

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2000 - 312592

(P2000 - 312592A)

(43)公開日 平成12年11月14日(2000.11.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 N 15/00	ZNA A
C 0 7 K 14/155			C 0 7 K 14/155	
C 1 2 N 7/00			C 1 2 N 7/00	
C 1 2 Q 1/68			C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/569			G 0 1 N 33/569	H

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 45662(P2000 - 45662)
(62)分割の表示 特願平5 - 249605の分割
(22)出願日 平成5年10月5日(1993.10.5)

(31)優先権主張番号 P4233646:5
(32)優先日 平成4年10月6日(1992.10.6)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号 P4235718:7
(32)優先日 平成4年10月22日(1992.10.22)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号 P4244541:8
(32)優先日 平成4年12月30日(1992.12.30)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 398032751
デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル
シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
フツング
ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン(番
地なし)
(72)発明者 ルーツ・ゲー・ギユルトラー
ドイツ連邦共和国81249ミュンヒエン・トイ
フェルスベルクシユトラーセ15
(74)代理人 100091731
弁理士 高木 千嘉 (外1名)

最終頁に続く

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

(57)【要約】

【課題】 H I V群由来レトロウイルスの検出のために有用なcDNAを提供する。

【解決手段】 European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) にNo. V 9 2 0 9 2 3 1 8の番号で寄託されたMVP - 5 1 8 0 / 9 1なる呼称を有するレトロウイルスの本質的な形態学的および免疫学的性質を示すH I Vグループの免疫不全ウイルスまたはこのウイルスの変異株のRNAまたはその部分に対し相補的であるcDNA。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) にNo. V 92092318の番号で寄託されたMVP-5180/91なる呼称を有するレトロウイルスの本質的な形態学および免疫学的性質を示すHIVグループの免疫不全ウイルスまたはこのウイルスの変異株のRNAまたはその部分に対し相補的であるcDNA。

【請求項2】 請求項1記載のcDNAを含むことを特徴とする組換えDNA。

【請求項3】 請求項1記載のcDNAまたは請求項2記載の組換えDNAを用いて調製された、またはそのcDNAから導くことができるアミノ酸構造を用いて調製された抗原。

【請求項4】 タンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求項3記載の抗原。

【請求項5】 第3表またはその部分配列に相当するアミノ酸配列を示すことを特徴とする請求項3または4記載の抗原。

【請求項6】 部分配列が少なくとも10個のアミノ酸を示すことを特徴とする請求項5記載の抗原。

【請求項7】 組換えにより調製されたことを特徴とする請求項3～6のいずれかに記載の抗原。

【請求項8】 合成により調製されたことを特徴とする請求項3～6のいずれかに記載の抗原。

【請求項9】 請求項3～6のいずれかに記載の抗原が適用されることを特徴とする免疫不全病因ウイルスに対する抗体を検出するためのテストキット。

【請求項10】 ウェスタンブロットであることを特徴とする請求項9記載のテストキット。

【請求項11】 ELISAテストであるかまたは蛍光抗体検出テストであることを特徴とする請求項9記載のテストキット。

【請求項12】 請求項1記載のcDNAまたは請求項2記載のDNAの、免疫不全の原因となるレトロウイルスの検出のための使用方法。

【請求項13】 請求項1記載のcDNAまたは請求項2記載のDNAの、接種素の調製のための使用方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、HIV群由来の新規レトロウイルスおよびそのウイルスの本質的性質を有する変異株のRNAまたはその部分に対して相補的であるcDNAに関する。そのレトロウイルスの培養方法も説明される。さらに本発明は、このレトロウイルスの取得のほか、そのウイルス、その部分または抽出物の、医学目的、診断のための、また接種素調製の際における使用にも関する。いわゆるHIV群に属すレトロウイルスはそれに感染した人間に免疫不全またはエイズ(先天性免疫不全症候群)という集合概念で総括される症状を招く。

【0002】疫学的研究により、ヒト免疫不全ウイルス

(HIV)がエイズ(先天性免疫不全症候群)症例の圧倒的多数の病因であることが実証されている。1983年にある患者から単離され特性評価されたレトロウイルスにHIV-1という名称が与えられた(Barre-Sinoussi, F. et al., Science 220, 868-871 [1983])。HIV-1の一変異株がWO 86/02383に記載されている。第2のヒト免疫不全ウイルス群は1985年に西アフリカで同定され(Clavel, F. et al., Science 233, 343-346 [1986])、そしてヒト免疫不全ウイルス・タイプ2(HIV-2)と名付けられている(EP-A-0239425)。HIV-2レトロウイルスは、明らかにHIV-1とは区別されるが、なおもサル免疫不全ウイルス(SIV-2)と近縁関係を示す。HIV-1と同様、HIV-2もエイズ症状を生じる。免疫不全レトロウイルスのもう一つの変異株がEP-A-0345375に記載されており、そこではHIV-3レトロウイルスと名付けられている(ANT 70)。

【0003】Lancet Vol. 340, Sept. 1992, pp. 681-682には免疫不全ウイルスのもう一つの変異株の単離が記載されている。高い変異性を示すことがヒト免疫不全ウイルスの一特徴であり、これが様々な単離物の比較の可能性を明らかにめんどろにしている。様々なHIV-1-単離物を比較すると、他のゲノム領域は比較的保存されたままであるのに、いくつかのゲノム領域では高い変異性が認められる(Benn, S. et al. Science 230, 949-951 [1985])。本質的により大きい多形態性はHIV-2についても観察することができた(Clavel, F. et al., Nature 324, 691-695 [1986])。構造的および酵素的に不可欠なタンパク質をコードしているgagおよびpol遺伝子は大きな遺伝安定性を有し; env遺伝子および調節タンパク質をコードする遺伝子(vif, vpr, tat, rev, nef)は高い変異度を示す。さらにHIV-1に対する抗血清がほんのわずかな配列相同性しかなくても、HIV-2のgagおよびpol遺伝子産生物とも交叉反応することも示すことができた。同様に、あまり厳しくない条件を用いなければ両ウイルス間のハイブリダイゼーションはほとんど有意でなかった(Clavel, F. et al., Nature 324, 691-695 [1986])。

【0004】HIV群由来レトロウイルスが広く伝播していることから、そして感染時点と、病理学的変化の明確な徴候が認められるまでの時点との間に数年乃至多年(2~20年)の間隔があることから、HIV群レトロウイルスをできるだけ早くそしてとりわけ確実に測定することは疫学的に極めて重要なことである。これは免疫不全の徴候を示す患者の診断の際だけでなく供血者の検査においても役割を果す。HIV-1またはHIV-2タイプのレトロウイルスまたはそれらの構成部分をヒト血清の検出系に用いた場合、それら血清が由来する患者に免疫不全の徴候が現われているのに、抗体を全く検

出できないかあるいは弱い検出しかなされないことがわかっている。本発明によるHIV群由来レトロウイルスを用いれば一定の場合にそのような検出が可能である。

【0005】1991年に免疫不全の徴候を示した34才のカメルーンの女性患者の末梢リンパ球から単離された、以下MVP-5180/91と称する新規ヒト免疫不全ウイルスの単離および特性評価を記述する。地理的には、このレトロウイルスは、HIV-2およびHIV-1ウイルス感染の伝播を特色とする西アフリカと、ほぼもっぱらにHIV-1が伝播している東中央アフリカとの間に位置するアフリカの地域に由来している。さらに本発明の対象は、MVP-5180/91と称されるHIV群の新規レトロウイルスおよびその変異株のほか、それより導かれるDNS配列およびアミノ酸配列または部分配列、およびこれらを含むテストキットである。レトロウイルスMVP-5180/91はブダペスト条約の条件に従ってEuropean Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) にV92092 318の番号の下に寄託された。

【0006】HIV-1およびHIV-2と同様に、本発明によるMVP-5180/91は次の細胞系統、HUT78、Jurkat-細胞、C8166-細胞およびMT-2-細胞で増殖する。ウイルスの単離および増殖は“Viral Quantitation in HIV Infection (HIV感染におけるウイルス定量)、Jean-Marie Andrien編、John Libbey Eurotext発行、1991年”、という本に詳述されている。そこに記述されている操作方法を引用により本出願の開示の一部とする。さらに、本発明ウイルスはマグネシウム依存性ではあるがマンガン依存性ではない逆転写酵素を有する。このことは、ウイルスHIV-1およびHIV-2とのもう一つの一致点である。

【0007】本発明によるMVP-5180/91ウイルスとレトロウイルスHIV-1およびHIV-2の相違をよく理解してもらうために、免疫不全の原因となるレトロウイルスの構築をまず簡単に説明する。ウイルスの内部には、p24 (pはprotein (タンパク質)のpである)の呼称を有するサブユニットより組成された円錐状コアにRNAが存在する。この内部コアは、タンパク質p17で構築されたタンパク質外被 (外部コア)で囲まれ、そして宿主細胞に由来する脂質のほかにトランスメンブレン (transmembrane) タンパク質gp41および外被タンパク質120 (gp120)を含む糖タンパク質外被により囲まれている。このgp120は次いで宿主細胞のCD-4-レセプターと結合することができる。

【0008】知られている限り、HIV-ウイルスのRNAは (簡略化して記述した場合) 次の遺伝子領域を示す: 両末端にいわゆるロングターミナルリピート、および次の遺伝子領域、すなわちgag、pol、envおよびnef。gag遺伝子はとりわけ中核 (コア) - タンパク質であるp24およびp17をコードし、pol遺伝子はとりわけ逆転

写酵素、RNエース (リボヌクレアーゼ) Hおよびインテグラーゼをコードし、そしてenvはウイルス外被の糖タンパク質であるgp41およびgp120をコードする。nef遺伝子は調整機能を有するタンパク質をコードする。HIV型のレトロウイルスのゲノム配置の概略図を図1に示す。

【0009】レトロウイルスHIV-1とHIV-2との間の区別は、ウイルス抗原がAbbott社のテストキット (HIVAG-1 Monoclonal) として商業的に入手されるモノクローナル抗体を用いてテストしそして (HIV-1) p24に指向させることにより可能になる。ウイルス型HIV-1およびHIV-2における逆転写酵素含量が略等しいことは知られている。そこで可溶化されたウイルスの希釈液について抗原抗体反応によって得られる吸光度 (E490nm) を逆転写酵素の活性に対してプロットすると大体図2に相当するグラフが得られる。ここでわかることは、HIV-1における逆転写酵素含量に比例して使用モノクローナル抗体にはp24に対する極めて高い結合親和性が存在することである。それに対し、HIV-2については、モノクローナル抗体をこの場合も逆転写酵素含量に関係させて用いた場合極めてわずかな対p24結合親和性しか認められない。この測定をMVP-5180/91について行うとかなり正確にHIV-1およびHIV-2の曲線の間にくる、すなわちモノクローナル抗体の結合親和性はHIV-1よりも低下している。図2はこれらの事実を図示したものであり、ここでRTは逆転写酵素を意味し、そして抗原 (Ag) としては、Abbott社より購入されるテストキットに存在するモノクローナル抗体がそれに対して指向するタンパク質p24が用いられる。

【0010】多面的に利用可能な遺伝子工学系はいわゆるPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) であり、その場合、この方法の実施に必要な成分は購入することができる。この方法を用いれば、増幅すべき配列のDNA領域が知られていればDNA配列を増幅することができる。その際、増幅すべき核酸配列の短い領域に付着する短い相補DNA断片 (オリゴヌクレオチド = プライマー) を合成する必要がある。テストの実施には、そのほかにポリメラーゼとヌクレオチドトリホスフェートを含有する反応混合物中でHIV-核酸をそのプライマーと混合する。重合 (DNA合成) を一定の時間行った後、核酸鎖を加温により分離させる。冷却後、重合を改めて開示させる。従って本発明によるレトロウイルスにおいてHIV-1またはHIV-2ウイルスが問題とされる場合には、HIV-1およびHIV-2ウイルスの既知配列内で保存されたプライマーを用いて核酸を増幅し得たはずであろう。そのようなプライマーは一部報告されている (pol3およびpol4についてはLaure, F. et al., Lancet ii, (1988) 538-541、またはsk38/39、sk68/69についてはOu C.Y. et al., Science 239 (1

988) 295-297)。

*すなわち

【0011】今般次の配列を示す一定のプライマー対、* 【化1】

HIV-1
 gaga : C T A C T A G T A C C C T T C A G G
 gagb : C G G T C T A C A T A G T C T C T A A A G
 sk38 : C C A C C T A T C C C A G T A G G A G A
 sk39 : C C T T T G G T C C T T G T C T A T G T C C A G A A T G C または
 pol3 : T G G G A A G T T C A A T T A G G A A T A C C C A C
 pol4 : C C T A C A T A G A A A T C A T C C A T G T A T T G
 pol 3n : T G G A T G T G G G T G A T G C A T A
 pol 4n : A G C A C A T T G T A C T G A T A T C T A および
 SK 145 : A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C
 SK 150 : T G C T A T G T C A C T T C C C C T T G G T
 145-P : C C A T G C A A A T G T T A A A A G A G A C
 150-P : G G C C T G G T G C A A T A G G C C C

【0012】またはpol3およびpol4と 20

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

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

(Donehower L.A. et al. (1990) J. Virol

との組合せを用い、その中で3-4のプライマー (ne *た。

sted primer) を用いたPCRを行うとMVP - 518 【0013】次のプライマー配列

0/91 - DNAの弱い増幅物が得られることがわかつ* 【化2】

tat 1 A A T G G A G C C A G T A G A T C C T A
 tat 2 T G T C T C C G C T T C T T C C T G C C
 tat 1P G A G C C C T G G A A G C A T C C A G G
 tat 2P G G A G A T F C C T A A G G C T T T T G
 enva : T G T T C C T T G G G T T C T T G
 envb : G A G T T T T C C A G A G C A A C C C C
 sk68 : A G C A G C A G G A A G C A C T A T G G
 sk69 : G C C C C A G A C T G T G A G T T G C A A C A G
 5v3e : G C A C A G T A C A A T G T A C A C A T G G
 3v3e : C A G T A G A A A A A T T C C C C T C C A C
 5v3degi : T C A G G A T C C A T G G G C A G T C T A G C A G A A G A A G
 3v3degi : A T G C T C G A G A C T G C A G C A T C G A T T C T G G G T C C C C T C C T G A G
 3v3longdegi : C G A G A C T G C A G C A T C G A T G C T G C T C C C A A G A A C C C A A G G
 3v3longext : G G A G C T G C T T G A T G C C C C A G A
 gagdi : T G A T G A C A G C A T G T C A G G G A G T
 pol e : G C T G A C A T T T A T C A C A G C T G C T A C

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

【0014】

gag c : T A T C A C C T A G A A C T T T A A A T G C A T G G G

gag d : A G T C C C T G A C A T G C T G T C A T C A

env a : G T G G A G G G G A A T T T T T C T A C T G

env d : C C T G C T G C T C C C A A G A A C C C A A G G

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

50 【0015】広く普及しているHIV - 抗体の検出方法

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

【0016】本発明によるウイルスMVP-5180/91はウイルスHIV-1およびHIV-2に対し、ウエスタンブロットにおいて二つの著しい本質的相違点を示す。HIV-1は、タンパク質p24に対応する強いバンドと、p23に対応する極めて弱い、しばしばほとんど視認できないバンドを規則的に示す。HIV-2はタンパク質p25に対応する強力なバンドを、そして多くの場合にp23に対応する弱いバンドを示す。これとは対照的に、本発明によるMVP-5180/91ウイルスはタンパク質p24およびp25に相当するほぼ同じ強さの二本のバンドを示す。

【0017】もう一つの著しい相違点は逆転写酵素に対応するバンドに存在する。HIV-1は逆転写酵素に相当する一本のバンド（p53）とRNエースHと結合した逆転写酵素に相当する一本のバンド（p66）を示す。HIV-2ではその逆転写酵素はタンパク質p55に相当し、またそれがRNエースHと結合している場合はタンパク質p68に相当する。それに対し本発明によるMVP-5180/91は、タンパク質p48のところに逆転写酵素に相当する一本のバンド、およびタンパク質p60のところにRNエースHと結合した逆転写酵素に相当する一本のバンドを示す。これらの結果から、MVP-5180/91の逆転写酵素はHIV-1またはHIV-2の逆転写酵素よりも約3～約7キロダルトン小さい分子量を有すると結論することができる。MVP-5180の逆転写酵素は従ってHIV-1またはHIV-2の逆転写酵素よりも約4,500～約5,500ダルトン小さい分子量を示す。

【0018】本発明によるウイルスMVP-5180/91を用いた場合、抗-env-抗体は免疫不全の徴候を示すドイツの患者の血清中にはほんの弱くに検出されるにすぎないが、本発明によるウイルスに代えてHIV-1ウイルスを用いるとそれらの血清が強く反応することが見出された。この強力な検出反応はとりわけgp41タンパク質に局在した。それらの試験では、一方はドイツの患者に由来し、そして他方は免疫不全の徴候を示すアフリカの患者に由来する血清パネルを対比した。前述の諸特徴が本発明によるMVP-5180/91に相当するようウイルス変異株を特徴付ける。従って、免疫

不全徴候を示しそして好ましくはアフリカに由来する人々に由来するヘパリン加供血者血液から免疫不全ウイルスが単離されれば、この方法により本発明によるウイルスまたはその変異株を得ることができる。

【0019】前述の性質を示すウイルスが単離されたのでcDNAのクローニングを次の方法により行うことができる：そのウイルスを相応の量（約1リットル）の培養液から沈殿させ、そしてホスフェート緩衝食塩水にとる。次に（20%）サッカロース-パッドを通してペレット化を行う。そのウイルスペレットは、20mMジチオトレイトールおよび0.5%Nonidet p40中の6Mグアニジニウムクロライド中に懸濁することができる。CsClを2M濃度になるまで添加しそしてその破碎されたウイルスを含有する溶液を塩化セシウムパッドに適用する。次いでウイルスRNAを遠心分離によりペレット化し、溶解し、フェノール抽出し、そしてエタノールおよび塩化リチウムを用いて沈殿させる。オリゴ（T）-プライマーを用いて第一cDNA鎖の合成をウイルスRNAまたはその一部で行う。逆転写酵素を添加しての合成は購入により入手されるキットを用いて行うことができる。第二鎖の合成にはRNA/DNAハイブリッドのRNA鎖をRNエースHで希釈しそして大腸菌（E. coli）DNAポリメラーゼIを用いて合成される。次いでT4 DNAポリメラーゼ平滑末端を作ることができ、そしてこれを制限切断部位に適したリンカーと結合させる。適切な制限エンドヌクレアーゼによる制限消化の後、cDNA断片をアガロースゲルから単離し、そして予め適切な方法で切断されたベクターに結合する。cDNA-インサートを有するそのベクターを次いでコンピテント大腸菌細胞の形質転換に用いることができる。得られたコロニーを次いで膜に移動し、溶菌させそして変性させ、そして最後にハイブリダイゼーションにより、ジゴキシゲニンまたはピオチンで標識された核酸と結合させる。相当するcDNAの遺伝子工学的調製後、レトロウイルスに由来する目的とするDNA断片の単離が可能である。適切な発現ベクター中でこの断片を構築することにより、次いで目的とするタンパク質またはタンパク質断片を発現させ、そして診断テストに適用することができる。

【0020】前述の方法とは別の選択肢として、免疫不全ウイルスをPCR法を用いてクローン化でき、その際前述のプライマーを用いることができる。様々なウイルス単離物の間の類似性を核酸またはタンパク質配列の相程度により絞り出すことができる。例えば50%相同性は配列中の100のヌクレオチド-またはアミノ酸-位のうち50が一致することを意味している。タンパク質の相同性は配列分析により決定される。相同DNA配列はハイブリダイゼーション法によっても調べることができる。

【0021】本発明によれば、まず外被タンパク質の一

部について配列決定がされたところ、この配列がHIV型のウイルスの相当する配列に対して比較的わずかな相同性しか示さないことが確認された。特にgp41領域に関しては、データバンクを利用して行われたHIV-配列との比較によって高々66%（核酸配列）の相同性が見出されたにすぎない。更に、gp41をコードする領域も配列決定された。この配列を第1表または第3表に示す。

【0022】従って本発明の主題は、第1表および/または第3表のヌクレオチド配列に関し、本発明によるHIVウイルス、MVP-5180/91に対して66%以上、好ましくは75%以上、そして特に好ましくは85%以上の相同性を示すようなウイルスである。更に本発明の主題は、少なくとも50、好ましくは100、ヌクレオチド長の第3表に記載の核酸配列の部分配列に対して66%以上、好ましくは75%以上、そして特に好ましくは85%以上の相同性を示すようなウイルスである。これは、少なくとも16、そして好ましくは33、のアミノ酸のアミノ酸長に相当する。

【0023】本発明によるウイルスはその配列によって従来より知られるウイルスとは区別される。従って本発明の主題は、相同度により相違度を確認した場合に本発明によるウイルスの配列に広範に対応するようなウイルスおよび相当する核酸またはアミノ酸配列である。従って例えば85%以上の相同性は、100のヌクレオチドまたはアミノ酸のうち少なくとも85において同じヌクレオチドまたはアミノ酸を示し残りは異なってもよいような配列が包含されることを意味する。相同性を確認するにあたって、両配列はできるだけ多くの相互に対応するヌクレオチドまたはアミノ酸が相互に一致するよう

に対応される。

【0024】本発明によるウイルスのDNA配列として記載された（ほぼ）完全な配列を第7表に示す。ここで本発明の主題は第7表による配列を示すウイルス、および第7表の配列に対し高い相同性を示すそれらの変異株、およびそれらより導かれる、診断的に使用できるかまたは接種素として通用できるタンパク質、ポリペプチドおよびオリゴペプチドである。

【0025】単離された配列に基づき免疫支配エペトープ（ペプチド）を調製し（konfektioniert）合成することができる。ウイルスの核酸配列がわかっているので当業者はそれよりアミノ酸配列を導くことができる。アミノ酸配列の部分領域を第3表に記述する。従って本発明の主題は、第7表または第4表に開示された情報を用いて調製することができる抗原、すなわちタンパク質、オリゴペプチドまたはポリペプチドでもある。これらの抗原、タンパク質、ポリペプチドおよびオリゴペプチドは、第7表から導き得る、または第3表に記載されているアミノ酸配列を示す。それら抗原またはペプチドは第3表に記載されているかまたは第7表より導き得るアミ

ノ酸配列の比較的短い部分配列を示すことができる。このアミノ酸配列は、少なくとも6アミノ酸長、好ましくは少なくとも10アミノ酸長、そして特に好ましくは15アミノ酸長である。これらのペプチドは組換え法によるだけでなく合成法によって調製することもできる。適当な調製方法の一つはMerrifield型の固相合成である。この方法の更なる記述および他の従来技術として知られる方法は文献、例えばM. Bodansky, et al., Peptide Synthesis, John Weeley & Sons, 第二版, 1976にみることもできる。

【0026】診断テストにおいては、検査すべき人の血清検体をMVP-5180/91に由来する一以上のタンパク質または糖タンパク質（それらは真核細胞系統において発現させることができる）のタンパク鎖またはその一部と混合する。好ましいテスト方法には免疫蛍光または免疫酵素テスト法（例えばELISA、イムノプロット）が包含される。免疫酵素テスト（ELISA）においては、例えばMVP-5180/91またはその変異株に由来する抗原をマイクロタイタープレートの壁面に結合することができる。その際に用いられる用量はテストシステムおよびマイクロタイタープレートの操作に本質的に依存する。次いで検査すべき人に由来する血清または血清希釈液をそのマイクロタイタープレートの穴に添加する。一定のインキュベーション時間の後、そのプレートを洗浄する。特異免疫複合体は、ヒト免疫グロブリンに特異的に結合しそして予め酵素例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどに結合しておいた抗体により、あるいは酵素標識抗原を用いて検出される。この酵素は無色基質を強く発色した生成物に変えることができ、次いでその色の強さで特異抗-HIV-抗体の存在を読み取ることができる。テストシステムにおける本発明ウイルス利用のもう一つの可能性はウェスタンブロットへの利用である。

【0027】たとえ、免疫不全疾患に対する接種素の調製が極端に困難であるとわかっていても、このウイルスまたはその一部、すなわち免疫支配エペトープおよび細胞性免疫のインデューサー、あるいは遺伝子工学的に調製された抗原は接種素の開発および調製に用いることができる。

【0028】実施例1

本発明による免疫不全ウイルスMVP-5180/91を免疫不全徴候を伴う女性患者の血液から単離した。そのために、HIVに感染していない供血者の血液からの末梢リンパ球（peripheral blood lymphocytes, PBL）および末梢単核細胞（末梢血リンパ球、PBL）を植物性血球凝集素（フィトヘマグルチニン）で刺激しそして培養液に保った。そのために、10%牛胎仔血清含有の普通培地RPMI 1640を用いた。培養条件はLanday A. et al., J. Inf. Dis., 161 (1990) pp. 706-710、に記載されている。次いで巨細胞（Reisenzellen）の形

成を顕微鏡観察した。HIVウイルスの生産をAbbott社から購入できるテストを用いたp24-抗原の測定により測定した。ウイルス増殖測定のためのもう一つのテストは粒子結合逆転写酵素を用いたテストであった(Eberle J., Seibl R., J. Virol. Methods 40, 1992, pp. 347-356)。すなわち、ウイルス生産を監視するためにウイルス増殖を培養上清中の酵素活性に基づいて週1~2回測定した。1週間に1回新たな供血者リンパ球を添加した。

【0029】HIVウイルス増殖が確認できた後、HIVで感染されていない健康供血者の血液からの新鮮末梢リンパ球(PBL)を初代培養液上清で感染させた。この段階を反復した後その上清でH9またはHUT78細胞を感染させた。この方法により免疫不全ウイルスの永続的生産が可能であった。そのウイルスはECCにNo. V 920 92 318の番号で寄託された。

【0030】実施例2

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

ウイルス型：ドイツの患者から単離されたHIV-1ウイルス

ドイツの血清 強い反応

アフリカの血清 gp41と強い反応

ウイルス型：MVP-5180/91

ドイツの血清 gp41と無反応乃至弱い反応

アフリカの血清 強い反応

【0031】前述の結果は、ドイツの患者から単離されたHIV-1型ウイルスをHIV-感染の検出に用いる場合、患者が本発明によるMVP-5180/91に相当するウイルスに感染しているときは、一義的結果は多分全く得られないことを示している。さらにそれによって、本発明によるウイルスを用いればゲノム全体に関し少くとも約85%相同性を本発明ウイルスに対して示すようなウイルスを検出できると結論される。

【0032】実施例3

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

右半分は、HIV-1ウイルスに関係する、ドイツの供血者から単離されたウイルス(MVP-899)を示す。それら個々のフィルター片を今度は様々な患者の血清と共にインキュベートした。図3からわかるように、それぞれ同じ(ドイツの患者の)血清を各々2つのフィルター片と反応させた。8と26; 9と27; 10と28; 11と29; 13と30; 13と31; 14と32; 15と33および16と34の番号は同じ血清を表示している。17および18番のウェスタンブロットでは、アフリカの患者の血清を適用した。右側余白の数値は概ねの分子量を1000(KD)単位で記述したものである。

【0033】図3は、本発明による免疫不全ウイルスを有するドイツの患者の血清がウェスタンブロットにおいてgp41とは極めて弱くしか反応しないことを明らかに示している。これに対し、アフリカの患者の血清は本発明による免疫不全ウイルスと極めて強く反応する。従って図3は、本発明による免疫不全ウイルスを用いればHIV-1またはHIV-2ウイルスを用いた場合には不確かな、すなわち一義的でない陽性結果しか得られないような免疫不全感染を検出できることを明らかにしている。この検出可能性は遠大な診断上の意義を有し得る。何故ならば、ウェスタンブロットで不確かな結果しか得られない場合は、免疫不全ウイルスによる感染が関係しているかどうかを明確な確実さをもって確認することができないからである。しかしながら本発明による免疫不全ウイルスを用いてかかる不確かな結果が本発明によるタイプのウイルスによる感染と相関させることができる。これは診断上大変な進歩である。

【0034】実施例4

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

MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞よりのゲノムDNAを標準的方法により単離した。単離物MVP-5180/91のゲノム領域の特徴評価をするためにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)実験を外被タンパク質領域gp41からのプライマー対を用いて行った。そのPCR実験の実施は次の改変を加えたSaikiら(Saiki et al., Science 239: 487-491, 1988)の方法により行った：HIV-特異的DNA領域を増幅するために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの5 μ lのゲノムDNAを100 μ lの反応混合物(0.25mM dNTP、各1 μ Mのプライマー1およびプライマー2、10mM Tris HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、2.5単位のTaqポリメラーゼ(Perkin Elmer社))にピペットで取り、そして次の温度プログラムに従って増幅した：1.初期変性：3分95、2.増幅：90秒94、60秒56、90秒72(30サイクル)。

【0035】前記PCRおよびヌクレオチド配列決定に用いたプライマーはBioResearch社のオリゴヌクレオチド合成装置8750で合成された。

プライマー1: AGC AGC AGG AAG CAC TAT GG (HIV単離物HxB2からの座標(コーディネート):塩基7795-781)

4、プライマーsk68に相当)
プライマー2: GAG TTT TCC AGA GCA ACC CC (HIV1単離物HxB2からの座標:塩基8003-8022、プライマー

【0036】増幅したDNAを3% "Nusieve" アガロースゲル(Biozyme社)で増幅した断片を切り取りそして等容の緩衝液(1xTBE(0.09M Trisボレート、0.002M EDTA、pH8.0)と混合した。そのDNA-アガロースゲル混合物を70度で10分間インキュベートし、次いでフェノール抽出した後、そのDNAを水性相から1/10容の3M NaAc(pH5.5)および2容のエタノールを添加することにより20度で15分間沈殿させ、次いで遠心分離機(Eppendorf社)でペレット化した(13000rpm、10分、4度)。ペレット化したDNAを乾燥し、水にとり、そして分光光度計(Beckman社)において260nmでのDNA濃度を光度計測定した後、Sander(F. Sander, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463,1977)の方法により配列決定した。Klenow DNAポリメラーゼを用いた配列決定に代えてApplied Biosystems社のキット("Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing"、注文番号(Best.-Nr.):401150)を用いて配列決定反応を行った。プライマーとしては別々の配列決定反応にプライマー1またはプライマー2(各1μM)を適用した。配列決定反応系の分析はDNA配列決定装置373A(Applied Biosystems社)で、装置製造元の指示に従って行われた。増幅されたDNA領域のヌクレオチド配列およびそれより導かれたアミノ酸配列を第1表に示す。

【0037】

【表1】
第1表

CGCGAGCGGCAACAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCAAC
CGCGTCGCCGTGTGTCGCGACTGCCATGCCTGGGTGTACATGACTTCCCATATCACGTTG
A A A T A L T V R T H S V L K G I V Q Q
AGCAGGACAACCTGCTGAGAGCGATAACAGGCCAGCAACACTTGCTGAGGTTATCTGTAT
TCGTCTGTGGACGACTCTCGCTATGTCCGGGTGCTGTGAACGACTCCAATAGACATA
Q D N L L R A I Q A Q Q H L L R L S V W
GGGGTATTAGACAACCTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTTAGAAACCTTATACAGAATCAGC
CCCCATAATCTGTGAGGCTCGAGCGGACGTTCCGGAATCTTTGGGAATATGTCCTTAGTCG
G I R Q L R A R L Q A L E T L I Q N Q Q
AACGCCTAAACCTAT
TTGCGGATTTGGATA
R L N L -

【0038】実施例5
確認された第1表記載のヌクレオチド配列の相同配列をGENEBANKデータバンク(リリース72、1992年6月)でGCG-コンピュータープログラム(GeneTic Computer Group, Inc.社、米国ウイスコンシン州、バージョン7.1、1992年3月)を用いて調べた。このデータバンクには1992年7月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスのおよび霊長類からの単離物のヌクレオチド配列のほとんどが含まれている。

【0039】第1表のヌクレオチド配列は最良の場合にはチンパンジーからの単離物に対し66%の相同性を示す。HIV1単離物に対して、MVP5180/91は

調べたDNA配列において最良の場合に64%相同である。HIV2単離物に対し第1表のDNAは56%相同である。チンパンジーからの単離物の外には第1表のヌクレオチド配列と霊長類からの単離物(SIV:サル免疫不全ウイルス)からのDNA断片の間の最良の相同性は、単離物SIV(アフリカ産オナガザル)TYO-1の外被タンパク質の部分領域をコードするDNA配列に存在する。その相同性は61.5%である。

【0040】実施例6
確認された第1表に記載のアミノ酸配列の相同配列をSWISSPROTタンパク質データバンク(リリース22、1992年6月)においてGCG-コンピューター

プログラムを用いて調べた。このデータバンクには1992年6月までに知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスのおよび霊長類からの単離物のタンパク質配列のほとんどが含まれている。

【0041】第1表記載のアミノ酸配列は前述のチンパンジーからの単離物の外被タンパク質断片に対し最良の場合62.5%相同である。HIV1-外被タンパク質の下では、第1表のアミノ酸配列との最良の相同性は単離物HIV1 Ma1に認められる。その相同性は59%である。HIV2-外被タンパク質に対しては第1表のアミノ酸配列との相同性は最良の場合52% (単離物HIV2 Rod)である。HIV1およびHIV2-単離物も最良の場合対応するタンパク質断片においてわずかに64%が一致するに過ぎないことから、単離物MVP-5180/91の場合はHIV1およびHIV2とは明らかに構造的に区別され従ってそれらから独立したHIVウイルス群の代表であるHIV変異株が関係していると思われる。

【0042】HIV単離物MVP-5180/91の増幅されたDNA領域のアミノ酸配列(第1表)は、HIV1の外被タンパク質の免疫診断的に重要な領域(アミノ酸584-618*)とオーバーラップする(第2表)(Gnann et al., J. Inf. Dis. 156:261-267, 1987; Norrby et al., Nature, 329:248-250, 1987)。HIV2およびSIVの外被タンパク質の対応するアミノ酸領域も同様に免疫診断的に保存されている(Gnann et al., Science, pp. 1346-1349, 1987)。従ってHIV1およびHIV2のこの外被タンパク質領域からのペプチドは多くの商業的に入手し得るHIV1/2抗体スクリーニングテストに固相抗原として適用される。それによって約99%の抗HIV1および抗HIV2陽性血清を捕捉することができる。

【0043】MVP-5180/91-外被タンパク質のアミノ酸領域(第1表)は、gp41の免疫診断的に重要な領域とオーバーラップしていることから、血清診断的に重要であり得る。特に、HIV感染した患者の抗血清が商業的に入手される抗体スクリーニングテストのいずれとも陽性に反応しない場合にはそうである。これらの場合には、MVP-5180/91と密接な関係にあるウイルスによる感染が存在し得る。

【0044】

【表2】

第 2 表

.....RILAVERYLKDQQLLGWGCSGKLICTTAVPWNAS
|: |:| :.: :|| |.:
WGIRQLRARLQALETLIQNQRLNL.....

【0045】実施例7 (gp41をコードする) HIV単離物MVP-5180

0/91のゲノム診断のDNA単離、増幅および構造的
特徴評価

MVP-5180/91に感染したHUT78細胞からのゲノムDNAを前述の如く単離した。単離物MVP-5180/91のゲノム領域の特徴評価を行うために、外被タンパク質領域gp41からのプライマー対を用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)実験を行った。PCR(Saiki et al., Science 239:487-491, 1988)および逆PCR(Triglia et al., Nucl. Acids, Res. 16:8186, 1988)は次の改変を加えて行われた:

【0046】1. PCR

HIV-特異的DNA領域を増幅するために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの5μl(218μg/ml)のゲノムDNAを100μlの反応混合物(0.25mM dNTP、各1μMのプライマー163envおよびプライマーenvend、10mM Tris HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%ゼラチン、2.5単位のTaqポリメラーゼ(Perkin Elmer社))にピペットでとりそして次の温度プログラムに従って増殖した: 1. 初期変性: 3分間95、2. 増幅: 90秒間94、60秒間56、90秒間72(30サイクル)。

【0047】2. gp41の5'領域(N-末端)およびgp120の3'配列を“逆PCR”により増幅した。そのために、MVP-5180/91に感染させたHUT78細胞からの100μlのゲノムDNA調製物(218μg/ml)を10単位の制限エンドヌクレアーゼSau3aを含む200μlの最終容量中37°Cで1時間消化した。そのDNAを次にフェノール処理し、そして酢酸ナトリウム(最終濃度300mM)および2.5容エタノールを用いて-70°Cで10分間沈殿させ、エッペンドルフ遠心分離機で遠心分離し、そしてそのペレットを乾燥しそして890μlの蒸留水に再懸濁した。100μlのリガーゼ緩衝液(50mM Tris HCl, pH7.8、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATP、25μg/ml牛血清アルブミン)および10μlのT4 DNA-リガーゼ(Boehringer社、マンハイム)を添加した後、それらDNA断片を室温で3時間結合し、改めてフェノール処理し、そして前述の如く酢酸ナトリウムおよびエタノールを用いて沈殿させた。遠心分離および乾燥後、そのDNAを40μlの蒸留水に再懸濁し、そして10単位の制限エンドヌクレアーゼSac I(Boehringer社、マンハイム)を用いて1時間消化した。次に5μlのこの混合物を“1. PCR”に記載の如くPCR実験に適用した。プライマー163envおよびenvendに代えてプライマー168;および169;を逆PCRに用いた。

【0048】それらプライマー163env、168;および169;は、HIV-単離物MVP-5180のすでに確認されている部分配列から選択した(実施例

4)。PCR/逆PCRおよびヌクレオチド配列決定に用いられたプライマーはBioResearch社のオリゴヌクレ

プライマー-163env: 5 CAG AAT CAG CAA CGC CT
A AAC C 3

プライマー-envend: 5 GCC CTG TCT TAT TCT T
CT AGG 3

(HIV1単離物BH10での位置:塩基8129-8109)

【0049】増幅されたDNAを3%“Blue” GCアガロースゲル(Biozyme社)で分離し、増幅された断片を切り取りそして等容の緩衝液(1x TBE (5.0 mM Trisボレート、0.02M EDTA、pH8.0)と混合した。そのDNA-アガロースゲル混合物を70で10分間インキュベーションし次いでフェノール抽出した後、DNAを水性相から1/10容の3M NaAc、pH5.5および2容のエタノールを用いて-20で15分間沈殿させ、次いでエッペンドルフ遠心分離機でペレット化した(13000rpm、10分間、4)。そのペレット化されたDNAを乾燥し、水にとり、そして分光光度計(Beckman社)により260nmでのDNA濃度を光度計測定した後、Sanger(F. Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463, 1977)の方法に従って配列

オチド合成装置8750で合成したところ、該プライマーは次の配列を示す:

決定したAG know DNAポリメラーゼを用いた配列決定に代えてApplied Biosystems社のキット(“Taq Dye Terminator Cycle Sequencing”、注文番号:401150)を用いて配列決定反応を行った。プライマーとしては別々の配列決定反応にプライマー-163envまたはプライマー-envend(各1μM)を適用した。この逆PCR実験で増幅されたDNAをプライマー-168;および169;を用いて配列決定した。配列決定反応の分析はDNA配列決定装置373A(Applied Biosystems社)で装置製造元の指示に従って行われた。増幅されたDNA領域のヌクレオチド配列およびそれより導かれたアミノ酸配列を第3表に示す。

【0050】

【表3】

第 3 表

```

1  AAATGTC AAGACCAATAATAAACATTACACCCCTCACAGGAAAAAAGAGCAGTAGGAT 60
   TTTACAGTTC TGGTTATTATTTGTAAGTGTGGGAGTGTCCCTTTTTCTCGTCATCCTA
   M S R P I I N I H T P H R E K R | A V G L
                                     gp120 ←-----→ gp41
61  TGGGAATGCTATTCTTGGGGGTGCTAAGTGCAGCAGGTAGCACTATGGGCGCAGCGGCAA 120
   ACCCTTACGATAAGAACCCCCACGATTCACGTCGTCCATCGTGATACCCGCGTCGCCGTT
   G M L F L G V L S A A G S T M G A A A T
121 CAGCGCTGACGGTACGGACCCACAGTGTACTGAAGGGTATAGTGCAACAGCAGGACAACC 180
   GTCGCGACTGCCATGCCCTGGGTGTCACATGACTTCCCATATCACGTTGTCGTCCTGTTGG
   A L T V R T H S V L K G I V Q Q Q D N L
181 TGCTGAGAGCGATACAGGCCAGCAACACTTGTGAGGTTATCTGTATGGGGTATTAGAC 240
   ACCGACTCTCGCTATGTCGGGTCGTTGTAACGACTCCAATAGACATACCCATAATCTG
   L R A I Q A Q Q H L L R L S V W G I R Q
241 AACTCCGAGCTCGCCTGCAAGCCTTAGAAACCCCTTATACAGAATCAGCAACGCCTAAACC 300
   TTGAGGCTCGAGCGGACGTTCCGAATCTTTGGGAATATGCTTAGTCGTTGCGGATTTGG
   L R A R L Q A L E T L I Q N Q Q R L N L
301 TATGGGGCTGTAAGGAAAATACTGTTACACATCAGTAAATGGAACACATCATGGT 360
   ATACCCCGACATTCCTTTTGATTAGACAATGTGTAGTCATTTACCTTGTGTAGTACCA
   W G C K G K L I C Y T S V K W N T S W S
361 CAGGAGGATATAATGATGACAGTATTTGGGACAACCTTACATGGCAGCAATGGGACCAAC 420
   GTCCCTCCTATATTACTACTGTGCATAAACCTGTTGGAATGTACCCGTCGTIACCCTGGTTG
   G G Y N D D S I W D N L T W Q Q W D Q H
421 ACATAAACAAATGTAAGCTCCATTATATATGATGAAATACAAGCAGCACAAAGACCAACAGG 480
   TGTATTTGTTACATTCGAGGTAATATATACTACTTTATGTTCTGTCGTTCTGTTGTTCC
   I N N V S S I I Y D E I Q A A Q D Q Q E
481 AAAAGAAATGTAAGCATTGTTGGAGCTAGATGAATGGGCCTCTCTTTGGAATTGGTTTG 540
   TTTTCTTACATTTTCGTAACAACCTCGATCTACTTACCCGGAGAGAAACCTTAACCAAAC
   K N V K A L L E L D E W A S L W N W F D
541 ACATAACTAAATGGTGTGGTATATAAAAATAGCTATAATCATAGTGGGAGCACTAATAG 600
   TGTATTGATTACCAACACCATATATTTTATCGATATTAGTATCACCCCTCGTGATTATC
   I T K W L W Y I K I A I I I V G A L I G

```

【0051】

【表4】

第3表 (続き)

501 GTATAAGATTATCATGATAGTACTTAACTAGTGAAGAACATTAGGCAGGGATATCAAC 660
 CATATTCCTCAATAGTACTATCATGAATTAGATCACTTCTTGTAAATCCGTCCCTATAGTTG
 I R V I M I V L N L V K N I R Q G Y Q P
 661 CCCTCTCGTTGCAGATCCCTGTCCACACCCGGCAGGAAGCAGAAACGCCAGGAAGAACAG 720
 GGGAGAGCAAACGTCTAGGGACAGGGTGTGGCCCTCCTTCGTCTTTGCGGTCCCTCTTGTC
 L S L Q I P V P H R Q E A E T P G R T G
 721 GAGAAGAAGGTGGAGAAGGAGACAGGCCAAGTGGACAGCCTTGCCACCAGGATTCCTGC 780
 CTCTTCTCCACCTCTTCTCTGTCCGGGTTCACCTGTGGAAACGGTGGTCCCTAAGAACG
 E E G G E G D R P K W T A L P P G F L Q
 781 AACAGTTGTACACGGATCTCAGGACAATACTTGTGGACTTACCACCTCTTGAGCAACT 840
 TTGTCAACATGTGCCTAGAGTCTGTATTAGAACACCTGAATGGTGGAGAACTCGTTGA
 Q L Y T D L R T I I L W T Y H L L S N L
 841 TAATATCAGGGATCCGGAGGCTGATCGACTACCTGGGACTGGGACTGTGGATCCTGGGAC 900
 ATTATAGTCCCTAGGCCTCCGACTAGCTGATGGACCCCTGACCCCTGACACCTAGGACCCCTG
 I S G I R R L I D Y L G L G L W I L G Q
 901 AAAAGACAATTGAAGCTTGTAGACTTTGTGGAGCTGTAATGCAATATTGGCTACAAGAAT 960
 TTTTCTGTAACTTCGAACATCTGAAACACCTCGACATTACGTTATAACCGATGTTCTTA
 K T I E A C R L C G A V M Q Y W L Q E L
 961 TGAAAAATAGTGTCTACAAACCTGCTTACTATTGCAGTGTGAGTTGCCAATTGGACTG 1020
 ACTTTTATCAGGATGTTGGACGAACATGATAACGTCACAGTCAACGGTTAACCTGAC
 K N S A T N L L D T I A V S V A N W T D
 1021 ACGGCATCATCTTAGGTCTACAAAGAATAGGACAAGG 1057
 TGCCGTAGTAAATCCAGATGTTCTTATCTGTTCC
 G I I L G L Q R I G Q

【0052】実施例8

確認された第3表記載のヌクレオチド配列の相同配列を
 GENE BANK - データバンク (リリース72、1
 992年6月) においてGCG - コンピュータープログラ
 ム (Genetic Computer Group, Inc.社、米国ウイス
 コンシン州、バージョン7.1、1992年3月) を用い
 て調べた。このデータバンクには1992年7月までに
 知られた、ヒト起源の免疫不全ウイルスのおよび霊長類
 からの単離物のヌクレオチド配列のほとんどが含まれて
 いる。第3表記載のヌクレオチド配列はHIV1 - 単離 10
 物に対して最良の場合62%相同性を示す。HIV2単
 離物に対して第5表記載のDNAは50%相同である。
 第3表のヌクレオチド配列から導かれるアミノ酸配列の
 相同配列をSWISSPROTタンパク質データバンク
 (リリース22、1992年6月) においてGCG - コ
 ンピュータープログラムを用いて調べた。このデータ
 バンクには1992年6月までに知られた、ヒト起源の免
 疫不全ウイルスのおよび霊長類からの単離物のタンパク
 質配列のほとんどが含まれている。

【0053】第3表記載のアミノ酸配列はチンパンジー 20
 からの単離物CIV (SIVcpz) の相当する外被タンパク
 質断片に対し最良の場合54%相同であり、そしてHI
 V1単離物Ma1に対して54.5%相同である。HI

V2 - 外被タンパク質に対する第3表記載のアミノ酸配
 列の相同性は最良の場合34% (単離物HIV2 D1
 94) である。それに対し、HIV1のgp41 - アミ
 ノ酸配列をSWISSRPOT - データバンクに存在するHIV
 1 gp - 41配列と比較すると期待されたとおり最良
 の場合ほぼ100%の相同性、そして最悪の場合に78
 %の相同性が得られる。第3表記載の配列領域とHIV
 1およびHIV2の対応する断片との間にこのような明
 らかな構造的相違があることから、単離物MVP - 51
 80 / 91の場合は、HIV1およびHIV2とは明らか
 に構造的に区別されるHIV変異株が関係していると思
 われる。おそらくMVP - 5180 / 91はHIV1
 およびHIV2とは区別される特別なHIVウイルス群
 に帰属すると思われる。

【0054】HIV1 - 外被タンパク質領域のアミノ酸
 584 - 618のペプチドは血清診断的に特に重要であ
 る (番号付けは次による: Wain Hobson et al., Cell 4
 0:9-17, 1985; Gnann et al., J. Inf. Dis. 156:261
 -267, 1987; Norrby et al., Nature, 329:248-250, 19
 87)。HIV2およびSIVの外被タンパク質の相当す
 るアミノ酸領域も同じく免疫診断的に保存されている
 (Gnann et al., Science, pp. 1346-1349, 1987)。従
 ってHIV1およびHIV2のこの外被タンパク質領域

からのペプチドは多くの商業的に入手し得るHIV 1/2抗体スクリーニングテストに固相抗原として適用される。それによって約99%の抗-HIV1および抗-HIV2陽性血清を捕捉することができる。MVP-5180/91外被タンパク質の相当するアミノ酸領域(第4表)およびこの単離物のgp41全体は、HIV感染患者の抗血清が商業的に入手される抗体スクリーニング

第4表

1 RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

2 LQLTLIQN RNL K YSKT

1 gp41由来のHIV1アミノ酸配列

2 gp41由来のMVP-5180配列。HIV1配列と相違して

いるところだけが記されている。

【0056】MVP5180に由来する情報を用いて確認されたペプチドは従って次のアミノ酸配列を有する：RLQALETLIQNQRLNLWGCKGKLCYTSVKWNTS。従って本発明の主題は、組換えまたは合成により調製することかでき、そして前述の配列または、少なくとも6個の連続するアミノ酸、好ましくは9個そして特に好ましくは12個の連続するアミノ酸を示す部分配列を示すペプチドである。

【0057】実施例9

HIV単離物MVP5180の全ゲノムのクローニング
a) ゲノムライブラリーの調製

MVP5180感染HUT78細胞由来のゲノムDNAを前述の如く単離した。300μgのこのDNAを770μlの容量として0.24Uの制限酵素Sau3Aと共に45分間インキュベートした。それによって部分的にのみ切断されたDNAを次いで0.7%アガロース(低融点アガロース、Nusieve)でサイズ分画し、そして10kbと21kbの間の断片を切り取った。そのアガロースを70で10分間溶融し、そして等容の緩衝液(1×TBE、0.2M NaCl)と混合した。次いでフェノールで2回、そしてクロロホルムで1回抽出した後、1/10容の3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.9)および2.5容のエタノールの添加により-70で10分間DNAを沈殿させた。沈殿したDNAを遠心分離し、乾燥しそして1μg/μl濃度で水に溶解した。

【0058】サイズ分画されたDNAの収量は約60μgであった。5μgのこのDNAを1Uアルカリ性ホスファターゼと共に相当する緩衝液中、37で20分間インキュベートした。5'-末端ホスフェート残基を分離することによってサイズ分画されたDNAの過度の多重な挿入を減少させた。そのホスファターゼ処理をフェノール処理により停止し、DNAを前述の如く沈殿させ、1μgのベクター(2DASH、BamHI切断Stratagene No.:247611)と、全容量を6μlとして2W

テストにおいてほんの弱くしかあるいはそもそも全く反応しない場合に特に血清診断的に重要であり得る。これらの場合には、MVP-5180/91と密接な関係にあるウイルスによる感染が存在し得る。

【0055】

【表5】

eiss単位のラムダT4リガーゼを用いて15で12時間結合した。結合が行われた後、そのDNAをパッキングキット(Gigapack II Gold, Stratagene No.:247611)を用いて製造元の指示に正しく従ってファージ外被にパッキングした。

【0059】b) DNAプローブの放射性標識
標識にはBoehringer Mannheim社の“ラムダ・プライムド・DNA・ラベリング・キット(Random Primed DNA Labeling Kit)”(No.:713023)を適用した。実施例3に記載の如くプライマーsk68およびenvbを用いて得られたPCR生成物を標識した。1μgのこのDNAを2×5分間煮沸した後氷水中で冷却することにより変性した。標識のために50mCi(-³²P)-dCTP(NEN, No.:NEX-053H)を添加した。その他の添加物質を製造元の指示に従ってピペットで添加した。37で30分間インキュベーションした後、放射性標識済みのDNAを沈殿させた。

【0060】c) ファージ-ライブラリーのスクリーニング

200μlの30で一夜培養した培養液(10mM MgSO₄のほか0.2%マルトースを含有するLB培地中のSRB(P2)株[Stratagene, No.:247611])に、100μlのSM緩衝液(5.8gのNaCl、2gのMgSO₄、50mlの1M Tris、pH7.5、および5mlの2%ゼラチン溶液を1リットルのH₂Oに溶解)中の20000pfu(プラーク形成単位)のライブラリーを添加し、ファージを20分間37で細菌に吸着させ、7.5mlの55に冷却したTop-アガロースと混合しそして予め加温した直径14cmのLb-寒天プレートで分別した。約8時間後にプラークが全面に及んだ。そこでプレートにニトロセルロースフィルターを数分間重ねそして非対称的マーキングを設けた。注意深く取り除いた後そのフィルターを2分間変性し(0.5M NaOH、1.5M NaCl)そして次に5分間中和した

(0.5 M Tris, pH8、1.5 M NaCl)。そのフィルターを次に80 で60分間ベーキング後プローブとハイブリダイズさせることができた。

【0061】プレハイブリダイゼーションを行うべき、そのフィルターをフィルター1枚あたり15mlのハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、0.5% SDS、5xSSPE、5xDenhardt溶液および0.1mg/mlサケ精子DNA)中、42 で振盪しながら2~3時間インキュベートした。〔³²P〕標識DNAプローブを2~5分間100 で変性し、氷冷し、プレハイブリダイゼーション溶液を添加しそして12時間42 でハイブリダイズした。次にそのフィルターを60 で、まず2xSSC/0.1%SDSで、次に0.2xSSC/0.1%SDSで洗浄した。そのフィルターを乾燥後、ハイブリダイゼーションシグナルをレントゲンフィルムX-OMATTMAR(Kodak社)を用いて検出した。あるシグナルを帰属させることができたプラークをSM緩衝液で溶出後さらなる希釈段階で分離した。2x10⁶プラークのスクリーニング後、下記のクローンを確認することができた。

【0062】d) ファージDNAの単離およびサブクロニング
SM緩衝液中のファージ溶出液10μlを用いて宿主株SRB(P2)の一夜培養物を、培養物の最初の濃密な増殖の後、約6~8時間後に溶解(Lyse)が行われるように感染させた。その溶解培養物から、9000gで2回10分間遠心分離することにより細胞残渣を分離した。次にファージを遠心分離(35000g、1時間)によりペレット化し、700μlの10mM MgSO₄にとり、そしてタンパク質中間相(インターフェーズ)がもはやみられなくなるまでフェノール処理した。そこで*

第6表

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

遺伝子	開始 ¹	停止 ¹
GAG	817	2310
POL	2073	5153
ENV	6260	8887

1) 数値はMvP5180/91の全配列における塩基位置

MvP5180/91の全配列は次の第7表に示されている。

*ファージDNAを沈殿させ、制限酵素EcoRIで切断し、そしてそれによって得られたEcoRI断片をベクターBluescript KS⁻(Stratagene, No.:212208)にサブクロン化した。全部で4つのクローンが得られた:

【0063】

【表6】

第5表

プラスミド	最初 ¹	最後 ¹
pSP1	1	1785
pSP2	1786	5833
pSP3	5834	7415
pSP4	7660	9798

1) 下記の全配列に関して

【0064】不足している塩基7416と7659の間の断片はプライマー157(CCATAA TAT TCA GCA GAA CTA G)および226(GCT GATTCT GTA TAA GGG)を用いたPCRにより得た。DNA鋳型としてはクローンのファージDNAを用いた。PCRの条件は次のとおりとした: 1) 初期変性: 94、3分間、2) 増幅: 1.5分間94、1分間56 および1分間72 (30サイクル)。DNAの配列決定は実施例4に記載の如く行った。全ゲノムからその鎖のほかに対向鎖も配列決定した。すべてのEcoRI切断部位の場合に、クローンのファージDNAを鋳型として用いたPCRによって、サブクロン移行時点で各々単一のEcoRI切断部位が関係していることが確認された。

【0065】

【表7】

【0066】

【表8】

第7表 M v P 5180 の配列

1 CTGGATGGGT TAATTTACTC CCATAAGAGA GCAGAAATCC TGGATCTCTG
 51 GATATATCAC ACTCAGGGAT TCTTCCCTGA TTGGCAGTGT TACACACCGG
 101 GACCAGGACC TAGATTCCA CTGACATTTG GATGGTTGTT TAAACTGGTA
 151 CCAGTGTGAG CAGAAGAGGC AGAGAGACTG GGTAATACAA ATGAAGATGC
 201 TAGTCTTCTA CATCCAGCTT GTAATCATGG AGCTGAGGAT GCACACGGGG
 251 AGATACTAAA ATGGCAGTTT GATAGATCAT TAGGCTTAAC ACATATAGCC
 301 CTGCAAAAGC ACCCAGAGCT CTTCCCAAG TAACTGACAC TGCGGGACTT
 351 TCCAGACTGC TGACACTGCG GGGACTTTCC AGCGTGGGAG GGATAAGGGG
 401 CGGTTCGGGG AGTGGCTAAC CCTCAGATGC TGCATATAAG CAGCTGCTTT
 451 CCGCTTGTA CCGGTCTTAG TTAGAGGACC AGGTCTGAGC CCGGGAGCTC
 501 CCTGGCCTCT AGCTGAACCC GCTGCTTAAC GCTCAATAAA GCTTGCCTTG
 551 AGTGAGAAGC AGTCTGTGCT CATCTGTTCA ACCCTGGTGT CTAGAGATCC
 601 CTCAGATCAC TTAGACTGAA GCAGAAAATC TCTAGCAGTG GCGCCCGAAC
 651 AGGGACGCGA AAGTAAAAGT GGAACCAGGG AAGAAAACCT CCGACGCAAC
 701 GGGCTCGGCT TAGCGGAGTG CACCTGCTAA GAGGCGAAG GAACCTACAA
 751 GAGGGTGAGT AAATTTGCTG GCGGTGGCCA GACCTAGGGG AAGGGCGAAG
 801 TCCCTAGGGG AGGAAGATGG GTGCGAGAGC GTCTGTGTTG ACAGGGAGTA
 851 AATTGGATGC ATGGGAACGA ATTAGTTAA GGCCAGGATC TAAAAAGGCA
 901 TATAGGCTAA AACATTTAGT ATGGGCAAGC AGGGAGCTGG AAAGATACGC
 951 ATGTAATCCT GGTCTATTAG AACTGCACA AGGTACTGAG CAACTGCTAC
 1001 AGCAGTTAGA GCCAGCTCTC AAGACAGGGT CAGAGGACCT GAAATCTCTC
 1051 TGGAACGCAA TAGCAGTACT CTGGTGCCTT CACAACAGAT TTGACATCCG
 1101 AGATACACAG CAGGCAATAC AAAAGTTAAA GGAAGTAATG GCAAGCAGGA
 1151 AGTCTGCAGA GGCCGCTAAG GAAGAAACAA GCCCTAGGCA GACAAGTCAA
 1201 AATTACCCTA TAGTAACAAA TGCACAGGGA CAAATGGTAC ATCAAGCCAT
 1251 CTCCCCCAGG ACTTTAAATG CATGGGTAAA GGCAGTAGAA GAGAAGGCCT
 1301 TTAACCCGTA AATTATTCCT ATGTTTATGG CATTATCAGA AGGGGCTGTC
 1351 CCCTATGATA TCAATACCAT GCTGAATGCC ATAGGGGGAC ACCAAGGGGC

【0067】

【表9】

第7表 ²⁹
(続き)

1401 TTTACAAGTG TTGAAGGAAG TAATCAATGA GGAAGCAGCA GAATGGGATA
 1451 GAACTCATCC ACCAGCAATG GGGCCGTTAC CACCAGGGCA GATAAGGGAA
 1501 CCAACAGGAA GTGACATTGC TGGAACTACT AGCACACAGC AAGAGCAAAT
 1551 TATATGGACT ACTAGAGGGG CTAACCTCTAT CCCAGTAGGA GACATCTATA
 1601 GAAAATGGAT AGTGCTAGGA CTAACAACAAA TGGTAAAAAT GTACAGTCCA
 1651 GTGAGCATCT TAGATATTAG GCAGGGACCA AAAGAACCAT TCAGAGATTA
 1701 TGTAGATCGG TTTTACAAAA CATTAAGAGC TGAGCAAGCT ACTCAAGAAG
 1751 TAAAGAATTG GATGACAGAA ACCTTGCTTG TTCAGAATTC AAACCCAGAT
 1801 TGTAAACAAA TTCTGAAAGC ATTAGGACCA GAAGCTACTT TAGAAGAAAT
 1851 GATGGTAGCC TGTCAAGGAG TAGGAGGGCC AACTCACAAG GCAAAAATAC
 1901 TAGCAGAAGC AATGGCTTCT GCCCAGCAAG ATTTAAAAGG AGGATACACA
 1951 GCAGTATTCA TGCAAAGAGG GCAGAATCCA AATAGAAAAG GSCCCATAAA
 2001 ATGCTTCAAT TGTGAAAAG AGGGACATAT AGCAAAAAAC TGTGAGCAC
 2051 CTAGAAAAAG GGGTTGCTGG AAATGTGGAC AGGAAGGTCA CCAATGAAA
 2101 GATTGCAAAA ATGGAAGACA GGCAAATTTT TTAGGGAAGT ACTGGCCTCC
 2151 GGGGGGCACG AGGCCAGGCA ATTATGTGCA GAAACAAGTG TCCCCATCAG
 2201 CCCCACCAAT GGAGCAGGCA GTGAAGGAAC AAGAGAAATCA GAGTCAGAAG
 2251 GGGGATCAGG AAGAGCTGTA CCCATTGCCC TCCCTCAAAAT CCCTCTTTGG
 2301 GACAGACCAA TAGTCACAGC AAAGGTGGG GGTCTCTAT GTGAGGCTTT
 2351 ACTGGATACA GGGGCAGATG ATACAGTATT AAATAACATA CAATTAGAAG
 2401 GAAGATGGAC ACCAAAAATG ATAGGGGGTA TAGGAGGCTT TATAAAAGTA
 2451 AAAGACTATA ACAATGTGAC AGTAGAAGTA CAAGGAAAGG AAGTACAGGG
 2501 AACAGTATTG GTGGGACCTA CTCCTGTAA TATTCTTGGG AGAAACATAT
 2551 TGACAGGATF AGGATGTACA CTAAATTTCC CTATAAGTCC CATAGCCCCA
 2601 GTGCCAGTAA AGCTAAAACC AGGAATGGAT GGACCAAAAG TAAAACAATG
 2651 GCCCTATCT AGAGAGAAAA TAGAAGCACT AACTGCAATA TGTCAAGAAA
 2701 TGGAACAGGA AGGAAAAATC TCAAGAATAG GACCTGAAA TCCTTATAAT
 2751 ACACCTATTT TTGCTATAAA AAAGAAAGAT AGCACTAAGT GGAGAAAATT

【0068】

【表10】

32
第7表 (続き)

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

【0069】

【表11】

第7表 (続き)³⁴

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

【0070】

【表12】

第7表 (続³⁶き)

5601 CTGGA³⁶AAATC AGGGACCAGC TAGGGAGCCA TTCAATGAAT GGACACTAGA
5651 GCTCCTGGAA GAGCTGAAAG AAGAAGCAGT AAGACATTC CCTAGGCCCT
5701 GGTTACAAGC CTGTGGGCAG TACATTTATG AACTTATGG AGACACTTGG
5751 GAAGGAGTTA TGGCAATTAT AAGAATCTTA CAACAAC³⁶TAC TGTTTACCCA
5801 TTATAGAATT GGATGCCAAC ATAGTAGAAT AGGAATTCTC CCATCTAACA
5851 CAAGAGGAAG AGGAAGAAGA AATGGATCCA GTAGATCCTG AGATGCCCCC
5901 TTGGCATCAC CCTGGGAGCA AGCCCCAAAC CCCTTGTAAT AATTGCTATT
5951 GCAAAGATG CTGCTATCAT TGCTATGTTT GTTTCACAAA GAAGGGTTTG
6001 GGAATCTCCC ATGGCAGGAA GAAGCGAAGA AGACCAGCAG CTGCTGCAAG
6051 CTATCCAGAT AATAAAGATC CTGTACCAGA GCAGTAAGTA ACGCTGATGC
6101 ATCAAGAGAA CCTGCTAGCC TTAATAGCTT TAAGTGCTTT GTGTCTTATA
6151 AATGTACTTA TATGGTTGTT TAACCTTAGA ATTTATTTAG TGCAAAGAAA
6201 ACAAGATAGA AGGGAGCAGG AAATACTTGA AAGATTAAGG AGAATAAAGG
6251 AAATCAGGGA TGACAGTGAC TATGAAAGTA ATGAAGAAGA ACAACAGGAA
6301 GTCATGGAGC TTATACATAG CCATGGCTTT GCTAATCCCA TGTTTGAGTT
6351 ATAGTAAACA ATTGTATGCC ACAGTTTATT CTGGGGTACC TGTA³⁶TGGGAA
6401 GAGGCAGCAC CAGTACTATT CTGTGCTTCA GATGCTAACC TAACAAGCAC
6451 TGAACAGCAT AATATTTGGG CATCACAAGC CTGCGTTCCT ACAGATCCCA
6501 ATCCACATGA ATTTCCACIA GGCAATGTGA CAGATAACTT TGATATATGG
6551 AAAAATTACA TGGTGGACCA AATGCATGAA GACATCATTG GTTTGTGGGA
6601 ACAGAGTTTA AAGCCTTGTG AGAAAAAGAC TTTCTTATGT GTACAAATGA
6651 ACTGTGTAGA TCTGCAAACA AATAAAACAG GCCTATTA³⁶AA TGAGACAATA
6701 AATGAGATGA GAAATTGTAG TTTAATGTA ACTACAGTCC TCACAGACAA
6751 AAAGGAGCAA AAACAGGCTC TATTCTATGT ATCAGATCTG AGTAAGGTTA
6801 ATGACTCAA TGCAAGTAAAT GGAACAACAT ATATGTAAAC TAATTGTAAC
6851 TCCACAATTA TCAAGCAGGC CTGTCCGAAG GTAAGTTTTG AGCCCATTC
6901 CATACTAT TGTGCTCCAA CAGGATATGC CATCTTAAAG TGTAAATGACA
6951 CAGACTTTAA TGGAACAGGC CTATGCCACA ATATTTAGT GGTACTTGT

【0071】

【表13】

38
第7表 (続き)

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

【0072】

【表14】

第7表 (続き)

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

【0073】実施例10

MvP5180/91の全配列の他のHIV1単離物からの区別

以下の配列比較の基礎は、遺伝子バンク・リリース75(1993年2月)、EMBL33(1992年12月)およびSwissprot 24(1993年1月)といったデータバンクであった。相同性比較はGCGソフトウェア(バージョン7.2、1992年10月、Genetics-Computer Group、ウイスコンシン)を用いて行われた。

【0074】まずアミノ酸レベルでGAG、POLおよびENVの配列をプログラム“Wordsearch”を用いてデータバンクと比較した。50の最良の相同性をプログラ

ム“Pileup”を用いて各々相互比較した。その結果、MvP5180/91がHIV1系統に属するが極めて早い時期に、それどころか更にチンパンジーウイルスSIVcpzより前に分岐し、HIV1の新しい亜科(サブファミリー)を代表していることが明らかになる。相同性の数値を得るためにプログラム“Gap”を用いてMvP5180を各々最も適切なHIV1、HIV2およびSIV配列そして更にSIVcpz配列と比較した。

【0075】

【表15】

第 8 表

MvP5180/91単離物のGAG、POLおよびENVのアミノ酸配列の相同性値

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

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

【0076】上側の数値は両配列の同一性を、下側は類似性を示す。更に、そのデータバンクを“Wordsearch”および“Gap”を用いてヌクレオチドレベルで徹底的に調べた。各々最良の“符合(matches)”についての相

*同性値を第9表にまとめる。
【0077】
【表16】

第 9 表

MvP5180/91のヌクレオチド配列の相同性値

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

【0078】実施例11

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

ウイルス増幅の過程で生じる自然突然変異を明示するためにウイルスゲノムの一部をPCR法によりクローニングしそしてそのように得られたDNA配列を第7表による配列と比較した。gag配列をMvP5180ゲノムの左端のLTR(“ロング・ターミナル・リピート”、LTR1プライマー)からpol(ポリメラーゼ遺伝子、pol 13.5;プライマー)まで内部をオーバーラップさせ

LTR1: 5 -CTA GCA GTG GCG CCC GAA CAG
G -3
gag3.5: 5 -AAT GAG GAA GCU GCA GAU TG
G GA -3 (U=A/T)
gag3.5i: 5 -TCC CAU TCT GCU GCT TCC T
CA TT -3 (U=A/T)
gag5: 5 -CCA AGG GGA AGT GAC ATA GCA

【0080】PCR法により得られたDNA配列を第7表に示されたDNA配列と比較した。両配列の比較を図5~7に示す。この際、同じウイルスを問題としているのにヌクレオチドが約2%相互に違っていたことが確認された。図5~7において各々上列は第7表に示されているDNA配列を表わし、そして下列はPCR法で得られたDNA配列を表わしている。更に、PCR法により調査されたタンパク質gagのアミノ酸配列を第7表から導かれる相当するタンパク質のアミノ酸配列と対比した。その際約2.2%のアミノ酸相違が認められ

*ながらクローン化した。クローニング手法は図4に概略図で示されている。それらPCR反応は、HIV-1コンセンサス配列から導かれた配列を有する下記のDNAプライマーを用いて行われた。配列決定はジデオキシ連鎖中断法を用いて行われた。MvP5180gag遺伝子をコードする配列は、ヌクレオチド817(ATG開始コドンのA)からヌクレオチド2300(最後のコドンのA)まで延びる。

【0079】

た。その比較を図8に示すが、図において下列は各々PCR法により得られた配列から導かれたアミノ酸配列を表わす。

【0081】実施例12

本発明によるウイルスMvP5180の配列をHIV1と、そして知られている限りANT-70(WO89/12094)の配列と比較した。その際に次の結果が得られた:

【表17】

第10表^{4a}

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

【0082】前記の表において、“HIV-1”はHIV-1ウイルスのコンセンサス配列を意味し；“HIV-2”はHIV-2ウイルスのコンセンサス配列を意味し；ANT-70はWO89/12094より知られたHIV-3と表示されるウイルスの部分配列を意味する。

【0083】従って本発明の主題は、遺伝子座 (Genor^{*})

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

【0084】

【表18】

第11表

最大相違率として表わされた遺伝子座に関する相同性

遺伝子座	相違	好ましい相違	特に好ましい相違
LTR	17%	15%	10%
GAG	29%	28%	14%
POL	25%	24%	12%
VIF	31%	30%	15%
ENV	46%	45%	22%
NEF	16%	12%	10%

【0085】第11表に記載の%単位の相同性値は、第7表による配列を別のウイルスの配列と比較した場合に高々前述の%値に相当する配列割合だけ異なってもよいことを意味している。

【0086】実施例13

V3-ループ/V3-シュラウフェ (Schlaufe)

このシュラウフェはHIVにおける主に中和性の領域であり、そしてその領域の免疫特異性を示したものが図9に要約してある。これはPeter Nara (1990)の研究によるエイズからのコピーである。次にV3-シュラウフェをアミノ酸レベルで記述し、そしてHIV-1ウイルス (現在のLAI) および最初のHIV-2単離物 (ROD) と比較した。シスチン架橋の個々のアミノ酸は保存され

ている。HIV-1のクローンはGPGRまたはGPGQであり、そしてHIV-2のクローンはGHVFであるのに対し、MVP5180/91のクローンはアミノ酸GPMRから形成されている。メチオニンをういたモチーフはこれまで報告されてなく、MVP5180/91の個性を強めている。

【0087】ウイルスの核酸配列を調べた後、そのV3-ループ領域を適切なプライマーを用いたPCR法により増幅した。その際に、突然変異、特にメチオニンコドン (ATG) からロイシンコドン (CTG) への変化をみることができた。

【0088】次いでクローン化された核酸から導かれたアミノ酸配列とPCR法を用いた増幅により得られた配

列とを比較した：

MvP5180(クローン化)：CIREGIAEVQ
DIYTGP MRWRSMTLKR SNNTSPRSR
VAYC

【0089】MvP5180(PCR法)：CIREG
IAEVQDLHTGPLRWRSMTLKKSSNS
HTQPRSKVAYC

【0090】実施例14

本発明によるウイルスMvP5180またはそれにより
導かれる抗原を用いれば、通常のHIV-1+2スクリーニング*10

*ーニングテストを用いたのでは把握できないような血清
もHIV-1として陽性に検出できることを示すため
に、カメルーンからの患者の様々な血清を検査した。

【0091】カメルーンでの研究において156の抗-
HIV-1-陽性血清が検査された。二つのこれらの血
清において、相当な、診断上重要な相違が認められた。
次の第12表に吸光度測定値を記す。CAM-Aまたは
CAM-Bは異なる患者の血清を表わしている。

【0092】

【表19】

第12表

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

【0093】両テストのカットオフ値は0.300であ
った。カメルーンからの47の抗-HIV-1陽性血清
を用いたもう一つの研究において二つの血清が特に目立
った。そのうちの一つ(93-1000)はわずかに症
候を示す患者、もう一つ(93-1001)はエイズ病²⁰

患者に由来する。次の第13表において、両EIAテス
トの吸光度値を相互に比較する：

【0094】

【表20】

第13表

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

【0095】この場合にもカットオフ値は0.3であ
った。患者93-1001の吸光度値は、通常のHIV-
1+HIV-2 EIAでは失敗し得るのに対し本発明
による抗原を適用することにより明瞭な検出が可能であ
ることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】HIV型レトロウイルスのゲノム配置概略図。

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

【図3】MVP-5180およびMVP-899ウイル
スのウェスタンブロット図。

【図4】HIV5180の遺伝子のPCR増幅、クロー 40

ニングおよび配列決定の手法図。

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

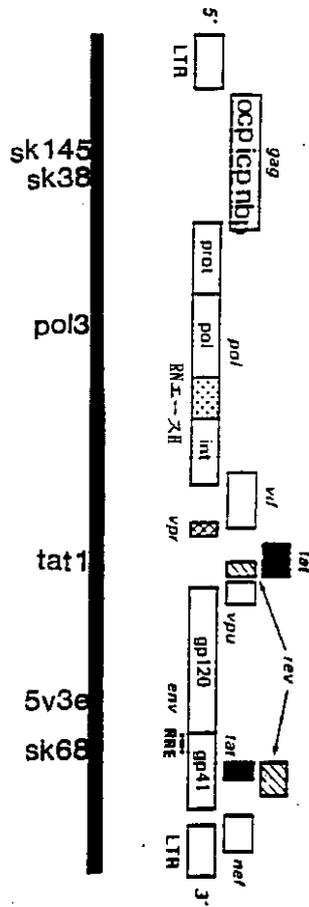
【図6】PCR法により得られたMVP-5180のD
NA配列と第7表に示されたDNA配列の図5に続く比
較図。

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

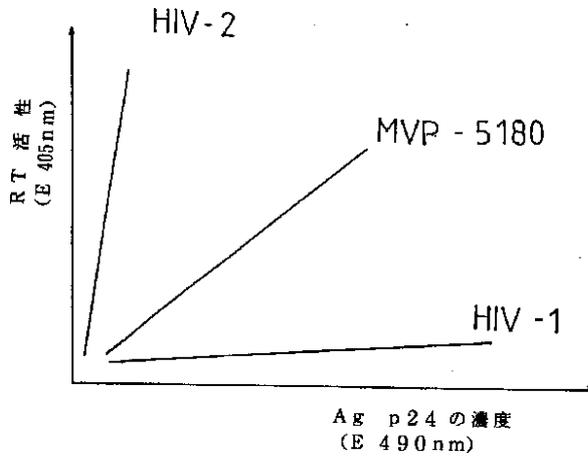
【図8】gagタンパク質の比較図(一つは第7表に従
って(各々上列)、一つはPCR法で(各々下列)確
認)。

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

【図1】



【図2】



【図5】

上列は表7に相当し、下列はPCR法で確認

MVP5180

```

685 AAACCTCCGACGCAACGGCTCGGCTTAGCGGAGTGCACCTGTAAAGAGG 734
1 aaacctccaacgcaacgggctcggttagcggagtgacactgctaagagg 50

735 CGAGAGGAATCACAAGAGGOTGAGTAAATTTGCTGGCGGTGGCCAGACC 784
51 cgagaggaactcacaagagggtgagtaaatctgctggcggtggccagacc 160

785 TAGGGGAAGGCGAAGTCCCTAGGGGAGGAAGATGGGTGCGAGAGCSTCT 834
101 taggggaaggcgaaagtccttaggggaggaagatgggtgogagacggtct 150

835 GTTTGACAGGGAGTAAATTTGGATGCATGGGAACCAATTAGGTTAAGGCC 884
151 gtttgacagggagtaaatggatgcatgggaacgaattaggttaagggc 260

885 AGGATCTAAAAGGCATATAGGCTAAAACATTTAGTATGGGCAAGCAGGG 934
201 aggatctaaaaggcatataggctaaaacatttagtatgggcaagcaggy 250

935 AGCTGGAAAGATACGCATGTAATCCTGGTCTATTAGAAACTGCAGAAGGT 984
251 agctggaaagatacgcataatactggtctactagaaactgcagaaggt 300

985 ACTGAGCAACTGCTACAGCAGTTAGAGCCAGCTCTCAAGACAGGGTCAGA 1034
301 actgacaactgctacagcagttagagccagctctcaagacagggtcaga 350

1035 GGACCTGAAATCTCTCTGGAACGCAATAGCAGTACTCTGGTCCGTTTACA 1084
351 ggacctgaaatcctctctggaaacgcaatagcagtactctgggtccgttcaca 400

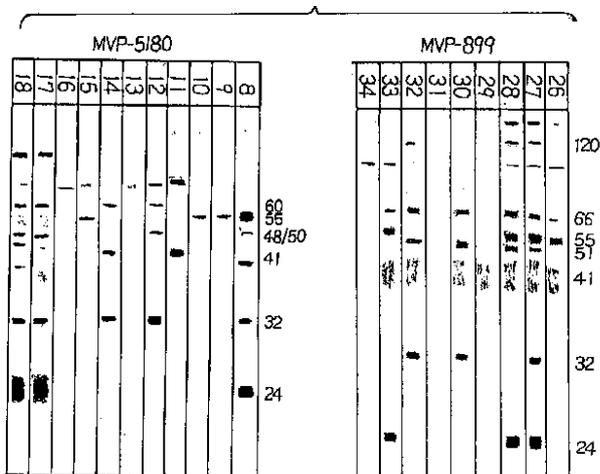
1085 ACAGATTTGACATCCGAGATACACAGCAGGCAATACAAAAGTTAAAGGAA 1134
401 acagatttgacatccgagatcacacagcaggcaatacaaaagttaaaggaa 450

1135 GTAATGGCAAGCAGGAAGTCTGCAGAGGCCCTAAGGAAGAAACAAGCCC 1184
451 gtaatggcaagcaggaagtctgcagagggccctaaggaagaaacaagccc 500

1185 TAGGCAGACAAGTCAAATTACCCTATAGTAACAAATGCACAGGGACAAA 1234
501 taggcagacaagtcaaataccctatagtaacaaatgcacagggacaaa 550

```

【図3】



【図4】

PCR増幅、クローニングおよび配列決定手法



【図6】

```

1235 TGGTACATCAAGCCATCTCCCCAGGACTTTAAATGCATGGGTAAAGCA 1284
551 ttgtacatcaagccatctccccaggactttaaatgcattgggtaaagca 600

1285 GTAGAAGAGAAAGCCCTTAAACCTGAAATATTCTCTATGTTTATGGCATT 1334
601 gtagaagaaagcccttaaacctgaaattattctctatgtttatggcatt 650

1335 ATCAGAAGGGGCTGTCCCCATGATATCAATACCATGCTGAAATGCCATAG 1384
651 atcagaaggggctgtccccatgatatacaataccatgctgaaatgccatag 700

1385 GGGGACACCAAGGGGCTTACAAGTGTGAAGGAAGTAATCAATGAGGAA 1434
701 ggggacaccaaggggcttacaagtgtgaaggaagtaatacaatgaggaa 750

1435 GCAGCAGAAATGGGATAGAATCATCCACCAGCAATGGGGCCGTACCAAC 1484
751 gcagcagaatgggatagaactcatccaccagcaatggggccgttaccaac 800

1485 AGGGCAGATAAGGAACCAACAGGAAGTACATTCCTGGAACAACCTAGCA 1534
801 agggcagataaggaaccaacaggaagtacattcctggaacaacctagca 850

1535 CACAGCAAGAGCAAAATATATGGACTACTAGAGGGCTAACTCTATCCCA 1584
851 cacagcaagagcaaaatataatggactactagagggctaaactctatccca 900

1585 GTAGGAGACATCTATAGAAAATGGATAGTGCCTAGGACTAAACAAAATGGT 1634
901 gtaggagacatctatagaaaatggatagtgcttaggactaaacaaaatgg 950

1635 AAAAATGTACAGTCCAGTGCATCTTAGATATTAGGCAGGGACCAAAAG 1684
951 aaaaatgtacagtccagtgcattcttagatattaggcagggaccaaag 1000

1685 AACCATTCAGAGATTATGTAGATCGGTTTACAAAACATTAAGAGCTGAG 1734
1001 aaccattcagagattatgtagatcggttttacaaaacatttagagctgag 1050

1735 CAAGTACTCAAGAAGTAAAGAAATGGATGACAGAAACCTTGCTTGTCCA 1784
1051 caagtactcaagaagttaaagaaatggatgacagaaaccttgcttgtcca 1100

1785 GAATTCAAACCCAGATTGTAAACAAATCTGAAAGCATTAGSACCAGAAG 1834
1101 gaattcaaaccagattgtaaacaaatctgaaagcatttagaccagaag 1150

```

【図7】

```

1835 CTACTTTAGAAGAAATGATGGTAGCCTGTCAAGGATAGGAGGGCCAACT 1884
1151 ctactttagaagaaatgatggtagcctgtcaaggataggagggccaact 1200

1885 CACAAGGCCAAAATACTAGCAGAAGCAATGGCTTCTGCCAGCAAGATT 1934
1201 cacaaggccaaaaatactagcagaagcaatggcttctgccagcaagatt 1250

1935 AAAAGGAGGATACACAGCAGTATTTCATGAAAAGAGGGCAGAAATCCAAATA 1984
1251 aaagggaggatcacacagcagtatttcattgaaaagagggcagaatccaaata 1300

1985 GAAAAAGGGCCATAAAATGCTTCAATTTGGAAAAGAGGGACATATAGCA 2034
1301 gaaaaagggccataaaatgcttcaatttggaaaagagggacatatagca 1350

2035 AAAAATCTGCAGCACCTGACAAAAGGGGTTGCTGGAAATGTGGCAGGA 2084
1351 aaaaatctgcagcacctgacaaaaggggctgctggaaatgtggcagga 1400

2085 AGGTCACCAAATGAAAGATGCAAAAATGGAAGCAGGCAAAATTTTGTAG 2134
1401 aggtcaccaaatgaaagatgcaaaaatggaagcagggcaaaatTTTTGTAG 1450

2135 GGAAGTACTGGCCTCCGGGGGGCACAGGGCCAGGCAATATATGTGCAGAAA 2184
1451 ggaagtactggcctccggggggcacagggccaggcaatATATGTGCAGAAA 1500

2185 CAAGTGTCCCCTCAGCCCCACCAATGGAGGAGGCGATGAAAGGAACAAGA 2234
1501 caagtgtcccctcagccccaccaatggagggagggcgatgaaaggaacaaga 1550

2235 GAATCAGAGTCAGAAGGGGATCAGGAAGAGCTGTACCCATTGGCTCCC 2284
1551 gaatcagagtcagaaggggatcaggaagagctgtacccattggctccc 1600

2285 TCNAATCCCCTCTTGGGACAGACCAATAGTCACAGCAAAAGTTGGGGGTC 2334
1601 tcnaatcccctcttgggacagaccaatagtcacagcaaaagttggggggtc 1650

2335 ATCTAETGTAGGCTTACTGGATACAGGGGCAGATGATACAGTATTAAT 2384
1651 atctaetgtaggcttactggatacaggggcagatgatacagtatTAAT 1700

2385 AACATACAATTAGAAGGAAGATGGACACCAAAA 2417
1701 aacatacaattagaaggaagatggacaccaaaa 1733

```

【図8】

```

MVP5180  MGARASVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELERAYACNPGL
PCR      MGARRSVLTGSKLDAWERIRLRPGSKKAYRLKHLVWASRELERAYANPGL

LETAEGTEQLLQOLEPALKTGSEDLKSLWNAIAVLWCVHNRFDIRDTQQA
LETAEGTEQLLQOLEPALKTGSEDLKSLWNAIAVLWCVHNRFDIRDTQQA

IQKLEVMASRKSAEAAKEETSPTQSONYPIVTNAQGMVHQAI SPRTL
IQKLEVMASRKSAEAAKEETSSTQASQNYPIVTNAQGMVHQAI SPRTL

NAWVKAVEEKA FNPEIIPMFALSEGAVPYDINTMLNAIGGHQALQVLK
NAWVKAVEEKA FNPEIIPMFALSEGAVPYDINTMLNAIGGHQALQVLK

EVINEEAAEWDRTHPPAMGFLPPGQIREPTGSDIAGTSTQQEQIITWTR
EVINEEAAEWDRTHPPAMGFLPPGQIREPTGSDIAGTSTQQEQIITWTR

GANSIPVGD IYRKWIVLGLNKMVKMYS PVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFY
GANSIPVGD IYRKWIVLGLNKMVKMYS PVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFY

KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCQILKALGPATLEEMMVACQ
KTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNSNPDCQILKALGPATLEEMMVACQ

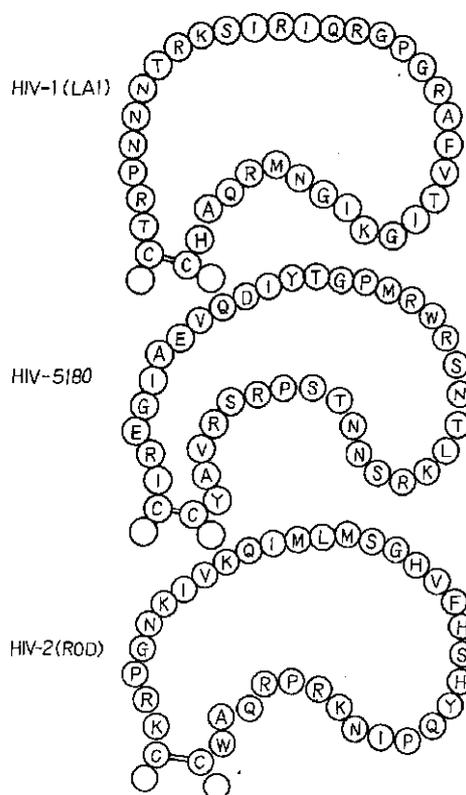
GVGGPTHKAKILAEAMASAQQDLKGGYTA VMQRGQNPNRKGP I KCFNCG
GVGGPTHKAKILAEAMASAQQDLKGGYTA VMQRGQNPNRKGP I KCFNCG

KEGHIAKNCRAPRRKRCWKCCGQEGHQMKDCKNGRQANFLGKYWPPGGTRP
KEGHIAKNCRAPRRRKYWKCCGQEGHQMKDCKNGRQANFLGKYWPPGGTRP

GNVYQKQVSPSAPFMEEAVKEQENQSQKGDQEEELYPFASLKSLFGTDQ
ANVYQKQVSPSAPFMEEAVKEQENQSQKGDQEEELYPFASLKSLFGTDQ

```

【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-コード ⁸ (参考)
// A 6 1 K 39/21		A 6 1 K 39/21	
A 6 1 P 31/18		A 6 1 P 31/18	
(31)優先権主張番号	P 4 3 1 8 1 8 6 : 4	(72)発明者	アルブレヒト・ファウ・ブルン
(32)優先日	平成5年6月1日(1993.6.1)		ドイツ連邦共和国86154アウクスブルク・
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		シューマンシユトラ-セ17
(72)発明者	ヨーゼフ・エーベルレ	(72)発明者	シユテファン・クナブ
	ドイツ連邦共和国85356フライジング・ゾ		ドイツ連邦共和国35041マルブルク・ヴェ
	ネンシユトラ-セ7ツエ-		ールスハウゼン・ヴェールスホイザーシユ
		(72)発明者	トラ-セ6
			ハンス・ペーター・ハウザー
			ドイツ連邦共和国35037マルブルク・ヴァ
			ンコプシユトラ-セ12

专利名称(译)	CDNA与HIV组免疫缺陷病毒的RNA互补		
公开(公告)号	JP2000312592A	公开(公告)日	2000-11-14
申请号	JP2000045662	申请日	2000-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	日德白令maru堡ゲゼルシヤフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡, Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ルーツゲーギユルトラー ヨーゼフエーベルレ アルブレヒトフアウブルン シユテフアンクナプ ハンスペーターハウザー		
发明人	ルーツ・ゲー・ギユルトラー ヨーゼフ・エーベルレ アルブレヒト・フアウ・ブルン シユテフアン・クナプ ハンス・ペーター・ハウザー		
IPC分类号	A61K39/21 A61K39/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/00 C07K14/155 C07K14/16 C12N5/02 C12N7/00 C12N7/01 C12N15/09 C12N15/48 C12P21/02 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/56988 A61K39/00 C07K14/005 C12N2740/16021 C12N2740/16022 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12Q1/703		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/155 C12N7/00 C12Q1/68.A G01N33/569.H A61K39/21 A61P31/18 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR84 4B063/QS05 4B063/QS15 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4C085/AA02 4C085/AA06 4C085/AA08 4C085/BA69 4C085/BB23 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	P4233646:5 1992-10-06 DE P4235718:7 1992-10-22 DE P4244541:8 1992-12-30 DE P4318186:4 1993-06-01 DE		
其他公开文献	JP4113318B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种可用于检测源自HIV组的逆转录病毒的cDNA。 解决方案：存入欧洲动物细胞培养物保藏中心 (ECACC) , 编号为V 920 92 318的名称为MVP-5180 / 91的逆转录病毒的基本形态学和免疫学性质。 与所示HIV组免疫缺陷病毒RNA或该病毒的突变体或其一部分互补的cDNA。

【図2】

