

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-511411

(P2016-511411A)

(43) 公表日 平成28年4月14日 (2016.4.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 H	4 B O 3 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
CO 7 K 7/08 (2006.01)	CO 7 K 7/08 Z N A	
CO 7 K 14/00 (2006.01)	CO 7 K 14/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-562242 (P2015-562242)	(71) 出願人	507180423
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		バイオマイ アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月16日 (2015.11.16)		オーストリア, ヴィエンナ アー ー 1 0 9
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055194		O, トップ 1, ラツァレットガッセ 1
(87) 国際公開番号	W02014/140332		9
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)	(74) 代理人	110000338
(31) 優先権主張番号	13159417.8		特許業務法人HARAKENZO WOR
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		LD PATENT & TRADEMA
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		R K
		(72) 発明者	ヴァレンタ, ルードルフ
			オーストリア, セレシーンフェルド アー
			- 2 6 0 4, ベートーヴェンストラッセ
			1 8
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ウイルス感染を診断する方法

(57) 【要約】

本発明は、対象のサンプル中のヒト免疫不全ウイルス (H I V) 特異的抗体を検出および／または定量する方法であって、前記サンプル中の、a) アミノ酸配列AIVCTRPNNNTRKS IRIGPGQVFYT (配列番号1) からなるペプチド、またはb) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、またはc) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片と結合している抗体の存在および／または量を決定する工程を含んでいる、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

前記サンプル中の、

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

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

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

10

【請求項 2】

対象におけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染を診断する方法であって、前記対象のサンプル中の、

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

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

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

【請求項 3】

対象におけるヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染の経過および進行をモニターする方法であって、

20

前記対象のサンプル中の、

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

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

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

【請求項 4】

抗 H I V 薬を用いた対象に対する処置の効果をモニターする方法であって、

(i) 前記抗 H I V 薬の投与前の対象のサンプル中の

30

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

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

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

(i i) 前記対象の 1 個以上の投与後サンプルにおける前記対象のサンプル中の、

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

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

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

40

(i i i) 前記抗 H I V 薬の投与前の対象のサンプルにおける決定された抗体の量を、1 個以上の投与後サンプルにおける前記決定された抗体の量と比較する工程、および

(i v) 前記抗 H I V 薬が前記対象において H I V 特異的抗体のレベルおよび／またはアイソタイプに影響を与えるかどうかを決定する工程を含んでいる、方法。

【請求項 5】

前記対象のサンプル中の、

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

50

b) a) のペプチドと少なくとも 70 % の同一性を有するホモログ、または
c) 15～24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
と結合している抗体の存在および／または量がさらに決定される、請求項 1～4 のいずれ
か 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

個体のサンプル中の、

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

b) a) のペプチドと少なくとも 70 % の同一性を有するホモログ、または
c) 15～24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
と結合している抗体の存在および／または量がさらに決定される、請求項 1～5 のいずれ
か 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記個体のサンプル中の、

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

b) a) のペプチドと少なくとも 70 % の同一性を有するホモログ、または
c) 15～24 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
と結合している抗体の存在および／または量がさらに決定される、請求項 1～6 のいずれ
か 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記個体のサンプル中の、

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

b) a) のペプチドと少なくとも 70 % の同一性を有するホモログ、または
c) 15～32 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
と結合している抗体の存在および／または量がさらに決定される、請求項 1～7 のいずれ
か 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記個体のサンプル中の、H I V カプシドタンパク質 p 24 に結合している抗体の存在
および／または量がさらに決定される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記個体のサンプル中の、H I V インテグラーゼ、H I V 逆転写酵素 + R N A s e H
、H I V プロテアーゼおよび H I V マトリクスタンパク質 p 17 からなる群から選択され
る少なくとも 1 つのポリペプチドと結合している抗体の存在および／または量がさらに決
定される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

サンプル中のペプチドまたはポリペプチドと結合している抗体の存在および／または量
は、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、ラジオイノムアッセイ (R I A)、ウェス
タンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、ペプチドチップおよびポリペプチドチ
ップからなる群から選択される方法を使用して決定される、請求項 1～10 のいずれか 1
項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記対象の前記サンプルは血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、唾液、涙液、
尿、鼻分泌物、生殖器分泌物、糞便、および／または母乳からなる群から選択されるサン
プルである、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

決定および／または定量される前記抗体は、I g G、I g G 1、I g G 2、I g G 3、
I g G 4、I g A および I g M からなる群から選択され、特に好ましくは I g G である、
請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 14】

AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号1)、LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号2)、RVRGILRNWPQWWIWGILGFWMIII (配列番号6)、WMIICRGEENSWVTVYYGVPVWTE (配列番号7)、PVWTEAKTTLFCASDAKAYEKEVHN (配列番号8)、KEVHNVWATHACVPTDPSQELVLE (配列番号9)、ELVL ENVTESFNMWENDMVDQMHD (配列番号10)、QMHEDIIGLWDESLKPCVKLTPLCV (配列番号11)、TPLC VTLNCNTTSHNNSPSPMTNC (配列番号12)、PMTNCSFNATTELRLDKTQKVNALFY (配列番号13)、NALF YRSDIVPLEKNSSEYILINC (配列番号3)、LINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHY (配列番号14)、IPIHY CAPAGYAILKCNKTFNGTG (配列番号15)、FNGTGPCSNVSTVQCTHGIKPVVST (配列番号16)、PVVST QLLNGSLAEGEIIRSEN (配列番号17)、RSENLTDNAKTIIIVHLNKSVAIVCT (配列番号18)、QVFYT NEIIGNIRQAHCNISRELWN (配列番号19)、RELWNNTLEQVKKLKEHFQNKIE (配列番号20)、NKTIE 10 FQPPAGDLEVTTHSFNCRG (配列番号21)、FNCRGEFFYCNTSNLFNITASNASD (配列番号22)、SNASD ANNNTITLPCIKQIINMWQ (配列番号23)、INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCNSS (配列番号24)、TCNSS ITGLLLTRDGGNNNDTGNN (配列番号25)、TGNNNDTEIFRPGGGMKDNWRSEL (配列番号26)、AVGLG AVLLGFLGTAGSTMGAASIT (配列番号27)、AASITLTVQARQLLSGIVQQSNLL (配列番号28)、QSNLL RAIEAQHMLQLTVWGIKQL (配列番号29)、GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLGLW (配列番号4)、SSWSNK SQDYIWGNMTWMQWDREIN (配列番号30)、DREINNYTDIIYTLLEESQSQQEKN (配列番号31)、QQEKN KDLLALDSWNNLWNWFSIT (配列番号32)、WFSITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLR (配列番号33)、LIGLRI ILGVLIVKRVRQGYSPLS (配列番号34)、YSPLSFQTLPPNPRGPDRLRGIEEE (配列番号35)、GIEEEG GEQDKDRSIRLVSGFLALV (配列番号36)、FLALVWEDLRSLCLFSYHRLRDFIL (配列番号37)、RDFILI 20 AGRAAELLGRSSLRGLQTG (配列番号38)、GLQTGWQALKYLGSLVQYWGLELKK (配列番号39) および ELKKSAINLFDTTAIVVAEGTDRL (配列番号40) からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、または15～24個のアミノ酸残基からなるその断片、またはアミノ酸配列 WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTAKARRVVEREKR (配列番号5) からなるペプチドもしくは15～32個のアミノ酸残基からなるその断片、または、アミノ酸配列 GTDRLIEGLQGIGRAIYNIPRRIRQGE AALL (配列番号41) からなるペプチドもしくは15～31個のアミノ酸残基からなるその断片。

【請求項 15】

固体担体であって、

前記固体担体上に固定化された、

- a) アミノ酸配列 AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT (配列番号1) からなるペプチド、または 30
 b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または
 c) 15～24個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
 を含んでいる、固体担体。

【請求項 16】

前記固体担体上に、

- a) アミノ酸配列 LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN (配列番号2) からなるペプチド、または
 b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または
 c) 15～24個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片 40
 がさらに固定化されている、請求項15に記載の固体担体。

【請求項 17】

前記固体担体上に、

- a) アミノ酸配列 NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINC (配列番号3) からなるペプチド、または
 b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または
 c) 15～24個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
 がさらに固定化されている、請求項15または16に記載の固体担体。

【請求項 18】

前記固体担体上に、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項15~17のいずれか1項に記載の固体担体。

【請求項19】

前記固体担体上に、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~32個のアミノ酸残基からなる、a) またはb) のペプチドの断片がさらに固定化されている、請求項15~18のいずれか1項に記載の固体担体。

【請求項20】

カプシドタンパク質p24が、前記固体担体上にさらに固定化されている、請求項15~19のいずれか1項に記載の固体担体。

【請求項21】

HIVインテグラーゼ、HIV逆転写酵素+RNase H、HIVプロテアーゼおよびHIVマトリクスタンパク質p17からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドが、前記固体担体上にさらに固定化されている、請求項15~20のいずれか1項に記載の固体担体。

【請求項22】

前記固体担体は、カラム、ビーズ、試験管、マイクロタイターディッシュ、固体粒子、マイクロチップまたはメンブレンの形態である、請求項15~21のいずれか1項に記載の固体担体。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

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

【0002】

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

【0003】

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

【0004】

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

【0005】

Riabina et al. (Mol Gen Mikrobiol Virusol 3(2007):33-36) においては、HIV-1 C型のgp120のV3領域に対応するペプチドが最も高い免疫活性を示したことが見出されている。

【0006】

Cardozo et al. (AIDS Res Human Retrovir 25(2009):441-450) は、ヒト抗V3モノクローナル抗体により認識されるHIV 1型エピトープの世界分布を調査している。

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

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

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15～24個のアミノ酸残基からなる、a) 若しくはb) のペプチド断片、に結合している抗体の存在を決定する工程と、上記サンプル中にそのような抗体の存在を確認したときに、上記対象におけるHIV感染を診断し、または、上記サンプル中にそのような抗体の不在を確認したときに、上記対象におけるHIV非感染を診断する工程と、を含む。

【0011】

HIV C型のエンベロープタンパク質gp120由来のペプチド断片およびそのホモログが、1つ以上、好ましくは2つ以上、好ましくは3つ以上、好ましくは4つ以上、好ましくは5つ以上、好ましくは6つ以上、好ましくは7つ以上、好ましくは8つ以上、の型のHIV感染の診断に使用できるという驚くべきことが見出された。その理由は、これらの型の全てのgp120に対する抗体であって、HIVに感染した対象から得られる抗体が、アミノ酸配列AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT（配列番号1）からなるペプチドまたはそのホモログまたは15～24個のアミノ酸残基からなるその断片と結合するからである。それゆえに、本発明の方法は、HIV A型、B型、C型、D型、F型、G型、H型、J型および／またはK型のHIV感染の診断を可能にし、HIV B型およびC型の診断に最も好ましく用いられる。

【0012】

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

【0013】

本発明の方法は、上述した抗体が対象のサンプル中に確認できない場合に、対象がHIVに感染していないと診断するためにも使用可能である。

【0014】

本発明で用いられる、AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT（配列番号1）および／またはLLGLW

10

20

30

40

50

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

【００１５】

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

【００１６】

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

【００１７】

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

【００１８】

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

【００１９】

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

【００２０】

本明細書において使用する場合、「ペプチドと少なくとも７０％の同一性を有するホモログ」または「ホモログ」は、例えば、AIVCTRPNNTRKSIRIGPGQVFYT（配列番号１）またはLLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号２）のアミノ酸配列からなるペプチドのような、本明細書中で定義したアミノ酸配列（配列番号１から４１のいずれか１つ）からなるペプチドと、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％の同一性、より好ましくは少なくとも８０％の同一性、さらにより好ましくは少なくとも８５％または９０％または９

5 %の同一性を有するペプチドに関する。配列の同一性は、BLOSUM62マトリクス、ギャップ存在ペナルティ11、およびギャップ伸長ペナルティ1を利用したBLASTアライメント (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Altschul SF et al J. Mol. Biol. 215(1990): 403-410) により決定する。

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

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

b) a) のペプチドと少なくとも70 %の同一性を有するホモログ、または

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

【0025】

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

【0026】

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

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

10

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0027】

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

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

20

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

【0028】

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

(i) 抗H I V薬の投与前の対象のサンプルにおいて、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

30

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

(ii) 対象の1回以上の投与後のサンプル中の、対象のサンプルにおいて、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

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

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

40

【0029】

本発明のペプチドを、抗H I V薬（例えば、抗レトロウイルス薬）により治療された対象におけるH I V特異的抗体の存在を決定するために用いてもよい。これにより、抗H I V薬が、対象におけるH I V特異的抗体のレベルおよび／またはアイソタイプに影響するか否かをモニターおよび決定することができる。例えば、工程(i)で決定したH I V特異的抗体の量が、工程(ii)でと比較して（例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも80%）より低い場合、H I Vの負荷量の減少を示し得るため、抗H I V薬は、疾患の経過に正に影響し得る。しかしながら、工程(ii)で決定したH I V特異的抗体の量が、工程(i)と比較して（例えば、少なくとも10%

50

、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも100%)より高い場合、抗HIV薬は疾患の経過になんら影響せず、HIV感染の治療において有用であるとは最も考えにくい。

【0030】

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

【0031】

本発明の好ましい実施形態において、対象のサンプル中の

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

10

b) a)のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0032】

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

20

【0033】

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

30

【0034】

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

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

b) a)のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

c) 15~24個のアミノ酸残基からなる、a)またはb)のペプチド断片

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

40

【0035】

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

50

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0036】

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

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0037】

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

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0038】

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

(i) 抗HIV薬の投与前の対象のサンプルにおいて、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

(ii) 対象の1回以上の投与後のサンプル中の、対象のサンプルにおいて、

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

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

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

【0039】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0040】

10

20

30

40

50

アミノ酸配列NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINCN（配列番号 3）を有するペプチドは、H I V ポリペプチド g p 1 2 0（C 型）由来である。

【0041】

本発明の好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

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

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

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

【0042】

アミノ酸配列GIKQLQARVLAIERYLKDQQLGLW（配列番号 4）を有するペプチドは、H I V ポリペプチド g p 1 2 0（C 型）由来である。

【0043】

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

【0044】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、個体のサンプル中の

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

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

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

【0045】

アミノ酸配列WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR（配列番号 5）を有するペプチドは、H I V ポリペプチド g p 1 2 0（C 型）由来である。

【0046】

このペプチドの断片またはこのペプチドと少なくとも 70% の同一性を有するホモログは、配列番号 5 のアミノ酸残基 1～31、1～30、1～29、1～28、1～27、1～26、1～25、1～24、1～23、1～22、1～21、1～20、1～19、1～18、1～17、1～16、1～15、2～32、2～31、2～30、2～29、2～28、2～27、2～26、2～25、2～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、3～32、3～31、3～30、3～29、3～28、3～27、3～26、3～25、3～24、3～23、3～22、3～21、3～20、3～19、3～18、3～17、4～32、4～31、4～30、4～29、4～28、4～27、4～26、4～25、4～24、4～23、4～22、4～21、4～20、4～19、4～18、5～32、5～31、5～30、5～29、5～28、5～27、5～26、5～25、5～24、5～23、5～22、5～21、5～20、5～19、6～32、6～31、6～30、6～29、6～28、6～27、6～26、6～25、6～24、6～23、6～22、6～21、6～20、7～32、7～31、7～30、7～29、7～28、7～27、7～26、7～25、7～24、7～23、7～22、7～21、8～32、8～31、8～30、8～29、8～28、8～27、8～26、8～25、8～24、8～23、8～22、9～32、9～31、9

～30、9～29、9～28、9～27、9～26、9～25、9～24、9～23、10～32、10～31、10～30、10～29、10～28、10～27、10～26、10～25、10～24、11～32、11～31、11～30、11～29、11～28、11～27、11～26、11～25、12～32、12～31、12～30、12～29、12～28、12～27、12～26、13～32、13～31、13～30、13～29、13～28、13～27、14～32、14～31、14～30、14～29、14～28、15～32、15～31、15～30、15～29、16～32、16～31、16～30、17～32、17～31、2～33、3～33、4～33、5～33、6～33、7～33、8～33、9～33、10～33、11～33、12～33、13～33、14～33、15～33、16～33、17～33、18～33または19～33からなり得る。

10

【0047】

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

20

【0048】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、個体のサンプルにおいてHIVカプシドタンパク質p24と結合している抗体の存在および／または量をさらに決定する。

30

【0049】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、個体のサンプルにおいて、HIVインテグラーゼ、HIV逆転写酵素+RNaseH、HIVプロテアーゼおよびHIVマトリクスタンパク質p17からなる群から選択される少なくとも1つのポリペプチドと結合している抗体の存在および／または量をさらに決定する。

【0050】

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

40

【0051】

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

【0052】

HIV感染が疑われるまたは判明した患者から得たサンプルは、HIVのポリペプチドおよびペプチドの種々のエピトープに対する種々の型の抗体のプールを含む。それゆえに

50

、本発明の好ましい実施形態によれば、決定および／または定量化される抗体は、I g G、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g AおよびI g Mからなる群から選択され、特に好ましくはI g GおよびI g Mである。

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

本発明の他の局面は、AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFYT（配列番号1）、LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN（配列番号2）、RVRGILRNWPQWWIWGILGFWMIII（配列番号6）、WMIIICRGEENSWVTVYYGVPVWTE（配列番号7）、PVWTEAKTTLFCASDAKAYEKEVHN（配列番号8）、KEVHNWVATHACVPTDPSPQELVLE（配列番号9）、ELVLENTESFNMWENDMVDQMHE（配列番号10）、QMHEDIIGLWDESLKPCVKLTPLCV（配列番号11）、TPLCVTLNCNTTSHNNSSPSPMTNC（配列番号12）、PMTNCSFNATTELRLDKTQKVNALFY（配列番号13）、NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINC（配列番号3）、LINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHY（配列番号14）、IPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTG（配列番号15）、FNGTGPCSNVSTVQCTHGIKPVVST（配列番号16）、PVVSTQLLLNGSLAEGEIIIRSEN（配列番号17）、RSENLTDNAKTIIVHLNKSVAIVCT（配列番号18）、QVFYTNEIIGNIRQAHCNISRELWN（配列番号19）、RELWNNTLEQVKKKLKEHFQNKTI（配列番号20）、NKTIEFQPPAGGDLEVTTHSFNCRG（配列番号21）、FNCRGEFFYCNTSNLNFNITASNASD（配列番号22）、SNASDANNNTITLPCIKQIINMWQ（配列番号23）、INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCNSS（配列番号24）、TCNSSITGLLLTRDGGNNNDTGNNN（配列番号25）、TGNNNDTEIFRPGGGNMKDNWRSEL（配列番号26）、AVGLGAVLLGFLGTAGSTMGAASIT（配列番号27）、AASITLTVQARQLLSGIVQQSNLL（配列番号28）、QSNLLRAIEAQHMLQLTVWGKQL（配列番号29）、GIKQLQARVLAIERYLKDDQLLGLW（配列番号4）、SSWSNKSQDYIWGNMTWMQWDREIN（配列番号30）、DREINNYTDIIYTLLEESQSQQEKN（配列番号31）、QQEKNEKDLLALDSWNNLWNWFSIT（配列番号32）、WFSITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLR（配列番号33）、LIGLRIILGVLSIVKRVQGYSPS（配列番号34）、YSPLSFQTLPPNPRGPDRLRGIEEE（配列番号35）、GIEEEGGEQDKDRSIRLVSGFLALV（配列番号36）、FLALVWEDLRSLCLFSYHRLRDFIL（配列番号37）、RDFILIAGRAAELLGRSSLRGLQTG（配列番号38）、GLQTGWQALKYGLSLVQYWGLELKK（配列番号39）およびLELKKSAINLFDTTAIVVAEGTDRL（配列番号40）からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、または15～24個のアミノ酸残基からなるその断片、またはアミノ酸配列WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKR（配列番号5）からなるペプチドもしくは15～32個のアミノ酸残基からなるその断片、または、アミノ酸配列GTDRLIEGLQGIGRAIYNIPRRIRQGFEEALL（配列番号41）からなるペプチドもしくは15～31個のアミノ酸残基からなるその断片に係る。

【0056】

本発明のペプチドは、当該技術分野において公知の化学的合成法を使用して合成的に生産することができる。また、ペプチドは安定性を増すためにポリペプチド担体（例えばスカシガイヘモシアニン）と結合していてもよい。加えて、ペプチドを担体分子と共に組み換え融合タンパク質として合成し、または既知の相互作用により担体分子と結合させてもよい（ピオチン-ストレプトアビジン-アビジン）。

【0057】

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

10

【0058】

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

20

【0059】

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

【0060】

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

30

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

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0061】

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

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

40

b) a) のペプチドと少なくとも70%の同一性を有するホモログ、または

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

【0062】

本発明の選択的な局面は、サンプル中のヒト免疫不全ウイルス（HIV）に結合した抗体の存在もしくは不在および／または量を決定するための、本明細書に開示される1つ以上のペプチドを含んでいる、固体担体に関しており、当該固体担体上に固定化された、

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

50

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

【0063】

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

対象におけるヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染を診断する

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

対象における抗 HIV 薬を用いた処置の効果をモニターする

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

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、

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

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

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

【0068】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、

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

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

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

【0069】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、

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

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

c) 15 ~ 32 個のアミノ酸残基からなる、a) または b) のペプチドの断片
が当該固体担体上にさらに固定化されている。

【0070】

本発明に係る固体担体は、当該固体担体に固定化される、上記で規定されている、1 つ

10

20

30

40

50

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

10

【0071】

本発明に係る固体担体は、H I V に由来するポリペプチドを含んでいてもよい。それゆえ、好ましい実施形態によれば、カプシドタンパク質 p 24 が当該固体担体にさらに固定化される。

【0072】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、H I V インテグラーゼ、H I V 逆転写酵素 + R N A s e H、H I V プロテアーゼおよび H I V マトリクスタンパク質 p 17 からなる群より選択される少なくとも 1 つのポリペプチドが当該固体担体上にさらに固定化される。

20

【0073】

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

【0074】

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

30

【0075】

図 1 は抗体が H I V-1 クレイド C g p 120 および g p 120 由来のペプチドに反応することを示す。(A) アフリカ人 (左) およびヨーロッパ人 (右) の患者の、組み換え g p 120 および 24 個の重複する g p 120 ペプチド (x 軸：ペプチド 1 ~ 24) に対する I g G、I g G サブクラス I g A および I g M の反応の頻度 (y 軸：反応性の血清の数)。(B) 最適な配列アラインメントに必要である、H I V-1 クレイド C 南アフリカ株 (クレイド C __ Z A) および参考株 H X B 2 (クレイド B __ H X B 2) の g p 120 における重複する g p 120 ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレイド C および B 由来の g p 120 におけるギャップ (欠落しているアミノ酸の数を表示) を示す。g p 120 クレイド B について説明する関連するタンパク質ドメインを示す (S P：シグナルペプチド、V 1-V 5：可変領域 1-5。)(C) H I V-1 クレイド C 南アフリカ株 (R e f. C. Z A) のペプチド 120 / 15 と、対応する H I V-1 参考株由来のペプチドとの多重配列アラインメント。右端に R e f. C. Z A ペプチドとの配列の同一性のパーセンテージを示す。点線は保存されたアミノ酸である。破線はギャップである。N 結合型グリコシル化サイトに下線を引いている。番号付けの方式は H I V-1 株 H X B 2 (R e f. B. F R) を参照する。aa はアミノ酸を意味する。

40

【0076】

図 2 は抗体が H I V-1 クレイド C g p 41 由来のペプチドに反応することを示す。(A) アフリカ人 (左) およびヨーロッパ人 (右) の患者の、17 個の重複する g p 41 ペ

50

プチド（x 軸：ペプチド 1～17）に対する I g G、I g G サブクラス I g A および I g M の反応の頻度（y 軸：反応性の血清の数）。（B）最適な配列アラインメントに必要である、H I V-1 クレード C 南アフリカ株（クレード C__Z A）および参考株 H X B 2（クレード B__H X B 2）の g p 4 1 における重複する g p 4 1 ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレード C および B 由来の g p 4 1 におけるギャップ（欠落しているアミノ酸の数を表示）を示す。g p 4 1 クレード B について説明する関連するタンパク質ドメイン／エピトープを示す（F：融合タンパク質、T M：トランスメンブレンタンパク質、I D：免疫優性領域、I S：免疫抑制領域、M P E R：膜近位外部領域）。

【0077】

10

図 3 は、組み換え H I V-1 クレード C 構造、補助および p o l 由来タンパク質の純度および免疫反応性を示す。（A）組み換えマトリクス（M A）、カプシド（C A）、ヌクレオカプシド（N C）、N E F、T A T、V I F、プロテアーゼ（P R）、逆転写酵素＋R N A s e H（P R）、インテグラーゼ（I R）および分子量マーカー（M）を含むクマシー染色された S D S P A G E。分子量（k D a）を左に示す。（B）アフリカ人（左）およびヨーロッパ人（右）の患者の、構造、補助および p o l 由来タンパク質（x 軸）に対する I g G、I g G サブクラス I g A および I g M の反応の頻度（y 軸：反応性の血清の数）。

【0078】

20

図 4 は、規定された従来の診断試験において陰性の結果を有する 2 個体の、g p 1 2 0 由来タンパク質およびペプチドに対する I g G および I g M の反応プロファイルを示す。I g G および I g M 抗体の、H I V-1 クレード C 抗原（r g p 1 2 0、M A：マトリクス；N E F、T A T、P R：プロテアーゼ、P R：逆転写酵素＋R N A s e H、I N：インテグラーゼ）およびペプチドに対する陽性反応が示される。I n n o L I A I g G イムノプロットで得られた、H I V 抗原 g p 1 2 0、g p 4 1、インテグラーゼ（I N）、カプシド（C A）、マトリクス（M A）および H I V-2 抗原 g p 1 0 5、g p 3 6 陰性の試験結果を右端に示す。

【0079】

30

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

〔実施例〕

（実施例 1）

<材料および方法>

40

H I V-1 クレード C エンベロープと重複するペプチドの合成

南アフリカの H I V-1 クレード C の参照用株（分離株 Z A.04.04 Z A S K 146、Los Alamos HIV 配列データベース承認番号 A Y 772699）由来の g p 1 2 0 および g p 4 1 の完全長アミノ酸配列をカバーする 24 個および 17 個のペプチドを、C E M-L i b e r t y（C E M、アメリカ合衆国）、または Applied Biosystem peptide synthesizer（Life technologies、アメリカ合衆国）において、固相合成により生成した。それぞれ 33 個および 32 個のアミノ酸を含んでおり g p 1 2 0 および g p 4 1 の C 末端ペプチドを除き、全てのペプチドはアミノ酸 25 個の長さであり、5 個のアミノ酸の重複を有している（次の表を参照）。H I V-1 クレード C エンベロープペプチド：

【0080】

50

【表 1】

gp120 ペプチド			
ペプチド	アミノ酸配列	配列番号	溶媒
120/1	RVRGILRNWPQWWIWGILGFWMIII	6	10% DMF
120/2	WMIIICRGEENSQWTVYYGVPVWTE	7	2% DMSO, 1mM DTE
120/3	PVWTEAKTTLFCASDAKAYEKEVHN	8	PBS, 1mM DTE
120/4	KEVHNVWATHACVPTDPSPQELVLE	9	H ₂ O, 1mM DTE
120/5	ELVLENVTESFNMWENDMVDQMHE	10	H ₂ O, 9mM NaOH
120/6	QMHEDIIGLWDESLKPCVKLTPLCV	11	H ₂ O, 1mM DTE
120/7	TPLCVTLNCNTTSHNNSSPSPMTNC	12	5% ACN, 1mM DTE
120/8	PMTNCSFNATTELKDKTQKVNALFY	13	H ₂ O, 1mM DTE
120/9	NALFYRSDIVPLEKNSSEYILINC	3	2% DMSO, 3mM NaOH, 1mM DTE
120/10	LINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHY	14	5% DMSO, 1mM DTE
120/11	IPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTG	15	H ₂ O, 1mM DTE
120/12	FNGTGPCSNVSTVQCTHGIKPVVST	16	H ₂ O, 1mM DTE
120/13	PVVSTQLLNGSLAEGERIIRSEN	17	3mM NaOH
120/14	RSENLTDNAKTIIVHLNKSVAIVCT	18	H ₂ O, 1mM DTE
120/15	AIVCTRPNNNTRKSIIRIGPGQVFT	1	H ₂ O, 1mM DTE
120/16	QVFTNEIIGNIRQAHCNISRELWN	19	5% DMF, 1mM DTE
120/17	RELWNTLEQVKKKLKEHFQNKTI	20	H ₂ O
120/18	NKTIEFQPPAGGDLEVTTHSFNCRG	21	H ₂ O, 1mM DTE
120/19	FNCRGEFFYCNTSNLFNITASNASD	22	PBS, 2mM NaOH, 1mM DTE
120/20	SNASDANNNTITLPCKIKQIINMWQ	23	H ₂ O
120/21	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCNSS	24	10% ACN, 1mMDTE
120/22	TCNSSITGLLLTRDGGNNNDTGNN	25	H ₂ O, 1mM DTE
120/23	TGNNNDTEIFRPGGNNMKDNWRSEL	26	H ₂ O
120/24	WRSELYKYKVVEIKPLGIAPTAKRRVVEREKR	5	H ₂ O
gp41 ペプチド			
41/1	AVGLGAVLLGFLGTAGSTMGAASIT	27	5% ACN
41/2	AASITLTVQARQLLSGIVQQSNLL	28	5% DMF, 1mM 酢酸
41/3	QSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGKQL	29	H ₂ O
41/4	GIKQLQARVLAIERYLKDQQLLGLW	4	H ₂ O
41/5	LLGLWGCSGKLICTTAVHWNSSWSN	2	5% DMSO, 1mM DTE
41/6	SSWSNKSQDYIWGNMTWMQWDREIN	30	H ₂ O, 3mM NaOH
41/7	DREINNYTDIIYTLLEESQSQQEKN	31	H ₂ O, 6mM NaOH
41/8	QQEKNKDLLALDSWNNLWNWFSIT	32	H ₂ O, 3mM NaOH
41/9	WFSITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLR	33	2% DMSO
41/10	LIGLRIILGVLSIVKRVRGYSPLS	34	10% ACN

41/11	YSPLSFQTLPPNPRGPDRLRGIEEE	35	H ₂ O
41/12	GIEEEGGGEQDKDRSIRLVSGFLALV	36	H ₂ O
41/13	FLALVWEDLRSLCLFSYHRLRDFIL	37	5% DMF
41/14	RDFILIAGRAAELLGRSSLRGLQTG	38	H ₂ O
41/15	GLQTGWQALKYLGSLVQYWGLELKK	39	5% ACN
41/16	LELKKSAINLFDTTAIVVAEGTDRL	40	2% DMSO, 2mM NaOH
41/17	GTDRLIEGLQGIGRAIYNIPRRIRQGFEEALL	41	2% DMF

10

【0081】

合成を、PEG-PSをプレロードしたレジンをを用いた9-フルオレニル1-メトキシ-カルボニル (Fmoc) 法により行った。合成されたペプチドを、ジクロロメタンで洗浄し、19 mlのトリフルオロ酢酸、500 μ lのシランおよび500 μ lのH₂Oの混合物中で樹脂から分離され、tert-ブチルメチルエーテル中に沈殿させた。ペプチドはアセトニトリルグラジエント (UltiMate 3000 Pump, Dionex、アメリカ合衆国) における逆相HPLCにより90%より高い純度で副生成物から単離され、質量スペクトル (Microflex MALDI-TOF、Bruker、アメリカ合衆国) により同定した。ペプチドの化学的性質は、ExPASy proteomics serverのProtParamにより予測し、可溶化の条件の最適化を検討した。疎水性の高いペプチドはジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) またはアセトニトリル (ACN) 中で可溶化し、システインを豊富に含むペプチドにはジチオエリトリール (DTE) 等の還元剤を、添加し、強度の酸性のペプチドにはNaOHを添加した。

20

【0082】

<HIV-1クレードCタンパク質の発現および精製>

組み換えマトリクス (MA)、カプシド (CA)、ヌクレオカプシド (NC) タンパク質、ならびにNEF、TATおよびVIF、およびpol由来プロテアーゼ (PR)、逆転写酵素+RNaseH (RP) およびインテグラーゼ (IN) をEscherichia coli (E. coli) において発現した。端的には、構造タンパク質および補助タンパク質ならびにプロテアーゼのcDNA配列は、南アフリカのHIV-1クレードC参照用株 (分離株ZA.04.04ZASK146、Los Alamos HIV配列データベース承認番号AY772699) に由来する。逆転写酵素-RNaseHおよびインテグラーゼコンストラクトは、エチオピアのHIV-1クレードC分離株 (Los Alamos HIV 配列データベース承認番号U46016) に由来する。タンパク質のcDNAはヘキサヒスチジンタグがその後続いており、細菌による発現のためにコドン最適化され、pET17bベクター (ATG:biosynthetics、ドイツ) にクローニングした。100 mg/lアンピシリンを添加したLB培地においてOD₆₀₀ = 0.4-0.6まで培養された、E. coli BL21(DE3)細胞における組み換えタンパク質の発現を0.5-1.0 mMのイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加により誘導し、タンパク質をニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより、未変性または変性の条件下で精製した。マトリクス、カプシドおよびヌクレオカプシドの未変性の条件下での精製については、50 mMのNaH₂PO₄、300 mMのNaCl、10 mMのイミダゾール pH 8.0、PMSF (1 μ l/ml)、リゾチーム (1 mg/ml) 中における連続的な凍結および融解のサイクルにより細胞を溶解し：DNAを5 μ g/ml DNase Iで開裂させ (20分間、室温)：細胞の破片を除去 (18000 rpm、20分間、4℃で遠心) した後、透明な可溶化液をニッケルアガロース (QIAGEN、ドイツ) で2-4時間、4℃でインキュベートした。ヒスチジンタグ付加したタンパク質の溶出を、50 mMのNaH₂PO₄、300 mMのNaCl pH 8.0中の、イミダゾール勾配 (20、50、100、250 mMのイミダゾール) を用いて実施した。NEF、TATおよびプロテアーゼの、変性条件下における精製については、細胞を8 Mの尿素または6 Mの塩化グアニジウムバッファー中で少なくとも2時間または一晩室温で溶解した。細胞の破片

30

40

50

を除去（18000rpm、20分間、4℃で遠心）し、透明な可溶化液をニッケルアガロース（QIAGEN、ドイツ）でインキュベート（室温で2～4時間、または4℃で一晩）した後、pH勾配（pH6.3、5.6、4.5）を使用して組み換えタンパク質を8Mの尿素、100mMの NaH_2PO_4 、10mMのトリス中に溶出させた。組み換えインテグラーゼの精製については、細胞をまず上述の未変性の状態で溶解し、タンパク質は遠心（18000rpm、20分間、4℃）の後、不溶性画分に見られるため、この不溶性画分を不溶性画分は再度8Mの尿素、100mMの NaH_2PO_4 、10mMのトリス、pH8.0に懸濁し、一晩室温でインキュベートした。細胞の破片を除去（第2の工程の18000rpm、20分間、4℃の遠心により）した後、組み換えインテグラーゼを、変性条件下で8Mの尿素中で上述のとおり精製した。VIFおよび逆転写酵素+RNase Hの精製は、封入体調製のプロトコルに従い達成した。変性条件下で精製された組み換えタンパク質の尿素的除去およびリフォールディングを、連続透析の工程により達成した。

【0083】

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

組み換えHIV-1クレードCタンパク質の生化学的性質

【0084】

【表2】

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

【0085】

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

<研究の対象およびルーチンイムノアッセイ>

14人のアフリカ人のHIVに感染した患者、2人の高度に曝露されたアフリカ人の個人、15人のヨーロッパ人のHIVに感染した患者、および10人の感染していない個体

から血清が採取された。各被験者のH I V血清学的陽性および陰性は、ルーチン分析により確認した。H I V特異的I g Gイムノブロットはラインイムノアッセイ（InnoLIA, Innogenetics、ベルギー）により実施され、また無症候の被験者をさらにAbbott Murex HIV Ag/Ab combination（Abbott、アメリカ合衆国）により試験した。

【0086】

<ELISAによるH I V-1クレードCタンパク質特異的I g G、I g AおよびI g Mの決定>

ELISAプレート（Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific、アメリカ合衆国）を、100mMの重炭酸ナトリウムバッファーpH9.6で希釈したH I V-1クレードC由来ペプチドおよびタンパク質（2μg/ml）を用いて4℃で一晩、被覆した。PBS 0.05% v/v Tween 20中で洗浄し、2% w/v BSA、PBS, 0.05% v/v Tween 20中で少なくとも4時間室温でブロッキングした後、プレートを0.5% w/v BSA、PBS, 0.05% v/v Tween 20で1:200に希釈した血清を用いて4℃で一晩インキュベートした。結合した抗体をマウス抗ヒトI g G₁、I g G₂、I g G₄、I g A、I g M（BD、1:1000、室温で2時間）またはマウス抗ヒトI g G₃（1:5000、室温で2時間、Sigma Aldrichst. Louis, MO）、およびセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）と結合したビツジ抗マウスI g G（1:2000、室温で1時間、GE Healthcare, Waukesha, WI）を用いて検出した。全I g G抗体は直接的に標識されたHRP-抗ヒトI g G（1:5000、室温で1時間、GE Healthcare、アメリカ合衆国）を用いて検出した。呈色反応を2, 2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）ジアンモニウム塩によって誘導し、光学濃度（OD_{405nm}-OD_{490nm}）をSpectra Max 分光光度計（Molecular Devices、アメリカ合衆国）において測定した。エンベロープ特異的反応性の分析のためのコントロール抗原として、293個の細胞（#1233-V08H, Sino Biological、中国）で発現した、H I V-1クレードC由来の組み換えヒスチジンタグgp120、単離CN54を使用した。プレート間の標準化のために、各プレートにおいて、各抗体のアイソタイプ/サブクラスに特異的なポジティブコントロール血清を分析した。加えて、ヒト血清アルブミン（HSA）に対する各血清サンプルの反応性を、ネガティブコントロールとして試験した。抗原のコーティングを、ヒスチジンタグタンパク質の、マウス抗ヒスチジンタグ抗体（Dianova、ドイツ）を用いた検出、ならびにタグ付されていないタンパク質およびペプチドの、H I V感染血清のプールを用いた検出によって確認した。コーティングされた抗原に対する検出抗体の非特異的結合を、バッファーのコントロールの分析によって排除した。全ての決定は2回行っており、結果はネガティブコントロール抗原に対する反応性を引いた生データの標準化された平均値として表される。閾値は、各抗体のアイソタイプ/サブクラスごとに、および各抗原について、H I Vに感染していない被験者の結果の平均値+3SDとして計算した。

【0087】

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

【0088】

<結果>

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

【0089】

gp120の詳細なエピトープマッピングのために、H I V-1に感染した、クレードCがH I V-1の主なサブタイプである、ジンバブエの患者由来の血清を試験し、また組

み換え g p 1 2 0 および 2 4 個の重複する g p 1 2 0 由来ペプチドとの抗体の反応性について、他のクレードの H I V - 1 株に感染したヨーロッパ人の患者由来の血清を試験した。これらのペプチドは、南アフリカの H I V - 1 サブタイプ C 参照用株に由来する g p 1 2 0 の完全長アミノ酸配列をカバーした（図 1 A、B）。I g G、I g A、I g M および I g G₁₋₄ サブクラスの反応性を測定した。

【0090】

興味深いことに、I g G、I g G サブクラス、I g A および I g M の、ペプチドに対する反応プロファイルは、アフリカ人の H I V に感染した患者（図 1 A 左パネル）およびヨーロッパ人の H I V に感染した患者（図 1 A 右パネル）においてほぼ同一であった。ペプチドの認識パターンは、全ての抗体クラスおよび I g G サブクラスで類似であった。しかしながら、抗体レベルおよび認識の頻度の分析により、I g G、特に I g G₁ の反応がどちらの集団においても支配的であることが示された。ペプチド 1 2 0 / 1 5 は、アフリカ人およびヨーロッパ人の患者について、認識の頻度および強度の観点において主たる抗体反応性ペプチドであった。（図 1 A）。ペプチド 1 2 0 / 2 4 もまた、試験された個体の大多数によって認識された。g p 1 2 0 の全体像（図 1 B）は、ペプチド 1 2 0 / 1 5 が、C D 4 細胞上のコレセプター C C R 5 / C X C R 4 のための結合サイトを含んでいると考えられる V 3 ドメインに存在していることを示す。ペプチド 1 2 0 / 2 4 は g p 1 2 0 のちょうど C 末端に位置している。

【0091】

図 1 C は、ペプチド 1 2 0 / 1 5 と、異なる大陸からの様々な H I V - 1 参照用株における対応するペプチドとの配列アラインメントを含んでいる。ペプチド 1 2 0 / 1 5 に対応する領域の相当程度の配列変異が、88 ~ 72 % の配列同一性の範囲で、前記株の間で発見された。株に依存して、ペプチド 1 2 0 / 1 5 と定義される領域は、1 つまたは 2 つの N 結合型グリコシル化サイトを含んでいる。

【0092】

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

次に、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者の、H I V - 1 クレード C の g p 4 1 由来のオーバーラップする 17 個のペプチドに対する I g G、I g A および I g M の反応を分析した（図 2 A、2 B）。再び、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者が類似のペプチドを認識し、免疫反応において I g G、および特に I g G₁ 抗体が支配的であることがわかった。認識の頻度および強度の両方が、g p 4 1 ペプチドに対するものよりも、g p 1 2 0 由来ペプチドに対するもののの方が低かった。I g G 抗体および I g G₁ 抗体は、主にペプチド 4 1 / 4 - 8 に定義される領域に向けられた（図 2 A）。この領域は、「免疫抑制的」かつ「免疫優性」ドメインと呼ばれてきた、予測される g p 4 1 の N 結合型グリコシル化サイトの大部分を含んでいる領域を包含する（図 2 A、B）。興味深いことに、ペプチド 4 1 / 1 4 - 1 7 に定義される他の抗体反応性領域は、いわゆる「細胞質顆粒ドメイン」の一部である、g p 4 1 の C 末端部分に位置していた。

【0093】

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

表面抗原以外のウイルスタンパク質に対する抗体反応を特徴づけるために、H I V - 1 クレード C の p o l 由来構造タンパク質および補助タンパク質を E. coli において発現させて精製し、タンパク質特異的抗体のレベルをアフリカ人の血清（図 3 B、左パネル）およびヨーロッパ人の血清（図 3 B、右パネル）において測定した。エンベロープタンパク質と同様、免疫応答は I g G 抗体、特に I g G₁ 抗体が支配的であった。再び、両方の集団の患者は類似の認識プロファイルを示した：プロテアーゼ、逆転写酵素 + R N A s e H、インテグラーゼ、ならびにカプシドタンパク質およびマトリクスタンパク質が最も高頻度かつ強力に認識される抗体であった。ヌクレオカプシドタンパク質および補助タンパク質に対する抗体の反応はまれで低いものであった。

10

20

30

40

50

【0094】

＜H I Vタンパク質およびペプチドの I g Gサブクラス認識は T h 1 / T h 2 混合免疫応答の徴候である＞

I g Gサブクラスの、g p 1 2 0およびg p 4 1ペプチドに対する反応ならびにp o l由来構造タンパク質および補助タンパク質に対する反応の測定を、同一の血清希釈物を使用して実施した。I g G₁は支配的なI g Gサブクラスであるので、I g G₁の反応はI g G₂、I g G₃およびI g G₄の反応よりも強力で高頻度であった。しかしながら、抗原およびエпитープ認識プロファイルは、アフリカ人の患者およびヨーロッパ人の患者において、全てのサブクラスで類似していた。I g G₂およびI g G₄の反応の頻度および強度は、T h 1 / T h 2 混合免疫応答の徴候であり、同等であった。

10

【0095】

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

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

20

【0096】

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

30

【0097】

(実施例2)

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

【0098】

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

40

【0099】

＜材料および方法＞

Casseb et al. 2002に使用されたペプチド「C o n s C」を、g p 1 2 0由来ペプチ

50

ドについて説明した（実施例1を参照）のと同様に、固相ペプチド合成を用いて製造した。ELISA実験のため、ペプチドをH₂Oに可溶化し、gp120由来ペプチドについて説明したのと同様に免疫学的アッセイを行った。

【図面の簡単な説明】

【0100】

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

10

【図1B】抗体がHIV-1クレードC gp120およびgp120由来のペプチドに反応することを示す。最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株（クレードC__ZA）および参考株HXB2（クレードB__HXB2）のgp120における重複するgp120ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp120におけるギャップ（欠落しているアミノ酸の数を表示）を示す。gp120クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメインを示す（SP：シグナルペプチド、V1-V5：可変領域1-5）。

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

20

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

【図2B】抗体がHIV-1クレードC gp41由来のペプチドに反応することを示す。最適な配列アラインメントに必要である、HIV-1クレードC南アフリカ株（クレードC__ZA）および参考株HXB2（クレードB__HXB2）のgp41における重複するgp41ペプチドの部分。最適な配列アラインメントに必要である、クレードCおよびB由来のgp41におけるギャップ（欠落しているアミノ酸の数を表示）を示す。gp41クレードBについて説明する関連するタンパク質ドメイン／エピトープを示す（F：融合タンパク質、TM：トランスメンブレンタンパク質、ID：免疫優性領域、IS：免疫抑制領域、MPER：膜近位外部領域）。

30

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

40

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

【図4】図4は、規定された従来の診断試験において陰性の結果を有する2個体の、gp120由来タンパク質およびペプチドに対するIgGおよびIgMの反応プロファイルを示す。IgGおよびIgM抗体の、HIV-1クレードC抗原（rgp120、MA：マトリクス；NEF、TAT、PR：プロテアーゼ、PR：逆転写酵素+RNaseH、IN：インテグラーゼ）およびペプチドに対する陽性反応が示される。InnoLIA I

50

g G イムノブロットで得られた、H I V 抗原 g p 1 2 0、g p 4 1、インテグラーゼ (I N)、カプシド (C A)、マトリクス (M A) および H I V - 2 抗原 g p 1 0 5、g p 3 6 陰性の試験結果を右端に示す。

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

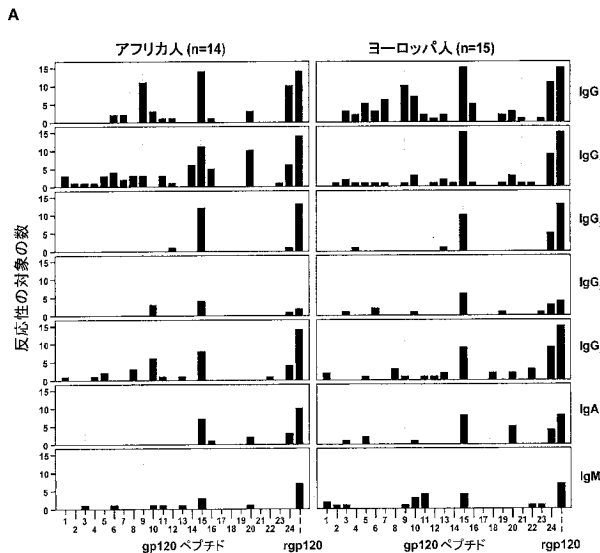
【図 5 B】図 5 A における 2 つのペプチドの、アフリカ人およびヨーロッパ人の H I V に感染した患者における I g G 血清反応性を、ネガティブコントロールに対する反応を差し引いた、光学濃度 (O D) として表す。

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

10

【図 1 A】

図 1 A



【図 1 C】

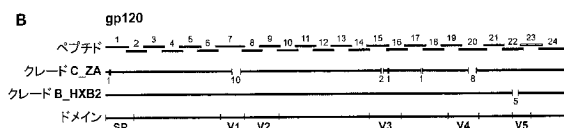
120/15 (aa 292-319)

	300	310
Ref.C.ZA	AIVCTRPNNNTRKSIRI--GPGQVFYT	
Ref.F2.CMD	K.N.....F.....A:	88%
Ref.A2.CD	F.N.....F.....A:	84%
Ref.C.BR	E.N.....F.....A:	84%
Ref.F1.FI	Q.N.....S.....A:	84%
Ref.A1.KS	T.K.I.....F.....A:	80%
Ref.A2.CY	L.T.I.....F.....A:	80%
Ref.C.IN	E.M.....D.....T.A:	80%
Ref.D.TZ	K.N.....G.....T.F:	80%
Ref.A1.AU	N.T.I.....V.....T.A:	76%
Ref.A1.RW	K.N.....T.....S.HA:	76%
Ref.A1.UG	T.N.....R.V.....T.A:	76%
Ref.B.FR	E.N.....QR.....RA.V:	76%
Ref.B.NL	E.N.....H.....RA.A:	76%
Ref.C.ET	E.T.....S.....T.A:	76%
Ref.F1.BR	Q.N.....R.SL.....R:	76%
Ref.F1.FR	Q.N.....HL.....A.A:	76%
Ref.G.BE	E.N.....R.VA.....A:	76%
Ref.G.NG	E.N.I.....P.....A:	76%
Ref.H.BE	Q.N.....G.HM.....L.A:	76%
Ref.J.SE	E.....G.HM.....L.A:	76%
Ref.K.CM	Q.N.....HM.....KA:	76%
Ref.B.TH	E.N.....Y.....R.Y:	72%
Ref.F1.BE	Q.N.....G.HL.....T.A:	72%
Ref.F2.CMa	I.D.R.....G.....T.FA:	72%
Ref.F2.CMb	K.N.....R.H.....RA.A:	72%
Ref.F2.CMc	N.....T.I.....R.M.....R.A:	72%
Ref.G.PT	P.T.A.....S.....A.A:	72%
Ref.H.BE	E.T.....G.HF.....A.A:	72%
Ref.J.SE	E.....Y.....G.HM.....L.A:	72%
Ref.K.CD	E.N.....S.....H.....RA.A:	72%

Fig. 1C

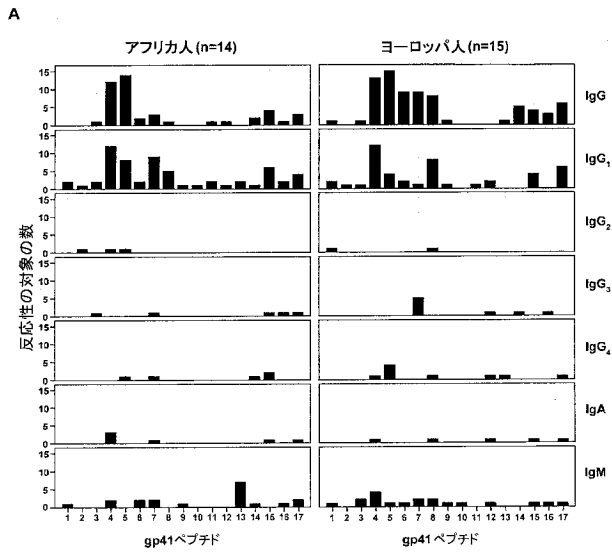
【図 1 B】

図 1 B



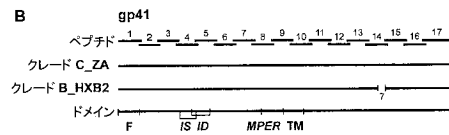
【図 2 A】

図 2A



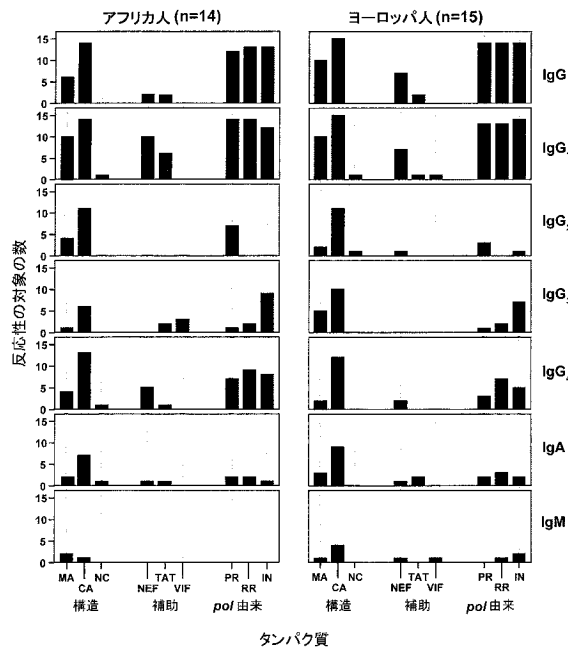
【図 2 B】

図 2B



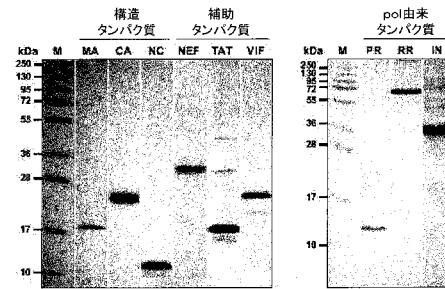
【図 3 B】

図 3B



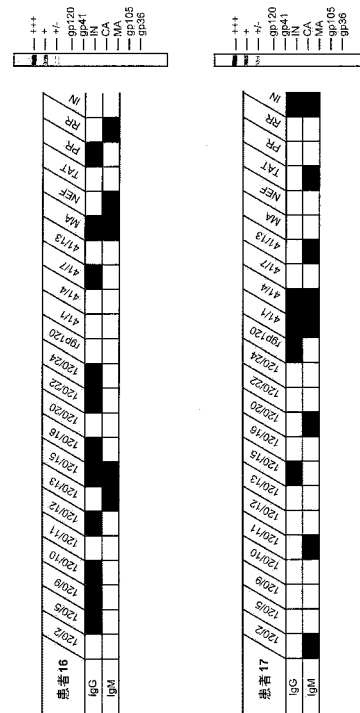
【図 3 A】

図 3A



【図 4】

図 4

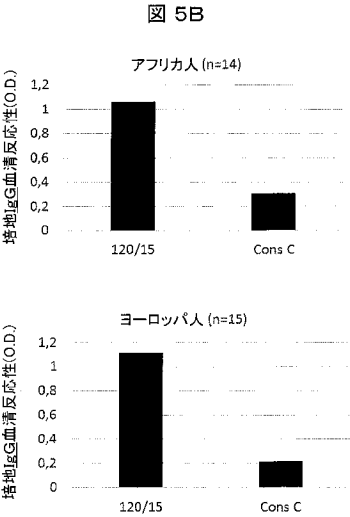


【図 5 A】

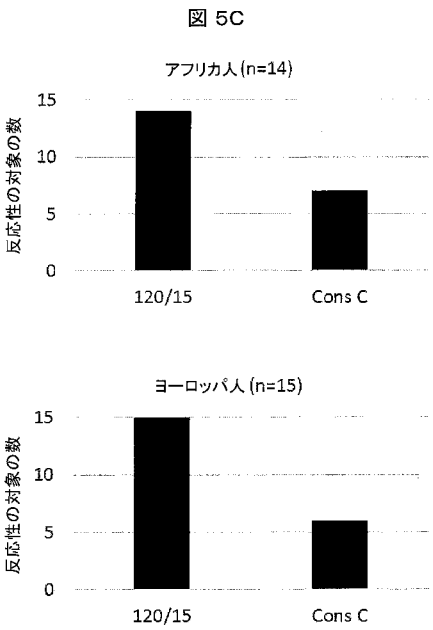
120/15 AIVCTRENNNTRKSIIRIGPGQVFYT 25
Cons C -----NTRKSIIRIGPGQTFY- 15
*****. **

Fig. 5A

【図 5 B】



【図 5 C】



【配列表】

2016511411000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/055194

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/055194**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 9-15, 20-22(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/569
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CASSEB J ET AL: "Serotyping HIV-1 with V3 peptides: Detection of high avidity antibodies presenting clade-specific reactivity", BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH 2002 BR, vol. 35, no. 3, 2002, pages 369-375, XP002703192, ISSN: 0100-879X abstract; figure 1 page 370, right-hand column, last paragraph ----- -/--	1-4, 9-15, 20-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 2014

Date of mailing of the international search report

19/08/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luis Alves, Dulce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. NOVITSKY ET AL: "Magnitude and Frequency of Cytotoxic T-Lymphocyte Responses: Identification of Immunodominant Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 10155-10168, XP055071493, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.76.20.10155-10168.2002 abstract; figure 4; table 4 -----	1-4
X	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 2007, RIABININA S A ET AL: "[Evaluation of diagnostic efficiency of the recombinant protein modeling immunodominant epitope V3 of envelope gp120 for immunoenzyme detection for HIV-1 infection antibodies].", XP002703193, Database accession no. NLM17886471 abstract & MOLEKULIARNAIA GENETIKA, MIKROBIOLOGIIA I VIRUSOLOGIIA 2007, no. 3, 2007, pages 33-36, ISSN: 0208-0613 -----	1-4,15
A	TIMOTHY CARDOZO ET AL: "Worldwide Distribution of HIV Type 1 Epitopes Recognized by Human Anti-V3 Monoclonal Antibodies", AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 25, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 441-450, XP055071175, ISSN: 0889-2229, DOI: 10.1089/aid.2008.0188 the whole document -----	1-4,14, 15
A	CATHERINE A. BRENNAN ET AL: "HIV global surveillance: Foundation for retroviral discovery and assay development", JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 78, no. S1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages S24-S29, XP055071197, ISSN: 0146-6615, DOI: 10.1002/jmv.20603 the whole document -----	1-4,14, 15

International Application No. PCT/ EP2014/ 055194

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 9-15, 20-22(all partially)

Peptide having Seq Id No 1, methods of diagnosing HIV-1 making use of and solid supports comprising said peptide.

2. claims: 5, 16(completely); 1-4, 9-15, 20-22(partially)

Peptide having Seq Id No 2, methods of diagnosing HIV-1 making use of Seq Id No 1 and Seq Id No 2 and solid supports comprising said peptides.

3. claims: 6, 17(completely); 1-4, 9-15, 20-22(partially)

Peptide having Seq Id No 3, methods of diagnosing HIV-1 making use of Seq Id No 1 and Seq Id No 3 and solid supports comprising said peptides.

4. claims: 7, 18(completely); 1-4, 9-15, 20-22(partially)

Peptide having Seq Id No 4, methods of diagnosing HIV-1 making use of Seq Id No 1 and Seq Id No 4 and solid supports comprising said peptides.

5. claims: 8, 19(completely); 1-4, 9-15, 20-22(partially)

Peptide having Seq Id No 5, methods of diagnosing HIV-1 making use of Seq Id No 1 and Seq Id No 5 and solid supports comprising said peptides.

6-41. claim: 14(partially)

Peptides having Seq Id No n, with n being 6 to 41.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K	14/005	(2006.01)	C 0 7 K 14/005
C 0 7 K	17/04	(2006.01)	C 0 7 K 17/04
C 0 7 K	17/14	(2006.01)	C 0 7 K 17/14
C 1 2 N	11/02	(2006.01)	C 1 2 N 11/02
C 1 2 N	11/14	(2006.01)	C 1 2 N 11/14

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ガレラーノ, ダニエラ
 オーストリア, ウィーン アー— 1 2 1 0, ミュールシュッテルガッセ 4 3
 (72)発明者 シバンダ, エロピー, エヌ.
 ジンバブウェ, ハラレ, マウント プレザント, スタッフォード ロード 1 2
 Fターム(参考) 4B033 NA22 NA26 NA30 ND01 ND03 ND05
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA16 BA17 BA18 BA60 BA61 BA63 CA01
 CA40 DA89 EA50

專利名称(译)	如何诊断病毒感染		
公开(公告)号	JP2016511411A	公开(公告)日	2016-04-14
申请号	JP2015562242	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	碧欧美公司		
申请(专利权)人(译)	Biomai股份公司		
[标]发明人	ヴァレンタルードルフ ガレラーノダニエラ シバンダエロピーエヌ		
发明人	ヴァレンタ,ルードルフ ガレラーノ,ダニエラ シバンダ,エロピー,エヌ.		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/005 C07K17/04 C07K17/14 C12N11/02 C12N11/14		
CPC分类号	G01N33/56988 G01N2333/162 C07K14/005 C07K14/162 C12N7/00 C12N2740/16122 G01N33/54366 G01N2333/16 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/53.N G01N33/543.545.A C07K7/08.ZNA C07K14/00 C07K14/005 C07K17/04 C07K17/14 C12N11/02 C12N11/14		
F-TERM分类号	4B033/NA22 4B033/NA26 4B033/NA30 4B033/ND01 4B033/ND03 4B033/ND05 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA60 4H045/BA61 4H045/BA63 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA50		
优先权	2013159417 2013-03-15 EP		
其他公开文献	JP6436919B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 本发明是一种用于检测和/或定量受试者样品中的人免疫缺陷病毒 (HIV) 特异性抗体的方法, 其中在样品中, a) 由氨基酸序列 AIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQVFTY (SEQ ID NO : 1) 组成的肽, 或 b) 与a) 的肽具有至少70%的同一性的同系物, 或c) 存在与a) 或b) 的肽片段结合的抗体, 该抗体由15-24个氨基酸残基组成, 并且 /或包括确定数量的步骤的方法。	(21) 出願番号 特願2015-562242 (P2015-562242) (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14) (85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015. 11. 16) (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/055194 (87) 国際公開番号 WO2014/140332 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18) (31) 優先権主張番号 13159417.8 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 507180423 ビオマイ アクチエンゲゼルシャフト オーストリア, ヴィエンナ アー-109 0, トップ 1, ラツアレットガッセ 1 9 (74) 代理人 110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK (72) 発明者 ヴァレンタ, ルードルフ オーストリア, セレシエンフェルド アー -2604, ベートーヴェンストラッセ 18
--	--	--