

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01818162.7

A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1311871C

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/87 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

[22] 申请日 2001.3.2 [21] 申请号 01818162.7

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 2 [33] US [31] 60/186,364

[32] 2000.12. 1 [33] US [31] 60/251,083

[86] 国际申请 PCT/US2001/006795 2001.3.2

[87] 国际公布 WO2001/092470 英 2001.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.18

[73] 专利权人 爱莫里大学

地址 美国佐治亚州

[72] 发明人 哈丽雅特·L·鲁宾逊

詹姆斯·M·史密斯

泰德·M·罗斯

里克·阿瑟·布赖特 华 建

丹尼斯·埃伦伯格

[56] 参考文献

CN1185811A 1998.6.24

CN1147834A 1997.4.16

CN1285409A 2001.2.28

Enhanced T - cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant Fowlpox virus KENT ET AL, JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 72 No. 12 1998

权利要求书 3 页 说明书 77 页 附图 55 页

Neutralizing antibody independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA ROBINSO ET AL. :, NATURE MEDICINE, Vol. 5 No. 5 1999

Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses - BOHM ET AL, VACCINE, Vol. 16 No. 9. 10 1998

细胞与分子生物学新技术在我国毒理学研究的应用 庄志雄, 卫生毒理学杂志, 第 13 卷第 4 期 1999

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

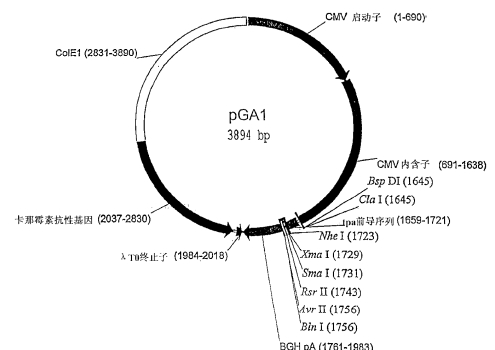
代理人 杨 青 樊卫民

[54] 发明名称

DNA 表达载体及其应用方法

[57] 摘要

本发明提供了新的 pGA 构建体, 它用于作为传递 DNA 疫苗插入片段的载体。此疫苗插入片段可包含各种病毒、细菌、寄生虫和 (或) 真菌的 DNA 转录本。本发明也描述了这样的方法, 它是通过给予治疗有效剂量的包含病原体疫苗插入片段的新的 pGA 构建体, 随后通过提高与活的包含同样疫苗插入片段的载体疫苗的免疫作用来提高多抗原决定簇 CD8 T - 细胞应答的方法。



1. 一种载体，其包含：

用于 λ T0 终止子的编码终止序列；

原核生物复制起点；

可选择的标记基因，其中 λ T0 终止子跟随可选择的标记基因之后，与该可选择的标记基因转录方向相同，并阻止从可选择的标记基因到疫苗插入片段的转录通读；和

真核生物转录盒，包含 CMV 立即早期启动子，tPA 引导序列，牛生长激素聚腺苷酸化序列，和编码一个或多个从病原体衍生的免疫原的疫苗插入片段。

2. 权利要求 1 的载体，其中所述病原体是病毒病原体。

3. 权利要求 1 的载体，其中所述病毒病原体是从由 HIV、麻疹、流感、脊髓灰质炎和风疹组成的组群中挑选的。

4. 权利要求 1 的载体，其中所述一个或多个免疫原是从由 HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、HIV Tat、HIV Rev、HIV Vpu、麻疹融合蛋白、麻疹血凝素、麻疹核蛋白、流感血凝素、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的。

5. 权利要求 1 的载体，其中所述一个或多个免疫原是进一步从由 HIV Gag、HIVgp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、HIV Tat、HIV Rev、HIV Vpu、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的。

6. 权利要求 1 的载体，其中所述编码一个或多个免疫原的疫苗插入片段进一步包含至少一个 C3d 基因。

7. 权利要求 1 的载体，其包含 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列。

8. 权利要求 7 的载体，其中该载体进一步包含编码一个或多个免疫原的疫苗插入片段，所述免疫原是从由 HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合蛋白、麻疹血凝素、麻疹核蛋白、流感选择血凝素、流感跨膜血凝素、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的；并且该载体可任选地包括至少一个 C3d 基因。

9. 权利要求 7 的载体，其中所述一个或多个免疫原是从由 HIV Gag、HIVgp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的。

10. 权利要求 1 的载体，其包含 SEQ ID NO: 2 的 DNA 序列。

11. 权利要求 10 的载体，其中该载体进一步包含编码一个或多个免疫原的疫苗插入片段，所述免疫原是从由 HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合蛋白、麻疹血凝素、麻疹核蛋白、流感选择血凝素、流感跨膜血凝素、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的；并且该载体可任选地包括至少一个 C3d 基因。

12. 权利要求 10 的载体，其中所述一个或多个免疫原是从由 HIV Gag、HIVgp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的。

13. 权利要求 1 的载体，其包含 SEQ ID NO: 3 的 DNA 序列。

14. 权利要求 13 的载体，其中该载体进一步包含编码一个或多个免疫原的疫苗插入片段，所述免疫原是从由 HIV Gag、HIV gp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、麻疹融合蛋白、麻疹血凝素、麻疹核蛋白、流感选择血凝素、流感跨膜血凝素、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的；并且该载体可任选地包括至少一个 C3d 基因。

15. 权利要求 13 的载体, 其中所述一个或多个免疫原是从由 HIV Gag、HIVgp120、HIV Pol、HIV Env、HIV VLP、它们的突变体及其子序列组成的组群中挑选的。

16. 权利要求 1 的载体, 其中真核表达盒还包括内含子 A 序列。

17. 药物组合物, 包含权利要求 1-16 任一项的载体。

18. 权利要求 1-16 任一项的载体在制备疫苗或药物中的应用。

DNA 表达载体及其应用方法

本专利申请要求享有于 2000 年 3 月 2 日提出申请的序列号为 60/186364 和于 2000 年 12 月 1 日提出申请的序列号为 60/251083 的美国临时申请的优先权。

政府支持

本说明书描述的工作有部分得到了国立卫生研究院（授权号 5 P01 AI43045）和国立卫生研究院/国家变态反应和传染病研究院（授权号 R21 AI4432501）的支持。美国政府在此发明中可有一定的权利。

本发明的领域

总的来说，本发明涉及分子遗传学和免疫学领域。更加具体地说，本发明描述了新的 DNA 表达载体，它是包含有编码一种免疫蛋白质的 DNA 的新载体；也描述了通过给予服用包含编码一种免疫蛋白质的 DNA 的新载体使动物（包括人类）获得免疫的新方法。

本发明的技术背景

疫苗在全世界保健方面一直具有深刻的和持久的影响。天花已经根除，脊髓灰质炎也已接近消灭，白喉、麻疹、流行性腮腺炎、百日咳和破伤风等一些疾病也已得到控制。然而，仅仅使用当前针对一小部分人类及其家养动物传染病的疫苗，微生物仍然是主要的杀手。没有疫苗的普通传染病每年就花费美国国家 1200 亿美圆（Robinson 等人，1997）。在第一世界国家出现了免疫缺陷病毒，象抗药类型的结核病又重新出现，这对疫苗的发展构成了新的威胁和挑战。在第三世界国家，更加明显需要新的和改善了疫苗，在那里常常无法得到有效的疫苗或者花费是无法承受的。最近，抗原表达 DNA 的直接注射显示出启动了保护性免疫应答。

以 DNA 为基础的疫苗利用细菌质粒在被接种宿主中表达蛋白质免疫原。重组 DNA 技术被用于将编码目的免疫原的 cDNA 克隆到真核生物的表达质粒中。然后将疫苗质粒在细菌中扩增、提纯，再将其直接接种进被接种的宿主体内。典型的方法是用针注射盐水中的 DNA 来接种，或者用基因枪将以金包被的 DNA 弹丸（或称为“珠”）传送进入皮肤。DNA 质粒被宿主细胞吸收，疫苗蛋白质被表达、加工以及被自身主要组织相容性复合体（MHC）类型 I 分子和类型 II 分子提呈，产生了对编码免疫原 DNA 的免疫应答。

历史上 DNA 疫苗（又称为“基因免疫接种”）是伴随基因治疗的研究和应用逆转录病毒载体的研究而出现的。将 DNA 传送入肌肉的基因疗法的研究揭示出，在转染骨骼肌肉细胞方面纯净的 DNA 同用脂质体胶囊包被的 DNA 一样有效（Wolff 等人）。此没有胶囊包被的 DNA 被命名为“裸露 DNA”，这是一个有想象力的术语，它在描述用于核酸疫苗的纯净 DNA 时已众所周知。基因枪一直被发展用于往植物细胞内传送 DNA，在基因治疗研究中它也被用于往皮肤中传送 DNA。在一系列测试表达人类生长激素质粒改变小鼠生长的能力的实验中，认识到没能改变小鼠生长的质粒接种激发了抗体的产生（Tang, De Vit 和 Johnston, 1992）。这是第一次揭示出通过接种质粒 DNA 可以产生免疫应答。同时，应用逆转录病毒载体的实验显示，可以用很少的感染细胞（ 10^4 — 10^5 ）提高保护性免疫应答。对用于产生疫苗接种的逆转录病毒载体的感染类型的质粒 DNA 的直接测试在小鸡流行性感冒模型中进行，其结果是导致了保护性免疫作用（Robinson、Hunt 和 Webster, 1993）。

至 2000 年底，明确显示 HIV-1（人免疫缺陷病毒-1）感染了世界 1% 的人口，由于这个最近的急迫原因，使得发展疫苗成为世界卫生优先考虑的事情。DNA 疫苗的临床前实验表明，在黑猩猩体内单独的 DNA 可对抗大大减毒的 HIV-1 的攻击（Boyer 等人，1997），但是在

恒河猴体内不能对抗致病力更强的 SIV 的攻击 (Lu 等人, 1997)。用 DNA 进行初始免疫再用衣壳糖蛋白进行加强免疫可提高与中和抗体有关的保护作用, 以对抗非致病的 SIV 和 HIV 之间的嵌合体 (SHIV-IIIb) 的类似的攻击 (homologous challenge) (Letvin 等人, 1997)。更为最近, 有人进行了一组对比性实验测试了八个不同的方案对抗 SHIV-s (猿和人免疫缺陷病毒嵌合体) 一系列攻击的能力, 这些实验揭示出对感染攻击有最大遏制能力的是包括以皮内接种 DNA 引发和用重组家禽天花病毒载体加强的免疫接种方案 (Robinson 等人, 1999)。这个对感染攻击的遏制与对攻击的病毒的中和抗体的存在无关。证明对遏制感染攻击有较小效用的方案包括均通过皮内或基因枪 DNA 接种进行起始免疫和加强免疫的免疫接种、皮内或基因枪 DNA 接种进行起始免疫然后用蛋白质亚单位加强免疫的免疫接种、通过基因枪 DNA 接种进行起始免疫和用重组家禽天花病毒加强免疫的免疫接种、仅仅用蛋白质的免疫接种和仅仅用重组家禽天花病毒的免疫接种 (Robinson 等人, 1999)。早期的在人体的 DNA 疫苗的临床实验证明没有不利的影响 (MacGregor 等人, 1996), 也证明了溶解细胞的 T-细胞的增加 (Calarota 等人, 1998)。一些研究对增加免疫接种效率的共转染淋巴因子和共刺激分子的能力进行了筛选 (Robinson 和 Pertmer)。

DNA 疫苗不利的方面包括 DNA 编码的产物 (例如, 蛋白质) 的免疫局限性和真核细胞对细菌和寄生物蛋白质非典型加工的可能性。DNA 疫苗存在的另一个重要问题是在细菌中 DNA 疫苗质粒生长和扩增期间一些疫苗插入片段序列的不稳定性。不稳定性的一个可能的原因是在质粒生长期间在疫苗插入片段的次级结构的暴露或质粒骨架的暴露, 它们可能被细菌内切核酸酶识别。

因此, 必需有可以显示出在细菌宿主体内有改善的稳定性的 DNA 表达载体; 其在用于动物体 (包括人) 时是安全的; 其作为抗击各种各样的传染病 (包括 HIV-1) 的疫苗, 免疫原蛋白质在真核生物中的

表达是有效的。

本发明的概述

本发明提供新的 pGA 构建体。新的 pGA 构建体被用于作为传送 DNA 疫苗的载体。

本发明也提供了具有疫苗插入片段的新的 pGA 构建体。病原疫苗插入片段可包括任何病毒、细菌、寄生虫和（或）真菌的 DNA 转录单位。

本发明描述了通过给予包含病原疫苗插入片段的治疗有效剂量的新 pGA 构建体给患者进行免疫接种的新方法。

本发明描述了免疫接种的新方法，其通过给予治疗有效剂量的新 pGA 构建体给患者进行，此新 pGA 构建体包含有病原疫苗插入片段，随后用例如包含同样疫苗插入片段的重组修饰的 Ankara 牛痘（MVA）载体那样的活的载体疫苗进行增强免疫作用。

本发明也描述了增强多抗原决定簇 CD8 T-细胞应答的方法，其通过给予包含病原疫苗插入片段的治疗有效剂量的新型 pGA 构建体，随后用例如包含有同样疫苗插入片段的重组修饰 Ankara 牛痘（MVA）载体那样的活的载体疫苗增强免疫作用。

在下面将更详细地描述本发明。

附图简要描述

图 1 图解本发明新的 pGA 构建体。标示给出了载体上各元件的名称和位置。以斜体字标示用于克隆进载体的疫苗插入片段的限制性内切核酸酶的位点。

图 2 图解图 1 表明的新 pGA1 构建体的 DNA 序列 SEQ ID

NO:1。在核苷酸序列的下面表示出质粒各元件的位置。

图 3 图解本发明的新 pGA2 构建体。标示给出了载体上各元件的名称和位置。斜体字标示用于克隆进载体的疫苗插入片段的独特的限制性内切核酸酶的位点。

图 4 图解图 3 表示的新型 pGA2 构建体的 DNA 序列 SEQ ID NO:2。在核苷酸序列的下面表示出质粒各元件的位置。

图 5 图解本发明的新 pGA3 构建体。标示给出了载体上各元件的名称和位置。斜体字标示用于克隆进载体的疫苗插入片段的独特的限制性内切核酸酶的位点。

图 6 图解图 5 表示的新型 pGA3 构建体的 DNA 序列 SEQ ID NO:3。在核苷酸序列的下面表示出质粒各元件的位置。

图 7 比较通过 pGA 载体 (pGA3/H1) 和 pJW4303 研究载体 (pJW4303/H1) 表达的 H1 流感血凝素增强的抗 HA IgG 的水平。BALB/c 小鼠被分别以低剂量 (0.1 μ g) 或高剂量 (1 μ g) 免疫接种和加强免疫: 用基因枪接种注入所述质粒, 起始接种后第 4 周进行加强免疫接种。

图 8A 提供了亲本 wt BH10 前病毒的图解, 从这个前病毒中产生非感染的病毒类似颗粒 (VLP)。点状的区域表示在 VLP 构建体中缺失的序列。在方形框中指出 BH10 前病毒各个区域的位置和名称标示。编码长末端重复序列的 U3RU5 区域包含转录控制元件。所有其他的区域表示编码蛋白质。为了清晰起见, 由 pol (Prt, RT, Int) 和 env (SU 和 TM) 表达的产物也表示出来。

图 8B 描述 JS2 疫苗插入片段。这个 6.7kb 疫苗插入片段表达 HIV-1-IIIb 的 BH10 品系的 Gag、Prt 和 RT 序列, Tat 和 Vpu 蛋白来自 ADA, Rev 和 Env 蛋白质为 ADA 和 BH10 序列嵌合体。Gag 序列包含限制病毒 RNA 包装的锌指结构的突变。RT 序列包括消除逆转录酶活性的三个点突变。与图 8A 中的名称标示是相同的。括号内的部分表示 BH10 区域, 在此区域 BH10 序列被来自 ADA 的序列代替, 以便于用 Env 引入 CCR-5。x 表示安全的突变。

图 8C 描述 JS5 插入片段。JS5 是 6kb 疫苗插入片段, 它表达 Gag、

Prt、RT、Vpu, Tat 和 Rev。除了在 Env 的序列缺失外, JS5 是由与 JS2 相同的序列组成的。缺失的序列在图 8B 中以黑色的矩形表示。与图 8A 和 8B 中的名称标示是相同的。在 Env 的 3' 区域内 Rev 应答元件 (RRE) 仍在构建体中保留。

图 9A 和 9B 表示分别作为 JS2 疫苗插入片段结构中中间体的 Gag 和 Env 的表达。数据来自于在 293T 细胞中的瞬时的转染。与野生类型 HIV-1 ADA 或 HIV-1 IIIb 前病毒以及在先前的研究中应用的产生 VLP 的 DNA (dPol) 相比, pGA1/JS1 (ADA VLP) 产生较高水平的 Gag (图 9A) 和 Env (图 9B)。

图 10 表示用疫苗载体在瞬时转染的细胞中 p24 衣壳的表达, 此疫苗载体表达没有安全突变的插入片段 (JS1 和 JS4)、具有在锌指结构和在 RT 中点突变的插入片段 (JS2 和 JS5) 和具有在锌指结构、RT 和蛋白酶中的点突变的插入片段 (JS3 和 JS6)。注意在锌指结构和 RT 中的安全突变支持有活性的 VLP 的表达, 而在 Prt 中的安全突变不支持。JS2 和 JS5 被选出来, 以便用于在具有安全突变的高水平表达的基础上该载体的继续研发。

图 11A 和 11B 表示分别为由具有和不具有内含子 A 的 pGA 载体表达的新候选疫苗构建体的 Gag 和 Env 表达。PGA1 含有内含子 A 而 PGA2 不含有。pGA2/JS2 和 pGA1/JS5 被选作在以良好表达水平为基础的疫苗中应用。

图 12A-12D 表示从 293T 细胞得来的细胞溶胞产物和组织培养上清液的蛋白质印迹, 293T 细胞分别用 (1) 模拟物、(2) pGA2/JS2 和 (3) pGA1/JS5 转染, 其中一级抗体是: 分别从被感染患者的抗-HIV Ig (图 A), 抗-p24 (图 12B)、抗-gp120 (图 12C) 和抗-RT (图 12D) 收集的。

图 13 图示 pGA。

图 14 比较在 pGA2/89.6、pGA1/Gag-Pol 和 pGA2/JS2 之间的 Gag 的表达水平。对表达的比较研究是在瞬时转染的 293T 细胞上进行的。

图 15A-15C 表示 Gag-专一性 T 细胞的瞬间频率。图 15A: 由 DNA 起始和 rMVA 增强免疫的 Gag-专一性 CD8 T 细胞的应答。图解提供

在高剂量的 DNA-被免疫接种动物中产生的 Gag-CM9-四聚体数据。图 15B: 在 Mamu-A*01 免疫接种的和对照的恒河猴中的攻击前和攻击后两周的不同时间的 Gag-CM9-Mamu-A*01 四聚体-专一性 T 细胞。每个图表右上角的数字表示作为 CD8 T 细胞总数的百分数的四聚体-专一性 CD8 T 细胞的频率。在图表的每个柱形之上的数字表示动物的个体编号。图 15C: 于攻击前和攻击后两周的不同时间在 A*01 和非 A*01 (有阴影线的柱图) 免疫接种和未免疫接种的恒河猴中的 Gag-专一性 IFN- γ ELISPOT。大约 10-13 Gag 肽 (有 12 个重叠的 22 聚体) 的三个数据库被用于分析。数据棒上面的数字代表在每个组内 ELISPOTs 的算术平均值 \pm 标准差。图表顶端的数字表示动物个体编号。*, 没有数据; #, <20 ELISPOTs/ 1×10^6 PBMC。

图 16A-16B 表示在 DNA/MVA 记忆应答中对抗 Gag 和 Env 的产生 IFN- γ 的 ELISPOT 的高度和宽度。图 16A: 对个体的 Gag 和 Env 肽库的应答。在一个组内的动物数据以同样的符号标示。图 16B: 对不同组应答的 ELISPOT 的平均高度和宽度。高为每组动物 Gag 和 Env ELISPOT 总和的平均值 \pm 标准差。宽为被每组动物识别的 Gag 和 Env 肽库的数目的平均值 \pm 标准差。ELISPOT 应答是在记忆状态期间应用代表 Gag 序列的大约 70 个氨基酸的 Gag 肽的 7 个库 (有 12 重叠的大约七个 22 聚体) 和代表 Env 序列的大约 40 个氨基酸的 Env 肽 (有 11 重叠的大约十个 15 聚体) 的 21 个库在 rMVA 加强免疫之后第 25 周 (攻击前四周) 在 PBMC 中被测定的。

图 17 表示包含有免疫插入片段的 pGA2 构建体的 DNA 序列 SEQ ID NO:4。病原疫苗插入片段 JS2 表达分化体的 B HIV-1 VLP。表明了 SEQ ID NO:4 核苷酸序列和编码的蛋白质。

图 18 表示包含有的病原疫苗插入片段的 pGA1 构建体的 DNA 序列。病原疫苗插入片段 JS5 表达分化体的 B HIV-1 Gag-pol 插入片段。表明了序列和编码蛋白质。

图 19A-19E 表示时间病毒负载、CD4 计数和在被接种的和对照的动物受到攻击后的存活率。图 19A: 病毒负载的几何平均值以及图 19B: 对在攻击后不同周的疫苗和对照组 CD4 计数的几何平均值。图

B 中标示出了各组所用的图例。图 19C: 被接种的动物和对照动物的存活曲线。点状线代表所有 24 只被接种动物。图 19D: 病毒负载。图 19E: 对在被接种动物和对照动物组中动物个体的 CD4 计数。动物数目的图例在图 19E 中表示。在攻击后第一个 12 周的测定每毫升血浆具有 1000 个 RNA 拷贝作为底数。负载在 1000 以下的动物以负载 500 计数。在第 16 和 20 周内测定的底数是每毫升具有 300 个 RNA 拷贝, 负载在 300 以下的动物以负载 300 计。

图 20A-20C 表示于接种和对照组中在攻击后 T 细胞的应答。图 20A: 四聚体+细胞和病毒随时间的负载。图 20B: 在攻击后两周产生对用 Gag-CM9 肽刺激的应答, 细胞内 IFN- γ 细胞因子的测定。这个活体外测定可得以评定在图 15A 所表示的高峰期激发后四聚体+细胞的功能状态。图 20C: 攻击后 12 周的增殖测定。由瞬间转染产生的 Gag-Pol-Env (空白的棒) 和 Gag-Pol (有影线的棒) 被用于刺激。转染培养物的上清液作为对照抗原。大约每毫升 1 μ g 的 p27Gag 的蛋白质用于刺激。刺激的指数是有病毒抗原存在时培养物的生长除以在模拟抗原存在时培养物的生长所得的值。

图 21A-21E 表示在攻击后 12 周的淋巴结组织形态学和病毒负载。图 21A: 被接种的恒河猴的典型的淋巴结, 其显示出泡状增生的特征, 它的特征为存在带有膨胀的生发中心以及分散的暗和亮的带状的大量次生小泡。图 21B: 转染对照动物的典型淋巴结, 其显示小泡排空和副皮质淋巴细胞的萎缩。图 21C: 来自于年龄相当的未被感染的恒河猴的典型的淋巴结, 显示无反应的生发中心。图 21D: 测量被生发中心所占据的所有淋巴结的区域的百分比, 给出了小泡增生的非专一性的指示。未感染的对照组的数据来自 4 个年龄相适的恒河猴。图 21E: 通过原位杂交用与 SHIV-89.6 gag 和 pol 互补的反义核糖核酸探针混合剂测定了淋巴结病毒负载。所有被检验的淋巴结都是腹股沟淋巴结。

图 22A-22D: 表示在攻击之后的抗体随时间的应答。应用酶的免疫吸附试验 (ELISA), 所有 Gag (图 22A) 或 Env (图 22B) 抗体的微克数被测定。用 MT-2 细胞杀灭和中性红染色, 89.6 (图 22C)

和 89.6P (图 22D) 中和抗体的滴度被测定。滴度是血浆稀释度的倒数, 此稀释度时使在人类 PBMC 中生长的被指明病毒有 50% 被中和。所使用的动物符号与图 19 相同。

图 23A-23E 表示疫苗实验的相互关系和剂量应答曲线 (图 23A 和 B)。在由 INF- γ ELISPOT 产生的峰疫苗和攻击之后两周 (图 23A) 和三周 (图 23B) 的病毒负载为负相关。因为失去了动物 3 (见图 15C) 的峰 DNA/MVA ELISPOT 样本, 24 个被接种的动物中仅仅有 23 个包括在相关性分析中。图 23C: 在峰 DNA-MVA 应答的 Gag ELISPOT 的平均高度的剂量应答曲线 (图 15C 的数据)。图 23D: DNA/MVA 记忆 ELISPOT 应答的宽度剂量应答曲线 (图 16B 数据)。图 23E: 在 MVA 加强免疫后, 峰抗 Gag 抗体应答的剂量应答曲线 (图 22A 数据)。DNA 的不同剂量产生了 ELISPOT 和抗体应答的不同水平 ($P < 0.05$)。DNA 接种的途径对抗体有显著的影响 ($P = 0.02$), 但对 ELISPOT 应答没有影响。

图 24 表示抗 HA IgG, 它是由基因枪接种表达 HA 蛋白质的 DNA 产生的。

图 25 表示抗 HA IgG 的抗体的亲合性, 所述抗 HA IgG 抗体由三种不同的 HA DNA 疫苗刺激产生的。

图 26 表示在病毒攻击后的保护作用, 免于体重损失。

图 27 图示在疫苗中包含 Env 的重要性。

图 28A-28D 图示在给予用 SHIV-89.6P 攻击的动物接种的疫苗中包含 Env 的重要性。

图 29 是表示 DNA 疫苗构建体载体的示意图。

图 30 表示蛋白质印记结果, 显示活体外疫苗构建体的表达。

图 31 是麻疹病毒中和抗体的时间曲线。

本发明的详细叙述

本发明与新载体、包含病原疫苗插入片段的新载体和给病人进行抗病原免疫接种的新方法有关。新的免疫方法激发了细胞免疫应答和体液免疫应答, 它们限制了病原的感染、扩散或生长以及导致了保护

免受随后的病原的攻击。

DNA 疫苗的经典参考资料包括第一次对提高免疫应答的论证 (Tang, De Vit 和 JohnsT0n, 1992); 第一次对细胞毒性 T 细胞 (Tc) 免疫的论证 (Ulmer 等人, 1993); 第一次对皮内的 (i.d.)、肌肉内的 (i.m.)、静脉内的 (i.v.)、鼻内的 (i.n.) 和基因枪 (g.g.) 的免疫接种的论证 (Fynan 等人, 1993; Robinson, Hunt 和 Webster, 1993); 第一次应用遗传佐剂 (Xiang 和 Ertl, 1995); 第一次应用文库免疫 (Barry, Lai 和 JohnsT0n, 1995) 和第一次对用传递 DNA 的方法调节 T 辅助细胞免疫应答类型的能力的论证 (Feltquate 等人, 1997)。收集 DNA 疫苗信息的非常有用的网站是 <http://www.genweb.com/Dnavax.html>。

为了便利, 在详细说明、实施例和所附的权利要求书中使用的术语收集于此。

定义

术语“核酸”在此是指任何天然的和合成的核苷酸和核苷的直链和连续的排列, 例如: cDNA、基因组 DNA、mRNA、tRNA、寡核苷酸、寡核苷及其衍生物。为了便于讨论, 在此这样的核酸可以被共同指为“构建体”、“质粒”或“载体”。本发明核酸的代表性的例子包括包含表达、克隆、粘粒和转化载体的细菌质粒载体, 例如 (也不限于此): pBR322; 动物病毒载体, 例如 (也不限于此): 修饰的腺病毒、感冒病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、反转录病毒、从噬菌体核酸衍生的载体以及象化学合成 DNA 或 RNA 的合成寡核苷酸。术语“核酸”进而包括修饰的或衍生的核苷酸和核苷, 例如 (也不限于此), 卤化核苷酸 (如 5-溴尿嘧啶) 和衍生核苷酸 (如生物素标记核苷酸)。

术语“人工分离的核酸”在此指有着这样结构的核酸: (a) 不

等同于任何天然存在的核酸或 (b) 不等同于任何天然存在的全长长于三个独立的基因的基因组核酸的片段, 以及包括 DNA、RNA 或其衍生物和变异体。此术语包括 (但不限于此) 下列: (a) 具有部分天然存在的基因组分子序列的 DNA, 但其两侧至少有一侧不是位于在天然存在物种的基因组中该分子部分的侧翼的编码序列; (b) 掺入到载体或原核生物或真核生物基因组核酸中的核酸, 其掺入方式是产生的分子不等同于任何载体或天然存在的基因组 DNA; (c) 作为 cDNA、基因组片段、由聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链式反应 (LCR) 或化学合成产生的片段、限制性片段; (d) 是杂交基因部分 (即编码融合蛋白质基因) 的重组核苷酸序列和 (e) 是非天然存在的杂交序列部分的重组核苷酸序列。

已提纯形式的核苷酸序列在有些方面是有益的。关于核酸的术语“纯净的”表示序列具有与自然环境相比而增加的纯度。

在此应用的术语“多肽”和“蛋白质”是指通过肽键连接的三个或更多氨基酸连续排列的氨基酸聚合物。术语“多肽”包括蛋白质、蛋白质片段、蛋白质类似物、寡肽等等。术语“多肽”更主要指由重组技术产生的、从适当来源中分离的或合成的核酸编码的上述定义中的多肽。术语“多肽”更进一步指包括化学修饰氨基酸、共价或非共价与标记配体连接的氨基酸的上述定义中的多肽。

在此应用的术语“片段”是指一个核酸 (例如 cDNA), 指人工构建 (例如化学合成) 的或用限制性内切核酸酶 (或机械剪切) 将天然产物剪切成许多碎片的核酸的分离部分, 或者指通过聚合酶链式反应 (PCR)、DNA 聚合酶或在本领域中熟知的任何其他聚合技术合成的或通过在本领域熟知的重组核酸技术在宿主细胞表达的核酸的部分, 在此应用的术语“片段”也可指多肽的分离部分, 其中多肽部分是被通过用起码一个蛋白酶进行蛋白质剪切从自然产生的多肽剪切的; 或者是指通过本领域熟知的化学方法合成的自然产生的多肽部

分。

在此应用的术语“基因”指编码遗传信息的核酸序列（包括 RNA 或 DNA），其用于整个 RNA、整个蛋白质或此整个 RNA 或整个蛋白质的任何部分的合成。特定的有机体基因组的非自然发生的基因是指外来基因、异种基因或外源基因，特定有机体基因组天然部分的基因被指称为“内源基因”。

在此应用的术语“被表达”或“表达”是指从基因到 RNA 核酸分子的转录，此 RNA 核酸分子至少部分与基因的双链中的一条链的某区域互补。在此应用的术语“被表达的”或“表达”也指从 RNA 核酸分子到蛋白质或多肽或其部分的翻译。

在此应用的术语“座位”是指基因在染色体上的位点。控制遗传性状的成对基因，每一个都在成对染色体上的相同位置。这些基因对或等位基因在表达性状上可以是显性的或隐性的。在两种情况的任何一种，对于这个基因对所控制的性状，个体都被称为纯合子。如果基因对（等位基因）由一个显性的和一个隐性的组成，对于这个基因对所控制性状，个体是杂合子。基因或核酸分子的自然变异（例如由重组引起的或由突变导致的）引起带有相似的但不等同的核苷酸序列的等位基因的变异。由于自然选择典型上都是逆着改变功能的变异而选择的，这样的等位基因变异典型上编码蛋白质与同它们相对照的基因编码蛋白质的活动类似。等位基因的变异也包含在基因的非翻译区域的变化（例如 3'或 5'非翻译区域）或可能涉及新生的转录本的替换剪接，其导致位置邻近替换的外显子。

在此应用的术语“转录调节序列”是指与基因核酸序列有联系的和调节基因转录表达的核苷酸序列。“转录调节序列”可以被分离和合并入一个载体核酸，使之能够调节在载体 DNA 部分的适当细胞中的转录。“转录调节序列”可以在一核酸序列区域之先（但不限于此），

此核酸序列区域在可以被转录为 mRNA 蛋白质编码序列的末端的 5' 区域。转录调节区域也可在蛋白质编码区域内，在与内含子区域等同的基因区域中或可以在核酸区域的核酸序列区域。

在此应用的术语“编码区”是指可翻译成蛋白质的连续的线状排列的核苷酸。全长的编码区可以被翻译成全长的蛋白质；也就是说，在自然状态下，没有任何翻译后的修饰，一完整的蛋白质将被翻译出。全长的编码区也可包括前导蛋白质序列或可能从被翻译蛋白质自然切除的蛋白质的任何其他区域。

在此应用的术语“探针”在涉及到核酸时是指某一核苷酸序列，其可用于杂交，用来鉴定互补序列的存在或互补序列与探针序列区别，但不能鉴定在在杂交的严格条件下防止杂交的程度。探针也可被标记修饰，例如（但不仅仅如此）用放射性基团、生物素或任何在本领域中熟知的其他标记。

在此应用的术语“核酸载体”是指自然的或合成的单链或双链的质粒或者病毒核酸分子，其可被转染或转化进入到细胞并在宿主细胞基因组外或内独立复制。根据质粒载体的核苷酸序列，环状的双链质粒通过用适当的限制酶处理可成为直链。通过用限制酶剪切载体和再将片段连接在一起，核酸可被插入进载体。核酸分子可以是 RNA 或 DNA。

在此应用的术语“表达载体”是指这样的核酸载体，其可进一步包括至少一个可被操纵连接于用于 Mago 蛋白质编码核苷酸序列的调节序列。调节序列在本领域是熟知的，无需进行任何不适当的实验，本领域的技术人员可将其选择出来以用于保证连接的核苷酸序列的很好的表达。在此应用的术语“调节序列”包括启动子、增强子和可控制表达的其他元件。在标准的分子生物学教科书[例如，Sambrook 等人著《分子克隆：实验手册》第二版，Cold Spring Harbor Press (1989)]

可查阅到设计适合的表达载体、启动子和其他表达控制元件的内容。但是现已公认，选择适合的表达载体依赖于多种因素，包括被转化的宿主细胞和（或）被表达的蛋白质类型的选择。

在此应用的术语“转化”和“转染”是指向宿主内插入核酸的过程。许多技术在本领域已被熟知，它们使将核酸转化或转染到原核生物或真核生物有机体内变得容易。这些方法涉及各种各样的技术，例如，用高浓度盐（例如，但不仅是，钙盐或镁盐）、电场、去污剂或脂质体为媒介的转染来处理细胞，这样使宿主细胞有能力吸收核酸分子。

术语“重组细胞”是指具有核酸片段新组合的细胞，在自然界这些片段不是共价互相连接的。应用本领域技术人员可掌握的各种核酸排列操纵技术，可将核酸片段的新组合导入到有机体内。重组细胞可以是单个的真核生物细胞、单个的原核生物细胞或哺乳动物细胞。重组细胞可以将基因组外的载体包含其内。基因组外的核酸载体不插入到细胞基因组内。重组细胞可进而将载体或其基因组内的部分包含其内。术语“基因组内”定义为并入重组细胞基因组的核酸构建体。

在此应用的术语“重组核酸”是指在真核生物或原核生物细胞中没有自然发现的至少两个核酸序列。核酸序列可以包括（但不限于此）核酸载体、基因表达调节元件、复制起点、在表达时赋予抗体抗性的序列以及蛋白质编码序列。术语“重组体多肽”包括通过重组 DNA 技术产生的多肽，它们与自然发生的多肽在位置、纯度或结构上都是有明显不同的。一般情况，这样的重组体多肽以与在自然中正常观察到的不同的量存在于细胞内。

在此应用的术语“患者”是指动物，尤其指哺乳动物，更尤其指人。

在此应用的术语“免疫”或“免疫作用”是指在患者体内产生免疫应答，它保护患者（部分地或全部地）使其不显露由病原引起的感染（即疾病）。用本发明进行免疫接种的患者将不被病原感染或与未被免疫接种的相比有较少程度的感染。免疫接种在性质上可是预防性的或治疗性的。这就是说从前未感染的和感染的患者都可以用本发明进行免疫接种。

在此应用的术语“DNA 转录单位”是指聚核苷酸序列，其至少包括两个成分：编码抗原的 DNA 和转录启动子元件。一个 DNA 转录单位可包括（任选的）另外的序列，例如，增强子元件、剪接信号、终止和多腺苷酸化信号、病毒复制子和（或）细菌质粒序列。可通过若干已知的方法产生 DNA 转录单位。例如，编码想要得到的抗原的 DNA 可被插入到表达载体内构建 DNA 转录单位，在《Maniatis 等人，分子克隆：实验手册，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）》已对此有所描述，其公开内容通过引证被全面并入本文。

在此应用的术语“疫苗插入片段”是指病原体的 DNA 转录单位。尤其指，疫苗插入片段是可在患者体内产生免疫应答的 DNA 转录单位。例如，疫苗插入片段是这样的病原疫苗插入片段，其编码由病毒、细菌、寄生虫和（或）真菌衍生的抗原。典型的病毒包括疱疹病毒、正粘病毒、鼻病毒、小核糖核酸病毒、腺病毒、副粘病毒、冠状病毒、弹状病毒、披膜病毒、黄病毒、本雅病毒、风疹病毒、呼吸道肠道孤儿病毒、麻疹病毒、肝 DNA 病毒、埃博拉病毒、逆转录病毒（包括人免疫缺陷病毒）等等。典型的细菌包括结核菌、分支杆菌、螺旋体、立克次体、衣原体、支原体等等。典型的寄生虫包括疟原虫等等。典型的真菌包括酵母菌、霉菌等等。本领域的技术人员将会意识到这个列表没有包括所有可用在此描述的方法产生的保护性免疫应答与之对抗的潜在病原体。

在此应用的术语“抗原”是指任何蛋白质、糖类或由病原所表达

的其他部分，其能够激发针对病原体的保护性应答。抗原可能是也可能不是病原体的结构成分。可以是翻译产物或各种长度的多肽的编码抗原也在术语“抗原”之列。抗原经过一般的宿主细胞修饰，例如，糖基化、肉豆蔻酰基化或磷酸化。除此之外，它们可被设计进行细胞内、细胞外或细胞表面的表达。进一步，它们可被设计进行装配和从细胞中释放。

在此应用的术语“佐剂”是指加入到疫苗中以增加免疫效率的物质。佐剂如何运作的机理还未完全搞清。一些佐剂被认为通过缓慢释放抗原来增强免疫应答，而另一些佐剂本身就是强免疫原性的，据认为具有协同功能。已知的疫苗佐剂包括（但不限于此）油和水的乳剂（例如，完全的分支杆菌佐剂和不完全的分支杆菌佐剂）、棒状杆菌 *parvum*、芽孢杆菌 Calmette Guerin、氢氧化铝、葡聚糖、硫酸葡聚糖、氧化铁、藻酸钠、Bacto 佐剂、某种合成聚合物（例如，聚合氨基酸和氨基酸的共聚物）、皂角苷、“REGRESSIN”（Vetrepharm, Athens, Ga）、“AVRIDINE”[N,N-二(十八烷基)-N,N-双(2-羟乙基)丙烷二胺]、石蜡油和胞壁酰二肽。佐剂也包含遗传佐剂（例如，在共接种的 DNA 中被编码的免疫调变剂分子）。共接种的 DNA 可以在作为疫苗免疫原的相同的疫苗构建体中或在另外的 DNA 载体中。

在此应用的术语“药学上可接受的载体”是指容纳可被注射入牛宿主并且无副作用疫苗的载体。在本领域熟知的适合的药学上可接受的载体包括（但不限于此）无菌水、盐水、葡萄糖、右旋糖或缓冲液。载体也可包括辅剂，其包括（但不限于此）稀释剂、稳定剂（即糖和氨基酸）、防腐剂、湿润剂、乳化剂、pH 缓冲剂、增强黏度添加剂、染料等等。

在此应用的术语“选择性标记基因”是指一种表达基因，它能用作从没有表达可选择的标记基因的细胞群中选择出包含可选择标记基因的细胞群。例如，“选择性标记基因”可以是“抗生素抗性基因”，

它可能使对于微生物专门的抗生素有耐受力，这是先前药物的不利影响。这样的抗性可是由突变导致的或者由于包含有转染微生物的抗性基因的质粒而获得的抗性。

在此应用的术语“终止子序列”或“终止子”是指功能为停止转录的核苷酸序列。在此应用的术语“转录”是指这样的过程，在此过程中以DNA为模板通过碱基互补配对形成RNA分子。此过程是由RNA聚合酶调节的。

在此应用的术语“VLP”是指病毒类似颗粒，也指病毒蛋白的聚集体。

以DNA为基础的免疫接种的主要免疫学优点是由MHC类型I和MHC类型II分子提呈的免疫原的能力。内源合成蛋白质容易进入加工途径，用以在MHC类型I和MHC II类型分子表面负载肽抗原决定簇。MHC I提呈的抗原决定簇提高细胞毒性T-细胞（Tc）的应答，而MHC II提呈的抗原决定簇增强辅助T-细胞（Th）的应答。相反，非细胞内合成的免疫原很大程度上局限于负载MHC II抗原决定簇并因而提高Th而非Tc的应答。当将活的减毒疫苗或能在细胞中产生免疫原并对Th和Tc都有增强的重组体病毒载体作比较时，DNA疫苗有不是感染性的优点和将免疫应答仅集中于免疫所要求的抗原上的优点。由于DNA疫苗对增强类型1或类型2 T-细胞的辅助比较容易操作，因此它们也是很有优点的。这使得疫苗对于将动员与感染战斗的免疫应答来说是特制的。由于用重组DNA技术容易构建DNA质粒、疫苗生产（质粒DNA的生长和提纯）中应用遗传方法的能力和在广泛的温度范围内DNA的稳定性，DNA疫苗的花费也较小。

用高度活性的表达载体制作模型以生产重组蛋白质，可得到最好的免疫应答（Robinson和Pertmer，1998）。最频繁使用的转录控制元件包括强启动子。虽然在DNA疫苗中可能应用的其他启动子也未

离开本发明的范围，一个适合应用的这样的启动子是巨细胞病毒（CMV），它是立即早期启动子。在本发明中用到的其他转录控制元件包括强多腺苷酸化信号，例如，从牛生长激素编码基因衍生的或兔 β 球蛋白多腺苷酸化信号（Bohm 等人，1996；Chapman 等人，1991；Hartikka 等人，1996；Manthorpe 等人，1993；Montgomery 等人，1993）。CMV 立即早期启动子可以在有内含子或无内含子 A 的情况下应用（Chapman 等人，1991）。内含子 A 的存在增强了 RNA 病毒、细菌和寄生虫中的许多抗原的表达，可能通过以支持加工和起真核生物 mRNA 功能的序列提供给被表达 RNA 来进行的。也将会意识到，用本领域已知的其他方法也可增强表达，其包括（但不限于此）尽可能完善地使原核生物 mRNA 密码子使用于真核生物细胞（Andre 等人，1998；Uchijima 等人，1998）。多顺反子载体可被用于表达超过一个的免疫原或一个免疫原与一个免疫刺激蛋白（Iwasaki 等人，1997a；Wild 等人，1998）。

通过将表达抗原靶向特定的细胞区室，可使免疫原对刺激产生抗体或 Tc 细胞应答更加有效或有较低的效果。例如，用位于细胞的质膜或从其分泌的抗原比用位于细胞内部的抗原对增强抗体应答更有效（Boyle, Koniaras, 和 Lew, 1997；Inchauspe 等人，1997）。用 N-端遍在蛋白化信号，将 DNA 编码蛋白质靶向可引起细胞质快速降解和更有效地负载肽于 MHC I 途径的蛋白酶体，可以增强 Tc 应答（Rodriguez, Zhang, 和 Whitton, 1997；Tobery 和 Siliciano, 1997；Wu 和 Kipps, 1997）。为了回顾 DNA 提高免疫应答的机理基础，可参考 Robinson 和 Pertmer, 《病毒研究进展》，vol 53, Academic Press (2000)，其中的发现在此通过全部引证被并入本文。

蛋白质的不同构造类型对抗体应答的效用、一系列 MHC I 抗原决定簇（微小基因）增强 Tc 应答的能力和抗原与免疫靶蛋白融合的效果都可用规定的插入片段来定值。有序的结构（例如，病毒类似颗粒）看起来比无序结构在增强抗体上更有效。（Fomsgaard 等人，1998）。

这似乎反映出免疫原的规律排列比抗原单体在交叉连接球蛋白受体和向 B-细胞发出增殖和产生抗体信号方面更有效。编码不同病原的一系列 MHC 抗原决定簇的重组 DNA 分子可以激发对许多病原的 Tc 应答 (Hanke 等人, 1998b)。如果它们也包含 Th 决定簇, 这些系列的 Tc 决定簇是最有效的 (Maecker 等人, 1998; Thomson 等人, 1998)。

操纵免疫应答的另外的方法是将免疫原与免疫靶分子或免疫刺激分子融合。根据资料, 这个融合的最成功的是将分泌的免疫原靶向抗原提呈细胞 (APC) 或淋巴结 (Boyle, Brady, 和 Lew, 1998)。人 IgG 的分泌形态与 CTLA-4 的融合增加了对 IgG 的抗体应答, 它的增加大大多于 1000 倍, 并且改变了从完全 (C'-) 依赖到 C'-独立抗体的倾向。

人 IgG 与 L-selectin 的融合也增加了抗体应答, 但不改变被增强抗体的 C'-结合特征。与 L-selectin 融合的免疫原可能通过作为门户的内皮小静脉被传递到淋巴结。抗原与细胞素 cDNAs 的融合引起抗体、Th、和 Tc 应答的适度增强 (Hakim, Levy, 和 Levy, 1996; Maecker 等人, 1997)。IL-4-融合增强了抗体应答, 而 IL-12 和 IL-1 β 增强了 T-细胞应答。

DNA 传递的两种方法是用皮下组织针注射溶于盐水中的 DNA 或基因枪传递包被金衣的 DNA 弹丸。盐水注射将 DNA 传递入细胞外的空间, 而基因枪将 DNA 直接轰击到细胞中。盐水注射比基因枪需要更大量的 DNA (多 100-1000 倍) (Fynan 等人, 1993)。这两种类型的传递的不同还在于, 盐水注射倾向于对类型 1 T-细胞辅助的应答, 而基因枪传递倾向于对类型 2 T-细胞辅助的应答 (Feltquate 等人, 1997; Pertmer, Roberts, 和 Haynes, 1996)。DNA 盐水注射能快速在整个体内散布。用基因枪传递 DNA 更局限于靶部位。使用任何一种接种方法, 细胞外质粒 DNA 只有短暂的半衰期, 大约 10 分钟 (Kawabata, Takaura, 和 Hashida, 1995; Lew 等人, 1995)。盐水注射疫苗也可肌肉内 (i.m.) 注射或皮内 (i.d.) 注射 (Fynan 等人, 1993)。

虽然静脉内和皮下的注射对不同的质粒都有不同程度的成功（Bohm 等人，1998；Fynan 等人，1993），但腹膜内注射还没有得到过成功（Bohm 等人，1998；Fynan 等人，1993）。基因枪传递可通过给予皮肤或外科手术后露出的肌肉来进行。在小鼠体内对增强免疫应答有效的 DNA 传递方法和路线在其他种类也是有效的。

通过粘膜传递 DNA 的免疫接种比用非肠道的接种途径进行的免疫更少成功。通过鼻内给服盐水 DNA 有两个好的（Asakura 等人，1997；Sasaki 等人，1998b）和有限的（Fynan 等人，1993）成功。通过把 DNA 传递到阴道粘膜，基因枪成功地增强了 IgG（Livingston 等人，1995）。用类脂体（McCluskie 等人，1998）、微球（Chen 等人，1998a；Jones 等人，1997）和重组 Shigella 载体（Sizemore, Branstrom, 和 Sadoff, 1995；Sizemore, Branstrom, 和 Sadoff, 1997）将 DNA 传递到粘膜表面也获得了一些成功。

对增强免疫应答的 DNA 剂量依赖于传递方法、宿主、载体和被编码抗原。对剂量影响最大的是传递方法。盐水注射 DNA 一般用 10 μ g 到 1mg DNA，而用基因枪传递 DNA 一般用 0.2 μ g 到 20 μ g DNA。一般情况，对小鼠用低剂量的 DNA（10-100 μ g 盐水注射和 0.2-20 μ g 基因枪传递），而对灵长类动物用高剂量的 DNA（100 μ g -1mg 盐水注射和 2 μ g -20 μ g 基因枪传递）。基因枪传递需要较低剂量的 DNA 反映出金弹丸是直接将 DNA 传递到细胞内的。

抗原在增强应答上的明显效果的实例可以在这样的研究中找到，它比较了在兔子体中对表达流感血凝集素的 DNA 或表达免疫缺陷病毒的包膜糖蛋白（Env）的 DNA 的抗体应答的增强（Richmond 等人，1998）。在类似情况下，表达血凝集素的 DNA 增强了长而持久的高抗体亲抗原性的和高效价的抗体（~100 μ g /ml 专一性抗体），而表达 Env 的 DNA 只增强了瞬间的低抗体亲抗原性的和低效价的抗体应答

（小于 10 μ g/ml 的专一性抗体）。在增强抗体上的区别可被假设为反映出了作为 T-依赖性抗原的血凝集素和作为 T-非依赖性抗原的高糖基化免疫缺陷病毒 Env。

蛋白质和重组体病毒都被用于加强经 DNA 引发的免疫应答。蛋白质加强免疫被应用于增强对 HIV-1 Env 的中和抗体应答。重组天花病毒增强也被应用于增强体液的和细胞的免疫应答。

对于弱免疫原，例如，免疫缺陷病毒 Env，用 DNA 增强抗体应答仅仅是在自然感染动物体内抗体应答的一部分，已用蛋白质促进提供了增强低效价抗体应答的手段（Letvin 等人，1997；Richmond 等人，1998）。在对兔的研究中，用蛋白质加强免疫提高了抗体效价、抗体亲抗原性和抗体应答的持久性（Richmond 等人，1998）。同对用蛋白质加强免疫的次级免疫应答一致，与只接受蛋白质的动物相比，在用蛋白质加强免疫之后，经 DNA 引发的动物显示出抗体的更快速的增加和更高的抗体效价。但是，第二次蛋白质免疫接种时，在曾接受和未曾接受 DNA 引发的免疫的动物中抗体应答的动力和效价是相似的。

用重组天花病毒加强免疫被证明是促进经 DNA 引发的 CD8+ 细胞应答的高度成功的方法（Hanke 等人，1998a；Kent 等人，1998；Schneider 等人，1998）。在用天花病毒加强免疫后，抗原专一性 CD8+ 细胞在经 DNA 引发的小鼠或恒河猴中增加了 10 倍之多。研究测定的免疫接种的顺序揭示，DNA 必须被首先递入（Schneider 等人，1998）。这被假定为，它反映出集中于对所要求免疫原的免疫应答的 DNA。在用天花病毒加强免疫后，CD8+ 细胞应答的较大的增加被假设为反映出较大量的由天花病毒载体表达的抗原，也反映出天花病毒诱导的细胞因子增强了免疫应答（Kent 等人，1998；Schneider 等人，1998）。

许多不同的天花病毒可被用于天花的加强免疫上。一种被定名为修饰疫苗 Ankara (MVA) 的疫苗病毒在小鼠模型中特别有效（Schneider

等人，1998）。这也可反映出在哺乳动物模型中不完全复制的 MVA 规避宿主免疫应答的能力被减弱了。

通过经 DNA 引发后由天花病毒加强免疫而提高的应答对提高保护性细胞介导的免疫反应是高度有效的。给小鼠肌肉注射 DNA，然后用重组天花病毒加强免疫可保护小鼠免受疟疾的攻击（Schneider 等人，1998）。在恒河猴体内，用皮内注射（但非基因枪传递）DNA 引发，然后用重组天花病毒加强免疫，以此抑制了猿和人免疫缺陷病毒嵌合体的攻击（Robinson 等人，1999）。

免疫缺陷病毒（例如，HIV-1）的 DNA 疫苗遇到足够有限的进入的感染的攻击，这样使导致艾滋病（AIDS）的无法制止的长期的感染得到了预防。使此变得复杂的是中和抗体难于产生并难于对特别的病毒品系有专一性。（Burton 和 Montefiori, 1997; Moore 和 Ho, 1995）。对于增强中和抗体的问题，许多努力都集中于增强对几个特定感染的足够强度的细胞介导的应答。根据资料，增强 Tc 高效价的最成功的实例是来自于用经 DNA 引发的然后用重组天花病毒加强免疫的方案。通过用测定溶解细胞的活性来测定专一性 Tc 的水平（Kent 等人，1998）、通过用 MHC-专一性四聚体对专一性 SIV Gag 抗原决定簇染色和通过用 SIV 或 SHIV 激发（Hanke, 1999），评价了这个方案的效果。

用 DNA 引发和用重组天花病毒加强免疫，许多显著的发现从临床前期的试验中出现。首先，攻击感染可被抑制在用对质粒病毒 RNA 进行定量的 RT-PCR 分析可检出的水平以下（Robinson 等人，1999）。第二，这个保护是长期持久的并不需要有中和抗体存在（Robinson 等人，1999）。第三，用 DNA 盐水注射的皮内的 DNA 引发对于增强保护性免疫优于用基因枪的引发（ $P=0.01$, Fisher's exact test）（Robinson 等人，1999）。

本发明的新 pGA 载体有原核生物复制起点、对质粒选择的选择性标记基因和对真核生物细胞的转录盒。本发明的 pGA 载体的独到之处是包括与转录同向的 λ 终止子和选择标记基因。在质粒于细菌内产生时，终止子序列防止从卡那霉素盒（kanamycin cassette）到疫苗的序列的通读。通过限制暴露可被细菌内切核酸酶识别的次级结构，防止转录的通读稳定了疫苗插入片段序列。

已并入到本发明 pGA 载体的转录盒应用了来自巨细胞病毒立即早期启动子序列（CMVIE）和来自牛生长素多腺苷酸化的序列（BGHpA）的序列以控制转录。组织溶酶原激活剂基因前导序列（tPA）的合成同系物作为前导序列在转录盒中是可有可无的。本发明的载体在对接受疫苗插入片段可应用的位点上有所不同，在转录盒是否包括 CMVIE 启动子中的内含子 A 序列上也有所不同。内含子 A 和 tPA 前导序列在某些例子中显示出对疫苗插入片段的强表达的优点（Chapman 等人，1991）。

pGA1 是一个 3894 bp 大小的质粒。pGA1 包含启动子（bp 1-690）、CMV-内含子 A（bp 691-1638）、tPA 前导序列合成模仿物（bp 1659-1721）、牛生长激素多腺苷酸化序列（bp 1761-1983）、 λ T0 终止子（bp 1984-2018）、卡那霉素抗性基因（bp 2037-2830）和 ColE1 复制子（bp 2831-3890）。在图 2 中表示 pGA1 构建体的 DNA 序列（SEQ ID NO: 1）。在图 1 中，所指示的限制性位点是用于疫苗插入片段克隆的单个切点。在疫苗插入片段 5'端被克隆在 tPA 前导序列上游区时，应用 ClaI 或 BspD1 位点。NheI 位点用于克隆在 tPA 前导序列框架中的序列。在于 SmaI 和 BlnI 之间的位点用于克隆疫苗插入片段的 3'端。

pGA2 是一个 2947 bp 大小的质粒，其缺少在 pGA 1 中存在的 947 bp 内含子 A 序列。除了内含子 A 序列缺失，pGA 2 与 pGA1 相同。对于克隆不需要有效表达所需的上游区内含子的序列或克隆上游区内含子可能与需要良好表达的剪接类型产生干扰的序列，pGA2 是有价

值的。图 3 提供了具有有用的克隆疫苗插入片段限制性位点的图，图 4 表示 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列。将疫苗插入片段克隆进入 pGA2 的限制性位点的应用与克隆片段进入 pGA1 的应用相同。

pGA3 是包含内含子 A 的 3893bp 的质粒。除了可被用于导入疫苗插入片段的克隆位点外，pGA3 与 pGA1 相同。在 pGA3，将插入片段克隆到 tPA 前导序列上游区用 Hind III 位点。将序列克隆到 tPA 前导序列下游区用 SmaI 和 BlnI 位点之间的位点。在 pGA3，这些位点包括 BamHI 位点。图 5 表示 pGA3 的图谱，图 6 表示 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列。

从此处的技术看来，本领域的技术人员将认识到，任何本领域已知的疫苗插入片段都可被应用于在此描述的新 pGA 构建体，其包括（但不限于）象 HIV、流感、麻疹、疱疹、埃博拉等等病毒病原体。

例如，本发明包括来自于下列的一些插入片段：免疫缺陷病毒特别是 HIV（包括 HIV-1 和 HIV-2 的分化体及其修饰体）、流感病毒基因（包括所有亚型和修饰体）和从麻疹基因衍生的疫苗插入片段。本领域的技术人员将意识到，关于从免疫缺陷病毒、流感病毒、麻疹病毒及其修饰体衍生的插入片段的讨论是自然的举例，仅仅为了说明缘故而提供的。

本发明的免疫缺陷病毒疫苗插入片段被设计为表达来自于单一 DNA 的非感染病毒类似颗粒（VLP）。这是用亚基因组剪接元件得到的，此元件一般应用于免疫缺陷病毒从单个病毒 RNA 表达多基因产物。对于亚基因组剪接模式而言重要的是：（i）剪接位点和全长病毒 RNA 中存在的受体（ii）Rev 应答元件（RRE）和（iii）Rev 蛋白质。逆转录病毒 RNA 的剪接位点用真核生物 RNA 剪接位点的规范序列。RRE 是一个大约 200bp RNA 的结构，其与 Rev 蛋白质相互作用使病毒 RNA 从细胞核到细胞质运送。在没有 Rev 的情况下，免疫缺陷病

毒的~10kb RNA 对调节基因 Tat、Rev 和 Nef 的 mRNA 进行剪接。这些基因被在 RT 与 Env 之间和在基因组 3'端存在的外显子编码。除了 Tat、Rev 和 Nef 的被多重剪接的 mRNA 之外，在 Rev 存在的情况下单个被剪接的 Env 的 mRNA 和未被剪接的 Gag 与 Pol 的 mRNA 得到了表达。

由单个 DNA 对非感染性的 VLP 的表达使免疫缺陷病毒疫苗具有了许多优势特征。单个 DNA 对许多蛋白质的表达给被接种的宿主提供了对这些蛋白质包含的广泛 T-细胞和 B-细胞抗原决定簇作出应答的机会。包含多样抗原决定簇的蛋白质的表达给由多样组织相容性类型对抗原决定簇的提呈提供了机会。通过使用所有蛋白质，给不同组织相容性类型的宿主提供了产生有广泛基础的 T-细胞应答的机会。这可能对有效抑制免疫缺陷病毒感染（它的高度突变率使之容易逃脱免疫应答）是必需的（Evans 等人，1999）（Poignard 等人，1999；Evans 等人，1995）。正如在药物治疗时，需要多个逃避突变的多抗原决定簇 T-细胞应答将比仅需要单一逃避突变的单个抗原决定簇 T-细胞应答提供更好的保护。

抗体应答常常被多价疫苗最好的引发，多价疫苗给应答 B-细胞提呈了抗原决定簇的有序排列（Bachmanm, Zinkernagel, 1997）。通过病毒颗粒膜上 Env 的多价性的效用，病毒类似颗粒将有利于增强抗 Env 抗体应答。这些颗粒也给免疫系统提呈非变性的和正常的 Env 形态。

在有佐剂或其他物质（这些物质要有促进 DNA 吸收或使免疫系统细胞恢复到接种位点的能力）的情况下，可给患者施用本发明的新载体。实施方案包括 DNA 疫苗与常规佐剂或基因佐剂的结合。常规佐剂包括有利于 DNA 稳定和吸收的佐剂、可使免疫系统细胞恢复到接种位点的佐剂或有利于应答淋巴细胞免疫激活的佐剂。常规佐剂包括（但不限于此）油剂和水剂（例如，完全的分支杆菌佐剂和不完全

的分支杆菌佐剂)、棒状杆菌 *parvum*、芽孢杆菌 Calmette Guerin、氢氧化铝、葡聚糖、硫酸葡聚糖、氧化铁、藻酸钠、BacT0 佐剂、某种合成聚合物(例如, 聚合氨基酸和氨基酸的共聚物)、皂角苷、“REGRESSIN”(Vetrepharm, Athens, Ga)、“AVRIDINE”[N,N-二(十八烷基)-N,N-双(2-羟乙基)丙烷二胺]、石蜡油和胞壁酰二肽。本发明也考虑应用遗传佐剂(例如, 在共接种的 DNA 中被编码的免疫调变剂分子)。共接种的 DNA 可以在作为疫苗免疫原的相同的疫苗构建体中或在分离的 DNA 载体中。

本发明的疫苗可以以各种方式服用, 包括非肠道的或典型的途径。例如, 可以通过静脉内的、腹膜内的、皮内的、皮下的或肌内的方法进行接种。例如可以用皮下注射针、用象推动液流进入靶位点那样的无针传递装置或用将于金弹丸上的 DNA 轰击入靶位点的基因枪。可通过各种方法将包含病原疫苗插入片段的载体给予粘膜表面, 包括鼻内服用即鼻滴剂或吸入剂, 或者通过直肠内或阴道内给予溶液、凝胶、泡沫或栓剂服用。也可选择口服包含疫苗插入片段的载体, 形式可为片剂、胶囊、嚼片、糖浆、乳剂等等。在另一替代方案, 可通过被动的皮肤贴片、电离子渗入疗法等方法经过皮肤给予载体。任何生理学合格的适当媒介对导入包含病原疫苗插入片段的载体都是适宜的。例如, 在本领域已知的适宜的药学上合格的载体包括(但不限于此)无菌水、盐水、葡萄糖、右旋糖或缓冲液。载体也可包括辅剂, 其包括(但不限于此)稀释剂、稳定剂(即糖和氨基酸)、防腐剂、湿润剂、乳化剂、pH 缓冲剂、增强黏度添加剂、染料等等。

通过下列实施例对本发明进行解释, 这些实施例是通过例证方式提供的并将不被局限地解释。参考资料的内容、出版专利和全部本申请书引用的专利在此通过引证被全部并入本文。

实施例 1: pGA1 的结构和序列

在图 1 和图 2 中表示的 pGA1 包含 ColE1 复制起点、用于抗生素

选择的卡那霉素抗性基因、 λ T0 终止子和包括上游区内含子的真核生物表达盒。ColE1 复制起点是 600 核苷酸的 DNA 片段，其包含复制起端 (ori)，编码 RNA 引物和编码两个复制起始的负调节基因。用于质粒复制的所有的酶促功能都是由细菌宿主提供的。包含 ColE1 复制基因的起始构建体质粒是 pBR322 (Bolivar 等人, 1977; Sutcliffe 等人, 1978)。

卡那霉素抗性基因是用于在细菌中质粒选择的抗生素抗性基因。 λ T0 终止子防止在原核生物质粒生长期间从卡那霉素抗性基因到疫苗转录盒的通读 (Scholtisse 和 kGrosse, 1987)。通过防止在疫苗表达盒中的通读，终止子帮助稳定在细菌中生长期间的质粒插入片段。

真核生物表达盒是由包括内含子 A (CMVIE-IA) 的 CMV 立即早期启动子和来自于牛生长素多腺苷酸化序列 (BGHpA) 的终止序列组成。组织溶酶原激活剂 (tPA) 的前导序列的合成模仿物转录盒内的选择性组份可被包括在内。有这些元件的转录盒被证明对于表达在真核生物细胞中的外来基因是高度有效的 (Chapman 等人, 1991)。在转录盒中的克隆位点包括位于 tPA 前导基因上游区的 ClaI 位点、用于与 tPA 前导基因以符合读码框克隆的 NheI 克隆位点以及用于在 BGHpA 之前克隆的 XmnI、SmaI、RsrII、AvrII 和 BlnI 克隆位点。

用来自于商用载体 pZErO-2 (Invitrogen、Carlsbad、CA) 和真核生物表达载体 pJW4303 的聚合酶链式反应 (PCR) 片段，将 ColE1 复制基因、卡那霉素抗性基因和用于真核生物细胞的转录控制元件结合为一个质粒。(Lu 等人, 1997)。

来自于从核苷酸 1319 到核苷酸 3178 的 pZErO2 的一个 1853 bp 片段包含 ColE1 复制起点和卡那霉素抗性基因。来自于从核苷酸 376 到核苷酸 2416 的 pJW4303 的一个 2040 bp 片段包含带有内含子 A 的 CMVIE 启动子、组织溶酶原激活剂前导基因 (tPA) 的合成同系物和

牛生长素多腺苷酸化位点 (BGHpA)。通过用包含有 SalI 位点的寡核苷酸引物的聚合酶链式反应 (PCR)，片段被扩增。与来于 pZeRO2 的卡那霉素抗性转录盒和来于 pJW4303 的真核生物转录盒以相反的转录方向的连接产物被鉴定以用于进一步的发展。对这 pGA 载体亲本的核苷酸计数从 CMV 启动子 5'端的第一个碱基对开始。

通过对带有 5'端 BamH1 限制性内切核酸酶位点和 3'端 XbaI 限制性内切核酸酶位点的 391 bp 片段的 PCR 扩增，T0 终止子被导入到这个 pGA 载体的亲本。片段起始的 355 bp 是在从 pJW4303 转录盒衍生的 BGHpA 序列中的序列，紧接其后的合成的寡核苷酸上的 36 个碱基导入了 T0 序列和 XbaI 位点。被导入的 T0 终止子序列包含下列核苷酸序列：

5'-ATAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAA-3'

(SEQ ID NO:)

包含 BamH1-XbaI 片段的 T0 终止子替代在来自于 pXeRO2 和 pJW4303 质粒的没有 T0 终止子的同系物片段。产物经过测序被证实为 T0 方向的序列。

于 1755-1845 核苷酸之间的真核生物转录盒的区域包含 SIV nef 的读码框的最后 30 bp。此区域通过在 pGA 的核苷酸 1858 产生突变并产生 Avr II 限制性内切核酸酶位点而将之从 pGA 中去除。自然发生的 Avr II 位点位于核苷酸 1755。用 Avr II 酶水解然后用 T4 DNA 连接酶重新连接使得在 1755-1845 核苷酸之间的 DNA 的 SIV 片段被去除。为了便于克隆 HIV-1 序列，用位点定点诱变在 bp1645 和在 bp1743 的 RsrII 位点上，ClaI 位点被导入 pGA 载体内。此构建体被序列分析验证。

实施例 2: pGA2 的结构和序列

如图 3 和图 4 所示，除了缺失了来自 CMVIE 启动子的内含子 A 序列外，pGA2 与 pGA1 是相同的。通过在 CMVIE 启动子中的 mRNA

帽子位点下游 8bp 的位置引入 ClaI 位点，从 pGA1 产生了 pGA2。用互补引物：

5' -CCGTCAGATCGCATCGATACGCCATCCACG-3' (SEQ ID NO:) 和

5'-CGTGGATGGCGTATCGATGCGATCTGACGG-3' (SEQ ID NO:)

用寡核苷酸定点诱变法使 ClaI 位点被导入。

在新 ClaI 位点插入之后，pGA1 被 ClaI 水解并从 pGA1 切除 946 bp ClaI 片段，然后重新连接产生 pGA2。

实施例 3：pGA3 的结构和序列

如图 5 和图 6 所示 pGA3 除了导入 HindIII 位点代替在核苷酸 1645 的 ClaI 位点和导入 BamHI 位点代替在核苷酸 1743 的 RsrII 位点外，pGA3 与 pGA1 相同。

实施例 4：pGA3 和 pJW4303 的比较表达和免疫原性

要测定 pGA 质粒作为疫苗载体的功效，可将 pGA 质粒与先前描述的疫苗载体 pJW4303 做比较。pJW4303 质粒被用作在小鼠、兔子和恒河猴体中的 DNA 疫苗接种 (Robinson 等人, 1999; Robinson 等人, 1997; Pertmer 等人, 1995; Feltquate 等人, 1997; Torres 等人, 1999)。比较是这样做的：用带有编码普通的 A/PR/8/34 (H1N1) 流感病毒血凝集素的质膜形式的疫苗插入片段的 pGA3 (pGA3/H1) 与编码同样片段的 pJW4303 (pJW4303/H1) 做比较。pGA3 和 pJW4303 在流感病毒 H1 序列的上游包含内含子 A。

pGA3/H1 和 pJW4303/H1 疫苗质粒在真核生物细胞中对 H1 表达的水平类似，总结如下：

表 5: HA 质粒的体外表达水平

质粒	相对的 HA 单位	
	上清液	细胞溶解产物
pGA3/H1	0.1±0.1	5.7±0.6
pGA 载体	0.0±0.0	0.2±0.1
pJW4303/H1	0.3±0.05	4.8±0.5
pJW4303	0.0±0.0	0.1±0.1

用 2 μ g 的质粒对人胚胎肾脏 293T 细胞进行瞬时转染, 应用捕获抗原的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 对上清液和细胞溶解产物的 H1 进行测定。捕获的抗体是抗 H1 多克隆兔血清、可检测抗体和多克隆抗 H1 小鼠血清。pGA3/H1 表达的 H1 稍稍多于 pJW4303/H1 的表达 [5.8HA 单位对 5.1H1 单位 (表 6)]。正如所预期的, 90% 的 H1 抗原在细胞溶解产物中。用 pGA3/H1 和 pJW4303/H1 进行的比较免疫的研究揭示出, pGA3/H1 比 pJW4303/H1 有相当的或更好的免疫原性 (图 7)。在 BALB/c 小鼠中测定免疫原性。在此例中使用基因枪给小鼠接种包被有金衣的 DNA 颗粒。小鼠被引发免疫, 用低剂量 (0.1 μ g) 或高剂量 (1 μ g) 的质粒 DNA 加强免疫。在引发免疫后四周给予免疫增强。用 pGA3/H1 免疫接种与用 pJW4303/H1 相比, 在免疫应答中提高的抗 H1 IgG 的量相同或较高 (图 7)。已证实, 在增强免疫应答上, pGA 载体与 pJW4303 载体一样有效或更有效。

实施例 5: 在 pGA 载体中的免疫缺陷病毒疫苗插入片段

表达颗粒病毒的免疫缺陷病毒疫苗插入片段在 pGA1 和 pGA2 得到发展。VLP 插入片段是用分化体 B HIV-1 序列设计的, 这样它与在美国流行的 HIV-1 序列相配。在分化体 B 内不同的分离物显示出簇的多样性, 每个分离物与分化体共有序列有总的类似的多样性 (Subbarao, Schochetman, 1996)。任何分化体 B 分离物都可用做其他分化体 B 分离物的代表序列。HIV-1 分离物用不同的趋化因子受体作为共受体。绝大多数经过传播的病毒用 CCR-5 作共受体 (Berger, E.A., 1997)。因此使用 EnV 将疫苗插入片段设计为具有 CCR-5。通

过 HIV-1 DNA 疫苗表达带有 R5-Env 的 VLP 也具有支持病毒颗粒的 Env 介导的进入到专门的抗原提呈细胞 (APC) 如树突细胞和巨噬细胞中去的优点。树突细胞和巨噬细胞表达由 CCR-5-向性 (R5) HIV-1 Envs 应用的 CD4 受体和 CCR-5 共受体。通过在疫苗中使用 R5 Env, 在被转染的非专门的 APC (例如, 角化细胞或肌肉细胞) 中被表达的 VLP 可通过 Env-介导的进入而得以进入到 APC 的细胞质中。在进入 APC 细胞质之后, VLP 可进行类型 I 组织相容性抗原的加工和提呈。以 DNA 为基础的免疫依赖于用于抗原提呈的专门的 APC (Corr 等人, 1996; Fu 等人, 1997; Iwasaki A 等人, 1997)。许多以 DNA 为基础的免疫是通过直接转染专门的 APC 来完成的 (Condon 等人, 1996; Porgador 等人, 1998)。被转染的肌肉细胞或角化细胞可作为抗原制造厂, 但其不能直接增强免疫应答 (Torres 等人, 1997)。通过用从被转染的角化细胞或肌肉细胞释放和装配的然后又有活性地进入专门的 APC 中的被表达的抗原, 免疫的效率可被增强。

构建 pGA2/JS2 的目标是 (i) 获得高度表达的使用 CCR-5 的分化体 B VLP, (ii) 产生非感染性的 VLP (iii) 将疫苗质粒的大小减到最小。在构建使用 CCR-5-的 VLP (pGA2/JS2) 之后, JS2 的衍生物被制备出来, 它表达 Env-不完全的 VLP。质粒插入片段被标示为 JS5。虽然预期此序列与包含 Env 的 JS2 VLP 相比效用较小, 但不含 Env 的 VLP 提供了某些优势。其包括能监控被接种的群体, 通过监测血清表型转化为 Env 来实现。Env 序列的缺失也减小了疫苗质粒的大小。pGA2/JS2 的 DNA 序列在图 17 中表示, pGA1/JS5 的 DNA 序列在图 18 中表示。

正如在下表中表示的, 为了获得高度表达的 VLP 质粒, 候选疫苗可从 7 种不同的 HIV-1 序列中构建。

表 I: 候选疫苗插入片段的比较

质粒名称	被测序列	质粒生长能力	Gag 的表达	Env 的表达	注释
BH10-VLP	BH10	好	好	好	X4 Env
6A-VLP	BH10-VLP 中的 6A env	差	没测定	没测定	
BAL-VLP	BH10-VLP 中的 BAL env	好	差	差	
ADA-VLP	BH10-VLP 中的 ADA env	好	好	好	被选出用作疫苗, 重新命名为 pGA1/JS1
CDC-A-VLP	BH10-VLP 中的 CDC-A env	好	好	差	
CDC-B-VLP	BH10-VLP 中的 CDC-B env	好	好	好	不如 ADA 那样表达良好
CDC-C-VLP	BH10-VLP 中的 CDC-C env	好	好	好	不如 ADA 那样表达良好

最初的构建体—pBH10-VLP 是从在细菌体内稳定的和在真核生物细胞中高度表达的 IIIb 序列制备的。BH10 序列是从 NIH-赞助的 AIDS 体藏库 (catalog #90) 中获得的。亲本的 pBH10 被用作 PCR 反应的模板构建 pBH10-VLP。

所用引物被设计为能产生一个 Gag-Rt PCR 产物 (5' PCR 产物), 此产物包含从 5'到 3'的 105 bp 的 5'不翻译的前导序列以及从 Gag 起始密码子到 RT 编码序列末端的 gag 和 pol 序列。寡核苷酸引物将 ClaI 位点导入到 PCR 产物的 5'端以及将 EcoRI 和 NheI 位点导入到 PCR 产物的 3'端。正义的引物 1 (5'-GAGCTCTATCGATGCAGGACTCGGCTTGC-3' (SEQ ID NO:) 和反义引物 2 (5'-GGCAGGTTTTAATCGCTAGCCTATGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:) 被用于扩增 5' PCR 产物。

HIV-1 的 env 区域的 PCR 产物 (3' PCR 产物) 包含 vpu、tat、rev 以及 env 序列和对于它们各自的 mRNA 的适当加工和表达所必需的剪接受体位点。一个 EcoRI 位点被导入到此产物的 5'端以及 NheI 和 RsrII 位点被导入到 3'端。正义引物 3 (5'-GGGCAGGAGTGCTAGCC-3' (SEQ ID NO:) 和反义引物 4 (5'-

CCACACTACTTTCGGACCGCTAGCCACCC-3' (SEQ ID NO:) 被用于扩增 3' PCR 产物。

5' PCR 产物在 ClaI 和 NheI 位点被克隆进入 pGA1, 通过序列分析进一步证实了构建体的身份。3' PCR 产物然后被插入到 5'克隆体中的 EcoRI 和 NheI 位点产生了 pBH10-VLP。此 VLP 的构建结果产生缺少 LTR、整合酶、vif 和 vpr 序列的前病毒序列 (见图 8A)。

由于 BH10-VLP 有 X4 而不是 R5 Env, 编码六个不同的 R5 Env 的序列代替了在 BH10-VLP 中的 env 序列。这是通过将包含有来自不同的病毒基因组的 tat、rev、vpu 和 env 编码序列的 EcoRI 至 BamHI 片段克隆进入 pBH10-VLP 的而完成的。得到的 env 和 rev 序列是上述被代替序列和 BH10 序列的嵌合体 (例见图 8B)。在 ADA 被膜的情况下, BamHI 位点被导入到 ADA 序列以使用 EcoRI 到 BamHI 的片段代替 BH10-VLP 中的 EcoRI 到 BamHI 的区域 (图 8)。在表 1 中总结了这些构建的结果。六个被测定序列中的一个即 6A-VLP 被发现与在转化细菌中质粒生长不良有关。此质粒不能在进一步的疫苗发展中使用 (表 1)。

在于细菌中显示生长良好的质粒中, 对 VLP 表达最好的是在 ADA-VLP 被发现的 (表 1)。在 293T 细胞中的瞬时转染中, 与野生型前病毒对 ADA 或 IIIb 的表达相比, ADA-VLP 的表达较高。表达也比以前的 VLP-疫苗 (dpol) 的表达高, 此 VLP-疫苗曾成功地在恒河猴体内引发了细胞毒性 T-细胞应答 (Kent 等人, 1998)。

实施例 6: 安全突变

ADA-VLP 一旦被鉴定为进一步发展疫苗的良好候选者, 这个质粒就要被突变以增加它在人体应用的安全性。进一步的突变使在 NC 的锌指结构无效, 此锌指结构在被病毒衣壳包裹的病毒 RNA 中是有活性的; 增加点突变还使病毒逆转录酶和蛋白酶失去活性 (图 8)。

下表概括总结了安全点突变的位置。

表 2: 在 pGA/JS2 和 pGA/JS5 上的安全点突变的位置, 点突变抑制病毒 RNA 的包装和使逆转录酶在疫苗构建体中失去活性

基因	区域	功能	氨基酸的改变 ¹	位置
Gag	锌指结构	病毒 RNA 包装	C392S	1285/128
Gag	锌指结构	病毒 RNA 包装	C392S	1294/129
Gag	锌指结构	病毒 RNA 包装	C413S	1348/135
Gag	锌指结构	病毒 RNA 包装	C416S	1357/135
Pol	RT	聚合酶的活动	D185N	2460/246
Pol	RT	链传送	W266T	2703/2704/2
Pol	RNaseH	RNase 的活性	E478Q	3339

¹氨基酸编号与在 HIV-1 BH10 序列中的个体基因相一致;

²在野生型 HIV-1 BH10 序列中核苷酸编号

依照生产厂商的操作规程使用定点诱变试剂盒 (Stratagene) 进行突变。所有突变已被序列分析所证实。诱变使用的引物对是:

(A) C15S ZN1

5'-GGTTAAGAGCTTCAATAGCGGCAAAGAAGGGC-3' (SEQ ID NO:)

C15S ZN2 5'-GCCCTTCTTTGCCGCTATTGAAGCTCTTAACC-3'
(SEQ ID NO:)

(B) C36S ZN3 5'-GGGCAGCTGGAAAAGCGGAAAGGAAGG-3'
(SEQ ID NO:)

C36S ZN4 5'-CCTTCCTTTCCGCTTTTCCAGCTGCCC-3' (SEQ ID NO:)

(C) D185N RT1

5'-
CCAGACATAGTTATCTATCAATACATGAACGATTTGTATGTA
GG-3' (SEQ ID NO:)

D185N RT2

5'-

CCTACATACAAATAGTTCATGTATTGATAGATAACTATGTCT

GG-3' (SEQ ID NO:)

(D) W266T RT3

5'-GGGGAAATTGAATACCGCAAGTCAGATTTACCC-3'(SEQ ID NO:)

W266T RT4 5'-GGGTAAACTGACTTGCGGTATTCAATTTCCCC-3' (SEQ ID NO:)

(E) E478Q RT5

5'-

CCCTAACTAACACAACAAATCAGAAAACCTCAGTTACAAGC-3'

(SEQ ID NO:)

E478Q RT6

5'-GCTTGTAACCTGAGTTTTCTGATTTGTTGTGTTAGTTAGGG-3' (SEQ ID NO:)

(F) D25A Prt1

5'-GGCAACTAAAGGAAGCTCTATTAGCCACAGGAGC-3' (SEQ ID NO:)

D25A

prt2

5'-

GCTCCTGTGGCTAATAGAGCTTCCTTTAGTTGCC-3' (SEQ ID NO:)

人们发现有锌指结构和 RT 突变的 ADA-VLP 对 Gag 和 Env 的表达比没有突变的 VLP 质粒更有效 (图 10)。使蛋白酶基因失去活性的突变明显降低了 VLP 的表达 (图 10)，其未被选入用作疫苗质粒的进一步发展。没有突变的 ADA-VLP 被标示为 JS1，带有突变的 ADA-VLP 被标示为 JS2。

实施例 7: JS5 疫苗插入片段的构建

JS5 插入片段是表达 Gag、RT、Tat 和 Rev 的质粒，其是通过缺失在 ADA Env 中的 Bg1II 片段由 JS2 构建的(图 8)。此缺失从 pGA2/JS2 序列中除去了核苷酸 4906-5486，其结果在 env 基因产生了早生的终止密码子，这导致在 Env 的 854 个氨基酸当中的 269 个被表达同时完

整留下编码 RRE 区域的 tat、rev 和 vpu 和剪接受体位点。在图 18 表示出 pGA1/JS5 的 DNA 序列。

实施例 8: JS2 和 JS5 疫苗质粒体积的最小化

JS2 和 JS5 疫苗插入片段最初是在 pGA1 构建的, pGA1 是一在疫苗插入片段的上游包含 CMVIE 启动子的~1kb 内含子 A 的载体。为测定此内含子对于疫苗的高水平表达是否必需, 构建了缺少内含子 A 的 pGA2 载体来表达 JS2 和 JS5 疫苗插入片段。在表达测试中证明了 pGA2 有着与 pGA1 一样好的对 JS2 的表达模式 (图 11)。与此结果对照, pGA1 对 JS5 的表达比 pGA2 有更大效力 (图 11)。对于 JS5 插入片段, 没有内含子 A 比有内含子 A 的表达水平低 2-3 倍。

实施例 9: 对在疫苗插入片段 JS2 和 JS5 中的安全突变效率的测试

在 RT (表 2) 的三个点突变完全消除了对 JS2 和 JS5 的逆转录酶活性的可测查水平。在逆转录产物被 PCR 扩增的情况下, 应用高度敏感的逆转录酶测定 (Yamamoto, Folks, Heneine, 1996)。此测定可测查象 10 个那样少的病毒颗粒中的逆转录酶。逆转录酶的测定可在瞬时转染细胞的培养物上清液进行。在 JS1 疫苗中对于 10 个那样少的颗粒 (p24 的 4×10^{-3} pg) 也容易测查出逆转录酶的活性, 但是对于 JS2 或 JS5 插入片段就不能测查出来。

在 JS2 和 JS5 疫苗插入片段中的缺失和锌指结构突变 (表 2) 减少颗粒中病毒 RNA 水平至少 1000 倍。从瞬时转染细胞上清液形成的颗粒被用来测定其病毒 RNA 的包装效率。用 DNase 处理 VLP, 提取 RNA 并在 RT PCR 之前以 p24 水平标准检验 RNA 的量。在 RT PCR 反应之后用对病毒序列的专门引物进行嵌套式 PCR。VLP RNA 的终点稀释度与从在野生型 HIV-1 Bal 病毒中包装的 RNA 获得的信号进行比较。

对 JS2 和 JS5 的包装被在质粒中的缺失限制达 500-1000 倍, 概括

如下：

表 3：在 pGA2/JS2 和 pGA1/JS5 VLP 中，病毒 RNA 的包装被减少

疫苗构建体	缺失/突变	与野生型 HIV-1 b 相关的 vRNA 拷贝
HIV-1 bal	Wt	1
pGA1/JS1 VLP	缺失 LTR、int、vif、vpr、nef	.002
pGA1/JS2 VLP	缺失 LTR、int、vif、vpr、nef；在锌指结构和 RT 的突变	.0001
pGA1/JS4 VLP	缺失 LTR、int、vif、vpr、nef	.001
pGA1/JS5 VLP	缺失 LTR、int、vif、vpr、nef、env；在锌指结构和 RT 的突变	.001

锌指结构的突变将对 JS2 颗粒的包装效率降低 20 倍，但是不进一步影响对 JS5 颗粒的包装效率。对独立转染产生的颗粒可再现性地以这种模式包装。

实施例 10：蛋白质表达的蛋白质印迹分析

在图 12A-D 中表示的蛋白质印迹分析揭示了预期的 pGA2/JS2 和 pGA1/JS5 的表达模式。在细胞溶解产物中都可观察到未成熟的和已成熟的蛋白质，而仅仅 Gag 和 Env 的成熟形态可以在包含 VLP 的溶解产物中发现（图 12B 和 12C）。在细胞溶解产物中很容易探测出逆转录酶（图 12D）。

实施例 11：pGA2/89.6 SHIV 载体构建

最初的免疫原性实验是用表达 SHIV 的 VLP 来进行的，而不是用表达 HIV-1 的疫苗质粒。SHIV 是猿和人免疫原性病毒序列的杂合体，它在恒河猴体内生长很好（Li 等人，1992）。通过用 SHIV，可测定至少部分来源于 HIV-1 的疫苗在恒河猴模型中的效能。

pGA2/89.6（也标示为 pGA2/M2）表达来自于 SHIV-89.6 的序列（Reimann、Li、Veazey 等人，1996）。89.6 Env 代表一个患者的分离物（Collman 等人，1992）。作为 SHIV-89.6 的高度病原性毒株，被定名为 SHIV-89.6P 病毒（Reimann、Li、Voss 等人，1996；Reimann、Li、Veazey 等人，1996），SHIV-89.6P 能使疫苗效能快速测定。可通过直肠和静脉内途径给予 SHIV-89.6P 的攻击。SHIV-89.6 和 SHIV-89.6P 不能产生交叉中和抗体。

pGA2/89.6（图 13）有许多 pGA2/JS2 的设计特征。二者都能表达免疫缺陷病毒 VLP：由 pGA2/89.6 表达的 VLP 是 SHIV VLP，而 pGA2/JS2 则为 HIV-1 VLP。在 pGA2/89.6 中的 gag-pol 序列来自于 SIV239，而 tat、rev 和 env 序列来自于 HIV-1-89.6。pGA2/89.6 与 pGA2/JS2 的不同也在于，整合酶、vif 和 vpr 序列没有缺失以及逆转录酶基因没有通过点突变失去活性。最后，在 NC 的锌指结构由于缺失而不是由于点突变才失去活性。

pGA1/Gag-Pol 的构建也使得 Gag-Pol 表达载体和 Gag-Pol-Env 表达性 pGA2/89.6 的保护效能可被评估。此载体是由 pGA1/JS5 和 pGA2/89.6 构建的（图 13）。

实施例 12：pGA2/89.6 SHIV 质粒的表达与 pGA2/JS2 表达的比较

pGA2/89.6 和 pGA1/Gag-Pol 表达 Gag 的水平与 pGA2/JS2 类似。对表达的比较研究在瞬时转染的 293T 细胞上进行。对瞬时转染细胞的溶胞产物和上清液的分析揭示，两种质粒对壳体抗原的表达水平类似（图 14）。用针对 HIV-1p24 和 SIVp27 的商用抗原捕获 ELISA 试剂盒对壳体蛋白质定量。

实施例 13：pGA2/89.6 SHIV 疫苗的实验方案

恒河猴被用于调查系统 DNA 引发免疫然后用重组体 MVA（rMVA）加强免疫对抗用 SHIV-89.6 P 攻击珠对粘膜攻击的保护能力

(Amara 等人, 2001)。

疫苗 (pGA2/89.6) 的 DNA 成分是如实施例 11 所描述的那样制成的, 其应用免疫缺陷病毒的亚基因组剪接机制从单个转录本表达了八个免疫缺陷病毒蛋白 (SIV、Gag、Pol、Vif、Vpx、Vpr 与 HIV Env、Tat 和 Rev)。r MVA 加强免疫剂 (89.6-MVA) 是由 Dr. Bernard Moss (NIH) 提供的, 在疫苗病毒早/迟启动子的控制下其表达 HIV89.6 Env 和 SIV239 Gag-Pol, 并分别插入到 MVA 的缺失 II 和缺失 III 内 (Wyatt 和 Moss, 未发表的结果)。89.6 Env 蛋白质被截断为 gp41 的 C-末端 115 氨基酸。经修饰的 H5 启动子控制两个外来基因的表达。

接种试验比较了 DNA 疫苗的皮内和肌肉内的施用, 也比较了基因佐剂的效力; 表达恒河猴 GM-CSF 的质粒增强了疫苗插入片段引发的免疫应答。在 0 和 8 周用 DNA 引发以及在第 24 周用 rMVA 加强免疫而完成了接种。为了进行表达 GM-CSF 质粒的共传递, 用包含 2.5mg 的 pGA2/89.6 和 2.5mg/ml 的 pGM-CSF 的溶液进行 1-100 μ l 的皮内接种。

以两种剂量 (2.5mg 和 250 μ g 的 DNA) 比较通过皮内的和肌肉内的对 DNA 的传递。通过皮内或肌肉内途径用无针喷射注射器 (Bioject, Portland OR), 六只恒河猴为一组的四个疫苗组由 2.5mg (高剂量) 或 250 μ g (低剂量) 的 DNA 引发。通过用针在皮内和肌肉内注射进行 89.6-MVA 加强免疫接种 (2×10^8 pfu)。对照组包括两个模拟免疫接种的动物和两个首次用来做实验的动物。接种的方案概括如下:

表 4: 接种试验

组别(# 恒河猴)	在 0-8 周引发	免疫原	在第 24 周加 强免疫接种	免疫原
1 (6)	i.d.无针喷射注射	2.5mg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
2 (6)	i.m.无针喷射注射	2.5mg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
3 (6)	i.d.无针喷射注射	250µg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
4 (6)	i.m.无针喷射注射	250µg VLP DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
5 (6)	i.d.无针喷射注射	2.5mg gag-pol DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol
6 (6)	i.d.无针喷射注射	250µg gag-pol DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol
7 (6)	i.d.无针喷射注射	250µg VLP DNA+250µg GM-CSF DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
8 (5)	i.d.无针喷射注射 i.d.+i.m. 对照 MVA	2.5mg 对照 DNA 对照 MVA	i.d.+i.m.	对照 MVA
9 (4)	i.d.无针喷射注射	250µg 对照 DNA+250µg GM-CSF DNA	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env
10 (6)	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env	i.d.+i.m.	MVA gag-pol-env

除了 Nef 被截断的 LTR、2nd ZN++ 锌指结构和被突变表达细胞表面 Env, VLP DNA 表达所有 SHIV-89.6 蛋白质; gag-pol DNA 表达 SIV mac 239 gag-pol; MVA gag-pol-env 表达 89.6 被截断的 env 和 SIV mac 239 gag-pol; MVA gag-pol 表达 SIV mac 239 gag-pol; MVA 剂量是 1×10^8 pfu。

在用 rMVA 加强免疫后七个月, 动物被攻击以测试是否疫苗产生了长期的免疫性。因为大部分 HIV-1 感染是通过粘膜表面传导的, 直肠内攻击用以测试是否疫苗能控制粘膜免疫缺陷病毒的攻击。简言之, 攻击(病毒 RNA 的 5.7×10^9 拷贝/ml) 是通过一次 i.v., 随后对经过初次 SHIV-89.6 P 攻击的恒河猴直肠内攻击进行的。淋巴细胞是从高峰时期的病毒血症感染动物直肠中取得的, 排除 CD8 的和用分裂素刺激生产的。在进行直肠内攻击之前, 将禁食动物麻醉(盐酸氯胺酮, 10mg/kg), 然后将其胃朝下骨盆区域稍稍抬高放置。将喂食管[8Fr (2.7mm) × 16 英寸 (41cm), Sherwood Medical, St. Louis, MO]插

入到直肠 15-20cm 的距离。插入喂食管后，将注射器[其中装有在 2ml RPMI-1640 加 10%胎牛血清（FBS）中的 20 倍直肠感染剂量]系在喂食管上，接种物缓缓注入到直肠内。在传递了接种物之后，用没有胎牛血清的 3.0ml RPMI 冲洗喂食管，然后慢慢将其拔出。在接种后 10 分钟内将骨盆区域缓缓抬起，再将动物挪开。

实施例 14: 疫苗增强的 T-细胞应答

在 DNA 引发后再用 rMVA 加强免疫产生了高频率的对病毒的专一性 T 细胞，如图 15 所示，其在使用 rMVA 加强免疫后一周达到高峰。用 Mamu-A*01-四聚体测定识别 Gag-CM9 抗原决定簇的 T 细胞频率；用重叠 Gag 和 Env 肽和酶联免疫点（ELISPOT）测定识别全部 Gag 和 Env 抗原决定簇的 T 细胞频率。

对于四聚体的分析，大约 1×10^6 PBMC 是抗体进行了表面染色，这些抗体是分别与 FITC、PerCP 和 APC 结合的抗 CD3（FN-18, Biosource International, Camarillo, CA）、抗 CD8（SK1, Becton Dickinson, San Jose, CA）和抗 Gag-CM9（CTPYDINQM）-Mamu-A*01 四聚体的抗体（染色容积 100 μ l，温度 8-10 $^{\circ}$ C，30 分钟）。用冷的包含 2% FBS 的 PBS 冲洗细胞两次，用在 PBS 中的 1%多聚甲醛对其固定，在 24 小时内以 FACScaliber（Becton Dickinson, San Jose, CA）获得分析结果。用前扩散器和侧扩散器使细胞最初分离出淋巴细胞群，然后再分离出 CD3 细胞。然后分析 CD3 细胞以找出 CD8 和四聚体结合细胞。每个样本大约获得 150000 淋巴细胞。用 FloJo 软件对数据进行分析（Tree Star, Inc. San Carlos, CA）。

对于 IFN- γ ELISPOT，于 8-10 $^{\circ}$ C 下，以碳酸氢钠缓冲液（pH9.6）中浓度为 2 μ g/ml 的抗人 IFN- γ 抗体（Clone B27, Pharmingen, San Diego, CA）对 MULTISCREEN 96 孔过滤板（Millipore Inc. Bedford, MA）包被过夜。用 RPMI 培养液冲洗过滤板两次，然后用完全培养基（包含 10% FBS 的 RPMI）在 37 $^{\circ}$ C 下封闭一小时。用纯 RPMI 培养

液冲洗过滤板五次以上，细胞被接种于 100 μ l 完全培养基上，其数目从每孔 2×10^4 到每孔 5×10^5 个细胞，每板设一重复。将肽库加入到每个孔使最终浓度为在 100 μ l 容积的完全培养基中每肽 2 μ g/ml。在 37 $^{\circ}$ C 与 5% CO₂ 条件下细胞被培养 36 小时。用冲洗缓冲液（含 0.05% Tween-20 的 PBS）冲洗过滤板六次，然后将其与用包含 2% FBS 冲洗缓冲液稀释的每毫升 1 μ g 的生物素化的抗人 IFN- γ 抗体（clone 7-86-1, Diapharma Group Inc., West Chester, OH）一起保温。在 37 $^{\circ}$ C 下板被保温 2 小时，后用冲洗缓冲液冲洗六次。在每个孔中加入亲合素-HRP（Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA）并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 30-60 分钟。将板用冲洗缓冲液冲洗六次，用稳定的 DAB 作为底物使样点扩展（Research Genetics Inc, Huntsville, AL）。用立体解剖显微镜对样点计数。在每个分析中包括作为对照的卵清白蛋白肽（SIINFEKL）。卵清白蛋白肽的本底样点一般每 5×10^5 PBMC 小于 5。当用 1×10^6 PBMC 标准化时本底小于 10。只有两次本底的 ELISPOT 计数（ ≥ 20 ）才被认为是有效的。因为在没有饲养细胞的情况下（34）细胞的不同稀释有不同的样点形成效率，ELISPOT 的频率是大约数。细胞的相同稀释被用于给定时间点的所有动物，但是不同的稀释被用于探测记忆和高峰期的效应应答。

简单的线形回归被用于估计加强免疫后和攻击后 ELISPOT 应答之间，记忆和攻击后 ELISPOT 应答之间和对数病毒负载和接种组内 ELISPOT 频率之间的相关性。用对数病毒负载和对数 ELISPOT 应答，通过 2-样本 t-检验进行疫苗组和对照组之间的比较。用 2-样本 t-检验，进行了 A*01 和无 A*01 恒河猴之间的 ELISPOT 或对数病毒负载的比较。根据高峰期 DNA/MVA ELISPOT，记忆 DNA/MVA ELISPOT，和对数转化的 Gag 抗体数据，用双因素方差分析的方法检测所给予剂量和途径的效力。

Gag-CM9 四聚体分析仅限于恒河猴，它表达 Mamu-A*01 组织相容性类型，而 ELISPOT 应答不依赖专一性的组织相容性类型。T 细胞

随时间的变化的测定用作记录 T 细胞应答的急性状态（效应细胞高峰）和长期（记忆）状态（图 15A）。正如所预期的，DNA 免疫接种产生了低水平的记忆细胞，其在用 rMVA 加强免疫后一周内增加为高频率（图 15）。在 Mamu-A*01 恒河猴中，对 Gag-CM9 抗原决定簇的专一性细胞增加到高达 CD8 T 细胞总数的 19%的比率（见图 15B 动物 2）。专一性细胞的峰值经过一次>10 倍的收缩变成 DNA/MVA 记忆库（图 15A 和 B）。在收缩成 DNA/MVA 记忆应答之前，三个 Gag 肽库的 ELISPOT 也经过大量的膨胀（频率达到每 1×10^6 PBMC 为 4000 点）（图 15C）。在有和没有 A*01 的组织相容性类型的恒河猴体中 ELISPOT 的频率是相同的（ $p > 0.2$ ）。在疫苗应答的高峰和记忆状态在不同疫苗组的 ELISPOT 高度的排列顺序是 2.5mg i.d. >2.5mg i.m. >250 μ g i.d. >250 μ g i.m.（图 15C）。IFN- γ ELISPOT 包括 CD4 和 CD8 细胞（工作在进行中）。在用肽再刺激之后，Gag-CM9-专一性 CD8 细胞具有良好的溶胞活性（没有显示数据）。

给人印象深刻的是，在动物远系交配的种群中所有 Gag 和 Env 肽均刺激 IFN- γ ELISPOT 反应（图 16A）。在用 rMVA 加强免疫后 25 周，疫苗免疫产生的 T 细胞处于记忆中时，对细胞应答的宽度进行测试。七个 Gag 肽库中的 7 个和 21 个 Env 肽库中的 16 个可被被接种动物体中的 T 细胞识别。5 个 Env 库不被识别，其中 2 个于美国疾病控制中心在恒河猴 DNA/MVA 疫苗试验中被识别（未显示数据）。其余的三个（19-21 库）在我们的免疫原中被截断（Amara 等人，2001，已提供），其作为阴性对照。Gag 和 Env ELISPOT 在 DNA/MVA 记忆应答中全都具有类似的频率（图 16B）。应答的最大的宽度是在高剂量 i.d. DNA 引发免疫的动物中，在那里平均 10 个肽库（4.5 Gag 和 5.3 Env）被识别。疫苗组的应答宽度排列顺序与 DNA/MVA 应答高度排列顺序相同：2.5mg i.d. >2.5mg i.m. >250 μ g i.d. >250 μ g i.m.（图 16B）。

实施例 15: AIDS 的攻击和对抗保护

在用 rMVA 加强免疫后当疫苗免疫产生的 T 细胞已记忆时，通过直肠给予高病原性 SHIV-89.6P 攻击（图 15）。

SHIV 拷贝数目的测定：用 QIAamp 病毒 RNA 试剂盒（Qiagen）直接提取 150 μ l ACD 抗凝血血浆中的病毒 RNA，将其在 60 μ l AVE 缓冲液中洗脱，在 -80 $^{\circ}$ C 下冰冻直到对 SHIV RNA 进行定量。在包含有 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3, 4mM MgCl₂, 1mM 各 dNTP, 2.5 μ M 随机六聚物, 20 单位 MultiScribe RT 和 8 单位 RNA 酶抑制剂的 20 μ l 的体积中，将 5 μ l 提纯的血浆 RNA 逆转录。反应在 25 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟，然后在 42 $^{\circ}$ C 保温 20 分钟 99 $^{\circ}$ C 下将逆转录酶去活性 5 分钟。将反应混合物最后调节到 50 μ l 容积，其中包含 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3, 4mM MgCl₂, 0.4mM 各 dNTP, 0.2 μ M 正向引物, 0.2 μ M 反向引物, 0.1 μ M 探针和 5 单位 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶（所有试剂来源于 Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA）。在 SIV gag 基因的保守区内的引物序列与以前描述的相同（Staprans, S, 等人, 1996）。

将 Perkin Elmer Applied Biosystems 7700 型序列探测器与 PCR 程序一起应用：95 $^{\circ}$ C 下 10 分钟，然后在 93 $^{\circ}$ C 下 30 秒，59.5 $^{\circ}$ C 下 1 分钟，40 个循环。用 7700 序列探测器和针对内部保守的 gag 基因序列的探针检测 PCR 产物，在此处 FAM 和 Tamra 表示报告和猝灭染料。SHIV RNA 拷贝数目是通过由病毒体衍生的用 SIV bDNA 方法定量的 SIVmac239 RNA 组成的外部标准曲线的比较来测定的（Bayer Diagnostics, Emeryville, CA）。所有样品的提取和扩增都设有重复实验，用平均结果报告的。血浆输入量为 0.15ml，测定的敏感性为每毫升血浆 10³ 拷贝 RNA，线性动力学范围是 10³ 到 10⁸ RNA 拷贝（R²=0.995）。对每毫升包含大于 10⁴ SHIV RNA 拷贝的样本，内测定变异系数小于 20%；对每毫升包含 10³-10⁴ SHIV RNA 拷贝的样本则小于 25%。为了更准确地对在接种 16 和 20 周的动物中低 SHIV RNA 拷贝数目定量，可以进行下列调整以增加 SHIV RNA 测定敏感性：1)

用离心方法（23000g，10℃，150 分钟）将来源于小于或等于 1 毫升的血浆的病毒颗粒浓缩，提取病毒 RNA；2）应用一步 RT-PCR 方法。通过与相同的 SIVmac239 标准比较，SHIV RNA 拷贝的绝对数被测定。这些改变提供了每毫升 300 SHIV RNA 拷贝的可靠定量限度并给出了 SHIV RNA 值，其与通过应用第一种方法获得的值高度相关（ $r=0.91$ ， $p<0.0001$ ）。

攻击结果：攻击感染了所有被接种的和对照组动物。但是，在攻击后两周疫苗组（几何平均数 1×10^7 到 5×10^7 ）比对照组动物（几何平均数 4×10^8 ）的血浆病毒 RNA 的效价至少低 10 倍（图 19A）。在攻击后 8 周高剂量 DNA 引发组和低剂量 i.d. DNA 引发组几何平均数负载减少到大约每毫升 1000 病毒 RNA 拷贝。在这时低剂量 i.m. DNA 引发组的几何平均数为 6×10^3 病毒 RNA 拷贝，没接种的对照组几何平均数为 2×10^6 。在攻击后 20 周即使低剂量的 i.m. 组的平均数也减少到了 1000 病毒 RNA 拷贝。在这时，未接种的对照组死于艾滋病。在 24 个被接种动物中仅有一个动物（低剂量 i.m. 组）出现间歇性的病毒负载达每毫升 1×10^4 拷贝以上（图 19D）。

病毒负载的迅速减少保护被接种的恒河猴避免 CD4 细胞的损失和艾滋病的迅速发作（图 19B、19C、19E）。攻击后 5 周所有未接种的对照组经受了 CD4 细胞的大量损耗，这是 SHIV-89.6P 感染的特征（图 19B）。除了动物 22（见上面）经受 CD4 的缓慢下降外，所有被接种动物都保持了它们的 CD4 细胞（图 19E）。在攻击后 23 周，四个对照动物中的三个死于艾滋病（图 19C）。这些动物不同程度上患有伴有腹泻的小肠结肠炎、隐孢子虫病、大肠杆菌性膀胱炎、小肠弯曲菌感染、淋巴结病和与 SIV 相关的巨细胞肺炎。与此对照的是，所有 24 个被接种动物都保持健康。

细胞内细胞因子的测定：大约 1×10^6 PBMC 在 37℃ 下被刺激一小时，其置于 5ml 聚丙烯试管中，其中有在体积为 100 μ l 的 RPMI 中

的每毫升 100 μ g 的 Gag-CM9 肽 (CTPYDINQM)，并包含 0.1% BSA 和抗人 CD28 和抗人 CD49d (Pharmingen, Inc. San Diego, CA) 共刺激抗体 (1 μ g/ml)。加入包含 10% FBS 和莫能菌素 (10 μ g/ml) 的 900 μ l RPMI，细胞于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 下，于 5 $^{\circ}$ 角被再培养 5 小时。在 8-10 $^{\circ}$ C 下用偶联于 PerCP (clone SK1, Becton Dickinson) 的抗 CD8 的抗体对细胞表面染色 30 分钟，用包含 2% FBS 的冷 PBS 冲洗两次，用 Cytotfix/Cytoperm (Pharmingen, Inc.) 溶液固定和透化。然后将细胞与分别连接于 FITC 和 PE 的抗人 CD3 (clone FN-18, Biosource International, Camarillo, CA) 和抗 IFN- γ (Clone B27, Pharmingen) 的抗体一起置于 Perm 冲洗液 (Pharmingen) 于 4 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。将细胞用 Perm 冲洗两次，用纯 PBS 冲洗一次，并重悬浮于 PBS 中的 1% 多聚甲醛中。用 FACS caliber 获得大约 150000 个淋巴细胞，用 FloJo 软件分析。

增殖测定：用适当抗原刺激大约 20 万 PBMC，一式三份，于 37 $^{\circ}$ C，在 5% CO₂ 下，于 200 μ l 的包含 10% FCS 的 RPMI 中 5 天。来自于由表达 SHIV-89.6 Gag 和 Pol 或表达 SHIV-89.6 Gag、Pol 和 Env 的 DNA 转染的 293T 细胞的悬浮液被直接用作抗原。来自于模拟 DNA (仅为载体) 转染细胞的悬浮液被用作阴性对照。在第 6 天，每孔用 1 μ Ci 的氚标记胸苷脉冲细胞 16-20 小时。用自动细胞采集器 (TOMTEC, Harvester 96, Model 1010, Hamden, CT) 采集细胞，再用 Wallac 1450 MICROBETA 闪烁计数器 (Gaithersburg, MD) 计数。刺激指数是掺入到受 89.6 抗原刺激的 PBMC 的氚标记胸苷的计数除以掺入到受模拟抗原刺激的同样 PBMC 的氚标记胸苷的计数。

攻击后 T 细胞结果：病毒攻击的抑制与抗病毒的 T 细胞发生有关 (图 15; 图 20A)。攻击后一周外周血的四聚体+细胞的频率降低，有可能反映出对感染位点的专一性 T 细胞得到补充 (图 20A)。但是，在攻击后两周外周血的细胞迅速扩增，其频率同用 MVA 加强免疫后一样高甚至更高 (图 15, 20A)。大多数四聚体+细胞产生了 IFN- γ

以应答用肽 Gag-CM9 的 6 小时的刺激 (图 20B)，它们没有有时在慢性病毒感染中观察到的“被震晕”的 IFN- γ 负表型。攻击后 T 细胞的发生伴随着病毒负载的下降。攻击后 12 周呈现的病毒专一性 T 细胞约为它们高峰时的十分之一 (图 15A、20A 以及未表示的数据)。DNA/MVA 诱导的 ELISPOT 峰值的高度预示了如用 ELISPOT ($r=+0.79$, $P<0.0001$) 测量的一样的攻击后 T 细胞应答的高度。与在被接种动物中强有力的次级应答相对照，在首次用来作实验的动物中，只是初级应答有了少量增长 (图 15B、15C 和 20A)。四聚体+细胞的峰值比所有 CD8 细胞的 1% 还少 (图 20A)，产生 IFN- γ 的 T 细胞呈现出大约 300 的平均频率，而在被接种组中呈现出 1000 到 6000 的高得多的频率 (图 15C) ($P<0.05$)。在用 Gag-CM9 肽刺激后，对照组的大部份细胞产生 IFN- γ ，这与被接种组的相同 (图 20B)。在攻击后 12 周，4 个对照动物中的三个已测查不出产生 IFN- γ 的 T 细胞 (数据未表示)。在存在高病毒负载的情况下，抗病毒的 CD8 细胞的迅速丢失可反映出缺少 CD4 的帮助。

T 细胞增殖性应答显示，病毒专一性 CD4 细胞在攻击后存活下来，并能够支持抗病毒免疫应答 (图 20C)。在攻击后 12 周，Gag-Pol-Env 或 Gag-Pol 蛋白的平均刺激指数在被接种组为从 35 到 14，但在对照组是探测不出的。与增殖测定一致，细胞内细胞因子测定也显示，在被接种动物有病毒专一性 CD4 细胞但在对照组没有 (未显示数据)。增殖性应答量在所有被接种疫苗组的排列顺序是：2.5mg i.d. >2.5mg i.m. >250 μ g i.d. >250 μ g i.m.

淋巴结的保持：在攻击后 12 周，被接种动物的淋巴结在形态上是完整的，其对感染是有应答的；而被感染的对照动物的淋巴结功能已被破坏 (图 5)。被接种动物的淋巴结包含大量反应性次级囊泡，膨大的生发中心和分散的暗带与亮带 (图 5A)。与此对照，未被接种的对照动物的淋巴结显示囊泡和副皮质的缺失 (图 5B)，而未被接种也未受攻击的动物的淋巴结显示了最低限度反应性生发中心的正常

数目（图 5C）。在感染的对照动物中，生发中心占据的淋巴结区域小于 0.05%，在未感染的动物中占据 2%，在被接种动物组中可高达 18%（图 5D）。被生发中心占据的淋巴结区域在接受低剂量 DNA 引发的动物中比接受高剂量引发的动物高两倍，这一点提示在低剂量动物中有更强有力的免疫反应性（图 5D）。在攻击后 12 周，在 24 个被接种的恒河猴中有 3 个其淋巴结中，病毒 RNA 原位杂交发现少量的病毒表达细胞，而在每一个被感染对照动物的淋巴结中都很容易检测出病毒表达细胞（图 5E）。在 CD4 T 细胞大量损耗的对照组中，被感染淋巴结细胞的细胞形态学与巨噬细胞的表型是一致的（未表示数据）。

抗体随时间的应答：总的抗 Gag 抗体的 ELISA 采用细菌产生的 SIV gag p27 来包被孔（于碳酸氢盐缓冲液中， $2\mu\text{g/ml}$ ）。抗 Env 抗体的 ELISA 采用瞬时转染的 293T 细胞产生的 89.6 Env，其可用抗 Env 绵羊抗体捕获（产品目录号：6205；International Enzymes, Fairbrook CA）。采用 SHIV-89.6 感染的恒河猴的血清和已知量的抗 Gag 和抗 Env 免疫球蛋白，产生了 Gag 和 Env 的 ELISA 标准曲线。用山羊抗恒河猴 IgG-PO（产品编号# YNGMOIGGFCP, Accurate Chemical, Westbury, NY）和 TMB 底物（产品编号 # T3405, Sigma, St. Louis, MO）可测查结合的抗体。在一式两份的孔中血清被 3 倍稀释，测定。在乳清缓冲液（4% 乳清和 0.1% Tween20 于 1X PBS 中）中将测试的血清进行稀释。封闭缓冲液由乳清缓冲液加 0.5% 无脂肪干奶组成。用 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 使反应停止，光密度读数在 450nm。用 SOFTmax 2.3 软件（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）绘出标准曲线，以每毫升血清的抗体量（ μg ）作为样本浓度插入图中。

结果显示，引发/加强免疫的方法产生了低水平的抗 Gag 抗体和几乎检测不到的抗 Env 抗体的水平（图 22）。但是在攻击后对 Env 和 Gag 的抗体经过了回忆应答，Gag 抗体总量达到接近每毫升 1mg，Env 抗体总量高达每毫升 $100\mu\text{g}$ （图 22A 和 B）。

攻击后两周，在高剂量 DNA 引发免疫组，对 89.6 免疫原的中和抗体显示为（几何平均效价在 i.d.组为 352，在 i.m.组为 303）（图 22C）出现，而 SHIV-89.6P 攻击组没有出现。攻击后 5 周对 89.6P 的中和抗体产生了（在高剂量 i.d.组几何平均效价为 200，在高剂量 i.m.组为 126）（图 22D），对 89.6 的中和抗体开始下降。这样，抗 89.6 的抗体应答的引发没有阻碍导致抗 SHIV-89.6P 的中和抗体的 B 细胞应答。在攻击后 16 到 20 周，抗 Gag 和 Env 的抗体在大多数动物中下降了（图 22A 和 B）。这和对病毒感染的对照是一致的。

与保护相关的 T 细胞。在攻击后两周和三周血浆病毒 RNA 水平与攻击前 DNA/MVA-产生的 IFN- γ ELISPOT 的峰频率负相关（分别为 $r=-0.53$ ， $P=0.008$ 和 $r=-0.70$ ， $P=0.0002$ ）（图 23A）。

重要的是，这些相关性是在免疫应答正有效减少病毒血症水平的时候观察到的。在攻击后的较后时间，在检测水平或之下的病毒负载组排除了相关性。也寻找了在病毒负载与攻击后的 ELISPOT、增殖性应答和中和性抗体应答之间的相关性。在攻击后两周，IFN- γ ELISPOT 水平与攻击后三周的病毒负载相关（ $r=-0.51$ ， $P=0.009$ ）（数据未表示）。攻击后的增殖性和中和性抗体应答与病毒负载无关。

剂量和途径：对于细胞和体液应答 DNA 的剂量有显著影响（ $P<0.05$ ），而 DNA 的施途径仅对体液应答有显著影响（图 23C-E）。在产生抗 Gag 抗体方面，DNA 的皮内传递途径比肌肉内传递途径的效果大约强 10 倍（ $P=0.02$ ）（图 23E）。在我们所给的数据中，i.d. DNA 注射在引发病毒专一性 T 细胞的高度和宽度上大约有效 3 倍多（图 23C 和 D）。但这些不同并不显著（高度， $P=0.2$ ；宽度， $P=0.08$ ）。有趣的是，DNA 的途径和剂量对保护水平无重要影响。在攻击后 20 周，高剂量 DNA 引发的动物（ 7×10^2 和 5×10^2 ）比低剂量 DNA 引发的动物的病毒 RNA（ 9×10^2 和 1×10^3 ）的几何平均水平稍低。有最高间歇

性病毒负载的动物（恒河猴 22）是在低剂量 i.m.引发组（图 19D）。这样，缓慢控制病毒血症的低剂量 i.m.引发组（图 19A）可能有较差的长期保护。应答的宽度对抑制病毒负载没有立即的影响，但随着时间，也可能影响到病毒逃避的频率。

这些结果清楚地显示，多蛋白 DNA/MVA 疫苗可以增强记忆免疫应答，其能控制高毒性粘膜免疫缺陷病毒攻击。其对病毒控制的优良水平比迄今为止仅用 DNA 或 rMVA 疫苗(Egan 等人, 2000; I.Ourmanov 等人, 2000) 达到的水平要更高, 这也与用白细胞介素-2 辅助的 DNA 免疫 (Barouch 等人, 2000) 所获得的水平不相上下。所有这些以前的研究都用到三次以上疫苗的接种, 没有应用粘膜攻击并且大部分是在高峰期效应物应答时进行攻击, 而没考虑到如我们的研究中所做的那样延长接种后的测试时期以测定长期效用。我们的结果也第一次证明, 如用 IFN- γ ELISPOT 所度量的, 疫苗免疫产生的 T 细胞与控制病毒血症相关。现在这个比较简单的测定可应用于 HIV-1 的 DNA 和 MVA 免疫原临床前期的评估, 也能用于作为人类临床试验功效的标记。

DNA/MVA 疫苗不能预防感染。然而疫苗迅速地减少病毒负载到接近每毫升血液有 1000 个病毒 RNA 拷贝或在其以下, 因而控制了感染。抑制而非预防感染使病毒有机会建立慢性感染(Chun 等人, 1998)。然而通过迅速减少病毒负载, 多蛋白 DNA/MVA 疫苗可长期抑制病毒感染的进展并限制 HIV 传染。

实施例 16: Gag-Pol 疫苗试验

用表达 Gag-Pol 而非 Gag-Pol-Env 的免疫原对在疫苗中包含 Env 的重要性进行测定(见图 27 的构建体)。不包括 Env 的疫苗在某方面(例如, 筛选作为感染标记的抗 Env 抗体的能力)有一定的优势。此试验应用 pGA1/Gag-Pol 和表达 SIV239 的 Gag-Pol 序列的 rMVA (MVA/Gag-Pol) (由 Dr. Bernard Moss 提供) (NIH-NIAID)。

按上面实施例 13 中描述的针对 “Gag-Pol-Env” (pGA2/89.6MVA89.6) 免疫原的方案施用 “Gag-Pol” 免疫原 (见表 4 中的 5 和 6 组)。以同样的 DNA 剂量 (2.5mg 和 250 μ g) 用于引发高剂量和低剂量组, 通过皮内途径施用。如前面实施例 13-15 中描述的疫苗试验, 在每个试验组中包括 2-3 只 mamu A*01 恒河猴。如上文实施例所描述的, 用 pll-c-m 四聚体和被重叠肽库刺激的 ELISPOT, 对那些对 pll-e-m 抗原决定簇有专一性的 T 细胞产生了 T 细胞应答。

免疫接种后, 疫苗受体显示了类似于在 Gag-Pol-Env 疫苗试验中观察到的抗 Gag T 细胞应答。在用 rMVA 加强免疫之后 7.5 月, 将动物用 SHIV-89.6P 直肠内攻击 (图 28)。与保护动物免受 CD4 细胞快速丢失的 Gag-Pol-Env 疫苗的方案不同, Gag-Pol 动物全都丢失 CD4 细胞 (图 28B 和 28D)。在接受低剂量 i.d. DNA 引发的组中, 丢失是最明显的。与 CD4 细胞的丢失一致, 与 Gag-Pol-Env 组相比, Gag-Pol DNA 接种组在减少它们病毒负载上也效力不高 (图 28A 和 28C)。这些组的几何平均病毒负载在攻击后 3 周高 10-100 倍, 在攻击后 5 周高 10 倍。这些结果证明, 在被攻击动物体中, Env 基因在保护 CD4 细胞和减少病毒 RNA 水平方面起着重要作用。结果也显示, 在保护受体对抗病毒攻击上 Gag-Pol-Env DNA/MVA 疫苗比 Gag-Pol DNA/MVA 疫苗更有效。

实施例 17: 麻疹插入片段

表达麻疹 H 和 C3d 补体成分融合蛋白的 DNA 疫苗被用于测定接种是否能够获得更早的和更有效的抗 H 抗体应答。在以前 Dempsey 等人所做的小鼠研究中, 两个或三个拷贝的 C3d 与模型抗原鸡卵溶菌酶的融合体增强了免疫效率 1000 多倍 (Dempsey 等人, 1996)。这导致了更快出现血凝反应的抑制 (HI) 活性和保护性免疫 (Ross 等人, 2000 和 Ross 等人, 2001)。

在人免疫系统中，补体活化的一个结果是第三补体蛋白 C3d 片段与对活化蛋白质的共价结合。C3d 转而结合 B 淋巴细胞上的 CD21，它是具有能扩大 B 淋巴细胞活性的 B 细胞刺激功能的分子。在麻疹 H-C3d 融合蛋白中，融合体的 H 部分将结合于 B 细胞上的抗 H Ig 受体和通过 B 细胞受体传递信号，而融合体的 C3d 部分将结合于 CD21 并通过 CD19 传递信号。在这个假说中，对 H-C3d 融合蛋白的 B 细胞应答将比仅仅对单独 H 的 B 细胞应答更有效。用表达结合三个 C3d 拷贝的分泌型 H 融合蛋白 (sH-3C3d) 的 DNA 疫苗接种的小鼠比仅表达 sH 的 DNA 疫苗接种的小鼠产生了更快的和更高水平的中和抗体活性。

质粒 DNA: pTR600, 一个真核生物表达载体, 被构建成包含加上内含子 A (IA) 的两个拷贝的巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV-IE) 用以起始真核生物插入片段的转录, 还包含牛生长素多腺苷酸信号序列 (BGH poly A) 用以终止转录。载体包含用以容易插入基因片段的多克隆位点, 也包含用以原核复制的 Col E1 复制起点和用以在抗生素介质中筛选的卡那霉素抗性基因 (Kan^r) (图 29A)。

来于 Edmonton 品系的血凝集素 (H) cDNA 序列和 C3d 序列如前所描述地被克隆和用单一的限制性内切核酸酶位点被转移到 pTR600 疫苗载体内 (图 29B)。通过去除 H 的跨膜和胞质结构域产生了分泌型版本。应用 PCR 将 H 基因片段与组织纤溶酶原激活物 (tpA) 前导序列 (Torres 等人, 2000) 的 N 端合成模仿物以符合读框的方式克隆而完成这些。

正如以前描述的, 通过在 sH 基因 3' 端以符合读框的方式克隆三个串联重复的小鼠同源性 C3d 基因而产生了表达 sH-C3d 融合蛋白的载体 (Dempsey, 1996; Ross 等人, 2000 和 Ross 等人, 2001)。构建体的设计依据 Dempsey 等人的资料, 用了来自于 pSLG-C3d 的序列。由 4 个甘氨酸和 1 个丝氨酸的两次重复 $\{(G_4S)_2\}$ 组成的连接物在 H 和

C3d 结合点和在每个 C3d 重复之间融合。通过用导致精氨酸密码子突变为甘氨酸密码子的 Bam HI 和 Bgl II 融合，在 C3d 接点和 sH 与 C3d 接点之间潜在的蛋白水解酶剪切位点发生了突变。

在大肠杆菌菌株，DH5a 中扩增质粒，用阴离子交换树脂柱（Qiagen, Valencia, CA）提纯，在-20℃于 dH₂O 下保存。通过适当的限制性酶消化和胶体电泳检验质粒。在 260nm 和 280nm 通过光密度读数测定 DNA 制备物的纯度。

小鼠和 DNA 免疫：6-8 周年龄的 BALB/c 小鼠（Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN）被用于接种。简言之，用 0.03-0.04ml 混合液[5ml 盐酸氯胺酮（100mg/ml）和 1ml 盐酸塞拉嗪（20mg/ml）混合]麻醉小鼠。在 400psi 氮压力下用每 0.5mg 含有 0.5μg DNA 的大约 1-μm 金弹丸（DeGussa-Huls Corp, Ridgefield Park, NJ）的两个基因枪剂量给小鼠进行免疫接种。

转染和表达分析：依据操作规程（Life Technologies, Grand Island, NY），用 12%脂转染剂以 2μg 的 DNA 转染人胚胎肾脏细胞系 293T（5×10⁵ 细胞/转染）。收集上清液并保存在-20℃。如以前描述的，用捕获抗原 H 的 ELISA 进行计量（Cardoso 等人，1998）。

为了进行蛋白质杂交分析，将 15μl 上清液或细胞溶解产物以 1:2 比例稀释于 SDS 样本缓冲液（Bio-Rad, Hercules, CA）中，并将其置于 10%聚丙烯酰胺/SDS 凝胶上。解离的蛋白质被转移到硝酸纤维素膜（Bio-Rad, Hercules, CA）并与以 1:1000 的多克隆兔抗 HA 抗血清稀释液保温于包含 0.1% Tween 20 和 1% 无脂干牛奶的 PBS 中。在彻底冲洗后，用以 1:2000 稀释的与辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔抗血清和增强的化学发光剂（Amersham, Buckinghamshire, UK）探测出结合的兔抗体。

抗体测定：进行计量 ELISA，以测定抗 H 专一性 IgG 水平。简言之，将组成型表达 MV (24) 的 H 蛋白质的 Ltk-细胞置于 96 孔板中生长。抗血清稀释液与表达 H 抗原的完整细胞一起保温保存。使抗 H 抗体结合于细胞上 30 分钟，在此后将细胞固定于丙酮 (80%) 中。用生物素酰基化的抗小鼠 IgG 抗体和链霉抗生物素磷酸酯酶碱性系统 (Sigma) 探测专一性抗体应答。结合于不表达 H 抗原的 Ltk-细胞的抗体被应用于使系统标准化。结果以终点稀释滴定度表达出。

中和性测定：中和性测定在于六孔板 (25) 中生长的 Vero 细胞上进行。简言之，将 100-200 p.f.u.的麻疹病毒 Edmonton 株与一系列血清稀释液混合，在 37°C 保温 1 小时，然后在板上保温。将板置于 37 °C 保温 48 小时并对斑块计数。中和效价定义为减少斑块形成 50% 或 90% 需要的血清相应的稀释度。免疫前血清作为阴性对照。

结果：两种表达血凝素的疫苗质粒被构建于 PTR600 载体以表达来于 Edmonston 株的分泌类型 H (sH) 或分泌类型 H 的 C3d 融合蛋白 (sH-3C3d) (图 29)。sH 代表 H 的全部胞外域，但不包括跨膜和胞质区。该克隆使 H 序列与组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (tPA) 前导序列的 N-端合成模拟物符合读框。tPA 前导基因和 H 序列融合于 H 跨膜区 3'端。通过将小鼠同源的三个串联重复的 C3D 序列与分泌型 H 基因以符合读框的方式克隆，产生了 sH-3C3d 融合蛋白 (图 29B)。在每个 C3d 分子之间结合处和 H 蛋白和第一个 C3d 编码区域之间结合处发现的蛋白水解剪切位点被诱变破坏。

蛋白印迹分析揭示了预期大小的 sH 和 sH-3C3d 蛋白质。应用抗 MV H 抗血清的兔多克隆抗体的蛋白印记分析显示出与在被转染细胞的上清液中 H 的分泌类型相符的~70kD 的宽阔带。~190kD 的高分子量带是与 sH-3C3d 融合蛋白反映的大小是一致的 (图 30)。通过蛋白分析没有发现 sH-C3d 融合蛋白的蛋白水解剪切证据。

与抗原的跨膜相关类型相比,麻疹病毒 H 通过包含 sH 或 sH-3C3d 的质粒以稍稍较低的水平被表达。用 2 μ g 质粒对人 293T 细胞进行瞬时转染,用抗原捕获 ELISA 测定上清液和细胞溶解产物中的 H。大约 75% 的 H 蛋白被分泌进入 sH-DNA 和 sH-3C3d-DNA 转染细胞的上清液。正如所预期的,在用表达 H 跨膜类型的质粒转染细胞的细胞溶解产物中可探测出~99% 的 H 抗原。

对麻疹 H DNA 免疫的抗体应答:表达 sH-3C3d DNA 质粒比 sH DNA 产生了更高的 ELISA 抗体效价。用 DNA 包被的金粒通过基因枪以 0.1 μ g 或 1 μ g 接种物给 BALB/c 小鼠接种。接种后 4 周和 26 周,用在第一次免疫接种时所给的同样 DNA 剂量对小鼠进行加强免疫。抗 H 抗体呈现的时间图形显示,与用 sH DNA 接种的小鼠比较,免疫应答在用表达 C3d 融合蛋白的 DNA 接种的小鼠体内能更快启动。通过第一次免疫接种产生了抗体的良好效价。通过第二次和第三次免疫接种得到进一步增强。在第三次免疫接种之后,用 sH-3C3D 接种的小鼠比用 sH DNA 接种的小鼠其体内效价高 5-6 倍。

中和作用测定:对 MV 中和的血清检测显示,在第二次接种 0.1 μ g 表达 sH-3C3d 的 DNA 后效价高达 1700。对 Vero 细胞的中和抗体研究探测出,与用 sH DNA 接种的小鼠血清相比,在用 sH-3C3d 构建体激发的小鼠血清中,抗 MV Edmonton 模型的中和活性的效价更高。用 sH-3C3d 质粒接种的小鼠在中和抗体水平上有急剧上升,在 14 周其达到一高平顶。与此对照的是,用 sH DNA 进行第三次接种后只激发出中和抗体的可探测水平。接种 28 周后,用 sH-3C3d-DNA 接种的小鼠血清具有的中和效价 (>250) 可减少 MV 感染形成的斑块 90%。

与用仅仅表达 sH 的 DNA 接种的小鼠相比,在用表达 C3d 蛋白构建体接种的小鼠体内对 H 的抗体应答的高度增加 7-15 倍。表达 sH-3C3d 的 DNA 增加的抗体应答更引起人们兴趣,因为这个质粒仅表达~60% 表达 sH 的质粒所表达的蛋白质。

除了整个抗体水平的增加外，在体外感染测定中，专门中和 MV 的抗体能更快产生。在第二次免疫接种后，在用 sH-3C3d 的 DNA 免疫接种的小鼠体内能观测到可探察水平的中和抗体。在 14 周中和抗体的效价达到高峰（1700，对于 50% 斑块减少），它实际上在与保护相关的最低量（>120，对于 50% 斑块减少）之上。与此对照，用表达 sH 的 DNA 接种的小鼠甚至在第三次接种后，其中和抗体的水平仍然低（180，对于 50% 斑块减少）（图 31）。

实施例 18：具有和没有-C3d 的流感插入片段

质粒载体构建和提纯的过程在以前针对 JW4303 已有所描述（Torres 等人，1999；Pertmer 等人，1995；Feltquate 等人，1997）。简言之，用单一的限制位点将来自于 A/PR/8/34（H1N1）的流感血凝素（HA）序列克隆于 pJW4303 或 pGA 真核表达载体内。

HA 的两种形式，一个分泌（s）型和一个跨膜（tm）型，在以前已有所描述（Torres 等人，1999；Feltquate 等人，1997）。在 pJW4303 中表达 sHA 或 tmHA 的载体分别被标示为 pJW/sHA 和 pJW/tmHA，在 pGA 中表达 sHA、tmHA 或 sHA-3C3d 的载体分别被标示为 pGA/sHA、pGA/tmHA 和 pGA/sHA-3C3d。

通过克隆小鼠同源的三个串联重复的 C3d 以及使三个串联重复的 C3d 与分泌型 HA 基因符合读框，产生了表达 HA-C3d 融合蛋白的载体。构建体的设计依据 Dempsey 等人的资料（1996）。由 4 个甘氨酸和一个丝氨酸的两个重复体 $[(G_4S)_2]$ 组成的连接物于每个 C3d 重复连接处融合。pGA/sHA-3C3d 质粒表达大约 50% 由 pGA/sHA 载体表达的蛋白质。但是在上清液与细胞溶解物中发现的 sHA-3C3d 的比率与由 pGA/sHA 表达的抗原的比率相似。80% 多的蛋白质被分泌入上清液。在蛋白质分析中，较高的分子量带 120kDa 被检测到，其代表了 sHA-3C3d 融合蛋白。因此，sHA-3C3d 融合蛋白象 sHA 抗原一样有效地被

分泌进入上清液。

小鼠和 DNA 免疫接种：6-8 周龄的 BALB/c 小鼠（Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN）被用于接种。小鼠被关在一个小隔离室，自由进食和饮水，并按照实验动物的 USDA 准则照料小鼠。用 5ml 盐酸氯胺酮（100mg/ml）和 1ml 盐酸塞拉嗪（20mg/ml）的混合物 0.03-0.04ml 对小鼠进行麻醉。用手握 Accell 基因运送系统在刮净的腹部皮肤上进行基因枪免疫接种，用每 0.5mg 约 1 μ m 金弹丸（DeGussa-Huls Corp., Ridgefield Park, NJ）含 0.5 μ g DNA 的两基因枪剂量在 400psi 氮压力下进行免疫接种。

流感病毒的攻击：通过鼻内滴注法以活的适于小鼠的流感病毒进行攻击，鼻内滴注法是将稀释于 PBS 中包含 3 份致死剂量病毒的 50 μ l 尿囊液注入到盐酸氯胺酮麻醉的小鼠的鼻孔中。这种方法导致肺部的迅速感染，其对于未经免疫接种的小鼠是 100% 的致死。在免疫接种后 8 或 14 周对小鼠个体进行攻击以及对其体重损失和存活情况进行监测。标绘的数据是指每一个实验组中个体平均攻击后体重与攻击前重量的百分比与攻击后天数的对应关系。

对 HA DNA 免疫接种的抗体应答：与 sHA DNA 比较，tmHA 和 sHA-3C3d DNA 质粒产生了较高的 ELISA 抗体的效价。用基因枪以 0.1 μ g 或 1 μ g 剂量的 DNA 包被的金粒对 BALB/c 小鼠进行接种。在接种后 4 周，将每个组一半的小鼠用与第一次免疫接种中所给剂量相同的剂量的 DNA 进行加强免疫。用 sHA-3C3d-和 tmHA-表达质粒诱导的所有抗 HA IgG 在不同小鼠试验组中是类似的并且比用 sHA 表达质粒产生的量高 3-5 倍（图 24）。除此之外，被激发的抗 HA 抗体的量以剂量依赖方式随接种的 DNA 量而增加（图 24E-24F）。总而言之，剂量应答曲线和抗 HA 抗体呈现的时间图形在用 tmHA-DNA 或 sHA-3C3d-DNA 接种的小鼠中是类似的，但是在用 sHA-DNA 接种的小鼠中它是较低和较缓慢的。如所预期的，加强免疫促进和增加了 HA 抗

体的效价。

小鼠 HA 抗血清的亲合力：硫氰酸钠（NaSCN）置换 ELISA 证明，用表达 sHA-3C3d 的 DNA 产生的 HA 专一性抗体的亲合力比来自于 sHA-DNA 或 tmHA-DNA 接种的小鼠的抗体的更高（图 25）。用梯度浓度的硫氰酸钠即一种破坏抗原抗体相互作用的离液剂对 HA 专一性抗体的亲合力进行比较。同对抗原有较大亲和力的抗体比较，对抗原有较小亲和力的抗体的结合在较低的硫氰酸钠浓度下就被破坏。释放 50% 抗血清的硫氰酸钠的有效浓度（ED₅₀）是~1.20M，其中抗血清是在接种后 8 周从 sHA-DNA 或 tm-DNA 加强免疫的小鼠（0.1μg 剂量或 1μg 剂量）中采集的（图 25A）。与此对照，来于用 sHA-3C3d-DNA 接种和加强免疫的小鼠的抗血清具有~1.75M 的 ED₅₀（图 25B）。在攻击时（接种后 14 周），来于用 sHA-DNA 和 tmHA-DNA 接种小鼠抗体的 ED₅₀ 增加到~1.8 M（图 25C）。来于用 sHA-3C3d-DNA 接种小鼠的抗体的 ED₅₀ 增加到~2.0 M（图 25D）。此结果提示，与来于用 sHA-DNA 和 tmHA-DNA 接种小鼠的抗体相比，来于用 sHA-3C3d-DNA 接种小鼠的抗体的亲合力成熟更迅速。在 sHA-3C3d 和 tmHA 的抗体亲合力随时间成熟之间的区别是对产生的抗体水平的非依赖性。这两种质粒有类似的抗体出现随时间变化的图形和产生抗体的能力的剂量应答曲线（图 25）。

血凝素抑制（HI）效价：进行血凝素抑制测定（HI）用来评定所产生抗体阻止 A/PR/8/34（H1N1）结合硅铝酸的能力。用从接种后 8 周和 14 周小鼠采集的血清样本测定 HI 效价。不考虑剂量或所给予的疫苗，所有被加强免疫的小鼠在第 14 周都有可被测定的 HI 效价。sHA-3C3d-DNA 接种小鼠有最高效价（高达 1: 1200）的记录。未被加强免疫的小鼠显示出 HI 效价的更多变化。用 0.1μg 剂量的 sHA-DNA 或 tmHA-DNA 表达质粒接种的未被加强免疫的小鼠具有 1: 10 的低 HI 效价。与此对照，用 sHA-3C3d-DNA 接种小鼠具有高于 1: 640 的效价。在 8 周有可测定 HI 效价（1: 160）的被接种小鼠仅仅是用 1μg

剂量 sHA-3C3d-DNA 接种并加强免疫的小鼠。这些结果指出，当融合于 sHA 时 C3d 能刺激专一性 B 细胞增强抗体的亲和活性的成熟从而产生对 HA 的中和抗体。

对流感攻击的保护功效：与激发 HI 抗体最高效价相一致，sHA-3C3d DNA 比 sHA 或 tmHA DNA 能提供更有效的保护。用致死剂量的 A/PR/8/34 流感病毒 (H1N1) 攻击小鼠，然后对其发病率（通过体重减少来度量）和死亡率进行每日的监测，以此来测定各种 HA-DNA 疫苗的保护效率。以相对于攻击前平均重量的百分比与攻击后天数的关系标绘每个动物重量减少图（图 26）。第一次被病毒攻击的小鼠和仅用 pGA 载体接种的小鼠显示出重量的急剧下降，在攻击后 8 天所有小鼠体重都下降 >20%（图 26）。与此对照，PBS 模拟攻击的小鼠在观察 14 天后体重仍未下降。不考虑所给予的 DNA 质粒的剂量，在接种后 14 周所有被加强免疫的小鼠都在攻击后存活下来。但是，用 0.1 μ g 剂量的 sHA-DNA 接种的被加强免疫的小鼠在复原前在接种后第 8 天其体重下降到它们起始的体重的 92%（图 26）。与此对照，使用 1 μ g 剂量，在接种后 8 周攻击被加强免疫的小鼠，在攻击下存活的小鼠只有 sHA-3C3d-和 tmHA-DNA 接种的小鼠，尽管在接种后 14 周观察到它们的体重有很大的下降。用 0.1 μ g 剂量加强免疫接种的小鼠在接种后 8 周在攻击后存活的只有 sHA-3C3d 接种小鼠（图 26）。

在未加强免疫的 0.1 μ g 剂量免疫接种组中，只有 sHA-3C3d-DNA 接种小鼠于接种后 14 周在攻击下存活（图 26）。所有只给予单独 DNA 接种的小鼠的体重下降。但是，在这些中 sHA-3C3d-DNA 接种小鼠体重下降最少，也只有它们是唯一在致死的攻击下存活下来的小鼠（图 26）。这些结果证明，3C3d 蛋白在与 HA 融合时加强了 DNA 疫苗的效率，以此可考虑减少 DNA 剂量和接种次数来提供抵抗致死流感病毒攻击的保护。

实施例 19: HIV gp120-C3d 融合构建体

在这项研究中，与实施例 18 所述相似之处是也应用三个鼠 C3d 拷贝并将其融合于 HIV Env gp120 亚单位的羧基端。用 DNA 接种法给 BALB/c 小鼠接种并测定增强的免疫应答。与野生类型 gp120 序列相比，融合构建体诱导较高的对 Env 的抗体应答和亲和活性成熟较快发生。此结果提示，增强抗体的 DNA 疫苗功效可通过与 C3d 的融合蛋白被极大改善。

质粒 DNA：如上面实施例 1 所述，pGA 的构建包含起始真核插入片段转录的巨细胞病毒立即早期启动子（CMV-IE）加上内含子 A（IA）以及终止转录的牛生长素多腺苷酸信号（BGH poly A）。应用单一的限制性内切核酸酶位点，将来自于分离的 ADA 的 HIV 包膜序列、IIIB 和编码几乎全部 gp120 区域的 89.6 与 C3d 序列克隆进入 pGA 疫苗载体。gp120 片段编码从氨基酸 32 到 465 的区域，并以氨基酸序列 VAPTRA 结束。前 32 个氨基酸从每个 sgp120 N 端缺失而由组织纤维蛋白溶酶原激活剂（tpA）的前导序列代替。通过与表达 sgp120 的 DNA 以符合读框的方式克隆小鼠同源的三个串联重复的 C3d，产生表达 sgp120-C3d 融合蛋白的载体。构建体的设计依据 Dempsey 等人（1996）资料。由 4 个甘氨酸和 1 个丝氨酸的二次重复体 $\{(G_4S)_2\}$ 组成的连接物在 HA 与 C3d 结合处和每个 C3d 重复体之间融合。通过连接 Bam HI 和 Bgl II 限制性内切核酸酶位点使 Arg 密码子突变为 Gly 密码子，潜在的在 C3d 结合处和 3C3d 结合处之间的蛋白质水解剪切位点发生了突变。

在大肠杆菌菌株，DH5a 中扩增质粒，用阴离子交换树脂柱（Qiagen, Valencia, CA）提纯，在 -20°C 于 dH_2O 下保存。通过适当的限制性酶消化和胶体电泳检验质粒。通过 260nm 和 280nm 光密度测定 DNA 制备物的纯度。

小鼠和 DNA 免疫：如在上面实施例 17 中所描述的，6-8 周龄的 BALB/c 小鼠（Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN）被用于接种。

简言之，在 400psi 氮压力下用每 0.5mg 包含有 0.5 μ g DNA 的大约 1- μ m 金弹丸（DeGussa-Huls Corp, Ridgefield Park, NJ）的两个基因枪剂量给小鼠进行免疫接种。

如实施例 17 所述进行转染与表达分析和蛋白质杂交实验，除了将硝化纤维素膜与 1: 1000 的多克隆 HIV 感染病人的抗血清稀释液保温于包含 0.1% Tween 20 和 1% 无脂干牛奶的 PBS 中。在彻底的冲洗后，用辣根过氧化物酶结合山羊抗人抗血清的 1: 2000 稀释液和增强的化学发光剂（Amersham, Buckinghamshire, UK）探测出结合的人抗体。

ELISA 和亲和力测定：用提纯的 HIV-1-IIIB gp120 CHO 表达的蛋白质（Intracell）包被板，进行终点 ELISA 以测定在免疫血清中的抗 Env IgG 的效价（如 Richmond 等人，1998 所述）。可以替代的是，板被绵羊抗 Env 抗体（International Enzymes Inc., Fallbrook, CA）包被并用于捕获在以 sgp120 表达载体瞬时转染的 293T 细胞中产生的 sgp120。来于被接种小鼠的血清结合并随后通过结合于辣根过氧化物酶的抗小鼠 IgG 被探测。终点效价比底数高两倍被认为是阳性。进行亲和力 ELISA，根据样本和标准的加入亲和力 ELISA 与血清抗体 ELISA 测定类似。根据 O.D.值，将样本稀释到与专一性 IgG 同样的浓度。用 0.05% PBS-Tween 20 冲洗板三次。然后加入不同浓度的离液剂——于 PBS 中的硫氰酸钠（0M、1M、1.5M、2M、2.5M 和 3M NaSCN）。将板放置于室温中 15 分钟然后用 PBS-Tween 20 洗涤 6 次。以下几步类似血清抗体 ELISA 测定，相对于起始 IgG 的百分比被计算为相对于起始的 O.D.百分比。所有测定都一式三份。

中和抗体测定：如前所述，HIV-1 IIIB 和 89.6 的抗体介导的中和作用在 MT-2 细胞杀死测定中测量（Montefiori 等人，1988）。简言之，将无细胞病毒（50 μ l 包含 10^8 TCID₅₀ 病毒）加入到在以多聚赖氨酸包被的 96 孔微滴定板的一式三份小孔中的 100 μ l 生长培养基里的血清样

本多倍稀释液中，并在 37℃保温 1 小时，然后加入 MT-2 细胞（每孔加入在 100 μ l 内的 10⁵ 细胞）。有必要时在三天后降低细胞密度并置换培养基。当对照孔中细胞病变效果大于 70% 但小于 100% 时，通过用 Finters 中性红给存活细胞染色测定中和作用。通过计算在测试孔（细胞+病毒）之间吸收作用（A₅₄₀）的差并将该结果除以在细胞对照孔（只有细胞）和病毒对照孔的吸收作用差来测定保护的百分率。根据需要保护至少 50%细胞免于病毒诱导杀灭的原生质稀释度的倒数来表示中和效价。

结果：包含任一种分泌类型抗原的质粒在类似的总水平上表达 Env，但 sgp120-C3d 表达质粒的表达水平低 2-4 倍。用 2 μ g 质粒对人 293T 细胞进行瞬时转染，并用抗原捕获 ELISA 测定上清液和细胞溶解产物的 gp120。sgp120 构建物表达量为每毫升 450 到 800ng，而 3C3d 融合物表达量为每毫升 140 到 250ng。在 sgp120 和 sgp120-3C3d-DNA 转染细胞的上清液中存在大约 90% Env 蛋白质（数据未表示）。不同的 sgp120 表达水平的区别大约为两倍，这似乎反映出 Env 基因的区别以及对不同 Env 识别的抗体的捕获与探测效率的区别。

蛋白质印记分析揭示出预期大小的 sgp120 和 sgp120-3C3d 蛋白质。应用病人多克隆抗血清，蛋白质印记分析显示，预期的 115-120kD 宽带与 gp120 相符。在~240kD 的更高的分子量带与 sgp120-3C3d 融合蛋白预期的大小一致。与抗原捕获测定一致，在 sgp120-DNA 转染细胞的上清液中存在了高强度蛋白质带，而在 sgp120-3C3d-DNA 转染的细胞上清液中存在的是较少强度的蛋白质带（未表示数据）。在蛋白质分析中未见 sgp120-C3d 融合蛋白的蛋白质水解剪切证据。

对 Env gp120 DNA 免疫接种的抗体应答：sgp120-3C3d 表达 DNA 质粒所产生的 ELISA 抗体效价比 sgp120 DNA 更高。通过基因枪以 1 μ g 剂量 DNA 包被金的颗粒给 BAIB/c 小鼠接种。在第一天给小鼠接种，然后在第 4、14 和 26 周用与第一次接种所给予的同样 DNA 进行加强

免疫。在 gp120-IIIB 包被板上测定血清，与 sgp120 表达质粒增强的抗体量相比，用表达 C3d 融合蛋白的 DNA 接种的小鼠具有高出 3-7 倍的抗 Env 抗体。在 C3d 构建体中，用 sgp120-(IIIB)-3C3d 接种的小鼠具有最高水平的抗体，而用 sgp120-(ADA)-3C3d 表达 DNA 接种的小鼠具有最低水平的抗 Env 抗体。抗 Env 抗体出现随时间变化的图形揭示出对于所有被测试的构建体每个接种中均增强了效价。

用不同 Env 产生的抗体水平的区别似乎是由所产生抗体的专一性来决定的。在可替换的 ELISA 方案里（其中，在 Env 同源物上捕获抗体）所有 C3d 融合物增强抗体的水平似乎是类似的。在这项测定中，绵羊抗 Env 抗体被用于捕获瞬间产生的 sgp120 蛋白质。此测定揭示出由每个 sgp120-3C3d 构建物增强的抗体水平低但类似。在这个测定中探测出的较低的抗体水平似乎反映出，用于捕获抗体的转染产生的 Env 水平比用商业生产的 IIIB gp120 包被板所做的测定值要低。正如应用 ELISA 方法预期的，加强免疫接种对于达到最适宜的抗体应答是必要的。

小鼠 Env 抗血清的亲和力：硫氰酸钠（NaSCN）置换 ELISA 证明，用表达 sgp120-3C3d DNA 产生的抗体的亲和力持续高于由 sgp120-DNA 接种小鼠产生的。因为所产生的抗血清的类型专一性和用于捕获抗原的 IIIB 蛋白质（不是其他蛋白质）可商业购得；亲和力测定是在用 sgp120-(IIIB) 和 sgp120-(IIIB)-3C3d 免疫产生的血清上进行的。用梯度浓度的硫氰酸钠，一种破坏抗原抗体相互作用的离液剂，对 Env 的专一性抗体的亲和力进行比较。结果指出，来自于 sgp120-3C3d-DNA 接种小鼠的抗体比来自于 sgp120-DNA 接种小鼠的抗体亲和活性成熟更快。

Env-3C3d 表达质粒激发适量中和抗体：在 MT-2 细胞进行的中和抗体研究在由 gp120-3C3d 构建体产生的血清中探测出比在由 sgp120 构建体产生的血清中更高的中和活性效价。用血清对两种包括 IIIB

(X4) 和 89.6 (X4R5) 病毒的合胞体进行测定。用 sgp120-3C3d 表达质粒接种的小鼠具有非常适量的对 HIV 同源毒株的中和抗体水平，这是通过以中性红摄取度量的对 MT-2 细胞免受病毒诱导杀灭的保护来测试的。由表达 gp120 的 DNA 产生的中和抗体效价作为测定的底数。

此研究结果显示，HIV-1 Env 和三个小鼠 C3d 副本的融合增强了对被接种小鼠 Env 的抗体应答。在第 4 次接种后（引发后 28 周），用三种表达 sgp120 序列的 DNA 质粒的任何一种接种的小鼠具有低的或不可探测水平的抗体。与此对照，用表达 sgp120 和 3C3d 融合蛋白的 DNA 接种的小鼠激发抗体更快地发生（第三次接种）也具有更高的抗体水平。

与抗体效价增强和抗体对 Env 亲和活性成熟相对照，被接种小鼠被激发的中和抗体量是低的。用表达 sgp120 的质粒接种的小鼠具有低的中和抗体水平，它在用 sp120-3C3d 表达质粒接种的小鼠体中仅有少量增加。但是中和抗体水平在第四次接种后有明显增加。中和抗体的不良效价可能反映出，因为没有将中和抗原决定簇充分暴露于应答 B 细胞造成 sgp120-3C3d 融合蛋白对增强中和抗体的内在的低劣能力。在小鼠血清中对 HIV-1 中和测定的固有的高底数也可能造成低劣的中和效价。

结果证明了 C3d 融合物作为增加抗体产生和增进抗体成熟的分子佐剂的效用。除此之外，对 Env 的中和抗体应答在用 C3d 融合疫苗接种的小鼠中有少量增加。与在使用了来自于麻疹和流感病毒的 HA 分泌型版本的实施例 17 和 18 中所看到的结果类似，仅仅应用表达相当于那些表达非融合 sgp120 的质粒所表达的蛋白质一半量的蛋白质的质粒，就可以获得 C3d-增强的抗体应答。

参考资料

Amara, R., 等人(2001).用多蛋白 DNA/MVA 疫苗对艾滋病的粘膜攻击的控制及其预防。Submitted.

Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W, Bultmann, A., 和 Hass, J.(1998).通过用有优选的密码子合成 gp120 序列的 DNA 接种被激发的增强的免疫应答。J Virol 72(2), 1497503.

Asakura, Y., Hinkula, J., Leandersson, A.C., Fukushima, J., Okuda, K., 和 Wahren, B.(1997).通过 DNA 接种诱导 HIV-1 专一性粘膜免疫应答。Scant J Immunol46(4), 326-30.

Bachmann MF, Zinkernagel RM.中和抗病毒 B 细胞应答 Annu Rev Immunol 1997;15:235-70.

Barouch.D.H.等人, 2000. Science 290:486-92.

Barry, M.A., Lai, W.C., 和 Johnston, S.A.(1995).应用表达库免疫接种保护免受支原体感染。Nature 377(6550), 632-5.

Berger EA(1997).HIV 的进入和向性: 化学激活受体的连接。AIDS 11 Suppl A:S3-16

Bohm, W., Kuhrober, A., Paier, T., Reimann, J., 和 Schirmbeck, R.(1996). DNA 载体构建体, 其引发在肌肉内注射后的小鼠体中乙型肝炎表面抗原专一性细胞毒性 T 淋巴细胞和抗体应答。J Immunol Methods 193(1), 29-40.

Bohm, W., Mertens, T., Schirmbeck, R., 和 Reimann, J.(1998).

引起小鼠体液和细胞免疫应答的质粒 DNA 接种的途径。Vaccine 16(9-10), 949-54.

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW(1997).新克隆载体的构建和特征。II. A 多目的克隆系统。Gene 2(2);95-113

Boyer, J.D, Ugen, K.E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W.V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R.B., McCallus, D., Coney, L., 和 Weiner, D.B.(1997).通过 DNA 接种保护黑猩猩免受高剂量杂合 HIV-1 的攻击。Nat Med 3(5), 526-32.

Boyle, J.S., Koniaras, C., 和 Lew.A.M.(1997).被表达抗原的细胞位置对 DNA 接种效率的影响: 当进行肌肉内 DNA 免疫接种后抗原为细胞质内时细胞毒性 T 淋巴细胞和抗体应答是次最适度的。Int Immunol 9(12), 1897-906.

Burton, D.R., 和 Montefiori, D.C.(1997).在 HIV-1 感染中的抗体应答[见评述]。Aids 11(Suppl A), S87-98.

Calarota, S., Bratt, G., Nordlund, S., Hinkula, J., Leandersson, A.C., Sandstrom, E., 和 Wahren, B.(1998).通过在 HIV-1 感染的患者进行的 DNA 接种诱导的细胞毒性应答。Lancet 351(9112).1320-5.

Cardoso, A.I., BlixenkronMoller, M., Fayolle, J., Liu, M., Buckland, R., 和 Wild, F.T. 用编码麻疹病毒血凝素和核蛋白的质粒 DNA 进行免疫接种引起体液和细胞介导的免疫。1998. Virology. 225:293-299.

Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL.人巨细胞病毒 (Towne) 立即早期基因的内含子 A 对哺乳动物细胞异源表达的作用。Nucleic Acids Research 1991;19(14):3979-86.

Chen, S.C., Jones, D.H., Fynan, E.F., Farrar, G.H., Clegg, J.C., Greenberg, H.B., 和 Herrmann, J.E.(1998a).由口服以轮状病毒进行免疫接种诱导的保护性免疫; 以微颗粒形式并用胶囊包被的 DNA 疫苗。J Virol 72(7), 5757-61.

Chun.T.W.等人, 1998. Proc Natl Acad Sci USA 95:8869-73.

Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N 等人, 人免疫缺陷病毒类型 1 的非同寻常的巨噬细胞向性的和高细胞病变毒株的感染性分子克隆。J Virol 1992;66(12):7517-21.

Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD, Jr. 通过树突细胞在活体内转染进行以 DNA 为基础的免疫接种。Nat Med 1996;2(10):1122-8.

Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H.用裸露质粒 DNA 进行基因接种: CTL 引发机制。J Exp Med 1996;184(4):1555-60.

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT(1996).作为分子佐剂的补体 C3d: 桥接先天的和获得性免疫。Science 271:348-50.

Egan, M.A.等人, (2000) J Virol 74:7485-95.

Evans DT, OConnor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J, da Silva J, 等人, 病毒专一性细胞毒性 T 淋巴细胞应答在猿免疫缺陷病毒 Env 和

Nef 中选择氨基酸的变异。Nat. Med 1999;5(11):1270-6.

Feltquate, D.M., Heaney, S., Webster, R.G., 和 Robinson, H.L.(1997). 用盐水和基因枪 DNA 进行免疫接种产生的不同 T 辅助细胞类型和抗体同型。Journal of Immunology 158(5), 2278-84.

Fomsgaard, A., Nielsen, H.V., Bryder, K., Nielsen, C., Machuca, K, Bruun, L., Hansen, J., 和 Buus, S.(1998).在用插入乙型肝炎表面抗原的编码 V3 的嵌合体 DNA 疫苗进行遗传免疫接种后改良的对抗 HIV-1 的 gp120 V3 环的体液和细胞免疫应答。Scand J Immunol 47(4), 289-95.

Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, 等人.由 DNA 疫苗对细胞毒性 T 淋巴细胞的引发: 需要专门的抗原提呈细胞和抗原从肌细胞转移的证据。Mol Med 1997;3(6):362-71.

Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., 和 Robinson, H.L.(1993).DNA 疫苗: 通过非肠道的粘膜的和基因枪接种的保护性免疫接种。Proc Natl Acad Sci USA 90(24), 11478-82.

Gromkowski, S.H., Nabel, G.J.等人, (1995).用质粒 DNA 进行癌症基因治疗: 给小鼠注射后的 DNA 的药物动力学研究[见评述]。Hum Gene Ther 6(5), 553-64.

Hakim, I., Levy, S.和 Levy, R.(1996).来自 IL-1 β 的 9 氨基酸肽增强由蛋白质和 DNA 疫苗引起的抗肿瘤免疫应答。J Immunol 157(12), 5503-11.

Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson JE, Sharp SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP,

McMichael(1999).通过应用多抗原决定簇和 DNA 引发修饰疫苗病毒 Ankara 加强免疫接种方案在恒河猴体中有效诱导猿免疫缺陷病毒专一性细胞毒性 T 淋巴细胞。J Virol 73(9):7524-32.

Hanke, T., Blanchard, T.J., Schneider, J., Hannan, C.M., Becker, M., Gilbert S.C., Hill, A.V., Smith, G.L.和 McMichael, A.(1998a).通过 DNA 引发/MVA 增强接种方案促进 MHC 类型 I 限制肽专一性 T 细胞诱导。Vaccine 16(5), 439-45.

Hanke, T., Schneider, J., GilbertS.C., Hill, A.V.和 McMichael, A.(1998b). EIIIV 和恶性疟原虫的 DNA 多 CTL 抗原决定簇疫苗: 小鼠的免疫原性。Vaccine16(4), 426-35.

Hartikka, J., Sawdey, M., ComefertJensen, F., Margalith, M., Barnhart, K., Nolasco, M., Vahlsing, H.L., Meek, J., Marquet, M., Hobart, P., Noman, J.和 Manthorpe, M.(1996).直接注射于骨骼肌的改良的质粒 DNA 表达载体。Hum Gene Ther 7(10), 1205-17.

Inchauspe, G., Vitvitski, L., Major, M.E., Jung, G., Spengler, U., Maisonnas, M.和 Trepo, C.(1997).表达分泌类型或非分泌类型丙型肝炎病毒核壳体的质粒 DNA: 对在基因免疫接种后抗体和 T 辅助细胞应答的比较研究。DNA Cell Biol 16(2), 185-95.

Iwasaki A, Torres CA, Ohashi PS, Robinson HL, Barber BH.(1997b) 在不同位点质粒 DNA 免疫接种后骨髓衍生细胞在 CTL 诱导中的主要作用。J Immunol 159(1):11-4.

Iwasaki, A., Stiernholm, B.J., Chan, A.K., Berinstein, N.L., 和 Barber, B.H.(1997a).由编码共刺激分子和细胞分裂素的质粒 DNA 免疫原调节的增强 CTL 应答。J Immunol 158(10), 4591-601.

Jones, D.H., Corris, S., McDonald, S., Clegg, J.C., 和 Farrar, G.H.(1997).聚(DL-lactide-co-glycolide)在口服后胶囊包被的质粒 DNA 激发系统和粘膜抗体对被编码蛋白质的应答。Vaccine 15(8), 814-7.

Kawabata, K., Takakura, Y.和 Hashida, M.(1995).于小鼠体中静脉注射后质粒 DNA 的命运:涉及在其肝摄取中的清除剂受体。Pharm Res 12(6), 825-30.

Kent S.J., Zhao, A., Best, S.J., Chandler, J.D., Boyle, D.B. 和 Ramshaw,

1.A.(1998). 由 DNA 连续引发和用重组禽天花病毒增强的一套人类免疫缺陷病毒类型 I 疫苗接种方案的被增强 T 细胞免疫原性和保护效率。J Virol 72(12), 10180-8.

Kuroda MJ, Schmitz JE, Barouch DH, Craiu A, Allen TM, Sette A, 等人, 通过用四聚体主要组织相容性复合体类型 I-肽复合体进行细胞染色在猿免疫缺陷病毒感染的恒河猴体中的 Gag 专一性细胞毒性 T 淋巴细胞的分析。Journal of Experimental Medicine 1998;187(9):1373-81.

Letvin, N.L., Montefiori, D.C., YasuTomi, Y., Perry, H.C., Davies, M.E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D.C., Lord, C.L., Handt, L.K., Liu, M.A.和 Shiver, J.W.(1997). 通过双峰 HIV 包膜 DNA 加蛋白质的免疫接种产生的有效保护性抗 HIV 免疫应答。Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(17), 9378-83.

Lew, D., Parker, S.E., Latimer, T., Abai, A.M., Kuwahara-Rundell, A., Doh, S.G., Yang, Z.Y., Laface, D.,

Gromkowski, S.H.和 Nabel, G.J., 用质粒 DNA 进行癌症基因治疗: 在对小鼠注射后 DNA 的药物动力学研究[见评述]。(1995).*Hum. Gene Ther.*6:553.

Li J, Lord CI, Haseltine W, letvin NL, Sodroski J. 用表达 HIV-1 包膜糖蛋白的嵌合体 HIV-1/SIVmac 病毒感染猕猴。 *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1992;5(7):639-46.

Livingston, J.B., Lu.S., Robinson, H.L.和 Anderson, D.J.(1995). 用基因枪技术在雌性生殖道诱导粘膜免疫。第一部分: 抗原表达。 *Annals of the New York Academy of Sciences* 772, 265-7.

Lu, S., Manson, K., Wyand, M., 和 Robinson, H.L.(1997). 在恒河猴的 SIV DNA 疫苗试验: 于接种组和对照组攻击后的尸体剖检。 *Vaccine* 15(g), 920-3.

MacGregor, R.R., Gluckman, S., Lacy, K., Kaniefski, B., Boyer, J., Wang, B., Bagarazzi, M., William, W.V., Francher, D., Ginsberg, R., Higgins, T., 和 Weiner, D.(1996). 强化 HIV-1 DNA 质粒疫苗的第一次人体试验: 安全性和宿主应答。 *Int Conf AIDS* 11(2), 23(abstract no.We.B.293).

Maecker, H.T., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H.和 Levy, S.(1997). 用细胞素融合构建体的 DNA 接种倾向对卵清蛋白的免疫应答。 *Vaccine* 15(15), 1687-96.

Maecker, H.T., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H.和 Levy, S.(1998). 对 DNA 接种的细胞毒性 T 细胞应答: 依赖于通过 MHC 类型 II 的抗原提呈。 *J Immunol* 161(12), 6532-6.

Manthorpe, M., Comefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Maralith, M., 和 Dwarki, V.(1993).肌肉内注射质粒 DNA 的基因治疗:对在小鼠体内闪光虫荧光素酶基因表达的研究。*Hum Gene Ther* 4(4), 419-31.

McCluskie, M.J., Chu, Y., Xia, J.L., Jessee, J., Gebyehu, G.和 Davis, H.L., (1998).用纯质粒和脂类配方的 DNA 对小鼠呼吸道的直接基因传送[在方法中引证]。*Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8(5), 401-14.

Montefiori, D.C., W.E.Robinson, S.S.Schuffman, 和 W.M.Mitchell, 1988.通过快速和敏感的微滴定感染测定对抗病毒药物和 HIV 中和抗体的评定。*J. Clin Microbiol.* 26:231-237.

Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H.C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J.和 Liu, M.A.(1993).通过 DNA 接种对免受流感 A 的异源和同源的保护:DNA 载体的最优化。*DNA Cell Biol* 12(9), 777-83.

Moore, J.P.和 Ho, D.D.(1995). HIV-1 的中和作用:对转化 T 细胞生长的病毒适应的结果。*Aids* 9(Suppl A), S 117-36.

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, 等人, 对抗原专一性 CD8 T 细胞的计数:重新评定在病毒感染期间偶尔发生的激活作用。*Immunity* 1998;8(2):177-87.

Ourmanov. I.等人, 2000.*J Virol* 74:2740-51.

Pertmer, T.M., Eisenbraun, M.D., McCabe, D., Prayaga, S.K., Fuller, D.H., 和 Haynes, J.R.(1995).基于基因枪的核酸免疫接种:

在皮内传送纳克计量的 DNA 之后体液和细胞毒性 T 淋巴细胞应答的激发。Vaccine 13(15), 1427-30.

Petmer, T.M., Roberts, T.R.和 Haynes, J.R.(1996). 由 DNA 接种激发的流感病毒核蛋白专一性免疫球蛋白 G 亚级和细胞因子应答依赖于 DNA 载体传送途径。J Virol 70(9), 6119-25.

Permer, T.M.和 Robinson, H.L.(In press). 对在用流感血凝素 DNA 或蛋白质新生儿免疫接种之后抗体应答的研究。Virology.

Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR(1999). 中和抗体对建立活体内 HIV-1 感染的控制的有限作用。Immunity 10(4):431-8

Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. 基因枪免疫接种后在对 CD8+ T 细胞的抗原提呈上对被直接转染树突细胞的主要作用。J Exp Med 1998;188(6):1075-82.

Reimann KA, Li JT, Veazey R, Halloran M, Park IW, Karlsson GB 等人, 表达初级患者人免疫缺陷病毒类型 1 分离体 env 的嵌合猿/人免疫缺陷病毒通过活体传送途径引起恒河猴的类似艾滋病的疾病。Journal of Virology 1996;70(10):6922-8.

Reimann KA, Li JT, Voss G, Lekutis C, Tenner-Racz K, Racz P, 等人, 由初级人免疫缺陷病毒类型 1 分离体衍生的 env 基因给予恒河猴体中的嵌合猿/人免疫缺陷病毒在活体内高水平复制能力。Journal of Virology.1996;70(5):3198-206.

Richmond, J.F., Lu, S., SanToro, J.C., Weng, J., Hu, S.L., Montefiori, D.C.和 Robinson, H.L., (1998).对通过 DNA 引发和蛋白

质加强免疫的抗人免疫缺陷病毒类型 1 Env 抗体的中和活性和亲和力的研究。J Virol 72(11), 9092-9100.

Robinson, H.L.和 Pertmer, T.M.(2000). DNA 疫苗: 基础研究和应用。In *Advances in Virus Research*. Academic Press, Vol. 53(in press).

Robinson, H.L., Montefiori, D.C., Johnson, R.P., Manson, K.H., Kalish, M.L., Lifson, J.D., Rizvi, T.A., Lu, S., Hu, S.L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L., Herndon, J.G., Glickman, R., Candido, M.A., Lydy, S.L., Wand, M.S.和 McClure, H.M.(1999). 通过 DNA 引发和重组天花病毒加强的免疫接种对免疫缺陷病毒攻击的中和抗体非依赖性抑制。Nat. Med. 5:526.

Robinson, H.L.和 Pertmer, T.M.(1998). 核酸免疫。In “*Current Protocols in Immunology*”(R.Coico, Ed.), Vol.1, pp.2.14.1-2.14.19. 3 vols. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Robinson, H.L., Ginsberg, H.S., Davis, H.L., Johnston, S.A.和 Liu, M.A.(1997). DNA 免疫接种的科学未来。American Academy of Microbiology. May 31-June 2-1996.

Robinson, H.L., Hunt, L.A.和 Webster, R.G.(1993). 通过用血凝素表达质粒 DNA 进行免疫接种保护免受致死的流感病毒攻击。Vaccine 11(9), 957-60.

Rodriguez, F., Zhang, J.和 Whitton, J.L.(1997). DNA 免疫接种: 病毒蛋白的遍在化增强细胞毒性 T 淋巴细胞诱导和抗病毒保护但消除抗体诱导。J Virol 71(11), 8479-503.

Ross, T.M., Y.Xu, R.A.Bright, 和 H.L.Robinson. 对血凝素抗

体的 C3d 增强促进保护免受流感病毒攻击。Nat. Immunol.2000.1:127-131.

Ross , T.M. , Y.Xu , T.D.Green , D.C.Montefiori , 和 H.L.Robinson.2001.增强对人类免疫缺陷病毒包膜的抗体亲和力成熟: 有 gp120-C3d 融合蛋白的 DNA 疫苗。AIDS Res. Human Retro. In press.

Sasaki, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Ihata, A., Ishii, N., Gorai, I., Hirahara, F., Mohri, H.和 Okuda, K.(1998b). 用 DNA 单磷酸脂 A 佐剂疫苗通过鼻内和肌内接种对抗人免疫缺陷病毒类型 I 的比较。Infect Immun 66(2), 823-6.

Schnider, J., Gilbert, S.C., Blanchard, T.J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., Sinden, R Smith, G.L.和 Hill, A.V.(1998). 通过用修饰疫苗病毒增强, 提高对 CD8+ T 细胞诱导的免疫原性和疟疾 DNA 接种的完全保护性效率。Nat Med 4(4), 397-402.

Scholtissek S, Grosse F. λ T(o)终止子的克隆载体。Nucleic Acids Res 1987;15(7):3185.

Sizemore, D.R., Branstrom, A.A.和 Sadoff, J.C.(1997). 作为传递 DNA 的免疫接种的 DNA 载体的减毒细菌。Vaccine 15(8), 804-7.

Sizemore, D.R., Branstrom, A.A.和 Sadoff, J.C.(1995).作为用于传递 DNA 免疫接种的 DNA 载体的减毒志贺氏菌。Science 270(5234), 299-302.

Staprans, S., B.Corliss, J.Guthrie, M.B.Feinberg, in Viral Genome Methods K.Adolph, Ed.(CRC Press, Boca Raton, FL, 1996)pp.167-184.

Subbarao S, Schochetman G. HIV-1 的遗传变异性。Aids 1996;10(Suppl A):S13-23.

Sutcliffe 等人, 1978. Cold Spring Harbor Quant. Biol.43:77-90.

Tang, D.C., DeVit, M.和 Johnston, S.A.(1992). 遗传免疫接种是激发免疫应答的简单方法。Nature 356(6365), 152-4.

Thomson, S.A., Sherritt, M.A., Medveczky, J., Elliott, S.L., Moss, D.J., Fernando, G.J., Brown, L.E.和 Suhrbier, A.(1998). 通过 DNA 接种传递多数 CD8 细胞毒性 T 细胞抗原决定簇。J Immunol 160(4), 1717-23.

Tobery, T.W.和 Siliciano, R.F.(1997). 在免疫接种后 FHV-1 抗原迅速地在细胞内降解增强了细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的识别和活体内新的 CTL 应答的诱导。J Exp Med 185(5), 909-20.

Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL(2000). DNA 免疫接种: DNA 表达血凝素的分泌在抗体应答中的作用。Vaccine 18:805-14

Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. 基因枪和肌内 DNA 免疫接种对靶位点组织的不同依赖。J Immunol 1997;158(10):4529-32.

Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T.和 Koide, Y.(1998). 质粒 DNA 疫苗密码子应用的最优化是细胞内细菌的有效的 MHC 类型 I 限制 T 细胞应答所需要的。J Immunol 161(10), 5594-9.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner,

P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A.等人, (1993). 通过注射编码病毒蛋白质 DNA 的对抗流感的异源性保护。 *Science* 259(5102), 1745-9.

Wild, J., Gruner, B., Metzger, K., Kuhrober, A., Pudollek, H.P., Hauser, H., Schirmbeck, R.和 Reimann, J.(1998). 应用二顺反子表达质粒对抗乙型肝炎表面和核心抗原的多价接种。 *Vaccine* 16(4), 353-60.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A.和 Felgner, P.L.(1990). 直接基因转送进入活体小鼠肌肉。 *Science* 247(4949 pt 1), 1465-8.

Wu, Y.和 Kipps, T.J.(1997). 编码具有迅速蛋白酶体依赖性降解抗原的脱氧核糖核酸疫苗是高度有效的细胞溶解 T 淋巴细胞的诱导物。 *J Immunol* 159(12), 6037-43.

Xiang, Z.和 Ertl, H.C.(1995). 通过用表达细胞因子的质粒的共接种控制对编码病毒抗原质粒的免疫应答。 *Immunity* 2(2), 129-35.

Yamamoto S, Folks TM, Heneine W. 逆转录酶活性的高度敏感的定性和定量测定: 最优化、有效性和与其他测定系统的比较分析。 *J Virol Methods* 1996;61(1-2):135-43.

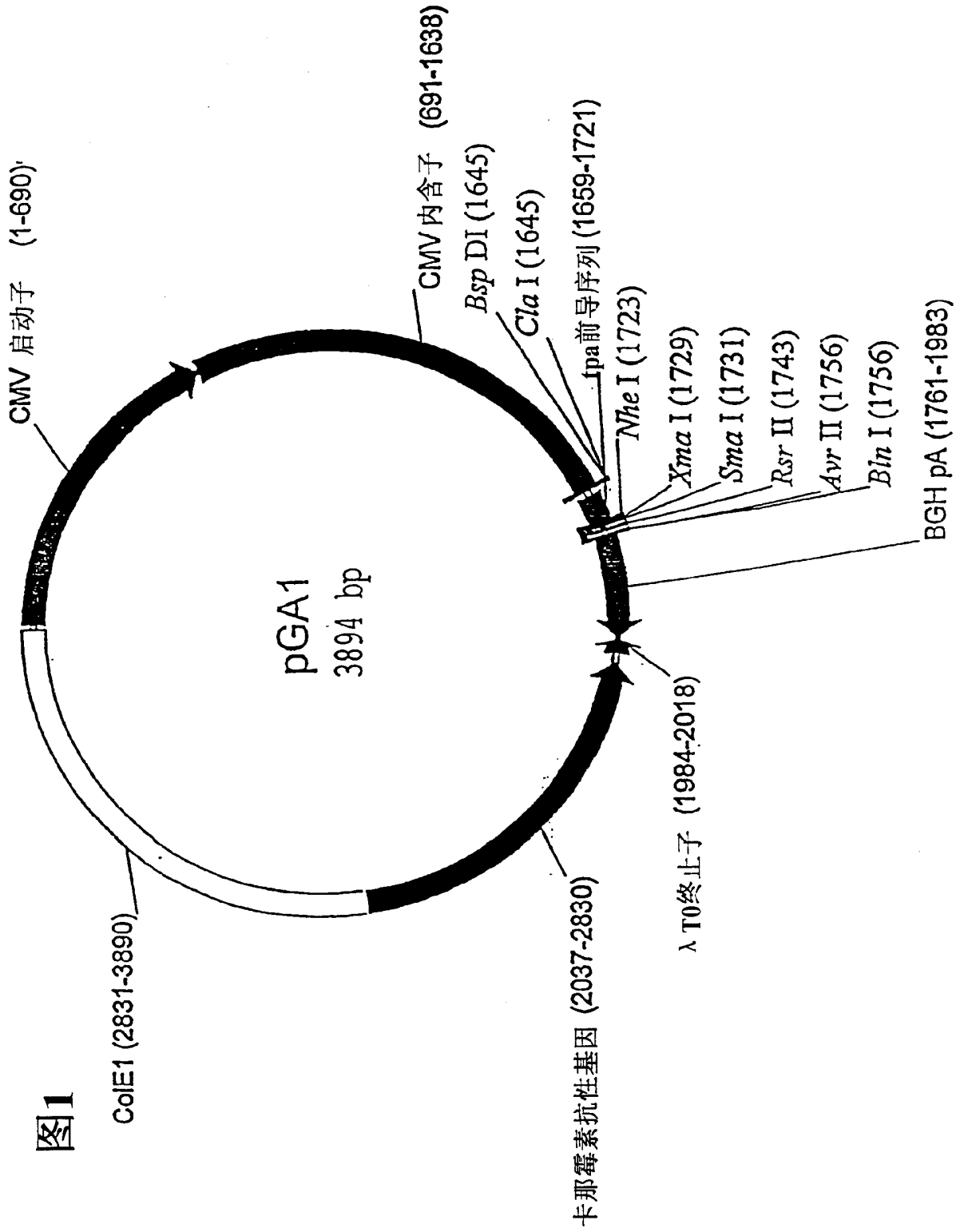
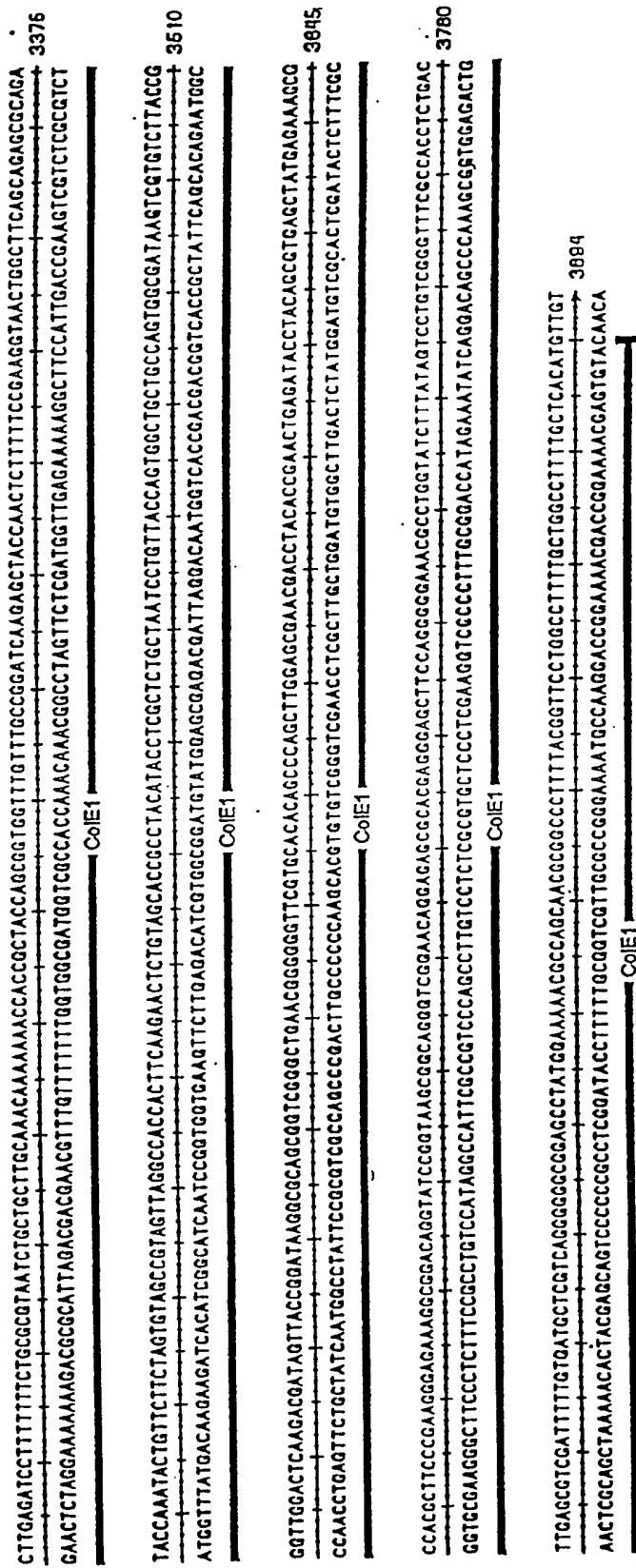


图1

图2

1999年12月21日,星期二,下午7点23分
 pGAI1的最终形式的图谱MPD (1>3894)位点和序列 (第4页)



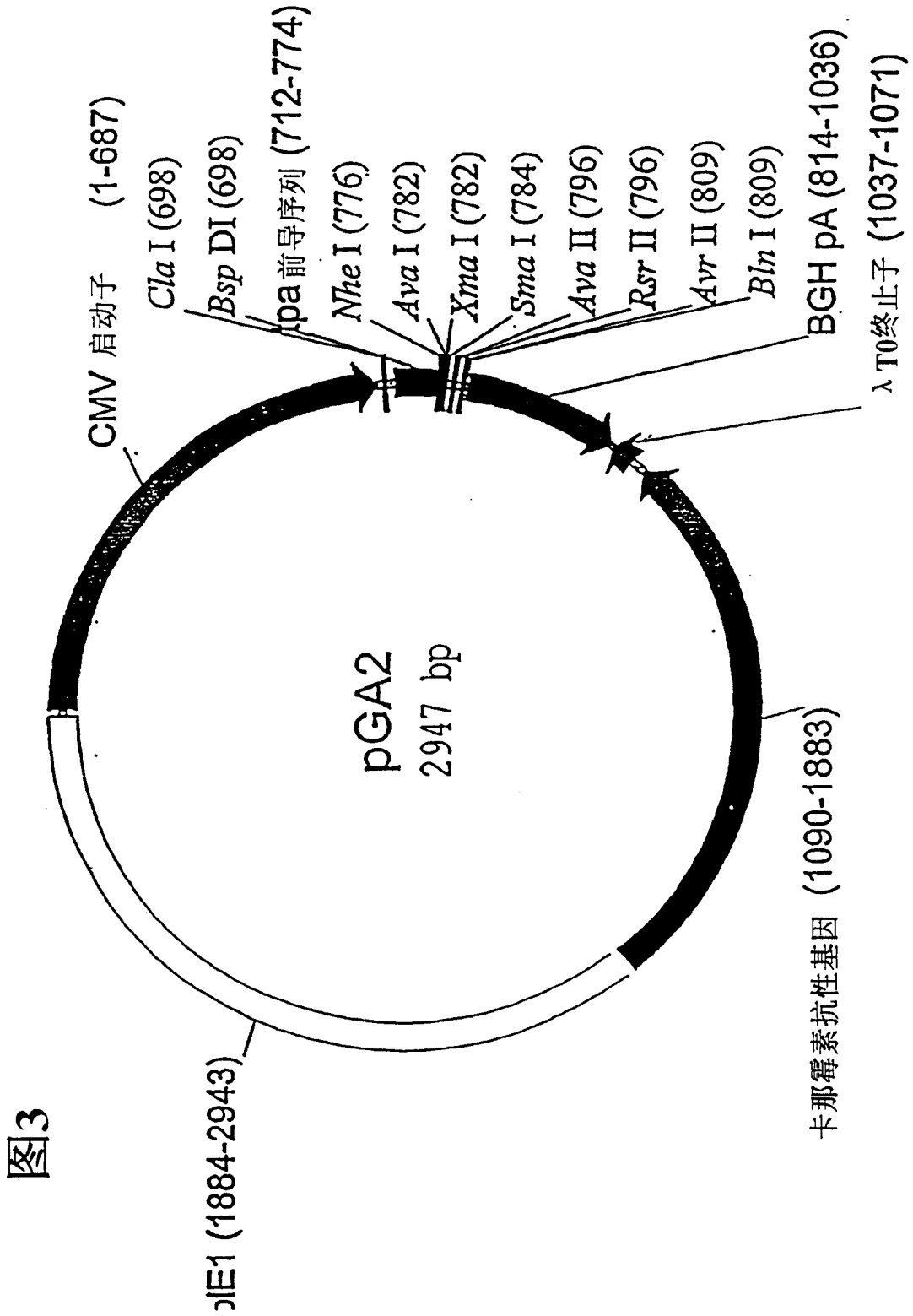


图3

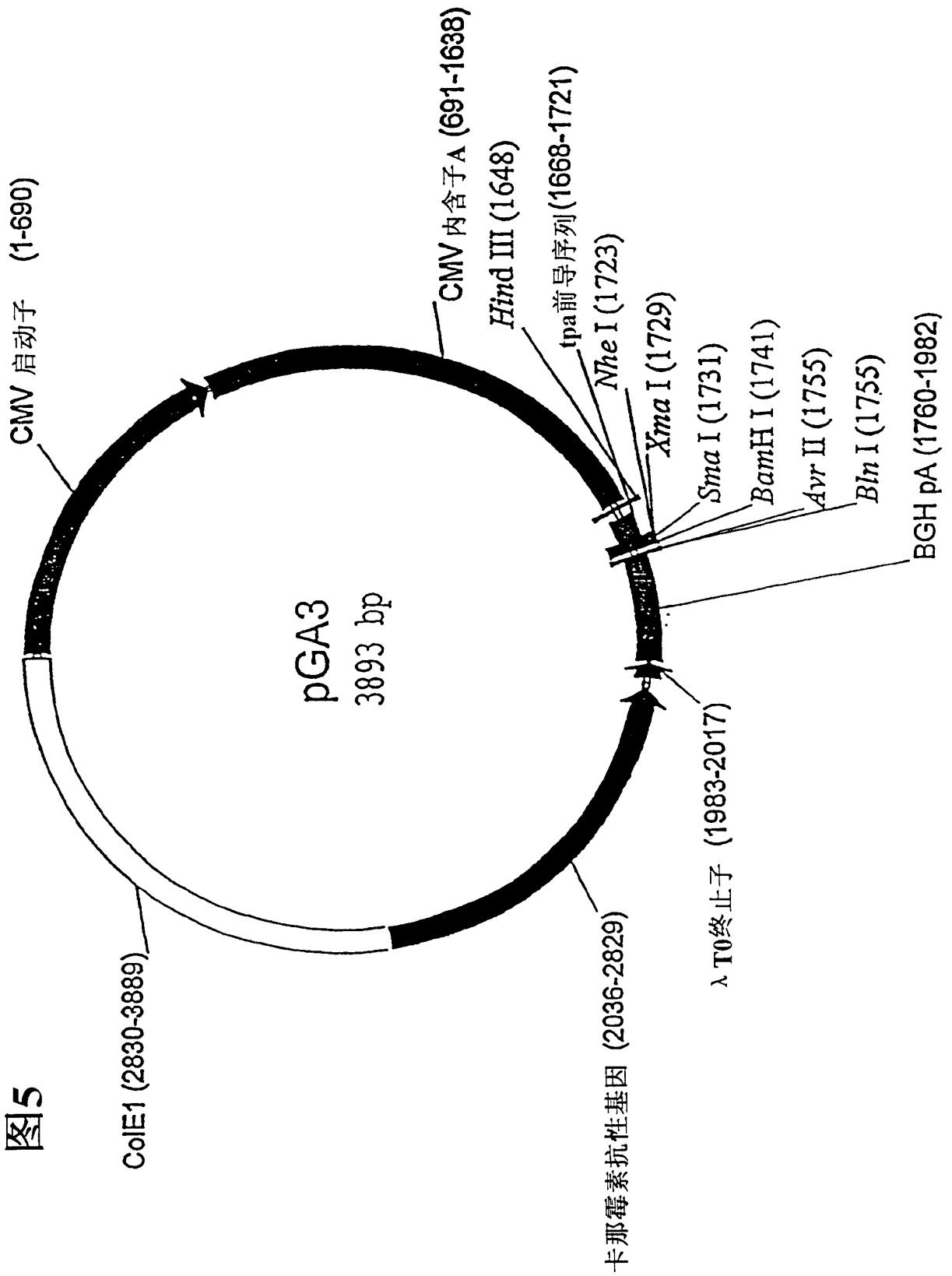


图5

图6

(第3页)

TTGAGATCCTTTTCTCGCGCTAATCTGCTGCTTGC AAACA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGC CGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCG AAGTAAC TGGCTTCAGCAGAGCCGAGAT 3375
 AACTTAGSA AAAAAGACCGGCA TTAGACACGAAACGTTTGT TTTTGGTGGGATGGTCGCCACCAACAACGCGCTAGTTCGATGGT TGAGAAAAAGGCTTCCATTGACCGAAGTCTCTCGGGTCTA
 ColE1

ACCAAA TACTGTTCTCTA BTGTAGCGGTAGT TAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGGAT AAGTCTGTGCTTACCCGG 3510
 TGGTTATGACAAGAGATCACATCGGCA TCAATCCGGTGGTGAAGTTC TTGACACATCGTGGCGGATGTA TGGAGCGAGCGATTAGGACAA TGGTCACCGACCGGTCACCCGCTATTCAGCACAGGAATGGCC
 ColE1

GTGGACTCAAGACGATAGT TACCGGATAAGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTG GTGCACACAGCCAGCTTGGACCGAAGCACCCTACACCGAACTGAGATACC TACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGC 3847
 CAACCTGAGTCTGCTATCAATGGCCTATTCGGCGTGGCCAGCCGACTTGCCCCCAAGCACGTTGTTCCGGTCGAACTCGCTTGGTGGATGTTGACTCTATGGATGTCGCACTCGATACTCTTTCGCCG
 ColE1

CAGCC TTCCEGAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGACCGCCAGGGAGGCTTCCAGGGGAAACGGCTGGTA TCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTCGCCACCCTCTGACT 3780
 GTCCGAAGGGCTTCCCTCTTCCGCTGTCCATAGGCCATTCGGCCTCCAGCTTGTCTCTCCGTTGCTCCCTCGAAAGTCCCCCTTTCGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAGCGGTGGAGACTGA
 ColE1

TGACCGTCCGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGCGGAGCC TATGGAAAAACCCAGCAGCGGGCCCTTTACGGTTCC TGGCCCTTTTGTCTGGCCCTTTTGTCTCACATGTTGT 3893
 ACTCCGACCTAAACACTACGAGCAGTCCCCCGCTCGGATACCTTTTTCGGTGGTTCCGCGGGAAATATGCCAAGGACCGGAAACCGGAAACCGAGTGTACAACA
 ColE1

图7

基因枪接种小鼠激发的全部IgG抗体的量

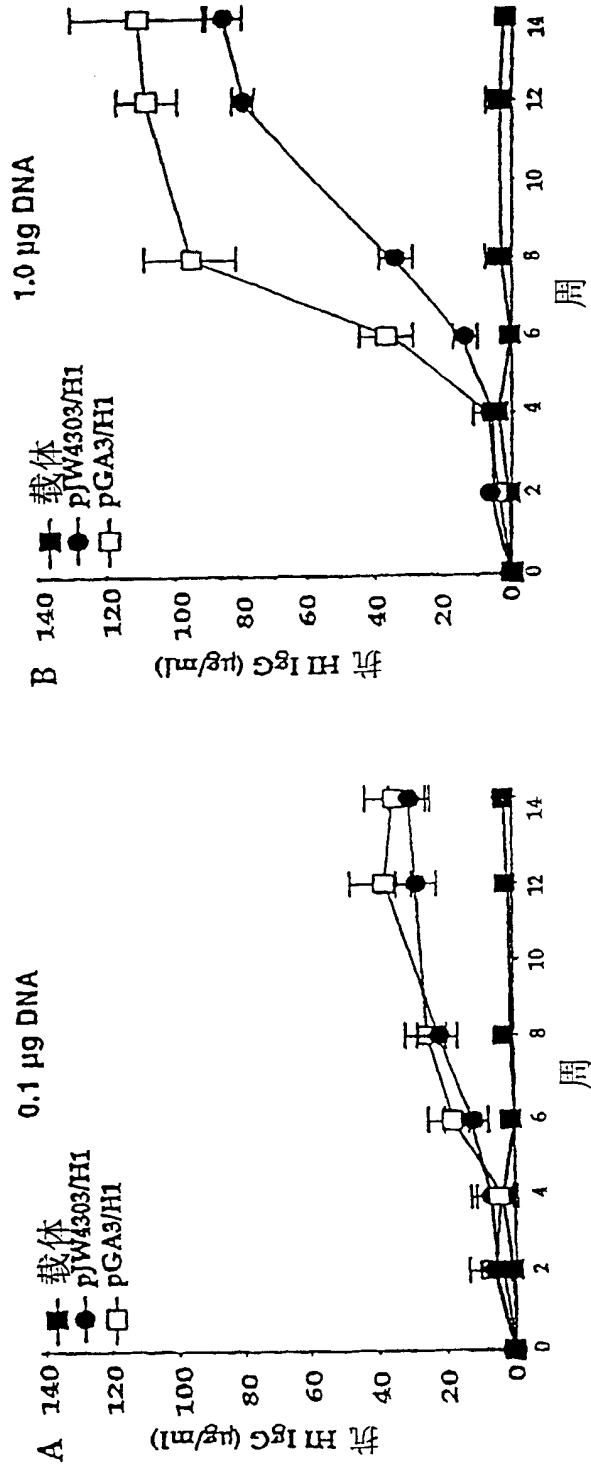


图8

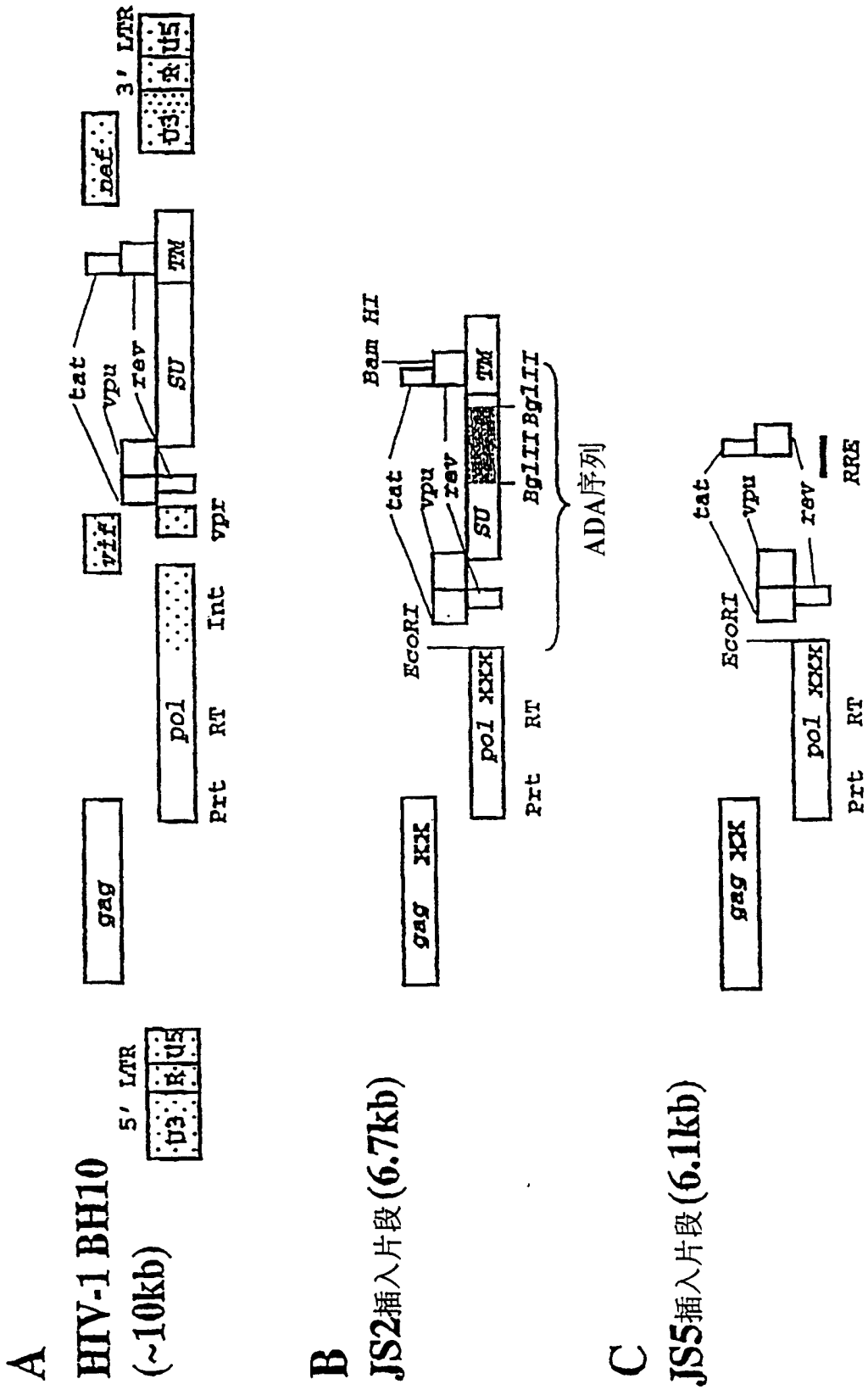
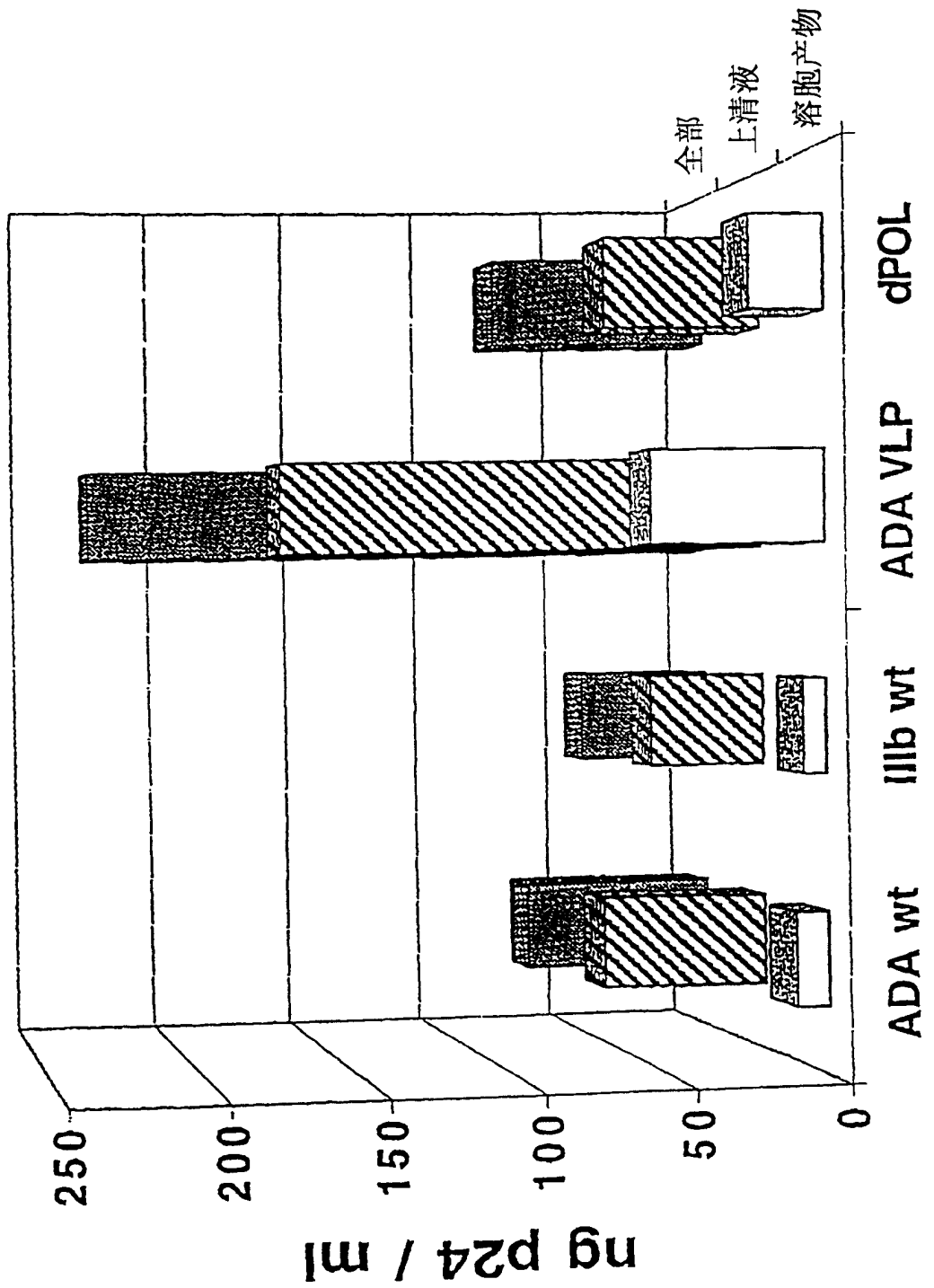
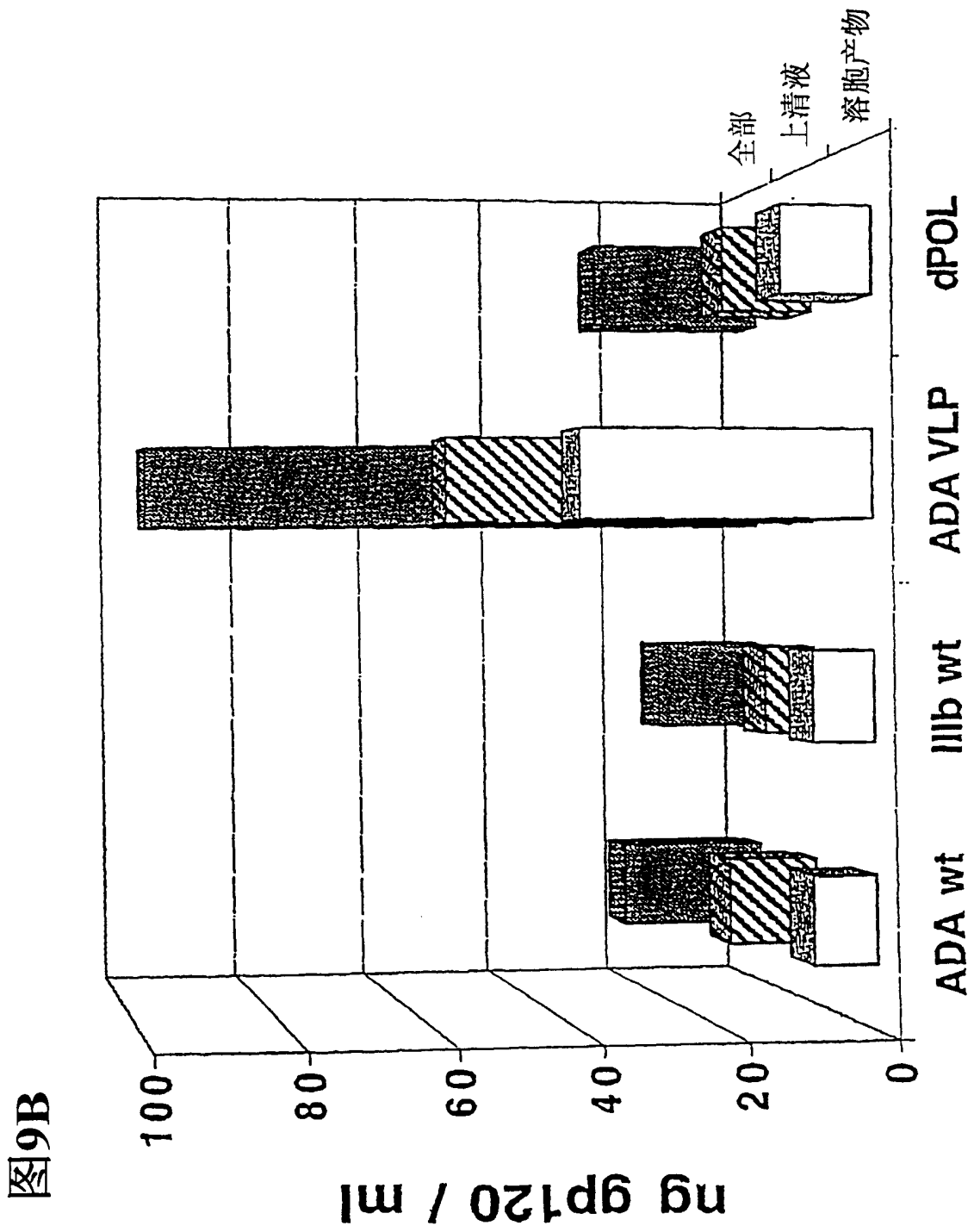


图9A





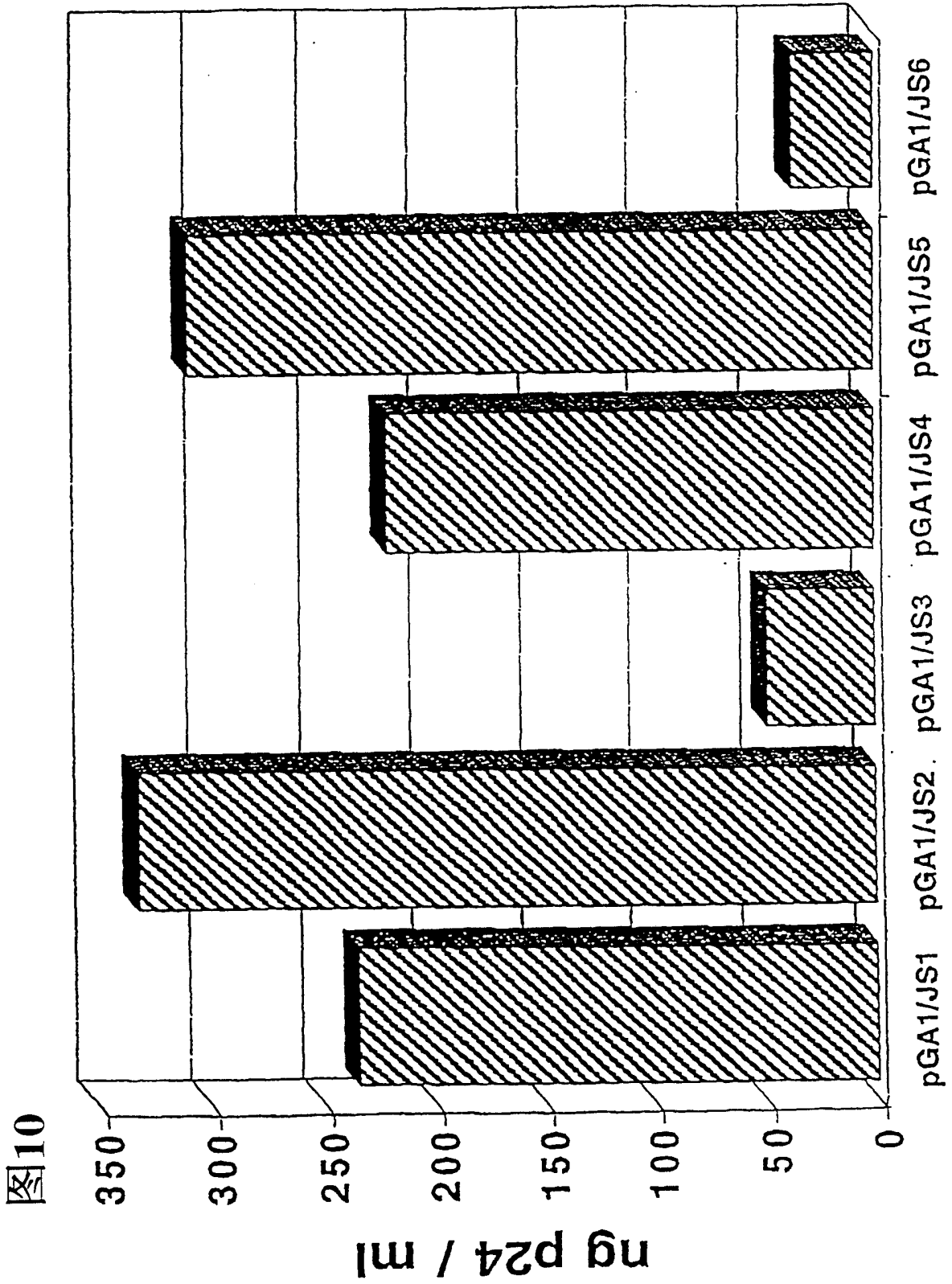


图10

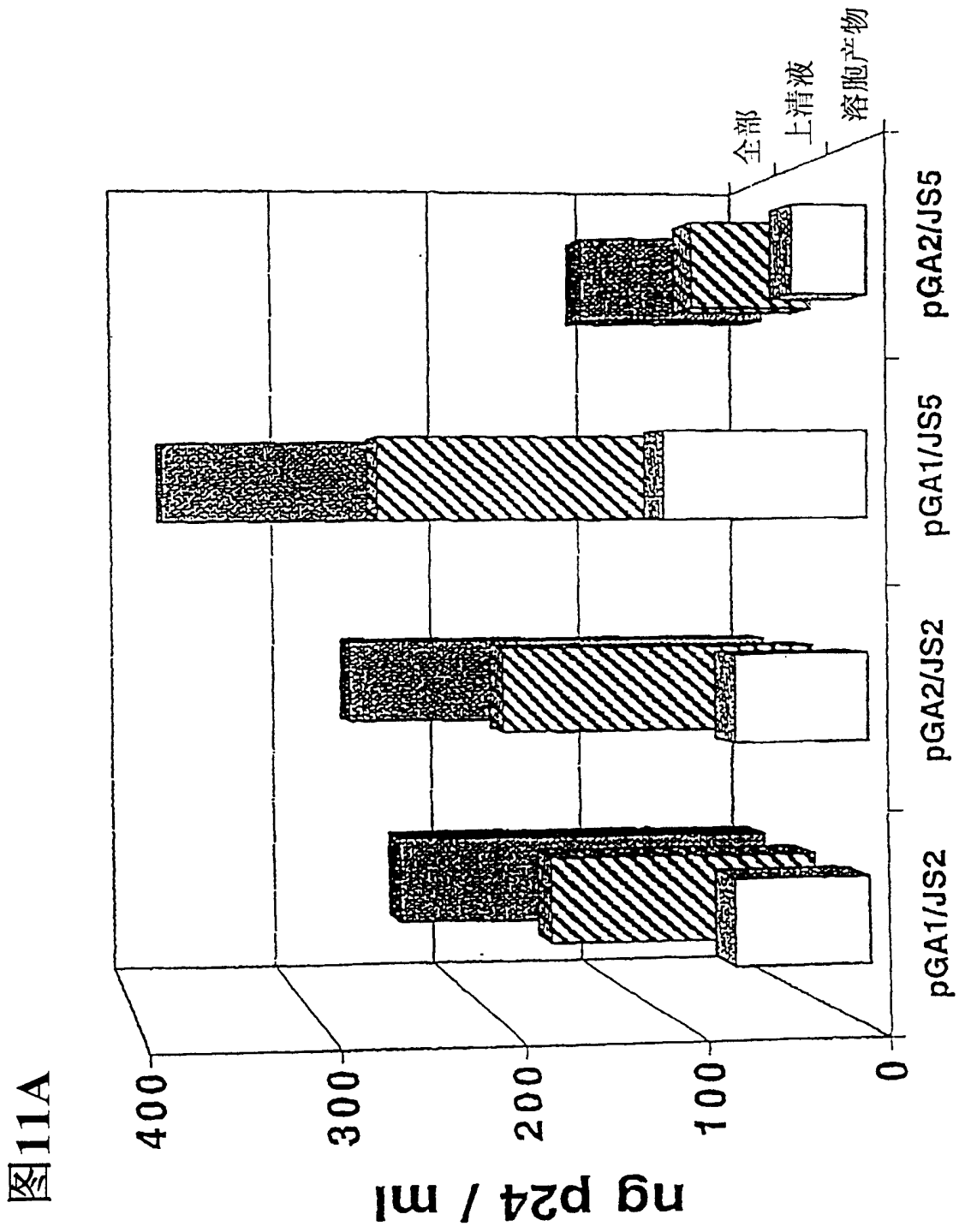


图11A

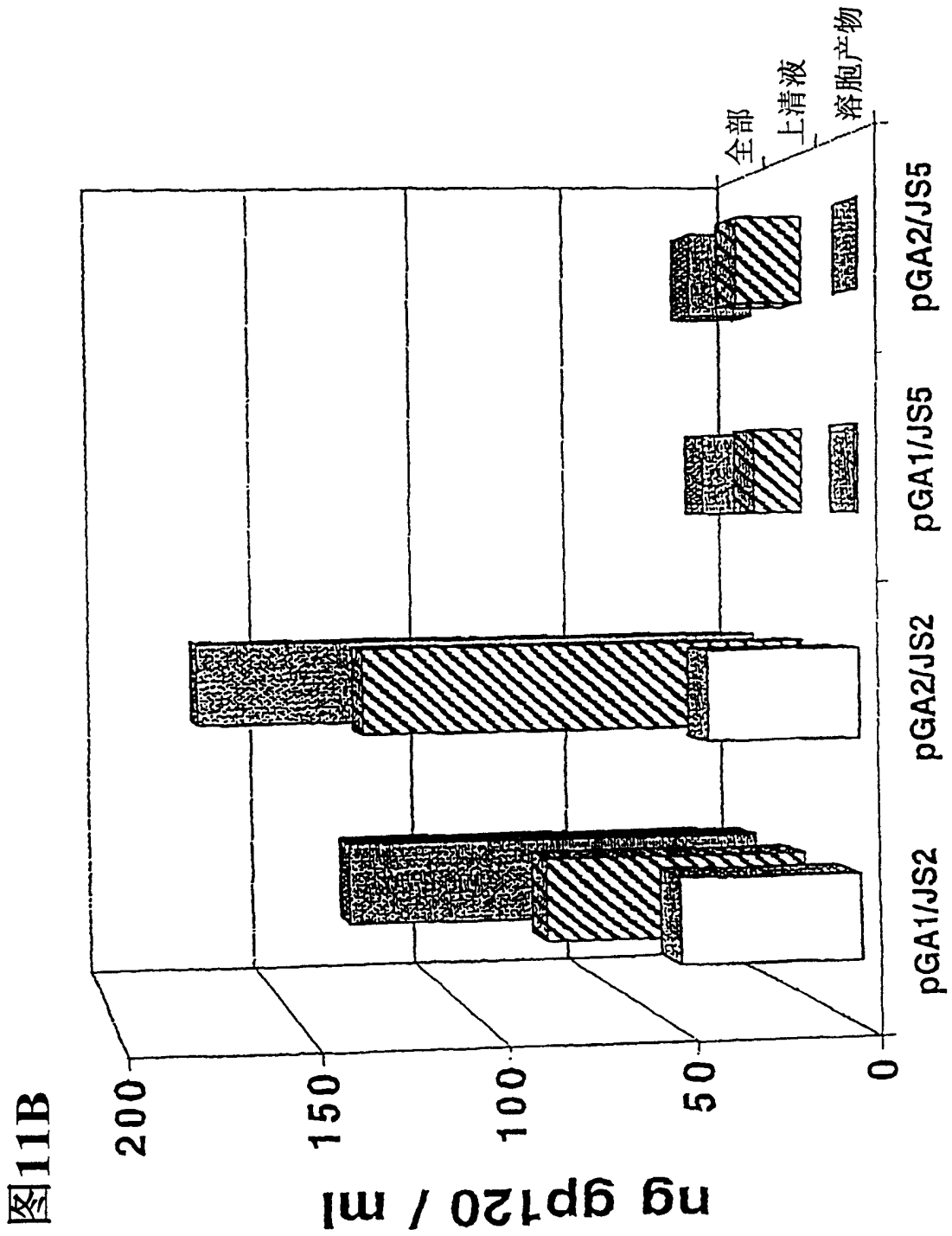
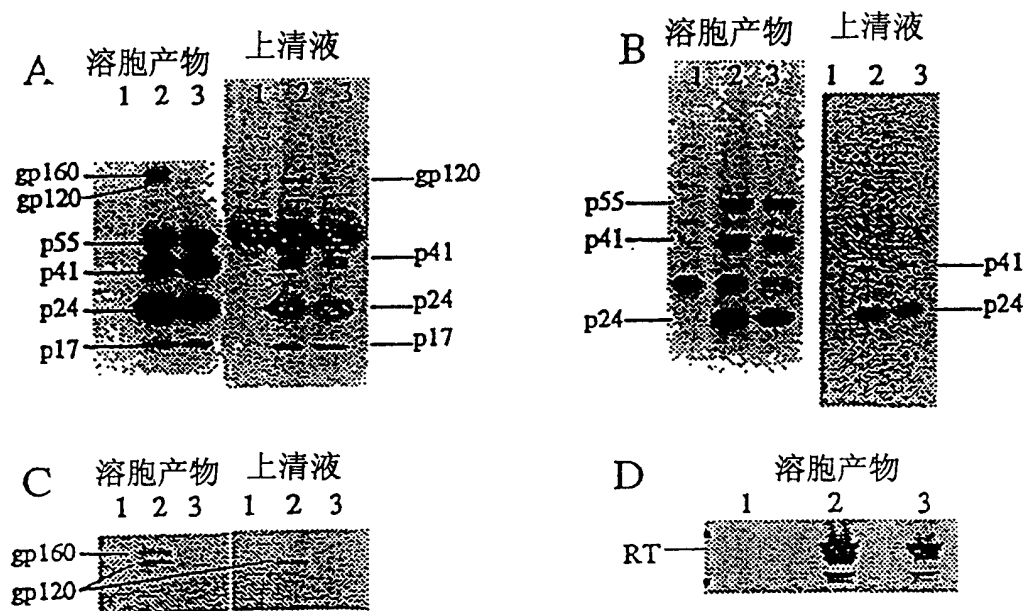


图11B

图12



对被1)模拟病毒 2)pGA2/JS2 3)pGA1/JS5 转染的293T细胞的
溶胞产物和组织培养上清液的Western印迹分析一级抗体为:

- A)来自患者的混合的抗-HIV Ig
- B)抗-p24
- C)抗-gp120
- D)抗-RT

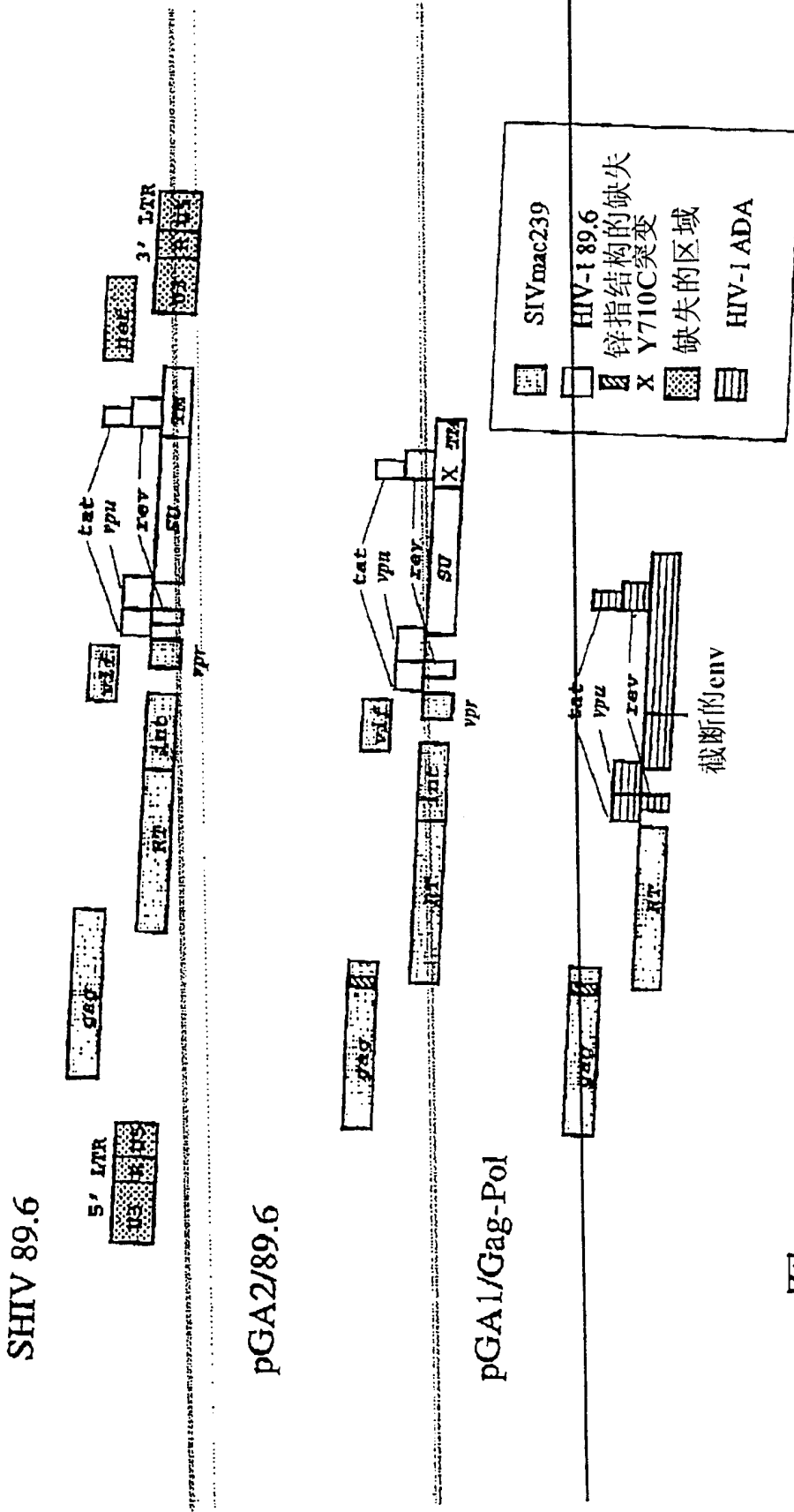


图13

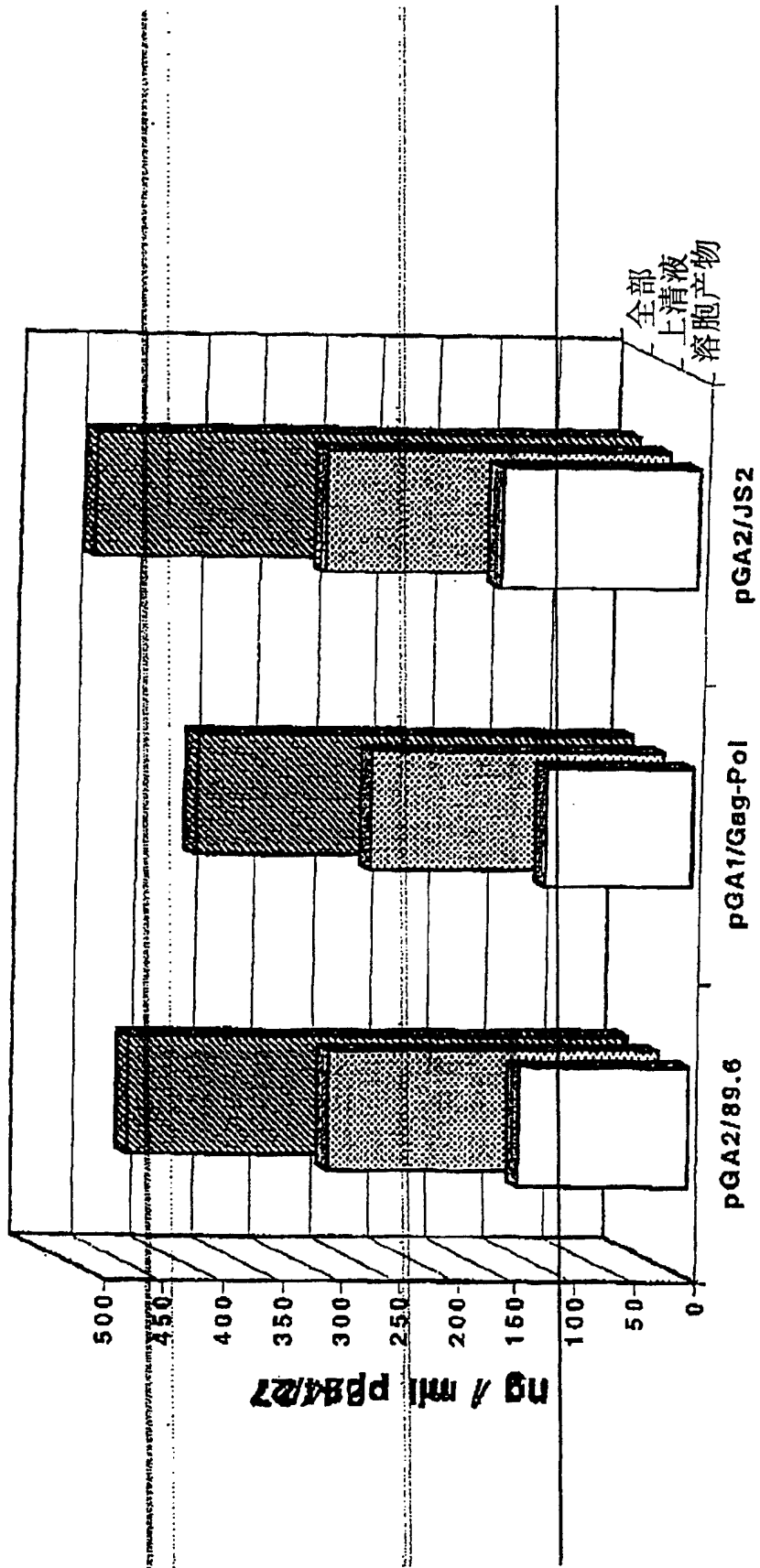
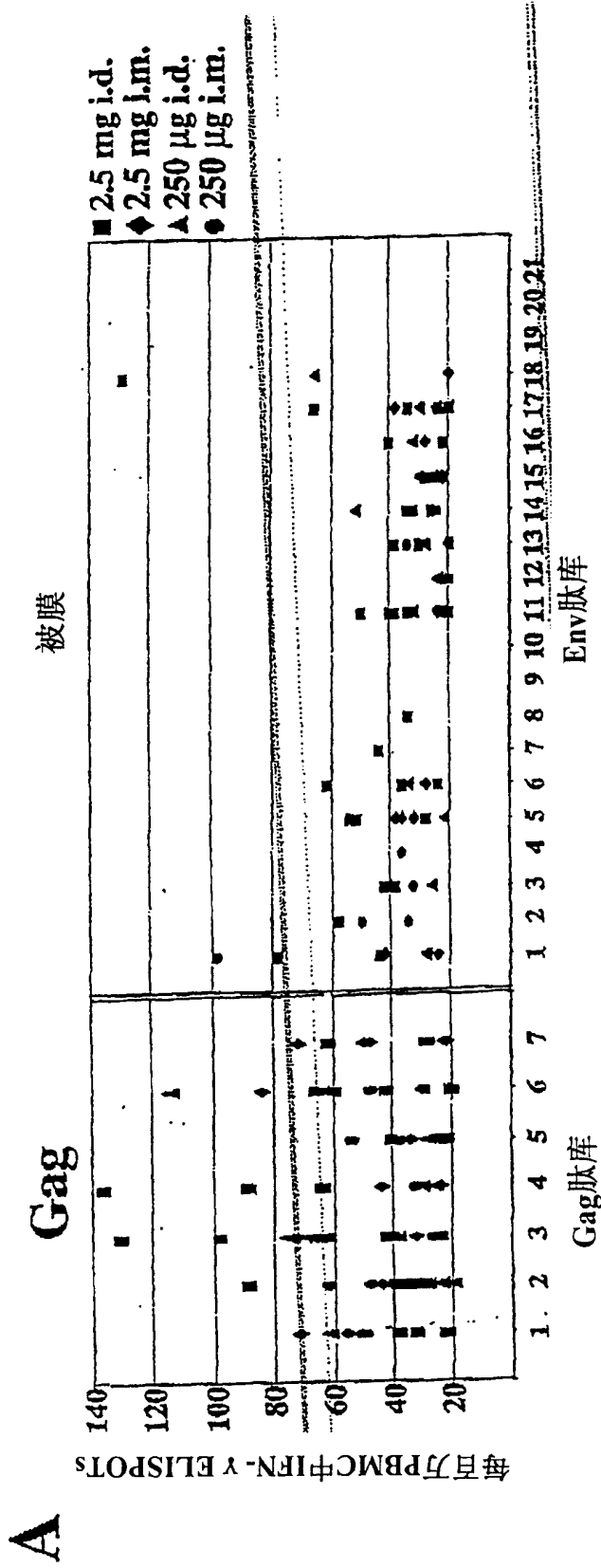


图14



B

DNA 引发	ELISPOTs 高度			ELISPOTs 宽度		
	Gag	Env	Total	Gag	Env	Total
2.5 mg, i.d.	285±130	224±76	509±137	4.5±1.2	5.3±2.0	9.8±2.4
2.5 mg, i.m.	203±97	83±44	286±73	4.4±1.8	2.8±1.3	7.2±1.1
250 µg, i.d.	104±113	101±77	205±183	2.2±2.5	3.5±2.4	5.7±4.5
250 µg, i.m.	76±99	84±110	160±207	1.7±2.0	2.3±2.9	4.0±4.7
对照 DNA	0	0	0	0	0	0

图16

图17

图17: Al 460 enzymes (未经过滤) 环状小范围的文本给出了某些位点 标注的基因编码

2ATGCAAGACTCGGCTTGGTGAAGCGCCACGGCCAAAGGCGAGGGCGGCGGACCTGGTGGCTACGCCAAAATTTTCACCTAGCGGCTAQAAGGAGAGATGGGTGCGAAGGCGTCAQTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGA 160
 | K Q A R A S V L S G Q E L D R |
 300
 GAAAAATTCGTTAAGCCACGGCCAAACAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGCAAGCAGGAGGTAGACAGATTCCAGTTAATCCCTGCTGTAGAAACATCAGAGGCTGTAGACAAATACTGGACAGCTACAA
 E K I R L R P Q Q K K K Y K L K H I V W A S R E L E R F A Y N P G L L E T S E G C R Q I L G Q L Q | 300
 450
 TCCCTTCAGCAGGATCAGAGAACTTAGATTATATACAGTAGCAACCCCTATTGTGTGCATCAAGGATAGATAAAGACACCAAGGAAAGCTTTAGCAAGTAGAGCAAGCAAAACAAAAGTAAGCAAAAAGCA
 S L O T O S E E L R S L Y N T Y A T L Y C Y H Q R I E I K D T K E A L D K I E E E Q N K S K X K K A | 450
 600
 CAAGCAGCTGACACAGGACAGCAGTCAAGTCAAGTACCCATACCCCTATAGTDCAGAAATCCAGGCGCAATCGGTACATCAGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCCATGGTAAAGTAGTAGAAGAGGCGCTTTCAGC
 O A A A D T G H S O V S Q H Y P I Y Q H I O G Q H V H O A I S P R T L N A W Y K Y E E K A F S | 600
 750
 AAAGTAATACCAGTITTCAGCATTATCAGAAAGGACCCACAGATTAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCATGCAAAATCTTAAAGAGACACCATCAATGAGCGACTGCGAATCGGATAGAGTA
 E V I P H F S A L S E G A T P O D L N T H L N T Y O G H O A A H O H L K E T I H E E A A E W D R Y | 750
 900
 CAGTCCATGCGGGCTATTGCCACGCCAGATGAGAGAACCAAGGAGTGCATAGCAGGAAGTACCTTCAGGAAACAATAGGATGGATGCAAAATTAATCCACTCCACTAGCAGAAATTTATAAAGATGG
 P V H A G P I A P G Q H R E P R G S D I A Q T T S T L O E O I Q V H T N N P P I P Y Q E I Y K R W | 900
 1050
 TCCTGGATTAAATAAGTAAAGATGTATAGCCCTACCCAGCATTCTGACATACACAGGACCAAAAGACCTTTTAGACACTATGACAGCTATGACAGCTTCTAAGCCGTTCTATAAACTTAAGCCAGCAAGCTTCCAGGAGGTAAAAAT
 I L Q L N K I V R M Y S P T S I L D I R O Q P K E P F R D Y V D R F Y K T L R A E O A S Q E Y K N | 1050
 1200
 TGCAGAAACCTTGTGGTCCAAATGGGAGCCAGATTGTAAGCTATTTAAAGCATTTGAAAGCATTTGGGACCGGCTACACTAGAAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGAGTAGAGAGCCGCCATAAGCCAGAGTTCGCTGAA
 M T E T L L Y O N A N P O C K T I L K A L O P A A T L E E H M T A C O G V G G P G H K A R V L A E | 1200
 1350
 TTAGCCAACTAACAAATACAGTACCATAATGATOCAGAGGCCAATTTAGGACCAAGAAAGATGGTTAAGCCTTCAATACCGCCAAAGAGGCGCACACAGCCAGAAATTCGAGGGCCCTAAGAAAAAGGCGCAGCTGCAAA
 M S Q V T H T A T I M H O R G N F R H O R K H V K S F N S C K E Q H T A R N C R A P R K K Q S W K | 1350
 1500
 :GAAAGGAGGACCAAAAGAAATTGACTGAGACAGGCTAATTTTAGGAGAGATCTGGCTTCTACAGGAGGCCAGGAAATTTCTCAGACAGAGCAGCCACCCACCCACCTTCTCAGAGCAGCA
 G K E G H Q H K D C T E R O A N F L Q K I V P S Y K G R P G N F L O B R P E P T A P P F L O B R P | 1500
 | F F R E D L A F L O K A R E F S S E O T R A N S P T I S S E O T | 1600

图 17

(第3页)

TAACAGGCGCAGTGCAGAAATACCCACAGAAAGCATAGTAATCGGAAAGAGCTCTAAATTTAAAGTACCCTACAAAAGCAACATCGGAAACATGGTGGACAGAGTATCCCAAGCCCACTGGATTCCTDAGTGGGATTC 3160
 L T E A Y Q K I T T E S I Y I V Q K T P K F K L P I O K E T W E T W H T E Y W O A T W I P E W E F
 ATACCCCTCTTAGTGAATATGGTACCAGTTAGAGAAAGACCCATAGTAGGACAGAAACCCTTCTATGTACATGGCCAGCTAGCCAGTAACTAACAGGACACTAAATAGGAAAGCAGGATATGTTACTAAAGAAAGCAAAAGGTTG 3300
 H T P L Y K L W Y Q L E K E P I Y Q A E T F Y V D G A A N R E T K L Q K A G Y Y T N K G R O K Y
 CCTAAGCTACAGCAAAATCAGAAACTCAGTTACAGCAATTTATCTAGCTTCCAGGATTCAGGATTAACATAGTAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAAATCATTTCAAGCACAACCAGATAAAAGTCAATCAGGT 3460
 P L T N T T H Q K T O L O A I Y L A L Q D S Q L E Y N I Y T D S O Y A L G I I Q A Q P D K S E S E
 TCAATCAATATAGACAGTAAATAAAGAAAGGCTATCTGCAATGCGTACCCAGCAGCAAGAAATTCAGCAAGTAACTAGTACTGCTGGAAATAGTAAATAGTACTATTTTAGATGGAATAGATA 3600
 Y N Q I I E O L I K K E K Y Y L A V Y P A H K Q I Q Q H E Q V D K L Y S A Q I R K I L F L D G I D
 TCCAADTAACATTCCGACAACTGCTGTTATCCATTTTCAGAAATGGGTGTCGACATAGCAGATAGCCCTTACTCCACAGGAGAGCAAGAAATGAGCCAGTACCTAGACTAGCCCTGGAAGCATCCAG 3760
 A O D E H
 M E P Y D P R L E P W K H P
 ATCAGCTAAAGACTGCTGTACCAATTCCTATTGTAAAGATGCTGTTTCATTCGCAAGTTGTTTCATACAAAAGCCCTTAGCCATCTCCTTAGCCAGGAAAGCCGACAGCAAGCAAGCCCTCCCAAGACAGTCCAGCTC 3900
 S O P K T A C T N C Y C K K C C F H C O V C F I T K A L G I S Y Q R K K R R Q R R R P P O D S Q T
 M A G R S G D S D E D L L K T Y R L
 AATTCTCTATCAAGCAGTAAAGTAAATGTAATGCAACCTTTACAAATATTAGCAATAGTATAGTACGCAATATAGCAATAGTTGTGGCCATAGTATTCATAGCAATATAGCAAAATATTACAGCAAGAA 4060
 J Y S L S K O
 K F L Y O S
 TAGACAGCTTAATTGATAGCATACAGAAAGCAGAGACAGTGGCAATGAAGTGAAGGGGATCAGGAAGAAATATCAGCACTGTGGAAATGCCCATCTGCTTGGGATGTGATGATCTGTAGTCTGTAGCAAAATTTG 4200
 A M K Y K G I R K N Y O H L W K Y G I H L L Q H L H I C S A V E H L
 ADA ENV

图17

(第4页)

TCGTCACAGTTTATTTCGGSTACCTGTGTGGAAAGAGCAACCACCTCTATTTTGTCCATCAGATCCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATCTTTGCCCCACACATGCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAAGAGTA 4960

-----|at|-----

Y V T V Y Y Q V P V W K E A T T T L F C A S O A K A Y D T E V H N Y W A T H A C V P T D P H P Q E Y
ADA env

GTATTGAAAATGTCACAGAAAATTTAACATGTGGAAAATTAACATGCTAGAACAGATGCATGAGGATTAATCACTTTATGGATCAAGCCTAAAGCCATGTGTAAATAAACCACCTCTGTGTACTTTAAATTCACACTGATTTG 4960

-----|at|-----

Y L E N Y T E H F N H W K N H H Y E Q H H E D I I S L Y D Q S L K P C Y K L T P L C V T L H C T O L
ADA env

GGAAATGTTACTAATCAATACTAGTGGGAAATGACAGGAAATAAAAGCTGCTTTTCAATATCACCAAGCATAAGAGATAAGGTGAGGAAAGACTATOCACCTTTTTTATAGACTTGATGTAGTACCACCAATAGATAATGAT 4960

-----|at|-----

R N V T N I H N S S E Q H R Q E I K N C S F N I T T S I R D K V K K D Y A L F Y R L D V Y P I D N D
ADA env

IACTAGCTAGCTGATAAATGTAATAGCTCAACCATTACACAGCCCTGTCCAAAGGSTATCCTTTGAGCAATTCCTACATACATTTGTACCCCGGCTGTTTTCCGATTCTAAAGTGTAAAGCAAGAAAGTTCAATGGAACAGGG 4960

-----|at|-----

H T S Y R L I N C N T S T I T O A C P K Y S F E P I P I H Y C T P A Q F A I L K C K D K K F N G T Q
ADA env

:CATGAAAATGTCAGCAGTACAAATGACATGGAAATAGGCCAGTAGTCAACTGCTGTTAAATGCCAGTCTAGCAAGAGAGGCTAGTAATTTAGATCTAGTAATTTCCACAGACAAATCCAAAACCAATAATAGTACAG 4960

-----|at|-----

P C K H Y S T Y Q C T H O I R P V Y S T O L L L N G S L A E E E V Y I R S S H F T O N A K N I I Y Q
ADA env

图17

(第8页)

```

TCGCTCGTAACTCTGTACAGTCCGCTCCGAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCGGTTGCAAGACATAGTTACCGGATAGCCGACGGCTCGGCTGAACGGGGTTCGTCACACAGCCAGCTTGGACCGAAGA
8650
      pGA2
CTACACCGAAGTAACTACAGGTGAGCTATGAGAAAGCCACGGCTCCGGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGATAGCGGCAAGGTCGGAACAGGAGAGCCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGATCTTT
8700
      pGA2
TTGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGGCCGTCGATTTTGTGATGCTGCTGTCAGGGGGGGAGCCTATGGAAGAGCCGCAACCGCGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTCCTCACATGTTGTCGAGCG
8850
      pGA2
CAATATGCTATGGCCATTGCATAGCTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATGGCTCATGTCGAAATGACGGCCATGTCGACTGATTAATGTAATCAATTAACGGGTCATTAGTTCATAGCC
9000
      pGA2
ATATAGGATTCGGGTTACATAACTTACGTTAAATGCGCCGCTGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATGACGTCATAATGAGCTATGTCCTCATAGTAACGGCAATAGGAGCTTTCATTAAGCTCAATGGCTGGAGTATT
9150
      pGA2
CGGTAACGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCGCCCTATTGAGGTCATGACGGTAAATGGCCCGCTGCAATTAAGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTTATA
9300
      pGA2
TCATCGCTATTACCATGTCATGCGGTTTGGCAGTACACCAATGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATTTCCAGTCCACCCCATGACGTCATGGAGTTTGTTCGACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGT
9450
      pGA2
GTAATAACCGGCGCCCTGACGCAATGGCGGTGACGCGGGAGGTTCTATAGCGAGGCTGCTTTAGTGAACCGTCAATCGC
      pGA2
      9545

```


图18

(第3页)

TCTAGTGGCTTTTAAATAACAAATCCGACATAGTATGTCATCAATACATGAGAGTCCAGCATAGACAAATAAGAGGAGTCCACACATCTGTTGAGCTGGGCACTTACCACAC 2850
 I L E P F K K Q H P D I V I Y Q Y M N D L Y V Q S D L E I G Q H R T K I E E L R Q H L L R W G L T T
 -pol(缺失的整合酶)
 CAGCAAAACATCAGAAAGACCTCCATTCCTTCGATCGGTTATGAAATGGAAGTACAGCTATAGTGGTCCAGAAAAGACAGCTGGACTGTCAATACATACAGAGTTAGTGGGGAATTCGAATACCG 2700
 P D E K H O K E P P F L W H G Y E L H P D K W T V O P I V L P E K D S W T V N D I O K L V G K L H T
 -pol(缺失的整合酶)
 CAGTGCATTAACCCGCAATTAAGTAAGCAATATGTAAACTCCTTAGAGGAACCAAGCACTAACAGAGTAATACCCTAACACAGAGAGCAGCTAGCAATCCCAAAACAGACAGACATTTTAAAGAACCCAGTACATCGAG 2850
 A S Q I Y P G I K Y R Q L C K L L R D T K A L T E V I P L T E E A E L E L A E N R E I L K E P Y H C
 -pol(缺失的整合酶)
 TGTATTGACCCATCAAAGACTTAATGCGAATACAGAGCCAGGCGCAAGGCCATGGACATATCAAAATTTTCAAGAGCCATTTAAATCTGAAACAGGAAATATCCAGAAATCCAGGCTGCCCCACACTAATCATCTAAAGC 3000
 Y Y T O P S K D L I A E I O K Q Q Q W T Y Q J Y Q E P F K N L K T G K T A R H R G A H T H D Y K
 -pol(缺失的整合酶)
 AATTAAAGAGCCATGCAAAAATACACAGAAAGCATAGTAAATGCGGAAAGACTCTAAATTTAAACTCCATACAAAAGCAATCCGAAACATGTCGACAGACTATGGCAAGCCACTGATTCCTCAGTGGGAGTTG 3150
 Q L T E A Y O K I T T E S I Y I W O K T P K F X L P J O K E T W E T W V T E Y W O A T V I P E W E F
 -pol(缺失的整合酶)
 TTAATACCCCTCTTAGTGAATTTAGTACAGTACAGCAAGCCATAGTACAGCAAGCCCTTCTATCTACTACATCCGCGACCTAACGGGAGACTAAATTAGGAAAGACGGAATAGTTACTAACAAAGGAGAGCAAAAGTGTG 3300
 Y N T P L Y K L W Y Q L E K E P I V G A E T F Y D G A A A N R E T K L G K A Q Y Y T N K G R O K Y
 -pol(缺失的整合酶)
 TCCCTTAAGTACAGCAAACTCAGTTACAGCAATTTATCTAGCTTTCAGGATTAAGATTAACATAGTACAGCAGCTCAGCAATATCCATTTAGGAACTTTCAGCAGCAAGCAGATAAAGTCAATCGAGT 3450
 Y P L T H T I H O K T O L O A I Y L A L O D S Q L E V N I V T D S O Y A L G I I Q A O P D X S E S E
 -pol(缺失的整合酶)
 TAGTCANTCAATATAGACGCTTAATAAAAAGGAAAGGCTCTATCTGCGATGGTACACAGCAAGGAAATCGAGGAAATGCAAGTAGATAAATTAGTCAAGTCTGGAAATCAGAAATACTATTTTAGTCCGAAATAGATA 3600
 L V N Q I J E O L J K X E X Y Y L A W V P A H K G I G G H E Q Y D X L Y S A G T R K I L F L D G I D
 -pol(缺失的整合酶)
 AGCCCAAGATGACATGATTGCGCAACTGCTGTTATCCATTTTCAGAAATGGTGGTCCACATAGCAGAAATAGGCTTACTGCGACAGGAGGCAAGAAATGGCCCTACTGACTAGACCCCTCGAAGCCATCCAG 3750
 K A Q D E H
 -pol(缺失的整合酶)

图18

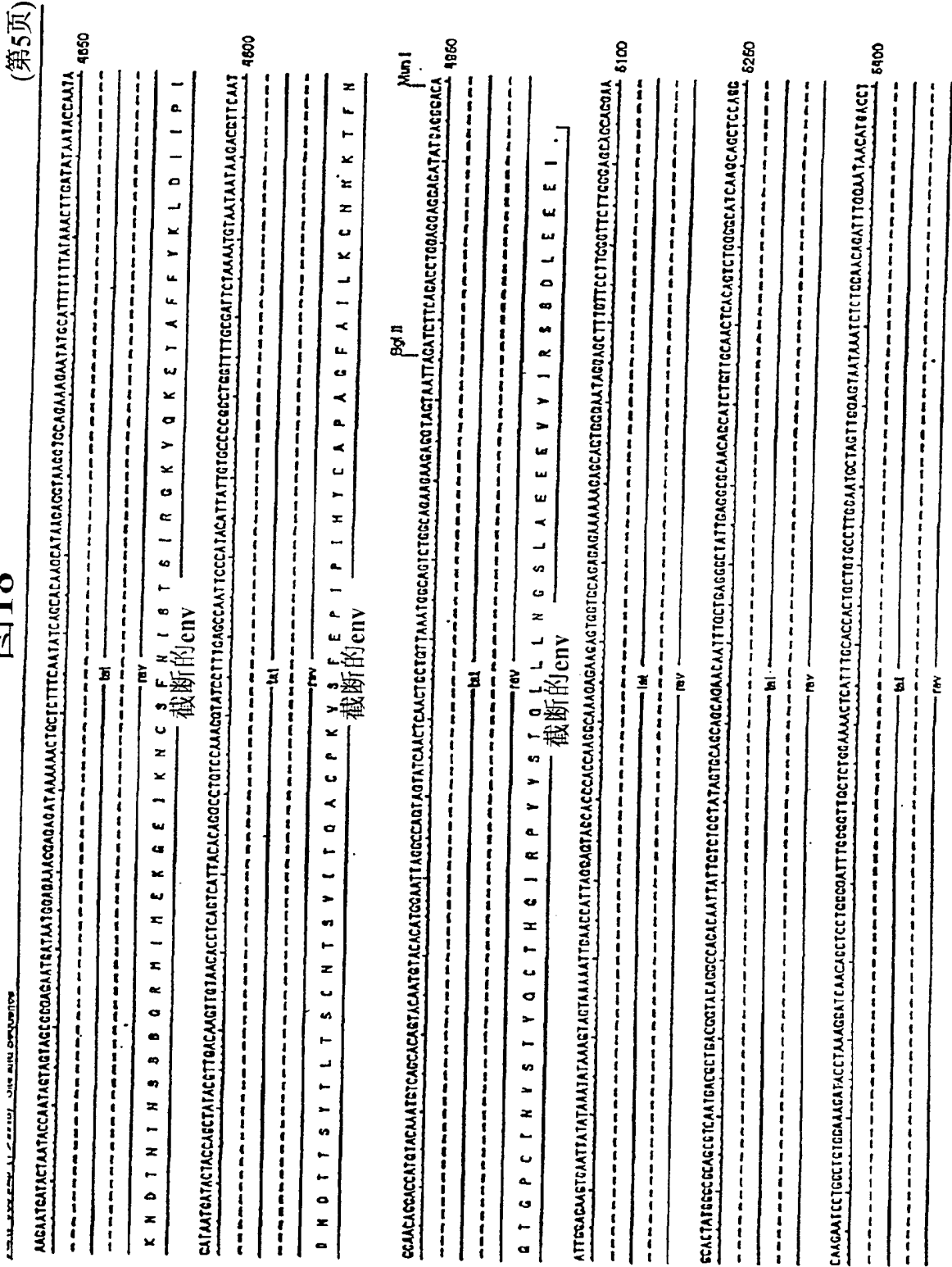


图18 (第7页)

AAGGCGCATTTCCACCATGATTTGGCAAGCAGCCATCGCCATCGGCGATCGCCATCGCCCTTGAAGCTGGCAACATTCGCGTGGCGAGCCCTGATCTCTTCTCCAGATCATCCCTGATCGA 8760
 | NcoI | SphI |
 -----PGA1-----
 CAAGCGGCTTCCATCCGATGCTGCTGATGCGATGTTTGGCTTGGTGTGMAATGGCCAGGTAGCCGATGATGCAAGCTATGCAAGCCGCGGATTCGATCAGCCATGATGGATGCTTCTCGGACGGCAAGGTGABATGACA 8900
 -----PGA1-----
 GAGAGCTGCGCGCGACITCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCGCGAAGCGCCGCTGCTGCGCCAGCATAGCCGCGGCTGCTGCTGCTTCCAGTTCCATTCAGGCGCACCGACA 7050
 -----PGA1-----
 CGTCGCTGTGACAAAGAACCGCGCGCTGCTGCTGACAGCCGGAACAAGCGCGCATGACAGCCAGGCGATGCTGCTGTTGTGCGCAATGCAAGCCGAAAGCCCTCCACCCAAAGCCGCGGAGAACCTGCGTCCCAATCCATCTTCTT 7200
 | XbaI |
 -----PGA1-----
 CAATCATGCGAAGCATCCATCTGCTGATTCAGATCTTGATGCGCTGCGCCATGATGCTTGGCGCGGAGAAAGCCATCCAGTTACTTTGCAAGGCTTCCAAAGCTTACGAGGCGGCGCCAGGTGCGCAATTCGCGTCCG 7350
 -----PGA1-----
 TTGCTGTGCATAAAGCGCGGATGCTATGCGATGAGCGGCACGTCGAAGCTAGCTGCTTCTGCTTGGCGTGGCTTTTCCCTGTCCAGATGAGCCAGTAGTGCATCATCGCGGCTCAGCCGCTTCTCGCGACTGCGCTT 7500
 -----PGA1-----
 TCTAGCGAAAGGATAGGATGATGCTTTTGATATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGCTGAGTTTGGTTCCACTGAGCGCTCAGACCCGCTGAAAGGATCAAGGATCTTCTTGAATCTTTTCTCGCGGTAATCTGCT 7650
 -----PGA1-----
 GCTTCACAAJAAJAGCCGCGTACCAGCGGCTGCTTTTGGCGGATCAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAAGGTAACTGGCTTCAGCAGCGCCAGATACCAAAATACTCTCTTAGTGTATGCGCTAGTATGCGCCAGCACTTCA 7800
 -----PGA1-----
 AGAACTCTGTAGCAGCGGCTGATAGCTGCGCTGCTGCTTACCGGTAGCTGCTGCTTACCGGCTTGGAGTCAAGACGATATACCGGATAAAGGCTTAAGGCTGCGGCTCGGCTGCAAGCGGCGGCTTCTG 7950
 -----PGA1-----
 GCACAGCCGAGTTGGAGCGAAGCGACTACCGGAAGTGGATACAGCTGAGCTGAGCTATGAGAGCGGCAAGAGCGGAGAGTACCGTAAAGCGGAGCGTCCGAAAGCCAGCGCTCCGAAAGCCAGCGCTCCGAAAGCCAGCGCC 8100
 -----PGA1-----
 TTCCAGCGGAAAGCGCTGCTATCTTTATAGTCTGCTGCGTTTCGCGCAGCTGACTGAGCGTCAATTTTGTGATGCTGCTGAGCGGCGGAGCGCTATGGAAGAACCCAGCAAGCGGCGCTTTTACGCTTCTGCGCTTCTGCT 8250
 -----PGA1-----

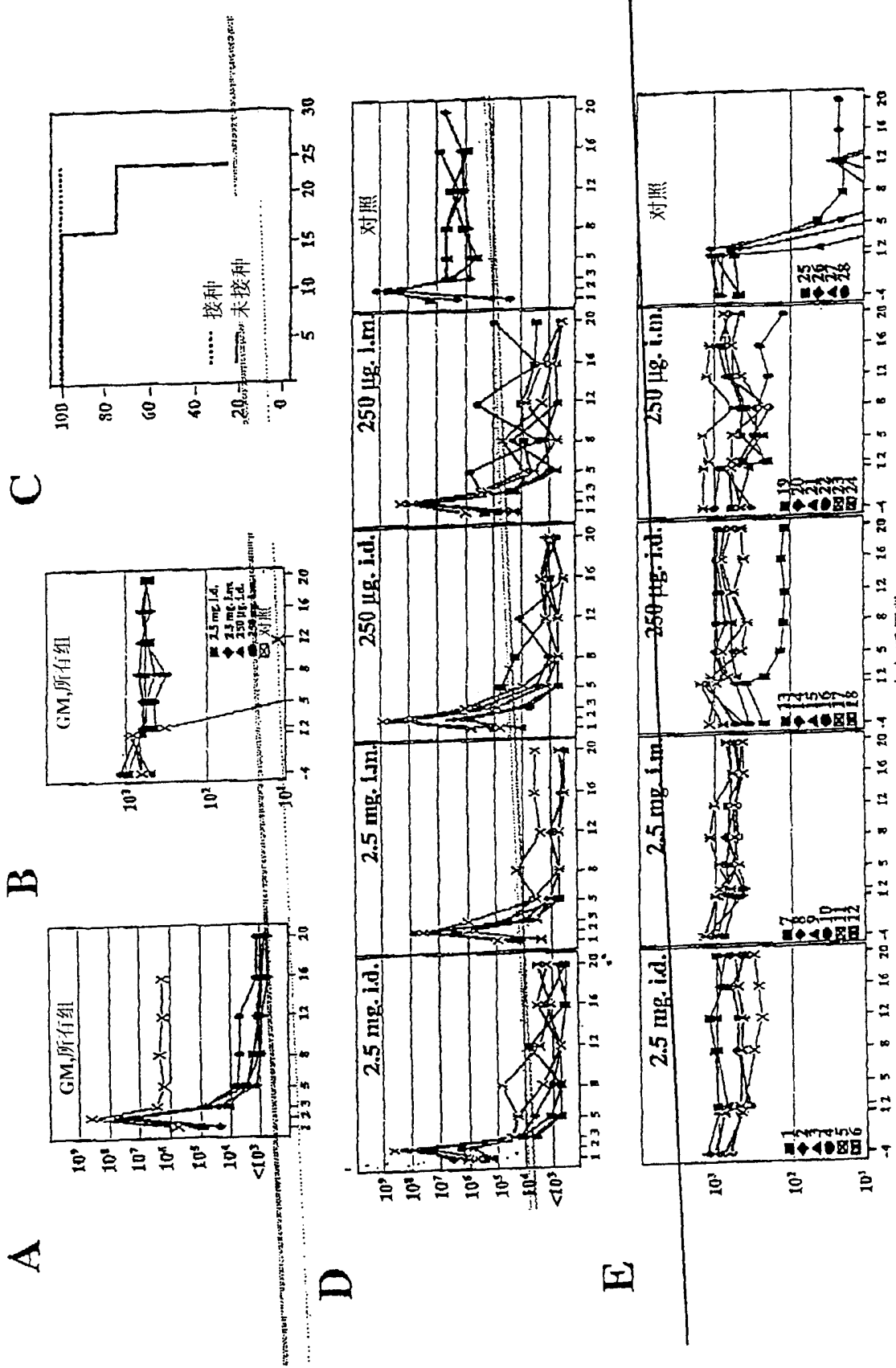


图19

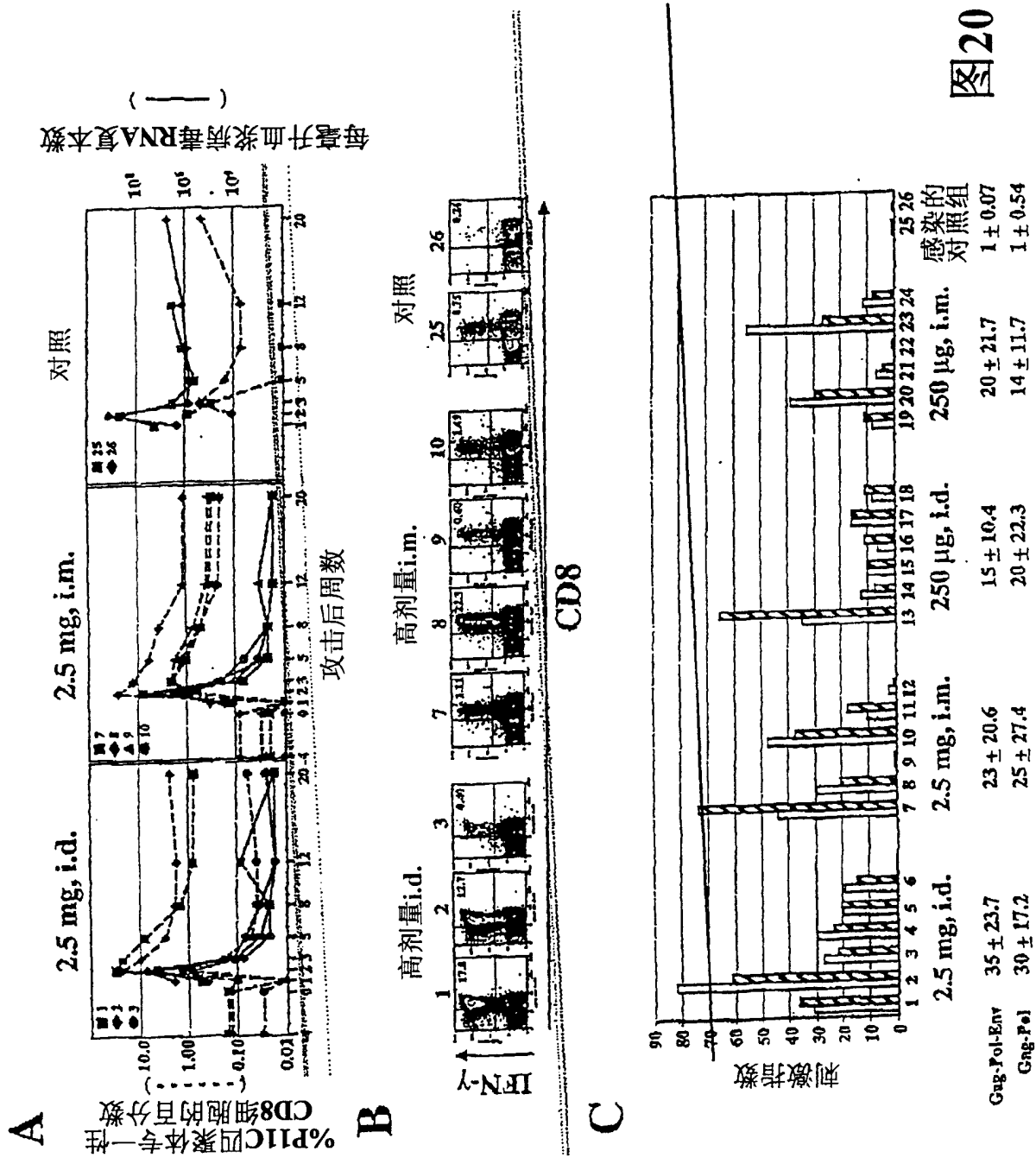


图20

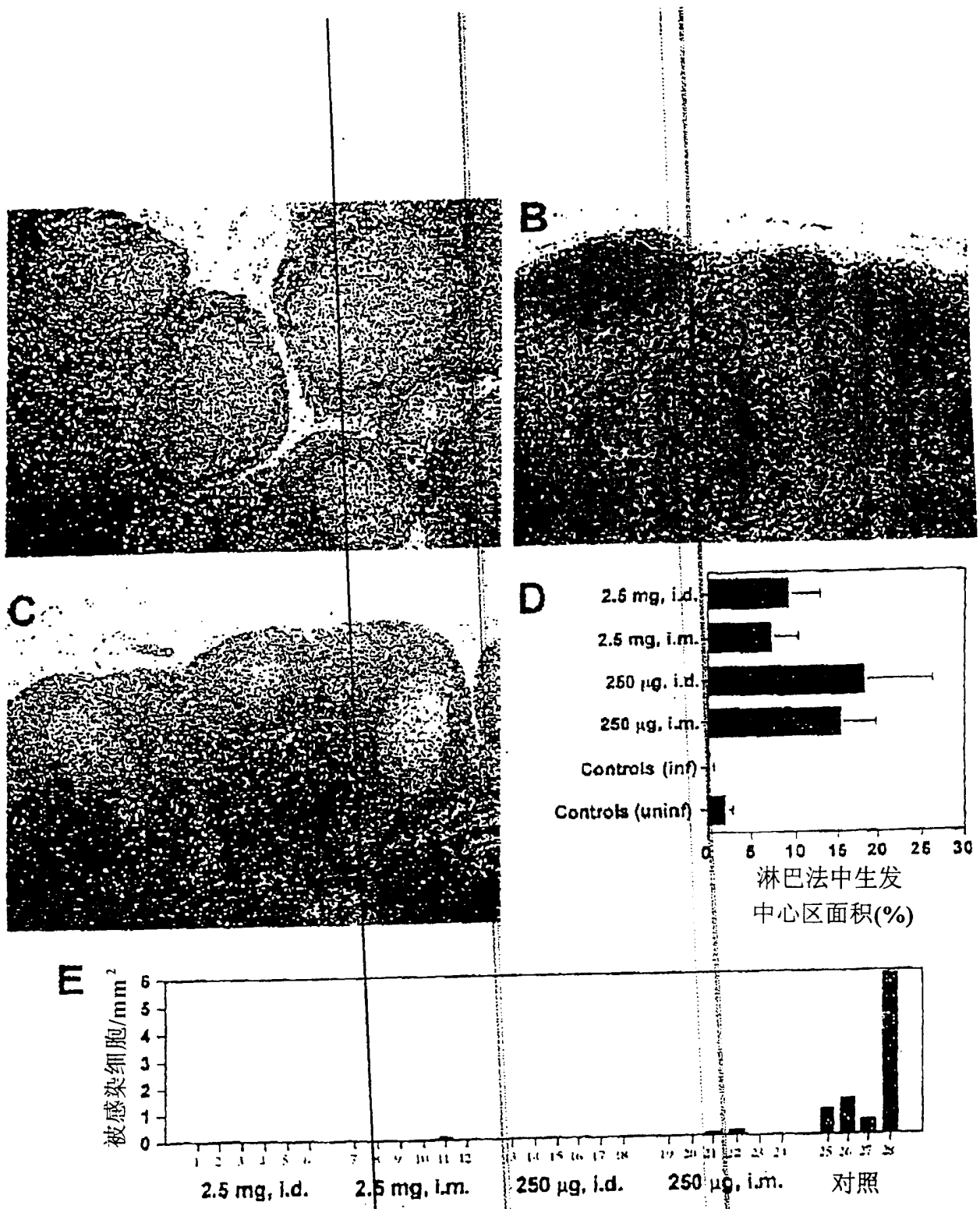


图21

2.5 mg i.d. 2.5 mg i.m. 250 µg i.d. 250 µg i.m. 对照

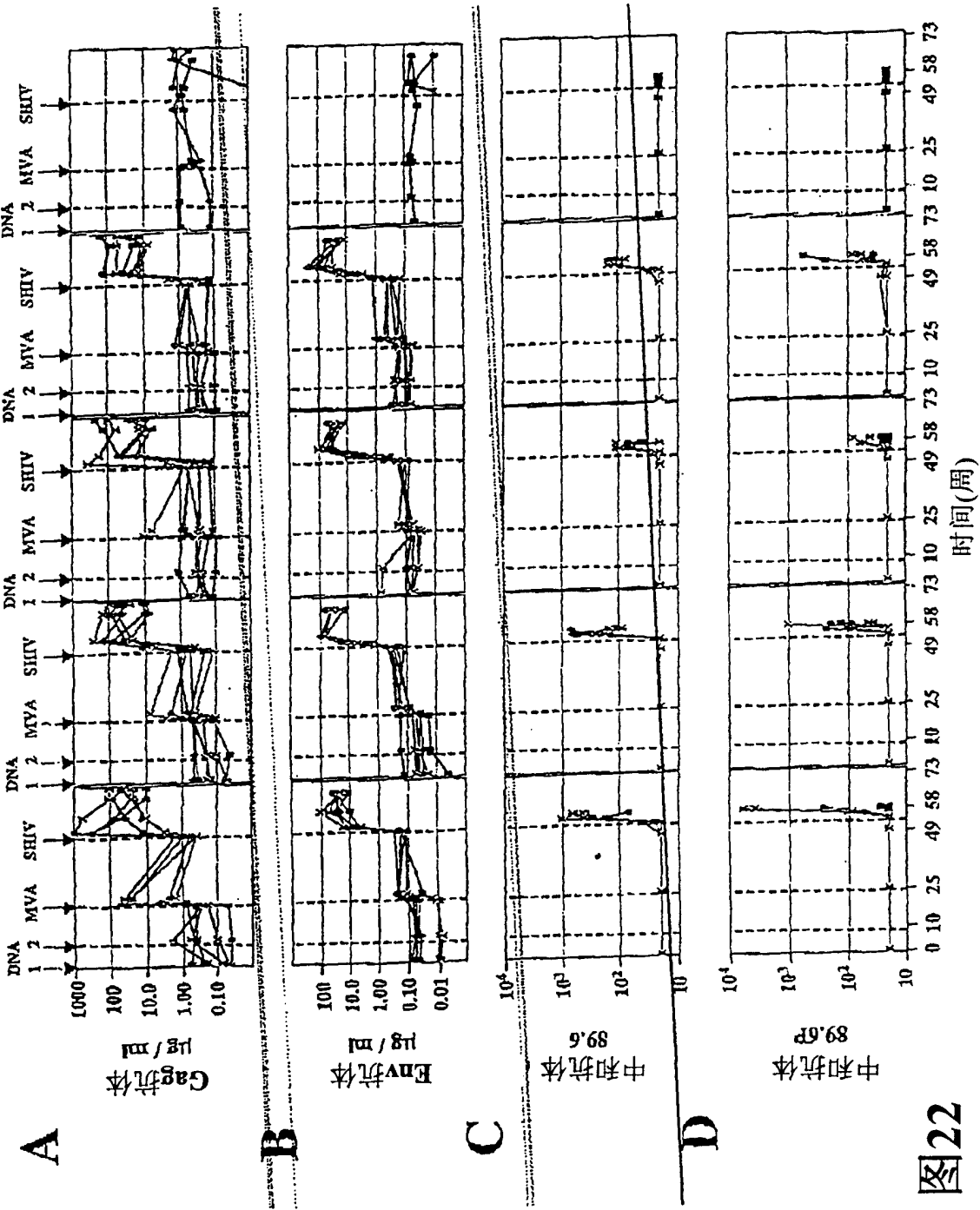


图 22

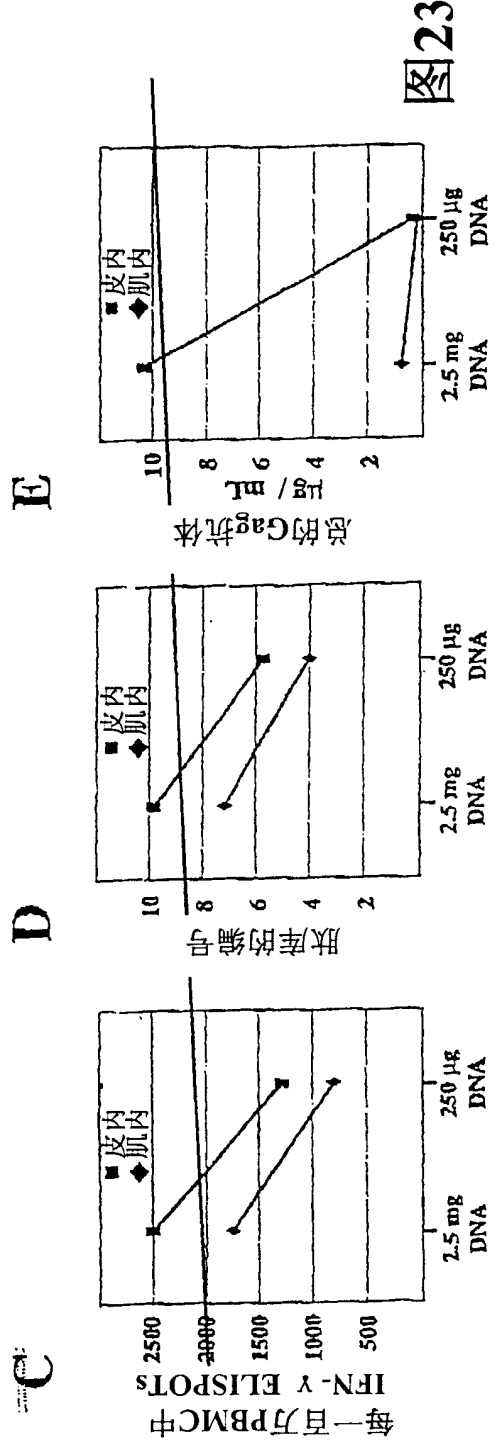
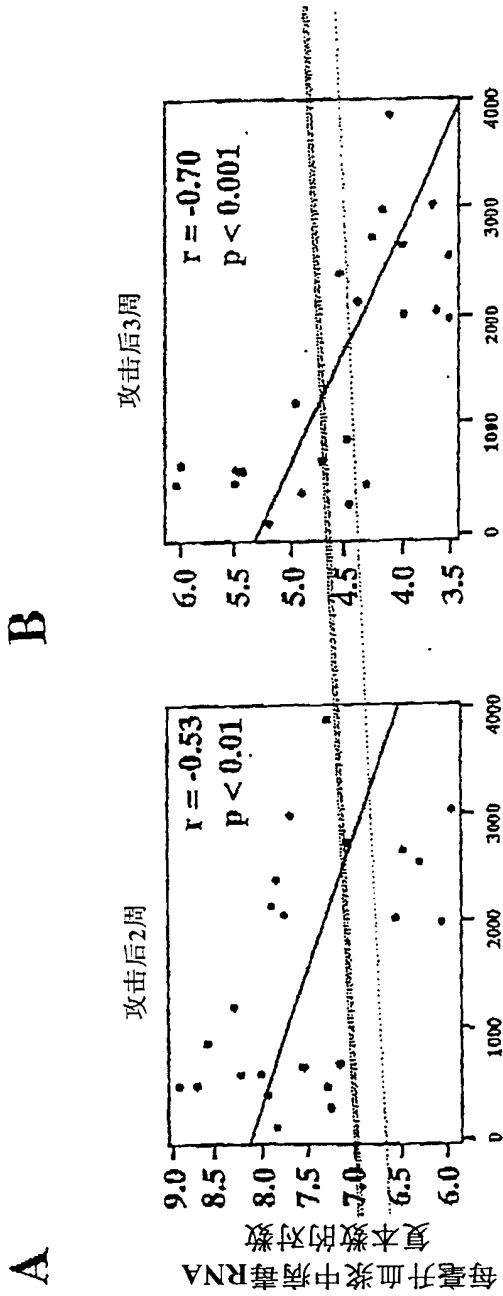
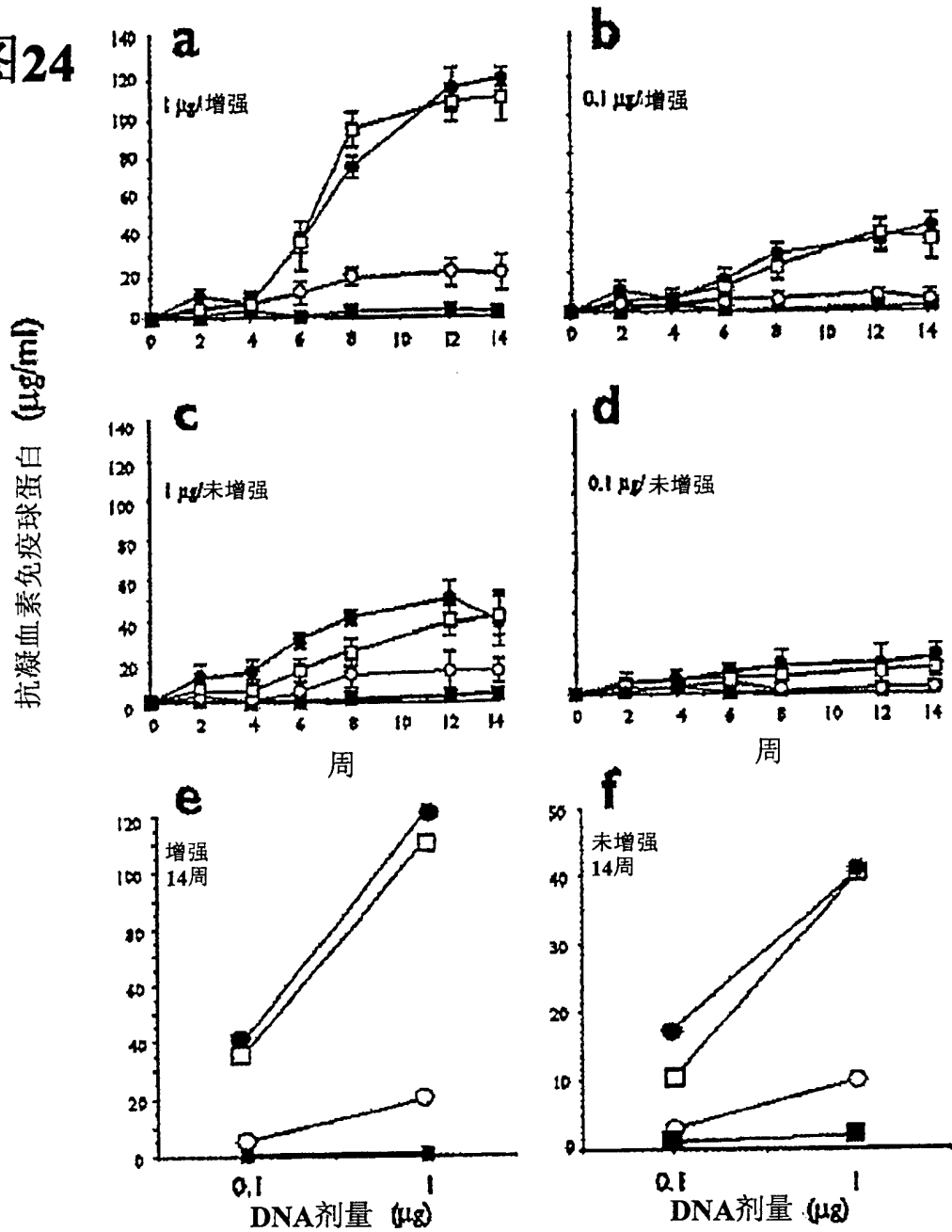


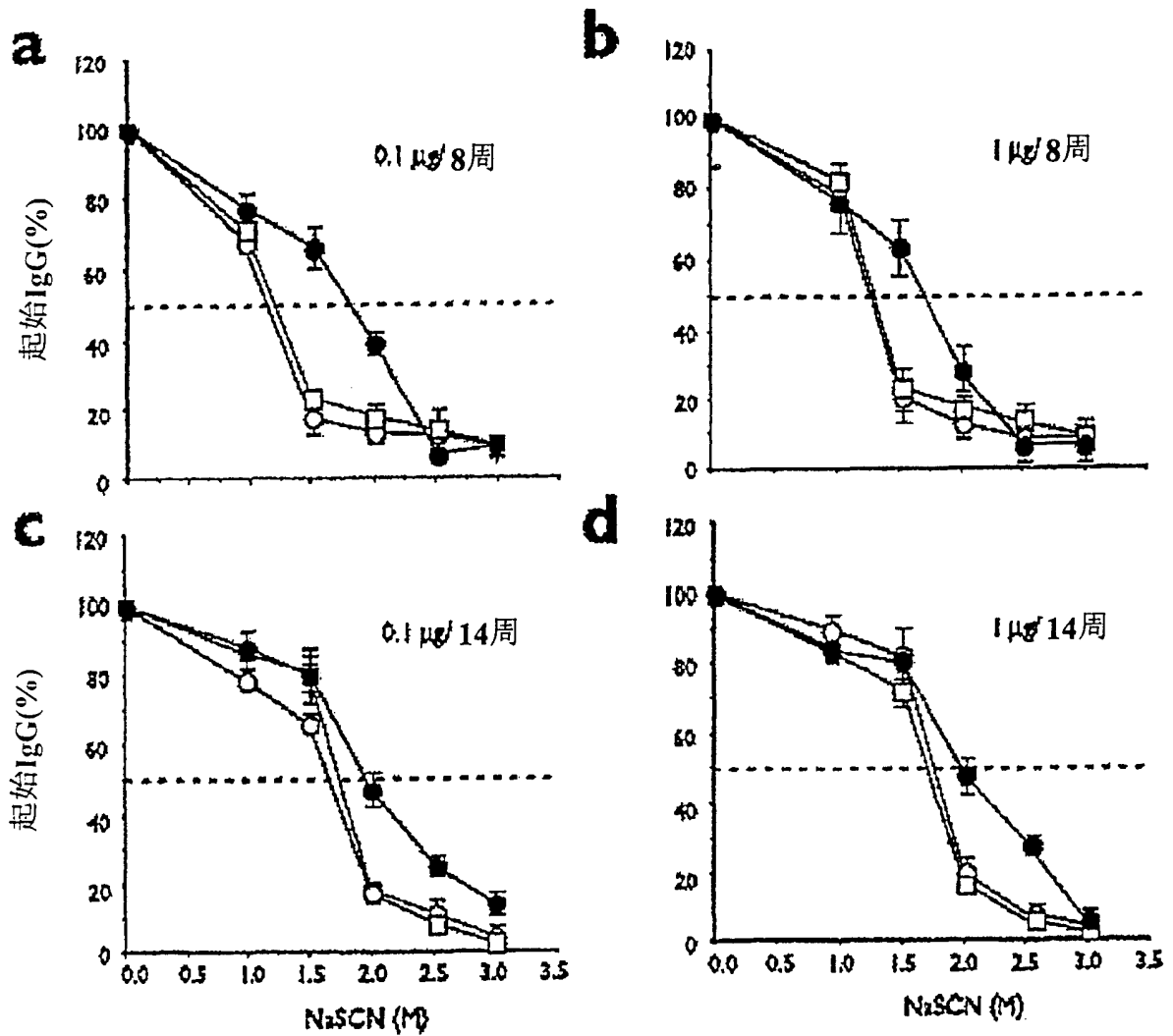
图 23

图24



用基因枪接种表达HA蛋白的DNA所产生的抗-HA IgG.用不同剂量的疫苗质粒对小鼠进行免疫.一半小鼠在0天起始免疫接种,并在第4周(a,b)进行加强接种,另一半小鼠在0天给予单一的疫苗接种(c,d).在第14周时获得DNA剂量对特异性IgG浓度的比率(e,f).从用载体(实心方块)、sHA(空心圆圈)、tmHA(空心方块)或sHA-3c3d(实心圆圈)接种的小鼠中获得血清.将从每组在标明的时刻收集到的血清汇集起来,用ELISA测定特异性IgG的含量.所示数据为3次独立试验的平均值.从小鼠得到的免疫前血清中没检测到特异性IgG.

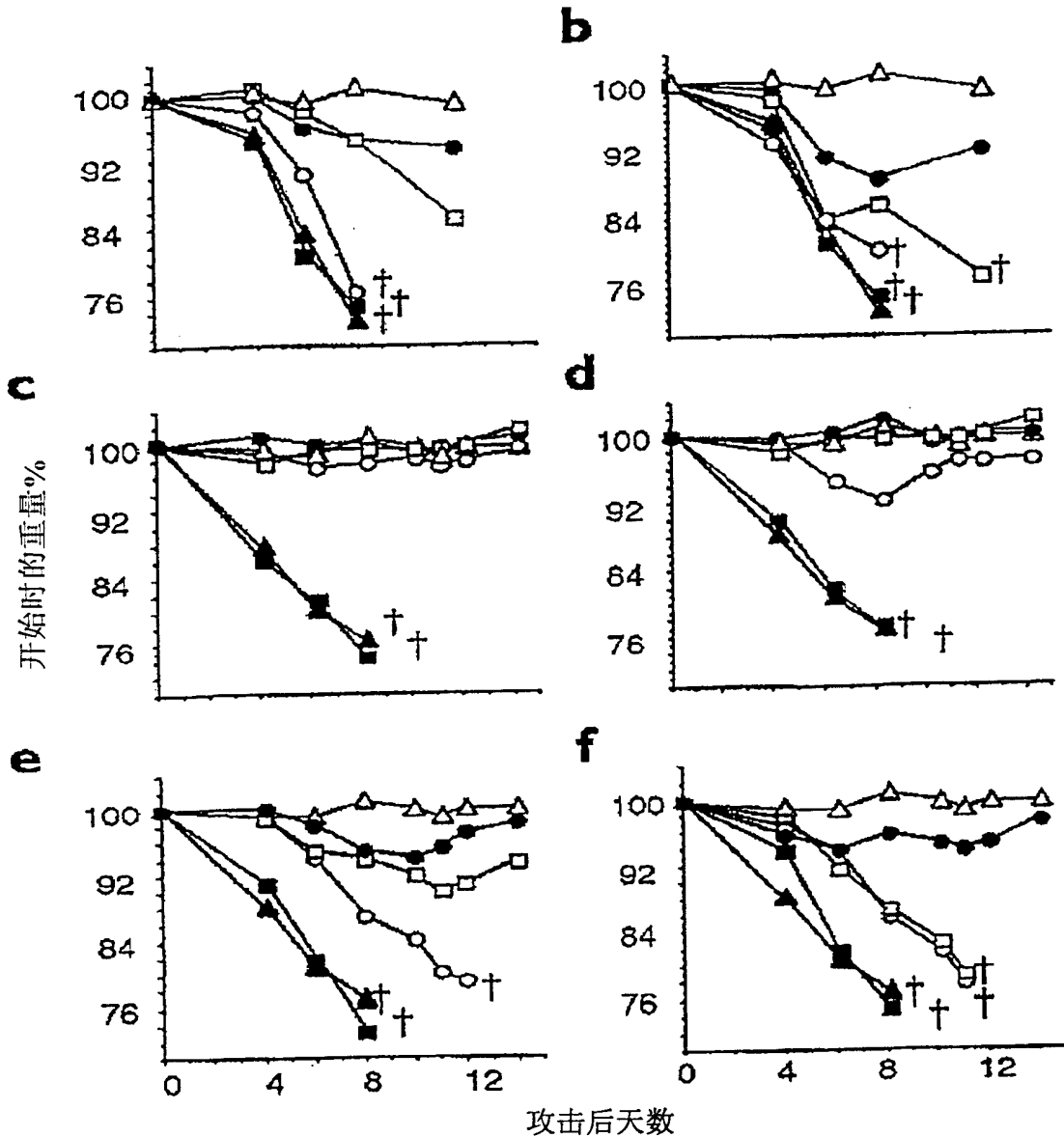
图25



由3种不同的HA DNA疫苗免疫接种产生的抗-HA IgG的亲合性。

以A/PR/8/34(H1N1)-特异性NaSCN置换ELISA分析来自第8周(a,b)和第14周(c,d)的血清。从被免疫接种的小鼠获得血清。从用sHA(空心圆圈)、tmHA(空心方块)或sHA-3c3d(实心圆圈)免疫接种的小鼠获得血清。试验采用从各小鼠组收集并汇集起来的血清样品,按1:300稀释。数据为3次独立试验的平均值加标准差。

图26



被病毒攻击后对体重下降的防止作用.用致死剂量的流感病毒A/PR/8/34(H1N1)在第8周(a,b)或第14周(c-f)对小鼠进行鼻内攻击,并每日监测其体重.图中所示数据为相对于起始体重的百分数.(a,c)小鼠用1g剂的DNA疫苗引发并加强接种.(b,d)小鼠中小1g剂的DNA疫苗进行引发和加强接种.(e)小鼠被仅给予一次1g DNA疫苗.(f)小鼠被仅给予0.1g DNA疫苗接种.从用载体(实心方块)、sHA(空心圆圈)、tmHA(空心方块),sHA-3c3d(实心圆圈)、原初病毒(实心三角)接种的小鼠获得血清.十字形符号标明所有5只小鼠被处死的时间点.

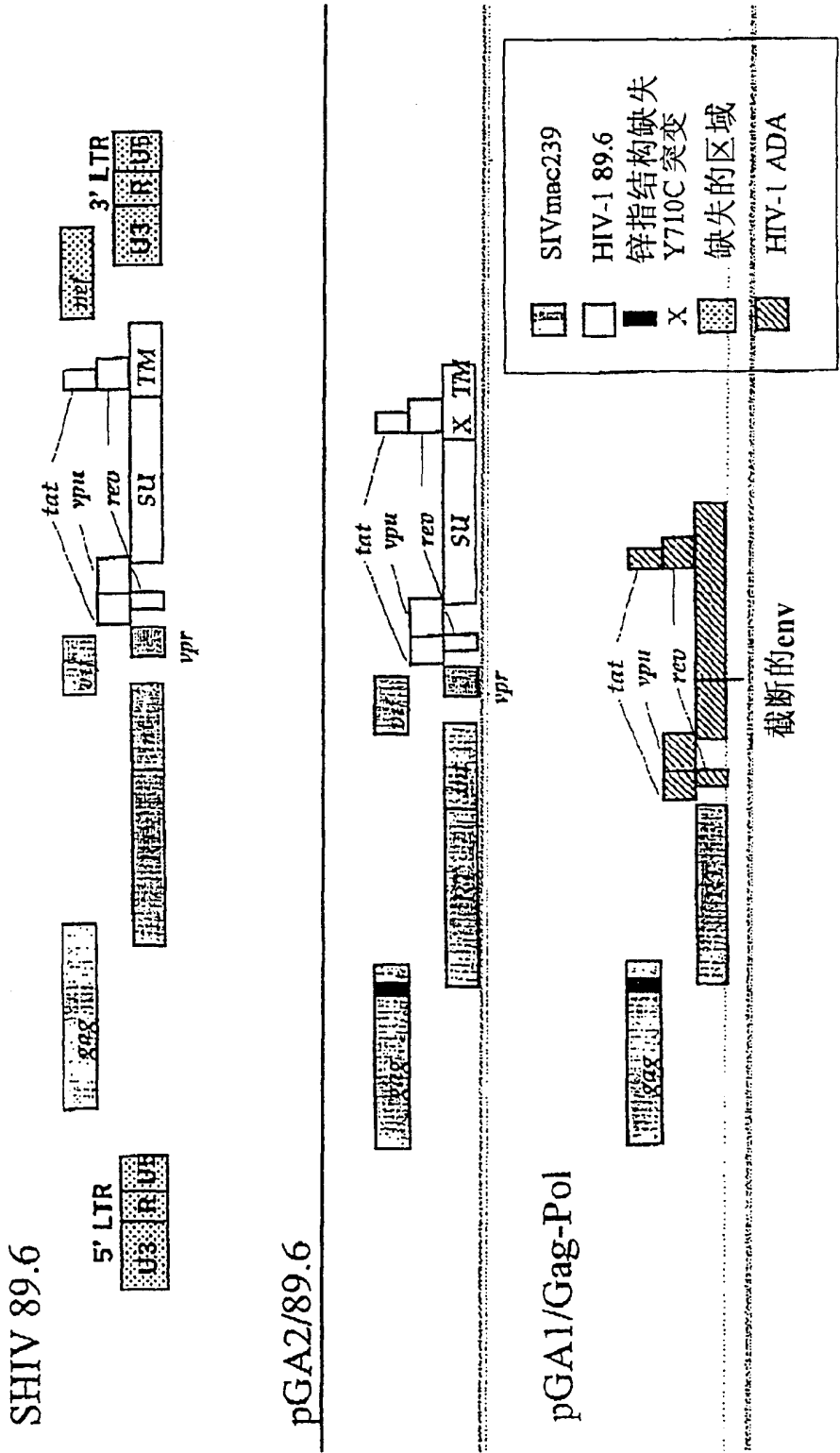
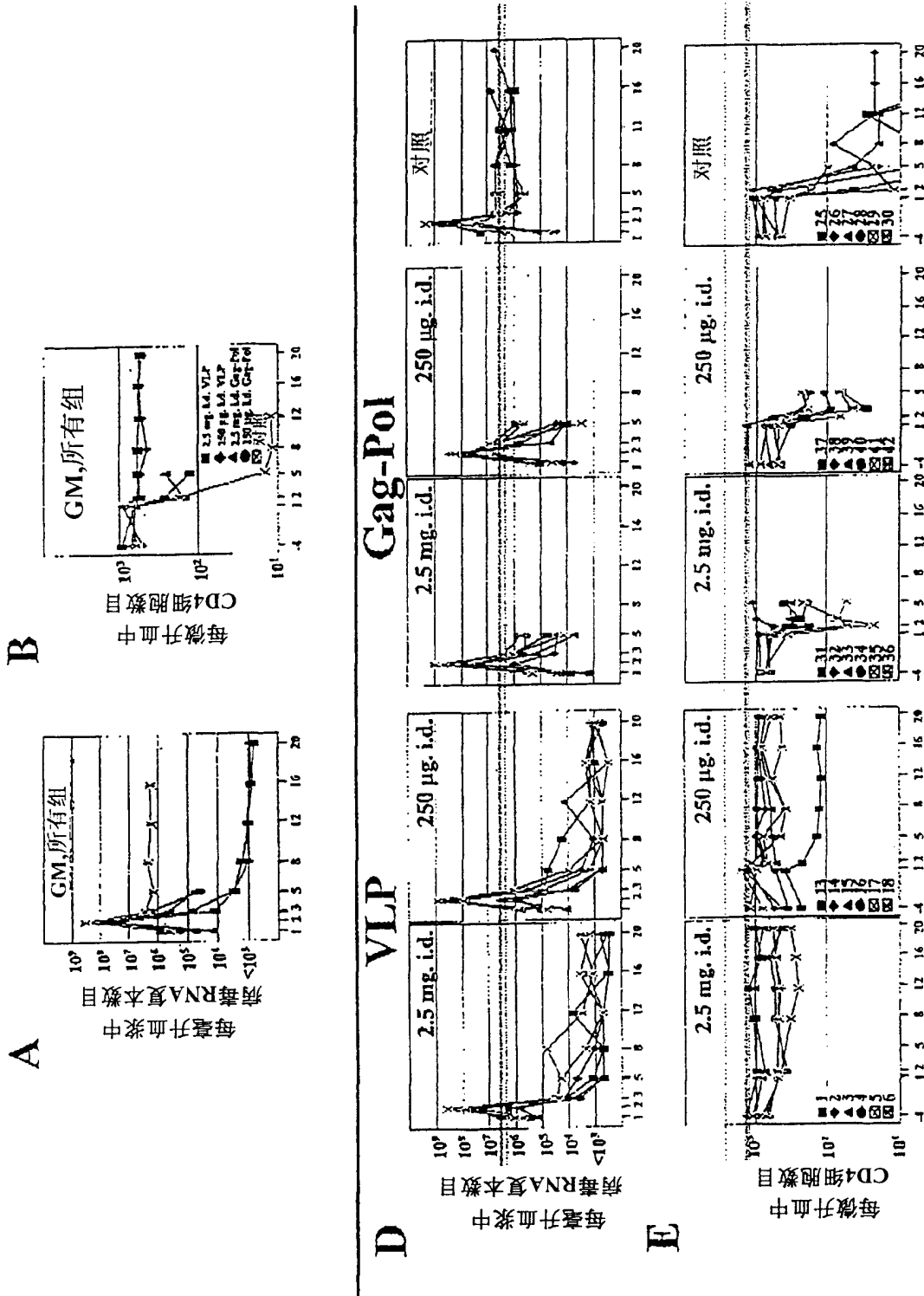


图27



攻击后周数

图 28

图29

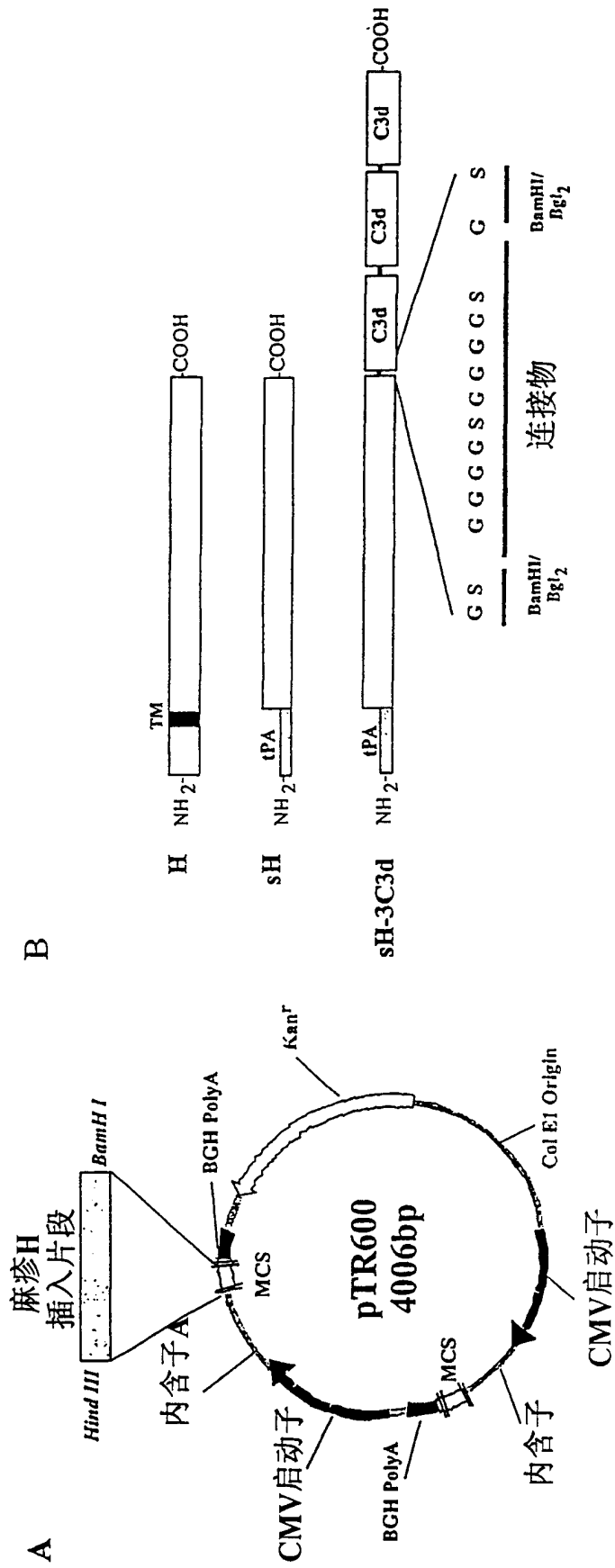


图 30

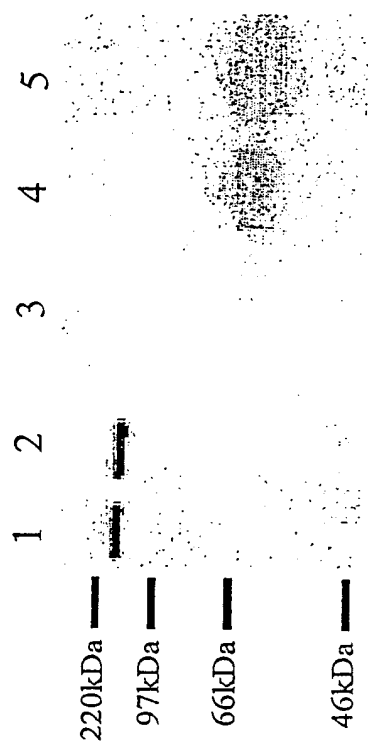


图31

