[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 14/47
G01N 33/569
A61K 38/17
A61K 39/00

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96195203.2

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1221568C

[22] 申请日 1996.5.1 [21] 申请号 96195203.2
[30] 优先权
[32] 1995. 5. 1 [33] US [31] 08/431,883
[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/485,548
[32] 1996. 5. 1 [33] US [31] 08/641,936
[86] 国际申请 PCT/US1996/006079 1996.5.1
[87] 国际公布 WO1996/034886 英 1996.11.7
[85] 进入国家阶段日期 1997.12.31
[71] 专利权人 美国汤姆森有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 哈里·P·扎比罗夫
审查员 丁 海

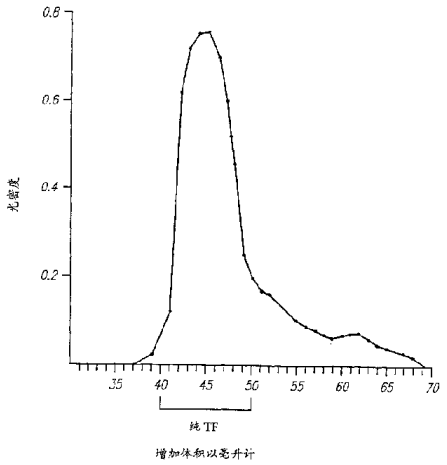
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南

权利要求书 4 页 说明书 36 页 附图 14 页

[54] 发明名称 检测和治疗获得性免疫缺陷综合症的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及免疫学和病毒学领域，特别涉及从哺乳类胸腺细胞获取的组合物，这些组合物可用于诊断、接种和治疗人类免疫缺损病毒(HIV)的感染及相关的疾病，如获得性免疫缺损综合症(AIDS)和爱滋病相关综合症(ARC)。 本发明也公开了使用这些组合物进行诊断、接种和治疗的方法和装置。



ISSN1008-4274

1. 一种胸腺因子(TF)蛋白组合物，所述 TF 蛋白从哺乳动物胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取得到，所述提取方式使所述蛋白：

(a) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(b) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，当其去甲基化时，包含一种用 11％非还原的十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定的 35 千道尔顿的蛋白质。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物，当它甲基化时，包含一种用 11％非还原的十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定的 28 千道尔顿的蛋白质。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物，其蛋白质的等电点为 5.6。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物，其 pH 值介于 7.4 和 8.6 之间。

6. 一种 TF 蛋白的组合物，用包括如下的步骤的方法制备：

a)从哺乳动物胸腺细胞核纯化一种赖氨酸富集的组蛋白组分；并且

b)将所述赖氨酸富集的组蛋白组分与一种阳离子交换色谱材料接触足够的时间以使 TF 蛋白与这种材料结合；

c)通过使色谱材料与一种有效的盐的水溶液接触以从阳离子色谱材料中洗脱 TF 蛋白，所述洗脱方式导致所述 TF 蛋白：

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

7. 根据权利要求 6 所述的组合物，进一步包括收集能够沉淀健康哺乳动物的 β、α_1和α_2巨球蛋白的洗脱物的步骤。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物，其阳离子交换色谱材料是一种羧甲基柱色谱，洗涤羧甲基柱和洗脱 TF 蛋白是用线性梯度的氯化钠的 0.05M 乙酸钠的溶液，pH 6.8。

9. 根据权利要求 7 所述的组合物，其中的赖氨酸富集的组蛋白组分的获得是通过用胃蛋白酶处理以解聚细胞核，并从得到的解聚混合物中分离而进行的。

10. 一种检测人类受试者的感染的方法，包含的步骤有：

a)提供受试者的生物样品，并，

b)检测血清与 TF 蛋白的 2-D 凝胶沉淀模式，所述 TF 蛋白从哺乳动物胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取得到，所述提取方式使所述蛋白：

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β 、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β 、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中的 TF 在去甲基化状态为 35 千道尔顿，在甲基化状态为 28 千道尔顿，这是用 11％非还原十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的，所述电泳中用到牛血清白蛋白、猪心延胡索酸酶、牛红细胞碳酸酐酶、牛乳 β －乳球蛋白和牛乳 α －乳清蛋白作为分子量标志物。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中的生物标本选自：血清、血液或血浆。

13. 一种检测人类受试者 HIV 感染的方法，包括步骤：

a)提供受试者生物标本，所述的生物标本选自：血清、血浆或血液；

b)将生物标本与从非哺乳类胸腺细胞核中赖氨酸富集的组蛋白组分纯化得到的 TF 蛋白混合，和

c)确定 TF 和来自 HIV 感染的生物标本中的 β 、α_1和α_2和α_2巨球蛋白在沉淀模式上的相关性；

其中所述 TF 蛋白经纯化后，

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β 、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β 、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其包括将生物标本和 TF 施加于凝

胶电泳，以及确定 TF 和 HIV 感染的生物标本间的与凝胶上β、α_1和α_2巨球蛋白位置相关的沉淀模式。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中的 TF 进一步甲基化并由 11% 非还原十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳确定分子量为 28 千道尔顿，且等电点为 5.6，所述电泳中用到牛血清白蛋白、猪心延胡索酸酶、牛红细胞碳酸酐酶、牛乳β－乳球蛋白和牛乳α－乳清蛋白作为分子量标志物。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中的凝胶电泳是双向凝胶电泳。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中在凝胶上紧邻从β、α_1至α_2巨球蛋白位置发出的连续的沉淀支线的缺失表明受试人受到 HIV 的感染。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中在没发现连续的沉淀支线而发现有断裂的沉淀支线的情况下，当第一位受试人的沉淀支线比第二位受试人的沉淀线弱或分子量小时，则说明第一位受试人比第二位感染了 HIV 的受试人有更严重的 HIV 感染或 HIV 相关疾病。

19. 一种用于体外检测受试人 HIV 感染的装置，所述的装置包括一固体支持物，其中含有一可放置取自受试人的生物流体标本的区域，及放置 TF 蛋白组合物的区域；所述的 TF 是能从非人哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集组分中提取，所述提取方式使所述 TF 蛋白(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；所述的固体支持物允许生物标本与 TF 接触并形成沉淀，且允许检测这种沉淀支线。

20. 根据权利要求 19 所述的装置，即所述的固体支持物是一种双向电泳凝胶，而所述的接触和沉淀是通过双向凝胶电泳来实现的，所述的生物标本是选自：血液、血清和血浆。

21. 一种用于体外检测受试人 HIV 感染的试剂盒，该试剂盒包括：

a)一种含有 TF 蛋白组合物的容器，该 TF 蛋白从非人哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集组分中提取，所述提取方式使所述 TF 蛋白(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

b)一种适用于进行双向电泳的电泳凝胶的装置。

22. 一种纯化蛋白质 TF 的方法，包含的步骤有：

a)从哺乳类胸腺中提取细胞核；

b)从细胞核中获取赖氨酸富集部分；和

c)基于 TF(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线的能力，从赖氨酸富集部分纯化 TF。

23. 一种 TF 蛋白，它是从哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取，所述提取方式导致所述蛋白：

a)在双向电泳的凝胶上，于邻近来源于健康人血清的 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白处，能形成单一的连续的沉淀支线；和

b)在双向电泳的凝胶上，在邻近来源于爱滋病病人血清的 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白处，不能形成单一的连续的沉淀支线。

24. 根据权利要求 23 所述的 TF 蛋白，它可用胃蛋白酶降解的方法从哺乳类胸腺细胞核中提取。

25. 权利要求 1 的 TF 蛋白组合物或权利要求 23 的 TF 蛋白在制备用于治疗 HIV 感染的药物组合物中的用途。

26. 根据权利要求 25 所述的用途，其中的 HIV 感染选自爱滋病和爱滋病相关疾病；所述 TF 蛋白可用胃蛋白酶降解的方法从哺乳类胸腺细胞核中提取，而哺乳类胸腺细胞核是非人类的。

27. 权利要求 1 的 TF 蛋白组合物或权利要求 23 的 TF 蛋白在制备用于接种人以抗 HIV 感染的疫苗组合物中的用途。

检测和治疗获得性免疫缺陷综合症的组合物和方法

这是一项部分继续的专利申请，是于1995年六月七日提交的美国专利申请号为08/485,548的专利的继续，后者依次是1995年五月一日提交的美国专利申请号为08/431,883的专利申请的部分继续。

技术领域

这项发明涉及免疫学和病毒学的领域，特别与可从哺乳类动物胸腺细胞获得的组合物有关，这种组合物可用于作为人类免疫缺陷型病毒(HIV)的感染和相关疾病，如获得性免疫缺损综合症(爱滋病，AIDS)和爱滋病相关综合症(ARC)的诊断用品，疫苗，和治疗用品。这项发明也公开了使用这些组合物进行诊断、接种和治疗的方法和装置。

背景技术

骨髓产生最终会转变成免疫细胞的细胞。这些细胞变成淋巴细胞或吞噬细胞。淋巴细胞是小型白血细胞，它在实现免疫系统的功能中承担主要的责任。淋巴细胞的两大类是B细胞和T细胞。B细胞在骨髓中成熟(因此称之为B细胞)。T细胞来自于胸腺(因此称之为T细胞)，它们在胸腺增殖成熟成能够进行免疫反应的细胞。一旦离开骨髓和胸腺，B细胞和T细胞广泛地并连续地在整个身体中迁移。

T细胞有两种类型，调节型和细胞毒型T细胞，它们在两种主要的免疫防御途径中起作用。T细胞中首要的是“辅助/诱导”细胞。辅助T细胞与T_4细胞具有一致的标志，是激活B细胞和其它T细胞以及自然杀伤细胞和巨噬细胞所必须的。细胞毒型T细胞是杀伤细胞，例如，它直接侵袭和除去已被病毒感染或被肿瘤转化了的细胞本身。

重要的吞噬细胞是单核细胞和巨噬细胞。单核细胞在血液中循环，然后迁移至组织发育成为巨噬细胞(“豪食者”)。巨噬细胞存在于全身的组织中，是多能的细胞，起多种作用。巨噬细胞可行使清洁工的作用，清除死细胞的胞体和其它的碎片。巨噬细胞是在所有呈递抗原给T细胞的细胞中首先消化和处理抗原，在启动免疫反应中所起的关键作用。作为分泌细胞，

单核细胞和巨噬细胞是调节免疫反应所必需的。它们也携带有淋巴因子的受体，从而使它们被激活去找寻微生物和肿瘤细胞。

获得性免疫缺损综合症(爱滋病)是由一种病毒，人类免疫缺损病毒(HIV)引起的。HIV 损坏辅助 T 细胞并且寄居在巨噬细胞和单核细胞中。爱滋病的特征是多种不寻常的感染，否则为稀有的癌症。HIV 也损害脑组织和脊髓，导致渐进性痴呆。

当 HIV 感染了病人，它使自身与免疫细胞中的脱氧核糖核酸(DNA)结合，在从 3 个月到 7 年的不等长的阶段中，病人可不表现任何免疫缺损症状。有时不能产生达到可检测水平的抗爱滋病抗体。由于最初的 HIV 感染也许并不立刻导致可检测的临床病症或可检测的抗体水平，因此在这里“HIV 感染”这一名称包括感染和任何由此导致的疾病，后者被称为“HIV 相关疾病”。HIV 相关疾病的例子是爱滋病和爱滋病相关综合症。在上述的潜伏期之后，HIV 在感染的细胞中增殖，并且最终摧毁宿主细胞，释放出新合成的病毒。由于在这一过程中寄生的细胞被损坏，病人的免疫系统被损害，其易于感染具有正常免疫系统的人不易感染的少见的疾病。在人类，爱滋病病毒通常要增殖，并最终死于严重的免疫缺损。有趣的是，只有人类才能受到爱滋病的损害。当给非人类哺乳动物，如兔子、小鼠、大鼠或牛注射 HIV，这些动物可暂时有一些 T 细胞的损害。然而，感染 14 至 21 天后，这些动物将达到一个抗体攻击作用，并且不会死于爱滋病。因此，没有爱滋病的动物模型。

目前，即没法治愈也没有有效治疗爱滋病的方法。在这一领域的研究正在进行。

同样也有持续的研究探索在爱滋病的早期准确诊断这一疾病的方法。目前，商业上可提供的诊断检验通常直接检测病人的抗 HIV 抗体。这种检验有一段从病人受到感染到病人产生抗病毒抗体的 14 到 21 天的检测盲区。因此，如果病人在这一盲盲区的时间内进行检验，检验将产生错误的阴性结果。另一方面，一些这类的检验也会由于非特异性的抗体结合而产生错误的阳性结果。检测病毒感染的另一种方法是通过核酸杂交。

除非另有注明，下面的叙述是根据 Stein, D.S.等，传感病杂志(Infeet. Diseases), 165:352(1992)。与 HIV 感染阶段最为相关的代替标志是 CD_4－或 T 辅助细胞的细胞计数。HIV－1 的外壳糖蛋白，gp120，特异性地结合 CD_4

受体。CD_4受体在一种 T 淋巴细胞的亚型上最大浓度地表达，而在单核细胞和巨噬细胞中少量表达。表达 CD_4受体的细胞称为“辅助/诱导”亚型，反映了它们既能作为B细胞对带有人类的细胞抗原(HLA)II类受体的细胞表达的抗原反应时的辅助细胞，又能作为诱导细胞引起 T 细胞抑制免疫反应。有选择地去除 CD_4^+细胞会导致严重的免疫缺损，其和作为爱滋病标志的对机会感染的易感性相关。

HIV 核心抗原 P_{24}能在出现 HIV 抗体之前被检测到。当 HIV 抗体的存在能通过扫描酶联免疫吸附测试时，P_{24}抗原通常变得无法检测到，尽管它在发病阶段能偶尔地持续表达并且经常地在随后重新表达。在血浆和外周血单核细胞培养中发现当特异的抗体可检测到时，HIV－I 的滴度会迅速下降，这说明宿主的免疫反应至少具有短暂的效果。免疫刺激的标志包括β_2－微球蛋白。

当病人在血清转型之后，CD_4^+细胞的下降是与爱滋病病情的发展相关的。β_2微球蛋白的血清水平和血液中 P_{24}抗原的检测都是分别与病情发展的程度相关。采用检测β_2微球蛋白和 P_{24}抗原结合 CD_4^+细胞计数比仅用 CD_4^+细胞计数能增加爱滋病发展的预后的准确性。

然而，对于血清阳转者而言，在随后的三年里，CD_4^+细胞的百分数的持续下降是很少见的。在两次查诊之间，有 38％的病例，其 CD_4^+细胞的百分数呈现稳定或下降水平，同时有 12％的发生着下降并随后伴有 CD_4^+细胞丢失率的调整。总的来说，有 62％的在随后的三年内发生过 CD_4^+细胞比例的下降。

在一项研究 306 个不知其血清转变时间的 HIV 感染血清阳性的同性恋男子中。CD_4^+细胞计数小于 500/ml 和 P_{24}抗原检测都断定了在 30 月内发生的爱滋病。

CD_8^+细胞计数的增加在一定程度上可断定随后的爱滋病的发生。

为了更好地确定临床终点，如爱滋病的存在和进展，与抗病毒治疗效果的替代指标的相关性，分析其他一些指标如新喋呤和β_2微球蛋白已与 CD_4^+细胞计数 P_{24}抗原结合起来。

在对患有爱滋病和爱滋病相关综合症，而又耐受一种抗爱滋病药物，齐多夫定，并且存活了 12 周的病人的有限研究中(Jacobson, M.A., BNJ, 302:73(1991))，有如下发现。

对照三种因素(年龄、基本的爱滋病诊断，基础血清新喋呤浓度的对数值)后，8 至 12 周的 CD_4^+ 细胞计数的对数值，而不是随时间的变化，能最准确地预测以后的存活。8 至 12 周时 β_2 微球蛋白浓度的下降能显著地预测存活，结合 CD_4^+ 细胞计数的对数值，则提供了最好诊断模式。P_{24} 抗原、血清新喋呤浓度的下降和 Karnofsky 表现状态(一种测定正常活动中功能的方法)都与治疗后的存活无明显的相关。

Stein, D.S.等人综合上述认为：在研究早期 HIV 感染的病人的药物或治疗的抗逆转录活性，CD_4^+ 细胞计数和其它替代标志的变化可能更多地作为单独的终点。

发明内容

本发明的第一个方面提供了可用于诊断和治疗 HIV 感染，例如爱滋病和爱滋病相关综合症的组合物。

这项发明的另一方面提供了使用上述组合物检测 HIV 感染的方法。

这项发明的另一方面提供了使用上述组合物治疗 HIV 感染的方法。

这项发明的另一方面提供了从非人类的哺乳动物胸腺中制备上述组合物的方法。

这项发明的另一方面提供了用上述组合物进行体外检测 HIV 感染的装置。

更具体地说，本发明涉及以下内容：

(1)一种胸腺因子(TF)蛋白组合物，所述 TF 蛋白从哺乳动物胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取得到，所述提取方式使所述蛋白：

(a) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(b) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

(2). (1)所述的组合物，当其去甲基化时，包含一种用 11％非还原的十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定的 35 千道尔顿的蛋白质。

(3). (1)所述的组合物，当它甲基化时，包含一种用 11％非还原的十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定的 28 千道尔顿的蛋白质。

(4). (1)所述的组合物，其蛋白质的等电点为 5.6。

(5). (4)所述的组合物，其 pH 值介于 7.4 和 8.6 之间。

(6). 一种 TF 蛋白的组合物，用包括如下的步骤的方法制备:

a)从哺乳动物胸腺细胞核纯化一种赖氨酸富集的组蛋白组分；并且

b)将所述赖氨酸富集的组蛋白组分与一种阳离子交换色谱材料接触足够的时间以便 TF 蛋白与这种材料结合;

c)通过使色谱材料与一种有效的盐的水溶液接触以从阳离子色谱材料中洗脱 TF 蛋白，所述洗脱方式导致所述 TF 蛋白:

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

(7). (6)所述的组合物，进一步包括收集能够沉淀健康哺乳动物的 β、α_1和α_2巨球蛋白的洗脱物的步骤。

(8). (7)所述的组合物，其阳离子交换色谱材料是一种羧甲基柱色谱，洗涤羧甲基柱和洗脱 TF 蛋白是用线性梯度的氯化钠的 0.05M 乙酸钠的溶液，pH 6.8。

(9). (7)所述的组合物，其中的赖氨酸富集的组蛋白组分的获得是通过用胃蛋白酶处理以解聚细胞核，并从得到的解聚混合物中分离而进行的。

(10). 一种检测人类受试者的感染的方法，包含的步骤有:

a)提供受试者的生物样品，并，

b)检测血清与 TF 蛋白的 2-D 凝胶沉淀模式，所述 TF 蛋白从哺乳动物胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取得到，所述提取方式使所述蛋白:

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

(11). (10)所述的方法，其中的 TF 在去甲基化状态为 35 千道尔顿，在甲基化状态为 28 千道尔顿，这是用 11％非还原十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的，所述电泳中用到牛血清白蛋白、猪心延胡索酸酶、牛红细胞碳酸酐酶、牛乳 β－乳球蛋白和牛乳 α－乳清蛋白作为分子量标志物。

(12). (11)所述的方法，其中的生物标本选自：血清、血液或血浆。

(13). 一种检测人类受试者 HIV 感染的方法，包括步骤：

a)提供受试者生物标本，所述的生物标本选自：血清、血浆或血液；

b)将生物标本与从非哺乳类胸腺细胞核中赖氨酸富集的组蛋白组分纯化得到的 TF 蛋白混合，和

c)确定 TF 和来自 HIV 感染的生物标本中的β、α_1和α_2和α_2巨球蛋白在沉淀模式上的相关性；

其中所述 TF 蛋白经纯化后，

(i) 能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

(ii) 不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线。

(14). (13)所述的方法，其包括将生物标本和 TF 施加于凝胶电泳，以及确定 TF 和 HIV 感染的生物标本间的与凝胶上β、α_1和α_2巨球蛋白位置相关的沉淀模式。

(15). (14)所述的方法，其中的 TF 进一步甲基化并由 11％非还原十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳确定分子量为 28 千道尔顿，且等电点为 5.6，所述电泳中用到牛血清白蛋白、猪心延胡索酸酶、牛红细胞碳酸酐酶、牛乳β－乳球蛋白和牛乳α－乳清蛋白作为分子量标志物。

(16). (15)所述的方法，其中的凝胶电泳是双向凝胶电泳。

(17). (16)所述的方法，其中在凝胶上紧邻从β、α_1至α_2巨球蛋白位置发出的连续的沉淀支线的缺失表明受试人受到 HIV 的感染。

(18). (17)所述的方法，其中在没发现连续的沉淀支线而发现有断裂的沉淀支线的情况下，当第一位受试人的沉淀支线比第二位受试人的沉淀线弱或分子量小时，则说明第一位受试人比第二位感染了 HIV 的受试人有更严重的 HIV 感染或 HIV 相关疾病。

(19). 一种用于体外检测受试人 HIV 感染的装置，所述的装置包括一固体支持物，其中含有一可放置取自受试人的生物流体标本的区域，及放置 TF 蛋白组合物的区域；所述的 TF 是能从非人哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集组分中提取，所述提取方式使所述 TF 蛋白(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)

不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；所述的固体支持物允许生物标本与 TF 接触并形成沉淀，且允许检测这种沉淀支线。

(20). (19)所述的装置，即所述的固体支持物是一种双向电泳凝胶，而所述的接触和沉淀是通过双向凝胶电泳来实现的，所述的生物标本是选自：血液、血清和血浆。

(21). 一种用于体外检测受试人 HIV 感染的试剂盒，该试剂盒包括：

a)一种含有 TF 蛋白组合物的容器，该 TF 蛋白从非人哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集组分中提取，所述提取方式使所述 TF 蛋白(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；和

b)一种适用于进行双向电泳的电泳凝胶的装置。

(22). 一种纯化蛋白质 TF 的方法，包含的步骤有：

a)从哺乳类胸腺中提取细胞核；

b)从细胞核中获取赖氨酸富集部分；和

c)基于 TF(i)能在双向电泳凝胶上，邻近健康人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线；且(ii)不能在双向电泳凝胶上，邻近 AIDS 人血清 β、α_1和α_2巨球蛋白之处，沉淀出单个连续沉淀线的能力，从赖氨酸富集部分纯化 TF。

(23). 一种 TF 蛋白，它是从哺乳类胸腺细胞核的赖氨酸富集的组蛋白组分中提取，所述提取方式导致所述蛋白：

a)在双向电泳的凝胶上，于邻近来源于健康人血清的 β、α_1和α_2巨球蛋白处，能形成单一的连续的沉淀支线；和

b)在双向电泳的凝胶上，在邻近来源于爱滋病病人血清的 β、α_1和α_2巨球蛋白处，不能形成单一的连续的沉淀支线。

(24). (23)所述的 TF 蛋白，它可用胃蛋白酶降解的方法从哺乳类胸腺细胞核中提取。

(25). (1)的 TF 蛋白组合物或(23)的 TF 蛋白在制备用于治疗 HIV 感染的药物组合物中的用途。

(26). (25)所述的用途，其中的 HIV 感染选自爱滋病和爱滋病相关疾病；

所述 TF 蛋白可用胃蛋白酶降解的方法从哺乳类胸腺细胞核中提取，而哺乳类胸腺细胞核是非人类的。

(27). (1)的 TF 蛋白组合物或(23)的 TF 蛋白在制备用于接种人以抗 HIV 感染的疫苗组合物中的用途。

附图说明

图 1 示胸腺因子(“TF”)制备的色谱。

图 2 图示双向凝胶中第一维的位置。

图 3 图示双向凝胶中第二维的位置。

图 4 至 11 是双向凝胶显示的 HIV 阳性或爱滋病人病例和正常健康人的血清样品的 TF 沉淀模式的照片。

图 12 图 7 的图示，分析时的距离测定。

图 13 双向电泳的凝胶的照片，显示 HIV 阴性人的血清样品中的 TF 沉淀模式。

图 14 双向电泳的凝胶照片，显示 HIV 阳性人的血清样品的 TF 沉淀模式。

图 15 是双向电泳凝胶的照片，血清样品取自样本 3 的测试病人，1995 年，5 月 4 日。

图 16 是双向电泳凝胶的照片，血清样品取自样本 3 的测试病人，1995 年，5 月 11 日。

图 17 是双向电泳凝胶照片，血清样品取自样本 3 的测试病人，1995 年，5 月 18 日。

图 18 是双向电泳凝胶照片，血清样品取自样本 3 的测试病人，1995 年，5 月 24 日。

图 19 是双向电泳凝胶照片，血清样品取自样本 3 的测试病人，1995 年，5 月 31 日。

具体实施方式

本发明提供了一种蛋白质，这里称之为胸腺因子(“TF”)，它可用于检测 HIV 爱滋病，HIV 可引起另一种蛋白质的断裂，这里称之为 aTF，它能够与 TF 结合。

可以推测 HIV 引起 aTF 的断裂，因此，一个未被感染的人将有完整的 aTF，而一个被 HIV 感染的人将有 aTF 的片段。进一步推测在感染的早期，

断裂的 aTF 的总量是少于感染的晚期。同样的，在感染的晚期，片断将更小。因此，检测 aTF 的片段可显示 HIV 的感染。aTF 片段的数量和大小显示感染的阶段。aTF 和 aTF 的片段可通过与 TF 的沉淀模式，特别是通过确定与 β－，α_1－，α_2－巨球蛋白相应的沉淀位置来检测，如下述样本 2 中描述的凝胶电泳。

在双向电泳胶中发现，TF 与未受 HIV 感染的人的血清相互作用形成与血清中 β－、α－、α_2 巨球蛋白的连续的沉淀支线。当 TF 与取自 HIV 感染病人的血清相互作用时，沉淀支线沿着一个或多个巨球蛋白中断或消失。推测 TF 能沉淀 aTF，aTF 发现于健康人的 β－、α_1－、α_2－巨球蛋白，与 β－、α_1－、α_2－巨球蛋白相联并导致沉淀支线连续地沿着 β－α_1－α_2 巨球蛋白出现。在 HIV 感染人时，aTF 片段化，因此引起中断的沉淀支线或在巨球蛋白处无沉淀支线。

因此，在人类生物学样本中发现 TF 能与 aTF 沉淀。生物等样本的例子是体液，如血液，血清和血浆。除了实施例 2 描述的双向凝脉电泳外，沉淀方式可用一些本领域的熟练技术人员已知的技术来检测，包括用于检测抗体和抗原的免疫沉淀的模式的方法。这类技术的例子由如下文章所描述。Oudin, J，科学院会议报告(C.R.Acad Sci), 222:115(1946)；Oudin, J.，医学研究的方法(Methods in Medical Reerrch). V335－78 Corcoran A.C.编，Year Book 出版公司。(1952)；Ouchterlony O，斯堪的纳维亚病理微生物学报(Acta. Path. Microbiol. Scond.), 25:186(1948)；Ouchterlony, O.，变态反应进展(Progrars in Allergy.), V.1－78, Kallos P.& Wakeman B.H, Baseland Karger, New York (1958)；Oucherlony, O.，变态反应进展(Progrars in Allergy), VI 30－154 Kallos P.& Wakeman，编，Basel and Karger, New York. (1962)；Mancini, G.等第 11 届生物流体学术讨论会记要 (Prot. Biol. Fluids th 11 Colloqn, Bruges)，pp 370－3,Peters 12 ed. (1964) mancini, G, 等免疫化学(Immunochemistry), 2:235(1965)。

TF 也可用于治疗 HIV 的感染，如爱滋病和爱滋病相关综合症。TF 可以甲基化或非甲基化状态存在。这里所用的“TF”，除非另有修饰，如“甲基化的 TF”，包括所有的甲基化和非甲基化 TF。

这一发明同样也提供获得 TF 的方法，尤其是从胸腺细胞获得。胸腺细胞最好取自非人类哺乳动物，尽管 HIV 感染过的非人哺乳动物有较高滴度

的 TF，但是否被 HIV 感染并不重要。非人哺乳动物包括有：猴子，猿，大猩猩，豚鼠，牛，兔子，狗，小鼠和大鼠。

甲基化和非甲基化的 TF 都能与 aTF 结合，因此可用于诊断 HIV 感染，特别是爱滋病。然而，至可对于人类的测试对象的血清来说，甲基化的 TF 比去甲基化的 TF 受到其它蛋白非特异性结合的影响较小。因此，甲基化的 TF 是较好的。非甲基化的 TF 可以适用文献中所述的方法，用化学的方法使之甲基化，如下述实施例 1 中所述的那样。甲基化的 TF 可用于 HIV 感染的治疗。特别是爱滋病。

TF 最好从新鲜获取的胸腺中纯化，即新鲜取得 4 小时内。新鲜宰杀的哺乳类动物如猴子、猩猩、猿、豚鼠、牛、兔子、狗、小鼠和大鼠。用文献中的方法从胸腺细胞中分离细胞核。部分细胞核中赖氨酸丰富的组蛋白组分用美国专利号 4, 415, 553 的胃蛋白酶降解的方法获取。其它的降解方法如胰酶降解、木瓜蛋白酶降解，溴化氰降解在提取 TF 时不是有效的。分离的蛋白质富集组合物用离子交换层析的方法纯化。TF(甲基化和非甲基化)那部分蛋白质可用文献中已熟知的多种方法之一浓缩，包括高盐沉淀，如硫酸铵或通过超滤。如果 TF 是用沉淀的方法浓缩，将能较适于在随后重新溶于含有蛋白酶抑制剂的适当的生理平衡盐溶液。

TF 用于抗 HIV 感染的治疗。

申请者发现非人哺乳动物，如牛被 HIV 感染但并不发展成爱滋病，其 TF 不受损伤。这一发现可推测 TF 在阻止 HIV 的感染，特别是爱滋病的发展具有作用。因此，对 HIV 感染的病人可用 TF 进行治疗。TF 最好从被 HIV 感染但未发展成爱滋病的非人哺乳类动物取得。甲基化的非哺乳类来源的 TF 是最好的。进而，最好能在感染病人的治疗中激发免疫反应。最后，TF 最好能与佐剂一同给予或者 TF 用化学的方法与免疫原载体连接，免疫原载体可引起病人的抗体反应。免疫原载体的例子是：钉形贝血蓝蛋白(keyhole limpet)和牛血清白蛋白。

这一发明的一个方面是 TF 用于接种预防，治疗或治愈 HIV 的感染，特别是爱滋病和爱滋病相关综合症。例如，TF 通过以所需的纯度与佐剂或生理上可接受的载体(即应用的剂量和浓度的载体对受者来说是无毒的)。混和进行制备以给药。尽管 TF 最好与佐剂一同给药，但在最初即用 TF 接种的情况下，用 TF 作为加强剂时不需要佐剂。

对于这项发明作为疫苗的治疗给药来说，注射(肌肉注射或皮下注射)将是首选的途径。然而，静脉给药，通过导管或其它的外科管给药也是可行的。其它的途径包括片剂和类似剂型，液体制剂和冻干的或雾化的吸入剂。液体制剂也可用粉制剂重溶而成。

TF的给药方式也可以是通过微球体,脂质体及其它的微颗粒运输系统，或者通过将药物置于有血管的组织处持续释放的方式。

TF给药的剂量取决于给药方式的性质，即其结合活性和体内的血浆半衰期，剂型中TF的浓度，给药途径，剂量的作用位点和剂量率，病人的临床耐受性，包括使病人感到痛苦的病理状况及类似情况，也包括内科医生的技术。在一系列的连续的预防接种中，应用不同剂量，医生给予最初的接种后以相对较小剂量的TF加强刺激。

下面是一个TF制剂配方、剂量和给药方案的例子。病人通过肌肉注射或皮下注射给予8毫克的TF(估选配方是2毫升生理可接受溶液中含有每毫升4毫克的TF)或者病人每一公斤体重给予57微克的TF蛋白。每一疗程包括16次注射，每周连续两天注射两次共八周。病人病情的监测通过下面进一步描述的方法进行。最后一次注射后三个月，如果病人仍然受到病情的折磨，治疗程序将重复一次。治疗程序可以不断重复直至获得满意的结果，即中或延缓病情的发展，减轻疾病的痛苦或治愈。TF优选地与氢氧化铝这种佐剂配伍。最后的一毫升TF的配方含有：4毫克TF，0.016M.的磷酸铝(或0.5毫克Al_3^+)，0.14M氯化钠，0.004M乙酸钠，0.004M氯化钾，pH值6.2。

另一种方案是，HIV感染的病人或未感染的受试者可在5个月后免疫接种，6个月至两年后再次接种，8个月至一年后再次接种增强病人的免疫记忆。见于Anderson等人，传染病杂志(J.Infeetious Diseases.)，160(6):960－969(1989)总的说来，用TF在相对较长的时间间隔后不经常地免疫比经常性地免疫在引起最强的免疫反应和保护作用方面具有更好的效果。

TF能够以多种的方式给药并且给不同类型的受者。TF也可作为疫苗给予那些可能或不可能有接触HIV危险的人。另外，这种疫苗应给予血清阳性的人或以前接触过HIV的人。

TF可以与其它的抗原组成一种“鸡尾酒”接种物给药。TF也可作为一系列长期接种给药的之一，这种系列给药可包括接种同样或不同的HIV抗原或其它疫苗的制剂。

适当的治疗参数的选择，例如剂量，时间方案，佐剂选择以及类似的参数的选择是通过获取病人血清样和在整个一个疗程中抗体和/或 T 细胞滴度的测定而确定的。T 细胞滴度可用常规的方法来测定。如 T 淋巴细胞可用 E－玫瑰花结的形成来检测，如下述文献描述 Bach, J.F，当代免疫学课题(Comp temporary Topic in Immunology), Vol.2: 胸腺依赖性，P.189. Plenum Press. New York, 1973; Hoffman, T.& Kunkel, H.G., and Kaplan, M.，E.等，两篇文章都出自细胞介导和肿瘤免疫中的体外方法(In Vitro Method in Cell mediated and Tumor Immunity), B.R.Bloom & J.R.David 编，Academic Press, New York (1976)。例如，T 细胞政瑰花结形成的数量的分析可在 TF 治疗三周后，十周前进行。若形成的政瑰花结超过百分之六十五，则显示病人具有良好的细胞介导的免疫反应。进一步的检验的指标是病人 aTF 的形成，这可用下面进一步描述的双向电泳的方法检测。

另外，病人临床状况可作为预期效果的检测指标，如抗感染效应。如果未取得足够的抗感染效果，病人可用进一步的 TF 治疗激发而且治疗参数可以调整。如通过增加 TF 和/或佐剂的量，将 TF 与载体混和或与一种免疫原性蛋白结合，或改变给药途径以增强免疫反应。

TF 可任意地与其它药剂一起给药用以治疗诸如爱滋病和爱滋病相关综合症类 HIV 感染。这类药物有：AZT，抗生素，免疫调节剂，如干扰素，抗炎药和抗肿瘤药。

检测 HIV 感染的诊断装置

这项发明的另一方面是提供可用于体外检测 HIV 感染的诊断装置。这种装置设计成可检测生物样品中 TF 和 aTF 之间的相互作用。更优选地，当生物样品是血液、血清或血浆的情况下，这种装置可检测 TF 与样品中 β－，α_1－和 α_2 巨球蛋白相关的沉淀模式。因此，最好这种装置包括有一 TF 位点和一测试样品位点。因为如实施例 2 中描述的双向凝胶电泳是优选的，这种装置最优选地由一个分别带有 TF 和诸如血清样品的测试样品槽的凝胶组成。这种装置优选地包装成一个试剂盒，其中含有测试操作必要的试剂，诸如缓冲溶液和 TF。优选地，该测试装置有自备的电源，如电池，以便能进行双向电泳。否则，优选地设计成能与外接电源连接。

已描述了申请人所称的发明，下面的实施例用以阐明这一发明，但并不可认为是对这项发明范围的限制。

实施例

实施例一：胸腺因子的提取和纯化

下面的实验显示了从宰杀后4小时的牛胸腺中提取TF并纯化和分析其特征。

用胃蛋白酶降解的方法从胸腺细胞中分离赖氨酸富集的组蛋白片段。

这一部分所用的所有的缓冲液和其它溶液已经过滤除菌。如果需要，缓冲液的pH值可用0.2N氢氧化钠或0.1N的盐酸调节。所有的化学试剂，包括制备缓冲液和其它溶液的蒸馏水都是USP级的。

新鲜宰杀的牛在4小时内将胸腺组织及相连的结缔组织分离。组织用含有0.14M氯化钠和0.005M乙二胺四乙酸钠的溶液在4℃洗5分钟。弃去洗涤溶液，再用同样的条件洗第二遍。组织在弃去洗涤液后称重。组织在匀浆器(Brinkman Polytron匀浆器 Brinkman仪器公司，Westbury, New York)中匀浆以去除细胞核。匀浆缓冲液含0.14M氯化钠，0.05M氯化钾，0.005M氯化镁，0.003M氯化钙，0.15M TRIS－HCl, pH 7.6, 0.25M蔗糖。4℃，每分钟的转数和时间按匀浆器操作手册上的推荐值。组织与缓冲液的重量比为1:4。

组织匀浆液用纱布块真空过滤。滤液在1000g 4℃条件下离心90分钟，弃去上清。沉淀用含0.008M氯化钠，0.003M氯化钙，0.003M氯化镁，0.08M磷酸二氢钠，0.002M TRIS－HCl, 0.25M氯化钙，pH 5.2的缓冲液垂悬，沉淀与缓冲液的重量比为 1:4。垂悬液置于有磁力搅拌子的烧杯中混匀，200rpm，4℃，5分钟。匀浆液再在4℃，以3500g离心60分钟。弃去上清。沉淀垂悬于含0.014M氯化钠，0.001M氯化钙，0.002M氯化镁，0.001M乙二胺四乙酸钠，0.002M TRIS－HCl，0.25M蔗糖，pH 4.2的缓冲液中，沉淀与缓冲液的重量比为 1:4。垂悬液再置于有磁力搅拌子的烧杯中混匀，200rpm－4℃, 5分钟。匀浆液再以8000g, 4℃离心60分钟，弃上清。沉淀以预先制备的缓冲液，按重量比1:4垂悬。缓冲液包括：1份溶液1，2分溶液2，17份缓冲液4(体积/体积)。溶液1为：10％的十二烷基磺酸钠的水/乙醇溶液(55:45，体积/体积)。溶液2为：10％吐温80(溶于蒸馏水)。缓冲液4为：0.011M磷酸二氢钠和0.19M磷酸氢二钠，pH 7.4。

垂悬液置于有磁力搅拌子的烧杯中匀浆，以200g, 4℃, 15分钟。匀浆液再以12000g, 4℃离心60分钟。弃上清。沉淀称重并垂悬于含0.05M

$Na_3C_6H_5O_7$，0.05M 乙酸钠，0.1N 盐酸，pH 2.8 的缓冲液，沉淀与缓冲液的重量比为 1:4。垂悬液置于组织匀浆器中以 1000rpm, 4℃匀浆 1 分钟。

将每毫克 800－2500 活力单位的胃蛋白酶(目录号 P7000, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri)按 1:10, 000 稀释于蒸馏水。按胃蛋白酶(干粉)与匀浆后的沉淀重量比 100:1.8 加胃蛋白酶于匀浆液中。混合物置于烧杯中搅拌。充氮气，45rpm, 4℃下磁力搅拌 12 小时。搅拌后的混合物在 12, 000g, 4℃下离心 60 分钟。弃沉淀，转移上清并用含饱和硫酸铵的溶液沉淀。一部分上清与一部分溶液混合，用磁力搅拌器搅拌 600rmp，4℃，6 小时。然后将混合物以 12, 000g, 4℃离心 60 分钟。弃上清，沉淀以最少量的含 0.1M 氯化钠，0.1M 乙酸钠，0.02M 硫二甘醇的溶液溶解。得到的溶液用 0.01M 氯化钠，0.01M 乙醇钠 pH 6.4 的溶液透析，直到硫酸铵从透析液中去除。

透析液中的蛋白质用 Lowry 法定量。溶液稀释至每毫升 2 毫克蛋白质。用 0.1N 氢氧化钠调溶液的 pH 值至 7.2。另将溴乙酸溶于 10 毫升或更少的水中配成 0.2M 溴乙酸溶液，用 0.1N 的氢氧化钠调 pH 值至 7.0。得到的溴乙酸溶液加入蛋白溶液中，混合物用磁力搅拌器充氮搅拌 48 小时。在反应过程中，混合溶液的 pH 值维持在 7.2。反应结束时，重复硫酸铵沉淀的步骤到用 Lowry 法测定蛋白质的浓度。最终的溶液按需要稀释或浓缩，从 200 克牛胸腺细胞获得浓度为每毫升 4 毫克的蛋白质 TF。

羧甲基柱色谱

一毫升上述含有 4 毫克蛋白的 TF 溶液加入用 0.05M 乙酸钠平衡的 0.9 × 14cm 的羧甲基柱。柱子用氯化钠溶于 0.05M 的乙酸钠，pH 6.8 的线性梯度溶液洗涤并洗脱。为了形成梯度，两个同样大小和形状的烧瓶用虹吸管连接。一个烧瓶中装有 50 毫升 0.05M 的乙酸钠，pH 6.8 的溶液，另一烧瓶中装有 50 毫升 0.05M 乙酸钠、0.5M 氯化钠，pH 6.8 的溶液。只有有 0.5M 氯化钠的烧瓶才与柱子相连。氯化钠的梯度从 0 到 0.5M。两个烧瓶必须剧烈地搅拌以确保完全混匀。1 毫升收集 1 份。洗脱液用流式分光光度计在 280nm 处的光吸收读数检测。洗脱组分 45 号被确定为含有蛋白质。(见图 1)。TF 组分以 10,000rpm 离心，发现有两条沉降带。收集第 45 号组分并用硫酸铵沉淀法浓缩。

所得的浓缩的组分进一步分析如下:

i)测定分子量

收集的 TF 组分的分子量通过银染的 11％非还原性十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳确定。该电泳是使用 Laemmli 方法(Laemmli, U.K. Datrue, 227:680(1970))和 Sigma 技术公告 MWS－877L 所提供的指南(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri)而进行的。快速银染(RSK－1, Sigma Chemical Company)用于染蛋白质。所用的低分子量标准品(M 5630, Sigma Chemical Company)包括 5 种蛋白质的混合物(总的蛋白质浓度是 1mg/ml): 牛血清白蛋白(66,000 分子量，MW)；猪心延胡索酸酶(48, 500MW)；牛红细胞碳酸酐酶，(29,000MW)；牛乳β－乳球蛋白(18, 400MW)；和牛乳α－乳清蛋白(14, 200MW)。

凝胶上有两条带。较大的带是非甲基化 TF，占 TF 组分的 98％。较小的带是甲基化的 TF，占 TF 组分余下的 2％。

根据蛋白质的标准曲线，非甲基化的 TF 的分子量约为 35 千道尔顿(Kd)，甲基化的 TF 分子量约为 28Kd。

TF 混合物(包括甲基化和非甲基化的 TF)用 pH 滴定测定其 pH 值在 7.64 和 8.6 之间。用免疫电聚焦的方法确定其等电点约为 5.6±0.1。

TF 组分中发现的蛋白质的甲基化。

TF 可通过甲基化制备成甲基化的 TF 以供下例使用。甲基化的操作如下。

TF 与足够量的溴乙酸混合成终浓度为 0.2M 的溴乙酸溶液。例如，2.78 克溴乙酸溶于 10 毫升蒸馏水中并加入 TF 至 100 毫升，含 TF 700 毫克(7mg/ml)。混合物的 pH 值用 0.1M 的氢氧化钠调节并维持在 7.24。混合物可孵育 6 至 8 小时。所获得的水相中的 TF 蛋白质可用文献中的技术用硫酸铵沉淀的方法浓缩。10 毫升甲基化的 TF 组分加入等量的饱和硫酸铵溶液。混和物冷藏 12 小时，然后以 20,000rpm 离心 60 分钟。转移沉淀并溶于含 0.1M 氯化钠，0.1M 柠檬酸钠，0.02M 硫二甘醇的缓冲液中。混合物再以同样的缓冲液透析 24 小时，以去除硫酸铵。

实施例 2

HIV 感染的诊断

从实施例 1 中获得的甲基化的 TF 用于测定取自病人的血清样品是否感染 HIV。实验操作如下。

本例中的人血清样品由加利弗尼亚洛杉矶爱滋病健康基金会提供。该基金会已用商品化的酶联免疫沉淀测试(ELISA)和检测病人抗 HIV 抗体的 Western 印迹法测试过该样品。首先用 ELISA 测试，如果 ELISA 显示 HIV 感染(HIV 阳性)，Western 印迹法用作确定。

使用本发明，上述样品用双向电泳检测。检测装置是用水浸没的小型凝胶电泳装置。(目录号 E 0638, Sigma Chemical Company)。这套装置包括一可容纳 800ml 缓冲液的缓冲液槽。装置也装有一蠕动泵用于缓冲液的循环。该电源的输出范围为 20 至 240V，0 至 100mA，包括稳流和稳压输出。

凝胶用 1％琼脂糖(目录号 A 4679, Sigma Chemical Company)制备。该凝胶缓冲液包含：0.0257M TRIS－HCl，0.009M 十水合硼酸钠，0.067M 甘氨酸，0.0034M 三水乙酸钠，0.015M 2－巯基乙醇和 0.015M 硫二甘醇，pH 7.64。将 14.25ml 熔化的 1％的琼脂糖置于电泳胶板上。凝固的凝胶有 0.2cm 厚，大小为 7.5cm × 7.5cm。凝胶用同样的缓冲液覆盖。用注射针在凝胶上刺了直径 0.9mm 可容纳 5μl 血清样品的槽。在走第一相电泳分离血清蛋白时，电压用 9V/cm，电泳是 27mA/cm2，14℃，通电 90 分钟，图 2 图示了第一向胶的排布，1 指示血清样品槽。为进行第二相电泳，胶盘需转 90°，并且在新的阴极端去掉一个 0.9 × 45mm 的槽，这个槽位于新的阴极端和血清样槽之间，垂直于阴极－阳极线。图 3 图示了第二向的排布，2 指示槽，槽中加满 100μl 实施例 1 中的甲基化的 TF。同样的电压和电流条件下，14℃电泳 50 分钟。在双向电泳时，电泳缓冲液以 25ml/min 的速率循环。最后一次电泳后，关闭电源，数秒钟后移开凝胶。然后将凝脉同时固定和染色，45 分钟，所用溶液为：3 份甲醇，1 份乙醇，12％乙醇和 0.1％的溴酚蓝(目录号 B－8026, Sigma Chemical Company)。凝胶再浸没于蒸馏水中脱色 3 至 4 小时然后干燥。

为测定分子量，在同样的条件下做一个对照的双向电泳，采用银染的方法，用小分子量的标记物代替血清和例 1 中所述的 TF。

双向电泳凝胶上血清蛋白质的位置如图 4 所显示。图 4 中，免疫球蛋白的斑点 3 紧邻含有病人血清样品的血清槽 1。β 聚球蛋白 4 也同样。距血清槽较远的是 α_2 巨球蛋白 5，α_1 聚球蛋白 6 和血清白蛋白 7。

TF 与血清中的 aTF 的沉淀通过显示的细的乳白线(沉淀支线)来检测。这些沉淀的方式显示测试对象是否有 HIV 感染。

图 4 中显示的沿着β和α_1巨球蛋白直至α_2巨球蛋白的连续的沉淀支线 8 表明测试对象未被 HIV 感染。不连续的(即中断的)沉β－，α_1，和α_2巨球蛋白的沉淀支线和/或不沿着任何或所有巨球蛋白的沉淀支线表明有 HIV 感染。

进一步，当测试对象的 HIV 感染(如爱滋病)加剧，沉淀会变少，沉淀支线也变得不清楚。

上述的发现提示，健康血清中 aTF 在 HIV 感染时被断裂，导致 TF 和断裂的αTF 沉淀形成的中断的沉淀支线。αTF 片段的分子量小于整个分子，因此在电泳场中迁移得更远。因而沉淀支线离 TF 槽更远。可以假设，但不必受这种假设的约束，当爱滋病，HIV 相关疾病或 HIV 感染相当严重时，αTF 将会断裂成更多的片段，因此，将会有较多的不连续的沉淀支线在距离含 TF 的沟较远的位置上。因而，沉淀的方式也能显示疾病发展的程度。

所以，显示在图上的凝胶可作如下解释:

图 5 显示断裂的沉淀支线 9 表明测试对象是 HIV 阳性。这个受试者的血清用 ELISA 和本发明的方法都为 HIV 阳性。在取血样时，受试者并未显示任何临床的爱滋病症状。

图 6 至 9 显示位置 10，β巨球蛋白定位于此，健康受试者的沉淀支线紧邻于此，并且沉淀支线沿β－，α－、α_2巨球蛋白的位置(图 4)连续展开。相对的是，在图 6 至 9 受试样的沉淀支线 11 是中断的(即不是沿着β－、α－和α_2巨球蛋白的位置连续的)并且低于位置 10。受试样的沉淀支线的位置表明它们比健康受试样的沉淀支线有较小的分子量。断裂的片段和支线以及较小的分子量表明受试样是 HIV 阳性的。在本测试进行之前 3 至 6 个月，这些样品用 ELISA 检测为 HIV－阳性。本检测所用的血清是与做 ELISA 检测时同时取的。在进行本检测时，受试者显示出爱滋病的临床症状。受试者病情的严重程度依次为图 6(爱滋病最严重的病例)，图 7，图 8 和图 9(爱滋病最轻的病例)。临床观察的疾病的严重程度与图中显示的沉淀模式是一致的。首先，凝胶上的沉淀支线比预计的健康样品的沉淀支线在距离上较远的与较近相比表明 aTF 的片段较小因而爱滋病的病情更严重。例如，这一距离可以与第一条沉淀支线的相对距离来确定，即从预计的健康样品的沉淀支线算起，离血清样品孔垂直距离最近的沉淀支线。从健康样品的沉

淀支线的位置算起，无论水平方向还是垂直方向，相对距离越远，则病情越严重。第二，如果上述的因素在两个爱滋病样品的凝胶中不能明显区分，则凝胶上显示沉淀支线颜色深而数量少的样品，病情较轻。沉淀支线数量少且沉淀作用强表明 aTF 较少断裂并且水平较高，因而爱滋病的病情较轻。

第一个分析的应用的例子是用于分析图 6 至 10。为了使这些图的比较标准化。所有的图应有一固定的点，这里选血清样品孔 1 作为基线 14。第一个沉淀支线是在垂直距离上 15，最靠近基线 14。由于健康样品的沉淀支线从 β 和 α_1 巨球蛋白的附近延伸至 α_2 巨球蛋白(见图 4)，因而可以从 β、α_1 或 α_2 巨球蛋白中任一点来计数相对距离。在这里选择 β 巨球蛋白的位置 10。这一系列的图中，沉淀支线到 β 巨球蛋白的位置 10 的垂直 17 和水平 16 距离都测定和比较。那些血清在凝胶上形成沉淀支线与 β 巨球蛋白的位置具有相对较大的垂直 17 和水平 16 距离的受试者比那些具较小距离的受试者病情更为严重。比较显示如下：图 6(爱滋病最严重的病例)，图 7，图 8 和图 9(爱滋病病情最轻的病例)。这是第一种分析应用的实例。本领域的熟练技术人员会认识到基线可作为另一个对所有凝胶照片都是标准的位置，相对距离可从另一血清样品延伸的点上计算。只要所有用于比较的照片上的这些点是一致的并且可始终用于测定相对距离。其它只要不偏离第一种分析的主旨的改变都是可行的。

图 10 的重要意义在于用血清进行这次检测的同时，样品用 ELISA 检测为阴性。而本发明的检测表明样品显示有断裂的沉淀支线 11，是 HIV 阳性的。血清检测二个月后，ELISA 检测的结果 HIV 阳性。因此，这一图示确认了本发明的检测比常规的 ELISA 更适于早期诊断 HIV 的感染。

图 11 的重要意义在于血清样品取自临床已诊断为爱滋病且接受了健康供体的输血的病人。由健康供体血清引起的沉淀支线，表明如箭头 12 所指在较高分子量的位置，这倾向于显示最初来自健康供体的全部 aTF 的少量断裂片段，所以沉淀支线的位置接近于预计的健康样品的分子量，其与图 10 中沉淀支线显示的相对相似的位置更表明感染的早期阶段。由爱滋病患者血清导致的沉淀支线如箭头 13 所指，位于低分子量的位置，表明来自病人和 HIV 感染的断裂而致的小的 aTF。

这里显示的双向凝胶电泳可作为一种体外装置的批量生产，用以检测生物流体样品以确定受试样品中 HIV 感染的存在。凝胶可进行干燥处理以

易于包装和运输。包装好的凝胶可包括预先制好的用以放样品的图形孔和放 TF 的槽。TF 可以置于一容器内分开出售或与凝胶一起作为一试剂盒出售。另外，试剂盒也可包括放电泳缓冲液的容器，染色剂和/或分子量标准。为了做对照，试剂盒更可包括来源于健康受试者的血清样品。

除了上述的检测，本发明还包括上述检测的改进方法和任何用 aTF 进行测定生物流体样品沉淀模式的方法，特别是与 β、α_1 和 α_2 巨球蛋白有关的。含有这一检测需要的试剂和材料的试剂盒也属于本发明。

实施例 3

本实施例描述的是用本发明的 TF 组合物治疗爱滋病人(在本实施例 3 中也称为受试者)的研究。在研究过程中病人未接受任何其它治疗或服用药物。

病人为一名 27 岁的白种同性恋男子，治疗开始时体重为 138 磅。8 个月前，病人的血清检测为 HIV 抗体阳性。其基于临床症状的诊断也为 HIV 阳性，如下表 1 中所显示的开始 TF 治疗前 2 周，即 1995 年 4 月 22 日所取病人血样的检验结果，指标包括：P_{24} 抗体计数，$C4^+$ 和 CD_8^+ 全部细胞的计数(细胞数/微升)，和淋巴细胞亚型所占的百分率。在接受 TF 治疗的前后，病人都未有爱滋病的症状。

治疗从 1995 年 4 月 27 日开始。病人每周接受两次肌肉注射共 14mg 的 TF。一次在周二，另一次在周三。每次注射含 7mg 的 TF(2ml，按 3.5mg/ml TF 的配方)。该 TF 是按上述实施例 1 所述方法纯化，无菌的 TF 配方含有：3.5mg/ml 甲基化的 TF，8.1mg/ml 氯化钠，1.9mg/ml 乙酸钠，2.6mg/ml 三磷酸钠，2.1mg/ml 氯化铝，pH 6.2。

表 1

检测指标	取样日期					
	95 年 4 月 12 日	95 年 4 月 27 日	95 年 5 月 4 日	95 年 5 月 11 日	95 年 5 月 18 日	95 年 5 月 24 日
红细胞计数	4.94	4.62	4.77	4.85	4.79	4.66
血红蛋白	15.3	16.6	14.5	15.5	14.8	14.7
血小板计数	233	221	236	206	186	208
白细胞计数	4.3	4.5	6.2	6	5.7	5.5
嗜中性细胞计数占白细胞计数的百分数	53	61	58	52	64	57
淋巴细胞百分计数	32	27	33	24	26	27
单核细胞百分计数	12	10	7	12	8	10
嗜曙红细胞百分计数	2	1	1	11	2	4
嗜碱性细胞	1	1	1	1	0	2
CD4 %	33	32	25	31	31	33
CD4 绝对数	468	397	531	446	459	498
CD8 %			52	56	52	56
CD8 绝对数			1108	806	979	848
辅助细胞/抑制细胞比率			0.47	0.6	0.6	0.6
全部血清蛋白	7.7	7.4	7.6	8	7.3	7.2
血清白蛋白	4.8； 62 %	3.8； 51.3	3.9； 513 %	4.3； 53.7 %	3.9； 53.3 %	3.6
α－1 球蛋白		0.1； 1.35 %	0.2； 2.63 %	0.2； 1.9 %	0.1； 1.7 %	0.1
α－2 球蛋白		0.7； 9.45 %	0.7； 9.21 %	0.8； 10.1 %	0.5； 7.3 %	0.7
β－球蛋白	2.9； 38 %	0.9； 12.5 %	0.9； 11.84 %	0.8； 10.0 %	0.8； 11.4 %	0.9
γ－球蛋白		1.9； 25.66 %	1.9； 25.00 %	1.9； 24.3 %	1.9； 26.3 %	1.9
P24 核心抗原	阳性	阳性	未检测	阴性	阴性	阴性

表 1 显示了实验结果，日期为取病人血样的日期。测试是由 Unilab 公司(Tarzana, California)，用普遍接受的临床检验方法完成的。

测试指标如下：

“RBC” 和 “WBC” 分别代表红细胞和白细胞的计数($\times 10^3/mm^3$)。

“HEMOGLOBIN” 和 “PLATELET COUNT” 分别代表血红蛋白计数(以 g/dl 计)和血小板计数($\times 10^3 mm^3$)。

“POLYS” 代表嗜中性细胞计数占白细胞计数的百分率。

“LYMPHOCYTES”，“MONOCYTES”，“EOSINOPHILS”，和 “BASOPHILS” 的计数分别是占白细胞计数的百分率。上述所有的血液计数是用血液分析仪完成的。

“CD4 %” 和 “CD8 %” 分别代表淋巴细胞亚型 CD_4^+ 和 CD_8^+ 的百分率。“CD4 ABS” 和 “CD8 ABS” 分别代表 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞的绝对细胞数(按细胞数/微升计)。CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞计数用流式细胞仪完成。

“RATIO H/S” 代表辅助细胞对抑制细胞的比率，由 “CD4 ABS” 数除以 “CD8 ABS” 数获得。

“TOTAL PROT” 代表病人血样中全部血清蛋白的量，以 g/dL 计。用 Olympus All 5000 仪器(Olympus Co. Ltd, Tokyo, Japan)采样比色法获得。

“ALB”代表血清白蛋白；“ALPHA－1”代表 alpha－1 球蛋白；“ALPHA－2” 代表 alpha－2 球蛋白；“BETA” 代表 beta 球蛋白；“GAMMA” 代表 gamma 球蛋白。这些血清蛋白通过血清蛋白电泳测定。对每一栏的对某一种血清蛋白的每一列而言，左边的数据是以 g/dl 计，右边的数据显示每一种血清球蛋白在全部的血清球蛋白中所占的百分比例。

“P/24” 代表 P_{24} 病毒核心抗原，用 P_{24} 抗原的 EIA 检测试剂盒(Abbott Laboratories, Abbotl Park, Illinois)测定。

还有，在表 1 所示时间所取的血样用 Organon Technica (Roleigh, North Carolina)的 HIV ELISA 试剂盒检测结果为 HIV－1 抗体阳性。从第一次注射 TF 到 1995 年 5 月 24 日，病人体重增加了 7 磅。

上述的检测结果显示了在开始 TF 治疗后，CD_4^+ 细胞计数上升和 CD_8^+ 细胞计数下降的趋势。另外，在开始 TF 治疗后，P_{24} 抗原检测显示阳性结果，而在 TF 治疗之前和开始时受试样为阳性。因受试样中仍存在残留的抗体，所以 HIV 抗体分析仍为阳性。这些检测结果提示，TF 治疗对于抵抗

HIV 感染和由 HIV 感染引起的疾病的发展是有效的。

除了由 Unilab 公司进行的上述检测外，申请人也对表 1 中显示时间取的血清样品进行了上述实施例 2 中所述的双向电泳 HIV 诊断检测。

图 13 和 14 是两个对照血清样品的双向电泳凝胶的照片：一个受试者的血清样品在 Organon Technica 进行的 ELISA 检测中 HIV 抗体阴性，另一个受试者的血清样品在同样的 ELISA 检测中呈阳性，从图 13 可见，沉淀支线 9 是一个沿着 β、α_1和α_2巨球蛋白延伸的连续的支线，表明健康的 HIV 阴性的受试者。相对的是，图 14 中的沉淀支线 9 是不连续的，表明受试者是受 HIV 感染的。

图 15 至 19 显示的是分别在 1995 年 5 月 11 日，5 月 18 日，5 月 24 日和 5 月 31 日采集的受试者血清样品的双向电泳凝胶的结果照片。

如图 15 所示，在接受了上述的于 1995 年 5 月 4 日的 TF 治疗一周后，受试者血清样品 HIV 感染检测为阴性，如沿着 β、α_1和α_2巨球蛋白的位置的连续的沉淀支线 9 所示的那样。

如图 16 所示，在治疗的第二周，即 1995 年 5 月 11 日，受试者的血清形成沿 β、α_1巨球蛋白位置沉淀支线 9，这比图 14 中 HIV 阳性病人对照连续性好。

如图 17 和 18 所示，在治疗的第三和第四周，即 1995 年 5 月 18 日和 24 日。受试者血清形成不很连续的沉淀支线 9。然而在第 5 周，1995 年 5 月 31 日，又能发现沿 β、α_1和α_2巨球蛋白位置的连续的沉淀支线 9(如图 19 所示)，表明 HIV 阴性状况。双向电泳检测有助于提示本发明的 TF 治疗对抵抗 HIV 感染和/或病情的发展的有效性。

实施例 4

本实施例提供有关 6 个病人用本发明的 TF 组合物进行治疗的进一步资料。这些病人在治疗过程中和治疗后 6 周内未接受任何其它的治疗和药物。下表也显示病人在治疗期结束后 9 个月(第 1－5 号病人)和 2 个月(第 6 号病人)的资料。

在连续的 6 周里，每个病人接受每周 2 次肌肉注射共 14mg TF，一次注射在周二，另一次在周三。每次注射含 7mg 的 TF(2ml，配方为 3.5mg/ml 的 TF)。TF 按上述实施例 1 中所述纯化，无菌的 TF 配方包含：3.5mg/ml 甲基化 TF，8.1mg/ml 氯化钠，1.9mg/ml 乙酸钠，2.6mg/ml 三磷酸钠，2.1mg/ml

氯化铝，pH 6.2。

表 2 至 7 显示对每个病人研究的结果。检测是由实验室用普遍接受的临床分析方法完成。表中“HIV_Ab, ELISA”表示 HIV－1 抗体用 ELISA 来测定。“CD4 abs”和“CD8. abs”分别表示 CD4 和 CD8 细胞的绝对细胞数(按细胞数/微升计)。“P_{24} Ag”表示 P_{24} 病毒核心抗原用 P_{24} 抗原免疫复合物分解(ICD)EIA 测定。这种用于 HIV－1 抗原的 EIA 在分解免疫复合物后检测 P_{24} 核心蛋白。“HIV－1 RNA, PCR”表示用聚合酶链式反应(PCR)扩增的方法定量检测每毫升血浆中 HIV－1 核糖核酸(RNA)的拷贝数。检测的病毒 RNA 拷贝数的增加/减少是与血浆中病毒的增加/减少有关。“HIV－1 Plasma Culture”表示在血浆和外周血单核细胞培养中 HIV－1 的滴度。“HIV－1 Plasma Quantitative”表示 HIV－1 病毒感染率，以每毫升感染单位表示(Iu/ml)。“Poly Cells”表示白细胞的绝对计数(细胞数/微升)。α_1 巨球蛋白(以 alpha－1 macro 表示)，α－2 巨球蛋白(以 alpha－2 Macro 表示)和 γ 免疫球蛋白(IgG)由血清蛋白电泳测定。数据(%)表明的是某一血清球蛋白在全部血清球蛋白中所占的百分率。表 7 中“IgA”和“IgM”分别表示免疫球蛋白 A 和 M。表 7 中，IgG，IgA 和 IgM 以 mg/DL 血清表示。“HLA－DR”代表位于染色体 6 上的人类主要组织相容性抗原复合物的一种产物。

表 2－7 中使用的其它的定义有：

inc.: 健康人的正常水平

pos.: 阳性

\+ 阳性，阳性水平的上升以增加的“+”表示

neg. 阴性

－ 未检测

nt 未检测

x 健康人正常水平的倍数，如“2x”表示正常水平的两倍。

下面是对每人病人情况的详细描述。

1 号病人

下面的表 2 概括了对 1 号病人所做临床检测的结果。

治疗开始时，1 号病人(－21 岁的女性)已完全发展为爱滋病，伴有大脑的损伤和神智失常，CD_4 计数为 36，预计寿命 6 至 12 个月。她的 CD_4 计数从 36(在治疗开始时)到 108(在结束疗程后 9 个月)。在治疗第四周开始时，

P_{24}核心抗原为阴性，即低于5μg/ml。这一阴性的P_{24}核心抗原的结果表明，在治疗的第四周，已无病毒的活动。当治疗4个月时，血浆HIV－1培养检测为阴性。阴性的血浆HIV培养结果表明分离自该病人血浆的T细胞当与未感染的对照血液混合，在体外进行检测时是无感染活力的，即阴性血浆培养。相反，当来自HIV－1感染的对照血液的T细胞与未感染的对照血液混合进行体外检测时产生阳性血浆培养。在TF治疗中和治疗后，IgG，α－1和α－2巨球蛋白的活性上升。治疗后4个月，病人不再有充分发展的爱滋病(即不会再有得病的机会)，尽管她仍然是HIV阳性。(即ELISA检测抗HIV抗体阳性)。

表 2

病例 1　　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗中的结果肌内注射 2 ×/周			治疗后的结果未进行其它治疗 - 月						
		2	4	6	1	2	4	5	6	7	9
HIV - Ab, ELISA	+	+ +	+ + +	+ + +	-	-	+ + + +	+ + + +	-	-	+ + + +
CD4 绝对数	36	23	34	49	-	-	53	61	-	-	108
CD8 绝对数	672	237	775	537	-	-	1209	1162	-	-	983
P24 抗原	pos.	pos.	neg.	neg.	-	-	neg.	neg.	-	-	neg.
HiV- 1RNA,PCR 每 ml 拷贝数	88200	-	-	17300	-	-	11900	-	-	-	6500
HIV - 1 血浆培养	pos.	-	-	neg.	-	-	neg.	-	-	-	neg.
HIV - 1 定量培养	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白细胞 × 10^3	2.23	2.8	4.76	5.7	-	-	6.6	6.4	-	-	6.9
α - 1 巨球蛋白	1.35 %	1.24 %	2.66 %	2.70 %	-	-	2.70 %	2.70 %	-	-	1.9 %
α - 2 巨球蛋白	8.12 %	7.91 %	5.22 %	11.1 %	-	-	9.30 %	8.80 %	-	-	8.80 %
γ 免疫球蛋白	14.20 %	23.60 %	25.00 %	26.2 %	-	-	26.00 %	25.20 %	-	-	22.00 %
δ / γ 链		2x	2x	1.5x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.
HLA - DR		2x	2x	2x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.

第 2 号病人

下面的表 3 概括了 2 号病人所做临床检测的结果。

治疗开始时，2 号病人(30 岁男子)是 HIV 阳性(即 ELISA 检测抗 HIV 抗体阳性)，但没有所有的爱滋病症状。他的 CD_4 细胞计数从 193(治疗前)上升至 305(治疗结束后 9 个月)。他的 P_{24} 核心抗原在 TF 治疗前、治疗中和治疗后保持阴性，表明低病毒活力。他的血浆培养在治疗 4 个月后转变为阴性，表明他的血浆在体外检测中无感录活性。IgG，α_1 和 α_2 巨球蛋白水平的上升表明他体液免疫力上升。在治疗结束后 4 个月，病人仍未显示任何爱滋病的症征兆。

表 3

病例 2　　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗中的结果肌内注射 2 ×/周			治疗后的结果未进行其它治疗 - 月						
		2	4	6	1	2	4	5	6	7	9
HIV - Ab, ELISA	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	-	-	+ + +	+ + + +	-	-	+ + + +
CD4 绝对数	193	50	144	173	-	-	193	288	-	-	305
CD8 绝对数	1348	298	755	840	-	-	1533	1312	-	-	1291
P24 抗原	neg.	neg.	neg.	neg.	-	-	neg.	neg.	-	-	neg.
HIV- 1RNA, PCR 每 ml 拷贝数	43200	-	-	21100	-	-	9000	-	-	-	7000
HIV - 1 血浆培养	pos.	-	-	neg.	-	-	neg.	-	-	-	neg.
HIV - 1 定量培养	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白细胞 × 10^3	4.9	3.8	6.1	6.2	-	-	6.0	6.9	-	-	6.1
α - 1 巨球蛋白	1.37 %	1.4 %	2.4 %	2.5 %	-	-	2.5 %	2.3 %	-	-	2.1 %
α - 2 巨球蛋白	2.7 %	4.2 %	8.4 %	8.7 %	-	-	8.8 %	8.3 %	-	-	8.5 %
γ 免疫球蛋白	13.0 %	13.5 %	15.0 %	17.0 %	-	-	20.0 %	18.0 %	-	-	18.8 %
δ / γ 链		1.5x	1.4x	1.2x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.
HLA - DR		1.2x	1.2x	1.2x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.

3 号病人

下面的表 4 概括了 3 号病人进行临床检测的结果。

治疗开始时，3 号病人(24 岁女子)是 HIV 阳性(即 ELISA 检测抗 HIV 抗体阳性)，但并未有所有爱滋病症状。CD_4 细胞计数从 404(治疗前)上升到 636(治疗结束后 9 个月)。在整个研究过程中她的 P_{24} 核心抗原检测为阴性。她的血浆培养在治疗后 4 个月时转为阳性。她的 IgG，α_1 和 α_2 巨球蛋白的上升表明病人体液免疫力的增强。治疗结束后 9 个月，病人未显示爱滋病征兆。

表4

病例3　　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗中的结果肌内注射2×/周			治疗后的结果未进行其它治疗－月						
		2	4	6	1	2	4	5	6	7	9
HIV－Ab, ELISA	++	++	+++	+++	－	－	+++	+++	－	－	+++
CD4 绝对数	404	217	538	375	－	－	446	580	－	－	636
CD8 绝对数	1544	1054	1587	898	－	－	1496	1381	－	－	1191
P24 抗原	neg.	neg.	neg.	neg.	－	－	neg.	neg.	－	－	neg.
HIV－ lRNA, PCR											
每 ml 拷贝数	51210	－	－	14240	－	－	－	－	－	－	8840
HIV－1 血浆培养	pos.	－	－	neg.	－	－	neg.	－	－	－	neg.
HIV－1 定量培养	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
白细胞× 10^3	3.7	2.9	5.1	6.9	－	－	6.8	6.6	－	－	6.7
γ 免疫球蛋白	12.24 %	14.4 %	17.7 %	21.0 %	－	－	19.8 %	18.01 %	－	－	18.0 %
α－1 巨球蛋白	1.2 %	1.4 %	2.6 %	2.7 %	－	－	2.7 %	2.4 %	－	－	2.4 %
α－2 巨球蛋白	4.1 %	4.1 %	5.3 %	8.3 %	－	－	8.1 %	8.2 %	－	－	8.2 %
δ/γ 链		1.2x	1.4x	inc.	－	－	inc.	inc.	－	－	inc.
HLA－DR		1.8x	1.4x	1.2x	－	－	inc.	inc.	－	－	inc.

4 号病人

下面的表 5 概括了 4 号病人所做临床检验的结果。

治疗前，病人(27 岁男子)是 HIV 阳性(即 ELISA 检测抗 HIV 抗体阳性)，并且有成熟的爱滋病症状(3 级伴随喉和肺上部的机会感染)。他的 CD_4 细胞计数从 389(治疗前)增加至 599(治疗结束后 9 个月)。他的 P_{24} 核心抗原在治疗 4 周后转阴并维持下去。他的 HIV 血浆感染力在治疗 6 周后转变成无感染力并维持下去。他的 IgG，α_1 和 α_2 巨球蛋白上升表明病人体液免疫力增强。治疗结束后 12 个月时，病人不表现任何爱滋病征兆。

表 5

病例 4　　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗中的结果肌内注射 2 ×/周			治疗后的结果未进行其它治疗 - 月						
		2	4	6	1	2	4	5	6	7	9
HIV - Ab, ELISA	+	+ +	+ + +	+ + +	-	-	+ + + +	+ + + +	-	-	+ + + +
CD4 绝对数	389	322	507	394	-	-	393	573	-	-	599
CD8 绝对数	850	752	839	540	-	-	563	607	-	-	802
P24 抗原	pos.	pos.	neg.	neg.	-	-	neg.	neg.	-	-	neg.
HIV- 1RNA, PCR											
每 ml 拷贝数	116000	-	-	30000	-	-	-	-	-	-	6600
HIV - 1 血浆培养	pos.	pos.	-	neg.	-	-	neg.	-	-	-	neg.
HIV - 1 定量培养	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白细胞 × 10^3	4.3	3.8	6.3	6.7	-	-	6.6	6.3	-	-	6.4
α - 1 巨球蛋白	1.7 %	1.8 %	4.0 %	4.4 %	-	-	3.3 %	2.4 %	-	-	1.6 %
α - 2 巨球蛋白	9.1 %	9.0 %	7.8 %	10.2 %	-	-	10.2 %	9.8 %	-	-	10.1 %
γ 免疫球蛋白	14.8 %	12.6 %	23.0 %	23.0 %	-	-	19.8 %	21.0 %	-	-	19.3 %
δ / γ 链		2x	2x	1.5x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.
HLA - DR		2x	2x	2x	-	-	inc.	inc.	-	-	inc.

5 号病人

此病人是与上述实施例 3 中的为同一人。

下面的表 6 概括了 5 号病人所做的临床检验的结果。

治疗前，病人是 HIV 阳性(即 ELISA 检测抗 HIV 抗体为阳性)，有肺炎、呕吐和无便血的腹泻症状。但没有成熟的爱滋病症状。他的 CD_4 细胞计数在治疗后保持不变。他的 P_{24} 核心抗原在治疗 4 周时转阴并在治疗后 7 个月保持不变。HIV－1 的 RNA 的 PCR 结果显示病毒的拷贝数维持在大约 6000－7000 拷贝/ml。他的血浆培养在治疗后无感染力。他的免疫系统使 IgG，α_1 和 α_2 巨球蛋白上升。他体重增加了 10－12 磅。治疗结束后 10 个月，他不显示任何爱滋病征兆。

表 6

病例 5　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗中的结果肌内注射 2 ×/周			治疗后的结果未进行其它治疗 - 月						
		2	4	6	1	2	4	5	6	7	9
HIV - Ab, ELISA	+	+	+ +	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
CD4 绝对数	528	531	502	420	470	596	434	415	438	438	669
CD8 绝对数	nt	1108	979	803	810	1220	1004	1150	926	909	890
P24 抗原	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
HIV - 1RNA PCR, 每 ml 拷贝数	70000	-	-	-	7870	30920	-	-	-	6317	-
HIV - 1 血浆培养	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
HIV - 1 定培养量	nt	nt	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
白细胞 × 10^3	4.3	6.2	5.7	5.9	60	5.9	7.3	6.5	5.6	5.8	6.0
α - 1 巨球蛋白	1.3 %	2.6 %	1.9 %	2.0 %	2.8 %	2.6 %	2.1 %	2.4 %	2.4 %	2.4 %	2.4 %
α - 2 巨球蛋白	9.4 %	9.2 %	7.3 %	8.0 %	10.3 %	-	10.1 %	11.8 %	11.8 %	-	11.2 %
γ 免疫球蛋白	18.6 %	25.0 %	26.3 %	25.1 %	24.7 %	-	24.6 %	23.9 %	22.8 %	-	23.3 %
δ / γ 链		1.2x	1.6x	2.0x	1.5x	-	-	-	inc.	-	inc.
HLA - DR		1.2x	1.8x	2.0x	2.0x	-	-	-	1.2x	-	inc.

6 号病人

下面的表 7 概括了 6 号病人所做的临床检验的结果。

在疗程开始时，病人有成熟的爱滋病征状(介于 3 至 4 级，有诸如视网膜炎，细胞肥大病毒感染，喉、肺、气管和支气管的真菌感染、以及卧床不起等病症)。他的 CD_4 细胞计数在 2 个月治疗后略有上升。他的 P_{24} 核心抗原在 4 周治疗后转阴并维持下去。他的血浆培养在治疗前是阳性，治疗后转阴成无感染力。通常，病人外周血细胞培养为阳性伴有 CD_4 计数低于 100，病毒数量为 5×10^5 但对于 6 号病人，在治疗 1 个和 2 个月时外周血细胞中检测不到 HIV。重要的是，病人的病毒数从 5×10^5 下降至 3×10^4 病毒 RNA 拷贝，这接近于病毒 RNA 下降 1.5 个对数值。6 号病人从治疗开始后体重也增加了 15 磅。治疗结束的 3 个月，病人未患爱滋病。

表 7

病例 6　　人的临床和实验室检验结果

检测指标	治疗前	治疗期间肌肉注射 2 ×/周			治疗后的结果未进行其它治疗的时期							
		2 周	4 周	6 周	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	9 月
HIV - Ab, ELISA	+	+	+	+	+	+						
CD4 绝对数	70				79	90						
CD8 绝对数	624				700	685						
P24 抗原	+	+	neg	neg	neg	neg (< 5pg/ml)						
HIV - 1 血浆培养	+	nt	nt	nt	neg	neg						
HIV 定量培养	nt	nt	nt	nt	neg	neg						
HIV - 1 RNA, PCR	5×10^5	nt	nt	nt	30924	31795						
lgG	nt	nt	nt	nt	1413	1323						
lgA	nt	nt	nt	nt	768	802						
lgM	nt	nt	nt	nt	210	244						

nt = 未检测；　neg = 阴性

结论:

本实施例显示当 P_{24} 核心抗原变得低于测试方法的测检低限，5μg/ml时，HIV 病毒的活性被中止。在 HIV 病人中也显示令人注目的 CD_4 计数的上升。比之那些诸如 AZT 和其它的在美国可购买到的抗病毒产品，这种上升在时间上更引人注目。本实施例也显示用定量 RNA 聚合酶链式反应的方法检测到病人病毒数量的令人注目的下降。病人的血浆培养转阴。在体外体系中，病人的血浆是无感染力的。病人的 T 细胞是不能在体外感染未感染(正常)的病人的 T 细胞。上述可能也表明血浆中无病毒。也可能表明病人可能已受到免疫，因此不能够感染其它未感染的病人。

外周血单核细胞(PBMC)检测呈 HIV 阴性。治疗使成熟的爱滋病人变成其血浆和外周血细胞都检测不到 HIV 的病人。显然，病人的体液免疫和细胞免疫都参与了破坏和中和病毒。

本发明已参照具体的实施方案来描述。然而，本申请意图包括那些不超出附加的权利要求书的精神和范围的并由那些本领域的熟练技术人员作做出的改更和替代。

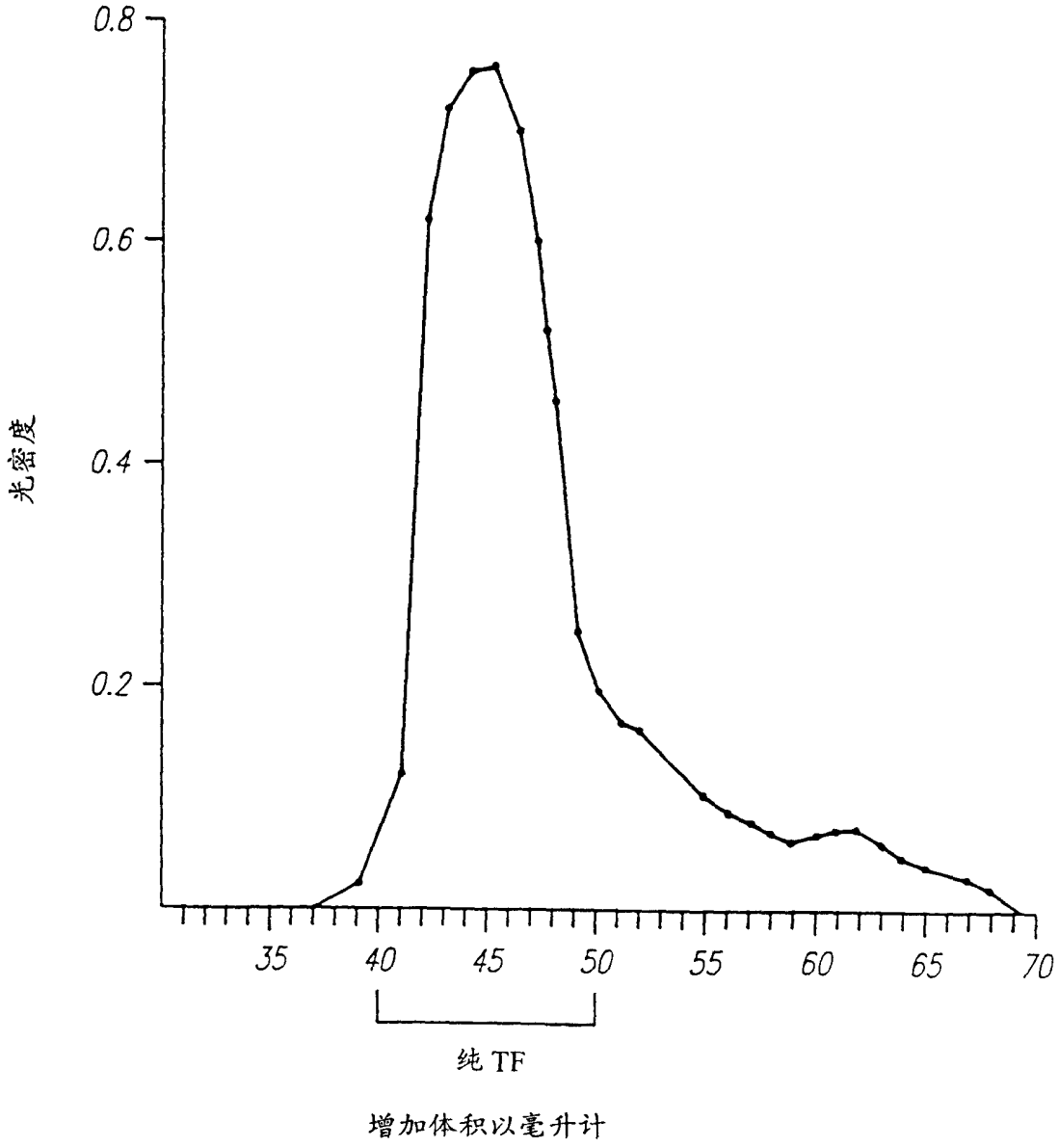


图 1

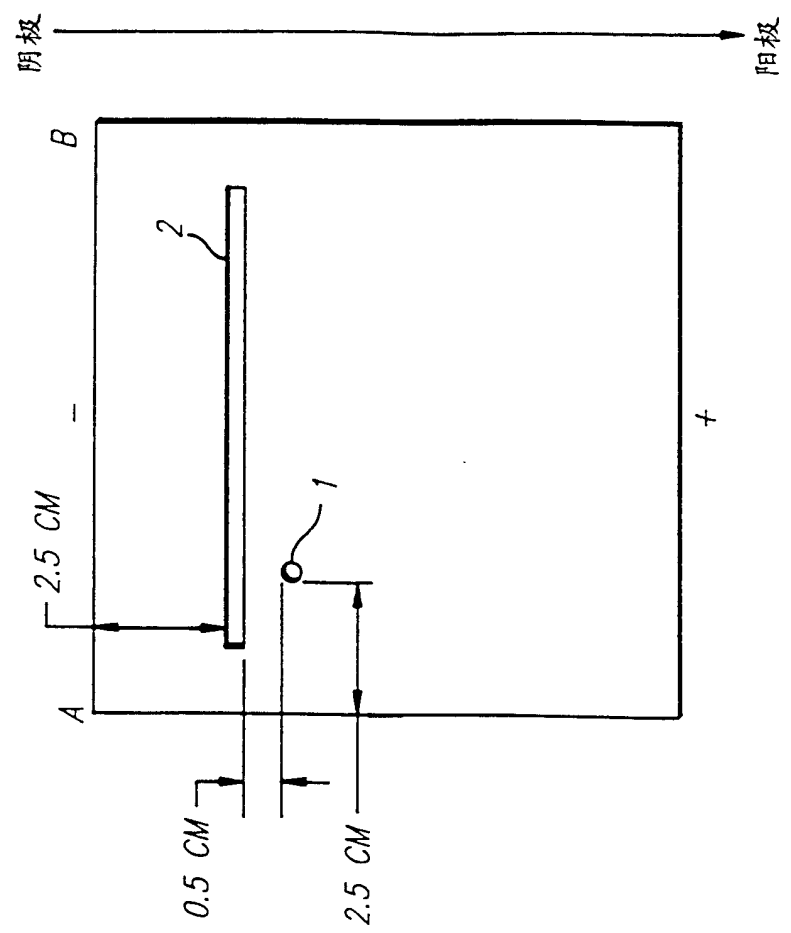


图 3

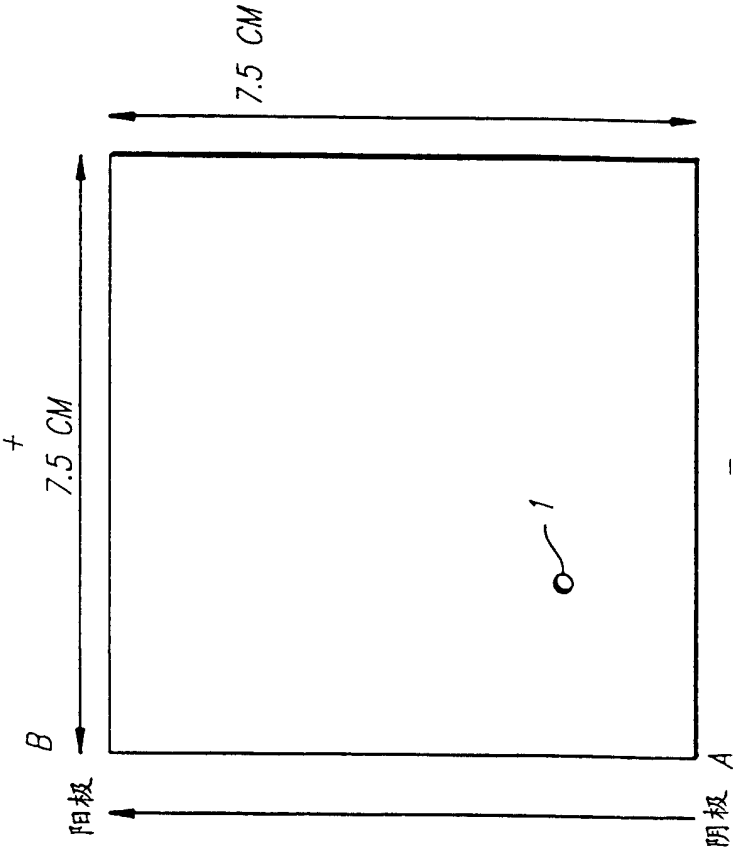


图 2

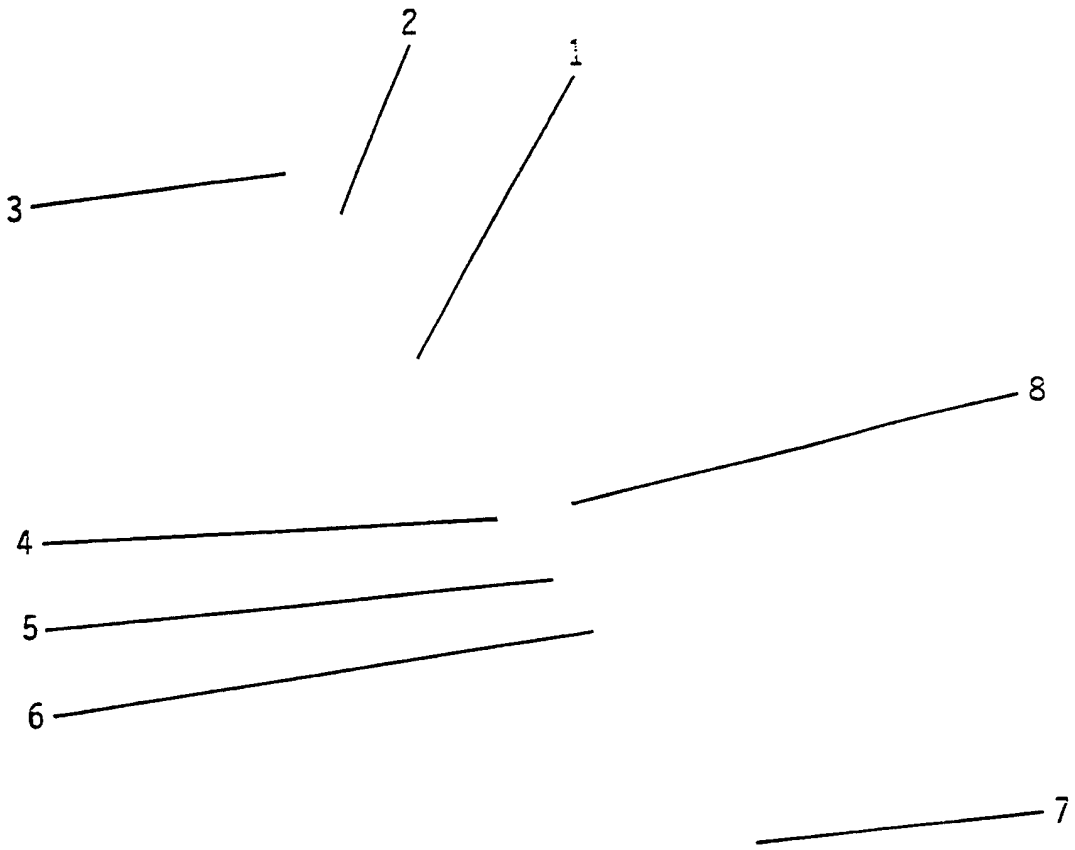


图 4

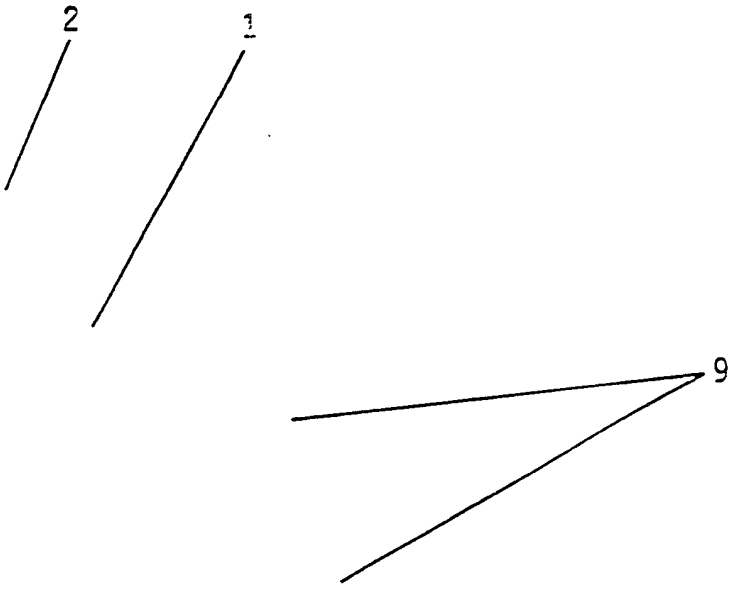


图 5

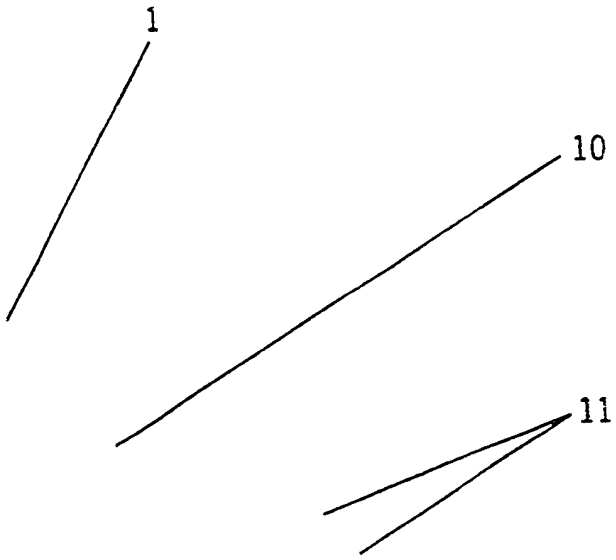


图 6

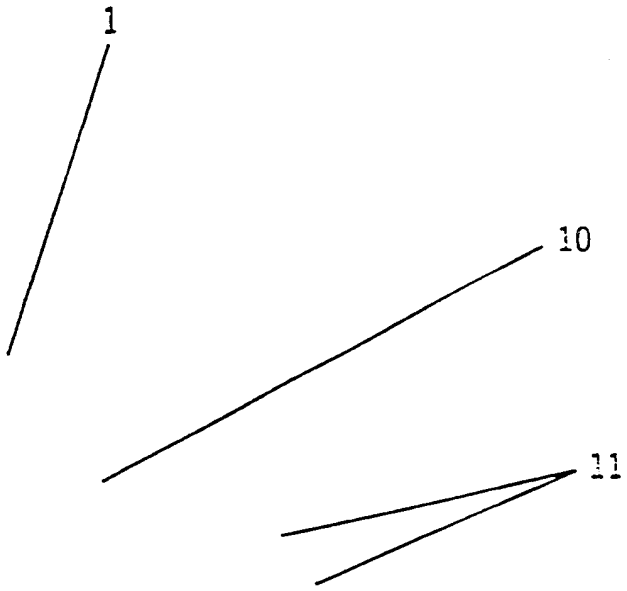


图 7

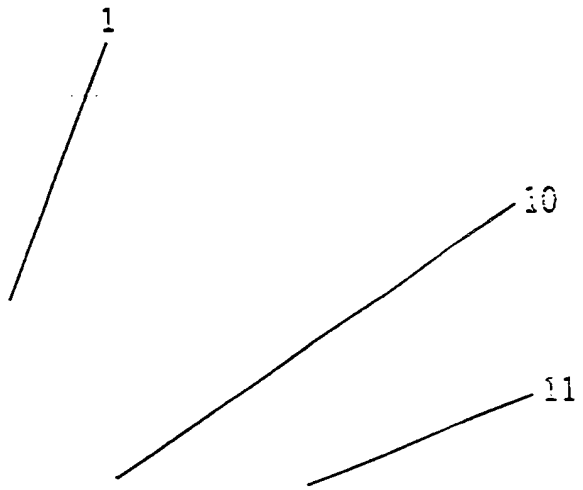


图 8

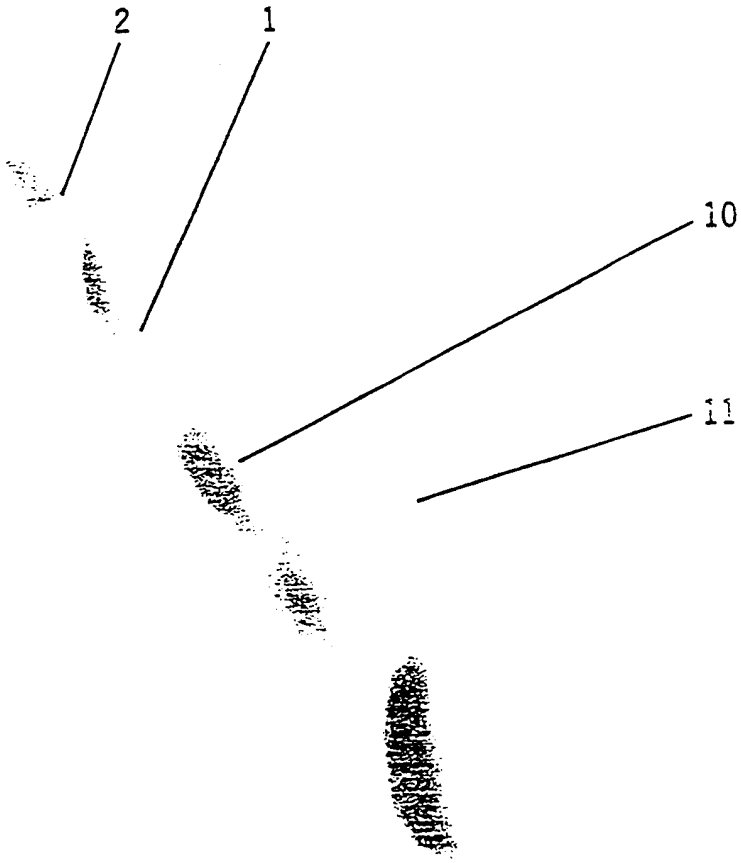


图 9

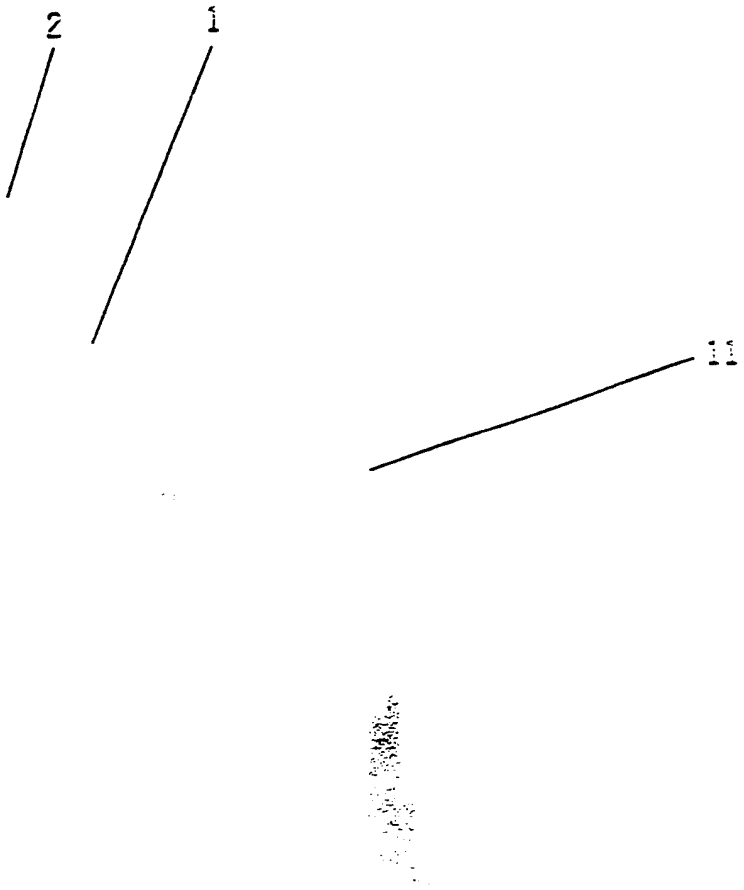


图 10



图 11

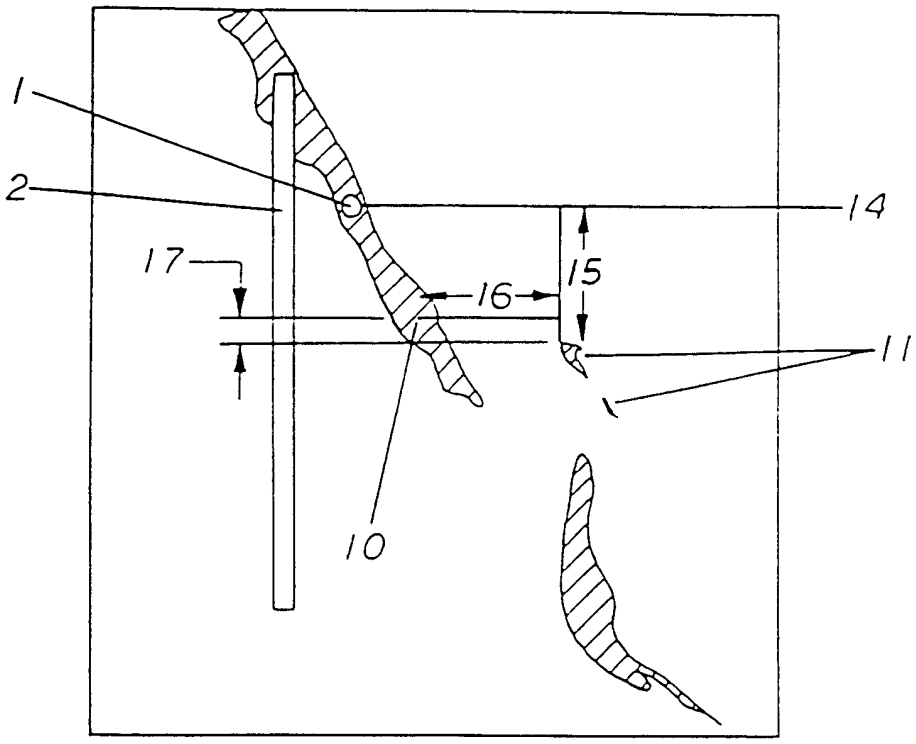


图 12

图 13

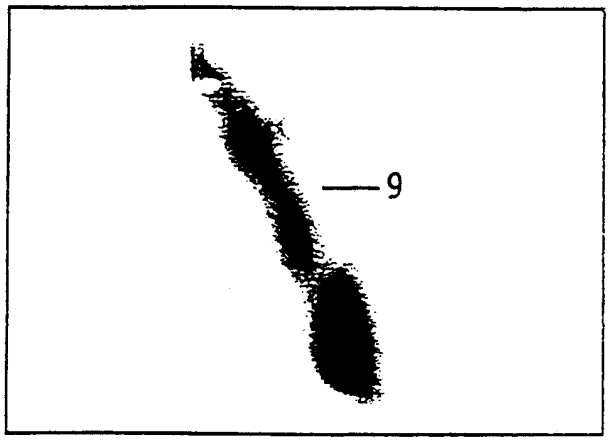


图 14

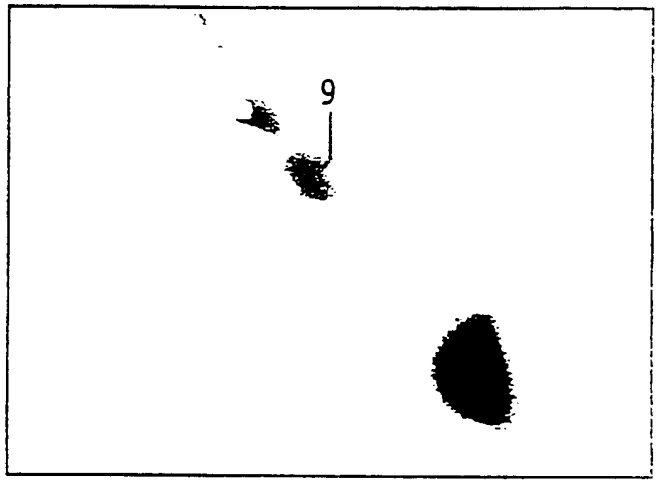


图 15

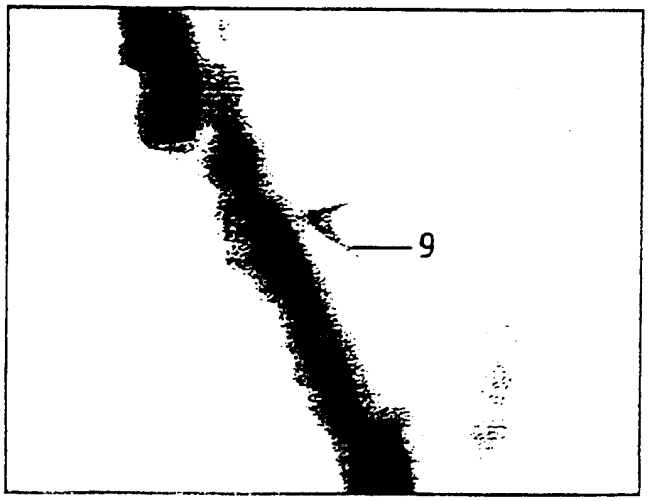


图 16

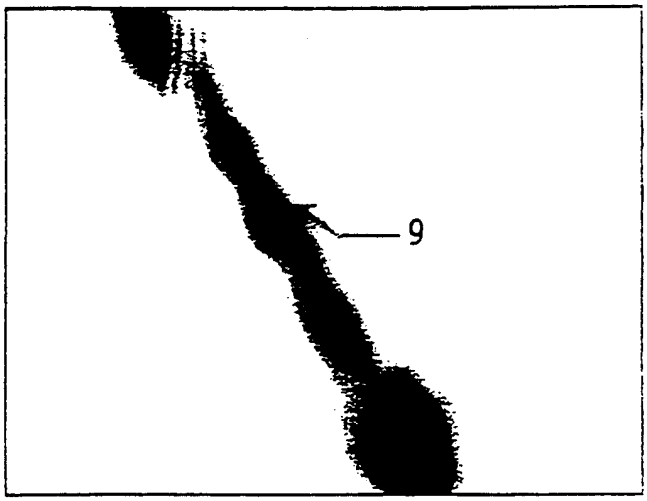


图 17

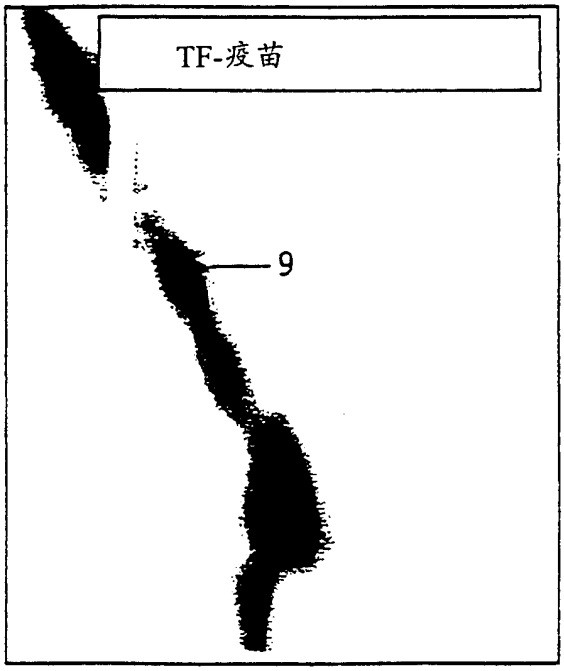


图 18

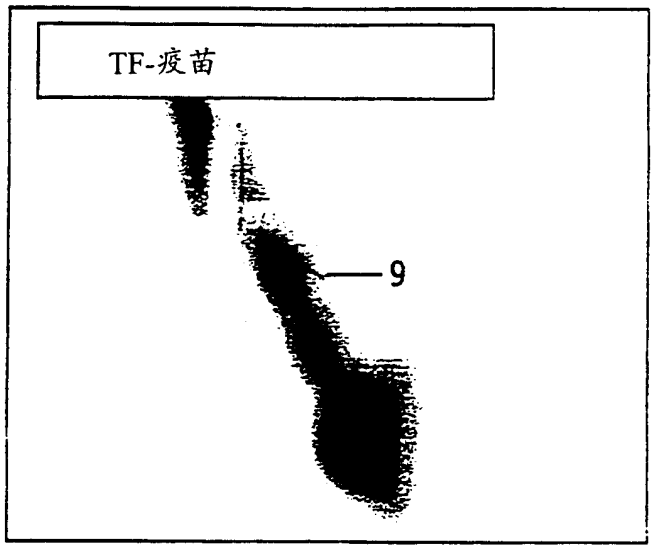


图 19

