

[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 200610170474.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
C07K 16/18 (2006.01)  
C07K 14/16 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月2日

[11] 公开号 CN 101210919A

[22] 申请日 2006.12.30

[21] 申请号 200610170474.6

[71] 申请人 叶新新

地址 100091 北京市海淀区大有北里小区 134  
楼 201 号

[72] 发明人 叶新新

权利要求书 2 页 说明书 26 页

[54] 发明名称

HIV - Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原  
免疫应答抗 HIV 实验与方法

[57] 摘要

本发明为：HIV - Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法。它涉及生命科学领域、及医药领域。证实：HIV 包膜蛋白 gp120、gp160 抗原疫苗临床人体试验，不能证实可以预防 HIV 感染人类，最重要的因素是：HIV 包膜蛋白 gp120、gp160 是人 CD4 受体的异种特异配体，与人 CD4<sup>+</sup> 细胞特异受体特异结合，触发人体免疫耐受机制，不能激发有效根除 HIV 的免疫应答机制。寻找解决触发人体免疫耐受机制的方法，研制不触发人体免疫耐受机制的，HIV - Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗，提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。

1. 一种 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法，其特征在于：应用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原

(1) 免疫接种实验动物 (2)、采血检测免疫实验动物 (2) 针对 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 的血清 (3) 抗体 (4) 的滴度 (5)。

2. 一种 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法，其特征在于：应用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 免疫接种实验动物 (2)，采血检测免疫实验动物 (2) 针对 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 的血清 (3) 抗体 (4) 的滴度 (5)，应用免疫实验动物 (2) 的血清 (3) 培养液 (6) 感染 CD4<sup>+</sup>细胞的 HIV-I 毒株 (7)、体外培养 CD4<sup>+</sup>细胞 (8)，检测免疫实验动物 (2) 的血清 (3) 抗体 (4) 抑制 HIV-I 毒株 (7) 感染培养 CD4<sup>+</sup>细胞 (8) 的能力。

3. 根据权利要求 1、2 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法，其特征在于：实验动物 (2) 是小鼠 (9)。

4. 根据权利要求 1、2 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法，其特征在于：实验动物 (2) 是非人类的灵长类动物 (10)。

5. 根据权利要求 1、2 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法，其特征在于：实验动物 (2) 是临床试验人体 (11)。

6. 根据权利要求 1 至 5 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋

白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 是 HIV- I -Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 抗原 (12)。

7. 根据权利要求 1 至 5 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 是 HIV- I -Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp160 抗原 (13)。

8. 根据权利要求 2 至 7 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: 培养 CD4<sup>+</sup>细胞 (8) 是传代人 CD4<sup>+</sup>细胞系 (14)。

9. 根据权利要求 2 至 7 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: 培养 CD4<sup>+</sup>细胞 (8) 是人 PBMC 细胞 (15)。

10. 根据权利要求 2 至 9 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: 感染 CD4<sup>+</sup>细胞的 HIV- I 毒株 (7) 是实验室 HIV- I 毒株 (16)。

11. 根据权利要求 2 至 9 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: 感染 CD4<sup>+</sup>细胞的 HIV- I 毒株 (7) 是取自 HIV- I 感染者血液成分 (17) 的 HIV- I 毒株 (7)。

12. 根据权利要求 1 中所述的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法, 其特征在于: HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原 (1) 是模拟实验应用的异种动物的单克隆抗体 (18)。

## HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法

### 技术领域

本发明涉及了一种 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法。它涉及生命科学领域、及医药领域。能够揭示 HIV 感染人体复制,通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原,与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合,触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制,能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制,更为有效对抗人体免疫抑制压力。证实:迄今 HIV 疫苗科学研究设计、研制的,所有各种不同的 HIV 包膜蛋白 gp160、gp120 抗原疫苗的临床人体试验,不能证实可以预防 HIV 感染人类,最重要的因素是:HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 是人 CD4 受体的异种特异配体抗原,与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合,触发人体免疫耐受机制,不能激发有效根除 HIV 的免疫应答机制。寻找到能够解决 HIV 包膜蛋白 gp120 触发人体免疫耐受机制的方法,研制不触发人体免疫耐受机制的, HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗,提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。

### 背景技术

自 1983 年人免疫缺陷病毒——艾滋病被发现以来,客观的讲,人类在根治、预防艾滋病科学研究方面,至今没有取得解决根本问题的科学研究突破。没有科学研究迹象表明:抗 HIV 治疗可以彻底治愈 HIV 感染者; HIV 疫苗可能会有效预防 HIV 感染。

HIV 科学界，把不能根治、预防艾滋病 AIDS，归咎于 HIV 复制速度快、HIV 基因具有高度变异性：病毒的产量平均约为  $10^{10}$ /天，HIV 在体内的平均产生时间约为 2.6 天；体外测定每 6000 个核苷酸在逆转录过程中有一次错误的概率，体内测试显示每轮复制过程可能产生一次突变。可产生大量具有各种不同基因变异型或表型的毒株，应对药物抑制压力、机体免疫抑制压力，不断衍生出新的耐药毒株、免疫逃逸毒株优势病毒种株。病毒通过特异性突变所获得的选择性优点将对病毒基因组产生有力的影响。HIV 感染人体免疫应答，出现高滴度的 HIV 的特有的抗体是 HIV 原发性免疫反应的特征，它出现在病毒血症的高峰或稍晚时间。这最初的抗体反应不包括 HIVgp120 中和抗体。抗逆转录病毒药和 IL-2 治疗虽然可以使 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数增加，却未能使解离体 V<sub>β</sub> 库恢复。应用 IL-2 治疗期间 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增加来源于 CD4<sup>+</sup>T 细胞库在胸腺外的扩增，因为 T 细胞 V<sub>β</sub> 库的 PCR 分析证明缺失的克隆不能再生。用 IL-2 和抗逆转录病毒药试图重建 T 细胞 V<sub>β</sub> 库的失败，暗示免疫系统的损伤可能存在阈值，若超过该阈值，免疫功能便不能重建。间接感染或各种疫苗免疫的 HIV 感染个体都有血浆病毒血症暂时增加，并且与诱导产生免疫活性程度相关；类似的发现也可见于 SIV 感染的恒河猴中。上述众多不可被一一综述 HIV 科学研究发现，显示：HIV 感染人体复制，是在最初期、还没有激发机体免疫应答之前，通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，首先触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，导致感染人体免疫系统针对 HIV 感染复制体液免疫应答反应延迟，不能首先产生针对 gp120 的保护性中和抗体、抑制 gp120 与 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异

结合触发的免疫耐受机制；使 HIV 可以在人体免疫应答产生针对 gp120 的保护性中和抗体之前，还没有被细胞免疫 CTL 有效抑制时、HIV 过度复制达到病毒血症峰值，进一步触发细胞免疫耐受机制-细胞免疫损伤机制；使 HIV 在感染者体内复制，不能激发有效根除 HIV 的体液免疫应答机制、细胞免疫应答机制，能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制，更为有效对抗机体免疫抑制压力。迄今 HIV 疫苗科学研究设计、研制的，所有各种不同的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗的各种临床人体试验，不能证实可以预防 HIV 感染人类，最重要的因素是：gp120 或 gp160 是人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，首先触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，不能激发有效根除 HIV 的免疫应答机制。

现代疫苗科学研究设计、研制的，HAV 甲肝灭活疫苗仅需要 100ng~500 ng 接种一次，即可使 90%以上接种人体产生保护性中和抗体；HBV 乙肝重组 DNA 蛋白 HBs 抗原疫苗 MSD 疫苗、COH 疫苗，仅需要 5μg~20 μg 接种三次，即可使 90%以上接种人体产生保护性抗-HBs 中和抗体。现代疫苗科学研究设计、研制的，HIV 重组 DNA 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，多数受试者在用 300μg HIV-III<sub>B</sub> gp120、300μg 或 600μg HIV-MN gp120 接种三次，仅可产生针对 V3 环的抗体、针对实验室同源毒株的中和抗体，不能中和野生 HIV 毒株、预防野生 HIV 毒株感染人类。例如，HIV 包膜蛋白 gp160 抗原疫苗，通常需用较高剂量接种 4 次以上才能使少数受试者产生较低滴度的同源中和抗体；Vaxgene 公司的 HIV 包膜蛋白 gp120 抗原疫苗在北美和泰国进行大规模的 III 临床人体试验，公布的北美地区的试验结果，其中接种疫苗人群 HIV 感

染率为 5.7%，未接种疫苗人群 HIV 感染率为 5.8%。临床人体试验结果表明 gp120 抗原疫苗不能有效预防 HIV 感染。迄今已经有上百次各种不同 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗临床人体实验失败，不能一一综述。HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗接种临床人体，表现出体液免疫应答延迟、弱免疫原体液免疫应答反应，与 HIV 感染人体复制最初表现体液免疫应答延迟，不能首先产生针对 gp120 的保护性中和抗体，弱免疫原体液免疫应答反应极为相似，可以为 HIV 感染人体，通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，首先触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制，更为有效对抗人体免疫抑制压力，提供 HIV 疫苗相关临床人体实验科学依据。

已经有众多相关器官移植免疫耐受动物模型实验结果证实：给动物注射 CD4 受体的异种特异配体抗原，动物 CD4 受体的异种特异配体抗原与动物 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发动物机体针对 CD4 异种特异配体抗原的体液免疫、细胞免疫耐受机制；表现出针对动物 CD4 异种特异配体抗原的体液免疫应答延迟、弱免疫原体液免疫应答反应。与现代 HIV 疫苗科学研究实施过的，所有各种不同的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗——人 CD4 受体的异种特异配体抗原接种临床人体实验，表现出针对 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原——人 CD4 受体的异种特异配体抗原体液免疫应答延迟、弱免疫原体液免疫应答反应极为相似；与 HIV 感染人体复制最初表现体液免疫应答延迟，不能首先产生针对 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的保护性中和抗体，弱免疫原体液免疫应答反应极为相似。实验证实，改变动物 CD4 受体

的异种特异配体抗原分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与动物 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与动物 CD4 受体结合；它将不能触发动物机体免疫耐受机制。

发明者认为：1. 改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合；它将不能触发人体免疫耐受机制。2. 现代 HIV 疫苗科学研究，设计研制 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、能够改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 分子的某个或某几个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，将有可能在研制筛选抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗科学研究方面，取得科学创新突破。

#### 发明内容

本发明公开了一种 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法。1. 用大鼠抗小鼠 CD4 受体的单克隆抗体 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原，模拟 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，多次免疫注射 CBA/Ca 小鼠；采血检测免疫小鼠针对大鼠 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。2. 用大鼠抗人或抗兔的单克隆抗体 IgG2a/b——不能与小鼠 CD4 受体结合的异种抗原，模拟 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，不触发人体免疫耐受机制

的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原，多次免疫注射 CBA/Ca 小鼠；采血检测免疫小鼠针对大鼠 IgG2a/b——异种抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。证实：1. 改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 异种特异配体分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，它不能触发人体免疫耐受机制；提供直接动物模型实验科学依据。2. 现代 HIV 疫苗科学研究，设计研制 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 分子的某个或某几个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，将有可能在研制筛选抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗科学研究方面，取得科学创新突破。3. 为研制 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗，提供可实施的小鼠、恒河猴、大猩猩与临床人体 HIV 疫苗实验科学研究方案。

本发明的目的是，提供一种 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法。设计、实施 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验，揭示 HIV 感染人体复制，通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制，更为有效对抗人体免疫抑制压力。证实：迄今 HIV 疫苗科学研究设计、研制的，所有各种不同的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗的临床人体试验，不能证实可以预防 HIV 感染人类，最重要的因素是：HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 是人 CD4

受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，不能激发有效根除 HIV 的体液免疫应答机制、细胞免疫应答机制。寻找解决 HIV 包膜蛋白触发人体免疫耐受机制的方法，研制不触发人体免疫耐受机制的，HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原抗 HIV 治疗疫苗、抗 HIV 预防疫苗，提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。

### 具体实施方式

为达到上述目的，实施本发明采用的方案：

## HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验与方法

### 1. 实验动物与临床试验人体

1.1. 实验动物：4~6 周龄无菌动物，CBA/Ca 小鼠，C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠，Hu-PBL-SCID 小鼠；非人类的灵长类动物，恒河猴，大猩猩。

1.2. 临床试验人体：未感染 HIV- I 的正常健康人，感染 HIV- I 急性期患者。

### 2. 实验生物材料

2.1. 用大鼠抗小鼠 CD4 受体的单克隆抗体 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原，模拟 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原；用大鼠抗人或抗兔的单克隆抗体 IgG2a/b——不能与小鼠 CD4 受体结合的异种抗原，模拟 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 分子某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160

异种抗原。模拟实验采用的大鼠抗小鼠 CD4 受体的单克隆抗体，大鼠抗人或抗兔的单克隆抗体，可以应用其它异种动物如兔、羊、人的同种 Ig 型的单克隆抗体。

2.2. 感染体外培养 CD4<sup>+</sup>细胞的 HIV- I 病毒：由取自 HIV- I 感染者最初急性期的血浆、液氮低温冷冻保存备用；由取自 HIV- I 感染者最初急性期的人 PBMC 细胞与 CD4<sup>+</sup>细胞共同培养获得；实验室 HIV- I 毒株。猴 SIV 毒株；将人 HIV 膜蛋白替换猴 SIV 膜蛋白所构成的镶嵌病毒-SHIV 杂合毒株。

2.3. 体外培养 CD4<sup>+</sup>细胞：取自 HIV- I 感染者最初急性期的人 PBMC 细胞；取自未感染 HIV- I 者的正常健康人 PBMC 细胞；传代人 CD4<sup>+</sup>细胞系，例如人 T 淋巴细胞系 MT4。

2.3. 人淋巴细胞：取自 HIV- I 感染者最初急性期，经非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗，经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原-疫苗多次免疫注射治疗后，采血获取的人淋巴细胞。

2.4. C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠血清：正常小鼠血清；小鼠经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原疫苗多次免疫注射后，采血获取的含抗 gp120 抗体的小鼠血清。恒河猴血清：正常恒河猴血清；恒河猴经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原疫苗多次免疫注射后，采血获取的含抗 gp120 抗体的恒河猴血清。大猩猩血清：正常大猩猩血清；大猩猩经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗

原疫苗多次免疫注射后，采血获取的含抗 gp120 抗体的大猩猩血清。  
正常健康人 AB 血清。未感染 HIV- I 者的正常健康人，经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原疫苗多次免疫注射后，采血获取的含抗 gp120 抗体的人 AB 血清。HIV- I 感染者最初急性期，经非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗，经 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原疫苗多次免疫注射治疗后，停止用药治疗 7d 后抽取的，含抗 gp120 抗体的人血清。

### 3. 实验检测、药物和试剂及与培养液

- 3.1. 检测 gp120 抗体的双夹心法、或直接夹心法试剂。
- 3.2. HIV 前病毒检测与试剂。
- 3.3. HIV 病毒载量检测 HIV-1 Qiantiplex 实验与试剂，或 Amplicor HIV-1Monitor 实验与试剂，或 NucliSens HIV-1 实验与试剂。
- 3.4. CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞检测实验与试剂。
- 3.5. RPMI-2 加 2%血清培养液，RPMI1640 加 10%~20%血清培养液含青霉素-G100U/ml、庆大霉素 50μg/ml；Ficoll-Hystopaque 密度梯度溶液 d=1.077g/ml Pharmacia，把 10ml Ficoll 液预先内置于 50ml 离心管内；淋巴细胞处理液 Nycomed, Birmingham, UK，把 15ml 淋巴细胞处理液预先内置于 50ml 离心管内；EDTA 钠盐、用生理盐水配制 4%抗凝液，把 0.4ml 抗凝 EDTA 钠盐溶液预先内置于 10ml 注射器内，把 0.6ml 抗凝 EDTA 钠盐溶液预先内置于 20ml 注射器内。

### 4. 制备生物实验材料

- 4.1. 设计、研制：各种不同 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包

膜蛋白 gp120 或 gp160 分子的某个或某些个氨基酸结构, 使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合, 不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗——HIV-1 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗。

4.2. 用大鼠抗小鼠 CD4 受体的单克隆抗体 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原, 模拟 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原, 在实施实验时分别制备: 用含有 10% 小鼠血清的生理盐水配制的 3 $\mu$ g/ml、6 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml 溶液; 用大鼠抗人或抗兔的单克隆抗体 IgG2a/b——不能与小鼠 CD4 受体结合的异种抗原, 模拟 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4 受体结合, 不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原, 在实施实验时分别制备: 用含有 10% 小鼠血清的生理盐水配制的 3 $\mu$ g/ml、6 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml 溶液。

4.3. HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人的 CD4 受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗, 在实施实验时分别制备: 用含有 10% 小鼠血清的生理盐水配制的 50 $\mu$ g/ml 溶液; 用含有 10% 人 AB 血清的生理盐水配制的 50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml 溶液。

4.4. 制取人 PBMC 细胞: 应用预先内置有 0.4ml 抗凝 EDTA 钠盐溶液的 10ml 注射器, 无菌抽取未感染 HIV-I 者静脉血 10ml、或感染 HIV-I 者静脉血 10ml, 加 2 倍 RPMI-2 培养液混匀; 将其仔细缓慢加入预先内置有 Ficoll 液 10ml 的 50ml 离心管上层; 20 $^{\circ}$ C、400g 离心 30min; 用灭菌吸管小心把离心管 Ficoll 液和血液分界层间的 PBMC 细胞吸出, 置入新离心管加 5 倍 RPMI-2 培养液混匀; 20 $^{\circ}$ C、300g 离心 10min,

弃上清液，加 5 倍 RPMI-2 培养液混匀；20℃、200g 离心 5min，弃上清液，用含有 10%人 AB 血清的 RPMI1640 培养液，配制细胞悬液  $1 \times 10^7$ /ml、并进行活细胞计数。

4.5. 制取人淋巴细胞：应用预先内置有 0.6ml 抗凝 EDTA 钠盐溶液的 20ml 注射器，无菌抽取未感染 HIV- I 者静脉血 15ml、或感染 HIV- I 者静脉血 15ml，加 1 倍 RPMI-2 培养液混匀；将其仔细缓慢加入预先内置有淋巴细胞处理液 15ml 的 50ml 离心管上层；不要刹车，20℃、800g 离心 25min；用灭菌吸管小心吸取离心管淡黄色层，置入新离心管加 5 倍 RPMI-2 培养液混匀；20℃、300g 离心 10min，弃上清液，加 5 倍 RPMI-2 培养液混匀；20℃、200g 离心 5min，弃上清液，用含有 10%人 AB 血清的 RPMI1640 培养液，配制细胞悬液  $2 \times 10^7$ /ml、并进行活细胞计数。

4.6. 活细胞计数检测：EB 和 AO 各 0.1mg 溶于 100ml PBS 液，制备 EB/AO 工作液；待检测细胞悬液  $20 \mu\text{l} \sim 50 \mu\text{l}$ ，与适量体积  $20 \mu\text{l} \sim 1 \text{ml}$  的 EB/AO 溶液混合，使最终细胞浓度为  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ /ml；将细胞悬液加入血球计数器，使用荧光显微镜配合紫外线 UV 和可见光，对活细胞绿色、死细胞橙色计数。或应用 2.5g/L 台盼蓝溶于 PBS 液，做细胞染色活细胞计数；台盼蓝是致癌剂，实验操作需要带手套。

4.7. 制取人血清：无菌抽取未感染 HIV- I 者静脉血 200ml、或感染 HIV- I 者静脉血 200ml；分置 4 只 100ml 离心管内，2000g 离心 10min，离心后 4℃低温静置 60min；然后用血管钳挤压血凝块，挤出内含的血清；弃去血凝块，再分置 2 只 100ml 离心管内， $5 \sim 10000 \text{g}$  离心 60min；用一系列过滤器进行过滤，最后用  $0.1 \mu\text{m}$  孔径无菌过滤器进行过滤后；分置于多个小无菌高密度聚丙烯容器，放置-70℃冰箱保存备用。

4.8. 制取动物血清：方法如上。

4.9. 人淋巴细胞免疫缺陷鼠 Hu-PBL-SCID 的再构建：用人淋巴细胞悬液  $2 \times 10^7/\text{ml}$ 、0.2ml/只，注射到 4~6 周龄免疫缺陷鼠的腹膜腔内。

## 5. 建立 HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统

5.1. 建立实验室 HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统；HIV- I 感染者最初急性期 HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统

5.1.1. 用含有 10%胎牛血清、10%含抗 gp120 抗体的动物血清的 RPMI1640 培养液，调整 MT4 细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{ml}$  培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养 MT4 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种浓度为 1000TCID<sub>50</sub> 的实验室 HIV- I 毒株，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养；用含有 10%胎牛血清、10%不含 gp120 抗体的正常动物血清的 RPMI1640 培养液，调整 MT4 细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{ml}$  培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养 MT4 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种浓度为 1000TCID<sub>50</sub> 的实验室 HIV- I 毒株，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每培养 3d 吸取细胞培养瓶中上清液，补充新鲜培养液。培养第 4d 后每天在倒置显微镜观察培养细胞病变。培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV- I 感染致死的活细胞计数。

5.1.2. 用含有 10%正常人 AB 血清、10%含抗 gp120 抗体的动物血清的 RPMI1640 培养液，调整正常人 PBMC 细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{ml}$  培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养正常人 PBMC 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种  $2.5 \times 10^6$ 、取自 HIV- I 感染者最初急性期液氮低温保存备用复苏的人 PBMC 细胞，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub>

的培养箱中培养；用含有 10%正常人 AB 血清、10%不含 gp120 抗体的正常动物血清的 RPMI1640 培养液，调整正常人 PBMC 细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml 培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养正常人 PBMC 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种  $2.5 \times 10^6$ 、取自 HIV-I 感染者最初急性期液氮低温保存备用复苏的人 PBMC 细胞，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每培养 3d 吸取细胞培养瓶中上清液，补充新鲜培养液。培养第 4d 后每天在倒置显微镜观察培养细胞病变。培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV-I 感染致死的活细胞计数。

5.1.3. 用含有 10%正常人 AB 血清、10%含抗 gp120 抗体的人血清的 RPMI1640 培养液，调整 MT4 细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml 培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养 MT4 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种浓度为 1000TCID<sub>50</sub> 的实验室 HIV-I 毒株，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养；用含有 20%正常人 AB 血清的 RPMI1640 培养液，调整 MT4 细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml 培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养 MT4 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种浓度为 1000TCID<sub>50</sub> 的实验室 HIV-I 毒株，将细胞培养瓶放置 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每培养 3d 吸取细胞培养瓶中上清液，补充新鲜培养液。培养第 4d 后每天在倒置显微镜观察培养细胞病变。培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV-I 感染致死的活细胞计数。

5.1.4. 用含有 10%正常人 AB 血清、10%含抗 gp120 抗体的人血清的 RPMI1640 培养液，调整正常人 PBMC 细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml 培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养正常人 PBMC 细胞浓度悬

液，在细胞培养瓶中接种  $2.5 \times 10^6$ 、取自 HIV- I 感染者最初急性期液氮低温保存备用复苏的人 PBMC 细胞，将细胞培养瓶放置  $37^\circ\text{C}$ ，5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养；用含有 20% 正常人 AB 血清的 RPMI1640 培养液，调整正常人 PBMC 细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{ml}$  培养细胞悬液，每个 50ml 细胞培养瓶中加入 10ml 该培养正常人 PBMC 细胞浓度悬液，在细胞培养瓶中接种  $2.5 \times 10^6$ 、取自 HIV- I 感染者最初急性期液氮低温保存备用复苏的人 PBMC 细胞，将细胞培养瓶放置  $37^\circ\text{C}$ ，5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。每培养 3d 吸取细胞培养瓶中上清液，补充新鲜培养液。培养第 4d 后每天在倒置显微镜观察培养细胞病变。培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV- I 感染致死的活细胞计数。

## 6. 实验方法、检测、结果评定

6.1. 模拟 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫 CBA/Ca 小鼠抗 HIV 动物模型，实验方法、检测、结果评定：

6.1.1. 用大鼠抗小鼠 CD4 受体的单克隆抗体 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原，模拟 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原。模拟 HIV 感染人体，人体针对 HIV 复制表达包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原的免疫应答机制，肌肉注射免疫 1 组 10 只 4~6 周龄 CBA/Ca 小鼠：3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2ml/只，0d、3d、6d、9d 各一次；6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2ml/只，12d、15d 各一次；10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2ml/只，18d 各一次；6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2ml/只，21d、44d 各一次；3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2ml/只，27d、30d、33d 各一次。

6.1.2. 用大鼠抗人或抗兔的单克隆抗体 IgG2a/b——不能与小鼠 CD4 受体结合的异种抗原，模拟 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、不能与人 CD4

受体结合的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 异种抗原，肌肉注射免疫 2 组 10 只 4~6 周龄 CBA/Ca 小鼠：3 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，0d、3d、6d、9d 各一次；6 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，12d、15d 各一次；10 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，18d 各一次；6 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，21d、44d 各一次；3 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，27d、30d、33d 各一次。

6.1.3. 在免疫接种第 14d、21d、28d、35d、42d，分别对 1 组、2 组各自 10 只小鼠，尾部微量采血，检测每只小鼠针对大鼠 IgG2a/b——异种抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。实验 1 组免疫小鼠针对大鼠 IgG2a/b——小鼠 CD4 受体的异种特异配体抗原的体液免疫应答延迟、血清抗大鼠 IgG2a/b 异种抗原的抗体滴度，明显低于实验 2 组免疫小鼠针对大鼠 IgG2a/b——异种抗原的体液免疫应答、血清抗大鼠 IgG2a/b 异种抗原的抗体滴度。**动物实验结论：**1. 注射动物 CD4 受体的异种特异配体抗原，异种特异配体抗原与动物 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发动物机体针对 CD4 异种特异配体抗原的免疫耐受机制；表现出针对 CD4 异种特异配体抗原的体液免疫应答延迟、弱免疫原体液免疫应答反应。与 HIV 疫苗科学研究实施过的，各种不同的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原-疫苗临床人体实验，免疫接种人体表现出针对 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原体液免疫应答延迟、弱免疫原体液免疫应答反应极为相似；与 HIV 感染人体复制最初表现体液免疫应答延迟，不能首先产生针对 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的保护性中和抗体，弱免疫原体液免疫应答反应极为相似。

2. 实验证实，改变动物 CD4 受体的异种特异配体抗原分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与动物 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表

位、不能与动物 CD4 受体结合；它将不能触发动物机体免疫耐受机制。

3. 实验证实，改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160——人 CD4 受体的异种特异配体抗原分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合；它将不能触发人体免疫耐受机制，提供直接动物模型实验科学依据。4. 设计研制 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原分子的某个或某些个氨基酸结构，使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合，不触发人体免疫耐受机制的 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原-疫苗，将有可能在研制筛选抗 HIV 治疗疫苗——抗 HIV 预防疫苗科学研究方面，取得重大科学创新突破。提供相关实验动物模型实验科学依据。

6.2. HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗免疫 C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠抗 HIV 动物模型，实验方法、检测、结果评定：

6.2.1. 对 1 组 30 只 4~6 周龄 C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠，实施断头采血，制取正常动物血清。

6.2.2. 用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗免疫 C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠，肌肉注射免疫 2 组 30 只 4~6 周龄 C57BL/6 小鼠或 BALB/c 小鼠：50 $\mu$ g/ml、0.2ml/只，0d、14d、28d、42d 各一次。在免疫接种第 14d、21d、28d、35d、42d，尾部微量采血，检测每只小鼠针对 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。49d，分别各自断头采血处死 30 只小鼠，制取含抗 gp120 抗体的动物血清。

6.2.3. 分别用1组30只小鼠的混合正常动物血清、2组30只小鼠的含抗gp120抗体混合动物血清，实施5.1.1./5.1.2. HIV-I毒株感染细胞体外培养系统实验：2种HIV-I毒株感染T4细胞体外培养、每种3个细胞培养瓶，2种HIV-I毒株感染人PBMC细胞体外培养、每种3个细胞培养瓶。各自培养12d后，对细胞培养瓶中没有被HIV-I感染致死的活细胞计数。检测用HIV-Env基因DNA变构重组包膜蛋白gp120或gp160抗原疫苗免疫C57BL/6小鼠或BALB/c小鼠抗HIV模型，体液免疫应答产生的抗gp120抗体，抑制实验室HIV-I毒株感染细胞的能力、抑制感染人体野生HIV-I毒株感染细胞的能力。

6.2. 小鼠抗HIV动物模型，应用做实验检测、筛选：研制各种不同的HIV-Env基因DNA变构重组、改变HIV包膜蛋白gp120或gp160抗原分子的某个或某些个氨基酸结构、使其失去与人CD4受体结合的特异氨基酸结构表位，能够具有最好解除HIV免疫抑制的强免疫原性、最好抑制感染人体野生HIV-I毒株感染细胞能力的，HIV-Env基因DNA变构重组包膜蛋白gp120或gp160抗原疫苗，提供初步相关动物模型实验科学依据。

6.3. HIV-Env基因DNA变构重组包膜蛋白gp120或gp160抗原疫苗免疫恒河猴抗HIV动物模型，实验方法、检测、结果评定：

6.3.1. 对12只恒河猴各自抽取静脉血30ml，制取正常动物血清。

6.3.2. 用小鼠抗HIV动物模型实验初步证实的，HIV-Env基因DNA变构重组包膜蛋白gp120或gp160抗原-疫苗，肌肉注射免疫12只恒河猴：50 $\mu$ g/ml、1ml/只，0d、21d、42d各一次。在免疫接种第14d、21d、28d、35d、42d、49d，采血检测每只恒河猴针对HIV-Env基因DNA变

构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。

60d, 分别各自抽取静脉血 30ml, 制取含抗 gp120 抗体的动物血清。分别对 12 只恒河猴实施 SHIV 毒株攻毒实验。

6.3.3. 分别用每只恒河猴的正常动物血清、含抗 gp120 抗体的动物血清, 实施 5.1.1./ 5.1.2. HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统实验: 2 种 HIV- I 毒株感染 T4 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶, 2 种 HIV- I 毒株感染人 PBMC 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶。各自培养 12d 后, 对细胞培养瓶中没有被 HIV- I 感染致死的活细胞计数。检测用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120、或 gp160 抗原免疫恒河猴抗 HIV 模型, 体液免疫应答产生的抗 gp120 抗体, 抑制实验室 HIV- I 毒株感染细胞的能力、抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞的能力。

6.3. 恒河猴抗 HIV 动物模型, 应用做实验检测、筛选: 研制各种不同的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原分子的某个或某些个氨基酸结构、使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位, 能够具有最好解除 HIV 免疫抑制的强免疫原性、最好抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞能力的, HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗, 提供进一步与人类相关的灵长类动物模型实验科学依据。

6.4. HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗免疫大猩猩抗 HIV 动物模型, 实验方法、检测、结果评定:

6.4.1. 对 4~6 只大猩猩各自抽取静脉血 30ml, 制取正常动物血清。

6.4.2. 用恒河猴抗 HIV 动物模型进一步证实的, HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗, 肌肉注射免疫 4~6 只大猩

猩：200 $\mu$ g/ml、2ml/只，0d、21d、42d 各一次。在免疫接种第 14d、21d、28d、35d、42d、49d，采血检测每只大猩猩针对 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。60d，分别各自抽取静脉血 30ml，制取含抗 gp120 抗体的动物血清。分别对 4~6 只大猩猩实施取自临床人体感染 HIV-1 毒株急性期血浆攻毒保护实验。

6.4.3. 分别用每只大猩猩的正常动物血清、含抗 gp120 抗体的动物血清，实施 5.1.1./5.1.2. HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统实验：2 种 HIV- I 毒株感染 T4 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶，2 种 HIV- I 毒株感染人 PBMC 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶。各自培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV- I 感染致死的活细胞计数。检测用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原免疫大猩猩抗 HIV 模型，体液免疫应答产生的抗 gp120 抗体，抑制实验室 HIV- I 毒株感染细胞的能力、抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞的能力。

6.4. 大猩猩抗 HIV 动物模型，应用做实验检测、筛选：研制各种不同的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原分子的某个或某些个氨基酸结构、使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位，能够具有最好解除 HIV 免疫抑制的强免疫原性、最好抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞能力的，HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，提供更进一步与人类最接近的灵长类动物模型实验科学依据。

6.5. HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原，作为抗 HIV 治疗疫苗，与抗 HIV 药联合治疗 HIV 急性期感染患者，I 临床

人体抗 HIV 治疗实验方法、检测、结果评定：

6.5.1. 在实施治疗前抽血制取 HIV- I 感染急性期患者的人 PBMC 细胞，液氮低温冷冻保存备用。

6.5.2. 选择经非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗，可在 14d 内病毒载量下降为不可检测、28d 内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞检测计数可恢复 $\geq 800/\mu\text{l}$  的，40~60 位患者。分 2 组，用猩猩抗 HIV 动物模型更进一步证实的，HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，与抗 HIV 药联合治疗 HIV 急性期感染患者：1 组 100 $\mu\text{g}$  /人、2 组 200 $\mu\text{g}$ /人，0d、7d、14d、21d、42d 各一次。在免疫接种第 14d、21d、28d、35d、49d，采血检测每位患者针对 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原的体液免疫应答、抗体的滴度。60d，分别各自抽取静脉血 30ml，制取淋巴细胞。

6.5.3. 用每位经非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗，与 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原——抗 HIV 治疗疫苗治疗患者的淋巴细胞，各自分别实施 3~5 只 SCID 鼠的，人淋巴细胞免疫缺陷鼠 Hu-PBL-SCID 的再构建。21d，分别抽血处死 Hu-PBL-SCID 鼠，分别做 HIV 前病毒检测、HIV 病毒载量检测。

6.5.4. 患者淋巴细胞重建 Hu-PBL-SCID 鼠的 HIV 前病毒、HIV 病毒载量为不可检测者，停止非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗 7d 后，抽取静脉血 30ml，制取血清。实施 5.1.3. / 5.1.4. HIV- I 毒株感染细胞体外培养系统实验：2 种 HIV- I 毒株感染 T4 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶；1 种患者本人实施治疗前预留、液氮保存的 PBMC 细胞 HIV- I 毒株感染人 PBMC 细胞体外培养、每种 3 个细胞培

养瓶，1种他人 PBMC 细胞 HIV- I 毒株感染人 PBMC 细胞体外培养、每种 3 个细胞培养瓶。各自培养 12d 后，对细胞培养瓶中没有被 HIV- I 感染致死的活细胞计数。检测用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原——抗 HIV 治疗疫苗，治疗 HIV 感染者，体液免疫应答产生的抗 gp120 抗体，抑制实验室 HIV- I 毒株感染细胞的能力、抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞的能力。

6.5.5. 患者的血清抗 gp120 抗体，具有抑制患者本人实施治疗前预留、液氮保存的 PBMC 细胞 HIV- I 毒株感染细胞的能力，征求患者同意停止非逆转录酶抑制剂 NRTIs/ NNRTIs 抗 HIV- I 药联合治疗。对患者实施定期抽血检测 HIV 前病毒、HIV 病毒载量 1 年，观察是否会发生 HIV 前病毒、HIV 病毒载量反跳恢复？如果患者的 HIV 前病毒、HIV 病毒载量仍为不可检测，可被认为是：应用 HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原——抗 HIV 治疗疫苗，临床治愈的首例或几例 HIV- I 感染者。

6.5. 抗 HIV 治疗疫苗 I 临床人体实验，应用做实验检测、筛选：研制各种不同的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原分子的某个或某些个氨基酸结构、使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位，能够具有最好解除 HIV 免疫抑制的强免疫原性、最好抑制感染人体野生 HIV- I 毒株感染细胞能力的，HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原疫苗，提供直接临床人体实验科学依据。

6.6. HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原，作为可以预防 HIV 感染人类的 HIV 疫苗，临床人体实验方法、检测、结果

评定:

**6.6.1.** 用被临床抗 HIV 治疗疫苗治疗 HIV 感染者人体实验证实的, HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原, 作为可以预防 HIV 感染人类的 HIV 疫苗, 实施 I、II、III 期临床人体试验。实施上述相关 HIV 疫苗实验科学研究、生物检测。

6.6. I、II、III 期临床人体试验应用做检验、筛选: 设计、研制的, 各种不同的 HIV-Env 基因 DNA 变构重组、改变 HIV 包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原分子的某个或某些个氨基酸结构, 使其失去与人 CD4 受体结合的特异氨基酸结构表位、不能与人 CD4 受体结合, 能够具有最好解除 HIV 免疫抑制的强免疫原性、最佳抑制感染人体野生 HIV-I 毒株感染细胞能力的, HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白 gp120 或 gp160 抗原, 将能够作为抗 HIV 治疗疫苗——抗 HIV 预防疫苗, 提供足够充分的直接临床人体实验科学依据。

### 发明创新讨论

自上个世纪 70 年代, Gershon 提出“感染性免疫耐受 (infection tolerance)”及“抑制性 T 细胞 (suppressor T cells)”, 免疫耐受新概念; Hall 等 1985 年最先描述介导移植免疫耐受中抑制性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的存在; Qin 等 1993 年实验证实, CD4<sup>+</sup>T 细胞的存在能够明显抑制小鼠移植免疫排斥反应, 用非剔除的抗 CD4 和抗 CD8 抗体处理受者可以诱导免疫耐受……。迄今世界各国从事器官移植免疫耐受研究的学者们, 针对 CD4<sup>+</sup>细胞及 CD4 特异受体同特异配体抗 CD4 的 mAb 结合与器官移植免疫耐受的关系, 在分子生物学科学研究层面, 在细胞模型的细胞生物学、分子生物学科学研究层面, 在动物模型及临床人体的组织学、

细胞生物学、分子生物学科学研究层面，已经研究分析揭示的比较全面。大量动物模型实验、及临床人体实验表明：非剔除性抗 T 细胞辅助分子的 mAb，如抗 CD4 的 mAb 同 CD4 特异受体结合，使 T 细胞产生不应答性，或诱导抑制性 T 细胞，建立 T 细胞免疫耐受、B 细胞免疫耐受，可以避免同种异体移植物的排斥反应，其免疫抑制功能失去抗原特异性，即可以抑制对第三者抗原特异的 T 细胞免疫应答……等；诱导“感染性免疫耐受”，诱导 CD4<sup>+</sup>T 前细胞 Th1/Th2 极性分化偏离，抗 CD4 单克隆抗体可以阻止 T 细胞在胸腺的分化成熟，……等。有众多不可被一一综述的，CD4<sup>+</sup>细胞及 CD4 特异受体同抗 CD4 的 mAb——特异配体抗原结合，促发免疫耐受关系的科学研究文献、科学研究报告，可以供 HIV 科学研究者学习借鉴，开拓 HIV 科学研究者创新综合科学研究思维，全面揭示：HIV 感染人体复制，通过表达包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，导致感染机体免疫系统针对 HIV 感染体液免疫应答反应延迟，不能首先产生针对 gp120 的保护性中和抗体、抑制 gp120 与 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合触发的免疫耐受机制；使 HIV 可以在免疫应答产生针对 gp120 的保护性中和抗体之前，还没有被 CTL 细胞免疫有效抑制时、过度复制达到病毒血症峰值，进一步触发细胞免疫耐受机制-细胞免疫损伤机制，不能激发有效根除 HIV 的体液免疫应答机制、细胞免疫应答机制；能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制，更为有效对抗机体免疫抑制压力的，现代细胞免疫学、分子免疫学生物机制。

可以借鉴器官移植免疫学的实验科学方法，利用现有的 SIV、HIV-

II 恒河猴动物模型, SIV-mac239 $\Delta$ nef 减毒株疫苗、SIV 包膜蛋白抗原疫苗、HIV-II 包膜蛋白抗原疫苗, 实施揭示 SIV 包膜蛋白、HIV-II 包膜蛋白——猴 CD4 受体的异种特异配体抗原, 与猴 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合, 触发猴机体免疫耐受机制相关的器官移植实验, 为模拟证实 HIV 感染人体, 通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原, 与人 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞受体特异结合, 触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制, 能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制, 更为有效应对机体免疫抑制压力, 提供可令人信服的, 足够充分的相关动物模型实验科学依据。通过“HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验”, 证实: HIV 感染人体, 通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原, 与人 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞受体特异结合, 触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制, 能够比 HIV 具有高度变异性免疫逃逸机制, 更为有效应对机体免疫抑制压力, 提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。但是它将会不幸的证实, HIV 疫苗科学研究设计、研制的, 所有各种不同 HIV 包膜蛋白 gp120、gp160 抗原疫苗临床人体试验不能预防 HIV 感染人类, 最重要的因素是: gp120、gp160 是人 CD4 受体的异种特异配体抗原, 与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合, 触发 HIV 人体免疫耐受机制, 不能激发有效根除 HIV 的免疫应答机制。世界 HIV 疫苗科学研究在过去 20 多年里, 关于是先加强基础研究, 搞清 HIV 致病机制和免疫机制, 还是尽快开始人体试验, 在试验中积累知识, 以便改进疫苗设计和工艺技术, 各国专家的意见趋于一致, 错误的主张采取后者; 在没有寻找到能够解决 HIV 包膜蛋白 gp120 触发人体免疫耐受机制问题的方法前, 现有的疫苗科学

研究思维、科学研究方法，不能研制出可能会有效预防 HIV 感染人类的 HIV 疫苗，是客观存在的必然科学现实。是被 HIV 科学界疏漏的，极重要的科学研究“盲区”。因此，在没有揭示 HIV 感染通过 gp120 与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发人体免疫耐受机制，寻找到能够解决它触发免疫耐受机制问题的方法前，没有科学研究迹象表明：HIV 疫苗可能会有效预防 HIV 感染人类。

发明者认为：HIV 感染人体，通过包膜蛋白 gp120——人 CD4 受体的异种特异配体抗原，与人 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合，触发 HIV 感染者人体免疫耐受机制，导致感染机体免疫系统针对 HIV 感染体液免疫应答反应延迟，不能首先产生针对 gp120 的保护性中和抗体、抑制 gp120 与 CD4<sup>+</sup>细胞特异受体特异结合触发的免疫耐受机制；使 HIV 可以在人体免疫应答产生针对 gp120 的保护性中和抗体之前，还没有被细胞免疫 CTL 有效抑制时、过度复制达到病毒血症峰值，进一步触发细胞免疫耐受机制-细胞免疫损伤机制；诱导抑制性 T 淋巴细胞，诱导“感染性免疫耐受”，由 HIV 过度复制表达所编码的超抗原，能够与某些特定的 T 淋巴细胞受体 V<sub>β</sub> 克隆反应，导致某些特定的 T 淋巴细胞受体 V<sub>β</sub> 克隆损伤、渐至枯竭，从而使 T 细胞 V<sub>β</sub> 库不可被再生恢复；因而确实存在 HIV 感染者免疫系统损伤的阈值，若超过该阈值，HIV 感染者的免疫功能便不可被恢复重建。因而发明者认为：HIV 感染者急性期达到病毒血症峰值期，可能是使 T 淋巴细胞受体 V<sub>β</sub> 克隆损伤、转向渐至枯竭不可被重建损伤，至无症状期达到免疫系统损伤不可被重建的阈值。因而发明者认为：在 HIV 感染者急性期、至达到免疫系统损伤不可被重建的阈值之前，可能会存在一个可以被抗 HIV 药有效根治、能够重

建 HIV 感染者受损免疫系统的，很短暂的抗 HIV 药有效根治早期 HIV 感染者的“窗口期”。是被 HIV 科学研究疏漏的，极重要的科学研究“盲区”。

“HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗 HIV 实验”方法，能够揭示上述被 HIV 科学研究疏漏的，极重要的科学研究“盲区”；寻找到能够解决 HIV 包膜蛋白 gp120 触发人体免疫耐受机制的方法，研制不触发人体免疫耐受机制的，HIV-Env 基因 DNA 变构重组包膜蛋白抗原——抗 HIV 治疗疫苗——抗 HIV 预防疫苗，提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。可行性科学分析理论、方法依据：是 HIV 相关生物学科不需要科学论证的基本科学常识，与相关实用科学技术；不存在不可实施的现代生物科学的，应用科学理论疑点、应用科学技术难点。

将可以在 HIV 科学研究理论、科学认识思维、方法论、方法方面取得科学突破。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | HIV - Env基因DNA变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗HIV实验与方法          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101210919A</a>                   | 公开(公告)日 | 2008-07-02 |
| 申请号            | CN200610170474.6                               | 申请日     | 2006-12-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 叶欣欣  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 叶新新  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 叶新新  |         |            |
| [标]发明人         | 叶新新  |         |            |
| 发明人            | 叶新新  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/577 C07K16/18 C07K14/16       |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明为：HIV - Env基因DNA变构重组包膜蛋白抗原免疫应答抗HIV实验与方法。它涉及生命科学领域、及医药领域。证实：HIV包膜蛋白gp120、gp160抗原疫苗临床人体试验，不能证实可以预防HIV感染人类，最重要的因素是：HIV包膜蛋白gp120、gp160是人CD4受体的异种特异配体，与人CD4+细胞特异受体特异结合，触发人体免疫耐受机制，不能激发有效根除HIV的免疫应答机制。寻找解决触发人体免疫耐受机制的方法，研制不触发人体免疫耐受机制的，HIV - Env基因DNA变构重组包膜蛋白抗原抗HIV治疗疫苗、抗HIV预防疫苗，提供足够充分的直接动物模型实验科学依据、直接临床人体实验科学依据。