



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92113703.6

[51] Int.Cl⁵

A61K 39/145

[43] 公开日 1993 年 7 月 7 日

[22] 申请日 92.12.10

[30] 优先权

[32] 91.12.11 [33] US [31] 805,105

[71] 申请人 美国家用产品公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 洪伯文 林少光

N·K·卡利扬

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成 汪 洋

A61K 37/02 C12P 21/02

C12N 15/09

说明书页数: 29 附图页数: 2

[54] 发明名称 用病毒抗原表达特异性免疫原

[57] 摘要

提供了嵌合 DNA 片段,它包括与编码具有 5 个免疫显性抗原性位点的甲型流感病毒 HA 表面蛋白的核苷酸顺序基本相同的核苷酸顺序,其中,与编码外源性抗原决定簇的核苷酸顺序基本相同的核苷酸顺序被插入到抗原性位点的核苷酸顺序中。还提供了相应的嵌合肽、表达载体及转化的宿主。这些肽可用于提供抗不同抗原的疫苗,并可用于检测这类抗原存在的检测药盒中。此外,这些肽或其相应抗体可用于治疗和预防由于接触这些抗原而引起的症状的方法,包括免疫疗法。

1. 一种制备抗病毒、病原菌或其它抗原疫苗的方法，其中，使一种肽与一种佐剂混合或结合，所述肽含有与具有 5 个免疫显性抗原性位点的甲型流感病毒 H A 表面蛋白基本相同的氨基酸顺序，所说的肽在至少一个所说抗原性位点插入了一段氨基酸顺序，该顺序与功能性呈递所说病毒、病原菌或其它抗原的外源性抗原决定簇基本相同。

2. 权利要求 1 的方法，其中所说的抗原性位点是 H A 蛋白的 A 区。

3. 权利要求 1 的方法，其中所说的抗原性位点相应于 H A 蛋白的氨基酸 1 8 3 - 1 9 2。

4. 权利要求 1 - 3 中任一项的方法，其中所说的插入是至少 1 2 个氨基酸单位的氨基酸顺序。

5. 权利要求 1 - 4 中任一项的方法，其中外源性抗原决定簇是病毒抗原决定簇、I g E 效应位点抗原决定簇、细菌蛋白抗原决定簇、肿瘤抗原决定簇或 S p 1 0 抗原决定簇。

6. 权利要求 1 - 4 中任一项的方法，其中外源性抗原决定簇是 H I V 抗原决定簇。

7. 权利要求 6 的方法，其中抗原决定簇是 T 2 0 E、T 1 6 G、D 1 8 S、G 2 0 E、K 2 7 R、E 1 4 Q、N 2 2 G、p 1 7、p 2 4、g p 1 6 0 或 g p 1 2 0。

8. 权利要求 1 - 7 中任一项的方法，其中佐剂是 Syntex 佐剂或明矾。

9. 一种制备肽的方法，所说的肽含有与具有 5 个免疫显性抗原

性位点的甲型流感病毒H A表面蛋白基本相同的氨基酸顺序，所说的肽在至少一个所说抗原性位点插入了一段与一种外源性抗原决定簇基本相同的氨基酸顺序，该方法包括，通过重组D N A技术构建含有编码所说肽的D N A顺序的可复制表达载体，转化适宜的宿主细胞以导入所说的表达载体并获每转化的宿主细胞，培养转化的宿主细胞以表达所说的肽，回收所说的肽。

1 0 . 权利要求 9 的方法，其中所说的抗原性位点是H A蛋白的A区。

1 1 . 权利要求 9 的方法，其中所说的抗原性位点相应于H A蛋白的氨基酸1 8 3 - 1 9 2 。

1 2 . 权利要求 9 - 1 1 中任一项的方法，其中所说的插入是长度至少为1 2个氨基酸的氨基酸顺序。

1 3 . 权利要求 9 - 1 2 中任一项的方法，其中外源性抗原决定簇是病毒抗原决定簇、I g E效应位点抗原决定簇、细菌蛋白抗原决定簇、肿瘤抗原决定簇或S P 1 0抗原决定簇。

1 4 . 权利要求 9 - 1 2 中任一项的方法，其中外源性抗原决定簇是H I V抗原决定簇。

1 5 . 权利要求 1 4 的方法，其中抗原决定簇是T 2 0 E、T 1 6 G、D 1 8 S、G 2 0 E、K 2 7 R、E 1 4 Q、N 2 2 G、P 1 7、P 2 4、g p 1 6 0或g p 1 2 0。

用病毒抗原表达特异性免疫原

本发明涉及流感病毒血凝素（H A）嵌合蛋白，这些蛋白可以用作抗病毒、抗病原菌或抗其它对癌组织、变态反应等具有特异性的抗原的疫苗，这些嵌合蛋白还可以用于这类抗原所致症状的治疗和这类抗原或相关抗体的检测。本发明还提供了编码这类蛋白质的核苷酸顺序。

外源性抗原决定簇，如人类免疫缺陷病毒抗原决定簇，被插入到H A蛋白的抗原性位点，这些嵌合蛋白就能够诱导针对所插入的抗原决定簇的特异性免疫反应。

有许多手段用于制备疫苗。对病毒性疾病而言，这些方法包括应用灭活病毒、活病毒、活重组病毒、病毒蛋白、病毒亚单位蛋白等。

但是，许多类型的疫苗只取得了有限的成功，其部分原因在于生物体的株系或分离物之间彼此有广泛的遗传变异。此外，参与发病机理的人或动物抗原，即参与变态反应的I g E、肿瘤抗原等，在产生这些抗原的同种动物体内并不诱发有益的免疫反应，这些抗原实际上被作为自身蛋白而不是抗原来对待。

然而，希望用具有给定抗原的生物学功能的小的肽顺序或抗原决定簇作免疫原，即使在同源动物中也是如此。从理论上讲，当这些肽被注射到动物体内后，就能用于诱导免疫反应。但实际上，这些肽常常并不是良好的免疫原，因为它们一般都很小，不能使自身有利地呈

递给免疫系统。

人免疫缺陷病毒 (H I V) 的外被膜糖蛋白 (g p 1 2 0) 第二保守区, 就是这类弱免疫原性肽的例子。已发现该区域对于H I V的感染性和抗体中和作用是很重要的 (Science, 1988年2月26日, p 1021)。针对该区域 (氨基酸254-274) 的抗血清可以在体外中和三种不同的H I V分离物, 而不影响病毒与T细胞受体或C D 4阳性细胞的结合。据信, 该保守区在病毒穿入过程中的后结合作用中很关键, 因而可能是抗体中和作用的潜在靶体。但是, 已经观察到, 在天然的H I V感染过程中, 当该区域被呈递给免疫系统时, 它相对地处于“免疫静止” (immunosilent) 状态。这种免疫静止现象提示, 该抗原决定簇可能由于 (例如) 蛋白质的构型而被遮掩。

有关H I V抗原进一步的详细情况可参见下列文献: Rusche 等, “抑制人免疫缺陷病毒感染细胞融合的抗体与病毒被膜gp120结合”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3198-3202, 1988年5月; Bolognesi, “抗S I V和H I V疫苗研制进展”, Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 3:390-394, Raven Press, Ltd, New York, 1990; Wain-Hobson, “艾滋病毒L A V的核苷酸顺序”, Cell, 40:9-17, 1985年1月; Ho等, “g p 1 2 0的第二保守区对H I V的感染性和抗体中和作用起重要作用”, Science, 239:1021-1023, 1988年2月26日。

增强抗原决定簇肽免疫原性的一个途径是通过以某种方式将它们与融合蛋白、大分子或佐剂相连接, 增大它们的体积, 从而增强其识别能力。

Colbere-Garapin 等人报道了Ⅲ型脊髓灰质炎病毒插入突变株（萨宾株）的制备，其中，将额外的氨基酸顺序（三肽或六肽）插入到衣壳蛋白VP1的中和位点1中（Colbere - Garapin 等，“在脊髓灰质炎病毒的主要衣壳蛋白中加入外源性寡肽”，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，85：8668-8672，1989年11月）。

Evans 等人报道了含有I型人免疫缺陷病毒（HIV-1）跨膜糖蛋白（gp 41）的抗原决定簇的脊髓灰质炎病毒抗原性嵌合蛋白的构建和鉴定。通过皮下注射活的脊髓灰质炎病毒/HIV嵌合体得到的兔抗血清显示出对多种美洲和非洲HIV-1分离物具有广泛的中和作用（Evans 等，“一种经过改造的脊髓灰质炎病毒嵌合体能诱导出具有广泛反应性的HIV-1中和抗体”，*Nature*，339：385-388，1989年6月1日）。但是，利用活的病毒载体，例如脊髓灰质炎病毒，会产生实际应用的问题，因为血清抗体可能会抑制重组病毒在机体中的复制。此外，活的病毒载体对插入片段的大小有严格限制，因而所提供的插入位点的数目有限。

Wu 等人报道了将对应于乙型肝炎病毒表面抗原S（122-137）和前S₂（120-145）的氨基酸残基的合成寡核苷酸码内（in frame）插入到克隆的沙门氏菌鞭毛蛋白基因的高可变区。正如通过ELISA检测到的，用活的重组细菌免疫的动物产生了特异于乙型肝炎病毒抗原决定簇的抗体（Wu等，“用沙门氏菌的疫苗株以杂交鞭毛蛋白表达乙型肝炎表面抗原的免疫原性抗原决定簇”，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，86：4726-4730，1989年6月）。所产生的免疫反应很弱，持续的时间很短，并在

免疫后迅速消退。

Michel 等人报道了将各种H I V被膜片段插入到乙型肝炎病毒表面抗原中。用这些融合蛋白免疫家兔产生了中和性抗体（Michel 等，“在用重组H I V－乙型肝炎表面抗原颗粒免疫的家兔体内诱导抗人免疫缺陷病毒（H I V）中和性抗体”，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7957－7961, 1988）。

同样，还发现大鼠肥大细胞在体外和体内的组胺释放可由于用人肽－蛋白结合物进行免疫而受到抑制（Stanworth 等，“用一种肽类疫苗进行变态反应治疗”，The Lancet, 336: 1279－1281, 1990年10月7日；Stanworth 等，“高亲和性和低亲和性I g E受体在细胞信号传递过程中的作用”，Molecular Immunology, 27(12): 1291－1296, 1990）。

单克隆抗体（m A b s）也已广泛用于被动免疫和诊断目的，以检测感染或象是否有肿瘤抗原存在这样的病理状况。但是，生产所需特异性单克隆抗体要做大量工作，而且结果难以预料。为了确定一个单克隆抗体的特异性，需要进行涉及一系列重叠肽的多个盲目筛选和测定步骤。有时，功能性抗原决定簇可能并不存在于供抗原产生抗该区单克隆抗体的免疫原性位置上。

因此，需要本发明的能够利用抗原决定簇潜在免疫原性的疫苗、诊断试剂和治疗剂。

现已发现了具有免疫原性的一些嵌合蛋白，它们含有插入了外源性抗原决定簇的甲型流感病毒H A蛋白。用这些重组或合成的嵌合蛋白免疫哺乳动物导致肽特异性抗体的产生。由这些嵌合蛋白诱发的免疫反应持续时间长。例如持续六个月以上。这些嵌合蛋白或相应抗体

还可以作为诊断工具和抗感染免疫疗法用于某些病理状况以及象医院中偶然发生的针刺等所致的后暴露病例中。

还已经发现了编码H A 嵌合蛋白的D N A 片段。这些片段所含有的核苷酸顺序，基本上与编码具有5个免疫显性抗原性位点的甲型流感病毒H A 表面蛋白的顺序相同。根据本发明，将一段基本上与编码某种外源抗原决定簇的顺序相同的核苷酸顺序，插入到编码至少一个抗原性位点的核苷酸顺序中。

本发明还包括一些肽，它们所包含的氨基酸顺序与具有5个免疫显性抗原性位点的甲型流感病毒H A 表面蛋白基本相同，其中，与外源性抗原决定簇基本上相同的一段氨基酸顺序，被插入到至少一个免疫原性抗原性位点的氨基酸顺序中。

这些蛋白可以以有效量给需要治疗或预防各种病症的哺乳动物（包括人）施用。此外，可以用这些肽或相应抗体，最好通过血液或血液的某一部分，检测哺乳动物所接触到的各种抗原。含有上述肽的疫苗；含有上述D N A 片段的表达载体，特别是杆状病毒；以及转化的微生物宿主，都包含在本发明中。

图1是甲型流感病毒H A 蛋白的示意图。

图2是将一个示例性H I V 抗原决定簇插入H A 基因，并在H A 基因的498bp处（相应于氨基酸139）产生一个A p a I 位点的流程图。

本发明涉及含有一个插入了抗原决定簇的H A 流感病毒表面蛋白的新D N A 和肽的合成、表达和应用，以及这些D N A 和肽本身。

A. 流感病毒H A 蛋白

甲型流感病毒的H A 表面蛋白是甲型流感病毒的两种表面蛋白之

一。另一种表面蛋白是神经氨酸苷酶 (NA) HA 是该病毒的主要表面糖蛋白, 是中和性抗体所针对的抗原。HA 还控制病毒与细胞受体的附着, 因此也控制病毒感染的启动。甲型流感病毒引起常见流行病是因为该病毒有广泛的抗原变异, 这些变异源于 HA 主要抗原性位点中的氨基酸变化。

已克隆了不同流感病毒株的各种 HA 基因, 它们都适用于本发明。特别值得注意的是 A/WSN/33 株的 HA 基因。该基因的长度是 1775 个核苷酸, 编码 565 个氨基酸 (Hiti 等, *Virology*, 111: 113-124, 1981)。

对从核苷酸顺序推测出的氨基酸顺序进行分析表明, 存在一个信号肽 (17 个氨基酸残基), 该信号肽在 HA 的分泌过程中被切掉。成熟 HA 具有 HA 1 (325 个残基) 和 HA 2 (222 个残基) 两个亚基, 这两个亚基由单个精氨酸残基连接, 该残基在成熟过程中被切掉, 生成双链 HA。C 末端的氨基酸顺序 (512-530) 具有很强的疏水性, 可能构成 HA 的跨膜区。有 7 个潜在的糖基化优点。HA 作为三聚体存在, 主要由二个明显不同的结构区组成, 一个是从膜开始伸出 76 Å 的 α 螺旋纤维状卷曲系统, 一个是反向平行的 β 片层球形区, 后者含有受体结合位点和位于该区长轴顶端的可变抗原性位点。

与其它流感病毒亚型相比较表明, 在所有病毒株中, 顺序中的许多区段, 包括所有的半胱氨酸, 都是保守的。这一事实提示, HA 的功能活性需要一个基本结构。HA 2 的氨基酸顺序比 HA 1 保守性更大, 因而株间变异是因为 HA 1 顺序的变化 (Hiti 等, *Virology*, 111: 113-124, 1981; Wiley 等, *Nature*, 289:

373-378, 1981)。

Wilson 等人说明了HA蛋白的三维结构 (Nature, 289: 366-373, 1988) (见图1)。它具有围绕受体结合位点的5个抗原性位点A、B、C、D和E, 受体结合位点以凹形袋状结构存在。在流感病毒A/WSN/33株的HA中, 对应于5个抗原性位点的位置鉴别如下: 位点A (氨基酸136-142) 是一个凸环区, 位点B (氨基酸183-192) 是一个 α -螺旋的外部残基区, 位点C是四级结构中位于半胱氨酸42和半胱氨酸274之间的二硫键处的膨出部分, 位点D是位于亚基间界面内的隐蔽区, 由氨基酸197-216组成, 位点E由氨基酸52-74组成。产生新的流行性流感病毒株似乎需要5个抗原性位点中的每一个都发生至少一个氨基酸置换。此外, 还观察到针对这5个抗原性位点的抗体能中和病毒性感染。据信, 由于位点A容易接近, 它很适于产生高活性的中和性抗体 (Wiley 等, Nature, 289: 373-378, 1981; Wiley 等, Ann. Rev. Biochem., 56: 365-394, 1987)。

在本发明中, HA蛋白用作携带非HA或外源性抗原决定簇的载体。优选插入到HA 5个抗原区中的一个或多个, 最好插入到A区。更优选的插入位点是由氨基酸183-192所限定的区域。

B. 示例性外源性抗原决定簇

对本发明有用的外源性抗原决定簇, 包括本领域技术人员已知的除HA蛋白抗原决定簇以外的任何抗原决定簇。与对应于天然存在的抗原决定簇的顺序基本相同的肽和核苷酸顺序, 对本发明也是有用的。

外源性抗原决定簇的例子包括 (但不限于): 病毒性抗原决定簇 (如HIV-1抗原决定簇、乙型肝炎抗原决定簇、丙型肝炎抗原决

定簇、还原病毒抗原决定簇、单纯疱疹病毒抗原决定簇)；细菌蛋白抗原决定簇；I g E 效应位点抗原决定簇(在变态反应中起作用)；S P 1 0 抗原决定簇(一种妊娠抗原)；包括乳腺癌抗原决定簇在内的肿瘤抗原决定簇；其它任何具有病理学意义的抗原决定簇及其中和性蛋白或其免疫原性部分。

术语“免疫原性部分”包括某种蛋白在任何条件下都具有免疫原性的各部分，包括那些在插入前呈免疫静止状态，而与H A 蛋白融合后变成具有免疫原性或抗原性的部分。鉴别这类肽或抗原决定簇的方法是已知的(Chou等，Biochemistry，13:222-245，1974；Holper等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，78:3824-3828，1981)。

术语“基本相同”包括相同的核苷酸或氨基酸顺序以及经生物学、遗传学或临床技术修饰而具有基本相同的生物活性的顺序。在核苷酸顺序的情况下，生物活性可以是(例如)编码能诱发相应抗体产生的抗原决定簇的能力。在氨基酸顺序的情况下，生物活性的例子可以是诱发相应抗体形成的能力。这类活性的测定可以用本领域技术人员已知的方法进行，包括(但不限于)免疫荧光法、E L I S A、Western 吸印、放射自显影等。

1. H I V 抗原决定簇

根据本发明，H I V - 1 病毒抗原决定簇是一类供插入H A 中的外源性抗原决定簇。H I V 是获得性免疫缺陷综合症(艾滋病)的致病因子。H I V - 1 基因组在gag区、pol区和 env或病毒被膜区这三个区编码三种病毒结构蛋白。gag 区产生病毒核心蛋白。

最初合成的主要核心蛋白为前体蛋白p 5 5。随后通过由pol区编

码的病毒蛋白酶的作用，p 5 5 被加工为p 1 7、p 2 4、p 1 5 (p 9 和p 6)。gag前体被认为在病毒颗粒于质膜处的组装过程中起关键性作用 (Gheysen 等, Cell, 59:103-112, 1989)。象大多数还原病毒gag蛋白一样，p 5 5 (和加工后的p 1 7)在其N末端被十四烷基化。

p 2 4 存在于H I V的内核上。p 1 7 似乎位于脂膜的内侧面上，而p 1 5 由于其碱性特征强，可能与H I V基因组相连。p 2 4 是最早在艾滋病患者体内检测到的H I V蛋白之一，并且抗p 2 4 和p 1 7 的抗体存在于所有艾滋病患者体内。据认为，核心蛋白即gag 能够诱导细胞介导的免疫。

H I V - 1 的pol 区编码反转录酶、蛋白酶和核酸内切酶蛋白。

env 区转录被加工成gp 1 2 0 和gp 4 1 的被膜蛋白gp 1 6 0。主要被膜蛋白gp 1 2 0 作为“刺突”位于病毒粒子的外表面，跨膜蛋白gp 4 1 包括一段膜附着顺序并作为gp 1 2 0 在H I V - 1 表面的附着位点。gp 1 2 0 含有T细胞受体 (C D 4) 结合位点以及被中和性抗体识别的主要位点。

在反复注射重组gp 1 2 0 或gp 1 6 0 后，诱导出低效价的中和性抗体。H I V 的主要中和性决定簇位于gp 1 2 0 V3 环的高可变区 (氨基酸 3 0 3 - 3 3 8)。由该肽产生的抗体具有病毒变异体特异性 (Javaherian 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 6768 - 6772, 1989)。

从同一感染个体中分离出了一系列抗原性不同的H I V。核苷酸顺序分析也表明，各H I V - 1 分离物有显著的变异。这些变异似乎集中在gp 1 2 0 中，使病毒能侵害大部分免疫监视机制。所预计的

gp1 2 0 中抗原决定簇的主要部分位于高可变区，并散布于高保守区（Modrow 等，J. Virology，61：570 - 578，1987）。gag 和 pol 顺序不具有高可变区。

已采用了数种方法生产艾滋病疫苗，例如灭活病毒、活的重组病毒、病毒亚单位蛋白等。这些方法到目前为止仅取得了有限的成功，这部分是因为 HIV 分离物相互间的遗传变异。实际上可以相信，被膜中约 25% 的氨基酸可发生突变。与如上述合成寡肽的免疫原性相对照，已证实当以 gp1 2 0 形式呈递给免疫系统时，HIV 的保守区呈“免疫静止”状态。含有一般为免疫静止的 HIV 保守区的抗原决定簇，在根据本发明被插入到 HA 的一个或多个抗原性位点中时则变得具有免疫原性。

几种适合于本发明的 HIV 抗原决定簇列于下表 1 中：

表 1

H I V 抗原决定簇

肽 ^A	位置	评 注
1 . T20E	env 255-274	env的第二个保守区；产生中和性抗体。
2 . T16G	env 255-270	
3 . D18S	env gp 41 735 - 752	高亲水性；中和若干HIV-1株；抑制合胞体形成。
4 . G20E	蛋白酶活性位点	在所有HIV株中高度保守。
5 . K27R	env 403-429	CD4结合区；免疫静止；保守；通过肽产生的抗体具中和能力。
6 . E14Q	env 414-427	
7 . N22G	env 307-330	主要免疫显性抗原决定簇，但高度可变；……HIGPGRAFY顺序产生中和性抗体。
8 . p17	gag 86-115	保守；产生T细胞反应。
9 . p24	gag 281-305	

^A 肽的命名表示出肽的大小以及该肽的第一个和最后一个氨基酸。除了一个抗原决定簇外其余抗原决定簇都来自病毒蛋白的保守区。有一个抗原决定簇即N 2 2 G对应于称为V 3环的gp1 2 0高可变区。

2 . I g E 抗原决定簇

另一个适用于本发明的抗原决定簇是免疫球蛋白 I g E 的一部分。I g E 以低浓度存在于血液中。它由重链和轻链二条链组成。I g E 是总的血清免疫球蛋白中的次要成分，介导引起变态反应的速发型超敏反应，所说的变态反应包括（但不限于）枯草热、哮喘、食物和药物过敏等。用合成的大鼠 ϵ 链或重链肽及抗肽抗体研究了 I g E 在触

发变态反应中的作用 (Stanworth, Molecular Immunology, 21: 1183-1190, 1984; Stanworth 等, Molecular Immunology, 27: 1291-1296, 1990)。循环的 IgE 与表达在肥大细胞和嗜碱细胞表面的高亲合性 IgE Fc 受体 (FcεRI) 结合。在 IgE 介导的反应中, 多价变应原引起结合于受体上的 IgE 交联, 导致下面的 FcεRI 受体聚集, 继而触发组胺及其它变态反应化学调节因子的释放。反复暴露于一种变应原导致特异性 IgE 的生成增加, 因而增强了变态反应, 有时导致致命性的变态反应。由于具有使结合有 IgE 的受体交联的能力, 单克隆和多克隆抗体是强效的变应原。

IgE 还与存在于 B 细胞和 T 细胞上的低亲合性 IgE Fc 受体 (FcεRII) 结合。该受体也称为 CD23, 据信它在 B 细胞的 IgE 合成中起重要作用。

发现负责 IgE 与受体结合的位点及负责效应物活性的位点, 存在于 IgE 分子的不同部分。当结合位点位于 IgE 的 CH3 和 CH4 两个区中时, 效应物或触发物位点位于 CH4 区。触发物位点的肽的特征在于, 由三个氨基酸将 N 末端阳离子“头”与亲水性尾分开。研究表明, 该肽介导肥大细胞中应答变应原刺激的免疫触发信号

(Stanworth 等, Lancet, 336: 1279-1281, 1990)。该肽的氨基酸顺序是: Lys-Thr-Lys-Gly-Ser-Gly-Phe-Phe-Val-Phe, 它对应于人 IgE 重链的氨基酸 497-506。该肽可以从下列二条互补寡核苷酸进行合成:

K T K G S G F F V F
 5' AAA ACC AAG GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC GGG GCC 3'
 CCGG TTT TGG TTC CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG CC

Sty 1

Apa 1

该抗原决定簇存在于编码 H 2 2 V 的核苷酸顺序中，H 2 2 V 的氨基酸顺序为 HSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEV。该肽可从下列核苷酸顺序合成：

Apa 1 H S T T Q P R K T K
 CAC AGT ACT ACA CAG CCC CGC AAA ACC AAG
 CCGG GTG TCA TGA TGT GTC GGG GCG TTT TGG TTC

 G S G F F V F S R L E V
 GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC TCA CGC CTA GAG GTG GCC
 CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG AGT GCG GAT CTC CA

C. H A 嵌合肽

本发明的 H A 嵌合肽可用作疫苗，以产生对该肽内若干顺序具有混合特异性的肽特异性抗体。这些抗体具高亲和力，适用于诊断及免疫治疗。本发明范围内的肽也能预防性给药以预防感染。可通过本领域技术人员已知的任何手段作为疫苗给药或为进行免疫治疗而给药，包括（但不限于）口服给药、直肠给药、经鼻给药、颊部给药或非肠道给药。用于免疫治疗中的疫苗或药物组合物还包括本领域常用的任何可药用载体或佐剂。

可以在任何 H A 嵌合体中插入一个或多个抗原决定簇，以提供二价、三价、四价或五价嵌合体 H A。位于每个插入位点的抗原决定簇可以相同或不同。如果抗原决定簇是相同的，将看到远强于单价 H A

嵌合体的抗体反应。如果抗原决定簇不相同，将产生多抗体反应。还可以插入不止一个拷贝的一种抗原决定簇和一个或多个其它抗原决定簇，以产生增强的抗体反应和多抗体反应。这种方法的一个具体应用是设计一种多价疫苗，它可以用来同时针对若干疾病或病原株进行接种。

可借助本领域技术人员已知的手段确定在每一种应用中肽的有效量。例如，用本发明活性剂的连续稀释制备物与某种适宜的测试方法相配合，能确定最适剂量。另外，可以确定各种剂量的基质和给药频率，并且可以将实验对象分组配给基质的每个部分，以确定最佳条件。

通常在一种疫苗中，将HA—抗原决定簇嵌合抗原与一种佐剂即 Syntex 佐剂或明矾充分混合，并给宿主注射约1—100 μ g。可以对宿主定期（即每隔4周）进行加强免疫，直到获得高效价的抗肽抗体。在同一疫苗中可以混合不止一种相似或不相似的HA—抗原决定簇蛋白。疫苗的制备一般包括，将带有外源抗原决定簇顺序（如HIV抗原决定簇顺序）的HA基因，插入到合适的表达载体中。在组织培养中表达新的蛋白质，并分离嵌合蛋白。然后给适宜的动物接种。

本发明的HA—抗原决定簇抗原也可用于诊断与抗原的接触或病毒感染。ELISA是检测血液中是否存在感染性病毒抗原最常用的方法（Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Son, 1989）。通常用肽特异性（俘获）抗体涂布微量滴定板的各小孔，然后与含病毒抗原的血清一起保温。洗掉未结合的抗原，并加入结合了检测载体如酶、辣根过氧化物酶的另一种抗原。然后通过例如基质底物的反应检测酶的存在。

所产生的针对本发明HA—抗原决定簇嵌合蛋白的抗体，可用于

这些诊断方法和诊断药盒中。用针对上述H A - H I V 抗原决定簇和H A - 乙型肝炎或丙型肝炎抗原决定簇而产生的抗体进行筛选极为有效。

同样，可通过将可疑样本，如血液或其一部分，与本发明的嵌合抗原接触，检测抗体的存在。

本发明的H A - 抗原决定簇嵌合蛋白也可用于免疫治疗。例如，在治疗对象已经受到感染的情况下，用所产生的针对本发明H A - 抗原决定簇蛋白的病原特异性抗体或中和性抗体抑制感染和疾病发生。这将包括被动免疫，因为含有针对感染因子的中和性抗体的免疫球蛋白可用于抑制或控制感染。被动免疫的例子包括针对动物或人的狂犬病免疫、用单克隆抗体治疗由革兰氏阴性细菌引起的脓毒性休克综合症、以及抗H I V 免疫。

编码本发明嵌合蛋白的基因组可以插入到表达载体系统中。适宜的表达载体包括B P V（牛乳头状瘤病毒）基表达载体、二氢叶酸还原酶（dhfr）相关载体、腺病毒载体或牛痘病毒载体。特别要提到的是杆状病毒表达系统，如感染昆虫细胞如草地粘虫（S f 9）的苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒（A c M N P V）。

在感染过程中，杆状病毒制造大量的多角体蛋白，后者促使病毒封闭于包涵体中。已经证明，多角体基因对病毒的感染或复制是非必需的。该基因的缺失产生包涵体阴性病毒。通过转移载体与野生型D N A 间的同源重组产生重组杆状病毒。转移载体（如p V L 9 4 1）包括含有多角体启动子的病毒D N A 片段（见实施例3）。需表达的基因插入到启动子顺序的下游。

插入到表达载体中的基因可以象腺病毒或牛痘病毒疫苗等活病毒

疫苗那样来施用。插入基因还可通过转化适宜宿主如大肠杆菌和纯化产物而大量表达。

所有的核苷酸顺序、肽及含有它们的组合物，都可通过重组技术或合成进行制备。

下面的实施例用于说明本发明。HA的核苷酸顺序和氨基酸顺序的编号如Hiti等所述（Virology，111：113 - 124，1981）。

HA基因得自人流感病毒A / W S N / 3 3株。酶反应、质粒DNA制备、位点特异性突变及细菌和哺乳动物细胞转化等常规重组DNA方法，按照供货商的说明或Sambrook等所述进行（Molecular Cloning, A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989）。除非特别说明，所有给出的份数和百分比均按重量计。

实施例1 - 7说明在HA的抗原性位点A构建一个插入位点，其中外源性抗原决定簇插入到该位点产生嵌合蛋白。实施例8说明用相似的方法有可能在HA的其它已知抗原性位点上构建插入位点。然后将外源性抗原决定簇插入到任何新构建的HA位点中，实施例8特别说明了在HA氨基酸184 / 185位置上构建独特的Bgl II限制性位点，所说氨基酸位置是抗原性位点B的一部分。实施例9表明多个HA插入位点的应用。

实施例1

HA表达载体的构建

参见图2。用BamHI消化携带HA基因完整编码顺序的质粒pHAX（也称为pSV-HA质粒，见Hartman等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，79：233 - 237，1982），分离出1.75

k b 片段。然后将这个编码 H A 的 D N A 片段插入至 p T Z 1 9 R (Pharmacia 公司的 B a m H I 位点, 以获得重组克隆 p t z 1 9 H A。

用 p t z 1 9 H A 分离含有作为正链携带的 H A 顺序的单链 DNA (Baldari 等, Gene, 35: 27-32, 1985)。该 DNA 用于完成用下列寡核苷酸进行的寡核苷酸介导的位点突变, 该寡核苷酸为 5' - T C T G T A A A A C T G C T T T T T C G G G C C C T A T G G G A G C A T G A T A C - 3' (# 972)。上述寡核苷酸对应于在中间插入了 A p a I 位点 (G G G C C C) 的 H A 基因的 bp 480 - 518。上述寡核苷酸所致的突变和大肠杆菌 J M 109 细胞的转化, 是按已发表的 研究报告进行的 (Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, p15-51, 1989)。发现克隆 ptz HA 139-15 具有新构建的 ApaI 位点, 其中 gly 139 被 ala-arg 置换, 而顺序的其余部分保持不变。这是由该区的 D N A 顺序分析所证实的。

实施例 2

蛋白抗原决定簇的插入

再参见图 2。用磷酸三酯法合成编码不同肽的互补寡聚体 (Crea 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70:5765, 1978)。将等摩尔浓度的互补寡聚体混合, 得到带有侧翼 ApaI 顺序的双链寡聚体。连接前, 用 A T P 和 T 4 D N A 激酶按供货商的说明 (Pharmacia 公司) 将寡聚体的 5' 端磷酸化。用 ApaI 消化约 10 μ g ptzHA 139-15, 并用细菌碱性磷酸酶脱磷酸化 (Sambrook 等, Molecular

Cloning , A Laboratory Manual , 1 9 8 9)。经ApaI切割的约 1 0 0 ng质粒和 1 μ g寡核苷酸分别进行连接, 并用于转化大肠杆菌。用放射标记的寡聚体进行原位杂交, 筛选细菌菌落。然后对含有插入片段的潜在重组克隆测序, 以确定插入片段的正确取向以及正确的读码。使用了表 1 和图 2 中的 9 个 H I V 抗原决定簇。

实施例 3

重组杆状病毒的构建

利用标准的重组 D N A 技术 (Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual , 1 9 8 9) 将以BamHI 顺序为侧翼的 1 . 7 5 k b H A 或 H A / H I V 抗原决定簇嵌合基因, 分别插入由 A c M N P V 衍生的转移载体 p V L 9 4 1 (得自Dr. Max D. Summers, 描述于 A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures , Texas A & M University , College Station , TX , 1 9 8 8)。在多角体启动子的转录调控下表达异源蛋白基因。用磷酸钙沉淀法 (Smith , G.E.等 , Molec . Cell Biol. , 3 : 2 1 5 6 - 2 1 6 5 , 1 9 8 3) 使野生型病毒 A c M N P V D N A (1 μ g) 和重组转移质粒 D N A (2 μ g) 一起共转染到 S f 9 细胞中, 产生含有所需基因的重组杆状病毒。六天后, 收集含有野生型和重组杆状病毒的培养基, 并通过有限稀释法, 以连续稀释病毒感染的 S f 9 细胞的³² P 标记 H A 基因在 9 6 孔板中进行杂交, 鉴定重组病毒 (Germann 等 , J . Biol . Chem . 2 6 4 : 7 8 1 4 - 7 8 2 4 , 1 9 8 9)。进行 3 至 5 轮杂交筛选后获得纯的包涵体阴性 (多角体阴性) 病毒, 如编码 H A - N 2 2 G 蛋白的 A c H A - N 2 2 G, 该病毒在 S f 9 细胞中繁殖。

以每个 T-150 (150 cm²) 培养瓶约 7×10^7 个细胞的密度接种 Sf9 细胞。另一种作法是将 Sf9 细胞作为悬浮培养在旋转瓶中培养至密度为 $2 - 3 \times 10^6$ 个细胞/ml。用重组病毒以 5 - 10 的感染复数 (MOI) 感染细胞。3 - 4 天后, HA 嵌合体的表达达到最高水平, 此时收集细胞。用 PBS 洗涤后, 再用含有等量 TritonX100 和脱氧胆酸盐的 1% 去污剂混合物提取细胞, 以分离膜结合 HA 或 HA 嵌合体。因为 HA 是一种糖蛋白, 所以使提取物通过外源凝集素 Sepharose 4B (兵豆外源凝集素, 得自 Sigma 化学公司 - St. Louis, MO) 亲和柱进行部分纯化。将部分纯化的 HA 或嵌合体用于免疫动物 (豚鼠), 以评估其作为免疫原的效力。

实施例 4

HA 和 HA/HIV 嵌合蛋白的生物特性

用高滴度 (10^9 pfu/ml) 重组病毒感染新铺板的 Sf9 细胞。三天后收集细胞, 并按实施例 3 的方法进行处理以分离重组蛋白。经凝胶考马斯蓝染色, 估计重组蛋白占细胞总蛋白的约 10 - 20%。约 2 - 10% 的重组蛋白可用去污剂提取, 并可能呈现天然形式。其余蛋白为贮存于细胞内的不溶性蛋白。合成的 HA 和 HA-HIV 嵌合蛋白为三条带。较下的条带 (约 55 KD) 代表非糖基化形式, 因为用糖基化抑制剂衣霉素处理过的被感染细胞只产生该蛋白带。上面两条带 (68 KD 和 66 KD) 可能代表不同的糖基化加工程度, 当用去污剂提取重组 HA 杆状病毒感染的细胞时, 只有 66 KD 蛋白带是可提取的, 表明此蛋白是连在膜上的, 可能代表 HA 的天然形式。

用兔抗流感病毒 (A/WSN/33) 血清和荧光素结合的第二抗体即羊抗兔 IgG, 进行免疫荧光检测 (Posse, Virus Res.,

5 : 4 3 - 5 9 , 1 9 8 6) 。用重组病毒感染的细胞表现出强的膜荧光。模拟感染的细胞和野生型感染的细胞没有显示出任何荧光。

通过用 1 % 鸡红细胞进行血细胞吸附和血细胞凝集, 检测被重组杆状病毒感染的 Sf 9 细胞的生物活性 (Posse, Virus Res. , 5 : 4 3 - 5 9 , 1 9 8 6) 。用重组 HA 杆状病毒感染的细胞表现出显著的血细胞吸附作用, 而用野生型或编码 HA - H I V 嵌合体 (N 2 2 G 、 D 1 8 S 和 T 1 6 G) 的重组杆状病毒感染的其它细胞在该测定中未显示出任何活性。当用细胞去污剂提取物进行血细胞凝集时, 获得了相似的结果。这些结果表明, HA 中 H I V 抗原决定簇的插入影响了介导 HA 生物活性的受体结合位点。HA 上的受体结合位点邻近抗原决定簇所选择性插入的抗原性位点 A (图 1) 。

实施例 5

豚鼠对注射 HA - H I V 嵌合体蛋白的免疫反应

根据实施例 3 的方法制备编码 HA - N 2 2 G 和 HA - D 1 8 S 的重组杆状病毒, 并用来感染 2 0 - 3 0 个 T 1 5 0 烧瓶中的 Sf 9 细胞, 感染复数为 1 0 。感染后 7 2 小时收集细胞, 用 P B S 洗 3 次, 并进行纯化处理。用部分纯化的 HA 或 HA 嵌合蛋白免疫豚鼠。每隔 4 周进行加强免疫注射。每次注射后二周采集血清。

通过血细胞凝集抑制 (HA) 试验测定血清的效力, 该试验测定的是抗血清抑制 4 单位重组 HA 和 1 % 鸡红细胞所显示的血细胞凝集反应的能力。所有血清首先以 1 : 1 0 进行稀释, 再用高岭土 (1 0 0 mg / ml / ml) 处理以去除天然抑制剂。高岭土处理并不影响抗体效价。

结果在表 2 中说明。

在第二次注射后。所有抗重组 HA 或 HA - H I V 嵌合蛋白的血

清所具有的HI效价，从针对N 2 2 G的1 6 0到针对D 1 8 S的5 1 2 0各不相同。无抗原对照血清的效价为2 0。

在第三次注射后，所有动物体内的H I效价都有进一步的提高。用从A c H A - N 2 2 G重组杆状病毒感染的细胞制备的粗质膜免疫的动物，也产生6 0 - 8 0的H I效价。H I效价等于或大于4 0被认为在给人进行疫苗接种时能起预防流感病毒感染的作用。

当用异源流感病毒株（A⁺ 台湾）的H A重复上述实验时，未观察到中和作用，这表明杆状病毒或所表达的H A抗原能诱导病毒株特异性中和性抗体。此外，如Western 吸印所显示。抗H A - D 1 8 S和H A - N 2 2 G的抗血清含有对H I V g p 1 6 0有反应性的抗体。H A - N 2 2 G免疫的结果示于表3中。

抗原决定簇N 2 2 G对应于H I V g p 1 6 0的主要中和性区域，因此是疫苗研制的主靶（Javaherian 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U S A，8 6：6 7 6 2 - 6 7 7 2，1 9 8 9）。用重组H A或H A - N 2 2 G重复进行动物实验，首先用含1 - 2 μ g H A

或嵌合蛋白的部分纯化制备物免疫动物，然后加强免疫3次。通过下述方法测定抗插入肽N 2 2 G抗体的产生：（I）抗肽（N22G）E L I S A；（II）被膜gp 1 6 0的Western 吸印；（III）体外中和试验（如表3所示）。在第二次（2°）和第3次（3°）加强免疫后，动物在所有三个测定中都表现出特异性高效价抗体的产生。正如所预料的，用H A免疫的动物在这些测定中未显示出任何活性。在用H A - N 2 2 G免疫的动物中产生抗H I V感染的中和性抗体是特别令人感兴趣的。

表 2

在第2次(2°)和第3次(3°)注射2周后
采集的豚鼠血清的血细胞凝集抑制(HA)效价

抗 原	豚鼠号	高岭土	H A I 效价	
			2 °	3 °
H A	A	+	1 2 8 0	1 0 2 4 0
	B	+	1 2 8 0	2 5 6 0
N 2 2 G	C	+	1 6 0	— ^a
	D	+	1 6 0	—
D 1 8 S	E	+	5 1 2 0	1 0 2 4 0
	F	+	6 4 0	3 7 9 0
无 ^b	9	+	2 0	4 0
	1 0	+	2 0	6 0
N 2 2 G 粗膜	1 1	+	8 0	N . D . ^c
	1 2	+	6 0	N . D .
流感病毒WSN	兔 3 1 3	+	5 1 2 0	
		—	5 1 2 0	

a 两只动物都在采血时死亡。

b 未经高岭土处理的正常血清的H I效价为3 2 0。

c N . D . = 未测。

表 3

用HA和HA-N22G(HIVMN V3环氨基酸
307-330)免疫的豚鼠的血清学分析(每组二只动物)

测 定	HA			HA-N22G		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
HA中和效价(HI)	1280 1280	2560 2560	2560 5120	160 160	640 1280	2560 1280
HA ELISA 效价	10 ⁶ 10 ⁶	3×10 ⁵ 3×10 ⁵	3×10 ⁵ 1×10 ⁶	3×10 ⁵ 3×10 ⁵	3×10 ⁵ 1×10 ⁵	1×10 ⁵ 1×10 ⁶
抗肽(N22G) ELISA	- -	- -	- -	300 300	30,000 10,000	30,000 10,000
抗被膜(吸印)	- -	- -	- -	N.D. N.D.	20,000 >1,000	>20,000 20,000
中和性抗体效价 (在国立卫生 研究所测定)	- -	- -	- -	<10 <10	40 20	>810 475

= 阴性。

N . D . = 未测。

实施例 6

HA-IgE(HA-K10F)抗原决定簇的制备

通过修饰侧翼限制性位点促进重组HA基因在杆状病毒转移载体pBL1(Vialard等, J. Virology, 69: 37-50, 1990)中的克隆。用BamHI消化约2 μg pTZHA-139-15, 分离1.75 kb DNA片段。在用DNA聚合酶Klenow片段和脱氧核苷三磷酸(dNTP)进行填充后, 将该DNA片段插入到HindIII/填充pGEM-9zf(-)质粒(Promega Biotec - Madison, WI)中, 获得pHA.NheI。在用SpeI和XbaI

消化后，从该质粒中切下以 1.75 kb DNA 片段存在的 HA 或嵌合 HA 基因。

用 *Apa*I 消化约 1 μ g pH A . N h e l 质粒 DNA，然后用细菌碱性磷酸酶脱磷酸化。合成编码 K 1 0 F 肽的二个互补寡核苷酸：

	K	T	K	G	S	G	F	F	V	F			
5'	AAA	ACC	AAG	GGA	TCA	GGA	TTC	TTT	GTA	TTC	GGG	GCC	3'
	CCGG	TTT	TGG	TTC	CCT	AGT	CCT	AAG	AAA	CAT	AAG	CC	
					Sty I								
												Apa I	

将等摩尔量的两个寡聚体混合，并用 T 4 多核苷酸激酶和 A T P 进行磷酸化。将约 0.1 μ g 脱磷酸化的载体和 1 μ g 双链寡聚体连接，然后用于转化大肠杆菌 MM 2 9 4 细胞。

从 12 个克隆中制得微量制备物，用 *S t y* I 消化，以筛选出含有插入寡聚体的克隆。发现克隆 p H A . N h e - h l g E - 1 1 在正确编码顺序中含有插入的核苷酸顺序。核苷酸顺序测定证实了在所需位点上的正确顺序。用 *S p e* I 和 *X b a* I 一起消化约 10 μ g 该质粒，分离 1.8 kb DNA 片段。

用 *N h e* I 消化约 10 μ g 杆状病毒转移载体 pBlueBac (pBL1 - Invitrogen Corp . - San Diego , CA)，并用 B A P 脱磷酸化。用约等摩尔量的 1.8 kb DNA 和经 *N h e* I 切割的载体连接，然后用连接混合物转化大肠杆菌 MM 2 9 4 细胞。选择 12 个克隆制备微量质粒制备物，鉴定出克隆 p B L - H A - K 1 0 F - 5 - 2 具有正确取向的 H A . K 1 0 F 基因。

为了获得重组杆状病毒，利用磷酸钙沉淀法 (Summers 等，A

Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas A&M University, College Station, TX, 1988), 用约 $1\ \mu\text{g}$ 野生型病毒 AcMNPV DNA 和 $2\ \mu\text{g}$ 重组转移载体 pBL-HA-K10F-5-2 转染 Sf9 昆虫细胞。通过转移载体和野生型病毒 DNA 间的同源重组产生重组杆状病毒。转染 6 天后, 收集含有野生型病毒和重组病毒混合物的培养基。在经连续稀释 ($10^{-3} - 10^{-8}$) 后, 用该培养基感染在 100 mm 培养皿中新铺板的 Sf9 细胞, 然后在培养皿中铺盖含 β -半乳糖苷酶底物 X-gal 的琼脂糖。通过若干轮噬斑纯化, 对出现蓝色噬斑的重组病毒进一步纯化 (Vialard 等, J Virology, 69: 37-50, 1990)。该重组杆状病毒被命名为 AcHA-K10F。用抗肽兔抗体进行感染的 Sf9 细胞蛋白的 Western 吸印分析, 测定嵌合蛋白 HA-K10F 的表达。在为大规模生产和纯化进行培养后, 用嵌合体作为疫苗。

实施例 7

HA-IgE (HA-H22V) 抗原决定簇的制备

按实施例 6 的方法, 将编码肽 H22V 的核苷酸顺序插入到 HA 基因中, 然后在杆状病毒表达系统中进行表达。合成二个互补寡核苷酸:

Apa 1	H	S	T	T	Q	P	R	K	T	K
	CAC	AGT	ACT	ACA	CAG	CCC	CGC	AAA	ACC	AAG
	CCGG	GTG	TCA	TGA	TGT	GTC	GGG	GCG	TTT	TGG
									TTC	

G S G F F F S R L E V
 GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC TCA CGC CTA GAG GTG GCC
 CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG AGT GCG GAT CTC CA

将该双链寡聚体插入到 pHA-Nhe1 的 Apa1 位点，获得重组 pHA-Nhe-H22V。将从上述质粒中获得的 1.8 kb Spe1/Xpa1 DNA 片段插入 pBL1 的 Nhe1 位点，获得重组转移质粒 pBL-HA-H22V-1。通过该质粒和 AcMNPV DNA 的同源重组获得重组杆状病毒 AcHA-H22V。在感染 Sf9 细胞后，该重组杆状病毒表达 HA-H22V 融合蛋白，经纯化后可用作疫苗。

实施例 8

构建在位点 B、C、D 和 E 处建立起插入位点的 HA 表达载体

用携带 HA 基因的重组质粒 p tz 19 HA 制备单链 DNA (Baldari 等, Gene, 35: 27-32, 1985)。用下列寡聚体完成对该 DNA 的位点特异性突变：5' ACT CTG TTG CTC AGA TCT GCT GGA CGG GTG ATG AAC 3'。该寡核苷酸对应于在其中部插入了 Bgl II 限制性位点 (AGATCT) 的 HA 基因的 bp 615-650 (氨基酸 178-189)。由该寡聚体所致的突变和大肠杆菌 JM109 的转化按已发表的研究报告进行 (Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual p15-51, 1989)。发现克隆 p tz HA 184-1 具有新构建的 Bgl II 位点。这是由该区的 DNA 测序证实的。突变导致分别以 arg 和 Ser

残基置换Ser 184和asp 185，而该顺序的其余部分保持不变。

实施例 9

构建含多个插入位点的HA表达载体

构建了二个插入位点，它们分别位于HA的抗原性位点A和位点B，这两个位点可以插入二个相同或不同顺序的抗原决定簇。实施例1所述的重组质粒p t z HA 139-15含有HA基因，其中在相应于抗原性位点A的顺序处构建了独特的限制性位点A p a I。以实施例8的寡聚体顺序使从上述质粒制得的单链DNA突变，该寡聚体顺序是为构建出位于位点B的独特B g l II识别顺序而设计的。发现克隆pHA 139 / 184具有二个新构建的位点A p a I和B g l II，随后通过相关区的DNA测序得以证实。然后将相同或不同的外源性抗原决定簇插入到任何一个已知的HA抗原性位点中。

实施例9的方法可以扩展而包括在对应于HA的抗原性位点C、D和/或E的区域中构建其它独特限制性位点。这里所说的独特限制性位点包括并不存在于HA或质粒p t z 19R顺序中的位点。除A p a I和B g l II外，其它独特限制性位点的例子有A f l II、A v r II、B c l II、N h e I、X h o I等。

实施例 10

用抗N 2 2 G抗体进行被动免疫以预防H I V感染

在个体偶然接触到被感染的血液或任何血液衍生成分的情况下，被动免疫是有用的。该应用也适合于控制母亲对胎儿的H I V传染。施用H I V-1 V 3环(N 2 2 G)特异性抗体能预防感染发生(Berzofsky, J. A. 等, “抗H I V疫苗研制的途径和问题”, J. Acquired Immune Deficiency Syndromes, 4: 451-

4 5 9 , 1 9 9 1) 。

为了获得大量的 N 2 2 G 肽特异性抗体，通过多次注射免疫大型动物（例如马），直到如实施例 5 和表 3 所述获得高效价抗 HIV-1 中和性抗体。给动物放血获取血清。然后按供货商的说明（GIBCO BRL , Life Technology , Inc . Gaithersburg , MD ）使血清通过蛋白 A 琼脂糖亲和柱，以富集 IgG 部份。IgG 部份含有 HIV-1 特异性抗体。将用适当载体配制的适量 IgG 注射给怀疑接触过 HIV-1 的个体。通过对人的临床试验确定注射剂量和时间。

上面提到的专利、出版物和试验方法，都引入本文作为参考。

根据上面的详细说明，对本发明进行多种改变是本领域技术人员容易做到的，并且也包括在本发明及所附权利要求书的范围内。

本申请所提出的疫苗提供了由病毒、细菌及肿瘤抗原性物质所致感染的预防作用，因为它使宿主产生针对外源性侵入物的中和性抗体，从而预防了疾病的进一步发展。例如，前面所述的在豚鼠体内产生的抗体，将在侵入的 HIV 进入细胞并在细胞繁殖之前就把它中和（杀死）。通过例如用抗 HIV 的人单克隆抗体与经修饰的本发明 HA-HIV 复合物反应，可证明本发明的抗原性多肽起到导入到 HA 中的外源性抗原决定簇的抗原作用。

各种佐剂可与本发明的抗原性多肽一起使用，所说的佐剂包括 Syntex 佐剂、明矾（0.2% 缓冲水溶液）、免疫刺激复合物（ISCOM）、破伤风类毒素、白喉类毒素、糖苷Quit A 佐剂（Spikoside ; Iscotec AB）（Morein 等，Nature 308 : 457-460, 1984）、胞壁酰二肽衍生物（MTP-PE）（分散于低油乳剂 MF 59 中）、最好是胆甾醇半琥珀酸酯（CHS）

基脂质体 (W O 9 0 / 0 1 9 4 7, 1 9 9 0 年 3 月 8 日; W O 9 0 / 1 9 4 8, 1 9 9 0 年 3 月 8 日; U S 4, 7 2 1, 6 1 2)。

通过将抗原性多肽与佐剂在室温下混合, 常规性制备疫苗。

根据疫苗的配制方法, 可通过口服、肠道外、直肠、经鼻, 最好是肌肉注射, 给有感染危险的病人接种, 有效剂量为 1 至约 5 0 0 μg , 通常是 5 - 3 0 0 μg , 有可能是 1 5 - 1 0 0 μg , 单次剂量或多次剂量。可应用加强免疫以达到所需的中和性抗体效价 (在 HIV 情况下为 3 0 0)。根据病情的不同, 可在约 1 年内进行加强免疫。

本申请通篇在提到特异性抗原决定簇时, 要么指出末端氨基酸的本性和氨基酸顺序的长度, 如 N 2 2 G, 其中 N 末端氨基酸是 A s n, C 末端氨基酸是 G l y, 顺序长度为 22 个氨基酸; 要么用见于文献中的该顺序的俗名表示, 如 g p 1 6 0 和 g p 1 2 0。

插入到 H A 蛋白的至少一个抗原性位点的氨基酸顺序长度最好至少为 1 2 个氨基酸。

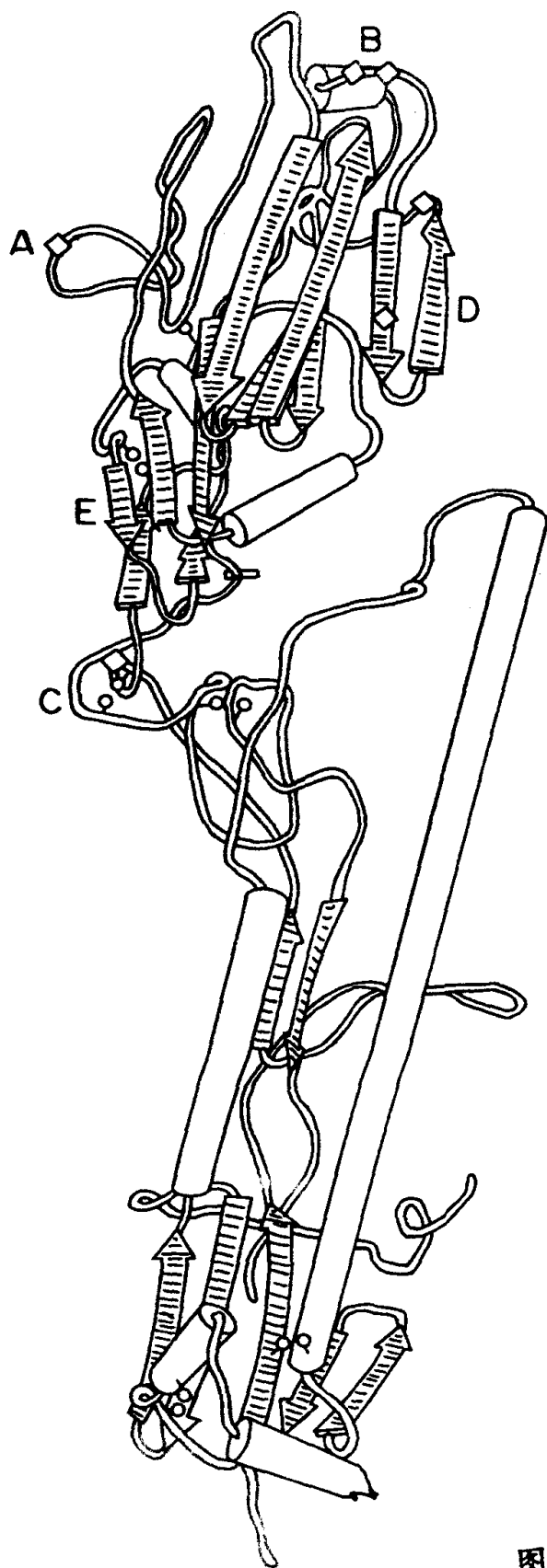


图 1

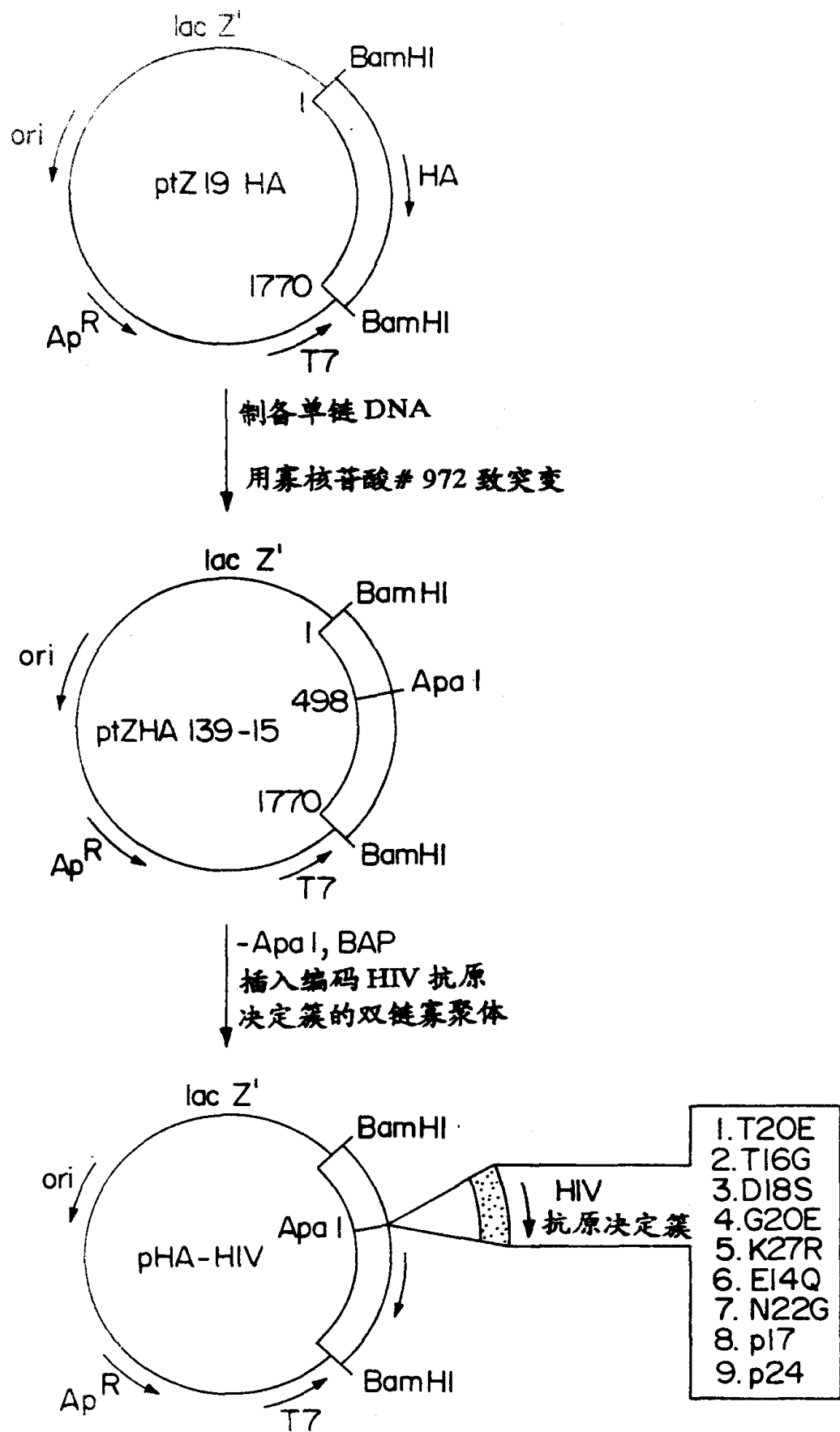


图 2