[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07H 21/04
C12N 5/00
C12N 5/08 C12N 5/10
C12N 1/21 C12N 1/15
C12N 15/00 C12N 15/09
C12N 15/12 C12N 15/63
C07K 14/00 C07K 14/435

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95195364.8

[45]授权公告日 2001 年 8 月 29 日

[11]授权公告号 CN 1070198C

[22]申请日 1995.9.21
[21]申请号 95195364.8
[30]优先权
[32]1994.9.30 [33]US [31]08/316,231
[86]国际申请 PCT/US95/12117 1995.9.21
[87]国际公布 WO96/10577 英 1996.4.11
[85]进入国家阶段日期 1997.3.28
[73]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·库利耶 池田秀之
蒂尔瑞·博恩－法勒尔
[56]参考文献
US－1－5405940 1995. 4.11 _
审查员 刘亚文

[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 3 页 说明书 19 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 编码肿瘤排斥抗原前体 DAGE 的分离的核酸分子及其应用

[57]摘要

本发明提供了一族新的肿瘤排斥抗原前体，编码它们的核酸分子。这种肿瘤排 斥抗原前体被称作 DAGE 肿瘤排斥抗原前体，编码它们的核酸分子被称作 D AGE 编码分子。本发明还提供了所说编码序列、肿瘤排斥抗原和其前体分子 的各种诊断和治疗用途。

ISSN1008-4274

00.12.19

权 利 要 求 书

1. 一种由 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列组成的分离的核酸分子。

2. 一种由 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列组成的分离的核酸分子。

3. 一种分离的核酸分子，该分子在严格条件下杂交到SEQ ID NO: 1 或SEQ ID NO: 2 所示的核酸分子上，并且编码一种肿瘤排斥抗原前体，所述的肿瘤排斥前体的至少一部分具有如下氨基酸序列：

Xaa Leu Xaa Gly $(Xaa)_n$ Leu，其中 n 是 4 或 5;

Xaa Leu Xaa Gly $(Xaa)_n$ Val，其中 n 是 4 或 5;

Xaa Leu $(Xaa)_6$ (Lys 或 Tyr);

$(Xaa)_7$ Lys Lys;

Xaa Tyr $(Xaa)_6$ Leu;

Xaa Pro Arg $(Xaa)_5$ Leu;

$(Xaa)_2$ Lys Xaa Lys $(Xaa)_3$ Leu ；或

Xaa Glu $(Xaa)_3$ Asp $(Xaa)_2$ Phe。

4. 一种由 SEQ ID NO: 1 的 1 -1554 位核苷酸组成的分离的核酸分子。

5. 一种分离的 mRNA 分子，该分子互补于权利要求 1 的核酸分子。

6. 一种由权利要求 1 的核酸分子转染或者转化的宿主细胞。

7. 一种由权利要求 3 的核酸分子转染或者转化的宿主细胞。

8. 一种由权利要求 4 的核酸分子转染或者转化的宿主细胞。

9. 一种表达载体，该载体包含可操作连接到启动子上的权利要求 1 或权利要求 2 的分离的核酸分子。

10. 一种表达载体，该载体包含可操作连接到启动子上的权利要求 3 的分离的核酸分子。

11. 一种表达载体，该载体包含可操作连接到启动子上的权利要求 4 的分离的核酸分子。

12. 权利要求 6 的宿主细胞，其中所说的宿主细胞是表达 HLA -A24 的哺乳动物细胞。

13. 权利要求 7 的宿主细胞，其中所说的宿主细胞是表达 HLA -A24 的哺乳动物细胞。

14. 权利要求 8 的宿主细胞，其中所说的宿主细胞是表达 HLA -A24 的哺乳动物细胞。

15. 权利要求 9 的表达载体，该载体还包含编码 HLA -A24 的核酸分子。

16. 权利要求 10 的表达载体，该载体还包含编码 HLA -A24 的核酸分子。

17. 权利要求 11 的表达载体，该载体还包含编码 HLA -A24 的核酸分子。

18. 包含每种以下各自独立的部分的表达试剂盒：

(i) 权利要求 1 或权利要求 2 的分离的核酸分子，和

(ii) 编码 HLA -A24 的核酸分子。

19. 包含每种以下各自独立的部分的表达试剂盒：

(i) 权利要求 3 的分离的核酸分子，和

(ii) 编码 HLA -A24 的核酸分子。

20. 包含每种以下各自独立的部分的表达试剂盒：

(i) 权利要求 4 的分离的核酸分子，和

(ii) 编码 HLA -A24 的核酸分子。

21. 一种分离的肿瘤排斥抗原前体，该前体由权利要求 1、2、3 或 4 的核酸分子编码。

22. SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 的分离的肽。

说　明　书

编码肿瘤排斥抗原前体 DAGE 的分离的核酸分子及其应用

相关申请

本申请是申请号为 08 /316,231，申请日为 1994 年 9 月 30 日的申请的部分继续申请，其公开的内容本文一并参考.

发明所属技术领域

本发明涉及编码肿瘤排斥抗原前体的核酸分子，更具体地说，本发明涉及这样的基因，其肿瘤排斥抗原前体被加工成至少一种由 HLA -A24 分子呈递的肿瘤排斥抗原. 所说的肿瘤排斥抗原前体，或"TRAP"可以被加工成由其他 MHC 分子（如 HLA-A1 和其等位体， HLA -A2 ， HLA -Cw* 1601 ， HLA -B44 等）呈递的附加肽. 所说的基因显示出不与其它已知肿瘤排斥抗原前体编码序列相关，被各种肿瘤表达，并且除了睾丸，卵巢和子宫内膜细胞外，不被正常细胞表达.

发明背景和现有技术

哺乳动物免疫系统识别外源物质和与外源物质反应的过程是一个复杂过程. 该系统的的一个重要方面是 T 淋巴细胞，或"T 细胞"应答. 该应答要求 T 细胞识别细胞表面分子（称作人类白细胞抗原("HLA"), 或主要组织相容性复合物(" MHCs ")）和肽的复合物并与其相互作用. 所说的肽类是由也呈递 HLA /MHC 分子的细胞加工从较大分子衍生的，这一点参见 Male 等，高等免疫学(J.P. Lipincott 公司， 1987), 6-10 章. T 细胞和 HLA /肽复合物的相互作用是受到限制的，要求 T 细胞对 HLA 分子和肽的特定组合是特异性的. 如果特异性 T 细胞不存在，即使它的配体复合物存在，也没有细胞应答. 同样地，如果特异性复合物不存在，仅 T 细胞存在也没有应答. 这种机制涉及到在自身免疫病理学中和细胞异常反应中的免疫系统对外源物质的应答. 许多工作曾集中于蛋白质加工成 HLA 结合肽的机制上. 在这一点上，参见， Barinaga ，科学 257： 880 (1992); Fremont 等，科学 257 ： 919 (1992); Matsumura 等，科学 257 ： 927 (1992); Latron 等，科学 257： 964 (1992).

T 细胞识别细胞异常的机制也牵涉进癌中. 例如，在 PCT 申请 PCT US/92/ 04354 (申请日 1992 年 5 月 22 日，公开日 1992 年 11 月 26 日，本文一并参考)中公开了一族基因，

它们被加工成肽，所述肽其后依次在细胞表面上表达，导致肿瘤细胞被特异性 CTLs 胞溶性 T 淋巴细胞，或以下称“CTLs”溶解．所说的基因被认为编码"肿瘤排斥抗原前体"或"TRAP"分子，其肽衍生物被称作“肿瘤排斥抗原”或"TRAs "，参见 Traversari 等，免疫遗传学 35： 145 (1992)； van derBruggen 等，科学 254： 1643 (1991)，有关这个基因族的其它信息， 也参见美国专利 5,342,774(申请号 807,043 ，申请日 1991 年 12 月 12 日，本文一并参考)．这一专利中公开了肿瘤排斥抗原前体“MAGE”族．

美国专利 5,405,940 （申请号 938,334 其公开的内容本文一并参考）阐述了编码肿瘤排斥抗原前体的 MAGE -I 基因，所述前体被加工成由 HLA -A1 分子呈递的九肽 (nonapeptides)． 结合到 HLA -A1 上的九肽遵循基序适合的结合“规则”．这一点，参见例如 PCT /US 93 /07421 ； Falk 等，自然 351： 290-296 (1991)； Engelhard，免疫学年度回顾， 12： 181 -207 (1994)； Ruppert 等，细胞 74 ： 929-937 (1993)； Rotzschke 等，自然 348 ： 252-254 (1990)； Bjorkm 等，自然 329： 512 -518 (1987)； Traversari 等，实验医学杂志 176 ： 1453-1457 (1992)．这些参考文献教导了假定已知特定肽对特定 HLA 分子的特异性，人们应预期结合到一种 HLA 分子上（而不是其它分子上）的特定肽，这一点是重要的，因为不同的个体具有不同的 HLA 表型．结果，经管鉴别作为特异性 HLA 分子的配体的特定肽具有诊断的和治疗用途，但这些仅仅与具有该特定的 HLA 表型的个体相关．在这一领域需要作进一步的工作，因为细胞异常不限于一种特定的 HLA 表型，定向疗法需要一些异常细胞表型的知识．

美国专利申请 008,446（申请日 1993 年 1 月 22 日，本文一并参考）描述了 MAGE -1 表达产物被加工成第二种 TRA 的事实．这一第二种 TRA 由 HLA -Cw*1601 分子呈递．这一公开表明给定的 TRAP 能产生许多 TRA，每一种都符合结合到 MHC 分子上的基序规则．

美国专利申请 994,928 （申请日 1992 年 12 月 12 日，本文一并参考）阐述了酪氨酸酶，即一种由一些正常细胞（例如，黑素细胞）产生的分子，在肿瘤细胞中被加工成由 HLA -A2 分子呈递的肽．

美国专利申请 08/032,978 （申请日 1993 年 3 月 18 日，本文一并参考）指出第二种 TRA （不是从酪氨酸酶衍生的）由 HLA -A2 分子呈递，所述 TRA 是从 TRAP 衍生的，但是被非 MAGE 基因编码．这一公开说明某一特定 HLA 分子可以呈递从不同来源衍生的 TRAs．

美国专利申请08/079,110（申请日1993年6月17日，本文一并参考）描述了非相关肿瘤排斥抗原前体，所谓的“BAGE” 前体，其不与MAGE 族相关.

美国专利申请 08/ 096,039 和 08/ 250,162 （两者本文一并参考）也描述了非相关TRAP 前体 GAGE .

由以上引用的论文，专利和专利申请所呈递的工作大部分涉及 MAGE 族基因以及非相关的 BAGE 和 GAGE 基因. 然而，现在已发现，还有一些另外的肿瘤排斥抗原前体由细胞表达. 这些肿瘤排斥抗原前体称作"DAGE "肿瘤排斥抗原前体. 它们不显示出与 MAGE 族基因， BAGE 基因或 GAGE 基因的同源性. 这样本发明涉及编码这样的TRAP 的基因，肿瘤排斥抗原前体本身以及两者的应用.

GAGE 肿瘤排斥抗原前体的其它特征是它们被肿瘤细胞的表达比以前描述的其它肿瘤排斥抗原前体更普遍. 这一点在以下证明. 而且，所述基因族被正常细胞的表达再一次被限制在睾丸，卵巢和子宫内膜细胞. 这样，有比以前更多的检测转化细胞存在的一般性方法可以使用. 这一点从实施例可以看出.

本发明进一步由随后的描述说明.

<u>附图简要描述</u>

图 1 共同描述 ^{51}Cr 释放，溶胞研究. 具体地说:

图 1A 显示细胞系 LB33 -MEL.B-1 的溶解;

图 1B 显示由 EBV 病毒转化的 LB33 B 细胞的溶解. 这些是自体细胞.

图 1C 显示在 NK 靶 K562 上的溶胞研究. 在每种情况之下，效应细胞均是 CTL 克隆 LB33 -CTL-269/17 .

图 2 表示在抗-HLA -A24 单克隆抗体的存在下，由胞溶性 T 细胞引起的溶胞抑制研究. 研究是在存在或不存在 30 倍稀释的产生 HLA -A24 特异性单克隆抗体之杂交瘤的培养基下进行.

图 3A 和 3B 显示在用序列 Hi2 转染 LB804 -ALL 细胞后的溶胞实验的结果.

图 4 显示在用 CTL 269/17 进行的 TNF 释放测定中获得的结果. 刺激物细胞是 LB33

--MEL.B-1， COS-7 细胞，用编码 HLA -A24 的 cDNA 序列转染的 COS-7 细胞或用编码 HLA -A24 的 cDNA 序列和编码依据本发明的肿瘤排斥抗原前体的 cDNA 两者转染的 COS-7 细胞.

图 5 比较用从 DAGE 衍生的各种肽引起的溶胞作用.

图 6 显示在各种组织样品中 DAGE 的表达.

优选实施方案的详细描述

实施例 1

黑素瘤细胞系 LB33 -MEL.B 是用标准的技术从转移病人 LB33 衍生的. 然后通过限制稀释克隆肿瘤细胞，形成此后使用的克隆 LB33-MEL.B-1 .

从病人采取含单核血细胞的样品(包括 B-淋巴细胞)的 LB33 . 将克隆 LB33 -MEL.B -1 样品与单核血细胞样品接触. 观察混合物的 LB33-MEL.B - 1 细胞溶解. 这一溶解表明样品中存在对由细胞呈递的肽和 HLA 分子复合物特异性的胞溶性 T 细胞 (" CTLs ").

所使用的溶解测定法是按照下列 Herin 等 (国际癌杂志: 390-396 (1987)，其公开的内容本文一并参考) 的铬释放测定法. 然而，本文描述了该测定法. 使靶黑素瘤细胞离体生长，在标记之前，在 50 U/毫升 IFN-γ 的存在下培养这些细胞 48 小时以便增加 HLA I 类分子的表达. 然后以 10^7 细胞/毫升将所述细胞悬浮在补充有 10mM HEPES 和 30%FCS(即，胎牛血清)的 DMEM 中，于 37 ℃与 200 μCi/毫升 $Na(^{51}Cr)O_4$ 一起培养 45 分钟. 用补充有 10mM Hepes 的 DMEM 洗涤标记细胞三次. 然后将它们悬浮到补充有 10 mM Hepes 和 10 % FCS 的 DMEM 中. 此后，将含 10^3 细胞的 100 ul 试样分布于 96 孔微量培养板. 添加在 100 ul 相同的培养基中的含 PBL 的样品，测定进行双份. 平板在 100g 下离心 4 分钟，于 37 ℃在 5.5 % 二氧化碳氛围中培养四小时.

再离心平板一次，收集 100 ul 样品的上清液，并计数. 按下式计算 ^{51}Cr 释放的百分比:

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

其中 ER 是观察到的实验的 ^{51}Cr 释放， SR 是在 200 ul 培养基中单独培养 10^3 标记细胞测

得的自发释放， MR 是最大释放，是通过添加 0.3 %Triton X-100®到靶细胞获得的.

经限制稀释扩增和克隆那些显示高 CTL 活性的单核血细胞样品，并用相同的方法再筛选一次.

将相同的方法用于测试靶 K562 细胞. 当使用 EBV-B 细胞时，唯一的变化是用补充有 5 % FCS 的 Hank's 培养基替代 DMEM 培养基.

这些实验导致从病人 LB33 分离出 CTL 克隆 LB33 -CTL -269 /17 . 如图 1A - 1C 所说明的，这一 CTL 克隆溶解 LB33 -MEL.B-1 肿瘤细胞，但不溶解 EBV 转化的病人 LB33 的 B 细胞，也不溶解 K562 细胞. 当靶细胞与对 HLA-A24 特异性的单克隆抗体一起培养时，溶解被抑制，说明任何涉及的 TRA 肽由 HLA -A24 呈递. 图 2 显示了这些结果.

第二种 CTL 克隆(称作 LB33 -CTL -269 /1)溶解 LB33 -MEL.B-1 ，但不溶解 EBV-B 转化的 B 细胞，也不溶解 K562 细胞. 这说明相同的靶抗原被识别. 由 LB33 -CTL -269 /1 引起的溶解也被抗-HLA -A24 单克隆抗体抑制.

实施例 2

由于存在的 MHC 分子已被鉴别为 HLA -A24 ，因此进行鉴别所述蛋白质编码序列的研究，所述蛋白质此后称作 "肿瘤排斥抗原前体" 或"TRAP"分子，其是被呈递的肽的来源.

为此，从细胞系 LB33 -MEL.B-1 分离总 RNA . 根据熟知的技术用寡脱氧胸苷结合试剂盒分离 mRNA . 一旦 mRNA 可靠，就再次用标准方法将它转录成 cDNA . 依据制造商的说明将 cDNA 连接到 EcoRI 衔接子，并克隆进质粒 pcDNA -I/Amp 的 EcoRI 位点. 然后将重组质粒电穿孔进 DH5α 大肠杆菌（电穿孔条件: 冲在 25μfarads ， 2500 V 下 1 个脉冲）.

转染细菌以氨苄青霉素(50 μg /毫升)选择，然后分成 400 份，每份 100 个克隆. 各份代表约 50 种不同的 cDNA ，因为分析显示所有质粒包含插人物并且克隆不是定向的，将各份扩增至饱和，按照 Maniatis 等(分子克隆: 实验室手册(Cold Spring Harbor， N.Y.)，1982 ）的方法经碱裂解，醋酸钾沉淀以及酚抽提分离质粒 DNA . 不使用铯梯度离心.

实施例 3

然后将扩增质粒转染进真核细胞。用补加有 10 %胎牛血清的 Dulbecco's 改进的 Eagles 培养基("DMEM ") 以 15,000 个细胞/孔将 COS - 7 细胞样品接种到组织培养平底微孔中。于 37 ℃培养细胞一夜，除去培养基，然后用 30 微升/孔包含 10 % Nu 血清，400 微克/毫升 DEAE -葡聚糖， 100 μM 氯奎， 100 纳克质粒 pcDNA -I/Amp -A2A ，和 100 纳克以上描述的 cDNA 文库的一份 DNA 的 DMEM 培养基替代。质粒 pcDNA -I/Amp -A24 包含 LB33 -MEL.B 的 HLA -A24 基因，其被鉴别为等位基因 HLA-A *2402 。 于 37 ℃培养四小时后，除去培养基，并且用 50 微升包含 10 % DMSO 的 PBS 替代 。两分钟后，除去这一培养基，并用 200 微升补加有 10 % FCS 的 DMEM 替代。

在如此变化培养基后，在 37 ℃下培养 COS 细胞 48 小时。 然后弃去培养基，添加在 100 微升含 10 %库集人血清的 Iscove's 培养基中的所述的 CTL 克隆 269/1 的 2000 个细胞， 24 小时后，除去上清液，按 Traversari 等免疫遗传学 35 ： 145-152(1992)（其公开的内容本文一并参考）所描述的方法在 WEHI 细胞测定中测定 TNF 含量。

在试验的 400 份中，一份是阳性。

实施例 4

将阳性的一份细菌亚克隆。从 600 个单个菌落抽提质粒 DNA ，用与以上描述相同的方法与 pcDNA -I/Amp -A24 一起共转染进 COS 细胞的新样品。就 CTL 269 /1 的刺激作用再一次测试细胞。发现一个阳性克隆，识别为 " 5E10 " 。

从阳性克隆抽提质粒，用本领域已知技术测序。

所鉴别的序列长度为 1554 个碱基对(参见 SEQ ID NO: 1)。这一序列包含编码 518 个氨基酸的一个开放读框。

发现在 1310-1413 位置上的 104 个核苷酸与 Genbank 登记的 113 个碱基对的序列 L25344(HOMRBCESTC " 人(克隆 17)" 红白血病(erythroleukemic)表达序列尾端(EST)mRNA 片段)的 104 个起始碱基对相同，然而，没有发现相应于 SEQ ID NO:1 序列之序列。

实施例 5

在以上描述的 5E10 分离后，将其在标准的 Northern 印迹法中用作为探针，所述印迹

法用 LB33-MEL 的总 RNA 和标准的技术.

结果显示出大约 2.5 千碱基的带，其当然比探针自身更长. 这说明克隆 5E10 是完全的.

结果，再一次用 cDNA5E10 作为探针筛选从 LB33-MEL 细胞的 RNA 制备的相同的 cDNA 文库. 鉴别出一个 2148 个碱基对的 cDNA 克隆，并且测序. 其被称为 Hi2 . 除了在254位碱基Hi2是胞嘧啶，而5E10是胸腺嘧啶而外，5E10 的序列完全包括在Hi2 的序列中.

实施例 6

在分离 Hi2 后，进行一组试验以证实 Hi2 是肿瘤排斥抗原前体编码序列. 具体地说，使用 HLA -A24 阳性白血病细胞系 LB804 -ALL，因为以上描述的预先的实验曾显示 269 /17 不溶解这一细胞系.

用表达载体 pEF -BOS -puro.PL3 转染白血病细胞系的细胞，所述载体携带赋予嘌呤霉素抗性的基因，并且 cDNAHi2 被克隆进其中. 选择并分离嘌呤霉素抗性群. 这些被证实对 CTL269/17 敏感，这表明抗原 LB33 -E 的表达不依赖于从 COS - 7 转染产生的高拷贝数.

图 3A 和 3B 显示这些结果，其中图 3A 显示转染之前白血病细胞系，而 CTL 269 /17 是效应器(responder).

SEQ ID NO:2 提供了 Hi2 的序列. 当将其与在数据库中的其它序列比较时，发现核苷酸 1486 - 1589 相同于髓细胞样(myeloid)白血病细胞系 K562 中表达的 113 碱基对序列(GenBank : L25344)的 104 个碱基. 核苷酸 1983 -2128 相同于早幼粒细胞白血病细胞系表达的 147 碱基对的 146 个碱基. 而 HL - 60 (DDBJ : D20455)，核苷酸 1736 - 2067 与在人睾丸细胞中发现的 332 碱基对 cDNA (Gen Bank : T19428)的 325 个碱基有 97 %的同源性.

对 Hi2 的序列分析显示出一个编码 509 个氨基酸的推定的蛋白质的开放读框，其没有信号序列. 没有发现与数据库中其它蛋白质序列有明显的同源性.

实施例 7

然后将 Hi2 用于分离编码相关蛋白质的基因组 DNA．收集人类基因组 DNA 文库的 12 组 70000 个粘粒的 DNA，按标准的方法用 5E10 与它们杂交. 所述克隆杂交到一个粘粒组上. 亚克隆后，鉴别了一个与 cDNA 克隆 5E10 杂交的粘粒. 序列通过用从 cDNA 序列推断的引物确证. 所述序列存在 6 个外显子，具有跨越 3 - 6 个外显子的开放读框.

实施例 8

SEQ ID NO: 1 中的信息足以使得可以经聚合酶链反应(PCR)分析基因表达.

采用下列引物:

5'-GCCTGCTGAAGGATGAGGCC-3' (SEQ ID NO: 3)

5'-GGTGCTGCAGGAGACTCTGC-3' (SEQ ID NO: 4)

这些分别相应于 SEQ ID NO:1 的 157 - 176 位 和 1328 - 1347 位核苷酸.

PCR 进行 28 个循环,(1 个循环: 94 ℃ 1 分钟 , 65 ℃ 的 2 分钟,在 72 ℃ 3 分钟). 在进行 PCR 时，将 2.5 ul cDNA 模板 (如以上描述制备的) 与 2.5 ul 10x Dynazyme 缓冲液， 0.25 ul 各 dNTP(10mM)， 0.5 ul 各种引物(20mM)， 0.5U Dynazyme (0.25 ul 贮存液， 2U/毫升)，以及 18.5 ul 水混合. 以下表 1 给出了结果，注意一些变化的肿瘤样品以及肿瘤细胞系上的表达，表明这不是细胞培养物的假象. 而且，除了睾丸例外以外，在正常的组织中绝对没有表达.

表　1

相应于 cDNA 克隆 5E10 的基因在肿瘤和正常组织中的表达

正常组织:	
肝脏	0/1
胃	0/1
结肠	0/1
肺脏	0/1
脾	0/1
心脏	0/1
乳腺	0/1
膀胱	0/1
前列腺	0/1
胸腺	0/1
骨髓	0/1
血液淋巴细胞	0/1
成纤维细胞	0/1
睾丸	2/2
肿瘤样品:	
黑素瘤	5/5
淋巴瘤	2/5
慢性髓细胞样白血病	1/2
慢性淋巴样白血病	1/5
急性髓细胞样白血病	0/6
肾癌	3/6
肉瘤	2/3
乳腺癌	2/5
肿瘤细胞系:	
黑素瘤	11/15
白血病	3/6
Burkitt 淋巴瘤	2/4

实施例 9

基于 TNF (肿瘤坏死因子)释放，进行第二种测定．在这一测定中，用携带 HLA -A24 cDNA 的质粒 pcDNAI /Amp （如上所述）转染或者用该质粒与包含 SEQ ID NO:1 的质粒 pcDNAI /Amp （如上所述）共转染 COS － 7 细胞（ 10000 个细胞/微孔）． 在转染之后

的二十四小时，向转染体添加 CTL 269/17 的 3000 个细胞。 在对照中，使用相同数量的 LB33-MEL.B -1 细胞。 细胞培养基中释放的 TNF 的浓度在 24 小时之后用 TNF 敏感细胞系 WEHI 164c13 测量。

结果在图 4 中给出。 它们说明 CTLs 的 TNF 释放仅仅在采用由表达 HLA -A24 和 SEQ ID NO:1 的载体共转染的 COS 细胞时被激发。 COS 细胞本身不存在 HLA -A24，它们也不表达本发明的序列。然而，当被共转染时，它们能够激发 TNF 释放，几乎达到自体细胞系 LB33-ME1.B1 的水平。

如图 3 所示，结果不仅显示 SEQ ID NO:1 的物质确实编码在加工后刺激 CILs 的肿瘤排斥抗原前体，也显示（如以上所说明的）人们可以经排除非转化细胞测定对肿瘤细胞特异性的 CTLs 的存在，以便形成的转染体表达 HLA -A24 和 DAGE 两者。

实施例 10

因为完全确信 TRAP 被加工成较小的肿瘤排斥抗原，所以进行实验以鉴别从所描述的序列产生的肿瘤排斥抗原。

用核酸内切酶 NsiI 部分消化 5E10 的 cDNA，将如此截短的 cDNA 克隆共转染进具有 HLA -A24 cDNA 克隆的 COS-7 细胞。然后通过添加 CTL 269/17 并测定 TNF 的产生测试转染体对 LB33 -E 的表达。

结果在图 5 中给出。 发现相应于 Hi2 cDNA 的 1047 -1260 位核苷酸之核苷酸编码相关抗原。在这个区中的四种序列是可能的，所述序列(i) 9 或 10 个氨基酸长，(ii) 在位置 2 有酪氨酸或苯丙氨酸，和(iii) 在 C-末端有苯丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，或色氨酸之一。 这是由 Kubo 等，免疫学杂志 152： 3913 (1994)； Meier ，等，免疫遗传学 40 ： 306-308 (1994) 描述的 HLA -A24 结合的基序。 合成这些序列，并与 MHC I 类阴性 B-细胞淋巴母细胞样细胞系 C1R(已用以上描述的 HLA -A24 cDNA 克隆转染)一起培养。发现一种肽 Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu (SEQ ID NO: 5)，使转化的 C1R -A24 细胞对抗 LB33 -E CTLs 的溶解敏感，在 500 nM 具有半数最大作用。

进行比较试验，其中使用包含一个附加 N-或 C-末端氨基酸并且其中的 C-末端亮氨酸被缺失的肽。 SEQ ID NO:7 使细胞对溶解敏感，尽管其程度不如 SEQ ID NO:5 。如图 6 所示， SEQ ID NO: 8 和 9 在敏化细胞中具有非常低的敏感性。使用的肽在 N-末端用丙

氨酸扩展 SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO: 7)，并且缺失 C-末端亮氨酸(SEQ ID NO:8)．精氨酸添加至 C 末端导致产生 SEQ ID NO:9．在这些实验中，将 ^{51}Cr 标记的 C1R-A24 细胞在所示肽浓度（ CTLs 以 E/T10： 1 比率添加）存在下培养 30 分钟， 4 小时之后测定铬释放．

实施例 11

然后，用公知的逆转录酶聚合酶链反应("RT -PCR")进行试验，以测定本发明基因的表达．表 2 示出了结果．

较高比例的阳性肿瘤是黑素瘤(91 %)， 肺鳞片癌(78 %)，腺癌(46 %)，以及肾癌(43 %)， 肉瘤(40 %)， 和急性白血病(33 %)．

在正常的组织中也有某些表达．在睾丸，卵巢，和子宫内膜中的表达均为在的在细胞系 LB33 -MEL 中的表达的约 10 %，在皮肤，脑，心脏，肾，和肾上腺组织中发现较低水平的表达． 参见表 2 和图 6．

表 2　DAGE 基因被肿瘤组织的表达

肿瘤样品				
脑肿瘤			1/7	
结肠直肠癌			2/51	4%
胃癌			1/2	
痣			9/18	
黑素瘤	初期损伤		43/49	88%
	转移		144/152	95%
	视觉的		5/9	
成神经细胞瘤			2/3	
头和颈鳞片癌			17/44	39%
肺癌	SCLC		1/4	
	NSCLC	腺癌	12/26	46%
		鳞片癌	51/65	78%
前列腺的癌			2/20	
肾癌			24/56	43%
膀胱癌	外表		4/36	11%
	渗人		9/42	21%
肉瘤			10/25	40%
乳房癌			45/169	27%
甲状腺癌			3/5	
急性白血病			21/63	33%
肿瘤细胞系				
黑素瘤			72/74	97%
肉瘤			4/5	
肺癌	SCLC		19/27	70%
	NSCLC		2/2	
间皮瘤			2/18	
头和颈肿瘤			2/17	
膀胱瘤			2/3	
结肠直肠癌			1/15	
肾癌			9/12	
EBV 转化的 淋巴母细胞样 B 细胞系			0/8	

以上实施例显示了编码肿瘤排斥抗原前体的核酸分子的分离。 然而，这一“TRAP”编码分子不与以上指出的参考资料所描述的任何以前公开的 MAGE ， BAGE 或 GAGE 编码序列同源。因此，本发明的一个方面是具有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列的分离的核酸分子以及表达 TRAs 的 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO:2 的那些部分，如编码由 MHC 分子（如 HLA -A24 ）呈递的并从 DAGE 衍生的 SEQ ID NO:5 ， 7 和 9 的那些部分。这一序列不是 MAGE ， BAGE 或 GAGE 编码序列，这一点可以通过将其与所引用的参考文献中描述的这些基因比较看出。本发明的另一部分是也编码非 MAGE，非 BAGE 或非 MAGE 肿瘤排斥抗原前体但在严格条件下 与具有 SEQ ID NO: 1 和/或 2 的核苷酸序列的核酸杂交的那些核酸序列。本文使用的“严格条件”指本领域熟悉的参数。更具体地说，本文使用的严格条件指在 1M NaCl ， 1 % SDS 和 10 % 葡聚糖硫酸盐中杂交。 其后于室温下在 2xSSC 中洗涤滤膜两次（每次 5 分钟），在 2xSSC ， 0.1%SDS 中洗涤一次（ 30 分钟）。其它条件，试剂，等可以使用，它们导致相同或更高的严格程度。本领域技术人员将熟悉这些条件，因此本文不作描述。

这一基因表达的广泛分布(发现 8 种类型肿瘤中的 7 种表达它)说明所说的分离的核酸分子可以用作诊断探针用以确定转化细胞的存在。 黑素瘤的鉴别是 100 %，所以在非常基础的水平，所说的分离的核酸分子可以用于确定黑素瘤是否存在。本领域技术人员可以用许多方法证实肿瘤样品是黑素瘤样品，此时不需要重复。而且，肿瘤鉴别中的成功率与测定细胞转化的基于核酸的诊断方法一致。

也可以从实施例看出本发明包括在表达载体中的序列的用途，所述载体可以用来转化或转染宿主细胞和细胞系，它们是原核细胞(例如，大肠杆菌)或真核细胞(例如 CHO 或 COS 细胞)。所述表达载体需要相关序列（例如以上描述的那些）可操作连接到启动子上。因为现已发现人类白细胞抗原 HLA -A24 呈递源于这些基因的肿瘤排斥抗原，所以表达载体也可以包括编码 HLA -A24 的核酸序列。 在载体包含两种编码序列的情况下，其可以用来转化或转染通常不表达其中任何一个的细胞。 当例如宿主细胞已经表达 HLA -A24 时，可以单独使用肿瘤排斥抗原前体编码序列。当然，对可以使用的宿主细胞没有限制。因为如果需要，包含两种编码序列的载体可以用于 HLA -A24 呈递细胞，所以肿瘤排斥抗原前体的基因可以用于不表达 HLA -A24 的宿主细胞。

本发明也包括所称的表达试剂盒，其使得技术人员可以制备的所需的的表达载体。这样的表达试剂盒包含至少各自独立的每种前面所讨论的编码序列部分。 如果需要，可以

添加其它组分，只要包含以上提及的所需的序列。

为了将本发明的核酸分子和 TRAP 与以前描述的 MAGE， BAGE 和 GAGE 材料相区别，本发明也称作 DAGE 基因族和 TRAP。 因此，只要本文中使用"DAGE "，它就指由前述序列编码的肿瘤排斥抗原前体。 "DAGE 编码分子"和类似的术语，用来描述核酸分子本身。

如本文所描述的，本发明具有许多用途，其中一些在此描述。首先，本发明使得技术人员可以诊断以表达 TRAP 为特征的紊乱。这些方法包括测定 TRAP 基因的表达，和/或从其衍生的 TRAs ，如由 HLA -A24 呈递的 TRA 。 在前一种情形下，这样的测定可以经任何标准的核酸测定方法进行，包括聚合酶链反应，或用标记的杂交探针测定。 在后一种情形下，用 TRA 和 HLA 的复合物的结合配体（如抗体）的测定是尤其优选的。一种替换性的测定方法是以上所述类型的 TNF 或 ^{51}Cr 释放测定。

TRAP 基因的分离也使得分离 TRAP 分子（尤其是包含由 SEQ ID NO:2 编码的氨基酸序列的 TRAP 分子）本身成为可能。当以 TRA 或 TRA 与 HLA 的复合物（如 HLA -A24 ）存在时，这些分离分子可以与佐剂之类的物质组合产生在治疗以表达 TRAP 分子为特征的紊乱中有用的疫苗。 此外，可以从在其表面呈递 TRA /HLA 复合物的细胞(如非增殖性癌细胞，非增殖性转染体，等等) 制备疫苗。在细胞用作疫苗的所有情况下，这些细胞可以是用提供 CTL 反应所需的一种或两种组分之编码序列转染的细胞，或者是不经转染表达两种分子的细胞。此外， TRAP 分子，其相关的 TRAs ，以及 TRA 和 HLA 的复合物可以用来经本领域已知的标准技术产生抗体。

当"紊乱"用于本文时，它指其中表达肿瘤排斥抗原前体的任何病理状态，这样一种紊乱的例子是癌，特别是黑素瘤。黑素瘤是公知的色素产生细胞癌。

基于所公开的内容的治疗方法以受治疗者免疫系统反应导致 TRA 呈递细胞（如 HLA -A24 细胞）溶解为前提。体外开发这样一种 CTLs 在本领域技术人员的知识范围内。具体地说，将细胞（如血液细胞）样品与呈递复合物和能够激发特异性 CTL 增殖的细胞接触。靶细胞可以是转染体，如以上描述的类型的 COS 细胞。这些转染体在其表面上存在所需的复合物，并且在与感兴趣的 CTL 结合时，刺激它的增殖。 COS 细胞（如本文所使用的那些）和其它适合宿主细胞一样是广泛可获得的。

所述治疗方法具体说来，指过继转移(Greenberg ，免疫学杂志 136 (5): 1917

(1986); Riddel 等，科学 257 : 238 (7-10-92); Lynch 等，欧洲免疫学杂志 21 : 1403-1410 (1991); Kast 等，细胞 59 : 603-614 (11-17-89))，存在所需复合物的细胞与 CTLs 结合导致 CTLs 特异性增殖．然后将增殖的 CTLs 施用于具有以某些异常细胞呈递特定复合物为特征的细胞异常的受治疗者，其中所述的复合物包含相关 HLA 分子．然后 CTLs 溶解异常细胞，进而达到所需的治疗目的．

以上疗法假定至少某些受治疗者的异常细胞呈递相关的 HLA /TRA 复合物．这可以十分容易地测定，因为本领域十分熟悉用于鉴别呈递特定的 HLA 分子之细胞的方法，以及如何鉴别表达相关序列（在这种情况下是 DAGE 序列）的 DNA 的细胞的方法．一旦经上述筛选方法鉴别出呈递相关复合物的细胞，它们就可以与患者的包含 CTLs 的样品结合． 如果呈递复合物的细胞被混合 CTL 样品溶解，则可以假定呈递 GAGE 衍生的肿瘤排斥抗原，所述的患者就是以上提出的治疗方法的合适的候选者．

按照本发明过继转移不是仅有的治疗形式．也可以用一些方法体内刺激 CTLs． 以上已阐述了一种方法，即采用表达复合物的非增殖细胞．用于这一方法中的细胞可以是通常表达复合物的那些，如照射过的黑素瘤细胞或用呈递复合物所需的一个或两个基因转染的细胞． Chen 等， Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 88 : 110-114 (1991 年 1 月)以例子说明了这种方法，显示了在治疗方案中采用表达 HPV E7 肽的转染细胞． 可以使用各种细胞类型．同样地，可以使用携带一个或两个兴趣基因的载体，病毒或细菌载体是尤其优选的．在这些系统中，感兴趣基因由例如，痘苗病毒和细菌 BCG 携带，所说的材料“感染”宿主细胞．所产生的细胞存在存在感兴趣的复合物，并被自体 CTLs 识别， CTL 然后增殖．一种类似的影响可以通过将肿瘤排斥抗原或其前体与佐剂相结合以有利于掺合进存在 HLA -A24 的细胞，其然后呈递感兴趣的 HLA/肽复合物． TRAP 被加工产生 HLA 分子的肽配体，而 TRA 无须进一步加工而被呈递．

本发明的另一个特征是从 DAGE TRAP 衍生的分离的肽类，其遵从 MHC 分子呈递规则．例如，在 PCT 申请 PCT /US93/07421(本文一并参考)中，若干基序被描述为与不同的 MHC 分子相关． 这些基序（本文一并参考）以及下列文献教导的那些被作为鉴别从 DAGE 基因可获得的或可衍生的合适的肽的基础，上述文献例如 Falk 等，自然 351 : 290-296 (1991); Engelhard ，免疫学年评 12 : 181-207 (1994); Ruppert 等，细胞 74 : 929-937 (1993); Rbtzschke 等，自然 348 : 252-254 (1990); Bjorkm 等，自然 329 : 512-518 (1987)和 Traversari 等， J. Exp. Med. 176 : 1453-1457 (1992)，所有这些本文一并参考．在现在所描述的本发明的另一方面，这些肽可以单独或混合使用．这

些的例证性例子如下. 就 HLA -A2 而言, 结合的基序是 Xaa Leu Xaa Gly (Xaa)$_n$ Leu (SEQ ID NO: 10), 其中 n 是 4 或 5 . SEQ ID NO:1 的 120 -128 位氨基酸相应于这一基序. HLA -A2 的第二种基序以缬氨酸代替末端亮氨酸(SEQ ID NO: 3), 氨基酸 375 -384 符合这一基序. 就 HLA -A3 而言, 基序是 Xaa Leu (Xaa)$_6$ (Lys 或 Tyr)(SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12). SEQ ID NO: 1 的氨基酸 48- 56 , 100 - 108, 138 - 146, 214- 222 , 257- 265 完全满足这一基序. 对于 HLA -A11 , 基序(Xaa)$_7$ Lys Lys (SEQ ID NO: 13) 是已知的, 氨基酸 169 -178 , 214 - 223 和 223 -232 将符合它. 对于 HLA -A24 , 已知基序是 Xaa Tyr (Xaa)$_6$, Leu , (SEQ ID NO: 13), 氨基酸 274 -282 , 467- 475 , 以及 SEQ IDNO: 5 符合它. 对于 HLA -B7 , 基序是 Xaa Pro Arg (Xaa)$_5$ Leu (SEQ IDNO:14) , 氨基酸 68-76 符合它. 对于 HLA-B8 , 基序是 (Xaa)$_2$ Lys Xaa Lys (Xaa)$_3$ Leu (SEQ ID NO: 15), 氨基酸 176 - 184 以及 218 -226 满足它 . 对于 HLA -B44 , 基序是 Xaa Glu (Xaa)$_3$ Asp (Xaa)$_2$ Phe (SEQ ID NO: 16), 氨基酸 204 -212 符合它. 对于 HLA -Cw* 1601 , 氨基酸 60 -68 和 395-403 符合它.

存在许多相应于 HLA 基序的序列事实建议了本文的被称作"混合物"治疗和诊断用途. 可以预期在一典型的对肿瘤细胞的 CTL 应答中, 对一种以上的肽和 HLA 分子复合物特异性的 CTLs 将增殖. 例如, 它可以是这样一种情况, 对呈递 HLA -A24 的细胞, 对 HLA -A24 和氨基酸序列 467 -475 特异性的 CTLs 将增殖. 这样, 在试图鉴别 CTLs 时, 人们可以用两种肽优化测定. 同样地, 可以通过利用 HLA - A24 结合肽优化治疗方法.

众所周知个体的 HLA 分子不是 "单价" 的, 因为细胞存在一种以上的 HLA . 因此, 在诊断测定中人们可以通过组合以上描述的多种肽来最大化诊断和/或治疗以确定 CTLs 或用以上的治疗法治疗病人.

任何假阳性的担心都被认为是不必要的, 因为如上所述, 本发明的核酸分子仅在肿瘤细胞中表达, 因此 CTLs 对 HLA 和肽的存在必定是在过去的一些时间存在癌或转化病症的事实上的证据. 这样, 可以制备本发明的肽的混合物. 混合物的组分测定并不困难, 因为所有需要的仅是考察个体的一种或多种 HLA 类型. HLA 分型是十分标准的技术, 本领域公知; 完全在本领域技术人员的知识范围内.

已完全确定患有肿瘤的个体的血液通常包含针对 MHC 分子和呈递的肽的复合物的胞溶性 T 细胞(" CTLs "). 参见, 例如, Robbins 等, 癌研究 54 : 3124-3126 (1994);

Topoli 等，免疫学杂志 142 : 3714-3725 (1989); Coulie 等，国际癌症杂志 50 : 289-297 (1992)，所有这些本文一并参考. 也，参见 Kawakami 等，实验医学 180 : 347-352 (1994); Hom 等，免疫治疗杂志 10 : 153-164 (1991), Darrow 等，免疫学杂志 142 (9): 3329-3335 (1989); Slovin 等，免疫学杂志 131 (9): 3042-3048 (1986)，所有这些本文一并参考. 所有这些论文给出了 CTL 增殖测定在诊断癌上的有效性. 一般而言，人们可以从受试者取得包含外周血液淋巴细胞(PBL)的样品. 假定患者确实具有肿瘤，或受治疗者的细胞开始经历转化，则样品中就包含对转化细胞特异性的 CTLs . 经与存在相关 MHC 分子和所呈递的肽的复合物的靶细胞接触，这些 CTLs 可被刺激增殖. 例如，如以上所示的，DAGE 衍生的肿瘤排斥抗原("TRAs)由 HLA -A24 细胞呈递. 这样，通过把 PBL 样品与呈递 HLA -A24 的细胞靶和肽类(其源于 TRAP 并由 HLA -A24 呈递) 相混合，人们可以观察 CTL 增殖，并且由此诊断转化细胞的存在. 这些细胞可以是所谈论的通常存在 MHC 分子的细胞，但是也可以是由 HLA 编码序列转化的细胞. 所说的细胞可以是肿瘤细胞，或正常细胞. 测定 CTL 增殖的各种方法是已知的，包括 TNF 释放测定，和 ^{51}Cr 释放测定. 其它方法也可使用. 这样，本发明的一个方面包括把带有源于 DAGE TRA 并由靶细胞样品的 MHC 分子呈递的肽或肽混合物的靶细胞样品和受治疗者的 PBLs 相混合. 然后就 CTL 增殖试验混合物.

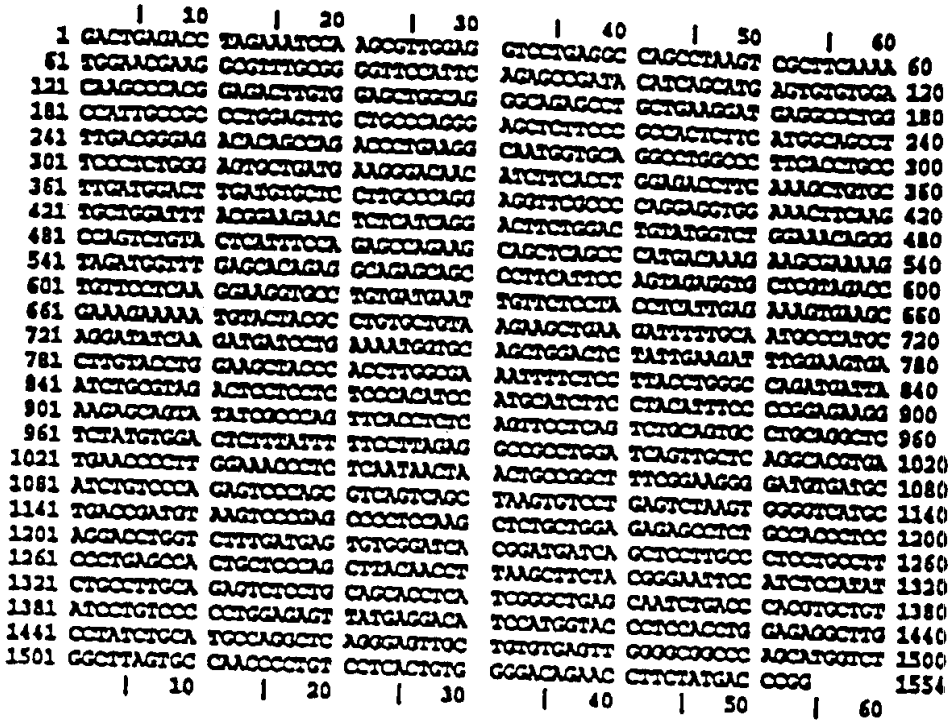
所示的肽或肽混合物也可以与刺激更显著的 CTL 应答的一种或多种佐剂组合，这样的佐剂的例子是皂苷和它们的衍生物，如 Kensil 等的美国专利 5,057,540 (本文一并参考) 或者 Scatt 等的 PCT 申请 PCT/ US92/ 03579 (本文也一并参考) 公开的那些. 当然，也可以使用标准佐剂，如弗氏完全佐剂，或弗氏不完全佐剂.

本发明的其它方面将对本领域技术人员是显而易见的，不必在此重复.

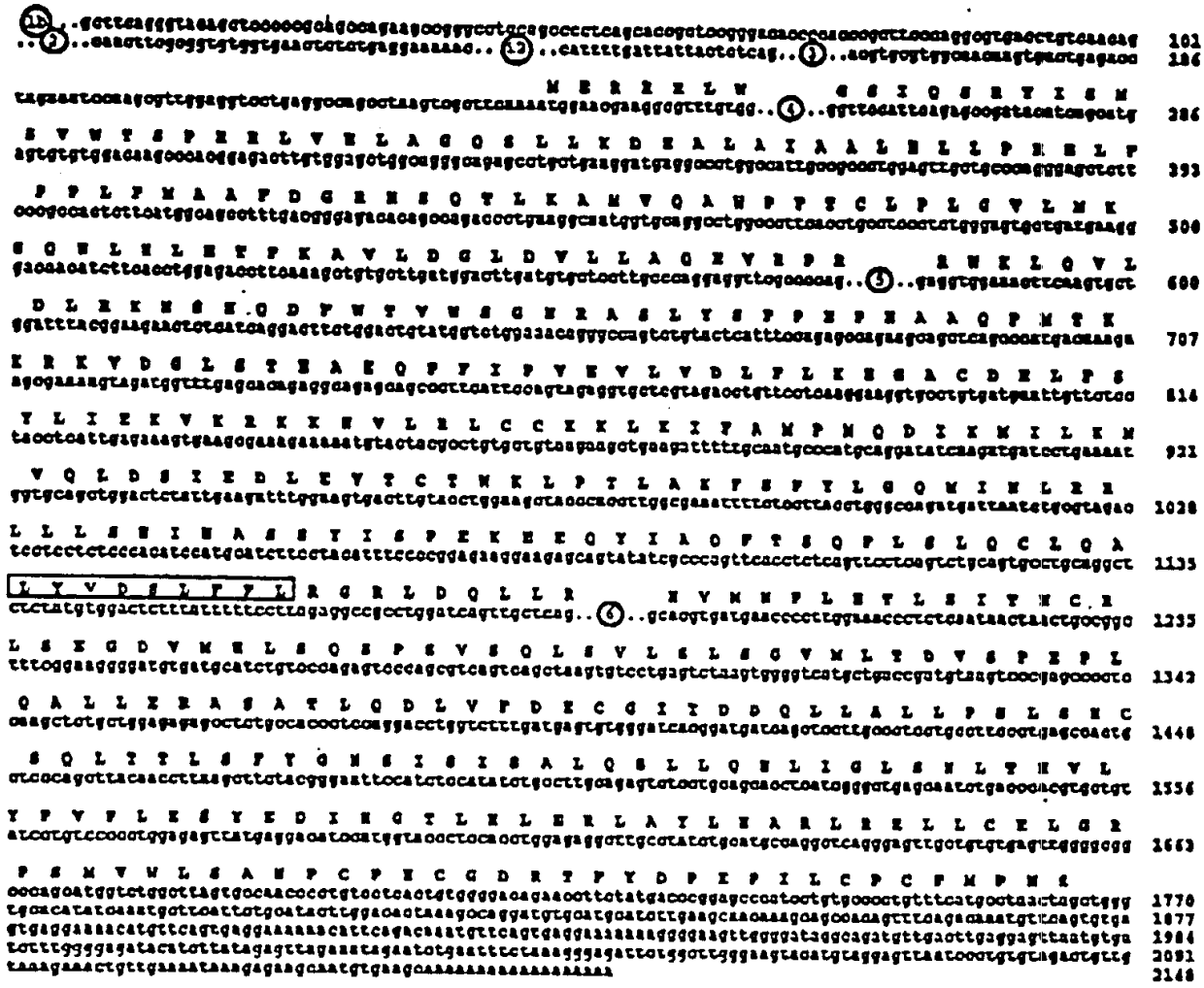
已使用的术语和表达是用来描述但不作为限制的术语，也无意于排除所示的和所描述的特征和其部分的任何等价物. 应认识到在本发明的范围内进行各种修改是可能的.

DNA序列

15 b.p. GACTGAGACCTA ... TCTATGACCCCG 1154



SEQ ID NO.1



SEQ ID NO.2

说 明 书 附 图

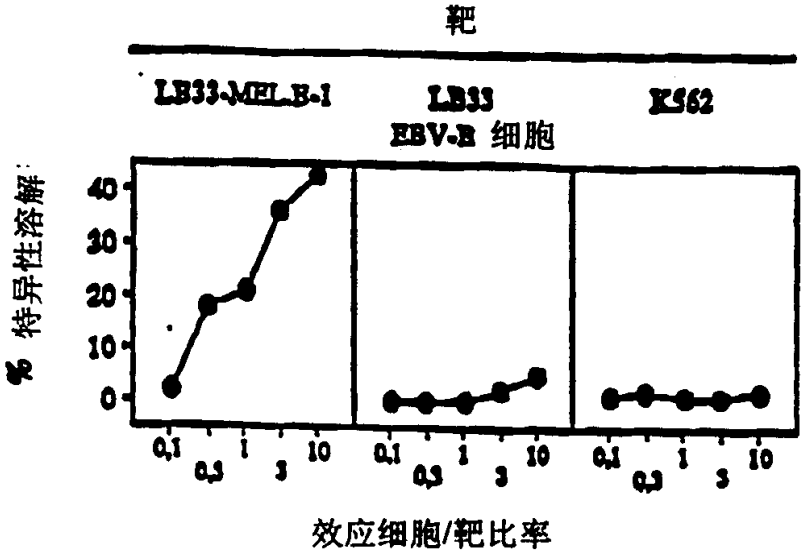


图1A 图1B 图1C

图1

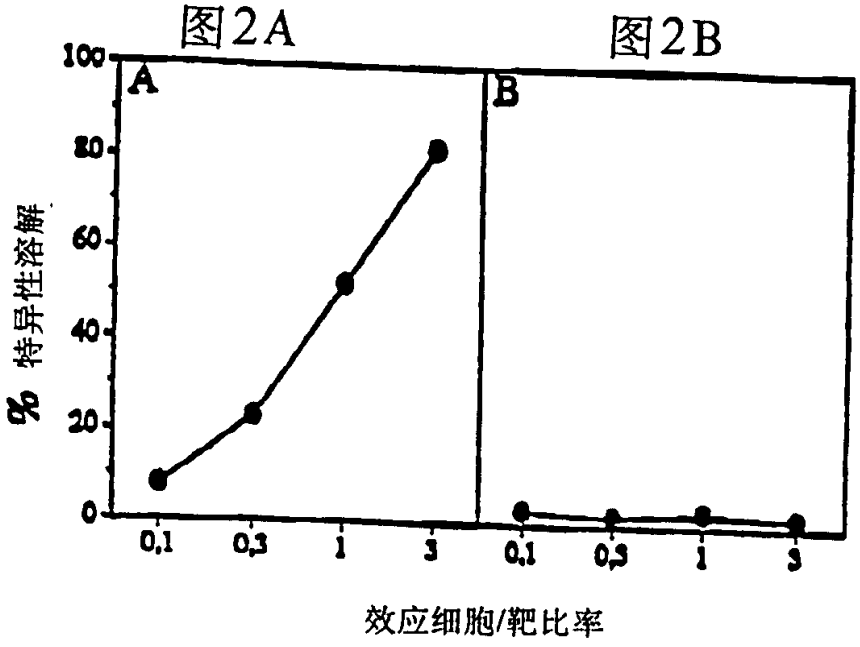


图 2

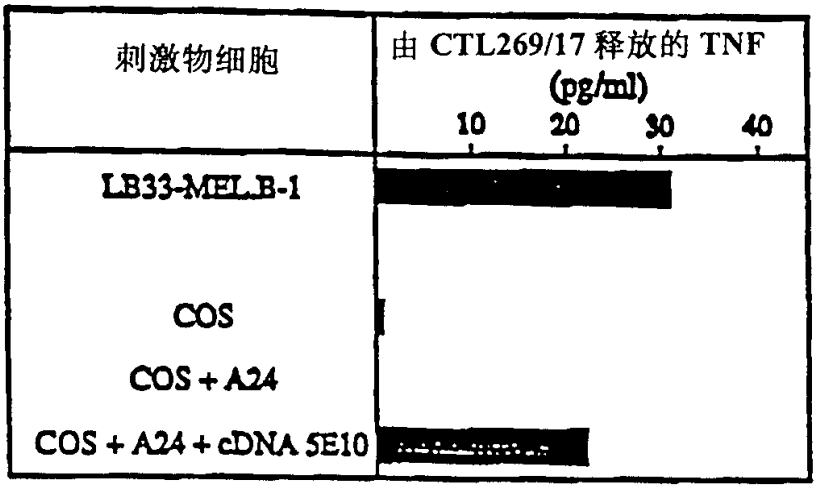

刺激物细胞
由 CTL269/17 释放的 TNF
(pg/ml)
10
20
30
40
LB33-MEL.B-1
COS
COS + A24
COS + A24 + cDNA 5E10

图 3

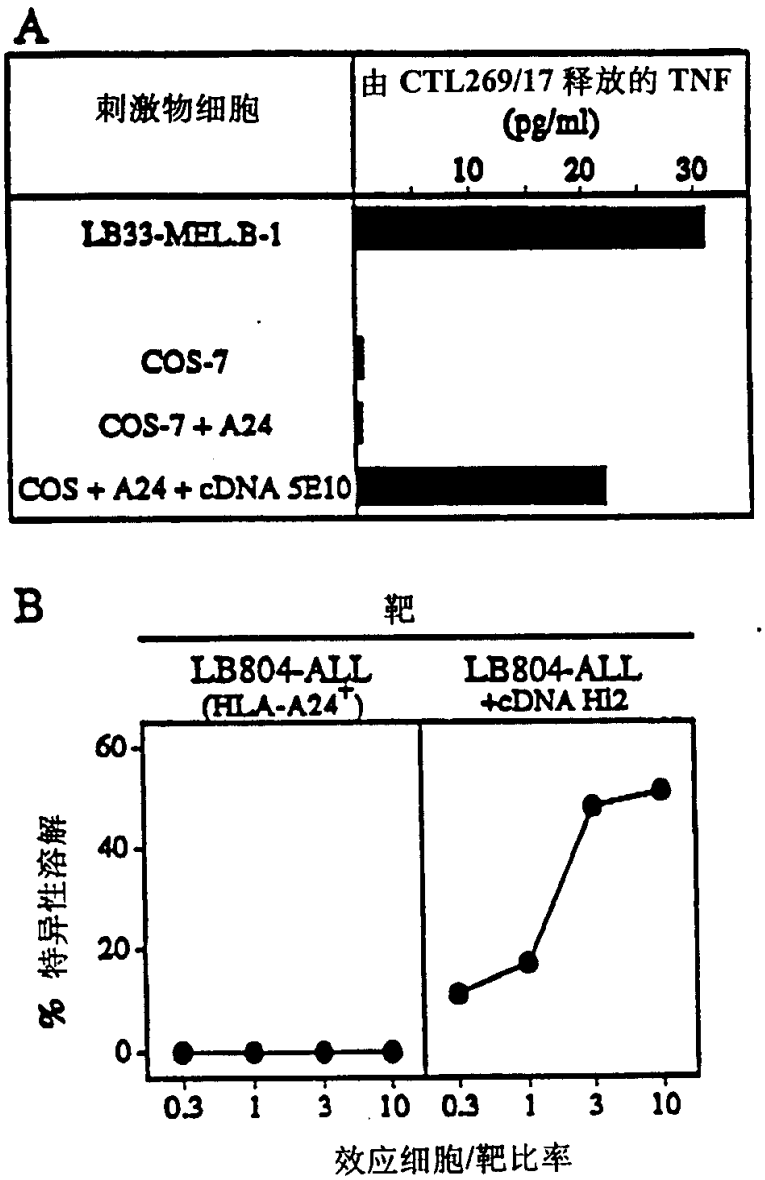

A
刺激物细胞
由 CTL269/17 释放的 TNF
(pg/ml)
10
20
30
LB33-MEL.B-1
COS-7
COS-7 + A24
COS + A24 + cDNA 5E10
B
靶
LB804-ALL
(HLA-A24+)
LB804-ALL
+cDNA H12
% 特异性溶解
60
40
20
0
0.3
1
3
10
0.3
1
3
10
效应细胞/靶比率

图 4

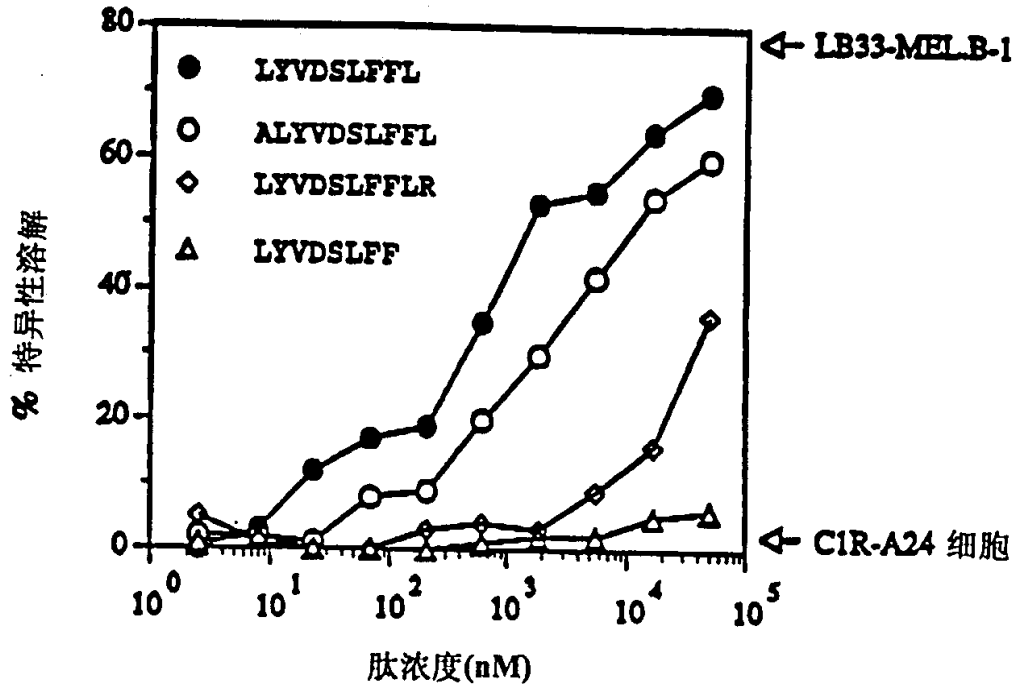

80
60
40
20
0
% 特异性溶解
LYVDSLFFL
ALYVDSLFFL
LYVDSLFFLR
LYVDSLFF
LB33-MEL.B-1
C1R-A24 细胞
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
肽浓度(nM)

图 5

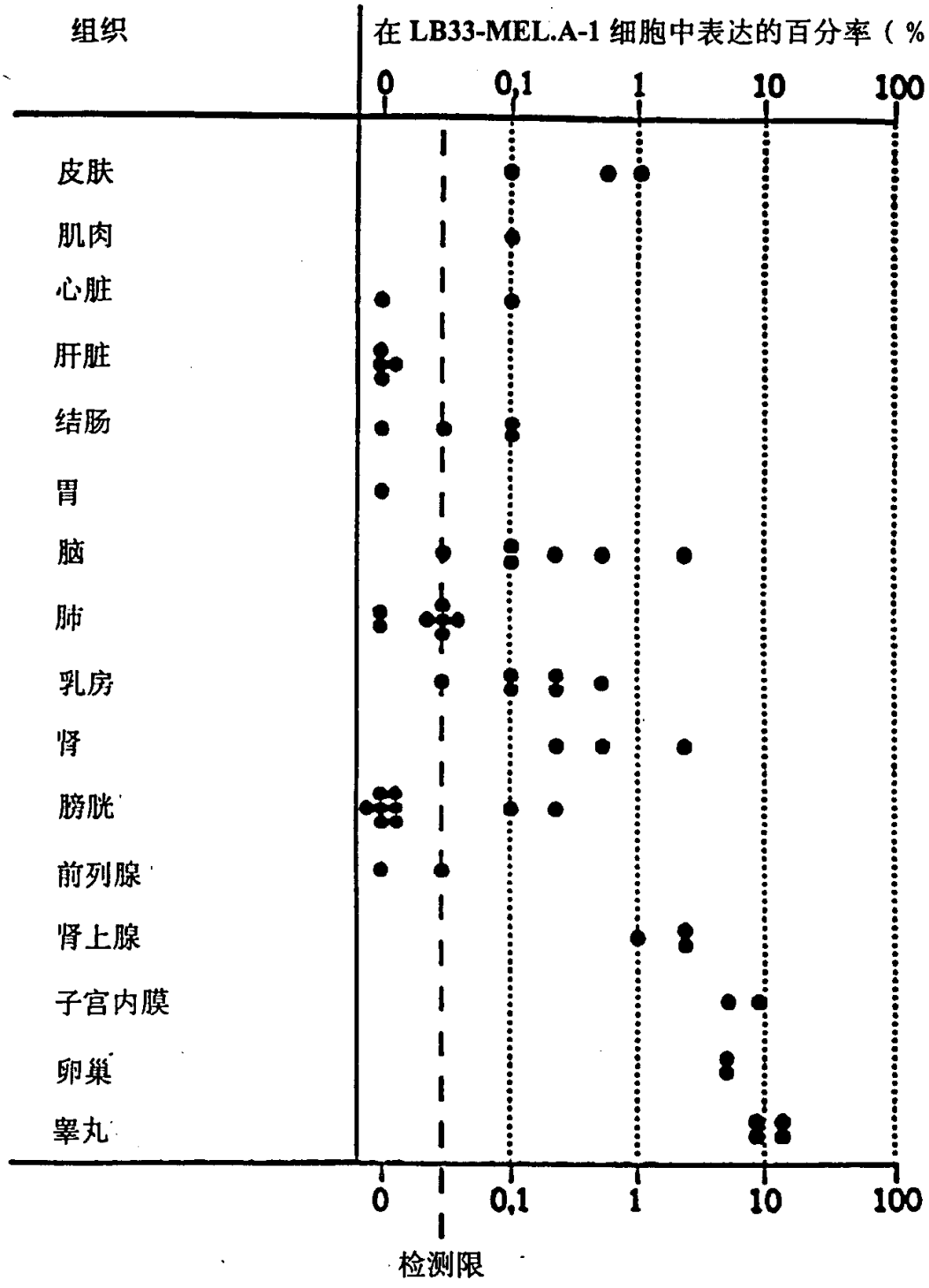

组织
在 LB33-MEL.A-1 细胞中表达的百分率（%）
0
0,1
1
10
100
皮肤
肌肉
心脏
肝脏
结肠
胃
脑
肺
乳房
肾
膀胱
前列腺
肾上腺
子宫内膜
卵巢
睾丸
0
0,1
1
10
100
检测限

图 6