

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3851761号
(P3851761)

(45) 発行日 平成18年11月29日(2006.11.29)

(24) 登録日 平成18年9月8日(2006.9.8)

(51) Int. Cl.	F I
CO7K 14/16 (2006.01)	CO7K 14/16 ZNA
CO7K 1/04 (2006.01)	CO7K 1/04
CO7K 1/06 (2006.01)	CO7K 1/06
CO7K 1/107 (2006.01)	CO7K 1/107
CO7K 1/20 (2006.01)	CO7K 1/20

請求項の数 6 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-202472 (P2000-202472)	(73) 特許権者	599140666
(22) 出願日	平成12年7月4日(2000.7.4)		アダルティス・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平7-273195の分割		Adaltis Inc.
原出願日	平成1年1月26日(1989.1.26)		カナダ、エイチ3エム・3エイ2、ケベック、
(65) 公開番号	特開2001-55400 (P2001-55400A)		ク、モンリオール、ハモン・ストリート
(43) 公開日	平成13年2月27日(2001.2.27)		10900番
審査請求日	平成12年7月4日(2000.7.4)	(74) 代理人	100062144
審査番号	不服2003-11006 (P2003-11006/J1)		弁理士 青山 稜
審査請求日	平成15年6月16日(2003.6.16)	(74) 代理人	100067035
(31) 優先権主張番号	148821		弁理士 岩崎 光隆
(32) 優先日	昭和63年1月27日(1988.1.27)	(72) 発明者	フランセスコ ベリーニ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国、エイチ3アール 1ジェイ8、
(31) 優先権主張番号	185518		ケベック、タウン オブ マウント・ロー
(32) 優先日	昭和63年4月22日(1988.4.22)		ヤル、グラハム ブールバール、3045
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV抗体を検出するための合成ペプチド及びその混合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ保護基としての9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)の使用により特徴付けられる固相ポリペプチド合成法と、それに続く、2個のシステイン残基の特異的酸化および純粋な環状ペプチドをもたらす逆相HPLC精製方法を包含する、

RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

(ここで、環状ジスルフィドは、配列 CSGKLICの2個のシステイン残基の間で形成される。)のペプチドの製造方法。

【請求項2】

9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)をアミノ保護基として使用する固相ポリペプチド合成法と、それに続く、2個のシステイン残基の特異的酸化および純粋な環状ペプチドをもたらす逆相HPLC精製方法を包含する製造方法により調製される、

RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

(ここで、環状ジスルフィドは、配列 CSGKLICの2個のシステイン残基の間で形成される。)のペプチド。

【請求項3】

HIV-1に対する抗体の検出、並びにAIDS、ARC及び前AIDS状態の診断のための組成物であって、

RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

(ここで、環状ジスルフィドは、配列 CSGKLICの2個のシステイン残基の間で形成される

10

20

。)のペプチドを抗原として含んでなる組成物。

【請求項4】

H I V - 1 に対する抗体の検出方法であって、
RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

(ここで、環状ジスルフィドは、配列 CSGKLICの2個のシステイン残基の間で形成される。)のペプチドを使用すること含んでなる方法。

【請求項5】

試験方法がE L I S A、血球凝集反応、単一ドットまたは複数ドットストリップアッセイ法を包含する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

免疫化学試薬が、

RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

(ここで、環状ジスルフィドは、配列 CSGKLICの2個のシステイン残基の間で形成される。)のペプチドであることを特徴とする、H I V - 1 に対する抗体の検出、並びにA I D S、A R C 及び前A I D S 状態の診断のための試験キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、H I V 抗体を検出するための新規の環状合成ペプチド及び線状の合成ペプチドとその組合せに関する。

【0002】

【従来の技術】

後天性免疫不全症候群(A I D S)、A I D S 関連複合体(A R C)及び前A I D S は、レトロウイルス、すなわちヒト免疫欠損ウイルスタイプ1(H I V - 1 ; またH T L V - III、L A V - 1 及びA R V としても知られている)により引き起こされると考えられて来た。最近、H I V - 2 (正式にはL A V - 2)と呼ばれるもう1種の病原性ヒトレトロウイルスが、A I D S を有する西アフリカの患者から単離された(Montagnierなど、国際公表番号W 0 8 7 / 0 4 4 5 9 として1 9 8 7 年、7 月 3 0 日に公表されたP C T / F R 8 7 / 0 0 0 2 5)。H I V - 2 は、H I V - 1 及びS imian免疫欠損ウイルス(S I V)と多くの配列を共有することが最近示された(Guyaderなど、Nature, 3 2 6 : 6 6 2 ~ 6 6 9 , 1 9 8 7)。

【0003】

たとえ他の番号システムが本発明に関する従来技術に使用されても、本発明に使用されるアミノ酸のための番号システムは、H I V - 1 タンパク質のためには、Ratnerなど、Nature, 3 1 3 : 2 7 7 ~ 2 8 4 , 1 9 8 5 のシステム及びH I V - 2 タンパク質のためには、Guyaderなど、Nature, 3 2 6 : 6 6 2 ~ 6 6 9 (1 9 8 7) のシステムである。ペプチドにおける本発明に使用されるアミノ酸は、次のような単一の文字コードにより与えられる：ala= A , arg= R , asn= N , asp= D , cys= C , gln= Q , glu= E , gly= G , his= H , ile= I , leu= L . lys= K , met= M , phe= F , pro= P , ser= S , thr= T , trp= W , tyr= Y 及びval= V。

【0004】

H I V - 1 により感染された患者の血清中の抗体の検出のための初期免疫診断試験は、抗原として完全なウイルスを使用した。第2世代試験は、組換えD N A 方法により得られたポリペプチド配列を使用した。Cabradillaなど、Bio/Technology, 3 : 1 2 8 ~ 1 3 3 (1 9 8 5) 及びChangなど、Bio/Technology, 3 : 9 0 5 ~ 9 0 9 (1 9 8 5) は、それぞれ8 2 個及び1 0 2 個のアミノ酸残基の細菌により合成されたウイルスタンパク質を得ることに成功した。E . P . 8 6 2 0 2 3 1 4 号及び8 6 1 1 4 2 4 3 号は、単独で又は混合して免疫反応性であるgp 4 1 及びgp 1 2 0 の領域を包含する組換えポリペプチドを記載する。Shoemanなど、Anal. Biochem. 1 6 1 : 3 7 0 ~ 3 7 9 (1 9 8 7) はまた、H I V - 1 により感染された患者からの血清中に存在する抗体との免疫反応特性を

10

20

30

40

50

有する、gp 4 1 からのいくつかのポリペプチドを記載する。上記アッセイ方法は許容されない。それらの感度の欠乏は、それが検出から漏れ、そして血液生成物受容体を感染せしめるウイルスを含む血液を可能にする場合、重大である。これらの抗原調製物中に存在する不純物は、健康な個人を苦悩にする、許容できない高レベルの誤った陽性結果の原因である。

【 0 0 0 5 】

次に、従来技術においては、より短いエピトープの同定が行なわれたことが明らかになった。これは、それらが容易且つ低費用で調製され得るためであり、そしてより重要なことには、A I D S に関係しないウイルスタンパク質との共有エピトープの存在による誤った陽性の試験結果の危険性を減じるためである。これに関しては、Gallagher, Cell, 5 0 : 3 2 7 ~ 3 2 8, 1 9 8 7 は、H I V - 1 のgp 4 1 の領域が、呼吸シんシチウムウイルスとの5個の隣接するアミノ酸残基の配列及びはしかウイルスF 1 糖タンパク質の4個の等しく分配されたアミノ酸の配列を共有することを見出した。従って、この領域又は発見されるべきいづれか他の共通領域を含むさらに高く精製された組換えポリペプチドが、誤った陽性結果を潜在的に担当するであろう。

10

【 0 0 0 6 】

卓越した特異性とは別に、H I V ウイルスのユニーク且つ高く保存されたエピトープに対応するより短いペプチド配列の同定が、化学合成によるその産生をより容易且つより安価にする。実験的な方法が記載されて来た。これらの方法は、活性タンパク質の表面上に暴露される予定である短いアミノ酸配列の選択に關与することができる(Hopp and Woods, J. Immunol. Met. 8 8 : 1 ~ 1 8, 1 9 8 6 を参照のこと)。いく分有用であるけれども、これらの方法はほとんど表示的でない。それにもかかわらず、それらは、A I D S の原因であるウイルスのタンパク質上に存在するエピトープの同定のために多く適用されて来た。たとえば、アメリカ特許第4,629,783号、国際特許出願番号 P C T / U S 8 6 / 0 0 8 3 1 及びE.P.出願第86303224号は、A I D S の診断キットに有用である。H I V - 1 のp18, p25, gp41及びgp120タンパク質からの種々の合成ペプチドを開示する。

20

【 0 0 0 7 】

しかしながら、より小さな抗原に対するこの傾向は、合成されたエピトープが、抗体により認識される厳密な立体配座を推定することができない危険性を伴う。これらの場合のそれぞれにおいて試験される血清サンプルの数はひじょうに制限されるけれども、小さな合成ペプチドによる特異性は、ひじょうに高いことが見出され(95%~100%)たが、しかしながら、全体の感度は80~100%の間であった。100%の感度が達成される例のみにおいては、単に10種のサンプルが試験された。

30

【 0 0 0 8 】

Smithなど、J. Clin. Microbiol. 2 5 : 1 4 9 8 ~ 1 5 0 4, 1 9 8 7 は、高い免疫反応性である2種のオーバーラップペプチド、E 3 2 及びE 3 4 を記載する。240種の血清陰性検体から誤った陽性結果は得られなかったが、しかしその試験は322種のうち3種の血清陽性サンプルを見落とした(99.1%の感度)。Wangなど、Proc. Natl. Acad. Sci. 8 3 : 6 1 5 9 ~ 6 1 6 3, 1 9 8 6 は、1つの21-マ-ペプチドが100%の特異性及び98%の感度を示す(A I D S の患者から取られた228種の血清陽性サンプルのうち、224種がこのペプチドに対して陽性であることが見出された)一連のオーバーラップペプチド(たとえばSmithなど、によって発見されたE 3 2 及びE 3 4 ペプチドのアミノ酸残基)を記載する。

40

【 0 0 0 9 】

1987年11月13日に出願されたアメリカ特許出願第120,027号においては、A I D S ウイルスにより感染された患者の抗体と免疫反応する、gp 4 1 (H I V - 1)の残基606~620(SGKLICTTAVPWNAS)を包含する短い合成ペプチドが開示される。この例においては、特異性がまた卓越している(63/63)が、しかし57種の確かな陽性のうち6種の血清陽性検体が検出され得なかった(89%の感度)。

50

【 0 0 1 0 】

Gnannなど、*J. Virol.* 61 : 2639 ~ 2641, 1987及び*J. Infec. Dis.* 156 : 261 ~ 267, 1987はまた、gp41(HIV-1)の免疫優性領域から一連のオーバーラップペプチドを報告する。配列SGKLC(606 ~ 611)を有する1つのペプチドが試験される22 HIV-1陽性血清のいづれとも免疫反応しなかったそれらの発見が特に興味あるものであった。N-末端へのシステイン残基の付加はある免疫反応性を回復した。すなわち44種の血清のうち21種が7-マーのペプチドと反応した(48%の感度)。Gnannなどは、cys-605がgp41-(HIV-1)タンパク質のセグメントの免疫反応性のために不可欠であることの結論を下した。

【 0 0 1 1 】

Gnannなどはまた、gp41(HIV-1)の位置605及び611(Ratnerの番号システム)でのシステイン残基が、ジスルフィド結合を通してのループの形成によりたぶんタンパク質のこの領域の抗原立体配座に臨界的な役割をはたすことができることを推定した。しかし、ジスルフィド結合の形成を同定し、そして証明するための著者による試みは失敗した。Gnannなどは、それらが一部のアミノ酸配列605 ~ 611(ここで2個の末端のシステイン基はジスルフィド結合により結合されている)を含む合成ペプチドを有することを決して示さなかったので、そのようなジスルフィド結合を有するペプチドの性質は不明であり且つ推定できない。

【 0 0 1 2 】

位置605 ~ 611で2個のシステイン残基を含む7-アミノ酸の一部の配列は、国際公開番号 WO 86 / 06414として1986年11月6日に発表されたPCT / US 86 / 00831のような他の記録に開示されていて、ここで約bp7516 ~ 7593の領域によりコードされるペプチドX(39)及び約bp7543 ~ bp7593の領域によりコードされるペプチドVIII(79)の両者は、上記刊行物においてGnannなど、により論じられた7-アミノ酸配列(アミノ酸605 ~ 611)を含む。そのペプチドは線状ペプチドとして報告され、そしてその著者は、環状構造のいづれの形成をも言及していない。

【 0 0 1 3 】

国際公開番号 WO 87 / 06005として1987年10月8日に発表されたPCT / US 87 / 00577においてRosenなどは、HIV-1のエンベローブ糖タンパク質(gp41)のCys(605) - Cys(611)を包含する一連の合成ペプチドが、中性又は塩基性水性緩衝液中での溶解に基づいて一連の自発的な酸化形質転換を受けることを報告している。その発明者は、これらの条件下で、ELISAに使用されるペプチドが線状モノマー、環状モノマー、線状又は環状ダイマー及び種々の長さの線状ポリマーのランダム混合物であることを推定している。しかしながら、その発明者は、環状成分の存在を証明せず、そして存在する他の種々のダイマー及びポリマーを特徴づけていず、そして彼らは、そのポリマー形がELISA試験における反応性のために最っとも重要な成分であることを推定している。

【 0 0 1 4 】

Gnannなど、*Science* 237 : 1346 ~ 1349, 1987は、gp41(HIV-1)上の1つに相同する領域に2つのシステイン、たとえばCys(605)及びCys(611)を含むgp42(HIV-2)の残基592 ~ 603を包含する短い線状合成ペプチドを報告する。このペプチドは、HIV-2により感染された患者から取られた5種の血清のうち5種と反応した。

【 0 0 1 5 】

【 発明が解決しようとする課題 】

上記引用文献は、HIV-1抗体を同定することにおいて有用であるペプチドを提供するけれども、それらはまた、陽性の血清サンプルを完全(100%)に検出できないようなある欠点をも示す。たとえば、Gnannなど、*J. Virol.* 61 : 2639 ~ 2641 (1987)は、600 ~ 611のアミノ酸配列に関するそれらの試験において、22種の陽性血清のうち22種すべてを検出し、そして彼らはまた、Centers for Disease Control

10

20

30

40

50

、Atlanta, Gaでの他の発明者に行なわれた、その同じ12-アミノ酸配列(600~611)に関する類似する試験が79種の陽性血清のうち78種を検出したことを述べている。J. Infect. Dis., 156:261~267, 1987においてその同じ著者は、gp41-(HIV-1)からの同じ12-アミノ酸配列が、アメリカ合衆国からの132人のHIV-1感染患者のうち131人と反応することを示した。

【0016】

同じ文献において、HIV-1陽性血清が500倍以上に希釈される場合、これらの希釈された血清のいくつかは、低感度を示す陰性であることが見出された。

【0017】

他の欠点は、被覆段階の間、システインを含むペプチドの多くの酸化形の形成に起因する十分に定義されていず且つ推定できない混合物のELISAにおける使用である。 10

【0018】

ひじょうに低レベルの抗体が存在する場合でさえ、HIV-1及び/又はHIV-2抗体を含むすべてのサンプルを正常な試験条件下で陽性として検出できる十分に定義された構造の最終生成物のみをELISAに使用するために、被覆段階の間、自発的な酸化に耐性であるペプチド又はペプチド混合物を提供することがひじょうに所望されるように思われる。

【0019】

【課題を解決するための手段】

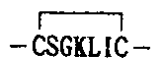
本発明によれば、HIV-1及びHIV-2抗体を100%検出することに特に適合され、そして血清がひじょうに希釈される場合でさえ、すべてのHIV-1抗体を完全に検出できる新規の一連のペプチド又はアミノ酸配列が提供される。 20

【0020】

より詳しくは、本発明の新規ペプチドは、586~629のいずれかのアミノ酸配列(gp41-HIV-1)を含んで成り、ここでいずれか選択されたアミノ酸配列において、次の一部配列：

【0021】

【化1】



605 611

30

【0022】

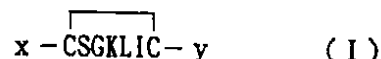
を提供するためにジスルフィド結合により結合される、605~611のアミノ酸配列のそれぞれの末端でシステイン残基を含むアミノ酸配列が常に存在する。

【0023】

さらにより詳しくは、本発明の新規の環状ペプチドは、その中に下記一般式：

【0024】

【化2】



40

【0025】

〔式中、xはアミノ末端、1つのアミノ酸又はアミノ酸604から始まり、そしてアミノ酸586まで戻るアミノ酸配列(gp41-HIV-1)を表わし；そしてyはカルボキシル末端、1つのアミノ酸又はアミノ酸612から始まり、そしてアミノ酸629まで延びるアミノ酸配列(gp41-HIV-1)を表わす〕で表わされるアミノ酸配列605~611(gp41-HIV-1)を含んで成る。

【0026】

より特定には、xは586から604まで延びる次のアミノ酸配列(gp41-HIV-1) 50

の 1 つを表わし :

G

WG

IWG

GIWG

LGIWG

LLGIWG

QLLGIWG

QQLLGIWG

DQQLLGIWG

KDQQLLGIWG

LKDQQLLGIWG

YLKDQQLLGIWG

RYLKDQQLLGIWG

ERYLKDQQLLGIWG

VERYLKDQQLLGIWG

AVERYLKDQQLLGIWG

LAVERYLKDQQLLGIWG

ILAVERYLKDQQLLGIWG

RILAVERYLKDQQLLGIWG

そして y はカルボキシル基又は 6 1 2 から 6 2 9 まで延びる次の 1 又は複数のアミノ酸配列 (gp 4 1 - H I V - 1) を表わす :

T

TT

TTA

TTAV

TTAVP

TTAVPW

TTAVPWN

TTAVPWNA

TTAVPWNAS

TTAVPWNASW

TTAVPWNASWS

TTAVPWNASWSN

TTAVPWNASWSNK

TTAVPWNASWSNKS

TTAVPWNASWSNKSL

TTAVPWNASWSNKSLE

TTAVPWNASWSNKSLEQ

TTAVPWNASWSNKSLEQG

TTAVPWNASWSNKSLEQGC

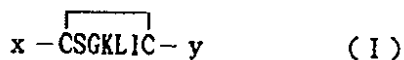
TTAVPWNASWSNKSLEQI。

【 0 0 2 7 】

下記の一般式 (I) :

【 0 0 2 8 】

【 化 3 】



【 0 0 2 9 】

10

20

30

40

50

〔式中、 x 及び y は前記に定義された通りである〕

で表わされる少なくとも1つのペプチド及び

- 497から518まで延びるアミノ酸配列(gp120 HIV-1)により特徴づけられるgp120のペプチド、又は

- 497から518まで延びるアミノ酸配列(gp120 HIV-1)により特徴づけられるgp120のペプチド及び241から263まで延びるアミノ酸配列(p24 HIV-1)により特徴づけられるp24のペプチド、又は

- 497から518まで延びるアミノ酸配列(gp120 HIV-1)により特徴づけられるgp120のペプチド及び586から620まで延びるgp41 HIV-1のペプチドの組合せ又は混合物もまた本発明の範囲内に存在する。

10

【0030】

本発明によれば、HIV-2により感染された少数の患者から取られた血清の100%を同定することに有用である一連の新規ペプチド又はアミノ酸配列もまた提供される。HIV-1及び/又はHIV-2の両者を検出するために本発明に記載されたペプチド又はペプチドの混合物のいくらかを使用することが可能である。

【0031】

より詳しくは、本発明の新規ペプチドは、578~613のいずれかのアミノ酸配列(gp42-HIV-2として言及されるであろう推定上のgp41.7)を含んで成り、ここでいづれか選択されたアミノ酸配列において、次の一部配列：

【0032】

【化4】



597 603

20

【0033】

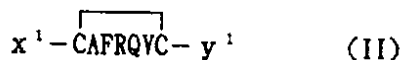
を提供するためにジスルフィド結合により結合される、597~603(gp42-HIV-2)のアミノ酸配列のそれぞれの末端でシステイン残基を含むアミノ酸配列が常に存在する。

【0034】

さらにより詳しくは、本発明の新規の環状ペプチドは、その中に下記一般式(II)：

【0035】

【化5】



30

【0036】

〔式中、 x^1 はアミノ末端、1つのアミノ酸又はアミノ酸596から始まり、そしてアミノ酸578まで戻るアミノ酸配列(gp42-HIV-2)を表わし；そして y^1 はカルボキシル末端、1つのアミノ酸又はアミノ酸604から始まり、そしてアミノ酸613まで延びるアミノ酸配列(gp42-HIV-2)を表わす〕で表わされるアミノ酸配列(gp42-HIV-2)を含んで成る。

40

【0037】

より特定には、 x^1 は578から596まで延びる次のアミノ酸配列(gp42-HIV-2)の1つを表わし：

G

WG

SWG

NSWG

LNSWG

50

RLNSWG

ARLNSWG

QARLNSWG

DQARLNSWG

QDQARLNSWG

LQDQARLNSWG

YLQDQARLNSWG

KYLQDQARLNSWG

EKYLQDQARLNSWG

IEKYLQDQARLNSWG

10

AIEKYLQDQARLNSWG

TAIEKYLQDQARLNSWG

VTAIEKYLQDQARLNSWG

RVTAIEKYLQDQARLNSWG

そして y^1 は 604 から 613 に延びる次のアミノ酸配列 (gp42 - HIV - 2) の 1 つを表す :

H

HT

HTT

HTTV

20

HTTVP

HTTVPW

HTTVPWV

HTTVPWVN

HTTVPWVND

HTTVPWVND_S。

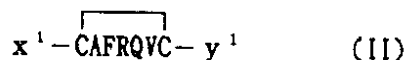
【0038】

下記一般式 (II) :

【0039】

【化6】

30



【0040】

〔式中、 x^1 及び y^1 は前記に定義された通りである〕で表わされる少なくとも 1 つの合成ペプチド及び外部エンペローブ糖タンパク質 (EGP) の及び 486 から 508 まで延びるアミノ酸配列により特徴づけられるペプチド 203 と呼ばれるペプチド、又は EGP の及び 486 から 501 まで延びるアミノ酸配列により特徴づけられるペプチド 204 と呼ばれるペプチドの組合せまたは混合物もまた、本発明の範囲内にある。

【0041】

40

さらに、前記定義された gp120 及び / 又は p24 及び / 又は EGP アミノ酸配列の 1 又は複数の線状ペプチドの不在又は存在中で、式 I の少なくとも 1 つのペプチド及び式 II の 1 つのペプチド (ここで、 x 、 y 、 x^1 及び y^1 は前記の通りである) を含んで成る合成ペプチドの組合せを使用することもまた、本発明の範囲内にある。

【0042】

本発明の新規混合物の 1 つの意外な利点は、それらが、1378 人の HIV - 1 陽性の被検者及び 5 人の HIV - 2 陽性の被検者から成る大パネルの血清に由来する HIV 抗体の完全な検出を提供することができることである。もう 1 つの利点は、最少の誤った陽性をもたらす本発明の混合物により保持される高レベルの特異性である。

【0043】

50

【発明の実施の形態】

(合成のためのペプチドの選択)

ペプチドが、H I V - 1 単離体の既知のアミノ酸配列及び保存される領域の知識に基づく合成のために選択された。つい最近、H I V - 2 (最近出願した新しいウイルスである)は、H I V - 1 との相当の相同性を共有することが示された。従って、H I V - 1 及び/又はH I V - 2 の両者を検出するために本発明に記載されるペプチド又はペプチドの混合物を使用することが可能である。

【0044】

既知のアミノ酸配列の他に、ポリペプチドの一部が表面配向され、そして従って免疫原性であることを推定することを助ける種々の生理化学的原理を用いることによって、可能性あるエピトープが選択される。これらは、Hopp and Woods(Proc. Nat. Acad. Sci. 78, 3824 ~ 3828, 1981)の親水性プロット及びKyte and Doolittle(J. Mol. Biol. 157, 105 ~ 132, 1982)による類似するアプローチを含む。また、タンパク質立体配座の実験的な推定(Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem., 47, 251 ~ 276, 1978)は、そのポリペプチドの一部が免疫原性であることを推定することにおいて有用なガイドである。これらの理論的なアプローチは有用なガイドであるけれども、本発明の研究の間、発見された多くの例外が存在する。

【0045】

多くの場合、免疫診断試薬としてより有用なペプチドを製造するためには、その抗原特性を変えないで、天然に存在する配列を変性することが所望される。そのような変性とは、
 - ヘテロ二価性架橋試薬、たとえばスルホスクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル)ブチレート(結合をもたらすための好ましい試薬)によりキャリアタンパク質へのペプチドの結合を促進するためにアミノ又はカルボキシル末端でのシステイン残基の付加；
 支持ペプチド又は大きなペプチドへの結合のために又はペプチドの物理的又は化学的性質を変性するために、ペプチドのお互いの結合を促進するためのオリゴペプチドのCOOH又はNH₂末端でのあるアミノ酸の付加を含む。そのような変性は、エステル化反応を通してリンカーとして使用され得るチロシン、グルタミン酸又はアスパラギン酸の付加により、及びシッフ塩基又はアミド形成、すなわち末端 - NH₂アシル化、チオグリコール酸アミド化、末端 - COOHアミド化による誘導体化、たとえばアンモニア、メチルアミン形成により結合され得るリシンの付加によりもたらされる。これらの修飾は、ペプチド上の実効電荷の変化をもたらし、そしてまた、固体支持体、キャリアー又は他のペプチドへのそのペプチドの共有結合も促進することができる。これらの修飾は、ペプチドの免疫反応性の変化をもたらさない。すなわち、自発的に酸化する傾向があるアミノ酸であるメチオニンが、抗原性を変えないでノルロイシンにより通常置換され得る。

【0046】

ペプチド配列は、種々の変化、たとえば挿入、欠失及び置換(保存性又は非保存性のいづれか)にゆだねられ得、そしてそのような変化は、それらの使用においてある利点を提供するであろう。これらの変化は、たとえばgly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; ala, ser; ala, thr; ala, val; ala, pro; ala, glu; leu, gln; gly, phe; ile, ser; 及びile, metの組合せを含む。

【0047】

ペプチドの受動的な吸収を促進するために少数(1 ~ 10)の疎水性アミノ酸から成る“テール”を固体支持体に付加することが便利である。この修飾は、COOH又はNH₂末端のいづれかで行なわれ得る。好ましい付加はphe - ala - phe - ala - pheである。

【0048】

本発明によれば、H I V - 1 抗体の検出のために有用な選択された環状ペプチドは、586 ~ 629のアミノ酸配列(gp41 - H I V - 1)を含んで成るペプチドであり、ここでいづれかの選択されたアミノ酸配列においては、式Iの環状ペプチドを提供するためにシステイン残基がジスルフィド結合により、605 ~ 611のgp41 - (H I V - 1)アミノ酸配列のそれぞれの末端で結合されているアミノ酸配列が常に存在する。好ましい環状ペ

10

20

30

40

50

チドは、次の条件のペプチドである：

x が NH_2G であり、そして y が $\text{TTAVPWNAS} - \text{COOH}$ (80) であり；

x が $\text{NH}_2 - \text{RILAVERYLKDQQLLGIWG}$ - であり、そして y が $- \text{TTAVPWNAS} - \text{COOH}$ であり (87c)；

x が $\text{NH}_2 - \text{VERYLKDQQLLGIWG}$ - であり、そして y が $- \text{TTAVPWNAS} - \text{COOH}$ であり (88)；

x が $\text{NH}_2 - \text{G}$ であり、そして y が $- \text{TTAVPWNASWSNKSLEQGC} - \text{COOH}$ であり (103)、そして

x が $\text{NH}_2 - \text{G}$ であり、そして y が $- \text{TTAVPWNASWSNKSLEQI} - \text{COOH}$ である (96)。

【0049】

また、本発明によれば、HIV-2 抗体の検出のために有用な選択された環状ペプチドは、578 ~ 613 のアミノ酸配列 (gp42 - HIV-2) を含んで成るペプチドであり、ここでいづれかの選択されたアミノ酸配列においては、式IIの部分配列を提供するために、システイン残基がジスルフィド結合により 597 ~ 603 のアミノ酸配列 (gp42 - HIV-2) のそれぞれの末端で結合されているアミノ酸配列が常に存在する。

【0050】

本発明の式(II)の好ましい環状ペプチドは、次の条件のペプチドである：

x^1 が $\text{NH}_2 - \text{RVTAIEKYLQDQARLNSWG}$ - であり、そして y^1 が $- \text{CONH}_2$ であり (ペプチド146)；

x^1 が $\text{NH}_2 - \text{QDQARLNSWG}$ - であり、そして y^1 が $- \text{HTTVPWVNDNS} - \text{CONH}_2$ であり (ペプチド147)；

x^1 が $\text{Ac} - \text{QDQARLNSWG}$ - であり、そして y^1 が $- \text{CONH}_2$ であり (ペプチド200)；

x^1 が NH_2G - であり、そして y^1 が $- \text{HTTVPWVNDNS} - \text{COOH}$ であり (ペプチド201)；そして

x^1 が $\text{NH}_2 - \text{RVTAIEKYLQDQARLNSWG}$ - であり、そして y^1 が $- \text{HTTVPWVNDNS} - \text{COOH}$ である (ペプチド202)。

【0051】

最っとも好ましい環状ペプチドは、ペプチド80, 87c, 146, 147, 200, 201 及び 202 である。

【0052】

表1は、本発明の好ましい環状ペプチドのために、Ratnerなど、Nature 313: 277 ~ 284 (1985) により公表された配列に基づいてのHIV-1のためのアミノ酸の位置番号及びGuyaderなど、Nature 326: 662 ~ 669 (1987) により公表された配列に基づいてのHIV-2のためのアミノ酸の位置番号を提供する。

【0053】

【表1】

10

20

30

ペプチド番号

アミノ酸の位置番号：

	gp41-HIV-1	gp42-HIV-2	
80	604-620		
87c	586-620		
88	590-620		
103	604-628-GC		
96	604-629		
146		578-603	10
147		587-613	
200		587-603	
201		596-613	
202		578-613	

【0054】

同定される領域は、HIV-1及びHIV-2に対する抗体を検出することにおいてひじょうに免疫反応性であるので、いずれかHIV単離体のその対応する領域がまた興味の対象であることは明らかである。同様に、HIVの他の単離体又は他の血清タイプに見出される配列もまた、本発明の範囲内にある。 20

【0055】

1又は2個のチオールを含有する残基、たとえばシステインを線状ペプチド配列に付加し、それによって対応する環状ペプチドの調製のために残基を付与することもまた、本発明の範囲内にある。

【0056】

一般的に言えば、脱アミノ-ジカルバ相同体が、gp41-(HIV-1)の位置611又はgp42-(HIV-2)の位置603でアミノスベリン酸(Asu)によるジスルフィド架橋に含まれる2個のシステインの置換により合成され得る。

【0057】

複数のペプチド配列を共有結合し、又は複数のペプチドから成るポリマーを形成することが所望される。そのような変性は、抗原性を失わないで固体表面上への抗原の受動的吸着を促進せしめることができる。 30

【0058】

(線状及び環状ペプチドの調製)

樹脂支持体は、ポリペプチドの固相調製のために当業界において通常使用される適切な樹脂であり、好ましくはp-ベンジルオキシアルコールポリスチレン及びp-メチルベンジドリルアミン樹脂である。初めの保護されたアミノ酸の樹脂支持体への結合に続いて、アミノ保護基が、当業界で従来使用されている固相ペプチド合成の標準方法により除去される。アミノ保護基の除去の後、残る保護されたアミノ基及び必要なら、側鎖を保護されたアミノ酸が、所望する生成物を得るために引き続いて結合される。他方、多重アミノ酸基が、樹脂支持性アミノ酸配列との結合の前、溶液方法を用いて結合され得る。 40

【0059】

適切な結合試薬の選択は、当業界で確立している。たとえば、適切な結合試薬は、単独で又は好ましくは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下でN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド又はN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)である。もう1つの有用な結合方法は、保護されたアミノ酸の予備形成された対称無水物を使用する。

【0060】

成長するポリペプチド鎖上に導入されるそれぞれのアミノ酸のために使用される必要なアミノ保護基は、好ましくは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)である 50

。しかしながら、保護基が結合条件下で分解せず、そして成長分子にすでに存在するいづれか他の保護基の存在下で選択的に容易に除去できるかぎり、どんな保護基でも使用され得る。

【 0 0 6 1 】

側鎖アミノ酸のための基を選択するための基準は次の条件である：(a) 合成のそれぞれの段階で - アミノ保護基の除去のための選択的な反応条件下での種々の試薬に対する保護基の安定性：(b) 保護基はその戦略的特性を保持すべきであること(すなわち、結合条件下で分離しないこと)及び(c) 保護基は、ポリペプチド合成の終結後及びポリペプチド構造に影響を及ぼさない条件下で容易に除去できるべきであること。

【 0 0 6 2 】

完全に保護された樹脂支持性ペプチドは、適切なスカベンジャー、たとえばアニソール、チオアニソール、エチルメチルスルフィド、1, 2 - エタンジチオール及び関連する試薬の存在下で室温で1 ~ 6時間、塩化メチレン中、トリフルオロ酢酸の50 ~ 60% 溶液によりp - ベンゼルオキシアルコール樹脂から分離される。同時に、ほとんどの酸不安定側鎖保護基が除去される。より酸耐性の保護基は、HF処理により除去される。

【 0 0 6 3 】

本発明の環状ペプチドは、当業界で一般的に知られているペプチド合成の次の技法により、保護された又は保護されていないSH - 基のジスルフィド結合への直接的な酸化転換により調製される。好ましい方法とは、フェリシアン化カリウムによる遊離SH - 基の直接的な酸化を包含する。そのような環状ペプチドは、抗体への結合を助けることができ、より固定されたコンホメーションを取る。システイン - システインのジスルフィド結合が天然のウィルスタンパク質に存在するかどうかは知られていない。

【 0 0 6 4 】

(ペプチド混合物)

1378人のHIV - 1陽性被検者及び5人のHIV - 2陽性被検者の血清に由来するHIV抗体の完全な検出を提供することが見出されている環状及び線状ペプチドの混合物もまた、本発明の範囲内にある。また、本発明の新規混合物は、最少数の誤った陽性をもたらす高レベルの特異性を提供することが見出された。

【 0 0 6 5 】

さらに、本発明の混合物は、下記一般式：

【 0 0 6 6 】

【化7】



【 0 0 6 7 】

〔式中、x及びyは前記定義通りである〕で表わされる少なくとも1種の環状ペプチド及び

- gp120の線状ペプチド、又は

- gp120の線状ペプチド、p24の線状ペプチド及びgp41の線状ペプチド、又は

- gp120の線状ペプチド及びgp41の線状ペプチドを含んで成る。

【 0 0 6 8 】

本発明の他の混合物は、下記一般式：

【 0 0 6 9 】

【化8】



【 0 0 7 0 】

〔式中、x¹及びy¹は前記定義通りである〕で表わされる少なくとも1種の環状ペプチド

10

20

30

40

50

及びH I V - 2のE G Pの線状ペプチドの1つを含んで成る。

【0071】

gp41 - (H I V - 1)及びgp42 - (H I V - 2)に由来する環状ペプチドがひじょうに保存され且つ免疫優性の領域をまねたとしても、gp41の他のペプチド配列及びH I Vの他の2種の免疫原タンパク質からのいくらかを含むことは、より安全であることが見出された。そのような感染された個人の血清中に含まれる抗体がもはや環状ペプチドに結合できない程度に突然変異がこのエピトープを変性する場合、この血清は、アッセイシステムに含まれる他のエピトープに対して向けられた他の抗体によりなお陽性であることが見出された。しかしながら、混合物に使用され得るペプチドの数は限定される。まず第1に、多過ぎる異なったペプチドは、誤った陽性結果の割合を高めるであろう。特に、p24タンパク質の多くのペプチドは、しばしば許容できない低い特異性を招くことが見出された。第2に、混合物中における多過ぎるペプチドの付加は、免疫優性ペプチドを希釈し、そして試験の感度を低めるであろう。

10

【0072】

より特定には、gp120の線状ペプチドは、497~518のアミノ酸配列を有し、そして次の式：

$\text{NH}_2 - \text{CGKIEPLGVAPTAKRRVVQREKR} - \text{COOR} (71)$ に相当する。

【0073】

p24の線状ペプチドは、241~263のアミノ酸配列を有し、そして次の式：

$\text{NH}_2 - \text{CGSTLQEQIGWNTNPPIPVGEIYK} - \text{COOH} (61)$ に相当する。

20

【0074】

E G P (H I V - 2)の線状ペプチドは、486~501のアミノ酸配列(ペプチド204)又は486~508のアミノ酸配列(ペプチド203)を有し、そしてそれぞれ次の式：

$\text{NH}_2\text{LVEITPIGFAPTKEKRYSSAHGR} - \text{COOH} (203)$ 又は

$\text{NH}_2\text{LVEITPIGFAPTKEKR} - \text{COOH} (204)$ に相当する。

【0075】

(H I V抗体の検出)

本発明のペプチド及びペプチド混合物は、当業界において良く知られている方法に従ってA I D S 関連抗体の検出のための診断試薬として使用される。A I D S に対する抗体の決定における本発明のペプチドの主な利点は、これまで使用されて来た既知の抗原と比べてのそれらの特異性にある。

30

【0076】

A I D S ウィルスに対する抗体の決定のための1つの方法に従えば、いわゆる“ウェスタンブロット”分析が使用される(Towbin, H., Staehelin, Th. and Gordon, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 76, 4350~4354 (1979))。この方法によれば、本発明のペプチド又は複数のペプチドがニトロセルロース紙上に適用される。このニトロセルロース紙は含浸され、そして次に試験されるべき血清により処理される。洗浄の後、そのニトロセルロース紙は、酵素によりラベルされた抗 - ヒトI g G により処理される。次に、その酵素活性が適切な基質により決定される。もちろん他の放射性ラベル又は蛍光ラベルも使用され得る。

40

【0077】

本発明のペプチド又はペプチド混合物を用いてのA I D S ウィルスに対する抗体の決定のための好ましい便利且つ従来の方法は、酵素結合性免疫吸着アッセイ(E L I S A)である。この試験によれば、本発明のペプチド又はペプチド混合物が、マイクロタイタープレートの壁上に吸着される。次に、その壁は、試験されるべき血清により処理される。洗浄の後、ペルオキシダーゼによりラベルされた抗 - ヒトI g G がその壁に付加される。そのペルオキシダーゼの決定は、対応する基質、たとえばo - フェニレンジアミンにより行なわれる。また、この方法において、ペルオキシダーゼは、他のラベル、たとえば放射性又は蛍光ラベルにより交換され得る。

【0078】

50

E L I S A 試験においては、個々のペプチド又はその組合せを使用することが可能である。誤った応答の原因となる抗体を同時に排除しながら、抗体を検出するための最っとも効果的なペプチドを組合すことを可能にするので、後者が好ましい。いくつかの血清サンプルが、抗原として個々のペプチドとの不確かな応答を示しながら、ペプチドの混合物との正しい陽性結果を示すことが、これらの研究の間、発見された。従って、H I V 抗体のための信頼すべき試験は、ペプチド抗原の適切な組合せによってのみ達成され得る。

【 0 0 7 9 】

本発明のペプチド又はペプチド混合物による、A I D S ウィルスに対する抗体の決定のためのもう1つの方法は、いわゆる“二抗原 - サンドイッチ法”による酵素免疫試験である。この方法は、Immunologocal Methods 20 : 25 ~ 34 (1978) に記載される M a i o l i n i , R . I . の研究に基づかれている。この方法によれば、試験されるべき血清が、本発明のペプチド又はペプチド混合物が被覆されている固相(捕獲層)及びペルオキシダーゼによりラベルされている本発明のペプチド又はペプチド混合物(プローブ層)と接触せしめられる。その免疫反応は、1又は2段階で行なわれ得る。その免疫反応が2段階で行なわれる場合、洗浄段階が2回のインキュベーションの間で行なわれる。免疫反応の後、洗浄段階が行なわれる。その後、ペルオキシダーゼが、基質、たとえばo - フェニレンジアミンにより決定される。

【 0 0 8 0 】

適切な固相は、有機及び無機ポリマー〔アミラーゼ、デキストラン、天然又は変性されたセルロース、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、アガロース、磁鉄鉱、多孔性ガラス粉末、ポリビニリデンフルオリド(Kynar)及びラテックス〕、試験容器(試験管、タイタープレート又はガラス又は人工的な材料のキュベット)の内壁及び固体物(ガラス及び人工的な材料のロッド、末端が太くなったロッド、末端のローブ又はラメラを有するロッド)の表面である。ガラス及び人工的材料からの球体は、特に適切な固相キャリアである。

【 0 0 8 1 】

本発明のペプチド及びペプチド混合物は、A I D S ウィルスに対する抗体の決定において有用であるのみならず、またA I D S ウィルス自体の決定のためにも有用である。なぜならば、これらのペプチド(遊離、重合されている又は適切なキャリアに接合されている)は、A I D S ウィルスに対する抗体、特にモノクローナル抗体を誘発することにおいて有用であるからである。そのような抗体は、本発明のペプチド又はペプチド混合物の十分な量を哺乳類又は鳥類に注射し、そして前記動物の血清から前記抗体を回収することによって産生され得る。

【 0 0 8 2 】

抗体を誘発するための適切な宿主動物は、哺乳類、たとえばウサギ、ウマ、ヤギ、テンジクネズミ、ラット、マウス、ウシ、ヒツジ、等を包含する。

【 0 0 8 3 】

一般的に知られている種々の方法は、A I D S ウィルス又はその一部の決定に使用される。

【 0 0 8 4 】

1つのそのような方法においては、アッセイされるべき血清サンプルの既知量、本発明の放射性ラベルされた環状ペプチド又はペプチド混合物及び本発明のラベルされていないペプチド又はペプチド混合物と一緒に混合され、そして静置される。抗体/抗原複合体が、当業界において既知の方法により、すなわち硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール、第二抗体(過剰量か又は不溶性支持体に結合されている)、デキストラン被覆性木炭及び同様のものによる処理により、結合されていない試薬から分離される。本発明のラベルされたペプチド又はペプチド混合物の濃度は結合された又は結合されていない相のいずれかにおいて決定され、そしてサンプルのA I D S 含有量は、それ自体既知の方法で標準曲線と観察されるラベルされた成分のレベルとを比較することによって決定され得る。

【 0 0 8 5 】

もう1つの適切な方法は、“二抗体サンドイッチアッセイ”である。このアッセイによれば、試験されるべきサンプルが2種の異なった抗体により処理される。これらの抗体の1つはラベルされ、そして他は固相上に被覆される。固相として、本明細書において前で言及されたものが考慮される。適切なラベルは、酵素、たとえばペルオキシダーゼ、放射性ラベル又は蛍光ラベルである。好ましい固相はプラスチックビーズであり、そして好ましいラベルは、ホースラディッシュペルオキシダーゼである。種々の抗体が、種々の動物、たとえばヒツジ及びウサギを免疫化することによって高められ得る。

【0086】

もう1つの方法は、モノクローナル抗体を産生するための良く知られた Koehler and Milstein 技法を用いることにある。同じ抗原に対して(但し異なったエピトープに対してではない)向けられるモノクローナル抗体を識別するために、Stahli など、J. Immunological Methods 32: 297~304 (1980) の方法が使用され得る。

10

【0087】

もちろん、抗血清(ポリクローナル抗体)及びモノクローナル抗体を使用することも可能である。

【0088】

“二抗体サンドイッチ法”によれば、サンプルが、固相抗体及びラベルされた抗体と共にインキュベートされる。まず、固相抗体によりサンプルを処理し、そして洗浄の後、ラベルされた抗体によりサンプルを処理することが可能である。しかし、まず固相抗体によりサンプルを処理し、そして一定の時間の後、ラベルされた抗体により処理することも可能である。さらに及び好ましくは、固相抗体及びラベルされた抗体により一緒にサンプルを処理することが可能である。

20

【0089】

免疫反応の後、洗浄段階が行なわれる。洗浄の後、当業界で既知の方法に従って、ラベルが決定される。ラベルとしてペルオキシダーゼが使用される場合、その決定は、基質、たとえばフェニレンジアミン又はテトラメチルベンジジンにより行なわれる。ラベルされた成分の量は、サンプル中に存在する抗原の量に比例する。

【0090】

AIDS ウィルス又は AIDS ウィルスに対する抗体の決定のための上記のような方法は、容器中に、本発明の環状ペプチド又は AIDS ウィルスに対する抗体(本発明の環状ペプチド又は環状及び線状ペプチドの混合物により誘発された)を含んで成る適切な試験キットで行なわれ得る。

30

【0091】

さらに、本発明の環状ペプチド及び本発明の環状及び線状ペプチドの混合物は、AIDS ウィルスに対する保護免疫性を誘発できるワクチンとして使用される。投与のルート、抗原投与量、注入の回数及び頻度は、個人ごとに異なり、そして他のウィルス感染において免疫性を提供することに現在使用されている方法に匹敵することができる。ワクチンは、既知の方法に従って調製される。ワクチン組成物は、便利には、生理学的に許容できるキャリアー物質と共に組合されるであろう。そのワクチン組成物は、アジュバント又は免疫応答のいずれか他のエンハンサーを含むことができる。さらに、そのワクチン組成物は、AIDS の他に他の疾病に対する免疫性を提供するために他の抗原も含むことができる。

40

【0092】

(試験されたパネル血清)

本発明の生成物により試験されたパネル血清を、広範囲の種類の中から得、そしてそれらは、HIV-1 に対して血清陰性であることが知られている845個のサンプル及びそれに対して血清陽性であることが確認されている1378個のサンプル並びにHIV-2 に対して血清陽性であることが確認されている5個のサンプルを含む。

【0093】

表2は、血清サンプルが取られた被検体及びそれらのHIV血清学的状態の説明を示す。

【0094】

50

【表2】

H I V - 抗体のための血清状態		
H I V - 1	血清陰性	血清陽性
輸血		
受容者：		
-サラセミア	9	3
-腎臓移植	21	1
-ヘモフィルス	38	31
-他	10	2
ウィルス感染：		
-エプステイン-バーウィルス	50	0
-サイトメガロウィルス	21	7
-乳頭腫	12	0
-肝炎（非-A、非-B）	1	0
-狼瘡	21	0
-重度のリウマチ様関節炎	20	0
-同性愛者	32	37
-明示されていない	610	1297
H I V - 2		
-明示されていない	0	5
合計	845	1383

【0095】

(結果)

本発明の環状ペプチド及び1又は複数の線状ペプチドとのそれらの混合物が、種々の血清 (このいくらかは陽性であり、そして他は陰性であることが確められている) に対して、前記 E L I S A 試験に従って試験された。 30

【0096】

表3は、既知のH I V - 1陽性血清を同定することにおいて個々に評価された単一のペプチドの結果を提供する。

【0097】

表4に表3のペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0098】

表5は、既知のH I V - 2陽性血清を同定することにおいて個々に評価された単一のペプチドの結果を提供する。 40

【0099】

表6は、種々の希釈度でのいくつかの血清の結果を比較することによって、E L I S A 試験における環状ペプチド対非環状ペプチドの感度を例示するために提供される。それぞれの対内で、環状相同体はその線状相同体よりもより活性であることが注目されるであろう。これらのデータは、抗体との反応において、一定のペプチドの環状性の重要性を明確に示す。

【0100】

最近、被覆のために使用されるいくつかの条件(炭酸緩衝液、pH 9.6)において、それらの配列中に2個のシステインを有する線状ペプチドが内部環状化及び重合を受けることが見出された。表6に示される結果がH I V - 1抗体を検出することにおいて線状ペプチ 50

ドよりも環状ペプチドの卓越性を明確に示したとしても、その高められた感度は、炭酸緩衝液(pH 9.6)中に溶解された後、線状ペプチドの可能性のある環状化及び重合のために過小評価されて来た。その実験は、前記のとおり炭酸緩衝液(pH 9.6)及びまた10%酢酸(pH 2.7)中に溶解される線状87ペプチド及び環状87cペプチドによりくり返された。ペプチドのHPLC分析は、炭酸緩衝液中において、使用される線状ペプチド87が、室温でその溶液中に維持される場合、環状化及び重合を受けることを確認した。プレートに結合される線状ペプチドに対する環状ペプチドの正確な割合はまだ決定されていないけれども、環状化及び重合がマイクロタイタープレートのウエル中において生じたと思われる。

【0101】

炭酸緩衝液中において見られるのとは反して、10%酢酸中に溶解された線状ペプチド87は、HPLC及びエルマン試験によって指摘されるように線状のまま残存した。

【0102】

10%酢酸中に溶解された環状ペプチド87cは、環状のまま残存した(HPLC分析及び負のエルマン試験から)。

【0103】

この実験に使用されるプレートは、10 µg/mlでのペプチドの溶液により被覆された(表6の実験結果が0.5 µg/mlでのペプチドにより被覆されたプレートにより得られた)。4種の異なったHIV-1陽性サンプルが連続的に希釈され、そしてそれらの力価が決定された。その力価を、すでに記載されたELISA方法の条件下で1.0の吸光度を示す血液希釈度として定義した。

【0104】

表6においてすでに示されたように、環状ペプチド87cは、その対応する線状ペプチド87よりも高い感度で、HIV-1に対して特異的な抗体を検出することができることが表7において明確である。線状ペプチド87に対する環状ペプチドにより測定される感度の割合は、1, 3~2, 2の間であり、そして平均1, 8である。環状87cペプチドを用いてのELISA試験の感度が、線状ペプチド87が線状で残存し、そして環状化又は重合されない条件(酸性pH)を用いて比較される場合、これらの割合はさらに高く、3.0~4.5である。

【0105】

十分に定義された環状ペプチド87cにより被覆されたプレートの感度とペプチド87の種々のポリマーのみを含むクロマトグラフィー画分のプールにより被覆された他のプレートの感度とを比較する類似実験はまた、最大感度でのHIV-1抗体の検出において、環状ペプチド87cの卓越性を示す。これらの実験の間、バックグラウンド読みが線状ペプチド87により被覆されたプレート上で有意に高く(0.144 ± 0.010対0.006 ± 0.002)、そしてAIDS試験において十分に酸化された環状ペプチド87cを用いることの1つの利点を示すことがまた突然見出された。

【0106】

表8において、環状及び線状ペプチドの混合物は、既知のHIV陽性血清を同定することにおいて評価され、そして表9はHIV陰性血清に対するその同じ混合物の結果を示す。

【0107】

表8及び表9に使用される混合物は、次の通りである：

10

20

30

40

混合物の番号	混合物中のペプチド	
1	線状ペプチド41, 42, 56及び71	
2	線状ペプチド23, 29, 42, 56及び71	
3	環状ペプチド80及び線状ペプチド61, 71及び87	
4	環状ペプチド80及び線状ペプチド71及び87	
5	環状ペプチド80及び87c及び線状ペプチド71	
6	環状ペプチド200, 201, 202及び 線状ペプチド203及び204	10
7	環状ペプチド80, 87c, 202及び 線状ペプチド71, 203及び204。	

【0108】

これらの混合物において、ペプチド23, 29, 203及び204は、次の配列を有する：

AcNH - YGCSGKLIC - CONH ₂	(23)	
NH ₂ - CGVKNWMTETLL - COOH	(29)	20
NH ₂ - LVEITPIGFAPTKEKRYSSAHGR - COOH	(203)	
NH ₂ - LVEITPIGFAPTKEKR - COOH	(204)。	

【0109】

表10は、167種のHIV-1陽性血清及び51種のHIV陰性血清をアッセイすることにおける本発明の混合物4とウェスタンブロット試験との間の試験の比較を示す。その結果は、ELISA試験における本発明の混合物4がウェスタンブロット試験よりも高い感度及び特異性を与えることを示す。

【0110】

表11は、822種のHIV-1陽性血清及び114種のHIV陰性血清をアッセイすることにおける免疫蛍光アッセイを示す。その結果は、ELISA試験における混合物4が免疫蛍光アッセイよりも高い感度及び特異性を与えることを示す。

【0111】

表3から表11まで以下にまとめて記載する。

【0112】

【表3】

HIV-1陽性血清を同定することにおけるペプチドの効力

ペプチド番号	HIV-1タンパク質	正しく同定された%陽性血清	試験された陽性血清の合計
42	gp41	5	73
56	gp41	100	17
77	gp41	100	37
78	gp41	100	37
80	gp41	100	34
81	gp41	100	34
87	gp41	99	149
87c	gp41	99	114
88	gp41	100	14
91	gp41	94	32
95	gp41	100	14
96	gp41	100	14
97	gp41	100	13
98	gp41	100	14
99	gp41	100	15
103	gp41	100	13
14	gp120	50	10
71	gp120	83	186
93	gp120	37	29
40	p24 遊離	0	11
	結合された	87	15
41	p24 遊離	63	11
	結合された	73	15
46	p24 遊離	0	15
	結合された	93	15
61	p24 遊離	100	3
64	p24 遊離	33	9

【 0 1 1 3 】

【 表 4 】

10

20

30

40

ペプチド番号		アミノ酸番号	
42NH ₂ -TTAVPWNASWSNKSLEQGC-COOH	gp41	612-628-GC	
56NH ₂ -SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQGC-COOH	gp41	606-628-GC	
77NH ₂ -GCSGKLICTTAVPWNAS-COOH	gp41	604-620	
78NH ₂ -IWGCSGKLICTTAVPWNAS-COOH	gp41	602-620	
81NH ₂ -VERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS-COOH	gp41	590-620	
87NH ₂ -RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS-COOH	gp41	586-620	
91NH ₂ -FAFAFGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQI-COOH	gp41	FAFAF-604-629	10
95NH ₂ -GCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQI-COOH	gp41	604-629	
97NH ₂ -CGYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQI-COOH	gp41	CG-593-629	
98NH ₂ -CGLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQI-COOH	gp41	CG-600-629	
99NH ₂ -CGVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQI-COOH	gp41	CG-590-629	
14NH ₂ -GHACVPTDPNPQEVVL-COOH	gp120	78-93	
71NH ₂ -CGKIEPLGVAPTAKRRRVVQREKR-COOH	gp120	CG-497-518	
93NH ₂ -TDADRRVVGREDRGAVGIGALFLGFLGAAGSG-COOH	gp120	513-535-GC	
41NH ₂ -CGNNPPIPVGE-COOH	p24	CG-252-260	20
46NH ₂ -CGRAEQASQEVKN-COOH	p24	CG-505-515	
61NH ₂ -CGSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYK-COOH	p24	CG-241-263	

【 0 1 1 4 】

【 表 5 】

H I V - 2 陽性血清を同定することにおけるペプチドの効力

ペプチド番号	H I V - 2 タンパク質	正しく同定された%陽性血清	試験された陽性血清の合計
146	gp42	100	5
147	gp42	100	5
200	gp42	100	5
201	gp42	100	5
202	gp42	100	5
203	E G P	100	5
204	E G P	100	5

【 0 1 1 5 】

【 表 6 】

10

20

30

40

ELISAにおける環状及び非環状ペプチドの
相対的性能 (吸光度単位)

血清の 抗体	希釈度	ペプチド			
		77 対 80 (線状)	80 (環状)	87 対 87c (線状)	(環状)
M-5	1/50	1.719	2.104	1.809	>2.0
	1/100	1.459	1.881	1.685	>2.0
	1/200	1.248	1.599	1.513	>2.0
	1/400	0.959	-----	1.418	>2.0
	1/800	0.057	0.767	1.012	1.854
M-7	1/50	0.142	0.191	1.504	>2.0
	1/100	0.025	0.067	1.329	>2.0
	1/200	0.007	0.019	1.184	1.729
	1/400	0.001	0.010	0.923	1.348
	1/800	0.000	0.005	0.571	0.611
M-8	1/50	0.795	1.026	1.390	>2.0
	1/100	0.507	0.737	1.087	>2.0
	1/200	0.376	0.520	0.883	1.655
	1/400	0.209	0.340	0.593	1.064
	1/800	0.062	0.159	0.240	0.384
M-16	1/50	1.219	1.601	1.846	>2.0
	1/100	0.962	1.300	1.784	>2.0
	1/200	0.613	0.903	1.740	>2.0
	1/400	0.301	0.583	1.634	>2.0
	1/800	0.205	0.329	1.537	1.962
87V103	1/50	0.000	0.003	0.005	0.011
1428	1/50	0.926	1.047	1.463	>2.0

10

20

30

【 0 1 1 6 】

【 表 7 】

環状ペプチド対その対応する線状ペプチドにより被覆された
プレート上で測定された血清の血清力価の比較

被覆緩衝液	血清	87c、環状	87、線状	A
		(A)		B
10%酢酸 (pH2.7)	M-5	13500	4500	3.0
	M-7	9000	2300	3.9
	M-8	6300	1400	4.5
	M-16	56000	15000	3.7
炭酸塩	M-5	13500	10500	1.3
炭酸水素塩	M-7	11000	6000	1.8
0.1M (pH9.6)	M-8	6500	2900	2.2
	M-16	56000	33000	1.7

10

【0117】

【表8】

HIV陽性血清を同定することにおける
ペプチド混合物の性能

20

混合物	正しく同定された	試験された陽性血清
	%陽性血清	の合計数
1	92	117
2	83	80
3	99	171
4	100	1378
5	100	114
6	100	5
7	100	5

30

【0118】

【表9】

HIV陰性血清を同定することにおける
ペプチド混合物の性能

混合物	正しく同定された	試験された陰性血清
	%陰性血清	の合計数
1	100	14
2	100	5
3	95	21
4	99.4	845
5	100	98
6	100	10
7	100	10

40

50

【 0 1 1 9 】

【表 1 0】

	本発明の混合物 番号 4 (ELISA)	ウェスタン ブロット試験
確認されたPOS	167	158
誤ったNEG	0	8
確認されたNEG	51	46
誤ったPOS	0	5
境界線	0	1
試験された合計	218	218

10

【 0 1 2 0 】

【表 1 1】

	本発明の混合物 番号 4 (ELISA)	免疫蛍光 アッセイ
確認されたPOS	822	800
誤ったNEG	0	1
確認されたNEG	114	111
誤ったPOS	0	0
境界線	0	24
	936	936

20

【 0 1 2 1 】

結果は、既知の HIV - 1 陽性血清を正しく同定することにおけるあるペプチド混合物、特に好ましい混合物 4 及び 5 の卓越性及び既知の HIV - 2 陽性血清を正しく同定することにおける混合物 6 の卓越性並びに HIV - 1 及び HIV - 2 陽性血清サンプルの両者を正しく同定することにおける最終混合物 7 の卓越性を明確に示す。単一のペプチドよりもむしろ混合物の使用が、抗体がひじょうに限定された数のエピトープに対して向けられている低い力価の異常な血清を同定する失敗の可能性を最少にする。すべての血清陽性サンプルが ELISA により試験され、そしてウェスタンブロット又は免疫蛍光アッセイにより確認された。矛盾する場合、サンプルは、最終の対照標準として取られるラジオイムノ沈殿アッセイによりアッセイされた。

30

【 0 1 2 2 】

次の実施例は、本発明のペプチドの合成のための一般的な方法及びそのペプチドの利用を例示する。

【 0 1 2 3 】

【実施例】

実施例 1 : N - Fmocにより保護されたアミノ酸残基を担持する樹脂の調製塩化メチレン (CH_2Cl_2) 及びジメチルホルムアミド (DMF) の混合物 (4 : 1) 中、所望する N - Fmoc保護性アミノ酸残基を、 CH_2Cl_2 : DMF (4 : 1) 中、p-ベンジルオキシアルコール樹脂の懸濁液に 0 で添加した。その混合物を数秒間、手で攪拌し、そして次に N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、次いで 4 - (ジメチルアミノ)ピリジンの触媒量により処理した。その混合物を、0 でさらに 30 分間攪拌し、そして次に室温で一晩攪拌した。濾過された樹脂を、 CH_2Cl_2 、DMF 及びイソプロパノール (それぞれ 3 回) 及び最後に CH_2Cl_2 により連続的に洗浄した。その樹脂を CH_2Cl_2 中に懸濁し、氷浴中に冷却し、そしてその攪拌された懸濁液に、再蒸留されたピリジン、続いて塩化ベ

40

50

ンゾイルを添加した。攪拌を0で30分間続け、そして次に室温で60分間続けた。濾過の後、その樹脂を、 CH_2Cl_2 、DMF及びイソプロパノール(それぞれ3回)及び最終的に石油エーテル(2度)により連続的に洗浄し、その後、真空下で乾燥せしめ、一定の重量にした。Meienhoferなど、(Int. J. Peptide Protein Res., 13, 35, 1979)による置換の分光光度決定は、樹脂上の置換の程度を示した。

【0124】

実施例2：連続するアミノ酸の結合

N - Fmoc保護性第1アミノ酸残基を担持する樹脂を、Laborotec SP640 Peptide Synthesizerの反応容器中に添加し、そして次のようにして処理した：

- (1) DMFによる洗浄(それぞれ1分間、2度)、
- (2) DMF中、ピペリジンの20%溶液による予備洗浄(3分間)、
- (3) DMF中、ピペリジンの20%溶液による保護解除(10分間)、
- (4) DMFによる洗浄(それぞれ1秒間、4度)、
- (5) イソプロパノールによる洗浄(それぞれ30秒間、2度)、
- (6) DMFによる洗浄(それぞれ45秒間、2度)、
- (7) 遊離アミノ基のためのチェック - Kaiser試験(陽性であるべきである)、
- (8) そのペプチド樹脂を、所望するF - moc - 保護性アミノ酸3モル当量及び両蒸留された乾燥DMF中にすべて溶解された1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール3モル当量と共に2分間、軽く振盪すること、
- (9) 次に、固体DCC(3.3モル当量)を、反応容器に添加すること、
- (10) その反応混合物の2時間の振盪、
- (11) DMFによる洗浄(それぞれ45秒間、2度)、
- (12) イソプロパノールによる洗浄(それぞれ45秒間、2度)。

【0125】

12段階の後、ニンヒドリン試験のためにアリコートを取る。その試験が陰性である場合、次のアミノ酸の結合のために段階1に戻す。その試験が陽性であり又はわずかに陽性である場合、段階6～12をくり返す。

【0126】

本発明に記載されるペプチドのアミノ酸のそれぞれの結合のために上記スキームを用いる。FmocによるN - 保護を、合成を通して残るアミノ酸のそれぞれにより使用する。

【0127】

放射性ラベルされたペプチドを、上記結合方法を用いて ^3H - グリシンの導入により得る。

【0128】

最後のアミノ酸の付加の後、N - 末端残基のN - Fmocを、上記スキームの段階1～7に戻すことによって除去する。ペプチド樹脂を CH_2Cl_2 により洗浄し、そして真空乾燥せしめ、保護された粗ペプチドを得る。

【0129】

実施例3：保護解除及び樹脂からペプチドの切断

保護されたペプチド - 樹脂を、2.5% エタンジチオール及び2.5% アニソールを含む CH_2Cl_2 中、トリフルオロ酢酸(TFA)の5.5%溶液中に懸濁する。その混合物を N_2 によりフラッシュし、そして室温で1.5時間攪拌する。その混合物を濾過し、そしてその樹脂を CH_2Cl_2 により洗浄する。その樹脂を、 CH_2Cl_2 中、20% TFAにより室温で5分間再び処理する。その混合物を濾過し、そして樹脂を CH_2Cl_2 中、20% TFAにより洗浄し、そして次に CH_2Cl_2 により洗浄する。集められた濾液を35以下で真空蒸発せしめ、そして残留物を、乾燥ジエチルエーテルにより数度こまかくすり砕く。固形物を10%水性酢酸中に溶解し、そして粗組成物を得るために凍結乾燥する。

【0130】

arg及びcys残基を含むペプチドをさらに、アニソール及びジメチルスルフィドの存在下で0で1時間、HF処理により保護解除する。固形物を10%水性酢酸中に溶解し、そ

10

20

30

40

50

して粗組成物を得るために凍結乾燥せしめる。

【0131】

実施例4：ペプチドの精製

粗ペプチドを、移動相のグラジエントを有するC₁₈又はC₄逆相のVydacカラム(2.5 × 2.5 mm)上で分離用HPLCにより精製する。流出液を220 nmでモニターし、そして続いて分析用HPLCによりモニターする。

【0132】

適切な画分をプールし、蒸発せしめ、そして凍結乾燥せしめる。合成ペプチドの同定を、分析用逆相クロマトグラフィー及びアミノ酸分析により確認する。

【0133】

実施例5：ペプチドの環状化

フェロシアン化カリウムの溶液(0.1 M, pH 7.0)を、線状ペプチドの希釈水溶液(0.5 mM)にpH 7.0でゆっくりと添加する。室温で2時間放置した後、そのpHを5.0に下げ、そしてその溶液をイオン交換樹脂(Bio-Rad Ag-3-X4a, Cl-形)により30分間処理する。その懸濁液を濾過し、そしてその濾液を凍結乾燥せしめ、粗環状ペプチドを得る。そのペプチドを、分離用逆相HPLCにより精製し、そしてアミノ酸分析により特徴づける。環状化の証明を、環状ペプチドのHPLC移動性と出発の線状ペプチドとを比較することによって、線状ペプチドに戻る環状ペプチドのアリコート還元することによって及びまた、環状化の後、遊離スルフィド基の消失(エルマン試験)を観察することによって得る。

【0134】

環状ペプチドとそれらの対応する線状ペプチドとの間の生理化学的相違を示すために、HPLCにおける保持時間の相違を示す表12に言及する。

【0135】

【表12】

ペプチド番号	保持時間(分)
77 (1)	36.6
80 (c)	39.1
87 (1)	49.3
87c (c)	46.1
81 (1)	49.2
88 (c)	48.7
95 (1)	48.3
96 (c)	48.5

(1)：線状

(c)：環状

【0136】

実施例6：ウシ血清アルブミン又はキーホールリムペット(アオガイ)ヘモシアニンへのペプチドの接合

ペプチドを、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(Sulfo-SMPB)により前もって誘導体化されたBSA又はKLHに接合せしめる。

【0137】

スルホ-SMPB(Pierce Chemicals)の水溶液を、0.02 Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中、BSA又はKLHの溶液に添加する。その混合物を、室温で45分間振盪し、そして、活性化されたキャリアーをすぐに、0.1 Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)により平衡化されたSephadex G-25カラムに4 で適用する。

【0138】

活性化されたキャリアーに対応する、最初のピークの吸光度の画分を丸底フラスコに集め、それに0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)中、ペプチドの溶液を添加する。その混合物をN₂により十分にフラッシュし、そして室温で一晩インキュベートする。その結合効力を、3 Hによりラベルされたペプチドを用いて及び接合体のアミノ酸分析によりモニターする。

【0139】

実施例7：酵素結合性免疫吸着アッセイ(ELISA)によるHIVに対する抗体の検出
マイクロタイタープレートのそれぞれのウェルを、ペプチド又はペプチド混合物を含む溶液(5 µg/ml)100 µlにより飽和せしめ、そして一晩放置する。ウェルを空にし、そして洗淨緩衝液(Tris, 0.043 M; NaCl, 0.5 M; チメロザル、0.01% W/V; Tween 20, 0.05% V/V; pH 7.4)により2度洗淨する。次に、ウェルを、洗淨緩衝液0.35 mlにより37 °Cで1時間飽和せしめ、そして同じ緩衝液により1度洗淨する。分析されるべき血清サンプルを、検体緩衝液(洗淨緩衝液+カゼイン、0.05% W/V)により希釈する。ウェルを洗淨緩衝液によりすすぎ、その後希釈された血清サンプル(0.1 ml)を添加する。これらを室温で1時間インキュベートする。次にウェルを空にし、洗淨緩衝液によりすぐに2度洗淨し、そして次に2分間1度洗淨する。洗淨緩衝液中、1% W/Vウシ血清アルブミンにより希釈された接合体溶液(ラベルされたヒトIgGペルオキシダーゼに対するアフィニティ精製されたヤギ抗体、50% グリセロール5 ml中0.5 mg)を、それぞれのウェルに添加し(0.1 ml)、そして室温で1時間インキュベートする。次にウェルを空にし、そして急速に洗淨緩衝液により2度洗淨し、そして次に5度洗淨し、ここで緩衝液は洗淨当り2分間、ウェルを接触せしめる。基質溶液(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、DMSO 1 ml当り8 mg)を、30% H₂O₂ 0.1% V/Vを含む0.1 Mのクエン酸塩-酢酸塩緩衝液(pH 5.6)100体積により希釈し、そしてそれぞれのウェルに添加する(ウェル当り、0.1 ml)。10分後、それぞれのウェルの内容物を、2 NのH₂SO₄ 0.1 mlにより処理し、そして対450 nmで吸光度を読む。すべての測定は2度行なわれる。

【0140】

【発明の効果】

本発明によれば、HIV-2により感染された少数の患者から取られた血清の100%を同定することに有用である一連の新規ペプチド又はアミノ酸配列もまた提供される。HIV-1及び/又はHIV-2の両者を検出するために本発明に記載されたペプチド又はペプチドの混合物のいくらかを使用することが可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I
G 0 1 N 33/569 (2006.01) G 0 1 N 33/569 H

(31)優先権主張番号 281205

(32)優先日 昭和63年12月7日(1988.12.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジェルベ ドワンヌ

カナダ国, エイチ4エル 3ダブリュ5, ケベック, サンローラン オブライエン ストリート,
1735

(72)発明者 マーシャル ラクロワ

カナダ国, ジェイ4ダブリュ 3エイチ8, ケベック, プロサール クロワッサン ツーランゴー,
1925

合議体

審判長 佐伯 裕子

審判官 種村 慈樹

審判官 阪野 誠司

(56)参考文献 1. SCIENCE, Vol. 237, p. 1346 - 1349 (1987)

2. J. Virology, Vol. 61, No. 8, p. 2639 - 2641 (1987)

专利名称(译)	用于检测HIV抗体及其混合物的合成肽		
公开(公告)号	JP3851761B2	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	JP2000202472	申请日	2000-07-04
申请(专利权)人(译)	生化免疫系统公司		
当前申请(专利权)人(译)	Adarutisu公司		
[标]发明人	フランセスコベリーニ ジェルベドワンヌ マーシャルラクロワ		
发明人	フランセスコベリーニ ジェルベドワンヌ マーシャルラクロワ		
IPC分类号	C07K14/16 C07K1/04 C07K1/06 C07K1/107 C07K1/20 G01N33/569 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/21 A61P31/12 A61P31/18 C07K1/10 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/64 C07K14/00 C07K14/155 C07K16/00 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 C12N2740/16122 G01N33/56988 Y02P20/55		
FI分类号	C07K14/16.ZNA C07K1/04 C07K1/06 C07K1/107 C07K1/20 G01N33/569.H		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA32 4H045/BA40 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA33 4H045/FA44 4H045/FA58 4H045/FA61 4H045/GA25		
审查员(译)	佐伯优子		
优先权	07/148821 1988-01-27 US 07/185518 1988-04-22 US 07/281205 1988-12-07 US		
其他公开文献	JP2001055400A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一系列新的肽或氨基酸序列，用于鉴定少数感染HIV-1且可用于检测HIV-1的患者的100%血清还提供一种成分。解决方案：以下环肽：其中x代表氨基末端，一个氨基酸或氨基酸序列，从氨基酸604开始，回到氨基酸586 (gp 41-HIV-1)；y代表从羧基末端开始的氨基酸序列，一个氨基酸或氨基酸612，并且代表延伸至氨基酸629 (gp 41-HIV-1)的氨基酸序列]。