[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/12
C07K 7/06
C12Q 1/68
A61P 35/00

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 94107222.3

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230535C

[22] 申请日 1994.6.17 [21] 申请号 94107222.3
[30] 优先权
[32] 1994. 2.15 [33] US [31] 08/196,630
[32] 1993. 6.17 [33] US [31] 08/079,110
[71] 专利权人 路德维格癌症研究所
地址 美国纽约州
[72] 发明人 皮埃尔·范德布鲁根
蒂尔瑞·布恩 —法勒尔
皮埃尔·库里
琼 —克里斯多弗·雷纳德
审查员 常 矛

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称 与主要组织相容复合物分子的 HLA-C-克隆 10 能形成复合物的分离的多肽及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一新族肿瘤排斥抗原前体，以及编码它们的核酸分子。这些所述肿瘤排斥抗原前体被称作 BAGE 肿瘤排斥抗原前体，编码它们的核酸分子被称作 BAGE 编码分子。本发明描述了该编码序列和该肿瘤排斥抗原前体分子的各种诊断和治疗用途。

ISSN1008-4274

1、一种分离出的包括 SEQ ID NO：1 所示的核苷酸序列的核酸分子。

2、一种分离出的核酸分子，在 0.3 X SSC，0.1% SDS 中洗涤 20 分钟的严格的条件下，它可与 SEQ ID NO：1 所示的核酸序列杂交，并编码肿瘤排斥抗原前体，其附加条件为所述分离出的核酸分子不编码 MAGE 肿瘤排斥抗原前体。

3、一种分离出的与权利要求 1 所述的核酸分子互补的 mRNA 分子。

4、一种用权利要求 1 所述的核酸分子转染的宿主细胞。

5、一种用权利要求 2 所述的核酸分子转染的宿主细胞。

6、一种包括将权利要求 1 所述的分离出的核酸分子经操作连接于启动子的表达载体。

7、一种包括将权利要求 2 所述的分离出的核酸分子经操作连接于启动子的表达载体。

8、如权利要求 4 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞是表达 HLA－C 克隆 10 的哺乳动物细胞。

9、如权利要求 5 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞是表达 HLA－C 克隆 10 的哺乳动物细胞。

10、如权利要求 6 所述的表达载体，还包括编码 HLA－C 克隆 10 的核酸分子。

11、如权利要求 7 所述的表达载体，还包括编码 HLA－C 克隆 10 的核酸分子。

12、表达试剂盒，包括如下每一种独立的部分：

（i）权利要求 1 所述的分离出的核酸分子和

（ii）编码 HLA－C 克隆 10 的核酸分子。

13、表达试剂盒，包括如下每一种独立的部分：

（i）权利要求 2 所述的分离出的核酸分子和

（ii）编码 HLA－C 克隆 10 的核酸分子。

14、由权利要求 1 所述的核酸分子编码的分离出的肿瘤排斥抗原前体。

# 与主要组织相容复合物分子HLA－C－克隆10能形成复合物的分离的多肽及其用途

本发明涉及一种用于诊断和治疗疾病的多肽，特别是它涉及被加工成一个由MHC分子的HLA－C－克隆10提呈（presented）的肽分子的多肽，以及该被提呈的肽。这些多肽被用于诊断和治疗。

哺乳动物免疫系统识别和与外源物质反应的过程是个复杂的过程。该系统一个很主要方面是T细胞应答。这种应答要求T细胞识别并与称为人白细胞抗原（“HLA”），或主要组织相容复合物（“MHCs”）的肽类细胞表面分子进行相互作用的复合物。这些多肽来源于参与提呈HLA/MHC分子之细胞加工的更大分子。这方面参见Male et al.，Advanced Immunology (J.P.Lipincott Company，1987，特别其第六至十章。T细胞和HLA/肽的复合物的相互作用是受限制的，这要求对一种HLA分子和一种肽特定结合状态具有特异性的一种T细胞。假如不存在特异性T细胞，尽管存在其配对结合的复合物，也没有T细胞应答。同样，假如无特异的复合物，尽管T细胞存在也无应答。这种机理涉及自身免疫病免疫系统对外源物质的应答，以及对细胞异常性的应答。人们将大量工作的重点放在这一机理的研究上，经过这种机理可将蛋白加工成HLA结合多肽。参见Barinage，Science 257：880 (1992)；Fremont et

al.，Science 257：919（1992）；Matsumura et al.，Science 257：927（1992）；Latron et al.，Science 257：964（1992）。

癌症也已暗示存在有T细胞识别细胞异常性的机制。例如，在PCT申请专利中的PCT/US92/04354（申请日1992年5月22日，公开日1992年11月26），其中所揭示的一族基因，它们被加工成能在细胞表面表达的多肽，这可引起由特异的CTLs对肿瘤细胞溶解的作用。所述的这类基团编码着“肿瘤排斥抗原前体”（“tumor rejection antigen precursors”）或“TRAP”分子，源自其中的多肽称之为“肿瘤排斥抗原”或“TRAs”。参见Traversari et al.，Immunogenetics 35：145（1992）；van der Bruggen et al.，Science 254：1643（1991），关于该族基因的进一步资讯也可参见1991年12月12日申请的USSN807，043。

在USSN938，334专利申请中揭示了由HLA-A1分子提呈的九肽。该文献披露假如给出对特定的HLA分子特定的多肽已知的特异性，人们希望一特定的肽结合一个HLA分子，而不结合其他的分子。这一点很重要，因为不同的个体具有不同HLA表型。结果，当一特定的肽被鉴定作为一特异的HLA分子的配对结合物的过程具有诊断和治疗意义时，这仅与具有

特定HLA表型的个体相关。该领域仍需要进一步研究，因为细胞异常性并不限于一种特定的HLA表型，而定向或靶位疗法需要有关异常细胞表型的某些知识。

在USSN008，446中（1993年1月22日申请的），披露MAGE-1表达产物被加工成一个次级TRA。这种次级TRA由HLA-C-克隆10分子提呈。该文献指出一个已知的TRAP可以产生大量的TRAs。

1992年12月22日申请的USSN994，928中描述酪氨酸酶是一种肿瘤排斥抗原前体。该文献披露由某些正常细胞（如黑色素细胞）产生的分子在肿瘤细胞中可被加工生成由HLA-A2分子提呈的肿瘤排斥抗原。

1993年3月18日提交的USSN08/032，978中公开一种由HLA-A2分子提呈的次级TRA，它不是源于酪氨酸酶。所述的TRA来自TRAP，但是，它是由一非MAGE基团编码的。该文献指出一个特定的HLA分子可以提呈不同来源的TRAs。

1993年6月17日申请的USSN08/079，110，为本申请的母申请，它披露一族基因，本文中称之为BAGE族。经观察得出这些基因也编码肿瘤排斥抗原前体。在那件申请中可见称做HLA-C-克隆10的MHC分子提呈来自BAGE肿瘤排斥抗原前体的肿瘤排斥抗原；然而，并没有披露所述的肿瘤排斥抗原。本申请涉及这种肽，本文中称之为SEQ ID NO：10，同时也讨论鉴别这一肽的其他方面。

以下将进一步描述本发明。

附图简要说明:

图1 所示采用CTL克隆82/82针对各种细胞系所做的铬释放分析测定的结果。

图2 所示为CTL克隆82/82用来与一组不同的细胞系对比，其TNF释放分析的结果。

图3 为用转染的COS细胞进行TNF释放分析的结果。

图4 表示用CTL克隆株82/82对各种转染子细胞进行的试验的结果和测定TNF释放量。

图5 为用SEQ ID NO:10的肽刺激溶细胞性T细胞克隆CTL82/82后测定细胞数最大溶解(half maximal lysis of cell)的研究所得到的结果。

实施例1

采用标准的方法学，用采自患者的MZ2的黑色素瘤细胞建立一个黑色素瘤细胞系，MZ2-MEL。该细胞系参见PCT/US92/04354，申请日为1992年5月22日，公开日为1993年11月26日。一旦细胞系建立之后，辐照其样品，使得其变为非增殖的。然后使用这种辐照后的细胞分离对其特异的溶细胞性T细胞克隆株（“CTLs”）。

从患者MZ2身上采集外周血单核细胞（“PBMCs”）的样品，并将其与辐照后的黑色素瘤细胞接触。观察混合物中黑色素瘤细胞溶解情况，该结果显示针对由黑色素瘤细胞提呈的肽和HLA分子复合物的特异性CTLs存在于样品中。

所用的细胞溶解分析试验是按Herin等人报道

的铬释放分析方法进行的，参见Herin et al.，Int.J.Cancer 39：390-396（1987）。然而本文也描述这一试验。在体外培养出靶黑色素瘤细胞，然后在DMEM中以$10^7$细胞/ml重新悬浮，并补加10mM HEPES和30%FCS，以200μCi/ml的Na($^5$Cr)$O_4$，37℃孵育45分钟。用加有10mM Hepes的DMEM洗涤标记细胞三次。在含有10mM Hepes和10%FCS的DMEM中悬浮之，随后将等份量含有$10^3$细胞的100μl加入96孔微培养板。在相同培养基中的PBLs也被加入每孔之中、每孔100μl。重复两次该试验。100g离心培养板4分钟，在8%$CO_2$条件下37℃孵育4小时。

重新离心培养板，收集和计数100μl份量的上清。并按以下公式计算$^{51}$Cr释放：

$$^{51}\text{Cr}\ \text{释放}\% = \frac{(ER-SR)}{(MR-SR)} \times 100$$

其中ER是实验得到的$^{51}$Cr释放量，SR为仅在200μl培养基中孵育$10^3$标记细胞所测的自发释放量（Spontaneous release）而MR为向靶细胞中加入100μl 0.3% Triton X-100而得到的最大释放量。

那些示出具有高CTL活性的单核血样经有限稀释法被扩大和克隆，再用相同方法进行筛选，从而分离出CTL克隆MZ2-CTL82/82。该克隆下文中称做“82/82”。

用相同的方法去检测K562靶细胞，以及一个黑

色素瘤细胞系。在图1 A 中的那些结果显示出这种CTL 克隆识别和溶解黑色素瘤细胞系，但不溶解K562。然后按前述相同的方式针对黑色素瘤细胞系检测CTL 克隆株82/82。图1 所示，当MZ2 -MEL．43 被CTL 克隆82/82 溶解时，MZ2 -MEL2．2．5 细胞系，它是一个缺失表达HLA -A29，HLA -B44 和HLA -C 克隆10 的变体并不被其溶解，提示TRA是由这些HLA 分子中的一种提呈的。当采用已知技术用编码HLA -C 克隆10 的DNA转染的细胞系MZ2 -MEL2．2．5 时，该细胞对CTL 克隆82/82 的溶解变得敏感了，因此显示HLA -C 克隆10 提呈由CTL 克隆82/82 识别的抗原。

实施例2

进一步进行的研究确定当82/82 与靶细胞接触时是否也产生肿瘤坏死因子（TNF）。采用的方法参见Traversari et al.，Immunogenetics 35：145-152（1992）。简言之，在培养基中，CTL 细胞系样品与目标靶细胞的样品结合。24 小时后，从培养物中除去上清，然后在TNF 敏感的WEHI 细胞上进行测试。如图2 所示，测试了14 个不同的细胞系。

图2 中表示的结果以接触上清而死亡的WEHI 细胞的百分率表示。该结果表明三个黑色素瘤细胞系提呈这种抗原。由于MZ2．MEL43 的强烈的应答结果，它被用于下面的实验。

实施例3

实施例2 的结果显示MZ２ •ＭＥＬ．４３ 提呈目的靶抗原。这样它可做为制备ｃ ＤＮＡ文库的总ｍＲＮＡ的来源。

从该细胞系中分离总ＲＮＡ。再用寡－ｄＴ 结合试剂盒按已熟知的技术分离出ｍＲＮＡ。一旦获得ｍＲＮＡ后，用标准方法将其转录成ｃ ＤＮＡ，然后将ｃ ＤＮＡ与ＥｃｏＲＩ 接头连接，并按使用说明克隆到质粒ｐｃＤ－ＳＲα的ＥｃｏＲＩ 位点。将重组质粒经电穿孔进入ＪＭ１０１ 大肠杆菌（电穿孔条件：２５ μｆａｒａｄｓ １个脉冲，２５００Ｖ）。

用氨苄青霉素（５０ μｇ／ｍｌ）选择出转染的细菌，将其分成８７ 库，每库４００ 个细菌，和２９７ 库，每库为２００ 个细菌。每个库分别代表约２８０ｃ ＤＮＡｓ，或者约１４０ｃ ＤＮＡｓ，经分析显示约７０％的质粒含有插入片段。扩增每个库至饱合，经碱溶解，不用酚提而用醋酸钾沉淀，分离出质粒ＤＮＡ，该方法参见Ｍａｎｉａｔｉｓ ｅｔ ａｌ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ （Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８２）。

实施例4

在制备如实施例3 中描述的文库之后，将所述的ｃＤＮＡ转染到真核细胞中。转染重复两次进行。将ＣＯＳ －７ 细胞样品接种到组织培养平底微孔中，接种量为每孔１５０００ 个细胞，该微孔中含有加入１０％ＦＣＳ的Ｄｕｌｂｅｃｏ'ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇ

l e s Me d i u m (DME M) 。3 7 ℃过夜孵育该细胞，移去培养基，然后换入每孔5 0 μl 的含有1 0 %Nu 血清，4 0 0 μg / ml DEAE－葡聚糖和1 0 0 μM氯喹，以及1 0 0 mg 质粒的DME M培养基。这些质粒是前述各个库中的质粒，1 0 0 n g 质粒含有在质粒p c D－S R α中编码HL A－C 克隆1 0 的质粒。3 7 ℃4 小时孵育后，移去培养基，再换入5 0 μl 的含1 0 %DMS O的P B S 。2 分钟后除去这一培养基，再换入2 0 0 μl 的含1 0 %F C S 的DME M。

变换培养基之后，3 7 ℃孵育C O S 细胞2 4 －4 8 小时。然后弃培养基，将1 5 0 0 个C T L 克隆株8 2 / 8 2 的细胞加入1 0 0 μl 含有1 0 %库后人血清和2 0 U / ml I L －2 的I s c o v e 培养基中。2 4 小时后移去上清液，按T r a v e r s a r i 等人的方法，进行WE HI 细胞试验测定出T N F 含量，参见T r a v e r s a r i e t a l . , I m m u n o l g e n e t i c s 3 5 : 1 4 5 －1 5 2 (1 9 9 2 ) 。

在受试的3 8 4 库中，9 9 %刺激T N F ，浓度低于5 p g / ml 时。有两个库浓度为4 0 p g / ml 以上，并有两个孔显示相同的结果。参见图3 。筛选这些库中的细菌，即库1 9 ，作时一步试验。

实施例5

克隆库1 9 的细菌，并对8 0 0 个细菌进行了测试。从中提取质粒D N A，并按前述相同的方法将其转染入一新C O S 细胞样品中，再测试细胞对C T L 克隆8 2

/ 8 2 的刺激作用。发现了1 2 个阳性克隆。其中对一个作进一步测试，该克隆被称之为c D N A 克隆A D 5 。在一个比较试验中，用c D N A 克隆A D 5 和H L A - C 克隆1 0 转染C O S 细胞，或H L A - C 克隆1 0 和M A G E - 1 ，或A D 5 本身，或者H L A - C 克隆1 0 本身转染C O S 细胞。M Z 2 - M E L 2 . 2 . 5 和M Z 2 - M E L . 4 3 为对照细胞系。按前述方法在W E H I 细胞上测试C T L 上清液中T N F 释放。残存W E H I 细胞的光密度用M T T 测定。图4 显示只有用H L A - C 克隆1 0 和c D N A - A D 5 转染的C O S 细胞，以及原M Z 2 - M E L 4 3 细胞系可刺激C T L 克隆8 2 / 8 2 释放T N F 。

实施例6

按公知的技术对c D N A A D 5 测序。序列检索表明质粒中插入片段没有与公知的基因或蛋白具有同源性。序列鉴定号（S E Q I D N O : 1 ）表示用于鉴定过的该基因的c D N A 核苷酸信息，下文中称“B A G E - 1 ”。推定的开放读框（O R F ）位于该分子的第2 0 1 - 3 3 2 碱基处。

实施例7

c D N A 序列测定之后，如实施例6 ，进一步进行实验以确定正常组织细胞是否表达该基因。为了确定这一点，反转录从正常组织中分离出的R N A ，并以寡- d T 做为引物。然后扩增得到的c D N A ，采用的引物:

5 ’ - C A G A A G A T G A A G C A C A G A G -3 ’

(SEQ ID NO: 2)

以及

5'-GAG CGG TTT TTC TGG CAT TG-3'

(SEQ ID NO: 3)

并采用标准PCR方法进行。加入放射活性的核苷酸，经磷显影测定扩增产物的量。

以从MZ2-MEL3.0细胞系中获得的产物百分率表示产品的数量，它表示表达的基因。其结果如下:

| | |
|---|---|
| MZ2-MEL3.0 | 100% |
| 肺 | <0.5% |
| 乳腺 | " |
| 胃 | " |
| 皮肤 | " |
| 脑 | " |
| 前列腺 | " |
| 肾 | " |
| 睾丸 | 8% |

在本文中另一未显出的实验中，用EcoRI消化MZ2-MEL细胞系的DNA，然后用对应于本文中cDNA的前300个核苷酸的PCR探针进行杂交。按标准的Southern印迹法，在对应于约5.8，7.5，8.5和11千碱基处鉴定出4条带，提示有Bage基因族的存在。

实施例8

也鉴定出肿瘤样品和肿瘤细胞系的该基因有表达作用。正好按实施例4获得cDNA，然后，采用套入引

物（nested primer）方法扩增相关序列。

首先采用下述引物进行20个周期的扩增：

5'-CGG CTT AGA GGA CCA GGA GAA-3'

(SEQ ID NO: 4)

和

5'-CAG AAG ATG AAG CAC AGA G-3'

(SEQ ID NO: 5)

随后再采用下述引物为进行另外20个周期的扩增：

5'-GGC TCC AAC CTC CAG CTC AC-3'

(SQE ID NO: 6)

和

5'-TTA GAG GAC CAG GAG AAG G-3'

(SEQ ID NO: 7)

结果如下：分子数字为阳性样品数；分母为受试样品的全部数目。

| | |
|---|---|
| 黑色素瘤 | 12/20 |
| 乳腺癌 | 2/5 |
| 小细胞肺癌 | 2/8 |
| 非小细胞肺癌 | 2/5 |
| 肉瘤 | 1/4 |
| 头颈部肿瘤 | 1/6 |
| 结肠癌 | 0/4 |
| 肾癌 | 0/5 |
| 白血病/淋巴瘤 | 0/3 |

实施例9

前述的实验显示溶细胞性T 细胞克隆CTL82/82识别由BAGE 基因编码的并由HLA-C-克隆10 提呈的抗原。本实施例中描述的工作详细地记载了如何鉴定被提呈抗原的氨基酸序列。

与编码BAGE 相同的cDNA克隆，即AD5，用来生产大量的不完全cDNA分子。将cDNA克隆插入表达载体pcDNAI/Amp，并用NotI 和SphI 限制性内切酶消化之。随后按使用说明用核酸外切酶Ⅲ处理。通过使用外切酶Ⅲ的时间长短，获得在AD5 3’端逐渐缺失片段。将截短的不同片段重新联接到pcDNAI/Amp，电穿孔进入大肠杆菌DH5αF’IQ菌株，用氨苄青霉素（50μg/ml）选择之。以这种方式获得400 个克隆。

从这400 个克隆中获得质粒DNA，再将其与HLA-C-克隆10 编码cDNA一起转染到COS-7 细胞中。然后以前述的TNF 释放试验测试转染子。阳性克隆为刺激CTL82/82 的TNF 释放的克隆。

一旦细胞被分成阳性和阴性转染子，确定出10 个阳性和10 阴性转染子的质粒DNA 序列。阳性克隆-克隆株19C2 含有前述的BAGE 基因的部分开放读框，它位于第1 位核苷酸至第67 位核苷酸处。相反，克隆17G12，为一种阴性转染子，它含有所述基因中的1-6 位核苷酸。

通过对比阳性和阴性克隆的插入片段，鉴别出一个22 氨基酸区可能含有提呈肽的序列，即：

Met Ala Ala Arg Ala

Val Phe Leu Ala Leu
Ser Ala Gln Leu Leu
Gln Ala Arg Leu Met
Lys Glu

(SEQ ID NO: 8)。

按该序列制备合成肽，并测试它们能否使用HLA-C-克隆10转染COS-7细胞的具有刺激TNF释放的能力。第一个阳性肽是一个16-聚体(16-mer)：

Met Ala Ala Arg Ala
Val Phe Leu Ala Leu
Ser Ala Gln Leu Leu
Gln

(SEQ ID NO: 9)。

对更小的肽的测试导致鉴定出下列九肽

Ala Ala Arg Ala Val
Phe Leu Ala Leu

(SEQ ID NO: 10)。

当半数最大溶解在上述肽浓度逐渐达到80nM时，如图5所示，该肽可有效地刺激CTL82/82。

前述的实施例表明了编码肿瘤排斥抗原前体的核酸分子的分离。然而，这种“TRAP”编码分子与任何一种前述的MAGE编码序列都无同源性。因此，本发明一方面是为一种分离出的核酸分子，它包括如SEQ ID NO 1所述的核苷酸序列。该序列不是MAGE编码序列，这可参阅前述文献中所述的任何一种MAGE基因序列并与其对比可见这一结果。本发明的又一部分是编码非MAGE肿瘤排斥抗原前体的那些核酸

序列，但这些序列在严格的条件下可杂交到含前述核苷酸序列的核酸分子。本文中采用的术语“严格的条件”其参数是本领域所熟知的。更具体讲，本文采用的严格条件为在3．5×SSC，1×Denhardt溶液，25mM磷酸钠缓冲液（pH，7．0），0．5%SDS，和2mM EDTA中65℃杂交18小时。随后，65℃用2×SSC，0．1%SDS四次洗涤该滤膜20分钟，再在0．3×SSC，0．1%SDS中洗20分钟。也可采用其它的条件，试剂等等，其严格程度相同。本领域的技术人员熟知这些条件，本文此处勿需赘言。

从实施例中可以看出本发明包括在表达载体中使用这些序列，以及将其转染到宿主细胞和细胞系，这些细胞为原核细胞（如大肠杆菌），或者为真核细胞（如CHO或COS细胞）。表达载体要求在操作上能将前述的相关序列连接到一个启动子上。因为已发现人白细胞抗原HLA－C克隆10提呈来自这些基因的肿瘤排斥抗原，所以表达载体也可包括编码HLA－C克隆10的核酸序列。当载体包含这两种编码序列时，该载体可被用来转染正常时不表达其中任何一种序列的细胞。当宿主细胞已经表达HLA－C克隆10时，肿瘤排斥抗原前体编码序列可以单独使用。当然对可以采用的特定的宿主细胞没有限制。由于需要，将含有两种编码序列的载体可被用在提呈HLA－C克隆10的细胞上，所以肿瘤排斥抗原前体基因能被用于不表达HLA－C克隆10的宿主细胞。

本发明也包括所谓的表达试剂盒，这使得技术人员制备出一种所需的表达载体或多种载体。这种表达试剂

盒包括至少每种前述的编码序列的各自部分。如需要也可以加入其他的组份，只要是前述的序列如需要都包括在其中。

为从前述的MAGE族中区别出本发明之核酸分子和TRAPs，本发明将简称为BAGE基因族以及TRAPs。因此，本文中使用“BAGE”时，它是指前述序列编码的肿瘤排斥抗原前体。“BAGE编码分子”以及相似的术语被用来描述核酸分子的本身。

本发明中的一部分为实施例9中列出的多肽SEQ ID NO：8，9和10。这些多肽可被用于鉴定那些提呈MHC分子HLA－C－克隆10的细胞。通过鉴定该肽已经结合的细胞再供给携带可检测信号的多肽，这是一条用于鉴定细胞的办法，就好象使用固相结合肽，HLA－C－克隆10提呈细胞所结合的那样，因而可从将要被检样品中移出它们。另外，本发明允许技术人员诊断以TRAP的表达为特征的疾病。这种方法涉及确定TRAP基因的表达，和/或源自其中的TRAs，如由HLA－C克隆10提呈的TRA。在前一种情况中，通过任何标准核酸测定方法能进行这种确定，包括聚合酶链反应，或标记杂交探针分析。在后一种情况中，优选分析TRA和HLA复合物的配对结合体的方法，如抗体，另一种替代测定方法是前述的那种类型的TNF释放分析测定。

分离TRAP基因也使分离TRAP分子本身成为可能，特别是含有由SEQ ID NO：1编码的氨基酸序列的TRAP分子。当如前所示的TRA，或TRA和HLA的复合物，如HLA－C克隆10时，这些分离出的分子可与如佐剂物质结合，制成疫苗，用于

治疗以表达TRAP分子为特征的疾病。另外，也可以从在其表面提呈TRA/HLA复合物的细胞中制备疫苗，例如非增殖性癌细胞，非增殖的转染子等等。在所有把细胞用做疫苗的例子中，它们可以是用有必要证明参与CTL应答的一种或两种组份的编码序列转染后的细胞，或者是表达两种分子而非转染的细胞。采用现有技术中公知的标准方法可以用TRAP分子，其相关TRAs，以及TRA和HLA复合物制备抗体。

本文中所用的“疾病”（disorder）是指任何一种表达肿瘤排斥抗原的病理状态。这种病的一个特别例子是恶性黑色素瘤。

基于现有技术文献的治疗方法，为一种患者免疫系统的应答反应，这将导致TRA提呈细胞，如HLA-C克隆10细胞的溶解。还有一种这样的治疗方法是向所涉及的表型异常细胞的患者使用对复合物特异性的CTLs。本领域技术人员能在体外开发出这种CTLs。特别是，例如血细胞等细胞样品，与提呈该复合物的细胞接触，能激发特异性的CTL增殖。靶细胞可以是转染子，例如上述类型的COS细胞。这些转染子在其表面上提呈所需的复合物，而且当与目标CTL结合时，就可刺激其增殖。如其他合适的宿主细胞一样，本文中使用了COS细胞可从很多渠道得到。

为了详细了解治疗方法学，参见过继性转移（adoptive transfer）（Greenberg，J.Immunol，136（5）：1917（1986）；Reddel et al.，Science 257：238（7-10-92）；Lynch et al.，Eur.J.Immunol.

21：1403－1410（1991）；Kast et al.，Cell 59：603－614（11－17－89）），提呈所需复合物的细胞与CTLs结合，这将引起对其特异性的CTLs增殖。然后，给细胞异常性的患者增殖后的CTLs，所说的异常性的特征在于某些异常细胞提呈那种特定复合物。然后，CTLs溶解异常细胞，借此达到理想的治疗目的。

先前的治疗保证至少部分患者异常细胞提呈相关的HLA/TRA复合物。这一点很容易确定，因为现有技术非常熟悉鉴定提呈一特定HLA分子细胞的方法，以及如何鉴定表达相应序列DNA（本例中指BAGE序列）的细胞。一旦提呈相关复合物的细胞经过前述的筛选方法鉴定出来，它们就能与患者的样品结合，其样品中含有CTLs。假如复合物提呈细胞可被混合的CTL样品溶解，这样则能断定来源BAGE的肿瘤排斥抗原即被提呈，这样患者是前述治疗方法适应者。

过继性转移不是用于本发明唯一的治疗方法。采用许多方法也能在体内激活CTLs。其中一个方法，即采用前述的表达复合物的非增殖细胞也能完成。用于这种方法的细胞可以是正常表达该复合物的细胞，例如辐照的黑色素瘤细胞，或用需提呈该复合物的一个或两个基因转染过的细胞。Chen等人（Chen et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA88：110－114（January，1991））示出这一方法，他们在治疗方案中采用表达HPVE7多肽的转染细胞。也可以用各种细胞类型。同样，也可以使用携带其中一个或两个目的基因的载体。特别优选的是病毒或细菌载体。在这些载体体系中，用如痘

苗病毒或者细菌BCG为载体操作目的基因，实际上用这些材料“感染”宿主细胞。提呈目的复合物的细胞可被自体CTLs识别，然后细胞开始增殖。肿瘤排斥抗原或前体与佐剂结合可获得相似的效应即其促进掺合到提呈目的HLA分子的HLA-C克隆10提呈细胞，这样，TRAP经加工生成HLA分子的肽配对结合物，而无需进一步加工后提呈TRA。

本发明的其他方面对于普通技术人员很清楚，此处不必重复。

已使用过的术语和表达方式被用做描述说明性术语。而并非起限定作用，使用这些术语和表达并不排除其所表示和描述的特征之任何等同物，这可说明在本发明的范围内可做各种修改。

SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1032 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 1

```
CGCCAATTTA GGGTCTCCGG TATCTCCCGC TGAGCTGCTC TGTTCCCGGC TTAGAGGACC   60
AGGAGAAGGG GGAGCTGGAG GCTGGAGCCT GTAACACCGT GGCTCGTCTC ACTCTGGATG  120
GTGGTGGCAA CAGAGATGGC AGCGCAGCTG GAGTGTTAGG AGGGCGGCCT GAGCGGTAGG  180
AGTGGGGCTG GAGCAGTAAG ATGGCGGCCA GAGCGGTTTT TCTGGCATTG TCTGCCCAGC  240
TGCTCCAAGC CAGGCTGATG AAGGAGGAGT CCCCTGTGGT GAGCTGGAGG TTGGAGCCTG  300
AAGACGGCAC AGCTCTGTGC TTCATCTTCT GAGGTTGTGG CAGCCACGGT GATGGAGACG  360
GCAGCTCAAC AGGAGCAATA GGAGGAGATG GAGTTTCACT GTGTCAGCCA GGATGGTCTC  420
GATCTCCTGA CCTCGTGATC CGCCCGCCTT GGCCTTCCAA AGTGCCGAGA TTACAGCGAT  480
GTGCATTTTG TAAGCACTTT GGAGCCACTA TCAAATGCTG TGAAGAGAAA TGTACCCAGA  540
TGTATCATTA TCCTTGTGCT GCAGGAGCCG GCTCCTTTCA GGATTTCAGT CACATCTTCC  600
TGCTTTGTCC AGAACACATT GACCAAGCTC CTGAAAGATG TAAGTTTACT ACGCATAGAC  660
TTTTAAACTT CAACCAATGT ATTTACTGAA AATAACAAAT GTTGTAAATT CCCTGAGTGT  720
TATTCTACTT GTATTAAAAG GTAATAATAC ATAATCATTA AAATCTGAGG GATCATTGCC  780
AGAGATTGTT GGGGAGGGAA ATGTTATCAA CGGTTTCATT GAAATTAAAT GTTATCAACG  840
GTTTCATTGA AATTAAATCC AAAAAGTTAT TTCCTCAGAA AAATCAAATA AAGTTTGCAT  900
GTTTTTTATT CTTAAAACAT TTTAAAAACC ACTGTAGAAT GATGTAAATA GGGACTGTGC  960
AGTATTTCTG ACATATACTA TAAAATTATT AAAAAGTCAA TCAGTATTCA ACATCTTTTA   1020
CACTAAAAAG CC                                                      1032
```

SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列表示: SEQ ID NO: 2

CAGAAGATGA AGCACAGAG

SEQ ID NO: 3 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列表示: SEQ ID NO: 3;

GAGCGGTTTT TCTGGCATTG

SEQ ID NO: 4 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列表示: SEQ ID NO: 4

CGGCTTAGAG GACCAGGAGA A

SEQ ID NO: 5 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 5

CAGAAGATGA AGCACAGAG

SEQ ID NO: 6 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列表示: SEQ ID NO: 6

GGCTCCAACC TCCAGCTCAC

SEQ ID NO: 7 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 7

TTAGAGGACC AGGAGAAGG

SEQ ID NO: 8 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 8

Met Ala Ala Arg Ala

5

Val Phe Leu Ala Leu

10

Ser Ala Gln Leu Leu

15

Gln Ala Arg Leu Met

20

Lys Gln

SEQ ID NO: 9 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 9

Met Ala Ala Arg Ala

5

Val Phe Leu Ala Leu

10

Ser Ala Gln Leu Leu

15

Gln

SEQ ID NO: 10 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(xi) 序列: SEQ ID NO: 10

Ala Ala Arg Ala Val

5

Phe Leu Ala Leu

图 1A

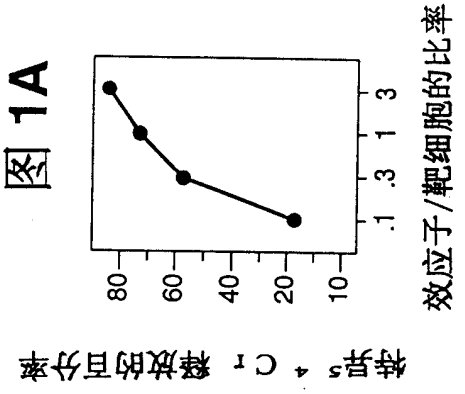



图 1B

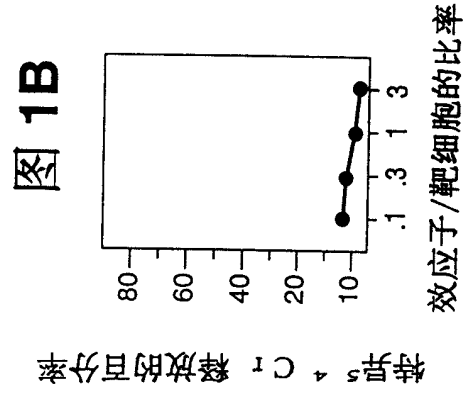



图 1C

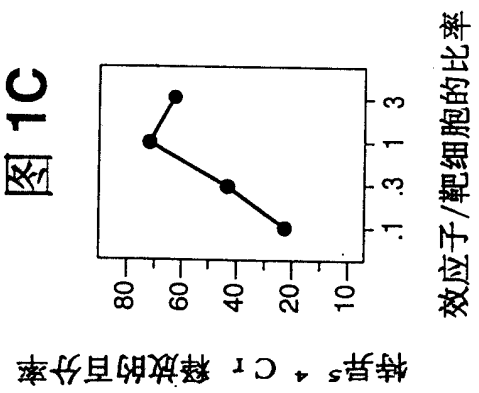



图 1D

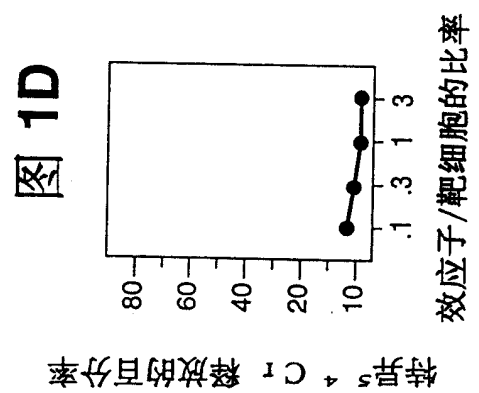


图 2

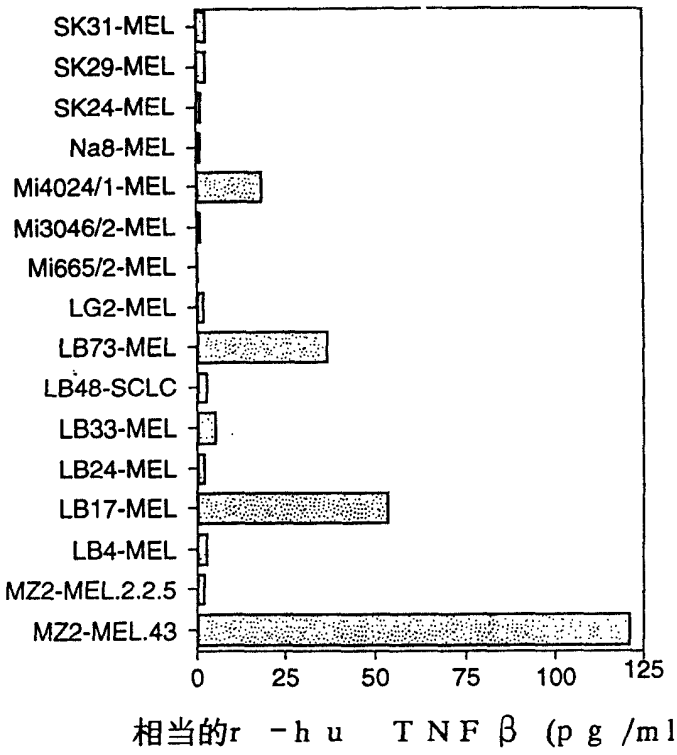

SK31-MEL
SK29-MEL
SK24-MEL
Na8-MEL
Mi4024/1-MEL
Mi3046/2-MEL
Mi665/2-MEL
LG2-MEL
LB73-MEL
LB48-SCLC
LB33-MEL
LB24-MEL
LB17-MEL
LB4-MEL
MZ2-MEL.2.2.5
MZ2-MEL.43
0
25
50
75
100
125
相当的r -h u TNF β (p g /m l )

图 4

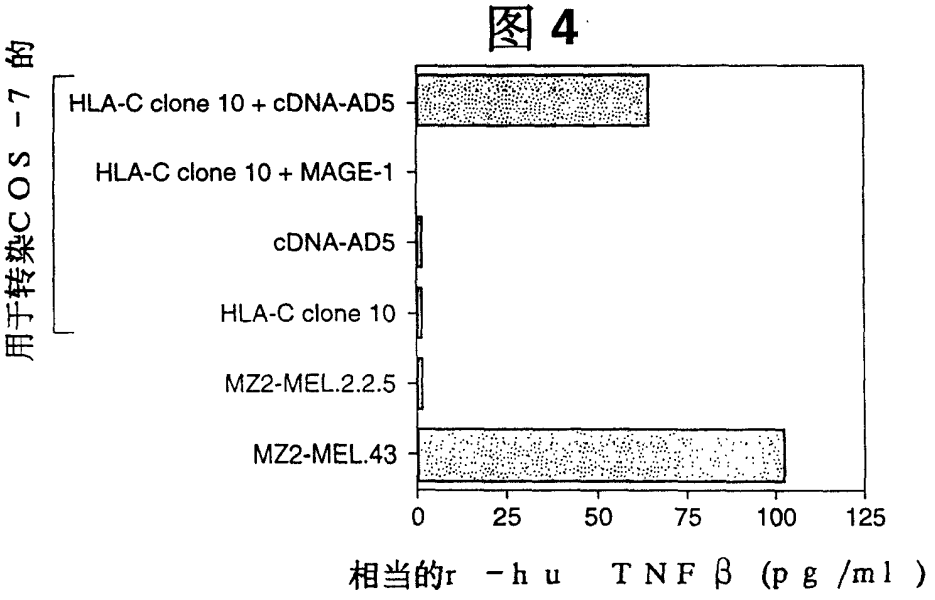

用于转染COS-7的
HLA-C clone 10 + cDNA-AD5
HLA-C clone 10 + MAGE-1
cDNA-AD5
HLA-C clone 10
MZ2-MEL.2.2.5
MZ2-MEL.43
0
25
50
75
100
125
相当的r -h u TNF β (p g /m l )

图3

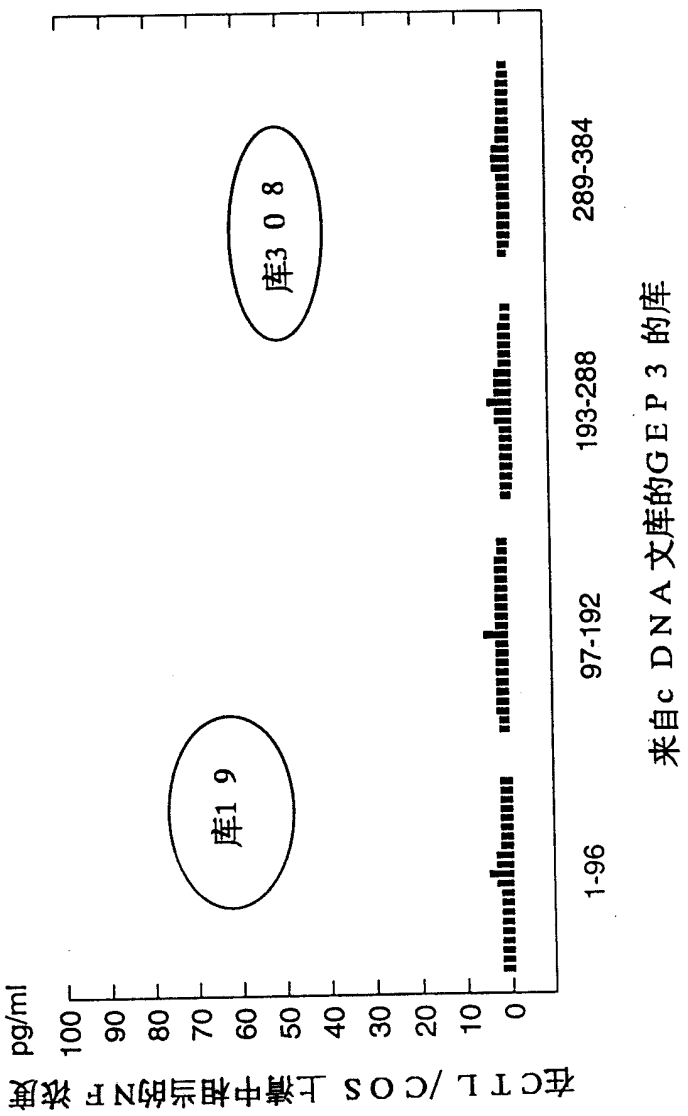
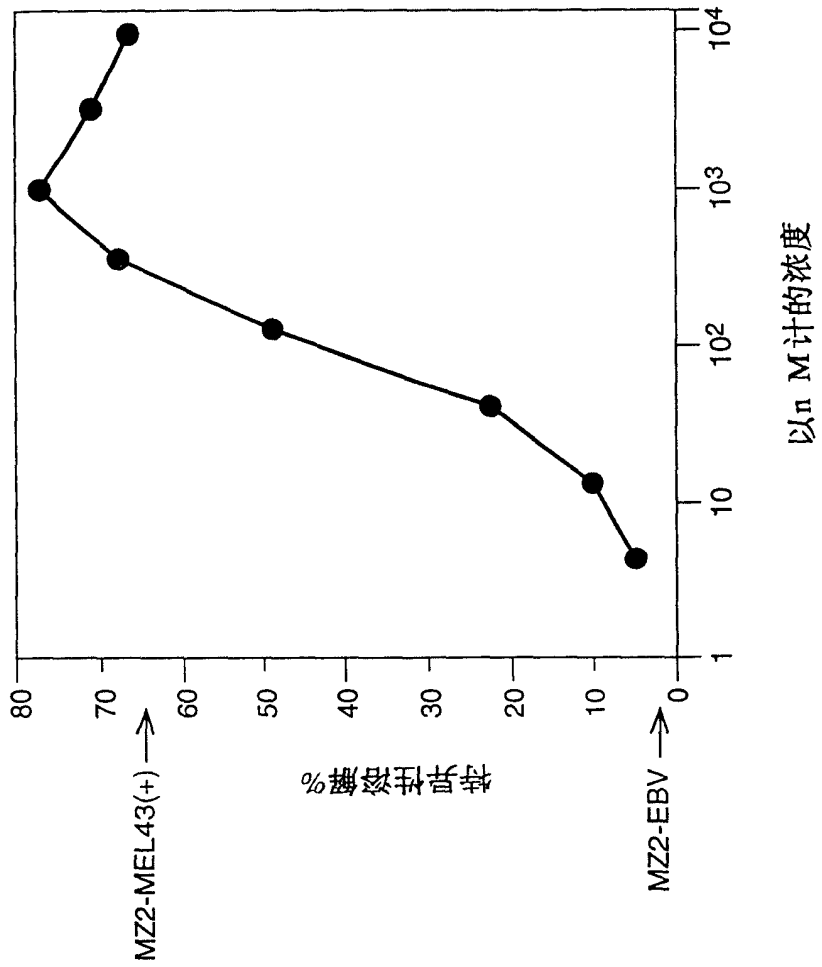

在CTL/COS上清中相当的NF浓度
pg/ml
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
库19
库308
1-96
97-192
193-288
289-384
来自cDNA文库的GEP3的库

图 5


80
70
60
50
40
30
20
10
0
MZ2-MEL43(+)
特异性溶解%
MZ2-EBV
1
10
10²
10³
10⁴
以n M计的浓度