

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880002138.8

[51] Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月6日

[11] 公开号 CN 101622364A

[22] 申请日 2008.1.11

[21] 申请号 200880002138.8

[30] 优先权

[32] 2007.1.11 [33] US [31] 60/879,803

[86] 国际申请 PCT/US2008/000412 2008.1.11

[87] 国际公布 WO2008/088747 英 2008.7.24

[85] 进入国家阶段日期 2009.7.13

[71] 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳州

[72] 发明人 巴顿·F·海恩斯

南希·G·斯密斯

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 郝传鑫

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 32 页

[54] 发明名称

监测 HIV 感染的方法

[57] 摘要

本发明大体涉及人类免疫缺陷病毒(HIV)，特别涉及一种监测 HIV 感染的强度并预测发展成获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的时间的方法。

1. 一种使用抗 HIV 药物识别需要治疗的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的病人的方法, 该方法包括:

i) 从所述病人获得血浆样品, 和

ii) 测定在所述样品中的 Fas 配体、肿瘤坏死因子受体 2 (TNFR2)、微粒或 TRAILA 的水平,

其中相对于对照具有升高的 Fas 配体、TNFR2、微粒或 TRAIL 的血浆水平的病人是需要所述治疗的病人。

2. 如权利要求 1 的方法, 其中所述对照是所述病人感染 HIV 前的 Fas 配体、TNFR2、微粒或 TRAIL 的血浆水平, 或未受感染的病人的 Fas 配体、TNFR2、微粒或 TRAIL 的血浆水平。

3. 如权利要求 1 的方法, 其中需要所述治疗的所述病人具有是所述对照至少两倍的 Fas 配体、TNFR2、微粒或 TRAIL 的血浆水平。

4. 如权利要求 1 的方法, 其中微粒的水平被测定。

5. 如权利要求 1 的方法, 其中微粒的水平是通过流式细胞仪来测定的, 或通过被捕获在抗体覆盖的板上的微粒来测定。

6. 如权利要求 1 的方法, 其中所述微粒是 CD45+、磷脂酰丝氨酸+或 CCR5+。

7. 如权利要求 1 的方法, 其中 Fas 配体的水平被测定。

8. 如权利要求 1 的方法, 其中 Fas 配体的水平是通过 ELIZA 分析来测定的。

9. 如权利要求 1 的方法, 其中所述 TNFR2 的水平被测定。

10. 如权利要求 1 的方法, 其中 TNFR2 的水平是通过 ELIZA 分析来测定的。

11. 如权利要求 1 的方法, 其中 TRAIL 的水平被测定。

12. 如权利要求 1 的方法, 其中 TRAIL 的水平是通过 ELIZA 分析来测定的。

13. 如权利要求 1 的方法, 其中所述识别是在急性 HIV 感染期间实现的。

14. 一种检测感染 HIV 的病人的免疫系统破坏的方法, 其包括:

i) 从所述病人获得血清样品, 和

ii) 测定所述样品中的微粒的水平, 其中所述微粒是磷脂酰丝氨酸⁺、CCR5⁺、CD3⁺或 CD19⁺,

其中相对于对照具有所述微粒的升高的血浆水平的病人是遭受免疫系统破坏的病人。

15. 如权利要求 14 的方法, 其中所述对照是在所述病人感染 HIV 之前的微粒的血浆水平, 或未受感染病人的微粒的血浆水平。

16. 如权利要求 14 的方法, 其中遭受免疫系统破坏的所述病人具有是所述对照的至少两倍的微粒的血浆水平。

17. 如权利要求 14 的方法, 其中所述微粒是 CD45⁺。

18. 如权利要求 14 的方法, 所述方法进一步包括测定所述样品中的 Fas 配体、TNFR2 或 TRAIL 的水平, 其中相对于对照升高水平的 Fas 配体、TNFR2 或 TRAIL 是所述病人的免疫系统破坏的进一步指示。

监测 HIV 感染的方法

本发明要求 2007 年 1 月 11 日提交的临时申请第 60/879,803 号的优先权，通过引用将其全部内容合并至本文中。

本发明是在政府资助下、根据美国国家健康研究院授权的批准号 1 UO1 AI0678501 下完成的。

技术领域

本发明大体涉及人类免疫缺陷病毒（HIV），特别涉及一种监测 HIV 感染强度和预测发展成获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的时间的方法。

背景

急性 HIV 感染中抗体的出现时间最近被图示出来（map），并且已显示大多数抗体在对 HIV 包膜表位的峰响应（peak response）之后约两至三个星期才会出现。实际上，大多数保护性抗体（中和自体病毒的抗体）可延迟长达 1 年（Wei 等, *Nature* 422:307-12 (2003); Richman 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4144-9 (2003)）（图 1）。

Fiebig 等(*AIDS* 17:1871-1879 (2003))研究了来自美国血库的血浆供体的血浆组（plasma panel），且发现该血浆组代表围绕 HIV 传播取样的最早时间点（图 2）。这些血浆组的时间进程在任何可检测的病毒存在之前开始，并且当未发生血清转化时，继续穿过病毒上升期（ramp-up stage）（或隐蔽期）并穿过 HIV 的第一期和第二期。图 3 显示了 11 个这样的血浆组的病毒量。

为了首先理解在 HIV 传播时抗体诱导的“延迟”，首先要解决的问题是是否有免疫抑制事件，例如大量凋亡，其伴随在急性 HIV 感染期间的病毒上升期

时磷脂酰丝氨酸微粒的释放 (Mattapallil 等, *Nature* 434:1093 (2005), Veazey 等, *Science* 280:427 (1998), Guadalupe 等, *J. Virol.* 77:11708 (2003), Benchley 等, *J. Exp. Med.* 200:749 (2004), Mehandru 等, *J. Exp. Med.* 200:761 (2004), Esser 等, *J. Virol.* 75: 6173-6182 (2001), Aupelx 等, *J. Clin Invest.* 99:1546-1554 (1997), Callahan 等, *J. Immunol.* 170:4840-4845 (2003))。凋亡微粒是有活性的细胞或凋亡细胞的产物, 它们在许多疾病的血浆中增加, 包括例如系统性红斑狼疮和风湿性关节炎的自身免疫性疾病 (Distler 等, *Arth. Rheum.* 52:33337-3348 (2005), Tesse 等, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 25:2522-2527 (2005), Cerri 等, *J. Immunol.* 177:1975-1980 (2006))、克罗恩氏病 (Chamouard 等, *Dig. Dis. Sci.* 50:574-580 (2005))、冠心病和其他形式的心脏疾病 (Boulanger 等, *Cardiovas. Res.* 67:1-3 (2005)) 和慢性 HIV-1 感染 (Esser 等, *J. Virol.* 75:6173-6182 (2001), Aupelx 等, *J. Clin Invest.* 99:1546-1554 (1997))。凋亡微粒可结合至非凋亡细胞并诱导凋亡 (Distler 等, *Apoptosis* 10:731- 741 (2005)), 并且凋亡微粒是促凝血的 (Distiller 等, *Apoptosis* 10:731-741 (2005))、促炎的 (Tesse 等, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 25:2522-2527 (2005), Cerri 等, *J. Immunol.* 177:1975-1980 (2006)), 且可免疫抑制 T 细胞和 B 细胞对特异抗原的应答 (Esser 等, *J. Virol.* 75:6173-6182 (2001), Fadok 等, *J. Immunol.* 174:1393 (2005))。

微粒水平与健康成人体内的 IL-6 水平相关 (Chirinos 等, *Amer. J. Card.* 95:1258-1260 (2005))、在急性冠状动脉综合症中增加并且与血管造影的冠状动脉损害的严重程度有关 (在 Mezentsev, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:H1106-H11 14 (2005) 中有综述)。CD31/膜联蛋白 V+凋亡微粒与冠心病病人的冠状动脉内皮功能有关 (Werner 等, *Arterioscler. Throm. Vase. Biol.* 26:112-116 (2006), 2005 年 10 月电子公布)。Aupelx 等 (*J. Clin Invest.* 99:1546-1554 (1997)) 表明, 测量血浆中的凋亡微粒的水平可提供关于 HIV 中免疫细胞破坏严重程度的信息, 也可提供对抗逆转录病毒药物的反应性的指示。

本发明通过测量微粒的血浆水平并测试细胞活性和/或凋亡而提供一种在急性 HIV 感染 (AHI) 期间预测病人体内 HIV 感染的进程的方法、一种测定在 AHI 中免疫系统的潜在破坏程度的方法和一种监测感染进程的方法。

发明概述

本发明大体涉及 HIV。更具体地, 本发明涉及一种监测 HIV 感染强度和预测发展成 AIDS 的时间的方法。本发明的目的和优点将从下述描述中变得清晰。

附图简述

图 1. 紧接在急性 HIV-1 感染后的抗体应答的概括图。通过 ELISA 分析来自急性 HIV-1 感染 (AHI) 之前、期间和之后的不同时间点的血浆供体的样品, 以确定是否存在抗 gp140 的抗体、V3 环、CD4 结合位点 (BS) 和近膜端外部区 (MPER)。样品还被分析是否存在中和抗体 (Nab) 和是否存在 2F5、4E10 和 2G12 中和抗体。使用 bDNA 技术 (Chiron Diagnostics) 来定量 HIV RNA。

图 2. HIV 标记物发展的示意性半定量显示 (根据 Fiebig 等, AIDS 17: 1871 (2003)修改)。

图 3. 血浆组的病毒量。使用 bDNA 技术 (Chiron Diagnostics) 分析在 HIV-1 感染之前、期间和之后的不同时间点从血库供体获得的血浆的病毒 RNA。

图 4A-4C. AHI 期间的可溶 Fas 配体水平。通过 ELISA (Diaclone) 分析在 HIV-1 传播之前、期间和之后的不同时间点从血库供体获得的血浆中是否存在可溶 Fas 配体。每个样品重复分析两次, 误差棒代表标准偏差。还测量了这些组的病毒量 (bDNA, Chiron diagnostics) 并将病毒量显示在第二个轴上 (拷贝/ml)。图中显示了三个代表性的组。

图 5. Fas 配体水平在第 0 天之前和之后的增加百分数。对于每个单独的组成员, 将第 0 天之前 (含) 的平均 Fas 配体水平与第 0 天之后的平均 Fas 配体水平比较。

图 6A-6C. AHI 期间的肿瘤坏死因子受体 2(TNFR2)。通过 ELISA(Diaclone)分析在 HIV-1 感染之前、期间和之后的不同时间点从血库供体获得的血浆中是否存在可溶 TNFR2 配体。每个样品重复分析两次，误差棒代表标准偏差。还测量了这些组的病毒量 (bDNA, Chiron diagnostics) 并将病毒量显示在第二个轴上 (拷贝/ml)。图中显示了三个代表性的组。

图 7. TNFR2 水平在第 0 天之前和之后的增加百分数。对于每个单独的组成员，将第 0 天之前 (含) 的平均 TNFR2 水平与第 0 天之后的平均 TNFR2 水平比较。

图 8A-8C. AHI 期间的 TNF 相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 水平。通过 ELISA (Hycult) 分析在 HIV-1 感染之前、期间和之后的不同时间点从血库供体获得的血浆中是否存在可溶 TRAIL。每个样品重复分析两次，误差棒代表标准偏差。还测量了这些组的病毒量 (bDNA, Chiron diagnostics) 并将病毒量显示在第二个轴上 (拷贝/ml)。图中显示了三个代表性的组。

图 9. TRAIL 水平在第 0 天之前和第 0 天之后的增加百分数。对于每个单独的组成员，将第 0 天之前 (含) 的平均 TRAIL 水平与第 0 天之后的平均 TRAIL 水平比较。

图 10. 血库组 6246 的 TRAIL 水平。通过 ELISA(Diaclone)分析来自组 6246 的血浆样品的可溶 TRAIL 水平并分析是否存在 HIV RNA (bDNA, Chiron Diagnostics) (拷贝/ml)。样品 6246-15 (病毒量>100 拷贝/ml 的第一时间点后的 11 天) 被选择用来作微粒的流式细胞分析。

图 11. 在 AHI 血浆中的纯化的微粒的流式细胞分析。纯化的微粒是通过使用星形孢菌素刺激 Jurkat 细胞 (ATCC TIB-152) 24 小时而制备的。通过高速离心收集微粒，并将颗粒重悬在 PBS 中。将血浆 (样品 6246-15) 稀释在 PBS 中。所有样品都以在 PBS 中 1:10 的最终稀释度来分析。通过 PBS 样品确定设门 (gating)，并且全事件 (total events) 被记录 2 分钟。

图 12. 纯化的微粒和 AHI 血浆的表型分析。纯化的微粒制剂或血浆（样品 6246-15）被稀释并直接用抗 CD3 和 CD45 的 APC 结合的抗体染色。通过 PBS 样品确定设门，并且全事件（#e）被记录 2 分钟。所显示的百分数代表门（gate）内的事件和平均荧光强度（MFI）以及信噪比（S/N）。

图 13. 微粒的抗磷脂酰丝氨酸染色。使用抗磷脂酰丝氨酸 2aG4 抗体或 C44 对照抗体对血浆（样品 6246-15）进行染色。随后与二抗（羊抗人 FITC 结合的抗体）一起温育。

图 14. HIV 感染的 T 细胞显示出抗磷脂酰丝氨酸。H-9 细胞（ATCC CRL-8543）或被 HIV 感染，或未被感染而被用作对照。随后使用对照抗体（抗人表皮生长因子受体，Erbtux）或抗磷脂酰丝氨酸（Tarvicin）染色细胞。随后细胞被与二抗（结合的（FITC-或金-标记的）羊抗人抗体）一起温育。

图 15. 微粒在 AHI 血浆中表达磷脂酰丝氨酸。利用流式细胞仪来分析各个时间点（病毒量被检测前的 21 天（第-21 天），在病毒量被测定为 >100 拷贝/ml 后的第 7、11 和 14 天）的组 6246 是否存在用抗磷脂酰丝氨酸抗体（2aG4）染色的微粒。作为对照，还以相同方式分析来自正常的未感染血库供体的血浆。

图 16A-16C. 与 HBV 组的比较

图 17A-17C. 图 17A. 从 OT1 T 细胞中分离出的微泡的 TEM。为免疫显微研究，OT1 微泡被施加至涂布有聚 L-赖氨酸的电子显微镜格栅上、被用 1% BSA 阻断，并用抗 CD8a 和抗 TCRb（图 17B）抗体双重标记。15nm（CD8，粗箭头）或 5nm（TCR，细箭头）Au 标记的链霉抗生物素蛋白结合的抗体被用作二抗。使用 OsO₄ 清洗和处理栅格，并使用透射式电子显微镜检查。图 17C. 将微泡锚定至 L1 传感器芯片（通过亲脂性连接体）的 BIAcore 结合分析的示意图和与肽-MHC 复合物之间的结合相互作用。

图 18. OT1 微泡被如示意性显示在图 17C 中那样锚定在 BIAcore L1 传感器芯片上。在基线稳定后并在注射 BSA 以阻断非特异性结合后，Ova-K^b（上方线

条) 或对照 VSV-K^b (下方线条) 四聚体以 0.25 mg/mL 被注射。结合应答显示 OVA-K^b 肽特异性结合至表达微泡的 OT1 TCR。

图 19A-19C. HIV-1、丙肝病毒 (HCV) 和乙肝病毒 (HBV) 血浆供体受试者的血浆病毒量。研究了 30 个 HIV+ 血清转化血浆供体血浆组 (HBV 和 HCV 阴性)、10 个 HBV 血浆供体血清转化组 (HIV 阴性) 和 10 个 HCV 血浆供体血清转化组 (HIV 阴性)。这些组证实了 HIV (图 19A)、HCV (图 19B) 和 HBV (图 19C) 中病毒上升的动力学。T₀ 被定义为: HIV 病毒量达到 100 拷贝/ml 的第一天, HCV 病毒达到 600 拷贝/ml 的第一天或 HBV 病毒达到 700 拷贝/ml 的第一天。

图 20-20C. 细胞死亡的血浆标记物。图 20A. 通过 ELISA 测量每个血浆样品的 TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体, 并与病毒量水平比较。图 20B 显示了三个代表性的受试者。为了比较受试者之间凋亡的血浆标记物的增加, 将 T₀ 前的平均值与 T₀ 后的平均值比较, 并计算增加百分数。图 20C. 相同的凋亡的血浆标记物还在 10 个 HCV 或 HBV 急性感染受试者中被测量。图中显示了一个 HCV 和一个 HBV 受试者中的代表性的结果。

图 21A-21C. 血浆分析物峰值水平与每个组中的第一个血浆以及未感染的血浆的比较。图 21A. 对于每组数据进行 Boxplot 分析, 并显示了急性 HIV-1、HBV 和 HCV 组的结果, 其中垂直线意味着最大值和最小值。使用 Student 氏 T 测试来计算 P 值。阴影方框表示 p<0.01。图 21B. 在 30 个被研究的急性 HIV-1 感染的患者内, 30/30、27/30、26/30 分别表明 TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体水平的峰值接近 (在 15 天内) 病毒量峰值。而且, 21/30 病人表明 TRAIL 水平在病毒量达到峰值之前达到峰值, 而 16/30 TNFR2 和 Fas 配体水平与病毒量同时达到峰值。对所研究的 10 个 HCV 和 HBV 受试者进行了同样的分析。图 21C 显示峰值分析物相对最大病毒扩张 (maximum viral expansion) 的时序 (timing)。结果来自配对 Wilcoxon 秩检验, 低 p 值显示两个平均数 (峰值天数) 是明显不同的。这暗示, 平均的峰值“达峰时间” (例如, 峰值扩张日和峰值 TRAIL 日)

是明显不同的。达峰时间之间的延迟可以平均值、中值和四分位差的方式来描述。每种分析物最大值的到达时间被与峰值病毒扩张的时间（最左边方框）比较。由 Wilcoxon 检验算出的 p 值显示在分析物的上方。有意义的 p 值显示峰值分析物水平的平均日显著不同于病毒扩张的峰值平均日或最大速度平均日。还记载了平均延迟时间（括号内的中等时间）。开圆表示离群值。

图 22A 和 22B. 血浆样品中的相对微粒计数。图 22A. 对于每个血浆供体受试者，获得每个连续时间点的相对微粒计数。研究了 30 个受试者，显示了三个代表性的受试者。图 22B. 对 10 个 HBV 和 HCV 感染受试者进行同样的分析。图中显示了在一个代表性的 HCV 和一个 HBV 受试者中的连续时间点的结果。微粒 (MP) 计数为 \blacklozenge ，病毒量为 x 。

图 23A-23C. 急性 HIV-1 感染中血浆 MP 的形态学和 CCR5 表达。图 23A 显示从急性 HIV-1 感染受试者 (6244) 收集的 plasma MP 的电子显微图片。通过超速离心法将 plasma MP 制成小球状，并通过蔗糖垫纯化。大箭头显示尺寸为 100 nm 至 1 μ M 的双膜微粒。小箭头显示 30-100 nm 的颗粒 (外来体)。棒=100 nm。图 23B 显示在急性 HIV-1 感染期间存在 CCR5+ MP。图 23B. MP 的流式细胞分析，与同种型阴性对照相比 (上图) MP 是 CCR5+ (下图)。图 23C 显示在 5 个不同的血清转化组中、在第一个血清样品中和在峰值 MP 计数时的 CCR5+MP (%CCR5+ MP, 它由表型流式分析乘以相对 MP 计数来决定) 的数目比较。

图 24A 和 24B. PWM/oCpG-刺激的扁桃体 B 细胞的 MP 诱导的抑制。图 24A. 从健康供体获得的扁桃体细胞被单独培养或在存在 PWM 和 oCpG 的情况下与或不与源自 PBMC 的 MP 一起培养。MP 的存在诱导了总 IgG 和 IgA 的减少的产出。数据代表五个实验，并以平均数 \pm SEM 的形式表示。图 24B 显示通过增加 PBMC MP 的量而形成的 IgG 的剂量依赖性抑制。

图 25A-25C. 测量 plasma MP 的流式细胞技术的发展。首先分析了聚苯乙烯珠粒的混合物 (图 25A)。尺寸为 0.1 μ m 至 1.0 μ m 的珠粒以等比例混合物，并被稀释，且使用 BD LSRII 来分析。使用侧向散射作为尺寸鉴别器，因为光电倍增

管比前向散射检测器的二极管具有增强的鉴别较小颗粒的能力。为了确定最佳的稀释范围，分析了一连串连续稀释的聚苯乙烯珠粒混合物（图 25B）。我们发现，任何未被充分稀释的样品因为重合和高中断率而产生了不实的低的事件计数。样品被稀释到一次只有一个微粒流过激光束的时候，细胞仪处理的计数事件将更加精确。实际上，当珠粒混合物以 1:1000 稀释时，4 种不同尺寸的珠粒不能被很好地辨别，但是以 1:100,000 稀释时，可以检测到每个尺寸的清楚的个数。为分析血浆微粒（图 25C），使用相似的稀释系列来实验性地确定最佳稀释度（数据未示出）。通过将 0.1 μm 珠粒包括在低侧向散射范围、将 1.0 μm 珠粒包括在较高侧向散射范围，而将具有非常小的前向散射和侧向散射的颗粒排除，而画出 MP 门（参见图 25A 和图 25C 的方框）。对于每个实验，以 1:100,000 稀释度分析聚苯乙烯胶料珠粒，使得所有数据都以相同方式被设门。在血浆样品中，大部分 MP 被发现在 0.1 至 0.5 μm 之间（微粒门内的数目证实侧向散射面积小于 10^4 ）。存在较大的微粒（大于 0.5 μm 但小于 1.0 μm ），但比例较小。

图 26. 冻融循环对血浆 MP 表型的影响。因为一些细胞外标记物在血浆供体样品中的表达水平低，因此作了冻融血浆对 MP 表型的影响的研究。来自 HIV-1 慢性感染供体的血浆被分成 2 部分。第一部分保留在 20°C（新鲜的）。第二部分被冻融 2 次。所有样品随后被如实施例 3 中所描述的那样稀释、过滤和离心。MP 重悬液被与直接结合有 CD3、CD45、CD61（血小板 MP 标记物）和膜联蛋白 V（其结合至磷脂酰丝氨酸）一起温育。方框中的百分数显示了在去除同种型对照的背景后 MP 对那种特定标记物呈阳性的百分数。CD3、CD4、CD61 和膜联蛋白阳性 MP 的百分数在两次冻融循环后显著减少。

发明的详细描述

本发明涉及确定 HIV 中免疫系统破坏程度的方法、确定 AHI 中预测和疾病进程的方法和确定 AHI 中治疗需要的方法。本发明进一步涉及一种检测 HIV 感染的强度并预测发展成 AIDS 的时间的方法。这些方法基于免疫活化和/或凋亡

的血浆测试和血浆微粒的表型分析和定量分析。在优选的实施方式中，这些方法包括检测 TRAIL、Fas 配体和/或 TNFR2 的血浆水平。免疫系统的 HIV-1 破坏的其他血浆标记物可被单独使用或与这些测试结合使用（一种这样的标记物是核蛋白 HMGB-1，其从凋亡细胞中释放在血浆中（Nowak 等, *Cytokine* 34:17-23 (2006), 2006 年 5 月 11 日电子公布））。

微粒可来自任何免疫细胞或非免疫细胞。微粒的表型特征化具有诊断用途。HIV-1 病毒微粒是 CD45⁻，因此 CD45 可被用来区别病毒和免疫细胞微粒（Esser 等, *Virology* 75:6173-6182 (2001)）。总体来说，增加的 T 细胞微粒表明 T 细胞在体内被破坏。

重要的是要注意，TNFR2 和 Fas 配体增加的程度具有不均匀性。这表明在 AHI 期间，具有免疫系统大量凋亡的病人，也具有免疫系统少量凋亡的病人。因此，确定哪些病人需要用抗 HIV 药物治疗（即，具有升高的 Fas 配体水平、TNFR2 水平、微粒水平和 TRAIL 水平的病人），哪些病人不需要用 HIV 药物治疗（没有或具有最低的 Fas 配体水平、TNFR2 水平、TRAIL 水平和 CD45、CD3 T 细胞微粒水平），对于指导在 AHI 中的治疗很重要。

以下实施例中提供的数据证实，在 AHI 的病毒量上升期，当需要产生保护性抗体时，在许多病人体内的血浆中存在很高水平的微粒、高 TRAIL 水平、高 Fas 配体水平和高 TNFR2 水平。这些蛋白质和微粒的水平的不均匀性表明，单独或组合测量这些参数提供一种适用于预测 HIV 感染进程和发展成 AIDS 的时间的预测测试。将意识到的是，一种或多种这些参数也可与其他凋亡、细胞死亡和/或活化的标记物（例如，可溶 HMGB-1、CD25、CD69 或 T 细胞活化/凋亡的其他可溶分子）一起考虑。

虽然以下实施例中提供的细节具体涉及 HIV，但本发明在其范围内也包括，使用这些相同的参数监控其他在急性感染期间带有凋亡的传染病（Bahl 等, *J. Immunol.* 176:4284-4295 (2006)）的发展和/或临床进程的方法。

本发明的某些方面将在以下非限制性的实施例中详细描述。本发明与 2006 年 11 月 17 日提交的美国临时申请第 60/859,496 号相关，通过引用将其全部内容合并至本文中。

实施例 1

已在血库组中研究了几种凋亡的血浆标记物，包括 Fas 配体、TNFR2 和 TRAIL。TRAIL 与 HIV 感染中的活化诱导的细胞死亡有关（Katsikis 等, *J. Exp. Med.* 186:1365-1372 (1997)）。Fas 配体被发现在 AHI 中升高（图 4 和图 5）。在 11/13 病人的血浆中观察到了 Fas 配体的升高，但在 2/13 中未升高，表明在一些病人中没有或有较少的凋亡，而在其他病人中并非如此。相似地，在 11/13 病人中 TNFR2 升高，同样，在具有低 Fas 配体水平的相同的两个病人中，血浆 TNFR2 没有增加（图 6 和图 7）。最后，TRAIL 水平在所有 30 个测试病人中都升高，其中具有较低水平的其他凋亡标记物的两个病人具有较低的 TRAIL（图 8、9）。

因此，与急性 HIV 感染一起出现的大量凋亡，导致 TRAIL 的释放、经由 FAS-FASL 相互作用的凋亡的介导和含病毒和其他颗粒的 PS 的释放，所有这些共同开始免疫抑制宿主，阻止了快速的保护性 B 细胞应答。

随后，进行了 AHI 样品 6246-15 中的微粒的流式细胞仪表型分析（图 10）。图 11 显示磷酸缓冲液盐（pH 7）背景的前向和侧向散射、来自星形孢菌素处理的 Jurkat T 细胞的纯化微粒的前向和侧向散射和在第 11 天峰值病毒血症（peak viremia）时的病人 6246 血浆中的微粒的前向和侧向散射。图 11 显示血浆中的微粒，每组计数 2 分钟。图 12 显示纯化的 Jurkat 微粒（pMP）或病人 6246 MP 的表型，并显示微粒可被表型分析，且 AHI 病人微粒为 78.6 % CD3+、53% CD45+。CD45 是 T 细胞和单核细胞的表面分子，其不存在于 HIV 病毒中（Esser 等, *J. Virol.* 75:6173-6182 (2001)）。因此，在图 12 中约一半的微粒像病毒，而一半的颗粒是来自未感染 HIV 的细胞的凋亡颗粒或不含有 HIV 基因物质。重要的是，

来自病人 6246 的大多数微粒是磷脂酰丝氨酸 (PS) 阳性的 (图 13)。相似的, 如图 14 所示, HIV 感染的细胞是 PS+。

实施例 2

基于表面等离子共振 (SPR) 的蛋白质组学分析已被开发用来描述来自 T 细胞的微粒的特征。该分析可以描述释放自免疫细胞的微粒的特征。图 17 和 18 图示了 SPR 分析在 T 细胞微粒的特征描述中的应用。本文所描述的分析可被用来监测抗原特异性 T 细胞应答的状态, 该状态以 TCR 特异性、蛋白质磷酸化和活化和凋亡的功能标记物来衡量。

使用 MHC I 类和 MHC II 类四聚体来描述抗原特异性 T 细胞微粒的特征

一旦活化或凋亡, 微粒即从免疫细胞 (如 T 细胞或 B 细胞) 或抗原呈递细胞中释放 (Distler 等, *Athritus & Rheumatism* 52:3337-3348 (2005))。但是, 这些微粒在数量上和质量上都不相同, 且根据诱导刺激物而改变 (Jimenez 等, *Thromb. Res.* 109:175-180 (2003); Distler 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:2892-2897 (2005); Kolowas 等, *Scand. J. Immunol.*, 61 :226-233 (2005))。因为这些颗粒携来自母细胞的膜, 表面抗原的特征可被用来确定微粒的来源。已报告称, 微粒含有免疫球蛋白家族的表面蛋白 (TCR、BCR)、糖基化磷脂酰肌醇- (GPI-) 锚定分子和四次跨膜蛋白 (tetraspan) 家族的成员 (Denzer 等, *J. Cell Sci.* 113:3336-3374 (2000); Koopman 等, *Blood* 84:1415-1420 (1994); Heijnen 等, 94:3791-3799 (1999))。

本文描述的 SPR 分析对于使用肽-MHC 四聚体检测抗原特异性 T 细胞是特别灵敏的分析。在本文所述的研究中, T 细胞微泡是从鼠科动物 OT1 T 细胞分离出的, 该 T 细胞表达对 SIINFEKL-K^b (Ova-K^b) 复合物特异的 Va2Vβ5 TCR。这些微泡的尺寸不均一, 并且如动态光散射和透射电镜所评估的, 它们的流体动力学半径在 400 nm 至 70 nm 内变化 (图 17A)。一旦细胞裂解并在蔗糖浓度离心以收集耐洗涤性微区 (detergent resistant microdomain, DRM) 后, 微泡会

本能地释放进培养物中。已报道称, DRM 在 TCR/CD3 复合体和共同受体 (CD8/CD4) 分子中是富集的 (Montixi 等, The EMBO J. 17:5334-5348 (1998))。

本文报道的是基于 SPR 的分析的进展, 其中微泡首先被锚定至固定在 Li 传感器芯片 (BIAcore Inc.) 的表面上的脂质连接体 (图 17 1C)。约 1600 个应答单位 (response unit, RU) 的 OT1 微泡被锚定至 L1 传感器芯片上, 其后为一段时间的表面稳定化, 注射 BSA (0.5 mg/mL) 5 分钟以阻断非特异性结合。当与对照 VSV-K^b 复合体相比时, 注射 Ova-K^b 复合体赋予锚定的 OT1 微泡特异性的结合 (图 18)。这证实, SPR 分析可被用来监测在活化或凋亡后是否存在从 T 细胞中释放出微粒。另外, 微泡被捕获在 L1 传感器表面上 (以 RU 单位计) 可使用已知尺寸的标准合成微泡和总磷脂量来定量。因此, 可能监测从来自 HIV 感染个体的样品中的 T 细胞释放出的微泡, 并确定经受凋亡的 T 细胞上的 TCR 的抗原特异性。T 细胞微泡将被选择性地捕获在抗 CD3 固定的表面上, 且随后使用 MHC I 类或 MHC II 类四聚体确定捕获的微泡的抗原特异性。

上述分析并不限于 T 细胞微粒, 也包括对来自 B 细胞的微粒的特征进行描述。B 细胞特异性四聚体已被开发出来 (参见美国临时申请第 60/840,423 号) 且已在 SPR 结合分析中和通过流式细胞仪被测试特异性。

T 细胞微粒的蛋白质磷酸化状态的特征描述

微粒由脱落的质膜片段组成并且包括胞质元素 (Distler 等, Arthritis & Rheumatism 52:3337-3348 (2005))。对于 T 细胞微粒, Src 激酶、Lck 和 Fyn 和衔接蛋白 LAT 与脂质微区结合, 并且它们是 T 细胞信号传导中的关键成分 (Zhang 等, Immunity, 9:239-246 (1998); Resh 等, Nature, 387:617-620 (1997); Schade & Levine, Biochem. Biophys. Res. Commun., 296:637-643 (2002))。因此, 所描述的方法将用来研究在微粒中发现的蛋白质磷酸化状态与免疫 T 细胞活化或 HIV 感染之间的关系。

本文使用的策略包括首先使用上述 MHC 四聚体来描述 T 细胞微粒的抗原特异性, 随后界定所发现的抗原特异性微粒的磷酸化状态。所捕获的微粒将利用

BIAcore 300 的恢复能力而从 BIAcore 传感器芯片上洗脱。洗脱的颗粒随后被裂解, 然后通过以下步骤确定磷酸化状态: a) 与抗信号分子抗体 (Src 激酶、Lck、Fyn、LAT) 免疫杂交; 和 b) 2D 液相色谱, 随后通过质谱法来鉴别。洗脱的物质将使用 2D-LC 被分离, 且单个的磷酸化蛋白将使用 MALDI-TOF/TOF 被分析。使用这种方法鉴别的蛋白质将使用与抗磷抗体的普通免疫杂交而被确认是磷酸化了的。这种应用使得可以描述释放的微粒的特征, 以鉴别免疫细胞中的活化状态和信号途径以及它们在暴露于 HIV 感染时的改变。

微粒的特征化以确定目细胞的功能状态。

对于 HIV-1 病毒, 其在从感染细胞芽生的过程中将细胞特异性膜蛋白加入其病毒包膜 (Hioe 等, J. Virol. 75: 1077-1088 (2001); Laio 等, AIDS Res. Hum. Retro. 16:355-366 (2000)), 芽生微粒携带来自母细胞的细胞表面蛋白标记物。这些表面标记物是释放出标记物的 T 细胞的功能状态的迹象标记 (tell-tale sign)。除了基于流式细胞分析的微粒表型分析外, 使用上述 SPR 分析捕获来自 T 细胞的微粒也是用于确定 T 细胞的活化状态的新方法。T 细胞的功能状态是通过监测活化标记物 (CD69、CD25)、凋亡标记物 (PD1、TRAIL 受体、FAS、Fas L) 的表达来确定的。

实施例 3

HIV-1 和 SIV 感染中的关键时间是病毒诱导的大量 CD4⁺、CCR5⁺ T 细胞损失, 这种细胞损失在肠相关淋巴组织 (GALT) 中非常严重 (Guadalupe 等, J. Virol. 77:11708-11717 (2003), Brenchley 等, J. Exp. Med. 200:749-759 (2004), Mehandru 等, J. Exp. Med. 200:761-770 (2004))。已有文献证明 GALT CD4 T 细胞的耗尽发生在急性 SIVmac239 感染的峰值病毒量时 (Veazey 等, Science 280:427-431 (1998), Haase, Nat. Rev. Immunol. 5:783-792 (2005), Li 等, Nature 434:1148-1152 (2005), Mattapallil 等, Nature 434:1093-1097 (2005)), 以及人 HIV-1 传播的数周内 (Guadalupe 等, J. Virol. 77:11708-11717 (2003), Brenchley 等, J. Exp. Med. 200:749-759 (2004), Mehandru 等, J. Exp. Med. 200:761-770 (2004))。在急性 SIV

感染中, 30-40%的记忆 CD4+ T 细胞被感染 (Veazey 等, *Science* 280:427-431 (1998), Haase, *Nat. Rev. Immunol.* 5:783-792 (2005), Li 等, *Nature* 434:1148-1152 (2005), Mattapallil 等, *Nature* 434:1093-1097 (2005))。急性 HIV-1 感染期间免疫细胞死亡的机制还是未知, 但可能包括通过 HIV Tat、Vpr 或 gp120 蛋白来诱导凋亡途径 (Badley 等, *Blood* 96:2951-1964 (2000), Chase 等, *Trends Pharmacol. Sci.* 27:4-7 (2006), Boya 等, *Biochim. Biophys. Acta* 1659:178-189 (2004))、CD4+ T 细胞的 HIV-1 感染 (Guadalupe 等, *J. Virol.* 77:1 1708-11717 (2003), Mehandru 等, *J. Exp. Med.* 200:761-770 (2004), Veazey 等, *Science* 280:427-431 (1998), Li 等, *Nature* 434: 1148-1152 (2005)) 和由于例如肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 的分子杀伤引起的未感染细胞死亡的诱导 (Lum 等, *J. Virol.* 75:11128-11136 (2001), Herbeuval 等, *Clin. Immunol.* 123:121-128 (2007))。

从 HIV-1 传播到 CD4 T 细胞的潜伏性感染库的建立的时间被定义为窗口期, 在此时期内预防性 HIV-1 疫苗必须消灭 HIV-1 (Johnston 等, *N. Engl. J. Med.* 356:2073-2081 (2007), Wong 等, *Biology of Early Infection and Impact on Vaccine Design* (早期感染的生物学和对疫苗设计的影响), 第 17-22 页 (Caister Academic Press, Norfolk, UK (2007))。虽然建立 CD4 T 细胞潜伏库的确切的最早时间尚且未知, 但潜伏库最迟在血清转化时 (传播后的约第 25 天) 有急性 HIV-1 感染症状时建立的 (Wong 等, *Biology of Early Infection and Impact on Vaccine Design* (早期感染的生物学和对疫苗设计的影响), 第 17-22 页 (Caister Academic Press, Norfolk, UK (2007), Chun 等, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:8869-8873 (1998))。在 HIV-1 感染的潜伏期或病毒量上升期, 未出现 CD4、CD8 和 B 细胞获得性抗体对 HIV-1 的应答, 但在病毒量 (VL) 的下降时以及窗口期后期出现急性感染症状时出现 (Reynolds 等, *J. Virol.* 79:9228-9235 (2005), Abel 等, *J. Virol.* 79:12164-12172 (2005), Fiebig 等, *AIDS* 17:1871-1879 (2003))。因此, 研究从传播至血清病毒血症之间 (潜伏期) 以及急性 HIV-1 感染的病毒量上升期的事件,

对于理解为什么免疫应答不在 HIV-1 传播后的较早时发生是至关重要的，以及对于确定成功的疫苗必须克服什么才能消灭 HIV-1 也是至关重要的。

在下述研究中，提出了这样的假设，即，除了肠 CD4 T 细胞损失外，HIV-1 传播后的早期 HIV-1 保护性免疫应答的延迟可涉及高水平的免疫抑制物质（例如 TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体）和血浆微粒的产生。如果免疫抑制分子的升高以及早期 CD4+ T 细胞死亡发生在 HIV-1 传播后的早期，那么这就为 HIV-1 复制界定了保护时间，而抗 HIV-1 T 或 B 细胞应答被抑制。

为了研究急性 HIV-1 感染的潜伏期和早期病毒上升期，使用了血浆供体的储存（archived）血浆，可获得的样品有 HIV-1 病毒量上升期之前、期间和之后的样品（Fiebig 等(AIDS 17:1871-1879 (2003))）。在血浆中出现 HIV-1 后（对应于传播后的约第 17 天），在血浆中发现了可溶 TRAIL 的最初爆发（burst）。还发现了围绕血浆 VL 的峰值随后出现的升高的血浆 TNFR2 水平、Fas 配体水平和血浆微粒（MP）水平。这些数据暗示 TRAIL 作为急性 HIV-1 感染中细胞死亡的早期中介体，并证实了 HIV-1 疫苗必须消灭传播病毒的窗口期很窄。

实验细节

血浆样品. 从 ZeptoMetrix Corporation (Buffalo, NY) 获得血清转化组（HIV-1+/HCV-/HBV-, n=30, HIV-1-/HCV-/HBV+, n=10, 和 HIV-1-, HCV+/HCV-, n=10）。每组由血浆的连续等分试样（sequential aliquots）（4-30）组成，血浆是在急性 HIV-1 感染期间大概每隔 3 天收集一次而获得的（Huang 等, J. Immunol. 177:2304-1313 (2006)）。从 Innovative Research (Southfield, MI) 获得 HIV-1-/HCV-/HBV- 人血浆（n=25）。所有的研究都经 Duke University Human Subjects Institutional Review Board（杜克大学人类受试者制度审核委员会）批准。

病毒量测试. 通过 Quest Diagnostics (Lyndhurst, NJ) (HIV-1 RNA PCR Ultra) 进行 HIV-1 血浆供体组的病毒量测试。由 Zeptomatrix 进行 HCV 和 HBV 病毒量的测试；选择(select)HCV 病毒量由 Philip Norris, Blood Systems Research Institute, San Francisco, CA 提供。

对凋亡的血浆标记物进行 ELISA. 根据制造商的说明书对 Fas、Fas 配体、TRAIL(Diaclone, Besancon Cedex, France)和 TNFR2(Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands) 进行 ELISA。在未稀释的情况下 (TRAIL)、在以 1:10 稀释的情况下 (TNFR2) 和在以 1:2 稀释的情况下 (Fas 配体), 分析了血浆。血浆分析物随时间的推移的增加被确定为, T0 之后与 T0 之前相比, 值增加了 >20%。

凋亡微粒 (MP) 定量. 使用流式细胞仪测定每个血浆样品中 MP 的数目。所有流式细胞分析都在 LSRII Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) 上进行, 且使用 FlowJo 软件 (Ashland, OR) 进行数据分析。在用于任何 MP 实验之前, 所有的缓冲液 (不含钙、镁的 PBS 和含甲醛的 PBS (Sigma, St. Louis, MO)) 都用 0.22 μm 过滤器 (Millipore, Billerica, MA) 过滤。用来稀释血浆样品的缓冲液 (1% 甲醛的 PBS, 不含钙和镁) 被用来确定背景 MP 计数 (在流式细胞仪上计时 60 秒计数约 150 个事件)。为定义 MP 门, 在流式细胞仪上分析了尺寸在 0.1 μm 到 1 μm 之间的 FluoSpheres Fluorescent Microspheres (Molecular Probes, Eugene, OR)。MP 门被围绕珠粒 (包括 0.1 μm 、0.2 μm 、0.5 μm 和 1.0 μm 珠粒) 画出。每个血浆样品以 1:100 和 1:1000 被稀释在 1% 甲醛/PBS 中, 用时 60 秒获得数据。最佳的样品稀释度被实验性地确定, 可接受的标准是血浆的稀释度伴随 <5% 的中断计数, 且噪信比 < 0.1 (噪信比 = PBS 中背景 MP 计数/实验血浆 MP 计数)。

微粒表型分析. 通过流式细胞仪分析 MP 的上述细胞表面标记物 (Hosaka 等, J. Infect. Dis. 178:1030-1039 (1998), Stacey 等和 the NIAID Centre for HIV/AIDS Vaccine Immunology. Elevations in plasma levels of innate cytokines prior to the peak in plasma viremia in acute HIV-I infection (2007), Clark 等, N. Engl. J. Med. 324:954- 960 (1991))。血浆样品 (1-2 ml) 被 5 ml 的过滤盐水稀释, 随后通过 5 μm 过滤器 (Pall Corporation, East Hills, NY) 被过滤。被稀释的样品随后被离心 (1 小时 200,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C) (Sorvall RC MI 50 GX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。除去 2.5 ml 的上清液, 加入 2.5 ml 的新鲜盐水, 再次离心样品

(1 小时 200,000 \times g, 4°C)。在 1ml 的过滤盐水中洗涤小球 2 次；最后一次洗涤后，除去 900 μ l 的上清液，将小球重悬在剩下的 200 μ l 的盐水中。将 10 μ l 的 MP 悬浮液与抗体和/或膜联蛋白 V 一起温育（总体积为 100 μ l，温育 20 分钟，20°C，黑暗条件）。具有 1% BSA 的盐水（Sigma）被用于与抗体温育的染色缓冲液，且 2.5 mM CaCl₂ 被加入缓冲液中，以染色膜联蛋白 V。作为膜联蛋白 V 对照，向缓冲液中加入 50 mM EDTA。温育后，使用盐水/甲醛将体积调整至 500 μ l，并在 24 小时内使用流式细胞仪分析。结合的抗体包括鼠抗人 CD45-PE、CD3-PE、CD61-PerCp、CCR5-PE 和同种型对照（BD Biosciences, San Jose, CA），且膜联蛋白 V 结合至 AlexaFluor 647 (Molecular Probes, Eugene, OR)。

血浆微粒的电镜分析. 将 8 ml 的血浆以 1:5 稀释在过滤盐水中，离心使 MP 成为小球(200,000 \times g, 1 小时, 4°C)。在 1 ml 的盐水中将小球洗涤 2 次(100,000 \times g, 30 分钟)。将 MP 小球重悬在 500 μ l 的盐水中，并覆盖在 1 ml 的 40%蔗糖溶液（在盐水中）上，并离心 MP（100,000 \times g，90 分钟）。使小球固化（fix）（1% 甲醛，4°C 过夜）、成为小球（100,00 \times g，60 分钟），随后固化在 1%四氧化钨中。切出超薄的截面并乙酸铀酰后染色，并在 Philips CM12 电镜(FEI Co., Hillsboro, OR)上检查。

体内黏膜 B 细胞培养模型. 在杜克大学医学中心从实施过扁桃体切除术的儿童患者和成人患者获得了扁桃体。一旦切除，将扁桃体放在运输培养基中（具有 L-谷酰胺（Gibco, Carlsbad, CA）的 RPMI 1640），该培养基补充有 200U/ml 青霉素 G、200 μ g/ml 链霉素、50 μ g/ml 庆大霉素和 1 μ g/ml 两性霉素 B (Sigma)，并将扁桃体运输到实验室以在 4 小时内处理。将扁桃体在具有 L-谷酰胺并补充有 100 U/ml 青霉素 G、100 μ g/ml 链霉素、50 μ g/ml 庆大霉素和 2 μ g/ml 两性霉素 B 的 RPMI 1640 中充分洗涤，以防止细菌和真菌污染。为分离扁桃体淋巴细胞，将样品机械地切碎并使用消毒过的镊子切开，所产生的单细胞悬浮液被处理通过 70 μ m 尼龙细胞过滤器 (BD Biosciences)。使用淋巴细胞分离介质 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) 分离淋巴细胞并洗涤两次。根据制造商的说明书，使用

Guava EasyCyte Mini (Hayward, CA)测定细胞数目和成活力。将细胞培养在补充有 100 U/ml 青霉素 G、100 µg/ml 链霉素、25 µg/ml 庆大霉素、1 µg/ml 两性霉素 B 和 10% FBS (Gemini Bioproducts, West Sacramento, CA) 的 RPMI 1640 中, 培养密度为 1 ml 的总体积为 1×10^6 个细胞, 培养在 5 ml 聚苯乙烯圆底管 (BD Biosciences) 中进行。为了刺激抗体产生, 将细胞与 oCpG 的优化的鸡尾酒 (cocktail) (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA) 和美洲商陆有丝分裂原提取物 (PWM) 1/2000 (Crotty et al, J. Immunol. Methods 286:111-122 (2004)) 一起培养。培养 5 日后, 收集上清液并通过 ELISA 测定存在于培养上清液中的总 IgG 和 IgA 的量。简言之, 使用纯化的鼠抗人 IgG Fc (HRL, Baltimore, MD) 或纯化的鼠抗人 IgA (BD Pharmingen) 在 0.1 M NaHCO₃ 将 96 孔 ELISA 板 (Corning, Corning, NY) 涂敷过夜。使用洗涤缓冲液 (具有 0.1% Tween 的 PBS (Sigma)) 洗涤孔 3 次。使用稀释缓冲液 (1% FBS, 0.5% BSA (Sigma) 和 0.05% Tween) 在 20°C 历时 2 小时将孔封闭。将孔洗涤 3 次, 并加入用稀释液以 1:2 稀释的上清液。在 4°C 将板温育过夜, 并洗涤 3 次。加入生物素化的鼠抗人 IgG Fc (HRL) 或生物素化的鼠抗人 IgA (BD Pharminge), 并将板在 20°C 温育 2 个小时。洗涤 3 次后, 加入辣根过氧化物酶链霉亲和素 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 并将板在 20°C 温育 45 分钟。将板洗涤 3 次, 使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、底物和终止溶液体系 (KPL, Gaithersburg, MD) 继续该分析。使用纯化的 IgG 和 IgA (Sigma) 的连续稀释来构建标准曲线。

通过使用星形孢菌素来处理正常供体 PBMC 或扁桃体细胞而获得微粒 (Bell 等, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 291 :C1318- C1 325 (2006))。在 Guava EasyCyte Mini 上进行细胞成活力和细胞计数的测试, 5×10^7 个细胞被培养在具有 L-谷酰胺、补充有 25 µg/ml 庆大霉素、10% FBS 和 1 µM 星形孢菌素 (Sigma) 的 5 ml RPMI 1640 中。培养过夜后, 收集细胞和上清液, 并离心 2 次 (5min, 400xg, 4°C)。随后在超速离心机中将不含细胞的上清液离心以收集 MP (30 分钟, 200,000xg, 4°C), 使用 RPMI 1640 洗涤 MP 1 次, 并将 MP 重悬在 1000 µl 的新鲜 RPMI

中, 添加 100 μ l 的 MP 悬浮液以选择扁桃体细胞培养物 (或不同的提及以测定剂量依赖性)。

统计学分析. 如在图和图的说明中所指出的, 使用 boxplot 分析、Student t 检验和 Wilcoxon Rank Sum 分析来进行统计学分析。为了建立起在所有血浆血清转化组中的参考点, 时间 0 (T0) 被定义为对于 HIV-1 来说病毒量达到 100 拷贝/ml 的那天, 对于 HCV 来说病毒量达到 600 拷贝/ml 的那天, 对于 HBV 来说病毒量达到 700 拷贝/ml 的那天。为了测定 HIV-1 感染、HBV 感染和 HCV 感染期间凋亡的血浆标记物的增加百分数, 第 0 天之前的平均 TRAIL、TNFRW 或 Fas 配体水平被与第 0 天后的平均水平比较, 并计算出增加百分数 $([(\text{第 0 天后的平均数}-\text{第 0 天前的平均数})/\text{第 0 天后的平均数}] \times 100)$ 。

结果

急性 HIV-1 感染期间 TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体血浆水平被升高

测定了 30 个 HIV-1 病人、10 个 HCV 病人和 10 个 HBV 病人的时间点(T0), 该时间点被定义为每个病毒量测定的检测较低限度 (图 19)。随后分析了每个血浆供体的连续血浆样品中的可溶 TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体 (图 20A)。血浆中 TRAIL 水平、TNFR2 水平和 Fas 配体水平的变化百分数通过将 T0 前的平均分析物水平与 T0 后的平均水平比较而测定; 根据该标准, 27/30 证实了 TRAIL 的增加; 26/30 具有增加的 TNFR2; 22/30 具有增加的 Fas 配体水平。

已报道称, 丙肝和乙肝感染都诱导肝细胞的细胞死亡 (Chase 等, Trends Pharmacol. Sci. 27:4-7 (2006), Chou 等, J. Immunol. 174:2160-2166 (2005))。作为对照, HCV 和 HBV 急性感染的受试者证实, TRAIL、TNFR2 或 Fas 配体的 >20% 的增长在 HBV 急性感染的受试者中分别只有 0/10、3/10 和 2/10 个受试者, 而在 HCV 急性感染的受试者中分别只有 1/10、6/10 和 7/10 个受试者 (图 20C、21B)。

第二, 将峰值病毒量时的细胞死亡血浆分析物水平与从病毒量上升之前的受试者抽取的样品比较, 并与未受感染血浆比较。峰值病毒量时的平均 TRAIL

水平、TNFR2 水平和 Fas 配体水平显著不同于在 T0 前从每个急性 HIV-1 感染病人抽取的最早的血浆样品（对于 TRAIL, $p=0.0075$ ；对于 TNRF2, $p=1.18\times 10^{-5}$ ；对于 Fas 配体, $p=3.88\times 10^{-6}$ ）（图 21A）。峰值 TRAIL 水平、TNFR2 水平和 Fas 配体水平也显著不同于在未受感染的血浆样品对照中的 TRAIL 水平、TNFR2 水平和 Fas 配体水平（p 值分别为 $p=2.16\times 10^{-8}$ 、 $p=6.16\times 10^{-9}$ 和 $p=1.64\times 10^{-6}$ ）（图 21A）。

第三，为研究与峰值血浆 VL 相比，TRAIL、TNFR2 和 Fas 配体的峰值水平的时序，测定了凋亡分析物峰值与峰值血浆 VL 之间的临时关系式。还研究了血浆细胞死亡分析物的峰值发生在 HIV-1 病毒量峰值之前、同时或之后的受试者的数目（图 21B）。大部分急性 HIV-1 感染受试者（对于 TRAIL 为 30/30、对于 TNFR2 是 27/30，对于 Fas 配体是 26/30）证实，峰值分析物水平发生在 30 天的期限内（即，病毒量峰值时间之前 15 天，或病毒量峰值时间之后 15 天内）。特别感兴趣的是，大部分受试者的 TRAIL 水平（21/30）在峰值病毒量之前达到峰值，而 TNFR2 和 Fas 配体水平更加通常与病毒量同时达到峰值（图 21B）。

第四，为了分析在病毒量上升期间，峰值分析物水平相对病毒扩张速度的时序，进行了配对 Wilcoxon 秩检验（图 21C）。峰值病毒扩张速度的那天说明 T0 后病毒以最大速度扩张的那天。在 24 个血浆供体中（其中 VL 扩张速度可被计算），峰值病毒扩张速度平均发生在 T0 后的第 5.5 天（图 21C）。血浆 TRAIL 水平在最大病毒扩张速度后的 1.7 天到达峰值（T0 后第 7.2 天），而 TNFR2 水平在最大病毒扩张速度后的 7.5 天（T0 后第 13 天），且 Fas 配体水平在最大病毒扩张速度后的 9.8 天（T0 后第 15.3 天）达到峰值。血浆供体 HIV-1 VL 平均在 T0 后的 13.9 天达到其峰值（中值为 13 天，四分位差范围为 3 天），这表明 TRAIL 水平在 VL 达到峰值之前很早就达到峰值，而 TNFR2 和 Fas 配体在接近于最高 VL 水平的时候达到峰值水平。

峰值血浆 TRAIL 水平平均为 2011 pg/ml（在 886-4138 pg/ml 的范围）。该 TRAIL 水平处于诱导免疫细胞凋亡的活性的生物学相关浓度范围内²¹。

血浆微粒的定量流式细胞仪分析. 血浆 MP 是多种类型活化细胞或凋亡细胞的正常副产物，或是从多泡体（外来体）中得来（Distler 等, *Autoimmunity* 39:683-690 (2006), Piccin 等, *Blood Rev.* 21 :157-171 (2007)）（图 25）。30 个血浆供体的 18 个（60%）证实峰值 MP 水平接近（T0 前 15 天内或 T0 后 15 天内）病毒量峰值，且这 18 个峰值中的 11 个紧接在病毒量峰值之前出现，而 4/18 在 VL 峰值时达到峰值（表 1 和图 22A）。10 个 HCV 供体中的 5 个（50%）具有相似的 MP 提高，但所研究的 10 个 HBV 组中只有 2 个（20%）类似峰值 VL 的 MP 水平的提高（图 22B）。

表 1

	HIV	HCV	HBV
30 天内的峰值 MP 水平 (峰值 VL 的 ±15 天)	18/30	5/10	2/10
峰值 VL 之前的峰值 MP 水平	11/18	3/5	2/5
与峰值 VL 同时的峰值 MP 水平	4/18	1/5	0/5
峰值 VL 之后的峰值 MP 水平	3/18	1/5	0/5

从急性 HIV-1 感染病人 6244、在来自峰值 VL 和峰值 MP 时（图 22A 中的第 10 天）的蔗糖梯度纯化的 MP 上研究峰值病毒量时的 MP 形态，发现尺寸不均一，尺寸范围为 10nm 至 1000nm（图 23A）。

血浆微粒的变形特征化. 虽然大多数 MP 的表型分析使用在数小时内处理过的新鲜血浆（Jy 等, *J. Thromb. Haemost.* 2:1842-1851 (2004)），但是此研究中的血浆供体样品已被冻融至少 2 次。研究发现，两个冻融循环显著降低了 CD3、CD45+、CD61+和膜联蛋白+ MP 的百分数（图 26）。因此，不能精确地量化血浆 MP 的表型，以定量方式分析 MP 的膜联蛋白和 CCR5 表达，以确定在五个血浆供体峰值 MP 样品和未受感染的第一个样品中在峰值 MP 时是否存在 MP 表达膜联蛋白或 CCR5 的情况。膜联蛋白+和 CCR5+ MP 都存在于血浆供体血浆中；

对于膜联蛋白，MP 峰值时的平均%+为 12%，范围为 2.3%-38.0%；对于 CCR5+MP，MP 峰值时的%+为 5.7%，范围为 1.1%-12.6%（图 23B、23C）。对于 CCR5+（非膜联蛋白+MP），与第一组样品相比，峰值 MP 时趋向于具有较高的 MP 数目（图 23C）。

虽然平均峰值 HIV-1 VL 水平为 1,421,628 拷贝/ml，总 MP 的 15 个平均峰值为 606,881,733/ml。因此，MP 平均比急性 HIV-1 感染期间血浆中病毒峰值时的病毒数目大 427 倍。

表 2

受试者	病毒量 (拷贝/ml)	MP(MP/分钟)
6246	922,270	541,145,000
9079	2,170,000	828,050,000
6240	1,097,490	737,750,000
9076	697,960	3,012,125,000
9077	1,114,040	121,575,000
9020	45,995	1,916,050,000
9021	5,417,090	834,200,000
9031	88,594	1,358,700,000
9032	34,213	1,309,650,000
6244	1,069,090	647,085,000
6243	60,358	279,425,000
9010	31,770	631,800,000
9015	2,912,250	461,740,000
9022	1,361,290	220,365,000
9030	660,060	178,255,000
9081	90,564	645,080,000
9018	372,977	806,150,000
9075	844,020	1,084,000,000
6247	2,821,080	319,300,000
6248	5,382,888	602,415,000
9023	1,219,850	234,600,000
9012	1,032,790	432,750,000
12007	47,422	60,600,000
12008	6,486,240	3,081,000,000
64012	2,228,480	119,605,000
9024	69,105	352,050,000
9025	3,706,202	257,700,000
9028	57,186	524,100,000
9029	45,188	403,100,000
9034	562,373	757,700,000
	校正: 1,421,628	平均: 758,602,167
		**校正: 606,881,733

*校正的 MP 水平——新鲜血浆中与两次冻融血浆中的 MP 水平定量显示 2 次冻融血浆中的 MP 水平增加~20%。因此，平均 MP 水平校正了~20%。

体内 MP 诱导的 B 细胞抑制。虽然已知血浆 MP 对巨噬细胞和 DC 具有抑制作用（Hoffmann 等, J. Immunol. 174:1393-1404 (2005), Huynh 等, J. Clin. Invest.

109:41-50 (2002)), 但只有一个研究表明 MP 可能抑制 B 细胞活化 (Koppler 等, Eur. J. Immunol. 36:648-660 (2006))。对 MP 对人记忆 B 细胞活化的作用特别感兴趣, 因为想要的是传播后快速的病毒诱导的记忆 B 细胞应答。为了确定 PBMC 来源的或扁桃体白细胞来源的 MP 是否可以抑制记忆 B 细胞活化, 使用美洲商陆有丝分裂原(PWM)+ B 类(class) CpG 来进行记忆 B 细胞 Ig 诱导分析 (Crotty 等, J. Immunol. Methods 286:111-122 (2004))。向 PWM 刺激的扁桃体细胞培养无中加入 MP 使得总 IgG 产量和总 IgA 产量分别降低了 70.8 % \pm SEM ($p=0.0064$) 和 94.2% \pm SEM ($p=0.00004$) (图 24A); MP 的 B 细胞抑制是剂量依赖性的 (图 24B)。当 MP 产生于自体扁桃体白细胞或 Jurkat T 细胞系时, 观察到了相似的结果 (数据未示出)。

概括地说, 此研究中的主要发现是, 在血浆供体中 TRAIL 的峰值早先出现在传播的第 17 天, 这暗示 TRAIL/DR5 处于紧接传播后的 HIV-1 诱导的细胞死亡的关键途径中。基于体内研究和 HIV-1+ 进行性 (progressor) 扁桃体组织的研究, CD4+ T 细胞凋亡的 IFN- α 、TRAIL、DR5 途径已被提议用于慢性 HIV-1 感染 (Lum 等, J. Virol. 75:11128-11136 (2001), Herbeuval 等, Clin. Immunol. 123:121-128 (2007), Herbeuval 等, Blood 106:3524-3531 (2005))。受感染的受试者体内的 CD4+ T 细胞因为上调的 TRAIL 受体 DR5 的原因, 与来自未受感染的受试者的 CD4+ T 细胞相比, 对 TRAIL 介导的凋亡更加敏感 (Lum 等, J. Virol. 75:11128-11136 (2001), Herbeuval 等, Clin. Immunol. 123:121-128 (2007), Herbeuval 等, Blood 106:3524-3531 (2005), Jeremias 等, Eur. J. Immunol. 28:143-152 (1998))。在体内, HIV-1 gp120 (Herbeuval 等, Blood 105:2458-2464 (2005)) 诱导单核细胞和浆细胞样树突细胞 IFN- α , 后者又诱导 CD4+ T 细胞和单核细胞/巨噬细胞 TRAIL (Lum 等, J. Virol. 75:11128-11136 (2001), Herbeuval 等, Clin. Immunol. 123:121-128 (2007), Herbeuval 等, Blood 106:3524-3531 (2005))。还报道过 HIV-1 Tat 诱导 TRAIL, 这是 CD4+ T 细胞的旁观者杀伤的机制 (Yang 等, J. Virol. 77:6700-6708 (2003))。

一个重要的问题是，为什么血浆 TRAIL 水平比血浆 Fas 配体、TNFR2 和 MP 在 HIV-1 传播后较早达到峰值？TRAIL、Fas 配体和 TNFR2 的血浆升高发生在慢性 HIV-1 中，且可通过免疫细胞活化、细胞死亡或两者同时来诱导（Herveuval 等，*Blood* 105:2458-2464 (2005)，Aukrust 等，*J. Infect. Dis.* 169:420-424 (1994)，Hober 等，*Infection* 24:213-217 (1996)，Hosaka 等，*J. Infect. Dis.* 178:1030-1039 (1998)）。Stacy 等（Stacey 等和 the NIAID Centre for HIV/ AIDS Vaccine Immunology. Elevations in plasma levels of innate cytokines prior to the peak in plasma viremia in acute HIV-I infection (2007)）在相同血浆供体中发现了 IFN- α 的爆发，该爆发与在此研究中看到的 TRAIL 峰值的时序同时。因此，血浆 TRAIL 峰值在 VL 血浆峰值之前可能是由于早期凋亡引起，但也可能是由于应答上升的 VL 的免疫活化和 IFN- α 的 pDC 生成引起的。假设提高的血浆 Fas 配体、TNFR2 和微粒的较后出现可能是由于或应答大量细胞死亡引起的，因为此峰值与细胞死亡峰值在相似的时间达到（在恒河猴的实验性 SIV 感染中被证明）（Veazey 等，*Science* 280:427-431 (1998)，Haase, *Nat. Rev. Immunol.* 5:783-792 (2005)，Li 等，*Nature* 434:1148-1152 (2005)，Mattapallil 等，*Nature* 434:1093-1097 (2005)）。

Veazey（Mattapallil 等，*Nature* 434:1093-1097 (2005)）记载了 CD4⁺ 肠 T 细胞损失发生在早至 SIV 感染后的第 7 天。在人体中，Guadalupe 等（*J. Virol.* 77:11708-11717 (2003)，Mehandru 等，*J. Exp. Med.* 200:761-770 (2004)）和 Mehandru 和其同事（Brenchley 等，*J. Exp. Med.* 200:749-759 (2004)）分别在 HIV-1 感染的第一个月内研究了 2 个、1 个和 9 个病人，发现肠 CD4⁺ T 细胞耗尽了。HIV-1 感染的潜伏期是指从传播到出现血浆病毒血症的时间，估计为 10 天（7-21 天的范围内）（Clark 等，*N. Engl. J. Med.* 324:954-960 (1991)，Gaines 等，*BMJ* 297:1363-1368 (1988)，Littl 等，*J. Exp. Med.* 190:841-850 (1999)，Schacker 等，*Ann. Intern. Med.* 125:257-264 (1996)）。从出现 HIV-1 病毒血症到第一个抗体应答和有症状的 HIV-1 感染（因此建立了潜伏池）的时间约为 14 天（Cooper 等，*J. Infect.*

Dis. 155:1113-1118 (1987), Daar 等, N. Engl. J. med. 324:961-964 (1991), Gaines 等, Lancet 1 :1249-1253 (1987))。因此,预防性 HIV-1 疫苗生效而没有细胞死亡诱导的免疫抑制的最大窗口期为约 24 天。由于凋亡和免疫抑制的中介体早在传播后的第 17 天即存在(10 天平均潜伏期+T0 后 7 天的 TRAIL 发作),窗口期被缩短至约 14-17 天。

在急性 HIV-1 感染的早期存在 TRAIL、TNFR2 和提高的 MP 表明,至少有四种潜在的免疫抑制机制。第一,直接的 HIV-1 感染导致大部分 CD4+ T 细胞损失,即使受感染的细胞的数目不是所有 CD4+ T 细胞耗尽的原因(Guadalupe 等, J. Virol. 77:11708-11717 (2003), Brenchley 等, J. Exp. Med. 200:749-759 (2004), Mehandru 等, J. Exp. Med. 200:761-770 (2004), Fiebig 等, AIDS 17:1871-1879 (2003))。第二,在未受感染的 CD4+ T 细胞中,TRAIL 诱导旁观者杀伤(Lum 等, J. Virol. 75:11128-1 1136 (2001), Herbeuval 等, Clin. Immunol. 123:121-128 (2007), Herveuval 等, Blood 105:2458-2464 (2005))。在这点上, Miura 等(J. Exp. Med. 193:651-660 (2001))显示在 HIV-1 感染的人-PBL-NOD-SCID 鼠中施用抗 TRAIL mAb 显著降低了 CD4+ T 细胞凋亡。

第三,免疫应答的抑制可通过 T 细胞 MP 来介导(Huang 等, J. Immunol. 177:2304-1313 (2006), Distler 等, Arth. Rheum. 52:33337-3348 (2005), Krysko 等, Apoptosis 11:1709-1726 (2006))。CXCR4+和 CCR5+ MP 可将共同受体转移至共同受体阴性的细胞,使得它们易受 HIV-1 感染(Mack 等, Nat. Med. 6:769-775 (2000), Rozmyslowicz 等, AIDS 17:33-42 (2003))。MP 经由巨噬细胞的噬菌作用释放 TGF- β 前列腺素 E2 和 IL-10,它们可抑制抗原特异性 T 和 B 细胞应答(Huang 等, J. Immunol. 177:2304-1313 (2006), Hoffmann 等, J. Immunol. 174:1393-1404 (2005), Huynh 等, J. Clin. Invest. 109:41-50 (2002))。在这点上, Estes 等(J. Infect. Dis. 193:703-712 (2006))已证实,在 SIV 感染后的第 12 天,淋巴结 TGF- β 和 IL-10 具有剧烈的增加。重要的是,已直接显示 PBMC 和扁桃体细胞 MP 可直接抑制记忆 B 细胞活化(图 24)。

最后, Fas 配体和 TRAIL 被加入 MP 中 (Huynh 等, *J. Clin. Invest.* 109:41-50 (2002), Koppler 等, *Eur. J. Immunol.* 36:648-660 (2006), Crotty 等, *J. Immunol. Methods* 286: 111-122 (2004))。Fas 配体表达 MP 可直接诱导邻近细胞的凋亡 (Huang 等, *J. Immunol.* 177:2304-1313 (2006), Jodo 等, *J. Biol. Chem.* 276:39938-39944 (2001), Monleon 等, *J. Immunol.* 167:6736-6744 (2001))。活化的 T 细胞可以是 Fas 配体介导的促凋亡微泡的靶标 (Monleon 等, *J. Immunol.* 167:6736-6744 (2001))。Salvato 等 (*Clinical and Developmental Immunology* (2008)) 最近表明使用抗 Fas 配体的 mAb 处理 SIV 感染的猕猴削弱了疾病并且可能导致对 SIV 升高的抗体应答。

因此, 在 HIV-1 传播的最初的 2-3 周, 高水平的生物活性血浆介质和细胞死亡的副产物的产生引起以下的观念, 即, 预防性疫苗工作的窗口期可能比之前想像的要短, 即, 在传播的最初 14-17 天内, 这给在传播后形成稳健的抗 HIV-1 免疫性的可利用时间带来相当大的限制。预防性疫苗的候选者可能需要靶定诱导细胞死亡的 HIV-1 分子, 并被设计以诱导对 HIV-1 的保护性免疫应答, 该诱导将以在传播时的最大抑制水平进行, 或作为二次免疫应答在数小时至数天内增强的方式进行, 以在 HIV-1 诱导的免疫抑制出现之前消灭 HIV-1。

通过 HIV 或其他传染病的疫苗来抑制细胞凋亡和免疫抑制性 MP 介导的效应也可能是重要的。这可通过, 例如, 诱导抗脂质抗体或抗微粒其他成分的抗体的 HIV 疫苗成分来实现, 以便清除微粒和/或阻断微粒毒性作用。

本文的数据的另一种用途是作为 HIV-1 处理的基本原理。例如, 抗 TNFR 或 TNF- α 的抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体或其他细胞死亡抑制剂 (Fas-Fc 作为 FAS-FAS 配体相互作用的抑制剂, DR5-Fc 作为 TRAIL DR5 相互作用的抑制剂) 可被用来作为治疗手段抑制 HIV 中的细胞死亡。

通过引用将以上引用的所有文献和其他信息源以它们的整体形式合并至本文中。

AH1期间的早期事件

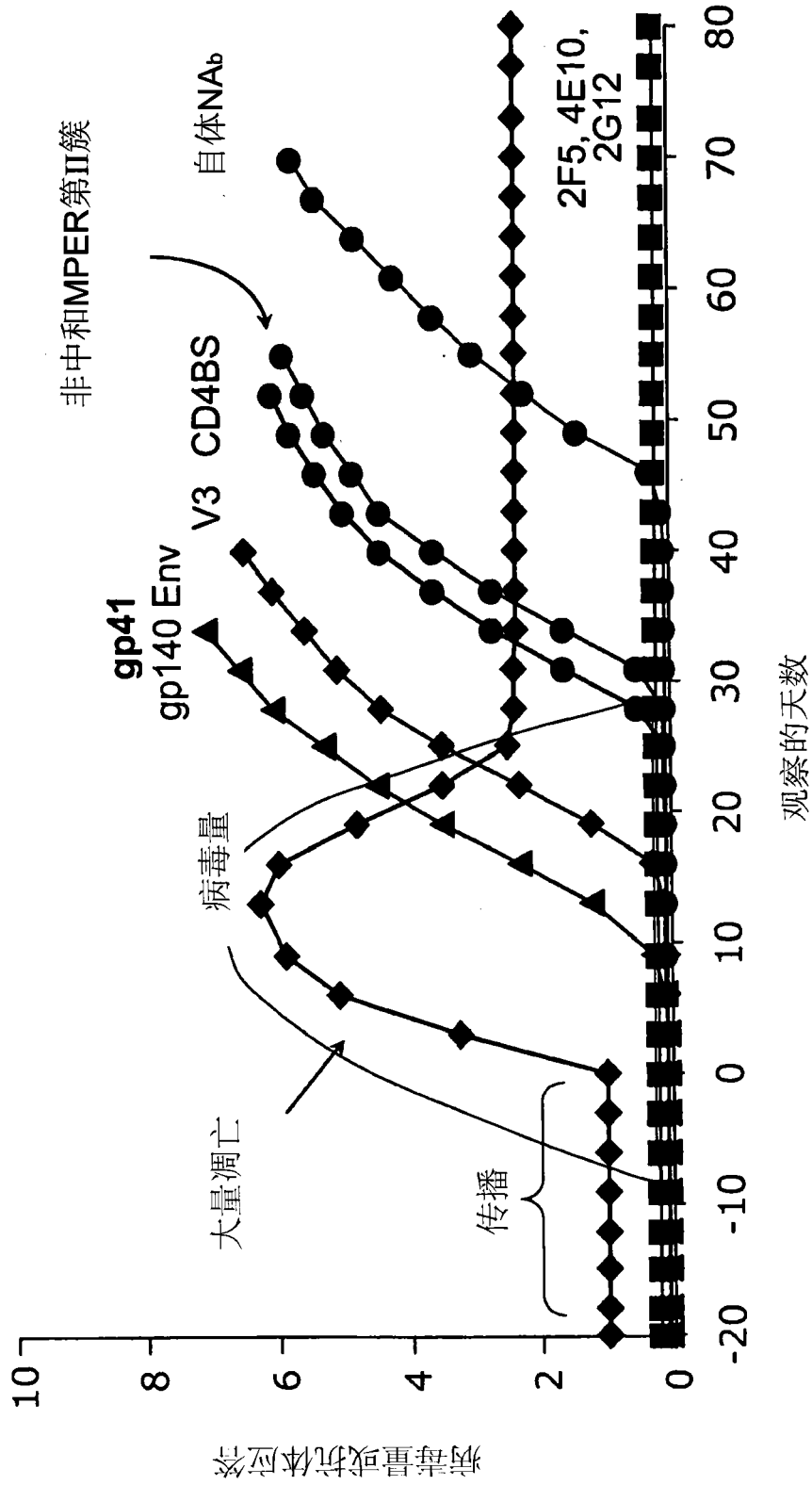


图1

HIV标记物进展的示意性半定量显示

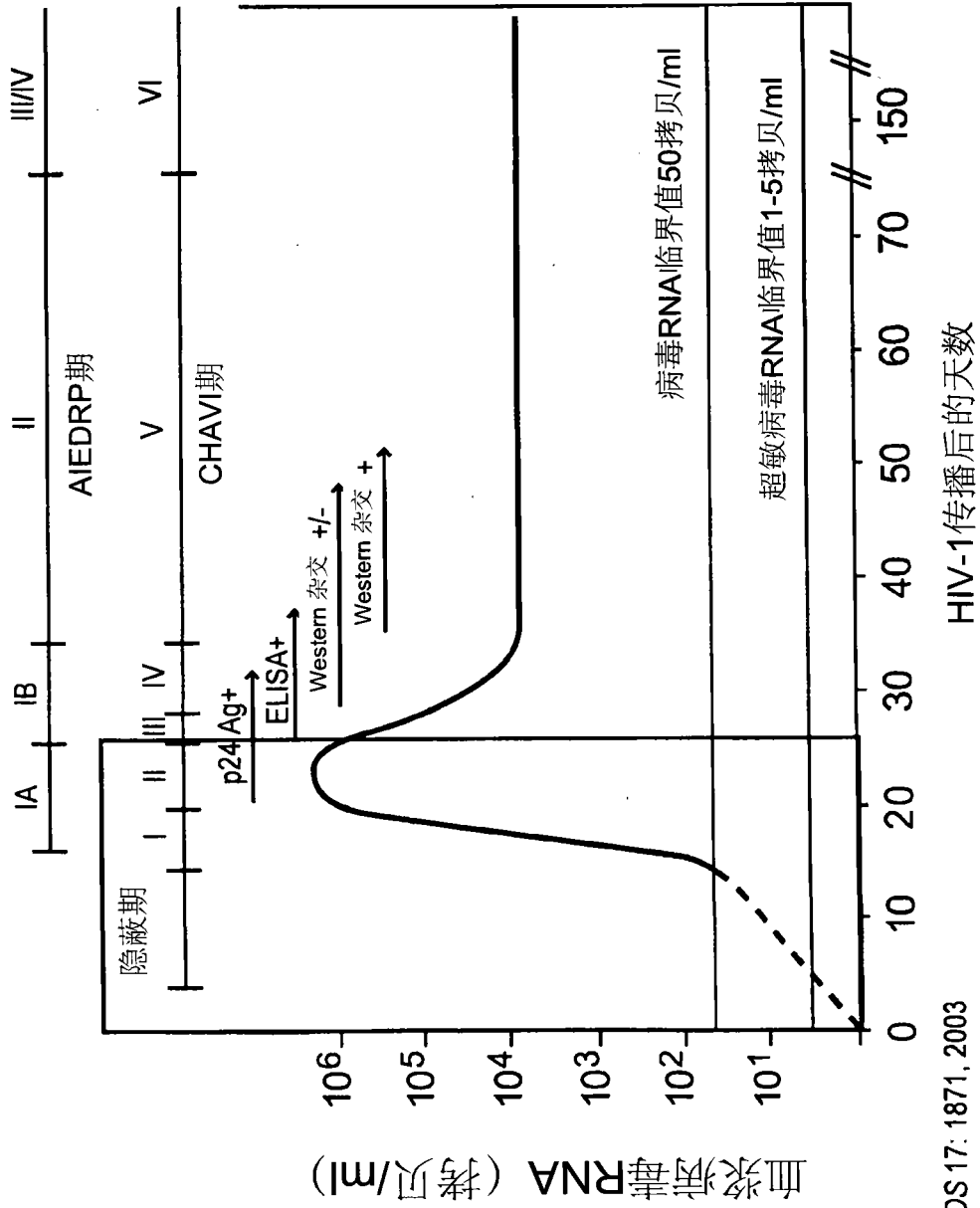


图2

Fiebig等 AIDS 17: 1871, 2003

图4A
Fas 配体
Fas 配体, 组6246

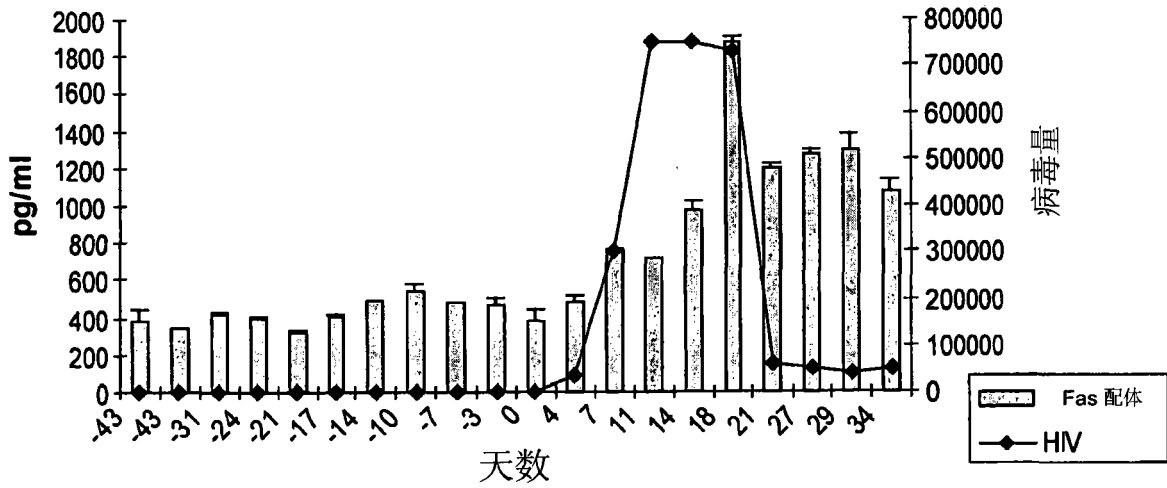


图4B
Fas 配体, 组9020

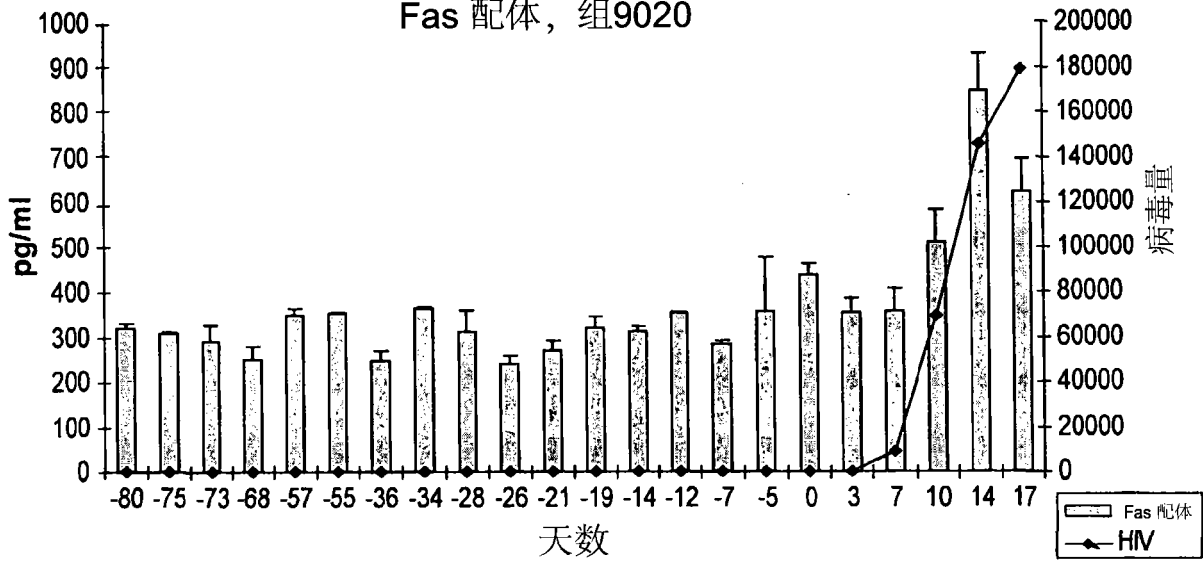
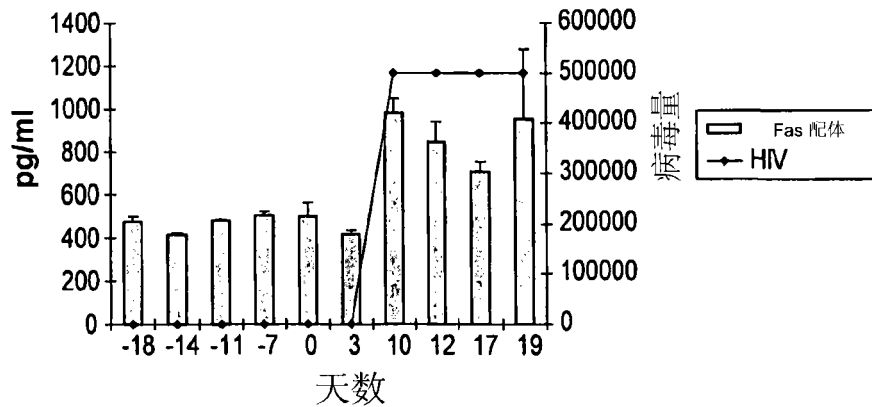
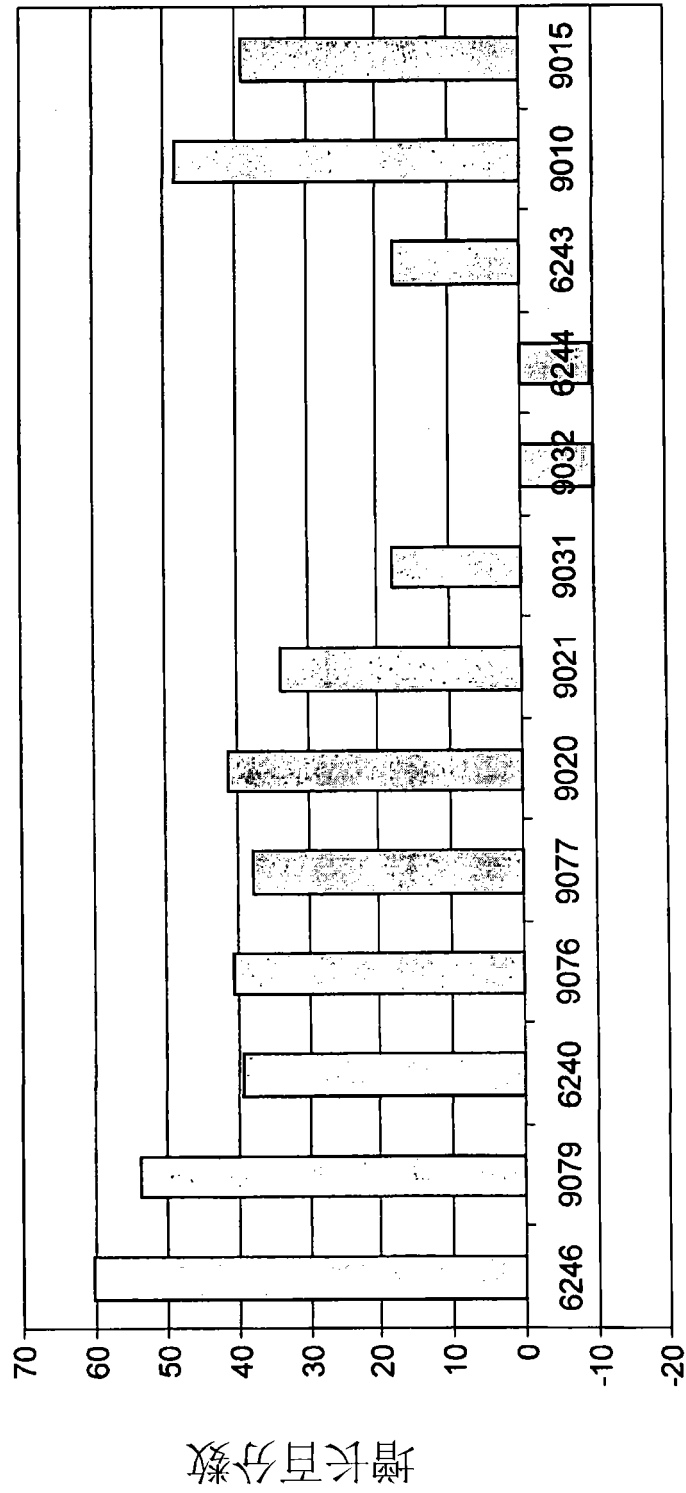


图4C
Fas 配体, 组9015



Fas配体：增长百分数
(传播前后的均值)



组
图5

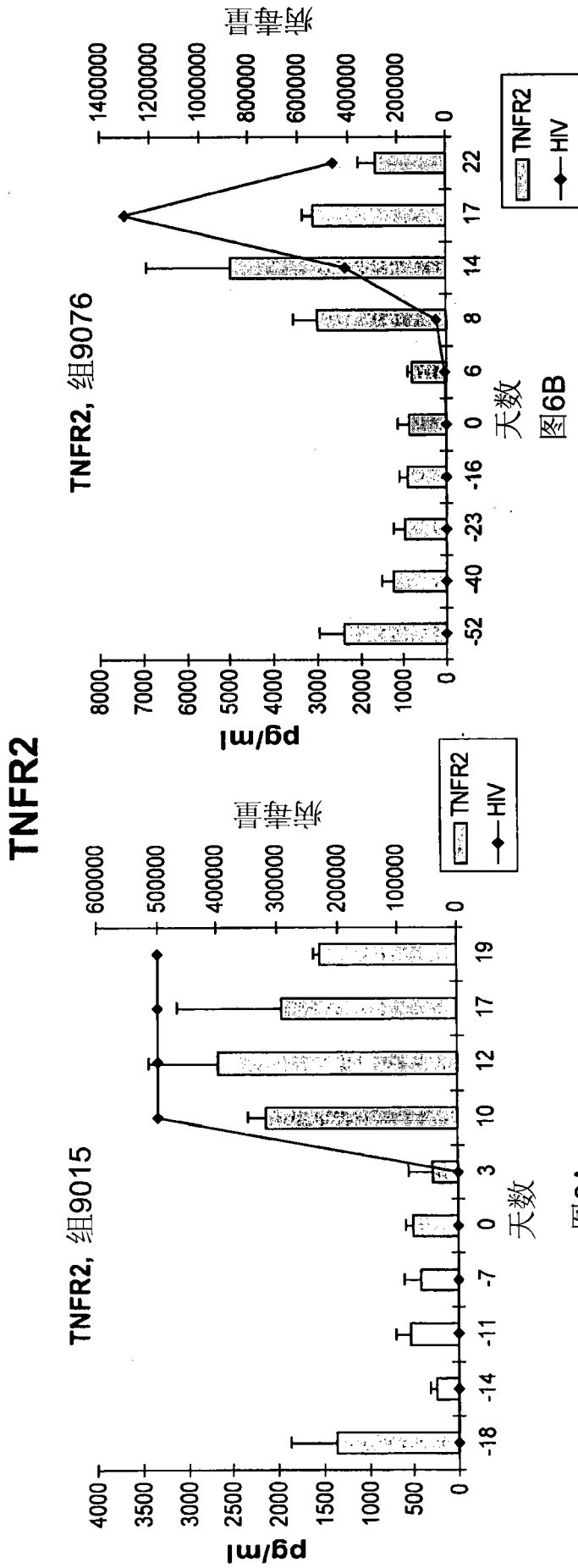


图6A

TNFR2, 组6240

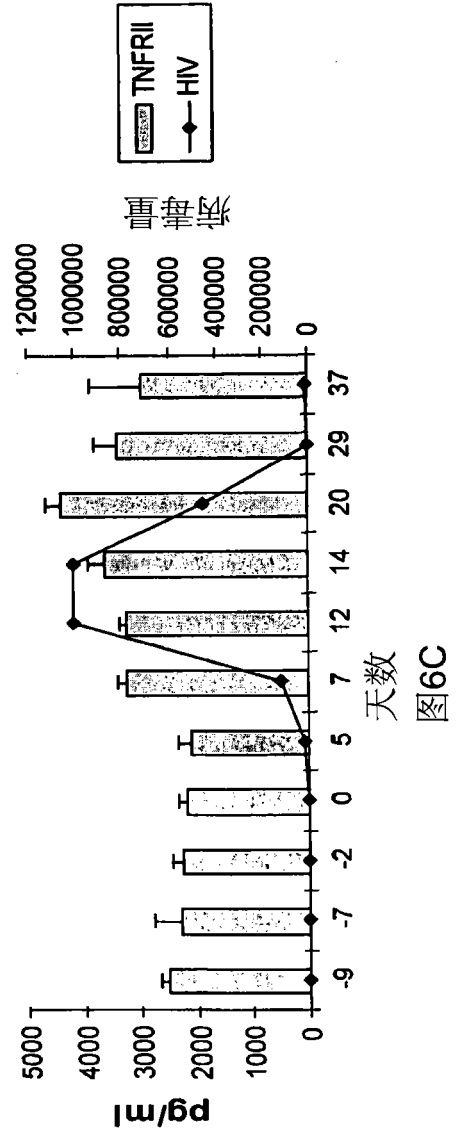


图6C

TNFR2: 增长百分数
(传播前后的均值)

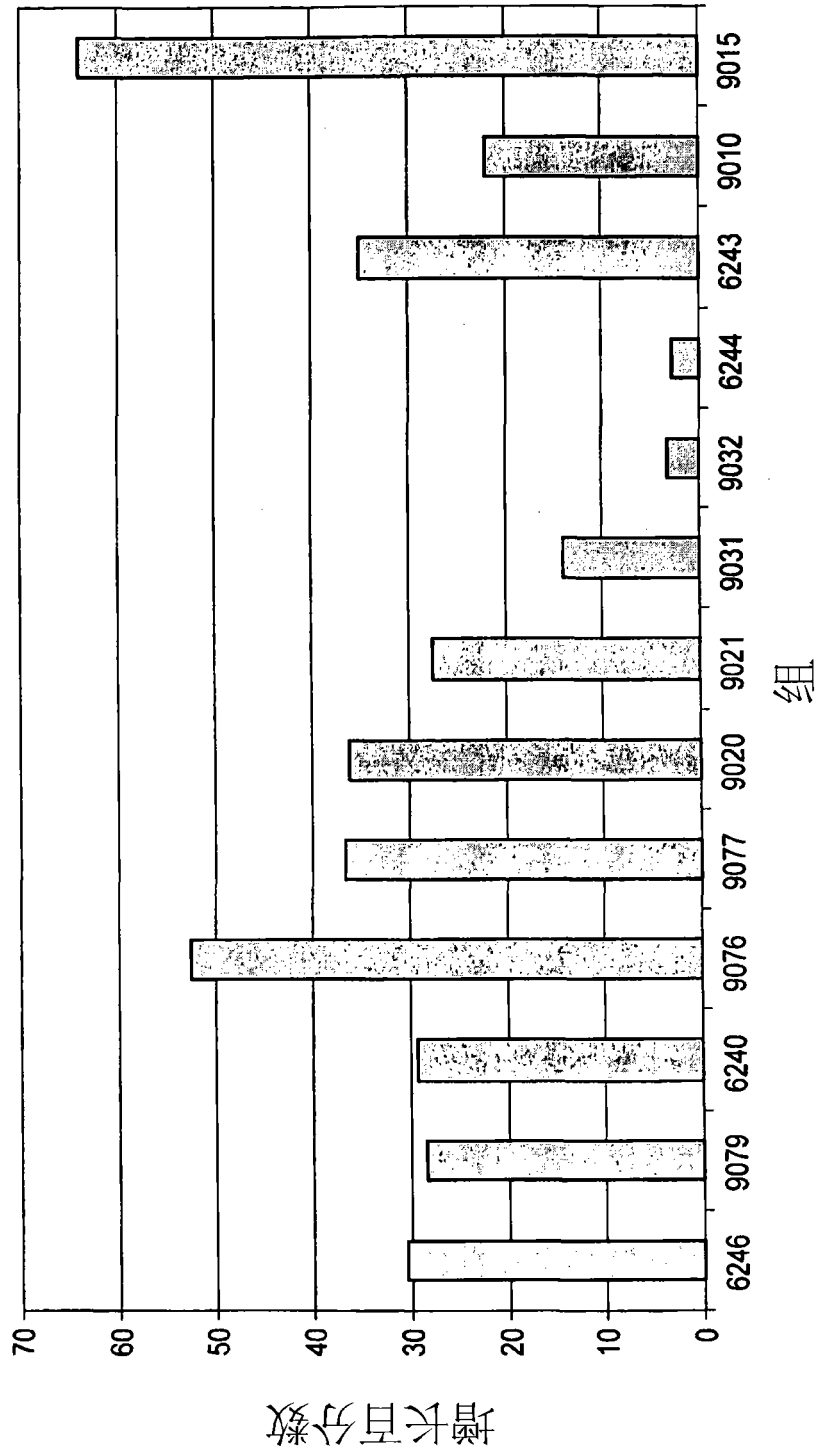


图7

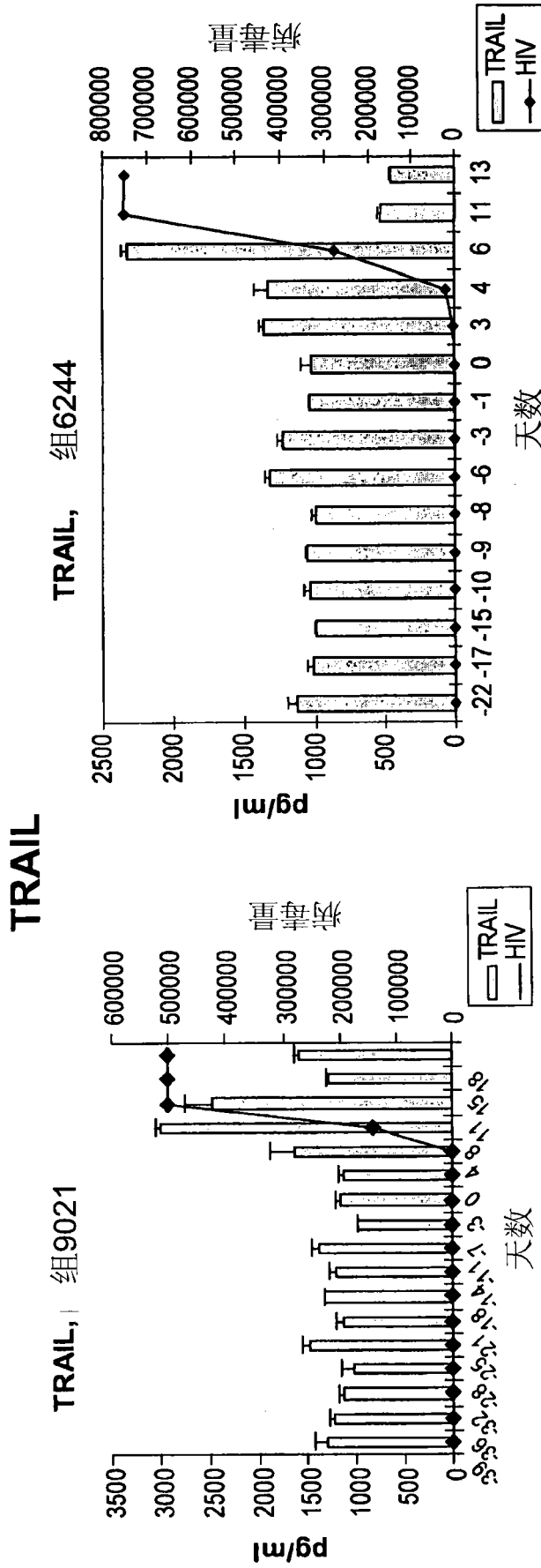


图8B

图8A

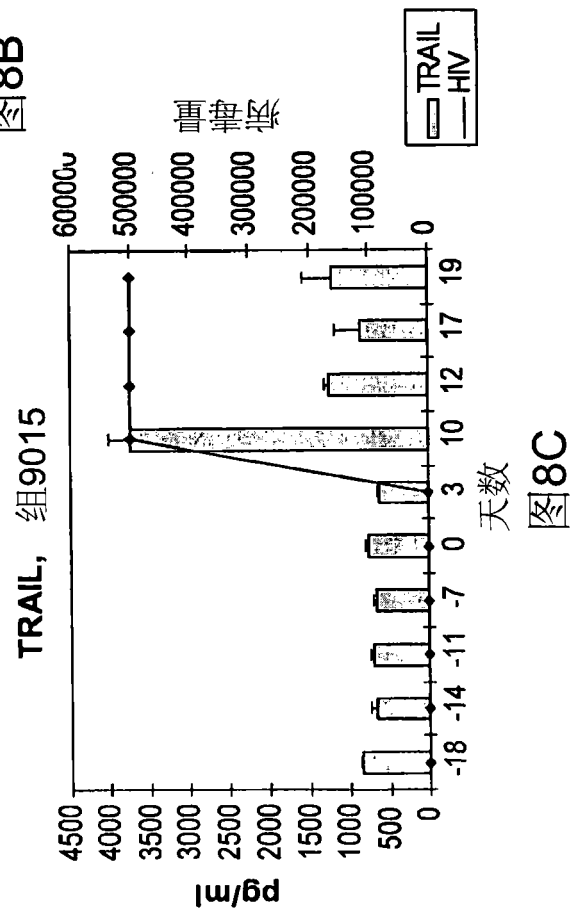
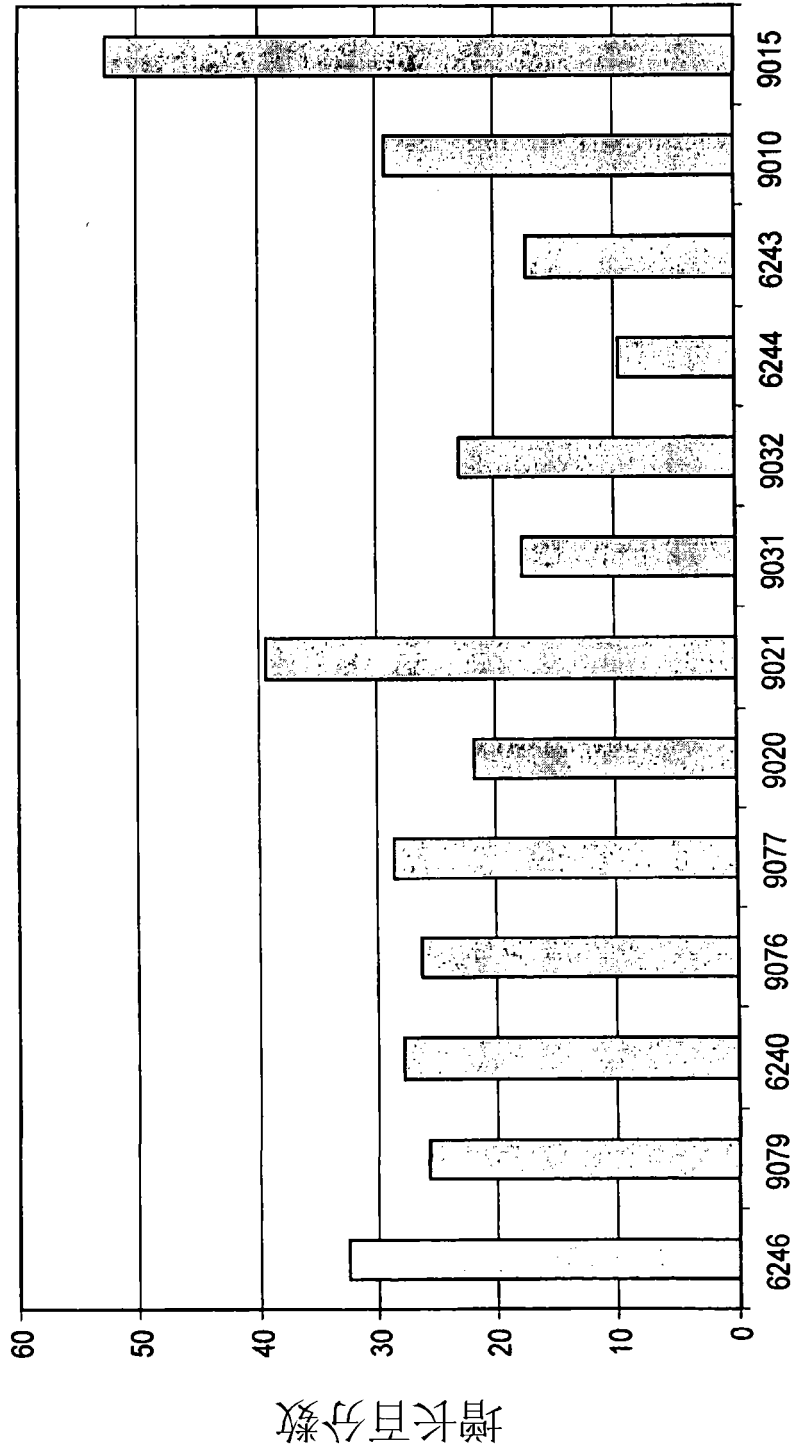


图8C

TRAIL: 增长百分数
(传播前后的均值)



组 图9

微粒的流式细胞分析

组6246的Trail水平

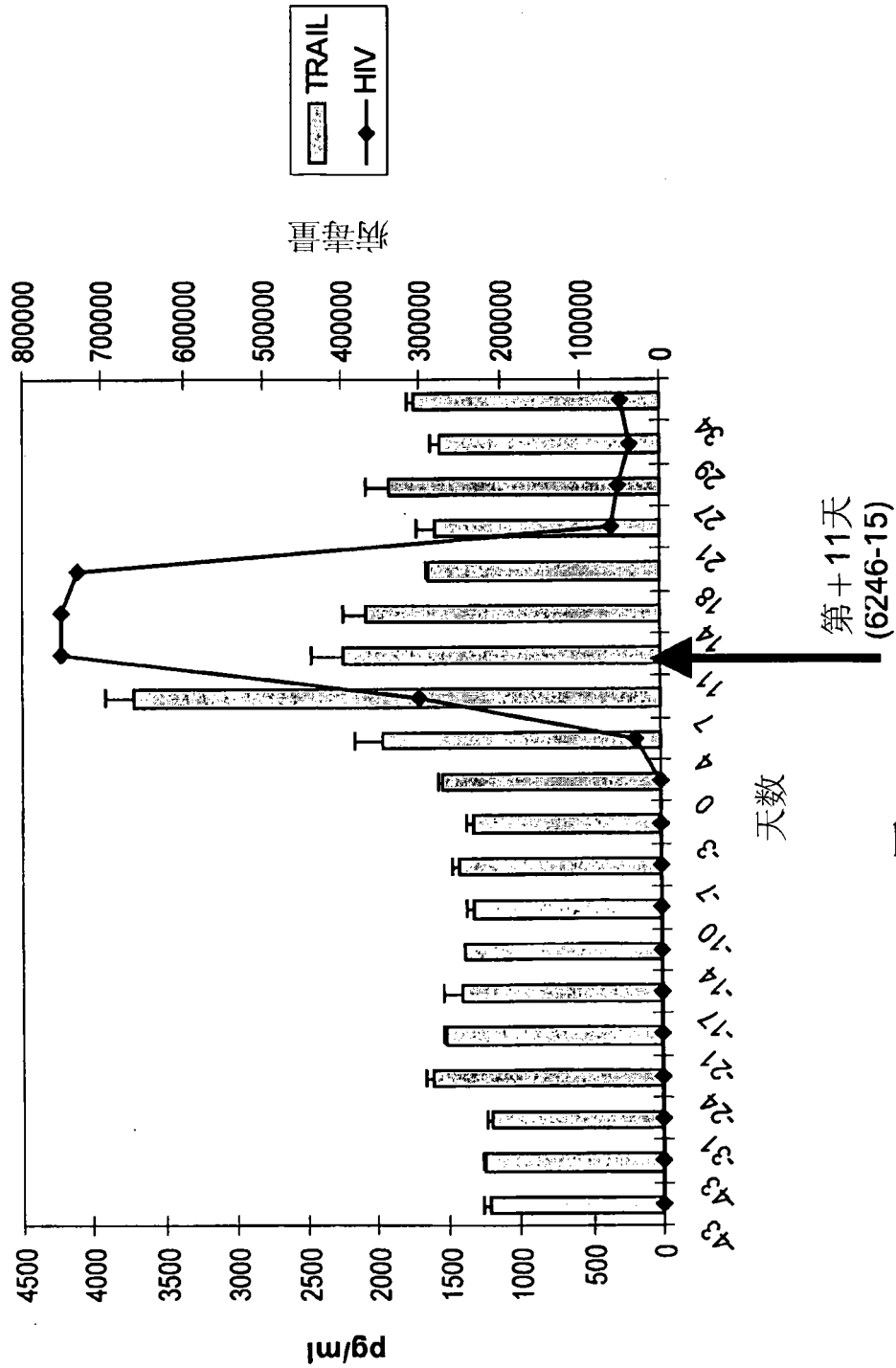
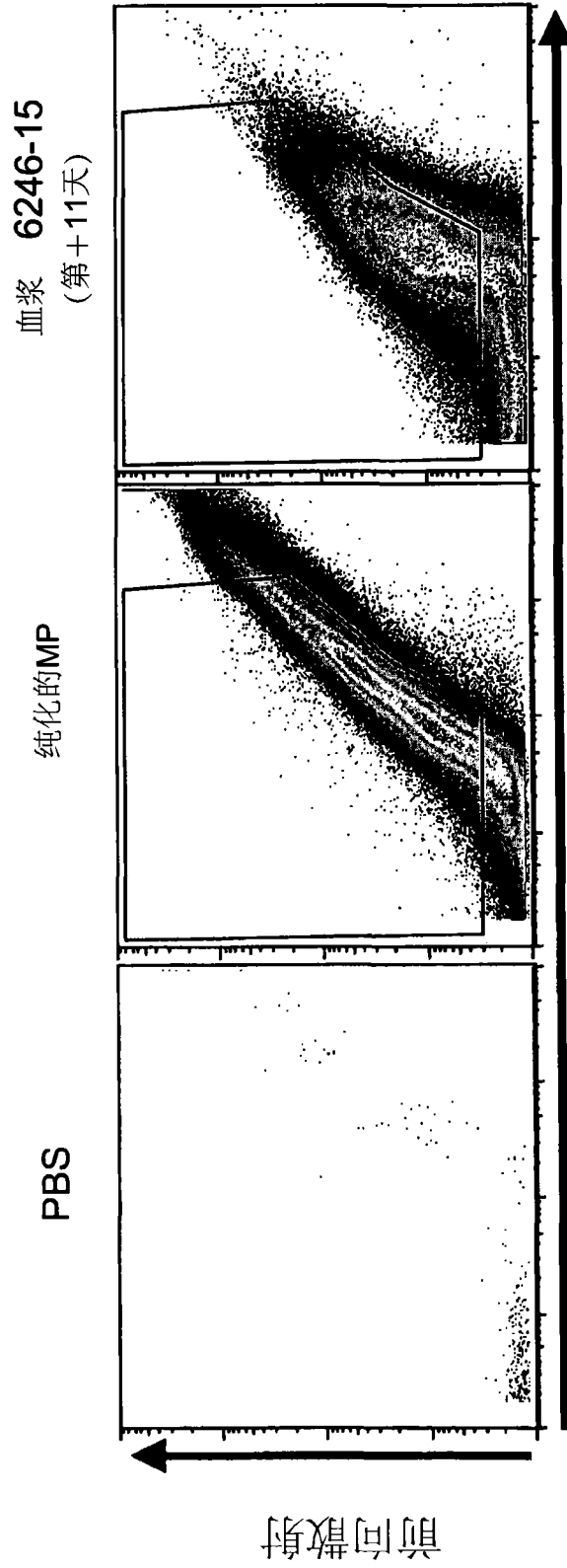


图10

来自凋亡Jurkat细胞和急性HIV感染血浆的纯化微粒的流式细胞分析



侧向散射

图11

侧向散射VS. 荧光

**α-CD3 & α-CD45 APC 结合来自凋亡Jurkat细胞 (pMP) 和来自急性性
HIV感染病人 (6246-15, 第+11天) 的血浆的纯化的微粒**

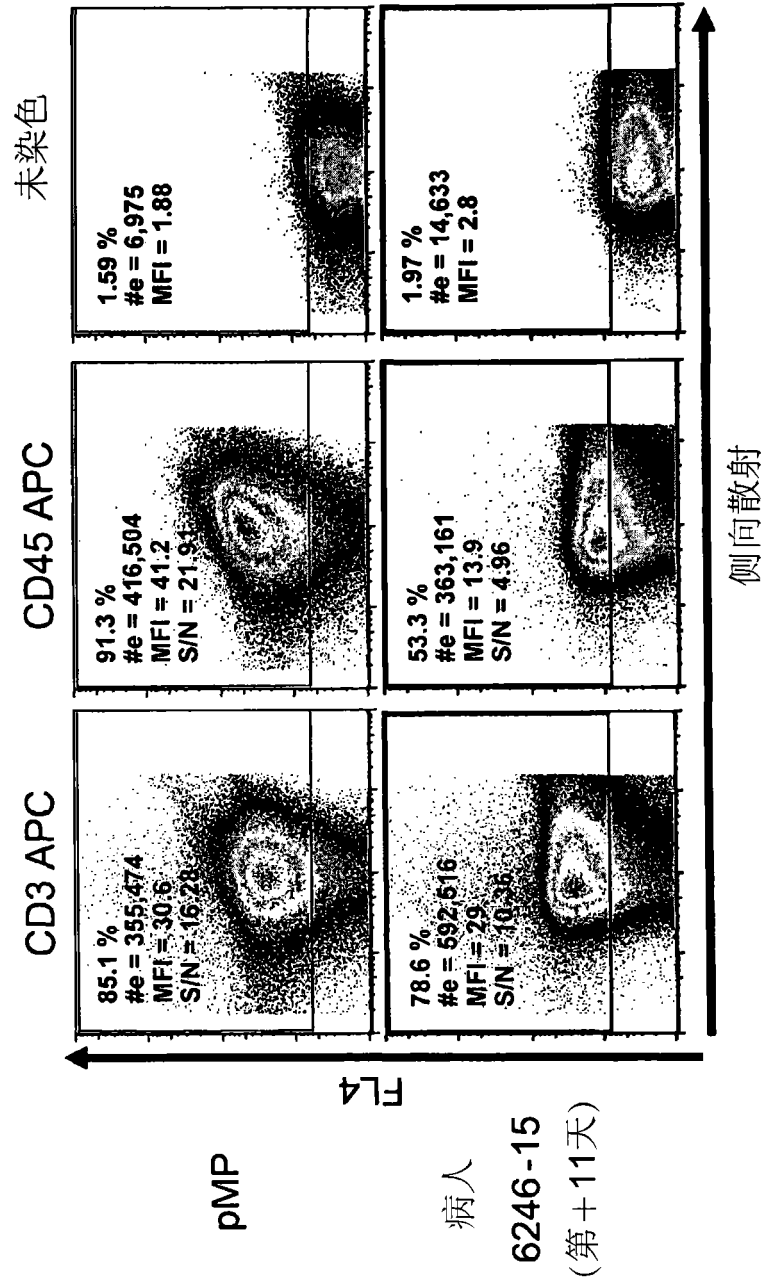


图12

侧向散射VS. FITC
急性HIV感染的血浆 (pt. 6246-15;峰值TRAIL水平的时间) 中微粒的
抗PS染色

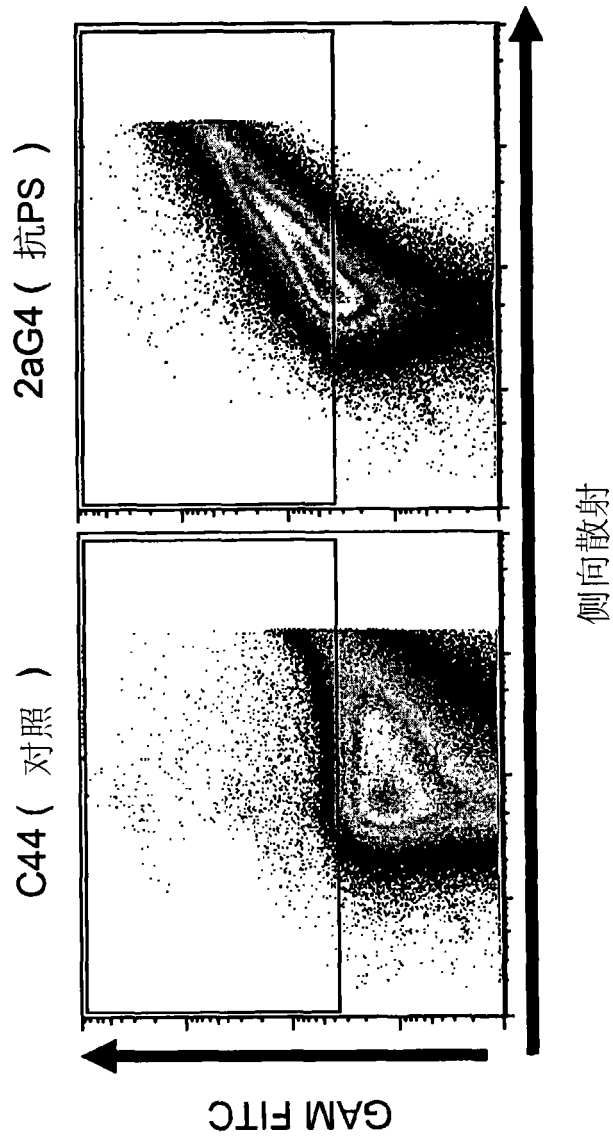
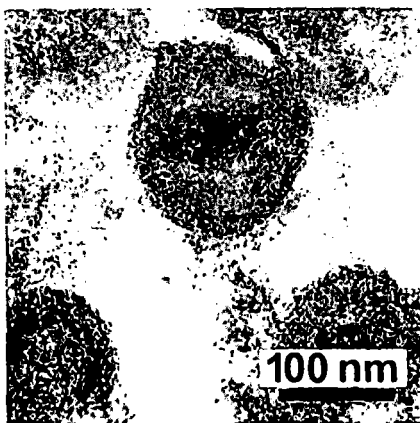
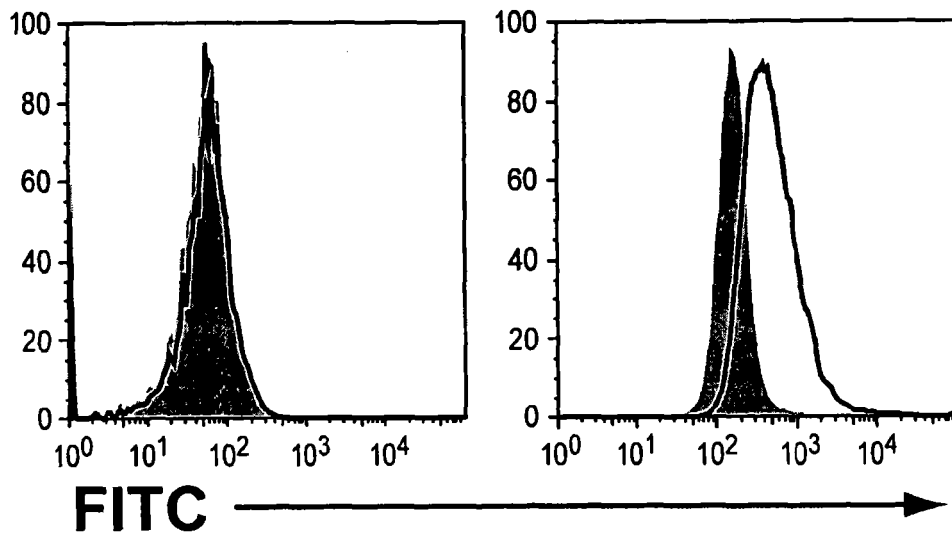
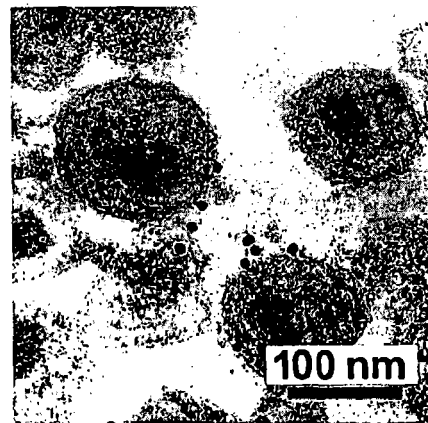


图13

未受感染细胞上的抗PS MS感染细胞上的抗PS



对照



抗PS

图14

检测在急性HIV-1病人#6246血浆中的表达磷脂酰丝氨酸的微粒

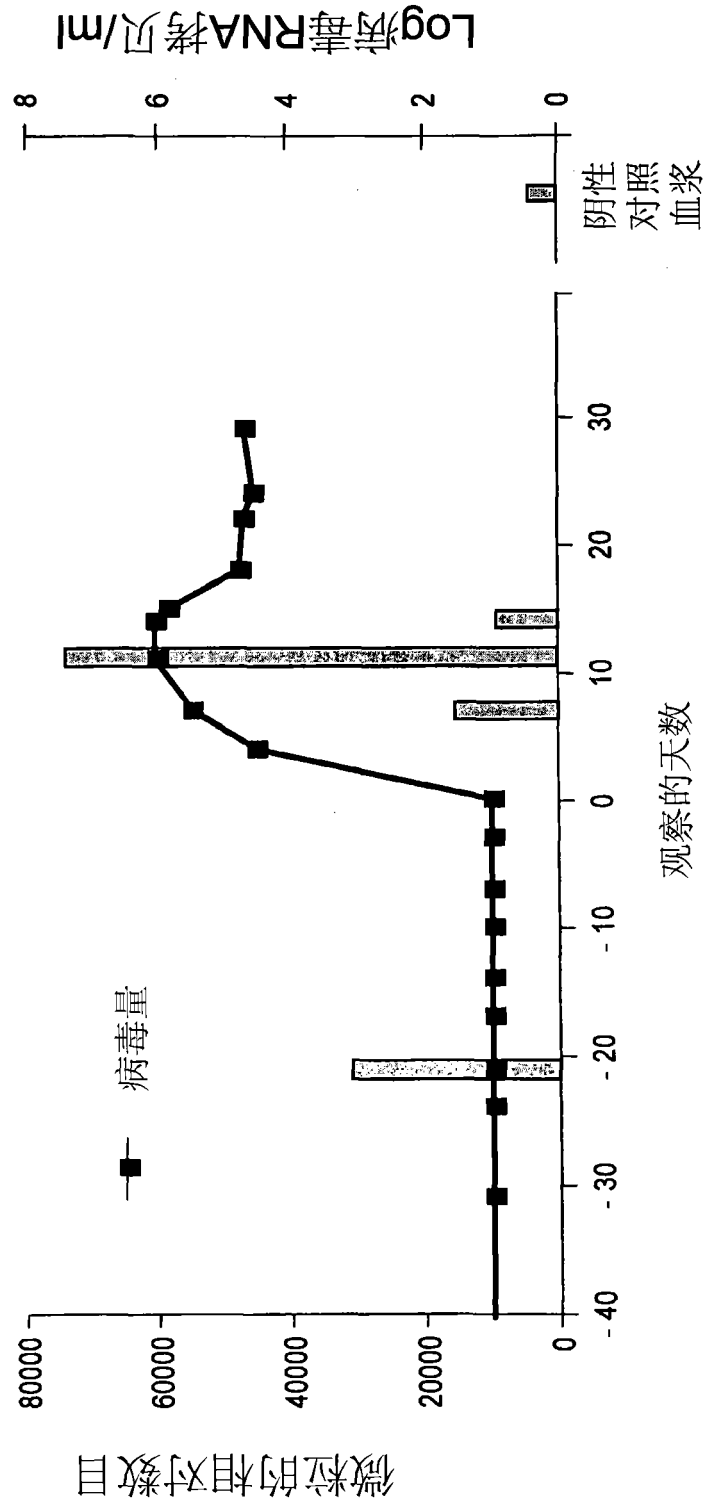


图15

与HBV组的比较

Fas配体, HBV组11069

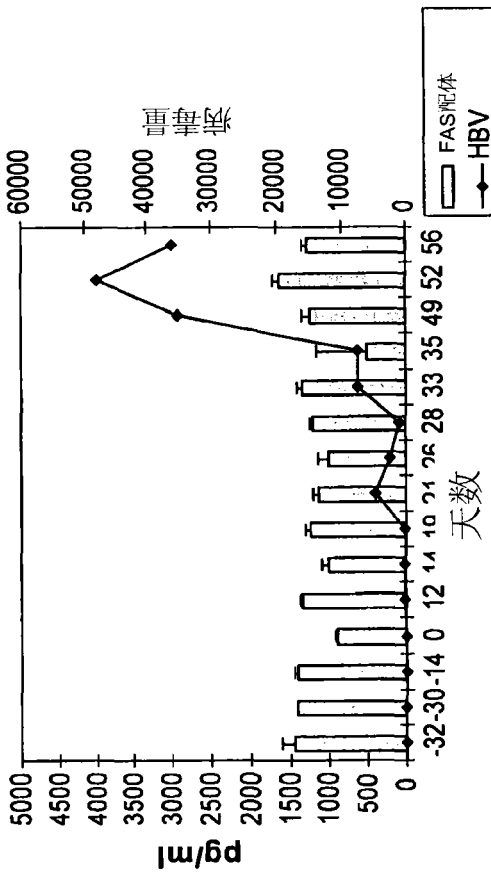


图16A

TNFR2, HBV 组 11069

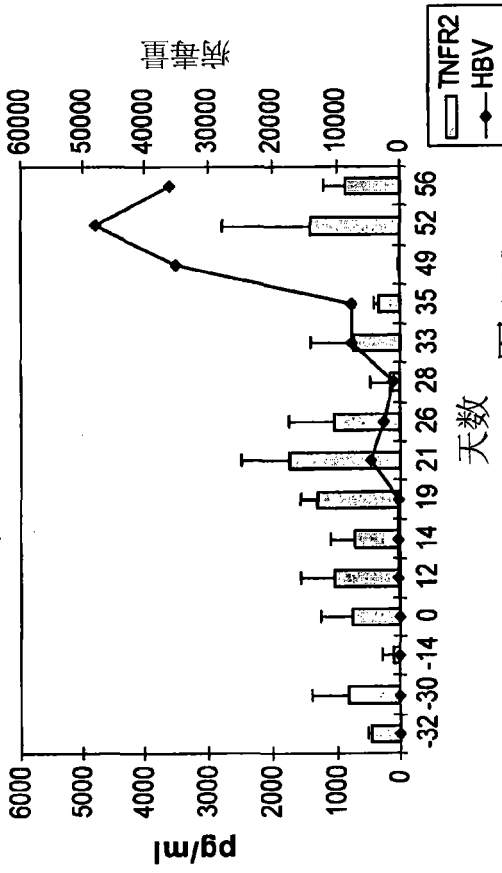


图16B

TRAIL, HBV 组 11069

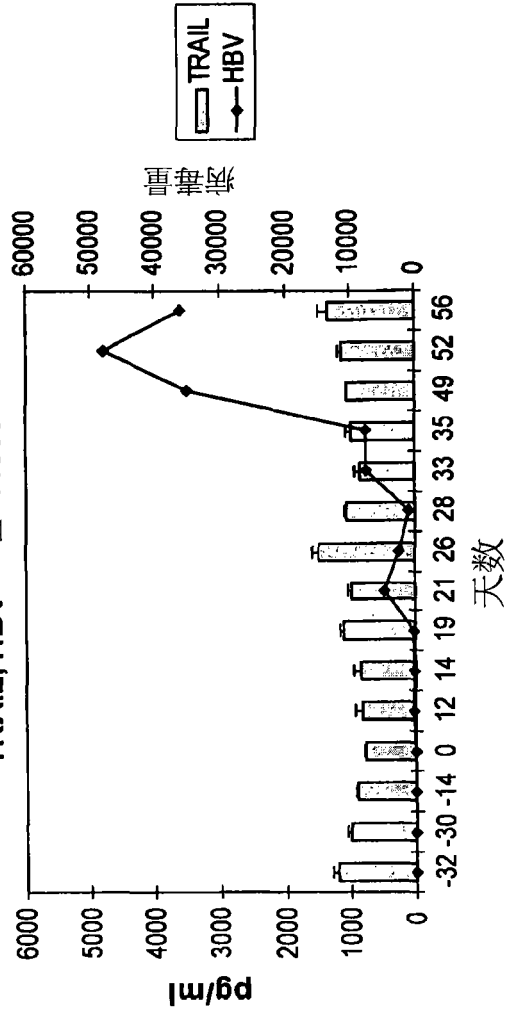


图16C

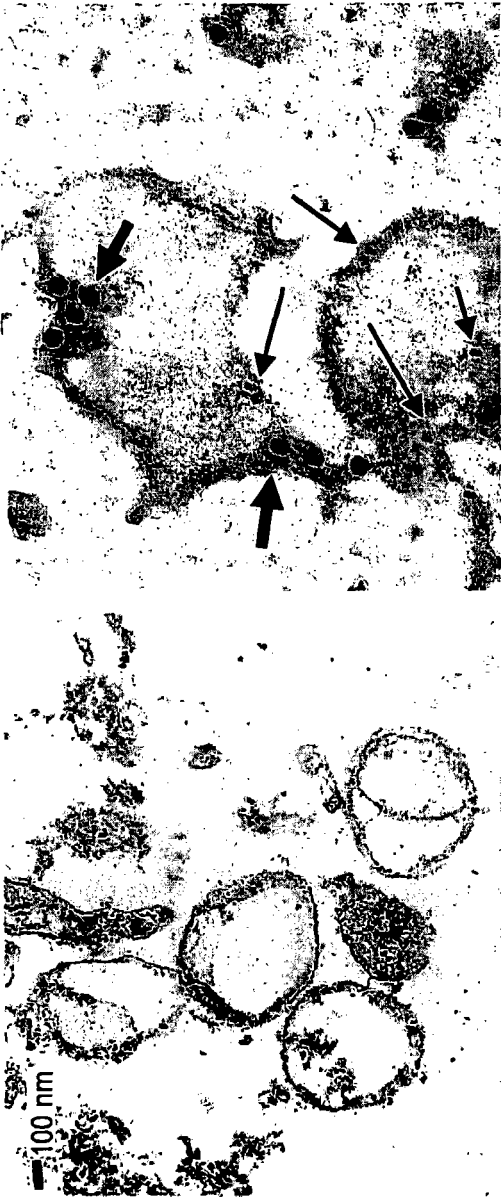


图17A

图17B

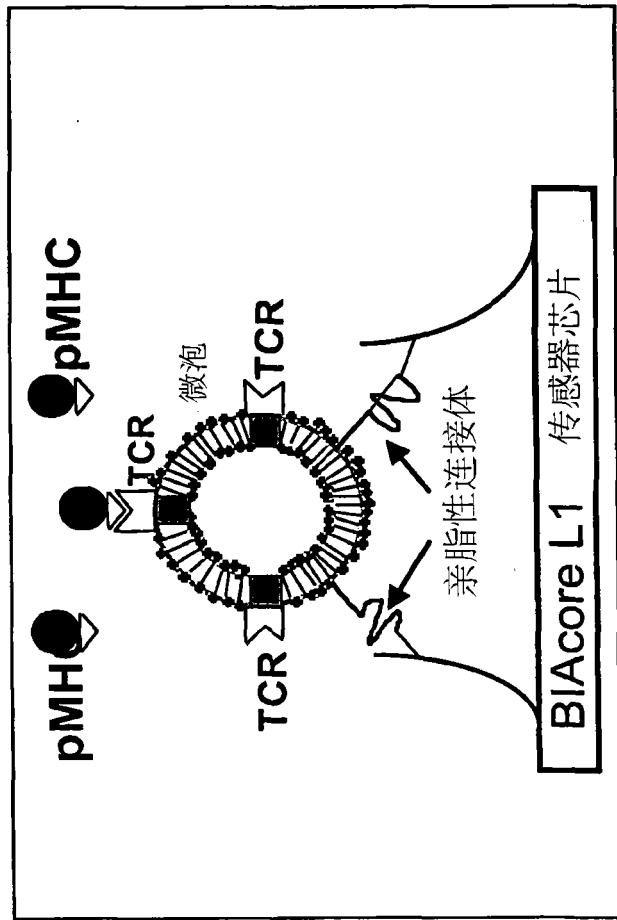
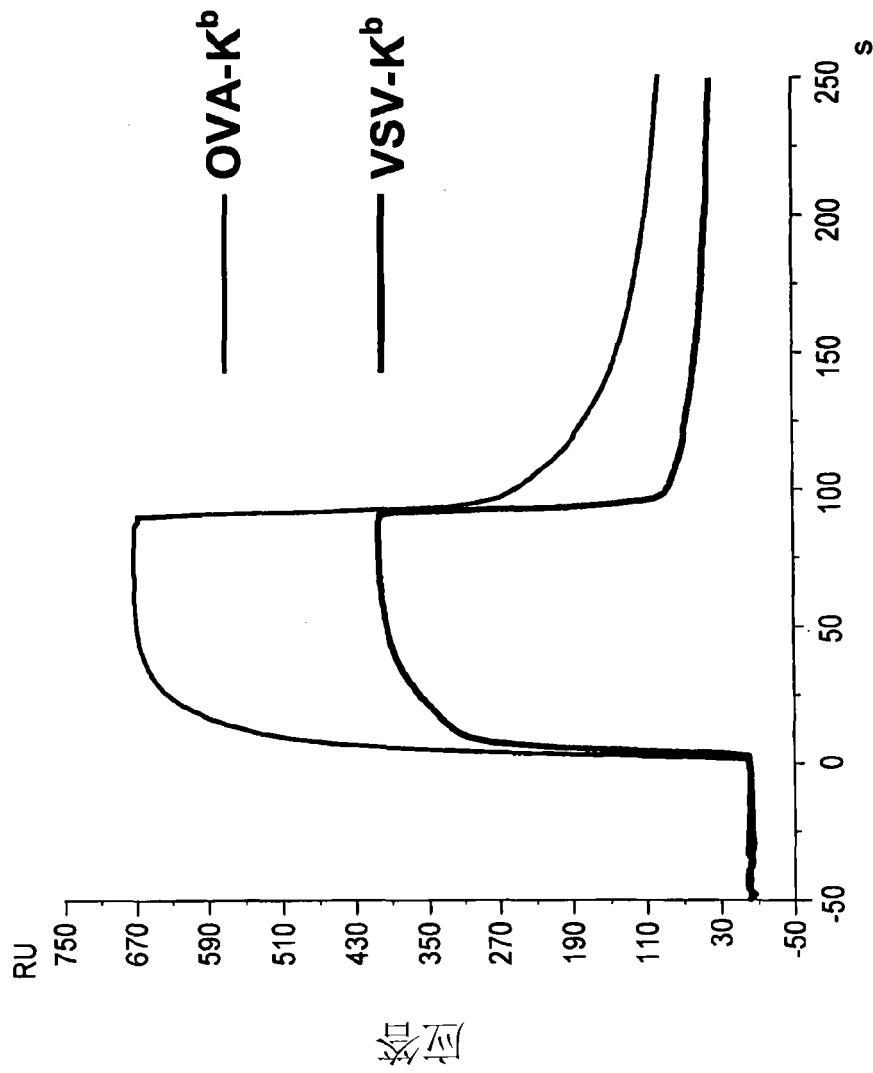


图17C



时间

图18

图19A

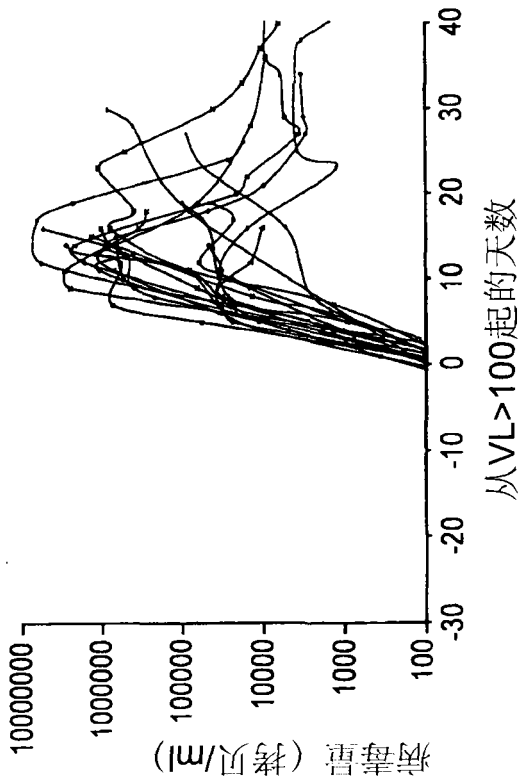


图19B 丙肝病毒

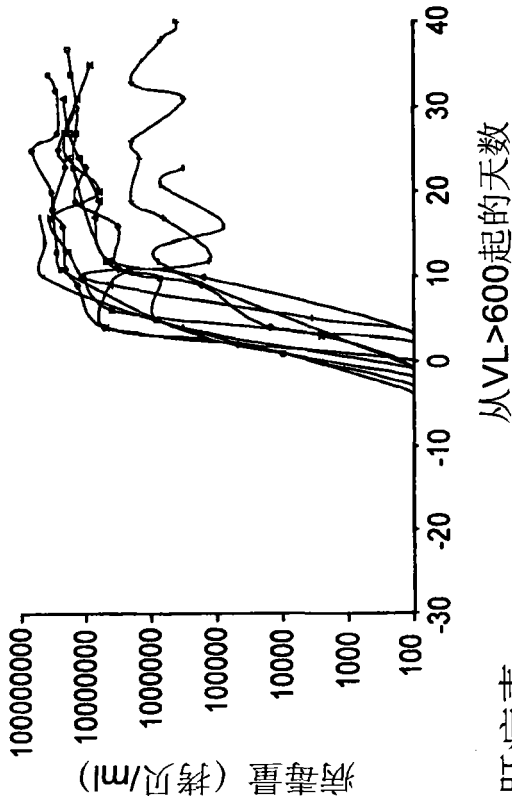


图19C 乙肝病毒

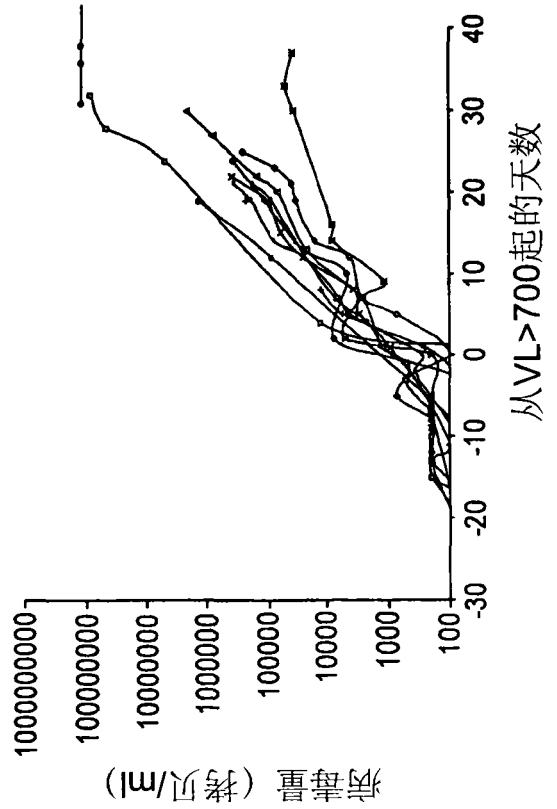
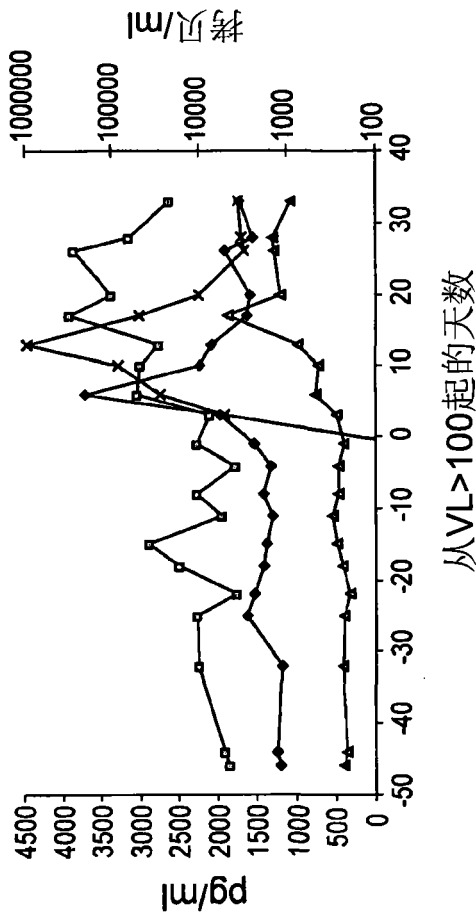
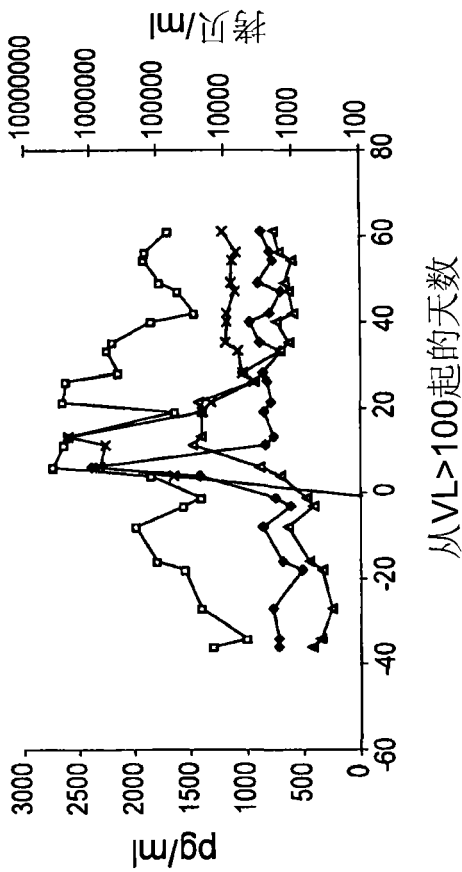


图20A

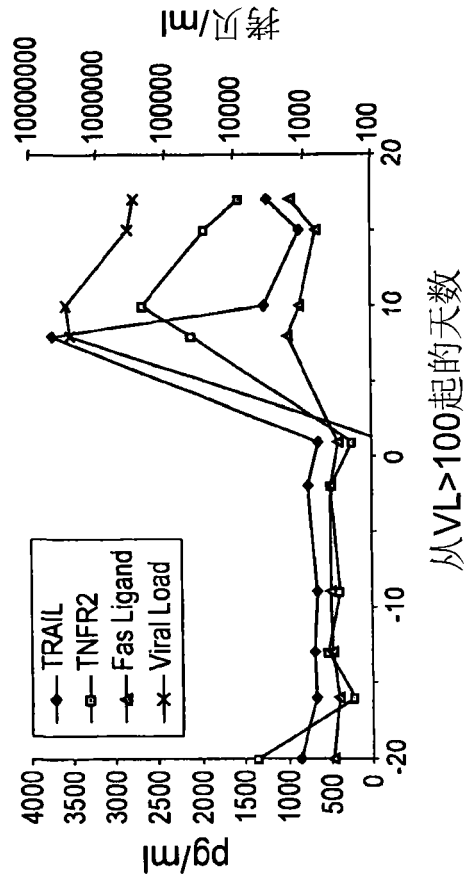
急性HIV: 6246



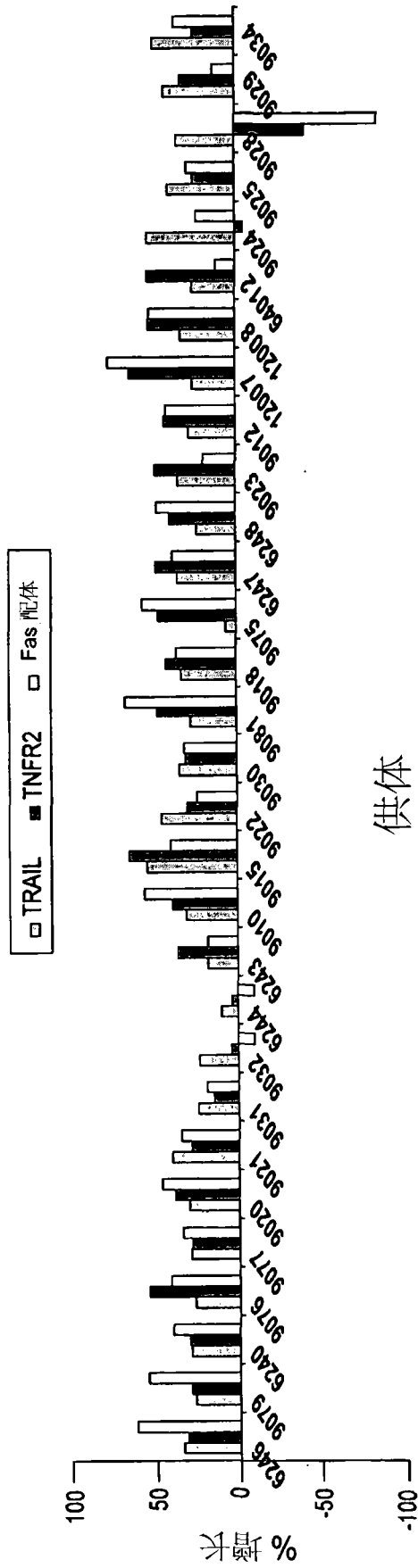
急性HIV: 9079



急性HIV: 9015



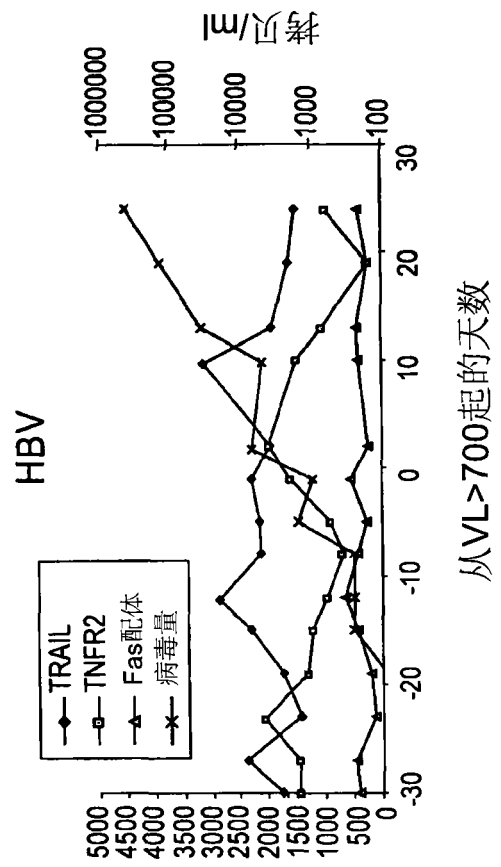
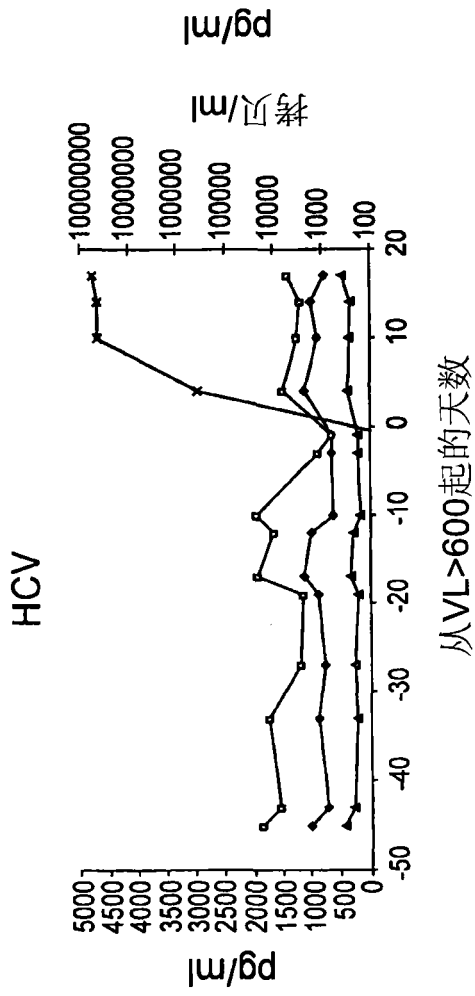
急性HIV-1感染的病人：平均分析物的增长百分数
T0后的水平



供体

图20B

图20C



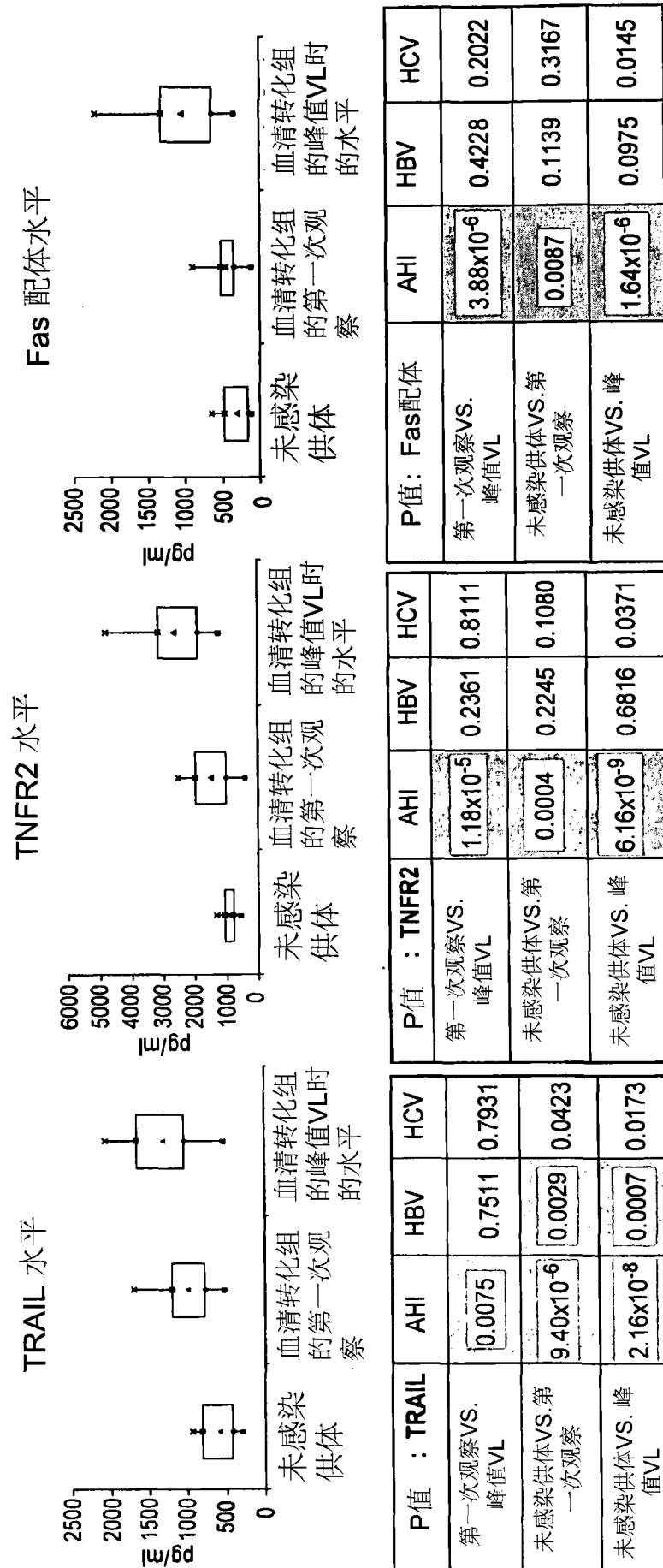


图21A

		接近VL峰时 达峰	在VL之前达峰	与VL同时达峰	在VL之后达峰
HIV-1	TRAIL	30/30	21/30	9/30	0/30
	TNFR2	27/30	7/30	16/30	4/30
	Fas配体	26/30	6/30	16/30	4/30
HCV	TRAIL	4/10	2/10	2/10	0/10
	TNFR2	7/10	2/10	3/10	2/10
	Fas配体	6/10	4/10	1/10	1/10
HBV	TRAIL	5/10	4/10	1/10	0/10
	TNFR2	4/10	2/10	2/10	0/10
	Fas配体	6/10	1/10	5/10	0/10

图21B

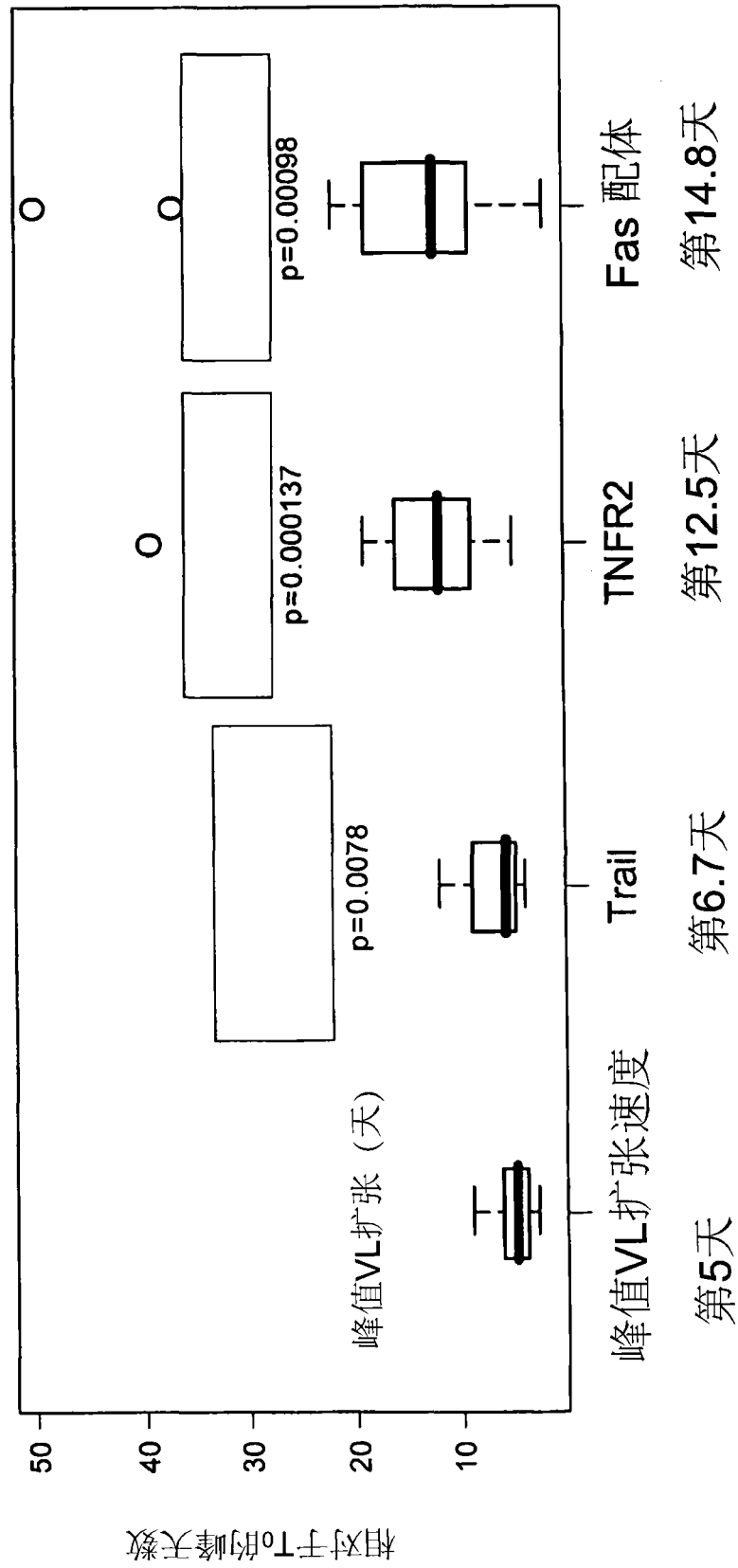
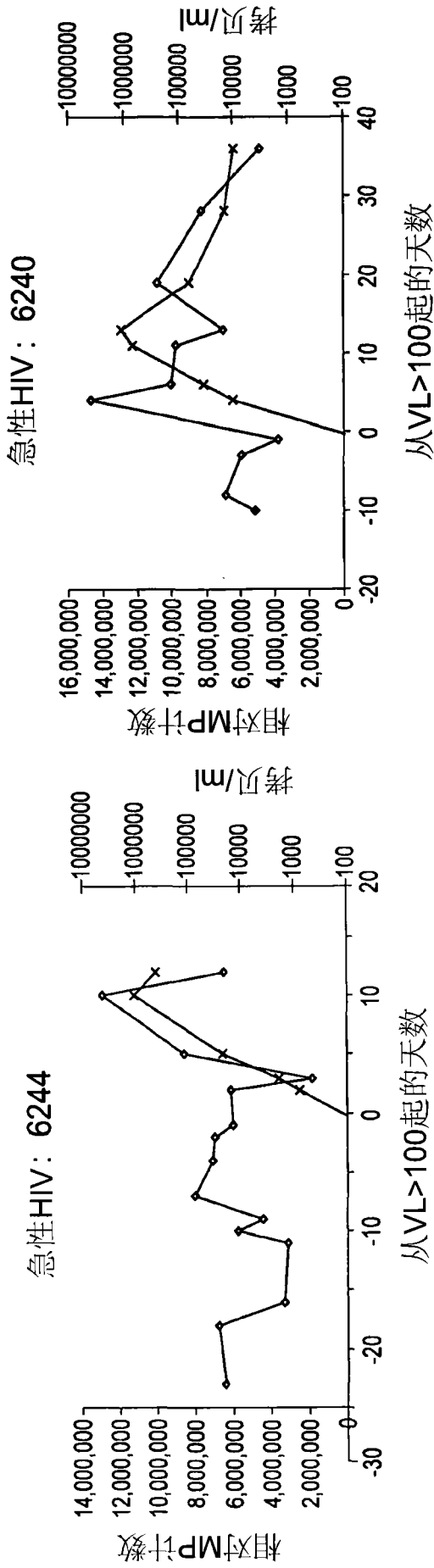


图21C

图22A



急性HIV: 9032

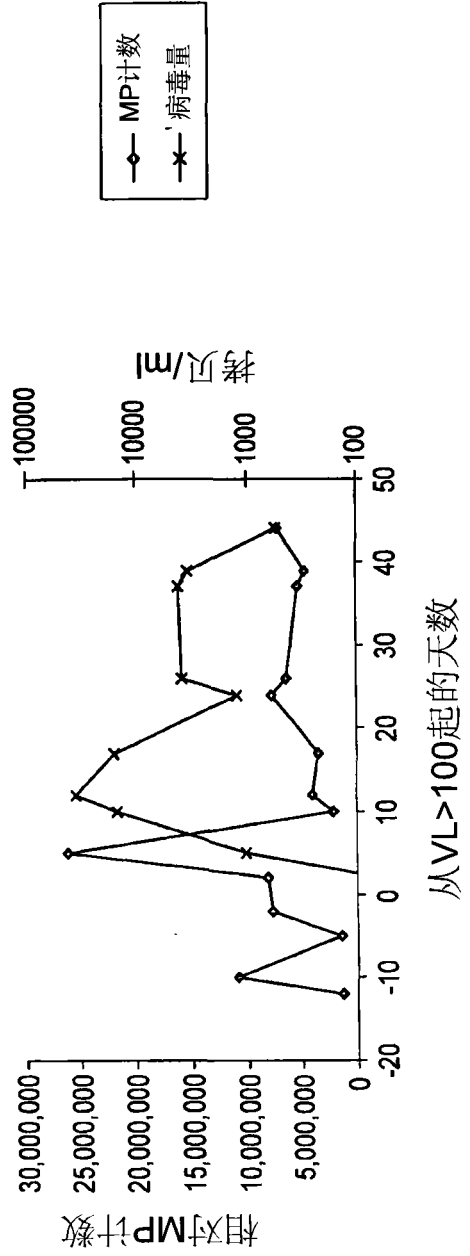


图22B

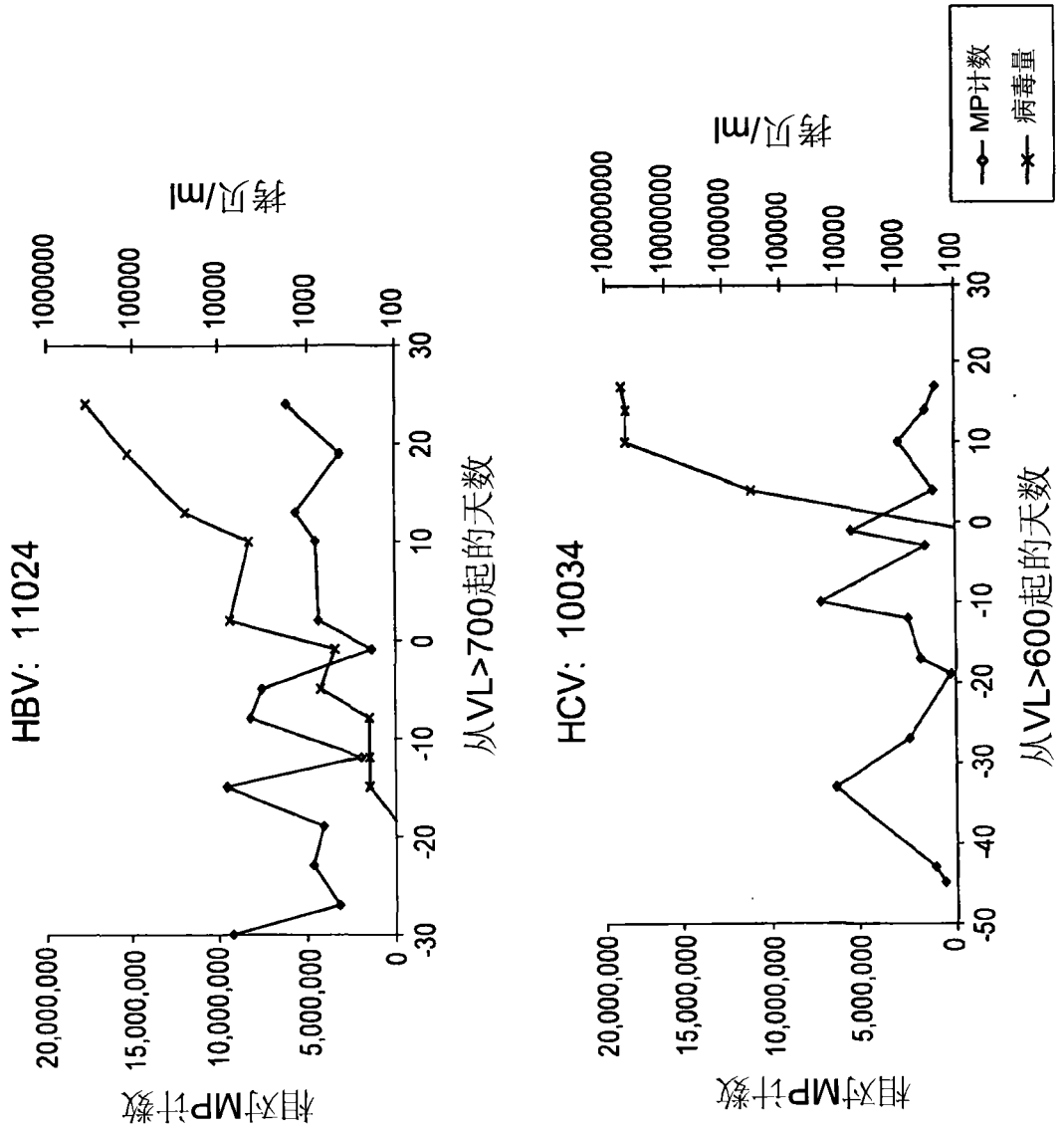


图 23A

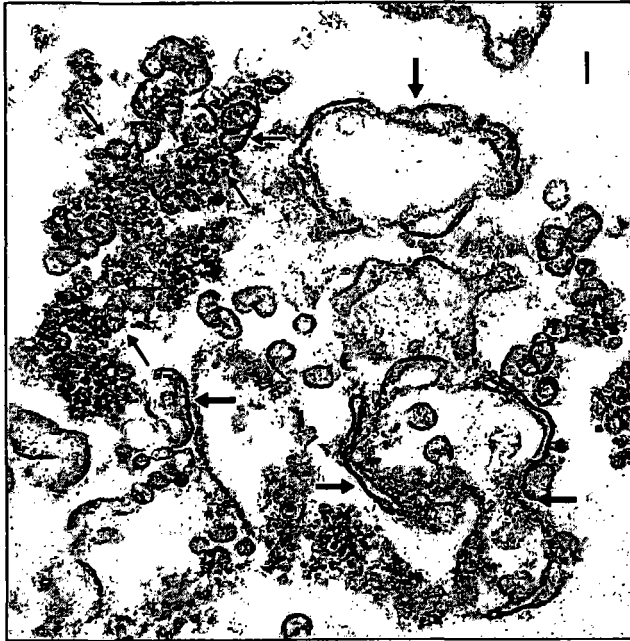


图 23B

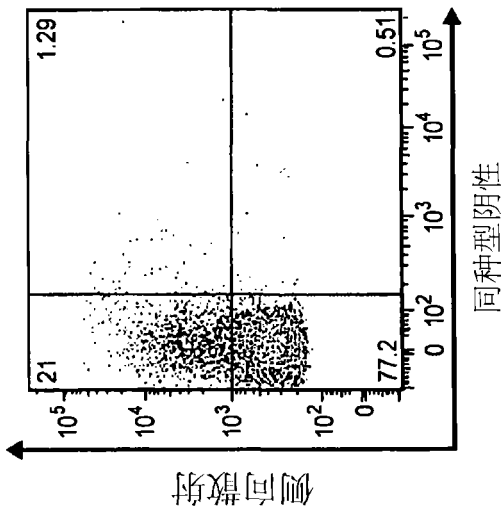
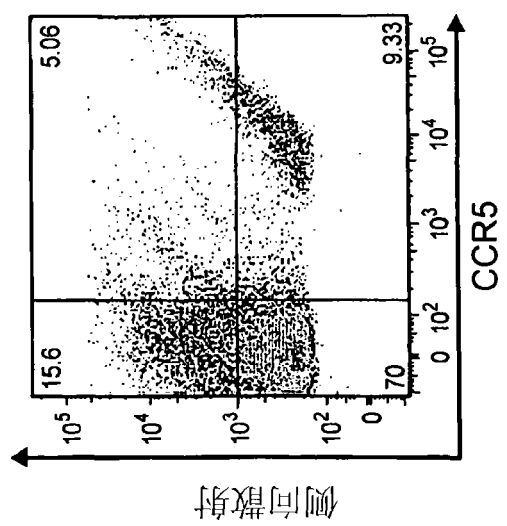
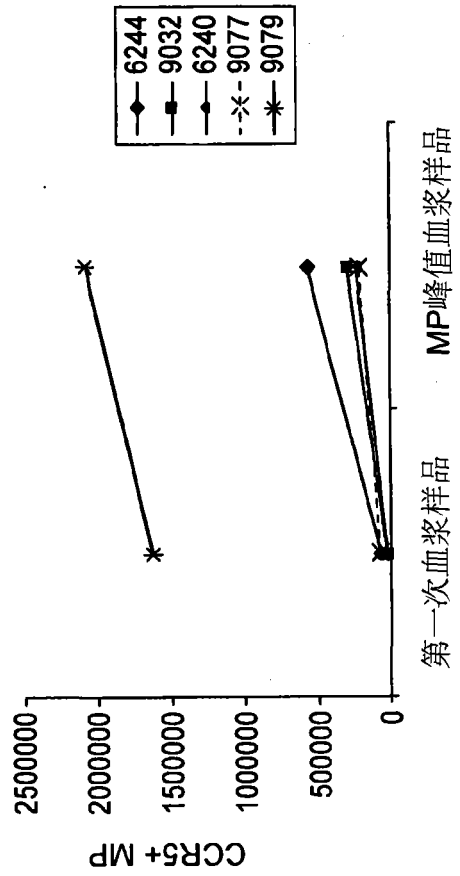


图 23C



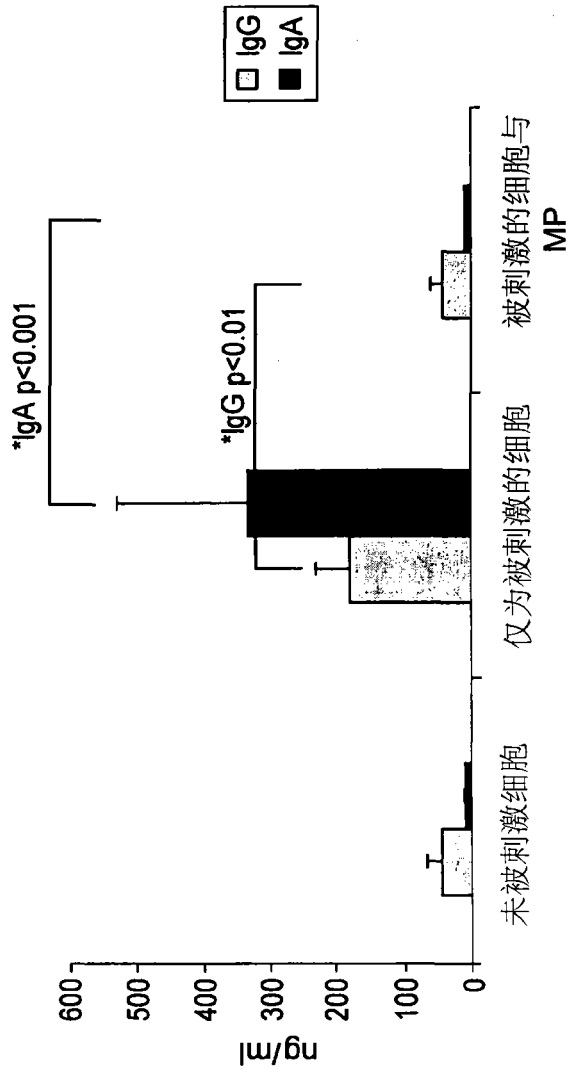


图 24A

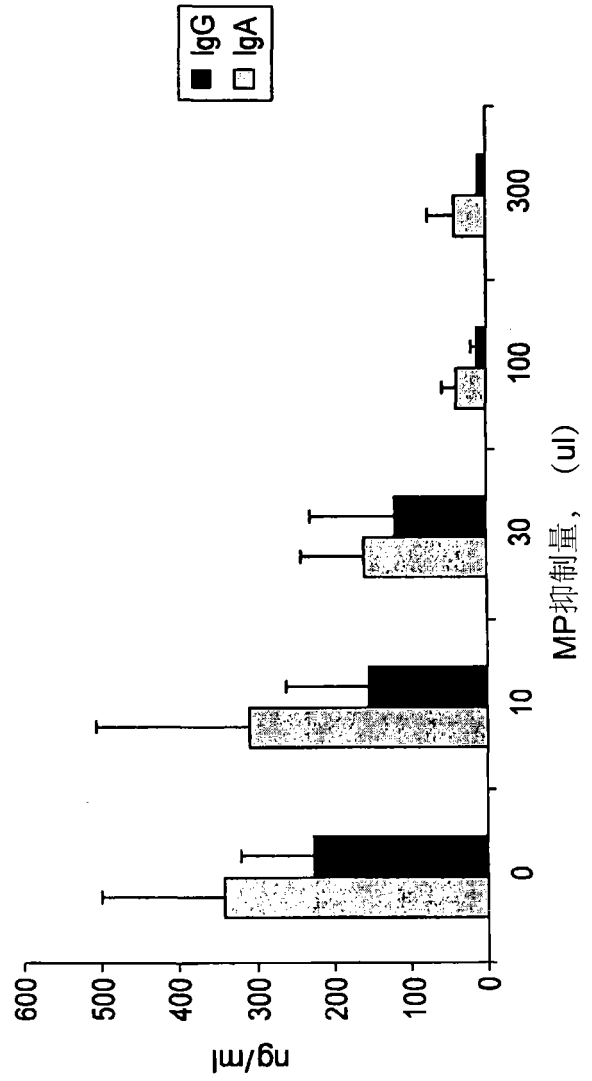


图 24B

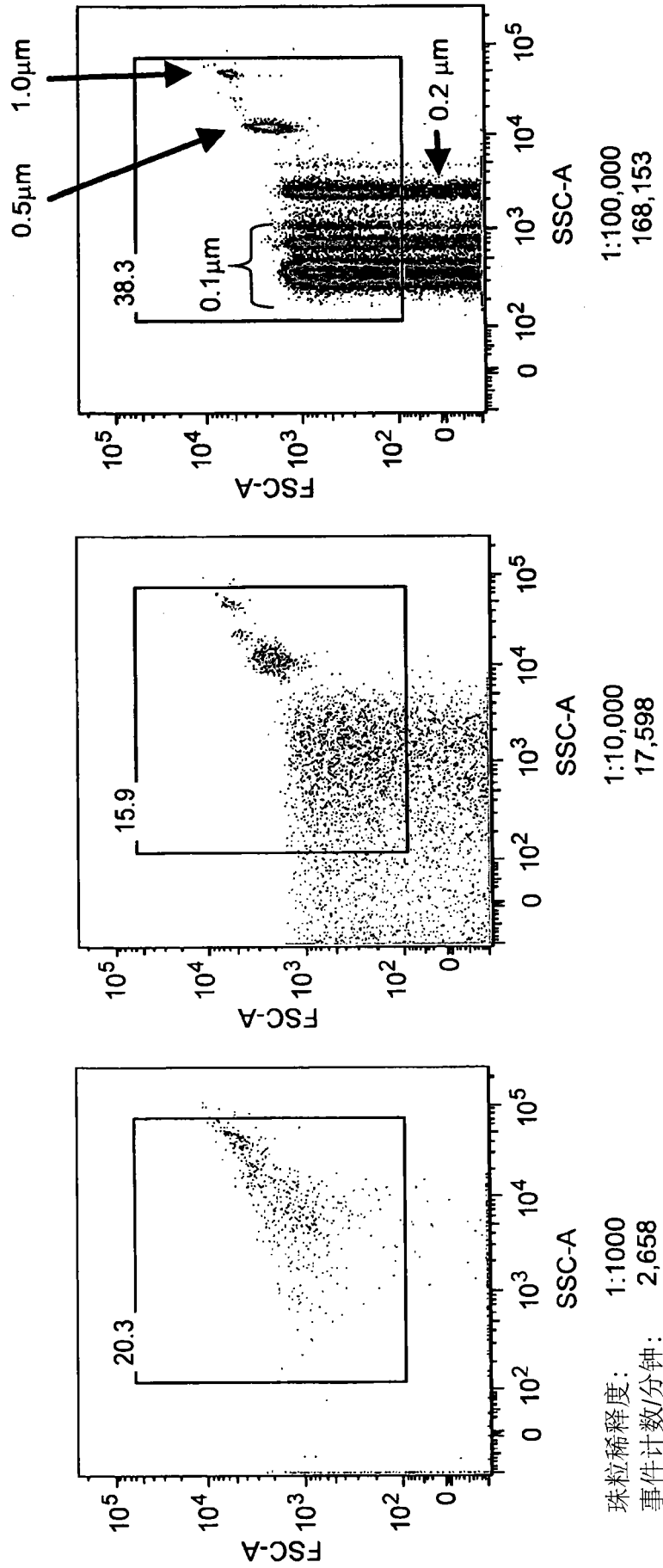


图25A

图25B

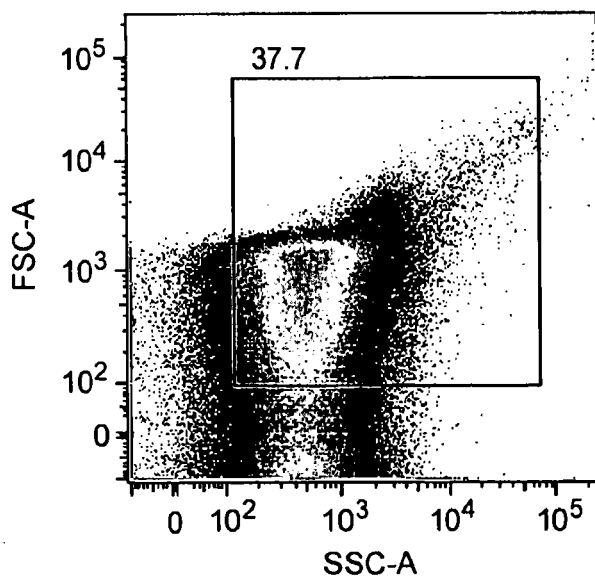
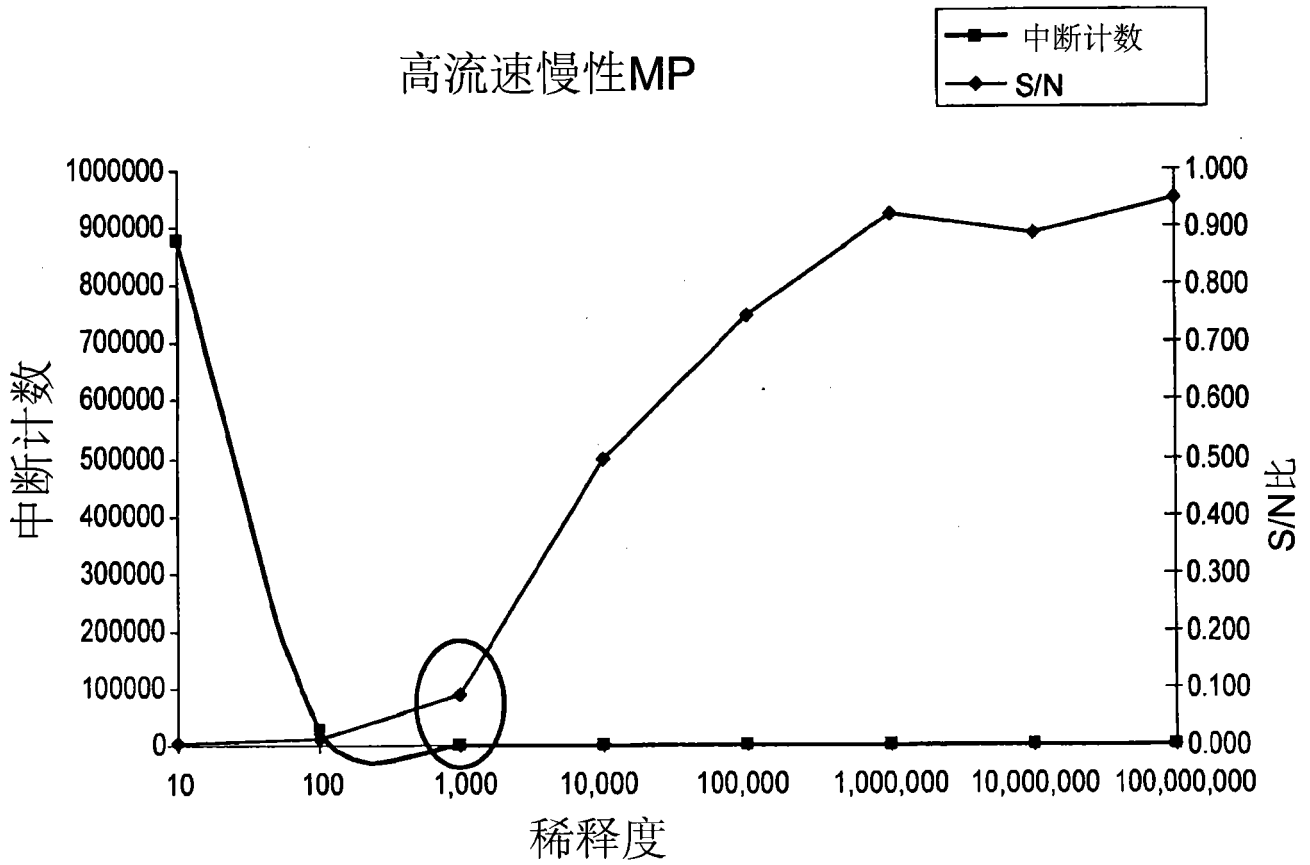
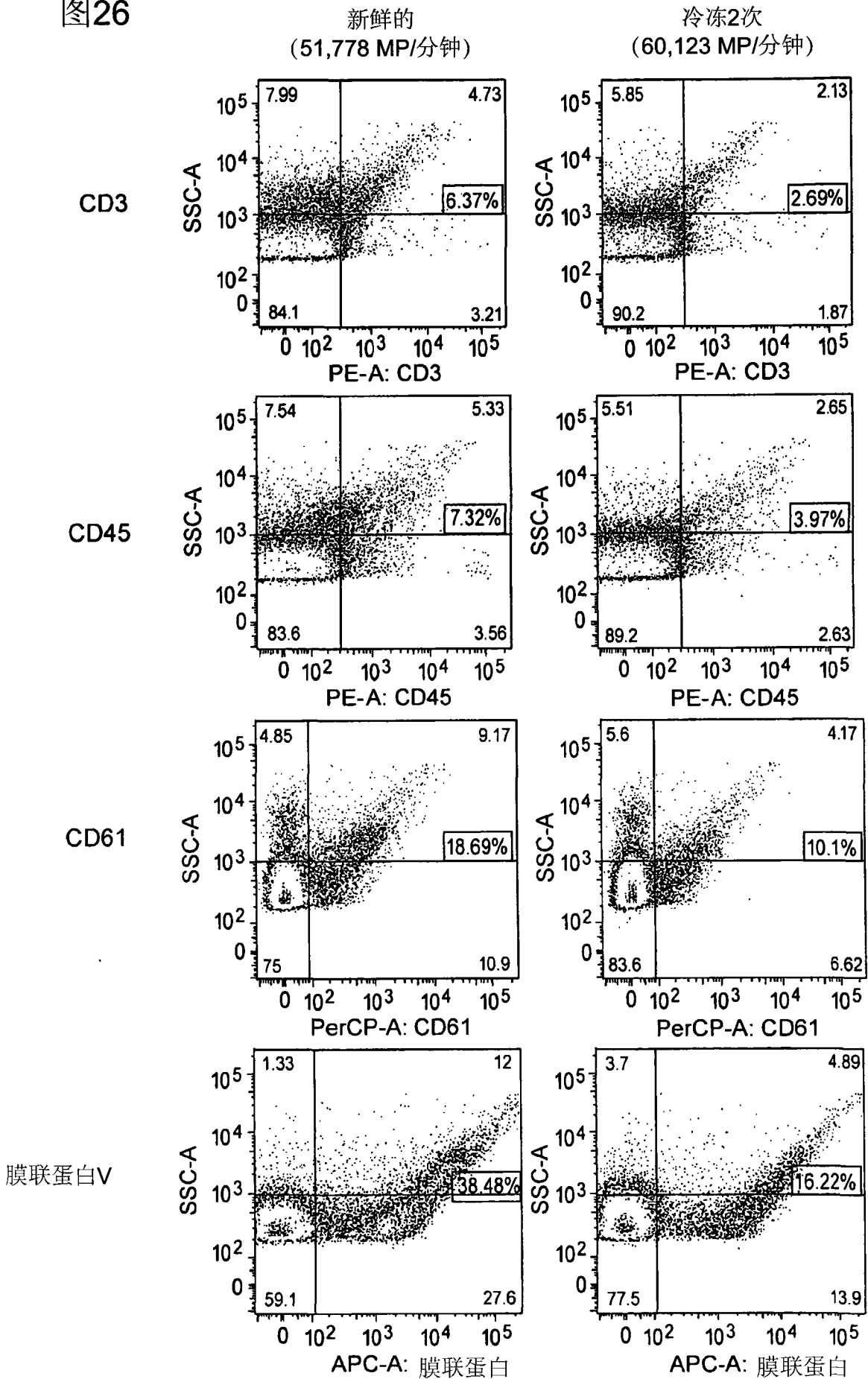


图25C

血浆微粒
事件计数/分钟: 527,988

图26



专利名称(译)	监测HIV感染的方法		
公开(公告)号	CN101622364A	公开(公告)日	2010-01-06
申请号	CN200880002138.8	申请日	2008-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	杜克大学		
申请(专利权)人(译)	杜克大学		
当前申请(专利权)人(译)	杜克大学		
[标]发明人	巴顿F海恩斯 南希G斯密斯		
发明人	巴顿·F·海恩斯 南希·G·斯密斯		
IPC分类号	C12Q1/70 G01N1/30 G01N33/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/16 G01N2333/70578 G01N33/56988 G01N33/56972 G01N2800/52		
优先权	60/879803 2007-01-11 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明大体涉及人类免疫缺陷病毒(HIV)，特别涉及一种监测HIV感染的强度并预测发展成获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的时间的方法。

