

1. 一种肽,其可通过 1995 年 2 月 23 日以保藏号 I-1542 保藏在国立微生物保藏中心(CNCM) 的 HIV-1-0_(DUR) 组病毒的核苷酸序列表达获得,其包含至少 4 个连续的氨基酸,其整个序列包含在图 9B 所示的 gp41 的优势免疫区序列中。

2. 根据权利要求 1 所述的肽,其被抗体识别,所述抗体特异性地识别以下的至少一个:

RLLALETLMQNQQL(17);

LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG(18);

CRGKAI(19);

SVQWN(20);

RLLALETLMQNQQLLNLWGCRGKAICYTS(21);或

QNQQLLNLWGCRGKAICYISVQWN(22)。

3. 按照权利要求 1 的肽,其包括序列 a)RLLALETLMQNQQL(17)、b)序列 LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG(18)或 c)这一肽的部分,所述肽包含:c1)序列 CRGKAI(19)、c2)或序列 SVQWN(20)或者 c3)序列 SVQWN,其中 Q 被不同于 K 的氨基酸取代,或者 c4)选自 c1)和 c2)或 c3)的序列。

4. 按照权利要求 3 的肽,其特征在于包含至少 8 个氨基酸的其 N-末端序列免疫学上不被抗序列 RILAVERY 所形成的抗体识别,所述序列包含在 HIV-1-LAI 毒株的 gp41 的优势免疫区中。

5. 按照权利要求 3 的肽,其特征在于其不被抗 HIV-1-LAI 毒株之肽 SGKLIC 所形成的抗体识别。

6. 按照权利要求 1 的肽,其特征在于其包含以下两个序列中的一个:

RLLALETLMQNQQLLNLWGCRGKAICYTS(21),

QNQQLLNLWGCRGKAICYTSVQWN(22)。

7. 权利要求 1 的肽,包含选自 RL*ALET、QNQQ、LWGC、CYTSV 和 WN*TW 中的数个区域,其中 * 代表任一氨基酸。

8. 选自权利要求 3 的肽 (17)、(18)、(19) 和 (20) 的肽用于制备在所述生物样品与所述组合物接触后在生物样品中辨别由 HIV-1 0 型 DUR 逆转录病毒引起的感染和由另一种 HIV-1 0 型逆转录病毒引起的感染的组合物的用途。

9. 特异于权利要求 1-7 中任一项所定义的肽的任一序列的单克隆抗体。

10. 权利要求 9 的单克隆抗体,其特异于肽 (17)-肽 (20) 中任一个的序列。

11. 含有编码权利要求 1-7 任一项的肽之序列的核酸。

12. 权利要求 11 的核酸,含有编码肽 (17)-肽 (20) 中任一个的序列。

13. 权利要求 11 或 12 的核酸,其由示于图 12 的序列组成。

14. 包含根据权利要求 11 至 13 之任一项核酸的载体。

15. 按照权利要求 14 的载体,其特征在于该载体是一种质粒。

16. 一种质粒,其选自 1995 年 2 月 24 日以保藏号 I-1548, I-1549 和 I-1550 保藏在 CNCM 的那些质粒。

17. 一种细胞,其含有权利要求 11-13 之任一项的核酸或权利要求 14-16 任一项的载体。

18. 1995 年 2 月 23 日以保藏号 I-1542 保藏在 CNCM 的病毒。

19. 权利要求 18 定义的病毒的基因组 RNA。

20. 用于体外检测针对 HIV 抗体的试剂盒,该试剂盒包含至少一种按照权利要求 1 到 7 任一项之肽。

21. 按照权利要求 20 的试剂盒,其至少包含:

a) 来自不同于 HIV-1-0 DUR 的 HIV 株的肽或多肽;或,

b) 根据 a) 的肽或多肽,其中一个或多个氨基酸已被其它氨基酸替换,前提是所得肽或多肽保持其与根据 a) 的肽或多肽之抗血清的反应性。

22. 按照权利要求 21 的试剂盒,其特征不在于所说的不同的 HIV 毒株是 HIV_{LAI} 毒株。

23. 一种用于体外诊断由于权利要求 18 所述病毒感染的肽组合物,所述组合物含有至少一种权利要求 1-7 任一项的肽。

24. 一种致免疫组合物,其特征不在于其含有与用于构建疫苗之药学可接受的载体相结合的至少一种权利要求 1-7 中任一项的肽。

25. 权利要求 1-7 任一项的肽用于制备在生物学样品接触组合物后体外检测所述生物学样品中抗 HIV-1 抗体的组合物的用途。

26. 一种产生权利要求 1-7 中任一项的肽或多肽的方法,其特征不在于所述肽或多肽的获得是通过:

- 表达权利要求 11-13 中任一项的核酸;
- 或者化学合成,将氨基酸加入以获得完整多肽或肽。

27. 一种寡核苷酸,其具有由来自以下核苷酸序列之一的至少 8 个连续核苷酸组成的序列:

5' -ATT CCA ATA CAC TAT TGT GCT CCA-3'

5' -AAA GAA TTC TCC ATG ACT GTT AAA-3'

5' -GGT ATA GTG CAA CAG CAG GAC AAC-3' 或

5' -AGA GGC CCA TTC ATC TAA CTC-3'

28. 权利要求 27 的寡核苷酸用于编码权利要求 1-7 中任一项肽的核苷酸序列基因扩增的用途。

29. 权利要求 27 的寡核苷酸用于制备在由生物样品中包含的 RNA 形成的 cDNA 与组合物接触并进行所述 cDNA 基因扩增后检测所述生物样品中包括权利要求 18 的病毒在内的 HIV 逆转录病毒特征性序列存在与否的所述组合物的用途。

30. 病毒裂解物,其是通过裂解由按照权利要求 18 的病毒感染之细胞获得的。

31. HIV-DUR 毒株的蛋白质提取物,包含权利要求 1 到 7 任一项之抗原肽。

32. 权利要求 7 的肽在制备用于体外诊断生物样品中特异性地由 HIV-1 型 0 组逆转录病毒引起的感染的制剂中的用途,其中所述的生物样品可能含有所述逆转录病毒感染后产生的抗体。

HIV-1 O 组（或亚组）逆转录病毒抗原的核苷酸序列

[0001] 本发明涉及通过表达核苷酸序列或通过化学合成（例如采用 Applied Biosystems 牌合成仪）获得的存在于 HIV-1 O 组（或亚组）变体中的抗原，更具体地说是相应于可以从病毒颗粒分离的抗原的那些抗原。

[0002] 本发明也涉及由这些抗原诱导的单克隆或多克隆抗体。

[0003] 本发明也涉及具有类似于或互补于以上提及的病毒基因组 RNA 之序列的克隆 DNA 序列。本发明也涉及制备这些克隆 DNA 序列的方法。本发明还涉及包含由所述克隆 DNA 序列编码的氨基酸序列的多肽。

[0004] 此外，本发明涉及以上提到的抗原在某种形式的艾滋病高危个体中体外检测上的应用，这些抗原中的某些在产生针对这种逆转录病毒的致免疫组合物和免疫接种组合物上的应用。类似地，本发明涉及以上提到的抗体在相同目的上的应用，这些抗体中的某些在产生用于抗这一人类艾滋病之医药产品的活性物质上的应用。

[0005] 本发明也涉及克隆 DNA 序列和从这些序列获得的多肽在诊断试剂盒中作为探针和基因扩增引物上的应用。

[0006] 本发明也涉及抗原组合物，该组合物可以由化学合成或重组细胞宿主表达获得，其使得可以诊断由 HIV-1 或 HIV-2 亚型不依赖性 HIV 型人逆转录病毒引起的感染。这种组合物包含至少一种选自与 HIV-1、HIV-2、HIV-1_(DUR) 和 HIV-1_(VAU) 病毒相同的抗原肽或者具有类似致免疫特征的所述抗原肽的变体。

[0007] 本发明也涉及这样一种组合物，其使得可以特异性地诊断由 HIV-1 型（更具体地说是 HIV-1 M 组）、HIV-2 或 HIV-1 O 组（或亚组）逆转录病毒引起的感染，它包含至少一种对 HIV-1 病毒特异性的抗原肽、对 HIV-2 病毒特异性的抗原肽和对 HIV-1 O 组（或亚组）病毒特异性的抗原肽或者具有类似致免疫特征的这些抗原肽的变体。更具体地说，所述的抗原肽来源于 HIV-1 M 组和 HIV-2 和 HIV-1 O 组（或亚组）病毒的包膜蛋白。

[0008] 此外，本发明涉及这样一种肽，基于（特别是基于）发现新 HIV-1 毒株：HIV-1 DUR，这种肽使得可以检测抗-HIV 抗体，现有技术的肽总是不使检测所述的肽成为可能。针对它的抗血清与现今使用的共有 HIV 肽总是不具有反应性。术语“共有 HIV”指分离物之间保守的区，其阐明对设计诊断试剂或疫苗是必需的，并且其突变赋予对抗病毒医药产品的抗性。本发明中使用的术语“肽”定义为寡核苷酸和多肽两者。

[0009] 现有技术状态

[0010] 在 LAS 或 AIDS 发展中起作用的两种类型的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 已被分离并确定特征。被称为 LAV-1 或 HIV-1 的第一种病毒已被分离，并且在英国专利申请 8324,800 和欧洲专利申请 84401,834(14/09/1984) 中有描述，该病毒也由 F. Barrie-Sinoussi 等在科学 (1983), 220, 868-871 中描述。

[0011] 2 型 HIV 逆转录病毒属于不同的类别，与 1 型 HIV 逆转录病毒仅有有限的免疫学关系。HIV-2 逆转录病毒在欧洲专利申请 87,400,151,4(公开号 239,425) 中已有描述。

[0012] HIV-1 逆转录病毒是最普遍的，其存在在世界上几个地区占优势。就 HIV-2 而言，最多的是在西非发现，尽管 Grez 等 ((1994) 病毒学杂志, 68, 2161-2168) 最近报道了其在这

一地区之外传播。

[0013] 灵长类免疫缺陷慢病毒属（包括 1 型和 2 型人免疫缺陷病毒以及几种类型的非人灵长类病毒）的总数数量上和复杂性上逐渐增加。这些病毒的最普遍的 HIV-1 当前以在世界范围内流行的方式传播，产生最大的公共卫生问题。在这种病毒的鉴别和分子特征确定之后不久，其被认识到是高度可变的，目前包括若干亚型（Myers, 1994, Louwagie 等, 1993, Louwagie 等, 1992, Myers, G. (1994) 在人类逆转录病毒和爱滋病 1994 中的 HIV-1 亚型系统树；Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F. 和 Pavlakis, G. N., Eds. Los Alamos 国家实验室, Los Alamos, NM. III-2-III-9)。这种亚型的分型主要基于 gag 和 env 的差别。至少已鉴别出 6 种亚型，指定为 A 到 F，但在基于 HIV-1 分离物的正在进行的广泛的世界范围的调查中很可能还出现几种亚型。业已发现这些各亚型在被成为星号（star）系统发育的系统发育轮廓上是相互等距离的。这表明各 HIV-1 亚型可能已进化并且同时区别于共同的祖先。

[0014] 前不久，HIV-1 病毒这一组的 2 种不同的病毒被分离并确定特征。这两种病毒是从生活在非洲中西部的喀麦隆的病人中获得的（Gurtler 等, 1994, Vanden Heasevelde 等 1994）。它们的序列，更具体地说是它们的 env（包膜）基因的序列，清楚地显示这些病毒属于 HIV-1 相关病毒的一个不同的类别。称为 HIV-1 0 组（Nkengasong 等, 1993）。

[0015] 然而，这一 HIV-1 相关病毒组内的分离物的差别是未知的，其在非洲之外的扩散未见报道。

[0016] 开发 HIV 血清学检验中的总的要点是避免假阳性或假阴性结果 - 同时保持或改善以前的试验所具有的血清反应阳性性检测的敏感性。

[0017] 在发现 HIV-1-0 变体之前，基于采用共有肽（基本上得自“env”基因）的试验被认为是揭示假阴性结果之可能性的近乎理想的解决办法（基因组克隆和高趋异进化非洲人免疫缺陷病毒分离物的全序列分析，病毒学杂志, 1994 ;68 :1586-96 ;来源于喀麦隆的人免疫缺陷病毒 1 型的新亚型（MPV-5180），病毒学杂志, 1994 ;68 :1581-85）。

[0018] 某些用“env”肽抗原的试验的非反应性（然而在病人中表现出（有时在它们之前）某种艾滋病临床综合病症特征或淋巴结病综合病症）有时归因于 HIV-1-0 组感染（在 HIV-1 0 亚型感染病人中的 HIV-1/HIV-2 血清学反应阴性性，Lancet, 1994 ;343 :1393-94 ;瑞士的新 HIV-1 亚型，Lancet 1994 ;344 :270-71）。

[0019] 发明描述

[0020] 本发明的目的是为诊断实验室提供一种手段，具体说来是一种特异性肽，其使得可以检测迄今不能检测的抗 HIV 抗体。本发明也涉及从 HIV-1 DUR 获得的肽混合物和从其它 HIV 获得的相应的肽的混合物，以避免潜在的“假阴性”结果。

[0021] 此外，本发明涉及在生物样品中检测和辨别 HIV-1-M 型逆转录病毒特征性抗体和 HIV-1 0 组（或亚组）逆转录病毒特征性抗体的方法。

[0022] 本发明基于在一个血清学反应阳性女性（曾在喀麦隆逗留，表现出非典型的血清学反应性）上在几个筛选 HIV 感染的试验（这些技术已被“Western 印迹”技术证实）中的观察结果。

[0023] 考虑到这一非典型的血清学反应性，特别是即使修饰 0 型也缺乏对某些第三 - 产生试验的反应性，本发明的发明人认为进行这一 HIV-1 DUR 毒株基因组某些部分（更具体

地说是 GAG 和 ENV 基因) 测序是有益的。

[0024] 然而, 利用从 M 组获得的引物和从 O 组获得的已知引物经 PCR 成功地进行了 gp120 的 V3 环的编码部分和 gp41 的优势免疫区的基因扩增。仅 GAG 区可以用现有技术已知的引物 (Loussert-Ajaka I, Lancet 1994 ; 343 : 1393) 扩增。因此, 本发明的另一个目的是确定能够解决这一问题的引物。

[0025] 测定了糖蛋白 gp41 和 gp120 的部分序列, 也测定了来源于淋巴细胞 DNA 以及病毒的培养物的衣壳蛋白质 (GAG 基因), 结果表明这一 HIV-1_{DUR} 毒株部分属于 HIV-1-O 组, 其与 M 组 (更具体地说是与 gp41 和 gp120) 有很大的不同。

[0026] 这样, 有可能说明 (更具体地说是说明 HIV-1_(DUR) GAG 序列) 在几个区 O 组共有序列的存在, 其不同于相同区的 M 组共有序列。

[0027] 在包含有 PST1 位点的 Bluescript[®] 质粒中进行 GAG、gp41 和 gp120 片段的编码序列。按照采用 T3 和 T7 通用引物的标准技术或者经采用先前扩增的引物直接测序来克隆扩增产物。然后, 所述序列用应用生物系统 373A 自动测序仪 (ESGS Montigny le Bretonneux, 法国) 测定。

[0028] 在本发明中, 发明人已从 O 组分离物 HIV-1_(VAU) 分离 env 基因并测序, 所说分离物是从从未离开过欧洲的并于 1992 年死于艾滋病的法国病人获得的。按照其包膜序列, HIV-1_(VAU) 与两种最近确定特征的喀麦隆病毒 HIV_{ANT70} 和 HIV_{MVP5180} 相关。env 基因的系统发育分析揭示三种病毒看来似乎构成一个单独的组, 本文称为 HIV-1 O 组。HIV-1_(VAU) 从这一病人分离也表明 HIV-1_(VAU) O 组的传播范围已在非洲之外发生。

[0029] HIV-1_(VAU) 病毒的分离

[0030] HIV-1_(VAU) 病毒是 1992 年从 41 岁患艾滋病的法国病人中分离到的。这一病人在 1986 年表现出严重的与子宫颈癌相关的无色中性白细胞减少 (leuconeutropenia)。然而她逐渐表现出机会感染的症状, 循环 CD4⁺ 数量较低, 其 1992 年死于艾滋病。1990 年首次用 ELISA (Elavia, SanofiDiagnostics Pasteur 和 Abbott 试验) 检测抗 HIV-1 抗体。

[0031] 该病人从未离开过欧洲, 没有静脉内使用过医药产品, 也没有接受过任何已知的血液输注。没有已辨明的非洲来源的性伙伴。她于 1971 年生下一个健康的孩子, 但 1980 年生下的一个儿子在很能说明新生期艾滋病的疾病临床发作后在 1 岁时死亡。其 1983 年出生的第三个孩子和其丈夫目前健康状况良好, 未被感染。

[0032] 按以下方式进行病毒的分离: 用涂上一层 I O T8 抗体 (Immunotech) 的小珠除去在病人 PBMCs (外周血淋巴细胞) 中存在的 CD8⁺ 细胞。用植物血细胞凝集素刺激这些余下的 PBMCs, 然后, 与从健康供体获得的 CD8⁻ 缺失 PBMCs 一起共培养, 并用植物血细胞凝集素刺激。通过测定上清液的逆转录酶 (RT) 活性和经 HIV-1p24 的 ELISA 试验 (由 DuPont 推向市场的诊断试剂盒) 监测共培养中的病毒生长。从初级共培养获得的病毒进行 CD8⁻ 缺失和植物血细胞凝集素 - 刺激 PBMC 培养物中的几次继代移植。进行了用 HIV-1_(VAU) 感染各种转化的细胞系的几种尝试, 所说细胞系包括 MT4 细胞 (Harada 等, 1985) 和 CEM 细胞 (Rey 等, 1989) 以及 HeLa-CD4-LTRlacZ 细胞系 P4-2, (Clavel 和 Charneau 1994)。

[0033] HIV-1_(VAU) 的生物学特征

[0034] 在与健康供体的类似细胞一起共培养病人的 CD8⁻ 缺失, 植物血细胞凝集素 - 刺激 PBMCs 两周后, 以 RT 活性高峰的形式在培养物上清液中检测病毒的产生。然后可以将这一

病毒在 CD8⁻ 缺失, PHA⁻ 刺激的正常的 PBMCs 上进行系列继代移植。在图 1 中, 图 1A 代表在感染 PBMC 培养物上清液中 HIV-1_(VAU) 的产生, 其由 RT 试验 (实心圆圈) 和 HIV-1p24 抗原俘获 ELISA (空心圆圈) 检测。HIV-1p24 的浓度以毫微克 / 毫升表示, RT 活性以 cpm/μl 表示。在图 1B 中, 用从艾滋病患者获得的初级 HIV-1 分离物进行相同的实验。

[0035] 尽管 HIV-1_(VAU) 的生长可容易地被 RT 试验检测, 但经 HIV-1p24ELISA (DuPont) 在培养上清液中检测病毒实质上具有较低的灵敏度。图 1 显示了用 HIV-1_(VAU) 和来源于艾滋病患者的初级 HIV-1 分离物的 PBMCs 的有效感染的轮廓之间的比较结果。就等量的颗粒而言, 在所试验的上清液中用 RT 活性试验检测时, 在 HIV-1_(VAU) 的情况下与在其它 HIV-1 分离物的情况下比较, 约少 25 倍的 p24 被检测到。这种不同可能是由于单克隆抗体对 HIV-1p24 是特异性的, 该抗体用于涂覆在 ELISA 平板上, 对 HIV-1_(VAU) gag 产物仅具有弱的亲和性。

[0036] 进行了在对 HIV-1 敏感的转化的人类 T 细胞系上繁殖 HIV-1_(VAU) 的几种阴性尝试。具体地说, 由 HIV-1 (VAU) 感染的 PBMCs 和 MT4 细胞或 CEM 细胞的共培养物不导致病毒的繁殖。也发现这一病毒不能感染携带有 lacZ 基因 (可由 tat 基因诱导) 的 CD4⁺HeLa 细胞 (P4-2) (Clavel 和 Charneau1994)。同样地, 在来源于几种黑猩猩的活化的外周血淋巴细胞中不能检测到 HIV-1_(VAU) 的复制。

[0037] HIV-1_(VAU) 包膜序列的分析 (稍后将详尽地描述) 和与前不久所描述的两种喀麦隆分离物的序列的比较表明, 所有三种病毒都属于 HIV-1 相关病毒的相同的组。此外, 这一比较表明, 这三种病毒变体相互大约是系统发育等距离的。因而, 三种病毒变体其自身各自构成它们的组的不同亚型, 现在被称为 HIV-1 0 组。这一组不同于迄今所鉴别的其它 HIV-1 分离物的组 (发明人在此称为 HIV-1 M 组)。

[0038] 这一新组的出现产生了它的起源问题: 0 组是从 M 组病毒进化的吗 (或相反) 或者各组具有不同的历史吗? 发明人认为, 迄今 M 组和 0 组具有类似的趋异轮廓, 很可能它们各自相应于不同人群中的不同病毒祖先的趋异进化。从目前可获得的系统发育和病毒学数据不可能估计两组的祖先是天然地影响人的还是从其它物种引入到人类的。仅类似于存在在非人灵长类中的 HIV-1 的病毒是 SIVCPZGAB 分离物 (Huet 等, 1990), 其是从明显天然感染的黑猩猩分离的, 明显不同于 M 组和 0 组两者, 没有其人类等同物被发现。0 组病毒不可能是最近从黑猩猩病毒进化来的, 因为 HIV-1_(VAU) 在黑猩猩淋巴细胞中的复制没有取得成功。

[0039] 为什么 0 组的流行仅出现在 M 组之后 15 至 20 年? 有三种可能的解释: 首先, 0 组病毒的祖先进入人类被认为比 M 组更近期地出现; 其次, 由于在其来源区域的社会条件不同, 与 0 组比较, 可能 M 组可以更早地扩散; 第三, 与 M 组病毒比较, 0 组病毒可能具有较低的传播能力。业已提出这种性质解释了 HIV-2 不出现明显世界范围的传播, 感染宿主中 HIV-2 较小的病毒荷载与降低的传播性相关联 (DeCock 等, 1993)。在这一点上, 虽然在由 HIV-1 0 组感染患者中有关病毒荷载没有可供使用的数据, 但是这些病毒的致病性没有显示出与 HIV-1 的不同。与从其中获得 HIV_{MVP5180} 0 组分离物的病人一样, 从其中分离 HIV-1_(VAU) 的病人死于艾滋病。

[0040] 然而, HIV-1_(VAU) 病人感染的历史仍然不清楚, 但是, 如她的第二个孩子患有类似于艾滋病的综合病症所提示的, 有若干线索说明这一病人在 1980 年之前被感染。

[0041] 本发明涉及 HIV-1_(VAU) 病毒或任何 0 组等价病毒的核酸序列的任何变体, 包括具有与被 env 基因编码的结构蛋白质相同的免疫学性质的结构蛋白质, 所说基因具有图 6 所描

述的序列,被称为"vau",也被指定为图6所示的序列。

[0042] 本发明也涉及一种组合物,该组合物包含按照本发明任何抗原或按照本发明的抗原的混合物以及得自一种或多种 HIV-1 0 组病毒或得自其它变体病毒的提取物,和另一方面得自一种或多种 HIV-2 和 / 或 HIV-1 病毒的提取物,另一方面这些组合物可以是可以不是标记的。采用任何类型的合适的标记(酶,荧光,放射性等)是可能的。

[0043] 核酸

[0044] 本发明涉及 DNA 或者 DNA 片段,更具体地说涉及可以从 RNA, cDNA 或可以用于 PCR 或其它基因扩增方法的引物获得的克隆 DNA 和 DNA 片段,来源于 HIV-1_(VAU) 逆转录病毒 RNA 或 DNA 的克隆 DNA 和 DNA 片段。本发明更具体地说涉及所有等同 DNA,特别是涉及具有同源源于 HIV-1_(VAU) DNA 的序列,特别是具有编码 HIV-1_(VAU) 毒株 env 区之序列(包括相应于称为"vau"的以图6代表的图6所示的序列的序列)的任何 DNA。与 HIV-1M 组的同源性至少等于 50%,优选的等于 70%,更优选的等于约 90%。总的来说,本发明涉及能够与 0 组 HIV-1 逆转录病毒 DNA 或 RNA 杂交的等价 DNA(或 RNA)。

[0045] 本发明也涉及相应于以上所限定的 DNA 序列的 RNA 序列。

[0046] 本发明也涉及 HIV-1_(VAU) 病毒整合酶基因,其包括由名称图7所限定的序列或与图7所示的序列杂交的序列。本发明也涉及相应于以上所述 DNA 的 RNA。

[0047] 本发明的主题也是一种组合物,其包含被以上提到的 DNA 或 DNA 片段所编码的肽或多肽。

[0048] 衍生自 VAU 序列或者是衍生自 HIV-1_(VAU) 病毒整合酶基因的寡核苷酸,特别是包含至少 9 个核苷酸的寡核苷酸,可以用于在生物样品,细胞培养物或者细胞抽提物中用 PCR 技术或任何其它基因扩增技术检测 0 组 HIV-1 病毒 DNA 或者 RNA 序列。这些序列可以用作基因扩增引物或用作特异性检测基因扩增产物的探针。也可以用作杂交探针的是扩增产物或者它们相应的从化学合成(应用生物系统)获得的合成序列。

[0049] 本发明也包括可以在杂交反应中用作探针和可以在高度严格杂交条件下与 HIV-1_(VAU) 变体的部分基因组反应的至少 100 个核苷酸的任何片段。HIV-1_(VAU) env 基因的克隆和测序

[0050] 就 HIV-1_(VAU) DNA 的初始的 PCR 扩增而言,从由 HIV-1_(VAU) 感染的 PBMCs 提取总 DNA,用以下简并引物扩增 pol 基因区段:

[0051] 引物 4506 :5 AGTGGAT(A/T)(T/C)ATAGAAGCAGAAGT 3 ;Seq ID No. 1 ;

[0052] 引物 5011 :5 ACTGC(C/T)CCTTC(A/C/T)CCTTTCCA 3 ;Seq ID No. 2 ;

[0053] 反应介质包含 50mM KCl, 10mM Tris-KCl(pH 值 8.9), 1.5mM MgCl₂, 0.1 毫克 / 毫升明胶, 0.2mM dNTP, 1U 尾端聚合酶 (Amersham)。PCR 进行 43 个热循环,在 92℃ 10 秒钟, 50℃ 1 分钟, 72℃ 40 秒钟。

[0054] 形成的扩增产物被克隆进 pBluescript 载体,产生克隆 ph4,其特征在于 1994 年 10 月 20 日以保藏号 I-1486 保藏在 CNCM,接着将其用作探针,筛选低分子量 DNA 的 λ 文库,其是用 EcoRI 消化并且是从由 HIV-1_(VAU) 感染的细胞获得的。简言之,由 HIV-1_(VAU) 感染的 PBMCs 与用植物血细胞凝集素刺激的新 PBMCs 一起并且在排除 CD8⁺ 细胞下共培养 24 小时。此后可见高的细胞致病作用 (CPE)。然后按照 Hirt 的方法 (Hirt1967) 提取低分子量 DNA,以酶 EcoRI 消化。这一 DNA 的以前的 Southern- 印迹确实显示 HIV-1_(VAU) 基因组仅

包含 EcoRI 位点,允许克隆代表整个病毒基因组的非整合环状 DNA 物种。将所形成的消化产物进行凝胶电泳,将大小约 8-12kb 的 DNA 片段群纯化,并连接于 EcoRI- 消化的 λ Zap DNA (Stratagene)。在衣壳化后,平板接种并经采用 ^{32}P - 标记的 ph4DNA 的杂交筛选,克隆 λ H34 被鉴别为阳性并扩增。纯化 EcoRI 插入物,超声处理,并经 "shotgun" 技术克隆进磷酸酶 - 处理的以酶 SmaI 消化的载体 M13mp18。所获得的 150 个克隆在 373A DNA 测序仪 (应用生物系统) 中测序,采用威斯康星 GCG DNA 分析包将所形成的序列装配进单一序列。

[0055] 这种序列分析揭示了在读框中的许多无意义的密码子,其很好地说明超变基因组 (Vartanian 等,1991)。这一序列是不稳定的,因而决定经 PCR 扩增 HIV-1_(VAU) env 基因,扩增中采用由 HIV-1_(VAU) 感染的 PBMCs 的总 DNA 和源于序列 λ H34 的寡核苷酸引物:

[0056] 引物 TH2 5' GCTCTAGATGGGGATCTCCCATGGCAGG 3' Seq ID No. 3;

[0057] 引物 UH2 5' GCTCTAGATCAGGGAAGAATCCCTGAGTGT 3' Seq ID No. 4。

[0058] PCR 扩增进行 35 个热循环,在 92°C 15 秒钟,52°C 1 分钟,60°C 2 分钟,72°C 2 分钟。形成的大小 3.5kb 的扩增产物被克隆进 M13mp18 载体并经后续反应测序,首先采用 M13 通用测序引物,然后采用从上游序列推断的引物。用威斯康星 GCG DNA 分析包分析核苷酸和肽序列。HIV-1_(VAU) env 基因总共编码 877 个氨基酸,包括信号肽。HIV-1_(VAU) env 基因的核苷酸序列相应于图 6 所示的序列 (参见图 3)。

[0059] 核酸作为探针的用途

[0060] 本发明也涉及 DNA, cDNA 或者其片段,以及包含这些片段的重组质粒或其它等同载体作为探针的用途,所说探针用于在从怀疑携带 HIV-1_(VAU) 病毒的患者获得的血清样品或其它生物体液或组织中检测 HIV-1_(VAU) 病毒的存在与否。这些探针可以是标记 (放射性,酶或荧光标记等) 的。在实施检测 HIV-1_(VAU) 病毒或 HIV-1_(VAU) 变体的方法上特别有价值的探针的特征可以是它们包含全部或部分 DNA,所说 DNA 互补于 HIV-1_(VAU) 病毒基因组或者包含在各种克隆中的特定的片段。包含所有或部分 env 区的 HIV-1_(VAU) cDNA 片段将被特别提到。

[0061] 用于这一检测 HIV-1_(VAU) 病毒之方法中的或者诊断试剂盒中的探针不以任何方式限制在前面所描述的探针。它们包括从 HIV-1_(VAU) 病毒或 HIV-1_(VAU) 变体或者结构类似的病毒获得的所有核苷酸序列,其前提是它们使得可以采用来自很可能患有艾滋病的个体的生物体液经与 HIV-1_(VAU) 病毒 DNA 或 RNA 杂交检测 HIV-1 O 组病毒,特别是 HIV-1_(VAU)。

[0062] 特别有利的是这样一些探针,当与 HIV-1 杂交时,它们给出与属于 O 组的 HIV 的强的反应和与属于 M 组的 HIV 的弱的反应。非限制性的例子是,从 HIV-1 病毒整合酶基因序列 (图 7 所示) 构建的探针在杂交条件下 (例如专利 EP178978 中所描述的那些) 与 HIV-1 杂交时,给出与 O 组 HIV 强的反应和与 M 组 HIV 弱的反应。

[0063] 所说的检测可以以任何已知的方式进行,所说方式尤其是:

[0064] 通过把这些探针与从包含在生物体液 (例如脊髓液,唾液等) 中之细胞获得的核酸接触或者与这些体液本身 (只要它们的核酸已经能用于与这些探针杂交) 接触,这一接触是在允许这些探针和这些核酸之间杂交的条件之下进行的,

[0065] 和通过检测可能产生的杂交。

[0066] 以上提到的牵涉杂交的诊断也可以采用分别得自 HIV-1_(VAU)、HIV-1 和 HIV-2 的探针混合物完成,只要不必区分所需 HIV 病毒型。

[0067] 包含编码 HIV-1 包膜蛋白质之序列的表达载体和包含编码所述的整合酶的表达载体也是本发明的主题。

[0068] 本发明包括用于在从很可能携带 HIV-1_(VAU) 病毒的患者获得的血清样品或其它生物体液或组织中检测 HIV-1_(VAU) 病毒的存在与否的组合物。这些组合物的特征是它们包含至少一种从得自或源于 HIV-1_(VAU) 病毒基因组（特别是包含 HIV-1_(VAU) 病毒或 HIV-1_(VAU) 变体 env 蛋白质编码区或编码区部分的 HIV-1_(VAU) DNA 片段）的核苷酸序列获得的探针。

[0069] 有利地是，以上所描述的组合物也包含从源于 HIV-1 或 HIV-2 的核苷酸序列获得的探针。

[0070] 其它诊断组合物包含本发明的引物，所述引物可以用于 O 亚组逆转录病毒或这些逆转录病毒变体的基因扩增。

[0071] 抗原，尤其是蛋白质和糖蛋白

[0072] 本发明涉及 HIV-1 O 组（或亚组）逆转录病毒蛋白质，或者包含至少一部分所述蛋白质的天然或合成肽或多肽，其能够被可以从血清分离的抗体识别，所述血清是在由 HIV-1 O 组 VAU 毒株或者 HIV-1 O 组 DUR 毒株感染后获得的。

[0073] 本发明涉及由包含相应于图 6 所示的序列的基因编码的 HIV-1_(VAU) 逆转录病毒的外包膜蛋白。按照本发明优选的实施方案，这一蛋白质的特征还有它包含相应于 Seq ID No. 102 的图 3 所示的氨基酸序列并包含氨基酸残基 1 到 526。得自所述序列具有可以被 HIV-1_(VAU) 病毒诱导的抗体识别的表位的任何多肽或肽也是本发明的主题。

[0074] 以上所提到的蛋白质可以以糖基化或者非糖基化的形式获得。

[0075] 包含氨基酸残基 527 和 877 之间的图 3 所示的氨基酸序列 Seq ID No. 102 的包膜跨膜蛋白质也是本发明的主题。在本发明范围内的这一跨膜蛋白质是糖基化或非糖基化形式的。

[0076] 本发明也涉及通过表达 HIV-1_(VAU) 基因组编码序列获得的并且具有等价于 HIV-1_(VAU) 的生物学性质的所有的抗原，尤其是蛋白质，糖蛋白，多肽或肽。倘若它们被相同的抗体（尤其是可以从由已感染 HIV-1_(VAU) 的病人获得的血清分离的抗体）识别，则这些抗原被说成是本发明范围内等价的。

[0077] 具体地说，化学合成的其氨基酸序列包含在 HIV-1_(VAU) 包膜蛋白质（其序列由图 3 代表）中的肽或多肽或者等价肽或多肽也是本发明的主题。

[0078] 其中也应当包括的是等价肽、多肽、蛋白质或糖蛋白、以上抗原的片段和经化学合成或基因工程方法制备的肽，只要它们与其所源于的抗原发生免疫交叉反应。换句话说，本发明涉及具有相同于或类似于以上提到抗原的表位并且能够被相同的抗体识别之表位的任何肽或多肽。后面这一类型的多肽的形成部分是相应于编码以上提到的多肽或抗原之 DNA 序列的 DNA 序列的表达产物。

[0079] 更具体地说，从 HIV-1_(VAU) 病毒获得的或者经基因工程或常规化学合成产生的并且是本发明的最大的目标的抗原是这样一些抗原，它们使得获得本发明的 HIV-1_(VAU) 病毒和 HIV-1 和 HIV-2 组病毒之间的明显区别成为可能。在这一点上，在 HIV-1_(VAU) 病毒包膜蛋白水平上以及 PM 蛋白质外蛋白优势免疫表位水平上已观察到大量的区别。明显地是 gag 和 pol 蛋白质比包膜蛋白表现出与 HIV-1 病毒更大的相似性。

[0080] 本发明也涉及相同于 HIV-1_(VAU) 包膜跨膜糖蛋白优势免疫区的肽或多肽。所述区

由图 3 所示。这个区的优选的多肽是,例如,包含序列 CKNRLIC 的那些或相应于这一序列的那些。它们也可以是相应于序列 RLLALETFIQNWLLNLWGCKNRLIC 或包含这一序列的肽或者多肽。

[0081] 以下由名称“VAU 肽”所限定的另一个更为优选的肽相应于以下序列或者包含这一序列或者包含这一序列的能够被针对 HIV-1_(VAU) 逆转录病毒之抗体识别的任何部分:R ARLLALETFIQNLQLLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT。

[0082] 这一序列的变体多肽是例如图 4 所示的 HIV-1_(MVP5180) 和 HIV-1_(ant70) 分离物的多肽。这些序列也可以经插入和 / 或缺失和 / 或取代 (例如经氨基酸残基的保守取代) 从上面的序列衍生。

[0083] 本发明涉及从 HIV-1-O_{DUR} 病毒 (于 1995 年 2 月 23 日以保藏号 I-1542 保藏在 CNCM) 获得的肽或者这样一些肽,由于氨基酸的取代,缺失或者添加,其序列不同于以上那些,但其保持以上各种的抗原特征。

[0084] 本发明的范围内的其它肽在下面限定。

[0085] 这样,本发明优选的肽是从 HIV-1-O_{DUR} 病毒获得的包含至少 4 个保守氨基酸的肽,所述的氨基酸包含在图 8 所示的 GAG 序列中或者免疫学上类似的 GAG 序列中,所述的免疫学上类似的序列被也特异性识别序列 AHPQQA, LWTTRAGNP (包含在图 8 的 GAG 序列中) 至少一个之抗体识别。

[0086] 优选地,这一肽包括氨基酸序列包含在以下序列之一中或相应的免疫学上类似的序列中的肽:

[0087] SPRTLNAWVKAVEEKA FNPEI IIPMFMA LSEGA (1)

[0088] MLNAIGGHQ GALQVLKEVIN (2)

[0089] GPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQI (3)

[0090] IPVGDYIRKWIVLGLNKMVKMYS PVSILDI (4)

[0091] QGPKEPFRDYVD RFYKTKLAE (5)

[0092] AHPQQA (5a)

[0093] LWTTRAGNP (5b)

[0094] 这一肽包含所述序列之一的至少 4 个连续的氨基酸。

[0095] 优选地这一肽包括氨基酸序列包含在以下序列之一中或相应的免疫学上类似的序列中的肽:

[0096] SPRTLNAWVK (6)

[0097] GSDIAGTTST (7)

[0098] QGPKEPFRDYVD RF (8)

[0099] 本发明特别优选的肽是包含氨基酸序列 NPEI (9) 或氨基酸序列 AVEEKA FNPEI IIPMFMA (10) 的肽,更具体地说是其氨基酸序列包含在以下序列之一中或相应的免疫学上类似的序列中的肽:

[0100] IGGHQ GALQ (23)

[0101] REPTGSDI (24)

[0102] 这一肽包含所述序列之一的至少 4 个连续的氨基酸,以及其氨基酸序列包含在以下序列之一中或相应的免疫学上类似的序列中的肽:

[0103] INDEAADWD (25)

[0104] 这一肽包含所述序列之一的至少 4 个连续的氨基酸。

[0105] 本发明涉及编码肽 (23), (24) 和 (25) 的核酸序列, 和编码免疫学上类型序列的核酸序列, 以及包含至少一种这些核酸的组合物。

[0106] 本发明也涉及至少一种这样的核酸在检测和辨别 HIV-1 M 组和 HIV-1 O 组毒株上的用途。

[0107] 一种得自以上所限定的 HIV-1-O DUR 病毒的肽也在本发明的范围内, 所述肽包含图 9 所示的 gp120 的 V3 环区序列或者从 HIV-1 O 组 (或亚组) DUR 病毒

[0108] 变体获得的免疫学上类似的序列的至少 4 个连续的氨基酸, 所说的免疫学上类似的序列被抗体识别, 这些抗体也特异性地识别以下序列的至少一个:

[0109] KEIKI (12),

[0110] EREGKGAN (13),

[0111] CVRPGNNSVKEIKI (14),

[0112] QIEREGKGANSR (15)。

[0113] 这一肽优选地包括:

[0114] a) 序列 CVRPGNNSVKEIKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAFC (11) 或这一序列的包含至少 4 个氨基酸的部分,

[0115] b) 或者氨基酸序列, 该序列不同于 a) 的序列之处在于, 在所述肽保持其与抗以上所说肽之抗血清的反应性的前体下, 其中的一个或多个氨基酸被两个氨基酸取代,

[0116] c) 或者氨基酸序列, 该序列不同于 a) 或 b) 的序列之处在于, 在所述肽保持其与抗 a) 的肽之抗血清的反应性的前体下, 其中的一个或多个氨基酸已被缺失或添加,

[0117] d) 或者相应的免疫学上类似的序列或者序列的一部分。

[0118] 这一肽包含以下序列也是优选的:

[0119] 序列 KEIKI (12), 或

[0120] 序列 EREGKGAN (13), 或

[0121] 序列 GPMAWYSM (16)。

[0122] 特别优选地是, 以上所限定的肽包含氨基酸序列 CVRPGNNSVKEIKI (14) 或序列 QIEREGKGANSR (15)。

[0123] 来自如上所限定的 HIV-1-O DUR 病毒的肽也在本发明的范围内, 所述的肽包含至少 4 个连续的氨基酸, 其整个序列包含在图 9 所示的 gp41 的优势免疫区序列中, 或者包含在从 HIV-1 O 组 (或亚组) DUR 病毒变体获得的免疫学上类似的序列, 所说的免疫学上类似的序列被抗体识别, 这些抗体也特异性地识别以下序列的至少一个:

[0124] RLLALETLMQNQQL (17),

[0125] LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18),

[0126] CRGKAI (19),

[0127] SVQWN (20),

[0128] RLLALETLMQNQQLLNLWGCRGKAICYTS (21),

[0129] QNQQLLNLWGCRGKAICYTSVQWN (22)。

[0130] 这样一种肽是优选的, 其包括序列 RLLALETLMQNQQL (17), 或

LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18) 或该肽的部分,所述肽包含:

[0131] a) 序列 CRGKAI (19) 或序列 SVQWN (20) 或者两者,其中 Q 合适地是被不同的氨基酸取代,然而其也不同于 K,

[0132] b) 或者氨基酸序列,该序列不同于 a) 的序列之处在于,在所述肽保持其与抗 a) 的肽之抗血清的反应性的前提下,其中的一个或多个氨基酸被两个氨基酸取代,

[0133] c) 或者氨基酸序列,该序列不同于 a) 或 b) 的序列之处在于,在所述肽保持其与抗 a) 的肽之抗血清的反应性的前提下,其中的一个或多个氨基酸已被缺失或添加,

[0134] d) 或者相应的免疫学上类似的序列或者序列的一部分。

[0135] 这一肽具有下列特征之一也是优选的:

[0136] - 包含至少 8 个氨基酸的其 N- 末端序列免疫学上不被抗序列 RILAVERY 所形成的抗体识别,所述序列包含在 HIV-1-LAI 毒株的 gp41 的优势免疫区中。

[0137] - 其不被抗 HIV-1-LAI 毒株之肽 SGKLIC 所形成的抗体识别。

[0138] - 其包含以下两个序列中的任何一个

[0139] RLLALETLMQNQQLLN LWGCRGKAICYTS (21),

[0140] QNQQLLNLWGCRGKAICYTSVQWN (22)。

[0141] VAU 肽的合成

[0142] 采用“继续流”Fmoc 方法经常规固相肽合成技术制备 VAU 肽。采用 Milligen 9050 PEP 合成仪并采用“微孔”PEG PAL 树脂制备所述的肽,取代第一个 C- 末端氨基酸残基。氨基酸侧链受到下列基团的保护:精氨酸为 Pmc;天冬酰胺、谷氨酰胺和半胱氨酸为 Trt;赖氨酸为 Boc;谷氨酸为 tBu 酯;丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸为 tBu 醚。临时的 Fmoc 基团用在 DMF 中的 20% 六氢吡啶溶液除去。用 6 当量的 DIPC DI 和 H₂O BT 完成偶联各氨基酸的反应。一些残基需要双偶联,尤其是精氨酸 1 和 23,半胱氨酸 19 和 26;天冬酰胺 11;谷氨酰胺 10、12 和 13;丙氨酸 4;异亮氨酸 9 和亮氨酸 2、3、14 和 15。

[0143] 在连接之后,树脂在真空下干燥。经 K 试剂在室温下 4 小时使肽从支持物上裂解。用乙醚沉淀粗肽并洗涤。经高压液相色谱 (HPLC) 纯化,这一步骤中使用具有 WATERS Delta Pak C1840×100mm 柱体的 WATERS LC PREP4000 仪器,流速 30 毫升/分钟,乙腈/0.1% TFA 梯度。合并包含肽的组分,然后在旋转蒸发器上浓缩并冻干。

[0144] 环化

[0145] 将肽 (0.025mM) 在 10mM 乙酸铵溶液中溶解。pH 值以 1M 氢氧化铵溶液调整至 8.5。3 或 4 小时之后再调整 pH 值。经 HPLC (WATERS Delta Pak C185 μ 柱,乙腈/0.1% TFA 梯度) 在 214 毫微米和 280 毫微米监测环化作用。环化在 15 小时之后完全。pH 值用 97-100% 醋酸调节至 6,冻干溶液,并在与粗肽相同的条件下纯化。

[0146] 肽由 HPLC 和按照电喷射技术的质谱 (FIS 0 N VG Trio2000 分光光度计) 检测。

[0147] Fmoc: 9- 芴基甲氧羰基

[0148] Pmc: 8- 甲基戊烷 -6- 磺酰苯并二氢吡喃

[0149] Trt: 三苯甲基

[0150] Boc: 叔丁氧羰基

[0151] tBU: 叔丁基

[0152] DMF: 二甲基甲酰胺

[0153] DPCDI :二异丙基碳化二亚胺

[0154] H O BT :1- 羟基苯并三唑

[0155] TFA :三氟乙酸

[0156] 反应剂 K :苯酚 / 水 / 苯硫基甲烷 / 乙二硫醇 /TFA

[0157] 2.5ml/2.5ml/2.5ml/1.5ml/41ml

[0158] HIV-1_(VAU) 包膜氨基酸序列与其它 HIV 病毒的相应序列的比较

[0159] 从 HIV-1_(VAU) 感染病人获得的一系列血清样品的 Western- 印迹分析结果在图 2 中给出。将携带有经电泳分离的和从纯化的 HIV 颗粒 (LAV BL O T SANO FI DIAGN O STIC SPASTEUR) 获得的蛋白质的硝基纤维素条与血清样品一起温育,它们的反应性按照制造商推荐的方法估价。获得的结果如下:1 道:对 HIV-2 特异性的蛋白质,其与 1992 年从 HIV-1_(VAU) 病人获得的血清样品反应。2-7 道:HIV-1 阳性血清;得自 HIV-1_(VAU) 病人的血清:2:1990 年 9 月获得的;3:1990 年 12 月获得的;4:1991 年 2 月获得的;5:1992 年 2 月获得的;6:阴性对照;7:阳性对照(从感染 HIV-1 个体获得的血清)。蛋白质的名称和大小在页边注明。

[0160] 图 3 显示了 HIV-1_(VAU) 包膜的氨基酸序列与 HIV-1-LAI 参照分离物 (Wain-Hobson 等,1985) 的相应的序列的序列对比。信号肽、V3 环以及 gp41 优势免疫表位由阴影矩形突出。外包膜糖蛋白 gp120 和跨膜 gp41 之间的裂解位点由箭头表明。氨基酸字母之间的垂直线表示完全等同,冒号(:)表示高的同源性,园点(.)表示单个氨基酸之间有限的同源性。采用威斯康星 GCG 包 GAP 程序进行序列对比。

[0161] GAP 和 BESTFIT 程序原始版本(1.0)由 Paul Haeberli 从 Needleman 和 Vunsch(分子生物学杂志,48,443-453(1970)以及 Smith 和 Waterman(Adv. Appl. Math. 2; 482-489(1981)出版物的详尽的研究编写。PaulHaeberli 发展了有限的序列对比,并添加到程序包中构成 3.0 版本。然后它们由 Philip Marquess 融合成一个单一程序构成 4.0 版本。蛋白质序列对比的缺口缺乏障碍按照 Rechid, Vingron 和 Argos(CABI O S5; 107-113(1989)) 的建议被修饰。

[0162] 图 3 的序列对比显示出许多高度差异的区,具有在这里或那里保持的很少的区。这些保持的区大致相应于在常规 HIV-1 分离物中也保持的区 (Alizon 等,1986, Benn 等,1985)。在差异的区域中,V3 环,也称作主要的中和决定簇 (Javaherian 等,1990, Javaherian 等,1989, Matsushita 等,1988) 明显地是最大差异的一个,尽管两个半胱氨酸限定的环被保持。环的帽序列 (HIV-1-LAI 的 GPGRAPH) 在 HIV-1_(VAU) 中是 GPMAWY。这一帽单位与喀麦隆 0 组分离物 HIV_(ANT70) 的 (van den Heasevelde 等,1994) 相同,但是不同于另一 0 组分离物,基序为 GPMRWR 的 HIV_{MVP5180} (Gurtler 等,1994)。

[0163] 在整个包膜中,总共鉴别 29 个潜在的 N-糖基化位点,与其它包膜蛋白质比较,其中 13 个被保持。总共也发现 19 个保持的半胱氨酸,这表明蛋白质的全部折叠体系结构被保持,但是发现 5 个未保持的半胱氨酸。

[0164] 图 4 显示在各种 HIV-1 分离物的跨膜包膜糖蛋白的细胞外片段中的优势免疫肽多种序列对比。所有序列与参照序列 HIV-1-LAI 比较。短线表示与 HIV-1-LAI 相同。借助威斯康星 GCG 包的 PILEUP 程序进行序列对比。

[0165] 在 PILEUP 程序中,由树状图阐述的装配策略称为 UPGMA,其意指“采用数学平均

值的非重量配对组方法 (Smith, P. H. A. Sokal, R. R. (1973), 数值分类学 (pp. 230-234), W. H. Freeman and Company, 旧金山, 加利福尼亚, 美国)。PILEVP 中的各对序列对比采用 Needleman 和 Wunsch 方法 (分子生物学杂志, 48 ;443-453 (1970))。

[0166] 如图 4 所示, TM 蛋白质的外部部分的优势免疫表位的氨基酸序列 (Gnann 等 1987) 实质上不同于其它 HIV-1 和 HIV-2 分离物的。然而, 它保持大多数发现在 HIV-1 和 HIV-2 病毒之间保守的氨基酸。

[0167] 发现一些特异性氨基酸仅仅在 O 组病毒之间保守 : 这样的情况是在 26 个氨基酸的肽中 21 位的赖氨酸, 7 位的苏氨酸和 11 位的天冬酰胺。这些区别能解释

[0168] 常规 HIV-1 包膜抗原检测的缺乏, 所述检测是经一种得自 HIV-1_(VAU) 病人的血清进行的或者也很可能是经感染其它 O 组病毒的病人的血清进行的。总之, HIV-1-LAI 和 HIV-1_(VAU) 包膜序列之间的比较显示 50% 的等同性。HIV-1_(VAU) 包膜序列也分别与其它 HIV 代表 (包括所描述的和测序的 HIV-10 组的两个成员 : HIV-1_{ANT70} 和 HIV-1_{MVP5180}) 和 SIV 代表之序列比较。表 1 所示这一分析结果说明 HIV-1_(VAU) 属于 O 组。HIV-1_(VAU) 包膜 70% 等同于 HIV-1_{ANT70} 包膜和 71% 等同于 HIV-1_{MVP5180} 包膜。

[0169] 在最普通的 HIV-1 亚型中, 包膜水平的等同性是可以比较的, 范围从 74% 到 80%。

[0170]

[illegible]

[0171] 通过采用 env 跨膜区的核苷酸序列经构建非重量节省 (unweighted parsimony) 系统发育树分析 HIV-1_(VAU)、HIV-1 病毒系统发育的其它成员和最近描述的两种 O 组病毒之间的相互关系。这一分析结果示于图 5 中, 其中数字表示核苷酸变化的数量。图 5 显示 HIV-1_(VAU) 大概与其它两个 O 组病毒等距离, 总的来说, 这三种病毒相互似乎大概是等距离的。事实上在所分析的基因组区段中, HIV-1_{MVP5180} 和 HIV-1_(VAU) 之间的核苷酸变化的数量是 218, 而 HIV-1_{MVP5180} 和 HIV-1_{ANT70} 之间的距离是 183, HIV-1_{ANT70} 和 HIV-1_(VAU) 之间是 213。这一差异轮廓非常类似于在所有其它 HIV-1 亚型中存在的, 其中存在于两个不同亚型之间的单个核苷酸变化的数量在 157 (E 亚型到 F 亚型) 到 219 (A 亚型到 D 亚型) 范围内。

[0172] 表 1 显示与 HIV-1 相关的不同病毒包膜序列的比较。数量表示包膜序列之间的氨

基酸等同的百分比,其是采用威斯康星 GCG 包 GAP 程序计算的。

[0173] * :在 HIV-1_{ANT70} 的情况下,仅外包膜蛋白质用于比较。

[0174] 包含 HIV-1_(VAU) 抗原的组合物

[0175] 总的来说,本发明涉及可以用于在生物体液中(特别是来源于已与 HIV-1_(VAU) 接触或与抗至少一种 HIV-1_(VAU) 抗原之抗体接触的个体的)体外检测 HIV 病毒存在的任何组合物。这一组合物可以用于经采用诊断技术(如在专利申请 EP84401, 834 和 EP87400, 151, 4 中所描述的那些)选择性地诊断 HIV-1 0 组感染。在本发明的范围内,使用任何包含能够被抗 HIV-1_(VAU) 所产生的抗体识别的抗原决定簇之组分例如, HIV-1_(VAU) 表位所限定的重组抗原或者肽或者化学合成肽。在这一点上,本发明更具体地说涉及包含至少一种 HIV-1_(VAU) 病毒包膜蛋白质的组合物。作为举例说明组合物的方式可以提到的是包含来源于相应于全部 HIV-1_(VAU) gp41 蛋白质 590-620 区或者对 HIV-1_(VAU) 特异性的这一区的部分的包膜蛋白的蛋白质,糖蛋白或肽,例如肽 -TFIQN- 或者 -WGCKNR-。

[0176] 本发明也涉及重组或合成 HIV-1_(VAU) 蛋白质和 / 或糖蛋白和 / 或肽与来源于 HIV-1 和 / 或 HIV-2 和 / 或来源于另一 HIV-1 0 组之蛋白质和 / 或糖蛋白和 / 或肽(其得自这些蛋白质或糖蛋白,并且其可以被 HIV-1 和 / 或 HIV-2 和 / 或 HIV-1 0 组病毒诱导的抗体识别)组合在一起的组合物。

[0177] 所说的诊断组合物包含能够被针对 HIV-1_(VAU) 的抗体识别的抗原决定簇,具体地说,是肽组合物,其可以包含在已经可以用于接触 HIV-1 和 / 或 HIV-2 逆转录病毒感染的组合物或试剂盒中或者与之组合,以扩大试剂盒接触 HIV-1 0 组逆转录病毒的接触范围。

[0178] 非限制性的例子是:

[0179] - 核心蛋白质,特别是 gag, pol, HIV-1 和 HIV-2 蛋白质或其肽,以及 HIV-1_(VAU) 包膜蛋白质或肽,

[0180] - 或者 HIV-1 包膜糖蛋白、HIV-2 包膜糖蛋白和 HIV-1_(VAU) 包膜糖蛋白,

[0181] - 或者 HIV-1 蛋白质和 / 或糖蛋白, HIV-2 蛋白质和 / 或糖蛋白和 HIV-1_(VAU) 包膜蛋白和 / 或糖蛋白的混合物。

[0182] 注意到以下一点是重要的,虽然来源于 HIV-1 0 组病毒感染病人的抗体与 HIV-1 M 组病毒的 gag 和 pol 抗原强烈反应,但其与 M 组包膜抗原的反应性实际上为零。因此,本发明的组合物包含至少一种 HIV-1_(VAU) 包膜的蛋白质或者多肽以便这一病毒可被确切地检测是重要的。

[0183] 因而,这样的组合物在用于诊断时有助于诊断爱滋病或者与之相关的病症,这扩展了对病原体较广泛的作用谱。不言而喻,使用仅包含 HIV-1_(VAU) 包膜蛋白和 / 或糖蛋白的诊断组合物在更具选择性地检测在所述疾病中起作用的逆转录病毒类别上仍然是有用的。

[0184] 用于诊断尤其是由 HIV-1_(VAU) 病毒引起的感染的方法和试剂盒

[0185] 本发明涉及体外诊断由 HIV 病毒(艾滋病病原体)引起的感染和相关病症的方法,该方法包括使从接受诊断的病人或受治疗者获得的血清或其它生物介质与包含至少一种 HIV-1_(VAU) 蛋白质、糖蛋白或肽的组合物接触,检测可能的免疫学反应。以上描述了这种组合物的例子。

[0186] 优选的方法包括,例如,免疫-荧光或 ELISA 型免疫酶促反应(immunoenzymicreaction)。测定可以受直接或间接的免疫荧光测定或直接或间接的免疫

酶促测定影响。

[0187] 这样的检测包括例如：

[0188] - 将一定量的提取物或者按照本发明的所需抗原组合物置于微滴板的孔中；

[0189] - 向孔中添加稀释的或未稀释的血清，其能够包含抗体，抗体的存在已在体外检测；

[0190] - 培养微滴板；

[0191] - 用适当的缓冲液细心地洗涤微滴板；

[0192] - 向微滴板的孔中添加人类免疫球蛋白特异性抗体标记，所述标记是用选自能够杂交底物的酶完成的，以便以后进行其辐射吸收（至少在一定波长带中

[0193] ）修饰。

[0194] - 检测（最好是以相对于对照的比较的方式）底物水解的程度，这一检测是潜在的风险或者实际存在感染的尺度。

[0195] 本发明也涉及诊断 HIV-1_(VAU) 病毒感染的试剂盒 (kit 或 box)，具体地说其包含：

[0196] - 一种提取物，进一步纯化的组分，或者得自以上所述的病毒类型的合成抗原，这一提取物组分或者抗原是（例如经放射性、酶促、荧光或其它）标记的，

[0197] - 对人免疫球蛋白抗体或蛋白质 A（有利地是其固定到不溶于水的支持物上，例如琼脂糖小珠或者微滴板孔等），

[0198] - 可有可无的从阴性对照受试者获得的生物体液或者细胞样品，

[0199] - 缓冲液和（合适时）显现标记的底物。

[0200] 能够诱导识别抗原（其可以由化学合成获得或重组获得）的抗体形成的致免疫组合物也是本发明的主题。

[0201] 血清学

[0202] 采用各种市售的试剂盒：Sanofi Duagnostics Pasteur, (GenelaviaMixt) Abbott, Wellcome 和 Behring 估价 HIV-1_(VAU) 感染病人血清抗体与 HIV-1 抗原制剂反应的能力。按制造商推荐的方法用 Sanofi Duagnostics Pasteur Western- 印迹试剂盒检查这些抗体与各种 HIV-1 蛋白质的反应性。

[0203] 更具体地说，用 HIV-1 特异性 ELISA 试剂盒检查病人血清几次。其首次被试验并证明为阳性是在 1990 年，用 Sanofi Duagnostics Pasteur 试剂盒测定值（这一值相应于测得的 OD 对背景 OD 的比率）是 7.33，用 Abbott 试剂盒的是 3.50，用 Wellcome 试剂盒的是 2.70。在使用对 HIV-1 和 HIV-2 两者特异性的试剂期间，用 Behring 试剂盒的测定值是 1.42，用 Wellcome 试剂盒的是 4.40。

[0204] 采用 HIV-1 LAV 印迹免疫印迹测定（Sanofi Duagnostics Pasteur 推向市场的一种试验）研究病人血清在不同日期与不同 HIV-1 结构蛋白反应的能力。如图 5 所示，在所有被试血清样品中，仅血清与 HIV-1 env 蛋白质 gp160 和 gp120 很弱的反应性被观察到。然而，血清与 HIV-1 gag 蛋白质 p55 (gag 前体) 和 p24 (CA)，和与 pol 产物 p66 (RT) 和 p34 (IN) 强烈地反应。由 HIV-2 免疫印迹，仅有与 gagp26 的非常弱的反应性被检测到。

[0205] 这说明用市售血清诊断试剂盒检测 O 组特异性抗体应当小心控制。尽管 O 组病毒感染病人之血清抗体表现出与 M 组 gag 和 pol 抗原强烈的交叉反应性，但其表现出与 M 组包膜抗原很低的或者没有反应性。因而，可以假定相当比例的这种患者不能用基于 M 组

包膜抗原试剂的某些试剂盒检测。事实上,在最近从 0 组感染病人的几种血清的初步研究中,发现检测对 0 组特异性抗体的能力依据所采用的试剂盒非常不一样 (Loussert-Ajaka, I., LY, T. D., Chaix, M. L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courrouce, A. M., Brun-Vezinet, F. 和 Simon, F. (1994)。HIV-1 0 亚型感染病人中 HIV-1/HIV-2 血清学阴性性, Lancet. 343, 1393-1394)。这意味着仔细和深入地研究大量 0 组血清与所有市售试剂盒的反应性是必要的。

[0206] 从 HIV-1_(VAU) 病毒重组或合成抗原制备的包含多克隆或单克隆抗体的组合物

[0207] 本发明涉及可以经接种 HIV-1_(VAU) 在动物中产生的血清,具体地说是 HIV-1_(VAU) 抗原表位,更具体地说是 HIV-1_(VAU) 病毒包膜蛋白的抗原表位。更具体地说本发明涉及更特异性地针对各抗原的多克隆抗体,特别是病毒的蛋白或者糖蛋白。本发明也涉及经各种技术产生的单克隆抗体,这些单克隆抗体抗各种 HIV-1_(VAU) 蛋白质(特别是包膜蛋白质)分别是更特异性的。

[0208] 这些多克隆或单克隆抗体可以用于各种应用中。特别可以提到的是它们用于中和相应的蛋白质,或者甚至抑制全病毒的感染性。它们也可以用于例如在生物制剂中检测病毒抗原或者实施纯化相应蛋白质和/或糖蛋白的方法,例如将它们用于亲和色谱柱中。

[0209] 举例来说,抗包膜抗体或抗 gag 抗体是可以用于诊断(特别是经抗原俘获 ELISA 检测 HIV-1 0 组颗粒)的试剂。

[0210] 本发明涉及针对一种或多种 HIV-1_(VAU) 病毒抗原之抗体,其是从 HIV-1_(VAU) 氨基酸序列产生的,以前已描述了从类似于本发明的 HIV-1_(VAU) 病毒抗原表位之抗原表位获得抗体的技术。

[0211] Ulmer 等 (1993) 在出版物中描述的抗体的制备的技术可以由本领域技术人员用来制备本发明的抗体,使这一技术适应本发明的抗原的改进在本领域技术人员的知识范围内。

[0212] vau 肽的免疫反应性的研究

[0213] vau 肽的免疫反应性在制备实验 ELISA 平板后,按照为了用于抗 HIV 抗体的筛选试验而建立的方法确证。这一试验基于用模仿 HIV-1 0 组(或亚组)病毒 VAU 分离物包膜糖蛋白的优势免疫表位之肽制备的固相检测。按照 Genelavia[®] Mixt 试剂盒提出的方法,用试剂盒中的试剂进行试验。

[0214] 在图 21 和 22 两份表中对照的数据说明:

[0215] a) 从 HIV-1 0(组或亚组)病毒感染病人取得的四个血清样品与 vau 肽反应性很强;

[0216] b) 在 Yacounde 的 Pasteur 研究所送出的 19 个血清中,十个假定从 HIV-10(组或亚组)病毒感染病人取得的血清与相同的肽反应性也很强;

[0217] c) 从 HIV-1B 亚型病毒个体(急性期)取得的血清(4 个样品)不与 vau 肽反应;

[0218] d) 从无症状供血者取得的血清(48 个样品)不与 vau 肽反应;这些实验数据(鉴于 HIV-1 组(或 0 亚组)抗体阳性样品的多样性,尽管有限)给出了所选择的肽的敏感性和特异性的证据。

[0219] 从上述内容可见,本发明也涉及 HIV-1_(VAU) 病毒或变体的检测,其是借助使用以上所述的抗体在牵涉各种阶段的方法中进行的,这些阶段特别地被预期揭示出 HIV-1_(VAU) 病毒

的特征性性质。

[0220] 本发明也涉及经分子杂交检测 HIV-1_(VAU) 病毒。

[0221] 一般地,这一在从易于携带 HIV-1_(VAU) 病毒的病人获得的血清样品或其它生物体液或者组织中检测 HIV-1_(VAU) 病毒的方法包括下列步骤;

[0222] - 制备至少一种可标记可不标记的探针;

[0223] - 通过将可疑病人样品之核酸与所说的标记探针接触在允许杂交的条件下完成至少一个杂交步骤,并可有可无地将所形成的复合物固定在合适的固相支持物上;

[0224] - 合适时,以一种适合的洗涤溶液洗涤所说的固体支持物;

[0225] - 用一种本领域已知的方法检测所说的复合物,并由此检测 HIV-1_(VAU) 病毒的存在或不存在。

[0226] 在按照本发明的方法的另一个优选的实施方案中,以上所提到的杂交是在非严格条件下进行的,在使得适于杂交的条件下洗涤膜。

[0227] 通过采用血清学或基因扩增技术,例如特异性的聚合酶链反应 (PCR) 精确地评价 HIV-1 0 组流行的程度。发现在喀麦隆 5 至 10% 感染 HIV-1 的病人事实上由 HIV-1 0 组病毒感染。然而,不同于这里所描述的分离物,已报道在非洲中西部之外 0 组病毒的传播。从其分离 HIV-1_(VAU) 的病人一直生活在法国,从未旅行到非洲。直到现在,我们没有有关感染来源的准确的证据,但这一病例说明在欧洲已出现 0 组病毒的一定程度的传播。

[0228] 本发明也涉及在生物样品中检测和辨别 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒特征抗体和 HIV-1-M 型逆转录病毒特征抗体的方法,其特征在于使所说生物样品与一种肽接触,所述肽不与 HIV-1-M 型逆转录病毒特征抗体反应,具体地说是以上描述的肽 (1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9) 和 (10)。

[0229] 本发明也涉及在生物样品中检测和辨别 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒特征抗体和 HIV-1-M 型逆转录病毒特征抗体的方法,其特征在于使所说生物样品与从图 8 和图 9 所示的 HIV-1-M 病毒获得的并与选自肽 (1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9) 和 (10) 的肽同源的肽接触,该序列起因于其自身连续氨基酸的垂直序列对比,其自身包含在相对 HIV-1-M 病毒和图 8 或 9 所代表的相关肽序列中,具有图 8 或 9 所示的选择的肽序列的连续氨基酸。

[0230] 按照本发明,检测和辨别 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒和 HIV-1 M 亚组逆转录病毒感染的方法的特征是使从接受艾滋病诊断试验的个体获得的血清与(特别是)肽 RILAVERY 接触。

[0231] 此外,检测由 HIV-1 0 亚组或 HIV-1M 亚组逆转录病毒引起的感染的方法的特征是采用两类肽混合物,第一类的那些相应于肽 (1)、(2)、(3)、(4)、(5a)、(5b)、(9) 和 (10)。

[0232] 另外,辨别由 HIV-1-0 DUR 逆转录病毒和由另一种 HIV-1-0 逆转录病毒引起的感染的方法的特征是使所说的生物样品与 (11) 到 (15) 或者 (17) 到 (20) 的任何肽接触。

[0233] 另外,本发明也涉及辨别 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒和 HIV-1 M 亚组逆转录病毒感染的方法,该方法采用裂解作用发生在 SR 二肽上的丝氨酸蛋白酶,该方法包括根据这一逆转录病毒是 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒还是 HIV-1 M 亚组逆转录病毒,检测逆转录病毒 gp120 的 V3 环的裂解或非裂解。

[0234] 本发明也涉及用于在生物样品中检测和辨别 HIV-1 M 亚组逆转录病毒和 HIV-1 0 组(或亚组)逆转录病毒的组合物,其包含两类肽的混合物,第一类特别是 (1)、(2)、(3)、

(4)、(5a)、(5b)、(9) 和 (10) 所限定的那些。

[0235] 对肽 (1) 到 (20) 各序列特异性的单克隆抗体也在本发明的范围内。

[0236] 本发明也涉及选自 1995 年 2 月 24 日以保藏号 I-1548, I-1549 和 I-1550 保藏在 CNCM 的那些质粒。

[0237] 本发明也涉及包含编码本发明所限定的肽 (1) 到 (20) 各种之序列的核酸。

[0238] 在优选的核酸序列中, 将选择图 10、11 或 12 代表的核苷酸序列。

[0239] 本发明也涉及包含以上所限定的核酸的载体。

[0240] 本发明也涉及容易包含任一所说的核酸或者所说的载体的细胞。

[0241] 本发明也涉及一种病毒, 如 1995 年 2 月 23 日以保藏号 I-1542 保藏在 CNCM 的病毒。

[0242] 也在本发明的范围内的一种病毒是与以上病毒相同组的病毒, 其特征是这一病毒的共有肽被特异性识别以上所限定的多肽或肽的抗体识别。

[0243] 这种病毒的基因组 RNA 也在本发明的范围内。

[0244] 也在本发明的范围内的是用于在来源于易被 HIV 型人逆转录病毒感染之病人的血清或其它生物样品中检测抗体的试剂盒, 其特征在于该试剂盒包含:

[0245] - 至少一种多肽或一种肽, 其序列具有 (尤其是) 以上所描述的序列 (1) 到 (20) 之一,

[0246] - 使得可以在所说多肽或肽与可能存在于被试生物样品中的抗体之间反应, 形成免疫复合物的材料, 例如, 需要时一种或多种培养缓冲液,

[0247] - 阴性对照样品,

[0248] - 用于显示所形成的抗原 / 抗体复合物的材料。

[0249] 按照本发明, 这一试剂盒还可以包括至少一种来源于另一 HIV 毒株或者一种肽或多肽的共有肽或多肽, 其包含:

[0250] 不同于这一肽或多肽序列的氨基酸序列, 在所述肽或多肽保持其与针对共有肽或多肽之抗血清的反应性的前提下, 其中的一个或多个氨基酸被其它氨基酸取代,

[0251] 或者在所述肽或多肽保持其与针对共有肽或多肽之抗血清的反应性的前提下, 其中的一个或多个氨基酸已被缺失或添加的氨基酸序列。

[0252] 优选地, 按照本发明的试剂盒还包含来源于另一个 HIV 毒株 (优选的是 HIV-LAI 毒株) 的至少一种肽或多肽。

[0253] 本发明也涉及用于体外诊断由按照本发明的逆转录病毒或者其变体引起的感染的多肽组合物, 这一诊断是在可能含有感染后形成的抗体的生物样品中进行的。这一组合物的特征是其包含肽 (1) 到 (20) 的至少一种。

[0254] 所说的生物样品具体地说可以包括血液, 血浆, 血清或任何其它生物提取物。上述组合物可以用于在以上提到的生物样品之一中检测抗体。

[0255] 因此, 本发明也涉及用于体外诊断特异性地由 HIV 型逆转录病毒感染的方法, 其特征是该方法包括下列步骤:

[0256] - 使生物样品与以上所限定的肽或者以上所限定的肽组合物在允许形成抗原 / 抗体免疫复合物的合适的条件下接触, 所说的生物样品可能含有 HIV-1 0 组 (或亚组) 逆转录病毒感染后产生的抗体,

[0257] - 检测可能的存在的复合物。

[0258] 此外,本发明涉及致免疫组合物,其特征在于该组合物包含至少一种肽以及制备疫苗可接受的药物载体。

[0259] 本发明也涉及制备按照本发明的逆转录病毒毒株之衣壳蛋白质和 gp41 和 gp120 糖蛋白的方法,该方法的特征是包括以下步骤:

[0260] - 裂解由按照本发明的 HIV-1 逆转录病毒感染之细胞,经离心分离上清液和感染细胞或所制备的病毒沉淀,

[0261] - 将细胞抽提物和 / 或病毒提取物置于包含有纯化的抗体的免疫吸附剂上,所说抗体是从按照本发明的逆转录病毒感染之个体的血清获得的,并且有利地固定在固体支持物上,所说的感染个体的血清具有与按照本发明的病毒包膜蛋白强的反应能力,

[0262] - 在缓冲液的存在下温育足够长的时间,以形成抗原 / 抗体免疫复合物,

[0263] - 用缓冲液洗涤免疫吸附剂,以便除去未保持在固体支持物上的分子,

[0264] - 回收所需抗原蛋白质。

[0265] 按照这一制备方法的第一个实施方案, HIV-1 DUR 之衣壳蛋白质和 gp41 和 gp120 糖蛋白的分离和回收是经电泳和经蛋白质的电还原 (electroreduction) 进行的。

[0266] 按照这一制备方法的另一实施方案,蛋白质通过以下方式回收:

[0267] - 洗脱固定到上述免疫吸附剂上的蛋白质,

[0268] - 在色谱柱上纯化如此洗脱的产物,所述色谱柱包含固定到分离支持物上的抗体,这些抗体识别 HIV-1 0 组 (或亚组) DUR 的衣壳蛋白质和 gp41 和 gp120 糖蛋白。

[0269] 也在本发明的范围内的是产生按照本发明的肽或多肽的方法,所述肽或多肽是用如下方式获得的:

[0270] - 经表达本发明的核酸,

[0271] - 或者经化学合成,通过增加氨基酸,直到获得所述肽或多肽。

[0272] 这里可以使用遗传工程的标准原则和方法 (" 分子扩增", Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989 CSH)。

[0273] 也在本发明的范围内的是产生以上限定的核酸的方法,其可以经从本发明的病毒分离或经化学合成或经使用特异性引物的核酸体外扩增产生。

[0274] 也按照本发明的寡核苷酸引物具有包含以下核苷酸序列的至少 8 个连续的核苷酸的序列:

[0275] ATT CCA ATA CAC TAT TGT GCT CCA-3

[0276] AAA GAA TTC TCC ATG ACT GTT AAA-3

[0277] GGT ATA GTG CAA CAG CAG GAC AAC-3

[0278] AGA GGC CCA TTC ATC TAA CTC-3

[0279] 通过例如编码本发明的肽的核苷酸序列的 PCR 或等价的技术,这些引物可以用于基因扩增方法中。用这些引物进行的试验给出结论性的结果。

[0280] 本发明也涉及使得可以经以上描述的 PCR 或等价的技术扩增的试剂盒。

[0281] 也在本发明的范围内的是在生物样品中检测 HIV-1 0 组 (或亚组) DUR 逆转录病毒 (包括按照本发明的逆转录病毒) 之核酸的方法。该方法包括将包含在该生物样品中的从 RNA 形成的 cDNA 在使这一 cDNA 杂交的条件下与逆转录病毒基因组接触,并在这一病毒

样品上进行基因扩增。

[0282] 本发明也涉及经按照本发明的病毒感染的细胞的裂解获得的病毒裂解物。

[0283] 包含特别是以上所限定的肽或者多肽的 HIV-1_(DUR) (或者 HIV-1_(VAU)) 毒株的蛋白质提取物也在本发明的范围之内。

[0284] 本发明涉及从 HIV-1 O 组 (或亚组) DUR 或者从这种 HIV-1 O 亚组逆转录病毒毒变体结构蛋白获得的特异性多肽, 其使以下过程成为可能:

[0285] 依据具体情况, 普遍性地辨别属于 O 类的 HIV-1 和属于 M 类的 HIV-1,

[0286] 或者特异性地辨别属于 HIV-1 O 组 (或亚组) DUR 特征亚组之病毒和 O 亚组的其它病毒,

[0287] 或者另一方面, 识别大多数 (如果不是全部的话) O 组 (或亚组) 逆转录病毒和 M 亚组逆转录病毒两者。

[0288] 也在本发明的范围内的是从其它 HIV-1 O 组 (或亚组) 或者 HIV-1 M 亚组病毒相应的结构蛋白获得的相应的肽, 具体地说是来源于 GAG, gp120 和 gp41 结构蛋白 (其部分在图表中示出) 的那些, 这些同源肽是将它们进行序列对比的结果, 也起因于从 HIV-1 O 组 (或亚组) DUR 病毒获得的肽的图表, 更具体地说是在本文中鉴定的。

[0289] 同样地, 某些同源肽可以用于这些试验中, 其使得进行以上提到的辨别成为可能, 在这种情况下应理解为它们用于替代来源于 GAG, gp120 和 gp41 结构蛋白的相应的肽。

[0290] O 组特异性寡核苷酸的测定

[0291] 采用 VAU 序列和其与 MVP5180 和 ANT70 序列的相关性, 限定寡核苷酸引物, 尽量使其 V3 区和 gp41 区整体对 O 亚组特异性。这些引物使扩增 DUR 毒株并由此构成所遇到的扩增问题的一种解决办法成为可能。这些 HIV O 亚组引物的位置和序列在图 13 中示出。这些引物使得由 PCR30 个循环的单一步骤获得用溴化乙锭染色可见的扩增带成为可能。获得了部分序列:

[0292] -GAG :513 个碱基对 (171 个氨基酸) = Seq ID No. 96

[0293] -gp120V3 环 :525 个碱基对 (75 个氨基酸) = Seq ID No. 98

[0294] -gp41 优势免疫区 :312 个碱基对 (104 个氨基酸) = Seq ID No. 100。

[0295] DUR 序列与 MVP5180、ANT、O 亚组 VAU 序列、HIV-1 共有序列 LAI、代表性的非洲 HIV-1 MAL 序列、加蓬黑猩猩 CIV 的 CPZ 的核苷酸 (图 15) 和蛋白质 (图 16) 比较显示, DUR 与其它已知的 HIV-1 O 组 (或亚组) 毒株的距离和这些毒株相互之间的距离是相同的。

[0296] 在 GAG 区的区别较小, 最大的区别在 gp120 的 V3 环区, 而蛋白质比较达到 40% 的不同 (图 16)。系统发育树证实, 一方面 DUR 毒株形成 O 亚组的一部分, 另一方面, 形成所描述的各种 O 毒株之间的重要区别, 然而, 没有明显出现亚型分支 (图 17)。

[0297] GAG 序列的比较:

[0298] 基于所获得的 GAG 序列与其它已知的两个 O 毒株 ANT70 和 MVP5180 以及 M 组的代表序列的比较 (图 8), 可能观察到 O 共有序列存在于几个区, 其不同于相同区的 M 共有序列。也可以发现两个超变区 (对 O 比对 M 更加可变) 和很少的一个或其它毒株的不同位点。然而, 区 SPRT.... SEGA, MLNAI.... KEVIN, GPLPP.... QQEQI 和 VGD.... SPV 看来似乎区别 O 共有序列和 M 共有序列。

[0299] 区 QQA 和 LWTTRAGNP 是超变区。就 M 和 O 共有序列而言, HIV-1 O 组 (或亚组)

DUR 毒株三个位置显著不同 (L 为 I 并两次为 E) 并在 3 个分离的超变位置采用一个特异性的氨基酸, V 位置 L9 ;A 位置 A77 ;L 位置 110。

[0300] 此外, 在 GAG 区限定与 O 组和 M 组相同的区段是可能的, 如 SPRTLNAWVK, GSIDIAGTTST 和 QGPKEPFRDYVDRF。

[0301] V3 环序列的比较

[0302] 这一比较研究揭示出相当大的不同, HIV-1 M 亚组共有序列蛋白质不同高达 56%, 其它 HIV-1 O 组 (或亚组) 共有序列达 35 到 42%。

[0303] gp120V3 环区与 gp41 的优势免疫区的肽序列对比示于图 9 中。DUR 毒株的 V3 环的内部序列实质上不同于 HIV-1M 亚组共有序列。其与 VAU 和 ANT70 毒株 (但不与 MVP 毒株) 共享基序 GPMWYSM, 其具有两个取代, R 替代 A 和 R 替代 Y。

[0304] V3 环离剩下的左和右部分明显不同于所有其它已知的 HIV, 并且确实不留下猜测其它交叉反应性的可能性。而且 DUR 的 V3 环比其它 O 序列长 1 个氨基酸, 后者自身比 HIV-1M 组序列另外长一个氨基酸。有关 gp41 优势免疫区序列对比的比较

[0305] DUR 毒株的“小环”具有序列 CRGKAIC, 被证明是对这种毒株非常特异性的: 其可以构成表位 (参见图 9)。此外, 这种序列很可能牵涉到 gp41 糖蛋白非折叠条件以及因此的该毒株的感染性的变化。

[0306] 在左边侧翼于这一环的 11 个氨基酸长序列与 VAU 序列相同。按照所分析的克隆, DUR 毒株的多态性对 S 或 T 位置可以是显著的。

[0307] 得自其它已知逆转录病毒毒株的相应肽也示于图 9。

[0308] DUR 毒株也使限定 gp41 区的 HIV O 亚组共有序列成为可能, 可以使用其若干足够长度的同源区。这些同源区特别是: RL*ALET, QNQQ, LWGC 和 CYTSV (* 代表可变氨基酸)。

[0309] 血清学相互关系

[0310] 抗 DUR 抗血清不与 HIV-1-M 共有序列的 V3 环肽、HIV-1 MAL 肽、HIV-1CPZ 肽或者 HIV-1 O 组 (或亚组) MVP5180 肽反应, 但与 HIV-1-O ANT70 的 V3 环肽反应。就 gp41 优势免疫区而言, 其不与“标准” HIV-1M 亚组共有序列反应, 但微弱地却令人惊奇地与 HIV-1M 亚组右延伸共有序列反应。

[0311] 参考文献

[0312] 1. Agut, H., Candotti, D., Rabanel, B., Huraux, J., Remy, G., Ingrand, D., Tabary, T., Chippaux, C., Chamaret, S., Guetard, D., Dauguet, C. 和 Montagnier, L. (1992), 爱滋病病人的非典型 HIV-1- 相关逆转录病毒的分离, Lancet. 340, 781-682。

[0313] 2. Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. 和 Sonigo, P. (1986), 艾滋病病毒的遗传可变性: 欧洲病人两种分离物的核苷酸序列分析, 细胞, 46, 63-74。

[0314] 3. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. 和 Montagnier, L. (1983), 获得性免疫缺陷综合症 (艾滋病) 风险病人之嗜 T 淋巴细胞逆转录病毒的分离, 科学. 220, 868-871。

[0315] 4. Benn, S., Rutledge, R., Folks, T. 等 e. (1985), 北美和扎伊尔艾滋病逆转录病毒分离物的基因组不均匀性, 科学, 230, 949-951。

[0316] 5. Clavel, F. 和 Charneau, P. (1994), 无人类免疫缺陷病毒颗粒指导的融合, 病毒

学杂志 68,1179-1185。

[0317] 6. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. 和 Montagnier, L. (1986), 西非艾滋病病人之新人逆转录病毒的分离, 科学, 233, 343-346。

[0318] 7. De Cock, K. M., Adjorlolo, G., Epkini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doorly, R. 和 Gayle, H. (1993), HIV-2 流行病学和传播: 为什么无 HIV-2 流行, JAMA. 270, 2083-2086。

[0319] 8. De Leys, R., Vanderborght, B., Vansen Haesevelde, M., Heyndrickx, L., vanGeel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P. 和 Willems, B. (1990), 得自中西部来源的两人的不常见人免疫缺陷逆转录病毒之分离和部分特征, 病毒学杂志, 64, 1207-1216。

[0320] 9. Gnann, J., Cormick, J., Michell, S., Nelson, J. 和 Oldstone, M. (1987), 区别 HIV1 型和 2 型感染的合成肽免疫测定, 科学, 237, 1346-1349。

[0321] 10. Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., vonBriesen, H., Maniar, J., Mahambre, G., Delwart, E., Mullins, J. 和 Rubsamen-Waigmann, H. (1994), 人免疫缺陷病毒 1 型和 2 型 (HIV-1 和 HIV-2) 混合感染的遗传分析揭示出来源于这些病毒各单一祖先的 HIV-1 和 HIV-2 的新近的扩散, 病毒学杂志 68, 2161-2168。

[0322] 11. Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M. 和 Kaptue, L. (1994), 来源于喀麦隆的一种人免疫缺陷病毒 1 型新亚型 (MVP-5180), 病毒学杂志, 68, 1581-1585。

[0323] 12. Harada, S., Koyanagi, Y. 和 Yamamoto, N. (1985), 在 HTLV-I- 携带细胞 MT-2 和 MT-4 中 HTLV-III/LAV 的感染和在噬斑测定中的应用, 科学, 229, 563-566。

[0324] 13. Hirt, B. (1967), 从感染的小鼠细胞培养物选择性抽提多瘤 DNA, 分子生物学杂志, 26, 365-369。

[0325] 14. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. 和 Wain-Hobson, S. (1990), 与 HIV-1 相关的黑猩猩慢病毒属的遗传组织, HIV-1. 345. 356-359。

[0326] 15. Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. 和 Matthews, T. J. (1990), 由 HIV-1 超变中和决定簇激发的广泛中和抗体, 科学. 250, 1590-1593。

[0327] 16. Javaherian, K., Langlois, A. J., MeDanal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I., Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D. 和 Matthews, T. J. (1989), 人免疫缺陷病毒 1 型包膜蛋白的主要中和区, 美国科学院学报, 86, 6768-6772。

[0328] 17. Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E., Eddy, G., vander Green, G., Fransen, K., Gershby-Damet, G. 和 Deleys, R. (1993), 70 个国际 HIV-1 分离物的 gag 基因的系统发育分析给出多种基因型的证据, 艾滋病, 7, 769-80。

[0329] 18. Louwagie, J., McCutchan, F., Van der Green, G., Peeters, M., Fransen, K., Plot, P., Gershby-Damet, G., Roelants, G., VanHeuverswyn, II. 和 Eddy, G. (1992), 来源于

非洲、欧洲、北美的 HIV-1 分离物的遗传学比较,艾滋病研究人逆转录病毒,8,1467-9。

[0330] 19. Matsushita, S. M., RobertGuroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K. 和 Putney, S. (1988), 人免疫缺陷病毒中和单克隆抗体的特征确定和中和表位作图, 病毒学杂志, 62, 2107-2114。

[0331] 20. NKENGAS O NG, J. N. 等, 艾滋病 1993, Vol. 7, No. 11, pp. 1536-1538.

[0332] 21. Hey, M. A., Krust, B., Laurent, A. G., Montagnier, L. 和 Hovanessian, A. G. (1989), 人免疫缺陷病毒 2 型包膜糖蛋白的特征确定: 加工期间糖蛋白前体的二聚化, 病毒学杂志 63, 647-658。

[0333] 22. ULMER J. B. 等, 科学, Vol. 259, 1993 年 3 月, pp. 1745-1749。

[0334] 23. Vanden Heasevelde, M., Decourt, J. L., deLeys, R. J., V 和 erborgh, B., vander Green, G., van Heuverswijn, H. 和 Saman, E. (1994), 高趋异非洲人免疫缺陷病毒分离物的基因组克隆和全序列分析, 病毒学杂志 68, 1586-1596。

[0335] 24. Vartanian, J. -P., Meyerhans, A., Asjo, B. 和 Wain-Hobson, S. (1991), HIV-1 基因组选择、重组和 G → A 超变, 病毒学杂志, 65, 1779-1788。

[0336] 25. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. 和 Alizon, M. (1985), 艾滋病病毒 LAV 的核苷酸序列, 细胞, 40, 9-17。本发明所涉及的相关微生物保藏信息如下:

[0337] 保藏单位: 国立微生物保藏中心 (CNCM)

保藏时间	保藏号	分类命名	是否存活
1994 年 10 月 20 日	I-1486	E. colipH4	是
1995 年 2 月 24 日	I-1548	HIV1-ODURV3	是
1995 年 2 月 24 日	I-1549	HIV1-ODUR41	是
1995 年 2 月 24 日	I-1550	HIV1-ODURGAG	是
1995 年 2 月 23 日	I-1542	HIV1-ODUR	是

[0338] 图 7 显示 SEQ ID NO :64 的 cDNA 序列, 其编码长度为 151 个氨基酸的多肽。

[0339] 图 14 表明不同 HIV 病毒株之间 V3 和 GP41 抗血清的交叉反应性。

[0340] 图 18A 和 18B 显示 VAU 肽的 HPLC 分析结果。

[0341] 图 19 和 20 显示 VAU 肽的质谱分析结果。

初级 HIV - 1 分离物

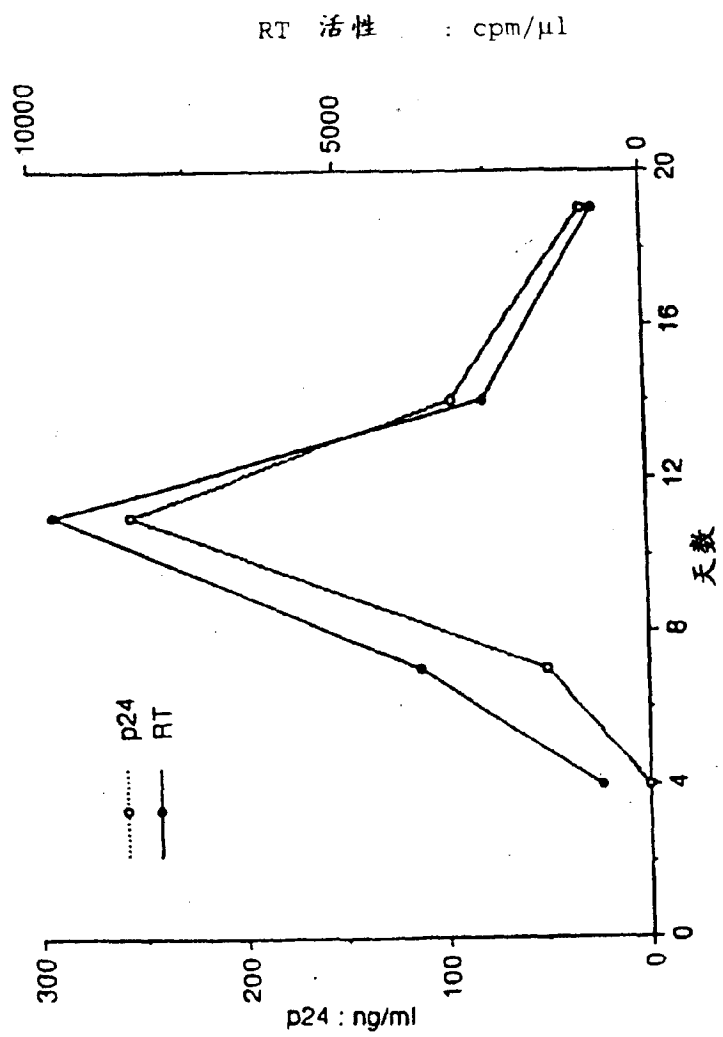
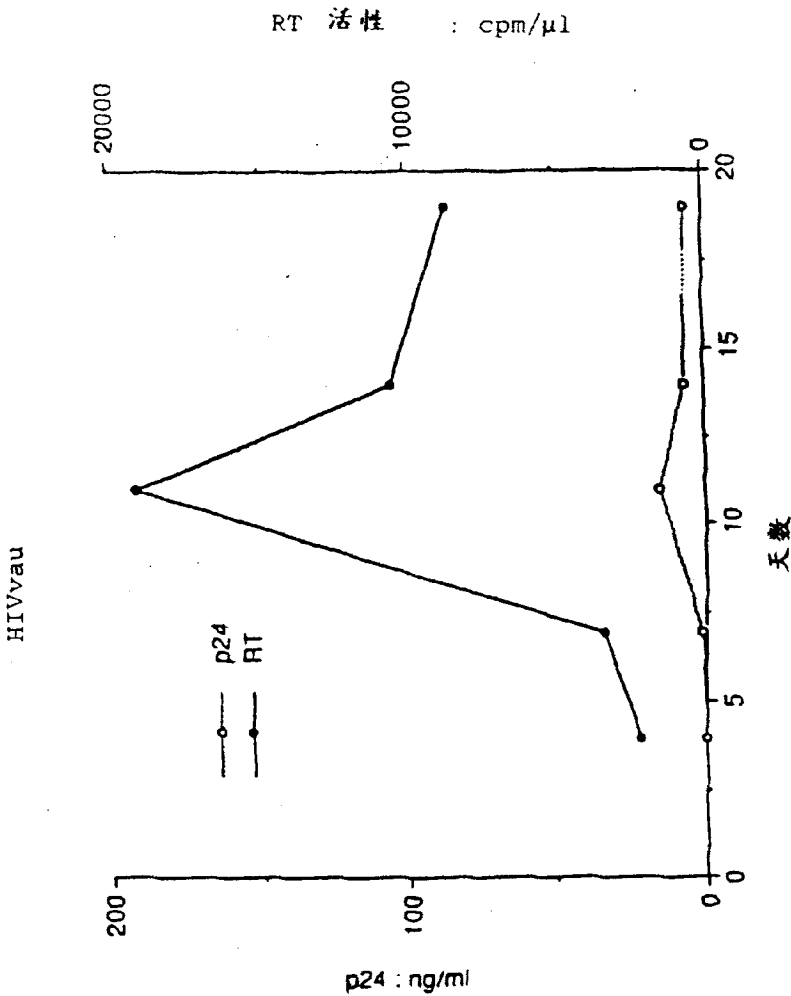


图 1A



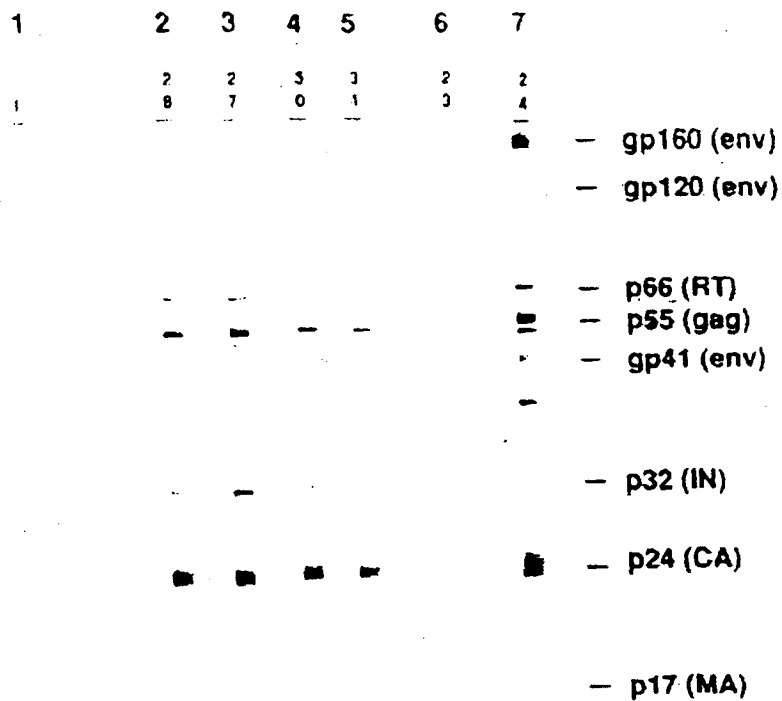


图 2

单个肢

1	vau	1	MTA	IMK	AMG	KRR	KLG	IM	ELI	LA	IP	CL	SC	NQ	LY	AT	VY	SG	VP	VW	ED	48
1	lal	1	HRV	KE	Y	CH	LR	HA	CH	KH	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	48
49	vau	49	KPT	LC	AS	DAN	LT	ST	EQ	HN	IW	AT	OC	AV	PT	DP	SP	NE	YEL	KN	VT	98
49	lal	49	TTT	LC	AS	DA	KAY	DT	EV	HN	VW	AT	HA	CV	PT	DP	NP	QEV	VL	VN	VT	98
99	vau	99	YIV	Q	M	H	ED	I	DL	WQ	SL	KP	CV	QM	TF	LC	VQ	MN	CT	DI	KN	148
99	lal	99	DM	VE	Q	M	H	ED	I	SL	WQ	SL	KP	CV	KL	TP	LC	VS	LK	CT	DL	148
149	vau	149	NTK	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	192
149	lal	149	SG	EM	ME	K	GE	I	K	NC	SF	NI	ST	S	IR	GK	VQ	KE	YA	FF	YK	196

图 3A

```

193 RLINCNSTTIRQACPKVSFEPIPIHYCAPAGCAIFKCNETGFNGTGLCKN 242
   . . . . . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | . . .
197 TLTS CNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFNGTGPCTN 246

243 VTVVTCTHGIKPTVSTCLILNGTLSKGNITIMGKNISDSGENILITLNTN 292
   . . . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
247 VSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEDEVIRSANFTDNAKTIIVQLNQS 296

      V3  37

293 ITIACERPGNOTIQKINAGPMAWYSWALSNTKGTTRAAECNYSATDHNKA 342
   : . . . . . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
297 VEINCTRPNNNTAKSIRIQHGPGRAFVTIKTEHNRBAHCNISRAKWNAT 346

343 LKNITERYLÉLVEYNQTDVTMKFGNHSGEDAEVTNFFFNCHGEFFYCNTN 392
   | | | . . . : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | |
347 LKQIASKLREQFGNNKTII...FKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNST 393

393 RLENHTFSCKKNMNTNNKINCTNISNNSNGTQAI..PCRLRQVVRDWMRGG 440
   . | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | |
394 QLENSTWF.....NSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRIKQFINMWQEVG 436

```

图 3B

vau	441	SGLYAPP	IPGNLVCRS	NITGMILQLDTPWKNKTHPNSTTLRP	GCGGDMKD	IW 490
lai	437	KAMYAPPI	SGQIRCSSNITGLLLTRDGGNNN..GSEIFRPGCGDMRDNW			484
				gp120 ← → gp41		
vau	491	RTOLF	KYKVVRVKPESVAPT	KIARPTIGTRSHREKRAAGLAMLELGILSA		540
lai	485	RSELYKYKVVKIEPLGVAPT	KAARRVV...OREKRAVGIGALFLGELGA			530
vau	541	AGSTMGAATA	LTVRTOHLIKGIVQQDNLLRAIQAOQHLLRPSVWGIRQ			590
lai	531	AGSTMGARSM	LTVQARQLLSGIVQQDNLLRAIEAQHLLOLTVMGIKQ			580
			优势免疫表位			
vau	591	LRAELLALAE	FIONQOLININGCKNKALICYTSVKWNKTWGGDN.ESIWDE			639
lai	581	LOARILAVEHYK	KKDDLLGFWGSGKLICTTAVPHNASWSNKSLEQIWNN			630

3C

```

vau 640 LTWQWDQQINNVSFIYEKIOEAQEQEKNEKELLEDEWASINWLDI 689
      :|| :||:|||| .||:|.. |:.|:|||||.|||||.||||:||||:|
la1 631 MTWMEWDREINNYSLSLIESQNQEKNEQELLELDKHWASLWNWFNI 680

vau 690 TKWLWYIKIAIIIVGALIGVRVWMIVLNLVKNIROGYOPLSLQIP100QA 739
      |.||||||| |:||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
la1 681 TNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPTPR 730

vau 740 EVGTPGGTGGGGDEDRRRNTPLPQGFHLHLLYTDLRTIILMIYHLLSNLA 789
      :.: |:|:|:|:|:| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 731 GPDREGIEEGGERDRDRSIRLVNGSLAIWDDLRSCLFSYHRLRDL 780

vau 790 SEIQKLIRHLGLGLHIIGQRTIEACRLFKAI IQYWLQELQTSATNLLDTV 839
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
la1 781 LIVTRIVE.....LLGRRGWEALKYWMNLLQYWSQELKNSAVSLLNAT 823

vau 840 AVAVANWTDSTILGIQSIGRGILNIPRRIROGLERLLL 877
      |:||||: ||..| .:|: |. | :||||| | | | | | | | | |
la1 824 AIAVAECTORVIEVVGACACRAIRHIPRRIROGLERILL 861

```

图 3D

HIV-1lai	RILAVEERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC
HIV-1Z321	-----I--
HIV-1eli	-----H--
HIV-1JRCSF	-V-----M-----
HIV-1WMJ	-V-----R-----
HIV-1NDK	-V-----R-----RH--
HIV-1mal	-V-----Q--R--M-----H--
SIVCPZGAB	-L-----Q--I--L-----AV-
 vau	 -L--L-TFIQN----NL---KNR---
mvp5180	-LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----
ant70	-L--L-TL-QN----SL---K---V-
 HIV-2rod	 -VT-I-K--Q--AR-NS---AFRQV-
HIV-2D194	-VT-I-K-----AQ-NS---AFRQV-

图 4

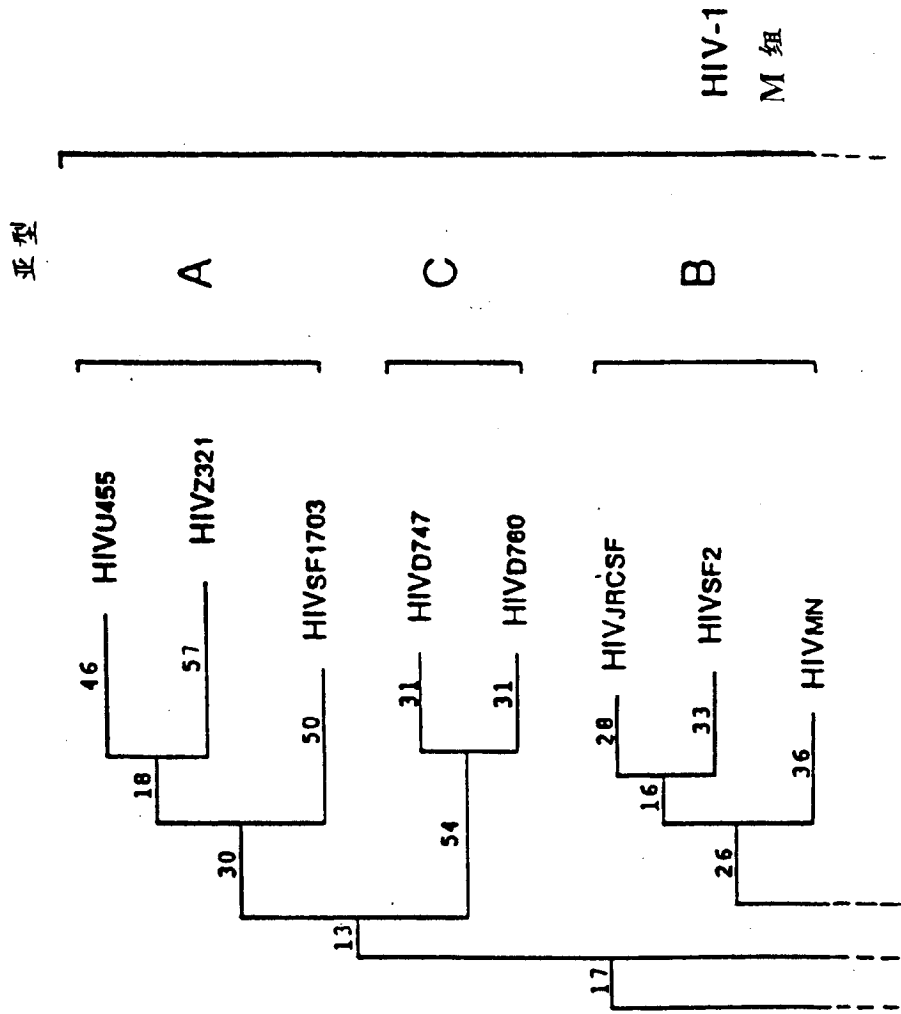


图 5A

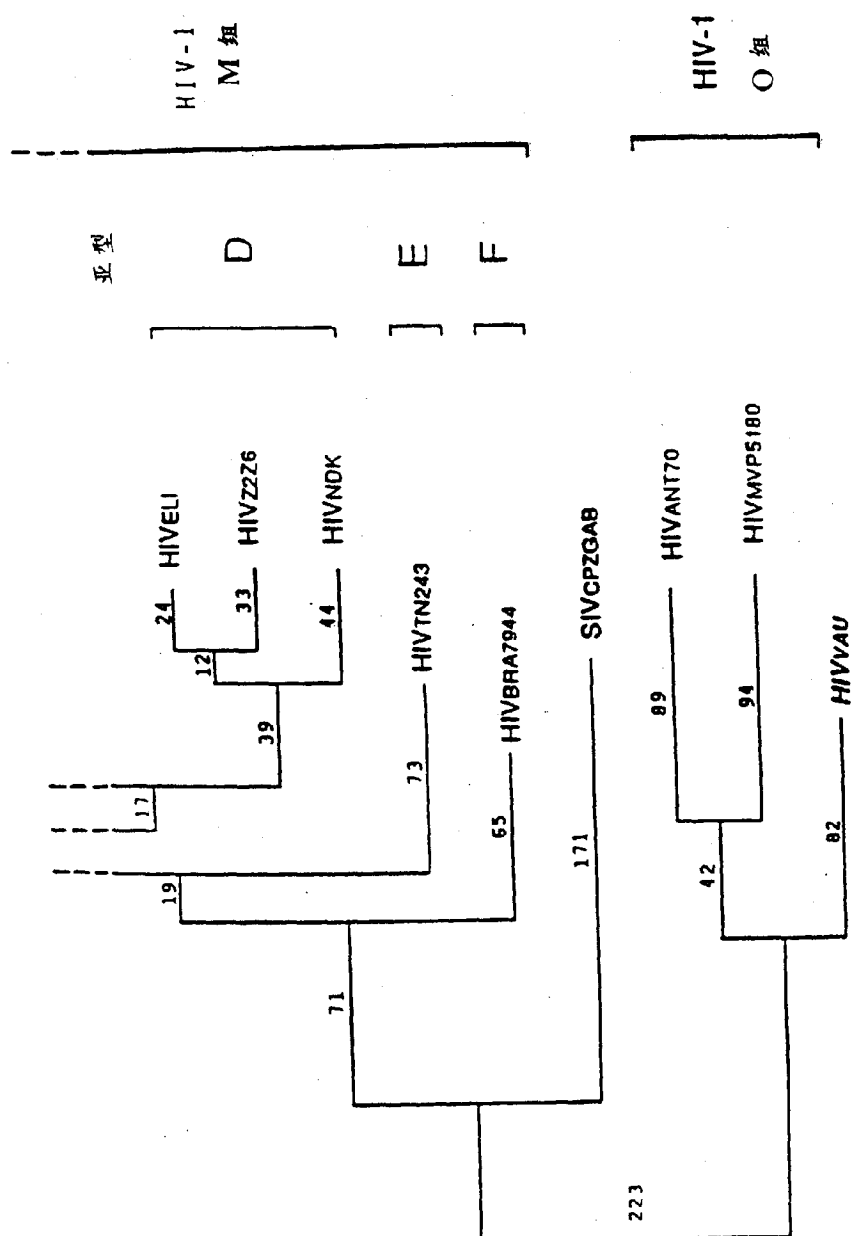


图 5B

DNA 序列 2631 b.p. ATGACAGCGATT ... CGACTCCTGTGA 线性

```

1  ATGACAGCGA TTATGAAGC AATGGGAG AGGACAGGA AGTTAGGGAT CTGGTGGCTG ATTTGGCTT TGATAATCCC ATGTTGAGC TGTAAACCAAC
101 TATATGCCAC AGTCTATTCT GGGGTACCCTG TATGGGAGA TGCAAAACCA ACATGTGTTCT GTCCTTCAGA TGCTAACTTG ACANGACTG AACAGCATAA
201 TATTTGGGCA ACACAGCCT GTGTTCCAC AGACCCACGT CCMAATGNAI ATGAGCTMAA AAATGTGACA GGTAAATTCA ATATATGAA AAATTATATA
301 GTAGACCCAA TGCACGNAGA CATTATAGAT TTGTGGGACC AGAGTTTMAA ACCTGTGTGT CMAATGACIT TCITGTGTGT ACAMTGAAT TGTACAGATA
401 TCAAAATATG TATTAAATCC ACMAACAGTC CCTTAAACTC AACAAADACA AAAGAGGTGA AACAGTGTGA CTTTAAATGTA ACTACAGTGC TCANAGACAA
501 ACAGGAGAAA AAACAGGCIC TATCTATGT GACAGCTTG GTTAAAGTAA AGCCACATC AAATGANAAC ATGTATAGT TAATTATATG TAACTCCACA
601 ACCATCAGGC AGCCTGTCC AAAGTATCT TTGAGCCCA TTCCCATACA CTATTGTGCT CCAGCGGGAT GTGCCATCTT TAAGTGAAT TAAGTGAAT GAACAGGAT
701 TTAATGGGAC AGGTCTCTGT AAAACGTTA CAGTAGTTAC TTGTACACAT GGCAATCAAC CNAACAGTNAG TACCCAACTA ATACTAATG GGACACTCTC
801 TAAAGGAAT ATACAAATCA TGGGAAGMA TATTCAGAC AGTGGGGAGA ACATCTTAT AACCTAAT ACTATATNA CANTAGCATG TGAGAGACCA
901 GGAATCAGA CAAACANAA GATAATGGA GGTCCATGG CTTGTACAG CATTGCCCCI AGTAATATAA AGGGGATAC AAGGGCAGC1 TATTGTNAIT
1001 ATAGTCCAC TGACTGGAC AAAGCCTTA AAACATMAA TGAAGATAT TTGAACTTG TAGAATATAA AGCACTGAT TTAACCATGA ATTGGTNA
1101 TCACAGTGT GAAGTGCAG AGTAAACAA TTTCTTTT AACTGTCTG GAGNATCTT TTAGTGTAC ACAATCGGC TGTATATCA TACCTTTTGC
1201 TCAAGAGA ATATGACCAA TAAAGATC AATTGTACTA ATATTAGCA TAAATAGCAAT GGCACTCAGG CAATACCTTG CAGGTTCAGA CAATAGTMA
1301 GGAATGGAT AATACACATC CTACAGCAC CACCTTAGA CCAGAGGGG AACCTAGTAT GCAGGTCAA CATACTGGA CATACTGGA ATGTTCTAC AATTGGACAC
1401 GCATGGGAT AATACACATC CTACAGCAC CACCTTAGA CCAGAGGGG AACCTAGTAT GCAGGTCAA CATACTGGA CATACTGGA ATGTTCTAC AATTGGACAC
1501 ACAGTMAAAC CTTTATAGT AGCACCMACA AATATGCAA GGCCAACTAT AGGAACTAGA TCTCAIAGAG AGAAAGAGC AGCAGGTTG GCATGCTAT
1601 TCTTGGGAT TCTAAGTGA GCAGGAGCA CTAATGGCC AGCCGCMACA GGCTGACGG TATGAGACCA GCATCTGATA AAGGTTATG TGCNACAGEA
1701 GATATACCTG CTAAAGGCA TACAGGCCA CTAATGGCC AGCCGCMACA GGCTGACGG TATGAGACCA GCATCTGATA AAGGTTATG TGCNACAGEA
1801 TTTATACAGA ATCAGCMACI CTTAACCCTG TGGGCTGCA AGAATAGACT AATCTGTCTAC ACATCAGTAA AGTGAATAA AACNTGGGA GGNATNAIT
1901 AATCAATTTG GGATGAGTTA ACATGGCAGC AGTGGGATC ACAGATNAAC AACGTMACT CTTCTATATA TGAATAATAA CAAGAGGCAC AAGAACAACA
2001 GGAGAAATAT GAGAAAGAT TGCTGGGTT AGATGAATG GCCTCTATT TCTAGTMAAG ACATATTAGC AGGATATCA ACCCTCTCG TTACAGATCC
2101 ATCATAGTAG GAGCACTAAT AGGTGTAGA GTAGTTATG TACTACTTA TCTAGTMAAG ACATATTAGC AGGATATCA ACCCTCTCG TTACAGATCC
2201 CCATCCACCA ACAGCGGAA GTAGGACCC GAGAGGAC AGGAGTAA GGTGGAGAGC ACATAGCCCA GAGATCCAGA AGTTCAGCAG AGTTCAGCAG ACACCTGGGA
2301 GCATCTGTTG TACACGGACC TCAGGACAT AATCTGTGG ATTACACC TCCTGAGCAA CTTAGCCCTC GAGATCCAGA AGTTCAGCAG AGTTCAGCAG ACACCTGGGA
2401 CTGGACTAT GGATCATAGG GCAGAGGACA ATTAAGCTT CGAGACTCT TAAAGCTATA ATACATAT GGTACAGA ATTGCMACT AGTCTACPA
2501 ATCTACTAGA TACTGTGCA GTGGCAGTG CTAAATGGAC TGAACAGCAT AGGGAGAGG ATCTTAAACA TACCNAAGNAG
2601 GATTAGACAG GGCCTTGAAC GACTCCTGT A

```

图 6

```

      | 10      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      | 80
      | 10      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      | 80
1 GCAGAGACAG GACAGGAAC TGCCTACTTC CTGTTAAAT TAGCAGCAAG ATGGCCTATT AAAATACTAC ATACAGACAA
81 TGGGCCCTAAC TTTACAAGTG CAGCCATGAA AGCTGCATGT TGGTGGACAA ACATACAACA TGAGTTTGGG ATACCATACA
161 ATCCACAAAG TCAGGGAGTA GTAGAAGCCA TAGACAAGGA TTAATAATCA ATCATACAGG TGAGGGACCA AGCAGAGCAC
241 TTAAGGACAG CAGTACAAAT GGCAGTATTT GGCAGTATTT TTAATAAGAA AGGGGGATT GGGGGGTACA CTGCAGGAGA
321 GAGATTAAATA GACATATTAG CATCACAAAT CATCACAAAT GAACTACAAA AACAAATTTT AAAAATTCNA AATTTCGGG
401 TCTATTACAG AGACAGCAGA GACCCCTATTT GAAAGGACC GGCACAGCTC CTG
      | 10      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      | 80

```

图 7

	特	特	特	特	特	特
DUR	q	q	g	m	v	h
ANT	q	q	m	v	h	q
MVP	a	l	s	p	r	t
LAI	n	a	w	k	a	e
MAL	k	a	f	i	p	m
CPZ	f	a	k	e	e	k

图 8A

DUR
ANT
MVP
LAI
MAL
CPZ

[illegible]

图 8B

GP120 V3 环区

---YK---ORTG- ---Q-LY- THR-I-DI_ ----
CTRPNNTRKSIRIQRGPAFVT_ IGK_IGNM_ RQAHG
-----NR-S- -----H-- TKQ-I-DI_ ----
-A--YQ---QRTP- _L-QSLX- TR_SRSII_ G----
----G-----RGIHF_ ---QALY- T- -V-DI_ -R-Y-
-S--Y-TRKNIRRYSI-S-QAFYV_ T---I-DI_ -Q---
-H--G-----GE_ VQI---MTFYN_ -ENVV-DT_ -S-Y-

MAD_
LAI
OYI
ELI
MAL
455
CPZ

-E--QI_DIQE_MRI-- M-WYSMG--GTA--S_ S---Y-
-I-EGIAEVQD-YT_ -- MRWRSM_TLIRSNT_S-V-Y-
-E--G-QTIQK-MA_ -- M-WYSMALSTK-DT_S-A-Y-
-V--G--SV-E-K- _M-WYSMQ-EREGKGANS-T-F-
C*RR*****I****GP_M*W*SM*****SR*A*C
CVRPGNNSVKEIKI_ GP_MAWYSMQIEREGKGANSRTAFL

ANT
MVP
VAU
DUR
HIV-O 共有
DUR

图 9A

42

GP41 优势免疫区

	[-----]
	[-----]
MAD	-V---Q-----H---T---S---
LAI	RI LAVERYLNKQQLGIGWCSGKLICTTAVPWNASWS
OYI	-V-----T-----
ELI	-----H---N---S---
MAL	-V---Q-R---M---H---F---S---
455	-V---Q-----T---S---
CPZ	-L---Q---I---L-----AV-Y-T---N---P
ANT	-L--L-TL-QN---SL---K---V-Y-S-K--RT-I
MVP	-LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----Y-S-K--RT-I
VAU	-L--L-TFIQN-----NL---KNR---Y-S-K--KT-G
DUR	-L--L-TLMQN-----NL---R--A--Y-S-Q--ET-G
HIV-O 共有	RL*ALET**QNQQ*L*LMGC*****CITSV*WN*TW*
DUR	RLLALETLMQNQQLNLNMGCRGKAICYTSVQWNETWG
	[-----]
	[-----]

图 9B

CAGGACAAATGGTACATCAGGCCATCTCCCCAGAACCTTTATGTATGGTAAAGGCA
 GTAGAAGAAAAGGCCCTTTAACCCCTGAAATTATCCCTATGTTTATGGCACTATCAGAAAGGA
 GCTGTTCCCTATGATATCAATGTTATGCTAAATGCCATAGGAGGACACCAAGGGGCTTTA
 CAAGTATTAAGAAAGTAAATCAATGATGAAGCAGCAGACTGGGATAGAGCTCACCCACAA
 CAGGCAGGGCCGTTACCAACGAGGACAGATAAGGGAACCCACAGGAAGTGACATTGCTGGA
 ACAACTAGCACACAGCAAGAGCAAAATTTCTCTGGACTACTAGGCGAGGTAAACCTATCCCA
 GTTGGAGACATCTATAGGAAATGGATAGTGTGGGTCTAAACAATAATGGTAAATGTAT
 AGTCCAGTGAGCATCTTAGATATTAGGCAGGACCAAAAGAACCATTTAGAGATTATGTA
 GACAGGTTTCTACAAAACATTAAAGAGCTGAGCAO

HIV - ODUR 毒株 GAG 区: 513 个碱基对

z SEQ ID N° 9

QGQNVTHQALSPRTLNAWVKAVEEKAFNPEUPMFMALSEGAVPYDINVMMLNAJGGHQGAL
 QVLKEVINDEAADWDRAPQAGPLPPGQIREPTGSDIAQTSTQEQILWTTTRAGNPBP
 VGDITRKWIVLGLNKQIVKMYSPVSILDRQGFKEPFRDYVDRFYKTLRAEQ

HIV - O 病毒 DUR 毒株 GAG 区: 171 个氨基酸

图 10

ATTCCAATACACTATTGTGCTCCAGCAGGATATGCTATCTTTAAATGCAACAACGAGGAG
TTTACTGGAAAAGGCCCATGTAAACAATTCAGTAGTTACCTGTACACAGGGTATCAAG
CCAACAGTAAGCACTCATCTAATATTCATGGACAATCTCTGAAAGAAATTAAGAAAT
ATGGGAAAGAACATCTCGAGCAACTCAGGTATATCTCTAGTACCCTAAATCTACTATA
AACATGACCTGTGTGAGCCAGGAAATATTCAGTACAGGAGATAAAATAGGTCCAAATG
GCTTGGTACAGTATGCCAATTGAGCGAGAGGAAAAGGAGCAAAATTCAGAACAGCTTTT
TGTAACCTATAATGCCACGGAGCTGGAGAAAACCTTCCAGGGATAGCTGAAAGGTATTTA
GAACCTTGTAAATAAAACAAGTCCGACTGAAATAATGTTCAATAAAAGCAATGGTGGAGAT
GCAGAAATAACCCGTTTGCATTTTAAGTGTGATGGAGAAATTCCTT

gp120 DUR 毒株 V3 环: 525 个碱基对
= • Seq 10 N° 10

IPHYCAPAGYAIFKCNNEFTGKGPCNNISVVTCTQGIKPTVSTHLFNGTISERKJRI
MGKNISSNSGNLVTLNSTDMTCVPRGNNSVQEKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAF
CTYNATDWRKTLQGLAERYLELVNKTSPTEIMFNKSNQGD AEITRLHFNSCOEFF

gp120 DUR 毒株 V3 环: 175 个氨基酸

图 11

ATAGTGCAACAGCAGGACAACCTGCTGAGAGCAATACAGGCCAGCAACATCTGCTGAGG
TTATCTGTATGGGGTATTAGACAACCTCCGAGCTCGCCTGCTAGCCTTAGAAACCCCTTATG
CAGAAATCAGCAACTCCTAAACCTGTGGGTTGTAGAGGAAAGCAATCTGCTACACATCA
GTACAAATGGAATGAACATGGGGAGGAAATGACTCAATTTGGGACAGGTTAACATGGCAG
CAATGGGATCAACAGATAGCCAAATGTAAGCTCTTTATATATGACAAAATACAAAGAGCA
CAAGAAACACAA

HIV1 - O D_{UR} GP41 优势免疫区 DNA 序列: 312 个碱基对

= Seq ID N° 11

IVQQQDNLLRAIQAAQQHLLRLSVWGRQLRARLLALETLNQNLNLWGCRGKAICYTS
VQWNETWGGNDSIWDRLLTWQQWDQQLANVSSFYDKJQEAQEQQ

HIV1 - O D_{UR} GP41 优势免疫区 DNA 序列一推定的蛋白质:
104 个氨基酸

图 12

HIV - O 型特异性引物

dur V3a	ATT-CCA-ATA-CAC-TAT-TGT-GCT-CCA-3'
dur V3r	AAA-GAA-TTC-TCC-ATG-ACT-GTT-AAA-3'
dur 41a	GGT-ATA-GTG-CAA-CAG-CAG-GAC-AAC-3'
dur 41r	AGA-GGC-CCA-TTC-ATC-TAA-CTC-3'

图 13A

引物位置

在 HIV MVP5180 中		
dur V3a		6896 至 6919
dur V3r		7400 至 7423
dur 41a		7934 至 7957
dur 41r		8292 至 8302
在 HIV ANT70 中		
dur V3a		6896 至 6920
dur V3r		7392 至 7415
dur 41a		7917 至 7940
dur 41r		8256 至 8276
在 HIV1 VAU 中		
dur V3a		640 至 663
dur V3r		1138 至 1161
dur 41a		1684 至 1707
dur 41r		2026 至 2046

图 13B

Y3	
HIV1-M 共有	阴性
HIV1-M MAL (非洲)	阴性
HIV1-M CIV-CPZ (黑猩猩)	阴性
HIV1-O MVP5180	阴性
HIV1-O ANT70	阴性

GP41	
HIV1-M Con 共有 :	
- Pasteur 标准	阴性
- Innogenetics 右延伸	弱阳性
HIV1-O MVP5180 :	
- Innogenetics	阴性
- Behring 左延伸	阳性
HIV1-O VAU	阳性

图 14

核苷酸比较

以百分不同表示

GP41 : 来自 330 个碱基

LAI	0						
MAL	11	0					
CPZ	33	31	0				
MVP5180	39	38	38	0			
ANT70	36	39	37	15	0		
VAU	39	38	38	14	14	0	
DUR	38	36	37	13	15	11	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

图 15A

V3 (来自 558 个碱基)							
LAI	0						
MAL	19	0					
CPZ	37	34	0				
MVP5180	46	43	45	0			
ANT70	45	44	43	23	0		
VAU	44	41	41	24	24	0	
DUR	46	43	42	25	22	24	0
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

gag (来自 520 个碱基)						
LAI	0					
MAL	9	0				
CPZ	21	25	0			
MVP5180	24	26	25	0		
ANT70	25	25	24	10	0	
DUR	25	26	25	9	10	0
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR
				5180	70	

图 15B

蛋白质比较

以百分不同表示

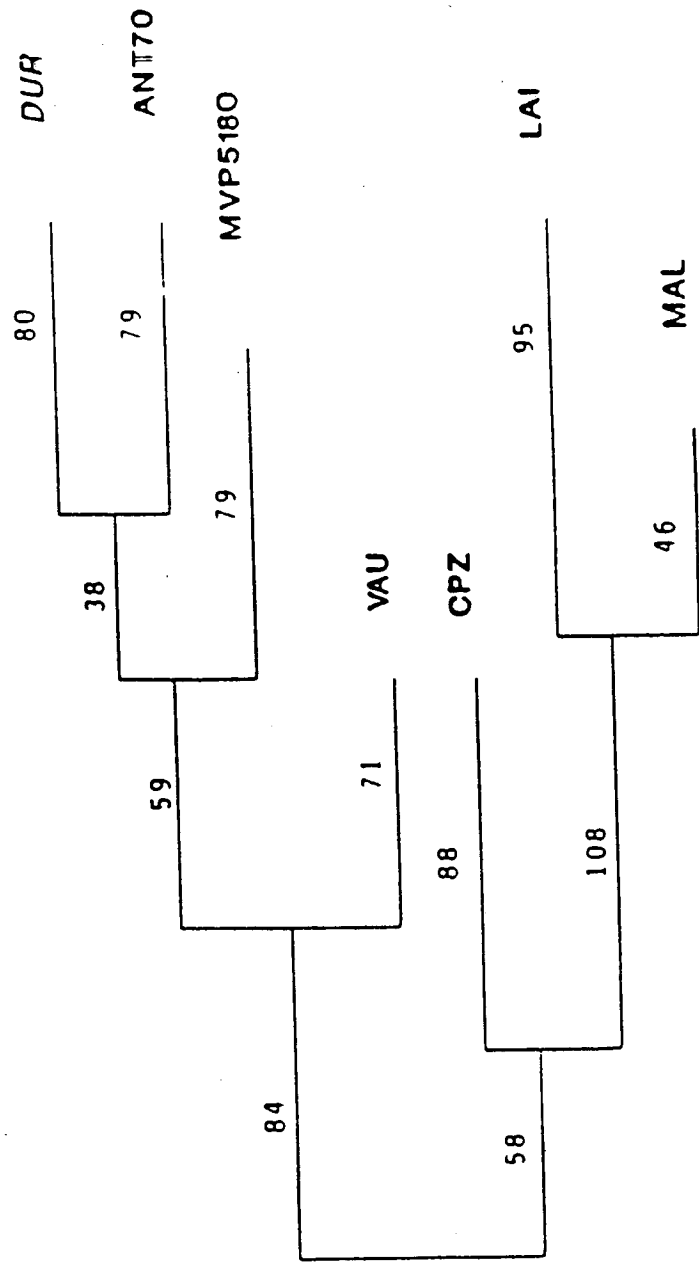
GP41 (来自 109 个氨基酸)							
LAI	0						
MAL	17	0					
CPZ	33	28	0				
MVP5180	42	40	41	0			
ANT70	42	45	39	22	0		
VAU	44	47	45	19	21	0	
DUR	44	42	39	17	17	14	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

图 16A

V3 (来自 18 个氨基酸)							
LAI	0						
MAL	31	0					
CPZ	46	39	0				
MVP5180	55	50	59	0			
ANT70	55	50	55	36	0		
VAU	55	51	55	39	36	0	
DUR	56	51	56	39	35	42	0
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

gag (来自 174 个氨基酸)							
LAI	0						
MAL	6	0					
CPZ	11	14	0				
MVP5180	21	23	18	0			
ANT70	21	24	19	6	0		
DUR	22	22	19	7	9	0	
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR	
				5180	70		

图 16B



V3 系统发育树
(Treealign 程序, J. Hein, on Bisancé, Citi2)
(来自 171 个氨基酸)

图 17

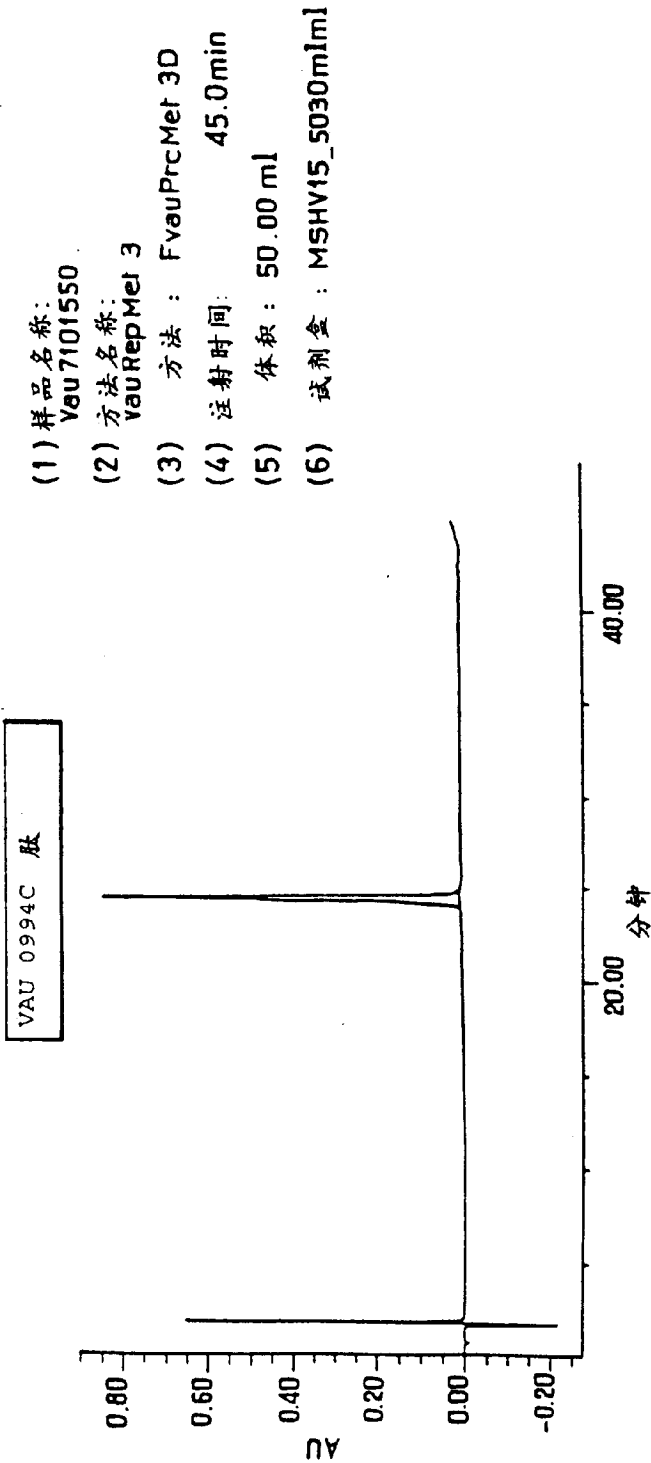


图 18A

色谱分析结果

保留时间 (min)	起始时间 (min)	最终时间 (min)	* 表面区	Int 型:
24.482	23.898	24.932	100.00	BB

图 18B

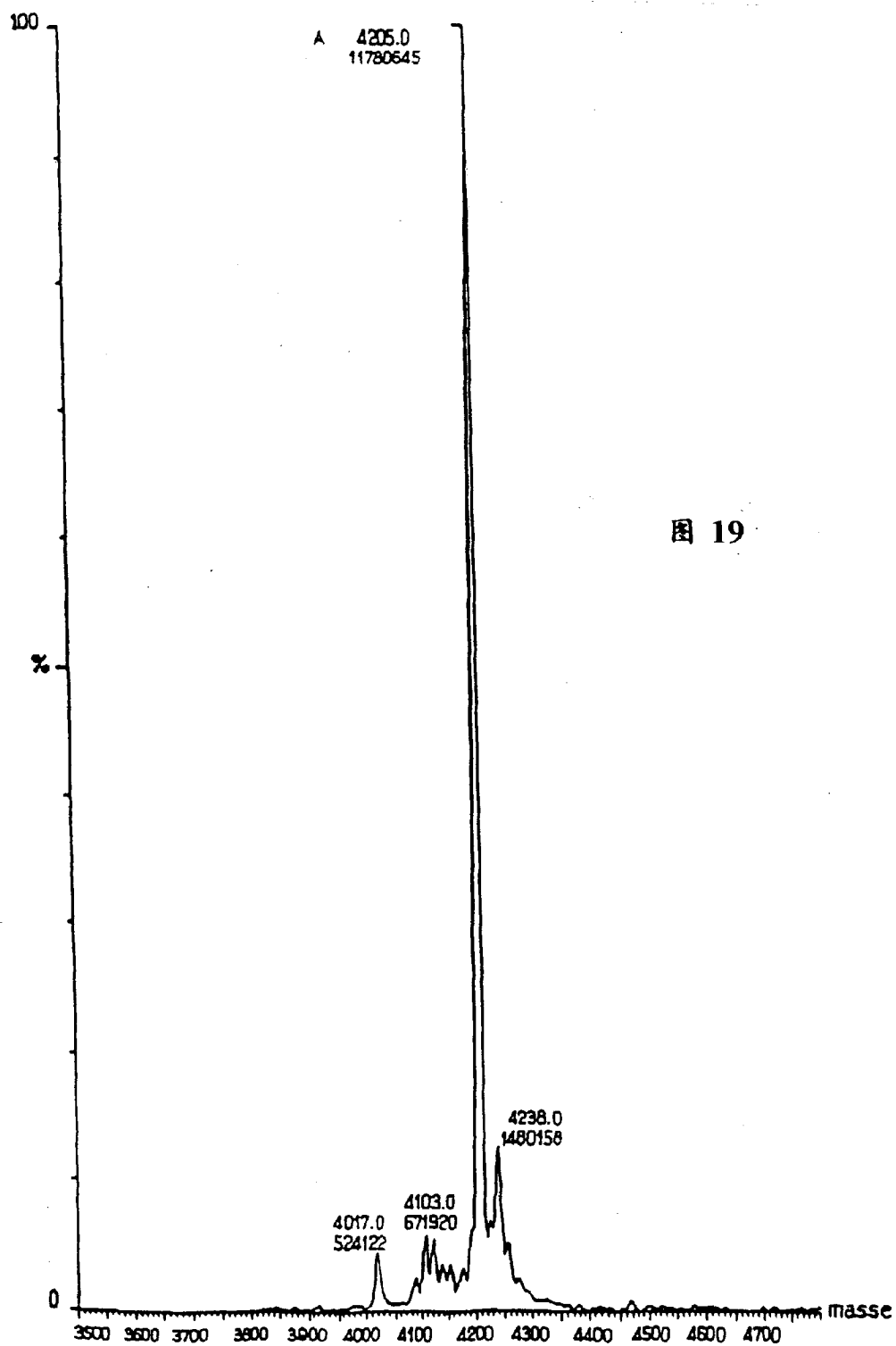


图 19

VAU 肽

REF : F Vau 0994 C 710

序列 : RLLALETFIQNQQLLNLWGCKNRLLICYTSVKWNKT

长度 : 35

分子量 : 4210

分析对照 : >HPLC 和质谱大于 95 %

图 20

模仿 GP160 VAU 序列 (O 亚型) 优势免疫肽之肽的免疫反应性研究

VS=0.4 比率	VAU 肽 2 μ g/ml
<u>HIV1 血清 (BBI 系列)</u>	
B01AF12	0.80
B01NC7	0.40
B01NC15	0.80
PRB911K6	0.20
<u>HIV1 血清 (Romania)</u> <u>stage 3/4</u>	
3989	9.50
5116	8.60
<u>HIV1 血清 (panel AFM)</u> <u>subtype O 亚型</u>	
MAA	>30
LOB	>30
HAM	>30
DUR	12.50
<u>HIV1 血清 (Reims)</u> <u>sub M 亚型?</u>	
MAD	0.20

图 21A

O 型上清液 (Yaoundé Pasteur 中心)	
3372	0.60
3381	>30
1507	28.80
3157	28.70
2628	>30
1060	28.10
4020	0.60
5713	0.30
5322	0.30
5666	0.40
5527	0.50
5863	0.30
5969	25.00
5487	>30
5507	>30
5787	0.70
5453	>30
3828	27.30
HIV2 血清	1.50
BERT	0.30
PAOL	4.50
RIV	15.80

间接 EIA 方法；3 × 30 分钟类型 Genelavia Mixt

阴性血清	
N=48	
平均值:	0.022
DS	0.007
平均值	
+12DS	0.107
VS	0.100

图 21B

在非洲血清上获得的结果的总结

	WB1 结果									
	GP 160	GF 120	P 68	P 55	GP 41	P 40	P 34	P 25	P 18	
3361	++	+-	+				++	+	+	POS
1507	+	+-					+-	+-		POS
2628	+-		++	++		+	+	++	++	POS
3167	++	+	++	++	+	+	++	++	++	POS
3372	++	+-	+	++	+	+	++	++	+-	POS
5453	++	+-	+	+	+-	+	+	+	+	POS
5863	++	+-	+	+	+-	+-	+	+	+	POS
5969	+-		+	+		+	+	+		IND
6487	++		+	+			+	+-	+-	IND
6782	++		+	+	+	+	+	+		POS
950	+-		+-				+-	+-	+-	IND
1060	+-							+-	+	IND
5527										?
6509	++		+-				+-			IND
6661	+							+		IND
4020=	+							(+-)		IND
SEMT										
4783=	+-							+-	+-	IND
5322										
3826								+-	+-	IND
MAD	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS
DUR										
MAA										
LOB	+		++	+-			++	++		IND
HAM			+				+	+		IND

=比率<1
 =比率>2

图 22A

	DE 筛选试验 (比率: DOVS)				
	Clonated Ind HIV1+2	GEM Ind HIV1+2	Abbott sdw HIV1+2	Murex sdw HIV1+2	Murex comp HIV1
3361	0.10	18.00	0.56	0.72	1.40
1507	0.97	14.25	3.03	5.35	0.98
2628	0.70	18.00	4.84	1.71	1.34
3167	0.33	18.30	11.89	>6	0.88
3372	0.19	18.80	11.63	3.76	0.47
5453	2.50	>20			1.70
5863	2.30	>20			1.90
5969	2.30	15.20			2.25
6487	0.30	19.70			1.90
6782	0.0	13.40			2.95
950	1.20	6.00	5.76	>6	0.68
1060	0.60	18.00	0.46	1.25	0.67
5527	0.12	2.40			0.52
6509	0.12	>16			2.14
6661	8.10	10.10			1.54
4020=	0.73	6.30	1.03	4.98	4.12
SENT					
4783=	0.9	8.10	0.41		0.55
5322		10.90			0.52
3826		3.93		1.64	0.72
MAD	-	+	+		
DUR		>8	2.00	0.80	
MAA					
LOB		>19	2.00	2.70	1.50
HAM		>19	1.80	7.80	2.70

图 22B

	-EIA 肽							
	Clonatec rap HIV1	39D6 HIV1B	FER HIV1B	39A HIV1B	VAU HIV1O	MVPP 5180 HIV1O	BNR 19 HIV1O	PEPTI- LAV1-2
3361	+				28.8	25.80	NT	
1507	不确定			8.4	28.7	28.80	1.7	
2628				3.6	28.1	19.30	1.2	
3167				>30	>30	>30	1.6	
3372	+-			2.8	>30	24.00	4.9	
6453	-	4.36	1.37	3.6	27.3		1.6	-
5863	-	1.42	0.40	1.4	25		0.5	-
5969	-	0.94	1.90	19.4	>30		0.6	+
6487	+	25.76	5.76	>30	>30		0.7	
6782	-	0.64	0.49	0.8	>30		10.3	-
950	不确定				0.6		0.4	
1060				1.9	0.6	0.40	0.2	
5527				4.6	0.3		1.2	+-
6609				16.9	0.7		0.2	
6661				2.8	0.5		0.4	
4020=	?Ag-			1.15	0.3		0.5	
SEMT				1.2	0.7		0.9	
4783=				2.5	0.3		0.3	
5322				4	0.4		0.3	
3826				1.6	1.5		0.7	
MAD		0.66	2.72	26.7	0.2		>30	-
DUR		>30	>30	>30	12.5		0.2	
MAA				NT	>30		NT	
LOB		1.02	5.62	12.5	>30		>30	
HAM		0.73	0.41	13.3	>30		0.7	

图 22C