

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 97198743.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/21 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A23J 1/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1327896C

[22] 申请日 1997.10.10 [21] 申请号 97198743.2

[30] 优先权

[32] 1996.10.10 [33] US [31] 60/028,194

[86] 国际申请 PCT/US1997/018257 1997.10.10

[87] 国际公布 WO1998/015658 英 1998.4.16

[85] 进入国家阶段日期 1999.4.12

[73] 专利权人 探针国际公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 弗兰克·B·格尔德

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 40 页 说明书 87 页

[54] 发明名称

治疗病毒感染的组合物及方法

[57] 摘要

用于治疗、诊断和预防病毒的方法和组合物，包括对患者给药与病毒蛋白的某些区域反应的抗体，并导致感染性的中和以及病毒寿命周期重要阶段的灭活。该抗体可识别某些病毒抗原决定簇，当通过感染或环境接触而遭遇时这些病毒抗原决定簇不能在人体内诱导出免疫应答。在一个优选的实施方案中，本发明提供了适用于治疗和诊断人类免疫缺陷病毒(HIV)感染。

1、一种组合物，其包含从 HIV 分离体的溶胞产物中提取的 HIV 蛋白，所述溶胞产物被处理以除去其中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，而所述蛋白包含至少一个抗原决定簇区域，当通过感染或环境接触遭遇到所述抗原决定簇区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自以下组中： a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域： gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76； gp41 的氨基酸残基 502—541； 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295； 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94； gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181； gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122； gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443； 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527； 和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域： gp120 的氨基酸残基 7—43。

2、如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域包含所述 HIV 蛋白的中和或灭活区。

3、如权利要求 1 所述的组合物，其已富集所述抗原决定簇区域。

4、如权利要求 3 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域包含 25% 至 95% 的所述蛋白。

5、如权利要求 4 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域包含 50% 至 95% 的所述蛋白。

6、如权利要求 1 所述的组合物，其包含来自不同 HIV 分离体的溶胞产物的混合物。

7、如权利要求 1 所述的组合物，其包含 HIV1_{MN}、HIV1_{BAL}、和 HIV2_{NZ} 之溶胞产物的混合物。

8、如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域相当于或模拟 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的蛋白的至少一个抗原决定簇区域，当通过感染或环境接触遭遇到所述抗原决定簇区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在山羊中诱导出免疫应答。

9、如权利要求 8 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域相当于或模拟以下至少一种 HIV1_{SF2} 蛋白的抗原决定簇区域：

- (k) 衣膜 gp120 外部糖蛋白；
- (l) 衣膜 gp41 跨膜糖蛋白；
- (m) 逆转录酶；
- (n) 蛋白酶 p10；或
- (o) gag 前体。

10、如权利要求 9 所述的组合物，其中，HIV1_{SF2} 蛋白的至少一种所述抗原决定簇区域包含：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；

- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域;
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域;
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域; 或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

11、如权利要求 1 所述的组合物, 其还包含选自于以下组中的佐剂: 胞壁酰二肽、Freunds Complete 佐剂、RIBI、Titer Max 和氢氧化铝。

12、如权利要求 11 所述的组合物, 其中, 所述佐剂包括偶联 HIV 蛋白的载体分子, 而所述载体分子选自于包含半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

13、如权利要求 12 所述的组合物, 其中, 所述载体分子包括糖肽的多重重复体, 而所述糖肽是胞壁酰二肽。

14、如权利要求 13 所述的组合物, 其中, 所述胞壁酰二肽的多重重复体为交联的。

15、如权利要求 14 所述的组合物, 其中, 所述胞壁酰二肽的多重重复体包含末端二肽 L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺。

16、一种组合物, 其包含一种合成肽, 所述合成肽包含一个相当于或模拟 HIV 蛋白之中和或灭活区域的抗原决定簇区域, 其中, 当通过感染或环境接触遭遇到所述肽时它不能在人体内诱导出免疫应

答，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2}蛋白的以下区域：gp120的氨基酸残基4—27和氨基酸残基54—76；gp41的氨基酸残基502—541；逆转录酶杂二聚体p66/55的氨基酸残基254—295；蛋白酶p10的氨基酸残基69—94；gag基因蛋白p24的氨基酸残基166—181；gag基因蛋白p17的氨基酸残基2—23区域和89—122；gag基因蛋白p7的氨基酸残基390—410和438—443；以及gp41的氨基酸残基512—531和518—527；和b) HIV_{1NZ}蛋白的以下区域：gp120的氨基酸残基7—43。

17、如权利要求16所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域内至少一个氨基酸被修饰，以促进对非人类哺乳动物给药所述肽后所得的MHC相互作用或免疫应答。

18、如权利要求17所述的组合物，其中，至少一个氨基酸被修饰，使得在亲水性氨基酸和疏水性氨基酸之间的所述抗原决定簇区域构成两亲螺旋结构。

19、如权利要求16所述的组合物，其包含所述合成肽的混合物。

20、如权利要求16所述的组合物，其中，所述HIV蛋白是HIV_{1SF2}蛋白。

21、如权利要求20所述的组合物，其中，所述HIV_{1SF2}蛋白包含：

- (a) 衣膜gp120外部糖蛋白；
- (b) 衣膜gp41跨膜糖蛋白；

- (c) 逆转录酶;
- (d) 蛋白酶 p10; 或
- (e) gag 前体。

22、如权利要求 21 所述的组合物, 其中, 所述 HIV_{1SF2} 蛋白的中和或灭活区域包含:

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域;
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域;
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域;
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域;
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域;
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域;
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域; 或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

23、如权利要求 16 所述的组合物, 其还包含选自于以下组中的佐剂: 胞壁酰二肽、Freunds Complete 佐剂、RIBI、Titer Max 和氢氧化铝。

24、如权利要求 23 所述的组合物, 其中, 所述佐剂包括偶联 HIV 蛋白的载体分子, 而所述载体分子选自于以下组中: 包括半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

25、如权利要求 24 所述的组合物, 其中, 所述载体分子包括糖

肽的多重重复体，而所述糖肽是胞壁酰二肽。

26、如权利要求 25 所述的组合物，其中，所述胞壁酰二肽的多重重复体为交联的。

27、如权利要求 26 所述的组合物，其中，所述胞壁酰二肽的多重重复体包含末端二肽 L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺。

28、一种鉴定 HIV 蛋白中和或灭活区域的方法，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，所述中和或灭活区域是从 HIV 分离体的溶胞产物中提取，所述溶胞产物被处理以除去其中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，而所述蛋白包含以下 HIV1_{SF2} 的抗原决定簇区域的至少一种：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
 - (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
 - (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
 - (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
 - (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
 - (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
 - (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
 - (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
 - (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域；
- 以及 HIV1_{NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7-43；且所述方

法包括：

- (a) 从一 HIV 株的溶胞产物中提取 HIV 蛋白；
 - (b) 用所述提取物免疫非人类哺乳动物；
 - (c) 从所述免疫哺乳动物体内获得抗血清；
 - (d) 在竞争性免疫检测法中采用所述抗血清和人类 HIV 抗血清鉴定被所述抗血清中抗体识别但不被所述人类抗血清中抗体识别的 HIV 蛋白的区域；和
 - (e) 确定哪一个所述区域为中和或灭活区域；
- 其中所述至少一种非人类哺乳动物是山羊。

29、如权利要求 28 所述的方法，其中，所述中和或灭活区域包含或类似于 HIV 分离体 HIV1_{SF2} 蛋白的以下一个区域：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

30、一种获得抗体的方法，所述抗体可与如权利要求 28 所鉴定的 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的一个抗原决定簇进行反应，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述蛋白的中和或灭活区域时它不能

在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，其中包括：

- (a) 从一 HIV 株的溶胞产物中提取 HIV 蛋白；
 - (b) 鉴定在至少一种所述蛋白上的一种抗体决定簇，所述抗体决定簇的氨基酸序列相当于或模拟一个中和或灭活区域的氨基酸序列，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答；
 - (c) 将所述蛋白与一种生理可接受的载体混合；
 - (d) 用所述蛋白和载体免疫一种非人类哺乳动物宿主；和
 - (e) 从所述免疫宿主中获得所述抗原决定簇的抗体；
- 其中所述至少一种非人类哺乳动物是山羊。

31、如权利要求 30 所述的方法，其中，处理所述溶胞产物以除去 HLA 类型 I 和类型 II 抗原。

32、如权利要求 30 所述的方法，其中，在与所述生理可接受的载体混合前，将所述蛋白脱去糖基。

33、如权利要求 30 所述的方法，其中，所述抗原决定簇的氨基酸序列相当于或模拟一部分人类蛋白的氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag

基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV1_{NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

34、如权利要求 30 所述的方法，其中，在所述蛋白与所述生理可接受的载体混合前，将所述蛋白与选自于以下组中的佐剂结合：胞壁酰二肽、Freunds Complete 佐剂、RIBI、Titer Max 和氢氧化铝。

35、如权利要求 34 所述的方法，其中，所述佐剂包括大分子载体，而该大分子载体包含胞壁酰二肽的多重重复体。

36、如权利要求 35 所述的方法，其中，所述胞壁酰二肽的多重重复体包含末端二肽 L-丙氨酸—D-异谷氨酰胺。

37、如权利要求 30 所述的方法，其中，所述蛋白包含相当于或模拟一个以上的中和或灭活区域的抗原决定簇。

38、如权利要求 30 所述的方法，其中，所述中和或灭活区域包含一种衣膜糖蛋白或跨膜蛋白的一部分。

39、如权利要求 37 所述的方法，其中，至少一个所述中和或灭活区域包含一种衣膜糖蛋白或跨膜蛋白的一部分。

40、如权利要求 39 所述的方法，其还包含蛋白酶 p10 的中和或灭活区域。

41、如权利要求 30 所述的方法，其中，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV1_{SF2} 的抗原决定簇区域，所述区域包含：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

42、如权利要求 41 所述的方法，其中，所述蛋白包含相当于或模拟一个以上的中和或灭活区域的抗原决定簇，而且所述抗原决定簇相当于或模拟二个或二个以上的所述 HIV1_{SF2} 抗原决定簇区域。

43、如权利要求 30 或 37 所述的方法，其中，所述蛋白富含所述抗原决定簇。

44、如权利要求 37 所述的方法，其中，所述抗原决定簇中任意两个的相对比例为 1：1 至最大不超过 10：1。

45、一种获得抗体的方法，所述抗体可与如权利要求 28 所鉴定的 HIV 蛋白之中和或灭活区域上的一个抗原决定簇进行反应，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体

内诱导出免疫应答,但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答,所述中和或灭活区域是从 HIV 分离体的溶胞产物中提取,所述溶胞产物被处理以除去其中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原,其中,所述蛋白被脱去糖基,而所述蛋白包含以下 HIV1_{SF2} 的抗原决定簇区域的至少一种:

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域;
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域;
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域;
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域;
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域;
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域;
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域; 或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域;

以及 HIV1_{NZ} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43; 且所述方法包括:

- (i) 合成一种肽,所述肽的氨基酸序列相当于或模拟 HIV 蛋白中和或灭活区域上的一个抗原决定簇,当通过感染或环境接触遭遇到所述抗原决定簇区域时它不能在人体内诱导出免疫应答,但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答;
 - (j) 将所述肽与一种生理可接受的载体混合;
 - (k) 用所述肽和载体免疫一种非人类哺乳动物宿主; 和
 - (l) 从所述免疫宿主中获得所述抗原决定簇的抗体
- 其中所述至少一种非人类哺乳动物是山羊。

46、如权利要求 45 所述的方法，其中，所述肽的氨基酸序列相当于或模拟人类蛋白氨基酸序列的一部分，而该肽的氨基酸序列选自以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

47、如权利要求 45 所述的方法，其中，在所述肽与所述生理可接受的载体混合前，将所述肽与选自以下组中的佐剂结合：胞壁酰二肽、Freunds Complete 佐剂、RIBI、Titer Max 和氢氧化铝。

48、如权利要求 47 所述的方法，其中，所述佐剂包括选自以下组中的大分子载体：包括半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

49、如权利要求 48 所述的方法，其中，所述大分子载体包含胞壁酰二肽的多重重复体。

50、如权利要求 49 所述的方法，其中，所述胞壁酰二肽的多重重复体包含末端二肽 L-丙氨酸—D-异谷氨酰胺。

51、如权利要求 45 所述的方法，其包含肽的混合物，所述各肽的氨基酸序列相当于或模拟 HIV 蛋白之中和或灭活区域上的一个抗

原决定簇，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答。

52、如权利要求 45 所述的方法，其中，所述肽的氨基酸序列相当于或模拟中和或灭活区域的氨基酸序列，所述中和或灭活区域包含一种衣膜糖蛋白或跨膜蛋白的一部分。

53、如权利要求 51 所述的方法，其中，至少一个肽的氨基酸序列相当于或模拟中和或灭活区域的氨基酸序列，所述中和或灭活区域包含一种衣膜糖蛋白或跨膜蛋白的一部分。

54、如权利要求 53 所述的方法，其还包含一种肽，该肽的氨基酸序列相当于或模拟蛋白酶 p10 的中和或灭活区域。

55、如权利要求 45 所述的方法，其中，所述肽的氨基酸序列相当于或模拟 HIV_{SF2} 蛋白的中和或灭活区域上一个抗原决定簇的氨基酸序列，所述区域包括：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；

- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

56、如权利要求 51 所述的方法，其中，所述肽的氨基酸序列相当于或模拟 HIV1_{SF2} 蛋白的中和或灭活区域上至少两个抗原决定簇的氨基酸序列，所述区域包括：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

57、如权利要求 51 所述的方法，其中，所述抗原决定簇中任意两个的相对比例为 1：1 至最大不超过 10：1。

58、一种识别抗原决定簇并与其反应的抗体，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白中和或灭活区域上的抗原决定簇，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：

- a) HIV1_{SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55

的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

59、如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述抗原决定簇的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白或神经毒素蛋白的一部分氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

60、如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述蛋白包含糖贫化的衣膜前体 gp160、gp120 糖蛋白或 gp41 跨膜糖蛋白。

61、如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述蛋白包含糖贫化的 gag 前体 p55 或裂解的 gag 产物 p17、p24 或 p7。

62、如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述蛋白包含糖贫化的蛋白酶 p10 或逆转录酶杂二聚体 p66/55。

63、如权利要求 59 所述的抗体，其中，所述人类蛋白包括人类 α —甲胎蛋白、天冬氨酰蛋白酶、脱氧尿苷 5'-三磷酸酯核苷酸水解酶、嗜曙红阳离子蛋白、或嗜曙红衍生的神经毒素。

64、如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述抗体识别一种抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV_{SF2} 蛋白的中和或灭活区域之一上的抗原决定簇：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

65、一种包含至少两种抗体的组合，所述各抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白中和或灭活区域上的抗原决定簇，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；

gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV₁_{NZ} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

66、如权利要求 65 所述的抗体组合, 其中, 所述各抗体识别并与之反应的抗原决定簇的氨基酸序列相当于或免疫模拟一种人类蛋白或一种神经毒素蛋白的一部分氨基酸序列, 而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中: a) HIV₁_{SF2} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76; gp41 的氨基酸残基 502—541; 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295; 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94; gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181; gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV₁_{NZ} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

67、如权利要求 65 所述的抗体组合, 其中, 至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟糖贫化的衣膜前体 gp160、gp120 糖蛋白或 gp41 跨膜糖蛋白之中和或灭活区域上的抗原决定簇。

68、如权利要求 65 所述的抗体组合, 其中, 至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟糖贫化的 gag 前体 p55 或裂解的 gag 产物 p17、p24 或 p7 的中和或灭活区域上的抗原决定簇。

69、如权利要求 65 所述的抗体组合，其中，至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟糖基化的蛋白酶 p10 或逆转录酶杂二聚体 p66/55 的中和或灭活区域上的抗原决定簇。

70、如权利要求 66 所述的抗体组合，其中，所述人类蛋白包括人类 α -甲胎蛋白、天冬氨酰蛋白酶、脱氧尿苷 5'-三磷酸酯核苷酸水解酶、嗜曙红阳离子蛋白、或嗜曙红衍生的神经毒素。

71、如权利要求 65 所述的抗体组合，其中，至少一种所述抗体识别一种抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的中和或灭活区域之一上的抗原决定簇：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域。

72、如权利要求 71 所述的抗体组合，其包含抗体，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2}

的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；和
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域。

73、如权利要求 71 所述的抗体组合，其包含抗体，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 糖蛋白的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白的第 502 至 541 氨基酸残基区域；和
- (d) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域。

74、如权利要求 71 所述的抗体组合，其包含抗体，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
 - (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
 - (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- 以及至少一个以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的中和或灭活区域：
- (d) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
 - (e) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
 - (f) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
 - (g) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；
 - (h) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域；或

(i) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域。

75、如权利要求 65 所述的抗体组合，其中，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；和
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

76、一种包含如权利要求 71 所述之抗体组合的组合物，该抗体组合是在药学可接受的载体中，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

77、一种包含如权利要求 72 所述之抗体组合的组合物，该抗体组合是在药学可接受的载体中，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

78、一种包含如权利要求 73 所述之抗体组合的组合物，该抗体组合是在药学可接受的载体中，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

79、一种包含如权利要求 74 所述之抗体组合的组合物，该抗体

组合是在药学可接受的载体中，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

80、一种包含如权利要求 75 所述之抗体组合的组合物，该抗体组合是在药学可接受的载体中，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

81、如权利要求 58 所述的抗体，其与毒素或放射性材料结合。

82、如权利要求 58 所述的抗体，其与人类 T 细胞激动剂复合。

83、一种组合物，其包含如权利要求 1 所述的蛋白以及药学可接受的载体，而所述载体包括 0.9%氯化钠。

84、如权利要求 83 所述的组合物，其中，所述蛋白与大分子载体偶联，而所述大分子载体选自于以下组中：包括半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

85、如权利要求 84 所述的组合物，其中，所述大分子载体包括胞壁酰二肽微粒。

86、一种组合物，其包含一种或多种如权利要求 16 所述的合成肽以及药学可接受的载体。

87、如权利要求 86 所述的组合物，其中，所述肽与大分子载体偶联。

88、如权利要求 87 所述的组合物，其中，所述载体为胞壁酰二

肽微粒。

89、包含一种或多种抗体的组合物在制备用于抑制 HIV 感染者体内病毒感染的药物中的应用，其中每种所述抗体可识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇，而且所述蛋白的中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

90、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述抗原决定簇的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白的一部分氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

91、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述蛋白包含糖贫化的衣膜前体 gp160、gp120 糖蛋白或 gp41 跨膜糖蛋白。

92、如权利要求 90 所述的应用，其中，所述蛋白包含糖贫化的 gag 前体 p55 或裂解的 gag 产物 p17、p24 或 p7。

93、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述蛋白包含糖贫化的蛋白酶 p10 或逆转录酶杂二聚体 p66/55。

94、如权利要求 89 所述的应用，其中，以日剂量 0.1—200 mg/kg 体重给药所述抗体。

95、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述组合物包含混合的抗体，所述各抗体之间的相互比例不大于 10。

96、如权利要求 95 所述的应用，其中，所述各抗体之间的相互比例为 1: 1。

97、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述抗体与大分子载体结合。

98、如权利要求 97 所述的应用，其中，所述载体为胞壁酰二肽微粒。

99、如权利要求 89 所述的应用，其中，所述抗体识别一种抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的中

和或灭活区域之一上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

100、如权利要求 99 所述的应用，其中，所述组合物包含至少两种抗体，所述各抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白中和或灭活区域上的抗原决定簇，而且当通过感染或环境接触遭遇到所述蛋白的中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答。

101、如权利要求 100 所述的应用，其中，至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟糖贫化的衣膜前体 gp160、gp120 糖蛋白或 gp41 跨膜糖蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇。

102、如权利要求 100 所述的应用，其中，至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟糖贫化的 gag 前体 p55 或裂解的 gag 产物 p17、p24 或 p7 的中和或灭活区域

上的抗原决定簇。

103、如权利要求 100 所述的应用，其中，至少一个所述抗体识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟糖贫化的蛋白酶 p10 或逆转录酶杂二聚体 p66/55 的中和或灭活区域上的抗原决定簇。

104、如权利要求 100 所述的应用，其中所述组合物包含抗体，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

105、包含一种或多种抗体的组合物在制备用于在 HIV 感染者体内中和或灭活 HIV 寿命周期中一个或多个重要阶段的药物中的应用，其中所述各抗体可识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇，而且所述蛋白的中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答，且该抗原决

定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

106、如权利要求 105 所述的应用，其中，所述抗原决定簇的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白的一部分氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

107、如权利要求 105 所述的应用，其中，所述抗体识别抗原决定簇，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{1SF2} 的中和或灭活区域之一上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；

- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域;
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域;
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域;
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域;
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域; 或
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

108、如权利要求 106 所述的应用, 其中, 所述组合物包含至少两种抗体, 所述各抗体识别一种抗原决定簇并与其反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白中和或灭活区域上的抗原决定簇, 而且所述中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答。

109、如权利要求 105 所述的应用, 其包含抗体, 所述抗体识别抗原决定簇并与之反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇:

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域; 和
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域。

110、如权利要求 105 所述的应用, 其包含抗体, 所述抗体识别抗原决定簇并与之反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇:

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域;
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域;

(d) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域。

111、如权利要求 105 所述的应用，其中所述组合物包含多种抗体，所述抗体识别抗原决定簇并与之反应，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

112、如权利要求 105 所述的应用，其中，所述抗体与大分子载体结合。

113、如权利要求 112 所述的应用，其中，所述载体为胞壁酰二肽微粒。

114、包含一种或多种抗体的组合物在制备用于在接触过 HIV 的患者体内防止病毒感染的药物中的应用，其中所述各抗体可识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇，而且所述蛋白的中和或灭活区域在

通过感染或环境接触而遭遇到时不能在人体内诱导出免疫应答,且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中: a) HIV_{1SF2}蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76; gp41 的氨基酸残基 502—541; 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295; 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94; gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181; gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV_{1NZ}蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

115、如权利要求 114 所述的应用,其中,所述抗原决定簇的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白的一部分氨基酸序列,而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中: a) HIV_{1SF2}蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76; gp41 的氨基酸残基 502—541; 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295; 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94; gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181; gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV_{1NZ}蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

116、如权利要求 114 所述的应用,其中,所述抗体识别抗原决定簇,所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{1SF2} 的中和或灭活区域之一上的抗原决定簇:

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域;

- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域;
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域;
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域;
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域;
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域;
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域; 或
- (i) gag 基因蛋白 p17 的第 89 至 122 氨基酸残基区域。

117、如权利要求 116 所述的应用, 其中, 至少给药两种抗体, 所述各抗体识别一种抗原决定簇并与其反应, 所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇, 其中, 所述中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答。

118、如权利要求 116 所述的应用, 其包含抗体, 所述抗体识别抗原决定簇, 所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇:

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域; 和
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域。

119、如权利要求 116 所述的应用, 其包含抗体, 所述抗体识别抗原决定簇, 所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV_{1SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇:

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域;
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域;

- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；和
- (d) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域。

120、如权利要求 116 所述的应用，其包含多种抗体，所述抗体识别抗原决定簇并与之反应，所述抗原决定簇相当于或模拟以下 HIV 分离体 HIV1_{SF2} 的各中和或灭活区域上的抗原决定簇：

- (a) gp120 的第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 的第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 的第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 第 89 至 122 氨基酸残基区域。

121、一种从生物液体样品中检测 HIV 是否存在的方法，该方法包括在抗体-抗原检测法中采用如权利要求 58 所述的抗体，并在诱导形成抗体-抗原复合物的条件下与所述样品混合，然后确定所述抗体是否与 HIV 抗原结合。

122、一种检测 HIV 是否存在的方法，其包括在一酶免疫检测法中采用如权利要求 58 所述的抗体，其中，所述抗体与一种酶结合，并在诱导形成抗体-抗原复合物的条件下与所述样品混合，然后确定所述抗体是否与 HIV 抗原结合。

123、一种组合物，其包含从一种病毒溶胞产物中纯化出的 HIV 病毒蛋白，所述病毒溶胞产物已被处理除去该溶胞产物中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，而且所述蛋白包含至少一种抗原决定簇区域，通过感染或环境接触所述抗原决定簇区域不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，其中所述至少一种非人类哺乳动物是山羊，且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

124、如权利要求 123 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域包含所述病毒蛋白的中和或灭活区。

125、如权利要求 123 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白的一部分氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89

—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

126、如权利要求 123 所述的组合物, 其中所述蛋白与大分子载体结合, 而所述大分子载体选自于以下组中: 包括半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

127、如权利要求 126 所述的组合物, 其中, 所述大分子载体包括胞壁酰二肽微粒。

128、如权利要求 126 所述的组合物, 其中, 所述胞壁酰二肽包含末端二肽 L-丙氨酸—D-异谷氨酰胺。

129、一种包含合成肽的组合物, 所述合成肽包含抗原决定簇, 所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 病毒蛋白的中和或灭活区域, 其中, 通过感染或环境接触所述肽不能在人体内诱导出免疫应答, 且该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中: a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76; gp41 的氨基酸残基 502—541; 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295; 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94; gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181; gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527; 和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 7—43。

130、如权利要求 129 所述的组合物，其中，所述抗原决定簇区域的氨基酸序列相当于或免疫模拟人类蛋白的一部分氨基酸序列，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

131、如权利要求 129 所述的组合物，其中，所述蛋白与大分子载体结合，而所述大分子载体选自于以下组中：包括半胱氨酸、赖氨酸、丙氨酸、异谷氨酰胺或酪氨酸的聚氨基酸。

132、如权利要求 131 所述的组合物，其中，所述大分子载体为胞壁酰二肽微粒。

133、如权利要求 131 所述的组合物，其中，所述胞壁酰二肽包含末端二肽 L-丙氨酸—D-异谷氨酰胺。

134、一种鉴定病毒中和或灭活区域的方法，其中，通过感染或环境接触所述中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，所述中和或灭活区域是从 HIV 分离体的溶胞产物中提取，所述溶胞产物被处理以除去其中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，

而所述蛋白包含以下 HIV1_{SF2} 的抗原决定簇区域的至少一种：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；
- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域；

以及 HIV1_{NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43；且该方法包括：

- (a) 从病毒溶胞产物中提取病毒蛋白；
- (b) 用所述提取物免疫非人类哺乳动物；
- (c) 从所述免疫哺乳动物体内采集抗血清；
- (d) 在一竞争性免疫检测法中采用所述抗血清和人类抗血清鉴定病毒蛋白区域，该区域可被所述抗血清中的抗体识别，但不被人类血清中的抗体识别；和
- (e) 确定哪一个所述区域为中和或灭活区。

135、一种获得抗体的方法，所述抗体与一种蛋白的中和或灭活区上的抗原决定簇反应，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述蛋白的中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，所述中和或灭活区域是从 HIV 分离体的溶胞产物中提取，所述溶胞产物被处理以除去其中存在

的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，而所述蛋白包含以下 HIV_{1SF2} 的抗原决定簇区域的至少一种：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；

基区域；

- (h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或
- (i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域；

以及 HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43；且该方法包括：

- (a) 从病毒溶胞产物中提取蛋白；
- (b) 鉴别在至少一种所述蛋白上的抗原决定簇，所述蛋白的氨基酸序列相应于或模拟中和或灭活区域的氨基酸序列，所述中和或灭活区域不能在人体内诱导出免疫应答，但可在至少一种非人类哺乳动物中诱导出免疫应答；
- (c) 将所述蛋白与一种生理可接受的载体混合；
- (d) 用所述蛋白和载体免疫非人类哺乳动物宿主；和
- (e) 从所述免疫宿主体内获得所述抗原决定簇的抗体；

其中所述至少一种非人类哺乳动物是山羊。

136、如权利要求 135 所述的方法，其中，在与所述生理可接受的载体混合前处理所述蛋白，以除去 HLA 类型 I 和 II 抗原并除去糖

基。

137、如权利要求 136 所述的方法，其中，在与所述生理可接受的载体混合前，将所述蛋白与大分子载体结合，所述大分子载体包括胞壁酰二肽微粒。

138、一种获得抗体的方法，所述抗体与 HIV 病毒蛋白的中和或灭活区上的抗原决定簇反应，其中，当通过感染或环境接触遭遇到所述中和或灭活区域时它不能在人体内诱导出免疫应答，但可在非人类哺乳动物中诱导出免疫应答，所述中和或灭活区域是从 HIV 分离体的溶胞产物中提取，所述溶胞产物被处理以除去其中存在的人 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，其中，所述蛋白被脱去糖基，而所述蛋白包含以下 HIV1_{SF2} 的抗原决定簇区域的至少一种：

- (a) gp120 糖蛋白之第 4 至 27 氨基酸残基区域；
- (b) gp120 糖蛋白之第 54 至 76 氨基酸残基区域；
- (c) gp41 跨膜糖蛋白之第 502 至 541 氨基酸残基区域；
- (d) 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基区域；
- (e) 蛋白酶 p10 之第 69 至 94 氨基酸残基区域；
- (f) gag 基因蛋白 p24 之第 166 至 181 氨基酸残基区域；
- (g) gag 基因蛋白 p7 之第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基区域；

(h) gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基区域；或

(i) gag 基因蛋白 p17 之第 89 至 122 氨基酸残基区域；

以及 HIV1_{NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43；且该方法包括：

(i) 合成一个肽，所述肽的氨基酸序列相当于或模拟病毒蛋白的中和或

- 灭活区上的抗原决定簇,其中所述区域在人体内不能诱导出免疫应答,但可在非人类哺乳动物诱导出免疫应答;
- (j) 将所述蛋白与一种生理可接受的载体混合;
- (k) 用所述蛋白和载体免疫非人类哺乳动物; 和
- (l) 从所述免疫宿主体内获得所述抗原决定簇的抗体;
- 其中所述非人类哺乳动物是山羊。

139、如权利要求 138 所述的方法,其中,在与所述生理可接受的载体混合前处理所述蛋白,以除去 HLA 类型 I 和 II 抗原并除去糖基。

140、如权利要求 139 所述的方法,其中,在与所述生理可接受的载体混合前将所述蛋白与大分子载体结合,所述大分子载体包括胞壁酰二肽微粒。

141、包含一种或多种抗体的组合物在制备用于在 HIV 病毒感染者体内抑制该病毒感染的药物中的应用,其中每种所述各抗体可识别一种抗原决定簇并与其反应,所述抗原决定簇相当于或模拟病毒蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇,而且所述蛋白的中和或灭活区域在通过感染或环境接触而遭遇到时不能在人体内诱导出免疫应答,而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中: a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域: gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76; gp41 的氨基酸残基 502—541; 逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295; 蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94; gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181; gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122; gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443; 以及

gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

142、如权利要求 141 所述的应用，其中，所述抗体与胞壁酰二肽微粒结合。

143、包含一种或多种抗体的组合物在制备用于在接触过 HIV 病毒的患者体内防止 HIV 病毒感染的药物中的应用，其中所述各抗体可识别一种抗原决定簇并与其反应，所述抗原决定簇相当于或模拟 HIV 蛋白的中和或灭活区域上的抗原决定簇，而且所述蛋白的中和或灭活区域在通过感染或环境接触而遭遇到时不能在人体内诱导出免疫应答，而该抗原决定簇区域的氨基酸序列选自于以下组中：a) HIV_{1SF2} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 4—27 和氨基酸残基 54—76；gp41 的氨基酸残基 502—541；逆转录酶杂二聚体 p66/55 的氨基酸残基 254—295；蛋白酶 p10 的氨基酸残基 69—94；gag 基因蛋白 p24 的氨基酸残基 166—181；gag 基因蛋白 p17 的氨基酸残基 2—23 区域和 89—122；gag 基因蛋白 p7 的氨基酸残基 390—410 和 438—443；以及 gp41 的氨基酸残基 512—531 和 518—527；和 b) HIV_{1NZ} 蛋白的以下区域：gp120 的氨基酸残基 7—43。

144、如权利要求 140 所述的抗体在制备用于在生物液体样品中检测 HIV 病毒是否存在的抗体—抗原检测物中的应用，其中所述生物液体样品来自已感染病毒的患者，并在诱导形成抗体—抗原复合物的条件下与来自所述患者的体液样品混合，然后确定所述抗体是否与病毒抗原结合。

145、如权利要求 140 所述的抗体在制备用于在 HIV 病毒感染者体内检测 HIV 病毒是否存在的酶免疫检测物中的应用，其中所述抗体与一种酶结合，并在诱导形成抗体-抗原复合物的条件下与来自所述患者的体液样品混合，然后确定所述抗体是否与病毒抗原结合。

治疗病毒感染的组合物及方法

技术领域

概括地说，本发明涉及治疗和预防病毒感染的组合物及方法。更具体而言，本发明提供用于在人类免疫缺陷病毒（HIV）感染的治疗和诊断中产生有用的抗体和肽的组合物和方法。

发明领域

病毒感染的诊断、治疗及预防是很多医学研究者的主要研究方向。尽管针对多种病毒的诊断、治疗及预防的组合物及方法已为人所熟知，但仍有很多病毒在人体内难以被检测，而且就目前所知尚无有效的治疗及预防接种方法。这些病毒中最引人注目的当然是 HIV。

产生获得性免疫缺陷综合症（AIDS）及其前期、AIDS 相关的综合症（ARC）和淋巴结病综合症（LAS）的传染性物质为 LAV、HTLV-III、ARV、以及最近被国际病毒分类委员会建议的 HIV（参见 299）等嗜淋巴逆转录病毒。在此采用推荐术语标识 AIDS 相关病毒及其病毒株。包括 LAV 及 ARV-2 病毒株在内的过去的术语，现分别被定名为 HIV1 LAI 和 HIV1_{SF2}。

由于 HIV 的传播达到流行性的程度，对受感染个体的治疗以及防止向可能接触病毒的未感染个体的传播最受世人所关注。已发展出多种作用于病毒寿命周期不同阶段的治疗方案，这些方法在 Mitsuya and Broder, 1987, Nature 325: 773 中已被列举。其中一种方法是采用与病毒结合并抑制病毒复制的抗体，其或者干扰病毒进入宿主细胞或采用

其它机制。一旦确定病毒成份易受抗体的影响，预计将产生足以中和病毒感染性的抗体反应性，并可对 HIV-感染者给药免疫球蛋白或纯化的抗体，而且该被动免疫有可能改变或逆转 HIV 感染的进程。此外，预计对未感染个体预防接种已被改良以促进 MHC 相互作用的抗原决定簇后，可防止以后接触 HIV 时造成的感染。

一般认为大多数逆转录病毒的衣膜糖蛋白与易感细胞表面的受体分子反应，从而决定了病毒对某些宿主的感染性。结合这些衣膜糖蛋白的抗体可阻断病毒和细胞受体间的相互作用，中和病毒的感染性。一般可参见“肿瘤病毒的分子生物学”(The Molecular Biology of Tumor Viruses), 534 (J. Tooze, ed., 1973); RNA Tumor Viruses, 226, 236 (R. Weiss 等人, eds., 1982); Gonzalez-Scarano 等人, 1982, Virology 120: 42 (La Crosse 病毒); Matsuno and Inouye, 1983, Infect. Immun. 39: 155 (新生牛犊泻痢病毒); 以及 Mathews 等人, 1982, J. Immunol., 129: 2763 (脊髓炎病毒)。到目前为止，通过预防接种 HIV 蛋白/肽诱导人体保护性免疫应答的治疗方案已经失败。此外，从 HIV 感染者体内回收的高滴度中和抗体，以及从鼠中制得的单克隆抗体，都不能成功地改变由 HIV 感染发展至艾滋病和死亡的疾病进程。本领域中需要确定其它 HIV 的免疫学作用靶点，使得可诱导出改变 HIV 感染进程的免疫应答。

HIV 的大体结构为一个核蛋白核心，其外周被一含脂质的衣膜所包围，在病毒从受感染宿主细胞中出芽释放出的过程中病毒需要这一衣膜。病毒编码的糖蛋白植于衣膜中并突出于其上。HIV 的衣膜糖蛋白在受感染细胞中首先被合成为分子量是 150,000—160,000 道尔顿 (gp160) 的前体分子，接着在细胞中被处理成分子量为 110,000—120,000 道尔顿 (gp120) 的 N-端片断、和分子量为 41,000—46,000 道尔顿 (gp41) 的 C-端片断，前者产生侧糖蛋白，后者为跨膜糖蛋

白。

由于以上所讨论的原因, HIV 的 gp120 糖蛋白作为一个干扰病毒寿命周期的潜在作用靶点已受到了广泛的研究。已经证实从 HIV 感染者体内提取出的血清在体外可中和 HIV, 而且在这些血清中存在结合纯化 gp120 的抗体, (Robert-Guroff 等人, 1985, Nature 316: 72; Weiss 等人, 1985, Nature 316: 69; 以及 Mathews 等人, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 9709)。用于免疫动物 (Robey 等人, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 7023; Lasky 等人, 1986, Science, 233: 209) 和人 (Zagury 等人, 1986, Nature 326: 249) 时, 经纯化并重组的 gp120 刺激中和性血清抗体的产生。同时已经证实 gp120 分子与 CD4 受体结合, 而且识别 CD4 受体某些抗原决定簇的单克隆抗体经证实可阻断 HIV 的结合、合胞体的形成和感染性。采用含羧基末端的半个 gp120 分子制成的重组融合蛋白进行免疫后, McDougal 等人, (1986, Science 231: 382) 和 Putney 等人 (1986, Science, 234: 1392) 在动物体内诱导出中和性血清抗体, 并进一步证实在中和性免疫应答中衣膜蛋白的糖化不是必需的。

HIV 感染后人体免疫系统很快对病毒作出反应, 产生抗体和细胞介导的免疫应答。有关逆转录病毒免疫应答的综述已经出版 (Norley, S., 和 Kurth R., 1994: The Retroviridae, Vol E, J. A. Levy, ed., pp 363—464, Plenum Press)。包括 gp160、gp120、p66、p55、gp41、p32、p24 和 p17 在内的多种 HIV 蛋白的特异性人类抗体已被报道 (Carlson, 1988, J. Am. Med. Assoc. 206: 674)。人体中对 HIV 的最初免疫应答是针对 p17 和 p24 的, 接着是 gp120/160, 然后是 gp41、p66/55, 最后是 p32 (Lange 35 等人 1986, Br. Med. J. 292: 228)。随着 HIV 感染发展为艾滋病, p17 和 p24 的抗体浓度大大下降至不可检出的程度, 并被 p17 和 p24 抗原血症所代替。p32 和 p55 的抗体滴度也下降, 但其下降程度较小

(McDougal 等人 1987 J. Clin. Invest. 80: 316)。但在 HIV 感染的整个病程中始终维持大量的 gp160/120 的抗体。HIV 感染早期评价总免疫球蛋白, 结果发现所增加的抗体是针对 HIV 的并且主要针对 gp120 (Amadori 等人, 1988 Clin. Immunol. Immunopathol. 46: 342; Amadori 等人, 1989, J. Immunol 143: 2146)。HIV 专属的超 γ 球蛋白血的可能机制于 1995 年已由 Barker E. 等人作了综述: The Retroviridae Vol 4, J. A. Levy, ed. pp1—96 Plenum Press。HIV 感染期间所产生的这些抗体的功能以及目标抗原决定簇已被描述, 这其中也包括易受抗体介导中和的抗原决定簇。这些主要的靶抗原决定簇主要位于衣膜蛋白 gp160 (gp120/gp41) 和 gag 蛋白 p17 之上; 其综述参见 Levy, 1994 Am. Soc. Micro; Nixon 等人, 1992 Immunol 76: 515。HIV 衣膜蛋白的中和抗体已被鉴定, 它们结合于 gp120 的保守和非周期性区域。这其中包括结合 CD4 结合区域的区域 (Linsley 等人, 1988; 以及 Thali 等人, 1992); 第二和第三易变环状区域 (Fung 等人, 1992; 以及 Haigwood 等人, 1990); 以及糖片断 (Benjouad 等人, 1992; 以及 Feizi 和 Larkin, 1990)。其它的中和部位已被确定在 gp41 的外部 and p17 上的一个结合位点上 (Changh 等人, 1986)。早期的研究指出, 中和抗体的存在导致更有利的临床结果 (Robert-Guroff 等人, 1985)。但这些研究采用经挑选的高中和性血清作用于 HIV 的实验室培养株, 而不是作用于自体同源的 HIV 分离体 (Homsy 等人, 1990; Tremblay 和 Wainberg, 1990)。随后的研究证明, 自体同源的抗体对自体同源 HIV 分离体有很少或没有中和作用 (Homsy 等人, 1990)。在中和抗体存在下, 抗体介导的中和作用敏感度的缺乏被认为是血清转化后出现幸存突变体的缘故 (Arendrup 等人, 1992), 而且整个感染期中均存在这一情况, 这是因为感染期中不断有新的抗体特异性产生。HIV 感染与产生中和抗体之间的临床相关性尚

不清楚。但有一点很清楚，尽管在 HIV 感染者体内对 HIV 的免疫应答强烈，但也会发展成艾滋病并最终由于免疫机能障碍频发而死亡。因此要寻找新的治疗方法。

发明目的

本发明的一个目的是确定病毒蛋白的中和区域，该区域在人体内不能诱导免疫应答，但对于非人类哺乳动物则可诱导出免疫应答并产生与这些区域反应的抗体。本发明的另一目的是在诊断、治疗和预防由病毒造成的疾病中利用这些被确定的蛋白中和区域以及与它们反应的抗体。在以下发明详述中，本发明的一些其它目的将被阐述。

发明简述

本发明提供治疗、诊断和预防病毒感染的方法和组合物，其中采用与病毒蛋白中和区域相反应的抗体中和和阻断病毒寿命周期的关键阶段。该抗体可识别某些病毒抗原决定簇，当遭到病毒感染或暴露于病毒环境中时，这些抗原决定簇不能在人体中诱导出免疫应答，但可在非人类哺乳动物中诱导出免疫应答。

所选定的可与非人类抗病毒抗体反应而不与人类抗病毒抗体反应的抗原决定簇被鉴定出来。这些抗原决定簇通过分子模拟人类蛋白逃避人类免疫系统的临控，而在某些情况中，这些抗原决定簇由易于在抗原处置细胞中酶解的氨基酸组成。理想的抗原决定簇被人类酶酶解，因而不能被加工成免疫呈递。

代表这些抗原决定簇的肽可被合成、任意地修饰、并与大分子载体佐剂相连接，在非人类动物体内诱导免疫应答。优选的佐剂为包含从 *Propionibacterium acini* 中提取的胞壁酰二肽多重重复体的微粒。

本发明的抗体和肽可在免疫测定构型中用于鉴别特异性抗原决定簇并定量测定人体组织和体液中的病毒抗原。在一个优选实施方案中，本发明提供适用于治疗及诊断病毒感染者的组合物和方法。

在一个优选实施方案中，目标病毒为 HIV。

发明详述

本发明提供新型诊断和中和病毒感染的组合物和方法。本发明将集中详细描述一个优选实施方案，其中目标病毒为 HIV。但应认识到，本发明的原理可用于鉴定其它病毒蛋白的中和区域并产生与这些蛋白相反应的抗体，用于诊断、治疗和预防由这些其它病毒导致的感染。

现集中讨论 HIV，本发明提供新型的组合物和方法，用于中和 HIV 感染并预防或基本上抑制 HIV 感染、细胞至细胞的传递、以及被感染宿主中的病毒生产。更具体而言，采用某些 HIV 蛋白序列按以下详述的方法在非人类哺乳动物体内产生抗体，给药该抗体可中和 HIV 感染、易化受感染的 CD4 淋巴细胞的杀灭、以及阻断 HIV 寿命周期中的关键阶段，但上述 HIV 蛋白序列中所包含的抗原决定簇在通过感染或通过环境接触而遭遇到 HIV 时不能在人体中诱导免疫应答。术语“中和区域”指 HIV、特别是 HIV 蛋白的某些部分，其中包含构成一个或多个可与抗体反应的抗原决定簇的氨基酸片断，所述抗体单独、或与本发明其它抗体联合可中和 HIV 感染。适用的评价中和的实验已为人所熟知，其中可包括测量 T-细胞系中 HIV 感染减少、负载 HIV 衣膜糖蛋白的 VSV (HIV) 假型的斑点形成单位减少的实验，合胞体抑制实验，以及病毒粒子受体结合实验。术语“灭活区域”指那些其中包含一个或多个当与单个或多个本发明抗体反应时可功能性阻断 HIV 寿命周期的重要阶段的抗原决定簇的 HIV 蛋白片断。适用的评价抗体介导的毁

灭 HIV 感染淋巴细胞的实验已为人所熟知，其中可包括抗体依赖的细胞介导的细胞毒性、补体介导的溶胞、和自然杀伤（NK）实验。测量抗体介导的阻断 HIV 寿命周期关键阶段的适用实验包括测量逆转录酶失活、或测量聚合酶和蛋白酶的活性的实验，或者用核苷酶降解病毒 RNA 来评价抗体介导的补体依赖核壳渗透性改变的实验。如果需要，可将免疫化学检测法如免疫荧光法、免疫印迹法、酶联免疫法、以及放射免疫检测法中的抗体反应性比作中和性。

本发明的原理是基于以下发现：某些在 HIV 寿命周期中起重要作用的抗原决定簇在人体内没有免疫原性，但采用所选的非人类哺乳动物而产生的抗体可确定和指征这些抗原决定簇。此外，已经发现这些区域在人体中的这种免疫不应答性是由于分子模拟及缺乏 MHC 相关作用的缘故，其中 MHC 相关作用包括通过必须的 MHC HLA 类型 1 和 HLA 类型 2 相关作用而产生的抗原呈递。利用分子模拟，这些抗原决定簇被认为是自身的并在正常情况下不引起免疫应答。在抗原呈递中缺乏 MHC 相关作用时，涉及几个步骤，而在任何一步中失败就可能导致对抗原不产生免疫应答。

含多重交叠抗原决定簇的肽区域以及这些抗原决定簇的抗体已被制出并在体外实验中可中和并阻断 HIV 寿命周期的关键步骤。此外，患有艾滋病的 HIV 感染者已经接受了这些肽区域的抗体的治疗，结果通过总可培养感染剂量（TCID）检测发现血液感染性很快下降。采用这些抗体治疗慢性艾滋病患者也取得重大临床学进展，包括体重增加、消除机会性感染、降低感染的发生率和严重性以及医生的救护率、消除 HIV 相关的神经病。患者进一步显示免疫恢复，其特征为 HIV-RNA 的减少、CD4 数量增加、CD8 数量增加以及由于改善了 CD4 和 CD8 的数量及功能使得细胞因子系统恢复。

抗原决定簇的鉴定和抗体的产生

大部分免疫反应是针对优势免疫抗原决定簇的。通过多种免疫学方法,其中包括采用抗血清作用于 HIV、针对 HIV 抗原决定簇的细胞毒性 T 淋巴细胞反应性以及 HIV 抗原决定簇的辅助性淋巴细胞抗原呈递,已对 HIV 抗原决定簇进行了最为频繁的鉴定和描绘。采用已为人所熟知的测试方法竞争性地或非竞争性地利用模拟 HIV 序列的已知序列的合成肽可证实这些观察结果。应认识到对免疫系统的刺激可引起免疫应答的加强或抑制。其支配因素包括:

- A、被免疫原刺激的淋巴细胞的子群数量(抑制性细胞对辅助性细胞)。
- B、首先接触免疫原的微环境,包括驻留于其中的细胞数量。
- C、当效应细胞接触免疫原时存在于微环境中的细胞因子的类型。
- D、效应细胞与免疫原接触后诱发的细胞因子类型。
- E、免疫原的结构组成及生化组成。
- F、免疫原的氨基酸序列及其在微环境中受蛋白酶降解的难易程度。

从初步实验中可见,在决定某些用于产生抗体的蛋白和肽的潜在价值中,以下性质被确定为具有十分重要的地位,所产生的抗体被用于被动免疫治疗中,以治疗或缓解人体疾病的进程,特别是包括艾滋病在内的 HIV 感染的各阶段:

- A、当用于产生适用于被动免疫疗法的抗体时,免疫原必须缺乏在人体细胞和组织中表达的抗原决定簇,其中有以下例外:
 - 1、抗原的分布被限制在与抗体隔绝和/或无法利用的位置。
 - 2、当无抗原时,则在发育周期中在允许于特定时间利用抗体的发

育期中表达抗原。

3、位于宿主内部的抗原决定簇不与重要结构相邻。

4、抗原在宿主细胞上的分布密度低于造成伤害所需的量，但有利于作用于目标靶点以形成选择性定位。

5、正常比率的靶点必须有足够的不同性并有助于抗体向目标靶点传送。

B、输送至抗原呈递细胞上的重复肽段的数量直接影响免疫应答的大小。

C、存在于体液中的抗原决定簇浓度应不能中和抗体并阻断抗体定位。

到目前为止，疫苗的开发已集中在设计更好的技术，以放大人类免疫系统所应答的靶的免疫应答，而且被动免疫疗法已得到不确定的结果。本发明所公开的为其它之 HIV 在人体内不诱导免疫作用的作用靶点，以及一种新的构型，用于传递导致前所未有的 HIV 免疫反应的抗原。本发明所公开的方法的目的在于治疗 HIV 和艾滋病，但应认识到本方法的药剂具有广泛的用途。通过 HIV 关键靶点的抗体产生，通过改善艾滋病临床效果的治疗，在山羊体内的抗体应答证明了本发明的效用。该技术在疫苗开发上具有广泛的应用。

针对抗原的刺激成功诱导出免疫力需要通过抗原呈递细胞（APC）经 MHC 作用的多重抗原决定簇重复的呈递。最具有免疫原性的抗原决定簇具有两亲性构型，其中一端为疏水的氨基酸，另一端为亲水的氨基酸，所述抗原决定簇包含的氨基酸与构成两亲性螺旋是一致的，即它们缺乏破坏螺旋结构的氨基酸如脯氨酸，并且缺乏碳水化合物。缺少在微环境中易受蛋白酶降解的氨基酸的序列特别理想。

为确定 HIV 上具有最重要性的免疫靶点,确定动物而非人类中 HIV 相关蛋白产生免疫性的区域。采用脱除或未脱除糖基的纯化 HIV 溶胞产物免疫山羊。从 HIV 蛋白上除去糖残基对于蛋白的免疫应答没有什么影响,并且也不能暴露出隐蔽的抗原决定簇。对商品 HIV 溶胞产物作进一步的纯化以除去包括人类 HLA 类型 1 抗原、HLA 类型 2 抗原、和 β -2-球蛋白在内的组织培养蛋白。免疫后,采用竞争性免疫检测法测定由山羊所得的抗血清以鉴定那些不被从 HIV 感染者体内采集的抗体所识别的 HIV 肽。采用所选的具有高中和性和 Western 印迹活性的患者血清制备人体 HIV 抗血清库,并作为标准竞争性免疫检测法中的竞争性抗体。宽范围的山羊抗体被确定出来,它们可与不同于人类抗 HIV 抗血清库所识别的 HIV 抗原决定簇反应。

本领域的技术人员认识到其它种动物可用于对这些抗原决定簇产生抗体,并且这些抗体可在 ADCC 和补体介导的反应中起作用。其它适用于产生抗体的动物种类包括但不限于:绵羊、兔、马、奶牛和老鼠。

采用包括 HIV_{1SF2} 线性氨基酸序列的 12 节 (mer) 的肽表征抗 HIV 抗体的抗原决定簇反应性。这种大小的肽容易与抗体反应,易于合成并易于制成高纯的形式。肽为合成并购自 Purification System, Inc.。这些合成肽与过氧化酶标记的山羊抗 HIV 抗体相结合,并各自与两套涂布有 HIV 的微量测定板孔结合。其中一套被人抗 HIV IgG 封闭;而另一套则没有被封闭。测量肽抑制山羊抗 HIV 结合被人抗 HIV 封闭的 HIV 蛋白的百分比。

当观察到某一具体合成肽抑制结合时,合成覆盖此抑制性肽的氨基酸序列的其它肽,以进一步确定抗原决定簇序列。

采用 HIV 肽-HRP 复合物作鉴定标记物进一步评价和确定 HIV

蛋白上被山羊抗 HIV IgG 识别而不被人抗 HIV IgG 识别的抗原决定簇的位置。在该实验中, HIV 蛋白被吸收于载体如微量滴定板孔或精密聚苯乙烯球上。将包括 HIV_{1SF2} 线性氨基酸序列的 12 节的肽与辣根过氧化物酶共价结合。利用人和山羊对吸收于载体上的原位抗原决定簇和对与过氧化物酶共价结合肽的抗 HIV 反应性, 独立测量人和山羊的抗 HIV 反应性。利用此方法, 详情参见实施例 8, 仅有包含在合成肽中的抗原决定簇被识别出来。

一旦鉴定出与人类蛋白有明显相似性的肽, 即确定出对 HIV 寿命周期具有十分重要作用的序列。与以下如实施例 8 所示, 通过生产出待选肽的抗体并接着测定这些抗体对于 HIV 感染性和病毒中和的作用进行此项工作。

如上所述, 已鉴别出多个特殊的抗原决定簇区域, 除非作特殊声明以下以 HIV_{1SF2} 序列为参考详细描述其中九个。对以下所列并贯穿针对 HIV_{1SF2} 的本发明申请的氨基酸残基的指定来自 Los Alamos Data Bank (AIDS Virus Sequence Data Base, Los Alamos National Laboratories, Theoretical Division, Los Alamos, N. M. 87545)。对以下所列并贯穿针对 HIV 2 NZ 的本发明申请的氨基酸残基的指定来自 Ex Pasy World Wide Web Molecular Biology Server of the Geneva University Hospital and the University of Geneva, 而 BioAccelerator 来自位于 Weizman Institute, Israel 的 Copugen Ltd.、以及 Akira Ohyama, Bioscience Systems Department, Mitsuey Knowledge Industry Co., Ltd., Tokoyo, Japan。本领域技术人员应认识到, 基于其在来自于多种分离体的相关蛋白中的位置, 来自其它 HIV 分离体的其它类似区域(类似物)也可被鉴别。实际上, 如下所述参考 HIV_{1SF2} 序列可鉴别这些类似物:

(a) 对比 HIV 分离体和 HIV_{1SF2} 的氨基酸序列, 在两序列间获得

最大的相似性，通常两序列间至少有约 75% 的相同性；

(b) 一旦一个氨基酸序列被定位于 HIV_{1SF2} 中的相应位置，将说明免疫模拟、相似性、或由于对模拟或相似性序列保持抗体反应性而等同与 HIV_{1SF2}。由此确定的来自其它 HIV 分离体的肽及其氨基酸序列将免疫模拟 HIV_{1SF2} 的相应区域。

该鉴别关键抗原决定簇的方法可用于尚未被发现的 HIV 株。例如，一旦鉴别出一种新的 HIV 株，可将其衣膜和核心氨基酸序列与 HIV_{1SF2} 序列对比，以获得该菌株最大的相似性。这种对比序列的方法已为本领域技术人员所熟知。在对比序列时，需要在半胱氨酸间构成尽可能多的相似性。可合成并按本发明使用相对应于本发明详细公开的肽的位置的新 HIV 株或种的氨基酸序列。

对于本发明，包含在这些序列中的抗原决定簇没有必要具有与 HIV 所有病毒株或种的抗体的交叉反应性。包含可分辨一个种或血清群而非其它的抗原决定簇的肽可用于鉴定特殊的种属或血清群，并有可能有助于确定感染有一种或多种 HIV 种或血清群的患者。在治疗方案中，它们还可与来自相似性区域或其它中和性区域的肽联合使用。

典型地，本发明的氨基酸序列包含约 5 至 50 个氨基酸，并包含位于 HIV 蛋白上的一个或多个抗原决定簇，在通过感染或环境接触而遭遇到这些抗原决定簇时，它们不能在人体内诱导出保护性免疫应答，但在非人类哺乳动物体内则可诱导出免疫应答。优选地，该序列包含约 5 至 35 个氨基酸。采用含有所需氨基酸序列的合成肽或经处理的天然 HIV 蛋白的溶解产物免疫对它们有免疫应答的动物，并产生对 HIV 感染有治疗价值的抗体。

通过模拟人类抗原决定簇或其它蛋白，这些目标氨基酸序列或肽在人体中不能诱导出免疫应答。特别值得注意的是那些肽抗原决定簇，

在 HIV 蛋白和人类 α -甲胎蛋白、天冬氨酰蛋白酶、脱氧尿苷 5'-三磷酸酯核苷酸水解酶、嗜曙红阳离子蛋白、嗜曙红衍生的神经毒素和核糖核酸酶 4 前体之间共同的抗原决定簇，以及由来自 Bungaris Naja、Dendoaspis、Psudechis、或 Androctonus Centruroides 的神经毒素所模拟的肽抗原决定簇。

在以下的讨论中，对于大量人类蛋白和神经毒素采用这些蛋白的标准特征缩写形式进行表征。下表列出这些蛋白的缩写及全名：

序列与 HIV 蛋白相似的人类蛋白

Swiss Prot ID Xxxx-人	蛋白
ACE	血管紧张素转化酶前体
ACHE	乙酰胆碱受体蛋白
3BH1	3- β -羟基-5-烯-类固醇脱氢酶 I
3BH2	3- β -羟基-5-烯-类固醇脱氢酶 II
41BL	4-1BB 配体
BLSA	β -淋巴细胞抗原前体
CATD	组织蛋白酶 D 前体
CD69	早期活化抗原 CD69
CD81	CD81 抗原
CO02	肿瘤相关抗原 CO-029
CP11	细胞色素 P450 IA1
CYRP	细胞因子受体普通 β -链前体
CYPC	肽酰-脯氨酰顺-反异构酶 C

DIAC	二-N-乙酰壳二糖酶前体
DUT	脱氧尿苷 5'-三磷酸酯核苷酸水解酶
ECP	嗜曙红阳离子蛋白前体
EV2B	外弯的病毒整合位点 2B 蛋白
FETA	α -甲胎蛋白
FOL1	叶酸受体 α -前体
GSHR	谷胱甘肽还原酶
IL9	白介素 9 前体
IN19	干扰素可诱导蛋白 9-27
INIU	干扰素可诱导蛋白 I-8U
INR2	干扰素 α/β -受体 β -链前体
KLTK	白细胞酪氨酸激酶受体前体
KPCL	η -型蛋白激酶 C
LBP	脂多糖结合蛋白前体
LCAT	卵磷脂-胆固醇脂酰基转移酶
LECH	脱唾液酸糖蛋白受体 1
LFA3	淋巴细胞功能相关抗原-3 前体
LMA1	Laminin α -1 链前体
LONN	线粒体 LON 蛋白酶同源性前体
LONM	线粒体 LON 蛋白酶同源性前体
LYOX	蛋白-赖氨酸 6-氧化酶前体
MAG1	黑素瘤相关抗原 1
MAG2	黑素瘤相关抗原 2
MAG3	黑素瘤相关抗原 3

MC5R	黑肾上腺素 (melanocortin) -5 受体
MYSE	胚胎肌球蛋白重链
NOL1	增殖细胞核仁抗原 P120
NRM1	自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 1
NT3	神经亲合素-3 前体
NTCR	依赖钠和氯离子的肌酸转运蛋白 1
NXS1-NAJAT	眼镜蛇毒素
PA2M	膜相关磷脂酶 A2 前体
PIP5	磷脂酶 C- γ -2
PGDS	α -血小板衍生的生长因子前体
PLK	蛋白多糖连接蛋白前体
POL1	逆转录病毒相关 pol 多聚蛋白
PSS1	磷脂酰丝氨酸合成酶 I
RENI	血管紧张肽原酶前体
PNKD	非分泌型核糖核酸酶前体
S5A2	3-氧-5- α -类固醇-4-脱氢酶 2
SDC1	多配体聚糖-1 前体
SDC4	多配体聚糖-4 前体
SEMI1	semenogelin 1 蛋白前体
SON	SON 蛋白
SPCB	红血球收缩蛋白 β -链
SRE1	固醇调节元素结合蛋白 1
SYV	缬氨酰-tRNA 合成酶
TCO2	transcobalin II 前体

TGL3	蛋白-谷氨酰胺谷酰基转移酶 E3 前体
TFPI	组织因子通道抑制剂前体
TRFL	乳运铁蛋白前体
TYK2	非受体型酪氨酸-蛋白激酶
VPRT	逆转录病毒相关蛋白酶
WNT2	WNT-2 蛋白前体
ZN45	锌指蛋白 45

以下叙述上述 9 个高度保守抗原决定簇的氨基酸序列。这些区域中的三个处于衣膜糖蛋白 gp120（二个靶点）和 gp41（一个靶点）上，一个位于逆转录酶杂二聚体 p66/55 上，一个位于蛋白酶 p10 上。其它靶点位于 Gag 前体（p55/Gag）上，位于 p14（二个靶点）、p24 和 p7 上。

HIV_{1SF2} gp120 上的一个抗原决定簇区域位于第 4 至 27 氨基酸残基上，第二个位于 HIV1 的第 54 至 76 氨基酸残基上。位于 gp120 抗原决定簇区域上的抗体协助 gp120 从 gp41 上的释放。gp120 从 gp41 上的释放是抗体剂量依赖的，并可用中和实验如测量 HIV 感染性的 TCID₅₀ 法证明。

HIV_{2NZ} 之 gp120 的中和或灭活区域的抗原决定簇区域也已被确定。HIV_{2NZ} 衣膜糖蛋白 gp120 的序列已被描绘，第 7 至 43 氨基酸残基为模拟 HIV_{1SF2} gp120 和某些人类蛋白序列的区域。作用于该区域的抗体使得 HIV₂ gp120 与 gp41 分裂，这与感染性的下降相关。

HIV_{1SF2} 的第三个 HIV 衣膜糖蛋白靶点位于跨膜糖蛋白 gp41 的 502 至 541 氨基酸残基上。在补体存在下作用于此区域的抗体导致 HIV 衣膜糖蛋白的抗体依赖补体介导的溶解，并明显降低 HIV 的感染性。

除衣膜糖蛋白抗原决定簇区域外，另一引人注目的 HIV1 抗原决定簇区域包括逆转录酶杂二聚体 p66/55 的第 254 至 295 氨基酸残基。作用于此区域的抗体导致抗体剂量依赖的逆转录酶活性的下降。另一引人注目的抗原决定簇区域包含蛋白酶 p10 的第 69—94 氨基酸残基。作用于此区域的抗体导致抗体剂量依赖的蛋白酶活性下降。

位于逆转录酶和蛋白酶上的靶点位于靠近酶活性位点的保守区域中，有关酶活性位点变异以及针对竞争性抑制剂继发的抵抗力已为人所熟知。抗体介导的灭活是由于酶立体或结构改变继而引起活性丧失的结果。该灭活的方法独立地起作用，不受酶活性部位变异的影响并且是不可逆的。

其它引入注目的是在 Gag 基因上的三个抗原决定簇区域。具体而言，Gag 基因蛋白 p24 的第 166 至 181 氨基酸残基，Gag 基因蛋白 p17 之第 2 至 23 氨基酸残基上的第一靶点和第 89 至 122 氨基酸残基上的第二靶点，以及 Gag 基因蛋白 p7 的第 390 至 410 和第 438 至 443 氨基酸残基在本发明中均有用。作用于这些区域的抗体在上述抗体造成 HIV 衣膜溶化后导致核壳体瓦解。当 HIV RNA 暴露于血浆 RNase 降解时，这种受体的结合达到最大值。此外，出芽后 p17 上的靶点暴露于被感染淋巴细胞的表面。这为感染淋巴细胞的 ADCC 溶胞作用提供了额外的靶点。

含至少一个不能被 HIV 感染者的抗体所识别、但能被山羊抗 HIV 抗体识别的抗原决定簇的上述列特异性肽之一为含 HIV_{1SF2} 衣膜 gp120 之第 4 至 27 氨基酸残基的肽，其包含抗原决定簇的线性序列为以下序列：

KGTRRNYQHLWRWGTLLLGMLMIC

该肽模拟人类蛋白 FOL1、NTCR、PIP5、PSS1、KLTK、MC5R、ECP、INIU、INI9、VPRT、CD69、MYSE、RNKD、ACHE、TCO2、LCAT、MAG1、MAG2、MAG3 和 LYOX。

HIV1_{SF2} gp120 衣膜糖蛋白的第二个抗原决定簇区域在第 54 至 76 氨基酸残基上，其序列为：

ASDARAYDTEVHNVWATHACVPT

该肽模拟蛋白 CYRB 和 SKV。

在 HIV1_{SF2} 衣膜上的第三个引人注目的抗原决定簇区域位于糖蛋白 gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基上。该肽具有以下氨基酸序列：

HIV1 Env 502

RVVQREKRAVGIVGAMFLGFLGAAGSTMGAVSLTLTVQAR 502
—541

该肽模拟人类蛋白 CYPC、TYK2、ACHE、NTCF、NTCR、CD81、41BL、NIDO、GSHR、COO2 和 TCO2。

在另一特殊实施方案中，引人注目的抗原决定簇区域位于 HIV1_{SF2} Gag 蛋白 p17 的第 2 至 23 氨基酸残基上。该肽具有序列：

GARASVLSGGELDRWEKIRLRP

该肽模拟人类蛋白 TFPI、PA2M、BLSA、ECP 和 FETA 以及某些神经毒素，如 NXS1 和 NAJAT。该肽具有一个结合和定位宿主细胞膜的疏

水性序列，其作用是模拟细胞翻译蛋白 Src。

HIV_{SF2} p17 上的第二个靶点位于第 89 至 122 氨基酸残基上。该肽具有序列：

LYCVHQRIDVKDTKEALEKIEEEQNKSK

该肽模拟 FETA 和 TRIC。

另一引人注目的肽为 Gag 基因蛋白 p24 和其中包含抗原决定簇的子序列的第 166 至 181 氨基酸残基构成的肽。该肽具有序列：

PEVIPMFSAALSEGATP

该肽模拟人类蛋白 FETA 和 TRFL。

第三个引人注目的 Gag 基因蛋白抗原决定簇区域为 Gag 基因蛋白 p7 和其中包含抗原决定簇的子序列的第 390 至 410 及 438 至 443 氨基酸残基构成的肽。该肽具有序列：

KTVKCFNCGKEGHIAKNCRAP+KIWSSQ

该肽模拟人类 FETA 和 RNA 结合蛋白。该肽包含结合 Zn 的区域，用于与病毒 RNA 相互作用和结合。该区域的抗体在已感染的 CD4+淋巴细胞溶胞后促进没有衣膜的早熟 HIV 的清除。

另一引人注目的抗原决定簇区域为蛋白酶 p10 和其中包含抗原决定簇的子序列的第 69 至 94 氨基酸残基构成的肽。该肽具有序列：

RIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLP

该肽模拟人类蛋白 REN1、BLSA、VPRT 和 CATD。该序列的抗体抑制 HIV 蛋白酶的活性。

本发明中另一有用的特异性序列为包含 HIV1 逆转录酶杂二聚体 p66/55 之第 254 至 295 氨基酸残基的序列。该肽具有序列：

GLKKKKSVTVLVDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSINNETP

该肽序列模拟人类蛋白 POL1 和 ECP。

如上所述，依据本发明的方法也可用其它 HIV 株得到肽和抗体。通过其它病毒株序列和 HIV_{SF2} 或 HIV_{NZ} 序列间的比较和对比，并找出与 HIV_{SF2} 或 HIV_{NZ} 中确定的抗原决定簇相似的序列，从而可确定其它 HIV 株中的有用的肽。

通过本发明的方法确定的 HIV_{NZ} 中引入注目的序列是在 env gp120 的可读框上，包括第 7 至 43 氨基酸残基。该肽具有以下序列：

QLLIAIVLASAYLIHCKQFVTVFYGI PAWRNASIPLF

该肽模拟人类蛋白 IL9、SRE1、NRM1、LBP、NOL1、S5A2、LMA1、LECH、LFA3、KPLC、FETA、3BH2、3BH1、INR2 和 EV2B。

例如，一旦所需氨基酸序列被鉴定，将获得识别这些序列的抗体。采用从 HIV 溶胞产物中提取并包含这些肽的蛋白、合成肽、细菌融合蛋白以及来自种系发生无关且含所需抗原决定簇的源的蛋白/肽，可获得这些抗体。

如果采用病毒溶胞产物，可采用单一 HIV 株的蛋白溶胞产物，或两种或两种以上病毒株的混合溶胞产物。如果使用混合溶胞产物，混合物可包含不同 HIV1 株的溶胞产物或至少一种 HIV1 株和至少一种

HIV2 株的混合物。优选的混合物为 HIV1_{BAL}、HIV1_{MN} 和 HIV2_{NZ} 溶胞产物的混合物。

首先处理病毒溶胞产物除去 HIV 蛋白中的脂质和其它杂质。然后处理该 HIV 蛋白质混合物，以除去来自细胞培养源的杂质，如人类白细胞抗原（HLA）类型 I 和类型 II 抗原。除去这些抗原的方法在本领域为人所熟知，包括采用单克隆抗 HLA 类型 I 和抗 HLA 类型 II 抗体和免疫亲合法；在以下实施例 3 中详细描述了一种方法。

此外，已经发现 HIV 蛋白的糖必须被除去；当对动物给药 HIV 蛋白时种系保守的糖抗原决定簇则可能刺激免疫应答，使得所生产出的抗体可能对人类组织具有细胞毒性作用。采用本领域技术人员所熟知的酶，其中包括 PGN 酶、neurominidase 和葡萄糖苷酶脱去糖基，实施例 3 中详细描述了一种这样的方法。

接着可将处理好的 HIV 蛋白混合物用于免疫动物，以产生目标肽的抗体。理想地，混合物中包含大约等量的含目标肽或抗原决定簇区域的蛋白。即理想状态下，它们间的比例约 1: 1，并且任何两肽的摩尔比不大于约 10: 1，优选为 3: 1。

此外，可采用合成肽作免疫原。如果采用合成肽，可通过如氨基酸序列的取代或截短来修饰所需肽的氨基酸序列。

氨基酸取代可防止预计的酶断裂，抗原加工过程中该酶断裂可能发生在某一特殊氨基酸片断上，迫使两亲性结构的形式满足所需的 MHC 相关的抗原呈递的要求并提供足够供 HLA 呈递的长度，蛋白断裂可发生在抗原决定簇的边缘上或其附近位置。选择截短序列使得所述肽保持如 MHC 类型 1 和类型 2 抗原呈递机制所预计的抗原决定簇长度要求。以下在合成肽部分给出理想氨基酸取代的更详细的原则。除取代和截取序列，延长的肽序列也可被制备，其中附加氨基酸被加在

所选抗原决定簇的任一端，以有助于与固相载体和大分子载体结合。

例如，含上述 HIV_{SF2} gp41 的第 502 至 541 氨基酸残基的肽的有用截短序列为包括含 512—531 氨基酸残基的肽：

GIVGAMFLGFLGAAGSTMGA

和含 518 至 527 氨基酸残基的序列：

FLGFLGAAGS

其它特别有用的截短肽为含 HIV_{NZ} gp120 的第 7 至 43 氨基酸残基肽的截短序列，其中包含序列：

LLIAIVLASAYLIHCKQ

该肽可采用多种方法进行制备。由于其相对较小，该肽可依据常规方法在溶液中或在固相载体上合成。现在也有多种商品化的自动合成器并可按已知的方案进行使用。参见，如 Stewart and Young, *Solid Phase Peptide synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., 1984；以及 Tam 等人., *J. Am Chem. Soc.* (1983) 105: 6442

此外，可采用杂交 DNA 技术，通过采用编码多肽的单链或与其基本上互补的链制备合成基因，将单链搭接并可在退火介质中连接在一起以构成杂化。杂化链可接着连接构成完整的基因，并通过选取适当的末端，可将该基因插到表达载体中，现在很多表达载体均可容易地得到。参见如 Maniatis 等人., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982。或者可通过常规重组 DNA

技术克隆编码该肽的病毒基因组的区域，并在原核细胞生物或真核细胞的表达系统中表达以产生所需的肽。

优选地，免疫原富含所需抗原决定簇，产生抗体的 B 淋巴细胞应答这些抗原决定簇，产生中和和灭活 HIV 感染寿命周期关键步骤的抗体。此处所采用的术语“富含”指所需抗原决定簇至少占 HIV 蛋白的 25%，优选为至少 50%，最优选为约 95%。更具体而言，如果有必要，需采用如聚丙烯酰胺凝胶电泳等纯化方法，纯化含瓦解病毒溶胞产物或提取物的溶液、或者生物表达重组蛋白或瓦解的表达载体或含模拟抗原决定簇的蛋白的上清液，以富集这些蛋白。对于含所需 HIV 抗原决定簇的蛋白和肽的纯化，免疫亲和纯化法是一种优选的和便利的方法，如采用经单一特异亲和性纯化的多克隆或单克隆抗体进行亲和纯化。用作免疫原的肽从溶液中被纯化出来的程度可能变动很大，即约 50%，典型为至少 75%至 95%，理想为 95%至 99%，最理想为完全均一。

为获得所需抗原决定簇的抗体，采用目标肽或含有这些肽的 HIV 蛋白免疫动物，其中如上所述 HIV 蛋白已被处理除去糖和 HLA 抗原。免疫规程已为人所熟知并可在保持效果的前提下作很大变动。参见 Colco, Current Protocols in Immunology, John Willey and Sons, Inc. 1995。可将蛋白和/或肽悬浮或稀释于适当的生理性载体中进行免疫。适用的载体为可传递和/或促进肽免疫原性的、有生物相容性的、无毒的任意载体，其中包括无菌水和 0.9%盐水。

此外，肽可在用作免疫原以前一载体分子结合。如以下更具体描述的一种优选技术将蛋白及其片断与一种糖肽如胞壁酰二肽（MDP）的多重重复体结合构成微球，其典型直径小于 $1\mu\text{m}$ ，优选为小于 $0.2\mu\text{m}$ 。接着将该微球悬浮于药物载体中供注射用。该方法可获得高密度

的供诱导免疫应答的肽。根据给药及免疫应答的途径选择载体。采用常规的、已为人所熟知的消毒技术对组合物进行消毒。通过口服或非肠道途径给药这些肽，其中后一种方法为优选方法。

富含所需抗原决定簇的抗原制剂被注射的免疫剂量通常为 $1\mu\text{g}$ 至 20 mg/kg 宿主体重。可通过注射，如肌肉、腹膜、皮下、静脉注射等进行给药，可一次给药或多次给药，通常间隔一至四周。

监测免疫动物是否产生所需抗原决定簇的抗体。对于被动免疫治疗，优选为高亲和力的补体结合的 IgG 抗体，可原样使用或使用其片断如 Fv、Fab、F(ab')₂。当需要更大组织穿透性时，优选使用抗体片断。可单独给药抗体及其片断或给药抗体与毒性物质或抗原决定簇所构成的复合物。一旦获得所需的免疫应答，采用如静脉穿刺、心脏穿刺、或血浆除去法收集血液。依据常规方法，包括如盐沉淀、离子交换色谱、粒径色谱、亲和色谱，将抗体从复杂的血清或血浆混合物中提纯出来。常常要将多种方法联合使用。免疫亲和色谱为优选的方法。

为防止接受非人类动物衍生的抗体在人体内产生可能的免疫原性，可构建重组抗体。重组抗体的一种类型是嵌合抗体，其中免疫球蛋白分子的抗原结合片断（可变区）通过肽键连接至不被人类识别为外源性的其它蛋白的至少一部分之上，如人免疫球蛋白的恒定区。这可通过将动物可变区编码因子与人类 κ 或 γ 恒定区编码因子融合而完成。对于技术人员来说已知有多种的方法，如 PCT86/01533、EP171496、以及 EP173494 中所描述的方法，这些专利公开在此被引用作为参考。重组抗体的优选类型为 CDR-移植抗体。

药物配方及其应用

中和感染性、杀伤已感染之 CD4 淋巴细胞和灭活 HIV 寿命周期关

键阶段的本发明抗体作为一成分复配入药物组合物中。该组合物包含治疗及预防剂量的至少一种本发明抗体，理想的为一种抗体鸡尾酒，以及药学可接受载体。药学可接受载体为任意适用于向患者传送抗体的、有相容性的、无毒的物质。因此，本发明提供非肠道给药的组合物，其包含溶于可接受性载体、优选为含水载体中的抗体的溶液。可采用多种含水载体，如水、水缓冲液、0.4%盐水、0.9%盐水、0.3%氨基乙酸溶液等。这些溶液为无菌的，通常其中不含颗粒状物质。组合物中也可包含药学可接受的辅助性物质以满足近似生理条件的要求，如 pH 调节及缓冲剂、毒性调节剂等。如可使用乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。配方中抗体的浓度是可变的，通常从小于约 0.1 mg/ml 到高至 150 至 200 mg/ml，优选为约 1 mg/ml 至 20 mg/ml，其主要依赖于液体体积、粘度等进行选择，优选依赖于所选取给药途径的特殊方式而作选择。本领域普通技术人员能够确定具体抗体或抗体鸡尾酒的浓度。因此，典型的经静脉输注的药物组合物可由 250 ml 无菌 Ringer's 溶液以及 100—200 mg 抗体制成。经肌肉注射的组合物可由 1ml 无菌水缓冲液和约 20 至 50 mg 的抗体制成。制造非肠道给药组合物的具体方法对于本领域技术人员来说是熟知或清楚的，如在 Remington's Pharmaceutical Science, 15th Ed., Mack Publishing Company Easton, Pa. (1980) 中有更详细的描述，在此引用该文献作为参考。这些组合物可包含单一的抗体，该抗体例如可特异性针对某些 HIV 株，或者针对由大多数、优选为所有 HIV 株表达的蛋白或糖蛋白。此外，药物组合物中可包含多于一种的抗体以构成“鸡尾酒”。例如，包含对抗多种 HIV 蛋白和病毒株的抗体的鸡尾酒可作为一种通用产品，用于治疗 and 预防绝大多数 HIV 的临床分离体。鸡尾酒中可包含与 HIV 蛋白或衣膜糖蛋白上的抗原决定簇结合的抗体，例如，可包含由针对上述 HIV_{1SF2} Env

蛋白 gp160、gp120、和 gp41；Gag 蛋白 p7、p17 和 p24；逆转录酶杂二聚体 p66/55 和蛋白酶 p10，或其子群上的抗原决定簇位点的抗体复合物，从而中和一系列在 HIV 寿命周期中起重要作用的抗原决定簇。当然，也可采用针对 HIV 蛋白其它中和或灭活区域抗原决定簇位点的抗体。

例如，改变病毒附着、细胞进入、转录、翻译、组装、成熟病毒粒子向血浆膜的定位和病毒粒子的释放的抗体将干扰 HIV 寿命周期。为灭活多种重要的 HIV 蛋白，更经常采用的是抗体鸡尾酒。这针对某些病毒粒子有特别的治疗作用，这些病毒粒子缺乏外衣膜但通过其它机制如微胞饮作用或转染等进入细胞而有可能造成感染。各种抗体成分间的摩尔比应不大于 10，最好不大于 5，一般一说各抗体成分间的摩尔比约为 1: 1—3。

对于上述九种特异性肽的抗体，理想的抗体鸡尾酒包含两个衣膜 gp120 肽和 gp41 肽的抗体。更为理想地，鸡尾酒中包含以上三个抗原决定簇区域的抗体再加上蛋白酶 p10 抗原决定簇区域的抗体。更为理想地，鸡尾酒中包含以上四个抗原决定簇区域的抗体以及至少一种所列举的其余五个抗原决定簇区域的抗体。在最优选的实施方案中，鸡尾酒中包含所有九种抗原决定簇区域的抗体。

本发明的抗体和抗体鸡尾酒可单独给药或与其它抗逆转录病毒药剂联合使用。其它抗逆转录病毒药剂，特别是抗 HIV 药剂的开发现状在 Mitsuya 等人, Nature 325: 773—778, 1987 中有综述。

本发明的抗体和肽可以液体制剂形式在多个已知能保持抗体活性的温度下贮存，如 -70℃、-40℃、-20℃、和 0—4℃，或冻干贮存，并在使用前用适当载体重新配制。对于常规免疫球蛋白、已纯化的抗体、以及由蛋白、糖蛋白以及肽组成的免疫原，已证明这一技术是有

效的。可采用本领域已为人所知的冻干及重新配制的技术，本领域技术人员已认识到冻干并重新配制可能会导致抗体活性不同程度的丧失（如对于常规免疫球蛋白，IgM 抗体比 IgG 抗体更易丧失活性），因此不得不调整剂量以补偿这种活性的丧失。

包含本发明抗体及其鸡尾酒的组合物可用于治疗和/或预防 HIV 感染。在治疗应用中，对已感染 HIV 的患者给药，其用量应足以治疗或至少部分阻止感染及其并发症。适宜完成此治疗目的的用量被定义为“治疗有效剂量”。治疗有效剂量的选取依赖于感染的严重程度以及患者自身免疫系统总的状态，但一般为约 0.1 至约 200 mg 抗体每公斤体重，优选为 0.5 至约 25 mg 抗体每公斤体重。在危及生命或潜在危及生命的严重病态下也可采用本发明的组合物。在这些病例中，治疗医师有可能并可能感到有必要超大剂量给药这些抗体。

在预防应用中，对尚未被 HIV 感染、但有可能近期接触或被认为已经接触，或有接触病毒的可能（如 HIV 感染者的新生儿），或刚刚接触或怀疑接触了 HIV 的患者给药含本发明抗体及其鸡尾酒的组合物。如果对被 HIV 感染的孕妇给药该组合物，在分娩前可一次或多次给药以降低母体血液中 HIV 的感染性，从而降低了 HIV 传染给新生儿的可能性。对于有可能被传染的新生儿也可进行治疗以进一步降低感染 HIV 的可能性。依赖于患者的健康状态及免疫总水平，定义为“预防有效剂量”的剂量一般在 0.1 mg 至 25 mg 每公斤体重。

此外，本发明的抗体可用作靶点特异性载体分子。抗体可与毒素结合构成免疫毒素，或与放射性材料或药物结合构成放射性药物或药物。制备免疫毒素和放射性药物的方法已为人所熟知（参见，如 *Cancer Treatment Reports* 68: 317 (1984)）。由本发明的抗体和人类 T 细胞激动剂，如 CD3 抗原或 T 细胞 Fc γ 受体的单克隆抗体，构成的杂聚体可

激动人类 T 细胞或携带 Fc γ 受体的细胞（如 K 细胞或嗜中性粒细胞），通过抗体依赖且细胞介导的细胞溶解（ADCC）杀伤 HIV 感染细胞。例如可采用 Karpowsky 等人, J. Exp. Med. 160: 1686 （1984）中描述的杂双功能基剂 N-琥珀酰亚氨基-3-（2-吡啶基二巯基）丙酸酯，将抗 HIV 抗体和抗 CD3 抗体共价交联组成这样的杂聚体，所述文献在此引用作为参考。

其它的抗 HIV 药剂也可包含在配方中，如 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷、2', 3'-双脱氧胞苷、2', 3'-双脱氧-2', 3'-双脱氢胞苷等。

除抗体组合物外，也可对 HIV 感染者给药含本发明肽的组合物供治疗和预防接种用。对于治疗应用，对 HIV 感染者给药含肽的组合物，其中肽可为上述任意修饰的纯化肽或为包含在上述被处理 HIV 蛋白中的，优选与 MDP 微粒结合以进一步刺激抗原性的肽。选择肽的给药剂量以刺激产生针对先前不被患者免疫系统识别的功能性 HIV 抗原决定簇的抗体，使得这些受激产生的抗体可阻止感染。对于预防应用，对于未感染 HIV 的患者给药包含结合 MDP 微粒的肽的组合物，以刺激产生针对尚未被识别的抗原决定簇的抗体，为将来的感染提供保护性措施。

抗体及抗原在诊断及病情预测中的应用

本发明所公开的抗体及被它们所识别的抗原决定簇也可用于 HIV 感染的诊断及处理上。典型地，采用抗体和/或其相应抗原的诊断检测要求检测抗原-抗体复合物的存在。已有很多免疫检测法被描述，它们采用用于免疫检测的已标记或未标记的免疫化学物质。当未标记时，抗体例如可用在凝集反应检测法、抗体依赖且补体介导的细胞溶解实验、以及中和实验中。未标记抗体可与其它已标记之与第一抗体反应

的抗体（第二抗体）联合使用，如对免疫球蛋白有特异性的抗体。未标记抗体可与已标记抗体联合使用，如用在夹心式免疫实验中，其中所述已标记抗体可与相同抗原上的非竞争抗原决定簇反应，或与已标记的抗原联合使用。此外，抗体可直接被标记并可用于竞争性或非竞争性免疫实验中。这些实验的类型及其配置在本领域已为人所熟知。可采用多种标记，如放射性同位素、荧光标记、酶、酶底物、酶辅助因子、酶抑制剂、配体（特别是半抗原）等。现有多种类型的现成的免疫检测方法，例如在第 3,817,827；3,850,752；3,901,654；3,935,074；3,984,533；3,996,345；4,034,074；和 4,098,876 号美国专利中所描述的方法。

一般来说将本发明的抗体和肽用于酶法免疫检测中，其中例如将目标抗体或其相应的抗原与酶结合，而且免疫实验被设计成具有最大限度的灵敏度和特异性，供检测生物样品如人类血清、唾液、阴道分泌物或病毒感染细胞培养悬浮液中的 HIV 抗原。

也可设计采用目标抗体的试剂盒，用于检测 HIV 感染或 HIV 抗原的存在。试剂盒中包含其它与 HIV 抗原决定簇特异性结合的抗体以及任意的本发明的抗体。这些抗体与缓冲剂如 Tris、磷酸盐、碳酸盐等，稳定剂，杀菌剂，惰性蛋白如牛血清球蛋白等一起包括在试剂盒中，以活性抗体的用量计，通常这些材料的用量小于约 5 wt%，通常总量至少为 0.001 wt%，而所述抗体与一种标记物结合，未结合或结合至固相载体如微量测定板孔或聚苯乙烯球的表面上。通常需加入惰性混合剂或赋形剂稀释活性成分，其中赋形剂可占总组合物的约 1 至 99 wt%。当采用可与抗体结合的第二抗体时，通常将第二抗体置于一个独立的小瓶中。典型地，第二抗体与一种标记物结合，并以与上述抗体配方相同的方式进行复配。被抗体识别的目标抗原决定簇可为标记的或未

标记的，并可作为一种较大蛋白（合成，重组，或天然）的一部分，可作修饰或不作修饰，如添加间隔臂、氨基、或半胱氨酸残基，用于将肽连接至载体上，并使其在载体表面上伸展。采用这些修饰使得抗原决定簇的位置最有利于与抗体间的免疫反应。这些肽按上述含抗原决定簇的蛋白相同的方法进行配制。

在多种生物样品中检测 HIV 抗原或整个病毒，可用于诊断 HIV 流行性感染，评价治疗效果，计数被感染细胞，HIV 株（分化体）的血清分型，与初期感染、发展和并发症如外周神经病、多病灶性脑白质病和卡波济氏肉瘤相关的毒性因子的鉴定及定量。生物样品可包括但不限于：血液、血清、唾液、精液、活组织检查样（脑、皮肤、淋巴结、脾等）、细胞培养上清液、经破坏的真核或细胞表达系统等。在诱导免疫复合物形成的条件下将抗体和生物样品温孵，然后检测免疫复合物的生成，由此测试病毒、病毒抗原、毒性因子、和血清型抗原决定簇的存在。在一个实施方案中，使用可与第一抗体结合并典型结合有标记物的第二抗体检测复合物的生成。该第二抗体按与上述配制第一抗体配方相同的方式进行配制。在另一实施方案中，抗体结合至固相载体上，然后与生物样品接触。经过温孵阶段后，加入已标记的抗体检测被结合的抗原。在另一实施方案中，抗体与一检测标记物结合，经过与生物样品如细胞或组织切片温孵阶段后，通过流式细胞计数或显微镜评价样品中的抗原。

合成肽的制备及应用

本发明的肽可通过在肽链中引入氨基酸取代进行修饰。理想的修饰是当改变一个或多个特定氨基酸，以更有效地模拟不同逆转录病毒株的抗原决定簇或促进免疫应答或 MHC 与抗原决定簇的相互作用，使

得用于免疫或预防接种时模拟肽产生更大免疫原性。此外，理想的修饰还包括进行某种氨基酸取代而增加肽的化学稳定性。

更具体而言，本发明所采用的多肽并不一定与特定 HIV 多肽顺序一致，只要相对于至少一种 HIV 株的蛋白提供免疫竞争性即可。因此，不论是保守性或非保守性改变都可对目标多肽作多种改变，如插入、删除、和取代，只要这种改变可增强所需的肽活性。保守性取代指采用如中性，酸性，碱性和亲水性氨基酸组内的相似氨基酸进行的取代。在这些组内取代的实施例可包括 gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; 以及 nor, met。以下显示针对 HLA 同种免疫球蛋白数据库分类（DNA 和血清学）应用分子模型软件获得的其它氨基酸取代：

组，1 字母代码	组，3 字母代码
F, S	phe, ser
Q, R	gln, arg
K, N	lys, asn
E, G	glu, gly
G, R	gly, arg
H, Q	his, gln
I, T	ile, thr
V, A	val, ala
D, N	asp, asn
Y, F	tyr, phe
I, F	ile, phe
K, E	lys, glu
E, L, R	glu, leu, arg

Y, L	tyr, leu
S, V	ser, val
Y, N, F, D	tyr, asn, phe, asp
D, R	asp, arg
L, F	leu, phe

在本发明优选的实施方案中，进行氨基酸修饰以在目标肽更亲水的一端取代亲水性残基，而在肽更疏水的一端取代疏水性残基。这种取代导致两亲性螺旋形成，而在两取代间托住所需的抗原决定簇。用 D 型氨基酸取代可托住需保护的抗原决定簇并稳定抗原决定簇，从而促进抗原决定簇的免疫原性。由于 D 型氨基酸不被细胞内的酶切断，当将它们插到适当的位置时这些部分为抗原决定簇提供了与 MHC 分子相互作用的所需长度。在以下实施例 8.5 中将作详细描述。

通常情况下，经修饰的序列与人类免疫缺陷逆转录病毒的至少一株的序列的不同点不大于 20%，但为使本发明的肽可方便地固定化到固相载体上、结合在大分子上，在肽的一端或两端上添加氨基酸以提供供连接的“手”的修饰，或通过改变或促进 MHC 结合和呈递促进免疫原性的修饰除外。供结合用的手可包含单个氨基酸或多至 50 或更多的氨基酸，典型的长度为 1 至 10 个氨基酸。

氨基酸如酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等可引入到肽或寡肽的 C-或 N-端，以提供供连接用的官能团。半胱氨酸是特别优选的，有助于与其它肽共价偶联或通过氧化构成聚合物的氨基酸。

此外，对序列末端 NH_2 酰化（如乙酰化）、巯基乙酸酰胺化、或端羧基酰胺化（如采用氨或甲胺）进行修饰使肽和寡肽序列与天然序列

不同，以提供稳定性，为与载体或其它分子的连接或结合、或聚合提供更大的疏水性。

因此，如在本发明所公开的肽的优选实施方案中，可在肽的末端添加一个或多个半胱氨酸残基，或添加一个或多个半胱氨酸残基和间隔氨基酸的组合。当需要单个肽时，赖氨酸为特别优选的间隔物。当需要肽的多重重复体时，已一个赖氨酸为核心合成肽的四重重复体。以实施例显示这种结构。供氧化聚合的优选肽为目标肽末端至少被添加两个半胱氨酸残基的肽。当两个半胱氨酸存在于同一末端时，当半胱氨酸残基被一个至三个优选为甘氨酸的隔离氨基酸分离时构成了优选实施方案。半胱氨酸残基的存在使得肽可能形成二聚体，和/或增加所得肽的疏水性而有助于肽在固相上的固定化或在固定化实验体系中的固定化。特别有意义的是利用半胱氨酸或用于酰化端氨基的巯基乙酸上的巯基，或者用于构造多重肽重复体或其类似物的第一氨基酸是通过二硫键或一种更长的连接形式连接两个肽或寡肽或其组合物，以构成含数个抗原决定簇的聚合物。这样的聚合物的优点是增加了免疫反应。当需要不同的肽进行免疫时，可将它们分别组装并复配成鸡尾酒以提供诱导更多抗体的能力，其中抗体与不同 HIV 分离体中的几种抗原决定簇反应。为构成抗原聚合物（合成多聚体），化合物可具有双一卤乙酰基、硝基芳基卤等，其中试剂对这些基团有特异性。肽或寡肽的一个或两个巯基间的连接可为单键或含至少 2 个或更多碳原子的连接。

肽与大分子载体的连接

可将目标肽连接至一个可溶性的大分子（如不大于 5 kDal）载体上。简单地，载体可为合成或天然聚氨基酸，它在人类血清中不易遭

遇抗体。这样的载体的实例有聚 L-赖氨酸、匙孔血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、白蛋白如牛血清白蛋白、破伤风类毒素等。载体的选取主要依赖抗原的最终用途以及方便和易得。在一个优选实施方案中，载体包含糖肽的多重重复体，这种微粒可以合成或从某些细菌如 *Propionibacterium acini* 等中分离得到。这种微粒由多重交联构成多聚结构的胞壁酰二肽构成。

当从 *Propionibacterium acini* 及其相关细菌中提取胞壁酰二肽时，菌株选择有助于提取工作的进行。选择的依据是对细菌细胞壁的化学分析。优选的实施方案是与由 L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺组成的二肽多重交联的胞壁酰二肽。

初步实验已经确定不同菌种的二肽组成及肽长度不同。含高浓度脂质 A 和 O-酰化- β -肉豆蔻酸酯的提取物是细胞壁的成分。初步实验证明这些不同点与增加毒性并降低佐剂作用相关。在以下实施例 4 中讨论了优选实验方案的菌种选择和纯化。

采用本领域已知的方法可合成 MDP 微粒。已经发现 MDP 是强的免疫增强剂，但具有明显的毒性。很多降低 MDP 毒性的尝试采用了延缓其释放的方法，如将 MDP 与脂质体或其它相关化合物结合或对其末端进行修饰。化学修饰使得所需的辅助性能大大降低，而改变转运速度的设计难于被控制。例如以下给出了 MDP 微粒的组成、大小、以及转运抗原的结合方法。从微粒组成中除去脂质有助于通过抗原呈递细胞（APC）使 MDP 迅速内在化。抗原呈递细胞主要是单核系细胞，包括单核细胞、巨噬细胞、组织细胞、Kuffer 细胞、Dendritic 细胞、Langerhans 细胞等，并通过 MHC 相关作用参与抗原处置和抗原呈递。有助于对外源性蛋白产生免疫应答的因素部分地可由在微环境中易受蛋白酶切断的氨基酸序列和序列决定。对于构成两亲螺旋的肽，其中

疏水端优选位于氨基端，而亲水端基常位于羧基端，最经常诱导免疫应答。对抗蛋白质降解并构成两亲性螺旋结构的序列常常为强免疫原。序列中包含脯氨酸残基通常免疫原性差，因为阻碍了螺旋的形成，而且糖基化位点不易接近，并经常阻断对肽抗原决定簇的应答。在宿主动物体内引起成功免疫应答的抗原激发需要通过 MHC 相关作用的抗原处置和抗原呈递。当内在化进入内涵体后，主要通过抗原呈递细胞（APC）处置外源性抗原。经过酶进行蛋白水解后，如在酸性环境下存在和反应的组织蛋白酶 D，符合上述标准的肽片段被 MHC 类型 II 汇集并呈递到细胞表面。当肽被呈递到足够的密度时即导致免疫的发生。免疫应答的类型受以下因素驱动：每 APC 上肽密度、微环境、细胞因子环境、以及被抗原呈递细胞首先激动的淋巴细胞类型。内在化后，细胞因子的级联应答被诱导出，其改变微环境并建立诱导免疫作用的条件。

例如，如以下实施例 5 所示采用单个 MDP 微粒（ $0.01-0.2\ \mu\text{m}$ ）运送免疫原至抗原呈递细胞，导致常规方法没有观测到的、针对差免疫原性的抗原决定簇产生的免疫应答。对这些免疫应答进行定量证明与其它佐剂相比抗体浓度增加了 10 至 100 倍。

用作免疫原的目标肽可采用目标肽的氨基或羧基端连接至胞壁酰二肽氨基酸部分的羧基端，或如实施例所述将其连接于糖部分上的醛氧化产物之上。每个 MDP 微粒上至少有一个目标肽分子，优选为每个 MDP 微粒上有 10—100 个目标肽分子，最优选为每个 MDP 微粒上有 100—1000 个目标肽分子。载体的大小及其可利用的连接基团数目将影响每个载体上目标肽的个数。

通过影响优先细胞吸收、肽半衰期、和通过 MHC 免疫作用的抗原呈递，大分子载体影响免疫原性。可将一种或多种不同目标肽连接

到同一大分子载体上，但优选将一种目标肽以一价或四价形式连接至大分子载体上。当需要多于一种的目标肽进行免疫时，可通过混合各目标肽大分子载体复合物制备复合物的鸡尾酒，其中混合比将最优化引入到鸡尾酒中各目标肽的免疫原性。在这一配置中，每个大分子载体复合物上具有足够的肽（100—1000 个肽），以促进单个抗原呈递细胞的抗原呈递。通过调节每个大分子载体上目标肽的个数，或连接结构，如氨基对羧基的连接、末端氨基酸的修饰、间隔臂的长度和组成，可优化目标肽的免疫原性。在这一构型中，通过抗原呈递细胞的抗原处置导致高密度，通常大于 100，和最常见大于 500 个肽通过 MHC 相互作用被呈递到抗原呈递细胞的细胞表面。如以下实施例所示，免疫后这种构型产生足够更高浓度的抗体。

连接的方式是常规的，采用如试剂 p-马来酰亚氨基苯甲酸、p-甲基二硫代苯甲酸、马来酸酐、琥珀酸酐、戊二醛等进行连接。连接可在分子的 N-端、C-端或分子的中部。采用胞壁酰二肽多重重复体时，通过对糖残基温和氧化，如采用高碘酸钠，产生醛基供与目标肽的连接，然后用硼氢化钠等温和还原将希弗碱中间体转化成一种稳定的共价连接。改变氧化条件可控制每个微粒上肽的数量，并可使用放射性示踪剂进行定量。在本领域中这些方法已为人所熟知。为获得所需的应答，不同肽可采用不同的连接方法和连接结构。

可采用多种本领域技术人员所熟悉的实验规程检测逆转录病毒蛋白抗原决定簇的抗体的存在或检测复杂蛋白混合物中的逆转录病毒蛋白。其中特别有意义的是一种本发明公开的新型检测法，其中将目标肽与一种供检测用的标记物如辣根过氧化物酶共价连接，并将天然 HIV 蛋白表达的抗原决定簇或多个抗原决定簇直接或间接连接至固相载体上。在这种构型中，识别肽抗原决定簇的抗体将使固相载体上的抗原

决定簇与标记物上的抗原决定簇相连。通过改变接在标记物上的肽，采用这种方法可测量和定量出抗体对 HIV 抗原决定簇的反应性。例如，通过本发明公开的一步竞争性免疫实验可对任何表达与 HIV 血清型、毒性因子或其它 HIV 特征相关的肽抗原决定簇的样品中的抗原决定簇进行鉴定和测量。

抗体及其相应抗原决定簇在免疫亲和纯化法中的应用

对包含在 HIV 蛋白中的抗原决定簇有特异性的抗体，以及含这些抗原决定簇的纯化蛋白，特别适用于免疫亲和纯化含这些抗原决定簇的蛋白以及与它们反应的抗体。通常抗体的亲和常数在 10^8 至 10^{12} M 数量级。可采用这种抗体纯化含目标抗原决定簇的蛋白和肽。通常可采用经基因改造的细菌制造 HIV 蛋白，如果被表达蛋白被分泌出来，可从重组表达系统的培养介质中提纯出目标重组融合蛋白，如果被表达蛋白不被分泌出来，可从经破坏的生物表达体系中提纯出蛋白，或者从蛋白的复杂生物混合物中提纯出蛋白，其中蛋白中的一些或一种成份包含有模拟 HIV 抗原决定簇的抗原决定簇。通常将可与 HIV 抗原决定簇反应的抗体结合或固定化至基体或载体上。接着在适用于抗体与含抗原决定簇的蛋白相互反应构成免疫复合物的条件下，将含有抗原决定簇的溶液与固定化的抗体接触。未结合材料从结合的免疫复合物中被分离出去，然后结合蛋白从固定化抗体上被释放出来并回收至洗脱液中。

类似地，含 HIV 抗原决定簇或模拟 HIV 的抗原决定簇的蛋白或肽被结合或固定化至基体或载体上，用于从溶液中提取目标抗体。含有抗体的溶液，如去除白蛋白的血浆，流经固定化肽或蛋白柱，其中肽或蛋白中包含所需抗原决定簇，免疫复合物形成后，非反应性抗体从

结合免疫复合物中被分离出去，用洗脱缓冲液释放抗体并将其回收在洗脱液中。对于包含模拟 HIV 的抗原决定簇但来源于与 HIV 无关种系中的蛋白的纯化，这种方法具有特别重要的价值。

典型地，将抗体从超免疫血清中粗分出来。腹水液体或细胞培养上清液以及包含模拟 HIV 抗原决定簇的蛋白或肽可从生物来源中粗提，该生物来源例如但不限于：体液、血液、血液成份、细胞提取物、成体或胚胎组织提取物、以及培养上清液、培养细胞提取物、毒液、以及结合到载体前的重组融合产物。这些方法本领域技术人员很清楚，可包括采用高浓度的中性盐分级。在用于免疫吸附前，也可采用其它纯化方法，如离子交换色谱、凝胶过滤色谱、制备型凝胶电泳、或亲和色谱以增加制剂的纯度。有必要时将粗分的抗体制剂与支持基体反应可制备亲合性纯化的抗体，其中支持基体上连接有反应性抗原决定簇或含有这种抗原决定簇的蛋白。

特别有意义的是通过天然系统来模拟的 HIV 抗原决定簇的抗体。由于可纯化 HIV 蛋白和描绘 HIV 蛋白序列的定位及功能，这种抗体适用于作治疗药剂并适用于研究 HIV。采用 HIV 衍生的蛋白/肽免疫可制备这种抗体，并通过所得超免疫多克隆多价抗血清与上述由非 HIV 源如胚胎蛋白、毒液、以及非 HIV 微生物/病毒成份衍生的、固定化于载体上的蛋白/肽反应来进行免疫亲和纯化。所得之经免疫亲和纯化的抗体对于 HIV 与用于免疫纯化的非种属相关蛋白所共享的抗原决定簇有抗原决定簇特异性。这些抗原决定簇特异性抗体在 HIV 和非 HIV 衍生蛋白和肽的免疫亲和纯化中具有特别重要的作用。这样的抗体可用于描绘抗原决定簇在 HIV 上的位置以确定其序列，评价其在 HIV 寿命周期中的作用，其在 HIV 进化株或其它逆转录病毒中的分布，其与 HIV 毒性的相关性，以及如果其对人体无毒害作用，但可中和 HIV 寿命周

期的重要阶段，则可用于治疗 HIV 感染。

理想的用于固定化抗体或抗原决定簇的载体具有以下基本特性：

(a) 与蛋白间相互作用一般较弱，以最小化非特异性结合；(b) 好的流动性，允许高分子量材料流过，(c) 具有经活化或修饰可与抗体或抗原决定簇构成化学键连的基团，(d) 在用于连接抗体的条件下具有物理和化学稳定性，以及 (e) 对于抗原吸附和洗脱所需的条件及缓冲液成份具有稳定性。常用的一些载体有琼脂糖、衍生化的聚苯乙烯、多糖、聚丙烯酰胺小球、活化的纤维素、玻璃等。有多种将抗体和抗原连接到载体上的化学方法。一般可参见 Cuatrecasas, P., *Advances in Enzymology* 36: 29 (1972)。本发明的抗体和抗原可直接或通过连接剂或间隔臂间接连接至载体之上。将抗体和抗原固定化至色谱固定相上所需的通用条件已为本领域所熟知。如可参见 Tijssen, P., 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*，此处引用此文献作为参考。具体的偶连条件部分地依赖于被偶联抗体或抗原的特性及类型。典型通过共价键进行连接。

将一种富含抗体的免疫血清、腹水或培养上清液或 HIV 病毒的提取物及溶胞产物、培养生物表达系统的上清液或提取物，经破坏的细胞组织或血液成份（成体或胚胎）的悬浮物的上清液或提取物、或其它复杂蛋白混合物，如含抗原决定簇的毒液、体液、或培养产物，加到适当的分离基体中。在一定条件下温孵混合物并保持一定时间，以足以产生抗原-抗体结合，通常至少 30 分钟，最好是 2 至 24 小时。接着将含有特异性结合的抗体或抗原决定簇的固定化免疫复合物从该复杂混合物中分离出来，采用吸收性缓冲液充分洗脱除去非结合杂质。然后采用与具体载体、结合蛋白和洗脱蛋白有相容性的洗脱缓冲液，将免疫复合物解离。可洗脱的蛋白、抗原或抗体被回收至洗脱液中。

洗脱缓冲液和技术已为本领域技术人员所熟知。包含被抗体识别之抗原决定簇的肽可被用在洗脱缓冲液中，用于竞争性结合抗体结合位点，洗脱可在一温和的洗脱条件下进行。通过改变缓冲液的 pH 和/或离子强度，或添加离液序列高的试剂，可将被选择性吸附的蛋白从亲和吸附剂上洗脱下来。洗脱缓冲液、其浓度以及其它洗脱条件的选择依赖于抗体-抗原相互反应的特性，并且一经确定后就不可作太大的变动。

如果采用低或高 pH 或者低或高离子强度缓冲液或离液序列高的试剂分解免疫复合物，需要将洗脱的蛋白调整至生理 pH 和离子强度。可通过渗析或凝胶过滤色谱进行这种调整。这些方法也使得洗脱的蛋白重新获得其天然构象。

上述的方法制得例如基本上纯化的、含有 HIV 抗原决定簇或模拟抗原决定簇的蛋白，以及与这些抗原决定簇反应的抗体。典型地，经纯化蛋白的纯度至少为 50%，更常见地至少为 75%，常常大于 95%至 99%。

通过以下实施例描述本发明的实验可表明本发明其它的特征和优点。实施例也进一步描述了本发明的方法，但不对本发明起界定作用。

实施例 1

人类抗 HIV 抗体 (IgG 部分) 库的制备，用于描绘人类和山羊免疫反应间 HIV 抗原决定簇的不同之处

在经患者同意，患者签名同意，医生许可和当地 IRB 同意的前提下，在一个社区诊所从 HIV 感染者体内获得人类血清。首先将所有血清稀释 10 倍，采用购自 Abbott Laboratories 的试剂盒筛选所有血清的 HIV 反应性。然后用 Western 印迹分析法对强反应性血清（通过实验，随意地定为吸附率大于 1）作进一步评价，以确定这些血清对大多数 HIV

蛋白（env、gag 和 pol）的抗体反应性。如此被确定对大多数 HIV 蛋白具有好的反应性的患者血清再通过小型培养中和试验评价确定血清中含有的抗体的特异性，这种抗体特异性将中和小型培养试验中 HIV 的感染性（总可培养感染剂量（TCID）中和反应）。共鉴别出 29 名患者的血清与 gp160、gp120、p66/55、gp41、p24 和 p17 和 p10 反应具有高抗体滴度，在小型培养中可中和 HIV 的感染性，并将这些血清集中在一起（每个 20—40ml）。对集中的抗人类 HIV 血清的进一步评价发现对多株 HIV 具有广泛的中和作用，并对以上详述的九个抗原决定簇区域具有高的抗体滴度（Western 印迹法 1: 100 或更大时为阳性）。采用常规方法从这一血清库中提取人类 IgG。纯化后将总 IgG 浓度调整至 10 mg/ml，用标准免疫检测法评价其组成和纯度。结果证明纯度大于 98% 并且其组成为人类 IgG。将纯化的人类抗-HIV 分成几等分并冷冻，供下述实验用。对于鉴别抗原和抗体库特异性的方法，本领域技术人员是熟悉的。这种特异性可用在以后对抗未知抗体或抗原的测定中作为比较。

如在以下实施例中所描述的那样，采用此人类抗-HIV 去跟踪粗病毒溶胞产物中之 HIV 蛋白的纯化，描述被人类免疫系统识别的 HIV 抗原决定簇，并在竞争性 EIA 中鉴别被山羊而非人类抗体进攻的 HIV 抗原决定簇。采用 Western 印迹分析法鉴定以含有目标肽的纯化 HIV 蛋白或这些肽的合成体免疫的山羊体内的免疫应答，并评价设计用于放大弱免疫原性肽的免疫反应的微粒载体复合物的功效。采用小型培养法评价中和 HIV 感染性的抗体，该方法采用从外周血液单核细胞（PBMC）中提取的纯化人类 CD4 淋巴细胞，其中利用标准技术，该技术采用单克隆抗体结合的磁性颗粒除去不需要的细胞。用促细胞分裂剂刺激 CD4 淋巴细胞，以增加其被 HIV 感染的可能性，除非特别声

明将用它作为 HIV 感染的宿主。除非特别声明, 将用 HIV_{1SF2} 作为参比 HIV 株。采用本领域技术人员所熟悉的技术利用小型培养法确定抗体对 HIV 感染性的作用。感染性以感染单元数 (IU) 表示。抗体介导的 IU 下降与病毒感染性被中和相关联, 并被表示为感染单元数的改变。在所有本发明描述的需要人类抗-HIV 抗体的实验中均使用人类抗-HIV 库。将该人类 IgG 抗-HIV 库与几种商品人类抗-HIV 制剂作比较, 发现它具有相等或更大的 HIV 中和活性, 当采用 Western 印迹分析法进行比较时发现它具有明显更强的反应性。

实施例 2

本发明所采用商品 HIV 病毒溶胞产物的表征

预实验

从 Advanced Bio-Technology, Inc., Columbia, MD 处以纯化病毒溶胞产物形式购买 HIV_{1MN}、HIV_{1BAL}、和 HIV_{2NZ}。对这些纯化病毒溶胞产物的分析表明, 批间总蛋白含量在 0.8 mg/ml 至 1.2 mg/ml 之间。利用人类 IgG 抗-HIV 通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹法评价各 HIV 溶胞产物的蛋白组成。用蛋白酶抑制剂和非离子表面活性剂 (1.0% v/v) 如 Nonidet P-40 或 Igepal CA 630 处理 HIV 溶胞产物, 以完全裂解 HIV 蛋白和糖蛋白使其成为单体形式, 并通过 0.22 μ m 过滤器过滤使之澄清。采用标准方法利用 SeroClear 除去脂质。本领域技术人员已经熟知, 在出芽过程中 HIV 将人类蛋白组装进其衣膜中。一旦鉴定出这种杂质, 采用免疫亲和色谱将其除去。在初期纯化的步骤中, 利用抗-正常人类血清 Sepharose CL6B (2-3 mg 抗体/g Sepharose) 通过免疫亲和色谱除去在有助于细胞生长的生长介质中存在的血清杂质和 HIV 溶胞产物中的杂质。在基体与溶胞产物比例为 1: 1 v/v、流速 10ml/h 的条件

下, 色谱分离 HIV 溶胞产物。在波长为 280nm 下分光光度监测色谱及洗脱。将含有 HIV 相关蛋白并富含蛋白的非结合部分浓缩成 1mg 蛋白/ml, 然后在 -70℃ 下贮存供将来需要时使用。用溶于 0.9% NaCl 中的 pH 2.2 甘氨酸-HCl 缓冲液将与亲和性基体结合的蛋白洗下。将洗脱液中和, 在含 0.1% Igepal CA 630 的 pH 7.8 PBS 中渗析, 浓缩并于 -70℃ 下贮存供随后分析。利用人类抗 HIV IgG, 采用 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析法分析纯化 HIV 制剂均证明 gp160、gp120、p66/55、gp41、p10、p24、p17 和 p7 的存在。采用 Western 印迹分析法于甘氨酸-HCl 洗脱液中未检出 HIV 蛋白, 但用使蛋白显现的考马斯良蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶证明有 2-3 个弱染色带。

不完全纯化的 HIV 溶胞产物产生的抗 HIV 抗体的表征

用上述所得的纯化 HIV 蛋白免疫山羊 (n=2), 山羊体内发生免疫应答, 产生与 HIV 上免疫抗原决定簇起反应的抗体。对该抗血清的进一步评价证明存在与 HIV 感染和非感染的 CD4⁺淋巴细胞反应的细胞毒性抗体的存在, 并检测到红血球 (RBC) 凝集素。这些凝集素与所有人类 RBC 血型以及兔和豚鼠的 RBC 血型反应。认为有两种可能导致这种不需要的抗体特异性。一种可能性是 HIV 溶胞产物中沾染有细胞培养引入的蛋白杂质, 第二种可能是 HIV 蛋白/糖蛋白和人类或其它种动物中糖蛋白之间的模拟。已经知道在 HIV 衣膜中常可鉴定出宿主膜蛋白的存在。将宿主膜成份组装到 HIV 衣膜中的原因被认为是非特异性的并与成熟病毒粒子的出芽相关。以前在成熟病毒粒子衣膜中鉴别出的两种蛋白为人类 HLA 类型 I 和类型 II 抗原。采用酶联免疫实验定量检测 HLA 类型 I 和类型 II 抗原, 结果证明在这些 HIV 制剂中存在 HLA 类型 I 和类型 II 抗原, 其浓度与其非感染培养细胞衍生的细

胞膜制剂中所测的浓度不成比例。进一步研究证明在不同 HIV 病毒溶胞产物制剂 (n=17) 中有 HLA 类型 I 和类型 II 抗原的存在。这些制剂中的实测浓度是不定的, 但总的来说要比在未感染对照细胞的膜提取物中浓度高 10 至 100 倍。采用 Western 印迹分析法检测山羊抗 HIV 抗体与已知 HLA 类型 I 和类型 II 抗原提取物的反应性, 证明其中含有针对 HLA 类型 I 和类型 II 抗原 (α 和 β 链) 和 β -2-小球蛋白的抗体特异性。评价该抗体对 HLA 同种异型的特异性。采用含有已知同种异型抗免疫球蛋白的淋巴细胞的商品盘作为作用靶。在实验条件下, 这种抗体对所有淋巴细胞具有细胞毒性, 而且这种细胞毒性以剂量依赖方式部分地被可溶性 HLA 类型 I 和 HLA 类型 II 抑制 (表 2.1)。

表 2.1

在纯化 HIV 溶胞产物产生的抗血清中 HLA I 对淋巴细胞毒性的抑制

稀释	抗 HIV	抗 HIV & HLA I & II 25 μ g	抗 HIV & HLA I & II 50 μ g	抗 HIV & HLA I & II 100 μ g	抗 HIV & HLA I & II 200 μ g	免疫前的血清
u	8	8	8	8	8	0
1: 5	8	8	8	8	8	0
1: 10	8	8	4	4	4	0
1: 20	8	8	4	4	4	0
1: 40	8	8	4	4	4	0
1: 80	8	4	2	4	2	0
1: 160	8	4	0	2	0	0
1: 320	8	2	0	0	0	0
1: 640	8	0	0	0	0	0
1: 1280	4	0	0	0	0	0

将溶解性 HLA 类型 I & II 加至含抗 HIV 抗体的微量测量板孔中, 4°C 下温孵过夜。

溶解性 HLA 类型 I & II 降低了淋巴细胞毒性，但浓度大于 50 μ g 后不再起作用。

进一步研究表明存在一种抗体，它可与存在于 gp120、人类红和白血球、以及包括兔、鼠和豚鼠在内的不同动物血红细胞上的和种族保守性糖抗原反应。经过 S-HLA I & II 吸附后，人和鼠血红细胞吸附实验完全去除了 RBC 血型（表 2.2）和淋巴细胞（表 2.3）的剩余抗体反应性。

表 2.2

针对 RBC 凝集素细胞抗 HIV 抗体对抗 RBC 吸附的分析

RBC 吸收#	抗* HIV 1			抗 i* HIV 2			抗* HIV 1&2		
	AB+	O+	兔	AB+	O+	兔	AB+	O+	兔
0	256	256	256	256	128	128	128	256	128
1	128	128	128	128	64	128	64	128	128
2	32	32	32	32	32	64	32	32	32
3	8	4	4	4	4	4	8	4	4
4	2	--	--	--	--	--	2	--	--

*纯化 HIV 溶胞产物产生的抗血清导致免疫后在山羊体内产生 RBC 凝集素。对于山羊（各 2 只）各采用 HIV1_{MN}、和 HIV1_{BAL} 和/或 HIV2_{NZ} 免疫

表 2.3

免疫过程中针对淋巴细胞毒性抗 HIV 抗体对抗 RBC 吸附的分析

RBC 吸收 (n) #	抗* HIV 1			抗* HIV 2			抗* HIV 1&2		
	AB+	O+	兔	AB+	O+	兔	AB+	O+	兔
0	512	512	256	1024	1024	1024	512	1024	1024
1	256	256	256	256	512	512	256	256	256
2	128	64	128	64	64	128	64	128	64
3	32	16	16	16	16	32	16	16	16
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	2	2	2	±	2	2	2	2	2

*未作糖苷酶处理于 20 周收集血液产生针对 HIV 的抗血清，血红细胞吸收 0—5 次，测试针对淋巴细胞的淋巴细胞毒性。

经过吸收和去除对 HLA 和血红素凝集素有特异性的抗体后，山羊抗 HIV 抗体的测定结果表明包括与以前文献所类似的特异性。这一信息说明需要对 HIV 蛋白进行修饰，以除去糖和 HLA 抗原，避免针对人类抗原的细胞毒性抗体的产生。

实施例 3

从 HIV 溶胞产物中提取的 HIV 蛋白的纯化及 HLA 类型 I 和类型 II 抗原及糖的去除

从 Advanced Biotechnologies, Columbia, MD 购买 HIV1_{MN}、和 HIV1_{BAL} 和 HIV2_{NZ} 溶胞产物。它们中含 0.8—1.2 mg 蛋白/ml。加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白被降解，加入非离子表面活性剂（Igepal Ca-630、或 Nonidet p-40）裂解 HIV 蛋白。加入脱脂试剂将混合物悬浮于具塞

的提取管中，以除去脂质并澄清混合物。离心并除去水相后，脂类有差别地溶在有机层中。

通过共价结合：免疫亲和纯化多克隆 IgG 抗体和人类血清蛋白，单克隆 IgG 和 HLA-1，单克隆 IgG 和 HLA-2，单克隆体和 β 2-球蛋白，免疫亲和多克隆 IgG 抗体与淋巴细胞和血红细胞膜抗原，制备 5 个分立的亲和基体，对这些亲和基体进行免疫亲和色谱分离，将细胞培养引入的杂质，包括 HLA，除去。每个基体中包含 2-3 mg 抗体/g Sepharose CL6B。柱子以串联形式安置，基体用含 0.1% Igepal Ca-630、pH7.8 的 PBS 冲洗并平衡。将体积等于柱床体积的溶胞产物溶液以 10 ml/h 的流速连续通过各柱进行色谱分离。在 280 nm 波长下分光光度检测色谱和洗脱。将含 HIV 相关蛋白并富含蛋白的未结合部分浓缩为 1 mg 蛋白/ml。

将 SDS 加到含目标 HIV 蛋白的免疫亲和纯化的混合物中，并将混合物在 70℃ 下加热 10 分钟。使用 PGN 酶对蛋白进行酶法脱糖。在采用含 0.1% 非表面活性剂的盐水预平衡的 Sepharose G50 上，通过粒径大小色谱分离蛋白混合物。收集蛋白部分，将含所需 HIV 蛋白的部分分别集中。保存这三个分别富含 gp160 和 gp120，p66/55 和 gp41，以及 p24、p17 和 p10 的蛋白库。将蛋白部分于 -70℃ 下贮存供以后使用。

在 “Identification, Characterisation, and Quantitation of Soluble HLA Antigens in Circulation and Peritoneal Dialysate of Renal Patients”, F. Gelder, Annals of Surgery Vol. 213, (1991) 中公开有定量测量及去除人类白血球抗原 (HLA) 的详细方法，此处引用作为参考。

表 3.1 显示纯化过程所得数据。

表 3.1

HIV 溶胞产物的纯化

分离步骤	蛋白 mg/ml	体积 ml	总蛋白	HLA I ng/ml	HLA II ng/ml	% 回收率
HIV 溶胞产物	1.13	10	11.3	1833	692	100%
除脂质后	0.96	10.3	9.8	1726	683	86.7
亲和色谱后	0.44	19.5	8.58	<10	<10	75.9
浓缩后	1.01	8.1	8.18	<10	<10	72.3

典型地，上述 HIV 制剂的纯化可除去包括 HLA 类型 I 和类型 II 在内的杂质。利用人类 IgG 抗 HIV 库通过 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析法分析纯化 HIV 制剂，均证明 gp160、gp120、p66/55、gp41、p10、p24、p17 和 p7 的存在。

实施例 4

用纯化的 HIV 引发佐剂作用时 MDP 微粒生物化学和结构要求的表征及其制备

从 *Propionibacterium acini* 中提取胞壁酰二肽（MDP）的多重重复体，构成本实施例 MDP 微载体复合物的核心结构。单体子单元的化学结构式为：



众所周知 MDP 具有增强免疫的作用，这一性质已受到了广泛地研究，以确定其在增加免疫功能上的作用。本领域技术人员熟悉这一作用。

到目前为止，当对哺乳动物给药时，不管天然提取的 MDP 或是合成 MDP 均具有明显的毒性。这种毒性限制了 MDP 作为载体。

本发明提供了一种用于提取不含有毒成份的 MDP 的方法。采用处于半稳定 (mid-stationary) 生长期的 *Propionibacterium acini*，采用本领域技术人员所熟知的方法冲洗除去来自细菌培养的杂质。在升高的温度下用梯度浓度的乙醇/甲醇/水连续提取细胞壁和细胞质中的疏水成份。将所得 MDP 微粒悬浮于 10% 乙醇中，比较其在 540 nm 处的吸收与浊度标准液的吸收，由此测定其浓度。将 MDP 微粒的浓度调整至 1 mg/ml，贮存供随后使用。

对这一制剂的分析表明胞壁酰二肽大量交联，粒径为 0.1 至 0.2 μm 。末端二肽氨基连接的 L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺与上述单体结构一致。已知该处在不同菌种间存在差别，这种差别导致在肽组成上的不同，如含 5 个或更多氨基酸的末端肽，二肽组成的改变，特别是 L-丙氨酸-L-异谷氨酰胺，以及插入 O-酰化 β -肉豆蔻酸酯基的部位的变化。这些变动是不理想的，导致天然提取的 MDP 具有毒性和差的佐剂性能。在一个优选实施方案中，MDP 微粒 (0.01–0.2 μm ；优选为 0.05–0.1 μm) 具有氨基连接的 L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺二肽。如上所述，这种微粒可从天然中提取，或采用已为人所熟知的合成方法合成。

实施例 5

MDP-免疫原复合物的制备和初步评价

采用在巯基桥处缺少约 22 个氨基酸的弱免疫原性的单克隆人类 λ 轻链片段 ($M_r \sim 18,000$) 作为免疫原 (I), 评价上述实施例的 MDP 微粒 (0.2μ) 对抗体产生的辅助作用。制备两种复合物, 其中一种通过末端羧基将免疫原共价结合到 MDP 上, 而另一种通过末端氨基进行结合。以分步的形式组装 MDP-免疫原复合物, 每步反应后通过离心、除去上清液并加入继续 MDP-免疫原组装所需的其它试剂进行试剂交换。每步反应所显示的摩尔比和每步反应后进行的试剂交换防止了由预实验产生的、明显降低抗体免疫应答的抗原的多点连接。

合成 MDP: NH_2 ; 免疫原: CO_2H

采用 EDC 的两步高效偶联 HIV 蛋白和胞壁酰二肽的实验规程

以下的方法是对 Grabarek, Z. And Gergely, J., J. Anal. Biochem. 185: 1311 (1990) 中所描述的方法改良, 使得可连续将 HIV 蛋白和肽偶联至 MDP 之上而不使 HIV 蛋白与 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 接触从而影响 HIV 的羧基。该方法采用一含巯基化合物中止第一反应。该反应在 2-[N-吗啉代]乙烷磺酸 (MES) (pH 4.5-5.0) 中进行。

将从水中冻干的 MDP (10 mg) 重新悬浮在 MES (0.5 ml) (pH 4.5-5.0) 中, 并加入溶于 MES (pH 4.5-5.0) 中的 0.5 ml EDC (0.5 mg $\sim$ 2 mM), 室温下反应 15 分钟。加入 2-巯基乙醇 (终浓度 20 mM) 破坏 EDC 并采用离心分离。反应混合物用 MES 洗一遍并重新悬浮于 0.5 ml MES (pH 4.5-5.0) 中。以摩尔比约 2: 1 将溶解在 MES 中的

人类 λ 轻链片断加到活化的 MDP 中。通过加入 MES (0.5 M pH 8.5) 使反应的 pH 经 15 分钟缓慢地变为 8.5, 并在室温下反应 2 小时。定量测量 MDP 端羧基计算加到 MDP 上的 λ 轻链片断的浓度, 并表示为摩尔羧基每 mg MDP。加入羟胺至终浓度为 10mM 终止反应。这种终止反应的方法水解所有未反应的 MDP 活化位点并重新生成先前的羧基。其它终止反应的方法包括加入 20—50 mM Tris、赖氨酸、甘氨酸、或乙醇胺; 但这些含一级氨基的化合物将产生修饰羧基的 MDP。当 MDP 与一种 HIV 合成肽反应并且需要对该肽进行修饰, 如改变疏水基或连接生物活性化合物时, 在最终终止反应前加入所需化合物可进行这种修饰。这使得 HIV 肽在最初偶联步骤完成后可连续加入所需化合物。当需要更好地控制肽免疫原性时, 也可一步将一定比例的生物活性肽与 HIV 肽一起加入。已为本领域技术人员所熟知的生物免疫调节剂 IL2 可用于此目的。

通过离心、清洗并重新悬浮于所选缓冲液中完成分离操作。

制备 MDP-CO₂H-免疫原-NH₂

合成 MDP: NH₂CH₂CH₂NH₂: CO₂H: 免疫原: NH₂

采用 EDC 的三步高效偶联 HIV 蛋白和胞壁酰二肽的实验规程

该方法可将蛋白或肽连续偶联至 MDP 之上而不使蛋白与 EDC 接触而影响蛋白的氨基。该方法采用了两个连续执行的中间步骤。在 MES (pH 4.5—5.0) 中进行第一反应。将从水中冻干的 MDP (10 mg) 重新悬浮在 0.5 ml MES (pH 4.5) 中, 并加入溶于 MES 中的 0.5 ml EDC (0.5 mg~2 mM), 室温下反应 15 分钟。加入 2-巯基乙醇 (终浓度 20 mM) 破坏过量 EDC, 然后离心分离已纯化的 MDP, 用 MES 洗两遍并重新悬浮于 0.5 ml MES (pH 4.5) 中。按摩尔比约 10: 1 将溶在 MES

(pH 4.5) 中的二氨基乙烷 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) 加到活化 MDP 中。通过加入 MES (0.5 M pH 8.5) 使反应的 pH 经 15 分钟缓慢地变为 8.5, 并在室温下反应 1 小时。离心分离 MDP: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 用 MES 洗两遍并重新悬浮于 0.5 ml EMS (pH 4.5) 中。将 λ 轻链片断悬浮在 0.5 ml MES (pH 4.5) 中, 加入 0.5 ml 溶在 EMS 中的 EDC (0.5 mg ~ 2 mM), 并在室温下反应 15 分钟。加入 2-巯基乙醇 (终浓度 20 mM) 破坏过量的 EDC, 并采用适当尺寸的凝胶过滤柱将活化蛋白从过量还原剂和非活化交联剂中分离出来。以摩尔比约 5: 1 将活化的蛋白加到活化的 MDP: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 中, 并在室温下反应 2 小时。定量测量 MDP 端羧基, 计算加到 MDP 上的 λ 轻链片断的浓度, 并表示为摩尔羧基每 mg MDP。加入羟胺至终浓度为 10 mM 终止反应。这种终止反应的方法水解所有未反应 MDP 活化位点, 并重新生成先前的羧基。当用 HIV 合成肽作为免疫原, 并且需要对该肽进行修饰, 如改变疏水基或连接生物活性化合物时, 可如上所述进行这种修饰。通过离心、清洗并重新悬浮于所选缓冲液中, 完成分离操作。

应注意的是当需要通过羧基进行连接时, 添加生物活性化合物可能需要上述的中间步骤。

实施例 6

MDP 免疫原复合物与商品佐剂的比较研究, 包括 Freund's Complete 佐剂、RIB®、Titer Max®和 Alum

采用上述实施例 1 中作为免疫原 (I) 的弱免疫原性单克隆人类 λ 轻链片断 ($M_r \sim 18,000$) 评价 MDP 微粒 (0.1μ) 对抗体产生的辅助作用。制备两种复合物, 其中一种通过末端羧基将免疫原共价结合到 MDP 上, 而另一种通过末端氨基进行结合。

用结合在约 500 微克 MDP 上并乳化在角鲨烯中的约 100 微克 λ 轻链皮下免疫兔（每组 5 只）。每月免疫动物一次，并测试免疫前和免疫后每两周的血液。比较 MDP: $\text{NH}_2\text{-I-CO}_2\text{H}$ 和 MDP: $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{:HO}_2\text{C-I-NH}_2$ 的免疫应答的强度；通过竞争性 EIA 检测表明， $\text{NH}_2\text{-I-CO}_2\text{H}$ 刺激的兔产生至少一种附加的抗体特异性。将所得抗体应答与通过常规佐剂产生的抗体应答作比较，包括 Freund's Complete 佐剂、RIB®、Titer Max®和 Alum（氢氧化铝）。在诱导抗体生成上，MDP: $\text{HO}_2\text{C-I-NH}_2$ 和 MDP: $\text{NH}_2\text{-I-CO}_2\text{H}$ 均明显优于免疫原与常规佐剂所构成的复合体。免疫原浓度（每次免疫 100 μg ）和免疫方案每组均相同。表 6.1 显示每两周所测的抗体滴度，并将滴度表示成如上所述产生正反应稀释度的倒数。两种 MDP 复合物均优于常规已为人所熟知的佐剂。

表 6.1

星期	*MDP: I CO_2H	+MDP: I NH_2	Freund's Complete	Ribi	Titer Max	Alum
T-0	---	---	---	---	---	---
2	---	---	---	---	---	---
4	2	---	---	---	---	---
6	16	4	---	---	---	---
8	256	128	---	---	---	---
10	512	512	4	4	4	---
12	1024	512	16	16	16	---
14	4096	2048	32	32	64	4
16	4096	4096	64	128	256	8
18	8192	4096	256	512	1024	32
20	16384	8192	256	512	2048	32

T-0=初次免疫并在免疫前采集血液。

MDP: I 胞壁酰二肽：免疫原微粒（ $\leq 0.2 \mu\text{m}$ ）。

*肽利用末端氨基与异谷氨酰胺暴露的末端羧基结合 (MDP: I: CO₂H)
+通过中间步骤结合肽的羧基端, 其中采用二氨基乙烷修饰 MDP 的末端羧基。(MDP: I: NH₂)

实施例 7

由 MDP: NH₂: I: CO₂H 和 MDP: NH₂CH₂CH₂NH₂: O₂HC-I-NH₂
免疫原诱导的外周血液单核细胞的细胞因子响应

为进一步评价 MDP 微粒-免疫原复合物增强免疫应答的机制, 采用一种测定细胞因子产生或外周血液单核细胞的体外方法, 并与已知细胞因子诱导剂比较。采用已知的细胞因子诱导剂脂多糖 (LPS) 以及 LPS 加植物血球凝集素 (PHA)。采用一种成熟的检测方法定量测定细胞因子并表示为单位/ml。通过 Ficoll Hypaque 梯度离心分离外周血液单核细胞并在组织培养介质中将浓度调为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。将细胞 (100 μl) 加到微量测定板孔中。以不稀释或稀释 1: 10 和 1: 25 (10 μl) 形式加入 MDP: I: CO₂H、MDP: I: NH₂、PHA+LPS、LPS 和单独的培养介质。培养物在 37°C、5%CO₂ 氛中温孵 48 小时, 除去上清液并用标准生物检测法和/或 EIA 法检测。

表 7.1

	IFNR	IL2	TNF	IL6
MDP: I: CO ₂ H	550	510	152	62
MDP: I: NH ₂	520	495	176	73
LPS+PHA	340	320	495	450
LPS	210	150	325	310
介质	0	0	0	0
I: CO ₂ H	496	398	68	25
NH ₂	23	410	72	21
LPS+PHA	205	165	210	152
LPS	175	90	135	140
I: CO ₂ H	125	90	5	10
NH ₂	51	85	9	10
LPS+PHA	20	10	15	20
LPS	20	10	15	20

与 LPS+PHA 或单独使用 LPS 相比, MDP: I: CO₂H、MDP: I: NH₂ 均刺激出更强的类型 I 细胞因子响应。类型 1 细胞因子响应促进免疫, 而类型 2 细胞因子响应则通过 IFN γ 和 IL2 升高以及较低水平 INF 和 IL7 来指征。

实施例 8

未处理和除去糖基部分的 HIV 蛋白在山羊体内抗体应答的指征以及 MDP 微粒与常规佐剂的佐剂性能的比较。

实施例 8.1

从 Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD.处购买 HIV1_{MN}、

HIV1_{BAL} 和 HIV2_{NZ} 病毒溶胞产物，将每个制剂的一半通过酶法处理除去糖基，并如上所述将所有制剂（含或不含糖）纯化。依据实施例 5 中所述方法，将每个制剂中的一份通过末端氨基结合到 MDP 上，并分别悬浮于角鲨烯中。为进行比较，同时也将那些未与 MDP 结合的蛋白乳化在 Freund's Complete 佐剂中。

组 1—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}, 1: 1, 未去糖;

组 2—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}, 1: 1, 去糖;

组 3—HIV2_{NZ}, 未去糖;

组 4—HIV2_{NZ}, 去糖;

组 5—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}: HIV2_{NZ}, 1: 1: 1, 未去糖;

组 6—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}: HIV2_{NZ}, 1: 1: 1, 去糖;

组 7—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}: HIV2_{NZ}, 1: 1: 1, 未去糖, 未与 MDP 结合, 乳化在 Frennd' s Complete 佐剂中;

组 8—HIV1_{MN}: HIV1_{BAL}: HIV2_{NZ}, 1: 1: 1, 去糖, 与 MDP 结合, 乳化在 Frennd' s Complete 佐剂中。

将山羊分成 8 个免疫组（每组 n=3）并按表 8.1 所示间隔每次用 100 μ g HIV 进行免疫。免疫前和每两周采集血液。采用经 FDA 批准并购自 Abbott Laboratories 的试剂盒通过 EIA 法定量测定抗体反应性。结果表示为产生吸收值 > 1.0 时抗血清稀释度的倒数。整个免疫过程中每两周测量一次抗体反应。EIA 检测显示在采用 MDP 的各动物组（组 1&2, 3&4, 5&6）间抗体反应性无显著差别。除去糖基并不影响目标抗 HIV 蛋白的抗体的产生。

表 8.1
HIV 蛋白的抗 HIV 抗体应答的分析

星期 #	组 1 抗 HIV 1	组 2 抗 HIV 1 ¹	组 3 抗 HIV 2	组 4 抗 HIV 2 ²	组 5 抗 HIV 1&2	组 6 抗 HIV 1&2 ¹	组 7 抗 HIV 1&2	组 8 抗 HIV 1&2
T-0*	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
4*	8	8	8	4	8	8	0	0
6	64	64	32	16	64	128	2	0
8*	64	128	32	32	64	128	4	2
10	512	512	64	128	256	512	16	8
12*	512	1024	128	256	512	1024	16	16
14	2048	2048	512	512	1024	2048	32	32
16*	4096	4096	256	512	4096	4096	64	32
18	4096	8192	512	1024	8192	8192	128	54
20	8192	16384	1024	1024	16384	16384	128	64

T-0=初次免疫和采集免疫前血液

1-去糖

*-免疫或增强

实施例 8.2

评价实施例 8.1 中所得抗血清的血细胞凝集抗体。从表 8.2 中可见从 HIV 蛋白上除去糖基消除了血细胞凝集的反应。

去糖的 HIV 制剂组不产生凝集血红细胞的抗体反应性（表 8.2A）。而被未去糖之 MDP-HIV 复合物免疫的山羊以及被乳化于 Freund's Complete 佐剂中且未去除糖的纯化 HIV 蛋白免疫的山羊都产生红细胞凝集素。在 MDP-HIV 复合物或乳化于 Freund's Complete 佐剂中的纯化 HIV 蛋白免疫的山羊的抗血清中，红血球凝集素的滴度无可检出的差别。此处所述的红血球凝集素与实施例 2 预试验中所述的基本一致。这些凝集素具有细胞毒性（表 8.2A）。但针对 HLA 类型 I 和类型 II 没有可检出抗体反应性，而且经红血球吸收后完全消除了血细胞凝集和细胞毒性抗体的反应性。

表 8.2
红细胞的抗 HIV 抗体应答的分析

星期 #	组 1 抗 HIV 1	组 2 抗 HIV 1'	组 3 抗 HIV 2	组 4 抗 HIV 2 ²	组 5 抗 HIV 1&2	组 6 抗 HIV 1&2'	组 7 抗 HIV 1&2	组 8 抗 HIV 1&2'
T-0*	--	--	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--	--	--
4*	--	--	--	--	--	--	--	--
6	2	--	2	--	4	--	4	--
8*	4	--	4	--	4	--	8	--
10	16	--	8	--	8	--	16	--
12*	32	--	8	--	32	--	16	--
14	64	--	64	--	128	--	64	--
16*	64	--	64	--	64	--	128	--
18	128	--	128	--	128	--	256	--
20	256	--	256	--	128	--	256	--

T-0=初次免疫和采集免疫前血液

1-去糖

*-免疫或增强

表 8.2A
抗 HIV 抗体对淋巴细胞毒性的连续分析

星期 #	组 1 抗 HIV 1	组 2 抗 HIV 1'	组 3 抗 HIV 2	组 4 抗 HIV 2 ²	组 5 抗 HIV 1&2	组 6 抗 HIV 1&2'	组 7 抗 HIV 1&2	组 8 抗 HIV 1&2'
T-0*	±	±	±	±	±	±	±	--
2	±	±	±	±	±	±	±	--
4*	+4	±	+2	±	+4	±	±	--
6	+8	±	+2	±	+8	±	+2	--
8*	+8	±	+4	±	+16	±	+4	--
10	+64	±	+32	±	+32	±	+4	--
12*	+256	±	+256	±	+128	±	+16	--
14	+256	±	+512	±	+256	±	+32	--
16*	+512	±	+512	±	+512	±	+64	--
18	+512	±	+1024	±	+512	±	+128	--
20	+512	±	+1024	±	+1024	±	+128	--

T-0=初次免疫和采集免疫前血液

1-去糖

*-免疫和增强

为评价 HIV 和 RBC 糖基之间模拟的可能性, 采用由提自人类血红细胞的纯化和汇集的细胞膜组成的免疫原免疫山羊, 产生另外一种抗血清。Western 印迹分析法证明这种抗血清与一种红血球糖蛋白 (~Mr 35,000) 以及 HIV gp41 和 gp120 有反应。但不与除去糖基的 HIV gp41 和 gp120 反应。这些数据与 HIV 的糖抗原决定簇和血红细胞糖蛋白之间的模拟相符。

Western 印迹分析法证明与大多数 HIV 蛋白之间有强反应性, 包括 gp160、gp120、gp41、p66/55、p10、p24、p17 和 p7。针对本发明所公开的 HIV 抗原决定簇, 这些抗体的反应性或特异性无明显差别。这些抗体与所有被测试 HIV 分离体反应, 包括那些已被证明具有对抗逆转录酶和蛋白酶抑制剂者。

实施例 8.3

糖贫化 HIV 产生的抗体对 HIV 感染性的中和

本实施例描述和指征了采用由上述贫化糖的 HIV 产生的抗体对 HIV 感染性的中和。结果表明这些抗体具有强的中和活性并以剂量依赖的方式保护 CEM 细胞免受感染。

中和实验:

采用一种敏感的中和实验定量检测山羊抗 HIV 对 HIV 感染性的作用。选取极易受 HIV 感染的 CEM CD4⁺ 细胞系作为靶细胞来测量抗体对 HIV 感染性的作用。按照要求将抗体和稀释液加到含 10% 胎牛血清的 RPMI 介质中。从培养约 4 天的处于 log 生长期的 CEM 中收集 HIV1_{SF2} 悬浮物, 从 0.2 或 0.45 μ m 过滤器中过滤, 分份并于一 70 $^{\circ}$ C 下冷冻。将其中一份解冻, 滴定测量 TCID₅₀, 在以下实验中采用刚解冻的病毒部

分，在培养介质中稀释 1: 500 使其浓度达到感染培养基中 50% CEM 细胞所需量的约 10 倍 (10 TCID_{50})。将病毒悬浮液与等体积 (250 μl) 的 1: 5 至 1: 9,765,625 的抗体的 5 倍稀释液混合。将病毒/抗体混合物于 37°C 下温孵 60 分钟。将 200 μl 同样的样品加到含 1.0ml 之约 2×10^5 CEM 细胞/板孔的接种板孔中。培养体系于 37°C、加湿的 5% CO_2 氛的条件下温孵 14 天。采集细胞，沉淀并用 1% Triton X-100 之 PBS 溶液溶解约 10 分钟。采用商品 p24 试剂盒定量检测在溶解细胞中存在的病毒（或病毒抗原）的量。测定中和活性的效价，并表示为，与无抗体或加入以相似方式制得的免疫前 IgG 温孵的对照培养体系相比，抑制 50% 以上 p24 抗原产生的抗体的稀释比的倒数。测量 200 微升的溶解细胞悬浮液。

表 8.3A

抗 HIV 抗体中和活性的分析

星期 #	组 1 抗 HIV 1	组 2 抗 HIV 1 ¹	组 3 抗 HIV 2	组 4 抗 HIV 2 ²	组 5 抗 HIV 1&2	组 6 抗 HIV 1&2 ¹	组 7 抗 HIV 1&2	组 8 抗 HIV 1&2
T-0*	--	--	--	--	--	--	--	
2	--	--	--	--	--	--	--	
4*	--	--	--	--	--	4	--	-
6	32	16	--	--	16	16	--	--
8*	256	32	4	--	64	128	2	--
10	1024	128	4	4	512	256	8	--
12*	1024	512	16	8	1048	1024	32	--
14	5096	1024	256	32	5096	2048	64	--
16*	10192	2048	512	64	10192	2048	128	--
18	20384	2048	1024	128	20384	5096	128	--
20**	20384/204	5096/5096	2048/256	256/256	40766/101	10192/101	256/12	--

T-0=初次免疫和免疫前采集血液

1-去糖 *-免疫&增强

**=20 周血液制得的抗-HIV 制剂被人血红细胞吸收，在同样条件下检测未吸收和吸收样品。结果表示为（未吸收/吸收）中和效价。

未除去糖抗原决定簇的 HIV-MDP 复合物所产生的抗 HIV 制剂具有最大的中和活性（表 8.3A）。抗体的红细胞吸收对糖贫化 HIV 复合物无效。但抗体的红细胞吸收对未除去糖的 HIV 复合物产生明显的中和活性下降的作用，说明 HIV 和人之间存在同种系的糖片断（表 8.3A 最后一行）。HIV-MDP 复合物产生的所有抗 HIV 抗体制剂均明显强于使用 Freund's Complete 佐剂所产生的抗 HIV。由于预计的 HIV 基因变异的特性，使用 HIV_{MN} 和四个 HIV 野生分离体，其中包括一个抗多种药物的病毒株在上述相同条件下测试 20 周抗 HIV 制剂的中和活性。在由去糖的 HIV 复合物产生的第 20 周抗制剂的抗 HIV 中和了所有病毒株（表 8.3B）。

本领域技术人员将看到由贫化 HLA、贫化糖的 HIV 蛋白产生的中和活性要比在典型人类抗 HIV 血清中观测到的中和活性明显更高。

表 8.3B

抗 HIV 抗体对多种病毒株的中和活性的分析

HIV 病毒株/ 分离体	抗 HIV 1 ¹	抗 HIV 2 ¹	抗 HIV 1&2 ¹	免疫前 IgG
HIVSF	10192	512	20384	0
HIVMN	5096	256	10192	0
野生#1	10192	512	20384	0
野生#2	2048	256	5096	0
野生#3	2048	128	5096	0

1=去糖

实施例 8.4

以抗体依赖补体介导的细胞毒性的方式抗 HIV 对 HIV 感染 CD4 淋巴细胞的作用

对于富含感染或未感染 HIV 的 CD4 淋巴细胞的正常外周血单核细胞，评价去糖和未去糖 HIV 复合物抗体之补体介导的细胞毒反应性。提取正常外周血单核细胞，进行 Ficol Hypaque 梯度离心并富集 CD4⁺ 淋巴细胞。在小型培养中用 PHA 刺激 CD4⁺ 淋巴细胞并用 HIV_{MN} 感染 7 天。除去上清液并加入去糖基 HIV 制剂所产生的抗 HIV，其中抗 HIV 对正常细胞无细胞毒性。如表 8.4 所示，抗 HIV 以剂量依赖方式溶解感染的 CD4 淋巴细胞。

表 8.4
对感染CD4 淋巴细胞抗 HIV 抗体介导的细胞毒性的分析

星期 #	组 1 抗 HIV 1	组 2 抗 HIV 1'	组 3 抗 HIV 2	组 4 抗 HIV 2 ²	组 5 抗 HIV 1&2	组 6 抗 HIV 1&2 ¹	组 7 抗 HIV 1&2	组 8 抗 HIV 1&2 ¹
T-0*	±	±	±	±	±	±	±	--
2	±	±	±	±	±	±	±	--
4*	4	4	2	±	4	4	±	--
6	8	16	2	±	32	32	±	--
8*	32	32	4	4	256	256	2	--
10	128	64	32	32	512	512	8	--
12*	256	128	256	64	1024	1024	16	--
14	1024	512	512	256	2048	2048	16	2
16*	2048	1024	512	256	4096	4096	32	4
18	4096	2048	1024	512	8192	8192	64	8
20	8192	4096	1024	512	8192	8192	256	8

T-0=初次免疫和采集免疫前血液

1-去糖

*-免疫和增强

实施例 8.5

相应于 HIV 蛋白之氨基酸序列的肽的合成

合成肽被构建成模拟 HIV_{1SF2} 之氨基酸序列的十二肽。依据 gp120、gp41、Vif、gag p17、gag p24、nef、Rev、整合酶、蛋白酶、Tat: H_xB2 和逆转录酶的氨基酸序列，由 Purification Systems Inc. 采用固相法合成覆盖 6 个氨基酸的肽，并从该处购得这些肽。

采用二环己基碳化酰亚胺和催化量的 4-N, N-二甲氨基吡啶将丁氧羰基-S-4-甲基苯基-L-半胱氨酸偶联于聚苯乙烯上，并将产物作为合成的固相载体。用 t-丁氧羰基 (t-Boc) 保护氨基，下列为侧链保护基：苄醚保护丝氨酸的羟基，二氯苄醚保护酪氨酸的酚羟基，β-苄基酯用于保护谷氨酸和天冬氨酸的羧基。采用三氟乙酸 (40% CH₂Cl₂ 溶液) 脱 t-Boc，并将所得盐用 N-二异丙基乙胺 (10% CH₂Cl₂ 溶液) 中和。采用二异丙基碳化酰亚胺偶联 t-Boc 氨基酸。脱去保护基，然后在 0℃ 下采用含作为清除剂的 10% 苯甲醚和 1% 乙二硫醇的无水氟化氢将肽从树脂上裂解下来。在 0℃ 下真空除去氟化氢试剂，然后用无水乙醚沉淀和清洗肽。当用三氟乙酸从树脂上提取肽后，在 15℃ 下蒸去溶剂并用乙醚将肽重新沉淀。离心后倾去乙醚，将沉淀物溶于含 6M 盐酸胍的 5% 乙酸溶液中。在用 5% 乙酸平衡的 BioGel P2 柱上将溶液脱盐，收集含肽的部分并冻干。当需要巯基供 EIA 法或连接 MDP (实施例 5) 中将肽与载体蛋白或固相载体连接时，要在肽的羧基端加上一个半胱氨酸。当需要肽的多重重复体时，首先将一个半胱氨酸残基连接到树脂载体上进行合成。加上不同长度的碳间隔剂；间隔剂的长度是可变的，并取决于应用、肽电荷和长度以及由肽连接载体所得的初步数据所预计的立体影响。如以上实施例 5 所示利用二氨基乙烷但改变保护基封闭的次序，在 6 碳的碳间隔剂如 6-氨基己酸上加入赖氨酸

—（赖氨酸）2—（赖氨酸）4。保护氨基，然后脱保护使得两个赖氨酸残基连于脱保护氨基上，脱保护然后加赖氨酸构建供肽合成的支链结构。添加 D-氨基酸可修饰具有特殊生物功能的肽或具有易于被酶降解的序列的肽。特别有用的添加是添加 L-丙氨酸—D-异谷氨酰胺，而目标肽从 D-异谷氨酰胺的氨基端开始合成。在另一种设计中，按序列 L-赖氨酸—L-赖氨酸—肽—D-异谷氨酰胺合成肽。在微环境中羧端赖氨酸基十分容易被多种酶酶解断裂，而 D-谷氨酰胺使肽的半衰期加长而且为组装肽提供了一个疏水位点，这种肽需要两亲性质以诱导如受体结合和通过 MHC 相关作用诱导免疫等功能。在氨基端加酪氨酸残基以用 ^{125}I 进行放射标记，用于检测肽与载体蛋白的偶联效率并在纯化过程中鉴定肽。 ^{125}I 为跟踪肽在生物体系中的半衰期提供了一种示踪剂，并在肽功能不受添加酪氨酸影响的条件下评价受体结合。

实施例 8.6

模拟 HIV 和其它逆转录病毒肽序列的合成肽在鉴别病毒抗原决定簇中应用

在本发明中公开了模拟 HIV 和其它逆转病毒中高度保守序列的合成肽序列，并确定了在治疗病毒感染中其作为免疫作用靶点的重要功能。这些肽还可用于诊断和治疗 HIV 微变种引起的感染，所述微变种的序列通过非特异性下调免疫反应导致 HIV 的发病，诱导自动免疫，并通过毒性作用导致 HIV 相关外周神经病。当这些症状的任何一种出现在患者体内都导致 HIV 的发病并降低生活质量。确定和定量测量那些诱发这些症状的 HIV—肽区域所采用的合成肽可用于确定自动免疫和外周神经病的风险因子。这些合成肽还可用于一种新型的检测法中以监测疾病的进程以及治疗进程的改变。

在本发明的一个步骤中，设计酶免疫检测法（EIA）用于确定山羊抗体对不被人类抗 HIV 识别的 HIV 的特异性识别。采用 5 μg/ml 在磷酸盐缓冲溶液（PBS < pH 7.8）中的 HIV1 gp120 和 gp41 纯化制剂，在 37℃ 温孵 20 小时，将其涂布在聚乙烯微量测量板孔中。板孔用含 0.1% 吐温 20 的 PBS（PBS/吐温）冲洗，并用 5% 牛血清白蛋白于 37℃ 温孵 1 小时饱和各板孔中的未结合位点。立即使用该测量板或在 4℃ 贮存。每个板孔中加入人类 IgG 抗-HIV（100 μl）（实施例 1），4℃ 下温孵 25 小时，然后用 PBS/吐温冲洗板孔。将先前产生并通过标准方法用 HRP 标记的山羊抗 HIV 加到板孔中，所采用的稀释度在测试条件下获得 1.0 的吸收（1: 10000 滴度）并在 4℃ 下温孵 24 小时。冲洗板孔并加入底物以测定山羊 IgG 的结合量。采用以下算式计算由于人类抗 HIV 封闭 HIV 蛋白所诱导的结合抑制百分比。

$$\frac{(OD_{\text{不封闭}} - OD_{\text{封闭}})}{OD_{\text{不封闭}}} \times 100 - OD_{\text{封闭}} \text{ 的阴性对照}$$

山羊抗-HIV-HRR 复合物被人类抗 HIV 封闭最少的事实说明山羊抗 HIV 的结合与人类抗 HIV 不同。

在另一步骤中，设计 EIA 用于确定对山羊抗体有抗原性而对人类抗体无抗原性的 HIV 蛋白抗原决定簇。采用 5 μg/ml 在磷酸盐缓冲溶液（PBS < pH 7.8）中的 HIV1 gp120 和 gp41 纯化制剂，在 37℃ 温孵 20 小时，由此将其涂布在聚苯乙烯小珠上。小珠用含 0.1% 吐温 20 的 PBS（PBS/吐温）冲洗，并用 5% 牛血清白蛋白于 37℃ 温孵 1 小时饱和小珠上的未结合位点。立即使用该小珠或在 4℃ 贮存。在每个小珠上加入人类 IgG 抗 HIV（100 μl）（实施例 1），4℃ 下温孵 24 小时，然后用 PBS/吐温冲洗小珠。将合成肽溶于含牛血清球蛋白（5 mg/ml）和吐

温 20 (0.1%) 的 PBS 中使浓度为 0.1 mg/ml。将肽 (25 μ l) 加到山羊抗 HIV IgG-HRP 复合物溶液 (100 μ l) 中, 并在 4°C 下温孵 24 小时。然后将混合物加到两组涂布 HIV 的小珠上。其中一组被加到两组涂布 HIV 的小珠中的人类抗 HIV 封闭。另一组在肽加到山羊抗 HIV-HRP 复合物中的同时被人类抗 HIV 封闭。含反应试剂的小珠在 4°C 下温孵 24 小时。温孵后, 冲洗小球并如上所述测定过氧化酶活性。将活性对 HIV 中肽位置画图。这些图显示出被山羊 HIV 免疫 IgG 识别而不被人类抗体所识别的 HIV 蛋白区域。当采用某一特殊合成肽并发现结合抑制时, 合成另外的更长的肽以覆盖先前的肽。缺少合成肽的抑制被认为是表示不被山羊免疫系统免疫识别。采用这一方法, 得出供研究的线性肽抗原决定簇。

在本发明的另一优选方法中, 设计一种 EIA, 其中采用如下所述制备的肽-过氧化酶, 用于鉴定被山羊识别但不被人类免疫系统识别的 HIV 蛋白的抗体反应性抗原决定簇。将模拟 HIV 序列的肽与 HRP 共价连接制备一个酶标记的肽库, 用于描绘抗体特异性。具体而言, 以 1 份 HRP: 10 份肽的计算摩尔比将 HRP 悬浮于一反应管中。将用于偶联的各个肽分别悬浮于微管中, 浓度 0.1–1 μ mol/ml, 体积 0.1–1 ml, 其具体数量依所需复合物的量和肽的分子量而变化。4°C 下 HRP 以 1–10 μ mol/ml 的浓度溶于 0.1 M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.8) 中, 加入高碘酸钠使其终浓度为 0.02 M。混合物立即分配至含肽的微管中, 混合并反应 30 分钟。加入乙二醇 (0.02M) 破坏剩余高碘酸钠。在肽的氨基和 HRP 糖部分经氧化形成的醛基之间构成的中间体希弗碱, 通过加入硼氢化钠水溶液 (0.2 M) 使其还原。采用 Sdephadex G25 柱对各肽-过氧化酶复合物色谱分离, 除去反应试剂及过量肽。

在该优选的检测法中, 采用抗体桥连由 HIV 病毒溶胞产物制得的

HIV 蛋白上所确定的抗原决定簇和共价连于 HRP 上的合成 HIV 肽，因为与含抗原结合位点的 HIV 抗原决定簇反应的抗体也可与连接于过氧化酶的合成肽抗原决定簇反应。如上所述在小珠上涂布 HIV 蛋白。涂好的小珠与山羊抗 HIV IgG 反应 24 小时，冲洗小珠并与底物反应以测定过氧化酶活性以及因此而得到的肽结合。通过这一方法，仅有包含在合成肽中的抗原决定簇被识别出。在这一检测法中，确定了全部的山羊反应性。对人类抗 HIV 和山羊抗 HIV 反应性作对比，并将仅与山羊抗 HIV 反应的肽选作候选抗原决定簇靶点。由于反应性的不同以及 HIV 蛋白上氨基酸肽序列同源性间的漂移，可能导致遗漏抗原决定簇反应性，以及合成肽的选取，故这些数据并不能全部概括人和山羊对 HIV 蛋白的反应性的差别。

实施例 9

作为治疗药剂的抗体的功效

采用一组免疫化学设计的抗体进行实验以确定作为治疗 HIV/AIDS 药剂的抗体的功效。具体而言，按实施例 3 所述方法处理 HIV_{1MN}、HIV_{1BAL} 和 HIV_{2NZ} 的 HIV 分离体的溶胞产物混合物，以除去低分子量杂质以及 HLA 类型 I 和类型 II 抗原，并对 HIV 蛋白脱去糖基。检测蛋白混合物发现其中包含模拟 HIV_{1SF2} 蛋白以下区域的肽：

gp120：一个抗原决定簇区域位于第 4 至 27 氨基酸残基上，第二个位于第 54 至 76 氨基酸残基上；

gp41：一个抗原决定簇区域位于第 502 至 541 氨基酸残基上；

蛋白酶 p10：一个抗原决定簇区域位于第 69—94 氨基酸残基上；

逆转录酶杂二聚体 p66/55：一个抗原决定簇区域位于第 254—295 氨基酸残基上；

Gag 基因蛋白 p24: 一个抗原决定簇区域位于第 166—181 氨基酸残基上;

Gag 基因蛋白 p17: 一个抗原决定簇区域位于第 2—23 氨基酸残基上, 第二个抗原决定簇区域位于第 89—122 氨基酸残基上; 以及

Gag 基因蛋白 p7: 一个抗原决定簇区域位于第 390—41 和 438—44 氨基酸残基上。

这些氨基酸序列在通过感染或通过自然环境接触时不能在人体内诱导免疫应答, 但可在其它哺乳动物种中诱导免疫应答。

富集被纯化和处理的蛋白并利用制备型 SDS—PAGE 电泳进一步纯化, 如果有必要有利用免疫亲和色谱进一步纯化, 其中采用针对 gp120、gp41、p66/55、p24、p17 和 p10 的 (ICN Costa Mesa, CA 和 Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) 商品单克隆抗体, 通过本领域已知的方法分别连接到 Sepharose CL4B 上。纯化后将各纯化 HIV 蛋白分别按实施例 4 所述方法与 MDP 微粒偶联。用 HIV—MDP 微粒复合物配成鸡尾酒, 其中包含等摩尔浓度的各 HIV 蛋白/肽, 在生理盐水中的终浓度约 1 mg 蛋白/ml。该 HIV-DMP 鸡尾酒 (0.5 μ l) 被乳化于角鲨烯 (1.5 ml, 含 0.05% 吐温 80) 中, 并按每只山羊 4 至 6 个注射点的方式皮下注射进 60 只山羊中。每月进行一次强化免疫以获得理想的抗体应答。在每月强化免疫前抽取每只山羊每月的血清样品, 并用实施例 8.6 中所公开的 Western 印迹分析法、HIV 中和实验以及酶免疫检测法检测。一旦获得所需的抗体应答, 采用 Baxter A 201-A 401 自动血浆去除仪从山羊颈静脉中抽取血浆, 将山羊血红细胞配在生理盐水中再返还到山羊体内。每次血浆抽取操作从每只动物体内采集 350 ml $\pm$ 5.0 ml 血浆。

用盐酸调 pH 为 4.8 后, 用辛酸分级公山羊免疫血浆。混合物离心,

过滤并通过活性碳过滤器除去凝聚物，然后将辛酸浓度降低至小于 0.05 %。通过以下一系列柱进一步纯化包括免疫球蛋白（IgG）的部分：

1. Sephadex G 25 柱，用 20 mM 磷酸盐缓冲液平衡
2. 在磷酸盐缓冲液中平衡的 Whatman DE 53 离子交换柱
3. 0.9% 盐水平衡的 Sephadex G 25

将最终的柱滤液无菌过滤，然后浓缩或稀释制成具有理想生物活性的 10mg IgG/ml 的终浓度。SDS-PAGE 和 Western 印迹分析法证明在 1: 100 稀释度下公山羊 IgG 免疫球蛋白与 gp120、gp41、p66/55、p24、p17、p7 和 p10 等七种不同的病毒蛋白有反应。HIV 中和试验表明其对实施例 8.3 中所述的实验室及野生病毒株具有广泛的中和作用。通过实施例 8.3 中所公开的酶联免疫检测法分析证明，在 1: 1000 或更高的样品稀释度下与九种目标抗原决定簇有阳性反应。对符合本发明所公开指标的产品批次给出商品名 HRG214，其中包含无菌且无热源的悬浮于 0.9 % NaCl 中的公山羊 IgG，浓度为 10 mg/ml，不含赋形剂。将各批产品与本发明所公开的对照批产品作比较，以确定 HRG214 活性的均一性。药效表示为 mg 等价物/ml。

在研究开始以前选择年龄为 18 的公山羊和未怀孕的母山羊，通过 Western 印迹法血清学诊断证明它们感染有 HIV，并符合界定 AIDS 的标准，及其临床症状，而且实验前在 30 天内 CD4 T 淋巴细胞计数 < 300 细胞/ μ l。采用临床和实验室参数评价功效。临床参数包括机会性感染的改变，体重的改变，胃肠功能的改变，包括大便的粘稠度及频率、精力水平的改变、食欲的改变、机体强度及耐力、以及生活质量的整体变化。实验室参数包括 CD4 和 CD8 淋巴细胞数量，所选定的血液学、血液化学和尿液分析指标的改变，以及如有可能通过 PCR 测量病毒 RNA 确定病毒负载量的改变。

研究结果表明采用免疫化学设计的抗体时，患者在临床学上得以改善，包括机会性感染的下降、体重增加、胃肠功能的改变，其中包括更少次数的严重腹泻、精力水平的提高、食欲改善、机体强度和耐力的改善、以及整个生活质量的改善。实验室参数也得以改善，包括 CD4 和 CD8 淋巴细胞数目增加、血液学、血液化学及尿液分析指标的改善、以及通过 PCR 测量病毒 RNA 证明病毒负载量下降、和 TCID 检测表明感染力下降。

研究中具体的实验室结果列于附表 9.1—9.13 中。

实施例 9.1

HIV 感染者的治疗中 HRG214 毒性及功效的临床评价

采用 HRG214 治疗 35 名 HIV 感染者。评价 HRG214 在降低 HIV 病毒负荷和改善病症进程和症状方面的功效。按 CD4 数目/mm³ (< 200 和 ≥ 200) 将患者分组，以下为治疗方案：

组 1：HRG214，CD4 < 200，n=11；

组 2：HRG214，并每月重复治疗，CD4 < 200，n=6；

组 3：HRG214，并在发病时重复治疗，CD4 < 200，n=5；

组 4：HRG214，CD4 > 200，n=7；

组 5：HRG214 并在发病时重复治疗（患者接受治疗癌症的化疗），CD4 < 200，n=6；

组 6：安慰剂对照组，CD4 > 500，n=19；

组 7：安慰剂对照组，CD4 > 200—500，n=3。

治疗组按 1—1.5 mg/kg 体重接受 21—28 天的 HRG214 输注。CD4 < 200 的患者或者每月重复治疗 3 天（n=6）或在出现 HIV 发展情况下重复治疗（n=11）。有害反应局限于 < 2°F 的低烧，发冷，头痛，和肌肉痛

等。在 90 天内治疗中和治疗后，临床化学和血液学分析表明所有患者的指标保持不变或得以改善。对 28 名患者评价了营养状态的改变。24 名增重 2—22 磅。平均增长体重 4.4 磅 ($p=0.0014$)。同时接受治疗癌症的系统化疗的 6 名患者中的 4 名体重保持 ($n=2$) 或降体重 (各为 2 和 6 磅)。体重增加与血清总蛋白和白蛋白的测量值的增加直接相关。在所有治疗组中 HIV-RNA 数量均下降。

G 组号: 给药后天数 总=n, 存活=s	CD4# 前/后	CD8# 前/后	HIV RNA % 变化
组 1 ^{HRG214} : 150 天, n=11, S=4	153/156	601/699	-18%
组 2 ^{HRG214} : 345 天, n=6, S=6	44/168	477/1143	-94%
组 3 ^{HRG214+} : 469 天, n=5, S=3	25/67	705/856	-67%
组 4 ^{HRG214} : 405 天, n=7, S=7	315/487	970/1164	-94%
组 5 ^{HRG214} : 化疗 469 天, n=6, S=2	43/41	476/592	-54%
组 6 对照: 469 天, n=19	909/628	NA	NA
组 7 对照: 469 天, n=3	315/177	NA	NA

与对照组 6 和 7 相比所有治疗组中 $CD4/mm^3$ 随时间的下降速度均下降 ($p < 0.01$)。在组 2、3 和 4 中观察到 $CD4$ 的持续增加。通过小型培养 (TCID) 测量感染性证明, 治疗 7—14 天感染性降低两个数量级 ($p < 0.001$) 而 HIV-RNA 定量测量结果无明显变化。临床学改变包括食欲增加, 并观察到在慢性疲劳综合症、腹泻、吸收不良、念珠菌病、CMV (视网膜炎除外)、单纯疱疹和带状疱疹、皮肤传染性软疣、口腔毛状粘膜白斑病、消瘦综合症、细胞性毛囊炎和肺炎及 HIV 相关的外周神经病中的抵抗力明显增强。

HRG214 为 HIV 感染的治疗提供了一种新型药剂。

以下更具体地表示了 2—5 患者组的数据。

患者组 2

患者 $n=6$

初步目的: 评价以日剂量 1.5 mg/kg/day 给药 28 天并每月重复治疗 3 次, 采用 HRG214 治疗 HIV 感染的安全性和功效。临床跟踪将持续 3 年。当复发时将对患者重新治疗。

目的: 临床和实验室参数的正规化, 其中包括机会性感染, 感染发生率, 消瘦综合症, 外周神经炎的改变, 以及不正常血液化学和血液学、 $CD4$ 和 $CD8$ 的改善以及通过 PCR 定量测定的 HIV-RNA 的减少。

安全性变量包括: 血液化学和血液学和临床参数。

功效变量包括: PCR 定量测定 HIV-RNA, $CD4$ 和 $CD8$ 细胞计数。

跟踪期=3 年

至今的跟踪期= > 345 天

研究中的患者统计: 患者 $n=6$; 开始日期 10/23/95; 390 天时, 存活=6; 死亡=0; 错过跟踪的患者=0。

患者统计: HIV 阳性, AIDS 界定指标为 CD4 数 $<50/\text{mm}^3$ 。

治疗药剂: HRG-214 — 1.5 mg/kg/day, 每月重复治疗。

表 9.2

患者组 2

PCR 定量测定 HIV-RNA					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	4918.3	2092.5	1338	731.8	696.6
标准误差	2422.6	1222	927.2	433.1	331.2
最大值	10649	4880	3993	1825	1164
最小值	494	23	19	17	15
中间值	4265	1733.5	670	542.5	466

表 9.3

患者组 2

CD4/ mm^3 定量					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	44	52.8	52.8	109.3	167.8
标准误差	14.2	19.1	16.8	33.2	41.7
最大值	72	96	82	154	189
最小值	5	4	5	11	23
中间值	49.5	55.5	62	136	139

表 9.4

患者组 2

CD8/mm ³ 定量					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	477.5	437	603.3	911.8	1143
标准误差	157.1	171.8	173.6	228.9	286.7
最大值	869	883	804	1376	1752
最小值	145	68	84	319	576
中间值	448	398.5	762.5	976	1293

患者组 3

患者 n=5

初步目的：评价以日剂量 1.5 mg/kg/day 给药 28 天，采用 HRG214 治疗 HIV 感染的安全性和功效。临床跟踪将持续 3 年。当复发时将对患者重复治疗。

目的：临床和实验室参数的正规化，其中包括机会性感染，感染发生率，消瘦综合症，外周神经炎的改变，以及不正常血液化学和血液学、CD4 和 CD8 的改善以及通过 PCR 定量测定的 HIV-RNA 的减少。

安全性变量包括：血液化学和血液学和临床参数。

功效变量包括：PCR 定量测定 HIV-RNA，CD4 和 CD8 细胞计数。

跟踪期=3 年

至今的跟踪期= > 469 天

开始日期 6/13/95；380 天时，存活=3；死亡=2；错过跟踪的患

者=0。

患者统计：HIV 阳性并符合 AIDS 界定的指标。5 名患者中的 5 名具有 $CD4 < 50/mm^3$ 的血液。PCR 定量分析 HIV-RNA 证明治疗 7 天 ($p=0.0179$) 和 21-28 天 ($p=0.043$) 后发生统计学上的显著下降。60-90 天和 120-150 天的 HIV-RNA 测量证明已下降但又重新上升的 HIV RNA 值。对所有 5 名患者重复治疗（在 120-150 天期间每月连续 3 次给药）。重复治疗后 HIV RNA 测量表明在 > 250 天内测量值统计学明显下降 ($p=0.0006$)。

采用成对 T 检验、Wilcoxon Signed Rank 检验和 Mann-Whitney Rank Sum 检验进行统计学分析。

起始日期：06/13/95

终止日期：未定

表 9.5

患者组 3

PCR 定量测定 HIV-RNA							
测试	天数 1	天数 7	天数 21-28	天数 60-90	天数 180-210	天数 240-300	天数 >380
平均值	21911	10643.2	10962.6	15231.8	18424	9385.2	8217
标准误差	5003.7	3244.3	2222.5	7385.9	5473.5	5436.3	5135
最大值	41182	21223	17679	41922	35129	30412	36412
最小值	12292	4448	3790	2984	4017	1036	756
中间值	18976	6317	11570	6787	16854	4708	4926

表 9.6

患者组 3

CD4/mm ³ 定量							
测试	天数 1	天数 7	天数 21-28	天数 60-90	天数 180-210	天数 240-300	天数 >380
平均值	25	30.8	13.8	35	40.4	59.6	67
标准误差	6.47	8.16	3.01	9.66	13.39	25.72	33.74
最大值	42	51	20	60	82	154	178
最小值	9	8	3	10	8	13	16.01
中间值	26	24	16	42	28	36	42.12

表 9.7

患者组 3

CD8/mm ³ 定量							
测试	天数 1	天数 7	天数 21-28	天数 60-90	天数 180-210	天数 240-300	天数 >380
平均值	705.6	633.8	486.4	681.4	570.8	826.6	856.24
标准误差	137.8	168.2	86	229	120.6	200.9	226
最大值	1152	1037	700	1380	756	1320	1346
最小值	444	220	260	180	101	169	556
中间值	585	828	540	720	638	812	843

患者组 4

患者 n=7

初步目的：评价以日剂量 1.5 mg/kg/day 给药 28 天并在第 1—7 和

21-23 天给药 IFN 诱导剂, 采用 HRG214 治疗 HIV 感染的安全性和功效。临床跟踪将持续 3 年。当复发时将对患者重复治疗。

目的: 临床和实验室参数的正规化, 其中包括机会性感染, 感染发生率, 消瘦综合症, 外周神经炎的改变, 以及不正常血液化学和血液学、CD4 和 CD8 的改善以及通过 PCR 定量测定的 HIV-RNA 的减少。

跟踪期=3 年

至今的跟踪期= > 405 天

研究中的患者统计: 患者 n=7; 开始日期 8/25/95; 390 天时, 存活=7; 死亡=0; 错过跟踪的患者=0。

患者统计: HIV 阳性, CD4 数 > 200, 不符合 AIDS 界定的指标。

治疗药剂: 1.5 mg/kg/day 共 28 天。当复发时对患者重复治疗。

表 9.8

患者组 4

PCR 定量测定 HIV-RNA					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	6078.7	964.3	899.7	658	386.2
标准误差	949.4	639.6	199.1	544	257
最大值	7936	2207	1257	1202	983
最小值	4808	80	569	114	54.1
中间值	5492	606	873	658	432

表 9.9

患者组 4

CD4/mm ³ 定量					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	315	302.7	361.3	409.3	486.5
标准误差	72.6	70.3	66.8	72.9	71.8
最大值	429	440	460	540	611
最小值	180	208	234	288	301
中间值	336	260	390	400	435

表 9.10

患者组 4

CD8/mm ³ 定量					
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 330-390
平均值	970.7	867.7	1016	1094	1164
标准误差	247.7	158.7	378.8	229.5	235.2
最大值	1464	1180	1770	1550	1672
最小值	685	663	576	820	921
中间值	763	760	702	912	986

患者组 5

患者 n=6

初步目的：采用 HRG214 治疗的毒性和功效。临床跟踪将持续 3 年。当复发时将对患者重新治疗。

目的：临床和实验室参数的正规化，其中包括机会性感染，感染发生率，消瘦综合症，以及不正常血液化学和血液学、CD4 和 CD8 的改善以及通过 PCR 定量测定的 HIV-RNA 的减少。

跟踪期=3 年

至今的跟踪期= > 469 天

开始日期 6/13/95；270 天时，存活=2；死亡=4；错过跟踪的患者=0。（180—210 天时 2 名患者死亡，240—270 天 1 名患者死亡，270 天后 1 名患者死亡）

患者人数：HIV 阳性患者符合界定 AIDS 的指标，包括 CD4 < 200/mm³ 血液和合并卡波济氏肉瘤。患者用系统化疗治疗。在 180-210 天时两名患者死亡，240 天后两名患者死亡。PCR HIV-RNA 定量检测证明在 60—90、120—150、180—210 和 240—270 天时测量值下降（p =0.018）。

采用成对 T 检验、Wilcoxon Signed Rank 检验和 Mann-Whitney Rank Sum 检验进行统计学分析。

表 9.11
患者组 5

PCR 定量测定 HIV-RNA						
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 180-210	天数 240-270
平均值	12483.3	16973.7	8373.7	8237.8	8287	4717.5
标准误差	3159.1	6889.1	3081.8	2152.3	2466.6	3609.5
最大值	20233	46586	19514	15249	15570	8327
最小值	442	1242	490	1358	4708	1108
中间值	13682	14510	7027	7392	6435	4717.5

表 9.12

患者组 5

CD4/mm ³ 定量						
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 180-210	天数 240-270
平均值	43.7	20.5	22.3	17.5	12.6	36
标准误差	31.46	12.04	8.45	6.76	4.12	未确定
最大值	200	80	48	48	24	36
最小值	4	4	2	2	4	36
中间值	12	9.5	17	11	8	36

表 9.13

患者组 5

CD8/mm ³ 定量						
测试	天数 1	天数 21-28	天数 60-90	天数 120-150	天数 180-210	天数 240-270
平均值	476.3	303.5	415.8	371	326.4	676
标准误差	152.9	62.7	159.1	100.7	96.2	未确定
最大值	1170	540	1152	710	618	676
最小值	98	86	92	62	101	676
中间值	352	271.5	293.5	358	245	676

参考文献

1. H. Mitsuya, S. Broder, Nature 325,773-778 (1987) .
2. The Molecular Biology of Tumor Viruses, J. Tooze, et al., Eds. (1973) .
3. RNA Tumor Viruses. R. Weiss, Ed. (1982) .
4. F. Gonzalez-Scarano, R.E. Shoppe, C. E. Calisher, N. Nathanson, Virology 120, 42-53 (1982)
5. S. Matsuno, S. Inouye, Infection and Immunity 39, 155-158 (1983) .
6. J. Mathews, J. Roehrig, The Journal of Immunology 129, 2763-2767 (1982) .
7. M. Robert-Guroff, M. Brown, R. Gallo, Nature 316, 72-74 (1985) .
8. R. Weiss, et al., Nature 316, 69-72 (1985) .
9. T. Matthews, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 83, 9709-9713 (1986) .
10. W. Robey, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 83, 7023-7027 (1986) .
11. L. Lasky, et al., Science 233, 209-212 (1986) .
12. D. Zagury, et al., Nature 326, 249-250 (1987) .
13. J. McDougal, et al., Science 231, 382-385 (1986) .
14. S. Putney, et al., Science 234, 1392-13905 (1986) .
15. S. Norley, R. Kurth, The Retroviridae, J. Levy, Ed. (Plenum Press, 1994) , Vol. 5.
16. J. Carlson, JAMA 260, 674-679 (1988) .
17. J. Lange, et al., British Medical Journal 292, 228-230 (1986) .
18. J. McDougal, et al., Journal of Clinical Investigation 80, 316-324 (1987) .

19. A. Amadori, A. De Rossi, G. Faulker-Valle, I. Chieco-Bianchi, *Clinical Immunology and Immunopathology* 46, 342-351 (1988) .
20. A. Amadori, et al., *The Journal of Immunology* 89, 2146-2151 (1989) .
21. E. Barker, S. W. Barnett, L. Stamataos, J. A. Levy, in *The Viruses: The Retroviridae* J. A. Levy Ed. (Plenum Press, New York and London, 1995) , Vol. 4, pp. 1-7.
22. J. A. Levy, in *HIV and the Pathogenesis of AIDS* A. Press, Ed. (AMS Press, Washington, DC, 1994) pp. 1-5.
23. D. F. Nixon, K. Broliden, G. Ogg, P.-A. Broliden, *Immunology* 76, 515-534 (1992) .
24. P. Linsley, J. Ledbetter, E. Kinney-Thomas, S.-L. Hu, *J Virology* 62, 3695-3702 (1988) .
25. M. Thali, et al., *J Virology* 66, 5635-5641 (1992) .
26. A. Benjouard, J. Gluckmna, H. Rochat, L. Montagnier, E. Bahraoui, *J. Virology* 66, 2473-83 (1992)
27. T. Chanh, et al., *The EMBO Journal* 5, 3065-71 (1986) .
28. J. Homsy, M. Meyer, J. Levy, *J. Virology* 64, 1437-40 (1990) .
29. M. Tremblay, et al., *J Immunology* 145, 2896-2901 (1990) .
30. R. Garry, *Science* 250, 1127-1129 (1990) .
31. M. Mackett, G. Smith, B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7415-7419 (1982) .
32. D. Panicali, E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927-4931 (1982) .
33. S.-L. Hu, S. Kosowski, J. Darymple, *Nature* 320, 537-540 (1986) .
34. S. Chakrabarti, M. Robert-Guroff, F. Wong-Staal, R. Gallo, B. Moss, *Nature* 320, 535-537 (1986) .

35. D. G. Kleid, et al., Science 214, 1125-1129 (1981) .
36. C. Cabradilla, et al., Bio/Technology 4, 128-133 (1986) .
37. Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, 1995) .
38. Remington' s Pharmaceutical Science (Mack Publishing Co, Easton, PA, ed. 15th, 1990) .
39. B. Karpovsky, J. Titus, D. Stephany, D. Segal, Journal of Experimental Medicine 160, 1686-1701 (1984) .
40. P. Cuatrecasas, Advances in Enzymology 36, 29 (1972) .
41. P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay (1985) .
42. Stewart Young, Slid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co, ed. 2nd, 1984) .
43. J. Tam., et al., Journal American Chemical Society 105,6442 (1983) .
44. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) .
45. Z. Grabarek, J. Gergely, Analytical Biochemistry 185 (1990) .
46. J. Staros, R. Wright, D. Swingle, Analytical Biochemistry 156, 220-222 (186) .
47. R. Timkovich, Analytical Biochemistry 79,135-143 (1977) .
48. F. Gelder, et al. Annals of Surgery, 591-599 (1991) .
49. M. Fung, et al., J. Virology, 66, 848-56 (1992) .