



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I626948 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：103111327

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/21 (2006.01)* *C07K14/15 (2006.01)*
C12N15/81 (2006.01) *A61P31/18 (2006.01)*
A61P37/04 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/26 美國 61/805,299
 2013/10/15 美國 61/891,093

(71)申請人：環球免疫公司(美國) GLOBEIMMUNE, INC. (US)
 美國

(72)發明人：金 湯瑪士 H KING, THOMAS H. (US)；艾佩連 大衛 APELIAN, DAVID (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

MICHELLE A. BARRON et al., "Human Dendritic Cell Interactions with Whole Recombinant Yeast: Implications for HIV-1 Vaccine Development", Journal of Clinical Immunology, Vol. 26, No. 3, May 2006.

2011 年 11 月 01 日 NCBI GenBank: ACV94677

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：7 共 159 頁

(54)名稱

治療或預防人類免疫缺乏病毒感染之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OR PREVENTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION

(57)摘要

本發明揭示用於治療及/或預防 HIV 感染及其症狀之基於酵母菌之免疫治療組合物、人類免疫缺乏病毒(HIV)抗原及融合蛋白質，以及利用該等基於酵母菌之免疫治療組合物、HIV 抗原及融合蛋白質預防性及/或治療性處置 HIV 及/或其症狀之方法。

Disclosed are yeast-based immunotherapeutic compositions, human immunodeficiency virus (HIV) antigens, and fusion proteins for the treatment and/or prevention of HIV infection and symptoms thereof, as well as methods of using the yeast-based immunotherapeutic compositions, HIV antigens, and fusion proteins for the prophylactic and/or therapeutic treatment of HIV and/or symptoms thereof.

指定代表圖：

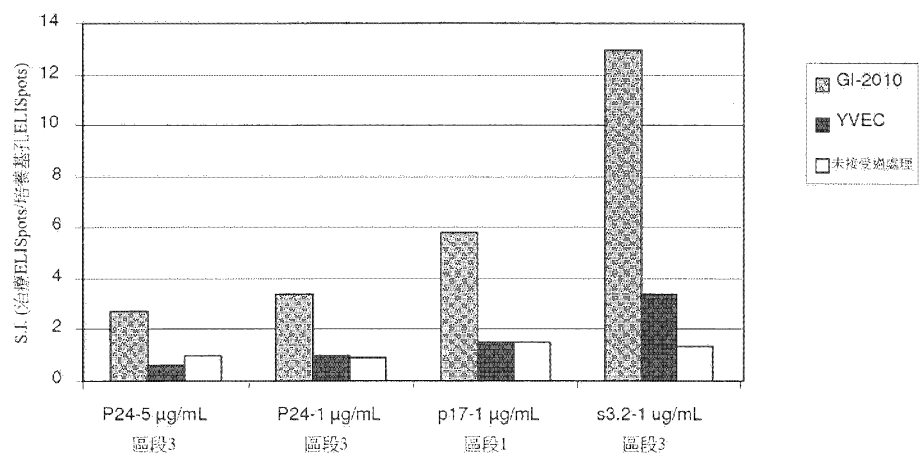


圖1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

治療或預防人類免疫缺乏病毒感染之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OR
PREVENTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
INFECTION

相關申請案之交叉參考

本申請案根據35 U.S.C. §119(e)規定主張2013年3月26日申請之美國臨時申請案第61/805,299號及2013年10月15日申請之美國臨時申請案第61/891,093號之優先權利。美國臨時申請案第61/805,299號及美國臨時申請案第61/891,093號各自之全部揭示內容以引用的方式併入本文中。

序列表之參考

本申請案包含藉由EFS-Web以電子文字檔案呈送之序列表。該名為「3923-44-PCT_ST25」之文字檔案大小為85KB字組，且記錄時間為2014年3月19日。該文字檔案中所包含之資訊之全文依照37 CFR § 1.52(e)(5)規定以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明大體上係關於用於預防及/或治療人類免疫缺乏病毒(HIV)感染之免疫治療組合物及方法。

【先前技術】

人類免疫缺乏病毒(HIV)感染/後天免疫缺乏症候群(HIV/AIDS)係一種由感染HIV引起並主要影響人類免疫系統細胞之疾病。自從1981年發現以來，AIDS已導致近3千萬人死亡(截至2009年) (「Global

Report Fact Sheet」. UNAIDS. 2010.)，且截至2010年，全世界約有三千四百萬人感染HIV (UNAIDS 2011第1–10頁)。在世界的許多地方，HIV/AIDS現在被認為係一種慢性疾病，而非致命疾病(Knoll等人，(2007) *Int J Dermatol* **46** (12): 1219–28)。雖然該疾病之預後可因患者而異，但患者的CD4⁺ T細胞計數及病毒載量均可用於預測結果。若不接受治療，預計感染HIV後的平均存活時間為9至11年，端視HIV亞型而定(UNAIDS, WHO (2007年12月)。「2007 AIDS epidemic update」(PDF))。診斷為AIDS後，若無法接受治療，存活範圍在6與19個月之間(Morgan等人，(2002) *AIDS* **16** (4):597–632；Zwahlen and Egger (2006), UNAIDS Obligation HQ/05/422204，2008年4月9日自原件歸檔得到)。高效抗逆轉錄病毒療法(HAART)及適當防止伺機性感染可使死亡率降低80%，且可將新近確診的年輕人的預期壽命提高20–50年(Knoll等人，上文；Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (2008), *Lancet* **372** (9635): 293–9；Schackman等人，(2006), *Med Care* **44** (11): 990–997)。

HAART選擇係由至少三種隸屬於至少兩種或「類」抗逆轉錄病毒製劑之藥物組成之組合劑(或「混合劑」)，該等抗逆轉錄病毒製劑可包括非核苷逆轉錄酶抑制劑(NNRTI)、核苷類似物逆轉錄酶抑制劑(NRTI)、整合酶抑制劑及進入抑制劑。最初的治療通常為非核苷逆轉錄酶抑制劑(NNRTI)加上兩種核苷類似物逆轉錄酶抑制劑(NRTI)。典型的NRTI包括：齊多夫定(zidovudine)(AZT)或替諾福韋(tenofovir)(TDF)及拉米夫定(lamivudine)(3TC)或恩曲他濱(emtricitabine)(FTC)。若以上方案失效，則使用包含蛋白酶抑制劑(PI)之製劑組合。

目前用於治療HIV之標準醫護(SOC)通常為固定劑量組合(FDC)，包括以每日服用一次的單片丸劑提供之跨類別藥物。此等FDC包括

ATRIPLA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/依法韋侖 (efavirenz)：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及依法韋侖(一種來自 Bristol Myers-Squibb 之非核苷逆轉錄酶抑制劑 (NNRTI))， Gilead Sciences, Inc.)、COMPLERA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/利匹韋林(rilpivirine)：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及利匹韋林(一種來自 Tibotec/Johnson & Johnson 之 NNRTI)， Gilead Sciences, Inc.)； STRIBILD/QUAD[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/埃替拉韋 (elvitegravir)/可比西他 (cobicistat)：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及可比西他增強型埃替拉韋(來自 Japan Tobacco 之整合酶抑制劑)， Gilead Sciences, Inc.)；及 572-TRII[®] (阿巴卡韋 (abacavir)/NRTI+拉米夫定/NRTI，及度魯特韋 (dolutegravir)(來自 Pfizer/Shionogi 之整合酶抑制劑)， ViiV (GlaxoSmithKline, Pfizer, Shionogi)。

組合抗逆轉錄病毒療法已使得 HIV 成為可控的慢性疾病，但無法治癒。HIV DNA 併入潛伏或不活化 T 細胞之 DNA 中，並保留下來直至該細胞被活化。目前的方案無法處理隱匿在潛伏細胞中之病毒。此外，目前的 FDC 及其個別組分存在副作用及失效的問題，包括：中樞神經系統 (CNS) 副作用、腎臟毒性、耐藥性/交叉耐藥性及由於病毒載量較高而失效。

先前開發治療性疫苗之嘗試以失敗告終或難以闡釋結果，包括嘗試利用基於牛痘病毒之方法、嘗試利用亞單位疫苗 (HIV gp160)、全殺死 HIV 單離疫苗及裸 DNA 疫苗。因此，此項技術仍需提供功能性治癒 HIV 感染 (亦即，在不進行持續治療下抑制 HIV 複製及預防疾病) 或徹底性治癒 HIV 感染 (亦即，完全消除病毒)，或進一步舒緩 HIV 感染症狀或其後遺症，及/或進一步使受感染個體能夠控制病毒並保持健康之組合物及方法。

【發明內容】

本發明之一實施例係關於一種免疫治療組合物，其包含：(a)酵母菌媒介；及(b)包含HIV抗原之融合蛋白質。在一態樣中，該等HIV抗原，其中該等HIV抗原包含至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或完全與選自以下之胺基酸序列相同之胺基酸序列或來自不同HIV病毒株之相應胺基酸序列或由其組成：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75及/或SEQ ID NO:84。

在本發明之一實施例中，該等HIV抗原由SEQ ID NO:5之胺基酸序列組成。在本發明之一實施例中，該融合蛋白質包含SEQ ID

NO:86之胺基酸序列。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該HIV抗原係由該酵母菌媒介表現。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌媒介係完整酵母菌。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌媒介係完整殺死或不活化酵母菌。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌媒介係完整熱不活化酵母菌。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌媒介係加工過的酵母菌(詳細描述於下文)。

本發明之另一實施例係關於一種免疫治療組合物，其包含(a)完整不活化酵母菌；及(b)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HIV融合蛋白質，其中該融合蛋白質受啟動子*CUP1*控制。該HIV融合蛋白質係由該酵母菌表現，且該組合物引起HIV-特異性T細胞反應。在本發明該實施例之一態樣中，該融合蛋白質包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列。

本發明之又另一實施例係關於一種免疫治療組合物，其包含：(a)酵母菌；及(b)由該酵母菌表現且包含HIV Gag蛋白質之HIV抗原，其中該HIV Gag蛋白質在藉由該酵母菌表現時形成極大顆粒(VLP)。

本發明之另一實施例係關於一種免疫治療組合物，其包含：(a)酵母菌；及(b)由該酵母菌表現且包含HIV Gag蛋白質之HIV抗原，其中該HIV Gag蛋白質在藉由該酵母菌表現時不會形成極大顆粒(VLP)。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)

中，在一態樣中，該酵母菌(或酵母菌媒介)係來自選自由下列組成之群之酵母菌屬：酵母菌屬(*Saccharomyces*)、念珠菌屬(*Candida*)、隱球菌屬(*Cryptococcus*)、漢遜酵母屬(*Hansenula*)、克魯維酵母菌屬(*Kluyveromyces*)、畢赤酵母屬(*Pichia*)、紅酵母屬(*Rhodotorula*)、裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)及耶氏酵母屬(*Yarrowia*)。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌(或酵母菌媒介)係來自酵母菌屬。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該酵母菌(或酵母菌媒介)係來自釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，其他組合物另外包含樹突細胞，其中該樹突細胞已負載該酵母菌。

在任何涉及本發明免疫治療組合物之實施例(包括上述實施例)中，在一態樣中，該組合物係調配於適用於藉由注射投與至個體之醫藥上可接受的賦形劑中。

本發明之另一實施例係關於一種包含HIV抗原之融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或完全與以下胺基酸序列相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID

NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75及/或SEQ ID NO:84。

本發明之另一實施例係關於一種編碼上文或本文別處所述之任何融合蛋白質之重組核酸分子。本發明之又另一實施例係關於一種經此重組核酸分子轉染之單離細胞。在一態樣中，此細胞係酵母菌細胞。

本發明之另一實施例係關於一種包含上文或本文別處所述之任何融合蛋白質之組合物。

本發明之又另一實施例係關於一種包含上文或本文別處所述之任何重組核酸分子之組合物。

本發明之另一實施例係關於一種包含上文或本文別處所述之任何單離細胞之組合物。

本發明之一實施例係關於一種治療個體中之人類免疫缺乏病毒(HIV)感染或至少一種由HIV感染引起之症狀之方法，其包括向已經感染HIV之個體投與上文或本文別處所述之任何組合物之至少一者。

在一態樣中，該方法另外包括向該個體投與一或多種可用於治療或舒緩HIV感染症狀之另外化合物或組合物。在一態樣中，此另外化合物係抗病毒化合物，包括(但不限於)固定劑量組合(FDC)藥物。在一態樣中，該另外組合物係DNA疫苗。在一態樣中，該另外組合物係加工過的酵母菌，包括(但不限於)經基因改造以表現至少一種HIV抗原之酵母菌或不表現抗原或表現並非HIV抗原之抗原之酵母菌。在一態樣中，該加工過的酵母菌係藉由(包括(但不限於))與HIV抗原摻合而與至少一種HIV抗原一起投與。在一態樣中，該另外組合物包含來自該個體之自體T細胞，其中該等自體T細胞已在活體外經至少一種HIV抗原刺激。在一態樣中，該另外組合物包含至少一種HIV抗原之蛋白質亞單位疫苗。在任何包含另外組合物及HIV抗原之態樣中，在一態樣中，該HIV抗原與該免疫治療組合物中之HIV抗原相同。在一態樣中，該HIV抗原不同於該免疫治療組合物中之HIV抗原。在一態樣中，該另外組合物包含生物反應調節劑。

在涉及另外化合物或組合物之任何本發明態樣中，該另外化合物或組合物可在投與該免疫治療組合物之前、在投與該免疫治療組合物之後及/或在投與該免疫治療組合物的同時投與。

在涉及投與本發明免疫治療組合物或其他組合物之任何本發明方法或用途之一態樣中，在一態樣中，向該個體投與該組合物可減少該個體之HIV病毒載量。在一態樣中，向該個體投與該組合物可增加或穩定該個體之 $CD4^+$ T細胞計數。在一態樣中，投與該組合物可減少投與至該個體之抗病毒療法之數量、持續時間或頻率。在一態樣中，投與該組合物可功能性治癒個體之HIV感染。

本發明之另一實施例係關於一種引起針對HIV抗原之抗原特異性細胞介導免疫反應之方法，其包括向個體投與上文或本文別處所述之任何組合物之至少一者。在一態樣中，該免疫反應係細胞毒性T淋巴

細胞(CTL)反應。

本發明之又另一實施例係關於一種預防個體感染HIV之方法，其包括向尚未感染HIV之個體投與上文或本文別處所述之任何組合物之至少一者。

本發明之另一實施例係關於一種使個體群對HIV產生免疫之方法，其包括向個體群投與上文或本文別處所述之任何組合物之至少一者。

本發明之又另一實施例係關於上文或本文別處所述之任何組合物，其係用於治療HIV感染或其症狀。

本發明之又另一實施例係關於上文或本文別處所述之任何組合物，其係用於預防HIV感染或其症狀。

本發明之另一實施例係關於上文或本文別處所述之任何組合物於製備用以治療HIV感染之藥劑之用途。

本發明之又另一實施例係關於上文或本文別處所述之任何組合物於製備用以預防HIV感染之藥劑之用途。

【圖式簡單說明】

圖1為顯示經GI-2010免疫小鼠(灰色條柱)對後續用各種HIV Gag區段3抗原(黑色條柱= YVEC對照酵母菌(無抗原)；白色條柱=未經處理的非免疫小鼠對照)進行活體外刺激之干擾素- γ (IFN- γ) ELISpot反應之圖表。

圖2為顯示經GI-2010免疫BALB/c小鼠對用區段3肽YVDRFYKTLRAEQAS (SEQ ID NO:84)進行活體外刺激之干擾素- γ (IFN- γ) ELISpot反應之圖表。

圖3為顯示來自接種HIVAX-2酵母菌之小鼠(表現Gag，經設計以表現不同水平之Gag抗原)之細胞在指示酵母菌劑量(X-軸)下殺死表現HIV-Gag之標靶(B16腫瘤細胞)之劑量相依性之圖表。

圖4為顯示由稱為GI-2013之酵母菌-HIV免疫治療物表現之融合蛋白質之結構之示意圖。

圖5為西方墨點法之數位圖像，其顯示融合蛋白質藉由酵母菌-免疫治療物GI-2013在U2及UL2兩種培養基中之表現情況。

圖6為顯示經GI-2013免疫BALB/c小鼠(黑色條柱)與經OVAX (對照)免疫小鼠(此實驗中未檢測到針對OVAX之反應)相比之抗原特異性干擾素- γ (IFN- γ) ELISpot反應之圖表。

圖7為顯示經GI-2013免疫BALB/c小鼠(黑色條柱)與經OVAX (對照)免疫小鼠(白色條柱)相比之抗原特異性淋巴細胞增殖之圖表。

【實施方式】

本發明大體上係關於用於預防及/或治療人類免疫缺乏病毒(HIV)感染之組合物及方法。本發明包括一種經設計以在個體中引起針對HIV感染之預防性及/或治療性免疫反應且包含酵母菌媒介及HIV抗原之基於酵母菌之免疫治療組合物(亦稱為「基於酵母菌之HIV免疫療法」)，及此等組合物於預防及/或治療HIV感染及其相關症狀之用途。本發明亦包括用於本發明基於酵母菌之組合物中之重組核酸分子，以及由此編碼之蛋白質及融合蛋白質，其係用於針對HIV感染之任何免疫治療組合物及/或任何治療性或預防性方案(包括任何將本發明HIV-特異性基於酵母菌之組合物與任何一種或多種針對HIV感染之其他治療性或預防性組合物、製劑、藥物、化合物及/或方案組合在一起之治療性或預防性方案)中。

該等基於酵母菌之HIV-特異性免疫治療組合物在各類免疫療法中係獨特的，其獨特之處在於此等本發明組合物誘導先天性免疫反應及特異性標靶HIV之適應性免疫反應，包括CD4-依賴性TH17及TH1 T細胞反應及抗原特異性CD8⁺ T細胞反應。由HIV-特異性基於酵母菌之免疫療法所引起之免疫反應之廣度適合標靶HIV。藉由活化先天性及

適應性免疫反應以及CD4⁺及CD8⁺ T細胞反應，預期基於酵母菌之HIV免疫療法可有效標靶並破壞感染HIV的細胞及/或預期可有效增強病毒清除能力，及提供針對重新活化病毒之長期記憶免疫力。

此外，且不受理論之約束，據信，針對HIV之基於酵母菌之免疫療法可誘導不僅專門針對由基於酵母菌之免疫治療產品所攜帶的靶抗原，而且發展出針對該病毒上之其他免疫抗原決定基(亦即，不同於彼等由酵母菌-抗原組合物所攜帶者)之免疫反應。換言之，針對基於酵母菌之免疫治療物中所包含之抗原及/或抗原決定基之初級細胞免疫反應可導致針對存在於接受治療的個體之受感染細胞中但不存在於該基於酵母菌之免疫治療物中之抗原及/或抗原決定基之次級細胞免疫反應，從而發展出各接受治療的個體所獨有之複雜且不可預測的免疫反應概況。在各接受治療的個體中，此等次級免疫反應係特定於分子HIV感染概況，且與其他治療模態(包括其他免疫療法平臺)相比，該基於酵母菌之免疫治療物可以獨特方式驅動此等下游效應。此現象通常亦可稱為「抗原決定基擴散(epitope spreading)」，且代表利用基於酵母菌之HIV免疫療法之優勢，因為預期誘導針對特定HIV抗原或甚至針對特定HIV類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株之免疫反應(例如，藉由在酵母菌免疫治療物之情境中提供抗原)可導致級聯靶向針對各種其他HIV抗原之免疫系統，其可導致產生有效針對來自不同HIV類型、群、亞型、基因型或病毒株且不同於彼等出現在基於酵母菌之免疫治療組合物中之抗原之免疫反應。

在本發明之一態樣中，將基於酵母菌之HIV免疫療法與抗病毒藥物及/或與其他HIV療法組合在一起，以將個體之病毒載量減少至可為免疫系統較有效處理之水平。

基於酵母菌之免疫治療組合物係作為生物製劑或醫藥上可接受的組合物投與。因此，不同於利用酵母菌作為抗原生產系統，隨後自

該酵母菌純化出抗原，如本文所述之全部酵母菌媒介必須適合及經調配投與至患者。因此，本發明基於酵母菌之免疫治療組合物包含容易檢測到的酵母菌DNA，且包含實質上超過5%的酵母菌蛋白質；通常，本發明基於酵母菌之免疫治療物包含超過70%，超過80%或通常超過90%的酵母菌DNA。

出於治療及/或預防目的，將基於酵母菌之免疫治療組合物投與至患者，以使該患者免疫。在本發明之一實施例中，將該等基於酵母菌之組合物調配於醫藥上可接受的賦形劑或調配物中，以進行投與。在一態樣中，該組合物應調配成適合投與至人類個體(例如，製造條件應適用於人類，且任何用以製成該組合物及/或製備該免疫治療組合物之投與劑量之賦形劑或調配物應適用於人類)。在本發明之一態樣中，將基於酵母菌之免疫治療組合物調配成藉由向患者或個體注射而投與，諸如藉由非經腸途徑(例如，藉由皮下、腹膜內、肌肉內或皮內注射或另一適宜非經腸途徑)。

在一實施例中，該酵母菌表現抗原(例如，可藉由西方墨點法檢測)，且該抗原不會在該酵母菌中聚集，該抗原不會在該酵母菌中形成內含體及/或不會在該酵母菌中形成極大顆粒(VLP)或其他大抗原顆粒。在另一實施例中，該抗原係作為可溶性蛋白質生產於該酵母菌中及/或不會自該酵母菌分泌或者不會實質上或大量自該酵母菌分泌。在又另一實施例中，將HIV融合蛋白質中之抗原之特定組合及/或配置用於本發明基於酵母菌之免疫治療物中，以在該酵母菌中有意地形成VLP或聚集體(更詳細描述於下文中)。不受理論之約束，據信，由該酵母菌表現所得抗原具有與其整體結構及形式有關之其他免疫原性性質，如來自該抗原中所攜帶之免疫抗原決定基(例如，T細胞抗原決定基)之免疫原性性質之獨立特性。當在本發明基於酵母菌之HIV免疫治療物中提供表現此等融合蛋白質之酵母菌時，該免疫治療組合物不僅

自如上所述酵母菌媒介(與本文所述所有基於酵母菌之免疫治療物一樣)，而且部份自融合蛋白質抗原結構得到活化先天性免疫系統之性質；此外，該免疫治療組合物與本文所述所有基於酵母菌之免疫治療物一樣以抗原特異性方式自融合蛋白質(經由提供各種T細胞抗原決定基)得到活化適應性免疫系統之性質。在本文所述之所有本發明實施例中，該等基於酵母菌之免疫治療物應容易藉由免疫系統之樹突細胞吞噬，且酵母菌及抗原容易藉由此等樹突細胞處理，以引起針對HIV之有效免疫反應。

本發明組合物

本發明之一實施例係關於一種可用以預防及/或治療HIV感染及/或舒緩至少一種由HIV感染引起之症狀之基於酵母菌之免疫療法組合物。該組合物包含：(a)酵母菌媒介；及(b)一或多種包含HIV蛋白質及/或其免疫原性域之抗原。連同該酵母菌媒介，該等HIV蛋白質最通常係藉由該酵母菌媒介(例如，藉由完整酵母菌或酵母菌原生質球，可視情況將其進一步處理成酵母菌胞質體、酵母菌殘骸或者酵母菌膜萃取物或其片段)表現為重組蛋白質，但本發明之一實施例係將一或多種此等HIV蛋白質負載於酵母菌媒介中或另外與如本文所述酵母菌媒介複合在一起、附接在一起、混合在一起或一起投與，以形成本發明組合物。根據本發明，提及與本發明酵母菌媒介有關之「異質性」蛋白質或「異質性」抗原(包括異質性融合蛋白質)意指該蛋白質或抗原並非該酵母菌天然表現之蛋白質或抗原，但包含異質性抗原或異質性蛋白質之融合蛋白質亦可包含同為酵母菌天然表現之酵母菌序列或蛋白質或其部份(例如，如本文所述之 α 因子前原序列)。

本發明之一實施例係關於各種HIV融合蛋白質。在一態樣中，此等HIV融合蛋白質可用於本發明基於酵母菌之免疫治療組合物中。此等融合蛋白質及/或編碼此等蛋白質之重組核酸分子亦可用於非基於

酵母菌之免疫治療組合物中、與非基於酵母菌之免疫治療組合物組合使用或用於生產非基於酵母菌之免疫治療組合物，該非基於酵母菌之免疫治療組合物可包括(但不限於)DNA疫苗、蛋白質亞單位疫苗、基於病毒的重組免疫治療組合物、殺死或不活化病原體疫苗、樹突細胞疫苗及/或自體T細胞疫苗(已在活體外用本發明融合蛋白質刺激之個體T細胞)。在另一實施例中，此等融合蛋白質可用於HIV之診斷分析中及/或用以產生針對HIV的抗體。本文描述提供HIV抗原之選定部份之示例性HIV融合蛋白質，包括(例如)修飾過的聚合酶(Pol)及/或修飾過的聚合酶(Pol)之選定部份、修飾過的Gag及/或修飾過的Gag之選定部份、及修飾過的包膜(Env)及/或修飾過的包膜(Env)之選定部份、以及此等抗原中之任一者、兩者或全部三者之配置及/或此等抗原中之任一者、兩者或全部三者之配置之選定部份。

人類免疫缺乏病毒、基因及蛋白質。HIV係VI族(ssRNA-RT)病毒，且係逆轉錄病毒科慢病毒(*Lentivirus*)屬之成員。人們普遍認為，HIV係在某一時間自密切相關的類人猿免疫缺乏病毒(Simian immunodeficiency virus) (SIV)演化而來，並在最近的過去自非人類靈長類動物(SIV或HIV)轉移至人類。HIV可分為兩種主要類型或種類，稱為HIV 1類(HIV-1)及HIV 2類(HIV-2)。HIV-1(該病毒之最常見致病株，且係造成全世界大多數感染之原因)進一步分為數群，據信，各自代表SIV進入人類之獨立傳播途徑。目前，已將HIV-1分為以下群：M (表示「重要」或「主要」)、N、O及P，其中M群係最普遍的HIV-1群。進一步將M群分為進化支，通常稱為「亞型」(例如，亞型A-K)。亞型可進一步分為亞亞型及「流行性重組型」(CRF)，其中據信兩種亞型已重組形成新的亞型。亦已將HIV-2分為數群，但僅有2群(A及B)係流行性。

在所有可能的6種閱讀框中，HIV-1包含39個開放閱讀框

(ORF)(Dwivedi等人, *I. Res. J. Biological Sci.*, 1(7), 52-54(2012), 但其中僅有若干種具有功能。雖然任何HIV蛋白質或其功能域、結構域或免疫原性域均可用於基於酵母菌之免疫療法組合物中, 但三種尤其有用的蛋白質包括HIV Gag、HIV Pol及HIV Env及/或任何此等蛋白質之任何功能域、結構域或免疫原性域。*gag* (群特異性抗原)編碼前體Gag聚合蛋白, 其在成熟過程中藉由病毒蛋白酶加工成MA (基質蛋白, p17); CA (衣殼蛋白, p24); SP1 (間隔肽1, p2); NC (核衣殼蛋白, p7); SP2 (間隔肽2, p1)及p6 (King, Steven R. (1994) HIV: Virology and Mechanisms of disease. *Annals of Emergency Medicine*. 24:443-449)。*pol* (聚合酶)編碼病毒酶: 逆轉錄酶(RT)、核糖核酸酶H、整合酶及HIV蛋白酶(Votteler and Schubert, (2008) Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology. **Encyclopedia of Virology**. (第3版) 517-525)。HIV蛋白酶係使前體Gag聚合蛋白裂解產生結構蛋白質所必需; RT係自RNA模板轉錄DNA所必需; 整合酶將雙股病毒DNA整合於宿主基因組中(Mushahwar (2007) Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Perspectives in Medical Virology*. 13:75-87)。*env* (表示「包膜」)編碼gp160, 其藉由細胞蛋白酶而非病毒裂解產生表面脂蛋白gp120(其附接至存在於淋巴細胞上之CD4受體)及嵌入病毒包膜中之gp41(跨膜)蛋白(其可使病毒附接至靶細胞並與之融合) (Mushahwar, 2007, 上文; King, 1994, 上文)。

此項技術中已知來自各種已知HIV類型、群及亞型之各種病毒株/分離株之HIV基因之核酸及胺基酸序列及由此編碼之蛋白質。應指出的是, HIV之相同蛋白質或結構域之胺基酸序列在不同的病毒分離株間可發生變化。利用本文提供之指導並參考示例性HIV序列, 熟習此項技術者將可容易地生產用於本發明組合物及方法中之來自任何HIV

類型、群、亞型、基因型或病毒株(分離株)之各種HIV-基蛋白質，包括融合蛋白質，且正因如此，本發明並不限於本文所揭示的具體序列。因此，可藉由提及來自本發明所呈現之一或多條序列之特定序列，或藉由提及來自不同HIV分離株(病毒株)之相同、類似或相應序列來提及本發明中任何地方之HIV蛋白質或HIV抗原，或提及其任何功能域、結構域或免疫原性域。

人類免疫缺乏病毒抗原及構築體。本發明之一實施例係關於新穎HIV抗原及融合蛋白質以及編碼此等抗原及蛋白質之重組核酸分子。本文描述若干種用於提供一或多種(兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種或更多種)來自一或多種蛋白質之抗原之基於酵母菌之免疫治療組合物或其他組合物(例如，其他免疫治療或診斷組合物)中之不同新穎HIV抗原，所有抗原均包含在相同融合蛋白質中並由相同重組核酸構築體(重組核酸分子)編碼。用於本發明組合物中之抗原包括至少一種使動物免疫(預防性或治療性地)之HIV蛋白質或其免疫原性域。該組合物可包含一種、兩種、三種、四種、幾種、若干種或複數種HIV抗原，包括一種、兩種、三種、四種或更多種HIV蛋白質之一種、兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種或更多種免疫原性域。在一些實施例中，該抗原係融合蛋白質。在本發明之一態樣中，融合蛋白質可包含兩種或更多種蛋白質。在一態樣中，該融合蛋白質可包含一或多種蛋白質之兩個或更多個免疫原性域及/或兩個或更多個抗原決定基。一種包含此等抗原之免疫治療組合物可為眾多患者提供抗原特異性免疫。例如，本發明所涵蓋之抗原或融合蛋白質可包含任一種或多種選自HIV Gag、HIV Env或HIV Pol之HIV蛋白質之至少一部份或全長；及/或此等HIV蛋白質之任一者或多者之任一個或多個免疫原性域。可將其他HIV蛋白質(例如，Nef、Vif、Vpr、Tat、Rev、Vpu)用於本發明抗原構築體中，

但以使用Gag、Env及Pol尤佳。

作為本發明之一實施例，重組核酸分子及由此編碼之蛋白質(包括融合蛋白質)可用於基於酵母菌之免疫療法組合物中，或用於HIV抗原之任何其他適宜目的，包括用於活體外分析、用於生產抗體或用於另一種並非基於本文所述基於酵母菌之免疫療法之免疫療法組合物(包括另一種疫苗)。藉由酵母菌表現蛋白質係一較佳實施例，但可使用其他表現系統來生產用於不同於基於酵母菌之免疫療法組合物之應用之蛋白質。

根據本發明，術語「抗原」在本文中之一般用途係指：蛋白質之任何部份(肽、部份蛋白質、全長蛋白質)，其中該蛋白質係天然或合成得到；細胞組合物(全細胞、細胞溶解產物或瓦解細胞；有機體(完整有機體、溶解產物或瓦解細胞)；或碳水化合物或其他分子，或其一部份。抗原可引起針對免疫系統之元素(例如，T細胞、抗體)遇到的相同或類似抗原之抗原特異性免疫反應(例如，體液及/或細胞介導的免疫反應)。

抗原可係如單一抗原決定基、單一免疫原性域一樣小或更大，且可包含多個抗原決定基或免疫原性域。正因如此，抗原之尺寸可係如約8-12個胺基酸(亦即，肽)一樣小及如全長蛋白質、多聚體、融合蛋白質、嵌合蛋白質、全細胞、完整微生物或其任何部份(例如，全細胞溶解產物或微生物萃取物)一樣大。此外，抗原可包括可負載於酵母菌媒介或本發明組合物中之碳水化合物。應瞭解，在一些實施例中(例如，當該抗原係藉由酵母菌媒介由重組核酸分子表現時)，該抗原係蛋白質、融合蛋白質、嵌合蛋白質或其片段，而非整個細胞或微生物。

當欲在酵母菌中表現抗原時，抗原係可以重組方式表現於酵母菌中之最小尺寸，且長度通常為至少或大於25個胺基酸、或至少或大

於26個胺基酸、至少或大於27個胺基酸、至少或大於28個胺基酸、至少或大於29個胺基酸、至少或大於30個胺基酸、至少或大於31個胺基酸、至少或大於32個胺基酸、至少或大於33個胺基酸、至少或大於34個胺基酸、至少或大於35個胺基酸、至少或大於36個胺基酸、至少或大於37個胺基酸、至少或大於38個胺基酸、至少或大於39個胺基酸、至少或大於40個胺基酸、至少或大於41個胺基酸、至少或大於42個胺基酸、至少或大於43個胺基酸、至少或大於44個胺基酸、至少或大於45個胺基酸、至少或大於46個胺基酸、至少或大於47個胺基酸、至少或大於48個胺基酸、至少或大於49個胺基酸、或至少或大於50個胺基酸，或長度為至少25-50個胺基酸、長度為至少30-50個胺基酸、或長度為至少35-50個胺基酸、或長度為至少40-50個胺基酸、或長度為至少45-50個胺基酸。可表現更小的蛋白質，且可表現明顯更大的蛋白質(例如，長度為幾百個胺基酸或甚至長度為幾千個胺基酸)。在一態樣中，可表現全長蛋白質、或其結構域或功能域、或其在N-及/或C-末端缺少一或多個胺基酸之免疫原性域(例如，N-及/或C-末端缺少約1至約20個胺基酸)。融合蛋白質及嵌合蛋白質亦為本發明可表現之抗原。「靶抗原」係本發明免疫治療組合物特異性靶向之抗原(亦即，需要引發針對其之免疫反應之抗原)。「HIV抗原」係自一或多種HIV蛋白質衍生、設計或生產，使得靶向該抗原亦靶向人類免疫缺乏病毒之抗原。

當提及刺激免疫反應時，術語「免疫原」係術語「抗原」之子集，且因此，在一些實例中與術語「抗原」互換使用。如本文所使用之免疫原描述可引起體液及/或細胞介導的免疫反應(亦即，具有免疫原性)，使得向個體投與該免疫原可增加針對該個體免疫系統遇到的相同或類似抗原之抗原特異性免疫反應之抗原。在一實施例中，免疫原引起細胞介導的免疫反應，包括CD4⁺ T細胞反應(例如，TH1、TH2

及/或TH17)及/或CD8⁺ T細胞反應(例如，CTL反應)。

給定抗原之「免疫原性域」可係包含至少一個在投與至動物時充當免疫原之抗原決定基之抗原之任何部份、片段或抗原決定基(例如，肽片段或亞單位、或抗體抗原決定基或其他構型抗原決定基)。因此，免疫原性域大於單個胺基酸，且尺寸至少足以包含至少一個可充當免疫原之抗原決定基。例如，單一蛋白質可包含多個不同的免疫原性域。免疫原性域在蛋白質中不一定係線性序列，諸如在體液免疫反應之情形下，該情形中涵蓋構型域。

給定蛋白質之「功能域」為該蛋白質之一部份或功能單元，其包含直接或間接負責至少一種與該蛋白質有關、歸因於該蛋白質或由該蛋白質執行之生物或化學功能之序列或結構。例如，功能域可包含對應酶活性之活性位點、配位體結合位點、受體結合位點、分子或部份(諸如鈣)之結合位點、磷酸化位點或轉活化域。

給定蛋白質之「結構域」為蛋白質之一部份或該蛋白質總體結構之成份，其具有可識別結構(例如，其可係隸屬於某一類蛋白質或某一蛋白質家族內之若干種蛋白質並指示該等若干種蛋白質之一級或三級結構)、具有自穩定性及/或可獨立於該蛋白質之剩餘部份進行折疊。結構域常常與其所屬蛋白質之生物功能有關或在其中起到重要作用。

本文將抗原決定基定義為給定抗原內之單一免疫原性位點，其在提供至具有適宜共同刺激訊號之免疫系統及/或免疫系統之活化細胞時足以引起免疫反應。換言之，抗原決定基係抗原之實際上為免疫系統之組分所識別之部份，且可稱為抗原決定子。熟習此項技術者將瞭解，T細胞抗原決定基之尺寸及組成不同於B細胞或抗體抗原決定基，且經由I類MHC途徑呈遞之抗原決定基之尺寸及結構屬性不同於經由II類MHC途徑呈遞之抗原決定基。例如，藉由I類MHC分子呈遞

之T細胞抗原決定基之長度通常在8與11個胺基酸之間，而藉由II類MHC分子呈遞之抗原決定基之長度之限制較小，且可為8個胺基酸至25個胺基酸或更長。此外，T細胞抗原決定基具有預計結構特性，端視該抗原決定基所結合的具體MHC分子而定。已在各種HIV病毒株中及針對許多人類HLA類型確定多種不同T細胞抗原決定基。抗原決定基可係線性序列抗原決定基或構型抗原決定基(保守結合區)。大多數抗體可識別構型抗原決定基。

在一實施例中，可用於本發明之HIV抗原包含一或多個CTL抗原決定基(例如，當呈遞在適宜的I類MHC分子之情境中時，可為細胞毒性T淋巴細胞(CTL)之T細胞受體所識別的抗原決定基)。在一態樣中，該HIV抗原包含一或多個CD4⁺ T細胞抗原決定基(例如，在適宜的II類MHC分子之情境中，可為CD4⁺ T細胞之T細胞受體所識別之抗原決定基)。在一態樣中，該HIV抗原包含一或多個CTL抗原決定基及一或多個CD4⁺ T細胞抗原決定基。在一態樣中，可用於本發明免疫治療組合物中之HIV抗原包含表1或表2中所述示例性HIV CTL抗原決定基之一或多者。基於下文所提供之指引，即使一些胺基酸不同於表1或表2之胺基酸，熟習此項技術者亦將很容易確定表1或表2中各抗原決定基之相應序列在任何病毒株/分離株之給定HIV序列中之位置。本發明並不限於包含此等抗原決定基之抗原，因為此項技術中將知曉其他抗原，且預期可用於本發明中。在一實施例中，可對抗原決定基進行修飾，以使其與HIV之某一類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株內之抗原決定基序列一致，因為此等抗原決定基在類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株間存在一或多個胺基酸的差異。

在本發明之一實施例中，可用於基於酵母菌之免疫治療物中之HIV抗原最大限度地包含在HIV類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株間具保守性之免疫原性域(及特定言之，T細胞抗原決定基)及/或

包含來自若干種不同類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株之免疫原性域及/或包含容易修飾產生多種存在小幅差異，但基於不同感染個體或個體群之HIV類型、群、亞型、基因型或病毒株/分離株定製治療此等個體或個體群之基於酵母菌之免疫治療產品之免疫原性域。例如，該HIV抗原可基於在待保護或治療的個體或個體群中最為普遍的HIV-1群或亞型進行生產，且該HIV抗原包含來自該(等)群或該(等)亞型之最保守免疫原性域。可選地或附加地，免疫原性域可經修飾以與該域或抗原決定基之共有序列相一致，或構築體中可包含超過一個版本之該抗原決定基。

在本發明之一實施例中，可用於基於酵母菌之免疫治療物中之HIV抗原最大限度地包含含一或多個「區段3」殘基之抗原決定基，且在另一態樣中，其亦可最大限度地包含含一或多個「區段1」殘基之抗原決定基。更具體言之，在2011年，Dahirel等人之出版物(2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108(28):11530-5)鑑定並描述截然不同的胺基酸群，其突變受到共同協調(通常指「HIV區段」)，其可定位HIV Gag之六聚物接合內及接合間之結構決定子。Gag中的五個HIV區段中有一個(指「區段3」)呈現高度保守性，表明對在該區段中具有多個突變之HIV病毒株之存活性具有多維度限制。此外，該使病毒最易受攻擊的區段係HIV感染類個體(稱為「傑出非進展者」，亦即，在不進行醫療干預之情形下持久地控制HIV感染的人)之免疫系統之最大目標。據Dahirel等人稱，指代「區段1」之區段中之其他位點亦被確定為潛在有利目標。藉由優先利用較大蛋白質域及/或全長蛋白質的抗原而與許多其他類型的免疫療法區別開來之本發明基於酵母菌之免疫治療組合物具有包含多種抗原決定基(包括區段3及/或區段1抗原決定基)之優勢，從而使針對HIV之高效免疫反應之潛能最大化。更具體言之，針對HIV之基於酵母菌之免疫療法基於在進行免疫時藉由吞噬酵

母菌免疫療法組合物之抗原呈遞細胞處理之肽多樣性使生產針對此等區段1及區段3抗原決定基之強烈T細胞反應之條件最優化，其可特別藉由在關鍵的區段1及區段3結構域中有意或無意地引入促效取代得到進一步增強。

此外，如下文更詳細論述的，發明人在本文中提出在免疫療法中藉由引入(不受理論之限制)發明人認為可進一步增強並非傑出非進展者之個體之免疫反應之變構肽配體(APL)位點而改良對HIV之多維區域之標的，從而使得或促進此等個體發動針對該病毒中最易受攻擊的目標之高效免疫反應。

在本發明涉及基於酵母菌之免疫治療組合物之HIV抗原之設計之任何實施例中，在一態樣中，使包含HIV抗原之融合蛋白質之片段間之人造接合最少化(亦即，包含有限的非天然序列或盡可能包含最少非天然序列)。不受理論之約束，據信，自然演化已導致：i)在該病毒中產生很有可能很好地表現於另一種細胞(諸如酵母菌)中之鄰接序列；及ii)在抗原呈遞細胞中產生可適當消化彼等序列並將其呈遞至免疫系統之免疫蛋白酶體。本發明基於酵母菌之免疫治療產品容許宿主免疫系統處理並呈遞靶抗原；因此，與保留有更多天然HIV蛋白質序列之融合蛋白質相比，具有許多非天然接合之融合蛋白質在基於酵母菌之免疫治療物中之益處更小。

在本文所述任何HIV抗原(包括任何融合蛋白質)中，可應用以下其他實施例。首先，N-末端表現序列及/或C-末端標記係可選擇的，且若使用的話，其可選自若干種下文所述不同序列來提高表現、穩定性及/或可鑑定及/或純化蛋白質。在一態樣中，完全略去N-或C-末端序列中一者或二者。此外，許多適用於酵母菌中之不同啟動子係此項技術中所已知，且可用於表現本發明HIV抗原。此外，可出於各種原因將短介入連接子序列(例如，1、2、3、4或5胺基酸肽或更大的胺基

酸肽)引入融合蛋白質之部份間，包括引入限制酶位點，以促進選殖及將來操縱構築體。最後，如本文別處詳細論述，本文所述序列係示例性，且可如本文別處之詳細描述進行修飾，以取代、添加或缺失序列，以適應HIV病毒株或分離株或共有序列之選擇，且包含較佳T細胞抗原決定基(包括優勢及/或次優勢T細胞抗原決定基)。下文提供若干種可用於本發明中之不同示例性HIV抗原之描述。

如上所述，視情況地，用作本發明基於酵母菌之免疫治療組合物之組分之蛋白質(包括融合蛋白質)可利用尤其有益於提高或增強重組抗原在酵母菌中之表現或表現穩定性之構築體產生。通常，使所需抗原蛋白質或肽以其胺基-末端(N-末端)與以下融合：(a)特別合成肽，其可使融合蛋白質在酵母菌媒介中之表現穩定或防止所表現融合蛋白質(此等肽係詳細描述於(例如)2004年8月12日公開之美國專利公開案第2004-0156858 A1號中，其全文以引用的方式併入本文中)進行轉譯後修飾；(b)內源性酵母菌蛋白質之至少一部份(包括(但不限於) α 因子)，其中融合伴侶可提高該蛋白質在酵母菌中之表現穩定性及/或防止酵母菌細胞對蛋白質(此等蛋白質亦詳細描述在(例如)上文美國專利公開案第2004-0156858 A1號中)進行轉譯後修飾；及/或(c)酵母菌蛋白質之至少一部份，其使融合蛋白質表現於酵母菌表面上(例如，本文更詳細描述之Aga蛋白質)。此外，本發明視情況包括與抗原編碼構築體之C-末端融合之肽之用途，特定言之用於篩選及鑑定蛋白質。此等肽包括(但不限於)任何合成或天然肽，諸如肽標記(例如，六聚組胺酸)或任何其他短抗原決定基標記。附接至本發明抗原C-末端之肽之使用可伴隨或不伴隨添加本文所述N-末端肽。

在一實施例中，將可用於融合蛋白質中之合成肽鍵聯至抗原N-末端，該肽由至少兩個不同於該抗原之胺基酸殘基組成，其中該肽可使該融合蛋白質在酵母菌媒介中之表現穩定或防止所表現的融合蛋白

質進行轉譯後修飾。該合成肽及該抗原N-末端部份一起形成具有以下要求之融合蛋白質：(1)該融合蛋白質之位置一上之胺基酸殘基係甲硫胺酸(亦即，該合成肽中之第一胺基酸係甲硫胺酸)；(2)該融合蛋白質之位置二上之胺基酸殘基不為甘胺酸或脯胺酸(亦即，該合成肽中之第二胺基酸不為甘胺酸或脯胺酸)；(3)該融合蛋白質之位置2-6上之胺基酸殘基均非甲硫胺酸(亦即，若該合成肽短於6個胺基酸，則不論係該合成肽或該蛋白質之一部份，位置2-6上之胺基酸均不包括甲硫胺酸)；及(4)該融合蛋白質之位置2-6上之胺基酸均非離胺酸或精胺酸(亦即，若該合成肽短於5個胺基酸，則不論係該合成肽或該蛋白質之一部份，位置2-6上之胺基酸均不包括離胺酸或精胺酸)。該合成肽可短至兩個胺基酸，但在一態樣中，為2-6個胺基酸(包括3、4、5個胺基酸)，且可長於6個胺基酸(全部以整數計)至多約200個胺基酸、300個胺基酸、400個胺基酸、500個胺基酸或更多。

在一實施例中，融合蛋白質包含M-X2-X3-X4-X5-X6之胺基酸序列，其中M係甲硫胺酸；其中X2係除甘胺酸、脯胺酸、離胺酸或精胺酸以外的任何胺基酸；其中X3係除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸以外的任何胺基酸；其中X4係除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸以外的任何胺基酸；其中X5係除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸以外的任何胺基酸；且其中X6係除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸以外的任何胺基酸。在一實施例中，X6殘基係脯胺酸。可增強抗原在酵母菌細胞中之表現穩定性及/或防止該蛋白質在酵母菌中進行轉譯後修飾之示例性合成序列包括序列M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:81)。另一具有相同性質之示例性合成序列係M-V。除增強表現產物之穩定性以外，此等融合伴侶似乎不會不利地影響針對構築體中免疫抗原之免疫反應。此外，合成融合肽可經設計，以提供可為篩選劑(諸如抗體)所識別之抗原決定基。

在一實施例中，將HIV抗原以N-末端鍵聯至酵母菌蛋白質，諸如 α 因子前原序列(亦稱為 α 因子訊號前導序列)，其胺基酸序列在本文中係以SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83例示。酵母菌 α 因子前原序列之其他序列係此項技術中所已知，且可用於本發明中。

用以設計本文所述融合蛋白質之HIV序列係基於特定人類免疫缺乏病毒之分離株。然而，本發明之一實施例係將相應序列或甚至出現在來自任何其他HIV病毒株或分離株之相應序列中之單一或小胺基酸取代、插入或缺失添加至或代入本文所述基於或衍生自特定病毒株或分離株之HIV抗原之任何部份中。在一實施例中，HIV抗原可藉由用來自一或多種不同HIV病毒株/分離株之相應序列取代本文所述HIV抗原之整個序列而生產。為另一序列添加來自一種HIV病毒株之序列或用該來自一種HIV病毒株之序列取代該另一序列容許(例如)針對特定個體或個體群(例如，指定國家或國家某一地區內之個體群，以靶向該國家或該國家某一地區中最普遍的HIV序列)定製免疫治療組合物。類似地，使用衍生自給定HIV病毒株、由其所確定或針對其公開之共有序列之全部或部份來改變給定HIV抗原之序列，以更緊密或精確地對應該共有序列亦係本發明之一實施例。根據本發明並如此項技術中通常所理解，「共有序列」通常係基於給定序列之特定位置進行多次序列比對後之最普遍核苷酸或胺基酸之序列。

作為上述類型修飾之一特定實例，HIV抗原可經修飾，以改變來自一種分離株之給定序列中之T細胞抗原決定基，以更緊密或精確地對應來自另一種分離株之T細胞抗原決定基，或更緊密或精確地對應該T細胞抗原決定基之共有序列。此等T細胞抗原決定基可包括優勢抗原決定基及/或亞優勢抗原決定基。例如，利用公開可用的軟體可容易地產生主要HIV蛋白質與來自各種病毒株之示例性序列之比對結果，該軟體將告知如何產生共有序列。此外，已公開許多HIV蛋白質

之共有序列。

在本發明之一實施例中，用於本發明組合物或方法中之HIV抗原係包含HIV抗原之融合蛋白質，其中該等HIV抗原包含HIV Gag或其至少一功能域、結構域或免疫原性域；HIV Pol或其至少一功能域、結構域或免疫原性域；及/或HIV Env或其至少一功能域、結構域或免疫原性域或由其組成。根據本發明任何實施例，提及「全長」蛋白質(或全長功能域、全長結構域或全長免疫學結構域)包括如本文所述或者另外如公開可用序列所知或所述之蛋白質或功能域、結構域或免疫學結構域之全長胺基酸序列。「近全長」蛋白質或結構域(其亦係蛋白質相似物中的一種)不同於全長蛋白質或結構域，不同之處在於此全長蛋白質或全長結構域之N-及/或C-末端添加或缺失或刪減1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸。一般提及蛋白質或結構域可包括全長及近全長蛋白質，及其其他相似物。

在一態樣中，該HIV抗原包含全長HIV蛋白質或其功能域、結構域或免疫原性域之至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的線性序列。在一態樣中，該HIV抗原與全長HIV蛋白質或其功能域、結構域或免疫原性域之至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之一實例。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV Gag p17-p24-p2融合蛋白質。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:1表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Gag p17蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:1之位置1-132)；2)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:1之位置133-363)；

及3)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:1之位置364-377)。
如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，由於SEQ ID NO:1之最初六個胺基酸為序列(M-G-A-R-A-S；SEQ ID NO:1之位置1-6)，故據信，該蛋白質在由酵母菌表現時之累積性良好，且因此，據信，沒有必要藉由(諸如)添加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83進行另外修飾來改良表現。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾而附上六組胺酸標記。由SEQ ID NO:1表示之融合蛋白質包含區段1及區段3殘基(上文所論述)。

雖然SEQ ID NO:1之p17部份包含據信在引起針對HIV之高效免疫反應方面具有潛在益處之區段1殘基，但與Gag之p24部份相比，其在HIV病毒株/分離株中並非極其高度保守。因此，可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:2表示，並描述於實例1中。SEQ ID NO:2僅包含HIV Gag p24及HIV Gag p2蛋白質。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV Gag p24-p2融合蛋白質。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:2表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：
1)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:2之位置1-231)；及2)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:2之位置232-245)。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol蛋白酶)之HIV Gag p24及p2之保守鄰接區域。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:3表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:3之位置1-231)；2)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:3之位置232-245)；及3)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:3之位置246-325)。SEQ ID NO:3之位置251上之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中係天冬胺酸，但在SEQ ID NO:3中經丙胺酸取代，以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例。在此實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV Gag p24及p2之保守鄰接區域融合至HIV Pol之最高度保守區之一Pol蛋白酶並融合至HIV Pol逆轉錄酶(RT)之一部份。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:4表示之單一多肽，具有以下序列元件自N-至C-端融合於框架內：1) HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:4之位置1-231)；2) HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:4之位置232-245)；3)缺乏N-端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中高度保守)之HIV

Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:4之位置246-325)；及4) HIV Pol的RT結構域之一部份之胺基酸序列，其經截短以排除已知具有許多HIV逃避突變之序列(聚合酶基序區)(SEQ ID NO:4之位置326-497)。SEQ ID NO:4之位置251之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中係天冬胺酸，但在SEQ ID NO:4中經丙胺酸取代以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。SEQ ID NO:4之位置435之胺基酸在天然HIV RT結構域中係天冬胺酸且對RT結構域之生物活性重要，但在SEQ ID NO:4中經丙胺酸取代以使該酶在酵母菌中之任何潛在活性不活化。病毒聚合酶在酵母菌中表現可引起假性或隱性酶活性，不利地影響酵母菌轉錄機制。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-端及/或C-端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-端經修飾以附加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-端經修飾以附加一個六組胺酸標記。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例。在此實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV Gag p24及p2之保守鄰接區域融合至HIV Pol之最高度保守區之一Pol蛋白酶且亦融合至Pol核糖核酸酶H及Pol整合酶之部份。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:5表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置1-231)；2)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置232-245)；3)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置246-325)；4)HIV Pol核糖核酸酶H蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置326-445)；及5)HIV Pol整合酶蛋白質之一部份之胺基酸序列(SEQ

ID NO:5之位置446-567)。SEQ ID NO:3之位置251上之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中為天冬胺酸，但在SEQ ID NO:3中經丙胺酸取代，以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。該融合蛋白質之Pol整合酶部份缺乏天然蛋白質之C-末端的166個胺基酸。具體言之，SEQ ID NO:5中不含「140s環」(參見Perryman等人，2010, *J. Mol. Biol.* 397(2):600-615)，以確保該融合蛋白質不包括該整合酶之催化功能。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

例如，為在酵母菌中穩定表現，在一態樣中，上文描述為SEQ ID NO:5之融合蛋白質另外在該融合蛋白質之N-末端包含以SEQ ID NO:82表示之 α 因子前導序列，其係融合至二胺基酸連接子序列Thr-Ser，其係融合至HIV p24蛋白質之N-末端或SEQ ID NO:5之N-末端。該融合蛋白質另外包含融合至C-末端(亦即，融合至SEQ ID NO:5之HIV Pol整合酶蛋白質之C-末端)之六組胺酸序列。整個融合蛋白質(包括N-末端 α 因子序列、連接子序列、HIV序列及C-末端六組胺酸序列)之胺基酸序列在本文中係由SEQ ID NO:86表示，其包含以下自N-至C-末端融合於框架中之序列元件：1) α 因子前導序列之胺基酸序列(SEQ ID NO:82，SEQ ID NO:86之位置1-89)；2)Thr-Ser之二胺基酸連接子序列(SEQ ID NO:86之位置90-91)；3)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置1-231；SEQ ID NO:86之位置92-322)；4)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置232-245；SEQ ID NO:86之位置323-336)；5)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位

置246-325；SEQ ID NO:86之位置337-416)；6)HIV Pol核糖核酸酶H蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置326-445；SEQ ID NO:86之位置417-536)；7)HIV Pol整合酶蛋白質之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置446-567；SEQ ID NO:86之位置537-658)；及8)六組胺酸序列(SEQ ID NO:86之位置659-664)。編碼SEQ ID NO:86及因此SEQ ID NO:5 (因為SEQ ID NO:5包含在SEQ ID NO:86中)之融合蛋白質並經密碼子最優化以供酵母菌表現之核酸序列在本文中係以SEQ ID NO:85表示。表現SEQ ID NO:5之酵母菌免疫療法組合物在本文中亦稱為GI-2013。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV整合酶之一部份。在各情形下，該HIV蛋白質係以SEQ ID NO:6表示之單一多肽，其包含HIV整合酶蛋白質之一部份之胺基酸序列。SEQ ID NO:6不含「140s環」(參見Perryman等人，2010, *J. Mol. Biol.* 397(2):600-615)，以確保該蛋白質不包括該整合酶之催化功能。如上所述，該構築體可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列表現為融合蛋白質及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現HIV Env蛋白質之三個相對保守部份之融合物。在各情形下，該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:7表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框

架內之序列元件：1)HIV Env蛋白質(包括gp41之N-末端區域至gp41之免疫顯性區域)之胺基酸序列(SEQ ID NO:7之位置1-88)；及2)HIV Env蛋白質(其係在HIV分離株中相當保守之gp41之短伸展(stretch))之胺基酸序列(SEQ ID NO:7之位置89-129)。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

本文描述可用於本發明之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之若干個其他實例。以下各實施例(以SEQ ID NO:8-13表示)利用以據信可引起不僅針對區段3及區段1抗原決定基而且針對其他HIV抗原決定基之免疫反應之方式融合至其他HIV蛋白質之選定部份之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)，以使針對HIV之高效免疫反應最大化。用於此等各構築體中之全長Gag蛋白質之胺基酸序列係以SEQ ID NO:74表示，且自N-至C-末端包含Gag之以下結構域：HIV Gag p17(SEQ ID NO:74之位置1-132)；HIV Gag p24 (SEQ ID NO:74之位置132-363)；HIV Gag p2 (SEQ ID NO:74之位置364-377)；及HIV p7 (SEQ ID NO:74之位置378-432)。表現SEQ ID NO:74之基於酵母菌之免疫治療組合物在本文中稱為GI-2010。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之一實例係由SEQ ID NO:8表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以N-末端融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol蛋白酶)之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:8表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末

端融合於框架內之序列元件：1)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:8之位置1-80)；及2)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:8之位置81-512)。SEQ ID NO:8之位置6上之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中係天冬胺酸，但在SEQ ID NO:8中經丙胺酸取代，以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:9表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以C-末端融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol蛋白酶)之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:9表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:9之位置1-432)；及2)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:9之位置433-512)。SEQ ID NO:9之位置438上之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中係天冬胺酸，但在SEQ ID NO:9中經丙胺酸取代，以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，由於SEQ ID NO:9之最初六個胺基酸為序列(M-G-A-R-A-S；SEQ ID NO:9

之位置1-6)，故據信，該蛋白質在由酵母菌表現時之累積性良好，且因此，據信，沒有必要藉由(諸如)添加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83進行另外修飾來改良表現。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:10表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以N-末端融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol逆轉錄酶(RT))之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:10表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Pol RT結構域之一部份(其經截短以不含已知具有許多HIV逃避突變之序列(聚合酶基序區))之胺基酸序列(SEQ ID NO:10之位置1-172)；及2)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:10之位置173-604)。SEQ ID NO:10之位置110上之胺基酸在天然HIV RT結構域中係天冬胺酸且對RT結構域之生物活性至關重要，但在SEQ ID NO:10中經丙胺酸取代，以使該酶在酵母菌中的任何潛在活性不活化。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:11表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以C-末端融合至HIV Pol之一最高

度保守區(Pol逆轉錄酶(RT))之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。
該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:11表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:11之位置1-432)；及2)HIV Pol RT結構域之一部份(其經截短以不含已知具有許多HIV逃避突變之序列(聚合酶基序區))之胺基酸序列(SEQ ID NO:11之位置433-604)。SEQ ID NO:11之位置542上之胺基酸在天然HIV RT結構域中係天冬胺酸且對RT結構域之生物活性至關重要，但在SEQ ID NO:11中經丙胺酸取代，以使該酶在酵母菌中的任何潛在活性不活化。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，由於SEQ ID NO:11之最初六個胺基酸為序列(M-G-A-R-A-S；SEQ ID NO:11之位置1-6)，故據信，該蛋白質在由酵母菌表現時之累積性良好，且因此，據信，沒有必要藉由(諸如)添加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83進行另外修飾來改良表現。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:12表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以N-末端融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol整合酶)之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:12表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Pol整合酶結構域之一部份之胺基酸序列，其經截短以不含「140s環」，以確保該蛋白質不包括該整合酶之催化功能(SEQ ID NO:12之位置1-122)；及2)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:12之位置123-554)。

如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，該蛋白質之N-末端經修飾以附上以SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83表示之序列。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

可用於本發明中且包含SEQ ID NO:74作為基本元件之針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物之另一實例係以SEQ ID NO:13表示。在該實施例中，酵母菌(例如，釀酒酵母菌)經設計，以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子之控制下表現以C-末端融合至HIV Pol之一最高度保守區(Pol整合酶)之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)。該HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:13表示之單一多肽，其具有以下自N-至C-末端融合於框架內之序列元件：1)HIV Gag蛋白質之胺基酸序列(p17-p24-p2-p7) (SEQ ID NO:13之位置1-432)；及2)HIV Pol整合酶結構域之一部份之胺基酸序列，其經截短以不含「140s環」，以確保該蛋白質不包括該整合酶之催化功能(SEQ ID NO:13之位置433-554)。如上所述，該融合蛋白質可利用如本文所述之任何N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，由於SEQ ID NO:13之最初六個胺基酸為序列(M-G-A-R-A-S；SEQ ID NO:13之位置1-6)，故據信，該蛋白質在由酵母菌表現時之累積性良好，且因此，據信，沒有必要藉由(諸如)添加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83進行另外修飾來改良表現。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。

激動劑抗原。在本發明之一些態樣中，可對野生型或參考HIV蛋白質之一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或更多個胺基酸進行胺基酸插入、缺失及/或取代，條件係所得

HIV蛋白質在用作本發明酵母菌-HIV免疫治療組合物中之抗原時可引起針對目標或野生型或參考HIV蛋白質之免疫反應，其包括增強的免疫反應、減弱的免疫反應或實質上類似的免疫反應。

例如，本發明包括使用HIV激動劑抗原(在本文中亦稱為「變構肽配體(APL)」)，其係HIV抗原，其可包括一或多個T細胞抗原決定基，且特定言之細胞毒性T淋巴細胞(CTL)抗原決定基，其已藉由用不同胺基酸殘基取代一或多個胺基酸殘基進行突變以產生「激動劑抗原決定基」。突變之目的在於引起針對HIV激動劑抗原決定基之T細胞反應，其與針對天然抗原之反應相比有所增強/放大/提升，其可藉由提升抗原決定基對MHC分子或在MHC呈遞之情景中針對識別該抗原決定基之T細胞受體之結合性或親和性而實現。因此，HIV抗原激動劑可提升T細胞反應針對感染宿主之天然HIV蛋白質之效力或效率。

本發明包括多種具有HIV變構肽配體(APL)突變(HIV激動劑抗原決定基)之新穎HIV抗原。將此等突變併入HIV Gag抗原或包含由針對HIV之基於酵母菌之免疫療法組合物表現之HIV Gag抗原之融合蛋白質中，且在使個體免疫後，與表現自然(天然或野生型) HIV Gag序列之基於酵母菌之免疫治療組合物所產生之T細胞反應相比，經設計以產生針對HIV感染靶細胞之提升、增強或放大的T細胞反應。如上所述，提升的T細胞反應可係由抗原中T細胞抗原決定基針對MHC分子或在MHC分子之情景中針對識別該抗原決定基之T細胞受體之結合性或親和性之提升而引起。

利用CTL抗原決定基之APL變異體之理念在癌症疫苗中係新興的概念，其中免疫療法之標靶可為自身抗原，其中有效的疫苗必須打破免疫耐受性。接種APL肽係一種打破耐受性的有效方式。然而，雖然已在CTL-誘導癌症疫苗中探究APL，且APL亦用於增強針對感染性因子(包括HIV)之抗體反應，但據信將APL或激動劑肽用於靶向傳染性

疾病(諸如HIV)(亦即，經由本發明基於酵母菌之免疫治療物)之CTL-誘導治療性疫苗係一種本發明所獨有的新概念。

因此，本發明之一實施例係關於一系列如本文所述針對HIV之基於酵母菌之免疫療法組合物，其中該酵母菌中表現之異質性抗原係HIV Gag之高度保守結構域，且在以下位點具有APL突變：i)在HIV進化支上高度不變之位點，及；ii)免疫「脆弱」位點，依據係靶向此等位點之T細胞優先見於傑出非進展者患者(亦即，彼等在沒有醫療干預下長期控制HIV之患者)中。最近利用計算演算法鑑別出此等「脆弱」HIV Gag殘基中的一些，且預期在突變時藉由破壞Gag亞單位間相互作用而使HIV衣殼不穩定(Dahirel等人，2011，上文)。此等殘基(稱為「區段3」殘基(參見上文論述))之關鍵作用與具有可靶向含此等殘基之抗原決定基之T細胞之患者控制病毒進展之觀察結果一致。

值得注意的是，HIV傑出非進展者通常具有在一般人群中並非普遍對偶基因之HLA類型。一般人群中且在多種不同種族間以相對緊密匹配的頻率出現之普遍對偶基因之一實例為HLA-A*0201。因此，發明人提出，可在具有常見HLA對偶基因(諸如HLA-A*0201)之患者中誘導針對區段3殘基之高結合性T細胞反應之基於酵母菌之免疫治療組合物代表一種HIV免疫療法之強大新型途徑。本文揭示此等免疫治療物之設計及生產。例如，實例3描述顯示用表現HIV Gag之基於酵母菌之免疫治療物進行免疫可在表現人類HLA-A2之小鼠中產生HLA-A2-特異性、Gag區段1及區段3-特異性T細胞反應之實驗。因此，包含區段3抗原決定基之酵母菌-HIV免疫治療物產生靶向涉及到控制HIV之Gag免疫脆弱區之T細胞反應。

更具體言之，發明人在本文中提出一系列可用於基於酵母菌之免疫療法組合物中之HIV Gag-APL抗原，其中APL係用於在HLA-A2個體中引起靶向區段3的T細胞反應。此等APL-誘導T細胞反應將比相

應肽通常觀察到的反應具有更高結合性及功效，依據係其等將在如實例中所述功能分析中被篩選。

為產生可改良對HIV Gag之T細胞反應之功效之基於酵母菌之免疫治療物，提出兩種方法。以下論述描述I類結合9-聚合體之初始評估，但本發明並不限於9-聚合體或I類MHC抗原決定基，因為可評估可用於本發明HIV抗原中之更小或更大抗原決定基及/或II類MHC抗原決定基。在第一個方法中，在包含一或多種區段3及/或區段1殘基之篩選HIV T細胞抗原決定基中，取代肽殘基2、3或9。此等係更為保守且將肽控制在I類MHC結合槽中之所謂'錨定'殘基。改變此等殘基係為提高肽對MHC之親和性(參見例如 Van Stipdonk及Badia-Mrtinez等人(2009). 69(19) 7784-7792)。在第二個方法中，取代殘基4至8。該區域包括可拱離結合槽並與T細胞受體相互作用之殘基。改變此等殘基旨在調節MHC/肽對T細胞受體之親和性(參見例如Fong及Hou (2001). PNAS 98(15) 8809-8814)。亦可考慮使用帶有該等兩種方法之序列組合之HIV Gag序列。

並非所有用於藉由本發明修飾之MHC I-類受限HIV抗原決定基均係確切的9個胺基酸；一些可多達11個胺基酸，且在此等情形下，錨定殘基間之殘基數可有所不同。

HIV傑出非進展者之抗原決定基結合MHC對偶基因而非普遍存在的HLA-A*-0201。因此，在設計本發明HIV Gag-APL抗原中包括之另一方面包括在關鍵錨定殘基位置使用殘基，其較佳或至少與HLA-A*0201結合相容。上游之較佳HLA-A*0201結合殘基(*通常為位置2)為L、M及V，且此位置上之耐受殘基為T、Q、A及I。C端之較佳HLA-A*0201結合殘基為I、V及L，且C端之耐受殘基為M、T及A (Sidney及Southwood等人2001 Human Immunology 62:1200-1216)。

表1呈現五種與控制HIV有關且包含區段3殘基(第2列中呈現之

「天然」序列)之抗原決定基。肽#5係最近由發明人所發現之抗原決定基。就各抗原決定基而言，發明人已基於上述基本原理設計出六種不同的APL抗原決定基。此等設計物試圖改變抗原決定基對I類MHC之結合親和性，並使得該肽更易於結合HLA-A*0201。

表1：APL設計(錨定殘基改變)

肽#	序列 (區段3加粗)	天然肽之 HLA結合	APL修飾 (區段3加粗；APL殘基 加底線)	錨定殘基 或TCR親和性 變化	SEQ ID NO:
1	KAFSPEVIPMF (SEQ ID NO:76)	B57	KALSPEVIPMV	錨定殘基	14
			KAMSPEVIPMV	錨定殘基	15
			KAVSPEVIPMV	錨定殘基	16
			KALSPEVIPMI	錨定殘基	17
			KAMSPEVIPMI	錨定殘基	18
			KAVSPEVIPMI	錨定殘基	19
2	TSTLQEQIGW (SEQ ID NO:77)	B57	TSLLQEQIGV	錨定殘基	20
			TSMLQEQIGV	錨定殘基	21
			TSVLQEQIGV	錨定殘基	22
			TSLLQEQIGI	錨定殘基	23
			TSMLQEQIGI	錨定殘基	24
			TSVLQEQIGI	錨定殘基	25
3	KRWILGLNK (SEQ ID NO:78)	B27	KRLIILGLNV	錨定殘基	26
			KRMILGLNV	錨定殘基	27
			KRVILGLNV	錨定殘基	28
			KRLIILGLNI	錨定殘基	29
			KRMILGLNI	錨定殘基	30
			KRVILGLNI	錨定殘基	31
4	DRFYKTLRA (SEQ ID NO:79)	B14	DLFYKTLRV	錨定殘基	32
			DMFYKTLRV	錨定殘基	33
			DVFYKTLRV	錨定殘基	34
			DLFYKTLRV	錨定殘基	35
			DMFYKTLRI	錨定殘基	36
			DVFYKTLRI	錨定殘基	37

肽#	序列 (區段3加粗)	天然肽之 HLA結合	APL修飾 (區段3加粗；APL殘基 加底線)	錨定殘基 或TCR親和性 變化	SEQ ID NO:
5	YVDRFYKTLRA* (SEQ ID NO:80)	不詳	YVD <u>L</u> FYKTLR <u>V</u>	錨定殘基	38
			YVDM <u>F</u> YKTLR <u>V</u>	錨定殘基	39
			YVD <u>V</u> FYKTLR <u>V</u>	錨定殘基	40
			YVD <u>L</u> FYKTLR <u>I</u>	錨定殘基	41
			YVDM <u>F</u> YKTLR <u>I</u>	錨定殘基	42
			YVD <u>V</u> FYKTLR <u>I</u>	錨定殘基	43

*發明人所發現的新穎抗原決定基。

表2呈現上表1中所述與控制HIV有關之五種相同抗原決定基，但在各情形下顯示六種改變肽之TCR-結合區之不同推薦APL設計。在設計以下肽時，發明人利用以下基本原理，選擇以下修飾：i)集中位於錨定殘基間之修飾，因為此等修飾影響與TCR之相互作用之機會最大，及；ii)僅略微影響空間環境之修飾。結構改變過大可完全消除TCR之任何識別，且亦可藉由改變該肽之構型動力學直接或間接地影響MHC結合。可使破壞性空間效應最小化之殘基改變之實例包括(但不限於)「保守取代」，諸如：1)天冬醯胺/天冬胺酸；2)麩胺醯胺/麩胺酸；3)苯丙胺酸/酪胺酸，4)精胺酸/離胺酸，5)甘胺酸/丙胺酸，6)白胺酸/異白胺酸，7)纈胺酸/白胺酸，8)纈胺酸/丙胺酸，9)絲胺酸/蘇胺酸。

表2：APL設計(TCR:MHC/肽相互作用)

肽#	序列 (區段3加粗)	天然肽之 HLA結合	APL修飾 (區段3加粗；APL殘基 加底線)	錨定殘基 或TCR親和性 變化	SEQ ID NO:
1	KAFSPEVIPMF (SEQ ID NO:76)	B57	KAFSPE <u>L</u> IPMF	TCR	44
			KAFSPEA <u>I</u> PMF	TCR	45
			KAFSPEV <u>L</u> PMF	TCR	46
			KAFT <u>P</u> EVIPMF	TCR	47
			KAFS <u>P</u> QVIPMF	TCR	48
			KAFS <u>P</u> DVIPMF	TCR	49

肽#	序列 (區段3加粗)	天然肽之 HLA結合	APL修飾 (區段3加粗；APL 殘基 加底線)	錨定殘基 或TCR親和性 變化	SEQ ID NO:
2	TSTLQEQIGW (SEQ ID NO:77)	B57	TSTL <u>N</u> EQIGW	TCR	50
			TSTLQENIGW	TCR	51
			TSTL <u>E</u> EQIGW	TCR	52
			TSTLQEEIGW	TCR	53
			TSTLQQQIGW	TCR	54
			TSTLQDQIGW	TCR	55
3	KRWILGLNK (SEQ ID NO:78)	B27	KRW <u>L</u> ILGLNK	TCR	56
			KRW <u>I</u> LLGLNK	TCR	57
			KRW <u>I</u> IIGLNK	TCR	58
			KRWIL <u>A</u> LNK	TCR	59
			KRWILG <u>I</u> NK	TCR	60
			KRWILG <u>V</u> NK	TCR	61
4	DRFYKTLRA (SEQ ID NO:79)	B14	DRFY <u>R</u> TLRA	TCR	62
			DRFY <u>M</u> TLRA	TCR	63
			DRFYK <u>S</u> LRA	TCR	64
			DRFYKT <u>I</u> RA	TCR	65
			DRFYKTVRA	TCR	66
			DRFYKT <u>A</u> RA	TCR	67
5	YVDRFYKTLRA* (SEQ ID NO:80)	不詳	YVDRFY <u>R</u> TLRA	TCR	68
			YVDRFY <u>M</u> TLRA	TCR	69
			YVDRFYK <u>S</u> LRA	TCR	70
			YVDRFYKT <u>I</u> RA	TCR	71
			YVDRFYKTVRA	TCR	72
			YVDRFYKT <u>A</u> RA	TCR	73

本發明之一實施例係關於一種針對HIV之基於酵母菌之免疫療法組合物，其包含至少一種HIV Gag抗原(包括全長Gag及/或HIV Gag之任何功能域、結構域或免疫原性域)且包含至少一種產生如上所述APL抗原決定基之胺基酸修飾。本發明之該態樣包括一種基於酵母菌之免疫療法組合物，其包含至少一種包含任何由表1或表2中所列SEQ ID NO:14-73中任一者或多者表示之APL抗原決定基序列之HIV Gag抗原。在一態樣中，用作基劑且經進一步修飾以包含一或多種本文所述APL抗原決定基之含HIV Gag抗原包括任何本文以SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID

NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:86表示之含HIV Gag抗原。APL抗原決定基可藉由取代插入任何此等Gag抗原之天然序列中，以使得APL抗原決定基替代相應天然序列及/或可將APL抗原決定基或包含APL抗原決定基中一或多者之HIV Gag序列添加至任何本文所述HIV抗原(因此亦包含SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7)，從而藉由添加(插入)修飾該HIV抗原。來自相同天然抗原決定基序列之多種不同APL抗原決定基可用於本發明之單一HIV抗原中。例如，包含SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:73之HIV Gag抗原可合併形成單一HIV融合蛋白質，且可另外藉由取代添加或併入任何本文所述HIV抗原中。舉個簡單實例，本發明基於酵母菌之免疫療法組合物包含酵母菌(例如，釀酒酵母菌)，其經設計以在銅誘導型啟動子*CUP1*或*TEF2*啟動子控制下表現由SEQ ID NO:74表示之全長HIV Gag蛋白質(p17-p24-p2-p7)，除Gag蛋白質經修飾以取代由SEQ ID NO:68表示之APL抗原決定基以外，其對應SEQ ID NO:74之位置296-306 (SEQ ID NO:74中之相應天然序列，其可容易地藉由熟習此項技術者利用簡單比對序列而確定)。如上所述，該抗原可利用任何如本文所述N-末端及/或C-末端序列構建及/或可將胺基酸連接子引入該融合蛋白質之蛋白質或結構域間。在一態樣中，由於SEQ ID NO:11之最初六個胺基酸為序列(M-G-A-R-A-S；SEQ ID NO:11之位置1-6)，故據信，該蛋白質在由酵母菌表現時之累積性良好，且因此，據信，沒有必要藉由(諸如)添加SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83進行另外修飾來改良表現。在一態樣中，該融合蛋白質之C-末端經修飾以附上六組胺酸標記。本發明明確涵蓋利用本文所述HIV抗原及本文所述APL抗原決定基中任一者或多者構築之其他類似較複雜融合蛋

白質，且熟習此項技術者基於本文所提供之教示將知曉其等。

在本發明之一態樣中，在本文中確定為SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:86之融合蛋白質經修飾以包括以如表1或表2中所列SEQ ID NOs:14-73中之任一者或多者表示之APL抗原決定基中之一或多者。APL抗原決定基可藉由取代插入SEQ ID NO:5或86之天然序列中，以使得該APL抗原決定基替代相應天然序列及/或整個APL抗原決定基可作為插在此等融合蛋白質之任何兩個其他片段間之新的融合片段添加至SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:86中。

病毒樣顆粒(VLP)。本發明之一實施例係關於本文所述針對HIV之基於酵母菌之免疫療法組合物，其中HIV抗原包含HIV Gag序列，且其中該HIV Gag序列在表現於酵母菌中時形成極大顆粒(VLP)。事實上，當以酶法方式移除酵母菌細胞壁時，VLP可自質膜出芽(Sayuri Sakuragi及Toshiyuki Goto等人2002 PNAS 99(12) 7956-61)。在開發有效的基於酵母菌之HIV免疫治療組合物的過程中，發明人已在HIV中利用VLP。已知，藉由表現病毒抗原所形成的VLP(包括B型肝炎病毒(HBV)核及C型肝炎病毒(HCV)核具有高度免疫原性，具有類佐劑性質，且可引起強烈T細胞反應(例如，Sominskaya I, Skrastina D 2010 Clin. Vaccine Immun. 17(6) 1027-33；Acosta-Rivero N等人2005 BBRC 334(3): 901-6)。已顯示，作為亞單位疫苗，HIV-1 Gag-病毒樣顆粒係安全強效的HIV-疫苗候選者，其可引起強烈細胞及體液免疫而無需任何佐劑(*J Innate Immun.* 2012;4(5-6):579-90)。不受理論之約束，發明人相信，由於I類MHC早期及晚期呈遞抗原(如下文所述)，基於完整酵母菌之免疫治療物(其中表現於酵母菌細胞質中之異質性抗原係呈VLP形式)將成為尤其有效的T細胞活化實體。

在流行的基於酵母菌之免疫療法活動模型中，以下步驟可引起酵母菌表現(異質性)抗原之交叉呈遞：i)藉由抗原呈遞細胞(APC)(包

括樹突細胞)吞噬酵母菌誘導吞噬體成熟，變為蛋白水解勝任型吞噬溶解小體(proteolytically competent phagolysosome)，ii)使該酵母菌分解，並將異質性抗原釋放至吞噬溶解小體上之管腔內；iii)將異質性抗原轉運至細胞溶質，並使該抗原經歷蛋白酶體分解，以產生肽；iv)經由TAP轉運體將該等肽轉運至ER管腔，並與MHC負載物耦合；及v)將肽/MHC複合物轉運至囊泡之質膜。

最近公開的內容認為，就VLP而言，有一種可利用I類MHC呈遞VLP抗原之替代性途徑。在此情形下，I類呈遞係藉由負載於自細胞表面再循環而來之I類MHC分子上而發生(Win SJ, Ward VK (2011). *Immunol. Cell Biol.* 89(6):681-8.)。此直接過程之動力學比經典途徑更快速。

發明人建議在本文中生產一種由同時表現可溶性HIV Gag及HIV Gag VLP之完整酵母菌組成之基於完整酵母菌之免疫治療組合物。不受理論之約束，發明人相信，與其他類型的疫苗或僅表現可溶性HIV Gag或僅表現VLP HIV Gag之酵母菌相比，此疫苗具有高T細胞刺激效力。預期，經由經典途徑進行呈遞可溶形式之HIV Gag之速度較緩慢，而經由I類MHC再循環途徑呈遞VLP形式之HIV Gag之速度較快。淨結果係APC呈遞該抗原之時間長於僅表現VLP或可溶形式之Gag之酵母菌。該更長的抗原呈遞時間範圍為與同源T細胞相互作用提供更大機會。本文所述SEQ ID NO:74之胺基酸序列係在酵母菌中形成VLP之全長HIV Gag之序列之代表。

在另一實施例中，本發明係關於一種基於酵母菌之免疫療法組合物，其中HIV抗原包含並非呈VLP形式而是呈可溶/非寡聚形式之HIV Gag抗原。在該實施例中，該抗原旨在加強藉由APC對該抗原之蛋白水解消化，以提高交叉呈遞效率。如上所述，以SEQ ID NO:74表示之野生型HIV-1 Gag之序列形成VLP。因此，發明人已對VLP-組

裝序列進行修飾，以變成可用於本發明之該態樣中之可溶/非寡聚形式，或如上所述在單一酵母菌中與VLP形式組合使用。在一態樣中，該抗原藉由缺失SEQ ID NO:74 MGARA之位置1-5中之N-末端甘胺酸(加底綫)而修飾(先前已由Sakuragi等人在2002年時證實)，以消除HIV-1 Gag形成VLP之能力。此適用於本發明之HIV抗原在本文中係由SEQ ID NO:75表示。另一產生不會形成VLP之HIV Gag抗原之方法係缺失所有或部份p7/核衣殼區。由SEQ ID NO:1表示之HIV Gag抗原係此抗原之一實例。

本發明亦包括上述任何融合蛋白質之相似物，以及此等融合蛋白質或另外本文所述者之一部份之個別HIV蛋白質或其部份(包括任何功能及/或免疫原性域)之相似物、變異體或突變體之用途。在一態樣中，本發明包括胺基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%分別與本文所述融合蛋白質或個別HIV蛋白質或HIV抗原之中任一者之胺基酸序列相同之融合蛋白質或個別(單一)HIV蛋白質或HIV抗原之用途，包括任何以本文具體序列識別符引用之HIV蛋白質、HIV抗原及融合蛋白質(例如，SEQ ID NO:1-13中任一者、包含SEQ ID NO:14-73、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75中任一者或由其組成之HIV抗原)，超過融合蛋白質之全長，或相對於融合蛋白質之定義片段或定義蛋白質或者其結構域(免疫原性域或功能域(亦即，具有至少一種生物活性之結構域))，其形成融合蛋白質之一部份。許多CTL抗原決定基(可被來自感染了HIV之患者之細胞毒性T淋巴細胞所識別之抗原決定基)及逃避突變(由於抗病毒藥物之選擇壓力而出現在HIV蛋白質中之突變)係此項技術中所已知，且此資訊亦可用於進行取代或產生本文所述HIV抗原之變異體或相似物，以在本發明HIV抗原中提供特異性序列。

本發明之另一態樣包括HIV抗原，其包含以下任何一者或多者表示之胺基酸序列、大體上由其組成或由其組成：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及/或SEQ ID NO:75。該HIV抗原適用於本文所述發明之任何實施例中，包括用於本文所述之基於酵母菌之免疫療法組合物中。

基於酵母菌之免疫療法組合物。 在本發明之各種實施例中，本發明包括至少一種「基於酵母菌之免疫治療組合物」(該片語可與以下片語互換使用：「基於酵母菌之免疫療法產品」、「基於酵母菌之免疫療法組合物」、「基於酵母菌之組合物」、「基於酵母菌之免疫治療

物」、「基於酵母菌之疫苗」或該等片語之衍生詞)之用途。「免疫治療組合物」係一種可在個體中引起足以達到至少一種治療益處之免疫反應之組合物。如本文所使用，基於酵母菌之免疫治療組合物係指一種包含酵母菌媒介組分且可在個體中引起足以達到至少一種治療益處之免疫反應之組合物。更特定言之，基於酵母菌之免疫治療組合物係一種包含酵母菌媒介組分且可引起或誘發免疫反應(諸如細胞免疫反應，包括(但不限於)T細胞介導的細胞免疫反應)之組合物。在一態樣中，可用於本發明之基於酵母菌之免疫治療組合物可誘發CD8⁺及/或CD4⁺ T細胞介導的免疫反應，且在一態樣中，誘發CD8⁺及CD4⁺ T細胞介導的免疫反應。視情況地，基於酵母菌之免疫治療組合物可引起體液免疫反應。可用於本發明之基於酵母菌之免疫治療組合物可(例如)在個體中引起免疫反應，以使得該個體免受HIV感染及/或治療該個體之HIV感染或由該HIV感染所引起之症狀。

本發明基於酵母菌之免疫療法組合物可係「預防性」或「治療性」。當以預防目的提供時，本發明組合物係在HIV感染之任何症狀之前提供。此組合物可在圍產期投與(例如，產前投與至母親，其後可投與至剛出生或出生後不久之嬰兒，(例如)以保護已感染或可能已感染HIV之母親之嬰兒)、在嬰兒出生時或出生後不久投與、在兒童早期投與、在兒童晚期或青春期中投與及/或投與至成人(尤其係HIV感染風險較高之成人)。預防性投與免疫療法組合物起到以下作用：預防後續HIV感染、若接著發生HIV感染時更快速地或更徹底地解決感染及/或若接著發生HIV感染時舒緩HIV感染症狀。當以治療目的提供時，免疫療法組合物係在發生HIV感染之時或之後提供，目的係舒緩至少一個感染症狀，且較佳地，目的係消除感染、提供長期緩和感染及/或提供針對後續感染之長期免疫力。

通常，基於酵母菌之免疫療法組合物包括酵母菌媒介及由該酵

母菌媒介表現、與其附接或與其混合之至少一種抗原或其免疫原性域，其中該抗原相對於該酵母菌而言係異質性，且其中該抗原包含一或多種HIV抗原或其免疫原性域。在一些實施例中，該抗原或其免疫原性域係作為融合蛋白質提供。本文已描述若干種適用於本發明組合物及方法中之HIV融合蛋白質。在本發明之一態樣中，融合蛋白質可包括兩種或更多種抗原。在一態樣中，該融合蛋白質可包括一或多種抗原之兩種或更多種免疫原性域、或者一或多種抗原之兩種或更多種抗原決定基。

在用於本發明之任何基於酵母菌之免疫療法組合物中，以下關於酵母菌媒介之態樣包括在本發明中。根據本發明，酵母菌媒介係可在本發明治療組合物中與一或多種抗原、其免疫原性域或其抗原決定基聯合使用之任何酵母菌細胞(例如，整個或完整細胞)或其衍生物(參見下文)，或在一態樣中，該酵母菌媒介可單獨使用或用作佐劑。因此，該酵母菌媒介可包括(但不限於)完整(整個)活的酵母菌微生物(亦即，具有其所有組分之酵母菌細胞，包括細胞壁)、殺死(死的)或不活化完整酵母菌微生物或完整/整個酵母菌之衍生物，包括：酵母菌原生質球(亦即，缺少細胞壁之酵母菌細胞)、酵母菌胞質體(亦即，缺少細胞壁及細胞核之酵母菌細胞)、酵母菌殘骸(亦即，缺少細胞壁、細胞核及細胞質之酵母菌細胞)、亞細胞酵母菌膜萃取物或其片段(亦稱為酵母菌膜顆粒，且先前稱為亞細胞酵母菌顆粒)、任何其他酵母菌顆粒或酵母菌細胞壁製備物。

在本發明之一態樣中，該酵母菌媒介係完整酵母菌。在一態樣中，該酵母菌係「加工過的酵母菌」(下文所述；通常為已經以產生酵母菌細胞壁製備物、酵母菌膜顆粒及/或酵母菌片段(亦即，不完整)及可溶性酵母菌蛋白質之方式研磨或加工之酵母菌)。在一態樣中，該酵母菌媒介包括一起投與、同時但分開注射投與或依次注射(例

如，暫時分開，其可包括初免-加強策略)投與之完整酵母菌及加工過的酵母菌。

酵母菌原生質球通常係藉由酶消化酵母菌細胞壁而製得。此方法描述在(例如)Franzussoff等人，1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674中，其全文以引用的方式併入本文中。

酵母菌胞質體通常係藉由去除酵母菌細胞之核而製得。此方法描述在(例如)Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55中，其全文以引用的方式併入本文中。

酵母菌殘骸通常係藉由重新密封透性化或裂解細胞而製得，但需不含該細胞之至少一些胞器。此方法描述在(例如)Franzussoff等人，1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614及Bussey等人，1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196中，其各自之全文以引用的方式併入本文中。

酵母菌膜顆粒(亞細胞酵母菌膜萃取物或其片段)係指缺乏天然細胞核或細胞質之酵母菌膜。該顆粒可具有任何尺寸，包括天然酵母菌膜之尺寸至先後藉由超音波或熟習此項技術者所知之其他膜破裂方法及重新密封產生之微粒之尺寸。一種用於產生亞細胞酵母菌膜萃取物之方法描述在(例如)Franzussoff等人，1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674中。亦可使用包含酵母菌膜部份之酵母菌膜顆粒之片段，且當抗原或其他蛋白質係在製備酵母菌膜顆粒、所欲抗原或其他蛋白質之前藉由酵母菌重組表現時。所欲抗原或其他蛋白質可攜帶在膜內部、在膜兩表面上或其組合(亦即，蛋白質可在膜內部及外部及/或橫跨酵母菌膜顆粒之膜)。在一實施例中，酵母菌膜顆粒係重組酵母菌膜顆粒，其可係膜表面上包含至少一種受到關注的所需抗原或其他蛋白質或至少一種受到關注的所需抗原或其他蛋白質至少部份包埋在膜內之完整、受到破壞或受到破壞並重新密封的酵母菌膜。

酵母菌細胞壁製備物之一實例係表面上攜帶抗原或抗原至少部份包埋在細胞壁內，以使得酵母菌細胞壁製備物在投與至動物時刺激針對疾病標靶之所需免疫反應之單離酵母菌細胞壁之製備物。

任何酵母菌株均可用以生產本發明酵母菌媒介。酵母菌係屬於以下三個綱中之一之單細胞微生物：子囊菌綱(Ascomycete)、擔子菌綱(Basidiomycete)及不完全真菌綱(Fungi Imperfecti)。篩選用作免疫調節劑之酵母菌類型之一考量因素係酵母菌之致病性。在一實施例中，該酵母菌係非致病菌株，諸如釀酒酵母菌。選擇非致病酵母菌株使該酵母菌媒介所投與之個體之任何副作用最小化。然而，若可藉由熟習此項技術者所知之任何方式去除酵母菌之致病性，則可使用致病酵母菌(例如，突變株)。

可用於本發明中之酵母菌株屬包括(但不限於)酵母菌屬、念珠菌屬、隱球菌屬、漢遜酵母屬、克魯維酵母菌屬、畢赤酵母屬、紅酵母屬、裂殖酵母屬及耶氏酵母屬。在一態樣中，酵母菌屬係選自酵母菌屬、念珠菌屬、漢遜酵母屬、畢赤酵母屬或裂殖酵母屬，且在一態樣中，酵母菌屬係選自酵母菌屬、漢遜酵母屬及畢赤酵母屬，且在一態樣中，使用酵母菌屬。可用於本發明中之酵母菌株種包括(但不限於)釀酒酵母菌、卡爾酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、乳酒念珠菌(*Candida kefir*)、熱帶念珠菌(*Candida tropicalis*)、羅倫隱球菌(*Cryptococcus laurentii*)、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、異常漢遜酵母(*Hansenula anomala*)、多形漢遜酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克魯維酵母菌(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克魯維酵母菌(*Kluyveromyces lactis*)、馬克斯克魯維酵母菌變種(*Kluyveromyces marxianus var. lactis*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、深紅酵母(*Rhodotorula rubra*)、粟酒裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)及耶氏解脂酵母(*Yarrowia*

lipolytica)。應瞭解，許多此等種包括各種意欲包括在上述種內之亞種、類型、亞型等。在一態樣中，用於本發明中之酵母菌種包括釀酒酵母菌、白色念珠菌、多形漢遜酵母、巴斯德畢赤酵母及粟酒裂殖酵母菌。釀酒酵母菌係有用，因為其相對易於操縱且係「普遍認為安全 (Generally Recognized As Safe)」或「GRAS」用作食品添加劑 (GRAS, FDA proposed Rule 62FR18938, April 17號, 1997)。本發明之一實施例係可將質體複製至特定高拷貝數之酵母菌株，諸如釀酒酵母菌 *cir*^o 菌株。該釀酒酵母菌菌株係可支持容許以高水平表現一或多種靶抗原及/或抗原融合蛋白質及/或其他蛋白質之表現載體之菌株。此外，本發明中可使用任何突變酵母菌株，包括彼等所表現靶抗原或其他蛋白質之轉譯後修飾減少者，諸如延伸N-連接醮化之酶之突變。

在本發明之大多數實施例中，該基於酵母菌之免疫療法組合物包含至少一種抗原、其免疫原性域或其抗原決定基。預期用於本發明中之抗原包括任何HIV蛋白質或其免疫原性域，包括HIV蛋白質或其結構域之突變體、變異體及激動劑，希望出於預防或治療地使宿主對HIV感染免疫之目的引起針對其之免疫反應。上文及本文別處詳細描述可用於本發明各種實施例中之HIV抗原。

在本發明之一態樣中，該酵母菌媒介經操作，以使得藉由將所表現的蛋白質產物部份或完全傳遞或轉位至酵母菌媒介表面上而表現或提供抗原(細胞外表現)。達到本發明之此態樣之一方法係使用間隔臂，以將一或多種蛋白質置於酵母菌媒介表面上。例如，可使用間隔臂產生所欲抗原或其他蛋白質與將該(等)所欲抗原或其他蛋白質靶向酵母菌細胞壁之蛋白質之融合蛋白質。例如，一種可用以標靶其他蛋白質之此蛋白質係可將該(等)抗原或其他蛋白質靶向酵母菌細胞壁，以使得該抗原或其他蛋白質位於該酵母菌表面上之酵母菌蛋白質(例如，細胞壁蛋白質2 (*cwp2*)、Aga2、Pir4或Flo1蛋白質)。間隔臂可使

用不同於酵母菌蛋白質之蛋白質；然而，就任何間隔臂蛋白質而言，最好具有針對靶抗原而非間隔臂蛋白質之免疫原性反應。正因如此，若間隔臂使用其他蛋白質，則所使用的間隔臂蛋白質不應產生針對間隔臂蛋白質自身，以致於壓過針對靶抗原之免疫反應之強烈免疫反應。熟習此項技術者應以使針對間隔臂蛋白質之免疫反應相對於針對靶抗原之免疫反應較小為目的。若需要，間隔臂可經構建以具有容許自酵母菌輕易移除或加工掉抗原之切割位點(例如，蛋白酶切割位點)。測定免疫反應量級之任何已知方法均可使用(例如，抗體生產、溶解分析等)且容易為熟習此項技術者所知。

用於定位欲曝露於酵母菌表面上之靶抗原或其他蛋白質之另一方法係使用訊號序列(諸如糖基磷脂酰肌醇(GPI))將目標錨定至酵母菌細胞壁上。或者，定位可藉由將靶向所欲抗原或其他蛋白質之訊號序列附加至分泌途徑中，經由轉位進入內質網(ER)中，以使得該抗原與附接至細胞壁之蛋白質(例如，cwp)結合而完成。

在一態樣中，該間隔臂蛋白質為酵母菌蛋白質。該酵母菌蛋白質可由酵母菌蛋白質之約兩個與約800個間之胺基酸組成。在一實施例中，該酵母菌蛋白質係約10至700個胺基酸。在另一實施例中，該酵母菌蛋白質係約40至600個胺基酸。本發明之其他實施例包括至少250個胺基酸、至少300個胺基酸、至少350個胺基酸、至少400個胺基酸、至少450個胺基酸、至少500個胺基酸、至少550個胺基酸、至少600個胺基酸或至少650個胺基酸之酵母菌蛋白質。在一實施例中，該酵母菌蛋白質之長度為至少450個胺基酸。使抗原表面表現最優化(若需要)之另一考量因素係該抗原及間隔臂組合是應作為單體或是二聚體或是作為三聚體或甚至更多個連接在一起之單元表現。使用單體、二聚體、三聚體等容許使抗原適當間隔開或折疊，以使得該抗原之一些部份(若非全部)以使其更具免疫原性之方式展示於酵母菌媒介表面

上。

使用酵母菌蛋白質可使融合蛋白質在酵母菌媒介中之表現穩定，防止所表現的融合蛋白質進行轉譯後修飾及/或將該融合蛋白質靶向該酵母菌之特定分室(例如，表現於酵母菌細胞表面上)。為遞送至酵母菌分泌途徑中，欲使用的示例性酵母菌蛋白質包括(但不限於)：Aga (包括(但不限於)Aga1及/或Aga2)；SUC2 (酵母菌轉化酶)； α 因子訊號前導序列；CPY；Cwp2p(因其在細胞壁中之定位及滯留)；用於在子細胞形成初始階段期間定位在酵母菌細胞芽之BUD基因；Flo1p；Pir2p；及Pir4p。

可使用其他序列使該蛋白質靶向、保持及/或穩定至酵母菌媒介之其他部份，例如，在細胞溶質或粒線體或內質網或細胞核中。可用於上述任何實施例之適宜酵母菌蛋白質之實例包括(但不限於)TK、AF、SEC7；磷酸烯醇丙酮酸羧激酶PCK1、磷酸甘油激酶PGK及磷酸丙糖異構酶TPI基因產物(因其葡萄糖之可抑制表現及胞質定位)；熱休克蛋白SSA1、SSA3、SSA4、SSC1，將細胞曝露至熱處理時誘導其表現且其蛋白質更具熱穩定性；進入粒線體之粒線體蛋白質CYC1；ACT1。

本發明涵蓋生產酵母菌媒介及使酵母菌媒介表現抗原及/或其他蛋白質及/或所欲製劑、使酵母菌媒介與抗原及/或其他蛋白質及/或所欲製劑組合及/或締合，以產生基於酵母菌之免疫療法組合物之方法。

根據本發明，術語「酵母菌媒介-抗原複合物」或「酵母菌-抗原複合物」通常係用以描述酵母菌媒介與抗原之任何聯繫，且可與「基於酵母菌之免疫療法組合物」(當此組合物係用於引起如上所述免疫反應時)互換使用。此聯繫包括由酵母菌(重組酵母菌)表現抗原、將抗原引入酵母菌中、抗原物理附接至酵母菌及在(諸如)緩衝劑或其他溶

液或調配物(例如，醫藥上可接受的賦形劑)中將酵母菌與抗原混合在一起。下文詳細描述此等類型之複合物。

在一實施例中，用編碼蛋白質(例如，抗原)之異質核酸分子轉染用以製備該酵母菌媒介之酵母菌細胞，以藉由該酵母菌細胞表現該蛋白質。此酵母菌在本文中亦稱為重組酵母菌或重組酵母菌媒介。然後，可將包括在醫藥上可接受的賦形劑中之完整的酵母菌細胞，或由該酵母菌細胞所產生之衍生物或其他經修飾媒劑(例如，酵母菌原生質球、胞質體、殘骸或亞細胞顆粒)投與至個體。在本發明之一態樣中，然後可將該酵母菌媒介負載至樹突細胞中。亦可直接用重組核酸分子轉染酵母菌原生質球(例如，由完整酵母菌產生原生質球，然後轉染)，以產生表現抗原或其他蛋白質之重組原生質球。

通常，酵母菌媒介及抗原及/或其他製劑可藉由本文所述任何技術締合。在一態樣中，將該(等)抗原及/或製劑以細胞內的方式負載於酵母菌媒介。在另一態樣中，以共價或非共價形式將該(等)抗原及/或製劑附接至該酵母菌媒介。在另一態樣中，該酵母菌媒介及該(等)抗原及/或製劑係藉由混合締合。在另一態樣中，且在一實施例中，該(等)抗原及/或製劑係藉由該酵母菌媒介或藉由該酵母菌媒介所衍生之酵母菌細胞或酵母菌原生質球重組表現。

許多藉由本發明酵母菌媒介產生之抗原及/或其他蛋白質係可藉由酵母菌媒介合理產生之任何數量之抗原及/或其他蛋白質，且通常為至少一種至至少約6種或更多，包括約2至約6種異質性抗原及或其他蛋白質。

抗原或其他蛋白質在本發明酵母菌媒介中表現係利用熟習此項技術者所知之技術完成。簡言之，將編碼至少一種所需抗原或其他蛋白質之核酸分子插入表現載體中，以該核酸分子可操作地連接至轉錄控制序列之方式，以在轉形至宿主酵母菌細胞中時可進行該核酸分子

之組成型或調節型表現。編碼一或多種抗原及/或其他蛋白質之核酸分子可在一或多個表現載體上可操作地連接至一或多個表現控制序列。尤其重要的表現控制序列為控制轉錄起始之序列，諸如啟動子及上游活化序列。任何適宜的酵母菌啟動子均可用於本發明中，且各種此等啟動子係熟習此項技術者已知。用於釀酒酵母菌中表現之啟動子包括(但不限於)編碼以下酵母菌蛋白質之基因之啟動子：乙醇脫氫酶I (ADH1)或II (ADH2)、CUP1、磷酸甘油酸激酶(PGK)、磷酸丙糖異構酶(TPI)、轉譯延伸因子EF-1 α (TEF2)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH；亦稱為TDH3，磷酸丙糖脫氫酶)、半乳糖激酶(GAL1)、半乳糖-1-磷酸尿苷轉移酶(GAL7)、UDP-半乳糖表異構酶(GAL10)、細胞色素c1 (CYC1)、Sec7蛋白質(SEC7)及酸性磷酸酶(PHO5)，包括雜合啟動子，諸如ADH2/GAPDH及CYC1/GAL10啟動子，且包括ADH2/GAPDH啟動子(當細胞中之葡萄糖濃度較低(例如約0.1至約0.2%)時，其受到誘導)，以及CUP1啟動子及TEF2啟動子。同樣，已知許多上游活化序列(UASs)，亦稱為增強子。用於釀酒酵母菌中表現之上游活化序列包括(但不限於)編碼以下蛋白質之基因之UASs：PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7及GAL10，以及由GAL4基因產物活化之其他UASs，在一態樣中使用ADH2 UAS。由於ADH2 UAS係由ADR1基因產物活化，當異質基因可操作地連接至ADH2 UAS時，較佳可過量表現ADR1基因。用於釀酒酵母菌中表現之轉錄終止序列包括 α -因子、GAPDH及CYC1基因之終止序列。

在甲醇營養型酵母菌中表現基因之轉錄控制序列包括編碼醇氧化酶及甲酸脫氫酶之基因的轉錄控制區。

可藉由任何可藉以將核酸分子引入細胞中之方法將核酸分子轉染於本發明酵母菌細胞中，且該方法包括(但不限於)擴散、主動運

輸、浴槽式超音波、電穿孔、顯微注射、脂質轉染、吸附及原生質體融合。轉染核酸分子可利用熟習此項技術者所知之技術整合至酵母菌染色體中或維持在染色體外載體中。本文詳細揭示攜帶此等核酸分子之酵母菌媒介之實例。如上所述，酵母菌胞質體、酵母菌殘骸及酵母菌膜顆粒或細胞壁製備物亦可如下產生：以重組方式用所需核酸分子轉染完整酵母菌微生物或酵母菌原生質球，從而在其中產生抗原，然後利用熟習此項技術者已知之技術進一步操縱該等微生物或原生質球，以產生含有所需抗原或其他蛋白質之胞質體、殘骸或亞細胞酵母菌膜萃取物或其片段。

用於產生重組酵母菌媒介及藉由該酵母菌媒介表現抗原及/或其他蛋白質之有效條件包括其中培養酵母菌株之有效培養基。有效培養基通常為包含可同化的碳水化合物、氮源及磷源及適宜鹽、礦物質、金屬及其他營養物(諸如維生素及生長因子)之水性培養基。該培養基可包含複雜營養物或可為限定基本培養基。本發明酵母菌株可在各種容器中培育，包括(但不限於)生物反應器、錐形瓶、試管、微量滴定皿及培養皿。培養係在適於該酵母菌株之溫度、pH及氧含量下進行。此等培養條件係在一般技術者之專業知識範圍內(參見，例如，Guthrie等人(eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, 第194卷, Academic Press, San Diego).

在本發明之一些實施例中，酵母菌係在中性pH條件下生長。如本文所使用，術語「中性pH」之一般用途係指pH範圍在約pH 5.5與約pH 8，且在一態樣中，在約pH 6與約8之間。熟習此項技術者將瞭解，當用pH計測量時可出現較小波動(例如，十分之一或百分之一)。正因如此，使用中性pH生長酵母菌細胞意指酵母菌細胞在培養的大部份時間內係生長於中性pH中。在一實施例中，酵母菌係生長在pH水平維持在至少5.5之培養基中(亦即，不容許培養基之pH降至pH 5.5

以下)。在另一態樣中，酵母菌係生長在維持在約6、6.5、7、7.5或8之pH水平下。在培養酵母菌時使用中性pH可促進若干種生物效應，該等效應係利用該酵母菌作為用於免疫調節之媒劑所需的特性。例如，在中性pH下培養該酵母菌可使該酵母菌生長良好，且對細胞世代時間無負面影響(例如，減緩倍增時間)。該酵母菌可繼續生長至高密度，而不會失去其細胞壁柔韌性。使用中性pH可在所有收穫密度下生產具有柔韌細胞壁之酵母菌及/或對細胞壁消化酶(例如，葡聚糖酶)更敏感之酵母菌。該特性係受歡迎的，因為與生長在較酸性條件下之酵母菌相比，具有可撓性細胞壁之酵母菌可(例如)藉由已吞噬該酵母菌之抗原呈遞細胞促進細胞介素(例如，TH1-型細胞介素，包括(但不限於)IFN- γ 、介白素-12 (IL-12)及IL-2以及發炎性細胞介素，諸如IL-6)分泌而誘導不同或經改良免疫反應。此外，藉由此等培養方法可更為接近位於細胞壁中之抗原。在另一態樣中，就一些抗原而言，使用中性pH可藉由以二硫蘇糖醇(DTT)處理而釋放帶有二硫鍵的抗原，該情形在此抗原表現酵母菌係培養在較低pH(例如，pH 5)培養基中時無法達成。

在一實施例中，利用控制酵母菌之醣化量來控制該酵母菌之抗原表現，尤其在表面上之表現。酵母菌之醣化量可影響表現在表面上之抗原之免疫原性及抗原性，因為糖部份是龐大的。正因如此，在調節本發明酵母菌時，應考慮到酵母菌表面上之糖部份之存在，及其對靶抗原周圍之三維空間之影響。可使用任何方法來減少該酵母菌之醣化量(或在需要時增加其醣化量)。例如，可使用已經篩選而具有低醣化之酵母菌突變株(例如，mnn1、och1及mnn9突變體)，或可藉由使靶抗原上之醣化受體序列突變而消除醣化。或者，可使用具有縮短醣化模式之酵母菌，例如，畢赤酵母屬。亦可利用可減少或改變醣化之方法處理酵母菌。

在本發明之一實施例中，作為在酵母菌媒介中重組表現抗原或其他蛋白質之另一選擇，酵母菌媒介以細胞內的方式負載蛋白質或肽、或負載充當抗原及/或可用作本發明免疫調節劑或生物反應調節劑之碳水化合物或其他分子。隨後，可將該當前細胞內含抗原及/或其他蛋白質之酵母菌媒介投與至個體或負載至載體(諸如樹突細胞)中。肽及蛋白質可藉由熟習此項技術者所知之技術(諸如藉由擴散、主動運輸、脂質體融合、電穿孔、吞噬作用、凍融循環及浴槽式超音波)直接插入本發明酵母菌媒介中。可直接負載肽、蛋白質、碳水化合物或其他分子之酵母菌媒介包括完整酵母菌及產生後可負載抗原及其他製劑之原生質球、殘骸或胞質體。或者，完整酵母菌可負載該抗原及/或製劑，然後可由此製備原生質球、殘骸、胞質體或亞細胞顆粒。在該實施例中，可將任何數量之抗原及/或其他製劑負載於酵母菌媒介中，諸如，例如使微生物或其部份負載將提供至少1個、2個、3個、4個或任何整數個至數百或數千個抗原及/或其他製劑。

在本發明之另一實施例中，抗原及/或其他製劑係以物理方式附著至該酵母菌媒介。該抗原及/或其他製劑與該酵母菌媒介之物理附著可藉由此項技術中之任何適宜方法實現，包括共價及非共價締合方法，其包括(但不限於)使該抗原及/或其他製劑與該酵母菌媒介之外表面以化學方式交聯或以生物學方式將該抗原及/或其他製劑連接至該酵母菌媒介之外表面(諸如藉由使用抗體或其他結合伴侶)。化學交聯可藉由(例如)以下方法實現，包括戊二醛鍵、光親和標記、用碳二醯亞胺處理、用可鍵合二硫鍵之化學品處理及用此項技術中之其他標準交聯化學品處理。或者，化學品可與該酵母菌媒介接觸，其可改變酵母菌膜之脂質雙層之電荷或細胞壁之組成，以使得該酵母菌之外表面更易於融合或結合至具有特定電荷特性之抗原及/或其他製劑。靶向劑(諸如抗體、結合肽、可溶性受體及其他配體)亦可併入抗原中作為

融合蛋白質或另外與用於使該抗原與該酵母菌媒介結合之抗原締合。

在又另一實施例中，藉由較被動非特異性或非共價結合機制將酵母菌媒介及抗原或其他蛋白質彼此締合在一起，諸如藉由在緩衝液或其他適宜調配物(例如，摻合物)中輕輕地將該酵母菌媒介及該抗原或其他蛋白質混合在一起。

在本發明之一實施例中，將該酵母菌媒介及該抗原或其他蛋白質以細胞內的方式負載於載體(諸如樹突細胞或巨噬細胞)內，以形成本發明治療組合物或疫苗。例如，重組酵母菌細胞(已經基因設計以表現本發明抗原之酵母菌)可作為完整細胞負載至樹突細胞中，或可殺死該酵母菌細胞，或其可經衍生或另外進行修飾，諸如藉由形成酵母菌原生質球、胞質體、殘骸或亞細胞顆粒，其中任一者隨後藉由將衍生物負載至樹突細胞中。或者，該抗原或其他蛋白質可在不存在酵母菌媒介下負載至樹突細胞中。

在一實施例中，完整酵母菌(表現或不表現異質性抗原或其他蛋白質)可以產生酵母菌細胞壁製備物、酵母菌膜顆粒及/或酵母菌片段(亦即，不完整)及可溶性酵母菌蛋白質之方式進行研磨或加工。此酵母菌在本文中可稱為「粉碎物(smashate)」或「加工過的酵母菌」。在一些實施例中，加工過的酵母菌可與一或多種本文所述之HIV抗原及/或與編碼、包含或已接觸HIV抗原之其他組合物(例如，DNA疫苗、病毒載體疫苗、蛋白質亞單位疫苗、自體T細胞疫苗、殺死或不活化病原體、抗體疫苗)聯合提供或投與，以增強免疫反應。例如，可利用酶處理、化學處理或物理力(例如，機械剪切或超音波)將該酵母菌分解為用作佐劑之部份。

在本發明之一實施例中，可用於本發明中之酵母菌媒介包括已經殺死或不活化之酵母菌媒介。殺死酵母菌或使其不活化可藉由此項技術中已知之各種適宜方法中之任一者完成。例如，酵母菌之熱不活

化係使酵母菌不活化之標準方法，且熟習此項技術者可藉由此項技術中已知之標準方法監測靶抗原之結構變化(若需要)。或者，可使用使酵母菌不活化之其他方法，諸如化學方法、電學方法、放射方法或UV方法。參見，例如，酵母菌培養標準教科書(諸如 **Methods of Enzymology**，第194卷，Cold Spring Harbor Publishing (1990))中所揭示之方法。所使用的任何不活化策略應將靶抗原之二級、三級或四級結構考慮在內，並維持此結構，以使其免疫原性最優化。

可將酵母菌媒介調配成本發明基於酵母菌之免疫療法組合物或產品，其包括欲直接投與至個體或首先利用熟習此項技術者所知之許多技術負載至載體(諸如樹突細胞)中之製備物。例如，酵母菌媒介可藉由冷凍乾燥法乾燥。包含酵母菌媒介之調配物亦可藉由將酵母菌包裝在塊狀物或片狀物中而製得，諸如針對用於烘焙或釀造操作中之酵母菌之作法。此外，酵母菌媒介可與醫藥上可接受的賦形劑(諸如為宿主或宿主細胞所耐受之等滲緩衝劑)混合在一起。此等賦形劑之實例包括水、鹽水、林格氏(Ringer's)溶液、右旋糖溶液、漢克(Hank's)溶液及其他水性生理平衡鹽溶液。亦可使用非水性媒劑，諸如不揮發性油、芝麻油、油酸乙酯或甘油三酸酯。其他可用的調配物包括含增黏劑(諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、甘油或葡聚糖)之懸浮液。賦形劑亦可包含少量添加劑，諸如增強等滲性及化學穩定性之物質。緩衝劑之實例包括磷酸鹽緩衝劑、碳酸氫鹽緩衝劑及Tris緩衝劑，而保存劑之實例包括硫柳汞、間-或鄰-甲酚、福馬林及苯甲醇。標準調配物可為液體注射劑或可溶解於適宜液體中作為注射用懸浮液或溶液之固體。因此，在非液體調配物中，賦形劑可包括(例如)可在投與前添加無菌水或鹽水之右旋糖、人類血清白蛋白及/或保存劑。

在本發明之一實施例中，組合物可包含亦可稱為生物反應調節劑化合物或具有產生此等製劑/調節劑之能力之其他製劑。例如，酵

母菌媒介可轉染或負載至少一種抗原及至少一種製劑/生物反應調節劑化合物，或本發明組合物可與至少一種製劑/生物反應調節劑聯合投與。生物反應調節劑包括可調節免疫反應之佐劑及其他化合物(其可稱為免疫調節化合物)，及改變另一化合物或製劑(諸如基於酵母菌之免疫治療物)之生物活性之化合物，此生物活性並不限於免疫系統效應。某些免疫調節化合物可刺激保護性免疫反應，而其他的可抑制有害免疫反應，且免疫調節物是否可與給定基於酵母菌之免疫治療物組合可至少部份取決於待治療或預防之疾病狀態或狀況及/或待治療的個體。某些生物反應調節劑優先增強細胞介導的免疫反應，而其他的優先增強體液免疫反應(亦即，可刺激其中細胞介導的免疫水平與體液免疫相比有所提升之免疫反應，或反之亦然)。某些生物反應調節劑具有一或多種與基於酵母菌之免疫治療物之生物性質相同之性質或增強或補充基於酵母菌之免疫治療物之生物性質。熟習此項技術者已知有許多測量免疫反應之刺激或抑制，及區分細胞介導的免疫反應與體液免疫反應，及區分不同類型的細胞介導的反應(例如，TH17反應對TH1反應)之技術。

可用於本發明中之製劑/生物反應調節劑包括(但不限於)細胞介素、趨化激素、激素、脂質衍生物、肽、蛋白質、多糖、小分子藥物、抗體及其抗原結合片段(包括(但不限於)、抗細胞介素抗體、抗細胞介素受體抗體、抗趨化激素抗體)、維生素、多核苷酸、核酸結合部份、適體及生長調節劑。可與本發明基於酵母菌之免疫療法組合物組合使用之製劑包括(但不限於)：抗-CD40、CD40L、淋巴細胞活化基因3 (LAG3)蛋白及/或IMP321 (衍生自可溶形式的LAG3之T-細胞免疫刺激因子)、抗-CTLA-4抗體(例如，以釋放無能T細胞)；T細胞共刺激因子(例如，抗-CD137、抗-CD28、抗-CD40)；阿倫單抗(alemtuzumab)(例如，CamPath®)、地尼白介素(denileukin diftitox)(例

如，ONTAK®)；抗-CD4；抗-CD25；抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-PD-L2；阻斷FOXP3之製劑(例如，以消除活性/殺死CD4+/CD25+ T調節細胞)；Flt3配體、咪喹莫特(imiquimod)(Aldara™)、類鐸受體(TLR)激動劑(包括(但不限於) TLR-2激動劑、TLR-4激動劑、TLR-7激動劑及TLR-9激動劑；TLR拮抗劑(包括(但不限於)TLR-2拮抗劑、TLR-4拮抗劑、TLR-拮抗劑及TLR-9拮抗劑)；抗炎劑及免疫調節劑(包括(但不限於)COX-2抑制劑(例如，塞來考昔(Celecoxib)、NSAIDS)、糖皮質激素、他汀類藥物及沙立度胺(thalidomide)及其類似物(包括IMiDs®(其係沙立度胺之結構及功能類似物(例如，REVLIMID® (來那度胺(lenalidomide))、POMALYST® (泊馬度胺(pomalidomide))))及調節抗原呈遞細胞或TH17、TH1及/或調節性T細胞之數量、調節其活化狀態及/或調節其存活性之任何製劑。本發明涵蓋此等製劑之任何組合，且與基於酵母菌之免疫治療物組合或按照某一協議與其(例如，同時、依次或以其他形式)投與之任何此等製劑係本發明所涵蓋之組合物。此等製劑係此項技術中所熟知。此等製劑可單獨使用或與本文所述其他製劑一起使用。此外，可在第一次給予基於酵母菌之免疫療法組合物之前或之後投與或進行一或多種療法。

製劑可包括給定蛋白質或其肽或其結構域之激動劑及拮抗劑。如本文所使用，「激動劑」係結合受體或配體並產生或引起反應之任何化合物或製劑(包括(但不限於)小分子、蛋白質、肽、抗體、核酸結合劑等)，其可包括模擬結合受體或配體之天然物質之作用之製劑。「拮抗劑」係任何阻斷或抑制或減少激動劑之作用之化合物或製劑，包括(但不限於)小分子、蛋白質、肽、抗體、核酸結合劑等。

本發明組合物可另外包含可用於預防或治療HIV感染之任何其他化合物或組合物或者治療或舒緩HIV感染之任何症狀之任何化合物，或可與其(同時、依次或間歇地)投與。已知有各種可用於治療或舒緩

HIV感染之製劑。此等製劑詳細描述在本文別處，且包括(但不限於)抗病毒化合物，包括固定劑量組合(FDC)。此等製劑通常係長期投與(例如，在患者有生之年每日投與)。此外，本發明組合物可與其他免疫治療組合物(包括預防性及/或治療性免疫療法)一起使用。此等組合物包括(但不限於)DNA疫苗、樹突細胞疫苗、病毒載體疫苗、蛋白質亞單位疫苗、自體T細胞疫苗、殺死或不活化病原體及/或抗體疫苗。本發明組合物亦可與生物反應調節劑(上文所述)一起投與或使用，其中許多具有免疫調節性質(例如，抗-PD-1、抗-CTLA-4等)。

本發明亦包括套組，其包含本文所述任何組合物或本文所述組合物之任何個別組分。

投與或使用本發明組合物之方法

可包含任何一或多種(例如，兩種、三種、四種、五種或更多種之組合)本文所述基於酵母菌之免疫治療組合物、HIV抗原(包括HIV蛋白質及融合蛋白質)及/或編碼上述此等HIV蛋白質或融合蛋白質之重組核酸分子之本發明組合物及包含本文所述此等基於酵母菌之組合物、抗原、蛋白質、融合蛋白質或重組分子之其他組合物可用於各種活體內及活體外方法中，包括(但不限於)用於治療及/或預防HIV感染及其後遺症、用於HIV診斷分析或用以產生針對HIV之抗體。

本發明之一實施例係關於一種治療個體或個體群之人類免疫缺乏病毒(HIV)感染及/或預防、舒緩或治療HIV感染之至少一種症狀之方法。該方法包括向感染HIV之個體或個體群投與一或多種本發明免疫治療組合物之步驟。在一態樣中，該組合物為一種包含一或多種如本文所述HIV抗原之免疫治療組合物，其可包括基於酵母菌之免疫治療組合物。在一態樣中，該組合物包含含如本文所述HIV抗原之蛋白質或融合蛋白質及/或編碼此蛋白質或融合蛋白質之重組核酸分子。在一實施例中，該個體或個體群感染了HIV。在一態樣中，該個體或

個體群另外接受可治療HIV感染之至少一種其他治療化合物及/或另外組合物之治療。此等治療化合物及/或另外組合物包括(但不限於)直接作用抗病毒藥物(例如，彼等上文或本文別處所述者，包括(但不限於)FDC藥物)及/或其他免疫治療或免疫調節劑，包括(但不限於)DNA疫苗(亦即，編碼HIV抗原之核酸基疫苗)、病毒載體疫苗(例如，編碼HIV抗原之病毒基載體)、樹突細胞疫苗(例如，含HIV抗原之樹突細胞，包括含表現或攜帶HIV抗原之酵母菌之樹突細胞)、蛋白質亞單位疫苗(例如，重組HIV蛋白質)、自體T細胞疫苗(例如，單離自個體及在活體外用(例如)HIV抗原或其他免疫調節劑刺激之T細胞)、殺死或不活化病原體(例如，殺死或不活化HIV病毒株)、抗體疫苗(例如，治療性或預防性抗體)及/或生物反應調節劑(本文別處所述)。

「標準醫護」或「SOC」通常係指當前批准用於治療具體疾病之標準醫護。在HIV感染中，SOC可為若干種不同批准治療方案中之一者，但可包括但並不限於抗病毒療法。當前批准用於治療HIV感染之抗病毒藥物包括固定劑量組合(FDC)藥物，包括以每日服用一次的單片丸劑提供之跨類別(cross-class)藥物。此等FDC包括(但不限於)：ATRIPLA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/依法韋侖：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及依法韋侖(一種來自Bristol Myers-Squibb之非核苷逆轉錄酶抑制劑 (NNRTI))， Gilead Sciences, Inc.)；COMPLERA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/利匹韋林：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及利匹韋林(一種來自Tibotec/Johnson & Johnson之NNRTI)， Gilead Sciences, Inc.)；及STRIBILD/QUAD[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/埃替拉韋/可比西他：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及可比西他增強型埃替拉韋(來自Japan Tobacco之整合酶抑制劑)， Gilead Sciences, Inc.)。一種稱為572-TRII[®] (阿巴卡韋/NRTI+拉米夫定/NRTI，及度魯特韋(來自Pfizer/Shionogi之

整合酶抑制劑)之FDC，ViiV (GlaxoSmithKline, Pfizer, Shionogi))當前在徵求FDA批准。本發明免疫治療組合物可在投與一或多種抗病毒藥物及/或其他免疫治療或免疫調節劑之前、之時、之間歇及/或之後投與。亦可在用本發明免疫治療組合物治療之前或之後投與其他治療化合物。

在本發明之一實施例中，本發明基於酵母菌之HIV免疫療法組合物係與增強針對HIV抗原之體液免疫反應之第二免疫療法組合物同時或依次投與(包括以初免-加強策略)。例如，當該基於酵母菌之HIV免疫療法組合物係以表現一或多種HIV抗原之完整重組酵母菌之形式提供時，該組合物所產生之免疫反應本質上主要係細胞免疫反應(例如，引起T細胞反應)，儘管亦可引發體液免疫反應。在本發明之一實施例中，為增強HIV感染之功能性治癒，希望誘導針對HIV之強烈細胞免疫反應及強烈體液免疫反應。因此，本發明涵蓋組合物與尤其適用於增強體液免疫反應之基於酵母菌之免疫療法之組合使用。此等組合物可包括(但不限於)：包含HIV抗原(本文別處所述)、表現或另外包含HIV抗原之蛋白質亞單位疫苗、或者表現HIV抗原之DNA或病毒載體疫苗之加工過的酵母菌免疫療法組合物。

在本發明之一態樣中，表現一或多種如本文所述之HIV抗原之完整重組酵母菌係與包含一或多種如本文所述HIV抗原之加工過的酵母菌同時投與，在單次注射中一起投與或分開注射。在一態樣中，表現一或多種如本文所述HIV抗原之完整的重組酵母菌係與包含一或多種如本文所述HIV抗原之加工過的酵母菌依次投與(例如，採用初免-加強策略)。視情況地，該包含一或多種HIV抗原之加工過的酵母菌亦可與表現一或多種HIV抗原之完整的重組酵母菌一起包含在初次劑量中。

在一實施例中，編碼HIV抗原之DNA疫苗係以初免-加強方案與

一或多種基於酵母菌之免疫療法組合物一起使用。利用活體內電穿孔之DNA疫苗已在各種病毒疾病(包括HIV)研究中用以引起細胞免疫反應，且可包括利用病毒載體之增強劑(參見，例如，Catanzaro等人，*J Infect Dis* 2006;194:1638-1649)。然而，已知病毒載體免疫療法及DNA免疫療法飽受疫苗經時/反復投與之中和作用之困擾。基於酵母菌之免疫療法不會受到中和作用之困擾，且可在長時間內多次投與。因此，本發明之一實施例係利用適宜方法(諸如電穿孔)，用HIV之DNA疫苗初次使個體免疫，隨後利用本發明基於酵母菌之HIV免疫療法組合物之增強劑。此方法(或利用基於酵母菌之HIV免疫療法作為至少一種組分之任何本發明方法)有效引起強烈免疫反應，並長期保持對感染細胞之免疫壓力。在一態樣中，該基於酵母菌之HIV免疫療法組合物係表現一或多種如本文所述HIV抗原之完整的重組酵母菌。在另一態樣中，該基於酵母菌之HIV免疫療法組合物係包含一或多種如本文所述HIV抗原之加工過的酵母菌。在另一態樣中，該基於酵母菌之HIV免疫療法組合物係表現一或多種如本文所述HIV抗原之完整的重組酵母菌及包含一或多種如本文所述HIV抗原之加工過的酵母菌之組合，其中該完整酵母菌及該加工過的酵母菌係同時投與，在單次注射中一起投與或分開注射。如本文所述之該方法可另外包含其他治療化合物及/或組合物(例如，抗病毒療法、其他類型之增強劑(諸如蛋白質亞單位疫苗)、免疫調節性生物反應調節劑等)。

在本發明之一實施例中，將本發明基於酵母菌之HIV免疫療法組合物負載於活體外樹突細胞中以形成樹突細胞疫苗。例如，來自待治療的個體之樹突細胞可自該個體分離，負載本發明基於酵母菌之HIV免疫療法組合物，然後返回該個體。視情況地，在此之前、之後或與此同時，自該個體分離之T細胞(自體T細胞)可用相同的基於酵母菌之HIV免疫療法組合物(及/或另一種免疫療法組合物或免疫調節劑/生物

反應調節劑)進行活體外刺激，且亦返回該個體。樹突細胞係單核細胞及淋巴細胞譜系之細胞，且已知係最強的抗原呈遞細胞(APC)，且可刺激抗原特異性T細胞反應。成熟的樹突細胞通常被認為具有以下細胞表面標記表現型：MAC3⁺、CD80⁺、CD86⁺、CD40^低、CD54⁺、I類MHC及II類MHC，且可攝入FITC-葡聚糖。用於本發明組合物中之樹突細胞較佳係單離自投與該組合物之患者(亦即，自體細胞)。樹突細胞可單離自骨髓或周邊血液。此等細胞可自(例如)周邊血液單核細胞，藉由在(例如)顆粒球巨噬細胞群落刺激因子、IL-4及TNF α 存在下培養產生。此項技術中已知其他用於單離及產生樹突細胞之方法(參見，例如，Wilson等人，1999, *J Immunol* 162: 3070-8；Romani等人，1994, *J Exp Med* 180: 83-93；Caux等人，1996, *J Exp Med* 184: 695-706；及Kiertcher等人，1996, *J Leukoc Biol* 59: 208-18，其各自之全文以引用的方式併入本文中)。有效投與至患者之治療組合物含有約 0.5×10^6 至約 40×10^6 個樹突細胞/單次劑量/個別患者。較佳地，治療組合物含有約 1×10^6 至約 20×10^6 個樹突細胞/單次劑量/患者，且在另一實施例中，為約 1×10^6 至約 10×10^6 個樹突細胞/單次劑量/患者。此等劑量係針對典型人類或其他靈長類動物給出。為將組分「負載」至細胞中，參考藉以迫使該組分進入該細胞(例如，藉由電穿孔)或將其置於某一環境(例如，接觸或靠近細胞)中之任何技術，其中該組分實質上將有可能藉助一些過程(例如，吞噬作用)進入該細胞。負載技術包括(但不限於)：擴撒、主動運輸、脂質體融合、電穿孔、吞噬作用及浴槽式超音波。在一較佳實施例中，使用使樹突細胞負載酵母菌媒介及/或抗原之被動機制，此被動機制包括藉由樹突細胞吞噬該酵母菌媒介及/或抗原。

本發明之另一實施例係關於一種使個體或個體群對HIV免疫，以在該個體或個體群預防HIV感染及/或減輕HIV感染之嚴重程度之方

法。該方法包括向未感染HIV(或據信未感染HIV)之個體或個體群投與本發明組合物之步驟。在一態樣中，該組合物係一種包含一或多種如本文所述HIV抗原之免疫治療組合物，包括一或多種基於酵母菌之免疫治療組合物。在一態樣中，該組合物包含含如本文所述HIV抗原之融合蛋白質或編碼此融合蛋白質之重組核酸分子。

如本文所使用，片語「治療(treat)」HIV感染或其任何變換(例如，「治療(treated for)HIV感染」等)通常係指出現感染後(急性或慢性)施加或投與本發明組合物，目的係減少或消除可檢測的病毒滴度或病毒載量；減少個體因感染而引起之至少一種症狀；延遲或防止因感染而引起之症狀及/或下游後遺症(發展成AIDS及AIDS相關疾病或病狀)之發作及/或嚴重程度；減少因感染所造成的器官或生理系統損傷；提升針對病毒之免疫反應；增加CD4+ T細胞計數；改善針對該病毒之長期記憶免疫反應；減少病毒之再活化；降低達到長期緩和所必需之HAART或類似療法之頻率、持續時間及/或用量；及/或改善該個體或個體群之一般健康狀況。在一實施例中，一種根據本發明之治療HIV之方法導致「功能性治癒」(亦即，在不進行持續治療下抑制HIV複製及預防疾病)。

「預防(prevent)」HIV感染或其任何變換(例如，「預防(prevention of)HIV感染」等)通常係指在出現感染HIV之前施加或投與本發明組合物，目的係預防HIV感染，或一旦出現感染時至少減少感染之嚴重程度及/或感染持續時間及/或因該感染所引起之生理損傷，其包括防止或減少個體因該感染而引起之至少一種症狀之嚴重程度或發生率及/或延遲或防止個體或個體群因該感染而引起之症狀及/或下游後遺症之發作及/或嚴重程度。

本發明包括向個體遞送(投與、免疫接種)一或多種本發明免疫治療組合物，包括基於酵母菌之免疫療法組合物。投與過程可在活體外

或活體內進行，但通常係在活體內進行。活體外投與係指在患者體外進行部份調節步驟，諸如在使得將酵母菌媒介、抗原及任何其他製劑或組合物負載至該細胞中之條件下將本發明組合物投與至自患者移除之細胞(例如，樹突細胞)群體，及使該等細胞返回該患者。本發明治療組合物可返回患者或藉由任何適宜投與模式投與至患者。

組合物之投與可係全身投與、黏膜投與及/或鄰近目標部位(例如，靠近感染部位)投與。依據待預防或治療之病狀類型、所使用的抗原及/或靶細胞群體或組織，熟習此項技術者將知曉適宜的投與途徑。各種可接受的投與方法包括(但不限於)靜脈內投與、腹膜內投與、肌肉內投與、結內(intranodal)投與、冠狀動脈內投與、動脈內投與(例如，進入頸動脈)、皮下投與、經皮遞送、氣管內投與、關節內投與、心室內投與、吸入(例如，氣溶膠)、顱內、脊柱內、眼內、經耳、鼻內、經口、經肺投與、注入導管及直接注入組織中。在一態樣中，投與途徑包括：靜脈內、腹膜內、皮下、皮內、結內、肌肉內、經皮、吸入、鼻內、經口、眼內、關節內、顱內及脊柱內。非經腸遞送可包括皮內、肌肉內、腹膜內、胸膜內、肺內、靜脈內、皮下、心房導管及腎導管途徑。經耳遞送可包括滴耳劑，鼻內遞送可包括滴鼻劑或鼻內注射，且眼內遞送可包括滴眼劑。氣溶膠(吸入)遞送亦可利用此項技術中之標準方法進行(參見，例如，Stribling等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281, 1992)。可調節黏膜免疫之其他投與途徑可用於治療病毒感染。此等途徑包括經支氣管、皮內、肌肉內、鼻內、其他吸入途徑、經直腸、皮下、局部、經皮、經陰道及尿道途徑。在一態樣中，皮下投與本發明免疫治療組合物。

通常，就本發明基於酵母菌之免疫療法組合物而言，當在適宜時間內投與一或多次時，適宜的單次劑量係可以呈有效引起針對一或多種HIV抗原或抗原決定基之抗原特異性免疫反應之量對患者身體之

給定細胞類型、組織或區域提供酵母菌媒介及抗原(若包含的話)之劑量。例如，在一實施例中，本發明酵母菌媒介之單次劑量係約 1×10^5 至約 5×10^7 個酵母菌細胞當量/正投與該組合物之生物體之千克體重。在一態樣中，本發明酵母菌媒介之單次劑量係約0.1 Y.U. (1×10^6 個細胞)至約100 Y.U. (1×10^9 個細胞)/劑量(亦即，/生物體)，包括臨時劑量，增量為 0.1×10^6 個細胞(亦即， 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 ...)。在一實施例中，劑量包括1 Y.U.與40 Y.U.間之劑量、1 Y.U.與50 Y.U.間之劑量、1 Y.U.與60 Y.U.間之劑量、1 Y.U.與70 Y.U.間之劑量或1 Y.U.與80 Y.U.間之劑量，且在一態樣中，在10 Y.U.與40 Y.U.、50 Y.U.、60 Y.U.、70 Y.U.或80 Y.U.之間。在一實施例中，該等劑量係在相同服藥時間內投與個體之不同部位。例如，40 Y.U.劑量可藉由在一個服藥時間內向個體之四個不同部位注射10 Y.U.劑量而投與，或者20 Y.U.劑量可藉由在相同服藥時間內向個體之四個不同部位注射5 Y.U.劑量或藉由向個體之兩個不同部位注射10 Y.U.劑量而投與。本發明包括在個體之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個不同部位投與一定量之基於酵母菌之免疫療法組合物(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 Y.U.或更多)，以形成單次劑量。

例如，當針對抗原之免疫反應變弱或視需要提供免疫反應或誘導針對特定抗原之記憶反應時，投與治療組合物之「增強劑(Booster)」或「增強劑(boost)」。增強劑可每隔約1、2、3、4、5、6、7或8週至每月一次、至兩月一次、至每季度一次、至每年一次、至初始投與若干年後投與。在一實施例中，投與時間表係其中組合物之約 1×10^5 至約 5×10^7 個酵母菌細胞當量/kg生物體體重係在數週至數月、至數年時間內分至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次投與之時間表。在一實施例中，該等劑量係每週一次投與1、2、3、

4、5、6、7、8、9、10或更多個劑量，隨後視需要投與每月一次劑量，以抑制或清除HIV病毒。在一實施例中，該等劑量係以每4週一次方案投與(每隔4週，或在第1天、第4週、第8週、第12週等，投與2至10個劑量或更長時間，由臨床醫師決定)。若需要，甚至在個體達到血清轉化後可投與另外劑量，但此用藥可係非必要。

在本發明之一實施例中，如上所述，可使用不同的(非基於酵母菌之)免疫治療組合物(諸如表現HIV抗原之DNA疫苗)預先刺激個體之免疫系統，且可使用本發明基於酵母菌之HIV免疫治療組合物來增強免疫反應。在一實施例中，單獨使用包含重組表現一或多種本文所述HIV抗原之完整酵母菌之本發明基於酵母菌之免疫治療組合物或與包含加工過的酵母菌之基於酵母菌之免疫治療組合物(較佳包含一或多種HIV抗原，其可為與初次劑量中所使用的抗原相同的抗原)一起預先刺激個體之免疫系統，隨後另外投與經加工的酵母菌作為增強劑。或者，增強劑劑量可包括(但不限於)任何其他的免疫治療組合物，包括特定增強體液免疫反應之組合物，諸如亞單位疫苗或抗體疫苗。

就投與本文所述基於酵母菌之免疫治療組合物而言，可向個體或個體群投與單一組合物或可投與此等組合物之組合。因此，在「調味品架(spice rack)」方法中可選擇兩種或更多種組合物，以最有效地預防或治療給定個體或個體群之HIV感染。該方法可包括在不同的本發明基於酵母菌之免疫療法組合物之情境下投與不同的HIV抗原(例如，使用兩種或更多種不同的基於酵母菌之組合物，各包含不同的HIV抗原)，及/或，在相同方案內，投與各種形式之本發明基於酵母菌之免疫治療組合物(例如，完整的重組酵母菌及加工過的酵母菌，各包含相同或不同的HIV抗原)，及/或，在相同方案內，一起使用基於酵母菌之免疫治療組合物及其他類型的組合物(例如，其他的免疫療法組合物，諸如自體T細胞疫苗、樹突細胞疫苗、抗體疫苗、亞單

位疫苗、DNA疫苗；生物反應調節劑(上文所述)；小分子藥物，諸如抗病毒藥物等)。此等各種利用不同組合物之方法可用於順序投與方案中及/或採用共同投與及/或亦可合併成一次注射及/或分開注射。

在本發明之一態樣中，一或多種其他治療劑、化合物或組合物(諸如彼等上文或本文別處所述之任一者)與基於酵母菌之免疫療法組合物係依次投與。在另一實施例中，一或多種其他治療劑係在投與基於酵母菌之免疫療法組合物之前投與。在另一實施例中，一或多種其他治療劑、化合物或組合物係在投與基於酵母菌之免疫療法組合物之後投與。在一實施例中，一或多種其他治療劑、化合物或組合物與基於酵母菌之免疫療法組合物係以交替劑量投與，或以其中基於酵母菌之組合物係以規定間隔投與或與該等其他治療劑、化合物或組合物之一或多個連續劑量一起投與之方案投與，或反之亦然。在一實施例中，一或多種其他治療劑與基於酵母菌之免疫療法組合物係一起投與(例如，在相同組合物中一起投與或作為獨立組合物同時投與)。在一實施例中，在開始投與該等其他治療劑、化合物或組合物之前，在一定時間內投與基於酵母菌之免疫療法組合物之一或多個劑量。換言之，基於酵母菌之免疫治療組合物作為單一療法投與一定時間，然後添加治療劑、化合物或組合物，同時伴隨著基於酵母菌之免疫療法之新劑量或與基於酵母菌之免疫療法呈交替形式。或者，在開始投與基於酵母菌之免疫療法組合物之前，可投與一定時間之治療劑、化合物或組合物。在一態樣中，酵母菌經設計以表現或攜帶製劑，或設計或產生不同的酵母菌以表現或攜帶製劑或化合物。

在本發明之一態樣中，當抗病毒化合物療法之療程開始時，在相同時間內投與免疫治療組合物之其他劑量，或投與至少一部份該時間，且可在抗病毒化合物療程結束後繼續投與。然而，在整個過程中，免疫療法之用藥時間表可係，且通常預期係不同於抗病毒化

物。例如，該免疫治療組合物可每日投與一次、每週投與一次、每兩週投與一次、每月投與一次、每兩月投與一次、或每3-6個月投與一次或以更長間隔投與(由醫師決定)，且最通常係每週投與一次後每月投與一次或每月投與一次，其中當前HIV抗病毒藥物係每日投與一次。在以單一療法投與該免疫治療組合物的初期時(若採用的話)，該免疫治療組合物較佳係每週投與一次投與4至12週，隨後每月投與一次(不論抗病毒療法何時加入該方案)。在一態樣中，該免疫治療組合物係每週投與一次投與四或五週，此後每月投與一次，直至完成整個治療方案。

在本發明之一態樣中，免疫治療組合物及其他製劑、化合物或組合物可一起投與(同時)。如本文所使用，同時使用並不一定表示所有化合物之所有劑量係在同一天的同一時間投與。更確切言之，同時使用意指各個療法組分(例如，免疫療法及抗病毒療法)係在差不多相同的時間(彼此相差數小時或至多1-7天)開始，且係在大體上相同的時間內投與，應注意的是，各組分可具有不同的用藥時間表(例如，免疫療法每月一次，抗病毒藥物每日一次)。此外，在同時投與的時間之前或之後，製劑或免疫治療組合物中之任一者均可在沒有其他製劑下投與。

如本文所使用，術語「抗病毒藥物」係指靶向病毒生命週期之一或多個步驟且具有直接抗病毒療效之任何化合物或藥物，通常為小分子抑制劑或抗體。在本發明之一實施例中，該欲在相同治療方案中與本發明免疫治療組合物一起投與之抗病毒化合物或藥物係選自：非核苷逆轉錄酶抑制劑(NNRTI)、核苷類似物逆轉錄酶抑制劑(NRTI)、整合酶抑制劑及進入抑制劑。典型的NRTI包括(但不限於)：齊多夫定(AZT)或替諾福韋(TDF)及拉米夫定(3TC)或恩曲他濱(FTC)。在一實施例中，該抗病毒化合物為固定劑量組合(FDC)，包括以每日服用一次

的單片丸劑提供之跨類別藥物。此等FDC包括(但不限於)：
 ATRIPLA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/依法韋侖：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及依法韋侖(一種來自Bristol Myers-Squibb之非核苷逆轉錄酶抑制劑 (NNRTI))， Gilead Sciences, Inc.)、
 COMPLERA[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/利匹韋林：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及利匹韋林(一種來自Tibotec/Johnson & Johnson之NNRTI)， Gilead Sciences, Inc.)；STRIBILD/QUAD[®] (富馬酸替諾福韋二吡呋酯/恩曲他濱/埃替拉韋/可比西他：替諾福韋/NRTI+恩曲他濱/NRTI，及可比西他增強型埃替拉韋(來自Japan Tobacco之整合酶抑制劑)， Gilead Sciences, Inc.)；及572-TRII[®] (阿巴卡韋/NRTI+拉米夫定/NRTI，及度魯特韋(來自Pfizer/Shionogi之整合酶抑制劑)， ViiV (GlaxoSmithKline, Pfizer, Shionogi))。可用於本發明中之抗病毒藥物包括任何此等化合物之任何類似物或衍生物、或含此化合物、藥物、類似物或衍生物之任何組合物。

在本發明方法中，可將組合物及治療組合物投與至動物，包括任何脊椎動物，及特定言之投與至脊椎動物綱、哺乳動物之任何成員，包括(但不限於)靈長類動物、齧齒類動物、家畜及家養寵物。家畜包括食用哺乳動物或生產有用產品之哺乳動物(例如，產羊毛的羊)。待治療或保護之哺乳動物包括人類、狗、貓、小鼠、大鼠、山羊、綿羊、牛、馬及豬。

「個體」為脊椎動物，諸如哺乳動物，包括(但不限於)人類。哺乳動物包括(但不限於)農場動物、競技類動物、寵物、靈長類動物、小鼠及大鼠。術語「個體(individual)」可與術語「動物」、「個體(subject)」或「患者」互換使用。

可用於本發明之一般技術

除非另有說明，否則本發明之實踐將採用分子生物學(包括重組

技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學、核酸化學及免疫學之習知技術，該等技術係熟習此項技術者所熟知。此等技術充分地闡釋於文獻中，諸如，**Methods of Enzymology**，第194卷，Guthrie等人編輯，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)；**Biology and activities of yeasts**，Skinner等人編輯，Academic Press (1980)；**Methods in yeast genetics : a laboratory course manual**，Rose等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)；**The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology**，Pringle等人編輯，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997)；**The Yeast Saccharomyces: Gene Expression**，Jones等人編輯，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993)；**The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics**，Broach等人編輯，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992)；**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**，第二版(Sambrook等人，1989)及**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**，第三版(Sambrook and Russel, 2001)，(本文統稱為「Sambrook」)；**Current Protocols in Molecular Biology** (F.M. Ausubel等人編輯，1987，包括至2001的增刊)；**PCR: The Polymerase Chain Reaction**，(Mullis等人編輯，1994)；Harlow and Lane (1988), **Antibodies, A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Publications, New York；Harlow and Lane (1999) **Using Antibodies: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本文統稱為「Harlow and Lane」)，Beaucage等人編輯，**Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000)；Casarett and Doull's **Toxicology The Basic Science of Poisons**, C. Klaassen編輯，第6版(2001)，及Vaccines, S. Plotkin及W. Orenstein編輯，第3版(1999)。

一般定義

「TARMOGEN[®]」(GlobeImmune, Inc., Louisville, Colorado)通常係指胞外(在其表面上)、胞內(內部或細胞溶質)或胞外及胞內均表現一或多種異質性抗原之酵母菌媒介。通常已描述TARMOGEN[®]產品(參見, 例如, 美國專利案第5,830,463號)。某些基於酵母菌之免疫療法組合物以及其製法及一般使用方法亦詳細描述在(例如)美國專利案第5,830,463號、美國專利案第7,083,787號、美國專利案第7,736,642號、Stubbs等人, *Nat. Med.* 7:625-629 (2001)、Lu等人, *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004)及Bernstein等人, *Vaccine* 2008 Jan 24;26(4):509-21中, 其各自之全文以引用的方式併入本文中。

如本文所使用, 術語「類似物」係指結構上類似於另一化合物但組成略有不同(如一種原子被不同元素原子替換或存在特定官能團、或一種官能團被另一種官能團替換)之化合物。因此, 類似物係功能及外觀類似或相當, 但相對於參照化合物具有不同結構或來源之化合物。

當用以描述化合物時, 術語「經取代的」、「經取代的衍生物」及「衍生物」意指結合至未經取代的化合物之至少一個氫經不同原子或化學部份置換。

雖然衍生物具有與母體化合物類似的物理結構, 但衍生物可具有不同於該母體化合物之化學及/或生物性質。此等性質可包括(但不限於)母體化合物之增加或減小的活性、相對於母體化合物之新活性、增強或減小的生物利用率、增強或減小的功效、增強或減小的活體外及/或活體內穩定性及/或增強或減小的吸收性。

一般而言, 術語「生物活性」表明化合物(包括蛋白質或肽)具有至少一種對細胞或生物體之代謝或其他過程具有影響之可檢測活性, 其係在活體內(亦即, 在自然生理環境下)或活體外(亦即, 在實驗室條件下)測得或觀察到。

根據本發明，術語「調整」可與「調節」互換使用，且通常係指向上調節或向下調節特定活性。如本文所使用，術語「向上調節」通常可用以描述以下任何一者：引發、起始、增加、增強、提高、改良、加強、放大、促進或提供特定活性。類似地，術語「向下調節」通常可用以描述以下任何一者：減少、減輕、抑制、舒緩、減弱、減小、阻礙或阻止特定活性。

在本發明之一實施例中，本文所述任何胺基酸序列均可自至少一個及至多約20個位於指定胺基酸序列之C-及/或N-末端兩側之其他異質性胺基酸製得。所得蛋白質或多肽可稱為「大體上由指定胺基酸序列組成」。根據本發明，該等異質性胺基酸係不可見於自然界(亦即，在自然界、活體內找不到)且位於指定胺基酸序列側面、或與該指定胺基酸序列之功能無關、或將不會由位於編碼該指定胺基酸序列之天然核酸序列側面之核苷酸(當其出現在基因中時)編碼之胺基酸序列(若天然序列中之此等核苷酸利用衍生出該給定胺基酸序列之生物體之標準密碼子用法進行轉譯)。類似地，當針對本文核酸序列使用時，片語「大體上由...組成」係指編碼指定胺基酸序列之核酸序列，且該編碼該指定胺基酸序列之核酸序列之5'及/或3'末端側面各具有至少一個及至多約60個其他異質性核苷酸。該等異質性核苷酸係不可見於自然界(亦即，在自然界、活體內找不到)，且當其出現在天然基因中或不會編碼賦予具有該指定胺基酸序列之蛋白質任何其他功能或改變該蛋白質之功能時，其係位於該編碼該指定胺基酸序列之核酸序列側面。

根據本發明，片語「選擇性結合至(selectively binds to)」係指本發明抗體、抗原結合片段或結合伴侶優先結合指定蛋白質之能力。更具體言之，片語「選擇性結合(selectively binds)」係指一種蛋白質特異性結合另一種蛋白質(例如，抗原之抗體、其片段或結合伴侶)，其

中藉由任何標準分析(例如，免疫分析)測得之結合水平比該分析之背景對照在統計學上明顯更高。例如，當進行免疫分析時，對照通常包括僅含有抗體或抗原結合片段(亦即，不存在抗原)之反應井/管，其中將該抗體或其抗原結合片段在不存在抗原時之反應性之量(例如，非特異性結合至該井)視為背景。可利用此項技術中之各種標準方法(包括酶免疫分析(例如，ELISA、免疫印跡分析等))測量結合。

提及用於本發明中之蛋白質或多肽包括全長蛋白質、融合蛋白質或此等蛋白質之任何片段、結構域、構型抗原決定基或相似物(包括蛋白質之功能域及免疫學結構域)。更具體言之，根據本發明，單離蛋白質係已經自其自然環境移除(亦即，已經人類操縱)之蛋白質(包括多肽或肽)，且可包含例如純化蛋白質、部份純化蛋白質、重組產生的蛋白質及合成產生的蛋白質。正因如此，「單離」並不反映蛋白質之純化程度。較佳地，本發明單離蛋白質係以重組方式產生。根據本發明，術語「修飾」及「突變」可互換使用，尤其就本文所述蛋白質或其部份之胺基酸序列(或核酸序列)之修飾/突變而言。

如本文所使用，術語「相似物」係用於指不同於天然蛋白質或肽(亦即，「原型」或「野生型」蛋白質)之蛋白質或肽，不同之處在於對該天然蛋白質或肽進行少量修飾，但其保留天然形式之基本蛋白質及側鏈結構。此等改變包括(但不限於)：一個或若干個胺基酸側鏈之改變；一個或若干個胺基酸之改變，包括缺失(例如，蛋白質或肽之截短版本)、插入及/或取代；一或若干個原子之立體化學之改變；及/或小的衍生化，包括(但不限於)：甲基化、醯化、磷酸化、乙醯化、豆蔻醯化、異戊二烯化、棕櫚酸化、醯胺化及/或添加糖基磷脂醯肌醇。與天然蛋白質或肽相比，相似物可具有增強、減小或實質上類似的性質。相似物可包括蛋白質之激動劑或蛋白質拮抗劑。相似物可利用蛋白質生產技術中已知之技術製得，該等技術包括(但不限於)

直接修飾單離的天然蛋白質、直接合成蛋白質或利用(例如)經典或重組DNA技術引起隨機或定向突變而修飾編碼該蛋白質之核酸序列。

給定蛋白質之相似物可包含至少約45%、或至少約50%、或至少約55%、或至少約60%、或至少約65%、或至少約70%、或至少約75%、或至少約80%、或至少約85%、或至少約90%、或至少約91%、或至少約92%、或至少約93%、或至少約94%、或至少約95%、或至少約96%、或至少約97%、或至少約98%、或至少約99%(或45%與99%間之任何同一性百分比，全部以整數遞增)與參考蛋白質之胺基酸序列相同之胺基酸序列，大體上由其組成或由其組成。在一實施例中，該相似物包含少於100%、少於約99%、少於約98%、少於約97%、少於約96%、少於約95%等以1%之增量至少於約70%與該參考蛋白質之天然胺基酸序列相同之胺基酸序列，大體上由其組成或由其組成。

相似物可包括「近全長」蛋白質或之「近全長」蛋白質結構域，其意指此相似物不同於全長蛋白質、功能域或免疫學結構域(因為此蛋白質、功能域或免疫學結構域係描述在本文中或另外在公開可用的序列中得知或描述於其中)，不同之處在於此全長蛋白質或全長功能域或全長免疫學結構域之N-及/或C-末端添加或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸。

如本文所使用，除非另有說明，否則提及同一性百分比(%)係指利用以下評估同源性：(1)BLAST 2.0 Basic BLAST同源性檢索，利用blastp檢索胺基酸並利用blastn檢索核酸，採用標準預設參數，其中查詢序列以預設方式篩選低複雜區域(描述於Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) 「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.」 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中，其全文以引用的方式併入本文中)；(2)BLAST 2比對(採用下文所述參數)；

(3)及/或PSI-BLAST，採用標準預設參數(位置特異性迭代(Position-Specific Iterated)BLAST)。應指出的是，由於BLAST 2.0 Basic BLAST與BLAST 2之標準參數間存在一些差異，故利用BLAST 2程式時，兩條特異性序列可視為具有顯著同源性，而在BLAST 2.0 Basic BLAST中利用其中一條序列作為查詢序列進行檢索時，可認為第二序列並非最佳匹配。此外，PSI-BLAST提供「概況(profile)」檢索之自動化易用版本，其係一種靈敏的搜尋序列相似物之方法。該程式首先進行gapped BLAST資料庫檢索。PSI-BLAST程式使用來自送回的重要比對資訊來構建位置特異性得分矩陣，其取代查詢序列進行下一輪資料庫檢索。因此，應瞭解，可利用此等程式中任一者測定同一性百分比。

兩條特異性序列可如Tatusova and Madden, (1999), 「Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250(其全文以引用的方式併入本文中)中所述利用BLAST 2序列進行相互比對。BLAST 2序列比對係在blastp或blastn中進行，其利用BLAST 2.0演算法對兩條序列進行Gapped BLAST檢索(BLAST 2.0)，容許在最終比對中引入間隙(缺失及插入)。本文為了明確起見，BLAST 2序列比對利用如下標準預設參數進行。

就blastn而言，利用0 BLOSUM62矩陣：

匹配所加分數= 1

不匹配所罰分數= -2

開放間隙(5)及擴展間隙(2)罰分

間隙 x_下降(dropoff) (50)期望值(10)字長(11) 過濾(開)

就blastp而言，利用0 BLOSUM62矩陣：

開放間隙(11)及擴展間隙(1)罰分

間隙 x_下降(dropoff) (50)期望值(10)字長(3) 過濾(開)

單離核酸分子係已經自其自然環境移除(亦即，已經人類操縱)之核酸分子，其自然環境係基因組或染色體，其中該核酸分子可在自然界中找到。正因如此，「單離」不一定反映核酸分子之純化程度，而是表明該分子不包含整個基因組或整個染色體，其中該核酸分子可在自然界中找到。單離核酸分子可包含基因。包含基因之單離核酸分子並非包含此基因之染色體之片段，而是包含與該基因有關之編碼區及調控區，但沒有天然可見於相同染色體上之其他基因。單離核酸分子亦可包含側面(亦即，位於該序列之5'及/或3'末端)具有通常在自然界不位於該指定核酸序列(亦即，異質性序列)側面之其他核酸之指定核酸序列。單離核酸分子可包括DNA、RNA (例如，mRNA)或DNA或RNA之衍生物(例如，cDNA)。雖然片語「核酸分子」主要係指物理核酸分子，且片語「核酸序列」主要係指該核酸分子之核苷酸序列，但該等兩個片語互換使用，特別對於可編碼蛋白質或蛋白質結構域之核酸分子或核酸序列而言。

重組核酸分子係可包含編碼任一種或多種本文所述操作連接至可有效調控待轉染細胞中之核酸分子之表現之任何轉錄控制序列中之至少一者之蛋白質之任何核酸序列中之至少一者之分子。雖然片語「核酸分子」主要係指物理核酸分子，且片語「核酸序列」主要係指該核酸分子之核苷酸序列，但該等兩個片語互換使用，特別對於可編碼蛋白質之核酸分子或核酸序列而言。此外，片語「重組分子」主要係指操作連接至轉錄控制序列之核酸分子，但可與片語投與至動物之片語「核酸分子」互換使用。

重組核酸分子包含重組載體，其係任何核酸序列，通常為異質性序列，其操作連接至編碼本發明融合蛋白質之單離核酸分子，其可重組生產該融合蛋白質，且其可將核酸分子傳送至本發明宿主細胞

中。此載體可包含在自然界中不鄰近待插入該載體中之單離核酸分子之核酸序列。該載體可係RNA或DNA(原核或真核)，且在本發明中較佳係病毒或質體。重組載體可用於核酸分子之選殖、定序及/或另外操縱核酸分子，且可用於傳送此等分子(例如，如DNA組合物或病毒載體基組合物中一樣)。重組載體較佳用於表現核酸分子，且亦可稱為表現載體。較佳的重組載體可在經轉染宿主細胞中被表現。

在本發明重組分子中，核酸分子係操作連接至含有調控序列(諸如轉錄控制序列、轉譯控制序列、複製起點及與宿主細胞相容且控制本發明核酸分子之表現之其他調控序列)之表現載體。特定言之，本發明重組分子包含操作連接至一或多種表現控制序列之核酸分子。片語「操作連接」係指將核酸分子連接至表現控制序列，連接方式為使得該分子在轉染(亦即，轉形、轉導或轉染)至宿主細胞中時得以表現。

根據本發明，術語「轉染」係用於指可藉以將外源核酸分子(亦即，重組核酸分子)插入細胞中之任何方法。術語「轉形」在用於指將核酸分子引入微生物細胞(諸如藻類、細菌及酵母菌)中時可與術語「轉染」互換使用。在微生物系統中，術語「轉形」係用以描述由於微生物獲得外源核酸而引起之遺傳變化，且本質上係術語「轉染」之同義詞。因此，轉染技術包括(但不限於)轉形、以化學方式處理細胞、粒子轟擊、電穿孔、顯微注射、脂質轉染、吸附、感染及原生質體融合。

以下實驗結果係出於說明目的而提供，而並不意欲限制本發明範圍。

實例

實例1

以下實例描述多種用於治療或預防人類免疫缺乏病毒(HIV)感染

之基於酵母菌之免疫治療組合物之生產。

用以下方法生產表現任何本文所述HIV抗原(例如，包含SEQ ID NO:1-75中任一者之抗原)之酵母菌。

以合成方式自寡核苷酸前驅體生產HIV基因，並使密碼子最優化以在酵母菌中進行表現。

利用標準選殖步驟將HIV基因置於酵母菌(釀酒酵母菌) 2 um表現質體中，其受銅誘導型*CUP1*啟動子控制。

藉由醋酸鋰/聚乙二醇轉染將所得質體引入釀酒酵母菌 W303 α 酵母菌中，並在缺乏尿嘧啶之固體最小板(UDM；無尿苷培養基(uridine dropout medium))上篩選初級轉染物。將群落再次劃到UDM或ULDM(無尿苷及白胺酸的培養基)上，並容許在30°C下生長3天。自該等板接種缺乏尿苷的液體培養基(U2培養基：20g/L葡萄糖；6.7 g/L含硫酸銨之酵母菌氮鹼；組胺酸、白胺酸、色胺酸及腺嘌呤各0.04 mg/mL)或缺乏尿苷及白胺酸的液體培養基(UL2培養基：20g/L葡萄糖；6.7 g/L含硫酸銨之酵母菌氮鹼；及組胺酸、色胺酸及腺嘌呤各0.04 mg/mL)，且菌原培養物在30°C，250 rpm下生長20 h。使用初代培養物接種具有相同調配物之最終培養物，並繼續生長，直至密度達到1.1至4.0 YU/mL。

在30°C下，在1-4 YU/ml之起始密度下用400 μ M硫酸銅誘導培養物3小時。然後收穫各培養物之細胞，用PBS清洗，並在56°C下於PBS中加熱殺死1小時。

對該等培養物進行加熱殺死後，在PBS中清洗該等細胞三次，並藉由玻璃珠破裂單離所有蛋白質，隨後在SDS溶解緩衝液中蒸煮。藉由amidoschwarz/硝化纖維素結合分析確定所有蛋白質之量，並藉由西方墨點法，利用抗-His標記單株抗體探針及內插至帶有His-標記的HCV NS3蛋白質標準曲線測量HIV抗原含量。

實例2

以下實例描述用於評估本發明APL抗原之分析。

該分析包括HLA-A2轉基因小鼠，其等除天然小鼠MHC基因以外表現HLA-A*0201。保護HLA-A2小鼠免受野生型Gag-表現腫瘤攻擊且其效力高於表現野生型Gag序列之基於酵母菌之免疫治療物之表現Gag-APL抗原之基於酵母菌之免疫治療物將考慮作為在感染HIV的患者中起到治療用途之候選者。

在本發明之一態樣中，藉由用與野生型空白載體酵母菌混合之合成肽使小鼠免疫，確定可誘導高於野生型功效之功效之APL。基於肽篩選結果，僅有彼等具有高功效者將在酵母菌中重組產生，然後在上文所述HLA-A2模型中驗證此等選定的領先候選疫苗。

實例3

以下實例描述來自利用稱為GI-2010之基於酵母菌之免疫治療物之實驗之結果，GI-2010係表現由SEQ ID NO:74表示之HIV-1 Gag抗原之完整的加熱殺死釀酒酵母菌。

圖1顯示GI-2010在HLA-A2轉基因小鼠中產生HLA-A2-特異性、Gag區段1及區段3-特異性T細胞反應。簡言之，為評估GI-2010是否產生靶向此等區段之免疫反應，發明人開發出小鼠模型，其中在人類HLA-A*0201轉基因小鼠中測量針對此等元件之T細胞反應。選擇此單套體，係因為其在一般群體(包括在HIV感染個體中)高度流行。用5 Y.U. GI-2010或稱為YVEC之對照(空白載體)酵母菌對小鼠進行皮下免疫，每週一次，持續3週，然後休息13天。收穫脾細胞及淋巴結，並以4:1之比例組合，然後與以5µg/mL或1µg/mL提供之重組p24 (Gag之206個胺基酸衣殼蛋白區，富含區段3殘基)；或以1 µg/mL提供之p24之C-末端94個殘基(表示s3.2，亦富含區段3殘基)；或以1 µg/mL提供之重組p17 (Gag基質蛋白之132個胺基酸區，富含區段1殘基)培育4

天。然後將該等細胞轉移至IFN γ ELISpot板，以評估產生此細胞介素之T細胞響應接種疫苗及響應各重組抗原之活體外刺激(IVS)之數量。圖1中所示結果表明，接種GI-2010可增加針對區段1及區段3抗原決定基之T細胞反應，且此等反應需要接種酵母菌-Gag，因為未接種疫苗的小鼠(未接受過處理)或彼等接種空白載體對照酵母菌(YVEC)者不會產生此效果。

參考圖1，此圖顯示接種GI-2010的小鼠針對用富含區段1及3殘基之重組Gag抗原進行活體外刺激之IFN- γ ELISpot反應。X-軸標記確定IVS中所使用的抗原：P24-5及P24-1重組純化HIV p24衣殼蛋白，濃度分別為5及1 $\mu\text{g/mL}$ ；p17，重組純化HIV p17基質蛋白，濃度為1 $\mu\text{g/mL}$ ；s3.2，p24之重組純化C-末端94個胺基酸，濃度為1 $\mu\text{g/mL}$ 。S.I.，刺激指數(斑點#經抗原處理的IVS/斑點#僅有培養基的IVS)。

為產生GI-2010-誘導的免疫反應性之高解析度功能圖譜，發明人接下來進行IFN γ ELISpot篩選分析，其中測試被9個殘基及跨越區段3覆蓋之44種15-mer肽之公正全面面板在活體外刺激收穫自GI-2010免疫小鼠之T細胞之能力。對BALB/C小鼠進行皮下接種，每週一次，持續3週。第三次接種後一週，收穫脾細胞，並在20U/mL重組鼠科IL-2存在下，與個別肽以25 μM 最終濃度培育4天(四重複IVS孔/肽處理)。將細胞轉移至IFN γ ELISpot板，歷時24 h，然後形成斑點。

圖2中所示結果表明，一種肽(YVDRFYKTLRAEQAS; SEQ ID NO:84)在接種GI-2010之小鼠中引起強烈IFN γ 反應，但在接種Yeast-Ovax之小鼠中不會，Yeast-Ovax係表現無關抗原雞卵清蛋白之酵母菌($p=0.028$, ANOVA)。GI-2010對Ovax免疫小鼠之斑點計數之比例為170:1，證實該反應具有特異性。值得注意的是，此HIV肽(SEQ ID NO:84)包含兩種區段3殘基，且完全與對病毒複製至關重要之序列(DA9)重疊，且確定為長期HIV非進展者中之免疫優勢抗原決定基

(Wagner等人(1999) 162:3727-3734)。此等數據進一步表明，包含區段3抗原決定基之GI-2010或酵母菌-HIV免疫治療物產生靶向涉及控制HIV之Gag之免疫脆弱區之T細胞反應。

圖3比較來自其中6-8小鼠組單獨接種PBS或接種指示數量之加熱殺死HIVAX-2酵母菌(表現由SEQ ID NO:74表示之HIV-1 Gag抗原之酵母菌)並用B16-gag腫瘤攻擊之獨立實驗之結果。此等結果顯示，此模型中之保護性免疫需要最小數量之酵母菌/劑量(約0.1 YU或 1×10^6)及最小數量之所表現的Gag抗原/酵母菌(約20 ng/YU)。

實例4

以下實例描述針對HIV之基於酵母菌之免疫治療組合物(稱為GI-2013)之設計及生產。

在該實驗中，酵母菌經設計以在銅誘導型啟動子*CUP1*控制下表現新穎HIV融合蛋白質抗原。更具體言之，釀酒酵母菌經設計以在銅誘導型啟動子*CUP1*控制下表現融合至HIV Pol之一最高度保守區域(Pol蛋白酶)及融合至Pol核糖核酸酶H及Pol整合酶之部份之HIV Gag p24及p2之保守鄰接區域。HIV融合蛋白質係由SEQ ID NO:5表示之單一多肽，其包含以下自N-至C-末端融合於框架內之HIV序列元件：1) HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置1-231)；2) HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置232-245)；3)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置246-325)；4)HIV Pol核糖核酸酶H蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置326-445)；及5)HIV Pol整合酶蛋白質之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置446-567)。SEQ ID NO:5之位置251上之胺基酸在天然HIV Pol蛋白酶中係天冬胺酸，但在SEQ ID NO:5中經丙胺酸取代，以消除該融合蛋白質之蛋白酶活性。該融合蛋白質之Pol整合酶部份缺乏天然蛋白質之C-末端166個胺基

酸，以確保該融合蛋白質不包括該整合酶之催化功能。

為在酵母菌中穩定表現，該融合蛋白質另外在該融合蛋白質之N-末端包含以SEQ ID NO:82表示之 α 因子前導序列，其係融合至二胺基酸連接子序列Thr-Ser，其係融合至HIV p24蛋白質之N-末端或SEQ ID NO:5之N-末端。該融合蛋白質另外包含融合至C-末端(亦即，融合至SEQ ID NO:5之HIV Pol整合酶蛋白質之C-末端)之六組胺酸序列。整個融合蛋白質(包括N-末端 α 因子前導序列、連接子序列、HIV序列及C-末端六組胺酸序列)之胺基酸序列在本文中係由SEQ ID NO:86表示，其包含以下自N-至C-末端融合於框架中之序列元件：1) α 因子前導序列之胺基酸序列(SEQ ID NO:82，SEQ ID NO:86之位置1-89)；2)Thr-Ser之二胺基酸連接子序列(SEQ ID NO:86之位置90-91)；3)HIV p24蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置1-231；SEQ ID NO:86之位置92-322)；4)HIV Gag p2蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置232-245；SEQ ID NO:86之位置323-336)；5)缺乏N-末端19個胺基酸(其等在HIV病毒株中較保守)之HIV Pol蛋白酶之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置246-325；SEQ ID NO:86之位置337-416)；6)HIV Pol核糖核酸酶H蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置326-445；SEQ ID NO:86之位置417-536)；7)HIV Pol整合酶蛋白質之一部份之胺基酸序列(SEQ ID NO:5之位置446-567；SEQ ID NO:86之位置537-658)；及8)六組胺酸序列(SEQ ID NO:86之位置659-664)。圖4為該融合蛋白質之結構之示意圖。

編碼SEQ ID NO:86及因此SEQ ID NO:5 (因為SEQ ID NO:5包含在SEQ ID NO:86中)之融合蛋白質並經密碼子最優化以供酵母菌表現之核酸序列在本文中係以SEQ ID NO:85表示。表現SEQ ID NO:5之酵母菌免疫療法組合物在本文中亦稱為GI-2013。

藉由標準醋酸鋰-聚乙二醇法將編碼SEQ ID NO:86之 α 因子前導

序列-p24-p2-Pol蛋白酶-Pol整合酶-六組胺酸標記融合蛋白質(在本文中亦稱為「HIVfuse」)之質體轉染至W303 α 酵母菌中。在無尿苷瓊脂(uridine dropout agar)(UDA)板上篩選初級轉染物，並將單一群落分離株再次劃到僅缺乏尿嘧啶(UDA)或缺乏尿嘧啶及白胺酸(ULDA)之酵母菌瓊脂培養基上，以進一步純化轉染選殖體。

使用來自UDA或ULDA板之單一群落接種25 mL U2或UL2液體介質之培養基，並在30°C下培育培養物16 h(菌原培養物)。使用菌原培養物接種U2或UL2之最終培養物，至0.2 YU/mL之密度，其在振盪下培養，直至密度達到2-3 YU/mL。然後，在30°C下，用500 μ M硫酸銅誘導培養物3小時，用PBS清洗一次，在56°C下加熱不活化1小時，並在PBS中清洗三次。萃取全部酵母菌蛋白質並進行定量分析，並藉由西方墨點法，依照標準步驟，利用檢測用抗-His標記單株抗體測量「HIVfuse」抗原(SEQ ID NO:86)含量。結果顯示，該融合蛋白質之表現水平異常高，至多為全部酵母菌細胞蛋白質之23% (14,000 Ng/YU)。結果顯示於圖5中。

實例5

以下實例描述接種稱為GI-2013之酵母菌-HIV免疫治療組合物之結果。

為證明GI-2013在活體內引發HIV抗原-特異性免疫反應之能力，在六週齡BALB/c小鼠之兩個部位(右側及左側)皮下接種2.5 YU/部位之GI-2013或對照酵母菌表現雞卵清蛋白(稱為OVAX)。每週進行一次接種，持續3週。第三次接種後七天，處死小鼠，並移除脾臟，處理成單細胞懸浮液，並藉由氯化銨/碳酸鉀基溶解液耗盡紅血球。在完整RPMI加10%胎牛血清中清洗後，計算細胞數量，並用GI-2013之離心澄清溶解液進行活體外刺激(IVS)，歷時4天(HIVfuse來源；等於6 μ g/mL抗原)。

然後使受刺激的免疫細胞接受ELISpot分析或³H胸苷合併(淋巴細胞增殖分析，LPA)。

就ELISpot分析而言，IVS四天後，向IFN γ /IL2雙色ELISpot板(R&D systems)之每孔轉移200,000個細胞。按照製造商指示，20 h後形成ELISpot，並藉由Cellular Technology Limited (Shaker Heights, Ohio)計算斑點計數。如圖6中所示，Y-軸數值等於HIV抗原刺激孔中之斑點計數減去培養基孔(無刺激)中得到之斑點計數。OVAX組之培養基扣除值略呈負值，且因此指定為零，因為未定義ELISpot負值(誤差槓，標準偏差)。圖6中所示結果證實，GI-2013引起強烈HIV抗原-特異性IFN γ 反應。

就淋巴細胞增殖分析(LPA)而言，將1 μ Ci ³H胸苷添加至各孔中含於20 μ L完整RMPI之受刺激脾細胞(200,000個細胞)中歷時20 h。收穫細胞，並經處理以按照標準步驟進行閃爍記數。如圖7中所示，Y-軸數值等於HIV抗原刺激孔中之平均每分鐘計數(cpm)減去培養基孔(無刺激)中得到之cpm。針對每一條件處理最少4個獨立重複IVS孔(誤差槓，標準偏差)。結果顯示，GI-2013引起強烈HIV-抗原特異性淋巴細胞增殖反應(GI-2013/OVAX反應比為~12)。

因此，GI-2013在活體內產生強勁免疫反應，特定言之，藉由引起據信在HIV感染之情境下有效之細胞免疫反應。

實例6

以下實例描述治療HIV之臨床研究。

利用本文所述基於酵母菌之HIV免疫療法組合物如GI-2010 (包含SEQ ID NO:74)、或利用本文所述基於酵母菌之HIV免疫療法組合物如GI-2013 (包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:86)進行開放標籤劑量遞增1b/2a期臨床試驗。本文所述其他基於酵母菌之HIV免疫療法組合物可用於類似的1期臨床實驗。個體感染1型人類免疫缺乏病毒(HIV-

1)，且其疾病利用HAART療法得到控制。

以循序劑量隊列遞增方案向滿足此等標準之個體投與基於酵母菌之HIV免疫療法組合物，所採用的劑量範圍為0.05 Y.U.至80 Y.U.(例如，0.05 Y.U.、10 Y.U.、20 Y.U.及40-80 Y.U.)。在一方案中，皮下投與5個每週一次的劑量(每週用藥，持續4週)，隨後亦皮下投與2-4個每月一次劑量，同時在用基於酵母菌之HIV免疫療法治療期間繼續抗病毒療法(初免-加強方案)。在第二方案中，繼之以每4週一次用藥方案，其中個體總共接受三個在第1天、第4週及第8週投與之劑量，利用與上文所列出相同的劑量遞增策略。視情況地，在一研究中，單一患者隊列(5-6名患者)將以與免疫療法加繼續抗病毒療法相同的時刻表接受皮下注射安慰劑(PBS)。

在該試驗之第二擴展階段中，個體接受如上測出之最高安全劑量，並聯合繼續抗病毒療法治療6個月至1年。

評估安全性、病毒載量、CD4⁺ T細胞計數及免疫原性(例如，藉由ELISpot測量之抗原特異性T細胞反應)。預期該基於酵母菌之HIV免疫療法組合物可為HIV-感染患者提供治療益處。預期該免疫療法在所有遞送劑量下係安全且耐受性良好。預期至少接受最高劑量之基於酵母菌之HIV免疫療法之患者出現治療引起的HIV-特異性T細胞反應，藉由ELISPOT測定。預期，與抗病毒藥物組相比及/或與安慰劑對照組(若採用的話)相比，接受基於酵母菌之HIV免疫療法之患者之病毒載量控制有所改進及/或CD4 T細胞計數提高。

雖然已詳細描述本發明之各種實施例，但很明顯，熟習此項技術者將思及彼等實施例之修改及改變。然而，應特別理解，此等修改及改變係在如以下申請專利範圍中所述之本發明範圍內。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商環球免疫公司
湯瑪士 H 金
大衛 艾佩連

<120> 治療或預防人類免疫缺乏病毒感染之組合物及方法

<130> 3923-44-PCT

<150> 61/805,299

<151> 2013-03-26

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 377

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 1

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly

340

345

350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met
 370 375

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 2

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
 1 5 10 15

Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
 20 25 30

Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
 35 40 45

Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
 50 55 60

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
 65 70 75 80

Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met
 85 90 95

Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln
 100 105 110

Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu
 115 120 125

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met
 130 135 140

Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro

[illegible]

<210>	3
<211>	325
<212>	PRT
<213>	人類免疫缺乏病毒

<400> 3

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
1 5 10 15

Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
20 25 30

Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
35 40 45

Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
50 55 60

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
65 70 75 80

Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met

85										90					95				
Arg	Glu	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	Ile	Ala	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln				
			100					105					110						
Glu	Gln	Ile	Gly	Trp	Met	Thr	Asn	Asn	Pro	Pro	Ile	Pro	Val	Gly	Glu				
		115					120					125							
Ile	Tyr	Lys	Arg	Trp	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Met				
	130					135					140								
Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile	Arg	Gln	Gly	Pro	Lys	Glu	Pro				
145					150					155					160				
Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Gln				
				165					170					175					
Ala	Ser	Gln	Glu	Val	Lys	Asn	Trp	Met	Thr	Glu	Thr	Leu	Leu	Val	Gln				
			180					185						190					
Asn	Ala	Asn	Pro	Asp	Cys	Lys	Thr	Ile	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Pro	Ala				
		195					200					205							
Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Met	Met	Thr	Ala	Cys	Gln	Gly	Val	Gly	Gly	Pro				
	210					215					220								
Gly	His	Lys	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Met	Ser	Gln	Val	Thr	Asn				
225					230					235					240				
Ser	Ala	Thr	Ile	Met	Lys	Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Asp	Asp				
				245					250					255					
Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Met	Ser	Leu	Pro	Gly	Arg	Trp	Lys	Pro	Lys	Met				
			260					265						270					
Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Phe	Ile	Lys	Val	Arg	Gln	Tyr	Asp	Gln	Ile				
		275					280					285							
Leu	Ile	Glu	Ile	Cys	Gly	His	Lys	Ala	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Val	Gly				
	290					295					300								

Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly
305 310 315 320

Cys Thr Leu Asn Phe
325

<210> 4
<211> 497
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 4

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
1 5 10 15

Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
20 25 30

Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
35 40 45

Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
50 55 60

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
65 70 75 80

Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met
85 90 95

Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln
100 105 110

Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu
115 120 125

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met
130 135 140

Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro
145 150 155 160

Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
 165 170 175
 Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
 180 185 190
 Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
 195 200 205
 Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
 210 215 220
 Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn
 225 230 235 240
 Ser Ala Thr Ile Met Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp
 245 250 255
 Thr Val Leu Glu Glu Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met
 260 265 270
 Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile
 275 280 285
 Leu Ile Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly
 290 295 300
 Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly
 305 310 315 320
 Cys Thr Leu Asn Phe Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys
 325 330 335
 Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr
 340 345 350
 Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys
 355 360 365
 Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro
 370 375 380

Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val
385 390 395 400

Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln
405 410 415

Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr
420 425 430

Val Leu Ala Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp
435 440 445

Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr
450 455 460

Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly
465 470 475 480

Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe
485 490 495

Arg

<210> 5
<211> 567
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 5

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
1 5 10 15

Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
20 25 30

Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
35 40 45

Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
50 55 60

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
65 70 75 80

Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met
85 90 95

Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln
100 105 110

Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu
115 120 125

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met
130 135 140

Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro
145 150 155 160

Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
165 170 175

Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
180 185 190

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
195 200 205

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
210 215 220

Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn
225 230 235 240

Ser Ala Thr Ile Met Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp
245 250 255

Thr Val Leu Glu Glu Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met
260 265 270

Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile
275 280 285

Leu Ile Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly
290 295 300

Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly
305 310 315 320

Cys Thr Leu Asn Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys
325 330 335

Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asn Arg Gly Arg Gln Lys Val Val
340 345 350

Thr Leu Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile Tyr
355 360 365

Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser
370 375 380

Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Gln Ser Glu Ser
385 390 395 400

Glu Leu Val Asn Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val
405 410 415

Tyr Leu Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln
420 425 430

Val Asp Lys Leu Val Ser Ala Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp
435 440 445

Gly Ile Asp Lys Ala Gln Asp Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp
450 455 460

Arg Ala Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu
465 470 475 480

Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His
485 490 495

Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His

8

—

115

120

<210> 7
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 7

Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 20 25 30

Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
 35 40 45

Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
 50 55 60

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
 65 70 75 80

Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe
 85 90 95

Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val
 100 105 110

Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe
 115 120 125

Gln

<210> 8
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 8

Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly
20 25 30

Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys
35 40 45

Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn
50 55 60

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe
65 70 75 80

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
85 90 95

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
100 105 110

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
115 120 125

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
130 135 140

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
145 150 155 160

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
165 170 175

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
180 185 190

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
195 200 205

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
210 215 220

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu

225		230		235		240
Glu Lys Ala Phe	Ser Pro Glu Val Ile	Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser				
	245	250			255	
Glu Gly Ala Thr	Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly					
	260	265			270	
Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu						
	275	280			285	
Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala						
	290	295			300	
Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr						
	305	310		315		320
Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile						
	325	330				335
Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys						
	340	345			350	
Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly						
	355	360			365	
Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu						
	370	375			380	
Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr						
	385	390		395		400
Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala						
	405	410				415
Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly						
	420	425			430	
Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser						
	435	440			445	

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
450 455 460

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
465 470 475 480

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
485 490 495

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
500 505 510

<210> 9
<211> 512
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 9

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
420 425 430

Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu
435 440 445

Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly
450 455 460

Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys
465 470 475 480

Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn
485 490 495

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe
500 505 510

<210> 10

<211> 604

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 10

Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met
1 5 10 15

Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys
20 25 30

Ala Leu Val Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser
 35 40 45

Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys
 50 55 60

Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His
 85 90 95

Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Ala Val Gly
 100 105 110

Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr
 115 120 125

Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr
 130 135 140

Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
 145 150 155 160

Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Met Gly Ala Arg
 165 170 175

Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg
 180 185 190

Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp
 195 200 205

Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu
 210 215 220

Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln Pro Ser Leu
 225 230 235 240

Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr
 245 250 255

Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp Thr Lys Glu Ala
260 265 270

Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Lys Lys Ala Gln
275 280 285

Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val Ser Gln Asn Tyr
290 295 300

Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser
305 310 315 320

Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe
325 330 335

Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr
340 345 350

Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala
355 360 365

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
370 375 380

Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met
385 390 395 400

Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln
405 410 415

Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu
420 425 430

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met
435 440 445

Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro
450 455 460

Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln

465 470 475 480

Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
485 490 495

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
500 505 510

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
515 520 525

Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn
530 535 540

Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys
545 550 555 560

Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn
565 570 575

Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly
580 585 590

His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
595 600

<210> 11
<211> 604
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 11

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu

50	55	60
Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn		
65	70	75
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp		
	85	90
Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys		
	100	105
Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val		
	115	120
Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His		
	130	135
Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu		
	145	150
Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser		
	165	170
Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly		
	180	185
Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu		
	195	200
Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala		
	210	215
Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr		
	225	230
Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile		
	245	250
Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys		
	260	265
		270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
420 425 430

Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met
435 440 445

Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys
450 455 460

Ala Leu Val Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser
465 470 475 480

Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys
485 490 495

Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu
500 505 510

Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His
515 520 525

Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Ala Val Gly
530 535 540

Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr
545 550 555 560

Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr
565 570 575

Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
580 585 590

Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg
595 600

<210> 12
<211> 554
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 12

Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Asp Glu His Glu Lys Tyr His
1 5 10 15

Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val
20 25 30

Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu
35 40 45

Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp
50 55 60

Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala
65 70 75 80

Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr
 100 105 110
 Ile His Thr Asp Asn Gly Ser Asn Phe Thr Met Gly Ala Arg Ala Ser
 115 120 125
 Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg
 130 135 140
 Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp Ala Ser
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser
 165 170 175
 Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln Pro Ser Leu Gln Thr
 180 185 190
 Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr
 195 200 205
 Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp
 210 215 220
 Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Lys Lys Ala Gln Gln Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile
 245 250 255
 Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg
 260 265 270
 Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro
 275 280 285
 Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln
 290 295 300

Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met
305 310 315 320

Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg
325 330 335

Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu
340 345 350

Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln
355 360 365

Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr
370 375 380

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg
405 410 415

Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser
420 425 430

Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala
435 440 445

Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr
450 455 460

Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His
465 470 475 480

Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Ser Ala
485 490 495

Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys Ile Val
500 505 510

Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn Cys Arg

515

520

525

Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln
 530 535 540

Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
 545 550

<210> 13

<211> 554

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 13

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
 100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
 130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu

145		150		155		160
Glu Lys Ala Phe	Ser 165	Pro Glu Val Ile	Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser			
Glu Gly Ala Thr	180	Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly				
Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu	195	200	205			
Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala	210	215	220			
Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr	225	230	235			240
Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile	245	250	255			
Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys	260	265	270			
Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly	275	280	285			
Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu	290	295	300			
Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr	305	310	315			320
Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala	325	330	335			
Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly	340	345	350			
Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser	355	360	365			

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
420 425 430

Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Asp Glu His Glu Lys Tyr His
435 440 445

Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val
450 455 460

Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu
465 470 475 480

Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp
485 490 495

Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala
500 505 510

Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu
515 520 525

Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr
530 535 540

Ile His Thr Asp Asn Gly Ser Asn Phe Thr
545 550

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 14

Lys Ala Leu Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Val
1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 15

Lys Ala Met Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Val
1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 16

Lys Ala Val Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Val
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 17

Lys Ala Leu Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Ile
1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 18

Lys Ala Met Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Ile
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 19

Lys Ala Val Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Ile
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 20

Thr Ser Leu Leu Gln Glu Gln Ile Gly Val
1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Thr Ser Met Leu Gln Glu Gln Ile Gly Val
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Thr Ser Val Leu Gln Glu Gln Ile Gly Val
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Thr Ser Leu Leu Gln Glu Gln Ile Gly Ile
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

Thr Ser Met Leu Gln Glu Gln Ile Gly Ile
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Thr Ser Val Leu Gln Glu Gln Ile Gly Ile
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

Lys Arg Leu Ile Ile Leu Gly Leu Asn Val
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Lys Arg Met Ile Ile Leu Gly Leu Asn Val
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Lys Arg Val Ile Ile Leu Gly Leu Asn Val
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 29

Lys Arg Leu Ile Ile Leu Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 30

Lys Arg Met Ile Ile Leu Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 31

Lys Arg Val Ile Ile Leu Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Asp Leu Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Asp Met Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 34

Asp Val Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 35

Asp Leu Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 36

Asp Met Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ile
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 37

Asp Val Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ile
1 5

<210> 38

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 38

Tyr Val Asp Leu Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 39

Tyr Val Asp Met Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 40

Tyr Val Asp Val Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 41

Tyr Val Asp Leu Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ile
 1 5 10

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 42

Tyr Val Asp Met Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 43

Tyr Val Asp Val Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ile
 1 5 10

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 44

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Leu Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 45

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Ala Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 46

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Leu Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 47

Lys Ala Phe Thr Pro Glu Val Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 48

Lys Ala Phe Ser Pro Gln Val Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 合成肽

<400> 49

Lys Ala Phe Ser Pro Asp Val Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 50

Thr Ser Thr Leu Asn Glu Gln Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 51

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Asn Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 52

Thr Ser Thr Leu Glu Glu Gln Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 53

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Glu Ile Gly Trp

1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 54

Thr Ser Thr Leu Gln Gln Gln Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 55

Thr Ser Thr Leu Gln Asp Gln Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 56

Lys Arg Trp Leu Ile Leu Gly Leu Asn Lys
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 57

Lys Arg Trp Ile Leu Leu Gly Leu Asn Lys
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 58

Lys Arg Trp Ile Ile Ile Gly Leu Asn Lys
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 59

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Ala Leu Asn Lys
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 60

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ile Asn Lys
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 61

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Val Asn Ly
1 5 10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 62

Asp Arg Phe Tyr Arg Thr Leu Arg Ala
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 63

Asp Arg Phe Tyr Met Thr Leu Arg Ala
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 64

Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成肽

<400> 65

Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Ile Arg Ala
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 66

Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Val Arg Ala
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 67

Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Ala Arg Ala
1 5

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 68

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Arg Thr Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 69

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Met Thr Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 70

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 71

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Ile Arg Ala
1 5 10

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 72

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Val Arg Ala
1 5 10

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 73

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 74

<211> 432

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 74

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
370 375 380

Asn Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
385 390 395 400

Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
420 425 430

<210> 75
<211> 431
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 75

Met Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu
1 5 10 15

Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His
20 25 30

Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly
35 40 45

Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln
50 55 60

Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr
65 70 75 80

Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp Thr
85 90 95

Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Lys
100 105 110

Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val Ser
115 120 125

Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu
145 150 155 160

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu
165 170 175

Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly
180 185 190

His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala
195 200 205

Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro
210 215 220

Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser
225 230 235 240

Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro
245 250 255

Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile
260 265 270

Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro
275 280 285

Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg
290 295 300

Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu
305 310 315 320

Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu
325 330 335

Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val
340 345 350

Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln
355 360 365

Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn
 370 375 380

Gln Arg Lys Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr
 385 390 395 400

Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly
 405 410 415

Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg His Ala Asn
 420 425 430

<210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 76

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe
 1 5 10

<210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 77

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp
 1 5 10

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 78

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
 1 5 10

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 79

Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala
1 5

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 80

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala
1 5 10

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成肽

<400> 81

Met Ala Asp Glu Ala Pro
1 5

<210> 82

<211> 89

<212> PRT

<213> 釀酒酵母菌

<400> 82

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala
85

<210> 83
<211> 89
<212> PRT
<213> 釀酒酵母菌

<400> 83

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala
85

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒

<400> 84

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser
1 5 10 15

<210> 85
<211> 2003
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1995)

```

<400> 85
atg aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc      48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1                               5                               10                               15

gca tca gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa      96
Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20                               25                               30

att ccg gct gaa gct gtc atc ggt tac tta gat tta gaa ggg gat ttc      144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35                               40                               45

gat gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg      192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50                               55                               60

ttt ata aat act act att gcc agc att gct gct aaa gaa gaa ggg gta      240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65                               70                               75                               80

tct cta gat aaa aga gag gct gaa gct act agt cct att gtg caa aac      288
Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Thr Ser Pro Ile Val Gln Asn
85                               90                               95

atc caa ggt caa atg gtt cat cag gca att tct ccc aga aca ttg aat      336
Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn
100                              105                              110

gcg tgg gtc aag gta gtt gag gaa aaa gcc ttt tca cca gaa gtc ata      384
Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile
115                              120                              125

cca atg ttt tcc gcc ttg tct gaa ggc gcc aca cct caa gac ctc aat      432
Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn
130                              135                              140

act atg ctg aat acc gtg gga gga cat caa gcc gct atg caa atg tta      480
Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu
145                              150                              155                              160

aag gaa acc atc aac gaa gag gcg gct gag tgg gat cgt gtt cac cct      528
Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro
165                              170                              175

gtc cat gca gga cct att gca cca ggt caa atg aga gaa cca aga gga      576
Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly

```

180	185	190	
tct gac att gcg ggt act aca agt aca ctg cag gaa caa ata gga tgg Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp 195 200 205			624
atg acg aac aat cct cct att cca gtt ggt gag ata tac aag aga tgg Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp 210 215 220			672
atc att ctt ggc tta aac aag att gtt aga atg tac agt cca aca tca Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser 225 230 235 240			720
atc cta gat atc aga cag ggt cca aaa gag cct ttt aga gat tac gtc Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val 245 250 255			768
gat aga ttt tac aaa aca ctt aga gca gaa caa gca tct caa gag gtg Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val 260 265 270			816
aaa aac tgg atg act gaa act ctt ctg gtt caa aat gct aat cca gac Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp 275 280 285			864
tgt aaa acg att ttg aag gca cta ggc cct gca gct act ttg gaa gag Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu 290 295 300			912
atg atg act gct tgt caa ggg gta ggt ggt cct ggt cac aaa gct aga Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg 305 310 315 320			960
gtg tta gca gaa gca atg tca caa gtc acc aat tcc gcc aca att atg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met 325 330 335			1008
aag gaa gct ctg tta gct act ggg gct gat gat aca gtt ttg gag gaa Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu 340 345 350			1056
atg tct ttg cca ggt aga tgg aag cca aaa atg atc ggg ggc ata ggc Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly 355 360 365			1104
ggc ttt atc aaa gta agg caa tat gac caa atc tta att gaa atc tgt Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys 370 375 380			1152
ggc cat aag gct atc gga act gtg ttg gta ggc cca aca cct gtt aac Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn 385 390 395 400			1200
ata att ggt aga aac cta ctt acc caa ata ggg tgt act ttg aat ttc			1248

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe	
405 410 415	
tac gtt gat gga gcc gct aat cga gaa acc aaa tta gga aaa gcg ggt	1296
Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly	
420 425 430	
tac gtt act aat aga ggt agg cag aaa gtc gtt aca ctg aca gat act	1344
Tyr Val Thr Asn Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Thr Leu Thr Asp Thr	
435 440 445	
aca aat caa aag aca gaa tta caa gcc att tac ctt gct ttg caa gat	1392
Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile Tyr Leu Ala Leu Gln Asp	
450 455 460	
tca ggt ttg gaa gta aac att gtt act gac agt cag tat gct ctt ggt	1440
Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Ala Leu Gly	
465 470 475 480	
atc atc cag gct caa cca gat caa tcc gaa tca gaa ctc gtt aat cag	1488
Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Gln Ser Glu Ser Glu Leu Val Asn Gln	
485 490 495	
att att gaa caa ctc atc aaa aag gag aaa gta tat cta gct tgg gtc	1536
Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu Ala Trp Val	
500 505 510	
cca gct cac aaa ggt ata gga ggg aat gaa caa gtc gat aag tta gtt	1584
Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val	
515 520 525	
tcc gct ggc atc cgt aaa gtg tta ttc cta gat ggc atc gac aaa gct	1632
Ser Ala Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala	
530 535 540	
caa gat gaa cac gag aaa tac cat tct aac tgg aga gca atg gca agc	1680
Gln Asp Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser	
545 550 555 560	
gat ttc aat ctt cca cca gta gtc gca aag gaa atc gta gca tct tgc	1728
Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys	
565 570 575	
gat aaa tgt caa ttg aaa ggg gaa gcc atg cac ggt cag gtt gat tgc	1776
Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys	
580 585 590	
tct cct ggt ata tgg caa ttg gac tgc acg cat tta gaa ggt aag gtg	1824
Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val	
595 600 605	
ata ttg gtg gcc gtt cat gta gca tca ggt tat atc gaa gct gaa gtt	1872
Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val	
610 615 620	

att cca gca gag aca gga caa gag aca gcc tac ttc cta ttg aag ctc
Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu
625 630 635 640

gcc gga aga tgg cca gtt aaa act atc cac acc gac aat ggt tct aac
Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr Ile His Thr Asp Asn Gly Ser Asn
645 650 655

ttt aca cat cac cat cat cat cat tag gcggccgc
Phe Thr His His His His His
660

1920

1968

2003

<210> 86
<211> 664
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 合成構築體

<400> 86

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Thr Ser Pro Ile Val Gln Asn
85 90 95

Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn
100 105 110

Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile
115 120 125

Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn
130 135 140

Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu
145 150 155 160

Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro
165 170 175

Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp
195 200 205

Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp
210 215 220

Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser
225 230 235 240

Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val
245 250 255

Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val
260 265 270

Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp
275 280 285

Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu
290 295 300

Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg
305 310 315 320

Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met
325 330 335

Lys Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu
340 345 350

Met Ser Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly
355 360 365

Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys
370 375 380

Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn
385 390 395 400

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe
405 410 415

Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly
420 425 430

Tyr Val Thr Asn Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Thr Leu Thr Asp Thr
435 440 445

Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile Tyr Leu Ala Leu Gln Asp
450 455 460

Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Ala Leu Gly
465 470 475 480

Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Gln Ser Glu Ser Glu Leu Val Asn Gln
485 490 495

Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu Ala Trp Val
500 505 510

Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val
515 520 525

Ser Ala Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala
530 535 540

Gln Asp Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser
545 550 555 560

Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys
565 570 575

Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys
580 585 590

Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val
595 600 605

Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val
610 615 620

Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu
625 630 635 640

Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr Ile His Thr Asp Asn Gly Ser Asn
645 650 655

Phe Thr His His His His His His
660

發明摘要

※ 申請案號： 103111327

※ 申請日： 103.3.26

A61K39/21 (2006.01)

※IPC 分類：C07K14/15 (2006.01)

C12N15/81 (2006.01)

A61P31/18 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

【發明名稱】

治療或預防人類免疫缺乏病毒感染之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OR
PREVENTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS
INFECTION

【中文】

本發明揭示用於治療及/或預防HIV感染及其症狀之基於酵母菌之免疫治療組合物、人類免疫缺乏病毒(HIV)抗原及融合蛋白質，以及利用該等基於酵母菌之免疫治療組合物、HIV抗原及融合蛋白質預防性及/或治療性處置HIV及/或其症狀之方法。

【英文】

Disclosed are yeast-based immunotherapeutic compositions, human immunodeficiency virus (HIV) antigens, and fusion proteins for the treatment and/or prevention of HIV infection and symptoms thereof, as well as methods of using the yeast-based immunotherapeutic compositions, HIV antigens, and fusion proteins for the prophylactic and/or therapeutic treatment of HIV and/or symptoms thereof.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

107年3月21日修正替換頁
第1-2頁

1. 一種免疫治療組合物，其包含：
 - a) 酵母菌媒介；及
 - b) 包含HIV抗原之融合蛋白質，其中該等HIV抗原包含與SEQ ID NO:5至少95%相同之胺基酸序列。
2. 如請求項1之免疫治療組合物，其中該等HIV抗原由SEQ ID NO:5之胺基酸序列組成。
3. 如請求項1之免疫治療組合物，其中該融合蛋白質包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列。
4. 如請求項1之免疫治療組合物，其中該酵母菌媒介係完整殺死或不活化酵母菌。
5. 一種免疫治療組合物，其包含：
 - a) 完整不活化酵母菌；及
 - b) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HIV融合蛋白質，其中該融合蛋白質受啟動子*CUP1*控制；
其中該HIV融合蛋白質係由該酵母菌表現；且
其中該組合物可引起HIV-特異性T細胞反應。
6. 如請求項5之免疫治療組合物，其中該融合蛋白質包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列。
7. 一種免疫治療組合物，其包含：
 - a) 酵母菌；及
 - b) 由該酵母菌表現且包含HIV Gag蛋白質之HIV抗原，其中該HIV Gag蛋白質在由該酵母菌表現時形成極大顆粒(VLPs)，其中該HIV抗原包含SEQ ID NO:5。
8. 一種免疫治療組合物，其包含：

a)酵母菌媒介；及

b)至少一種HIV抗原，其係包含區段3抗原決定基及/或區段1抗原決定基之HIV Gag抗原，其中該HIV抗原包含SEQ ID NO:5。

9. 如請求項1至8中任一項之免疫治療組合物，其中該酵母菌係來自釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。
10. 如請求項1至8中任一項之免疫治療組合物，其中該組合物係調配於適合注射投與個體之醫藥上可接受的賦形劑中。
11. 一種包含HIV抗原之融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含與SEQ ID NO:5之胺基酸序列至少95%相同之胺基酸序列。
12. 一種編碼如請求項11之融合蛋白質之重組核酸分子。
13. 一種經如請求項12之重組核酸分子轉染之分離細胞。
14. 一種如請求項1至10中任一項之組合物之用途，其係用於製備治療已經感染人類免疫缺乏病毒(HIV)之個體之HIV感染或至少一種由HIV感染引起之症狀之藥物。
15. 如請求項14之用途，其中該藥物進一步與可用於治療或改善HIV感染症狀之一或多種另外化合物或組合物投與。
16. 如請求項15之用途，其中該一或多種另外化合物或組合物係選自由下列所組成之群：固定劑量組合(FDC)藥物；編碼至少一種HIV抗原之DNA疫苗；加工的酵母菌；該個體之自體T細胞，其中該等自體T細胞已經至少一種HIV抗原離體(ex vivo)刺激；含有至少一種HIV抗原之蛋白質亞單位疫苗；及生物反應調節劑。
17. 如請求項15之用途，其中該另外化合物或組合物係在投與該免疫治療組合物之前投與、在投與該免疫治療組合物之後投與或在投與該免疫治療組合物的同時投與。
18. 一種如請求項1至10中任一項之組合物之用途，其係用於製備用以免疫個體群對抗HIV之藥物。