[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1128043A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192512.9

[51]Int.Cl[6]
C12N 5/10

[43]公开日 1996年7月31日

[22]申请日 94.4.20

[30]优先权

[32]93.4.20 [33]US[31]08/049,259

[86]国际申请 PCT/US94/04367 94.4.20

[87]国际公布 WO94/24267 英 94.10.27

[85]进入国家阶段日期 95.12.20

[71]申请人 W·S·罗宾逊

地址 美国加利福尼亚

共同申请人 K·楚

[72]发明人 K·楚

W·S·罗宾逊

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 张 闽

C12N 15/11 C12N 15/12
C12N 15/30 C12N 15/31
C12N 15/33 C12N 15/63

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 对受胞内传染原感染的个体进行治疗的方法和物质

[57]摘要

本发明提供了一种重组多核苷酸，其至少使个体对传染性的胞内病原体具有部分免疫力。该重组多核苷酸编码一种共同刺激因子和/或一种靶抗原多肽。赋予免疫力的免疫应答来自两种多肽在个体抗原呈递细胞中的表达。免疫是针对自然编码靶抗原多肽的病原体。

权 利 要 求 书

1. 一种重组多核苷酸，它含有一个可操纵地与转录控制区连接、编码共同刺激因子的区域，并进一步含有一个可操纵地与转录控制区连接、编码靶抗原多肽的区域。

2. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，共同刺激因子选自 *B7*—1、*B7*—2 和 *B7*—3。

3. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，共同刺激因子和靶抗原多肽在个体中的表达，至少使个体对自然编码靶抗原多肽的胞内传染原具有部分免疫力。

4. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在病毒中被自然编码的。

5. 根据权利要求 3 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在肝炎病毒中被自然编码的。

6. 根据权利要求 3 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在逆转录病毒中被自然编码的。

7. 根据权利要求 3 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在人类免疫缺陷病毒(*HIV*)中被自然编码的。

8. 根据权利要求 3 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在丙型肝炎病毒(*HCV*)中被自然编码的。

9. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在原生动物中被自然编码的。

10. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在真菌中被编码的。

11. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在细菌中被自然编码的。

12. 根据权利要求 1 所述的重组多核苷酸，其中，靶抗原是在寄生原中被编码的。

13. 一种包含权利要求 1 所述的重组多核苷酸的表达载体。

14. 一种包含权利要求 2 所述的重组多核苷酸的表达载体。

15. 一种包含权利要求 3 的重组多核苷酸的表达载体。

16. 一种包含权利要求 1 所述的重组多核苷酸的病毒载体。

17. 一种包含权利要求 2 所述的重组多核苷酸的病毒载体。

18. 一种包含权利要求 3 所述的重组多核苷酸的病毒载体。

19. 一种宿主细胞，它是由含有可操纵地与转录控制区连接、编码共同刺激因子的区域的重组多核苷酸和含有可操纵地与转录控制区连接、编码靶抗原多肽的区域的重组多核苷酸转化的。

20. 根据权利要求 19 所述的宿主细胞，其中，共同刺激因子选自 *B7*—1、*B7*—2 和 *B7*—3。

21. 权利要求 19 的宿主细胞，其中，共同刺激因子和靶抗原多肽在个体中的表达，至少使个体对自然编码靶抗原多肽的胞内传染原具有部分免疫力。

22. 使用一种含有可操纵地与转录控制区连接、编码共同刺激因子的区域的重组多核苷酸，以及一种含有可操纵地与转录控制区连接、编码靶抗原多肽的区域的重组多核苷酸的方法，该方法包括：

给与个体治疗有效量的重组多核苷酸，并确定与对自然编码靶抗原的胞内病原体的感染的应答有关的身体症状的减轻。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中，共同刺激因子选自 *B*7—1、*B*7—2 和 *B*7—3。

24. 权利要求 22 的方法，其中，给药的重组多核苷酸包含在病毒载体中。

25. 权利要求 22 的方法，其中，给药的重组多核苷酸包含在来自体内的多核苷酸转化的宿主细胞中。

26. 一种使用权利要求 1 的重组多核苷酸的方法，包括用多核苷酸转化一种宿主细胞。

27. 一种使用权利要求 3 的重组多核苷酸的方法，包括用多核苷酸转化一种宿主细胞。

28. 通过权利要求 26 中的方法制备的宿主细胞及其子代。

29. 通过权利要求 27 中的方法制备的宿主细胞及其子代。

说　明　书

对受胞内传染原感染的个体进行治疗的方法和物质

发明领域

本发明涉及预防新的感染，治愈流行性感染和治疗慢性感染的方法，这些感染均是由胞内传染原引起的。该方法包括使用基因疗法以加强共同刺激 T 细胞活化的配体间的相互作用。更确切地说，本发明涉及基因疗法的方法和物质，其中编码源自传染原的抗原和共同刺激 T 细胞活化的配体的基因在宿主动物细胞中共表达，以预防或治疗慢性感染。该方法通过增强抗原特异性 T 细胞的反应，刺激或增强对传染原抗原的免疫应答，由此保护机体不受新的感染或终止慢性感染。

发明背景

许多传染原能够在宿主机体内引起感染和疾病；此类传染原包括原生动物，真菌，细菌，病毒，甚至虫子。这些传染原中，那些有细胞内作用机制的，对预防和治疗提出了最大挑战。当胞内传染原的宿主为哺乳动物，如人时，尤为如此。

哺乳动物具有复杂的免疫系统，其具有多种不同的机制以防御传染原的侵入。在正常情况下，免疫系统的作用是从哺乳动物宿主体系中彻底排除传染原。因为哺乳动物的免疫系统通常能够排除传染原，所以大多数感染是自身限制的。然而，当免疫系统不能够或者

不对传染原的存在作出反应时，就会产生问题。这种情况下，感染会变成慢性并持续存在多年甚至受感染的人或动物一生，通常导致严重的疾病。

传统的、标准疫苗将免疫系统暴露给外来抗原，如那些传染原，以引发抗原特异性免疫应答。这种免疫应答大多常为体液免疫而非细胞免疫，也就是说，它导致抗体的产生，而不是下面所述的基于T—细胞的免疫。有效的接种预防感染或减轻感染引起的疾病，感染是由疫苗针对的传染原引起的。

引发中和抗体的免疫应答足以预防某些病毒的感染。*Murphy*等(1990)。所以，这些病毒引起的感染可以通过接种产生中和抗体的抗原来预防。然而，对某些病毒和非病毒传染原，不能引发中和抗体，或即使能够引发，中和抗体也不足以预防感染和/或疾病的发展。

两种传统的疫苗类型为死病毒和活的减毒病毒。死病毒由完整的病毒体组成或者其它传染原组成，其传染性已被灭活。这些病毒也可以由抗原的亚单位或病毒体的组成部分或其它传染原组成。这些疫苗以非肠道途径接种或直接用于粘膜上。活的减毒疫苗由活病毒或其它经遗传学手段已改变毒力的传染原组成。当用于接种时，这些疫苗会引起减轻形式的疾病或根本不发病。

已经研究出并在实验中使用了第三种类型的疫苗，但还没有用于临床。该方法是使用活的物质(如病毒或细菌)做载体来表达异源传染原的疫苗抗原。编码抗原的基因或核苷酸序列由该载体表达，并且当用于接种时，直接将宿主暴露给抗原。期望对该抗原产生的免疫应答能保护宿主不受传染原(上述抗原源自该传感染)的感染。

死疫苗的例子包括破伤风类毒素，流感病毒亚单位，狂犬病，脊髓灰质炎和 *HBV*。活的减毒疫苗的例子包括伤寒杆菌（*Salmonella typhi*）*Ty*21—*a* 和脊髓灰质炎，麻疹，风疹，腮腺炎，天花和黄热病病毒活疫苗。用于表达异源疫苗抗原的活载体的例子有牛痘病毒，腺病毒，腺病毒相关病毒和 *S. typhi Ty*21—*a* 株。

与严重发病和早死有关的慢性感染的例子包括两种人肝炎病毒，乙型肝炎病毒（*HBV*）和丙型肝炎病毒（*HCV*），它们可导致慢性肝炎，肝硬化和肝癌。人 *HBV* 传染很类似于在某些动物中由密切相关的肝 *DNA* 病毒引起的传染，包括感染 *Beechey* 地松鼠的地松鼠肝炎病毒（*GSHV*），感染土拨鼠的土拨鼠肝炎病毒（*WHV*）和感染鸭子的鸭肝炎病毒（*DHBV*），*Robihson*，在，*Virology*，第 2 版，编辑 *B. Fields*，*Raven Rress*，*NewYork*，*PP.* 2137—2169（1990）。人类由病毒传染原引起的慢性感染的其它例子包括那些由人逆转录病毒引起的感染：人免疫缺陷病毒（*HIV*—1 和 *HIV*—2），它引起获得性免疫缺陷综合症（*AIDS*）；和引起 *T* 细胞性白血病和骨髓病的人 *T* 亲淋巴性病毒（*HTLV*—1 和 *HTLV*—2）。许多其它的感染如包括单纯性疱疹病毒（*HSV*）型 1 和 2 的人疱疹病毒，*Epstein Barr* 病毒（*EBV*），巨细胞病毒（*CMV*），水痘—带状疱疹病毒和人疱疹病毒 6（*HHV*—6）不能被宿主机制根除，而是变为慢性并在此情况下会引起疾病。人乳头状瘤病毒引起的慢性感染与子宫颈癌有关。许多其它的病毒和传染原当宿主防御机制不能将它们排除时在胞内进行复制并且会变为慢性感染。这些包括病原性的原生动物（如卡氏肺囊虫 *Pneumocystis Carinii*，锥虫属 *Trypanosoma*，利什曼原虫属 *Leishmania*，疟 *Malaria* 和兔弓形虫 *Toxoplasma gondii*），细菌

(如,分支杆菌 *mycobacteria*,沙门菌 *Salmonella* 和李斯特菌属 *Listeria*),和真菌(如假丝酵母属 *Candida* 和曲霉属 *aspergillus*)。

可以产生显著的临床效果的,对慢性病毒感染的治疗还未取得重大成功,因为治疗不能终止感染或排除病毒。以前的治疗包括服用如核苷类似物的小分子化合物或如干扰素的有生物活性的蛋白质。这些治疗抑制病毒的复制但没有从细胞中排除病毒或排除病毒感染的细胞,并且仅在用药过程中使疾病得到有限的改观。遗憾的是,当给药中断时病毒感染经常会加重。

常用的抗病毒治疗包括核苷类似物,如治疗慢性 *HIV* 感染和有关 *AIDS* 的叠氮脱氧胸苷(*AZT*),双脱氧肌苷(*DDI*)和双脱氧胞苷(*DDC*)和治疗 *HBV* 感染和有关的肝病的阿糖腺苷(*araA*)。在治疗慢性感染的过程中干扰素相似地抑制 *HBV* 和 *HCV*,但是当治疗中断时,病毒通常会返回治疗前的水平且疾病会进一步加重。

哺乳动物的免疫系统对于控制和彻底排除胞内传染原导致的不断发展的感染所采取的一个重要机制是通过某些 *T* 细胞的活化来激活细胞免疫应答。*T* 细胞的活化导致细胞毒性的 *T* 淋巴细胞(*CTL*)对被感染细胞表面的病毒(或其它胞内传染原)抗原的应答和感染细胞的排除。*Guilhot* 等,*J. Virolm*,66:2670—2678(1992)。这样最终导致被感染细胞的排除和感染细胞中的传染原的排除。对病毒传染原的免疫应答的总体论述参见 *Whitton* 等,在 *Virology*,第 2 版,编辑 *B. Fields*, *Raven Press*, *New York*, *PP.* 369—381(1990);和 *Roitt. Essential Immunology*,第 7 版(1991)。

当 *T* 细胞受体(*TCR*)和抗原多肽形成一种三元复合物(这里的抗原多肽已在专门的抗原呈递细胞(*APC*)表面和自身—*MHC*(主

要组织相容性复合物）形成复合物)时发生T细胞的活化，专门的APCs包括巨噬细胞和活化的B细胞。*Townsend* 等，*Cell*，44：959—968（1986）；*Townsend* 等，*Ann. Rev. Immunol.*，7：601—624（1989）；*Bjorkman* 等，*Nature*，329：512—518（1987）；和 *Jardetsky* 等，*Nature*，353：326—329（1991）。该三元复合物允许一种共同刺激信号在细胞间通过。T细胞的活化不仅要求TCR对抗原多肽—MHC复合物的识别，而且还要求位于APCs表面的“共同刺激因子”与T细胞表面的特异性分子“共同刺激配体”相互作用。*Freeman* 等，*J. Exp. Med.*，174：625—691（1991）。正如此处所说的，APCs上的共同刺激因子包括在T细胞表面与CD28和CTL—4蛋白特异结合的B7—1蛋白，和T细胞活化时与CTLA—4结合的B7—2和B7—3蛋白，但并不限于这些。*Boussiotis* 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，90：11059—11063（1993）。B7配体专一地由专门的APCs表达。*Freeman* 等，*J. Exp. Med.*，174：625—631（1991）；*Razi—Wolf* 等（1992）；和 *Larsen* 等（1992）已表明，CD28和B7—1的相互作用对T细胞活化是非常必要的。*Jenkihs* 等，*J. Immunol.*，140：3324—3330（1988）；*Linsley* 等（1990）；*Linsley* 等，*J. Exp. Med.*，173：721—730（1991）；*Gimmi* 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，88：6575—6579（1991）；*Jenkins* 等，*J. Immunol.*，147：2461—2466（1991）；和 *Harding* 等（1992）。

发现于APC上的共同刺激因子分子之一是B7蛋白，它是T细胞表面分化抗原CD28的配体。已发现，通常受专门APCs影响的B7的表达对原始（*naive*）T细胞的活化是至关重要的。*Larsen* 等，*J. Exp. Med.*，176：1215—1220（1992），其它研究已经表明，T细

胞功能活性的提高与 *B7* 表达的增强之间存在直接的联系。*Razi—Wolf* 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，89：4210—4214(1992)。在缺乏以 *CD28* 为受体的共同刺激配体的细胞上，当 *T* 细胞与抗原多肽相遇时，*T* 细胞不显示变应性。*Harding* 等，*Nature*，356：607—609(1992)。

当结合有 *MHC* Ⅰ类分子的特异性病毒抗原多肽片断作为 *MHC* 限制的 *CTL* 的靶呈现在细胞表面时，被感染细胞中的病毒抗原会降解。*Whitton* 等(1990)。然而，被病毒感染的宿主中的大多数感染细胞不是表达共同刺激蛋白的专门 *APCs*。并且，缺乏如 *B7—1*，*B7—2*，*B7—3* 这样的共同刺激分子的被感染的细胞不会引发有效的细胞免疫应答。当这些机制不足以且不能够排除传染原时，感染就会持续下去并转为慢性。

有些参与消除胞内传染原引起的不断发展的感染的免疫机制，如 *CTL* 应答，在预防新的感染中也起一定的作用。而其它免疫机制，如中和抗体，在预防某些病毒感染方面比在消除不断发展的感染方面显得更为重要。在中和抗体这种情形中，直接作用于表面抗原的抗体能够通过促使病毒的聚集并从血流中彻底移去病毒来中和病毒的传染性。通常由病毒中和抗体阻断的病毒感染也能通过引发相同中和抗体的抗原产生的免疫来预防。然而，对其它胞内传染原来说，中和抗体不会被引发，或即使被引发，也不足以起到保护作用。不过，通过引入适当的免疫制剂仍能获得保护。在这种情况下，细胞免疫机制显示出能促进免疫制剂保护机体不受感染。为使免疫应答产生保护作用，免疫制剂必须引发一种强烈而持续的 *CTL* 应答。*Murphy* 等，在 *Virology*，第 2 版，编辑 *B. Field*，*Raven Press*，*New*

York, pp. 469—502(1990)。

因此，需要一种通过引发强烈的 *CTL* 应答来增强对胞内传染原(如病毒)的免疫应答的方法。本发明即满足了这种需要。

发明概述

本发明提供了增强个体对胞内传染原如病毒，原生动物，真菌或细菌的免疫应答的物质和方法。物质包括编码用于 *T* 细胞活化的共同刺激因子(以后均称"共同刺激因子")和一来自传染原的"靶抗原"的载体。载体可以是一种核苷酸，也可以装配于病毒中，可以直接给药于受治疗的个体，或者可选择地，插入于一细胞中然后将该细胞给药于受治疗的个体。编码共同刺激因子和靶抗原的遗传信息的摄入通过引发针对于传染原感染的细胞的 *CTLs* 的产生增强了免疫应答，此处靶抗原来自传染原。

相应地，本发明的一个实例是重组多核苷酸，其包含一个编码共同刺激因子的区域(该区域可操纵地与转录控制区连接)，进一步包含一个编码靶抗原多肽的区域(该区可操纵地与转录控制区相连)。共同刺激因子和靶抗原多肽在个体上的表达，使个体对自然编码靶抗原多肽的胞内传染原至少具有部分免疫力。重组多核苷酸可以包括一个病毒载体或其它如下所述的载体。

本发明的另一实例是由包含一个可操纵地与转录控制区相连接、编码共同刺激因子的区域的重组多核苷酸和包含一个可操纵地与转录控制区相连接、编码靶抗原多肽的区域的重组多核苷酸转化的宿主细胞。共同刺激因子和靶抗原多肽在个体中的表达使个体对自然编码靶抗原多肽的胞内传染原至少具有部分免疫力。

本发明的另一实例是使用含有可操纵地与转录控制区相连接、

编码共同刺激因子的区域的重组多核苷酸和含有可操纵地与转录控制区相连接、编码靶抗原多肽的区域的重组多核苷酸的方法，该方法包括给予个体治疗有效果的重组多核苷酸；并确定身体症状的减轻程度，其与对自然编码靶抗原的胞内病原体产生的感染的应答有关。

本发明的另一实例是一种使用上述重组多核苷酸的方法，包含多核苷酸转化宿主细胞。用这种方法制备的宿主细胞和其子代也是要求保护的内容。

附图的简要说明

图 1 是两种病毒载体的直线图。

发明详细描述

共同刺激因子的关键作用是使表达所需的靶抗原，如病毒抗原的细胞成为有效的 *APCs*，以促进 *T* 细胞的活化。通过产生一个同时表达共同刺激因子（或其功能部分）和靶抗原的系统，结果应答可导致被感染宿主细胞的排除和对未感染宿主细胞免受新感染的更强保护。

本发明说明，免疫疗法能用来活化和/或增强被感染哺乳动物宿主的免疫应答，该免疫疗法是将编码共同刺激因子的功能部分和靶抗原的遗传信息导入个体。这种增强效果包括对胞内传染原（靶抗原来自该传染原）所引起的感染的细胞应答，和一种在未感染细胞内诱导的保护性免疫应答，以预防传染原的新感染。

此处所用的术语定义如下。

术语“多肽”是指氨基酸的多聚物而不是指特定长度的产品；因此，肽、寡肽和蛋白质均包括在多肽的定义中。这一术语也不指或排

除表达后多肽的修饰，如糖基化，乙酰化，磷酸化等。此定义包括如含一个或多个氨基酸（包括如非天然氨基酸等）类似物的多肽，有取代键的多肽，以及其它本领域所公知的修饰的多肽，自然产生的和非天然产生的。

这里用的“转化”是指将外源多核苷酸插入宿主细胞，而不用考虑所使用的插入方法，如直接摄取，转导，f—接合或电穿孔。外源多核苷酸可以保持为一个非整合的载体中，如质粒或可选择地，可以整合到宿主细胞的基因组中。

这里用的“治疗”是指预防和/或治疗。治疗的有效性由通常与由胞内病原体引起的疾病有关的一个或多个症状的减轻程度而确定。

“胞内病原体”是指能在敏感个体上引起疾病状态的物质，病原体的部份或全部复制循环过程发生于被感染的个体细胞中。胞内病原体包括，例如，原生动物，真菌，细菌和病毒。

“协助细胞”或“T_H 细胞”是能协助产生细胞毒性的 T 细胞和协助 B 细胞产生抗体应答的 T 细胞的功能性亚类。协助细胞通常识别与Ⅱ类 MHC 分子有关的抗原。

“抗原特异的 T 细胞克隆”由单一细胞的子代组成；这种类型克隆的细胞具有相同的表型并且均靶向于同样的抗原。制备抗原特异 T 细胞克隆的方法在本领域是公知的。

术语“重组表达载体”是指能够通过转化，电穿孔，转导或病毒感染被转入靶细胞中的 DNA 或 RAN 的可复制单位，其编码异源结构编码序列的表达如细胞因子，在基因表达中起调节作用的单位的控制下被转录到 $mRNA$ 并被翻译成蛋白质。这种载体也优选含有

适当的转录和翻译控制序列，包括可操纵地与编码序列连接的起始序列。

这里的“重组体”意思是指，一种特定的 *DNA* 序列是克隆、限制作用和连接步骤的各种组合的产物，得到具有区别于自然系统中发现的同源序列的结构编码序列的构建物。通常，编码结构编码序列的 *DNA* 序列，如细胞因子，可通过 *cDNA* 片断和短的寡核苷酸接头，或一系列的寡核苷酸装配而得，以提供能在重组体转录单位中被表达的合成基因。优选以未被内部非翻译序列或内含子中断的开放阅读框的形式提供这些序列，其通常存在于真核生物基因中。也可使用含有相关序列的基因组 *DNA*。非翻译 *DNA* 序列可位于开放阅读框的 5′或 3′端，这里此序列不干扰编码区的操作和表达。

“重组宿主细胞”，“宿主细胞”，“细胞”，“细胞系”，“细胞培养物”和其它这类术语表示作为单一细胞整体培养的微生物或更高级真核生物细胞系是指能或已用作重组载体或其它转移多核苷酸的接受者，并包括已被转染的原代细胞的子代。由于自然的，偶然的或人为造成的突变，单一细胞的子代可以不必在形态上或基因组的或整个的 *DNA* 补体上与原代亲本细胞完全相同，它一点已为人所知。

若 *CTL* 能选择性识别并溶解带有抗原的细胞，则 *CTL* 对表达抗原的细胞具有“细胞溶解特异性”。如果 *CTL* 能溶解带有抗原的细胞，而不考虑其选择识别这些细胞的能力，则 *CTL* 对表达抗原的细胞具有细胞溶解反应性。

“抗原特异的表达”指当 *T* 细胞识别其同源抗原时发生的表达。

“ 同源抗原”是指一种抗原，即一种多肽，当与其 *MHC* 分子结合时，形成一种配体，该配体与识别它的淋巴细胞结合，并引发细胞

的效应子功能信号和/或增殖信号。

"靶抗原"是指一种抗原，当其在细胞中被表达时能引发直接针对于表达该抗原的细胞的*CTL*应答。

"配位"是指抗原或抗原片断的一部分，其允许抗原与*MHC*分子结合。

"活化的淋巴细胞"是指作为同源抗原多肽:*MHC*分子的结合结果，其可以比未结合配体的淋巴细胞更高水平产生多肽刺激因子(包括，例如细胞因子)。

"转录调节区"包括所有转录所必需的单位并且可包括调节和细胞特异转录所必需的单位。因此，转录调节区至少包括启动子序列，并也可包括其它调节序列，如增强子，和转录因子结合位点。

"可操纵地连接"是指一种并置，其中所描述的组成部分处在一种允许其行使所欲想的功能的关系中。例如，如果启动子能影响编码序列的转录或表达，则称启动子与编码序列是可操纵地连接。

"重组"多核苷酸或核酸是指非天然产生的，或是通过两个其它分离的序列片断的人工组合而制得。这种人工组合通常由化学合成法来完成，或由对分离的核酸片断的人工操纵如基因工程技术手段来完成。一般地，当导入或移去一个序列识别位点时，通常以编码同样氨基酸或共有氨基酸的丰余密码子来取代一个密码子。可选择地，将所需功能的核酸片断连接在一起，产生一个需要的功能组合。

"调节序列"是指那些通常与影响基因表达(包括基因的转录，和翻译，剪切，稳定性或信使*RNA*的诸方面)的基因座编码区有关的序列(例如，在50*kb*之内)。调节序列包括特别是，启动子，增强子，剪切位点和聚腺苷酸化位点。

核酸的“有意义链”含有与同源 *mRNA* 具有序列同源性的序列。“反意义链”含有“有意义链”的互补序列。

此处所用的“个体”是指脊椎动物，尤其是哺乳类动物，并包括家畜、竞技动物和灵长类动物（包括人），但并不限于此范围。

“免疫”是指通过给予治疗或预防制剂使个体产生的免疫状态。

通过“免疫”是指减轻和/或预防一种或多种身体症状，该症状与对病原体（靶抗原源自该病原体）的感染产生的应答相关。

对组合物或疫苗的“免疫应答”是在宿主中对编码靶抗原的胞内传染原产生的细胞和/或抗体介导的免疫应答的发展。通常，这种应答包括个体产生的对表达靶抗原的 *APCs* 具有特异性的 *CTLS* 和/或 *B* 细胞和/或各种不同类型的 *T* 细胞。

组合物的“治疗有效量”是足以诱导免疫应答和/或对自然编码靶抗原的胞内传染原具有免疫力的剂量。

除非另有说明，本发明的实施手段将采用分子生物学，微生物学，重组 *DNA* 和免疫学的常规技术，其均为本领域所熟知。这类技术在文献中有充分的说明，参见如，*Sambrook*，*Fritsch*，和 *Maniatis*，*MOLECULAR CLONING*：*A LABORATORY MANUAL*，第 2 版（1989），*OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS*（*M. J. Gait* 编，1984），*ANIMAL CELL CULTURE*（*R. I. Freshney* 编，1987），*the Series METHODS IN ENZYMOLOGY*（*Academic Press, Inc.*）；*GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS*（*J. M. Miller* 和 *M. P. Calos* 编，1987），*HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY*，（*D. M. Weir* 和 *C. C. Blackwell*，编）；*CURRENT PROTOCOLS*

IN MOLECULAR BIOLOGY,(*F. M. Ausubel*, *R. Brent*, *R. E. Kingston*, *D. D. Moore*, *J. G. Siedman*, *J. A. Smith*, 和 *K. Struhl* 编, 1987)；和 *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*(*J. E. Coligan*, *A. M . kruisbeek*, *D. H. Margulies*, *E. M. Shevach* 和 *W. Strober* 编,1991)。所有这里所提及的专利,专利申请以及专利公开,无论是前述的或后提到的,在此均被引为参考文献。

根据本发明,表达靶抗原和能刺激 *T* 细胞应答,尤其是 *CTL* 应答的 *APCs* 既可在体内产生,也可在体外产生,即通过插入一段或多段含有编码至少一种共同刺激因子和至少一种靶抗原多肽的序列来产生,这样共同刺激因子和靶抗原多肽便在受体宿主细胞内得到表达。

由重组多核苷酸表达的共同刺激因子至少包括蛋白质的一部分,其足以使表达共同刺激因子的细胞与其共同刺激配体结合。确定这种结合的方法在本领域为公知技术。参见,例如,*Linsley* 等描述的一种方法,其中要检测的细胞用 ^{51}Cr 标记,然后与 $CD28^+$ 和 $CD28^-$ *CHO* 细胞一起保温,通过测定 ^{51}Cr 的释放来确定标记细胞和 *CHO* 细胞粘着。*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5031—5035 (1990)。共同刺激因子的胞外区域和跨膜区域通常包含于多肽中,在优选实施例中,对整个共同刺激因子进行编码。编码共同刺激因子和功能区的多核苷酸序列是已知的,并描述于如 *Linsley* 等(1990)(人)和 *Freeman* 等 *J. Immunol.*,143:2714—2722(1989)(鼠)。

由重组多核苷酸表达的靶抗原多肽是全部靶抗原或靶抗原的片断,靶抗原是在致病的胞内微生物中自然编码的,需要一个增强或增大的免疫应答来对抗它,并由一个或多个来自该微生物的配位组

成。靶抗原优选来自病毒，尤其是导致慢性感染的病毒，例如肝 *DNA* 病毒（包括 *HBV*），慢病毒属（包括 *HIV*），疱疹病毒（包括 *HSV*－1，*HSV*－2，*EBV*，*CMV*，*VZV* 和 *HHV*－6）和黄病毒/瘟病毒属（包括 *HCV*）。还包括的作为引起慢性病毒感染的病毒有，人反转录病毒，例如 T 亲淋巴细胞病毒（*HTLV*－1 和 *HTLV*－2），其引起 T 细胞白血病和骨髓病。引起慢性感染的其它微生物包括，例如，病原性的原生动物（如卡氏肺囊虫，锥虫属，疟和兔弓形虫），细菌（如分支杆菌，沙门菌和李斯特菌属）和真菌（如假丝酵母属和曲霉属）。

这些病毒包括不同的种，株和分离物，其核苷酸序列均在本领域所公知。参见：*Robinson*（1990）（*Hepadnaviridae*）；*Levy*，*Microbiological Reviews*，57：183－289（1993）（*HIV*）；和 *Choo* 等，*Seminars in Liver Disease*，12：279－288（1992）（*HCV*）。特别适合的靶抗原是那些在感染中能诱导 T 细胞应答，并特别是 *CTL* 应答的靶抗原。这些可以包括，例如得自 *HBV* 的核心抗原，*E* 抗原和表面抗原（*HBsAg*）。包括得自各种表面抗原亚型的 *Pre*－*S*1，*Pre*－*S*2 和 *S* 区的 *HBsAg* 的多核苷酸序列在本领域已公知。见，例如，*Okamoto* 等，*J. Gen. Virol.*，67：1383－1389（1986）；*Genbank accession numbers* *DOO*329 和 *DOO*330。编码 *HIV* 糖蛋白 *gp*160 和其它抗原性的 *HIV* 区的多核苷酸序列在本领域已公知。*Lautenberger* 等，*Nature*，313：277－284（1985）；*Starcich* 等，*Cell*，45：637－648（1986）；*Wiley* 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，83：5038－5042（1986）；和 *Modrow* 等，*J. Virol.*，61：570－578（1987）。

本发明范围内也包括编码两种或多种可被融合或不可被融合的靶抗原多肽的核苷酸。两种靶抗原多肽可以得自同一病原性胞内微

生物，或者当欲增强对多于一种微生物的免疫应答时，两种靶抗原多肽来自不同的微生物。

编码共同刺激因子和靶抗原多肽的序列与转录控制区可操纵地连接。转录控制区在本领域已公知，并包括，例如自下述来源分离出的区域：人巨细胞病毒（*HCMV*）*IE*94 启动子区（*Boshart* 等，*Cell*，41：521－530(1985)）；人 *IL*－2 基因（*Fujita* 等，*Cell*，46：401－407(1986)）；人 *IFN*－γ 基因（*Ciccarone* 等，*J. Immunol.* 144：725－730(1990)）；人 *IL*－3 基因（*Shoemaker* 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，87：9650－9654(1990)）；人 *IL*－4 基因（*Arai* 等，*J. Immunol.*，142：274－282(1989)）；人淋巴毒素基因（*Nedwin* 等，*Nucl. Acids. Res.*，13：6361－6373(1985)）；人粒细胞－巨噬细胞 *CSF*（*GM*－*CSF*）基因（*Miyatake* 等，*EMBO J.*，4：2561－2568(1985)）；人穿孔素基因（*Lictenheld* 等，*J. Immunol.*，143：4267－4274(1989)）；人 519 基因（*Manning* 等，*J. Immunol.*，148：4036－4042(1992)）；人粒酶 *B*（*CTLA*－1）基因（*Haddad* 等，*Gene*，87：265－271(1990)）；人 *CTLA*－4 基因（*Harper* 等，*J. Immunol.*，147：1397－1044(1991)）；人 *CGL*－2 基因（*Heuesl* 等，*J. Biol. Chem* 266：6152－6158(1991)）；人粒酶 *H* 基因（*Haddad* 等，*Int. Immunol.*，3：57－66(1990)）；人 *IL*－2 受体，α 链基因（*Cross* 等，*Cell*，49：47－56(1987)）；鼠 *T* 细胞活化 3（*TCA*－3）基因（*Wilson* 等，*J. Immunol.*，141：1563－1570(1988)）；和人 *CD*69 基因。

在本发明的一些实施例中，转录控制区是杂交的。例如，增强子区（如得自 *HCMV IE* 转录控制区和/或得自 *SV*40 早期启动子区）可插入转录控制区的上游区域。可选择地，或另外，多亚基转录因子

的结合位点可插入转录控制区内或转录控制区的上游，将一个控制区上游区与其它控制区的邻近区域相结合。适合的情况下也包括分泌信号，其或来自天然蛋白质或来自同种或相关物种的其它分泌性多肽，该信号允许蛋白质穿过和/或停留于细胞膜，并由此形成蛋白质的功能拓扑结构，或允许蛋白质从细胞中分泌出来。

另外，在重组多核苷酸中含有一个正标记是很有用的，以便能够选择带有重组多核苷酸的细胞。正选择标记可以是一段基因，当被导入宿主细胞中其表达显性表型，以允许正选择携带该基因的细胞。这类基因在本领域已公知，包括，特别是对潮霉素 *B* 产生抗性的潮霉素—*B* 磷酸转移酶基因（*hph*），来自编码对抗菌素 G418 产生抗性的 *Tn*5 的氨基糖苷磷酸转移酶基因（*neo* 或 *aph*），二氢叶酸还原酶（*DHFR*）基因，腺苷脱氨酶基因（*ADA*）和多药耐性（*MDR*）基因。

编码共同刺激因子和靶抗原多肽的序列可在分离的多核苷酸上，但优选处于同一多核苷酸上。这些编码序列可受分离的转录控制序列的控制，也可受同一转录控制序列的控制。

一些实施例中，除转录控制区之外，编码共同刺激因子或靶抗原的多核苷酸呈现重组表达载体形式。

核酸操作技术概述于，例如，*Sambrook* 等（1989），*Ausubel* 等（1987）；和 *Annual Reviews of Biochemistry*，61：131—156(1992)。用于此项技术的试剂，如限制性内切酶等在本领域已众所周知，并可从多处购买到。

用来产生本发明细胞的大量多核苷酸可通过在适宜的宿主细胞中复制而得。编码所需片断的天然或合成的多核苷酸片断可被插入能够导入并在原核或真核细胞中复制的重组核酸构建物，一般是多

核苷酸构建物中。通常，构建物适宜在单细胞宿主中复制，如酵母或细菌，但也可和与不和基因组一起，以及整合入基因组的形式导入培养的哺乳动物或植物或其它真核细胞系中。通过本发明方法生产的核酸的纯化描述于如 *Sambrook* 等(1989)。

用于本发明的多核苷酸也可部分地或全部用化学合成的方法来生产，如亚磷酰胺法，描述于 *Beaucage* 和 *Carruthers*，*Tetra. Letts*，22：1859—1862(1981) 或由 *Matteucci* 等 *J. Am. Chem. Soc.*，103：3185(1981) 描述的三酯化合物法，并可用商用自动寡核苷酸合成仪合成。双链片断可由化学合成的单链产物来制备。通过合成互补链并在适当的条件一起退火的方法 或通过以 *DNA* 聚合酶用一适当的引物序列增加互补链的方法制得。

用于导入原核或真核宿主细胞进行复制的多核苷酸构建物一般包含一种可由宿主识别的复制系统，包括编码所需多肽的预想的重组多核苷酸片断。这类载体可由本领域熟知的标准重组技术来制备，并描述于如 *Sambrook* 等(1989)或 *Ausubel* 等(1987)。

在克隆阶段，优选多核苷酸构建物含有一选择性标记，编码由载体转化的宿主细胞的存活或生长所必须的蛋白质的基因。这段基因的存在仅确保表达插入片断的那些宿主细胞的生长。典型的选择性基因编码的蛋白质：(*a*)对抗菌素或其它毒性物质如氨苄青霉素，新霉素，氨甲蝶呤等产生抗性；(*b*)补充营养缺陷型的缺失，或(*c*)提供不能从复合培养基中获得的关键的营养物，如编码用于芽胞杆菌(*Bacilli*) 的 *D*—丙氨酸消旋酶的基因。适当的选择性标记的选择取决于宿主细胞，不同宿主的适当的标记在本领域已熟知。

编码共同刺激因子和靶抗原多肽的重组多核苷酸可以以不同的

方式导入个体体内。例如，多核苷酸可被导入来自体内的宿主细胞，如树状细胞或得自皮肤活组织检查的细胞。含有重组多核苷酸的细胞可用来赋予个体免疫力。这些细胞通常以注入形式给药，每次注入范围至少 10^6 至 10^{10} 细胞/m^2，优选范围至少 10^7 至 10^9 细胞/m^2。克隆细胞可以通过一次注入或一段时间范围内多次注入给药。然而不同个体的反应性不同，所以注入的细胞的类型，数量以及注入的次数、多次注入的时间范围均由参加治疗的内科医生或兽医决定，并可根据日常检查的情况决定。

编码共同刺激因子和靶抗原多肽的多核苷酸可通过本领域已知技术导入来自体内的所需细胞，这些已知技术包括如转化，电穿孔，脂质转染法和转导，包括腺病毒相关病毒(*AAV*)载体的使用和尤其是使用本领域已知的逆转录病毒基因转移法。

已开发研制使用重组传染病毒颗粒进行基因送递的各种感染技术。本发明中这是一优选途径。已用于这种方法中的病毒载体包括来自猴病毒 40(*SV*40; *Karlsson* 等，*Proc Natl. Acad. Sci. USA*，82: 158(1985))，腺病毒(*Karlsson* 等，*EMBO J.*，5: 2377 (1986))，*AAV*(*Carter*，*Current Opinion in Biotechnology* 1992，3:533—539) 和逆转录病毒(*Coffin*，在 *Weiss* 等(编辑)，*RNA Tumor Viruses*，第 2 版，*Vol.* 2，*Cold Spring Harbor Laboratory*，*New York*，1985，*PP.* 17—71)的病毒载体。因此，基因转移和表达的方法多种多样，但对哺乳动物细胞中导入和表达遗传物质起着必不可少的作用。上述几项技术已用于转导造血或淋巴细胞，包括磷酸钙转染(*Berman* 等(1984))，原生质体融合(*Deans* 等(1984))，电穿孔(*Cann* 等，*Oncogene*，3: 123(1988))，和用重组

腺病毒感染(*Karlsson* 等,(1986));*Reuther* 等,*Mol. Cell. Biol.*,6:123(1986));*AAV*(*Carter*(1985))和逆转录病毒载体(*Overell* 等,*Oncogene*,4:1425(1989))。

逆转录病毒载体为将基因转移入真核细胞提供了一种高效方法,其是送递本发明多核苷酸的优选方法。进而,逆转录病毒的整合以一可控制的方式发生,并可导致形成每个细胞中新遗传信息的一个或几个拷贝的稳定的整合。

逆转录病毒是一类利用病毒编码的、指导 *RNA* 的 *DNA* 聚合酶或逆转录酶进行复制的病毒,通过复制病毒 *RNA* 基因组提供一种掺入鸟类和哺乳类宿主细胞染色体 *DNA* 的双链 *DNA* 中间体。大多数逆转录载体来自于鼠逆转录病毒。然而,适和于本发明的逆转录病毒可以从任何鸟或哺乳动物细胞来源中得到。优选这些逆转录病毒具有兼嗜性,即其能感染包括人类在内的多种物种的广大宿主范围内的宿主细胞。

逆转录病毒基因组(和这里讲述的逆转录病毒载体)的特点是逆转录病毒的长末端重复序列,或 *LTR*,其是一种发现于逆转录病毒基因组 5′和 3′末端稍微有些变化形式的含大约 600 个碱基对的非翻译区。当被掺入 *DNA* 作为原病毒时,逆转录病毒的 *LTR* 在每一末端包括一短直重复序列,和通过 *RNA* 聚合酶Ⅱ和 3′的切割及 *RNA* 转录物的聚腺苷酸化进行转录的起始信号。*LTR* 包含病毒复制必需的其它顺式作用序列。

"原病毒"是指逆转录病毒的 *DNA* 逆转录物,其中逆转录病毒是稳定整合于适当的宿主细胞的染色体 *DNA* 中,或其克隆复制物上,或逆转录病毒 *DNA* 的未整拿 中间体形式的克隆拷贝上。原病

毒的正向转录和装配入感染病毒中发生于适当的辅助病毒存在条件下或发生于细胞系中，该细胞系包含能衣壳化而不会偶然产生污染性辅助病毒的适当序列。*Mann* 等人描述了“包装”细胞系(如 ψ2)的发展，其能用于产生重组逆转录病毒的无辅助病毒贮存物(*Stocks*)。*Cell*，33：153(1983)。

包装细胞系含有整合的逆转录基因组，其缺乏顺式衣壳化所需的序列，但提供产生完整毒粒的所有必需的反式基因产品。从整合的突变原病毒转录的 *RNA* 不能自我包装，但这些细胞能使从导入同一细胞的重组逆转录病毒上转录的 *RNA* 衣壳化。产生的病毒颗粒具感染性，但又是复制缺陷性，使其成为有用的载体，即导入缺乏能衣壳化互补遗传信息的细胞后不能产生感染性病毒。

在含有编码亲嗜性病毒外壳(如 ψ2)的反式作用单位的细胞系的衣壳化，可以提供亲嗜性(限制的宿主范围)子代病毒。可选择地，在含有亲嗜性包装基因(如 *PA*317，*ATCC CRL*9078)的细胞系中装配，可以提供亲嗜性子代病毒。*Miller* 和 *Buttimore*，*Mol. Cell. Biol.* 6：2895(1986)。这种包装细胞系提供必需的逆转录病毒的反式 *gag*、*pol* 和 *env* 蛋白质。这种方式导致逆转录病毒颗粒的产生，其对哺乳动物细胞具有高度的感染性，而这些颗粒整合入靶细胞基因组后就不能进一步复制。*env* 基因的产物负责在靶细胞表面将逆转录病毒与病毒受体结合并由此确定逆转录病毒的宿主范围。*PA*317 细胞产生具有兼嗜性包膜蛋白的逆转录病毒颗粒，其能够转导人的细胞和其它物种源细胞。其它的包装细胞系产生具有亲嗜性包膜蛋白的颗粒，其仅能转导小鼠细胞和大鼠细胞。

许多逆转录病毒载体构建物已成功地用于表达外源基因(见，

如，*Coffin*(1985))。具有插入序列的逆转录病毒载体一般具有功能性，一贯抑制逆转录病毒感染的序列很少被鉴别出来。功能聚腺苷酸化基元通过阻断逆转录病毒 *RNA* 合成来抑制逆转录病毒的复制，有上限大小为约 11*kb* 的序列，其能被装入逆转录病毒颗粒；然而，发现起初以为有问题的多重内部启动子的存在在一些逆转录病毒构建物中被很好地接受。*Coffin*(1985)；和 *Overell* 等，*Mol. Cell. Biol* 8: 1803(1983)。

许多基因产品已在逆转录病毒载体中表达。这既能通过将被表达的序列置于掺入逆转录病毒 *LTR* 的启动子的转录控制下来实现，也能通过将其置于插入 *LTRs* 间的异源启动子的控制之下来实现。后一方式提供了一种在载体中共同表达显性选择性标记基因的方法，因而能选择表达特定载体序列的细胞。

在本发明其它实施例中，编码共同刺激因子和靶抗原多肽的重组多核苷酸被直接导入受治疗的和/或免疫化的个体。在一实例中本发明的多核苷酸直接给药于受治疗的个体。此方法优选编码共同刺激因子和靶抗原多肽的多核苷酸。另外，优选呈现表达载体形式的多核苷酸。

多核苷酸与适合的赋形剂混合，并通过任一合适的本领域已知方法给药于个体，包括如非肠道（包括如静脉内、腹膜内、肌内和皮下）注射，脂质转染法和经表皮。合适的赋形剂为本领域已知，可取决于用多核苷酸给药的个体的种类以及给药方式。给予个体使用的多核苷酸的量是足以使免疫化个体获得免疫力的量。此量根据受治疗个体而各不相同，将由实施治疗的内科医生或兽医决定。给药量以及给药时间(感染前或感染后)和一次或多次剂量数均由本领域技

术人员所知的常规方法决定。

本发明另一实施例中，本发明的多核苷酸在病毒颗粒中衣壳化，并以该衣壳化的多核苷酸治疗个体。所用病毒颗粒可以是任一本领域已知的适于基因疗法步骤的毒粒，其中有些在有关将多核苷酸导入来自体内的细胞的内容中已有描述。给药方式取决于所用的病毒颗粒，可包括如上面所列的未衣壳化的多核苷酸的给药。病毒颗粒在适合的赋形剂中制备，并给药于个体。给药量以及给药时间(感染前或感染后）和一次或多次剂量数均由实施治疗的内科医生或兽医决定，并由本领域技术人员所知的常规方法获得。

下述实施例是为本领域技术人员提供进一步指导，并不在任何意义上限定本发明的范围。

实施例 1

一种表达载体的设计，它编码作为病毒靶抗原多肽的 *B7* 多肽和 *GSVH c*—多肽

Beechey 地松鼠的慢性地松鼠肝炎病毒（*GSVH*）感染，可作为人类 *HBV* 感染的模型系统(参见 *Seeger* 等，*I. Virol*，51：367—375，(1984))。本实施例描述一种用于表达 *B7* 基因和一种编码 *GSVH* 的 *c*—抗原（*cAg*)基因的逆转录病毒载体构建物。

载体构建物利用基于无复制活性的载体 *pMV*—7 的 *Moloney* 鼠白血病病毒（*MMLV*）。（*Ausubel* 等，(1989)；和 *Kirschmeier* 等，*DNA*，7：219—225(1988))。*PMV*—7 含有一种 *HSV* 胸苷激酶 (*TK*)启动子控制下的新霉素抗生基因，由此可以在含有该载体的细胞组织培养物中加以选择。

包含前核心序列的 *GSHV c*—基因，被用作编码靶抗原的多

核苷酸序列。*GSVH c*—基因是通过聚合酶链反应(*PCR*)，从病毒基因组(*EMBC/Genbank Accession Number K02715*)中分离出来的。*Marion* 等，*Proc. Natl. Acad Sci USA*，77：2941—2945(1980)和 *Seeger*(1984)。分离出来的 *GSHV c*—基因随后在 *MMLV LTR* 的控制下导入 *pMV*—7 载体。

人类 *B7 cDNA*(*EMBL/Genbank Accession Number M27533*)是通过 *PCR* 利用引物，从 *Raji* 人类 *B* 细胞系的 *B7 mRNA*，克隆成扩增的 *cDNA*，其中引物是根据公开的 *DNA* 序列设计出来的。*Freeman*(1989)。编码 *B7*—1 基因的 *cDNA*，在 *CMV* 中间物早期启动子的控制下，被导入与 *GSVH c*—基因相同的载体。*Gaballe* 等 *J. Virol.*，62：3334—3340(1988)。

编码 *B7* 多肽和 *cAg* 多肽的基于 *pMV*—7 的载体构建物，被转染入逆转录病毒包装细胞系，*psi*—2。*Miller* 等，*Mol, Cell, Biol.*，6：2895—2902(1986)。随后通过在含有新霉素的培养基中的生长选择出转染细胞。由生长于新霉素培养基中的细胞产生的带有兼嗜性包膜的无复制活性的逆转录病毒，可在培养基中发现。

实施例 2

一种表达载体的设计，它编码作为病毒靶抗原多肽的 *B7* 多肽和 *GSVH GSHsAg*—多肽

该构建物按实施例 1 的方法制备，不同的是，编码地松鼠肝炎表面抗原(*GSHsAg*)，包括 *pre*—S_1，*pre*—S_2 和 *S* 区域的 *GSVH* 多核苷酸代替了编码 *GSVH cAg* 的多核苷酸。编码前述的 *S* 区域的多核苷酸序列已被 *Seeger* 等(1984)描述。

实施例 3

利用编码 *B7* 多肽和 *GSHsAg* 的载体给未受感染的个体赋予对 *GSHV* 的免疫力

治疗有效量的组合物用非肠道方式给药于一未感染且对 *GSHV* 敏感的 *Beechey* 地松鼠，该组合物由包装于兼嗜性包膜(10^7 个组织培养物感染性单位)中的感染性逆转录病毒载体组成，这个载体含有编码 *B7* 多肽和 *GSHsAg* 多肽的多聚核苷酸序列。*Seeger* 等(1984)。载体按实施例 2 所述的方法构建。一个"未感染"的 *GSHV* 易感地松鼠，没有可测出的抗地松鼠肝炎病毒核心抗原(*anti—GSHcAg*)的血清抗体或地松鼠肝炎病毒表面抗原(*anti—GSHsAg*) 的抗体。含有 *B7* 基因和 *GSHV* 的逆转录病毒载体的非肠道给药，可导致直接针对于表达 *GSHsAg* 的细胞的血清应答(*anti—GSHsAg*)和 *CTL* 应答。

两种应答，即血清和 *CTL*，至少使未感染地松鼠对将来的 *GSHV* 感染具有部分免疫力。

实施例 4

利用编码 *B7* 多肽和 *GSHsAg* 多肽的载体治疗慢性病毒感染

两种不同的方法可被用来将编码 *B7* 多肽和病毒靶抗原的多核苷酸给药于 *GSHV* 慢性感染的动物，以治疗感染。

将编码 *B7* 多肽和 *GSHsAg* 多肽的载体直接送递到感染的哺乳动物

按实施例 1 的方法构建一种包装于兼嗜性包膜、编码 *B7* 多肽和 *GSHcAg* 多肽的感染性逆转录病毒载体。该载体采用非肠道方式，以治疗有效量给药于 *GSHV* 慢性感染的地松鼠。

监测多肽从逆转录病毒载体的表达对地松鼠免疫应答的效果，

包括直接针对于表达 *GSHcAg* 的细胞的 *CTL* 应答。另外，监测对疾病慢性作用的效果，包括病毒 *DNA* 的存在，*GSHsAg* 的存在和与疾病相关的致病作用。在治疗个体中，身体症状和/或 *GSHsAg* 和/或 *GVSH DNA* 的减少，表明 *GSHV* 引起的慢性疾病的减轻和/或终止。

用被编码 *B7* 多肽和 *GSHcAg* 的载体在体外转染的细胞治疗被感染哺乳动物

从被感染个体的皮肤活检分离出来的成纤维细胞生长于培养基中，并被编码 *B7* 多肽和 *GSHcAg* 多肽的逆转录病毒载体转染。载体构建如实施例 1 所述。随后，感染(转染)细胞从含有新霉素的培养基中的生长细胞中选择。表达 *GSHcAg* 的细胞可通过用使用抗—*HBc* 的荧光染色法(*IFA*) 来鉴定，*B7* 蛋白的表达用使用抗—*B7* 单克隆抗体(*mAb*)的 *ELISA* 法来鉴定。治疗有效量的表达 *GSHcAg* 和 *B7* 的自身细胞，通过静脉注入 *GSHV* 感染的地松鼠。

在监测多肽从得自植入细胞中的逆转录病毒载体的表达对地松鼠免疫应答的效果，包括直接针对于表达 *GSHcAg* 的细胞的 *CTL* 应答。另外，监测对疾病慢性作用的效果，包括病毒 *DNA* 的存在，*GSHsAg* 的存在和与疾病有关的致病作用。被治疗个体身体症状和/或 *GSHsAg* 和/或 *GVSH DNA* 的减少，表明由 *GSHV* 导致的慢性疾病得到减轻和/或终止。

实施例 5

表达 *B7* 和 *HBS* 的逆转录病毒载体的构建

图 1 描述重组逆转录病毒载体，以证明通过与体内细胞中的 *B7*—1 共表达，增强了对乙肝病毒表面抗原(*HBS*)的免疫应答。逆转录

病毒载体 *pMV—7* *DNA* 用来和插入在 *pMV—7* 多接头的 *HBS* 编码序列构建重组载体 907；与 *HBS* 编码序列，一种脑心肌炎病毒(*EMC*)帽独立翻译单位和鼠 *B7—1* 编码序列构建重组载体 1016，这些序列均处于插在 *PWV—7* 多接头处的同一阅读框架中。每个重组载体通过磷酸钙 *DNA* 法转染一个鼠 *Balbc* 包装的细胞系，并且由含有各种载体的细胞通过在含有新霉素的细胞培养基中生长而选择出来。由新霉素选择出的含有重组载体 907 和那些含有重组载体 1016 的包装细胞群落释放出病毒，通过赋予 *Balbc* 3*T*3 细胞的抗新霉素能力对病毒进行分析。通过 *ELISA* 表明，由重组病毒 907 感染的抗新霉素 *Balbc* 3*T*3 细胞释放 *HBS*。由重组病毒 1016 感染的抗新霉素 *Balbc* 3*T*3 细胞，通过上述相同的实验表明其表达 *HBS*，通过使用针对 *B7—1* 蛋白的单克隆抗体进行的 *FACS* 分析表明能够表达 *B7—1* 蛋白质。每种类型和未转染 *Balbc* 3*T*3 的细胞(2×10^7)，通过腹膜内途径，分别接种于 10 只 *Balbc* 鼠的各个组中，以研究其对 *HBS* 的免疫应答。通过 *ELISA* 测定的抗—*HBS*，和通过表达 *HBS* 的 *Balbc* 3*T*3 细胞释放的铬 51 测定的体外暴露于 *HBS* 的脾细胞的增殖和脾细胞细胞毒性，可在接种后两周时每组 5 只鼠中和接种后四周时每组 5 只鼠中进行分析。图 1 中，*LTR* 代表逆转录病毒载体的长末端重复序列，*TK* 代表单纯性疱疹病毒的胸苷激酶启动子，*Neo* 代表赋予新霉素抗性的基因。

尽管已经通过说明和实施例在一些细节上描述了前述发明，以达到清楚明了的目的。但是很明显，对本领域技术人员而言，某些变动和修改是可以实施的。因此，说明书和实施例不应构成对权利要求所述的本发明范围的限制。

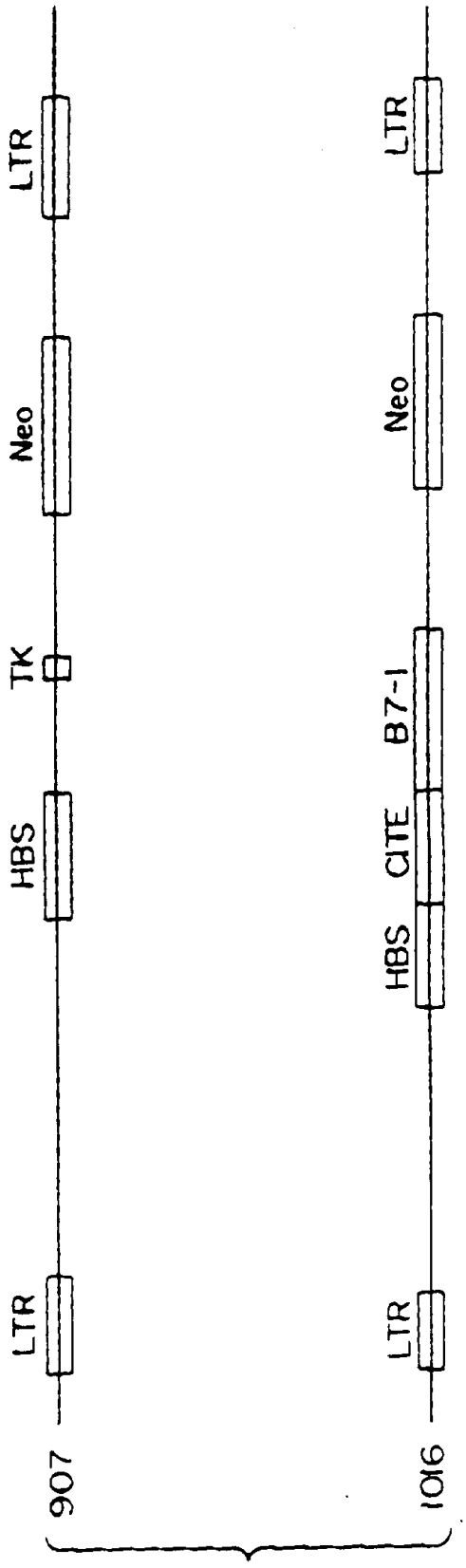


图 1