

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/00

C07K 16/00 C07H 21/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02807778.4

[43] 公开日 2004 年 9 月 1 日

[11] 公开号 CN 1525864A

[22] 申请日 2002.4.2 [21] 申请号 02807778.4

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 2 [33] US [31] 60/280,137

[86] 国际申请 PCT/US2002/010155 2002.4.2

[87] 国际公布 WO2002/078607 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.30

[71] 申请人 迈阿密大学

地址 美国佛罗里达州

[72] 发明人 黛安娜·M·洛佩斯 林恩·赫伯特

小曼特利·多尔西 甘特·克劳斯

詹姆斯·H·纳蒂欣

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

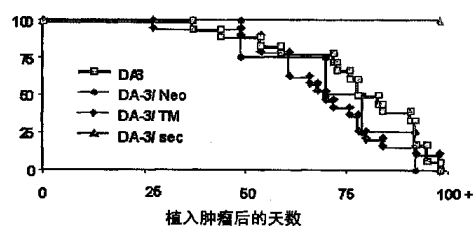
代理人 高龙鑫 楼仙英

权利要求书 2 页 说明书 17 页 序列表 1 页
附图 10 页

[54] 发明名称 具有免疫增强特性的粘蛋白肽

[57] 摘要

一种包含序列 VSIGLSFPLP (SEQ ID NO: 1) 的分离肽或多肽, 其在人的分泌型 MUC1 中被发现, 当被施用于哺乳动物时, 能增强免疫应答, 以及包含该肽的组合物, 产生该肽的宿主细胞及使用方法。该肽或多肽可以与载体蛋白偶联并作为疫苗或免疫性组合物的一部分使用来预防或治疗疾病或机能紊乱。



- 1.一种包含氨基酸序列 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)分离肽或多肽,或其类似物或衍生物,当所述肽或多肽施用至哺乳动物时,其具有增强对抗原的免疫反应的性质。
- 2.权利要求1所述的肽或多肽,其长度在11和200个氨基酸残基之间。
- 3.权利要求1所述的肽或多肽,其长度在11和20个氨基酸残基之间。
- 4.权利要求1所述的肽或多肽,它包含 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)。
- 5.权利要求1所述的衍生物,其包括至少一个含有氨基酸序列 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)的肽或多肽偶联至蛋白质载体上。
- 6.权利要求4所述的衍生物,其中载体是钥孔虫血蓝蛋白。
- 7.一种编码权利要求1的肽或多肽的核酸,或一种具有其互补序列的核酸。
- 8.一种药物组合物,它含有权利要求1的肽或多肽,或其类似物或衍生物,以及药用可接受的赋型剂或载体。
- 9.权利要求8所述的药物组合物,其还包括一种抗原。
- 10.权利要求9所述的药物组合物,其中所述抗原为一种肿瘤抗原。
- 11.权利要求10所述的药物组合物,其中所述抗原选自前列腺特异性抗原、黑素瘤有关的抗原和 p53。
- 12.权利要求10所述的药物组合物,其中,所述肽为 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)。
- 13.一种载体,其包含权利要求7的核酸。
- 14.一种宿主细胞,其包含权利要求7的核酸。
- 15.权利要求14所述的宿主细胞,其包括编码 MUC1/sec 的核酸。
- 16.权利要求15所述的宿主细胞,其为 DA-3 细胞。
- 17.一种疫苗,其包括权利要求1的肽或多肽,或其类似物或衍生物,一种抗原,和一种药用可接受的赋型剂或载体。
- 18.一种治疗或预防哺乳动物癌症的方法,其包括给哺乳动物施用安全且有效剂量的权利要求8或9的药物组合物。
- 19.一种诱导或增强哺乳动物对抗原的免疫反应的方法,其包括给哺乳动物施用安全且有效剂量的权利要求8或9的药物组合物。

20.权利要求 19 所述的方法，其中，所述抗原也施用于哺乳动物。

具有免疫增强特性的粘蛋白肽

技术领域

本发明涉及具有免疫增强特性的粘蛋白肽(mucin peptide), 包含该肽的药物组合物, 以及治疗或预防癌症的方法。

背景技术

MUC1 基因在正常的上皮细胞和多种人类癌症中被表达, 在乳腺肿瘤中所表达的水平非常高(1)。这种基因的主要产物是一种多态型 1 跨膜分子, 其包含有一个大的, 多糖基化的细胞外区域, 一个跨膜区和一个含 72 个氨基酸的细胞质尾巴(2)。

这种多态性主要来自于存在于细胞外区域的 20 个氨基酸串联重复单元的数目变化。已发现一种分泌型 MUC1 同种型(isoform) (MUC1/sec) (3), 其包括内含子 2 的序列, 并在内含子的中止密码子处永久性终止, 因此可缺少跨膜区。

MUC1 及其片段和衍生物已经被广泛地用于抗癌疫苗和癌症治疗的研究中。U.S.Pat. No.6,344,203 公开了模拟 MUC1 的肽及其结合到 IB4 植物血凝素和抗-Gal.alpha.(1,3)Gal 抗体中, 以用于癌症疫苗中。这些肽偶联到蛋白质载体, 如破伤风类毒素, 白喉类毒素或氧化的 KLH 上, 用以刺激 T 细胞。

U.S. Pat. No.5,827,666 公开了一种合成的 MUC1 肽, 它包括 MUC1 的 20-氨基酸串联的至少两个重复, 其能够在没有糖基化的情况下, 获得其天然结构。表明该合成肽可被用于包括抗原决定基的氨基酸序列的疫苗及其它物质中。U.S. Pat. No.5,989,552 公开了一种 MUC1 多肽或其串联重复和氧化的甘露聚糖的偶联物被用于免疫治疗中。

U.S. Pat. No.6, 080, 725 公开了皂甙类似物佐剂可与 MUC1 及其肽片段用于疫苗中, 该 MUC1 及其肽片段作为肿瘤相关抗原。

公开的 U.S.专利申请 20020009759, 200020012931, 20020022235 和 20010051351 中描述了 MUC1 被用作癌症细胞的决定簇或标记物。

在上述公开物中，MUC1 及其片段和模拟物被用作或被认为是肿瘤相关抗原而被用于疫苗或免疫组合物中，或被用作诊断测试的标记物。

本发明的意料之外的发现是，一种不同的 MUC1 分泌的同种型具有佐剂的性质，并因此具有与抗原不同的免疫增强性质。

发明概述

一种含有氨基酸序列 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)的肽及其类似物和衍生物，表现出在体内的免疫调节活性。这样的肽和编码它们的核酸（如，RNA, DNA）可被用作佐剂来刺激或增强动物或人体内的免疫应答，可通过本领域已知的体液或细胞内的标准检测。例如，可使抗体的产生得到增强，可溶性免疫调节子（如，细胞因子）的分泌，抗原的呈递、效应细胞产生或发挥功能（如，细胞毒性），以及其它已知的免疫反应方法、或其结合来显示功效。尤其是，肽或核酸可被用作疫苗佐剂来增强体内免疫反应，以诱导体内和/或体外细胞因子的生成，作为一个或多个细胞亚群的促细胞分裂剂，或增强细胞毒性。本发明的一个目的就是提供一种新型的免疫调节和增强分子。

为了刺激或增强一种抗原特异性的免疫反应，该肽可与抗原（如，一种肿瘤抗原或一种来源于传染性物质，如细菌、病毒、原生动物、真菌、霉菌或酵母菌的抗原）一起混合到疫苗制剂中或被偶联到抗原上应用。核酸可以与抗原和/或编码抗原的表达载体一起整合至基因疫苗的制剂中；或一种编码 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)的核苷酸序列，或其类似物或衍生物也包含在与编码抗原的一个区域相接合的或与该区域显著不同的表达载体上。该疫苗制剂的成分还包含诸如其它佐剂和/或细胞因子。因此，组合物可被混合至细胞内的，无细胞的，分次或纯化的，重组的、基于蛋白质的、或“裸露的 DNA”疫苗中。

可以治疗的肿瘤类型包括，但不限于，肉瘤和癌。例如，癌症如白血病、淋巴瘤、或脑癌都可以被治疗。通常，本发明可使任何基于抗体或其它的免疫治疗得以增强。

本发明提供了有效的和低毒的佐剂替代物来增强免疫应答。它是在能够满足医用或兽医治疗为目的的生物品的标准条件下制备的，并与用于治疗 and 预防的制剂是生物相容的。

本发明所用的术语“肽”“多肽”和“蛋白质”可以相互转变，每一种都指天然存在的氨基酸的序列。通常，“肽”是指少于20个氨基酸残基的序列，“多肽”是指20个或更多个氨基酸残基的序列，本发明所用的多肽也包括蛋白质。优选地，本发明的肽、多肽或蛋白质包含11至200个氨基酸残基，更优选为11至100个残基，再更优选为11至50个残基，最优选为11，12，13，14，15，16，17，18，19或20个残基。

如本发明所用，术语“分离”是指物质从其原始的环境中被取出（如，天然存在的物质从其自然环境中被取出）。这样的物质能作为载体的部分或作为一种组合物，或能在细胞内获得，如果上述载体、组合物或细胞不是物质的原始环境。

本发明的一个目的是提供一种被分离肽，多肽或蛋白质，它包含氨基酸序列 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)，或其类似物或衍生物。本发明的肽具有免疫增强特性并能够用于药物组合物和疫苗中。

本发明使用的术语“类似物”是指具有相同或相似功能性质（即，产生免疫调节作用）的序列变体。这样的变体可以具有一个或几个（2-3）替代的氨基酸残基，优选为保守性替代，以使变体保持“母体化合物”的免疫调节特性。

本发明使用的“衍生物”是指一种肽、多肽或蛋白质，它包含添加了至少了一个附加基团而修饰的序列 VSIGLSFPMLP(SEQ ID NO:1)，并仍保持母体化合物的免疫调节能力的特性。在一个优选的实施例中，衍生物包括一个 KLH 分子，其上偶联了多拷贝的本发明的肽。该衍生物也可以是连接了本发明的肽、多肽、或蛋白质的抗原。衍生物的其他实例包括，但不限于，偶联了多拷贝的肽的 OVA 和 BSA。该肽也可以纯品形式使用。本发明的肽、多肽或蛋白质可以以常规的化学合成或 DNA 重组技术的方法制备。例如，将编码多肽的 DNA 片段转化至宿主微生物中，然后从培养物中收集多肽。宿主微生物可以是，如细菌、酵母菌、病毒的载体或哺乳动物细胞，其中所述的 DNA 片段被整合到宿主微生物的基因组中，或被插入至合适的表达载体中通过宿主微生物复制。将 DNA 片段放置在由含有合适的转录和翻译信号的区域所控制的位置。多肽的制备采用本领域技术人员所熟悉的方法。

本发明的另一个目的是提供一种核酸，该核酸编码本发明的肽、多肽或

蛋白质，或其衍生物或类似物。本发明的核酸可以重组地、合成地或通过任何本领域技术人员可获得的方法制备，并可以利用本领域已知的技术被克隆。在这个方面，本发明也包括一种包含本发明核酸的载体，和一种包括本发明核酸的宿主细胞。

本发明使用的术语“核酸”，“寡核苷酸”和“多核苷酸”包括 RNA, DNA, 或 RAN/DNA 杂交序列，并且它们在其中一个单链或双链上具有一个以上的核苷酸，这些术语可以相互转换使用。

本发明使用的术语“互补”或“其互补体”是指多核苷酸序列，其在整个互补区能形成与另一个特定的多核苷酸配对的 Watson & Crick 碱基。该术语用于仅根据其序列的多核苷酸对，而不是指任何特定条件下两个多核苷酸都能够结合的情况。

本发明还包括一种免疫性的药物组合物，其包括本发明的肽或多肽，或其类似物或衍生物，以及可药用的赋型剂或载体。在一个优选实施例中，药物组合物包括至少一种抗原，优选为肿瘤抗原。肿瘤抗原包括，如自体肿瘤细胞、同种异体肿瘤细胞、神经节糖苷、胚胎性癌抗原、前列腺特异性抗原、黑素瘤相关的抗原和 p53 以及其它本领域技术人员熟知的肿瘤抗原。其它可用于本发明的抗原包括病毒抗原，如来源于乳头状瘤病毒、B 型和 C 型肝炎病毒、HIV 和 HTLV-1 以及细菌及其它感染性微生物如 M. Tuberculosis 的抗原。

本发明还包括一种疫苗，和一种诱导或加强免疫应答的方法。在一个优选实施例中，疫苗包括一种本发明的免疫调节肽或多肽，或其类似物或衍生物，一种抗原、一种药学可接受的赋型剂或载体。在一个尤其优选的实施方案中，抗原为肿瘤抗原。

疫苗的制备方法是本领域技术人员所熟知的并被广泛描述在技术文献中（见，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA）。

本发明的免疫性药物组合物或疫苗也可包括一种或多种附加的佐剂，如 BCG, KLH, IL-2, GM-CSF 和环磷酰胺(cytosan)，其可选择性地与本发明的免疫调节肽或多肽相连接。在一个优选实施例中，本发明的免疫调节肽与马来酰胺活化的 KLH 偶联。依据与肽结合的佐剂采用一些本领域已知的连接键。

通常的形式有 R-HNCO-X 或 R-HCNO-X, 其中 R=佐剂, X=肽。

本发明的又一个目的是提供一种预防或治疗疾病或失调的方法, 其是通过施用安全且有效剂量的本发明的疫苗或药物组合物而进行的。本发明的药物组合物和疫苗的安全且有效的剂量可以通过本领域技术人员经适当的实验而确定。安全和有效的剂量被认为是在受试体使用该剂量可以产生有益的免疫应答效果, 并且不会产生本领域技术人员不可接受的副作用的剂量。可以领会到, 任何这样的副作用一定会与本发明的治疗疗效, 可选择的治疗方法, 和其它本领域技术人员熟悉的因素相抵消。在一个优选实施例中, 本发明提供了一种预防或治疗肿瘤尤其是癌性瘤的方法。

附图说明

图 1 在注入 10^6 未转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞, 或只用新霉素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo), 或用跨膜 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/TM), 或用分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 后, 纯系 BALB/c 小鼠的存活率。

图 2 未转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞或只用新霉素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo), 或用跨膜 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/TM), 或用分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 的体外生长动力学特征。

图 3 注入 10^6 未转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞 (DA-3/neo), 或只用新霉素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo), 或用跨膜 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/TM), 或用分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 后, BALB/c(nu+nu+)小鼠中的肿瘤生长。

图 4 接种 10^6 未转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞 (DA-3/neo), 或只用新霉素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo), 或用跨膜 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/TM), 或用分泌型 MUC1 同种型的三个单独的转染子转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 接种后, BALB/c 裸鼠中的肿瘤生长。

图 5 用分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 接种, 对于跨膜 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/TM) 和 DA-3/sec 细胞的混合物在 BALB/c 小鼠中生长的作用。

图 6 接种分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞 (DA-3/sec) 对于新霉

素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo) 和 DA-3/sec 细胞的混合物在 BALB/c 小鼠中生长的作用。

图 7 接种分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞 (DA-3/sec) 对于 RENCA 肾细胞癌和 DA-3/sec 细胞的混合物在 BALB/c 小鼠中生长的作用。

图 8 接种分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 乳腺肿瘤细胞 (DA-3/sec) 对于 K7 骨瘤细胞和 DA-3/sec 乳腺肿瘤细胞的混合物在 BALB/c 小鼠中生长的作用。

图 9 人跨膜 MUC1 (MUC1/TM) 和人分泌 MUC1 (MUC1/sec) 同种型的 cDNAs 示意图。

图 10 肽免疫。用分泌型的人 MUC1 同种型的独特的 11 个氨基酸肽与 KLH 的偶联物来接种, 它对偶联独特肽的 KLH 与只用新霉素载体转染的 DA-3 细胞 (DA-3/neo) 或跨膜 MUC1 同种型 (DA-3/TM) 转染的 DA-3 细胞的混合物的生长作用。

图 11A 和 11B 用分泌型的人 MUC1 同种型的独特的氨基酸肽与 KLH 的偶联物来接种, 对于偶联独特氨基酸肽的 KLH 和 BALB/c 小鼠中的 RENCA 肿瘤细胞 (11A) 或 C57/BL6 小鼠中 Lewis 肺癌细胞 (11B) 的混合物的生长作用。该图表明 MUC1/sec 肽的免疫接种效果不受菌株限制。

图 12 施用含有较低数量的可产生抗体的抗原细胞 (DA-3/TM) 和 DA-3/sec 细胞的混合物对于肿瘤生长的影响。该图显示了在没有接种疫苗时, 较低数量的可产生抗体的抗原细胞能够产生有效的保护作用。

图 13 注射 DA-3/sec 的小鼠脾细胞对于 DA-3 肿瘤靶细胞的细胞毒活性。

图 14 穿孔素抑制剂 concanamycin A 对于 DA-3/sec 脾细胞的细胞毒性作用。该图显示了穿孔素通过活化的脾细胞介导 DA-3/sec 肿瘤细胞的溶解。

图 15 抗-Fas 抗体作用于 DA-3/sec 活化的脾细胞相对于 DA-3/sec 靶体和阳性对照的细胞毒性效果。该图显示 Fas/FasL 在 DA-3/sec 的细胞毒性中不起作用。

图 16 体内注入 DA-3/sec 对抑制 YAC-1 靶体的典型 NK 活性的影响。该图显示了体内注入 DA-3/sec 导致更强的抑制 YAC-1 靶体的典型 NK 活性。

图 17A 和 17B。MUC1/sec 肽对于体外 (17A) 和体内 (17B) 含有的

D1-DMBA-3 肿瘤的免疫应答的影响。该图显示了 MUC1/sec 肽刺激了含有 D1-DMBA-3 肿瘤的免疫应答。

图 18A 和 18B。含有和不含 MUC1/sec 肽的正常 BALB/c 肾细胞对于 YAC-1(18A)和 EL-4(18B)靶细胞的影响。该图显示了 MUC1/sec 肽活化正常的 BALB/c 肾细胞而杀死多种靶体。

图 19A 和 19B。含有和不含 MUC1/sec 肽的不同种类小鼠的正常肾细胞对于 DA-3/sec 肿瘤细胞的溶解作用。该图显示了在 MUC1/sec 肽存在时, 正常的肾细胞能杀死 DA-3/sec 肿瘤细胞。

发明详述

为了用一种确定的肿瘤抗原研究乳腺肿瘤的免疫应答, 将跨膜 MUC1 同种型 (DA-3/TM)、分泌型 (DA-3/sec), 或单独的新酶素载体 (DA-3/neo) 转染至 DA-3 细胞中, 该细胞是导致转移损害以及 BALB/c 小鼠宿主死亡的乳腺肿瘤细胞系。MUC1 分泌型的转染使 DA-3 细胞不能在纯系 BALB/c 小鼠中生长, 但是能在 BALB/c 裸鼠中生长。用 DA-3/sec 细胞进行免疫接种可以激发对 DA-3/TM 或 DA-3/neo 细胞的免疫应答, 而且抑制 BALB/c 的同源小鼠中的两种不相关的肿瘤。结果显示在分泌型 MUC1 同种型中存在一种独特的 11 个氨基酸的肽, 其具有保护作用并可用作免疫增强分子。

材料和方法

小鼠和肿瘤。纯系 BALB/c 小鼠在 University of Miami School of Medicine 的实验室通过兄弟姐妹交配的方法繁衍。BALB/c un+/nu+ 从 Taconic Labs 中购得。DA-3 肿瘤细胞系是从 BALB/c 小鼠 (4) 同源的 D1-DMBA-3 体内的乳腺肿瘤中得到的。DA-3 细胞在 BALB/c 小鼠体内产生肿瘤并引起肺部转移损伤。该细胞系在 RPMI-1640 培养基中培养, 培养基还补充有 5%FCS (胎牛血清)、100U 青霉素、100μg/ml 链霉素、 5×10^{-5} M 2-β-巯基乙醇 (2-BME)、2mM L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%必需氨基酸和 1%丙酮酸钠 (所有都来自 GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 并通过连续的传代延续。通过常规的鲎鱼阿米巴状细胞自溶 (Limulus amoebocyte lysate (Pyrogen[®] plus; Whittaker M.A. Bioproducts, Inc., Walkersville, MD)) 方法测定这些细胞没有

内毒素。

肽片段和抗体的制备。使用称为 H₂₃ 的单克隆抗体来检测 MUC1/TM 和 MUC1/sec 中都常见的串联重复序列。通过含有 MUC1/sec 的特定肽 VSIGLSFMLP(SEQ ID NO:)与马来酰胺活化的钥孔虫凝集素蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 偶联来免疫鸡制得抗体 1709 (Aves Labs, Tigard, OR)。游离肽的浓度以及每分子 KLH 至少结合 150 个肽分子的偶联物被用于免疫中。免疫前 IgY 抗体是从免疫前的鸡蛋中制得的。

DA-3 细胞的转染。表达 MUC1 同种型的稳定转染体是通过具有 MUC1/TM 或分泌型 MUC1/sec cDNA 的表达质粒与新霉素质粒 (pSV2 neo) 选择标记物共同转染至 DA-3 小鼠乳腺肿瘤细胞中而得到的。作为对照, 用空质粒和选择耐受新霉素的质粒进行转染。

体内肿瘤的生长。清洗 DA-3 母细胞及新霉素对照和 MUC1 同种型转染的细胞, 并计数, 将 10⁶ 个细胞皮下注射 (s.c.) 至同源的 BALB/c 纯系小鼠或 un+/nu+ 裸鼠中。每隔 2-3 天监控肿瘤的生长, 当小鼠的肿瘤大小用标尺测量 >10mm 时, 为肿瘤阳性。

疫苗免疫方案。用 10⁶ 个 DA-3/sec 肿瘤细胞的生理盐水溶液免疫 BALB/c 小鼠两次或三次, 每次间隔两个星期。在最后一次免疫的两个星期后, 用 DA-3 细胞对动物进行免疫激发, 该 DA-3 细胞是未转染的或单独用新霉素载体转染或与 MUC1 跨膜同种型一起转染的细胞。在一些实验中, 进行免疫激发的肿瘤是肾细胞瘤、RENCA 或骨瘤 K7。每次将 10⁶ 个肿瘤细胞与 10⁶ 个 DA-3/sec 细胞混合以激发免疫应答。

在其它研究中, 存在于分泌型 MUC1 同种型中独特的 11 个氨基酸肽是由 Aves Labs, Inc.(Tigard, OR)合成的, 并偶联到 KLH 上。由于在每次合成中, 肽和 KLH 的确切比率会不同, 因而需要使制备规格化以使每次能以相同量施用。KLH 肽作为疫苗时, 间隔两个星期使用。第一次免疫 BALB/c 小鼠时, 给予 50μg 肽和完全的福氏佐剂。两个星期后, 给予 25μg 肽和不完全的福氏佐剂。两个星期后, 用含有 25μg 肽且没有佐剂的 10⁶ 个 DA-3c 细胞或 DA-3/neo 细胞来激发小鼠产生免疫应答。

在所有的研究中, 未免疫的小鼠给予和试验组相同的肿瘤激发, 来作为对照。每两天或三天监控肿瘤生长并用标尺测量肿瘤大小。

实施例 1

如材料和方法中所描述，将人 MUC1 的跨膜或分泌同种型转染至 DA-3 乳腺肿瘤细胞。用 MUC1 串联重复序列的特异性 H₂₃ 抗体对存在该序列的细胞进行染色以证明转染成功（5）。将得到的细胞系用于体内试验以确定在 BALB/c 小鼠中肿瘤的发生和时间。如表 1 所示，将 DA-3，DA-3/neo 和 DA-3/TM 乳腺肿瘤细胞植入小鼠中，可产生明显的肿瘤，肿瘤在 7 天和 15 天的尺寸基本相同，且所有动物都具有类似大小的肿瘤。

表 1 BALB/c 小鼠中肿瘤的发生和时间

肿瘤类型	肿瘤出现的天数				
	7	15	25	37	12+月
DA-3	32/38	38/38			
DA-3/neo	17/25	24/25	25/25		
DA-3/TM	29/36	33/36	35/36	36/36	
DA-3/sec	0/70	0/70	1/70	1/70	1/70

令人惊异的是，用 MUC1 分泌型（DA-3/sec）转染的 DA-3 细胞不会导致肿瘤的发生。从图 1 可以明显的看出，这些动物甚至在植入该类细胞 12 个多月后仍没有肿瘤，而植入其它三种类型的 DA-3 细胞的动物都不能存活 100 天。应该指出的是，每次以高达 1×10^7 的浓度给小鼠植入 DA-3/sec 肿瘤细胞，都没有观察到肿瘤产生。

实施例 2

这样结果的一个解释是转染过程选择性地减弱了 DA-3/sec 细胞的基本生长能力。为了检验这种可能，我们研究了 DA-3 肿瘤细胞的四种类型的体外生长特性。如图 2 所示，母细胞系和所有转染体的生长在体外都具有相似的动力学特征。事实上，DA-3/sec 细胞似乎比其它细胞系繁殖得更好，显示了这些细胞体外生长能力并没有由于转染处理而被改变。

实施例 3

为了确定 DA-3/sec 细胞在体内是否失去了产生肿瘤的能力，将四种 DA-3 细胞系都植入 un+/nu+ BALB/c 小鼠中，测量肿瘤出现的几率和不同时间的肿瘤大小。图 3 显示了将 DA-3, DA-3/neo,和 DA-3/TM 细胞植入 BALB/c 裸鼠 7 天后就导致产生明显的肿瘤，而且肿瘤的生长与在纯系 BALB/c 动物中生长的方式相似。与表 1 和图 1 的结果形成对比，DA-3/sec 肿瘤细胞在 14 天时，使 30%的裸鼠产生肿瘤，在 25 天时，使所有的动物都产生肿瘤。因此，在纯系 BALB/c 小鼠中植入 DA-3/sec 细胞而没有产生肿瘤，这似乎是免疫性原因而控制的结果。因为将这种肿瘤植入裸鼠中，尽管有些肿瘤出现的时间较晚，但它能导致 100%的小鼠产生肿瘤。用带有分泌型 MUC1 的表达质粒分别转染其它两种 DA-3 肿瘤细胞，该肿瘤细胞重复了同样的结果。如表 2 所示，用 MUC1/sec 基因分别转染的那三种 DA-3 细胞都不能在纯系 BALB/c 小鼠中产生肿瘤。

表 2 不同的 DA-3/sec 转染体在 BALB/c 小鼠中产生肿瘤的几率

转染体	几率
DA-3/neo	6/6
DA-3/TM	6/6
DA-3/sec	0/6
DA-3/sec 11	0/14
DA-3/sec 22	0/11

图 4 显示了三种不同的 DA-3/sec 细胞转染体，即 DA-3/sec, DA-3/sec11, 和 DA-3/sec22，都能够在 BALB/c 裸鼠体内产生肿瘤，只是在免疫缺陷的小鼠中，其各自的生长动力学特征略有不同。有趣的是，当 DA-3/sec 肿瘤被植入至免疫纯系 BALB/c 小鼠中时，能够在 BALB/c 裸鼠中生长的 DA-3/sec 肿瘤却不生长了，但是当接种至其它 BALB/c 裸动物中时肿瘤仍然生长（数据没有显示）。这些实验结果提示了 T 细胞或至少是另一种非 T 细胞的效应细胞参与控制了用 MUC1 分泌型转染的肿瘤生长。

实施例 4

我们评价了将 DA-3/sec 细胞植入 BALB/c 小鼠中是否能够提供对于其它

表达 MUC1 的肿瘤细胞的保护作用。不表达粘蛋白的 DA-3 细胞 (DA-3/neo) 也包含在本研究中。在单独给予 1×10^6 的 DA-3/TM 细胞或 DA-3/neo 细胞, 或与 DA-3/sec 细胞相混合进行免疫激发反应之前, 实验组间隔 1 周接受两次或三次注射 1×10^6 的 DA-3/sec 细胞。作为对照, 没有接种疫苗的动物用 DA-3/neo 或 DA-3/TM 细胞来激发免疫。接受两次未混合的 DA-3/sec (10^6 细胞) 注射的动物, 当仅用 DA-3/TM 细胞来激发免疫反应时, 只是引起肿瘤出现的短时间的延迟, 即 13/22 动物在两周时出现肿瘤, 而对照组 13/14 动物在一周时出现肿瘤。在激发免疫应答之前接受了三次注射 10^6 DA-3/sec 细胞的小鼠, 与未接种的对照组相比, 不仅异想不到地延迟了 DA-3/TM 细胞的生长, 而且延迟了 DA-3/neo 细胞的生长。明显地, 当用于激发的 DA-3/TM 肿瘤细胞在植入的时候就与 DA-3/sec 细胞混合 (图 5), 与对照组相比, 其不仅延迟了肿瘤出现的时间, 而且产生了实质性保护, 导致 50% 接种后的小鼠没有出现 DA-3/TM 肿瘤细胞的生长。此外, 由于 MUC1 分子的识别, 这种保护作用没有出现, 因为在免疫接种 DA-3/sec 细胞并且用 DA-3/neo 和 DA-3/sec 乳腺肿瘤细胞混合物进行免疫激发的动物中能够看到类似的效果。

实施例 5

除了在 DA-3 乳腺肿瘤的环境下的研究以外, 本发明还进行了进一步的研究以确定接种 DA-3/sec 细胞是否能产生保护而不形成肿瘤。采用与 BALB/c 小鼠同源的两种不相关的肿瘤, 即肾细胞瘤系 RENCA 和骨瘤 K7 细胞系。图 7 显示了给 BALB/c 小鼠接种两次 DA-3/sec 细胞, 随后用 RENCA 细胞和 DA-3/sec 细胞的混合物进行免疫激发, 与未接种的对照组相比, 其生长的肿瘤明显减小。因为未混合的 RENCA 细胞的生长并没有被减弱, 因此在激发免疫应答时, 加入 DA-3/sec 是必要的, 这对于 DA-3/TM 和 DA-3/neo 细胞的试验也是同样。在采用 k7 骨瘤细胞的实验中可得相似的结果。如图 8 所示, 植入 K7 和 DA-3/sec 混合物的小鼠中的 80% 未接种疫苗的小鼠, 在免疫激发后的 21 天出现肿瘤。然而, 接种两次 10^6 DA-3/sec 乳腺肿瘤细胞的小鼠在免疫激发后延迟至 40 天才出现肿瘤, 并能抑制肿瘤发展。确实, 免疫激发后 70 天, 少于 50% 的接种疫苗的小鼠具有肿瘤。

实施例 6

关于分泌型 MUC1 可提供保护的原因, 一种可能的线索可以从 MUC1 跨膜和分泌型同种型的结构分析中得到。图 9 是 MUC1/TM 和 MUC1/sec 同种型的 cDNAs 的示意图。CDNAs 是从图左端 5' 末端开始描述的。串联重复排列由栅栏状 (barred) 区域描述, 编码信号肽、跨膜区、和细胞质区的区域由 SP, TM 和 CYT 分别表示, 两种类型具有相同的阴影。MUC1/sec 同种型末端的氨基酸序列是 VSIGLSFPMLP(3)。重要的是, 对这 11 个氨基酸采用高度严格的 BLASTP 1.4.11(6) 分析, 发现大约 50% 与人 Ly49E 配体相同, 但不与任何已知的蛋白质序列相同。在较低严格度下, 两种 *Echinococcus* 中的谷胱苷肽 S-转移酶与分支杆菌属 *leprae* 的假设蛋白 MLCB4.30 以及两种植物种的 EF hand 蛋白有些相似。该肽的高度抗原性很可能由于其亲水性的原因。为了确定这种肽存在于分泌型 MUC1 同种型转染的 DA-3 细胞中, 将针对独特的 11 个氨基酸肽的鸡 IgY 抗体偶联到 KLH 上。利用该试剂, 用酶联法 (ELISA) 直接检测 DA-3/sec 培养物上清液中的肽。简单描述该方法, 4℃ 下, 将含有 0.2-10.0μg 蛋白质/ml 的 50μl 涂覆缓冲液 (coating buffer) 或无血清培养物的组织培养上清液在培养板上放置过夜。加入封闭液在 37℃ 放置 1 个小时, 清洗培养板 3 次, 将第一抗体孵育 1 个小时或过夜; 清洗 3 次; 如果需要, 加入第二抗体, 保持 1 个小时, 清洗 3 次; 加入显影溶液; 孵育并读数。在所有测试中, 用已知浓度的纯化的肽作阳性对照。所有测试的培养物对于该分子都呈阳性 (数据未显示)。

实施例 7

进行实验, 来评价用这种肽接种可能产生的有益效果 (图 10)。无论佐剂是否存在, 接受 DA-3/TM 或 DA-3/neo 细胞 (10^6 细胞) 注射的对照小鼠都 100% 导致肿瘤生长。实验小鼠是在间隔 8 天接受具有佐剂的 KLH-独特肽的偶联物两次注射。在第二次注射后的 8 天, 用 KLH 结合肽和肿瘤细胞的混合物激发动动物产生免疫应答。用肽和 DA-3/TM 细胞混合物激发免疫应答导致 12 只小鼠中有 7 只有肿瘤产生, 还有一只在 4 个星期时产生肿瘤。用 KLH 结合肽和 DA-3/neo 细胞混合物激发接种后的小鼠产生免疫应答, 能够对更多小鼠提供保护, 只有 40% 的动物产生肿瘤, 还有一只小鼠在一个月后才

出现肿瘤。重要的是，存活的动物在用 DA-3/TM 或 DA-3/neo 细胞激发免疫应答后的 6 个月都没有肿瘤存在的迹象。

实施例 8

在进一步的研究中，在其它两种肿瘤中评价接种肽疫苗的效果。从图 11A 可以看出，将 RENCA 细胞植入 BALB/c 小鼠时，只有很弱的保护作用并且使肿瘤的出现延后。重要的是，如图 11B 所示，将 KLH 与免疫增强肽的偶联物用于另一小鼠种 (C57/BL6 小鼠)，并用攻击性很强的 Lewis 肺肿瘤进行免疫激发时，也观察到了保护作用。

实施例 9

为了确定混合有 DA-3/sec 细胞的低数量的激发免疫应答细胞是否能够避免预先接种后者 DA-3/sec 细胞的必要性，其中该预先接种是为了抑制肿瘤生长，将 5×10^5 DA-3/TM 细胞与等量的 DA-3/sec 细胞混合，注入小鼠中。如图 12 所示，在没有提前接种疫苗的情况下，这种治疗使 60% 小鼠的肿瘤生长得到了抑制。

实施例 10

为了确定何种效应细胞参与抑制 DA-3/sec 肿瘤细胞生长，取两个星期前接种 DA-3/sec 肿瘤细胞的小鼠脾细胞，进行 ^{51}Cr 标记的细胞毒性测定。在丝裂霉素处理过的 2×10^5 - 2×10^6 个 DA-3/sec 细胞 C(MMC)存在下，培养 10×10^6 个脾细胞 5 天。被 DA-3/sec 初次激活的脾细胞显示了很强的抑制 DA-3/sec 细胞的活性(图 13)。被 DA-3/sec 初次激活的脾细胞对于 DA-3/TM, DA-3/neo 和 DA-3 靶体显示了低水平的抑制作用。这些结果显示了在 DA-3/sec 的刺激下，淋巴细胞在体外出现增长，且对 DA-3/sec 靶体具有有效的抑制功能。

实施例 11

免疫系统的细胞具有多种杀伤机制，其包括 Fas-Fas 配体相互作用 (7) 和穿孔素-granzyme 介导的杀伤 (8)。被 DA-3/sec 初次激活的脾细胞用抗-Fas 抗体或 Concanamycin A(CMA)处理，CMA 是一种液泡酸化抑制剂，其通过

阻断 H^+ ATP 酶而阻滞穿孔素介导的杀伤 (9)。CMA 以剂量依赖方式有效地阻滞 DA-3/sec 靶体的杀伤 (图 14)，然而当加入抗-Fas 抗体时没有观察到细胞毒作用 (图 15)。上述结果表明 Fas/FasL 在 DA-3/sec 细胞的细胞毒性中不起作用，而是通过穿孔素-granzyme 途径介导的。

实施例 12

为了确定是否体内注入 DA-3/sec 细胞会导致更强的能抑制 YAC-1 靶细胞 (一种典型的鼠科 NK-靶细胞) 的 NK 活性 (10)，在实验中，将正常的脾细胞与体内注入 DA-3/sec 细胞 3-10 天的脾细胞相比较，比较它们诱导溶解的能力。如图 16 所示，测试的 3 天前注射 DA-3/sec 细胞的 BALB/c 小鼠的脾细胞对 YAC-1 细胞的溶解活性水平比正常小鼠的略高一些。这种 NK 反应性被增强的现象在测试前 10 天就接种 DA-3/sec 细胞的小鼠中更明显。

实施例 13

其它初步的研究提示了用人分泌型 MUC1，而不是跨膜型转染的 DA-3 细胞，无论在体内还是体外，都会刺激效应细胞产生针对 DA-3/sec 细胞的反应。如上所述，在 MUC1/sec 蛋白的 C-末端存在一独特的 11 个氨基酸肽，但在 MUC1/TM 蛋白质上没有该肽。根据这种肽制备了一种合成肽 (称为“免疫增强肽”，或 IEP)，并用于免疫实验中，结果发现其具有抑制 DA-3, DA-3/neo, DA-3/TM, K7 骨瘤, RENCA 和 Lewis 肺癌细胞的作用。我们研究了该肽对细胞毒反应的可能的效果。测试时，采用另一种肿瘤模型，即带有 D1-DMBA-3 乳腺肿瘤的小鼠。DA-3 细胞系最初来自于这种肿瘤，该细胞在同源的 BALB/c 小鼠体内按常规方式在实验室传代。从图 17 可以看出，在正常小鼠的脾细胞或具有 D1-DMBA-3 肿瘤的小鼠脾细胞体外加入 MUC1/sec 独特的肽，5 天后导致对 DA-3/sec 肿瘤靶体的显著细胞毒作用。重要的是，在接种疫苗的方案与上述方案类似的情况下，表现出明显的抑制 D1-DMBA-3 肿瘤生长的作用。在 NK 细胞中进行该肽刺激免疫细胞能力的测试。根据 DA-3/sec 肿瘤在裸鼠的最初生长阶段就被抑制的现象来选择测定方法，其提示了固有的免疫能力可能参与了抑制 DA-3/sec 的直接反应。因此，为了检测免疫增强肽 (IEP) 的免疫调节活性，BALB/c 脾细胞用 $10\mu\text{g}$ IEP

预处理 30-45 分钟，然后加入铬标记的 YAC-1 或 EL-4 靶体，进行如上所述的 4-小时测试（11）。如图 18 所示，加入肽导致正常脾细胞抑制典型的鼠 NK-靶细胞(YAC-1)的细胞毒水平的提高。而且，当将免疫增强肽注入对正常脾细胞的 NK-型的细胞毒性不敏感的 EL-4 靶细胞后，该 EL-4 靶细胞易被这些效应器溶解。在其他的实验中，通过提前注入 MUC1/sec 独特的肽，我们也能够激活正常的 BALB/c 或 C57BL(B6)小鼠中的脾效应细胞以杀伤 DA-3/sec 靶细胞（图 19）。

实施例 14

对于观察到的细胞毒性是由于肿瘤细胞上的独特 11 个氨基酸肽的直接毒性作用的结果是有争论的。为了检测这种可能性，我们将高水平的 IEP 加入到体外的几个肿瘤靶体中，培养 4 天后测定细胞的存活能力。如表 3 所示，用比体内细胞，或效应细胞介导的细胞毒性测定中所用的更高水平的肽进行处理，却没有导致对肿瘤细胞生长的抑制或对肿瘤细胞的杀伤作用。

表 3 Sec 肽对于体外肿瘤生长的作用

肿瘤细胞系	仅培养基	+KLH-Sec 肽 ¹
DA-3	3.7×10 ⁶ 细胞 ²	3.5×10 ⁶ 细胞
DA-3/neo	3.9×10 ⁶ 细胞	4.0×10 ⁶ 细胞
DA-3/TM	3.1×10 ⁶ 细胞	3.0×10 ⁶ 细胞
DA-3/sec	2.9×10 ⁶ 细胞	3.1×10 ⁶ 细胞

¹50μg/孔

²培养 4 天后的所有细胞

结论

本发明公开的数据表明用新型分泌型同种型 MUC1 基因(MUC1/sec)转染，能够预防 BALB/C 小鼠中已存在的进攻性强并可产生免疫力的肿瘤细胞系的生长。当将其用于接种方案中，能够以非特异性方式抑制同源肿瘤。存在于 MUC1/sec 分子中的一种独特的 11 个氨基酸肽与保护作用有关，当用于接种免疫的方案中时，它能有效抑制各种肿瘤细胞系。这些数据还提示了，

由固有的和/或调节性免疫系统的效应器细胞产生的细胞毒性也与所观察的结果相关。由于该肽的作用不被限制于所指出的肿瘤类型或小鼠种类，它应该可以单独地和/或与其它免疫调节分子结合使用来抑制多种肿瘤。在注射了该肽的动物体内，没有检测到毒性反应。IEP 的广谱作用使其不仅可用于抑制肿瘤，而且还可抑制病毒或细菌性疾病，如 HIV，乙型肝炎和丙型肝炎，以及其它微生物引起的感染（如，肺结核），其中免疫应答的增强对受试体可能具有积极的作用。

在本发明描述的优选实施例中，为了描述清晰使用了特定的术语。然而，本发明并无意于使发明限制于所选择的特定术语。可以理解，每一个具体要素都包括可以相似方式操作以实现相似目的的所有技术的等效方式。

本发明详述部分举例说明并讨论的实施例只是希望给本领域技术人员提供发明人所知的最佳方式以实施和使用本发明，而不应该将其认为是对本发明范围的限制。根据本领域技术人员对于上述发明内容的理解，在没有背离本发明的情况下，本发明例举的实施例可以被修饰或改变，增加或删减要素。因此可以理解，在权利要求及其等效转换的范围内，本发明可以被实施而不只是作为具体的描述。

所有专利，公开的专利申请和其它公开的参考文献都在此作为引用文献。为了方便，将参考文献列在下面。

REFERENCES

1. Ceriani RL, Thompson KE, Peterson JA, and Abrahams S: Surface differentiation antigens of human mammary epithelial cells carried on the human milk fat globule. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash)* 74 : 582-587, 1977.
2. Lloyd KO, Burchell J, Kudryashou V, Yin BWT, and Taylor-Papadimitriou J: Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 271 : 33325-33334, 1996.
3. Smorodinsky N, Weiss M, Hartmann M-L, Baruch A, Harness E, Yaakovovitz

- M, Keydar I, and Wreschner DH: Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 228 : 115-121,1996.
4. Fu Y-X, Watson GA, Kasahara M, and Lopez DM: The role of tumor derived cytokines on the immune system of mice bearing mammary adenocarcinomas. I. Induction of regulatory macrophages by in vivo administration of rGM-CSF. *J. Immunol.* 146 : 783-789, 1991.
5. Keydar I, Chou CS, Hareuveni M, Tsarfaty I, Sahar E, Selzer G, Chaitchik S, and Hizi A: Production and characterization of monoclonal antibodies identifying breast tumor associated antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, 86 : 1362-1366,1989.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403-410, 1990.
7. Nagata S and Golstein P: The FAS death receptor. *Science* 267: 1449-1456,1995.
8. Podack ER, Olsen KJ, Lowery DM, and Lichtenheld M: Structure and function of perforin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 140 : 11-17,1989.
9. Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, Takaku K, Kondo S, Yonehara S, and Nagai K: Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contributions of perforin-anad Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. I. *Immunol.* 156: 3678-3686,1996.
10. Herberman RB, Nunn ME, and Lavrin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16 : 216-223,1975.
11. Paul R, Padmanabhan R, and Lopez DM: Characterization of the effector cells mediating an "innocent bystander" cytotoxicity reaction induced by a syngeneic mammary adenocarcinoma in mice. *Cancer Res.* 44 : 4480-4486,1984.

SEQUENCE LISTING

<110> 迈阿密大学

<120> 具有免疫增强特性的粘蛋白肽

<130> PC03938C

<150> US 60/280,137

<151> 2001-04-02

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Ser Ile Gly Leu Ser Phe Pro Met Leu Pro
1 5 10

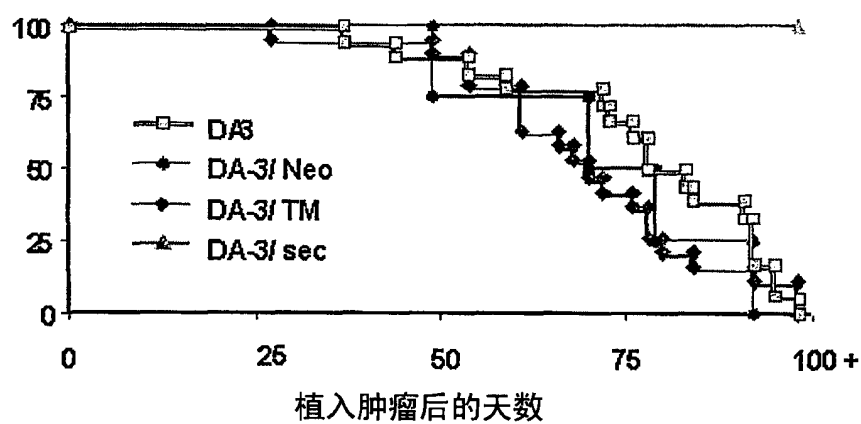


图 1

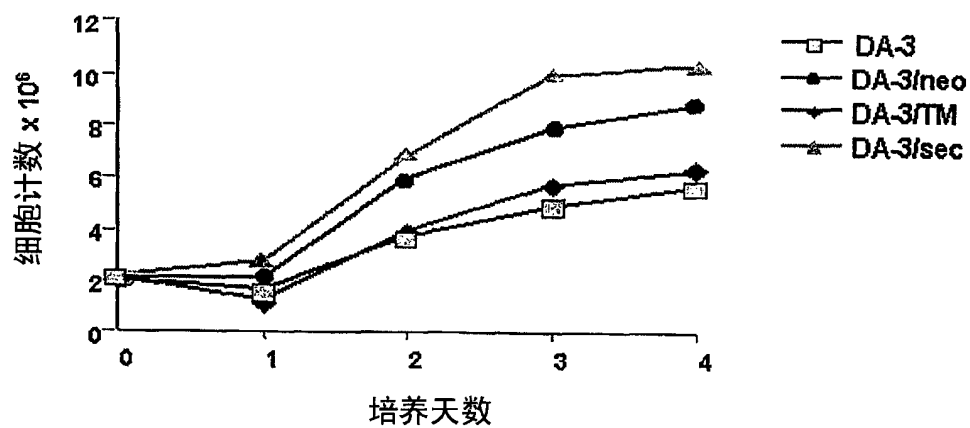


图 2

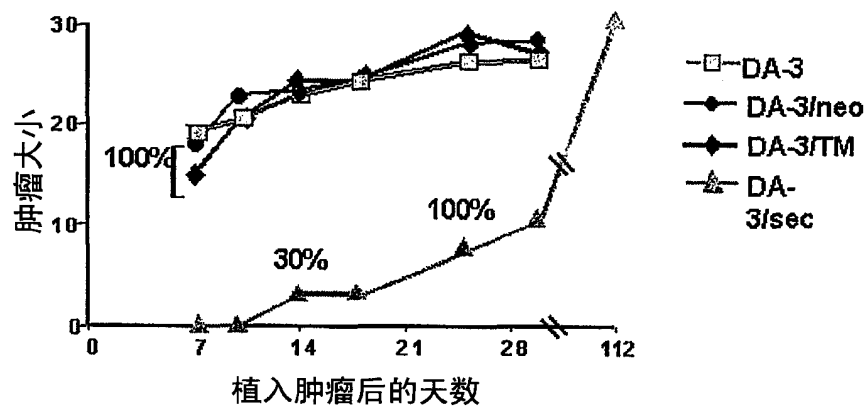


图 3

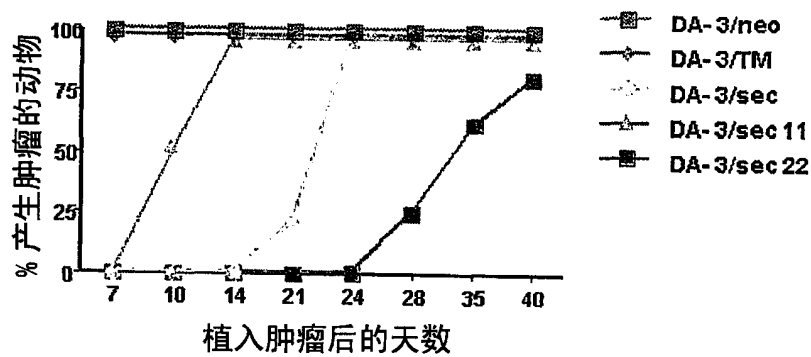


图 4

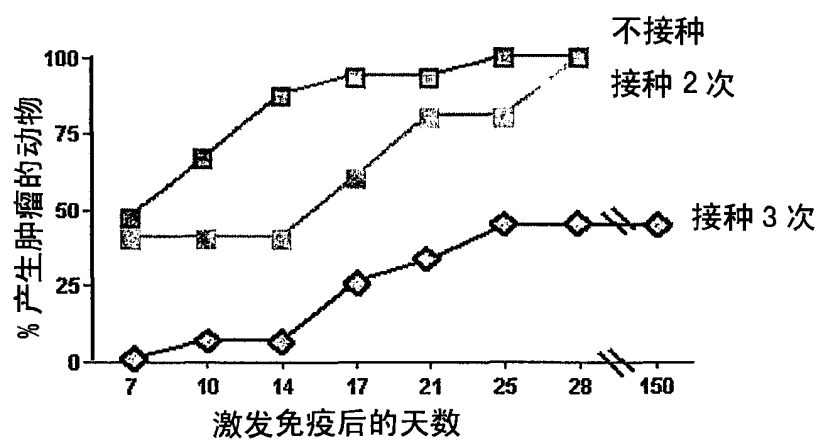


图 5

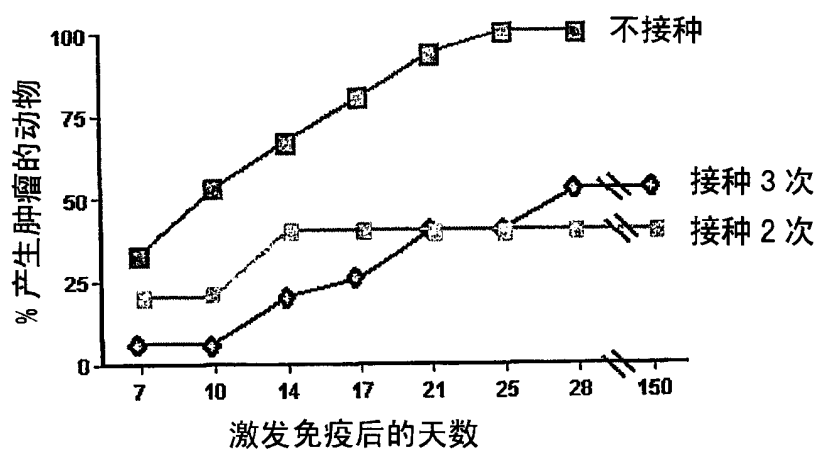


图 6

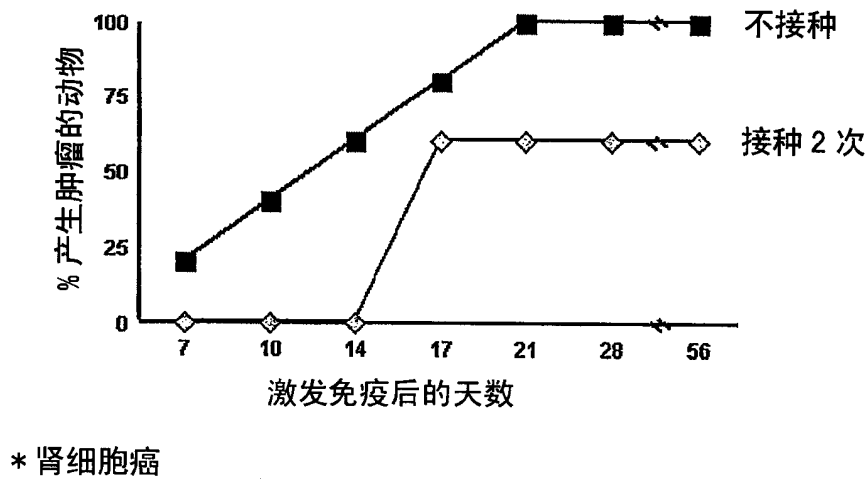
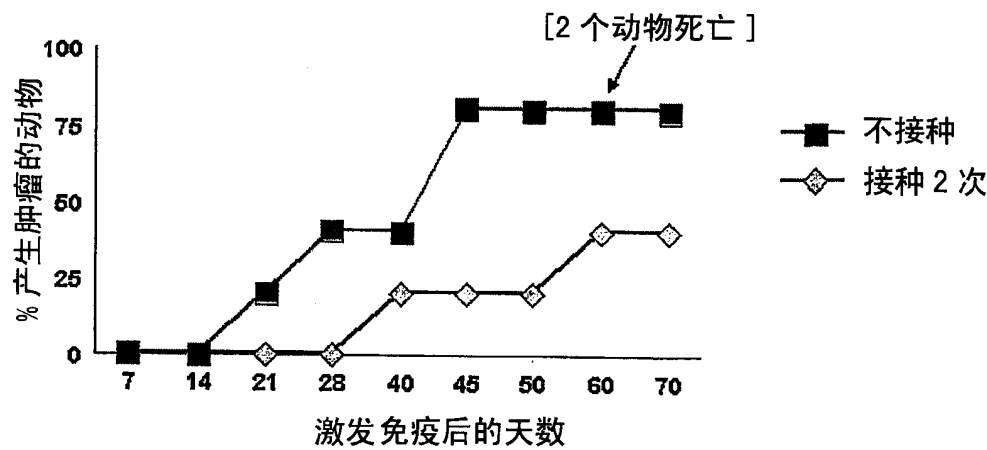


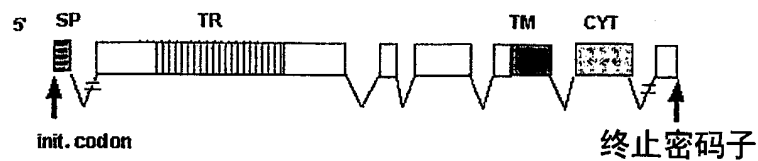
图 7



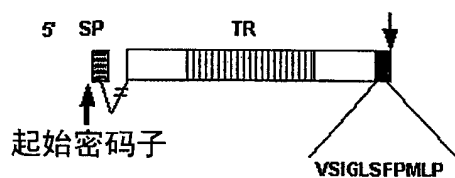
* 骨肉瘤

图 8

A. 跨膜 MUC1 (MUC1/TM)

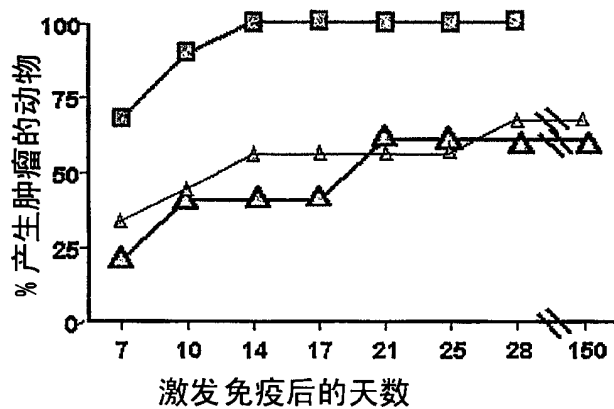


B. 分泌型 MUC1 (MUC1/sec)



- 信号肽 (SP)
- ▨ 串联重复排列 (TR)
- 跨膜区 (TM)
- ▨ 细胞质区域 (CYT)
- 独特的 11 个氨基酸序列

图 9



接种

无

2 x 肽 -KLH

2 x 肽 -KLH

□

△

△

激发免疫应答

DA-3/ TM or DA-3/ neo Cells

DA-3/TM + 肽 -KLH

DA-3/ neo + 肽 -KLH

图 10

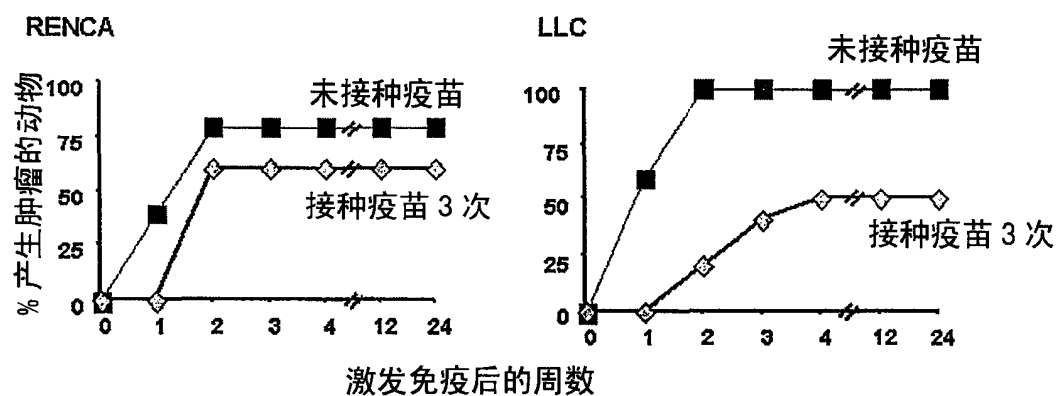


图 11

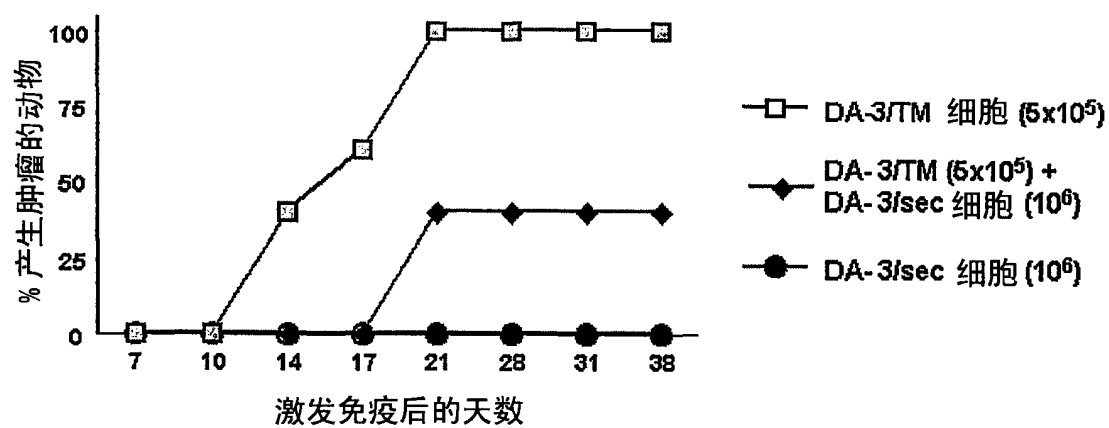


图 12

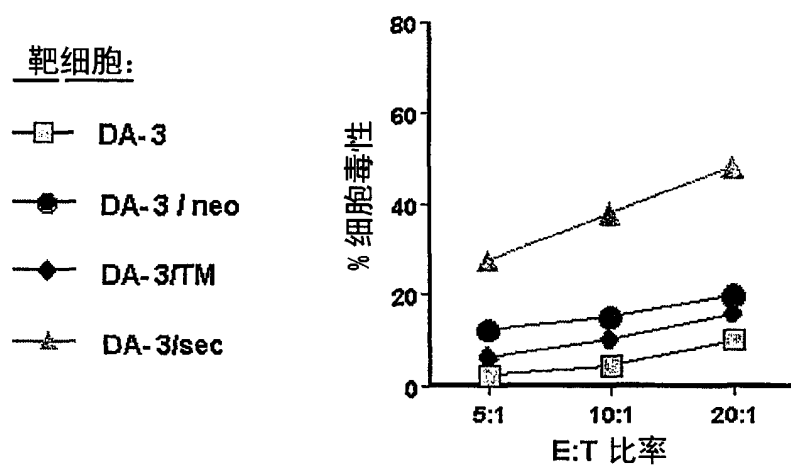


图 13

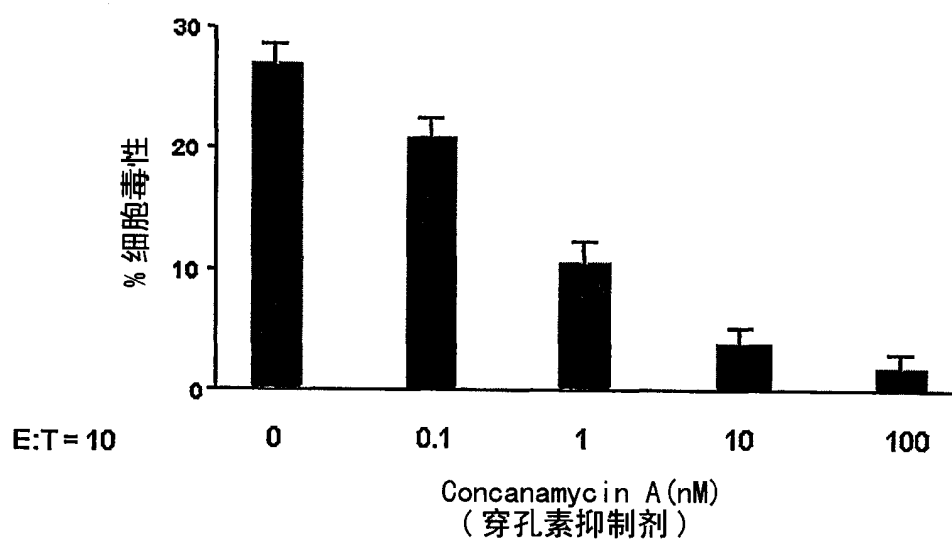


图 14

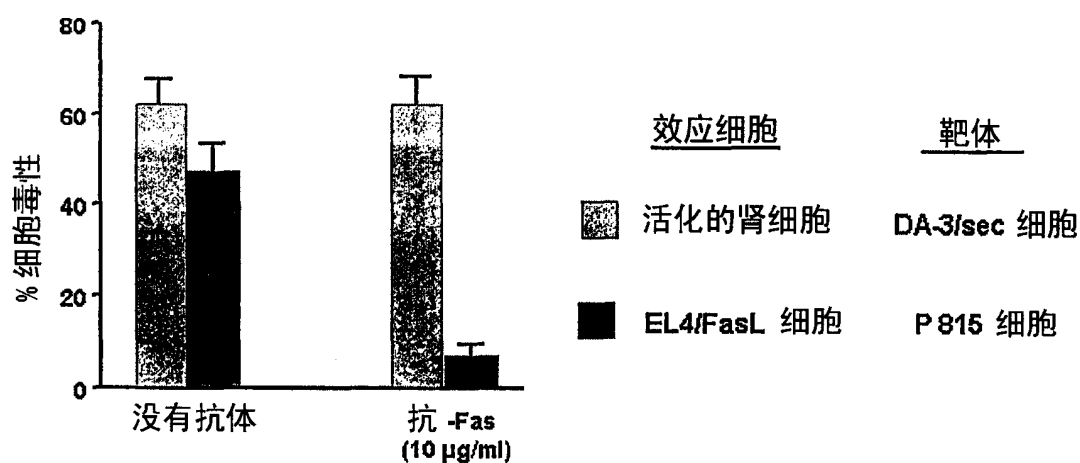


图 15

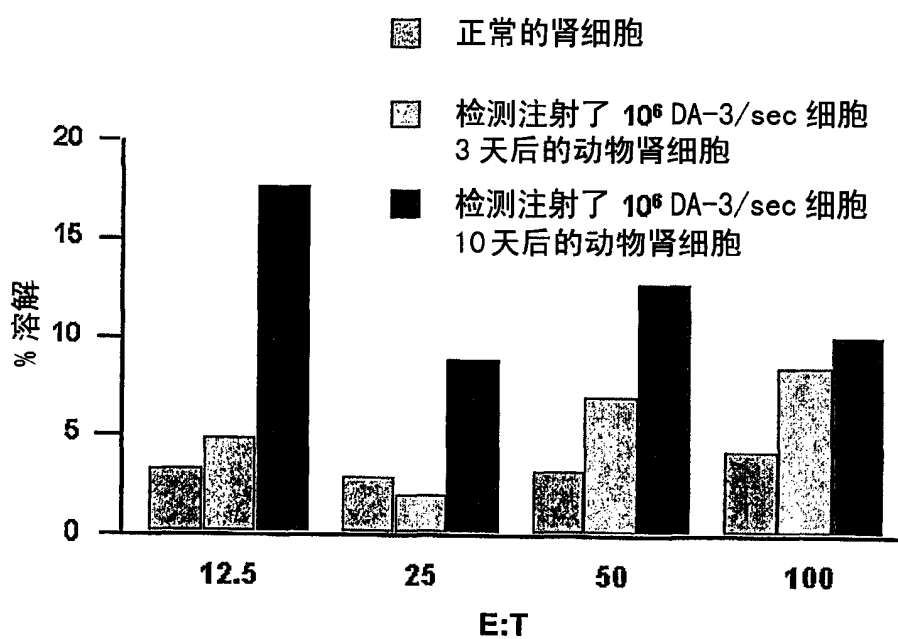


图 16

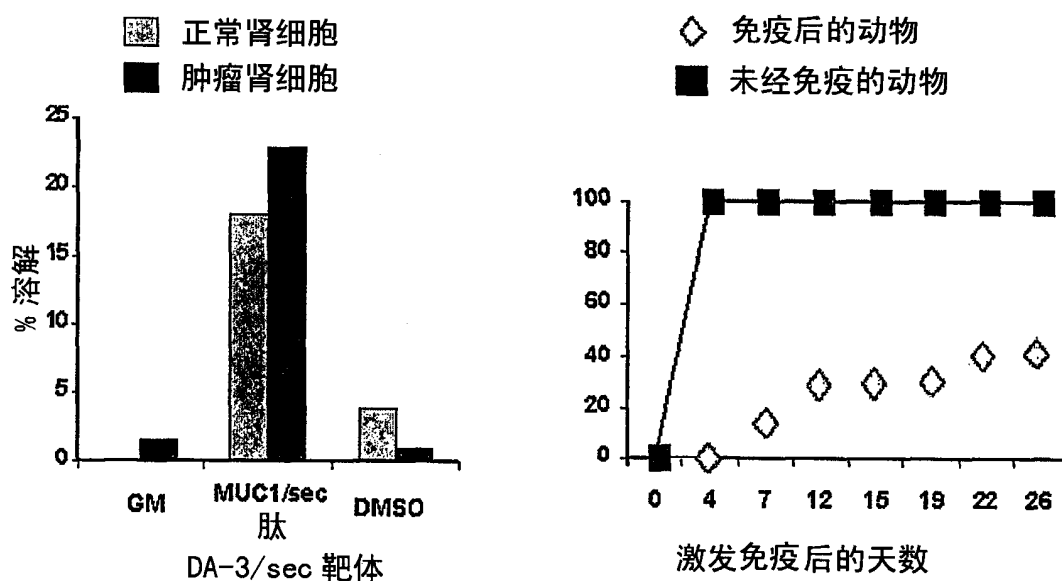


图 17

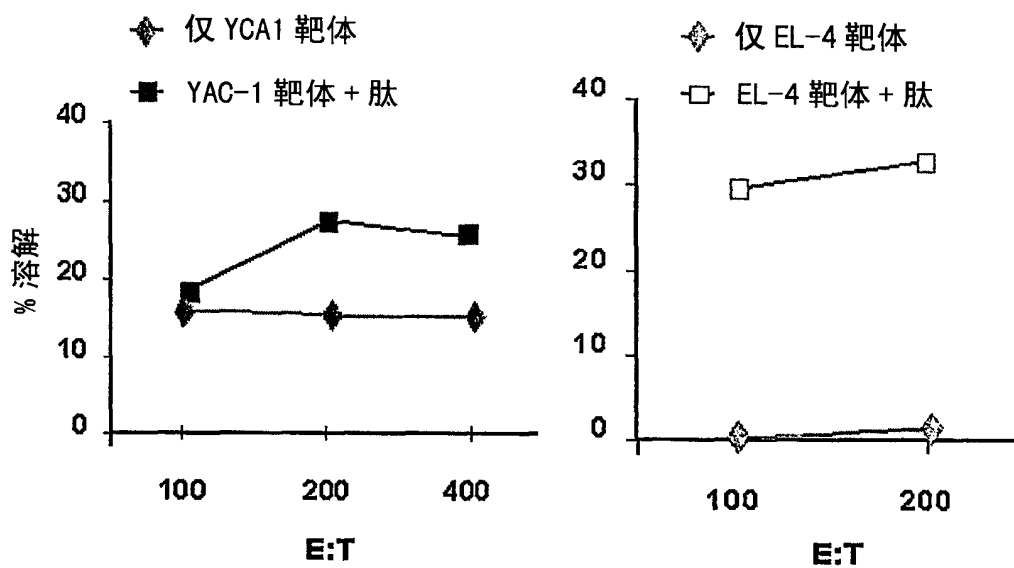


图 18

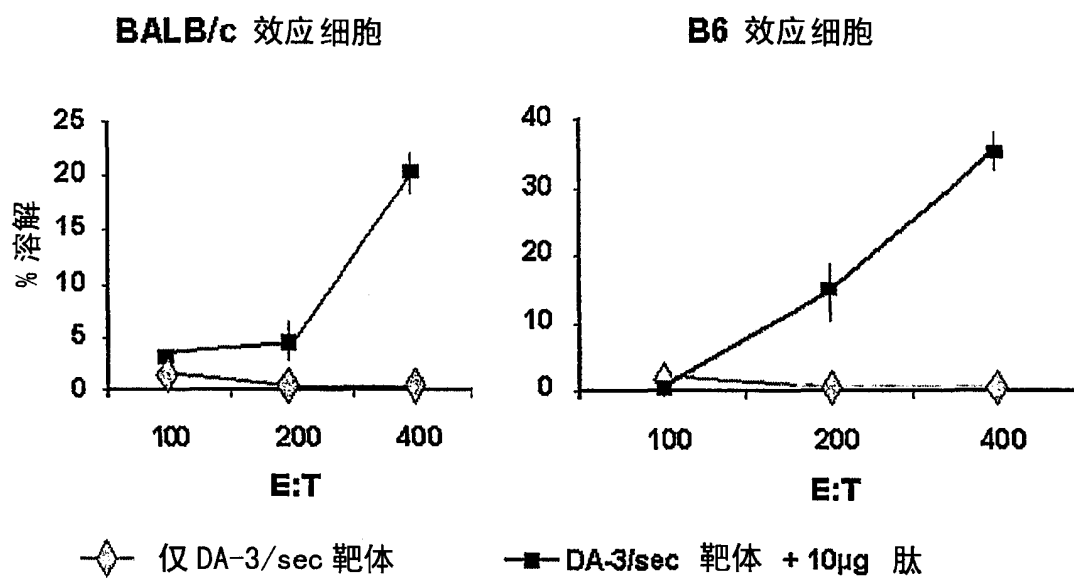


图 19