

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01812776.2

[51] Int. Cl.

C07K 1/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1312171C

[22] 申请日 2001.7.12 [21] 申请号 01812776.2

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 14 [33] US [31] 60/218,192

[86] 国际申请 PCT/US2001/041357 2001.7.12

[87] 国际公布 WO2002/006303 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.14

[73] 专利权人 宾夕法尼亚州立大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 D·B·韦纳 V·阿亚沃

[56] 参考文献

Immunogenicity of a novel DNA vaccine cassette expressing multiple human immunodeficiency virus (HIV-1) accessory genes Ayyavoo V et al, AIDS, Vol. 14 No. 1 2000

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 34 页 附图 9 页

[54] 发明名称

可编码 HIV 辅助蛋白的 DNA 疫苗

[57] 摘要

揭示了改进的疫苗以及使用疫苗的方法。揭示了用于治疗患有自身免疫疾病或移植的个体的免疫抑制剂组合物及其使用方法。

1. 一种多肽，包含减毒的 HIV Vif，减毒的 HIV Vpu 和减毒的 HIV Nef，所述减毒的 HIV Vif 在无细胞感染中缺少 *vif* HIV-1 前病毒的反式互补作用，所述减毒的 HIV Vpu 的特征在于 CD4 缺失和 MHC-I 降解，所述减毒的 HIV Nef 的特征在于 CD4 和 MHC-I 表达的负调节缺失。

2. 如权利要求 1 所述的多肽，其中，HIV Vif 由 1 号序列编码。

3. 如权利要求 1 所述的多肽，其中，HIV Vpu 由 2 号序列编码。

4. 如权利要求 1 所述的多肽，其中，HIV Nef 由 3 号序列编码。

5. 如权利要求 1 所述的多肽，其中，HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef 以从 N 末端到 C 末端依次为 HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef 的顺序出现。

6. 如权利要求 5 所述的多肽，其中，在 HIV Vif 和 HIV Vpu 之间有蛋白酶剪切位点，同时在 HIV Vpu 和 HIV Nef 之间有蛋白酶剪切位点。

7. 如权利要求 6 所述的多肽，其中，HIV Vif 由 1 号序列编码。

8. 如权利要求 6 所述的多肽，其中，HIV Vpu 由 2 号序列编码。

9. 如权利要求 6 所述的多肽，其中，HIV Nef 由 3 号序列编码。

10. 如权利要求 6 所述的多肽，其中，蛋白酶剪切位点是 REKRAVVG。

11. 如权利要求 1 所述的多肽，其中，HIV Vif 由 1 号序列编码，HIV Vpu 由 2 号序列编码，HIV Nef 由 3 号序列编码。

12. 一种含有编码如权利要求 1-11 中任一项所述的多肽的编码序列的核酸分子。

13. 如权利要求 12 所述的核酸分子，其中所述的编码序列可操作地连接到各调节元件上。

14. 如权利要求 12 所述的核酸分子，其中所述的核酸分子是质粒。

15. 如权利要求 12 所述的核酸分子，其中，所述的核酸分子是质粒，所述的编码序列可操作地连接到各调节元件上。

16. 一种含有如权利要求 12 所述的核酸分子的重组的疫苗或减毒的疫苗。

17. 一种含有如权利要求 1-11 中任一项所述多肽，权利要求 12-15 中任一项所述核酸分子或权利要求 16 所述疫苗的药物组合物。

18. 权利要求 17 所述的组合物用于制造免疫个体以抵抗 HIV 的药物的用途。

19. 如权利要求 18 所述的用途，其中所述的免疫是预防性的。

20. 如权利要求 18 所述的用途，其中所述的免疫是治疗性的。

可编码 HIV 辅助蛋白的 DNA 疫苗

发明领域

本发明涉及改进的疫苗以及免疫个体以抵抗人免疫缺陷病毒(HIV)的方法,涉及蛋白质和核酸分子,涉及含有它们的药物组合物以及使用它们的方法。

发明背景

有效的疫苗应该能够长期保持免疫力而不会造成任何不利的副作用或回复到疾病状态。传统的疫苗着眼于在向宿主施用减毒、完全杀死或无活性的病原体制剂上。这些疫苗被证明可有效产生抵抗多种病毒的保护性体液免疫反应和细胞免疫反应。开发抗某些病毒病原体的疫苗并不是简单的任务。这项任务的复杂性涉及以下几个因素,这包括病原体的病理学以及宿主免疫反应的特异性。最近,提出了一种了解这些相互作用中所含免疫组分的新方法。这一方法(即,遗传免疫法或 DNA 疫苗法)是开发可抵抗多种病原体的安全有效的疫苗的唯一来源。

1 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体。HIV-1 是一种慢病毒,它用 RNA 将它的信息传递到它的靶细胞,然后在那里转变成 cDNA 并整合进靶细胞核。由于在从 RNA 转变成 cDNA 的过程中出错率很高,HIV-1 是高度可变的病毒,以至很难开发抗此病毒的传统疫苗。而将与整个病毒基因组相对的短的 DNA 片段用来免疫患者的遗传免疫法被证明是免疫接种防治这种病毒的安全方法。迄今为止,已经开发出了抵抗 HIV-1 结构基因、酶基因和辅助基因的 DNA 各种疫苗,并且检测了它们在鼠类和灵长类中诱导免疫反应的能力。这些疫苗中有一些已经处于 I 期临床试验阶段。

防治 HIV-1 的(各种)免疫机制还不清楚。对于各种宿主的免疫反应,细胞介导免疫的诱导对于有效的 HIV-1 候选疫苗是一个非常重要的要求,这是因为细胞免疫在病毒清除中扮演了决定性的角色。CTL 不仅能够以病毒体中存在的基因产物作为目标,还能以在病毒复制过程中表达的所有病毒基因产物作为目标。早期研究显示,在被 HIV-1 感染的患者中,对早期病毒血症的控制是与 CD8⁺T 淋巴细胞的细胞应答伴随出现的。此外,HIV-1 阳性长期未发展的患者以及受 HIV-1 感染的母亲生出的未被感染的儿童显示了非常高的抗 HIV-1 各种蛋白的 CTL 反应,这说明取得 CTL

各种病毒蛋白质的定向免疫反应有助于破坏病毒生产而减少病毒负荷,从而减少早期病毒负荷的形成。

灵长类慢病毒的基因组含有可编码新的调节蛋白和辅助蛋白的基因,此外还编码它们的结构基因和酶基因。调节基因 *tat* 和 *rev*, 以及辅助基因 *nef*、*vif*、*vpr*、*vpu* 和 *vpx* 被完好保留在灵长类的慢病毒(包括 HIV-1、HIV-2 和 SIV)中。这些基因被完好保留的性质说明, 它们的蛋白质产品在体内病毒发病机制中起决定性的作用。最近的研究提到了增强的病毒体产物中的辅助基因, 并将它们归因于 HIV 感染的发病机制, 这两者都支持如下观点, 即辅助基因实际上是 HIV-1 的重要组成部分。这些基因产物代表了 20% 的病毒开放阅读框, 且在体内具有免疫原性, 并可能对诱变作用不敏感, 因此, 它们提供了疫苗研制的一个重要的目标。已经研究了抗 HIV-1 辅助基因和调节基因的 DNA 疫苗的发展, 但这些基因能够干扰正常细胞活动的潜在作用, 这一事实增加了发展抗辅助基因的 DNA 疫苗的难度。

抗 HIV 的疫苗还很缺乏。需要有能够产生从不同的分化阶段清除被病毒感染的靶细胞的免疫反应的组合物和方法。

附图简述

图 1A 和 1B 显示了在实施例中所描述的各项试验数据。图 1A 显示了研究由有效并减毒的 *vif* 和 *nef* 表达盒诱导的细胞毒 T 淋巴细胞活性的各项试验数据。图 1B 显示了在 T 细胞增殖试验中所得的数据, 其中 T 细胞的增殖是通过用表达 *vif*、*vpu*、*vpr* 和 *nef* 的质粒进行免疫而诱导的。

图 2A 揭示了结构, 图 2B 显示了由实施例中所描述的各项试验所得的数据。图 2A 揭示了 *vif*、*vpu* 和 *nef* 融合蛋白和具有作为单一表达盒的蛋白酶剪切位点的融合蛋白的结构图。图 2B 显示了在体外用 T7 系统翻译后 VVN 和 VVN-P 表达的试验数据。

图 3A、3B 和 3C 显示了由实施例中所描述的各项试验所得的数据。图 3A 显示了在海拉细胞中与 VVN 和 VVN-P 融合蛋白的表达和加工有关的数据, 数据是由免疫沉淀反应获得的。图 3B 显示了体内与 VVN 和 VVN-P 融合蛋白的亚细胞定位有关的数据。图 3C 显示了对 VVN 和 VVN-P 抗原表达进行免疫组织化学分析的结果。

图 4A、4B 和 4C 显示了由实施例中所描述的试验中所得的数据, 实验涉及小鼠(用重组体 *Vif*、*Vpu* 和 *Nef* 体外刺激, 然后再用 pVVN 和 pVVN-P 进行免疫)脾细胞的 T 细胞增殖。

图 5 显示了由实施例中所描述的试验中所得的数据, 涉及用 pVVN 和 pVVN-P 免

疫接种诱导的细胞毒 T 淋巴细胞的反应。

图 6A 和 6B 显示了由实施例中所描述的试验中所得的数据, 涉及通过抗 HIV-1 (T-向亲和和双向亲和) 感染的靶子的 pVVN 和 pVVN-P 免疫接种诱导的细胞毒 T 淋巴细胞的反应, 以及由分离自用 VVN 和 VVN-P 表达结构免疫的小鼠的脾细胞诱导的交叉分化阶段的 CTL 反应。图 6A 显示了关于由抗 HIV-1 (T-向亲和和双向亲和) 感染的靶子的 pVVN 和 pVVN-P 免疫接种诱导的细胞毒 T 淋巴细胞的反应试验的数据。图 6B 显示了关于由分离自用 VVN 和 VVN-P 表达结构免疫的小鼠的脾细胞诱导的交叉分化阶段的 CTL 反应试验的数据。

对发明的描述

这里所使用的“HIV VVN 多蛋白”是指一种多蛋白, 其中包括作为单个蛋白质的 HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef 的氨基酸序列。HIV VVN 多蛋白包括那些其中有一个或多个 HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef 被减毒的多蛋白。HIV VVN 多蛋白包括那些其中 HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef 以任何顺序存在的多蛋白。HIV VVN 多蛋白包括那些其中的组成蛋白质 (HIV Vif、HIV Vpu 和 HIV Nef) 与其它的组成蛋白质接触或被非组成蛋白质序列 (比如 (但不限于) 构成蛋白酶剪切位点的氨基酸序列) 分离的多蛋白。

这里使用的“HIV VVN 结构”是指编码 HIV VVN 多蛋白的核酸分子。

这里所用的“减毒”是指与野生型进行免疫交叉反应的 HIV 辅助蛋白 (但相对于野生型而言是无效或功能受损的)。通常, 相对于各种有效的野生型蛋白质而言, 减毒的蛋白质有经过修饰的序列。本领域的一般技术人员能很容易地辨认那些与野生型进行免疫交叉反应的经修饰的序列 (但相对于野生型而言是无功能的)。

HIV 蛋白 Vif 是一个 23kD 的多肽, 据报道它对于 HIV 在外周血淋巴细胞、巨噬细胞和某些细胞系中进行复制是必需的。可以进行一项试验来测试具有修饰序列的 Vif 蛋白从而确定经修饰的形式与野生型相比是否是无效或功能受损的。HIV Vif 的核苷酸序列和氨基酸序列已经熟知, 并且可以在 Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 和 HIV 序列数据库 (hiv-web.lanl.gov) 中找到, 在此将其并入以供参考。编码减毒 HIV Vif 的遗传结构可以按 Ayyavoo V 等, (1997) AIDS 11:1433-1444 中描述的方法制造, 在此将其并入以供参考。编码优选的减毒形式的 HIV Vif 的核苷酸序列是 1 号序列:

atgGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAG
GATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACACCATATG
TATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACT
ATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAGAAGTACACATCCC
ACTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTG
CATACAGGAGAAAGAGACTGGCATTGTTGGGTCAGGGAGTCTCCA
TAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTG
ACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACTATTTTGATTGTTTT
TCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTA
GTCCTAGGTGTGAATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATC
TCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAG
ATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTAGGAACTGACAGAGGACA
GATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCC
ATACAATGAATGGACACtac.

vif 基因是从某 HIV-1 患者分离的，该患者是无症状的。进行了像反式互补试验之类的功能分析，结构表面，这种变体不能在体外支持无细胞的 HIV-1 感染。

HIV 蛋白 Vpu 是一种 16kD 的多肽，它是一种主要定位在细胞内膜的完整的膜磷蛋白。(Sato A. 等, Virus Genes 1990;4:303-312, 在此将其并入以供参考)。在受 HIV 感染的细胞中，病毒受体、CD4 和病毒包膜蛋白在内质网中形成复合物，这使得这两种蛋白质的接触被限制在这一区域内。这种细胞内 Env-CD4 复合物的形成会干扰病毒体的组装。引发与 Env 复合的 CD4 分子降解可使 Vpu 逸出病毒包膜。(Willey R. L. 等, J. Virol 1992;66(12):7193-7200, 在此将其并入以供参考。) Vpu 还可促进 HIV 从受感染细胞的表面释放。(Klimkait T 等, J Virol 1990; 64: 621-629, 在此将其并入以供参考)。对有经修饰的序列的各种 Vpu 蛋白质进行了分析以确定经修饰的形式与野生型相比是否是无效或功能缺损的。HIV Vpu 的核苷酸序列和氨基酸序列已经熟知，并且可以在 Genbank(www.ncbi.nlm.nih.gov)和 HIV 序列数据库(hiv-web.lanl.gov)中找到，在此将其并入以供参考。编码优选的减毒形式的 HIV Vpu 的核苷酸序列是 2 号序列：

atgCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAAT
AATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATAT
AGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGAT
AGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAA
GGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAAATGGGG
CACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGtac.

HIV 蛋白质 Nef 显示了多种活性, 包括对细胞表面 CD4 的表达进行负调节 (Garcia J.V. 和 Miller A.D. Res Virol 1992; 143:52-55, 在此将其并入以供参考), 干扰 T 细胞的活性 (Luria S. 等, Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:5326-533, 在此将其并入以供参考) 以及激发 HIV 的传染性 (Miller M.D. 等, J Exp Med 1994; 179:101-113, 在此将其并入以供参考)。对有修饰序列的受试 Nef 蛋白质可进行各种分析, 以确定经修饰的形式与野生型相比是否是无效或功能缺损的。HIV Nef 的核苷酸序列和氨基酸序列已经熟知, 并且可以在 Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 和 HIV 序列数据库 (hiv-web.lanl.gov) 中找到, 在此将其并入以供参考。编码优选的减毒形式的 HIV Nef 的核苷酸序列是 3 号序列:

atgGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTGGATGGCCTGC
TGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGG
GGTGGGAGCAGTATCTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATC
ACAAGTAGCAATACAGCAGCTAACAATGCTGCTTGTGCCTGGC
TAGAAGCACAAGAGGAGGAAGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACC
TCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT
CTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAA
TTCCTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTA
CCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCA
GGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACA
AGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATA
AAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGG
AATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGAC
AGCCGCCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGG
AGTACTTCAAGAACTGCTGA.

从一例长期未发展的患者也分离到了该 Nef 的克隆, 当它在 CD4 细胞中表达时不会对 CD4 和 MHC-I 分子造成负调节。

本发明涉及含有人免疫缺陷病毒 (HIV) 辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef 的蛋白质组成

序列的多蛋白。一些实施方案中，这类多蛋白的组成蛋白按照从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef 的顺序排列。一些实施方案中，有一个或多个蛋白质组分是辅助蛋白质的减毒形式的。一些实施方案中，人免疫缺陷病毒辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef 蛋白质组分中的每一个都是减毒形式的。

一些实施方案中，多蛋白的蛋白质成分之间包括蛋白酶剪切位点。一些实施方案中，HIV 辅助蛋白 Vif 和 Vpu 之间包括蛋白酶剪切位点。一些实施方案中，HIV 辅助蛋白 Vpu 和 Nef 之间包括蛋白酶剪切位点。一些实施方案中，多蛋白的组成蛋白按照从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef 的顺序排列，且在 HIV 辅助蛋白 Vif 和 Vpu 之间包括蛋白酶剪切位点，同时在 HIV 辅助蛋白 Vpu 和 Nef 之间包括蛋白酶剪切位点。一些实施方案中，蛋白酶剪切位点是 REKRAVVG(4 号序列)。一些优选的实施方案中，多蛋白中包括减毒形式的组成蛋白，多蛋白的组成蛋白按照从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef 的顺序排列，且蛋白酶剪切位点 REKRAVVG(4 号序列)在 Vif 和 Vpu 之间以及 Vpu 和 Nef 之间。

本发明涉及含有编码序列的核酸分子，它编码包括 HIV 辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef 的蛋白质成分序列在内的各种多蛋白。一些实施方案中，编码序列编码按照从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef 的顺序排列的组成蛋白在内的多蛋白。一些实施方案中，编码序列编码减毒形式的 HIV 辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef 中的一个或多个。一些实施方案中，编码蛋白编码 HIV 辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef 中每一个的减毒形式。一些实施方案中，在编码多蛋白蛋白成分的编码序列之间含有编码蛋白酶剪切位点的编码序列。一些实施方案中，在编码 HIV 辅助蛋白 Vif 和 Vpu 的编码序列之间含有编码蛋白酶剪切位点的编码序列。一些实施方案中，在编码 HIV 辅助蛋白 Vpu 和 Nef 的编码序列中含有编码蛋白酶剪切位点的编码序列。一些实施方案中，编码多蛋白辅助蛋白的编码序列被排列成从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef，并且在 HIV 辅助蛋白 Vif 和 Vpu 之间含有蛋白酶剪切位点，在 HIV 辅助蛋白 Vpu 和 Nef 之间含有蛋白酶剪切位点。一些实施方案中，编码蛋白酶剪切位点的编码序列是 REKRAVVG(4 号序列)。一些优选的实施方案中，编码序列编码多蛋白中减毒形式的辅助蛋白，多蛋白的组成蛋白从N末端到C末端依次为 Vif、Vpu 和 Nef，同时，编码序列编码 Vif 和 Vpu 之间以及 Vpu 和 Nef 之间的蛋白酶剪切位点 REKRAVVG(4 号序列)。

一些实施方案中，核酸分子的编码序列可操作地连接到调节元件上。一些实施方案中，核酸分子是质粒。一些实施方案中，核酸分子是质粒，并且核酸分子的编码序列可操作地连接到调节元件上。

一些实施方案中，核酸分子被作为重组疫苗或减毒疫苗的一部分，或与重组疫苗或减毒疫苗相结合，同时，核酸分子的编码序列可操作地连接到调节元件上。

本发明涉及药物组合物，包括可注射的药物组合物，其中含有多蛋白和/或如上所述的本发明的核酸分子。

本发明涉及免疫个体使其抗 HIV 感染的方法。这些方法包括以有效导致治疗性或预防性免疫反应的量施用含有多蛋白和/或如上所述的本发明的核酸分子的步骤。一些实施方案中，个体未受感染，此法是预防性的。一些实施方案中，个体是受感染的，这一方法是治疗性的。一些治疗性的方法包括鉴别被 HIV 感染的个体的步骤。鉴别被 HIV 感染的个体的方法是本领域的一般技术人员所熟知的。一些实施方案中，个体被施用多蛋白。一些实施方案中，个体被施用编码多蛋白的核酸分子。

根据本发明，提供了可预防性和/或治疗性免疫个体抵抗 HIV 的组合物和方法。遗传材料被个体的细胞表达，并被作为可诱导免疫反应的免疫原性的靶子。所导致的免疫反应具有广泛基础：除了体液免疫反应以外，还可以诱导细胞免疫反应。本发明的方法可有效用于预防性和治疗性免疫。因此，免疫的方法包括保护个体免遭 HIV 感染的方法，以及治疗已受 HIV 感染的患者的方法。

当被细胞吸收时，本发明的遗传结构材料可以作为有效的染色体外的分子持续存在于细胞中，和/或整合进细胞的染色体 DNA 中。可以单个质粒或多个质粒的形式将 DNA 引入仍保持独立的遗传材料的细胞。或者，可以将线性 DNA 整合进染色体而引入到细胞中。当将 DNA 引入细胞时，可以加入可促进 DNA 整合进染色体的试剂。DNA 分子中可以包括对促进整合有效的 DNA 序列。或者，可对细胞施用 RNA。预计本发明的遗传结构也可以着丝点、端粒和复制起始点等线性微型染色体的形式提供。

本发明的遗传结构包括核酸分子基因表达所必需的调节元件。这些元件包括：启动子、起始密码子、终止密码子以及多腺苷酸化信号。此外，编码本发明的蛋白质的序列在基因表达时通常还需要增强子。这些元件必需可操作地连接在编码各种所需蛋白质的序列上，且这些调节元件在所施加的个体中也是可操作的。

起始密码子和终止密码子通常被认为是编码所需蛋白质的核苷酸序列的一部分。然而，这些元件在被施用该基因结构的个体中必需是有效的。起始和终止密码子必需与编码序列相协调。

启动子和多腺苷酸化信号在个体的细胞中必需是有效的。

对于实践本发明(尤其是在人类遗传疫苗的制造中)有效的启动子的例子包括(但不限于)猴病毒 40(SV40)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)

如 HIV 长末端重复序列(LTR)启动子、Moloney 病毒、禽类白血病病毒(ALV)、巨细胞病毒(CMV)如 CMV 立即早期启动子、EB 病毒(EBV)、Rous 肉瘤病毒(RSV)以及来自于人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸、人金属硫蛋白等人基因的启动子。

对于实践本发明(尤其是在人类遗传疫苗的制造中)有效的多腺苷酸化信号的例子包括(但不限于)人和牛生长激素多腺苷酸化信号、SV40 多腺苷酸化信号以及 LTR 多腺苷酸化信号。特别是被称为 SV40 多腺苷酸化信号的 pCEP4 质粒(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)中的 SV40 多腺苷酸化信号已经投入使用。

除了 DNA 表达时所需的各调节元件外, DNA 分子中也可以含有其它的元件。此类额外的元件包括增强子。增强子可以选自(但不限于)人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸以及 CMV、RSV 和 EBV 等的病毒增强子。

本发明的遗传结构可以提供哺乳动物的复制起点以便保持染色体外部结构以及在细胞中产生此结构的多拷贝。Invitrogen(圣地亚哥, 加利福尼亚州)的 pCEP4 和 pREP4 质粒含有 EB 病毒的复制起点和无需整合就可以产生大量附加体复制拷贝的核抗原 EBNA-1 的编码区。

一些优选的涉及免疫应用的实施方案中, 分离出了一些核酸分子, 其中包括编码 HIV Vif、Vpu 和 Nef 多蛋白的核苷酸序列, 以及可进一步增强抗此类靶蛋白免疫反应的蛋白质的基因。此类基因的例子是那些编码细胞因子和淋巴因子(比如 α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、GC-SF、GM-CSF、TNF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 以及 B7.2)的基因。可进一步增强抗靶蛋白的免疫反应的蛋白质的基因的应用的这一内容在提交于 1999 年 2 月 26 日的 PCT 申请 PCT/US99/04332、并于 1999 年 9 月 2 日公布的国际申请 WO 99/43839 号也有描述, 在此将其并入以供参考。

为使蛋白质的产量最大, 调节序列可以经过挑选, 它应该充分适合基因在施用了结构材料的细胞中表达。另外, 密码子也可以经过选择, 以使其在细胞中被最有效的转录。本领域的一般技术人员能够制造在细胞中有功能的 DNA 结构。

本发明的方法包括向个体的组织施用核酸分子。在一些优选的实施方案中, 核酸分子是通过肌肉内、鼻内、腹膜内、皮下、真皮内、静脉内施用的; 通过气溶胶对肺组织施用; 或局部施用; 或向选自阴道、直肠、尿道、颊部和舌下的粘膜组织灌注。

本发明的一个方面涉及在本发明的方法中使用各种药物组合物。这些药物组合物包括核酸分子, 较好的是 DNA 分子, 它含有编码一个或多个可操作地连接到在个

体细胞中表达必需的各种调节元件上的蛋白质的核苷酸序列。药物组合物进一步包括一种药学上可接受的载体或稀释剂。“药物的”一词对于精通这一技术的技术人员而言是熟知且被广泛理解的。用在这里时，“药物组合物”和“可注射的药物组合物”是指可被精通这一技术的技术人员所理解的它们的常规含义。药物组合物应满足特定的标准，如无菌、热原、颗粒物质以及等渗性和 pH。例如，可注射的药物是无菌且无热原的。

如本发明所述的药物组合物可以含有约 1ng 至约 10,000 μ g 的 DNA。在一些优选的实施方案中，药物组合物含有约 2000 μ g、3000 μ g、4000 μ g 或 5000 μ g 的 DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物含有约 1000 μ g DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物中含有约 10ng 至约 800 μ g 的 DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物中含有约 0.1 至约 500 μ g 的 DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物中含有约 1 至约 350 μ g 的 DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物中含有约 25 至约 250 μ g 的 DNA。一些优选的实施方案中，药物组合物中含有约 100 μ g 的 DNA。

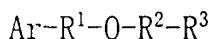
如本发明所述的含有本发明基因结构的药物组合物是根据所使用的用药模式来制造的。本领域的一般技术人员可以很容易的将其制成含有基因结构的疫苗或非免疫原性的治疗剂。当所选用药模式为肌肉内注射时，最好使用一种等渗的制剂。通常，为达到等渗所用的添加剂包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。有时，较好是使用磷酸缓冲盐溶液脂类渗溶液。稳定剂包括明胶和白蛋白。一些实施方案中，在制剂中加入了血管收缩剂。如本发明所述的药物制剂是以无菌和无热原的形式提供的。如本发明所述的药物组合物包括与核酸分子相结合的输送组分，还可进一步含有药学上可接受的载体或赋形剂，比如，盐水。可以使用任何能够成功输送核酸的介质。精通这一技术的技术人员将很容易了解多种可用于本发明的药学上可接受的介质。合适的药物载体被描述在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol，这是本领域的标准参考书，在此将其并入以供参考。

一些实施方案中，核酸分子是与强化剂一起使用输送到细胞中的。这种强化剂也被称为多核苷酸功能增强子或基因疫苗强化剂。在发表于 1998 年 11 月 3 日的美国专利 5,830,876 号、发表于 1997 年 1 月 14 日的美国专利 5,593,972 号以及提交于 1994 年 1 月 26 日的国际申请第 PCT/US94/00899 号(美国序列号为 08.979,385，提交于 1997 年 11 月 29 日)中都对这类强化剂有描述，在此将它们并入以供参考。此外，在发表于 1998 年 4 月 14 日的美国专利 5,739,118 号、发表于 1998 年 11 月 17 日的美国专利 5,837,533 号、提交于 1995 年 9 月 28 日的 PCT/US95/12502 以及提交于 1995 年 3 月 30 日的 PCT/US95/04071 中也有对它的描述，在此将它们

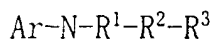
并入以供参考。与核酸分子一起施用的强化剂可以与核酸分子混合施用,或是在施用核酸分子的同时、之前或之后单独施用。此外,具有转染剂和/或复制剂和/或炎症试剂功能的其它试剂;能或不能与强化剂共同施用的试剂:包括生长因子、细胞因子和淋巴因子(如, α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生长因子(PDGF)、GM-CSF、TNF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12和B7.2、以及成纤维细胞生长因子)、表面活性剂(如免疫刺激复合物(ISCOMS))、弗氏不完全佐剂、LPS的类似物(包括单磷酰脂A(MPL)、胞壁酰肽、醌类似物以及像鲨烯之类的囊泡)以及透明质酸等。在涉及免疫方法的一些实施方案中,选择了能够提高免疫反应的协同试剂。在涉及免疫抑制方法的一些实施方案中,选择了不会提高免疫反应的协同试剂。

在一些优选的实施方案中,本发明的遗传结构是与选自苯甲酸酯、酰替苯胺、脘、氨基甲酸乙酯和它们的盐酸盐(比如局部麻醉剂家族中的那些)的强化剂一起构建或是与它一起施用的。

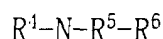
一些优选的实施方案中,强化剂可以有以下的结构:



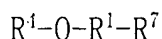
或



或



或



其中:

Ar 是苯、对-氨基苯、间-氨基苯、邻-氨基苯、取代的苯、取代的对-氨基苯、取代的间-氨基苯、取代的邻-氨基苯,其中,氨基苯中的氨基基团可以是氨基、 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷基胺, $\text{C}_1\text{-C}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_5$ 二烷基胺,取代的化合物上的取代基可以是卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷基和 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷氧基;

R^1 是 $\text{C}=\text{O}$;

R^2 是包括分支的烷基在内的 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基;

R^3 是氢、胺、 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷基胺, $\text{C}_1\text{-C}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_5$ 二烷基胺;

R^2+R^3 可以形成环烷基、一个 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代的环烷基、一般环式脂肪胺、一个 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代的环式脂肪胺、一个杂环和包括一个 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基 N-取代的杂环在内的一个 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基取代的杂环;

R^4 是 Ar, R^2 或 C1-C5 烷氧基、一个环烷基、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环烷基、一个环式脂肪胺、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环状脂肪胺、一个杂环、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的杂环和包括一个 C₁-C₁₀ 烷基 N-取代的杂环在内的一个 C₁-C₁₀ 烷氧基取代的杂环;

R^5 是 C=NH;

R^6 是 Ar, R^2 或 C1-C5 烷氧基、一个环烷基、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环烷基、一个环式脂肪胺、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环状脂肪胺、一个杂环、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的杂环和包括一个 C₁-C₁₀ 烷基 N-取代的杂环在内的一个 C₁-C₁₀ 烷氧基取代的杂环; 以及

R^7 是 Ar, R^2 或 C1-C5 烷氧基、一个环烷基、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环烷基、一个环式脂肪胺、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的环状脂肪胺、一个 C₁-C₁₀ 烷基取代的杂环和包括一个 C₁-C₁₀ 烷基 N-取代的杂环在内的一个 C₁-C₁₀ 烷氧基取代的杂环。

酯类的例子包括, 苯甲酸酯, 如哌罗卡因、美普卡因以及异布卡因; 对-氨基苯甲酸酯, 如普鲁卡因、丁卡因、丁胺卡因、丙氧卡因和氯普鲁卡因; 间-氨基苯甲酸酯, 包括美布他明和 primacaine; 以及对-氨基苯甲酸酯, 如对乙氧卡因。酰替苯胺的例子包括利多卡因、依替卡因、甲哌卡因、布比卡因、吡咯卡因和丙胺卡因。此类化合物其它的例子包括地布卡因、苯佐卡因、达克罗宁、普莫卡因、丙美卡因、布他卡因、奥布卡因、卡波卡因、甲基布比卡因、苦味酸氨基苯甲酸丁酯 (butasin picrate)、非那卡因、diothan、lucaine、intracaine、奴白卡因、美布卡因、匹多卡因、珍尼柳酯以及植物衍生的二环, 如可卡因、肉桂酰可卡因、异托品基可卡因和升柯卡因 (cocaethylene), 以及所有与盐酸复合的此类化合物。

在优选的实施方案中, 强化剂是布比卡因。布比卡因和甲哌卡因之间的区别是, 布比卡因在甲哌卡因 N-甲基基团的位置上有一个 N-丁基基团。这些化合物在那个 N 处可以有 C1-C10 的基团。这些化合物可以被卤素 (如普鲁卡因和氯普鲁卡因) 取代。酰替苯胺是优选的。

强化剂先于、同时或后于遗传结构施用。强化剂和遗传结构可以被制在同一种组合物中。

盐酸布比卡因在化学上被称为 2-哌啶氨甲酰, 1-丁基-N-(2, 6-二甲基苯基)-一氢氯化物, 一水合物, 它在商业上广泛用于制药业, 可从许多来源获得, 包括 Astra Pharmaceutical Products 公司 (Westboro, 麻萨诸塞州) 和 Sanofi Winthrop Pharmaceuticals (纽约, 纽约州), Eastman Kodak (罗彻斯特, 纽约州)。商业上, 布比卡因是和或不和对羟基苯甲酸甲酯以及和或不和肾上腺素一起制造。可以使用

任何此类配方。商业上供制药使用的浓度为 0.25%、0.5%和 0.75%，它们可用于本发明。如果需要的话，也可以制备其它的浓度，尤其是在 0.05%和 1.0%之间，这样的浓度可产生理想的效果。根据本发明，施用的是约 250 μ g-约 10mg 的布比卡因。一些实施方案中，施用了约 250 μ g-约 7.5mg。一些实施方案中，施用了约 0.05mg-约 5.0mg。一些实施方案中，施用了约 0.5mg-约 3.0mg。一些实施方案中，施用了约 5-50 μ g。例如，一些实施方案中，施用了约 50 μ l-约 2ml，较好的是 50 μ l-约 1500 μ l，更好的是约 1ml 0.25-0.50%的盐酸布比卡因，并在施用疫苗之前、同时或之后在前面接种疫苗的同一位置上，施用溶于等渗的药理学上可接受的载体的 0.1%的对羟基苯甲酸甲酯。类似的，一些实施方案中，在前面注射疫苗的同一位置上，在施用疫苗之前、同时或之后施用了约 50 μ l 至约 2ml，较好的是 50 μ l 至约 1500 μ l，更好是约 1ml 溶于等渗的药理学上可接受的载体的 0.25-0.50%的盐酸布比卡因。可以一定的浓度施用布比卡因和任何其它具有类似作用的化合物，尤其是与局部麻醉剂相关家族的那些物质，这一浓度应能提供细胞吸收遗传结构所需的促进作用。

在本发明的一些实施方案中，在施用遗传结构之前首先向个体注射了强化剂。即，例如，在施用遗传结构约一周或十天前先向个体注射强化剂。一些实施方案中，约在施用遗传结构约 1-5 天，一些实施方案中是 24 小时，之前或之后前向个体注射强化剂。或者，也可以同时施用，或在施用遗传结构之前或之后几分钟施用强化剂。或者，可以将强化剂和遗传结构结合制成单一的药物组合物。

一些实施方案中，在施用遗传结构时没有强化剂，即在施用方案中采用的制剂配方中没有强化剂，其施用步骤中遗传结构没有与强化剂的施用相结合。

在一些涉及免疫接种的实施方案中，本发明的遗传结构可以保留一部分减毒的活微生物或是重组微生物载体的基因材料的。本发明涉及改进的减毒活疫苗和采用重组载体来运送 VVN 多蛋白和/或编码多蛋白的核酸分子的改进的疫苗。减毒的活疫苗以及那些用重组载体运送外源抗原的例子，在美国的 4,722,848; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; 以及 5,482,713 等号专利中有描述，在此将它们分别并入以供参考。提供的遗传结构中包括可操作地连接到能在疫苗中发挥作用以影响表达的调节序列上的编码 HIV VVN 多蛋白的核苷酸序列。这类基因结构被包括在减毒的活疫苗和重组疫苗中以便产生如本发明所述的改进的免疫作用。这类基因结构可以是重组病毒疫苗基因组的一部分，其中基因材料或者整

合进细胞的染色体，或者保留在染色体外。

本发明的一些实施方案涉及蛋白质以及使用蛋白质的方法。例如，一些免疫方法中，HIV VVN 多蛋白被用于个体。当用在这里时，“本发明的蛋白质”是指 HIV VVN 多蛋白，其中的每一个都可以用类似的方法制造，并且可以类似的方式配方并施用以用在本发明的方法中。

可按照常规制造包括重组表达载体(含有编码本发明的蛋白质的核苷酸序列)在内的载体。当用在这里时，“重组表达载体”这一术语是指质粒、噬菌体、病毒体或是其它的载体，当被引入合适的宿主中时，它含有必需的基因元件以指导编码序列的表达。本领域中的一般技术人员能够分离或合成编码本发明蛋白质的核酸分子，并用标准的技术和可简便获得的原材料将其插入表达载体中。编码序列被可操作地连接到必要的调节序列上。表达载体是熟知且容易获得的。这类表达载体的例子包括质粒、噬菌体、病毒载体以及其它的核酸分子，或是含有对转化宿主细胞有效并可使编码序列的表达变得容易的载体的核酸分子。本发明的一些实施方案涉及含有编码 HIV VVN 多蛋白的核苷酸序列的重组表达载体。本发明的重组表达载体可用于转化宿主。本发明涉及含有编码 HIV VVN 多蛋白的核苷酸序列的重组表达载体。

本发明涉及一种含有重组表达载体的宿主细胞，重组表达载体中包括编码 HIV VVN 多蛋白的核苷酸序列的。用在熟知的重组表达系统中以便制造蛋白质的宿主细胞是人们所熟知的且很容易获得。宿主细胞的例子包括细菌细胞，如大肠杆菌；酵母细胞，如酿酒酵母；昆虫细胞，如 *S. Frugiperda*；非人哺乳类组织培育细胞中国仓鼠卵巢(CHO)细胞以及人组织培育细胞，如海拉细胞。

一些实施方案中，例如，本领域的一般技术人员用熟知的方法，将 DNA 分子插入到商业上获得的表达载体中以便用于熟知的表达系统。例如，可以使用商业上获得的质粒 pSE420(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)在大肠杆菌中制造 CD80 ΔC 突变蛋白。商业上获得的质粒 pYES2(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)可以，例如，在酿酒酵母品系的酵母中进行生产。商业上获得的 MAXBACTM 完全杆状病毒表达系统(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)可以，例如，在昆虫细胞中进行生产。商业上获得的质粒 pcDNA I 或 pcDNA3(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)可以，例如，在哺乳类细胞如中国仓鼠卵巢细胞中进行生产。本领域中的一般技术人员可以使用这些商品表达载体和系统或其余，用常规的技术和容易获得的原材料来制造本发明的蛋白质。(参见，例如，Sambrook 等, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Press(1989), 在此将其并入以供参考。)因此，所需的蛋白质可以在真核或原核系统中制备，这就导致了一

套蛋白质的加工形式。

这一技术领域的一般技术人员可以使用其它商业上可获得的表达载体和系统或是用熟知的方法和容易获得的原材料来制造载体。含有必需的控制序列(比如启动子和多腺苷酸化信号, 较好是增强子)的表达系统是容易获得的, 并且在这一领域中已知可将其用于各种宿主。参见(例如)Sambrook 等, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Press(1989)。

包括编码本发明的蛋白质的 DNA 在内的表达载体被用来转化适合的宿主, 然后培养宿主并将其保持在外源 DNA 的表达能够进行的条件下。然后通过溶解细胞或是用这一领域的技术人员已知的合适的方法, 从培养基上收集由此制得的本发明的蛋白质。这一领域的一般技术人员可以用已经被熟知的技术, 分离用此类表达系统制得的本发明的蛋白质。用特异性结合此类蛋白质的抗体从原材料中纯化本发明的蛋白质的方法与生产此类抗体的方法一样, 都是常规的方法(参见: Harlow, E. 和 Lane, E., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 在此将其并以供参考)。此类抗体可用来纯化由重组 DNA 法或天然原料制得的蛋白质。

遗传结构的例子包括编码本发明的蛋白质的编码序列以及可操作地连接到在将此结构转染进的细胞系中起作用的启动子上的编码序列。组成型启动子的例子包括巨细胞病毒或 SV40 的启动子。诱导性启动子的例子包括小鼠乳腺白血病病毒或金属硫蛋白启动子。本领域的一般技术人员能够很容易的用很容易获得的原材料制造可以用带有编码本发明的蛋白质的 DNA 的细胞有效进行转染的遗传结构。此类基因结构可用于生产本发明的蛋白质。

除了用重组的方法制造本发明的蛋白质, 也可以用自动肽合成器来生产本发明的蛋白质。此类技术是本领域的一般技术人员所熟知的, 并且是有效的一如果含有取代基的衍生物不被用来生产 DNA 编码的蛋白质的话。

本发明的蛋白质可以用以下任何一种已知的技术来制造。比较方便的是, 可以用固相合成技术来制造本发明的蛋白质, 这一技术最先由 Merrifield 描述在 *J. Am. Chem. Soc.*, 15:2149-2154(1963), 在此将其并入以供参考。其它的蛋白质合成技术可以在以下文章中找到, 例如: M. Bodanszky 等, (1976) *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 第二版, 在此将其并入以供参考; Kent 和 Clark-Lewis, *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*, 第 295-358 页, Alitalo, K. 等编, Science Publishers, (阿姆斯特丹, 1985), 在此将其并入以供参考; 以及其它的精通这一领域的技术人员所熟知的参考资料。对合成技术的总结可以在

J. Stuart 和 J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州(1984)中找到。也可以用液态方法进行合成, 如描述在 *The Proteins*, 第 II 卷, 第三版, 105-237 页, Neurath, H. 等编, Academic Press, 纽约, 纽约州(1976), 在此将其并入以供参考。适用于此类合成的各种保护基团可以在上述文献中找到, 也可以在 J. F. W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 纽约, 纽约州(1973)中找到, 在此将其并入以供参考。

总之, 这些合成方法都包括在一条生长中的肽链中加入一种或多种氨基酸残基或合适的保护性的氨基酸残基肽链。通常, 对第一个氨基酸残基的氨基或羧基用一种合适的可选择性除去的保护基团加以保护。对于含有反应性侧链基团的氨基酸(如赖氨酸)可以适用不同的、可选择性除去的保护基团。

以采用固相合成法为例, 将受保护的氨基酸或衍生的氨基酸通过未被保护的羧基或氨基附在惰性固体载体上。然后选择性除去氨基或羧基的保护基团, 并使序列中下一个被适当保护的氨基酸(含在有互补(氨基或羧基)基团)与已经附在固体载体上的残基混合并反应。然后从这种新加入的氨基酸残基上除去氨基或羧基的保护基团, 再加入下一种受适当保护的氨基酸, 依此类推。当所有需要的氨基酸都以适当的顺序连接后, 依次或同时除去所有保留的末端和侧链的保护基团(以及固体载体), 以提供最终的肽。本发明的肽最好是未被苄化或甲苄化的氨基酸。此类保护部分可在合成过程中使用, 但是要在使用这些肽之前将它们除去。还需要进行额外的反应来形成分子内连接以限制其构象, 这将另行讨论。

一些实施方案中, 蛋白质是在转基因动物中制造的。本发明涉及一种转基因的含有重组表达载体的非人哺乳类, 表达载体包括编码 HIV VVN 多蛋白的核酸序列。可有效制造重组蛋白质的转基因的非人哺乳类和必需的表达载体以及制造转基因动物的技术一样, 都已熟知。通常, 转基因动物中含有重组表达载体, 其中, 编码 HIV VVN 多蛋白的核苷酸序列被可操作地连接到乳房细胞特异的启动子上, 编码序列仅在乳房细胞中表达, 这样就可以从动物的乳汁中回收被表达的重组蛋白质。本领域的一般技术人员可用标准的技术来生产能够制造 HIV VVN 多蛋白的转基因动物。优选的动物是山羊和啮齿类动物, 尤其是大鼠和小鼠。这类标准技术有, 比如发表于 1989 年 10 月 10 日的 Wagner 的美国专利 4,873,191 号以及发表于 1988 年 4 月 12 日的 Leder 的美国专利 4,736,866 号中所描述的, 在此将这两者并入以供参考。

已经设想了对本发明的蛋白质的氨基酸序列进行保守性取代。当用在这里时, “保守性取代”这一术语是指用其它有类似结构和/或电荷特征的残基来取代 HIV

VVN 多蛋白的氨基酸。本领域的一般技术人员可以根据熟知的保守性基团很容易地设计出对氨基酸进行保守性取代的本发明的蛋白质。

本发明的药物组合物可以用任何能够让活性因子到达哺乳动物身体中的药剂作用位点的方法进行用药。本发明的药物组合物可以用很多途径进行施用，这要根据是否需要局部或全身治疗以及被治疗的面积。用药可以是局部的(包括眼、阴道、直肠、鼻内、透皮)、口服或是不经肠的。由于当口服用药时肽会被消化，口服制剂被制成将活性因子用肠溶胶囊包裹，或被制成在胃中不被降解(比如预中和)。不经肠的用药包括静脉滴注、皮下注射、腹膜内注射或肌肉内注射用药，肺部用药，如，吸入法或吹入法，或鞘内或心室内用药。在优选的实施方案中，不经肠的，即静脉内、皮下、跨皮、肌肉内用药，通常可使吸收最优化。静脉内用药可以在输液泵的帮助下进行。本发明的药物组合物可被制成乳剂。

精通这一领域的技术人员将很容易理解可被用于本发明的药学上可接受介质的多样性。合适的药学上可接受载体描述在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol 中，这是本领域的标准参考书，在此将其并入以供参考。局部施用的制剂包括透皮贴、软膏剂、洗剂、乳膏、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液剂和粉末剂。常规的药学上可接受的载体、水基、粉基或油基、增稠剂等是必需或需要的。供口腔用药的组合物包括粉末剂或颗粒剂、水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊剂、丸剂或片剂。可以有增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。不经肠、静脉内、鞘内或心室内施用的组合物包括无菌水溶液，它还可以含有缓冲液、稀释剂或其它合适的添加剂，且最好是无菌和无热原的。根据本发明，适合静脉施用的药物组合物是无菌且无热原的。对不经肠的用药而言，本发明的肽可以被制成(例如)与药学上可接受的不经肠的载体相结合的溶液、悬浮液、乳剂或冻干粉末。此类载体的例子包括水、盐水、林格溶液、葡聚糖溶液以及 5% 的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和固定油之类的非水载体。载体或冻干粉末可以含有能够维持等渗性(如，氯化钠、甘露醇)和化学稳定性(如，缓冲液和防腐剂)的添加剂。制剂用通常使用的方法灭菌。例如，可以将占重量 1.5% 的活性成分溶解在 0.9% 的氯化钠溶液中，以制得适合注射用药的不经肠的组合物。

如本发明所述的药物组合物可以单剂量用药或以多剂量用药。本发明的药物组合物可以作为单独的治疗试剂施用或是与其它的治疗试剂结合施用。本发明的治疗可与依次或同时进行的常规治疗结合。

剂量的变化依赖于已知的因素，比如特定试剂的药代动力学特征，其模式和用药途径；受试者的年龄、健康状况和体重；症状的性质和表现，同时采取的治疗的

类别, 治疗频率以及需要达到的效果。据认为, 治疗组合物的制剂和它们随后的施用都已纳入本领域的技术范围之内。通常, 肽的剂量是每 50 千克体重约为 1-3000 毫克; 较好的是每 50 千克体重约为 10-1000 毫克; 更好的是每 50 千克体重约为 25-800 毫克。一般每天向个体施用 8-800 微克, 以分散剂量的形式, 一天 1-6 次, 或以持续释放的形式以获得所需效果。

根据施用一种或多种蛋白质的方法, 可与最有效的制造和施用本发明的药物组合物。精通这一领域的技术人员根据公开项目就可掌握各种用药模式。

本发明的方法在人药和兽药领域都可适用。相应的, 本发明涉及哺乳类、鸟类和鱼类的遗传免疫措施。本发明的方法对于包括人类、牛类、绵羊类、猪类、马类、犬类和猫类在内的哺乳类特别有效。

此外, 本发明还涉及减毒的人免疫缺陷病毒(HIV)辅助蛋白 Vif、Vpu 和 Nef, 尤其是在这里描述并提到的那些, 涉及对它们进行编码的核酸分子, 并涉及这里通常所描述的含有蛋白质或核酸的疫苗以及制造或使用它们的方法。一些实施方案中, 本发明涉及一种选自 Vif、Vpu 和 Nef 的辅助蛋白, 涉及对它们进行编码的核酸分子, 并涉及这里通常所描述的含有蛋白质或核酸的疫苗以及制造或使用它们的方法。一些实施方案中, 本发明涉及一种含有两种选自 Vif、Vpu 和 Nef 的辅助蛋白的多蛋白, 涉及对它们进行编码的核酸分子, 并涉及这里通常所描述的含有这种多蛋白或核酸的疫苗以及制造或使用它们的方法。

以下列出的实施例包括本发明各个方面的代表性的实施例。这些实施例不能理解为限制了本发明的范围, 而只是提供了示范性的用途。此外, 可以通过以下描述概括本发明的各个方面。然而, 这类描述不是意味着限制本发明的范围, 而是要强调本发明的各个方面。本领域的一般技术人员能够很容易地领会本发明的其它方面和实施方案。

实施例

用 Ayyavoo V, (2000), AIDS 14:1-9 中描述的方法可以制造出表达多种人免疫缺陷病毒(HIV-1)的辅助基因, 包括 HIV Vif、Vpu 和 Nef 在内的 DNA 疫苗盒, 在此将其并入以供参考。

材料和方法

细胞: 使用来自美国模式培养物保藏所(ATCC)的海拉细胞和 NIH3T3 细胞, 在 37°C、5%CO₂ 下, 在含 10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素和 1%L-谷氨酰胺的

Dulbecco 改进的 Eagle 培养基上单层生长。将由 ATCC 获得的 P815 细胞在 37℃、5%CO₂ 下, 在含 10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素和 1%L-谷氨酰胺的 RPMI1640 中以悬浮培养物的形式保持。经植物血凝素 (PHA) 刺激的 (5 μg/ml) PBL 被保持在含有 10%T 细胞生长因子的 RPMI 1640 培养基中。

多种免疫原表达盒的产生: 用 PCR 分别克隆 HIV-1 的 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 基因。减毒的 HIV-1 的辅助基因 *vif*(N17)、*vpu*(M5256) 和 *nef*(S313) 被挑选出来构成多基因融合的盒子。为构建融合蛋白和带有蛋白酶裂解位点的融合蛋白, 我们采用了重叠 PCR 技术。用以下引物使 HIV-1 的 *vif*、*vpu* 和 *nef* 按顺序融合:

vif(+) 5' ATTGAAAGCTTATGGAAAACAGATGGCAGG 3' (5 号序列);

vif(-) 5' TACTATTATAGGTTGCATCTCGTGTCCATTCATTGT 3' (6 号序列);

vpu(+) 5' GGACACGAGATGCAACCTATAATAGTAGCA 3' (7 号序列);

vpu(-) 5' TGACCACTTGCCACCCATCTCGAGATCATCAATATCCCAAGG 3' (8 号序列);

nef(+) 5' GGAGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGT 3' (9 号序列); 和

nef(-) 5' CGCAAGCTTCGATGTCAGCAGTCTTTGTAG 3' (10 号序列)。

同样的这种引物被用来构建融合蛋白, 除了 *vif*(-) 引物和 *vpu*(-) 引物有额外的八个氨基酸 (REKRAVVG) (4 号序列) 的蛋白酶剪切位点。扩增的融合基因产物 (1.4kb) 用 Hind III (其识别序列的位点含在外部的引物对中) 消化处理, 克隆成 pcDNA3 (Invitrogen, 加利福尼亚州), 并测序以验证其突变并确保融合基因的完整性。

用 T7 系统在活体外翻译各融合蛋白: 在活体外转录和翻译是用 T7 RNA 聚合酶, 按照其使用说明 (Promega, 麦迪逊, 威斯康星州) 在 1 μg 融合蛋白表达结构 DNA 上进行的。将在活体外翻译反应的产物 5 μl 与 500 μl 放射免疫沉淀反应检测缓冲液混合, 并和兔抗 Vif、抗 Vpu 和抗 Nef 的抗血清进行免疫沉淀反应。将免疫沉淀反应的产物溶解于 12%的 SDS-PAGE 并使其放射自显影。

Western 印迹(免疫印迹分析): 采用 DOTAP (BMB, 印地安那州), 用 20 μg 的 pVVN 和 pVVN-P 表达结构材料转染海拉细胞。48 小时后, 将被转染的细胞置于选择培养基 (含有 400 μg/ml Geneticin 的 DMEM) 上; 并将单个的细胞克隆体分离出来。为对表达、有效性以及细胞蛋白酶对蛋白质进行的合适的剪切情况进行分析, 将稳定的细胞溶解, 并用抗 Vif、抗 Vpu 和抗 Nef 的抗体对细胞溶解产物进行免疫沉淀反应, 随后进行 Western 印迹。

免疫荧光测定: 将海拉细胞保持在含有 10%FBS 的 DMEM 中, 然后以每皿 (35mm) 1×10^6 个细胞的密度接种到涂有聚 L-赖氨酸的盖玻片上。24 小时后用 vTF7-3 感染

并按上述方法转染。转染 16-24 小时后, 用 PBS 冲洗细胞并用甲醇在室温下固定 30 分钟。然后再用 PBS 冲洗细胞并和初级抗血清(1:50)培育 90 分钟。用 PBS 冲洗盖玻片后, 将其与以 1:100 稀释在 PBS 中的 FITC-共轭的亲纯化的山羊抗兔 IgG 的 F(ab)'₂ 片段(ICN Biochemicals; 加利福尼亚州)一起培育 90 分钟, 并用 PBS 冲洗 6 次。然后用 DAPI(0.1%溶于 PBS; Sigma; 圣路易斯, 密苏里州)将盖玻片复染 5 分钟并再次冲洗, 然后用防褪色的封固剂(Citiflour; 英格兰)将其封在载玻片上。所有的温育都在湿化室中于 37℃ 下进行。

研制表达 hCD4 和 CCR5 或 CXCR4 的小鼠的稳定细胞系供 CTL: 使用 DOTAP (BMB, 印地安那州), 用 hCD4 表达载体和 pBabe-Fusin 或用 hCD4 和 pBABE-CCR5 表达载体共转染 NIH3T3 细胞。转染 48 小时后, 将细胞保持在 400 μ g/ml 的 Geneticin 和 2 μ g/ml 的嘌呤霉素中。用单一的细胞克隆体建立各种稳定的细胞系, 用流式细胞计对细胞系中 hCD4 和 Fusin 或 CCR5 的表达进行分析。简单地说, 用 FITC 或 PE 标记的对 CD4、Fusin 或 CCR5 的人的 mABs (Pharmingen, 加利福尼亚州) 将细胞 (5×10^5) 染色 1 小时, 用 FACS 缓冲液 (3%BSA、0.1%NaN₃ 溶于 1×PBS) 冲洗两次, 然后用 2% 的多聚甲醛固定, 并用荧光活化细胞分选仪 (Beckton Dickinson, 加利福尼亚州) 分析。

初级分离物的病毒感染: 用与初级且充分鉴定的 T-向亲和 (pNL43) 和双向亲和 (89.6) 的实验分离物相当的 10-50ng HIV-1 p24 感染表达 hCD4/Fusin 和 hCD4/CCR5 的 NIH3T3 细胞。初级分离物中还包括衍生自不同分化阶段 C、D、E 和 A (通过 NIH ARRPP 从 WHO 中获得) 病毒。通过测量释放到培养基中的 p24 抗原可以分析细胞的感染性。p24 分析是用 p24 捕获 ELISA 试剂盒 (Coulter, 佛罗里达州) 按照使用说明进行的。

小鼠: Balb/c 雌性小鼠, 6-8 周龄, 从 Harlan Sprague Dawley 公司购得 (印第安纳波利斯, 印第安纳州)。按照国立卫生研究院 (National Institute of Health) 和宾西法尼亚大学的方针, 将小鼠养在温度控制并有光周期的房间中。

DNA 接种: 我们使用了一种强化的 DNA 接种方法, 它可以增加来自质粒传递基因的蛋白质在体内的表达水平。具体方法是, 用 27 号针头向 BALB/c 小鼠的四头肌注射 100 μ l 0.25% 的布比卡因 (Sigma, 密苏里州)。48 小时后, 向注射布比卡因的肌肉的同一区域注射 100 μ g 溶于磷酸盐缓冲盐溶液的相关的 DNA 结构材料。两周后再向小鼠强化注射一次。第二次注射两周后, 每组中取出半数小鼠的脾, 其余的小鼠再第二次强化注射一次相应的 DNA 结构材料。

T 辅助细胞增殖的测定: 从所得小鼠脾脏制备淋巴细胞。将分离的细胞悬浮液

再次悬浮在含有 10%FBS 的 RPMI 1640 中,使其浓度为 5×10^6 细胞/毫升。每次试验中,在 96 空平底微量滴定板相应的孔中加入含有 5×10^5 细胞的 $100 \mu\text{l}$ 等分溶液。以 10 或 $2 \mu\text{g/ml}$ 在各孔中一式三份加入 $100 \mu\text{l}$ 相应的蛋白质,使最终蛋白质的浓度分别为 5 和 $1 \mu\text{g/ml}$ 。将细胞在 5%的 CO_2 中于 37°C 下温育 3 天。在每个孔中加入 $1 \mu\text{Ci}$ 氘化胸苷,并将细胞在 37°C 下温育 12-18 小时。收集平板并在 β 平板阅读器中测量被吸收的氘化胸苷的量。为确保细胞是健康的,以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 PHA 作为多克隆刺激物作为阳性对照。刺激指数是按以下公式确定的:刺激指数 = (试验数-自发数)/自发数。

细胞毒 T 淋巴细胞的测定: 用被牛痘苗感染的目标或肽处理的目标进行 5 个小时的 ^{51}Cr 释放 CTL 测定。从脾中收集淋巴细胞,并通过除去红血细胞并用新鲜的培养基洗涤几次将其制成了效应细胞。测定是在活体外有或没有效应物刺激的情况下进行的。当在活体外刺激测定时,用浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 的伴刀豆球蛋白 A(Sigma, 圣路易斯, 密苏里州)对效应细胞刺激 1 天。然后用相应的被牛痘苗感染的或用 $1 \mu\text{M}$ 肽处理的 P815 细胞对效应物刺激 3 天,然后用 0.1%的多戊二醛和 0.1M 的甘氨酸固定。被牛痘苗感染的目标是将 3×10^6 个 P815 细胞在 37°C 下感染 5-12 小时制得的。加有肽的目标是将 P815 细胞和肽类一起温育 5-12 小时制得的。用 $100 \mu\text{Ci/ml}$ 的 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 将靶细胞标记 60-120 分钟,然后和被刺激的脾细胞在 37°C 下温育 4-6 小时。在效应物:目标(E:T)比从 50:1 至 12.5:1 的范围内检测 CTL。收集上清液并在 LKB γ -计数器上计数。用以下公式计算地溶率: $100 \times \{ (\text{试验释放数} - \text{自发释放数}) / (\text{最大释放数} - \text{自发释放数}) \}$ 。最大释放数是按在含有 5%的 Triton X-100 培养基中靶细胞溶崩量来测定的。重组牛痘苗(vNef 和 vSC8)是从 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program 获得的。

用被临床 HIV-1 分离物感染的靶子的 CTL 测定: 用同时代表 T-向亲和和巨噬(细胞)-向亲和病毒的 HIV-1 实验室和临床分离物感染表达 hCD4/Fusin 或 hCD4/CCR5 的 NIH3T3 细胞。用铬标记被 HIV-1 感染的 NIH3T3 的克隆体,并将其作为 CTL 测定的靶子。

交叉分化阶段 CTL 杀伤试验: 用分离自不同分化阶段的 HIV-1 病毒感染表达 hCD4/Fusin 或 hCD4/CCR5 的 NIH3T3 细胞。通过检测 p24 抗原测定感染性,并将被感染的细胞作为 CTL 测定的靶子。

结论

用于 DNA 免疫处理的减毒 *vif*、*vpu* 和 *nef* 基因的结构和特征: HIV-1 辅助基因 *vif*、*vpu* 和 *nef* 克隆自 HIV-1 阳性患者,分析了它们的功能并进行了减毒处理。

这些基因的生物特征是按照如表 1 所示的标准功能检测法测试的。选择了减毒的 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 克隆体供在小鼠中做进一步的免疫学测定。有功能(野生型)和一定数量无功能的(减毒的) *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 克隆体被用来免疫处理小鼠,同时测定了所产生的免疫反应。几组小鼠被用一种疫苗结构材料免疫处理并在 15 天后被加强一次。在第二次注射两周后杀死动物,取出它们的脾脏以供细胞毒 T 细胞(CTL)和淋巴增殖测定使用。根据供 CTL 试剂的利用率,以表达 Vif 的 P815 细胞或被 Nef 表达牛痘苗感染的 P815 作为靶细胞。对功能性和减毒的 *vif* 和 *nef* 结构材料都能够诱导与载体结构材料免疫处理的小鼠相匹配的抗原特异 CTL。

图 1A 显示了由功能性和减毒 *vif* 和 *nef* 结构材料同时诱导的特异性 CTL 活性的百分比。通过肌肉内向小鼠施用了 100 μ g 野生型和减毒的 *vif* 或 *nef* 表达质粒。第一次注射两周后,用同样剂量的相应质粒对小鼠加强一次。再过两周后,如方法一节中所描述的那样,在免疫处理小鼠的脾细胞上进行 CTL 测定。在获得脾细胞的那一天检测由特异性和不相关的牛痘苗感染的靶细胞所释放的铬。在单纯用一种空白载体免疫处理的对照组中,靶细胞的特异性溶崩没有超过背景的水平。用表达 β -gal 的牛痘苗(vSC8)感染 p815 以制备无关的目标。在多项实验中都得到了类似的结果。当效应物:目标物的比例为 50:1 时, *vif* 克隆体 T-37(功能性)和 N-17(减毒的)分别表现有 19.9%和 25%的特异性溶崩。这些结果证明,用不同的 *vif* 结构材料免疫的 DNA 可诱导抗原特异的 CTL 反应。同样,功能性 *nef* 克隆体(Nef-Mn)和减毒的 *nef* 克隆体(Nef-Hxb2)也能够对被 Nef 牛痘苗感染的目标诱导特异性细胞毒 T 细胞的溶崩。

我们还检测了由减毒的 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 克隆体诱导的 T 细胞增殖反应以及它们相应抗原的刺激作用。图 1B 显示了 T 细胞增殖试验中所得的数据,其中 T 细胞的增殖是通过表达 *vif*、*vpu*、*vpr* 和 *nef* 的质粒的免疫处理而诱导的:向小鼠肌肉内注射 100 μ g 相应的 cDNA 表达盒,并在 2 周后对小鼠加强一次。加强处理一周后,从两只小鼠中取出脾脏,合并,并将其用于 T 细胞增殖。对脾细胞用 5 和 1 μ g/ml 的重组蛋白质刺激 3 天。加入 1 μ Ci 的 ^{3} H 并计数掺入的 cpm。加入 PHA 作为阳性对照。计算对于 Vif、Vpu 和 Nef 呈现的抗原特异性刺激作用(SI)。至少在三组独立的实验中得到了类似的结果。结果证明, *vif*、*vpu* 和 *nef* 都能够诱导明显的淋巴增殖反应,而在这项测定中用 Vpr 抗原刺激则没有效果。基于这些结果以及早先研究所得的浆料,辅助基因 *vpr* 在本研究中未被作为多基因疫苗结构材料的一部分。

我们的结果证明,在确定功能域并不影响抗原表达的情况下对这一区域减毒

处理之后,就可将致病基因用作免疫原。为进一步构建多基因盒,我们采用了减毒的 *vif*、*vpu* 和 *nef* 克隆体。

***vif/vpu/nef*融合蛋白盒(pVVN)和含有蛋白酶剪切位点的 *vif/vpu/nef*融合蛋白(pVVN-P)的构建与表达:** 为构建含有各种辅助基因作为融合蛋白的多基因 DNA 表达盒,我们选择了减毒但保持免疫学活性的 *vif*(N17) *vpu*(M5256)和 *nef*(S313)克隆体作为研究基础。*vif*和 *vpu* 的终止密码子被除去并被融合在结构中,使该融合蛋白具有和单个基因一样的抗原决定簇。该 *vif/vpu/nef* 融合基因结构材料被称为 pVVN。我们还希望保留可表达带有蛋白酶裂解位点的 *vif/vpu/nef* 融合蛋白的天然氨基和羧基终端,被称为 PVVNP。图 2A 显示了 *vif*、*vpu* 和 *nef* 融合蛋白以及作为单一表达盒的含有蛋白酶剪切位点的融合蛋白的构建和设计图样。*vif*和 *vpu* 的终止密码子被除去并在结构中融合了以下各序列。pVVN 代表了表达 *vif*、*vpu* 和 *nef* 的单个基因;pVVN-P 代表了表达 *vif*、*vpu* 和 *nef*的和在 *vif*和 *vpu* 以及 *vpu*和 *nef* 之间含有蛋白酶剪切位点的单个基因。在 pVVN-P 融合蛋白中,*vif*和 *vpu* 的终止密码子被除去,并在结构中放进了一个有八个氨基酸的细胞蛋白酶剪切位点(REKRAVVG)以便从下一个蛋白质序列上裂解下来。

为测试新的融合结构部分是否具有能够制造融合基因蛋白质(类)的功能,在 pVVN 和 pVVN-P 上分别用对 Vif、Vpu 和 Nef 特异的抗体进行免疫次降反应以便进行体外翻译。其中,Vif、Vpu 和 Nef 分别表达为 24、10 和 27kDa 的蛋白质。pVVN 和 pVVN-P 载体的体外翻译导致了 61kDa 的融合蛋白的表达,预期,这种蛋白质可用对其它三种蛋白质的特异性抗原检测。图 2B 显示了用 T7 系统进行体外翻译后 VVN 和 VVN-P 表达的数据。在体外翻译系统中使用了 1 μg pVVN(14 号克隆体)和 pVVN-P(2 号克隆体)。用抗 Vif(aVif)、抗 Vpu(aVpu)和抗 Nef(aNef)的抗体对体外翻译产物进行免疫沉淀试验。

海拉细胞中 VVN 和 VVN-P 融合蛋白的表达和亚细胞定位: VVN 和 VVN-P 融合蛋白在哺乳动物细胞中的表达,分别是用表达 pVVN 和 pVVN-P 结构的 Hela-VVN 和 Hela-VVN-P 稳定细胞系进行评定的。用 DNA 载体转染后,让细胞在选择性培养基上生长两天,用 PBS 冲洗两次,然后进行溶解处理。将细胞溶解产物和抗 *vif*、抗 *vpu* 和抗 *nef* 的抗体一起培养,经免疫沉淀处理并在 SDS-PAGE 胶上分析,然后进行免疫印迹测定。pVVN 在海拉细胞上的转染导致了 61kDa 融合蛋白的表达,这可用所有三种抗体进行检测(数据未显示)。相反,pVVN-P 的转染可同时产生高分子量的种类以及可被抗 *vif*、抗 *vpu* 和抗 *nef* 的抗体分别识别的 24、10 和 27kDa 的蛋白质。图 3A 显示了与通过免疫沉淀处理,VVN 和 VVN-P 融合蛋白在海拉细胞中

表达以及加工相关的数据。海拉细胞被 pVVN-P 质粒转染过夜。将细胞在正常状态下保持 48 小时后再进行 G418 选择。G418 选择需进行两周，按材料和方法一节中所述使细胞溶解并用抗 vif、抗 vpu 和抗 nef 的抗体与细胞进行免疫沉淀处理。用 SDS-PAGE (12%) 分析免疫沉淀物。在顶部表明各抗血清的名称，并用箭头标出了剪切产物。这些结果证明，pVVN 的体内表达产生了一个融合蛋白，而正如预料，pVVN-P 的体内表达产生的融合蛋白至少被细胞蛋白酶部分剪切。

在被 HIV-1 感染的细胞中，Vif、Vpu 和 Nef 通常存在于细胞质膜上。为证实将这些蛋白质融合成单个蛋白质或是带有蛋白酶剪切位点的融合蛋白是否会改变它们的细胞定位，我们在体外和体内进行了免疫荧光和免疫组织化学研究。用 pVVN 和 pVVN-P 转染海拉细胞，并用抗 vif、抗 vpu 和抗 nef 的抗体通过间接免疫荧光法研究 *vif/vpu/nef* 融合蛋白和带有蛋白酶剪切位点的融合蛋白的定位。图 3B 显示了与 VVN 和 VVN-P 融合蛋白在体内亚细胞定位相关的数据。用重组的牛痘病毒 vTF7-3 感染海拉细胞并用 VVN 和 VVN-P 表达质粒转染海拉细胞。转染过夜后，将细胞用抗 vif、抗 vpu 和抗 nef，然后用经亲和纯化的与山羊抗兔免疫球蛋白 G 共轭的异硫氰酸盐荧光素进行固定和染色。由于所有的抗血清都是用家兔生产制成的，它们在单独的免疫荧光检测中不能结合。DAPI，核染色；FITC，代表了被特异性抗血清染色的细胞。图 3B 中的数据显示，Vif、Vpu 和 Nef 保持了它们野生型的像融合蛋白或是带有蛋白酶剪切位点的融合蛋白的细胞质定位模式。这些结果证明，这些基因的融合没有改变它们的亚细胞分布模式，同时提示这两种基因产物都可经过与野生型基因同样的加工途径，从而可以存在于与野生型类似的 MHC 分子中。此外，我们还用抗 Nef 的抗体在经 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠的肌肉切片上进行免疫组织化学测定分析了 VVN 和 VVN-P 的体内表达。对肌肉切片的免疫组织化学测定说明，VVN 和 VVN-P 融合蛋白都能够在体内通过基因输送以高水平表达。图 3C 显示了对 VVN 和 VVN-P 抗原表达进行免疫组织化学测定的结果。免疫处理 5 天后从天然、pVVN 和 pVVN-P 免疫的小鼠中制备冷冻的肌肉切片，并用抗 Nef 的抗体染色。实验组 (DAPI) 代表了核染色，实验组 (FITC) 代表了抗 Nef 抗体的特异性染色。阳性细胞着染。对各个实验的各个染色都检测了 5 组。

T 辅助细胞增殖测定：T 辅助淋巴细胞的活化和增殖，在体液免疫反应(发出信号使抗原活化的 B 细胞扩增)和细胞免疫反应(为 CD8⁺细胞毒 T 淋巴细胞的扩增产生细胞信号)的诱导中都扮演了关键性角色。几组小鼠(每组 4 只)被注射了两种结构材料中的一种或单独的载体。第一次 DNA 免疫处理两周后，用同样的剂量对小鼠加强一次。再两周后，从免疫的小鼠中收集脾脏并分离它们的淋巴细胞。然后按照

方法一节中的描述对 T 细胞的增殖进行检测。图 4 显示了由所描述的实验中所得的数据, 该实验涉及用重组的 Vif、Vpu 和 Nef 在体外刺激处理后经 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠脾细胞的 T 细胞增殖情况。对小鼠肌肉内注射 100 μ g 各自的 cDNA 表达盒, 并在 2 周后对小鼠加强一次。加强处理一周后, 从两只小鼠中分离出脾细胞, 合并并进行 T 细胞增殖处理。用 5 和 1 μ g/ml 的重组蛋白质刺激处理 3 天。加入 1 μ Ci 的 ^{3} H 并计数掺入的 cpm。加入 PHA 作为阳性对照。在底部标中出了所用的 DNA 结构材料的名称。计算 Vif、Vpu 和 Nef 呈现的抗原特异性刺激作用(SI)。在多项实验中都得到了类似的结果。图 4A、4B 和 4C 显示了对以 Vif、Vpu 和 Nef 蛋白质作为抗原, 经 DNA 疫苗盒 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠进行增殖测定的结果。在各个孔中加入重组的蛋白质(10 μ g/ml)以刺激 T 细胞的增殖。以 10 μ g/ml 植物凝集素(PHA)作为多克隆刺激物的阳性对照。如图所示, 在对照组的天然小鼠脾脏中观察到了低背景水平的增殖(刺激指数为 0.2-1)。在用 pVVN 和 pVVN-P 的免疫组的脾细胞中观察到了抗所有三种蛋白质的中等程度的增殖(图 4A、4B 和 4C)。为确定 VVN、VVN-P 诱导相对的 T 细胞增殖情况, 我们对经单基因结构材料免疫处理的小鼠平行进行了 T 细胞增殖测定。Vif 自身, 或在 VVN、VVN-P 融合蛋白中, 分别导致了 6、5 和 5.4 的 SI(图 4A)。以 Vpu 蛋白质(图 4B)和重组的 Nef 蛋白质(图 4C)作为抗原也都观察到了类似的结果。

使用 Nef 牛痘苗的细胞毒 T 淋巴细胞的活性: 为进一步研究这些结构材料对所得细胞免疫反应的诱导作用, 我们在经 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠的脾细胞上对 Nef 牛痘感染的或 Nef 肽刺激的 P815 目标进行了细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)测定。用免疫小鼠处理的脾脏细胞进行 CTL 测定, 先进行体外刺激, 然后再测定由特异性或非特异性牛痘感染的或肽处理的目标释放的铬。用 100 μ g 的 pVVN、pVVN-P 和对照载体免疫处理 Balb/C 小鼠。第一次和第二次加强两周后从小鼠中获得脾细胞, 并在 6 个小时的 ^{51} Cr 释放法中进行抗原特异性 CTL 测定。计算经 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠的脾细胞诱导的特异性溶胞作用, 结果显示在图 5 中。这些图代表了特异性溶胞(用被作为对照的重组牛痘苗感染的靶细胞减去通过分析测出的非特异性溶胞)的百分比。在如上所述的被免疫处理的小鼠收集的脾细胞上进行了 CTL 测定。在多项实验中都得到了类似的结果。在一个效应器: 目标的比例为 50:1 的 Nef 牛痘苗感染的目标中, pVVN-P 和 pVVN 免疫处理小鼠的脾细胞中, 特异性溶胞的比例分别为 38%和 31%。特异性溶胞的比例是可滴定的。用表达 Vif 的 P815 目标也得到了类似的结果。在一些重复测定中, 在用 pVVN-P 免疫处理的小鼠中观察到的特异性溶胞的重现性, 高于用 pVVN 免疫处理的小鼠。

采用 HIV-1 感染的目标的细胞毒 T 细胞的溶胞作用：通常，由于 HIV-1 不会自然感染鼠类细胞，在小鼠系统中进行抗 HIV-1 病毒的 CTL 测定是困难的。为评价 VVN 和 VVN-P 溶解被 HIV-1 感染的目标的能力，我们构建了表达 hCD4 与 CCR5 或 Fusin 共受体的 NIH3T3 细胞系。由于 MHC 与在我们的研究中使用的 Balb/C 小鼠兼容，我们选择了 NIH3T3 细胞系。尽管鼠类细胞不支持 HIV-1 感染，但这些稳定的细胞系能够被不同品系的 HIV-1 细胞感染经单轮的复制。我们假设这样一轮的感染可被用来进行 CTL 测定。NIH3T3/hCD4/Fusin 和 NIH3T3/hCD4/CCR5 稳定的细胞系可被初级且已充分鉴定的实验室病毒感染，并通过释放到培养基中的 p24 抗原可测定其感染性(表 2)。HIV-1 分离物的初级克隆体和分子克隆体能够以可检测并可重现的方式感染这些细胞系。有些初级分离物(92RW009&BJ)不会感染这些游离细胞形式的细胞。为进行分析 pVVN 和 pVVN-P 结构材料的免疫处理是否能够杀死被 HIV-1 感染的靶细胞，我们分别用分化阶段 B 的 T-向亲和(HIV-1 NL43)和双向亲和(HIV-1 89.6)病毒分别感染 NIH3T3/CD4/CXCR4 和 NIH3T3/CD4/CCR5 细胞。这些被感染的细胞被用作 CTL 测定的靶子。被 pVVN 和 pVVN-P 免疫处理的小鼠的脾细胞都可诱导被天然病原体感染的细胞的溶胞作用。图 6A 显示了关于由抗 HIV-1(T-向亲和和双向亲和)感染的靶子的 pVVN 和 pVVN-P 免疫法诱导的细胞毒 T 淋巴细胞的反应实验的数据。表达 CD4/CCR5 或 CD4/CXCR4 的 NIH3T3 细胞被双向亲和(89.6)和 T-向亲和(pNL43)病毒感染并被用作 CTL 测定的靶细胞。用 100 μ g pVVN、pVVN-P 或对照载体免疫处理 Balb/C 小鼠。第一次和第二次加强两周后从小鼠中获得脾细胞，并在 6 个小时的 ^{51}Cr 释放法中进行抗原特异性 CTL 测定。计算了被 HIV-1 感染的靶细胞的自然(非特异性)溶胞作用，并从实验样品中减去自然溶胞作用以计算出在这一测定中由免疫处理小鼠的脾细胞诱导的特异性溶胞作用。在多项独立的实验中都观察到了类似的结果。数据显示了采用被 HIV-1 感染的 NIH3T3/CD4/CCR5 细胞时，pVVN 和 pVVN-P 导致的特异性溶胞作用的百分比。以 50:1 的效应器：目标的比例，在被双向亲和的病毒感染的目标中，VVN 和 VVN-P 导致的溶胞作用的百分比分别是 29 和 42%，而在被 T-向亲和病毒感染的目标中，特异性溶胞作用是 16 和 21%。值得注意的是，由 pVVN-P 结构材料诱导的特异性 CTL 的百分比总是高于用 pVVN 结构材料免疫处理的结果。

pVVN 和 pVVN-P 结构材料诱导的交叉分化阶段 CTL 分析：为估算被这些结构材料(b 分化阶段病毒的基因)识别的交叉分化阶段 CTL，我们用分离自分化阶段 D、E、C 和 A 的 HIV-1 分离物感染 NIH3T3/hCD4/Fusin 或 NIH3T3/hCD4/CCR5 细胞系(表 2)。一旦细胞到达了中等感染水平，就用 ^{51}Cr 标记这些细胞并将其作为 CTL 测定中的

目标。图 6B 显示了关于由分离自用 VVN 和 VVN-P 表达结构材料免疫处理的小鼠的脾细胞诱导的交叉分化阶段的 CTL 反应的数据。由分离自用 VVN 和 VVN-P 表达结构材料免疫处理的小鼠的脾细胞诱导的交叉分化阶段的 CTL 反应的过程是：用分离自分化阶段 B、C/A 和 E 的 HIV-1 病毒感染表达 CD4/CCR5 或 CD4/CXCR4 的 NIH3T3 细胞，并将其用作 CTL 测定的靶细胞。用 100 μ g pVVN、pVVN-P 或对照载体免疫处理 Balb/C 小鼠。第一次和第二次加强两周后从小鼠中获得脾细胞，并在 6 个小时的 ^{51}Cr 释放法中进行抗原特异性 CTL 测定。计算了被 HIV-1 感染的靶细胞的自然（非特异性）溶胞，并从实验样品中减去自然溶胞以计算出这一测定中，由免疫小鼠的脾细胞诱导的特异性溶胞作用。在多项独立的实验中都观察到了类似的结果。图 6B 中显示的结果说明，pVVN 和 pVVN-P 都可诱导对分化阶段 B（临床分离物）、D（HIV-1_{Zr6}）和 E（92THA022）感染的目标的 CTL 活性。其活性滴度随效应物：目标的比例而衰减。此外，我们还注意到，来自 pVVN-P 免疫处理小鼠的脾细胞对分化阶段 E 和 D 感染的目标物诱导的 CTL 反应要高于 pVVN 免疫处理小鼠的脾细胞。然而，通过 pVVN 或 pVVN-P 的免疫处理，我们都没有观察到任何对分化阶段 C/A（92RW009）感染的目标物的 CTL 活性。这一结果很可能反映了这种分离物在这些小鼠细胞系中的感染率较低（表 2）

讨论

最近有关 UNAIDS 的报道显示，全球有超过 3600 万的人已经被 HIV-1 感染，且这一数目还在迅速增长，尤其是在发展中国家。尽管在体内控制 HIV-1 复制的一些抗病毒疗法已经出现，但它们昂贵的花费和庞大的用药计划，使得它们无法理想地解决全球性的 HIV 问题。疫苗显然是一种最为经济的在全世界范围内控制 HIV-1 感染的有效方法。DNA 疫苗技术代表了抗病毒疫苗发展的重要工具。注射含有部分 HIV-1 基因组的 DNA 结构材料以抵抗完整的基因组可以产生免疫力从而不用担心被感染。不同的实验室都已报道了用 DNA 接种在体内产生的免疫反应，包括我们所采用的不同的治疗目标和输送技术。以前，我们和其它的实验室已经指出，输送核酸的方法可以在小鼠以及非人的灵长类中产生抗 HIV-1 的细胞免疫反应和体液免疫反应，如今在人类中也已实现。

已经不断有数据证实，细胞介导的免疫力的诱导是任何 HIV-1 候选疫苗的一个重要特征。在自然感染中，抗 HIV-1 的 CTL 反应出现的非常早并且是暂时的，这显然与病毒定点的建立有关。CTL 以病毒感染的细胞为目标并将其破坏，它在清除病毒中起着关键性角色。通过形成特异性 CTL 反应来指导抗病毒蛋白质的免疫反应，

可以诱导对病毒内部的多种抗原性目标广泛的免疫反应。抗病毒的 CTL 活性通常都是在外观健康的感染人群中被测出的, (与已经发展为艾滋病的患者对比)。据报道特异性 CTL 能够减少疾病的发生而增加在 CTL 反应和优选的临床状况之间建立联系。特异性 CTL 反应显然能够保持 HIV-1 感染的无症状的状态。可见, 在体内诱导强大的 HIV-1 特异性 CTL 就可在使宿主最终受到防护免于形成感染, 并发展成 HIV 感染中扮演关键性角色。

在这一报道中, 我们评价了 HIV-1 辅助基因 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 作为免疫原的作用。曾经认为, 它们是消耗性的, 但最近的研究却证实, HIV-1 的各种辅助基因在 AIDS 的发病机理中通过调节正常细胞的活动而起到了重要的作用。例如, 通过与功能性 *vif* 基因反式互补可以增强初级细胞中的细胞自由感染, 这说明 Vif 参与了某些细胞类型(47)中的病毒复制。当 Vpu 和 Nef 在内部表达时, 都显示出与 CD4 和 MHC I 类分子的负调节有关。Nef 可阻止 MHC I 类在被感染细胞表面的表达, 由此可庇护被病毒感染的细胞免遭 CTL 介导的破坏作用。这些基因的生物学功能的适当减弱就能够消除任何可想象的不利的宿主细胞效应, 从而维持它们重要的免疫学决定簇。

在我们的研究中, 从不同临床状态的患者分离的病毒中克隆出了 *vif*、*vpr* 和 *nef* 基因。对表达这些基因功能性形式和减毒形式的 DNA 结构材料在免疫耐受性小鼠中诱导细胞反应和体液反应的能力进行了分析。使用功能性基因和减毒基因作为免疫原的免疫学数据很有可比性。减毒的以及功能性克隆体都能够在小鼠中诱导强力的但是可变的 CTL 反应以及 T 细胞增殖反应。通常, 这些基因诱导的体液反应的水平较低, 这很可能是由于这些辅助基因是在细胞内表达的, 故而不容易被 B 细胞免疫球蛋白辨认。一个重要的观察是, *vpu* 可以被用作在这些模型中导致特异性免疫反应的免疫原。

HIV-1 的各种辅助基因是可用于抗 HIV 的 DNA 疫苗中重要的免疫原, 因为它们全面扩大了免疫攻击下被感染目标的数目, 因此有助于限制病毒逃脱。此外, 它们比 HIV-1 表面和核心的蛋白质经受了更大的选择压力。为证实这一点, 我们采用了一个新的系统以在小鼠模型中测试抗 HIV-1 临床和实验室分离物的细胞免疫反应。这种单轮感染系统不需要产生各个病毒抗原的重组载体, 从而可强化受测试抗原产生对 HIV-1 完整病毒靶标的效应物反应的能力。这里显示的证据支持了这一点, 即用 pVVN 和 pVVN-P 结构材料免疫处理的小鼠能够溶解分离自 HIV-1 的 B、E 和 d 分化阶段的目标物。这提示, 由于这些辅助基因保留这一点性质, 它们能够诱导交叉分化阶段的 CTL 反应, 这也许是疫苗发展中一个有效的辅助工具。此外, 在本研究

中，我们还查明了使用减毒形式的致病性基因的可行性。我们以辅助基因作为疫苗靶标的初先，分析显示，这些结构材料在小鼠中都完全可被耐受，没有显示什么不利的作用在此。证实明显的好处是一个，辅助基因能够参与交叉分化阶段的识别和 CTL 反应。很显然，蛋白酶剪切位点的插入可以产生此类融合的疫苗抗原更加自然的加工过程，并且这为这些方法增添额外的价值，这可由这里所观察到的由这些小盒诱导的高度细胞免疫反应的趋势所证实。此类反应对于疫苗研究可能是重要的。

将各辅助基因结合可作为多功能疫苗混合物的一部分，这包括结构基因和酶基因，这种结合可能作为一种治疗疫苗而在被感染的个体中诱导更强力的免疫反应。此类方法可能是新的标准抗逆转录病毒治疗法一个有价值的补充，从而在治疗措施作用下增加基因靶标的数量。对活的减毒的 SIV 疫苗的发展进行的基础研究证实，HIV-1 的各种辅助基因在体内作为病毒发病的作用物的重要性。理论上，原来预期可对缺少辅助基因功能的病毒逃脱突变体作出选择的 CTL 反应会在体内形成各种病毒表型，现在已被减毒。因此，即使是未灭活的预防性疫苗或在作为免疫疗法的治疗方案中，仍可预期其结果会有两个特殊的好处。一方面的好处是，所得病毒可能会失去了发病作用的方面；第二方面的好处是，余下的病毒可能实际上已成为具有类似活的减毒疫苗的保护作用。如我们所制造的能够诱导对一批基因产生免疫力的单一的 DNA 疫苗结构材料可很容易的进行用药，并且比研究和使用的单一基因的 DNA 疫苗盒更加经济有效。

表 1:在鉴定减毒的 HIV-1 辅助基因 *vif*、*vpu*、*vpr* 和 *nef* 的研究中使用的生物学测定法

所用基因	生物学	突变作用
Nif (N17)	在无细胞感染中缺少 <i>vif</i> HIV-1 前病毒的反式互补作用	在 26、31、36、45、60、127、136、140 和 150 个氨基酸处突变
Vpr (NA)	抑制 T 细胞增殖和细胞因子合成	ND
Vpu (5256)	CD4 缺失和 MHC-I 降解	在 52 和 56 个氨基酸处突变
Nef (S313)	CD4 和 MHC-I 表达的负调节缺失	在 2、10、11、14、15、19、21-26、55、106、113、131、164、174、185、191、199、201 和 213 个氨基酸处突变

HIV-1 辅助基因 *vif* 和 *Nef* 克隆自临床分离物并以对它们的功能测定为基础进行定性。基于早先的研究在 *Vpr* 和 *Vpu* 中引起突变(41、48)。NA 代表未采用。

表 2:通过各种有着不同细胞向性的分化阶段的 HIV-1 病毒分离物表达人类 CD4 和 CCR5 或 CD4 和 CXCR4 的 NIH3T3 细胞的感染性

所用细胞系	用于感染的病毒	分化阶段	细胞向性	p24 抗原产物 (ng/ml)
NIH3T3/CD4/CXCR4	pNL43	B	T 向亲和	110899.0
NIH3T3/CD4/CXCR4	Z6	D	T 向亲和	22815.46
NIH3T3/CD4/CXCR4	KS(临床)	B	T 向亲和	22311.9
NIH3T3/CD4/CCR5	89.6	B	双向亲和	89254.7
NIH3T3/CD4/CXCR4	92THA022	E	ND	32417.6
NIH3T3/CD4/CXCR4	92RW009	C/A	T 向亲和	256.06

HIV-1 的各种初级分离物是通过 NIH AIDS RRRP 从 UNAIDS 获得的,并在正常 PBMCs 中繁殖。用 10-50ng p24 抗原当量的病毒对表达 hCD4/CCR5 和 hCD4/CXCR4 的 NIH 3T3 细胞感染 12 小时。用 PBS 将细胞冲洗两次并将细胞保持在正常的培养介质中。监测细胞的感染,收集细胞和培养基并对 p24 产物进行测定。ND 表示未确定。

 序列表

<110> 宾西法尼亚州立大学托管会(The Trustees Of The University Of Pennsylvania)
 D.B. 韦纳(Weiner, David B.)
 V. 阿亚沃(Velpandi, Ayyavoo)

<120> 可编码 HIV 辅助蛋白的 DNA 疫苗

<130> UPAP0444

<150> 60/218, 192

<151> 2000-07-14

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 579

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca	60
tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat	120
agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag agtacacat cccactaggg	180
gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat	240
ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct	300
gacctagcag accaactaat tcattctgcac ttttttgatt gtttttcaga atctgctata	360
agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac	420
aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaacaaa acagataaag	480
ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc	540
aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactac	579

<210> 2

<211> 246

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt	60
gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	120
ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	180
tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat	240
ctgtac	246

<210> 3

<211> 621

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

atgggtggca agtgggtcaaa aagtagtgtg attggatggc ctgctgtaag ggaaagaatg	60
agacgagctg agccagcagc agatggggtg ggagcagtat ctcgagacct agaaaaacat	120
ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct aacaatgctg cttgtgcctg gctagaagca	180
caagaggagg aagaggtggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact	240
tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta	300
attcactccc aaagaagaca agatatcctt gatcigtgga tctaccacac acaaggctac	360
ttccctgatt ggcagaacta cacaccaggg ccaggggtca gatatccact gacctttgga	420
tggtgctaca agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa taaaggagag	480
aacaccagct tgitacaccc tgtgagcctg catggaatgg atgacctga gagagaagtg	540
ttagagtgga ggittgacag ccgcctagca ttcatcacg tggcccgaga gctgcatccg	600
gagtacttca agaactgctg a	621

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 4

Arg Glu Lys Arg Ala Val Val Gly

1 5

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 5

attgaaagct tatggaaaac agatggcagg

30

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 6

tactattata gggtgcatct cgtgtccatt cattgt

36

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 7

ggacacgaga tgcaacctat aatagtagca

30

<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 8
tgaccacttg ccacccatct cgagatcatc aatatcccaa gg 42

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物

<400> 9
ggagatgggt ggcaagtgggt caaaaagt 28

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 10
cgcaagcttc gatgtcagca gtctttgtag 30

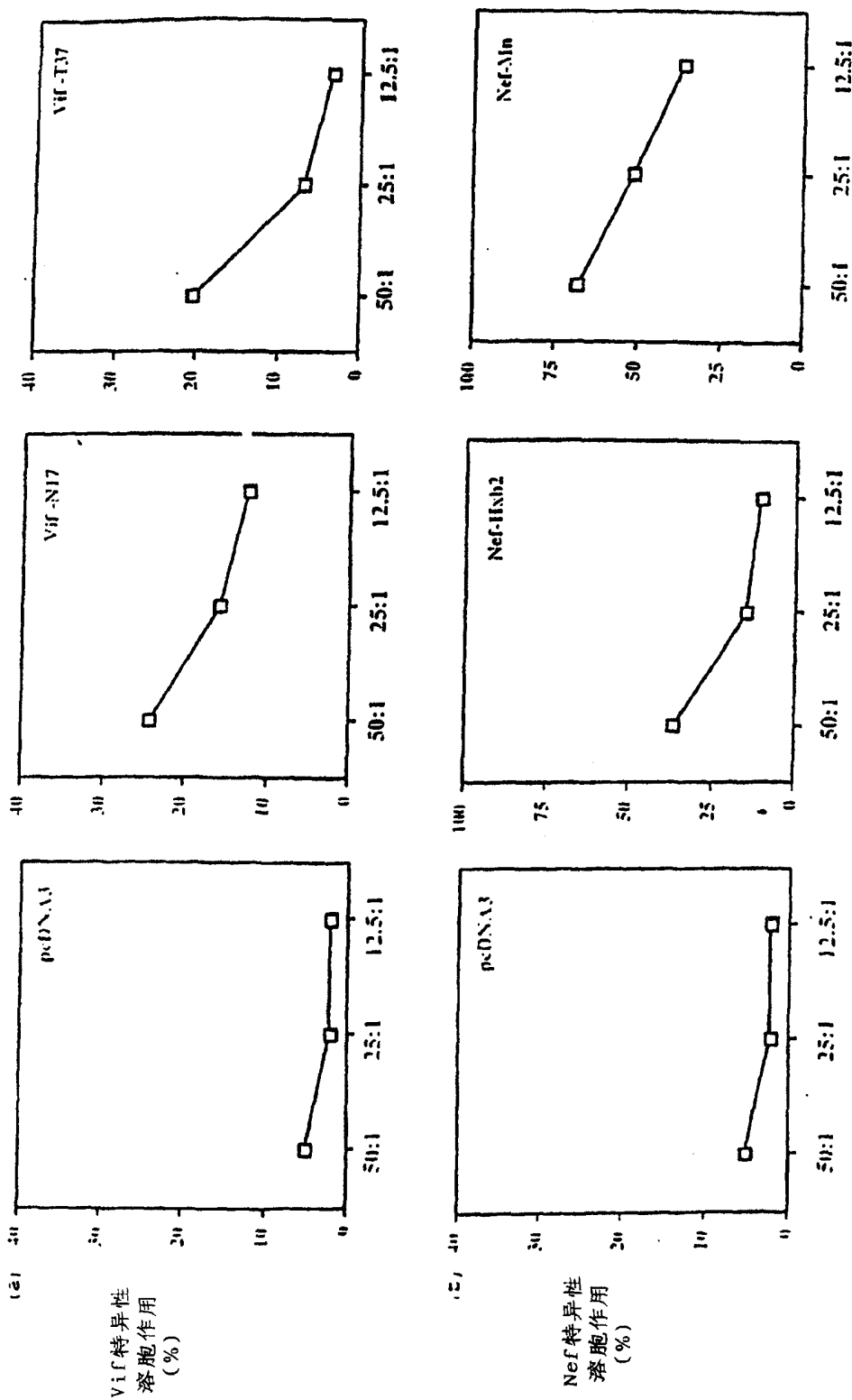


图 1A

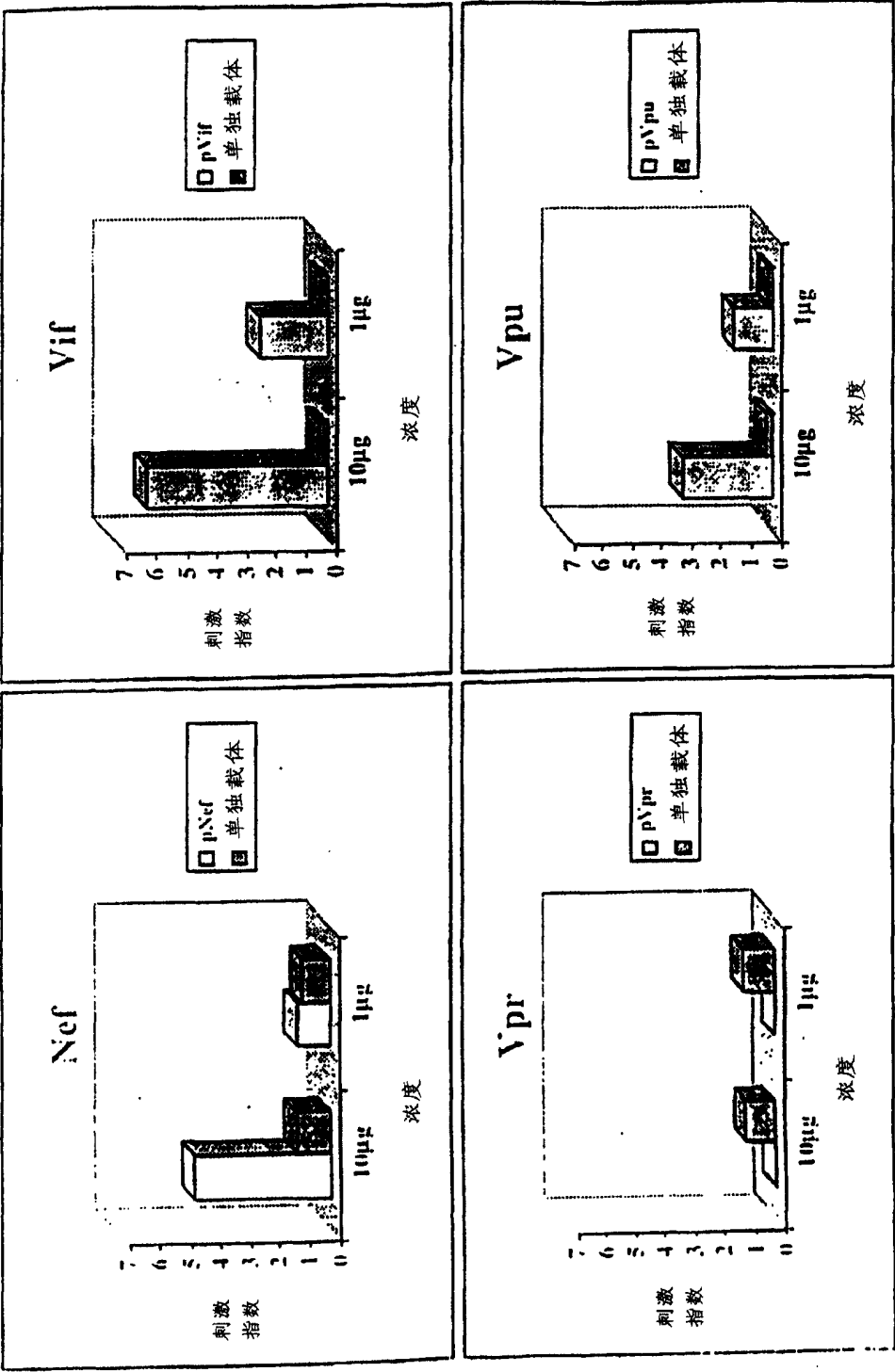


图 1B

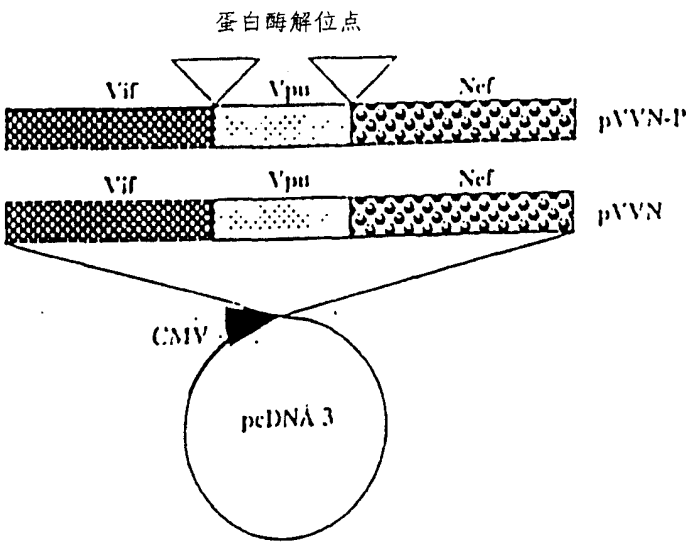


图 2A

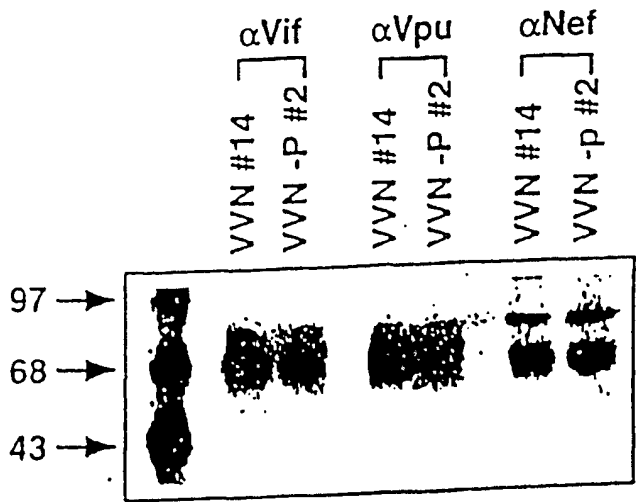


图 2B

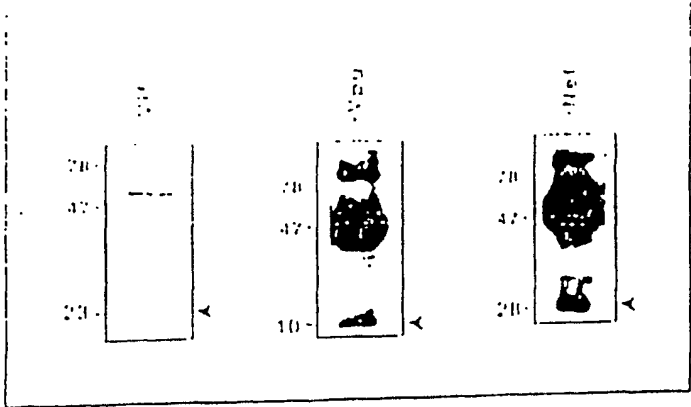


图 3A

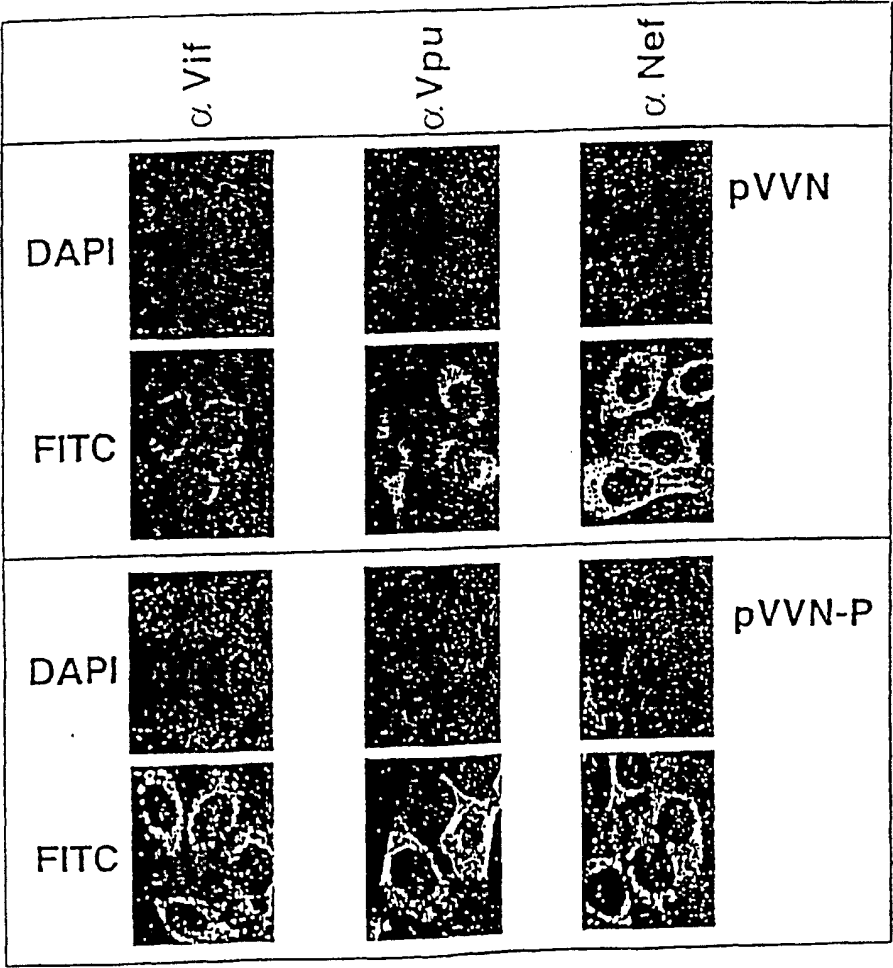


图 3B

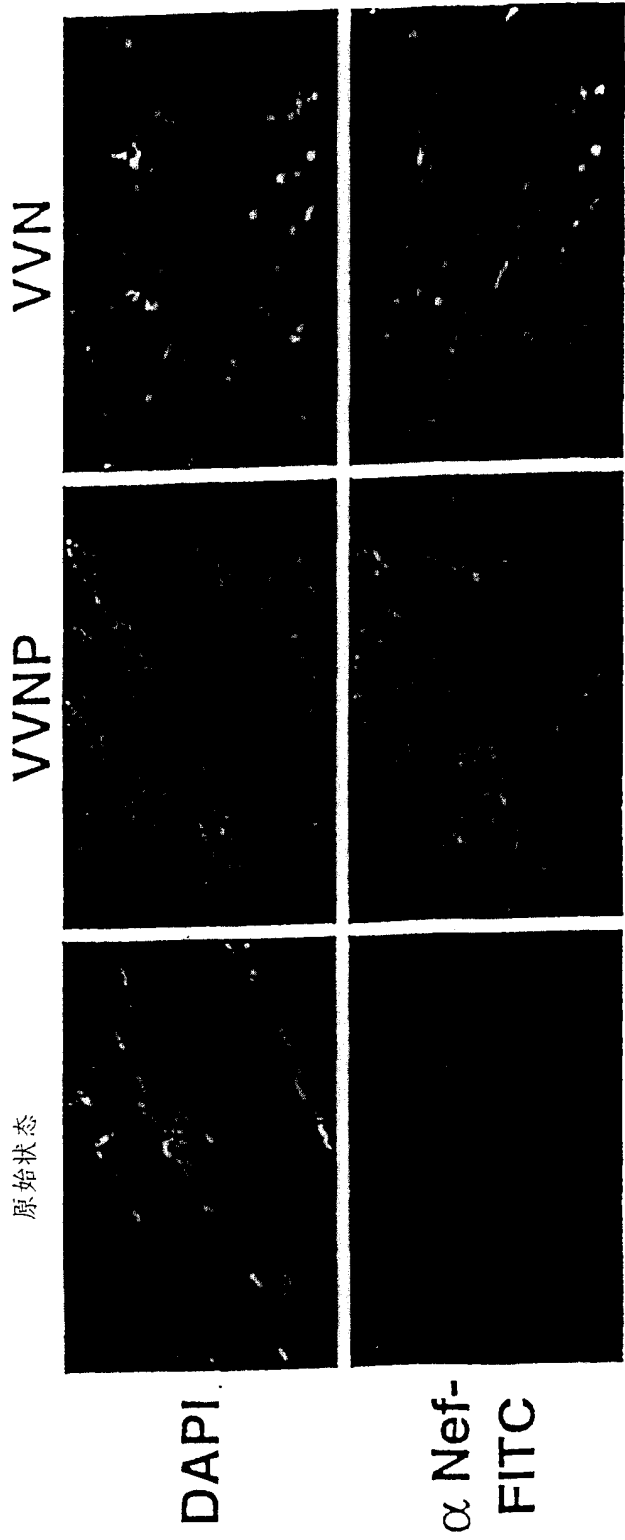
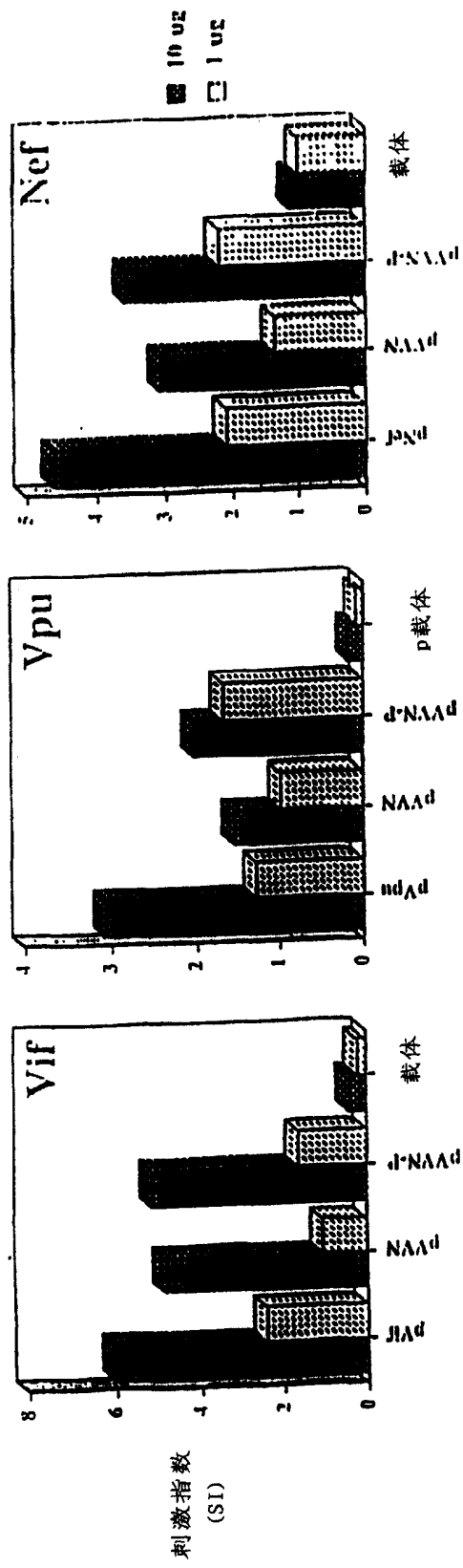
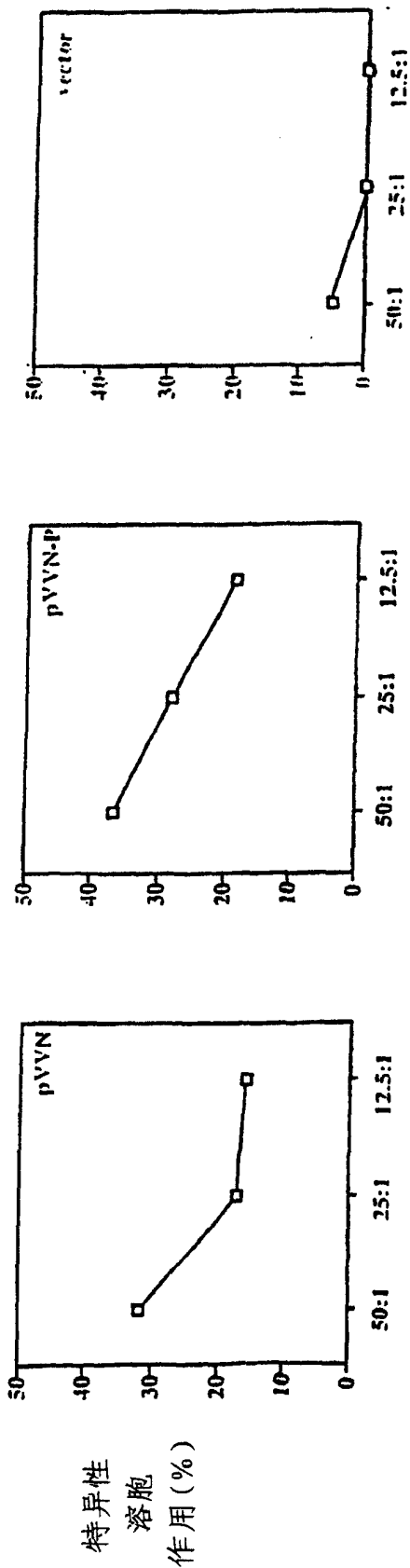


图 3C



所用DNA结构材料

图 4A 图 4B 图 4C



效应物: 目标比例

图 5

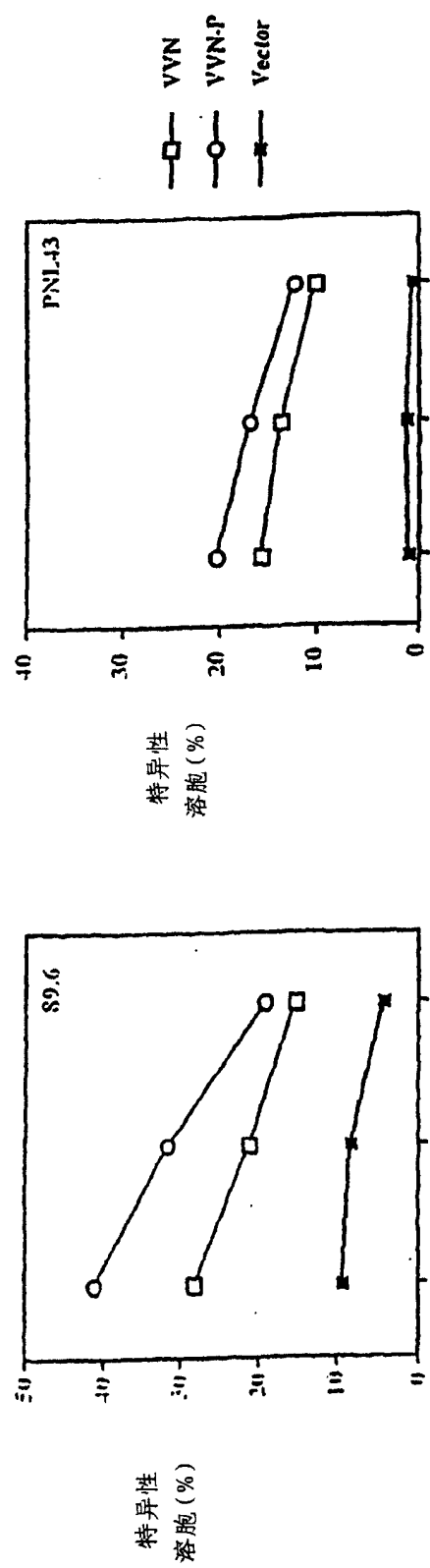


图 6A

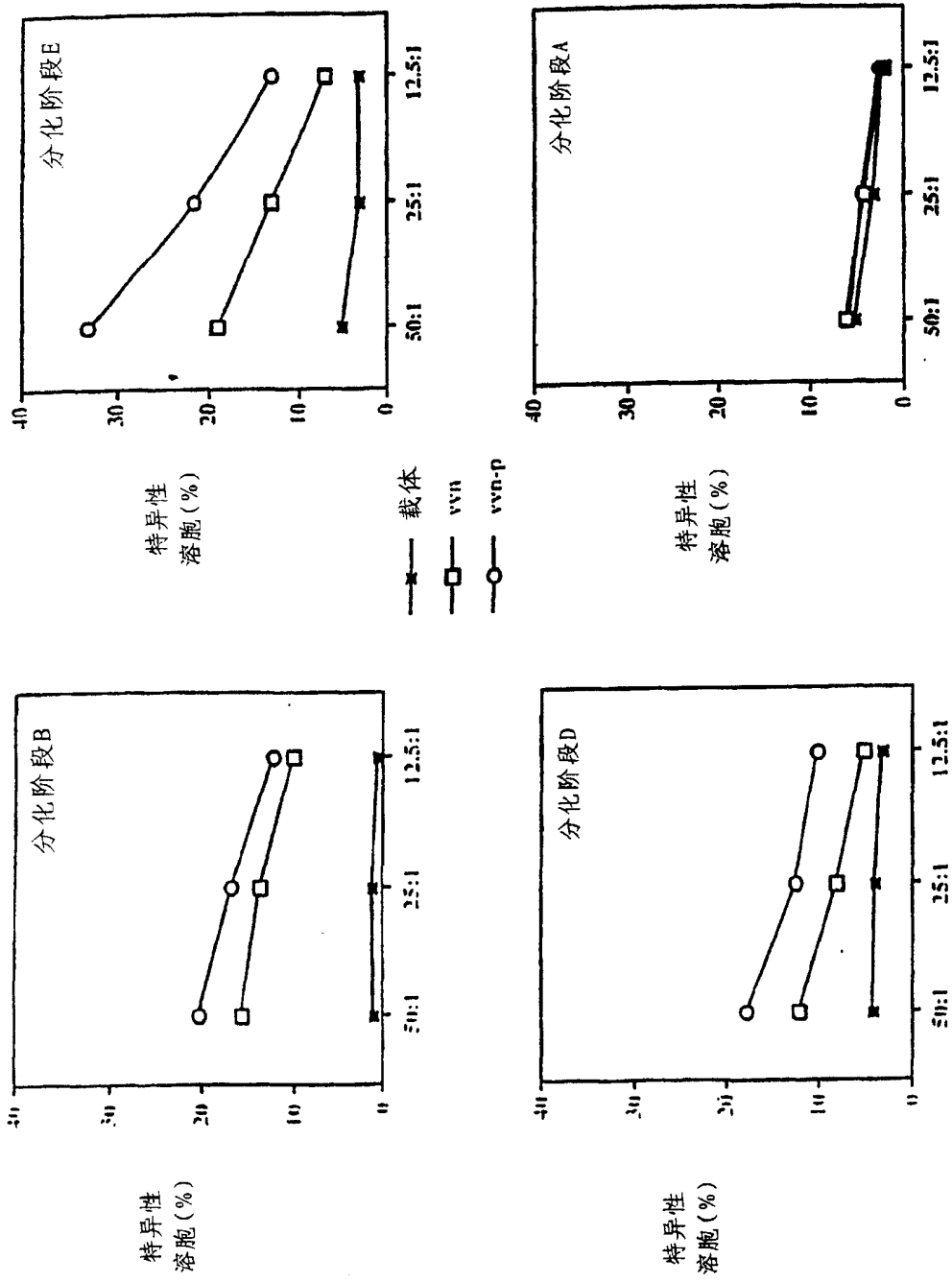


图 6B