〔19〕中华人民共和国专利局

[11]公开号 CN 1067382A

〔12〕发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91110657.X

[51] Int.Cl[5]

A61K 39/285

〔43〕公开日 1992年12月30日

[22]申请日 91.9.26

[30]优先权

[32]90.9.26 [33]US [31]588,384

[71]申请人 布里斯托尔-迈尔斯斯奎尔公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 E·K·托马斯 L·P·陈

J·布莱克 K·E·海尔斯特伦

I·海尔斯特伦

S·L·胡

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

A61K 39/395 A61K 37/02

C12P 21/02

说明书页数: 45 附图页数: 18

[54]发明名称 人类乳头状瘤病毒肽的表达以及在致免疫组合物中的应用

[57]摘要

包含和表达编码了诱发的乳头状瘤区域或乳头状瘤蛋白质，如E6或E7区域的HPVDNA插入物的肽，抗体及重组表达系统或细胞．含有这些肽，抗体和/或重组细胞的组合物被用做为致免疫成分并被用在抑制和治疗HPV感染和肿瘤发生及进展的方法中．具体描述了表达HPV16E6或E7核蛋白质的抗原决定区域的特异性肽和重组细胞，如牛痘病毒和肿瘤细胞．

权　利　要　求　书

1．一种组合物，包括基本上对应于在哺乳细胞中由于人类乳头状瘤病毒感染而被表达的肽的氨基酸残基序列的一种致免疫肽。

2．根据权利要求1所述的组合物，包括含有一个编码了所说的肽的基因的重组细胞。

3．根据权利要求2所述的组合物，其中所说的重组细胞是病毒。

4．根据权利要求3所述的组合物，其中所说的病毒是牛痘病毒。

5．根据权利要求2所述的组合　物，其中所说的重组细胞选自上皮细胞，成纤维细胞和MHC　I级阳性淋巴细胞。

6．根据权利要求2所述的组合　物，其中所说的重组细胞是肿瘤细胞。

7．根据权利要求2所述的组合　物，其中所说的基因编码了基本上对应于E_6核蛋白质区域的肽

8．根据权利要求2所述的组合　物，其中所说的基因编码了基本上对应于E_7核蛋白质区域的肽。

9．根据权利要求1所述的组合　物，其中所说的肽包括E_6蛋白质的一个抗原决定区域。

10．根据权利要求1所述的组合物，其中所说的肽包括E_7蛋白质的一个抗原决定区域。

11．根据权利要求4所述的组合物，包括一种重组牛痘病毒，其中含有一种编码和表达人类乳头状瘤病毒的E_6核蛋白质的抗原决定区域和基因。

12．根据权利要求4所述的组合　物，包括一种重组牛痘病毒，

其中含有一种编码和表达人类乳头状瘤病毒的E_7核蛋白质的抗原决定区域的基因。

13．根据权利要求4所述的组合　物，包括一种重组牛痘病毒，其中含有在哺乳细胞中诱发致免疫肽的表达的人类乳头状瘤病毒的一个基因区域。

14．根据权利要求6所述的组合　物，其中所说的肿瘤细胞包括一种重组哺乳动物细胞，其中含有编码和表达了由所说的哺乳细胞产生的致免疫肽的一个抗原决定区的人类乳头状瘤病毒E_6基因的一个区域。

15．根据权利要求14所说的组合物，其中所说的哺乳细胞是人类细胞。

16．根据权利要求6所述的组合物，其中所说的哺乳细胞包括一种重组人细胞，其中含有编码和表达由所说的黑素瘤细胞所产生的致免疫肽的一个抗原决定区域的人类乳头状瘤病毒E_7基因的一个区域。

17．根据权利要求16所述的组合物，其中所说的哺乳细胞是选自血细胞，成纤维细胞及上皮细胞中的一种细胞。

18．一种治疗由人类乳头状瘤病毒感染引起的疾病的方法，包括：

给患者施用治疗有效量的一种组合　物，其中包括一种肽，它基本上对应于由于人类　乳头状瘤病毒感染而在哺乳动物细胞中被表达的肽的一个区域的氨基酸残基序列，治疗持续一段足以抑制所述疾病进展的时间。

19．根据权利要求18所述的方法，其中所说的组合物包括一

种重组细胞，它含有在哺乳动物细胞中诱发致免疫肽的表达的人类乳头状瘤病毒的E_6基因的一个区域。

20．根据权利要求19所述的方法，其中所说的细胞是牛痘病毒。

21．根据权利要求18所述的方法，其中所说的组合物包括一种重组细胞，它含有在哺乳动物细胞中诱发致免疫肽的表达的人类乳头状瘤病毒的E_7基因的一个区域。

22．根据权利要求21所述的方法，其中所说的细胞是牛痘病毒。

23．根据权利要求18所述的方法，其中所说的疾病是宫颈疣。

24．根据权利要求18所述的方法，其中所说的疾病是宫颈癌。

25．根据权利要求18所述的方法，其中所说的方法抑制被人类乳头状瘤病毒感染的细胞的增殖。

26．一种在检测到人类乳头状瘤病毒感染后抑制细胞中肿瘤发生的预防方法，包括：

给患者施用治疗有效量的一种组合物，其中包括一种肽，它基本上对应于在哺乳细胞中由人类乳头状瘤病毒感染诱发的肽的氨基酸残基序列以在患者体内激发一种抑制所说的病毒感染细胞的肿瘤发生的保护性应答。

27．根据权利要求26所述的方法，其中所说的组合物包括一种含有编码了所说的肽的基因的重组细胞。

28．根据权利要求27所述的方法，其中所说的重组细胞是牛痘病毒。

29．根据权利要求27所述的方法，其中所说的重组细胞是选

自上皮细胞，成纤维细胞及MHCI级阳性淋巴细胞中的一种细胞。

30．根据权利要求26所述的方法，其中所说的肽包括人类乳头状瘤病毒E_6核蛋白质的一个抗原决定簇。

31．根据权利要求26所述的方法，其中所说的肽包括人类乳头状瘤病毒E_7核蛋白质的一个抗原决定簇

32．根据权利要求26所述的方法，其中所说的肽包括一种由人类乳头状瘤病毒基因的一个区域诱发的哺乳动物的肽。

33．一种重组细胞，包含有一个编码了一个肽的基因，该肽基本上对应于由于人类乳头状瘤病毒感染而在哺乳细胞中引起肽表达的一个氨基酸残基序列。

34．根据权利要求33所述的重组细胞，其中所说的肽以一种抗原决定区域形式被所说的细胞表达。

35．根据权利要求33所述的重组细胞，其中所说的细胞是牛痘病毒。

36．根据权利要求33所述的重组细胞，其中所说的细胞是上皮细胞。

37．根据权利要求33所述的重组细胞，其中所说的细胞是肿瘤细胞。

38．一种肽，包括基本上对应于人类乳头状瘤病毒蛋白质的一个区域的约8－30个氨基酸残基序列。

39．根据权利要求38所说的肽，其中所说的区域是所说的蛋白质的一个抗原决定区域。

40．根据权利要求38所述的肽，其中所说的蛋白质是HPV16的E_7蛋白质。

41．根据权利要求40所述的肽，对应于在图7的E_7氨基酸序列中的从约残基1到残基10的氨基酸残基序列。

42．根据权利要求40所述的肽，对应于在图7的E_7氨基酸序列中的从约残基29到残基50的氨基酸残基序列。

43．根据权利要求40所述的肽，对应于在图7的E_7氨基酸序列中的从约残基78到残基81的氨基酸残基序列。

44．根据权利要求40所述的肽，其中所说的蛋白质是HPV16的E_6蛋白质。

45．根据权利要求44所述的肽，对应于在图7的E_6氨基酸序列中的从约残基1到残基20的氨基酸残基序列。

46．根据权利要求44所述的肽，对应于在图7的E_6氨基酸序列中的从约残基8到残基20的氨基酸残基序列。

47．根据权利要求44所述的肽，对应于在图7的E_6氨基酸序列中的从约残基119到残基134的氨基酸残基序列。

48．根据权利要求44所述的肽，对应于在图7的E_6氨基酸序列中的从约残基148到残基158的氨基酸残基序列。

49．一种抑制患者体内的人类乳头状瘤病毒感染的方法，其中包括：

给患者施用足够量的致免疫组合 物以便在所说的患者体内有效地激发针对由人类乳头状瘤病毒引起的感染的免疫保护性应答，该致免疫组合物包括含有编码了一个肽的重组细胞，该肽基本上与由于人类乳头状瘤病毒感染而在哺乳细胞中被诱发的肽的一个区域的氨基酸残基序列、所说的肽或两者的结合相对应。

50．根据权利要求49所说的方法，其中所说的重组细胞是一

种病毒。

51．根据权利要求50所说的方法，其中所说的病毒是一种牛痘病毒。

52．根据权利要求50所说的方法，其中所说的重组细胞选自上皮细胞，成纤维细胞及MHCI级阳性淋巴细胞中的一种细胞。

53．根据权利要求49所述的方法，其中所说的肽包括人类乳头状瘤病毒E_6核蛋白质的一个抗原决定区域。

54．根据权利要求49所述的方法，其中所说的肽包括人类乳头状瘤病毒E_7核蛋白质的一个抗原决定区域。

55．一种抗体分子，它能够与由于HPV感染而被表达的一种争夺所说肽的受体。

56．根据权利要求56所述的抗体，其中所说的肽包括HPV的E_7蛋白质的一个区域。

57．根据权利要求56所述的抗体，其中所说的抗体分子是针对所说肽的一种抗－特异基因型抗体。

58．根据权利要求57所述的抗体，其中所说的肽对应于在图7的E_7氨基酸序列中从约残基29到约残基50的氨基酸残基序列。

59．根据权利要求55所述的抗体，其中所说的肽包括HPV的E_6蛋白质的一个区域。

60．根据权利要求59所述的抗体，其中所说的抗体分子是针对所说肽的一种抗－特异基因型抗体。

说　　明　　书

人类乳头状瘤病毒肽的表达以及在致免疫组合物中的应用

本发明涉及重组细胞、肽、抗体、组合物以及能够用来抑制和治疗人类乳头状瘤病毒（ＨＰＶ）感染和细胞转化的方法。

包含并表达一种编码了ＨＰＶ一个蛋白区域的ＤＮＡ插入物或一种由哺乳动物细胞中的ＨＰＶ基因诱发的肽的重组细胞被制备出来，例如像表达ＨＰＶ E_6 或 E_7 核蛋白基因产物的一个抗原决定区域的重组牛痘病毒，或包含和表达ＨＰＶ的 E_6 或 E_7 核蛋白基因产物的一个区域的转染的或重组病毒感染的重新构建的成纤维细胞，上皮细胞，淋巴或肿瘤细胞。与 HPV_{16} E_6 和 E_7 蛋白的抗原决定区域相应的特异肽已被制备出来，而且这些肽已被用于致免疫组合物和疫苗中。并描述了抑制和消退患者体内的ＨＰＶ感染和肿瘤发展的治疗和预防的方法。

对实验动物，特别是啮齿动物的研究表明大多数由致瘤病毒引发的肿瘤表达了由病毒基因组编码的抗原，而且采用这些抗原的免疫法可导致随后的由相同病毒诱发的肿瘤细胞激发的排异反应。尽管这些研究的大部分是利用实验室病毒株进行的，例如 SV_{40}，多瘤病毒，及Friend, Moloney, 或 Rauscher 鼠白血病病毒，但实际上瘤诱发病毒的水平和垂直传染已被证实：现在确实可以得到对抗病毒诱发的猫白血病和肉瘤的商业疫苗。

相比之下，大多数人类癌症的病毒病原学说尚未被证实，可能的例外是肝炎病毒（肝细胞瘤），Epstein Barr 病毒（鼻咽癌），以及人类乳头状瘤病毒（ＨＰＶ１６）（宫颈癌）。然而，在过去的二十年中，已经证实，某些人类肿瘤细胞表达肿瘤抗原，即能够将肿瘤细胞与其正常细胞区别开的抗原，某些患者对于这些抗原产生细胞－传导的或体液免疫应答（Hellstrom 等，１９６８年，Nature，220：1352；Morton 等，１９６８年，Science，162:1279-1281；Shiku等，1976，J.Exp. Med. 144:873-881）。这些免疫反应的某些靶是由人类基因组编码的胎儿瘤抗原或分化抗原（Hellstrom 等，１９７０，Int. J. Cancer 6: 346-351）。

直到目前为止，肿瘤抗原的分子特性仍是未知的，而且肿瘤的这种免疫学反应的特异性程度也不清楚。而试图将这些信息用在发展癌症的诊断测定或癌症的治疗方面的作法也很不成功。由于肿瘤的自发消退几乎罕见，因此，人们可以得出结论，即在玻璃试管中被证实的免疫应答并非在体内有效。例如，来自癌症患者体内的抗体及淋巴细胞可有效地用于杀灭玻璃试管内的肿瘤细胞，而同一癌症患者的免疫应答在体内却不足以阻止肿瘤的发展。

由Kohler 和 Milstein 所发展的单克隆抗体技术（１９７５年，Nature，256:495-497）引导了对于人类肿瘤抗原的深入的研究，因为该技术不仅在分子水平上而且在特异性方面为定义这样一些抗原提供了手段（Hellstrom 和 Brown，1979，in The Antigens，M.Sala，ed.，Academic Press，Vol. V:1-66）。

在过去几年中，已描述了大量的与肿瘤有关的抗原，其中大多数已采用小鼠单克隆抗体进行了定义（Reisfeld 和 Sell eds. 编辑，

1985年，in Monoclonal Antibodies and Cancer TIlerapy, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Serres, Vol.27, Alan R. Liss, Inc. New York, pp.1-609)。虽然实际上所有已明确描述的抗原都已被证明是胎儿瘤或分化抗原，而且它们对于肿瘤的特异性已被发现是定量的而不是定性的，有几种抗原对于肿瘤细胞和正常细胞具有足够的特异性（通常对应一个10到1000倍的因子），以致可以用作鉴别肿瘤细胞和治疗的潜在目标。针对肿瘤抗原的人类单克隆抗体也已得到（Cote 等，1983年，Proc.Natl. Acad.Sci. 80:2026-2030）。这就支持了前面所引用的证据，即某些癌症患者增强了对其肿瘤的免疫应答。许多这些肿瘤抗原是由人类染色体编码的，而在某些情况下，这些肿瘤抗原是内原性或外原性病毒感染的结果。

人类乳头状瘤病毒是众所周知的在其宿主内产生上皮细胞瘤如疣和乳头状瘤的传染剂。普通手疣和足跖疣是人类最常见的皮肤损害；然而，在男性和女性中的鳞状细胞癌和生殖器癌也普遍与某些HPV感染株有关。

乳头状瘤病毒基因组包含一个具有约5，000千道尔顿(KDa)分子量的双股环状超螺旋DNA分子。该基因组在8和10个蛋白质之间编码，这个数目还不确定，因为尚未将一种功能或蛋白质产物赋予基因组的每一个开放阅读构架（ORF's）。在复制早期疣形成的ORF's最初被指定为E，而后来形成的那些ORF's被指定为L。但是这种指定已不再有效，且已经发现某些E基因产物形成于感染的早期和晚期。

HPV感染与子宫颈癌和其它人类非生殖器癌有很大关系（Zur

Hausen 等，1989，Cancer Res. 49:4677-4681；Galloway等，1989，Adv. Virus Res. 37:125-171）。一种HPV类型，HPV_{16}，通常与严重发育不全和宫颈癌有关（Galloway等，Supra；Ikenberg 等，1983，Int. J. Cancer 32:563-565），在这种疾病中，某些病毒 E基因及其蛋白质产物已显示出突出的作用。采用一种通讯基因，如氯霉素乙酰转移酶，所进行的试验区表明，E_6 基因转移激活了HPV DNA的非编码段（Phelps 等，1988. Cell 53:539-547）。E_7 核蛋白质已显示出在哺乳动物细胞中转化和保持恶性表现型的作用（Tsunokawa等，1986年，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2200-2203；Kanada 等，1988年，J. Virol. 62:610-613；Crook 等，1989年，EMBOJ. 8:513-519）。

对于实验动物，通常为小鼠的研究已表明，采用活的或死的癌症细胞的免疫接种可以导致随后由能成活的癌症细胞激发的排异反应。在许多情况下，负责保护作用的靶抗原已被按病毒编码，但在其许多情况下，激发一种保护性免疫应答的抗原的特性仍是未知。

建议在人体上应用癌症疫苗的一个主要的、理论上的反对意见是，“接种”例如被杀灭的癌细胞或没有细胞的制剂的人可能是免疫学上无应答的。据信这是经常发生的，因为在某些正常细胞中存在可以作为免疫应答 靶肿瘤抗原，虽然仅仅是微量的，而且被免疫系统视为“自身”。针对这种“自身”抗原的免疫接种，如果有效的话，可能导致一种自身免疫应答。大多数的（如果不是所有的）由单克隆抗体在人类肿瘤中检测出来的与肿瘤有关的抗原还存在于某些正常组织内，而且几乎没有证据证明癌症患者在体内对这些抗原具有有效的响应。另一方面，对于人类免疫系统是外来的一种抗原，例如，一种被

致瘤病毒，如HPV$_{16}$编码的抗原，应该很可能诱发一种强的免疫应答。为预防病毒感染和细胞转化而利用重组DNA技术生产疫苗包括在一种适当的载体中分子克隆和表达编码了病毒蛋白的遗传信息，所说病毒蛋白能够在宿主动物中针对该蛋白质激发免疫应答。一种新的对于这种疫苗的制备可能是有用的方法已被描述（Mackett等，1982年，Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 7415-7419; Mackett 等，1984年，J. Virol. 49:857-864; Panicali 等，1982 年 Proc. Natl. Acad. Sci. 79:4927-4931）。该方法包括将牛痘病毒用作载体来表达插入其基因组中的外来基因。由于引入到宿主动物中后，该重组的牛痘病毒表达该被插入的外来基因，并且因此激发对该基因产物的宿主免疫应答。由于这种活的重组牛痘病毒能够被用作一种疫苗，所以，该项方法结合了亚单元和活疫苗二者的优点。

表达来自外来病毒的抗原的重组牛痘病毒已被发现在实验动物中诱发，对外来病毒刺激的抗性。实例包括表达一种HSV糖蛋白(Cremer 等，1985, Science 228:1985)，一种狂犬病毒表面抗原（Blancou等，1986, Nature 322:373）的重组疫苗病毒，非表达HPV16就是表达牛乳头状瘤病毒蛋白（Lathe等，1989, in Vaccines for Sexually Transmitted Disease, A. Meheus 和 R.E. Spiel, eds, Butterworth Co. pp. 166-177）以及一种流感病毒核蛋白的重组疫苗病毒（Smith等，1983，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7155; Yewdell 等，1985，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1785)。已有报道说，表达流感病毒核蛋白的重组牛痘病毒在免疫接种的小鼠体内诱发了对流感病毒特异的T细胞中介的免疫性（Bennink 等，1984 年，Nature 311:578）。此外，利用被表达流感

病毒核蛋白的重组牛痘病毒感染的靶细胞，已证实流感病毒核蛋白被流感阳性血清供血者的细胞毒素T细胞识别出来（McMichael 等，1986年，J.Gen. Virol. 67:719）。类似地，最近已发现，被一种表达HSV糖蛋白的重组牛痘病毒感染的人的靶细胞被HSV特异的人CTL克隆所识别。（Zarling 等，1986年 J.Virol. 59: 506)。

本发明涉及重组细胞，肽，抗体，组合物以及抑制和治疗人类乳头状瘤病毒感染和肿瘤抑制或退化的方法。

本发明的重组细胞包含一个编码了肽的基因，该肽基本上对应于一个由于人类乳头状瘤病毒感染而被表达的肽的氨基酸残基序列，如一种基本上对应于E_6和／或E_7基因产物的一段区域或HPV蛋白质的一段或多段区域的嵌合肽化合物的肽。这种肽能够基本上对应于一种由于HPV感染而被表达的HPV蛋白或对应于一种由于将HPV基因插入到哺乳动物细胞内而被表达的细胞肽。本发明的重组细胞包括通过含有编码了人类乳头状瘤病毒的一个蛋白质段的附加的DNA被分别转染或转化的真核和原核细胞。作为例证的重组细胞包括细菌、病毒如牛痘病毒，哺乳动物细胞如转染的上皮或成纤维细胞或淋巴细胞和编码了这样一个与HPV有关的蛋白质段的肿瘤细胞如子宫颈癌细胞。激发B细胞和／或T细胞应答的可溶性蛋白质和肽也被包括在本发明之中。

与这样一些蛋白质和肽相仿的和／或与之竞争结合位点的抗体分子也被包括在本发明之中。特别优选的抗体是针对与HPV16 E_6和／或E_7蛋白的特异区域相对应的肽的抗体和针对这些抗肽抗体的抗特异基因型抗体。

本发明的组合物包含如上所述的重组细胞，抗体和／或肽，且最

好是表达人类乳头状瘤病毒的E_6或E_7核蛋白的抗原决定区域的重组细胞和/或肽。本发明的组合物最好是能够在受体中激发一种免疫保护应答的致免疫组合物。

所述的重组细胞、肽，和组合物被用在抑制和治疗HPV感染和肿瘤产生和/或消退的方法中。在本发明的一个治疗由人类乳头状瘤病毒感染而产生的疾病的方法中，将治疗有效量的含有本发明重组细胞和/或肽的组合物施予患者一段足以抑制这种疾病进一步发展的时间。

还构思了一种在发现人类乳头状瘤病毒感染后抑制肿瘤发生的预防方法。在该方法中，将治疗有效量的本发明组合物施予患者以便在该患者体内激发一种保护性应答，从而抑制在病毒感染细胞中肿瘤的发生。本发明还涉及一种抑制患者体内的人类乳头状瘤病毒感染的方法。在该方法中，足够量的致免疫组合物被施予患者以便有效地在患者体内激发一种免疫学保护应答以抑制人类乳头状瘤病毒的感染。

致免疫组合物还可以被配制成包含表达HPV蛋白的抗原决定区域的重组细胞。例如，这样一些组合物可包含一种主要组织相容性复合物（MHC）I级阳性的非致瘤细胞，在该细胞内，已插入一种编码了HPV蛋白的致免疫区域的基因。该组合物的重组细胞则可以被施予患者以便通过激发起针对该被表达的肽区域的致免疫应答，促进对肿瘤的排异作用。该肽区域也在肿瘤细胞中被表达。

该致免疫组合物还可被配制成一种疫苗，在这种情况下，免疫原包括表达人类乳头状瘤病毒蛋白质的抗原决定区域的一种重组细胞。取决于被用作免疫原的重组病毒的特性，既可配制出灭活的病毒疫苗，也可配制出活的病毒疫苗。用本发明的这种疫苗成分或致免疫组合物

进行适当的免疫接种能够导致诱发一种免疫应答，该免疫应答在被免疫物体中导致了表达HPV抗原决定区域的肿瘤细胞的破坏，同时也抑制了HPV感染。本发明优选的重组细胞包括编码和表达E_6或E_7 HPV16核蛋白的抗原决定区域的牛痘病毒，及上皮细胞，成纤维细胞，淋巴细胞，血细胞和被E_6或E_7 HPV16基因转染的肿瘤细胞。

本发明进一步的优越性和有益性通过下面的具体描述，实施例以及随后的权利要求，对于本领域的普通技术人员来说将是显而易见的。

在附图中：

图1表示将HPV16 E_6开放阅读构架克隆成两个表达载体。

A．E_6开放阅读构架（ORF）取自HPV16全长DNA并作为钝端了的DdeI片段被克隆到已用SmaI切割了的牛痘表达载体pGS62中。

B．E_6 ORF在pIC20H中被克隆以便在5′端引入HindIII位点，用于在如下所描述的$pCDM_8$表达质粒中的CMV启动子下段的定向克隆点。在未转译的E_6 ORF的5′端有58个碱基对，在3′端有98个碱基对。

图2表示将HPV16 E_7开放阅读构架克隆成为两个表达载体。

A．E_7开放阅读构架被作为TaqI，PstI片段，从全长度HPV16 DNA中克隆到已被ClaI和PstI切割的pIC20R中。E_7 ORF在EcoRI点处被克隆到牛痘表达载体pGS62中。

B．E_7 ORF被克隆到pIC20H载体中，以在该基因的5′端引入一个HindIII位点并置于$pCDM_8$载体中的CMV启动子的

控制下。对于E_7有56个ORF来说是未转化序列5′的碱基对，且有24个对于E_7 ORF来说是3′的碱基对。

图3表示由表达HPV16 E_6蛋白的两个不同的斑点纯化的重组牛痘病毒所感染的细胞所得到的溶胞产物的放射免疫沉淀法的放射自显影像。

牛痘溶胞产物按照例5所述制备，实行放射免疫沉淀法并且对沉淀电泳。通道1，3，5表示采用兔子对E_6的抗血清（由D.Lowy提供）所得的结果；通道2，4和7采用正常的兔子血清，而通道6采用兔子的抗E_7血清（α16E_7NP）。抗原被注解在通道编号上方。溶胞产物从被标记了感染的细胞中制备，而且电泳胶是17.5%的聚丙烯酰胺。

图4表示采用抗HPV16 E_6或E_7核蛋白的兔子抗血清沉淀的重组牛痘溶胞产物的放射自显影图像。

牛痘重组被感染细胞用^{35}cys和^{35}Met标记一小时。感染病毒被注解在通道号上方。施加放射免疫沉淀法，从而使通道1和5表示用抗HPV16E_6兔子血清（D.Lowy）所得的结果，通道2，4和7表示采用正常兔子血清所得的结果；而通道3和6表示用α16E_7NP得到的结果，标准的被染色的分子重量标记的位置注解在右侧，而E_6和E_7的位置注解在左侧。

图5表示E_7蛋白稳定性的脉冲跟踪研究。

牛痘病毒感染的细胞如此后所述的，用^{35}S－Cys和^{35}S－Met脉冲标记一小时，然后，用非标记介质保温一段时间，这段时间表示在通道号上方。感染病毒（vNY或vHPV16／E_7）被列在时间标记上面。在所指示的时间段之后，为在17.5%的丙烯酰胺凝胶

上作放射免疫自显影分析，将细胞溶解并保持在0～4℃。奇数通道表示α-抗E_7 NP沉淀产物，而偶数标号的通道表示正常兔子血清免疫沉淀产物。分子量标记表示在右方。

图6表示E_7基因产物的放射免疫沉淀法，该产物是在用pCDM$_8$-E_7哺乳动物表达质粒短暂转染的COS细胞中被表达的。

通道1和3表示了对于用兔子抗Trp E/E_7沉淀的蛋白质所得到的结合方式。

通道2和4表示对于用正常兔子血清沉淀的蛋白质所得到的结合方式。

N＝核组分

C＝细胞浆组分

A．牛痘E_7重组溶胞产物被用来作为对E_7蛋白质的阳性对照。

B．pCDM$_8$ E_7转染的COS细胞。

C．未转染的COS细胞。

图7表示HPV16 E_6和E_7核蛋白质的氨基酸残基序列。

图8表示针对HPV16 E_7蛋白的肽3-9的两个单克隆抗体的滴定法。空白方块表示杂种瘤克隆#14，实的方块表示杂种瘤克隆#10。

图9表示抗E_6肽的抗血清滴定法的Western 印迹。用来自E_6 ORF的肽对兔子免疫接种三天后取得的抗E_6肽血清仅仅针对同系的特异的Trp 溶合蛋白质（16 E_6 DS）在Western印迹道上作滴定。编号(1)和(2)表示用相同的肽进行免疫接种的两个不同的兔子。

图10表示抗E_7肽的抗血清滴定的Western印迹。加强接种后三天从用E_7 ORF的肽免疫接种的动物上取得抗E_7血清针对特异的

Trp融合蛋白（16E7NP）在Western印迹上滴定。编号(1)和(2)表示用相同的肽进行免疫接种的两个不同的兔子。

图11表示抗E_6和E_7肽的抗血清的两种稀释度的Western印迹。来自用E_6或E_7肽免疫接种的兔子的血清针对特异的Trp溶合蛋白和TrpE载体基因产物用Western印迹来证实血清中的反应性是专门针对HPV16E_6或E_7蛋白的。按照前述滴定法，最高血清稀释比被选择为靠近反应活性的终点。

用作原免疫原的特异性肽（以编号表示）被列在每组硝化纤维素通道的上面；每个通道中的抗原被表示在凝胶的顶部且所采用的两种血清稀释度被表示在底部，括号的下面。M表示预先染色的分子量标记。血清样品在第一次或第二次加强接种后一周后被抽出供这些研究所用。抗血清α358，α360和α361在第二次加强接种后一周得到。抗血清α359在第一次增加强接种后的一周得到。

图12表示抗E_7肽的抗血清对E_7天然蛋白的识别。来自第一次加强接种后一周从兔子抽取的抗肽359的抗血清被用于对^{35}S-蛋氨酸及^{35}S-半胱氨酸标记的牛痘E_7重组感染细胞溶胞产物的放射免疫沉淀测量。对照α16E_7NP（通道1）使17-18KDa带段发生沉淀，α359兔子血清（通道3和4）同样使相同分子量的带段发生沉淀，而α360血清（通道2）未能使E_7段沉淀。在右侧可看到分子量标记。

图13表示对来自HPV16E_7转染物的细胞质RNA和RT-PCR分析。通道包含（从左到右）pCDM$_8$／E_7质粒，作为阳性的PCR控制；分别来自N7．4和N7．2细胞的细胞质RNA，这些细胞是NCTC2555衍生的HPV16E_7转染物；NCTC

2555细胞作为阴性对照；E_7 C_3 是M_2 黑素瘤衍生的HPV16 E_7 转染物；而且M_2 黑素瘤细胞作为一个阴性对照（par）。标准的碱对标记在左侧可见。

图14表示在C_3 H／HeN小鼠体内的E_7 C_3 肿瘤的生长情况。在方框A中，在肿瘤细胞接种前用NCTC2555成纤维细胞使小鼠免疫，上述成纤维细胞已被HPV16 E_7（N7．2和N7．4，分别为空白三角和涂实的圆圈7或HPV16 E_6（N6.8，空白三角）基因转染。方框B表示在E_7 C_3 肿瘤细胞接种之前，与用$N_{7.2}$对小鼠的免疫接种相对照通过给小鼠接种磷酸盐缓冲液（PBS，空白方块）或被人类黑素瘤抗原P97（CL19，涂实的三角）转染的NCTC2555成纤维细胞所进行的研究，方框C表示在接受E_7 转染的NCTC2555成纤维细胞（$N_{7.2}$）免疫接种的小鼠体内的亲代M_2 黑素瘤细胞（par）的肿瘤生长情况。

图15表示抗－CD_8 抗体对在接受$N_{7.2}$细胞免疫接种的小鼠体内的肿瘤生长的治疗效果。随着免疫接种后，在施予E_7 C_3 肿瘤细胞之前，给小鼠注射抗CD_8 抗体（涂实的圆圈）或注射抗－CD_5 抗体（空白三角）。

图16表示来自接受抗－CD_8 单克隆抗体（右组）或抗－CD_5 单克隆抗体（左组）治疗的小鼠的CD_4 阳性和CD_8 阳性的脾细胞的动态血细胞计数分析。

本发明涉及重组细胞，肽，抗体，组合物，及用于抑制和治疗人类乳头状瘤病毒感染和肿瘤发生的方法。重组细胞包括一种编码了HPV蛋白，最好是E_6 和／或E_7 HPV核蛋白的DNA结构这些重组细胞表达一个多肽的抗原决定区域，该肽基本上与哺乳动物细胞中由于诸

如通过HPD感染或重组方式插入一个HPV基因后在该哺乳动物细胞中被表达的肽相对应。在一个优选的实施例中，本发明的肽基本上对应于HPV蛋白的约8到30个氨基酸残基段。在一个特别优选的实施例中，本发明的肽基本上对应于HPV16E_6或E_7蛋白的一个区域，并具体是对应于一个当将其施加给宿主时能够用抗体和 或T细胞表面分子激发免疫反应的抗原决定区域。本发明还包括这些重组细胞的组合物，及能够被用作致免疫组合物的肽，免疫治疗法或用于治疗患者的疫苗。在此还考虑了能够与这些肽竞争结合位点的抗体分子。具体地说，产生出抗HPV16E_6和／或E_7蛋白的结合区域的抗体分子，及对抗这些抗体的抗特异基因型抗体，它们竞争在正常细胞蛋白和肿瘤细胞蛋白上的HPV结合位点，如与HPV16E_7蛋白结合的视网膜胚细胞瘤基因产物（RB105）。本发明还涉及抑制和治疗人类乳头状瘤病毒感染和瘤形成的方法。本发明一些具体的方法涉及治疗由HPV感染引起的疾病，和在发现HPV感染后抑制和消退细胞中肿瘤的预防方法。本发明的另一方面涉及抑制患者体内HPV感染的方法。

为了更清楚地描述本发明及其实施例，下列定义被包括其中。

在此使用的“转染”是指通过将附加DNA掺入到真核细胞中，获得新的遗传标记。

在此使用的“转化”是指通过将附加DNA掺入到原核细胞中，获得新的遗传标记。

在此使用的“瘤形成”是指细胞获得导致非受控细胞增殖的肿瘤特异表现型。

在此使用的“克隆载体是指任何可插入外来DNA以进行克隆的

质粒或病毒。

在此使用的“质粒”是一种自主的自身复制染色体外的环状DNA。

在此使用的“开放阅读构架（ORF）”是指（潜在地）可被转译成蛋白质的DNA序列。

在此使用的“辅助病毒”是提供缺陷性病毒所缺少的功能的一种病毒，使后者能够在混合感染过程中完成感染循环。

在此使用的“基因（作用子）”是编码了一个肽链序列DNA片段；它可包括编码区域之前和之后的区域（前端和尾部），还有个别的编码段（exons）之间的介入序列（introns）。

在此使用的“表达”是通过一结构基因来产生一种肽或蛋白质所经历的过程。它是转录和转译的结合。

在此使用的“克隆”一词描述具有单一祖先细胞或分子的任何数目的等同细胞或分子。

在此使用的“碱基对”（bp）一词是在DNA双螺旋结构中腺嘌呤（A）与胸腺嘧啶（T），或胞嘧啶（C）与鸟嘌呤（G）的组合。

在此使用的“表达载体”一词是可以插入和／或表达外来DNA的任何质粒或病毒。

在此所使用的“下段”一词是指在表达方向前面的那些序列；例如，基因的肽编码区域相对于起始密码子是下段或者沿着远离基因的3′方向；上段是朝向所讨论的序列的5′。

在此使用的“聚合酶链反应”（PCR）一词是指通过成功的使用一种温度稳定的DNA聚合酶复制DNA链来放大DNA分子，通过加热、加入引子分离其互补链，并重复该过程约30次以产生约

10^9个DNA复制品。通过使用PCR技术，微小量的DNA可以被放大并产生足以用在各种不同过程中的DNA。

以其各种不同语法形式出现的“接种物”一词在此用于描述包含有本发明的重组细胞或肽的组合物，作为用于抗体制剂，或抗人类乳头状瘤病毒感染/转形变异细胞的T细胞激发制剂的活性成分。当肽被用来诱发抗体时，应该理解，该肽偶而可被单独使用，而更经常地是与载体相连或结合其它成分，但是为便于表达，这些变化此后将不经常表示出来。

接种物还可包括佐剂。佐剂如完全的Freund's 佐剂（CFA），非完全Freund's佐剂（IFA）以及明矾是本领域内熟知的物质，且可以在商业上从几个货源得到。

单个的接种物很容易用CFA或IFA制备。例如，将一定量的重组细胞或肽结合物溶解于pH7.2的PBS（约0.5毫升）中，其量应足以对每次接种提供所需量的重组细胞或肽组合物。然后，将等容量的CFA或IFA与溶液混合以提供一种接种物，其中包含该重组细胞和/或结合物，水，和佐剂，其中水与油的比例是1：1，此后，均化该混合物给出了一种接种物。这样制备出的接种物的容积一般大于1毫升，且一些重组细胞和/或肽组合物，PBS和佐剂可能在乳化过程中被损失。基本上所有能够被吸回的乳化剂被置于注射器内，然后，如下面所讨论的那样被注入到动物体内。注入到诸如兔子或小鼠这类动物 体内的接种物的数量应该是至少约为在乳化步骤进行之前存在量的90%。

在本发明的接种物中，重组细胞和肽既可以单独被包括，也可以结合到一载体蛋白，如钥孔蜈血蓝素（KLH）加上生理上可接受的

稀释剂，如带有佐剂的水或PBS。KLH是可接受的用于动物体内的载体，但对于商业规模上的使用是很昂贵的，还考虑使用替换的载体，其中包括大豆凝集素，氢氧化铝（alum），牛血清白蛋白（BSA）卵白蛋白，花生凝集素，破伤风类毒素，及聚-L-赖氨酸。皂苷，一种植物产生的葡萄糖苷，也是一种熟知的佐剂，可在商业上从俄亥俄州，辛辛那提的Berghausen化学公司以5%的固溶体形式得到，并在此能与氢氧化铝一起使用。

上述的接种物原溶液是用来说明本发明的接种物的，如在此所证实的，它们可被用来产生抗体分子或激发与本发明的重组细胞和/或肽进行免疫反应的T细胞。

以其各种不同的语法形式出现的“致免疫组合物”一词在此被用来描述一种接种物类型，它包含本发明的重组细胞或肽，即，被用来在宿主动物中诱发免疫活性的一个活性成分。在一个优选实施例中，本发明的致免疫组合物可以是一种疫苗，由于免疫活性既包括抗体的产生，也包括激发起一个细胞的免疫应答，因此疫苗和接种物可包含这些同等的成分，但其用途不同。在多数情况下，用于疫苗的成分和用于接种物的成分是不同的，因为许多用于动物的佐剂不可以被用于人类。

在本发明的研究中所采用的相对较小的肽是在403A型应用生物系统肽合成器上利用Merrifield的固相方法合成的（1963，J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154），该文献被结合在本申请中。在该序列的C端或N端插入了一个增加的半胱氨酸残基。当从树脂中分裂出来并保护之后，该肽被反相高效液态色谱法提纯。在将其用作免疫原之前，通过其半胱氨酸残基，采用双功能试剂马来酰亚磺胺4-(N

－马来酰亚胺甲基）环己糖－羧酶将肽与ＫＬＨ耦合。

在此使用的“合成的”一词是指已由化学手段，即化学合成，构成的肽分子，而不是采用生物学手段，如遗传工程技术，制备的。

在此使用的疫苗和致免疫组合物包含所说量的单独的肽，重组细胞，结合物或其组合。这些致免疫组合物还包含生理学上可容许的稀释剂，如水或盐水，一般还包括佐剂，如完全Freund's 佐剂和非完全Freund's佐剂。

致免疫的原溶液用ＩＦＡ或ＣＦＡ按如下方法制备：足以产生所需每次接种量的一定量的合成肽结合物和／或重组细胞被溶解于磷酸盐缓冲液（ＰＢＳ）中。然后，将等容积的ＣＦＡ或ＩＦＡ与该溶液混合以提供包含该细胞和／或肽，水及佐剂的合成物，其中水与油的比率为１：１。此后混合物被搅匀以得到原溶液。

在此使用的“抗原决定区域”一词是一个结构范围，如能够在宿主中与抗体分子或Ｔ细胞表面分子激发一种特异性免疫反应的分子的一个特异的氨基酸残基序列或肽段。一个抗原决定区域可包含一个或多个抗原决定子和／或致免疫决定簇。

在此使用的“抗原决定基”一词指负责与相应的由相同的或相关的抗原或免疫原激发的抗体（免疫球蛋白）分子或Ｔ细胞表面分子进行特异性反应的分子结构成分。

在此使用的“致免疫决定子”一词指负责在宿主中诱导产生包含一个在用作抗原时与免疫原结合的抗原结合位点（基因型）的抗体或Ｔ细胞表面分子的分子结构成分。

在此可相互变换使用的“抗特异基因型”和“抗特异基因型抗体”二词是指一种抗体，其抗原结合位点特异性地与为抗特定抗原（如乳

头状瘤病毒抗原）而制备的原始抗原的特异基因型相结合，使抗特异基因型抗体与抗原始抗体竞争与抗原的结合。

在此使用的“抗原”一词是指被一种由于对所提出的结构成分的应答而产生的抗体或T细胞表面分子所结合的实体。

在此使用的“免疫原”一词，描述在宿主动物中诱发产生抗体或特异性T细胞应答的实体。

“单位剂量”一词指对动物适合作为单元剂量的物理上离散的一些单位，每个单位包含预定量的活性物质，该预定量的活性物质与所需稀释剂（即一种载体或赋形剂）结合在一起能产生所期望的治疗效果。本发明的新颖的单位剂量的规范受下列因素所支配，并直接依赖于它们，即(a)活性物质的独特的特性以及要取得的特定的治疗效果，和(b)在合成这种治疗用的活性物质的技术领域内固有的限制。

在此使用的“有效量”一词意指足以有效地抑制由于HPV感染而引起的细胞的感染和／或肿瘤的发生。

对于特定患者来说的有效量可以根据诸如感染状况患者的整体健康情况，施用方法，副作用的严重性等这样一些因素而变化。

在此以及在权利要求书中有关肽序列所使用的以其各种不同语法形式出现的“相应”一词意指所述肽序列在氨基和羧基末端的任一端或同时在该两端加上或减去最多3个氨基酸残基，而且在沿该肽和／或多肽序列的特定的氨基酸残基中仅包含保守替换。

上面所使用的“保守替换”一词指一个氨基酸残基已被另一个，生物学相似的残基所替代。保守替换的例子包括用一个疏水残基，如Ile，Val，Leu，或Met 替代另一个或用一种极性残基替代另一种，如Arg和Lys之间，Glu 和 Asp之间或Gln和Asn之间或类似情形的替换。

在一些例子中，由一种带相反电性的离子残基进行的离子残基替换，如Lys替代Asp，已在本技术领域内被确定为是保守替换，因为那些离子基团被认为很少对可溶性提供援助。然而总体说来，由于在此所讨论的替代相对于一个完整的蛋白质来说是在相对较短的合成肽区域上进行的，一个离子残基被另一个带相反电性的离子残基的替代在此被认为是“基团替代”，如由非离子的和离子残基、和大残基如Phe，Tyr 和 Trp以及稍大的残基如Gly ，Ile 和 Val的替代就是基团替代。

在此按其通常的含义使用的“非离子的”和“离子的”残基分别指那些在生理pH值下，不带电或通常带一种电荷的氨基酸残基。示例的非离子残基包括Thr和Gln，而示例的离子残基包括Arg和Asp。

抑制和治疗患者体内的人类乳头状瘤病毒感染，瘤形成和肿瘤的发生是本发明的目的。证实在被感染细胞中的乳头状瘤蛋白和肽的表达鼓舞本发明者去研究在此所描述的重组细胞、肽和方法。

本发明的重组细胞包含一个基本上与人类乳头状瘤病毒的一个ＤＮＡ区域相似的基因插入物。在一个实施例中，基因插入物编码了ＨＰＶ１６E_6和／或E_7核蛋白的区域。在一个特别优选的实施例中，E_6和／或E_7蛋白的抗原决定区域被表达。在另一个实施例中，基因插入物在含有该基因插入物的重组哺乳动物细胞内诱发了细胞蛋白质的表达。

本发明考虑了诱发ＨＰＶ蛋白区域的表达系统，并包括病毒，如牛痘病毒和腺病毒，成纤维细胞，如ＣＯＳ猴细胞和人类角化细胞，肿瘤细胞如CaSki宫颈癌细胞和黑素瘤细胞，以及其它哺乳动物细胞如上皮细胞和淋巴细胞。在另一个实施例中，ＭＨＣ１级阳性的、且最

好是非致瘤的细胞用一个编码了ＨＰＶ蛋白一个区域的基因转染。在一个特别优选实施例中，一个编码了ＨＰＶ１６E_6和／或E_7蛋白的一个区域的基因被插入到这些ＭＨＣ１级阳性细胞中或在用含有这些基因的重组细胞感染后被表达，且作为一种促使肿瘤退化的方法，将包含这些细胞的致免疫组合物施用于有ＨＰＶ１６诱发肿瘤的患者体内。这种肿瘤退化是随着由致免疫细胞在患者体内诱发的免疫应答而产生的，该应答因而是直接针对肿瘤的。

本发明的重组细胞是表达系统，或细胞，它们包含有编码ＨＰＶ蛋白区域的插入基因结构。本发明的一些说明性的表达系统或细胞包括诸如在一种致免疫组合物或一种疫苗中的病毒如牛痘病毒，还原病毒，腺病毒，脊髓灰质炎病毒以及能够以非致病方式施予患者的其它病毒，能够用ＨＰＶ基因感染、转染或转化的细胞如外周血液淋巴细胞和上皮细胞。本发明的构思包括了能够整合和表达人类乳头状瘤病毒和基因的一个区域的所有细胞。被表达基因产物的氨基酸残基中的一些不会很大削弱致免疫性的变化以及对于E_6和E_7区域来说具有相似的氨基酸残基的特异肽段也在本发明的构思之中。

在一个实施例中，本发明的基因构建物是通过克隆一个ＯＲＦ制备的，该ＯＲＦ与人类乳头状瘤病毒核蛋白的一个区域如ＨＰＶ１６的E_6或E_7蛋白相对应，它是通过限制性内切酶从一个含有更大部分ＨＰＶ１６基因组的质粒上取得的。该限制片段然后通过如Auswbel, F.M 等人(1990, “Current Protocols in Molecular Biology”, Greens Publishing Assoc. and Wiley Interscience) 和 Maniatis, T. 等人 (1982, “Molecular Cloning: A Laboratoy Manual” Cold Spring Harbor Laboratory, NY)描述的标准分子生物学方法被克隆到

表达载体中。

包含所需ＯＲＦ的表达载体然后进一步处理，并被插入宿主细胞的基因组中以通过如同系重组或用选择性压力整合；或通过细胞的病毒感染被引入来产生本发明的重组细胞。

被选取用于将选定的ＯＲＦ片段插入到该克隆载体中以形成重组ＤＮＡ分子的特定位点是由本技术领域的普通技术人员所熟知的多种因素所决定的，这些因素如被表达的肽或蛋白的大小和结构，由宿主细胞产生的基因产物的降解敏感性以及标准终止密码子的位置等。

在一个特别优选的实施例中，本发明的宿主细胞是牛痘病毒。牛痘病毒包括约１８７４碱基对的一个线性双螺旋ＤＮＡ基因组，并在被感染细胞的细胞质中复制。这些病毒在病毒核中包含一个对病毒的感染性是不可缺少的完全的转录酶系统（包括鼠盖酶，甲基化酶和多腺甘酶）。牛痘病毒转录调节序列（启动子）允许通过牛痘ＲＮＡ聚合酶，而不是宿主细胞ＲＮＡ聚合酶开始转录。

在重组牛痘病毒中的外来ＤＮＡ的表达需要将牛痘启动子连结到外来基因的蛋白质编码ＤＮＡ序列上。已构建了质粒载体，也称插入载体，用于将外来基因插入牛痘病毒中。一类插入载体由下构成：(a)包括转录起始位点在内的牛痘病毒启动子；(b)几个用于插入外来ＤＮＡ片段插入物、位于转录开始位点下游段的独特的限制性内切酶克隆位点；(c)在启动子侧面的非必需牛痘病毒ＤＮＡ（如ＴＫ基因等）以及将该外来基因插入物引导进入该病毒基因组的该同系非必需区域中的克隆位点；和（ｄ）复制的一个细菌源以及在大肠杆菌（E.Coli）中复制和选择用的抗菌素抗性标记物。这样一些载体的实例已由Mackett (Mackett 等人, 1984, J.Virol. 49:857-864) 描述过。

重组牛痘病毒产生于含有外来基因的重组病毒插入质粒被转染到以前被牛痘病毒感染的细胞中之后。同系重组在被感染的细胞内发生并导致外来基因插入到病毒基因组中。被感染的细胞可利用免疫学技术，ＤＮＡ斑快杂交，或对最终可被分离的重组病毒的遗传学选择被筛选出来。这些牛痘重组体保留了其基本的功能和感染性，并可被构建成包含约３５千碱基对的外来DNA。外来基因表达的检测可通过利用Northem 印迹法或点印迹法及核酸杂交检测ＲＮＡ含量或通过利用免疫检测法（例如，放射免疫沉淀法，放射免疫检测法，或免疫印迹法）检测蛋白水平来进行。

本发明的肽和肽结合物包含了基本上与被表达的ＨＰＶ蛋白质的一些区域相应的氨基酸序列。肽最好对应于在本发明的重组细胞中被表达的ＨＰＶ诱发蛋白质的那些区域。特别优选的肽对应于ＨＰＶ１６E_6和／或E_7蛋白的抗原决定区域。肽既可以采用上面所提到过的Merrifield 的固相合成法制备，也可以采用标准的遗传工程方法。

包含本发明重组细胞和／或肽的组合物被用作为致免疫组合物，疫苗和治疗组合成。在一个实施例中，一种包含了表达ＨＰＶ１６E_7蛋白抗原决定区域的重组牛痘病毒的组合物被用作致免疫组合物，它能够在患者中针对ＨＰＶ感染和／或肿瘤发生激发保护性应答的。

本发明的组合物，除了在此描述的重组细胞或肽以外，还包含生理上相容的稀释剂如水或盐水，并且一般还包括上面描述过的佐剂。

本发明还包含给患有由ＨＰＶ感染而导致的疾病的患者施用有效量的最好是表达ＨＰＶ抗原决定区域的重组细胞和／或肽。

一般，本发明的重组细胞和／或肽是以药物组合物形式被施用，组合物包含有效量的重组细胞和／或肽以及一种药物载体。当非经

肠胃道施用时，本发明组合物被配制成与一种药物载体结合的可注射的单位剂量形式（通常为溶液，悬浮液或乳化液）。这样一些载体本身是无毒的和无治疗作用的。这种载体的例子是普通的盐水，Ringer氏溶液，葡萄糖液和Hank氏溶液。非水性载体如不易挥发的油和乙基油酸盐也可被使用。一个优选的载体是5%的葡萄糖／盐水。载体可包含微量的添加剂如增加致免疫力，等渗性和化学稳定性的物质，例如缓冲剂和防腐剂。总的说来，对于注射有用的载体在本领域内是熟知的。

由本发明重组细胞和肽产生的（诱发的）抗体和基本上的全抗体，以及由这样一些抗体制备的抗原结合位点和对这些抗体和／或抗体片段制备的抗特异基因型抗体构成了本发明的另一个实施例。这种抗体在哺乳动物宿主中，如小鼠、大鼠、几内亚猪、兔子、马及类似动物中，通过采用以上面描述过的接种物或用于形成抗特异基因型抗体的结合到载体上的单克隆抗体所产生的免疫作用而形成的。

在一个优选实施例中，本发明的抗体分子包括通过用包含以上所述的重组细胞和／或肽或抗肽抗体的接种物进行免疫接种在哺乳动物中形成的全抗体。

针对E_6和E_7的特异肽制备的抗体将允许E_6和E_7细胞同系物的检测。例如，肽，如肽359，包含称为RB105的视网膜胚细胞瘤基因产物的部分结合区域。针对这些肽的抗体可模仿RB105并结合到与E_7同有序列同系物的细胞蛋白上。这种E_7细胞同系物的识别有可能可以识别出负责细胞增殖的细胞蛋白以及可能是RB105普通配位体的细胞蛋白。这样一些抗体的抗特异基因型会模仿E_7并识别出除E_7本身的RB105的配位体或其同系物，即细胞增殖蛋

白质。这样可导致识别其它一些与细胞增殖蛋白反应的与起上调或下调增殖作用的细胞蛋白质，如肿瘤抑制基因蛋白或转化蛋白。类似的研究可应用于E_6和它的配位体p53以及E_6或p53其它未知的配位体。

用在完全Freund氏佐剂中包含50微克至1.0毫克的重组细胞和／或肽结合物的接种物为兔子进行免疫接种，两到三周后，用在非完全Freund氏佐剂中的10微克至1.0毫克的重组细胞或结合肽进行加强接种。每个兔子的免疫法包括在背部十次真皮下的注射，其中两次在肩胛下的区域，并在五个位点进行加强接种，一个是在肩胛下的区域。在开始注射后两周和加强注射后一周（5～8天）对兔子进行抽血。

包含有免疫活性抗体的血清然后可采用本领域内的已知方法从血液中产生出来。这些抗体对于本发明的一个或多个肽是具有免疫活性的。这样一些抗体然后可被类似的方法用来产生本发明的一个或多个肽的抗特异基因型抗体。

适当的单克隆抗体，一般是全抗体，也可采用Niman等人，1983. Proc. Natl. Acad. of Sci. USA 802 4949所描述的杂交瘤技术进行制备，上述描述通过引用被结合到本申请中。简单说来，为形成产生单克隆抗体的杂交瘤，将骨髓瘤或其它自身延续的细胞系与用本发明的重组细胞或肽或抗体超免疫接种的哺乳动物的脾中得到的淋巴细胞相融合。

优选的是骨髓瘤细胞系来自同种的，如淋巴细胞，但交叉种的杂交可以在裸鼠中产生。一般情况下，Balb/c株的小鼠是优选的哺乳动物。适合用在本发明中的鼠骨髓瘤包括AG－8细胞和NS－1细胞

一般采用聚乙二醇，如ＰＥＧ１５００或ＰＥＧ６０００将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。被融合的杂种按其对于ＨＡＴ介质（次黄嘌呤，氨喋呤，胸苷）的敏感性进行选择。产生本发明的抗体分子的杂种瘤利用此后描述的与免疫吸收测量法相关的酶被鉴别。

单克隆抗体不仅需要从杂种瘤上清液得到，通常还可以以更浓的形式从已引入所需杂交瘤的哺乳动物腹水液中得到。利用腹水液制备单克隆抗体是已有技术，且在此将不再讨论。

本发明还构思了用于抑制和治疗患者的ＨＰＶ感染以及由ＨＰＶ感染引起的疾病的方法。

在一个实施例中，治疗由ＨＰＶ感染引起的疾病的方法包括给患者施用治疗有效量的本发明组合物一段足以抑制疾病发展的时间。示例说明的疾病包括宫颈疣和人类子宫颈癌，其中用本发明组合物的治疗阻止或延缓了患者疾病的进一步发展。

还构思了另一个预防方法，根据对于向患者体内施加治疗上有效量的本发明的合成物而激发的一种抑制肿瘤发生的保护性应答进行ＨＰＶ感染的检测以抑制患者体内肿瘤的发生。包含本发明重组细胞和／或肽的致免疫组合物的施用最好激发　引起抑制患者体内肿瘤发生的$CD8^+$淋巴细胞的补充。

在本发明还构思了抑制有接触ＨＰＶ危险患者的ＨＰＶ感染的方法。在该方法中，足够量的包含本发明重组细胞和／或肽的致免疫组全物被施予患者以有效地在患者体内激发一种保护性免疫应答以抑制随后的ＨＰＶ感染。

在一个优选实施例中，致免疫合成物是施用时使患者对ＨＰＶ感染免疫的疫苗。

通过下列意在说明而不是限制的实施例进一步描述本发明。

实施例 1

E_6 和 E_7 的ＯＲＦ构建物的制备

A． E_6

E_6 和 E_7 ＯＲＦＳ是从包含全部ＨＰＶ１６基因组的pＢＲ322质粒（pＢＲ３２２／ＨＰＶ１６）中克隆出来的。６３０碱基对的ＤｄｅＩ片段（bp＃２５－６５４）包含了 E_6 ＯＲＦ。该ＤｄｅＩ片段与ＤＮＡ聚合酶的Klenow片段圆端接并在３％的NuSieve遗传技术级（ＧＴＧ）（ＦＭＣ Bioproducts Rockland ME）琼脂糖中接受凝胶电泳。６３０bp的ＤｄｅＩ段电泳转移到ＮＡ４５ DEAE（Schleicher & Schuell, Keene, N. H）纸上，并被提洗在高盐缓冲液（１．０Ｍ NaCl，０．１毫摩尔 ＥＤＴＡ，２０ 毫摩尔Tris pH ８．０）中在６５℃下先用苯酚然后用氯仿提取，用２个体积的１００％的乙醇沉淀，然后，ＤＮＡ 沉淀物被再次悬浮在 Tris-EDTA CTE$_7$ 缓冲液中（１０毫摩尔Tris-Cl，pH 7.5，１毫摩尔ＥＤＴＡ，pH８．０）。

所利用的牛痘表达载体是pＧＳ６２，它除了将ＥｃｏＲＩ位点从质粒中删除、仅留下一个位于ＳｍａＩ位点下段的ＥｃｏＲＩ位点以外，与pＧＳ２０相同。该载体用ＳｍａＩ线性化，并通过采用腓肠的碱性磷酸酶（ＣＩＡＰ）处理去除磷酸并被凝胶提纯。按如同对从pＢＲ３２２得到 E_6 ＯＲＦ一样的描述从凝胶中回收该片段。E_6 ＯＲＦ加上未转译的由５８bp５′和９８bp３′组成的序列，被连结到pＧＳ６２牛痘表达载体的７．５Ｋ启动子的下段。具有如图１所示结构的重组质粒通过标准分子生物学方法被分离、特征化和繁殖，这些方面如在下列文章中所描述的：Mancatis T. 等人，１９８２年，“Molecular

Cloning: A Laboratory Manual”（Cold Spring 海港实验室，New York, 1982）及 Ausubel, F.M. 等人，1990年，“Current protocols in Molecular Biology”（Green Publishing Assoc. 及 Wiley Interscience）

B. E_7

在pBR322中被克隆的完整的HPV16基因组用TaqI和PstI切开并进行电泳。包含E_7 ORF的374bp片段如按对E_6的描述那样进行凝胶提纯。pIC20R载体（Marsh, J.L. 等，1984，Gene 32:481-485）用PstI和ClaI分切开并凝胶纯化。具有所示结构（图2）的重组pIC20R E_7质粒如上所述地被分离，特征化并繁殖。pIC20R E_7用EcoRI进行处理，并采用凝胶电泳法提纯包含E_7 ORF的片段。

牛痘表达质粒pGS62用EcoRI进行切开，并用肠的碱性磷酸酶处理和凝胶提纯。得到图2所示的包含E_7 ORF和E_7 ORF的56bp的非转译的5′，及24bp3′的重组质粒，对它特征化并繁。

C.

两种重组牛痘表达质粒被扩大并通过CsCl，溴化乙锭平衡离心分离法进行提纯。

实施例2

重组牛痘病毒的构建

E_6或E_7 ORFs的克隆步骤被设计用于在一个恰好是在感染的早期和晚期被表达的牛痘病毒的转录控制元件（7.5K启动因子）的下段的独特的克隆位点处，插入开放阅读构架中（Earl, 等1990

年，J. Virol. 64:2448-2451)。ORFs由牛痘胸苷激酶（7K）基因的左右臂侧接以便于用牛痘病毒基因组的同系重组。

采用由Mackett, M. 等人，1984年，J.Virol. 49:857-864，描述的一般方法，利用同系重组，pGS62／E_6 和pGS62／E_7 被分别插入到胸苷激酶基因内的牛痘病毒基因组中。由Wyetn天花疫苗中得到的亲代病毒，V－NY在三次斑块提纯之后，在BSC40细胞中被繁殖。简而言之，在被亲代型牛痘病毒感染之前将嵌合质粒引入细胞中。该质粒的Tk区域与病毒的Tk区域是同系物。将外来基因插入到牛痘病毒染色体组中的重组的插入质粒提供了重组病毒Tk^-。Tk^- 病毒是在存在包含5－溴脱氧尿苷酸的介质中生长的Tk^- 细胞中选出的。采用三轮斑块提纯方法将重组病毒提纯，且通过将病毒DNAs与从一种细菌载体中提纯出来的^{32}P－标记的E_6 或E_7 DNA进行杂交来识别嵌合病毒。

实施例3

哺乳动物细胞表达质粒pCDM$_8$／E_6 和pCDM$_8$／E_7 的构建

E_6 和E_7 的HPV16开放阅读构架（ORF）在速发早期（IE）巨细胞病毒（CMV）启动子（图1和图2）的下段的HindIII点处被分别克隆到哺乳类表达载体pCDM$_8$（Invitrogen. San Diego, CA）中。通过对从pGS621 E_6 牛痘病毒表达质粒得到的BamHI, EcoRI 片段凝胶提纯、并将它连接到用BamH1，EcoRI切开的pIC20H质粒亚克隆E_6 ORF，以便在E_6 ORF 5′端处获得一个用于定向克隆到pCDM8中的HindIII位点。用HindIII和XhoI消化质粒pIC20H／E_6，E_6 ORF 5由ORF 5′端的58bp和3′端的98bp组成的非转译序列一起被凝胶提纯，并

被连结到HindⅢ，xhoI消化的pCDM8载体中。如前所述地分离出图1所示的重组pCDM8／E_6，对它特征化和繁殖。所形成的菌落用标准的微型制备DNA提纯方法筛选，接着用限制性内切酶处理这些DNA，选择这些酶组合物，以产生对转录方向以正确取向（即从5′至3′）克隆的DNA片段的诊断谱带图形。放大适当的克隆，并用CsCl，溴化乙锭平衡离心分离法纯化它们的DNA。

E_7 ORF被从pIC20R／E_7 中凝胶提纯出来作为EcoRI，PstI片段，并在EcoRI和PstI位点被亚克隆到pIC20H中（图2）。为了在E_7 ORF的5′端引入HindⅢ位点，利用HindⅢ和PstI将E_7 ORF从pIC20H／E_7 取出来。含E_7 ORF的片段被凝胶纯化并与ORF56bp的非转译的HPV序列5′和E_7 ORF24bp的非转译的HPV16序列3′一起，被连结到HindⅢ，PstI切开的$pCDM_8$ 表达质粒中，以产生图2所示的$pCDM_8$ E_7。筛选菌落，进行放大并如上所述地纯化其DNA。

实施例4

将编码了HPV16核蛋白的抗原决定区域的DNA插入到上皮细胞或成纤维细胞中。

对应于人类乳头状留病毒的E_6 或E_7 的至少一个抗原决定区域的DNA核苷酸序列通过以上在例3中描述的方法，随着甘油休克，利用标准磷酸钙沉淀法，被插入到哺乳类表达载体中并转染到上皮细胞或成纤维细胞中。则在转染后，细胞被置于含G418的Iscove氏修正的Dulbecco's介质（IMDM）（1毫克G418／毫升）中。当菌落生长到可见大小时，利用克隆环将它取出，并转移到具有24眼滴定板各个眼内，并在组织培养基中生长到较大数目。部分在液氮

环境下被存储于１０％ＤＭＳＯ，９０％的牛胎血清中，并用作进一步研究。

实施例５

从重组牛痘病毒感染得到的E_6和E_7基因产物的放射免疫沉淀法

针对ＨＰＶ１６E_7及ＨＰＶ１６E_6 TrpE融合蛋白的兔子抗血清被制备（分别为α１６E_7ＮＰ及α１６E_6 Ds，并如Jenison等，1988年，J. Virol. 62:2115-2113中所述的那样由D.Galloway提供。

针对ＨＰＶ１６E_6的兔子抗血清如Androphy等，１９８７，ＢＭＢＯ，６：９８９中所述的那样由D.Lowy(National Cancer Institute, Laboratory of Cellular, Bethesda, MA）提供。

被本发明牛痘重组病毒或Caski宫颈癌细胞（由ＡＴＣＣ得到）感染１２小时的ＢＳＣ４０猴子细胞一个１０cm的培养皿中、在补充有５％的透析过的牛胎血清（ＦＣＳ）、０．２５mCi（毫立方英吋）[^{35}Ｓ]——蛋氨酸、及０．２５mCi（毫立方英吋）[^{35}Ｓ]——半胱氨酸的没有蛋氨酸的培养基中被标记６０分钟。细胞被溶解于１毫升的溶胞缓冲液中（２０mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5% 的 Nonidet p-40, 0.5% 的去氧胆酸盐，０．５％的十二烷基硫酸钠（ＳＤＳ），０．１抑肽酶Tripsin 抑制因子单位／毫升及１mM ＥＤＴＡ）并被短时间地进行超声处理。

通过在４℃时与１０微升正常兔子血清或牛痘免疫兔子血清和蛋白质Ａ－Sepharose 珠一起保温来对溶胞产物进行预纯清处理。离心分离之后，弃去这些小珠。纯清处理过的溶胞产物与兔子αE_6（Ｄ

Lowy）或α16E7（α16E7 NP）免疫血清一起保温，这种血清已通过与未标记的牛痘病毒溶胞物一起保温而被预先吸附。然后，将涂有蛋白A的Sepharose 珠加入到免疫兔子抗体和细胞胞解物的混合物中，并被保温。离心分离之后，小珠用RIPA缓冲液（10mM，Tris - HCl（pH 7.4），0.15 M MaCl，1% NP-40，1%脱氧胆酸盐，0.1%SDS，0.1胰蛋白酶抑制因子单位／毫升抑肽酶）清洗两次，然后相继用高盐缓冲液（10mM Tris-HCl(pH7.4)，2M NaCl，1%NP-40，0.5%脱氧胆酸盐），低盐缓冲液（0.5% NP-40 0.1% SDS溶于PBS中）、1MMgCl₂，1M Tris-Hcl(pH 7.4) 以及RIPA缓冲液清洗。

通过在样品缓冲液中加热沸腾5分钟，将蛋白质从抗体和小珠中释放出来，并用17.5%的SDS-PAGE与预先染色的标准分子量标记比较进行分析。

凝胶放射自显影照片证实了当抗E6的兔子血清（由d.Lowy提供）被用来沉淀溶胞产物时，在E6－牛痘重组体溶胞产物中存在约17KDa分子量的谱带。（图3和4）。而用正常的兔子血清进行沉淀的通道上，或用抗－E6兔子血清沉淀vNY溶胞产物的通道上相应的位置上看不到这种区域谱带。

两种牛痘E6重组体斑块7.1和7.8被扩大，分析得到相似的结果。

当采用以上所述的放射自显影术对E7－牛痘重组体溶胞产物进行分析时，用抗E7兔子血清（α16E7 NP）沉淀后发现了18－20KDa谱带。而在用正常兔子血清进行沉淀或用抗－E7兔子血清对放射标记的vNY溶胞产物进行沉淀的通道中，相应位置上看不到

该谱带。脉冲－跟踪研究（图5）表明E_7蛋白质在合成后2－6小时被降解在携带全部HPV16基因组的Caski细胞中（D.Smotkin 和F.Wettstein，1987年，J.Virol. 61:1686-1689)的E_7蛋白质也已显示出类似结果。E_7蛋白质的迁移与在Caski细胞中观察到的迁移是相同的，这就说明在重组牛痘细胞中制成了全长度的基因产物。

实施例6

从重组COS细胞得到的E_7基因产物的

放射免疫沉淀法

COS猴子细胞被本发明的pCDM8E_7质粒转染，并在培养基中培养48小时。然后按照在实施例5中对Caski细胞所描述的那样，用^{35}S－Met和^{35}S－Cys对该细胞进行标记。如在Sato等，1989，Virology 170:311-315 中所述，将细胞分隔成核，细胞质及细胞膜组分。

如在例5中所述，通过在样品缓冲液中加热沸腾5分钟，将蛋白质释放出来，并用17.5%的SDS聚丙烯脒凝胶与预染色的标准分子量标记比较对蛋白质进行分析。凝胶放射自显影响照片证实了在用抗E_7兔子血清进行沉淀后存在约18KDa的谱带。该结果表示在图6中。

实施例7

Western 印迹分析

E_6和E_7肽致免疫性的Western吸印迹研究是如Jenison等1988. J. Virol. 62:2115-2123 中所述的那样，采用由连结到HPV16E_6或E_7 ORF段的TrpE组成的融合蛋白进行的。

简单地说，融合蛋白被利用其在非离子洗涤剂中的相对不溶性进

行部分提纯。５０毫升诱生的细菌培养物被制成小丸，悬浮在１０毫升Tris-EDTA缓冲液(50mM Tris (pH 8.0) -5mM EDTA)中并用溶菌酶（２毫克／毫升）在０～４℃下消化９０分钟。

分别加入NaCl（５．０Ｍ）和１０％ＮＤ－４０到０．３Ｍ和０．７％的最后浓度，且将混合物在０－４℃下保持３０分钟。让溶液三次通过一个１８号标准单位的针以降低其粘度，并在０－４℃下保持另外的３０分钟。

不溶的组分在１６，０００×ｇ，４℃下离心１０分钟被制成小丸片，悬浮在１０毫升的１０mM Tris (pH8.0)-1.0M NaCl中，并在０°至４℃下保持１０分钟。如上所述那样，将不溶的组分制成小丸片，悬浮在１．０毫升的Laemmli蛋白质样品缓冲液中（Leammli, 1970 年，Nature 227:680)(10 毫升０．６２５Ｍ的ＴＲＩＳ pH6.8, ２０毫升１０％ＳＤＳ，２０毫升甘油，２毫升的２－巯基乙醇，１毫升１．５％的溴苯酚兰（Bromophenol Blue）（在７０％的乙醇试剂中制备），１毫升１．０％的Pyronin Y（Biorad Catalog No. 161-0425，或等价物，在H_2O中制备），和３６毫升的去离子水）并加热至１００℃５分钟。

融合蛋白制品通过用包含０．１％的十二烷基硫酸钠（ＳＤＳ）的１０％的聚丙烯酰胺凝胶电泳　被分离。融合蛋白利用Coomassie兰染色的凝胶的肉眼检查进行定量。每６mm槽盛载的每一定量不溶性蛋白质组分的体积被调节到给出等同于５微克牛血清白蛋白的Coomassie兰染色强度。将蛋白质１００毫安培，１６－１８小时，传递给在２５mM　Tris-195mM 苷氨酸（pH８．５）－２０％乙醇（Western 传递缓冲液）中的硝化纤维素中。印迹被浸泡在含有１０mM　Ｎ－乙基

马来酰亚胺的磷酸盐缓冲液中10分钟，在5%的脱脂干燥乳剂，0.9%的NaCl，0.1%的Antifoam-A (Sigma 化学公司，圣路易斯，Mo.)，0.1%的叠氮化钠及1mM的碘化钾（吸印剂）中保温2小时，并在含有10%的胎牛血清的印迹剂（blotto）中保温1小时。

由50ml诱生的细菌培养物制备抑制试剂，该培养物被制成小丸，悬浮在3.6毫升50mM的Tris(pH 8.5)，5mM EDTA 中并以50瓦功率进行超声处理20秒钟；加入20%的SDS，将溶胞产物加热至100℃5分钟。这种被称为“Blocko”的试剂在（－20℃）下以等分试样形式被存储。为了让TrpE蛋白质样品对Western印迹起阴性对照抗原的作用，将溶胞的、仅包含载体（通道10）的诱发细菌培养物如关所述地被制成小丸以形成“Blocko”。该细胞溶胞产物与2X Laemmli样品缓冲液以1：1混合，加热至沸腾5分钟，并加到凝胶上以检查Trp对照蛋白质。

为制抑制试剂，将混合物（“Blocko”）在印迹剂中以1：20的比例稀释，加入Np40和脱氧胆酸钠至各自为1%的最终浓度。将兔子血清在25毫升的抑制试剂中以1：1000的比例稀释，并在4℃下预保温8小时。然后加入硝化纤维素印迹，在4℃下连续保温16－18小时。将印迹在0.5%的脱盐胆酸盐、0.1M NaCl，0.5%Triton X-100，及10mM磷酸钠（pH7.5）中清洗三次，每次20分钟。结合碱性磷酸盐（Boehringer Mannheim Biochemicals，Indianapolis，IN）的山羊抗兔子血清以1：1000的稀释比例加入到吸印剂中。在约27℃下，保温2小时之后，过滤物被再次清洗三次，并转移到基质溶液（表1）中10分钟或直到产生颜色为止。将过滤物在蒸馏水中清洗来结束反应。过滤物被干燥并照相。

表 1

Western Blot Reagents

10倍乘的转移缓冲剂	2升	
缓血酸胺碱(25mM Tris)	60.53克	
甘氨酸	288.27克	
稀释到1倍乘后加MeOH至最终容积的 20%		
印迹剂(BLOTTO)	4升	8升
脱脂奶粉(5%)	200克	400克
NaCl (0.9%)	36克	72克
防沫剂 A (0.1%)	12ml	24ml
叠氮化钠(0.1%)	4克	8克
碘化钾(1mM)	0.664克	1.33克
Western 清洗液	4升	8升
去氧胆酸 (0.5%)	20克	40克
Triton X-100 (0.5%)	20ml	40ml
NaCl (0.1M)	23.4克	46.8克
1M 磷酸钠,pH7.4 (10mM)	40ml	80ml
(1M磷酸钠-268克 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$[加热溶解],约4ml 85% H_3 pH4至pH7.4, 足量至1升)		
碱性磷酸酶基质		
够2个印迹用. 加入每种试剂后混合		
避光; 1小时内使用		
碱性磷酸酶缓冲液		10ml.
NBT基质(50毫克/ml. 在70% N,N-二甲基甲酰胺中)		66μl

BCIP基质(50毫克/ml，在100%N,N-甲基甲酰胺中)　33ul

碱性磷酸酶缓冲液

1M Tris, pH 9.5	10ml	(100mM Tris-HCl, pH 9.5)
5M NaCl	2ml	(100mM NaCl)
1M $MgCl_2$	0.5ml	(5mM $MgCl_2$)

足量至100ml

NBT基质　　氮蓝四唑(Sigma)

BCIP基质　　3-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐(Sigma)

实施例 8

HPV肽

合成了对应于HPV16 E_6 或 E_7 核蛋白的特异性抗原决定区域的合成肽被。该特异性肽被列在表 2 中，并与在如图 7 所说明的 E_6 或 E_7 蛋白质序列中的从氨基终端到羧基终端读出的被标明了的氨基酸残基相对应。

表　2

肽	E_6 或 E_7	氨基酸位置
359	E_7	29-50
360	E_7	70-81
361	E_7	1-10
358	E_6	148-158
358	E_6	119-134
375	E_6	8-20
376	E_6	1-20

实施例 9

利用ＨＰＶ１６肽作为免疫原产生单克隆克体

２０微克的与钥孔蜈血蓝素（ＫＬＨ）结合的肽３５９在完全Freund氏佐剂中被乳化，并在皮下或腹膜内注射给小鼠施用。大约３和５1/2周后，用在非完全Freund氏佐剂中的加强注射剂通过腹膜内注射。三天后取出脾细胞，用标准杂种瘤技术（参见Milstein, supra）将其与ＡＧ８骨髓瘤系融合。利用以每眼涂复５００纳克在０．１Ｍ碳酸盐缓冲液中的未结合肽的微滴定板，在ＥＬＩＳＡ检测中用健康克隆的上清液来鉴别特异抗体的存在。与马的萝卜过氧化酶（ＨＲＰ）结合的山羊抗小鼠ＩｇＧ在经过三次清洗后被加入，并采用标准ELISA方法进行底物反应。两个高活性克隆（克隆＃１０和＃１４）被选择用作进一步克隆并在肽３５９的ＥＬＩＳＡ中对其上清液进行滴定，其结果在图８上。类似地，针对E_6肽３５８和３７５（数据未示出）的单克隆抗体已被制备出来。

实施例１０

肽——ＫＬＨ的致免疫性研究

通过采用与完全Freund's 佐剂混合的结合了ＫＬＨ的１００微克肽进行其皮内注射对兔子进行免疫接种。三周后，通过采用与非完全Freund's 佐剂混合的结合了ＫＬＨ的５０微克的肽进行真皮内注射来对动物进行免疫加强注射。加强注射后三天，兔子被取血。

血清在（－２０℃）下贮存。抗Trp E-HPV融合蛋白质的兔子抗血清如Jenison等人１９８８年，J. of Virol. 62:2115-2123）所描述的那样被制备，并由Dr. Denise Galloway (Fred Hutchinson 癌症研究中心，seattle, WA）提供。为了消除针对E.Coli——编码蛋白质

(包括该融合蛋白的TrpE部分）的抗体，利用以上实施例7中所述的抑制试剂，将血清对表载体（pATH）序列的E．coli的变性溶胞产物进行预吸收。

兔子血清作一系列的稀释，并在针对T　E－E_6 和E_7 融合蛋白的Western印迹测量中进行反应。所有抗肽血清与同系的融合蛋白质是起反应的，证这了肽结合物的致免疫性。抗血清的滴定度在此被表示成在Western印迹分析中与该特异性蛋白质仍显示反应性的最高稀释度的倒数，各种不同不同抗血清的滴定度表示在表3中，且滴定的Western 印迹可见于图9和图10。

表　3

兔血清	滴定度*	
α357(E_6)	≥3,200	100**
α358(E_6)	102,400	≥6,400
α359(E_6)	≥109,600	≥409,000
α360 (E_7)	1,600	
α361 (E_7)	800	
α16E_7 NP	720,000	
α16E_6 DS	40,000-80,000	

＊ 显示E_6 或E_7 谱带阳性染色的最高稀释度的倒数，

**两个滴定度表示两个不同的兔子被试验。

在这些Western 印迹中，抗肽359抗血清具有一个≥490,600的滴定度，是在所测量抗血清中最具反应活性的。通过将两种血清的稀释液与Westen印迹中的同系Trp融合蛋白质和Trp对照抗原进行反应以证实这些反应的特异性。该血清被发现对于同系融合蛋白质（图

１１）是具有特异性的。在这种测量中，抗肽３５９的抗血清的滴定度≥１０００，０００。

针对TrpE－E_6 融合蛋白质，ｐ１６E_6 ＤＳ－２（DraⅢ（１１１）－Sau３ａ（５２５））和E_7 融合蛋白（ｐ１６，E_7 ＮＰＩ（NsiI（５６２）－PstI（８７５））的阳性对照兔血清（α１６E_7 ＮＰ和α１６E_6 ＤＳ）被分别制备。并由D.Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA）提供。

实施例１１

利用ＥＬＩＳＡ识别Ｂ细胞的抗原决定基

如在实施例１０中所述的，结合E_6 和E_7 肽的ＫＬＨ被用于ＫＬＩＳＡ测量中，以确定它们是否代表由被细菌表达的ＨＰＶ１６E_6 或ＨＰＶ１６E_7 融合蛋白质接种免疫的动物所识别的抗原决定簇。

在实施例８中所述的三个E_7 肽被抗Trp－Ｅ－E_7（α１６E_7 ＮＰ）（由D.Galloway, Fred Hutchinson 癌症研究中心，seattle, ＷＡ提供）的兔子抗血清所识别，如见表４。识别从Triton Biosciences 购买的ＨＰＶ１６E_7 的单克隆抗体与氨基末端的肽361一一对映。

表　4

在ＥＬＩＳＡ中试验抗血清对E_7 开放构架的ＫＬＨ－结合肽的滴定度*

肽	α16E7 NP	McAb Triton (Biascience)
359(aa29-50)	1,600	<100
360(aa70-81)	6,400	<100
361(aa1-10)	12,800	≥12,800

* 滴定度被确定为显示出比本底高4倍ELISA值的最高血清稀释度的倒数，本底是在涂同样肽的滴定板上用1：100的正常血清确定的。

E_6 序列（357和358）的两种肽也利用类似方法进行研究。用两种不同的抗－E_6 抗血清的结果表示在表5中。肽编号358与αHPV－E_6（Lowy）在1：400的血清稀释度下还是有反应性的，而α16E_6 Ds具有较低的反应性（1：100）。肽357在1：100的血清稀释度下，被α16E_6 DS勉强识别出来。

表 5

在ELISA中试验抗血清对E_6 开放构架的KLH－结合肽的滴定度*

肽	α16E6 DS	αHPV16-E6(Lowy)
357(aa148-158)	100	<100
358(aa119-134)	100	400

* 滴定度被确定为显示比本底大3倍的ELISA值的最高稀释度的倒数，本底如表4那样被确定。

实施例12

利用抗肽抗血清识别天然的E_7 蛋白质

如实施例8所述，按照实施例10的方法及如用RIP进行测量

的那样用E_7肽对兔子进行免疫。图12表示的结果说明了利用抗-E_7肽抗血清对E_7肽的识别。来自用肽389免疫接种的兔子的抗血清，对应于E_7的29至50-氨基酸残基，如放射免疫沉淀法所确定的那样对牛痘重组溶胞产物中的天然E_7蛋白质进行识别。

实施例13

RNA的逆转录酶聚合酶链反应分析

用如在以上实施例3中所描述的pCDM8／E_7转染的M_2鼠黑素瘤细胞和NCTC2555成纤维细胞各自的24个克隆被利用RNA点吸印测量法进行检测。其中给出阳性信号的这些克隆中的三个然后利用逆转录酶聚合酶链反应（RT-PCR）分析进行进一步检测。

这些转染细胞的细胞质RNA按照如在Ausubel等，1989，in Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates 所描述的方法被分离。

细胞质RNA的合成第一股cDNA的典型引物延伸-RT与PCR一起被用来放大cDNA。1微克的细胞质DNA被用作放大反应的模板。利用鼠白血病病毒的逆转录酶（Life Science）合成第一股cDNA。

包含变性RNA样品的RT缓冲液，1微克变性的无规则六聚体，1mM每种脱氧核苷酸三磷酸盐（dNTP），10mM焦磷酸钠，5mM二硫苏糖醇，10个单位的核糖核酸酶(RNasin) (Promega, Madison, WI) 以及18个单位的鼠白血病逆转录酶在42℃下被保持1小时，并然后在100℃下变性10分钟。上清液被用于PCR。

用于PCR的寡核苷酸的引物是HPVA22：5′-GCAT

GGAGATACACCTACATTG－3′和HPVA20：5′－TGGTTTCTGAACAGATGG－3′（DNA Factory, San Diego, CA）。292bp的cDNA片段被放大。PCR反应混合物（GeneAmp DNA amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus Norwalk, CT）包含200μM的dNTP 1μM的引物HPVA22和HPVA20以及由RT合成的各种cDNA和25个单位的Taq聚合酶。1纳克的pCDM8／E_7质粒被用在PCR台作为反阳性对照。利用DNA热循环装置（perkin Elmer Cetus）以33次循环进行PCR（在94℃下变性1分钟，在50℃下退火2分钟以及在70℃下延伸3分钟），并将20微升的PCR产物通过在用溴化乙锭染色的4%的NuSieve琼脂糖凝胶（FMC，生物制品，Rockland, ME）上电泳进行分馏。

在图13所示的结果说明来自三种转染物（E_7 C3，N7．2和N7．4）的PCR产物显示了预测的292bp的DNA片段。然而，亲代细胞系（黑素瘤和NCTC2555成纤维细胞）不显示这些片段。

当从这些转染物分离出的mRNA在RT-PCR之前用DNase-游离的RNase预处理时，PCR 产物按凝胶电泳法测定并不显示出这些片段。

实施例14

肿瘤诱发和消退

在6－10周龄的雌性C3H／HeN小鼠（Charles River Breeding Laboratory）中研究了用HPV转染细胞进行免疫的阻止肿瘤发展的能力。

将取自表达HPV－E_6或E_7抗原决定簇和表达高水平的主要组织相容性复合物（MHC）I级抗原的非致肿瘤的转染株通过腹膜内注射到5个小鼠一组的每一组小鼠体内。然后，小鼠被在其削去绒毛的右

侧背部皮下注射的致瘤剂量的用HPV16E_7（E_7C3）转染过的M_2黑素瘤细胞去激发。通过对肿瘤直径的测量确定肿瘤块。图14所示的结果表明，用表达E_7抗原决定簇的成纤维细胞进行的免疫通过E_7C3而引起肿瘤的短暂发展，而接着却总是肿瘤的消退。另一方面，用表达HPV16E_6抗原决定簇的成纤维细胞的接种不抑制由E_7C3细胞引起的肿瘤形成，而且未免疫小鼠在用被E_7C3激发时，总是生成原发肿瘤。

.类似研究，即用E_6或E_7转染株成纤维细胞给小鼠腹内注射，然后用E_6转染的M_2细胞激发，产生了相似的结果；施用E_6转染株成纤维细胞阻止由于用E_6转染的M_2细胞而形成的、而不是用E_7转染的M_2细胞形成的肿瘤。结果表示在表6中。

表 6

给小鼠的接种物：		
成纤维细胞	黑素瘤细胞	进行性肿瘤生长
无	M_2	是
无	E_7C3	是
无	M_2／E_6	是
非转染的	无	否
非转染的	E_7C3	是
E_6	无	否
E_6	M_2	是
E_6	M_2／E_6	否
E_6	E_7C3	是
E_7	无	否

E_7	M_2	是
E_7	E_7 C 3	否
E_7	M 2 ／ E_6	是

用E_7 C 3细胞为C 3 H／H e N小鼠注射在小鼠体内产生了肿瘤。当同时给这些小鼠施用干扰素时，发生了肿瘤迅速消退；然而，当与非转染的M_2 细胞一起给小鼠注射，干扰素并不抑制肿瘤发展。

在裸鼠中的研究表明，为了发生肿瘤消退，需要功能性T细胞。由于接种转染的或非转染的M_2 细胞，在裸鼠体内产生了肿瘤。该研究的结果表示于表7中，而且，干扰素的存在与否不会对裸鼠体内肿瘤的发展产生影响。

表　7

接种物	小鼠	进行性肿瘤生长
M_2	C_3 H／H e N	是
M_2 ＋干扰素	C_3 H／H e N	是
E_7 C_3	C_3 H／H e N	是
E_7 C_3 ＋干扰素	C_3 H／H e N	否
M_2	裸鼠	是
E_7 C_3	裸鼠	是
E_7 C_3 ＋干扰素	裸鼠	是
M_2 ＋干扰素	裸鼠	是

实施例15

CD8⁺ T淋巴细胞对肿瘤消退的中介作用

用由HPV16E_7（N7.2）转染的NCTC2555衍生的非致瘤成纤维细胞对C3H／HeN小鼠进行免疫接种。然后，给这些小鼠各自注射含有1毫克抗－CD8单克隆抗体（来自ATCC的克隆116－13.1 IgG2A）的1.0毫升的PBS－稀释的腹液以消除$CD8^+$ T淋巴细胞。对照组小鼠接受包含同型匹配的抗－CD5单克隆抗体（杂种瘤10.2 IgG_{2a}，致肿瘤基因）的1毫升的PBS－稀释的腹液。

结果表示在图15中。当用E_7 C3细胞激发时，N7.2免疫过的抗－CD8单克隆抗体处理的小鼠产生了进行性肿瘤。而用N7.2免疫过的抗CD5单克隆抗体处理的对照小鼠在用E_7 C3细胞激发时抵制了进行性肿瘤的形成。对小鼠淋巴细胞数量的FACS分析是通过用抗CD^4 或抗－CD^8 对这些小鼠的脾细胞进行染色、然后通过荧光激活细胞分析器分析进行监测进行的。结果表示在图16中。$CD8^+$ 细胞的消除在抗－CD8处理的小鼠中被表明是大于90%。结合荧光素的抗－CD4进行测量在那些小鼠体内的$CD4^+$ 淋巴细胞，并证实这些小鼠中的CD4子集没有变化。

这些结果表明，CD^+，HPV16E_7 ——特异的T淋巴细胞对调节用N7.4免疫的小鼠体内M_2／E_7 肿瘤的消退，是重要的效应细胞。

前面的描述和实施例的意图在于说明本发明，而不是限定。在不偏离本发明的实质精神和范围的情况下，可以作出大量的改换和改进。

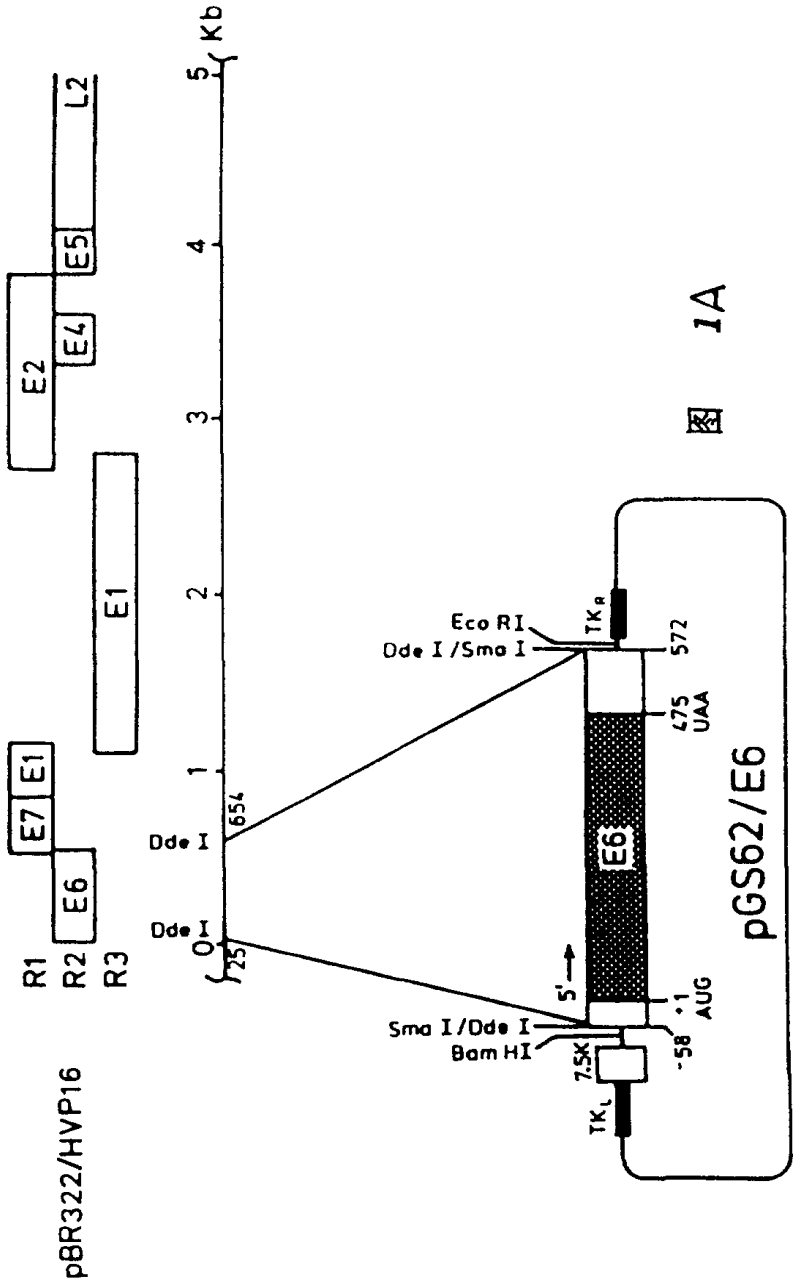

pBR322/HVP16
R1
R2
R3
E7
E1
E6
E2
E4
E5
L2
E1
0
25
654
Dde I
Dde I
1
2
3
4
5
Kb
Eco RI
Dde I/Sma I
TKR
572
475
UAA
E6
5'
+1
AUG
Sma I/Dde I
Bam HI
-58
7.5K
TKL
pGS62/E6

图 1A

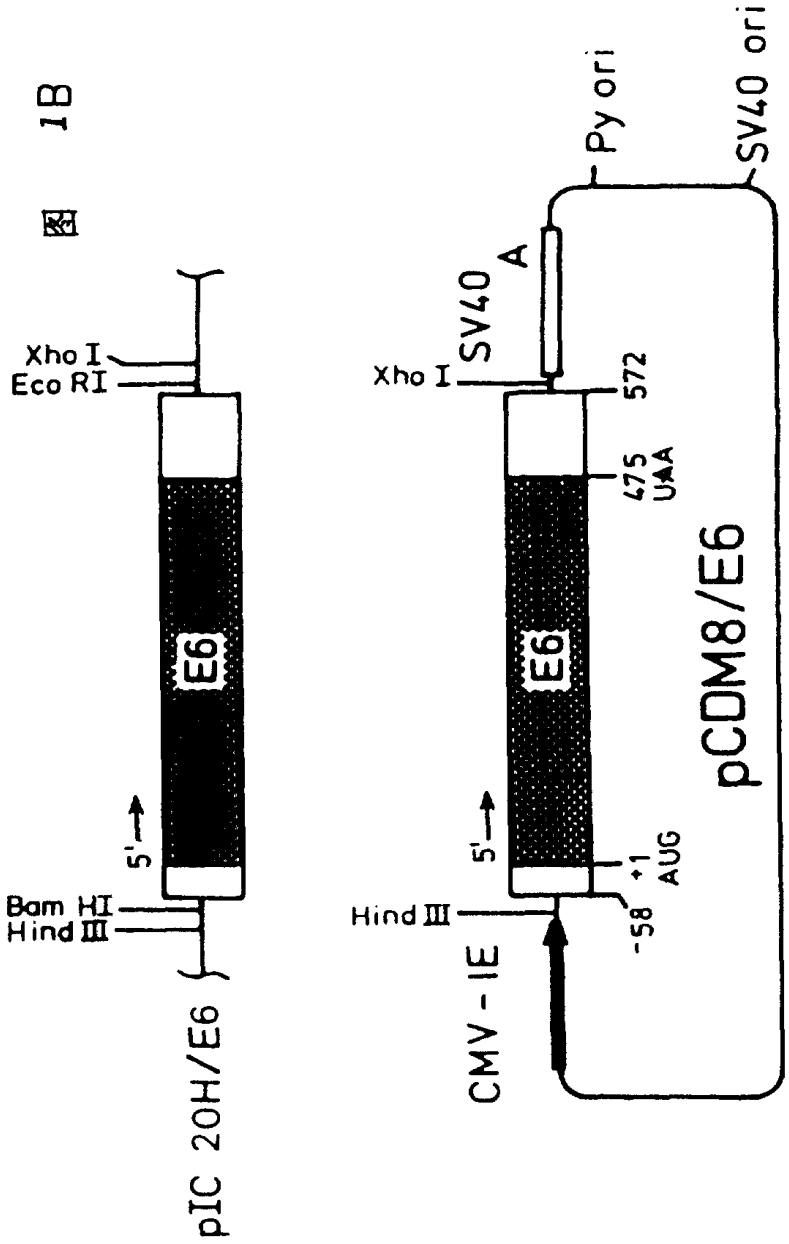

Xho I
Eco RI
E6
5'
Bam HI
Hind III
pIC 20H/E6
Py ori
SV40 ori
SV40
A
Xho I
572
475
UAA
E6
5'
+1
AUG
Hind III
-58
CMV - IE
pCDM8/E6

図 1B

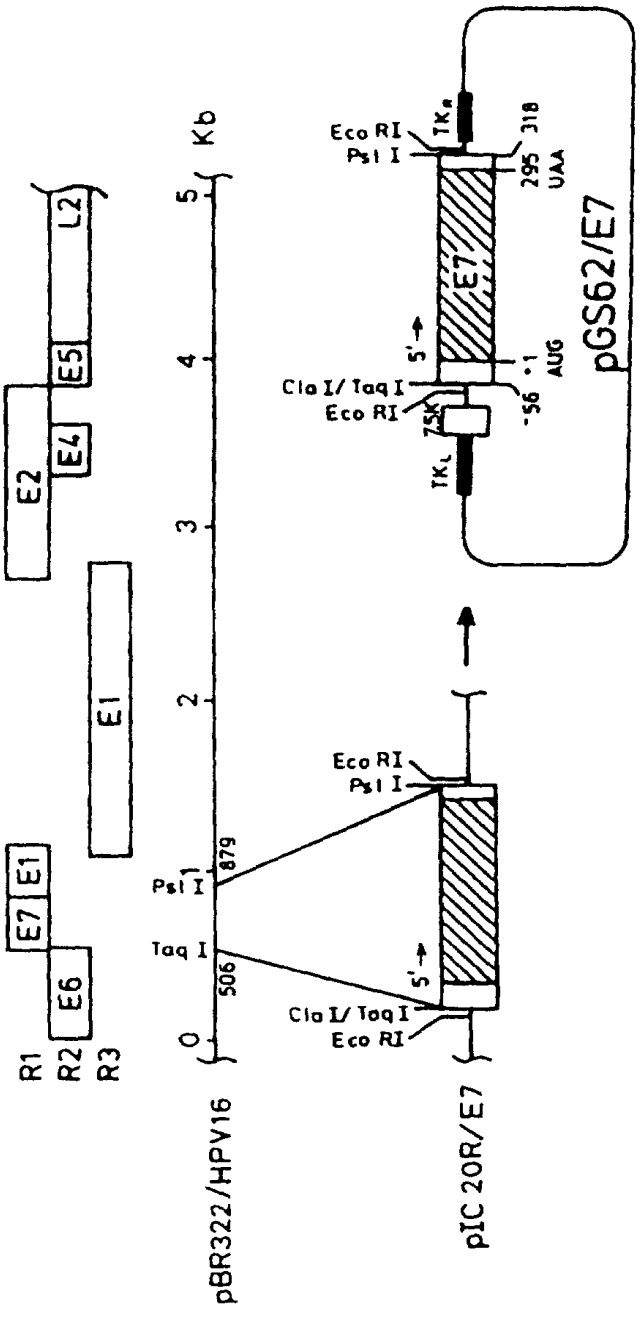
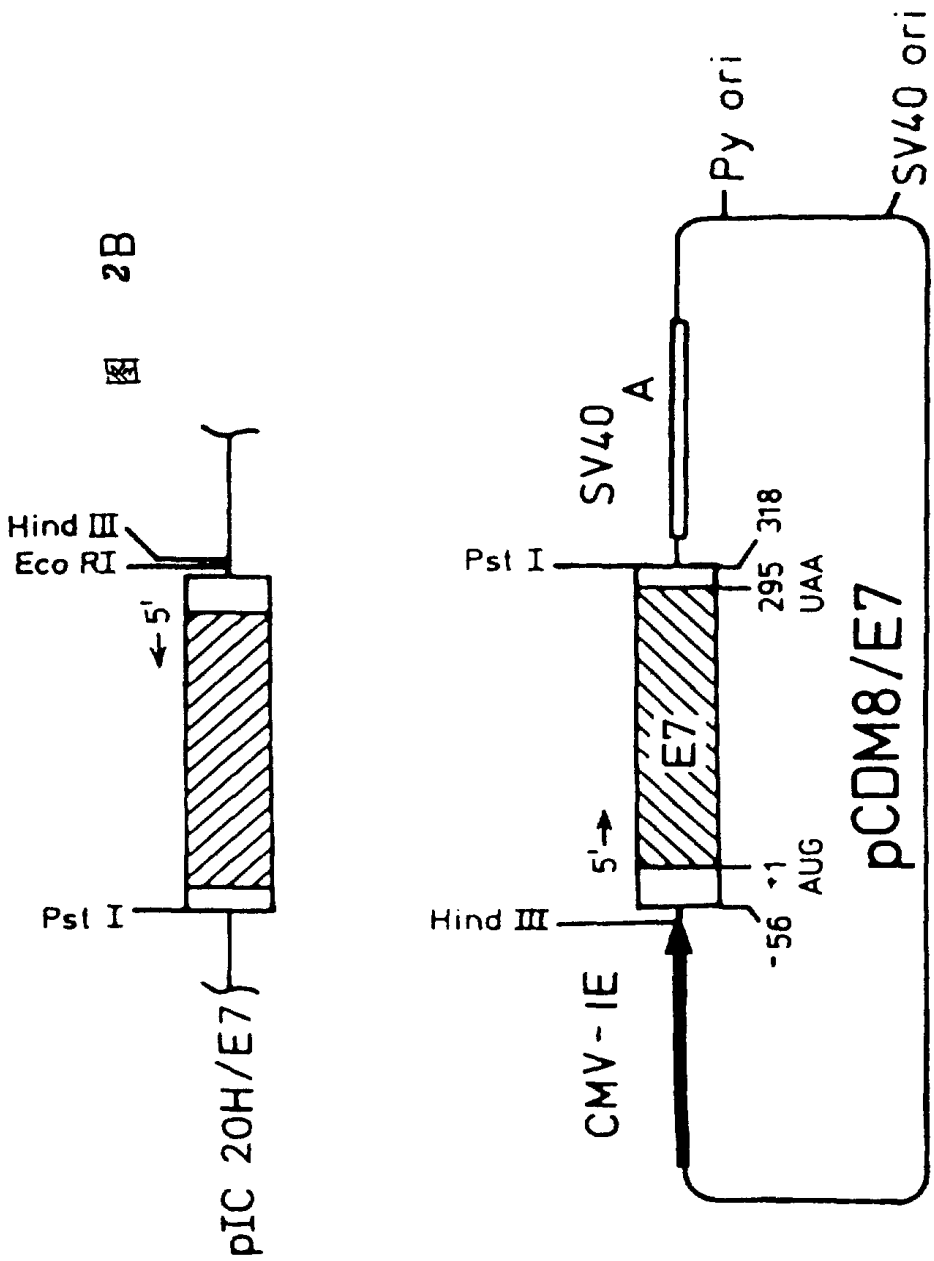

R1
R2
R3
E6
E7
E1
E4
E5
L2
E2
E1
0
1
2
3
4
5
Kb
Psi I
879
Taq I
506
pBR322/HPV16
Eco RI
Psi I
5'
Cla I/ Taq I
Eco RI
pIC 20R/E7
Eco RI
Psi I
TK
318
295
UAA
E7
5'
Cla I/ Taq I
Eco RI
TSK
TK
-56
+1
AUG
pGS62/E7

图 2A

図 2B


Hind III
Eco RI
5'
Pst I
pIC 20H/E7
SV40
A
Py ori
SV40 ori
Pst I
318
295
UAA
E7
5'
+1
AUG
Hind III
-56
CMV-IE
pCDM8/E7

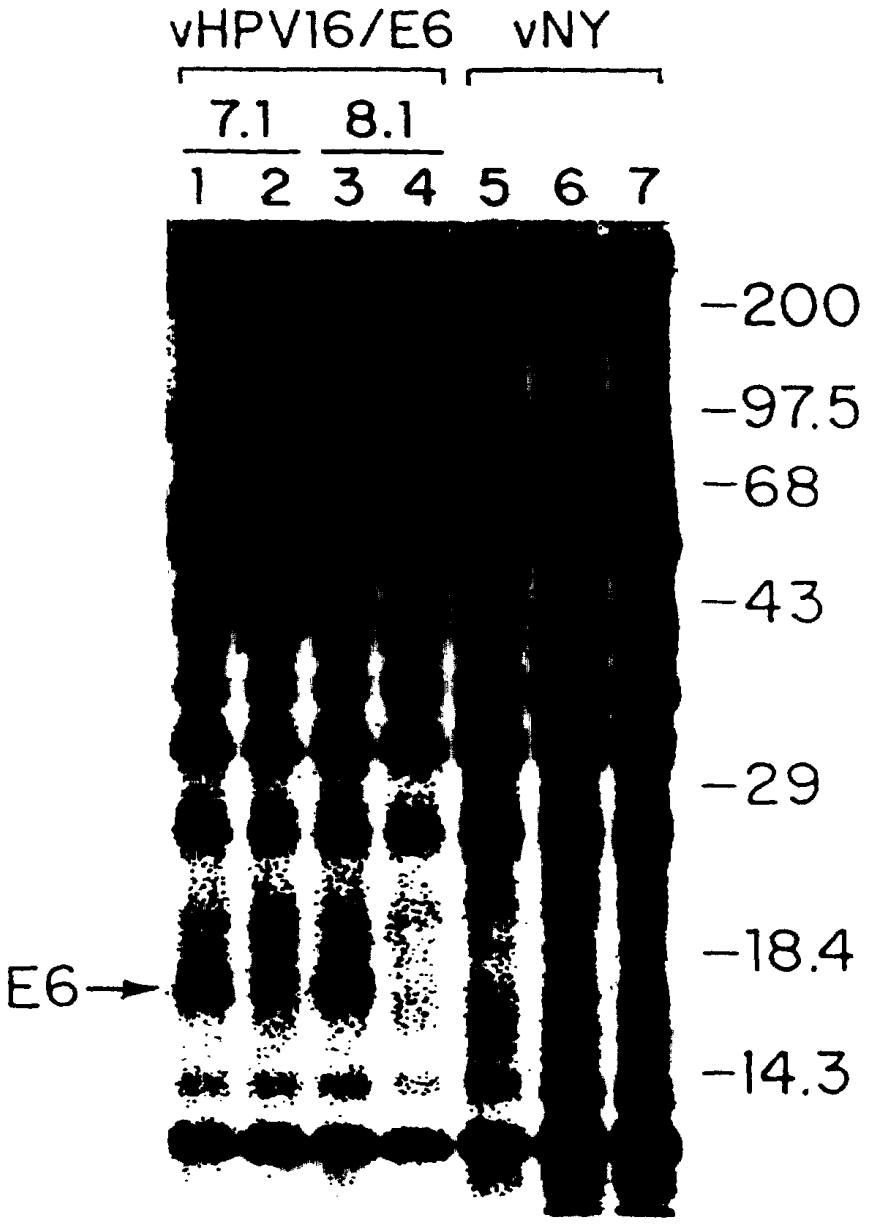


图 3

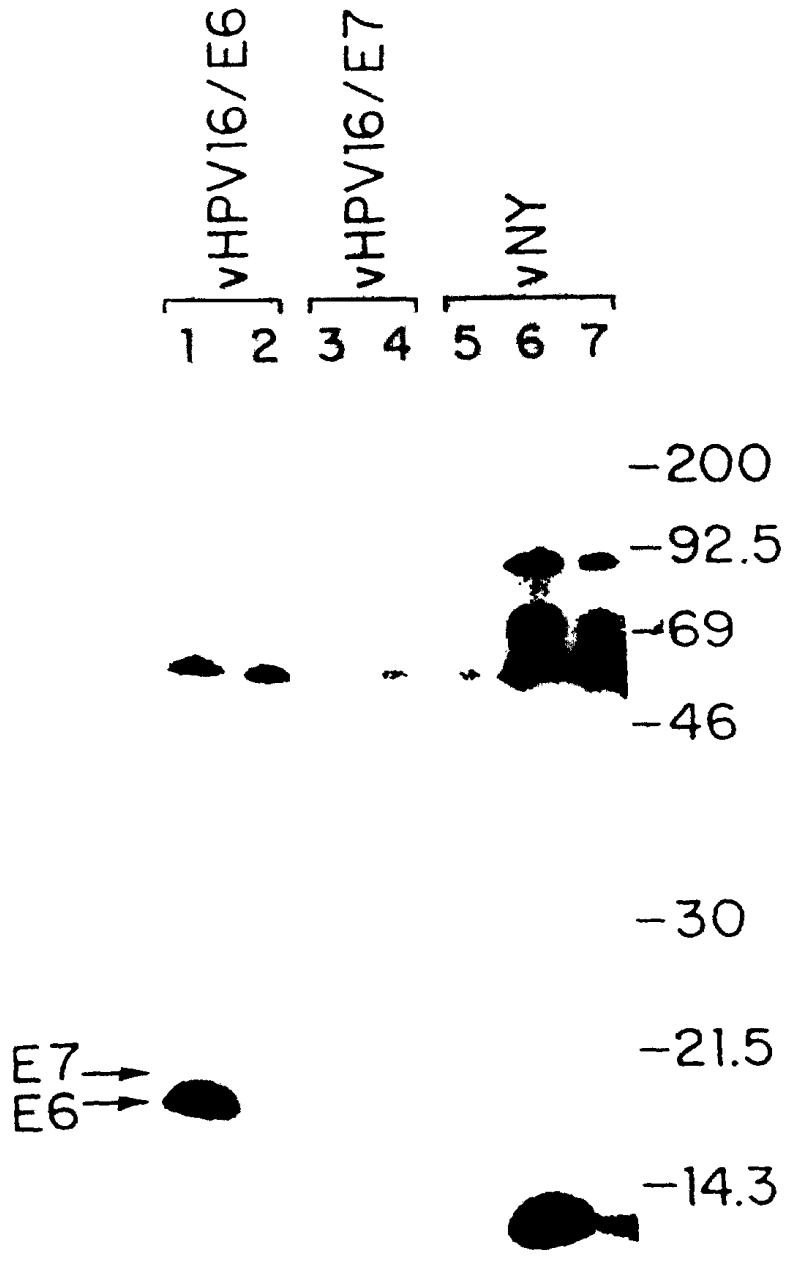
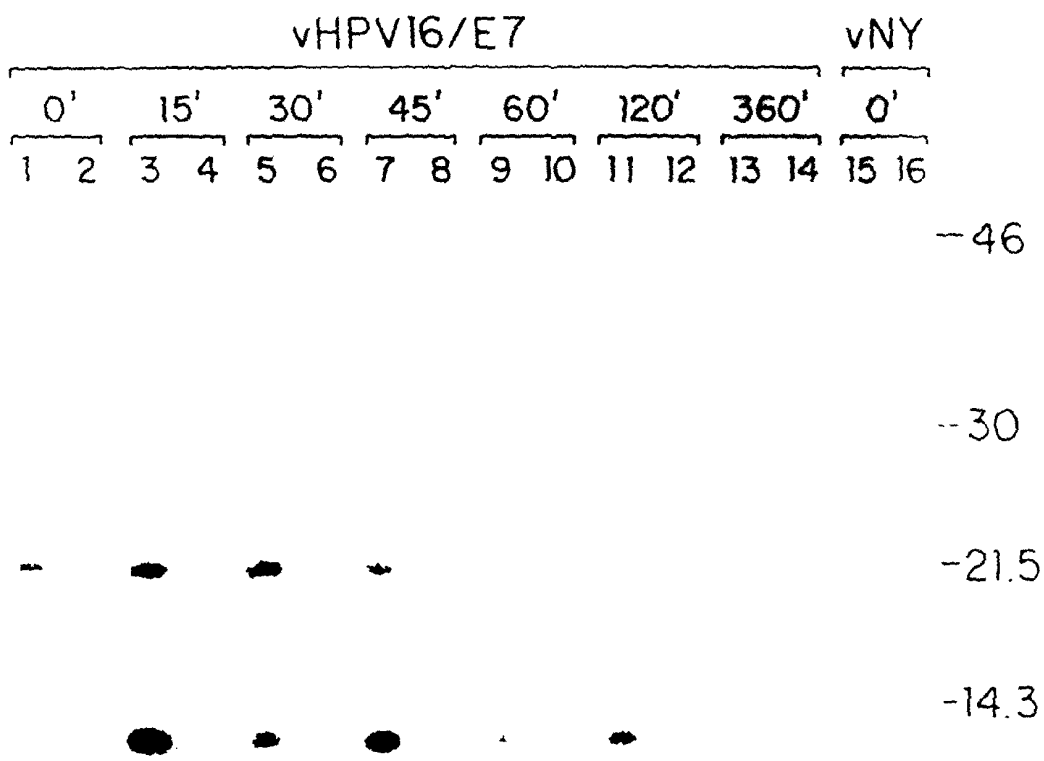


图 4

图 5


vHPV16/E7
vNY
0'
15'
30'
45'
60'
120'
360'
0'
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
-46
-30
-21.5
-14.3

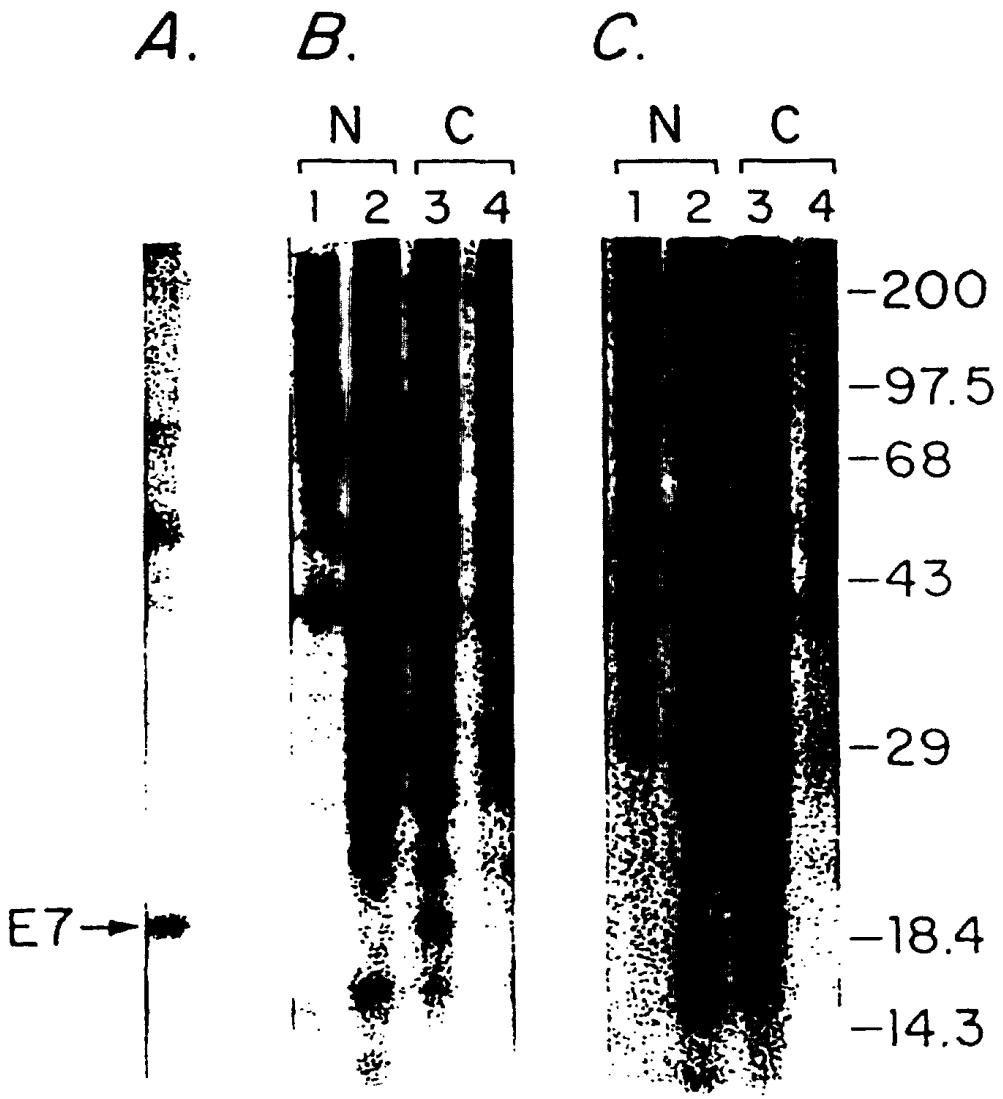
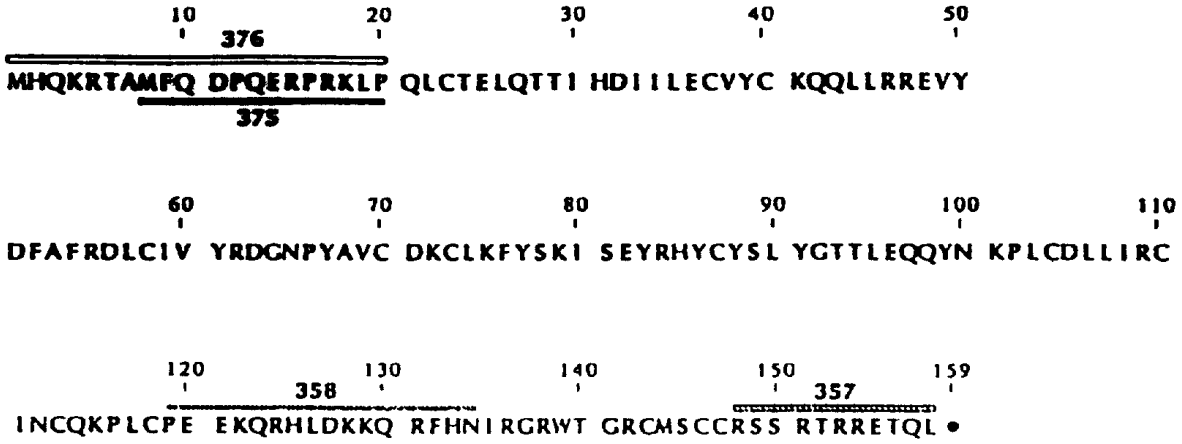


图 6

E6 氨基酸序列



E7 氨基酸序列

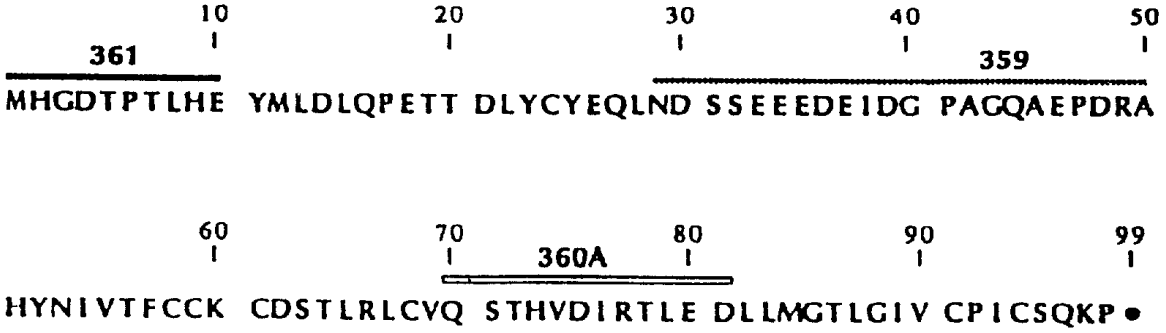
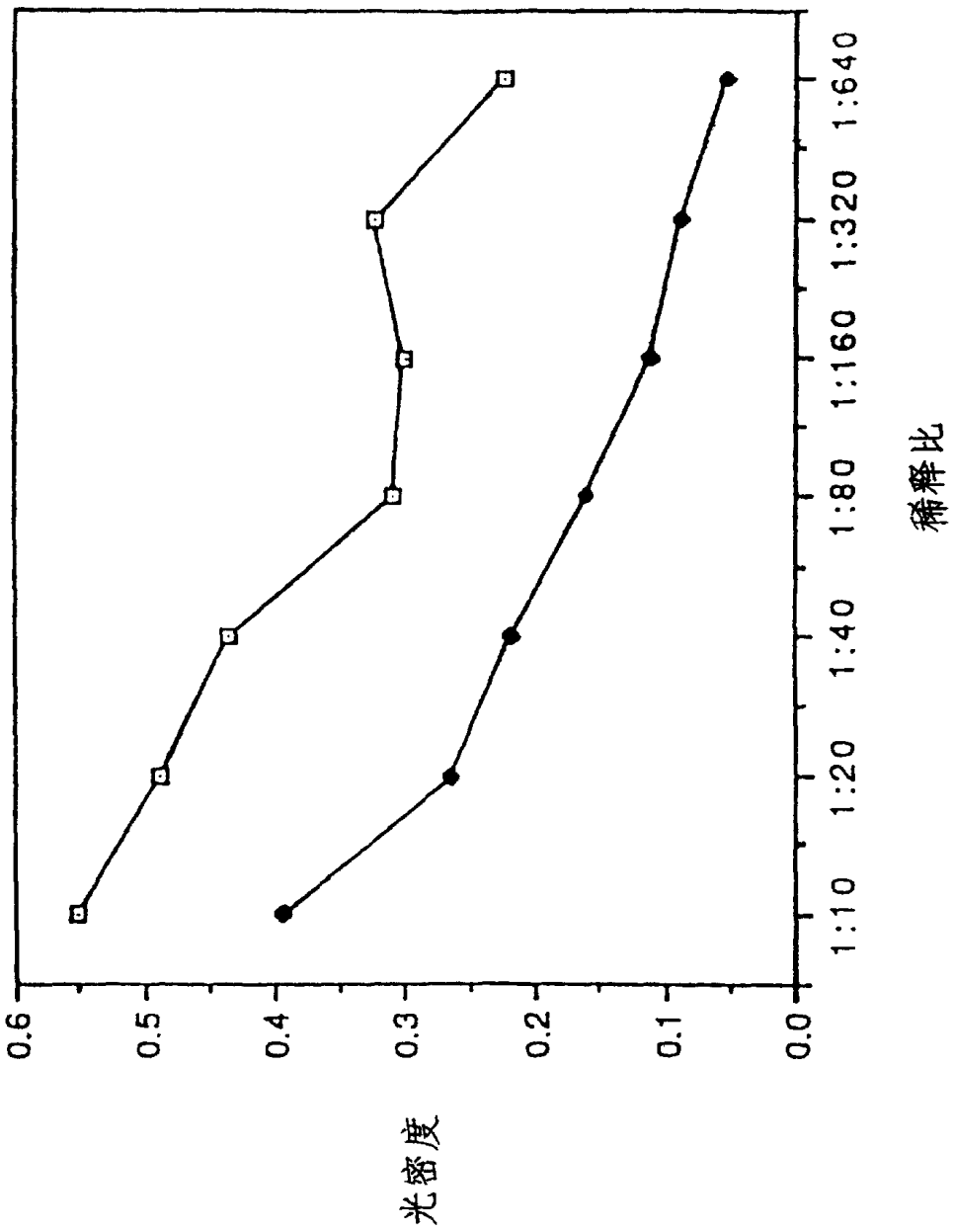
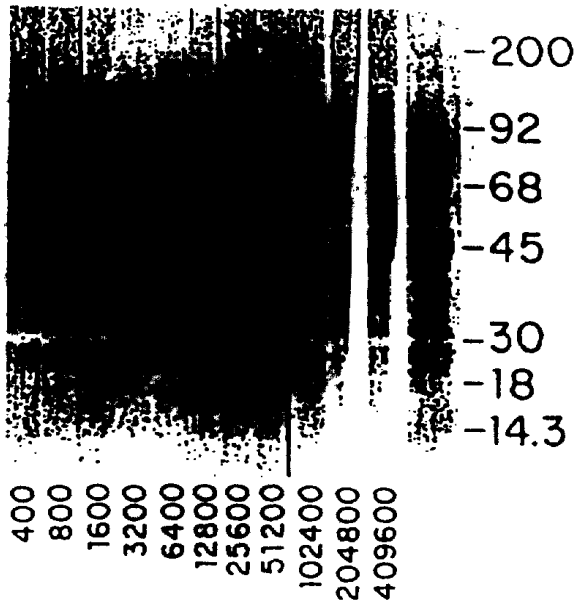


图 7

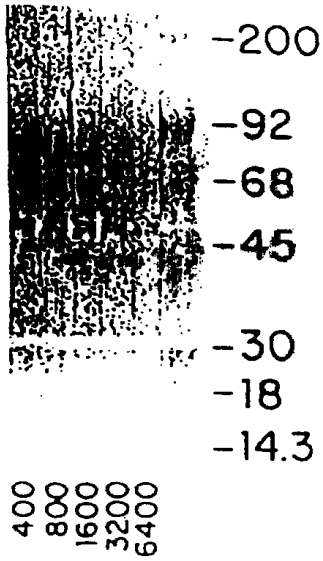
图 8



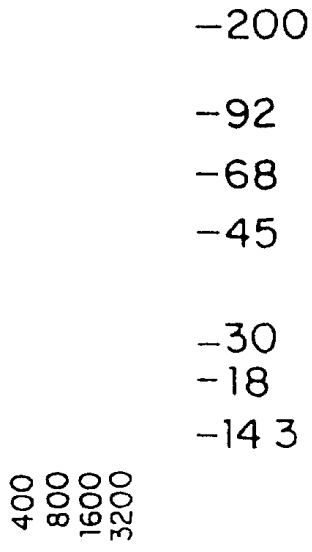
α358 (1)



α358 (2)



α357



α16E6DS

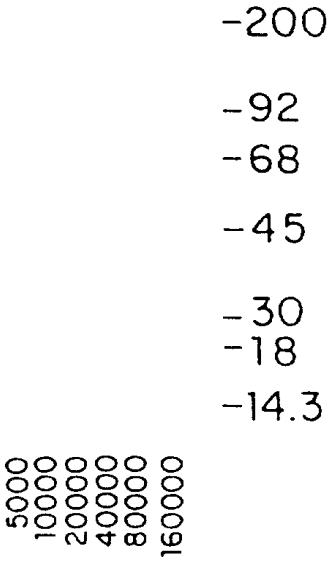


图 9

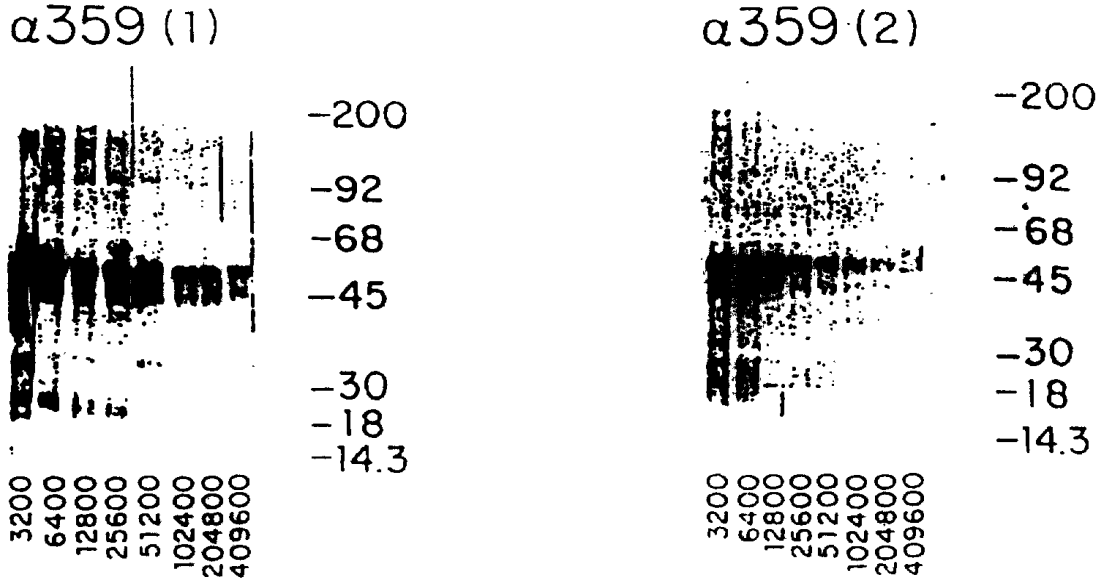
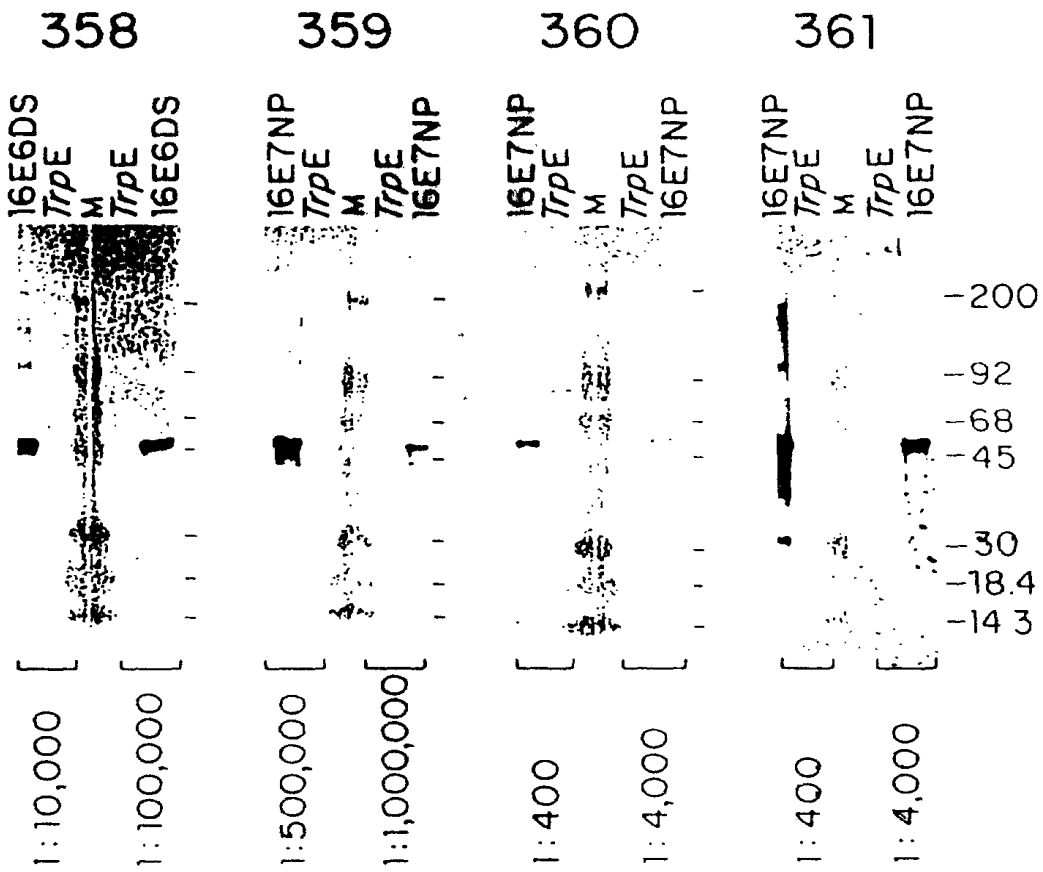

α359 (1)
-200
-92
-68
-45
-30
-18
-14.3
3200
6400
12800
25600
51200
102400
204800
409600
α359 (2)
-200
-92
-68
-45
-30
-18
-14.3
3200
6400
12800
25600
51200
102400
204800
409600
α360
-200
-92
-68
-45
-30
-18
-14.3
100
200
400
800
1600
α361
-200
-92
-68
-45
-30
-18
-14.3
100
200
400
800
1600
α16E7NP
-200
-92
-68
-45
-30
-18
-14.3
120000
240000
480000
720000
1440000

图 *10*

图 11


358
359
360
361
16E6DS
TrpE
M
TrpE
16E6DS
16E7NP
TrpE
M
TrpE
16E7NP
16E7NP
TrpE
M
TrpE
16E7NP
16E7NP
TrpE
M
TrpE
16E7NP
1:10,000
1:100,000
1:500,000
1:1,000,000
1:400
1:4,000
1:400
1:4,000
200
92
68
45
30
18.4
14.3

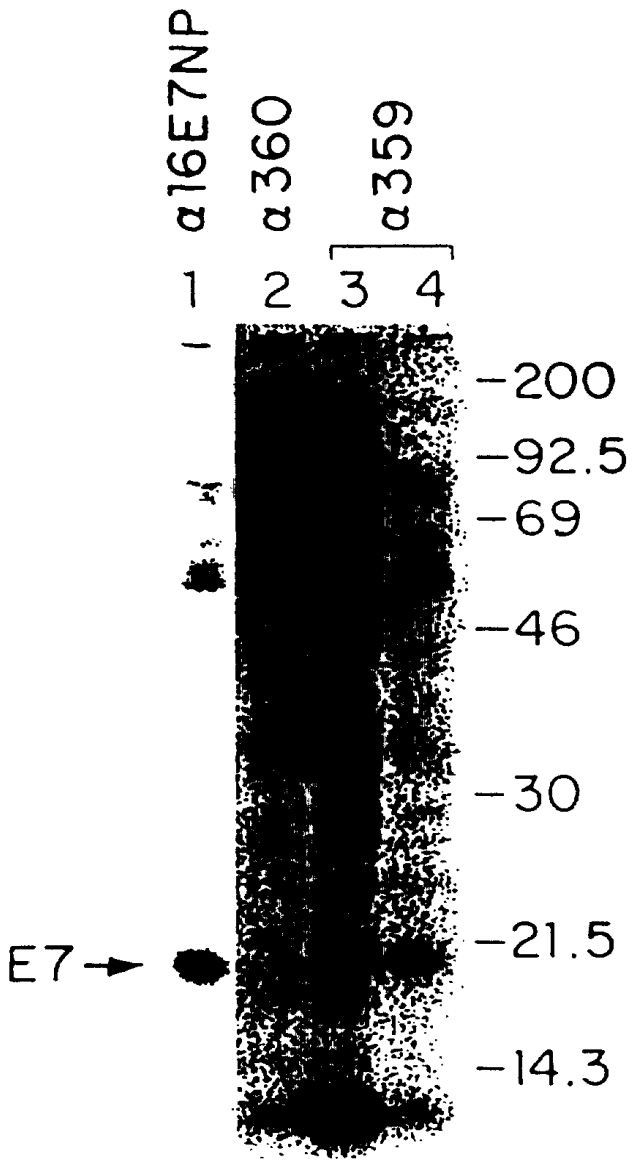


图 12

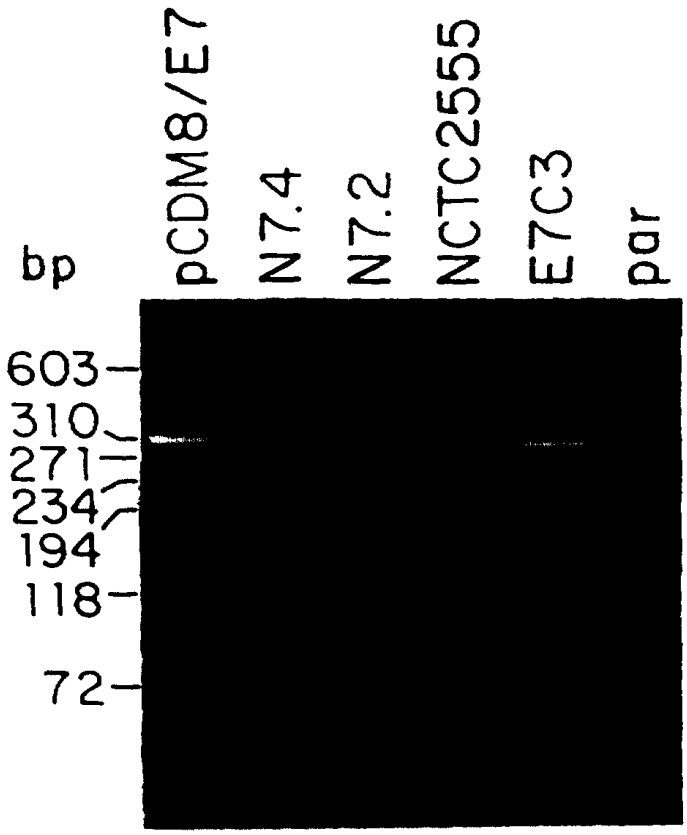

bp
pCDM8/E7
N7.4
N7.2
NCTC2555
E7C3
par
603
310
271
234
194
118
72

图 13

图 14

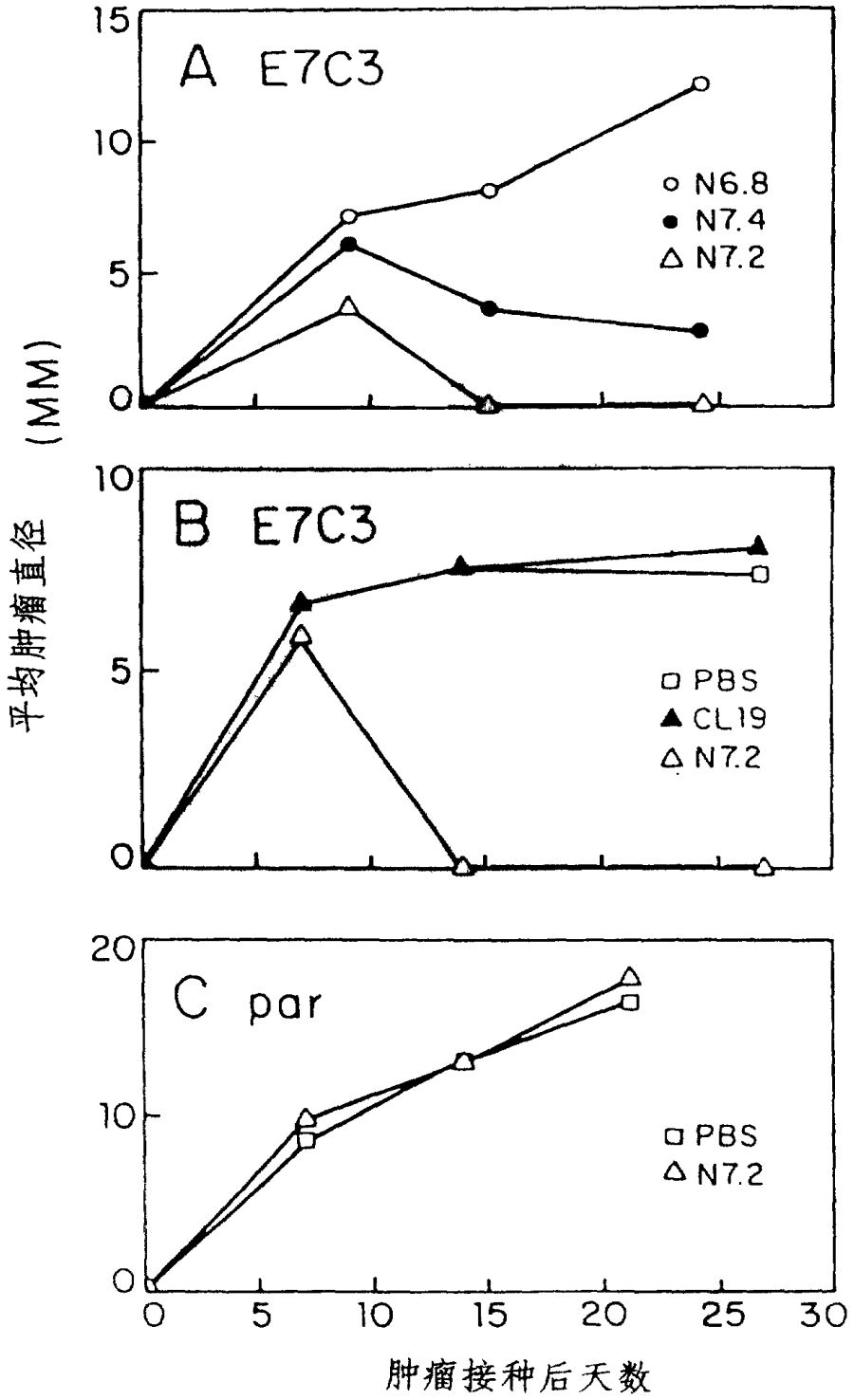
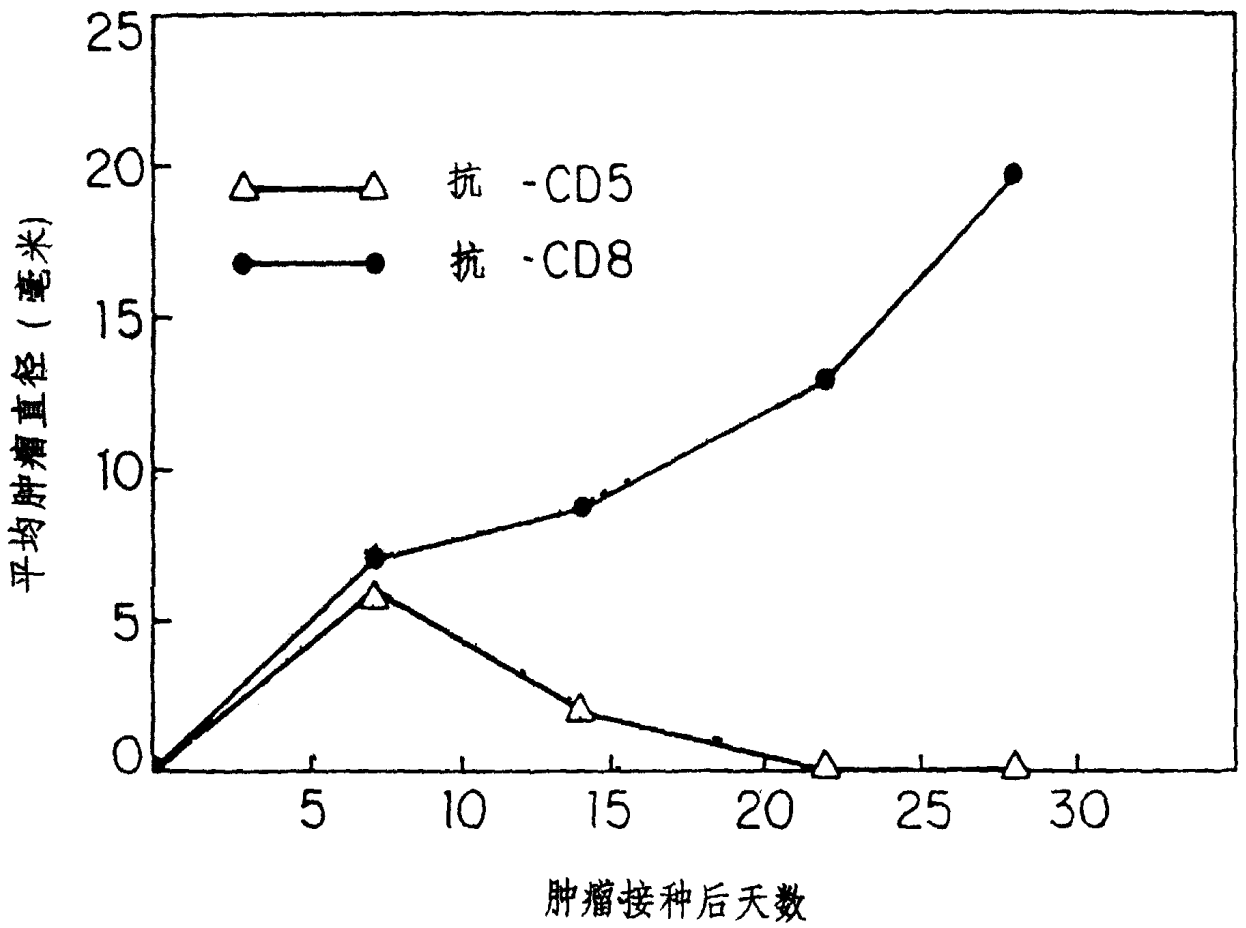

A E7C3
N6.8
N7.4
N7.2
B E7C3
PBS
CL19
N7.2
C par
PBS
N7.2
平均肿瘤直径 (MM)
肿瘤接种后天数
0
5
10
15
20
25
30

图 15



用作体内消除的抗体

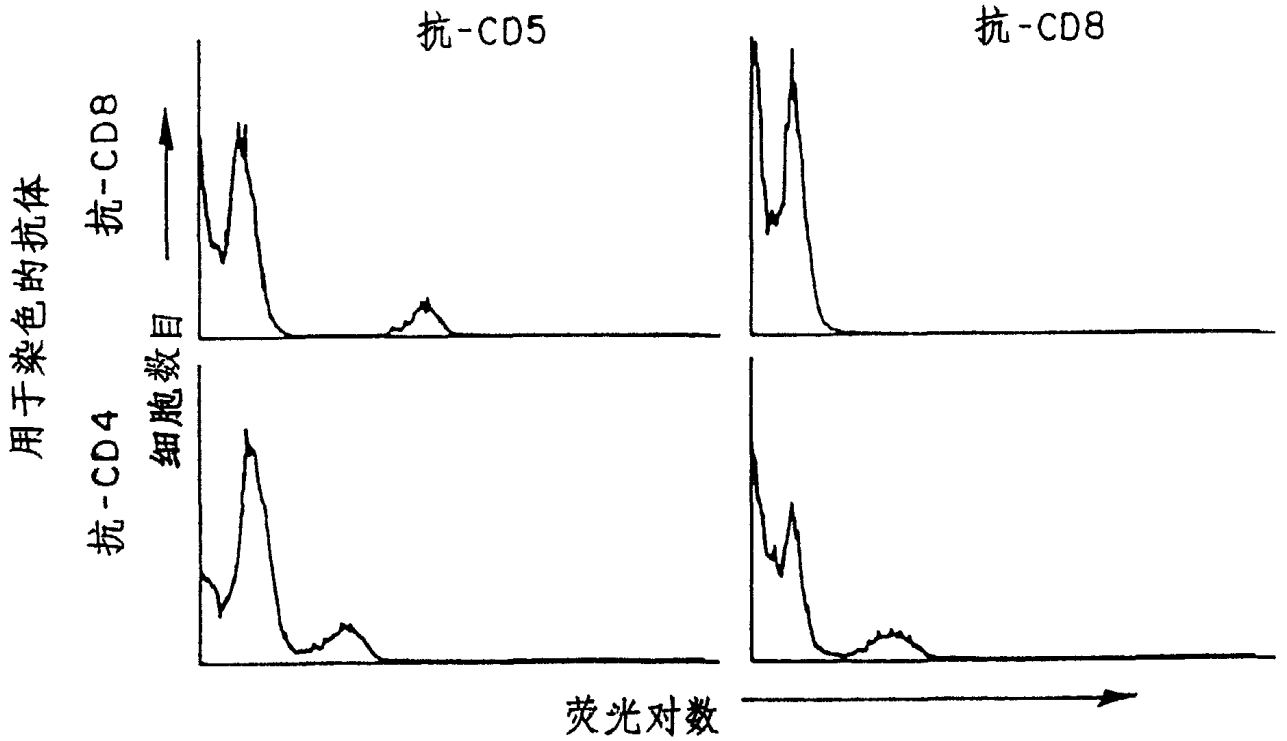


图 16