

[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 200910140941.4

[51] Int. Cl.

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101628933A

[22] 申请日 2001.9.3

[21] 申请号 200910140941.4

分案原申请号 01815739.4

[30] 优先权

[32] 2000.9.4 [33] NO [31] 20004412

[71] 申请人 比奥诺尔免疫有限公司

地址 挪威希恩

[72] 发明人 B·索伦森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 罗菊华

权利要求书1页 说明书46页

[54] 发明名称

来自 Tat、Rev 和 Nef 保守区的 HIV 肽以及它们作为例如疫苗组分的应用

[57] 摘要

本发明涉及来自 Tat、Rev 和 Nef 保守区的 HIV 肽以及它们作为例如疫苗组分的应用。具体地，本发明涉及能够诱导 HIV - 1 特异性免疫反应的新的修饰的肽，而不对抗细胞毒性 T - 细胞的活性，从而得到对抗 HIV 的有效的预防性和治疗性疫苗。该肽是基于 HIV 的 Tat 和 Rev (即调节性蛋白质) 和 Nef (即辅助蛋白质) 的保守区域的。描述了包含至少一种所说的肽的自由或载体结合形式的抗原、包含至少一种抗原的疫苗组合物、免疫测定试剂盒和用此类抗原探测由 HIV 或 HIV 特异性肽诱导的抗体的方法。

1. 一种肽，特征在于它包含氨基酸序列：

Phe Val Ile His Arg Leu Glu Pro Trp Leu His Pro Gly Ser
Gln His Nle Thr Ala Ser Thr Asn (SEQ ID NO: 14)，

该序列的末端可为自由羧基或氨基基团、酰胺、酰基、乙酰基或它们的盐，

两个或多个 Cys 残基可形成链内或链间二硫键的部分，即其中的 $p=1-8$ 的 $-S-(CH_2)_p-S-$ 或 $-(CH_2)_p-$ 桥，可选择地有一个或多个杂原子如 O、N 和 S 介入，和/或所说的肽被固定于固体支持体上。

2. 用于诱导免疫应答的组合物，特征在于它包含根据权利要求 1 的肽和药学上可接受的稀释剂，也可选择地包含佐剂、载体和/或媒介物以及额外的免疫刺激化合物。

3. 根据权利要求 2 的组合物，特征在于它包含 SEQ ID NO: 14 的肽。

4. 根据权利要求 2 或 3 的组合物，特征在于肽是溶解于无菌水溶液的且所述可选择的免疫刺激化合物是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

5. 根据权利要求 2-4 任一项的组合物，特征在于该组合物包含选自单磷酰脂 A (MPL[®])、弗氏完全或不完全佐剂或氢氧化铝的佐剂。

6. 组合物，特征在于根据权利要求 1 的肽是作为脂肽和/或脂质体制剂而制备的。

7. 一种在体液样品中检测由 HIV 或 HIV 特异性肽或蛋白质诱导的抗体的方法，特征在于对所说的样品进行免疫测定，其中所述肽选自权利要求 1 的肽。

8. 在体液样品中检测由 HIV 或 HIV 特异性肽或蛋白质诱导的抗体的免疫测定试剂盒，特征在于该诊断肽是权利要求 1 的肽。

来自 Tat、Rev 和 Nef 保守区的 HIV 肽
以及它们作为例如疫苗组分的应用

本申请是申请日为 2001 年 9 月 3 日、发明名称为“来自 Tat、Rev 和 Nef 保守区的 HIV 肽以及它们作为例如疫苗组分的应用”、申请号为“01815739.4”的分案申请。

本发明涉及基于调节性和辅助性 HIV 蛋白质的保守区域的新肽、自由或载体结合形式的包含至少一种所说的肽的抗原、包含至少一种抗原的疫苗、免疫测定试剂盒和用该抗原探测由人免疫缺陷病毒 (HIV) 或 HIV 特异性肽诱导的抗体的方法。

背景

获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 的病原体 1 型人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 在发展中国家里持续提出了难以应付的挑战。在西方国家里, 针对 HIV-1 复制和成熟的治疗策略已经对疾病的发展产生了显著的效果。然而, 目前治疗的高成本、药品的高毒性和很少的痊愈意味着安全有效的疫苗的发展对控制 AIDS 的大范围流行仍然是极为重要的。

HIV-1 是编码六个在简单反转录病毒中没有发现的调节和辅助基因的复杂反转录病毒, 该基因即 *tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr* 和 *vpu* (表 1)。在真核细胞中, 只有完全剪接的 mRNAs 被输出到细胞质中进行翻译。未剪接或部分剪接的 RNAs 在细胞核中保留并最终被降解。这样, 由衍生自多重剪接的 RNA 类的 *tat*、*rev* 和 *nef* 基因编码的蛋白质 (称为 Tat、Rev 和 Nef) 首先被表达并组成早期的 HIV-1 基因表达。为了表达单独地剪接的 RNAs 并也为了将未剪接的全长 RNA 基因组转运入细胞质进行包装, HIV-1 发展了克服对 RNA 转运限制的方法。调节蛋白质 Tat 和 Rev 对 HIV-1 复制是基本的, 因为这些蛋白质中的突变除去了 HIV-1 的生产 (Dayton A. I. 等人 (1986) *Cell*, 44: 941-947 和 Fisher, A. G. 等人 (1986) *Nature*, 320:

367-371)。

辅助基因是衍生自完全位于 HIV-1 包膜基因上游的外显子的, 如 *vif*, 或衍生自位于 *env* 上游也在其中但在不同读框中的外显子的, 如 *tat*、*rev*。剪接的效率部分地调节了不同辅助蛋白质基因表达的水平。

在 HIV-1 原病毒 DNA 整合后, 由细胞的 RNA 聚合酶 II 合成了 mRNA 的占优势的截短的形式, 该 RNA 聚合酶 II 与位于原病毒 DNA 长末端重复 (LTR) 的 5'位点相互作用。*tat* 是首先被表达的基因之一, 它携带核定位信号。它是可使 LTR-指导的转录增强高达一千倍的有效转录激活物。Tat 的持续表达为持续的高水平基因表达提供了正反馈回路的保证。不同于与 DNA 序列相互作用的常规转录激活物, Tat 在特定的茎-环二级结构即 TAR (反式激活反应元件) 上直接结合到所有 HIV-1 RNAs 的 5'末端。环的结构对 Tat 的功能是高度保守的和基本的。已经用核磁共振 (NMR) 分析了 Tat/TAR 相互作用的结构 (Puglisi 等人 (1992) *Science*, 257: 76-80)。Tat 结合与细胞蛋白质 (细胞周期蛋白 T) 有关联的 TAR, 它依次再结合使 RNA 聚合酶 II 的 C-末端结构域磷酸化的 CDK9, 从而促进 RNA 转录物的延长。这些 Tat 的细胞辅因子只在激活的细胞中存在, 它们的缺乏抑制了原病毒 DNA 的转录, 导致 T-淋巴细胞中的“准潜伏期”。Tat 是从两个外显子表达的, 核定位信号和 TAR 结合区域两者都位于第一个外显子中。Tat 是由感染的细胞分泌的, 且可以对相邻细胞发挥异源的作用。这包括细胞激活 (Hofman 等人 (1993) *Blood*, 82: 2774-2780)、细胞凋亡的诱导 (Macho 等人 (1999) *Oncogene*, 18: 7543-7551)、发挥分泌型生长因子的功能 (Trinh, D.P. 等人 (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256: 299-306) 和调制宿主细胞蛋白质合成以有利于病毒的蛋白质合成 (Xiao 等人 (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244: 384-389, 1998)。目标为 Tat 的治疗策略因此对 HIV-1 感染具有强烈的效果。

在感染后的早期中, 编码 Tat、Rev 和 Nef 的小的多重剪接的

mRNAs 占优势。当产生了 Rev 的阈水平时，未剪接的和单独地剪接的 RNAs 在细胞质中积累以进行翻译，使得生产性的感染得以进行。缺乏生成 Rev 的该阈水平可能有助于 HIV 的准潜伏期。Rev 只可以结合到携带有 RNA 结构—RRE (Rev 反应元件) 的 RNAs 上，该 RRE 位于基因组的 *env* 编码区域。Rev 与 RRE 通过在蛋白质的氨基酸末端一半的富碱性精氨酸区域以多聚体方式相互作用。该相互作用的结果是可提供例如 Env、Vif、Vpu 和 Vpr 的基因产物的部分剪接的 RNAs 的转运以及可充当新基因组以整合入装配颗粒的未剪接的 RNAs 的转运。利用 NMR 也完成了对 Rev/RRE 相互作用的结构分析 (Battiste 等人 (1996) *Science*, 273: 1547-1551, 1996)。Rev 携带有富亮氨酸输出信号，使得它可以为了新合成的 RNAs 的继续的转运而在细胞核和细胞质之间穿梭往返 (Kalland 等人 (1994) *J. Virol.*, 68: 1475-1485; Meyer & Malim, (1994) *Genes Dev.*, 8: 1538-1547)。这样，Rev 确保结构基因是在调节基因之后晚期表达的。对抗 Rev 的治疗策略将在感染早期打断病毒的生活周期。

尽管最初 Nef 被描述为负因子，后来显示它对病毒的复制具有正作用，且它在感染的早期和贯穿始终都以比 Tat 和 Rev 更大的量表达。Nef 在 N 末端十四烷基化且与质膜的内侧面有关联。Nef 是通过胞吞作用造成表面 CD4 减量调节和降解的部分原因 (Piguet 等人 (1998) *EMBO J.*, 17: 2472-2481)。将 CD4 从细胞表面去除可防止其他 HIV-1 菌株的超感染或新释放的病毒的再感染。Nef 也是造成 MHC 类型 I 减量调节的原因，从而防止受感染的细胞被细胞毒性 T-淋巴细胞破坏 (Le Gall 等人 (1997) *Res. Virol.*, 148: 43-47)。Nef 不是基本的病毒蛋白质，因为它对于外周血淋巴细胞或 T 细胞系的体外感染不是必需的。然而，Nef 缺失突变体在很长的时期里是较小致病性的。Nef 也对细胞内的信号转导途径具有复杂的作用，且它含有可与在 T-细胞激活中涉及的激酶的 SH3 结构域相互作用的富脯氨酸的区域，这是有效的 HIV 复制所必需的特征 (Moarefi 等人 (1997) *Nature*, 385: 650-653)。含有 Nef 的病毒能够有比缺失

Nef 基因的病毒 DNA 合成，这暗示 Nef 直接或间接地激活病毒的逆转录酶。与病毒体有关联的低水平的 Nef 可能是造成该现象的原因。低水平的 Nef 也是从受感染的细胞中释放的，尽管对相邻细胞的潜在作用还不清楚。由于 Nef 是在感染的早期表达的且对 CD4 和 MHC 类型 I 的表达以及疾病的进行有显著的作用，因此它代表了将来治疗策略的重要目标。

Tat 和 Nef 是分泌的并可被巨噬细胞吸收，且与 MHC 类型 II 有关联地表达。这改进了它们作为基于肽的治疗的目标的适宜性，其中的肽也要在 MHC 类型 II 的环境中表达。明显地，除了也在早期表达且影响疾病进行的 Nef 之外，也应该优先把对于 HIV-1 的复制是基本的早期基因产物如 Tat 和 Rev 作为目标。

表 1 HIV-1 调节和辅助蛋白质。

基因	蛋白质	名称	表达	定位 (localisation)	功能
<i>Tat</i>	Tat	病毒转录的转录激活物	早期	细胞核	激活病毒转录。从受感染的细胞分泌，在那里它可以激活 T-细胞，诱导细胞凋亡并发挥生长因子的功能
<i>Rev</i>	Rev	细胞核 RNA 输出因子	早期	核仁、核质、细胞质	调节剪接/RNA 到细胞质的转运。穿梭蛋白质。
<i>Nef</i>	Nef	多种效应物功能	早期	细胞质、膜关联的、病毒体	触发 CD4 的胞吞作用。减量调节 MHC 类型 I 的表达。结合到激酶上并可影响 T-细胞的信号转导和激活。
<i>Vpu</i>	Vpu	病毒蛋白质 u	晚期	细胞质、膜关联的	触发细胞内 CD4 的降解，减量调节 MHC 类型 I、逆转录病毒颗粒释放的非特异性启动子
<i>Vif</i>	Vif	病毒感染性因子	晚期	细胞质、膜、病毒体	以细胞依赖性方式增强病毒颗粒的感染性。在逆转录中改进病毒 DNA 的合成。
<i>Vpr</i>	Vpr	病毒蛋白质 r	晚期	主要为细胞核，病毒体	有助于前整合复合体的细胞核转入。在细胞周期的 G2/M 期阻止细胞。

在疫苗候选物中的天然的 HIV 序列不能够刺激稳定的长期免疫反应，这是由于 HIV 通过改变递呈给免疫系统的抗原决定部位的外观而

隐藏的固有能力。为了克服抗原决定部位的这种变化的递呈，某些氨基酸替代物和氨基酸组合将支持免疫系统以可靠的方式递呈和识别外源的病毒抗原并因而达到更高的程度。

基于上述背景，我们决定研究设计新型合成肽的可能性，这些肽可以模仿来自调节性和辅助性的 HIV 蛋白质的抗原决定部位，以使得它们可以暴露在免疫系统的体液和细胞两部分，以满足有效的治疗性的和/或预防性的疫苗的需要。

最初的工作是基于天然的 Tat 氨基酸序列的，该序列发表在 Korber B. 等人，《人逆转录病毒和 AIDS》(Human Retroviruses and AIDS) 1997 Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. 第一个 Tat 抗原决定部位定位于 tat 蛋白质的氨基酸 1 和氨基酸 24 之间：

表 2 Tat 抗原决定部位

氨基酸序号	天然出现的氨基酸							
1	M	S						
2	E	D	V					
3	S	Q	P	L	V	A		
4	V	I						
5	D	N						
6	P	H	A					
7	R	N	S	K	E	D		
8	L	I	Q	R	V	M	T	
9	E	D	P					
10	P	S						
11	W							
12	K	N	E	H	L			
13	H	R	Q					
14	P							
15	G	P						
16	S	N	A					
17	Q	K	T					
18	P	H						
19	K	T	S	A	R	P	E	Q
20	T	A	I					
21	A	P	D	V				
22	C	S						
23	T	N	S					
24	N	K	R	Q	A	P	T	

在本说明书中给出的序列中表示氨基酸的单字母以及三字母代号是与国际标准相一致的，并且也在教科书中给出，例如 Lehninger A.L., 《生物化学原理 (Principles of Biochemistry)》，Worth Publishers Inc., New York, 1982. 在左侧栏的右边给出的氨基酸代表序列的天然的变型。我们的分析结果得到了含有该修饰的抗原决定部位的序列：

```
CSWVNPRLEPWLHPGSQP NITACTN
|_____
```

其中的 N1 表示 2-氨基己酸（正亮氨酸，三字母和单字母分别缩写为 Nle 和 N1），半胱氨酸残基是氧化态的，即形成了链内二硫键。由于肽的 C-末端部分（在位置 22）的半胱氨酸残基是在该选择的抗原决定部位外部的分子内二硫键的一部分，因此相似的肽内二硫键是通过在选择的抗原决定部位的 N-末端放置半胱氨酸而形成的。另一种可供选择的办法是通过序列的二聚化而形成分子间二硫键：

```
WVNPRLEPWLHPGSQP NITACTN
|
WVNPRLEPWLHPGSQP NITACTN
```

进一步可供选择的办法是与选自 Tat 的另一个抗原决定部位二聚化。Tat 上的第二个抗原决定部位位于 C-末端方向的氨基酸 35 和 57 之间，与第一个抗原决定部位由 10 个氨基酸分隔，这 10 个氨基酸除每个抗原决定部位中的 Cys 残基之外还含有 5 个 Cys 残基。相对高的 Cys 残基的数目提供了各种分子间和分子内交联的可能性。很可能该富 Cys 的结构域将支配这种蛋白质的免疫学暴露并因此导致两个相关抗原决定部位的“隐藏”。两个接近的抗原决定部位的选择和修饰可以更优化的方式暴露 Tat 蛋白质的基本部分。

为了减少脱逸突变型发展的概率，进一步增加了抗原决定部位的数目，并且选择了两个额外的肽序列。这些序列位于 Rev（残基 58-78）和 Nef（残基 65-85）。天然的序列已经发表在《人逆转录病毒

和 AIDS》(Human Retroviruses and AIDS) 1999; 核酸和氨基酸序列的汇集和分析 (A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences) Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos.

表 3 Tat 抗原决定部位

氨基酸序号	天然出现的氨基酸
35	Q P I L T Y V
36	V A C L
37	C
38	F
39	I L Q M T
40	T N K R
41	K Q
42	G A
43	L
44	G S
45	I
46	S F Y
47	Y N
48	G
49	R K S
50	K
51	K
52	R
53	R K S G
54	Q R P
55	R
56	R
57	R G S

表 4 Rev 抗原决定部位:

氨基酸序号	天然出现的氨基酸								
58	R	W	Q						
59	I	V	L	F					
60	L	I	P						
61	G	S	N	D	C	V	T	A	R
62	T	A	D	N	S				
63	Y	C	F	R	H	S	V	L	
64	L	V							
65	G	H							
66	R	G							
67	S	P	F	L					
68	A	T	E	Q	V	P	S		
69	E	K	Q	D	N				
70	P	S	A	N					
71	V	N	G	P					
72	P	Q	H	S	L	R	T	D	I
73	L	F	V						
74	Q	L	P	H	D	E			
75	L								
76	P								
77	P	L	E						
78	L	I	V	P					

以及

Nef 抗原决定部位, 表 5:

氨基酸序号	天然出现的氨基酸			
65	E	G	D	S
66	N	G	D	E
67	E	V		
68	A	G		
69	L	F		
70	P			
71	I	V		
72	T	R	K	A M
73	P			
74	Q	H		
75	V	L	I	
76	P			
77	L	V	T	
78	R			
79	P			
80	M	V	I	
81	T	D		
82	Y	F	R	
83	K	R		
84	A	G	S	E Q
85	A	S	V	

为了确定序列的唯一性以及它们与其作为 HIV-1 抗原的特异性和

敏感性相结合的刺激免疫系统的性质，已经合成了几个修饰的肽。

发明描述

根据本发明的肽是来源于上述的 HIV-1 的 Tat、Rev 和 Nef 蛋白质的 4 个不同的保守区域的，具有维持 HIV-1 的抗原决定部位的唯一性（免疫原性、敏感性和特异性）的性质。进一步地，根据本发明的新肽不具有已知的细胞毒性 T-淋巴细胞（CTL）拮抗效应并应该具有至少一个潜在的 CTL 抗原决定部位。

根据本发明，满足上述标准的肽选自：

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Leu Glu Pro Trp Xaa₁₂ His Pro Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇
Xaa₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ Xaa₂₄ (SEQ ID NO : 1)

其中链中的氨基酸可具有如下的含义：

肽衍生物 1 位的 Xaa 是 Met、Ser、Cys 或没有，

2 位的 Xaa 是 Glu、Asp、Val、Ser 或没有

3 位的 Xaa 是 Ser、Gln、Pro、Leu、Val、Ala、Trp、Tyr 或 Phe,

4 位的 Xaa 是 Val 或 Ile,

5 位的 Xaa 是 Asp、Asn 或 Ile,

6 位的 Xaa 是 Pro、His 或 Ala,

7 位的 Xaa 是 Arg、Asn、Ser、Lys、Glu 或 Asp

12 位的 Xaa 是 Leu、Ile 或 Nle

15 位的 Xaa 是 Gly 或 Pro

16 位的 Xaa 是 Ser、Asn 或 Ala,

17 位的 Xaa 是 Gln、Lys 或 Thr

18 位的 Xaa 是 Pro 或 His,

19 位的 Xaa 是 Lys、Thr、Ser、Ala、Arg、Pro、Glu、Leu、Ile

或 Nle

20 位的 Xaa 是 Thr、Ala 或 Ile

21 位的 Xaa 是 Ala、Pro、Asp 或 Val

22 位的 Xaa 是 Cys 或 Ser

23 位的 Xaa 是 Thr、Asn 或 Ser

24 位的 Xaa 是 Asn、Lys、Arg、Gln、Ala、Pro 或 Thr

该肽包含 SEQ ID NO: 1 序列的至少 6 个连续的氨基酸, 此外两个或多个 Cys 残基可形成部分链内或链间二硫键连接, 即其中 p=1-8 的-S-(CH₂)_p-S-或-(CH₂)_p-桥, 可选择地由一个或多个杂原子如 O、N 或 S 介入;

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Phe Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ -Z- Tyr Xaa_i Gly
Xaa₁₅ Lys Lys Arg Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃ (SEQ ID NO : 4)

其中链中的氨基酸可具有如下的含义:

1 位的 Xaa 是 Pro、Ile、Leu、Thr、Tyr 或 Val

2 位的 Xaa 是 Val、Ala、Cys、Leu

3 位的 Xaa 是 Cys、Ile、Leu、Val 或 Nle

5 位的 Xaa 是 Ile、Leu、Gln、Met 或 Thr

6 位的 Xaa 是 Thr、Asn、Lys 或 Arg

7 位的 Xaa 是 Lys、Arg 或 Gln

8 位的 Xaa 是 Gly 或 Ala

9 位的 Xaa 是 Leu 或 Ile

10 位的 Xaa 是 Gly、Ser 或 Ala

11 位的 Xaa 是 Ile 或 Gly

12 位的 Xaa 是 Ser、Phe 或 Tyr

在 14 位前插入的 Xaa_i 是 Leu、Ile、Nle

15 位的 Xaa 是 Arg、Lys、Ser 或瓜氨酸 (Cit)

19 位的 Xaa 是 Arg、Lys、Ser、Gly 或 Cit

20 位的 Xaa 是 Gln、Arg 或 Pro

21 位的 Xaa 是 Ile 或 Leu

22 位的 Xaa 是 Gly、Leu、Ile、Cys 或没有

23 位的 Xaa 是 Gly 或没有

其中 SEQ ID NO: 4 的序列包含至少 6 个连续的氨基酸, -Z-为可选择的连接体并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或[Gly]_n 的含义, 其中 n=1、2 或 3, 此外两个或多个 Cys 残基可形成部分链内或链间二硫键连接, 即其中 p=1-8 的-S-(CH₂)_p-S-或-(CH₂)_p-桥, 可选择地由一个或多个杂原子如 O、N 或 S 介入;

Xaa₁ Ile Leu Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Leu Gly Arg Xaa₁₀ Xaa₁₁ -Z- Xaa₁₂ Leu Xaa_iXaa_jXaa₁₄
Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Xaa₁₈ Xaa₁₉ Leu Pro Pro Leu (SEQ ID NO : 7)

其中 1 位的 Xaa 是 Phe、Tyr、Trp 或 Arg

4 位的 Xaa 是 Gly、Ser、Asn、Asp、Cys、Val、Thr、Ala 或 Arg

5 位的 Xaa 是 Thr、Ala、Asp、Asn 或 Ser

6 位的 Xaa 是 Tyr、Cys、Phe、Arg、His、Ser、Val 或 Leu

10 位的 Xaa 是 Ser、Pro、Phe、Leu 或 Ile

11 位的 Xaa 是 Ala、Thr、Glu、Gln、Val、Pro 或 Ser

12 位的 Xaa 是 Glu、Lys、Gln、Asp、Asn、Tyr、Trp 或 Phe

在 13 位后插入的 Xaa_i 是 Ser、Pro、Phe、Leu 或 Ile

在 14 位前插入的 Xaa_i 是 Ala、Thr、Glu、Gln、Val、Pro 或 Ser

14 位的 Xaa 是 Glu、Lys、Gln、Asp 或 Asn

15 位的 Xaa 是 Pro、Ser、Ala 或 Asn

16 位的 Xaa 是 Val、Asn、Gly 或 Pro

17 位的 Xaa 是 Pro、Gln、His、Ser、Leu、Arg、Thr、Asp 或 Ile

18 位的 Xaa 是 Leu、Phe 或 Val

19 位的 Xaa 是 Gln、Leu、Pro、His、Asp 或 Glu

其中 SEQ ID NO: 7 的序列由至少 6 个连续的氨基酸组成，连接体-Z-是可选择的并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或[Gly]_n的含义，其中 n=1、2 或 3；

Xaa₁ Leu Val Gly Xaa₅ Pro Xaa₇Xaa₈ Pro Xaa₁₀ Xaa₁₁ Pro -Z-[Arg]_m Xaa_iXaa₁₃ Xaa₁₄
Pro Xaa₁₆ Xaa₁₇ Xaa₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀Xaa₂₁ (SEQ ID NO : 10)

其中 1 位的 Xaa 是 Lys 或 Arg

5 位的 Xaa 是 Phe 或 Leu

7 位的 Xaa 是 Ile 或 Val

8 位的 Xaa 是 Thr、Arg、Lys、Ala 或 Met

10 位的 Xaa 是 Gln 或 His

11 位的 Xaa 是 Val、Leu 或 Ile

在 13 位前插入的 Xaa_i 是 Leu

13 位的 Xaa 是 Leu、Val 或 Thr

14 位的 Xaa 是 Arg 或瓜氨酸 (Cit)

16 位的 Xaa 是 Met、Val、Ile 或 Nle、Leu

17 位的 Xaa 是 Thr 或 Asp

18 位的 Xaa 是 Tyr、Phe 或 Arg

19 位的 Xaa 是 Lys 或 Arg

20 位的 Xaa 是 Ala、Gly、Ser、Glu 或 Gln

21 位的 Xaa 是 Ala、Ser 或 Val

其中 SEQ ID NO: 10 的序列由至少 6 个连续的氨基酸组成，连接体-Z-是可选择的并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或[Gly]_n的含义，其中 n=1、2 或 3，且独立于 n，[Arg]_m中的 m=0、1、2 或 3，序列的末端可为游离羧基或氨基基团、酰胺、酰基、乙酰基或其盐类，和/或所说的肽序列是固定在固体支持物上的。

新肽的序列具有充当好的抗原的潜力，其中该抗原包含至少一种选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 10 的序列的肽。可以通过以如二聚化或多聚化和/或固定到固相上来调整不同肽的比率或浓度或肽的大小以改变抗原性。根据本发明，抗原包含一个或多个多肽序列，它们或者通过如位于链中 Cys 残基之间的二硫键或可能由一种或多种杂原子如 O、S 或 N 介入的 C₁-C₈ 的亚烷基 (alkylen) 的键来连接，或者优选地它们是不连接的。该键可被以单聚体、二聚体或寡聚体的形式固定到固相上。可将额外的氨基酸添加到末端以获得促进固定化的《臂》。

PEG 是聚乙二醇 (HO (CH₂CH₂O)_aH 且可以是连接体-Z-的部分，可选择地，在连接之前用二羧酸 (HO (CH₂CH₂O)_aCO (CH₂)_bCOOH) 或末端羧基 (HO (CH₂CH₂O)_{a-1}CH₂COOH) 对 PEG 进行修饰，其中 a=1-10, b=2-6。

连接体-Z-可或者由 PEG、修饰的 PEG 或其组合组成，和/或由一种或多种结合的 Gly 残基组成。可作为选择地，连接体-Z-可由 Gly-桥 [Gly]_n 组成，其中 n=1、2 或 3。

本发明中肽的所有氨基酸均可为 D-或 L-型的，尽管优选的是天然的 L-型。

经过修饰末端 NH₂-基团和/或 COOH-基团，肽序列的 C-和 N-末端可以与天然序列不同，它们可被进行如酰基化、乙酰基化、酰胺化或修饰以提供载体或其他分子的结合位点。

根据本发明的肽由 6 到 50 个氨基酸组成，优选地为 10 到 30 个氨基酸之间。它们包括了氨基酸在鉴定了的位置的所有天然变型。

根据本发明的多肽抗原是游离或载体结合型的。肽可选择地结合的载体或固相可选自大量已知的载体。它们应该是根据固定的多肽作为诊断抗原或疫苗中的免疫成分的计划用途而选择的。

可被用作如诊断目的的载体例子是共聚物的磁珠或胶乳如苯乙烯-二乙烯苯、羟基化的苯乙烯-二乙烯苯、聚苯乙烯、羧基化的聚苯乙烯、炭黑珠、非激活的或聚苯乙烯或聚氯乙烯激活的玻璃、环氧激

活的多孔的磁性玻璃、明胶或多糖颗粒或其他蛋白质颗粒、血红细胞、单克隆或多克隆抗体或这样的抗体的 fab 片段。

根据本发明的进一步的实施方案，抗原可构成疫苗的部分，该疫苗可能与载体、佐剂结合或与其他免疫刺激元件如携带有 *env* 基因的金丝雀痘病毒 (canarypox virus) 结合。用于疫苗目的的载体和/或佐剂的例子是其他蛋白质，例如人或牛的血清白蛋白和匙孔血蓝蛋白和脂肪酸。可将免疫刺激材料分为三组：佐剂、抗原的载体和媒介物。佐剂的实施例包括氢氧化铝 (aluminum hydroxyd)、铝盐、皂苷、胞壁酰二肽和三肽、单磷脂脂 A、棕榈酸、*B. pertussis* 和包括 Th1 细胞因子 IL-12 和 IL-1 的各种细胞因子。许多蛋白质毒素可被用于携带过客 (passenger) 蛋白质跨细胞膜进入细胞溶胶，该蛋白质在发展 CTL 疫苗中是有用的。载体包括细菌类毒素，例如失活的破伤风和霍乱毒素、遗传上去毒的细菌毒素如来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的热不稳定性的肠毒素、脂肪酸、活的载体如形成例如酵母反转录转座子杂合体 TY 颗粒和 HBcAg 颗粒的微粒的脊髓灰质炎嵌合和杂交蛋白质。在现代疫苗中经常出现的成分媒介物由矿物油乳剂、弗氏完全和不完全佐剂、植物油乳剂、非离子型嵌段共聚物表面活性剂、角鲨烯或角鲨烷、脂肽、脂质体和生物降解性微球组成。具有发展新疫苗的重要潜力的两个新佐剂包括水包油微乳状液 (MF59) 和多聚体微颗粒。可以用到任何可以增强抗原的免疫原性的物质，且几个载体或佐剂的此外的替代物在美国或欧洲药典中给出。

用于免疫刺激用途的抗原的适当的制剂也可包含干扰素如 INF- γ 、抗病毒的趋化因子或生血生长因子例如粒细胞巨噬细胞生长因子。

为了增强如肠内的刺激和吸收的另一种方法是与小肽如二、三或四肽一起给予本发明的肽。这些肽可在加于本发明的肽之后或与其组合给予。优选地，这些肽是与三肽 YGG 一起给予的，由 D-或 L-型的氨基酸组成，优选地为 D-型。

最近的对非肠胃外的疫苗递送例如通过粘膜层的方法包括基因融

合技术以创建粘膜佐剂的非毒性衍生物、在基本基因有缺失的遗传上失活的抗原、抗原和在粘膜的免疫反应的调节和控制中重要的特异性细胞因子的共表达，以及本身允许 DNA 或 RNA 摄入及在宿主细胞中的内源表达的遗传材料。

发展持久的反应（其中细胞介导的免疫是必需的）的一个方法是用编码一种或多种特异性抗原的质粒 DNA 来进行免疫。

为了保护免受 HIV 感染，疫苗应该诱导粘膜的和全身的免疫反应并可通过任何方便的路线给予，肠胃外的或非肠胃外的，例如皮下的、皮内的、静脉内的、肌内的、口服的、粘膜的或鼻内的。

在根据本发明的疫苗的优选实施方案中，该疫苗包含含有选自 SEQ ID NO: 1、4、7 和 10 中至少一组的肽的抗原，更优选的是不同的肽以相等的量出现，

在进一步的优选实施方案中，疫苗组合物包含抗原：

FVIHRLEPWLHPGSQHNTASTN - NH₂ (SEQ ID NO :14)

和

RLVGFPVKPQVPGLLRPLTYKAA - NH₂ (SEQ ID NO :15).

该序列可激活细胞免疫系统，并与 CTL-抗原决定部位一起作用。在 CTL-抗原决定部位的读框内进行的氨基酸改变被设计用来获得增强的结合。已经实施了其他的氨基酸改变以促进肽的合成和/或增加肽的溶解性。

用现在的抗原在体液样品中探测由 HIV-1 或 HIV-1 特异性肽或蛋白质诱导的抗体的方法是本发明的进一步的实施方案。本发明还包含为该探测而设计的免疫测定试剂盒和能够选择性地与所说的抗原反应的抗体。

肽制备描述

本发明的肽可通过任何已知的生产线性氨基酸序列的方法进行生产，例如重组 DNA 技术。将编码一种或多种本发明的肽或该肽的多聚体的核酸序列引入到表达载体中。适当的表达载体是含有复制和表达的必需的控制区域的如质粒、粘粒、病毒和 YAC（酵母人工染色体）。表达载体在宿主细胞中可被刺激而表达。适当的宿主细胞为如细菌、酵母细胞和哺乳动物细胞。这样的技术是本领域所公知的，并描述于如 Sambrook 等人，《分子克隆：实验室手册》（Molecular Cloning: A Laboratory manual），Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989。其他众所周知的技术是降解或通过将一个氨基酸残基在液相中或优选地在固相（树脂）中与下一个相偶联的合成，例如通过所谓的 Merrifield 合成法。参见如 Barany 和 Merrifield 的 Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol.2, E, Gross 和 Meinhofer, Ed. (Acad. Press, N.Y., 1980)、Kneib-Coronier 和 Mullen Int. J. Peptide Protein Res., 30, p. 705-739 (1987) 以及 Fields 和 Noble Int. J. Peptide Protein Res., 35, p. 161-214 (1990)。

倘若连接的或环状的肽是必需的，那么当适当的线性氨基酸序列合成后，可使氨基酸序列遭受化学氧化步骤以在一个肽序列中或在两个肽序列之间环化或连接两个 Cys 残基，参见 Akaji 等人，Tetrahedron Letter, 33, 8, p. 1073-1076, 1992。

合成概述

在下面给出的实施例中制备的所有肽衍生物均利用标准程序在 Milligen 9050 肽合成仪上合成。所用的树脂为 Tentacel P RAM，理论加样为 0.20 meq/g (RAPP POLYMERE GmbH, Tübingen)。合成

的终产物在真空中干燥过夜。然后通过作为清除剂的乙二硫醇（5%）和水（5%）的存在下用 90% 的三氟乙酸将肽从树脂上分开（RT1.5 小时）。然后将树脂过滤并在过滤器上用额外的三氟乙酸（100%）（2 × 20 ml）洗涤。将组合的滤出液在真空中蒸发（在 RT 水浴），且用乙醚（200 ml）和过滤掉的沉淀产物研磨残余物。迅速地将固体用冰乙酸（100 ml）在过滤器中溶解，并加入 1.5 升 20% 的在甲醇中的乙酸，然后用 0.1 M 在甲醇中的碘溶液处理直到获得淡褐色的颜色。然后加入乙酸盐形式的 Dowex 1 × 8 离子交换（Bio-Rad, Richmond, CA）（15 g）并过滤混合物。蒸发滤出液并从乙酸中冷冻干燥残余物。然后在含有在 0.1% 的三氟乙酸水溶液中的乙腈的适当的系统中，通过在用 Kromasil[®]100-5C8（EKA Noble, Surte, Sweden）填充的柱上的反相液相层析提纯产物。从柱中收集的样品通过装备了 Kromasil[®]100-5C8 柱（EKA Noble, Surte, Sweden）的分析性高效液相色谱（HPLC）（Beckman System Gold, USA）进行分析。汇集含有纯物质的组分，将溶液蒸发并从乙酸中冷冻干燥产物。最终的 HPLC 分析是在终产物上进行的，并且肽的结构通过氨基酸分析和质谱分析法（LDI-MS）来证实。

在合成中所用的所有氨基酸都是 L-氨基酸且它们在 α -氨基官能团处用苄基-甲氧基-羰基基团进行保护。侧链以如下所示来保护：

Cys (Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), Thr(tBu).

在括弧内的缩写为：

Trt = 三苯基甲基

tBu = 叔丁基

OtBu = 叔丁基酯

氨基酸衍生物是由 Bachem AG, Switzerland 提供的。

实施例 1

C S W V N P R L E P W N I H P G S Q H N I T A C T N - NH₂ (SEQ ID NO: 2) 的制备。该肽是根据合成概述从相应起始材料以酰胺形式合成的。然后通过用 I₂ 氧化来环化该肽。将该肽溶解于乙酸/甲醇 (1: 4) 中并加入 0.1 M 在甲醇中的 I₂。纯度是用 HPLC 分析确定的, 而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC): 大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱): 2746.2

实施例 2

F V I P R L E P W N I H P G S Q P N I T A C T N - NH₂ (SEQ ID NO: 3) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的, 而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC): 大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱): 2538.0

实施例 3

Y L L F L T K G L G I S G G G Y N I G Cit K K R Cit Q I L G - NH₂ (SEQ ID NO: 5) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的, 而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

实施例 4

Y L N I F L T R G L G I S G G G Y N I G Cit K K R Cit Q I C G - NH₂ (SEQ ID NO: 6) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的, 而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC): 大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱): 3097.7

实施例 5

R I L S T Y L G R I S G G G W L S A E P V P L Q L P P L - NH₂ (SEQ ID NO: 8) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱)：2990.6

实施例 6

R I L S T Y L G R I S G G G Y L S A E P V P L Q L P P L - NH₂ (SEQ ID NO: 9) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

实施例 7

K L V G F P V K P Q V P G G G R L L Cit P N I T Y K A A - NH₂ (SEQ ID NO: 11) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

实施例 8

R L V G F P V K P Q V P G G G R L L R P L T Y K A A - NH₂ (SEQ ID NO: 12) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱)：2790.4

分子式：C₁₃₀H₂₁₇O₃₉N₂₉

实施例 9

经由二硫键的二聚化

使实施例 2 中的肽序列经由氧化步骤连接而形成二肽，其中的半胱氨酸残基形成二硫键。该键以下面任何一种途径形成，即

A) 用 I_2 进行氧化。将该肽（如果不同的话用相等的量）溶解于乙酸/甲醇（1: 4）中并加入 0.1 M 在甲醇中的 I_2 以得到同型二聚体的混和物，

或

B) 经由 $[Cys(Spy)^{22}]$ -SEQ ID NO: 3 进行氧化。将溶解于 2 M AcOH (aq) 和 2-丙醇（1: 1）中的 2.3 mM 的肽 SEQ ID NO: 3 用 2,2 二硫代二吡啶（dithiodipyridin）（3 eqv）处理以得到 $[Cys(Spy)^{22}]$ -SEQ ID NO: 3。将 $[Cys(Spy)^{22}]$ -SEQ ID NO: 3 溶解于 10 mM NH_4Oac (aq pH=6.5) 和甲醇（5: 2）中以得到二聚体 SEQ ID NO: 13。

结果所得的二聚体的纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法（LDI-MS）来证实的。

实施例 10

F V I H R L E P W L H P G S Q H N I T A S T N - NH_2 (SEQ ID NO: 14) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法（LDI-MS）来证实的。

纯度（HPLC）：大于 98%（单一杂质少于 1%）

分子量（游离碱）：2540.2

实施例 11

R L V G F P V K P Q V P G L L R P L T Y K A A - NH_2 (SEQ ID NO: 15) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形

式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 99% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱)：2520.3

实施例 12-参考实施例

天然 tat1 序列 M E S V D P R L E P W K H P G S Q P K T A C T N - NH₂ (SEQ ID NO: 16) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 97% (单一杂质少于 1%)

分子量 (游离碱)：2708.1

实施例 13-参考实施例

天然 tat2 序列 Q V C F I T K G L G I S Y G R K K R R Q R R R - NH₂ (SEQ ID NO: 17) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 94%

分子量 (游离碱)：2806.4

实施例 14-参考实施例

天然 Nef 序列 E E V G F P V R P Q V P L R P M T Y K A A - NH₂ (SEQ ID NO: 18) 的制备。该肽是从根据合成概述的相应起始材料以酰胺形式合成的。纯度是用 HPLC 分析确定的，而结构是用氨基酸分析和质谱分析法 (LDI-MS) 来证实的。

纯度 (HPLC)：大于 95%

分子量 (游离碱)：2384.8

实施例 15

制备了包含肽 SEQ ID NO: 3 和 12 的疫苗。将冷冻干燥的肽以终浓度 4 mg/ml 溶解于无菌水中。根据生产商的使用说明, 也制备了终浓度为 0.3 mg/ml 的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 制剂。将两种溶液以皮内方式给予。一般的注射剂量为 100 μ l。

实施例 16

制备了包含肽 SEQ ID NO: 14 和 15 的疫苗。将冷冻干燥的肽以终浓度 4 mg/ml 溶解于无菌水中。根据生产商的使用说明, 也制备了终浓度为 0.3 mg/ml 的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 制剂。将两种溶液以皮内方式给予。一般的注射剂量为 100 μ l。

实施例 17

将抗原溶液或悬浮液与等份的 Behring 的弗氏完全或不完全佐剂混和, 然后通过将该溶液吸入注射器针筒内并用力挤出或用匀浆器而使其很好地乳化。该乳剂应保持稳定至少 30 分钟。最好使抗原-佐剂乳剂以贮存物 (depot) 形式进行皮下注射。

实施例 18

探测由 HIV-1 诱导的抗体的免疫测定。

磁性颗粒试剂将根据生产商推荐的规程来制备。Dynal AS 是所使用的 Dynabeads 的生产商。用配体覆盖的磁性颗粒被称为试剂 1。根据本发明的肽是与磁性颗粒预活化的表面共价偶联的。也可能将肽物理地吸附到磁性颗粒表面。试剂 1 中颗粒的浓度为 1 mg/ml 到 15 mg/ml。颗粒的大小在 0.2 μ m 到 15 μ m。肽的浓度为 0.01 mg/mg 颗粒到 1 mg/mg 颗粒。

抗人 Ig 碱性磷酸酶 (AP) 缀合抗体试剂是根据 Dako AS 推荐的规程制备的。该规程是本领域中的标准程序。将该试剂称为试剂 2。

底物溶液酚酞-单磷酸酯 (phenolphthaleine-monophosphate) 将

根据 Fluka AG 推荐的规程来制备。该规程是本领域中的标准程序。将该底物溶液称为试剂 3。

所使用的洗涤和温育缓冲液是具有下面额外的化合物的 0.05 M tris-碱缓冲液: Tween 20 (0.01%到 0.1%)、甘油 (0.1%到 10%) 和氯化钠 (0.2%到 0.1%)。

测定程序包含温育步骤, 其中在每一个孔内将 1 滴试剂 1 与 2 滴洗涤缓冲液混和。混和后, 加入 30 μ l 样品, 然后将溶液温育 5 分钟。磁性颗粒可用磁体来捕获, 并且在磁体被分离之前去除液体。然后在与试剂 2 温育之前, 用 4 滴洗涤缓冲液将孔洗涤两次。将 1 滴试剂 2 和 2 滴洗涤缓冲液加入并使溶液温育 5 分钟。磁性颗粒可用磁体来捕获, 并且在磁体被分离之前去除液体。然后在与试剂 3 温育之前重复洗涤步骤。将 2 滴试剂 3 加入到每一个孔中且使溶液温育 3 分钟。结果可在白色背景下读取。正结果是红色的 (3+ = 浓红色) 然而负结果是明显的淡黄/褐色溶液, 在负对照中得到。

免疫测定试剂盒可被用于探测由 HIV 病毒或 HIV 特异性肽或蛋白质例如本发明的肽所诱导的抗体。

实施例 19

治疗性或预防性疫苗

选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 10 的本发明的至少一个多肽可形成抗原, 并且可组成预防性或治疗性疫苗的活性要素, 其中的疫苗可提供对 1 型人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的保护。该疫苗可包括在保护或刺激宿主 (人或脊椎动物) 的免疫系统具有有利作用的化合物如白细胞介素、干扰素、粒细胞巨噬细胞生长因子、生血生长因子等。优选地, 该疫苗组合物进一步含有佐剂或媒介物, 更优选地, 佐剂或媒介物为可能含有明矾的单磷酰脂 A (MPL[®])、弗氏佐剂 (完全的或不完全的) 或氢氧化铝。佐剂/媒介物最适的量将依赖于所选择的类型。

本发明的肽通过在 C-末端添加单脂肪酸如单棕榈酰链进行修饰以

形成脂肽疫苗。进一步，该脂肽可用冷冻-融化方法而引入脂质体膜，结果得到在其表面具有肽配体的脂质体。

肽或疫苗制剂在贮藏之前可以被冷冻干燥。可将冷冻干燥的肽溶解于无菌水中至终浓度为 0.1-100 mg/ml。可将疫苗优选地于低温贮藏在安瓿中以备使用，该安瓿含有一个或多个剂量单位。根据本发明的肽的一般剂量单位在浓度范围 0.05 μ g-1 mg 每 kg 体重，优选地为 0.15 μ g-0.15 mg 每 kg 体重。本领域的技术人员可以理解适当的剂量将依赖于病人的体重、疾病类型、状况的严重程度、给予途径以及几个其他因素。当用作治疗性疫苗时，该疫苗通过注射可给予高达 12 次。可随后加以进一步的强化，并且在一些情况下该强化在贯穿病人一生发生。在注射溶液的制备中，将每种肽以终浓度为 1 mg/ml 溶解于无菌水中。一般的注射量为 100 μ l 到 200 μ l (2 \times 100 μ l)。优选地，该肽是与适当的佐剂和/或粒细胞巨噬细胞生长因子共同给予的，例如在浓度范围 0.1 mg/ml 到 1 mg/ml 的 Leucoma[®]《Shering Plough》，或根据生产商的使用推荐。特别优选地为组合治疗，其中本肽是与在公布的国际专利申请号 PCT/N000/00075 和/或共同未决的挪威专利申请号 2000 4413 中所描述的肽一起给予的。这些肽可同时或相继地给予。适当的给予法可为皮内、皮下、静脉内、口服、肌内、鼻内、粘膜的或任何其他适当途径。为了维持保护，强化的给药是必需的。对那些本领域的技术人员而言，可以理解根据本发明的疫苗组合物不仅在预防感染中也有用，而且在治疗感染中也有用。

当在小鼠中以 100 μ g 每 kg 体重的剂量注射时，观察不到根据本发明的肽的毒性作用。

上述实施例仅仅意味着本发明的说明。必须理解本领域的技术人员可修饰此处描述的肽、抗原和疫苗，而不背离如本发明在权利要求中所阐明的概念和范围。

具体地，本申请涉及：

项目 1：特征在于包含至少一种选自如下氨基酸序列的氨基酸序列的肽：

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄Xaa₅Xaa₆Xaa₇LeuGluProTrpXaa₁₂HisProXaa₁₅Xaa₁₆Xaa₁₇Xaa₁₈Xaa₁₉Xaa₂₀Xaa₂₁Xaa₂₂Xaa₂₃Xaa₂₄ (SEQ ID NO: 1)

其中链中的氨基酸可具有如下的含义：

肽衍生物 1 位的 Xaa 是 Met、Ser、Cys 或没有，

2 位的 Xaa 是 Glu、Asp、Val、Ser 或没有

3 位的 Xaa 是 Ser、Gln、Pro、Leu、Val、Ala、Trp、Tyr 或 Phe，

4 位的 Xaa 是 Val 或 Ile，

5 位的 Xaa 是 Asp、Asn 或 Ile，

6 位的 Xaa 是 Pro、His 或 Ala，

7 位的 Xaa 是 Arg、Asn、Ser、Lys、Glu 或 Asp

12 位的 Xaa 是 Leu、Ile 或 Nle

15 位的 Xaa 是 Gly 或 Pro

16 位的 Xaa 是 Ser、Asn 或 Ala，

17 位的 Xaa 是 Gln、Lys 或 Thr

18 位的 Xaa 是 Pro 或 His，

19 位的 Xaa 是 Lys、Thr、Ser、Ala、Arg、Pro、Glu、Leu、Ile 或 Nle

20 位的 Xaa 是 Thr、Ala 或 Ile

21 位的 Xaa 是 Ala、Pro、Asp 或 Val

22 位的 Xaa 是 Cys 或 Ser

23 位的 Xaa 是 Thr、Asn 或 Ser

24 位的 Xaa 是 Asn、Lys、Arg、Gln、Ala、Pro 或 Thr

肽包含 SEQ ID NO: 1 的序列的至少 6 个连续氨基酸，

$Xaa_1Xaa_2Xaa_3PheXaa_5Xaa_6Xaa_7Xaa_8Xaa_9Xaa_{10}Xaa_{11}Xaa_{12}-Z-$
 $TyrXaa_iGlyXaa_{15}LysLysArgXaa_{19}Xaa_{20}Xaa_{21}Xaa_{22}Xaa_{23}$ (SEQ ID NO: 4)

其中链中的氨基酸具有如下的含义：

1 位的 Xaa 是 Pro、Ile、Leu、Thr、Tyr 或 Val

2 位的 Xaa 是 Val、Ala、Cys、Leu

3 位的 Xaa 是 Cys、Ile、Leu、Val 或 Nle

5 位的 Xaa 是 Ile、Leu、Gln、Met 或 Thr

6 位的 Xaa 是 Thr、Asn、Lys 或 Arg

7 位的 Xaa 是 Lys、Arg 或 Gln

8 位的 Xaa 是 Gly 或 Ala

9 位的 Xaa 是 Leu 或 Ile

10 位的 Xaa 是 Gly、Ser 或 Ala

11 位的 Xaa 是 Ile 或 Gly

12 位的 Xaa 是 Ser、Phe 或 Tyr

在 14 位前插入的 Xaa_i 是 Leu、Ile、Nle

15 位的 Xaa 是 Arg、Lys、Ser 或瓜氨酸 (Cit)

19 位的 Xaa 是 Arg、Lys、Ser、Gly 或 Cit

20 位的 Xaa 是 Gln、Arg 或 Pro

21 位的 Xaa 是 Ile 或 Leu

22 位的 Xaa 是 Gly、Leu、Ile、Cys 或没有

23 位的 Xaa 是 Gly 或没有

其中 SEQ ID NO: 4 的序列包含至少 6 个连续的氨基酸，-Z-为可选择的连接体并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或 [Gly]_n 的含义，其中 n=1、2 或 3，

$Xaa_1IleLeuXaa_4Xaa_5Xaa_6LeuGlyArgXaa_{10}Xaa_{11}-Z-$
 $Xaa_{12}Leu_{13}Xaa_iXaa_jXaa_{14}Xaa_{15}Xaa_{16}Xaa_{17}Xaa_{18}Xaa_{19}LeuProProLeu$ (SEQ ID

NO: 7)

其中 1 位的 Xaa 是 Phe、Tyr、Trp 或 Arg

4 位的 Xaa 是 Gly、Ser、Asn、Asp、Cys、Val、Thr、Ala 或 Arg

5 位的 Xaa 是 Thr、Ala、Asp、Asn 或 Ser

6 位的 Xaa 是 Tyr、Cys、Phe、Arg、His、Ser、Val 或 Leu

10 位的 Xaa 是 Ser、Pro、Phe、Leu 或 Ile

11 位的 Xaa 是 Ala、Thr、Glu、Gln、Val、Pro 或 Ser

12 位的 Xaa 是 Glu、Lys、Gln、Asp、Asn、Tyr、Trp 或 Phe

在 13 位后插入的 Xaa_i 是 Ser、Pro、Phe、Leu 或 Ile

在 14 位前插入的 Xaa_i 是 Ala、Thr、Glu、Gln、Val、Pro 或 Ser

14 位的 Xaa 是 Glu、Lys、Gln、Asp 或 Asn

15 位的 Xaa 是 Pro、Ser、Ala 或 Asn

16 位的 Xaa 是 Val、Asn、Gly 或 Pro

17 位的 Xaa 是 Pro、Gln、His、Ser、Leu、Arg、Thr、Asp 或

Ile

18 位的 Xaa 是 Leu、Phe 或 Val

19 位的 Xaa 是 Gln、Leu、Pro、His、Asp 或 Glu

其中 SEQ ID NO: 7 的序列由至少 6 个连续的氨基酸组成, 连接体-Z-是可选择的并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或[Gly]_n的含义, 其中 n=1、2 或 3,

Xaa₁LeuValGlyXaa₅ProXaa₇Xaa₈ProXaa₁₀Xaa₁₁Pro-Z-

[Arg]_mXaa_iXaa₁₃Xaa₁₄ProXaa₁₆Xaa₁₇Xaa₁₈Xaa₁₉Xaa₂₀Xaa₂₁ (SEQ ID NO :

10)

其中 1 位的 Xaa 是 Lys 或 Arg

5 位的 Xaa 是 Phe 或 Leu

7 位的 Xaa 是 Ile 或 Val

8 位的 Xaa 是 Thr、Arg、Lys、Ala 或 Met

10 位的 Xaa 是 Gln 或 His

11 位的 Xaa 是 Val、Leu 或 Ile

在 13 位前插入的 Xaa_i 是 Leu

14 位的 Xaa 是 Leu、Val 或 Thr

15 位的 Xaa 是 Arg 或瓜氨酸 (Cit)

17 位的 Xaa 是 Met、Val、Ile 或 Nle、Leu

18 位的 Xaa 是 Thr 或 Asp

19 位的 Xaa 是 Tyr、Phe 或 Arg

20 位的 Xaa 是 Lys 或 Arg

21 位的 Xaa 是 Ala、Gly、Ser、Glu 或 Gln

22 位的 Xaa 是 Ala、Ser 或 Val

其中 SEQ ID NO: 10 的序列由至少 6 个连续的氨基酸组成，连接体-Z-是可选择的并具有 PEG、修饰的 PEG 和/或 [Gly]_n 的含义，其中 n=1、2 或 3，且独立于 n，[Arg]_m 中的 m 为 0、1、2 或 3，

序列的末端可为自由羧基或氨基基团、酰胺、酰基、乙酰基或它们的盐，

两个或多个 Cys 残基可形成链内或链间二硫键的部分，即其中的 p=1-8 的 -S- (CH₂)_p-S- 或 - (CH₂)_p- 桥，可选择地有一个或多个杂原子如 O、N 和 S 介入，和/或所说的肽序列被固定于固体支持体上。

项目 2: 根据项目 1 的肽，特征在于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 14。

项目 3: 根据项目 1 的肽，特征在于 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6。

项目 4: 根据项目 1 的肽，特征在于 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9。

项目 5: 根据项目 1 的肽，特征在于 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 15。

项目 6: 特征在于包含至少一种根据项目 1 的肽的抗原。

项目 7: 根据项目 6 的抗原, 特征在于它包含至少一个选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 10 中至少一组的肽。

项目 8: 疫苗组合物, 特征在于它包含根据项目 6 的抗原和药学上可接受的稀释剂, 也可选择地包含佐剂、载体和/或媒介物以及额外的免疫刺激化合物。

项目 9: 根据项目 8 的疫苗组合物, 特征在于它包含至少一个选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 10 中至少一组的肽。

项目 10: 根据项目 9 的疫苗组合物, 特征在于它包含 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 中的肽。

项目 11: 根据项目 8-10 的疫苗组合物, 特征在于肽是溶解于无菌水溶液的且可选择的免疫刺激化合物是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

项目 12: 根据项目 8-11 的疫苗组合物, 特征在于该组合物包含选自单磷酸脂 A (MPL[®])、弗氏完全的或不完全的佐剂或氢氧化铝的佐剂。

项目 13: 疫苗组合物, 特征在于根据项目 6 的抗原是作为脂肽和/或脂质体制剂而制备的。

项目 14: 一种在体液样品中探测由 HIV 或 HIV 特异性肽或蛋白质诱导的抗体的方法, 特征在于对所说的样品进行免疫测定, 其中抗原是选自项目 1、2、3、4 和 5 的肽。

项目 15: 在体液样品中探测由 HIV 或 HIV 特异性肽或蛋白质诱导的抗体的免疫测定试剂盒, 特征在于诊断抗原是前述项目 1 到 5 中任何一项的肽。

项目 16: 特征在于能够选择性地与项目 6 和 7 中的抗原进行反应的抗体。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 姓名: Bionor Immuno AS
- (B) 街道: Strømdalsjordet 4, P.O.Box 1893 Gulset
- (C) 城市: 3703 Skien

(E) 国家: 挪威

- (F) 邮政编码(ZIP): N-3705
- (G) 电话: +47 35 50 57 50
- (H) 电传: + 47 35 50 57 01

(i) 发明人:

- (A) 姓名 : Birger Sørensen
- (B) 街道 : Meierlia 3
- (C) 城市 : 3727 Skien
- (D) 国家 : 挪威

(ii) 发明题目: 来自 Tat, Rev 和 Nef 保守区的 HIV 肽以及它们作为例如疫苗组分的应用

(iii) 序列数目: 18

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM 兼容
- (C) 操作系统: Windows 2000
- (D) 软件: Word 7.0

(v) 目前申请日:

申请号:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 22-24 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(v) 片段 类型: 内部的

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 1 的 Xaa 是 Met, Ser, Cys 或没有"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 2
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 2 的 Xaa 是 Glu, Asp, Val, Ser 或没有"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 3
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 3 的 Xaa 是 Ser, Gln, Pro, Leu, Val, Ala, Trp, Tyr 或 Phe"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 4
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 4 的 Xaa 是 Val 或 Ile"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 5
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 5 的 Xaa 是 Asp, Asn 或 Ile"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 6
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 6 的 Xaa 是 Pro, His 或 Ala"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 7
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 7 的 Xaa 是 Arg, Asn, Ser, Lys, Glu 或 Asp"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 12 的 Xaa 是 Leu, Ile 或 Nle"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 15
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 15 的 Xaa 是 Gly 或 Pro"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注释= " 位置 16 的 Xaa 是 Ser, Asn 或 Ala"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 17
- (D) 其它信息: /注释= "位置 17 的 Xaa 是 Gln, Lys 或 Thr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 18
- (D) 其它信息: /注释= "位置 18 的 Xaa 是 Pro 或 His

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释= "位置 19 的 Xaa 是 Lys, Thr, Ser, Ala, Arg, Pro, Glu, Leu, Ile 或 Nle

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释= "位置 20 的 Xaa 是 Thr, Ala 或 Ile

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 21
- (D) 其它信息: /注释= "位置 21 的 Xaa 是 Ala, Pro, Asp 或 Val

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 22
- (D) 其它信息: /注释= "位置 22 的 Xaa 是 Cys 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 23
- (D) 其它信息: /注释= "位置 23 的 Xaa 是 Thr, Asn 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 24
- (D) 其它信息: /注释= "位置 24 的 Xaa 是 Asn, Lys, Arg, Gln, Ala, Pro 或 Thr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /注释= "位置 1 的 Cys 可以形成二硫键的一部分

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 22
- (D) 其它信息: /注释= "位置 22 的 Cys 可以形成二硫键的一部分

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 8
- (D) 其它信息: /注释= "位置 8 的 Xaa 是 Gly 或 Ala

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 9
- (D) 其它信息: /注释= "位置 9 的 Xaa 是 Leu 或 Ile

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 10
- (D) 其它信息: /注释= "位置 10 的 Xaa 是 Gly, Ser 或 Ala

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11
- (D) 其它信息: /注释= "位置 11 的 Xaa 是 Ile 或 Gly

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12
- (D) 其它信息: /注释= "位置 12 的 Xaa 是 Ser, Phe 或 Tyr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 插在位置 14 前的 Xaa_i
- (D) 其它信息: /注释= "插在位置 14 前的 Xaa_i 是 Leu, Ile, Nle

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 15
- (D) 其它信息: /注释= "位置 15 的 Xaa 是 Arg, Lys, Ser 或 瓜氨酸

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释= "位置 19 的 Xaa 是 Arg, Lys, Ser, Gly 或 瓜氨酸

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释= "位置 20 的 Xaa 是 Gln, Arg 或 Pro

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 21

(D) 其它信息: /注释= "位置 21 的 Xaa 是 Ile 或 leu

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 22

(D) 其它信息: /注释= "位置 22 的 Xaa 是 Gly, Leu, Ile, Cys 或 没有

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 23

(D) 其它信息: /注释= "位置 23 的 Xaa 是 Gly 或 没有

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 12..13

(D) 其它信息: /注释= " 选择性插入的连接体 -Z-

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 2, 3 和 22

(D) 其它信息: /注释= " 位置 2、3 和 22 的 Cys 可以形成二硫键的一部分

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4 :

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Phe Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ -Z- Tyr Xaa₁ Gly
 1 5 10 15

Xaa₁₅ Lys Lys Arg Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ Xaa₂₂ Xaa₂₃
 20

(2) SEQ ID NO: 5 的信息 :

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 12..13

(D) 其它信息: /注释= "插入的 3 个残基的 Gly-桥

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5 :

Tyr Leu Leu Phe Leu Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Nle Gly Cit Lys Lys
 1 5 10 15 20
 Arg Cit Gln Ile Leu Gly

25

(2) SEQ ID NO: 6 的信息：

(i) 序列特征：

- (A) 长度: 28 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12..13
- (D) 其它信息: /注释= "插入的 3 个残基的 Gly-桥"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 27
- (D) 其它信息: /注释= "位置 27 的 Cys 可以形成二硫键的一部分"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

Tyr Leu Nle Phe Leu Thr Arg Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Nle Gly Cit Lys Lys
 1 5 10 15 20

Arg Cit Gln Ile Cys Gly
 25

(2) SEQ ID NO: 7 的信息：

(i) 序列特征：

- (A) 长度: 25-28 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /注释= "位置 1 的 Xaa 是 Phe, Tyr, Trp 或 Arg"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点

- (B) 位置: 4
(D) 其它信息: /注释= "位置 4 的 Xaa 是 Gly, Ser, Asn, Asp, Cys, Val, Thr, Ala, 或 Arg
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 5
(D) 其它信息: /注释= "位置 5 的 Xaa 是 Thr, Ala, Asp, Asn 或 Ser
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 6
(D) 其它信息: /注释= "位置 6 的 Xaa 是 Tyr, Cys, Phe, Arg, His, Ser, Val 或 Leu
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 10
(D) 其它信息: /注释= "位置 10 的 Xaa 是 Ser, Pro, Phe, Leu 或 Ile
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 11
(D) 其它信息: /注释= "位置 11 的 Xaa 是 Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro 或 Ser
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 12
(D) 其它信息: /注释= "位置 12 的 Xaa 是 Glu, Lys, Gln, Asp, Asn, Tyr, Trp 或 Phe
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 插入在位置 13 后的 Xaa_i
(D) 其它信息: /注释= "插入在位置 13 后的 Xaa_i 是 Ser, Pro, Phe, Leu 或 Ile
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 插入在位置 14 前的 Xaa_i
(D) 其它信息: /注释= "插入在位置 14 前的 Xaa_i 是 Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro, 或 Ser
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 14
(D) 其它信息: /注释= "位置 14 的 Xaa 是 Glu, Lys, Gln, Asp 或 Asn
- ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 15
(D) 其它信息: /注释= "位置 15 的 Xaa 是 Pro, Ser, Ala 或 Asn

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11..12
- (D) 其它信息: /注释= " 插入的 [Gly]_n 桥, 其中 n = 3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8 :

Arg Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly Arg Ile Ser Gly Gly Gly Trp Leu Ser Ala Glu Pro Val
 1 5 10 15 20

Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu
 25

SEQ ID NO: 9 的信息 :

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11..12
- (D) 其它信息: /注释= " 插入的 [Gly]_n 桥, 其中 n = 3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9 :

Arg Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly Arg Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Leu Ser Ala Glu Pro Val
 1 5 10 15 20

Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu
 25

(2) SEQ ID NO: 10 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 22-29 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /注释= "位置 1 的 Xaa 是 Lys 或 Arg"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 5
- (D) 其它信息: /注释= "位置 5 的 Xaa 是 Phe 或 Leu"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 7
- (D) 其它信息: /注释= "位置 7 的 Xaa 是 Ile 或 Val"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 8
- (D) 其它信息: /注释= "位置 8 的 Xaa 是 Thr, Arg, Lys, Ala 或 Met"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 10
- (D) 其它信息: /注释= "位置 10 的 Xaa 是 Gln 或 His"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11
- (D) 其它信息: /注释= "位置 11 的 Xaa 是 Val, Leu 或 Ile"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 插入在位置 13 前的 Xaa_i
- (D) 其它信息: /注释= "Leu 是插入在位置 13 前的"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注释= "位置 13 的 Xaa 是 Leu, Val 或 Thr"

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 14
- (D) 其它信息: /注释= "位置 14 的 Xaa 是 Arg 或 Cit"

ix) 特征:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 26 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (C) 位置: 12...(Leu_iXaa₁₃....)
- (D) 其它信息: /注释=" 连接体 -Z- 是 [Gly]_n (其中 n 是 3) 和 [Arg]_m (其中 m 是 1) .

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11 :

```

Lys Leu Val Gly Phe Pro Val Lys Pro Gln Val Pro Gly Gly Gly Arg Leu Leu Cit Pro Nle
 1           5           10          15          20
Thr Tyr Lys Ala Ala
                25

```

(2) SEQ ID NO: 12 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 26 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (E) 位置: 12...(Leu_iXaa₁₃)
- (F) 其它信息: /注释=" 连接体 -Z- 是 [Gly]_n (其中 n 是 3) 和 [Arg]_m (其中 m 是 1)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12 :

```

Arg Leu Val Gly Phe Pro Val Lys Pro Gln Val Pro Gly Gly Gly Arg Leu Leu Arg Pro Leu
 1           5           10          15          20
Thr Tyr Lys Ala Ala
                25

```

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 44 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 二聚体肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: SEQ ID NO : 3 位置 20 和 SEQ ID NO : 3 位置 20 之间的二硫键

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 22 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14 :

Phe Val Ile His Arg Leu Glu Pro Trp Leu His Pro Gly Ser Gln His Nle Thr Ala Ser Thr Asn
 1 5 10 15 20

(2) SEQ ID NO: 15 的信息 :

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 23 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子 类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15 :

Arg Leu Val Gly Phe Pro Val Lys Pro Gln Val Pro Gly Leu Leu Arg Pro Leu Thr Tyr Lys Ala
 1 5 10 15 20
 Ala

(2) SEQ ID NO: 16 的信息 :

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, tat1 天然序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16 :

Met Glu Ser Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser Gln Pro Lys Thr Ala Cys
 1 5 10 15 20

Thr Asn

(2) SEQ ID NO: 17 的信息 :

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 23 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, tat2 天然序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17 :

Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15 20

(2) SEQ ID NO: 18 的信息 :

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, 天然 Nef 序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18 :

专利名称(译)	来自Tat、Rev和Nef保守区的HIV肽以及它们作为例如疫苗组分的应用		
公开(公告)号	CN101628933A	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910140941.4	申请日	2001-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
[标]发明人	B索伦森		
发明人	B·索伦森		
IPC分类号	C07K14/16 A61K39/21 A61P31/18 A61K9/127 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 A61K39/12 C07K16/08		
CPC分类号	Y10S435/975 Y10S435/974 A61K2039/525 Y10S530/826 C12N2740/16322 C07K14/005 A61P31/18		
优先权	20004412 2000-09-04 NO		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及来自Tat、Rev和Nef保守区的HIV肽以及它们作为例如疫苗组分的应用。具体地，本发明涉及能够诱导HIV - 1特异性免疫反应的新的修饰的肽，而不对抗细胞毒性T - 细胞的活性，从而得到对抗HIV的有效预防性和治疗性疫苗。该肽是基于HIV的Tat和Rev(即调节性蛋白质)和Nef(即辅助蛋白质)的保守区域的。描述了包含至少一种所说的肽的自由或载体结合形式的抗原、包含至少一种抗原的疫苗组合物、免疫测定试剂盒和用此类抗原探测由HIV或HIV特异性肽诱导的抗体的方法。

