

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99806448.3

[51] Int. Cl.

C07K 5/00 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 14/00 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)  
C07H 21/04 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100378121C

[22] 申请日 1999.3.24 [21] 申请号 99806448.3

[30] 优先权

[32] 1998.4.17 [33] US [31] 09/062,422

[32] 1998.10.2 [33] US [31] 09/165,546

[86] 国际申请 PCT/US1999/006875 1999.3.24

[87] 国际公布 WO1999/053938 英 1999.10.28

[85] 进入国家阶段日期 2000.11.21

[73] 专利权人 路德维格癌症研究院

地址 美国纽约州

[72] 发明人 伊丽莎白·斯托克特

埃尔克·贾格尔 陈耀桢

马修·斯坎伦 克努特·亚历山大

劳埃德·J·奥尔德 阿利·格里

格尔德·里特 简·W·德里奥特

[56] 参考文献

CN1150805A 1997.5.28

CN1149889A 1997.5.14

审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 3 页

[54] 发明名称

分离的结合 MHC I 类和 MHC II 类分子的同 NY  
- ESO - 1 的氨基酸序列相关的肽及其应用

[57] 摘要

本发明涉及结合 MHC I 类和 MHC II 类分子的  
肽。这些肽在不同的治疗和诊断情况下是有用的。

1. 与 MHC II 类 HLA-DR53 分子结合的分离的 NY-ESO-1 (SEQ ID NO:1) 多肽, 其选自 SEQ ID NO:8、9 或 10 的肽。
2. 根据权利要求 1 的分离肽, 其中所述肽刺激 CD4+细胞的识别和增殖, 所述 CD4+细胞对所述肽与 HLA-DR53 分子的复合物有特异性。
3. MHC II 类分子 HLA-DR53 与权利要求 1 或 2 之多肽的分离的复合物。
4. 包含权利要求 1 或 2 之分离多肽和至少一种佐剂的组合物。
5. 分离的核酸分子, 其由编码权利要求 1 或 2 之分离多肽的核苷酸序列组成。
6. 表达载体, 其包含权利要求 5 的分离核酸分子, 所述核酸分子可操作地连接至启动子。
7. 重组细胞, 其包含权利要求 5 的分离核酸分子或权利要求 6 的载体。
8. 刺激辅助性 T 细胞增殖的体外方法, 其包括使含 T 细胞的样品与复合物相接触, 所述复合物是 MHC II 类分子 HLA-DR53 与选自 SEQ ID NO:8、9 和 10 之肽的复合物, 其量足以刺激识别所述复合物的辅助性 T 细胞增殖。
9. 选自 SEQ ID NO:8、9 和 10 的肽, 其中所述肽用于治疗 HLA-DR53 阳性患者的方法, 所述治疗是通过所述肽与 HLA-DR53 形成复合物而刺激辅助性 T 细胞。
10. 选自 SEQ ID NO:8、9 和 10 的肽在制备用于治疗 HLA-DR53 患者的药物中的用途, 所述治疗是通过所述肽与 HLA-DR53 形成复合物而刺激辅助性 T 细胞。
11. 一种细胞系在制备用于诊断受试者中癌症状态的药物中的用途, 其中所述细胞系用编码权利要求 1 或 2 之多肽的分离核酸分子所转染, 使所述受试者含免疫反应性细胞的样品与所述转染细胞系相接触, 以确定所述转染细胞系与所述免疫反应性细胞的相互作用, 所述相互作用指示所述癌症状态。
12. 根据权利要求 11 的用途, 其中所述免疫反应性细胞是辅助性 T 细胞。
13. 一种试剂在制备用于确定癌症状态消退、进展或发生的药物中的用途, 其中所述试剂监测取自具有所述癌症状态之患者的样品中的参数, 所述参

数选自 (i) 权利要求 1 或 2 的肽与 MHC II 类分子的复合物, 和 (ii) 对所述复合物有特异性的辅助性 T 细胞, 并且其中所述参数的量指示所述癌症状态的进展或消退或发生。

14. 包含 SEQ ID NO:7 之分离肽和至少一种其它肽的组合物, 该其它肽的氨基酸序列发现于由 SEQ ID NO:1 编码的蛋白质中并且其是由 SEQ ID NO:8、9 或 10 定义的肽。

分离的结合 MHC I 类和 MHC II 类分子  
的同 NY-ESO-1 的氨基酸序列  
相关的肽及其应用

### 相关申请

本申请是 1998 年 4 月 17 日提交的申请号 09/062,422 的部分继续申请, 申请号 09/062,422 为 1997 年 9 月 15 日提交的申请号 08/937,263 的部分继续申请, 而后者又是 1996 年 10 月 3 日提交的申请号 08/725,182 现在的美国专利 5,803,381 号的部分继续申请。所有这些申请均被引入作为参考。

### 发明的领域

本发明涉及来自癌症相关抗原的 HLA 结合肽。这些肽结合 I 类和 II 类 MHC 分子。

### 背景和现有技术

现已完全确认: 许多病理学状态, 如感染、癌症、自身免疫病等都是某些分子的不适当表达为特征的。因此这些分子可作为特定病理学或异常状态的“标志物”。这些分子除了可作为诊断“靶标”, 即诊断这些异常状态所必需鉴定的物质外, 它们还可作为用来产生诊断和/或治疗剂的反应物。其一个绝非限制性的实例是利用癌症标志物来产生特异性针对一种特定标志物的抗体。还有另一非限制性的实例是利用与 MHC 分子形成复合物的肽来产生针对异常细胞的溶细胞性 T 细胞。

当然, 此类物质的制备必需有用于产生这些物质的反应物来源。从细胞进行纯化是进行该工作的一种辛苦而不可靠的方法。另一种优选的方法是分离编码一特定标志物的核酸分子, 随后用分离的编码分子来表达目的分子。

目前, 两种策略已被用于如在人类肿瘤中检测此类抗原。这些被称作遗传学方法和生物化学方法。遗传学方法由例如 dePlaen 等, 美国国家科学院进展(Proc. Natl. Sci. USA)85:2275(1988)举例说明, 其被引入作为参考。在

该方法中, 将获自一种肿瘤的一个 cDNA 文库的数百份质粒集合体转染到受体细胞, 例如 COS 细胞, 或者测试了该特异性抗原表达的抗原阴性的肿瘤细胞系变体中。生物化学方法由例如引入作为参考的 O. Mandelboim 等, 自然(Nature)369:69(1994)举例说明, 其基于对结合于肿瘤细胞 MHC-I 类分子的肽的酸洗脱, 及随后的反相高效液相色谱(HPLC)。抗原性肽在它们结合抗原加工有缺陷的突变细胞系上的空 MHC-I 类分子后被识别, 并诱导同细胞毒性 T 淋巴细胞的特异性反应。这些反应包括 CTL 增殖的诱导、TNF 的释放以及靶细胞的裂解, 可在 MTT 检测法或  $^{51}\text{Cr}$  释放检测法中测定。

这两种对抗原进行分子确定的方法具有下述缺点: 第一, 它们非常麻烦, 耗时而且昂贵; 第二, 它们依赖于具有预定特异性的细胞毒性 T 细胞系(CTLs)的建立。

这两种用于抗原的鉴定和分子确定的已知方法有其固有的问题, 这一点已通过以下事实得到了最好的证实: 迄今为止这两种方法在人体肿瘤中只成功确定了很少的几种新抗原。见例如 van der Bruggen 等, 科学(Science)254:1643-1647(1991); Brichard 等, 实验医学杂志(J. Exp. Med.)178:489-495(1993); Coulie 等, 实验医学杂志 180:35-42(1994); Kawakami 等, 美国国家科学院进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:3515-3519(1994)。

此外, 所述方法学有赖于目的癌症类型已建立的永生细胞系的可用性。建立来自特定癌症类型的细胞系是很难的, 如 Oettgen 等, 北美免疫学和过敏症临床(Immunol. Allerg. Clin. North. Am.)10:607-637(1990)所示。还已知一些上皮细胞癌在体外对 CTL 的易感性极低, 妨碍了常规检测。这些问题促使本领域来发展用于鉴定癌症相关抗原的其他方法。

Sahin 等, 美国国家科学院进展 92:11810-11913(1995)描述了一个关键的方法, 其引入作为参考。还可见美国专利 5,698,396 号以及 1996 年 1 月 3 日提交的申请号 08/479,328。所有这三篇文献均引入作为参考。总之, 该方法涉及 cDNA 文库在原核宿主中的表达。(文库均得自肿瘤标本)。然后, 为了检测那些引发高滴度体液应答的抗原, 用已吸附并稀释的血清对表达文库进行免疫筛选。该方法被称为 SEREX 方法(通过重组表达克隆进行的抗原血清学鉴定(“Serological identification of antigens by Recombinant Expression Cloning”))。该方法学已被用来证实以前鉴定的肿瘤相关抗原的

表达, 以及检测新抗原。见上面参考的专利申请和 Sahin 等, 同上, 以及 Crew 等, 欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J)144:2333-2340(1995)。

SEREX 方法已被用于食管癌标本, 而且目前已经鉴定出一种抗原, 并分离和克隆了其编码核酸分子。这是几个专利申请的主题, 其中一些被引入作为参考。已发现该抗原和其截断形式同癌症患者血清中的抗体发生反应。还发现源自该分子的肽同 MHC 分子结合, 激发溶细胞性 T 细胞和辅助性 T 细胞的应答。在随后的公开中可以看到本发明的这些特征。

#### 附图简述

图 1 显示 NY-ESO-1 抗原的 RNA 在各种类型组织中的表达模式。

图 2 显示 NY-ESO-1 mRNA 的 RNA 印迹(Northern Blot)杂交分析, 其在睾丸和细胞系 SK-MEL-19 中可检测到, 而在其它各种细胞和组织样品中未检测到。

图 3 显示对推导的 NY-ESO-1 氨基酸序列进行修饰的潜在位点。

图 4 是 NY-ESO-1 的亲水性曲线图, 其显示在氨基末端的亲水区和靠近羧基端较长的疏水片段。

图 5 显示利用各种 HLA-A2 阳性、NY-ESO-1 阳性、双阳性或双阴性的细胞进行的 CTL 裂解研究的结果。

图 6 提供资料确定 HLA-A2 为提呈 SEQ ID NO:1 衍生肽的提呈分子。

#### 优选实施方案的详细描述

##### 实施例 1

利用众所周知的方法从快速冷冻的高分化或中分化的食管鳞状细胞癌标本中提取总 RNA。关于此类方法见例如 Chomzynski, 分析生物化学杂志(J. Analyt. Biochem.)162:156-159(1987)。按照制造商的说明利用此 RNA 制备一个随后被转染到  $\lambda$  ZAP 噬菌体载体中的 cDNA 文库。然后将  $\lambda$  ZAP 文库转染到大肠杆菌中, 产生  $1.6 \times 10^6$  个初级分离菌。

然后利用 Sahin 等, 美国国家科学院进展 92:11810-11813(1995)的 SEREX 方法, 其被引入作为参考。简言之, 通过将自体血清和不含有食管癌细胞 cDNA 克隆的  $\lambda$  ZAP 所转染的大肠杆菌的裂解液相合并, 从血清中去除抗大肠杆菌内源性分子的抗体。

然后将清理过的血清稀释，并同含有噬菌斑的硝酸纤维素膜混合。将噬斑室温孵育过夜。随后进行洗涤，然后将滤膜同碱性磷酸酶结合的山羊抗人 FC  $\gamma$  二抗进行孵育，并通过同 5-溴-4-氯-吲哚磷酸盐和氮蓝四唑一起孵育来显色。发现了一共 13 个阳性克隆。

## 实施例 2

鉴定后，通过稀释克隆和用人血清检测将反应性克隆亚克隆至单克隆化。然后利用制造商的说明，对这些克隆进行纯化，体外切割，并转换成 pBK-CMV 质粒的形式。然后利用 EcoRI-XbaI 限制性作图评价插入的 DNA 来确定不同的插入子。鉴定出 8 个不同的插入子，大小从大约 500 到大约 1300 个碱基对。利用 ABI PRISM 自动测序仪对克隆进行测序。

表 1 总结了结果。一个基因由 4 个重叠的克隆代表，另一个由 3 个重叠的克隆代表，而其余的 6 个基因都只由一个克隆代表。

同源性检索揭示被称为 NY-ESO-2、3、6、7 的克隆是已知的。见 Elisei 等，内分泌研究杂志(J. Endocrin. Invest.)16:533-540(1993); Spritz, 等，核酸研究(Nucl. Acids Res.)15:10373-10391(1987); Rabbits 等，自然遗传学(Nature Genetics)4:175-180(1993); Crozat 等，自然 363:640-644(1993); Genbank H18386 和 D25606。以前已经显示两个克隆(NY-ESO-3 和 NY-ESO-6)表达于人体各种正常组织中。尚未发现谱系限制性的证据。NY-ESO-6(cDNA)似乎是 FUS/TLS 基因的 3'-非翻译部分。在此处未报告的实验中，NY-ESO-6 的测序和 DNA 印迹(Southern Blot)分析未显示在肿瘤中易位或点突变的证据。4 个克隆，即 NY-ESO-1、4、5 和 8 显示同所检索数据库中的序列没有明显的同源性，因此对其进行进一步研究。

表 1.用自体血清对从食管癌文库中分离的基因进行免疫筛选

| 基因       | 克隆编号    | 大小    | DNA 数据库         | 注释              |
|----------|---------|-------|-----------------|-----------------|
| NY-ESO-1 | E1-5b   | 679bp | 无明显同源性          | 表达于睾丸和卵巢中       |
|          | E1-114b | 614bp |                 |                 |
|          | E1-153c | 670bp |                 |                 |
|          | E1-50   | 679bp |                 |                 |
| NY-ESO-2 | E1-71a  | 605bp | U1 小核 RNP 1 同系物 | 通过 Ab 筛选而克隆(甲状腺 |

|          |         |        |                 |                                       |
|----------|---------|--------|-----------------|---------------------------------------|
|          | E1-140  | 874bp  |                 | 炎患者)                                  |
|          | E1-31   | 750bp  |                 |                                       |
| NY-ESO-3 | E1-141b | 517bp  | 结肠 3' 直接 MboI   | (dbj D25606、gb H18638) 未发表            |
|          |         |        | cDNA; 成人脑 cDNA  |                                       |
| NY-ESO-4 | E1A-10c | 400bp  | 无明显同源性          | 在正常组织中普遍表达                            |
| NY-ESO-5 | E1A-54  | 670bp  | 无明显同源性          | 表达于正常食管中                              |
| NY-ESO-6 | E1B-9b  | -1.2kb | 人 fus mRNA      | 在脂肉瘤中易位 t(12;16)                      |
| NY-ESO-7 | E1B-20f | -1.0kb | 人 U1-70k sn RNP | 与 NY-ESO-2 不同(emb1 HSU17052、gbM22636) |
| NY-ESO-8 | E1B-20g | -1.3kb | 无明显同源性          | 在正常组织中普遍表达                            |

### 实施例 3

进行研究来评价 NY-ESO-1、4、5 和 8 克隆的 mRNA 表达。为了进行这个研究, 针对每个序列设计特异性寡核苷酸引物, 以便可以扩增 300-400 个碱基对的 cDNA 片段, 而且引物解链温度可以在 65-70 °C 的范围内。然后利用市售的材料和标准的方法进行反转录 PCR。检测了多种类型的正常和肿瘤细胞。克隆 NY-ESO-4 和 NY-ESO-8 是普遍存在的, 因此没有进行进一步研究。NY-ESO-5 显示在原发肿瘤和正常食管组织中高水平表达, 提示其是分化标志物。

在肿瘤 mRNA 和睾丸中发现表达 NY-ESO-1, 而在正常结肠、肾脏、肝脏或脑组织中则没有表达。这种表达模式同其它肿瘤排斥抗原前体一致。

### 实施例 4

针对 NY-ESO-1 在一组更全面的正常和肿瘤组织中进行了上述 RT-PCR 检测。表 2、3 和 4 显示了这些结果。简言之, NY-ESO-1 被发现高表达于正常睾丸和卵巢细胞中。在正常子宫肌层中发现了少量的 RT-PCR 扩增而子宫内膜中未发现, 但是阳性结果并不一致。各种细胞类型的鳞状上皮, 包括正常食管和皮肤也均为阴性。

当检测无关细胞谱系的肿瘤时, 11 个黑色素细胞系中的 2 个表现出高表达, 67 个黑色素瘤样品中的 16 个、33 个乳腺癌样品中的 6 个以及 4 个

膀胱癌中的4个也是如此。在其它肿瘤类型中存在零星的表达。

表2：在正常组织中 NY-ESO-1 的 mRNA 的分布

| 组织 | mRNA | 组织        | mRNA  |
|----|------|-----------|-------|
| 食管 | -    | 肾上腺       | -     |
| 脑* | -    | 胰腺        | -     |
| 胎脑 | -    | 精囊        | -     |
| 心  | -    | 胎盘        | -     |
| 肺  | -    | 胸腺        | -     |
| 肝脏 | -    | 淋巴结       | -     |
| 脾脏 | -    | 扁桃体       | -     |
| 肾脏 | -    | PBL       | -     |
| 胃  | -    | PBL, 活化的# | -     |
| 小肠 | -    | 黑色素细胞     | -     |
| 结肠 | -    | 甲状腺       | -     |
| 直肠 | -    | 子宫        | +/-** |
| 乳腺 | -    | 睾丸        | +     |
| 皮肤 | -    | 卵巢        | +     |

\*来自不同部位的组织用 IL-2 和 PHA 测试

\*\*在部分样品中弱阳性, 通过 RNA 印迹分析为阴性

表3：在黑色素瘤和乳腺癌细胞系中 NY-ESO-1 的 mRNA 的分布

| 细胞系        | NY-ESO-1 mRNA |
|------------|---------------|
| MZ2-MEL3.1 | -             |
| MZ2-MEL2.2 | -             |
| SK-MEL-13  | -             |
| SK-MEL-19  | +             |
| SK-MEL-23  | -             |
| SK-MEL-29  | -             |
| SK-MEL-30  | -             |
| SK-MEL-31  | -             |
| SK-MEL-33  | -             |
| SK-MEL-37  | +             |
| SK-MEL-179 | -             |
| SK-BR-3    | -             |
| SK-BR-5    | -             |
| 734B       | -             |
| MDA-MB-231 | -             |

表 4: 在各种人类肿瘤中通过 RT-PCR 检测 NY-ESO-1 mRNA 的表达

| 肿瘤类型 | mRNA(阳性/总数) | 肿瘤类型        | mRNA(阳性/总数) |
|------|-------------|-------------|-------------|
| 黑色素瘤 | 25/77       | 卵巢癌         | 2/8         |
| 乳腺癌  | 17/43       | 甲状腺癌        | 2/5         |
| 前列腺癌 | 4/16        | 膀胱癌         | 9/13        |
| 结肠癌  | 0/16        | Burkitt 淋巴瘤 | 1/2         |
| 胶质瘤  | 0/15        | 基底细胞癌       | 0/2         |
| 胃癌   | 0/12        | 肌肉瘤         | 0/2         |
| 肺癌   | 5/17        | 其它肉瘤        | 0/2         |
| 肾癌   | 0/10        | 胰腺癌         | 0/2         |
| 淋巴瘤* | 0/10        | 精原细胞瘤       | 0/1         |
| 肝癌   | 2/7         | 脊髓瘤         | 0/1         |

\*非何杰金、非 Burkitt 型

进行另一组实验来确证是否可以通过 ELISA 来检测在癌症患者血清中抗 NY-ESO-1 抗体的存在。

具体如下,将在包被缓冲液(15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、30mM NaHCO<sub>3</sub>、pH9.6, 0.02% NaN<sub>3</sub>)中浓度 1 μg/ml 的重组 NY-ESO-1 吸附至微孔板(每孔 10 μl), 然后 4℃ 保存过夜。用磷酸盐缓冲液洗板并用 10 μl/孔 2%牛血清白蛋白/磷酸盐缓冲液于 4℃ 封闭过夜。洗涤后,将在 2%牛血清白蛋白中稀释的血清 10 μl/孔加入到孔中。室温下孵育 2 小时后,洗板,并加入 10 μl/孔 1:1500 稀释的山羊抗人 IgG-碱性磷酸酶结合物。将该溶液在室温下孵育 1 小时,随后洗涤并加入碱性磷酸酶的底物溶液(10 μl/孔)。室温放置 25 分钟后,用荧光读板仪读取各孔。结果列于下面的表中:

|       | Eso 1+/检测总数 | %    |
|-------|-------------|------|
| 癌症患者: |             |      |
| 黑色素瘤  | 12/127      | 9.4  |
| 卵巢癌   | 4/32        | 12.5 |

|     |      |     |
|-----|------|-----|
| 肺癌  | 1/24 | 4.0 |
| 乳腺癌 | 2/26 | 7.7 |
| 献血者 | 0/70 | 0   |

为了确定肿瘤中 NY-ESO-1 的 mRNA 表达和对 NY-ESO-1 蛋白的抗体应答之间是否相关, 比较了来自 62 个黑色素瘤患者的资料。患者血清同 NY-ESO-1 蛋白有反应的所有患者(即含有针对 NY-ESO-1 的抗体)也都有 NY-ESO-1 阳性的肿瘤, 而 NY-ESO-1 阴性肿瘤的患者在他们的血清中未出现针对 NY-ESO-1 的抗体。缺乏该抗体的 NY-ESO-1 阳性患者占有一定比例。已知大约 20-40% 的黑色瘤表达 NY-ESO-1, 而且只有 NY-ESO-1 阳性肿瘤的患者具有抗体, 资料表明高比例的 NY-ESO-1 阳性肿瘤患者产生抗该蛋白的抗体, 因此提示大规模检测在诊断和对治疗的反应性中是有用的。

#### 实施例 5

然后进行 RNA 印迹分析来研究 NY-ESO-1 转录子的大小, 并证实组织表达模式。采用了 Ausubel 等, 分子生物学最新方法(Current Protocols In Molecular Biology)(John Wiley 和 Sons, 1995)的方法。具体的是, 将每条泳道 20  $\mu$ g 的总 RNA 溶于含有甲酰胺和甲醛的缓冲液中, 加热至 65  $^{\circ}$ C, 然后在含有 3% 甲醛的 1.2% 琼脂糖凝胶上分离, 随后转移质硝酸纤维素膜上。然后利用  $^{32}$ P 标记的探针进行杂交, 随后进行高严谨度洗涤。最后的洗涤是用 0.1  $\times$  SSC、0.1% SDS、60  $^{\circ}$ C 洗涤 15 分钟。

来自睾丸以及在前面的检测中 NY-ESO-1 为阳性的一种黑色素瘤细胞系(SK-MEL-19)的 RNA 显示出一条大约 0.8-0.9kb 的 RNA 转录子。一个食管癌样品显示出在 0.4-0.9kb 范围内的成片条带(smear), 表明部分降解。来自所检测的其它组织或细胞系的 RNA 显示无转录子。

为了获得编码全长转录子的 cDNA, 利用噬斑杂交方法并以原始 cDNA 克隆作为杂交探针对食管癌 cDNA 文库进行了再次筛选。当筛选了  $3 \times 10^5$  个克隆时, 发现了 6 个阳性克隆。对 3 个最长的克隆进行了测序。开放阅读框架分析显示, 所有 3 个克隆都含有整个编码区和不同大小的 5'-非翻译区。最长的克隆长度为 755 个碱基对(不包括多聚 A), 含有 543 个碱基对的编码区, 以及在 5' 末端 53 个非翻译的碱基和在 3' 末端的 151 个非翻译碱基。

见 SEQ ID NO:1(还有图 3)。

长的 ORF 表明推导的 NY-ESO-1 蛋白序列为 180 个氨基酸。单个免疫阳性克隆含有编码其中 173 个的序列。推导的分子量为 17,995 道尔顿。

分析显示在 N-末端部分有大量的甘氨酸残基(前 80 个中有 30, 其余 100 个中有 4 个)。亲水性分析表明在该分子的 N-端一半中有亲水性抗原序列, 还有交替的疏水和亲水序列, 并以一个长的 C 端疏水性尾(152-172 位氨基酸)结束, 其后为一个短的亲水性尾。该模式提示为跨膜蛋白。该分子存在数个潜在的 N-十四酰化位点、3 个磷酸化位点, 但没有 N-糖基化位点。

#### 实施例 6

1995 年从一名罹患恶性黑色素瘤的患者中建立了一个黑色素瘤细胞系“NW-MEL-38”。血清样品、外周血淋巴细胞和肿瘤样品均取自该患者, 并冻存直至进行了本文所描述的工作。为了评价该患者体内的抗肿瘤 T 细胞应答, 对患者进行 HLA 配型, 为 HLA-A1 和 HLA-A2。

为确定来自该患者的黑色素瘤是否表达 NY-ESO-1, 利用标准的技术从肿瘤标本和 NW-MEL-38 细胞系中分离总 RNA。然后, 再利用标准的技术将各样品的 2  $\mu$ g 总 RNA 用于进行 cDNA 合成。

然后利用下述引物: 5'-CACACAGGAT CCATGGATGCTGCAGATGCG G-3'(SEQ ID NO:2)和 5'-CACACAAAGC TTGGCTTAGC GCCTCTGCCC TG-3'(SEQ ID NO:3)将 cDNA 进行 RT-PCR 实验。这些引物应该扩增 SEQ ID NO:1 的一个片段, 其跨越 271 至 599 位核苷酸。

将扩增进行 35 个循环, 利用 60  $^{\circ}$ C 作为退火温度。在 1.5% 琼脂糖凝胶中通过溴化乙锭染色使 PCR 产物显色。

结果说明, 所述肿瘤和细胞系均表达 SEQ ID NO:1。该细胞系和肿瘤样品均用于随后的实验中。

#### 实施例 7

然后将上述分离的 cDNA 分子用于制备重组蛋白。具体包括利用标准的技术对 cDNA 进行扩增, 然后将其克隆到一种市售含有 His 标签的质粒载体即 pQE9 中。在本文未详细阐述的工作中, 还利用了另一种载体,

pQE9K。其与 pQE9 的不同之处在于 pQE9K 为卡那霉素抗性，而不是氨苄青霉素抗性。

将质粒载体转化到大肠杆菌菌株 XL1-Blue 中，并通过限制性作图和 DNA 测序鉴定阳性转化子。利用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导重组蛋白的产生，并按照众所周知的方法在  $\text{Ni}^{2+}$  离子层析柱上纯化该蛋白。当通过 15% SDS-PAGE 和银染分析时，该蛋白被鉴定为分子量约 22 千道尔顿的蛋白质。这与由该蛋白的序列所推测的大小一致。还鉴定出该重组蛋白的 2 种其它形式。这些由在 SEQ ID NO:1 中所报道的氨基酸序列的 10-180 和 10-121 位氨基酸组成。在如上所进行的 SDS-PAGE 上，它们的分子量分别为大约 14 kD 和 20 kD。

进行另外一组实验来在杆状病毒中表达 NY-ESO-1。具体为：通过用 BamH I 和 Hind III 切割从 pQE9 载体中释放 NY-ESO-1 cDNA 插入片段。然后将该插入片段亚克隆至用相同的酶切割过的市售杆状病毒载体中。利用标准的方法确定阳性克隆，并转染到 Sf9 受体细胞中。然后利用补充有 10% 胎牛血清的标准培养基(IPL-41)将重组病毒用于感染昆虫细胞。所用的感染复数为 20。如上所述确定重组蛋白的表达。在该载体中产生的重组蛋白携带一个 His-标签，因此也按照上面所描述的，在  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱上对其进行纯化。该蛋白由 10-180 位氨基酸组成，而且通过 SDS-PAGE 确定分子量为 20kD。

然后制备了其它真核转染子。为了进行该实验，从如上所述 pQE9 载体中分离 NY-ESO-1 编码序列，然后克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 的 BamHI-HindIII 位点中。接着，通过将 COS-7 细胞样品同 150ng 上述质粒和 150ng 含有 HLA-A2.1 的 cDNA 或 HLA-A1 的 cDNA 的质粒 pcDNA 1 Amp 相接触，而用该载体转染 COS-7 细胞。利用了众所周知的 DEAE-葡聚糖氯奎方法。然后将细胞在 37 °C 孵育 48 小时，之后在 CTL 刺激实验中对它们进行检测。具体地按照 Traversari 等，免疫遗传学(Immunogenetics)35:145-148(1992)进行该实验，其被引入作为参考。简言之，将在补充有 10% 人血清的 RPMI 100 $\mu$ l 中的 2500 个 CTLs (NW38-IVS-1，见实施例 9，如下)和 25U/ml 的重组 IL-2 加入到含有 COS-7 转染子的微孔中(20,000 细胞/孔)。24 小时后，从每孔中收集 50  $\mu$ l 的上清，并在一个标准的检测，即一种利用 MTT 测定对 WEHI 164 克隆 13 细胞的细胞毒性的方法中测定 TNF- $\alpha$  的水

平。将阳性细胞用于蛋白质印迹(Western Blot)分析,其在随后的实施例中进行了描述。

所用的 CTL 为 CTL NW38-IVS-1,其按照引入作为参考的 Knuth 等,美国国家科学院进展 81:3511-3515(1984)来制备。具体为,通过将  $10^5$  个自体 NW38-MEL-1 肿瘤细胞和取自受试者的  $10^6$  个外周血淋巴细胞合并来建立混合的 T 淋巴细胞培养。加入细胞因子 IL-2,并在 37 °C 将混合培养孵育一周。去除肿瘤细胞,加入一份新的  $5 \times 10^4$  个肿瘤细胞及 IL-2。该步骤每周重复一次,直到对  $^{51}\text{Cr}$  标记的 NW-MEL-38 细胞进行检测时观察到强的反应。收集反应 T 细胞并冻存直至在进一步实验中使用。

### 实施例 8

然后利用上面所描述的血清样品以及取自上面所描述的 NW-MEL-38 细胞系和上面所描述的 COS-7 转染子的细胞裂解液及也是上面所描述的纯化的重组蛋白来进行蛋白质印迹分析。血清样品取自患者治疗过程中的各个时刻。结果无差别。

在这些检测中,将  $1 \mu\text{g}$  的重组 NY-ESO-1 蛋白或  $5 \mu\text{l}$  每种类型细胞的裂解液稀释于 SDS 中,并煮沸 5 分钟,然后在 15% 的 SDS 凝胶中电泳。在向硝酸纤维素膜( $0.45 \mu\text{m}$ )上转印过夜,并用 3% BSA 封闭后,将印迹同以 1:1000、1:10,000 和 1:100,000 稀释的血清或稀释至 1:50 的抗 NY-ESO-1 单克隆抗体(为阳性对照)进行孵育。单克隆抗体通过 Chen 等,美国国家科学院进展 5915-5919(1996)来制备,其被引入作为参考并详细描述如下。通过以 2-3 周的间隔将重组 NY-ESO-1 蛋白进行 5 次皮下注射对 BALB/C 小鼠进行免疫。免疫制剂包括在佐剂中的  $50 \mu\text{g}$  的重组蛋白。第一次注射利用完全弗氏佐剂,其后利用不完全弗氏佐剂。从免疫的小鼠中取脾细胞,同小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 进行融合来产生杂交瘤。将代表性的杂交瘤 E978 用于制备 mAb。

一旦产生了杂交瘤,便对它们进行克隆,并在微量滴定板上利用标准的固相 ELISA 筛选上清中的重组蛋白。按照 Dippold 等,美国国家科学院进展 77:6114-6118(1980)进行该检测,其被引入作为参考。利用重组的 NY-ESO-1 还设置一系列阴性对照。利用碱性磷酸酶标记的 1:10,000 稀释的山羊抗人 IgG 对上述大肠杆菌所产生的结合重组蛋白的血清抗体进行显

色, 然后利用 NBT-磷酸盐显色。未转染的 COS-7 细胞也被用做对照。取自一个健康个体的血清也用做对照。

在低至 1:100,000 的血清稀释度时发现针对重组蛋白的强反应性, 而且还有针对 NW-MEL-38 裂解液的反应性。对于未转染的 COS-7 细胞无反应性, 取自健康个体的血清也未显示反应性。

### 实施例 9

上面描述了 4 种不同形式的 NY-ESO-1, 即: 在大肠杆菌中由 SEQ ID NO:1 产生的形式和由 10-180 位氨基酸组成的形式、由 10-121 位氨基酸组成的形式以及在上面所讨论的杆状病毒载体系统中表达的由 10-180 位氨基酸组成的形式。按照上面所描述的方法, 将每种形式均用于 ELISA。所有形式的蛋白质均被发现与取自各种患者的抗体以及上面所讨论的小鼠单克隆抗体有同等的反应。

### 实施例 10

在检测上面的 COS-7 转染子时以及在本实施例所讨论的检测法中利用了一个溶细胞性 T 细胞系 “NW38-IVS-1”。该 “CTL” 是通过利用肿瘤细胞系 NW-MEL-38 体外刺激上面所提到的外周血淋巴细胞而产生的。这是利用标准的技术来进行的。

将 CTL 同 NW-MEL-38(其为 HLA-A1、A2 阳性, 而 NY-ESO-1 阳性)、两种 NY-ESO-1 和 HLA-A2 阳性的同种异型细胞系(SK-MEL-37 和 MZ-MEL-19)、MHC I 类阴性的一个细胞系(SK-MEL-19)、HLA-A2 阳性而 NY-ESO-1 阴性的一个细胞系(NW-MEL-145)、以及对照细胞系 K562 和植物血凝素刺激的自体母细胞一起用于细胞毒性检测。利用了各种效应/靶细胞比, 并以  $^{51}\text{Cr}$  标记的靶细胞的裂解为测定参数。由图 5 示之。

结果表明, CTL NW-38-IVS-1 裂解自体细胞系 NW-MEL-38 以及 HLA-A2 和 ESO-1 均为阳性的同种异型细胞系。因此, CTL 可与同种异型物质反应。见图 6。

### 实施例 11

由于患者 NW38 为 HLA-A1 和 HLA-A2 双阳性, 所以进行实验来确定

哪种 MHC 分子是提呈分子。

进行与上面所描述的对 COS-7 细胞的相同实验，不同的是注意保证使 HLA-A1 cDNA 或 HLA-A2 cDNA 分别转化而非一起转化的共转化子分离。这些结果显示，CTL NW38-IVS-1 只裂解含有 NY-ESO-1 和 HLA-A2 的 COS-7 转染子。见图 6。该工作还证实 CTL 的特异性，因为在实施例 9 中所描述的 NY-ESO-1 阴性、HLA-A2 阳性细胞中含有其它已知被加工成由 HLA-A2 分子提呈的肽的分子。

### 实施例 12

一旦提呈的 MHC 分子被确定为 HLA-A2，便利用引入作为参考的由 D'Amaro 等，人类免疫学(Human Immunol)43:13-18(1995)和 Drijfhout 等，人类免疫学 43:1-12(1995)所提出的模型筛选 NY-ESO-1 氨基酸序列来鉴定能与该基元相配的所有肽。利用标准的技术合成了由此所推断的所有氨基酸序列的相应肽，然后按照引入作为参考的 Knuth 等，美国国家科学院进展 81:3511-3515(1984)将其用于细胞毒性检测。特别地，利用了细胞系 CEMX721.174.T2(此后为“T2”)，因为其不将抗原加工成 MHC 复合肽，因此使其非常适于进行本文所述的实验类型。利用标准的方法用 100  $\mu$  Ci 的  $\text{Na}^{51}\text{Cr}\text{O}_4$  对 T2 细胞样品进行标记，然后洗涤 3 次，随后同 10  $\mu$  g/ml 的肽和 2.5  $\mu$  g/ml 的  $\beta$  2-微球蛋白孵育。室温孵育 1 小时。然后以 90:1 的效应/靶细胞比加入反应细胞(100  $\mu$  l 的 CTL NW38-IVS-1 悬液)，并于 37  $^{\circ}\text{C}$  在有 5% $\text{CO}_2$  的水饱和空气中孵育 4 小时。然后将滴定板以 200  $\times$  g 离心 5 分钟，移取 100  $\mu$  l 上清，并测定放射活性。按照已知的策略确定  $^{51}\text{Cr}$  释放的百分比。发现肽 SLLMWITQCFL(SEQ ID NO:4)、SLLMWITQC(SEQ ID NO:5)和 QLSLLMWIT(SEQ ID NO:6)为三个最佳的 CTL 刺激物。在用 NW-MEL-38 和细胞系 SK-MEL-37 和 MZ-MEL-19 做靶标时发现相似的结果，如上所示。

### 实施例 13

对由 SEQ ID NO:1 所编码蛋白的氨基酸序列分析了对应于 HLA 结合基元的肽序列。利用由 Parker 等，免疫学杂志(J. Immunol.)142:163(1994)所教授的算法进行，其被引入作为参考。在随后的表中给出了氨基酸序列、其

可能结合的 HLA 分子以及在 SEQ ID NO:1 中的位置。所获复合物应引发溶细胞性 T 细胞应答。这可以由本领域的技术人员按照, 例如由引入参考的 van der Bruggen 等, 欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol)24:3038-3043(1994)所教授的方法来确定。

| 序列          | MHC/HLA 分子 | 位置      |
|-------------|------------|---------|
| GPESRLLEF   | HLA-A1     | 82-90   |
| LI.MWITQCF  | HLA-A3     | 158-166 |
| LMWITQCFL   | HLA-A3     | 159-167 |
| EFTVSGNIL   | HLA-A24    | 125-133 |
| LQLSISACL   | HLA-A24    | 145-153 |
| GARGPESRL   | HLA-B7     | 79-87   |
| APRGPHGGA   | HLA-B7     | 60-68   |
| ESRLLEFY    | HLA-B7     | 84-92   |
| APPLPVPVGV  | HLA-B7     | 113-121 |
| FATPMEAE    | HLA-B7     | 96-104  |
| AADHRQLQL   | HLA-B7     | 139-147 |
| GARGPESRL   | HLA-B8     | 79-87   |
| ESRLLEFY    | HLA-B8     | 84-92   |
| VPGVLLKEF   | HLA-B35    | 118-126 |
| ESRLLEFY    | HLA-B35    | 84-92   |
| GARGPESRL   | HLA-B35    | 79-87   |
| LEFYLAMPF   | HLA-B44    | 88-96   |
| PESRLLEFY   | HLA-B44    | 83-91   |
| AELARRSLA   | HLA-B44    | 102-110 |
| MEAEARRS    | HLA-B44    | 100-108 |
| QQLSLLMWI   | HLA-B52    | 154-162 |
| AODAPPLPV   | HLA-B52    | 110-118 |
| LQLSISSCL   | HLA-B52    | 145-153 |
| ITQCFLPVF   | HLA-B52    | 162-170 |
| LLEFYLAMPF  | HLA-A1     | 87-96   |
| GPESRLLEFY  | HLA-A1     | 82-91   |
| PLPVPVGVLLK | HLA-A3     | 115-124 |
| RSLAQDAPPL  | HLA-A24    | 107-116 |
| APPLPVPVGV  | HLA-B7     | 113-122 |
| GARGPESRL   | HLA-B7     | 79-88   |
| GPHGGAASLG  | HLA-B7     | 63-72   |
| APRGPHGGAA  | HLA-B7     | 60-69   |
| GPRGAGAARA  | HLA-B7     | 44-53   |
| TAADHRQLQL  | HLA-B8     | 138-147 |
| APPLPVPVGV  | HLA-B52    | 113-122 |
| QQLSLLMWIT  | HLA-B52    | 154-163 |
| LQQLSLLMWI  | HLA-B52    | 153-162 |
| KEFTVSGNIL  | HLA-B52    | 124-133 |

#### 实施例 14

进行进一步的实验来确定其它相关的肽。在这些实验中, 利用了一个稳定的肿瘤细胞系, 即, MZ-MEL-19。该细胞系是利用由被引入作为参考

的 Jäger 等, 实验医学杂志(J. Exp. Med.)187:265-269(1998)所描述的方法从一名被称为 MZ19 的患者建立的。利用 MZ-MEL-19 和在上述实施例 7 以及上述 Jager 等的方法还建立了一种溶细胞性 T 细胞系, 即, MZ2-MEL 19-IVS-1。该 CTL 以 HLA-A2 限制的方式裂解自体肿瘤细胞系。这可用标准方法确定。将上面由 D'Amaro 等所提出的模型用于鉴定在 ESO-1 中与 HLA-A2 结合基元相配的所有序列。用该方式确定了 26 个肽。利用标准的方法对所有这些肽进行合成、纯化, 并检测完整性。然后合成肽, 并在随后的实验中进行测试。利用了 MZ19-IVS-1 以及实施例 12 中所描述的 T2 细胞。SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 的肽结合 HLA-A2 分子, 并被 CTL MZ19-IVS-1 识别, 随后裂解这些细胞。该 CTL 还识别 HLA-A2 和十肽 LLMWITQCFL(SEQ ID NO:7)形成的复合物, 该十肽被发现位于 SEQ ID NO:1 的 156-167 位点处。

#### 实施例 15

通过进一步的研究确定 CD4+辅助 T 细胞是否识别 MHC II 类分子和肽的复合物。

肿瘤细胞系 MZ-MEL-19 的配型为 HLA-DR53 阳性。因此, 对 NY-ESO-1 利用 Futaki 等, 免疫遗传学 42:299-301(1995)来筛选, 其被引入作为参考, 文中指出 HLA-DR53 的结合基元。一共 28 个肽理论上独自可以结合 HLA-DR53 和抗原提呈细胞。

外周血淋巴细胞(“PBL”)分离自 2 个具有转移的黑色素瘤的患者, 他们的配型为 HLA-DR53 阳性。

利用标准的市售试剂进行配型。一个患者的配型为 HLA-DRB1(等位基因 1501-05、1601-1603、1605 和 0701)、HLA DRB4\*(等位基因 0101-0103)和 DRB5\*(等位基因 0101)阳性, 而第二个患者的配型为 HLA-DRB1\*(等位基因 1401、1407、1408 和 0901)、HLA-DRB3\*(等位基因 0201-0203)和 DRB4\*(等位基因 0101-0103)阳性。按照 Bodmer 等, 人类免疫学 34:4-18(1992), 其被引入作为参考, HLA-DRB4\*的所有等位基因被称为 HLA-DR53。

用包被有适当抗体的磁珠处理 PBL 来清除 CD4+和 CD8+ T 淋巴细胞。将其余的细胞以  $4 \times 10^6$  个细胞/孔接种于 24 孔板中, 并使其贴壁于孔塑料

24 小时。去除任何未贴壁的细胞，并将其余的细胞用做抗原提呈细胞。在用 5  $\mu$ g/ml 的抗  $\gamma$  干扰素抗体 4 $^{\circ}$ C 包被过夜的 96 孔平底硝酸纤维素板中，用 GM-CSF(1000U/ml)和 IL-4(1000U/ml)刺激这些细胞 5 天。细胞以  $3.5 \times 10^5$  个细胞/孔进行接种。

然后用 4  $\mu$ g/孔的测试肽或 2  $\mu$ g/孔的完整 NY-ESO-1 蛋白做为对照进行冲击。

然后以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔加入 CD4+ T 细胞，细胞悬浮于 RPMI 1640 培养基和 2.5ng/ml 的 IL-2 中，终体积为 100  $\mu$ l，其中 RPMI 1640 培养基中添加有 10%人血清、L-天冬酰胺(50mg/l)、L-精氨酸(242mg/l)和 L-谷氨酰胺(300mg/l)。

将混合物于 37 $^{\circ}$ C 在水饱和的空气中孵育 48 小时。然后，用 0.05%的 Tween 20/PBS 溶液洗板 6 次，随后以 0.5  $\mu$ g/ml 加入生物素化的抗  $\gamma$  干扰素抗体。将抗体在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时，随后用标准的试剂处理培养板 1 小时。加入底物 3-乙基-9-氨基吡唑，并孵育 5 分钟，阳性表现为红色的斑点。每个孔中红色斑点的数量表示 CD4+ T 淋巴细胞的频率，该 CD4+ T 淋巴细胞识别肽和 HLA-DR53 的复合物或 HLA-DR53 和由重组 NY-ESO-1 所加工的肽的复合物。单用试剂(即单纯 CD4+细胞和单纯染色剂)进行测试作为对照。

发现下面的肽使 CD4+ T 淋巴细胞致敏而释放  $\gamma$  干扰素。

AADHRQLQLSISSCIQQQL  
VLLKEFTVSGNILTIRLT  
PLPVPGVLLKEFTVSGNI

(SEQ ID NOS:8-10)

这 3 种肽与 Futaki 等的上述结合 HLA-DR53 的基元相配，该基元具有锚定残基 Tyr、Phe、Trp 或 Leu，从该残基之后的第一个残基开始计数的第三个残基为 Ala 或 Ser。

发现其它结合 HLA-DR53 的肽。

这些肽为：

GAASGLNGCCRCGARGPE  
SRLLEFYLA MPFATPMEA  
TVSGNILTIRLTAAADHRQ

(SEQ ID NOS:11-13)

上述的实施例描述了编码一种食管癌相关抗原的核酸分子的分离。本文使用了“相关”，因为虽然该相关分子由食管癌所表达是清楚的，但其它癌也表达该抗原，例如黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌和肺癌。

本发明涉及那些核酸分子，其编码所述抗原，而且其在严谨的条件下参照序列 SEQ ID NO:1 杂交。本文所用的“严谨的条件”指例如那些在美国专利 5,342,774 号中所定义的条件，即在 65 °C 杂交 18 小时，随后 4 次在  $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中洗涤 1 小时，最后在  $0.2 \times \text{SSC}$ 、更优选  $0.1 \times \text{SSC}$ ，0.1% SDS 中洗涤 30 分钟，以及其他提供相同水平严谨度的条件和更严谨的条件。

本发明的一部分还为表达载体，其包括有与一个启动子可操作连接(即“可操作地连接于”)的本发明的核酸分子。此类载体的构建在本领域的技术人员中是已知的，细胞的转化或转染、制备编码目的分子的真核细胞系或原核细胞系同样也是已知的。在这种方式中可以选用的宿主细胞的实例是 COS 细胞、CHO 细胞、酵母细胞、昆虫细胞(例如，草地夜蛾)、NIH 3T3 细胞等等。原核细胞，例如大肠杆菌和其它细菌也可使用。

本发明还有一部分为本文所描述的抗原，其为原始肽形式和翻译后的修饰形式，以及由 SEQ ID NO:1 所编码蛋白的至少 10-121 位氨基酸和最多 10-180 位氨基酸所组成的蛋白。该分子不经任何翻译后修饰便大到足以具有抗原性，因此当同一种佐剂(或没有它)联合时，其以前体或翻译后修饰的形式都可用作免疫原。如上所示，这些蛋白可以用来确定在样品，例如血清或血液中是否存在抗体。利用该抗原制备的抗体，不论多克隆还是单克隆，以及产生单克隆抗体的杂交瘤，也均为本发明的一部分。这些抗体可作为完整分子或其部分用于治疗或诊断，如下述。本发明还有一部分为反应性片段，例如 Fab、 $\text{F(ab)}_2$  和其它片段，以及嵌合体、人源化抗体、重组制备的抗体等等。特别优选的是嵌合体，其中除了互补性决定区“CDR”以外的整个抗体是人的，而 CDR 是小鼠的。

本公开显示，本发明的蛋白和核酸分子可用于诊断。本文所讨论的 SEREX 方法学是以对一种病理学相关抗原的免疫应答为前提的。因此，可以通过例如检测受检者的一种体液标本，如血清，同抗原本身的反应性来检测相关病理学。反应性可以被认为是该病理学可能存在的指征。因此，也可以通过任何本领域众所周知而无需详细说明的标准核酸杂交检测法来

检测抗原的表达。也可用标准的免疫检测法检测针对受试分子的抗体。

SEQ ID NO:1 的分析表明其中存在 5'和 3'非编码区。本发明涉及那些分离的核酸分子,其包括至少编码片段,即 SEQ ID NO:1 的 54-593 位核苷酸,而且其可能含有 SEQ ID NO:1 的 1-53 和/或 594-747 位核苷酸的一个或全部。

如上面所讨论的,进一步的研究揭示这些分子也被加工成引发溶细胞性 T 细胞裂解的肽。实施例 7 显示对 HLA-A2 分子如何进行这类基元分析。对于各种 MHC 或 HLA 分子的基元已有了大量的工作,其在此处是适用的。因此,本发明的另一方面为一种治疗方法,其中将结合患者肿瘤细胞表面 HLA 分子的一个或多个肽,以它们足以结合 MHC/HLA 分子并激发 T 细胞对细胞的裂解的数量施予患者。上述 HLA-A2 分子的实例绝非该方法可利用的唯一类型。任何肽组合也可以使用,如其它 HLA 分子的那些肽,如上述。可以单独或联合使用的这些肽,以及整个蛋白或其免疫反应性部分可以根据受试者的需要利用任何标准的施药形式,例如静脉内、皮内、皮下、经口、直肠、以及穿皮,施予受试者。标准的药用载体、佐剂,如皂苷、GM-CSF 和白细胞介素等也可以使用。此外,这些肽和蛋白可以同所列举的材料一起制成疫苗,如同可与树突状细胞或提呈相关 MHC/肽复合物的其它细胞一起配制一样。这些肽还可以用于形成 HLA/肽的多体复合物,例如那些由 Dunbar 等,现代生物学(Curr. Biol.)8:413-416(1998),其被引入作为参考,其中将 4 种肽/MHC/生物素复合物连接至链亲和素或亲和素分子。此类复合物可用来鉴定和/或刺激 T 细胞前体。

相似地,本发明设想一些疗法,其中将编码 NY-ESO-1 的核酸分子插入到载体例如基于腺病毒的载体中,使其能够转染到真核细胞例如人的细胞中。类似地,编码这些肽中的一或多种的核酸分子可以插入到这些载体中,其随后成为核酸为基础的疗法的主要组成部分。

这些检测法中的任何检测法也可以用于进展/消退研究。仅用上面提出的方法中的任何或所有方法监测蛋白的水平、其表达等等就可以监测涉及 NY-ESO-1 表达的异常过程。

应该清楚的是这些方法也可以用于跟踪一种治疗方案的疗效。基本上,利用上面讨论的检测法中的任何方法可以获得 NY-ESO-1 的基线值,施予给定的治疗剂,然后监测其后该蛋白的水平,观察 ESO-1 水平的改变

作为该治疗方案疗效的指标。

如上所示，本发明特别涉及对 NY-ESO 分子的“整合”免疫应答的识别。其一个分支为监测癌症治疗过程的能力。在作为本发明的一个部分的此方法中，一个需要治疗的受试者接受本文所描述的一类接种。这样一种接种引起例如针对表面提呈 HLA/肽复合物的细胞的 T 细胞应答。应答还包括一种抗体应答，可能是通过 T 细胞对细胞的裂解使抗体激发蛋白释放的结果。因此，通过监测免疫应答可以监测疫苗的效果。如上所示，抗体滴度或 T 细胞数的升高可以当作疫苗进展的一个指标，反之亦然。因此，本发明的另一个方面为施药后通过测定受试者中特异性针对疫苗本身或疫苗为其一部分的一个大分子的抗体水平来监测疫苗效果的方法。

通过监测接受疫苗的受试者的 T 细胞应答也可测定疫苗的效果。多种检测法可以用于测定这些体外刺激的 T 细胞中前体的频率。这些包括，但不限于，铬释放检测法、TNF 释放检测法、IFN  $\gamma$  释放检测法、ELISPOT 检测法等等。可以测定前体 T 细胞频率的改变而且其与疫苗的效果相关。其它可以利用的方法包括 MHC/肽的多体复合物的使用。此类复合物的一个实例是 Dunbar 等，现代生物学 8:413-416(1998)(其被引入作为参考)的四聚 HLA/肽-生物素-链亲和素系统。

对在病理学状态例如癌症中所涉及的 NY-ESO-1 蛋白的鉴定也提示除了上面所讨论的那些外的多种治疗方法。上述实验证实，抗体是应答蛋白质的表达而产生的。因此，本发明的另一个实施方案为通过施予抗体，如人源化抗体、抗体片段等等，对以 NY-ESO-1 蛋白的异常或不正常水平为特征的状态进行治疗。这些抗体或片段可以连接有或标记有适当的细胞抑制性或细胞毒性试剂。

也可施予 T 细胞。要注明的是，可以在体外利用免疫反应细胞，例如树突状细胞、淋巴细胞或其它任何免疫反应细胞诱导 T 细胞，并将其回输到待治疗受试者中。

要注明的是，T 细胞和/或抗体的产生也可以通过施予细胞来完成，优选经处理使其具有不增殖性的细胞，所述细胞提呈与应答相关的 T 细胞或 B 细胞表位，例如上面讨论的表位。

治疗方法还可以包括反义疗法，其中将一种反义分子，优选长度为 10 到 100 个核苷酸的反义分子，“单纯”或者在一种促进其掺入细胞的载体，

例如脂质体中施予受试者，随后抑制该蛋白的表达。此类反义序列也可以掺入到适当的疫苗中，例如病毒载体(如痘苗病毒)、细菌构建体，例如已知BCG疫苗的变体等中。

本发明还有一个部分为肽，其可以是被定义为具有 LLMWIT(SEQ ID NO:14)核心序列的九聚体、十聚体或十一聚体，其在第一个 L 残基后具有至少一个额外的残基，优选为丝氨酸，且可以具有多达 3 个残基，其中丝氨酸连接于 L 形成-SL-，而且在 C-末端具有 0-4 个额外的氨基酸，其如上所示结合 HLA-A2 分子，从而引发 CTL 应答。这些肽可通过施予 HLA-A2 阳性并在病理情况中表达 NY-ESO-1 的患者而用于治疗，也可用于诊断，即确定的 HLA-A2 阳性细胞是否存在或者相关的 CTL 是否存在等等。

HLA-A2 分子是 MHC I 类分子，针对肽和 I 类分子的复合物应答的 T 细胞通常为 CD8<sup>+</sup>细胞。另一亚群的 T 细胞，CD4<sup>+</sup>细胞，针对 MHC II 类分子和肽的复合物应答，而且在黑色素瘤患者中已检测到由自体培养的树突状细胞提呈的针对重组 NY-ESO-1 的 MHC II 类分子限制性 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答。特别地，在本文未描述的结果中，利用众所周知的技术，使 CD4<sup>+</sup>细胞从 PBL 或血清样品中与其它细胞分离。然后将它们同用 NY-ESO-1 蛋白冲击过的树突状细胞相混合。观察到 CD4<sup>+</sup>细胞的增殖，从另一个侧面反映本文所讨论的整合免疫应答。因此，本发明的另一方面为这些 CD4<sup>+</sup> T 细胞、结合 MHC II 类分子的肽以及它们在治疗中的应用。

由 SEQ ID NO:14 的核心序列所定义的肽的实例为由 SEQ ID NO:7 所定义的肽。如所示的，该肽结合 HLA-A2 分子。因此，它是 HLA-A2 的“标志物”，也是如上刺激 CTL 增殖的肽/MHC 复合物的一个组分。

如实施例所示，ESO-1 也被加工成与 MHC II 类分子，特别是 HLA-DR53 形成复合物的肽。这些分子与上面 Futaki 等所描述的基元相配，即 Tyr、Phe、Trp 或 Leu，从该残基之后的第一个残基开始计数的第三个氨基酸为 Ala 或 Ser。此类肽长度必需为至少 18 个氨基酸，而且优选不超过 25 个氨基酸。它们优选由 18 个氨基酸组成，例如 SEQ ID NO:8、9、10、11、12 和 13。这些肽用于鉴定 HLA-DR53 阳性细胞。此外，诸如 SEQ ID NO:8、9 和 10 的肽可用来激发辅助 T 细胞的增殖，如实施例所示。上述关于 MHC I 类限制性肽的所有应用也可用于这些 MHC II 类限制性肽。此外，由于对 MHC I 类分子/肽复合物的免疫应答不同于对 MHC I 类分子/肽复合物的免疫应答，

所以可使两类肽组合如在免疫组合物中，由此产生组合免疫应答。因此，所述所有应用可仅针对 I 类分子限制性肽、也可仅针对 II 类分子限制性肽、或者针对两者的组合。

本发明的其它特征和应用对于普通技术人员是清楚的，因此本文无需描述。

所用的术语和表述用作描述的而非限制的术语，而且无意利用这些术语和表述来排除所显示和所描述特征或其部分的任何等价体，需承认各种修饰都可能在本发明的范围内。

## 序列表

- (1)一般信息:
- (i) 申请人: Stockert, Elisabeth ; Jager, Elke ; Chen, Yao-Tseng ; Scanlan, Matthew ; Knuth, Alexander ; Old, Lloyd J.
  - (ii) 发明的标题: 结合 NY-ESO-1 癌症相关蛋白的抗体、其应用、NY-ESO-1 的截断形式、以及由其衍生的 HLA 结合肽
  - (iii) 序列数: 7
  - (iv) 联系地址:
    - (A) 收信人: Felfe&Lynch
    - (B) 街道: 第三大街 805 号
    - (C) 城市: 纽约市
    - (D) 州: 纽约
    - (E) 美国
    - (F) 邮编: 10022
  - (v) 计算机可读形式:
    - (A) 媒介类型: 磁盘, 3.5 英寸, 144kb 容量
    - (B) 计算机: IBM
    - (C) 操作系统: PC-DOS
    - (D) 软件: WordPerfect
  - (vi) 当前申请数据:
    - (A) 申请号:
    - (B) 提交日期:
    - (C) 分类:
  - (vii) 在先申请数据:
    - (A) 申请号: 08/937,263
    - (B) 提交日期: 1997 年 9 月 15 日
  - (vii) 在先申请数据:
    - (C) 申请号: US 08/752,182
    - (D) 提交日期: 1996 年 10 月 3 日
  - (viii) 律师/代理人信息:

- (A) 姓名: Hanson, Norman D.  
 (B) 注册号: 30,946  
 (C) 参考/案号: LUD 5466.3  
 (ix) 通讯信息:  
 (A) 电话: (212)688-9200  
 (B) 传真: (212)838-3884

(2)SEQ ID NO: 1 的信息:

- (i) 序列特征:  
 (A) 长度: 752 个碱基对  
 (B) 类型: 核酸  
 (C) 链型: 双链  
 (D) 拓扑构型: 线性

(x) 序列描述: SEQ ID NO: 1

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ATCCTCGTGG GCCCTGACCT TCTCTCTGAG AGCCGGGCAG AGGCTCCGGA GCC                                                                 | 53  |
| ATG CAG GCC GAA GGC CGG GGC ACA GGG GGT TCG ACG GGC GAT GCT<br>Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala | 98  |
| 5 10 15                                                                                                                    |     |
| GAT GGC CCA GGA GGC CCT GGC ATT CCT GAT GGC CCA GGG GGC AAT<br>Asp Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn | 143 |
| 20 25 30                                                                                                                   |     |
| GCT GGC GGC CCA GGA GAG GCG GGT GCC ACG GGC GGC AGA GGT CCC<br>Ala Gly Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Aly Pro | 188 |
| 35 40 45                                                                                                                   |     |
| CGG GGC GCA GGG GCA GCA AGG GCC TCG GGG CCG GGA GGA GGC GCC<br>Arg Gly Ala Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala | 233 |
| 50 55 60                                                                                                                   |     |
| CCG CGG GGT CCG CAT GGC GGC GCG GCT TCA GGG CTG AAT GGA TGC<br>Pro Arg Gly Pro His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys | 278 |
| 65 70 75                                                                                                                   |     |
| TGC AGA TGC GGG GCC AGG GGG CCG GAG AGC CGC CTG CTT GAG TTC<br>Cys Arg Cys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe | 323 |
| 80 80 90                                                                                                                   |     |
| TAC CTC GCC ATG CCT TTC GCG ACA CCC ATG GAA GCA GAG CTG GCC<br>Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala | 368 |
| 95 100 105                                                                                                                 |     |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| CGC AGG AGC CTG GCC CAG GAT GCC CCA CCG CTT CCC GTG CCA GGG       | 413 |
| Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly       |     |
| 110 115 120                                                       |     |
| GTG CTT CTG AAG GAG TTC ACT GTG TCC GGC AAC ATA CTG ACT ATC       | 458 |
| Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile       |     |
| 125 130 135                                                       |     |
| CGA CTG ACT GCT GCA GAC CAC CGC CAA CTG CAG CTC TCC ATC AGC       | 503 |
| Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln Leu Gln Leu Ser Ile Ser       |     |
| 140 145 150                                                       |     |
| TCC TGT CTC CAG CAG CTT TCC CTG TTG ATG TGG ATC ACG CAG TGC       | 548 |
| Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys       |     |
| 155 160 165                                                       |     |
| TTT CTG CCC GTG TTT TTG GCT CAG CCT CCC TCA GGG CAG AGG CGC       | 593 |
| Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg       |     |
| 170 175 180                                                       |     |
| TAA GCCCAGCCTG GCGCCCTTC CTAGGTCATG CCTCCTCCCC TAGGGAATGG         | 646 |
| TCCCAGCACG AGTGGCCAGT TCATTGTGGG GGCCTGATTG TTTGTCGCTG GAGGAGGACG | 706 |
| GCTTACATGT TTGTTTCTGT AGAAAATAAA ACTGAGCTAC GAAAAA                | 752 |

## (2)SEQ ID NO: 2 的信息:

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 31 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

CACACAGGAT CCATGGATGC TGCAGATGCG G

31

## (2)SEQ ID NO: 3 的信息:

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 32 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

CACACAAAGC TTGGCTTAGC GCCTCTGCCC TG

32

## (2)SEQ ID NO: 4 的信息:

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 11 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑构型: 线性

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Leu | Met | Trp | Ile | Thr | Gln | Cys | Phe | Leu |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

## (2)SEQ ID NO: 5 的信息:

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 9 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (E) 拓扑构型: 线性

99806448.3

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys  
5

(2)SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(F) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr  
5

(2)SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(G) 拓扑构型: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7

Leu Leu Met Trp Ile Thr  
5

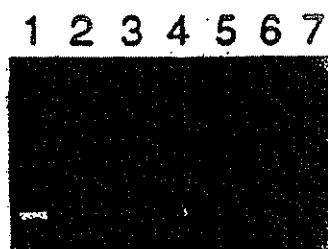


图 1A

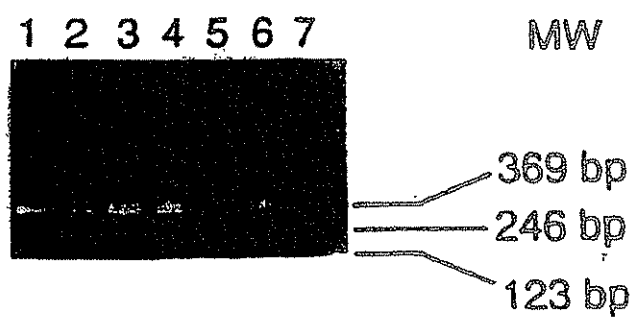


图 1B

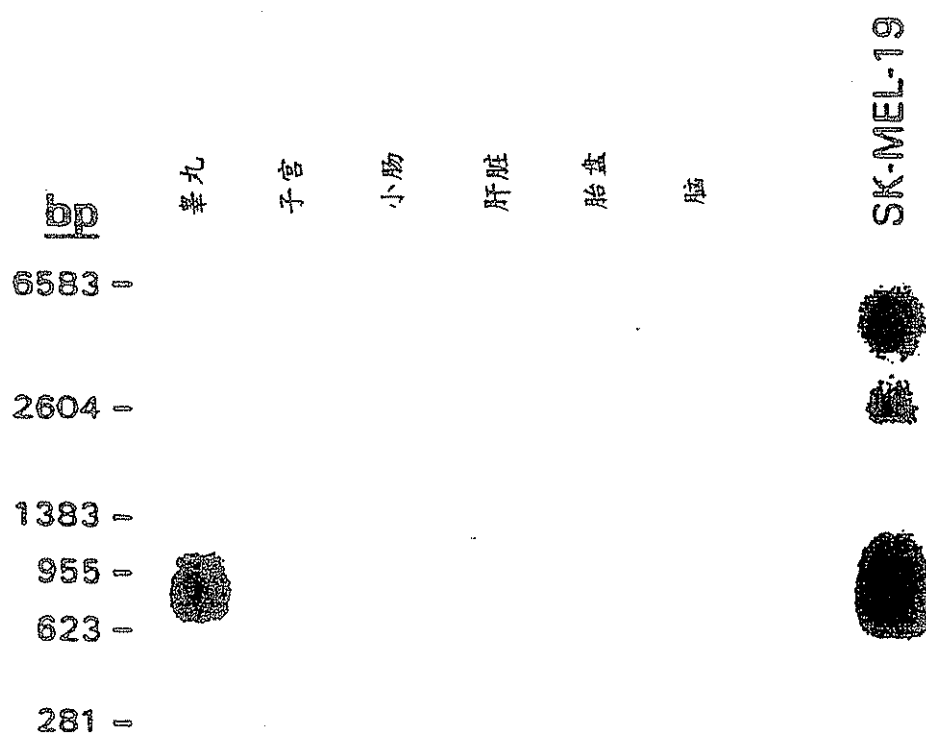


图 2

图 3

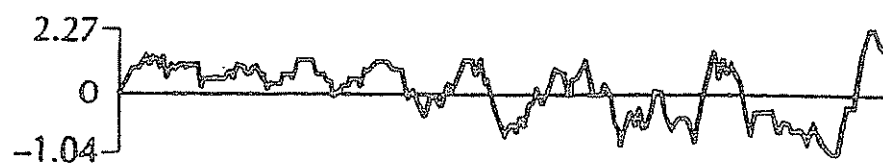


图 4

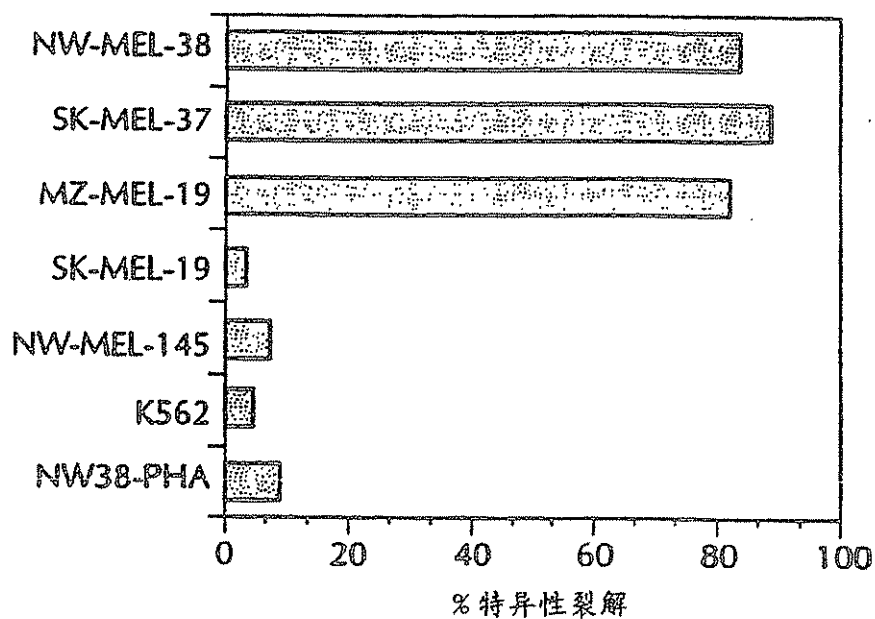


图 5

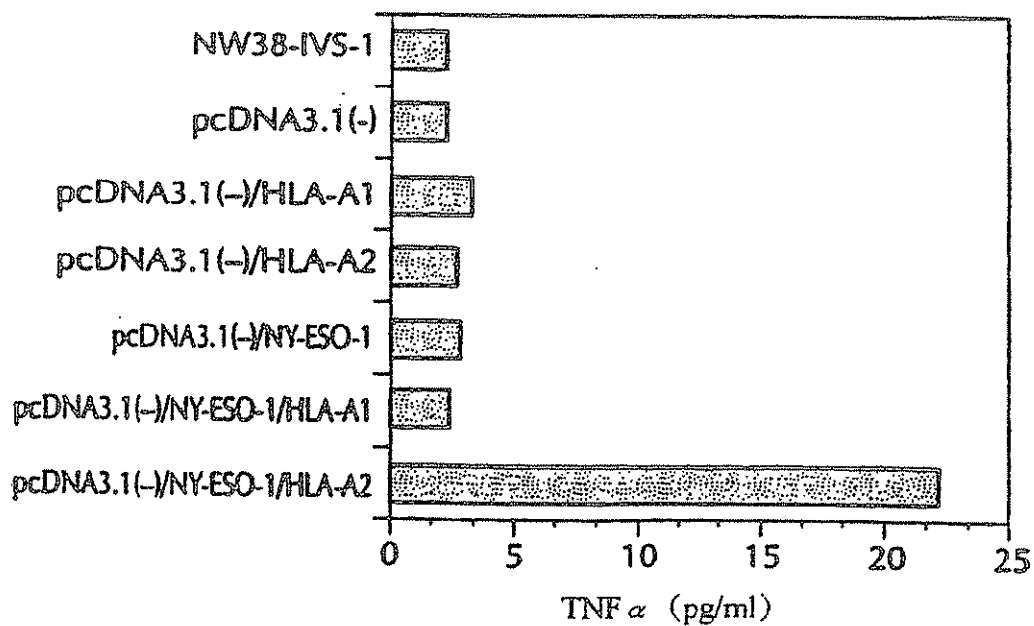


图 6