

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580037821.1

[43] 公开日 2007 年 11 月 14 日

[11] 公开号 CN 101072585A

[22] 申请日 2005. 11. 1

[21] 申请号 200580037821.1

[30] 优先权

[32] 2004. 11. 1 [33] US [31] 60/624,506

[86] 国际申请 PCT/US2005/039558 2005. 11. 1

[87] 国际公布 WO2006/050394 英 2006. 5. 11

[85] 进入国家阶段日期 2007. 5. 8

[71] 申请人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 美国政府健康及人类服务部

[72] 发明人 S·W·巴尼特

V·R·戈麦斯 - 罗马

M·罗伯特 - 古罗夫

I·K·斯里瓦斯塔瓦

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 4 页 说明书 61 页

[54] 发明名称

产生免疫应答的组合方法

[57] 摘要

本发明涉及方法、多肽和编码相同或类似的免疫原性 HIV 多肽的多核苷酸，这些多肽衍生自 HIV 亚型内的相同或不同毒株和/或不同亚型。也描述了这些多核苷酸和多肽在产生免疫应答的组合方法中的应用。本文所述组合方法诱导了抗给定亚型内多种毒株的各种 HIV 毒株和抗各种亚型的广泛且强有力的免疫应答。也公开了产生免疫应答的组合物制剂和使用这些组合物的方法。

1. 一种在对象中产生免疫应答的组合物，所述组合物包含，  
第一多核苷酸组分，其编码衍生自第一 HIV 毒株的 HIV 免疫原性多肽，和  
第二多核苷酸组分，其编码与所述第一多核苷酸组分编码的多肽相同或类似的 HIV 免疫原性多肽，  
其中所述第一和第二多核苷酸组分包含基因递送载体，所述基因递送载体选自复制型腺病毒基因递送载体和非复制型腺病毒或  $\alpha$  病毒基因递送载体。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第二 HIV 毒株是与第一 HIV 毒株亚型相同的 HIV 毒株。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述第二 HIV 毒株是与第一 HIV 毒株亚型不同的 HIV 毒株。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的组合物，还包含含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽的多肽组分。
5. 如权利要求 4 所述的组合物，其特征在于，一种或多种 HIV 免疫原性多肽与第一或第二多核苷酸组分编码的多肽相同或类似。
6. 如权利要求 5 所述的组合物，其特征在于，所述至少两种 HIV 免疫原性多肽衍生自不同亚型的不同 HIV 毒株。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述第一或第二多核苷酸组分或所述多肽组分包含至少一种天然多核苷酸或多肽。
8. 如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述第一或第二多核苷酸组分包含至少一种合成多核苷酸。
9. 如权利要求 8 所述的组合物，其特征在于，所述合成多核苷酸包含为在哺乳动物细胞中表达而改变的密码子。
10. 如权利要求 9 所述的组合物，其特征在于，所述哺乳动物细胞是人细胞。
11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述第一和第二多核苷酸组分编码的多肽选自：一种或多种天然 HIV 包膜多肽，与天然 Env 多肽相比具有改变或突变的一种或多种 HIV Env 多肽，或其组合。
12. 如权利要求 11 所述的组合物，其特征在于，所述改变或突变选自切割位点的突变、糖基化位点的突变、V1 区的缺失或修饰、V2 区的缺失或修饰、V3 区的缺

失或修饰，或其组合。

13. 如权利要求 12 所述的组合物，其暴露了 HIV Env 蛋白的中和表位。

14. 如权利要求 13 所述的组合物，其特征在于，所述中和表位包含 CD4 结合区或结合于 CCR5 趋化因子共同受体的包膜结合区。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述第一 HIV 亚型选自亚型 A、亚型 B、亚型 C、亚型 D、亚型 E、亚型 F、亚型 G、亚型 H、亚型 I、亚型 J、亚型 K、亚型 N 或亚型 O。

16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述多核苷酸组分还包含编码与在所选宿主细胞中的表达相容的一种或多种控制元件的序列，其中所述控制元件操作性连接于编码 HIV 免疫原性多肽的多核苷酸。

17. 如权利要求 16 所述的组合物，其特征在于，所述控制元件选自转录启动子、转录增强子元件、转录终止信号、聚腺苷酸化序列、优化翻译启动的序列、内部核糖体进入位点或翻译终止序列。

18. 如权利要求 17 所述的组合物，其特征在于，所述转录启动子选自 CMV、CMV+内含子 A、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-ltr 或金属硫蛋白。

19. 如权利要求 1-22 中任一项所述的组合物，其特征在于，至少一种基因递送载体还包含运载体。

20. 如权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，所述运载体选自颗粒运载体、金或钨颗粒、PLG 颗粒或其组合。

21. 如权利要求 1-20 中任一项所述的组合物，其特征在于，将至少一种基因递送载体包装到脂质体制剂中。

22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的组合物，还包含一种或多种其它基因递送载体，它们选自病毒载体、细菌载体或真菌载体。

23. 如权利要求 22 所述的组合物，其特征在于，所述病毒载体选自病毒载体的不同亚型、种类或血清型。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的组合物，其特征在于，所述病毒载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、 $\alpha$  病毒载体、腺病毒载体或其组合。

25. 如权利要求 24 所述的组合物，其特征在于，所述腺病毒载体是活的复制型载体或非复制型载体。

26. 一种在对象中产生免疫应答的方法，该方法包括给予所述对象权利要求 1-25 中任一项所述的组合物。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 同时给予所述组合物的第一和第二多核苷酸组分。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 依次给予所述第一和第二多核苷酸组分。

29. 如权利要求 26、27 或 28 所述的方法, 其特征在于, 所述多肽组分还包含佐剂。

30. 如权利要求 26-29 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述对象是哺乳动物。

31. 如权利要求 30 所述的方法, 其特征在于, 所述哺乳动物是人。

32. 如权利要求 26-32 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述免疫应答包括选自下组的应答: 适应性免疫应答; 先天免疫应答; 体液免疫应答; 细胞免疫应答和其组合。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 所述免疫应答包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)应答。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 其特征在于, 所述抗体对来自两种或多种不同 HIV 亚型的两种或多种 HIV 毒株具有 ADCC 活性。

35. 如权利要求 34 所述的方法, 其特征在于, 所述抗体对两种或多种 HIV 亚型具有 ADCC 活性, 所述 HIV 亚型选自以下 HIV 亚型: A、B、C、D、E、F、G 和 O。

36. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 所述免疫应答是包括在对象中产生中和抗体的体液免疫应答, 其中所述中和抗体选自对抗衍生自第一 HIV 亚型的多种毒株的中和抗体、对抗衍生自一种以上 HIV 亚型的多种毒株的中和抗体、中和多种 HIV 分离物的中和抗体、中和同一 HIV 亚型的两种或多种 HIV 毒株的活性的中和抗体、中和两种或多种不同 HIV 亚型的两种或多种 HIV 毒株的活性的中和抗体或其组合。

37. 如权利要求 36 所述的方法, 其特征在于, 所述广泛中和性抗体中和能利用 CCR5 共同受体的 HIV 毒株的活性。

38. 如权利要求 26-37 中任一项所述的方法, 其特征在于, 通过肌肉内、粘膜内、鼻内、皮下、皮内、透皮、阴道内、直肠内、口服或静脉内途径给予至少一种所述基因递送载体。

39. 如权利要求 26-38 中任一项所述的方法, 还包括给予所述对象多肽组分,

---

所述多肽组分包含与所述多核苷酸组分编码的多肽相同或类似的一种或多种 HIV 免疫原性多肽。

## 产生免疫应答的组合方法

### 技术领域

本发明涉及包含多核苷酸组分和任选的多肽组分的组合物，它们可用于在对象中产生免疫应答。在一个方面，将本发明组合物用于在给予该组合物的对象中产生免疫应答的方法。在另一方面，将本发明组合物用于对衍生自选定微生物如人体免疫缺陷病毒(HIV)的一种亚型或血清型或者多种亚型或血清型的多个毒株产生广泛免疫应答的方法。

### 背景

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)被认为是现代医学所面临的最大的健康威胁之一。但迄今为止，仍无法治愈这种疾病。

在 1983-1984 年，三个小组独立地鉴定到 AIDS 的可能病原体。参见例如，Barre-Sinoussi 等(1983) *Science* 220:868-871; Montagnier 等，《人类 T 细胞白血病病毒》(Human T-Cell Leukemia Virus) (Gallo、Essex 和 Gross 编，1984); Vilmer 等(1984) *The Lancet* 1:753; Popovic 等(1984) *Science* 224:497-500; Levy 等(1984) *Science* 225:840-842。这些分离物分别被称为淋巴病-相关病毒(LAV)、人类 T 细胞淋巴细胞病毒 III 型(HTLV-III)或 AIDS-相关性逆转录病毒(ARV)。所有这些分离物都是相同病毒的毒株，后来统称为人体免疫缺陷病毒(HIV)。由于分离到引起 AIDS 的相关病毒，起初称为 HIV 的毒株现在称为 HIV-1，相关病毒称为 HIV-2。参见例如，Guyader 等(1987) *Nature* 326:662-669; Brun-Vezinet 等(1986) *Science* 233:343-346; Clavel 等(1986) *Nature* 324:691-695。

关于 HIV 病毒收集了大量信息；然而，迄今为止仍然没有鉴定到有效的疫苗。已经检测了疫苗开发的几个靶点，包括 HIV1 编码的 env 和 Gag 基因产物。Gag 基因产物包括但不限于：Gag-聚合酶和 Gag-蛋白酶。Env 基因产物包括但不限于：单体 gp120 多肽、寡聚 gp140 多肽和 gp160 多肽。

Haas 等(*Current Biology* 6(3):315-324, 1996)提示，HIV-1 选择性使用密码子似乎解释了大量无效的病毒蛋白合成。Andre 等, (*J. Virol.* 72(2):1497-1503, 1998)描述

了采用密码子使用被改变的合成 gp120 序列进行 DNA 疫苗接种引起免疫应答增加。Schneider 等(*J Virol.* 71(7):4892-4903, 1997)讨论了位于 Gag 编码序列和 Gag-蛋白酶编码序列内的抑制(或不稳定)元件(INS)的失活。

HIV-1 的 Gag 蛋白是病毒样颗粒组装必需的。HIV-1 Gag 蛋白参与了病毒生活周期的许多阶段, 包括组装、颗粒释放后病毒体成熟和病毒复制种的早期进入后步骤。HIV-1 Gag 蛋白的作用多且复杂(Freed, E. O., *Virology* 251:1-15, 1998)。

Wolf 等(PCT 国际公开号 WO 96/30523, 公开于 1996 年 10 月 3 日; 欧洲专利申请, 公开号 0 449 116 A1, 公开于 1991 年 10 月 2 日)描述了 HIV-1 的改变的 pr55 Gag 用作非感染性逆转录病毒样颗粒运载体的应用, 尤其是, 用于递呈免疫学重要表位。Wang 等(*Virology* 200:524-534, 1994)描述了研究 HIV Gag- $\beta$ -半乳糖苷酶融合蛋白组装成病毒体的系统。他们描述了编码 HIV Gag- $\beta$ -半乳糖苷酶融合蛋白的序列的构建、在 HIV Gag 蛋白存在下该序列的表达和这些蛋白质组装成病毒颗粒。

Shiver 等(PCT 国际公开号 WO 98/34640, 公开于 1998 年 8 月 13 日)描述了改变 HIV-1(CAM1) Gag 编码序列, 以产生编码 HIV Gag 和 HIV Gag 修饰的合成 DNA 分子。合成分子的密码子是计划使用的宿主细胞的优选密码子。

近年来, 描述了 HIV Env 多肽在免疫原性组合物中的应用(参见 Hurwitz 等的美国专利号 5,846,546, 1998 年 12 月 8 日出版, 描述了包含各自表达不同 HIV env 变体的至少四种不同重组病毒的混合物的免疫原性组合物; 和 Vahlne 等的美国专利号 5,840,313, 1998 年 11 月 24 日出版, 描述了对应于 HIV-1 gp120 蛋白的表位的肽)。此外, 1999 年 3 月 2 日出版的 Sia 等的美国专利号 5,876,731 描述了抗 HIV 的候选疫苗, 其包含 Gag T-细胞表位的氨基酸序列, 该序列直接连接于含有序列 GPGR 的 HIV-1 分离物的 V3 环蛋白的 B-细胞表位的氨基酸序列。

PCT 国际公开号 WO/00/39302; WO/00/39303; WO/00/39304; WO/02/04493; WO/03/004657; WO/03/004620; 和 WO/03/020876 描述了许多密码子优化的 HIV 多肽, 以及一些天然 HIV 序列。此外, 描述了包含突变的各种 HIV 多肽。也描述了将这些 HIV 多肽用于疫苗组合物和免疫方法。

本发明提供了改进的组合物和方法, 用于产生抗所选微生物如病毒(如 HIV-1)的多种亚型、血清型或毒株的免疫应答。

## 发明概述

本发明涉及用于在对象中产生免疫应答的组合物和方法。本发明组合物包含至

少两种组分，其中各组分包含相同或类似的多肽免疫原。多肽免疫原以多肽形式(包括多肽片段、修饰形式、包囊形式等)直接提供，或者在优选实施方式中作为在基因递送载体中编码的多核苷酸免疫原(包括编码多肽免疫原的 DNA 和/或 RNA)间接提供。

本发明组合物可用于在给予该组合物的对象中产生免疫应答的方法，其中所述免疫应答指向所选微生物如病毒(如人体免疫缺陷病毒(HIV)的多种亚型、血清型或毒株。在优选实施方式中，本发明涉及包含两种或多种不同多核苷酸组分(如复制型或非复制型腺病毒载体与非复制型  $\alpha$  病毒载体联用)的组合物，这些多核苷酸组分编码可用于在对象中产生免疫应答，例如产生中和抗体、ADCC 活性和 T 细胞应答的相同或类似多肽和一种或多种任选多肽组分。

本发明组合物可用于在给予该组合物的对象中产生免疫应答的方法，其中所述免疫应答指向第一亚型或血清型的多种毒株或指向所选微生物如病毒(如人体免疫缺陷病毒(HIV)的多种亚型或血清型。在另一实施方式中，可用病毒载体，优选不同载体递送各免疫原。例如，用作免疫原的第一多肽可由通过腺病毒载体或  $\alpha$  病毒载体递送给对象的多核苷酸编码。随后或同时，可通过另一种腺病毒或  $\alpha$  病毒载体递送用作免疫原的相同或类似的第二多肽。相同或类似的第一和第二免疫原可来自相同亚型或不同 HIV 亚型的相同或不同的 HIV 毒株。

在其它方面，该组合物还包含含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽的多肽组分，所述免疫原性多肽与多核苷酸组分编码的多肽相同或类似。该多肽可衍生自相同毒株或亚型，就像一种或多种多核苷酸组分那样，或者可衍生自不同的毒株或亚型。

本文所述第一和第二(初敏和加强)基因递送载体可包含作为天然多核苷酸的至少一种多核苷酸。或者或另外，初敏和加强性基因递送载体可包含作为合成多核苷酸的至少一种多核苷酸。合成多核苷酸可包含为在哺乳动物细胞(如人细胞)中表达进行优化的密码子。基因递送载体可包含一种多核苷酸分子，或者两种或多种不同的多核苷酸分子，各自编码一种或多种 HIV 多肽。基因递送载体可包含 DNA 或 RNA 或二者皆有。

任选的 HIV 免疫原性多肽(由多核苷酸组分编码和/或包含多肽组分)可以是 HIV 包膜、Gag 或其它 HIV 多肽。基因递送载体可编码与野生型(即天然产生的)HIV 多肽相比，包含一个或多个突变的 HIV 多肽(如在包膜蛋白的情况下，至少一种包膜多肽可包含切割位点中的突变或糖基化位点中的突变、V1 区的缺失或修饰、V2 区的缺失或修饰、V3 区的缺失或修饰、暴露结合于 CCR5 趋化因子共同受体的包膜结合区



的修饰及其组合)。包膜蛋白中的突变也可将抗体结合位点暴露给参与病毒结合和/或进入的其它受体。而且,其它免疫原性 HIV 多肽可包括但不限于: Gag、Env、Pol、Prot、Int、RT、vif、vpr、vpu、tat、rev 和 nef 多肽。

可从中选择 HIV 免疫原性多肽和编码序列的第一亚型包括但不限于: 亚型 A、亚型 B、亚型 C、亚型 D、亚型 E、亚型 F、亚型 G 和亚型 O, 以及任何已鉴定的 CRF。

除了免疫原性 HIV 多肽及其编码序列以外, 基因递送载体还可编码, 并且任选的多肽组分还可包含一种或多种其它抗原性多肽, 所述抗原性多肽可包括不衍生自 HIV-1 编码序列的抗原性多肽。

一种或多种基因递送载体还可包含编码与所选宿主细胞中表达相容的一种或多种控制元件的序列, 其中所述控制元件操作性连接于编码 HIV 免疫原性多肽的多核苷酸。示范性控制序列包括但不限于: 转录启动子(如 CMV、CMV+内含子 A、SV40、RSV、HIV-Ltr、MMLV-ltr 和金属硫蛋白)、转录增强子元件、转录终止信号、聚腺苷酸化序列、优化翻译启动的序列、内部核糖体进入位点和翻译终止序列。

基因递送载体可包含本文所述其它组分(如运载体、控制序列等)。多肽组分可包含本文所述其它组分(如运载体、佐剂、免疫增强剂等)。

本发明也包括在对象中产生免疫应答的方法, 例如将本文所述任何组合物给予对象。在某些实施方式中, 该方法可包括给予包含第一基因递送载体(也称为初敏载体)的组合物, 在与对象中表达该多核苷酸相容的条件下给予对象包含编码第一 HIV 免疫原性多肽的第一多核苷酸组分的多核苷酸的第一基因递送载体, 以产生编码的 HIV 免疫原性多肽。同时或随后, 将包含第二基因递送载体(也称为加强载体)的组合物给予对象。第一和第二基因递送载体可以是(例如)复制型或非复制型腺病毒载体或  $\alpha$  病毒载体(如非复制型)。

在又一方面, 产生免疫应答的方法还包括给予本文所述的一种或多种多肽组分。第一和第二基因递送载体以及多肽组分可(例如)同时或依次给予。任选的多肽组分可包含本文所述其它组分(如运载体、佐剂、免疫增强剂等), 并且可以是可溶性物质或颗粒。

一种或多种基因递送载体可包括(例如)非病毒和/或病毒载体。示范性病毒载体包括但不限于: 逆转录病毒、慢病毒、 $\alpha$  病毒、痘病毒、疱疹病毒、腺伴随病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、腺病毒载体, 或其它已知病毒载体。在优选实施方式中, 第一和第二基因递送载体是  $\alpha$  病毒或腺病毒载体。在尤其优选的实施方式中, 第二(加

强)基因递送载体是非复制型腺病毒载体或非复制型  $\alpha$  病毒载体。

可采用颗粒运载体,例如包被在金或钨颗粒上的颗粒运载体递送基因递送载体,可用基因枪将包被颗粒递送给对象,或者用电穿孔或其它方式递送 PLG 颗粒。或者,可将基因递送载体包装到脂质体制剂中。

可通过(例如)肌肉内、粘膜内、鼻内、皮下、皮内、透皮、阴道内、直肠内、口服、静脉内方法或这些方法的组合给予基因递送载体和/或多肽。

本发明方法的对象一般是哺乳动物,例如人类。

本发明方法产生的免疫应答可以是体液和/或细胞应答。在一个实施方式中,该免疫应答导致对象产生针对第一 HIV 亚型衍生的多种毒株或针对多种亚型的广泛中和性抗体。在另一实施方式中,该免疫应答产生针对不同亚型衍生的多种毒株的广泛中和性抗体。

本领域普通技术人员根据本文内容不难实施本发明的这些和其它实施方式。

## 发明详述

除非另有说明,本发明的实施将采用本领域技术人员已知的化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学的常规方法。参见例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第 18 版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990);《酶学方法》(Methods In Enzymology)(S. Colowick 和 N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.);和《实验免疫学手册》(Handbook of Experimental Immunology),第 I-IV 卷(D.M. Weir 和 CC. Blackwell 编, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook 等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第二版, 1989);《分子生物学简略方案》(Short Protocols in Molecular Biology),第 4 版(Ausubel 等编, 1999, John Wiley 和 Sons);《分子生物学技术:详细实验室教程》(Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course), (Ream 等编, 1998, Academic Press); PCR(生物技术介绍系列(Introduction to Biotechniques Series)),第 2 版(Newton 和 Graham 编, 1997, Springer Verlag)。

将本说明书中引用第所有专利、发表物、序列引用和专利申请纳入本文作参考,就像特别和单独将各个专利、发表物、序列引用或专利申请全文引入作参考用于所有目的那样。

本说明书所用单数形式“一个”、“一种”和“这种”包括复数含义,除非文中明确另有说明。因此,例如,提到“一种抗原”就包括两种或多种这种物质的混合物。

### 1.0.0 定义

在描述本发明的过程中,采用以下术语,它们的定义如下。

本文所用"合成"序列指编码 HIV 多肽的多核苷酸,按照本文所述,例如,通过密码子替换、改变活性和/或抑制序列失活修饰了该多核苷酸的表达。本文所用"野生型"或"天然"序列指与其天然存在形式基本相同的编码多肽的多核苷酸,如 HIV 分离物中发现的 Gag、Pol、Vif、Vpr、Tat、Rev、Vpu、Env 和/或 Nef 编码序列, HIV 分离物包括例如: SF162, SF2, AF110965, AF110967, AF110968, AF110975, MJ4(亚型 C, Ndung'u 等(2001) *J. Virol.* 75:4964-4972), 亚型 B-SF162, 亚型 C-TV1.8\_2 (8\_2\_TV1\_C.ZA), 亚型 C-TV1.8\_5(8\_5\_TV1\_C.ZA), 亚型 C-TV2.12-5/1 (12-5\_1\_TV2\_C.ZA), 亚型 C-MJ4, 印度亚型 C-93IN101, 亚型 A-Q2317, 亚型 D-92UG001, 亚型 E-cm235, 肯尼亚 GenBank 登录号 AF004885 的 HIV-1 亚型 A 分离物 Q23-17, 乌克兰 GenBank 登录号 AF413987 的 HIV-1 亚型 A 分离物 98UA0116, 坦桑尼亚 GenBank 登录号 AF069669 的 HIV-1 亚型 A 分离物 SE8538, 人体免疫缺陷病毒 1 亚型 A 的前病毒 DNA, 完整基因组, 克隆: pUG031-A1 GenBank 登录号 AB098330, 1 型人体免疫缺陷病毒亚型 D 的完整前病毒基因组, 毒株 92UG001 GenBank 登录号 AJ320484, 乌干达 GenBank 登录号 U88824 的 HIV-1 亚型 D 分离物 94UG114, 1 型人体免疫缺陷病毒亚型 D, 分离物 ELI GenBank 登录号 K03454, 以及 1 型人体免疫缺陷病毒印度亚型 C, 亚型 C 基因组 RNA GenBank 登录号 AB023804。

HIV 基因组的各个区域见表 1, 相对于 8\_5\_TV1\_C.ZA 进行编号。因此,术语"Pol"指以下多肽中的一种或多种:聚合酶(p6Pol);蛋白酶(prot);逆转录酶(p66RT 或 RT);RNA 酶 H (p15RNA 酶 H);和/或整合酶(p31Int 或 Int)。本领域普通技术人员可根据本文所述内容和本领域已知信息鉴定任何所选 HIV 分离物(如亚型中的毒株,或衍生自不同亚型的毒株)的基因区,例如,通过与 8\_5\_TV1\_C.ZA 进行核苷酸和/或多肽比对,或与其它已知 HIV 分离物,如具有基因区(如 SF2, GenBank 登录号 K02007; SF162, GenBank 登录号 M38428)的亚型 B 分离物和具有基因区(如 GenBank 登录号 AF110965 和 GenBank 登录号 AF110975)的亚型 C 分离物比对进行鉴定。

通过系统发生分析将 HIV-1 分为三组: M 组(主要)、O 组(次要)和 HIV-1 变体,称为 N 组。亚型(进化枝)代表 HIV 的不同谱系,它具有地理相关性。HIV-1 亚型是 HIV-1 序列的系统发生相关类型,从整个基因组来看,任何一种亚型内的序列或亚亚型的序列之间的相似性大于不同亚型的序列之间的相似性。参见例如,洛斯阿拉莫

斯国家实验室 HIV 序列数据库 (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/HelpDocs/subtype-more.html>) (新墨西哥州洛斯阿拉莫斯)。

HIV-1 M 组亚型是 HIV-1 序列的系统发生相关组或进化枝, 包括亚型 A(如 A1、A2)、B、C、D、F (如 F1、F2)、G、H、J 和 K。认为在一次黑猩猩-至-人的传播事件后, HIV-1 M 组的亚型和亚-亚型在人类中已经不同。各种 HIV-1 M 组亚型在世界上的分布迥异, 其中亚型 B 在北美和欧洲最流行, 亚型 A 在非洲最常见。虽然大多数亚型在中非很常见, 但其它地区具有限制的基因型分布。例如, 亚型 C 在印度和南非很常见, 亚型 F 在罗马尼亚、巴西和阿根廷很普遍。HIV-1 M 组也包括循环重组形式(CRF), 在系统发生分析中, 它是完整基因组是重组物或镶嵌物的一种病毒, 所述重组物或镶嵌物由与一种亚型聚簇的一些区域和与另一种亚型聚簇的其它基因组区域组成。CRF 的例子参见洛斯阿拉莫斯国家实验室 HIV 序列数据库 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>)(新墨西哥州洛斯阿拉莫斯)。本领域也将 CRF 称为亚型 E 和 I。CRF(亚型 E)在泰国非常流行。

本文所用术语"病毒样颗粒"或"VLP"指非复制型病毒外壳(shell), 衍生自下面进一步讨论的几种病毒中的任何一种。VLP 通常由一种或多种病毒蛋白组成, 例如但不限于: 称为衣壳、外被、外壳、表面和/或包膜蛋白的蛋白, 或衍生自这些蛋白的颗粒形成多肽。在合适的表达系统中重组表达该蛋白后 VLP 可自发性形成。产生具体 VLP 的方法是本领域已知的, 以下更详细地进行讨论。可用本领域常规技术, 如电子显微术、X-射线晶体学等检测重组表达病毒蛋白后 VLP 的存在。参见例如, Baker 等, *Biophys. J.* (1991) 60: 1445-1456; Hagensee 等, *J. Virol.* (1994) 68:4503-4505。例如, 可通过密度梯度离心分离 VLP 和/或通过特征性密度条带分析鉴定 VLP。或者, 可对所研究的 VLP 制剂的玻璃化水性样品进行低温电子显微术, 在合适的曝光条件下记录图像。

衍生自具体病毒蛋白的"颗粒形成多肽"指全长或接近全长的病毒蛋白, 及其片段, 或者是具有内部缺失的病毒蛋白, 该多肽能够在有利于 VLP 形成的条件下形成 VLP。因此, 该多肽可包含全长序列、片段、截短和部分序列、以及参比分子的类似物和前体形式。因此, 该术语也指序列的缺失、加入和取代形式, 只要该多肽保留形成 VLP 的能力。因此, 该术语包括所述多肽的天然变异, 因为病毒分离物之间常常存在外被蛋白的变异。该术语也包括天然情况下参比蛋白中不会发生的缺失、加入和取代, 只要该多肽保留形成 VLP 的能力。优选取代是天然情况下保守的取代, 即在侧链相关的氨基酸家族内发生的取代。具体说, 氨基酸通常分为四个家族: (1)

酸性—天冬氨酸和谷氨酸；(2)碱性—赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3)非极性—丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；和(4)不带电极性—甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。有时将苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸分类为芳族氨基酸。

术语"HIV 多肽"指与天然 HIV 多肽(如 Gag、Env、Prot、Pol、RT、Int、vif、vpr、vpu、tat、rev、nef 和/或其组合)有同源性和/或有功能的任何氨基酸序列。HIV 多肽可以具有的功能的非限制性例子包括：用作免疫原(如产生体液和/或细胞免疫应答)、用于诊断(如被用于 ELISA 或其它免疫测定的合适抗体结合)和/或具有与野生型或合成 HIV 多肽相关的一种或多种生物活性的多肽。例如，本文所用术语"Gag 多肽"可以指被一种或多种抗-Gag 抗体结合；初敏体液和/或细胞免疫应答；和/或能够形成颗粒的多肽。

"抗原"指含有能刺激宿主免疫系统产生体液和/或细胞抗原-特异性应答的一个或多个表位(线性、构象或二者)的分子。该术语可与术语“免疫原”互换使用。通常，B-细胞表位包括至少约 5 个氨基酸，但可小至 3-4 个氨基酸。T-细胞表位，如 CTL 表位包括至少约 7-9 个氨基酸，辅助 T-细胞表位至少约 12-20 个氨基酸。通常，表位包括约 7-15 个氨基酸，如 9、10、12 或 15 个氨基酸。术语"抗原"指亚基抗原(即与天然情况下该抗原与其相关的整体生物分离或分开的抗原)，以及杀死、减毒或灭活的细菌、病毒、真菌、寄生生物或其它微生物。也在本文所述抗原的定义下获得了抗体如抗-独特型抗体或其片段，和可模拟抗原或抗原决定簇的合成肽模拟表位。类似地，本文抗原定义也包括例如在基因治疗和 DNA 免疫应用中体内表达抗原或抗原决定簇的寡核苷酸或多核苷酸。而且，可通过病毒载体递送表达抗原或免疫原的寡核苷酸或多核苷酸。

出于本发明目的，抗原(如编码抗原的多核苷酸，或包含抗原的多肽)可获自具有有一种以上亚型、血清型或毒株变异的任何微生物(如病毒、细菌、寄生生物、真菌等)。该术语也指各种肿瘤抗原。而且，出于本发明目的，"抗原"指相对于天然序列包含修饰，如缺失、加入或取代(通常具有保守特性)的蛋白质，只要该蛋白保持初敏免疫应答的能力，如本文所述。这些修饰可以是有意的，如通过定位诱变引入，或者可以是偶发性，如通过产生抗原的宿主的突变产生。

在描述 HIV 免疫原性多肽时，本文所用"相同"旨在包括来自相同 HIV 毒株的相同基因的蛋白质。本文中该术语也旨在包括"相同"多肽，其中相同多肽的一种或多种如本文所述进行了修饰。例如，相同的 env 多肽旨在包括例如：突变或修饰的 env

蛋白、来自相同毒株的野生型或未修饰的 env 蛋白、或来自相同毒株的相同基因的不同修饰物。该修饰可以相同或不同，只要起始基因来自相同株系。

对抗原或组合物的"免疫应答"是对象发生针对感兴趣组合物中存在的抗原的体液体液和/或细胞免疫应答。出于本发明目的，"体液免疫应答"指抗体分子介导的免疫应答，而"细胞免疫应答"是 T-淋巴细胞和/或其它白细胞介导的免疫应答。细胞免疫的一个重要方面包括细胞裂解性 T 细胞("CTL")产生的抗原特异性应答。CTL 对与主要组织相容性复合物(MHC)编码和细胞表面上表达的蛋白质结合递呈的肽抗原特异。CTL 帮助诱导和促进破坏胞内微生物，或裂解感染这种微生物的细胞。细胞免疫的另一方面包括辅助 T-细胞产生的抗原-特异性应答。辅助 T 细胞用于帮助刺激对抗表面上递呈 MHC 分子结合性肽抗原的细胞的非特异性效应细胞的功能，并集中其活性。"细胞免疫应答"也指产生细胞因子，趋化因子和活化 T-细胞和/或其它白细胞产生的其它这种分子，包括 CD4+和 CD8+ T 细胞产生的分子。

初敏细胞免疫应答的组合物或疫苗可通过在细胞表面上递呈 MHC 分子结合性抗原用于致敏脊椎动物对象。细胞介导的免疫应答是指向表面上递呈抗原的细胞或其附近。此外，可产生抗原-特异性 T-淋巴细胞，以在未来保护免疫的宿主。

可通过许多实验，如淋巴增殖(淋巴细胞活化)实验、CTL 细胞毒性细胞实验或测定在致敏对象中对抗原特异的 T-淋巴细胞测定具体抗原刺激细胞介导的免疫应答的能力。这些实验是本领域熟知的。参见例如，Erickson 等，*J. Immunol.* (1993) 111:4189-4199；Doe 等，*Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376。近年来，测定细胞介导的免疫应答的方法包括测定胞内细胞因子或 T 细胞群体分泌的细胞因子，或测定表位特异性 T 细胞(如四聚体技术)(综述见 McMichael, A.J.和 O'Callaghan, C.A., *J. Exp. Med.* 187(9)1367-1371, 1998；Mcheyzer-Williams, M.G.等，*Immunol. Rev.* 150:5-21, 1996；Lalvani, A.等，*J. Exp. Med.* 186: 859-865, 1997)。

因此，本文所用免疫应答可能是刺激抗体(如阻断细菌毒素和进入细胞的病原体如病毒并通过结合于毒素和病原体阻断其复制，一般能保护细胞不被感染和破坏的中和抗体)产生的免疫应答。感兴趣的抗原也可初敏 CTL 的产生。因此，免疫应答可包括一种或多种以下效果：B 细胞产生抗体；和/或激活特异性指向感兴趣的组合物或疫苗中存在的抗原的抑制 T 细胞和/或记忆/效应 T 细胞。这些应答可用于中和侵染性和/或介导抗体-补体、或抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)，以保护免疫的宿主。可采用本领域熟知的标准免疫实验和中和实验测定这种应答。(参见例如，Montefiori 等(1988) *J. Clin Microbiol.* 26:231-235；Dreyer 等(1999) *AIDS Res Hum Retroviruses*

(1999) 15(17):1563- 1571)。哺乳动物的先天免疫系统也能通过激活免疫细胞上的 Toll 样受体和相似受体分子识别病原性微生物的分子特征并作出反应。先天免疫系统激活后, 各种非适应性免疫应答细胞被激活, 以(如)产生各种细胞因子、淋巴因子和趋化因子。先天免疫应答激活的细胞包括非成熟和成熟的单核细胞的树突细胞和浆细胞样谱系(MDC、PDC), 以及  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  T 细胞和 B 细胞等。因此, 本发明也考虑了包括先天应答和适应性应答的免疫应答。

"免疫原性 HIV 多肽"是将免疫原性多肽给予实验动物(如小鼠、豚鼠、恒河猴、黑猩猩、狒狒等)时, 能够初敏针对一种或多种天然 HIV 多肽的免疫应答的多肽。

"免疫原性组合物"是包含抗原分子的组合物, 其中将该组合物给予对象导致对象对感兴趣对抗原分子发生体液和/或细胞免疫应答。可(例如)通过注射、吸入、口服、鼻内或粘膜(如直肠内或阴道内)给药将免疫原性组合物直接引入接受对象。

术语"亚型"包括目前鉴定的亚型以及循环重组形式(CRF)。不断鉴定到 HIV 亚型(包括 CRF), 可以在从互联网上获得的洛斯阿拉莫斯国家实验室的 HIV 数据库中发现它们。亚型包括亚型 A(如 A1、A2)、B、C、D、F(如 F1、F2)、G、H、J 和 K、以及各种 CRF。

"表位"指特异性 B 细胞和/或 T 细胞对其产生反应, 使包含这种表位的分子能够初敏免疫反应或能够与生物样品中存在的 HIV 抗体反应的抗原上的位点。该术语也可与"抗原决定簇"或"抗原决定簇位点"互换使用。表位可包含空间构建独特的三个(3)或多个氨基酸。通常, 表位由至少五个(5)这样的氨基酸组成, 更通常, 由至少 8-10 个这样的氨基酸组成。本领域已知测定氨基酸的空间构象的方法, 包括例如: x-射线晶体衍射法和二维核磁共振。而且, 不难用本领域熟知技术, 如采用疏水性研究和定位血清学试验鉴定给定蛋白中的表位。也参见 Geysen 等(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002 (快速合成肽以测定给定抗原中免疫原性表位的位置的通用方法); 美国专利号 4,708,871(鉴定和化学合成抗原表位的方法); 和 Geysen 等(1986) *Molecular Immunology* 23:709-715 (对给定抗体具有高亲和力的肽的鉴定技术)。可在简单的免疫试验中鉴定识别相同表位的抗体, 该试验能显示一种抗体阻断靶抗原的另一种抗体结合的能力。

"亚基疫苗"指包含一种或多种所选抗原但非所有抗原的疫苗组合物, 这些抗原是感兴趣的病原体如病毒、细菌、寄生生物或真菌的抗原衍生的或与其同源。这种组合物基本不含完整病原体细胞或病原性颗粒, 或者这种细胞或颗粒的裂解物。因此, 可从至少部分纯化的(优选基本纯化的)病原体的免疫原性多肽或其类似物制备"

亚基疫苗”。因此，获得亚基疫苗包含的抗原的方法可包括标准纯化技术、重组产生或合成产生。

"基本纯化"通常指分离一种物质(化合物、多核苷酸、蛋白质、多肽、多肽组合物)，以使该物质占其所在样品的绝大部分。样品种基本纯化的组分一般占样品的50%，优选80%-85%，更优选90-95%。纯化感兴趣的多核苷酸和多肽的技术是本领域熟知的，包括例如：离子交换色谱、亲和色谱和密度沉降法。

"多核苷酸编码序列"或"编码"所选多肽的多核苷酸序列是位于合适的调节序列(或“控制元件”)的控制下时在体内被转录(在DNA的情况下)和翻译(在mRNA的情况下)成多肽的核酸分子。编码序列的边界有启动密码子(例如5'端或5'端附近)和翻译终止密码子(例如，3'端或3'端附近)决定。编码序列可包括但不限于：来自病毒、原核或真核mRNA的cDNA、来自病毒或原核DNA的基因组DNA序列以及合成DNA序列。示范性编码序列是本发明所用密码子优化的病毒多肽编码序列。本领域技术人员可鉴定本发明多核苷酸序列的编码区，例如，不难通过翻译多核苷酸的所有三个读框并鉴定对应于编码多肽的读框来鉴定该编码区，例如，本发明的合成nef多核苷酸编码了nef-衍生的多肽。转录终止序列可位于编码序列的3'端。

"控制元件"一般包括但不限于：转录调节物，如启动子、转录增强子元件、转录终止信号和聚腺苷酸化序列；和翻译调节物，例如，优化翻译启动的序列如Shine-Dalgarno(核糖体结合位点)序列，内部核糖体进入位点(IRES)如ECMV IRES，Kozak-型序列(即优化翻译的序列，位于(例如)编码序列的5'端，如位于启动ATG的前端(5')的GCCACC)，前导序列，翻译启动密码子(如ATG)和翻译终止序列(如TAA或，优选位于编码序列之后(3')的TAAA)。在某些实施方式中，一种或多种翻译调节或启动序列(如前导序列)衍生自野生型翻译启动序列，即在天然状态下调节编码区翻译的序列。用本文所述方法修饰的野生型前导序列也可用于本发明。启动子可包括诱导型启动子(由分析物、辅因子、调节蛋白等诱导操作性连接于启动子的多核苷酸序列表达)、抑制型启动子(由分析物、辅因子、调节蛋白等诱导操作性连接于启动子的多核苷酸序列表达)和组成型启动子。

"核酸"分子或"多核苷酸"可包括但不限于：原核序列、真核mRNA、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列、甚至是合成的DNA序列。该术语也包括含有任何已知的DNA和RNA碱基类似物的序列。在提及本发明的多核苷酸时，在特别述及“DNA”的例子中，应该明白许多这种实施方式同样需要RNA。



“操作性连接”指元件的排列，其中所述成分的配置使得可行使其正常功能。因此，当存在合适的酶时，操作性连接于编码序列的给定启动子能实现编码序列的表达。启动子无需与编码序列毗连，只要其指导该序列表达的作用。因此，例如启动子序列和编码序列之间可存在插入的未翻译但转录的序列，该启动子序列仍认为是“操作性连接”于编码序列。

按照其来源或操作，本文用于描述核酸分子的“重组物”表示基因组、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸，所述多核苷酸：(1)不与其天然相连的多核苷酸的全部或部分相连；和/或(2)与除和其天然相连的多核苷酸以外的多核苷酸相连。用于蛋白质或多肽的术语“重组物”指经重组多核苷酸表达产生的多肽。“重组宿主细胞”、“宿主细胞”“细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和其它表示作为单细胞实体培养的原核微生物或真核细胞系的术语可互换使用，表示可用作或已用作重组载体或其它转移DNA受体的细胞，并且包括感染的原始细胞的后代。由于随机或有意的突变，应该理解的是单一亲代细胞的后代在形态、基因组或总DNA补体上无需与原始亲代完全相同。该定义所指的后代包括由相关特性，例如编码所需肽的核苷酸序列的存在表征为与亲代足够相似的亲代细胞的后代，并且上述术语包括这些后代。

测定氨基酸序列“相似性”的技术是本领域熟知的。通常，“相似性”表示在适当位置两个或多个多肽的确切的氨基酸对氨基酸比较，所述位置的氨基酸相同或具有相似的化学和/或物理特性，例如荷电或疏水性。然后可确定所比较的多肽序列之间称为“相似性百分数”的术语。测定核酸和氨基酸序列同一性的技术也是本领域熟知的并且包括测定编码氨基酸序列(通常经cDNA中间体)的基因的mRNA的核苷酸序列，测定所编码的氨基酸序列与将其与第二条氨基酸序列比较。通常，“同一性”指两条多肽或多核苷酸序列各自精确的氨基酸-对-氨基酸或核苷酸-对-核苷酸的对应性。

两条或多条多核苷酸序列可通过测定它们的“同一性百分比”来比较。同样，两条或多条氨基酸序列通过测定它们的“同一性百分比”来比较。无论核酸或肽序列，两条序列的同一性百分比通常描述为两条对比序列之间确切的匹配数除以较短序列的长度并乘以100。核酸序列的近似对比由Smith和Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489(1981)的局部同源性算法提供。使用Dayhoff(“蛋白质序列和结构图谱集”(Atlas of Protein Sequences and Structure), M.O.Dayhoff编, 增刊5. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA)开发、Gribskov(*Nucl.Acids Res.* 14(6):6745-6763(1986))标准化的评分矩阵可拓展该算法

用于肽序列。Genetics Computer Group(Madison, WI)在他们的 BestFit 实用程序应用软件执行该算法用于核酸和肽序列。该方法的默认参数描述于《威斯康星序列分析软件包程序手册》(Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual), 第 8 版(1995)(来源于 Genetics Computer Group, Madison, WI)。其它同样适用于计算序列之间同一性或相似性百分数的合适程序通常是本领域已知的。

例如, 特定核苷酸序列与参考序列的同一性百分比可使用默认计分表和 6 个核苷酸位置的间隔罚分的 Smith 和 Waterman 同源性算法来确定。本发明内容中建立同一性百分比的另一种方法是使用 John F.Collins 和 Shane S. Sturrok 开发的、爱丁堡大学版权所有、IntelliGenetics, Inc.(Mountain View, CA)分销的 MPSRCH 程序包。这套程序包可使用 Smith-Waterman 算法, 其中计分表使用默认参数(例如, 间隔开放罚 12 分、间隔延伸罚 1 分、一个间隔罚 6 分)。产生的“匹配值”数据反映了“序列同一性”。其它计算序列间同一性或相似性百分数的合适程序一般是本领域公知的, 例如也可以默认参数使用的对比程序 BLAST。例如, 在一个优选的实施方式中, 可用使用以下核酸检索的默认参数的 BLASTN 和 BLASTP: 遗传密码=标准; 过滤器=无; 链=两条; 截断值=60; 预期值=10; 矩阵=BLOSUM62; 描述=50 条序列; 排序=高分; 数据库=非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译+Swiss 蛋白+Spupdate+PIR; (ii) 多肽检索。这些程序的细节参见以下因特网的网址: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

例如, 可使用 Smith-Waterman 相似性检索算法(例如, 位于网址 [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov), 或商业来源, 例如 TimeLogic Corporation, Crystal Bay, NV)进行蛋白质相似性和同一性百分比序列检索。例如, 在一个优选的实施方式中, Smith-Waterman 相似性检索可使用以下默认参数, 例如权重矩阵=BLOSUM62.MAA; 开放间隔罚分=-12; 延伸间隔罚分=-2; 框架罚分=0; 查询形式=FASTA/PEARSON; 查询类型=AA; 查询检索=1; 查询设置=CGI\_1d82ws301bde.seq; 目标类型=AA; 目标设置=NRpdb gsaa; 显著性=GAPPED; 最大评分=30; 最大对比=20; 报道阈值=评分=1; 对比阈值=20。

本领域的技术人员可容易地确定用于给定序列的合适检索参数, 基于 Smith Waterman 的示范性优选参数如上所示。例如, 检索参数可依所研究的序列而变。因此, 就本发明的多核苷酸序列而言, 本文公布的多核苷酸序列的长度对选择的数据

库进行检索并与基本上相同长度的序列作比较来确定同一性百分比。例如，本发明的一个代表性实施方式包括含有 X 毗连核苷酸的分离的多核苷酸，其中(i)相对于本文所述的一条或多条序列或其片段的 Y 毗连核苷酸，X 毗连核苷酸具有至少约一个选择的同一性百分比水平，和(ii)出于检索的目的，使 X=Y，其中 Y 是长度确定的选择的参考多核苷酸(例如，长度从 15 个核苷酸到选择的全长序列中存在的核苷酸数目)。

本发明的序列可包括序列的片段，例如约 15 个核苷酸到本文所述全长序列中存在的核苷酸数目，包括上述范围内的所有整数值。例如，本发明多核苷酸序列的片段可为 30-60 个核苷酸、60-100 个核苷酸、120-240 个核苷酸、240-480 个核苷酸、480-1000 个核苷酸，和在其间的所有整数值。

当本发明的序列用作对，例如序列数据库的检索序列时，本文所述合成的多核苷酸包括与本文公布的合成的多核苷酸序列具有约 80%-100%、大于 80-85%、优选大于 90-92%、更优选大于 95%、最优选大于 98%到 100%序列同一性(包括所述范围内的所有整数值)的相关多核苷酸序列。

两个核酸片段被认为进行本文所述的“选择性杂交”。两个核酸分子之间的序列同一性的程度影响这种分子之间杂交的效率和强度。部分相同的核酸序列至少可部分抑制完全相同的序列与靶分子的杂交。对完全相同的序列杂交的抑制可使用本领域熟知的杂交试验(例如，Southern 印迹、Northern 印迹、溶液杂交等，或者参见 Sambrook 等，同上或 Ausubel 等，同上)来评估。这种试验可使用各种选择性程度来进行，例如使用从低到高的严谨性条件。如果使用低严谨性条件，可使用二级探针来评估非特异性结合的缺乏，该探针缺乏甚至是部分程度的序列同一性(例如，与靶分子具有小于约 30%序列同一性的探针)，以致无非特异性结合时，二级探针不与靶杂交。

当使用基于杂交的检测系统时，选择与靶核酸序列互补的核酸探针，然后通过选择合适的条件使探针与靶序列互相“选择性杂交”或结合以形成杂交分子。能在“中等严谨性”条件下与靶序列选择性杂交的核酸分子通常在可检测靶核酸序列的条件下杂交，该靶核酸序列至少约 10-14 个核苷酸长，与选择的核酸探针具有至少约 70%的序列同一性。严谨性杂交条件通常可检测至少约 10-14 个核苷酸长，与选择的核酸探针的序列具有大于约 90-95%序列同一性的靶核酸序列。如本领域已知的，可确定用于探针/靶(序列)杂交的杂交条件，其中探针和靶具有一定程度的序列同一性

(参见, 例如《核酸杂交: 一种实用方法》(Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach), B.D.Hames 和 S.J.Higgins 编, (1985) Oxford; Washington, D C; IRL Press)。

就杂交的严谨性条件而言, 本领域熟知利用许多等价条件通过改变, 例如以下因素来建立特定的严谨性: 探针和靶序列的长度与性质、各种序列的碱基组成、盐和其它杂交溶液成分的浓度、在杂交溶液中存在或不存在阻断剂(例如, 甲酰胺、葡聚糖硫酸酯和聚乙二醇)、杂交反应温度和时间参数以及不同的洗涤条件。按照以下的本领域标准方法选择特定杂交条件(参见, 例如 Sambrook 等, 同上或 Ausubel 等, 同上)。

如果第一多核苷酸具有与第二多核苷酸的一个区域、其 cDNA、其补体相同的碱基对序列, 或者如果第一多核苷酸与第二多核苷酸的一个区域、其 cDNA、其补体表现出实质性序列同一性, 其中序列同一性如上述确定, 则第一多核苷酸“衍生自”第二多核苷酸。实质性的序列同一性通常约 90%或更大, 优选约 95%或更大, 更优选约 98%或更大。

如果第一多肽由衍生自第二多核苷酸的第一多核苷酸编码, 或者第一多肽具有与第二多肽或其部分相同的氨基酸序列, 或者第一多肽与第二多肽或其部分表现出上述确定的实质性的序列同一性, 则第一多肽“衍生自”第二多肽。实质性的序列同一性通常约 90%或更大, 优选约 95%或更大, 更优选约 98%或更大。

通常, 如果一个病毒多肽(i)由某病毒的一个多核苷酸(病毒多核苷酸)的相同开放读框编码, 或者(ii)与上述该病毒的一个肽表现出实质性的序列同一性, 则这个病毒多肽“衍生自”该病毒的特定多肽(病毒多肽)。

如果一个多肽衍生自 HIV 亚型成员中的多肽, 衍生自该亚型成员中的多核苷酸编码的多肽, 由该亚型成员中的多核苷酸衍生而来的多核苷酸编码, 或者衍生自由该亚型成员中的多核苷酸衍生而来的多核苷酸编码的多肽, 则该多肽“衍生自”该 HIV 亚型。

如果一条多肽衍生自 HIV 毒株成员中的多肽, 衍生自该毒株成员中的多核苷酸编码的多肽, 由该毒株成员中的多核苷酸衍生而来的多核苷酸编码, 或者衍生自由该毒株成员中的多核苷酸衍生而来的多核苷酸编码的多肽, 则该多肽“衍生自”该 HIV 毒株。

“类似多肽”指由来自不同多核苷酸来源的同一生物体的同一基因编码的多肽, 或衍生自由它们编码的多肽。在本发明内容中, 不同的多核苷酸来源可是不同的亚

型、不同的血清型或不同的毒株。因此，例如 B 亚型 HIV 的 Gag 多肽或许是亚型 C HIV 的 Gag 多肽的类似多肽，或者来源于第一 HIV-1 亚型、血清型或毒株的包被多肽是来源于第二 HIV-1 亚型、血清型或毒株的包被多肽的类似多肽。可来源于不同 HIV-1 亚型或毒株的类似多肽类型的例子包括均被认为是类似多肽的包被多肽 gp41、gp120、gp140 和 gp160。此外，这种类似多肽的每一种可含有不同的改变或突变，例如来源于 HIV-1 包被基因的类似多肽包括(但不限于): gp41 多肽、gp120 多肽、gp140 多肽、gp160 多肽、缺失 V1 环一部分的 gp140、缺失 V2 环一部分的 gp140 多肽、缺失 V3 环一部分的 gp140 多肽、具有突变的蛋白酶切割位点的 gp140 多肽、缺失 V1 环一部分的 gp160、缺失 V2 环一部分的 gp160 多肽、缺失 V3 环一部分的 gp160 多肽和具有突变的蛋白酶切割位点的 gp160 多肽。

本发明内容中使用的“基因”是与遗传功能相关的遗传核酸(病毒基因组、染色体、质粒等)中的核苷酸序列。基因是在生物体的基因组中占据特定物理位置(“基因座”或“遗传座”)的遗传单位，例如一种含有多核苷酸序列(如，HIV-1 的 RNA 序列或原病毒 HIV-1 的 DNA 序列)的生物体。基因可编码所表达的产物，例如多肽或多核苷酸(如，tRNA)。或者，基因可限定用于特定情况/功能的基因组位置，例如蛋白质和/或核酸(例如，5'LTR)的结合，其中基因不编码表达的产物。HIV-1 基因的例子包括(但不限于): Gag、Env、Pol(prot、RNA 酶、Int)、tat、rev、nef、vif、vpr 和 vpu。基因可含有编码序列，例如多肽编码序列，与非编码序列，例如启动子序列、聚腺苷酸化序列、转录调节序列(如增强子序列)。许多真核生物基因具有被“内含子”间断的“外显子”(编码序列)。在某些情况中，一种基因可与另一基因分享序列(例如，重叠基因)。应该注意到在常见的群体中，野生型基因可含有多种普遍的形式，这些普遍的形式在互相有关的序列中具有改变。这些变异称为“多态性”或“等位变异”。

“纯化的多核苷酸”指基本上不含该多核苷酸天然相连的蛋白质的感兴趣多肽或其片段，例如含有少于约 50%、优选少于约 70%、更优选少于约 90%的天然相连的蛋白质。纯化感兴趣的多肽的技术是本领域熟知的，包括例如用破膜试剂破坏含有多核苷酸的细胞并通过离子交换层析、亲和层析和密度沉降分离多核苷酸和蛋白质。

“核酸免疫”指为了体内表达抗原、多种抗原、表位或多种表位而将编码一种或多种选择的抗原的核酸分子引入宿主细胞。核酸分子可直接引入对象，例如通过注射、吸入、口服、鼻内和粘膜施用等；或者可离体引入取自宿主的细胞。后一种

情况中，转化的细胞再次引入对象从而在那里初敏抗核酸分子编码的抗原的免疫应答。

“基因转移”或“基因递送”指可靠地将感兴趣的核酸(即，DNA 或 RNA)插入宿主细胞的方法或系统。这种方法可导致非整合转移的 DNA 的瞬时表达、转移的复制子(例如，附加体)的染色体外复制和表达。或转移的遗传物质整合入宿主细胞的基因组 DNA。基因递送表达载体包括(但不限于)来源于以下病毒的载体：腺病毒、腺伴随病毒、 $\alpha$  病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、水疱病毒和牛痘病毒。当用于免疫时，这种基因递送表达载体可称为疫苗或疫苗载体。在优选实施方式中，基因递送载体包括用作编码或表达本文所述多肽的多核苷酸的递送载体的复制型和非复制型病毒和细菌载体。

术语“转染”用来指细胞摄入外来 DNA。当外源性 DNA 引入细胞膜内，则该细胞被“转染”。许多转染技术是本领域公知的。参见，例如 Graham 等，(1973) *Virology*, 52:456; Sambrook 等，(1989) 《分子克隆，实验室手册》(Molecular Cloning, a laboratory manual), 冷泉港实验室，纽约；Davis 等，(1986) “分子生物学基础方法”(Basic Methods in Molecular Biology), Elsevier 和 Chu 等，(1981) *Gene* 13:197。这种技术可用于将一种或多种外源性 DNA 部分引入合适的宿主细胞。该术语指稳定的与瞬时的摄入遗传物质，并且包括摄入肽或抗体连接的 DNA。

“载体”能将基因序列转移至靶细胞(例如，病毒载体、非病毒载体、颗粒载体和脂质体)。因此，该术语包括细菌、真菌以及病毒载体。

“慢病毒载体”和“重组慢病毒载体”指携带并且在某些实施方式中能引导感兴趣的核酸分子表达的核酸构建物。慢病毒载体含有至少一个转录启动子/增强子或基因座定义元件，或通过其它方式，例如交替剪接、核 RNA 输出、信使的转录后修饰或蛋白质的转录后修饰来控制基因表达的其它元件。这种载体构建物也必须含有包装信号，长末端重复序列(LTRS)或其部分，适合于所用逆转录病毒的正链和负链引物结合位点(如果这些在逆转录病毒载体中已不存在)。重组慢病毒载体也可任选含有引导聚腺苷酸化、选择标记(例如 Neo、TK、潮霉素、腐草霉素、组氨醇或 DHFR) 以及一个或多个限制性位点和翻译终止序列的信号。例如，这种载体通常含有 5'LTR、tRNA 结合位点、包装信号、第二链 RNA 合成的起点和 3'LTR 或其部分。

本发明使用的“慢病毒载体颗粒”指携带至少一种感兴趣基因的慢病毒。逆转录病毒也可含有选择标记。重组慢病毒能将其遗传物质(RNA)逆转录为 DNA 并在感

染时将该遗传物质掺入宿主细胞的 DNA。慢病毒载体颗粒可具有慢病毒包膜、非慢病毒包膜(例如, amphi 或 VSV-G 包膜)或嵌合包膜。

“ $\alpha$  病毒载体”、“重组  $\alpha$  病毒载体”和“ $\alpha$  病毒复制子载体”指携带在某些实施方式中能引导感兴趣的核酸分子表达的核酸构建物。 $\alpha$  病毒载体含有至少一个转录启动子/增强子或通过其它方式,例如交替剪接、核 RNA 输出、信使的转录后修饰或蛋白质的转录后修饰来控制基因表达的其它元件。这种载体构建物也必须含有包装信号和  $\alpha$  病毒复制识别序列。重组甲型病毒载体也可任选含有引导聚腺苷酸化、选择标记(例如 Neo、TK、潮霉素、腐草霉素、组氨醇或 DHFR)以及一个或多个限制性位点和翻译终止序列的信号。 $\alpha$  病毒载体通常含有  $\alpha$  病毒非结构蛋白的编码序列、包装位点、复制识别序列和能引导感兴趣的核酸分子表达的序列。

“表达盒”指能引导感兴趣的序列或基因表达的组分。表达盒通常含有操作性连接于感兴趣的多核苷酸或基因的启动子。也可有其它控制元件。本文所述的表达盒可包含于质粒构建物中。除了表达盒的组分以外,质粒构建物也可含有细菌的复制起点、一个或多个选择标记、允许质粒构建物以单链 DNA 存在的信号(例如, M13 的复制起点)、多克隆位点和“哺乳动物”的复制起点(例如, SV40 或腺病毒的复制起点)。

“复制子颗粒”或“重组颗粒”指含有  $\alpha$  病毒 RNA 载体复制子的病毒样单元。通常,重组颗粒包含一种或多种病毒结构蛋白、脂质包膜和 RNA 载体复制子。重组颗粒优选包含宿主细胞-衍生的脂质双层,如质膜中包含的核衣壳结构,其中嵌入了一种或多种病毒包膜糖蛋白(如 E2、E1)。颗粒也可包含其它组分(如靶向元件如生物素、其它病毒结构蛋白或其部分、杂交包膜或其它受体结合的配体)。

“包装细胞”指含有生产感染性重组病毒载体所需的元件,但缺少重组病毒载体的细胞。这种包装细胞通常含有能表达引入载体的复制和包装所需蛋白质的一个或多个表达盒,例如就慢病毒载体而言,表达盒编码 Gag、pol 和 env 蛋白,就甲病毒载体而言,表达盒编码甲病毒结构蛋白。

“产生细胞”或“载体生产细胞”指含有产生重组病毒载体颗粒所需的所有元件的细胞。

将“自杀基因”(例如,药物敏感性基因)转移至靶细胞使得该细胞对相对正常细胞无毒的化合物或组合物敏感。Moolten, F.L. (1994) *Cancer Gene Ther.* 1:279-287。自杀基因的例子是单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶(HSV-tk)、细胞色素

P450(Manome 等, (1996) *Gene Therapy* 3:513-520)、人脱氧胞苷激酶(Manome 等, (1996) *Nature Medicine* 2(5):567-573)和细菌酶胞嘧啶脱氨酶(Dong 等, (1996) *Human Gene Therapy* 7:713-720)。表达这些基因的细胞被赋予对相对无毒前体药物的作用的敏感性, 所述物质有: 更昔洛韦(HSV-tk)、环磷酰胺(细胞色素 P450 2B1)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(人脱氧胞苷激酶)或 5-氟胞苷(细菌胞嘧啶脱氨酶)。Culver 等, (1992) *Science* 256:1550-1552; Huber 等, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8302-8306。

“选择标记”或“报道标记”指包含于基因转移载体中, 无治疗活性的核苷酸序列, 而是含有这些标记更便于制备、生产、鉴定或测试基因转移载体。

“特异性结合剂”指一对特异性结合分子的一员, 其中一个分子通过化学和/或物理方式特异地结合第二个分子。特异性结合剂的一个例子是直接抗选择的抗原的抗体。

“对象”指脊索动物亚门的任一成员, 包括(不限于)人和其它灵长类, 包括非人灵长类, 如狒狒、恒河猴、黑猩猩和其它猿类和猴类; 农畜, 如牛、绵羊、猪、山羊和马; 家养哺乳动物, 如狗和猫; 实验室动物, 如小鼠、大鼠、兔和豚鼠; 鸟, 包括家养、野生和狩猎野禽, 如鸡、火鸡和其它家禽, 鸭、鹅等。该术语不指明具体的年龄。所以, 包括了成年的和新生的个体。由于所有这些脊椎动物的免疫系统相似地操作, 上述系统可用于以上任一种脊椎动物种类。

“亚型”指基于遗传水平(即, 核酸序列)的相似性将类似的生物体系统发生分类成组。这种组称为“亚型”。在 HIV 领域中, 洛斯阿拉莫斯国家实验室是确定具体病毒分离物的这种类似性和分类成亚型的著名且广为接受的中心组织。本文所指的 HIV 亚型由洛斯阿拉莫斯国家实验室确定。(参见, 例如 Myers 等, 洛斯阿拉莫斯数据库, 洛斯阿拉莫斯国家实验室, 洛斯阿拉莫斯, 新墨西哥; Myers 等, “人逆转录病毒与艾滋病”(Human Retroviruses and Aids), 1990, 洛斯阿拉莫斯, 新墨西哥: 洛斯阿拉莫斯国家实验室)。一种亚型也可称为一种“进化支”。术语“亚型”包括目前鉴定的亚型以及循环重组形式(CRF)。不断鉴定到 HIV 亚型(包括 CRF), 可以在从互联网上获得的洛斯阿拉莫斯国家实验室的 HIV 数据库中发现它们。因此, 亚型包括亚型 A(如 A1、A2)、B、C、D、F(如 F1、F2)、G、H、J 和 K、以及各种 CRF。



“血清型”指基于抗体交叉反应性的类似生物体的分类。

“株系”指基于核酸序列的差异来自该亚型中但分化自同一亚型的其它成员的生物体。

“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”指非生物的或其它不理想的材料，即材料可以制剂或组合物给予个体而不会导致任何不理想的生物学效应或以有害的方式与该组合物所含的任何组分相互作用。

“生理 pH”或“生理范围内的 pH”指约 7.0-8.0 范围的 pH(包括端点)，更常见的是约 7.2-7.6 的范围(包括端点)。

本文使用的“治疗”指以下任一种情况：(i)以常规疫苗的形式来预防感染或再次感染，(ii)缓解或消除症状，或(iii)基本上或完全消除可疑的病原体。治疗可是预防性(感染前)或治疗性(感染后)地施行。

“共同给药”指给予多种组合物、组合物的组分或分子。因此，共同给药包括经同一或不同给药途径同时给予或依次给予。共同给药方案的非限制性例子包括核酸和多肽的共同给药；不同核酸的共同给药(例如，本文所述的不同表达盒和/或不同的基于递送载体)；和不同多肽的共同给药(例如，不同 HIV 多肽和/或不同的佐剂)。该术语也包括共同给予的分子或组合物中的一种的多次给药(例如，多次给予一种或多种本文所述的表达盒，然后一次或多次给予含有多肽的组合物)。当分子或组合物依次递送时，本领域的技术人员根据本文的指导可容易地确定每次给药之间的时间。

该组合物可给予一次以上(如“初敏”给药，然后是一次或多次“加强”)，以达到所需效果。可作为初敏或一次或多次加强剂量给予同一组合物。或者，可将不同组合物用于初敏和加强。例如，在某些实施方式中，给予多次多肽组合物的免疫(初敏和/或加强)。

“T 淋巴细胞”或“T 细胞”是不产生抗体的淋巴细胞，该细胞构成免疫系统的细胞介导臂的一部分。T 细胞来源于从骨髓迁移至胸腺的不成熟的淋巴细胞，在那里该不成熟的淋巴细胞在胸腺激素的引导下经历成熟过程。成熟的淋巴细胞在胸腺中快速大量分裂。基于其识别和结合特异性抗原的能力，成熟的 T 细胞成为免疫活性的。但抗原与淋巴细胞表面受体结合时触发免疫活性 T 细胞的激活。

### 2.0.0 实施本发明的方式

在详细描述本发明之前，应该理解的是本发明不受具体制剂或方法参数的限制，

因为这些参数当然是可变的。也应该理解的是，本文使用的术语仅是出于说明本发明的具体实施方式并非限制性的。

虽然许多类似的或等价于本文所述的方法和材料可用于实践本发明，但本文所述的方法和材料最佳。

### 2.1.0 发明概述

本发明涉及使用包含免疫原性多核苷酸和多肽的组合物在对象中产生免疫应答的组合方法。

在本发明一个总的方面，用两种或多种基因递送载体在对象中产生免疫应答，各载体包含编码衍生自微生物(如病毒、细菌、真菌等)的相同或类似的免疫原性多肽的一种多核苷酸或由其组成。该基因递送载体可以是病毒或非病毒载体。在一些实施方式中，基因递送载体是腺病毒或 $\alpha$ 病毒载体。

一种或多种基因递送载体可包含其它额外元件，如免疫增强子、免疫调节组分、运载体、颗粒、赋形剂、表达控制序列等。此外，一种或多种基因递送载体可包含其它组分，如增强免疫应答的分子(如脂质体、PLG、颗粒、明矾等)。

任选地，该方法也包括给予包含与一种或多种基因递送载体编码的多肽相同或类似的一种或多种免疫原性多肽的多肽组分。此外，一种或多种多肽组分可包含其它组分，如免疫增强子、免疫调节组分、佐剂、运载体、颗粒、赋形剂等。

在本发明的第二个总的方面，一种或多种基因递送组分包含两种或多种多核苷酸序列，所述多核苷酸序列包含衍生自微生物(如病毒、细菌、真菌等)的两种或多种相同或类似的免疫原性多肽的编码序列，其中至少两种免疫原性多肽的编码序列衍生自该微生物的不同亚型、血清型或株系。

在这些方面，任选的多肽组分可包含一种或多种免疫原性多肽，所述多肽与编码两种或多种相同或类似的免疫原性多肽的基因递送载体编码的多肽相同或类似。多肽组分可提供免疫原性多肽的数量与一种或两种基因递送载体编码的相同或类似的免疫原性多肽相比更小、更大或相同。而且，多肽组合物的免疫原性多肽可衍生自相同和/或不同亚型、血清型或毒株，正如基因递送载体提供的免疫原性多肽。

本文所述基因递送载体可包含其它组分，如免疫增强子、免疫调节组分、运载体、颗粒、赋形剂、表达控制序列等。此外，基因递送载体可包含其它组分如增强免疫应答的分子(如脂质体、PLG、颗粒、明矾等)。此外，多肽组分可包含其它组分，

如免疫增强子、免疫调节组分、佐剂、运载体、颗粒、赋形剂等。

本文参考人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)来举例说明本发明。根据说明书的指导,本领域的普通技术人员可将本发明的指导应用于其它合适的生物体,例如微生物。例如,本发明的组合物和方法可利用编码 HIV 包膜多肽的多核苷酸以及 HIV 包膜多肽(如与该多核苷酸编码蛋白相同或类似的 HIV 包膜蛋白)来诱导广泛和/或强烈的抗各种 HIV 毒株的中和活性。虽然参考 HIV 病毒进行了描述,本发明的组合物和方法可应用于具有各种亚型、血清型和/或毒株变异的其它病毒科,例如包括(但不限于)其它非-HIV 逆转录病毒(如 HTLV-1,2)、嗜肝 DNA 病毒(如 HBV)、疱疹病毒(如 HSV-1、2、CMV、EBV、水痘带状疱疹病毒等)、黄病毒(如 HCV、黄热、蜱传性脑炎、圣路易斯脑炎、西尼罗河病毒等)、冠状病毒(如 SARS)、副粘病毒(如 PIV、RSV、麻疹病毒等)、流感病毒、细小 RNA 病毒、呼肠孤病毒(如轮状病毒)、沙粒病毒、弹状病毒、乳多空病毒、细小病毒、腺病毒、等革热病毒、布尼亚病毒(如汉坦病毒)、杯状病毒(如诺沃克病毒)、丝状病毒(如埃博拉病毒、马尔堡病毒)。

HIV 病毒的多样性和可突变性是对 HIV 疫苗开发的挑战。HIV 持续在全球蔓延,高达 4 千 2 百万的人受 HIV 感染(“UNAIDS 有关全球 HIV/AIDS 流行的报道”(UNAIDS Report on the global HIV/AIDS epidemic), UNAIDS, 日内瓦, 瑞士(2002 年 12 月))。这些人受到不同的 HIV 亚型(和/或毒株)感染。感染性 HIV 亚型(和/或毒株)通常是地域依赖性的。本发明一方面涉及提供能诱导广泛且强烈的抗各种 HIV 亚型、血清型和/或毒株的中和抗体来治疗感染、降低感染风险、减少传播、减少疾病的表现和/或预防不同地区出现的 HIV 感染的组合物和方法。

本文所述方法可诱导强烈而广泛的 HIV 中和活性。这些方法包括联合用各种编码来源于不同亚型、血清型或毒株的 HIV 多肽的多核苷酸来免疫和用来源于不同亚型、血清型或毒株的 HIV 多肽来免疫。本发明还包括用这种多核苷酸和多肽的各种剂量和免疫方案来免疫。

因此,在本发明第一个方面,本发明一种或多种基因递送载体(如  $\alpha$  病毒或腺病毒基因递送载体)各自包含编码相同或类似的 HIV 免疫原性多肽的一种多核苷酸和必需的载体序列或由其组成。任选的多肽组分由与所述多核苷酸组分编码的一种或多种多肽相同或类似的一种或多种 HIV 免疫原性多肽组成。在一个实施方式中,与该多核苷酸组分编码的至少一种免疫原性多肽的编码序列相比,多肽组分中至少一种 HIV 免疫原性多肽衍生自不同的 HIV 亚型、血清型或毒株。在此内容中,基本由...组成指多核苷酸组合物中存在编码一种 HIV 免疫原性多肽的一种多核苷酸序列。

在优选实施方式中，两种或多种基因递送载体的多核苷酸编码的 HIV 免疫原性多肽相同或类似。例如，在本发明的一个实施方式中，至少一种多核苷酸组分编码的 HIV 免疫原性多肽衍生自亚型 B，至少一种其它多核苷酸组分编码的 HIV 免疫原性多肽衍生自亚型 C。同样，存在时，任选多肽组分可衍生自任何亚型、毒株或分离物(如亚型 B、亚型 C 或其它亚型)。

本文也描述了在哺乳动物中产生免疫应答的方法，该方法包括：给予哺乳动物第一和第二基因递送载体，各基因递送载体包含编码 HIV 免疫原性多肽的多核苷酸。在某些实施方式中，第一和第二基因递送载体不同，例如  $\alpha$  病毒载体和腺病毒(复制型或非复制型)载体。可同时或依次给予基因递送载体。第一和第二基因递送载体可编码相同 HIV 亚型、毒株或血清型的 HIV 免疫原性多肽，或者，可编码衍生自不同 HIV 亚型、血清型或毒株的 HIV 多肽。此外，第一和第二基因递送载体可编码相同或类似的 HIV 多肽。在本发明的一个实施方式中，与第二基因递送载体的序列相比，第一基因递送载体的类似 HIV 免疫原性多肽编码序列可衍生自 HIV 的不同亚型。在另一实施方式中，第一和第二基因递送载体的多核苷酸编码的类似 HIV 多肽可衍生自相同 HIV 亚型的不同 HIV 毒株。

可同时或依次给予本文所述基因递送载体。例如，依次给予可以是初次给予和加强给予，即通过递送多核苷酸用包含编码免疫原性 HIV 多肽的多核苷酸的第一基因递送载体免疫(如初敏)，用不同于第一基因递送载体的第二基因递送载体免疫，其中相同或类似的免疫原性 HIV 多肽衍生自相同或不同的 HIV 亚型、血清型或毒株(如加强免疫)。

本领域描述了各种初敏-加强方案，它们是本领域普通技术人员熟知的。在典型的初敏-加强方案中，将提供多肽免疫原的第一组分(如编码 HIV 免疫原性多肽的第一基因递送载体)给予对象；测定所述对象的初始免疫应答(如通过测定体液免疫应答中编码免疫原的结合抗体的产生)，直到结合抗体的效价开始下降；将提供第二相关多肽免疫原的第二组分(如编码相同或类似的 HIV 免疫原性多肽的第二基因递送载体)给予对象。在优选实施方式中，初敏基因递送载体是复制型腺病毒载体、非复制型腺病毒载体或非复制型  $\alpha$  病毒载体，加强基因递送载体是非复制型腺病毒或非复制型  $\alpha$  病毒载体。

例如，第一基因递送载体可用于初次核酸免疫，其中第一基因递送载体的第一多核苷酸分子编码 HIV gp140 包膜多肽，该包膜多肽(i)衍生自南非 HIV 亚型 C 分离物/毒株，(ii)为了在哺乳动物细胞中表达进行过密码子优化，和(iii)通过缺失 V2 环突

变(如 gp140mod.TV1.delV2, 如 PCT 国际公开号 WO/02/04493 所述)。给予第一基因递送载体后, 给予至少一种第二(加强)基因递送载体, 所述第二基因递送载体包含编码 HIV gp140 包膜多肽的多核苷酸, 可以或可以不包含第一多核苷酸中所含突变(如编码 gp140.mut7.modSF162.delV2 的多核苷酸, 如 PCT 国际公开号 WO/00/39302 所述)和相同或不同毒株的不同(非-gp140 Env 多肽)多肽, 如 HIV Gag、Pol、RT、Tat、Rev 和/或 Nef 多肽。可采用包膜多肽的寡聚形式(如 o-gp140, 如 PCT 国际公开号 WO/00/39302 和美国专利号 6,602,705 所述)。

此外, 一次初敏后, 可进行多次加强免疫, 多次初敏后可进行一次加强免疫, 多次初敏后可进行多次加强免疫, 或者可采用一系列初敏和加强免疫。

在又一实施方式中, 用本文所述方法广泛产生抵抗采用 CCR5 共同受体进入细胞的病毒毒株的中和抗体。例如, 在哺乳动物中产生中和抗体的组合物可包含第一基因递送载体和第二基因递送载体, 第一基因递送载体包含编码衍生自采用 CCR5 共同受体进入细胞的 HIV 毒株的 HIV 免疫原性多肽的一种多核苷酸, 或由其组成, 第二基因递送载体编码衍生自采用 CCR5 共同受体进入细胞的 HIV 毒株的一种或多种 HIV 免疫原性多肽, 该多肽类似于所述第一基因递送载体编码的多肽。在某些实施方式中, 与第一基因递送载体相比, 第二基因递送载体编码的 HIV 免疫原性多肽衍生自不同 HIV 毒株。在其它实施方式中, 第二基因递送载体编码一种以上 HIV 免疫原性多肽, 其中多肽编码序列衍生自采用 CCR5 共同受体进入细胞的一种以上 HIV 毒株。

也可给予其它基因递送载体, 例如, 包含编码不同亚型的类似 HIV 多肽的多核苷酸的一种或多种基因递送载体。例如, 可同时或依次给予三种基因递送载体, 其中所述基因递送载体编码三种免疫原性 HIV 多肽, 一种编码序列衍生自亚型 B 毒株, 一种编码序列衍生自亚型 C 毒株, 一种编码序列衍生自亚型 E 毒株。任选的多肽组分可包含三种免疫原性 HIV 多肽, 一种编码序列衍生自亚型 B 毒株, 一种编码序列衍生自亚型 C 毒株, 一种编码序列衍生自亚型 O 毒株。

在本发明这个方面的另一实施方式中, 基因递送载体的多核苷酸包含编码不同亚型、血清型或毒株的类似 HIV 免疫原性多肽的多核苷酸, 正如多肽组分的多肽。例如, 用编码 HIV gp140 多肽的两种或多种 DNA 分子进行 DNA 免疫(其中两种或多种 gp140 编码序列衍生自两种或多种 HIV-1 亚型、血清型或毒株)。用于蛋白质免疫的任选多肽组分包含两种或多种 gp140 多肽(其中两种或多种 gp140 编码序列衍生自两种或多种 HIV-1 亚型、血清型或毒株, 限制条件是: 至少一种多肽序列衍生自 DNA

组分中不存在的 HIV-1 亚型、血清型或毒株)。

另一方面, 本发明涉及不同剂量的多核苷酸和任选多肽在初敏/加强方法, 具体是本文所述方法中的应用。在任何免疫方法中, 例如使用混合的多核苷酸初敏(即编码免疫原性 HIV 多肽的两种或多种多核苷酸衍生自两种或多种 HIV 亚型、血清型或毒株)结合多肽加强的方法, 本发明包括使用剂量降低的每种单一组分以提供与使用全剂量的每种组分相等的免疫应答。在一个实施方式中, DNA 的高阈值是 DNA 的最大可耐受剂量(如约 5-10mg 总 DNA), DNA 的低阈值是最低有效剂量(如约 2-10 $\mu$ g 的总 DNA), 蛋白质的高阈值是蛋白质的最大可耐受剂量(如约 1mg 总蛋白), 蛋白质的低阈值是最低有效剂量(如约 2 $\mu$ g 总蛋白)。而且, 总 DNA 剂量可在多核苷酸组分的多核苷酸中分配。此外, 总多肽剂量可在含有多肽组分的多肽中分配。总的 DNA 和总的蛋白质通常均高于低阈值。

在一个优选的实施方式中, 一给定的 DNA 免疫中 DNA 的总量具有小于或等于约 10mg 总 DNA 和大于或等于 1mg 总 DNA 的高阈值, 一给定的多肽加强免疫中蛋白质的总量具有小于或等于约 200 $\mu$ g 的总蛋白产物和大于或等于 10 $\mu$ g 的总蛋白的高阈值。例如, 当给予各自编码免疫原性 HIV 多肽的两种基因递送载体时, 每位对象的每种 DNA 分子的剂量可是: 就两种 DNA 分子的总量是 2mg 而言, 编码免疫原性 HIV 多肽的每种 DNA 分子是 1 毫克, 或者就两种 DNA 分子的总量是 1mg 而言, 编码免疫原性 HIV 多肽的每种 DNA 分子是 0.5 毫克。

使用任选多肽组分的剂量也可类似地变化, 例如, 使用具有两种免疫原性 HIV 多肽的多肽组分, 每位对象的每种多肽剂量可是: 就两种多肽的总量是 200 $\mu$ g 而言, 每种免疫原性 HIV 多肽是 100 微克, 就两种多肽的总量是 100 $\mu$ g 而言, 每种免疫原性 HIV 多肽是 50 微克, 或者就两种多肽的总量是 50 $\mu$ g 而言, 每种免疫原性 HIV 多肽是 25 微克。如上所述, 两种以上的多肽可包含于本发明的多肽组分中。

基因递送载体中包含的示范性多核苷酸、制备这些多核苷酸和构建物的方法、相应的多肽产物、和制造用于 HIV 免疫的多肽的方法以前已描述于, 例如以下 PCT 国际公开号: WO/00/39302、WO/00/39303、WO/00/39304、WO/02/04493、WO/03/004657、WO/03/004620 和 WO/03/020876。

虽然参考亚型 B 和 C HIV 作为示范性亚型进行了总体的描述, 本发明的组合物和方法可应用于各种 HIV 亚型、血清型或毒株和藉此编码的免疫原性多肽, 包括(但不限于)以前已鉴定的亚型 A-K、N 和 O 的 HIV-1、已鉴定的 CRF(循环重组形式)和 HIV-2 毒株及其亚型。参见, 例如, Myers 等, 洛斯阿拉莫斯数据库, 洛斯阿拉莫斯

国家实验室，洛斯阿拉莫斯，新墨西哥；Myers等，“人逆转录病毒和艾滋病”(Human Retroviruses and Aids)，1990，洛斯阿拉莫斯，新墨西哥：洛斯阿拉莫斯国家实验室。此外，本发明的组合物和方法可用于产生抗使用 CCR5 共同受体进入细胞的病毒毒株和亚型的广泛反应性的中和抗体(例如，TV1 和 SF162 均使用 CCR5 共同受体)。

本发明的任选多肽组分可含有免疫原性多肽的片段，例如其中多肽序列或其部分含有核酸序列编码的多肽的至少 3-5 个氨基酸的氨基酸序列，更优选至少 8-10 个氨基酸，甚至更优选至少 15-20 个氨基酸。还包含由该序列编码的多肽免疫鉴定的多肽序列。此外，可通过框内融合编码多肽或肽产物的两种或多种多核苷酸序列构建多蛋白。

此外，本发明基因递送组分的多核苷酸可包含一个或多个含有编码免疫原性 HIV 多肽的多核苷酸的单顺反子表达盒，或一个或多个含有编码免疫原性 HIV 多肽的多核苷酸的多顺反子表达盒或其组合。多顺反子编码序列一般在一个启动子的控制下通过，例如两条或多条编码相互毗连的多肽产物的多核苷酸序列产生，其中可修饰每条多肽编码序列以包括内部核糖体结合位点的序列。

编码免疫原性多肽(例如，HIV 免疫原性多肽)的多核苷酸和免疫原性多肽或其片段(例如，HIV 免疫原性多肽)的各种组合可用于实践本发明。编码免疫原性多肽的多核苷酸序列可包含在本发明组合物的多核苷酸组分中，例如作为含有如下成分的 DNA 免疫构建物：合成的 Env 表达盒、合成的 Gag 表达盒、合成的 pol-衍生的多肽表达盒、含有编码一种或多种附加或调节基因(例如，tat、rev、nef、vif、vpu、vpr)的合成表达盒。本发明组合物的多肽组分中可含有作为纯化的多肽的免疫原性多肽。

免疫原性多肽可是合成或野生型的。在优选的实施方式中，免疫原性多肽是抗原性病毒蛋白或其片段。

### 2.2.0 鉴定类似的多肽和编码这种多肽的多核苷酸

参考示范性 HIV-1 序列描述本发明的组合物和方法。本发明不限于本文所述的序列。以前描述了用于实践本发明的许多序列(参见，例如，PCT 国际公开号 WO/00/39302、WO100/39303、WO/00/39304、WO/02/04493、WO/03/004657、WO/03/004620 和 WO/03/020876)。用于实践本发明的多核苷酸序列通常编码来自病毒来源(例如，HIV-1)的多肽。多肽通常来源于抗原性病毒蛋白，特别是，群特异性抗原多肽、包膜多肽、衣壳多肽和其它结构性和非结构性多肽。特别参考包

膜多肽和其修饰物(和编码该多肽的多核苷酸)描述了本发明, 所述多肽来源于 HIV-1 病毒的不同亚型、血清型或毒株。其它 HIV-1 多肽和编码这种多肽的多核苷酸可用于实践本发明, 包括(但不限于)Gag、Pol(包括蛋白酶、逆转录酶和整合酶)、Tat、Rev、Nef、Vif、Vpr 和 Vpu。

HIV 基因组和各种多肽编码区域示于表 1。相对于南非毒株 8\_5\_TV1\_C.ZA 的亚型 C HIV-1 分离物给出核苷酸位置。然而, 根据本文的指导, 本领域的普通技术人员可容易地理解如何确定其它 HIV 毒株(来自相同或不同的亚型)或变体(例如, 分离物 HIV<sub>IIIb</sub>、HIV<sub>SF2</sub>、HIV-1<sub>SF162</sub>、HIV-1<sub>SF170</sub>、HIV<sub>LAV</sub>、HIV<sub>LAI</sub>、HIV<sub>MN</sub>、HIV-1<sub>CM235</sub>、HIV-1<sub>US4</sub>)、来自不同亚型的其它 HIV-1 毒株(例如, 亚型 A-K、N 和 O)、已鉴定的 CRF(循环重组形式)、HIV-2 毒株和各种亚型和毒株(例如, HIV-2<sub>UC1</sub> 和 HIV-2<sub>UC2</sub>)、和猿免疫缺陷病毒(SIV)中的相应区域。参见, 例如, 《病毒学》(Virology), 第三版, (W.K.Joldik 编, 1988); 《基础病毒学》(Fundamental Virology), 第二版(B.N.Fields 和 D.M.Knipe 编, 1991); 《病毒学》(Virology), 第三版, (Fields, BN, DM Knipe, PM Howley 编, 1996, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA; 为描述这些和其它相关的病毒, 例如使用序列比较程序(如 BLAST 和其它本文所述的程序)或鉴定和对比结构特征的程序(例如, 本文所述可鉴定各种区域的“ALB”程序)。

表 1

相对于 8\_5\_TV1\_C.ZA 的序列的 HIV 基因组的区域

区域	核苷酸序列中的位置
<b>5'LTR</b>	<b>1-636</b>
U3	1-457
R	458-553
U5	554-636
NFkB II	340-348
NFkB I	354-362
Sp1 III	379-388
Sp1 II	390-398
Sp1 I	400-410
TATA 盒	429-433
TAR	474-499
Poly A 信号	529-534
<b>PBS</b>	<b>638-655</b>
<b>p7 结合区域, 包装信号</b>	<b>685-791</b>
<b>Gag:</b>	<b>792-2285</b>
p17	792-1178



p24	1179-1871
亲环蛋白 A bdg	1395-1505
MHR	1632-1694
p2	1872-1907
p7	1908-2072
移码滑动	2072-2078
p1	2073-2120
p6Gag	2121-2285
Zn-基序 I	1950-1991
Zn-基序 II	2013-2054
<b>Pol:</b>	<b>2072-5086</b>
p6Pol	2072-2245
Prot	2246-2542
p66RT	2543-4210
p15RNA 酶 H	3857-4210
p31Int	4211-5086
<b>Vif:</b>	<b>5034-5612</b>
亲水区域	5292-5315
<b>Vpr:</b>	<b>5552-5839</b>
寡聚化	5552-5677
两性 $\alpha$ -螺旋	5597-5653
<b>Tat:</b>	<b>5823-6038 和 8417-8509</b>
Tat-1 外显子	5823-6038
Tat-2 外显子	8417-8509
N-末端结构域	5823-5885
反式激活域	5886-5933
转导结构域	5961-5993
<b>Rev:</b>	<b>5962-6037 和 8416-8663</b>
Rev-1 外显子	5962-6037
Rev-2 外显子	8416-8663
高亲和力 bdg.位点	8439-8486
富含 Leu 的效应子结构域	8562-8588
<b>Vpu:</b>	<b>6060-6326</b>
跨膜结构域	6060-6161
胞质结构域	6162-6326
<b>Env(gp160)</b>	<b>6244-8853</b>

信号肽	6244-6324
gp120	6325-7794
V1	6628-6729
V2	6727-6852
V3	7150-7254
V4	7411-7506
V5	7663-7674
C1	6325-6627
C2	6853-7149
C3	7255-7410
C4	7507-7662
C5	7675-7794
CD4 结合	7540-7566
gp41	7795-8853
融合肽	7789-7842
寡聚化结构域	7924-7959
N-末端七残基重复序列	7921-8028
C-末端七残基重复序列	8173-8280
免疫优势区域	8023-8076
<b>Nef:</b>	<b>8855-9478</b>
豆蔻酰化	8858-8875
SH3 结合	9062-9091
聚嘌呤段	9128-9154
SH3 结合	9296-9307

易于理解的是，本领域的技术人员可对比表 1 所示的任何 HIV 序列来确定任何特定 HIV 基因的相对位置。例如，使用本文所述的对比程序之一(例如，BLAST)来对比其它 HIV 基因组序列与 8\_5\_TV1\_C.ZA(表 1)并确定基因的位置。可类似地对比多肽序列。如国际公开号中所详述的，Env 多肽(例如，gp120、gp140 和 gp160)含有“桥连片层”，该桥连片层由 4 条形成  $\beta$  片层的反平行  $\beta$  链( $\beta$ -2、 $\beta$ -3、 $\beta$ -20 和  $\beta$ -21)组成。两个环，V1 和 V2 从一对  $\beta$ -链( $\beta$ -2 和  $\beta$ -3)中伸出。相对于 SF-162， $\beta$ -2 片层出现于约氨基酸残基 113(Cys)-氨基酸残基 117(Thr)，而  $\beta$ -3 片层出现于约氨基酸残基 192(Ser)-氨基酸残基 194(Ile)，相比于 SF-162。“V1/V2”区域出现于约氨基酸位置 120(Cys)-残基 189(Cys)，相比于 SF-162。“小环”结构从第二对  $\beta$ -链( $\beta$ -20 和  $\beta$ -21)中伸出，本文也将该结构称为“桥连片层小环”。按照本文的指导和 PCT 国际公开号 WO/00/39303 所述，小环和桥连片层小环的位置可对应于 HXB-2 确定。

### 2.3.0 含有多核苷酸序列、载体、多肽、其它组分的表达盒与用于实践本发明的制剂

用于产生免疫应答的本发明组合物至少含有第一和第二基因递送载体，各基因递送载体包含编码免疫原性病毒多肽的多核苷酸。这种多核苷酸可含有编码免疫原性病毒多肽的天然病毒序列或编码免疫原性多肽的合成多核苷酸。相比于天然的类似多核苷酸序列，为提高编码的多肽表达，合成的多核苷酸可含有优化序列。此外，相比于对应的野生型序列，合成的多核苷酸可含有突变(单点和多点突变、错义突变、无义突变、缺失、插入等)。

本发明组合物的任选多肽组分可含有一种或多种免疫原性病毒多肽。这种多肽可含有天然免疫原性病毒多肽或修饰的免疫原性多肽。相比于类似的天然多核苷酸序列，为提高多肽表达，修饰的多肽可含有优化序列。此外，相比于对应的野生型序列，修饰的多肽可含有突变(单点和多点突变、错义突变、无义突变、缺失、插入等)。

参考 HIV-1 衍生的序列描述了本发明组合物。然而，本发明的组合物和方法也可应用于其它类型的病毒，其中这种病毒具有多种亚型、血清型和/或毒株变异，例如包括(但不限于)其它非-HIV 逆转录病毒(如 HTLV-1,2)、嗜肝 DNA 病毒(如 HBV)、疱疹病毒(如 HSV-1、2、CMV、EBV、水痘带状疱疹病毒等)、黄病毒(如 HCV、黄热、蜱传性脑炎、圣路易斯脑炎、西尼罗河病毒等)、冠状病毒(如 SARS)、副粘病毒(如 PIV、RSV、麻疹病毒等)、流感病毒、细小 RNA 病毒、呼肠孤病毒(如轮状病毒)、沙粒病毒、弹状病毒、乳多空病毒、细小病毒、腺病毒、等革热病毒、布尼亚病毒(如汉坦病毒)、杯状病毒(如诺沃克病毒)、丝状病毒(如埃博拉病毒、马尔堡病毒)。

#### 2.3.1 修饰多核苷酸编码序列

相比于对应的天然野生型序列，可修饰 HIV-1 编码序列及相关序列提高其在靶细胞中表达。以下是一些可对这种序列作出的示范性修饰。

首先，可修饰 HIV-1 密码子使用模式从而使得到的核酸编码序列与在高度表达的人基因中发现的密码子使用相差不大。HIV 密码子使用反映了密码子-三联体的核苷酸 A 或 T 的含量高。HIV-1 密码子使用的效果是 DNA 序列中的 AT 含量高，这导致 mRNA 的翻译能力降低和不稳定性。比较起来，高度表达的人密码子优选核苷酸 G 或 C。可修饰 HIV 编码序列使之与在高度表达的人基因中发现的密码子使用相差

不大。

第二，抑制性(或不稳定)元件(INS)位于编码序列，例如 Gag 编码序列中。RRE 是与 HIV 编码的 Rev 蛋白相互作用以克服 INS 的表达下调作用的二极 RNA 结构。为克服 RRE 和 Rev 的转录后激活机理，可通过引入多个不改变编码的蛋白质的读码框的点突变来失活不稳定元件。

第三，就一些基因而言，改变编码序列使得多核苷酸编码序列编码失活的或非功能性的基因产物(例如，失活的聚合酶、蛋白酶、tat、rev、nef、vif、vpr 和/或 vpu 基因产物)。实施例 1 描述了一些示范性的突变。

按照本说明书的指导，通过本领域已知的方法，例如由 Midland Certified Reagent Company(Midland, Texas)等公司来装配合成的编码序列。

例如，PCT 公开号 WO/00/39303、WO/00/39302、WO00/39304、WO/02/04493、WO/03/020876、WO/03/004620 和 WO/03/004657 描述了一些用于本发明方法中的示范性编码免疫原性 HIV 多肽的合成多核苷酸序列及其所编码的多肽。

在一优选的实施方式中，本发明涉及编码 Env 多肽的多核苷酸及相应的 Env 多肽。例如，可修饰 Env 的密码子使用模式从而使得到的核酸编码序列与在高度表达的人基因中发现的密码子使用相差不大。这种合成的 Env 序列能产生蛋白质的水平高于天然 Env 序列(参见，例如 PCT 国际公开号 WO/00/39302)。与野生型编码序列相比，修饰 Env 多肽编码序列提高了在许多哺乳动物细胞系(以及其它类型的细胞系，包括，但不限于昆虫细胞)中的表达。可获得相似的 Env 多肽编码序列，修饰和测试一提高来自多种分离物的表达。

Env 的其它修饰包括(但不限于)产生编码其中具有突变和/或缺失的 Env 多肽的多核苷酸。例如，可删除本文所述的高变区，V1 和/或 V2。此外，可修饰或删除可变区 V3、V4 和/或 V5。(参见，例如美国专利 6,602,705)此外，例如也可按照本说明书的指导对 Env 内的桥连片层区域和/或 N-糖基化位点进行其它修饰。(参见，图 2A-2E 以及 PCT 国际公开号 WO/00/39303、WO/00/39302、WO00/39304、WO/02/04493、WO/03/020876 和 WO/03/004620)。其它有用的 env 修饰是熟知的并且包括以下文献所述：Schulke 等，(J.Virol. 2002 76:7760)，Yang 等，2002，(J.Virol. 2002 76:4634)，Yang 等，2001 (J.Virol. 2001 75:1165)，Shu 等，(Biochem. 1999 38:5378)，Farzan 等，(J.Virol. 1998 72:7620)和 Xiang 等，(J.Virol. 2002 76:9888)。

这些修饰的各种组合可用于产生合成的表达盒与本文所述相应的多肽。

本发明也包括含有来源于除 Env 以外 HIV 基因的合成序列的表达盒,包括(但不限于)Gag、Env、Pol 以及 tat、rev、nef、vif、vpr 和 vpu 内的区域。此外,本发明包括含有两种或多种抗原多肽的合成多核苷酸和/或表达盒(以及其编码的多肽)。例如,这种序列可全部使用,或者可按照本说明书的指导和本领域已知的信息从合成的编码序列中选择编码特定表位或抗原的序列。例如,多核苷酸编码的多肽序列可经计算机分析来预计全长序列中的抗原肽片段。然后,相应的多核苷酸编码片段可用于本发明的构建物。用于这种分析的示范性算法包括(但不限于):

AMPHI.该算法已用于预计 T-细胞表位(Gao 等, (1989) *J.Immunol.* **143**:3007; Roberts 等, (1996) *AIDS Res Hum Retrovir* **12**:593; Quakyi 等, (1992) *Scand J Immunol* 增刊 **11**:9)。DNASTAR, Inc. (Madison, WI, USA)的 Protean 软件包中的 AMPHI 算法是可用的。

抗原性指数(ANTIGENIC INDEX).该算法用于预计抗原性决定簇(Jameson 与 Wolf, (1998) *CABIOS* **4**:181:186; Sherman, KE 等, *Hepatology* 1996 年 4 月, **23**(4):688-94; Kasturi, KN 等, *J Exp Med* 1995 年 3 月 1 日, **181**(3):1027-36; van Kampen V 等, *Mol Immunol* 1994 年 10 月, **31**(15):1133-40; Ferroni P 等, *J Clin Microbiol* 1993 年 6 月, **31**(6):1586-91; Beattie J 等, *Eur J Biochem* 1992 年 11 月 15 日, **210**(1):59-66; Jones GL 等, *Mol Biochem Parasitol* 1991 年 9 月, **48**(1):1-9)。

亲水性(HYDROPHILICITY).一种 Hopp 和 Woods (1981) (*PNAS USA* **78**:3824-3828)公布的用于确定氨基酸序列的抗原决定簇的算法。

以上列举的算法可使用默认参数来确定抗原位点。此外,可结合两种或多种以上分析的结果来鉴定特别优选的片段。

### 2.3.2 多核苷酸序列及其编码的多肽的进一步修饰

本文所述免疫原性病毒的编码多肽的表达盒也可含有一种或多种其它编码序列,例如一种或多种转基因。在本发明的一个实施方式中,多核苷酸组分可含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽的编码序列。此外,多肽组分可含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽。

在本发明另一个实施方式中,多核苷酸组分可含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽的编码序列,其中该多核苷酸组分还含有编码其它抗原性多肽的序列,前提是所

述其它的抗原性多肽不是来源于 HIV-1 毒株的免疫原性多肽。此外，多肽组分可含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽，其中该多肽组分还含有其它抗原性多肽，前提是所述其它的抗原性多肽不是来源于 HIV-1 毒株的免疫原性多肽。

用于实践本发明的其它序列(例如，转基因)包括，但不限于编码以下物质的其它序列：病毒表位/抗原(包括但不限于 HCV 抗原(例如，E1, E2; Houghton, M 等，1998 年 2 月 3 日颁发的美国专利号 5,714,596; Houghton, M 等，1998 年 1 月 27 日颁发的美国专利号 5,712,088; Houghton, M 等，1997 年 11 月 4 日颁发的美国专利号 5,683,864; Weiner, A.J.等，1998 年 3 月 17 日颁发的美国专利号 5,728,520; Weiner, A.J.等，1998 年 6 月 16 日颁发的美国专利号 5,766, 845; Weiner, A.J.等，1997 年 9 月 23 日颁发的美国专利号 5,670,152)、HIV 抗原(例如，来源于一种或多种 HIV 分离物); 和编码肿瘤抗原/表位的序列。其它序列也可来源于非病毒来源，例如编码以下细胞因子的序列，如白介素-2(IL-2)、干细胞因子(SCF)、白介素-3(IL-3)、白介素-6(IL-6)、白介素-12(IL-12)、G-CSF、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、白介素-11(IL-11)、MIP-1、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞抑制因子(LIF)、c-kit 配体、血小板生成素(TPO)和 flt3 配体，这些序列可购自几个厂家，如 Genzyme(Framingham, MA)、Genentech(South San Francisco, CA)、Amgen(Thousand Oaks, CA)、R&D Systems and Immunex(Seattle, WA)。其它序列描述于下文。

HIV 多肽编码序列可获得自其它 HIV 分离物，参见，例如 Myers 等，洛斯阿拉莫斯数据库，洛斯阿拉莫斯国家实验室，洛斯阿拉莫斯，新墨西哥，(1992); Myers 等，“人逆转录病毒和艾滋病”(Human Retroviruses and Aids), 1997, 洛斯阿拉莫斯，新墨西哥：洛斯阿拉莫斯国家实验室。可按照本说明书的指导用这种编码序列作为起始材料来产生合成的表达盒。

此外，本发明的合成表达盒包含与本文所述合成表达盒序列编码的多肽具有大于 85%、优选大于 90%、更优选大于 95%、最优选大于 98%序列同一性的相关多肽序列。

示范性表达盒与修饰见实施例 1 并在下文进一步讨论。

此外，本发明的多核苷酸可含有其它聚合物骨架结构，例如(但不限于)聚乙烯骨架(Pitha, Biochem Biophys Acta, 204:39, 1970a; Pitha, Biopolymers, 9:965,

1970b)和吗啉代骨架(Summerton, J 等, 08/25/92 颁发的美国专利号 5,142,047; Summerton, J 等, 02/09/93 颁发的美国专利号 5,185,444)。报道了各种其它荷电与未荷电的多核苷酸类似物。本领域已知许多骨架修饰, 包括(但不限于)未荷电的键(例如, 磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酸酰胺化物和氨基甲酸酯)与荷电的键(例如, 硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯)。

### 2.3.3 与编码免疫原性多肽的多核苷酸序列一起使用的示范性克隆载体和系统

用于本发明的基因递送载体组合物和方法的多核苷酸序列可使用重组技术获得, 例如通过从表达基因的细胞中筛选 cDNA 文库和基因组文库或通过从已知含有该基因的载体中取得。此外, 可使用标准技术, 例如苯酚提取和 cDNA 或基因组 DNA 的 PCR 从含有基因的细胞和组织中直接分离所需基因。为描述用于获得和分离 DNA 的技术可参见, 例如 Sambrook 等, 同上。除了克隆, 感兴趣的基因也可合成产生。可用特定的所需氨基酸序列的合适密码子来设计核苷酸序列。一般可选择序列将在其中表达的宿主的优选密码子。完整的序列从用标准方法制备的重叠寡核苷酸装配并装配成完整的编码序列。参见, 例如 Edge, *Nature* (1981) 292:756; Nambair 等, *Science* (1984) 223:1299; Jay 等, *J Biol. Chem.* (1984) 259:6311; Stemmer, W.P.C., (1995) *Gene* 164:49-53。

然后, 编码所需抗原的基因序列可插入含有本发明的合成表达盒的载体中。在一个实施方式中, 编码选择的抗原的多核苷酸单独克隆入表达载体(例如, 第一 Env 编码多核苷酸克隆入第一载体, 第二类似的 Env 编码多核苷酸克隆入第二载体)。在某些实施方式中, 抗原插入或毗连合成的 Gag 编码序列, 从而使得当组合序列表达时可产生含有 Gag 肽和感兴趣抗原(例如来源于 HIV 的 Env(天然或修饰的)或其它抗原(天然或修饰的))的 VLP。可在编码序列内或编码序列的任一末端插入(5', 表达的 Gag 多肽的氨基末端; 或 3', 表达的 Gag 多肽的羧基末端)(Wagner, R.等, *Arch Virol.* 127:117-137, 1992; Wagner, R.等, *Virology* 200:162-175, 1994; Wu, X.等, *J Virol.* 69(6):3389-3398, 1995; Wang, C-T.等, *Virology* 200:524-534, 1994; Chazal, N.等, *Virology* 68(1):111-122, 1994; Griffiths, J.C.等, *J. Virol.* 67(6):3191-3198, 1993; Reicin, A.S.等, *J Virol.* 69(2):642-650, 1995)。可删除高达 50%的 p55Gag 编码序列而不影响病毒样颗粒的装配与表达效率(Borsetti, A.等, *J. Virol.* 72(11):9313-9317, 1998; Gamier, L.等, *J Virol* 72(6):4667-4677,

1998; Zhang, Y.等, *J Virol* **72(3)**:1782-1789, 1998; Wang, C.等, *J Virol* **72(10)**:7950-7959, 1998)。当在 Gag 的氨基末端加上序列时,多核苷酸可在 5'端含有编码用于给含有 Gag 的多肽加上肉豆蔻部分的信号的编码序列(例如,编码 Met-Gly 的序列)。

用于实践本发明的表达盒也可含有操作性连接于编码序列的控制元件,该控制元件允许基因在对象种类的体内表达。例如,典型的哺乳动物细胞表达的启动子包括 SV40 早期启动子、CMV 启动子,如 CMV 立即早期启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒 LTR 启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)和单纯疱疹病毒启动子等。其它非病毒启动子,例如来源于鼠金属硫蛋白基因的启动子也发现可用于哺乳动物表达。通常也存在位于翻译终止密码子的 3'的转录终止和聚腺苷酸化序列。也优选在位于编码序列的 5'存在用于优化翻译启动的序列。转录终止子/聚腺苷酸化信号的例子包括来源于如 Sambrook 等所述(同上)的 SV40 以及牛生长激素终止子序列。

本文也可使用增强子元件来增加哺乳动物构建物的表达水平。例子包括如 Dijkema 等, *EMBO J.* (1985) **4**:761 中所述 SV40 早期基因增强子,如 German 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1982b) **79**:6777 中所述来源于 Rous 肉瘤病毒的长末端重复(LTR)的增强子/启动子和如 Boshart 等, *Cell* (1985) **41**:521 中所述来源于人 CMV 的元件,如包含于 CMV 内含子 A 序列中的元件。

此外,可构建包含嵌合的抗原编码基因序列的质粒,所述序列编码,例如多种感兴趣的抗原/表位,如来源于多种病毒分离物。

抗原编码序列通常在合成的编码序列之前或之后,嵌合的转录单元具有单个编码感兴趣的抗原和合成编码序列的开放读框。或者,可构建允许使用 EMCV IRES 等表达单个 mRNA 的多种抗原的多个顺反子盒(例如,双-顺反子盒)。

在本发明的一个实施方式中,本文所述基因递送载体的多核苷酸可含有,例如以下物质:含有第一 Env 表达盒的第一表达载体,其中 Env 编码序列来源于第一 HIV 亚型、血清型或毒株,和含有第二 Env 表达盒的第二表达载体,其中 Env 编码序列来源于第二 HIV 亚型、血清型或毒株。含有本发明的编码序列的表达盒可以任何组合数量组合,这取决于待产生所需免疫应答的编码序列产物(例如 HIV 多肽)。在另一个实施方式中,多种 HIV 衍生多肽的合成的编码序列可构建入单个启动子控制下的多顺反子信息,其中 IRES 置于毗连每种编码多肽的编码序列。



用于本发明的示范性的感兴趣多核苷酸序列可来源于以下毒株，包括(但不限于)：亚型 B-SF162，亚型 C-TV1.8\_2(8\_2\_TV1\_C.ZA)，亚型 C-TV1.8\_5(8\_5\_TV1\_C.ZA)，亚型 C-TV2.12-5/1(12-5\_1\_TV2\_C.ZA)，亚型 C-MJ4，印度亚型 C-93IN101，亚型 A-Q2317，亚型 D-92UG001，亚型 E-cm235，肯尼亚的亚型 A HIV-1 分离物 Q23-17、GenBank 登录号 AF004885，乌克兰的亚型 A HIV-1 分离物 98UA0116、GenBank 登录号 AF413987，坦桑尼亚的亚型 A HIV-1 分离物 SE8538、GenBank 登录号 AF069669，亚型 A 人免疫缺陷病毒 1 原病毒 DNA 的完全基因组、克隆:pUG031-A1、GenBank 登录号 AB098330，亚型 D 人免疫缺陷病毒 1 型的完全原病毒基因组、毒株 92UG001、GenBank 登录号 AJ320484，乌干达的亚型 D HIV-1 分离物 94UG114、GenBank 登录号 U88824，亚型 D 人免疫缺陷病毒 1 型、分离物 ELI、GenBank 登录号 K03454 和印度亚型 C 人免疫缺陷病毒 1 型亚型 C 基因组 RNA、GenBank 登录号 AB023804。

用于本发明的多核苷酸编码序列可编码功能性基因产物或使之突变以降低(与野生型相比)、减毒、失活、消除或给予合成多核苷酸编码的基因产物的非功能活性。

一旦完成，表达盒一般用于使用标准基因递送方案的核酸免疫的构建物中。基因递送的方法为本领域已知。参见，例如美国专利号 5,399,346；5,580,859；5,589,466。基因可直接递送至脊椎动物对象，或者可离体递送至来源于对象的细胞再将细胞植入对象。

在优选实施方式中，基因递送载体是病毒载体。开发了基于病毒的系统，以将基因转移到哺乳动物细胞中。对各种逆转录病毒、慢病毒、痘病毒、牛痘病毒和腺伴随病毒载体系统以及递送裸露的 DNA(如质粒)的描述参见例如，WO/00/39302；WO/00/39304；WO/02/04493；WO/03/004657；WO/03/004620 和 WO/03/020876；美国专利号 6,602,705 以及美国公开专利申请号 20030143248 和 20020146683，和其中引用的参考文献。

在某些实施方式中，第一或第二基因递送载体是腺病毒载体。也描述了许多腺病毒载体。与整合入宿主基因组的逆转录病毒不同，腺病毒保留在染色体外，从而最大程度降低了插入诱变伴随的风险(Haj-Ahmad 和 Graham, *J. Virol.* (1986) 57:267-274; Bett 等, *J. Virol.* (1993) 67:5911-5921; Mittereder 等, *Human Gene Therapy* (1994) 5:717-729; Seth 等, *J. Virol.* (1994) 68:933-940; Barr 等, *Gene Therapy* (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. *BioTechniques* (1988) 6:616-629;和 Rich 等, *Human Gene*

Therapy (1993) 4:461-476)。

在其它实施方式中，一种或多种基因递送载体是细菌载体。例如，Powell 等的美国专利号 5,877,159 描述了可侵入动物细胞从而引入编码抗原的真核表达盒的活细菌。在又一实施方式中，一种或多种基因递送载体是真菌载体。

Michael 等, *J. Biol. Chem.* (1993) 268:6866-6869 和 Wagner 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:6099-6103 所述的分子偶联载体, 如腺病毒嵌合载体也可用于基因递送。

$\alpha$  病毒载体也可有益地用于实施本发明。 $\alpha$  病毒属成员, 例如但不限于: 衍生自辛德毕斯病毒、Semliki Forest 病毒和委内瑞拉马脑炎病毒的载体也可用作递送本发明多核苷酸(例如, 编码第一和第二合成 gp140-多肽的表达盒, 其中第一和第二 gp140 多肽类似并衍生自不同 HIV 亚型、血清型或毒株)的病毒载体。用于实施本方法的辛德毕斯病毒衍生载体的描述参见 Dubensky 等, *J Virol.* (1996) 70:508-519, 国际公开号 WO 95/07995 和 WO 96/17072; 以及美国专利号 5,843,723 和美国专利号 5,789,245。优选的表达系统包括但不限于: 真核分层载体启动系统(如, 美国专利号 6,015,686, 美国专利号 5,814,482, 美国专利号 6,015,694, 美国专利号 5,789,245, EP 1029068A2, 国际公开号 WO 99/18226, EP 00907746A2, 国际公开号 WO 97/38087)。示范性表达系统包括但不限于: 嵌合  $\alpha$  病毒复制子颗粒, 例如, 形成 VEE 和 SIN 的复制子颗粒(参见例如, Perri 等, *J. Virol* 2003, 77(19):10394-10403; 国际公开号 WO02/099035; 美国公开号 20030232324)。这种基于  $\alpha$  病毒的载体系统可用于初敏或在 DNA 初敏的对象中用作加强免疫剂, 也可能用作用本文所述方法诱导中和抗体的独立免疫方法。

基因递送载体也可包括组织特异性启动子, 以驱动感兴趣的一种或多种基因或序列表达。

可产生能表达一种以上感兴趣基因的基因递送载体构建物。可通过采用双顺反子盒或寡聚顺反子盒(如, 其中编码区被 80 个或更少的核苷酸分开, 通常参见 Levin 等, *Gene* 108:167-174, 1991), 或通过采用内部核糖体进入位点("IRES")实现此目的。

此外, 本发明的表达盒在递送至对象或从其中得到的细胞之前可包装在脂质体中。一般使用能稳定结合或截获和保留核酸的脂质体实现脂质包囊化。浓缩的 DNA 与脂质制剂之比可变, 但通常在约 1:1(mgDNA:微摩尔脂质)或更多脂质。为综述使用脂质体作为递送核酸的运载体, 参见, Hug 和 Sleight, *Biochim.Biophys.Acta.* (1991) 1097:1-17; Straubinger 等, 《酶学方法》(Methods of

Enzymology), (1983), 第 101 卷, 512-527 页。

用于本发明的脂质体制剂包括阳离子(带正电)、阴离子(带负电)和中性制剂, 特别优选阳离子脂质体。阳离子脂质体显示以功能性形式介导质粒 DNA(Felgner 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1987)84:7413-7416)、mRNA(Malone 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1989) 86:6077-6081)和纯化的转录因子(Debs 等, *J.Biol.Chem.* (1990) 265:10189-10192)的胞内递送。

阳离子脂质体可容易地获得。例如脂质体 N [1-2,3-二油酰氧基]丙基]-N,N,N-三乙基铵(DOTMA)以商品名 Lipofectin 来源于 GIBCO BRL, Grand Island, NY。(也参见, Felgner 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1987) 84:7413-7416)。其它市售可得的脂质包括(DDAB/DOPE)和 DOTAP/DOPE(Boehringer)。其它阳离子脂质体可用本领域熟知的技术从易得的材料制备。参见, 例如描述 DOTAP(1,2-二(油酰氧基)-3-(三甲基氨基)丙烷)脂质体合成的 Szoka 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1978) 75:4194-4198; 国际公开号 WO 90/11092。

类似地, 阴离子和中性脂质体可容易地获得, 例如来源于 Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL), 或者可用易得的材料容易地制备。这种材料包括磷脂酰胆碱、胆固醇、磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)等。这些材料也可以合适的比例 DOTMA 与 DOTAP 起始材料混合。用这些材料制造脂质体的方法是本领域熟知的。

脂质体可含有多层脂泡(MLV), 单层小脂泡(SUV)或单层大脂泡(LUV)。用本领域已知的方法可制备各种脂质体-核酸复合物。参见, 例如 Straubinger 等, 《免疫学方法》(METHODS OF IMMUNOLOGY) (1983), 第 101 卷, 512-527 页; Szoka 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1978) 75:4194-4198; Papahadjopoulos 等, *Biochim.Biophys.Acta* (1975) 394:483; Wilson 等, *Cell* (1979) 17:77; Deamer 和 Bangham, *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 443:629; Ostro 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) 76:836; Fraley 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1979) 76:3348; Enoch 和 Strittmatter, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1979) 76:145; Fraley 等, *J.Biol.Chem.* (1980) 255:10431; Szoka 和 Papahadjopoulos, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1978) 75:145 和 Schaefer-Ridder 等, *Science* (1982) 215:166。

DNA 和/或蛋白质抗原也可以类似于 Papahadjopoulos 等, *Biochem. Biophys. Acta.* (1975) 394:483-491 所述的螺旋形脂质组合物的形式递送。也参见, 美国专

利号 4,663,161 和 4,871,488。

感兴趣的表达盒也可包囊入、吸附入颗粒运载体或与之相连。这种运载体具有针对免疫系统的选择抗原的多份拷贝并促进抗原在局部淋巴结中的捕获和保留。这些颗粒可由巨嗜细胞吞噬并能通过细胞因子释放来增强抗原呈递。具体运载体的例子包括来源于聚甲基丙烯酸甲酯聚合物以及来源于聚(丙交酯)和聚(丙交酯-共-乙交酯),称为 PLG 的微粒。参见,例如 Jeffery 等, *Pharm.Res.* (1993) 10:362-368; McGee JP 等, *J Microencapsul.* 14 (2):197-210, 1997; O'Hagan DT 等, *Vaccine* 11 (2):149-54, 1993。合适的微粒也可在荷电洗涤剂存在时生产以得到表面带净负电荷或净正电荷的微粒。例如,用阴离子洗涤剂生产的微粒,如十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),即 CTAB-PLG 微粒吸附负电荷的大分子,如 DNA(参见例如,国际公开号 WO 00/06123)。

此外,其它具体的系统和聚合物可用于体内或离体递送感兴趣的基因。例如,聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺等聚合物以及这些分子的偶联物可用于转移感兴趣的核酸。类似地,DEAE 葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀或使用其它不溶的无机盐,例如磷酸锶、硅酸铝(包括膨润土、高岭土、氧化铬、硅酸镁、滑石粉)等沉淀可用于本方法。用于基因转移的递送系统的综述参见,例如 Felgner, P.L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5:163-187。拟肽(Zuckerman, R.N.等,美国专利号 5,831,005)也可用于递送本发明的构建物。

在本发明的一些实施方式中,明矾和 PLG 是提高多核苷酸疫苗(例如, DNA 疫苗)的免疫力的有用递送佐剂。其它实施方式包括(但不限于)类毒素、细胞因子,共刺激分子也可作为遗传佐剂与多核苷酸疫苗一起使用。

携带本发明的合成表达盒的基因递送载体配制入用于递送至脊椎动物对象的组合物。这些组合物可是预防性(防止感染)或治疗性的(感染后治疗疾病)。如果需要预防疾病,这些组合物一般在感兴趣病原体的初次感染之前给予。如果需要治疗,例如减少症状或复发,这些组合物一般在初次感染后给予。这些组合物含有“治疗有效量”的感兴趣基因,从而可在体内产生一定量的抗原进而在所给予的个体内产生免疫应答。确切的所需量视以下因素而变:治疗的对象、待治疗对象的年龄和一般情况、对象的免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、治疗的疾病的严重性、选择的具体抗原及其给药方式等。本领域的技术人员可容易地确定合适的有效量。因此,可通过常规试验确定范围较宽的“治疗有效量”。

这些组合物一般可含有一种或多种“药学上可接受的赋形剂或载体”,例如水、盐水、甘油、聚乙二醇、透明质酸、乙醇等。此外,这种载体中可存在辅助

物质，例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。某些核酸摄取和/或表达的易化剂，例如(但不限于)布比卡因、心毒素和蔗糖也可包含于这些组合物中或共同给予。

一旦配制好，本发明的组合物可直接给予对象(例如，上述的)或者使用例如上述的方法离体递送至来源于对象的细胞。例如，将转化的细胞离体递送并再植入对象的方法是本领域已知的，包括，例如葡萄糖介导的转染、磷酸钙沉淀、多聚季铵盐介导的转染、脂转染胺(lipofectamine)和 LT-1 介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸(有或没有相应的抗原)包裹在脂质体中与将 DNA 直接微注射入核。

可用多种方式体内给予基因递送载体。这些载体可通过皮下、表皮、表皮内、粘膜内(例如鼻、直肠和阴道)、腹膜内、静脉内、口服或肌肉内注射。特别优选递送入表皮细胞的给药方式，因为这种方式可接近皮肤相关的淋巴样细胞并使得 DNA 瞬时存在于接受者中。其它给药方式包括口服和肺部给药、栓剂、无针头注射、经皮和透皮应用。剂量治疗可是单剂量方案或多剂量方案。编码免疫原性多肽的多肽可按照本发明的方法与类似的免疫原性多肽联合给予。

#### 2.3.4 编码 HIV-1 多肽和相关多肽的合成序列的表达

本发明的免疫原性病毒多肽编码序列可克隆入许多不同的表达载体/宿主细胞系统以提供产生免疫应答的本发明组合物的多肽组分中的免疫原性多肽。例如，编码 HIV 多肽的 DNA 片段可克隆入真核表达载体，包括瞬时表达载体、基于 CMV-启动子的哺乳动物载体和用于杆状病毒表达系统的穿梭质粒。合成的多核苷酸序列(例如，密码子优化的多核苷酸序列)和野生型序列一般可克隆入同一载体。许多克隆载体是本领域技术人员已知的，选择合适的克隆载体是选择的问题。一般参见 Sambrook 等，同上。然后，该载体用于转化合适的宿主细胞。合适的重组表达系统包括(但不限于)本领域熟知的细菌、哺乳动物、杆状病毒/昆虫、牛痘病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、甲病毒(例如辛德毕斯病毒、委内瑞拉马脑炎病毒(VEE))、哺乳动物、酵母和非洲爪蟾表达系统。特别优选的表达系统是哺乳动物细胞系、牛痘病毒、辛德毕斯病毒、真核分层载体起始系统(例如，美国专利号 6,015,686; 5,814,482; 6,015,694; 5,789,245; EP 1029068A2; PCT 国际公开号 WO 9918226A2/A3; EP 00907746A2; PCT 国际公开号 WO 9738087A2)、昆虫和酵母系统。

许多这种表达系统的宿主细胞也是本领域已知的。例如，哺乳动物细胞系是

本领域已知的，包括获得自美国模式培养物保藏所(A.T.C.C.)的无限增殖细胞系，例如(但不限于)中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)以及其它细胞。类似地，细菌宿主细胞，例如大肠杆菌、枯草杆菌和链球菌中发现可与本发明构建物一起使用。用于本发明的酵母宿主尤其包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guillermondii*)、巴斯特毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和解脂亚罗威亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)等。与杆状病毒表达载体一起使用的昆虫细胞包括埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)、家蚕(*Bombyx mori*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)等。参见，例如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987)。

病毒载体可用于表达真核细胞中的多肽，例如来源于痘病毒科，包括牛痘病毒和禽痘病毒。如 Tomei 等, *J.Virol.* (1993) 67:4017-4026 和 Selby 等, *J.Gen.Virol.* (1993) 74:1103-1113 所述基于牛痘病毒的感染/转染系统也发现可用于本发明。基于牛痘病毒的感染/转染系统可容易地用于提供感兴趣的编码序列在宿主细胞中可诱导地瞬时表达。在该系统中，首先用编码细菌噬菌体 T7 RNA 聚合酶的牛痘病毒重组体在体外感染细胞。该聚合酶显示精细的特异性在于它仅转录携带 T7 启动子的模板。感染后，由 T7 启动子驱动用感兴趣的多核苷酸转染细胞。表达于细胞质中的牛痘病毒重组体的聚合酶将转染的 DNA 转录为 RNA，然后 RNA 通过宿主的翻译装置翻译为蛋白质。该方法提供高水平、瞬时、细胞质产生的大量 RNA 及其翻译产物。参见，例如 Elroy-Stein 和 Moss, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1990) 87:6743-6747; Fuerst 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1986) 83:8122-8126。

用牛痘病毒或禽痘病毒重组体感染的另一种方法可使用扩增系统，该系统在引入宿主细胞后导致高水平表达。特别是 T7 RNA 聚合酶编码区域之前的 T7 RNA 聚合酶启动子可改造。翻译来源于该模板的 RNA 产生 T7 RNA 聚合酶，进而转录更多模板。同时存在 T7 启动子控制下表达的 cDNA。因此，从扩增模板 RNA 的翻译产生的一些 T7 RNA 聚合酶导致所需基因的转录。由于启动扩增需要一些

T7 RNA 聚合酶, 可将 T7 RNA 聚合酶与模板一起引入细胞以引发转录反应。聚合酶可以蛋白质或编码 RNA 聚合酶的质粒引入。为进一步讨论用于转化细胞的 T7 系统及其用途, 参见, 例如 PCT 国际公开号 WO 94/26911; Studier 和 Moffatt, *J.Mol.Biol.* (1986) 189:113-130; Deng 和 Wolff, *Gene* (1994) 143:245-249; Gao 等, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (1994) 200:1201-1206; Gao 和 Huang, *Nuc.Acids Res.* (1993) 21:2867- 2872; Chen 等, *Nuc.Acids Res.* (1994) 22:2114-2120 和美国专利号 5,135, 855。

这些载体转染入合适的宿主细胞。然后在合适的条件下培养该细胞系并在上清液中评估任何合适的多肽产物的水平。例如, p24 可用于评估 Gag 表达; gp160、gp140 或 gp120 可用于评估 Env 表达; p6pol 可用于评估 Pol 表达; prot 可用于评估蛋白酶; p15 用于 RNA 酶 H; p31 用于整合酶; 其它合适的多肽用于 Vif、Vpr、Tat、Rev、Vpu 和 Nef。

此外, 修饰的多肽也可用于, 例如其它 Env 多肽, 包括(但不限于)如天然 gp160、寡聚 gp140、单体 gp120 以及这些多肽的修饰和/或合成的序列。

Western 印迹分析可用于显示含有合成的表达盒的细胞产生期望的蛋白质, 该蛋白质的每个细胞的浓度一般高于含有天然表达盒的细胞。细胞裂解物和上清液中均可见 HIV 蛋白质。

与野生型序列相比, 用合成的表达盒转染的哺乳动物细胞的上清液分级显示该表达盒提供产生较多的 HIV 蛋白质。

这些含有 HIV 的多肽在哺乳动物细胞系中的有效表达具有以下好处: 多肽不含杆状病毒污染物; 用已建立方法进行的生产由 FDA 批准; 纯度增加; 产量更高(与天然编码序列相比); 与一种在 CHO 细胞中产生含有 Sub HIV 的多肽的新颖方法, 这在没有用本发明构建物获得表达增加的情况下是做不到的。示范性的哺乳动物细胞系包括(但不限于)BHK、VERO、HT1080、293、293T、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/克隆 8、MT-2、MT-4、H9、PM1、CEM 和 CEMX174(例如这种细胞系可获得自 A.T.C.C.)。

所需的多肽编码序列可克隆入任何数量的可市售载体以在合适的宿主系统中表达多肽。这些系统包括(但不限于): 杆状病毒表达 {Reilly, P.R.等, 《杆状病毒表达载体: 实验室手册》(BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A

LABORATORY MANUAL), (1992); Beames 等, *Biotechniques* 11:378 (1991); Pharmingen; Clontech, Palo Alto, CA}, 牛痘表达 {Earl, P.L.等, “使用牛痘在哺乳动物细胞中表达蛋白质” (Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia), 《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), (F.M.Ausubel 等编), Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991); Moss, B.等, 1992 年 8 月 4 日颁发的美国专利号 5,135,855}, 在细菌中表达 {Ausubel, F.M.等, 《新编分子生物学实验指南》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY), John Wiley and Sons, Inc., Media PA; Clontech}, 在酵母中表达 {Rosenberg, S.和 Tekamp-Olson, P., 1998 年 3 月 17 日颁发的美国专利号 RE35,749; Shuster, J.R., 1997 年 5 月 13 日颁发的美国专利号 5,629,203; Gellissen, G.等, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62(1-2):79-93(1992); Romanos, M.A. 等, *Yeast* 8(6):423-488 (1992); Goeddel, D.V., *Methods in Enzymology* 185 (1990); Guthrie, C.和 G.R.Fink, *Methods in Enzymology* 194 (1991)}, 在哺乳动物细胞中表达 {Clontech; Gibco-BRL, Ground Island, NY; 例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(Haynes, J.等, *Nul.Acid.Res.* 11:687-706 (1983); 1983, Lau, Y.F.等, *Mol.Cell.Biol.* 4:1469-1475 (1984); Kaufman, R.J., “异源基因在哺乳动物细胞中的选择和共同扩增” (Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells), 《酶学方法》(Methods in Enzymology), 185 卷, 537-566 页, Academic Press, Inc., San Diego CA(1991)), 和在植物细胞中表达 {植物克隆载体, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA 和 Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ; Hood, E.等, *J.Bacteriol.* 168:1291-1301 (1986); Nagel, R.等, *FEMS Microbiol.Lett.* 67:325 (1990); An 等, “二员载体” (Binary Vectors), 《植物分子生物学手册》(Plant Molecular Biology Manual) A3:1-19 (1988); Miki, B.L.A. 等, 249-265 页所述的其它载体, 与《植物 DNA 感染剂》(Plant DNA Infectious Agents), (Hohn, T.等编)Springer-Verlag, Wien, Austria, (1987)所述的其它载体; 《植物分子生物学: 基本技术》(Plant Molecular Biology : Essential Techniques), P.G.Jones 和 J.M.Sutton, New York, J.Wiley, 1997; Miglani, 《Gurbachan 植物遗传学和分子生物学词典》(Gurbachan Dictionary of Plant Genetics and Molecular Biology), New York, Food Products Press, 1998; Henry, R.J., 《植物分子生物



学实践应用》(Practical Applications of Plant Molecular Biology), New York, Chapman & Hall, 1997}。

除了哺乳动物、昆虫和酵母载体以外,本发明的合成表达盒可用选择的表达控制元件掺入各种表达载体中。本领域的普通技术人员可根据本说明书的指导和本领域关于表达载体的已知信息来选择任何给定细胞的合适载体和控制元件。

例如,合成的编码序列可插入含有操作性连接于所需编码序列的控制元件的载体,这些元件允许编码序列在选择细胞类型中表达。例如,典型的哺乳动物细胞表达的启动子含有 SV40 早期启动子,CMV 启动子,如 CMV 立即早期启动子(可含有内含子 A 的 CMV 启动子),RSV, HIV-Ltr, 小鼠乳腺肿瘤病毒 LTR 启动子(MMLV-ltr), 腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)和单纯疱疹病毒启动子等。其它非病毒启动子,例如来源于鼠金属硫蛋白基因的启动子也发现可用于哺乳动物表达。转录终止和聚腺苷酸化序列一般也存在于翻译终止密码子的 3'。用于优化翻译起始的序列也优选存在于编码序列的 5'。转录终止子/聚腺苷酸化信号的例子包括如 Sambrook 等,同上所述来源于 SV40 的以及牛生长激素终止子序列。本发明使用的构建物也可设计有包含剪接供体和受体位点的内含子(Chapman 等, *Nuc.Acids Res.* (1991) 19:3979-3986)。

本文也使用增强子元件来增加哺乳动物构建物的表达水平。例子包括 Dijkema 等, *EMBO J.* (1985) 4:761 所述的 SV40 早期基因增强子, Gorman 等, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1982b) 79:6777 所述来源于 Rous 肉瘤病毒的长末端重复(LTR)的增强子/启动子和 Boshart 等, *Cell* (1985) 41:521 所述的来源于人 CMV 的元件,例如包含于 CMV 内含子 A 序列中的元件(Chapman 等, *Nuc.Acids Res.* (1991) 19:3979-3986)。

本发明也包括含有编码序列和允许编码区域在合适宿主中表达的表达控制元件的表达盒。控制元件一般包括启动子、翻译起始密码子与翻译和转录终止序列,与用于将插入物引入载体的插入位点。用于表达本发明多肽的翻译控制元件见 M.Kozak 的综述(例如, Kozak, M., *Mamm.Genome* 7(8):563-574, 1996; Kozak, M., *Biochimie* 76(9):815-821, 1994; Kozak, M., *J Cell Biol* 108(2):229-241, 1989; Kozak, M.和 Shatkin, A.J., *Method.Enzymol* 60:360-375, 1979)。

在酵母系统中表达具有商业生产的优点。由牛痘和 CHO 细胞系生产重组蛋

白具有用哺乳动物表达系统的优点。此外，牛痘病毒表达具有以下几个优点：(i) 宿主范围广；(ii)重组蛋白质的精确转录后修饰、加工、折叠、转运、分泌和装配；(iii)相对可溶重组蛋白质的表达水平高；和(iv)容纳外来 DNA 的能力高。

免疫原性 HIV 多肽编码表达盒的重组表达的多肽一般从裂解的细胞或培养基中分离。可用本领域已知的方法，包括分级盐析、离子交换层析、凝胶过滤、体积排阻层析、大小分级和亲和层析来纯化。可利用基于，例如 HIV 抗原产生的抗体来进行免疫亲和层析。分离寡聚形式的 HIV 包膜蛋白已见描述(参见，例如 PCT 国际申请号 WO/00/39302)。

使用哺乳动物细胞表达本发明的蛋白质的优点包括(但不限于)：良好建立的用于按比例放大生产的方法；符合优质生产规范(GMP)标准的细胞系；哺乳动物细胞的培养条件本领域已知。

### 2.3.5 与本发明的多肽组分一起使用的免疫原性增强组分

在哺乳动物中产生免疫应答含有第一和第二基因递送载体的本发明组合物可含有各种赋形剂、佐剂、运载体、辅助物质、调节剂等。本领域的技术人员可确定合适的有效量。

任选的多肽组分可含有运载体，其中所述运载体是本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的分子。合适的运载体一般是大的、缓慢代谢的大分子，例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体(例如油滴或脂质体)和灭活的病毒颗粒。颗粒运载体的例子包括来源于聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的颗粒以及来源于聚(丙交酯)和聚(丙交酯-共-乙交酯)，称为 PLG。参见，例如 Jeffery 等，*Pharm.Res.* (1993) **10**:362-368；McGee JP 等，*J Microencapsul.* **14**(2):197-210, 1997；O'Hagan DT 等，*Vaccine* **11**(2):149-54, 1993。这种运载体是本领域的普通技术人员已知的。此外，这些运载体可起到免疫刺激剂的作用(“佐剂”)。抗原还可与细菌类毒素，例如来源于白喉、破伤风、霍乱等的类毒素以及来源于大肠杆菌的毒素偶联。

也可使用佐剂来增强组合物的效力。这种佐剂包括(但不限于)：(1)铝盐(明矾)，例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等；(2)水包油乳剂(有或没有其它免疫刺激剂，例如胞壁酰肽(见下文)或细菌细胞壁组分)，例如(a)使用微流化器，例如 110Y 型微流化器(Microfluidics, Newton, MA)配制进亚微米颗粒，含有 5%角鲨烯、0.5%吐温 80 和 0.5%司盘 85(任选含有各种量的 MTP-PE(见下文)，但不是必需的)

的 MF59(PCT 国际公开号 WO 90/14837), (b)含有 10%角鲨烯、0.4%吐温 80、5%普朗尼克-阻断的聚合物 L121 和 thr-MDP(见下文), 微流化入亚微米乳剂或涡流以产生较大粒径乳剂的 SAF, 和(c)含有 2%角鲨烯、0.2%吐温 80 和选自单磷酸脂质 A(MPL)、岩藻糖二分支菌酸(TDM)和细胞壁骨架(CWS)的一种或多种细菌细胞壁组分, 优选 MPL+CWS(Detox™)的 Ribi™ 佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT); (3)可使用皂苷佐剂, 例如 Stimulon™(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)或从中产生颗粒, 例如 ISCOM(免疫刺激复合物); (4)完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA); (5)细胞因子, 例如白介素(IL-1、IL-2 等)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等; (6)编码免疫刺激 CpG 基序的寡核苷酸或聚合分子(Davis, H.L.等, *J.Immunology* 160:870-876, 1998; Sato, Y.等, *Science* 273:352-354, 1996)或抗原/寡核苷酸复合物(聚合分子含有双链或单链 RNA 和 DNA, 其骨架修饰物, 例如甲基磷酸酯键); 或(7)细菌 ADP-核糖基化毒素的解毒突变体, 例如霍乱毒素(CT)、百日咳毒素(PT)或大肠杆菌热不稳定毒素(LT)、特别是 LT-K63(其中赖氨酸取代 63 位的野生型氨基酸)、LT-R72(其中精氨酸取代 72 位的野生型氨基酸)、CT-S109(其中丝氨酸取代 109 位的野生型氨基酸)和 PT-K9/G129(其中赖氨酸取代 9 位的和甘氨酸取代 129 位的野生型氨基酸)(参见, 例如 PCT 国际公开号 WO/93/13202 和 WO/92/19265); (8)胞壁酰肽包括(但不限于)N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酸基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰基-胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1-2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(MTP-PE)等; (9)Iscomatrix(CSL Limited, Victoria, Australia; 也参见, 例如 Morein B, Bengtsson KL, “由 iscom, 免疫刺激复合物进行的免疫调节”(Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes), *Methods*. 9 月; 19(1):94-102, 1999)和(10)作为免疫刺激剂增强组合物效力的其它物质(例如, 明矾和 CpG 寡核苷酸)。

优选的佐剂包括(但不限于)MF59 和 Iscomatrix。

用本发明的免疫刺激组合物的任选多肽组分进行的剂量治疗可是单剂量方案或多剂量方案。多剂量方案是其中接种疫苗的基础过程为 1-10 份单独剂量, 然后以后续时间间隔给予其它剂量, 来维持和/或加强免疫应答, 例如以 1-4 个月的间隔给予第二剂量, 如果需要几个月后给予后续剂量。剂量方案至少部分由对象的需要来确

定并取决于医师的判断。

直接递送本发明的产生免疫应答组合物的多肽组分一般可在有或没有佐剂时，用常规注射器或基因枪，例如 Accell®基因递送系统(Chiron Corporation, Inc., 牛津, 英格兰)通过注射来实现。这些多肽可通过皮下、表皮、皮内、粘膜内(例如鼻、直肠和阴道)、腹膜内、静脉内、口服或肌肉内注射。其它给药方式包括口服和肺部给药、栓剂、无针头注射。剂量治疗方案可是单剂量方案或多剂量方案。多肽可与佐剂或其它物质联合给予。

### 2.3.6 免疫调节分子

在本发明的一些实施方式中，基于转移载体可构建为编码细胞因子或其它免疫调节分子。例如，编码天然 IL-2 和 $\gamma$ 干扰素的核酸序列可分别如美国专利号 4,738,927 和 5,326,859 所述获得，而这些蛋白质的有用突变蛋白可如美国专利号 4,853,332 所述获得。编码短和长形式的 mCSF 的核酸序列可分别如美国专利号 4,847,201 和 4,879,227 所述获得。本发明的具体方面可产生表达细胞因子或免疫调节基因的逆转录载体(例如，PCT 国际公开号 WO/94/02951)。

本文使用的合适的免疫调节分子的例子包括：IL-1 和 IL-2(Karupiah 等, (1990) *J Immunology* 144: 290-298; Weber 等, (1987) *J.Exp.Med.* 166:1716-1733; Gansbacher 等, (1990) *J.Exp.Med.* 172:1217-1224 和美国专利号 4,738,927); IL-3 和 IL-4(Tepper 等, (1989) *Cell* 57:503-512; Golumbek 等, (1991) *Science* 254:713-716 和美国专利号 5,017,691); IL-5 和 IL-6(Brakenhof 等, (1987) *J Immunol.* 139:4116-4121 和 PCT 国际公开号 WO 90/06370); IL-7(美国专利号 4,965,195); IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 和 IL-13(“细胞因子公报”(Cytokine Bulletin), 1994 年夏); IL-14 和 IL-15;  $\alpha$ 干扰素(Finter 等, (1991) *Drugs* 42:749-765; 美国专利号 4,892,743 和 4,966,843; PCT 国际公开号 WO 85/02862; Nagata 等, (1980) *Nature* 284:316-320; Familletti 等, (1981) *Methods in Enz.* 78:387-394; Twu 等, (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86:2046-2050 和 Faktor 等, (1990) *Oncogene* 5:867-872));  $\beta$ -干扰素(Seif 等, (1991) *J Virol.* 65:664-671);  $\gamma$ -干扰素(Radford 等, (1991) *The American Society of Hepatology* 20082015; Watanabe 等, (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86:9456-9460; Gansbacher 等, (1990) *Cancer Research* 50:7820-7825; Maio 等, (1989) *Can.Immunol.Immunother.* 30:34-42 和美国专利号 4,762,791 和 4,727,138); G-CSF(美国专利号 4,999,291 和 4,810,643); GM-CSF(PCT

国际公开号 WO 85/04188)。

免疫调节因子夜可是这些分子的激动剂、拮抗剂或配体。例如，由于可溶形式受体能改变因子本身的形状，它们经常可作为这些类型因子的拮抗剂。

编码上述物质的核酸分子以及有利于用于本发明的其它核酸分子可容易地从各种来源获得，包括例如保藏所，如美国模式培养物保藏所或来自商业来源，如 British Bio-Technology Limited(Cowley, 牛津, 英格兰)代表性的例子包括 BBG12(含有编码 127 个氨基酸的成熟蛋白的 GM-CSF 基因)、BBG6(含有编码 $\gamma$ 干扰素的序列)、A.T.C.C.保藏号 39656(含有编码 TNF 的序列)、A.T.C.C.保藏号 20663(含有编码 $\alpha$ 干扰素的序列)、A.T.C.C.保藏号 31902、31902 和 39517(含有编码 $\beta$ -干扰素的序列)、A.T.C.C.保藏号 67024(含有编码白介素-1b 的序列)、A.T.C.C.保藏号 39405、39452、39516、39626 和 39673(含有编码白介素-2 的序列)、A.T.C.C.保藏号 59399、59398 和 67326(含有编码白介素-3 的序列)、A.T.C.C.保藏号 57592(含有编码白介素-4 的序列)、A.T.C.C.保藏号 59394 和 59395(含有编码白介素-5 的序列)和 A.T.C.C.保藏号 67153(含有编码白介素-6 的序列)。

含有细胞因子基因或免疫调节基因的质粒(PCT 国际公开号 WO 94/02951 和 WO 96/21015)可用合适的限制性酶消化，含有特定的感兴趣基因的 DNA 片段可使用标准分子生物学技术插入基因转移载体(参见，例如 Sambrook 等，同上或 Ausubel 等编，《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), Greene Publishing and Wiley-Interscience)。

编码上述分子的多核苷酸序列可用重组方法获得，例如通过从表达基因的细胞中筛选 cDNA 或基因组文库，或从含有该序列的已知载体中获得基因。例如，含有编码改变的细胞产物的序列的质粒可从保藏所获得，如 A.T.C.C.或来自商业来源。含有感兴趣的多核苷酸序列的质粒可用合适的限制性酶消化，含有多核苷酸序列的 DNA 片段可用标准分子生物学技术插入基因转移载体。

或者，用于本发明的 cDNA 序列可用标准技术从表达或含有该序列的细胞中获得，所述技术例如 cDNA 或基因组 DNA 的苯酚提取和 PCR。用于获得和分离 DNA 的技术描述于，例如 Sambrook 等，同上。简言之，可使用寡聚-dT 或随机引物，用逆转录酶逆转录表达感兴趣基因的细胞的 mRNA。然后可用与所需序列的任一侧上序列互补的寡核苷酸引物，通过 PCR 扩增单链 cDNA(参见美国专利

号 4,683,202; 4,683,195 和 4,800,159; 也参见《PCR 技术: DNA 扩增的原理和应用》(PCR Technology : Principles and Applications for DNA Amplification), Erlich 编, Stockton Press, 1989)。

除了克隆以外, 感兴趣的核苷酸序列也可使用 DNA 合成仪(例如, 392 型应用生物系统 DNA 合成仪, ABI, Foster City, California)来合成产生。可用表达产物所需的合适的密码子来设计核苷酸序列。完整的序列从用标准方法制备的重叠寡核苷酸装配并装配成完整的编码序列。参见, 例如 Edge, *Nature* (1981) 292:756; Nambair 等, *Science* (1984) 223:1299; Jay 等, *J Biol.Chem.* (1984) 259:6311。

#### 2.4.0 在治疗对象中产生免疫应答

如上所述, 本文所述基因递送载体可用于(例如)通过给予本发明第一和第二基因递送载体在对象中产生免疫应答(见表 3)。

#### 3.0.0 将本发明应用于 HIV

尽管不想受任何具体的模型、理论或假说的束缚, 提供以下信息为了更完全地了解本发明。

抗 HIV 感染的保护作用可能需要在接触病毒侵袭的接种个体中预先存在强有力且广泛的反应性中和抗体。虽然需要细胞免疫应答来控制受感染个体中的病毒血症, 但未证实仅依赖诱导这些应答的疫苗方法可提供保护作用。鉴于此, 支持本发明而进行的实验使用组合初敏-加强方法, 该方法用多核苷酸组分和任选的多肽组分, 其中多核苷酸组分编码, 例如来自初级 HIV 分离物(例如, R5 亚型 B (HIV-1<sub>SF162</sub>)和亚型 C (HIV-1<sub>TV1</sub>)毒株)的类似的 V 缺失包膜抗原, 多肽组分含有这些抗原中的至少一种。

本发明基因递送载体优选包含基于腺病毒的载体和  $\alpha$  病毒复制子。描述了这种载体中的序列的有效表达。可给予本发明任选多肽组分, 以用(例如)MF59 或 Iscomatrix 佐剂配制 HIV(如 Env)蛋白加强免疫。

所有蛋白制剂均高度纯化并用生物物理和免疫化学方法全面鉴定。虽然任何 HIV 病毒蛋白也可用于实施本发明, 但在优选实施方式中, V1-、V2-和/或 V3-修饰/缺失的包膜 DNA 和相应多肽是用于本发明组合物的良好候选物。

本发明这方面的一个实施方式通常如下所述。选择用于疫苗组合物的抗原。编码 Env 多肽的多核苷酸和 Env 多肽一般用于产生免疫应答的组合物, 该组合物含有多核苷酸组分和多肽组分。

设计 HIV 包膜疫苗要考虑的一些因素是：有效的 HIV 疫苗的基本标准是其诱导广泛且强有力的抗流行性 HIV 毒株的中和抗体应答的能力。中和抗体在预防 HIV、SIV 和 SHIV 感染的发生或延迟疾病发作中的重要作用是几项研究的重点。首先，中和耐受性病毒在受感染动物的疾病发生的同时或之前出现(Burns (1993) *J Virol.* 67:4104-13; Cheng-Mayer 等, (1999) *J.Virol.* 73:5294-5300; Narayan 等, (1999) *Virology* 256:54-63)。第二，在受 HIV、SIV 或 SHIV 病毒侵袭之前在猕猴、黑猩猩和 SCID 小鼠的血液循环系统中预先输注高浓度的强中和单克隆抗体 (mAb) 提供了保护作用或延迟疾病发生(Conley 等, (1996) *J.Virol.* 70:6751-6758; Emini 等, (1992) *Nature (London)* 355:728-730; Gauduin 等, (1997) *Nat Med.* 3:1389-93; Mascola 等, (1999) *J Virol.* 73:4009-18; Mascola 等, (2000) *Nature Med.* 6(2):207-210; Baba 等, (2000) *Nature Med.* 6(2):200-206)。类似地，给天然豚尾猕猴(pig-tailed macaques)输注收集自 HIV-1 感染的黑猩猩血清中的中和抗体保护后者动物免受后来 SHIV 病毒的侵袭(Shibata 等, (1999) *Nature Medicine* 5:204-210)。此外，基于包膜的疫苗证实在非人灵长类模型中有抗感染的保护作用。不含 Env 多肽的疫苗一般赋予较弱的保护效力(参见，例如 Hu, S.L.等，“作为研究抗灵长类慢病毒感染的相关方法的重组亚单位疫苗”(Recombinant subunit vaccines as an approach to study correlates of protection against primate lentivirus infection), *Immunol Lett.* 6 月; 51(1-2):115-9 (1996); Amara, R.R.等，“Env 以及 Gag-Pol 在用 DNA 初敏/重组修饰的牛痘病毒 Ankara 疫苗控制猿-人免疫缺陷病毒 89.6P 侵袭中的关键作用”(Critical role for Env as well as Gag-Pol in control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine), *J Virol.* 6 月; 76(12):6138-46 (2002))。

来源于 SF2 lab 毒株的单体 gp120 蛋白在灵长类模型中中和 HIV-1 lab 毒株并防止病毒侵袭(Verschoor, E.J.等, (1999), “比较核酸、MF59 和 ISCOM-配制的 HIV-1 gp120 疫苗在恒河猴中产生的免疫力”(Comparison of immunity generated by nucleic acid, MF59 and ISCOM-formulated HIV-1 gp120 vaccines in rhesus macaques), *J.Virology* 73:3292-3300)。来源于 Thai E 野外菌株的初级 gp120 蛋白提供 lab 毒株的交叉亚型中和作用(VanCott 等(1999), *J.Virology* 73:4640-4650)。

原始亚型 B 寡聚 o-gp140 蛋白提供对亚型 B 原始(野外)分离物的部分中和作用(Barnett 等(2001), *J.Virology*, 75:5526-5540)。原始亚型 B o-gp140 delV2 DNA 初敏加上蛋白质加强免疫在灵长类模型中提供强有力中和各种亚型 B 原始分离物并防止病毒侵袭(Cherpelis 等(2000), *J.Virology*, 75, 1547-1550)。

可通过构建暴露保守的中和表位的包膜多肽结构来协助诱导强有力、广泛反应性中和抗体的疫苗方案,例如可变区的修饰/缺失和去糖基化、包膜蛋白受体复合物、基于晶体结构(例如,β-片层缺失)的合理设计和基于免疫原的 gp41-融合结构域。

使用优化的包膜多肽编码序列开发了用于包膜蛋白生产的稳定 CHO 细胞系,所述序列包括(但不限于): gp120、o-gp140、gp120delV2、o-gp140delV2、gp120delV1V2、o-gp140delV1V2。

用于本发明的示范性包膜蛋白和其编码序列包括(但不限于)gp120、gp140、寡聚 gp140 和 gp160,包括其成熟或修饰的形式(例如,删除 V2 环、切割位点中突变或在糖基化位点中突变)。在一个实施方式中,修饰以暴露多肽与 CCR5 受体结合区域的 HIV 包膜多肽以及编码这种多肽的多核苷酸序列可用于实践本发明。从体液免疫的观点看,产生提供初级分离物的中和作用的免疫应答是有用的,所述初级分离物利用了据信对病毒进入重要的 CCR5 趋化因子共同受体(Zhu, T.等, (1993) *Science* 261:1179-1181; Fiore, J.等, (1994) *Virology*, 204:297-303)。这些和其它用于 HIV 免疫的示范性多核苷酸构建物(例如,各种包膜蛋白编码序列)、制造多核苷酸构建物的方法、相应的多肽产物和制造多肽的方法已在,例如以下文献中描述: PCT 国际公开号 WO/00/39302; WO/00/39304; WO/02/04493; WO/03/004657; WO/03/004620 和 WO/03/020876; 美国专利号 6,602,705 和美国公布专利申请号 20030143248 和 20020146683。

虽然参考 HIV 亚型 B 和 C 作为示范性亚型描述了本发明,本发明的组合物和方法可应用于各种 HIV 亚型、血清型或毒株及其编码的免疫原性多肽,包括(但不限于): HIV-1 亚型 A-K、N 和 O, 已鉴定的 CRF(循环重组形式)和 HIV-2 毒株及其亚型。参见,例如 Myers 等, 洛斯阿拉莫斯数据库, 洛斯阿拉莫斯国家实验室, 新墨西哥; Myers 等, “人逆转录病毒和艾滋病”(Human Retroviruses and Aids), 1990, 洛斯阿拉莫斯, 新墨西哥: 洛斯阿拉莫斯国家实验室)。

Env 的进一步修饰包括(但不限于)产生编码其中具有突变和/或缺失的 Env 多



肽的多核苷酸。例如，超变区 V1、V2、V3、V4 和/或 V5 的一些或全部可如本文所述删除或修饰，特别是 V1、V2 和 V3 区域。V1 和 V2 区域可掩盖 CCR5 共同受体结合位点。(参见，例如 Moulard 等，(2002) Proc.Nat'l Acad.Sci 14:9405-9416)。因此，某些实施方式中删除了一些或全部可变环区域，例如可能暴露保守的中和表位。此外，由于高度糖基化也遮蔽了蛋白质表面可能的中和表位，N-相连位点的去糖基化也是可能的修饰靶位。单用或与可变区删除和/或去糖基化修饰联用的其它任选的修饰作用包括对  $\beta$ -片层区域的修饰(例如，删除)(例如，WO 00/39303 所述)、对前导序列的修饰(例如，加入 Kozak 序列和/或用具有天然或序列修饰的 tpa 前导序列取代修饰的野生型前导序列)和/或对蛋白酶切割位点的修饰(例如，Chakrabarti 等，(2002) J.Virol. 76 (11):5357-5368 描述了在切割位点、gp41 的促融合区域和保留天然抗原性构象决定簇的 gp41 的七残基重复序列 1 和 2 的间距含有缺失的 gp140 $\delta$  CFI,寡聚物的形成和体外的病毒中和作用，所述“保留天然抗原性构象决定簇”定义为与已知的单克隆抗体或 CD4 结合)。

这些修饰的各种组合可用于产生本文所述野生型或合成多核苷酸序列。

Env 多肽编码序列的修饰可导致(1)相对于野生型编码序列，提高在许多哺乳动物细胞系中的表达(以及其它类型的细胞系，包括(但不限于)昆虫细胞)，和/或(2)提高中和表位的呈递。类似的 Env 多肽编码序列可从各种分离物中得到、修饰和测试以提高表达。

如上所述，优选采用初敏-加强方法，其中在“初敏”步骤中递送一种或多种基因递送载体，随后在“加强”步骤中递送一种或多种第二基因递送载体。在某些实施方式中，用本文所述一种或多种基因递送载体初敏和加强免疫后，再用一种或多种含多肽组合物(如包含 HIV 抗原的多肽)加强免疫。

在任何涉及共同给药的方法中，各种组合物可以任何顺序递送。因此，在包括递送多种不同的组合物或分子的实施方式中，核酸无需全部在多肽之前递送。例如，初敏步骤可包括递送一种或多种多肽，加强步骤可包括递送一种或多种核酸和/或一种或多种多肽。多次多肽给药之后可进行多次核酸给药，或者多肽与核酸给药可以任何顺序进行。因此，本文所述的一种或多种基因递送载体和本文所述的一种或多种多肽可经任何给药途径以任何顺序共同给药。所以，本文所述多核苷酸和多肽的任何组合可用于引发免疫反应。

此外，采用初敏-加强方案(例如，本文所述的那些方案)可有益于降低受感染的

对象中的病毒负荷以及可能减缓或防止 HIV 相关疾病的进展(相对于未治疗的对象)。

## 实验

以下是实施本发明的特定实施方式的实施例。提供这些实施例仅是为了说明性目的而决非要限制本发明的范围。

我们努力保证所用数值(例如,量、温度等)的精确,但也当然应该允许一些实验性误差和偏差。

### 实施例 1

#### 合成表达盒的产生

##### A.产生合成多核苷酸

用于实践本发明的多核苷酸序列通常经处理以在所需宿主或宿主细胞中最大地表达其基因产物。以下是有关密码子优化和 HIV 多肽的功能性变体的一些示范性指导。以下步骤的顺序可变。

首先,可修饰 HIV-1 密码子使用模式使得到的核酸编码序列与在高度表达的人基因中发现的密码子使用相差不大。HIV 密码子使用反映了密码子-三联体的核苷酸 A 或 T 的高含量。HIV-1 密码子使用的作用是在 DNA 序列中的高 AT 含量,这导致在 RNA 中的高 AU 含量以及降低 mRNA 的翻译能力和稳定性。比较起来,高度表达的人密码子优选核苷酸 G 或 C。通常修饰编码多肽的野生型多核苷酸序列以使与在高度表达的人基因中发现的密码子使用相差不大。

其次,产生了一些基因变体(例如,野生型多肽的突变形式)。下表(表 2)公布了影响几种 HIV 基因活性的突变。

表 2

基因	“区域”	示范性突变
Pol	Prot	<b>Att</b> =通过蛋白酶减毒作用降低活性(Thr26Ser)(例如, Konvalinka 等, 1995, J Virol 69:7180-86)
		<b>Ina</b> =突变的蛋白酶, 非功能性酶(Asp25Ala)(例如, Konvalinka 等, 1995, J Virol 69:7180-86)
	RT	<b>YM</b> =催化中心缺失(YMDD_AP; SEQ ID NO:7)(例如, Biochemistry, 1995, 34, 5351, Patel 等) <b>WM</b> =引物夹紧区域缺失(WMGY_PI, SEQ ID NO:8)(例如, J Biol Chem, 272, 17, 11157, Palaniappan 等, 1997)
	RNA 酶	无直接突变, RNA 酶受 RT 中“WM”突变的影响

	整合酶	<p>1)HHCC 结构域突变, Cys40Ala(例如, Wiskerchen 等, 1995, J Virol, 69:376)。</p> <p>2)催化中心失活, Asp64Ala、Asp116Ala、Glu52Ala(例如, Wiskerchen 等, 1995, J Virol, 69:376)。</p> <p>3)最小 DNA 结合结构域的失活(MDBD), Tip235 缺失(例如, Ishikawa 等, 1999, J Virol, 73:4475)。</p> <p>构建物 int.opt.mut.SF2 和 int.opt.mut_C(南非 TV1)均含有这些突变(1、2 和 3)</p>
Env		<p>切割位点的突变(例如, Earl 等, (1990) PNAS USA 87:648-652; Earl 等, (1991) J.Virol. 65:31-41)。</p> <p>糖基化位点的突变(例如, GM 突变体, 如将 V1 和/或 V2 中的 Q 残基改变为 N 残基; 也可通过在序列中改变残基来设计)</p> <p>V1、V2、V3、V4 或 V5 区域或其组合的缺失或修饰(参见, 例如 US 6602705)</p> <p>B-片层区域的缺失或修饰(参见, 例如 WO 00/39303)</p>
Tat		反式激活区域中 Tat 的突变体(例如, Caputo 等, 1996, Gene Ther. 3:235), 例如 cys22 突变体(Cys22Gly)、cys37 突变体(Cys37Ser)和双突变体
Rev		Rev 结构域中的突变(例如, Thomas 等, 1998, J Virol. 72:2935-44), 例如, RNA 结合-核局部化 ArgArg38, 39AspLeu 中的突变, 激活结构域 LeuGlu78, 79AspLeu=M10 中的突变
Nef		<p>豆蔻酰化信号和寡聚化结构域中的突变, 例如:</p> <p>1.单点突变豆蔻酰化信号: Gly-至-Ala</p> <p>2.N-末端最初 18(亚型 B, 例如 SF162)或 19(亚型 C, 例如南非克隆)个氨基酸缺失(例如, Peng 和 Robert-Guroff, 2001, Immunol Letters 78:195-200)</p> <p>单点突变寡聚化(例如, Liu 等, 2000, J Virol 74:5310-19)</p> <p>影响(1)HIV-病毒体的感染力(复制)和/或(2)CD4 下调的突变。(例如, Lundquist 等, (2002) J Virol. 76(9):4625-33)</p>
Vif		<p>Vif 的突变:</p> <p>例如, Simon 等, 1999, J Virol 73:2675-81</p>
Vpr		<p>Vpr 的突变:</p> <p>例如, Singh 等, 2000, J Virol 74:10650-57</p>
Vpu		<p>Vpu 的突变:</p> <p>例如, Tiganos 等, 1998, Virology 251:96-107</p>

含有这些突变的示范性多核苷酸已见描述(参见, 例如 PCT 国际公开号 WO/00/39302; WO/00/39303; WO/00/39304; WO/02/04493; WO/03/004657;

WO/03/004620 和 WO/03/020876)。鉴于本说明书的指导，采用上表所示的指导可降低或消除相关基因产物的功能。

本发明一方面包括 Env 编码序列，所述序列包括(但不限于)编码以下 HIV 所编码多肽的多核苷酸序列：gp160、gp140 和 gp120(参见，例如描述 HIV-1<sub>SF2</sub>(“SF2”)Env 多肽的美国专利号 5,792,459)。不难确定这些多肽之间的关系。多肽 gp160 包括 gp120 和 gp41 的编码序列。多肽 gp41 由包括寡聚化结构域(OD)和跨膜结构域(TM)的几个结构域组成。在天然包膜中，寡聚化结构域要与三个 gp41 多肽非共价结合以形成三聚物结构；通过与 gp41 三聚物(及自身)的非共价相互作用，gp120 多肽也组成三聚结构。切割位点(或几个切割位点)约存在于 gp120 的多肽序列和对应于 gp41 的多肽序列之间。该切割位点(或几个切割位点)可突变以防止在该位点的切割。得到的 gp140 多肽对应于 gp160 的截短形式，其中删除了 gp41 的跨膜结构域。由于在 gp41 部分中存在寡聚化结构域，该 gp140 多肽可以单体和寡聚(即，3 聚物)形式存在。当突变切割位点以防止切割以及删除 gp41 的跨膜部分时，得到的多肽产物命名为“突变的”gp140(例如，gp140.mut)。本领域的人员可明白，可以各种方式突变切割位点。(也参见，例如 PCT 国际公开号 WO 00/39302 和 WO/02/04493)。

可从任何已知的 HIV 分离物选择野生型 HIV 编码序列(例如，Gag、Env、Pol、tat、rev、nef、vpr、vpu、vif 等)并且可根据本发明的指导对这些序列进行处理以最大表达它们的基因产物。野生型编码区域可以一种或多种以下方式来修饰：删除编码 Env 的超变区，特别是 V1 和/或 V2 的序列，和/或将突变引入，例如编码 Env 中切割位点的序列中以取消寡聚的 gp140 被酶切割成 gp120 单体。(参见，例如 Earl 等，(1990) PNAS USA 87:648-652; Earl 等，(1991) J.Virol. 65:31-41)。在又一实施方式中，删除了超变区、除去了糖基化位点和/或使切割位点突变。如上所述，可将不同的突变引入不同基因的编码序列(参见，例如表 2)。

为产生本发明的合成非编码序列，设计含有完整的感兴趣编码序列的基因盒。通过寡核苷酸合成和 PCR 扩增构建合成的基因盒以产生基因片段。选择引物以提供用于亚克隆的方便的限制性位点。然后连接得到的片段以产生完整的所需序列，再将该序克隆入合适的载体。最终的合成序列是：(i)经限制性内切酶消化和分析筛选的，(ii)为确认得到所需序列而经 DNA 测序和(iii)通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹确认所表达蛋白质的同一性和完整性。合成的编码序列由 Chiron Corp.(Emeryville, CA) 或 Midland Certified Reagent Company(Midland, Texas)装配。

本发明的合成序列的同一性百分比可用，例如 Smith-Waterman 检索算法(Time Logic, Incline Village, NV)，按照以下示范性参数来确定：权重矩阵=nuc4x4hb；间隔开放罚分=20、间隔延伸罚分=5、报道阈值=1、对比阈值=20。

可组合本发明不同实施方式的各种形式(例如构建物)。

## 实施例 2

### 测定免疫应答的方法

#### A. 体液免疫应答

免疫后 0 和 2-4 周间隔的小鼠血清用合适抗-HIV 抗体 ELISA(酶联免疫吸附测定)检测体液免疫应答。

血清的抗体效价通过抗-HIV 抗体 ELISA 测定。简言之，筛选免疫小鼠的血清中直接抗 HIV 包膜蛋白的抗体。以每孔 0.2 $\mu$ g HIV 包膜 gp140 蛋白涂布 ELISA 微效价板过夜并洗涤 4 次；然后用 PBS-0.2%吐温(Sigma)封闭 2 小时。除去封闭溶液后，加入 100 $\mu$ l 稀释的小鼠血清。此后，以 1/25 稀释并通过连续的 3 倍稀释测试血清。洗涤微效价板 4 次并与继发性、过氧化物酶偶联的抗小鼠 IgG 抗体(Pierce, Rockford, IL)孵育。洗涤 ELISA 板并向每孔加入 100 $\mu$ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB; Pierce)。15 分钟后测量每孔的光密度。所报道的效价是得到最大光密度(O.D.)一半的血清稀释度的倒数。

基本如 Buge 等, J. Virol. 71:8531-8541 (1997)和 Lubeck 等, Nature Med. 3:651-8 (1997)所述地进行 Ad5 和 Ad7 微量滴定中和试验。

这些测定结果用于显示本发明的多核苷酸/多肽免疫方法在小鼠中产生免疫应答的效力。

#### B. 细胞免疫应答

特定的细胞毒性 T-淋巴细胞(CTL)的频率通过肽脉冲 Balb/c 小鼠 CD4 细胞的标准铬释放测定来评价。HIV 蛋白表达的牛痘病毒感染的 CD-8 细胞可用作阳性对照(vv-蛋白)。简言之，脾细胞(效应细胞, E)获得自 BALB/c 小鼠(如上所述免疫)。培养、再次刺激细胞并测定抗，例如包膜蛋白脉冲靶细胞的 CTL 活性(参见，例如一般描述该测定的 Doe, B.和 Walker, C.M., AIDS 10(7):793-794, 1996)。在标准 <sup>51</sup>Cr 释放测定中检测细胞毒性活性。靶细胞(T)与效应细胞(E)以各种 E:T 比例一起培养 4 小时，

双复孔的平均 cpm 用于计算特定的  $^{51}\text{Cr}$  释放百分比。

免疫小鼠中的抗原特异性 T 细胞应答也可由 zur Megede, J.等, 在“序列修饰的 1 型人免疫缺陷病毒亚型 B pol 和 gagpol DNA 疫苗的表达和免疫原性”(Expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 subtype B pol and gagpol DNA vaccines), *J Virol.* 77:6197-207, (2003)中所述的胞内细胞因子生产的流式细胞术测定(细胞因子流式细胞术或“CFC”)来检测。

细胞毒性 T 细胞(CTL)或 CFC 活性在回收自用本文所述 HIV DNA 构建物和多肽免疫的小鼠的脾细胞中检测。免疫动物的效应细胞一般表现出特异性裂解作为 CTL 应答指标的 HIV 肽脉冲 SV-BALB(MHC 匹配)靶细胞。肽脉冲的和来源于 MHC 不匹配小鼠品系(MC57)的靶细胞不裂解。CTL 或 CFC 测定的结果用于显示本发明的多核苷酸/多肽免疫方法通过 DNA 免疫诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答的效力。

### C. 产生 ADCC 活性

如前所述, 抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)也可为免疫的宿主提供保护。可用本领域熟知的各种标准免疫试验测定这种应答。(参见例如, Montefiori 等(1988) *J. Clin Microbiol.* 26:231-235; Dreyer 等(1999) *AIDS Res Hum Retroviruses* (1999) 15(17):1563-1571)。

## 实施例 3

### 体内免疫原性研究

#### A. 通用免疫方法

为评价使用本发明的组合物(含有多核苷酸组分和多肽组分)和方法产生的免疫应答, 使用豚鼠、家兔、小鼠、恒河猴、狒狒和/或黑猩猩进行研究。这些研究的结构一般如下表(表 3)所示。

优选用最低 Ad5-和 Ad7-交叉反应性抗体选择动物。

以前描述了 delAd5-E3、Ad7delE3、Ad5delE1/E3 和 Ad7delE1/E3 载体(Nan X.等, “开发 Ad7 粘粒系统和产生 Ad7 $\Delta$ E1 $\Delta$ E3HIV(MN) env/rev 重组病毒”(Development of an Ad7 cosmid system and generation of an Ad7deltaE1deltaE3HIV(MN) env/rev recombinant virus), (*Gene Ther.* 10(4):326-36 (2003))。类似地, 非复制型  $\alpha$  病毒载体的描述参见例如, Dubensky 等, *J Virol.* (1996) 70:508-519; 和国际公开号 WO 95/07995

和 WO 96/17072; 美国专利号 5,843,723; 美国专利号 5,789,245; 美国专利号 6,015,686; 美国专利号 5,814,482; 美国专利号 6,015,694, 美国专利号 5,789,245, EP 1029068A2, 国际公开号 WO 9918226; EP 00907746; 国际公开号 WO 9738087A2, 和 Perri 等(2003) *J. Virol* 77(19):10394-403。

表 3

初敏阶段	加强免疫阶段 1	加强免疫阶段 2
复制型腺病毒	非复制型 $\alpha$ 病毒	无或仅佐剂
复制型腺病毒	非复制型 $\alpha$ 病毒	蛋白 Env+佐剂
非复制型腺病毒	非复制型 $\alpha$ 病毒	无或仅佐剂
非复制型腺病毒	非复制型 $\alpha$ 病毒	蛋白 Env+佐剂
非复制型 $\alpha$ 病毒	非复制型腺病毒	无或仅佐剂
非复制型 $\alpha$ 病毒	非复制型腺病毒	蛋白 Env+佐剂

初敏和加强免疫阶段可以单次或多次给予载体或蛋白质。初敏和加强的基因递送载体可编码不同亚型、毒株或分离物的类似蛋白(如亚型 B 和亚型 C 的 Env、Gag、Gagpol、rev 蛋白)。在优选实施方式中, 编码的多肽是 env 多肽。任选蛋白可来自载体编码蛋白的一种或多种亚型或来自一种或多种不同亚型。例如, 初敏基因递送载体可编码毒株 MN 的 env, 类似的加强基因递送载体可包含 SF162 的 env。如本文进一步所述, 可对多肽和/或编码该多肽的多核苷酸进行截短修饰或其它改变以提高其免疫原性。

混合样品(即本例中的 B 和 C)中各 DNA 和/或蛋白质加入的量可等于一次免疫中的递送量(以便递送 2X 总 DNA 和/或蛋白质的量), 或者可调整混合样品中各 DNA 和/或蛋白质的量, 以便在混合或单个样品中递送相同总量(IX)的 DNA 和/或蛋白质。

除了举例说明多核苷酸组分和多肽组分组合的表 3 中的例子以外, 也可考虑其它组合。

可采用佐剂, 如 MF59C 佐剂或 Iscomatrix 佐剂, MF59C 佐剂是溶于 10 mM 柠檬酸盐 pH 6 中的 5% 鲨烯、0.5% 吐温 80、0.5% Span 85 的微流体化乳剂, 以 10 ml 等份储存于 4°C; Iscomatrix 佐剂是用于蛋白质递送的基于皂草毒蛋白(quil saporin)的佐剂(购自(如)CSL Limited, Victoria, Australia)。

## B. 小鼠

可按照表 3 说明的免疫方案并使用基本上如实施例 2 所述的方法在小鼠中进行

实验。

### C.豚鼠

在豚鼠中进行的实验如下。各组(每组 6 只豚鼠)在 0、4 和 12 周用如表 3 所示含有表达盒的初敏基因递送载体经胃肠外(例如,肌肉内或真皮内)或粘膜免疫,所述表达盒含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽。然后,一亚组动物约于 12-24 周用如表 3 所示单剂量(肌肉内、真皮内或粘膜)的加强基因递送载体和任选的蛋白质加强免疫。然后可以 8-16 周的间隔用第二基因递送载体和任选的 HIV 蛋白加强免疫动物多次。

在第三次初敏 DNA 免疫两周后和 DNA 加强两周后检测抗体效价(几何平均效价)。这些研究的结果用于证明本发明的组合物和方法产生免疫应答,特别是产生广泛和强有力抗各种 HIV 毒株的中和活性的有效性。

### D.家兔

在家兔中进行的实验如下。用含有表达盒的初敏基因递送载体在多位点经肌肉内或真皮内(使用针注射,然后使用或不使用电穿孔,或使用 Bioject 无针注射)或粘膜免疫家兔,所述表达盒含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽。然后,一亚组动物用如表 3 所示单剂量(肌肉内、真皮内或粘膜)的加强基因递送载体和任选的蛋白加强免疫。动物可用加强载体和任选蛋白加强免疫多次。

用于产生免疫应答的本发明组合物一般是高度免疫原性的并且在家兔中仅免疫两次后即产生显著的抗原结合抗体的应答。

这些研究的结果用于证明本发明的组合物和方法产生免疫应答,特别是产生广泛和强有力抗各种 HIV 毒株的中和活性的有效性。

### E.恒河猴

在恒河猴中进行的实验如下。在约 0、4、8 和 24 周用如表 3 所示含有表达盒的初敏基因递送载体经胃肠外或粘膜免疫恒河猴,所述表达盒含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽。可利用增强的 DNA 递送系统来增加在免疫方案的 DNA 初敏期间的免疫应答,所述系统例如使用与 PLG 微粒形成复合物的 DNA 或 DNA 的盐水注射接着进行电穿孔。

然后,一亚组动物用如表 3 所示单剂量(肌肉内、真皮内或粘膜)的加强基因递送



载体加强免疫。然后可以 3-6 个月的间隔用加强基因递送载体和任选的 HIV 蛋白加强免疫动物多次。通常, 在使用 2 或 3 次 1mg 剂量的多核苷酸组分后通过 CTL 测定或细胞因子流式细胞术检测到恒河猴具有可检测的 HIV 特异性 T 细胞应答。也可检测中和抗体。这些研究的结果用于证明本发明的组合物和方法产生免疫应答, 特别是产生广泛和强有力抗各种 HIV 毒株的中和活性的有效性。

#### F. 狒狒

用如表 3 所示含有表达盒的初敏基因递送载体经胃肠外或粘膜免疫狒狒 4 次(在约 0、4、8 和 24 周), 所述表达盒含有一种或多种 HIV 免疫原性多肽。初敏基因递送载体可在盐水中(有或没有电穿孔)或在 PLG 微粒上递送。然后, 一亚组动物用如表 3 所示单剂量(肌肉内、真皮内或粘膜)的加强基因递送载体和任选的 HIV 蛋白加强免疫。通常可以 3-6 个月的间隔用加强基因递送载体和任选蛋白加强免疫动物多次。

每次免疫后 2-4 周对动物放血并用分离的血浆进行 HIV 抗体 ELISA。该 ELISA 基本上按下文 G 章节所述进行, 除了使用的二抗共轭物一般是以 1:500 稀释的抗-人 IgG, g-链特异性过氧化物酶共轭物(Sigma Chemical Co., St. Louis, MD 63178)。50 $\mu$ g/ml 酵母提取物可加入血浆样品和抗体共轭物的稀释液以降低由于狒狒中预先存在的酵母抗体造成的非特异性背景。在用 HIV-多肽加强后通常在狒狒中观察到淋巴增殖应答。这种增殖结果是诱导 T 辅助细胞功能的指标。这些研究的结果用于证明本发明的组合物和方法产生免疫应答, 特别是产生广泛和强有力抗各种 HIV 毒株的中和活性的有效性。

#### G. 体液免疫应答

如实施例 2 所述, 在任何免疫动物模型(包括上述以及, 例如黑猩猩)中, 在免疫后的各个时间用抗-HIV 抗体 ELISA(酶联免疫吸附测定)检测免疫动物的血清样品中的体液免疫应答。简言之, 筛选免疫动物的血清中直接抗用于免疫动物的 DNA 编码的 HIV 多肽/蛋白质和/或用于免疫动物的多肽(例如, 寡聚的 gp140)的抗体。通常使用对应于免疫研究中使用的每种亚型的多肽进行独立 ELISA 测定。

ELISA 微滴定板的孔用选择的 HIV 多肽/蛋白质涂布过夜, 洗涤 4 次, 然后用 PBS-0.2%吐温(Sigma)封闭 2 小时。除去封闭液后, 加入 100 $\mu$ l 稀释的小鼠血清。然

后，以 1/25 稀释并用连续 3 倍稀释来测试血清。洗涤微滴定板 4 次并与继发性、过氧化物酶偶联的抗-小鼠 IgG 抗体孵育(Pierce, Rockford, IL)。洗涤 ELISA 板并向每孔加入 100 $\mu$ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB; Pierce)。15 分钟后检测每孔的光密度。所报道的效价一般是得到最大光密度(O.D.)一半的血清稀释度的倒数。

也可按照实施例 2 所述评价细胞免疫应答。

血清中中和抗体的存在基本上如下测定：在来源于 Nathaniel Landau 博士(Salk Institute, San Diego, CA)的 5.25.EGFP.Luc.M7(M7-luc)细胞中检测病毒中和作用。除了使用市售荧光素酶试剂盒(Promega)通过荧光素酶报道基因表达来定量病毒感染外，该测定的形式基本上与其它文献所述的 MT-2 试验相同(Montefiori 等, (1988) *J.Clin Microbiol.* 26:231-235)。所有血清样品在测定前于 56 $^{\circ}$ C，热灭活 1 小时。HIV-1 分离物的病毒原种在 PBMC 中产生。

虽然详述了本发明的一些优选实施方式，应理解的是可作出明显的改变而不脱离本发明的构思和范围。提供以下实施例仅为说明性目的，决非想限制本发明的范围。