

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

C12N 15/51 C12N 15/06



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02804395.2

[43] 公开日 2004 年 4 月 14 日

[11] 公开号 CN 1489630A

[22] 申请日 2002.1.8 [21] 申请号 02804395.2

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 8 [33] KR [31] 2001/00894

[86] 国际申请 PCT/KR02/00031 2002.1.8

[87] 国际公布 WO02/053757 英 2002.7.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.31

[71] 申请人 金哲仲

地址 韩国大田

[72] 发明人 金哲仲 金 恩 申光淳 金铉洙

[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 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 31 页 PCT/RO/134 表 3 页
附图 32 页

[54] 发明名称 HIV 样颗粒及其用途

[57] 摘要

本发明公开了表达 HIV - 1 的 env, gag, pro, 和/或 pol 基因的基于甲病毒属的表达载体, 它们的转录物, 和转化的宿主细胞。 本发明描述了使用上面的表达载体表达 Env, Gag, Pol, 和/或 Pro 蛋白, 和由上面的重组蛋白组成的 HIV 样颗粒 (HIV-LPs)。 本发明的病毒样颗粒 (VLPs) 作为成熟和有感染性的颗粒, 作为 HIV 感染的诊断试剂盒和预防 HIV 感染的疫苗组合物的抗原非常有效。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种基于甲病毒属的表达载体, 包含与第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列 (6264-8879bp), 和与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV gag 的核苷酸序列 (832-2328bp)。
2. 权利要求 1 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag。
3. 一种基于甲病毒属的表达载体, 包含与第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV gag 的核苷酸序列 (832-2328bp), 和与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列 (6264-8879bp)。
4. 权利要求 3 的表达载体, 它是质粒 pSFV/gag-env。
5. 一种基于甲病毒属的表达载体, 包含与第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列 (6264-8879bp), 与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV gag 的核苷酸序列 (832-2328bp), 和与第三亚基因组启动子可操作连接的 HIV pro 的核苷酸序列 (2268-2606bp)。
6. 权利要求 5 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag-pro。
7. 一种基于甲病毒属的表达载体, 包含与第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列 (6264-8879bp), 与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV gag 的核苷酸序列 (832-2328bp), 和与第三亚基因组启动子可操作连接的 HIV gagpro 的核苷酸序列 (832-2577bp)。
8. 权利要求 7 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag-gagpro。
9. 权利要求 7 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag-gag Δ pro。
10. 一种基于甲病毒属的表达载体, 包含与第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV gagpol 的核苷酸序列 (832-5132bp), 和与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列 (6264-8879bp)。
11. 权利要求 10 的表达载体, 它是质粒 pSFV/gagpol-env。

12. 权利要求 1-11 任一项的表达载体, 它进一步包含组成型转运元件 (CTE)。

13. 权利要求 12 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag-gagpro-CTE。

14. 权利要求 12 的表达载体, 它是质粒 pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE。

15. 权利要求 12 的表达载体, 它是质粒 pSFV/gagpol-env-MCTE。

16. 权利要求 12 的表达载体, 它是质粒 pSFV/gag-env-MCTE。

17. 保藏在韩国微生物保藏中心 (KCCM) 的保藏号为 KCCM-10233 的表达载体。

18. 保藏在韩国微生物保藏中心 (KCCM) 的保藏号为 KCCM-10234 的表达载体。

19. 保藏在韩国微生物保藏中心 (KCCM) 的保藏号为 KCCM-10348 的表达载体。

20. 一种制备 HIV 样颗粒的方法, 包括将权利要求 1-19 任一项的表达载体或其 RNA 转录物导入动物细胞, 并允许该表达载体和 RNA 产生 HIV 样颗粒的步骤。

21. 权利要求 20 的方法, 其中 HIV 样颗粒是成熟 HIV 样颗粒。

22. 权利要求 21 的方法, 其中成熟 HIV 样颗粒有感染性。

23. 一种由从权利要求 1-19 任一项的表达载体选择的表达载体转化的宿主细胞。

24. 权利要求 23 的宿主细胞, 其中宿主细胞是用表达载体稳定转化的。

25. 一种 AIDS 疫苗组合物, 包含诱导免疫反应足够量的权利要求 1-19 任一项的表达载体或其 RNA。

26. 一种 AIDS 疫苗组合物, 包含根据权利要求 21 的方法制备的诱导免疫反应足够量的成熟 HIV 样颗粒。

27. 一种给人接种抗 AIDS 的方法, 包括将权利要求 25 或 26 的

AIDS 疫苗组合物给予人。

28. 一种 HIV 感染的诊断试剂盒，包括根据权利要求 21 的方法制备的成熟 HIV 样颗粒。

29. 一种检测测试样品中特异性抗 HIV 抗原的抗体的方法，包括步骤：

(a) 收集怀疑含有特异性抗 HIV 的抗体的测试样品；

(b) 将测试样品与根据权利要求 21 的方法制备的成熟 HIV 样颗粒在允许样品中形成抗原-抗体免疫复合物的条件下发生反应；和

(c) 检测测试样品中形成的抗原-抗体复合物。

HIV 样颗粒及其用途

技术领域

本发明涉及表达 HIV 的 Gag 蛋白的表达载体，表达 HIV 的 Env 蛋白的表达载体，同时表达 Gag 和 Env 蛋白的表达载体，表达 HIV 的 Gagpol 多蛋白的表达载体和同时表达 Gagpol 多蛋白和 Env 蛋白的表达载体。

背景技术

已知人免疫缺陷病毒 (HIV) 是获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 的成因物质。特别是，HIV-1 和 HIV-2 属于慢病毒亚科 (Lentiviridae) 逆转录病毒，携带单链 RNA。一旦在易感宿主细胞中，RNA 基因组即被病毒反转录酶反翻译而产生双链 DNA，双链 DNA 被整合到宿主的染色体中，产生原病毒。

为了更好地理解本发明的背景，参考图 1，那里给出了大小 9.2kb 的 HIV-1 基因组的结构。HIV-1 基因组具有由 gag, pol 和 env 组成的结构基因，和包括 tat, rev, nef, vif, vpu 和 vpx 的附加基因。

HIV Gag 多蛋白前体 Pr55gag 从全长 gag-pol RNA 表达，大小 55kDa。HIV Gag 前体被 N 末端肉豆蔻酸部分运输到细胞质膜的内表面，在那里指导病毒粒体的装配。病毒粒体的成熟需要 HIV 的 pol 基因编码的蛋白酶(Pro)将 Pr55gag 蛋白水解切割为基质蛋白(MA, p17)，衣壳蛋白(CA, p24)，核壳蛋白(NA, p9)和 p6 蛋白(Gheysen D. 等, Cell, 59,103-112 (1989); Bray, M. 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91,1256-1260 (1994); Cann, A. J., 和 J. Karn, AIDS 3 (Suppl. 1), S19-S34 (1989); Ratner, L.,W. 等, Nature 313,277-284 (1985); Wain-Hobson, S. 等, Cell 40,9-17

(1985))。

包膜糖蛋白(Env)前体 gp160 从剪接 RNA 表达。在病毒感染的细胞中,前体被来自宿主或病毒的蛋白酶在 N 末端侧切割为 gp120 亚单位,在 C 末端侧切割为 gp41 亚单位,它们被正确靶向质膜,分别固定在外表面和插入到细胞膜中。在成熟病毒颗粒中, gp120 和 gp41 亚单位形成异源二聚体,其中两个亚单位非共价连接,已知它直接负责 HIV 的感染性,细胞向性和致细胞病变作用(Robey, E. 和 Axel, R., Cell 60, 697-700 (1990))。由于与免疫原性的密切关系, HIV 的 Env 蛋白是 HIV 疫苗开发的目标。

蛋白酶(Pro)是由 Pr160 gag-pol 前体的自身切割产生的,在翻译 gag-pol mRNA 的同时由 gag mRNA 区域 3' 末端核糖体移码翻译(Jacks, T. and Varmus, H. E. Science 230, 1237-1242 (1985); Jacks, T. 等, Nature 331, 280-283 (1988); Sonigo, p. 等, Cell 45, 375-385 (1986))。蛋白酶参与 Pr160gag-pol 多蛋白和 env 蛋白的加工,产生成熟感染性病毒颗粒(Kohl, N. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4686-4690 (1988))。

迄今为止,提议的 AIDS 疫苗包括灭活疫苗,减毒疫苗,重组活疫苗,病毒样颗粒疫苗和亚单位疫苗。

灭活完整病毒疫苗是由化学或物理处理分离的病毒颗粒从而破坏它们的感染性而制备的。这种类型的疫苗容易制备并且能够使用大多数的表位,相比之下,当病毒没有被完全灭活时,它可能引起疾病,另一方面,完全灭活的强烈处理可能引起很多表位破坏。尽管有一些灭活 SIV 疫苗的成功报道(Scott E. J. Nature 253, 393 (1991); Le Grand R. 等, Nature 355, 684 (1992); Crange M. P. 等, Nature 355, 685-686 (1992); Arthur L. O. 等, J Virol 69, 3117-3124 (1995); Neidrig M. 等, Vaccine 11, 67-74 (1993)), 但是不认为它可用作安全和有效的 AIDS 疫苗,因为已经对培养的宿主细胞中包含的外抗原的作用引起成功免疫产生怀疑。

活减毒疫苗是由部分删除 HIV 基因组制备的,如删除 nef 基因或

nef 和 vpr 基因 (Descrosiers R. C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 411-421 (1992); Gibbs J. S. 等, *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 607-616 (1994); Cranage M. P. 等, *Virology* 229, 143-154 (1997); Wyand M. S. 等 *Nature Med* 3, 32-36 (1997))。然而, 这种疫苗可在接种动物中恢复删除的基因, 允许它们具有感染性。因此, 活减毒疫苗可能不完全安全, 因为它们可在接种个体 (或动物) 引起 AIDS。

活重组疫苗是非致病性病毒的非必需基因被编码 HIV 免疫原的基因取代的载体。公开了 gag, pol 或 env 基因和免疫原性区域包括 HIV 的 V3 环在痘苗病毒, 痘病毒, 金丝雀痘病毒, 禽痘病毒和脊髓灰质炎病毒或流感病毒中表达为嵌合形式 (Tartaglia J. 等, *Virology*, 188, 217-232 (1992); Abimiku A. 等, *Nature Med*, 1, 321-329 (1995); Natuk R. J. 等, *AIDS Hum Retroviruses* 9, 395-404 (1993); Li S. 等, *J Virol*, 67, 6659-6666 (1993); Muster T. 等, *J Virol* 69, 6678-6686 (1995))。因为这个技术通常使用蛋白的一部分作为疫苗材料, 不能提供有效的免疫原。而且, 活重组载体不稳定 (Morrow. C. D. 等, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10, S61-S66 (1994); Anderson M. J. 等, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13, 53-62 (1997))。

亚单位疫苗是 HIV 编码的蛋白的亚单位, 是天然分离或由重组 DNA 技术表达的。这些疫苗容易操作, 但它们与病毒颗粒中存在的最初蛋白具有不同构象。使用哺乳动物和昆虫细胞表达系统表达了重组 Env 糖蛋白, gp120 和 gp160 (Lasky, L. A., 等, *Science*, 249, 932-935 (1986); Barr, P. J. 等, *Vaccine* 5, 90-101 (1987); Hu, S-L. 等, *J Virol* 61, 3617-3620 (1987); Rusche, J. R. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 6924-6928 (1987); Berman, P. W., 等 *J Virol* 63, 3489-3498 (1989); Ivey-Hoyle, M., and Rosenberg, M., *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6152-6159 (1990); Lasky, L. A. 等, *Cell*, 50, 975-985 (1987))。被注射给黑猩猩, 在 CHO

细胞中表达的 gp120 亚单位疫苗不能提供抗病毒攻击实验的保护 (Berman, P. W. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 5200-5204 (1988))。

通常, 病毒颗粒形式的疫苗比亚单位形式的疫苗更具有免疫原性和更稳定。最近开发了不携带遗传物质的非感染性病毒样颗粒 (VLPs) 用作疫苗的新技术。例如, 包装基因成熟可提供没有 RNA 基因组的 VLP, 含未加工 gag 蛋白的 VLP 可使用重组杆状病毒或痘苗病毒制备 (Gorelink R. J. 等, J Virol 64, 3207-3211 (1990); Gheysen D. E. 等, Cell 59, 103-112 (1989))。也报道了从分别含 gag-pol 基因和 env 基因的两个重组痘苗病毒共转染的细胞中制备病毒样颗粒 (Haffar O. K. 等, Virology, 183, 487-495 (1991))。这种假颗粒可有效制备中和抗体, env-CD4 保护抗体和合胞体抑制, 但它们具有它们不是成熟病毒颗粒和缺乏感染性的缺陷。

作为其它形式的含 HIV 免疫决定簇的病毒样颗粒, 描述了包括脊髓灰质炎病毒 capsvector, 乙型肝炎病毒 (HBV) 核心颗粒, HBsAg 颗粒和酵母逆转录转座子病毒样颗粒的杂种颗粒。但是, 这些杂种颗粒仅含有 HIV 免疫决定簇的部分区域, 产生非有效的疫苗 (Greene E. 等, AIDS Res Hum Retroviruses, 13, 41-51 (1997); Schlienger K., 等 J Virol 66, 2570-2576 (1991); Adams S. E. 等, Nature 329, 68-70 (1987); Layton G. T. 等, J Immunol, 151, 1097-1107 (1993); Eckart L. 等, J Gen Virol 77, 2001-2008 (1996))。

本发明的发明人尝试使用甲病毒属载体系统开发含成熟病毒样颗粒的新 AIDS 疫苗。本发明人相信该病毒样颗粒将提供预防 AIDS 的方法。

发明内容

本发明的一个目的是提供表达 Gag 蛋白的表达载体, 表达 HIV 的 Env 蛋白的表达载体, 同时表达 HIV 的 Gag 和 Env 蛋白的表达载体, 表达 HIV 的 Gagpol 多蛋白的表达载体和同时表达 HIV 的 Gagpol 多蛋

白和 Env 蛋白的表达载体。

本发明的另一个目的是提供用上面的表达载体转化的转化体。

本发明更进一步目的是提供 HIV 样颗粒 (HIVLPs)，及其制备方法，其用途，其中，上面的表达载体或其 RNA 转录物被导入动物细胞。

提供使用成熟 HIV 样颗粒检测 HIV 的方法及其在诊断 HIV 感染中的应用是本发明更进一步的目的。

提供包含成熟 HIV 样颗粒的疫苗组合物，和提供了包含该表达载体或其 RNA 转录物的 AIDS 疫苗组合物是本发明更进一步的目的。

提供检测测试样品中 HIV 抗原特异性抗体存在的方法是本发明更进一步的目的，该方法包括步骤：(a) 收集可能含有抗 HIV 的特异性抗体的测试样品；(b) 将该测试样品与根据权利要求 21 的方法制备的成熟 HIV 样颗粒在允许抗原-抗体免疫复合物形成的条件下发生反应；和 (c) 检测抗原-抗体复合物。

附图简述

图 1 是显示 HIV-1 基因组结构的简图；

图 2 是显示表达载体 pSFV 和 pSFV-helper 的结构限制性图谱；

图 3 是显示表达载体 pSFV/gag 构建过程的示意图；

图 4 是显示表达载体 pSFV/gagpro 构建过程的示意图；

图 5 是显示 HIV 样颗粒与 AIDS 患者血清的 western 印迹的照片，其中 HIV 样颗粒产生于 pSFV-helper 和 pSFV/gag，或 pSFV-helper 和 pSFV/gagpro，和 pSFV/gagpro 的 RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞；

图 6 是显示 HIV 样颗粒与 AIDS 患者血清的 western 印迹的照片，其中 HIV 样颗粒产生于体外活化 HIV 样颗粒感染的 BHK-21 细胞，所述体外活化 HIV 样颗粒从 pSFV-helper 和 pSFV/gag，或 pSFV-helper 和 pSFV/gagpro，和 pSFV/gagpro 的 RNA 转录物转染的

BHK-21 细胞中制备;

图 7 是显示 pSFV/gag 或 pSFV/gagpro 载体转染的 BHK-21 细胞中 Gag 蛋白的免疫细胞化学结果的照片, 用抗 p24 多克隆抗体染色;

图 8 是显示从 pSFV/gag 载体 (A) 或 pSFV/gagpro RNA 转录物 (B) 转染的 BHK-21 细胞的培养基上清分离的 VLPs 的负染色电子显微镜观察结果的照片 (X140, 000);

图 9 是显示 pSFV/env 表达载体构建过程的概图;

图 10 是显示 pSFV/env RNA 转录物和 pSFV-helper RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞中 Gag 蛋白的免疫细胞化学结果的照片, 用抗 gp160 单克隆抗体染色;

图 11 是显示体外活化缺陷性 SFV 颗粒感染的 BHK-21 细胞溶解产物与 AIDS 患者血清的 western 印迹的照片, 其中缺陷性 SFV 颗粒从 pSFV/env RNA 转录物和 pSFV-helper RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞制备;

图 12 是显示 pSFV/gag 和 pSFV/env RNA 转录物共转染 BHK-21 细胞中 HIV-1 的 Gag 和 Env 蛋白的免疫细胞化学结果的照片; 用抗 gp160 单克隆抗体 (B) 或 AIDS 患者血清 (C) 染色;

图 13 是显示包装在 VLPs 中的 RNA 基因组的 RT-PCR 和 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳模式的照片, VLPs 产生于 pSFV/gag RNA 转录物、或 pSFV/gag 和 pSFV/env RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞;

图 14 是显示体外活化的缺陷性 SFV 颗粒感染的 BHK-21 细胞中 Gag 和 Env 组成的 VLPs 的产生的 western 印迹照片, 所述颗粒在 pSFV-helper 和 pSFV/gag RNA 转录物或 pSFV-helper 和 pSFV/env RNA 转录物共转染的 BHK-21 细胞中制备;

图 15 是显示表达载体 pSFV/pro 构建过程的概图;

图 16 是显示表达载体 pSFV/env-gag 构建过程的概图;

图 17 是显示表达载体 pSFV/env-gag-pro 构建过程的概图;

图 18 是显示来自 pSFV/env-gag RNA 转录物转染的 BHK-21 的细胞溶解产物或 VLPs 与 AIDS 患者血清的 western 印迹的照片;

图 19 是 pSFV/env-gag-pro 的 RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞的免疫细胞化学的照片, 显示 Gag, Env 和 Pro 蛋白的表达;

图 20 是显示表达载体 pSFV/CTE 构建过程的概图;

图 21 是显示表达载体 pSFV/gagpro-CTE 构建过程的概图;

图 22 是显示表达载体 pSFV/env-gag-gagpro-CTE 构建过程的概图;

图 23 是显示表达载体 pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE 构建过程的概图, 显示 gag Δ pro 基因插入 pSFV/env-gag 载体, gag Δ pro 通过删除负责在 gag mRNA 区域的 3' 末端核糖体移码的序列而制备;

图 24 是显示表达载体 pSFV/gagpol 构建过程的概图;

图 25 是显示 pSFV/gagpol 载体转染的 BHK-21 细胞中 Gag 和 Gagpol 多蛋白表达的免疫细胞化学照片, 使用抗 p24 多克隆抗体和抗蛋白酶多克隆抗体;

图 26 是使用抗 p24 多克隆抗体的、pSFV/gagpol RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞的 western 印迹照片;

图 27 是显示表达载体 pSFV/envMCTE 构建过程的概图;

图 28 是显示表达载体 pSFV/gag-envMCTE 构建过程的概图;

图 29 是显示表达载体 pSFV/gagpol-envMCTE 构建过程的概图;

图 30 是显示 pSFV/gag-envMCTE 载体转染的 BHK-21 细胞中 Gag 和 Env 蛋白表达的免疫细胞化学的照片, 使用抗 p24 多克隆抗体和抗蛋白酶多克隆抗体;

图 31 是显示 pSFV/gagpol-envMCTE 载体转染的 BHK-21 细胞中 Gagpol 多蛋白和 Env 蛋白表达的免疫细胞化学的照片, 使用抗 p24 多克隆抗体, 抗蛋白酶多克隆抗体, 和抗 env 单克隆抗体;

图 32 是显示 pSFV/gag-envMCTE 和 pSFV/gagpol-envMCTE 的 RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞的 western 印迹照片, 使用抗 p24 多克隆抗体和抗 env 单克隆抗体。

发明的最佳实施方式

本发明提供了表达 HIV 结构蛋白的基于甲病毒属的表达载体。本发明中使用的术语“HIV”包括所有类型的人逆转录病毒如 HIV-1, HIV-2, HTLV-1 和 HTLV-2。

本发明中使用的术语“甲病毒属(Alphaviruses)”包括分类为生物工艺学和病毒学领域中的甲病毒属及其亚型的病毒种, 如 Estern 马脑炎病毒 (EEE), Venezuelan 马脑炎病毒 (VEE), Everglades 病毒, Mucambo 病毒, Pixuna 病毒, 西方脑炎病毒 (WEE), 新培斯病毒, 南非虫媒病毒 NO.86, Girdwood S. A. 病毒, Ockelbo 病毒, 赛姆利基森林病毒 (Semliki Forest virus), Middleburg 病毒, 屈曲病毒, O'Nyong-Nyong 病毒, Ross River 病毒, Barmah Forest 病毒, Mayaro 病毒, Getah 病毒, Sagiya 病毒, Bebaru 病毒, Mayaro 病毒, Una 病毒, Aura 病毒, Whataroa 病毒, Babanki 病毒, Kyaylagach 病毒, Highlands J 病毒, Fort Morgan 病毒, Ndumu 病毒, Buggy Creek 病毒 和已被国际病毒分类委员会分类为甲病毒属的其它病毒。

甲病毒属, 属于披膜病毒科 (Togaviridae), 是有包膜的正链 RNA 病毒, 具有广范围易感细胞, 包括昆虫、鸟和哺乳动物。甲病毒 RNA 基因组本身有感染性并编码 RNA 复制酶, 允许甲病毒属用作能够执行 RNA 复制和翻译的表达载体 (Liljestrom, P 和 Graoff, *Biotechnology*, 9, 1356-1361 (1991))。

优选甲病毒属选自“赛姆利基森林病毒”(SFV)和“新培斯病毒”。最优选, 甲病毒属选自赛姆利基森林病毒 (SFV)。本发明实施方案中提供的基于 SFV 的表达载体, pSFV, 是由 SFV cDNA 基因组插入到包含 SP6 启动子的质粒中制备的, 提供使用 SP6 聚合酶体外翻译和在 26S 亚基因组启动子控制下, 代替结构基因插入的外来基因的表达。

重组 RNA 通过感染导入细胞需要体内包装系统。pSFV-helper 载体含有 SFV 的 RNA 复制信号和表达结构基因的遗传信息, 但它缺乏基因组 RNA 的包装信号。因此, 当 pSFV 载体与 pSFV-helper 共转染

时，可产生在 SFV 结构蛋白内部仅携带重组 RNA 的病毒颗粒。感染易感细胞时，病毒颗粒表达重组基因，但不能重新组成病毒颗粒。参考图 2，那里图解了本发明实施方案中使用的 pSFV 和 pSFV-helper 载体的结构。本发明中利用的所有 DNA 载体及其 RNA 转录物在本发明的范围内。

在本发明的一个方面，提供了分别携带 gag, gagpro, gagpol 和 env 基因的基于甲病毒的表达载体，携带 env-gag 基因的表达载体，携带 env-gagpro 基因的表达载体，携带 env-gag-gagpro 基因的表达载体，携带 env-gag-gag Δ pro 基因的表达载体和携带 gagpol-env 基因的表达载体，其中每个 HIV 基因通过分别将基因插入 26S 亚基因组启动子下游，被甲病毒属亚基因组启动子调节。已知 Pro 合成表达依赖于 Gag 蛋白的量 (Velissarios K. 等, *Virology*, 193, 661-672 (1993); Magdeleine H. 等, *J Virol.* 72, 4819-4824 (1998); Joel G. 等, *Virology*, 244, 87-96 (1998))。为了通过加工 Gag 蛋白获得 Pro 蛋白的最大表达，构建表达载体，其特征是，负责核糖体移码的核苷酸在 gag 和 pro 基因连接处被删除的 gag Δ pro 基因或 gagpro 基因分别与 26S 启动子连接，而且位于 gagpol 基因下游的 env 基因与 26S 启动子连接。

本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，其中 HIV-1 的 gag 基因与启动子可操作连接。这里使用的术语“可操作连接”是指被连接的 DNA 序列典型地是相邻的和在阅读框架中。在本发明的一个实施方案中，描述了 pSFV/gag 载体 (参见实施例 1)。本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，其中 gagpro 基因与启动子可操作连接。本发明的一个实施方案示例了 pSFV/gagpro 载体 (参见实施例 1)。而且，本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，其中 HIV-1 env 基因与启动子可操作连接。本发明的一个实施方案示例了 pSFV/env 载体 (参见实施例 4)。

本发明提供了同时表达 HIV-1 env 和 gag 的基于甲病毒属的表达载体。更优选地，本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，它包含与

第一亚基因组启动子可操作连接的 HIV env 的核苷酸序列，和与第二亚基因组启动子可操作连接的 HIV gag 的核苷酸序列。在本发明的一个实施方案中，示例了质粒 pSFV/env-gag（参见实施例 9）。而且，本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，它包含与启动子可操作连接的 HIV pro 的核苷酸序列。在本发明的一个实施方案中，示例了质粒 pSFV/pro（参见实施例 9）。

在本发明更进一步的方面，提供了同时表达 HIV-1 的 env, gag 和 pro 的甲病毒属载体。更优选，本发明提供了基于甲病毒属的表达载体，其包含分别与第一，第二和第三亚基因组启动子可操作连接的 env, gag 和 pro 基因。示例了载体 pSFV/env-gag-pro（参见实施例 9）。

本发明提供了表达 HIV-1 的 gagpro 基因和编码组成型转运元件（constitutive transport element）（CTE）的基因的甲病毒属载体，还提供更优选的基于甲病毒属的表达载体，除了编码 CTE 的基因外，它还包含与启动子可操作连接的 gagpro 基因。示例了载体 pSFV/pagpro-CTE（参见实施例 9）。

而且，本发明提供了表达 HIV-1 的 env, gag, gagpro 基因和编码 CTE 的基因的甲病毒属载体，和更优选基于甲病毒属的表达载体，除了编码 CTE 的基因外，后者还包含分别与第一，第二和第三亚基因组启动子可操作连接的 env, gag 和 gagpro 基因。示例了载体 pSFV/env-gag-gagpro-CTE（参见实施例 12）。

本发明提供了表达 HIV-1 的 env, gag 和 gag Δ pro 基因和编码 CTE 的基因的甲病毒属载体，更优选基于甲病毒属的表达载体，除了编码 CTE 的基因外，它还包含分别与第一，第二和第三亚基因组启动子可操作连接的 env, gag 和 gag Δ pro 基因。这里，应该注意的是 gag Δ pro 是指在 gag 和 pro 基因接头区域删除了核苷酸序列而制备的 gagpro 基因，提供开放阅读框架并允许 pro 蛋白在没有 gag mRNA 的 3' 末端移码翻译时表达。示例了 pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE 载体（参见实施例 13）。

本发明提供了表达 HIV-1 的全长 gagpro 基因的甲病毒属载体，更优选基于甲病毒属的表达载体，其包含与亚基因组启动子下游可操作连接的全长 gagpro 基因，pSFV/gagpol 载体是一个实施方案（参见实施例 14）。

本发明提供了同时表达 HIV-1 的 env 和 gag 基因的甲病毒属载体，更优选基于甲病毒属的表达载体，除了编码 MCTE 的基因外，其包含分别与第一和第二亚基因组启动子可操作连接的 env 和 gag 基因。示例是 pSFV/gag-envMCTE 载体（参见实施例 16）。

本发明提供了同时表达 HIV-1 的 gagpol 和 env 基因的甲病毒属载体，更优选基于甲病毒属的表达载体，除了编码 MCTE 的基因外，其包含分别与第一和第二亚基因组启动子可操作连接的 gagpol 和 env 基因。示例是 pSFV/gagpol-envMCTE 载体（参见实施例 16）。

可以使用本发明所属领域已知的重组 DNA 技术制备本发明的表达载体，做一些改动。

本发明提供了使用上述基于甲病毒属的表达载体制备前体或已加工亚单位形式的 HIV-1 结构蛋白（包括 Gag, Pro 和/或 Env）的方法。本发明基于甲病毒属的表达载体可在广范围的宿主细胞中表达蛋白。而且，本发明提供了通过在宿主细胞，或更优选在动物细胞中表达表达载体或其 RNA 转录物制备 HIV-1 的 Gag, Pro 和/或 Env 蛋白的方法。优选动物细胞从鸟、哺乳动物、爬行动物、两栖动物、昆虫和鱼（水生动物）制备，哺乳动物的实例包括人、猴、仓鼠、大鼠（或小鼠）和猪。最优选，由宿主细胞和载体组成的表达系统是 BHK-21 细胞/pSFV 载体或 COS 细胞/pSFV 载体，但本发明的表达系统不限于它们。

甲病毒属表达载体和它们的 RNA 转录物可通过常规转染方法，包括 DEAE 葡聚糖介导的转染、磷酸钙共沉淀和更优选电穿孔，导入动物细胞，如 BHK-21 细胞。在本发明的一个实施方案中，pSFV 载体的 RNA 转录物通过电穿孔有效转染宿主细胞。而且，上述转染方法可用于共转染。

通过导入感染性病毒颗粒可使外来基因在动物细胞中的表达最大化。关于此，本发明提供了制备上面的 HIV 蛋白的方法，包括用包含 RNA 转录物的感染性病毒颗粒感染宿主细胞，病毒颗粒使用辅助病毒产生。在实施例 2 和 6 中，示例了该方法。通过使用辅助病毒或本发明表达载体的 RNA 转录物产生的缺陷性病毒颗粒感染宿主细胞制备的 HIV-1 蛋白可使用常规方法分离，包括离子交换层析、亲和层析和凝胶渗透层析。

此外，本发明提供了用本发明表达载体的 RNA 转录物和包含重组 RNA 的 VLP 瞬时转化的宿主细胞，也提供了用该表达载体永久转化的宿主细胞。永久转化的细胞可以以具有 HIV 基因组 cDNA 整合进入宿主细胞的染色体所需的巨细胞病毒 (CMV) 启动子，用于逆转录酶非依赖性表达的编码组成型转运元件 (CTE) 的基因，和作为选择性标记的抗新霉素基因的动物细胞系提供。更优选 CTE 基因是编码 MPMV (Mason-Pfizer 猴病毒) 的基因。

本发明提供了使用上述表达载体和宿主细胞制备感染性 HIVLP 的方法，更特别的是，通过将表达 Gag 蛋白的表达载体导入宿主细胞制备含 Gag 的未成熟 HIVLP 的方法。当蛋白酶没有加工 Gag 时，不产生成熟病毒颗粒，导致未成熟病毒样颗粒 (VLPs)。“病毒样颗粒 (VLP)”是指不等同于野生型 (成熟) 病毒颗粒，但与野生型具有相似的物理化学性能的病毒颗粒。“未成熟病毒样颗粒 (未成熟 VLP)”是显示出病毒颗粒形态学特征，而它不能够完成野生病毒颗粒产生所需的加工的病毒颗粒。“复制子”是指含基因复制的必需基因的自身复制 RNA，因此能够被用作表达外来基因的表达载体，同时与外来基因组合使病毒增殖。

仅含 Gag 蛋白的 HIV 能够产生没有感染性的未成熟病毒颗粒。而且，已知抗 HIV 的中和抗体主要与具有可变氨基酸序列的位于包膜 (Env) 蛋白的表位结合。因此，Env 蛋白是开发 HIV 疫苗的主要目标，对开发携带 Env 蛋白的含 Gag 的重组病毒颗粒的关注不断增长。为了获得这种 HIV 疫苗，本发明提供了通过在宿主细胞中同时表达两

种蛋白制备由 Gag 和 Env 蛋白组成的未成熟 HIVLP 的方法，其中宿主细胞用包含 gag 和 env 基因的表达载体共转染。

在另一方面，用于制备 HIVLP 的共转染方法需要很多步骤且效率低。为了克服这些问题，本发明的发明人使用携带 2 或 3 个靶基因的重组质粒，提供了制备和回收 HIVLP 的经济和有效方法。因此，本发明提供了由 Gag 和 env 蛋白组成的未成熟 HIVLP 的制备方法，这通过将 gag 和 env 基因每个都插入甲病毒属复制子的每个启动子下游和将所得复制子载体导入宿主细胞而提供。

在装配或出芽过程中，或在病毒颗粒中，gag 蛋白被蛋白酶切割，切割的亚单位蛋白装配，产生成熟颗粒。仅由 gag 蛋白组成的 HIVLP 在大小和形态学上与天然 HIVLP 变化很大。而且，除非由 Gag 和 Env 组成的 HIVLP 经历蛋白酶的加工，否则不能产生成熟病毒颗粒。为了诱导有效的免疫反应，提供与野生型 HIV 相似的免疫原（抗原）很重要。因此，成熟 HIVLP 的产生是制备 HIV 疫苗的有力工具。在本发明中，发明人发展了通过同时表达 Gag 和 Pro 蛋白，或 Gag，Env 和 Pro 蛋白制备成熟 HIVLP 的方法。“成熟病毒样颗粒（成熟 VLP）”是指（定义为）具有蛋白酶（Pro）完全加工的结构蛋白并显示出与野生型 HIV 相似的形态学和大小的 HIVLP。在本发明中，发现当 gagpol 和 env 基因同时表达时产生大量成熟 HIVLP。

HIV 样颗粒（HIVLP）被认为是 HIV 疫苗或诊断 HIV 感染的抗原最优选的形式。然而，除了建立产生 HIVLP 的稳定细胞系很困难外，在每个不同载体中表达 Gag，Env 和/或蛋白酶产生 HIVLP 复杂且效率低。在本发明中，成功开发了同时表达大量足以产生 HIVLP 的 Gag，Env 和蛋白酶的基于甲病毒属的表达载体，并成功制备和分离了感染性 HIVLP。

本发明进一步提供了诱导免疫反应足够量的上面的表达载体的制备方法，包括表达载体的 RNA 转录物或 HIVLP 的疫苗组合物，和预防或治疗 AIDS 的方法，包括给予该疫苗组合物。优选，HIVLP 是成熟 HIVLP，未成熟 HIVLP，感染性 HIVLP 或非感染性 HIVLP，最优选成熟

HIVLP。由于其三维结构，HIVLP，当它用作疫苗时，可诱导很好的免疫反应。

本发明的疫苗组合物可以以适合活体的类型给予人。适合活体的类型是指能够以比其毒性作用更高的治疗或预防作用给予活体的物质类型。该物质可给予动物，更优选给予人。

本发明的疫苗另外包括合适的稀释剂、赋形剂和/或载体。赋形剂包括能够提高疫苗免疫原性的合适佐剂。佐剂可选自革兰氏阴性细菌的内毒素脂质 A、分枝杆菌属物种的 trehalos dimycolate、磷脂溶血卵磷脂、溴化二甲基双十八烷基铵 (DDA)、聚氧丙烯-聚氧乙烯 (POP-POE) 嵌段共聚物，氢氧化铝和脂质体。载体可以是任何物质，除非在所给予的个体内诱导不希望的抗体。特别是，各种合适载体或稀释剂如盐水、缓冲盐水，和盐水和非特异性血清白蛋白的混合物可以用于本发明。药物组合物可以包括载体、缓冲液、抗氧化剂、碳水化合物如葡萄糖、蔗糖或糊精和螯合剂如 EDTA，另外包括水、盐水、甘油、乙醇、乳化剂、加湿剂或 pH 调节剂。

疫苗组合物可以包括能够增强免疫反应的佐剂。佐剂的实例包括氢氧化铝 (alum)，thr-MDP，nor-MDP 和 MPT-PE。而且，疫苗可以包括细胞因子如 GM-CSF，IL-2，IL-12，TNF 和 IFN，已知它们可增强免疫反应。

疫苗的剂量可以依赖于因素如健康情况、年龄、性别、体重和疫苗的免疫反应能力。而且，为了达到最大反应，剂量可以变化。例如，可以每天以相同剂量给予疫苗，或在紧急情况下，可以逐渐减少剂量。可以如通常皮下、静脉内、肌内、口服或真皮内给予疫苗。可以应用吸入或栓剂给药。加强给药可以在 4 至 6 周后给予。

本发明提供了 HIV 感染的诊断试剂盒和使用它们的诊断方法。诊断试剂盒包括步骤：(a) 将 HIVLP 与来自动物，特别是人的生物学样品发生反应；和 (b) 检测样品中抗体与 HIVLP 的结合。而且，提供了使用诊断试剂盒诊断 HIV 感染的方法。测定抗原和抗体结合程度的方法是本发明所属领域熟知的。ELISA (酶链免疫吸附试验) 是适

用方法之一。诊断中抗原-抗体结合可直接或竞争进行。

从上面观点看，本发明提供了测试样品中特异性抗 HIV 抗原的抗体的检测方法，包括步骤：（a）收集怀疑含有特异性抗 HIV 的抗体的测试样品；（b）将测试样品与根据实施例 18 所述方法制备的成熟 HIV 样颗粒在允许样品中形成抗原-抗体免疫复合物的条件下发生反应；和（c）检测测试样品中形成的抗原-抗体复合物。

本发明的成熟 HIV 样颗粒作为抗原，可用于执行免疫试验，包括 ELISA，RIA 和其它非酶链抗体实验，或检测逆转录病毒抗原（如 HIV 抗原）和抗逆转录病毒抗体（如抗 HIV 抗体）。在 ELISA 中，成熟 HIV 样颗粒可粘附到特定表面，如聚苯乙烯微量滴定平板的孔，其中蛋白可结合。洗涤平板以去除未结合成熟 HIV 样颗粒。经洗涤去除未完全粘附的成熟 HIV 样颗粒后，用非特异性蛋白如牛血清白蛋白（BSA）或酪蛋白封闭平板，降低成熟 HIVLP 与表面的非特异性结合。

其后，临床或生物样品可以施加到固定表面，允许免疫复合物（抗原-抗体复合物）形成。这里，可以用稀释剂如 BSA，牛 γ 球蛋白（BGG）或磷酸缓冲溶液（PBS）/Tween 溶液稀释样品，后随 25℃ 和随后 37℃ 温育 2 至 4 小时。接着通过洗涤从表面去除非免疫复合物。可以用 PBS/Tween 或硼酸缓冲溶液进行洗涤。

洗涤后，向一抗中添加特异性二抗可进行定性或定量测试，其中二抗与成熟 HIVLP 形成免疫复合物。在样品来自人的情况下，二抗主要特异性抗人免疫球蛋白中的 IgG。为了容易检测免疫复合物，二抗与能够使用产色底物的酶结合，因此允许使用分光光度计进行定性分析。

为了鉴定与多个 HIV 分离株反应的多个抗体，免疫学不同的多个 HIV 样颗粒可与特定表面粘附。为了检测识别 HIV 分离株中保守表位的抗 HIV 抗体，可粘附一个或有限数量的成熟 HIVLP。为了鉴定与一个 HIV 分离株（如 LA1，MN，SF2 或 HXB2）反应的抗体，可粘附本发明 HIV 分离株特异性的一个成熟 HIVLP。这个另外的诊断系统可用于

检测临床测试和医学或法医领域的特定 HIV 分离株。

此外，可能需要另一个诊断方法鉴定属于不同分类的免疫学不同的 HIV 分离株。免疫学不同的 HIV 分离株实例包括 LA1, MN, SF2, HXB2 和最初 HIV-1 分离株。在这个诊断方法的一个方面，本发明的成熟 HIVLP 可用于制备抗体，包括能够特异性识别免疫学不同的 HIV 分离株的单克隆抗体。可能免疫学不同的本发明的成熟 HIVLP 可用作疫苗和诊断免疫原。混合成熟 HIVLPs 的混合物可提供混合分离株的保护和/或诊断。在这种情况下，免疫原的混合物可以称作“鸡尾酒 (cocktail)”。

本发明的具有免疫性能的组合，以非混合或鸡尾酒形式，可用于检测样品（包括生物学样品）中的 HIV 抗原，或产生 HIV 特异性抗体（包括单克隆抗体）中和 HIV。

在进一步的诊断应用中，为了诊断和治疗目的，本发明的成熟 HIVLP 可用于刺激从 HIV 感染患者得到的生物学样品中的 HIV 特异性 T 细胞。

参考下列实施例结合所附附图将更详细解释本发明。然而，提供下列实施例仅用来举例说明本发明，且本发明不限于它们。

实施例 1: 表达载体 pSFV/gag 和 pSFV/gagpro 的构建

HIV 的 Gag 蛋白及其蛋白水解切割产物是病毒粒体的主要结构成分，没有其它任何病毒蛋白，Gag 本身足以指导病毒样颗粒的装配和释放。Gag 蛋白被 pol 蛋白编码的病毒蛋白酶 (PR) 切割，产生基质蛋白 (MA, p17)，衣壳蛋白 (CA, p24)，核壳蛋白 (NA, p9) 和 p6，它们装配以产生成熟病毒颗粒 (Gheysen D. 等, Cell, 59, 103-112 (1989))。因此，在本研究中，通过如下将 gag 基因插入复制子构建了能够表达 Gag 的表达载体。为了扩增全长 gag 基因，用下面的引物 1 和 2 组成的引物组，使用含全长 gag 基因 (832-2328bp) 的 HIV 进化枝 E (cladeE) 基因组 (Genbank 登记号 U51188, Journal of Virology, 1996) 作为模板实施 PCR。而且，为了除了 gag 基因

外扩增 pro 基因, 用下面的引物 1 和 3, 使用含 gag 基因, 移码位点和 pro 基因 (832-2577bp) 的 HIV 进化枝 E 基因组作为模板实施 PCR。在两种情况下, 如下制备 PCR 化合物: 携带全长 HIV-1 进化枝 E 基因组的质粒 pUHD (100ng/ μ l) 用作模板, 与 4 μ l 2.5mM dNTP (Boehringer Mannheim (BM), 德国), 1 μ l 正义引物 (100pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times Taq 聚合酶缓冲液, 37 μ l 蒸馏水混合。PCR 混合物在 98 $^{\circ}$ C 预温育 5 分钟, 然后补充 1 μ l Taq 聚合酶, 随后是 30 个循环的 PCR 反应, 其中每个循环由 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 3 分钟组成。HIV-1 gag 和 gagpro 的扩增产物分别克隆进入 pSFV 载体的 BamHI 位点, 得到重组载体 pSFV/gag (参见图 3) 和 pSFV/gagpro (参见图 4)。

引物 1: 正义 (SEQ ID NO.: 1)

5'-GCGGATCCCGGGATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTAAGT-3'

引物 2: 反义 (SEQ ID NO.: 2)

5'-CGCGGATCCCTGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA-3'

引物 3: 反义 (SEQ ID NO.: 3)

5'-CGCGGATCCCTGCAGTTAAAGTACAACCAATCTGAGTCAACA-3'

实施例 2: 使用 pSFV-helper 和 pSFV/gag, 或 pSFV-helper 和 pSFV/gagpro 制备 VLP

HIV-1 的蛋白酶 (Pro) 在病毒粒体出芽过程中或之后活化, 并参与结构多蛋白包括 Gag 和 Gagp1 前体的加工。在这个实施例中, 在宿主细胞中与 pSFV-helper 一起表达实施例 1 中制备的重组载体 pSFV/gag 和 pSFV/gagpro。

使用限制性酶 PvuI 使 pSFV/gag 和 pSFV/gagpro 载体完全线性化, 用酚/氯仿提取法纯化。10 μ l 质粒 10 μ l DNA, 5 μ l 10 \times SP6 缓冲液 (TaKaRa), 2.5 μ l 100mM DTT, 5 μ l rNTP 混合物 (10 mM ATP,

10mM CTP, 10mM UTP, 10 mM GTP, BM), 2 μ l Rnasin(BM), 1.5 μ l SP6 RNA 聚合酶 (TaKaRa) 和 19 μ l 蒸馏水制备反应混合物, 接着在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时 30 分钟。然后电穿孔进行转染, 如下: 25 μ l (1 μ g) pSFV-helper RNA 转录物, 50 μ l 所得 gag 或 gagpro 基因 RNA 转录物添加到 800 μ l 悬浮于 PBS (磷酸缓冲盐水, 1.37 mM 氯化钠, 0.02mM 氯化钾, 0.1mM 磷酸缓冲液/ml) 中的 BHK-21 细胞 (10⁷ 个细胞/ml), 接着, 在室温下, 0.4cm 电穿孔杯中, 使用 Bio-Rad 基因脉冲发生器, 830 V/25 μ F 的两次脉冲进行电穿孔。转染 48 小时后, 培养基以 3500 rpm 离心 15 分钟, 接着使用 Beckman SW41 转子对所得上清以 30,000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 超离心 2 小时, 得到含病毒颗粒的沉淀。沉淀重悬于 TNE 缓冲液中 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) 并保存在 -70 $^{\circ}$ C。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶对沉淀中所含的缺陷性 VLPs 进行电泳, 使用来自 AIDS 患者的血清用 western 印迹分析 (见图 5, 泳道 M: 阴性对照; 泳道 1: 从 pSFV-helper 和 pSFV/lacZ 制备的 VLP; 泳道 2: 从 pSFV-helper 和 pSFV/gag 制备的 VLP; 泳道 3: 从 pSFV-helper 和 pSFV/gagpro 制备的 VLP)。在图 5 的泳道 2 中, 检测到 gag 蛋白。这表明 Gag 蛋白在 pSFV/gag RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞中表达, Gag 蛋白组成的 HIVLPs 和 SFVLP 释放到培养基中。揭示了为表达 Pro 蛋白以及 Gag 蛋白而制备的 pSFV/gagpro 产生 Gag 蛋白比 pSFV/gag 少 (参见图 5 的泳道 3)。用制备的病毒颗粒感染 BHK-21 细胞, 如下: 为活化缺陷性 VLPs, TNE 缓冲液中的 100 μ l 缺陷性 VLPs 悬浮液与 5 μ l 糜蛋白酶 (10mg/ml), 5 μ l 50 mM CaCl₂ 在冰上孵育 30 分钟, 然后添加 45 μ l 抑酶肽 (2mg/ml, Sigma, USA) 终止蛋白酶活性。活化的 VLPs 添加到单层 70% 汇合的 BHK-21 细胞中, 然后在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下孵育 90 分钟, 允许 VLPs 感染 BHK-21。接着抽吸培养基, 提供新的培养基, 进行孵育 48 小时。用 200 μ l 裂解缓冲液 (1% NL40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 μ g/ml PMSF) 裂解 BHK-21 细胞, 以 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。上清与样品缓冲液混

合, 然后煮沸 5 分钟。用 SDS-PAGE (12%) 分离变性样品。分离的蛋白转移到 PVDF 膜 (BM) 上, 在 15V 和 7 mA 的条件下进行 2 小时, 并使用特异性抗体进行 western 印迹, 在那里来自 AIDS 患者的血清用作一抗和生物素化抗人 IgG 作为二抗。接着, 膜与抗生物素蛋白-生物素溶液反应, 用 DAB 溶液进行颜色显影 (参见图 6, 泳道 1: 来自 pSFV/gag 的 VLP 感染的 BHK-21 细胞; 泳道 2: 来自 pSFV/gagpro 的 VLP 感染的 BHK-21 细胞)。再次感染的结果, 55kDa 条带代表 BHK-21 细胞的细胞质中产生 Gag 蛋白。因此, 这些结果提示从 pSFV/gag 或 pSFV/gagpro 得到的 VLP 含 gag 基因且有感染性。

实施例 3: 使用 pSFV/gag 和 pSFV/gagpro 表达载体制备 VLP

实施例 2 中制备的 VLPs 是 SFV 核心 (SFVLPgag 或 SFVLPgagpro) 组成的 VLP 和 HIV-1 核心 (HIVLPgag 或 SFVLPgagpro) 组成的 VLP 的混合物。为了仅得到 HIV-1 核心组成的 VLPs, 根据上面实施例 2 的方法, 将实施例 1 中制备的 pSFV/gag 和 pSFV/gagpro 在体外转录并在没有 pSFV-helper RNA 转录物下转染 BHK-21 细胞。用冷纯甲醇固定转染的细胞, 在 -20℃ 冷却 4 至 6 分钟, 用 1% 明胶封闭, 用抗 p24 (病毒衣壳) 多克隆抗体 (抗兔), 接着用二抗生物素化抗兔 IgG 免疫染色。结果, 发现 Gag 蛋白在转染的 BHK-21 细胞中表达 (参见图 7, A: 阴性对照, 没有转染的 BHK-21 细胞; B: pSFV/gag 转染的 BHK-21 细胞; C: pSFV/gagpro 转染的 BHK-21 细胞)。细胞质中检测到 Gag 蛋白, 使用实施例 2 的方法从培养基的上清中分离 VLPs, 在电子显微镜下观察 (图 8, A: pSFV/gag 的 VLPs; B: pSFV/gagpro 的 VLPs)。发现甚至当 pSFV/gag 或 pSFV/gagpro RNA 转录物在没有 pSFV-helper RNA 转录物下表达时, 仍产生仅由 Gag 蛋白组成的 VLP (HIVLPgag)。

实施例 4: pSFV/env 表达载体的构建

为了扩增 HIV 的 gp160 基因, 用下面的引物 4 和 5 组成的引物

组，使用在 6264-8879bp 之间含 gp160 基因的 HIV 进化枝 E 基因组 (Genbank 登记号 U51188, Journal of Virology, 1996) 作为模板实施 PCR。

引物 4: 正义 (SEQ ID NO.: 4)

5'-CGCGCCTCGAGCGGGATCCCATGAGAGTGAAGGGGACACGGA-3'

引物 5: 反义 (SEQ ID NO.: 5)

5'-AATGGATCCTATAGCAAAGCCCTTTCCAAGCCC-3'

PCR 混合物制备如下: 携带全长 HIV-1 进化枝 E 基因组的质粒 pUHD (100 ng/ μ l) 用作模板, 与 4 μ l 2.5mM dNTP (BM, 德国), 1 μ l 正义引物 (100 pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100 pmol/ μ l), 5 μ l Taq 聚合酶 10 \times 缓冲液和 37 μ l 蒸馏水混合。PCR 混合物在 98 $^{\circ}$ C 预温育 5 分钟, 然后补充 1 μ l Taq 聚合酶, 随后是 30 个循环的 PCR 反应, 其中每个循环由 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 3 分钟组成。将 Gp160 基因的扩增产物克隆进入 pSFV 载体的 BamHI 位点, 得到重组载体 pSFV/env (参见图 9)。

实施例 5: 使用 pSFV-helper 和 pSFV/env 表达载体制备 VLP

因为仅 HIV-1 的 Env 不能产生 VLP, 所以由 pSFV-helper 和 pSFV/env 制备 VLP。用 SpH I 使实施例 4 中制备的 pSFV/env 完全线性化, 酚/氯仿提取法纯化。为了得到 env 基因的 RNA 转录物, 用 10 μ l 线性化质粒 DNA, 5 μ l 10 \times SP6 缓冲液 (TaKaRa), 5 μ l 10mM m7G(5')ppp(5')G(BM), 2.5 μ l 100mM DTT, 5 μ l rNTP 混合物 (10mM ATP, 10mM CTP, 10mM UTP, 10mM GTP, BM), 2 μ l Rnasin (BM), 1.5 μ l SP6 RNA 聚合酶 (TaKaRa) 和 19 μ l 蒸馏水制备反应混合物, 在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时 30 分钟。接着根据与实施例 2 相同的电穿孔进行转染, 除了使用 50 μ l pSFV/env RNA 转录物和 25 μ l pSFV/辅助 RNA 转录物作为 RNA 转录物。转染后 48 小时, 培养基以 3500rpm 离心 15 分钟, 接着使用 Beckman SW41 转子对上清超离心 (2 小时,

30000rpm, 4℃), 得到含病毒颗粒的沉淀。沉淀重悬于 TNE 缓冲液中 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) 并保存在 -70℃。而且, 用冷纯甲醇固定转染的细胞, -20℃ 冷却 4 至 6 分钟, 用 1% 明胶封闭, 以抗 gp160 单克隆抗体 (1mg/ml) 和接着以生物素化抗小鼠 IgG 二抗 (5μl/ml) 免疫染色。接着, 感染细胞与 AB 溶液 (5μl 抗生物素蛋白, 5μl 生物素/1ml PBS, VECTOR) 孵育 30 分钟, 用 DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 溶液 (VECTOR) 显色 (见图 10, A: 阴性对照, 没有转染的 BHK 细胞; B: pSFV/env 载体转染的 BHK 细胞)。结果, 发现 Env 蛋白在 pSFV/env 载体转染的 BHK-21 细胞中表达。

为了活化 VLPs, TNE 缓冲液中 100μl 病毒颗粒悬浮液与 5μl 糜蛋白酶 (10mg/ml), 5μl 50mM CaCl₂ 冰上温育 30 分钟, 然后添加 45μl 抑酶肽 (2mg/ml, Sigma, USA) 终止蛋白酶活性。活化的 VLPs 添加到 70% 汇合的单层 BHK-21 细胞中, 然后在 37℃, 5%CO₂ 下孵育 90 分钟, 允许 VLPs 感染 BHK-21。接着抽吸培养基, 提供新的培养基, 进行孵育 48 小时。孵育后, 200μl 裂解缓冲液 (1% NL40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1μg/ml PMSF) 裂解 BHK-21 细胞并离心 (12000rpm, 5 分钟, 4℃)。上清与样品缓冲液混合, 然后煮沸 5 分钟。用 SDS-PAGE (12%) 分离变性样品。分离的蛋白转移到 PVDF 膜 (BM) 上, 在 15V 和 7 mA 的条件下转移 2 小时, 使用特异性抗体进行 western 印迹, 在那里来自 AIDS 患者的血清用作一抗和生物素化抗人 IgG 作为二抗。接着, 膜与抗生物素蛋白-生物素溶液反应, 用 DAB 溶液进行显色 (参见图 11, 泳道 1: 阴性对照, BHK-21 细胞; 泳道 2: VLP 转染的 BHK-21 细胞)。结果, 体外活化的 VLPs 感染了 BHK-21 细胞, 发现 BHK-21 细胞的细胞质中产生了 Env 蛋白, 证明感染性 SFVLP_{env} 的产生。

实施例 6: 使用 pSFV/gag 和 pSFV/env 表达载体制备 VLP

熟知 HIV 的 Gag 蛋白指导未成熟 VLP 的装配, 和 HIV 的 Env 蛋白

是开发中和抗体的主要目标 (Gheysen D. 等, Cell, 59, 103-112 (1989); Lasky, L. A. 等, Science, 249, 932-935 (1986); Lasky, L. A. 等, Cell, 50, 975-985 (1987)). 因此, 为了将 Env 蛋白掺入由 Gag 蛋白组成的病毒颗粒中, 将实施例 1 制备的 pSFV/gag 的 RNA 转录物和实施例 4 制备的 pSFV/env 共转染易感宿主细胞。根据与实施例 2 相同的方法 (没有 pSFV-helper), 表达载体 pSFV/gag 和 pSFV/env 在体外转录, 并共转染 BHK-21 细胞。转染后 48 小时, 用 AIDS 患者血清和能够识别 Env 蛋白的抗 gp160 单克隆抗体免疫染色转染的细胞。用 AIDS 患者血清免疫染色的样品 (参见图 12 的 C) 比抗 gp160 抗体 (参见图 12 的 B) 显示多得多的染色。这个结果表明产生了由 HIV-1 的 Gag 和 Env 蛋白组成的 HIVLP (图 12A: 阴性对照; B: 抗 gp160 单克隆抗体; C: AIDS 患者血清)。

实施例 7: HIV 样颗粒相关核酸的分析

我们研究了实施例 3 和 6 制备的, 分别通过仅用 pSFV/gag RNA 转录物转染, 或用 pSFV/gag 和 pSFV/env RNA 转录物共转染的 VLPs 是否携带核酸。VLPs 通过 10%蔗糖垫。用 1 mg Rnase A 和 70 单位无 RNase 的 Dnase I 在 Mg_2SO_4 -醋酸缓冲液中室温消化 1 小时去除其它 RNA 和 DNA 污染物。用病毒 RNA 纯化试剂盒 (Viogene) 纯化 RNA, 然后使用纯化的 RNA 进行 PCR, 扩增大小 650bp 的 mRNA 片段作为 gag, 特别是 p24 的产物, 和 350bp 的 mRNA 片段作为 env 的产物。对于纯化 RNA 的 RT-PCR, RNA 与 4 μ l 5 Superscript II 逆转录酶缓冲液 (250 mM Tris-HCl, pH 8.5, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 2 μ l 0.1M DTT 和 4 μ l 脱氧核苷三磷酸 (dNTP; 每种 25 mM; TaKaRa) 和引物, 和蒸馏水混合达到 20 μ l。混合物 42 $^{\circ}C$ 孵育 2 分钟, 补充 1 μ l Superscript II 逆转录酶 (来自 Molony 小鼠白血病病毒 pol 基因 (Gibco BRL)), 随后 42 $^{\circ}C$ 孵育 50 分钟得到 RNA/DNA 杂种形式的第一条 DNA 链。这里, 对于 gag RNA 使用 1 μ l 100pmol 的引物 6, 对于 env RNA 使用 1 μ l 100pmol 的引物 7。

引物 6:反义 (SEQ ID NO.: 6)

5'-CCCAAGCTTTTAGCATGCTGTCATCATTTC-3

引物 7: 反义 (SEQ ID NO.: 7)

5'-GGTTCCTGCAGAAGCTTCCTTGTATTTCAAACCA-3

在 70℃ 孵育 15 分钟使 RNA/DNA 杂种变性和灭活逆转录酶。用 Z tag DNA 聚合酶 (TaKaRa) 和引物组 (对于 gag RNA 检测, 用引物 8 和引物 6; 对于 env RNA 检测, 用引物 9 和引物 7), 使用从上面 RT-PCR 得到的 cDNA 作为模板进行 DNA 扩增。这里, 10μl 模板 cDNA 与 4μl 2.5mM dNTP (BM, 德国), 1μl 正义引物 (100pmol/μl), 1μl 反义引物 (100pmol/μl), 5μl 10 × Z Taq 聚合酶缓冲液, 28μl 蒸馏水和 1μl Z Taq 聚合酶 (TaKaRa) 混合。PCR 混合物在 94℃ 预温育 5 分钟, 然后用 35 个循环进行 PCR, 其中每个循环由 94℃ 1 分钟, 55℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟组成, 随后 72℃ 孵育 7 分钟。

引物 8 : 正义 (SEQ ID NO.: 8)

5'-CCCAAGCTTCATCAGGCCTTATCACCT-3

引物 9: 正义 (SEQ ID NO.: 9)

5'-TCCCCCGGGAAGCTTGCGCAGCAGCATCTGTTG-3

扩增产物施加到琼脂糖凝胶上分离, 溴化乙锭染色后在 UV 照明下可视化。发现从仅用 pSFV/gag RNA 转录物转染后得到的 HIVLP 以及 pSFV/gag 和 pSFV/env RNA 转录物共转染后得到的 HIVLP 扩增了 p24 基因 (见图 13 的泳道 1 和 2)。相比之下, 在两个 VLPs 中根本没有检测到 gp41 基因的扩增 (见图 13 的泳道 1 和 3)。这个结果提示仅对应于 gag 基因的 RNA 被包装进入 VLPs (见图 13, 泳道 1: 来自 pSFV/gag 的 VLP; 泳道 2 和 3: pSFV/gag 和 pSFV/env 共转染得到的 VLP; 泳道 1 和 2 使用 p24 的引物扩增, 泳道 3 使用 gp41 的引物扩增; 650bp 片段是 gag 基因的 PCR 产物, 350bp 片段是 env 基因的产物)。

实施例 8:通过缺陷性 SFVLP 感染来制备 VLP

我们研究了当从实施例 2 和 5 得到的 VLPs 体外活化并感染 COS-1 细胞时, 是否产生 VLPs。从用实施例 2 或 5 的 VLP 感染的 COS-1 细胞制备的培养基上清得到细胞裂解物和 VLPs 后, 用 AIDS 患者血清, 抗 p24 多克隆抗体 (抗兔) 和抗 p24 单克隆抗体的 western 印迹分析它们 (参见图 14, A: AIDS 患者血清; B: 抗 p24 多克隆抗体; C: 抗 p24 单克隆抗体; 阴性对照 (泳道 1, 4, 7, 10 和 13); SFVLPgag 感染 (泳道 2, 5, 8, 11 和 14); SFVLPgag 和 SFVLPenv 共感染 (泳道 3, 6, 9, 12 和 15); 细胞溶解产物 (泳道 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 和 12); VLP (泳道 4, 5, 6, 13, 14 和 15))。

如图 14 的 A 和 B 所示, 当含 gag 基因的缺陷性 SFVLP 感染 COS-1 细胞时, 在 COS-1 细胞的细胞质 (泳道 2 和 8) 和上清的 VLPs 中检测到 Gag 蛋白。此外, 当含 gag 和 env 基因的 SFV 复制子共转染 COS-1 细胞时, 在 COS-1 细胞的细胞质 (泳道 3 和 9) 和上清的 VLPs (泳道 6) 中检测到 Gag 和 Env 蛋白两者。因此, 证实了当 Gag 和 Env 蛋白同时在细胞中表达时, 产生由这两种蛋白组成的 VLPs。如图 14 的 C 所示, 用抗 p24 的单克隆抗体 (Biogenesis, Cat. No. 4999-8607) 进行 western 印迹, 检测到 Gag 前体 Pr55 和 p24 蛋白。这解释了 Gag 前体在没有 HIV-1 蛋白酶时, 在 COS-1 细胞中可能被加工或变性。

实施例 9:表达载体 pSFV/env-gag 和 pSFV/env-gag-pro 的构建

为了得到含 26S 亚基因组启动子的 pro 基因 (HIV-1 进化枝 E 基因组的 2268-2606bp), 用由含完整 HIV-1 进化枝 E 基因组的 pUHD (100 ng/ μ l), 4 μ l 2.5 mM dNTP (BM, 德国), 1 μ l 正义引物 (100 pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100 pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times Taq 聚合酶缓冲液, 37 μ l 蒸馏水和 1 μ l Taq 聚合酶组成的混合物进行 PCR, 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 1 分钟的热循环重复 40 次。

引物 10: 正义 (SEQ ID NO.: 10)

5'-CCAAGATCTATGACAGCCTCCTCCTTTAGTTTC-3'

引物 11: 反义 (SEQ ID NO.: 11)

5'-CAACCCGGGTCGCGATTAAGTGTCAATAGGACTAAT-3'

使用在引物的两个末端的 EcoRV 和 SmaI 识别序列, 将 pro 基因的扩增产物克隆进入 pSFV 的多克隆位点的 SmaI 位点。产生 pSFV/pro 载体 (见图 15)。为了构建 pSFV/env-gag 载体, 使用实施例 1 制备的载体 pSFV/gag 作为模板, 在对于 26S 亚基因组启动子的引物 12 (正义) 和对于 gag 基因的引物 2 (反义) 存在下首先扩增 26S gag 基因。然后将扩增的 26S gag 基因插入载体 pSFV/env 的 SmaI 位点 (见图 16)。

引物 12: 正义 (SEQ ID NO.: 12)

5'-CCGGATATCACCTCTACGGCGGTCCTA-3'

引物 13: 反义 (SEQ ID NO.: 13)

5'-CGCCCGGGTTACTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAA-3'

使用 pSFV/pro 载体作为模板, 用对于 26S 亚基因组启动子的引物 12 (正义) 和对于 pro 基因的引物 11 (反义) 的引物组扩增 26S pro 基因, 接着扩增产物插入 pSFV/env-gag 载体的 SmaI 位点, 得到 pSFV/env-gag-pro 载体 (见图 17)。这里, 扩增的 pro 基因的核苷酸序列, 与实施例 1 的 gagpro 的 pro 基因相比, 在 N 末端被部分删除和在 C 末端被增加。由此得到的 pro 基因的序列含有自身加工所需的核苷酸序列 (Viviane V 等, J. Gen. Virol. 73, 639-651 (1992))。载体 pSFV/env-gag-pro 于 2000 年 12 月根据国际承认用于专利程序微生物保藏布达佩斯条约保藏在国际保藏单位之一 - 韩国微生物保藏中心 (KCCM), 保藏号 KCCM-10233。

实施例 10: 通过 pSFV/env-gag 载体的表达制备 VLP

为了制备掺入了 Env 蛋白的含 gag 的 VLPs, 在含分开的亚基因组启动子的相同质粒中, 将 Gag 和 Env 蛋白基因克隆到的的赛姆利基森林病毒 (SFV) 复制子中, 如实施例 9 所述。实施例 9 所得 pSFV/env-gag 载体的 RNA 转录物转染 BHK-21 细胞。在转染后 48 小时, 用 AIDS 患者血清以 western 印迹和随后 ECL (增强化学发光) 实验分析转染的细胞溶解产物和从上清得到的 VLPs (见图 18, 泳道 1: 阴性对照; 泳道 2 和泳道 3: 细胞溶解产物; 泳道 4 和 5: 细胞上清)。结果, 在 VLPs 中检测到 Gag 和 Env 蛋白, 证明 env 和 gag 克隆到相同质粒中, 其中两个基因的表达在不同亚基因组启动子下分开控制, 同时在相同细胞中表达, 通过两个蛋白的相互作用, 允许 VLP 产生。在图 18 中, 培养基的上清中, Gag 蛋白的条带显示比细胞溶解产物中的大小稍小, 因为被高含量的 65kDa 白蛋白推进。

实施例 11: 通过 pSFV/env-gag-pro 载体的表达制备 VLP

将实施例 9 制备的 pSFV/env-gag-pro 载体转染宿主细胞并检测三个基因的表达水平。pSFV/env-gag-pro 的 RNA 转录物转染 BHK-21 细胞。转染后 48 小时, 用 AIDS 患者血清, 抗 gp160 单克隆抗体, 抗 p24 多克隆抗体和抗蛋白酶多克隆抗体 (抗绵羊) 免疫染色转染的细胞 (见图 19, A: 阴性对照; B: AIDS 患者血清; C: 抗 gp160 单克隆抗体; D: 抗 p24 多克隆抗体; E: 抗蛋白酶多克隆抗体)。结果, Gag, Env 和 Pro 蛋白全部被检测到。因此, 表明 Gag, Env 和 Pro 在不同 26S 亚基因组启动子下分开表达, 证明可以表达与基于甲病毒属的表达载体的亚基因组启动子分开连接的三个外来基因中的每一个。

实施例 12: pSFV/env-gag-gagpro-CTE 表达载体的构建

为了首先制备 pSFV/CTE 载体, 用引物 14 和 15, 使用 pGEM 7fz (-)/MPMV 质粒 DNA 作为模板进行 PCR。扩增的 CTE 基因插入 pSFV 的 BamHI 位点和 SmaI 位点之间的区域 (见图 20)。通过用 BamHI 消化从实施例 1 制备的 pSFV/gagpro 切割 Gagpro 基因, 克隆到载体

pSFV/CTE 的 BamHI 位点, 得到 pSFV/gagpro-CTE (见图 21)。接着, Maston-Pfzier 猴病毒的 CTE 基因插入在 pSFV/gagpro 之后, 产生 pSFV/gagpro-CTE 载体。

为了最终构建 pSFV/env-gag-gagpro-CTE, 使用载体 pSFV/gagpro-CTE 作为模板, 用引物 12 和 15, 通过 PCR 扩增含 26S 亚基因组启动子的全长 gagpro 基因和 CTE 基因。所得产物插入实施例 9 的载体 pSFV/env-gag 的 SmaI 位点 (参见图 22)。PCR 混合物制备如下: 1 μ l pSFV/gagpro-CTE 与 4 μ l 2.5 mM dNTP (BM, 德国), 1 μ l 正义引物 (100 pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100 pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times Taq 聚合酶缓冲液和 37 μ l 蒸馏水混合。PCR 混合物在 98 $^{\circ}$ C 预孵育 5 分钟, 然后补充 1 μ l Taq 聚合酶, 随后进行 40 个循环的 PCR 反应, 其中每个循环由 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟组成。载体 pSFV/env-gag-gagpro-CTE 于 2000 年 12 月根据国际承认用于专利程序微生物保藏布达佩斯条约保藏在国际保藏单位之一 - 韩国微生物保藏中心 (KCCM), 保藏号 KCCM-10234。

引物 14 正义 (SEQ ID NO.: 14)

5'-AATGGATCCCCTCCCCTGTGAGCTAGACT-3'

引物 15 反义 (SEQ ID NO.: 15)

5'-AATGATATCAGATCTCCAAGACATCATCCGGGCAA-3'

实施例 13: pSFV/env-gag-gagApro-CTE 表达载体的构建

从 gagpro 序列在核糖体移码信号处删除保守的五个 T 制备 gagApro, 如下。使用实施例 1 的载体 pSFV/gag 作为模板, 使用下面的引物 12 和引物 16, 扩增含 26S 亚基因组启动子和 gag 基因的部分 (832-2113), 位于位点上游。这里, PCR 混合物制备如下: 1 μ l pSFV/gag 与 4 μ l 2.5 mM dNTP (BM, 德国), 1 μ l 正义引物 (100 pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100 pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times Taq 聚合酶缓冲液和 37 μ l 蒸馏水混合。PCR 混合物在 98 $^{\circ}$ C 预孵育 5 分钟, 然后补充

1 μ l Taq 聚合酶，随后是 40 个循环的 PCR 反应，其中每个循环由 94 $^{\circ}$ C 1 分钟，55 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 1 分钟组成。扩增的产物插入 pGEMT 载体 (Promega)。而且，使用实施例 12 的载体 pSFF/gagpro-CTE 作为模板，用引物 15 和 17 的引物组，扩增除了移码信号的保守序列外的全长 pro 基因，接着根据上述相同的步骤插入 pGEMT 载体。

引物 16 反义 (SEQ ID NO.: 16)

5'-AATAGGCCTGTCCTTTCAGTGCAGTCTT-3'

引物 17 正义 (SEQ ID NO.: 17)

5'-CACAGGCCTATAGGGAAAATCTGGCCTTC-3'

用限制性酶 StuI 消化两个得到的基因并连接，产生 gag Δ pro。在这个步骤中，用 Tyr (酪氨酸) 置换 Asn (天冬酰胺)，两个 Phe (苯丙氨酸) 随保守的五个 Ts 缺失而删除。接着用 EcoRV 消化 gag Δ pro 并插入载体 pSFV/env-gag 的 SmaI 位点，得到 pSFV/env-gag-gag Δ pro-CTE 载体 (参见图 23)。

(SEQ ID NO.: 18) F F R E

CAG GCT AATT TTT AGG GAA gag-pol

mRNA 的核糖体移码位点

Q A N

(SEQ ID NO.: 19)

CAG GCC TAT AGG GAA Gag Δ pro 的突变位点

Q A Y R E

实施例 14: pSFV/gagpol 表达载体的构建

为了制备表达 Gagpol 多蛋白的表达载体，HIV-1 的 gagpol 基因插入甲病毒复制子。用引物 18 和 19，使用 HIV-1 进化枝 E 基因组作为模板，用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 HIV-1 的全长 gagpol 基因 (832-5132bp)。PCR 混合物制备如下：携带全长 HIV-1 进化枝 E 基

因组的质粒 pUHD (100ng/ μ l) 作为模板, 与 4 μ l 2.5 mM dNTP (BM, 德国), 1 μ l 正义引物 (100 pmol/ μ l), 1 μ l 反义引物 (100 pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times Taq 聚合酶缓冲液和 37 μ l 蒸馏水混合。PCR 混合物在 98 $^{\circ}$ C 预孵育 5 分钟, 然后补充 1 μ l Taq 聚合酶, 随后进行 40 个循环的 PCR 反应, 其中每个循环由 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 3 分钟组成。

引物 18: 正义 (SEQ ID NO.: 20)

5'-TTAGGATCCATGGGTGCGAGAGCGTCA-3'

引物 19: 反义 (SEQ ID NO.: 21)

5'-CGCGGATCCCTAATCCTCATTCTGTCTACC-3'

扩增产物插入 pSFV 载体的 BamHI 位点, 得到 pSFV/gagpol 载体 (参见图 24)。

实施例 15: 使用 pSFV/gagpol 载体制备 VLP

为了产生由加工的 HIV-1 核心蛋白组成的 VLP, 根据与实施例 2 相同的方法, 将实施例 14 制备的载体 pSFV/gagpol 载体体外转录并在没有 pSFV-helper RNA 转录物时, 转染 BHK-21 细胞。用冷无水甲醇固定转染细胞, 在 -20 $^{\circ}$ C 冷却 4 至 6 分钟, 用 1% 明胶封闭, 用 AIDS 患者血清, 抗 p24 多克隆抗体和抗 pro 多克隆抗体免疫染色 (见图 25, A: 阴性对照; B: AIDS 患者血清; C: 抗 p24 多克隆抗体; D: 抗 pro 多克隆抗体)。发现 Gagpol 多蛋白以及 Gag 蛋白在转染的细胞中表达。用 pSFV/gagpol RNA 转录物转染 BHK-21 细胞, 48 小时的孵育期后, 用抗 p24 多克隆抗体以 western 印迹, 随后用 ECL 实验分析转染的细胞溶解产物和上清的 VLPs (见图 26, 泳道 1 和 4: 阴性对照; 泳道 2 和 5: pSFV/gag 的样品; 泳道 3 和 6: pSFV/gagpol 的样品; 细胞溶解产物 (泳道 1, 2 和 3); VLP (泳道 4, 5 和 6))。

如图 26 所示, pSFV/gag 载体转染的 BHK-21 细胞仅表达 Pr55 和释放未成熟 VLPs。相比之下, pSFV/gagpol 载体转染的 BHK-21 细

胞,除了 Pr55,还表达 p24,并释放加工的成熟 VLPs,结果,加工的 Pr55 正面调节 p24 的表达。

实施例 16: pSFV/gag-envMCTE 和 pSFV/gagpol-envMCTE 表达载体的构建

为了制备携带 Env 蛋白的成熟 VLP,扩增含 26S 亚基因组启动子和 MCTE 的 env 基因并插入载体 pSFV/gagpol 的 SmaI 位点,得到 pSFV/gagpol-envMCTE 载体。而且,作为比较构建,制备 pSFV/gag-envMCTE 载体。为了构建 pSFV/gag-envMCTE 载体,首先,重新制备 pSFV/gag 载体。因为实施例 1 制备的载体 pSFV/gag 在 gag 基因前含有 SmaI 位点,所以使用没有 SmaI 位点的引物 18 和引物 2,根据与实施例 1 相同的方法,用 PCR 再次扩增 HIV-1 的全长 gag 基因(832-2328bp)。接下来,根据与实施例 4 相同的方法,在 pSFV/MCTE 的 BamHI 位点插入 env 基因制备 pSFV/envMCTE(见图 27)。使用 pSFV/envMCTE 作为模板,用对于 26S 亚基因组启动子的引物 12(正义)和对于 MCTE 的引物 15(反义)扩增 26SenvMCTE,插入到 pSFV/gag 载体的 SmaI 位点,最后得到 pSFV/gag-envMCTE(见图 28)。而且,将扩增的 26SenvMCTE 基因插入载体 pSFV/gagpol 的 SmaI 位点,得到 pSFV/gagpol-envMCTE 载体(见图 29)。载体 pSFV/gagpol-envMCTE 于 2001 年 12 月根据国际承认用于专利程序微生物保藏布达佩斯条约保藏在国际保藏单位之一—韩国微生物保藏中心(KCCM),保藏号 KCCM-10348。

实施例 17:使用 pSFV/gag-envMCTE 和 pSFV/gagpol-envMCTE 表达载体制备 VLP

根据与实施例 2 相同的方法,pSFV/gag-envMCTE 在体外转录,在没有 pSFV-helper RNA 转录物时,将转录物转染 BHK-21 细胞。用冷纯甲醇固定转染细胞,在-20℃冷却 4 至 6 分钟,用 1%明胶封闭,用 AIDS 患者血清,抗 p24 多克隆抗体,抗 pro 多克隆抗体和抗 env 单

克隆抗体免疫染色（见图 30, A: 阴性对照; B: AIDS 患者血清; C: 抗 p24 多克隆抗体; D: 抗 env 多克隆抗体）。发现 Env 蛋白以及 Gag 蛋白在转染的细胞中表达。

而且，使用与实施例 2 相同的方法转染 pSFV/gagpol-envMCTE 载体（参见图 31, A: 阴性对照; B: AIDS 患者血清; C: 抗 p24 多克隆抗体; D: 抗 pro 多克隆抗体; E: 抗 env 单克隆抗体）。也揭示了 Env 蛋白以及 Gagpol 蛋白在转染的细胞中表达。此外，在 pSFV/gag-envMCTE 和 pSFV/gagpol-envMCTE 的 RNA 转录物转染 BHK-21 细胞后 48 小时，用抗 p24 多克隆抗体和抗 env 单克隆抗体以 western 印迹，随后以 ECL 实验分析从培养基上清分离的 VLPs（见图 32, A: AIDS 患者血清; B: 抗 env 单克隆抗体; 泳道 1 和 4: pSFV/gag 的样品; 泳道 2 和 5: pSFV/gag-envMCTE 的样品; 泳道 3 和 6: pSFV/gagpol-envMCTE 的样品）。结果，发现当 pSFV/gagpol-envMCTE 表达时，产生携带 Env 的加工的成熟 VLPs。

关于保藏微生物或其它生物材料的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

| | |
|--|-----------------|
| A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>25</u> 页第 <u>19-25</u> 行所指的微生物。 | |
| B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 <input type="checkbox"/> | |
| 保藏单位名称： 韩国微生物保藏中心 (KCCM) | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国家)： 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, 韩国 | |
| 保藏日期：2000 年 12 月 11 日 | 保藏编号：KCCM 10233 |
| C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 <input type="checkbox"/> | |
| | |
| D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国) | |
| | |
| E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空) | |
| 以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如“保藏编号”) | |
| | |

| |
|--------------------------------------|
| 本栏由受理局填写 |
| <input type="checkbox"/> 本页和国际申请一起收到 |
| 核准人签字 |
| |

| |
|---|
| 本栏由国际局填写 |
| <input type="checkbox"/> 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日 |
| 核准人签字 |
| |

PCT/RO/134 表

关于保藏微生物或其它生物材料的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

| | |
|--|-----------------|
| A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>27</u> 页第 <u>6-15</u> 行所指的微生物。 | |
| B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 <input type="checkbox"/> | |
| 保藏单位名称： 韩国微生物保藏中心 (KCCM) | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国家)： 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, 韩国 | |
| 保藏日期：2000 年 12 月 11 日 | 保藏编号：KCCM 10234 |
| C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 <input type="checkbox"/> | |
| | |
| D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国) | |
| | |
| E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空) | |
| 以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如“保藏编号”) | |
| | |

| |
|--------------------------------------|
| 本栏由受理局填写 |
| <input type="checkbox"/> 本页和国际申请一起收到 |
| 核准人签字 |
| |

| |
|---|
| 本栏由国际局填写 |
| <input type="checkbox"/> 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日 |
| 核准人签字 |
| |

PCT/RO/134 表

关于保藏微生物或其它生物材料的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

| | |
|--|------------------|
| A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>30</u> 页第 <u>14-22</u> 行所指的微生物。 | |
| B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 <input type="checkbox"/> | |
| 保藏单位名称: 韩国微生物保藏中心 (KCCM) | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国家): 361-221, Yurim B/D, Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, SEOUL 120-091, 韩国 | |
| 保藏日期: 2001 年 12 月 21 日 | 保藏编号: KCCM 10348 |
| C. 其它说明 (如果不适用则留空) 该信息续在附页上 <input type="checkbox"/> | |
| | |
| D. 本说明所适用的指定国 (如果本说明不用于所有指定国) | |
| | |
| E. 单独提交的说明 (如果不适用则留空) | |
| 以下说明将在以后提交给国际局 (指明说明的一般性质, 如“保藏编号”) | |
| | |

| |
|--------------------------------------|
| 本栏由受理局填写 |
| <input type="checkbox"/> 本页和国际申请一起收到 |
| 核准人签字 |
| |

| |
|---|
| 本栏由国际局填写 |
| <input type="checkbox"/> 国际局于以下日期收到本页: 年 月 日 |
| 核准人签字 |
| |

PCT/RO/134 表

图1

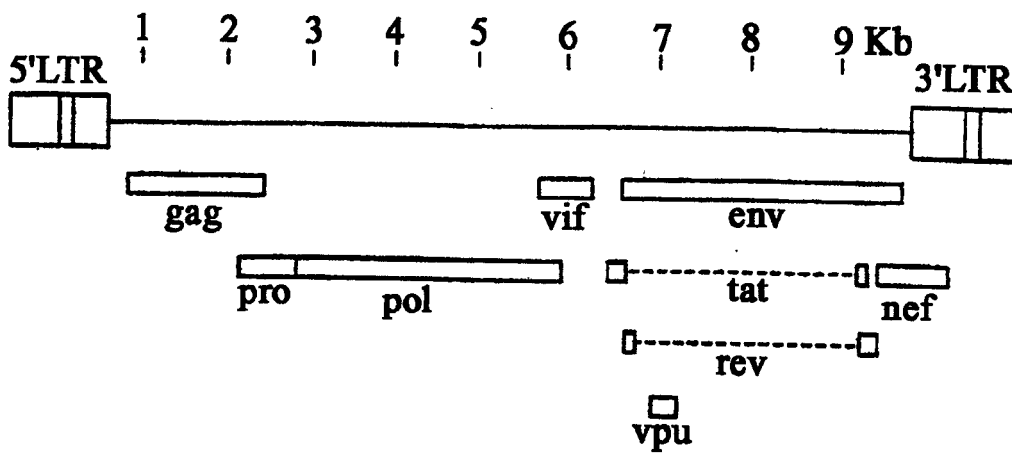


图 2

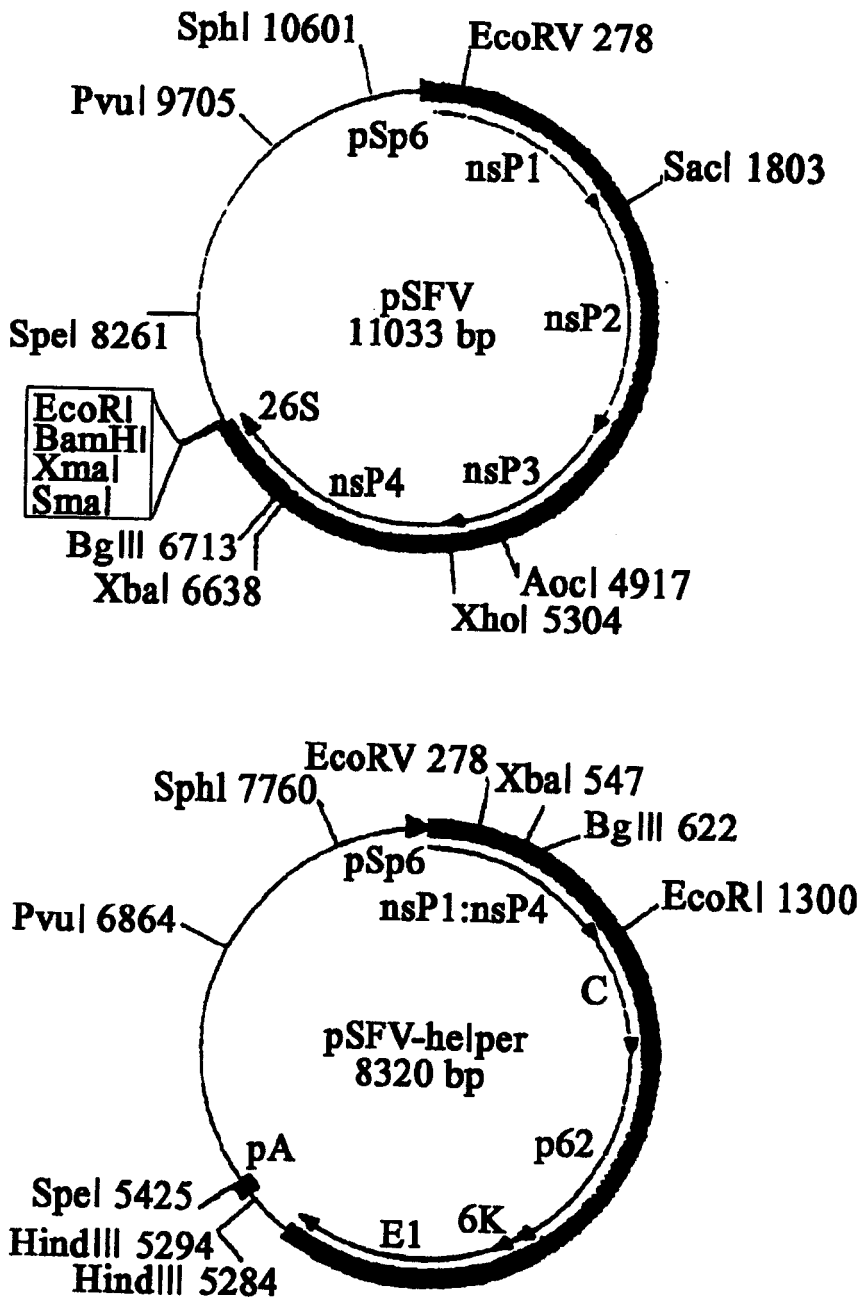


图 3

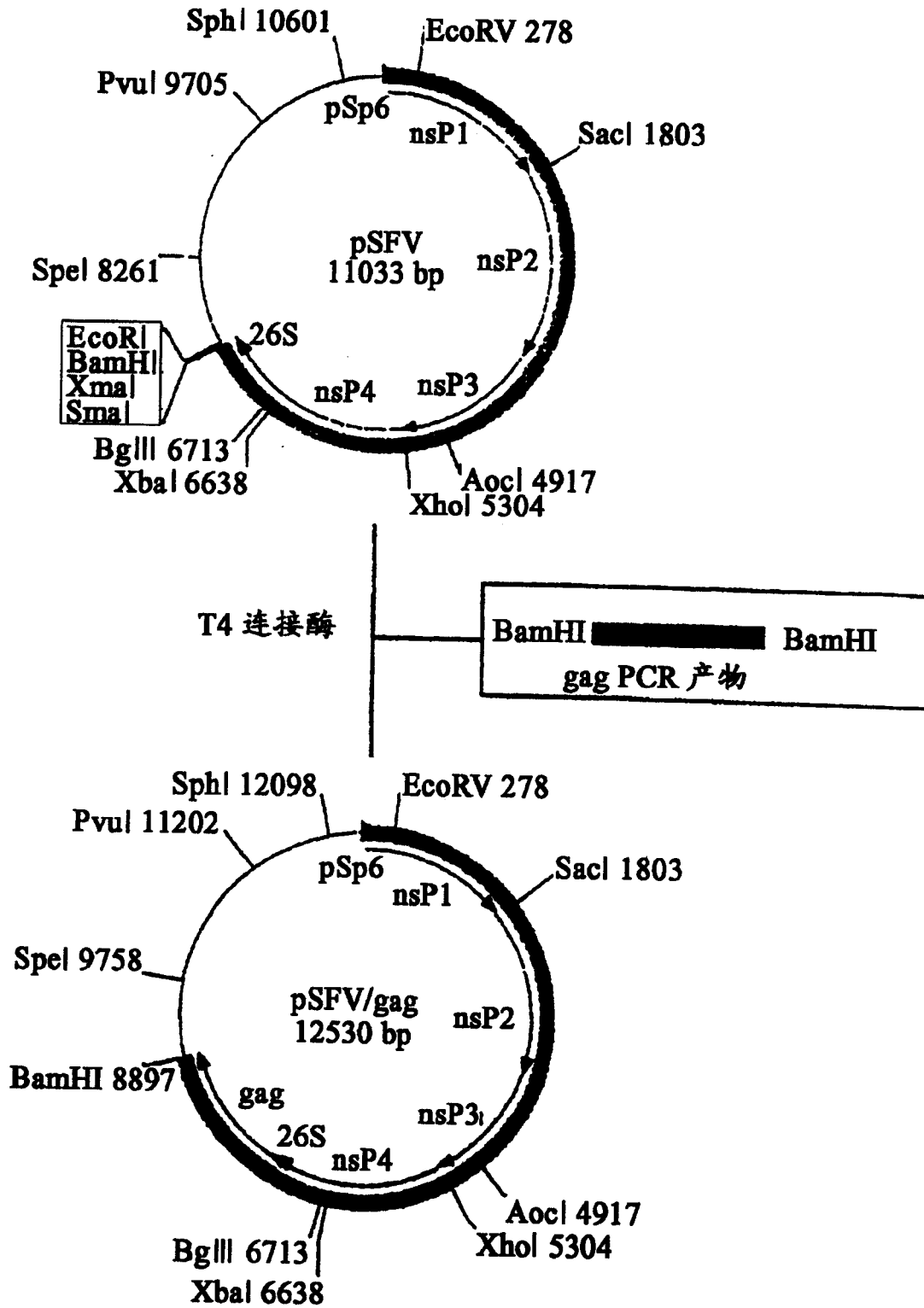


图 4

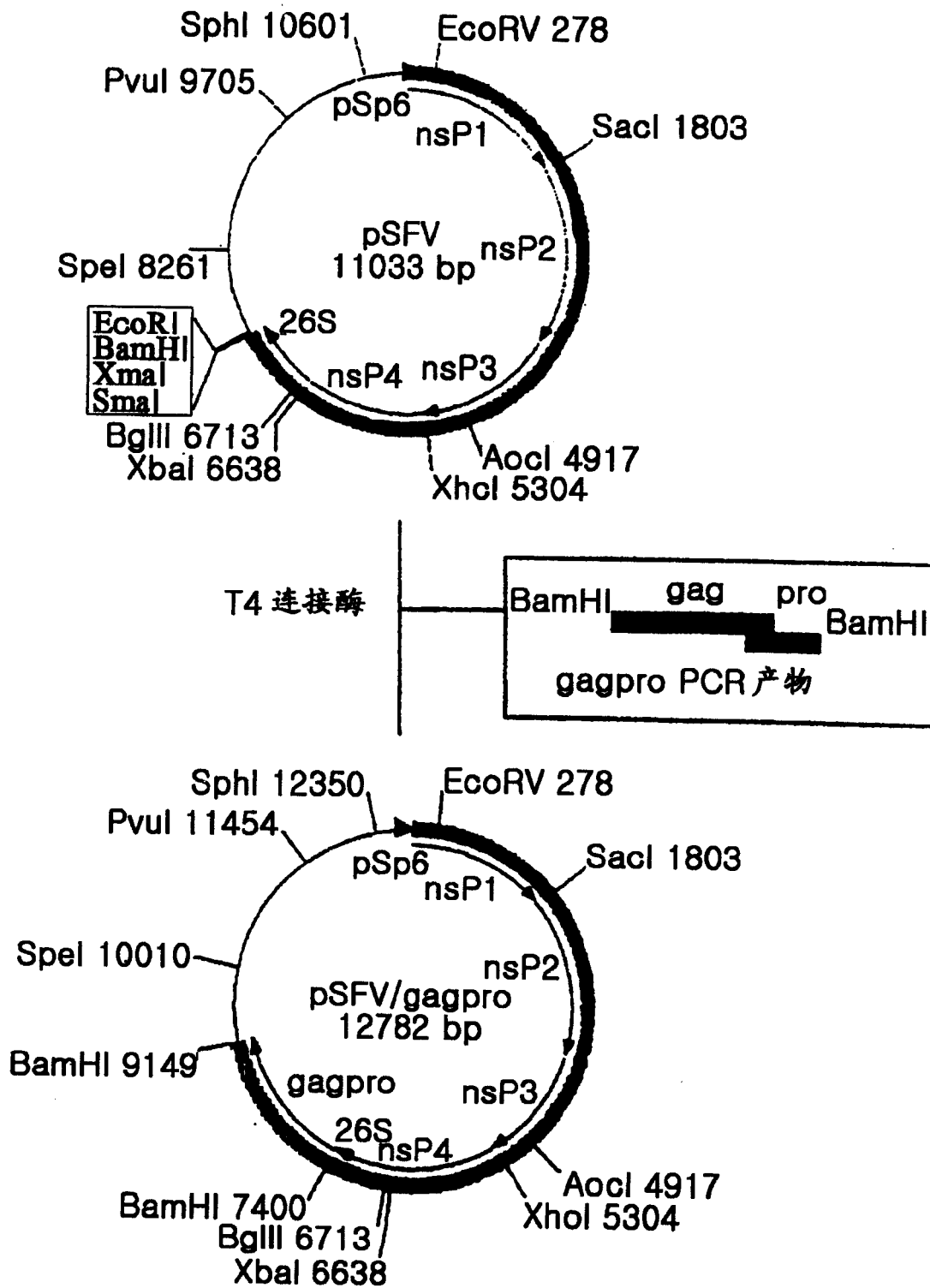


图5

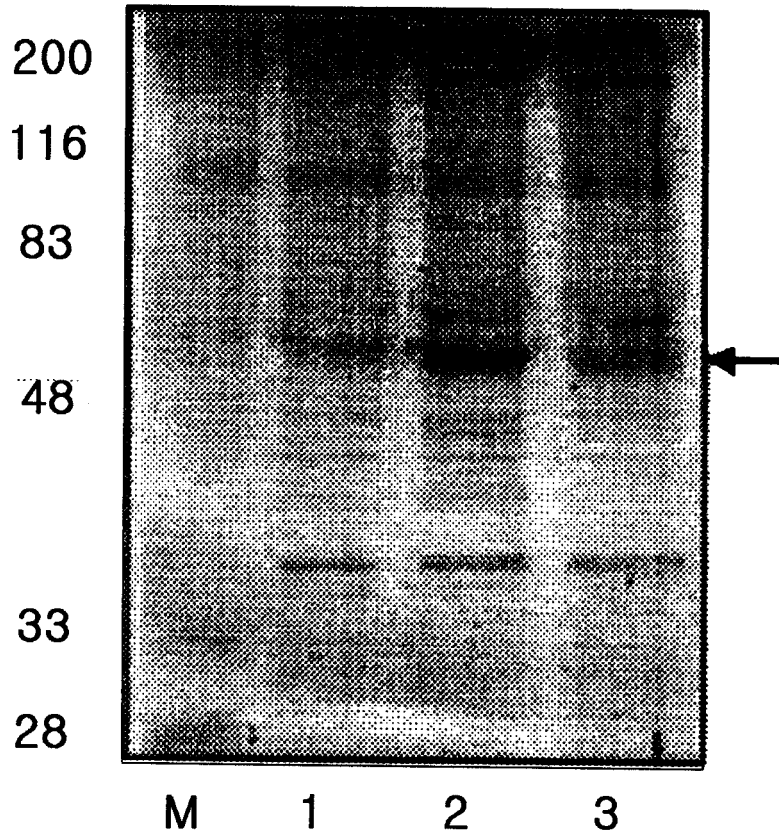


图6

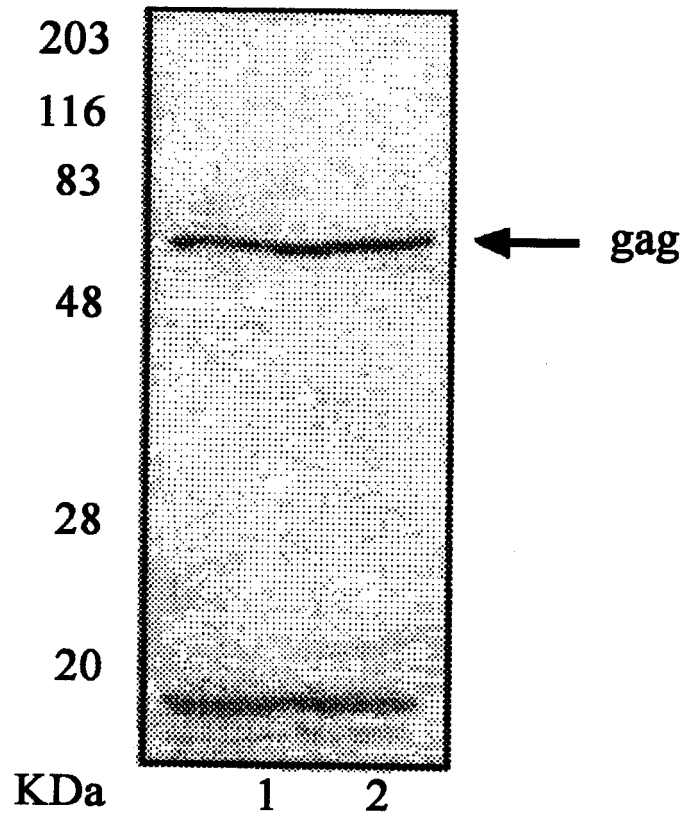


图7

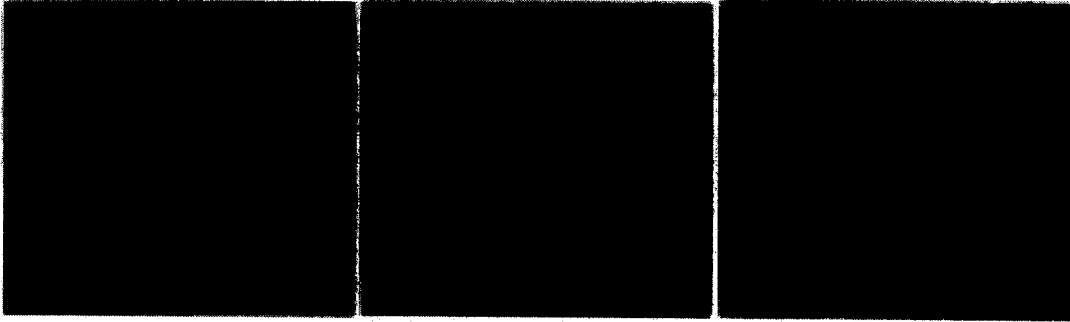


图8

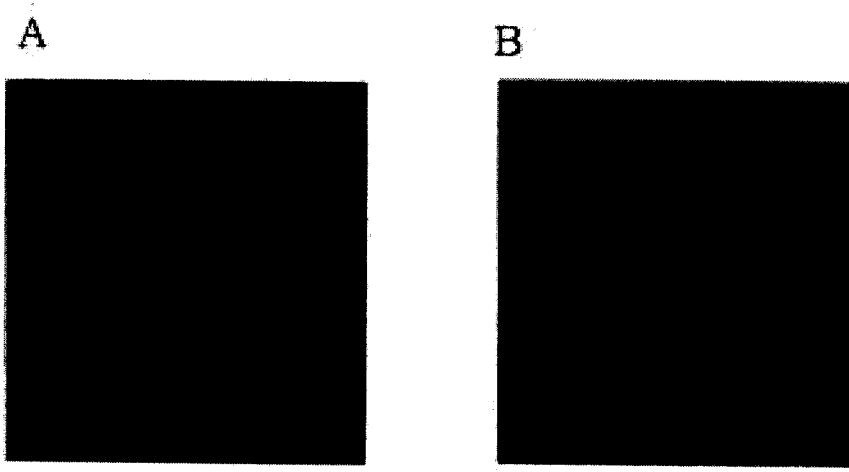


图9

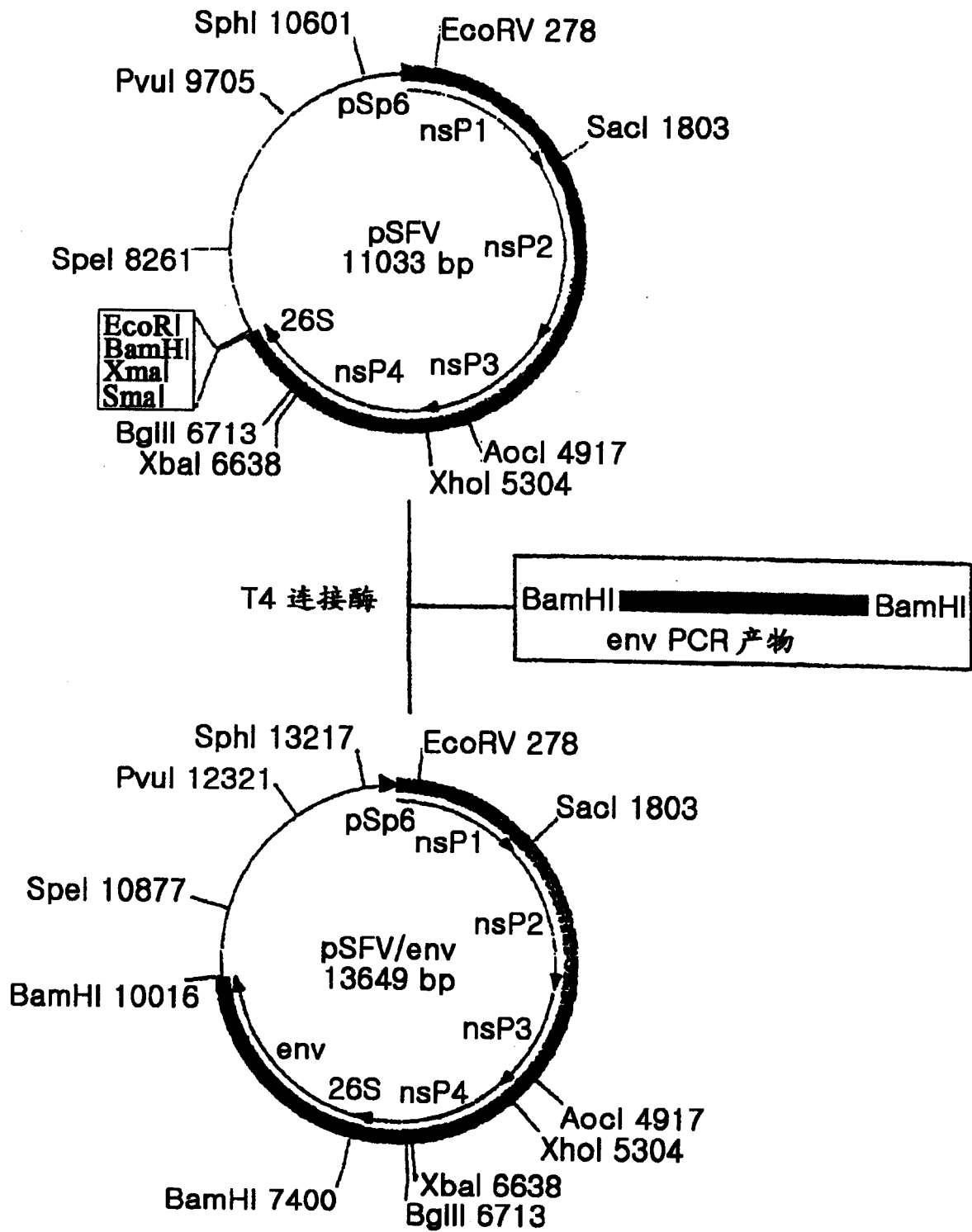


图10

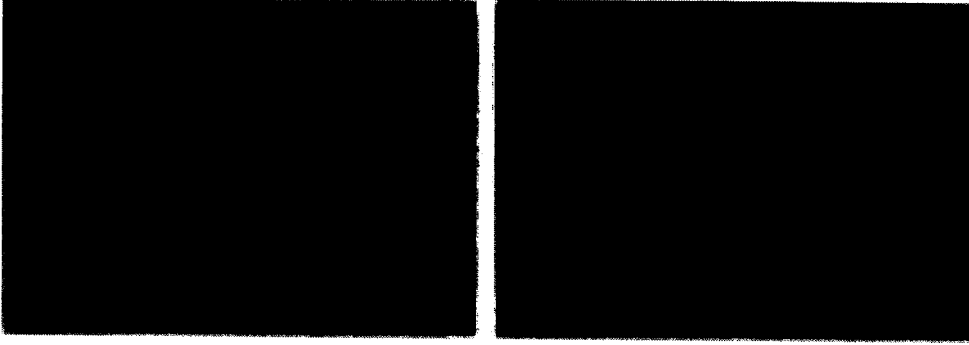


图 11

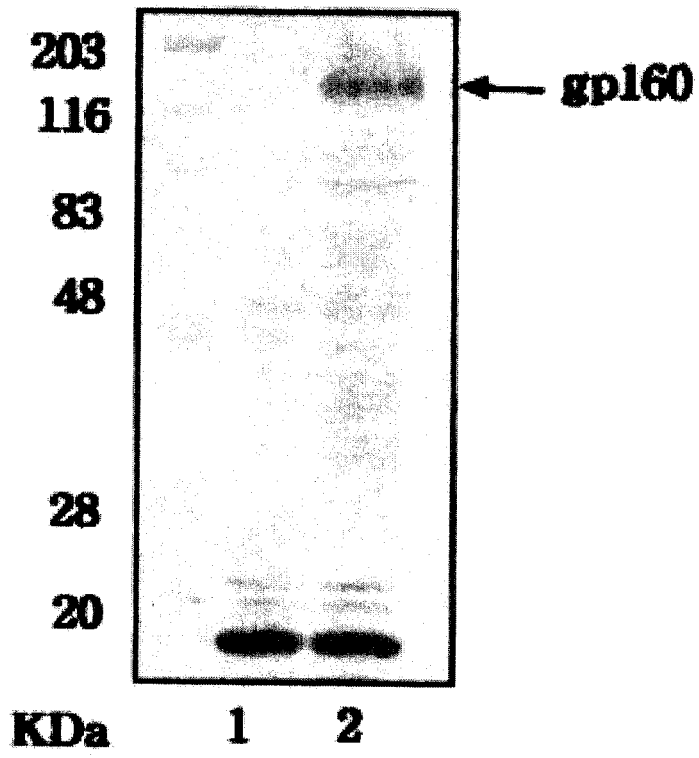


图12

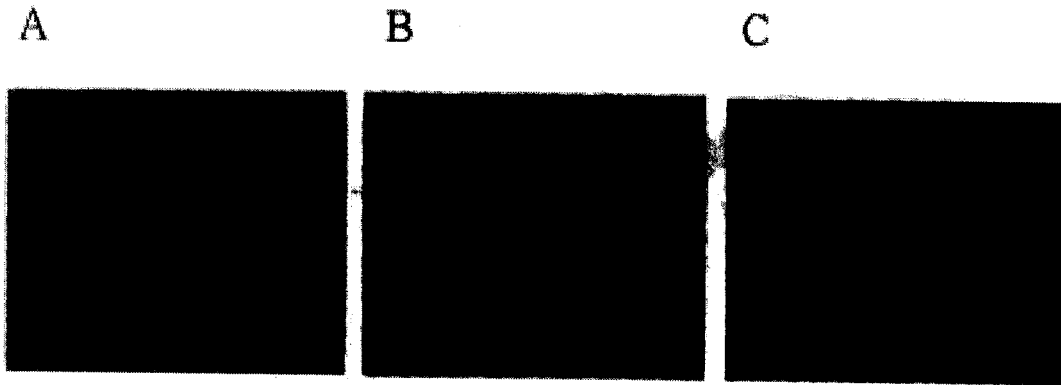


图13

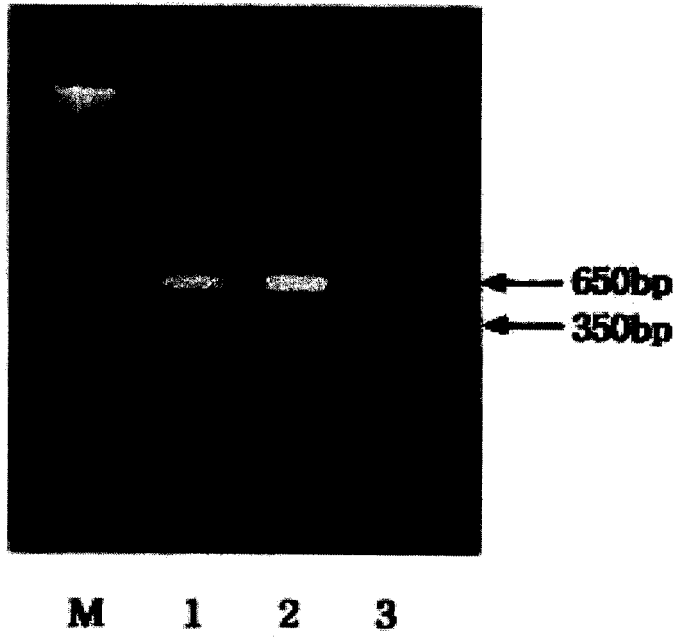


图14

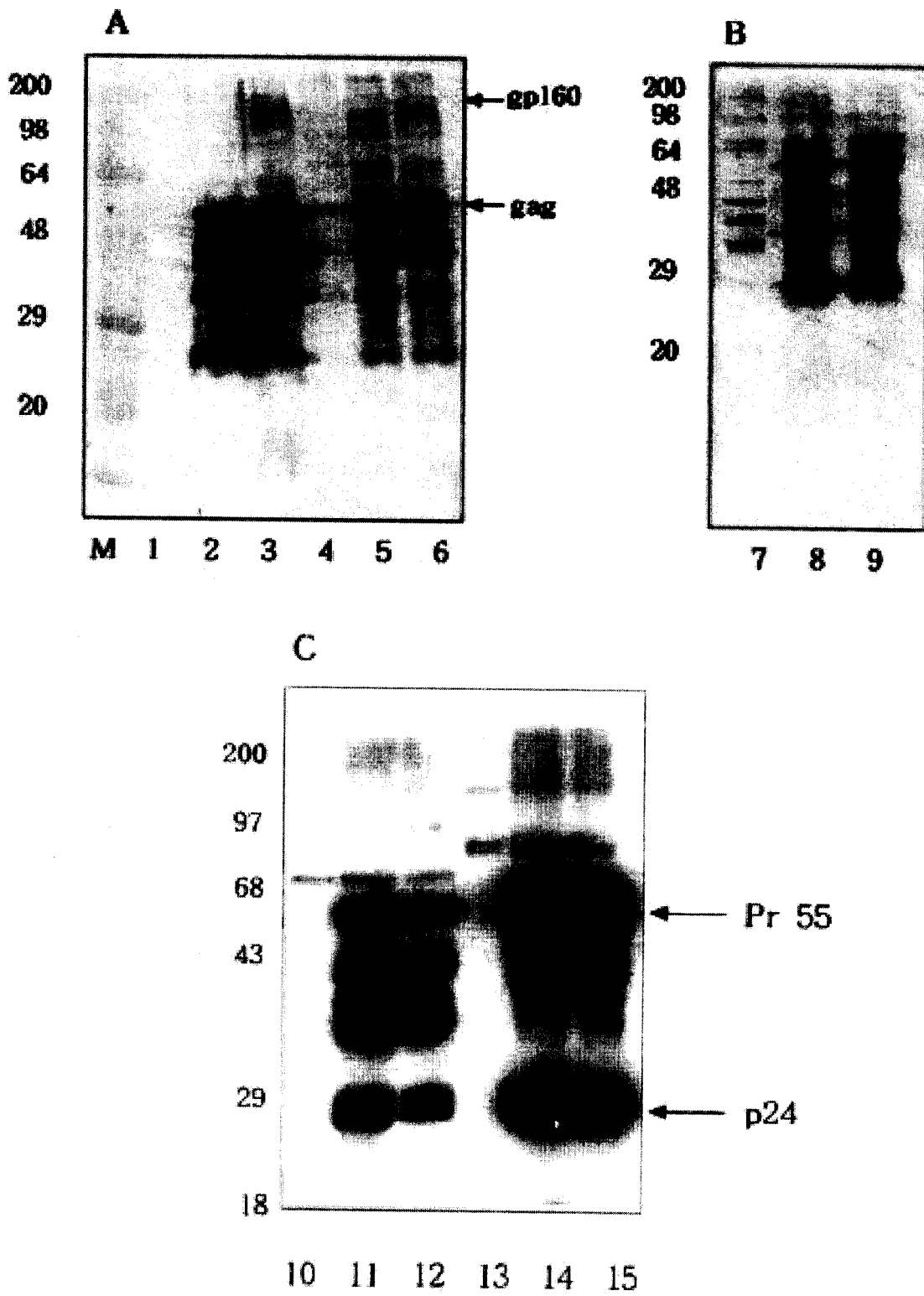


图 15

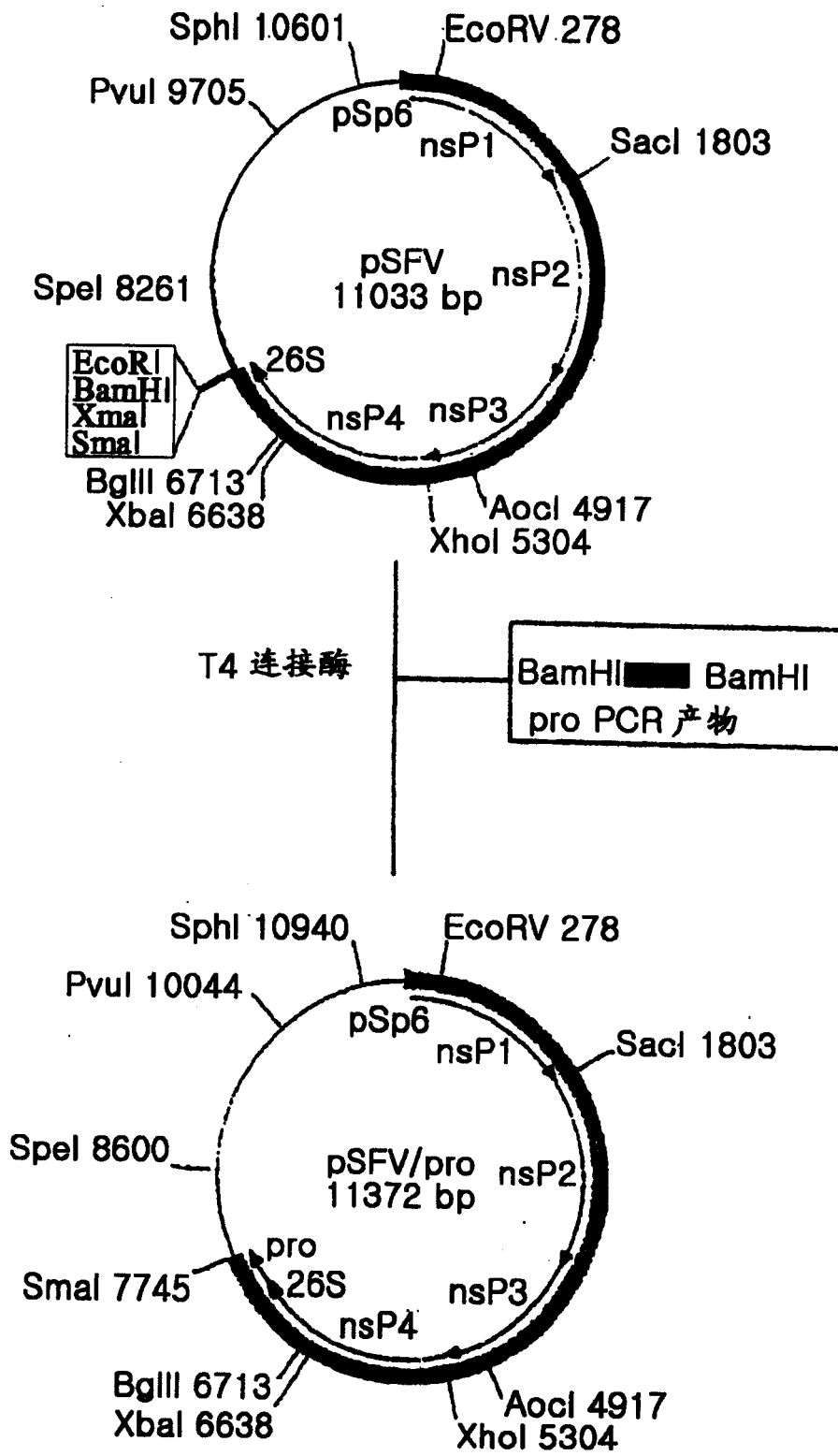


图 16

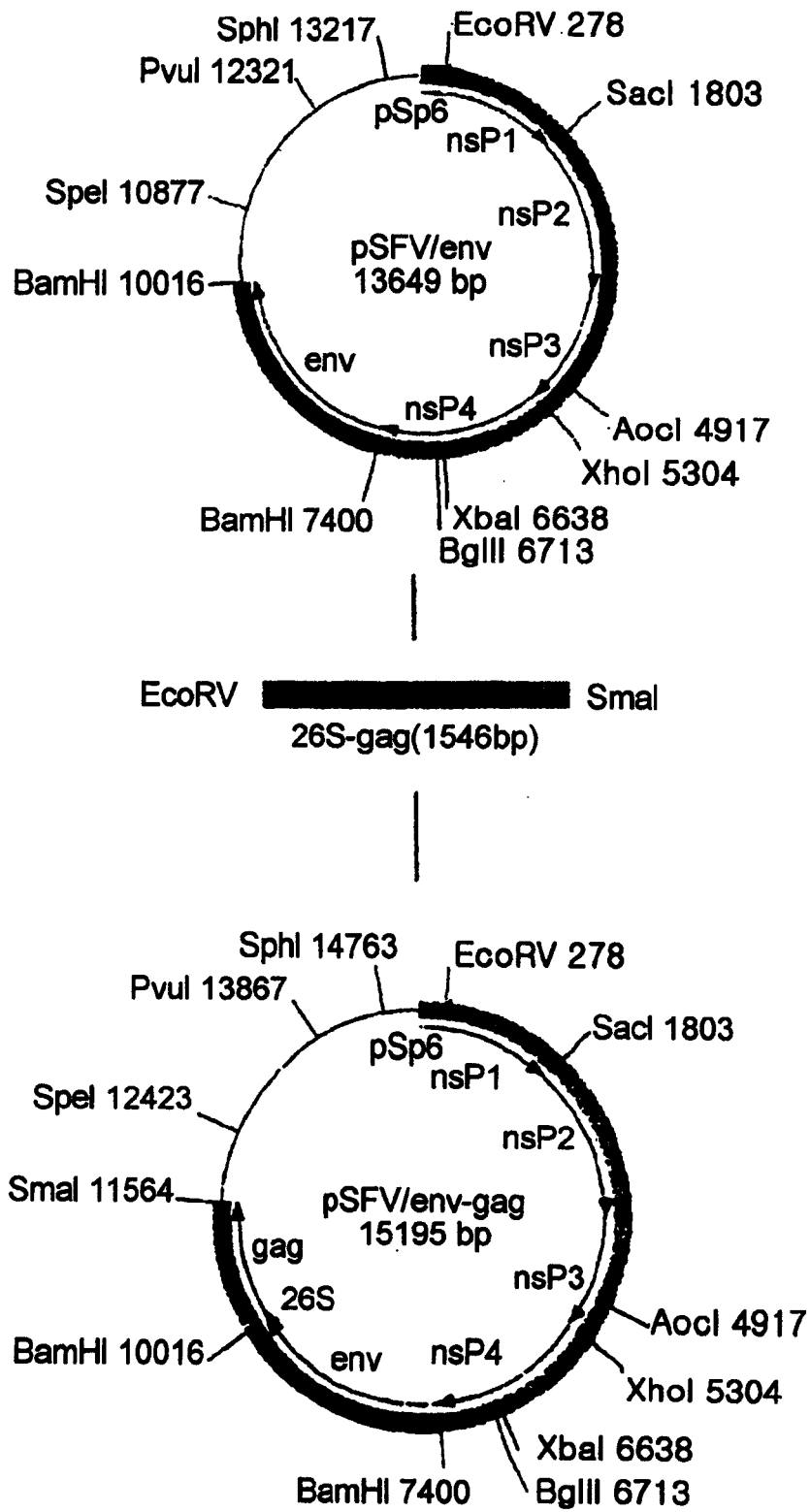


图 17

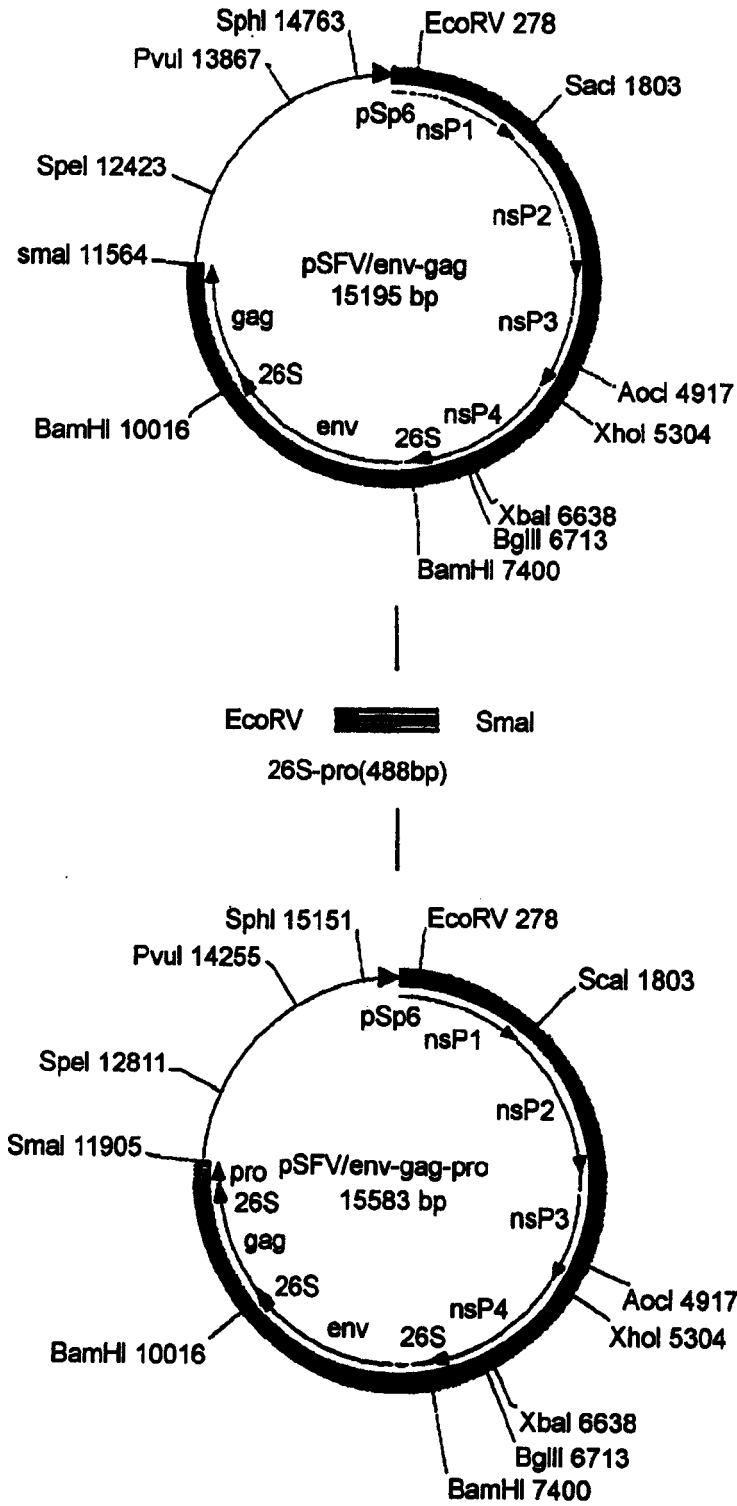


图18



图19

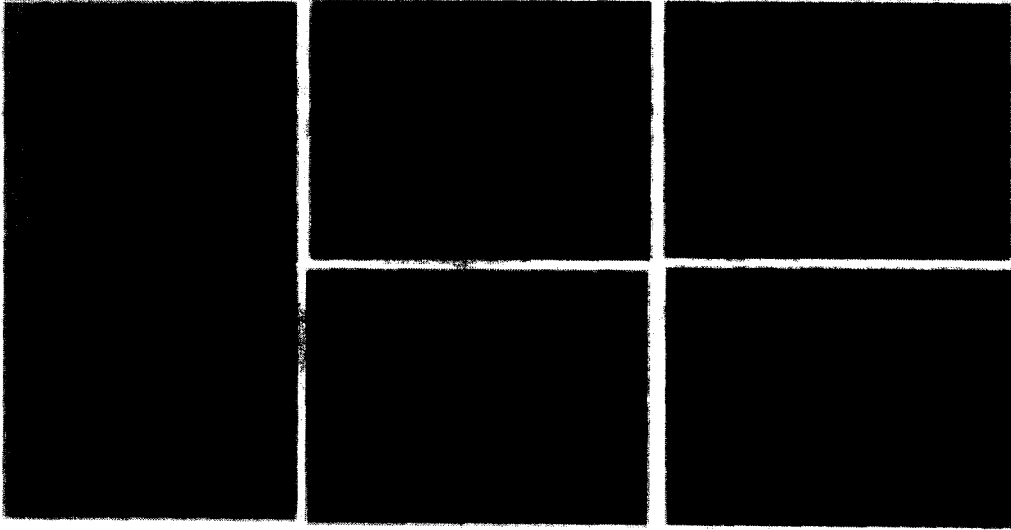


图 20

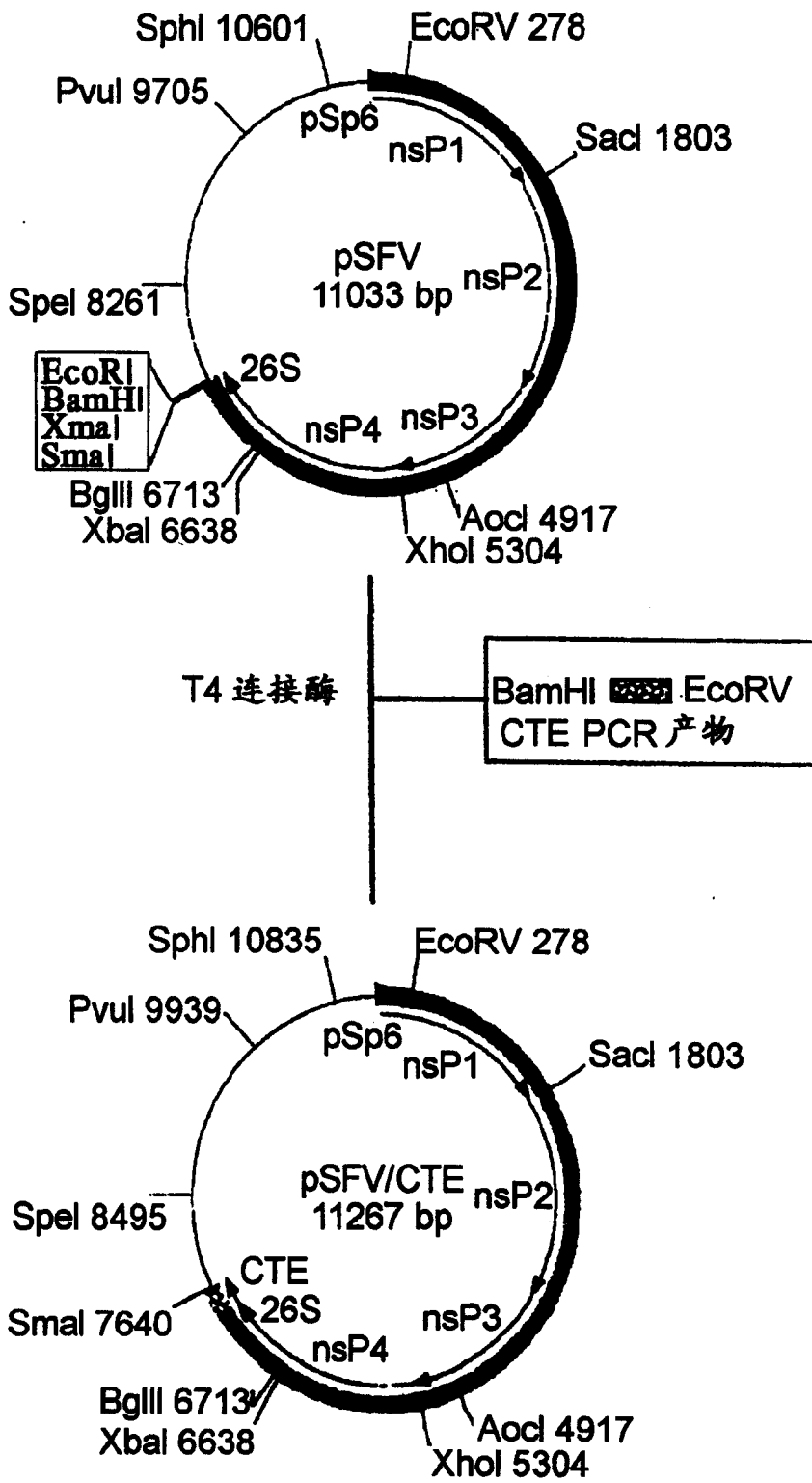


图 21

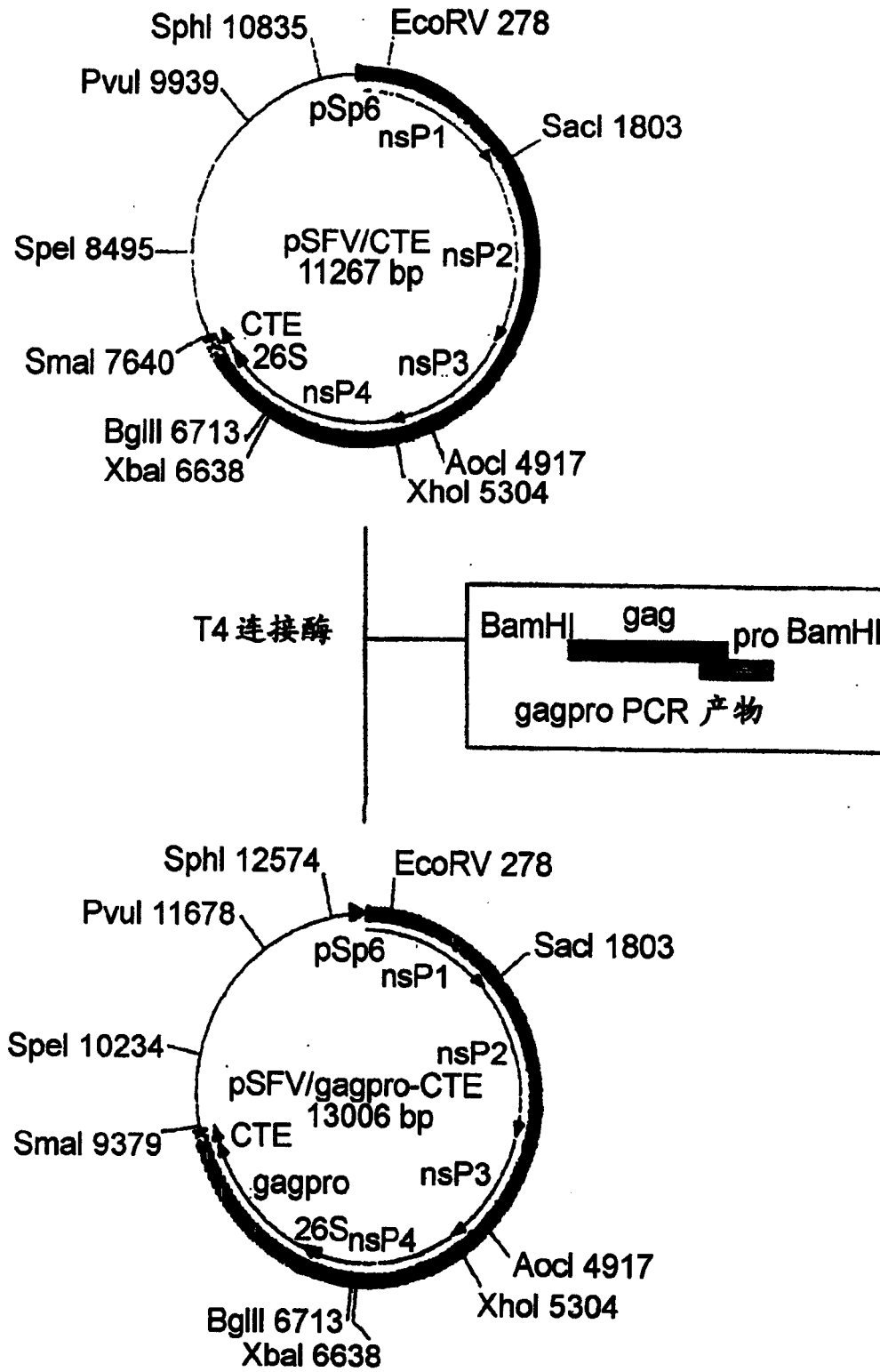


图 22

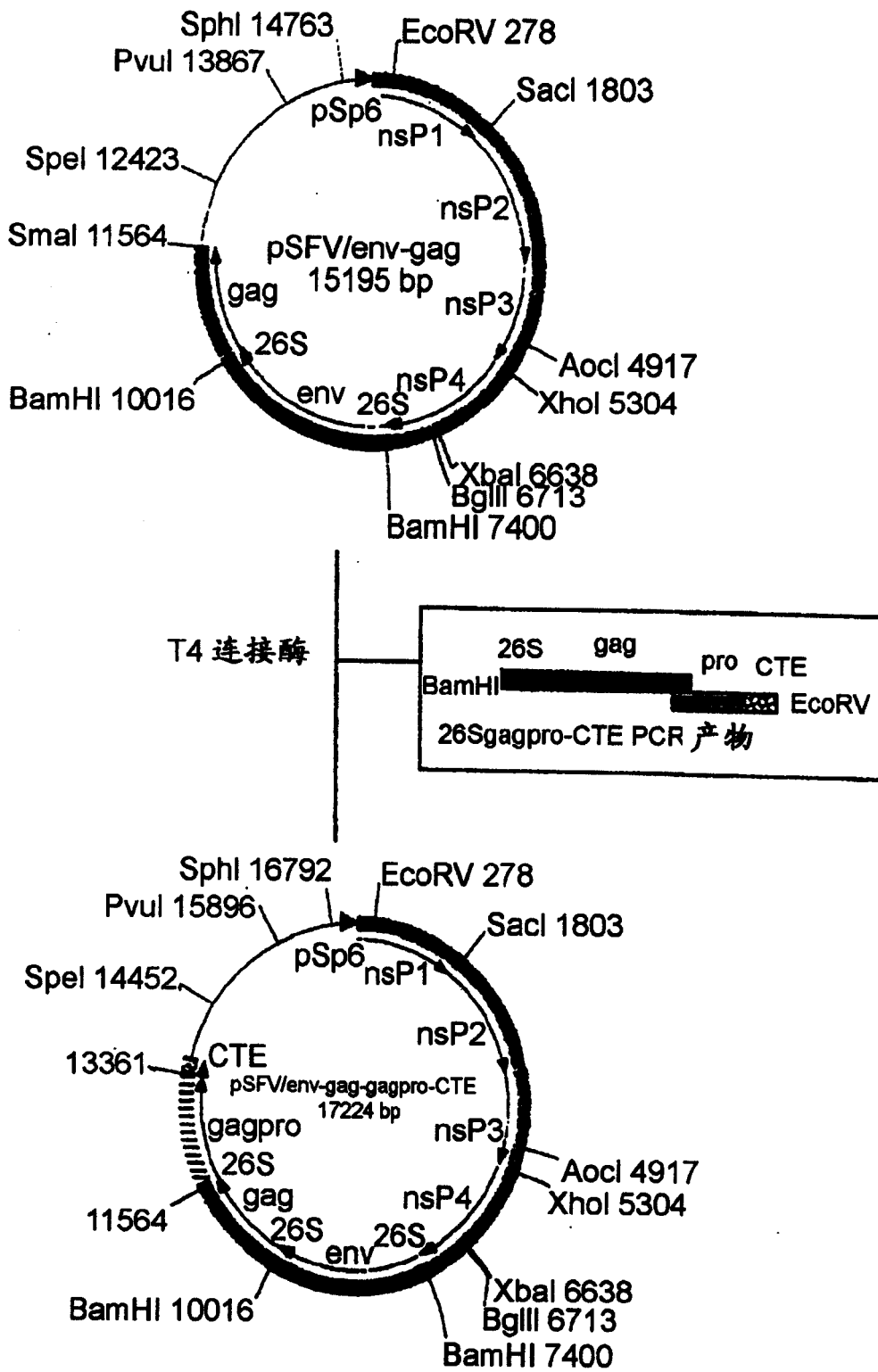


图 23

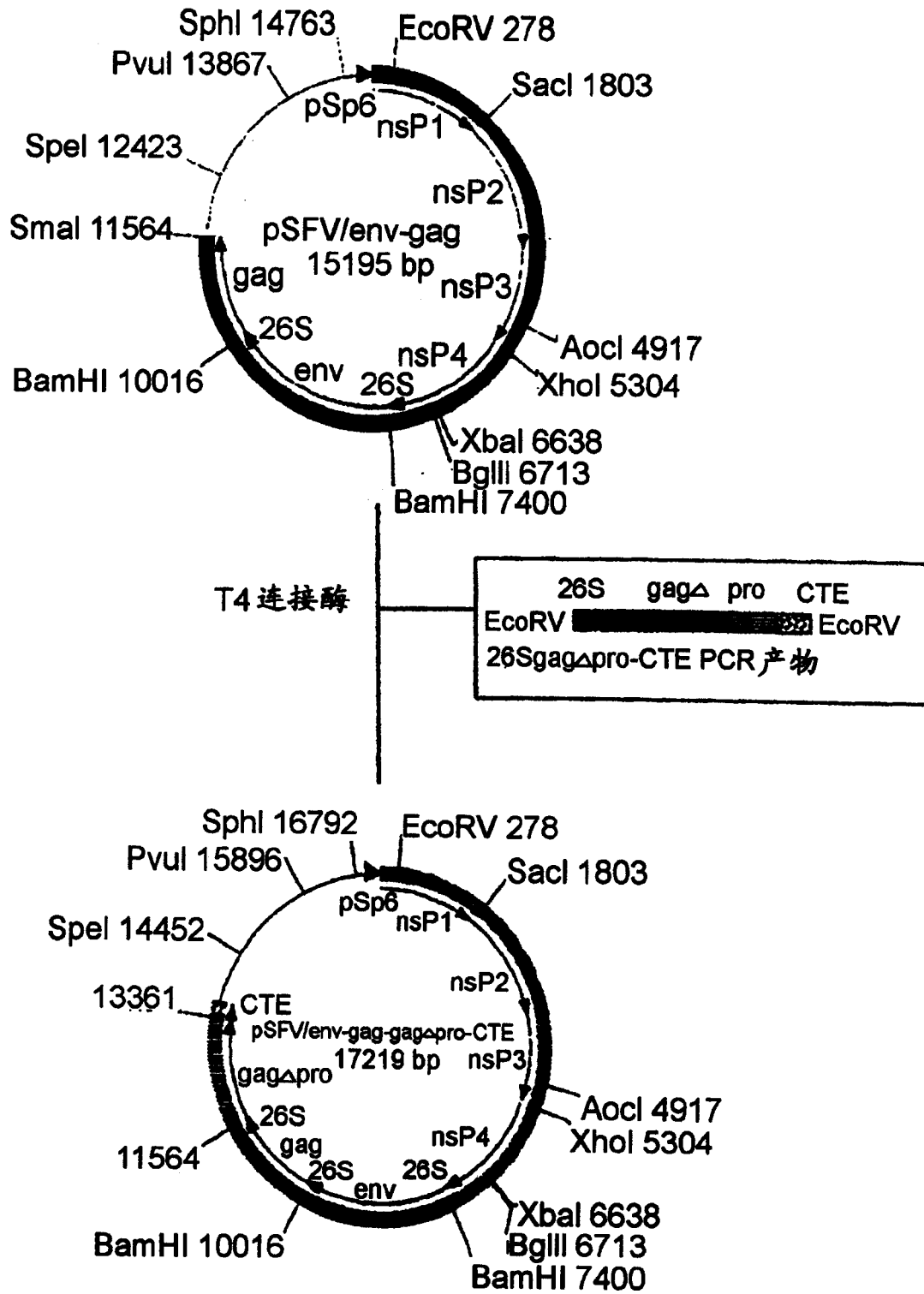


图 24

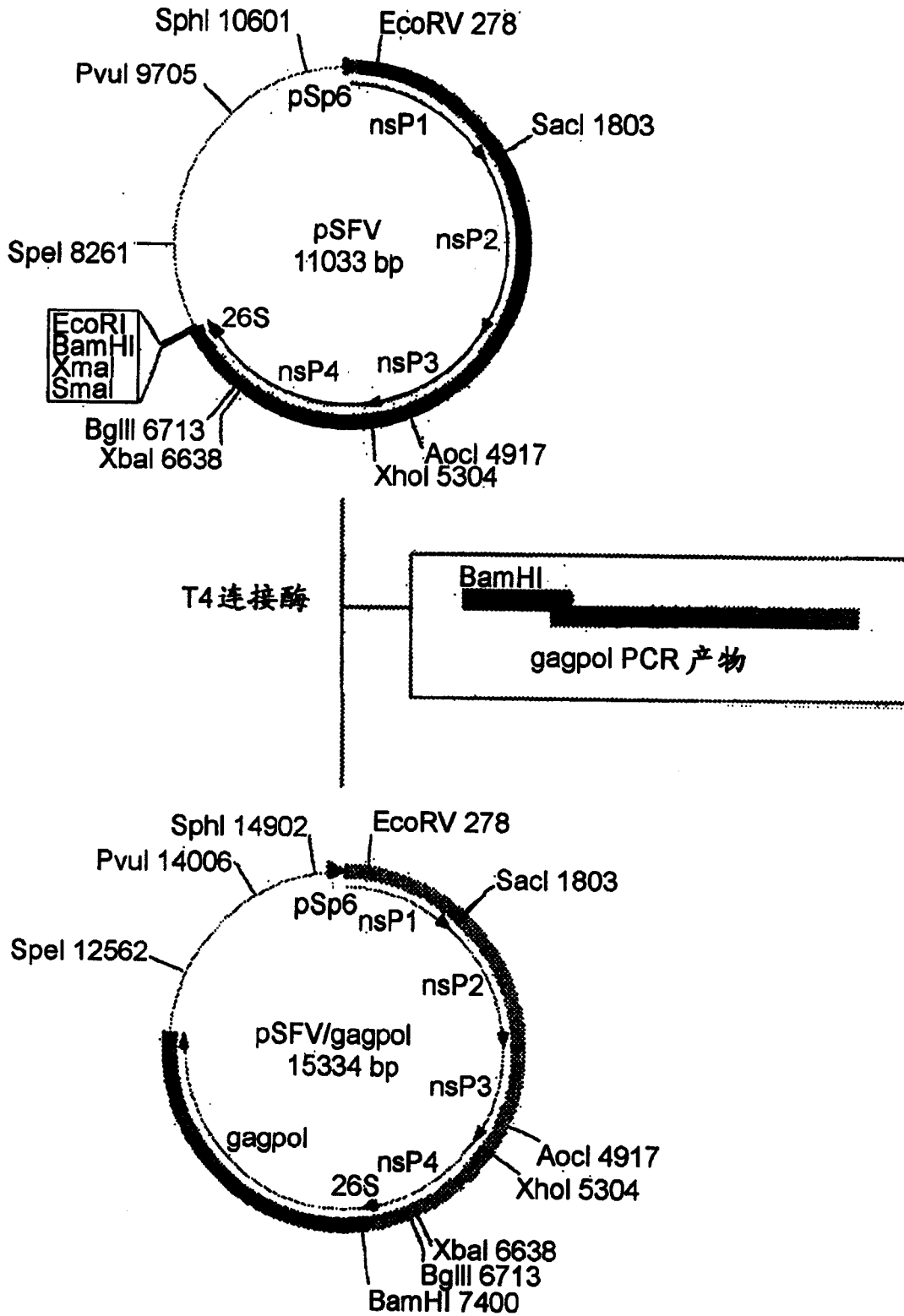


图 25

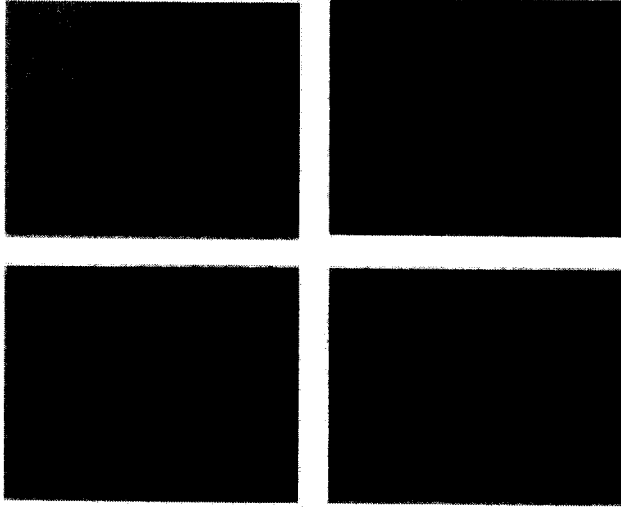


图26

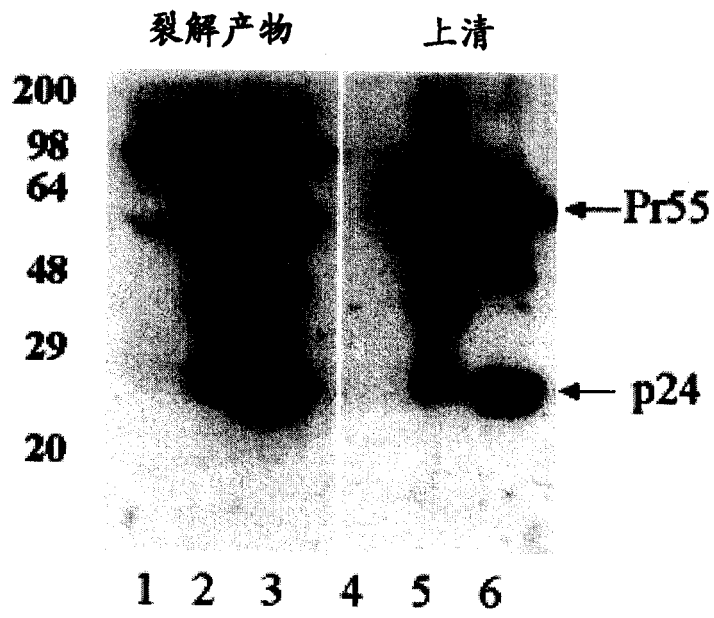


图 27

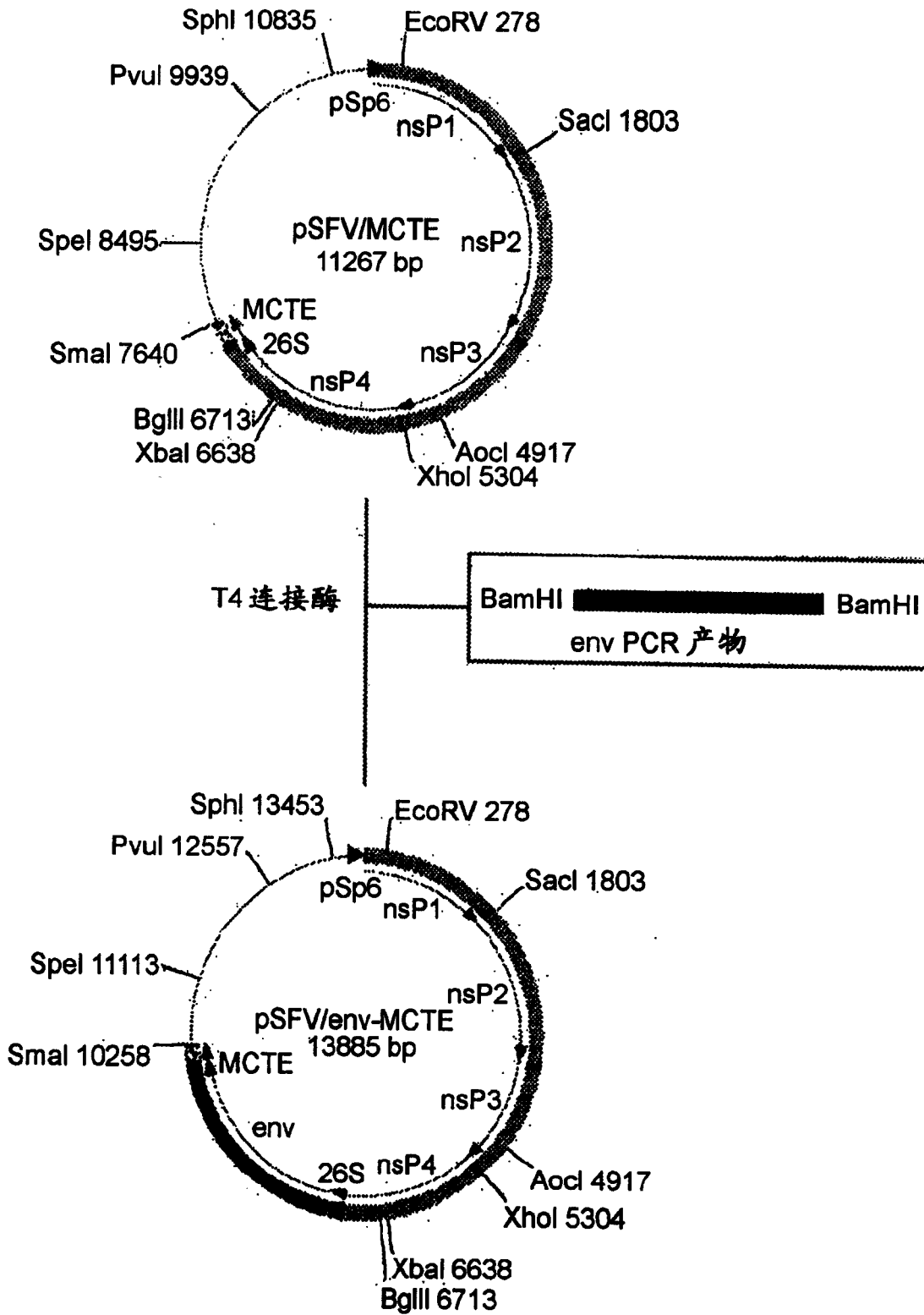


图 28

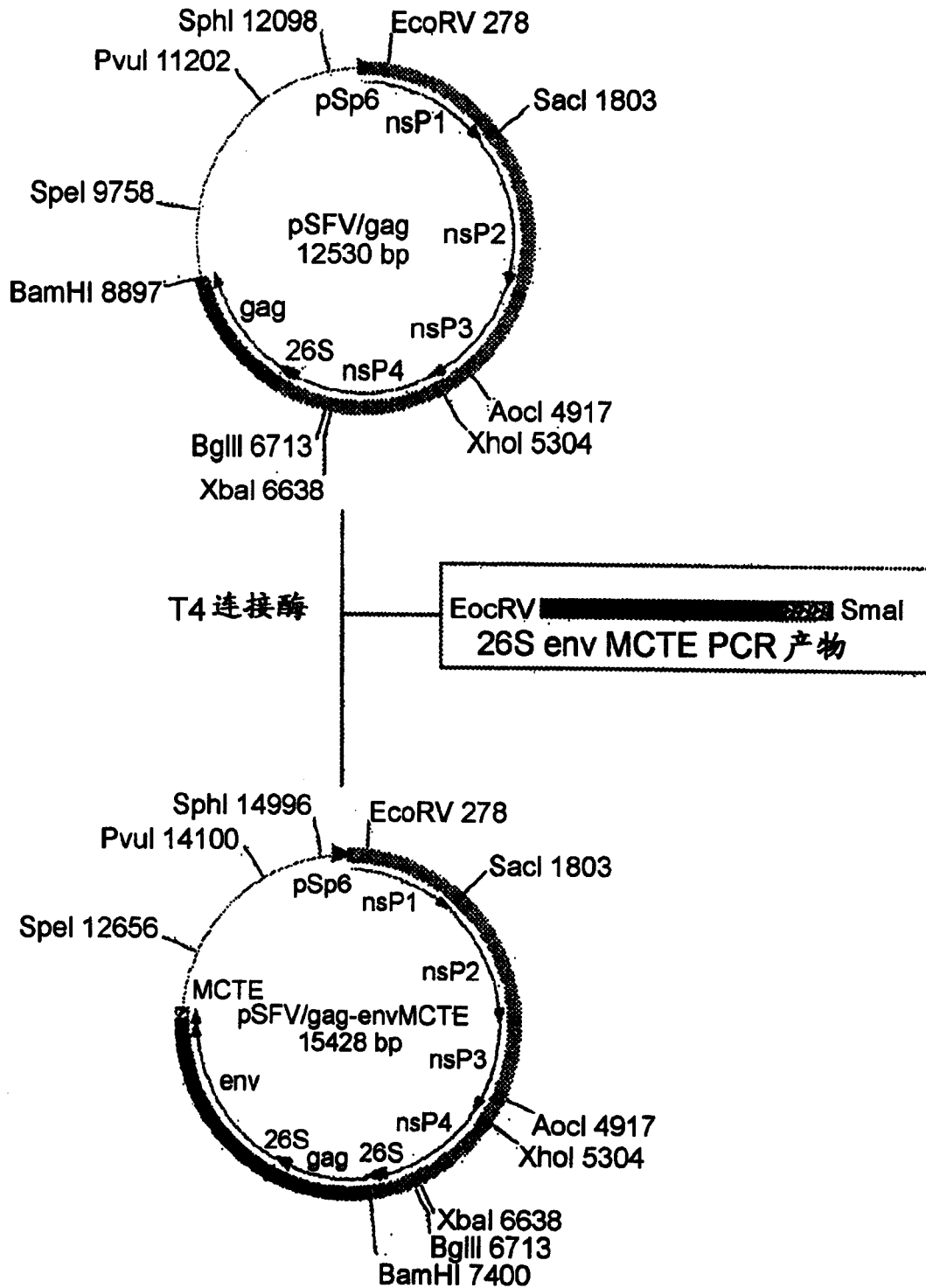


图 29

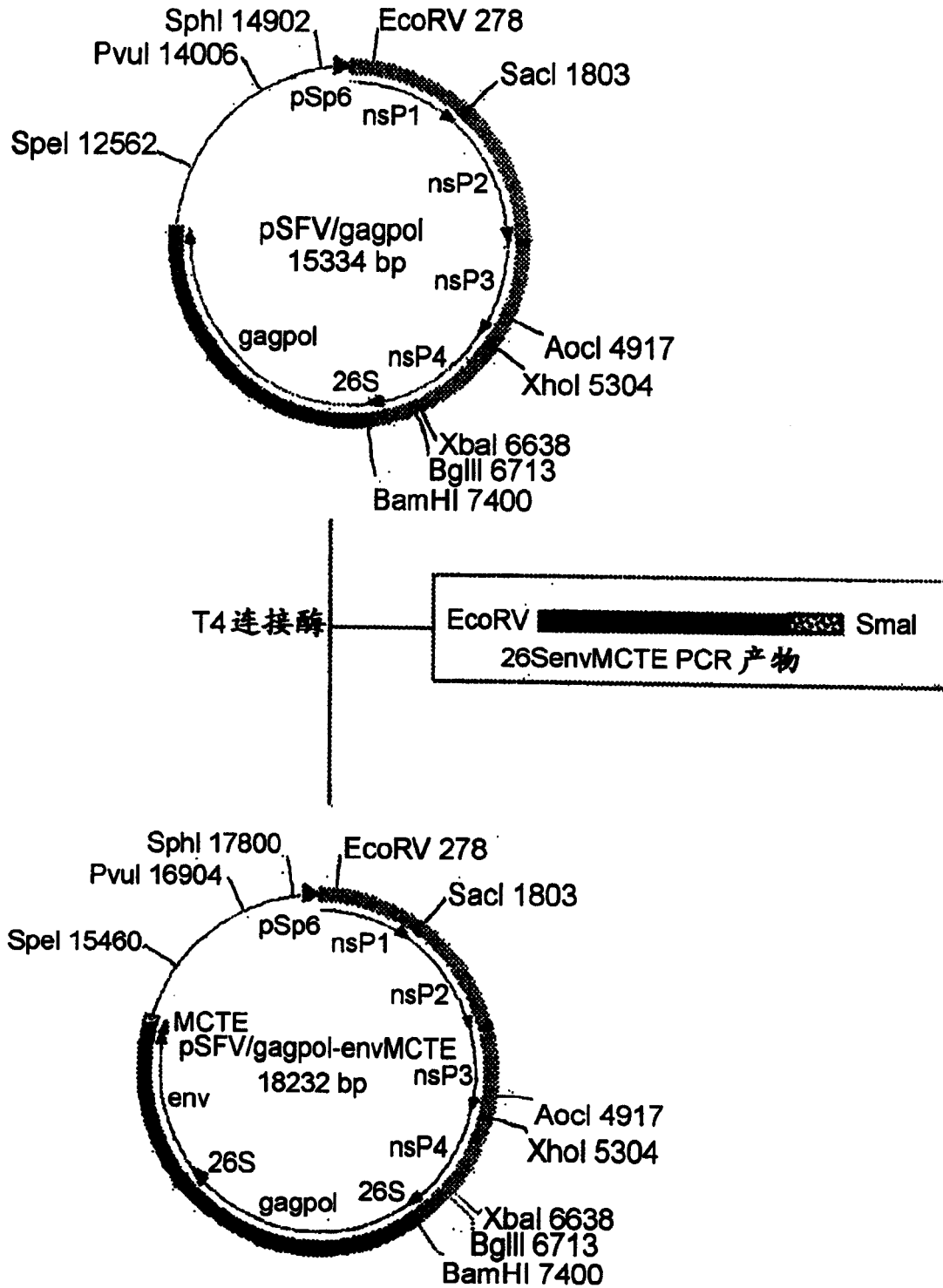


图 30

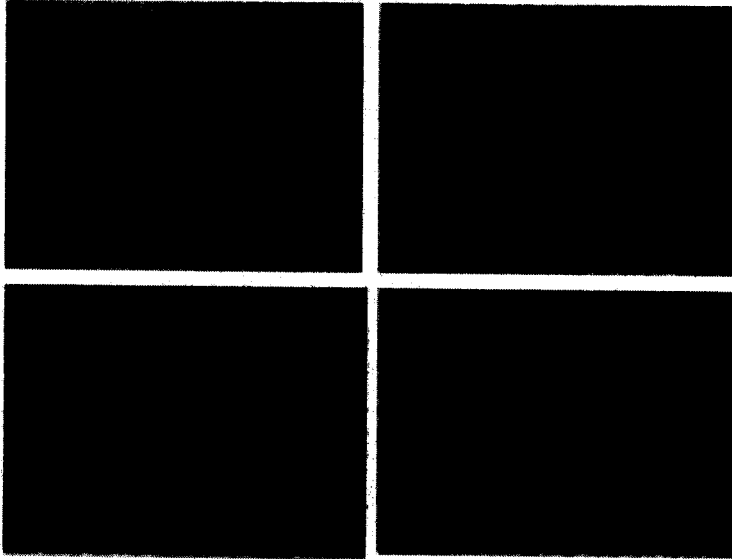


图 31

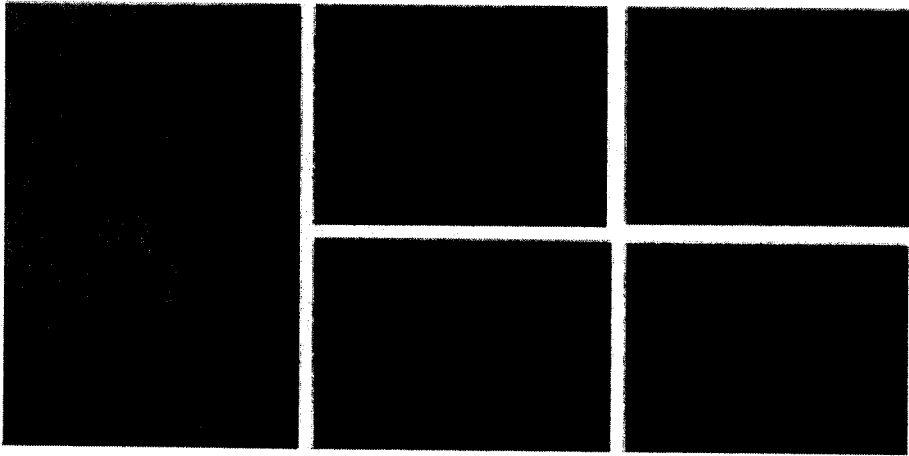
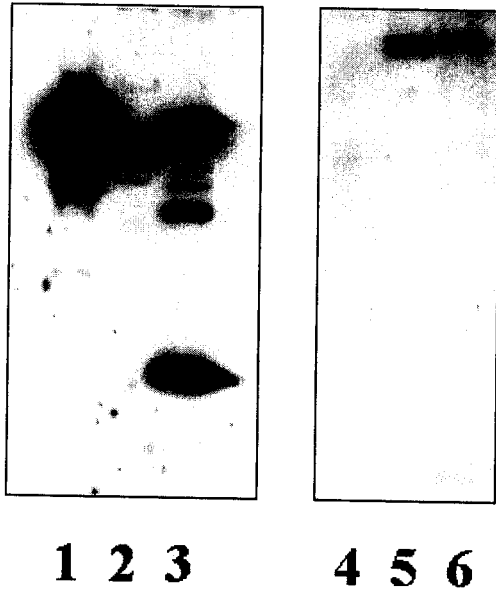


图 32



| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | HIV样颗粒及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN1489630A | 公开(公告)日 | 2004-04-14 |
| 申请号 | CN02804395.2 | 申请日 | 2002-01-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 金哲仲 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 金哲仲 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 金哲仲 | | |
| [标]发明人 | 金哲仲 金恩 申光淳 金铉洙 | | |
| 发明人 | 金哲仲 金恩 申光淳 金铉洙 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/21 A61P31/18 C07K14/16 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/06 C12N15/09 C12N15/51 C12N15/63 C12N15/86 C12Q1/70 G01N33/569 | | |
| CPC分类号 | C12N2740/16222 C12N2740/16122 C12N2830/48 C12N2740/16023 A61K2039/5258 C12N2770/36143 C12N15/86 A61K39/00 C07K14/005 | | |
| 代理人(译) | 唐伟杰 | | |
| 优先权 | 1020010000894 2001-01-08 KR | | |
| 其他公开文献 | CN1249241C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了表达HIV - 1的env, gag, pro, 和/或pol基因的基于甲病毒属的表达载体, 它们的转录物, 和转化的宿主细胞。本发明描述了使用上面的表达载体表达Env, Gag, Pol, 和/或Pro蛋白, 和由上面的重组蛋白组成的HIV样颗粒(HIVLPs)。本发明的病毒样颗粒(VLPs)作为成熟和有感染性的颗粒, 作为HIV感染的诊断试剂盒和预防HIV感染的疫苗组合物的抗原非常有效。

