0026】

本発明のもう1つの目的は、上述の方法において用いられるペプチドの調製に有用な中間化合物を提供することにある。

【0027】

本発明のもう1つの目的は同様に、診断用としてタンパク質上の免疫学的に重要なエピトープに相当すると決定されたペプチドを含む組成物を提供することにもある。

【0028】

本発明のもう1つの目的は、ワクチン用としてタンパク質上の免疫学的に重要なエピト-

10

20

30

40

50

ブに相当すると決定されたペプチドを含む組成物を提供することにある。

【0029】

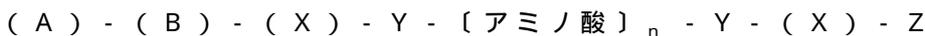
本発明に従うと、ウイルスタンパク質の免疫学的に重要な領域を表わすビオチニル化された一連のペプチドが同定され、固相ペプチド合成によって調製される。これらのペプチドは、(i) HCV及び/又はHIV及び/又はHTLV-IもしくはIIに対する抗体の検出にとって、きわめて有用であるものとして同定されている。いくつかの好ましい態様においては、これらのペプチドは、BALB/Cマウスなどの健康な動物におけるHCV及び/又はHIV及び/又はHTLV-IもしくはIIに対する抗体の産生を刺激する上で、ならびにHCV及び/又はHIV及び/又はHTLV-IもしくはIIの感染予防のためのワクチン組成物において、有用であるということが発見されているか、或は少なくとも予想されている。

【0030】

本発明の実施例の節で実証されているように、ビオチニル化ペプチドを用いることによって、予め決定されたタンパク質配列内の免疫学的に重要なエピトープの決定が可能になる。固相に対し共有結合的にカップリングされた非ビオチニル化ペプチドを用いる免疫学的に重要なエピトープの決定は、往々にしてこれらのエピトープを局在化できない。特に構造エピトープの局在化の場合、ビオチニル化ペプチドの使用はかなり成功すると思われる。

【0031】

(1) 本発明に従うと、HCV及び/又はHIV及び/又はHTLV-IもしくはIIに対する抗体の検出のために有用なペプチド組成物は、次のような構造をもつ免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドを含んでいる：



式中、

- $[\text{アミノ酸}]_n$ は、 n を約4～約50、好ましくは約35未満、さらに好ましくは約30未満、そして有利には約4～約25の整数である残基の数として、ペプチド鎖の長さを示し；
- Bは、ビオチンを表わし；
- Xは、合成プロセス中に取り込まれるビオチニル化された化合物を表わし；
- Yは、ビオチニル部分B又はXからペプチド自体のアミノ酸を分離するリンカーアームを単独で又は一緒になって形成し、しかもアビジン又はストレプトアビジンに対するビオチニル部分B又はXの結合と干渉しうる立体障害を最小限にするという機能をもつ単数又は複数の化学的単位又は共有結合を表わし、Yが共有結合でない場合、有利には少なくとも1つの化学的単位であり、30個もの化学的単位から構成されていてよいが、最も頻繁には1～10個の同一の又は異なっているよい化学的単位、より好ましくはグリシン残基、 α -アラニン、4-アミノブチル酸、5-アミノ吉草酸、6-アミノヘキサン酸(カプロン酸)で構成されることになり；
- B及びXは、カッコ内に囲まれていて、これはこれらの位置でのビオチン又はビオチニル化された化合物の存在が任意のものであり、唯一の規定要件はB又はXが示された位置のうち少なくとも1つにおいて存在していることであることを表わしており；
- Aは、カッコで表わされているように存在する場合、アミノ酸(単数又は複数)、アミノ基又はペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾を表わし；
- Zは、単数又は複数のアミノ酸、1つのOH基、1つのNH₂-基又はこれら2つの化学基のいずれかが関与するリンケージを表わし、ここで該アミノ酸は、大きな割合の真性陽性血清によって認識されるか又は試験においてその他の抗原を補って検出率を増大させることのできる免疫優性エピトープとなるべく選択的に選ばれ、Bは選択されたアミノ酸と相互作用して、より大きい診断上の感度をもつ化合物を生成する。

【0032】

このペプチド組成物は、少なくとも1つ、及び好ましくは2つ、3つ、4つ又はそれ以上の、以下の配列から選ばれたビオチニル化ペプチドの組合せを含んでいる：

1. ヒト免疫不全ウイルス1型エンベロープペプチド:

a. gp41

1. gp41、分離株HTLV-IIIB

(A) - (B) - (X) - Y - I l e - T r p - G l y - C y s - S e r - G l y - L y s - I l e - C y s - Y - (X) - Z

2.

(A) - (B) - (X) - Y - I l e - T r p - G l y - C y s - S e r - G l y - L y s - L e u - I l e - C y s - T h r - T h r - A l a - V a l - P r o - T r p - A s n - A l a - S e r - Y - (X) - Z

3.

(A) - (B) - (X) - Y - G l u - A r g - T y r - L e u - L y s - A s p - G l n - G l n - L e u - L e u - G l y - I l e - T r p - G l y - C y s - S e r - G l y - L y s - L e u - I l e - Y - (X) - Z

10

4.

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - G l n - A l a - A r g - I l e - L e u - A l a - V a l - G l u - A r g - T y r - L e u - L y s - A s p - G l n - G l n - L e u - Y - (X) - Z

5. gp41、分離株Ant70

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - T r p - G l y - C y s - L y s - G l y - L y s - L e u - V a l - C y s - Y - (X) - Z

20

6. gp41、分離株ELI

(A) - (B) - (X) - Y - A s p - G l n - G l n - L e u - L e u - G l y - I l e - T r p - G l y - C y s - S e r - G l y - L y s - H i s - I l e - C y s - T h r - T h r - A s n - V a l - P r o - T r p - A s n - Y - (X) - Z

b. gp120

1. 部分的V3ループ配列、コンセンサス

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - A s n - T h r - A r g - L y s - S e r - I l e - H i s - I l e - G l y - P r o - G l y - A r g - A l a - P h e - T y r - T h r - T h r - G l y - G l u - I l e - I l e - G l y - Y - (X) - Z

1. a. 完全V3ループ配列、コンセンサス

(A) - (B) - (X) - Y - C y s - T h r - A r g - P r o - A s n - A s n - A s n - T h r - A r g - L y s - S e r - I l e - H i s - I l e - G l y - P r o - G l y - A r g - A l a - P h e - T y r - T h r - T h r - G l y - G l u - I l e - I l e - G l y - A s p - I l e - A r g - G l n - A l a - H i s - C y s - Y - (X) - Z

30

2. 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 SF2

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - A s n - T h r - A r g - L y s - S e r - I l e - T y r - I l e - G l y - P r o - G l y - A r g - A l a - P h e - H i s - T h r - T h r - G l y - A r g - I l e - I l e - G l y - Y - (X) - Z

3. 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 SC

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - A s n - T h r - T h r - A r g - S e r - I l e - H i s - I l e - G l y - P r o - G l y - A r g - A l a - P h e - T y r - A l a - T h r - G l y - A s p - I l e - I l e - G l y - Y - (X) - Z

40

4. 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 MN

(A) - (B) - (X) - Y - T y r - A s n - L y s - A r g - L y s - A r g - I l e - H i s - I l e - G l y - P r o - G l y - A r g - A l a - P h e - T y r - T h r - T h r - L y s - A s n - I l e - I l e - G l y - Y - (X) - Z

5. 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 RF

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - A s n - T h r - A r g - L y s - S e r - I l e - T h r - L y s - G l y - P r o - G l y - A r g - V a l - I l e - T y r - A l

50

- a - Thr - Gly - Gln - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z
- 6 . 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 mal
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Arg - Gly - Ile - His - Phe - Gly - Pro - Gly - Gln - Ala - Leu - Tyr - Thr - Thr - Gly - Ile - Val - Gly - Y - (X) - Z
- 7 . 部分V3ループ配列、分離株HTLV-IIIB
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Lys - Ser - Ile - Arg - Ile - Gln - Arg - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Val - Thr - Ile - Gly - Lys - Ile - Gly - Y - (X) - Z
- 8 . 部分V3ループ配列、分離株HIV-1 ELI 10
(A) - (B) - (X) - Y - Gln - Asn - Thr - Arg - Gln - Arg - Thr - Pro - Ile - Gly - Leu - Gly - Gln - Ser - Leu - Tyr - Thr - Thr - Arg - Ser - Arg - Ser - Y - (X) - Z
- 9 . 部分V3ループ配列、分離株ANT70
(A) - (B) - (X) - Y - Gln - Ile - Asp - Ile - Gln - Glu - Met - Arg - Ile - Gly - Pro - Met - Ala - Trp - Tyr - Ser - Met - Gly - Ile - Gly - Gly - Y - (X) - Z
- 10 . 部分V3ループ配列、ブラジル分離株、ペプチドV3-368 20
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Asn - Thr - Arg - Arg - Gly - Ile - His - Met - Gly - Trp - Gly - Arg - Thr - Phe - Tyr - Ala - Thr - Gly - Glu - Ile - Ile - Gly - Y - (X) - Z
- 11 . カルボキシ末端、HIV-1 gp120
(A) - (B) - (X) - Y - Arg - Asp - Asn - Trp - Arg - Ser - Glu - Leu - Tyr - Lys - Tyr - Lys - Val - Val - Lys - Ile - Glu - Pro - Leu - Gly - Val - Ala - Pro - Thr - Lys - Ala - Lys - Arg - Arg - Val - Val - Gln - Arg - Glu - Lys - Arg - Y - (X) - Z
- 2 . ヒト免疫不全ウイルス2型エンベロープペプチド
- a . gp41、分離株HIV-2 rod 30
(A) - (B) - (X) - Y - Ser - Trp - Gly - Cys - Ala - Phe - Arg - Gln - Val - Cys - Y - (X) - Z
- b .
(A) - (B) - (X) - Y - Lys - Tyr - Leu - Gln - Asp - Gln - Ala - Arg - Leu - Asn - Ser - Trp - Gly - Cys - Ala - Phe - Arg - Gln - Val - Cys - Y - (X) - Z
- c . gp120、分離株HIV-2 NIHZ
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Lys - Thr - Val - Leu - Pro - Ile - Thr - Phe - Met - Ser - Gly - Phe - Lys - Phe - His - Ser - Gln - Pro - Val - Ile - Asn - Lys - Y - (X) - Z
- d . 部分V3ループ配列、ペプチドV3-GB12 40
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Lys - Thr - Val - Val - Pro - Ile - Thr - Leu - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Phe - His - Ser - Gln - Pro - Ile - Asn - Lys - Y - (X) - Z
- e . 部分V3ループ配列、ペプチドV3-239
(A) - (B) - (X) - Y - Asn - Lys - Thr - Val - Leu - Pro - Val - Thr - Ile - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Phe - His - Ser - Gln - Pro - Ile - Asn - Asp - Y - (X) - Z
- 3 . チンパンジー免疫不全ウイルス
- a . gp41 50
(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Trp - Gly - Cys - Ser - Gly - Ly

s - A l a - V a l - C y s - Y - (X) - Z

4 . サル免疫不全ウイルス

a . 膜貫通タンパク質、分離株 S I V a g m (T Y 0 1)

(A) - (B) - (X) - Y - S e r - T r p - G l y - C y s - A l a - T r p - L y s - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z .

b . 膜貫通タンパク質、分離株 S I V m n d

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - T r p - G l y - C y s - S e r - T r p - A l a - G l n - V a l - C y s - Y - (X) - Z

5 . H T L V - I 及び H T L V - I I ウィルス

ペプチド I - g p 4 6 - 3

(A) - (B) - (X) - Y - V a l - L e u - T y r - S e r - P r o - A s n - V a l - S e r - V a l - P r o - S e r - S e r - S e r - S e r - T h r - L e u - L e u - T y r - P r o - S e r - L e u - A l a - Y - (X) - Z

ペプチド I - g p 4 6 - 5

(A) - (B) - (X) - Y - T y r - T h r - C y s - I l e - V a l - C y s - I l e - A s p - A r g - A l a - S e r - L e u - S e r - T h r - T r p - H i s - V a l - L e u - T y r - S e r - P r o - Y - (X) - Z

ペプチド I - g p 4 6 - 4

(A) - (B) - (X) - Y - A s n - S e r - L e u - I l e - L e u - P r o - P r o - P h e - S e r - L e u - S e r - P r o - V a l - P r o - T h r - L e u - G l y - S e r - A r g - S e r - A r g - A r g - Y - (X) - Z

ペプチド I - g p 4 6 - 6

(A) - (B) - (X) - Y - A s p - A l a - P r o - G l y - T y r - A s p - P r o - I l e - T r p - P h e - L e u - A s n - T h r - G l u - P r o - S e r - G l n - L e u - P r o - P r o - T h r - A l a - P r o - P r o - L e u - L e u - P r o - H i s - S e r - A s n - L e u - A s p - H i s - I l e - L e u - G l u - Y - (X) - Z

ペプチド I - p 2 1 - 2

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - T y r - A l a - A l a - G l n - A s n - A r g - A r g - G l y - L e u - A s p - L e u - L e u - P h e - T r p - G l u - G l n - G l y - G l y - L e u - C y s - L y s - A l a - L e u - G l n - G l u - G l n - C y s - A r g - P h e - P r o - Y - (X) - Z

ペプチド I - p 1 9

(A) - (B) - (X) - Y - P r o - P r o - P r o - P r o - S e r - S e r - P r o - T h r - H i s - A s p - P r o - P r o - A s p - S e r - A s p - P r o - G l n - I l e - P r o - P r o - P r o - T y r - V a l - G l u - P r o - T h r - A l a - P r o - G l n - V a l - L e u - Y - (X) - Z

ペプチド I I - g p 5 2 - 1

(A) - (B) - (X) - Y - L y s - L y s - P r o - A s n - A r g - G l n - G l y - L e u - G l y - T y r - T y r - S e r - P r o - S e r - T y r - A s n - A s p - P r o - Y - (X) - Z

ペプチド I I - g p 5 2 - 2

(A) - (B) - (X) - Y - A s p - A l a - P r o - G l y - T y r - A s p - P r o - L e u - T r p - P h e - I l e - T h r - S e r - G l u - P r o - T h r - G l n - P r o - P r o - P r o - T h r - S e r - P r o - P r o - L e u - V a l - H i s - A s p - S e r - A s p - L e u - G l u - H i s - V a l - L e u - T h r - Y - (X) - Z

ペプチド I I - g p 5 2 - 3 :

(A) - (B) - (X) - Y - T y r - S e r - C y s - M e t - V a l - C y s - V a l - A s p - A r g - S e r - S e r - L e u - S e r - S e r - T r p - H i s - V a

10

20

30

40

50

l - L e u - T y r - T h r - P r o - A s n - I l e - S e r - I l e - P r o - G l n - G l n - T h r - S e r - S e r - A r g - T h r - I l e - L e u - P h e - P r o - S e r - Y - (X) - Z

ペプチドII - p 19

(A) - (B) - (X) - Y - P r o - T h r - T h r - T h r - P r o - P r o - P r o - P r o - P r o - S e r - P r o - G l u - A l a - H i s - V a l - P r o - P r o - P r o - T y r - V a l - G l u - P r o - T h r - T h r - T h r - G l n - C y s - P h e - Y - (X) - Z

【0033】

これらの上述のビオチニル化ペプチドは、合成され、感染を受けたヒト又は霊長類からの抗血清によって特異的に認識されることがわかっており、特に有利であると考えられている。これらの上述のペプチドは全て新しいものである。 10

【0034】

本発明の方法は、これらのHIVペプチドの抗原性を増大させることを可能にし、これらのペプチドはたとえビオチニル化されていない場合でさえ支持体に結合することができる。

【0035】

次に続くHCVペプチド配列は、感染を受けたヒト又は霊長類からの抗血清により特異的に認識されることがわかっており、それらは特に有利であると考えられている。非ビオチニル化アミノ酸配列は、従来の方法に従って合成可能である。 20

【0036】

問題のペプチドは、HCVによりコードされるタンパク質又はそのドメインを、免疫学的に擬態するように意図されている。HCVに関して配列可変性が観察されたため、異なる株のエピトープをより良く擬態するように単数又は複数のアミノ酸を変えることが望ましい可能性もある。対象となる化合物がHCVの少なくとも1つの株との免疫学的競合を提供することができるかぎりにおいて、記載したペプチドがいずれかの特定のHCV配列と同一である必要はないということも理解すべきである。従ってペプチドは、その使用においてある種の利点を提供する可能性がある場合に、挿入、欠失、ならびに保存的及び非保存的アミノ酸置換といった変更の対象となる可能性がある。これらのペプチドは、好ましくは、より大きな配列の感度を全て維持しながらも、可能なかぎり短いものであろう。ある種のケースにおいては、2つ以上のペプチドを単一の構造の形に合体させることが望ましい可能性がある。このような複合物の形成には、共有結合的又は非共有結合的リンケージが関与する可能性がある。 30

【0037】

特に興味の対象となるのは、ペプチドの環化に使用することのできるメルカプト基を提供する目的で、システイン、チオグリコール酸又はその他のチオール含有化合物をペプチド鎖中に取り込んだHCVのビオチニル化されたペプチドである。

【0038】

HCVのコア領域からの以下のペプチドは、免疫学的に重要なエピトープに相当するものとして決定された。 40

1. ペプチドI又はコアI〔アミノ酸(aa)1-20〕は以下のアミノ酸配列を有する：

(I)

(A) - (B) - (X) - Y - M e t - S e r - T h r - I l e - P r o - L y s - P r o - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - Y - (X) - Z

(II)

(A) - (B) - (X) - Y - P r o - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - A s p - V a l - L y

50

s - P h e - P r o - G l y - Y - (X) - Z 特に興味深いのはオリゴペプチド I I A (a a 8 - 1 8) である。

(I I A)

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - Y - (X) - Z . 3 . ペプチド I I I 又はコア 3 (a a 1 3 - 3 2) は以下の配列を有する :

(I I I)

(A) - (B) - (X) - Y - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - A s p - V a l - L y s - P h e - P r o - G l y - G l y - G l y - G l n - I l e - V a l - G l y - Y - (X) - Z 4 . ペプチド I V 又はコア 7 (a a 3 7 - 5 6) は以下の配列を有する :

(I V)

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r g - L e u - G l y - V a l - A r g - A l a - T h r - A r g - L y s - T h r - S e r - G l u - A r g - S e r - Y - (X) - Z 特に興味深いのはオリゴペプチド I V a 又はコア 6 (a a 3 1 - 5 0) である。

(I V a)

(A) - (B) - (X) - Y - V a l - G l y - G l y - V a l - T y r - L e u - L e u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r g - L e u - G l y - V a l - A r g - A l a - T h r - A r g - Y - (X) - Z 5 . ペプチド V 又はコア 9 (a a 4 9 - 6 8) は以下の配列を有する :

(V)

(A) - (B) - (X) - Y - T h r - A r g - L y s - T h r - S e r - G l u - A r g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y s - V a l - Y - (X) - Z 特に興味深いのはオリゴペプチド V a (a a 5 5 - 7 4) である :

(V a)

(A) - (B) - (X) - Y - A r g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y s - V a l - A r g - A r g - P r o - G l u - G l y - A r g - Y - (X) - Z 6 . ペプチド V I 又はコア 1 1 (a a 6 1 - 8 0) は以下の配列を有する :

(V I)

(A) - (B) - (X) - Y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y s - V a l - A r g - A r g - P r o - G l u - G l y - A r g - T h r - T r p - A l a - G l n - P r o - G l y - Y - (X) - Z

7 . ペプチド V I I (a a 7 3 - 9 2) 又はコア 1 3 は次の配列を有する :

(V I I)

(A) - (B) - (X) - Y - G l y - A r g - T h r - T r p - A l a - G l n - P r o - G l y - T y r - P r o - T r p - P r o - L e u - T y r - G l y - A s n - G l u - G l y - C y s - G l y - Y - (X) - Z

8 . ペプチドコア 1 2 3 (a a 1 - 3 2) :

(A) - (B) - (X) - Y - M e t - S e r - T h r - I l e - P r o - G l n - A r g - L y s - T h r - L y s - A r g - A s n - T h r - A s n - A r g - A r g - P r o - G l n - A s p - V a l - L y s - P h e - P r o - G l y - G l y - G l y - G l n - I l e - V a l - G l y - Y - (X) - Z

9 . ペプチドコア 7 9 1 0 (a a 3 7 - 8 0) :

(A) - (B) - (X) - Y - G l y - G l y - V a l - T y r - L e u - L e u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r g - L e u - G l y - V a l - A r g - A r g - A l a - T h r - A r g - L y s - T h r - S e r - G l y - A r g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y

10

20

30

40

50

s - V a l - A r g - A r g - Y - (X) - Z

HCVのNS4領域からの以下のペプチドは、免疫学的に重要なエピトープに対応することがわかった。

ペプチドVIIII又はNS4-1又はHCV1 (a a 1 6 8 8 - 1 7 0 7) は次の配列を有する：

(VIIII)

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - S e r - G l y - L y s - P r o - A l a - I l e - I l e - P r o - A s p - A r g - G l u - V a l - L e u - T y r - A r g - G l u - P h e - A s p - G l u - Y - (X) - Z ペプチドIX又はHCV2 (a a 1 6 9 4 - 1 7 1 3) は次の配列を有する：

10

(IX)

(A) - (B) - (X) - Y - I l e - I l e - P r o - A s p - A r g - G l u - V a l - L e u - T y r - A r g - G l u - P h e - A s p - G l u - M e t - G l u - G l u - C y s - S e r - G l n - Y - (X) - Z

ペプチドHCV3

(A) - (B) - (X) - Y - V a l - L e u - T y r - A r g - G l u - P h e - A s p - G l u - M e t - G l u - G l u - C y s - S e r - G l n - H i s - L e u - P r o - T y r - I l e - G l u - Y - (X) - Z

ペプチドX又はHCV4 (a a 1 7 0 6 - 1 7 2 5) は次の配列を有する：

(X)

(A) - (B) - (X) - Y - A s p - G l u - M e t - G l u - G l u - C y s - S e r - G l n - H i s - L e u - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n - G l y - M e t - M e t - L e u - A l a - Y - (X) - Z

20

11. ペプチドXI又はNS4-5又はHCV5 (a a 1 7 1 2 - 1 7 3 1) は次の配列を有する：

(XI)

(A) - (B) - (X) - Y - S e r - G l n - H i s - L e u - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n - G l y - M e t - M e t - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n - L y s - Y - (X) - Z

12. ペプチドXII又はHCV6 (a a 1 7 1 8 - 1 7 3 7) は次の配列を有する：

30

(XII)

(A) - (B) - (X) - Y - I l e - G l u - G l n - G l y - M e t - M e t - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n - L y s - A l a - L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - Y - (X) - Z

13. ペプチドXIII又はNS4-7又はHCV7 (a a 1 7 2 4 - 1 7 4 3) は次の配列を有する：

(XIII)

(A) - (B) - (X) - Y - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n - L y s - A l a - L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - T h r - A l a - S e r - A r g - G l n - A l a - Y - (X) - Z

14. ペプチドXIV又はHCV8 (a a 1 7 3 0 - 1 7 4 9) は次の配列を有する：

40

(XIV)

(A) - (B) - (X) - Y - G l n - L y s - A l a - L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - T h r - A l a - S e r - A r g - G l n - A l a - G l u - V a l - I l e - A l a - P r o - A l a - Y - (X) - Z

15. ペプチドNS4-27又はHCV9 (a a 1 7 1 2 - 1 7 4 3) :

(A)

(A) - (B) - (X) - Y - S e r - G l n - H i s - L e u - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n - G l u - M e t - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n - L y s - A l a - L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - T h r - A l a - S e r - A r g - G l n - A l a - Y - (X) - Z

16. ペプチドNS4e :

50

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Glu - Gly - Ala - Val - Gln - Trp - Met - Asn - Arg - Leu - Ile - Ala - Phe - Ala - Ser - Arg - Gly - Asn - His - Y - (X) - Z

HCVのNS5領域の以下のペプチドは、免疫学的に重要なエピトープに対応することがわかった。

ペプチドXV又はNS5-25 (aa2263-2282)は次の配列を有する：

(XV)

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Asp - Glu - Arg - Glu - Ile - Ser - Val - Pro - Ala - Glu - Ile - Leu - Arg - Lys - Ser - Arg - Arg - Phe - Ala - Y - (X) - Z

10

ペプチドXVI又はNS5-27 (aa2275-2294)は次の配列を有する：

(XVI)

(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Arg - Lys - Ser - Arg - Arg - Phe - Ala - Gln - Ala - Leu - Pro - Val - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Y - (X) - Z

ペプチドXVII又はNS5-29 (aa2287-2306)は次の配列を有する：

(XVII)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Pro - Pro - Leu - Val - Glu - Thr - Trp - Lys - Lys - Pro - Asp - Tyr - Y - (X) - Z

20

ペプチドXVIII又はNS5-31 (aa2299-2318)は次の配列を有する：

(XVIII)

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Thr - Trp - Lys - Lys - Pro - Asp - Tyr - Glu - Pro - Pro - Val - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pro - Pro - Y - (X) - Z

ペプチドXIX又はNS5-33 (aa2311-2330)は次の配列を有する：

(XIX)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pro - Pro - Pro - Lys - Ser - Pro - Pro - Val - Pro - Pro - Pro - Arg - Lys - Lys - Y - (X) - Z

30

ペプチドNS5-2527 (aa2263-2294)：

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Asp - Glu - Arg - Glu - Ile - Ser - Val - Pro - Ala - Glu - Ile - Leu - Arg - Lys - Ser - Arg - Lys - Ser - Arg - Arg - Phe - Ala - Gln - Ala - Leu - Pro - Val - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asp - Tyr - Asn - Y - (X) - Z

HCVのE2/NS1領域のN末端領域からの以下のペプチドは、免疫学的に重要なエピトープに対応することがわかった。

ペプチドXXa (aa183-416)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Ala - Ala - Ser - His - Thr - Thr - Ser - Thr - Leu - Ala - Ser - Leu - Phe - Ser - Pro - Gly - Ala - Ser - Gln - Arg - Ile - Gln - Leu - Val - Asn - Thr - Y - (X) - Z

40

ペプチドXXa-1 (aa383-404)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Ala - Ala - Ser - His - Thr - Thr - Ser - Thr - Leu - Ala - Ser - Leu - Phe - Ser - Y - (X) - Z

ペプチドXXa-2 (aa393-416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ser - His - Thr - Thr - Ser - Thr - Leu - Ala - Ser - Leu - Phe - Ser - Pro - Gly - Ala - Ser - Gl

50

n - A r g - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXb (a a 3 8 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - S e r - A l a - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXb - 1 (a a 3 8 3 - 4 0 4)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - S e r - G l
 y - G l y - A l a - A l a - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - Y - (X) - Z 10
 ペプチドXXb - 2 (a a 3 9 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - S e r - A s p - T h r - A r g - G l y - L e
 u - V a l - S e r - L e u - P h e - S e r - P r o - G l y - S e r - A l a - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXc (a a 3 8 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - T h r - G l
 y - G l y - V a l - G l n - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXc - 1 (a a 3 8 3 - 4 0 4) 20
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - A r g - V a l - T h r - G l
 y - G l y - V a l - G l n - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - Y - (X) - Z
 ペプチドXXc - 2 (a a 3 9 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - V a l - T h r - C y s - T h r - L e
 u - T h r - S e r - L e u - P h e - A r g - P r o - G l y - A l a - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXd (a a 3 8 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A r g - V a l - A l a - S e r - S e r - T h r - G l n - S e r - L e 30
 u - V a l - S e r - T r p - L e u - S e r - G l n - G l y - P r o - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXd - 1 (a a 3 8 3 - 4 0 4)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - H i s - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A r g - V a l - A l a - S e r - S e r - T h r - G l n - S e r - L e
 u - V a l - S e r - T r p - L e u - S e r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXd - 2 (a a 3 9 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - A l a - S e r - S e r - T h r - G l n - S e r - L e
 u - V a l - S e r - T r p - L e u - S e r - G l n - G l y - P r o - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - V a l - A s n - T h r - Y - (X) - Z 40
 ペプチドXXe (a a 3 8 3 - 4 1 6)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - A s p - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A l a - G l n - A l a - L y s - T h r - T h r - A s n - A r g - L e
 u - V a l - S e r - M e t - P h e - A l a - S e r - G l y - P r o - S e r - G l
 n - L y s - I l e - G l n - L e u - I l e - A s n - T h r - Y - (X) - Z
 ペプチドXXe - 1 (a a 3 8 3 - 4 0 4)
 (A) - (B) - (X) - Y - G l y - A s p - T h r - H i s - V a l - T h r - G l
 y - G l y - A l a - G l n - A l a - L y s - T h r - T h r - A s n - A r g - L e
 u - V a l - S e r - M e t - P h e - A l a - Y - (X) - Z
 ペプチドXXe - 2 (a a 3 9 3 - 4 1 6) 50

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Lys - Thr - Thr - Asn - Arg - Leu - Val - Ser - Met - Phe - Ala - Ser - Gly - Pro - Ser - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXf (aa383 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Asn - Ala - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Pro - Gly - Pro - Lys - Gln - Asn - Val - His - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXf - 1 (aa383 - 404)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Ser - Gly - Gly - Asn - Ala - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Y - (X) - Z
 ペプチドXXf - 2 (aa393 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Gly - His - Thr - Met - Thr - Gly - Ile - Val - Arg - Phe - Phe - Ala - Pro - Gly - Pro - Lys - Gln - Asn - Val - His - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXg (aa383 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Ile - Val - Ser - Gly - Gly - Gln - Ala - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Pro - Gly - Ala - Lys - Gln - Asn - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXg - 1 (aa383 - 404)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Ile - Val - Ser - Gly - Gly - Gln - Ala - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXg - 2 (aa393 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Arg - Ala - Met - Ser - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Thr - Pro - Gly - Ala - Lys - Gln - Asn - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXh (aa383 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Thr - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Arg - Gly - Ala - Lys - Gln - Asp - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z
 ペプチドXXh - 1 (aa383 - 404)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Glu - Thr - Tyr - Thr - Thr - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Y - (X) - Z
 ペプチドXXh - 2 (aa393 - 416)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Arg - Thr - Thr - Gln - Gly - Leu - Val - Ser - Leu - Phe - Ser - Arg - Gly - Ala - Lys - Gln - Asp - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z

【0039】

上述の配列は、HCV 1型分離株HCV - 1 (Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 2451 - 2455, 1991) 及びHCV - J1 (Okamoto et al., Jap. J. Exp. Med. 60, 167 - 177, 1990) 配列上に局在化されたエピトープに対応する。しかしながら、上述の免疫学的に重要な領域に対応するその他の1型HCV分離株配列からのペプチドも、同様に本発明に従った組成物中に含まれうるということも理解しなくてはならない。同様に本発明の範囲内に入る変異体HCV配列の一例を、HCV - J分離株から誘

導することができる (Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9524-9528)。

【0040】

以下のペプチドは、2型HCV配列からの上述のペプチド領域と同じ領域に由来したものである。

ペプチドXX/2

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Gln - Thr - His - Thr - Val - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - His - Asn - Ala - Arg - Thr - Leu - Thr - Gly - Met - Phe - Ser - Leu - Gly - Ala - Arg - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z 10

ペプチドXX/2-1

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Gln - Thr - His - Thr - Val - Gly - Gly - Ser - Thr - Ala - His - Asn - Ala - Arg - Thr - Leu - Thr - Gly - Met - Phe - Ser - Y - (X) - Z

ペプチドXX/2-2

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - His - Asn - Ala - Arg - Thr - Leu - Thr - Gly - Met - Phe - Ser - Leu - Gly - Ala - Arg - Gln - Lys - Ile - Gln - Leu - Ile - Asn - Thr - Y - (X) - Z

ペプチドVIIII-2又はNS4-1(2)

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Asn - Gln - Arg - Ala - Val - Val - Ala - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Glu - Ala - Phe - Asp - Glu - Y - (X) - Z 20

ペプチドIX-2

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Ala - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Glu - Ala - Phe - Asp - Glu - Met - Glu - Glu - Cys - Ala - Ser - Y - (X) - Z

ペプチドX-2

(A) - (B) - (X) - Y - Asp - Glu - Met - Glu - Glu - Cys - Ala - Ser - Arg - Ala - Ala - Leu - Ile - Glu - Glu - Gly - Gln - Arg - Ile - Ala - Y - (X) - Z 30

ペプチドXI-2又はNS4-5(2)

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Ser - Arg - Ala - Ala - Leu - Ile - Glu - Glu - Gly - Gln - Arg - Ile - Ala - Glu - Met - Leu - Lys - Ser - Lys - Y - (X) - Z

ペプチドXII-2

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Glu - Glu - Gly - Gln - Arg - Ile - Ala - Glu - Met - Leu - Lys - Ser - Lys - Ile - Gln - Gly - Leu - Leu - Gln - Y - (X) - Z

ペプチドXIII-2又はNS4-7(2)

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Ala - Glu - Met - Leu - Lys - Ser - Lys - Ile - Gln - Gly - Leu - Leu - Gln - Gln - Ala - Ser - Lys - Gln - Ala - Y - (X) - Z 40

ペプチドXIV-2

(A) - (B) - (X) - Y - Ser - Lys - Ile - Gln - Gly - Leu - Leu - Gln - Gln - Ala - Ser - Lys - Gln - Ala - Gln - Asp - Ile - Gln - Pro - Ala - Y - (X) - Z

ペプチドXV-2

(A) - (B) - (X) - Y - Arg - Ser - Asp - Leu - Glu - Pro - Ser - Ile - Pro - Ser - Glu - Tyr - Met - Leu - Pro - Lys - Lys - Arg - Phe - Pro - (X) - Y - Z 50

ペプチドXVI - 2

(A) - (B) - (X) - Y - Met - Leu - Pro - Lys - Lys - Arg - Phe - Pro - Pro - Ala - Leu - Pro - Ala - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Y - (X) - Z

ペプチドXVII - 2

(A) - (B) - (X) - Y - Ala - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Pro - Pro - Leu - Val - Glu - Ser - Trp - Lys - Arg - Pro - Asp - Tyr - Y - (X) - Z

ペプチドXVIII - 2

(A) - (B) - (X) - Y - Glu - Ser - Trp - Lys - Arg - Pro - Asp - Tyr - Gln - Pro - Ala - Thr - Val - Ala - Gly - Cys - Ala - Leu - Pro - Pro - Y - (X) - Z 10

ペプチドXIX - 2

(A) - (B) - (X) - Y - Val - Ala - Gly - Cys - Ala - Leu - Pro - Pro - Pro - Lys - Lys - Thr - Pro - Thr - Pro - Pro - Pro - Arg - Arg - Arg - Y - (X) - Z

【0041】

上述の配列は、HCV 2型分離株HC - J 6配列上に局在化されたエピトープに対応する (Okamoto et al., J. Gen. Virology 72, 2697 - 2704, 1991)。しかしながら、上述の免疫学的に重要な領域に対応するその他の2型HCV分離株配列からのペプチドも、同様に本発明に従った組成物中に含まれうるということも理解されるべきである。本発明の範囲内に入る変異株配列の例を、HCV分離株HC - J 8から誘導することが可能である (Okamoto et al., Virology 188, 331 - 341, 1992)。 20

【0042】

HCV 3型のNS 4領域からの以下のペプチドも、同様に本発明に従った好ましいペプチドである：

ペプチド NS 4 - 1 (3)

(A) - (B) - (X) - Y - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu - Y - (X) - Z 30

ペプチド NS 4 - 5 (3)

(A) - (B) - (X) - Y - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Y - (X) - Z

ペプチド NS 4 - 7 (3)

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Ala - His - Gln - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln - Gln - Y - (X) - Z

【0043】

HCV 1型及び2型について決定されたような免疫学的に重要な領域に対応するHCV 3型分離株配列に対応するその他のペプチドも、同様に本発明に従った組成物中に含まれうるということも理解されるべきである。 40

【0044】

本発明に従った組成物は同様に、Gly及び/又はSer残基により分離されるHCVコア(表9)、HCV NS 4(表10)又はHCV NS 5(表11)領域のコアエピトープの組合せから成るハイブリッドHCVペプチド配列、そして好ましくは以下のハイブリッドHCV配列をも含むうる：

【0045】

Epi - 152

(A) - (B) - (X) - Y - Ile - Pro - Asp - Arg - Glu - Val - Leu - Tyr - Arg - Gly - Gly - Lys - Lys - Pro - Asp - Tyr - Glu - Pro - Pro - Val - Gly - Gly - Arg - Arg - Pro - Gln - Asp - Val - Lys - Phe - Pro - Y - (X) - Z
Epi - 33B3A

(A) - (B) - (X) - Y - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn - Pro - Pro - Gly - Gly - Gln - Phe - Lys - Gln - Lys - Ala - Leu - Gly - Leu - Gly - Ser - Gly - Val - Tyr - Leu - Leu - Pro - Arg - Arg - Gly - Y - (X) - Z
Epi - 4B2A6

(A) - (B) - (X) - Y - Arg - Gly - Arg - Arg - Gln - Pro - Ile - Pro - Lys - Gly - Gly - Ser - Gln - His - Leu - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ser - Gly - Pro - Val - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pro - Y - (X) - Z

【0046】

本発明に従った組成物は、同様に、上述の免疫学的に重要な領域のいずれかから誘導された状態にあって、しかも天然の分離株に見られる全てのアミノ酸を各位置に含んだペプチドから成るいわゆるビオチニル化されたミクソトープ (mixotope) 配列をも含むうる (図14参照)。

【0047】

(2) C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型及びヒト免疫不全ウイルス2型を検出し、及び/又はこれに対して免疫するためのビオチニル化ペプチドの好ましい混合物は、以下のものから成る：

A. II、III、IVa、Va、IX、XI、XIII、XV、XVI、XVII、1a.3、1a.4、1a.b、1b.1a、2b、2d、

B. II、III、IVa、Va、IX、IX-2、XI、XI-2、XIII、XIII-2、XV、XV-2、XVI、XVI-2、XVII、XVII-2、1a.3、1a.4、1a.b、1b.1a、2b、2d。

【0048】

(3) ヒト免疫不全ウイルス1型及び2型、及びヒトリンパ球栄養性ウイルスI型及びII型を検出し、及び/又はこれに対して免疫するためのビオチニル化ペプチドの好ましい混合物は、以下のものから成る：

1a.3、1a.4、1b.1、2b、2c、2d、I-gp46-3、I-gp46-4、I-gp46-5、I-gp46-6、II-gp52-2、II-gp52-3、I-p21-2、I-p19、II-p19。

【0049】

(4) C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型及び2型、及びヒトリンパ球栄養性ウイルスI型及びII型を検出し、及び/又はこれに対して免疫するためのビオチニル化ペプチドのもう1つの好ましい混合物は、以下のものから成る：

1a.3、1a.4、1a.6、1b.1a、2d、II、III、IVa、Va、IX、XI、XIII、XV、XVI、XVII、XXa-2、XXc-2、XXg-2、XXh-2、I-gp46-3、I-gp46-4、I-gp46-5、I-gp46-6、II-gp52-3、I-p21-2、I-p19、II-p19。

【0050】

(5) 本発明は、同様に、C型肝炎ウイルスに対する診断用ならびに免疫原としての目的のために特に有利であり、かつ次のような混合物を有利に含む、ビオチニル化ペプチドの組成物にも関する：

A. I、III、IVa、Va、
B. II、III、IVa、Va、
C. IX、XI、XIII、

10

20

30

40

50

D . X V 、 X V I 、 X V I I I 、 X I X 、
 E . X X c - 2 、 X X a - 1 、 X X a - 2 、 X X h - 1 、 X X h - 2 、 X X g - 2 、 X X
 / 2 - 2 、
 F . I X - 2 、 X I - 2 、 X I I I - 2 、
 G . X V - 2 、 X V I - 2 、 X V I I I - 2 、 X I X - 2 、
 H . I X 、 I X - 2 、 X I 、 X I - 2 、 X I I I 、 X I I I - 2 、
 I . X V 、 X V - 2 、 X V I 、 X V I - 2 、 X V I I I 、 X V I I I - 2 、 X I X 、 X I
 X - 2 、
 J . I I 、 I I I 、 I V a 、 V a 、 I X 、 I X - 2 、 X I 、 X I - 2 、 X I I I 、 X I I
 I - 2 、 X V 、 X V - 2 、 X V I 、 X V I - 2 、 X V I I I 、 X V I I I - 2 、
 K . I I 、 I I I 、 I V a 、 V a 、 I X 、 X I 、 X I I I 、 X V 、 X V I 、 X V I I I 、
 L . I I 、 I I I 、 I V 、 V 、 I X 、 X I 、 X I I I 、 X V 、 X V I 、 X V I I I 、
 M . I I 、 I I I 、 I V a 、 V a 、 I X 、 X I 、 X I I I 、 X V 、 X V I 、 X V I I I 、
 X X a - 2 、 X X c - 2 、 X X g - 2 、 X X h - 2 。

10

【 0 0 5 1 】

(6) 本発明は、同様に、ヒト免疫不全ウイルスに対する診断用ならびに免疫原としての
 目的のために特に有利であると考えられ、

しかも以下の混合物の中から有利に選択されるビオチニル化ペプチドの組成物にも関する
 :

1 型について :

20

A . 1 a . 3 、 1 a . 4 、 1 a . 5 、 1 a . b
 B . 1 a . 3 、 1 a . 4 、 1 b . 1 、 1 b . 3 、 1 b . 6 、 1 b . 1 0 、
 C . 1 b . 1 、 1 b . 2 、 1 b . 3 、 1 b . 4 、 1 b . 5 、 1 b . 6 、 1 b . 7 、 1 b .
 8 、 1 b . 9 、 1 b . 1 0
 D . 1 b . 1 、 1 b . 2 、 1 b . 3 、 1 b . 4 、 1 b . 6 、 1 b . 1 0 、
 E . 1 a . 3 、 1 a . 4 、 1 a . 5 、 1 a . b 、 1 b . 1 a 。

2 型について :

A . 2 b 、 2 c 、 2 d 、 2 e 。

1 型及び 2 型について :

30

A . 1 a . 3 、 1 a . 4 、 1 b . 1 、 2 b 、 2 c 、 2 d 、
 B . 1 a . 3 、 1 a . 4 、 1 b . 1 a 、 2 b 、 2 d 。

【 0 0 5 2 】

(7) 本発明は、同様に、ヒト T リンパ球栄養性ウイルスに対する診断用ならびに免疫原
 としての目的のために特に有利であると考えられ、しかも以下の混合物の中から有利に選
 択されるビオチニル化ペプチドの組成物にも関する :

ヒト T リンパ球栄養性ウイルス I 型について :

ペプチド I - g p 4 6 - 3 、 I - g p 4 6 - 4 、 I - g p 4 6 - 5 、 I - g p 4 6 - 6 、
 I - p 2 1 - 2 、 I - p 1 9 。

ヒト T リンパ球栄養性ウイルス II 型について :

40

ペプチド II - g p 5 2 - 1 、 II - g p 5 2 - 2 、 II - g p 5 2 - 3 、 I - g p 4 6
 - 4 、 II - p 1 9 、 I - p 2 1 - 2 。

ヒト T リンパ球栄養性ウイルス I 型及び II 型について :

ペプチド I - g p 4 6 - 3 、 I - g p 4 6 - 4 、 I - g p 4 6 - 5 、 I - g p 4 6 - 6 、
 II - g p 5 2 - 1 、 II - g p 5 2 - 2 、 II - g p 5 2 - 3 、 I - p 2 1 - 2 、 I -
 p 1 9 、 II - p 1 9 。

【 0 0 5 3 】

ペプチドの合成は、溶液中又は固体支持体上で達成することができる。合成プロトコール
 は、一般に t - ブチルオキシカルボニル又は 9 - フルオレニルメトキシカルボニルで保護
 された活性化アミノ酸を利用する。合成を行なうための手順、アミノ酸活性化技術、側鎖
 保護タイプ及び使用される開裂手順は、例えば、S t e w a r t a n d Y o u n g ,

50

固相ペプチド合成、第2版、Pierce Chemical Company, 1984; 及び Atherton and Sheppard, 固相ペプチド合成、IRL Press, 1989 の中に十分に記載されている。

【0054】

(8) 本発明は、同様に、上述のビオチニル化ペプチドを用いる抗体のインビトロ決定のための方法において、前記ビオチニル化されたペプチドが、好ましくはストレプトアビジン-ビオチニル化ペプチド複合体又はアビジン-ビオチニル化ペプチド複合体の形態である方法にも関する。

【0055】

ストレプトアビジン-ビオチニル化ペプチド又はアビジン-ビオチニル化ペプチド複合体において、ペプチドは、N末端、C末端又は内部のいずれがビオチニル化されていてもよい。

10

【0056】

抗体の決定のためのこのアプローチは、ペプチドの長さに関して制限されておらず、免疫学的評価のために固相上に直接ペプチドをコーティングする場合の固有の問題点が回避される。

【0057】

本発明の方法においてビオチニル化ペプチドを使用することによって、固体支持体に対するペプチドの固定は、その必須のアミノ酸を抗体により自由に認識されうる状態にするものとなる。

20

【0058】

固体支持体にペプチドを固定するという表現は、ペプチドが固定化された状態となるような共有結合又は非共有結合的相互作用を介しての支持体に対するペプチドの付着を意味する。

【0059】

固体支持体は、ニトロセルロース、ポリスチレン、ナイロン又はその他のいかなる天然もしくは合成ポリマーであってもよい。

【0060】

「その必須のアミノ酸が抗体により自由に認識されうる状態にされる」という表現は、ペプチド自体のアミノ酸側鎖が、いかなる形であれ化学的に修飾されておらず、又ペプチドと固相との間の相互作用にも関与しないということの意味する。

30

【0061】

本発明におけるビオチニル化ペプチドの使用は、このビオチニル化ペプチドが、それに対する抗体の結合に適しているものを少なくとも1つ含む広範囲のコンホーメーションを自由にとることを可能にする。

【0062】

本発明の方法で使用するのに、いかなるビオチニル化ペプチドを選択することもできる。しかしながら、そのうちのいくつかは、ビオチニル化されず、ストレプトアビジン又はアビジン複合体に関与していなくても、固体支持体上に固定され、このペプチド内のエピトープを特異的に認識する抗体と反応することができる。この場合、ビオチニル化ペプチドの使用は、ペプチドがビオチニル化されていない場合に観察される抗原性との関係において、ペプチドの見かけ上の抗原性の増大という結果をもたらす。「見かけ上の」という語は、観察された変化の絶対的原因の如何に関わらず、類似の試験条件下で得られる観察された変化を表わすためのものである。

40

【0063】

「抗原性」というのは、抗体によって結合されるというペプチドの特性のことを意味する。

「抗原性の増大」というのは、非ビオチニル化ペプチドの希釈の少なくとも2倍の希釈に対し、陽性シグナルが得られることを意味する。この陽性シグナルは、非ビオチニル化ペプチドについて得られるものと同じ絶対値(大きさ)のものである。

50

換言すると、陽性シグナルの獲得は、非ビオチニル化ペプチドの量と比べて少ない量のビオチニル化ペプチドについて得ることができる。

【0064】

本発明は、同様に、以下の工程を含むタンパク質配列内のエピトープの同定方法をも示している：

- 分析すべきタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列の部分に対応するペプチドを調製する工程、なお、このペプチドは隣接しているか又は好ましくは互いに重複しており、重複の量は少なくともアミノ酸3個、好ましくは約6個～12個であり、ペプチドの長さは少なくともアミノ酸約5個であって約50個未満、好ましくはアミノ酸約40個未満、より好ましくは9個～約30個であり、このペプチドはビオチニル化されていることを特徴とする：

10

- ビオチニル基とストレプトアビジン又はアビジンとの間の相互作用を通して固相にペプチドを結合し、従来の方法を用いて個々のペプチドに結合する抗体を測定する工程。

【0065】

(9) 本発明は、同様に、上述のようなペプチド組成物を免疫検定手順において使用することによる、HIVに対する抗体のインビトロ決定又はHIV感染の診断のための方法において、使用されるビオチニル化ペプチドが、ストレプトアビジン-ビオチニル化ペプチド又はアビジン-ビオチニル化ペプチドの複合体の形態である方法にも関する。

【0066】

(10) 本発明は、同様に、上述のようなペプチド組成物を免疫検定手順において使用することによる、HCVに対する抗体のインビトロ決定又はHCV感染の診断のための方法において、使用されるビオチニル化ペプチドが、ストレプトアビジン-ビオチニル化ペプチド又はアビジン-ビオチニル化ペプチドの複合体の形態である方法にも関する。

20

【0067】

(11) 本発明は、同様に、上述のようなペプチド組成物を免疫検定手順において使用することによる、HTLV-I又はIIに対する抗体のインビトロ決定又はHTLV-又はII感染の診断のための方法において、使用されるビオチニル化ペプチドが、ストレプトアビジン-ビオチニル化ペプチド又はアビジン-ビオチニル化ペプチドの複合体の形態である方法にも関する。

【0068】

抗体のインビトロ決定を行なうための好ましい方法は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いるものである。この検定法は、一般にポリスチレンマイクロタイタープレート又はビーズである固相を利用する。しかしながら、固相は、共有結合を介して化学的に又は受動吸着によってタンパク質を結合することのできるあらゆる材料であってよい。この点において、ナイロンベースの膜も特に有利であるものとみなされる。固相は、ストレプトアビジン又はアビジンによりコーティングされ、適当な時間の後、余分な未結合タンパク質は洗浄により除去される。固相上の占有されていない結合部位があれば、それはこのときウシ血清アルブミン又はカゼインといった無関連タンパク質でブロッキングされる。

30

【0069】

ビオチニル化ペプチドの混合物又は選択物を含む溶液を、その後ストレプトアビジン又はアビジンでコーティングされた表面と接触させ、結合させる。未結合のペプチドは、洗浄によって除去する。代替的には、アビジン又はストレプトアビジンのいずれかとビオチニル化ペプチドとに、複合体を形成させる。結果として得られた複合体を、固相をコーティングするのに用いる。適当なインキュベーション時間の後、未結合の複合体を洗浄によって除去する。抗血清又はその他の体液の適当な希釈溶液を、ペプチドが結合されている固相と接触させる。結合反応を起こさせるのに必要な時間、インキュベーションを行なう。その後、固相を洗浄して未結合成分を除去する。免疫複合体の検出は、供試血清の中に存在する抗体に対して特異的に結合し、かつ、目で検出できるか又は分光光度分析法で測定できる色原体との有色複合体を形成することのできる生成物又は高度に着色された生成物

40

50

の形に、無色の又はほとんど無色の基質又は補基質を変換することのできる酵素、好ましくは(ただしこれに制限されるわけではない)西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は - ガラクトシダーゼのいずれかとコンジュゲートされた異種抗体を用いることによって達成される。

【0070】

しかしながら、当該技術分野において知られているその他の検出システムも利用することができ、それには、形成された生成物の量を電気化学的又はルミノメトリーによって測定するシステムが含まれる。検出システムは、放射能標識された抗体を利用してもよく、この場合、免疫複合体の量は、シンチレーション計数又は計数によって定量される。原理的には、試験がストレプトアビジン又はアビジンと上述のとおり合成されたビオチニル化ペプチドとの間の複合体を利用するかぎりにおいて、抗体の検出のためのあらゆるタイプの免疫学的試験を用いることができる。

10

【0071】

同様に、溶液中のストレプトアビジン又はアビジン - ビオチニル化ペプチド複合体を抗体結合に関して固相結合抗体と競合させる競合検定、又は溶液中の遊離ペプチドを、固相結合されたストレプトアビジン又はアビジン - ビオチニル化ペプチド複合体と競合させる検定も含まれる。一例を挙げると、抗体及び抗原の検出及び定量のための数多くの免疫検定が詳細に論述されている(Tijssen, P., 酵素免疫検定の実践と理論, Elsevier Press, Amsterdam, Oxford, New York, 1985)。

20

【0072】

免疫学的検定は、単一のビオチニル化ペプチドに制限されうる。しかしながら、好ましくは、特異的抗体の存在を測定すべき対象である感染因子から誘導された複数のエピトープを含むビオチニル化ペプチドの混合物が使用される。

【0073】

抗体検出のインビトロ決定を行なうためのもう1つの好ましい方法は、直線免疫検定法(LIA)である。

この抗体検出方法は、基本的に以下の工程から成る：

- 試験すべき又は使用されるビオチニル化ペプチド - ストレプトアビジン又はアビジン複合体の形態の抗原を、試験すべき抗原を共有結合により又は非共有結合により結合することのできる膜上に平行線として適用する、
- 膜上の占有されていない結合部位を、カゼイン又はウシ血清アルブミンのような非関連タンパク質でブロックする、
- 抗原(ビオチニル化ペプチド)の線が適用されている方向に対して垂直方向に、ストリップ状に膜を切断する、
- (検出すべき抗体を含む)血清又はその他の体液の適当な希釈溶液を、抗原が結合されたストリップと接触させ、結合反応が起こるのに十分な時間インキュベートする、
- ストリップを洗浄することによって未結合成分を除去する、
- 供試血清中の抗体と特異的に結合し、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素にコンジュゲートされた異種抗体と共にストリップをインキュベートすることによって、免疫複合体の検出を達成する、
- 結合を起こさせるのに十分な期間インキュベーションを行なう、
- 酵素の作用によって有色生成物に変換される必要な基質又は補基質の添加により、結合したコンジュゲートの存在を検出する、
- 反応を、視覚により検出するか、又はデンシトメトリーにより定量する。

30

40

【0074】

(12)実施例の節で実証されるように、本発明は、同様に、HIV、及びノ又はHCV、及びノ又はHTLV-IもしくはII感染に対する免疫のための上述のとおりペプチド組成物の使用にも関する。

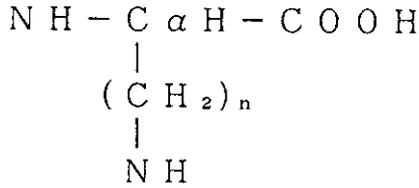
【0075】

50

(13) 本発明は、同様に、本発明で用いられるビオチニル化ペプチドの調製方法において、N - - Fmoc - X (N - y - ビオチン) 又は N - - Fmoc - X (N - y - ビオチン) 誘導体の使用が関与し、ここで X は、

【0076】

【化16】



10

【0077】

を表わし、nは、1以上10未満、好ましくは2~6の間であり、C 原子に1つのアミノ基が付着している一方、その他のアミノ基は側鎖中で最も遠くの炭素である炭素Cyに付着しているか；又はアルコールROHを用いて得られるそのエステル、より特定的にはペンタフルオロフェニルエステルであり；yは、ラジカル内でCOOH基を担持する炭素原子との関係におけるyの位置を表わす調製方法にも関する。

このビオチン誘導体は、中間生成物と呼ばれ、上述の中間生成物は本発明の方法に従って決定された新しい化合物である。

20

【0078】

(14) 本発明の化合物を調製するための有利な方法において、中間生成物は以下の式のうちの1つによって表わすことができる：

N - - Fmoc - (N - y - ビオチン) は、N - - Fmoc - リジン (- ビオチン) 又は N - - Fmoc - オルニチン (N - - ビオチン) である。

【0079】

(15) N - 末端ビオチニル化ペプチドは、以下の工程を含む方法に従って調製することができる：

- 適切に保護された連続したアミノ酸を樹脂に付加して、
- Fmoc - AA_n ... AA₁ - 樹脂を得る工程；
- 例えばピペリジンを用いて、NH₂ - 末端を脱保護する工程；
- 中間生成物：

30

【0080】

【化17】



40

を、そのCOOHを通してNH₂ - 末端に付加して、

【0081】

【化18】



を得る工程；

【0082】

50

- 得られた化合物の NH_2 - 末端基を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのアミノ末端でビオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及びペプチド開裂工程が同時又は別々に行なわれる可能性もある工程；特に
- 例えばピペリジンを用いて、中間基の NH_2 末端基を脱保護する工程；
- エタンジチオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャー（掃去剤）の存在下で、例えばトリフルオロ酢酸などの酸を用いて樹脂から開裂させる工程；
- 酸及びスカベンジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出する工程；
- HPLCなどを用いて精製して、

【0083】

【化19】

10

(B)



を得る工程。

【0084】

ビオチンは、そうでなければ完全に保護されているペプチド鎖の自由アミノ末端に対して、同様に従来 of 活性化手順を用いて便利にカップリングされ得る。ビオチンは1つのカルボキシ基を有し、アミノ基を全く有さないことから、ビオチンは基本的に鎖ターミネーターとして機能する。インシチュ (*in situ*) 活性化のための好ましい活性化剤としては、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP)、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N,N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) 及び O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TBTU) が挙げられるが、これらに制限されない。これらの及び関連する化合物を利用する活性化手順は、固相ペプチド合成の当業者にとっては周知のことであり、ビオチンのカップリングは、標準的カップリングプロトコールからの大きな逸脱をもたらすものではない。

20

30

【0085】

予め活性化された形態のビオチンも、同様に使用可能である。N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン又はビオチンアミドカブロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルのいずれでも便利に利用され、両方共市販されている。このカップリング方法は、Lob1, T. J., Deibel, M. R., 及び Yem, A. W., Anal. Biochem. (1988), 170(2): 502-511 により記載されている。N末端ビオチンの付加の後、ペプチドをスカベンジャーの存在下で樹脂から開裂させるが、スカベンジャーの選択は、ペプチドアミノ酸組成及び使用される保護基の性質の通常 of 考慮事項によって左右される。

【0086】

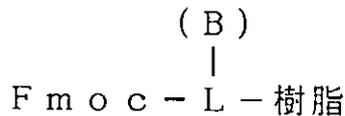
(16) 本発明の方法に關与するカルボキシ末端ビオチニル化ペプチドは、次の工程を含む方法に従って調製できる：

- 樹脂に付着した開裂可能なリンカーに対してカルボキシ活性化形態 of 上述 of 中間生成物をカップリングし、例えば以下の化合物：

【0087】

【化20】

40



を得る工程；

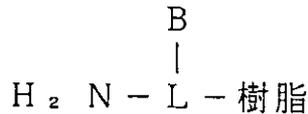
【0088】

- 例えばピペリジンを用いて、中間化合物の アミノ基を脱保護して、

【0089】

【化21】

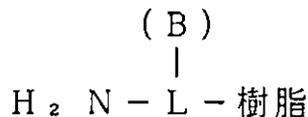
10



を得る工程；

【0090】

【化22】

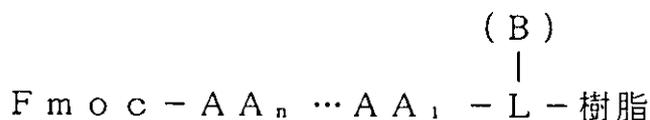


20

上に、適切に保護された次に続くアミノ酸 $\text{AA}_1 \dots \text{AA}_n$ を連続的に付加して、

【0091】

【化23】



30

を得る工程；

【0092】

- 例えばピペリジンを用いて、 NH_2 - 末端を脱保護する工程、

- 得られた化合物を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのカルボキシ末端でピオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及びペプチド開裂工程が同時又は別々に行なわれる可能性がある工程；そして特に

- 例えばピペリジンを用いて、 NH_2 末端を脱保護する工程；

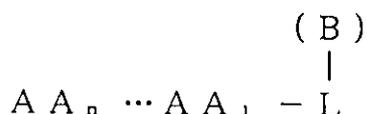
- エタンジチオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャーの存在下で、例えばトリフルオロ酢酸を用いて樹脂から開裂させる工程；

- 酸及びスカベンジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出する工程；

- HPLCなどを用いて精製して、

【0093】

【化24】



50

を得る工程。

【0094】

(17) 内部的にビオチニル化されたペプチドは、以下の工程を含む方法に従って調製することができる：

- 適切に保護された連続したアミノ酸を樹脂に付加して、

Fmoc-AA_n...AA₁-樹脂を得る工程、

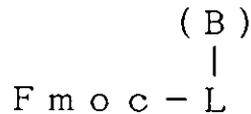
- NH₂ - 末端を脱保護する工程、

- 中間生成物：

【0095】

【化25】

10



【0096】

を、そのCOOHを通してNH₂ - 末端に付加して、

【0097】

【化26】

20



を得る工程、

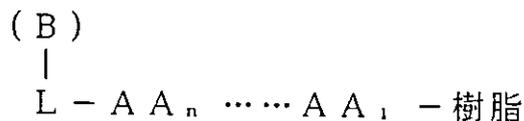
【0098】

- 例えばピペリジンを用いて、中間化合物の アミノ基を脱保護して、

【0099】

【化27】

30



を得る工程、

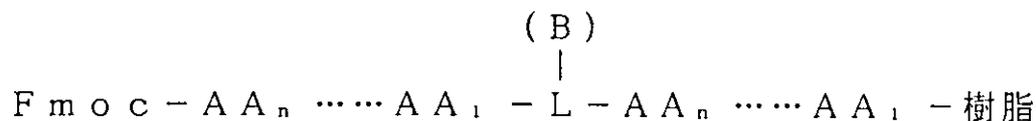
【0100】

- 適切に保護された次に続くアミノ酸を樹脂に付加して、

【0101】

【化28】

40



を得る工程、

【0102】

- 得られた化合物のNH₂ 末端基を脱保護し、樹脂から開裂させ、そのアミノ末端でビオチニル化された得られたペプチドを抽出及び精製し、側鎖脱保護及びペプチド開裂工程が同時又は別々に行なわれる可能性がある工程；特に

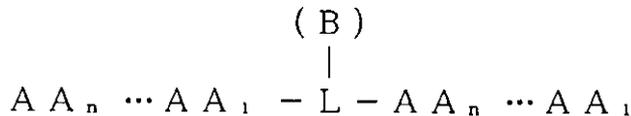
- 例えばピペリジンを用いて、NH₂ - 末端を脱保護する工程；

50

- エタンジチオール、チオアニソール又はアニソールのようなスカベンジャーの存在下で、例えばトリフルオロ酢酸などの酸を用いて樹脂から開裂させる工程；
- 酸及びスカベンジャーの大部分を除去するためにジエチルエーテルのような溶剤でペプチドを抽出する工程、
- HPLCなどを用いて精製して、

【0103】

【化29】



10

を得る工程。

【0104】

ある種の状況の下では、内部的に又はそのカルボキシ末端でペプチドをビオチニル化できることが特に有利であることがわかるかもしれない。このようなケースは、例えばペプチドのアミノ酸配列がタンパク質のアミノ末端配列に対応する場合に生じる。このようなペプチドのアミノ末端に対するビオチンの付着は、結果として、未変性タンパク質の中に見られるものとはかなり異なる構造をもたらし、その結果として、ペプチドの生化学的特性の結合特性に悪影響を及ぼしうる。内部タンパク質配列に対応するペプチドについてさえ、結合タンパク質又は免疫グロブリンによるそれらの認識は、ペプチドのどの末端にどのような要領でそれが結合のために提示されるかによって左右される可能性がある。ペプチド配向（オリエンテーション）の重要性については、Dyrberg, T. 及び Oldstone, M. B. A, J. Exp. Med. (1986) 164: 1344-1349 に記載されている。

20

【0105】

ビオチニル部分を、位置及び配列に無関係な形でペプチド内に取り込ませることができるようにするために、従来の手順を用いてカップリングできる好適な試薬を合成するべく努力が払われた。C末端又は内部ビオチニル化のための便利な1つの試薬は、N- ϵ -ビオチニル-リジンである。この化合物の ϵ -アミノ基が好適に保護されていれば(Fmoc及びtBoc)、この試薬は、固相ペプチド合成において使用される標準的手順により、アミノ酸末端を含むペプチド鎖内のどこにでもビオチンを導入するのに用いることができる。t-Bocで保護された誘導体の合成は、すでに記載されており[Bodansky, M. 及び Fagan, D. T., J. Am. Chem. Soc. (1977) 99: 235-239]、ある種のトランスカルボキシラーゼの酵素活性を研究する上で使用するための短いペプチドを合成するのに用いられた。

30

【0106】

t-Boc誘導体とは異なり、N- ϵ -Fmoc-Lys(N- ϵ -ビオチン)の合成については記載されておらず、Fmoc-ベースの合成戦略に対する関心が高まってきていることから、この化合物は特に有利なものとみなされている。

40

【0107】

Fmocで保護された望ましい化合物に到達するためにとることのできる可能なルートは数多く存在する。これらを図1に示す。第1のアプローチにおいては、市販のN- ϵ -Fmoc-Lys(N- ϵ -tBoc)を出発材料として用いることができる。N- ϵ -tBoc保護は、トリフルオロ酢酸、及び水などのスカベンジャーを用いて除去される。わずかにモル過剰のこのようにして得られたN- ϵ -Fmoc-リジンを、次にカルボキシ活性化ビオチンと反応させる。結果として得られた生成物は、選択的抽出及び標準的クロマトグラフィ技術により、容易に精製することができる。代替的な1つのアプローチにおいては、フルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネートとの反応により、市販のN- ϵ -ビオチニルリジン(ビオシチン)からN- ϵ -Fmoc-Lys(N- ϵ -ビオシチン)から

50

ン)を生成することができる。指針として用いることのできるこれらの反応の数多くの例が、Atherton及びSheppard、固相ペプチド合成、IRL Press、1988年に示されている。

【0108】

図1に示されている戦略(方法A)も同様に、市販のN-Fmoc-オルニチン(N-tBoc)からN-Fmoc-オルニチン(N-ビオチン)を合成するために適用することができる。オルニチン誘導体は、オルニチン誘導体に関しては1つの炭素原子分だけ短い側鎖の長さの点でのみ、リジン誘導体と異なっている。N-Fmoc-Lysは、遊離ビオチンについて記載されているインシチュ活性化用のものと同じ試薬を用いて、ペプチド鎖の中に便利に取り込ませうる。

10

【0109】

代替的には、アミノ酸のO-ペンタフルオロフェニルエステルの調製についてGreen, M. 及びBerman, J., Tetrahedron Lett. (1990) 31: 5851-5852に記載されている塩基触媒のエステル交換反応を用いて、N-Fmoc-Lys(N-ビオチン)及びトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニルから、N-Fmoc-Lys(N-ビオチン)-O-ペンタフルオロフェニルエステルを便利に合成することができる。この活性エステルは、ペプチド鎖中にN-Fmoc-Lys(N-ビオチン)を取り込ませるために直接使用できる。上述の中間生成物のクラスは、以下の工程を含む方法に従って調製できる：

- 前述のジアミノ-、モノカルボン酸を、入念に制御されたpH条件下でフルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート又はフルオレニルメチルクロロホルメートと反応させて、単独で保護されたN-Fmoc誘導体を得る工程、
- 又は代替的には、アミノ基を保護するのに使用されたFmoc基とは異なる保護基を側鎖アミノ基が有している場合、市販のN-Fmocで保護されたジアミノ-モノカルボン酸を使用する工程、なお、この側鎖アミノ基保護は、N-Fmoc基を無傷の状態に残す条件下で選択的に除去されやすい；
- 選択的抽出及びクロマトグラフィによりモノ保護N-Fmoc-ジアミノ-モノカルボン酸誘導体を精製する工程；
- N-ヒドロキシスクシンイミドビオチンのようなビオチンのカルボキシ活性化誘導体と、得られた誘導体とを反応させて、望ましい中間生成物である(N-Fmoc)-(N-y-ビオチン)を得る工程；
- 選択的抽出、沈殿又はクロマトグラフィにより中間生成物を精製する工程。

20

30

【0110】

本発明の方法において使用されるビオチニル化ペプチドに、リンカーアームを備えつける場合、これらの化学的単位は、これらの化合物のアミノ基に適切な一時的アミノ基保護を有しているかぎりにおいて、標準的カップリングプロトコルを用いて固相合成の間にペプチド配列のN末端又はC末端のいずれかに便利に付着されうる。これらの具体的なビオチニル化ペプチドは、全て新しいものである。

【0111】

表1は、ELISAにおける非ビオチニル化HIV-1及びHIV-2ペプチド(TM-HIV-1及びTM-HIV-2と称されている)、ならびにビオチニル化HIV-1及びHIV-2ペプチド(上記で1a.1及び2aと呼び、TM-HIV-1Bio及びTM-HIV-2Bioとも呼称されている)の抗体認識を表わす。

40

表2は、ELISAにおける分離株HIV-1mnのV3配列からの非ビオチニル化及びビオチニル化ペプチド(1b.4とも呼ぶ)の抗体認識の比較を表わす。

表3は、ELISAにおけるストレプトアビジン及びアビジンに結合したビオチニル化V3-mnペプチド(1b.4と呼ぶ)の抗体認識の比較を表わす。

表4は、ELISAにおけるビオチニル化及び非ビオチニル化HCVペプチドの抗体認識の比較を表わす。

より特定的には、

50

- 表 4 A は、H C V ペプチド X I に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 B は、H C V ペプチド X V I に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 C は、H C V ペプチド I I に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 D は、H C V ペプチド I I I に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 E は、H C V ペプチド V に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 F は、H C V ペプチド I X に対する抗体結合に対応する。
- 表 4 G は、H C V ペプチド X V I I I に対する抗体結合に対応する。
- 表 5 は、E L I S A における異なるペプチドコーティング濃度でのビオチニル化ペプチド及び非ビオチニル化ペプチドに対する抗体結合の比較を表わす。
- 表 6 は、E L I S A における N 末端及び C 末端ビオチニル化 T M - H I V - 1 ペプチド (1 a . 1 と呼ぶ) の比較を表わす。 10
- 表 7 は、非ビオチニル化及びカルボキシビオチニル化 H C V ペプチド I の抗体認識の比較を表わす。
- 表 8 は、E L I S A における抗体検出のためのビオチニル化 H I V ペプチド及び H C V ペプチドの混合物の使用を表わす。
- 表 9 は、H C V コアタンパク質のコアエピトープの配列を表わす。
- 表 1 0 は、H C V N S 4 タンパク質のコアエピトープの配列を表わす。
- 表 1 1 は、H C V N S 5 タンパク質のコアエピトープの配列を表わす。
- 表 1 2 は、1 0 の供試血清によるさまざまなコア、N S 4 及び N S 5 ビオチニル化 2 0 - m e r s の抗体結合を表わす。 20
- 表 1 3 は、個々の E 2 / N S 1 ペプチドの抗体認識 (陽性反応を与える全ての血清のパーセンテージ) を表わす。
- 表 1 4 は、H I V V 3 ループペプチドの全体的認識を表わす。
- 表 1 5 は、地理学的地域による H I V ペプチドの認識を表わす。
- 表 1 6 は、H I V - I V 3 ループペプチドである V 3 - c o n 及び V 3 - 3 6 8 に対するヨーロッパ産、アフリカ産及びブラジル産 H I V - 1 陽性血清の認識を表わす。
- 表 1 7 は、2 つの H I V - 2 V 3 ループペプチドに対する H I V - 2 陽性血清の認識を表わす。
- 表 1 8 は、ハイブリッドペプチドの抗体認識を表わす。
- 表 1 9 は、混合 H T L V - I 及び I I ペプチドの抗体認識を表わす。 30
- 全てのアミノ酸配列は、世界的に受け入れられた慣用的な三文字コードで、又表示のある場合には一文字コードで示されている。ペプチド配列は、慣用上アミノ末端からカルボキシ末端への方向である左から右に示されている。

【 0 1 1 2 】

いくつかの非慣用的コードも、化学基又は修飾を表わすのに用いられ、以下のように定義づけられる：

(基)	(コード)	
A c		アセチル
B i o		D - ビオチニル
F m o c		9 - フルオレニルメトキシカルボニル
t B o c		第 3 ブチルオキシカルボニル

40

【 0 1 1 3 】

例 1 : ペプチド合成

記載される全てのペプチドは、開裂時点でペプチドカルボキシ末端アミドを生成させるために、酸不安定性リンカー、4 - (- F m o c - アミノ - 2 , 4 - ジメトキシベンジル) フェノキシ酢酸 [R i n k , T e t r a h e d r o n L e t t . (1 9 8 7) 2 8 : 3 7 8 7] で共重合体官能化されたポリスチレン - ポリオキシエチレングラフトである T e n t a G e l S - R A M (R a p p P o l y m e r e , T u b i n g e n , ドイツ) 上で合成した。t - ブチルベースの側鎖保護及び F m o c - アミノ保護を用いた。アルギニンのグアニジン基は、2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチ 50

ルクロマン - 6 - スルホニル部分で保護した。ヒスチジンのイミダゾール基は、*t*-Boc又はトリチルで保護し、システインのスルフヒドリル基は、トリチル基で保護した。1.5当量の塩基N-メチルモルフォリンの存在下で活性化剤としてTBTUを用いたアルギニンの場合を除いて、予備形成されたO-ペンタフルオロフェニルエステルを用いてカップリングを行なった。場合によっては、グルタミン及びアスパラギンも、同様に、TBTU活性化を用いてカップリングした。これらの場合には、これらのアミノ酸のトリチルで保護された誘導体を利用した。TBTU又はHBTUのいずれかを用いて、ビオチンをカップリングした。全ての合成は、連続フロー手順を用いてMilligen 9050 PepSynthesizer (Novato、カリフォルニア)上で行なった。スカベンジャーの存在下でのトリフルオロ酢酸での開裂及びジエチルエーテルでの抽出の後、全てのペプチドを、C18-逆相クロマトグラフィにより分析した。 10

【0114】

例2：N- - Fmoc-Lys(N- - ビオチン)の合成

A. 方法A

市販のN- - Fmoc-L-リジン(N- - *t*Boc)(1.5g)を、20ミリリットルの95%トリフルオロ酢酸、5% H_2O で、室温で2時間処理した。その後、大部分の酸を窒素流の下で蒸発させた。10ミリリットルの水を添加し、ジエチルエーテルで3回、溶液を抽出した。次に、五酸化リン上、真空中で、乾燥に至るまで水相を蒸発させた。結果として得られた粉末(N- - Fmoc-L-リジン)を逆相クロマトグラフィで分析し、これは予想通り出発物質よりもさらに親水性の均質な生成物であることがわ 20

かった。8ミリリットルの0.1M 硼酸塩緩衝液、pH 8.7中に、N- - Fmoc-リジン(190mg、0.49mmol)を溶解した。4ミリリットルのジメチルホルムアミド中に、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン(162mg、0.47mmol)を溶解し、N- - Fmoc-リジンの溶液に添加した。pHを監視し、必要に応じてNaOHで滴定した。2時間後、溶液をHClでpH 2.0になるまで酸性化し、この時点で白色沈殿物が得られた。

酢酸エチルでの抽出及び遠心分離の後、白色沈殿物は H_2O ：酢酸エチルの界面に見出された。両方の相を除去し、10mM HClで2回、酢酸エチルで1回、そしてその後ジエチルエーテルで2回、沈殿物を抽出した。DMF中に沈殿物を溶解し、ジエチルエー 30

テルを添加することによって沈殿させた。その後、五酸化リン上、真空中で結晶性粉末を乾燥した。結果として得られた生成物を逆相クロマトグラフィで分析したところ、予想通りN- - Fmoc-Lysよりも遅く溶出される主要なピークが明らかになった。N- - Fmoc-Lysの非常に小さいピークも同様に観察された(図2a)。

【0115】

B. 方法B

市販のN- - ビオチニルリジン(ビオシチン、Sigma、249mg、0.67mmol)を、8ミリリットルの1M Na_2CO_3 中に溶解させ、氷上で冷却した。2ミリリットルのアセトン中にフルオレニルメチルスクシンイジミルカーボネート(222mg、0.66mmol)を溶解し、激しく攪拌しながら30分間にわたってビオチニルリジン 40

溶液に添加した。攪拌は室温で5時間続けた。pHは、必要に応じて1M Na_2CO_3 を添加することにより8~9に維持した。その後、真空下でアセトンを蒸発させ、溶液のpHが約2となるまで1.0M HClを添加した。溶液の酸性化の時点で、白色沈殿物が現われ、これを10mM HClで2回、酢酸エチルで2回、ジエチルエーテルで2回洗浄した。沈殿物をDMF中に溶解し、ジエチルエーテルを添加することによって沈殿させた。次に、結晶性粉末を五酸化リン上、真空中で十分に乾燥した。逆相クロマトグラフィによって、結果として得られた生成物を分析し、方法1(図2b)を用いて得られた生成物と同じ保持時間(30.5分)で溶出される主要なピークが明らかになった。

【0116】

例3：特異的抗体を用いる酵素結合免疫吸着検定(ELISA)

において免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドを決定する方法

ペプチドを直接コーティングする場合、ペプチドの原液を炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6で希釈し、1ミリリットル当たり2~5マイクログラムのペプチド濃度で、ポリスチレンマイクロタイタープレートを37で1時間コーティングするのに使用した。

ビオチニル化されたペプチドを評価する場合には、プレートを、

まず、炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6中、1ミリリットル当たり3マイクログラムの濃度のストレプトアビジンを用いて、37で1時間コーティングした。その後、プレートを洗浄して余分の未結合タンパク質を除去した。次に、マイクロタイタープレートのウェルに、炭酸ナトリウム緩衝液中、1ミリリットル当たり1マイクログラムのビオチニル化ペプチドの作用溶液を添加し、37で1時間インキュベートした。

10

プレートをひとたび抗原でコーティングし、プラスチック上のあらゆる残りの占有されていない結合部位をカゼインでブロッキングした。洗浄の後、適切な抗血清の希釈液(通常1:100)をプレートのウェルに添加し、37で1時間インキュベートした。

非結合物質を除去するため洗浄を行なった後、酵素西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされたヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体と共にプレートをインキュベートすることにより、特異的抗体結合を検出した。洗浄による非結合コンジュゲートの除去の後、H₂O₂及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含む溶液を添加した。

好適な間隔をおいた後、硫酸の添加により反応を停止させた。陽性反応は黄色を呈し、これを従来のマイクロタイタープレートリーダーを用いて定量した。450ナノメートルの波長で吸光度測定を行ない、全てのデータをこの波長での光学密度値として表わした。

20

【0117】

例4: HIV特異的抗体の検出のためのビオチニル化されたHIVペプチドの使用

HIV-2及びHIV-2の膜貫通タンパク質に含まれているその他のものに相当する、10アミノ酸の長さの短いN-アセチル化ペプチドの抗体認識を評価するために、実験を行なった。マイクロタイタープレートのウェル中のこれらのペプチドの直接的コーティングは、ELISAにおいて抗体結合を評価した場合、きわめて貧弱な結果を与えた。ペプチドがポリスチレン固相に充分結合しなかったことが疑われたため、リンカーアームとして役立つことを役目とする3つのグリシン残基によりデカマーペプチド配列から分離した状態で、ペプチドのアミノ末端にビオチンを付着した点を除き、同じ要領でペプチドを再合成した。比較のために使用したペプチドは、以下のとおりであった。

30

TM-HIV-1:

Ac-Ile-Trp-Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys-NH₂

TM-HIV-1 Bio

Bio-Gly-Gly-Gly-Ile-Trp-Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys-NH₂ TM-HIV-2

Ac-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-NH₂

TM-HIV-2 Bio

Bio-Gly-Gly-Gly-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-NH₂

40

【0118】

ビオチニル化ペプチドを、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタープレート上にロードした。これらのペプチドに対する抗体結合を、マイクロタイタープレート上に直接コーティングされた非ビオチニル化ペプチドに対する抗体結合と比較した。結果を表1に示す。ストレプトアビジンに結合したHIV-1又はHIV-2膜貫通タンパク質からのビオチニル化ペプチドが、それぞれHIV-1又はHIV-2に感染した人物からの抗血清により非常に良く認識されるということは明らかである。これは、ポリスチレンプレート上に直接コーティングされたこれらのペプチドの非ビオチニル化バージョンとは対照的である。さらなる対照実験は、共にマイクロタイタープレート上に直接コーティン

50

グした場合には、ビオチニル化ペプチド又は非ビオチニル化ペプチドの抗体認識に全く差がなかったことから、抗体結合の増加がビオチニル化ペプチドとストレプトアビジンとの間の特異的相互作用の結果であることを示した。

【0119】

いくつかのペプチド、特に長さが15アミノ酸以上であるペプチドは、十分に固相に結合して、ペプチド配列内に存在するエピトープを認識する特異的抗体の検出を可能にする。

【0120】

ビオチニル化がより長いペプチドの抗体認識をも改善するか否かを確認するため、分離株 HIV-1mnの部分的V3ループ配列のビオチニル化及び非ビオチニル化の両バージョンを合成した。両方のペプチドの配列及び合成方法は、アミノ末端において以外、同一であった。非ビオチニル化ペプチドは、単にアセチル化されただけであるが、一方ビオチニル化されたバージョンにおいては、ビオチニル部分からペプチドを分離するためのリンカーアームとして、2つのグリシン残基が付加された。

10

【0121】

使用された2つのペプチドの配列は以下のとおりである：

- 非ビオチニル化V3mnペプチド

Ac - Tyr - Asn - Lys - Arg - Lys - Arg - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Thr - Thr - Lys - Asn - Ile - Ile - Gly - NH₂ ,

- ビオチニル化V3mnペプチド(ペプチド1b.4)

Bio - Gly - Gly - Tyr - Asn - Lys - Arg - Lys - Arg - Ile - His - Ile - Gly - Pro - Gly - Arg - Ala - Phe - Tyr - Thr - Thr - Lys - Asn - Ile - Ile - Gly - NH₂ .

20

【0122】

非ビオチニル化ペプチドは、ポリスチレンマイクロタイタプレート上のウェル上に直接コーティングしたが、一方、ビオチニル化ペプチドは、予めストレプトアビジンでコーティングしたウェルに結合させた。表2に示す結果は、ビオチニル化ペプチドに対する抗体結合が、プラスチック上に直接コーティングされたペプチドに対する抗体結合よりも優れているということを実証している。

【0123】

例5：抗体検出のためのビオチニル化ペプチド-アビジン複合体の使用

ペプチドをビオチニル化し、ストレプトアビジンに結合させた場合、このペプチドの抗体認識が改善されることを実証した後、ストレプトアビジンをアビジンで置換できるか否かを決定するためさらに実験を行なった。表3に示す結果は、それが事実であり、アビジンに結合されたビオチニル化ペプチドが特異的抗体によってきわめて効率良く認識されることを表わしている。

30

【0124】

例6：HCV特異抗体の検出のためのビオチニル化HCVペプチドの使用

ビオチニル化ペプチドの強化された抗体認識が一般的な現象であるか否かを決定するために、C型肝炎ウイルス(HCV)ポリタンパク質から誘導された配列に相当する付加的な20アミノ酸の長さのペプチドを多数合成した。評価したアミノ酸配列は以下のとおりであった：

40

a. HCVペプチドXI

Ser - Gln - His - Leu - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Gly - Met - Met - Leu - Ala - Glu - Gln - Phe - Lys - Gln - Lys

b. HCVペプチドXVI

Leu - Arg - Lys - Ser - Arg - Arg - Phe - Ala - Gln - Ala - Leu - Pro - Val - Trp - Ala - Arg - Pro - Asp - Tyr - Asn

c. HCVペプチドII

Pro - Gln - Arg - Lys - Thr - Lys - Arg - Asn - Thr - Asn -

50

Arg - Arg - Pro - Gln - Asp - Val - Lys - Phe - Pro - Gly
d . HCVペプチドII I

Arg - Asn - Thr - Asn - Arg - Arg - Pro - Gln - Asp - Val -
Lys - Phe - Pro - Gly - Gly - Gly - Gln - Ile - Val - Gly
e . HCVペプチドV

Thr - Arg - Lys - Thr - Ser - Glu - Arg - Ser - Gln - Pro -
Arg - Gly - Arg - Arg - Gln - Pro - Ile - Pro - Lys - Val
f . HCVペプチドIX

Ile - Ile - Pro - Asp - Arg - Glu - Val - Leu - Tyr - Arg -
Glu - Phe - Asp - Glu - Met - Glu - Glu - Cys - Ser - Gln
g . HCVペプチドXVII I

Glu - Thr - Trp - Lys - Lys - Pro - Asp - Tyr - Glu - Pro -
Pro - Val - Val - His - Gly - Cys - Pro - Leu - Pro - Pro
【0125】

各々のケースにおいて、2つのバージョンのペプチドを合成した。非ビオチニル化バージョンは、ペプチドをアミノ末端でアセチル化した。ビオチニル化バージョンは、全てN末端ビオチニル化した。2つのグリシン残基から成るリンカーアームにより、ビオチニル部分を、HCV配列を含むアミノ酸から離れた。

【0126】

非ビオチニル化ペプチドは、1ミリリットル当り3マイクログラムの濃度でポリスチレン
マイクロタイターのウェル上に吸着させた。

【0127】

ビオチニル化ペプチドは、1ミリリットル当り1マイクログラムの濃度で、ストレプトア
ビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートに結合させた。これらのペプチド
に対する抗体を含むことが知られている血清を、評価のために使用し、20倍の希釈でテ
ストした。これらの比較の結果を、表4 a ~ gに示す。

【0128】

これらの結果は、ストレプトアビジンに結合したビオチニル化ペプチドの抗体認識が、マ
イクロタイタープレートのウェル上に直接コーティングされたペプチドのものに比べ、高
められていることを明らかに示している。

【0129】

例7：抗体検出に対するコーティング濃度の影響

プラスチック上の直接吸着に比べて高められたストレプトアビジン又はアビジンに結合し
たビオチニル化HCVペプチドの抗体認識について、さらに調べるため、ペプチドコーテ
ィング濃度の影響を調べた。マイクロタイタープレートのウェル1つ当り200マイクロ
リットルの容積で、1ミリリットルにつき10ナノグラム～3マイクログラムまでの濃度
で、3つのペプチド(HCVペプチドII、XI及びXVI)をコーティングした。直接
コーティングのためには、これらのペプチドの非ビオチニル化バージョンを用いた。予め
ストレプトアビジンを吸着させたウェルをコーティングするために、これらのペプチドの
ビオチニル化バージョンを使用した。これらのペプチドに対する抗体を含むことが知られ
ている血清を、1～100の希釈で使用して、抗体結合の程度を評価した。

この実験の数値的結果は、表5に示され、図3、a～cではグラフに表わされている。

わずかな例外を除いて、テストされた最低の濃度(1ミリリットル当り10ナノグラム、
1ウェル当り2ナノグラム)においてさえ、ビオチニル化ペプチドが非常に良く認識され
るということは明白である。数多くのケースにおいて、1ミリリットルにつきわずか30
ナノグラムのペプチド濃度(1ウェル当り6ナノグラム)で、到達可能な最大値に近い光
学密度値が観察される。しかしながら、それとは対照的に、プラスチック上に直接吸着さ
れた非ビオチニル化ペプチドは、全くないと言わないもののわずかし抗体によっ
て結合されない。

【0130】

10

20

30

40

50

例 8 : 固相上でのペプチドのコーティング効率に対するペプチドのビオチニル化の影響
 ペプチドを直接コーティングした場合のシグナルの欠如が、ペプチド吸着の欠如によるものか否かを決定するため、さらに実験を行なった。この場合、ペプチドのビオチニル化バージョンは、非ビオチニル化バージョンについての前の実験で用いられたものと同じ濃度でプラスチック上に直接コーティングした。ビオチン標識されたペプチドが結合したか否かを確かめるために、マイクロタイタープレートと、ストレプトアビジン：西洋ワサビペルオキシダーゼのコンジュゲートと共にインキュベートした。各ペプチドは単一のビオチニル基を含んでいることから、結果として得られる光学密度は、結合したペプチドの絶対量はわからないものの、結合したペプチドの量の 1 つの尺度である。図 4 にグラフで表わされている結果は、プラスチックに結合したペプチドを検出することができることを立証している。予想通り、曲線は各ペプチドについて異なっており、これはその化学的独自性を反映するものである。ペプチドのうち 2 つ、すなわち H C V ペプチド X I と X V I は、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルに弱く結合するにすぎないように思われ、この弱い結合は、E L I S A において得られた低い光度密度値に反映されている。ストレプトアビジンでコーティングされたウェルに対するビオチニル化ペプチドの結合は、非常に優れた抗体認識という結果をもたらすことから、ビオチンとストレプトアビジンとの間の相互作用を使用する場合には、固相に対するペプチドの貧弱な結合が、制限条件とはならないことは明白である。

10

【 0 1 3 1 】

一方、ペプチドのうち 1 つ、すなわち H C V ペプチド I I は、特に高い方のコーティング濃度において、固相に対して非常に有意な結合を示す。しかしながら、どんなコーティング濃度においてであれ、ペプチドを直接コーティングした場合に得られるシグナルが、ビオチニル化ペプチドをストレプトアビジンに結合させた場合に得られるシグナルと等しくなることはなかった。試験した最低濃度においてさえ、このペプチドのストレプトアビジンと結合したビオチニル化バージョンは、試験した抗血清で陽性シグナルを明らかに与えることから、結果は、このペプチドの直接コーティングが異常に効率が悪いのか、又は固相に対するペプチドの単純な結合に加えてその他の要因が重要であることのいずれかを表わしていると思われる。

20

【 0 1 3 2 】

定量するのは難しいものの、これらの要因の 1 つは、ペプチドが結合し、抗体結合に利用可能となる方法にほぼ確実に関与している。固相上に直接コーティングされるペプチドの場合、いくらかの割合のペプチド分子が、抗体認識にとっても必須のアミノ酸側鎖を通して固相と相互作用するであろうということは、事実上避けられない。従って、これらのペプチド分子は抗体との結合反応に参加することができないであろう。この問題は、ビオチンと、固相に結合したストレプトアビジンとの間の相互作用を通して、全て固相に結合されているビオチニル化ペプチドの場合には見られないものである。

30

【 0 1 3 3 】

例 9 : 特異的抗体認識のための C 末端ビオチニル化 H I V ペプチドの使用

そのカルボキシ末端でビオチニル化されたペプチドも、強化された抗体認識に使用できるか否かを決定するために、T M - H I V - 1 ペプチドのカルボキシ - ビオチニル化バージョンを合成した。20%ピペリジンでリンカー結合 F m o c 基を除去した後、酸不安定性リンカー、4 - (- F m o c - アミノ - 2 , 4 - ジメトキシベンジル) フェノキシ酢酸で官能化した樹脂に、上述のような方法 A によって調製された N - - F m o c - L y s (N - - ビオチン) を、直接カップリングした。樹脂官能基と比べて 3 倍モル過剰の N - - F m o c - L y s (N - - ビオチン) を用いることにより、カップリングを行なった。カルボキシル基の活性化を、H B T U 1 当量、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール 1 当量及び N - メチルモルフォリン 1 . 5 当量を用いて達成した。N - - F m o c - L y s (N - - ビオチン) の完全な溶解を達成するために必要な 40 パーセントのジメチルスルホキシドを含むジメチルホルムアミド中、0 . 6 M 溶液として N - メチルモルフォリンを施した。N - - F m o c - L y s (N - - ビオチン) のカップリング

40

50

に続いてFmoc脱保護ピークを検査すると、カップリングがスムーズにかつ効率良く進んだことがわかった。TM-HIV-1アミノ酸配列からビオチニルリジンを分離させるため、2つのグリシン残基をカップリングした。ペプチド合成に続いて、無水酢酸を用いてアミノ末端をアセチル化した。結果として得られたカルボキシビオチニル化ペプチドの構造は、アミノ末端でビオチニル化されたペプチドとはかなり異なっている。これらの構造の比較を図5に示す。

【0134】

これら2つのペプチドの抗体認識を評価するため、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイプレートにペプチドを個別に結合させ、HIV-1血清陽性ドナーからの抗血清パネルを用いて試験した。この比較の結果を表6に示す。明らかに、C末端でビオチニル化されたペプチドの抗体認識は、N-末端でビオチニル化されたペプチドの抗体認識と比べ、まさるとも劣らないものである。これらの結果は、同様に、カルボキシ末端ビオチニル化についての試薬N-Fmoc-Lys(N-ビオチン)の有用性をも確認している。

10

【0135】

例10：直接コーティングされた(非ビオチニル化)又はストレプトアビジンでコーティングしたプレートに結合された(カルボキシ末端ビオチニル化)HCVペプチドIの抗体認識の比較

カルボキシ-ビオチニル化形態のペプチドが、非ビオチニル化形態のペプチドに比べ、結果として優れた抗体認識をもたらすか否かを決定するため、ポリスチレンELISAプレートに比較的良好に結合するペプチドを用いて、類似の実験を行なった。選択されたペプチドはHCVペプチドIであり、これを以下のバージョンで合成した：

20

【0136】

a. 非ビオチニル化バージョン：

H₂N-Met-Ser-Thr-Ile-Pro-Lys-Pro-Gln-Arg-Lys-Thr-Lys-Arg-Asn-Thr-Asn-Arg-Arg-Pro-Gln-CONH₂

b. カルボキシ-ビオチニル化バージョン

H₂N-Met-Ser-Thr-Ile-Pro-Lys-Pro-Gln-Arg-Lys-Thr-Lys-Arg-Asn-Thr-Asn-Arg-Arg-Pro-Gln-Gly-Gly-Lys(Bio)-CONH₂

30

Lys(N-Bio)からペプチド自体のHCV部分を物理的に分離するため、カルボキシ末端に2つのグリシン残基から成るスペーサーを付加した。開裂時にカルボキシ末端アミドを生成させるため、4-(Fmoc-アミノ-2,4-ジメトキシベンジル)フェノキシ酢酸リンカーで官能化した樹脂上で合成を行なった。リンカーに対するN-Fmoc-Lys(N-ビオチン)のカップリングは、リンカーと比べ3倍モル過剰の中間生成物を用いて行なった。N-Fmoc-Lys(N-ビオチン)の活性化は、TBTU1当量、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1当量及びN-メチルモルフォリン1.5当量を用いて達成した。その他の全てのアミノ酸のカップリングは、従来のプロトコルに従って行なった。適切なスカベンジャーの存在下、トリフルオロ酢酸中でのペプチドの開裂に続いて、ペプチドを沈殿させ、ジエチルエーテルで抽出した。

40

【0137】

非ビオチニル化HCVペプチドIは、炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中、1ミリリットル当たり3マイクログラムの濃度で、ポリスチレンELISAプレートのウェル上に直接コーティングした。ビオチニル化HCVペプチドIは、1ミリリットルにつき1マイクログラムの濃度でペプチドを含む原液を用いて、ストレプトアビジンでコーティングしたウェルに結合させた。次に、結果として得られたプレートを、平行して、HCV-血清陽性ドナーからの血清のパネルと共にインキュベートした。この比較の結果を表7に示す。

50

ビオチニル化されたペプチドは、明らかに、同じ配列の非ビオチニル化バージョンと比べて優れた結果を与えている。2つの血清(8326及び8244)は、非ビオチニル化バージョンに比べてはるかに良くこのペプチドのビオチニル化バージョンを認識している。抗体反応の特異性は、同様に、非感染ドナーからの5つの血清試料(F88、F89、F76、F136及びF6)について得られた低い光学密度によっても反映されている。

【0138】

例11: ビオチニル化HIV及びHCVペプチドの混合物の使用

数多くのケースにおいて、望ましい結果を得るために、ペプチド混合物の使用が必要となる。ペプチド混合物は、単一のウイルスの単数又は複数のタンパク質に対して向けられた抗体を検出するため、又は単一の試験において複数のウイルスのタンパク質に対して向けられた抗体を検出するために使用することができる。このような試験は、輸血のため及び血液製剤の供給源として使用する上での適性について献血をスクリーニングするために、特に有利であると考えられる。このような場合、好適なペプチド混合物でコーティングされたELISAプレート又はその他の固体支持体を用いて、その存在が試料を使用に適さないものにしてしまう単数又は複数の感染性因子に対する抗体の存在について、試料をスクリーニングすることができる。特定の感染性因子の診断には、精確な決定を得るためにペプチドの適切な混合物が必要とされる。個々のペプチド又はペプチド混合物が、固相に結合されており、しかし、個々の反応を観察及び評価できるように、例えば直線免疫検定の場合のように物理的に分離されている試験システムを使用すれば、単数又は複数の感染性因子から誘導された個々のウイルス性抗原に対する抗体を、個々に検出し、同時に同定することが可能である。このような試験は、望ましい結果を達成するためには、ペプチド混合物の適切な組合せの使用を必要とする。

10

20

【0139】

往々にして、進行中の又は過去の感染の診断のために、単一のペプチドではなくむしろ複数のペプチドの混合物を使用することが好ましい。単一のエピトープに対する個々の応答はかなり可変的でありうるので、抗体試験においていくつかの免疫学的に重要なエピトープが存在する場合に、より信頼性の高い結果が往々にして得られる。しかしながら、各ペプチドは化学的に独特のものであるので、1つの試験の中に望ましいペプチドの全てを取込むことは、特にペプチドを固相上に直接コーティングしようとする場合に、往々にして困難である。全てのペプチドが固相に結合できるわけではなく、混合物中のペプチドは、pH、イオン強度及び緩衝液組成に関して非常に異なる最適コーティング条件を示しうる。

30

【0140】

ストレプトアビジン又はアビジンでコーティングしたプレートに結合させた場合に、混合物中でビオチニル化ペプチドがいかにうまく機能するかを決定するため、HCV-1ペプチドTM-HCV-1(前記では1a.1と呼んでいる)及びV3-mn(前記では1b.4と呼んでいる)、HIV-2ペプチドTM-HIV-2(前記では2aと呼んでいる)、ならびにC型肝炎ウイルスペプチドII、IX及びXVIIのN末端ビオチニル化バージョンの2つの混合物を作った。混合物Aは、1ミリリットル当たり1マイクログラム(合計で1ミリリットルにつきペプチド6マイクログラム)の濃度で6つのビオチニル化ペプチドの各々を含んでおり、一方、混合物Bには、1ミリリットル当たり0.1マイクログラム(合計で1ミリリットル当たりペプチド0.6マイクログラム)の濃度で各ペプチドが存在していた。個々のペプチドを、1ミリリットルにつき1マイクログラムの濃度でコーティングした。比較のために、混合物A及びBを、マイクロタイプレートの上で直接コーティングもした。HIV-1、HIV-2及びHCV-血清陽性ドナーからの試料を試験し、血清陰性血液ドナーからの血清と比較した。反応が陽性か陰性かを決定するため、0.250をカットオフ吸光度値とした。0.250以上の吸光度値を陽性とみなし、一方、この値より下の吸光度値は陰性とみなした。この実験の結果を表8に示す。

40

【0141】

50

個々のペプチドに対する反応に基づくと、HCV血清試料は全て、HIV-1又はHIV-2のいずれかに対する抗体について陰性であった。1つのHIV-2試料(No.1400)は、HCVペプチドXVIIIIに対する抗体を有していた。試験したHIV試料のうち、交叉反応性を示すものは全く存在せず、個々のペプチドに基づくELISAは特異的である。

【0142】

混合物A及びBは、両方共、アビジンでコーティングしたマイクロタイタープレートに結合させた場合、優れた結果を与えた。予想通り、これらの混合物は、HIV-1、HIV-2及びHCV陽性の血清によっては認識されたが、血清陰性血液ドナーからの血液によっては認識されなかった。これとは対照的に、これらの混合物をマイクロタイタープレート上に直接コーティングした場合、結果はかなり満足度の低いものであり、数多くの試料が、適用したカットオフ値よりも下に入る反応を与えた。これらの結果は、直接固相上にコーティングされたペプチドと比較して高められたアビジンに結合したビオチニル化ペプチドの免疫学的認識、ならびに複数の抗体検出のためにペプチド混合物を用いることの利点を、かなり説得力のある形で例示するのに役立つ。

10

【0143】

例12：HCVの診断上有用な領域におけるエピトープのマッピングのためのビオチニル化ペプチドの使用

例6において、コア、NS4及びNS5のようなHCVポリタンパク質の診断上重要ないくつかの領域を、重複する20-merのビオチニル化ペプチドを用いて同定できることが立証された。さらに広範に血清学的試験を行なうことにより、これらのビオチニル化ペプチドを利用した直線免疫検定の開発を可能にした最も有用な20-merビオチニル化ペプチドが同定された。しかしながら、これら20アミノ酸の長さの配列中のどこにエピトープが位置しているかをより正確に知ることが望ましい。その理由の1つは、より短い配列が同定できた場合、ペプチドが極端に長くなることなく2つ又は3つのエピトープを含む合成ペプチドを作ることが可能になるという点にある。

20

【0144】

推定HCVタンパク質の1つの位置に存在するエピトープは、Geysen, H.M., Meloen, R.H.及びBarteling, S.J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81: 3998-4002

によって初めて記載された方法を用いてマッピングされた。8アミノ酸の重複を伴う9アミノ酸の長さの連続的なペプチドを、開裂不可能なリンカーで誘導されたポリエチレンピンプン上で合成した。このペプチドの長さが選ばれたのは、それが、一般に5~7アミノ酸の長さである標準的な線状エピトープのサイズよりも大きいためである。9-mersを合成することにより、エピトープが見逃がされる確率は最小限におさえられることになる。

30

【0145】

HCVポリタンパク質の走査された領域は、コア配列(aa1~80)、NS4(aa1688~1755)、及びNS5(aa2191~2330)を含んでいる。これらの領域は、予め決定された20-mers、すなわちペプチドI~VII(コア1~13)、ペプチドVIII~XIV(NS4-1~9)及びペプチドXV~XIX(NS5-13~33)に相当する。

40

【0146】

合成の後、アミノ末端の天然でない正の電荷を除去するため、側鎖脱保護に先立って、全てのペプチドをN-アセチル化した。

その後、ペプチドを、HCV血液陽性ドナーからの血清中に存在する抗体によって認識されるその能力について検定した。これらの実験の結果を図6a~6cに示す。図示されている光学密度値は、重複した測定値の平均であり、9-mer配列の最初のアミノ酸に割り当てられている。

【0147】

10個の異なるHCV血清の抗体結合プロフィールを図6aに示す。HCVのコアタンパ

50

ク質が、合成ペプチドにより容易に刺激される明確な線状エピトープを呈するということは明らかである。少なくとも表面的には、ほとんどの血清はきわめて類似したパターンを示すように見える。しかしながら、より密に検査すると、個別の相違があることが明らかになる。抗体により認識されたHCVコアタンパク質のさまざまな領域は、まちがいに、各領域がポリクローナル血清を用いて区別することが不可能でなければ困難であるいくつかの重複するエピトープから構成されているので、恐らくそのままのエピトープというよりもむしろエピトープ性クラスターと呼ぶ方が適切であると思われる。これらのエピトープ性クラスターの各々におけるコアエピトープを同定するための試みを行なった。この意味で、「コア」という語は、抗体によって認識可能な最小限のアミノ酸配列のことを言う。しかしながら、コア配列に加えてアミノ酸が、特にポリクローナル血清の場合において反応性を改善するという点を強調しておくべきであろう。エピトープの分析を表9に示す。さまざまな血清の反応を比較することにより、エピトープ性クラスターのサブドメインを同定することができた。いくつかの血清は1つのサブドメインと優先的に反応するが他のサブドメインとは反応せず、一方、その他の血清は全てのサブドメインを認識するものの、各々がその特定のエピトープ性クラスターを構成する大きいピークにおいて肩部を形成することから、なおもサブドメインの区別を許す。表9及び図7aは、20-mer sの配列との関係におけるコアエピトープの場所を示している。

10

【0148】

20-mer コアペプチドの各々に相当する一連の9-mer sを、試験した抗血清の1つに関する抗体認識プロフィールと関連させたこれらの配列の各々の位置づけと合わせて、図7aに示す。

20

【0149】

10の血清を用いて得られたNS4に対する抗原プロフィールを、図6bに示す。一般に、9-mer sとこれらの血清との反応は、コアタンパク質からのペプチドとの反応に比べ、さほど強いものではなかった。それでもなお、ウイルス性NS4タンパク質のN末端配列内のエピトープ領域を同定することは可能であった。これらのエピトープのコア配列は表10で分析されており、この領域において診断上重要な20-mer の合成ペプチドに対するその関係を示している。異なる20-mer sに対応する9-mer sを、抗原プロフィールの一例と関連させたその位置づけと合わせて、図7bに示す。20-mer sがこの領域内のエピトープにかなり良く対応していることがわかる。

30

【0150】

走査されたNS5タンパク質の部分は、20-mer ペプチド13~33により網羅される領域に相当する。この領域で得られた抗原プロフィールを図6cに示す。ここでも又、コアエピトープを定義づけする試みを行なった、これらを表11に列挙する。この配列のアミノ末端部分には抗体結合はほとんど見られなかった。図7cには、20-mer ペプチドNS5-21~NS5-31に対応する9-mer sが列挙され、抗原プロフィールの1つと関連させたそれらの位置が示されている。

特に、HCVペプチドXVI(NS5-27)によって表わされる配列の重要性は、重複する9-mer sを用いて得られた結果に基づくと著しく過小評価されたであろうということが明らかである。この配列の重要性は、同様に、マイクロタイタープレート上への直接コーティングに続くELISAにおいて非ビオチニル化HCVペプチドXVI(NS5-27)が評価された場合にも、過小評価されたであろう(表4B参照)。しかしながら、このペプチドのビオチニル化バージョンをストレプトアビジン又はアビジンでコーティングされたプレートに結合させた場合、診断上価値のある非常に重要なエピトープの存在が明らかになる。

40

【0151】

9-mer sの場合に見られる往々にして弱い結合とは対照的に、20-mer sでの結合は、往々にして非常に強い(表12参照)。いくつかのケースでは、相違は劇的である。例えば、血清8241はいずれの9-mer sも認識しないのに対し、ペプチドHCV2(ペプチドIX)及びHCV5(ペプチドXI)に対する結合は非常に強い。ペプチド

50

H C V 7 (ペプチド X I I I) に対する中程度の結合も観察された。このことは、20 - m e r s には存在するが 9 - m e r s には存在しないこれらのエピトープに対する重要な構造的成分が存在することを表わしていると思われる。

【 0 1 5 2 】

例 1 3 : H C V 直線免疫検定の N S 1 領域の N 末端におけるエピトープの同定のためのピオチニル化ペプチドの使用

エピトープは、直線免疫検定 (L I A) を用いても同定することができる。一般に、非ピオチニル化ペプチドは、ポリスチレン E L I S A プレートに対してよりもナイロン膜に対してより良く結合する。それでもなお、ストレプトアビジン又はアビジンと複合体形成したピオチニル化ペプチドは、直線免疫検定において、膜に直接結合されたその非ピオチニル化対応物よりも優れた結果を与える。これを例示するため、H C V ペプチド X X g - 1 及び X X g - 2 の非ピオチニル化及び N 末端ピオチニル化バージョンを合成した。非ピオチニル化ペプチドは、1 ミリリットル当り 1 0 0 マイクログラムのペプチドを含む原液として膜に適用し、一方、ピオチニル化ペプチドは、ストレプトアビジンに結合させ、1 ミリリットル当り 1 0 0 マイクログラムの複合体の原液として適用した。従って、原液中のピオチニル化ペプチドの量は、1 ミリリットル当り約 1 0 0 マイクログラムであった。反応の強度を評価する上での助けとするため、3 つのヒト I g G 対照ラインをもストリップに適用した。抗原ラインの適用の後、膜上の余分な結合部位を、リン酸緩衝生理食塩水中のカゼインを用いてブロッキングした。その後、膜を、抗原ラインを適用した方向に対して垂直にストリップの形に裁断し、結果として得られたストリップを、H C V 血清陽性ドナーからの血清パネルと共にインキュベートした。結合した抗体を、酵素アルカリホスファターゼにコンジュゲートされたヤギ抗ヒト I g G 抗体を用いて、5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェートとニトロブルーテトラゾリウムを添加した後、視覚的に検出した。結果を図 8 に示す。

【 0 1 5 3 】

反応の特異性は、H C V 血清陰性ドナーから得た 3 つの血清 (3 3 、 3 4 及び 3 5) により H C V ペプチドのいずれかに対する検出可能な抗体結合の欠如によって実証される。非ピオチニル化 H C V ペプチド X X - 1 及び X X - 2 に対する血清 1 ~ 3 2 の反応は、一般に存在しないか又はきわめて弱い。これとは対照的に、試験した血清の多くは、ストレプトアビジンと複合体形成したこれらのペプチドのピオチニル化バージョンを認識した。ピオチニル化ペプチドに対する抗体反応は、非ピオチニル化ペプチドの原液中に存在する量に比較してこれらの原液中には約 1 0 分の 1 の量のペプチドしか存在しなかったという事実にもかかわらず、有為に強いものである。ピオチニル化ペプチドを用いて得られた結果は、ペプチドの非ピオチニル化バージョンを用いた場合には明らかでないこれらのペプチド配列中の診断上有用なエピトープの存在を実証している。

【 0 1 5 4 】

さらなる評価のため、異なる H C V 分離株の H C V E 2 - N S 1 領域の超可変性 N 末端にまたがる合計 8 つの配列 (H C V ポリタンパク質の a a 3 8 3 ~ 4 1 6) を選択した。これらの整列させた配列 (一文字コード) は以下のとおりである :

X X a G E T Y T S G G A A S H T T S T L A S L F S P G A S Q R I Q L V N T (40
1)
X X b G H T R V S G G A A A S D T R G L V S L F S P G S A Q K I Q L V N T (2)
X X c G H T R V T G G V Q G H V T C T L T S L F R P G A S Q K I Q L V N T (3)
X X d G H T H V T G G R V A S S T Q S L V S W L S Q G P S Q K I Q L V N T (4)
X X e G D T H V T G G A Q A K T T N R L V S M F A S G P S Q K I Q L I N T (5)
X X f A E T Y T S G G N A G H T M T G I V R F F A P G P K Q N V H L I N T (50

6)

XXg A E T I V S G G Q A A R A M S G L V S L F T P G A K Q N I Q L I N T (7)

XXh A E T Y T T G G S T A R T T Q G L V S L F S R G A K Q D I Q L I N T (8)

【0155】

これらの配列は、以下のグループによって記載された分離株から誘導されている：

(1) Hijikata et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 175:220-228, 1991。(2) 結果未公開

(3) Hijikata et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 175:220-228, 1991。

(4) Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528, 1990。

(5) Takamizawa et al., J. Virology 65:1105-1113, 1991。

(6) Weiner et al., Virology 180:842-848, 1991。

(7) Okamoto et al., Japan. J. Exptl. Med. 60:167-177, 1990。

(8) Kremsdorfl et al., Abstract V64, HCVに関する第3回国際シンポジウム, Strasbourg, France, September, 1991。

【0156】

配列がやや長く、合成中に二次構造に関連する問題点が発生することが予想されたことから、配列を、重複する2つの部分(「a」=HCVポリタンパク質のアミノ酸383~404、「b」=アミノ酸393~416)に分割することが決定された。配列を細分割することによって、エピトープの位置がより正確に定義づけられ得ることにもなる。

【0157】

ペプチドは、全てN末端ピオチニル化し、ストレプトアビジンと複合体形成させ、LIA ストリップの調製に使用した(データは示さず)。

【0158】

LIA 陽性試料のみを考慮した場合、E2/NS1ペプチドに関する検出率は、およそ90パーセント台であることがわかった。E2/NS1ペプチドの認識とLIA反応性との間の相関関係ならびに個々のペプチドに対するスコアを、表13に示す。観察された反応から、この配列中の一次エピトープが超可変領域のカルボキシ末端に向かって位置していることも同様に明らかであった。ただし、これには例外があった。各々の血清は、このエピトープがLIAにおいて1本のラインとして含まれる場合、異なる配列の混合物を用いることの重要性を過小評価する独自の認識パターンをもつように思われた。同様に、タイプ1aとタイプ1bの配列の間にはかなりの程度の交叉反応性が存在するか、又は大部分の人々が二重感染しているかのいずれかであるとも思われた。1つの配列に結合する抗体を選択的に除去し、その他の配列の抗体認識に対する効果がいかなるものであるかを見ることによって、これら2つの可能性を区別することは単純なことである。多くの試料が、1つ又はそれ以上のE2/NS1ペプチドに対してやや弱い反応を与えたものの、LIA陰性であった。擬陽性反応である確率が最も高いものの、これらの血清は、以前に感染したものの感染を消滅させた人からのものである可能性もある。

【0159】

例14：LIAによる抗体の検出のための、HCVのコア領域からの組合されたHCVペプチドの使用

HCVのELISA又はLIAにおけるペプチドの総数を減少させるため、その他の免疫

学的に重要なペプチドにまたがるビオチニル化ペプチドを合成することができる。HCVのコアタンパク質NS3領域からのこのような「組合わされた」HCVペプチドの例を、以下に示す：

【0160】

【表26】

ペプチド	配列
17 1 (I)	MSTIEFKPQRKTKRNTNRRPQ
17 2 (II)	FKPQRKTKRNTNRRP
17 3 (III)	RNTNRRPQDVVFPPGGGQIVG
17 123	MSTIEFKPQRKTKRNTNRRPQDVVFPPGGGQIVG
17 6 (IVa)	VGGVYLLPRRGPRLGVRATR
17 7 (IV)	LPRRGPRLGVRATR
17 8 (V)	TRKTSERS
17 10 (VI)	TRKTSERSQPRGRRQPIPEV
17 7910	GGVYLLPRRGPRLGVRATRTRKTSERSQPRGRRQPIPEVRRPEGR

10

【0161】

これらのペプチド全てには、アミノ末端に1つのビオチンとGly-Glyスペーサーが備えられていた。ペプチドを、直線免疫検定実験(LIA)において評価し、より短いコアペプチドと比較した。結果を図9に示す。より長いコアは、より短いペプチドに比べて好ましく、一貫してより強い反応を示す。これは、(1)長い方のペプチドが、以前は2つの別々のペプチド上に広がっていた2つ以上のエピトープを取り込んでいる場合、及び/又は(2)長い方のペプチドにおいてさらに卓越したものでありうる何らかのコンフォメーション上の貢献が存在する場合に、説明しうる。

20

【0162】

例15：LIAによる抗体の検出のための、HCVのNS4及びNS5領域からの組合わされたHCVペプチドの使用

その他のペプチドにおいては、次のもののようなNS4及びNS5内の配列が組合わされている：

【0163】

【表27】

ペプチド	配列
NS4-5 (XI)	SQHLPYIEQGMMLAEQFKQK
NS4-7 (XIII)	LAEQFKQKALGLLQTASRQA
NS4-57	SQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA
NS5-25 (XV)	EDEREISVPAEILRKSRRFA
NS5-27 (XVI)	LRKSRRFAQALPVWARPDYN
NS5-2527	EDEREISVPAEILRKSRRFAQALPVWARPDYN

30

【0164】

より長いペプチドを使用することの一般的利点は、ELISA又はLIAにおけるその使用が、免疫学的に重要なエピトープを担持するその他のペプチドを取り込むためのより多くのスペースを残すという事実にある。

40

【0165】

例16：LIAによる抗体の検出のための、型特異的HCVNS4ペプチドの使用
NS4のエピトープを含むことがわかった1型ペプチドに対応するHCV2型及び3型NS4配列を含む等価ペプチドを合成した。比較のために、これらのペプチドの配列を以下に示す：

【0166】

【表28】

ペプチド	配列
NS4-1 (1)	L S G K P A I I P D R E V L Y R E F D E
NS4-1 (2)	V N Q R A V V A P D K E V L Y E A F D E
NS4-5 (1)	S Q H L P Y I E Q G M M L A E Q F K Q K
NS4-5 (2)	A S R A A L I E E G Q R I A E M L K S K
NS4-7 (1)	L A E Q F F Q K A L G L L Q T A S R Q A
NS4-7 (2)	A E M L K S K I Q G L L Q Q A S K Q A

10

【0167】

L I A ストリップを、これらの9つのペプチドを用いて調製し、それを、その後、異なる血清を用いてインキュベートした。結果を図10に示す。1型のNS4ペプチドに関して以前陰性であった血清のうち2つが、3型及び2型のペプチドに対して陽性の反応を示した。このことは、これらのペプチドを用いてNS4検出率を増大することが可能であることを表わしている。

【0168】

例17：H I V 抗体の検出のための直線免疫検定における、異なるH I V - 1分離株のg p 1 2 0のV3ループ領域からのビオチニル化ペプチドの使用
g p 1 2 0のV3ループ領域の一般的な診断上の価値を決定するために、9つの異なるH I V - 1分離株のこの領域から誘導された9つのペプチドを合成し、L I A に用いた。9つのペプチドは全て、G l y - G l y スペーサーとN末端ビオチンを備えていた。整列させたペプチド（一文字アミノ酸コード）配列は、以下のとおりである：

20

```

CON      NNTRKSIHI - - GPGRAFYTTGEIIG      23
SF2      NNTRKSIYI - - GPGRAFHTTGRIG      23
SC       NNTTRS IHI - - GPGRAFYATGDIIG      23
MN       YNKRKR IHI - - GPGRAFYTTKNIIG      23
RF       NNTRKSIITK - - GPGRV IYATGQIIG      23
MAL      NNTRRGIHF - - GPGQALYTTG - IVG      22
BH       NNTRKSIIRIQRGPGRAFVTIGKI - G      24
ELI      QNTRQRTPI - - GLGQSLYTT - RSR S      22
ANT70   QIDIQEMRI - - GP - MAWYSMG - IGG      21

```

30

【0169】

ペプチドを、ビオチン結合部位に対しわずかにモル過剰のストレプトアビジンと混合し、ペプチド：ストレプトアビジン複合体を、S e p h a d e x G - 2 5 上で未結合の物質から分離した。ボイド容量中に溶出する材料を、L I A の調製に使用した。

【0170】

さまざまな地理的地域から得られた合計332の血清を試験した。ヨーロッパ又は北米で単離されたウイルス株が、アフリカの分離株と比べて低い株ごとの変動性を示すことがわかっているため、V3 - ループ配列認識における地理的な差は予想されるものであった。さまざまなラインの反応を、陽性（i）又は陰性（o）として評価した（データは示さず）。

40

【0171】

血清の完全な評価を表14に示す。合計で、332のうち307の血清が、V3 - ループL I A に関して少なくとも1つのペプチドに対する反応を示した。V3 - ループL I A でいかなるペプチドに対しても反応を示すことのなかった血清は、ウェスタンブロット法で試験して、その血清が本当に抗H I V - I 抗体について陽性であったか否かを決定した。6つの血清が実際には陰性であることがわかった。従って、試験した陽性血清の合計数は326であった。しかしながら、V3 - ループL I A のいずれとも反応しなかったg p 1 2 0 に対する抗体を含む血清が19あり、陽性反応を示す血清のパーセンテージは、包括

50

的に言って94%であった。しかしながら、著しい地理的差異が存在していた。これらの差異を表15に示す。

【0172】

少なくとも1つの陽性反応を示す異なる地理的地域からの血清の合計パーセンテージは、以下のように要約できる：

ヨーロッパ	100%
アフリカ	94%
ブラジル	92%

ヨーロッパの試料を用いてさらに評価すると、このパーセンテージが実際には100%より幾分か低いものであるということがわかる(データは示さず)。LIAにおいて反応を示さなかったアフリカの試料は、その他のHIV抗体の存在を確認するべくウェスタンブロット法によって試験されなかった。

10

【0173】

ヨーロッパの血清が優れたスコアを示すことは、予想されていた。アフリカの血清について得られたより低いスコアも、アフリカにはより高いウイルスの不均一性が存在することがわかっているため、全く予想外ではなかった。HIVのアフリカ株のV3-ループ配列はヨーロッパや北米の株ほど広範に特徴づけられていなかったため、我々が代表的配列をもっていないか、又はあまりにも配列多様性が大きすぎるので、コンセンサス配列に関してアフリカ株を特徴づけしようとすることは不可能であることが明白である。ブラジルの血清を用いて得られた結果は、ブラジルにおけるHIV変動性に関してこれまで何も報告

20

【0174】

例18：ブラジル分離株から誘導されたV3配列を用いたブラジルの血清中のHIV-1抗V3ドメイン抗体の改良型検出

前述のLIAストリップ上に存在するどのHIV-1V3ループ配列も認識しなかったが、ウェスタンブロット上のHIV-1gp120タンパク質を認識する抗体については陽性であったブラジルの血清試料を、さらなる研究のために選択した。これらの試料のうちの1つにおいて、血清試料中に存在するウイルスのV3ループ配列を、超可変ドメインに隣接するより定常的な領域から誘導されたプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅することができた。結果として得られたDNAフラグメントを、続いてクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。このフラグメントによりコードされる推定アミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、さまざまなHIV-1抗体陽性血清によって認識されるその能力について試験した。このペプチドの配列は、以下のとおりであった：

30

ペプチドV3-368：

Asn Asn Thr Arg Arg Gly Ile His Met Gly
Trp Gly Arg Thr Phe
Tyr Ala Thr Gly Glu Ile Ile Gly

【0175】

2つのグリシン残基から成るスペーサーを、アミノ末端に付加した。その後、結果として得られたN末端グリシン残基をピオチニル化した。ヨーロッパ、アフリカ及びブラジルのHIV-1抗体陽性血清がこのペプチドを認識する能力を調べ、これら同じ血清のELISAにおけるコンセンサス配列ペプチド認識能力と比較した。同様に、2つのペプチドを1つの混合物として一緒に評価した。これらの結果を表16に要約する。これらの結果は、ヨーロッパ又はアフリカ産の血清を用いる場合、V3-368ペプチドが、V3conペプチドで見られるものに比べて増大した抗V3ループ抗体の検出という結果をもたらさないことを立証している。それとは対照的に、V3-368ペプチドの使用は、ブラジルの血清でのV3抗体検出において著しい改善をもたらす。このペプチドはV3conペプチドに比べて少ない頻度で認識されるが、2つのペプチドは互いに相補って、検出率を、

40

50

V3 conペプチドを単独で用いた場合の83.3パーセントから2つのペプチドと一緒に用いた場合の97.2パーセントまで上昇させる。

【0176】

例19：HIV-2 V3ループ配列の抗体認識

HIV-2の外膜糖タンパク質(gp105)は、その編成に関してHIV-1のそれと類似している。HIV-1のgp120タンパク質と同様に、HIV-2のgp105タンパク質は、比較的保存されたアミノ酸配列のドメインと隣接する可変的配列のドメインから成る。このウイルスによる感染にตอบสนองして産生されたHIV-2のV3ドメインに対して特異的な抗体を検出するため、HIV-2/SIV分離株GB12及び分離株SIVmm239のV3配列に対応するビオチニル化ペプチドを合成した(Boeri, E. 10
, Giri, A., Lillo, F. et al; J. Virol. (1992) 66 (7): 4546-4550)。合成されたペプチドの配列は、以下のとおりである：

V3-GB12:

Asn Lys Thr Val Val Pro Ile Thr Leu Met
Ser Gly Leu Val Phe
His Ser Gln Pro Ile Asn Lys

V3-239:

Asn Lys Thr Val Leu Pro Val Thr Ile Met
Ser Gly Leu Val Phe
His Ser Gln Pro Ile Asn Asp 20

【0177】

スペーサーとして役立つよう各ペプチドのN末端に2つのグリシン残基を付加し、結果として得られたN末端グリシンの - アミノ基にビオチンをカップリングした。ペプチドをストレプトアビジンに結合させ、マイクロウェルプレートのウェル内をコーティングした。ELISAにおいてこれら2つのペプチドを評価するため、HIV-2抗体陽性血清を使用した。これらの結果を表17に要約する。これらの結果は、HIV-2感染の診断に対するこれら2つのペプチド配列の有効性を明らかに立証している。

【0178】

例20：ビオチニル化ペプチドを用いたC-100のカルボキシ末端におけるエピトープの局在化 30

C-100タンパク質のカルボキシ末端部分に向かって位置するエピトープについては、さまざまな報告書が存在してきた(EP-A-0 468 527、EP-A-0 484 787)。5-1-1フラグメント内に位置するエピトープに対してではなく、このエピトープに向かってのある種の血清の反応性によって、これらの血清が、何故C-100に関しては陽性反応を示すが上述の例に記されている上述のペプチドに対しては示さないのかを説明することができた。合成された5つの重複するビオチニル化ペプチド、NS4-a、b、c、d及びeを図11に示す。これらは、最後の3つのアミノ酸を除いてC-100のカルボキシ末端を網羅している。これらのペプチドを用いて調製したLIAストリップを、一連のHCV抗体(Ab)陽性及び陰性血清を用いて試験した。この実験の結果(データは示さず)を以下に要約する： 40

ペプチド	反応性血清の数	パーセンテージ
NS4-a	0	0%
NS4-b	2	3%
NS4-c	0	0%
NS4-d	0	0%
NS4-e	16	27%

【0179】

例21：異なるHCVタンパク質からのエピトープを含むビオチニル化されたハイブリッドペプチドの使用

9 - m e r s を用いた H C V ポリタンパク質の免疫学的に最も重要な領域におけるエピトープの詳細なマッピングを、例 1 2 に示すとおりに行なった。この情報を用いて、2 アミノ酸の長さのスペーサーで分離された H C V 配列の 3 つの 9 - m e r ストレッチから成る 3 つのペプチド配列が考案された。一般に、鎖の柔軟性を提供するため、G l y - G l y、G l y - S e r 又は S e r - G l y スペーサーが用いられた。合成された 3 つのハイブリッドペプチド内のエピトープの配置及びその配列を、図 1 2 に示す。L I A ストリップ上で 3 つのペプチドを評価した。第 1 の評価では、エピトープの詳細マッピング実験で当初用いた血清がエピトープとの精確な相互作用が知られていることから、これらの血清を用いた。これらの結果を、図 1 3 に示し、表 1 6 に要約する。エピトープがこれら 3 つのハイブリッドペプチドに取り込まれる順序は任意であった。しかしながら、個々の 9 - m e r s に基づく試験を開発しようとするよりは、むしろエピトープを合わせて、限られた数のペプチド鎖にリンケージさせることが有利である。別々の 9 - m e r s を使用すると、プレート上のストレプトアビジン結合部位 (1 つの 9 - m e r s 当り 1 つの ビオチン結合部位) は急速に飽和し、一方、これらの実験において行なったように限られた数のペプチド内に 9 - m e r s を取り込ませれば、1 つが 3 倍の結合を行なうことが可能になる (3 つの 9 - m e r s につき 1 つの ビオチン結合部位) 。

【 0 1 8 0 】

例 2 2 : E 2 / N S 1 「 b 」配列ミクソトープペプチド

合成ペプチドを用いた結果 (上記の例を参照) は、大部分の H C V 血清陽性の血清が E 2 / N S 1 の超可変 N 末端に向けられた抗体を含んでいることを表わしていた。しかしながら、このタンパク質のこの領域の超可変性のため、許容可能なほど高いパーセンテージの血清においてこれらの抗体を検出するには、かなり広範な配列スペクトルを使用することが必要である。利用可能な配列の分析は、観察されたアミノ酸置換が完全に無作為のものでなく、配列内のある位置にはあるアミノ酸が好まれるということを示した。超可変配列はかなり長いものであるため、生成物の質を改善し合成を単純化するため、この配列を、重複する 2 つの部分 (「 a 」及び「 b 」) に分割した。この領域を細分割することにより、抗体により最も頻繁に認識される E 2 / N S 1 タンパク質のこの N 末端セグメントの部分が、これらの配列の「 b 」バージョンに包含される領域の中に位置するということができた。図 1 4 に示す配列情報に基づいて、検査した天然の分離株に見られる全てのアミノ酸を各位置に含む「ミクソトープ」を合成した。ミクソトープの合成において用いた戦略を、図 1 5 に記す。ミクソトープを設計するための戦略は、G r a s - m a s s e e t a l . , P e p t i d e R e s . (1 9 9 2) 5 : 2 1 1 - 2 1 6 において総説されている。樹脂は、カップリングすべきアミノ酸の数に等しい数の部分に分割した。カップリング反応は、さまざまなアミノ酸の間でのカップリング動態の差により生じる問題を避けるため、個別に行なった。カップリング反応の後、樹脂部分をプールし、よく混合した。この 2 3 アミノ酸の長さの配列について得られた変異体の合計数は、 $+ 1 . 1 4 7 \times 1 , 0 1 0$ であった。カルボキシ末端又はアミノ末端から測定した鎖の長さの関数としての増大する変異体数を、図 1 4 に示す。ミクソトープアプローチの背後にある原理は、エピトープが、抗体結合に対する貢献度が等しくないアミノ酸で構成されているということである。抗体は、いくつかの位置において比較的多数の (一般に無作為でない) 置換があったとしても、1 つのエピトープを認識する可能性がある。この点に関して、ミクソトープの抗原的複雑性は、混合物を含む変異体の数よりも実質的に小さいはずである。例示を目的として、平均的エピトープの長さが 6 アミノ酸であると仮定したならば、配列内の連続した 6 つのアミノ酸という長さをもつセグメントの各々について変異体数を計算することが可能である。配列内の位置の関数としての変異体数を、図 1 4 に示す。機能的変異体配列の実際の数値は、偶然 1 つのエピトープに相当する 6 アミノ酸の長さのあらゆる配列について示された数値を、エピトープの各位置における許容される置換の数に等しい縮重係数で割り算した数値に等しくなるが、しかし特定の置換が許容される割合を反映するべく修正された。残念なことに、エピトープの正確な位置はわかっていない。これが無作為のペプチドライブラリーでないということは明白に述べてお

10

20

30

40

50

くべきである。天然の分離株におけるアミノ酸変異の欠如によって明らかにされているように、合計配列中の置換を許容しない主要な位置が保存される。この合成アプローチに関する1つの欠点は、稀なアミノ酸置換が過度に代表され、より一般的に遭遇するアミノ酸を減殺する傾向をもつということにある。一方、稀な置換の過度の代表が、より頻繁に遭遇するアミノ酸を含むエピトープ配列で検出不可能な抗体の検出を許す可能性がある。ミクソトープの合成の完了後、免疫学的評価を容易にするため、全てのペプチド鎖に(Gly)₂ スペースター及びビオチンを備えさせた。ミクソトープの多重抗原ペプチド(MAP)も、平行して合成することができる。

【0181】

以前の研究の1つの結果は、HCV陽性血清の約90パーセントが、調査された16の「a」及び「b」配列を伴うN末端超可変領域に対して向けられた抗E2/N51抗体を含むことが立証できたということにあった。残りの10パーセントのHCV抗体陽性血清におけるこれらの抗体の見かけ上の欠如は、1)患者がE2/N51のこの部分に対する抗体を産生しなかったか、又は2)これらの抗体を検出する正しい配列がまだ同定されていなかったという2つの要因によるものであることが考えられた。HIV-1V3ループでの実験に基づくと、この後者の可能性は全く非現実ではないと思われる。ミクソトープに加えて以前に用いた8つの「b」配列を含むLIAストリップを調製した。8つの規定された配列のうち少なくとも1つについて以前陽性とスコアされた血清ならびに陰性とスコアされた血清を選択した。合計で60の血清を試験し、そのうち56は以前に陽性反応を示したものであり、4つは以前に陰性であることがわかったものであった。以前陽性とスコアされた56の血清のうち、21はストリップ上のペプチドのうちわずか1つ又は2つと反応するか、又は非常に弱い反応を示した(データは示さず)。ミクソトープは、試験した全ての血清の約3分の1によって認識された。いくつかの血清のミクソトープに対する反応は驚くほど強かったが、ミクソトープの基礎となったE2/N51配列の収集物は真に代表的なものではなかった可能性がある。ミクソトープMAPは、E2/N51のアミノ末端に対して向けられた特異性の広い抗血清の産生を惹起することが予想される。

【0182】

例23:抗体を産生させるための、分岐状HCV N末端E2/N51領域ペプチドの使用

E2/N51のN末端からのいくつかの配列を、Tam (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5409-5413, 1988)により記載された技術を用いて多重抗原ペプチド(MAP's)として合成するために選択した。分岐状ペプチドを合成するのに用いた戦略を、図16に概略的に示す。初回注射をウサギ(各MAPにつき2匹)に施し、1回追加免疫(ブースト)してから、抗体産生の第1回目の評価のため採血した。合計16のE2ペプチド(8つの1型分離株から誘導された配列の、各々の「a」及び「b」バージョン)を含むLIAストリップ上で抗血清を試験した。LIAストリップを検査したところ、ウサギの体内で産生させた抗体とストリップ上のさまざまなE2ペプチドの間には著しい交叉反応が存在することがわかる(図17)。異なる抗血清によって認識される「a」及び「b」の両方のバージョンが見い出されうるという事実は、これら2つのバージョンが重複する領域内に少なくとも1つのエピトープが位置しているということを表わしている。

【0183】

例24:ビオチニル化合物ペプチドを用いたHTLV感染の診断

HTLV-I及びIIは、抗原的に関連する、発ガン性レトロウイルスのファミリーのメンバーである。HTLV-I感染は、2つの疾患症候群、すなわちHTLV-I関連骨髄症/熱帯性瘧疾不全対麻痺(神経障害)及び成人T細胞白血病(ATL)と関連していることが立証されている。これとは対照的に、HTLV-IIは、既知のいかなる疾患症候群とも決定的に結びつけられていない。このウイルスは、元来ヘアリーセル白血病患者から分離されたものであるが、HTLV-II感染と該疾患状態との間にはいかなる因果関係も確立されていない。HTLV-I感染が人間の病気を引き起こす可能性をもつことが

決定的に実証されてきた一方で、HTLV-I感染については実証されていないことから、これら2つの感染性因子を区別できることは、臨床学的に興味深い。これら2つのウイルスは、抗原的に高度の関連性を有することから、抗体検出のためにウイルス性又は組換え型抗原を用いる場合、HTLV-I及びHTLV-IIを区別することは困難である。数多くのビオチニル化ペプチドを合成し、HTLV-I又はHTLV-IIによる感染に反応して産生された抗体を検出するその能力について評価した。これらのペプチドのうちいくつかは、それらがHTLV-IとHTLV-IIの間で高度に保存されているエピトープを含み、従ってウイルスタイプとは無関係にHTLV感染を検出するための有効な試薬となるはずであることを理由として、選択された。さらにその他のペプチドは、それらがHTLV-IとHTLV-IIの感染を区別できるようにするはずのエピトープを含んでいることを理由として選ばれた。合成したペプチドは以下のとおりである。

【0184】

I - gp 46 - 3 :

Bio Gly Gly Val Leu Tyr Ser Pro Asn Val
 Ser Val Pro Ser Ser Ser Ser Thr Leu Leu
 Tyr Pro Ser Leu Ala

I - gp 46 - 5 :

Bio Gly Gly Tyr Thr Cys Ile Val Cys Ile
 Asp Arg Ala Ser Leu Ser Thr Trp His Val
 Leu Tyr Ser Pro

I - gp 46 - 4 :

Bio Gly Gly Asn Ser Leu Ile Leu Pro Pro
 Phe Ser Leu Ser Pro Val Pro Thr Leu Gly
 Ser Arg Ser Arg Arg

I - gp 46 - 6 :

Bio Gly Gly Asp Ala Pro Gly Tyr Asp Pro
 Ile Trp Phe Leu Asn Thr Glu Pro Ser Gln
 Leu Pro Pro Thr Ala Pro Pro Leu Leu Pro
 His Ser Asn Leu Asp His Ile Leu Glu

I - p 21 - 2 :

Bio Gly Gly Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Arg
 Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln
 Gly Gly Leu Cys Lys Ala Leu Gln Gln Gln
 Cys Arg Phe Pro

I - p 19 :

Bio Gly Gly Pro Pro Pro Pro Ser Ser Pro
 Thr His Asp Pro Pro Asp Ser Asp Pro Gln
 Ile Pro Pro Pro Tyr Val Glu Pro Thr Ala
 Pro Gln Val Leu

II - gp 52 - 1 :

Bio Gly Gly Lys Lys Pro Asn Arg Gln Gly
 Leu Gly Tyr Tyr Ser Pro Ser Tyr Asn Asp
 Pro

II - gp 52 - 2 :

Bio Gly Gly Asp Ala Pro Gly Tyr Asp Pro
 Leu Trp Phe Ile Thr Ser Glu Pro Thr Gln
 Pro Pro Pro Thr Ser Pro Pro Leu Val His
 Asp Ser Asp Leu Glu His Val Leu Thr

II - gp 52 - 3 :

Bio Gly Gly Tyr Ser Cys Met Val Cys Val

10

20

30

40

50

A s p A r g S e r S e r L e u S e r S e r T r p H i s V a l
 L e u T y r T h r P r o A s n I l e S e r I l e P r o G l n
 G l n T h r S e r S e r A r g T h r I l e L e u P h e P r o
 S e r

II - p 19 :

B i o G l y G l y P r o T h r T h r T h r P r o P r o P r o
 P r o P r o P r o P r o S e r P r o G l u A l a H i s V a l
 P r o P r o P r o T y r V a l G l u P r o T h r T h r T h r
 G l n C y s P h e

【0185】

多数のこれらのペプチドを用いて、HTLVに対する抗体の検出のためのLIAストリップを調製した。これらのペプチドのいくつか、例えばそれぞれHTLV - I p 19 g a g タンパク質及びエンベロップ糖タンパク質の領域から誘導されたI - p 19 及びI - g p 46 - 4 のようなペプチドが、2つのウイルスにおいてこれらの配列がきわめて相溶性が高いことから、HTLV - I 及びHTLV - II の両方の感染の結果として産生された抗体によって認識されると予想される。HTLV - I についてはI - g p 46 - 3、I - g p 46 - 6、そしてHTLV - II についてはII - g p 52 - 1、II - g p 52 - 2 及びII - g p 52 - 3 といったその他のペプチドは、抗体の検出ならびに区別に有用でありうる。HTLV - I とHTLV - II の配列の間には幾分かの相溶性があることから、交叉反応が予想される。しかしながら、さまざまなペプチドに対する反応の強さは、抗体の産生された対象であるウイルスのアイデンティティを明らかにするはずである。

【0186】

多数のピオチニル化されたHTLV - I 及びHTLV - II ペプチドを用いて調製したLIAストリップの例を、図xxxに示す。LIAストリップは、市販の血清パネル(Boston Biomedica Inc., 混合タイターパネル、PRP203)を用いて評価した。テスト結果は、販売業者が提供した分析と完全に一致している。HTLV - I に対してはわずか1つの試料(nr. 9)のみが陽性であった。

試料nr. 12は、ペプチドI - p 19 に対する陽性反応のために陽性として検出されている。この試料は、これらのペプチドを用いて識別することができず、又、血清パネルの販売業者により用いられたその他のいかなる試験によっても識別できなかった。試料nr. 11は陰性であり、その他全ての試料はHTLV - II に対して陽性であることがわかった。付加的な実験において、ピオチニル化されたHTLV - I 及びHTLV - II ペプチドを10個全て用いてELISAを行なった。ペプチドをストレプトアビジンと個別に複合体形成させ、次にコーティングに先立って混合した。LIAストリップを評価するために用いたパネルからの試料のいくつかを用いて、ELISAにおいてペプチドを評価した。これらの結果を表に示す。この形態でのELISAは、HTLV - I 及び - II 感染を区別するのに使用できないが、ウイルスタイプの如何にかかわらずHTLV陽性試料全般を同定するはずである。この結果は、さらに、HTLV感染の診断のためのこれらのペプチドの有用性を立証している。

【図面の簡単な説明】

図及び表に記載の試料及び血清は全て、ウイルス性作用物質による自然に生じる感染の結果として産生される抗体を含む、無作為に選択された試料及び血清である。

【図1 - 1】N - - Fmoc - リジン(N - - ピオチン)の合成のための戦略を表わす。

より特定的には、方法Aは、N - - Fmoc - Lys(N - - tBoc)からのN - - Fmoc - Lys(N - - ピオチン)の合成に対応し、方法Bは、N - - ピオチニルリジンからのN - - Fmoc - Lys(N - - ピオチン)の合成に対応する。

【図1 - 2】N - - Fmoc - リジン(N - - ピオチン)の合成のための戦略を表わす。

より特定的には、方法Aは、N - - Fmoc - Lys(N - - tBoc)からのN -

10

20

30

40

50

- Fmoc-Lys(N-Biotin)の合成に対応し、方法Bは、N-Biotin-NilargininからのN-Fmoc-Lys(N-Biotin)の合成に対応する。

【図2】上述の中間生成物及び中間化合物の調製に關与する前駆物質の逆相クロマトグラフィで得られたダイアグラムを表わす。

逆相クロマトグラフィは、以下の条件下で行なった。

- 勾配仕様：

緩衝液A：H₂O中、0.1% TFA

緩衝液B：アセトニトリル中、0.1% TFA

カラム：C2/C18逆相(Pharmacia, Pep-S)、

検出波長：255ナノメートル；

- 勾配：

0～1分 0%B

1分～60分 0%B～100%B

60分～70分 0%B

第1のダイアグラムは、方法Aに対応し(図1参照)、第2のダイアグラムは方法Bに対応する(図1参照)。

【図3a】(ELISAにおいて)HCVペプチドIIに結合する抗体を表わす。

上部左側の曲線は、試料8320に対応する。

上部右側の曲線は、試料8242に対応する。

下部左側の曲線は、試料8243に対応する。

下部右側の曲線は、試料8318に対応する。

これらの試料の各々において、光学密度(450nmでの)は、 $\mu\text{g/ml}$ 単位で表わしたコーティング濃度に対してプロットされている。

十字記号を付した曲線は、非ビオチニル化HCVペプチドIIに対応し、点を付した曲線はビオチニル化されたHCVペプチドIIに対応する。

【図3b】(ELISAにおいて)HCVペプチドXIに結合する抗体を表わす。

上部左側曲線は、試料8320に対応する。

上部右側曲線は、試料8326に対応する。

下部左側曲線は、試料8242に対応する。

下部右側曲線は、試料8243に対応する。

これらの試料の各々において、光学密度(450nmでの)は、 $\mu\text{g/ml}$ 単位で表わしたコーティング濃度に対してプロットされている。

十字記号を付した曲線は、非ビオチニル化HCVペプチドXIに対応し、点を付した曲線はビオチニル化されたHCVペプチドXIに対応する。

【図3c】(ELISAにおいて)HCVペプチドXVIに結合する抗体を表わす。

上部左側曲線は、試料8326に対応する。

上部右側曲線は、試料8242に対応する。

下部左側曲線は、試料8243に対応する。

下部右側曲線は、試料8318に対応する。

これらの試料の各々において、光学密度(450nmでの)は、 $\mu\text{g/ml}$ 単位で表現されたコーティング濃度に対してプロットされている。

十字記号を付した曲線は、非ビオチニル化HCVペプチドXVIに対応し、点を付した曲線はビオチニル化されたHCVペプチドXVIに対応する。

【図4】(ELISAにおいて)直接コーティングされたビオチニル化ペプチドの検出に対応する。

第1の曲線は、ビオチニル化されたHCVペプチドIIに対応し、第2の曲線はビオチニル化されたHCVペプチドXIに対応し、第3の曲線はビオチニル化されたHCVペプチドXVIに対応する。

これらの試料の各々において、光学密度(450nmでの)は、 $\mu\text{g/ml}$ 単位で表わされたコーティング濃度に対してプロットされている。

10

20

30

40

50

【図5】HIV-1の膜貫通(TM)タンパク質を起源とするN末端及びC末端ビオチニル化HIV-1ペプチド(前記1a.1と呼称されている)の構造を表わす。

【図6a-1】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのコア領域のコアエピトープの検出を表わす。

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。

【図6a-2】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのコア領域のコアエピトープの検出を表わす。 10

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。

【図6b-1】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのNS4領域のコアエピトープの検出を表わす。

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。 20

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。

【図6b-2】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのNS4領域のコアエピトープの検出を表わす。

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。 30

【図6c-1】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのNS5領域のコアエピトープの検出を表わす。

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。

【図6c-2】(ELISAにおいて)重複する9-merを用いたHCVのNS5領域のコアエピトープの検出を表わす。

使用された血清は、各ダイアグラムの上に表示されている。 40

縦座標は、450nmでの光学密度に対応する。

横座標は、エピトープの場所を決定すべきタンパク質の配列に対応する。グラフ表示する目的で、光学密度はそれぞれの9-mer配列における第1のアミノ酸に割り当てられている。

【図7a】(ELISAにおける)重複する9-merとの関係におけるビオチニル化された20-merの位置に対応する。

縦座標は、エピトープを決定すべきタンパク質配列に対応する。

【図7b】(ELISAにおける)重複する9-merとの関係におけるビオチニル化された20-merの位置に対応する。

縦座標は、エピトープを決定すべきタンパク質配列に対応する。 50

【図7c】(ELISAにおける)重複する9-merとの関係におけるビオチニル化された20-merの位置に対応する。

縦座標は、エピトープを決定すべきタンパク質配列に対応する。

【図8】直線免疫検定(LIA)によるビオチニル化及び非ビオチニル化HCVペプチドの抗体認識の比較を表わす。

【図9】直線免疫検定(LIA)によるビオチニル化コアペプチドの抗体認識の比較を表わす。

短い方のペプチドと長い方のペプチドが比較されている。

【図10】直線免疫検定(LIA)による型特異的HCVNS4ペプチドの評価を表わす。

【図11】ペプチドNS4-a~NS4-eのアミノ酸配列を表わす。

【図12】ハイブリッドHCVペプチドの組成を表わす。

【図13】ハイブリッドHCVペプチドの抗体認識を表わす。

【図14】HCV1型のE2/NS1のN末端からのミクソトープペプチドについての構築模式図を表わす。

【図15】ミクソトープ合成戦略を表わす。

【図16】多重抗原ペプチド(MAPs)の合成を表わす。

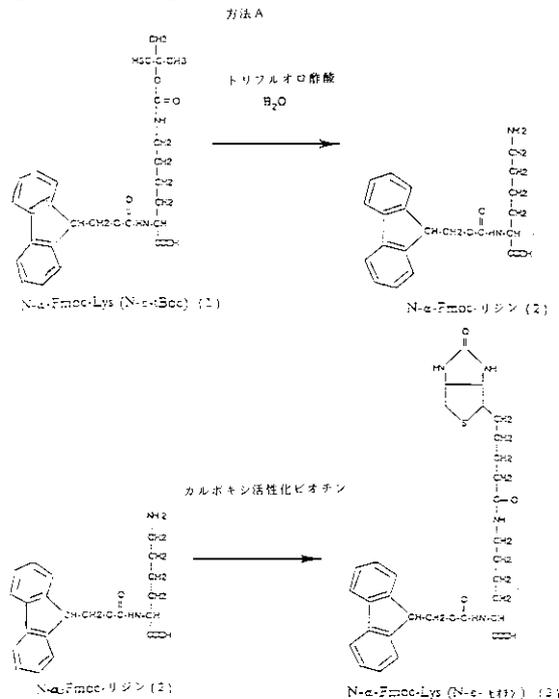
【図17】E2/NS1「b」ペプチドMAPsで免疫したウサギからの血清によるE2/NS1ペプチドの認識を表わす。

【図18】LIAストリップに取り込まれたある数のビオチニル化HTLV-I及びHTLV-IIペプチドでの市販の血清パネルの認識を表わしている。

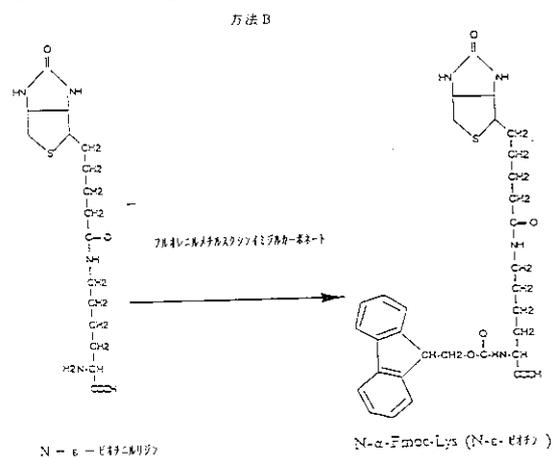
10

20

【図1-1】

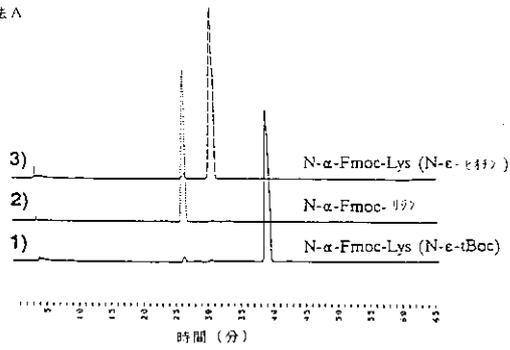


【図1-2】

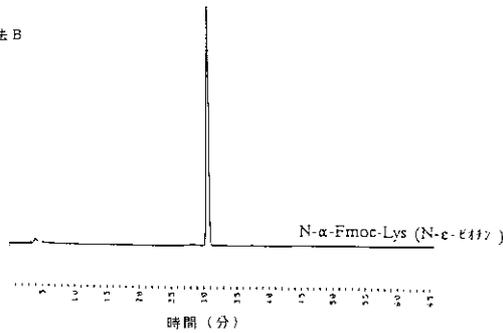


【 図 2 】

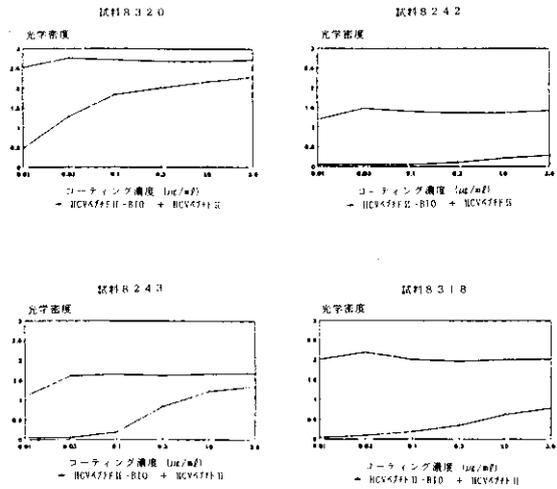
方法 A



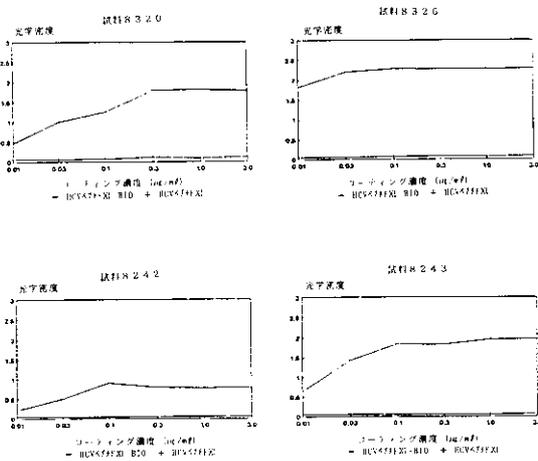
方法 B



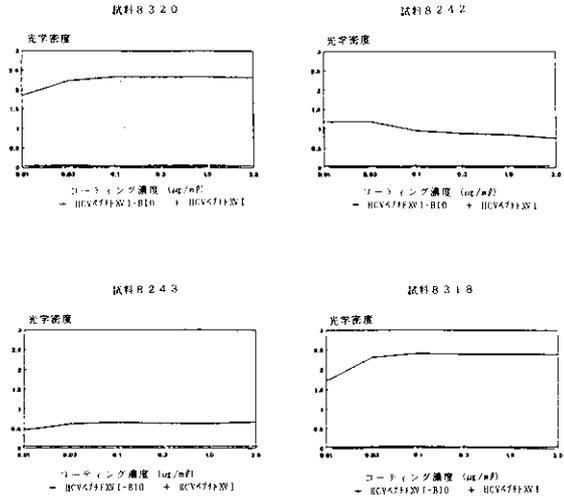
【 図 3 a 】



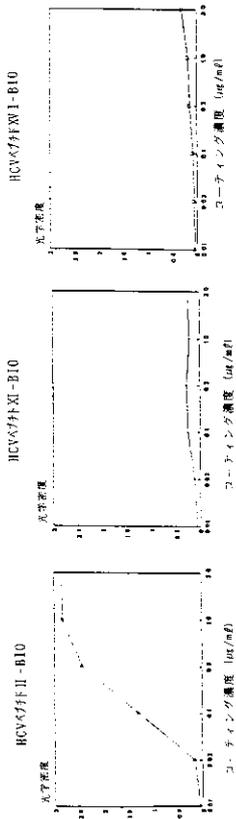
【 図 3 b 】



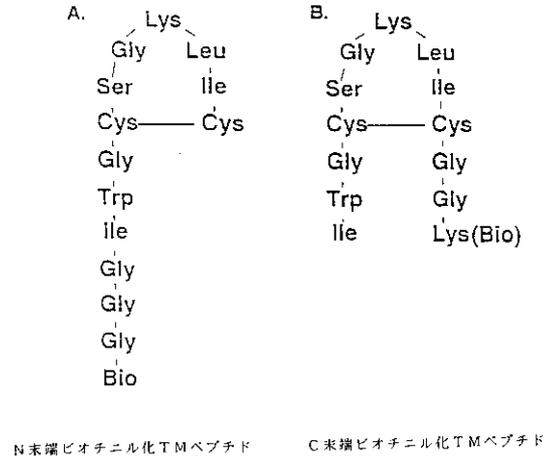
【 図 3 c 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 a - 1 】

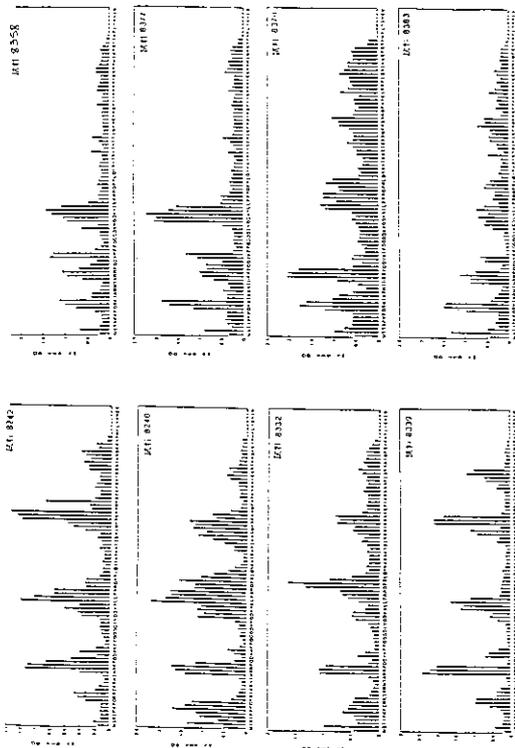


図 6 a
HCVコアペプチド (1-13)

【 図 6 a - 2 】

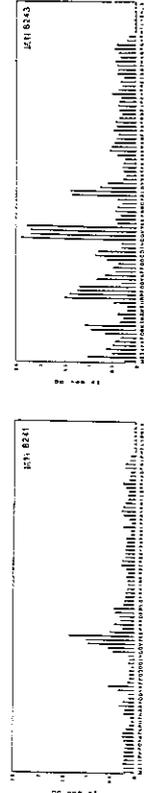


図 6 a (続き)
HCVコアペプチド (1-13)

【 6 b - 1 】

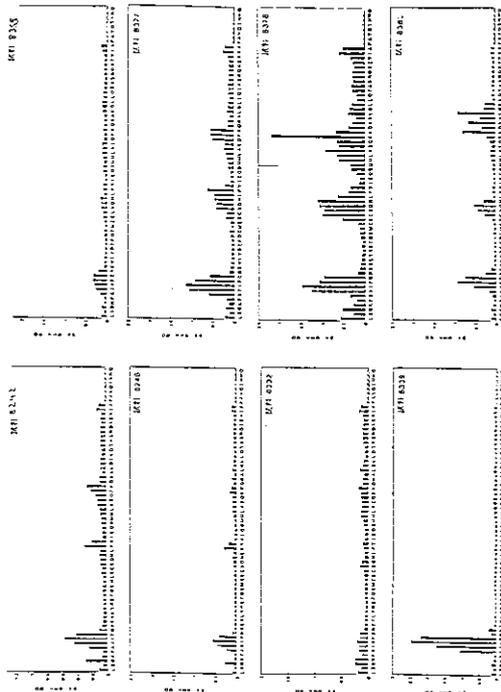


図6b
HCV NS4ペプチド

【 6 b - 2 】

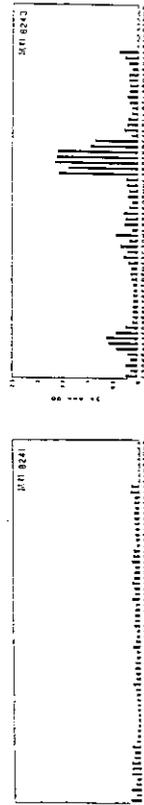
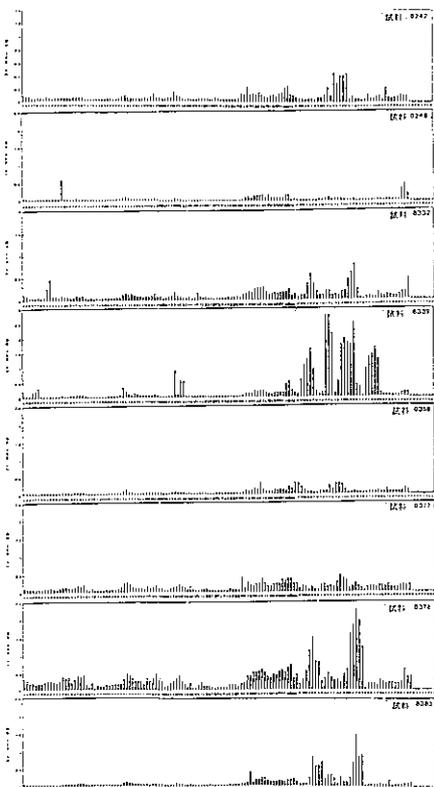
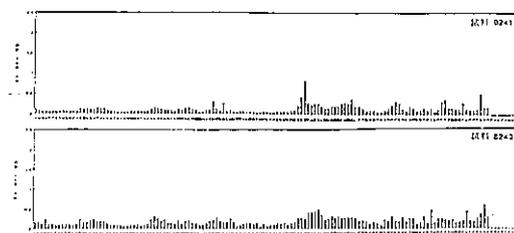


図6b (続き)
HCV NS4ペプチド(1-9)

【 6 c - 1 】

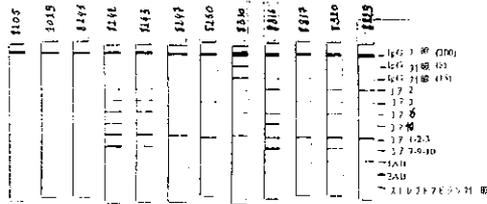


【 6 c - 2 】

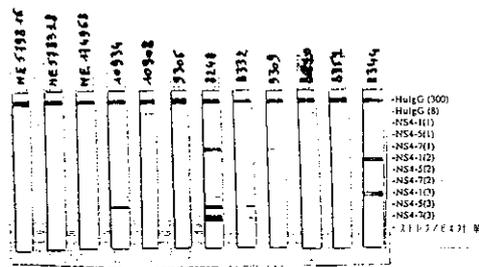


HCV NS5ペプチド(13-33)

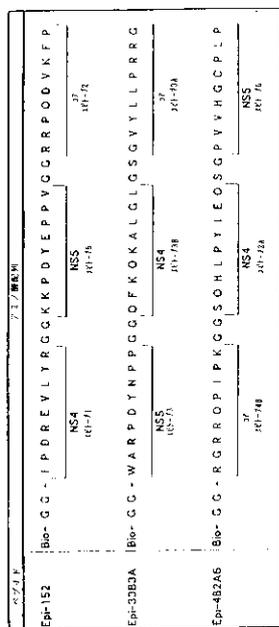
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 12 】



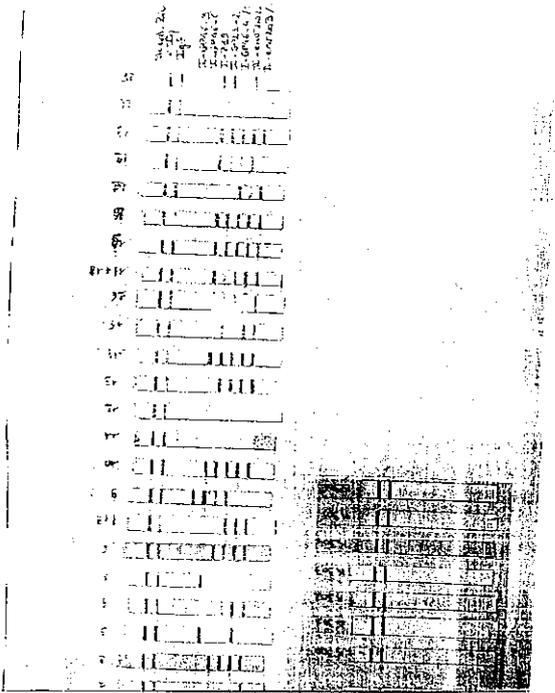
【 図 11 】



【 図 13 】



【図 18】



【手続補正書】

【提出日】平成15年5月9日(2003.5.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の配列、

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro -
 Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp -
 Glu - Z (NS4 - 1 (3))

(A) - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln -
 Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu -
 Lys - Z (NS4 - 5 (3))

(A) - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val -
 Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln -
 Gln - Z (NS4 - 7 (3))

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す)で示されるアミノ酸配列の、少なくとも5つのアミノ酸からなるその断片を有するペプチドであって、該断片が、HC V 3型特異的抗血清に特異的である、ペプチド、ただし、該断片は、上記アミノ酸配列からなるペプチドではない。

【請求項2】

該ペプチドが、NS4領域のアミノ酸1688位～1743位の間領域由来である、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu - Z (NS4 - 1 (3))

(A) - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Z (NS4 - 5 (3))

(A) - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln - Gln - Z (NS4 - 7 (3))

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) からなる群より選択されるアミノ酸配列の、N末端側にアミノ基を有するか、若しくはそのペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾を有する、及び/又はそのC末端側にOH基、NH₂基若しくはこれら2つの基のいずれかを含む結合を有する該ペプチドに由来するペプチド；ただし、当該ペプチドは、上記の群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドではない；又は、該ペプチドの少なくとも5つのアミノ酸を含む、免疫学的に反応性のその断片であって、HCV3型抗血清と反応する断片、又は、該ペプチドの環状型のもの、又は、該ペプチドの分岐したペプチド型のもの。

【請求項4】

C型肝炎ウイルス3型に特異的なアミノ酸配列からなるNS4領域由来のペプチドであって、以下のもの：

Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu (NS4 - 1 (3))、

Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys (NS4 - 5 (3))、

Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln - Gln (NS4 - 7 (3))、

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu - Z (NS4 - 1 (3))、

(A) - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Z (NS4 - 5 (3))、及び

(A) - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val - Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln - Gln - Z (NS4 - 7 (3))

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) からなる群より選択される、内部的にピオチニル化されているペプチド。

【請求項5】

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu - Z (NS4 - 1 (3))

(A) - S e r - G l n - A l a - A l a - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n -
A l a - G l n - V a l - I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u -
L y s - Z (N S 4 - 5 (3))

(A) - I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u - L y s - V a l -
L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - A r g - A l a - T h r - G l n - G l n -
G l n - Z (N S 4 - 7 (3))

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチド、又は、

N末端側にアミノ基を有するか、若しくはそのペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾を有する、及び/又はそのC末端側にOH基、NH₂基若しくはこれら2つの基のいずれかを含む結合を有する該ペプチドに由来するペプチド;ただし、当該ペプチドは、上記の群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドではない;又は、

該ペプチドの少なくとも5つのアミノ酸を含む、免疫学的に反応性のその断片であって、HCV3型抗血清と反応する断片、又は、

該ペプチドの環状型のもの、又は、

該ペプチドの分岐したペプチド型のもの、

からなる群より選択される、少なくとも2つのペプチド配列を含み、場合によりスペーサー残基によって分けられているハイブリッドペプチド。

【請求項6】

スペーサー残基がGly及び/又はSer残基である、請求項5記載のハイブリッドペプチド。

【請求項7】

該ペプチドがビオチニル化されている、請求項1記載のペプチド。

【請求項8】

該ペプチドが、N末端、C末端又は内部でビオチニル化されている、請求項7記載のペプチド。

【請求項9】

該ペプチドが、ストレプトアビジン又はアビジンに結合しており、該ストレプトアビジン又はアビジンが場合により固相に結合されている、請求項7記載のペプチド。

【請求項10】

該ペプチドが、そのビオチン基を介してナイロン膜上に存在するストレプトアビジンと結合している、請求項7記載のペプチド。

【請求項11】

該ペプチドが、固体支持体に固着している請求項1記載のペプチド。

【請求項12】

生物学的試料中に存在するHCVに対する抗体を検出する方法であって、

(i)分析される生物学的試料を請求項2~5又は7~11のいずれか1項記載のペプチド、あるいは、

L e u - G l y - G l y - L y s - P r o - A l a - I l e - V a l - P r o - A s p -
L y s - G l u - V a l - L e u - T y r - G l n - G l n - T y r - A s p - G l u
(N S 4 - 1 (3))

S e r - G l n - A l a - A l a - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n - A l a -
G l n - V a l - I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u - L y s
(N S 4 - 5 (3))、及び

I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u - L y s - V a l - L e u -
G l y - L e u - L e u - G l n - A r g - A l a - T h r - G l n - G l n - G l n
(N S 4 - 7 (3))

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、又は

(A) - L e u - G l y - G l y - L y s - P r o - A l a - I l e - V a l - P r o -

A s p - L y s - G l u - V a l - L e u - T y r - G l n - G l n - T y r - A s p -
G l u - Z (N S 4 - 1 (3))、

(A) - S e r - G l n - A l a - A l a - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n -
A l a - G l n - V a l - I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u -
L y s - Z (N S 4 - 5 (3))、及び

(A) - I l e - A l a - H i s - G l n - P h e - L y s - G l u - L y s - V a l -
L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - A r g - A l a - T h r - G l n - G l n -
G l n - Z (N S 4 - 7 (3))

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) 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

と接触させること、及び

(i i) H C V に対する抗体と該ペプチドとの間で形成された免疫複合体を検出して H C V に対する抗体の存在を測定すること、

を含む、方法。

【請求項13】

接触させる工程が、さらに、生物学的試料を、

(A) - V a l - A s n - G l n - A r g - A l a - V a l - V a l - A l a - P r o -
A s p - L y s - G l u - V a l - L e u - T y r - G l u - A l a - P h e - A s p -
G l u - Z、

(A) - A l a - S e r - A r g - A l a - A l a - L e u - I l e - G l u - G l u -
G l y - G l n - A r g - I l e - A l a - G l u - M e t - L e u - L y s - S e r -
L y s - Z、及び

(A) - I l e - A l a - G l u - M e t - L e u - L y s - S e r - L y s - I l e -
G l n - G l y - L e u - L e u - G l n - G l n - A l a - S e r - L y s - G l n -
A l a - Z

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、該ペプチドは、そのN末端側にアミノ基又はそのペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾、そしてそのC末端側にOH基、NH₂基若しくはそれら2つのいずれかを含む結合を有する) からなる群より選択される少なくとも一つのHCV2型NS4ペプチドと接触させることを含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

該接触させる工程が、

(A) - L e u - S e r - G l y - L y s - P r o - A l a - I l e - I l e - P r o -
A s p - A r g - G l u - V a l - L e u - T y r - A r g - G l u - P h e - A s p -
G l u - Z、

(A) - S e r - G l n - H i s - L e u - P r o - T y r - I l e - G l u - G l n -
G l y - M e t - M e t - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n -
L y s - Z、及び

(A) - L e u - A l a - G l u - G l n - P h e - L y s - G l n - L y s - A l a -
L e u - G l y - L e u - L e u - G l n - T h r - A l a - S e r - A r g - G l n -
A l a - Z

(式中、Aは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Zは、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、該ペプチドは、そのN末端側にアミノ基又はそのペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾、そしてそのC末端側にOH基、NH₂基若しくはそれら2つのいずれかを含む結合を有する) からなる群より選択される少なくとも一つのHCV1型NS4ペプチドと接触させることを含む、請求項12記載の方法。

【請求項15】

H C V の NS 4 ペプチドの利用を含む H C V 単離物のタイピングの方法であって、

(i) 分析される生物学的試料を請求項 2 ~ 5 又は 7 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載のペプチド、あるいは、

Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro - Asp -
Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp - Glu
(NS 4 - 1 (3))

Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln - Ala -
Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys
(NS 4 - 5 (3))、及び

Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val - Leu -
Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln - Gln
(NS 4 - 7 (3))

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、又は

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro -
Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp -
Glu - Z (NS 4 - 1 (3))

(A) - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln -
Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu -
Lys - Z (NS 4 - 5 (3))

(A) - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val -
Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln -
Gln - Z (NS 4 - 7 (3))

(式中、A は、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Z は、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) 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

と接触させること、及び

(i i) 該資料中の H C V に対する抗体と該ペプチドとの間で形成された免疫複合体を検出すること (ここで、該複合体の存在は H C V の存在を示唆する)、

を含む方法。

【請求項 1 6】

以下の配列、

(A) - Leu - Gly - Gly - Lys - Pro - Ala - Ile - Val - Pro -
Asp - Lys - Glu - Val - Leu - Tyr - Gln - Gln - Tyr - Asp -
Glu - Z (NS 4 - 1 (3))

(A) - Ser - Gln - Ala - Ala - Pro - Tyr - Ile - Glu - Gln -
Ala - Gln - Val - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu -
Lys - Z (NS 4 - 5 (3))

(A) - Ile - Ala - His - Gln - Phe - Lys - Glu - Lys - Val -
Leu - Gly - Leu - Leu - Gln - Arg - Ala - Thr - Gln - Gln -
Gln - Z (NS 4 - 7 (3))

(式中、A は、それが存在する場合には、少なくとも一つのアミノ酸を表し、Z は、それが存在する場合には少なくとも一つのアミノ酸を表す) で示されるアミノ酸配列及び、少なくとも 5 つのアミノ酸からなるその断片を有するペプチドであって、該断片が、H C V 3 型特異的抗血清に特異的であるペプチドからなる群より選択される、少なくとも二つのペプチド配列を含み、場合により、スペーサー残基によって分けられている、ハイブリッドペプチド。

【請求項 1 7】

該スペーサー残基が、Gly 及び / 又は Ser 残基である、請求項 1 6 に記載のハイブリッドペプチド。

【請求項 1 8】

以下の配列：

(A) - (B) - (X) - Y - G l y - G l y - V a l - T y r - L e u - L e u - P r o - A r g - A r g - G l y - P r o - A r g - L e u - G l y - V a l - A r g - A r g - A l a - T h r - A r g - L y s - T h r - S e r - G l y - A r g - S e r - G l n - P r o - A r g - G l y - A r g - A r g - G l n - P r o - I l e - P r o - L y s - V a l - A r g - A r g - Y - (X) - Z (ペプチドコア 7 9 1 0 (a a 3 7 - 8 0))

(ここで、

- B は、ピオチンを表わし；
- X は、合成プロセス中に取り込まれるピオチニル化された化合物を表わし； - Y は、ピオチニル部分 B 又は X からペプチド自体のアミノ酸を分離するリンカーアームを単独で又は一緒になって形成し、しかもアビジン又はストレプトアビジンに対するピオチニル部分 B 又は X の結合と干渉しうる立体障害を最小限にするという機能をもつ単数又は複数の化学的単位又は共有結合を表わし、Y が共有結合でない場合、有利には少なくとも1つの化学的単位であり、30個もの化学的単位から構成されていてよいが、最も頻繁には1～10個の同一の又は異なってもよい化学的単位、より好ましくはグリシン残基、
- アラニン、4 - アミノブチル酸、5 - アミノ吉草酸、6 - アミノヘキサン酸 (カプロン酸) で構成されており；
- B 及び X は、カッコ内に囲まれているのは、これらの位置でのピオチン又はピオチニル化された化合物の存在が任意のものであり、唯一の規定要件は B 又は X が示された位置のうち少なくとも1つにおいて存在していることであることを表わしており；
- A は、カッコで表わされているように存在する場合、アミノ酸 (単数又は複数)、アミノ基又はペプチド鎖のアミノ末端の化学的修飾を表わし；
- Z は、単数又は複数のアミノ酸、1つのOH基、1つNH₂-基又はこれら2つの基のいずれかが関与するリンケージを表わし、ここで該アミノ酸は、大きな割合の真性陽正血清によって認識されるか又は試験においてその他の抗原を補完して検出率を増大させることのできる免疫優性エピトープとなるべく選択的に選ばれ、B は選択されたアミノ酸と相互作用して、より大きい診断上の感度をもつ化合物を生成する) からなるペプチド。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 1/04	C 0 7 K 1/04	
C 0 7 K 1/06	C 0 7 K 1/06	
C 0 7 K 1/10	C 0 7 K 1/10	
C 0 7 K 1/14	C 0 7 K 1/14	
C 0 7 K 7/00	C 0 7 K 7/00	
C 0 7 K 14/15	C 0 7 K 14/15	
C 0 7 K 14/155	C 0 7 K 14/155	
C 0 7 K 14/18	C 0 7 K 14/18	
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	H
G 0 1 N 33/576	G 0 1 N 33/576	Z

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA69 BA87

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19

BA20 BA51 BA62 CA02 CA04 CA05 DA86 EA50 FA33 FA52

FA53 FA58 FA61 FA81 FA82 FA83 GA01 GA05 GA21 GA25

(54) 【発明の名称】免疫学的に重要なエピトープに相当するペプチドの決定方法、及び免疫学的に重要なエピトープに相当するビオチニル化ペプチド又は抗体の決定のための方法におけるその利用、その調製方法及びそれを含む組成物

专利名称(译)	用于测定对应于免疫学重要表位的肽的方法及其在测定对应于免疫学重要表位的生物素化肽或抗体的方法中的用途，其制备方法和含有该肽的组合物		
公开(公告)号	JP2004002379A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003107716	申请日	2003-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	INNOJENETEIKUSU SA NV 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	NV-在卢武铉遗传学兴业ANONYME		
[标]发明人	ドレイスロベルト		
发明人	ド・レイス,ロベルト		
IPC分类号	A61K39/21 A61K39/29 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P37/04 C07D495/04 C07K1/00 C07K1/04 C07K1/06 C07K1/10 C07K1/113 C07K1/13 C07K1/14 C07K7/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/15 C07K14/155 C07K14/16 C07K14/18 C07K14/655 C07K16/00 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/68		
CPC分类号	C07K1/13 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2740/14022 C12N2740/16122 C12N2770/24222 G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N33/6878 G01N2333/18		
FI分类号	C07K14/00.ZNA A61K39/21 A61K39/29 A61P31/14 A61P31/18 A61P37/04 C07K1/04 C07K1/06 C07K1/10 C07K1/14 C07K7/00 C07K14/15 C07K14/155 C07K14/18 G01N33/569.H G01N33/576.Z		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA69 4C085/BA87 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA51 4H045/BA62 4H045/CA02 4H045/CA04 4H045/CA05 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA52 4H045/FA53 4H045/FA58 4H045/FA61 4H045/FA81 4H045/FA82 4H045/FA83 4H045/GA01 4H045/GA05 4H045/GA21 4H045/GA25		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	1992400598 1992-03-06 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供对应于细菌或病毒蛋白上的免疫学重要表位的肽以及该肽在诊断或免疫原性组合物中的用途。解决方案：体外测定抗体的方法包括使用生物素化的肽，尤其是链霉抗生物素蛋白-生物素化肽或抗生物素蛋白-生物素化肽的复合物。Z

