

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/16

G01N 33/569

G01N 33/50



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99815618.3

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230444C

[22] 申请日 1999.11.16 [21] 申请号 99815618.3

[30] 优先权

[32] 1998.11.16 [33] US [31] 60/108,563

[32] 1999.1.8 [33] US [31] 60/115,175

[86] 国际申请 PCT/US1999/027185 1999.11.16

[87] 国际公布 WO2000/029008 英 2000.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.13

[71] 专利权人 德克萨斯州立大学董事会

地址 美国得克萨斯

[72] 发明人 J·K·萨斯特里

R·B·阿林豪斯 P·N·尼赫特

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 3 页 说明书 99 页 附图 27 页

[54] 发明名称 含有 HIV 细胞毒 T 淋巴细胞表位的
HIV 多肽或肽或其多聚核苷酸表达
构建体的用途

[57] 摘要

本发明公开了诊断、预防和治疗 AIDS，包括确定一个体是否显示 HLA - Cw7 限制性的 CTL 反应。一些方法涉及 HLA - Cw7 作为长期无进展和对治疗有反应的遗传标记的用途。诊断方法包括在 HIV 未感染个体中预测长期无进展的方法。预防和治疗方法包含确定一个体是否显示或能够显示 HLA - Cw7 限制性 CTL 反应。如果必要它们还包含诱导该反应的方式。更进一步，一些方法包括给予一种或多种 HIV 多肽或肽或编码它们的多聚核苷酸，作为预防发展成 AIDS 的治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 含有 HIV 细胞毒 T 淋巴细胞表位的 HIV 多肽或肽, 和/或包含编码这样的 HIV 多肽或肽的多聚核苷酸的表达构建体用于制备治疗 HIV 感染个体从而防止 AIDS 发展的药物的用途, 其中所述 HIV 多肽或肽包含任意下列各组的序列:

(a) YL(R/K)DQQLLGIWGC, YLKDQKFLGLWG, YLXDQQLLGLWG, YLXDQQLLGIWG, YLRDQQLLGLWG, YLESQQLLGLWG;

(b) FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQ,
FLGFLGAGSTMGAASXTLTVQARQ,
IFLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
FLGFLGAAGSTMGAAATALTVQARQ,
FLGVLSAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
FLGFLGAAGSTMGAASXXLTVQARQ;

(c) VYYGVPVWKEA, VYYGVPVWKDA, VYYGVPVWRDA,
VYYGYPVWKEA, VYYGYPVWKDA,

(d) LWDQSLKPCVKLT, LWDESLKPCVKLT, LWDQSLKPCVQMT,
LWDXSLKPCVKLT;

(e) SVITQACSKVSFE, SAITQACSKVSFE, SAITQACSKVTFE,
STITQACSKVSWD,

(f) STIKQACSKVNFD, SXIKQACSKVSFE;

(g) TTLXQACSKVSFE, SAITQACSKVSFD,

(h) GTGPCTNVSTVQC, GTGPCKNVSTVQC, GTGPCKNVSSVQC,

(i) GTGPCHNVSTVQC, GTGLCXNITVVTC。

上述序列中出现的符号“X”各自独立地表示与其同一组的其它序列中相对应的氨基酸的生物学功能等同的氨基酸, 所述生物学功能等同的氨基酸相对被替代的氨基酸来说亲水性指数的变化在 ± 2 内,

其中所述 HIV 多肽或肽是包含任意所述序列的 11 至 25 个残基的

合成肽。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述亲水性指数的变化在 ± 1 内。
3. 权利要求 1 的用途，其中所述亲水性指数的变化在 ± 0.5 内。
4. 权利要求 1 的用途，其中 HIV-感染个体显示出 HLA-Cw7 单元型。
5. 权利要求 1 的用途，其中将所述 HIV 多肽或肽与佐剂一起配制成治疗 HIV 感染个体从而防止 AIDS 发展的药物。
6. 权利要求 1-5 任一项的用途，其中 HIV 是 HIV-1。
7. 权利要求 1-5 任一项的用途，其中所述 HIV 多肽被偶联到一载体分子。
8. 权利要求 7 的用途，其中所述载体分子是 KLH 或 BSA。
9. 权利要求 5 的用途，其中所述佐剂是选自脂类、毒素、细胞因子、寡核苷酸和细菌 DNA。
10. 权利要求 1-5 任一项的用途，所述药物进一步包含叠氮胸苷。
11. 权利要求 1-5 任一项的用途，其中所述药物与高活性抗-逆转录酶疗法联合用药。
12. 权利要求 1-5 任一项的用途，其中所述药物含有至少两种合成的 HIV 多肽。
13. 权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种包含任意两个选自 (a) 至 (i) 亚组的序列的肽。
14. 权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种包含任意三个选自 (a) 至 (i) 亚组的序列的肽。
15. 权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种包含任意四个选自 (a) 至 (i) 亚组的序列的肽。
16. 权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种包含任意五个选自 (a) 至 (i) 亚组的序列的肽。
17. 权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种包含选自 (a) 至 (i) 亚组的每一组的序列的肽。
18. 下列组合物用于制备预防显示出 HLA-Cw 7 单元型的 HIV 感染

个体 AIDS 发展的药物的用途,所述组合物含有权利要求 1 中所述的任意的多肽或肽或者含有包含在一启动子的转录控制下编码这样的多肽或肽的多聚核苷酸的表达构建体。

19. 下列组合物用于制备预防没有被 HIV 感染但显示出 HLA-Cw 7 单元型的个体 HIV 感染的药物的用途,所述组合物含有权利要求 1 中所述的任意的多肽或肽或者含有包含在一启动子的转录控制下编码这样的多肽或肽的多聚核苷酸的表达构建体。

含有 HIV 细胞毒 T 淋巴细胞表位的 HIV 多肽或肽 或其多聚核苷酸表达构建体的用途

发明背景

本申请对于在 1998 年 11 月 16 日递交的美国临时专利申请序列号 60/108,563, 和在 1999 年 1 月 8 日递交的美国临时专利申请序列号 60/115,175 要求优先权, 通过参引在此将两者合在一起。

1. 技术领域

本发明一般性地涉及为预防 AIDS 的发作的诊断和治疗领域。更具体地说, 其涉及 HIV 肽和 HLA-限制的 T 细胞反应在 AIDS 长期无进展的预报和 AIDS 的预防中的应用。

2. 背景技术

在人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 感染的进展中, 感染个体的病毒特异的免疫反应逐渐恶化, 导致获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 的发展。多数感染的病人在初始感染后 6 到 10 年没有疾病明显的临床表现。但是报告指出, 约 5% HIV-1 感染者在 10 或更多年保持无病状态。(Haynes, 1996; Munoz, 1995; Rinaldo, 1995; Rowland-Jones, 1995; Rowland-Jones, 1993; Clerici, 1991; Lifson, 1991)。这样的人, 称为长期无进展者 (LTNP), 表现较低的病毒载量和稳定的 CD4+ 细胞计数。

细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的诱导构成了对抗病毒感染的重要防御机制; 偶尔, 病毒特异性 CTL 反应可以致使完全保护而没有伴随的抗体反应。(Sastry 1992; Bevan, 1989; Lukacher, 1984)。近来的研究提示了细胞免疫 (CMI) 在长期无进展者 (LTNP) 和高危群体中维持无病状态的重要性 (Rosenberg, 1997; Haynes, 1996; Munoz, 1995; Rinaldo, 1995; Roos, 1995; Rowland-Jones, 1995; Koup, 1994; Pantaleo, 1994; Rowland-Jones, 1993; Picard, 1992; Clerici, 1991; Lifson, 1991)。重要的, 少量 HIV 感染母亲生育的显然未感染

孩子和暴露于 HIV 但未感染的冈比亚妇女证明了 HIV 特异性的细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 反应 (Rowland-Jones, 1995; Rowland-Jones, 1993). Rinaldo 等还报告高水平抗-HIV-1 记忆 CTL 活性而低的病毒载量与 HIV-1 感染的 LTNP 者不发病有关联。通过病毒特异性主要组织相容性复合体 (MHC) -I 类限制的 CTL 活性在 HIV-1 感染的临床期, 免疫系统可以有效消除病毒感染的细胞 (Koup, 1994)。上述证据提示 HIV-1 - 特异性 CTL 活性在 HIV-I 感染的临床期对于控制病毒传播是很重要的 (Klein, 1995; Koup, 1994), 在无症状期维持低水平病毒载量是很重要的 (Musey, 1997; Rinaldo, 1995; Koup, 1994; Walker, 1987), 并且可能对于完全消除病毒感染细胞是很重要的, 如对于接触 HIV 但病毒阴性的儿童和妇女的报告所暗示的那样 (Rowland-Jones, 1995; Rowland-Jones, 1993)。更进一步的, 截面研究的报告显示出了 HIV-I 感染的晚期阶段 HIV-I 特异性 CTL 反应的缺乏或水平严重降低 (Carmichael, 1993)。因此, 研究人员已聚焦于确定病毒特异性的 CTL 表位。

许多研究人员已证明人 MHC-I 类抗原特异性 CTL 反应的诱导与 HLA-A 和 HLA-B 有关。HLA-A 和 HLA-B 是作为强移植抗原和外源抗原 CTLs 识别的限制分子 (Dill, 1988; McMichael, 1977)。与此形成对比, 第三种 I 类抗原 HLA-C 的功能特征所知较少。编码 HLA-C 抗原的 DNA 序列与编码 HLA-A 和 HLA-B 的序列密切相关并位于他们之间。HLA-C 抗原在淋巴细胞中表达, 尽管比 HLA-A 或 HLA-B 的程度小 (约 10%) (Schendel, 1992; Gasson, 1987; Sodoyer, 1984)。

近来的报告提示 HLA-C 的表达对于由天然杀伤细胞 (NK) 细胞和非 MHC 限制的效应 T 细胞引起的裂解提供保护 (Falk, 1995; Falk, 1993)。特别的, 证实 Cw7 的表达直接控制对于这些类型的效应类群的抗裂解。 (Falk, 1995)。

典型的, 病毒特异性 CTLs 的诱导可以通过病毒的感染或表达病毒基因产物的重组病毒而受影响。病毒基因产物经过加工成肽呈递到感染细胞表面与 CTL 识别的 MHC-I 类分子相关联 (Unanue, 1989;

Branciale, 1987)。

另外，研究力量已集中到确定和特征化诱导病毒特异性 CTL 反应的 HIV 肽。当 Townsend 等的研究小组证明利用流感核蛋白短合成肽作为表位诱导 CTL 反应，阐明利用蛋白质中 T 细胞表位作为疫苗候选物的概念。本发明人和其余人员已报告利用合成肽在体内产生抗流感病毒，淋巴细胞 choriomeningitis，仙台病毒和 HIV 的病毒特异性的 CTLs(Kast, 1991; Aichele, 1990; Deres, 1989; Sastry, 1992; Sastry, 1994; Casement, 1995)。HIV 感染病人或 HIV 蛋白免疫的人和鼠显示针对各种 HIV 基因产物的特异的 CTL 反应(Chenciner, 1989; Tsubota, 1989; Nixon, 1988; Walker, 1988; Plata, 1987; Walker, 1987)。

确定和特征化其它 HIV 特异性的 HLA 单元型和能诱导特异性 CTL 反应的 HIV 肽对于 AIDS 的诊断和治疗是有用的，特别是如果该单元型与 LTNP 的无病状态和高度保守的 HIV 序列中的肽有关。

本发明概述

本发明一般性地涉及 AIDS 的诊断、预防和治疗。本发明提供了预测 HIV 感染病人中长期无进展的方法。本发明还提供了在感染和未感染个体中预防 AIDS 的方法。它是基于可证实 HLA-C 特异性 CTL (细胞毒 T 淋巴细胞) 反应抗一些 HIV 包膜肽的观察资料。

本发明首先提供了通过确定对于一靶细胞病人是否显示出有 HLA-Cw7 (人组织相容性白细胞抗原) CTL 反应，在 HIV 感染病人中预测长期无进展的方法。在一实施例中，病人被 HIV-1 感染或有被 HIV-1 感染的危险。分析 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应存在的方法包含得到病人的细胞并暴露于表达 HLA-Cw7 单元型的靶细胞。本发明被理解为包括从外周血单核细胞(PMBC)、黏膜淋巴细胞、淋巴结细胞和脾细胞中得到的细胞。在另一实施方案中，在暴露于靶细胞之前 PMBCs 用植物凝集素、抗 CD3 抗体或 HIV 抗原刺激。

对一 HIV 感染个体可以检测 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应或拥有 HLA-Cw7 单元型。CTL 反应还包括 CD4 和 CD8 表达 (CD4+, CD8+) 细胞。

探测一 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的方法使用了靶细胞, 包括来自同系 B 细胞系, 树突状细胞或 MHC 匹配细胞的细胞。

CTL 反应可以通过靶细胞的裂解进行分析, 靶细胞可用 (^{51}Cr) 铬酸盐标记, 或通过 γ -干扰素产生或四聚体实验进行分析。

在另一实施方案中, 本发明的方法提供了存在至少一 HIV 多肽的靶细胞, 包括 HIV 包膜 (env) 多肽或 gag 多肽, 以及其中的 HIV 多肽片段。在首选的实施方案中, 多肽是 gp160, 或其中的片段。在进一步的实施例中, 发明通过应用呈递合成肽的靶细胞预测 AIDS 的长期无进展, 该肽的氨基酸序列从 HIV 基因产物中得到, 如一合成肽可以有 11 到 25 个残基的长度。在另外的实施例中, 肽序列包括 YL(R/K)DQQLLGIWGC, FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ, or VYYGVPVWKEA。

进一步, 本发明包括 HIV 肽到靶细胞的传递, 它是通过在启动子转录控制下包含编码至少一 HIV 肽的多核苷酸序列的表达构建体来完成的。在一些实施方案中, 表达载体是病毒载体。该病毒载体可以从一组包含痘苗病毒、腺病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、腺伴随病毒和慢病毒中选择的任何病毒。

本发明然后提供了预防 HIV 感染个体发展成 AIDS 的方法, 它是通过确定病人是否表达 HLA-Cw7 和显示出有 HLA-Cw7 限制的 HIV 特异的 CTL 反应, 如果显示该反应, 给予病人含有 HIV 多肽的组合物, 该多肽还是 HIV CTL 表位。作为选择, 本发明的方法实际上可以确定是否 HIV 感染个体有 HLA-Cw7 单元型。本发明被理解为包括 HIV 感染的病人。本发明要求保护的组合物包括 HIV 多肽如 env 多肽, gag 多肽, 和其各自的片段。进一步的, 本发明要求保护的 HIV 多肽进一步被理解为包括一合成肽, 其序列从 HIV 基因产物中得到。该合成肽可以有 11 到 25 个残基的长度, 包括序列如 YL(R/K)DQQLLGIWGC, FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ, 或 VYYGVPVWKEA。该方法可能还包括给予多种 HIV 多肽。该多种 HIV 多肽可能包括 2 个或多个不同的含有序列 YL(R/K)DQQLLGIWGC, FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ, 或 VYYGVPVWKEA 的肽。作为选择, 该方法可能还包括给予一个或多个有 11 到 25 个残

基的长度的合成肽，其包括序列如 YL(R/K)DQQLLGIWGC, FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ, VYYGVPVWKEA, LWDQSLKPCVKLT, SVITQACSKVSFE, 或 GTGPCTNVSTVQC。包含两个、三个、四个、五个、或所有六个这些序列的多种肽被包括在本发明的方法内。进一步预期序列还可包括序列的一个或多个末端有其它的残基在其侧的多肽。例如，肽 FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQC 就落入本发明的范围内。

含有 HIV 多肽的组合物可与偶联载体分子如 KLH 或 BSA 的 HIV 多肽一起给药。组合物还可包括佐剂，佐剂可为脂类、毒素、细胞因子、寡核苷酸或细菌 DNA。

预防 HIV 感染的个体发展成 AIDS 的方法还包括给予 HIV 感染个体 AZT 或用高活性逆转录病毒治疗 (HAART) 来治疗 HIV 感染个体。

本发明还提供了用于当个体不显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应时，预防 HIV 感染个体发展成 AIDS 的方法。在这种情况下，该方法首先包括确定个体是否具有或表达 HLA-Cw7 单元型。这种确定被理解为包括利用识别 HLA-Cw7 的抗体进行血清学实验或进行核酸扩增反应使得 HLA-Cw7 区域扩增。如果这些实验揭示个体确实表达 HLA-Cw7 单元型，本发明要求保护的方法进一步提供了诱导的 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应。诱导这样的 T 细胞反应的路线包括给予个体有效性治疗剂量的干扰素，尤其 α -或 γ -干扰素，使得 HLA-Cw7 单元型的表达水平增加。该方法还包含刺激 HIV 特异的 T 辅助细胞反应的另外步骤。

本发明还包括在未感染个体中预防 HIV 的感染的方法，首先确定个体是否具有或表达 HLA-Cw7 单元型和，如果个体具有或表达，随后给予个体含有 HIV 多肽的组合物，该多肽还是 CTL 表位，选择性地还提供 T 辅助表位。这种预防方法预期了 HIV-1 感染的预防。如果未感染的个体可表达 HLA-Cw7 单元型，本发明被理解为包括 HIV 多肽的组合物，该多肽包括 HIV 包膜多肽或 gag 多肽或其中的片段。还可应用从 HIV 多肽得到序列的合成肽。该 HIV 来源的合成肽可有 11 到 25 个残基的长度并包括序列 YL(R/K)DQQLLGIWGC, FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ 或 VYYGVPVWKEA。如前文提及，本发明

的方法还包括含有一个或多个下述序列组成的多肽：LWDQSLKPCVKLT, SVITQACSKVSFE, 或 GTGPCTNVSTVQC。一个、两个、三个、四个、五个或所有六个这些多肽序列的任何联合可用于本发明的方法。更进一步, HIV 多肽可用于偶联载体分子如 KLH 或 BSA; 并且还可以与佐剂一起给药, 佐剂可为脂类、毒素、细胞因子、寡核苷酸或细菌 DNA。除给予未感染个体 HIV 多肽, 个体还可以用 AZT (叠氮胸苷) 或 HAART (highly active anti-retroviral therapy, 高活性抗-逆转录酶疗法) 治疗。

如前文提及, 本发明的方法中应用的 HIV 肽可以提供给细胞作为含有编码一个或多个 HIV 肽的多核苷酸的表达构建体。在本发明的一些方面, 可以施用不同的小基因构建体以至于将一种类型以上的肽序列提供给细胞。在本发明的另一些方面, 表达构建体可以含有能使其表达多于一个肽序列的多个序列; 例如, 表达构建体可含有允许其表达 FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ 和 VYYGVPVWKEA 的序列。表达构建体因此可表达一个、两个、三个、四个、五个、六个或多个肽序列。

另外, 本发明包括当个体表达或可以表达 HLA-Cw7 单元型和诱导 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应时, 在未感染个体中预防 HIV 感染。作为选择, 个体可以接受有效治疗剂量的干扰素使得 HLA-Cw7 单元型表达水平增加。

更具体地说本发明涉及含有 HIV 细胞毒 T 淋巴细胞表位的 HIV 多肽或肽, 和/或包含编码这样的 HIV 多肽或肽的多聚核苷酸的表达构建体用于制备治疗 HIV 感染个体从而防止 AIDS 发展的药物的用途, 其中所述 HIV 多肽或肽包含任意下列各组的序列:

(a) YL(R/K)DQQLLGIWGC, YLKDQKFLGLWG, YLXDQQLLGLWG, YLXDQQLLGIWG, YLRDQQLLGLWG, YLESQQLLGLWG;

(b) FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
 FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQ,
 FLGFLGAGSTMGAASXTLTVQARQ,
 IFLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
 FLGFLGAAGSTMGAAATALTVQARQ,
 FLGVLSAAGSTMGAASLTLTVQARQ,
 FLGFLGAAGSTMGAASXXLTVQARQ;

(c) VYYGVPVWKEA, VYYGVPVWKDA, VYYGVPVWRDA,
VYYGYVWKEA, VYYGYVWKDA,

(d) LWDQSLKPCVKLT, LWDESLKPCVKLT, LWDQSLKPCVQMT,
LWDXSLKPCVKLT;

(e) SVITQACSKVSFE, SAITQACSKVSFE, SAITQACSKVTFE,
STITQACSKVSWD,

(f) STIKQACSKVNFD, SXIKQACSKVSFE;

(g) TTLXQACSKVSFE, SAITQACSKVSFD,

(h) GTGPCTNVSTVQC, GTGPCKNVSTVQC, GTGPCKNVSSVQC,

(i) GTGPCHNVSTVQC, GTGLCXNITVVTC.

上述序列中出现的符号“X”各自独立地表示与其同一组的其它序列中相对应的氨基酸的生物学功能等同的氨基酸，所述生物学功能等同的氨基酸相对被替代的氨基酸来说亲水性指数的变化在 ± 2 内，

其中所述 HIV 多肽或肽是包含任意所述序列的 11 至 25 个残基的合成肽。

本发明的其它目的、特征和优势从下面的详细描述将变得显然。它应该被理解为当指出发明优选的实施方案，详细的描述和特殊的实施例通过解释说明给出，因为从这种详细的描述在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域熟练人员是显而易见的。

附图的简要说明

后面的附图构成了本说明书的一部分并进一步证实了本发明的某些方面。通过参考一个或多个这些附图与在此提出的具体实施方案的详细描述结合，发明可被更好理解。

图 1. HIV 阳性 LTNPs 中 HIV-1 包膜和 gag 特异性 CTL 活性。从一对对照 (JR) 和四个 HIV 阳性 LTNPs (LB, HD, DH 和 RLF) 中分离的 PBMCs 用于分析在用对照 (vSC-8) 或表达包膜蛋白 (vPE-16) 或 gag 蛋白 (vv-gag) 的重组疫苗病毒感染后，针对同系 B 细胞系作为靶细胞的 CTL 活性。

图 2. HIV 阳性 LTNPs 中 HLA-Cw7 限制的 CTL 活性。四个 HIV 阳性 LTNPs (LB, HD, DH 和 RLF) 中分离的 PBMCs 用于分析由包含具有不同的 HLA 抗原的自体 and 异源 B 细胞系作为靶细胞的 CTL 活性。每种情况下的靶细胞用对照 (vSC-8) 或表达包膜蛋白 (vPE-16) 的重组痘苗病毒感染。示出了效靶比 (E:T) 40:1 的特异性裂解值百分数。

图 3. 在对照和免疫的猴子中的增殖反应。从研究的五只猴子中每一只猴子分离外周血单核细胞 (PBMC), 在所示不同的时间间隔收集, 并将标准 [³H] 胸腺嘧啶掺入分析法用于对各种肽和热灭活 SHIV 为抗原检测增殖反应。结果用刺激指数 (SI) 值表示, 统计为用检测抗原与培养基对照比较的增加倍数。该值还用一无关对照肽进行调整 (构成 HPV-16 的 E7 癌蛋白的一辅助 T 细胞表位肽)

图 4. 对照和免疫猴子中的 PMBC 的 NK 活性。在免疫后各种时间点从猴子中新鲜分离的 PBMC 用于针对 ⁵¹Cr 标记的 K-562 靶细胞检测 NK 活性。

图 5. 从对照和免疫猴子分离的 CD4+ 和 CD8+ 细胞的流动式细胞计数分析。利用各自偶联 PE 和 FITC 的特异性抗 CD4 和抗 CD8 抗体通过流动式细胞计数器处理在免疫后各时间点从猴子中得到的新鲜血液样品。

图 6. 对照和肽免疫猴子中 HIV 包膜特异性 CTL 活性。两个免疫猴子 (J13 和 L889) 和两个对照 (L913 和 L933) 中得到的 PBMC, 检测裂解自体 ⁵¹Cr-标记的 B-LCL 靶细胞前在体外用肽脉冲 DC 刺激 14 天, 靶细胞用对照或表达 HIV 包膜蛋白的重组痘苗病毒 (分别为 vSC8 和 vPE16) 感染。在免疫后不同时间点从收集血样中分离 PBMC, 用肽脉冲 DC 体外刺激两周, 利用感染对照 (vSC8) 或表达 HIV 包膜 gp160 的重组痘苗病毒 (vPE16) 的自体 B-LCL 靶细胞通过标准的铬释放实验进行分析。示出了效靶比 50: 1 的 CTL 活性。

图 7A-B. A. 免疫和对照猴子中 DC 灌输前肽特异性的增殖反应。六个保守 HIV 包膜肽每一个的等分量 (100ug) 被乳化在完全弗氏佐剂 (CFA) 中并皮下注射给三只猴子, 而两只对照只注射 CFA。在 4 周和 8

周，注射加强剂量的乳化在不完全弗氏佐剂 (IFA) 中的肽混合物 (对照只注射 IFA)。特异性针对六个单独肽的增殖反应用标准 [3H] 胸腺嘧啶掺入法评价。只在免疫猴子而未在对照组中观察到肽特异性反应 (相对于培养基背景和对照肽)。大多数情况中，20 周反应降低到背景水平。此时肽脉冲的 DC 灌输给予免疫的猴子来加强反应，同时对照猴子接受无脉冲的 DC。

B. DC 灌输后在免疫和对照猴子中肽特异性的增殖反应。PMBC 中制备的自体的单核来源树突状细胞 (DC) 在静脉灌输进猴子前用六个合成肽的混合物脉冲 24 小时，这些猴子之前用乳化在弗氏佐剂中的相同肽混合物免疫。在 22、24 和 25 周总共三次灌输。对照猴子给予未用肽脉冲的自体 DC。在免疫猴子中，对于进行 DC 灌输后增殖反应增加的肽 (相对于背景和对照肽) 用星号 (*) 标记。

图 8. 对照和免疫猴子血样的攻击后分析。血样的攻击后分析显示与对照动物相比在免疫猴子中有效控制了 SHIV 感染。用 SHIV-ku2 攻击后不同的时间间隔从猴子中收集血样，用流动式细胞计数器分析总 CD4+ 细胞，表示为绝对数值 (CD4+ 细胞)。10 倍系列稀释血样中分离的 PMBC 在 24 孔组织培养板中与 10^6 C8166 指示细胞共培养，显示可见细胞病变效果 (CPE) 的 PMBC 的最高稀释度用于计算每 10^6 PMBC 的 SHIV 感染的细胞的数值 (SHIV+ 细胞数)。

图 9. SHIV-ku2 攻击后对照和肽免疫猴子总体重的变化。免疫前到攻击后连续监控猴子的体重。两免疫猴子 J13 和 L889 稳定地增加体重，在攻击后 24 周，他们开始减肥饮食维持合理体重。其余免疫猴子 L993 和一对照猴子 L933 体重未显示可评价的差别。而一对照猴子 L913 在 24 周开始体重降低，尽管补充营养饮食，连续显示体重降低，这是消瘦综合症的信号，通常与 AIDS 有关。(30 和 37 周开放和填充箭头各自代表给对照猴子 L913 补充营养饮食的开始和结束日期。) 在 39 周对该猴子实行安乐死。*猴子 J13 和 L889 在 24 周开始减肥饮食来预防肥胖。

图 10A-D. 利用病人 RLF 中的 PMBC 针对不同 HLA 靶细胞的 HIV env-

特异性 CTL 活性。A. 针对 HLA-A2 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。B. 针对 HLA-B2705 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。C. 针对 HLA-Cw7 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。D. 针对 HLA-Cw7 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。

图 11A-D. 利用病人 DH 中的 PBMC 针对不同 HLA 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。A. 针对 HLA-A2 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。B. 针对 HLA-B2705 靶细胞 HIV env-特异性 CTL 活性。C. 针对 HLA-Cw7 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。D. 针对 HLA-Cw7 靶细胞的 HIV env-特异性 CTL 活性。

图 12A-B. 编码 HIV 多肽和肽序列的表达载体。A. 小基因构建体显示代表 P18 序列的插入片段, HIV CTL 表位。B. 表位表达基因疫苗单免疫 BALB/C 小鼠后 P18 特异性的 CTLs。每种质粒 i. m. 注射 10 μ g 免疫小鼠。60 天后, 收获脾细胞并分析体外刺激后 P18 肽荷载的 P815 靶细胞的 P18 特异性的 CTL 反应。CMVi-P18 是一表达有附加起始甲硫氨酸的 P18 肽的基因疫苗。CMVi-UB#23 是一表达含有 P18 表位的 gp120 区域的泛素融合蛋白基因疫苗。CMVi-UB#2 是表达同样融合泛素的 gag 基因区域的阴性对照质粒。

图 13A-F. 编码特异性 HIV 肽序列的表达载体构建体。A. P18 构建体。B. 肽 61#构建体。C. 肽 63#构建体。D. 肽 104#构建体。E. 肽 111#构建体。F. 肽 113#构建体。

说明性实施方案的描述

在感染和未感染人中治疗和预防性治疗 AIDS 是很重要的, 因为在 1995 年, 在世界卫生组织有多于一百二十五万的 AIDS 病历报告。明显的, 治疗和预防 AIDS 发作的治疗是非常重要的。多数治疗包括抗逆转录化疗已被检验和执行, 但他们还未消除疾病。同样, 疫苗策略还没有提供成功结果。因为抗 HIV 抗体在体外显示增强病毒感染单核细胞和淋巴细胞, 避免诱发抗体反应而激活 T 细胞反应的疫苗可能有前途。

有趣的是, 一些感染 HIV 的病人维持 10 年或更长时间的无病状态并没发展成 AIDS; 然而, 维持这种状态的原因未知。近来证据显示了

长期无进展者(LTNPs)无病状态的建立和维持中 T 细胞的作用,尤其是细胞毒 T 淋巴细胞(CTL) (Clerici, 1991; Haynes, 1996; Koup, 1994; Lifson, 1991; Munoz, 1995; Pantaleo, 1994; Picard, 1992; Rinaldo, 1995; Roos, 1995; Rosenberg, 1997; Rowland-Jones, 1993, 1995)。因为 MHC 表面分子引导的 CTLs 被激活,对应于 CTL 限制性的遗传要素可能有助于长期无进展。鉴定这种遗传要素可用于诊断 HIV 感染病人来确定是否他们拥有与 LTNPs 一致的遗传成分。更进一步,遗传要素可用作确定感染和未感染病人是否能够利用 T 细胞反应和 HIV 多肽和肽治疗和预防 AIDS 的发展的标记。在这种情况下,可以对个体检测遗传要素的存在,如果一个体拥有遗传要素,该个体可接受预防 AIDS 发作的治疗。

实际上,本发明提供了这样的遗传要素,可以用于确定可能的 LTNPs 并用于实行抗 AIDS 发展的治疗。HLA-Cw7,一种 LTNPs 中的 HLA 遗传要素已与长期无进展联系。HIV-1 血清阳性的 LTNPs 展示一包膜特异性 CTL 反应是 HLA-Cw7 限制的。因此,HLA-Cw7 限制性可用于确定是否 HIV 感染的病人可能是 LTNP 的诊断工具。

本发明还证明 HIV 包膜特异性的 CTLs 从 HIV 包膜蛋白高度保守区域识别表位,特别是从 gp160 得到的三个肽。因此,本发明提供了针对 HIV 多肽激起 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应治疗的方法。在本发明的一些方法中,三个肽可个别或联合用于激起反应。另外,一 HIV 多肽、肽或相应的多聚核苷酸可偶联于载体分子,如 KLH 或 BSA,或可用于偶联于佐剂,如脂类、毒素、细胞因子、寡核苷酸或细菌 DNA。增强这种反应的方法包括应用 α -或 γ -干扰素在那些是候选的 LTNPs 个体中增加 HLA-Cw7 单元型的表达水平。

在此透露的诊断和治疗的方法有益于鉴定一新的 HIV 特异的 HLA 单元型。

A. HIV 和免疫

1. 人类免疫缺陷病毒

因为含有反转录酶,HIV 分类为逆转录病毒。HIV 感染细胞通常导

致细胞死亡。HIV 出现 HIV-1 和 HIV-2 两种主要血清型，根据与包膜糖蛋白抗体反应的不同容易区分。HIV-1 和 HIV-2 有 40% 的同源性。HIV-1 显示比 HIV-2 更有效地引起 AIDS。

多数 HIV 感染病人最终发展成成熟的 AIDS。一般的，当病人 CD4+T 细胞计数低于 200 细胞/mm³ 时或病人显示首次 AIDS 定义的机会感染或瘤时，正式诊断为 AIDS。仅有约 10% 的小量 HIV 感染个体，在感染后 10 年或更多年不显示疾病状态。长期无进展者 (LTNPs) 是那些 HIV 感染 10 年或更多年而不显示 AIDS 进展的病人。无进展的原因不清楚。

HIV 感染的第一步是 gp120 糖蛋白与 CD4+受体的高亲和力结合，CD4+受体呈现在很多细胞类型的表面，包括 T4 细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞和中枢神经系统的细胞。HIV 包膜糖蛋白与 CD4+受体的高亲和力在 HIV 发病机理中至关重要，因为表达 CD4 的主要细胞是靶细胞 (Maddon, 1986; Dalgleish, 1984; Klatzmann, 1984)。

2. 主要组织相容性复合物

本发明鉴别了一 HIV 特异性 MHC I 类分子，它存在于 HIV 感染的 LTNPs。本发明揭示了不同的诊断、预防和治疗方法得益于这种遗传标记，以确定和治疗那些显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的个体。

人主要组织相容性复合物 (MHC) 含有六个 HLA 的 I 类基因的两兆碱基端粒片段 (Trowsdale, 1993)。在此之中，HLA-A, -B 和 -C 编码高度多态性的、普遍表达的、膜结合的糖蛋白，与 β -2 微珠蛋白非共价相连 (Bjorkman and Parham, 1990; Klein, 1986)。它们将来自内源性合成蛋白的短肽配基呈递给 CD8+T 淋巴细胞的 $\alpha\beta$ T 细胞受体 (TCR)，使得这些细胞毒 T 细胞消灭病毒感染的细胞 (Townsend and Bodmer, 1989)。

细胞可根据他们表面表达的 HLA 分子来分类。本领域熟练人员充分了解“HLA 分类”的方法，例如 Olerum 和 Zetterquist 的方法 (Olerum, 1992)。

与大量关于 HLA-A 和 -B 的文献相比，HLA-C 抗原在呈递外源抗原到 CTLs 中的作用的证据很少 (Bogedain, 1995; van den Eynde, 1995;

Johnson, 1993; Littaua, 1991). HIV 特异性细胞免疫(CMI) (包括增殖和 CTL 反应) 在用于病毒复制成功控制的重要性, 已在利用一组 LTNP 和高危个体(Haynes, 1996)的研究中被认识(Haynes 综述). 基于此点, Rosenberg 等(Rosenberg, 1997)近来报告控制病毒血症的 HIV 感染个体是因为高水平 HIV 特异性的 CMI, 针对 HIV 包膜和 p24 蛋白的 CD4+T 细胞增殖反应的测量. 更近的, Musey 等(Musey, 1997)报告在 HIV 感染的早期阶段, HIV 包膜特异性 CTL 记忆反应的诱导有助于控制病毒复制和延迟 HIV 诱导的 AIDS 进展.

关于 HIV-1 感染, HIV-1 特异性的 CTLs 已直接用 HIV-1 感染个体的外周血单核细胞(PBMC)检测到(Haynes, 1996; Falk, 1993; Johnson, 1993; Jassoy 1992; Dadaglio, 1991; Gasson, 1987; Dai, 1992). 因此, 研究人员已集中注意力来鉴定与 HIV 诱导的 CTL 反应有关的 HLA 单元型. Littaua 等和 Johnson 等的研究报告在无症状血清阳性个体中建立的 CTL 克隆, 识别 HLA-Cw4 和 -Cw3 限制的 gag 和包膜蛋白中高度保守的表位. 别的研究人员已确定 gp41 中 CD8+CTL 表位是 HLA-A3.1(Takahashi, 1991)和 HLA-A24 (Dai, 1992)限制性的. HLA-24 限制性的 CTL 表位位于 gp141 的氨基酸 584 到 591 位. 氨基酸 585 位突变消除了 CTL 诱导反应(Dai, 1992).

B. AIDS 长期无进展的诊断检验

根据本发明的诊断检验可评价一 HIV 感染者是否为长期无进展者的候选人, 利用针对靶细胞的 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的分析. 本发明界定的另一诊断检验可评价一个体是否为预防 AIDS 进展的治疗方法的首选者.

在一实施方案中, 本发明包括一诊断检验以确定个体是否可显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应. 该检验通常包含从个体中获得 T 细胞类群并确定是否这些细胞能与表达 HLA-Cw7 决定基的靶细胞反应. 在另一实施方案中, 应用一诊断检验确定个体是否表达 HLA-Cw7 单元型. 如果该个体表达, 本发明包括诱导 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应. 在下面讨论的进一步实施方案中, 向显示或可以显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应

的个体给予预防 AIDS 发展的治疗方法。

1. 靶细胞

在本发明的一实施方案中，靶细胞用于分析一 HIV 感染病人是否显示限制性的 T 细胞反应。靶细胞是表达 MHC I 类分子的任何细胞。多数体细胞有 MHC I 类分子表达，但不同细胞类型之间表达水平有变化。通常的，淋巴细胞表达高水平 MHC I 类分子，每个细胞约 5×10^5 个分子。单细胞可表达大量的 MHC I 类分子，在他们肽结合缝隙呈递肽。正常健康细胞将显示来自普通胞内蛋白片段的自身肽。但是，病毒感染细胞的 MHC I 类分子除自身肽以外将显示病毒肽。特定的 I 类分子将显示特定的病毒肽，同时其它类型的 I 类分子将显示其它病毒肽。更进一步的，不同个体肽结合缝隙的等位基因差异导致不同批的病毒肽被显示。在本发明中，分析的 T 细胞反应限制于 MHC I 类分子 HLA-Cw7。本发明证明根据 T 细胞反应分析 HLA-Cw7 是显示 HIV 包膜来源肽的单元型。

在分析 T 细胞反应中有用的靶细胞包括自体 B 细胞系 (B-LCL)、树突状细胞或 MHC 匹配的细胞。术语“自体的”用于指的是得到该细胞的个体也是得到效应细胞的个体。自体的 B-LCL 可用来自诊断和治疗个体的外周血单核细胞 (PBMC) 制备并转化。在优选的实施方案中，自体的 B-LCL 从 HIV 感染个体中制备，并用作 T 细胞反应实验的靶细胞预测 B-LCL 供体的长期无进展。

树突状细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞并在 T 细胞活化中起关键作用。在抗原呈递细胞 (APC) 中，由于它们活化免疫性始祖 T 细胞 (Steinman, 1991) 的有效能力，它们是独特的。DC 组成性或成熟后表达介导生理反应的几种分子并传递活化信号到反应 T 细胞。这包括 I 类和 II 类 MHC 分子、CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2)、CD40、CD11a/CD18 (LFA-1) 和 CD54 (ICAM-1) (Steinman, 1995; Steinman, 1991)。DC 可以呈递抗原到 CD8+ 和 CD4+ T 淋巴细胞。DC 还在刺激时分泌几种 T 细胞刺激因子，包括 IL-1 β 、IL-6、IL-8，巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α) 和 MIP-1 γ (Mohamadzadeh, 1996; Ariizumi, 1995;

Kitajima, 1995; Caux, 1994; Enk, 1992; Heufler, 1992; Matsue, 1992; Schreiber, 1992)。其它的 APC 也有黏附分子表达和细胞因子产生这两个特征(如, 活化巨噬细胞和 B 细胞), 但在活化始祖 T 细胞方面基本上无能力。更进一步, 肽脉冲的 DC 已在没有任何佐剂的情况下, 在动物模型和有限的人临床实验中被成功用于诱导保护性 CMI 反应。

本发明的靶细胞包括任何 MHC 匹配细胞, 该细胞在其表面具有合适的 MHC 或 HLA 单元型, 使得被用于产生 CTL 反应的效应细胞识别。

在一些实施方案中, 靶细胞可用于 HIV 特异性的 T 细胞反应的检验, 这是通过引进表达 HIV 多肽的病毒载体或 HIV 肽到细胞内。在本发明另外的实施方案中, 病毒多肽和肽来自 HIV 包膜基因产物, 尤其是 gp160。

2. 效应细胞

分析 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的当前诊断方法的实施方案是通过利用效应细胞证明细胞毒反应。通常的, 效应细胞和 T 细胞来自抗原活化的记忆细胞, 该记忆细胞具有细胞毒或迟发型超敏反应。由于它们的裂解能力, 效应细胞在识别和去除改变的自身细胞中很重要, 包括病毒感染细胞。它们通过 T 细胞毒细胞的活化产生。

在针对病原微生物(如病毒、细菌和寄生虫)和外源蛋白以及特别是那些在被感染细胞内的保护免疫中, T 细胞活化是重要步骤。T 细胞在其表面表达受体(如 T 细胞受体), 该受体识别抗原呈递细胞表面所存在的抗原。在正常的免疫反应过程中, 这些抗原结合到 T 细胞受体, 启动胞内变化, 导致 T 细胞活化。DC 表达几种不同的黏附(和共刺激)分子, 介导其与 T 细胞的相互作用。已知的起该作用的受体(DC 上)和相反受体(T 细胞上)的结合包括: a) I 类 MHC 分子和 CD8, b) II 类 MHC 分子和 CD4, c) CD54(ICAM-1) 和 CD11a/CD18 (LFA-1), d) ICAM-3 和 CD11a/CD18, e) LFA-3 和 CD2, f) CD80 (B7-1)和 CD28 (和 CTLA4), g) CD86 (B7-2)和 CD28 (和 CTLA4), 和 h) CD40 和 CD40L (Steinman, 1995)。重要的, 不仅这些分子的连接促进 DC 和 T 细胞间

的物理结合，还转导活化信号。

除特异性活化之外，T 细胞还可通过与有丝分裂原接触被非特异性诱导分裂。凝集素是植物来源的与糖结合的促有丝分裂蛋白。活化 B 和 T 细胞的凝集素包括如植物凝集素、伴刀豆球蛋白 A 或美洲商陆有丝分裂原。

更具体的，本发明涉及通过观察 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应预测长期无进展。CTLs 是细胞毒 T 细胞。CTLs 组成了被定义为能够介导膜损伤的一组效应 T 细胞，它们会导致细胞裂解。当 T_C 细胞识别一抗原-MHC I 类分子复合物时，T 辅助细胞 (T_H) 释放的细胞因子诱导 T 细胞毒细胞 (T_C) 增殖分化。CTLs 通常表达 CD8。

3. T 细胞或 T 淋巴细胞反应

本发明的一些方法有益于 T 细胞反应，通过利用它们作为长期无进展的诊断指示剂或作为针对 AIDS 进展的预防治疗。更具体的，该方法分析 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的存在。

免疫健全动物中多数病毒感染导致针对病毒感染细胞的细胞免疫反应，结果为细胞的裂解。在病毒感染期，病毒蛋白在细胞内以内涵物形式合成进入新的病毒颗粒。一些内源性病毒蛋白还被降解并转运到 I 类抗原呈递途径，在此外源抗原与 MHC I 类分子相联系。该肽-MHC 复合物随后被转运到细胞表面，在此由于自身 MHC 的原因呈递外源肽到细胞毒 T 细胞 (CTLs)。

CTLs 是抗原特异性的效应细胞。多数为识别 MHC I 类分子呈递抗原的 CD8⁺T 细胞；少数为趋向识别 MHC II 类分子呈递抗原的 CD4⁺T 细胞。淋巴细胞表面标记研究可用于一本领域普通熟练人员利用已知的各种程序分析这些 T 细胞表面标记的存在，包括免疫荧光和流动式细胞计数器。

当识别为外源抗原时，CTLs 裂解靶细胞，这是通过诱导编程性细胞死亡的分子相互作用或通过成孔酶的分泌在胞浆膜上成孔破坏其完整性。因此 CTL 介导的免疫反应在病毒感染细胞的清除中起显著作用。

CTLs 效应细胞裂解病毒感染的靶细胞的能力由遗传和抗原限制性

调节。靶细胞必须带有与初始诱导 CTLs 相同或相当的病毒抗原。靶细胞和诱导的 CTL 还必须具有相同的 MHC I 类分子。

特别的, MHC 限制的病毒特异性的 CD8+CTL 和 CD4+辅助 (T_H) T 细胞反应的发展与急性期病毒感染的恢复有关 (Ada and Jones, 1986; Howes, 1979)。感染 HIV 的个体中, CD8+T 淋巴细胞通过直接裂解感染的细胞和抑制病毒复制有助于控制 HIV 复制 (Walker, 1987; Walker, 1986)。尽管在 HIV 血清阳性健康个体中诱导 CD8+ MHC 限制的 HIV 特异性的 T_C 反应, 如通过外周血淋巴细胞分析所证实, 在 AIDS 病人中这些反应降低或不存在 (Paltaleo, 1990)。本发明提供了确定针对 HIV 多肽的限制 T 细胞反应的 MHC I 类分子。HLA-Cw7 是针对包膜多肽的限制 T 淋巴细胞反应的单元型。长期无进展的 HIV 感染病人显示这种限制性的反应, 因此, 这种反应的证实可作为长期无进展的预报器。

一限制性单元型的同一性可通过利用多种技术被显示, 包括含有 I 类特异性抗体的抗体抑制研究和遗传手段如 PCR 实验。

进一步的, 通过利用 HIV 多肽或肽在感染和未感染个体中诱导 HIV 特异性 HLA-Cw7 限制性 CTL 反应可预防 AIDS 的发作。

4. 反应分析

如上文规定, 本发明一方面包括分析限制性的 T 细胞反应。在一实施方案中, HLA-Cw7 限制性 CTL 反应的证实可用于预测长期无进展和确定治疗可能有益的个体。T 细胞反应可通过本领域普通熟练人员已知的各种操作方法进行测量。一些这样的实验被完全详细描述如下。

a. 利用 ⁵¹[Cr] 裂解

细胞介导的淋巴裂解 (CML) 可用作 T 细胞反应的指示。靶细胞在暴露于效应细胞之前可用放射性铬-51 (⁵¹[Cr]) 标记。释放进培养基的 ⁵¹[Cr] 量与细胞介导的裂解水平成比例。在本发明首选的实施方案中, 培养自体 B 淋巴细胞系并在它们与有细胞毒活性细胞一起温育之前暴露于 ⁵¹[Cr] 铬酸钠两小时。

b. γ -干扰素的产生

γ -干扰素 (γ -干扰素), 还称为 II 型或免疫干扰素, 由 T 细胞

和 NK 细胞产生。它对于辅助 T 细胞的发展是必要的。因为是初始巨噬细胞活化因子，在细胞免疫中是强细胞因子。 γ -干扰素增强 MHC I 类和 MHC II 类分子表达的水平，改善抗原呈递和其余认知的反应。进一步的，它扩大 TNF- α 的效果和增加血管内皮细胞表面黏附分子的表达水平，导致 T 细胞黏附和溢出。最后，作为本发明的一部分， γ -干扰素由 CTLs 分泌，使得 γ -干扰素的水平能作为 CTL 活性和 CTL 反应的指示剂。 γ -干扰素水平的确定用标准实验方法进行。

c. 四聚体实验

四聚体实验为那些本领域熟练人员所熟知。见 Altman, 1996.

d. 细胞因子的产生

细胞因子是在免疫反应调节中和不同细胞类型分化途径中起重要作用的蛋白质。它们在 T 细胞调节和分化中有重要作用，包括 γ -干扰素、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、淋巴毒素、MIF、TGF- β 、TNF- α 、和其它的趋化因子。细胞因子分析是本领域所熟知。

5. HLA-Cw7 的表达

除提供直接确定是否一个体显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的方法之外，本发明包括确定是否一个体表达或可以表达 HLA-Cw7 单元型的方法。因为 HLA-Cw7 单元型提供了确定可以对预防 AIDS 发作的治疗有反应的个体的标记，本发明的方法包括在不显示 HLA-Cw7 限制的 CTL 反应的 HIV 感染和未感染个体中测试 HLA-Cw7 表达或能够表达 HLA-Cw7。有大量实验可来质化和量化分子的表达水平，这些可包括检测表示特定单元型的 DNA 序列或测量蛋白或 mRNA 表达水平。这些实验被本领域普通熟练人员所熟知。一些例子提供如下。

a. 血清生物学实验

本发明包括通过血清生物学来评价 HLA-Cw7 的表达水平。这些实验通过抗原-抗体相互作用来量化和质化抗原水平。可施行许多类型的实验，在本发明的范围内本领域一普通熟练人员熟知如何施行。

i. ELISAs, 免疫测定和免疫组织生物学实验

本发明界定的免疫测定包括，但不局限于，那些描述于美国专利号 4367110（双单克隆抗体夹心法实验）和美国专利号 4452901（western blot）的方法。其余实验包括在体内和体外的标记配基的免疫沉淀和免疫细胞化学。

免疫测定通常是结合实验。某些首选的免疫测定是本领域已知的各种类型的酶联免疫吸附实验(ELISAs)和放射免疫测定(RIA)。用组织切片的免疫组织化学检测也显著有用。

在一示范性 ELISA 中，抗体固定在选择的表面，如聚苯乙烯微量滴定板的孔，或柱状支持物。接着，将推测含有所需抗原的待检测成分，如一临床样品，加样到孔内。结合和洗涤除去非特异性结合的免疫复合物后，可以检测结合的抗原。检测通常通过加入另一特异性针对所需抗原的抗体完成，与可检测的标志相连。这种类型的 ELISA 称为“夹心 ELISA”。检测还可通过加入对所需抗原特异性的第二抗体来完成。随后加入与第二抗体亲和结合的第三抗体来完成，第三抗体与可检测标记相连。

ELISA 技术的变化是本领域那些熟练人员已知的。在一这样的变化中，将推测含有所需抗原的待检样品固定于孔表面并与本发明抗体接触。结合和适当的洗涤后，检测结合的免疫复合物。初始抗原特异性的抗体与可检测的标志相连，免疫复合物可直接被检测。此外，免疫复合物可用与第一抗原特异性抗体亲和结合的第二抗体进行检测，第二抗体与可检测的标志相连。

竞争 ELISAs 也可行，在此待检样品与已知量标记抗原或抗体竞争结合。未知样品中反应种类的量通过在包被孔温育之前或温育期间与已知标记种类样品混合进行检测。样品中反应种类的存在降低了可与孔结合的标记种类的量，并因此减少最终信号。

与应用形式无关，ELISAs 通常有某些共同的特征，如包被、温育或结合、洗涤除去非特异性结合种类和检测结合的免疫复合物。这些如下所述。

抗原或抗体还可与固相支持物相连，如以板、珠、浸柱、膜或柱

基质的形式，分析的样品应用于固定化的抗原或抗体。用抗原或抗体包被板，通常用抗原或抗体溶液温育板孔，温育过夜或特定时期。随后洗涤板孔除去不完全吸附的材料。板孔的任何可能残留表面随后用与考虑到待检血清抗原性中性的非特异性蛋白进行“包被”。这包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白和奶粉溶液。包被允许封闭在固相表面的非特异吸附位点并因此降低因抗血清非特异性结合到表面引起的背景。

ELISAs 中更贯于用二级或三级检测手段而非直接程序。因此抗原或抗体结合到孔后，用非反应材料包被降低背景，并洗涤除去未结合材料，固相化表面与待检的临床或生物学样品在允许免疫复合物（抗原/抗体）有效形成的条件下接触。免疫复合物的检测需要一标记的第二结合配基或抗体，或与标记的第三抗体或第三结合配基相联的第二结合配基或抗体。

“在允许免疫复合物（抗原/抗体）有效形成的条件下”意味更适宜的条件包括用溶液稀释抗原和抗体，如 BSA、牛 γ 球蛋白(BGG)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)/吐温。这些加入的试剂也会有助于非特异性背景降低。

合适的条件还意味着温育是在一定温度和一定时间允许有效结合。温育步骤典型地是从约 1 到 2 到 4 小时，更优选温度在 25 °C 到 27 °C 或可以在 4 °C 左右过夜。

在 ELISA 的所有温育步骤之后，洗涤接触的表面以除去非复合物材料。洗涤常包括用 PBS/吐温溶液或硼酸盐缓冲溶液洗涤。在检测样品和初始结合材料之间形成特异性的免疫复合物之后，即使少量免疫复合物的发生也可以被测定。为提供检测方法，第二或第三抗体将有结合的标记物以允许检测。更合适的，应是与合适发色底物温育产生颜色变化的酶。因此，例如，将需要第一或第二免疫复合物与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或氢过氧化物酶偶联的抗体接触和温育一段时间并在有助于进一步免疫复合物形成的条件下，如，在含有 PBS 溶液如 PBS-吐温中室温温育 2 小时。

与标记抗体温育和随后的洗涤去除未结合材料后，标记物的量进

行量化，如通过与发色底物如尿素和溴甲酚紫或 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[ABTS]和 H_2O_2 温育，这是在过氧化物酶作为酶标记的情况下进行的。通过测定颜色生成的程度完成量化，如，用可见分光光度计。作为选择，标记物可为化学发光指示剂。这种标记物的应用描述于美国专利号 5310687、5238808 和 5221605。

HLA 单元型的存在的分析可直接在组织样品中完成。体外原位分析方法是已知的，包括将推测的抗原特异性抗体结合到组织、细胞或细胞抽提物中。这些传统技术已在那些本领域熟练人员的掌握之中。

b. 核酸扩增反应

核酸分子可用各种技术检测，包括扩增反应。本发明预期用这些扩增反应检测是否 HLA-Cw7 基因是或可在一个体病人中表达。在一方法中，扩增反应用于检测 DNA 重排从而表示一个体能或确实表达 HLA-Cw7 单元型。

i. 聚合酶链反应 (PCR™)

作为扩增模板的核酸从生物学样品包含的细胞中分离，根据标准的方法学 (Sambrook) 进行。核酸可为基因组 DNA 或分离的或全细胞的 RNA。当使用 RNA 时，应需要将 RNA 转换为 cDNA。

对应于 K_{ATP} 通道蛋白或其中的突变与核酸选择性杂交的引物对在允许选择性杂交的条件下与分离的核酸接触。在此定义的术语“引物”意味着包含能够在模板依赖的过程中引导新生核酸合成的任何核酸。典型的，引物是 10 到 20 碱基对长度的寡核苷酸，但可以应用更长的序列。引物可为双链或单链形式，尽管单链形式是首选的。

一旦杂交，核酸：引物复合物与一个或多个酶接触，以便于模板依赖的核酸合成。进行多轮扩增，也称为“循环”，直到产生足够量的扩增产物。

接着检测扩增产物。在某些应用中，检测可通过可见方法进行。可选择的，检测可包括通过化学发光产物，掺入的放射标记或荧光标记的放射性闪烁扫描法或甚至通过利用电或温度脉冲信号系统 (Affymax 技术) 进行间接确定。

许多模板依赖方法可用于扩增在给出的模板样品中存在的标记序列。一个众所周知的扩增方法是聚合酶链式反应（指 PCR™），在美国专利号 4683195、4683202 和 4800159 中详细描述，并且它们通过参引结合于此。

简要的，在 PCR™ 中，准备的两引物序列与标记序列的对应互补链的区域互补。过量的脱氧核苷三磷酸和 DNA 聚合酶如 Taq 聚合酶一起加入反应混合物。如果样品中出现标记序列，引物将与标记结合，并且聚合酶将沿标记序列通过加入核苷酸引起引物延伸。通过升高和降低反应混合物的温度，延伸的引物从标记物上游离形成反应产物，过量的引物结合到标记物上形成反应产物，该过程反复重复。

反转录酶 PCR™（RT-PCR™）扩增程序可用于量化扩增的 mRNA 量或从所需 mRNA 中制备 cDNA。反转录 RNA 成 cDNA 的方法已熟知和描述在 Sambrook 等 1989 中。反转录可选择的方法利用热稳定的 RNA 依赖的 DNA 聚合酶。这些方法描述于 WO 90/07641，于 1990 年 12 月 21 日递交，在此通过参引结合于本文。聚合酶链反应方法学在本领域被熟知。

ii. 其它核酸扩增反应

用于扩增的其它方法是连接酶链反应（LCR™），公开在 EPA No. 320 308，通过参引将其全部结合于此。在 LCR 中，制备两个互补的探针对，并在靶序列存在下，每一对将与靶的对应互补链结合以使它们邻接。加入连接酶，两个探针对将连接形成一个单元。如在 PCR™ 中一样通过温度循环，结合连接单元从靶上游离并接着作为用于过量探针对连接的“靶序列”。美国专利 4883750 描述了与 LCR 相似的用于结合探针对到靶序列的方法。

Qbeta 复制酶，描述在 PCT 申请号 PCT/US87/00880，通过参引结合于此，还可用于本发明另一个扩增方法。在此方法中，RNA 的复制序列有与加入到 RNA 聚合酶存在的样品中的靶互补的区域。聚合酶将复制可接着检测的复制序列。

一等温的扩增方法，其中限制性内切酶和连接酶用来完成限制性位点的一条链中含有核苷酸 5'-[α-硫代]-三磷酸的靶分子扩增，也可

在本发明中用于核酸扩增。

链置换扩增 (SDA) 是包括数轮链置换和合成完成核酸等温扩增的另一方法, 即切口平移。相似的方法, 称为修复链反应 (RCR), 包括退火贯穿扩增靶区域的几个探针, 接着进行修复反应, 其中四碱基中仅有两个加入。另外两个碱基可以作为 (生物素) biotinylated 衍生物加入其中以易于检测。相似的方法用于 SDA。靶特异性序列也可用循环探针反应 (CPR) 检测。在 CPR 中, 一具有非特异性 DNA 的 3' 和 5' 序列和特异性 RNA 中间序列的探针与样品中存在的 DNA 杂交。杂交后, 用 RNA 酶 H 处理反应, 探针确定的产物为特定产物, 在消化后释放。初始模板与另一循环探针退火, 反应重复进行。

另一扩增方法还描述于 GB 申请号 2 202 328 和 PCT 申请号 PCT/US89/01025 中, 其每一个均结合于此作为参考, 可以按本发明被应用。在以前的申请中, “修饰的”引物用于 PCR™ 样模板和酶依赖的合成。引物可以修饰为用捕获部分 (如生物素) 和/或检测部分 (如酶) 标记。在近来的申请中, 将过量的标记探针加入样品。在靶序列存在下, 探针结合并被催化裂解。分开后, 靶序列完整无缺地被释放以通过过量探针结合。标记探针的裂解发出靶序列存在的信号。

其它的核酸扩增程序包括基于转录的扩增系统 (TAS), 包括基于核酸序列的扩增系统 (NASBA) 和 3SR Gingeras 等, PCT 申请 WO 88/10315, 通过参引结合于此。在 NASBA 中, 可以通过标准的酚/氯仿提取、临床样品热变性、裂解缓冲液处理和分离 DNA 和 RNA 的小离心柱或 guanidinium 氯化物提取 RNA 制备扩增的核酸。这些扩增技术包括有靶特异性序列的引物的退火。聚合后, DNA/RNA 杂合体用 RNA 酶 H 消化同时双链 DNA 分子再次热变性。在任一情况下, 单链 DNA 通过在聚合后加入第二个特异性引物完全形成双链。双链 DNA 分子随后用 RNA 聚合酶如 T7 或 SP6 多重转录。在热稳定性循环反应中, RNA 反转录为单链 DNA, 随后转变为双链 DNA, 并随后再次用 RNA 聚合酶如 T7 或 SP6 转录。得到的产物, 无论截断的或完整的, 显示了靶特异性序列。

Davey 等 (EPA No. 329 822, 通过参引结合于此) 揭示核酸扩增方

法包括循环合成单链 RNA (ssRNA), ssDNA 和双链 DNA(dsDNA), 可以与本发明一致应用。ssRNA 是第一个寡核苷酸引物的模板, 通过反转录酶延伸 (RNA 依赖的 DNA 聚合酶)。随后通过核糖核酸酶 H 的作用从产生的 DNA:RNA 双体中除去 RNA (RNA 酶 H, 特异性用于 RNA 与 DNA 或 RNA 的双体的 RNA 酶)。产生的 ssDNA 是第二个引物的模板, 还包括 5' 与模板有同源性的 RNA 聚合酶启动子的序列 (其例子为 T7RNA 聚合酶)。该引物随后用 DNA 聚合酶延伸 (其例子为用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I “Klenow” 大片段), 产生双链 DNA 分子 (“dsDNA”), 具有与引物之间初始 RNA 同样的序列, 另外在一末端具有启动子。这启动子序列可用于合适的 RNA 聚合酶以产生 DNA 的许多 RNA 拷贝。这些拷贝随后可重进入循环导致迅速扩增。通过适当的选择酶, 扩增可不必在每轮循环中加入酶而热稳定地完成。因为这个过程的循环是自然状态, 起始序列可选择用 DNA 或 RNA 的形式。

Miller 等 (PCT 申请 WO 89/06700, 通过参引结合于此) 揭示核酸序列扩增方案基于启动子/靶单链 DNA (“ssDNA”) 引物序列的杂交, 随后转录序列的许多拷贝。该方案不是循环的, 如, 新模板没有从所得的 RNA 转录物中产生。其它扩增方法包括 “RACE” 和 “单侧 PCR” (Frohman, 1990, 通过参引结合于此)。

基于核酸中存在的两个 (或更多) 寡核苷酸连接的方法, 所述核酸具有产生双寡核苷酸的序列, 因此, 扩增双寡核苷酸也可用于本发明的扩增步骤。

iii. 扩增产物的分析

接着任何扩增, 可能想从模板和过量引物中分离扩增产物, 以决定是否发生特异性扩增。在一实施例中, 扩增产物用琼脂糖、琼脂糖-丙烯酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳常规方法分离。见 Sambrook, 1989。

作为选择的, 色谱法技术可被用于有效分离。有许多种色谱法可在本发明中应用: 吸附、分配、离子交换和分子筛和应用它们的许多特殊的技术, 包括柱、纸、薄层和气相色谱。

为证实标记序列的扩增, 扩增产物必须显色。一典型的显色方法

包括用溴化乙锭染色并在 UV 灯下显色。作为选择的，如果扩增产物用放射性或荧光物质标记的核苷酸掺入标记，扩增产物可暴光于 X 线膜或在适当激发光谱下显色，接着分离。

在一实施方案中，显色间接完成。接着扩增产物的分离，加入标记的核酸探针与扩增的标记序列接触。优选的探针是与发色基团缀合但可以是放射标记的。在另外的实施方案中，探针与结合配偶体缀合，如抗体或生物素，而结合对的另一成员带有可被检测部分。

在一实施方案中，通过 Southern blotting 检测并用来自 HLA-Cw7 基因序列的标记探针杂交。包括在 Southern blotting 中的技术对那些本领域熟练人员所熟知并可以在许多标准的关于分子操作的书中发现。见 Sambrook, 1989。简要的，扩增产物是通过凝胶电泳分离。凝胶随后与膜接触，例如硝酸纤维素，允许核酸转移并且非共价结合。随后，膜与发色基团缀合的探针温育，该探针能够与靶扩增产物杂交。检测通过将膜暴露于 X 线膜或离子发射检测装置进行检测。

一以前实施例描述于美国专利号 5,279,721，在此通过参引与本文结合，它公开了自动电泳和核酸转移的仪器和方法。仪器允许电泳和没有凝胶的外部操作的印迹并适合根据本发明实行的方法。

6. 诱导限制性的 T 细胞反应

本发明公开了在显示 HLA-Cw7 限制性的 CTL 反应或表达 HLA-Cw7 单元型的病人中预防 AIDS 的方法。对于可以表达单元型但不显示 HLA-Cw7 限制性 CTL 反应的个体，可以通过增强 HLA-Cw7 单元型表达水平从他们中诱导反应。这可以通过给予有效治疗剂量的 γ -干扰素来完成。 γ -干扰素的描述在上文讨论。

7. HIV 多肽和肽

在一些实施方案中，本发明的方法包括呈递 HIV 多肽或肽，用于分析病毒特异性的 T 细胞反应或作为诱导病毒特异性 T 细胞反应的方法。

a. HIV 多肽和其中的片段

从近年来大量报告中，已清楚基于 DNA 免疫的方案有效地引发特

异性的 CTL 反应, 尤其针对病毒抗原 (Ulmer, 1993; Xiang, 1994; Sedegah, 1994; Fuller, 1994; Lu, 1995; Yokoyama, 1995; Yasutomi, 1996)。另外, 已进行成功尝试用核酸引进肽序列来诱导 CTL 反应, 或用直接的 DNA 疫苗或基于重组痘苗病毒多表位疫苗 (Thomson, 1996; An, 1997; Sastry, 1992; Nehete, 1994; Nehete, 1995; Ciernik, 1996; Wang, 1998)。基于 CTL 表位而非 HIV 完全蛋白抗原的 DNA 疫苗基本原理是认识到需要避免非必需免疫反应如感染增强抗体 (Levy, 1993)。

因此, 本发明的各方面涉及应用分离的 DNA 片段和表达野生型、多形态的或突变的 HIV 多肽及其片段 (如肽) 的重组载体, 和应用重组宿主细胞通过 DNA 技术的应用表达野生型、多形态的、截断的或突变的 HIV 多肽。本发明方法优选的实施方案包括 HIV 包膜和 gag 多肽的应用。即使更优选的是 gp160 多肽的应用。最终, 另外优选的实施方案利用 HIV 肽, 尤其从 gp160 中得到的肽。

本发明涉及从哺乳动物和人细胞中分离的 DNA 片段, 它是从总基因组 DNA 释放的并能够表达从 HIV 尤其 HIV-1 中得到的蛋白或多肽。

当在此应用时, 术语 "DNA 片段" 指的是已从释放的特别物种总基因组 DNA 分离的 DNA 分子。因此, 编码 HIV 多肽的 DNA 片段指的是含有野生型、多形态、截断或突变的 HIV 多肽编码序列的 DNA 片段, 是从总哺乳动物或人基因组 DNA 分离的或纯化的。包括在术语 "DNA 片段" 是 DNA 片段和这些片段的小片段, 和重组载体包括例如, 质粒、粘粒、噬菌体、病毒等等。

同样的, 包含分离的或纯化的野生型、多形态、截断的或突变的 HIV 多肽基因的 DNA 片段指的是包括野生型、多形态、或突变的 HIV 多肽编码序列的 DNA 片段, 在某些方面, 调节序列, 基本上是与其余自然存在基因或蛋白编码序列分离的。在此方面, 术语 "基因" 用于简单地指功能蛋白、多肽或肽编码单位。如那些本领域所理解, 该功能术语包括基因组序列、cDNA 序列和小的工程基因片段, 表达或可适合表达蛋白、多肽、域、肽、融合蛋白和突变体。类似的, 术语 "α

- 基因”在本文中是用来特指表达或可适合表达部分蛋白或多肽的基因片段，如肽、域、融合蛋白和突变体。类似的，术语“小-基因”在本文中是用来特指表达或可适合表达部分蛋白或多肽的基因片段，如肽、域、融合蛋白和突变体。

“基本上与其余编码序列分离的”是指感兴趣的基因，在野生型的、多形态的或突变的 HIV 多肽基因情况下，形成 DNA 片段编码区的重要部分和 DNA 片段不含有自然存在的编码 DNA 的大部分，如大的染色体片段或其余功能基因或 cDNA 编码区域。当然，这指的是 DNA 片段作为初始分离的并不排斥后来人为操作加入的基因或编码区域。

在特别的实施方案中，发明涉及分离的 DNA 片段和结合有编码野生型的、多形态的、截断的或突变的 HIV 多肽或肽的 DNA 序列的重组载体，所述肽或多肽在其氨基酸序列中包括与野生型的、多形态的、截断的或突变的 HIV 多肽一致的或本质上相应的紧邻的氨基酸序列。

在其余的实施方案中，发明涉及分离的 DNA 片段和结合有编码 HIV 多肽或肽的 DNA 序列的重组载体，所述肽或多肽在其氨基酸序列中包括与 HIV env 或 gag 多肽一致的或本质上相应的紧邻的氨基酸序列。例如发明涉及应用小基因作为载体，针对小基因的氨基酸产物产生有效免疫反应。小基因可编码能够诱导 T 细胞特异性反应的肽，尤其是 HLA-Cw7 反应。

术语“生物学功能相当的”在本领域被熟知并在此进一步详细描述。因此，氨基酸序列有在约 70%到 80%，或更优选的在约 81%到 90%，或甚至更优选的，在 91%到 99%之间与 HIV env 或 gag 多肽的氨基酸是一致的或功能相当的，其条件是蛋白的生物学活性被维持。

在此应用的术语“功能相当的密码子”指的是编码相同氨基酸的密码子，如编码精氨酸或丝氨酸的六个密码子，还指的是编码生物学相当的氨基酸的密码子（见表 1，下文）

表 1
密码子表

氨基酸			密码子							
丙氨酸	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
半胱氨酸	Cys	C	UGC	UGU						
天冬氨酸	Asp	D	GAC	GAU						
谷氨酸	Glu	E	GAA	GAG						
苯丙氨酸	Phe	F	UUC	UUU						
甘氨酸	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU				
组氨酸	His	H	CAC	CAU						
异亮氨酸	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
赖氨酸	Lys	K	AAA	AAG						
亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
甲硫氨酸	Met	M	AUG							
天冬酰胺	Asn	N	AAC	AAU						
脯氨酸	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU				
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA	CAG						
精氨酸	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU		
丝氨酸	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU		
苏氨酸	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU				
缬氨酸	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU				
色氨酸	Trp	W	UGG							
酪氨酸	Tyr	Y	UAC	UAU						

还将理解氨基酸和核酸序列可包括另外的残基，如其它 N-或 C-末端氨基酸或 5'或 3'序列，并仍可在本质上为此处公开的前述序列之一，只要该序列符合上述的标准，包括生物学蛋白活性的维持，此处涉及蛋白质表达。终止序列的加入特别应用于核酸序列，可以，例如，包括编码区域 5'或 3'部分两端的各种非编码序列或可包括各种终止序

列，如，内含子，在基因中是已知存在的。

本发明应用的核酸片段，不管编码序列本身的长度，可与其余的NA序列结合，如启动子、聚腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、其余编码片段等等，以至于其总长度可适当变化。因此可预期应用几乎任何长度的一核酸片段，优选对其总长度的限制能够使所计划的重组DNA操作易于制备和应用。

本发明应用的DNA片段界定了生物学功能相当的HIV env和gag蛋白和肽。这些序列可引起编码冗余和功能相当，已知这可以自然发生在核酸序列和因此编码的蛋白中。作为选择，功能相当蛋白或肽可通过应用重组DNA技术产生，其中蛋白结构的改变可被操作，基于所更换的氨基酸的特征的考虑。人们设计的改变可通过应用定点突变技术来引入，如引入提高蛋白抗原性或为检查分子水平DNA结合活性而检测突变体。

任何人还可制备融合蛋白和肽，如HIV多肽编码区与其余的具有所需功能的蛋白或肽位于同一表达单元，如用于纯化或免疫检测目的（如蛋白可分别通过亲和层析纯化和酶标记编码区得以纯化）。

本发明包含的是编码相对小的肽的DNA片段，如，从约15到约50个氨基酸长度的肽，并更优选的，从约15到约30个氨基酸长度的肽；还有大到包括对应的HIV env或gag多肽全长序列的蛋白。

i. 体外蛋白的产生

依照本发明的一些实施方案，在着用病毒载体转染后，可用多种方法制备初始哺乳动物细胞培养物。在体外为保持细胞存活并与表达构建体接触，有必要确保细胞与正确比例的氧和二氧化碳和营养基质维持接触而免于微生物污染。细胞培养技术在此通过文献被较好证明和公开(Freshner, 1992)。

前述的一实施方案包括应用基因转移到无限增殖化细胞，用于蛋白的产生和/呈递。所需蛋白的基因可用上文描述方法转移到适当的宿主细胞，随后在合适条件下培养细胞。实质上任何多肽基因可以这种方式应用。重组表达载体的产生和其包括的原理在上文讨论。作为选

择，产生的蛋白可以是所述细胞正常合成的内源性蛋白。

本发明的另一实施方案应用自体 B 淋巴细胞系，用表达 HIV 包膜蛋白的病毒载体转染。哺乳动物宿主细胞系其它例子包括 Vero 和 HeLa 细胞、其它 B-和 T-细胞系，如 CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, 等，也有中国仓鼠卵巢细胞系、W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 和 MDCK 细胞。另外，可选择宿主细胞株调节插入序列的表达或以所需方式修饰和加工基因产物。蛋白产物的这种修饰（如糖基化）和加工（如切割）对于蛋白的功能应是重要的。不同的宿主细胞有翻译后蛋白的加工和修饰的特有和特殊机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统确保表达的外源蛋白的正确修饰和加工。

可以应用大量的选择系统，包括但不局限于，在 tk⁻, hgp^{rt}- or ap^{rt}- 细胞中，分别应用 HSV 胸苷激酶、次黄嘌呤-谷氨酸磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因。同样，抗代谢抗性可被应用为选择基础：对于 dhfr, 承担对---抗性；gpt, 承担对霉酚酸的抗性；neo, 承担对氨基糖苷 G418 的抗性；和 hyg^{ro}, 承担对潮霉素的抗性。

动物细胞在体外可以两种方式传代：遍及在大量培养物的悬浮液中非依赖贴壁细胞生长或需要贴附于固相基质中传代的依赖贴壁细胞生长（如细胞生长的单层型）。

连续建立的细胞系的非依赖贴壁或悬浮培养物是细胞和细胞产物大规模生产的最广泛应用手段。然而，悬浮培养有限制性，如潜在致癌性和与贴壁细胞相比低的蛋白产量。

ii. 生物学功能等同物

如本领域那些熟练人员将所理解的，修饰和更换可在 HIV 多肽或肽的结构中进行并仍产生有相似或另外所需特征的分子。例如，在蛋白结构中某些氨基酸可用其它氨基酸替代，没有可发现的与结构交互结合能力的损失，如，抗体的抗原结合区或如 Tat 和 RNA 聚合酶 II 的分子的结合位点。既然是相互活性能力和定义蛋白的生物功能活性的蛋白的本质，特定氨基酸序列的替代可在蛋白序列中进行（或，当然，在潜在的 DNA 编码序列中进行）且仍然得到有相似（拮抗的

(agonistic)特征的蛋白。因此本发明人预期各种改变可在 HIV 多肽或肽序列(或潜在的 DNA)中进行,没有可发现的生物学用途或活性的损失。

在功能等同物方面,熟练技术人员也理解,还是熟练技术人员较好理解,生物学功能等同蛋白或肽的内在定义是,局限于可在一分子的规定部分进行大量改变,仍产生有等同生物学活性可接受水平的分子。生物学功能相当的肽在此定义为那些其中某些,但并非多数或全部的氨基酸可被替代的肽。特别的,关于小肽,较少的氨基酸可被改变。当然,许多独特的有不同替代的蛋白/肽可较易产生并一致用于本发明中。

还可较好地理解,当某些残基对于蛋白或肽的生物学或结构特征显示特别重要时,如在酶活性位点中或 RNA 聚合酶 II 结合区域中的残基,这些残基一般不可以改变。这是在本发明的情况下,此处残基显示对 CTL 诱导反应是必须的,一般不应该改变。

氨基酸替代一般基于氨基酸侧链替代的相对类似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等等。大小、形状和氨基酸侧链替代类型的分析揭示精氨酸、赖氨酸和组氨酸全是阳性电荷残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸全有相似的大小;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸一般都有相似的形状。因此基于这些考虑,此处定义下面的亚群为生物学功能等同物:精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

为达到更定量的改变,应考虑氨基酸的亲水性指数。根据疏水性和电荷特征已赋予每种氨基酸的亲水性指数(hydrophobic index),这些是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酰胺(-3.5);谷氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

在授予蛋白相互生物学功能中氨基酸亲水性指数的重要性在本领域通常理解 (Kyte & Doolittle, 1982, 在此通过参引结合于本文)。已知某些氨基酸可被其它具有相似的亲水性指数或数值的氨基酸替代并仍保持相似的生物学活性。基于亲水性指数进行改变, 亲水性指数在 ± 2 内的氨基酸替代是优选的, 在 ± 1 内是特别优选的, 在 ± 0.5 是甚至更特别优选的。

在本领域还理解, 相似氨基酸的替代可基于疏水性有效进行, 特别是由此产生的生物学功能相当的蛋白或肽打算用于免疫学实施方案, 在本案中。美国专利号 4554101, 通过参引结合于本文, 表明蛋白最大的局部平均亲水性, 由其邻近的氨基酸的亲水性支配, 与其免疫原性和抗原性相关, 即, 与蛋白的生物学特性有关。

如美国专利号 4554101 所详述, 下面的亲水性值 (hydrophilicity values) 已赋值于氨基酸残基: 精氨酸 (+3.0); 赖氨酸 (+3.0); 天冬酰胺 (+3.0 ± 1); 谷氨酰胺 (+3.0 ± 1); 丝氨酸 (+0.3); 天冬氨酸 (+0.2); 谷氨酸 (+0.2); 甘氨酸 (0); 苏氨酸 (-0.4); 脯氨酸 (-0.5 ± 1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 (-0.5); 胱氨酸 (-1.0); 甲硫氨酸 (-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸 (-1.8); 异亮氨酸 (-1.8); 酪氨酸 (-2.3); 苯丙氨酸 (-2.5); 色氨酸 (-3.4)。

在基于相似的亲水性值进行改变时, 替代的氨基酸的亲水性值在 ± 2 内的氨基酸替代是优选的, 在 ± 1 内是特别优选的, 在 ± 0.5 是甚至更特别优选的。

当讨论集中于氨基酸改变产生的功能性相当的多肽时, 将认识到这些改变可以有效通过编码 DNA 的改变, 全面来看遗传密码是兼并的并且两个或更多密码子可编码同一个氨基酸。此文上面显示的氨基酸表和其密码子应用于这样的实施例方案, 以及其它用途, 如用于设计探针和引物等等。

b. 合成肽

本发明还描述用于本发明各种实施方案的 HIV env 肽。发现这些肽的序列遍及提供的实施例, 例如在表 2 和 8 中。可预期本发明方法

可用包含这些肽中的一个肽或不同肽编码多样的这些序列。例如，包含肽 61#序列的肽可与肽 63#和/或肽 104#结合应用(见表 2)。因此可预期任何与公开的肽序列多样的改变包括在本发明内。肽#61, #63, #104, #111, #113, 和 #116 已在一起应用, 然而根据本发明的方法包括一个或多个这些序列的肽可在混合液中省略。作为选择, 其它序列可包括在肽序列的混合物中。因此, 其它序列肽可包括在混合液中, 其可包括, 例如, #61 和/或 #63 和/或#104 和/或 #111 和/或#113 和/或 #116。

进一步的, HIV 包膜肽的各种共有序列也是在发明的范围内(见表 2)。表 2 显示来自不同型别 HIV 株的相应的共有序列 HIV 包膜肽氨基酸序列的比较(应用于实施例中, 如表 8 描述)。共有序列是从 1995 年 Los Alamos 国家实验室数据库得到的 A-U 型氨基酸序列。

表 2: 肽序列

肽编号	104	V Y Y G V P V W K E A
共有序列	-A	V Y Y G V P V W K D A
共有序列	-B	V Y Y G V P V W K E A
共有序列	-C	V Y Y G V P V W K E A
共有序列	-D	V Y Y G V P V W K E A
共有序列	-E	V Y Y G V P V W R D A
共有序列	-F	V Y Y G Y P V W K E A
共有序列	-G	V Y Y G Y P V W E D A
共有序列	-O	V Y S G V P V W E D A
共有序列	-U	V Y Y G V P V W K D A
肽编号	111	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-A	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-B	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-C	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-D	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-E	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-F	L W D Q S L K P C V K L T
共有序列	-G	L W D E S L K P C V K L T
共有序列	-O	L W D Q S L K P C V Q M T
共有序列	-U	L W D ? S L K P C V K L T

肽编号	113	S	V	I	T	Q	A	C	S	K	V	S	F	E
共有序列	-A	S	A	I	T	Q	A	C	S	K	V	S	F	E
共有序列	-B	S	V	I	T	Q	A	C	S	K	V	S	F	E
共有序列	-C	S	A	I	T	Q	A	C	S	K	V	S	F	D
共有序列	-D	S	A	I	T	Q	A	C	S	K	V	T	F	E
共有序列	-E	S	V	I	K	Q	A	C	S	K	I	S	F	D
共有序列	-F	S	T	I	T	Q	A	C	S	K	V	S	W	D
共有序列	-G	S	T	I	K	Q	A	C	S	K	V	N	F	D
共有序列	-O	T	T	I	?	Q	A	C	S	K	V	S	F	E
共有序列	-U	S	?	I	K	Q	A	C	S	K	V	S	F	E

肽编号	116	G	T	G	P	C	T	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-A	G	T	G	P	C	K	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-B	G	T	G	P	C	T	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-C	G	T	G	P	C	H	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-D	G	T	G	P	C	K	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-E	G	T	G	P	C	K	N	V	S	S	V	Q	C
共有序列	-F	G	T	G	P	C	K	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-G	G	T	G	P	C	K	N	V	S	T	V	Q	C
共有序列	-O	G	T	G	L	C	?	N	I	T	V	V	T	C
共有序列	-U	G	T	G	P	C	K	N	V	S	T	V	Q	C

肽编号	63	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	L	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-A	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	I	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-B	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	?	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-C	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	L	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-D	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	?	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-E	I	F	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	L	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-F	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	L	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-G	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	A	T	A	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-O	F	L	G	V	L	S	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	L	T	L	T	V	Q	A	R	Q
共有序列	-U	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T	M	G	A	A	S	?	?	L	T	V	Q	A	R	Q

肽编号	61	Y	L	R	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-A	Y	L	R	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-B	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-C	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-D	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-E	Y	L	K	D	Q	K	F	L	G	L	W	G
共有序列	-F	Y	L	?	D	Q	Q	L	L	G	L	W	G
共有序列	-G	Y	L	?	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G
共有序列	-O	Y	L	R	D	Q	Q	L	L	G	L	W	G
共有序列	-U	Y	L	E	S	Q	Q	L	L	G	L	W	G

应用 AIDS 感染的人 PBMCs 分析特异性肽诱导特异性 T 细胞反应的能力。早先的实验也已检测 HIV 肽,但在那些实验中,检测 HIV 包膜蛋白 gp160 中的一系列肽的诱导鼠 T 细胞增殖反应的能力,而非抗体反应(Sastry, 1991;通过参引结合于此)。在两个 F1 杂交鼠株(B6C3 F1 和 A. SW x Balb/c F1)中 19 个肽中的 7 个(61, 63, 103, 104, 111, 113, 和 116)诱导相对好的 T 细胞增殖反应。肽 61, 63, 103, 104, 和 113 不产生可识别重组 gp160 的抗体,但它们诱导针对免疫肽和 HIV Env 蛋白的 T 细胞反应,肽 103-112 来自第一个保守区而肽 113-117 来自第二个保守区。肽 61 和 63 分别来自免疫决定基区域和膜融合结构域。

应用在鼠中确定的诱导 T 细胞增殖反应的一些肽的混合液在猴子中检测诱导 HIV 特异性 T 细胞反应的能力(Nehete, 1993;通过参引结合于此)。肽 104、111 和 63 在所有三只检测猴子的 PBMC 中产生好的反应,而肽 113 和 116 产生弱的反应。两个猴子的 PBMCs 中显示针对肽 61 好的增殖反应,而用肽 105 和 R15K 诱导则没反应。

此外,来自 HIV 基因产物的特异肽序列产生的体内 CTL 反应是一致的,应用了一修饰肽(Berzofsky, 1991)和一未修饰的游离的合成肽(Sastry, 1992;通过参引结合于此)。来自 HIV 包膜蛋白 gp120 免疫决定基 V3-环(aa 315-329)的合成肽 R15K 在鼠中诱导 CD8⁺-env 特异性的 CTLs。

因为他们相对较小,发明的肽还可根据传统技术在液相或固相中合成。各种自动合成仪是商业上可获得的并可依据已知的操作指南进行使用。见,例如,Stewart 和 Young, (1984); Tam 等人, (1983); Merrifield, (1986); 和 Barany and Merrifield (1979), 每一个通过参引结合于此。短肽序列或交迭肽的文库,通常从约 6 到约 35 到 50 氨基酸,其对应于在此描述的选择区域,可容易的合成并在所设计的用于鉴别活性肽的筛选实验中筛选。作为选择,重组 DNA 技术可在此应用,其中编码本发明肽的核苷酸序列插入到表达载体,转化或转染进合适的宿主细胞并在适于表达的条件下培养。

发明的组合物可包括致使其得到生物学保护的修饰肽。当给予人

个体时生物学保护的肽比非保护肽有确定的好处，和如在美国专利号 5028592 中公开的，在此通过参引结合于本文，保护性肽常显示增加的药理学的活性。

本发明应用的组合物还可含有包括所有 L-氨基酸、所有 D-氨基酸或它们的混合物的肽。D-氨基酸的应用可授予对在人体内自然存在的蛋白酶另外的抗性和较少的免疫原性并因此能期望有较长的生物学半衰期。

8. 运载系统

为检测病毒特异性 T 细胞反应，在要求发明的一些实施例中，HIV 多肽或肽被运载到靶细胞，为诱导 T 细胞反应在其表面表达病毒蛋白的片段。有各种运载方法包括灌注、表达构建的转染、病毒载体和下文公开的其它方法。

A. 通过灌注转运

本发明的实施方案通过灌注将肽或肽组合物转运进入细胞。表达构建体或病毒构建体的连续灌注是预期的。连续灌注运载的大量的构建体或肽可由所需摄取的量决定。本发明公开一灌注例子，初始细胞培养物浓度为 10^6 细胞/ml，可首先被标记，洗涤，随后与 $100\mu\text{g}$ 合成肽温育两个小时。

b. 表达载体

在可选择的实施方案中，HIV 多肽或肽通过应用表达构建体运载到靶细胞。贯穿该申请，术语“表达构建体”意味着包括含有编码 HIV 多肽的核酸的任何类型基因构建体。“病毒载体”指的是主要来源于病毒序列的表达构建体。为使构建体有效表达，编码 HIV 多肽的多核苷酸将位于启动子的转录控制之下。“启动子”指的是由宿主细胞合成机器或引入的合成机器识别的 DNA 序列，对于起始一基因特异性转录所必需。短语“在转录控制下”意味着启动子在多核苷酸相关的正确位置控制 RNA 聚合酶起始和表达多核苷酸。

术语启动子将在此用来指一组转录控制模块，它们成串位于 RNA 聚合酶 II 的起始位点周围。得自多种病毒启动子的分析认识到大量启

动子是如何组织的,包括那些来自 HSV 胸苷激酶(tk)和 SV40 的早期转录单元。这些研究,通过许多近期工作增强,已显示启动子由不连续功能模块组成,每个含有约 7-20bp 的 DNA,并含有转录活化子或抑制子蛋白的一个或多个识别位点。

在每个启动子中至少一个模块有 RNA 合成起始位点定位功能。这种最熟知的例子是 TATA 盒,但在一些启动子中缺少 TATA 盒,如来自哺乳动物末端脱氧核苷转移酶基因的启动子和 SV40 晚期基因的启动子,不连续元件覆盖起始位点本身有助于固定起始部位。

另外的启动子元件调节转录起始的频率。典型的,这些位于起始位点上游 30-110bp 区域,尽管近期大量的启动子显示同样含有起始位点下游的功能元件。启动子之间的间距常常是灵活的,所以当元件彼此之间反转或迁移时启动子功能是被保护的。在 tk 启动子中,启动子之间的间距可增加到 50bp 间隔,此时活性开始下降。依赖于启动子,看来单独元件可协同的或独立的行使活化转录的功能。

控制 HIV 多核苷酸表达应用的具体启动子不被认为是重要,只要它能够在靶细胞中表达多核苷酸。因此当人源细胞作为目标,优选的定位多核苷酸编码区邻近并在能够在人源细胞中表达的启动子控制之下。通常说来,这类启动子可包括人源或病毒启动子。

在各种实施方案中,人巨细胞病毒(CMV)立即早期基因启动子,SV40 早期启动子,劳氏肉瘤病毒长末端重复可用于获得 HIV 多核苷酸高水平表达。应用其它病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子,这些在本领域是熟知的,完成多核苷酸表达是同样可预期的,条件是表达水平足以诱导 T 细胞反应。

通过应用有熟知特征的启动子,转染后多核苷酸表达的水平 and 模式可被最优化。例如,启动子的选择是在特异性细胞中有活性的,如酪氨酸酶(黑色素瘤)、 α -胎蛋白和白蛋白(肝肿瘤)、CC10(肺肿瘤)和前列腺特异性抗原(前列腺肿瘤)将允许 HIV 多核苷酸组织特异性表达。进一步,通过选择在对特异性物理学信号的反应中调节的启动子可允许 HIV 多肽构建体的诱导表达。

增强子原先作为遗传元件被检测，它定位在 DNA 同一分子的启动子远端位置增强转录。通过远距离增强作用能力在原核转录调节经典研究中有很少先例。随后研究显示具有增强子活性的 DNA 区域象启动子样被组织一起。那是，它们是由许多单独的元件组成，其中每个结合于一个或多个转录蛋白。

增强子和启动子之间的基本区别是可操作的。一增强子区域作为整体必须能在远端刺激转录；这对于启动子区域或其组成元件不必是真实的。另一方面，启动子必须有一个或多个元件指导特定位点和特定方向 RNA 合成的起始，然而增强子缺少这些特异性。启动子和增强子常常交迭和邻近，表面上常有很相似的模块组织。

另外，任何启动子/增强子的结合（如真核启动子数据库 EPDB）也可用于驱动 HIV 多核苷酸构建体的表达。应用 T3、T7 或 SP6 细胞质表达系统是另一可能的实施方案。如果提供合适的细菌噬菌体聚合酶，或作为运载复合物的一部分或为另外的基因表达载体，真核细胞能支持某些细菌噬菌体启动子的细胞质转录。

在发明某些实施方案中，表达载体运载进入细胞可利用表达载体中的标记在体外或体内确定。标记将导致转染细胞可鉴别的改变，允许表达的鉴别。通常的，包含药物选择标记有助于克隆和转化子的选择。作为选择，酶如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)（真核的）或氯霉素转乙酰酶(CAT)（原核的）可被应用。免疫学标记也可被应用。不认为应用的选择性标记是重要的，只要能够和编码 HIV 多肽的多核苷酸一起表达。进一步的选择性标记例子对于本领域熟练人员是已知的。

典型的，将包括聚腺苷化信号以有效指导转录物的正当聚腺苷化。聚腺苷化信号的本质对于发明的成功操作不被认为是重要的，并且任何这种序列都可以应用。本发明人已应用 SV 聚腺苷化信号，在此它是方便的并已知的在应用的靶细胞中功能良好。也预期作为表达构建体的元件是终止子。这些元件可增强信号水平并使得从构建体到其它序列的通读最小化。

c. 病毒载体

在本发明的一些实施方案中，表达构建体包含一病毒或来自病毒基因组的工程构建体。确定病毒通过受体介导内吞进入细胞的能力和，在一些情况下，整合进入宿主细胞染色体，使得它们能够作为基因转移进入哺乳动物细胞内的较好的候选物。然而，因为已证明直接摄取裸DNA，和DNA复合物受体介导的摄取一样（下文讨论），表达载体不必为病毒，作为替代，可为能够支持哺乳动物细胞中编码基因的表达的任何质粒、粘粒或噬菌体构建体，如pUC或Bluescript™质粒系列。

i. 逆转录病毒

逆转录病毒种类被细分为三个主要组：癌病毒，如鼠白血病病毒；慢病毒，包括HIV-1和HIV-2；和泡沫病毒（foamy viruses）（泡沫病毒（spuma viruses））。逆转录病毒是单链RNA病毒，由在感染细胞中通过逆转录的过程能够转换它们RNA到双链DNA而特征化（Coffin, 1990）。产生的DNA随后稳定整合进细胞染色体作为原病毒并指导病毒蛋白的合成。整合导致病毒基因序列在受体细胞和其后代的保持。

逆转录病毒基因组含有三个基因-gag, pol和env-分别编码衣壳蛋白，聚合酶和包膜成分。Gag基因上游发现的序列，称为 Ψ ，功能是作为包装基因组进入病毒粒子的信号。两个长末端重复(LTR)序列存在于病毒基因组的5'和3'末端。这些含有强的启动子和增强子序列并需要整合进宿主细胞基因组中（Coffin, 1990）。

本发明包括应用慢病毒衍生的载体运载HIV多肽到靶细胞。慢病毒包括免疫缺陷病毒HIV-1, HIV-2, SIV和FIV。已知人慢病毒HIV-1是AIDS的诱因。自从AIDS首先在美国验证，病例数已以惊人步伐增加，现在已报道几百万AIDS感染者。一旦在感染个体中有重要的免疫抑制症状显现，对感染者预料的结果是死亡。当前没有已知的治疗能无限延迟或预防疾病的致命结果。尽管疾病首先出现在同性恋或双性男人和静脉内毒品滥用者中，已通过例如与病毒携带者亲密性接触或接受血液制品的方式传播到其他个体。

以相似的方式，猫免疫缺陷病毒，FIV，和猴免疫缺陷病毒，SIV，在猫和非人类灵长动物中导致AIDS样症状。FIV首先从加利福尼亚免

疫缺陷猫中分离并已经在世界各地的猫中发现。HIV-2 和 SIV 特别感染灵长动物如猩猩。由于 FIV、HIV-2 和 SIV 有与 HIV-1 生物学和病理学共同的特征，他们是研究抗-AIDS 策略的有益工具。HIV 自身可用作载体 (Dull, 1998; Naldini, 1996)。

慢病毒感染靶细胞的初步结果是病毒的外膜糖蛋白和其细胞受体之间相互作用，如在 HIV-1 感染人 T 细胞的例子中 gp120 和 CD4 所代表的。近来已报道 CD26 可能在 HIV-1 进入 CD4+ 细胞时被需要 (Callebaut, 1993)。

尽管包膜蛋白与靶细胞相互作用对于慢病毒的进入是必须的，这方面的知识已导致预防病毒感染有效策略的发展。从 gp120 V3 的某些肽在抑制 HIV 感染中有功能 (Nehete, 1993)。然而，De Rossi (1991) 报告 V3 衍生的合成肽事实上通过 CD4-依赖性机制增强 HIV-1 感染细胞。

为构建逆转录病毒载体，编码 HIV 多肽的核酸被插入到病毒基因组的某些病毒序列位置中，产生复制缺陷型病毒。作为选择，不能导致 AIDS 的突变的 HIV 病毒可被应用。为产生病毒粒子，含有 gag, pol 和 env 基因但没有 LTR 和 Ψ 成分的包装细胞系被构建 (Mann, 1983)。当含有人 cDNA 与逆转录病毒 LTR 和 Ψ 序列的重组质粒被导入该细胞系时 (如用磷酸钙沉淀)， Ψ 序列允许重组质粒的 RNA 转录物包装进入病毒粒子，随后分泌进入培养基 (Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann, 1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基，选择性浓缩，用于基因转染。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。当然，整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂 (Paskind, 1975)。

近来开发了一种允许逆转录病毒载体特异性靶向的新方法，是基于逆转录病毒的化学修饰，通过乳糖残基化学添加到病毒包膜上发展而成。该修饰可允许通过唾液酸糖蛋白受体特异感染肝细胞。

设计重组逆转录病毒靶向的不同方法，其中使用了针对逆转录病毒包膜蛋白和针对特异性细胞受体的生物素化抗体。抗体通过应用亲和素与生物素成分偶联 (Roux, 1989)。应用针对主要组织相容性复合

体 I 类和 II 类抗原的抗体,他们证实在体外嗜环境病毒感染带有那些表面抗原的各种人细胞(Roux, 1989)。

ii. 腺病毒

人腺病毒是双链 DNA 病毒肿瘤病毒,基因组大小约 36kb(Tooze, 1981)。作为真核基因表达的模型系统,腺病毒已被广泛研究和较好特征化,使得他们对于开发腺病毒基因转移系统成为有用的系统。该组病毒生长和操作相对简单,并在体内和体外显示广泛的宿主范围。在裂解性感染细胞中,腺病毒能够关闭宿主蛋白合成,引导细胞机器合成大量病毒蛋白,并产生大量的病毒。

基因组的 E1 区包括 E1A 和 E1B,编码作用于病毒基因组和一些细胞基因转录调节的蛋白。E2 表达,包括 E2A 和 E2B,允许病毒复制功能,如 DNA 结合蛋白、DNA 聚合酶和引导起始复制的末端蛋白的合成。E3 基因产物预防 CTLs 和肿瘤坏死因子引起的细胞裂解并在病毒繁殖中显示重要性。E4 蛋白相关的功能包括 DNA 复制,晚期基因表达,宿主细胞关闭,晚期基因产物包括大部分病毒体衣壳蛋白,并且这些仅在主要晚期启动子中多数单初始转录物加工发生后被表达。主要晚期启动子(MLP)在感染的晚期阶段显示高效率(Stratford-Perricaudet 和 Perricaudet, 1991)。

由于仅有小部分病毒基因组显示要求顺式(Tooza, 1981),腺病毒来源的载体提供了极好的大片段 DNA 替代潜力,与细胞系如 293 细胞结合使用。已开发 Ad5 转化的人胚肾细胞系(Graham, 1977)来提供反式的必要病毒蛋白。腺病毒的特征使得它们成为用于体内靶向细胞的好的候选者(Grunhaus and Horwitz, 1992)。

腺病毒系统运载外源蛋白到细胞中的特别好处包括:(I)用外源 DNA 替代相对大片段病毒 DNA 的能力;(ii)重组腺病毒的结构稳定性;(iii)给予人腺病毒的安全性;和(iv)缺少任何已知的腺病毒感染与肿瘤或恶化的关联;(v)获得高滴度的重组病毒的能力;和(vi)腺病毒的高感染性。

通常,腺病毒基因转移系统是基于重组工程化的腺病毒,通过缺

失其部分基因组使其复制机能不全，如 E1，并仍保持感染能力。当在腺病毒基因组中进行另外缺失时，可表达编码相对大的外源蛋白的序列。例如在 E1 和 E3 区都缺失的腺病毒能携带多达 10kb 的外源 DNA 并能在 293 细胞中生长至高滴度 (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991)。也已报道腺病毒感染后转基因神奇的持续性表达。

iii. AAV 载体

腺相关病毒是令人感兴趣的载体系统，用于本发明细胞中的转导，因其有高整合频率并能感染未分裂细胞，使得其能用于运载基因进入哺乳动物细胞，如，在组织培养中 (Muzyczka, 1992) 或体内。AAV 有广泛的宿主范围感染性 (Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Laughlin, 1986; Tratschin, 1984)。关于产生和应用 AAV 载体的详细资料描述在美国专利号 5,139,941 和美国专利号 4,797,368，每个在此通过参引合并于本文。

研究证实了 AAV 在基因运载中的应用，包括 LaFace 等 (1988); Zhou 等 (1993); Flotte 等 (1993); and Walsh 等 (1994)。重组 AAV 载体已成功用于体外和体内转导标记基因 (Kaplitt, 1994; Shelling 和 Smith, 1994; Yoder, 1994; Zhou, 1994; Samulski, 1989; Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Tratschin, 1985; Hermonat 和 Muzyczka, 1984) 和涉及人疾病的基因 (Luo, 1994; Walsh, 1994; Wei, 1994; Flotte, 1992; Ohi, 1990)。近来，AAV 载体已被证明可用于治疗胆囊纤维化的人 I 期临床实验。

AAV 是依赖性细小病毒，需要用另一种病毒共感染 (或腺病毒或单纯疱疹病毒的一员) 在培养细胞中进行生产性的感染 (Muzyczka, 1992)。在没有辅助病毒共感染的情况下，野生型 AAV 基因组通过其末端整合进入人染色体 19，在此其作为原病毒以潜伏状态存在 (Samulski, 1991; Kotin, 1990)。rAAV，然而，不限制在染色体 19 整合，除非 AAV Rep 蛋白也被表达 (Shelling 和 Smith, 1994)。当一细胞携带 AAV 原病毒用辅助病毒超感染时，AAV 基因组从染色体或从

重组质粒中被“拯救”；并建立正常生产性感染(Muzyczka, 1992; Kotin, 1990; Samulski, 1989; McLaughlin, 1988)。

典型的，重组 AAV(rAAV)病毒通过共转染含有所需基因两侧有两 AAV 末端重复的质粒(McLaughlin, 1988; Samulski, 1989; each incorporated herein by reference)和含有无末端重复的野生型 AAV 编码序列，如 pIM45，的质粒而产生(McCarty, 1991; 在此通过参引结合于本文)。细胞也被腺病毒或携带 AAV 辅助功能所需腺病毒基因的质粒感染或转染。以这种方式产生的 rAAV 病毒库污染有腺病毒，必须从 rAAV 颗粒中物理分离(如用氯化铯密度离心)。作为选择，含有 AAV 编码区域的腺病毒载体或含有 AAV 编码区域的细胞系和一些或全部的腺病毒辅助基因可被应用(Clark, 1995; Yang, 1994)。携带 rAAV DNA 的细胞系作为整合的原病毒也可被应用(Flotte, 1995)。

iv. 作为表达构建体的其它病毒载体

其它病毒载体可在本发明中用作表达构建体。载体源自病毒如痘苗病毒(Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)，和单纯疱疹病毒同样可被应用。这些病毒提供了一些令人感兴趣的特征用于各种哺乳动物细胞(Horwich, 1990; Friedmann, 1989; Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)。

根据近来缺陷型乙肝病毒的识别，得到不同病毒序列的结构功能关系的新视点。体外研究显示病毒尽管缺失多达 80%的基因组，仍可保持辅助依赖的包装和反转录能力(Horwich, 1990)。这暗示大部分基因组可被外源基因材料替代。嗜肝性和持续性(整合)是特别令人感兴趣的特征，用于肝导向基因转移。Chang(1991)近来将氯霉素转乙酰酶(CAT)基因引入鸭乙肝病毒基因组代替聚合酶、表面和前表面编码序列。用野生型病毒共转染进入禽肝细胞瘤细胞系。含有高滴度的重组病毒培养基用于感染原代鸭肝细胞。转染后至少 24 天检测到稳定 CAT 基因表达(Chang, 1991)。

d. 非病毒转染方法

本发明还考虑到了转移表达载体到培养哺乳动物细胞的几种非病

毒方法。这些包括磷酸钙沉淀(Graham 和 Van Der Eb, 1973; Chen 和 Okayama, 1987; Rippe, 1990)、DEAE-右旋糖苷(Gopal, 1985)、电穿孔(Tur-Kaspa, 1986; Potter, 1984)、直接显微注射(Harland 和 Weintraub, 1985)、DNA 荷载脂质体(Nicolau and Sene, 1982; Fraley, 1979)和 lipofectamine-DNA (脂质体转染胺 - DNA) 复合体、细胞超声降解(Fechheimer, 1987)、用高速微粒基因轰击(Yang, 1990)、聚阳离子(Boussif, 1995)和受体介导的转染(Wu and Wu, 1988; Wu and Wu, 1987)。这些技术中的一些可成功的适用于体内或离体用途。

c. 预防 AIDS 发展的治疗

本发明的方法包括预防 HIV 感染的或未感染个体发展为 AIDS 的治疗。首先评价可以评定个体显示出 HLA-Cw7 限制性 CTL 反应的能力。根据本发明, 在 HIV 感染或未感染病人的阳性结果暗示治疗的方法可给予用来预防 AIDS 的发病。

治疗个体的方法包括给予 HIV 多肽或肽。在一些实施方案中, 治疗包括给予单个或结合的 HIVenv-来源的肽。在另外的实施方案中, 治疗在佐剂或载体存在下给予。而在其它方案中, 也可考虑应用肽脉冲的树突状细胞。更进一步, 在一些例子中, 治疗包含给予 HIV 多肽或肽和其它 AIDS 治疗如 AZT 和 HAART。

1. HIV-Cw7 限制性的 CTL 反应

本发明提供了预防 AIDS 发展的方法。它包括检测个体显示 HLA-Cw7 限制性 CTL 反应的能力, 它是在本发明前未知的 HIV 特异性反应。HLA-Cw7 提供了确定可对将预防 AIDS 发病的治疗顺利反应的病人的遗传标记。用于决定这种类型 T 细胞反应的靶细胞和效应细胞在前面部分讨论。

除用 HIV CTL 表位直接刺激 CTL 反应外, 它可提供有用的通过刺激相关的辅助 T 细胞反应增强该反应。辅助细胞识别抗原 MHC II 类复合物, 被激活并分泌各种细胞因子, 随后活化其它免疫细胞的特异或非特异效应细胞, 包括 CTLs。辅助细胞通常在其表面表达 CD4 并被 IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , α - 和 γ -干扰素刺激。

2. 多肽和表位的核心序列

本发明预期给予含有 HIV 特异的 CTL 表位的 HIV 多肽或肽, 有效治疗预防 AIDS 发展。在此以前讨论过制备多肽的方法。肽产生的程序也在“诊断”部分讨论, 进一步描述提供如下。

对应于本发明 HIV 多肽或 HIV 多肽片段的一个或多个抗原决定基或“表位核心区”的肽也可被制备。该肽通常应为至少 5 或 6 氨基酸残基长度, 优选约 10、15、20、25 或约 30 氨基酸残基长度, 并可含有多达约 35-50 残基左右。

在一些实施例中, 本发明的三个肽(#61, 63, 和 104)单独或联合给予个体(见前面讨论, 下文)。肽编码 HIV-1 包膜蛋白中的保守区(表 4)。肽 104(aa45-54)来自表面 env 蛋白 gp120 的氨基末端。肽 63 和 61(aa 519-543, aa 586-598)来自穿膜蛋白 gp41。

在以前的研究中, 检测来自 HIV-1 的 env 蛋白 gp160 的 19 个合成肽在小鼠中诱导抗体反应和 T 细胞增殖的能力(Sastry, 1991)。5 个肽(104, 106, 107, 113, 和 63)诱导针对免疫肽和重组 HIV Env 蛋白 gp160 的增殖反应。此外, 肽 61, 63, 103, 104, 和 113 不产生能识别重组 gp160 的抗体, 但特别在表现四种 MHC 单元型小鼠中诱导针对免疫肽和 HIV Env 蛋白的 T 细胞增殖。

在另一研究中, 用肽混合物免疫猴子(Nehete, 1993)。利用 PBMCs 结果证实了针对肽 104, 111, 和 63 的良好增殖反应。三只猴子中两只还显示针对肽 61 的良好反应。可是, 在所有研究中, 仅分析增殖反应。

此外, 来自 gp120 V3 环的 15 个氨基酸肽(aa 315-329)(肽 R15K), 在小鼠中应用裂解实验引起肽特异的和 gp160 特异的 CD8+CTL 的迅速诱导(Sastry & Arlinghaus, 1992)。

本发明涵盖的三个肽中的两个与已报道的通过不同 HLA I 类分子存在的 CTL 表位重叠(Dupuis, 1995; Dai, 1992; Jassoy, 1992; Johnson, 1992; Dadaglio, 1991)。来自包膜蛋白穿膜部分的 25 氨基酸肽, gp41, 识别为 HLA-B14 限制的 CTL 表位(Dupuis, 1995), 与

本发明一些方法涵盖的合成物肽 61 重叠 (见表 4)。

进一步, 识别该 25 氨基酸肽的 CTL 克隆还被描述为组特异的, 因为靶细胞表达包膜突变体, 显示肽 61 涵盖的区域内小的氨基酸替代, 被有效裂解 (Jassoy, 1992)。Johnson 等 (1992) 报道肽 61 截断形式含有前 11 个氨基酸 (586-596), 被识别为 HLA-B8 限制性的 CTL 表位, 同时另外含有 9 氨基酸的重叠肽通过来自 HIV 阳性个体克隆的 CTLs 确定为 HLA-B14 限制性表位。

Dai 等 (1992) 的第三个报道描述 HLA-A24 限制性的 CTL 克隆不能识别与肽 61 的前 8 氨基酸一致的肽, 这是由于在位置 2 的单氨基酸替代 (赖氨酸到精氨酸)。因此, gp41 中含有肽 61 的区域似乎有高免疫原性, 其中有 CTLs 的多 HLA 分子识别的表位, 并且单氨基酸改变可潜在的导致免疫逃避机制。

肽 104 是来自 HIV 血清阳性个体 HLA-A2 限制性 CTLs 识别的 22 个氨基酸序列的部分 (Dadaglio, 1991)。最近, Dupuis 等 (1995) 确定了一种 9 氨基酸肽, 在其羧基端与肽 104 前 5 氨基酸重叠, 为 HLA-A*0201 CTL 识别的最小表位。肽 104 在位置 2、5 和 7 各自有酪氨酸、缬氨酸和色氨酸。

肽 61 在位置 1、4 和 8 各自有酪氨酸、天冬氨酸和亮氨酸。多数这些残基似乎与 Falk 等 (1993) 描述的 HLA-Cw7 结合特异性一致。

通常合成肽长约 35 残基, 这约是自动肽合成仪的上限长度, 如那些可来自 Applied Biosystems (Foster City, CA) 的肽。也可制备较长肽, 如通过重组手段。

美国专利号 4, 554, 101, (Hopp) 在此通过参引结合于本文, 讲授了基于亲水性的初始氨基酸序列的表位的确定和制备。通过 Hopp 公开的方法, 本领域熟练人员将能确定来自氨基酸序列中的表位, 如 HIV env 多肽中的表位。

大量的科学出版物也已投入到二级结构预测和表位确定, 根据氨基酸序列分析 (Chou & Fasman, 1974a, b; 1978a, b, 1979)。如果需要, 可应用这些中的任何方法补充 Hopp 在美国专利号 4, 554, 101 的讲

授。

此外，近来可利用计算机程序可辅助蛋白的抗原性部分和表位核心区的预测。实施例包括那些基于 Jameson-Wolf 分析的程序 (Jameson & Wolf, 1998; Wolf, 1988)、PepPlot* 程序 (Brutlag, 1990; Weinberger, 1985) 和其它蛋白三级结构预测的新程序 (Fetrow & Bryant, 1993)。其它能完成该分析的商业可获得的软件被称为 MacVector (IBI, New Haven, CT)。

在进一步的实施方案中，多肽的主要抗原决定基可用经验方法确定，其中编码多肽的基因部分在重组宿主中表达，并检测产生的蛋白诱导免疫反应的能力。例如，PCR™ 可用于制备一些缺少蛋白 C 末端连续长片段的肽。确定这些肽的每一个的免疫活性来确定哪些多肽的片段或结构域是免疫显性的。进一步的研究中每次反复仅移去小量的氨基酸，随后允许更精确的确定多肽抗原决定基的定位。

一旦完成一个或多个这些分析，制备含有至少一个或多个抗原决定基本质特征的多肽。编码这些决定基的小基因或融合基因还可被构建并通过常规方法插入到表达载体中，例如应用 PCR™ 克隆方法学。

应用这种小肽免疫通常要求肽与免疫原性载体蛋白交联，如乙肝表面抗原、匙孔血蓝蛋白或牛血清白蛋白。实行该交联的方法是本领域中熟知的。

3. 药物组合物和给药途径

本发明提供了 AIDS 发展的诊断方法和预防方法。在一些实施方案中，将药物组合物给予个体。本发明不同方面包括给予有效剂量的水相组合物。例如，为提高表达的 HLA-Cw7 单元型的水平，可给予病人包含 γ -干扰素的组合物。在本发明的另一实施方案中，可给予病人 HIV 多肽或肽预防 AIDS 发展。作为选择，可给予病人编码该多肽或肽的表达载体进行预防性治疗。另外，这样的化合物可与用 HAART 或给予 AZT 或两者的治疗联合给予。该组合物通常将被溶解或分散于可药用载体或水相介质中。

短语“可药用的”或“药理学接受的”指的是当给予动物或人时，

分子实体和组合物不产生不利的、变态反应的或其它麻烦反应。如此处应用，“可药用载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗微生物和抗真菌试剂、等渗和吸收延迟试剂等等。该介质和试剂用于药理学活性物质是本领域熟知的。除了在任何传统介质或试剂范围内与活性成分不相容之外，其在治疗性组合物中的用途是可预期的。辅助的活性成分，如其它抗癌试剂，也可掺入组合物中。除肠道外给予化合物的制剂外，如那些静脉或肌肉内注射，其它可药用形式包括，如片剂或其它口服给药的固体；缓释胶囊；和近来应用的任何其它形式，包括乳膏、洗液、漱口水、吸入剂等等。

本发明的活性化合物可制成肠道外给药制剂，如，制成通过静脉、肌肉内、皮内或甚至腹膜内途径注射的制剂。含有增加 MHC I 类分子表达的一种或多种化合物的液相组合物的制备将是根据本发明公开内容本领域那些熟练人员已知的。典型的，该组合物可制备为可注射的，或液体溶液或悬浮液；也可制备适于用在注射前加入另外的液体制备溶液或悬液的固体形式；而且，制剂也可被乳化。

活性化合物的溶液为在适当地与表面活性剂如羟丙基纤维素混合的水中制备的游离碱或药理学可用盐。分散液也可制备于甘油、液体聚乙烯乙二醇、和它们和油的混合物中。在通常贮藏和应用的情况下，这些制剂含有预防微生物生长的防腐剂。

适于注射用途的药物学形式包括消毒水溶液或分散液；制剂包括芝麻油、花生油或水相丙二醇；和用于无菌注射溶液或分散液的临时制备的消毒粉。在所有情况下剂型应该无菌并必须是可容易注射的流体范围。它还应该在加工和贮藏条件下稳定并必须保持对抗微生物污染，如细菌和真菌。

活性化合物可以中性或盐形式配伍加入组合物中。可药用盐，包括酸加成盐（用蛋白游离氨基基团形成）和用无机酸形成的如，例如，盐酸或磷酸或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等等。用游离羧基基团形成的盐还可来自无机碱如，例如，钠、钾、铵、钙或氢氧化铁，并且这样的有机碱如异丙基胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等等。

载体还可以是溶剂或分散介质，含有，如，水、乙醇、多羟基化合物（如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等）、它们合适的混合物和植物油。适当的流动性可被维持，如，通过应用包被，如卵磷脂，通过在分散情况下所需颗粒大小的维持，和通过应用表面活性剂。微生物行为的预防可通过各种抗微生物和抗真菌试剂达到，如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、乙基汞硫代水杨酸钠。在许多情况下，优选包括等渗试剂，如，糖或氯化钠。注射组合物的延长吸收可通过在组合物中应用延迟吸收试剂达到，如，单硬脂酸铝和凝胶。

无菌注射溶液通过在适当溶剂中加入所需量的活性化合物与各种上文列举的其它成分来制备，若需要，随后无菌过滤。通常，通过将各种无菌活性成分加入到无菌载体中制备分散液，其含有基本的分散介质和那些上文列举中所需的其它成分。对于制备无菌注射溶液的无菌粉剂，首选的制备方法是真空干燥和冻干技术，产生活性成分的粉剂，加上前述无菌过滤溶液中的任何其它所需成分。

在某些情况下，本发明的治疗剂还可以适于局部给药形式制备，如乳膏和洗液。这些形式可用于治疗皮肤相关疾病，如各种肉瘤。

根据本发明给予治疗性组合物将通过只要能通过该途径达到靶组织的任何普通途径给予。这包括口服、鼻腔、口腔、直肠、阴道、黏膜或局部。作为选择，将通过常位、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、阴道内、鼻腔内、或静脉内注射给予。该组合物将正常作为可药用组合物给予，包括物理学可接受载体、缓冲液或其它赋形剂。对于治疗肺的条件下，预计气雾剂被运载到肺。气雾剂的体积在约 0.01ml 到 0.5ml 之间。相似的，治疗直肠相关疾病的优选方法将通过灌肠。灌肠的体积在约 1ml 到 100ml 之间。

在特定实施方案中，可以将治疗性组合物连续供给病人一段时间。时间构成包括给予一个或多个小时、一或多天、一或多周或一或多月，在该时间段有可能的间隔。对于静脉内或动脉内途径，这可通过输液系统完成。对于局部给药，可以使用重复给药法。对于各种方法，缓释制剂可被用来在超过和超出时间段提供有限的但持续量的治疗试

剂。对于内部给药，连续灌注所需区域可能是优选的，例如用合成的HIV肽。这可能在一些情况下手术后通过导管完成，接着连续给予治疗试剂。灌注时间段将通过临床医生对于特定病人和情况进行选择，但时间可从约1-2小时到2-6小时、到约6-10小时、到约10-24小时、到约1-2天、到约1-2周或更长的范围。通常，通过连续灌注的治疗组合物的剂量将与一次或多次注射给予的剂量相平衡，调整给予注射中的时间段。可是，据认为通过灌注可达到高剂量。

对于以水溶液肠道外给药，例如，如果必要溶液应该为稳定缓冲液并用足够的盐或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定水溶液特别适于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。在这种关系下，可应用的无菌水介质将是本领域那些熟练人员根据目前的公开内容所知的。例如，一剂量可溶于1ml等渗氯化钠溶液并加入1000ml皮下输液的液体或在建议的灌输位点注射，（见例如，Remington's 药理学科学，1990）。剂量的一些变更将依赖被治疗个体的情形必要发生。对给药负责的人将，在任何情况下，决定给予单个个体合适的剂量。

治疗性组合物的有效剂量根据已定目标来决定。术语“单位剂量”或“剂量”指的是适于应用在个体中的物理不连续单位，每单位含有为产生所需反应计算的治疗组合物的预先定量，上文有讨论，与其给药关联，如，合适途径和治疗方案。根据治疗次数和单位剂量给予的量依赖于所需的保护。

治疗组合物的精确量还依赖于实际工作者的判断并且对于每个个体是特有的。影响剂量的因素包括病人的体格和临床状态，给药途径，治疗的已定目的（对于治疗，症状的缓和）和特定治疗物的效力、稳定性和毒性。

在配制时，溶液将以与剂量制剂相容的方式给予并且该剂量是治疗有效的。制剂很容易以多种剂量形式给药，如，上文描述的注射溶液的类型，但药物缓释胶囊等等也可被应用。

a. 体外、离体、体内给药

如在此应用，术语体外给药指的是在离开动物的细胞中进行操作，

包括，但不局限于，培养的细胞。术语离体给药指的是已在体外操作的细胞，并在随后给予活体动物。术语体内给药包括在动物内细胞中进行的所有操作。

在本发明的特定方面，组合物可在体外、离体或体内给予。在某些体外实施方案中，同系 B 淋巴细胞系与本发明的痘苗病毒载体一起培养 24 到 48 小时，或与合成的 HIV 肽一起培养 2 小时。转导的细胞可用于体外实验或用于体内给药。

美国专利号 4,690,915 和 5,199,942，在此通过参引结合于本文，公开了血液单核细胞和骨髓细胞的离体操作方法，用于治疗性的应用。

本发明组合物还可体内给药。实施例包括，但不局限于，给予通过膀胱内导管插入术插入膀胱转导本发明组合物转导膀胱上皮细胞 (Bass, 1995)，并和通过门静脉用导管进行合适的转导组合物的灌输转导肝细胞 (Bao, 1996)。其它例子包括用即时的转导组合物进行肿瘤的直接注射，和转导组合物鼻内或气管内 (Dong, 1996) 滴注有效转导肺细胞。

b. 疫苗

本发明包括在有 HLA-Cw7 单元型的感染或未感染人中预防 AIDS 发展的方法。如此，发明涉及用于主动和被动免疫实施方案的疫苗。免疫原性组合物，设想适于用作疫苗，直接从在此公开的方式制备的免疫原性 HIV 肽中可最易制备。更适宜的，将抗原性材料彻底透析以移去不想要的小分子量分子和或冻干而更容易配制到所需载体中。

作为选择，其它以肽为基础疫苗的可行和重要选项包括引进肽序列如核酸，或是直接的 DNA 疫苗或是基于重组痘苗病毒的多表位疫苗。基于此观点近来的报告描述了表达 10 个邻接的最小 CTL 表位 (Thomson, 1996) 或来自几个细菌的 B 细胞、CTL 和 TH 表位 (An, 1997) 的重组痘苗病毒的构建体，和成功应用该构建体免疫小鼠引发保护性的免疫反应。因此，文献中有充足证据，成功地将肽、肽脉冲 APC 和肽编码构建体用于有效地在体内引发保护性免疫反应，特别是 CMI。

在 HIV 的情况下，来自 V3 环区的一免疫决定基 CTL 表位序列，我

们和别人报道在小鼠中诱导 CTL 反应 (Sastry, 1991; Nehete, 1994; Nehete, 1995), 已被报道当以表达小基因构建肽 DNA 疫苗给予时, 可引发 CTL 免疫 (Ciernik, 1996)。本发明的方法包括编码来自高度保守 HIV 包膜序列的 6 个不同肽为小基因产物的 DNA 疫苗构建体的制备和应用。基于此观点, Wang 等近来报道用编码 4 个恶性疟原虫的不同蛋白的 DNA 质粒的混合物肌肉内免疫, 在恒河猴中成功诱导 CD8+T 细胞反应。核酸序列作为疫苗的应用描述在美国专利号 5,958,895 和 5,620,896。

含有 HIV 肽序列作为活性成分的疫苗的制备是本领域通常熟知的, 如以美国专利号 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; 和 4,578,770 为例子, 在此全部通过参引结合于本文。典型的, 该疫苗以可注射的液体溶液或悬液制备; 也可被制备成固体形式, 在注射前适于溶解在或悬浮在液体中。制剂还可被乳化。活性的免疫原性成分常与可药用的和与活性成分相容的赋形剂混合。适当的赋形剂是, 如, 水、盐、葡萄糖、甘油、乙醇等等和它们的混合物。另外, 若需要, 疫苗可含有小量辅助物质如湿润或乳化试剂、pH 缓冲试剂或增强疫苗效力的佐剂。

Imaoka 等报道了用 SIV 的 p55gag 与黏膜佐剂霍乱毒素 (CT) 混合, 在鼻内途径免疫, 在恒河猴系统或黏膜部位抗原特异 CD4+ 和 CD8+ 细胞反应的诱导。同样, 近来已报道用单纯疱疹病毒抗原鼻内或阴道内途径小鼠黏膜免疫导致在黏膜部位抗病毒 CTL 反应的诱导, 反应持续超过 18 个月 (Gallichan, 1996)。

霍乱毒素 (CT), ADP-核糖基化酶, 由霍乱弧菌产生, 是一种潜在的非复制口服免疫原, 诱导活跃的系统性和黏膜免疫 (Pierce, 1984)。针对 CT 的免疫反应有长期记忆 (Lycke, 1986) 并且是 T 细胞依赖的。还已经显示 CT 通过差分上调 B7.2 表达增强抗原呈递细胞的共刺激活性, 对其黏膜佐剂性和免疫原性显示重要的效果 (Cong, 1997)。CT 还已经显示当与 HIVgp120 编码的 CTL 表位一起鼻内给予时, 诱导 CTL 反应 (Porgador, 1997)。

因为负的生理学效果，缺乏腺苷二磷酸核糖(ADP-ribose)转移酶活性的突变的CT(CT-2*)已经被纯化，在动物中无生物学活性。在该CT突变体中，Arg7和Glu¹¹²已通过定点突变各自被替代为Lys和Gln，消除CT的在真核细胞中增加cAMP水平并在动物中唤起液体分泌反应的能力(Peterson, 1999)。此外，从天然CT和CT-2*纯化的B亚单位都刺激S49cyc细胞和鼠单核/巨噬细胞(RAW264.7) [³H]-AA的释放，暗示在增加对疫苗成分的免疫反应中，受体介导的细胞活化过程潜在重要性。本发明包括当与天然CT结合应用于鼻内免疫时，应用HIV肽的方法。

另一细菌毒素Aeromonas细胞毒素肠毒素(Act)可与本发明方法结合用作黏膜佐剂。Aeromonas是急性发作人病原，引起败血症和肠胃炎(Merino, 1995; Yamada, 1997)。肠胃炎归因于Aeromonas感染可能因两类肠毒素—cytotoxic和细胞毒素(Keusch, 1975)。这些独特的肠毒素已经被同质纯化并广泛研究(Chopra, 1996; Chopra, 1994; Ferguson, 1997; Xu, 1998)。

一些aa残基的替代，如Tyr²⁵⁶到Ser减少了细胞毒素活性，但对于Act的溶血性和肠毒素活性没有影响(Ferguson, 1995)。His²⁰⁹到Asn的替代影响了细胞毒和肠毒素活性但溶血性活性保持不变。有趣的是，Asn^{177, 178}到Thr和Asp¹⁷⁹到Glu的替代减少了溶血性和细胞毒活性，但没有影响肠毒素活性。当His³⁵⁵变为Asn时，表明了相似结果。一些aa残基(如Trp²⁷⁰, Gly²⁷⁴, Trp³⁹⁴, 和His¹⁴⁴)对于所有三个生物学活性都显示重要(Ferguson, 1995)。该突变的Act分子可以作为疫苗共同给药，例如，作为疫苗，在本发明方法中增强对此处公开的HIV肽和多肽的CTL反应。

疫苗可常规肠外给予，通过注射，例如，或皮下的或肌肉内的。适于其它给予模式的其它剂型包括栓剂和在一些情况下，口服制剂。对于栓剂，传统的粘合剂和载体可包括，如，聚链烷基二醇或甘油三酸酯：该栓剂可在含有约0.5%到约10%，优选的约1%到2%范围的活性成分的混合物形成。口服制剂包括这些正常应用的赋形剂如，例如，

药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物以溶液、悬液、片剂、药丸、胶囊、缓释制剂或粉剂，形成并含有约 10%到约 95%的活性成分，优选的约 25%到约 70%。

本发明的来自 HIV 的肽和 HIV 编码的 DNA 构建体可以中性或盐的形式配制剂疫苗中。可药用盐包括酸附加盐（用肽的游离氨基基团形成）和那些与无机酸形成的盐如，例如，盐酸或磷酸或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等等。与自由羧基基团形成的盐还可来自无机碱如，例如，钠，钾、铵、钙或氢氧化铁和有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组胺、普鲁卡因等等。

疫苗以与剂量制剂一致的方式给予，并且所用量是治疗有效的和免疫原性的。给予的剂量依赖于治疗个体，包括，如，个人的免疫系统合成抗体的能力和所需的保护程度。要求给予的活性成分的精确量依赖于从业者的判断。然而，合适剂量范围是规定的每次免疫几百微克级的活性成分。初始给药和加强接种的合适方案也是可变的，但由初始给药随后接种或其它给药为代表。

应用方式可广泛变化。可使用疫苗给药的任何传统方法。这些包括口服在固相物理学可接受的碱或在物理学可接受的分散剂，肠胃外的，通过注射等等。疫苗的剂量将依赖于给予途径并将根据宿主大小变化。

对疫苗达到佐剂效果的各种方法包括应用试剂如氢氧化铝或磷酸铝 (alum)，通常用作磷酸缓冲盐中约 0.05 到约 0.1%溶液，与合成的糖聚合物 (Carbopol[®]) 混合用作约 0.25%的溶液，在疫苗中蛋白聚集通过分别在约 70℃到 101℃温度范围之间热处理 30 秒到 2 分钟时间。也可使用通过胃蛋白酶处理的 (Fab) 抗体到铝的聚集体，与细菌细胞如 C. Parvum 或内毒素或革兰氏阴性细菌脂多糖组分的混合物，在生理学可接受油载体如，mannide 单油酸酯 (Aracel A) 的乳浊液或与 20%用作封阻代用品的全氟化碳 (Fluosol-DA[®]) 的溶液。

在许多例子中，疫苗的多次给药是需要的，通常不超过 6 次接种，更通常不超过 4 次接种并且优选一次或多次，通常至少约 3 次接种。

免疫接种正常的在两周到 12 周间隔，更通常在 3 到 5 周间隔。在 1-5 年时间间隔的定期加强，通常 3 年，以维持抗体的保护性水平，是需要的。免疫过程可通过表面抗原的抗体分析后进行。分析通过用传统的标记物标记进行，如放射性核酸、酶、荧光等等。这些技术是熟知的并可在大量专利中发现，如美国专利号 3,791,932; 4,174,384 和 3,949,064，如这些实验的说明。

c. 病毒作为治疗性组合物

本发明的工程病毒可直接给予动物或作为选择，给予随后给予动物的细胞。病毒可与各种抑制性制剂的 β -干扰素结合产生有高转导效率的转导制剂。关于合适的病毒的讨论如上文所述。

d. 治疗添加剂

i. 载体分子

如本领域所熟知的，给出的组合物的免疫原性可以变化。因此加强宿主免疫系统常常是必须的，如可通过将 HIV 肽或多肽免疫原与载体偶联来完成。示范性的和优选的载体是匙孔血蓝蛋白 (KLH) 和牛血清白蛋白 (BSA)。其它的白蛋白如卵清蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可被用为载体。将多肽与载体蛋白缀合的方式是本领域所熟知的并包括戊二醛、间马来酰亚胺基 bencoyl-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和 bis-biazotized 联苯胺。

ii. 佐剂

也如本领域所熟知的，HIV 多肽或肽组合物的免疫原性可通过应用免疫反应的非特异性刺激因子增强，已知的为佐剂。合适的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物，如细胞因子、毒素或合成的组合物。

可应用的佐剂包括 IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -干扰素, GMCSP, BCG, 氢氧化铝, MDP 化合物, 如 thur-MDP 和 nor-MDP, CGP (MTP-PE), 脂质 A, 和单磷酸脂质 A (MPL)。RIBI, 其含有从细菌中抽提的三种组分, MPL, 海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS), 乳化在 2% 鲨烯/吐温 80 中。甚至可应用 MHC 抗原。

示范性的，常常优选的佐剂包括完全弗氏佐剂（免疫反应的非特

异刺激因子, 含有灭活的结核分枝杆菌), 不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

除佐剂之外, 可能需要共给予生物反应修饰成分(BRM), 已经显示上调 T 细胞免疫或下调抑制者细胞活性。这种 BRM 包括, 但并不局限于, 甲胍咪胍((CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 或低剂量环磷酰胺(CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ) 和细胞因子如 γ -干扰素、IL-2 或 IL-12 或编码涉及免疫辅助功能的蛋白的基因, 如 B-7。

T 辅助肽也可与本发明的 HIV 多肽、肽或它们相应的核酸序列一起给药以提高 CTL 诱导(Del Guercio 等人, 1997; Mortara 等人, 1999)。例如, 包括混杂的破伤风毒素肽中人辅助 T 细胞(Th)表位的脂肽增加对于各种 SIV 肽的 CTL 诱导反应(Mortara 等人, 1999)。该肽的序列(aa830-aa846)有下文序列: QYIKANSKFIGITELKK, 有脂类部分连接于末端。其余 T 辅助混杂的肽可用于本发明的方法如 PADRE 表位, 其已经特征化为结合不同 HLA-DR 实体(Del Guercio, 等人, 1997)。

e. 联合治疗

当然, 可以理解本发明方法, 特别是 HIV 多肽或肽给予病人, 还可用于与传统治疗一起联合给药。一些这种治疗描述在下文。

i. AZT

治疗 AIDS 的熟知的传统治疗包括 zovidovudine(AZT™ 可从 Burroughs Wellcome 得到)。这是一组核苷类似物的一种, 已知为二脱氧核苷酸, 通过抑制 HIV 反转录酶封阻 HIV 复制。抗 AIDS 药物齐多夫定(已知为 AZT)可用于有限的环境中, 主要与利福平联合, 如 Burger 等所描述(1993)。

此处公开的组合物和方法与其他形式的治疗联合将特别有效, 如 AZT 和/或蛋白酶抑制剂计划用于抑制病毒复制, 这是通过维持需要的白细胞水平。这有效的给予病人抗病毒治疗剂作用必须的时间。

ii. HAART

在 HIV 感染病人的治疗中, 新的联合药物治疗已显示有希望的结

果。用潜在抗 HIV 药物联合治疗指的是“高活性抗逆转录病毒治疗”(HAART)，并已经提供临床改进，较长的生存，和在所有 HIV 疾病的四个时期提高 HIV 感染病人的生活质量。HAART 的例子包括蛋白酶抑制剂 (indinavir, nelfinavir, ritonavir, ritonavir/saquinavir, 或 saquinavir) 与两个核苷类似物联合 (AZT/ddI, d4T/ddI, AZT/ddC, AZT/3TC, 或 d4T/3TC)。

D. 实施例

实施例 1: 材料和方法

1. 病人人群

从已经是 HIV 血清阳性超过 11 年并且没有发展为 AIDS 的三个志愿者中获得血样 (称为 LTNPs)，从一个在 1991 年感染仍维持无症状的个体获得血样。病人临床状态的详情包括在表 2 中。从 HIV 阳性志愿者收集的的血样在许多实验中用作对照。

表 3: 个体的临床状态

LTNP=长期无进展者 AS=无症状的 UD=未检测的

志愿者	HLA 单元型			感染 (日期)	临床 状态	AZT 治疗	CD4 (每 mm ³)	p24 (pg/ml)
	A	B	C					
LB	A1	B2/B13	Cw7/C*15	1985	LTNP	+	617	4.9
DH	A3	B7/B55	Cw3/Cw7	1985	LTNP	-	375	UD
HD	A2:A3	B7/B14	Cw7/Cw8	1985	LTNP	+	154	9.5
RLF	A2	B7/B14	Cw7/Cw8	1991	AS	-	464	UD

2. 合成肽

对应于 HIV-1 包膜蛋白的高度保守序列的合成肽应用在当前研究中。肽如以前描述的通过 Merrifield (Merrifield, 1963) 的固相方法合成 (Sastry, 1991)，或在 Vega 250 自动肽合成仪 (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) 或通过如 Houghten 描述的“袋子”方法 (Houghten, 1985)。在多数实验中，应用的肽纯度约为 70-80%，在有

限的实验中使用了显示大于95%纯度的肽，有同样结果。

3. 淋巴细胞表面标记研究

分析外周血单核细胞(PBMCs) T细胞表面标记的存在，利用全血染色程序并且样品通过流动式细胞计数器分析(Epics-Profile, Coulter Corporation, Hialeah, FL)。CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞亚群的相对百分比利用藻红蛋白缀合的小鼠单克隆抗体 Leu3A 和 Leu2A 直接免疫荧光列举(Becton Dickinson, Mountain View, CA)。细胞亚群绝对数的计算基于完全的血细胞计数和 Wright-Giemsa-染色的血液涂片完成不同的检测。在确定 HIV 特异性 CTL 效应细胞类型的特定实验中，对新分离的 PBMCs 进行荧光细胞分选，并且分离 CD4⁺和 CD8⁺细胞亚群用于检测 CTL 活性。

4. HLA 类型测定

应用于该研究的来自所有供体的淋巴细胞，在未分离的 PBMCs 中由 Methodist Hospital, Baylor College of Medicine, Houston, TX 的组织类型测定实验室分成 HLA-A, -B, 和 -C 抗原。HLA 等位基因的鉴定根据 Olerum and Zetterquist (Olerum, 1992) 的方法通过 PCR-SSP 类型进一步测定证实。

5. 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)实验

CTL 实验如以前描述的在圆底 96 孔板完成(Sastry, 1992)。将在 0.1ml 含有 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI - 1640 培养基中各种浓度的效应细胞加入到 0.1ml [51Cr] 标记的靶细胞悬液中[每孔含有 10^4 细胞/ml 得到描述的效靶(E:T)比]。37℃温育 6 小时，从每孔中收获上清在 γ 计数器(Wallac Inc., Gaithersburg, MD)上测量放射性。实验在三个孔中进行，特异性细胞裂解百分数通过公式计算： $100 \times (\text{平均实验释放} - \text{平均自然释放}) / (\text{平均最大释放} - \text{平均自然释放})$ 。最大释放值从加入 5% Triton X-100 裂解的细胞上清中确定。自然释放从没有加入效应细胞温育的靶细胞中确定。出现的所有结果标准偏离值小于 10%。

6. 靶细胞系

同系 B 淋巴细胞系 (B-LCLs) 通过将 PBMCs 与产生 EBV 的绒猴细胞系 B95.8 (ATCC:CRL-1612) 的上清温育制备。所有转化的细胞系维持在有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI1640 培养基中。表达 HIV-1 IIIIB gp160 或 gag 的重组痘苗病毒和对照痘苗病毒从 AIDS 研究和参考试剂计划获得 (Rockville, MD; Dr. B. Moss 捐赠)。痘苗病毒库制备物通过生长在 HeLa 细胞中产生并通过标准噬斑实验滴定。靶 B-LCL 用感染倍数为 10 的重组或对照痘苗病毒感染, 在细胞浓度为 10^7 细胞/ml 于 37°C 5% CO₂ 空气中培养 2 小时 (Sastry, 1992)。培养物稀释到 10^6 细胞/ml 浓度, 另外培养 16 小时并用 [51Cr] 铬酸钠标记 2 小时, 洗涤三次, 重悬到合适的浓度用作细胞毒实验的靶细胞。肽脉冲的靶细胞通过将 B-LCLs 与 [51Cr] 铬酸钠温育 2 小时制备, 随后与 100ug 的合成肽另外温育两小时。

7. 抗体抑制研究

为确定 HLA I 类特异性的 CTL 反应, 效应子 PBMCs 用 1: 100 稀释的 W6/32 处理, 其为 I 类特异性抗体, 来自杂交瘤培养物的上清 (ATCC: HB95)。

实施例 2. HIV 血清阳性长期无进展者显示包膜特异性的 CTL 反应

对指定为 LTNP 的个体检测其显示 HIV 包膜特异性的 T 细胞反应的能力。本研究中四个个体中的三个分类为 LTNP, 因为在这些个体中 HIV 感染建立在 12 年前, 没有导致感染症状, 尽管 CD4⁺ 细胞计数有一些波动。第四个个体诊断为 HIV 阳性相对近些 (自从 1991) 并且是无症状的 (表三)。从一 HIV 血清阴性志愿者 (JR) 收集的的血样在所有实验中作为对照。对照个体 JR 的 HLA 谱鉴定为 HLA-A2/A28, -B35/B38, 和 -Cw4。四个 HIV⁺ 个体中仅有两个观察到低血浆水平的 p24 抗原 (4.9 和 9.5 pg/ml, 各自在 LB 和 HD 中), 通过酸分解 ELISA 方法利用 Coulter ICD-Prep 试剂盒。

从这些个体中新得到的肝素化血样中分离的 PBMCs 用作效应细胞来决定针对用不同表达 HIV-1 包膜或 gag 蛋白的重组痘苗病毒感染的同系靶 B-LCLs 的 HIV 特异性的 CTL 反应。四个 HIV⁺ 个体的每个显示

的直接针对 HIV 包膜蛋白的 CTL 活性通过与对照 HIV-阴性个体相比的显著特异性裂解值作为证据 (图 1)。CTL 反应的大小在四个个体间变化, DH 和 RLF 显示相对较高的包膜特异性 CTL 反应(与 HD 和 LB 相比)。在两年期间从这些个体中得到血样是可能的, 用于 CTL 反应的重复分析, 并在所有例子中在四个 HIV+个体中观察到 HIV 包膜特异性 CTL 活性。

在两个单独的实验中, 纯化的 CD4+和 CD8+细胞亚群还被应用并观察到 CTL 活性对于 CD8+亚群是特异性。一个体(HD)还显示显著的 gag 特异的 CTL 反应。该病人, 尽管 CD4+细胞计数(154 和 670/mm³, 在两不同时间点)波动在 CTL 反应中显示没有显著改变(比较资料在图 1 和 2)。其余三个个体的重复样品在 CD4+细胞计数或 CTL 反应的本质和大小中没显示可评价的差别。

实施例 3. HIV 包膜特异性 CTL 反应是 HLA-Cw7 限制性的

在这些个体中 HLA I 类限制性 CTL 活性通过在抗 I 类特异性抗体 W6/32 存在下 CTL 活性特异减少来证实。我们使用了 1:4 稀释的 W6/32 分泌杂交瘤细胞培养物上清液并观察到 HIV 包膜特异性 CTL 活性的 73%减少(特异性裂解值从 23.2%减少到 6.2, 在效靶比为 25: 1 时), 用来自 LB 的 PBMCs 作为效应细胞。为确定这些个体的 CTL 反应中涉及的 I 类位置, 我们应用了大量与效应 CTLs 共有不同 HLA-A, -B 和 -C 位置抗原的靶细胞系。因为观察到直接针对 HIV-1 包膜的 CTL 活性在所有四个 HIV 阳性个体中是共同的, 我们在这些研究中应用了表达包膜蛋白的重组痘苗病毒感染的靶细胞。图 2 数据显示 HLA-Cw7 抗原作为四个 HIV+个体中 HIV 包膜特异性 CTL 活性的限制性因素。HLA-A1, -A2, -A3, 和 -B7 抗原在通过所有四个个体的 CTLs 裂解的靶细胞中不常共有。

实施例 4. HIV 包膜特异性 CTLs 识别来自包膜蛋白高度保守区的表位

四个 HIV 来源肽在动物模型中似乎一致的为 T 细胞表位(Nehete, 1993; Sastry, 1991)被选择用于研究来检测它们在 LTNP 中 HIV 特

异性 CTLs 对敏感的自体靶细胞裂解的能力。来自一 LTNP 的 PBMCs 在植物凝集素 (PHA) 有丝分裂原存在下体外再刺激 7 天用作效应细胞。

结果显示了针对用三个肽脉冲的自体 B-LCLs 的显著 CTL 活性 (表 4)。这些包括来自表面包膜蛋白 gp120 的氨基酸末端部分的肽 104 (aa 45-55) 和 gp41 穿膜蛋白的肽 63 和 61 (分别为 aa 519-543 和 aa 586-598)。另一来自 gp120 的肽 (#113, aa 204-216) 在这些实验中没有 CTL 表位。当从病人中新分离 PBMCs 作为效应细胞时, 还观察到用肽 104, 63, 和 61 脉冲的靶细胞的特异性裂解, 尽管比用再刺激的 PBMCs 观察到的程度较小。

当未刺激 PBMCs 用作效应细胞时, 它们有效裂解用表达 gp160 的重组痘苗病毒感染的自体 B-LCLs (表 4)。尽管 PHA 刺激的 PBMCs 也有效裂解表达 gp160 的自体靶细胞, 它们显示高水平的用对照重组痘苗病毒 vSC8 感染的自体 B-LCL 靶细胞的背景裂解。背景裂解不是由于 EBV 特异性的 CTL, 因为未感染的 B-LCL 不显示任何特异性裂解。

表 4. 在 HIV 血清阳性 LTNP 中 CTL 反应的肽特异性

肽编号 No.	残基	肽氨基酸序列 ²	在各种 E:T 比下的特异性裂解% ³			
			100:1	50:1	25:1	12.5:1
61	586-598	YLRDQQLLGIWGC	15.0	14.5	4.0	4.0
63	519-543	FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ	17.6	8.8	7.9	0
104	44-55	VYYGVPVWKAE	12.2	9.3	3.7	1.5
113	204-216	SVITQACSKVSFE	0	0	0	0
		介质				
		vSC-8 ⁴	2.9	2.2	3.0	1.6
		vPE-16 ⁵	22.4	19.5	16.4	3.5

¹ 用来自病人志愿者 HD 的 PBMCs 分析 CTL 活性

² 肽氨基酸序列根据 Modrow 等, 病毒学杂志 (J. Virol.), 61:570-578, 1987.

³分析在植物凝集素培养基中再刺激 7 天 PBMCs 的 CTL 活性, 针对肽脉冲自体 EBV 转化的 B 细胞 (B-LCL)。

⁴分析新分离的 PBMCs 针对用对照疫苗病毒感染 B-LCL 的 CTL 活性。

⁵分析新分离的 PBMCs 针对用表达 HIV-1 IIIB 的 gp160 的重组疫苗病毒感染的 B-LCL 的 CTL 活性。

实施例 5: 材料和方法

1. 猩猩

肝素化血样从 HIV 感染和未感染猩猩中获得, 来决定包膜肽特异性增殖反应。9 个 HIV 感染的动物在符合动物生物安全要求的条件下单独饲养。9 个感染猩猩中, 6 个(#62, 100, 139, 175, 247 和 310) 用 HIV-1 IIIB 感染, 2 个(#69 和 80) 用 HIV-1 LAV 感染 (与 IIIB 紧密相关), 而 1 个(#99) 连续用 HIV-1 株 NY-5 和 IIIB 感染。

猩猩在 11 到 25 岁并且是 HIV+7-11 年, 如时时通过 PCR 分析所确定的。未感染猩猩饲养在与饲养感染猩猩的不同的场所。尽管血样从 5-8 个动物中获得, 那些来自两个未感染猩猩(#CH40 和 #CH73) 的血样作为对照包括在所有分析中。

2. 病人

肝素化血样从 17 个感染 HIV 的志愿者中获得, 来研究特异性针对来自 HIV 包膜蛋白保守区的肽的增殖反应。病人人群包含有症状的和无症状的个体, 多数在进行抗逆转录治疗。他们详细的 CD4+ 细胞计数, 抗逆转录药物和临床情形仅在一些个体中可以到的。所有病人中 HIV 阳性通过 Western blot 实验和 p24 抗原捕获 ELISA 证实。血样还从约 10 个正常 HIV 血清阴性志愿者中获得, 其中两个在所有实验中作为对照一致分析。

3. 肽

当前研究中所用肽序列列在下面的表 5 中。

表 5. HIV 包膜蛋白中保守区的合成肽的氨基酸序列

肽编号	氨基酸残基	氨基酸序列*
104	45 - 55	VYYGVPVWKEA
113	204 - 216	SVITQACSKVSFE
120	586 - 598	YLRDQQLLGIWG
121	519 - 543	FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ
122	417 - 435	CRlKQIINMWQGVGKAMYA

*肽的氨基酸序列是根据 Modrow 等。

在我们以前研究中，对应于 HIV-1 包膜蛋白保守区的这些肽在小鼠和恒河猴中被确定为 T 细胞表位 (Nehete, 1993; Sastry, 1991)。如前文描述合成肽 (Sastry, 1991)，应用 Merrifield 固相方法 (Merrifield, 1963) 或在修饰的 Vega 250 自动肽合成仪 (Vega Biochemical, Tucson, AZ) 上或通过如 Houghten (Houghten, 1985) 描述的“袋子”方法。在多数实验中，应用的肽纯度约为 70-80%，并在有限的实验中，使用了显示大于 95% 纯度的肽，有相同结果。除了保守的包膜肽，来自 c-mos 原癌基因的肽 (aa 158-170, STRTPEDSNSLGT) 在所有实验中用作对照。用于多数的实验的其它对照肽包括：来自 c-abl 原癌基因的肽，来自 HPV-16 的 E6 和 E7 癌蛋白的肽，对应 gp120 V3 环区但有拼凑氨基酸序列的肽，和来自 HIV pol 和 gag 区的肽。在所有这些情况下，针对对照的增殖反应的量是一致的并且比针对来自 HIV 包膜蛋白的检测肽反应量显著小。在所有这些情况下，针对对照肽的增殖反应水平是一致的并且比来自 HIV 包膜蛋白的检测肽反应水平显著小。C-mos 肽一致用于所有实验中作为对照。肽贮藏溶液在磷酸缓冲盐水 (PBS) 中制备并无菌过滤。

4. T 细胞增殖实验

肝素化血通过从对照和 HIV 感染猩猩和人类志愿者静脉穿刺收集。HIV 阳性样品或通过标准血清 p24 抗原捕获实验、western blot 或 PCR

分析确证。外周血单核细胞(PBMCs)通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离(Histopaque-1073; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。不同样品 PBMCs 的增殖反应通过如以前描述的(Nehete, 1996; Nehete, 1995)标准^[3H]胸苷掺入实验确定,针对不同浓度的植物凝集素(PHA)、对照肽或保守的包膜肽。每个样品根据 96 孔 U-底微量滴定板的孔中一式三份测定。猩猩的增殖反应从应用三个不同时间点收集的样品实验中完成。来自人的数据还包括大多数样品至少在两个不同时间点完成的分析。计算加入用各种物质所处理细胞的特异性放射性,在每种情况下通过减去细胞仅与培养基培养得到每分钟计数(cpm)值。对包膜肽的 T 细胞增殖反应的显著性(术语刺激指标[SI])通过接触包膜肽的细胞与那些没有加入肽的细胞相比^[3H]胸苷掺入增加倍数进行计算。大于 3.0 的 SI 值认为有意义,而 SI 值 <3.0 但 >2.0 ,到至少肽的一浓度认为是阳性反应。别人描述的有意义的增殖反应报告了相似标准(Pontessili, 1995; Schrier, 1989)。在所有实验中,来自三个样品的数据标准误差 $<10\%$ 是可比较的。

5. 抗肽抗体的分析

自对照和 HIV 感染猩猩和人志愿者收集血清样品,如以前所述进行分析(Nehete, 1993, Sastry, 1991),通过 ELISA 分析对于在研究中应用的 5 个包膜来源肽中每一个和对照肽的抗体。简要的,肽稀释在 0.05M 碳酸氢盐缓冲液 (PH9.6) 中,包被到 96 孔微量测定-II 柔性板上(Falcon, Los Angeles, CA), $5\mu\text{g}/\text{孔}$ 37℃ 温育 20 小时。随后用封闭液(5%重量/体积脱脂奶粉)温育板,并用含有 0.5%吐温 20 磷酸缓冲盐水洗涤两次。血清样品两倍系列稀释(1:20 到 1:2560)(在 0.01M 磷酸钠缓冲液中, pH7.4, 含有 0.075 M NaCl, 2.5% 脱脂奶粉, 和 0.5% 吐温 20)用辣根过氧化物酶偶联的第二抗体进行分析。除非另外提及, 1: 100 或更高的对肽的抗体滴度被认为阳性反应。

6. 统计学分析

显示 SI 值的数据,代表在 HIV 阳性猩猩或人志愿者中 HIV 肽特异性增殖反应,用变异的 2(x6)混合因子分析(ANOVA)进行分析。因为全面的 ANOVA 显示在 HIV 感染猩猩和 HIV+个体中对不同的肽有显著差

别, 进行几种有计划比较。这包括: (a) 所有 5 个包膜肽对对照肽, (b) 肽 104 对对照肽, 和 (c) 肽 104 对其它保守包膜肽。对于抗肽抗体滴度值进行相似的分析。

实施例 6. 来自包膜蛋白 gp160 中第一个保守区的合成肽在 HIV 感染的猩猩和人中是一 T 细胞表位

1. 在 HIV 感染的猩猩中对肽 104 的增殖反应

从两个对照未感染猩猩和 9 个感染 HIV 猩猩新鲜分离的 PBMCs 检测对于 PHA (非特异性 T 细胞有丝分裂原)、对照肽和来自 gp120 氨基末端保守区肽 104 的增殖。

标准 [3H] 胸苷掺入实验揭示 9 个 HIV 感染的猩猩中 7 个对肽 104 有阳性增殖反应 (SI 值范围在 2 到 11 之间)。在 HIV 感染猩猩中对肽 104 增殖反应比对对照肽的反应是显著高 [$F(1, 8) = 6.59, p < 0.05$]. 在三个猩猩中, SI 值高于 5.1, 显示对肽 104 增殖反应的显著水平。猩猩 175 显示对对照肽较高的增殖背景水平 (SI 2.7); 然而, 对肽 104 的增殖是相当高于这种水平的, 显示阳性反应。两个对照猩猩没显示对检测的任何 HIV 肽或对照肽的阳性增殖反应, 但在两个 PHA 刺激猩猩中观察到显著增殖 (cpm 和 SI 值范围分别在 15832-20504 和 34-49.5 之间)。单个猩猩培养基对照的 cpm 值范围在 147 ± 15 和 2819 ± 298 之间。相似的, 所有 9 个感染 HIV 的猩猩显示对 PHA 较高的增殖水平。

2. 在 HIV+ 人中对肽 104 的增殖反应

增殖实验的结果显示检测的 17 个 HIV+ 个体中 8 个显示对肽 104 的阳性增殖反应; 这些 8 个个体中的 6 个, SI 值超过 4.1。另一方面, 没有一个检测的 HIV+ 阳性个体显示对对照肽特异性的增殖反应。人个体中培养基对照的 cpm 值在 123 ± 11 和 1529 ± 163 之间。

总的说来, 在 17 个 HIV+ 个体中, 对肽 104 的增殖反应显著高于对照肽的反应 [$F(1, 16) = 12.30, p < 0.01$]. 从对照 HIV 阴性个体分离的 PBMCs 没显示对任何检测肽的特异性增殖反应。然而, 在所有 HIV+ 个体中观察到直接对非特异性有丝分裂原 PHA 的增殖反应 (cpm 和 SI 值范围分别在 108361-127640 和 20.3-23.3 之间)。正常个体值的对应范围 cpm 在 32137-99557 之间, 而 SI 在 131-183 之间。

3. 在 HIV 感染的猩猩和人对来自 HIV gp160 包膜蛋白的四个不同保守肽的增殖反应

同样研究来自猩猩的 PBMCs 对合成肽 113, 120, 121, 和 122 的增殖反应, 这些肽来自 HIV 包膜蛋白的保守区。虽然没有观察到来自对照猩猩 PBMCs 对任何肽的增殖, 9 个 HIV 感染猩猩中的 5 个显示对至少四个保守肽中的三个有阳性反应。在 5 个动物中的每个均观察到对肽 113 和肽 121 阳性增殖反应 ($SI > 2.0$), 而猩猩 69、80 和 100 显示对所有四个检测肽的阳性反应。在四个肽中, 对肽 120 的增殖反应比其余三个肽相当低, 即使差别不显著。统计性的, 对肽 113, 120, 121, 和 122 的结合反应比那些对对照 c-mos 肽的反应显著高 [$F(1, 8) = 12.08, p < 0.01$]. 另外, 没有猩猩显示对其余对照肽的阳性增殖反应。

还检测了来自 17 个 HIV+ 个体 PBMCs 对四个保守 HIV 肽 113, 120, 121, 和 122 的增殖反应。最大的 7 个个体显示对肽 122 的阳性增殖反应, 而 5 个个体对其余三个肽中的每一个都是阳性。在病人 RB 中观察到对所有四个保守肽有效的增殖反应 (SI 值 > 3.0)。在所有 17 个 HIV+ 个体中, 对四个不同保守肽的 SI 值比那些对对照肽的值显著高 [$F(1, 16) = 9.98, p < 0.01$]. 没有一个病人显示对 c-mos 肽或检测的任何其它对照肽阳性增殖。并且, 没有一个来自对照的正常个体的 PBMC 表现出对任何待测肽的增殖。在 17 个 HIV+ 个体中, 尽管大范围的 $CD4+$ 细胞计数 (146-656/mm³), 没有观察到对检测肽的增殖水平的显著差异。

在 9 个 HIV 感染的猩猩中 SI 值统计学分析揭示对结合的 5 个保守 HIV 肽 (104, 113, 120, 121, 和 122) 总体的增殖反应比那些对对照肽的反应显著性高 [$F(1, 8) = 24.5, p < 0.001$]. 然而, 对 5 个单独肽增殖反应的比较没有显示显著差异 [$F(1, 8) = 1.49, p > 0.05$]. 总的说来, 在 9 个 HIV 感染的猩猩中对肽增殖反应的排列顺序是 $104 > 121 > 113 > 122 > 120$ 。对于 HIV+ 个体, 不仅对 5 个保守 HIV 包膜肽的总体增殖反应比那些对对照肽的反应显著高 [$F(1, 16) = 13.72, p < 0.01$], 而且, 对肽 104 的增殖反应比对其余 4 个保守肽 113, 120, 121, 和 122 的反应高 [$F(1, 16) = 3.75, p < 0.07$].

4. 在 HIV 感染的猩猩和人对保守肽的抗体反应

与增殖反应相比较，在 HIV 感染的猩猩中没有观察到直接对任何保守 HIV 肽的抗体反应 (ELISA 滴度 < 1:20)。下面表 6 中数据显示对增殖和抗体反应的阳性和阴性结果。来自两个对照未感染动物中的血清样品也显示没有抗肽抗体反应。

表 6. 来自对照和 HIV-1 感染的猩猩的 PBMCs 对各种来自 HIV-1 包膜蛋白保守区合成肽的 T 和 B 细胞反应

猩猩	免疫反应*	肽					对照**
		104	113	120	121	122	
正常对照:							
40	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
73	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
HIV 感染的:							
62	T	+	+	+	+	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
69	T	+	+	+	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	-
80	T	+	+	+	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	-
99	T	+	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
100	T	-	+	+	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	-
139	T	+	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
175	T	+	+	-	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-
247	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
310	T	+	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-

* T T-细胞增殖反应: +, 阳性 (刺激指标 [SI] > 2.0); -, 阴性 (SI < 2.0).

* B 抗肽抗体反应: +, 阳性 (滴度 >1:100); -, 阴性 (滴度 <1:100).

** 对照是来自小鼠 c-mos 原癌基因产物的 15 氨基酸肽

在一些 HIV 感染的个体中观察到直接对保守肽的低水平的抗体反应 (见下表 7)。来自 17 个个体中的 2 个血清样品通过 ELISA 终点稀释分析分别显示对对照肽的抗体滴度 1: 160 和 1: 320。因此, 对保守肽的抗体滴度用对对照肽的最高值正常化 (1:320)。基于这些计算, 在三个个体中对肽 104、两个人对肽 120 和一个人对肽 113 和 121 观察到阳性抗体滴度 (<1:1280)。没有一个 HIV+个体显示对肽 122 阳性抗体滴度。总的说来, 在研究的总共 6 个 HIV+个体中直接对 5 个保守肽仅有低水平抗体反应 (ELISA 滴度 <1:1280)。计划的比较揭示抗体滴度对任何 5 个保守 HIV 合成肽和对照, 肽 104 和对照, 肽 104 和其余四个保守肽 [$F(1, 16) = 2.67$, $F(1, 16) = 2.40$, $F(1, 16) = 0.22$; 所有 p values > 0.05] 没有显著差异。对照 HIV 阴性个体没有显示对任何检测肽的抗体反应。当前研究中应用的有对肽 104, 120, 和 122 重叠的氨基酸序列的合成肽已在文献中报道, 在特定动物模型中具有免疫原性并还与来自 HIV+个体的抗血清反应 (Clerget-Raslain, 1991; 综述在 Bjorling, 1996)。

表 7. 来自正常和 HIV-1 阳性个体的 PBMCs 对各种来自 HIV-1 包膜蛋白保守区合成肽的 T 和 B 细胞反应

病人	免疫反应*	肽					对照 (c-mos)
		104	113	120	121	122	
CS	T	+	+	+	+	-	-
	B	+	+	-	-	-	-
BH	T	+	-	-	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	-
MH	T	+	-	+	-	+	-
	B	-	-	-	+	-	-
RR	T	+	+	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
ER	T	+	-	+	-	-	-
	B	-	-	+	-	-	-
MB	T	+	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	-	-
RC	T	-	-	-	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	-
JH	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
RT	T	+	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	-
RB	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	+	-	+	+	-
WC	T	-	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	+	-
DN	T	-	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	+	-
ST	T	-	+	+	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
JW	T	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	+	-	-	-
MSm	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
MSf	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
BT	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
正常-1	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-
正常-2	T	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-

* T T细胞增殖: +, 阳性 (刺激指数[SI] > 2.0); -, 阴性 (SI < 2.0).

* B 抗肽抗体: +, 阳性 (高于对照滴度); -, 阴性 (低于对照滴度).

实施例 7: 用来自包膜蛋白 gp160 合成肽的混合液免疫猴子诱导增殖和 CTL 反应

因为在几个动物模型（包括 HIV 感染的猩猩和 HIV 感染的人）中观察到对几个 HIV 包膜来源肽的增殖反应，还没有感染病毒的猴子给予 env 肽的混合液来评价它们对混合物的 T 淋巴细胞反应。

该研究中包括 5 个猴子；三个接受 HIV env 肽混合疫苗（表 8）而其余两个作为对照。免疫操作方案由用完全弗氏佐剂的肽混合物初次免疫和随后一月间隔两加强剂量的不完全弗氏佐剂的肽混合物组成（通过皮下途径）。对照猴子用没有肽混合物的佐剂制剂免疫。随后，免疫猴子接受三周静脉剂量的肽混合物脉冲的自体树突状细胞 (DC)，而对照猴子仅接受 DC。所有 5 个猴子在初次免疫后 29 周用猴 HIV (SHIV) 攻击。

表 8. 用于疫苗研究中的保守的 HIV 包膜肽

肽 编号	氨基酸残基	氨基酸序列
61	586 - 597	YLRDQQLGIWG
63	519 - 543	FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQ
104	45 - 55	VYYGVPVWKEA
111	118 - 130	LWDQSLKPCVKLT
113	204 - 216	SVITQACSKVSFE
116	540 - 552	GTGPCTNVSTVQC

在规范的间隔监控猴子对肽和 HIV 包膜蛋白的各种免疫反应特异性。包括在疫苗制剂中的各种肽氨基酸序列显示在表 8 中。显示于图 3 的数据显示肽和在 32 周期间收集的外周血样中 HIV 特异性增殖反应。用肽混合物免疫的两个猴子 J13 和 L889，显示在整个 32 周期间显著的增殖反应，而第三个免疫猴子 (L993) 和两个对照猴子没有一致的反应（图 6）。

重要的，检测的免疫猴子中的两个显示 HIV 包膜特异性 CTL 反应，而对照猴子则没有（图 6）。五个猴子中自然杀伤细胞 (NK) 活性没有显著性不同（图 4）。用 SHIV 攻击猴子前，体外检测每个猴子对 SHIV 感

染的 PBMCs 的易感性。通过巢式 PCR 分析 18 个小时后监控 HIV 感染；与对照猴子相比较，来自免疫猴子的 PBMCs 对 SHIV 感染有较小易感性。然而，肽免疫前来自免疫和对照猴子的 PBMCs 在体外对 SHIV 的感染有相等的易感性。

更显著的，5 个猴子的 CD4+ 和 CD8+ 细胞分析显示两个对照猴子在攻击后两周显示 CD4+ 细胞数激烈的降低（图 5）。发表的报告显示初始的，并最显著的，在恒河猴中 SHIV 感染迹象是 CD4+ 细胞几乎全部丧失。已知 CD4+ 细胞丧失后伴随其它 AIDS 典型征候如机会感染和体重减轻，其与在人中 HIV 诱导的 AIDS 有相似的典型症状。有趣的是，对照猴子中 CD4+ 细胞数的急剧降低与血浆中高病毒载量平行，也和循环中高的病毒感染细胞平行（表 9）。

表 9. 攻击后分析

检测	猴子 #	1 周	2 周	3 周
CD4+ 细胞 (#/μl)	J13	2259	1194	1831
	L889	2282	1072	825
	L993	1257	1839	423
	L913	1290	121	126
	L933	4055	2339	373
	感染细胞 (#/10 ⁶ PBMC)	J13	100	100
L889		100,000	100,000	100,000
L993		10,000	10,000	10,000
L913		100,000	100,000	100,000
L933		100,000	100,000	100,000
血浆病毒滴度*		J13	ND	ND
	L889	ND	ND	1:5
	L993	ND	ND	1:5
	L913	ND	ND	1:625
	L933	ND	ND	1:625

* 最终血浆稀释度,在此观察到感染病毒(在 C1866 细胞中用细胞病变效果(CPE)测定)。

ND =未检测

用肽混合液或对照液免疫猴子后进行的实验在肽免疫猴子而不在对照中显示对 HIV 包膜特异性的显著 CTL 和增殖反应(图 6)。

DC 灌输在免疫猴子中还显著增加细胞免疫反应,但在对照猴子中没有效果(图 7A 和 7B)。重要的,在用致病的 SHIVKU-2 攻击时,尽管所有 5 个猴子都感染,在免疫动物循环中病毒阳性细胞迅速降低到低于检测不到的水平,而其在对照中维持高水平(图 8)。

同样,在一对照猴子中,CD4+细胞数在两周内降低到 40 并在 6 到 24 周进一步降低,还伴随着体重降低显示消瘦,典型的 AIDS 相关病理。在 39 周,该猴子减轻显著的体重(图 9),没有循环 CD4+细胞,并因此实施安乐死。验尸时,组织学检查揭示衰弱、肌肉萎缩和胃出血。显微镜下,在几个淋巴结中明显有严重淋巴细胞损耗,脑中多区域有损害显示脑炎,核内病毒包含体暗示在中脑区域 CMV 感染。这些是恒河猴中 SHIV 感染典型 AIDS 相关特征。在另一对照猴子中,尽管缺乏任何明显的 AIDS 症状,病毒阳性细胞数持续的比在免疫动物中的高。

因此得到的结果很强的显示基于在 SHIV 猕猴模型中 HLA-Cw7 限制的 CTL 表位的疫苗的有效性。然而,已报道 MHC 抗原的 C 位点不存在于猕猴中(Boyson 等人, 1996)。因此在 SHIV 恒河猴模型中观察到的保守性 HIV 包膜 CTL 表位肽的保护性效果是可以想象的归因于特异的对 MHC 等位基因免疫反应,其与 HLA-Cw7 或近或远地相关。

实施例 8: 在人 LTNPs 中 HLA-Cw7 限制性的 CTL 反应

进行进一步研究来证实在 HIV 感染的长期无进展者(LTNPs)中 HLA-Cw7 限制性 HIV 包膜特异性 CTL 反应。特别的,对于这些研究应用一突变的人 B 细胞系 721.221 在 HLA I 类表达中缺陷。这些 721.221 细胞用单 HLA 等位基因转染并表达,随后它们作为靶细胞用于分析两个长期无进展者(RLF 和 DH)PBMCs 的 CTL 的效应子功能。效应细胞通

过在表达 HIV 包膜的自体抗原呈递细胞存在下培养来自病人的 PBMCs 两周时间来制备。对 HIV 包膜的 CTL 活性在典型的铬释放实验中进行测定。结果显示在图 10 和图 11。图 10 显示来自病人 RLF 的 PBMCs 对表达 HIV 包膜蛋白靶细胞的 CTL 活性，在 Cw7 背景下而不是 HLA A2 或 B2705（系列 A 和 B 与 C 的比较数据）。另外的，系列 D 中数据显示对两个保守的 HIV 包膜肽的特异性的 Cw7 限制性的 CTL 活性。从病人 DH（图 11）得到相似的数据显示 HIV 包膜特异性 CTL 活性是 HLA Cw7 限制性的并在该病人中三个保守的 HIV 包膜肽作为 Cw7 限制性的 CTL 表位。

这些结果证实我们早期 HIV 感染的长期无进展者显示 HLA-Cw7 限制性的 CTL 活性的报告，并进一步确证在两个以前没分析表位特异性的另外个体中保守性包膜肽为 CTL 表位。这些结果还提供对在 LTNP 中 HLA-Cw7 限制性 CTL 反应争论的进一步支持，特别是在这些研究中确证的那些直接抗保守性 HIV 包膜肽的反应，组成抗 HIV 保护性免疫的重要方面。

实施例 9: 适合于 HIV 的小基因混合液 DNA 疫苗

在该例子中，如下面图 12A 显示的克隆 p18 肽序列。10 μ g 该质粒单肌肉内免疫到 BALB/c 小鼠 60 天后从小鼠脾细胞中介导充分高 CTL 活性（图 12B）。小基因构建体介导的 CTL 反应可与那些通过泛素融合含有相同 p18 表位的 HTLV IIIb gp120 区域的载体产生的反应相比较（UB#23）。

假设该方法成功，不同的 HIV 表位通过 PCR 克隆以与 p18 表位类似的方式克隆进小基因表达质粒（图 13A-F）。设计质粒构建体编码对应肽号 61, 63, 104, 111, 和 113（见表 7，可是在某些情况下包括编码其它氨基酸的序列）的保守氨基酸序列。

为做这些，合成对每个表位的寡核苷酸用每个表位附加在 poly A 的 5' 序列来扩增人生长激素聚腺苷酸化序列（图 12A）。以至于每个表位的寡核苷酸前面有 EcoRI 位点和 Kozak 起始甲硫氨酸并且有在肽最终氨基酸后的终止密码子。每个这些表位寡核苷酸用于与对 hGH 聚腺

苷酸化序列特异性的寡核苷酸连接,其中有加入的 BglIII 位点。用 Taq 聚合酶通过 PCR 扩增每个表位寡核苷酸并用 Qiaex II 胶纯化。PCR 产物将随后用 EcoRI 和 BglIII 消化、胶纯化并连接进载体 pG-CMV_i 的 EcoRI 和 BamHI 位点(图 12A)。产生的载体将有巨细胞病毒增强子/启动子, 5' 合成的内含子, Kozak 甲硫氨酸, 抗原表位, 终止密码子和 hGH 聚腺苷酸化序列, 用于在哺乳动物细胞中过量表达。根据这种策略, 在细胞质中产生肽, 甲硫氨酸从表位中修饰除去(trimmed)用于 TAP 定位进内质网(E. R.)和 MHC I 负载。

首先检测构建体在小鼠模型中诱导 Th 和/或 CTL 反应。为做这些, 用 10ug 从无内毒素 Qiagen 质粒纯化柱纯化的每个质粒肌肉内注射免疫 BALB/c 小鼠。这些将与用合成肽和佐剂免疫小鼠相比较(Sastry, 1991; Sastry, 1992)。P18 小基因构建体(图 12B)将用作阳性对照。14 天后, 一半小鼠被处死, 评估 Th 和 CTL 活性。另一半小鼠将在 60 天分析记忆 T 细胞反应。这些实验评估: 1) 在小鼠中相对于合成肽小基因构建体诱导 Th/CTL 的能力; 2) 指示该方法在其它哺乳动物中的效果。

如果对任何细胞质表达构建体有问题, 肽序列将被转到 pSECI 载体中, 其中抗原肽将直接融合在 a1 抗胰岛素分泌前导区的切割位点后。在这种形式, 肽将被翻译并分泌进 E. R., 在此除去分泌前导区因此暴露精确的抗原性肽。在这种方法中, 肽避免了异源性甲硫氨酸的加入和细胞质蛋白酶裂解降解。这些第二代载体将如上文描述进行检测。如果表位仍然失败, 它们将被融合到泛素的下游(Barry, 1995)。泛素可被聚泛素化, 因此靶向肽到蛋白溶酶体, 随后切割成肽, 适于 TAP 和 MHC I 类相互作用。这些构建体将如上文所述在小鼠中进行检测。在本发明的一些方面中, 可通过用编码鼠单核-巨噬细胞集落刺激因子(Johnston, 1997)的质粒和小基因质粒共转染进行所述方法, 增强体液和细胞免疫反应和 IL-12 促进鼠的 CTLs。作为选择, 可采用串珠方法, 此中每个 MHC I 类表位相互融合并包括异源性 T 辅助表位来增加免疫原性(Ishioka, 1999)。

对于每个构建体, 每批 5-8 只小鼠接受 10ug, 100ug 和 1mg 的质粒小基因疫苗。对照组小鼠接受相等量的合成肽和佐剂, 并在所有组小鼠中如上文所述在 14 天和 60 天时间点监控肽和 gp160 特异性免疫反应。作为选择, 在小鼠模型中的研究将包括检测编码 6 个高保守 HIV 包膜肽质粒的混合液, 以最适宜的浓度引发特异性 Th 和 CTL 反应。

来自小鼠研究的结果组成检测混合液质粒在 SHIV 猕猴模型中的基础。一组 8 只猴子将接受质粒混合液的最佳剂量, 并在免疫后 14 天, 从猴子中收获 PBMCs 并通过典型的 [3H] 胸苷掺入实验检测 Th 活性和体外再刺激后对抗原表达的和肽负载自体细胞的 CTL 活性。该时间点应显示构建体的 CTL 引发的相对水平。另外, 免疫后 60 天, 将检测来自猴子的 PBMCs 的 Th 和 CTLs, 同样作为在适度时间已经建立的 T 细胞记忆水平的指示。猴子随后将用相等量 DNA 加强免疫, 并在 14 和 60 天测量 CTLs 决定是否加强有任何效果。猴子将仅加强免疫一次以避免 DNA 对动物的“过量”而削弱反应。如果一次加强后 CTL 反应是最小, 可尝试用相同时间线路另一次加强。一旦完成 CTL 相关的测量, 每个猴子将如初步结果部分所述的用 SHIV 攻击。在随后的数周通过 RT-PCR 检测病毒基因组和感染性中心实验评估病毒滴度。

实施例 10: 小鼠黏膜免疫合成肽疫苗

HIV 合成肽有效的用于黏膜免疫并在黏膜和系统部分中诱导特异性免疫反应。这些研究包括通过鼻腔内途径用我们前面报告起到 CTL 诱导因素和表位功能的合成肽免疫 Balb/c 或 C57B1/6 小鼠, 每周一次, 连续 4 周。选择不同 HIV 株包膜蛋白的 V3 环区的两个肽, 和来自人乳头瘤病毒 16 型 (HPV-16) 的 E6 癌蛋白的一个肽。最初, 霍乱毒素 (CT 1 μ g/小鼠) 用作黏膜佐剂并且得到的数据显示特异性 CTL 反应的诱导。应用少到两个剂量的肽在 CT 中可观察到这些反应。

因为毒性问题, 进行了应用 CT 突变形式和 Act 的进一步实验。对于这些实验, 应用了来自 HIV-1 IIIB V3 环的 CTL 表位肽。每周一次, 连续 4 周通过鼻腔内途径用肽在 Act (1 μ g/小鼠) 中免疫小鼠。收获脾和宫颈淋巴结细胞并在体外用肽再刺激 5 天检测 CTL 活性。在两种

细胞类群中有效的 CTL 活性是明显的，指示在黏膜和系统部分特异性 CTL 活性的诱导。还检测另一来自 HIV gp160 氨基末端区域的肽，该肽已经报道能诱导特异性增殖反应(Sastry, 1991)。在该情况下，肽被乳化在 CFA 中并注射进小鼠的后脚垫，或与热灭活的 Act 混合并通过鼻腔内途径引入。假设脚垫免疫是腿弯的淋巴结细胞，假设鼻腔内免疫是脾和宫颈淋巴结细胞，对它们进行检测并观察到对肽的阳性增殖反应。

将进行其它实验研究 CT 和 Act 突变体与本发明治疗性和预防性治疗剂结合的佐剂活性。CT 的突变形式称为 CT2*，其中在 CT 酶活性 A 亚单位的氨基酸残基 Arg7 和 Glu112 分别替代为 Lys 和 Gln。通过另一组同质性水平纯化突变的毒素，不象天然的 CT，在兔子结扎的小肠环中 CT2*缺乏其引起液体分泌的能力。此外，CT2* (1ug) 攻击环的灌洗液含有 3'5' 腺苷单磷酸 (cAMP) 的基础水平和前列腺素 (PGE2) 水平。与此相反，用天然 CT (1ug) 攻击结扎环引起显著液体分泌反应 (环的 1.9 ml/cm)，在环液体中 cAMP 和 PGE2 水平有 4-5 倍增加。这些数据明显指示突变的 CT (CT2*) 将没有任何安全问题。尽管人们可仅应用 CT 的结合亚单位 (CTB) 作为黏膜佐剂，突变完整的 CT 将被应用。

Act 的热灭活形式证明其作为佐剂的能力，当通过鼻腔内途径引进小鼠时，引发 HIV 肽的 CTL 反应。另外，Act 的突变形式通过另一组产生，其中，氨基酸残基 Trp394 替代为苯丙氨酸导致的 Act 的突变形式可用于与本发明结合。

用突变形式的 CT 和 Act 进行的实验用来检测它们作为黏膜佐剂的能力，在小鼠中与 HIV 包膜肽混合液通过鼻腔内途径一起施用引发特异性 Th 和 CTL 反应。基于这些初步研究中的结果，设计灵长类研究用于鼻腔内免疫引发特异性细胞免疫反应。在 SHIV 猕猴模型中，仅应用有更有效的黏膜佐剂的突变的毒素。

基于在小鼠中研究的结果，将选择一突变毒素制剂并从猴子中开始研究，通过鼻腔内途径用肽黏膜免疫，随后通过阴道内途径用 SHIV

攻击。因为文献中几个报道描述当抗原通过阴道途径引进小鼠，成功引发免疫反应，检测通过阴道内途径给予抗原（与选择的突变毒素混合）的小鼠并监控免疫反应。

对于小鼠中的黏膜免疫研究，进行的免疫接种方案包括每周一次共四周在鼻腔内用肽（1ug）在 CT 中接种，和一周后收获脾和排尽宫颈淋巴结细胞确定免疫反应。将采用相似的方案免疫猴子（n=8），但疫苗将以两周间隔给予四次，随后用两月剂量（10ug 毒素/猴子）。鼻腔内免疫猴子的方法将如 Imaoka 等所述。在此程序中，猴子用氯胺酮麻醉，并置于背部体位使头斜于背以至于鼻腔朝上。疫苗溶液（0.5ml）以逐滴滴入方式进入每个鼻腔而不是插入注射器到鼻腔内。猴子保持这种位置 10 分钟并随后放置侧体位直到它们从麻醉中苏醒。免疫学监控、SHIV 攻击和随后检测保护反应将如上文所述的特殊目的 1 中研究的设计。如上文表明，进行鼠研究来确定肽混合液阴道内给药产生有效和特异性免疫反应的潜在性。基于这些研究的结果，作出进行 SHIV 猕猴研究的决定（每组 8 只动物）。通过四等份疫苗在四个等距离位点用 22 规格针头直接注射来给予肽混合液。以两周间隔一系列四次注射，随后两月剂量的肽混合液（每肽 100 μ g/剂量，在 1ml 盐水中）。在用 SHIV 阴道内途径攻击前将进行至少六个月的免疫学监测和如上文所述的一年的进一步的重复。

以两周间隔收集血样监控免疫反应。另外，最终剂量后两周得到排尽淋巴结的组织切片确定局部免疫反应。对鼻腔内给药反应的淋巴结将来自下颌和上远宫颈区域，特异性对阴道内途径的那些淋巴结将来自腹股沟区域的淋巴结（或表面或深部链）。动物 SHIV 攻击后，利用动物相同的淋巴区域完成病毒学检测，但来自以前那些样品的对侧。

此处公开和要求的所有组合物和方法可按照本发明公开的适当实验进行制备和操作。当本发明组合物和方法已经用术语优选的实施方案描述，对于本领域那些熟练人员其将是明显的，可应用改变的组合物和方法并且不超出此处描述的方法步骤或步骤程序、本发明的概念、精神和范围。更明确的，其将是显然的，化学和物理学相关的特定试

剂可替代此处描述的试剂而获得相同或相似的结果。所有这些相似的替代和修饰对于本领域那些熟练人员是显然的，并且在所附权利要求定义的本发明的精神、范围和概念之中。

文献

下列文献，在一定程度上他们提供了示范性方法或对于此处公开的内容的详细补充，它们通过参引结合于此。

美国专利号. 3, 791, 932

美国专利号. 3, 949, 064

美国专利号. 4, 174, 384

美国专利号. 4, 367, 110

美国专利号. 4, 452, 901

美国专利号. 4, 554, 101

美国专利号. 4, 578, 770

美国专利号. 4, 596, 792

美国专利号. 4, 599, 230

美国专利号. 4, 601, 903

美国专利号. 4, 608, 251

美国专利号. 4, 683, 195

美国专利号. 4, 683, 202

美国专利号. 4, 690, 915

美国专利号. 4, 797, 368

美国专利号. 4, 800, 159

美国专利号. 4, 883, 750

美国专利号. 5, 028, 592

美国专利号. 5, 139, 941

美国专利号. 5, 199, 942

美国专利号. 5, 221, 605

美国专利号. 5, 238, 808

美国专利号. 5, 279, 721

美国专利号. 5, 310, 687

美国专利号. 5, 620, 896

美国专利号. 5, 958, 895

EPA No. 320 308

EPA No. 329 822

GB 申请号 2 202 328

PCT 申请号 PCT/US87/00880

PCT 申请号 PCT/US89/01025

PCT 申请 WO 88/10315

PCT 申请 WO 89/06700

WO 90/07641

Ada 和 Jones, 微生物免疫当前话题 (Curr. Top. Microbiol. Immunol.), 1986.

Aichele 等人, 实验医学杂志(J. Exp. Med.), 171:1815-1820, 1990.

Altman 等人, 科学 (Science), 274:94-96, 1996.

An L-L 和 Whitton, 病毒学杂志(J. Virol.), 71:2292-2302, 1997.

Ariizumi, Kitajima, Bergstresser, Takashima, 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.), 25:2137-2141, 1995.

Baichwal 等人, 来自动物 DNA 病毒用于基因转移的载体: 转移基因的瞬时和稳定表达 “(Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes,” In: 基因转移 (Gene Transfer), Kucherlapati, R., ed., Plenum Press, New York, pp. 117-148, 1986.

Barany and Merrifield, 固相肽合成 (Solid-Phase Peptide Synthesis), In: 肽: 分析, 合成, 生物学, (The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology), Gross and Meinhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 3-284, 1980.

- Barry 等人, 自然 (Nature), 377:632-635, 1995.
- Berzofsky, FASEB J., 5:2412-2418, 1991.
- Bevan, 自然 (Nature), 342:478-479, 1989.
- Bjorkman 和 Parham, 生物化学年度综述 (Ann. Rev. Biochem.), 59:253-288, 1990.
- Bjorling 等人 爱滋病 (AIDS) 6:1259-1264, 1996.
- Bogedain 等人, 病毒学杂志 (J. Virol.), 69:4872-4879, 1995.
- Boussif 等人, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA), 92:7297-7301, 1995.
- Boyson 等人 免疫学杂志 (J. Immunol). 156:4656-4665, 1996.
- Braciale 等人, 免疫学综述 (Immunol. Rev.), 98:95-114, 1987.
- Brutlag 等人, CABIOS, 6:237-245, 1990.
- Callebaut 等人, 科学 (Science), 262:2045-2050, 1993.
- Capaldi 等人, 生物化学和生物物理研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Comm.), 76:425 1977.
- Carmichael 等人, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 177:249-256, 1993.
- Casement 等人, 病毒学 (Virology), 211(1):261-67, 1995.
- Caux 等人, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 180:1263-1272, 1994.
- Chang 等人, 肝学 (Hepatology), 14:134A, 1991.
- Chen and Okayama, 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.), 7:2745-2752, 1987.
- Chenciner 等人, 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.), 19:1537-1544, 1989.
- Chopra 等人, 基因 (Gene) 139:87-91, 1994.
- Chopra 等人, 微生物病理学 (Microbial Path.) 21:357-377, 1996.
- Ciernik 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol.), 156:2369-2375, 1996.
- Clark 等人, 人类基因治疗 (Human Gene Therapy), 6:1329-1341.
- Clerget-Raslain 等人, 病毒学研究 (Res. Virol.), 142:423-438,

1991.

Clerici 等人, 感染性疾病杂志 (J. Infect. Dis.), 164:178-182, 1991.

Coffin, In: 病毒学 (Virology), Fields 等人, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.

Cong 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 158:3936-3946, 1997.

Coupar 等人, 基因 (Gene), 68:1-10, 1988.

Dadaglio 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol.), 147:2302-2309, 1991.

Dai 等人, 病毒学杂志 (J. Virol.), 66:3151-3154, 1992.

Del Guercio 等人, 疫苗 (Vaccine) 15:441-448, 1997.

De Rossi 等人, 病毒学 (Virology), 184:187-196, 1991.

Deres 等人, 自然 (Nature), 342:561-564, 1989.

Dill 等人, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci.) USA, 85:5664-5668, 1988.

Dull 等人, 病毒学杂志 (J. Virol.), 72:8463-8471, 1998

Dupuis 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol.), 155:2232-2239, 1995.

Enk 和 Katz, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA), 89:1398-1402, 1992.

Falk 等人, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 182:1005-1018, 1995.

Falk 等人, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA), 90:12005-12009, 1993.

Fechheimer 等人, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA), 84:8463-8467, 1987.

Ferguson 等人, 基因 (Gene) 156:79-83, 1995.

Ferguson 等人, 感染免疫 (Infect. Immun.) 65:4299-4308, 1997.

Fetrow 和 Bryant, 生物技术 (Biotechnology), 11:479-483, 1993.

Flotte 等人, 基因治疗 (Gene Therapy), 2:29-37, 1995.

Flotte 等人, 美国国家科学院学报 (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA) 90:10613-10617, 1993.

Flotte, 等人, 美国呼吸细胞分子生物学杂志 (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.), 7:349-356, 1992.

Fraley 等人, 美国国家科学院学报 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.

Freshney 动物细胞培养: 实用方法, Animal cell culture: a practical approach, Oxford (England); New York: IRL Press, Oxford University Press, 1992.

Friedmann, 科学 Science, 244:1275-1281, 1989.

Frohman, PCR 操作指南: 方法和应用指南, PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, New York, 1990.

Fuller and Haynes, 爱滋病研究 AIDS Res. Hum. Retroviruses, 11:1433-1441, 1994.

Gallichan 等人, 实验医学杂志 J. Exp. Med. 181:1879-1890, 1996.

Gasson 等人, 免疫遗传学 Immunogenetics, 25:313-322, 1987.

Gopal, 分子细胞生物学 Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.

Graham and van der Eb, 病毒学 Virology, 52:456-467, 1973.

Graham 等人, 普通病毒学杂志 J. Gen. Virol., 36:59-72, 1977.

Grunhaus and Horwitz, 病毒学研究会 Seminar in Virology, 3:237-252, 1992.

Harland and Weintraub, 细胞生物学杂志 J. Cell Biol., 101:1094-1099, 1985.

Haynes 等人, 科学 Science, 274:324-328, 1996.

Hermonat and Muzyczka, 美国国家科学院院刊 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6466-6470, 1984.

Heufler 等人, 实验医学杂志 J. Exp. Med., 176:1221-1226, 1992.

Horwich 等人 病毒学杂志 J. Virol., 64:642-650, 1990.

Houghten, R. A. 美国国家科学院院刊 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:5131-5135, 1985.

Howes 等人, 自然 Nature, 277:67, 1979.

- Imaoka 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 161:5952-5958, 1998.
- Ishioka 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 162:3915-3925, 1999.
- Jameson and Wolf, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):181-186, 1988.
- Jasoy 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 149:3113-3119, 1992.
- Johnson 等人, 实验医学杂志 *J. Exp. Med.*, 175:961-971, 1992.
- Johnson 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 67:438-445, 1993.
- Johnston 等人, Boehm, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 1-8, 1997.
- Kaplitt 等人, 自然遗传学 *Nature Genetics*, 8:148-154, 1994
- Kast 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88:2283, 1991.
- Keusch 等人, 感染性疾病杂志 *J. Infect. Dis.* 131:58-63.
- Kitajima 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 155:3794-3800, 1995.
- Klein 等人, 实验医学杂志 *J. Exp. Med.*, 181:1365-1372, 1995.
- Klein, 主要组织相容性复合体的自然历史, *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*, John Wiley & Sons, New York, pp. 775, 1986.
- Kotin 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.
- Koup 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 68:4650-4655, 1994.
- Kyte and Doolittle, 分子生物学杂志 *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.
- LaFace et al, 病毒学 *Viology*, 162:483-486, 1988.
- Laughlin 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 60:515-524, 1986.
- Lebkowski, 等人, 分子细胞生物学 *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996, 1988.
- Levy, 微生物学综述 *Microbiol. Rev.*, 57:183, 1993.
- Lifson 等人, 感染性疾病杂志 *J. Infect. Dis.*, 163:959-965, 1991.

- Littaua 等人, 病毒学杂志 J. Virol., 65:4051-4056, 1991.
- Lukacher 等人, 实验医学杂志 J. Exp. Med., 160:814-826, 1984.
- Lu 等人, 病毒学 Virology, 209:147-154, 1995.
- Luo 等人, 血液 Blood, 82:suppl. 1:303A, 1994.
- Lycke 等人, Scand. 免疫学杂志 J. Immunol. 23:611-616, 1986.
- Mann 等人, 细胞 Cell, 33:153-159, 1983.
- Matsue 等人, J. Invest. Dermatol., 99:537-541, 1992.
- McCarty 等人, 病毒学杂志 J. Virol., 65:2936-2945, 1991.
- McLaughlin 等人, 病毒学杂志 J. Virol., 62:1963-1973, 1988.
- McMichael 等人, 自然 Nature, 270:524-546, 1977.
- Merino 等人, Int'l 食品微生物学杂志 J. Food. Microbiol. 28:157-168, 1995.
- Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963.
- Mizrahi, 生物化学方法 Process Biochem., (August):9-12, 1983.
- Modrow 等人, 病毒学杂志 J. Virol. 61:570-578, 1987.
- Mohamadzadeh 等人, 免疫学杂志 J. Immunol., 156:3102-3106, 1996.
- Mortara 等人, 病毒学杂志 J. Virol. 73:4447-4451, 1999.
- Munoz 等人, 人逆转录病毒获得性免疫缺陷综合症杂志 J. Acquired Immune Syndr. Hum. Retroviruses, 8:496-505, 1995.
- Musey 等人, 新英格兰医学杂志 New Engl. J. Med., 337:1267-1274, 1997.
- Muzyczka, N., 微生物免疫当前话题 Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:97-129, 1992.
- Naldini 等人, 科学 Science, 272:263-267, 1996
- Nehete 等人, 人逆转录病毒获得性免疫缺陷综合症研究 AIDS Res. Hum. Retroviruses, 9:235-240, 1993.
- Nehete 等人, 病毒免疫学 Vir. Immunol., 7:189, 1994.
- Nehete 等人, 爱滋病 AIDS 9:567-572, 1995.

- Nehete 等人, 细胞免疫学 *Cell. Immunol.*, 160:217, 1995.
- Nehete 等人, 临床免疫学杂志 *J. Clin. Immunol.*, 16:115-124, 1996.
- Nehete 等人, 病毒免疫学 *Vir. Immunol.*, 11:119-129, 1998.
- Nehete 等人, 病毒免疫学 *Vir. Immunol.*, 11:147-158, 1998.
- Nicolas and Rubinstein, 逆转录病毒载体, In: *Retroviral vectors,* In: 载体: 分子克隆载体及其应用的纵览 Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau and Sene, 生物化学和生物物理学报 *Biochem. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nixon 等人, 自然 *Nature* 336:484-487, 1988.
- Ohi 等人, 基因 *Gene*, 89:279-282, 1990.
- Olerum and Zetterquist, 组织抗原 *Tissue Antigens*, 39:225-235, 1992.
- Paltaleo 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol*, 144:1696, 1990.
- Pantaleo 等人, 自然 *Nature*, 370:463-467, 1994.
- Paskind 等人, 病毒学 *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Peterson 等人, 感染免疫 *Infect. Immunol.* 67:794-799, 1999.
- Phillips 等人, In: 大规模哺乳动物细胞培养 *Large Scale Mammalian Cell Culture*, Feder, J. and Tolbert, W.R., eds., Academic Press, Orlando, FL, 1985.
- Picard 等人, 获得性免疫缺陷综合症杂志 *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, 5:539-546., 1992.
- Pierce, 感染免疫 *Infect. Immunol.* 158:341-346, 1984.
- Plata 等人, 自然 *Nature*, 328:348-351, 1987.
- Pontesilli 等人, 临床实验免疫学 *Clin. Exp. Immunol.*, 100:419-424, 1995.

- Porgador 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.* 158:834-841, 1997.
- Potter 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Ratner 等人, 自然 *Nature* 313:277-284, 1985.
- Ridgeway, 哺乳动物细胞表达载体, "Mammalian expression vectors,* In: 载体: 分子克隆载体及其应用的纵览 *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses.*, Rodriguez R. L., Denhardt D. T., eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 467-492, 1988.
- Rinaldo 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 69:5838-5842, 1995.
- Rippe 等人, 分子细胞生物学 *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Roos 等人, 感染性疾病杂志 *J. Infect. Dis.*, 171:531-536, 1995.
- Rosenberg 等人, 科学 *Science*, 278:1447-1450, 1997.
- Roux 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Rowland-Jones 等人, *Lancet*, 341:860-861, 1993.
- Rowland-Jones 等人, 自然医学 *Nature Med.*, 1:59-64, 1995.
- Sambrook, 等人, 分子克隆 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, N. Y., 1989.
- Samulski 等人, *EMBO J.*, 10:3941-3950, 1991.
- Samulski 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989.
- Sastry and Arlinghaus, 爱滋病 *AIDS*, 5:699-707, 1991.
- Sastry 等人, 病毒免疫学 *Viral Immunol.*, 8(3):165-74, 1994.
- Sastry 等人, 病毒学 *Virology*, 188:502-509, 1992.
- Schendel 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 149:2406-2416, 1992.
- Schreiber 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 149:3525-3534, 1992.
- Schrier 等人, 免疫学杂志 *J. Immunol.*, 142:1166-1176.
- Sedegah 等人, 免疫学 *Immunology*, 91:9866-9870, 1994.

- Shelling & Smith, 基因治疗 Gene Therapy, 1:165-169, 1994.
- Sodoyer 等人, EMBO J., 3:879-885, 1984.
- Steinman, 免疫学年度综述 Ann. Rev. Immunol., 9:271-296, 1991.
- Steinman, Inaba, Schuler, In: 表皮郎罕氏细胞的免疫功能, The Immune Functions of Epidermal Langerhans Cells, Heidrun Moll, ed., R.G. Landes Company, Austin, Texas, pp. 1-19, 1995.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, In: 人基因转移 Human Gene Transfer, O. Cohen-Haguenaer and M. Boiron, eds., John Libbey Eurotext, France, p. 51-61, 1991.
- Takahashi 等人, 美国国家科学院院刊 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10277-102, 1991.
- Tam 等人, J. Am. Chem. Soc., 105:6442, 1983.
- Temin, “逆转录病毒载体用于基因转移: 在脊椎动物细胞中外源基因的有效整合和表达。” “Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome,” In: Gene Transfer, Kucherlapati, ed., Plenum Press, New York, pp. 149-188, 1986.
- Tooze, J., ed., 肿瘤病毒的分子生物学, Molecular Biology of DNA Tumor Viruses, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1991.
- Townsend and Bodmer, 免疫学年度综述 Annu. Rev. Immunol., 7:601-624, 1989.
- Townsend 等人, 细胞 Cell, 44:949-968, 1986.
- Tratschin 等人, 分子细胞生物学 Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081, 1984.
- Tratschin 等人, 分子细胞生物学 Mol. Cell. Biol., 5:32581-3260, 1985.
- Trowsdale, 遗传学趋势 Trends Genet., 9:117-122, 1993.
- Tsubota 等人, 实验医学杂志 J. Exp. Med., 169:1421-1434, 1989.

- Tur-Kaspa 等人, 分子细胞生物学 *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Ulmer 等人, 科学 *Science*, 259:1745-1749, 1993.
- Unanue & Cerottini, *FASEB J.* 3:2496-2502, 1989.
- van den Eynde 等人, 实验医学杂志 *J. Exp. Med.*, 182:689-698, 1995.
- Walker 等人, 科学 *Science*, 234:1563, 1986.
- Walker 等人, 自然 *Nature*, 328:345-348, 1987.
- Walker 等人, 科学 *Science*, 240:64-66, 1988.
- Walsh 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:7257-7261, 1994.
- Wang 等人, 感染免疫 *Infect. Imm.*, 66:4193-4202, 1998.
- Wei 等人, 基因治疗 *Gene Therapy*, 1:261-268, 1994.
- Weinberger 等人, 科学 *Science*, 228:740-742, 1985.
- Wigler 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 77:3567, 1980.
- Wolf 等人, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):187-191, 1988.
- Wu and Wu, 生物化学 *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
- Wu and Wu, 生物化学杂志 *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Xiang 等人, 病毒学 *Virology*, 199:132-140, 1994.
- Xu 等人, 感染免疫 *Infect. Immun.* 66:3501-3509, 1998.
- Yamada 等人, 流行病学和感染学 *Epidemiol. & Infect.* 119:121-126, 1997.
- Yang 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 68:4847-4856, 1994.
- Yang 等人, 美国国家科学院院刊 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.
- Yasutomi 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 70:678-681, 1996.
- Yoder 等人, 血液 *Blood*, 82:suppl. 1:347A, 1994.
- Yokoyama 等人, 病毒学杂志 *J. Virol.*, 69:2684-2688, 1995.

Zemmour and Parham, 免疫遗传学 *Immunogenetics*, 37:239-250, 1993.

Zhou 等人, 实验血液学 *Exp. Hematol. (NY)*, 21:928-933, 1993.

Zhou 等人, 实验医学杂志 *J. Exp. Med.*, 179:1867-1875, 1994.

序列表

<110> Sastry, K. Jagannadha
Arlinghaus, Ralph B.
Nehete, Pramod N.

<120> HIV 特异的 T-细胞诱导

<130> UTFC:561P

<140> PCT/US99/27185

<141> 1999/11/16

<150> 60/115,175

<151> 1999/01/08

<150> 60/108,563

<151> 1998/11/16

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 1

Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala

1

5

10

<210> 2

<222> (4)

<223> X=任何

<400> 14

Thr Thr Ile Xaa Gln Ala Cys Ser Lys Val Ser Phe Glu

1

5

10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (2)

<223> X=任何

<400> 15

Ser Xaa Ile Lys Gln Ala Cys Ser Lys Val Ser Phe Glu

1

5

10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 16

Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys

1

5

10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 17

Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys

1

5

10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 18

Gly Thr Gly Pro Cys His Asn Val Ser Thr Val Gln Cys

1

5

10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (6)

<223> X=任何

<400> 19

Gly Thr Gly Leu Cys Xaa Asn Ile Thr Val Val Thr Cys

1

5

10

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 20

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser

1

5

10

15

Leu Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln

20

25

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 21

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (17)

<223> X=任何

<400> 22

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Xaa Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 23

Ile Phe Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 24

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (17)..(18)

<223> X=任何

<400> 25

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Xaa Xaa Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 26

Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly
 1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 27

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly
 1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 28

Tyr Leu Lys Asp Gln Lys Phe Leu Gly Leu Trp Gly

1

5

10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (3)

<223> X=任何

<400> 29

Tyr Leu Xaa Asp Gln Gln Leu Leu Gly Leu Trp Gly

1

5

10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 I 型

<220>

<221> 不清楚

<222> (3)

<223> X=任何

<400> 30

Tyr Leu Xaa Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly

1

5

10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213>人免疫缺陷病毒 I 型

<400> 31

Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Leu Trp Gly

1

5

10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213>人免疫缺陷病毒 I 型

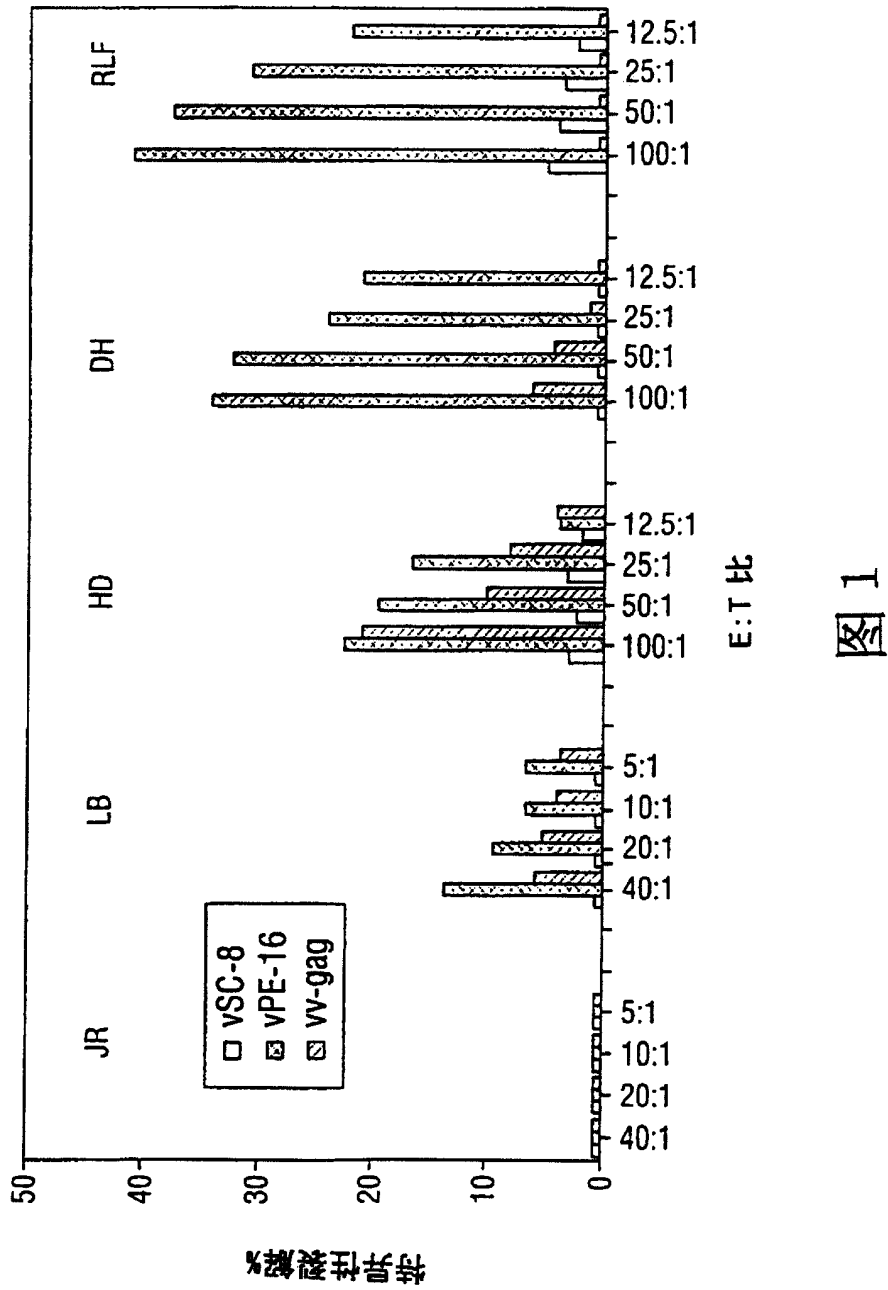
<400> 32

Tyr Leu Glu Ser Gln Gln Leu Leu Gly Leu Trp Gly

1

5

10



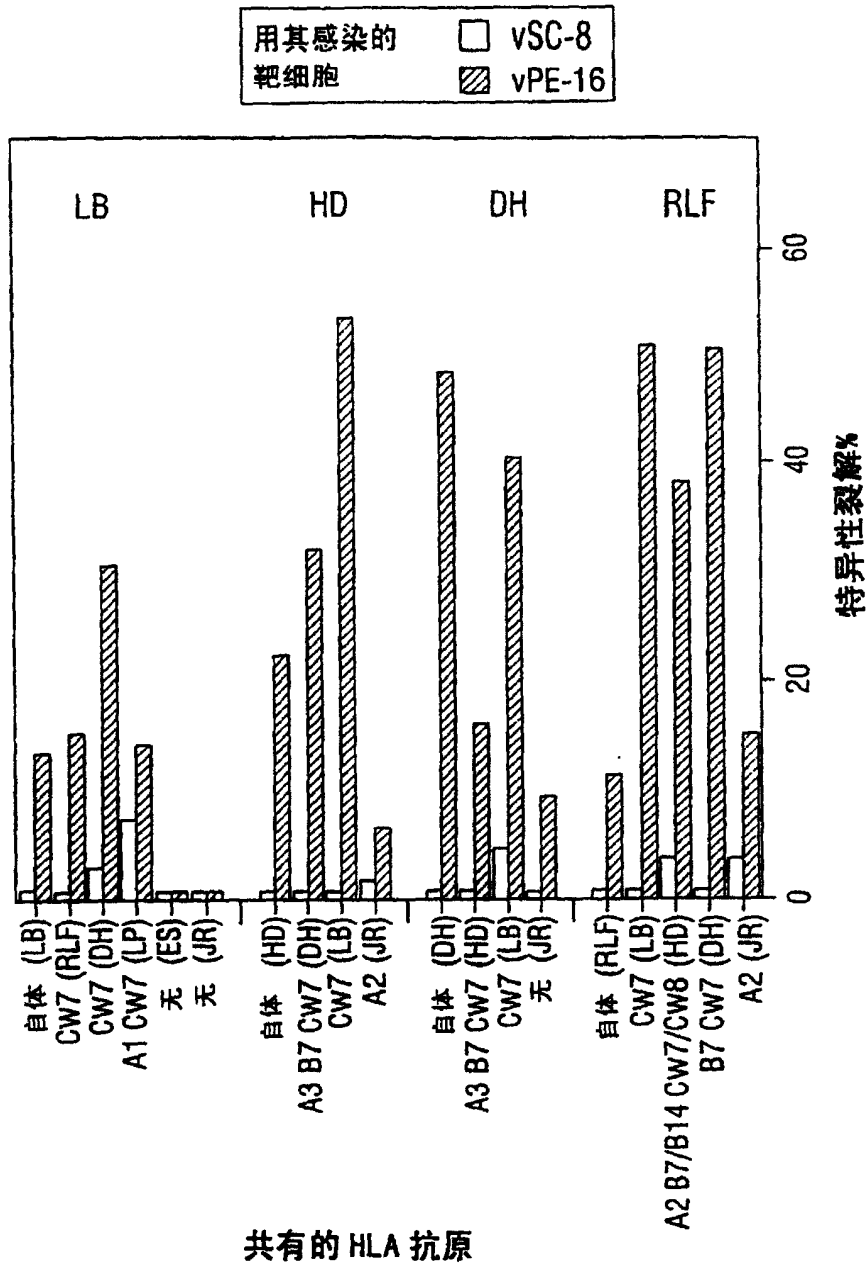


图 2

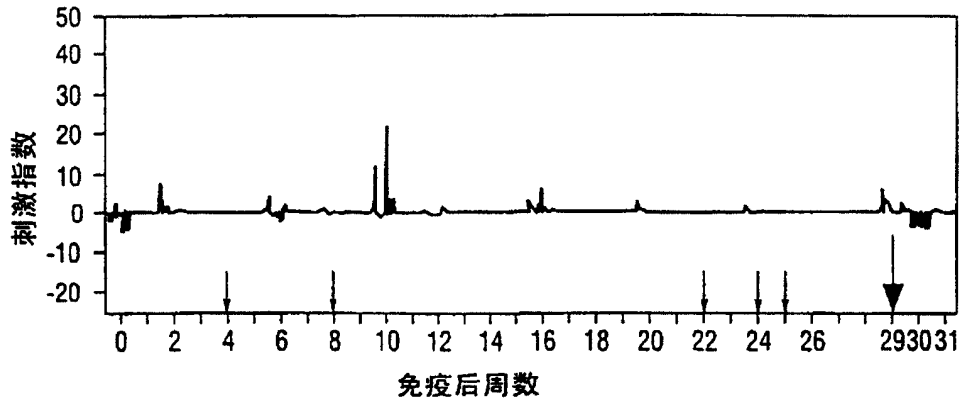


图 3A

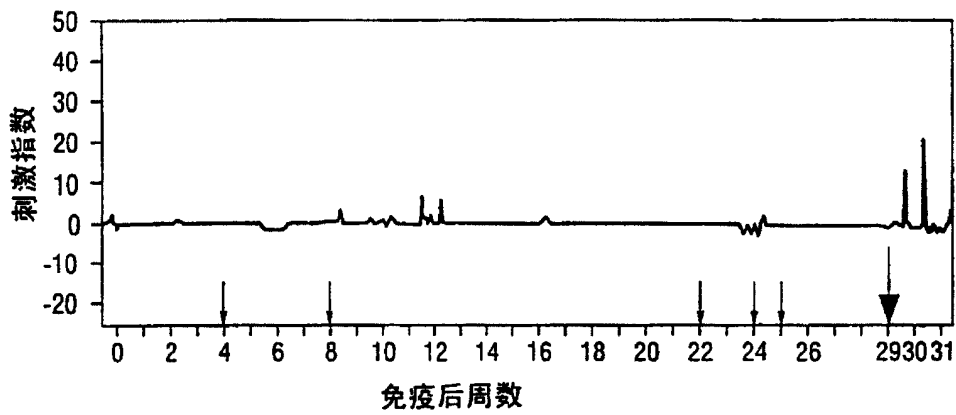


图 3B

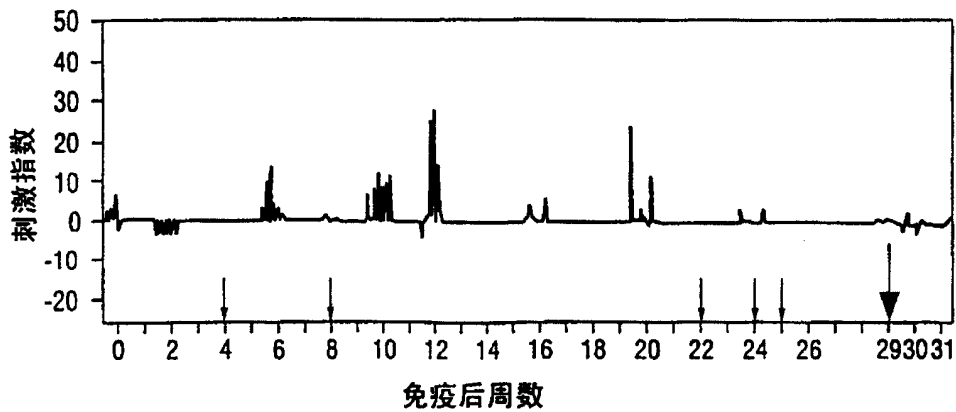


图 3C

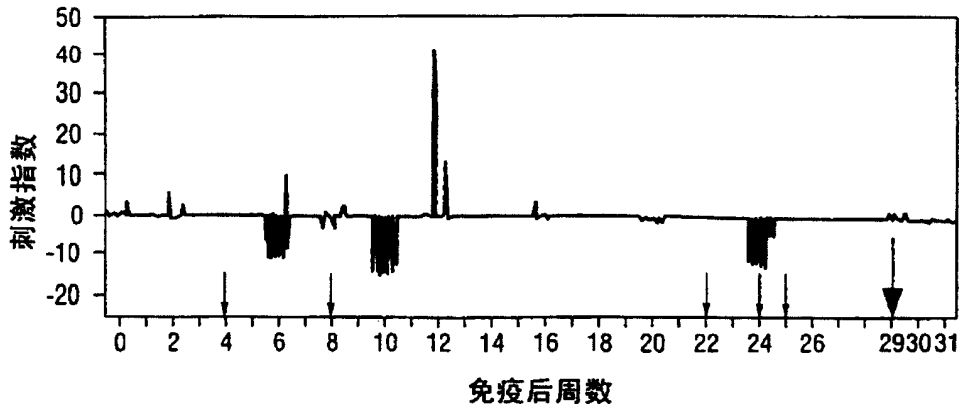


图 3D

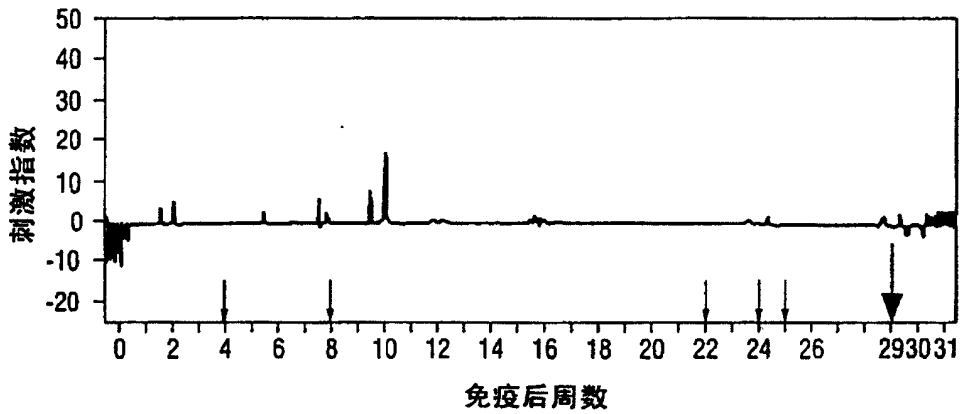


图 3E

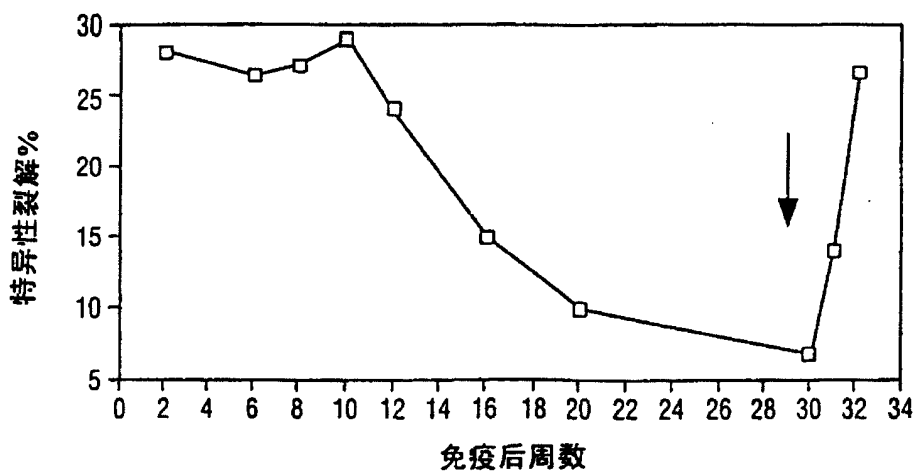


图 4A

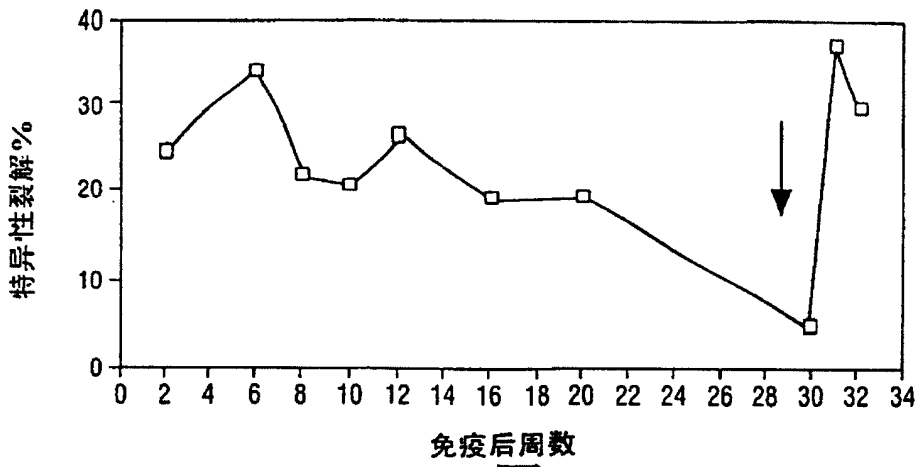


图 4B

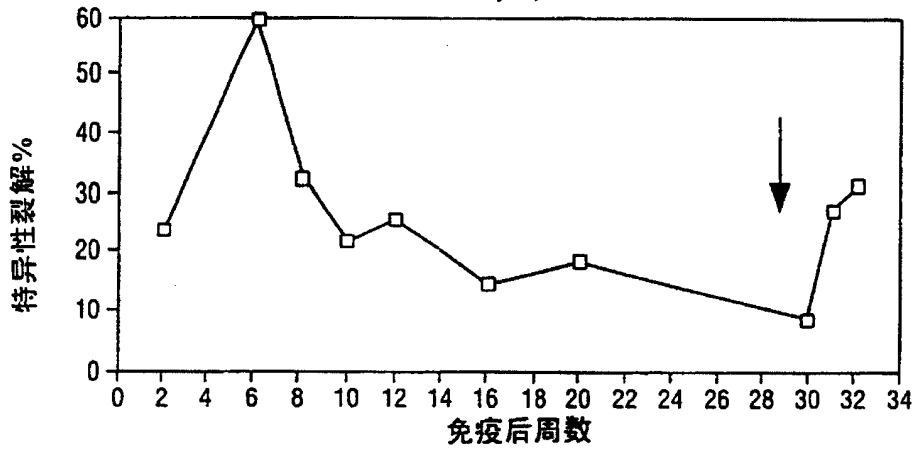


图 4C

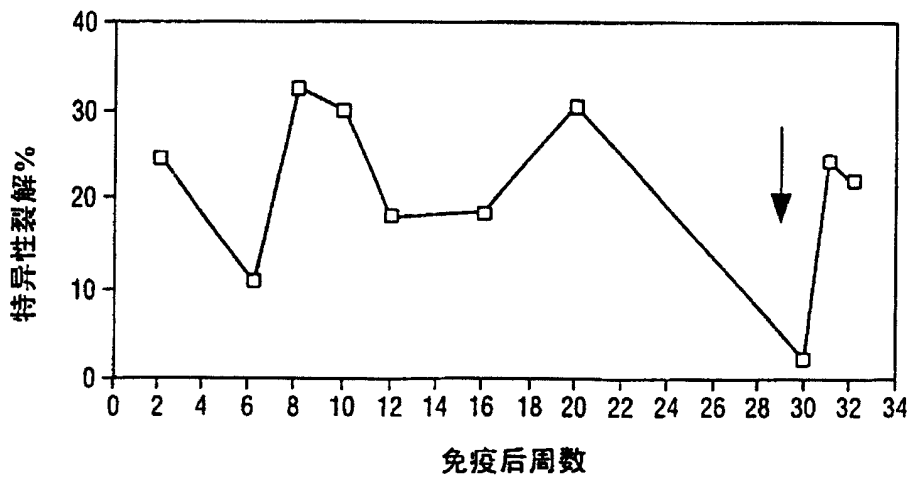


图 4D

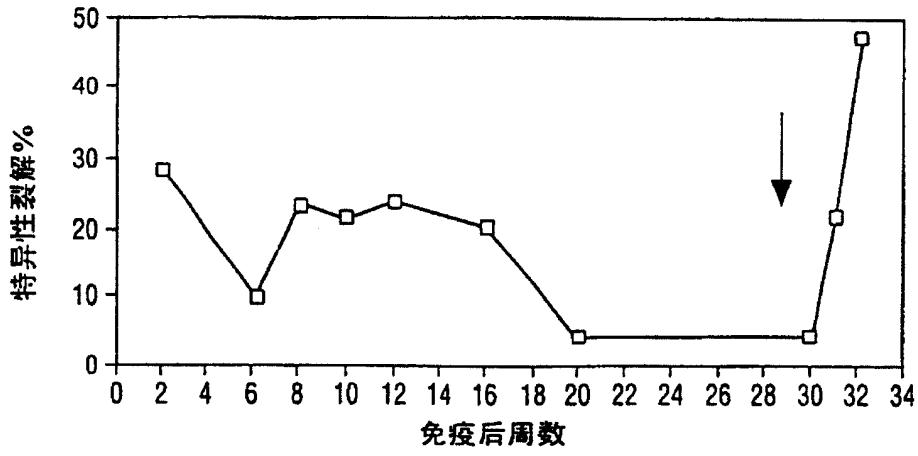


图 4E

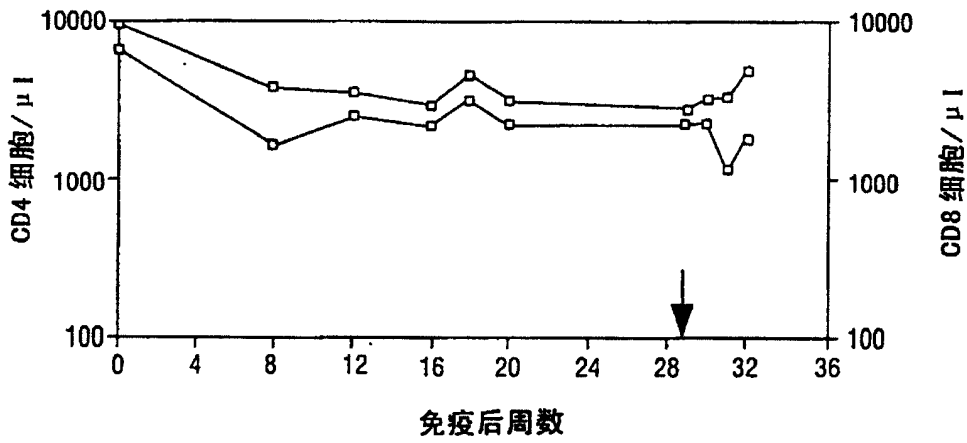


图 5A

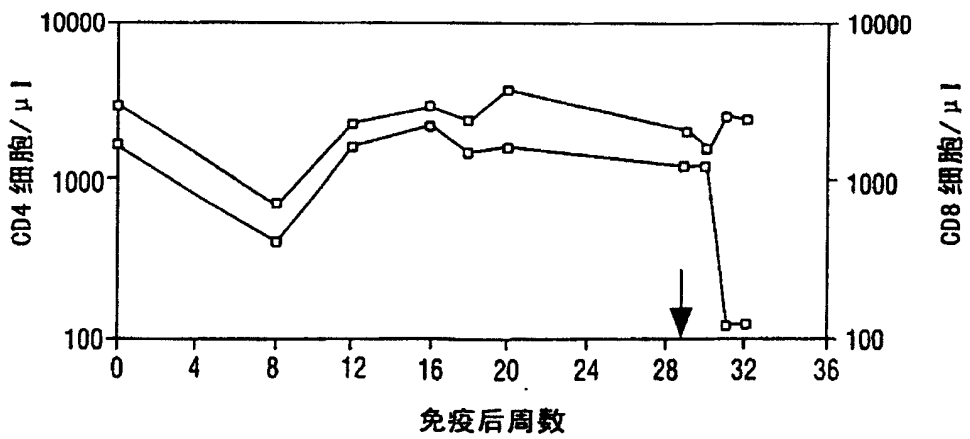


图 5B

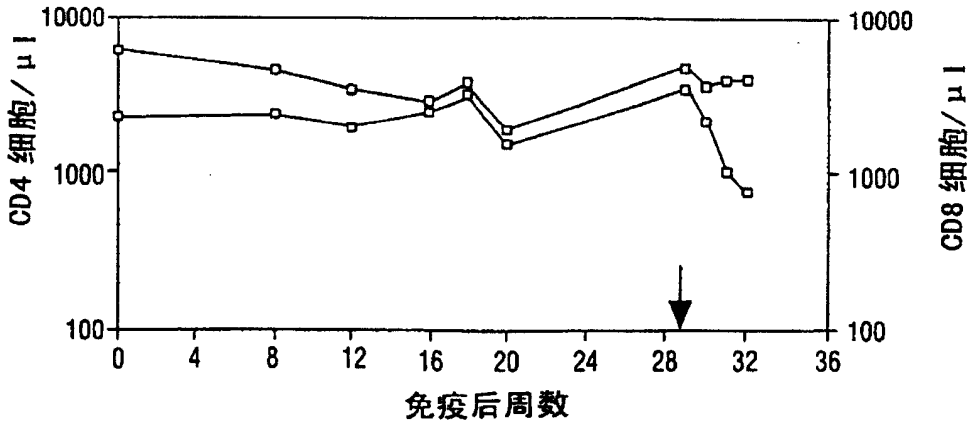


图 5C

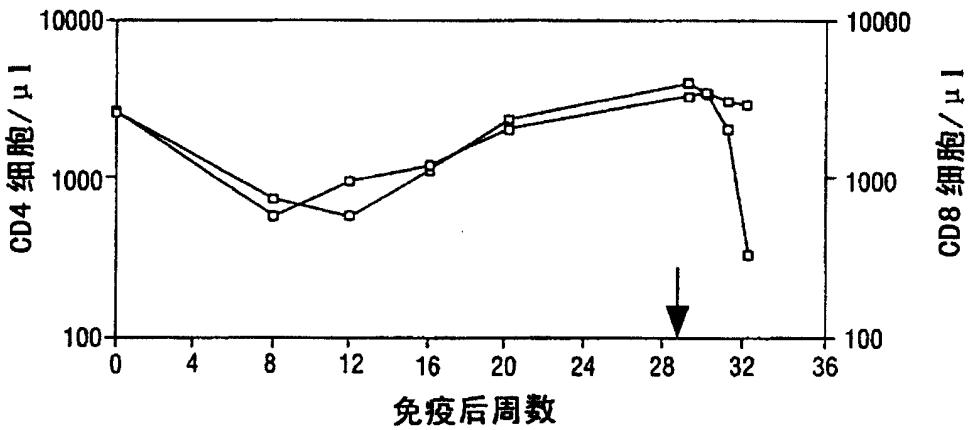


图 5D

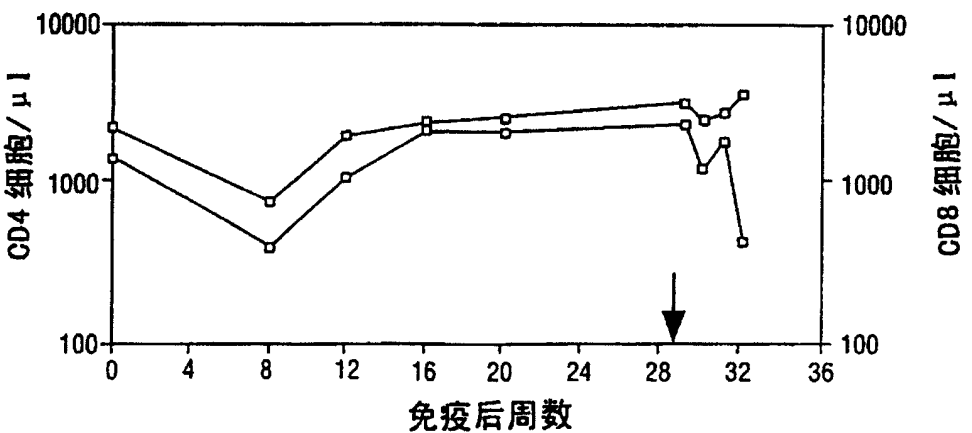


图 5E

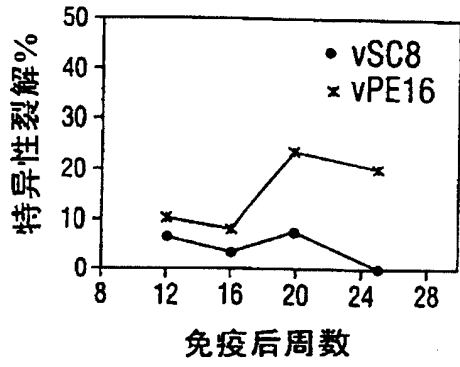


图 6A

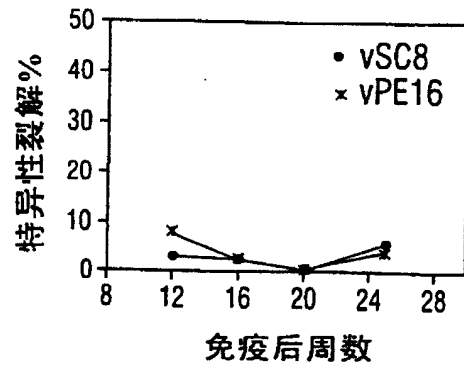


图 6B

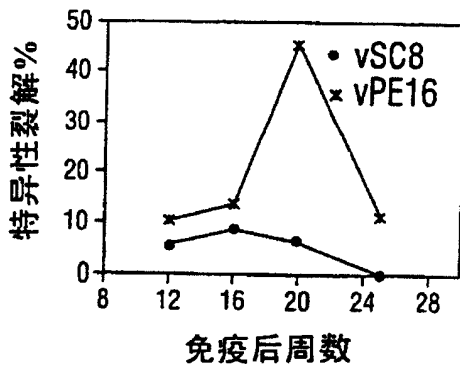


图 6C

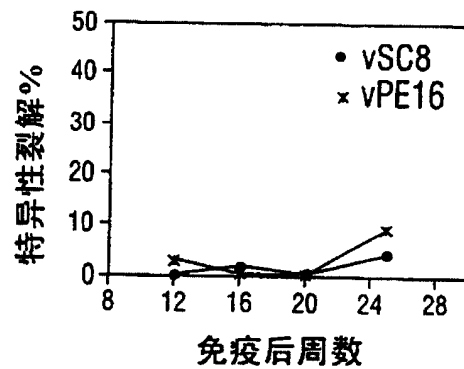


图 6D

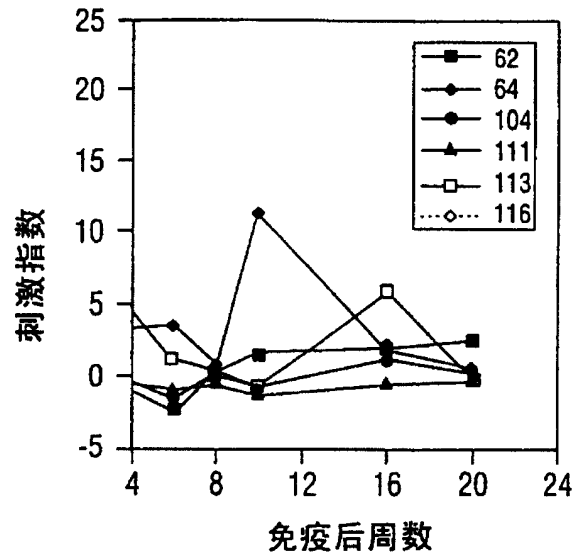


图 7A-1

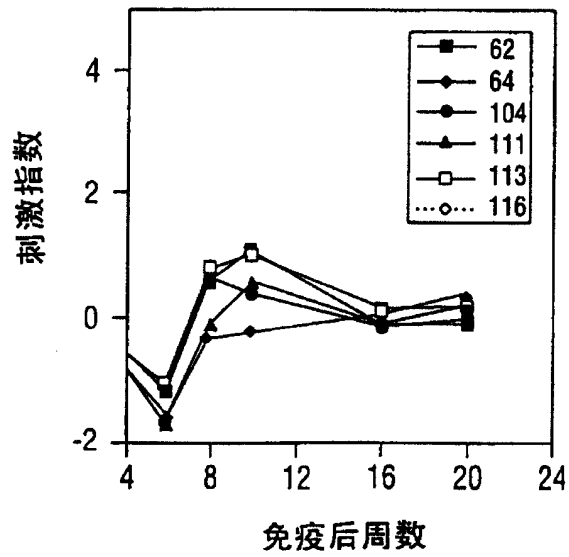


图 7A-2

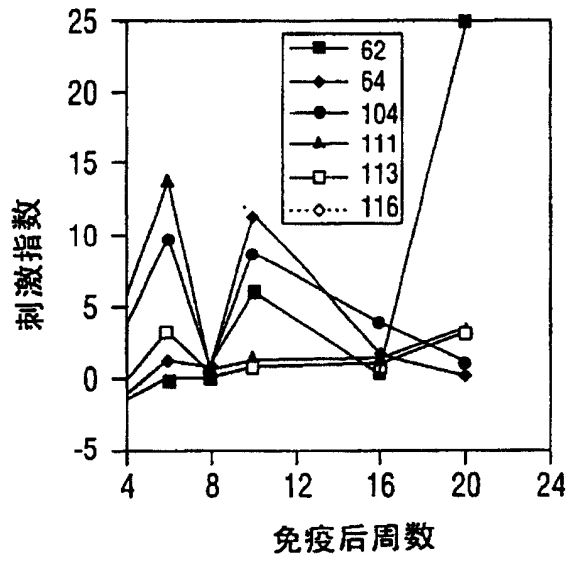


图 7A-3

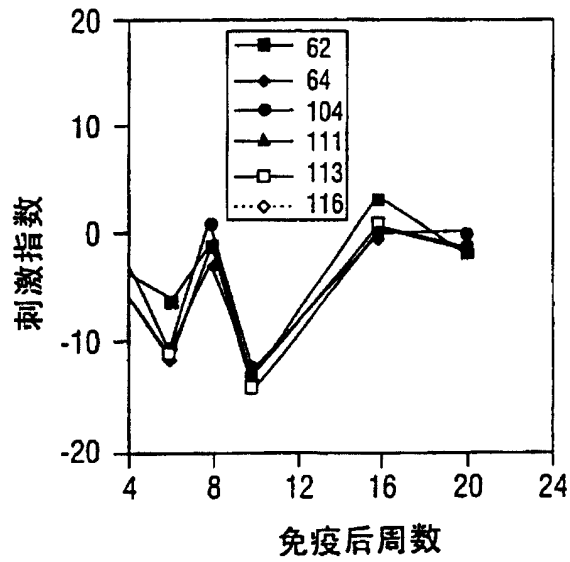


图 7A-4

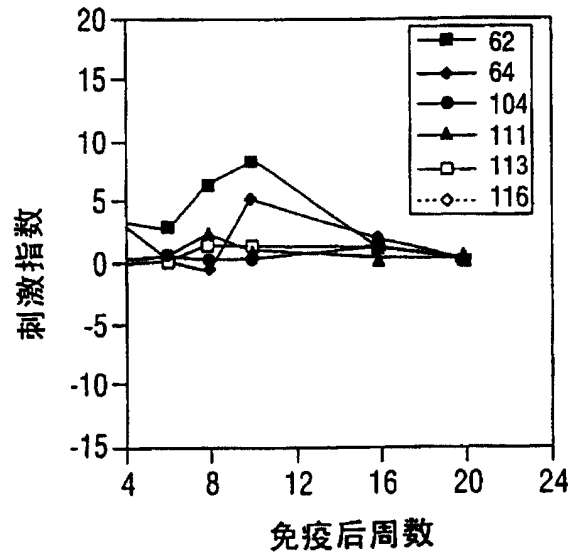


图 7A-5

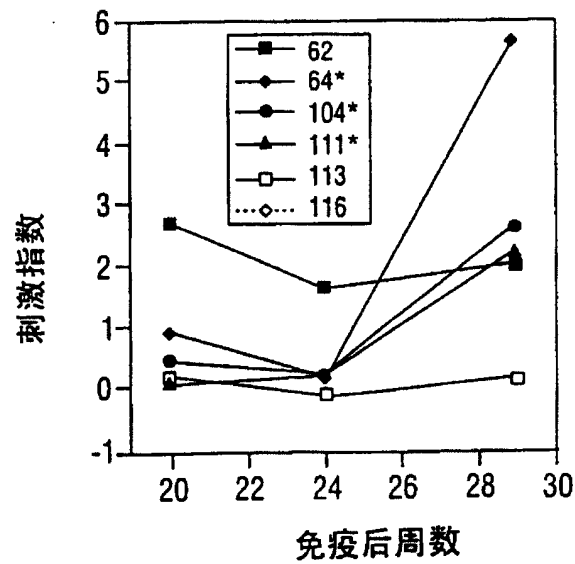


图 7B-1

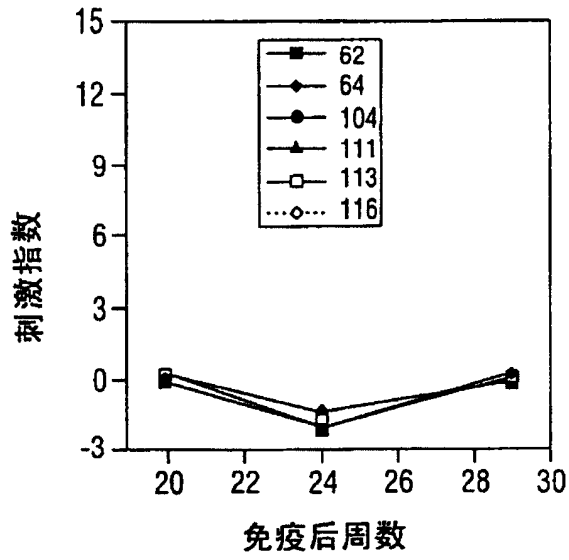


图 7B-2

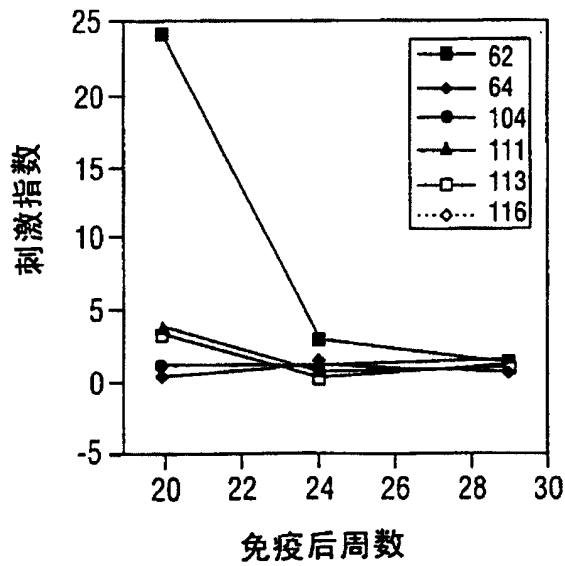


图 7B-3

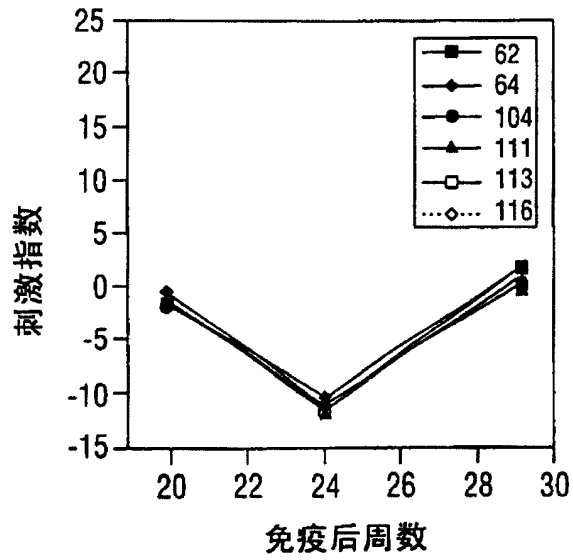


图 7B-4

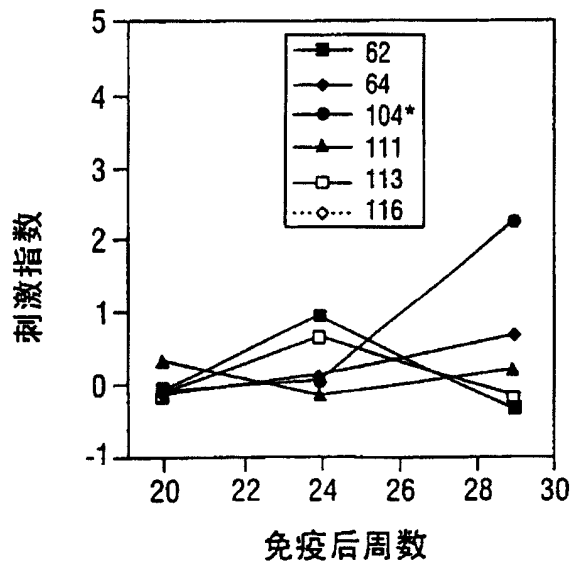


图 7B-5

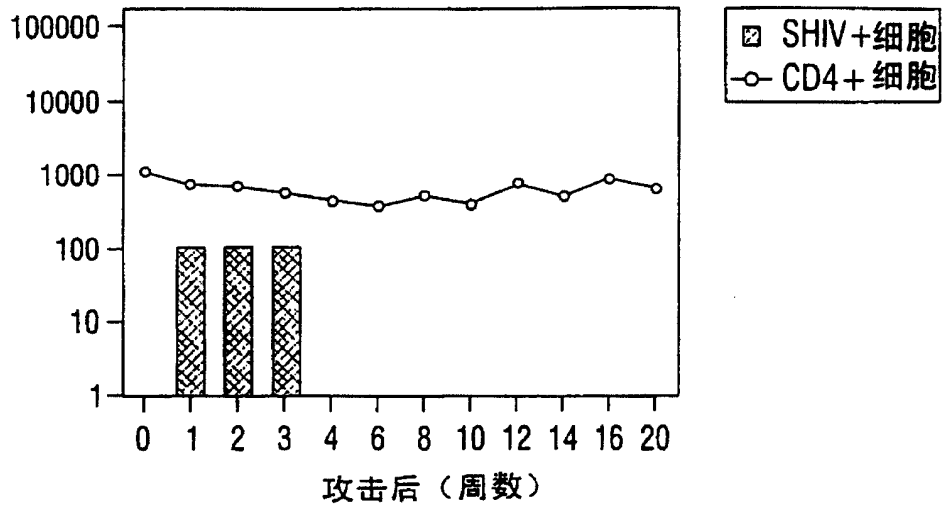


图 8A

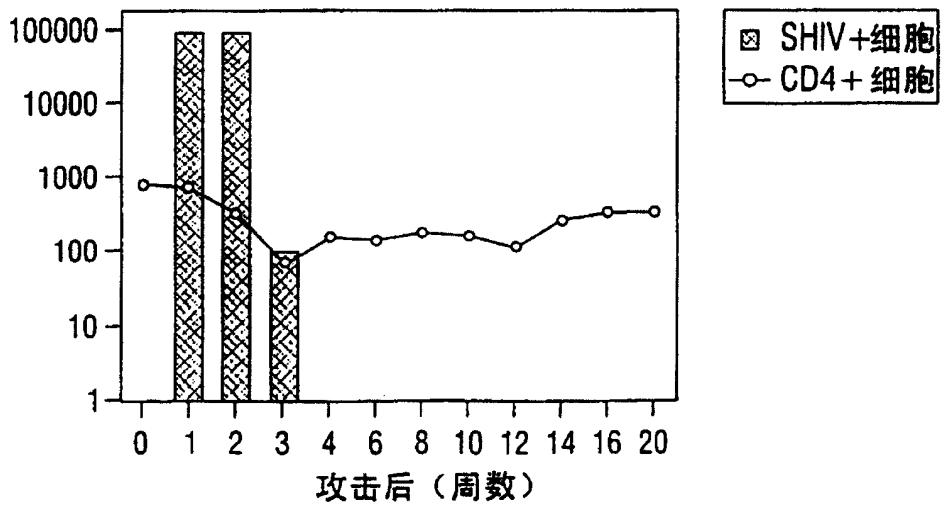


图 8B

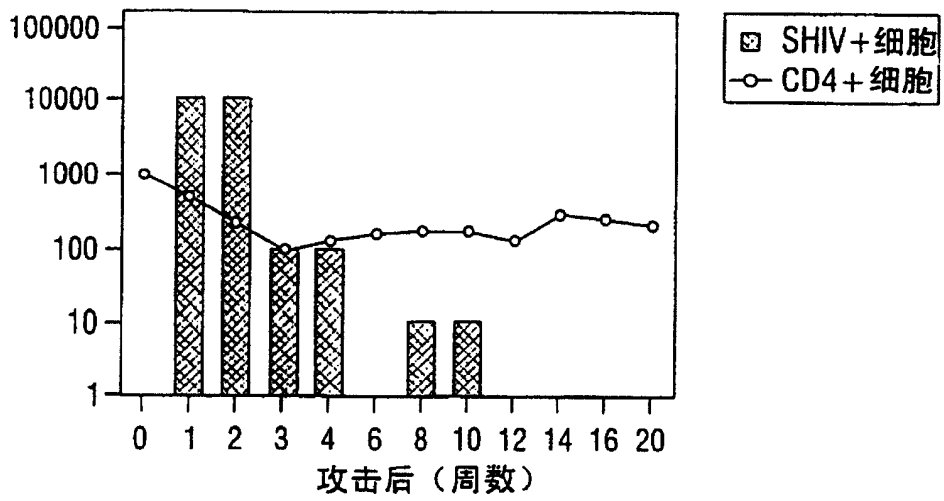


图 8C

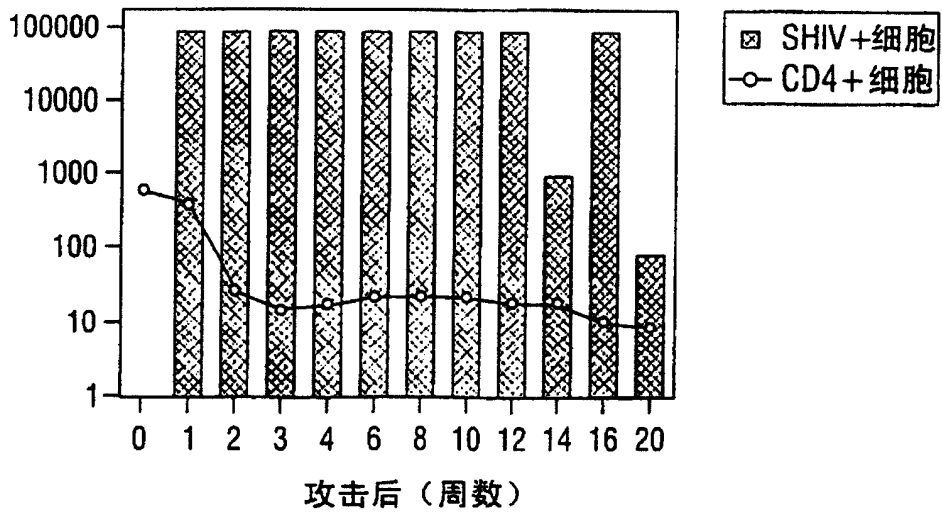


图 8D

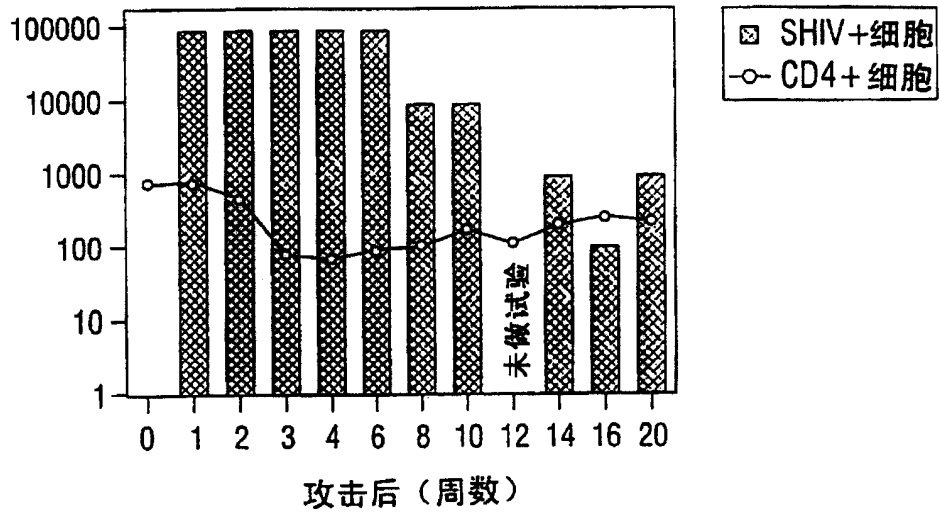


图 8E

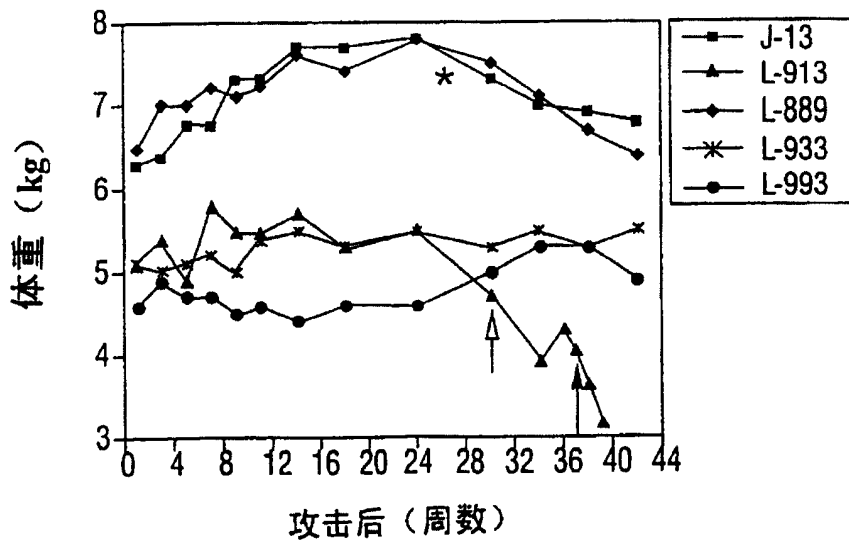


图 9

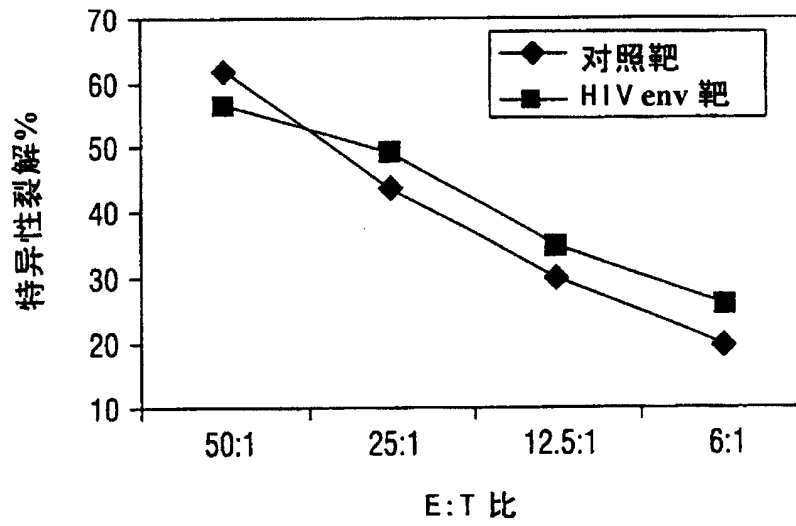


图 10A

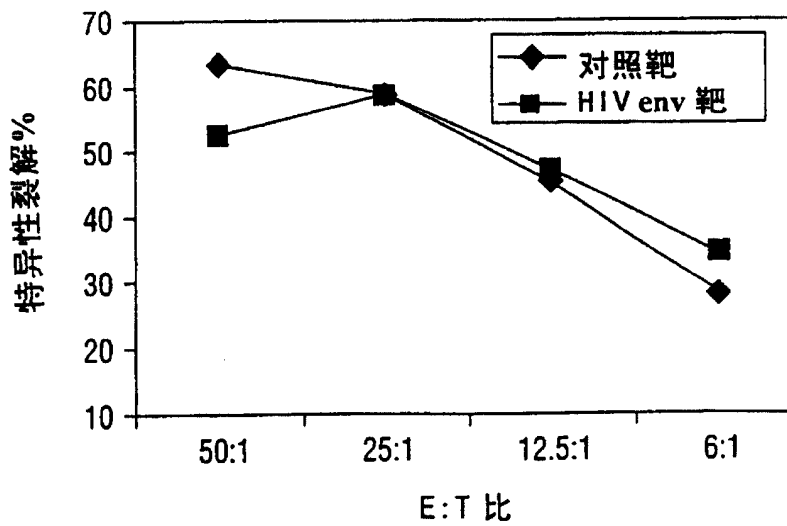


图 10B

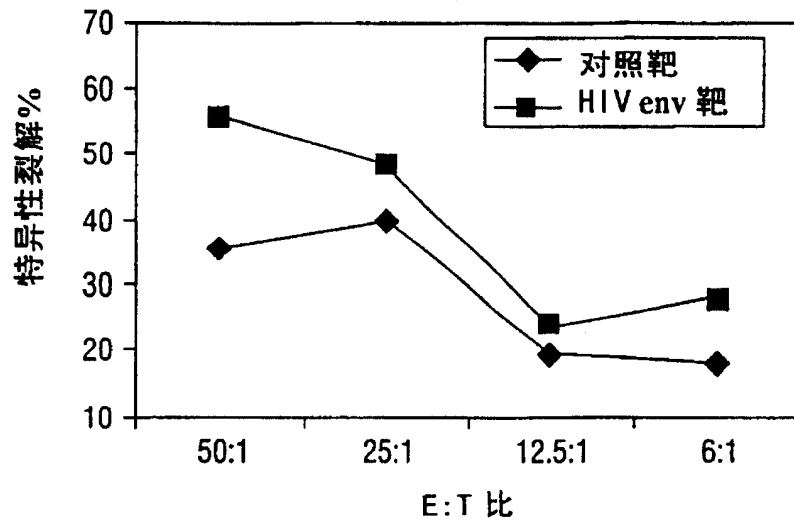


图 10C

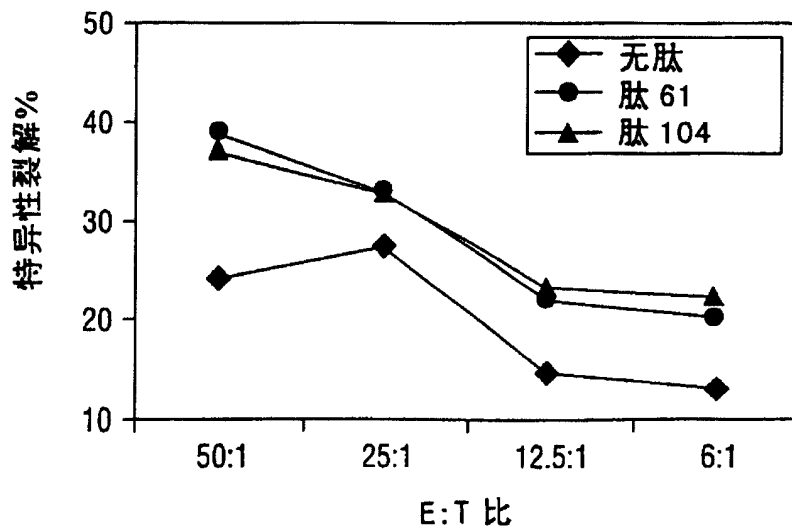


图 10D

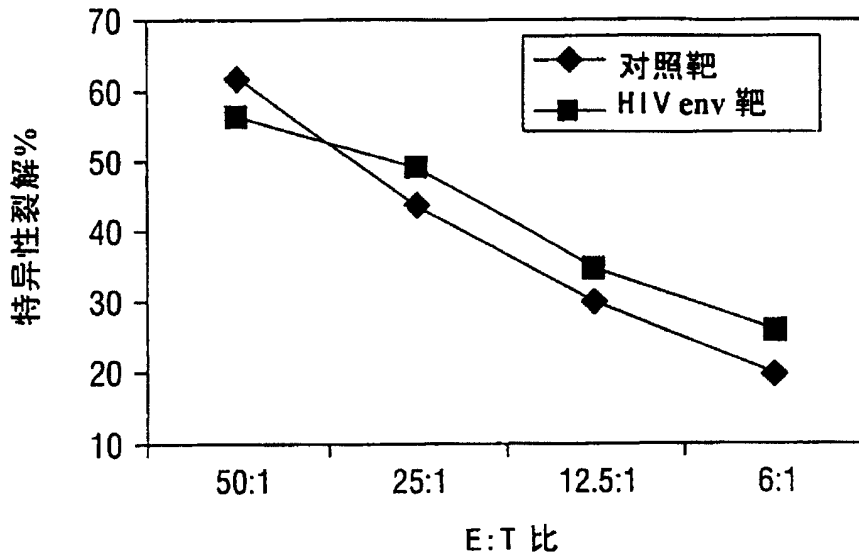


图 11A

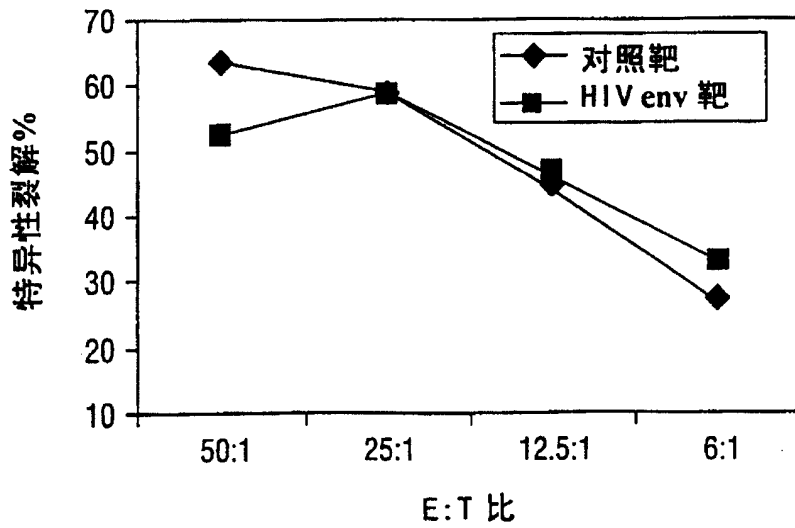


图 11B

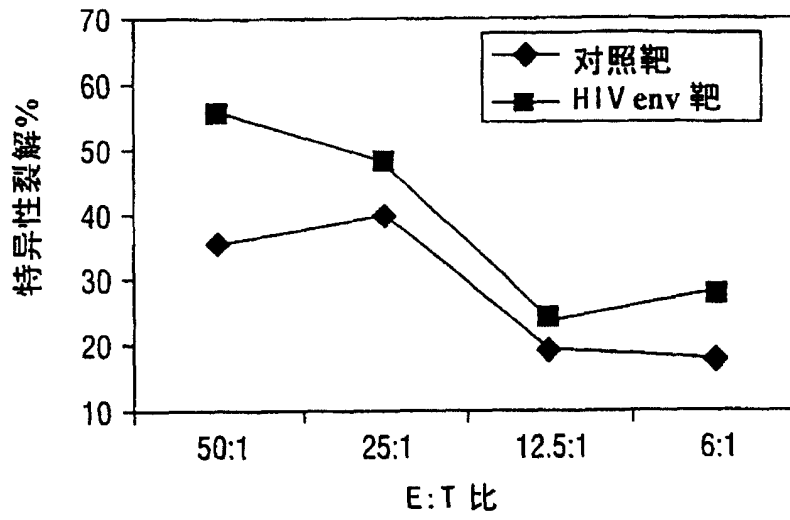


图 11C

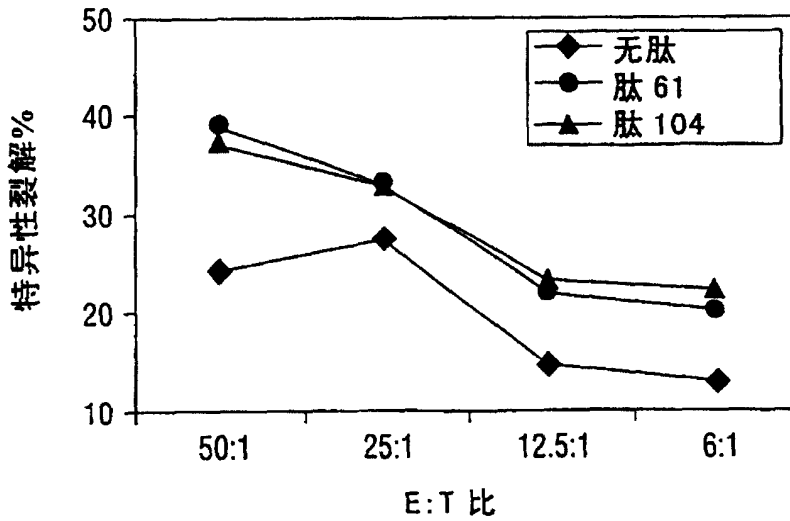


图 11D

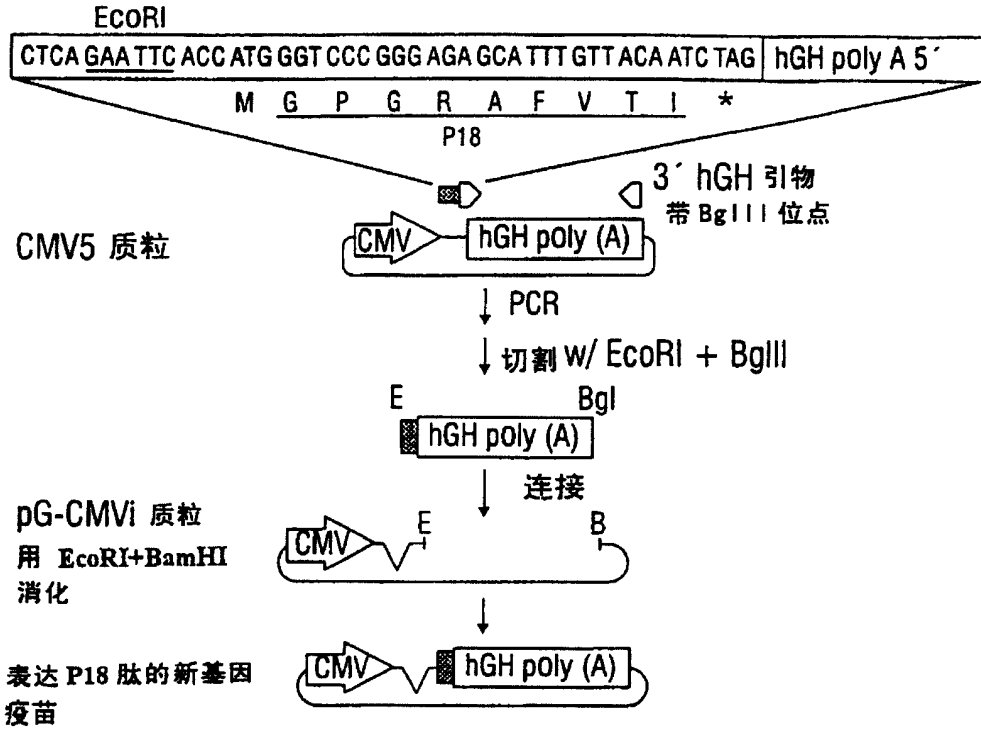


图 12A

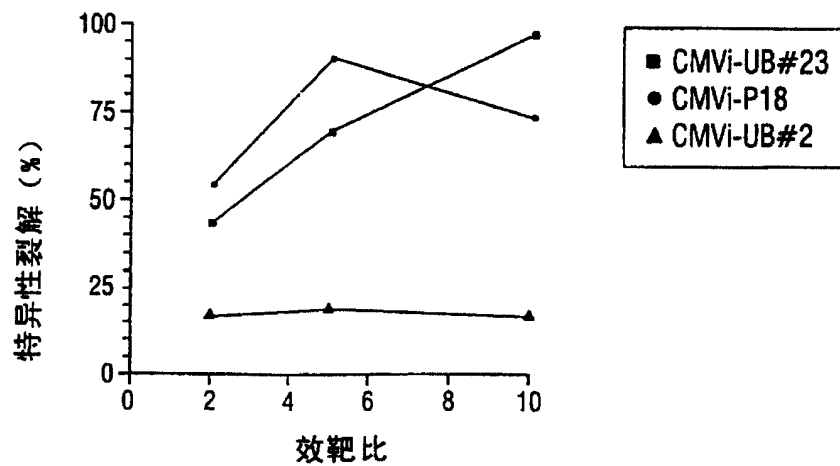


图 12B

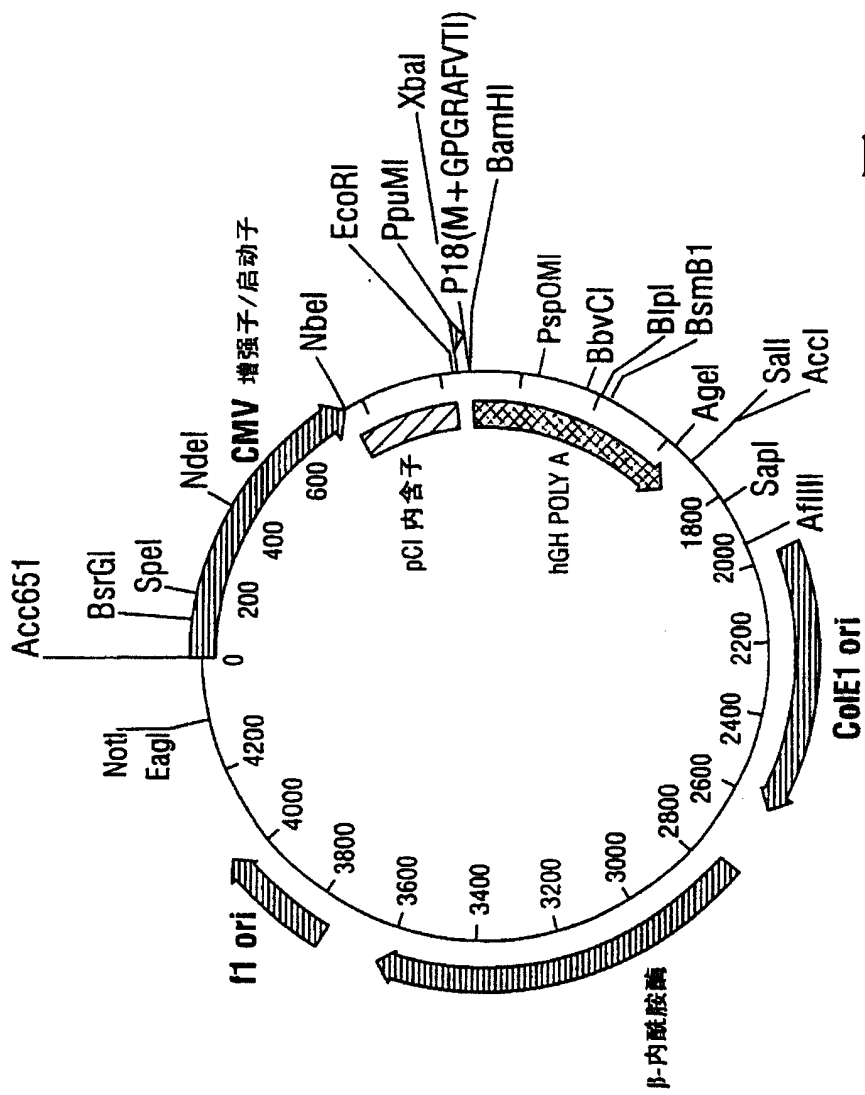


图 13A

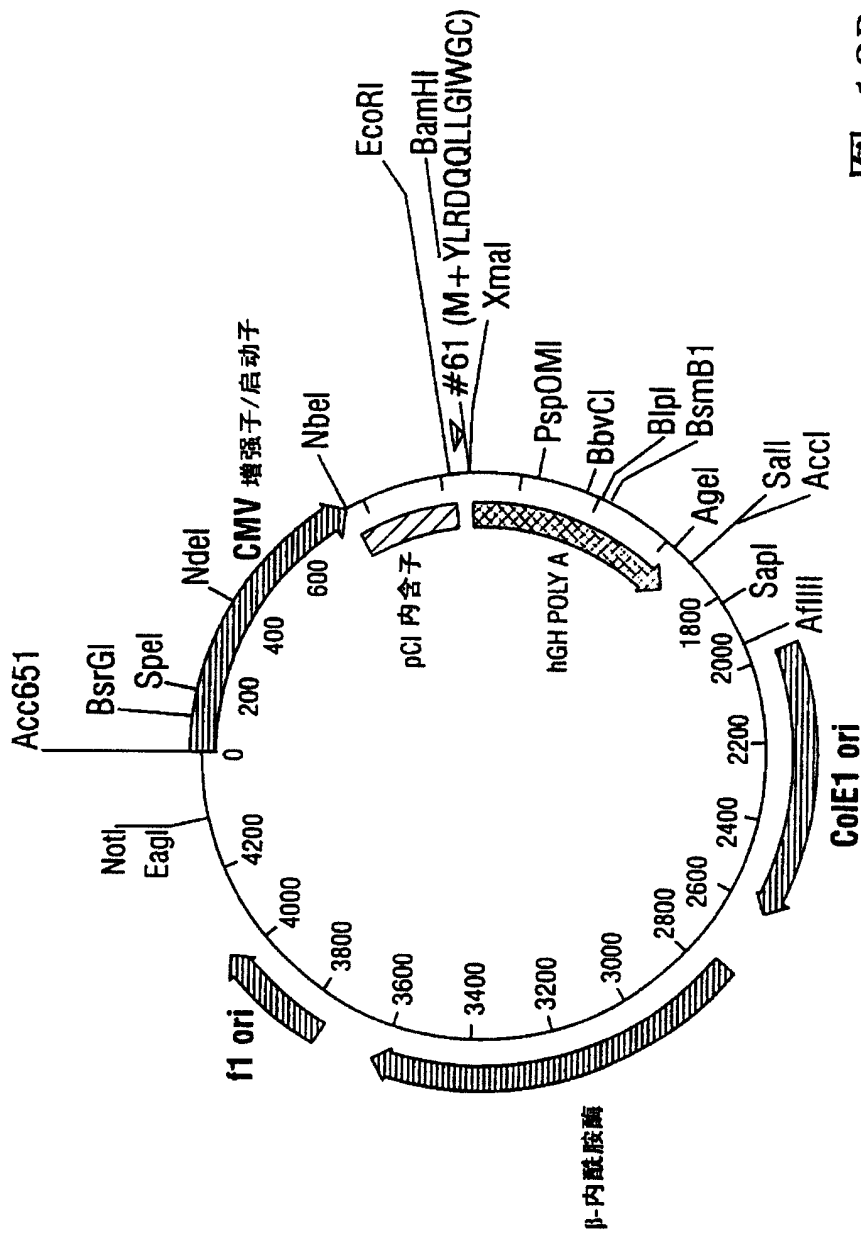


图 13B

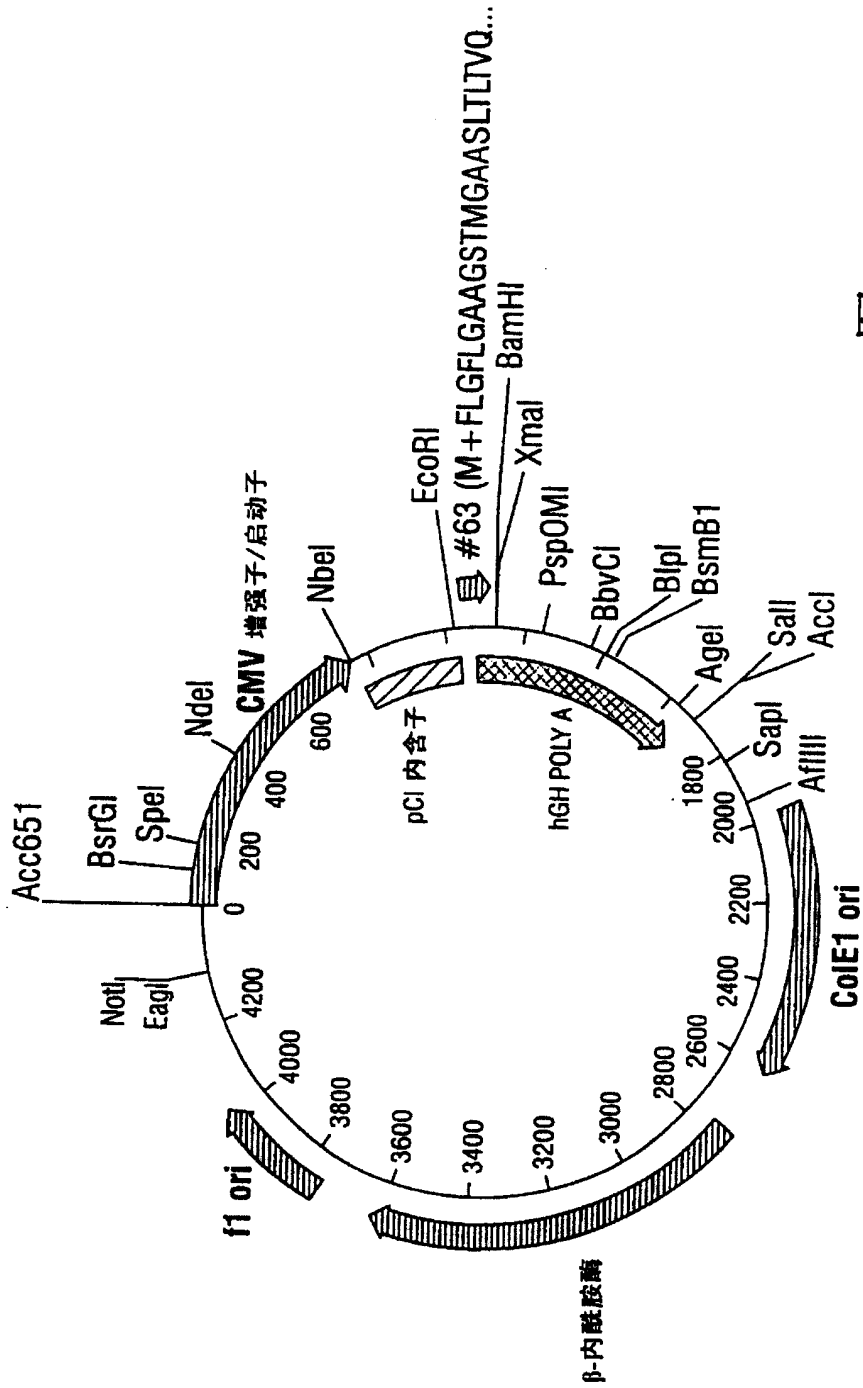


图 13C

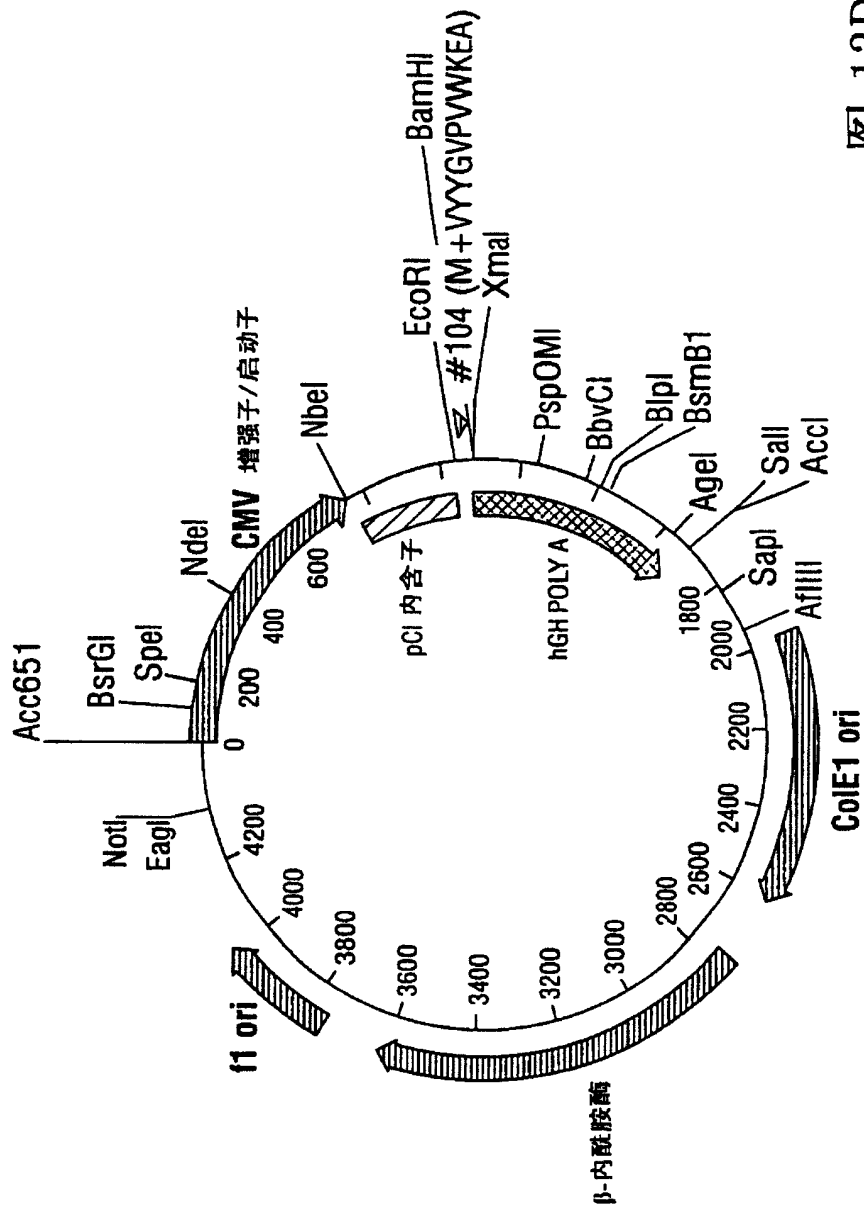


图 13D

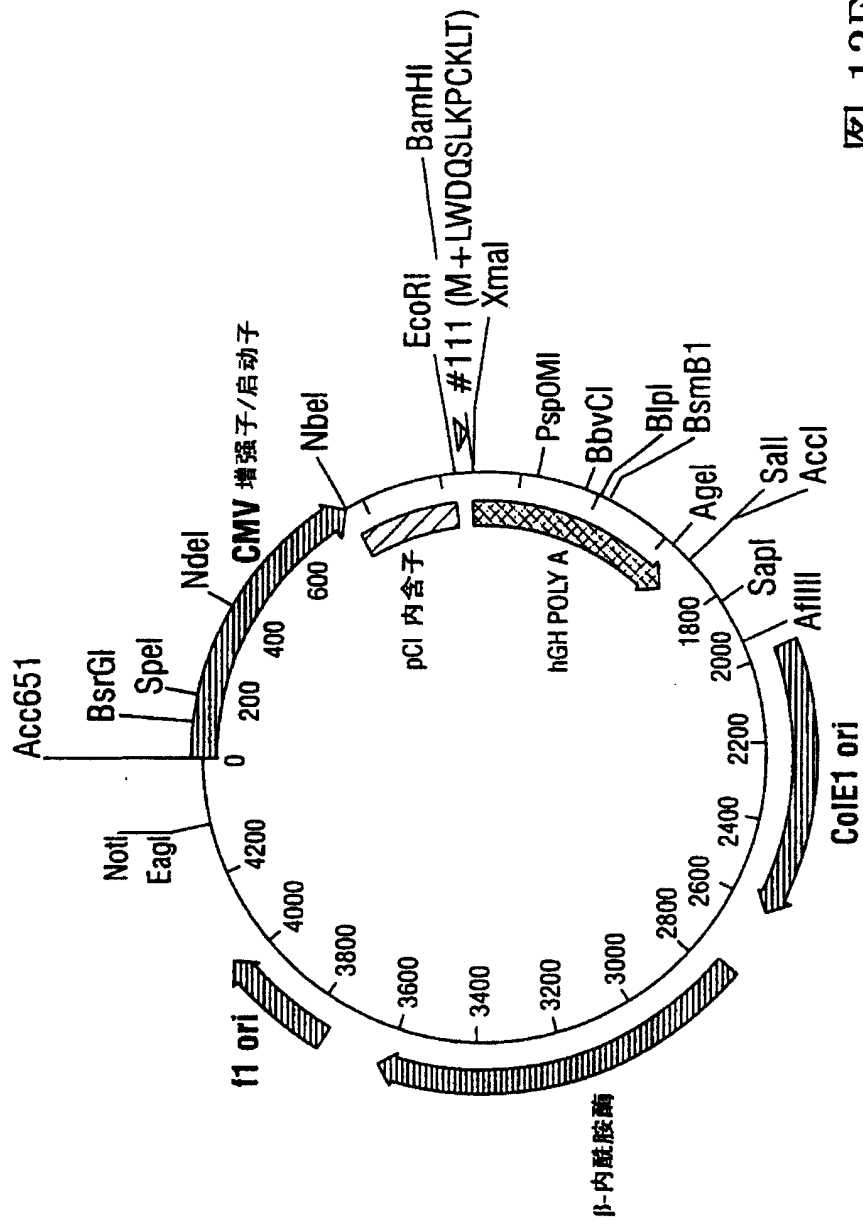


图 13E

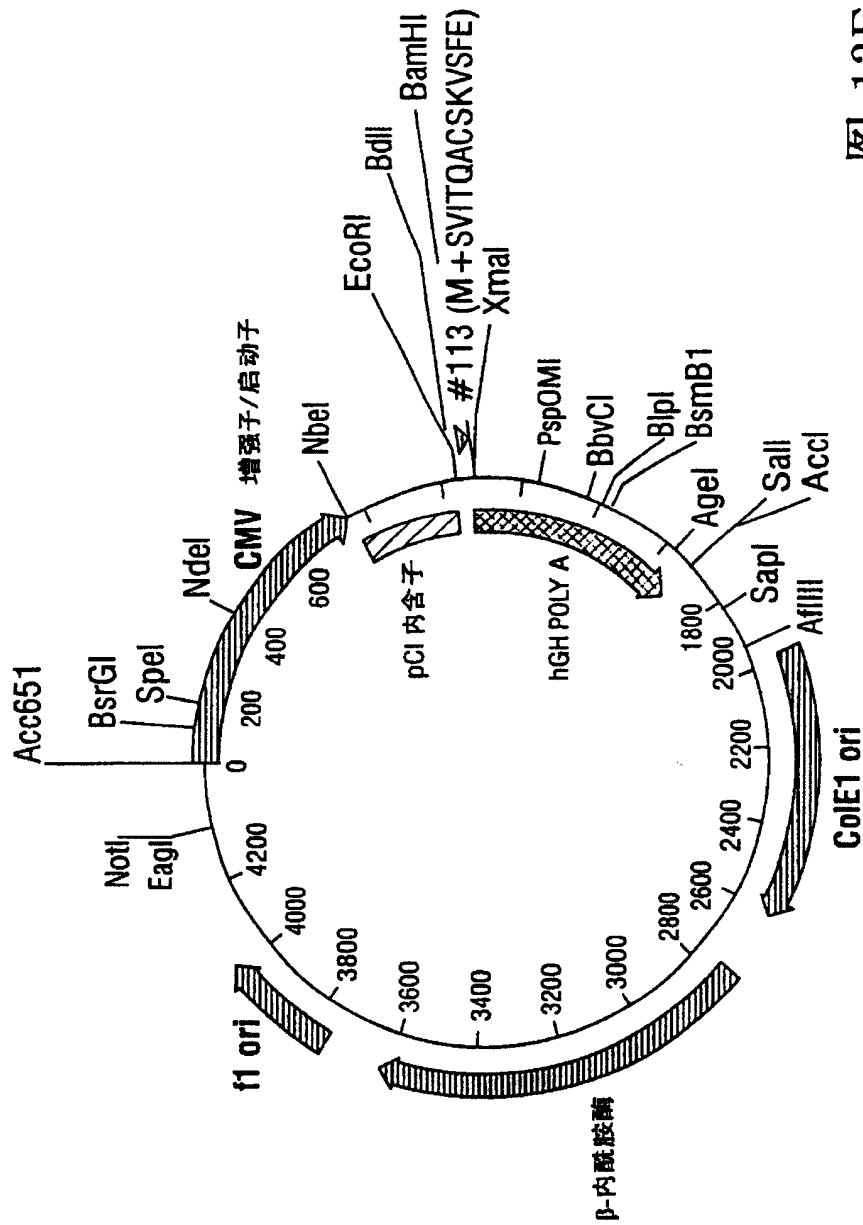


图 13F