

## HIV 疫苗研究进展

王芳宇, 罗进贤<sup>\*\*</sup>, 张添元

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东广州 510275)

### Progress in HIV Vaccine

WANG Fang-Yu, LUO Jin-xian<sup>\*\*</sup>, ZHANG Tian-yuan

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education, Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

关键词: 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 疫苗; DNA 疫苗; 中和抗体 CTL 应答。

中图分类号: R512.91

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0087-05

自从 1983 年发现人类免疫缺陷病毒 (*Human immunodeficiency virus*, HIV) 以来, HIV 一直以惊人的速度在全球蔓延, 感染 HIV 的人数也日益增多。到目前为止, 因患艾滋病死亡的人数已达到 2500 万, 到 2010 年这一数字可能会突破 8000 万, 因此研究预防和治疗艾滋病的药物也正日益迫切地摆在人们面前。然而, 迄今为止还没有一种药物能完全制服艾滋病病毒(虽然著名美籍华人何大一先生发明的“鸡尾酒疗法”在工业化国家遏制了艾滋病的流行), 如果对一名艾滋病患者进行有效的治疗需耗资 20 万美元以上, 这对于广大低收入人群来说, 无异为一笔天文数字。因而预防艾滋病毒的感染就成了一种更为经济有效的途径。根据对以往流行的传染病控制的经验, 针对 HIV 传染的有效 HIV 疫苗则成为首选。

## 1 HIV 的生物学

感染人并引起艾滋病的 HIV 包括具有遗传多样性的 HIV 病毒株系<sup>[1]</sup>, 主要分为在西非流行的 HIV-2 和在全世界其他地方流行的 HIV-1, HIV-1 和 HIV-2 在基因序列上差异甚大, 以致于它们的外膜糖蛋白常常不能引起交叉免疫反应。HIV-1 包括一些在不同的地理区域流行的不同病毒进化枝或株系, 这些不同病毒进化枝或株系在基因序列上的差异导致世界上不同的地理区域需要不同的 HIV 疫苗。

在 HIV 感染某一个体的过程中, HIV 基因的变异不断产生。由于目前还不确切的 HIV 复制的酶机

制而导致的病毒突变子不断产生, 这样就导致了一种抗体只能中和一种病毒株而不能中和来自同一个体的另外的病毒株。在 HIV 中所发生的这种基因变异使得 HIV 疫苗的研制过程更趋复杂。

HIV 可以通过性行为 and 血液传播, 因而有效的 HIV 疫苗必须能诱导出抑制性传播病毒的粘膜免疫和抑制病毒直接进入血液的系统免疫。此外, HIV 可能通过两种方式即游离于细胞外和与细胞相结合而传播, 因而提示一个有效的 HIV 疫苗应能诱导一种以上的免疫类型, 即游离于细胞的病毒能被抗体结合并中和, 与细胞相结合的病毒能被细胞免疫清除。最令 HIV 疫苗研究者麻烦的是, HIV 经常产生高水平的复制, 而且与大多数感染人类的其它病毒不同, HIV 的复制机理还不十分清楚, 而这种复制的高水平和持续性不可避免地与临床疾病的快速进展相关联。到目前还没有一种疫苗诱导的免疫应答能完全清除或无限地抑制 HIV 的复制。

## 2 传统的疫苗设计

在进行 HIV 疫苗的研究早期, 人们首先想到的自然是曾成功地控制了脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、天花病毒等在人类流行的传统疫苗的设计方式。然而迄今为止, 在非人类的灵长类和人体早期试验中, 已经证实传统形式的疫苗如活的减毒病毒疫苗、失活的病毒疫苗和重组蛋白疫苗在预防 HIV 感染和 AIDS 发生上均是无效的<sup>[2]</sup>。而且具有很大的局限性: 如活的减毒疫苗具有潜在的致病性; 带

收稿日期: 2003-07-15, 修回日期: 2003-09-22

作者简介: 王宇芳 (1965-), 男, 湖南籍, 副教授、博士生。主要从事 AIDS 治疗的药物研究。

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 020-84112397, E-mail: Lsbr02@zsu.edu.cn

佐剂的失活病毒疫苗只诱导有限的特异性中和抗体且缺乏 CTL 应答;重组外膜蛋白疫苗只诱导针对病人 HIV-1 的非中和抗体,并且缺乏 CTL 应答。

表达大多数 HIV 蛋白的活的减毒疫苗在灵长类实验中曾被证明是最好的免疫原,用这样的减毒病毒事先感染可以阻止随后的致病野生型病毒感染的<sup>[3]</sup>,高度减毒的 SIV 可以保护成年的恒河猴不受 HIV 的感染<sup>[4]</sup>和初生的恒河猴不产生艾滋病<sup>[5]</sup>。不过,有些受保护的成年恒河猴最终还是发展成为艾滋病<sup>[6]</sup>。而且,这类疫苗在人体的使用还存在安全上的隐患<sup>[7-9]</sup>,因而采用这种活的减毒病毒方式生产 HIV 疫苗是行不通的。

失活病毒疫苗在人类预防流感病毒和脊髓灰质炎病毒方面曾被证明是行之有效的,然而在 SIV/恒河猴模型中进行的评价却令人失望。这种疫苗策略在预防由同种 SIV 病毒株感染猴子时可产生最大的保护<sup>[10]</sup>,然而这种保护既不广泛也不强烈;而且,当制备疫苗的病毒株与感染的病毒株在遗传上即使有轻微的差异或当免疫高峰出现几个星期之后,这种保护就不再存在。此外,有些研究提示在这种动物模型中这种保护可能反映的是实验的假象 (artifact) 而不是病毒特异性免疫<sup>[11]</sup>。失活病毒免疫原在有限的早期人体免疫性试验中<sup>[12]</sup>的结果也是令人失望的,这样的免疫原不能诱导中和 HIV 的抗体应答,这样的疫苗也不能诱导 CTL 应答。因此,这种疫苗策略在 HIV 疫苗研究中也是不可行的。

通过重组 DNA 技术产生的高度纯化的病毒蛋白对于人体预防乙肝病毒感染是一个高度有效的免疫原。几年前,这一技术被应用到 HIV 疫苗的设计上,HIV 的亚单位如 Env、Tat 或 P24 蛋白通过 DNA 重组技术产生,结果证明它们在人体试验中具有良好的安全性<sup>[13]</sup>。采用重组 HIV 外膜糖蛋白作为免疫原在非人灵长类动物模型中,动物只得到适当的保护,而且只有在感染病毒与免疫原的外膜糖蛋白序列相同时<sup>[14]</sup>。此外,这类疫苗倾向于只刺激抗体应答,而不能诱导 CTL 应答。今年 2 月,由美国 VaxGen 生物公司研制的 AIDS VAX gp120 HIV 疫苗在历经三年 5000 人次的 III 期临床试验后,宣布该疫苗不能有效地预防 HIV 在人体的感染<sup>[15]</sup>,从而为该种方法产生 HIV 疫苗蒙上了一层阴影。

综上所述,采用传统的疫苗设计思路不能产生有效的 HIV 疫苗。

### 3 新的疫苗策略

HIV 疫苗的两个重要潜在靶是病毒进入过程和

病毒复制。HIV-1 通过它的表面外膜糖蛋白 gp120 结合宿主细胞的 CD4 受体,并籍此改变构像促进与趋化因子受体的相互作用,从而感染靶细胞<sup>[16]</sup>。抗体能中和病毒阻止这种进入过程,从而预防感染;T 细胞不能预防感染,但能控制 HIV 的复制。目前已知 CD8 T 细胞可通过三种不同的机理控制 HIV 的感染:(1)通过细胞毒功能杀死感染的细胞;(2)通过分泌可溶性因子抑制病毒复制<sup>[17]</sup>; (3)通过分泌趋化因子如 MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  和 RANTES 而抑制病毒进入。因此,一个理想的 HIV 疫苗既要产生具有广泛交叉反应的抗体又要产生高水平的抗病毒 T 细胞。

近来,HIV 疫苗的研制主要集中在 DNA 疫苗上(见表 1)<sup>[16]</sup>。最近,由编码 Env 和/或 Rev 蛋白的治疗性 DNA 疫苗在 15 个无征兆 HIV 感染病人中所进行的 I 期临床试验表明,HIV DNA 疫苗具有潜在的免疫原性和安全性。对于 HIV DNA 疫苗目前采取的策略主要有:以质粒 DNA、活的重组病毒或基因缺失病毒作载体;或采用初始免疫+加强免疫(prime-boost)相结合的组合疫苗策略等。

质粒 DNA 疫苗在恒河猴能诱导 SIV 特异性 CTL 应答,这种疫苗诱导的免疫能促进第二次 CTL 应答的产生并能控制随后的致病性 SIV 感染后的病毒复制<sup>[18]</sup>;此外,许多研究表明质粒 DNA 在二型(bimodal)疫苗策略中作为初始免疫原是十分有效的<sup>[19]</sup>。采用质粒 DNA 免疫原作为 HIV 候选疫苗的人体早期试验研究已在进行中。

除裸露的质粒 DNA 外,病毒载体正逐渐被用来携带各种 HIV 基因。最常使用的病毒有:水痘病毒<sup>[20,21]</sup>、塞姆利基森林病毒<sup>[22-24]</sup>、腺病毒<sup>[25-27]</sup>和辛德毕斯病毒<sup>[28]</sup>等。目前研究较多的是水痘病毒家族,如以牛痘作为载体制成的 HIV 疫苗在非人灵长类实验中能诱导针对 HIV 和 SIV 蛋白的较强的 CTL 应答<sup>[29]</sup>,然而出于安全考虑而妨碍了牛痘作为 HIV 疫苗载体的进一步研究。另一种作为潜在的 HIV 疫苗载体的水痘病毒是修饰的牛痘安卡拉(MVA),MVA 是一种高度减毒的牛痘病毒株,在非人灵长类动物实验中,MVA 可诱导强烈的免疫应答。MVA 作为 HIV 疫苗载体不久将会在早期人体试验中进行评估。作为 HIV 疫苗载体,研究最为广泛的水痘病毒可能是鸟类水痘病毒。重组金丝雀水痘病毒最近几年经历了广泛的人体试验<sup>[30]</sup>,这些研究表明它是安全的,并具有免疫原性,在接种疫苗的个体中能诱导 70%的人产生抗体应答和 30%的个体产生 CTL 应答。

到目前为止,最有希望作为 HIV 疫苗的活的重组病毒载体或许是基因缺失的腺病毒。通过 E1 和 E3 基因缺失或失活而失去复制能力的血清型 V 腺

病毒已经证明在鼠科动物和非人灵长类动物具有强烈的免疫原性<sup>[31]</sup>, 这类载体在这些动物模型中能诱导高滴度的抗体和高强度的 CTL 应答。

表 1 新一代正在或即将在人体进行安全性和有效性试验的 HIV 疫苗(引自文献<sup>[16]</sup>)

Table 1 New generation vaccines that are ongoing or about to enter safety and efficacy trials in humans

Vector	Immuogen	Ongoing or to be Started	Completed	Sponsor/Developer
<b>Recombinant DNA vaccine</b>				
DNA	Clade B Gag	Phase I (USA)		Merck
DNA	Gag p17 and p24 plus > 25CTL epitopes from Gag, Pol, Nef and Env from subtype A	Phase I (USA) Phase I (UK) Phase I (Kenya)		IAVI/Oxford
DNA	Clade B Gag, Pol, Env, Tat, Rev and Vpu	Phase I (USA)		NIAID/Emory
DNA	Multiclade(A+B+C) Gag, Pol, Net and Env	Phase I (USA)		NIAID
DNA-IL-2-Ig	Multiclade(A+B+C) Gag, Pol, Net and Env	Phase I (USA)		NIAID/Harvard
<b>Recombinant live-vector vaccines</b>				
Canarypox (ALVAC Vcp205)	Clade B gp120, gp41, Gag and Pol	Phase I (USA)	Phase II (USA) Phase I (France)	Aventis Pastur
Canarypox (ALVAC Vcp1452)	Identical to Vcp205, plus CTL epitopes from Nef and Pol genes	Phase II (Brazil)	Phase I / II (USA) Phase I (France)	Aventis Pastur
Canarypox (ALVAC Vcp1521)	Clade E gp120, clade B Gag and Pro genes	Phase I / II (Thailand)		Aventis Pastur
MVA	Gag p17 and p24 plus >25CTL epitopes from Gag, Pol, Nef and Env from subtype A	Phase I (UK)		IAVI/Oxford
MVA	Clade B Gag, Pol and Env	Phase I (USA)		NIAID
Ad5	Clade B Gag	Phase I (USA)		Merck
<i>Smlmonella typhi</i> CVD 908	HIV-1 subtype B Gp120 protein expressed in an attenuated <i>S. typhi</i> vector		Phase I (USA)	Chiron/HV
<b>Heterologous prime-boost vaccines</b>				
DNA-MVA	Gag p17 and p24 plus >25 CTL epitopes from Gag, Pol, Nef and Env from subtype A	Phase I (UK)		IAVI/Oxford
DNA-MVA	Clade B Gag, Pol and Env	Phase I (USA)		NIAID/Emory
DNA-Ad5	Clade B Gag	Phase I (USA)		Merck
DNA-Ad5	Multiclade(A+B+C)Gag, Pol, Nef and Env	Phase I (USA)		NIAID

Abbreviations: Ad5, adenovirus 5; CTL, cytotoxic T lymphocyte; HIV, human immunodeficiency virus; IAVI, International AIDS Vaccine Initiative; Ig, immunoglobulin; IHV, Institute of Human Virology; IL-2, interleukin 2; MVA, modified vaccinia Ankara; NIAID, National Institutes for Allergy and Infectious Diseases. More information can be obtained from [www.iavi.org/trialsdb/](http://www.iavi.org/trialsdb/) and [www.hvtn.org](http://www.hvtn.org)

一些具有复制能力的病毒也用来研究作为 HIV 疫苗的可能,如单链 RNA 甲型病毒、细小病毒等。此外,为了提高粘膜免疫,细菌载体如 *Bacillus calmette guerin* (BCG)<sup>[32-35]</sup>等也在考虑之中。

DNA 疫苗在过去 10 年中广受欢迎,因为它们简单和能诱导 CD4 和 CD8 T 细胞应答。但研究表明,如果只用 DNA 作为初始免疫和加强免疫则不能控制致病性免疫缺损病毒的进攻<sup>[36, 37]</sup>, 这是因为 DNA 本身不能有效产生高水平的 T 细胞。但是在 DNA 疫苗中加入各种常规佐剂<sup>[38]</sup>、基因佐剂<sup>[39]</sup>和包裹 DNA 的微球<sup>[40]</sup>, 则其免疫原性可增加 5~10 倍。例如采用 IL-2-Ig 融合蛋白<sup>[36]</sup>和 CRL1005<sup>[38]</sup>作为 DNA 疫苗的佐剂可控制致病性 SHIV89.6P 的进攻。

最近,异质的初始免疫(DNA)和加强免疫(活病毒载体)策略因为它们能产生高强度的细胞免疫和高滴度的体液免疫应答<sup>[37, 41]</sup>而受欢迎,通过活病毒载体如 MVA<sup>[42]</sup>或复制缺陷的重组腺病毒(rAd5)<sup>[38]</sup>加强免疫则 DNA 初始免疫的有效性得以加强。此外,同质的初始和加强免疫(同为活病毒载体)疫苗也能产生较多的 T 细胞,但由同质的初始—加强免疫疫苗产生的 CD8 T 细胞应答要比异质的初始—加强免疫疫苗低<sup>[43]</sup>。

尽管对于一个有效的 HIV 疫苗的组成仍不清楚,但我们已有了一个日趋一致的看法,即一个有效的 HIV 疫苗不是单一疫苗模式。在二型(bimodal)疫苗策略中,活的重组病毒载体和质粒 DNA 可以诱导 CTL 应答,而亚单位免疫原则可诱导中和抗体应答。

## 4 小结

HIV 疫苗的研制近年虽取得了一些进展,但确实还存在许多困难。与其它病毒不同, HIV 所侵袭的主要靶细胞是人体免疫活性细胞,从而导致疫苗无法发挥作用。HIV 可以隐藏在淋巴器官、中枢神经系统和感染的静息 CD4 T 细胞<sup>[44]</sup>,在这些部位它可以不表达病毒蛋白,因而杀伤性 T 细胞难以发现它的存在。HIV 的 Nef、Tat 和 Vpu 蛋白下调 I 型 MHC 和 CD4 的表达,从而降低了细胞免疫应答。HIV 在感染过程中,其与 CD4 受体结合后构像会发生改变,从而暴露出 gp120 上一些新的位点,但由于这种结合使得 HIV 与 CD4 细胞更加靠近,因而在空间上阻止了 gp120 上新近暴露的抗体结合位点与抗体的结合<sup>[45]</sup>。同时 HIV 外膜蛋白因抗体而导致突变的速度非常之快,甚至远远超过因抗 HIV 药物而产生的突变速度<sup>[45]</sup>,从而逃避体内抗体的攻击。HIV 还能将自己的前病毒基因整合到靶细胞的基因组中去,从而在细胞内长期潜伏,逃避免疫攻击。

HIV 疫苗的研究也受到了一些来自大的制药公司的冷漠对待,尽管这一状况目前已有改变。这或许是因为成功的 HIV 疫苗将会减少抗 HIV 药物的销售,也可能是因为 HIV 疫苗的研制成本太高。难于得到足够多的实验动物模型也是制约 HIV 疫苗研究的一个重要因素。黑猩猩可以被 HIV-1 感染,但并不致病;恒河猴可以被 SIV 感染并致病,但所得结果对 HIV 疫苗来说只有参考价值,因为 SIV 与 HIV 两者抗原在一级结构上有较大的差异。因而建立合适的足够数量的实验动物模型也是 HIV 疫苗成功的有效前提。

此外, HIV 疫苗的临床试验还受到一些来自文化、宗教等因素的影响,因此对于 HIV 疫苗的研究也带来了一些困扰。

尽管目前在 HIV 疫苗研究上遇到了一些挫折<sup>[46]</sup>,但新的进展仍不断涌现,如能中和广泛的 HIV-1 的特殊抗体 2G12 结构的阐明<sup>[47]</sup>、HIV 小鼠模型的有望建立<sup>[48]</sup>等,使我们有理由相信 HIV 疫苗的研制会有一个美好的明天。

## 参考文献

- [1] Malim M H, Emerman M. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation[J]. *Cell*, 2001, 104: 469-472.
- [2] Norman L L. Strategies for an HIV vaccine [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110: 15-20.
- [3] Daniel M D, Kirchhoff F, Czajak S C, *et al*. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene [J]. *Science*, 1992, 258: 1938-1941.
- [4] Wyand M S, Manson K H, Lackner A A, *et al*. Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 32-36.
- [5] Baba T W, Koch J, Mittler E S, *et al*. Mucosal infection of neonatal rhesus monkeys with cell-free SIV [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10: 351-357.
- [6] Baba T W, Liska V, Khimani A H, *et al*. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 194-203.
- [7] Putkonen P, Walther L, Zhang Y J, *et al*. Long-term protection against SIV-induced disease in macaques vaccinated with a live attenuated HIV-2 vaccine [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 914-918.
- [8] Wyand M S, Manson K, Montefiori D C, *et al*. Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge [J]. *J Virol*, 1999, 73: 8356-8363.
- [9] Johnson R P, Lifson J D, Czajak S C, *et al*. Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation [J]. *J Virol*, 1999, 73: 4952-4961.
- [10] Murphey-Corb M, Martin L N, Davison-Fairburn B, *et al*. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques [J]. *Science*, 1989, 246: 1293-1297.
- [11] Stott E J. Anti-cell antibody in macaques [J]. *Nature*, 1991, 353: 393.
- [12] Levine A M, Nelson R. Initial studies on active immunization of HIV infected subjects using a gp120-depleted HIV-1 immunogen: long-term follow-up [J]. *J Acquir Immune Defic*, 1996, *Sydr*. 11: 351-364.
- [13] Matilu M, Andrew J M. A review of vaccines for HIV prevention [J]. *J Gene Med*, 2003, 5: 3-10.
- [14] Berman P W, Gregory T J, Riddle L, *et al*. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160 [J]. *Nature*, 1990, 345: 622-625.
- [15] Cohen J. A setback and an advance on the AIDS vaccine front [J]. *Science*, 2003, 300: 28-29.
- [16] Amara R R, Robinson H L. A new generation of HIV vaccines [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8: 489-495.
- [17] Levy J A, Mackewicz C E, Barker E, *et al*. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells [J]. *Immunol Today*, 1996, 17: 217-224.
- [18] Egan M A, Charini W A, Kuroda M J, *et al*. Simian immunodeficiency virus (SIV) *gag* DNA vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection [J]. *J Virol*, 2000, 74: 7485-7495.
- [19] Amara R R, Villingier F, Altman, J D, *et al*. Control of a mucosal challenge and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by a multiprotein DNA/MVA vaccine[J]. *Science*, 2001, 292: 69-74.
- [20] Abimiku A G, Franchini G, Tartaglia J, *et al*. HIV-1 recombinant

- poxvirus vaccine induces cross-protection against HIV-2 challenge in rhesus macaques [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 321-329.
- [21] Tartaglia J, Cox W I, Taylor J, *et al*. Highly attenuated poxvirus vectors [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, 8: 1445-1447.
- [22] Berglund P, Quesada-Rolander M, Putkonen P, *et al*. Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1997, 13: 1487-1495.
- [23] Brand D, Lemiale F, Turbica I, *et al*. Comparative analysis of humoral immune responses to HIV type 1 envelope glycoproteins in mice immunized with a DNA vaccine, recombinant Semliki forest virus RNA, or recombinant Semliki forest virus particles [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998, 14: 1369-1377.
- [24] Mossman S P, Bex F, Berglund P, *et al*. Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine [J]. *J Virol*, 1996, 70: 1953-1960.
- [25] Natuk R J, Lubeck M D, Chanda P K, *et al*. Immunogenicity of recombinant human adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993, 9: 395-404.
- [26] Natuk R J, Davis A R, Chanda P K, *et al*. Adenovirus vectored vaccines [J]. *Dev Biol Stand*, 1994, 82: 71-77.
- [27] Lubeck M D, Natuk R J, Chengalvala M, *et al*. Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10: 1443-1449.
- [28] Villacres M C, Zuo J, Bergmann C C. Maintenance of CD8(+) T-cell memory following infection with recombinant sindbis and vaccinia viruses [J]. *Virology*, 2000, 270: 54-64.
- [29] Shen L, Chen Z W, Miller M D, *et al*. Recombinant virus vaccine-induced SIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes [J]. *Science*, 1991, 252: 440-443.
- [30] Evans T G, Keefer M C, Weinhold K J, *et al*. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers [J]. *J Infect Dis*, 1999, 180: 290-298.
- [31] Shiver J W, Fu T M, Chen L, *et al*. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity [J]. *Nature*, 2002, 415: 331-335.
- [32] Aldovini A, Young K A. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines [J]. *Nature*, 1991, 351: 479-482.
- [33] Ferrari G, Kostyu D D, Cox J, *et al*. Identification of highly conserved and broadly cross-reactive HIV type 1 cytotoxic T lymphocyte epitopes as candidate immunogens for inclusion in *Mycobacterium bovis* BCG-vectored HIV vaccines [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000, 16: 1433-1443.
- [34] Falk L A, Goldenthal K L, Esparza J, *et al*. Recombinant bacillus Calmette-Guerin as a potential vector for preventive HIV type 1 vaccines [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000, 16: 91-98.
- [35] Stover C K, de la Cruz V F, Fuerst T R, *et al*. New use of BCG for recombinant vaccines [J]. *Nature*, 1991, 351: 456-460.
- [36] Barouch D H, Santra S, Schmitz J E, *et al*. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination [J]. *Science*, 2000, 290: 486-492.
- [37] Robinson H L, Montefiori D C, Johnson R P, *et al*. Neutralizing antibody independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant poxvirus booster immunization [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 526-534.
- [38] Shiver J W, Fu T M, Chen L, *et al*. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency virus immunity [J]. *Nature*, 2002, 415: 331-335.
- [39] Scheerlinck J Y. Genetic adjuvants for DNA vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 2647-2656.
- [40] Singh M, Briones M, Ott G, *et al*. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 811-816.
- [41] Schneider J, Gilbert S C, Hannan C M, *et al*. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunization strategies [J]. *Immunol Rev*, 1999, 170: 29-38.
- [42] Allen T M, Vogel T U, Fuller D H, *et al*. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara-boost regimen [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 4968-4978.
- [43] Amara R R, Villinger F, Staprans S I, *et al*. Different patterns of immune responses but similar control of a mucosal immunodeficiency virus challenge by MVA and DNA-MVA vaccines [J]. *J Virol*, 2002, 76: 7625-7631.
- [44] Chun T W, Stuyver L, Mizell S B, *et al*. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13 193-13 197.
- [45] Cohen J. Escape artist par excellence [J]. *Science*, 2003, 299: 1505-1508.
- [46] Barouch D H, Kunstman J, Kuroda M J, *et al*. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes [J]. *Nature*, 2002, 415: 335-339.
- [47] Calarese D A, Scanlan C N, Zwick M B, *et al*. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition [J]. *Science*, 2003, 300: 2065-2071.
- [48] Zheng Y H, Yu H F, Peterlin B M, *et al*. Human p32 protein relieves a post-transcriptional block to HIV replication in murine cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 611-618.