

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/00

A61K 38/04 A61K 39/00

A61K 39/12 A61K 39/21

C07K 16/00 C07K 17/00

C07K 5/00 C07K 7/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808761.2

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426306A

[22] 申请日 2001.4.20 [21] 申请号 01808761.2

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 28 [33] US [31] 09/561,366

[86] 国际申请 PCT/US01/13031 2001. 4. 20

[87] 国际公布 WO01/82944 英 2001. 11. 8

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 28

[71] 申请人 西蒙有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 G·戈尔茨坦

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 7 页 说明书 34 页 序列表 13 页

附图 3 页

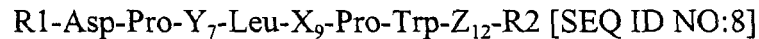
[54] 发明名称 削弱 HIV-1 增殖的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供一种组合物，该组合物引起针对 B 进化枝和非 B 进化枝的 HIV-1 Tat 蛋白的大多数 (如 95% 以上) 已知变体的抗体，它含有式 R1 - Asp - Pro - Y₇ - Leu - X₉ - Pro - Trp - Z₁₂ - R2 [SEQ ID NO: 8] 的表位 I 的肽或多肽的至少两种变体。根据此式子，Y₇ 是 Arg、Lys、Ser 或 Asn；X₉ 是 Glu 或 Asp；Z₁₂ 是 Lys 或 Asn；R1 是氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R2 是游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的 1 个或约 5 个以内的额外的氨基酸的序列。在此组合物中，两种变体中至少有一种其 Y₇ 是 Arg、Z₁₂ 是 Lys，另一种的 Y₇ 是 Asn、Z₁₂ 是 Asn。疫苗组合物和药物组合物可含有一种或多种与载体蛋白结合、结合于多抗原肽中或者作为重组蛋白质的一部分的这种肽。除了这种组合外的其它任选免疫原可提供用于引起灵长类动物

抗-Tat 抗体的其它组合物，所述抗体与多种菌株和 HIV-1 Tat 蛋白的变体发生交叉反应。疫苗组合物和药物组合物可含有被动治疗中使用的肽组合物诱导产生的灵长类动物抗体。描述了诊断组合物及其在评估接种患者的免疫状态中的用途。

1. 一种组合物，它含有式



5 的肽或多肽的至少两种变体，其中

Y₇选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn;

X₉选自 Glu 和 Asp;

Z₁₂选自 Lys 和 Asn;

10 R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和长 1 到约 5 个氨基酸、任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的序列;

R2 选自游离的羟基、酰胺，和长 1 到约 5 个额外的氨基酸、任选地被酰胺取代的序列;

其中，在所述两种变体的至少一种中，Y₇是 Arg 和 Z₁₂是 Lys，且在所述两种变体至少另一种变体中，Y₇是 Asn，Z₁₂是 Asn。

15 2. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述 R1 是 Val，从而得到 Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:37]的序列。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述 R1 是 X₂-Pro-Val，其中，X₂是 Glu 或 Asp，从而得到 X₂-Pro-Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:38]的序列，R1 可任选地被低级烷基或低级烷酰基取代。

20 4. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，R2 是-His-Pro-Gly-Ser-[SEQ ID NO:16]，它可任选地被酰胺取代。

5. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包含至少 3 条或 3 条以上的下述氨基酸序列:

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:17]; 和

25 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:18];

以及 1 种或 1 种以上的下述序列:

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:19]

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:22]

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:20]

R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:24]

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:21]和

R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:23]。

6. 如权利要求 5 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物还含有至少 7 种
5 所述氨基酸序列。

7. 如权利要求 5 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物含有所有 8 种所
述序列。

8. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, 所述肽或多肽是合成产生的。

9. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, 所述肽或多肽是重组产生的。

10. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种所述肽表达为偶
10 联于载体蛋白的合成肽。

11. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种所述肽表达为任
选地偶联于载体蛋白的多抗原肽。

12. 如权利要求 1 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种选择的肽在重组
15 产生的蛋白中表达, 并可任选地按读框与载体蛋白融合。

13. 如权利要求 10-12 中任一项所述的组合物, 其特征在于, 所述载体蛋白
选自大肠杆菌 DnaK 蛋白、GST 蛋白、分枝杆菌热激蛋白 70、白喉类毒素、破伤
风类毒素、半乳糖激酶、遍在蛋白、 α -交配因子、 β -半乳糖苷酶和流感 NS-1 蛋白。

14. 一种组合物, 它含有:

20 (a) 式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]的肽或多肽的至少
两种变体, 其中 Y₇选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn; X₉选自 Glu 和 Asp; Z₁₂选自 Lys
和 Asn; R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基, 和任选地被低级烷基或低级烷酰基
取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列; 其中, R2 选自游离羟基、酰胺, 和任选地
被酰胺取代的长 1 个到约 5 个额外的氨基酸序列; 其中, 所述两种变体中至少有一
25 种的 Y₇是 Arg、Z₁₂是 Lys, 至少有另一种的 Y₇是 Asn、Z₁₂是 Asn;

(b) 式 R3-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4[SEQ ID NO:5]的至少
一种肽或多肽, 其中 X₄₂选自 Gly 或 Ala; R3 选自氢、低级烷基、低级烷酰基,
和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列; R4 选自
游离羟基、酰胺, 和任选地被酰胺取代的长 1 个到约 5 个额外的氨基酸序列, 并
30 排除碱性氨基酸 Lys-Arg-Arg-。

15. 如权利要求 14 所述的组合物, 其特征在于, 所述肽或多肽是合成产生的。

16. 如权利要求 14 所述的组合物, 其特征在于, 所述肽或多肽是重组产生的。

5 17. 如权利要求 14 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种所述肽表达为偶联于载体蛋白的合成肽。

18. 如权利要求 14 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种所述肽表达为任选地偶联于载体蛋白的多抗原肽。

10 19. 如权利要求 14 所述的组合物, 其特征在于, 一种或多种选择的肽在重组产生的蛋白中表达, 任选地按读框与载体蛋白融合。

20. 如权利要求 17、18 或 19 所述的组合物, 其特征在于, 所述载体蛋白选自大肠杆菌 DnaK 蛋白、GST 蛋白、分枝杆菌热激蛋白 70、白喉类毒素、破伤风类毒素、半乳糖激酶、遍在蛋白、 α -交配因子、 β -半乳糖苷酶和流感 NS-1 蛋白。

15 21. 一种药物组合物, 它含有权利要求 1 所述的组合物、药学上可接受的载体和任选的佐剂。

22. 一种诱导抗-HIV-1 Tat 抗体的方法, 该方法包括:

使受试者暴露于权利要求 1 的有效量的组合物, 该组合物有效地诱导与 HIV-1 的不同株或亚型的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体。

20 23. 一种方法, 该方法用于产生削弱免疫无能的人中 HIV-1 增殖的组合物, 它包括:

(a) 用权利要求 1 的组合物免疫灵长类动物;

(b) 从所述经免疫的哺乳动物中分离和纯化出无菌形式的抗体, 其中, 所述抗体是所述组合物的成分。

25 24. 如权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 所述分离的抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体以及抗体片段。

25 25. 一种方法, 该方法测定由免疫 Tat 免疫原而诱导的抗体的存在与否和/或效价, 它包括:

30 (A) 使从经免疫的受试者获得的生物样品与结合于固相载体上的权利要求 1 的肽或多肽组合物接触;

(B) 洗涤所述支持物，以从所述生物样品中除去任何没有结合于所述序列的物质；

(C) 使所述支持物与结合有可检测的标记物的试剂接触，其中，所述试剂检测所述固相载体上的序列与所述生物样品中抗体之间的结合，所述标记物产生可检测的信号。

26. 一种抗体，它特异性地与式-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:9]的表位结合，其中 Y₇选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn，X₉选自 Glu 和 Asp，Z₁₂选自 Lys 和 Asn。

27. 如权利要求 26 所述的抗体，其特征在于，所述抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体以及抗体片段。

28. 一种抗体组合物，它含有权利要求 26 所述的至少一种抗体。

29. 一种抗体组合物，它含有特异性地与式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]的肽或多肽的至少两种变体结合的至少两种不同的抗体，

其中 Y₇选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn；X₉选自 Glu 和 Asp；Z₁₂选自 Lys 和 Asn；R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R2 选自游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的长 1 个到约 5 个额外的氨基酸序列；其中，所述两种变体中至少有一种的 Y₇是 Arg、Z₁₂是 Lys，至少有另一种的 Y₇是 Asn、Z₁₂是 Asn。

30. 如权利要求 29 所述的组合物，其特征在于，所述组合物含有两种以上不同的所述抗体的混合物，所述抗体结合多个 HIV-1 的病毒株的 HIV-1 Tat 蛋白表位序列。

31. 如权利要求 29 所述的组合物，其特征在于，所述抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体和抗体片段以及它们的混合物。

32. 一种抗体，它特异性地与具有 Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:10]氨基酸序列的表位结合，其中 X₄₂选自 Gly 和 Ala，所述抗体与识别具有-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:11]氨基酸序列的表位的抗体不同。

33. 如权利要求 32 所述的抗体，其特征在于，所述抗体选自分离的多克隆

抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体和抗体片段。

34. 一种抗体组合物，它含有权利要求 32 所述的至少一种抗体。

35. 一种药物组合物，它含有权利要求 26-34 中任一项所述的抗体或抗体组合物，以及药学上可接受的载体和任选的佐剂。

36. 一种减少 HIV-1 病毒水平的方法，它包括对人给予权利要求 26-34 中任一项所述的抗体或抗体组合物。

37. 一种合成基因，它含有顺序编码式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]的肽或多肽的至少两种变体的核酸序列，其中 Y₇选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn；X₉选自 Glu 和 Asp；Z₁₂选自 Lys 和 Asn；R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R2 选自游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的长 1 个到约 5 个额外的氨基酸序列；其中，所述两种变体中至少有一种的 Y₇是 Arg、Z₁₂是 Lys，至少有另一种的 Y₇是 Asn、Z₁₂是 Asn。

38. 如权利要求 37 所述的合成基因，其特征在于，所述肽或多肽与载体蛋白融合。

39. 如权利要求 37 所述的合成基因，其特征在于，所述编码氨基酸系列的各核酸序列被间隔区序列分开。

40. 一种药物组合物，它含有权利要求 37 所述的合成基因、药学上可接受的载体和任选的佐剂。

41. 一种诱导抗-HIV-1 Tat 抗体的方法，所述方法包括：

使受试者暴露于有效量的权利要求 37 所述的合成基因，该基因有效地诱导与 HIV-1 的不同株或亚型的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体。

42. 一种方法，该方法产生用于削弱免疫无能的人中 HIV-1 增殖的组合物，它包括：

(a) 用权利要求 37 的合成基因免疫灵长类动物；

(b) 从所述经免疫的哺乳动物中分离和纯化出无菌形式的抗体，其中，所述抗体是所述组合物的成分。

43. 如权利要求 42 所述的方法，其特征在于，所述分离的抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产

生的抗体和抗体片段。

44. 一种合成分子，它含有权利要求 37 所述的合成基因，该合成基因可操作性地连接调控核酸序列，该调控核酸序列指导和控制所述合成基因的产物在宿主细胞中的表达。

5 45. 如权利要求 44 所述的分子，其特征在于，所述分子是质粒。

46. 一种药物组合物，它含有权利要求 44 所述的合成分子、药学上可接受的载体和任选的佐剂。

47. 一种诱导抗-HIV-1 Tat 抗体的方法，该方法包括：

10 使受试者暴露于权利要求 44 所述的有效量的合成分子，该分子有效地诱导与 HIV-1 的不同株或亚型的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体。

48. 一种方法，该方法产生用于削弱免疫无能的人中 HIV-1 增殖的组合物，它包括：

(a) 用权利要求 44 的合成分子免疫灵长类动物；

15 (b) 从所述经免疫的哺乳动物中分离和纯化出无菌形式的抗体，其中，所述抗体是所述组合物的成分。

49. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述分离的抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体和抗体片段。

50. 一种微生物，它包括：

20 (a) 第一合成基因，它包含编码权利要求 1 所述的至少两种肽或多肽的核酸序列，所述基因任选地与载体蛋白融合；或

(b) 合成分子，它包含(a)中的合成基因，该基因可操作性地与调控核酸序列连接，该调控核酸序列指导和控制所述合成基因的产物在宿主细胞中的表达。

25 51. 如权利要求 50 所述的微生物，其特征在于，所述微生物选自能在宿主细胞中表达所述基因的多拷贝产物的重组病毒，和能在宿主中表达所述基因的多拷贝产物的共生菌，其中所述病毒对人是非致病性的。

52. 一种药物组合物，它含有权利要求 51 所述的微生物、药学上可接受的载体和任选的佐剂。

53. 一种诱导抗-HIV-1 Tat 抗体的方法，该方法包括：

30 使受试者暴露于有效量的权利要求 50 所述的微生物，该微生物有效地诱导

与 HIV-1 的不同株或亚型的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体。

54. 一种方法，该方法产生用于削弱免疫无能的人中 HIV-1 增殖的组合物，它包括：

(a) 用权利要求 50 的微生物免疫灵长类动物；

5 (b) 从所述经免疫的哺乳动物中分离和纯化出无菌形式的抗体，其中，所述抗体是所述组合物的成分。

55. 如权利要求 54 所述的方法，其特征在于，所述分离的抗体选自分离的多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、筛选噬菌体展示产生的抗体和抗体片段。

10 56. 一种哺乳动物宿主细胞，它含有编码式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]的肽或多肽的至少两种变体的核酸序列，其中 Y₇ 选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn；X₉ 选自 Glu 和 Asp；Z₁₂ 选自 Lys 和 Asn；R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R2 选自游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的长 1 个到约 5 个额外
15 的氨基酸序列；其中，所述两种变体中至少有一种的 Y₇ 是 Arg、Z₁₂ 是 Lys，至少有另一种的 Y₇ 是 Asn、Z₁₂ 是 Asn。

削弱 HIV-1 增殖的方法和组合物

5 技术领域

本发明总的涉及用于抑制有症状或无症状的感染患者中的人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)增殖的组合物和方法，以及削弱之前未被感染的受试者中初次感染后 HIV-1 的增殖，从而尽可能减少发展成 AIDS 的组合物和方法。

10 发明背景

治疗人免疫缺陷 1 型病毒(HIV-1)的各种方法集中于 HIV-1 的转活基因(*tat*)，该基因产生病毒转录必需的蛋白质(Tat)。已测定了 *tat* 基因及其蛋白质的序列，并检测了它们在 HIV 的建议治疗中的作用(例如可参见美国专利第 5,158,877 号、第 5,238,882 号和第 5,110,802 号；分别在 1992 年 5 月 14 日、1991 年 7 月 25 日、15 1991 年 7 月 11 日和 1987 年 5 月 21 日出版的国际专利申请 WO92/07871、WO91/10453、WO91/09958 和 WO97/02989)。Tat 蛋白在细胞外释放，使它可被其它感染细胞摄取，以增强这些细胞中 HIV-1 的转录，它也可被未感染的细胞摄取，从而改变宿主细胞的基因激活作用。Tat 使细胞易于受到病毒的感染。细胞对 Tat 的摄取非常强烈，已报道这种摄取由该蛋白质的一条短的碱性序列介导 (S. 20 Fawell 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 664-668(1994))。

正在积极地研究用 HIV-1 Tat 蛋白作为潜在的 AIDS 疫苗用于免疫接种。在已报道的研究中，已使用 HXB/LAV HIV-1 Tat 序列作为免疫原，该序列要么以重组蛋白质 (A. Cadaro 等人，Nat. Med., 5: 643-650(1999))、要么以 DNA 疫苗 (S. Calarota 等，Lancet, 351: 1320-5(1998))、要么以未激活的蛋白质(Tat 类毒素) (S. S. Cohen 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(19): 10842-10847(1999)； 25 A. Gringeri 等人，J. Hum. Virol., 1: 293-8(1998))，要么以 DNA 疫苗表达灭活 Tat (E. Caselli 等人，J. Immunol., 162: 5631-5638(1999)) 用作免疫原。用完整的 Tat 序列进行免疫诱导细胞免疫和体液免疫。也可参见 M. C. Rhe 等人，J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Virol., 10: 408-416(1995)；C. J. Li 等人，Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 94: 8116-8120(1997); 以及其它文献。

1992年9月3日出版的国际专利申请 WO92/14755 涉及 Tat 蛋白, 以及能结合该 Tat 蛋白的整联蛋白细胞表面受体。与整联蛋白结合的两条 Tat 序列为-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-[SEQ ID NO:1] 和 -GLY-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-
5 [SEQ ID NO:2]。这些序列是碱性区域或结构域, 是整联蛋白的优先结合位点。本说明书证明, 许多对应于这些 Tat 序列的肽和相应的整联蛋白在体外阻断了细胞与 Tat 包被的平板的结合, 抗体对适当的整联蛋白也一样。但是, 本说明书还显示, 这些试剂并没有阻断细胞对功能性 Tat 的摄取(参见 WO92/14755 中的实施例
10 9), 从而使所提出的有利于 HIV 感染治疗的作用机制无效。在此国际申请中描述的 Tat 序列与本发明的肽免疫原不同。

已容易地在动物中产生 Tat 蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体, 这些抗体显示能阻断 Tat 蛋白质的体外摄取(如参见 D. Brake 等人, J. Virol., 64: 962(1990); D. Mann 等人, EMBO J., 10: 1733(1991); J. Abraham 等人, 同上; P. Auron 等人, 同上; M. Haye 等人, 同上; G. Zauli 等人, 同上)。最近的报道表明, 加到
15 组织培养基中的 Tat 蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体削弱了 HIV-1 的体外感染(L. Steinaa 等人, Arch. Virol., 139: 263(1994); M. Re 等人, 同上; G. Zauli 等人, J. Acq. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol., 10: 306(1995))。

本发明者自己的出版物(G. Goldstein, Nature Med., 2: 960(1996); 和 1995年 11 月 30 日出版的国际专利申请 WO95/31999) 综述了表明 HIV-1 Tat 蛋白从感
20 染细胞中分泌以及被感染细胞和未感染细胞摄取对于 HIV-1 的感染性具有重要性的证据。先前的研究还表明, Tat 蛋白的抗体在体外阻断了 Tat 的摄取, 并抑制了体外感染性。哺乳动物的主动免疫被认为诱导了针对 HIV01 Tat 蛋白的抗体, 此抗体可作为潜在的 AIDS 疫苗。还可参见 Goldstein 等人, 《免疫了合成的 HIV-1 Tat 肽并感染了嵌合的猿/人免疫缺陷病毒(SHIV₃₃)的猕猴中慢性血浆病毒血的最小
25 化》(Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus(SHIV₃₃)), Vaccine, 18: 2789(2000)。

发明者的其它出版物, 1999年1月21日出版的国际专利申请 WO99/02185 和 1999年4月6日出版的美国专利第 5,891,994 号(本文将这两篇文献纳入作为参
30 考), 揭示了用被兔免疫系统识别为表位的 Tat 序列治疗和预防 HIV-1 感染的新概

念。与上述在先公开内容不同，这些出版物涉及治疗性的和免疫原性的组合，需要至少两条包含“表位 I”序列的 Tat 肽或多肽，较佳是所有 4 条，该“表位 I”序列跨越第 4(或 5)到第 10 位 Tat 氨基酸残基，其序列如下：-Asp-Pro-X₇-Leu-Glu-Pro-[SEQ ID NO:3]或 R¹-Val-Asp Pro-X₇-Leu-Glu-Pro-R²[SEQ ID NO:4]，其中 X₇ 是 Arg、Lys、Ser 或 Asn。这些组合物诱导与大多数 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体，并削弱 HIV-1 的增殖。根据此出版物，可将其它某些包含“表位 II”肽或多肽的 Tat 序列加到此组合物中，该“表位 II”肽或多肽跨越 Tat 的第 41-50 位氨基酸残基，为 R₃-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R₄[SEQ ID NO:5]，其中，X₄₂ 选自 Gly 或 Ala。或者，也可将跨越 Tat 第 56-62 位氨基酸残基的“表位 III”肽或多肽加到此组合物中，该肽或多肽为 R₅-Arg-Arg-X₅₈-Z₅₉-A₆₀-Y₆₁-Ser-R₆[SEQ ID NO:6]，其中 X₅₈ 选自 Ala、Pro、Ser 和 Gln；Y₆₁ 选自 Asp、Gly 和 Ser；Z₅₉ 选自 Pro 和 His；A₆₀ 选自 Gln 和 Pro。或者，还可将跨越 Tat 第 62-73 位氨基酸残基的“表位 IV”肽或多肽加到此组合物中，该肽或多肽为 R₇-Ser-Gln-X₆₄-His-Gln-Y₆₇-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R₈[SEQ ID NO:7]，其中，X₆₄ 选自 Asn 和 Thr，Y₆₇ 选自 Ala 和 Val。该组合物自身也可用于诱导针对 HIV-1 多种变体的大量 Tat 序列特征的抗体。所产生的这些组合物或抗体可用作针对这些多种变体的疫苗或预防性处理。

尽管关于 HIV-1 疾病发展的知识不断积累，但本领域仍需要在预防性和治疗性方面开发治疗 HIV-1 的组合物和方法，这些组合物和方法能用于减少 HIV-1 的病毒水平，以治疗和可能预防随后的、通常致命的 AIDS 疾病。

发明概要

一方面，本发明提供一种组合物，该组合物含有式 R₁-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R₂[SEQ ID NO:8]的表位 I 的肽或多肽的至少两种变体，其中 Y₇ 选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn；X₉ 选自 Glu 和 Asp；Z₁₂ 选自 Lys 和 Asn；R₁ 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R₂ 是游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的 1 个或长约 5 个以内的额外的氨基酸的序列。在此组合物中，两种变体中至少有一种其 Y₇ 是 Arg 和 Z₁₂ 必须是 Asn。两种变体中至少有一种其 Y₇ 和 Z₁₂ 都必须是 Asn。此组合物的各种表位被灵长类动物的免疫系统识别为 HIV-1 Tat 表位 I。这个式子允许各种肽组

合的构建和使用。

另一方面，上述组合物还含有一种或多种额外的肽或多肽，这些肽或多肽代表对应于 HIV-1 Tat 第 5 到第 12 位氨基酸残基的其它氨基酸序列。这些任选的氨基酸序列将在下文详细描述。这些序列较佳是从具有 Tat 蛋白变体的 HIV-1 株中的该位置上获得。

另一方面，本发明提供一种上述组合物，该组合物含有至少两种必需的表位 I 的肽或多肽(较佳含有额外的表位 I 肽)，被灵长类动物识别，该组合物还含有一种或多种 HIV-1 Tat 表位 II、III 和/或 IV。表位 II、III 和 IV 是国际专利出版物 WO99/02185 中描述的 HIV-1 Tat 肽的式子，本文将该出版物的内容纳入作为参考。这类组合物可与适当的 HIV-1 Tat 肽组合，以便提供一种诱导与约 95% 以上的所有已知的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体。

另一方面，本发明提供一种抗体组合物，该组合物含有至少一种抗体，该抗体较佳是产生于灵长类动物，特异性地与式 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]的肽或多肽结合，其中，Y₇ 选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn；X₉ 选自 Glu 和 Asp；Z₁₂ 选自 Lys 和 Asn；R1 选自氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长 1 个到约 5 个氨基酸的序列；R2 是游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的 1 个或长约 5 个以内的额外的氨基酸的序列。这种抗体组合物较佳含有至少两种抗体，即一种与 Y₇ 是 Arg、Z₁₂ 是 Lys 的表位 I 变体结合的抗体，和至少另一与 Y₇ 是 Asn、Z₁₂ 是 Asn 的第二种表位 I 变体结合的第二种抗体。针对除了这两种列举的变体外的其它变体的其它抗体也可包含在此组合物中。组合物中的这些抗体与灵长类动物的免疫系统识别的表位 I 序列结合，该表位出现在 HIV-1 Tat 蛋白的多种变体上。这些抗体包括各种抗体构建物，如单克隆抗体，见下文详述。

另一方面，本发明提供一种抗体，具体是单克隆抗体，该抗体特异性地与灵长类动物识别的 HIV Tat 蛋白的表位结合，该表位含有 -Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-[SEQ ID NO:9]的氨基酸序列，其中 Y₇、X₉ 和 Z₁₂ 的定义同上。

另一方面，本发明提供一种抗体组合物，该组合物含有至少一种识别表位 II 肽的抗体，该表位的序列为 -Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:10]，其中 X₄₂ 是 Gly 或 Ala，该表位与先前所述的抗体识别的 -Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:11]的表位不同。较佳的是，该组合物含有一种

都能识别 X₄₂ 是 Gly 和 X₄₂ 是 Ala 的两种肽。这些抗体较佳是在灵长类动物中产生。组合物中的这些抗体与灵长类动物免疫系统识别的表位 II 序列结合，该表位出现在 HIV-1 Tat 蛋白的多种变体上。这些抗体包括各种抗体构建物，详见下文。

5 又一方面，本发明提供一种抗体，较佳是单克隆抗体，该抗体识别表位 II 肽序列-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:10]，其中 X₄₂ 是 Gly 或 Ala，该表位与先前所述的抗体识别的-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:11]的表位不同。

10 另一方面，本发明提供一种重组的或合成的基因，该基因顺序地编码含有上述 R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]表位 I 的肽或多肽的至少两种变体的肽或多肽。在这种合成基因中，两种变体中至少一种其 Y₇ 必须为 Arg，Z₁₂ 必须为 Lys，并且这两种变体中至少有另一种其 Y₇ 和 Z₁₂ 都必须是 Asn。任选地，这种合成基因含有被灵长类动物免疫系统识别的羧基末端表位 II 肽。或者，该重组的或合成的基因含有 7 条或 8 条优选的灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列，这些序列将在下文鉴别。该合成基因可含有被间隔序列分开的各氨基酸序列，
15 或者可在开放读框中与载体蛋白质表达各条肽/多肽。如果间隔区被融合到灵长类动物识别的表位 I 序列中，那么该合成基因可被该间隔区而从载体蛋白质中分开，在重组蛋白质的羧基末端留下表位 II 序列。另外的实施例包括上述式子一起融合并与载体蛋白质融合的多种表位 I 肽。

20 又一方面，本发明提供一种合成分子，如载体，该分子含有上述合成基因，该基因可操作性地连接于调控核酸序列，此调控核酸序列指导并控制该合成基因的产物在宿主细胞中的表达。

另一方面，本发明提供一种重组微生物，如病毒或共生菌，该微生物包含上述合成基因或合成分子。这种微生物能在宿主中表达该基因或分子的产物的多份拷贝。

25 本发明的另一方面是用于诱导与大量的已知 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体的药物组合物，如大于 95%、较佳是大于 99%的已知 Tat 蛋白。诱导产生的这些抗体可削弱 HIV-1 的增殖。该药物组合物在药学上可接受的载体中含有至少一种上述重组的或合成的肽/多肽组合物；或者上述合成的基因/分子；或者上述重组的微生物。

30 本发明的另一方面是用于削弱 HIV-1 增殖的药物组合物，该组合物含有上述

抗体组合物或单克隆抗体组合物。

在本发明的又一方面，减少 HIV-1 病毒水平的方法涉及使人或其它灵长类动物暴露于上述诱导抗体的药物组合物中，主动诱导与大多数 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体，削弱该病毒在体内的增殖。此方法适用于具有感受态免疫系统的 HIV-1 5 感染者，或者未受感染的或长期感染当无症状的受试者。该方法诱导与 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体，该抗体减少 HIV-1 的任何初始急性感染期间病毒的增殖，并进一步将导致 AIDS 的慢性病毒血症减少到最低程度。

另一方面，本发明提供一种减少 HIV-1 病毒水平的方法，该方法能对 HIV-1 感染激发有效或快速的免疫应答的人给予含有上述抗体组合物的药物组合物。该 10 方法可涉及长期给予该组合物。

本发明的又一方面包括生产上述组合物的方法，以及用这些组合物转染宿主细胞的方法。

本发明的又一方面是用于测量和检测用上述组合物免疫产生的抗体的滴度和特异性的试剂盒。本发明的试剂盒较佳包括上述两种所需的表位 I 肽，以及被灵 15 长类动物识别的表位 I 的额外肽、可能的额外的表位 II 到 IV 的肽，以及包被的固相载体、用于检测抗体与这些肽结合的标记试剂，和用于引起或检测标记物产生的信号的各种各样的底物和装置，以及用于获取血样的常规装置、适当的病毒和其它诊断性检测成分。

又一方面，本发明提供一种检测免疫了本发明组合物的受检者中抗体的滴度和反应模式的方法。该方法包括：使受检者的生物体液的稀释度(如血清)与结合 20 了本发明表位 I 序列的一种或多种肽的平板或珠培育，该平板或珠还可任选地结合表位 II 到 IV；洗去未结合的生物材料；测量与具有标记的试剂的肽结合的任何抗体，如与酶结合的抗人免疫球蛋白。根据使用的标记物的类型，通过加入与酶反应的底物，可进一步激发由该标记物产生的信号，如产生颜色变化。在此试验 25 设计中也可使用其它常规的标记物。

在以下对本发明优选的实施例进行的详细描述中，将对本发明其它的方面和优点进行进一步的描述。

附图的简要说明

30 图 1A 是兔抗血清针对截短的检测肽上较大的线性表位 I 肽的 ELISA 滴度图，

以与较大肽结合的最高百分比表示。相应的检测肽的 N 末端或 C 末端氨基酸以单个字母编码显示在各个柱下面。

图 1B 是灵长类动物抗血清针对截短的检测肽上较大的线性表位 I 肽的 ELISA 滴度图，以与较大肽结合的最高百分比表示。相应的检测肽的 N 末端或 C 末端氨基酸以单个字母编码显示在各个柱下面。

图 2A 是兔抗血清针对截短的检测肽上的线性表位 II 肽的 ELISA 滴度图，以与较大肽结合的最高百分比表示。相应的检测肽的 N 末端或 C 末端氨基酸以单个字母编码显示在各个柱下面。

图 2B 是灵长类动物抗血清针对截短的检测肽上较大的线性表位 II 肽的 ELISA 滴度图，以与较大肽结合的最高百分比表示。相应的检测肽的 N 末端或 C 末端氨基酸以单个字母编码显示在各个柱下面。

图 3A 阐述五价表位 I/表位 II HIV-1 Tat 免疫源性构建物的设计，以三个字母的氨基酸编码表示[SEQ ID NO:12]。

图 3B 八价的一般表位 I 的设计，以三个字母的氨基酸编码表示[SEQ ID NO:13]。

图 3C 阐述单价的一般表位 II 免疫源性构建物的设计，以三个字母的氨基酸编码表示[SEQ ID NO:14]。

发明的详细描述

本发明通过提供诱导未感染受检者或者早期感染 HIV-1、仍能激发对免疫原的免疫应答的受检者产生抗体，从而提供一种解决上述问题的方法，所述抗体与大量(即，大于 95%，更佳大于 99%)的已知 HIV-1 Tat 蛋白变体反应。术语“Tat 序列(或蛋白)变体”指含有 Tat 蛋白氨基酸残基的多肽或肽，或者从另一 HIV-1 株 Tat 蛋白得到的基本上类似于表 I 的[SEQ ID NO:15]的共有序列的序列。各变体可与该共有序列不同，和/或其它变体不同，不同之处在于对表位 I 到 IV 感兴趣的残基中至少有一个氨基酸改变。当将具有这种改变的变体加到本发明的组合物中时，这种变化可提供对具体的 Tat 表位相同或不同的抗原特异性。

由本发明的组合物诱导产生的抗体可抑制 HIV-1 的增殖，这防止了疾病进一步发展成艾滋病(AIDS)。抗体组合物也可用于未能激发针对 HIV-1 感染的有效或快速的免疫应答的感染的或未感染的人中。这些组合物能与大量的 Tat 蛋白反应，

从而减少 HIV-1 的病毒水平。这些抗体用于治疗性或预防性范围，以控制暴露于在感染后产生免疫学上不同的 Tat 蛋白的 HIV-1 株中，或者受其感染的大人群中 AIDS 的发展。

5 本发明的组合物包含肽和蛋白质，或者编码诱导针对灵长类动物中的 Tat 的抗体的肽和多肽的核酸序列，所述“肽和蛋白质”以灵长类动物针对其而发展抗体的 HIV-1 Tat 蛋白的表位提供的肽为基础。这些诱导的抗体反过来削弱 HIV-1 的增殖。

10 HIV-1 Tat 蛋白由两个外显子产生：外显子 1 编码 72 个氨基酸(AA)的蛋白质，该蛋白质可在没有剪接的情况下表达，或者它可已由外显子 2 编码的大约 15-32 个氨基酸剪接。HIV-1 Tat 外显子 1 序列出现在表 I 中，该序列是以在普通 B 亚型中发现的 31 种已知的 HIV-1 株 (NIH Los Alamos 数据库) 的 Tat 蛋白序列为基础的共有序列。这些出现变化的氨基酸位置以小写字母表示。在表 I 的[SEQ ID NO:15]中，位置 73 上的氨基酸残基是 HIV-1 Tat 的外显子 2 的第一个 Pro。由于外显子 1 的 72 个氨基酸产物能单独在细胞中被摄取并被激活，所以需要使抗体与
15 该 72 个氨基酸的肽反应，并阻断其在细胞内转运。HIV-1 Tat 在外显子 1[SEQ ID NO:15]的第 22 位和第 37 位之间含有富含半胱氨酸的区域，并在 Cys21 和 Cys37 之间有一个共价键，产生了复杂的三级结构。科学文献指出，这个区域并没有显示出免疫源性。针对 Tat 的显性抗体是该线性的 N 末端富含 Pro 的区域(第 1-21 个氨基酸)和线性的碱性区域(第 44-65 个氨基酸)，以及报道为第 62-73 个氨基酸
20 的额外抗体。

本发明者先前已鉴别了 Tat 变体的外显子 1[SEQ ID NO:15]的 N 末端线性序列 1-21(22 个氨基酸)中兔抗体(抗原序列)识别的表位，即结合区域，并已定义了 HIV-1 Tat 中的 4 种 B 细胞表位。如先前在国际专利出版物 WO99/02185 中所述，此较大序列的免疫源性区域被兔免疫系统识别。这些区域在下面表 I 中的外显子
25 1 的共有序列中被鉴别：表位 I 由兔抗体鉴别为外显子 1 的第 2 到 10 位上的 9 个氨基酸序列。表位 II 鉴别为外显子 1 第 43 到 50 位上的 8 个氨基酸序列。表位 III 鉴别为外显子 1 第 56-62 位上的 7 个氨基酸序列。表位 IV 鉴别为 Tat 第 62-43 位上的 12 个氨基酸序列，包括外显子 2 的第一个 Pro(第 73 个氨基酸)以及与表位 III 重叠的第 62 位上的 Ser。

30

表 1——共有 Tat 序列

	Met Glu Pro <u>Val asp pro arg Leu Glu Pro Trp lys His Pro Gly Ser</u>
	1 10
5	Gln Pro lys thr ala cys thr asn Cys Tyr Cys Lys lys Cys Cys phe
	20 30
	his Cys gln val Cys Phe ile thr <u>Lys gly Leu gly Ile Ser Tyr Gly</u>
	40
	<u>Arg Lys</u> Lys Arg Arg Gln Arg arg arg ala pro gln asp Ser gln thr
	50 60
10	his Gln val ser Leu ser Lys gln [SEQ ID NO:15]
	70

但是，在本发明中，发明者已检测了尤其是灵长类动物的 B 细胞识别的表位 I 的氨基酸序列中令人惊讶的转移。在表 I 中，被灵长类动物识别的表位 I 和 II 序列是划有下划线的。灵长类动物识别的表位 I 跨越了 Tat 的第 5 到第 12 个氨基酸。被灵长类动物 B 细胞识别的表位 II 的序列跨越第 41 到第 50 个氨基酸。如 WO99/02185 中所报道，表位 III 和 IV 是在兔子中识别相同的表位，本文将其纳入作为参考。

A. 灵长类动物识别的表位 I 免疫源性组合物

在一个实施例中，本发明提供含有灵长类动物免疫系统识别的肽或多肽的至少两种变体的组合物，(为本发明的目的)该组合物在暴露于这些序列的灵长类动物体内引起特殊的体液免疫应答。这些灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列对应于表 1 的 Tat 共有序列[SEQ ID NO:15]的第 5 到 12 个氨基酸残基，衍生自许多“Tat 序列变体”。灵长类动物识别的表位 I 定义了下述通式的肽：R1-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-R2[SEQ ID NO:8]，其中，Y₇ 是 Arg、Lys、Ser 或 Asn；X₉ 是 Glu 或 Asp；Z₁₂ 是 Lys 或 Asn。这个式子允许有各种各样的哺乳动物表位 I 肽变体。本发明的组合物必须含有至少一种其 Y₇ 是 Arg、Z₁₂ 是 Lys 的肽变体，以及至少另一种其 Y₇ 和 Z₁₂ 都是 Asn 的第二肽变体。

出现在上述灵长类动物识别的表位 I 的式子中的指定氨基酸是最小的反应性灵长类动物表位 I 序列。由该式子定义的用于本发明的方法中以产生针对该最小表位 I 序列的抗体的每种免疫原，可以是较大的氨基酸序列。例如，这些最小表位 I 氨基酸可侧接其它氨基酸，这样整个表位 I 免疫源性序列的长度为 8 到约 25 个氨基酸。侧接氨基酸的同一性对于该表位 I 免疫原的生物学功能并不是必需的。

具体而言，灵长类动物识别的表位 I 序列的 N 末端上的额外氨基酸不影响免疫源性。因此，对于每种灵长类动物识别的表位 I 肽，N 末端 R1 可以是未修饰的 N 末端氨基酸上的游离氢，或者是低级烷基(即，C1-C10 烷基)，或者是低级 C1-C10 烷酰基，如乙酰基。R1 也可包括长 1 到约 5 个氨基酸的序列，该序列任选地被低级烷基或低级烷酰基取代。较佳的是，R1 代表 2 个氨基酸。在一个实施例中，R1 是 Val，这样得到 Val-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:37]的序列，其中 Y₇、X₉ 和 Z₁₂ 的定义同上。在另一实施例中，R1 是-X₂-Pro-Val-，这样得到 X₂-Pro-Val-Asp-Pro- Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:38]的序列，其中，X₂ 是 Glu 或 Asp，Y₇、X₉ 和 Z₁₂ 的定义同上。较佳的是，R1 代表 3 个氨基酸。

10 灵长类动物识别的表位 I 最小序列的 C 末端上的额外氨基酸可增强抗体滴度。虽然 C 末端 R2 可以是该 C 末端氨基酸上的简单的游离羟基，但是它也可以是 C 末端酰胺。但是，为了增强滴度，R2 较佳是长 1 到约 14 个，较佳约 4 个额外氨基酸，并在羧基末端酰胺化的序列。在一个优选的实施例中，R2 是-His-Pro-Gly-Ser-酰胺，这样得到 Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂-His-Pro-Gly-Ser[SEQ ID
15 NO:16]的序列，其中，Y₇、X₉ 和 Z₁₂ 的定义同上。

较佳的是，本发明的组合物除了上述鉴别的两种必需的肽外，还包含灵长类动物识别的表位 I 式的至少 5 种或 6 种不同的氨基酸序列。最佳的是，该组合物含有 7 种或 8 种变体氨基酸序列，详见下文。该组合物还可含有其它肽或多肽序列，各条序列含有不同的 X₉、Y₇ 和 Z₁₂ 组合。如下面的实施例所证明，由于在灵
20 长类动物识别的表位 I 中具有 3 个抗原变异性的位点，本发明的优选组合物可含有足量的灵长类动物识别的表位 I 的肽，从而通过包括下述两种“必需”的肽而包含了 95%的所有已知 B 分化体和非 B 分化体 HIV-1 Tat 变体：

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:17]; 和
R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:18]; 以及 1 到 5 种下述
25 额外的表位 I 肽：

R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:19];
R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:20];
R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:21];
R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:22]; 和
30 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:23]; 以及视需要，稀

罕的变体 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:24]。

本发明灵长类动物识别的表位 I 组合物可含有许多额外肽或多肽，该肽或多肽含有对应于 SEQ ID NO:15 的第 5 到第 12 个氨基酸残基的序列，但它们从没有与针对该灵长类动物识别的表位 I 组合物的抗体交叉反应的其它 Tat 变体衍生得到。本发明的表位 I 组合物可含有以任何顺序排列的 5 种或 5 种以上不同表位 I 肽的多份拷贝。在一个实施例中，上述 7 种或所有 8 种氨基酸序列[SEQ ID NO:17-24]至少有一份拷贝存在。

本发明这些肽或多肽由合成或重组产生。任选的氨基酸(如-Gly-Ser-)或其它氨基酸或化合物间隔区可包含在这些肽的末端中，以用于将这些肽连接于载体。这种组合物可以取一种或多种上述表达为与载体蛋白质偶联的合成肽的肽的形式。或者，组合物可含有多个表位 I 肽，每条肽表达为多抗原肽，并任选地与载体蛋白质偶联。或者，选择的肽可顺次连接，并在重组产生的蛋白质中表达。例如，上述 8 个明确鉴别的序列顺次连接，它们之间可以有或没有间隔区氨基酸，以形成较大的重组蛋白质。或者，该重组蛋白质可与载体蛋白质按读框融合。可将这些灵长类表位 I 组合物设计成诱导与 95% 以上的 HIV-1 Tat 蛋白的已知变体反应的抗体，该 Tat 蛋白包括 HIV-1 B 进化枝和非 B 进化枝的 Tat 蛋白。

灵长类动物识别的表位 I 组合物证明具有在经免疫的免疫感受态灵长类动物(即，未感染的人，或者无症状的被感染的人)中诱导针对 95% 以上、较佳 99% 以上的 HIV-1 Tat 蛋白的已知变体的主动体液免疫应答(即抗体)的生物学活性。这种治疗的最终结果是 HIV-1 急性感染后其增殖的削弱。这种削弱阻止了与发展成 AIDS 相关的 HIV-1 的高血清转化后血浆水平。HIV 感染的无症状期中抗体的主动诱导可减少病毒的增殖，降低血清的病毒负荷，并减少发展成 AIDS 的可能性。含有至少两种必需的灵长类动物识别的表位 I 免疫原，较佳含有那些表位 I 序列[如 SEQ ID NO:17-24]的 7 种或 8 种序列的组合物，可引起 HIV-1 的普通 B 亚型的 294 种已知 Tat 序列中的约 95%，以及所有 56 种已测序的非 B HIV-1 亚型的 Tat 蛋白质的免疫应答 (Esther Guzman 博士惠赠，Los Alamos NIAID HIV 数据库；Genbank 数据库)。

B. 含有额外表位的免疫源性组合物

在另一实施例中，本发明提供其它的组合物，这些组合物使用两种或两种以

上灵长类动物识别的表位 I 序列与至少一种表位 II 序列组合，并任选地使用一种或多种表位 III 或 IV 肽。这些被兔免疫系统识别的 HIV-1 Tat 表位 II、III 和 IV 在国际专利申请 WO99/02185 中有详细描述，本文将该申请的内容纳入作为参考。

简言之，表位 II 序列在暴露于表位 II 序列的灵长类动物体内引起特异性的体液免疫应答。灵长类动物识别的表位 II 定义为式 R3-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-R4[SEQ ID NO:5]的肽，其中 X₄₂ 是 Gly 或 Ala。被灵长类动物免疫系统识别的最小表位是该式子的明确鉴别的氨基酸的表位，即-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-(SEQ ID NO:15 的第 41 到第 50 个氨基酸)。这也是目前表位 II 的优选免疫原的序列。X₄₂ 是 Gly 的这种免疫原诱导产生与 X₄₂ 是 Ala 的序列交叉反应的抗体。这种抗体可与 95% 以上的已知 HIV-1 Tat 蛋白反应/交叉反应。这种表位 II 序列在大量已知的 HIV-1 Tat 变体中没有抗原变异性。N 末端 R3 可表示未修饰 N 末端氨基酸 Lys 上的氢，或者 R3 可以是低级烷基，或者是低级烷酰基，如 Lys 上的取代基乙酰基。R3 也可包括长 1 到约 5 个氨基酸的序列，该序列任选地被低级烷基或低级烷酰基取代。C 末端 R4 可表示为该 C 末端氨基酸的游离羟基，或者 R4 可以是该 C 末端氨基酸上的酰胺。R4 可包括额外的非极性氨基酸，如间隔区。可以使用这样的间隔区例子：gly-ser-gly-ser，结果得到 Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Gly-Ser-Gly-Ser [SEQ ID NO:25]的序列，其中 X₄₂ 是 Gly 或 Ala。但是，R4 不可以是碱性氨基酸-Lys-Arg-Arg-，这个序列天然存在于 Tat 序列中，出现在表位 II 式子中的最后一个氨基酸之后。在 294 种 B 进化枝 Tat 变体中发现的这种表位 II 序列被灵长类动物识别(如 WO99/02185 中所报道，兔的免疫系统识别得自 SEQ ID NO:15 的第 43 到第 50 个氨基酸的表位)。

当在其它序列中存在时，表位 II 的免疫源性差。因而，为了获得最佳的免疫源性，将这种序列制备成融合到、或偶联于载体蛋白质的合成肽；或者制备成多抗原肽，任选地偶联于载体蛋白质。或者，可使表位 II 表达为重组蛋白质的 C 末端序列，该序列可任选地与载体蛋白质在其氨基末端序列按读框融合。在本发明的组合物中，表位 II 肽较佳单独存在，或者与一种或多种灵长类动物识别的表位 I 肽组合。

简单地描述，并如 WO99/02185 中所述，表位 III 定义为式 R5-Arg-Arg-X₅₈-Z₅₉-A₆₀-Y₆₁-Ser-R6[SEQ ID NO:6]的肽，其中 X₅₈ 可以是 Ala、Pro、Ser 或 Gln；Y₆₁ 可以是 Asp、AsnGly 或 Ser；Z₅₉ 选自 Pro 或 His；A₆₀ 可以是 Gln 或 Pro。表位 IV

定义为式 R7-Ser-Gln-X₆₄-His-Gln-Y₆₇-Ser-Leu-Ser-Lys-Gln-Pro-R8[SEQ ID NO:7]的肽，其中，X₆₄可以是 Asn 或 Thr，Y₆₇可以是 Ala 和 Val。

因此，本发明的组合物，即含有上述鉴别的氨基酸序列的肽/多肽，当提供给人时，可用于大多数 HIV-1 株的细胞外 Tat 蛋白的免疫学阻断。这些组合物起到
5 决定性地减少病毒的长期增殖的功能，并允许对该病毒进行有效的免疫控制。

各表位的免疫原较佳设计为诱导产生与各表位最高比例的天然变体反应的抗体。对于诸如灵长类动物识别的表位 I 之类的表位，可将多份拷贝的免疫原加到合成的或重组的免疫原中，以增强免疫源性，并产生较高效价的抗体。此外，可将两种或两种以上表位的免疫原组合，以扩展其覆盖范围，因为各表位的序列变
10 化独立地产生。因此，举个例子，本发明的组合物含有两种必需的灵长类动物识别的表位 I 肽，以及 4 种或 5 种上述明确鉴别的在末端具有 Cys 的其它表位 I 肽，该末端与载体蛋白质偶联。或者，可制备多抗原肽，任选地与载体蛋白质偶联，并组合形成本发明的组合物。或者，可使用两种或两种以上免疫原的混合物。

可制备本发明的灵长类动物识别的表位 I 免疫原，该免疫原可有或没有任何
15 表位 II、III 或 IV 或其它任选的免疫原，并将其以各种形式用于免疫源性组合物中，例如，化学合成的肽或重组的肽、多肽、蛋白质、融合蛋白或融合肽。

1. 偶联于载体的重组的或合成的肽/蛋白质

作为一个实施例，本发明的组合物可以是合成的或重组产生的肽，它含有至少两种必需的灵长类动物识别的表位 I 免疫源性氨基酸序列(以及额外的其它表位
20 I 序列)，它还含有偶联于所选择的载体蛋白质的一种或多种表位 II/III/IV 免疫源性氨基酸序列。在本发明组合物的这个实施例中，有或没有侧接序列的多种上述灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列，可顺次组合在多肽中，并与相同的载体偶联。或者，表位 I、II、III 或 IV 免疫原可作为肽单独与相同的或不同的载体蛋白质偶联，然后将所得的免疫原-载体构建物一起混合，形成单一的组合物。可采用
25 化学合成的常规方法合成，或者通过在选择的宿主细胞中表达重组，从而制得这些序列，也可采用现在常规的方法制备。

对于这个实施例，载体蛋白质最好是可增强选择的免疫原的免疫源性的蛋白质或其它分子。这种载体可以是具有辅助作用的较大分子。常规的蛋白质载体的例子包括但不限于大肠杆菌 Dnak 蛋白、半乳糖激酶(galK，它在细菌中催化半乳
30 糖代谢的第一步)、遍在蛋白、 α -交配因子、 β -半乳糖苷酶和流感 NS-1 蛋白。类

毒素(即, 编码天然毒素的序列, 有足够的修饰, 以减少其毒性), 如白喉类毒素和破伤风类毒素也可用作载体。类似地, 可使用各种细菌热激蛋白, 如分枝杆菌 hsp-70。谷胱甘肽还原酶(GST)是另一有用的载体。本领域熟练的技术人员可易于选择适当的载体。

- 5 在特别合乎要求的免疫原-载体蛋白质构建物中, 所述两种必需的表位 I 免疫原和 3-6 种额外的灵长类动物识别的表位 I 免疫原和任选的免疫源性肽/多肽可共价连接于分枝杆菌大肠杆菌热激蛋白 70(hsp) (K. Suzue 等人, *J. Immunol.*, 156: 873(1996))。在另一合乎要求的实施例中, 通过将含有免疫原的肽或多肽序列共价连接于白喉类毒素, 可形成该组合物。

10 2. 多抗原肽

- 在另一实施例中, 所述肽或多肽表位免疫原和任何选择的任选免疫原可以多抗原肽(“MAP”, 也指八聚体的赖氨酸核心肽)构建物的形式。可采用 Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5409-5412(1988)中所述的 MAP 系统来设计这种构建物。这个系统利用赖氨酸残基的核心基质, 在该基质上, 如下述文献中所述合成本发明相同的灵长类动物识别的表位 I 的多份拷贝; D. Posnett 等人, *J. Biol. Chem.*, 263(4): 1719-1725(1988); J. Tam, 《采用多抗原肽方法化学限定的合成免疫原和疫苗》(Chemically Defined Synthetic Immunogens and Vaccines by the Multiple Antigen Peptides Approach), *Vaccine Research and Developments*, 第 1 卷, W. Koff 和 H. Six 编辑, 第 51-87 页(Marcel Deblau, Inc., 纽约, 1992)。各 MAP 含有仅一种肽的多份拷贝。因此, 含有 MAP 的组合物将含有至少两种、较佳约 7 种 MAP。一种 MAP 将具有连接于各赖氨酸核心的第一必需肽或多肽表位 I 免疫原; 第二种 MAP 将具有连接于各赖氨酸核心的第二必需肽或多肽表位 I 免疫原。还有其它的 MAP, 它们具有上述不同的灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列, 也可包括在组合物中。可使用多种不同的 MAP, 以获得表位 I、II、III 或 IV 序列的任何所需组合。较佳的是, 这些 MAP 构建物与其它的 T 细胞刺激性序列结合, 或者作为药物组合物, 与 T 细胞刺激性试剂(如已知的佐剂)一同给药。

25 3. 间隔区

- 在上述任一种组合物中, 如肽/多肽-载体构建物或 MAP, 每种肽/多肽免疫原或者免疫原中的各条氨基酸序列可任选地被称为“间隔区”的氨基酸序列分开。间隔区是长 1 到约 4 个氨基酸的序列, 它插入两条序列之间, 允许在它们之间连

接而对该免疫原的三维结构没有不利的影 响。间隔区也可含有限制性内切酶切割位点，以在需要时分离序列。对于本领域的熟练技术人员来说，合适的间隔区或连接物是已知的，并易于设计和选择。较佳的间隔区是含有 Gly 和/或 Ser 氨基酸的序列。

5 *F. 本发明的核酸组合物，包括合成的或重组产生的基因*

本发明的其它实施例包括编码上述灵长类动物识别的表位 I 肽/多肽组合物的核酸序列，包括上述组合物的肽和多肽免疫原，以及与载体蛋白融合的那些肽和多肽。这些核酸序列也可包括编码载体蛋白的序列。

因此，本发明一个优选的实施例是顺序地编码至少两种必需的灵长类动物识别的表位 I 免疫源性的肽/多肽的“合成基因”。注意到虽然该基因是“合成的”，但它可根据需要采用化学合成或重组的方法设计。较佳的是，合成基因编码 7 种或所有 8 种明确鉴别的灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列[SEQ ID NO:17-24]。合成基因还可编码表位 II 或 III 免疫原的任何选择，条件是该表位 II 或 III 肽与该灵长类动物识别的表位 I 序列的 C 末端融合，并且在它自己的 C 末端上并没有被进一步修饰。合成基因可编码所述两种必需表位 I 氨基酸序列的多份拷贝，或者额外的多种不同的免疫原或氨基酸序列的拷贝，或者多种不同的免疫原或氨基酸系列的多份拷贝。合成基因可与编码载体蛋白质的核酸序列一起编码开放读框中的选择的氨基酸序列，或者与该核酸序列融合后编码所述氨基酸序列。合成基因的另一特征是，它可以编码编码免疫原的各序列之间的间隔区，和/或编码免疫原的序列与编码载体蛋白的序列之间的间隔区。

本发明的合成基因也可以是合成的或重组的分子的一部分。合成分子可以是核酸构建物，如含有在编码调节性元件如启动子、终止信号等的核酸序列的操作性控制下，含有编码蛋白质、肽、多肽、融合蛋白或融合肽的合成基因的载体或质粒。这类合成分子可以用于重组产生多肽/肽免疫原组合物。可采用化学合成方法制备合成基因或合成分子，或者，较佳的是采用重组技术。例如，合成基因或分子可含有指的定宿主细胞的种类的某些优选密码子。

合成基因或分子较佳以 DNA 的形式用于各种方法中。例如，可用这些合成的核酸序列在宿主细胞培养物中体外表达本发明的肽/多肽。表达的免疫原在适当的纯化后，可加到药物制剂或疫苗中。或者，可将本发明的合成基因或合成分子以所谓的“裸 DNA”的形式直接给予哺乳动物，较佳是人，以在患者中体内表达

蛋白质/肽免疫原。例如可参见 J. Cohen, Science, 259: 1691-1692(1993 年 3 月 19 日); E. Fynan 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11478-11482(1993 年 12 月); 和 J. A. Wolff 等人, Biotechniques, 11: 474-485(1991), 本文将上述所有文献的内容都纳入作为参考。合成分子如载体或质粒可用于直接注入哺乳动物宿主中。

- 5 这会使宿主细胞表达蛋白质, 并接着将该蛋白质引向免疫系统, 从而体内诱导抗体形成。

G. 表达合成基因的微生物

- 在本发明的又一方面, 可将本发明所述合成基因或分子加到非致病性微生物中。所得的微生物, 在给予哺乳动物宿主时, 在体内表达本发明的组合物, 并使其增殖, 从而诱导特异性抗体形成。例如, 携带本发明所述组合物或合成基因, 并用于给予哺乳动物患者的非致病性重组病毒或共生菌可采用常规的方法制得, 10 并从已知的非致病性微生物中选择得到。

- 可用于将合成分子外源传送给患者, 和/或用于将合成基因携带到患者体内的共生菌包括但不限于链球菌属(*Streptococcus*) (如格氏链球菌 *S. Gordonii*)、大肠杆菌属、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和酵母菌属(*Saccharomyces*) 15 的各种菌株。

- 可被工程改造成将合成基因携带到宿主细胞中的合适的非致病性病毒包括痘病毒(如牛痘)、腺病毒、腺相关病毒、金丝雀痘病毒、逆转录病毒等。许多的这类非致病性病毒通常用于人的基因治疗, 并用作其它疫苗制剂的载体, 并且为本 20 领域熟练的技术人员所熟知。

H. 本发明组合物的制备或生产

- 可采用已知的化学合成技术, 如 Merrifield, L. Amer. Chem. Soc., 85: 2149-2154(1963)中所述的技术, 以常规的方式制备本发明的组合物、含有本发明灵长类动物识别的表位 I 以及任选地含有一种或多种表位 II、III 或 IV 的单独的多肽/ 25 肽、本发明的合成基因和合成分子。或者, 可采用重组 DNA 技术, 通过在宿主微生物或细胞中克隆和表达携带编码含有至少两种必需的灵长类动物识别的表位 I 序列肽/多肽的序列, 从而可制备本发明的组合物, 该肽/多肽任选地具有其它免疫原和任选的载体蛋白。可以合成的方式制备表位 I 和任选的免疫原的编码序列 (W. P. C. Stemmer 等人, Gene, 164: 49(1995)), 或者采用已知的技术从病毒 30 RNA 衍生得到, 或者从可获得的含有 cDNA 的质粒得到。

可采用这些技术的组合。例如，可将采用常规的分子生物学技术的顺序免疫原的装配用于合成基因的生产，用定点诱变用于提供免疫原的所需序列。然后重组产生合成基因的产物。所有这些操作都可采用常规的方法进行。

5 使用合成基因或分子克隆和表达本发明的肽/多肽组合物的系统包括使用各种微生物和细胞，这些微生物和细胞在重组技术中是周知的。例如，这些包括大肠杆菌、芽胞杆菌、链霉菌和酵母菌以及哺乳动物、酵母和昆虫细胞的各种菌株。因此，合适的载体是已知的，并可从私人或公共实验室和保藏中心获得，也可以从商业的卖主获得。目前，最优的宿主是哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或 COS-1 细胞。这些宿主可与痘病毒载体(如牛痘或猪痘)一起使用。选择
10 用于转化、培养、扩增、筛选和产物生产和纯化的其它合适的宿主细胞和方法可由本领域熟练的技术人员参考已知的技术进行。例如尤其可参见 Gething 和 Sambrook, Nature, 293: 620-625(1981)。其它优选的系统包括杆状病毒表达系统和载体。

当采用常规的重组方法生产时，本发明的组合物，即含有灵长类动物识别的
15 表位 I 免疫原和任选的免疫原的多肽/肽，可采用常规的裂解技术从细胞内容物中分离，或者采用常规的方法(如色谱法)从细胞培养物中分离。例如可参见 Sambrook 等人，《分子克隆实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory，纽约(1989)。任一用于生产作为 DNA 疫苗的肽/多肽成分的合适的质粒和病毒载体对于本领域熟练的技术人员来说都是已知的，并且不是本发明的限制。参见 Sambrook 等人，同上，以及上述蛋白质生产
20 中引用的参考文献。还可参见 1994 年 1 月 20 日出版的国际专利申请 PCT WO94/01139。简言之，将编码选择的肽/多肽的 DNA 插入含有其它任选的侧接序列的载体或质粒中，该侧接序列可以是启动子、mRNA 前导序列、起始位点和其它能指导该 DNA 在体内或体外增殖和表达的调节性序列。这些载体使患者细胞
25 受到感染，并使合成基因序列在体内表达，或者使该序列在体外表达为蛋白质/肽或融合蛋白/肽。

可将所得的组合物配制成具有任何数量的任选免疫原的灵长类动物识别的表位 I 组合物，并根据功效进行体内试验筛选。这种试验使用该组合物免疫动物如猴，然后评估针对 HIV-1 的 Tat 蛋白或对应于变体 Tat 序列的合成检测肽的抗体的效价(如下面的实施例所示)。
30

I. 本发明的抗体组合物

本发明的抗体组合物或配体结合组合物包括至少一种特异性地与式-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:9]表位 I 结合的抗体, 其中 Y₇ 选自 Arg、Lys、Ser 和 Asn, X₉ 选自 Glu 和 Asp, Z₁₂ 选自 Lys 和 Asn。较佳的是, 如本文所述, 5 这种抗体组合物包括至少两种或两种以上特异性地与至少两种必需的表位 I 序列结合的抗体或配体。产生针对表位 I 的两种必需序列 R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Trp-Lys-R2[SEQ ID NO:17]和 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:18]的抗体(或其它结合配体)。因此, 该组合物的抗体结合出现在 HIV-1 Tat 蛋白的多种变体上的 HIV Tat 蛋白。产生针对上式表位 I 中其它序列的额外抗体或配体。

10 在一个实施例中, 如上文所述, 针对结合本发明表位 I 肽或多肽的分离的抗体也是本发明的一个方面。这种多克隆抗体组合物通常如下产生: 用上述含有所述两种必需表位 I 免疫原的肽/多肽, 和其它灵长类动物识别的表位 I 免疫原和任选的免疫原的组合物免疫哺乳动物, 较佳是灵长类动物。特别可以用作免疫原的是七价的灵长类动物识别的表位 I 免疫原(即, 没有罕见的变体)或八价的免疫原(如 15 下文实施例 3 中所述的合成基因或融合蛋白), 和/或单价表位 II 免疫原×即, 单一的表位 II 肽, 任选地结合于载体)。除了在灵长类动物中产生外, 这类抗体也可在转基因动物中产生, 包括所谓的“人源化”转基因小鼠。但是, 产生针对本发明组合物的多克隆抗体的合乎要求的宿主包括人。可采用标准的技术监测暴露于表位 I 组合物中的哺乳动物产生的这类多克隆抗体的效价, 如采用酶联免疫吸附 20 测定。如果需要, 可从哺乳动物分离抗体分子, 如从全血、血浆或血清中分离, 然后采用常规的技术进一步从免疫的哺乳动物的血浆或血清中纯化。常规的收集技术尤其可包括血浆去除法、A 蛋白色谱法。这类多克隆抗体组合物自身可以用作本发明的药物组合物。

或者, 可从哺乳动物中获得产生抗体的细胞, 然后用这些细胞来制备其它形式 25 的抗体或配体, 如单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体, 由筛选噬菌体展示产生的配体、它们的抗体片段和混合物, 以及合成抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和完整的人抗体。产生这些类型的配体的制备技术是已知的, 可采用灵长类动物识别的表位 I 和任选的免疫原的公开的氨基酸序列来产生配体自身。例如可参见 Kohler 和 Milstein(1975), *Nature*, 256: 495-497; Kozbor 等人 30 (1983), *Immunol. Today*, 4: 72; Cole 等人, 1985, 《单克隆抗体和癌症治疗》

(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页; Harlow 等人,《抗体——实验室手册》(Antibodies A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, (1988); Queen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10032(1989); Hodgson 等人, Bio/Technology, 9: 421(1991); 出版号为 WO92/04381 的国际 PCT 5 申请 PCT/GB91/01554 和出版号为 WO93/20210 的国际 PCT 申请 PCT/GB93/00725。

例如, 在另一实施例中, 单克隆抗体特异性地与含有由表位 I 式定义的任何较大免疫原的 HIV Tat 蛋白的最小表位 I 序列结合, 该表位 I 序列为-Asp-Pro-Y₇-Leu-X₉-Pro-Trp-Z₁₂[SEQ ID NO:9], 其中可变的氨基酸和 R 基团的定义同上。作为 10 一个实施例, 单克隆抗体特异性地与氨基酸序列-Asp-Pro-Asn-Leu-X₉-Pro-Trp-Asn-[SEQ ID NO:26]结合, 其中 X₉ 是 Glu 或 Asp。特异性地与上述式子定义的最小表位 I 序列结合的其它一些单克隆抗体是本发明的一部分。

在本发明的另一实施例中, 单克隆抗体特异性地与含有氨基酸序列-Lys-X₄₂-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys [SEQ ID NO:10]的最小表位 II 序列结合, 其中, 15 X₄₂ 是 Gly 或 Ala, 该表位 II 作为从表位-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-[SEQ ID NO:11]获得的不同表位, 被先前所述的抗体识别。较佳的是, 抗体组合物含有与 X₄₂ 是 Gly 的肽和 X₄₂ 是 Ala 的肽交叉反应的一种抗体。这些抗体较佳在灵长类动物中产生。还有一些特异性地与上述式子定义的最小表位 II 序列结合的单克隆抗体也是本发明的一部分。

20 可通过使用本发明灵长类动物识别的 HIV-1 Tat 表位筛选重组组合的免疫球蛋白库(如抗体噬菌体展示), 以分离结合 HIV-1 Tat 的免疫球蛋白库成员, 从而开发其它的抗-Tat 抗体 (W. D. Huse 等人, Science, 246: 1275-1281(1988))。用于产生和筛选噬菌体展示库的试剂盒可从市售获得, 如 Pharmacia 重组噬菌体抗体系统(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), 目录号 27-9400-01; Strategene 25 噬菌体展示试剂盒(Strategene Phage Display kits)等。例如可参见美国专利第 5,223,409 号、国际出版物 WO92/09690、WO90/02909 等。类似地, 可采用已知的技术开发嵌合抗体 (尤其是 Morrison 等人, (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851; Takeda 等人, Nature, 313: 452(1984))。嵌合抗体是其不同部分从 30 不同的动物种类得到的分子。还可采用常规的方法, 使用本发明的多克隆或单克隆抗体的可变部分制备单链抗体 (例如可参见美国专利第 4,946,778 号和第

4,704,692号)。抗体片段如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv 片段及其库也可用在本发明的各个方面。

5 这些抗体/配体组合物合乎要求地结合于大多数已知的 HIV-1 Tat 蛋白变体(如 95%以上, 较佳是 99%以上的已知的 Tat 蛋白变体), 并阻止了这些 Tat 蛋白进一步支持 HIV-1 的增殖。这些组合物可包含多种不同的抗体的混合物, 这些抗体结合从 HIV-1 的多种菌株得到的 HIV-1 Tat 蛋白表位序列。因此, 这些抗体可用于下面的药学方法和制剂中。

J. 本发明的药物组合物

10 作为本发明的另一方面, 用于诱导与大多数(如 95%以上, 较佳 99%以上)已知的 HIV-1 Tat 蛋白反应, 并削弱 HIV-1 的增殖的抗体的药物组合物可包含本发明所述的至少两种必需的灵长类动物识别的表位 I 肽或多肽作为其活性制剂, 并较佳还含有额外的表位 I 肽。几种合乎要求的组合物包含下述成分:

- (a) 含有至少两种必需的, 较佳至少 7 种灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列[SEQ ID NO:17-24]的肽/多肽免疫原;
- 15 (b) 还含有表位 II、III 或 IV 氨基酸序列的任一种, 较佳是单价表位 II 免疫原的(a)的肽/多肽免疫原;
- (c) 编码所述两种必需的灵长类动物识别的表位 I 序列、较佳是 7 种表位 I 序列[SEQ ID NO:17-24]以及上述任意序列的合成或重组产生的基因;
- (f) 含有(c)的合成基因的合成分子;
- 20 (g) 携带上述合成基因或合成分子的重组病毒;
- (h) 携带上述合成基因或合成分子的共生菌。

25 选择的活性成分存在于药学上可接受的载体中, 并且该组合物可含有额外的成分。含有本发明组合物的药剂可含有其它的活性制剂, 如 MAP 的 T 细胞刺激剂、佐剂和免疫刺激性细胞因子, 如 IL-12, 以及其它已知的细胞因子, 用于蛋白质/肽组合物。所有这些药物组合物都可降低哺乳动物的病毒水平。

30 作为药物组合物, 含有灵长类动物识别的表位 I 肽或核酸序列以及任选的免疫原系列与药学上可接受的载体混合, 以给予哺乳动物, 用于预防或治疗病毒感染。蛋白质/肽可组合成单一的药物制品用于给药。用于本发明的免疫源性蛋白质组合物的合适的药学上可接受的载体对于本领域的熟练技术人员来说是已知的。这类载体包括如盐水、缓冲盐水、选择的佐剂, 如氢氧化铝和氢氧化镁的水性悬

浮液、脂质体、水中油乳液和其它的载体。合适的佐剂也可用于本发明含有蛋白质的组合物中。用于指导 DNA、质粒核酸或重组载体给药的合适的载体包括但不限于盐水，或蔗糖、鱼精蛋白、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、聚赖氨酸、聚阳离子、蛋白质、CaPO₄ 或亚精胺。例如可参见 PCT 申请 WO94/01139 5 和上面引用的参考文献。肽/多肽组合物和合成的基因或分子能在免疫的宿主哺乳动物(如人)的体内引起能阻断从 HIV-1 得到的多种(约 95%到约 99%)已知的细胞外 Tat 蛋白变体的免疫应答，从而降低病毒水平。

另一可用于削弱 HIV-1 的增殖的药物组合物包含一种抗体组合物，该抗体组合物含有一种或多种上面已详细描述抗体。在药物组合物中，抗体可存在于盐 10 水溶液或者其它合适的载体中。抗体组合物能使提供即时的、外源提供的 Tat 的阻断。

本发明并不受到常规的、生理学上可接受的载体、佐剂或用于上述类型的药物制备中的其它成分的限制。由上述成分制备具有适当的 pH、等渗性、稳定性和其它常规特征的这些药学上可接受的组合物都在本领域技术人员知识范围内。

15 K. 本发明的方法——削弱 HIV-1 的增殖

根据本发明，减少 HIV-1 的病毒水平的方法涉及使人暴露于上述诱导 Tat 抗体的药物组合物中，主动诱导与多种(如，95%以上，较佳在 99%以上)已知的 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体，并在体内削弱该病毒的增殖。这种方法适用于具有活性的免疫系统的 HIV 感染的受试者，或者用于未感染受试者的主动免疫。该方法诱导 20 与 HIV-1 Tat 蛋白反应的抗体，减少 HIV-1 的初始急性感染期间的病毒增殖，并使导致 AIDS 的慢性病毒血症减到最小程度。这种方法也降低感染受试者中长期的病毒增殖，也使发展成 AIDS 的可能性减到最小程度。使用这些方法可控制长期的 HIV-1 感染，提供一种不产生抗性的新的治疗机制。针对 Tat 的抗体抑制 HIV-1 准种类的复制而与它们产生的 Tat 无关，因为细胞外的 Tat 蛋白没有与病毒的复制部分结合。因此，对于 Tat 抗体可对非反应性的逃逸型 Tat 变体产生选择性压力 25 这方面没有显而易见的机制。

根据本方法，这些药物组合物较佳含有肽/多肽组合物、合成的基因或分子、重组的病毒或共生重组菌。较佳的是，这些组合物含有七价的合成基因或融合蛋白(没有表位 I 的罕见变体)或实施例 3 的八价的合成基因或融合蛋白，并任选地含 30 有单价的表位 II 肽。药物组合物的这些活性成分，每一种都主动地诱导暴露的人

中抗 Tat 抗体的形成，该抗体阻断 Tat 从感染的细胞转移到未感染的细胞。这种作用减少感染的多重性，并阻断 HIV-1 病毒扩长的爆发，从而降低病毒水平。在已经感染的患者中，这种减少病毒水平的方法可减少慢性病毒血症和向 AIDS 的发展。在未感染的人中，给予本发明的组合物可减少急性感染，并从而使导致 AIDS 的慢性病毒血症减到最小程度。

本发明的另一方面是，向对 HIV-1 感染不能引起有效的或快速的免疫应答的人给予含有上述抗体组合物的药物组合物，从而减少 HIV-1 的病毒水平。该方法可涉及长期给予该组合物。这些适合用本方法治疗的患者是由疾病产生的免疫妥协的并且不能引起强烈的免疫应答的 HIV-1 感染患者。在 HIV 感染的后期阶段，产生有效的抗体效价的可能性很小，这是由于与该疾病相关的免疫削弱的缘故。这些患者还包括 HIV-1 感染的孕妇、感染的母亲的新生儿，以及具有推定暴露的未免疫患者(如，不当心被 HIV-1 感染的人用过的针“扎”过的人)。

对于这些患者，在本发明的方法中，较佳将药物组合物用作本发明的抗体组合物。该抗体组合物包含在其它哺乳动物中制得的多克隆抗体组合物，较佳是在正常的人中制得，或者，该抗体是上述其它形式的抗体，如单克隆抗体等。这些抗体组合物以被动的免疫治疗给予，以抑制病毒的增殖，并降低病毒负荷。与从 HIV-1 得到的多种已知的 Tat 蛋白反应的外源抗体使患者即时阻断 Tat 从病毒感染的细胞中转移到其它感染的或未感染的细胞中。根据本方法，可采用长期的治疗方案用抗体组合物对患者进行长期的治疗。

在上述各种方法中，以适当的途径给予本发明的组合物，如皮下、口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、经鼻或吸入给药。目前优选的给药途径是免疫用(主动诱导)组合物的肌肉内给药，和抗体(被动治疗)组合物的静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)或肌肉内(i.m.)给药。重组病毒载体或裸 DNA 较佳是肌肉内给予，但是，其它某些重组病毒载体和/或活的共生菌可口服给予。

根据患者的年龄、体重、性别、总的身体状况等选择本发明各种疫苗剂量中的蛋白质、肽或核酸序列的量。需要用于诱导免疫应答(较佳是保护性应答)的活性成分的量，或者在患者中产生外源效果而没有明显的不利副作用的活性成分的量，根据所使用的药物组合物和任选存在的(用于含有蛋白质的组合物的)佐剂而改变。

通常，对于含有蛋白质/肽、融合蛋白、MAP 或偶联蛋白质的组合物或者抗

体组合物,各剂量将含有约 50 μ g 到约 20mg 的肽/多肽免疫原/毫升无菌溶液。更佳的剂量可以是约 500 μ g 的免疫原。本领域熟练的技术人员也可考虑其它的剂量范围。给予最初剂量之后,可在需要时任意地进行重复的激发。

5 本发明的抗体组合物可用于长期治疗由于针扎或母体感染而患急性感染的风险的受检者。这类“急性”感染的剂量频率可以 i.v.、s.c.或 i.m.方式每日给药到每周给药 1 次或 2 次,持续约 6 周。本发明的抗体组合物也可用作感染患者或晚期 HIV 患者的长期治疗。在感染患者中,长期给药的频率可以 i.v.、s.c.或 i.m.方式每日给药到每月 1 次或 2 次,可根据免疫原的半衰期给药(如约 7-21 天)。但是,这些感染患者的长期治疗的持续时间预计是不确定的,并且是长期的。

10 或者,本发明的组合物可设计用于直接给予作为“裸 DNA”本发明的合成基因或分子。由于具有蛋白质免疫源性组合物,本领域熟练的技术人员可选择并调节 DNA 和载体组合物中的成分的量以及给药方式(如注射或鼻内)。通常,每种剂量将包含约 50 μ g 到约 1mg 的编码免疫原的 DNA/毫升无菌溶液。

15 对于含有合成基因或分子的重组病毒,剂量范围可以是含有浓度为 1×10^7 - 1×10^{10} pfu/ml 的本发明重组病毒的约 20-50ml 的盐水溶液。较佳的人用剂量约为上述浓度的 20ml 盐水溶液。但应理解的是,本领域熟练的技术人员可根据重组病毒的特性和传送给宿主的免疫原的构成改变这种剂量。

20 携带要传送给患者的合成基因或分子的共生菌的量,其范围通常约为 10^3 - 10^{12} 个细胞/kg。本领域熟练的技术人员可根据所要使用的细菌,和含有表位 I 和由该活细菌传送的任选免疫原的具体组合物而改变这些剂量。

因此,将本发明的组合物设计成使用未感染的哺乳动物(如人)的选择病毒来延迟感染或使感染减到最小。因而,这些组合物可用作疫苗。抗 Tat 蛋白抗体并不与诊断试验中用来检测感染后血清转化的 HIV-1 蛋白质反应。因此,用本发明的组合物治疗的受试者将不会受到 HIV-1 感染的假阳性测试的影响,并且,如果
25 经治疗的受试者感染了 HIV-1,仍有检测到血清转化的可能性。

对哺乳动物给予本发明的组合物,不论是含有蛋白质/肽的组合物还是编码免疫原的新颖的核酸序列,都可提供根本上不同的 AIDS 接种策略,因为这样可使约 95%以上,较佳约 99%以上的 HIV-1 的已知 Tat 蛋白变体受到生物学阻断,从而降低病毒水平,并减少 HIV-1 的增殖。

30 与用于抵抗这些病毒的其它治疗和预防方法相反,使用含有 Tat 免疫原的组

合物具有特别合乎要求的优点。由于 Tat 蛋白的阻断在细胞外不加选择地抑制所有的 HIV 准种类或菌株的增殖，所以这种阻断并没有对用于突变病毒变体选择的母体病毒产生选择性压力。因此，阻断患者细胞对 Tat 蛋白的摄取不仅减少病毒血的水平，而且这种阻断还以排除“逃避变体”的方式进行。

- 5 此外，本发明包括一种主动治疗无症状 HIV-1 感染的病毒血症患者的方法，因为在患病期间，细胞外的 Tat 蛋白有可能对持久的感染和在此 HIV-1 感染阶段存在的免疫异常产生影响。由本发明的免疫诱导的抗体对细胞外 Tat 蛋白的阻断可以更有效的免疫控制减少病毒血症，并延迟或阻止疾病向 AIDS 发展。

10 本发明上述机制可用于阻止病毒感染的过程，并产生所需的临床结果。更具体地说，本发明的组合物通过阻断未感染细胞对 Tat 蛋白的进一步摄取，能减少已经感染了病毒的患者的病毒血症。本发明的组合物，不论是单独使用还是与 HIV 感染患者的其它治疗方案一起使用，都有助于减少病毒血症，并阻止临床恶化。

15 对于这些治疗用途，给药的制剂和方式基本上与上面特别指出的相同，并且可与用于特殊的病毒感染的其它常规治疗一起或同时进行。对于治疗用途或预防性用途，需要反复给予免疫用组合物，如每年激发一次，或者以其它的间隔时间激发。

L. 本发明的诊断试剂盒

上述肽和多肽也可用作测量和检测由接种上述组合物诱导产生的抗体的效价和特异性的试剂盒中的试剂。本发明的试剂盒可包括上述至少两种必需的表位 I
20 肽，较佳是两种或两种以上灵长类动物识别的表位 I 和任选的免疫原。在一个实施例中，各肽在其 N 末端上具有蛋白质生物素和间隔区，如-Ser-Gly-Ser-Gly-[SEQ ID NO:27]。或者，该肽在其 C 末端上可具有间隔区，如-Gly-Ser-Gly-Ser-[SEQ ID NO:39]，以及蛋白质生物胞素。这些实施例使这些肽结合于抗生物素蛋白包被的固相载体如平板或珠。诊断检测领域中熟练的技术人员已知的其它结合试剂也可
25 用于相同的目的。试剂盒中还提供了标记的试剂，这类试剂检测抗体与固定的表位肽(如山羊抗人免疫球蛋白等)的结合。试剂上的标记物可选自许多已知的诊断用标记物，如放射性化合物、荧光化合物和蛋白质、比色酶等。因此，试剂盒还包含各种各样的试剂和用于读取标记物的装置(如某些与酶标记物反应以产生颜色信号的底物等)、用于采取血样的装置，以及适当的瓶和其它诊断检测用成分。本
30 领域熟练的技术人员还易于选择其它常规的诊断用成分用于此试剂盒。

这些试剂盒和试剂可用于检测接种了本发明组合物的受试者中抗体的效价和反应性方式的方法。用于测定由免疫产生的针对 Tat 免疫原的抗体的存在和/或效价的方法包括以下步骤：使从免疫的受试者获得的生物样品(如体液，较佳是血液、血清或血浆，但也有可能是尿、唾液和其它液体或组织)与一种或多种灵长类动物识别的表位 I 和任选的免疫原的结合序列接触，该结合序列较佳是固定在固相载体上，如平板或珠。用于本方法的灵长类动物识别的表位 I 和任选的结合序列可以是未修饰的最小表位结合区域。

一旦该生物样品暴露在固定的肽中足够的时间后，洗涤该支持物，以从该生物样品中除去未与肽结合的任何材料。这一洗涤步骤在诊断检测中是常用的，并且用盐水进行。如果针对表位 I 和任选的免疫原或它们的组合的抗体由于上述治疗而在受试者中产生，那么固定的肽已与生物样品中的抗体结合。此后，将标记的试剂加到支持物上的材料中，以检测固相载体上的肽与上述生物样品中的抗体的结合。较佳的是，这种试剂是抗-人免疫球蛋白，如山羊抗-人免疫球蛋白。如上所述，标记物选自大范围的常用诊断用标记物。在一个实施例中，标记物可以是比色酶，这种酶在与底物接触后产生可检测的颜色信号。颜色的存在和/或强度提供治疗受试者中抗体诱导的证据。这种检测可用于测定免疫的功效，以及用于监测患者的免疫状态。

选择具体的检测步骤以及各种可检测的标记系统对于本领域的熟练技术人员来说是已知的。这种选择是常规的，且并不限制本发明。

20 M. 本发明的优点

本发明组合物的一个优点是，本发明的组合物中需要少量的免疫原与普通 B 亚型的 HIV-1 的 95%-99%以上的已知 Tat 蛋白变体发生交叉反应。如以下实施例中所述，含有两种必需的灵长类动物识别的表位 I 氨基酸序列以及六种额外的表位 I 序列的灵长类动物识别的表位 I 免疫源性组合物与普通 B 亚型的 HIV-1 的 95% Tat 蛋白交叉反应，以及与从较少见的非 B 亚型 HIV-1 获得的所有 56 种 Tat 蛋白序列交叉反应。因此，单一的组合物可有效地用于预防或治疗由可能遇到的大量的 HIV-1 株引起的感染。

此外，在鉴别针对所需的结合的 Tat 的准确表位之后(即 SEQ ID NO:15 的第 5-12 个氨基酸)，可采用本文所述的方法易于鉴别从新产生的 HIV-1 株或新发现的株得到的新的合乎要求的 Tat 肽免疫原，并将其包含在组合物中。这种适应性使

本发明的组合物可用于预防性地针对将来鉴别出来的 HIV-1 的任何新株。结合本文所述的内容，本领域熟练的技术人员有望能易于将新的 Tat 免疫原组合(和编码它们的核酸构建物)加到组合物中。

例如，采用常规技术如 PCR 和高密度寡核苷酸阵列 (M. J. Kozal 等人, Nature Med., 2: 753(1996))，使本领域熟练的技术人员能获得代表 HIV-1 株和亚型的临床分离物的变体的 HIV-1 Tat 蛋白的大阵列。使用这些技术可测定 HIV-1 B 亚型以及不发达国家中发现的其它亚型的其它变体，这些变体到目前还没有研究透彻。新的 Tat 序列的测定将使得相应的肽可作为免疫原简便地加到本发明的组合物中，从而诱导针对 HIV-1 的其它稀有的 Tat 蛋白的抗体反应。

10 使用针对对应于各种 Tat 变体的合成肽而产生的抗体进行的交叉反应性研究可用于消除对使用其序列变化在免疫学上是沉默的 Tat 变体进行免疫的需求，因为这些肽被抗体强烈地结合在共有序列或其它变体上。

下面的实施例阐述了制备本发明的组合物和利用这些组合物诱导针对免疫宿主中的病毒 Tat 蛋白的抗体的较佳方法。这些实施例仅仅是阐述性的，并不是限制本发明的范围。

实施例 1——与 HIV-1 Tat 蛋白中灵长类动物识别的表位 I 的抗体结合所必需的最小 Tat 蛋白氨基酸序列的免疫学研究、序列变化以及针对这些序列的抗血清的免疫学交叉反应性

20 A. 合成肽和共轭物

采用固相合成技术，在衍生化的聚乙烯载体上合成所述合成肽 (R. M. Valerio 等人, Int. J. Peptide Res., 44: 158-165(1994))。用氨基末端 Cys 和酰胺化 C 末端合成免疫用肽，加入该氨基末端以促进与载体蛋白的偶联。用氨基末端生物素-Ser-Gly-Ser-Gly-序列[SEQ ID NO:27]和 C 末端上游离酸官能合成检测肽，将其用于 ELISA 检测，以检测反应性和交叉反应性。采用高压液相层析(HPLC)纯化经由半胱氨酰侧链以 5-8 的肽-载体比例共价偶联于白喉类毒素(DT)载体蛋白的免疫用肽 (A. C. J. Lee 等人, Molec. Immunol., 17: 749(1980))，使用分析性 HPLC 和质谱法测得纯度大于 95%，所使用的检测肽的纯度大于 50%。

B. 免疫

30 在纯净水中溶解肽共轭物，用完全福氏佐剂(CFA)或不完全福氏佐剂(IFA)以

1: 1 的比例乳化 (《抗体——实验室手册》(ANTIBODIES—A LABORATORY MANUAL), E. Harlow 和 P. Lane 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory(1998))。向每种灵长类动物给予的总体积是 1ml, 这 1ml 中含有 100 μ g 与 DT 偶联的肽。

如下用 IFA/CFA 中的抗原免疫作为病毒攻击的一部分的猕猴。对几种灵长类动物使用免疫用肽, 最初用共轭物的 CFA 溶液肌肉内(IM)注射, 接着用共轭物的 IFA 溶液 IM 加强 2 周。在第 1 次注射之前, 先采取血样, 然后在加强注射后 3 到 5 周后采取更多的血样。

C. ELISA 效价

如 H. M. Geysen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998(1983)所述进行 ELISA 检测。抗体效价是在背景上产生 1.0 OD 单位的吸光度的血清稀释度的倒数。使用 2-3 份血清的几何平均效价(GMT)计算各个反应, 或者仅从一些猴子免疫获得单一的血清。

兔与猴中的这种 ELISA 检测的结果分别显示在图 1A 和 1B 中。这些 ELISA 结果证明, 针对加了表位 I 的免疫原的灵长类动物抗体与序列-Asp-Pro-Arg₇-Leu-Glu₉-Pro-Trp-Lys₁₂-[SEQ ID NO:15 的第 5-12 个氨基酸]反应。如下面所述, 位置 7、9 和 12 表示灵长类动物识别的这种表位 I 肽的共同变体。

D. 表位中的氨基酸系列的多样性分析

从 GenBank 和 Los Alamos 人逆转录病毒和 AIDS 数据库 (HUMAN RETROVIRUSES 和 AIDS 1996, 由 Los Alamos 国家实验室的理论生物学和生物物理学组(Theoretical Biology and Biophysics Group of the Los Alamos National Laboratory)出版, Los Alamos, NM; 以及由 Los Alamos 实验室的 Esther Guzman 从 GenBank 友情提供的额外序列) 检索 HIV-1 Tat 第一外显子序列。不完整的序列和具有终止密码子或导致移码的碱基删除的序列被删除, 由相同的隔离种群具有明显相同的重复序列的序列也被删除。记录下表位中这些位置上的氨基酸的变化, 并将其汇总。

E. 变体之间的抗原交叉反应性

采用 ELISA, 在共有序列和具有共同氨基酸变体的序列上测定针对表位共有序列的抗血清的效价, 以测定氨基酸多态对抗原性的影响。

F. 序列中的变化

评价灵长类动物识别的表位 I 共有序列的最大频率和被灵长类动物的识别。

为这些肽评价从 294 种 B 进化枝(I)病毒得到的 294 种 HIV-1 Tat 蛋白和 56 种非 B 进化枝(II)病毒的 HIV-1 Tat 蛋白中的抗原和序列保守性, 并将结果汇总在表 II-VI 中。

表 II 和 III 的第一行表示最大频率的共有序列。中间的那些行是在各位置上
5 的 5% 以上序列(如果有多条序列的话)中发现的氨基酸的百分比发生率。各表的最后一行是总的发生率, 包括在 5% 以上的序列(如果有多条序列的话)中产生的氨基酸。表 II 中所有这些选择在抗原性上产生不同的表位(<25% 交叉反应性); 表 III 中所有的选择除了氨基酸 4 这一项外其余的也和表 II 中的一样。

表 II

10

表位 I——294 种 B 进化枝

Val ₄	Asp ₅	Pro ₆	Arg ₇	Leu ₈	Glu ₉	Pro ₁₀	Trp ₁₁	Lys ₁₂
			Arg(73)					Lys(96)
			Lys(12)					Asn(2)
			Ser(11)					
			Asn(4)					
100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

表 III

表位 I——56 种非 B 进化枝

Val ₄	Asp ₅	Pro ₆	Asn ₇	Leu ₈	Glu ₉	Pro ₁₀	Trp ₁₁	Lys ₁₂
Val(89)			Asn(79)		Glu(86)			Asn(87)
Ile(11)			Lys(14)		Asp(14)			Lys(13)
			Ser(5)					
100%	100%	100%	98%	96%	100%	98%	100%	100%

15

如表 II 和 III 中所示, 灵长类动物识别的表位 I 具有潜在的 16 倍抗原多态, 但 B 进化枝存在一种主要的抗原, 非 B 进化枝存在另一种主要的抗原。5 种其它的变体占了已知 Tat 变体的 95% 以上。参见表 IV 和 V; 标有星号的序列表示在 B 进化枝和非 B 进化枝中都存在。

表 VI——B 进化枝(294 种序列)

灵长类动物的表位序列	SEQ ID NO	发生率	百分比发生率
ValAspProArgLeuGluProTrpLys	SEQ ID NO:15 的第 4-12 个氨基酸	220	75
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	SEQ ID NO:12 的第 185-193 个氨基酸	35	12
ValAspProSerLeuGluProTrpLys	SEQ ID NO:12 的第 120-127 个氨基酸	20	7
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	SEQ ID NO:12 的第 55-63 个氨基酸	7	2
		总计:282	总计:96
ValAspProArgLeuGluProTrpAsn	28	1	<1

表 V——非 B 进化枝(56 种序列)

灵长类动物的表位序列	SEQ ID NO	发生率	百分比发生率
ValAspProAsnLeuGluProTrpAsn	SEQ ID NO:13 的第 227-235 个氨基酸	36	64
ValAspProLysLeuGluProTrpAsn	SEQ ID NO:13 的第 344-352 个氨基酸	8	14
ValAspProAsnLeuAspProTrpAsn	29	6	11
ValAspProAsnLeuGluProTrpLys*	SEQ ID NO:13 的第 55-63 个氨基酸	3	5
ValAspProLysLeuGluProTrpLys*	SEQ ID NO:12 的第 185-193 个氨基酸	1	2
		总计: 53	总计: 95
ValAspProSerLeuGluProTrpAsn	SEQ ID NO:13 的第 279-287 个氨基酸	1	2
ValAspProSerLeuAspProTrpAsn	30	1	2
ValAspProAsnLeuAspProTrpLys	31	1	2

表 VI 显示表位 I 的位置 7 变体的抗原交叉反应性差、位置 9 变体的抗原区别和抗血清对在位置 7 和 12 上都有变化的 GluProValAspProAsn₇LeuGlu₉Pro - TrpAsn₁₂ [SEQ ID NO:13 的第 225-235 个氨基酸]和 GluProValAspProArg₇LeuGlu₉Pro - TrpLys₁₂ [SEQ ID NO:15 的第 2-12 个氨基酸]的非常缺乏的交叉反应性。该表还显示 Glu9 和 Asp9 变体的抗原区别。

10 表 VI——猴抗血清对具有 Tat 氨基酸位置 7、9 和 12 变化的检测肽上的表位 I 免疫原的 ELISA 反应性

免疫原表位序列	检测肽表位序列效价(对于自身肽的效价百分比)			
GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProArg, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProLys, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProSer, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂
SEQ ID NO: 12 的第 53-63 个氨基酸	SEQ ID NO: 12 的第 53-63 个氨基酸 119,000 (100)	SEQ ID NO: 15 的第 2-12 个氨基酸 25,000 (21)	SEQ ID NO: 12 的第 183- 193 个氨基酸 24,000 (20)	SEQ ID NO: 12 的第 105- 115 个氨基酸 24,000 (20)
GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpAsn ₁₂	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpAsn ₁₂	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProArg, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	
SEQ ID NO: 13 的第 225- 235 个氨基酸	SEQ ID NO: 13 的第 225- 235 个氨基酸 157,000 (100)	SEQ ID NO: 12 的第 53-63 个氨基酸 23,000 (15)	SEQ ID NO: 15 的第 2-12 个氨基酸 2000 (1)	
GluProVal AspProAsn LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProAsn, LeuGlu ₂ Pro TrpLys ₁₂	GluProVal AspProAsn, LeuAsp ₂ Pro TrpLys ₁₂		
SEQ ID NO: 12 的第 53-63 个氨基酸	SEQ ID NO: 12 的第 53-63 个氨基酸 163,000 (100)	[SEQ ID NO: 32] 6000 (4)		

实施例 2——与 HIV-1 Tat 蛋白中灵长类动物识别的表位 II 的抗体结合所必需的最小 Tat 蛋白氨基酸序列的免疫学研究、序列变化以及针对这些序列的抗血清的免疫学交叉反应性

- 5 采用与实施例 1 相同的方法，在猴子中结合的抗体的表位 II 范围内，测定 294 种 B 进化枝和 56 种非 B 进化枝 HIV-1 Tat 序列的氨基酸序列变化的发生率。结果列在表 VII 和 VIII 中。这两个表的第一行是共有共有序列。中间几行是在各位置上的 5% 以上序列(如果有多条序列的话)中发现的氨基酸的百分比发生率。各表的最后一行是总的发生率，包括在 5% 以上的序列(如果有多条序列的话)中产生的氨基酸。
- 10 氨基酸。Tat 位置 42 上的氨基酸变体在抗原性上是交叉反应的。

表 VII
表位 II——294 种 B 进化枝

Lys ₄₁	Gly ₄₂	Leu ₄₃	Gly ₄₄	Ile ₄₅	Ser ₄₆	Tyr ₄₇	Gly ₄₈	Arg ₄₉	Lys ₅₀
	Gly (72)								
	Ala (28)								
100%	100%	99%	99%	100%	98%	99%	100%	99%	100%

表 VIII

表位 II——56 种非 B 进化枝

Lys ₄₁	Gly ₄₂	Leu ₄₃	Gly ₄₄	Ile ₄₅	Ser ₄₆	Tyr ₄₇	Gly ₄₈	Arg ₄₉	Lys ₅₀
100%	100%	100%	99%	100%	95%	100%	100%	98%	100%

5 如表 VII 和 VIII 所揭示，表位 II 显示出几乎完整的抗原保守性。

测量针对检测肽内具有 Tat Gly₄₂ 或 Ala₄₂(变体)的检测肽上的表位 II 免疫原的猴抗血清的 ELISA 反应性，其结果列在表 IX 中。参见分别显示兔和猴的结果比较的图 2A 和 2B。

表 IX

免疫原表位序列	检测肽表位序列效价(对于自身肽的效价百分比)	
LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys	LysGlyLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys	LysAlaLeuGlyIleSerTyr GlyArgLys
SEQ ID NO:15 的第 41-50 个氨基酸	SEQ ID NO:15 的第 41-50 个氨基酸	[SEQ ID NO:33]
	25,000 (100%)	19,000 (76%)

10

实施例 3：用于无症状的 HIV-1 感染的人单克隆抗体治疗的发展

用适量的偶联于白喉类毒素载体蛋白的表位 II 免疫原 Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-酰胺[SEQ ID NO:34]免疫市售获得的抗体人源化的小鼠。在链霉抗生物素蛋白包被的平板上，用生物素-Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-OH [SEQ ID NO:35]筛选杂交瘤，选择具有亚毫微摩尔结合亲和力并且不与互补的受体结合的 IgG 单克隆抗体。在重组的 HIV-1 Tat 蛋白上确定特异性。

由于该单克隆抗体针对的是非自身的抗原，所以要考虑常规的临床前生产、纯化和安全性测试。人单克隆抗体在人中具有 20 天的半衰期，而在内部 CD3 上被广泛消耗的小鼠单克隆抗体 OKT3 则有 18 小时的半衰期。5mg OKT3 的日剂量在人中维持约 1 微克/ml 的低水平。因此，5mg 的抗-Tat 单克隆抗体的两周一次剂

5 量预计将足以维持类似的低水平，这个水平超过所估计的感染受试者中达到 1ng/ml 的 HIV-1 Tat 蛋白的最大循环水平的 50 倍克分子以上。

现在，对血浆病毒负荷的控制是 HIV-1 治疗功效的可接受标准。在无症状 HIV-1 感染受试者中易于测定抗-Tat 单克隆抗体的功效，这种测定最初要进行 4 周的疗程。这种方案可用于未治疗的患者、由于各种原因导致 HAART 方案失败

10 的患者，或者由 HAART 治疗控制的患者，这一治疗有 4 周的结束时间(如果 HAART 终止的话，病毒负荷将迅速回弹)。血浆病毒负荷减少了 2-3 个对数，从而减到 LOD(50 个病毒 RNA 拷贝/mL)以下，这一结果支持了使用单克隆抗体进行的单一

15 治疗法，这一结果是在很长的时间跨度内评估的。减少超过 1 个对数(90%)，但没有低于 LOD 的结果表明，可将单克隆抗体用作治疗成分。

15 实施例 4——预防患者向 AIDS 发展的普通疫苗的发展

A. 合成基因的构建

图 3A 阐述编码四种表位 I 多态的拷贝加上四种表位 II 的拷贝的合成基因，该表位 I 被用于检测兔的抗体应答，该合成基因在大肠杆菌中与大肠杆菌

20 DnaK(HSP70)表达为线性融合蛋白。当用表位特异性的兔抗血清在 ELISA 中测试这种表达的蛋白质时，测得它含有所有的抗原表位。但是，当用它们免疫兔或猴时，所有的表位 I 变体都是免疫源性的，而表位 II 不是。因此，表位 II 最佳用作偶联于适当的载体蛋白的合成肽共轭物。

图 3B 阐述构建一种新颖的八价合成基因，使其灵长类动物识别的表位 I 范

25 围内的多态性的基础上，按读框加到 8 种灵长类动物识别的表位 I 多态中：

R1-Asp-Pro-Arg-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 17]
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 19]
 R1-Asp-Pro-Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 22]
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 20]
 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 24]
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-R2 [SEQ ID NO: 21]
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 18] 和
 R1-Asp-Pro-Asn-Leu-Asp-Pro-Trp-Asn-R2 [SEQ ID NO: 23]

表位 I 序列被含有 Gly 和/或 Ser 残基的二肽间隔区分开。该基因如 W. P. C. Stemmer 等人, *Gene*, 164: 49(1995)中所述的那样装配。简言之, 有 20 个核苷酸(nt)重叠的顶链 60-聚体寡核苷酸(寡聚物)和底链寡聚物与两个端 50-聚体一起合成。使这
 5 些 60-聚体在杂交条件下一起培育, 并采用聚合酶链式反应(PCR)来填满该序列, 并使其扩增。然后加入端 50-聚体, 进行 PCR 完成装配, 并在琼脂糖凝胶上分离全长基因。测序该基因, 发现它在实际表位内具有正确的序列。通过消除稀有的变体 R1-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-R2[SEQ ID NO:24], 可构建类似的七价基因。

10 B. 融合蛋白的表达

然后用限制性酶切割上述基因, 并按读框将其插入含有白喉类毒素序列(HSP70)的合适的表达载体中。将该载体转染大肠杆菌, 分离表达该蛋白质的菌落。使分离的菌落生长, 并诱导其表达。鉴别从表达该融合蛋白的菌落中得到的蛋白质。采用常规的方法纯化所得蛋白质。

15 图 3C 阐述采用类似的技术任选地制备作为具有载体蛋白(如白喉类毒素)的合成肽的共轭物的单价表位 II 免疫原。

C. 评价表位在融合蛋白中正确表达及其诱导抗-Tat 抗体的功效的试验

如以上 A 节和 B 节所述, 将 Y₇ 是 Arg、Asn、Lys 或 Ser, X₉ 是 Glu 和 Z₁₂ 是 Lys 的的 4 种表位 I 变体和两种表位 II 变体构建为合成基因, 并使其表达为融合蛋白。为测定各表位是否在融合蛋白中表达为可被灵长类动物抗血清识别的形式, 采用常规的方法, 通过 ELISA 测试针对对应于表位 I 序列的合成肽而产生的
 20

灵长类动物抗血清。平板最初直接用该融合蛋白包被，然后将其暴露在 100 μ g/ml 的抗血清(如兔抗血清)溶液中，已知该抗血清与表位 I 和 II 反应。由各肽 32,000 以上的效价可看出，变体表位序列可以被针对相应的合成肽的抗体识别的构型表达。

- 5 为了评价多价免疫原的免疫源性，用融合蛋白的 IFA 溶液免疫猴。然后在表位 I 和 II 的合成肽上评价猴抗血清。产生了针对表位 I 变体的较大效价，即对 Y₇ 是 Arg、Z₁₂ 是 Lys 的表位 I 的效价为 28,000，对 Y₇ 是 Asn 和 Z₁₂ 是 Lys 的表位 I 的效价为 16,000，对 Y₇ 是 Lys 和 Z₁₂ 是 Lys 的表位 I 的效价为 37,000 效价，以及对 Y₇ 是 Ser 和 Z₁₂ 是 Lys 的表位 I 的效价为 4,000。针对表位 II 的效价为 700，表明这种表位最好是作为偶联于载体的合成肽用于免疫。
- 10

实施例 5：检测接种诱导产生的抗体的效价和特异性的方法和试剂盒

- 为了研究经本发明的疫苗免疫后诱导产生的抗体的效价和特异性，可采用一种检测方法。在这种检测的一个实施例中，使用实施例 1 所述的含有灵长类动物识别的表位 I 序列的肽(根据免疫用疫苗的组成)来开发测量接种的受试者中抗体的效价和反应性模式的试剂盒。
- 15

- 这些肽在其 N 末端与生物素-Ser-Gly-Ser-Gly-[SEQ ID NO:36]合成。各肽分别被包涂到抗生物素蛋白包被的平板上，以序列-Ser-Gly-Ser-Gly-[SEQ ID NO:27]为间隔区，以确保相关的肽序列外部紧靠抗生物素蛋白的生物素结合囊。然后使平板与测试血清的稀释液培育，洗涤，用针对人的免疫球蛋白的试剂(如山羊抗-人免疫球蛋白)直接用酶标记来测定抗体结合。使用一种试剂与该酶反应，产生比色信号(R & D 试剂盒插入)。
- 20

- 对本发明进行的大量修改和变动都包括在上述内容中，这些修改和变动对于本领域的熟练技术人员来说是显而易见的。对本发明的组合物和方法进行的这些修改和改动都包括在附带的权利要求的范围中。
- 25

<110> 西蒙有限公司 (Thymon L. L. C.)
G. 戈尔茨坦 (Goldstein, Gideon)

<120> 削弱 HIV-1 增殖的方法和组合物

<130> GGP3APCT

<150> US 09/561,366

<151> 2000-04-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<400> 2

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

<400> 3

Asp Pro Xaa Leu Glu Pro
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Val 可任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)
 <223> Pro 被任选地酰胺化

 <400> 4
 Val Asp Pro Xaa Leu Glu Pro
 1 5

 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> Lys 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa 可以是 Gly 或 Ala

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10).. (10)
 <223> Lys 被任选地酰胺化

 <400> 5
 Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> Arg 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa 可以是 Ala、Pro、Ser 或 Gln

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa 可以是 Pro 或 His

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa 可以是 Gln 或 Pro

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa 可以是 Asp、Asn、Gly 或 Ser

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7).. (7)
 <223> Ser 可被任选地酰胺化

<400> 6
 Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> Ser 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa 可以是 Asn 或 Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa 可以是 Ala 或 Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12).. (12)
 <223> Pro 被任选地酰胺化

<400> 7
 Ser Gln Xaa His Gln Xaa Ser Leu Ser Lys Gln Pro
 1 5 10

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa 可以是 Lys 或 Asn, 并可被任选地酰胺化

<400> 8
 Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
 1 5

<210> 9
 <211> 8

<212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa 可以是 Lys 或 Asn

 <400> 9
 Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
 1 5

 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa 可以是 Gly 或 Ala

 <400> 10
 Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 11
 Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5

 <210> 12
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> Glu 连接于 DnaK (HSP70)

 <400> 12
 Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val
 1 5 10 15

 Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg
 20 25 30

 Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro
 35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly
50 55 60

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro
65 70 75 80

Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu
100 105 110

Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys
115 120 125

Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu
130 135 140

Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp
145 150 155 160

Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu
165 170 175

Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp
180 185 190

Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser
195 200 205

Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu
210 215 220

Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser
225 230 235 240

Tyr Gly Arg Lys Ser Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg
245 250 255

Lys Ser Gly Ser
260

<210> 13

<211> 380

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Glu 连接于 DnaK(HSP70)

<400> 13

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val
1 5 10 15

Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg
20 25 30

Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro
35 40 45

Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly
50 55 60

Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro
 65 70 75 80
 Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
 85 90 95
 Asn Leu Glu Pro Trp Lys Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu
 115 120 125
 Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys
 130 135 140
 Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys Gly Ser Glu Pro Val Asp
 165 170 175
 Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu
 180 185 190
 Ala Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp
 195 200 205
 Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Ala Pro Trp Asn Gly Ser
 210 215 220
 Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val
 225 230 235 240
 Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn
 245 250 255
 Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro
 260 265 270
 Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly
 275 280 285
 Ser Glu Pro Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro
 290 295 300
 Val Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro
 305 310 315 320
 Ser Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu
 325 330 335
 Pro Trp Asn Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn
 340 345 350
 Gly Ser Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser Glu
 355 360 365
 Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn Gly Ser
 370 375 380

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Lys 被任选地酰胺化

<400> 20
 Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Lys
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Lys 被任选地酰胺化

<400> 21
 Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Lys
 1 5

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn 被任选地酰胺化

<400> 22
 Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Asn
 1 5

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn 被任选地酰胺化

<400> 23
Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Asp 任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Asn 任选地被酰胺化

<400> 24
Asp Pro Ser Leu Glu Pro Trp Asn
1 5

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys 可任选地被低级烷基或烷酰基修饰

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 可以是 Gly 或 Ala

<400> 25
Lys Xaa Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<400> 26
Asp Pro Asn Leu Xaa Pro Trp Asn
1 5

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<400> 27
Ser Gly Ser Gly
1

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 28
 Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Asn
 1 5

 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 29
 Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Asn
 1 5

 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 30
 Val Asp Pro Ser Leu Asp Pro Trp Asn
 1 5

 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 31
 Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys
 1 5

 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 32
 Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Asp Pro Trp Lys
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <400> 33
 Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> C 末端 Lys 被酰胺化

<400> 34
 Cys Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 生物素连接于 N 末端 Ser

<400> 35
 Ser Gly Ser Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10

<210> 36
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 生物素连接于 Ser

<400> 36
 Ser Gly Ser Gly
 1

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa 可以是 Lys 或 Asn, 并可被任选地酰胺化

<400> 37
 Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
 1 5

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 可以是 Arg、Lys、Ser 或 Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 可以是 Glu 或 Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 可以是 Lys 或 Asn, 并可被任选地酰胺化

<400> 38
 Xaa Pro Val Asp Pro Xaa Leu Xaa Pro Trp Xaa
 1 5 10

<210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒 1 型

<400> 39
 Gly Ser Gly Ser
 1

ELISA效价
(最高百分比)

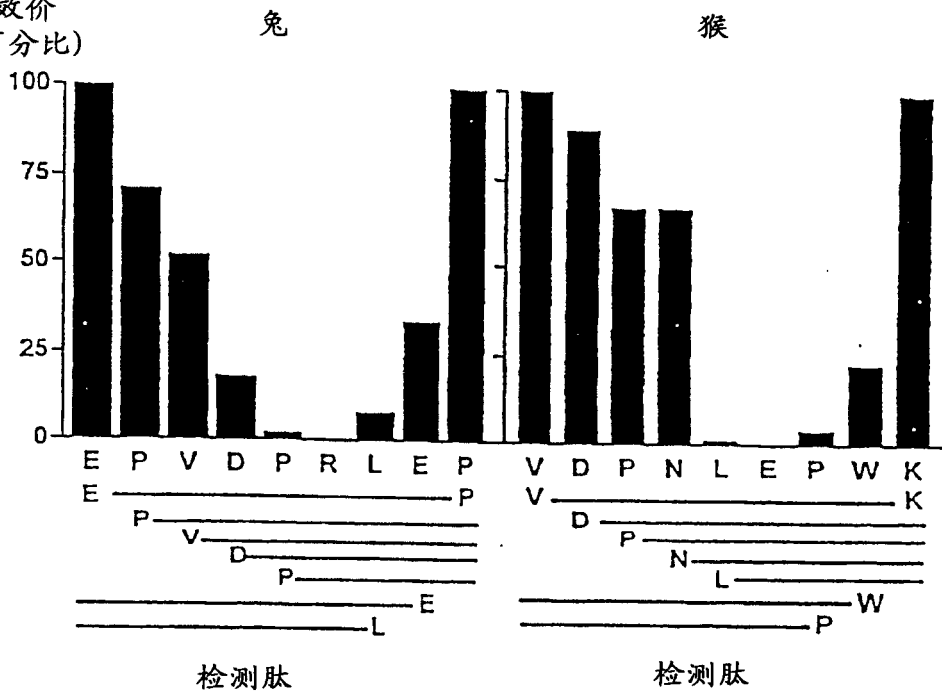


图 1A

图 1B

ELISA效价
(最高百分比)

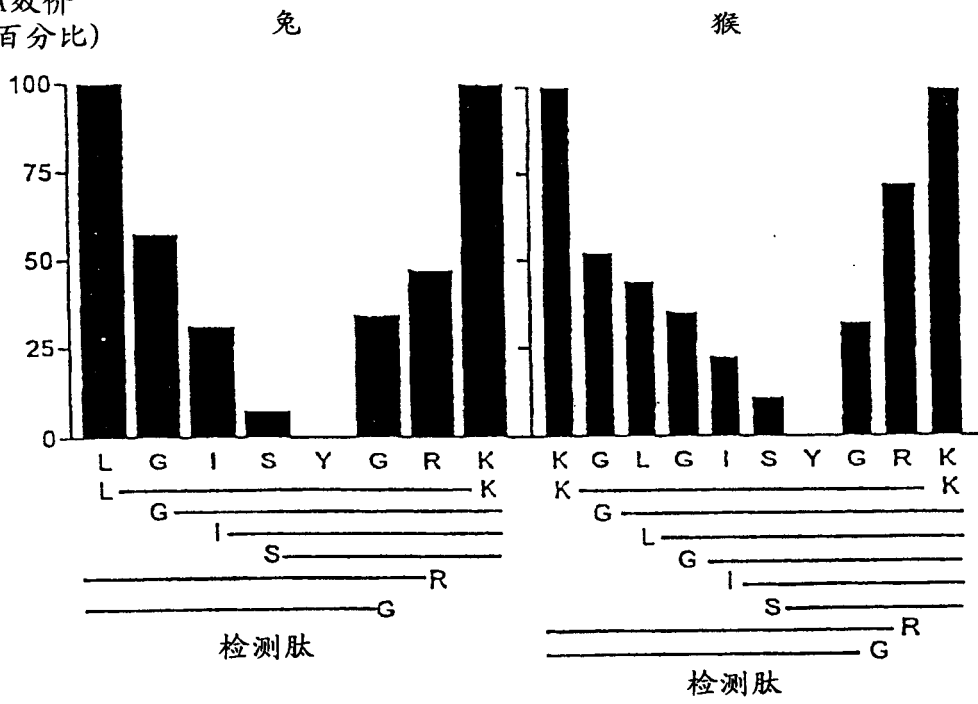


图 2A

图 2B

图 3A [SEQ ID NO: 12]

DnaK (HSP70)- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys-Ser-Gly-Ser)₄

图 3B [SEQ ID NO: 13]

DnaK (HSP70) - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Arg -Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Lys-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Asn -Leu-Ala-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄- (Glu-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Ser-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄ - (Glu-Pro-Val-Asp-Pro- Lys-Leu-Glu-Pro-Trp-Asn-Gly-Ser)₄

图 3C [SEQ ID NO: 14]

与 -Cys-Gly-Ser-Lys-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-

Arg-Lys- 酰胺偶联的白喉类毒素

专利名称(译)	削弱HIV - 1增殖的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1426306A	公开(公告)日	2003-06-25
申请号	CN01808761.2	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	西蒙有限公司		
申请(专利权)人(译)	西蒙有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西蒙有限公司		
[标]发明人	G·戈尔茨坦		
发明人	G·戈尔茨坦		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/18 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/16 C07K16/08 C07K16/10 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 A61K38/04 A61K39/12 A61K39/21 C07K16/00 C07K17/00 C07K5/00 C07K7/00		
CPC分类号	C07K16/1045 C07K2317/34 A61K2039/6037 G01N2333/163 C07K7/06 G01N2469/20 C07K2317/21 C07K16/1072 A61K38/08 C12N2740/16322 A61K2039/505 A61K2039/6043 A61K39/00 C07K14/005 G01N33/56988		
代理人(译)	徐迅		
优先权	09/561366 2000-04-28 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种组合物，该组合物引起针对B进化枝和非B进化枝的HIV - 1Tat蛋白的大多数(如95%以上)已知变体的抗体，它含有式R1 - Asp - Pro - Y7 - Leu - X9 - Pro - Trp - Z12 - R2[SEQ ID NO : 8]的表位I的肽或多肽的至少两种变体。根据此式子，Y7是Arg、Lys、Ser或Asn；X9是Glu或Asp；Z12是Lys或Asn；R1是氢、低级烷基、低级烷酰基，和任选地被低级烷基或低级烷酰基取代的长1个到约5个氨基酸的序列；R2是游离羟基、酰胺，和任选地被酰胺取代的1个或约5个以内的额外的氨基酸的序列。在此组合物中，两种变体中至少有一种其Y7是Arg、Z12是Lys，另一种的Y7是Asn、Z12是Asn。疫苗组合物和药物组合物可含有一种或多种与载体蛋白结合、结合于多抗原肽中或者作为重组蛋白质的一部分的这种肽。除了这种组合外的其它任选免疫原可提供用于引起灵长类动物抗 - Tat抗体的其它组合物，所述抗体与多种菌株和HIV - 1 Tat蛋白的变体发生交叉反应。疫苗组合物和药物组合物可含有被动治疗中使用的肽组合物诱导产生的灵长类动物抗体。描述了诊断组合物及其在评估接种患者的免疫状态中的用途。

