

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610151748.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月16日

[11] 公开号 CN 101104636A

[22] 申请日 2001.9.3

[21] 申请号 200610151748.7

分案原申请号 01815742.4

[30] 优先权

[32] 2000.9.4 [33] NO [31] 20004413

[71] 申请人 比奥诺尔免疫有限公司

地址 挪威希恩

[72] 发明人 B·索伦森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 程泳

权利要求书 2 页 说明书 40 页

[54] 发明名称

来自 gag p17 和 p24 保守区域的 HIV 肽以及它们在例如疫苗中的应用

[57] 摘要

本发明包含新的和经过修饰的肽，它们能够诱导 HIV - 1 特异性免疫应答而且不拮抗细胞毒性 T 细胞的活性，其目的是得到一种针对 HIV 的有效的预防和治疗疫苗。这些肽基于 HIV gag p17 和 p24 的保守区域。本发明还阐述了：包含至少一种所述的肽的游离形式或载体结合形式的抗原，包含至少一种抗原的疫苗组合物，以及应用这些抗原的免疫测定试剂盒和检测 HIV 或 HIV 特异肽诱导的抗体的方法。

1. 来源于 HIV - 1 gag p24 蛋白质的肽, 其特征在于它包含氨基酸序列:

Xaa₁AlaXaa₃Xaa₄Xaa₅AlaXaa₇Xaa₈Xaa₉LeuLeuXaa₁₂Xaa₁₃Xaa₁₄ - Z - Xaa₁₅Xaa₁₆HisGlnXaa₁₉AlaXaa₂₁Xaa₂₂(SEQ ID NO:9)

其中第 1 位 Xaa 是 Tyr, Trp, Phe 或 Gly

第 3 位 Xaa 是 Thr, Ala, Val, Ile 或 Leu

第 4 位 Xaa 是 Pro 或 Ser,

第 5 位 Xaa 是 Gln, His, Gly, Thr, Ser 或 Tyr

第 7 位 Xaa 是 Leu, Ile 或 Val

第 8 位 Xaa 是 Asn 或 Tyr

第 9 位 Xaa 是 Thr, Met, Leu 或 Ala

第 12 位 Xaa 是 Ser, Thr 或 Asn

第 13 位 Xaa 是 Thr, Ile, Val 或 Ala

第 14 位 Xaa 是 Val 或 Ile

第 15 位 Xaa 是 Gly 或无

第 16 位 Xaa 是 Gly 或无

第 19 位 Xaa 是 Ala 或 Gly

第 20 位 Xaa 是 Ala

第 21 位 Xaa 是 Met, Leu, Cys 或无

第 22 位 Xaa 是 Gln, Glu, His, Gly 或无

连接子 - Z - 是可选的, 并且为 PEG、修饰的 PEG 和/或 [Gly]_n, 其中 n=1, 2 或 3,

序列的末端可以是游离的羧基或氨基、酰氨基、酰基、乙酰基或者是它们的盐, 两个或更多的 Cys 残基可以形成链间二硫键的一部分, 即 - S - (CH₂)_p - S - 或 - (CH₂)_p - 桥, 其中 p=1 - 8, 其间可任选地插入一个或更多的杂原子如 O, N 和 S; 和/或上述

肽序列是固定于固体支持物上的。

2. 根据权利要求 1 的肽，其特征在于 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列选自肽 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12。

3. 抗原，其特征在于它包含至少一种根据权利要求 1 的肽。

4. 疫苗组合物，其特征在于它包含根据权利要求 3 的抗原和药物上可接受的稀释剂，可选地也可包含佐剂、载体和/或运载载体和附加的免疫刺激化合物。

5. 根据权利要求 4 的疫苗组合物，其特征在于它包含肽 SEQ ID NO:9。

6. 根据权利要求 4 的疫苗组合物，其特征在于它包含肽 SEQ ID NO:11。

7. 根据权利要求 4-6 的疫苗组合物，其特征在于肽溶于无菌水溶液，并且可选的免疫刺激化合物是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

8. 根据权利要求 4-7 的疫苗组合物，其特征在于此组合物包含选自单磷酸脂 A (MPL®)、弗氏完全或不完全佐剂或氢氧化铝的佐剂。

9. 疫苗组合物，其特征在于根据权利要求 3 的抗原是以脂肽和/或脂质体制剂配制的。

10. 检测体液样本中由 HIV 或 HIV 特异肽或蛋白质诱导的抗体的方法，其特征在于对上述样本进行免疫测定，其中抗原选自权利要求 1 和 2 的肽。

11. 用于检测体液样本中由 HIV 或 HIV 特异肽或蛋白质诱导的抗体的免疫测定试剂盒，其特征在于诊断抗原是前面权利要求 1-2 中任何一项的肽。

12. 抗体，其特征在于它能选择性地与权利要求 3 的抗原发生反应。

来自 gag p17 和 p24 保守区域的 HIV 肽以及 它们在例如疫苗中的应用

本案是分案申请，母案申请号为 01815742.4 (PCT 申请号为 PCT/NO 01/00362)，申请日为 2001 年 09 月 03 日，发明名称为“来自 gag p17 和 p24 保守区域的 HIV 肽以及它们在例如疫苗中的应用”。

本发明涉及基于 HIV gag p17 和 p24 的保守区域的新肽，包含至少一种所述肽的游离形式或载体结合形式的抗原，包含至少一种抗原的疫苗组合物，应用这些抗原的免疫测定试剂盒和检测人类免疫缺陷病毒(HIV)或 HIV 特异肽诱导的抗体的方法。

背景

控制 HIV 感染的全球流行是迫切的需要，而且开发 HIV 疫苗是艾滋病研究的主要目的之一。大体上来说，疫苗应能够激活抗原提呈细胞，克服 T 细胞应答的遗传限制，并且产生记忆性 T 细胞和 B 细胞。病毒群体的变异性给获得有效的 HIV 疫苗提出更大的困难。迄今为止，试图开发艾滋病疫苗的过程中还没有重大突破报道。现在普遍认为，抗原特异的体液免疫和细胞介导的免疫的诱导是开发有效的预防和治疗性疫苗的关键。免疫系统的三种武器，包括中和抗体、CD8⁺CTL 和 T 辅助细胞 - 1 (TH1)，对于 HIV 的保护性免疫可能是必需的。已知，CTL 能清除其它病毒感染 (Ada, Immunol. Cell Biol., 72:447 - 454, 1994)，并能在细胞产生和释放病毒子代之前裂解感染早期的靶标，Ada 等，同上。研究焦点集中在抗原的选择与不同佐剂的设计和评价。用于体外和体内不同研究的抗原包括了所有从粗蛋白质到来源于几种 HIV 蛋白质的多种人工合成肽。已经对 gp120 V3 环做了大量的研究。已经

观察到 B 细胞和 T 细胞免疫应答的诱导，然而有体外研究报道，来源于 gp41 保守区的肽表明感染的增强（Bell S.J.等，*Clin.Exp.Immunol.*,87(1):37 - 45, January 1992）。

由于病毒固有的通过改变表达在感染细胞表面的抗原决定部位而获得的逃逸能力，候选疫苗中天然产生的 HIV 序列不能刺激稳定的免疫应答。实际上当那些重要的氨基酸隐藏起来的时候，免疫系统错误地认为特定氨基酸序列是有关的。

最近的一项针对 gag p24 抗体滴度的研究表明，向艾滋病发展的慢性过程与抗体的高滴度相关，而向艾滋病发展的急性过程与抗体的低滴度相关。已表明 p24 抗体滴度低的人比 p24 抗体滴度高的人更快地发展成艾滋病（Zwart G.等 *Virology*,201,p.285 - 93,June 1994），提示 gag 和（特别是）p24 可能在控制艾滋病发展过程中扮演关键角色。

在 WO91/13360 中描述了新的 HIV p24 肽，其中这些肽用于鉴定诊断为 HIV 阳性的血清样本的真伪。

Johnson R.P.等,*The Journal of Immunology*, vol. 147, p. 1512 - 1521, No.5, September 1, 描述了在三个 HIV 血清阳性个体中 gag 特异 CTL 应答的特异性分析，发现此 gag 特异 CTL 应答是由 HLA - I类分子限制的 CD3⁺CD8⁺淋巴细胞介导的。Goulder P.J.R.等,*Journal of Virology*,Vol.74,p.5679 - 5690,No 12,June 2000 研究了不同人群中的 HIV p17 和 p24 的不同部分的 CTL 应答。研究发现存在某些免疫显性区域，然而氨基酸组成上较小的差异就能导致应答的较大不同。

EP - A - 0 356 007 公开了抗原决定簇，尤其是它涉及与 HIV - 1 中蛋白质相关的合成多肽序列，并且这些合成多肽序列能用作抗艾滋病的潜在疫苗的基础。

Rosenberg E.S.等,*Science*,Vol.278,21 November 1997, p.1447 - 1450 描述了在一些慢性病毒感染中，病毒特异性的 CD4⁺T 辅助淋巴细胞是维持有效免疫性的关键，但是在慢性人类免疫缺陷病

毒 1 型 (HIV - 1) 感染中不能检测到其特征。对 p24 的 HIV - 1 特异的增生性反应与病毒载量呈负相关。他们得出结论, HIV - 1 特异的辅助细胞在免疫治疗干预和疫苗开发中可能是重要的。

F. Hoffmann - La Roche 和 Co. Aktiengesellschaft 名下的 EP 0 230 222、EP 0 270 114、DE 37 11 016 和 GB 2 118 639 都是关于重组表达和纯化 HTLVIII Gag/Env 基因的蛋白质或融合蛋白质的。这些天然序列组成的蛋白质能纯化为均一的蛋白质, 而且作为检测针对与艾滋病相关病毒的抗体的诊断试验的基础。gag/env 蛋白质也可配制成疫苗, 从而通过预防免疫接种来抵抗艾滋病。

从诊断和治疗的角度看, 使用 p24 作为试验或治疗的制剂成分其主要问题与 p24 的大量抗原决定部位有关, 这些抗原决定部位刺激产生大量特异性差的抗体, 这些特异性差的抗体可通过重复刺激潜在的突变序列能产生自身抗体 (HIV 感染中 α/β T 细胞受体的自身抗体 (Autoantibodies to the alfa/beta T - cell receptors in HIV infection) ;dysregulation and mimicry.Lake D.F. 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,(23):10849 - 53,Nov.8 1994)。进而报道了 p24 抗体滴度不能达到与包膜蛋白 (gp120 和 gp41) 同样高的水平。通常情况下 p24 抗体是在感染十分早期阶段产生的, 但是在开始感染后抗体滴度非常迅速地稳定下来。之后, p24 滴度逐渐降低, 此时 gp160 的滴度反而升高。最近关于天然产生的 HIV - 1 gag 突变体拮抗细胞毒性 T 细胞活性的报道也支持了这一发现 (Klenerman P.等, Nature,2:369(6479),p.355,2 June 1994)。这可能是 p24 滴度迅速稳定下来以及之后又开始下降的原因之一。

基于以上的背景数据, 我们决定研究设计能模拟 p17 和 p24 表位却不拮抗细胞毒性 T 细胞活性的新合成肽的可能性, 其目的是满足有效的预防和治疗疫苗的需要。

Korber B. 等, Human Retroviruses and AIDS 1999 Eds.Theoretical Biology and Biophysics Group,Los Alamos

National Laboratory, Los Alamos, NM 公布了 p17 的序列, 该序列可以作为开发能引发 CTL 和抗体应答的肽的可能模板。这些鉴别出来的氨基酸序列位于第 33 位和第 53 位氨基酸之间, 参考表 1:

表 1

氨基酸序号	氨基酸序列	天然产生的氨基酸
33	H	
34	I	L V M
35	I	V
36	W	
37	A	
38	S	N R
39	R	S
40	E	
41	L	M
42	E	D K G Q
43	R	K G N
44	F	S Y
45	A	T S
46	V	L I C
47	N	D S
48	P	R S T
49	G	S A D N Q
50	L	F
51	L	M
52	E	G D
53	T	S A

说明书中代表序列中氨基酸的单字母和三字母密码与国际标

准及参考书中给出的一致，如 Lehniger A.L., 《Principles of Biochemistry》,Worth Publishers Inc.,New York, 1982.第二列右侧给出的氨基酸代表序列的天然变异。氨基酸修饰引起的抗原决定部位电荷变化涉及到免疫原性的显著提高，氨基酸修饰包含从原来的螺旋结构到折叠结构的可能的构象改变，以一种不同的方式向免疫系统暴露出抗原决定部位以求达到更大的反应程度。

为了进一步增加 T 细胞表位的数量和减少 gag 蛋白的免疫逃逸突变，来源于 p24 的另外三段肽序列是基于下列三段序列：133 - 158, 178 - 199, 233 - 251 残基。这些序列分别发表于 Human Retroviruses and AIDS 1999 , A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Eds.Theoretical Biology and Biophysics Group,Los Alamos National Laboratory,Los Alamos. 参见表 2 - 4:

表 2

氨基酸序号	氨基酸序列	在每个位置上天然产生的氨基酸
133	P	
134	I	V L
135	V	M A I
136	Q	S T V
137	N	D T
138	I	A L M
139	Q	E K G
140	G	
141	Q	I
142	M	P A
143	V	I A T R
144	H	
145	Q	H
146	A	S V N P

147	I	L M V
148	S	T
149	P	A
150	R	
151	T	
152	L	S
153	N	F
154	A	
155	W	
156	V	
157	K	
158	V	A C

表 3

氨基酸序号	氨基酸序列	在每个位置上天然产生的氨基酸
178	G	
179	A	
180	T	A I V L
181	P	S
182	Q	H G T S Y
183	D	
184	L	I V
185	N	Y
186	T	M L A
187	M	
188	L	
189	N	S T
190	T	I V A
191	V	I

192	G	
193	G	D
194	H	
195	Q	
196	A	G
197	A	
198	M	L
199	Q	E H

表 4

氨基酸序号	氨基酸序列	在每个位置上天然产生的氨基酸
233	G	
234	S	A
235	D	
236	I	
237	A	
238	G	
239	T	A S
240	T	S
241	S	T
242	T	N S
243	L	P V Q
244	Q	A H
245	E	
246	Q	H
247	I	L V M
248	G	A Q T N R H I
249	W	
250	M	T

251

T

S

为确定对 HIV-1 特异而敏感的独特序列，已经合成几种修饰的肽。

发明描述

根据本发明的肽来源于上面提到的 HIV-1 gag 蛋白 p17 和 p24 的四个不同的保守区域，它们保持了 HIV-1 表位的独特性。而且，本发明的新肽有至少一种潜在的 CTL 表位并且还没发现具有细胞毒性 T 细胞 (CTL) 拮抗作用。

根据本发明，满足上述标准的肽选自下面几组序列：

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Gln Leu Gln Xaa₁₁
 Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Xaa₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀
 Xaa₂₁(SEQ ID NO:1)

其中链上的氨基酸具有以下意义：

肽衍生物的第 1 位 Xaa 是 His, Lys 或 Arg,

第 2 位 Xaa 是 Ile, Leu, Val 或 Met,

第 3 位 Xaa 是 Ile 或 Val,

第 4 位 Xaa 是 Trp 或 Tyr,

第 5 位 Xaa 是 Ala 或 Leu,

第 6 位 Xaa 是 Ser, Thr, Arg 或 Asn,

第 7 位 Xaa 是 Arg 或 Ser

第 11 位 Xaa 是 Arg, Lys, Gly 或 Asn,

第 12 位 Xaa 是 Phe, Ser 或 Tyr,

第 13 位 Xaa 是 Ala, Thr 或 Ser,

第 14 位 Xaa 是 Val, Leu, Ile 或 Cys,

第 15 位 Xaa 是 Asn, Asp 或 Ser,

第 16 位 Xaa 是 Pro, Arg 或 Ser,

第 17 位 Xaa 是 Gly,Ser,Ala,Asp 或 Asn,

第 18 位 Xaa 是 Leu 或 Phe,

第 19 位 Xaa 是 Leu 或 Met,

第 20 位 Xaa 是 Glu,Gly,Asp 或 Ile,

第 21 位 Xaa 是 Thr,Ser 或 Ala,

这个肽包含 SEQ ID NO:1 的至少 6 个连续的氨基酸。

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄Xaa₅Xaa₆Xaa₇GlyXaa₉LeuVal-Z -

TyrXaa₁₃Xaa₁₄ Xaa₁₅Xaa₁₆Xaa₁₇Xaa₁₈Xaa₁₉Xaa₂₀Xaa₂₁ Ala

Xaa₂₃Xaa₂₄Xaa₂₅Xaa₂₆(SEQ ID NO:4)

其中链上的氨基酸具有以下意义:

第 1 位 Xaa 是 Pro,Tyr 或 Phe,

第 2 位 Xaa 是 Ile, Val 或 Leu,

第 3 位 Xaa 是 Ile ,Ala,Val,Met 或 Leu,

第 4 位 Xaa 是 Gln,Ser,Thr 或 Val,

第 5 位 Xaa 是 Asn,Asp 或 Thr,

第 6 位 Xaa 是 Ile ,Ala, Leu 或 Met,

第 7 位 Xaa 是 Gln, Glu,Lys 或 Gly,

第 9 位 Xaa 是 Gln 或 Ile,

第 13 位 Xaa 省略,

第 14 位 Xaa 是 Ala,Ser,Asn,Val 或 Pro,

第 15 位 Xaa 是 Ile,Leu,Met 或 Val,

第 16 位 Xaa 是 Ser 或 Thr,

第 17 位 Xaa 是 Pro 或 Ala,

第 18 位 Xaa 是 Arg 或 Lys,

第 19 位 Xaa 是 Thr 或 Ser

第 20 位 Xaa 是 Leu 或 Ser,

第 21 位 Xaa 是 Asn,Phe 或 Val,

第 23 位 Xaa 是 Trp,Tyr,Gly 或无

第 24 位 Xaa 是 Val,Leu,Gly 或无

第 25 位 Xaa 是 Lys,Arg,Gly 或无

第 26 位 Xaa 是 Val,Ala,Cys,Gly 或无

SEQ ID NO:4 的序列包含至少 6 个连续的氨基酸, - Z - 是可选的, 并且为 PEG、修饰的 PEG 和/或 [Gly]_n(n=1,2 或 3)。

Xaa₁AlaXaa₃Xaa₄Xaa₅AlaXaa₇Xaa₈Xaa₉LeuLeuXaa₁₂Xaa₁₃Xaa₁₄ - Z - Xaa₁₅Xaa₁₆HisGlnXaa₁₉AlaXaa₂₁Xaa₂₂(SEQ ID NO:9)

其中第 1 位 Xaa 是 Tyr,Trp,Phe 或 Gly

第 3 位 Xaa 是 Thr,Ala,Val,Ile 或 Leu

第 4 位 Xaa 是 Pro 或 Ser,

第 5 位 Xaa 是 Gln,His,Gly,Thr,Ser 或 Tyr

第 7 位 Xaa 是 Leu,Ile 或 Val

第 8 位 Xaa 是 Asn 或 Tyr

第 9 位 Xaa 是 Thr,Met,Leu 或 Ala

第 12 位 Xaa 是 Ser,Thr 或 Asn

第 13 位 Xaa 是 Thr,Ile,Val 或 Ala

第 14 位 Xaa 是 Val 或 Ile

第 15 位 Xaa 是 Gly 或无

第 16 位 Xaa 是 Gly 或无

第 19 位 Xaa 是 Ala 或 Gly

第 21 位 Xaa 是 Met,Leu,Cys 或无

第 22 位 Xaa 是 Gln,Glu,His,Gly 或无

其中 SEQ ID NO:9 的序列包含至少 6 个连续的氨基酸, 连接器 - Z - 是可选的, 并且为 PEG、修饰的 PEG 和/或 [Gly]_n(n=1,2 或 3)。

Xaa₁Xaa₂AlaLeuAlaGlyXaa₇Xaa₈Xaa₉LeuXaa₁₁Xaa₁₂Xaa₁₃Xaa₁₄Xaa₁₅Xaa₁₆Xaa₁₇Xaa₁₈Xaa₁₉Xaa₂₀Xaa₂₁(SEQ ID NO:15)

其中第 1 位 Xaa 是 Trp 或 Tyr

- 第 2 位 Xaa 是 Ser 或 Ala
- 第 7 位 Xaa 是 Thr,Ala 或 Ser
- 第 8 位 Xaa 是 Ser 或 Thr
- 第 9 位 Xaa 是 Ser 或 Thr
- 第 11 位 Xaa 是 Leu,Pro,Val 或 Gln
- 第 12 位 Xaa 是 Gln,Ala 或 His
- 第 13 位 Xaa 是 Glu 或 Gly
- 第 14 位 Xaa 是 Gln 或 His
- 第 15 位 Xaa 是 Ile,Leu,Val 或 Met
- 第 16 位 Xaa 是 Gly,Ala,Gln,Thr,Asn,Arg,His 或 Ile
- 第 17 位 Xaa 是 Trp 或 Tyr
- 第 18 位 Xaa 是 Thr,Met,Leu 或 Ile
- 第 19 位 Xaa 是 Thr 或 Ser
- 第 20 位 Xaa 是 Cys,Gly 或无
- 第 21 位 Xaa 是 Gly 或无

其中 SEQ ID NO:15 的序列由至少 6 个连续的氨基酸组成,序列的末端可以是游离的羧基或氨基、酰氨基、酰基、乙酰基或者是它们的盐。两个或更多的 Cys 残基可以形成链间二硫键的一部分,即 $-S-(CH_2)_p-S-$ 或 $-(CH_2)_p-$ 桥 ($p=1-8$) 其间可选地插入一个或更多的杂原子(如 O, N 或 S); 和/或上述肽序列固定于固体支持物上。

此新的肽序列有适合作为良好抗原的潜能,其中该抗原包含至少一种选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:15 的肽。抗原性可以通过调整肽的大小或不同肽的比例或浓度来改变,方法为例如二聚体化或多聚体化和/或固定于固相。根据本发明,抗原包含二个或更多的多肽序列,这些多肽或者通过桥联结,例如链间的 Cys 残基的二硫桥或 C_1-C_8 亚烷基之类的桥(此亚烷基上可能插入一个或多个杂原子如 O、S 或 N),或者优选的它们并不连接。肽链以单体、二聚体或寡聚体形式固定于

固相上。可以把更多的氨基酸加到末端形成便于固定的“臂”。

PEG 是聚乙二醇($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$)，它可以是连接子 - Z - 的部分，连接前 PEG 可选地被二羧酸修饰 ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CO}(\text{CH}_2)_o\text{COOH}$) 或被末端羧基修饰 ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{m-1}\text{CH}_2\text{COOH}$)，其中 $m=1-10$ 和 $o=2-6$ 。

连接子 - Z - 可能由 PEG、修饰的 PEG 或它们的组合和/或一个或多个组合的 Gly 残基组成。或者，连接子 - Z - 可能由 Gly 桥[Gly] n ($n=1,2$ 或 3) 组成。

尽管优选天然出现的 L 型，本发明的多肽中所有氨基酸可以是 D 型或 L 型。

肽序列的 C 端和 N 端可以通过对末端 $-\text{NH}_2$ 基团和/或 $-\text{COOH}$ 基团的修饰而偏离其天然序列，例如它们可以酰基化、乙酰化、酰胺化或为载体或其它分子提供结合位点而被修饰。

本发明的肽至少由 6 个氨基酸组成，优选的包含 10 个至 30 个氨基酸。它们包括所有在确定位点上的氨基酸的天然变体。

本发明的多肽抗原是游离的或与载体结合的形式。多肽可选择地结合的载体或固相物质可以在多种已知的载体中选择。载体的选择应该根据固定多肽是用作诊断抗原还是疫苗中的免疫组分而定。

用于例如诊断的载体的例子有磁珠或共聚物乳胶，例如苯乙烯二乙烯苯、羟基化的苯乙烯二乙烯苯、聚苯乙烯、羧基化的聚苯乙烯、炭黑珠、未活化的或聚苯乙烯或聚氯乙烯活化的玻璃、环氧活化的多孔磁性玻璃、明胶或多糖颗粒或其他蛋白质颗粒、红细胞、单克隆或多克隆抗体或这些抗体的 Fab 段。

按照本发明的实施方案，本发明中抗原可形成疫苗的一部分，该疫苗可能结合于载体、佐剂或其他免疫刺激成分，如携带 env 基因的金丝雀痘病毒。用于疫苗目的的载体和/或佐剂的例子有其他蛋白质，如人或牛血清白蛋白，匙孔血蓝蛋白和脂肪酸。免疫刺激物可分为三组：佐剂、抗原载体和运载载体(vehicle)。佐剂的

例子包括氢氧化铝(aluminum hydroxyd)、铝盐、皂甙、胞壁酰二肽和三肽、单磷酸脂 A、棕榈酸、B. pertussis 和包括 Th1 细胞因子 IL-12 和 IL-1 在内的多种细胞因子。一些蛋白质毒素可用来运载过客蛋白质(passenger protein)穿越细胞膜进入胞质溶胶, 这些蛋白质毒素可用于开发 CTL 疫苗。载体包括细菌类毒素, 如灭活的破伤风毒素和霍乱毒素、遗传脱毒的细菌毒素如大肠杆菌的不耐热肠毒素、脂肪酸、活载体如脊髓灰质炎嵌合体(polio chimeras)和形成颗粒的杂交蛋白(如酵母反转座子杂交 TY 颗粒和 HBcAg 颗粒)。现代疫苗中常用的运载载体组分由矿物油乳剂、弗氏完全佐剂和不完全佐剂、植物油乳剂、非离子嵌段共聚物表面活性剂、角鲨烯或角鲨烷、脂肽、脂质体和生物降解微球体组成。两种最新的具有开发新疫苗的潜在意义的佐剂, 包括水包油微乳剂(MF59)和多聚微粒。可以使用任何能够增强抗原免疫性的物质, 并且美国或欧洲药典中给出了一些可供选择的载体或佐剂的替代物。

用作免疫刺激的抗原的合适制剂中还可以包含干扰素如 IFN- γ 、抗病毒趋化因子或造血生长因子如粒细胞巨噬细胞生长(集落刺激)因子。

另一种增加抗原刺激和吸收的方法(例如在肠道内)是用本发明的肽与二肽、三肽或四肽等小肽共同使用。这些小肽可以添加方式施用或与本发明的肽结合在一起施用。这些肽更优选的是与 YGG 三肽一起施用, 可以由 D 型或 L 型氨基酸组成, 最好是 D 型。

近期, 非肠胃外传送疫苗的方法(例如粘膜途径)包括: 基因融合技术以制造粘膜佐剂的无毒性衍生物、删除必需基因的基因灭活抗原、在调节控制粘膜免疫应答中重要的特异的细胞因子和抗原的共表达、能在宿主细胞允许 DNA 或 RNA 吸收和其内源性表达的遗传物质。

维持持久的免疫应答(其中细胞介导的免疫是必需的)的一

种方法是接种编码一种或多种特异抗原的质粒 DNA。

为了抵抗 HIV 感染，疫苗应该既诱导粘膜免疫应答也诱导系统免疫应答，而且能以方便的途径施用，肠胃外途径或非肠胃外途径，例如用皮下途径、皮内途径、静脉内途径、肌内途径、口服、粘膜途径或鼻内途径等。

根据本发明的疫苗的优选实施方案中，疫苗含有包含至少一种选自 SEQ ID NO:1、4、9 和 15 的肽的抗原，更优选的是不同的肽都以等量存在。

更优选的实施方案中，疫苗组分包含下列抗原：

RLIYATRQLQRFAVNPGLLIT - NH₂ (SEQ ID NO:3)

FILQNIQGQLVGGGYAISPRTLVAGGGG (SEQ ID NO:6)

YAIPQALNTLLNTVGGHQAA - NH₂ (SEQ ID NO:11)

和

WSALAGTTSLLQGQLGWIT - NH₂ (SEQ ID NO:14)

这些序列提供 CTL 表位并能够激活细胞免疫系统。对 CTL 表位框架内的氨基酸进行改变以增强结合力。为了便于肽的合成和/或增加肽的可溶性改变了其他的氨基酸。

在体液样本中，使用这里的抗原测定 HIV - 1 或 HIV - 1 特异多肽或蛋白质诱导的抗体的检测方法是本发明的另一个实施方案。本发明还包含进行这种测定的免疫测定试剂盒与同上述抗原选择性反应的抗体。

肽制备的描述

本发明的肽可以用已知的制备线性氨基酸序列的方法制备，例如，重组 DNA 技术。将编码本发明的肽或上述肽的多聚体的核酸序列导入一个表达载体。合适的表达载体是：例如，质粒、粘粒、病毒和 YAC (酵母人工染色体)，他们包含必需的复制和表达控制区域。表达载体在宿主细胞可以被激活表达。合适的宿主细

胞是如细菌、酵母细胞和哺乳动物细胞。这些技术已为大家所熟知并在 Sambrook 等 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. 一书中有描述。其它熟知的方法是降解法或合成法, 例如, 在液相或优选的固相(树脂)上把一个氨基酸残基与另一个氨基酸残基偶联, 例如被称为 Merrifield 合成的技术。参见如 Barany 和 Merrifield, *the Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol.2, E. Gross and Meinhofer, Ed. (Acad. Press, N.Y., 1980), Kneib_Coronier 和 Mullen *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, p.705 - 739 (1987) 以及 Fields 和 Noble *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, p.161 - 214 (1990)。

倘若要得到连接或环化的肽, 须在适当的线性氨基酸序列合成时, 对氨基酸序列进行化学氧化以使两段肽序列上的两个半胱氨酸残基环化或连接。参见 Akaji 等, *Tetrahedron Letter*, 33, 8, p.1073 - 1076, 1992。

合成过程的一般描述

下述实施例中给出的所有的肽衍生物都是用 Milligen 9050 Peptide Synthesizer 在标准程序下合成的。所用树脂为 Tenta Gel P RAM (RAPP POLYMER GmbH, Tübingen), 理论载量 0.20 meq/g。合成终产物在真空中干燥过夜。然后在作为清除剂的乙二硫醇(5%)和水(5%)存在下, 用 90%三氟乙酸溶液从树脂上解离产物(室温下 1.5 小时)。然后过滤树脂并用 100%三氟乙酸(2×20ml)洗涤滤器中的树脂。真空蒸干混合滤液(室温下水浴), 残留物质用乙醚(200ml)和滤掉的沉淀产物研磨。立即向滤器中加入冰乙酸(100ml)溶解固体物质, 再加入 1.5 L 20%乙酸的甲醇溶液处理直到微弱的棕色为止。接着加入乙酸盐形式 1×8 离子交换 Dowex(15g)(Bio - Rad, Richmond, CA)并过滤混合物。滤液蒸

干，残留物从乙酸中冰冻干燥。产物在填充 Kromasil® 100 - 5 C8(EKA Nobel,Surte,Sweden)的柱上于合适的系统（含有乙氰的0.1%三氟乙酸水溶液）下用反向液相色谱纯化。从柱上收集下来的样品经过装有 Kromasil® 100 - 5 C8 Column(EKA Nobel,Surte,Sweden)的分析用高效液相色谱（HPLC）（Beckman System Gold,USA）分析。收集含纯化物质的组分，蒸干溶液，产物从乙酸冰冻干燥。终产物最后用 HPLC 分析并且用氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）来确定肽的结构。

在合成过程中使用的氨基酸都是 L-氨基酸，而且它们都用苄基甲氧基羰基保护 α -氨基官能团。侧链的保护如下：

Cys(Trt),Gln(Trt),Glu(OtBu),Thr(tBu)。

括号中的缩略语分别指：

Trt=三苯基甲基

t - Bu=叔丁基

OtBu=叔丁基酯

氨基酸衍生物由瑞士公司 Bachem AG 提供

实施例 1

制备 HLIYLTRQLQRFALNPGLLIT - NH₂(SEQ ID NO:2)。

从相应起始物按照合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）确定。

实施例 2

制备 RLIYATRQLQRFAVNPGLLIT - NH₂(SEQ ID NO:3)。

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）确定。

纯度（HPLC）：高于 97%（单一不纯物质小于 1%）

分子量（游离碱）：2442.9

实施例 3

制备 YILQNIEGQLVGGGYAISPRTLVAAYLRG - NH₂ (SEQ ID NO:5)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

实施例 4

制备 FILQNIEGQLVGGGYAISPRTLVAAGGGG (SEQ ID NO:6)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 高于 94%

分子量: (游离碱) 2745

分子式: C₁₂₃H₁₉₈O₃₇N₃₄

实施例 5 - - - 参考实施例

制备天然 p24 序列 PIVQNIEGQMVHQ AISPRTLNAWVKV (SEQ ID NO:7)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 约 85%

分子量 (游离碱): 2929

分子式: C₁₃₁H₂₁₄O₃₆N₃₈S

实施例 6

制备 FILQNIQGQLVGGGYAISPRTLVAAG - NH₂ (SEQ ID NO:8)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 高于 97% (单一杂质低于 1%)

分子量 (游离碱): 2572.0

实施例 7_参考实施例

制备天然 p24 序列 GATPQDLNTMLNTVGGHQAA - NH₂ (SEQ ID NO:10)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 98%

分子量 (游离碱): 1995.2

分子式: C₈₂H₁₃₅O₂₉N₂₇S

实施例 8

制备 YAIPQALNTLLNTVGGHQAA - NH₂ (SEQ ID NO:11)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 98%

分子量 (游离碱): 2051.4

分子式: C₉₁H₁₄₇O₂₇N₂₇

实施例 9

制备 FAIPQALNTLLNTVGGGGHQAAACG - NH₂ (SEQ ID NO:12)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯

度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）确定。

实施例 10_参考实施例

制备天然 p24 序列 GSDIAGTTSTLQEQIGWMT - NH₂ (SEQ ID NO:13)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）确定。

纯度 (HPLC): 90%

分子量 (游离碱): 1995.2

分子式: C₈₄H₁₃₅O₃₁N₂₃S

实施例 11

制备 WSALA GTTSL LQGQL GWIT - NH₂ (SEQ ID NO:14)。

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度由 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析(LDI-MS) 确定。

纯度(HPLC): 大于 97% (单一杂质小于 1%)

分子量 (游离碱): 2007.3

实施例 12_参考实施例

制备天然 p17 序列 HIVWASRELERFAVNPGLLEVT - NH₂ (SEQ ID NO:16)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析（LDI-MS）确定。

纯度 (HPLC): 高于 95%

分子量 (游离碱): 2436.8

实施例 13_参考实施例

制备天然 p24 序列 PIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAW - NH₂
(SEQ ID NO:17)

从相应起始物根据合成的一般描述以酰胺的形式合成该肽。其纯度用 HPLC 方法确定，其结构由氨基酸分析和质谱分析 (LDI-MS) 确定。

纯度 (HPLC): 约 93%

分子量 (游离碱): 2601.0

实施例 14

通过二硫桥的二聚作用。

肽序列经氧化过程利用其中半胱氨酸残基间形成的二硫桥连接成二肽。该二硫桥可在如 I₂ 作用下氧化形成。步骤如下:

等量肽溶解于乙酸/甲醇之比为 1: 4 的溶液中;

加入 0.1M 碘的甲醇溶液即可产生二聚体的混合物。

实施例 15

制备包括肽 SEQ ID NO: 3、6、11 和 14 的疫苗。

用无菌水溶解冰冻干燥的肽，其终浓度为 4mg/ml。溶液的最终盐浓度是生理兼容的。按照生产商的使用说明制备粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)，使其终浓度为 0.3mg/ml。将这两种溶液皮内给药，一般注射剂量为 100 μ l

实施例 16

将抗原的溶液或悬浊液与等量的 Behring 的弗氏完全或不完全佐剂混合，用注射器或匀浆器不断将该混合液吸进再有力推出，使其充分乳化。乳液至少应保持稳定 30 分钟。该抗原佐剂乳液最好是以贮存方式皮下注射。

实施例 17

检测 HIV - 1 诱导的抗体的免疫测定法。

按照生产商建议的实验方案制备磁性颗粒反应物。所使用的 Dynabeads 由 Dynal AS 公司生产。试剂 1 为覆盖有配基的磁性颗粒。本发明的肽与活化的磁性颗粒表面共价结合。肽也可以通过物理吸附的方法与磁性颗粒表面结合。在试剂 1 中，颗粒物的浓度范围在 1mg/ml 至 15mg/ml 之间。颗粒大小在 0.2 μ m - 15 μ m 之间。肽浓度范围在 0.01 毫克每毫克颗粒至 1 毫克每毫克颗粒之间。

按照 Dako AS 公司建议的实验方案制备抗人 Ig 碱性磷酸酶 (Ap) 结合的抗体试剂。该方案是本领域的标准程序。将该试剂称为试剂 2。

按照 Fluka AG 公司建议的试验方案制备底物酚酞—单磷酸盐 (phenolphthalein - monophosphate) 溶液，该方案是本领域的标准程序，将该底物溶液称为试剂 3。

所用的洗涤和孵育缓冲液是标准的 0.05M Tris - 碱缓冲液与以下化合物的混合：

吐温 20 (0.01% 至 0.1%)、甘油 (0.1% 至 10%) 和氯化钠 (0.2% 至 0.1%)

本实验过程包括孵育步骤，其中在每一孔中加入 1 滴试剂 1 与 2 滴洗脱缓冲液。混合后加入 30 μ l 的样品，孵育 5 分钟。用磁体捕获磁性颗粒，在磁体移去之前弃去液体成分。在与试剂 2 孵育之前，用 4 滴洗涤液将孔洗涤 2 次。加入 1 滴试剂 2 和 2 滴洗涤缓冲液，孵育 5 分钟。

用磁体捕获磁性颗粒，并在磁体被分离之前弃去液体。试剂 3 孵育前，进行重复洗涤的步骤。然后在每一小孔中加入 2 滴试剂 3，孵育 3 分钟。在白色背景下读取结果。阳性结果是红色（深红色代表 3+），而阴性结果与阴性对照相似是清晰的淡黄色/棕色。

免疫测定试剂盒能用于检查由 HIV 病毒或 HIV 特异肽或蛋白质（例如本发明的肽）诱导的抗体。

实施例 18

治疗或预防性疫苗

为了预防人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 的感染, 本发明的至少一种选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:15 的多肽能用于形成抗原并作为预防或治疗性疫苗的主要活性成分。此种疫苗可以包含有益于保护或刺激宿主(人或脊椎动物)免疫系统的化合物, 例如白细胞介素、干扰素、粒细胞-巨噬细胞生长因子、造血生长因子或类似物。优选的是, 疫苗组合物包含一种佐剂或运载载体; 更优选的是, 佐剂或运载载体为可能与铝结合的单磷酸脂 A (MPL®)、弗氏完全或不完全佐剂或氢氧化铝。佐剂或运载载体的最优量取决于选择的运载载体或佐剂的类型。

为了形成脂肽疫苗, 可在本发明肽的 C 端加上单脂肪酸(如单棕榈酰基链)进行修饰。进而, 脂肽通过冻融法导入脂质体膜, 导致在脂质体表面形成肽配体。

肽或疫苗制剂可在贮存前冷冻干燥。冻干的肽可在无菌水中溶解达到最终浓度 0.1—100mg/ml。疫苗优选按一次或多次给药剂量单位分装于安瓿瓶中, 低温贮存, 以备使用。本发明肽的一般剂量单位为: 每千克体重 0.05 μ g—1mg, 优选的是每千克体重 0.15 μ g—0.15mg。本领域技术人员认为适合的剂量取决于患者的体重、疾病的类型、状况的严重性、给药的途径和一些其他因素。当用作治疗性疫苗时, 一般最初注射约 12 次。可进一步强化治疗, 在极端的病例中患者需要终生给药。在注射液的制备中, 肽溶于无菌水并使每种肽的终浓度为 1mg/ml。常规的注射体积是 100 μ l—200 μ l (2 \times 100 μ l)。优选的是, 肽与适合的佐剂和/或粒细胞巨噬细胞生长因子共同使用, 例如 0.1—1mg/ml 的浓度范围的 Leucomax® 《Shering Plough》, 或按制造商的建议使用。特别优选的是在 2000 年 3 月 2 日申请的国际专利申请号为 PCT/NO00/00075 和/或共同未决的挪威专利申请号为 20004412 中

描述的肽与本专利提供的肽联合治疗。这些肽可以顺序给药或同时给药。适宜的给药途径有皮内途径、皮下途径、静脉内途径、口服途径、肌内途径、鼻内途径、粘膜途径或其他适合的途径。为了维持保护力，可能需要加强免疫。对于本领域中技术人员来讲，可以理解，本发明的疫苗组合物不仅在感染的预防中有作用，而且在感染的治疗中也有作用。

按每千克体重 $100\mu\text{g}$ 剂量在小鼠体内注射发现本发明的肽无毒性效应。

上面的实施例仅是本发明的说明。在不背离本专利权利要求书所述的概念和范围内，本领域技术人员可以修饰上述肽、抗原和疫苗。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 姓名: Bionor Immuno AS
- (B) 街道: Str?mdalsjordet 4, P.O.Box 1893 Gulset
- (C) 城市: 3703 Skien
- (E) 国家: 挪威
- (F) 邮政编码(ZIP): N-3705
- (G) 电话: +47 35 50 57 50
- (H) 电传: + 47 35 50 57 01

(i) 发明人:

- (A) 姓名: Birger S?rensen
- (B) 街道: Meierlia 3
- (C) 城市: 3727 Skien
- (D) 国家: 挪威

(ii) 发明题目: 来自 gag p17 和 p24 保守区域的 HIV 肽以及它们在例如疫苗中的应用。

(iii) 序列数目: 17

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM 兼容
- (C) 操作系统: Windows 2000
- (D) 软件: Word 7.0

(v) 目前申请日:

申请号:

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(v) 片段类型: 内部的

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 1
- (D) 其它信息: /注释= “位置 1 的 Xaa 是 His, Lys 或 Arg

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 2
- (D) 其它信息: /注释= “位置 2 的 Xaa 是 Ile, Leu, Val 或 Met

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 3
- (D) 其它信息: /注释= “位置 3 的 Xaa 是 Ile 或 Val

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 4
- (D) 其它信息: /注释= “位置 4 的 Xaa 是 Trp 或 Tyr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 5
- (D) 其它信息: /注释= “位置 5 的 Xaa 是 Ala 或 Leu

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 6
- (D) 其它信息: /注释= “位置 6 的 Xaa 是 Ser, Thr, Arg 或 Asn

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 7
- (D) 其它信息: /注释= “位置 7 的 Xaa 是 Arg 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11
- (D) 其它信息: /注释= “位置 11 的 Xaa 是 Arg, Lys, Gly, 或 Asn

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12
- (D) 其它信息: /注释= “位置 12 的 Xaa 是 Phe, Ser 或 Tyr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注释= “位置 13 的 Xaa 是 Ala, Thr 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 14
- (D) 其它信息: /注释= “位置 14 的 Xaa 是 Val, Leu, Ile 或 Cys

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 15
- (D) 其它信息: /注释= “位置 15 的 Xaa 是 Asn, Ser 或 Asp

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注释= “位置 16 的 Xaa 是 Pro, Arg 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 17
- (D) 其它信息: /注释= “位置 17 的 Xaa 是 Gly, Ser, Ala, Asp 或 Asn

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 18
- (D) 其它信息: /注释= “位置 18 的 Xaa 是 Leu 或 Phe

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释= “位置 19 的 Xaa 是 Leu 或 Met

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释= “位置 20 的 Xaa 是 Glu, Gly, Asp 或 Ile

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 7
- (D) 其它信息: /注释= “位置 7 的 Xaa 是 Gln, Glu, Lys 或 Gly

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 9
- (D) 其它信息: /注释= “位置 9 的 Xaa 是 Gln 或 Ile

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注释= “位置 13 的 Xaa 是去除的

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 14
- (D) 其它信息: /注释= “位置 14 的 Xaa 是 Ala, Ser, Asn, Val 或 Pro

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 15
- (D) 其它信息: /注释= “位置 15 的 Xaa 是 Ile, Leu, Met 或 Val

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注释= “位置 16 的 Xaa 是 Ser 或 Thr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 17
- (D) 其它信息: /注释= “位置 17 的 Xaa 是 Pro 或 Ala

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 18
- (D) 其它信息: /注释= “位置 18 的 Xaa 是 Arg 或 Lys

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释= “位置 19 的 Xaa 是 Thr 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释= “位置 20 的 Xaa 是 Leu 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 21
- (D) 其它信息: /注释= “位置 21 的 Xaa 是 Asn, Phe 或 Val

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 23
- (D) 其它信息: /注释= “位置 23 的 Xaa 是 Trp, Tyr, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 24
- (D) 其它信息: /注释= “位置 24 的 Xaa 是 Val, Leu, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 25
- (D) 其它信息: /注释= “位置 25 的 Xaa 是 Lys, Arg, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 26
- (D) 其它信息: /注释= “位置 26 的 Xaa 是 Val, Ala, Cys, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 11..12
- (D) 其它信息: /注释= “选择性插入的连接子-Z-, 其为 PEG, 修饰的 PEG 和/或[Gly]_n, 其中 n=

1, 2, 或 3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Gly Xaa9 Leu Val -Z-Tyr Xaa14Xaa15
 1 5 10
 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Ala Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26
 15 20

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

Tyr Ile Leu Gln Asn Ile Glu Gly Gln Leu Val Gly Gly Gly Tyr Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Pro Arg Thr Leu Val Ala Tyr Leu Arg Gly-NH2
 20 25

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

Phe Ile Leu Gln Asn Ile Glu Gly Gln Leu Val Gly Gly Gly Tyr Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Pro Arg Thr Leu Val Ala Gly Gly Gly Gly -OH
 20 25

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 26 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, 天然 p24 序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```

Pro Ile Val Gln Asn Ile Glu Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro
 1           5           10           15
Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val
      20           25

```

(2) SEQ ID NO: 8 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 25 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8

```

Phe Ile Leu Gln Asn Ile Gln Gly Gln Leu Val Gly Gly Gly Tyr Ala Ile
 1           5           10           15
Ser Pro Arg Thr Leu Val Ala Gly
      20           25

```

(2) SEQ ID NO: 9 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的：无

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：1
- (D) 其它信息：/注释= “位置 1 的 Xaa 是 Tyr, Trp, Phe 或 Gly

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：3
- (D) 其它信息：/注释= “位置 3 的 Xaa 是 Thr, Ala, Val, Ile 或 Leu

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：4
- (D) 其它信息：/注释= “位置 4 的 Xaa 是 Pro 或 Ser

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：5
- (D) 其它信息：/注释= “位置 5 的 Xaa 是 Gln, His, Gly, Thr, Ser 或 Tyr

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：7
- (D) 其它信息：/注释= “位置 7 的 Xaa 是 Leu, Ile 或 Val

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：8
- (D) 其它信息：/注释= “位置 8 的 Xaa 是 Asn 或 Tyr

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：9
- (D) 其它信息：/注释= “位置 9 的 Xaa 是 Thr, Met, Leu 或 Ala

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词：修饰位点
- (B) 位置：12
- (D) 其它信息：/注释= “位置 12 的 Xaa 是 Ser, Thr 或 Asn

ix) 特征：

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注释= “位置 13 的 Xaa 是 Thr, Ile, Val 或 Ala

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 14
- (D) 其它信息: /注释= “位置 14 的 Xaa 是 Val 或 Ile

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 15
- (D) 其它信息: /注释= “位置 15 的 Xaa 是 Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注释= “位置 16 的 Xaa 是 Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释= “位置 19 的 Xaa 是 Ala 或 Gly

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 21
- (D) 其它信息: /注释= “位置 21 的 Xaa 是 Met, Leu, Cys 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 22
- (D) 其它信息: /注释= “位置 22 的 Xaa 是 Gln, Glu, His, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 14..15
- (D) 其它信息: /注释= “选择性插入的连接子-Z-, 其是 PEG, 修饰的 PEG 和/或[Gly]_n, 其中 n=

1, 2 或 3

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 21

(D) 其它信息: /注释= “位置 21 的 Cys 可以形成二硫键的一部分”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9

```
Xaa1 Ala Xaa3 Xaa4 Xaa5 Ala Xaa7 Xaa8 Xaa9 Leu Leu Xaa12 Xaa13 Xaa14
  1           5           10
-Z- Xaa15 Xaa16 His Gln Xaa19 Ala Xaa21 Xaa22
    15           20
```

(2) SEQ ID NO: 10 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, 天然 p24 序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10

```
Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His
  1           5           10           15
Gln Ala Ala
    20
```

(2) SEQ ID NO: 11 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11

```
Tyr Ala Ile Pro Gln Ala Leu Asn Thr Leu Leu Asn Thr Val Gly Gly His
  1           5           10           15
```

Gln Ala Ala

20

(2) SEQ ID NO:12 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 23
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 23 的 Cys 可以形成二硫键的一部分”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12

Phe Ala Ile Pro Gln Ala Leu Asn Thr Leu Leu Asn Thr Val Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly His Gln Ala Ala Cys Gly

20

(2) SEQ ID NO:13 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 19 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, 天然 p24 序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13

Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp

1 5 10 15

Met Thr

(2) SEQ ID NO:14 的信息

(D) 其它信息: /注释= “位置 8 的 Xaa 是 Ser 或 Thr

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 9

(D) 其它信息: /注释= “位置 9 的 Xaa 是 Ser 或 Thr

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 11

(D) 其它信息: /注释= “位置 11 的 Xaa 是 Leu, Pro, Val 或 Gln

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 12

(D) 其它信息: /注释= “位置 12 的 Xaa 是 Gln, Ala 或 His

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 13

(D) 其它信息: /注释= “位置 13 的 Xaa 是 Gly 或 Glu

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 14

(D) 其它信息: /注释= “位置 14 的 Xaa 是 Gln 或 His

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 15

(D) 其它信息: /注释= “位置 15 的 Xaa 是 Ile, Leu, Val 或 Met

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 16

(D) 其它信息: /注释= “位置 16 的 Xaa 是 Gly, Ala, Gln, Thr, Asn, Arg, His

或 Ile

ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 17

(D) 其它信息: /注释= “位置 17 的 Xaa 是 Trp 或 Tyr

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 18
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 18 的 Xaa 是 Thr, Ile, Leu 或 Met

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 19
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 19 的 Xaa 是 Thr 或 Ser

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 20 的 Xaa 是 Cys, Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 21
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 21 的 Xaa 是 Gly 或无

ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 20
- (D) 其它信息: /注释 = “位置 20 的 Cys 可以形成二硫键的一部分

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15

```

Xaa1 Xaa2 Ala Leu Ala Gly Xaa7 Xaa8 Xaa9 Leu Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14
  1             5             10
Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21
  15             20

```

2) SEQ ID NO:16 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 两者

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假定的: 无, 天然 p17 序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16

专利名称(译)	来自gag p17和p24保守区域的HIV肽以及它们在例如疫苗中的应用		
公开(公告)号	CN101104636A	公开(公告)日	2008-01-16
申请号	CN200610151748.7	申请日	2001-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	比奥诺尔免疫有限公司		
[标]发明人	B索伦森		
发明人	B·索伦森		
IPC分类号	C07K14/16 A61K39/12 G01N33/53 C07K16/10 G01N33/569 A61K9/127 A61K39/00 A61K39/39 A61P31/18		
CPC分类号	A61K2039/57 C12N2740/16222 A61K2039/55522 C07K14/005 A61P31/18		
代理人(译)	程泳		
优先权	20004413 2000-09-04 NO		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包含新的和经过修饰的肽，它们能够诱导HIV - 1特异性免疫应答而且不拮抗细胞毒性T细胞的活性，其目的是得到一种针对HIV的有效的预防和治疗疫苗。这些肽基于HIV gag p17和p24的保守区域。本发明还阐述了：包含至少一种所述的肽的游离形式或载体结合形式的抗原，包含至少一种抗原的疫苗组合物，以及应用这些抗原的免疫测定试剂盒和检测HIV或HIV特异肽诱导的抗体的方法。