



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102282175 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 30

(21) 申请号 200980154787. 4

代理人 李丙林 张英

(22) 申请日 2009. 11. 18

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 17/00(2006. 01)

61/115, 703 2008. 11. 18 US

审查员 黄利

61/152, 184 2009. 02. 12 US

61/248, 188 2009. 10. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/064999 2009. 11. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/059732 EN 2010. 05. 27

(73) 专利权人 贝斯以色列护理医疗中心

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司

(72) 发明人 丹·H·巴劳赫 贝特·T·科贝尔

威廉·M·菲舍尔

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

权利要求书2页 说明书39页 附图50页

(54) 发明名称

具有改进的细胞免疫原性的抗病毒疫苗

(57) 摘要

本发明提供用于治疗或预防病毒感染的组合物、方法及试剂盒。本文所述的多价(例如二价)疫苗并入了计算优化的病毒多肽,其可增加接种对象的细胞免疫应答的多样性或广度和深度。

1. 一种用于治疗哺乳动物病毒感染或降低其风险的疫苗,包括:
至少两个不同的优化病毒 HIV-1 多肽,或者
一个或多个编码所述至少两个不同的优化病毒 HIV-1 多肽的载体,
其中所述至少两个不同的优化病毒 HIV-1 多肽与相同的病毒 HIV-1 基因产物对应,其中所述病毒 HIV-1 基因产物选自由 Gag、Pol 和 Env 组成的组中,以及
其中至少两个不同的优化 Gag 多肽分别是 SEQ ID NO:3 和 4 的氨基酸序列;
其中至少两个不同的优化 Pol 多肽分别是 SEQ ID NO:12 和 13 的氨基酸序列;以及
其中至少两个不同的优化 Env 多肽分别是 SEQ ID NO:9 和 10 的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的疫苗,其中所述至少两个优化病毒 HIV-1 多肽分别是 SEQ ID NO:3 和 4 的氨基酸序列的 Gag 多肽。
3. 根据权利要求 1 所述的疫苗,其中所述至少两个优化病毒 HIV-1 多肽分别是 SEQ ID NO:12 和 13 的氨基酸序列的 Pol 多肽。
4. 根据权利要求 2 所述的疫苗,进一步包含氨基酸序列分别是 SEQ ID NO:12 和 13 的至少两个优化 Pol 病毒 HIV-1 多肽。
5. 根据权利要求 4 所述的疫苗,进一步包含氨基酸序列分别是 SEQ ID NO:9 和 10 的至少两个优化 Env 病毒 HIV-1 多肽。
6. 根据权利要求 1 所述的疫苗,其中所述疫苗包含一个或多个编码至少两个优化 Gag 病毒 HIV-1 多肽的所述载体,所述至少两个优化 Gag 病毒 HIV-1 多肽的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:3 和 4。
7. 根据权利要求 6 所述的疫苗,其中所述疫苗进一步包含一个或多个编码至少两个优化 Pol 病毒 HIV-1 多肽的所述载体,所述至少两个优化 Pol 病毒 HIV-1 多肽的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:12 和 13。
8. 根据权利要求 7 所述的疫苗,其中所述优化 Gag 和 Pol 多肽的是由相同的载体编码的。
9. 根据权利要求 7 所述的疫苗,其中所述疫苗进一步包含一个或多个编码至少两个优化 Env 病毒 HIV-1 多肽的所述载体,所述至少两个优化 Env 病毒 HIV-1 多肽的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:9 和 10。
10. 根据权利要求 9 所述的疫苗,其中所述优化 Gag、Pol 和 Env 多肽的是由相同的载体编码的。
11. 根据权利要求 1 和 6-10 中任一项所述的疫苗,其中所述载体选自由腺病毒血清型 26(Ad26)、腺病毒血清型 34(Ad34)、腺病毒血清型 35(Ad35)、腺病毒血清型 48(Ad48) 或腺病毒血清型 5 HVR48(Ad5HVR48)、痘病毒、修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)组成的组中。
12. 根据权利要求 11 所述的疫苗,其中所述载体是腺病毒血清型 26(Ad26)。
13. 根据权利要求 11 所述的疫苗,其中所述载体是修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)。
14. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗进一步包括药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。
15. 一种制备用于治疗人 HIV-1 感染或降低人 HIV-1 感染风险的疫苗的方法,所述方法包含合成根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的疫苗。
16. 一种试剂盒,包含:

- a) 根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的疫苗；
- b) 药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂；
- c) 其使用说明书；和，可选的
- d) 佐剂。

17. 一种 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的多肽。

18. 根据权利要求 17 所述的多肽在制备用于治疗人 HIV-1 感染或降低人 HIV-1 感染风险的药物中的应用，其中所述药物包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

19. 一种编码权利要求 17 所述的多肽的载体。

20. 权利要求 19 所述的载体在制备用于治疗人 HIV-1 感染或降低人 HIV-1 感染风险的药物中的应用，其中所述药物包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

具有改进的细胞免疫原性的抗病毒疫苗

[0001] 联邦政府资助研究的声明

[0002] 本研究得到了 NIH 基金号 U19-AI066305 和 U19-AI078526 的部分赞助。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明提供用于治疗或预防病毒感染的组合物、方法及试剂盒。本文所述的多价（例如二价）疫苗并入了计算优化的病毒多肽，其可增加接种对象的细胞免疫应答的多样性或广度和深度。

背景技术

[0004] 引起针对病毒的细胞免疫应答的疫苗必须反映全球的病毒多样性，以便有效地治疗或预防病毒感染。例如，强烈而多样的 HIV-1 特异性 T 细胞应答的启动可能对于有效的 HIV-1 疫苗至关重要。细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答与人类缓慢的疾病进程相关，在非人灵长类动物接种模型中，CTL 应答的重要性已得到很好的确证。由于高度易变的包膜 (Env) 是中和针对 HIV 的抗体的主要靶点，并且疫苗抗原也需要进行调整以引起这些抗体应答，T 细胞疫苗组分能够靶向作用于更加保守的蛋白以引发更可能是交叉反应的应答。但是即使是最保守的 HIV-1 蛋白也足够多样以至于变异将成为问题。人工中央序列疫苗法，如共有和始祖 HIV-1 序列，基本上能“分开”株系间的差异，与天然病毒株疫苗相比，能够刺激具有增强的交叉反应的应答。共有抗原代表合成的抗原序列，其为所有流行株 (circulating strain) 中唯一最好的“平均水平”。虽然这些抗原能够引起直接的细胞免疫应答，但是在先前的疫苗策略中，这些应答的广度和强度未得到大幅度的提高。

[0005] 用于治疗或预防病毒感染的下一代疫苗的开发必须引起细胞免疫广度的增长，以使接种结果成功。在治疗或预防 HIV-1 时，对这类疫苗的需求是尤为紧急的。

[0006] 发明概述

[0007] 第一个方面，本发明的特征在于一种用于治疗或降低哺乳动物如人类的病毒感染风险的疫苗，其包括至少两个不同的优化病毒多肽（如 2、3、4、5 或多个不同的优化病毒多肽），其中所述优化病毒多肽与相同的病毒基因产物相对应。在一个实施方式中，病毒感染由逆转录病毒、呼肠孤病毒、小核糖核酸病毒、披盖病毒、正粘病毒、副粘病毒、杯状病毒、沙粒病毒、黄病毒、丝状病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、星状病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、嗜肝性 DNA 病毒、痘病毒、或多瘤病毒引起。在其它实施方式中，逆转录病毒是 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)，并且病毒基因产物包括 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu。在另一个实施方式中，疫苗包括仅两个 (no more than two) 与 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu 病毒基因产物之一相对应的优化病毒多肽。在另一个实施方式中，疫苗不包括与 Gag 和 Nef 相对应的优化病毒多肽。在又一个实施方式中，疫苗包括至少两个对于选自 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 和 Vpu 的第一个病毒基因产物的不同的优化病毒多肽（例如 2、3、4、5 或多个不同的优化病毒多肽），以及包括一个或多个

对于与选自 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 和 Vpu 的第一个病毒基因产物不同的第二个病毒基因产物的不同的优化病毒多肽（例如 2、3、4、5 或多个不同的优化病毒多肽）。

[0008] 第二个方面，本发明的特征在于一种用于治疗或降低哺乳动物如人类 1 型人类免疫缺陷病毒（HIV-1）感染风险的疫苗，其包括具有至少 7 个连续氨基酸（如，长度为至少 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 或更多的连续氨基酸）的优化病毒多肽，该氨基酸与 SEQ ID NOS :1-29 所描述的序列中的任意一个具有至少 85% 的氨基酸序列同一性（identity）。在一个实施方式中，优化病毒多肽具有至少 7 个连续的氨基酸（如，长度为至少 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 或更多的连续氨基酸），该些氨基酸与 SEQ ID NOS :1-29 所描述的序列中的任意一个具有氨基酸序列同一性。在另一个实施方式中，优化病毒多肽具有 SEQ ID NOS :1-29 所描述的序列中的任意一个的氨基酸序列。在又一个实施方式中，疫苗包括至少两个优化病毒多肽，其选自组 a)-k) 中的任意一个或多个：a) SEQ ID NOS :1 和 2；b) SEQ ID NOS :3、4 和 5；c) SEQ ID NOS :6 和 7；d) SEQ ID NOS :8-12；e) SEQ ID NOS :13、14 和 15；f) SEQ ID NOS :16、17 和 18；g) SEQ ID NOS :19 和 20；h) SEQ ID NOS :21、22 和 23；i) SEQ ID NOS :24 和 25；j) SEQ ID NOS :26 和 27；k) SEQ ID NOS :21-22。在另一个实施方式中，疫苗可包括一对选自上组 a)-k) 中任意一个的优化病毒多肽，以及一个或多个来自相同或不同的组 a)-k) 的不同的优化病毒多肽。在其它实施方式中，疫苗可包括至少三个或四个或多个优化病毒多肽，其来自组 a)-k) 中的一个或多个。

[0009] 第三个方面，本发明的特征在于一种用于治疗或降低哺乳动物如人类的病毒感染风险的疫苗，其包括至少两对不同的优化病毒多肽，其中每一对优化病毒多肽与相同的病毒基因产物相对应，并且其中仅仅两个（no more than two）已并入疫苗的优化病毒多肽与相同的病毒基因产物相对应。在一个实施方式中，疫苗包括至少三对不同的优化病毒多肽。在另一个实施方式中，疫苗包括至少四对不同的优化病毒多肽。在一个实施方式中，病毒感染由逆转录病毒、呼肠孤病毒、小核糖核酸病毒、披盖病毒、正粘病毒、副粘病毒、杯状病毒、沙粒病毒、黄病毒、丝状病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、星状病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、嗜肝性 DNA 病毒、痘病毒、或多瘤病毒引起。在其它实施方式中，逆转录病毒是 1 型人类免疫缺陷病毒（HIV-1），并且病毒基因产物包括 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu。在又一个实施方式中，疫苗仅包括两个与病毒基因产物 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu 之一相对应的优化病毒多肽。在另一个实施方式中，疫苗不包括与 Gag 和 Nef 相对应的优化病毒多肽。在又一个实施方式中，疫苗包括至少三对与病毒基因产物 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu 中的任意三个相对应的不同的优化病毒多肽。在另一个实施方式中，疫苗包括至少四对与病毒基因产物 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 或 Vpu 中的任意四个相对应的不同的优化病毒多肽。

[0010] 在本发明前三个方面中任意一个方面的实施方式中，疫苗引起针对病毒基因产物的细胞免疫应答。在另一个实施方式中，疫苗引起针对 HIV-1 的细胞免疫应答。在又一个实施方式中，至少一个不同的优化病毒多肽的核苷酸序列由核酸或载体编码。在一个实施方式中，载体为重组腺病毒，如血清 26 型腺病毒（Ad26）、血清 34 型腺病毒（Ad34）、血清 35 型腺病毒（Ad35）、血清 48 型腺病毒（Ad48）或血清 5HVR48 型腺病毒（Ad5HVR48）。在又一

个实施方式中,疫苗与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂结合。

[0011] 第四个方面,本发明的特征在于一种包括优化病毒多肽的核苷酸序列的核苷酸,该优化病毒多肽具有至少7个连续的氨基酸(如,长度为至少8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,50,100,150,175,200,250,300,350,400,450,500或更多的连续氨基酸),该核苷酸序列与SEQ ID NOS:1-29所描述的序列中的任意一个具有至少85%的氨基酸序列同一性。在一个实施方式中,优化病毒多肽具有至少7个连续的氨基酸(如,长度为至少8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,50,100,150,175,200,250,300,350,400,450,500或更多的连续氨基酸),该优化病毒多肽与SEQ ID NOS:1-29所描述的氨基酸序列中的任意一个具有序列同一性。在另一个实施方式中,优化病毒多肽具有SEQ ID NOS:1-29所描述的氨基酸序列中的任意一个。在又一个实施方式中,核酸包括载体。在一个实施方式中,载体为重组腺病毒,如血清26型腺病毒(Ad26)、血清34型腺病毒(Ad34)、血清35型腺病毒(Ad35)、血清48型腺病毒(Ad48)或血清5HVR48型腺病毒(Ad5HVR48)。

[0012] 第五个方面,本发明的特征在于一种优化病毒多肽,其具有至少7个连续的氨基酸(如,长度为至少8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,50,100,150,175,200,250,300,350,400,450,500或更多的连续氨基酸),该优化病毒多肽与SEQ ID NOS:1-29所描述的氨基酸序列中的任意一个具有至少85%的氨基酸序列同一性。在一个实施方式中,优化病毒多肽具有至少7个连续的氨基酸(如,长度为至少8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,50,100,150,175,200,250,300,350,400,450,500或更多的连续氨基酸),该优化病毒多肽的序列与SEQ ID NOS:1-29所描述的氨基酸序列中的任意一个完全一致。在另一个实施方式中,优化病毒多肽具有SEQ ID NOS:1-29所描述的氨基酸序列中的任意一个。

[0013] 第六个方面,本发明的特征在于通过给予本发明所述的疫苗或核酸,治疗或降低哺乳动物如人类的病毒感染风险的方法。在一个实施方式中,病毒感染由逆转录病毒、呼肠孤病毒、小核糖核酸病毒、披盖病毒、正粘病毒、副粘病毒、杯状病毒、沙粒病毒、黄病毒、丝状病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、星状病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、嗜肝性DNA病毒、痘病毒或多瘤病毒引起。在又一个实施方式中,逆转录病毒是1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1),并且病毒基因产物包括Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr或Vpu。在一个实施方式中,疫苗或核酸引起针对病毒基因产物的细胞免疫应答。

[0014] 第七个方面,本发明的特征在于通过合成本发明所述的疫苗,制备用于治疗或降低哺乳动物如人类的病毒感染风险的疫苗的方法。

[0015] 第八个方面,本发明的特征在于通过将本发明的核酸与细胞接触并分离出优化病毒多肽,制备用于治疗或降低哺乳动物如人类的病毒感染风险的疫苗的方法。

[0016] 在本发明的第七个或第八个方面的实施方式中,优化病毒多肽在给予哺乳动物时引起细胞免疫应答。细胞免疫应答可针对病毒基因产物。在另一个实施方式中,病毒感染由逆转录病毒、呼肠孤病毒、小核糖核酸病毒、披盖病毒、正粘病毒、副粘病毒、杯状病毒、沙粒病毒、黄病毒、丝状病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、星状病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、疱疹病毒、嗜肝性DNA病毒、痘病毒或多瘤病毒引起。在又一个实施方式中,逆转录病毒是1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1),并且病毒基因产物包括Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、

Vpr 或 Vpu。

[0017] 第九个方面,本发明的特征在于一种试剂盒,其包括本发明的疫苗、药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂及其使用说明书。在一个实施方式中,试剂盒还包括佐剂。

[0018] 最后一个方面,本发明的特征在于一种试剂盒,其包括本发明的核酸,药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂及其使用说明书。在一个实施方式中,试剂盒还包括佐剂。

[0019] 在本发明所有方面的实施方式中,优化病毒多肽由为在人类中表达而优化的核苷酸序列编码(例如,SEQ ID NOS :5、10、11、12、15、18 和 23 中的任意一个)。

[0020] 定义

[0021] “优化的病毒多肽”或“计算优化的病毒多肽”指的是一种免疫原性多肽,其不是天然存在的病毒肽、多肽或蛋白。优化病毒多肽序列起初是通过修饰一个或多个天然存在的病毒基因产物(例如肽、多肽和蛋白)的氨基酸序列而生成,以增加哺乳动物(例如人类)免疫(例如,当并入本发明所述的疫苗)后所产生的抗病毒免疫应答(例如,细胞或体液免疫应答)的广度、强度、深度或寿命。因此,优化病毒多肽可能与“亲本”病毒基因序列相对应;可替换地,优化病毒多肽可能不与特定的“亲本”病毒基因序列相对应,而可能与病毒的变异株或准种产生的类似物的序列相对应。对优化病毒多肽中包括的病毒基因序列进行的修饰包括氨基酸的添加、替换和删除。在本发明的一个实施方式中,优化病毒多肽是两个或多个天然存在的病毒基因产物(例如,天然或临床的病毒分离物)的复合或融合的氨基酸序列,其中每个潜在的抗原表位(例如,每个连续或重叠的氨基酸序列,其长度为 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30 或多个氨基酸)经分析和修饰,以提高所生成的优化病毒多肽的免疫原性。与不同病毒基因产物相对应的优化病毒多肽也可融合以促进其并入本发明的疫苗。生成优化病毒多肽的方法在,例如,Fisher 等“全球性 HIV-1 变体中潜在 T 细胞表位的最佳覆盖率的多价疫苗 (Polyvalent Vaccine for Optimal Coverage of Potential T-Cell Epitopes in Global HIV-1 Variants)”*Nat. Med.* 13(1):100-106 (2007) 以及国际专利申请公开文本 WO 2007/024941 中所描述,此处以引用方式并入。一旦生成了优化病毒多肽序列,可通过标准技术生产或管理相对应的多肽(例如,重组病毒载体,如国际专利申请公开 WO 2006/040330 和 WO2007/104792 所公开的腺病毒载体,此处以引用方式并入)。

[0022] “药学上可接受的载体”指的是接受治疗的哺乳动物在生理上可接受的、并且保留与其共同给予的化合物的治疗性质的载体。典型的药学上可接受的载体为生理盐水。其它生理上可接受的载体及其配方对于本领域技术人员是已知的,并且在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition, ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA) 中描述,此处以引用方式并入。

[0023] “载体”指的是 DNA 构建体,其包含可操作的连接到下游基因或编码区域(例如,编码多肽或多肽片段的 cDNA 或基因组 DNA 片段)的启动子。在受体细胞(例如原核或真核细胞,如细菌、酵母菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞,取决于表达载体中的启动子)或生物体(包括,例如人类)中导入载体后,细胞能够表达载体编码的 mRNA,之后其翻译为本发明所述的编码的优化病毒多肽。体外转录/翻译的载体在本领域是熟知的,并在此处作进一步描述。载体可能是基因工程质粒,病毒或衍生自例如噬菌体、腺病毒、逆转录病毒、痘病毒或疱疹病毒的人工染色体。

[0024] “病毒基因产物”指的是任何天然存在的病毒肽、多肽、或蛋白、或其片段。在本发明的一个实施方式中,病毒基因产物衍生自 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)。HIV-1 病毒基因产物包括 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 和 Vpu 多肽。

附图说明

[0025] 图 1 为说明针对恒河猴中的全球潜在 T 细胞表位 (PTE) 肽,计算优化的 HIV-1Gag、Pol 和 Env 病毒多肽的扩大的广度的图表。用优化病毒多肽 (蓝色) 免疫的动物以最大数量与记忆肽池反应。

[0026] 图 2 为显示计算修饰的 HIV-1Gag、Pol 和 Env 病毒多肽扩大了表位特异性细胞免疫应答的广度的图表。

[0027] 图 3 说明在用来自本发明的计算修饰的病毒多肽的 HIV-1 病毒基因产物 Gag、Pol 和 Env 进行免疫后的恒河猴以及接种共有 HIV-1 抗原或者 HIV-1 进化支 C 分离抗原的动物中检测到的细胞免疫应答的广度。用优化病毒多肽 (蓝色) 免疫的动物以最大数量与记忆肽池反应。由于动物是远交种,池在动物与动物之间不同。Gag、Pol 和 Env 各自引起多种细胞免疫应答,并可以共享反应模式。

[0028] 图 4A-4C 为显示用病毒多肽 (Pol (图 4A)、Gag (图 4B) 和 Env (图 4C)) 测试的不同疫苗 (二价镶嵌序列 (Mos2)、M 共有序列 (Mcon) 和优化的进化支 C (OptC)) 之间共享的潜在表位的图表。图 4A-C 显示不同疫苗候选物对目前 HIV 数据库全长基因组和 PTE 肽的相对覆盖率。

[0029] 图 5 为一图表,其显示 PTE 肽与二价镶嵌 (Mos2) 疫苗的反应数量 (认为每个应答是一个独立事件,不论重叠与否) 大于与 M 组共有 (Mcon) 疫苗和天然病毒株疫苗 (优化的进化支 C (天然 C (最佳))) 的反应数量,已选择该天然病毒株疫苗以产生 M 组集合 (OptC) 疫苗抗原的最佳覆盖率。图 5 显示蛋白、CD8+T 细胞和 CD4+T 细胞在每只动物中的 PTE 肽应答数量。统计学上, $Mos2 > Mcon \sim OptC$ (Mcon 显示比 OptC 更多的应答的趋势)。Mos2 与 Mcon 相比的 Wilcoxon p 值: p 值 = 0.001058。

[0030] 图 6 为一图表,其显示引发 T 细胞应答的 PTE 肽的数量。二价镶嵌 (Mos2) 疫苗中的中位数为 16 (范围:12-29) 的 PTE 肽引发 CD8+T 细胞内的应答,而中位数仅为 6 (范围:0-7) 的 Mcon 肽和 OptC 肽中的中位数仅为 3 (范围:0-3) 的肽引发 CD8+T 细胞内的应答。二价镶嵌 (Mos2) 疫苗中的中位数为 4 (范围:2-6) 的 PTE 肽触发 CD4+T 细胞内的应答,而中位数仅为 1 (范围:0-2) 的 Mcon 肽和 OptC 肽中的中位数仅为 0.5 (范围:0-2) 的肽触发 CD4+T 细胞内的应答。因此,应答的趋势是 $Mos2 > Mcon > OptC$ 。

[0031] 图 7 为一示意图,总结了由每只被研究动物的 T 细胞识别的所有 CD8+T 细胞 Gag PTE 肽的图谱 (见下面的实施例 3)。动物编号,肽池和肽编号标记每个活性肽的边界。组用符号表示:*,Mos2;✂,ConM;±,OptC。此处 Gag 作为实施例被包括。即使动物是远交种,CD8 应答仍倾向于聚类。镶嵌疫苗与单价疫苗相比具有潜在的优势。镶嵌型 (mosaic,嵌合体) 有更好的机会刺激应答,其与更普通的变体相作用。镶嵌型还刺激针对在混合物中存在的不同形式的多重应答。因此,镶嵌型有阻断普通逃逸途径的潜力。在我们的研究中,镶嵌疫苗倾向于刺激 T 细胞应答,识别更多重叠肽。有许多活性肽定位的热点。设计 PTE 肽以使用于评估疫苗的肽试剂中的 HIV-1M 组的潜在表位 (或 9 个氨基酸连续段的九聚体)

的覆盖率最大化。不可避免地,在 PTE 肽中有许多重叠,但是由于算法,重叠通常是与某些变异的重叠。图 7 公开了 SEQ ID NO:42。

[0032] 图 8 为一示意图,总结了由每只被研究动物的 T 细胞识别的 CD4+T 细胞 Gag PTE 肽的图谱(mapping)。图 8 公开了 SEQ ID NO:43。

[0033] 图 9 为一图表,其描述了针对 ConM 疫苗或最佳天然疫苗的 PTE 应答的典型模式,比对了引起应答的肽和疫苗相关区域的肽。疫苗和目标 PTE 肽之间的具有同一性的稳定肽段的良好匹配对于实现对这些疫苗的反应是必要的。图 9 按出现顺序分别公开了 SEQ ID NOS 44-57。

[0034] 图 10 为一图表,其说明了镶嵌疫苗产生多个应答,识别具有不明显抗原性竞争和具有宽泛局部应答的多个变异重叠肽。尤其识别四个易变(variable)的 PTE 肽。此外,在重叠区域,两个镶嵌形式以及两者的结合均被识别。最后,新形式(S)被识别。图 10 按出现顺序分别公开了 SEQ ID NOS 58-63。

[0035] 图 11 为一图表,其说明了在镶嵌疫苗接种的动物中(361-07)CD8+PTE 肽应答的典型模式。测试了 22 个 PTE 肽并确定了 8 个 CD8 应答区域;5 个区域包括与在一个或另一个镶嵌序列(mosaic)中的氨基酸匹配的易变的肽。确定了 5 个 CD4 应答区域。因此,对镶嵌序列的 T 细胞应答在给定区域内可见更多易变的肽。这对于 CD8T 细胞应答似乎尤为真实。这可能是引发多个 T 细胞克隆而识别表位变体的结果,而且这可能阻断合适的逃逸途径。不仅有更多的应答,而且它们更深入并且覆盖了更多的变体。图 11 按出现顺序分别公开了如 SEQ ID NOS 64-101 所描述的 CD8 应答。按出现顺序分别公开了如 SEQ ID NOS 102-117 所描述的 CD4 应答。

[0036] 图 12 为一图表,其显示了重叠的易变 PTE 肽的数量,该 PTE 肽贯穿了疫苗引起的 T 细胞所靶向的区域。

[0037] 图 13 为一图表,其显示相对于 Mcon 和 OptC 疫苗,2 个镶嵌抗原疫苗产生更多的针对含有一个或多个重叠 PTE 肽的区域的 T 细胞应答。图 13 与图 5 相似,猴子从右至左以相同的顺序显示,但改变其比例以反映对含有一个或多个重叠 PTE 肽而不是单肽的区域的应答数量。

[0038] 图 14 为一图表,其显示在给予动物二价镶嵌疫苗(Mos2)、Mcon 疫苗和 OptC 疫苗后, T 细胞应答的数量。二价镶嵌(Mos2)疫苗在 CD8+T 细胞中引发中位数为 8 的应答,而 Mcon 疫苗和 OptC 疫苗分别引发中位数仅为 3(范围:0-6)和 1.5(范围:0-5)个肽的 CD8+T 细胞应答。二价镶嵌(Mos2)疫苗在 CD4+T 细胞中引发中位数为 3(范围:2-5)的应答,而 Mcon 疫苗和 OptC 疫苗分别引发中位数仅为 1(范围:0-2)和 0.5(范围:0-2)的 CD4+T 细胞应答。因此,应答的趋势是 Mos2 > Mcon > OptC。

[0039] 图 15 为一图表,其显示镶嵌疫苗与进化支 C(进化枝 C)天然疫苗相比能够引起更多的应答与进化支 C 天然蛋白交叉反应:GAG 整合肽(pooled peptide)代表 5 个蛋白。接种了 M 组共有序列或最佳覆盖率进化支 C 天然蛋白的动物对来自这些蛋白的肽有 0-2 个应答,而接种了镶嵌疫苗的动物能够应答 1-5 个肽池。与 Mcon 或最佳 C 序列相比,镶嵌疫苗引起对每个测试蛋白的更多的应答。由镶嵌疫苗引起的 T 细胞应答也识别更多的贯穿真实 Gag 蛋白的整合肽组。10-12 个亚池=10×十五聚体肽(96ZM Gag 除外,其为 5×二十聚体肽)。

[0040] 图 16 为一图表,其显示随着时间的推移,镶嵌设计对于病毒多肽中的变化稳定(例如 Gag M)。

[0041] 图 17 为一图表,其显示利用九聚体优化的覆盖率在接近(例如,八-十二聚体)优化长度时稳定(显示的是 Gag)。

[0042] 图 18 为一图表,其显示变异数量的增加使覆盖率增加,但仅有递减的恢复(return)(显示的是 Gag)。

[0043] 图 19A-19B 为显示表位特异性 T 淋巴细胞对 PTE 肽应答的广度和幅度的图表。图 19A 为一图表,其显示了在表达镶嵌序列(蓝色)、M 共有序列(绿色)、进化支 B+ 进化支 C(紫色)或最佳天然进化支 C(红色)HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的 rAd26 载体的单次免疫后,表位特异性 CD4+(顶部)和 CD8+(底部)T 淋巴细胞对单个 PTE 肽应答的数量。单个猴子描绘在 x 轴上。每种颜色的不同阴影反映了对不同抗原(Gag、Pol、Env)的应答。图 19B 为一图表,其显示 CD4+(顶部)和 CD8+(底部)T 淋巴细胞应答区域的数量。

[0044] 图 20A-20C 示出一图解,其显示定位(mapping)于 HIV-1Gag(图 20A) (SEQ ID NO: 118)、Pol(图 20B) (SEQ ID NO: 119)和 Env(图 20C) (SEQ ID NO: 120)蛋白序列的免疫 4 周后,CD8+T 淋巴细胞对 PTE 肽的应答。颜色表示接受镶嵌序列(蓝色)、M 共有序列(绿色)、进化支 B+ 进化支 C(紫色)或最佳天然进化支 C(红色)HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的猴子。对于每个表位,猴子编号、抗原(G, Gag; P, Pol; E, Env)、子池编号和单个 PTE 肽编号均有显示。

[0045] 图 21A-21C 示出一图解,其显示定位于 HIV-1 Gag(图 21A) (SEQ ID NO: 121)、Pol(图 21B) (SEQ ID NO: 122)和 Env(图 21C) (SEQ ID NO: 123)蛋白序列的免疫 4 周后,CD4+T 淋巴细胞对 PTE 肽的应答。颜色表示接受镶嵌序列(蓝色)、M 共有序列(绿色)、进化支 B+ 进化支 C(紫色)或最佳天然进化支 C(红色)HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的猴子。对于每个表位,猴子编号、抗原(G, Gag; P, Pol; E, Env)、子池编号和单个 PTE 肽编号均有显示。

[0046] 图 22 示出一个图解,其显示使用表达镶嵌序列、M 共有序列、进化支 B+ 进化支 C 或最佳天然进化支 C HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的 rAd26 载体免疫 4 周后,所有猴子中具有活性 PTE 肽的疫苗序列的比对。对于每只猴子,疫苗序列显示在顶部,活性 PTE 肽显示在由抗原(G, Gag; P, Pol; E, Env)和 PTE 肽编号表示的疫苗序列下方。最小重叠区域以粗体显示。两个镶嵌序列或两个进化支 B+ 进化支 C 抗原之间的序列多态性显示为蓝色。疫苗序列与活性 PTE 肽之间的差异显示为红色。图 22 按出现顺序分别公开了 SEQ ID NOS 124-640。

[0047] 可能含有免疫应答表位的肽内最小区域,基于其出现时的活性肽间的重叠,在疫苗中是粗体的。如果没有重叠肽,我们推测表位可以在肽中的任何位置,因此整个区域是粗体的。我们不能区分肽内部具有不同边界的不同的 T 细胞应答靶向表位,或当变体存在时可耐受变异的更多杂乱的克隆 T 细胞应答;在疫苗免疫应答中两种情况均是有利的。靶向区域的数量与说明数据所需的 T 细胞应答的最小数量相对应。

[0048] 疫苗和肽不匹配处的氨基酸写为红色;如果它们落入可能带有表位的区域,它们为粗体红色。当多个肽重叠时,重叠区域外的氨基酸差异以非粗体红色标记。

[0049] 疫苗总是在顶部。代表每个蛋白(Gag 为 G, Pol 为 P, Envelope 为 E)的字母和肽编号用来标记每个活性 PTE 肽。蛋白和 HXB2 编码接在每个肽后。

[0050] 对于镶嵌序列和进化支 B+C 疫苗,每个含有 2 个抗原并且均包括在比对中;疫苗中的氨基酸差异标记为蓝色,如果活性肽在第二镶嵌序列中带有变异氨基酸,也标记为蓝色。在两个疫苗抗原具有差异的每个位置,活性肽也标记为粗体,以显示包括两个变体的位置可能影响疫苗免疫应答并且使广度和深度更大。

[0051] 例如,总结的第一个疫苗是进化支 B+C 疫苗,动物 287-95 是应答被列出的第一只动物。有 3 个针对 PTE 肽的 CD8 应答,1 个针对 CD4。两个 CD8 肽 E26 和 E282 显示大量的重叠,因此两者可能是相同 CTL 应答的靶点;因此我们也注意到仅有 2 个 CD8 应答区域,以及 1 个 CD4 应答区域。对于每个应答区域,我们写出每个区域中重叠肽的数量(例如,CD8:12CD4:1)以评估应答的深度;两个为红色,表明重叠区域在活性肽中易变。如果疫苗不同,如第二活性区域中的 D/E,则标记为蓝色。仅重叠的区域为粗体。E282 中的 H 在两个疫苗中均未发现,因此标记为红色;它在重叠区域中因此为粗体。每个活性肽具有其蛋白和相应的 HXB2 编号,标记在右侧。

[0052] 图 23A-23C 为图表,其显示了从最低到最高排列的所有 Gag、Pol 和 Env 特异性 CD8+(图 23A 和 23B)和 CD4+(图 23C)T 淋巴细胞应答的幅度。

[0053] 图 24A-C 显示了对 PTE 肽的表位特异性 T 淋巴细胞应答的深度。图 24A 为一图解,其显示在接受了最佳天然进化支 C 抗原的猴子 366 中,定位的 T 淋巴细胞应答的实例。图 24B 为一图解,其显示在接受了二价镶嵌抗原的猴子 361 中,定位的 T 淋巴细胞应答的实例。在图 24A 和 24B 中,疫苗序列显示在顶端 (OptC;Mos1, Mos2),活性 PTE 肽显示在由抗原 (G, Gag;P, Pol;E, Env) 和 PTE 肽编号表示的疫苗序列的下方。最小重叠区域以粗体显示。两个镶嵌抗原间的序列多态性显示为蓝色。疫苗序列与活性 PTE 肽之间的差异显示为红色。所有由应答区域构成的阳性肽的完整比对均显示在图 22 中。图 24C 为一图表,其显示了用表达镶嵌序列、M 共有序列、进化支 B+ 进化支 C 或最佳天然进化支 C 抗原的 rAd26 载体进行免疫后,CD4+(顶部)和 CD8+(底部)T 淋巴细胞应答的深度。单个猴子描绘在 x 轴上。对于每个表位区域,显示一个应答变异(浅阴影)或 > 1 个应答变异(深阴影)。图 24A 按出现顺序分别公开了 SEQ ID NOS641-650。图 24B 按出现顺序分别公开了 SEQ ID NOS 651-685。

[0054] 图 25 为一图表,其显示了对来自进化支 A、B 和 C 的 HIV-1Gag 肽的表位特异性 T 淋巴细胞应答的广度。利用来自下列 HIV-1Gag 株的重叠肽的子池来评估细胞免疫应答的广度:进化支 C DU422、进化支 C ZM651、共有序列 C、共有序列 A 和共有序列 B。用表达镶嵌序列(蓝色)、M 共有序列(绿色)、进化支 B+ 进化支 C(紫色)或优化天然进化支 C(红色)HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的 rAd26 载体进行单次免疫后,显示了阳性子池的数量。单个猴子描绘在 x 轴上。

[0055] 图 26A-D 为图表,其显示加强免疫后的细胞和体液免疫应答。显示了每只猴子在初免后第 4 周(每个画面左侧)和加强后第 44 周(每个画面右侧)单个 T 淋巴细胞应答的幅度(图 26A)和广度(图 26B)。在第 0 周用 rAd26 载体对猴子进行初免,并且在第 40 周用表达镶嵌序列、M 共有序列或最佳天然进化支 C HIV-1 Gag、Pol 和 Env 抗原的 rAd5HVR48 载体进行加强。单个猴子描绘在 x 轴上。在图 26A 中,红色表示 CD8+T 淋巴细胞应答,蓝色表示 CD4+T 淋巴细胞应答,用线条描绘在两个时间点均观察到的应答,用点描绘仅在一个时间点观察到的应答。在图 26B 中,每种颜色的不同阴影反映对不同抗原 (Gag、Pol、Env) 的应答。

图 26C 为一图表,其显示在 0、4、44 周的 Env 特异性 ELISA 终点效价。图 26D 为一图表,其显示在第 44 周时对 1 级进化支 A(DJ263. 8),进化支 B(SF162. LS) 和进化支 C(MW965. 26) 病毒的中和抗体 (NAb) 效价。对鼠白血病病毒的 NAb 效价作为阴性对照,在所有样品中 < 20。

[0056] 图 27 为一图表,其显示不同的疫苗抗原对 PTE 肽的理论覆盖率。显示了被镶嵌序列 (蓝色)、M 共有序列 (绿色)、进化支 B+ 进化支 C (紫色) 或优化天然进化支 C (红色) HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原所覆盖的 9 个氨基酸 PTE 肽的百分比。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明的特征在于一种优化的病毒多肽,其是从天然存在的病毒基因产物计算衍生的。使用一个或多个本发明的优化病毒多肽或并入一个或多个本发明的优化病毒多肽的疫苗 (例如载体) 对对象 (例如人类) 进行免疫后,本发明所述的优化病毒多肽使病毒特异性免疫 (例如,细胞免疫,如基于 T 细胞的免疫应答) 的广度和深度增高。本发明提供疫苗,其可给予已感染或具有感染病毒感染的风险的对象 (例如人类)。本发明所述疫苗并入了至少两个不同的每个相应的病毒基因产物所代表的优化病毒多肽。发明人发现并入两个不同优化病毒多肽使疫苗中的覆盖率和免疫原性表位表现增加,导致在对象接种后,病毒特异性免疫应答总数量增长。本发明还提供了给予和制备用于对象 (例如人类) 的疫苗、载体和优化病毒多肽的方法。此处所述的组合物、方法和试剂盒通过提供至少两个不同的优化病毒多肽,能够明显增加病毒特异性细胞免疫应答的多样性、广度和 / 或深度。

[0059] 本发明的优化病毒多肽

[0060] 本发明提供多价 (例如二价) 疫苗,其并入了对应于并来自天然传播的病毒基因产物的计算优化 (computationally-optimized) 的病毒多肽。多价镶嵌蛋白由天然序列通过计算机上执行的 (in silico) 重组并优化而装配得到,以便对于给定的价提供潜在 T 细胞表位 (PTEs) 最大化的覆盖率。镶嵌抗原为全长蛋白,其设计成保留天然的抗原表达和加工。

[0061] 发明人发现使用对应于并来自单病毒基因产物 (即二价疫苗) 的两个不同的优化病毒多肽进行免疫,与传统的并入来自相同病毒基因产物 (例如,基于临床分离株的序列) 的天然存在的多肽,或来自相同病毒基因产物的天然存在多肽的共有序列的单价或多价疫苗相比,能够明显引起更高数量的细胞免疫应答 (例如 T 细胞应答)。

[0062] 因此,关于并入了计算优化 (或计算机上优化) 的病毒多肽的疫苗,其序列提供流行病毒序列的非稀有短节段最大化的覆盖率,该疫苗能够提高免疫应答的广度和深度。

[0063] 一种遗传算法用来创建优化病毒多肽组,作为任意一组天然存在的病毒基因产物序列的片段的“镶嵌”混合物,提供作为输入数据。该遗传算法策略使用来自普通病毒群体的未经比对的蛋白序列作为输入数据组,因此具有“不依赖于比对”的优点。其创建的人工优化病毒多肽类似于在自然界中发现的病毒蛋白,但不是天然存在的。可以调整遗传算法以根据预期靶点或期望的免疫应答来优化不同长度的病毒多肽。由于大部分 T 细胞表位的长度为九个氨基酸,设计本发明所述的优化病毒多肽所利用的遗传算法基于优化给定病毒基因产物 (例如,HIV-1Gag) 的每个连续的九聚体氨基酸序列。根据该方法,可排除自然界中不存在的或非常稀有的 (例如) 九聚体——相对于基于共有序列的疫苗策略是一种改进,因为后者可包含一些稀有或自然界中根本不存在的 (例如) 九聚体。用于遗传算法中的适合度的定义是,最“合适的”多价混合物是在群体中产生所有九聚体的最佳覆盖率 (完美

匹配的最高分数)的输入病毒序列的组合,并且满足群体中无九聚体缺失或稀有的限制。用于生成本发明的优化病毒多肽的遗传算法在国际专利申请公开 WO 2007/024941 中进一步描述,此处以引用方式并入。

[0064] 在一个实施方式中,本发明提供了并入单一优化 HIV-1 多肽(例如,在 SEQ ID NOS:1-29 中所描述的多肽)的多价(例如二价)HIV-1 疫苗。在另一个实施方式中,本发明的特征在于一种并入两个或多个优化 HIV-1 多肽的多价疫苗。在每种情况下,优化 HIV-1 多肽都是基于全球流行的所有 HIV-1 变体,称为 HIV-1 主要(M)组。发明人生成了一组优化的 HIV-1 多肽(SEQ ID NOS:1-29),其增加基于 M 组镶嵌基因的细胞免疫的广度和深度,该 M 组镶嵌基因中每个基因仅利用两个变体(例如,两个多肽序列,每个为 Gag、Pol、Env、Nef、Tat、Rev、Vif、Vpr 和 Vpu)。我们已经在恒河猴(Rhesus macaques)中获得新的并且惊人的结果,在多价(例如二价)HIV-1M 组疫苗中使用这些优化 HIV-1 多肽,与其它两个领先疫苗抗原策略(M 共有序列抗原和最佳天然进化支 C 抗原)相比,引起明显更大的 HIV-1 特异性细胞免疫应答的广度和深度。

[0065] 本发明提供了与不同的病毒基因产物相对应的优化病毒多肽的融合。上述遗传算法可用于生成在本发明的疫苗中所使用的融合多肽。例如,Gag/Nef(SEQ ID NOS:19-20)、Gag/Pol(SEQ ID NOS:21-27)、Gag/Pol/Nef(SEQ ID NOS:28-29)的优化 HIV-1 多肽融合可并入本发明的载体中,以给予感染 HIV-1 或具有感染 HIV-1 风险的对象(例如人类)。本发明所述疫苗(不论是多肽还是核酸的形式)还可以包括一个或多个非“镶嵌”多肽(或分别编码它们的序列),如,例如,最佳进化支 C 序列(SEQ ID NOS:30-36)或共有序列(SEQ ID NOS:37-39)。

[0066] 本发明公开的优化病毒多肽可通过化学合成技术进行传统制备,如 Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149(1963)(也见于例如 Stemmer 等,164Gene 49(1995))中所描述。例如,该疫苗可容易地使用固相肽合成(SPPS)制备。自动固相合成可通过使用很多熟知的、市售的自动合成器中的任何一个进行,如应用生物系统公司(Applied Biosystems)的 ABI433A 肽合成器。可替换地,本发明的优化病毒多肽可通过使用可实现优化病毒多肽细胞内表达的核酸或载体(例如,病毒载体,如腺病毒)对细胞或有机体进行转染或转导而进行重组化生产。编码本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列的核酸和载体可通过熟知的重组 DNA 技术合成,包括本文中描述的技术。

[0067] 本发明的疫苗

[0068] 本发明的特征还在于一种疫苗,其可给予已感染病毒或具有感染病毒(例如 HIV-1)风险的患者。本发明的疫苗包含至少一个本发明的优化病毒多肽,如本文所讨论。本发明的疫苗可以是编码两个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列的核酸(例如,重组体的免疫原性组分(例如亚单元)或完整有机体(例如,完整病毒)病毒载体)。核酸包括并入两个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列的载体(例如,病毒载体,如腺病毒)。本发明的优化病毒多肽,以及并入了优化病毒多肽的疫苗、核酸和载体,可在细胞或有机体中进行重组化表达,或可直接给予已感染病毒或具有感染病毒风险的对象(例如人类)。

[0069] 本发明的载体

[0070] 本发明的特征还在于编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列(例

如 DNA 或 RNA) 的载体。载体可以是包括编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列的载体 (例如脂质体)、质粒、黏粒、酵母人工染色体或病毒。载体能够包括其他的来自几个来源的核酸序列。

[0071] 编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的载体可以使用任何本领域公知的重组分子生物技术进行构建。对靶细胞或有机体进行转染或转导后,载体可在染色体外或可整合入宿主细胞的染色体。每个靶细胞中载体的核酸组分可以为单或多拷贝数,可为线型、环形或串联状。

[0072] 本发明的载体也可以包括内部核糖体进入位点 (IRES) 序列,以实现单次核酸转录表达多个肽或多肽链。例如,本发明的载体可以编码一个或多个本发明的优化病毒多肽以及其它多肽 (例如,可检测的标记,如绿色荧光蛋白 (GFP))。

[0073] 本发明所述的载体进一步包括促进本发明优化病毒多肽表达的基因表达元件。有助于编码本发明所述的优化病毒多肽的载体的表达的基因表达元件包括,但不限于 (a) 调节序列,如病毒转录启动子及其增强子元件,如 SV40 早期启动子、劳斯 (Rous) 肉瘤病毒 LTR 和莫洛尼 (Moloney) 鼠白血病病毒 LTR; (b) 例如来自 SV40 晚期区的拼接区和多腺苷酸化位点; 以及 (c) 例如在 SV40 中的多腺苷酸化位点。还包括来源于复制的质粒、抗生素耐药性或选择性基因、多克隆位点 (例如,限制性内切酶位点) 以及其它病毒基因序列 (例如,编码病毒结构元件、功能元件或调节元件的序列,如 HIV 长末端重复序列 (LTR))。

[0074] 本发明载体也可以包括本发明的用于在人类中表达而优化的优化病毒多肽,如,例如 SEQ ID NOS: 11, 14-18 和 23 中的任意一个。

[0075] 本发明的载体可以被设计成包括多克隆位点 (MCS), 该多克隆位点含有如下酶切位点: XbaI-EcoRI-Kozak-起始... 终止-BamHI-NheI; 以及如下序列: TCTAGA GAATTC GCCACC[ATG 基因 TAA TGA]GGATCCGCTAGC。具有该 MCS 的载体可与优化病毒多肽共同使用, 该优化病毒多肽不具有内部 XbaI、EcoRI、BamHI、NheI 位点也不具有 6 个或多个 C 或 G 的节段。

[0076] 体内给予

[0077] 本发明的特征在于一种用于体内给予对象 (例如人类) 一种或多种本发明的疫苗 (例如, 编码两个或多个本发明的优化病毒多肽) 的方法, 以促进两个或多个本发明的优化病毒多肽的表达。给予对象疫苗后, 将表达一个或多个本发明的优化病毒多肽, 能够引起针对病毒免疫原的保护性或治疗性免疫应答 (例如, 细胞或体液免疫应答)。

[0078] 可使用若干种载体来将编码本发明所述的一个或多个优化病毒多肽的核苷酸序列直接递送至对象 (例如人类)。本发明的载体包括病毒、裸露 DNA、寡核苷酸、阳离子类脂 (例如脂质体)、阳离子聚合物 (如多核糖体)、病毒颗粒和树枝状聚合物。本发明提供细胞 (例如血细胞) 的体外转染或转导, 随后将这些细胞给予供体对象, 以表达本发明的具有免疫原特性的优化病毒多肽。根据本发明所述方法能够被分离并且进行体外转染或转导的细胞包括但不限于血细胞、皮肤细胞、成纤维细胞、内皮细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、前列腺上皮细胞和血管内皮细胞。干细胞也适合用本发明的载体进行转染或转导。全能、多能性、多能或单能干细胞, 包括骨髓祖细胞和造血干细胞 (HSC), 可被分离并利用编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的载体进行转染或转导, 并且根据本发明的方法给予对象。

[0079] 用于表达本发明所述的优化病毒载体的转染或转导的方法, 对在转染或转导细胞

中以及在随后接受细胞的对象中的蛋白表达的强度和寿命有着很强的影响。本发明提供自然界中寿命短暂的（例如腺病毒载体）或寿命长的（例如逆转录病毒载体）载体。调节序列（例如启动子和增强子）是本领域已知的，可用于调节蛋白表达。转染或转导的细胞类型对蛋白表达的强度和寿命也有着很强的影响。例如，可以预期具有高周转率的细胞类型具有更短的蛋白表达周期。

[0080] 体外转染和转导

[0081] 本发明的特征还在于一种用于体外细胞（例如，血细胞，如淋巴细胞）转染和转导的方法，随后将这些细胞给予对象（例如人类）。在一个实施方式中，细胞为所处理对象的自体细胞。可使用编码一个或多个本发明所述优化病毒多肽的核苷酸序列的一个或多个载体对细胞进行体外转染或转导，以使优化病毒多肽能够在处理的对象中进行短暂或长期表达。将这些修饰的细胞给予对象后，会表达一个或多个本发明所述的优化病毒载体，以引起针对病毒免疫原的保护性或治疗性的免疫应答（例如细胞或体液免疫应答）。

[0082] 可使用若干种载体来将编码一个或多个本发明所述的优化病毒多肽的核苷酸序列递送至细胞（例如血细胞，如淋巴细胞）。本发明所述载体包括病毒、裸露 DNA、寡核苷酸、阳离子类脂（例如脂质体）、阳离子聚合物（如多核糖体）、病毒颗粒和树枝状聚合物。本发明提供细胞（例如血细胞）的体外转染或转导，随后将这些细胞给予供体对象，以表达本发明所述的具有免疫原特性的优化病毒多肽。根据本发明所述方法，能够被分离并且进行体外转染或转导的细胞包括但不限于血细胞、皮肤细胞、成纤维细胞、内皮细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、前列腺上皮细胞和血管内皮细胞。干细胞也是用于用本发明所述的载体进行转染或转导的合适的细胞。全能、多能性、多能或单能干细胞，包括骨髓祖细胞和造血干细胞（HSC），可被分离并利用编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的载体进行转染或转导，并且根据本发明所述的方法给予对象。

[0083] 用于表达本发明所述的优化病毒载体的转染或转导的方法，对在转染或转导细胞中以及在随后接受细胞的对象中的蛋白表达的强度和寿命有着很强的影响。本发明提供在自然界中寿命短暂的（例如腺病毒载体）或寿命长的（例如逆转录病毒载体）载体。调节序列（例如启动子和增强子）是本领域已知的，其可用于调节蛋白表达。转染或转导的细胞类型对蛋白表达的强度和寿命也有着很强的影响。例如，可以预期具有高周转率的细胞类型具有更短的蛋白表达周期。

[0084] 病毒载体

[0085] 编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列的病毒载体可用作本发明的疫苗。例如，一个或多个本发明的优化病毒多肽的核苷酸序列可重组地插入适于对象或从对象中分离的细胞（例如，体外转导之后将细胞给予对象）的转导（例如，体内给予）的天然或修饰（例如，减毒）的病毒基因组的核苷酸序列中。可以对病毒进行额外的修饰，以提高感染性或趋性（例如假型），减少或消除复制能力，或降低病毒组分的免疫原性（例如，所有与免疫原性疫苗因子不相关的组分）。本发明所述载体可以由转导的细胞表达并分泌到细胞外的空间或留在表达细胞中（例如，作为细胞内分子或呈现在细胞表面）。嵌合或假型病毒载体也可用于转导细胞以实现一个或多个本发明所述优化病毒多肽的表达。典型的载体描述如下。

[0086] 腺病毒

[0087] 重组腺病毒在用作表达一个或多个本发明所述的优化病毒多肽的载体时提供数个显著的优点。病毒可制备成高效价,可感染非复制的细胞,也可在接触靶细胞群后提供体外靶细胞的高效转导。此外,腺病毒不将其 DNA 整合入宿主的基因组中。因此,其作为表达载体的使用降低了诱导自发增殖异常的风险。在动物模型中,通常发现腺病毒载体介导约一星期的高水平表达。转基因表达(编码本发明所述优化病毒多肽的核酸的表达)的持续时间可通过使用细胞或组织特异性启动子延长。腺病毒载体自身的分子工程中的其它改进产生更持久的转基因表达和更少的炎症。这见于所谓的“第二代”具有在另外的早期腺病毒基因中的特异性突变的载体,以及实际上已利用 Cre-Lox 策略删除了所有病毒基因的“没有生机的(胆小的, gutless)”载体(Engelhardt 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 6196(1994) 和 Kochanek 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :5731(1996), 此处每个以引用方式并入)。

[0088] 公开于国际专利申请公开 WO 2006/040330 和 WO 2007/104792(此处每个以引用方式并入) 的稀有血清型和嵌合腺病毒载体,作为本发明所述的载体尤其有用。例如,重组腺病毒 rAd26、rAd34、rAd35、rAd48 和 rAd5HVR48 能够编码一个或多个本发明所述的优化病毒多肽。一个或多个编码本发明所述的优化病毒多肽的重组病毒载体可给予对象,以治疗或预防病毒感染。

[0089] 腺相关病毒(AAV)

[0090] 腺相关病毒(AAV),来自非致病性细小病毒,由于这些载体引起几乎无抗载体的细胞免疫应答,并在大多数实验系统中产生持续数月的转基因表达,因此也可以用于表达本发明所述的优化病毒多肽。

[0091] 逆转录病毒

[0092] 逆转录病毒用于本发明所述的优化病毒多肽的表达。与腺病毒不同,逆转录基因组是基于 RNA 的。当逆转录病毒感染细胞时,会将其 RNA 与数种酶一起导入该细胞。来自逆转录病毒的病毒 RNA 分子将通过称为逆转录的过程产生双链的 DNA 拷贝,称为前病毒。在转运至细胞核后,前病毒 DNA 整合入宿主细胞染色体,持久地改变所转导细胞及任何来自该细胞的后代细胞的基因组。持久地将基因导入细胞或有机体的能力是用于基因治疗的逆转录病毒的必然特征。逆转录病毒包括慢病毒,其为包括人免疫缺陷病毒(HIV) 的病毒家族,包括若干辅助蛋白以促进病毒感染和前病毒整合。目前,“第三代”慢病毒载体具有完全无复制能力、广泛的趋向性以及对于哺乳动物细胞的基因转移能力增强的特征(见于,例如 Mangeat 和 Trono, Human Gene Therapy 16(8) :913(2005) 以及 Wiznerowicz 和 Trono, Trends Biotechnol. 23(1) :42(2005), 此处每个以引用方式并入)。

[0093] 其它病毒载体

[0094] 除了腺病毒和逆转录病毒,本领域已知其它病毒载体和技术可用于在细胞(例如血细胞,如淋巴细胞)或对象(例如人类)中表达本发明的优化病毒多肽。这些病毒包括痘病毒(例如牛痘病毒和修饰的安卡拉牛痘病毒或(MVA); 见于,例如美国专利号 4,603,112 和 5,762,938, 此处每个以引用方式并入)、疱疹病毒、披盖病毒(例如委内瑞拉马脑炎病毒; 见于,例如美国专利号 5,643,576, 此处以引用方式并入)、小核糖核酸病毒(例如脊髓灰质炎病毒; 见于,例如美国专利号 5,639,649, 此处以引用方式并入)、杆状病毒以及其它由 Wattanapitayakul 和 Bauer 所描述的(Biomed. Pharmacother, 54 :487(2000), 此处以引

用方式并入)。

[0095] 其它表达载体:裸露 DNA 和寡核苷酸

[0096] 编码一个或多个本发明所述的优化病毒多肽的裸露 DNA 或寡核苷酸也可用于在细胞(例如血细胞,如淋巴细胞)或对象(例如人类)中表达这些多肽。见于,例如,Cohen, Science 259:1691-1692(1993);Fynan 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11478(1993);和 Wolff 等, BioTechniques 11:474485(1991),在本文中每一个以引用方式并入。这是最简单的非病毒转染方法。递送裸露 DNA 的有效方法有如电穿孔和“基因枪”的使用,其用高压气体和载体微粒(例如金)将 DNA 包被的金微粒射入细胞中。

[0097] 脂复合物和聚合复合物

[0098] 为提高编码本发明所述的优化病毒多肽的核酸递送进入细胞或对象,脂复合物(例如脂质体)和聚合复合物可以用于保护载体 DNA 在转染过程中免于不希望的降解。质粒 DNA 可以覆盖着像胶束或脂质体的组织结构的脂质。当该组织结构与 DNA 复合时,被称为脂复合物(lipoplex)。有三种类型的脂类,阴离子的(带负电荷的)、中性的或阳离子的(带正电荷的)。利用阳离子脂类的脂复合物已证明对基因转运有用。阳离子脂类,由于其正电荷,自然地与带负电荷的 DNA 形成复合物。同样由于其电荷,它们与细胞膜相互作用,发生脂复合物的内吞,并将 DNA 释放至细胞质。阳离子脂类也保护 DNA 免于被细胞降解。

[0099] 聚合物与 DNA 的复合物称为聚合复合物(polyplex)。大多数聚合复合物由阳离子聚合物组成,其产生是由离子相互作用所调节的。聚合复合物和脂复合物作用方式之间的较大差异是,聚合复合物不能将其 DNA 负载释放至细胞质中,因此,必须用内涵体溶解剂(以溶解在细胞内吞过程中生成的内涵体)如灭活的腺病毒进行共转染。然而,这并非总是如此;聚合物如聚乙烯亚胺具有其特有的内涵体破坏方法,如同壳聚糖和三甲基壳聚糖那样。

[0100] 可用于与编码本发明所述的优化病毒多肽的核酸结合以形成脂复合物或聚合复合物的典型的阳离子脂类和聚合物包括但不限于,聚乙烯亚胺、脂转染试剂(lipofectin)、脂转染胺试剂(lipofectamine)、聚赖氨酸、壳聚糖、三甲基壳聚糖和海藻酸盐。

[0101] 杂交方法

[0102] 几种基因转移的杂交方法结合了两种或多种技术。病毒颗粒,例如,将脂复合物(例如脂质体)与灭活的病毒结合。已显示该方法与单独使用病毒或脂质体方法相比,导致在呼吸道上皮细胞中更有效的基因转移。其它方法涉及将其它病毒载体与阳离子脂质或杂交病毒混合。这些方法中每一个都可用于促进编码本发明所述的优化病毒多肽的核酸转移至细胞(例如血细胞,如淋巴细胞)或对象(例如人类)中。

[0103] 树枝状聚合物

[0104] 树枝状聚合物也可用于将编码本发明所述的优化病毒多肽的核酸转移至细胞(例如血细胞,如淋巴细胞)或对象(例如人类)中。树枝状聚合物是高度支化的球形大分子。微粒的表面可在许多方面发挥作用,并且所产生构建体的许多性质由其表面决定。尤其可能构建阳离子树枝状聚合物(即具有表面正电荷的树枝状聚合物)。当存在于基因材料如 DNA 或 RNA 中,电荷互补性导致核酸与阳离子树枝状聚合物的短暂的结合。一旦到达目标,树枝状聚合物-核酸复合物通过细胞内吞作用摄入细胞内。

[0105] 体内给予

[0106] 本发明的特征在于一种使用本发明的疫苗对对象（例如人类）进行免疫的体内方法。在一个实施方式中，本发明所述的一个或多个疫苗可直接给予对象，以引起针对病毒（HIV-1）的保护性或治疗性的免疫应答（例如，细胞或体液免疫应答）。可替换地，可将如上所述的编码一个或多个本发明的优化病毒多肽的载体直接给予对象以预防或治疗病毒感染。有效地在体内转染或转导一个或多个细胞的载体（例如病毒载体）能够在所处理对象中引起广泛的、持久的以及有效的免疫应答。在表达载体的核酸组分转移至宿主细胞（例如血细胞，如淋巴细胞）后，宿主细胞产生并呈现或分泌本发明所述的疫苗，随后用于活化免疫系统的组分，如抗原呈递细胞（APCs）、T 细胞和 B 细胞，导致免疫的建立。

[0107] 药物组合物

[0108] 本发明的特征在于本发明的疫苗、载体和优化病毒多肽与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、缓冲液或其它可接受的载体的组合。疫苗、载体或优化病毒多肽的配方会使用或实现有效量的优化病毒多肽免疫原的表达。也就是说，会包括一定量的抗原，其导致所处理对象（例如人类）产生特异性和充分的免疫应答，以保护对象以免随后暴露于病毒（例如 HIV-1）或治疗已有的病毒感染。例如，本发明的疫苗的配方可实现一定量的抗原表达，其导致对象产生广泛和特异性的细胞免疫应答。使用本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽处理的对象也可产生抗病毒抗体（例如中和抗体），该抗体可向对象提供保护性或治疗性的益处。本发明的疫苗、载体或优化病毒多肽可单独或与本领域已知的任何药学上可接受的载体、盐或佐剂结合后直接给予对象。

[0109] 药学上可接受的盐可能包括制药工业中常用的无毒酸加成盐或金属复合物。酸加成盐的例子包括有机酸如乙酸、乳酸、扑酸、马来酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、苯甲酸、棕榈酸、辛二酸、水杨酸、酒石酸、甲基磺酸、甲苯磺酸或三氟乙酸或类似物；共聚物如单宁酸、羧甲基纤维素或类似物；和无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸或类似物。金属复合物包括锌、铁及类似物。典型的药学上可接受的载体是生理盐水。其它生理上可接受的载体及其配方对本领域技术人员是已知的，并且在例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th版), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA 中描述。

[0110] 本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的预防性或治疗性有效量的药物配方与药学上可接受的适合于给予途径的载体混合后，可通过口服、胃肠道外（例如，肌肉、腹腔内、静脉或皮下注射，吸入，皮内注射，滴眼或植入）、鼻腔、阴道、直肠、舌下或局部给予。配方中本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的浓度可在约 0.1-100 质量%间变化。

[0111] 用于胃肠道外给予含有本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的组合物的配方包括无菌的水性或非水性溶液、悬浮液或乳剂。适宜的载体的例子包括丙二醇、聚乙二醇、植物油、凝胶、氢化萘以及可注射的有机酯，如油酸乙酯。这种配方也可包含添加剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可生物相容、生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯 / 乙醇酸交酯共聚物或聚氧乙烯 - 聚氧丙烯共聚物可用于控制化合物的释放。其它可能有用的包含本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的组合物的胃肠道外递送系统包括乙烯 - 醋酸乙烯共聚物微粒、渗透泵、植入式输注系统和脂质体。

[0112] 液体配方可通过例如细菌过滤器过滤、在组合物中加入灭菌剂或辐照或加热组合物进行灭菌。可替换地，也可以无菌、固态的组合物形式生产，该组合物在溶解于无菌水或一些其它的无菌可注射介质后立即使用。

[0113] 用于直肠或阴道给予含有本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的组合物优选栓剂,其可能含有除活性物质以外的赋形剂,如可可油或栓剂蜡。用于鼻腔或舌下给予的组合物也用本领域已知的标准赋形剂进行制备。用于吸入给予的配方可能含有赋形剂例如乳糖,或可能是含有例如聚氧乙烯-9-月桂醚、甘胆酸盐和脱氧胆酸盐的水性溶剂,或可能是油性溶剂,以滴鼻剂或喷雾剂形式或作为凝胶给予。

[0114] 本发明所述的组合物中活性成分的量可以是不同的。本领域技术人员应懂得准确的个体剂量可能有所调整,取决于多种因素,包括所给予的肽、给予时间、给予途径、配方的性质、排泄的速率、对象疾病的性质以及患者的年龄、体重、健康状况和性别。此外,由疫苗、载体或优化病毒多肽所治疗的疾病的严重程度也对剂量水平产生影响。通常,剂量水平在 $0.1\mu\text{g/kg}$ 体重至 100mg/kg 体重间,每天单剂量或分为多个剂量给予。优选地,一般剂量范围在每天 $250\mu\text{g/kg}$ 体重至 5.0mg/kg 体重间。由于不同给予途径的效率不同,可以预期所需剂量有广泛变化。例如,与静脉注射给予相比,通常预期口服给予需要更高的剂量水平。这些剂量水平的变化可以使用本领域熟知的优化用标准经验程序进行调整。通常,准确的预防性或治疗性有效的剂量能够由主治医生参考如上确定因素进行确定。

[0115] 在给予患者的每个剂量中存在的本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的量是鉴于对患者年龄、体重、性别、一般身体状况及类似情况的考虑而选择的。在患者中诱导免疫应答(例如细胞免疫应答)或产生外源性效应而无明显不良副作用所需的疫苗、载体或优化病毒多肽的量根据所使用的药物组合物和可选佐剂的存在进行变化。如果需要,初始剂量可选地跟随反复的加强。方法可涉及长期给予本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽。对于治疗性用途或预防性用途,免疫疫苗、载体或优化病毒多肽的重复剂量是可取的,例如每年加强或其它时间间隔的加强。当然,所给予的剂量根据已知因素如特定疫苗、载体或优化病毒多肽的药效学特征及其给予模式和途径;接受者的年龄、健康状况和体重;症状的性质和程度,同时治疗的种类,治疗的频率和所需的效果有所不同。本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽可在长期治疗中给予由于针刺或母性感染而具有急性感染风险的对象。该“急性”感染的剂量频率范围可从每日剂量到每周一次或两次肌注或静注,持续约6星期。疫苗、载体或优化病毒多肽也可在长期治疗中给予已感染患者,或晚期感染病毒(例如HIV-1)的患者。在已感染患者中,长期给予的频率范围可从每日剂量到每周一次或两次肌注或静注,并取决于存在于本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽中的免疫原的半衰期。

[0116] 佐剂

[0117] 本发明所述的用于接种需要其的哺乳动物(例如人类)的针对病毒的疫苗可与一个或多个药学上可接受的佐剂共同给予或连续给予,以增加疫苗的免疫原性。批准用于人类的佐剂包括铝盐(明矾)。这些佐剂已用于某些疫苗,包括乙型肝炎、白喉、狂犬病、脊髓灰质炎及流感疫苗。其它有用的佐剂包括完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、胞壁酰二肽(MDP)、MDP的合成类似物、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰基-L-丙氨酸-2-[1,2-二棕榈酰基-s-甘油-3-(羟基磷酰氧基)]乙酰胺(MTP-PE)和含有可代谢油和乳化剂的组合物,其中所述油和乳化剂以水包油乳剂形式存在,该乳剂的油滴基本上所有的直径小于一微米。

[0118] 试剂盒

[0119] 本发明提供试剂盒,其包括含有本发明所述的用于预防或治疗病毒感染的治疗有效量的疫苗、载体或优化病毒多肽和药学上可接受的载体的药物组合物。所述试剂盒包括使用说明书,以允许临床医生(例如医生或护士)给予其中所含的组合物。

[0120] 优选地,所述试剂盒包括多包装的单剂量药物组合物,其含有有效量的本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽。可选地,试剂盒可包括给予药物组合物所必需的仪器或装置。例如,本发明所述试剂盒可提供一个或多个预充注射器,其含有有效量的本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽。此外,所述试剂盒也可包括其它组分,例如已感染病毒或具有感染病毒风险的患者使用含有本发明所述的疫苗、载体或优化病毒多肽的药物组合物的使用说明书或给予日程。

[0121] 对本领域技术人员显而易见的是,可以作出各种对本发明所述的组合物、方法和试剂盒的修改和变化而不违背本发明的精神和范围。因此其意图是,如果本发明所述的修改和变化落入所附权利要求及其等同物的范围,其被本发明所涵盖。

具体实施方式

[0122] 本发明由如下实施例进行说明,该些实施例并不意在限制本发明。

[0123] 实施例 1

[0124] 镶嵌抗原 Gag、Pol、Nef 和 Env 序列 (SEQ ID NOS :1-8) 使用如上讨论的遗传算法进行构建。然后修改这些序列,通过消除 Env (SEQ ID NOS :9-11) 中的切割/融合活性,消除 Pol (SEQ ID NOS :12-14) 中的催化活性,消除 Nef (SEQ ID NOS :16-18) 中的十四烷基化位点,以及构建包括 GagNef、GagPol 或 GagPolNef (SEQ ID NOS :19-29) 的融合构建体,使这些序列对于疫苗开发具有实用性。也描绘了比对最佳天然进化支 C 基因 (SEQ ID NOS :30-36)。

[0125] 实施例 2

[0126] 用来自 M 共有序列 (组 1)、二价 M 镶嵌序列 (组 2) 或最佳天然进化支 C 序列 (组 3) 的表达 Gag、Pol 和 Env 基因的 3×10^{10} vp rAd26 载体对 20 只恒河猴进行免疫。M 共有序列代表合成序列,该合成序列代表全球流行病毒中唯一最好的“平均水平”。二价 M 镶嵌序列描述如上。最佳天然进化支 C 序列是来自性质最“类似共有序列”的真实进化支 C HIV-1 病毒的天然存在的序列。通过评价来自全球潜在 T 细胞表位 (PTE) 肽组中的应答肽的数量来评估细胞免疫的广度。所述 PTE 肽代表 > 85% 的全球 HIV-1 序列,并由 NIH 免费提供。

[0127] 结果显示新型二价 M 镶嵌序列显著优于其它两个主要抗原概念。如表 1 所示,与 M 共有抗原和最佳天然进化支 C 抗原相比,二价 M 镶嵌抗原引起 Gag 特异性、Env 特异性、Pol 特异性和总 T 淋巴细胞应答的广度显著增加。(平均值代表每组猴子的平均 # 表位;SEM 代表平均值的标准误差)。

[0128] 表 1:恒河猴中镶嵌 HIV-1Gag/Pol/Env 抗原针对全球 PTE 肽的扩展广度

[0129]

广度	组 I: M 共有序列		组 II: 二价 M 镶嵌序列		组 III: 天然进化支 C	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
Gag	2.0	0.4	7.7	0.9	2.2	0.5
Env	2.0	0.4	4.0	0.6	1.6	0.5
Pol	2.7	0.5	8.1	1.4	2.4	0.5
总计	6.7	0.7	19.9	1.9	6.1	1.1

[0130] 实施例 3

[0131] 用来自实施例 2 中描述的 M 共有序列 (组 1 ;n = 7)、二价 M 镶嵌序列 (组 2 ;n = 7) 或最佳天然进化支 C 序列 (组 3 ;n = 6) 的表达 Gag、Pol 和 Env 基因的 3×10^{10} vp rAd26 载体对恒河猴进行免疫。通过评价来自全球潜在表位 (PTE) 肽组中的应答肽的数量来评估细胞免疫的广度。

[0132] 作为一个示数 (readout, 读出), 我们评估对整合 PTE 肽的 CD4/CD8IFN- γ 酶联免疫斑点测定法 (ELISPOT) 应答 (幅度)。使用十五聚体 PTE 肽对表位进行综合定位, 以评估阳性的数量 (阳性定义为每 10^6 个 PBMC 和 $4 \times$ 背景中有 55 个斑点形成细胞 (SFC))。也测试了贯穿 5 个 Gag 蛋白的重叠肽的整合组, 以比较对一组完整蛋白的应答。

[0133] 结果显示二价 M 镶嵌序列显著优于其它两个主要抗原概念 (Mcon 和 OptC)。

[0134] 实施例 4

[0135] 我们使用建模来验证我们观察到的 T 细胞应答由于镶嵌疫苗而增加。我们拟合了泊松 (Poisson) 回归模型, 预测作为疫苗、多肽和 T 细胞类型函数的活性肽的数量, 然后逐步消除相互作用。我们观察到, 虽然镶嵌疫苗在阳性 PTE 应答的数量上产生了高度显著的增加, 但是它或多或少均匀地穿过所有多聚蛋白和 T 细胞类型。因此, 可通过结合分别取决于 T 细胞类型、多肽和动物所接受疫苗的贡献, 预测在动物中具有阳性效果的肽数量。

[0136] 这些模型也包括随机效果, 以说明动物和动物之间的差异。这是所设计的预防措施, 通过适当分配模型的预测能力, 以产生更加可信的 p 值。

[0137] 我们观察到以下效果:

[0138] a) CD8 应答大大多于 CD4 应答, 为 4.37 倍, $p < 2 \times 10^{-16}$;

[0139] b) 在 gp160 中的应答少于在 gag 或 pol 中的应答, 为 0.54, $p = 0.000830$, 并且 gag 和 pol 间无明显差异 (即使当用序列长度归一化, 由于 pol 是 Gag 长度的两倍, 因此有更多机会反应); 和

[0140] c) 镶嵌疫苗比 Mcon 产生明显更多的阳性应答 (为 3.6 倍, $p = 6.26 \times 10^{-11}$), 而 OptC 产生更少, 虽然 Mcon-OptC 间差异不显著。

[0141] 实施例 5

[0142] 如果我们只考虑由疫苗引起并由 PTE 肽检测的最小应答数量, 那么所有重叠 ≥ 8 个氨基酸的肽在忽略变异的情况下仅计数一次, 镶嵌疫苗仍然对不同区域产生大量的应

答。

[0143] 对于 CD8, 每个重叠肽组仅计数一次 :

[0144] 统计概要 :

[0145] Mos2 > Mcon ~ OptC (Mcon 显示比 OptC 更多应答的趋势)

[0146] Mos2 与 Mcon 相比的 Wilcoxon p 值 : p 值 = 0.0009992

[0147] Mcon 与最佳 C (序列) 相比的 Wilcoxon p 值 : p 值 = 0.2351

[0148] 各组总结 :

[0149]

疫苗	最小值	1 st Qu.	中位数	平均数	3 rd Qu.	最大值
Mos2. cd8	7	7.5	8	9.4	11	14
Mcon. cd8	0	3	3	3.3	4	6
OptC. cd8	0	1	1.5	2	4.25	5

[0150] 对于 CD4, 每个重叠肽组仅计数一次 (CD4 中重叠很少, 因此这几乎和第一次计数相同)。

[0151] 统计总结 :

[0152] Mos2 >> Mcon ~ OptC (Mcon 显示比 OptC 更多应答的趋势)

[0153] Mos2 与 Mcon 相比的 Wilcoxon p 值 : p 值 = 0.00198

[0154] Mcon 与最佳 C (序列) 相比的 Wilcoxon p 值 : p 值 = 0.099

[0155] 各组总结 :

[0156]

疫苗	最小值	1 st Qu.	中位数	平均数	3 rd Qu.	最大值
----	-----	---------------------	-----	-----	---------------------	-----

[0157]

Mos2. cd4	2	2.5	3	3.4	4.5	5
Mcon. cd4	0	1	1	1.3	2	2
OptC. cd4	0	0	0.5	0.67	1	2

[0158] 实施例 6 : 每个重叠肽组仅计数一次的泊松回归

[0159] 使用重叠 PTE 肽, 我们确定了以下与上述实施例 4 中讨论的结果大致相同的内容, 其中每个阳性 PTE 应答单独计数 :

[0160] a) CD8 应答大大多于 CD4 应答, 为 2.8 倍, $p \approx 1 \times 10^{-7}$;

[0161] b) 镶嵌疫苗比 Mcon 产生明显更多的阳性应答 (为 2.84 倍, $p \approx 4.3 \times 10^{-7}$), 而 OptC 产生更少, 虽然 Mcon-OptC 间差异不显著 ; 和

[0162] c) 对 Pol 的应答多于对 Gag 的应答, 对 Gag 的应答多于对 gp160 的应答, 但是仅有 Pol-gp160 间的差异显著, 约为 2 倍, $p < 0.001$ 。

[0163] 实施例 7 :

[0164] 下表是对接种 2(价) 镶嵌序列 (Mos2) 或 Mcon 的 7 只动物, 以及接种最佳天然进化支 C (OptC) 的 6 只动物中的三种疫苗应答、对 Gag、Pol 和 Env 应答的总应答记录:

[0165]

	CD8			CD4		
	Env	Gag	Pol	Env	Gag	Pol
2Mos	13	20	33	3	10	11
ConM	8	7	8	2	3	4
OptC	4	5	5	1	2	1

[0166] OptC 疫苗在所有猴子中产生的平均应答稍低于每蛋白的 CD8+T 细胞应答。Mcon 疫苗显示每蛋白约 1 个应答。只有使用 Mos2 时我们才能观察到蛋白中的差异, 其中 Env 通常具有比 Gag 或 Pol 更少的应答。

[0167] 在 Mos2 疫苗中的每个蛋白引起许多应答, 并有助于总应答。在修饰使 pol 失活以及将 Env 中的切割和融合域删除后, 共有蛋白的相对长度为: Env 为 671 个氨基酸, Pol 为 851 个, Gag 为 498 个 (1.35 : 1.7 : 1)。

[0168] 总结

[0169] 广度: 2(价) 镶嵌序列疫苗引起的 T 细胞应答与 M 共有序列或单一最佳天然株相比, 能够识别更多的表位区域。

[0170] 深度: PTE 肽识别的多样性表明在 2(价) 镶嵌序列中的两种形式均可引起对变体肽的不同 T 细胞应答, 增加了交叉反应的可能性。

[0171] 实施例 8:

[0172] 本发明所述的镶嵌 HIV-1 疫苗扩大了恒河猴中细胞免疫应答的广度和深度。我们构建了镶嵌 HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原, 其优化了 PTE 对 HIV-1M 组序列的覆盖率, 包括在洛斯阿拉莫斯 (Los Alamos) HIV-1 序列数据库中的所有主要的 HIV-1 进化支和重组系。利用二价镶嵌策略来平衡理论覆盖率和实用性的竞争问题。相对于使用共有和天然序列 HIV-1 抗原时在恒河猴中所观察到的免疫应答, 二价镶嵌 HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原大大扩大了恒河猴中表位特异性 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞的广度和幅度 (深度)。

[0173] 我们通过单次注射表达下列抗原的血清 26 型重组腺病毒 (rAd26) 载体对 27 只远交种恒河猴进行免疫: (i) 二价镶嵌序列 (N = 7), (ii) M 共有序列 (N = 7), (iii) 二价组合进化支 B 和进化支 C (N = 7), 或 (iv) 最佳天然进化支 C (N = 6) HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原。总剂量为 3×10^{10} 的表达这些抗原的 rAd26 载体的病毒颗粒通过肌注一次给予每只动物。在洛斯阿拉莫斯 HIV-1 序列数据库中, 最佳进化支 C 抗原为天然株序列, 选择其以提供最大化的进化支 C 序列的 PTE 覆盖率 (在下面的材料及方法中讨论)。利用包括所有在至少 15% 的 HIV-1M 组序列中发现的 PTE 的池与子池进行免疫后第四周, 我们通过 IFN- γ ELISPOT 法评估了疫苗引起的 HIV-1 特异性 T 淋巴细胞应答的广度和幅度 (深度)。解析了所有单个肽应答, 并进行细胞去除 IFN- γ ELISPOT 法以确定活性肽是否代表 CD8+ 或 CD4+T 淋巴细胞表位。

[0174] 由镶嵌抗原引起的对 PTE 肽的 Gag、Pol 和 Env 特异性细胞免疫应答的总数量比由共有或天然序列抗原诱导的应答数量高 3.8 倍 (图 19A ; $P = 1 \times 10^{-11}$, 镶嵌序列与共有抗原——第二高的组相比, 基于泊松回归模型)。CD8+ 比 CD4+T 淋巴细胞应答多 4.4 倍 ($P < 10^{-11}$), 对 Env 的应答少于对 Gag 或 Pol 的应答 ($P < 0.0007$)。CD8+T 淋巴细胞应答的中位数最高的是镶嵌疫苗, 其次是共有序列、组合 B+C 和天然进化支 C 疫苗 (每组中每只动物中的应答中位数分别是 16、5、3 和 2)。虽然总体的 CD4+T 淋巴细胞应答较少, 但出现相同的相关模式, 对镶嵌疫苗的 CD4+T 淋巴细胞应答数量最高, 其次是共有序列、组合 B+C 和天然进化支 C 疫苗 (每组中每只动物中的应答中位数分别是 4、1、1 和 0.5)。由共有序列、组合 B+C 和天然进化支 C 疫苗引起的 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞的应答数量无统计学差异。

[0175] PTE 肽包括多个重叠序列, 反映天然存在的 HIV-1 序列多态性, 因此 PTE 肽应答包括特定表位的识别 (广度) 以及该表位变体的交叉识别 (深度)。我们通过评估每只猴子中活性表位区域的数量, 对广度进行了保守分析, 其中所有由 8 个或多个氨基酸重叠的活性 PTE 肽作为一个事件进行计数。在该保守分析中, 我们仍然观察到与共有抗原或天然序列抗原 (图 19B ; $P = 1.6 \times 10^{-7}$, 泊松回归) 相比, 镶嵌抗原引起 Gag、Pol 和 Env 活性表位区域数量增加 3.1 倍。表位区域在动物中显示聚类, 如由高表位密度的区域所证明 (图 20A-20C 和图 21A-21C)。所有由应答区域组成的阳性肽的完整比对显示在图 22 中。

[0176] 这些数据表明, 与 M 共有序列和天然进化支 C 抗原相比, 镶嵌抗原大大提高细胞免疫应答的广度。也证明二价镶嵌抗原优于进化支 B 和进化支 C 抗原的二价组合体 (图 19A 和 19B), 表明提高的广度是由于镶嵌序列的设计, 并不简单反映每个蛋白中两个不同抗原序列的使用。为确定由镶嵌抗原诱导的增加的广度是否损害了应答的效能, 我们评估了所有单个 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞应答的幅度。这些应答的幅度被证明为在所有组中相似 (图 23 ; $P = 0.58$ 和 $P = 0.99$, 双侧 Kolmogorov-Smirnov 检验)。因此, 镶嵌抗原扩大细胞免疫的宽度而不损害单个表位特异性应答的幅度, 表明抗原性竞争和免疫显性限制不限制本研究中镶嵌抗原的免疫原性。

[0177] 接下来我们描述了由不同疫苗方案引起的细胞免疫应答的深度的特征。我们将深度定义为对于特定表位区域, 同时引起的不同 PTE 肽的数量。诱导对多个常见表位变体的应答可能增加感染病毒序列的免疫覆盖率, 阻断体内常见的逃逸途径, 或迫使病毒下行至第三逃逸途径, 其引起高的适合度代价。共有和天然序列抗原引起特征为疫苗序列与活性 PTE 肽之间高度序列同一的应答, 例如在接受了天然进化支 C 抗原的猴子 366 中的应答 (图 24A ; 也见于图 22)。相反, 镶嵌抗原引起特征为特定表位区域中多个活性 PTE 肽的应答。这些肽代表常见的变体, 并且通常反映镶嵌疫苗序列中包含的多态性, 例如在猴子 361 中的应答 (图 24B ; 也见于图 22)。对这些动物中所有表位特异性应答的总结表明, 与共有序列或天然序列抗原相比, 镶嵌抗原提高对具有两个或多个靶向变体的肽的细胞免疫应答的频率 (图 24C ; $P = 0.001$, 镶嵌序列与共有抗原——第二高的组相比的 Wilcoxon 秩和检验)。

[0178] 为了利用 PTE 肽对分析进行补充, 我们也评估了用传统的覆盖了 5 个不同 Gag 序列 (进化支 C DU422、进化支 C ZM651、共有序列 C、共有序列 A 和共有序列 B) 的重叠肽接种的猴子中的细胞免疫应答的广度。通过评估对贯穿每个 Gag 序列的 10 个重叠肽的子池的反应来确定细胞免疫广度。与共有或天然序列抗原相比, 镶嵌抗原引起针对所有测试 Gag

序列的更大的 T 淋巴细胞应答的广度 (图 25 ; $P = 1 \times 10^{-7}$, 二项回归)。因此, 镶嵌抗原增大细胞免疫的广度, 不仅针对 PTE 肽, 而且也针对来自进化支 A、B 和 C 的真实 Gag 肽。甚至证明镶嵌抗原在诱导针对进化支 C Gag 肽的应答方面优于最佳天然进化支 C 抗原。此外, 镶嵌抗原引起对来自多个进化支的 Gag 肽相似的应答, 而天然进化支 C 抗原显示对进化支 A 和进化支 B Gag 肽的减少的应答 (图 25)。

[0179] 为评估这些观察数据的耐用性, 在第 40 周, 我们用总剂量为 3×10^{10} 个表达与初次免疫所用序列匹配的 HIV-1 Gag、Pol 和 Env 抗原的异源载体 rAd5HVR48 的病毒颗粒对接受镶嵌抗原、共有抗原和最佳天然进化支 C 抗原的猴子进行了加强。细胞免疫广度通过评估在第 4 周 (初免后) 及第 44 周 (加强后) 对 10 个 PTE 肽的子池的反应进行确定。初免后所观察到的大多数 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞应答在加强后扩大了 (图 26A, 红色和蓝色的线), 并且也检测到很多新的应答 (图 26A 红色和蓝色的点)。在第 44 周, 单个细胞免疫应答的幅度证明在组间相似 (图 26A)。然而, 在加强免疫后, 由镶嵌抗原引起的子池应答的数量 (每只动物应答的中位数为 27) 仍然大大高于由共有抗原 (每只动物应答的中位数为 11) 或最佳天然进化支 C 抗原 (每只动物应答的中位数为 10) 引起的子池应答的数量 (图 26B)。加强之前和之后, 与共有疫苗 (consensus vaccine) 或天然进化支 C 疫苗相比, 每只动物中都有更多的由镶嵌疫苗引起的应答 ($P < 0.001$, 所有配对比较的 Wilcoxon 秩和检验)。

[0180] 在加强免疫后, 我们也通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) (图 26C) 和基于荧光酶的假病毒中和测定法 (图 26D) 测量了 Env 特异性体液免疫应答。所有组均显示与进化支 C gp140 相似的 ELISA 效价以及 1 级进化支 C 病毒 MW965.26 相似的中和抗体 (NAb) 应答。与共有或天然进化支 C 抗原相比, 镶嵌抗原引起对 1 级进化支 B 病毒 SF162.LS 稍高的 Nab 应答 ($P = 0.02$, Wilcoxon 秩和检验), 虽然我们没有在任何组中检测到任何对 2 级病毒的 Nab 应答。

[0181] 我们的数据表明在恒河猴中, 与共有或天然序列抗原相比, 镶嵌 HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原增大表位特异性细胞免疫应答的广度和深度, 与理论预测很好的吻合 (图 27)。本研究中镶嵌抗原的惊人结果可能反映了 rAd26 载体对于引起 CD8+T 淋巴细胞应答尤其有效的事实, 以及镶嵌抗原对于增加 CD8+T 淋巴细胞广度可能尤其有效的事实 (图 19A 和 19B)。我们也观察到镶嵌抗原使 CD4+T 淋巴细胞的广度增加, 虽然这些应答的数量相当低。

[0182] 已显示 Gag 特异性细胞免疫应答的广度对恒河猴中 SIV 抑制和人类 HIV-1 抑制至关重要。此外, 在 STEP 研究的 2b 期, 表达天然进化支 B Gag、Pol 和 Nef 抗原的基于 rAd5 的 HIV-1 疫苗候选物仅引起有限的 HIV-1 特异性细胞免疫应答广度, 未观察到疫苗的优势。STEP 研究中的疫苗形成了中位数仅为 2-3 的表位特异性 T 淋巴细胞应答, 包括中位数仅为 1 的对 Gag 的表位特异性应答, 该很窄的细胞免疫应答的广度可能提供不充分的感染病毒多样性的免疫覆盖率。已报导在急性 HIV-1 感染期, 病毒从 CD8+T 淋巴细胞的逃逸迅速发生, 这样也可能证明疫苗引发的针对常见表位变体的细胞免疫应答是至关重要的。总之, 这些研究强调了开发增大细胞免疫广度与深度的 HIV-1 疫苗策略的必要性。

[0183] 由于我们在本研究中评估了镶嵌 HIV-1 抗原, 我们无法评估这些疫苗方案针对 SIV 激发的保护性功效。然而, 我们以前报导过在恒河猴中由 rAd 载体引起的 SIV 特异性细胞免疫应答的广度与针对 SIV 激发的保护性功效相关 (Liu 等, Nature 457 :87, 2009)。我

们也表明在恒河猴体内针对变异表位 (variant epitope) 的细胞免疫应答能够阻断 SIV 突变进化 (Barouch 等, Nat. Immunol. 6 :247, 2005), 表明扩大细胞免疫深度的生物相关性。对非人灵长类动物中针对 SIV 激发的镶嵌疫苗的保护性功效进行建模具有内在局限性, 因为所观察到的 SIV 和 HIV-1M 组序列的多样性大大不同, 并且受到不同潜在的生物因素影响。例如, CD8+T 淋巴细胞在天然宿主如乌白眉猴 (sooty mangabeys) 中的选择压力似乎大大小于在人类中的选择压力。因此, 对作为 HIV-1 疫苗候选物的镶嵌抗原的进一步评价能够得益于临床试验。

[0184] 总之, 我们证明了在恒河猴中, 二价镶嵌 HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原大大扩大了细胞免疫的广度和深度。这些发现对 HIV-1 疫苗开发具有重要意义, 因为全球病毒多样性和病毒从细胞免疫应答中逃逸体现了基于 T 细胞的 HIV-1 疫苗开发的重要障碍。二价镶嵌抗原的混合物对于临床开发也具有实际和潜在的可行性。增加镶嵌抗原的价可能进一步提高覆盖率。最后, 镶嵌抗原策略是可推广的, 并且可用于除 HIV-1 以外的其它遗传多样性病原体。

[0185] 材料与方法

[0186] 抗原的设计与载体的产生。构建二价镶嵌 HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原, 以提供基本如所述的在洛斯阿拉莫斯 HIV-1 序列数据库中的 HIV-1M 组序列的最佳覆盖率 (1, 2)。选择最佳天然进化支 C 抗原作为提供在洛斯阿拉莫斯 HIV-1 序列数据库中的进化支 C 序列的最佳 PTE 覆盖率的序列 (C. IN. -. 70177Gag, C. ZA. 04. 04ZASK208B1 Pol, C. SN. 90. 90SE 364 Env)。选择进化支 B 抗原作为接近共有序列或共有序列 (B. CAM-1 Gag, B. IIBPol, B. Con Env), 并且用于补充二价进化支 B+C 疫苗法中的最佳进化支 C 抗原。Pol 抗原含有 RT 和 IN, 无 PR, 并包括点突变, 以消除所述催化活性 (Priddy 等, Clinical infectious diseases 46 :1769, 2008)。Env gp140 抗原包含点突变以消除切割和融合活性。疫苗序列在图 27 中有描述。表达这些抗原的重组体、复制不完全的 26 血清型腺病毒 (rAd26) 和六邻体嵌合 rAd5HVR48 载体在 PER. 55K 细胞中生长并基本通过所述双 CsCl 梯度沉降进行纯化 (Abbink 等, J. Virol. 81 :4654, 2007, 和 Roberts 等, Nature 441 :239, 2006)。

[0187] 动物及免疫。27 只不表达 MHC I 类等位基因 Mamu-A*01 的远交种恒河猴被安置在麻萨诸塞州 (MA) 南镇 (Southborough) 的新英格兰灵长类动物研究中心 (NEPRC)。包含 3×10^{10} 个表达镶嵌序列、M 共有序列、进化支 B+ 进化支 C 或最佳天然进化支 C HIV-1Gag、Pol 和 Env 抗原的 rAd26 或 rAd5HVR48 载体的病毒颗粒的免疫以 1ml 注射液的形式在第 0 周和第 40 周通过对双侧股四头肌进行肌注给予。所有动物研究由我们的机构动物管理和使用委员会 (IACUC) 批准。

[0188] IFN- γ ELISPOT 法。接种的猴子中的 HIV-1 特异性细胞免疫应答基本通过所描述的干扰素 - γ (IFN- γ) ELISPOT 法进行评估 (Roberts 等, Nature 441 :239, 2006, 和 Liu 等, Nature 457 :87, 2009)。HIV-1Gag、Pol 和 Env 潜在 T 细胞表位 (PTE) 肽获自 NIH AIDS 研究和参考试剂计划, 其包括在至少 15% 的 HIV-1M 组序列和来自进化支 C DU422、进化支 CZM651、共有序列 C、共有序列 A 和共有序列 B 株的 HIV-1Gag 肽中发现的所有 PTE。用无内毒素的 Dulbecco's PBS (D-PBS) 中的抗人 IFN- γ 10 μ g/ml (BD Biosciences) 以 100 μ l/孔对 96 孔多孔滤模板 (Millipore) 包被过夜。然后用含 0.25% 吐温 20 的 D-PBS (D-PBS/吐温) 将板洗涤三次, 37°C 下用含有 5% FBS 的 D-PBS 封闭 2 小时, 用 D-PBS/吐温洗涤三次,

用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 漂洗以除去吐温 20, 用 $2 \mu\text{g/ml}$ 每种肽和 2×10^5 PBMC 一式三份在 $100 \mu\text{l}$ 反应容积中进行孵育。37℃ 下孵育 18 小时后, 板用 PBS/ 吐温洗涤九次, 用蒸馏水洗涤一次。然后板用 $2 \mu\text{g/ml}$ 生物素标记的抗人 IFN- γ (BD Biosciences) 室温下孵育 2 小时, 用 PBS/ 吐温洗涤六次, 用 1 : 500 的链霉亲和素 - 碱性磷酸酶稀释液 (Southern Biotechnology Associates) 孵育 2 小时。用 PBS/ 吐温洗涤五次和 PBS 洗涤一次后, 用硝基四氮唑蓝 /5- 溴 -4 氯 -3- 吡啶 - 磷酸盐色原 (Pierce) 对板进行显色, 用自来水洗涤终止, 风干, 使用 ELISPOT 读板仪 (Cellular Technology Ltd) 进行读数。计算每 10^6 PBMC 的斑点形成细胞 (SFC)。背景介质中每 10^6 PBMC 通常 < 15 个 SFC。阳性应答定义为每 10^6 PBMC 中 > 55 个 SFC 且 > 4 倍背景。

[0189] 表位定位。利用获自 NIH AIDS 研究和参考试剂计划的 Gag、Pol 和 Env PTE 肽对 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞表位进行综合定位。在用完整肽池和含有 10 个 PTE 肽的子池初次免疫后的第 4 周, 进行了 IFN- γ ELISPOT 法。将所有具有阳性应答的肽子池去卷积, 并证实了表位具有单个 15 个氨基酸的 PTE 肽。然后进行细胞去除 IFN- γ ELISPOT 法以确定活性肽是否代表 CD8+ 或 CD4+T 淋巴细胞表位。利用 PTE 子池的部分表位定位也在加强免疫 4 周后即第 44 周进行。重新检测所有不明确的应答, 如果证实则认为是阳性。还利用含有 10 个重叠 Gag 肽的子池进行部分表位定位 (mapping, 作图) 以评估来自不同进化支的 HIV-1Gag 的广度。

[0190] 体液免疫测定法。Env 特异性体液免疫应答通过基本上如所描述的利用 HIV-1 进化支 C Env gp140 的直接 ELISA 法和基于荧光酶的假病毒中和测定法进行评价 (Montefiori, 在荧光酶报告基因测定法中评价针对 HIV、SIV 和 SHIV 的中和抗体 (Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV and SHIV in luciferase reporter gene assays), Current Protocols in Immunology, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach, Strober 和 Coico, Ed. (John Wiley & Sons, 2004, pp. 1-15))。

[0191] 统计分析。所有统计分析是使用 R 软件包 (Team, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009) 进行的。为分析对定位 PTE 肽的细胞免疫应答的广度 (图 19A), 我们拟合了泊松回归模型以根据疫苗组、抗原 (Gag、Pol、Env) 和淋巴细胞亚群 (CD4、CD8) 预测活性肽数量。我们的模型包括随机效应以适应动物到动物的变化, 并且用 R 软件包中的 lme4 库 (Pinheiro, Springer, New York (2000)) 拟合。数据与模型拟合良好 (离散参数 1.0), 并且在三个说明性因素间没有明显的相互作用。例如, 与接受了共有序列或天然序列抗原 (图 19A) 的猴子相比, 接受了镶嵌抗原的猴子所识别的 PTE 肽数量的 3.8 倍的提高同等地适用于来自 Gag、Pol 和 Env 的 PTE, 并且对 CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞产生的应答均适用。对活性表位区域数量的分析 (图 19B) 也包括具有随机效应的泊松回归模型, 并且拟合良好 (离散系数 0.87), 无任何明显相互作用。CD8+ 和 CD4+T 淋巴细胞应答幅度的比较 (图 23) 利用双侧 Kolmogorov-Smirnov 检验进行。也进行了非参数检验, 以比较不同疫苗间每只猴子应答的广度和深度 (图 19A 和 24C)。我们最初采用 Kruskal-Wallis 检验以确定是否在 4 个疫苗组之间存在差异。在每种情况下这都是高度显著的, 因此我们随后使用 Wilcoxon 秩和 (rank-sum) 检验评估了 4 个疫苗组之间的所有配对比较。在每一个比较中, 镶嵌疫苗比其它三个疫苗引起每只猴子中明显更多的应答。为分析对来自不同进化支的 HIV-1Gag 应答的广度 (图 25), 我们将数据拟合为二项回归模型。这些模型将疫苗组

用作说明变量,并且包括随机效应以说明动物与动物以及株系与株系之间的变化。该数据略有离散,但接受镶嵌疫苗的动物仍然引起明显更大数量的应答。使用洛斯阿拉莫斯 HIV-1 序列数据库中提供的工具对 PTE 覆盖率进行评估。

[0192] 序列附录

[0193] I. 二价 M 镶嵌序列 ENV GP160, GAG, POL, NEF 序列

[0194] 镶嵌序列 ENV1GP160 (AA 序列)

[0195] SEQ ID NO :1

[0196] MRVTGIRKNYQHLWRWGTMLLGILMICSAGKLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNVWA
THACVPTDPNPQEVVLENTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDDVRNVTNNATNTNS
SWGEPMEKGEIKNCSFNITTSIRNKVQKQYALFYKLDWPIDNDSNNTNYRLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCA
PAGFAILKCNDKKFNGTGPCNTVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEEVVIRSENFNTNAKTIMVQLNVSVEINC
TRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTAGDIIIGDIRQAHCNISRANWNTLRQIVEKLGKQFGNKTIVFNHSSGGDPEIVMH
SFNCGGEFFYCNSTKLFNSTWTWNNSTWNTKRSNDTEEHTLPCRICKIINMWQEVGKAMYAPPPIRGQIRCSSNIT
GLLLTRDGGNDTSGTEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKARRVVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAG
STMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLC
TTTVPWNASWSNKS LDKIWNMTWMEWEREINNYTSLIYTLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDISNLWY
IKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTRLPAPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSVRLVDGFLVLIWD
DLQSLCLFSYHRLRDLILLIVELLGRRGWEALKYWWNLQYWSQELKNSAISLLNATAVAVAEGTDRVIEALQRACRA
ILHIPRRIRQGLERLLL

[0197] 镶嵌序列 ENV2GP160 (AA 序列)

[0198] SEQ ID NO :2

[0199] MRVRGIQRNWPQWWIWGILGFWMIICRVMGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWA
THACVPTDPNPQEMVLENTENFNMWKNDMVDQMHEDIIRLWDQSLKPCVKLTPLCVTLECRNVRNVSSNGTYNIH
NETYKEMKNCSFNATTVVEDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSEKSSSENSSEYYRLINCNTSAITQACPKVSFDP
IPHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEIIIRSENLTNNAKTIIVHLNET
VNITCTRPNNNTRKSIIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWNKTLQGVKKKLAEHFPNKTINFTSSSGGDL
EITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFNGTYPNGTNSNSSNITLPCRICKIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCRSNITGLL
LTRDGGSNNGVPNDTETFRPGGGDMRNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTEAKRRVVEREKRAVGIGAVFLGILGAAG
STMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLQDQQLLGLWGCSGKLC
TTAVPWNTSWSNKSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLLEESQNQQEKNEKDLLALDSWKNLWNWFDITNLWY
IKIFIMIVGGLIGLRIILGVLIVRRVRQGYSPLSFQTLTPNPRGLDRLGRIEEEGGEQDRDRSIRLVNGFLALAWD
DLRSLCLFSYHQLRDFILIVARAVELLGRSSLRGLQRGWEALKYLGNLVQYWGLELKKGAISLLDTIAIAVAEGTDR
IIELIQSICRAIRNIPRRIRQGFEASLL

[0200] 镶嵌序列 GAG1 (AA 序列)

[0201] SEQ ID NO :3

[0202] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIWVASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQ
TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALEKIEEEQNSKSKKAQQAADTGNSSQVSQNYPIVQNIQGMVHQA
ISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPPVSILDIRQGPKEPFRDYVDRF

YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIM
MQRGNFRNRKRTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGPRGNFLQNRPE
PTAPPEESFRFGEETTTSPSQKEPIDKEMYPLASLKSFLGNDPSSQ

[0203] 镶嵌序列 GAG2 (AA 序列)

[0204] SEQ ID NO :4

[0205] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIKQLQPALQ
TGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSSQKTTQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGQMVHQPI SP
RTLNAWVKVIEEKA FSPEVIPMFTALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDR LHPVHAGPVAPG
QMREPRGSDIAGTTSNLQE QIAWMTSNPPIPVGDIYKRWII LGLNKIVRMYSPTSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQ

[0206] 镶嵌序列 POL1 (AA 序列)

[0207] SEQ ID NO :5

[0208] FFRENLA FQQGEAREFPSEQTRANSPTSRELQVRGDNPHSEAGAERQGT LNFPQITLWQRPLVSIKVG
QIREALLDTGADDTVLEDINLP GKWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTPVNI IGRNMLTQLG
CTLNFPISPIETVPVKLKPGMDGPRVKQWPLTEEEKIKALTAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWR
KLVD FRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKS VTLVDVGDAYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRYQYNVL
PQGWKGPSAIFQCSMTRILEPFRANKPEI VIYQYMDL YVGS DLEIGQHRAKIEELREHLLKWGFTTPDKKHQKEPP
FLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKL VGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEA ELEL
AENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHDQWYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIAMESI
VIWGKTPKFLPIQKETWETWWTDYWQATWIPEWEFVNT PPLVKLWYQLEKDPIAGVETFYVDGAANRETKLGKAGY
VTDRGRQKIVSLTETTNQKTELQAIYLALQDSGSEVNI VTD SQYALGIIQAQPKSESELVNQII EQLIKKERVYLS
WVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGD KAQEEHEKYHSNWRAMASDFNLPPVAKEIVASCDQCQLKGEAMH
GQVDCSPGIWQLDCTHLEGKII LVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFILKLGRWPVKVIHTDNGSNFTSAAVKA
ACWWAGIQQEFGIPYNPQSQG VVESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIIDIIA
TDIQTKE LQKQIIKI QNFRVYYRDSRDP IWKGP AKLLWKGE GAVVIQD NSDIKVVP RRKVKI IKDYGKQ MAGADCVA
GRQDED

[0209] 镶嵌序列 POL2 (AA 序列)

[0210] SEQ ID NO :6

[0211] FFRENLA FPQ GKAREFSSEQTRANSPT RRELQVWGRDNNSLSEAGADRQGTVSFSFPQITLWQRPLVTI
KIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQIPIEICGHKAIGTVLVGPTPVNI IGRNLL
TQIGCTLNFPISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFA IKKKDS
TKWRKLVD FRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKS VTLVDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQ
YNVLPQGWKGPSAIFQSSMTKILEPFRKQNPDI VIYQYMDL YVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQ
KEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKL VGKLNWASQIYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEA
ELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGQWYQIYQEPFKNLKTGKYARMGAHTNDVKQLTEAVQKIA
TESIVIWGKTPKFLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNT PPLVKLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLG
KAGYVTDGRGRQKVSLTDTTNQKTELQAIHLALQDSGLEVNI VTD SQYALGIIQAQPKSESELVSQII EQLIKKEK

VYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHSNWRAMASEFNLPPIVAKEIVASCDKCQLKG
EAIHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGVILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFLLKLAGRWPVKTIHTDNGSNFTSA
TVKAACWWAGIKQEFIPYNPQSQGVVESINKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGEYSAGERIV
DIIASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPLWKGPAKLLWKGEGAVVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAGD
DCVASRQDED

[0212] 镶嵌序列 NEF1 (AA 序列)

[0213] SEQ ID NO :7

[0214] MGGKWSKSSVVGWPAIRERMRRAPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWEAQEEEEVGFPV
RPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVP
VEPEKIEEANEGENNSLLHPMSQHGMDDPEKEVLMWKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC

[0215] 镶嵌序列 NEF2 (AA 序列)

[0216] SEQ ID NO :8

[0217] MGGKWSKSSIVGWPAVRERIRRAEPAAEGVGAASQDLDDKYGALTSSNTAATNADCAWLEAQEDEEVGFP
VKPQVPLRPMTYKAAFDLSFFLKEKGGDGLIYSKKRQEILDLWVYNTQGGFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVP
PVDPREVEEANKGENNCLLHPMNLHGMDPEREVLVWRFDSRLAFHHMAREKHPEYYKNC

[0218] II. 二价 M 镶嵌序列 ENV GP140 序列 (切割 / 融合缺陷的)

[0219] 镶嵌序列 ENV1GP140 (AA 序列)

[0220] SEQ ID NO :9

[0221] MRVTGIRKNYQHLWRWGTMLLGILMICSAAAGKLWVTVYYGVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNVWA
THACVPTDPNPQEVVLENTENFNMWKNMVEQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDDVRNVTNNATNTNS
SWGEPMEKGEIKNCSFNITTSIRNKVQKQYALFYKLDVVPIDNDSNNTNYRLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYC
APAGFAILKCNDDKKFNGTGPTNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEVIRSENFTNNAKTIMVQLNVSVEIN
CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTAGDIIGDIRQAHCNISRANWNTLRQIVEKLGKQFGNKTIVFNHSSGGDPEIVM
HSFNCGGEFFYCNSTKLFNSTWTWNSTWNNTKRSNDTEEHITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSNI
TGLLLTRDGGNDTSGTEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVQSEKSAVGIGAVFLGLGAAG
GSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLI
CTTTVPWNASWSNKS LDKIWNMTWMEWEREINNYTSLIYTLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDISNWLW

[0222] 镶嵌序列 ENV2GP140 (AA 序列)

[0223] SEQ ID NO :10

[0224] MRVRGIQRNWPQWWIWGILGFWMIIICRVMGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLCASDAKAYEKEVHNVWA
THACVPTDPNPQEMVLENTENFNMWKNDMVDQMHEIDIIRLWDQSLKPCVKLTPLCVTLECRNVRNVSSNGTYNIIH
NETYKEMKNCSFNATTVVEDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSEKSSSENSSEYYRLINCNTSAITQACPKVSFDPIPI
IHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEIIRSENLTNNAKTIIIVHLNET
VNITCTRPNNNTRKSIIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWNKTLQGVKKKLAEHFPNKTINFTSSSGGDLE
ITTHSFNCRGEFFYCNTSGLFNGTYMPNGTNSNSSNITLPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCRSNITGLL
LTRDGGSNNGVPNDTETFRPGGGDMRNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTEAKRRVVESEKSAVGIGAVFLGLGAAG
STMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLQDQQLLGLWGC SGKLI
TTAVPWNTSWSNKSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLLEESQNQQEKNEKDLLALDSWKNLWNWFDITNWLW

[0225] MOS3 ENV GP140 (AA 序列)

[0226] 678AA

[0227] SEQ ID NO :11

[0228] MRVKGIRKNYQHLWKWGTMLLGLMLICSAAEQLVWTVVYGVVPWRDAETTLFCASDAKAYEREVHNIWA
THACVPTDPNPQEIVLENTVEEFNMWKNMVEQMHTDIIISLWDESLKPCVKLAPLCVTLNCTNANLNCTNDNCNRTV
DKMREEIKNCSFNMTTELDRDKKQKVYALFYKLDIVPIEKNSSSEYRLINCNTSTITQACPKVTFEPIPIHYCTPAGFA
ILKCKDKKFNGTGPKNVSTVQCTHGIKPVISTQLLLNGSLAEGEIIIRSENITNNAKTIIVQLNESVVINCTRPGN
NTRKSVRIGPGQAFYATGEIIGDIRQAYCNI SRAKWNTLTKQIVTKLKEQFKNKTIIVFNQSSGGDPEITTHSFNCGG
EFFYCNTTQLFNSTWNSNSTWNDTTGVSVEGNDTITLPCRICKQIVNMWQVRVGQAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLV
RDGGNINRTNETFRPGGNNMKDNWRSELYKYKWEIKPLGVAPTRAKRRVVESEKSAVGLGAVFLGFLGTAGSTMGA
ASLTTLTVQARQVLSGIVQQSNLLKAIEAQQHLLKLTVWGIKQLQARILAVERYLRDQQLGIWGCSGKLICTTNVP
WNSSWSNKSQEEIWNMTWMQWDREISNYTDTIYRLLEDSSQNQQEKNEQDLLALDKWASLWNWFSITNWLW

[0229] III. 二价 M 镶嵌序列 POL 序列 (广泛失活, 删除 PR, 9 个 A 失活突变以消除催化活性)

[0230] 镶嵌序列 POL1 (AA 序列)

[0231] SEQ ID NO :12

[0232] MAPISPIETVPVKLPGMDGPRVKQWPLTEEKIKALTAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKD
STKWRKLVDRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLAVGDAYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRY
QYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTRILEPFRAKNPEIVIYQYMAALYVGSdle IGQHRAKIEELREHLLKWGFTTPDKKH
QKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEE
AELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHQWYTYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKI
AMESIVIWGKTPKFRPLIQKETWETWWTDYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKDPIAGVETFYVAGAANRETKL
GKAGYVTDGRGRQKIVSLTETTNTKTALQAIYLALQDSGSEVNIVTASQYALGIIQAQPKSESELVNQIEQLIKKE
RVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHSNWRAMASDFNLPVVAKEIVASCDQCQLK
GEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFILKLAGRWPVKVIHTANGSNFTS
AAVKAACWWAGIQQEFQIPYNPQSQGVVASMNELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERI
IDIIATDIQTKELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPWKGPAKLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIKDYGKQMAG
ADCVAGRQDED

[0233] 镶嵌序列 POL2 (AA 序列)

[0234] SEQ ID NO :13

[0235] MAPISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIAKKKD
STKWRKLVDRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLAVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRY
QYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYIYQYMAALYVGSdle IGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKH
QKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEE
AELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWYTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKI
ATESIVIWGKTPKFKLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKEPIVGAETFYVAGAANRETKL
GKAGYVTDGRGRQKVVSLTDTTNQKTALQAIHLALQDSGLEVNIVTASQYALGIIQAQPKSESELVSQIEQLIKKE
KVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHSNWRAMASEFNLPPIVAKEIVASCDKCQLK
GEAIIHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKVIILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFLLKLAGRWPVKTIHTANGSNFTS
ATVKAACWWAGIKQEFQIPYNPQSQGVVASINKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGEYSAGERI

VDIIASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPLWKGPAKLLWKGEGAVVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAG
DDCVASRQDED

[0236] MOS3 POL V3(AA 序列)

[0237] 851AA

[0238] SEQ ID NO :14

[0239] MAPISPIDTVPVTLKPGMDGPKIKQWPLTEEEKIKALTEICTEMEKEGKISRIGPENPYNTPVFAIKKKN
STRWRKLVDFRELNKKTKQDFWEVQLGIPHPAGLKKKRSVTVLAVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSVNNETPGVRY
QYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTKILEPFRAQNPEIVIIYQYVAALYVGSLEIEQHRTKIEELRAHLLSWGFTTPDKKH
QREPPFLWMGYELHPDRWTVQPIELPEKESWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGKVKQLCRLLRGAKALTEVIPLTKE
AELELAENREILREPVGHVYDPSKDLVAEIQKQGQDQWYQIYQEPYKNLKTGKYARKRSAHTNDVRQLTEAVQKI
ALESIVIWGKIPKFRLLPIQRETWETWWTEYWQATWIPDWEFVNTPLVKLWYQLEKEPIAGAETFYVAGASNRETKI
GKAGYVTDKGRQKVVSLETETNQKAALQAIQLALQDSGPEVNIIVTASQYVLGIIQAQPDSESELVNQIEELIKKE
KVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAGIRKILFLDGDKAQEEHERYHSNWRMTASDFNLPPIVAKEIVANCDCQKLK
GEAMHGQVDCSPGMWQLACTHLEGKIIIVAVHVASGYMEAEVIPAETGQETAYYILKLGRWPVKVHTANGSNFTS
TTVKAACWWANVTQEFQIPYNPQSQGVIA SMNKELKKIIGQVREQAHLKTAVQMAVLIHNFKRRGGIGGYSAGERI
VDIIATDIQTRELQKQIIKIQNFRVYFRDSRDPLVWKGPAKLLWKGEGAVVIQDNSEIKVVPRRKVKIIRDYGKQMAG
DDCVAGRQDEDQ

[0240] IV. 二价 M 镶嵌序列 GAG 序列

[0241] MOS3 GAG(AA 序列)

[0242] 508 AA

[0243] SEQ ID NO :15

[0244] MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELDRLFALNPGLLETAEGCQQIIIEQLQPALQ
TGSEELKSLYNTVAVLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSQKTQQAADTGSSSKVSQNYPIVQNAQQGMVHQA
LSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIMFSALEAGATPQDLNMLNI VGGHQAAMQILKDTINEEAADWDRHPVHAGPI
PPGQMREPRGSDIAGTTSTPQEQIGWMTSNPPVPVGEIYKRWIIMGLNKIVRMYSVPSILDIKQGPKEFRDYVDRF
FKVLRAEQATQEVKNWMTETLLIQNANPDCKSILRALGPGASLEEMMTACQGVGGPSHKARILAEAMSQANNTNIMM
QRGNFKGQKRIKCFNCGKEGHLARNCRAPRKRGCWKGREGHQMKDCNERQANFLGKIWPSSKGRPGNFPQSRPEPT
APLEPTAPPAEPTAPPAESFGFGEEITPSPKQEQKDREPLTSLKSLFGSDPLLQ

[0245] V. 二价 M 镶嵌序列 NEF 序列(将 2 个 G 位置替换为 A 以删除十四烷基化位点)

[0246] MOS1 NEF

[0247] (206AA)

[0248] SEQ ID NO :16

[0249] MAGKWSKSSVVGWPAIRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFP
VRPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKL
VPEPEKIEEANEENSLHHPMSQHGMDDPEKEVLMWKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC

[0250] MOS2 NEF

[0251] (206AA) - 将 2 个 G 位置替换为 A 以删除十四烷基化位点

[0252] SEQ ID NO :17

[0253] MAGKWSKSSIVGWPVAVRERIRRAEPAAEGVGAASQDLKYGALTSSNTAATNADCAWLEAQEDEEVGFP

VKPQVPLRPMTYKAAFDSLFFLKEKGGDLGLIYSKKRQEILDLWVYNTQGFFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPREVEEANKGENNCLLHPMNLHGMDPPERVLVWRFD SRLAFHHMAREKHPEYYKNC

[0254] MOS3 NEF

[0255] (208AA)

[0256] SEQ ID NO :18

[0257] MAGKWSKRSVVGWPAVRERMRRTEPAAEGVGAVSQDLDKHGALTSSNTAHNNADCAWLQAQEEEEVEGFPVRPQVPRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQKRQEILDLWVYHTQGFFPDWHNYTPGPGTRFPLTFGWICYKLVVPDPKEVEEANEKENNCLLHPMSQHGMEDDREVLKWKFDSSLARRHMARELHPEFYKDCL

[0258] VI. 二价 M 镶嵌序列 GAGNEF 融合序列

[0259] 镶嵌序列 GAGNEF1 (AA 序列)

[0260] SEQ ID NO :19

[0261] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQQAADTGNSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSVPSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMMQRGNFRNRKTKVCFNCGKEGHIKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGPRGNFLQNRPEPTAPPEESFRFGEETTPSQKQEPIDKEMYPLASLKSFLGNDPSSQAGKWSKSSVVGWPAIRERMRRRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVEGFPVRPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVEPEKIEEANEKENNSLLHPMSQHGMDDPEKEVLMWKFD SRLAFHHMARELHPEYYKDC

[0262] 镶嵌序列 GAGNEF2 (AA 序列)

[0263] SEQ ID NO :20

[0264] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIKQLQPALQTGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSQQKTQQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGQMVHQPISPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMFTALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVHAGPVAPGQMREPRGSDIAGTTSNLQEQIAWMTSNPPIPVGDYIKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKTLRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSNFKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPPAESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQAGKWSKSSIVGWPAVRERIRRAEPAAEGVGAASQDLDKYGALTSSNTAATNADCAWLEAQEDEVGFPVKPQVPLRPMTYKAAFDSLFFLKEKGGDLGLIYSKKRQEILDLWVYNTQGFFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPREVEEANKGENNCLLHPMNLHGMDPPERVLVWRFD SRLAFHHMAREKHPEYYKNC

[0265] VII. 二价 M 镶嵌序列 GAGPOL 融合序列 (变体 3 ;POL 广泛失活,删除 PR,9 个 A 失活突变以消除催化活性)

[0266] 镶嵌序列 GAGPOL1 V3 (AA 序列)

[0267] SEQ ID NO :21

[0268] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQQAADTGNSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQA

ISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIM
MQRGNFRNRKTKVCFNCGKEGHIKNCRAPRKKGCWCKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGPRGNFLQNRPE
PTAPPEESFRFGEETTTSPSQKEPIDKEMYPLASLKSFLGNDPSSQMAPISPIETVPVKLKPGMDGPRVKQWPLTEE
KIKALTAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKS
TVLAVGDAYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTRILEPFRAKNPEIVIIYQY
MAALYVGSDELIGQHRAKIEELREHLKKGWFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKL
VGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHQW
TYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIAMESIWIWGKTPKFLPIQKETWETWWTDYWQATWIPEW
EFVNTPLVLKLYQLEKDPIAGVETFYVAGAANRETKLGKAGYVTDGRQKIVSLTETTNQKTALQAIYLALQDSGS
EVNIVTASQYALGIIQAQPDKSESELVNQIIIEQLIKKERVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGDIDKA
QEEHEKYHSNWRAMASDFNLPPVVAKEIVASCDQCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIILVAVHVASGYIE
AEVIPAETGQETAYFILKLGRWPVKVIHTANGSNFTSAAVKAACWWAGIQQEFGIPYNPQSQGVVASMNKELKKII
GQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIIDIIATDIQTKELQKQIKIQNFRVYYRDSRDPWKGPA
KLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIKDYGKQMAGADCVAGRQDED

[0269] 镶嵌序列 GAGPOL2 V3(AA 序列)

[0270] SEQ ID NO :22

[0271] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIKQLQPALQ
TGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSSQKTTQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQPISP
RTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFTALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRVHPVHAGPVAPG
QMREPRGSDIAGTTSTNLQEQIAWMTSNPPIPVGDYIKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWCKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQMAPISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEIC
TEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLAVGDAY
FSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIIVIIYQYMAALYVGS
LEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQ
IYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWTYQIYQEPF
KNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKIATESIWIWGKTPKFLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLV
KLWYQLEKEPIVGAETFYVAGAANRETKLGKAGYVTDGRQKVVSLTDTTNQKTALQAIHLALQDSGLEVNIVTASQ
YALGIIQAQPDKSESELVSQIIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHS
NWRAMASEFNLPPIVAKEIVASCDKCQLKGEAIIHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIILVAVHVASGYIEAEVIPAETG
QETAYFLLKLGRWPVKTIHTANGSNFTSATVKAACWWAGIQQEFGIPYNPQSQGVVASINKELKKIIGQVRDQAEH
LKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGEYSAGERIVDIIASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPWKGPAKLLWKGEA
VVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAGDDCVASRQDED

[0272] MOS3 GAG-POL V3(AA 序列)

[0273] 1359aa- 完整 GAG 及修饰的 POL 的 GAG-POL 融合

[0274] SEQ ID NO :23

[0275] MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELDRLFALNPGLLETAEGCQQIIEQLQPALQ
TGSEELKSLYNTVAVLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSQKTQAAAADTGSSSKVSQNYPIVQNAQGMVHQA
LSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIPMFSALAEGATPQDLNMLNI VGGHQAAMQILKDTINEEAADWDRLHPVHAGPI
PPGQMREPRGSDIAGTTSTPQEQIGWMTSNPPVPVGEIYKRWIIMGLNKIVRMYSVPSILDIKQGPKEFRDYVDRF
FKVLRAEQATQEVKNWMTETLLIQNANPDCKSILRALGPGASLEEMMTACQGVGGPSHKARILAEAMSQANNTNIMM
QRGNFKGQKRIKCFNCGKEGHLARNCRAPRKRGCWKCGRGHEGHQMKDCNERQANFLGKIWPSSKGRPGNFPQSRPEPT
APLEPTAPPAEPTAPPAESFGFGEEITPSPKQEQKDREPLTSLKSLFGSDPLLQMAPISPIDTVPVTLKPGMDGPKI
KQWPLTEEKIKALTEICTEMEKEGKISRIGPENPYNTPVFAIKKKNSTRWKLVDFRELNNKTQDFWEVQLGIPHPA
GLKKKRSVTVLAVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSVNNETPGVRYQYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTKILEPFRAQN
PEIVIIYQYVAALYVGSLEIEQHRTKIEELRAHLLSWGFTTPDKKHQREPPFLWMGYELHPDRWTVQPIELPEKESW
TVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVKQLCRLRGAKALTEVIPLTKEAELELAENREILREPVHGVYDPSKDLVAEI
QKQGDQWTYQIYQEPYKNLKTGKYARKRSAHTNDVRQLTEAVQKIALESIVIWGKIPKFRLP IQRETWETWWTEYW
QATWIPDWEFVNTPLVLWYQLEKEPIAGAETFYVAGASNRETKIGKAGYVTDKGRQKVSLTETTNQKAALQAIQ
LALQDSGPEVNIVTASQYVLGIIQAQPDSESELVNQIIIEELIKKEKVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAIRKIL
FLDGIDKAQEEHRYHSNWRTMASDFNLPPIVAKEIVANCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGMWQLACTHLEGKIIIVAV
HVASGYMAEVI PAETGQETAYYILKLGRWPVKVHTANGSNFTSTTVKAACWWANVTQEFGIPYNPQSQGVIASM
NKLKIIIGQVREQAHLKTAVQMAVLIHNFKRRGGIGGYSAGERIVDIIATDIQTRELQKQIKIQNFRVYFRDSR
DPVWKGPAKLLWKGEAVVIQDNSEIKVPPRRVKIIRDYGKQMAGDDCVAGRQDEDQ

[0276] VIII. 二价 M 镶嵌序列 GAGPOL 融合序列 (变体 4 ;POL 最小化失活, 完整的 PR-RT-IN)

[0277] 镶嵌序列 GAGPOL1 V4 (AA 序列)

[0278] SEQ ID NO :24

[0279] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQ
TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQAAAADTGNSQVSQNYPIVQNIQGMVHQA
ISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPIPVEIYKRWIILGLNKIVRMYSVPSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVNTSATIM
MQRGNFRNRKTKVCFNCGKEGHIAKNCRAPRKKGCWKCGRGHEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSSKGRPGNFLQNRPE
PTAPPEESFRFGEETTTSPSQKEPIDKEMYPLASLSLFGNDPSSQRENLAFFQGEAREFPSEQTRANSPTSRELQV
RGDNPHSEAGAERQGTNLNFPQITLWQRPLVSIKVGQIREALLATGADDTVLEDINLPGKWPKMIGGIGGFIKVGQ
YDQILIEICGKKAIGTVLVGPTPVNIIGRNMLTQLGCTLNFPISPIETVPVKLPGMDGPRVKQWPLTEEKIKALTA
ICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNNKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLDVGD
AYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTTRILEPFRAKNPEIVIIYQYMDHLYVG
SDLEIGQHRAKIEELREHLLKWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWA
SQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHQWTYQIYQE
PFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIAMESIVIWGKTPKFRLP IQKETWETWWTDYQATWIPEWEFVNTPP
LVKLWYQLEKDPIAGVETFYVDGAANRETGLGKAGYVTDGRGRQIVSLTETTNQKTELQAIYLALQDSGSEVNIVTD
SQYALGIIQAQPDKSESELVNQIIIEQLIKKERVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGIDKAQEEHEKY
HSNWRAMASDFNLPPVVAKEIVASCDQCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIIVAVHVASGYIEAEVIPAE

TGQETAYFILKLAGRWPVKVIHTDNGSNFTSAAVKAACWWAGIQQEFGIPYNPQSQGVVESMNKELKKI IGQVRDQA
EHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERI IDI IATDIQTKELQKQI IKIQNFRVYYRDSRDPIWKGPAKLLWKGE
GAVVIQDNSDIKVVPRRKVKI IKDYGKQMAGADCVAGRQDED

[0280] 镶嵌序列 GAGPOL2 V4 (AA 序列)

[0281] SEQ ID NO :25

[0282] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQI IKQLQPALQ
TGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSSQKKTQQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGQMVHQPI SP
RTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRHPVHAGPVAPG
QMREPRGSDIAGTTSNLQEQAWMTSNPPIPVGDYKRWI ILGLNKIVRMYSPTSILDIKQGPKEPFRDYVDRFCKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQRENLAFFPQGKAREFSSEQTRANSPTRELQVWGRDNNSLS
EAGADRQGTVSFSFPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLATGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGIGGFIKVGQYDQIP
IEICGHKAIGTVLVGPTPVNI IGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEM
EKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLVDVGDAYFSV
PLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKWSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDI VIYQYMDHLYVGSLEI
GQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYA
GIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWTYQIYQEPFKNL
KTGKYARMGAHTNDVKQLTEAVQKIATESI VIWGKTPKFKLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLW
YQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDGRGRQKVVS LTDITNQKTELQAIHLALQDSGLEVNIVTDSQYAL
GIIQAQPDKSESELVSQI IEQLIKKEKVYLAWPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGIDKAQEEHEKYHSNWR
AMASEFNLPPIVAKEIVASCDKQKLGAEIHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKVLVAVHVASGYIEAEVIPAETGQET
AYFLLKLAGRWPVKTIHTDNGSNFTSATVKAACWWAGIKQEFGIPYNPQSQGVVESINKELKKI IGQVRDQA EHLKT
AVQMAVFIHNFKRKGGIGEYSAGERIVDI IASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPLWKGPAAKLLWKGE GAVVI
QDNSDIKVVPRRKAKI IRDYGKQMAGDDCVASRQDED

[0283] IX. 二价 M 镶嵌序列 GAGPOL 融合序列 (变体 5 ;POL 最小化失活, 删除 PR)

[0284] 镶嵌序列 GAGPOL1 V5 (AA 序列)

[0285] SEQ ID NO :26

[0286] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHI VWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQ
TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIE IKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQQAADTGNSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQA
ISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQE QIGWMTNNPPIPVGEIYKRWI ILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTSATIM
MQRGNFRNRKRTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGPRGNFLQNRPE
PTAPPEESFRFGEETTTSPSQKQEPIDKEMYPLASLSLFGNDPSSQMAPISPIETVPVKLPGMDGPRVKQWPLTEE
KIKALTAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSV
TVLVDVGDAYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGKWSPAIFQCSMTRILEPFRANKPEI VIYQY
MDHLYVGSLEIGQHRAKIEELREHLLKWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKL
VGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHQDQW

TYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIAMESIVIWGKTPKFRLPIQKETWETWWTDYWQATWIPEW
EFVNTPLVLKLYQLEKDPIAGVETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDGRGRQKIVSLTETTNQKTELQAIYLALQDSGS
EVNIVTDSQYALGIIQAQPDKSESELVNQIIIEQLIKKERVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGIDKA
QEEHEKYHSNWRAMASDFNLPPVVAKEIVASCDQCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIILVAVHVASGYIE
AEVIPAETGQETAYFILKLGRWPVKVIHTDNGSNFTSAAVKAACWWAGIQQEFGIYPNPQSQGVVESMNKELKKII
GQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIDI IATDIQTKELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPIWKGPA
KLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIIKDYGKQMAGADCVAGRQDED

[0287] 镶嵌序列 GAGPOL2 V5 (AA 序列)

[0288] SEQ ID NO :27

[0289] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIKQLQPALQ
TGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSQQKTQQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGQMVHQPI SP
RTLNAWVKVIEEKA FSPEVIPMFTALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRHPVHAGPVAPG
QMREPRGSDIAGTTSNLQEQA WMTSNPPIPVGDYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWP SHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQMAPISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEIC
TEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLVDVGDAY
FSVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQYNVLPQGWKGPSAIFQSSMTKILEPFRKQNPDI VIYQYMDHLYVGS
LEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQ
IYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWYTYQIYQEPF
KNLKTGKYARMGAHTNDVKQLTEAVQKIATESIVIWGKTPKFRLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLV
KLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDGRGRQKVSLTDTTNQKTELQAIHLALQDSGLEVNIVTDSQ
YALGIIQAQPDKSESELVSQIIIEQLIKKEKVYLA WPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGIDKAQEEHEKYHS
NWRAMASEFNLPPIVAKEIVASCDKCQLKGEA IHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIVLVAVHVASGYIEAEVIPAETG
QETAYFLLKLGRWPVKTIHTDNGSNFTSATVKAACWWAGIKQEFGIYPNPQSQGVVESINKELKKIIGQVRDQAEH
LKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGEYSAGERIVDI IASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPLWKGPAKLLWKGEA
VVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAGDDCVASRQDED

[0290] X. 二价 M 镶嵌序列 GAGPOLNEF 融合序列 (POL 广泛失活, 删除 PR)

[0291] 镶嵌序列 GAGPOLNEF1 (AA 序列)

[0292] SEQ ID NO :28

[0293] MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHI VASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQ
TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQQAADTGNSSQVSQNYPIVQNIQGQMVHQA
ISPRTLNAWVKVVEEKA FSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPI
APGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPVSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIM
MQRGNFRNRKRTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWP SNKGRPGNFLQNRPE
PTAPPEESFRFGEETTTPSQKQEPIDKEMYPLASLKS LFGNDPSSQMAPISPIETVPVKLPGMDGPRVKQWPLTEE
KIKALTAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSV
TVLAVGDAYFSVPLDEGFRKYTAFTIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGWKGPSAIFQCSMTRILEPFRKNPEI VIYQY

MAALYVGSdleIGQHRAKIEELREHLKKGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKL
VGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGHQW
TYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIAMESIVIWGKTPKFRPLIQKETWETWWTDYWQATWIPEW
EFVNTPLVLKWLQLEKDPiAGVETFYVAGAANRETKLGKAGYVTDGRQKIVSLTETTNQKTALQAIYLALQDSGS
EVNIVTASQYALGIIQAQPDKSESELVNQIIIEQLIKKERVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGIDKA
QEEHEKYHSNWRAMASDFNLPPVVAKEIVASCDQCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIILVAVHVASGYIE
AEVIPAETGQETAYFILKLAGRWPVKVIHTANGSNFTSAAVKAACWWAGIQQEFGIPYNPQSQGVVASMNKELKKII
GQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIIDIIATDIQTKELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPIWKGPA
KLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIIRDYGKQMAGADCVAGRQDEDMAGKWSKSSVVGWPAIRERMRAEPAAD
GVGAVSRDLEKHGAITSSNTAANNADCAWLEAQEEEEVGFPVRPQVPLRPMTYKGALDLSHFLKEKGGLEGLIYSQK
RQDILDWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGIRYPLTFGWCFKLVPVEPEKIEEANEGENNSLLHPMSQHGMDDPEKEVLM
WKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC

[0294] 镶嵌序列 GAGPOLNEF2 (AA 序列)

[0295] SEQ ID NO :29

[0296] MGARASILRGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIKQLQPALQ
TGTEELRSLFNTVATLYCVHAEIEVRDTKEALDKIEEEQNKSSQKTTQAKEADGKVSQNYPIVQNLQGGMVHQPISP
RTLNAWVKVIEEKAFSPEVPMFTALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRHPVHAGPVAPG
QMREPRGSDIAGTTSNLQEQAWMTSNPPIPVGDYIKRWIILGLNKIVRMYSPSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTNSTILMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQEPKDREPLTSLRSLFGSDPLSQMAPISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEIC
TEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLAVGDAY
FSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMAALYVGS
LEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQ
IYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWTYQIYQEPF
KNLKTGKYARMGAHTNDVKQLTEAVQKIATESIVIWGKTPKFKPLIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLV
KLWYQLEKEPIVGAETFYVAGAANRETKLGKAGYVTDGRQKVVSLTDTTNQKTALQAIHLALQDSGLEVNIVTASQ
YALGIIQAQPDKSESELVSQIIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSRGIRKVLFLDGIDKAQEEHEKYHS
NWRAMASEFNLPIVAKEIVASCDKCQLKGEA IHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIVLVAVHVASGYIEAEVIPAETG
QETAYFLLKLAGRWPVKTIHTANGSNFTSATVKAACWWAGIKQEFGIPYNPQSQGVVASINKELKKIIGQVRDQAEH
LKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGEYSAGERIVDIIASDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPLWKGPALLLWKGEA
VVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAGDDCVASRQDEDMAGKWSKSSIVGWPAVRERIRRAEPAAEGVGAASQDL
DKYGALTSSNTAATNADCAWLEAQEEDVGFVPKQVPLRPMTYKAAFDSLFFLKEKGGLDGLIYSKKRQEILDWV
YNTQGFPPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPREVEEANKGENNCLLHPMNLHGMDDPEREVLVWRFDSRLAF
HHMAREKHPEYYKNC

[0297] XI. 最佳进化支 C ENV GP160, GAG, POL, NEF 序列

[0298] 最佳进化支 C ENV GP160 (SN90. 90. SE364) (AA 序列)

[0299] SEQ ID NO :30

[0300] MRVTGMLRNCQPWWIWGILGFWMLLIYNVGGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLCASDAKAYEKEVHNVWA

THACVPTDPNPQEMVLENVTEYFNMWKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCRNVTTSSNNATSNDNPN
GEIKNCSFNITTELDRKRRNEYALFYRLDIVPLSGSKNSSNSSEYRLINCNTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGY
AILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGKIPVVSTQLLNGLSLAEGEIIIRSENLTNNAKTIIVHLNESIEIVCARPN
NNTRKSMRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISGNWNATLEKVKGKLQEHFPGKNI SFEPSSGGDLEITTHSFNCRG
EFFYCDTSKLFNGTTHTANSSITIQCRKQIINMWQGVGRAIYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGTLNNDTEKFR
PGGGDMRDNRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS
GIVQQQSNLLRAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLGIWGCSGKI ICTTAVPWNTSWSNKSLEDIW
DNMTWMQWDREINNYTSIIYSLLEESQNNQEKNEKDLLALDSWNNLWNWFNITKWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIIFA
VLSIVNRVRQGYSPLSFQTLIPNPRGPDRLGRIEEEGGEQDRDRSIRLVNGFLAIAWDDLRSCLFSYRRLRDFILI
VARAVELLIQRGWETLKYLGLSLPQYWGLELKKSAISLLDTIAITVAEGTDRI IELVQRICRAISNIPRRIRQGFEEA
LQ

[0301] 最佳进化支 C GAG (IN. 70177) (AA 序列)

[0302] SEQ ID NO :31

[0303] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQILKQLQPALQ
TGTEELRSLYNTVATLYCVHAGIEVRDTKEALDKIEEEQNKGGQKTQQAAGADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQAISP
RTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFTALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPG
QMREPRGSDIAGTTSTLQEQIAWMTNPPVPVGDIIYKRWIIILGLNKIVRMYSVPSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTGSTIMMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKGEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGPRGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQELKDREPLTSLKSLFGSDPLSQ

[0304] 最佳进化支 C POL (ZA. 04. 04ZASK208B1) (AA 序列)

[0305] SEQ ID NO :32

[0306] FFRENLAFFQQGEAREFPSEQARANSPTSREFQVRGDNPCSEAGVKGGQTLNFPQITLWQRPLVSIKVG
QVKEALLDTGADDTVLEEINLPGKWPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTPVNIIGRNMLTQLG
CTLNFPISPIETVPVKLKPGMDGPKIKQWPLTEEKIKALMAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWR
KLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLVDVGDAYFSVPLDESFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVL
PQGWWGSPAIFQSSMTKILEPFRAKNPEIIVYQYMDLYVGSLEIGQHRAKIEELREHLLRWGFTTPDKKHQKEPP
FLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYSGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALEL
AENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGYDQWTYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKIALESI
VIWGKTPKFRLPIQKETWEIWWTDYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKEPIAGAETFYVDGAANRETKIGKAGY
VTDKGRQKIVTLTETTNQKTELQAIQLALQDSGSEVNI VTDQSQYALGIIQAQPKSESELVNQIIIEQLINKERVYLS
WVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFLDGDKAQEEHEKYHSNWRAMASEFNLPPVVAKEIVASCDKCKLKGEAIIH
GQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVIILVAVHVASGYMEAIVIPAETGQETAYYILKLGRWPVKVIHTDNGSNFTSAAVKA
ACWWAGIQQEFGIPYNPQSQGVVESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIIDIIA
TDIQTKEKQKQIKIKQNFVYYRDSRDPIWKGPALLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIKDYGKQMGADCVAG
GRQDED

[0307] 最佳进化支 C NEF (ZA00. 1170MB) (AA 序列)

[0308] SEQ ID NO :33

[0309] MGGKWSKSSIVGWPDPVRERMRRTEPAAEGVGAASQDLDKYGALTSSNTTHNNADCAWLEAQEEGEVGF

VRPQVPLRPMTYKGAFDLSFFLKEKGGLDGLIYSKKRQEILDLWVYHTQGFFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKL
VPDPREVEEANKGENNCLLHPMSLHGMEDEEREVLKWEFDSSLARRHLARELHPEYYKDC

[0310] XII. 最佳进化支 C ENV GP140 序列 (切割 / 融合缺陷的)

[0311] 最佳进化支 C ENV GP140 (SN. 90. 90. SE364) (AA 序列)

[0312] SEQ ID NO :34

[0313] MRVTGMLRNCQPWWIWGILGFWMLLIYNVGGNLWVTVYVGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWA
THACVPTDPNPQEMVLENVTEYFNMWKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCRNVTTSNNATSNDNP
GEIKNCFSNITTELDRKRRNEYALFYRLDIVPLSGSKNSSNSSEYRLINCNTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGY
AILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGKIPVVSTQLLLNGSLAEGEIIIRSENLTNNAKTIIVHLNESIEIVCARPN
NNTRKSMRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISGNWNATLEKVKGKLQEHFPGKNISFEPSSGGDLEITTHSFNCRG
EFFYCDTSKLFNGTTHTANSSITIQCRKQIINMWQGVGRAIYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGTLNNDTEKFR
PGGGMDRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPTKAKRRVVESEKSAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS
GIVQQQSNNLLRAIEAQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLKDQQLLGIWGCSGKICTTAVPWNTSWSNKSLEDIW
DNMTWMQWDREINNYTSIIYSLLEESQNQQEKNEKDLLALDSWNNLWNWFNITKWLW

[0314] XIII. 最佳进化支 C POL 序列 (广泛失活, 删除 PR)

[0315] 最佳进化支 C POL (ZA. 04. 04ZASK208B1) (AA 序列)

[0316] SEQ ID NO :35

[0317] MAPISPIETVPVKLPGMDGPKIKQWPLTEEKIKALMAICEEMEKEGKITKIGPENPYNTPIFAIKKKD
STKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLAVGDAYFSVPLDESFRKYTAFTIPSINNETPGIRY
QYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRAKNPEIVYQYMAALYVGSDEIGQHRAKIEELREHLLRWGFTTPDKKH
QKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYSGIKVRQLCKLLRGAKALTDIVPLTEE
AELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGYDQWYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRTAHTNDVKQLTEAVQKI
ALESIVIWGKTPKFRPLIQKETWEIWWTDYWQATWIPEWFEVNTPLVKLWYQLEKEPIAGAETFYVAGAANRETKI
GKAGYVTDKGRQKIVTLTETTQKTALQAIQLALQDSGSEVNIIVTASQYALGIIQAQPKSESELVNQIEQLINKE
RVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVLFDGIDKAQEEHEKYHSNWRAMASEFNLPVVAKEIVASCDKQCQK
GEAIIHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKVLVAVHVASGYMEAEVIPAETGQETAYYILKLGRWPVKVIHTANGSNFTS
AAVKAACWWAGIQQEFQIPYNPQSQGVVASMNELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERI
IDIATDIQTKELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPWKGPAKLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKVKIKDYGKQMAG
ADCVAGRQDED

[0318] XIV. 最佳进化支 C GAGNEF 融合序列

[0319] 最佳进化支 C GAGNEF (IN. 70177-ZA00. 1170MB) (AA 序列)

[0320] SEQ ID NO :36

[0321] MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQILKQLQPALQ
TGTEELRSLYNTVATLYCVHAGIEVRDTKEALDKIEEEQNKGGQKTQQAAGADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQAISP
RTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFTALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPG
QMREPRGSDIAGTTSTLQEQIAWMTNPPVPVGDYKRWIILGLNKIVRMYSVSIIDIKQGPKEPFRDYVDRFFKT
LRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAMSQTGSTIMMQRSN
FKGSKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWCKGEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPP
AESFRFEETTPAPKQELKDREPLTSLKSLFGSDPLSQAGKWSKSSIIGWPDVRRERMRRTEPAAEGVGAASQDLDKYG

ALTSSNTTHNNADCAWLEAQEEGEVGFVPVRPQVPLRPMTYKGAFDLSFFLKEKGGLDGLIYSKKRQEILDLWVYHTQ
GFFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPREVVEANKGENNCLLHPMSLHGMEDEEREVLKWEFSSSLARRHLA
RELHPEYYKDC

[0322] XV. 共有序列

[0323] M 共有序列 ENV

[0324] SEQ ID NO :37

[0325] MRVRGIQRNCQHLWRWGTLILGMLMICSAAENLWVTVYYGVPVWKEANTTLCASDAKAYDTEVHNVWA
THACVPTDPNPQEIIVLENTENFNMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTTNTTEEKG
EIKNCSFNITTEIRDKKQKVYALFYRLDVVPIDNNNNSSNYRLINCNTSAITQACPKVSFEPPIHYCAPAGFAIL
KCNDKKFNGTGPKNVSTVQCTHG IKPVVSTQLLLNGSLAEEIIIRSENITNNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNT
RKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNISGTKWNKTLQQVAKKLREHFNNKTIIFKPSSGGDLEITTHSFNCRGEF
FYCNTSGLFNSTWIGNGTNNNTNDTITLPCRICKIINMWQGVGQAMYAPPIEGKITCKSNITGLLLTRDGGNNNT
NETEIFRPGGGMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRWESEKSAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQ
ARQLLSGIVQQSNLLRAIEAQHLLQLTVWG IKQLQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTTPWNSSWSNK
SQDEIWDNMTWMEWEREINNYTDIIYSLIEESQNNQEKNEQELLALDKWASLWNWFDITNWLW

[0326] M 共有序列 GAG

[0327] SEQ ID NO :38

[0328] MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQIIGQLQPALQ
TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALEKIEEEQNKSSQKTQQAADKGNSSKVSQNYPIVQNLQGQMVHQA
ISPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRHPVHAGPI
PPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIAWMTSNPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSVPSILDIRQGPKEPFRDYVDRF
FKTLRAEQATQDVKNWMTDTLLVQANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNAAIMM
QRGNFKGQRRIIKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGPRGNFLQSRPEP
TAPPAESFGFGEIITPSPKQEPKDEPPLTSLKSLFGNDPLSQ

[0329] M 共有序列 POL

[0330] SEQ ID NO :39

[0331] MAPISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKD
STKWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRY
QYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRTQNPEIIVYQYMDHLYVGSdleIGQHRAKIEELREHLLRWGFTTPDKKH
QKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVKQLCKLLRGAKALTDIVPLTEE
AELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQDQWTYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRSHTNDVKQLTEAVQKI
ATESIVIWGKTPKFRPLIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKEPIAGAETFYVDGAANRETKL
GKAGYVTDGRGRQKVSLTETTQKTELQAIHLALQDSGSEVNIIVTDSQYALGIIQAQPDKSESELVNIIEQLIKKE
KVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSTGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHSNWRAMASDFNLPPIVAKEIVASCDKQK
GEAMHGQVDCSPGIWQLACTHLEGKIIIVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFILKLGRWPVKVIHTDNGSNFTS
AAVKAACWWAGIQQEFQIPYNPQSQGVVESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERI
IDIIATDIQTKEKQKITKIQNFRVYYRDSRDPWKGPAKLLWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAG
DDCVAGRQDED

[0332] 其它实施方式

[0333] 虽然本发明是与特定实施方式相结合而进行描述的,但应理解其可以做进一步修改,并且本申请旨在涵盖总体上符合本发明原理的本发明的任何变动、使用或改动,并且包括虽然不属于本发明所公开内容但属于本发明所属领域公知技术或常用技术手段并且能够适用于此前所描述的基本特征。

[0334] 该说明书所提及的所有公开文本和专利申请在此处均以引用方式并入,其引用程度如同将每个独立公开文本或专利申请特定且单独地以全文引用方式并入本文。

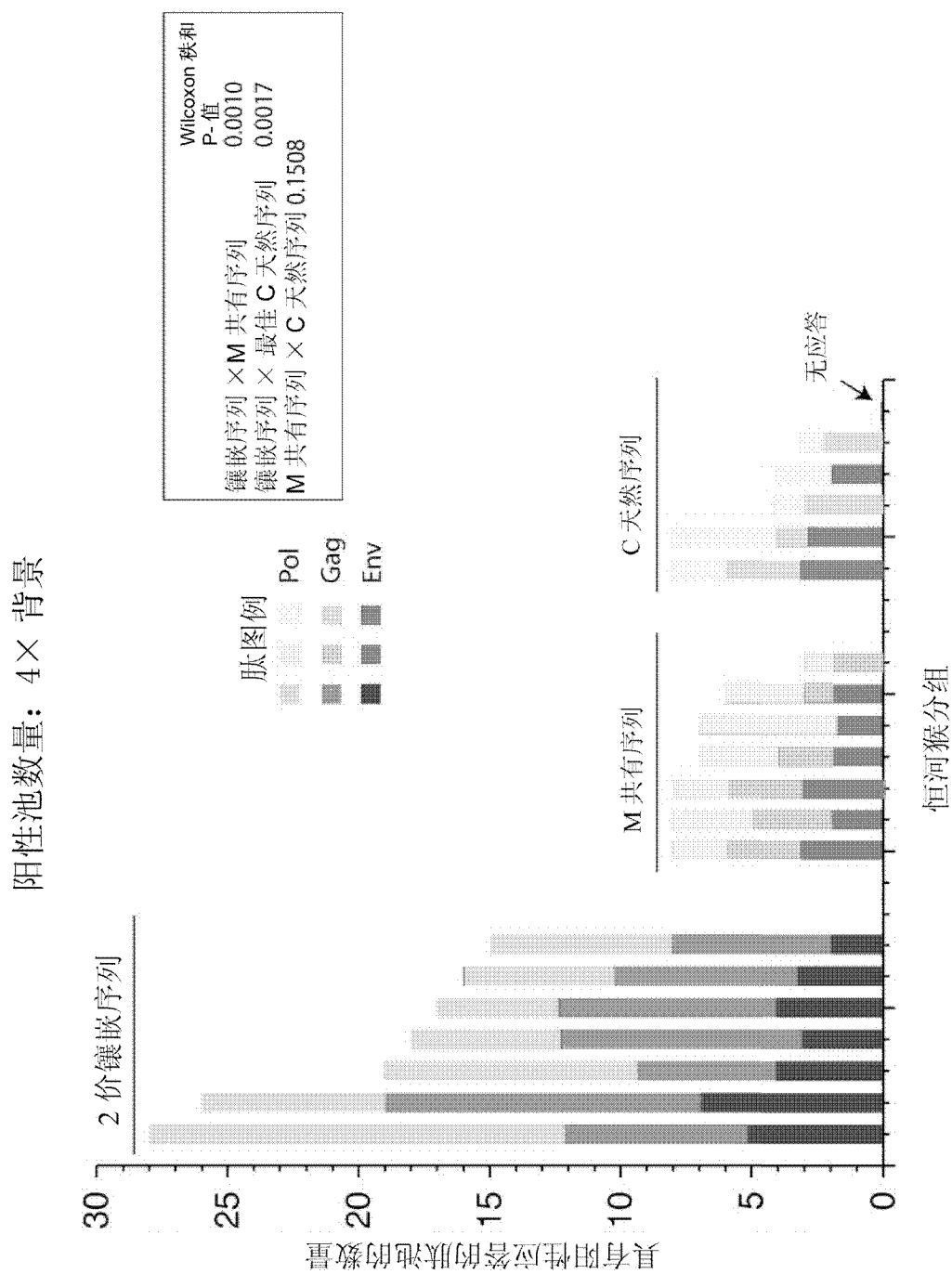


图 1

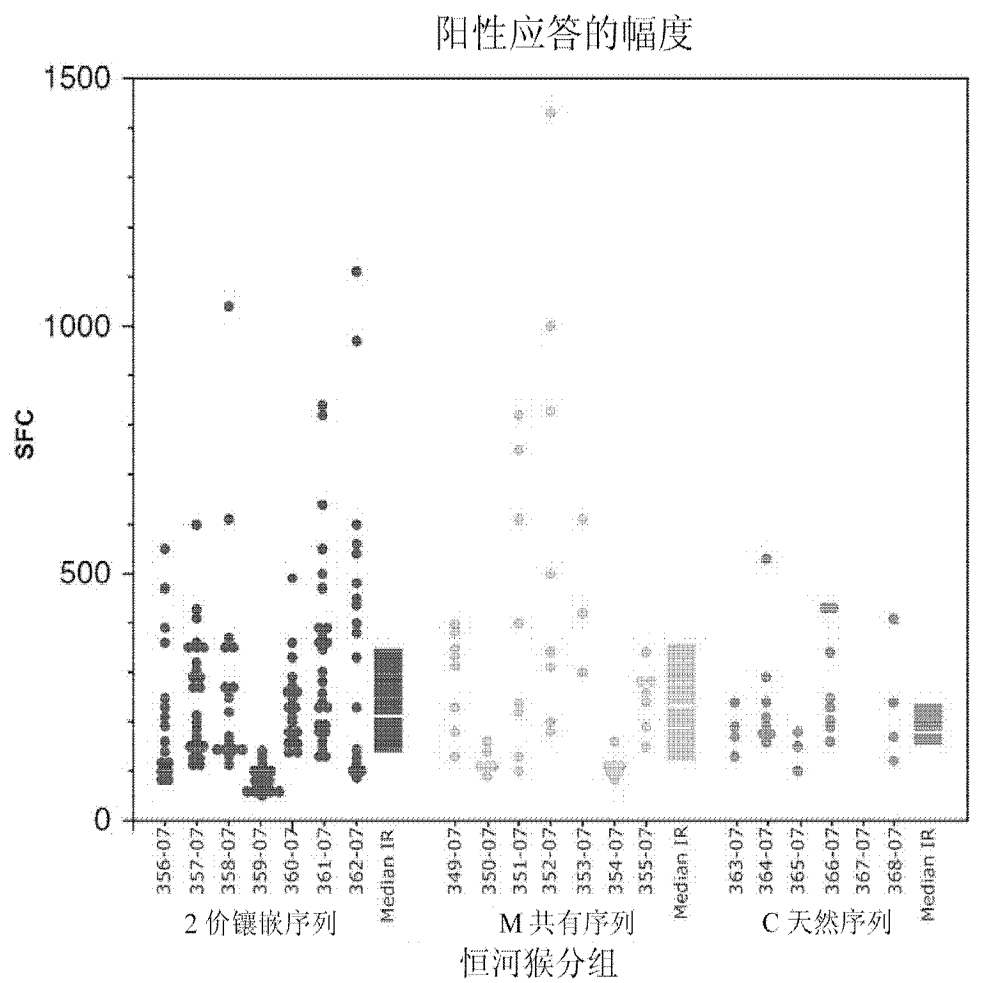


图 2

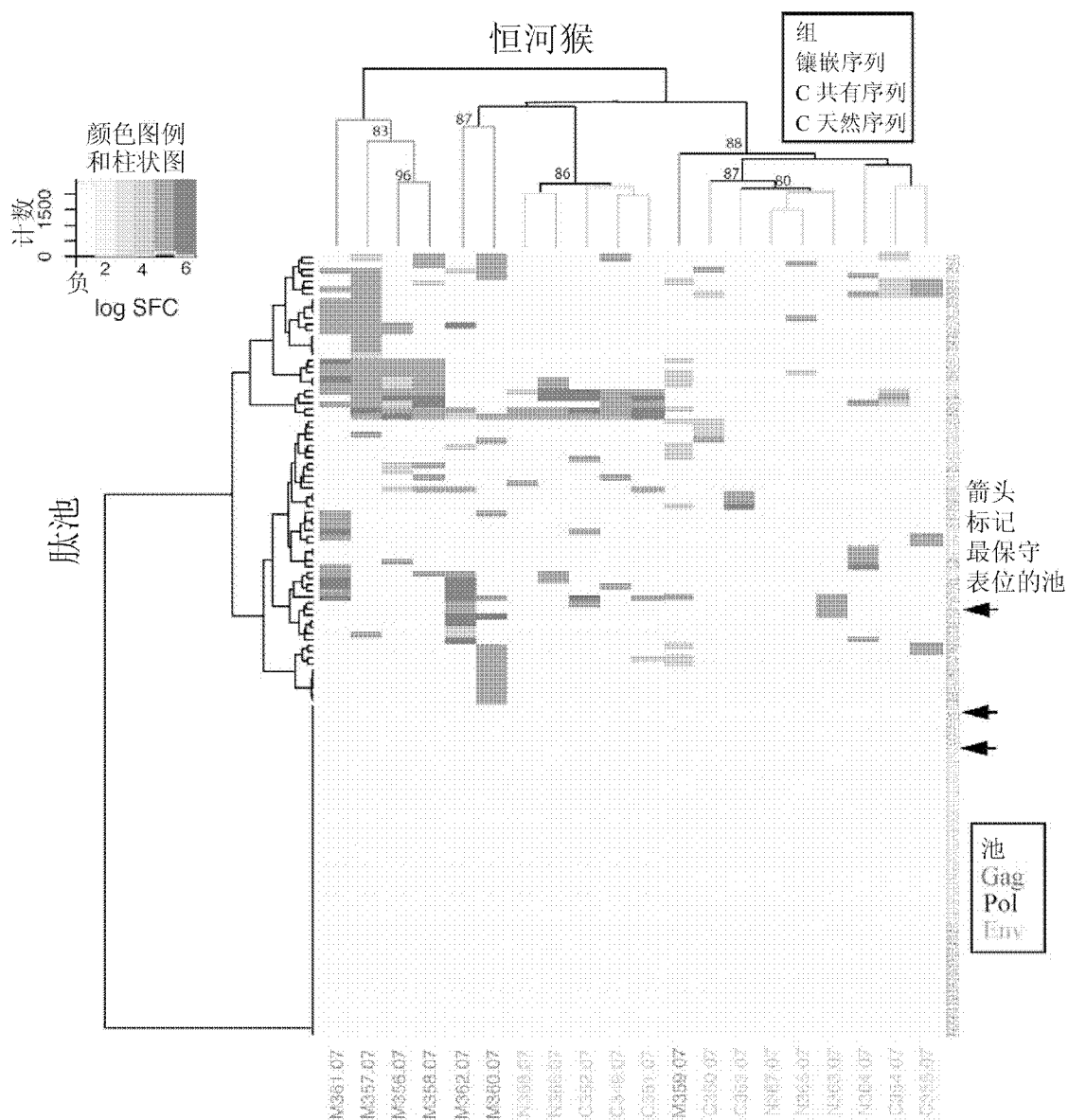


图 3

不同疫苗候选物的 PTE 和 M 组九聚体的覆盖率

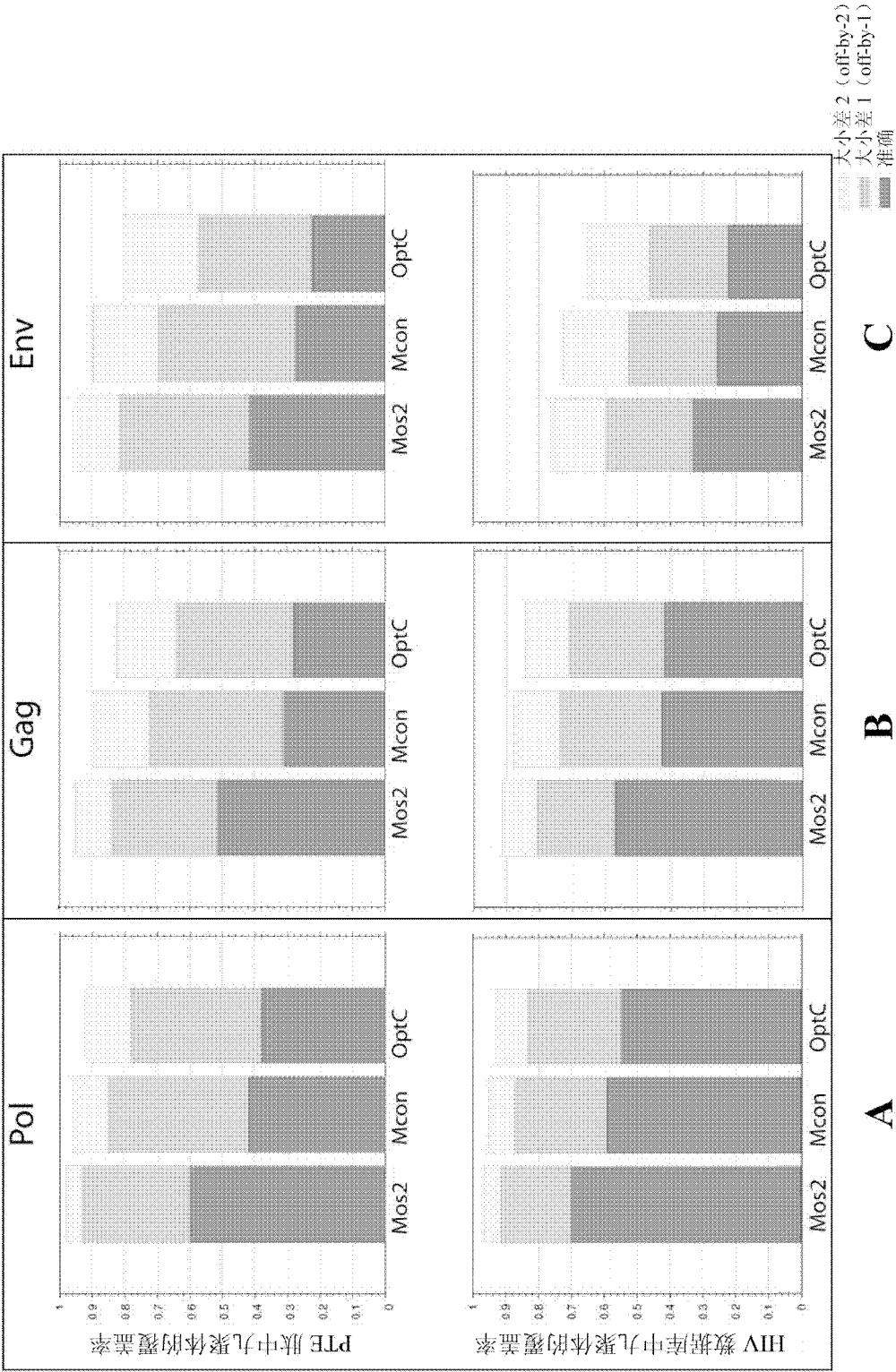


图 4

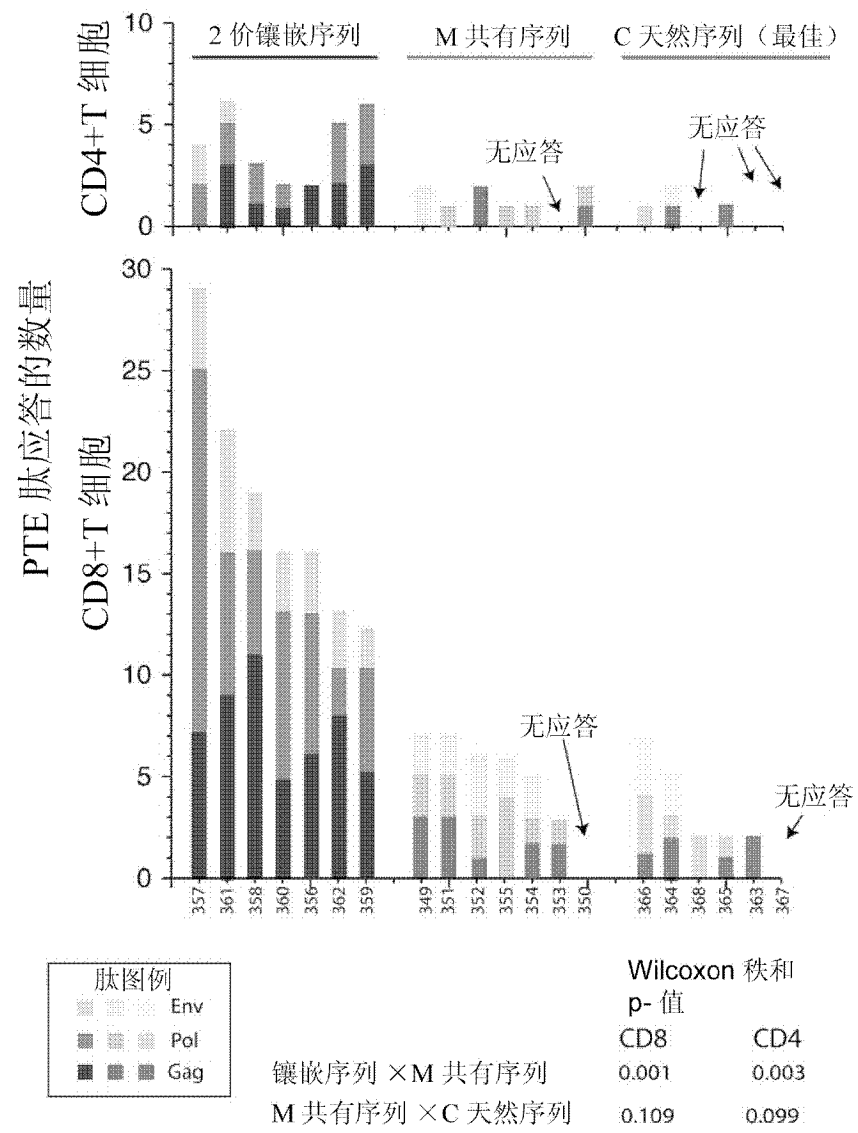


图 5

- CD8 T 细胞：中位数（范围）
 - 2 价镶嵌：16 (12-29)
 - Mcon: 6 (0-7)
 - OptC: 3 (0-7)
- CD4 T 细胞：
 - 2 价镶嵌：4 (2-6)
 - Mcon: 1 (0-2)
 - OptC: 0.5 (0-2)

图 6

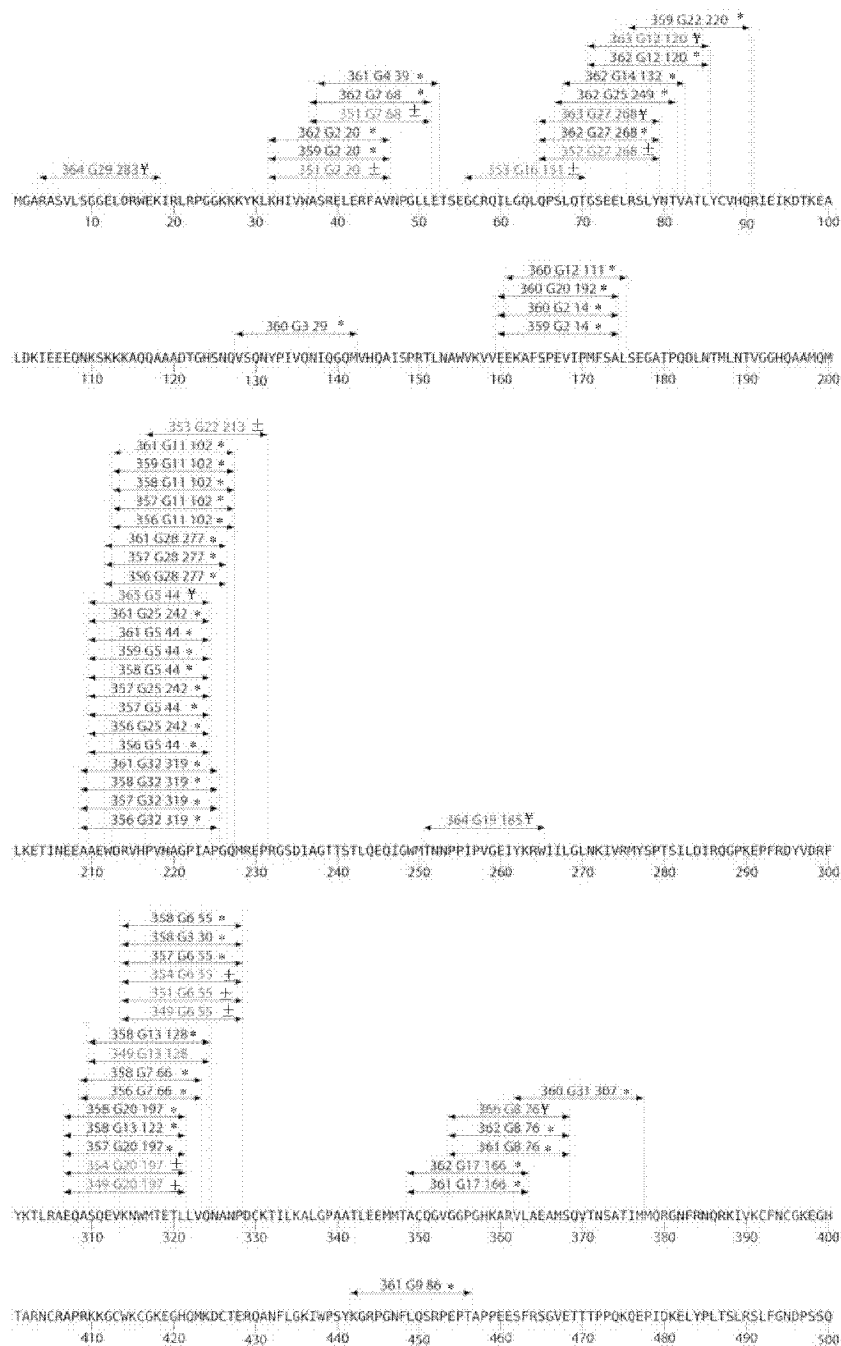


图 7

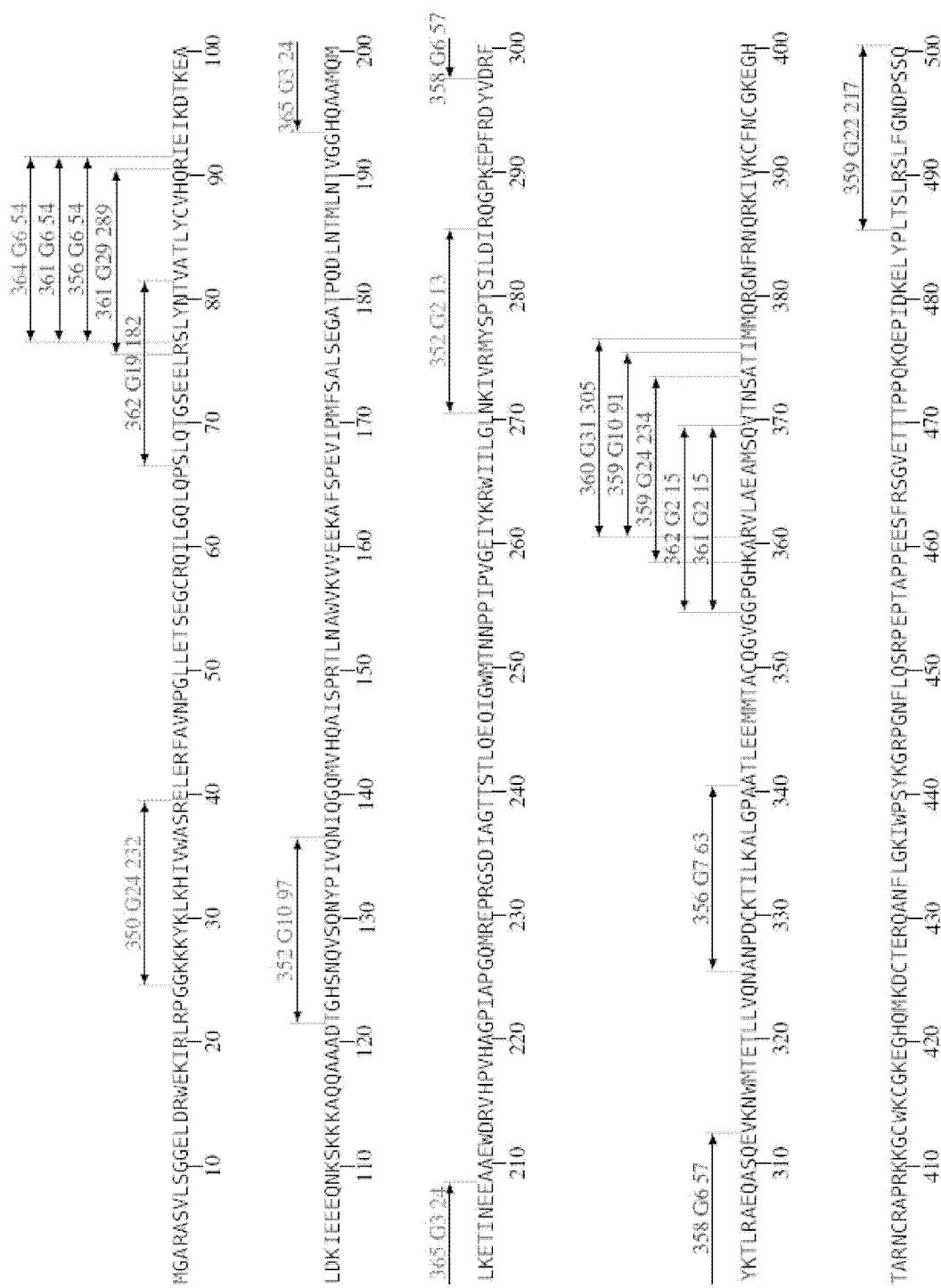


图 8

OptC 366-07:

5 个 CD8 应答:

OptC	IVQQQSNLLRAIEAQQ			
E54	VVQQQSNLLRAIEAQ	Env	548	562
E72	-VQQQNNLLRAIEAQH	Env	549	563

OptC	AVFIHNFKRKGGIGGY			
P22	AVFIHNFKRKGGIGG	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	Pol	895	909

OptC	MAICEEMEKEGKITK			
P224	TAICEEMEKEGKITK	Pol	190	204

OptC	CTHGIKPVVSTQLLL			
E15	CTHGIKPVVSTQLLL	Env	247	261

OptC	GGPSHKARVLAEAMS			
G76	GGPSHKARVLAEAMG	Gag	354	368

1 个 CD4 应答:

OptC	IIGQVRDQAEHLKTA			
P86	LIGQVRDQAEHLKTA	Pol	876	890

图 9

T...A
T...S
A...A
A...T

Mos1 ICTTTPWNASWSNKSIL
Mos2 ICTTAVPWNTSWNSKSQ
E334 ICTTTPWNASWSNR
E214 -CTTTPWNSWSNKT
E158 --TTAVPWNASWSNKSIL
E290 --TTAVPWNTSWNSKSIL

图 10

8 个 CD8 应答：

Mos1	EOLIKKERVYLSWVPAHKGIG
Mos2	EOLIKKERVYLSWVPAHKGIG
P221	EELIKKERVYLSWVPAHKGIG
P250	EPLIKKERVYLSWVPAHKGIG
P316	-KLIKEDRVYLSWVPAHKGIG
P223	--LIKERVYLSWVPAHKGIG
P169	-----EVLVWVPAHKGIG
P83	-----ERVYLSWVPAHKGIG
Mos1	CTHGIRPVVSTQILL
Mos2	CTHGIRPVVSTQILL
E15	CTHGIRPVVSTQILL
E47	CTHGIRPVVSTQILL
Mos1	ICTTVPWNASWSNKS
Mos2	ICTTVPWNASWSNKS
E334	ICTTVPWNASWSNR
E214	-CTTVPWNASWSNKT
E158	--TTAVPWNASWSNKS
E290	--TTAVPWNISWSNKS
Mos1	ACQVGGPGCHKARVLAEMS
Mos2	ACQVGGPGCHKARVLAEMS
G166	ACQVGGPGCHKARVLAEMS
G76	-----GGPGCHKARVLAEMS
Mos1	AAEWDRLHFPVHAGPIAPGQ
Mos2	AAEWDRLHFPVHAGPIAPGQ
G319	AAE--DRLHFPVHAGPIAPGQ
G242	-ADWDRLHFPVHAGPIAPGQ
G44	-AEWDRLHFPVHAGPIAPGQ
G277	---WDRVHFPVHAGPIAPGQ
G102	---DRVHFPVHAGPIAPGQ
Mos1	HSNWRAMASDFNLPP
Mos2	HSNWRAMASDFNLPP
P93	HSNWRAMASDFNLPP
Mos1	KGRPGNFIQNRPEPT
Mos2	KGRPGNFIQNRPEPT
G86	KGRPGNFIQNRPEPT
Mos1	SRELERFAVNPGLLE
Mos2	SRELERFAVNPGLLE
G39	SRELERFAVNPGLLE

5 个 CD4 应答：

Mos1	RSLYNTVATLYCVHQR		
Mos2	RSLYNTVATLYCVHQR		
G289	RSLYNTVATLYCVHQR	76	90
G54	-SLYNTVATLYCVHQR	77	91
Mos1	YVTDGRGQKIVSLTE		
Mos2	YVTDGRGQKIVSLTE		
P134	YVTDGRGQKIVSLTE		612
	626		
Mos1	CTTVPWNASWSNKS		
Mos2	CTTVPWNISWSNKS		
E53	CTTVPWNISWSNKS		604
	618		
Mos1	WAGIQOEFGLIPYNP		
Mos2	WAGIQOEFGLIPYNP		
P135	WAGIQOEFGLIPYNP		846
	860		
Mos1	GGHKKARVLAEMS		
Mos2	GGHKKARVLAEMS		
G15	GGHKKARVLAEMS		355
	369		

图 11

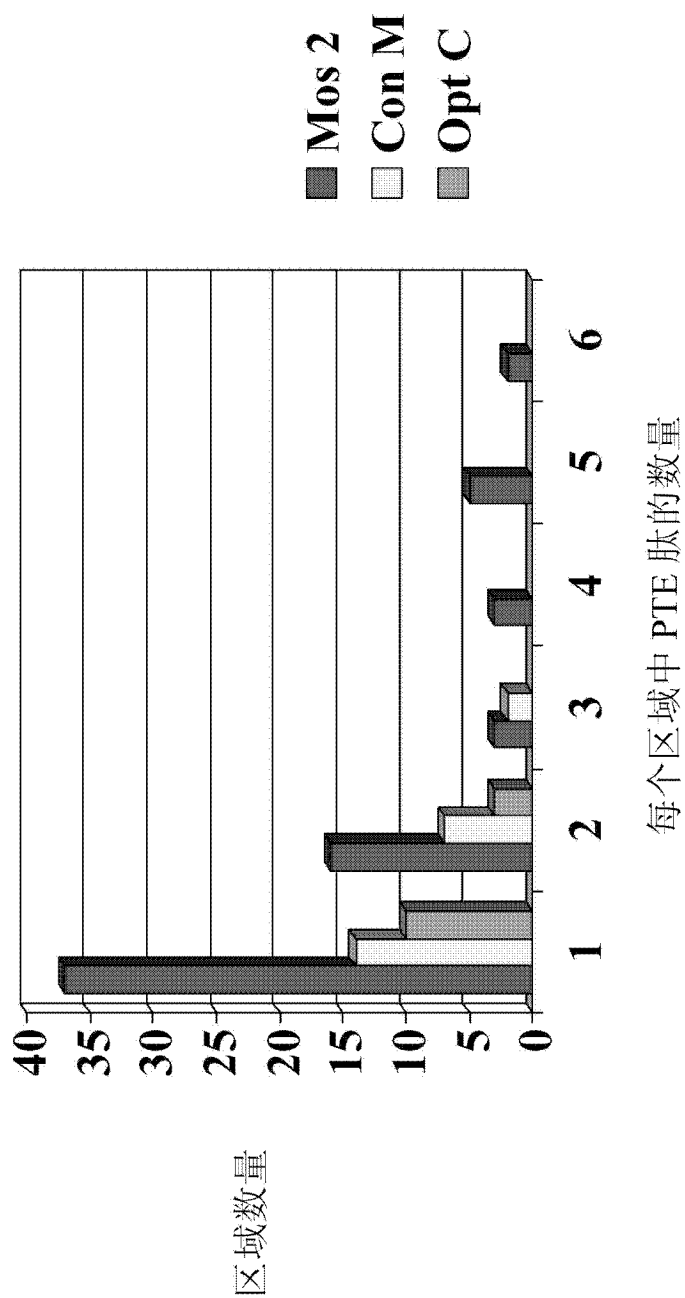
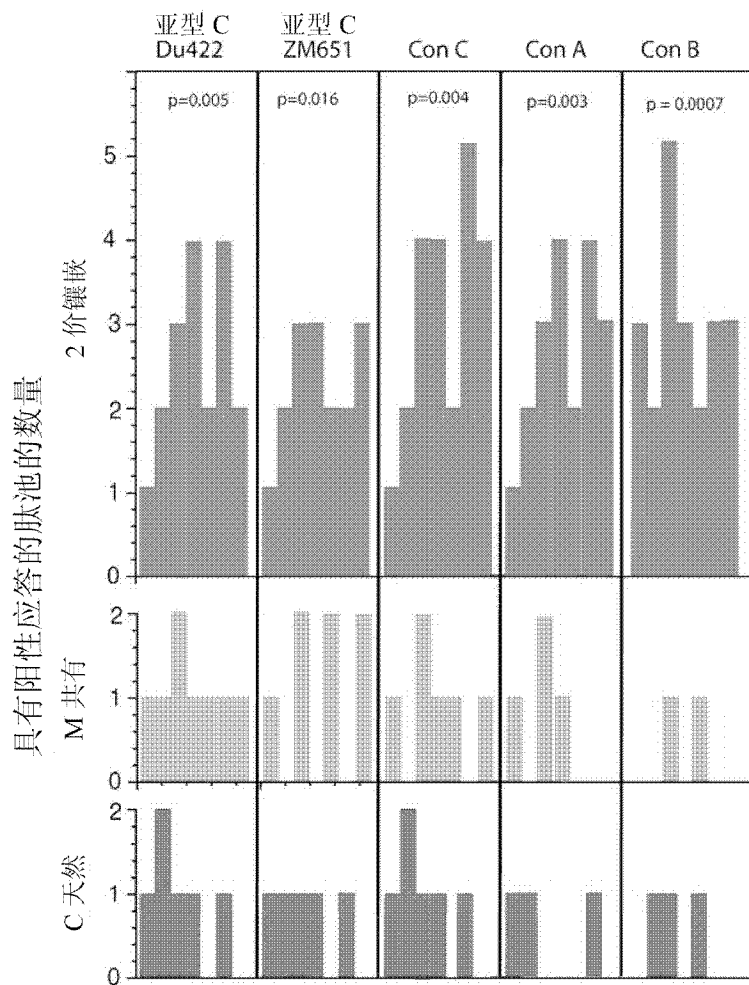


图 12

- CD8 T 细胞： 中位数（范围）
 - 2 个镶嵌： 8 (7-14)
 - Mcon: 3 (0-6)
 - OptC: 1.5 (0-5)
- CD4 T 细胞：
 - 2 个镶嵌： 3 (2-5)
 - Mcon: 1 (0-2)
 - OptC: 0.5 (0-2)

图 14

疫苗组中针对基于 5 个不同 Gag 的阳性肽池的测试应答



每只动物对每组肽的应答

p 值是 Wilcoxon 秩检验，镶嵌 × M 共有

M 共有疫苗和 C 最佳天然疫苗无显著差异。

图 15

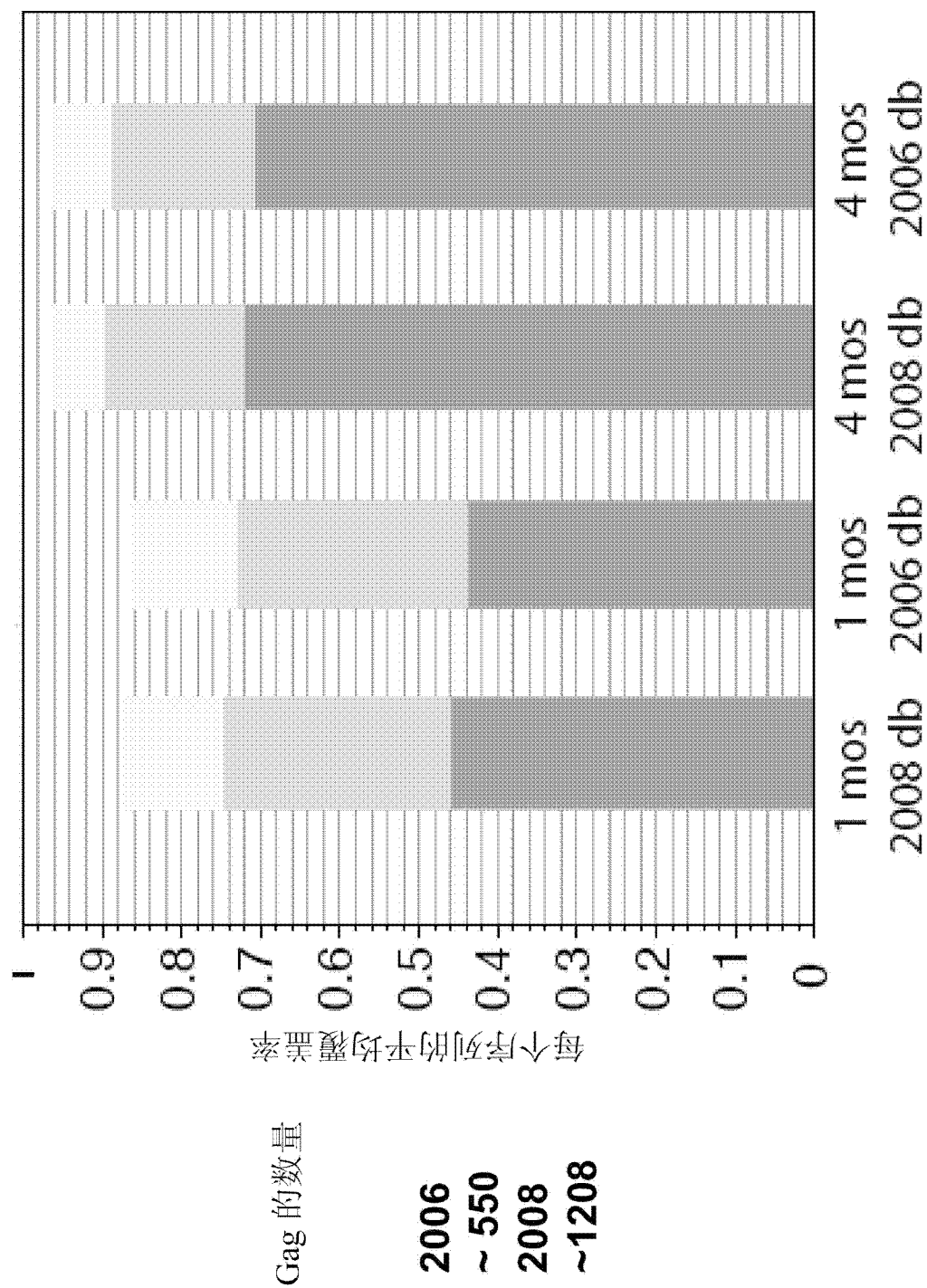


图 16

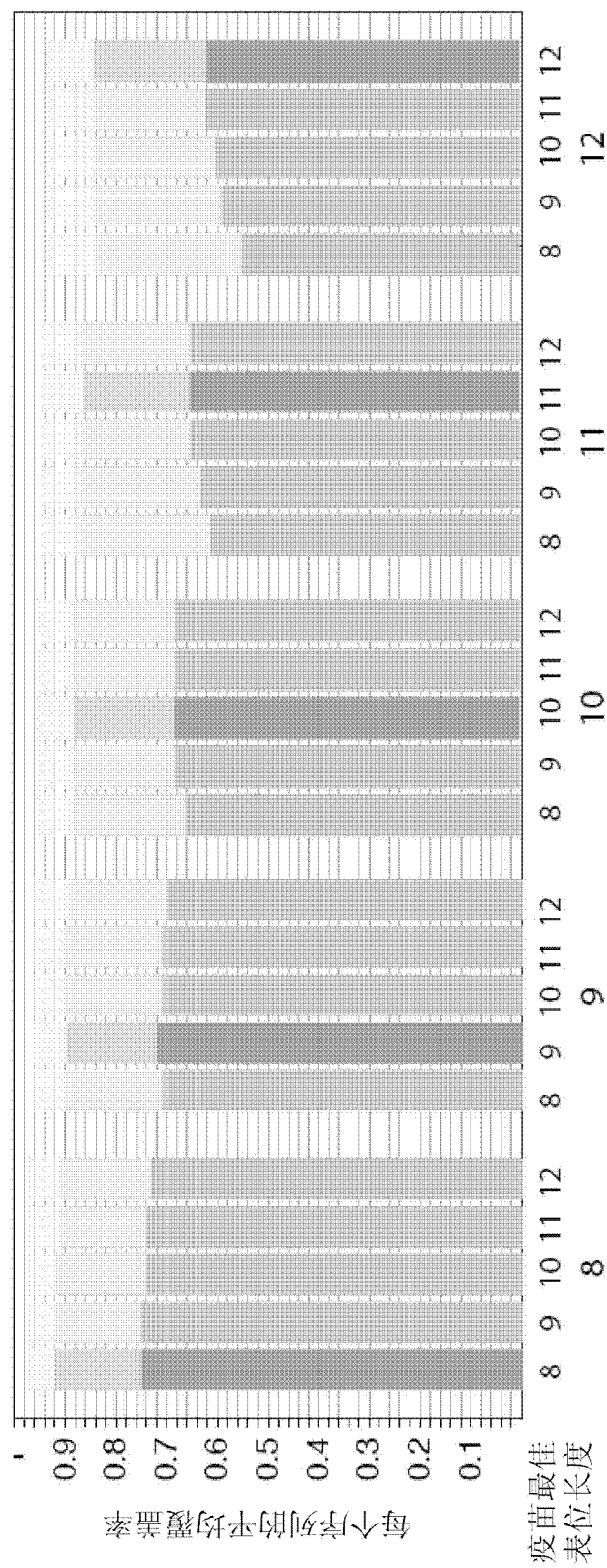


图 17

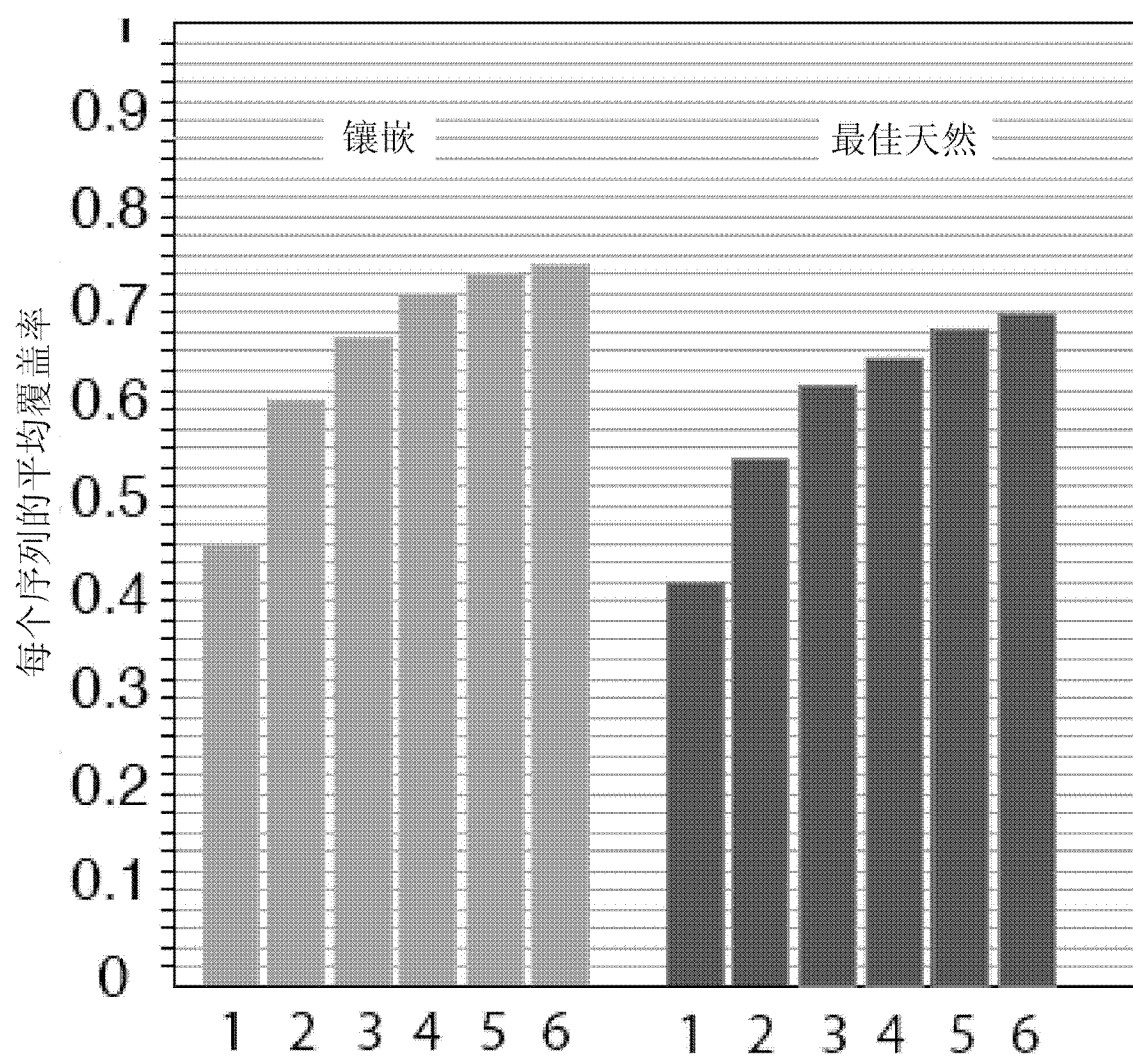


图 18

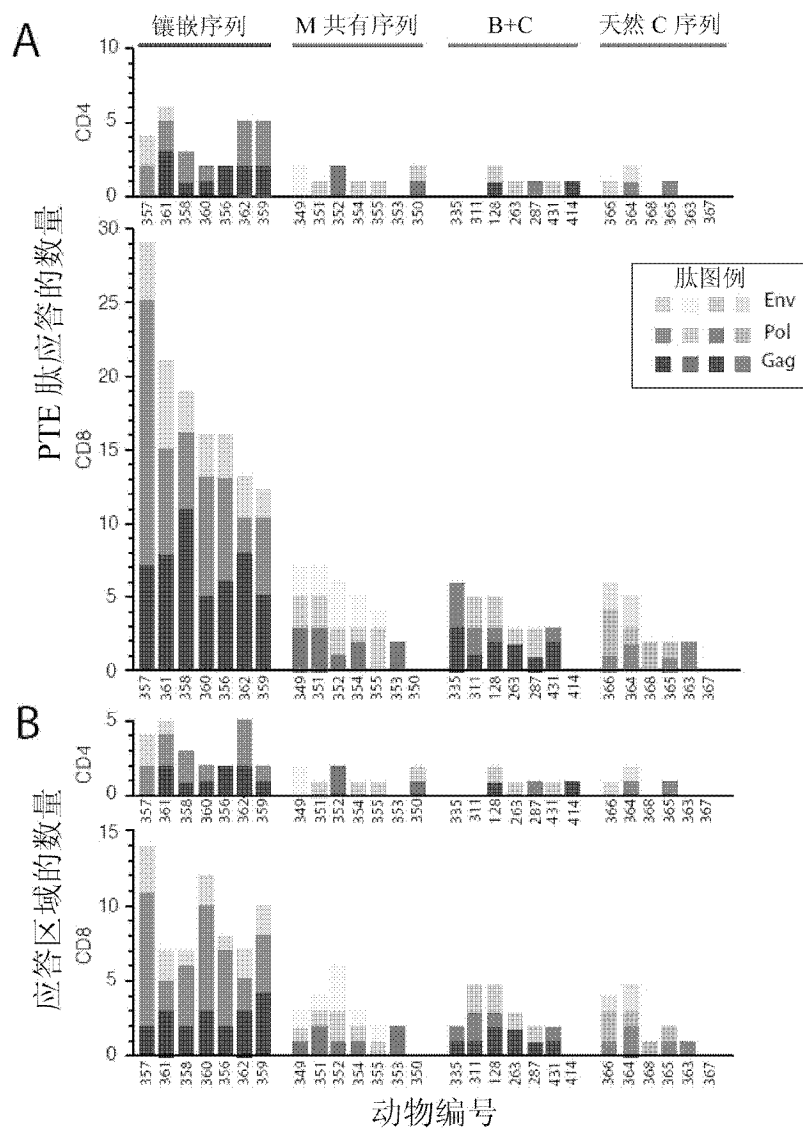


图 19

CD8 Gag

天然 C 序列

M 共有序列

B+C

镶嵌序列

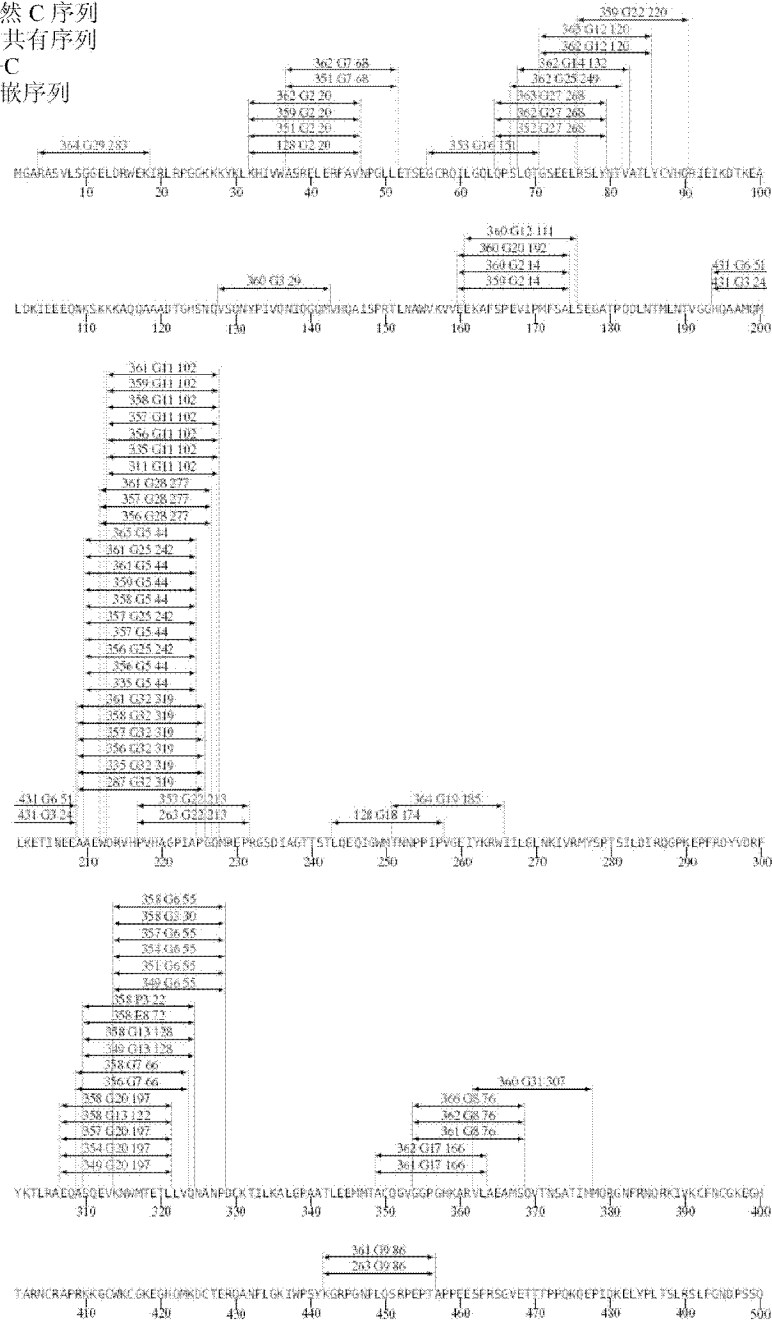


图 20A

CD8 Pol

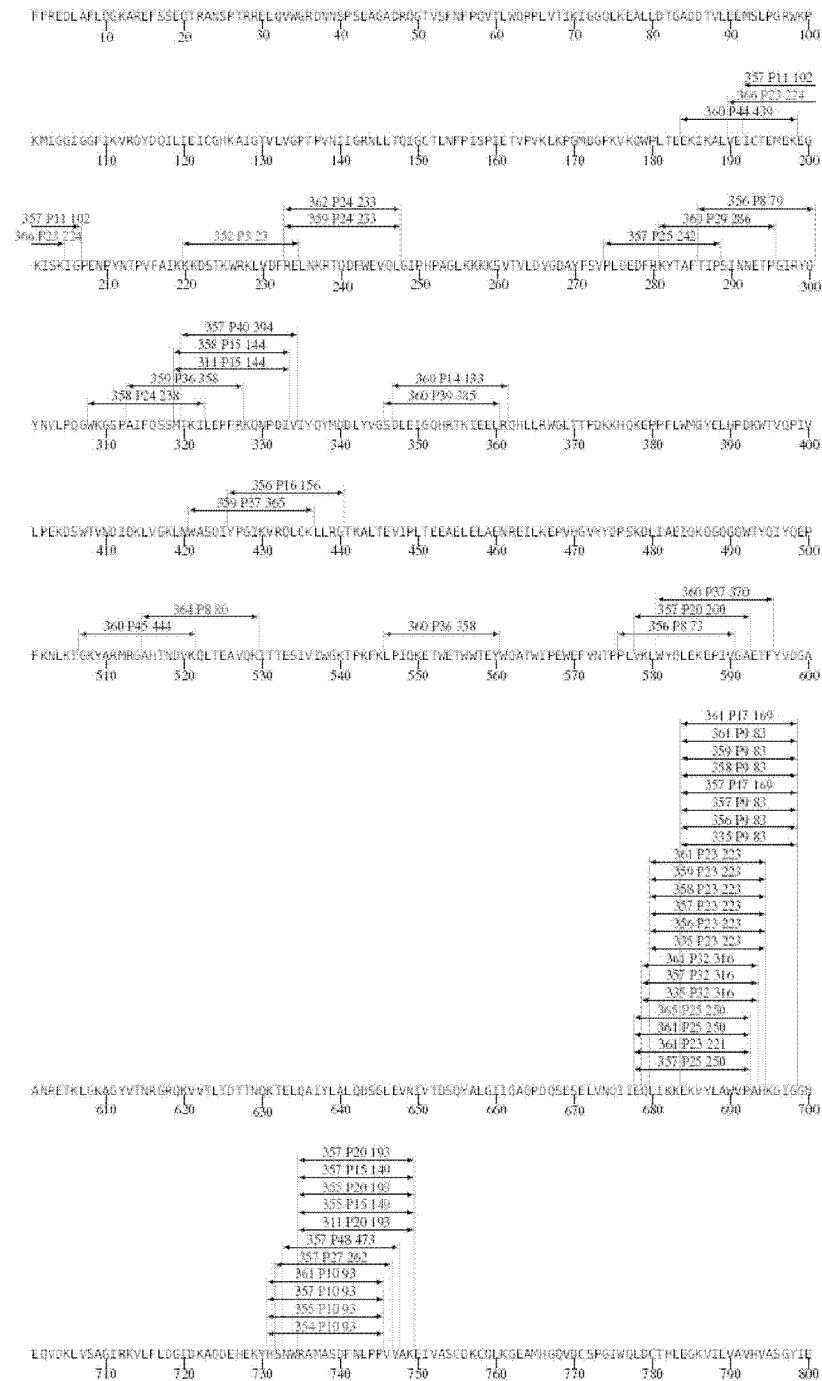


图 20B

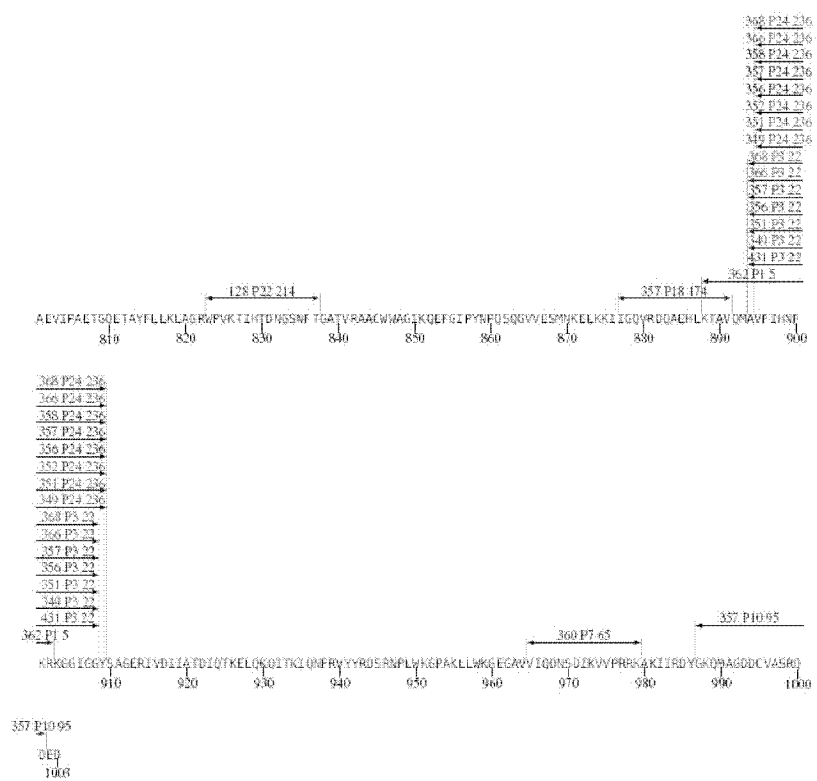


图 20B(续)

CD8 Env

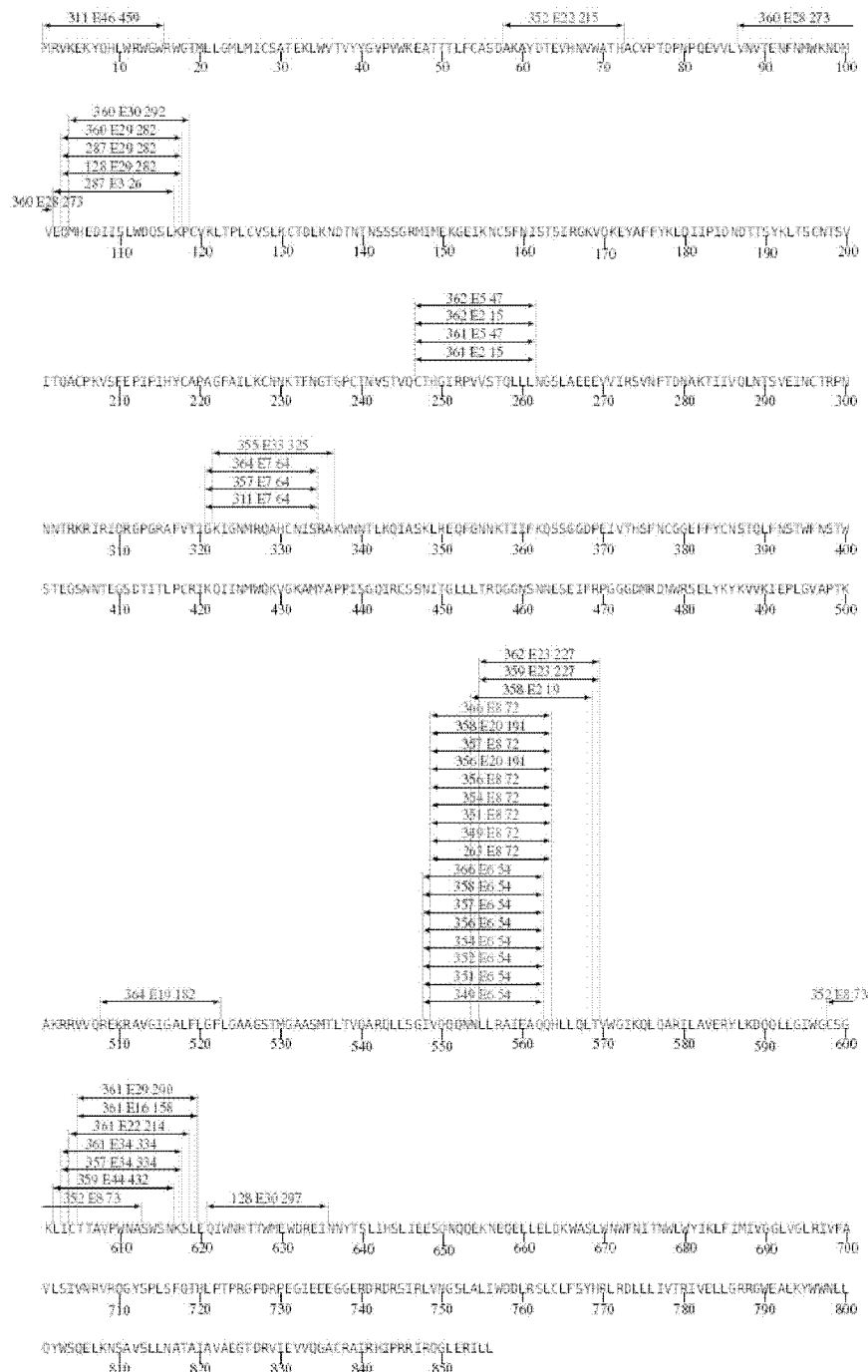


图 20C

CD4 Gag

天然 C 序列

M 共有序列

B+C

镶嵌序列

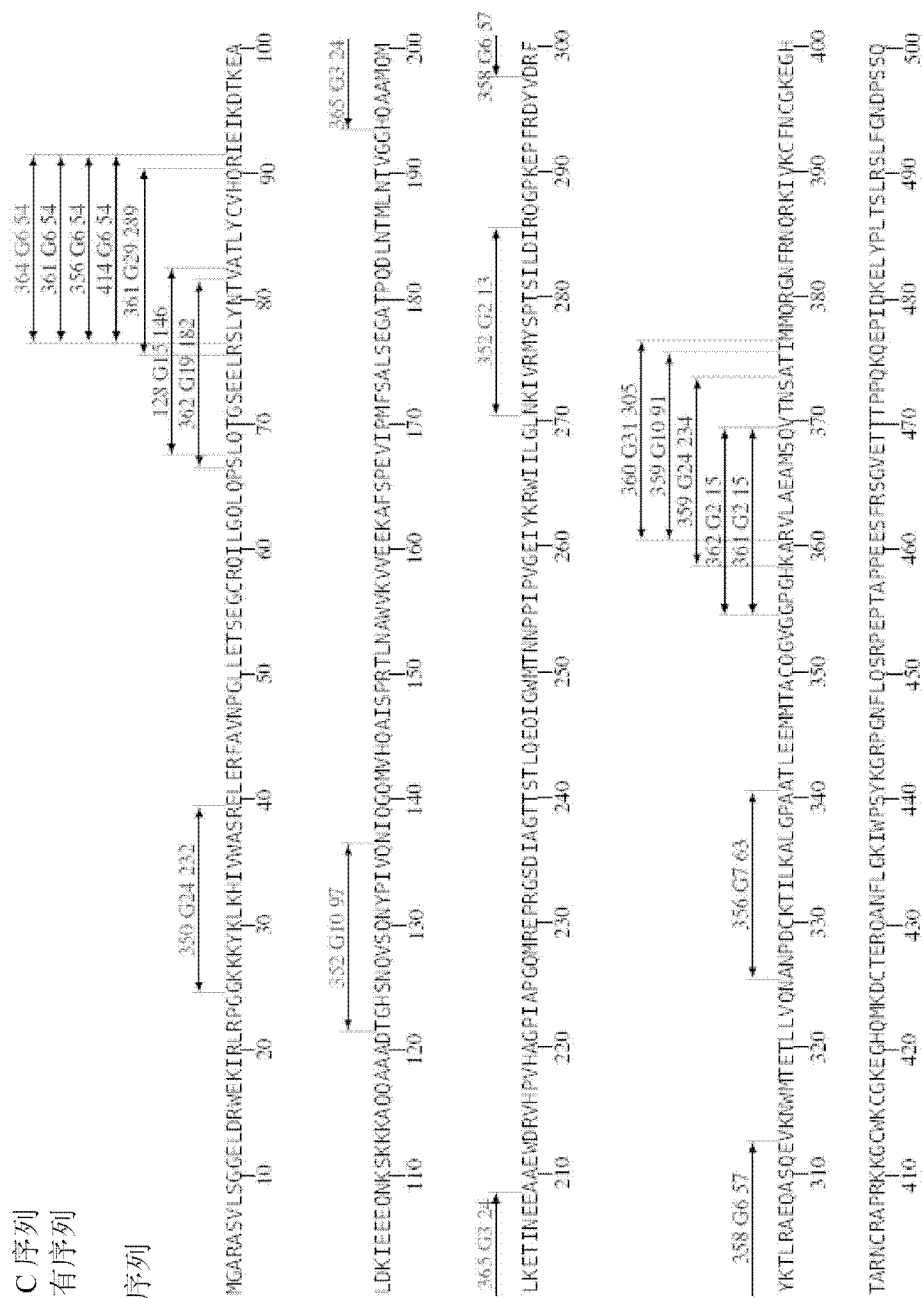


图 21A

CD4 Pol

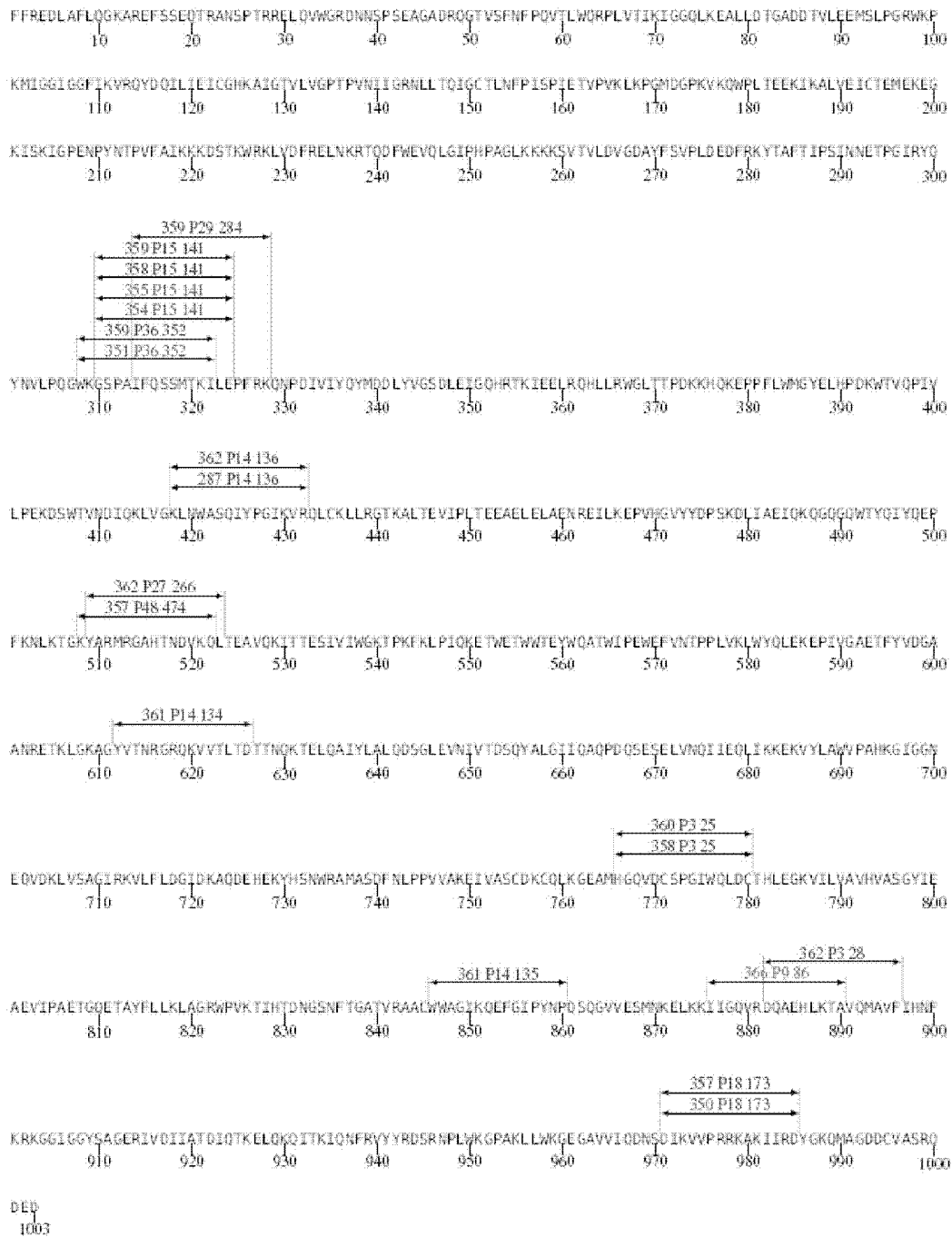


图 21B

CD4 Env

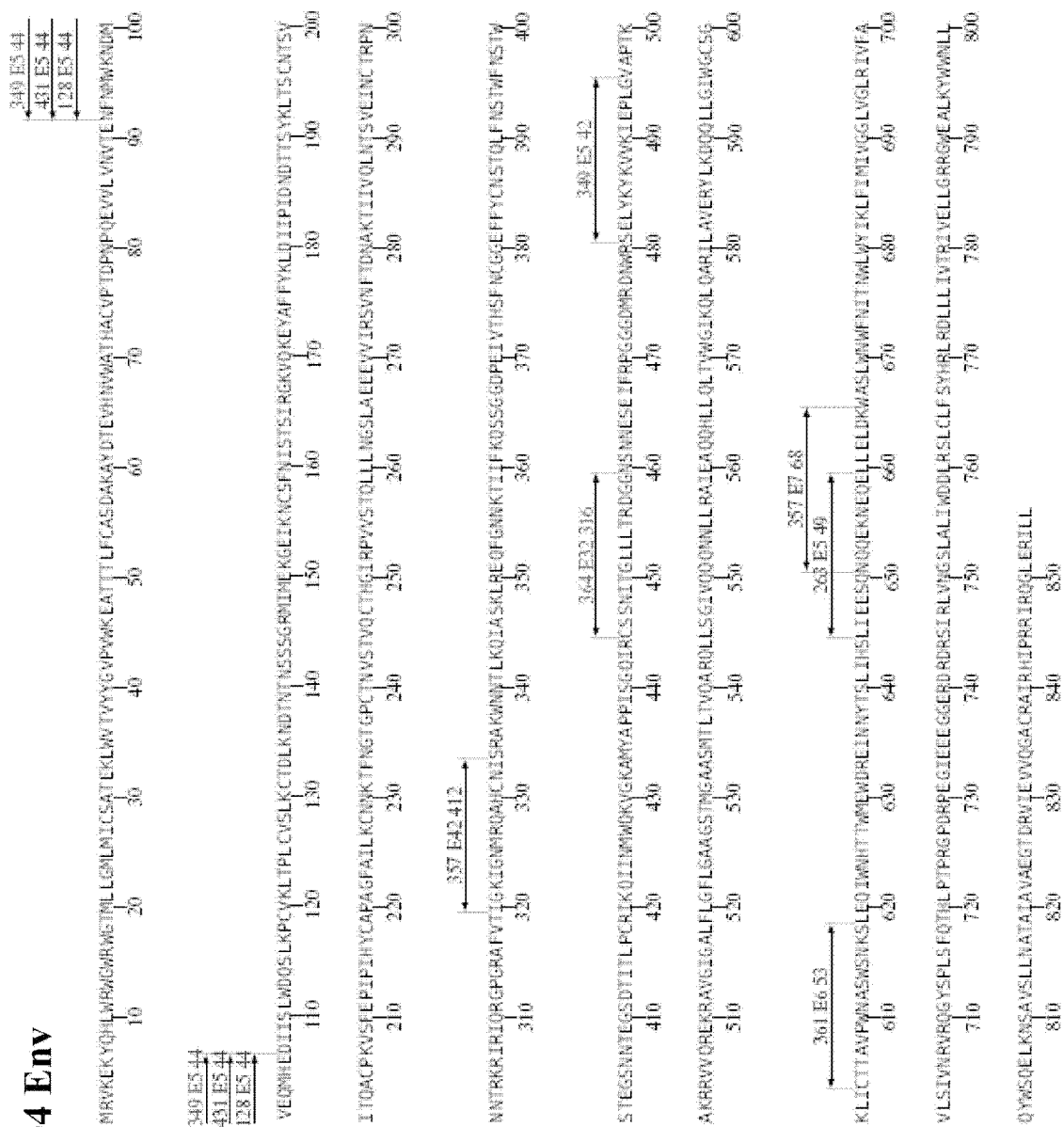


图 21C

活性肽及应答的广度与深度：进化支 B+C 疫苗

进化支 B+C 287-95:

3 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+
2 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 2 CD4: 1

3 CD8 应答:

C AAEWDRLHPVHAGPIA
B AAEWDRLHPVHAGPIA
G319 AAE-DRLHPVHAGPIIP Gag 209 225

C BQMHEIIISLWDQSLK
B BQMHEIIISLWDQSLK
E26 BQMHEIIISLWDQSL Env 102 116
E282 BQMHEIIISLWDESLK Env 103 117

1 CD4 应答:

C KLNWASQIYSGIKVR
B KLNWASQIYPGIKVR
P136 KLNWASQIYAGIKVK Pol 418 432

进化支 B+C 128-92:

5 CD8 PTE+, 2 CD4 PTE+
5 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 1 1 1 1 CD4: 1 1

5 CD8 应答:

C KHLVWASRELERFAL
B KHLVWASRELERFAV
G20 KHLVWASRELERFAL Gag 32 46

C LQEQLAWMTNPPVP
B LQEQLAWMTNPPPIIP
G174 LQEQLAWMTNPPPIIP Gag 243 257

C BQMHEIIISLWDQSLK
B BQMHEIIISLWDQSLK
E282 BQMHEIIISLWDESLK Env 103 117

C DIWDNMTWMQWDREI
B DIWDNMTWMQWDREI
E297 DIWDNMTWMQWDREI Env 621 635

C WPKVIHTANGSNFT
B WPKVIHTANGSNFT
P214 WPKVIHTANGSNFT Pol 823 837

2 CD4 应答:

C AQTGTEELRSLYNTV
B AQTGTEELRSLYNTV
G146 AQTGTEELRSLYNTV Gag 68 82

C YFNMWKNMVDQMHE
B YFNMWKNMVDQMHE
E544 YFNMWKNMVDQMHE Env 92 106

图 22

进化支 B+C 263-00:					
3 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+					
3 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域					
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 1 1 CD4: 1					
3 CD8 应答:					
C	GRPGNFLQSRPEPT				
B	GRPGNFLQSRPEPT				
G86	GRPGNFLQNRPEPT	Gag	442	456	
C	FVHAGPIAPGQMREP				
B	FVHAGPIAPGQMREP				
G213	FVQAGPIAPGQMREP	Gag	217	231	
C	VQQQSNNLLRAIEAQQ				
B	VQQQSNNLLRAIEAQQ				
E72	VQQQSNNLLRAIEAQM	Env	549	563	
1 CD4 应答:					
C	LLEESQNQQEKNEKD				
B	LLEESQNQQEKNEQE				
E49	LLEESQNQQEKNEQD	Env	645	659	

进化支 B+C 311-00:					
5 CD8 PTE+, 0 CD4 PTE+					
5 CD8+ 区域, 0 CD4+ 区域					
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 1 1 1 1 CD4: 0					
5 CD8 应答:					
C	DRLHPVHAGPIAPGQ				
B	DRLHPVHAGPIAPGQ				
G102	DRVHPVHAGPIAPGQ	Gag	213	227	
C	GDIIGDIRQAHCNIS				
B	GDIIGDIRQAHCNIS				
E64	GDIIGDIRQAHCNIS	Env	321	334	
C	TGMLRNCQPWWIWGI				
B	KGIRKNYQHLWRWGT				
E459	KEIRKNYQHLWRWGT	Env	4	18	
C	MTKILEPFRKNPEI				
B	MTKILEPFRKNPDI				
P144	MTKILEPFRKNPDI	Pol	319	333	
C	RAMASEFNLPVVAK				
B	RAMASDFNLPVVAK				
P193	KAMASDFNLPPIVAK	Pol	735	749	

图 22(续)

进化支 B+C 335-96:

6 CD8 PTE+, 0 CD4 PTE+

2 CD8+ 区域, 0 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 3/3 CD4: 0

6 CD8 应答:

C	AAEWDRLEHPVHAGPIAPGQ			
B	AAEWDRLEHPVHAGPIAPGQ			
G319	AAE-DRLHPVHAGPIP	Gag	209	225
G44	AEWDRLEHPVHAGPIA	Gag	210	224
G102	DRVHPVHAGPIAPGQ	Gag	213	227

C	QLINKERVYLSWVPAHKGIG			
B	QLIKKERVYLSWVPAHKGIG			
P316	KLIEKDKVYLSWVPA	Pol	679	693
P223	LIKKEERVYLSWVPAH	Pol	680	694
P83	EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698

进化支 B+C 414-95:

0 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+

0 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 0 CD4: 1

1 CD4 应答:

C	SLYNTVATLYCVHAG			
B	SLYNTVATLYCVHQK			
G54	SLYNTVATLYCVHQK	Gag	77	91

进化支 B+C 431-01:

3 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+

2 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2/1 CD4: 1

3 CD8 应答:

C	HQAAMQMLKDTINEE			
B	HQAAMQMLKETINEE			
G24	HQAAMQMLKDTINEE	Gag	194	208
G51	HQAAMQMLKETINEE	Gag	194	208

C	AVFIHNFKRKGGIGG			
B	AVFIHNFKRKGGIGG			
P22	AVFIHNFKRKGGIGG	Pol	894	908

1 CD4 应答:

C	YFNMWKNDMVDQMHE			
B	NFNMWKNNMVEQMHE			
E44	NFNMWKNNMVEQMHE	Env	92	106

图 22(续)

活性肽及应答的广度与深度：M 共有疫苗

M 共有序列 349-07:

7 CD8 PTE+, 2 CD4 PTE+

3 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 3 2 2 CD4: 1 1

3 CD8 应答:

Moon EQATQDVKNWMTDTLLVQNANP

G197 EQSTQGEVKNWMTDTL Gag 307 321

G128 ---TQDVKNWMTDTLLIQ Gag 310 324

G55 -----KNWMTDTLLVQNANP Gag 314 328

Moon IVQQQSNLLRAIEAQQ

E54 VVQQQSNLLRAIEAQ Env 548 562

E72 -VQQQSNLLRAIEAQH Env 549 563

Moon AVFIHNFKRKGGIGGY

P22 AVFIHNFKRKGGIGG Pol 894 908

P236 -VLIHNFKRKGGIGGY Pol 895 909

2 CD4 应答:

Moon SELYKYKVVKIEPLG

E42 SELYKYKVVKIEPLG Env 481 495

Moon NFNMWKNMVEQMHE

E44 NFNMWKNMVEQMHE Env 92 106

M 共有序列 350-07:

0 CD8 PTE+, 2 CD4 PTE+

0 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: none CD4: 1 1

2 CD4 应答:

Moon GKKKYRLKHLVWASR

G232 GRKKYRLKHIVWASR Gag 25 39

Moon DIKVVPRRKAKIIRD

P173 DIKVVPRRKVKIIRD Pol 971 985

M 共有序列 351-07:

7 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+

4 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2 2 2 1 CD4: 1

图 22(续)

4 CD8 应答:

Mocon	KHLVWASRELERFALNPGLL			
G20	KHLVWASRELERFAL	Gag	32	46
G68	-----ASRELERFAVNPGLL	Gag	37	5
Mocon	IVQQQSNNLLRAIEAQ			
E6	VVQQQSNNLLRAIEAQ	Env	548	562
E8	-VQQQNNLLRAIEAQH	Env	549	563
Mocon	AVFIHNFKRKGIGGY			
P22	AVFIHNFKRKGIGG	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGIGGY	Pol	895	909
Mocon	KNWMTDTLLVQNANP			
G55	KNWMTDTLLVQNANP	Gag	314	328

1 CD4 应答:

Mocon	WKGSPAIFQSSMTKI			
P352	WKGSPAIFQASMTKI	Pol	308	322

M 共有序列 352-07:

6 CD8 PTE+, 2 CD4 PTE+
 6 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域
 每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 1 1 1 1 1 CD4: 1

6 CD8 应答:

Mocon	QPALQTGSEELRSLY			
G268	LPALKTGSEELRSLY	Gag	65	79
Mocon	IVQQQSNNLLRAIEAQ			
E54	VVQQQSNNLLRAIEAQ	Env	548	562
Mocon	CSGKLICTTTVPWNS			
E73	CSGKLICTTAVPWNS	Env	598	612
Mocon	AKAYDTEVHNVWATH			
E315	AKAYEKEVHNVWATH	Env	58	72
Mocon	KKDSTKWRKLVDFRE			
P23	KKDSTKWRKLVDFRE	Pol	220	234
Mocon	VFIHNFKRKGIGGY			
P236	VLIHNFKRKGIGGY	Pol	895	909

2 CD4 应答:

Mocon	NKIVRMYSFVSILDI			
G13	NKIVRMYSFVSILDI	Gag	271	285
Mocon	KGNSSKVSQNYPIVQ			
G97	FGNSSQVSQNYPIVQ	Gag	122	136

图 22(续)

M 共有序列 **353-07:**
 2 CD8⁺ PTE+, 0 CD4⁺ PTE+
 2 CD8⁺ 区域, 0 CD4⁺ 区域
 每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 1 CD4: none

2 CD8 应答:
 Mcon **GCKQIIGQLQPALQT**
 G151 GCRQILGQLQPSLQT Gag 56 70

Mcon **FVHAGPIPPGQMREP**
 G213 FVQAGPIAPGQMREP Gag 217 231

M 共有序列 **354-07:**
 5 CD8⁺ PTE+, 1 CD4⁺ PTE+
 3 CD8⁺ 区域, 1 CD4⁺ 区域
 每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2 2 1 CD4: 1

3 CD8 应答:
 Mcon **EQATQDEVKNWMTDTLLVQNANP**
 G197 EQSTQDEVKNWMTDTL Gag 307 321
 G55 -----KNWMTDTLLVQNANP Gag 314 328

Mcon **IVQQQSNLLRAIEAQQ**
 E54 VVQQQSNLLRAIEAQ Env 548 562
 E72 -VQQQSNLLRAIEAQH Env 549 563

Mcon **HSNWRAMASDFNLPP**
 P93 HSNWRAMASDFNLPP Pol 731 745

1 CD4 应答:
 Mcon **GSPAIFQSSMTKILE**
 P141 GSPAIFQSSMTKILD Pol 310 324

M 共有序列 **355-07:**
 3 CD8⁺ PTE+, 1 CD4⁺ PTE+
 2 CD8⁺ 区域, 1 CD4⁺ 区域
 每个区域中重叠肽的数量: CD8: 1 3 CD4: 1

2 CD8 应答:
 Mcon **IIGDIRQAHCNISGT**
 E325 IIGDIRQAHCNVSR\$ Env 322 336

Mcon **SNWRAMASDFNLPPIVAK**
 P93 SNWRAMASDFNLPP Pol 731 745
 P149 ---RTMASDFNLPPVAK Pol 735 749
 P193 ---KAMASDFNLPPIVAK Pol 735 749

1 CD4 应答:
 Mcon **GSPAIFQSSMTKILE**
 P141 GSPAIFQSSMTKILD Pol 310 324

图 22(续)

活性肽及应答的广度与深度：镶嵌疫苗

镶嵌序列**356-07**:

15 CD8⁺ PTE+, 2 CD4⁺ PTE+

8 CD8⁺ 区域, 2 CD4⁺ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 5 3 1 2 1 1 1 2 CD4: 1 1

8 CD8 应答:

Mos1	AAEWDRVHFPVHAGPIAPGQ			
Mos2	AAEWDRLHPVHAGPVAPGQ			
G319	AAE-DRLHPVHAGPIP	Gag	209	225
G44	-AEWDRLHPVHAGPIA	Gag	210	224
G242	-ADWDRLHPVHAGPVA	Gag	210	224
G277	---WDRVHFPVHAGFNPPG	Gag	212	226
G102	----DRVHFPVHAGPIPPGQ	Gag	213	227

Mos1	IVQQQNNLLRAIEAQQ			
Mos2	IVQQQSNLLRAIEAQQ			
E54	VVQQQSNLLRAIEAQ	Env	548	562
E72	-VQQQNNLLRAIEAQ#	Env	549	563
E191	-VQQQSNLLRAIEAQQ	Env	549	563

Mos1	ASQDVKNWMTETLLV			
Mos2	ATQDVKNWMTDTLLV			
G66	ASQEVKNWMTETLLV	Gag	309	323

Mos1	AVFIHNFKRKGGIGGY			
Mos2	AVFIHNFKRKGGIGGY			
P22	AVFIHNFKRKGGIGG	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	Pol	895	909

Mos1	PLVKLWYQLEKDPIA			
Mos2	PLVKLWYQLEKEPIV			

P73	PLVKLWYQLEKEPIV	Pol	576	590
-----	-----------------	-----	-----	-----

Mos1	TIPSTNNETPGIRYQ			
Mos2	TIPSTNNETPGIRYQ			
P79	TIPSTNNETPGIRYQ	Pol	286	300

Mos1	YFGIKVRQLCKLLRG			
Mos2	YAGIKVRQLCKLLRG			
P156	YFGIKVRQLCKLLRG	Pol	426	440

Mos1	LIKKERVYLSWVPAHKGIG			
Mos2	LIKKEKVYLAWVPAHKGIG			
P223	LIKKERVYLSWVPAH	Pol	680	694
P83	----EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698

2 CD4 应答:

Mos1	SLYNTVATLYCVHQ#R			
Mos2	SLYNTVATLYCVHAE			
G54	SLYNTVATLYCVHQ#R	Gag	77	91

Mos1	ANPDCKTILKALGPA			
Mos2	ANPDCKTILRALGPG			
G63	ANPDCKTILRALGPG	Gag	326	340

图 22(续)

镶嵌序列 357-07:

29 CD8 PTE+, 4 CD4 PTE+

14 CD8+ 区域, 4 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽的数量: CD8: 5 5 2 5 5 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 CD4: 1 1 1 1

14 CD8 应答:

Mos1	EQLIKKERVYLSWVPAHKGIG			
Mos2	EQLIKKERVYLSWVPAHKGIG			
P250	EFLIKKERVYLSWVPAHKGIG	Pol	678	692
P316	--KLIKEDKRVYLSWVPAHKGIG	Pol	679	693
P223	--LIKKERVYLSWVPAHKGIG	Pol	680	694
P189	-----EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698
P83	-----EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698
Mos1	IVQQQNNLLRAIEAQQ			
Mos2	IVQQQNNLLRAIEAQQ			
E54	IVQQQNNLLRAIEAQQ	Env	548	562
E72	-VQQQNNLLRAIEAQQ	Env	549	563
Mos1	EQASQDVKNWMTETLLVQNANP			
Mos2	EQATQDVKNWMTETLLVQNANP			
G197	EQSTQEVKNWMTETLLVQNANP	Gag	307	321
G55	-----KNWMTETLLVQNANP	Gag	314	328
Mos1	HSNWRAMASDFNLPPVIAK			
Mos2	HSNWRAMASEFNLPPVIAK			
P93	HSNWRAMASDFNLPPVIAK	Pol	731	745
P262	--SNWRAMASEFNLPPVIAK	Pol	732	746
P473	--NWRMTASDFNLPPVIAK	Pol	733	747
P149	----RTMASDFNLPPVIAK	Pol	735	749
P193	----KAMASDFNLPPVIAK	Pol	735	749
Mos1	AEWDRVHPVHAGPIAPGQ			
Mos2	AEWDRLHPVHAGPIAPGQ			
G319	AEEDRLHPVHAGPIAPGQ	Gag	209	225
G242	ADWDRLHPVHAGPIAPGQ	Gag	210	224
G44	AEWDRLHPVHAGPIAPGQ	Gag	210	224
G277	--WDRVHPVHAGPIAPGQ	Gag	212	226
G102	---DRVHPVHAGPIAPGQ	Gag	213	227
Mos1	AVFIHNFKRKGGIGGY			
Mos2	AVFIHNFKRKGGIGGY			
P22	AVFIHNFKRKGGIGGY	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	Pol	895	909
Mos1	PLDEGFRKYTAFTIP			
Mos2	PLDEDFRKYTAFTIP			
P242	PLDESFRKYTAFTIP	Pol	274	288
Mos1	TRILEPFRKNPEIV			
Mos2	TKILEPFRKNPEIV			
P394	TKILEPFRKNPEIV	Pol	320	334
Mos1	ICEEMEKEGKISKIG			
Mos2	ICTEMEKEGKISKIG			
P102	ICTEMEKEGKISKIG	Pol	192	206
Mos1	VKLWYQLEKDPVGA			
Mos2	VKLWYQLEKDPVGA			
P200	VKLWYQLEKDPVGA	Pol	578	592
Mos1	GDIIGDIRQAHCNIS			
Mos2	GDIIGDIRQAHCNIS			
E764	GDIIGDIRQAHCNIS	Env	331	334
Mos1	ICTTTVPWNASWSNK			
Mos2	ICTTAVPWNASWSNK			
E334	ICTTTVPWNASWSNK	Env	603	617

图 22(续)

Mos1	IGQVRDQAEHLKTAV			
Mos2	IGQVRDQAEHLKTAV			
E174	IGQVREQAEHLKTAV	Pol	877	891
Mos1	GKQMAGADCVAQRQD			
Mos2	GKQMAGDDCVASRQD			
P95	GKQMAGDDCVASRQD	Pol	987	1001
4 CD4 应答:				
Mos1	KYAKMRTAHTNDVKQ			
Mos2	KYARMRGAHTNDVKQ			
E474	KYAKMRTAHTNDVRQ	Pol	508	522
Mos1	AGDIIIGDIRQAHENI			
Mos2	TGDIIGDIRQAHENI			
E412	TGSEIIGDIRQAHENI	Env	320	333
Mos1	NQQEKNEKDLLALDS			
Mos2	NQQEKNEQELLELDK			
E68	NQQEKNEQDLLALDK	Env	651	665
Mos1	DIKVVPRRKVKIIRD			
Mos2	DIKVVPRRKAKIIRD			
P173	DIKVVPRRKVKIIRD	Pol	971	985
镶嵌序列 358-07:				
19 CD8 FTE+, 3 CD4 FTE+				
7 CD8+ 区域, 3 CD4+ 区域				
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 3 4 2 6 3 1 1 CD4: 1 1 1				
7 CD8 应答:				
Mos1	LIKKERVYLSWVPAHKGIG			
Mos2	LIKKERVYLSWVPAHKGIG			
P223	LIKKERVYLSWVPAH	Pol	680	694
P83	----EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698
Mos1	IVQQQNLLRAIEAQQHLLQL			
Mos2	IVQQQSLLRAIEAQQHMLQL			
E54	IVQQQSLLRAIEAQ	Env	548	562
E191	-VQQQSLLRAIEAQQ	Env	549	563
E72	-VQQQNLLRAIEAQH	Env	549	563
E19	-----NLLRAIEAQHLLQL	Env	554	568
Mos1	AVFIHNFRRKGGIGGY			
Mos2	AVFIHNFRRKGGIGGY			

图 22(续)

P222	AVFIHNFKRKGGIGG	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	Pol	895	909
Mos1	EQASQDVKNWMTETLLVQNANP			
Mos2	EQATQDVKNWMTDTLLVQNANP			
G122	EQASQDVKNWMTETL	Gag	307	321
G197	EQSTQEVKNWMTDTL	Gag	307	321
G66	--ASQEVKNWMTETLLI	Gag	309	323
G128	---TQDVKNWMTDTLLIQ	Gag	310	324
G30	-----KNWMTETLLVQNANP	Gag	314	328
G55	-----KNWMTDTLLVQNANP	Gag	314	328
Mos1	AEWDRVHPVHAGPIAPGQ			
Mos2	AEWDRLHPVHAGPVAPGQ			
G319	AAEDRLHPVHAGEIP	Gag	209	225
G44	AEWDRLHPVHAGPIA	Gag	210	224
G11	---DRVHPVHAGPIPPGQ	Gag	213	227
Mos1	WKGSPAIFQCSMTRI			
Mos2	WKGSPAIFQSSMTKI			
P238	WKGSPAIFQCSMTKI	Pol	308	322
Mos1	MTRILEPFRKNPEI			
Mos2	MTKILEPFRKNPDI			
P144	MTKILEPFRKNPDI	Pol	319	333
3 CD4 应答:				
Mos1	GSPAIFQCSMTRILE			
Mos2	GSPAIFQSSMTKILE			
P141	GSPAIFQSSMTKILD	Pol	310	324
Mos1	HGQVDCSPGIWQLAC			
Mos2	HGQVDCSPGIWQLAC			
P25	HGQVDCSPGIWQLDC	Pol	766	780
Mos1	DRFYKTLRAEQASQD			
Mos2	DRFFKTLRAEQATQD			
G57	DRFYKTLRAEQASQE	Gag	298	312
镶嵌序列 359-07:				
12 CD8 PTE+, 5 CD4 PTE+				
10 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域				
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 CD4: 3 2				
10 CD8 应答:				
Mos1	LIKKERVYLSWVFAHKGIG			

图 22(续)

Mos2	LIKKEEVLAWVFAHKGIG			
P223	LIKKEEVLAWVFAH	Pol	680	694
P83	----EKVYLSWVFAHKGIG	Pol	684	698
Mos1	AEWDRVHPVHAGPIAPGQ			
Mos2	AEWDRHHPVHAGFVAPGQ			
G44	AEWDRHHPVHAGPIA	Gag	210	224
G102	---DRVHPVHAGPIAPGQ	Gag	213	227
Mos1	AIFQCSMTRILEPFR			
Mos2	AIFQSSMTKILEPFR			
P358	AIFQSSMTRILEPFR	Pol	313	327
Mos1	ASQIYPGKVRQLCK			
Mos2	ASQIYAGIKVRQLCK			
P365	WSQIYAGIKVRQLCK	Pol	421	436
Mos1	RELNRRTQDFWEVQL			
Mos2	RELNRRTQDFWEVQL			
P233	RELNRRTQDFWEVQL	Pol	233	247
Mos1	LLRAIEAQQHLLQLT			
Mos2	LLRAIEAQQHMLQLT			
E227	LLMAIEAQQHLLQLT	Env	555	569
Mos1	LICTTTVPWNASWSN			
Mos2	LICTTAVFWNTSWSN			
E432	BICTTNVFWNASWSN	Env	602	616
Mos1	KHIVWASRELERFAV			
Mos2	KHLVWASRELERFAL			
G20	KHLVWASRELERFAL	Gag	32	46
Mos1	RSLYNTVATLYCVHQ			
Mos2	RSLENTVATLYCVHA			
G220	MSLYNTVAVLYCVHQ	Gag	76	90
Mos1	EKAFSPFVPMFSA			
Mos2	EKAFSPFVPMFTA			
G14	EKAFSPFVPMFSA	Gag	160	174
2 CD4 应答:				
Mos1	WKGSPAIFQCSMTRILEPFR			
Mos2	WKGSPAIFQSSMTKILEPFR			
P352	WKGSPAIFQASMTKI	Pol	308	322
P141	--GSPAIFQSSMTKILD	Pol	310	324

图 22(续)

```

P284 -----IFQCSMTKILEPFRA      Pol      314

Mos1  KARVLAEAMSQVTSAT
Mos2  KARVLAEAMSQVTSIL
G234  KARVLAEAMSQVQQT      Gag      359      373
G91   --RVLAEAMSQVTSAT      Gag      361      375

```

镶嵌序列 360-07:
 16 CD8 PTE+, 2 CD4 PTE+
 12 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域
 每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2 2 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 CD4: 1 1

12 CD8 应答:

```

Mos1  SDLEIGQHRAKIEELR
Mos2  SDLEIGQHRTKIEELR
P385  SDLEIGQHRKIEEL      Pol      346      360
P133  -DLEIGQHRAKIEELR    Pol      347      361

Mos1  QMHEDIISLWDQSLKP
Mos2  QMHEDIIRLWDQSLKP
E282  QMHEDIISLWDESLK      Env      103      117
E292  -MHEDVISLWDQSLKP    Env      104      118

Mos1  EEKAFSPEVIPMFSA
Mos2  EEKAFSPEVIPMTAL
G14   EEKAFSPEVIPMFSA      Gag      160      174
G192  EEKGFNPEVIPMFSA      Gag      160      174
G111  -EKGFSPPEVIPMTAL    Gag      161      175

Mos1  KYTAF TIPSTNNETP
Mos2  KYTAF TIP SINNETP
P286  KYTAF TIPSTNNETP      Pol      281      295

Mos1  EKIKALTAICEEMEK
Mos2  EKIKALVEICTEMEK
P439  EKIEALTAICEEMEK      Pol      184      198

Mos1  GKYAKMRTAHTNDVK
Mos2  GKYARMRGHTNDVK
P444  GKYARMRGHTNDVR      Pol      507      521

Mos1  LPIQKETWETWTDY
Mos2  LPIQKETWEAWWTEY
P358  LPIQKETWEAWWTEY      Pol      546      560

Mos1  WYQLEKDPAGVETF

```

图 22(续)

Mos2	WYQLEKEPIVGAETF			
P370	WYQLEKDPVGAETF	Pol	581	595
Mos1	ENVTFENFMWKNNMV			
Mos2	ENVTFENFMWKNDMV			
E273	ENVTFENFMWKNNMV	Env	87	101
Mos1	VIQDNSDIKVVPRRK			
Mos2	VIQDNSDIKVVPRRK			
P765	VIQDNSDIKVVPRRK	Pol	965	979
Mos1	VSQNYPIVQNIQGQM			
Mos2	VSQNYPIVQNLQGQM			
G29	VSQNYPIVQNLQGQM	Gag	128	142
Mos1	VLAEAMSQVTNSATIM			
Mos2	VLAEAMSQ-TNSTILM			
G307	VLAEAMSQ-AQQTNIM	Gag	362	377
2 CD4 应答:				
Mos1	HGQVDCSPGIWQLAC			
Mos2	HGQVDCSPGIWQLAC			
P25	HGQVDCSPGIWQLDC	Pol	766	780
Mos1	RVLAEAMSQVTNSAT			
Mos2	RVLAEAMSQTNSTIL			
G305	RVLAEAMSQTNSTIL	Gag	361	376
镶嵌序列 361-07:				
21 CD8 PTE+, 6 CD4 PTE+				
7 CD8+ 区域, 5 CD4+ 区域				
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 6 2 4 2 5 1 1 CD 1 1 1 1				
7 CD8 应答:				
Mos1	EQLIKKERVYLSWVPAHKGIG			
Mos2	EQLIKKEKVYLAWVPAHKGIG			
P221	EELIKKEKVYLAWVP	Pol	678	692
P250	EELIKKEKVYLSWVP	Pol	678	692
P316	-KLIEKDKVYLSWVPA	Pol	679	693
P223	--LIKKERVYLSWVPAH	Pol	680	694
P169	-----EKVYLAWVPAHKGIG	Pol	684	698
P83	-----EKVYLSWVPAHKGIG	Pol	684	698
Mos1	CTHGIRPVVSTQLLL			
Mos2	CTHGIRPVVSTQLLL			
E15	CTHGIRPVVSTQLLL	Env	247	261

图 22(续)

E47	CTHGIRPVVSTQLLL	Env	247	261
Mos1	ICTTTVPWNASWSNKSL			
Mos2	ICTTAVPWNTSWSNKSQ			
E334	ICTTTVPWNASWSNR	Env	603	617
E214	-CTTTVPWNSSWSNKE	Env	604	618
E158	--TTAVPWNASWSNKSL	Env	605	619
E290	--TTAVPWNTSWSNKSL	Env	605	619
Mos1	ACQGVGGPGHKARVLAEAMS			
Mos2	ACQGVGGP\$HKARVLAEAMS			
G166	ACQGVGGPGHKARVL	Gag	349	363
G76	-----GGP\$HKARVLAEAMG	Gag	354	368
Mos1	AAEWDRVHPVHAGPIAPGQ			
Mos2	AAEWDRLHPVHAGPVAPGQ			
G319	AAE--DRLHPVHAGPIF	Gag	209	225
G242	--ADWDRLHPVHAGPVA	Gag	210	224
G44	--AEWDRLHPVHAGPIA	Gag	210	224
G277	---WDRVHPVHAGPNSPG	Gag	212	226
G102	----DRVHPVHAGPIPPGQ	Gag	212	226
Mos1	HSNWRAMASDFNLPP			
Mos2	HSNWRAMASEFNLPP			
P93	HSNWRAMASDFNLPP	Pol	731	745
Mos1	KGRPGNFLQNRPEPT			
Mos2	KGRPGNFLQ\$RPEPT			
G86	KGRPGNFLQNRPEPT	Gag	442	456
5 CD4 应答:				
Mos1	RSLYNTVATLYCVHQR			
Mos2	RSL\$NTVATLYCVHAE			
G289	RSL\$NTVATLYCVHA	Gag	76	90
G54	-SLYNTVATLYCVHQR	Gag	77	91
Mos1	YVTDGRGRQKIVSLTE			
Mos2	YVTDGRGRQKVVS LTD			
P134	YVTDGRGRQKVVS L TE	Pol	612	626
Mos1	CTTTVPWNASWSNKS			
Mos2	CTTAVPWNTSWSNKS			
E53	CTTNVPWNSSWSNKS	Env	604	618
Mos1	WWAGIQQEF G I P Y N P			
Mos2	WWAGIKQEF G I P Y N P			

图 22(续)

```

P135 WWAGIQQEEFGIPYNE          Pol  846  860

Mos1  GPGHKARVLAEAMSQ
Mos2  GPGSHKARVLAEAMSQ
G15   GPGHKARVLAEAMSQ          Gag  355  369

镶嵌序列 362-07:
13 CD8 PTE+, 5 CD4 PTE+
7 CD8+ 区域, 5 CD4+ 区域
每个区域中重叠肽的数量: CD8: 2 2 4 2 1 1 1 CD4: 1 1 1 1 1

7 CD8 应答:
Mos1  CTHGIRPVVSTQLLL
Mos2  CTHGIRPVVSTQLLL
E15   CTHGIRPVVSTQLLL          Env  247  261
E47   CTHGIRPVVSTQLLL          Env  247  261

Mos1  KHLVWASRELERFAVNPGLL
Mos2  KHLVWASRELERFALNPGLL
G20   KHLVWASRELERFAL          Gag  32   46
G68   -----ASRELERFAVNPGLL   Gag  37   51

Mos1  QPSLQGTGSEELRSLYNTVATL
Mos2  QPALQGTGTEELRSLENTVATL
G268  LPALKGTGSEELRSLY          Gag  65   79
G249  --ALQGTGSEELRSLENT       Gag  67   81
G132  ---LQGTGTEELRSLENTV      Gag  68   82
G120  -----GSEELRSLYNTVATL   Gag  71   85

Mos1  ACQGVGGPGHKARVLAEAMS
Mos2  ACQGVGGPSHKARVLAEAMS
G166  ACQGVGGPGHKARVL          Gag  349  363
G76   -----GPGSHKARVLAEAMS   Gag  354  368

Mos1  RELNKRTQDFWEVQL
Mos2  RELNKRTQDFWEVQL
P233  RELNRRTQDFWEVQL          Pol  233  247

Mos1  LLRAIEAQQHLLQLT
Mos2  LLRAIEAQQHMLQLT
E227  LLMAIEAQQHLLQLT          Env  555  569

Mos1  KTAVQMAVFIHNFKR
Mos2  KTAVQMAVFIHNFKR
P5    KTAVQMAVFIHNFKR          Pol  888  902

```

图 22(续)

5 CD4 应答:

Mos1	KLNWASQIYPGKVR			
Mos2	KLNWASQIYAGIKVK			
P136	KLNWASQIYAGIKVK	Pol	418	432
Mos1	YAKMRTAHTNDVKQL			
Mos2	YARMRGAHTNDVKQL			
P266	YARKRSHTNDVKQL	Pol	509	523
Mos1	DQAEHLKTAVQMAVF			
Mos2	DQAEHLKTAVQMAVF			
P28	DQAEHLKTAVQMAVF	Pol	882	896
Mos1	SLQTGSEELRSLYNT			
Mos2	ALQTGTEELRSLFNT			
G182	ALKTGTEELRSLYNT	Gag	67	81
Mos1	GPGHKARVLAEAMSQ			
Mos2	GPGHKARVLAEAMSQ			
G15	GPGHKARVLAEAMSQ	Gag	355	369

活性肽及应答的广度与深度: 最佳自然 C 进化支疫苗**天然 C 进化支 363-07:**

2 CD8 FTE+, 0 CD4 FTE+

1 CD8+ 区域, 0 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽数量: CD8: 2 CD4: none

1 CD8 应答:

C	QPALQTGTEELRSLYNTVATL
G268	LPALKTGSEELRSLY
G120	-----GSEELRSLYNTVATL

天然 C 进化支 364-07:

5 CD8 FTE+, 2 CD4 FTE+

5 CD8+ 区域, 2 CD4+ 区域

每个区域中重叠肽数量: CD8: 1 1 1 1 1 CD4: 1 1

5 CD8 应答:

C	AHTNDVKQLTEAVQK			
P80	AHTNDVKQLTEAVQK	Pol	515	529
C	GDIIGDIRQAHCNIS			
E64	GDIIGDIRQAHCNIS	Env	321	334

图 22(续)

C	SEKSAVGIGAVFLGF			
E182	SEKRAVGLGAVFLGF	Env	508	522
C	RASILRGGKLDKWEK			
G283	SASILRGGKLDKWEK	Gag	4	18
C	TNNPPVPVGDIIYKRW			
G185	TSNPPVPVGDIIYKRW	Gag	251	265
2 CD4 应答:				
C	CKSNITGLLLTRDGG			
E316	CTSNITGLLLVRDGG	Env	445	459
C	SLYNTVATLYCVHAG			
G54	SLYNTVATLYCVHQR	Gag	77	91
天然 C 进化支 365-07:				
2 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+				
2 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域				
每个区域中重叠肽数量: CD8: 1 1 CD4: 1				
2 CD8 应答:				
C	EQLINKERVYLSWVP			
P250	EPLIKKEKVYLSWVP	Pol	678	692
C	AEWDRLHPVHAGPIA			
G44	AEWDRLHPVHAGPIA	Gag	210	224
1 CD4 应答:				
C	HQAAMQMLKDTINEE			
G24	HQAAMQMLKDTINEE	Gag	194	208
天然 C 进化支 366-07:				
6 CD8 PTE+, 1 CD4 PTE+				
4 CD8+ 区域, 1 CD4+ 区域				
每个区域中重叠肽数量: CD8: 2 2 1 1 CD4: 1				
4 CD8 应答:				
C	IVQQQSNLLRAIEAQQ			
E54	VVQQQSNLLRAIEAQ	Env	548	562
E72	-VQQQNNLLRAIEAQH	Env	549	563
C	AVFIHNFKRKGGIGGY			
P22	AVFIHNFKRKGGIGG	Pol	894	908
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	Pol	895	909

图 22(续)

C **MAICEEMEKEGKITK**
P224 **TAICEEMEKEGKITK** Pol 190 204

C **GGPSHKARVLAEAMS**
G76 **GGPSHKARVLAEAMG** Gag 354 368

1 CD4 应答:

C **IIGQVRDQAEHLKTA**
P86 **LIGQVRDQAEHLKTA** Pol 876 890

天然 C 进化支 **367-07:**

0 CD8 PTE+, 0 CD4 PTE+
0 CD8+ 区域, 0 CD4+ 区域
每个区域中重叠肽数量: none

0 CD8 应答

0 CD4 应答

天然 C 进化支 **368-07:**

2 CD8 PTE+, 0 CD4 PTE+
1 CD8+ 区域, 0 CD4+ 区域
每个区域中重叠肽数量: CD8: 2 CD4: 0

1 CD8 应答

C **AVFIHNFKRKGGIGGY**
P22 **AVFIHNFKRKGGIGG** Pol 894 908
P236 **-VLIHNFKRKGGIGGY** Pol 895 909

图 22(续)

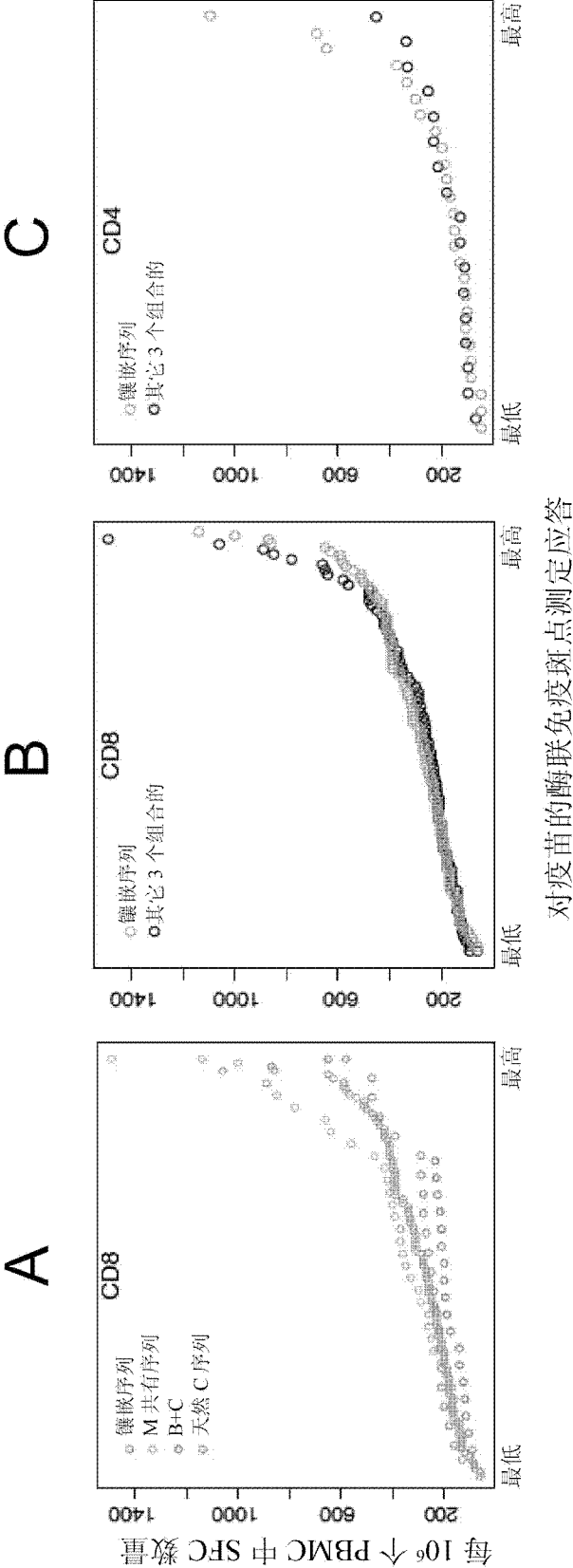


图 23

A 猴子 366 号 (天然 C 序列)		B 猴子 361 号 (镶嵌序列)	
OptC	IVQQQSNLLRAIEAQQ	Mos1	EQLIKKERVYLSWVPAHKGIG
E54	VVQQQSNLLRAIEAQ	Mos2	EQLIKKERVYLAWVPAHKGIG
E72	-VQQQNNLLRAIEAQH	P221	EELIKKERVYLAWVP
OptC	AVFIHNFKRKGGIGGY	P250	EPLIKKERVYLSWVP
P22	AVFIHNFKRKGGIGG	P316	-KLIKKERVYLSWVPA
P236	-VLIHNFKRKGGIGGY	P223	--LIKKERVYLSWVPAH
OptC	MAICEEMEKEGKITK	P169	-----EKVYLAWVPAHKGIG
P224	TAICEEMEKEGKITK	P83	-----EKVYLSWVPAHKGIG
OptC	GGPSHKARVLAEAMS	Mos1	CTHGIRPVVSTQLLL
G76	GGPSHKARVLAEAMG	Mos2	CTHGIRPVVSTQLLL
		E15	CTHGIRPVVSTQLLL
		E47	CTHGIRPVVSTQLLL
		Mos1	ICTTTVPWNASWSNKSL
		Mos2	ICTTAVPWNSSWSNKSG
		E334	ICTTTVPWNASWSNR
		E214	-CTTTVPWNSSWSNKI
		E158	--TTAVPWNASWSNKSL
		E290	--TTAVPWNSSWSNKSL
		Mos1	ACQGVGGPGHKARVLAEAMS
		Mos2	ACQGVGGPSHKARVLAEAMS
		G166	ACQEVGGPGHKARVL
		G76	-----GGPSHKARVLAEAMG
		Mos1	AAEWDRVHPVHAGPIAPGQ
		Mos2	AAEWDRLHPVHAGPVAPGQ
		G319	AAE-DRLHPVHAGPIE
		G242	-ADWDRLHPVHAGEVA
		G44	-AEWDRLHPVHAGPIA
		G277	---WDRVHPVHAGPNPFG
		G102	----DRVHPVHAGPIEPGQ
		Mos1	HSNWRAMASDENLPP
		Mos2	HSNWRAMASEFNLPP
		P93	HSNWRAMASDENLPP
		Mos1	KGRPGNFLQNRPEPT
		Mos2	KGRPGNFLQSRPEPT
		G86	KGRPGNFLQNRPEPT

图 24

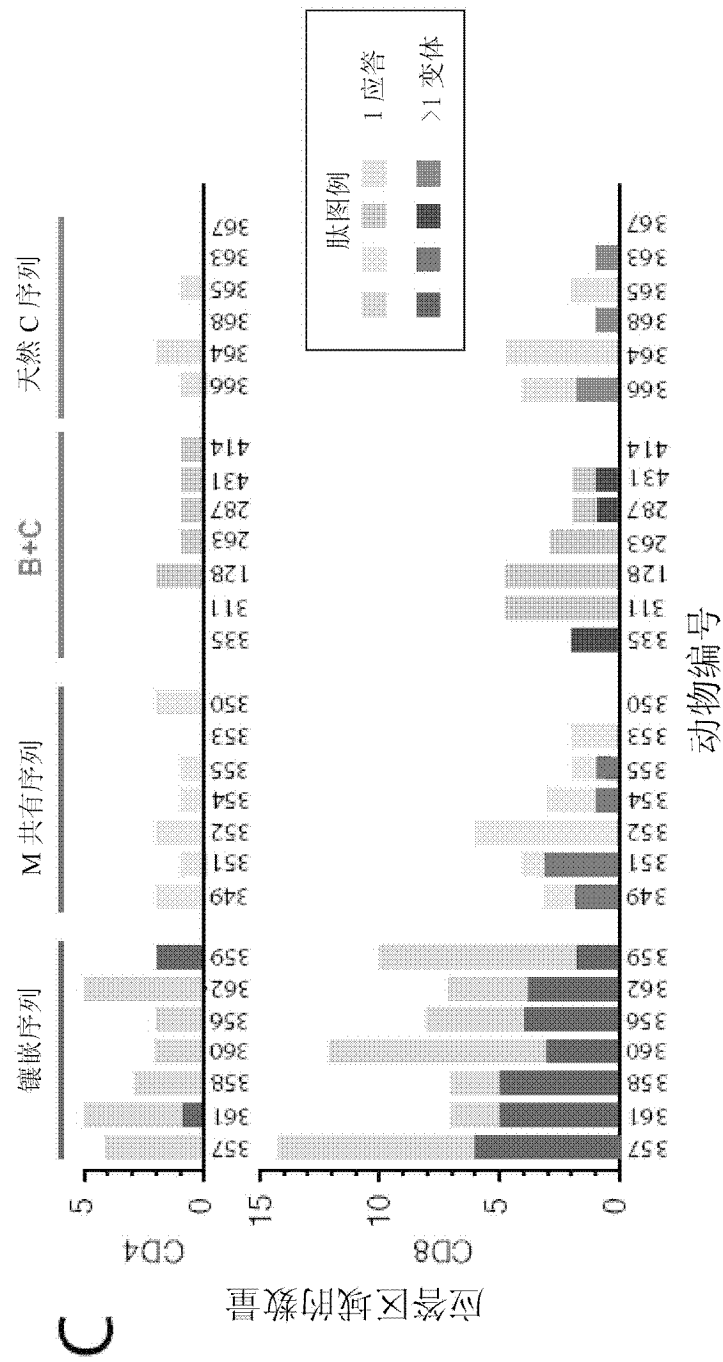


图 24(续)

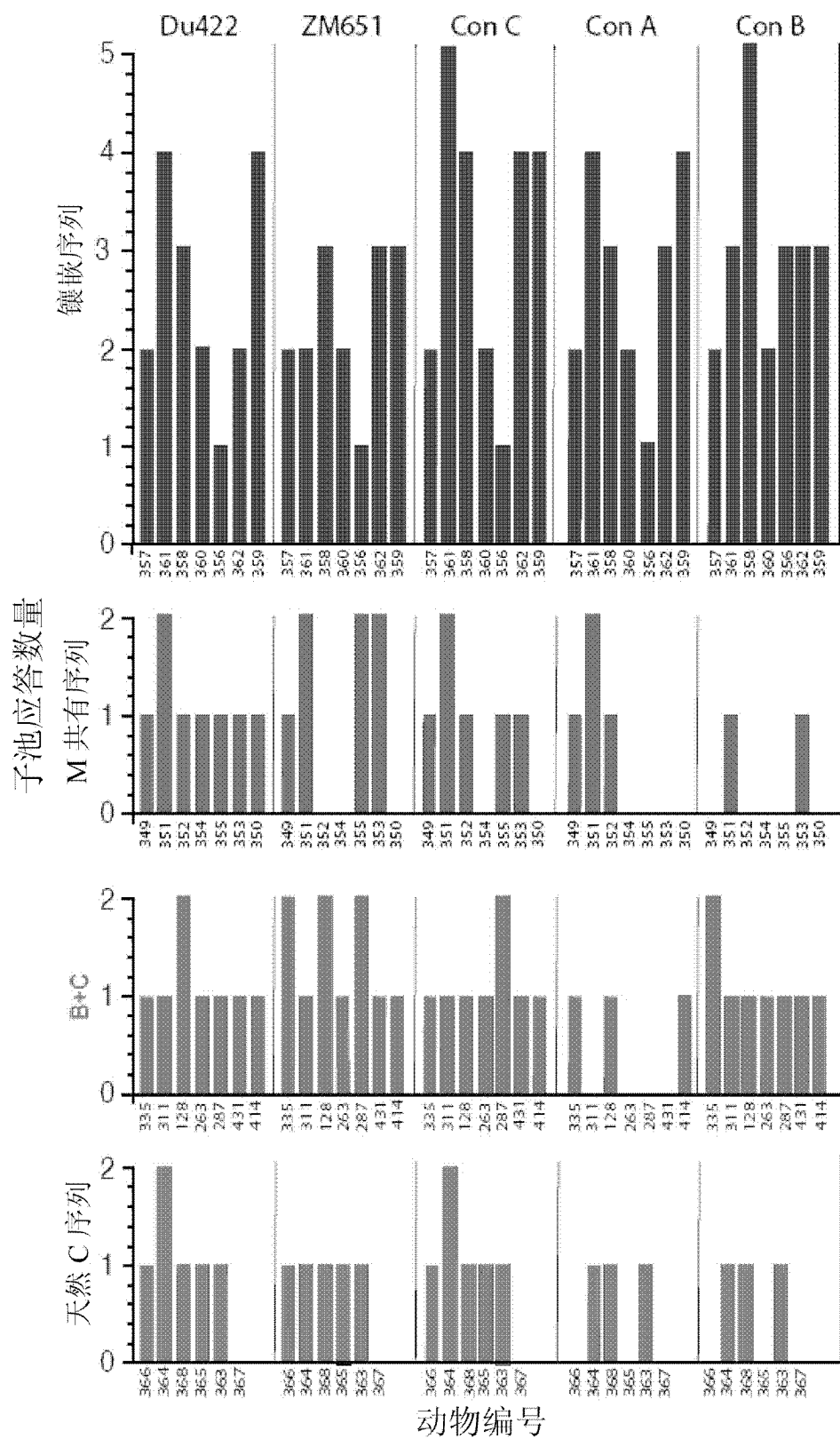


图 25

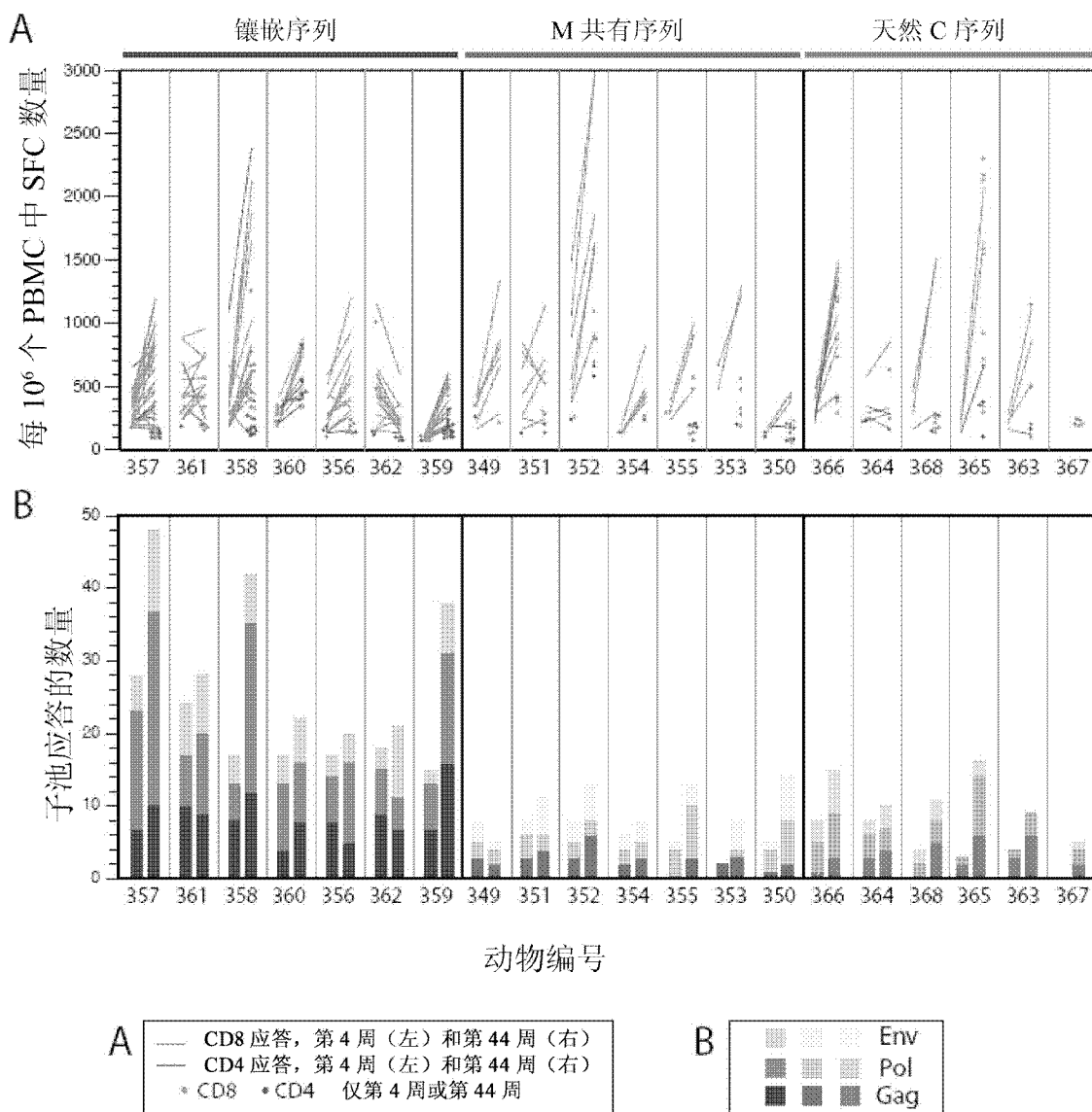


图 26

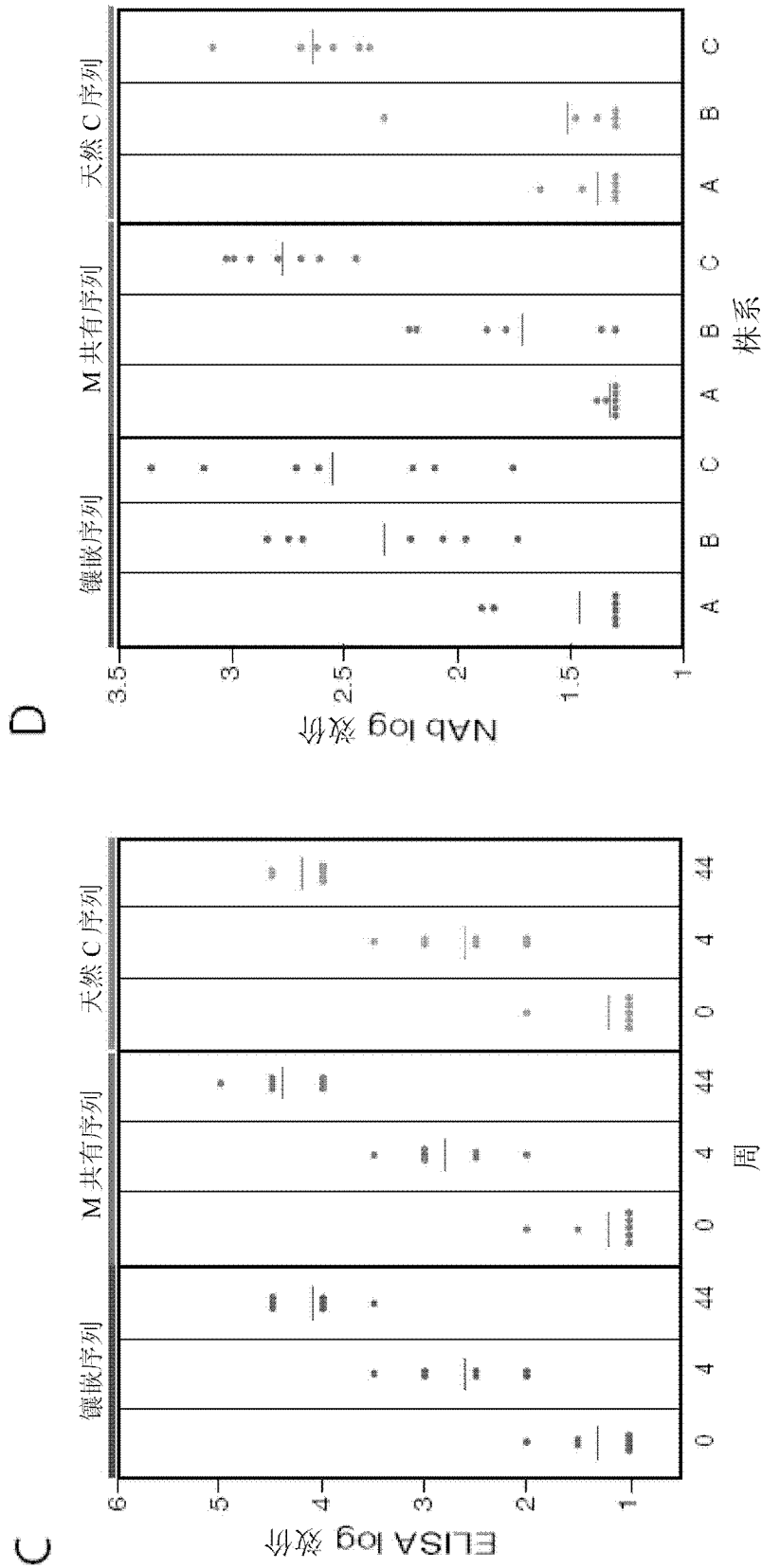


图 26(续)

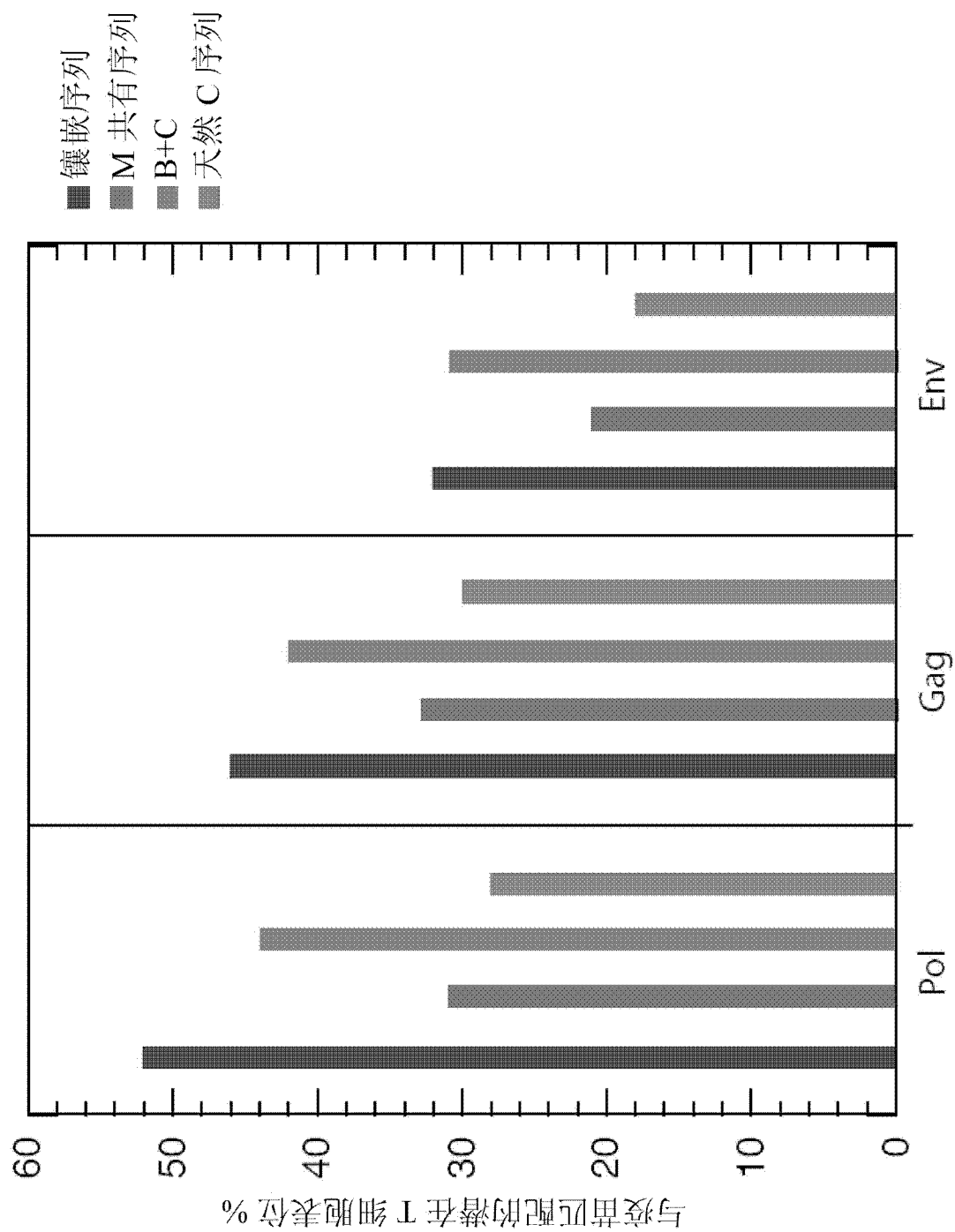


图 27