



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 87 1 00603 A

CN 87 1 00603 A

[43] 公开日 1988年8月10日

[21] 申请号 87 1 00603

[22] 申请日 87.2.10

[71] 申请人 昂科公司

地址 美国华盛顿 98121

[72] 发明人 约瑟夫·P·布朗 乔治·D·普洛曼
安东尼·F·普尔奇奥 斯里德哈·班
纳瑟尔 查理斯·D·埃斯丁 迪莫希
·M·罗斯 英吉格德·赫尔斯特罗姆
施苏·洛克·胡 卡尔·E·赫尔斯特
罗姆

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 顾柏棣 辛敏忠

[54] 发明名称 抗黑素瘤疫苗

[57] 摘要

叙述了与黑素瘤相关抗原有关的肽或蛋白质。
可通过重组 DNA 技术和 / 或化学方法大量生产。
该肽和蛋白质可在疫苗体系中用作免疫原, 在接种疫苗
的个体内可诱导选择性杀死黑素瘤细胞的免疫应
答。当用一重组病毒表达该肽或蛋白质时, 可制备失
活的或活的病毒疫苗体系。

881A04492 / 02-774

权 利 要 求 书

1、与黑素瘤相关 P 9 7 抗原有关的基本纯的抗原肽或蛋白质。

2、权项 1 所述的肽或蛋白质，其氨基酸序列包含了大体示于图 3 的氨基酸序列或任何抗原部分。

3、权项 1 或 2 中的肽或蛋白质是从一培养细胞中纯化，该细胞含有一段编码该肽或蛋白质的核苷酸序列，这个序列受第二个核苷酸序列的控制，后者调节基因表达，从而使培养细胞表达该肽或蛋白质。

4、权项 3 所要求的肽或蛋白质，其中培养细胞包括一微生物。

5、权项 4 的肽或蛋白质，其中微生物包括一细菌。

6、权项 4 的肽或蛋白质，其中微生物包括一酵母。

7、权项 3 的肽或蛋白质，其中培养细胞包括一动物细胞系。

8、权项 3 的肽或蛋白质，其中培养细胞包括一昆虫细胞系。

9、权项 1 或 2 的肽或蛋白质，其中该肽或蛋白质由化学方法合成。

10、一重组病毒，它的基因组含有一段编码与黑素瘤相关 P 9 7 抗原有关的抗原肽或蛋白质或一个抗原部分的核苷酸序列，这个序列处于第二个核苷酸序列的控制之下，后者调节基因表达，使与黑素瘤相关 P 9 7 抗原有关的肽或蛋白质在用病毒感染了的宿主内得到表达。

11、根据权项 10 所述的重组病毒，包含了大体如图 3 所示的核苷酸顺序或编码抗原肽或蛋白质的任何一部分核苷酸顺序。该重组病毒的核苷酸顺序编码了一个与黑素瘤相关 P 9 7 抗原有关的抗原肽或蛋白质。

12、据权项 10 或 11 的病毒包括一包被病毒。

13、据权项 12 的病毒包括一疫苗病毒。

14、据权项 10 或 11 的病毒包括一裸病毒。

15、据权项14的病毒包括一腺病毒。

16、据权项10或11的病毒包括一核多角病毒。

17、据权项16的病毒包括一棒病毒。

18、据权项10或11的病毒包括一噬菌体。

19、据权项18的病毒包括一lambda噬菌体。

20、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项1或2所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

21、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项3所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

22、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项4所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

23、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项5所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

24、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项6所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

25、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项7所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

26、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项8所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

27、一亚单位疫苗体系，其中免疫原包括一有效剂量的权项9所述与一药物载体混合的肽或蛋白质。

28、一活病毒疫苗体系，包括权项10或11所述重组病毒，其中病毒是感染性的，在接种疫苗的宿主内不致病。

29、权项28的活病毒疫苗体系，其中重组病毒包括一包被病毒。

30、权项29的活病毒疫苗体系，其中包被病毒包括一疫苗病毒。

31、权项28的活病毒疫苗体系，其中重组病毒包括一株病毒。

- 3 2、权项 3 1 的活病毒疫苗体系，其中裸病毒包括一腺病毒。
- 3 3、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 0 或 1 1 的重组病毒，处于与一药物载体混合非感染状态。
- 3 4、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 2 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 3 5、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 3 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 3 6、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 4 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 3 7、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 5 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 3 8、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 6 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 3 9、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 7 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 4 0、一失活病毒疫苗体系，包括有效剂量的权项 1 8 所述重组病毒处于与一药物载体混合的非感染状态。
- 4 1、含有 P 9 7 b 的一重组 D N A 载体。
- 4 2、含有权项 4 1 的重组 D N A 载体的单细胞生物。
- 4 3、含有权项 4 1 的重组 D N A 载体的细菌。
- 4 4、权项 4 3 的细菌，包括用 A T C C 存储的大肠杆菌，其登记号为 5 3 4 0 3，或一突变体，重组体或遗传工程衍生物。
- 4 5、包括 P M T P 9 7 b 的重组 D N A 载体。
- 4 6、含有权项 4 5 的重组 D N A 载体的细胞系。
- 4 7、权项 4 5 的细胞系，包括用 A T C C 存储的 TKMP97-12，登记号 C R L 8 9 8 5，或一突变体，重组体或遗传工程衍生物。

48. 一种重组DNA载体，包括 p S Vp97a。

49. 一种细胞系，包括有权项48所述的重组DNA载体。

50. 根据权项49所述的细胞系，包括以 C R L9304号保藏于 A T C C 的 B16 S Vp97a .14 以及其突变体，重组的或遗传工程的衍生物。

51. 根据权项13所述的病毒，包括以 V R2159号保藏于 A T C C 的病毒 Vp97a- N Y 以及其突变体，重组的或遗传工程的衍生物。

抗 黑 素 瘤 疫 苗

本发明是一个在接种者体内诱导免疫应答选择性杀伤黑素瘤细胞的疫苗体系。相应地，通过重组DNA技术和/或化合成方法大量生产与黑素瘤相关抗原有关的肽或蛋白质。本发明的肽或蛋白质可被用作疫苗配制中的免疫原。在特定实例中这种与黑素瘤相关抗原有关的肽或蛋白质由一重组病毒表达，该重组病毒本身也可用作疫苗配制中的免疫原。本发明还提供了应用重组DNA技术以及化学合成方法大量生产与黑素瘤相关抗原有关的肽或蛋白质的工艺。

本发明用采用P97肽作为免疫原的例子说明，P97是一单节显性细胞表面唾液糖蛋白，分子量略低于97,000道尔顿，是黑素瘤细胞表面成份。

2

2·1 癌相关抗原

用实验动物（特别是啮齿类）研究表明，由致癌病毒引起的大部分癌症表达由该病毒基因组编码的抗原，带有这些抗原的免疫可导致抵制对于由同一病毒诱导的癌细胞随后发生的用接触性传染物所进行的免疫性试验。尽管大部分工作是用实验室病毒品系来做的，如SV40，多形瘤病毒，Friend病毒，Moloney病毒，或Rauscher鼠白血病毒，天然致癌病毒的横向和纵向传染也已被证明。实际上抗病毒诱导的猫白血病和肉瘤的商品化疫苗现在已可获得。

与此相反，许多人类癌症的病毒病原学尚未研究。值得注意的是肝炎病毒（肝癌），疱疹单性病毒（颈癌），以及Epstein Barr

病毒(鼻咽癌)除外。然而,在过去二十年中已证实,一些人类癌细胞表达癌抗原(即那些区分癌细胞和正常细胞配对物的抗原);一些病人具有对抗这些抗原的细胞介导的或体液的免疫应答(Hellstrom et al, 1968, Nature, 220: 1352; Morton et al, 1968, Science 162: 1279-1281; Shiku et al, 1976, J. Exp Med: 144: 873-881)。这些免疫应答的靶有一些是人类基因组编码的癌胎抗原或分化抗原。(Hellstrom et al, 1970, Int, J Cancer 6: 346-351)。

直到最近该癌抗原的分子特性仍未知,对癌的免疫反应的特异性程度也不清楚。试图将这些信息应用于癌的诊断或治疗方面的尝试大都失败了。由于自发癌退化极罕见,人们可以得出这样的结论:在体外证明了的免疫应答在体内是无效的;例如,从癌症患者身上得到的抗体和淋巴细胞可能在体外能有效地杀死癌细胞,可是在体内同一癌症患者的免疫应答是无效的。

Kohler和Milstein引入单克隆抗体技术(1975, Nature 256: 495-497)导致了对于人类癌症抗原的深入研究,因为它提供了在分子水平及特异性方面确定某抗原的工具。(Hellstrom and Brown, 1979, In "The Antigens", M Sela, ed, Academic Press, Vol, V: 1-66),在过去的几年内已描述了大量癌相关抗原,其中大部分由小鼠单克隆抗体所确定。(Reisfeld and Sell, eds, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol, 27, Alan R. Liss, Inc, New York, 1985, PP. 1-609)

尽管实际上这些已确定性质的抗原证明是癌胎抗原或分化抗原，它们对于癌的特异性已发现是定量的而不是定性的，但有一种抗原对肿瘤细胞与正常细胞极为特异（对肿瘤细胞的特异性一般是对正常细胞特异性的10~1000倍），它们被用作鉴定癌细胞及治疗的潜在的靶。已得到了癌症抗原的人类单克隆抗体（Cote et al, 1983, Proc, Natl Acad Sci 80: 2026—2030）。这就支持了前面提到的事实：一些癌症患者对他们的癌症具有免疫反应，现已鉴定的癌相关细胞表面抗原中一大部分是由人类基因组编码的蛋白质或糖蛋白（而不是由内源或外源病毒编码），其余为糖脂，是糖基转移酶不正常表达或调控的结果。

2·2 黑素瘤相关P97抗原

P97抗原是一癌相关抗原，首次用单克隆抗体技术自人类黑素瘤中鉴定出。（Brown et al, 1980, J·Biol Chem, 255: 4980—4983; Dippold et al 1980, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6114—6118; Woolbury et al, 1980, Proc Natl Acad Sci USA 77: 2183—2187）。已深入研究了P97抗原在正常组织和癌组织中的表达，它出现于大部分人类黑素瘤中及某些胎儿组织中，成人正常组织仅发现痕量P97抗原。（Brown et al, 1981, J Immunol 127: 539—546; Brown et al, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 539—543; Garrigues et al, 1982, Int J Cancer 29: 511—515）在人类临床检查中P97被用作检测黑素瘤的靶。（Larson et al, 1983, J Clin

Invest 72: 2101—2114)。

P97是一单节显性细胞表面唾液糖蛋白，用SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳测得分子量略低于97,000道尔顿。单克隆抗体已确定了位于胰酶切下来的一个40,000道尔顿稳定片段上的三个主要抗原区(Brown et al, 1981, J Immunol 127: 539—546)；然而，P97的完整顺序尚未见报道。至少还有其它两个独立表征的人类黑素瘤相关抗原，gP95(Dippold et al, 1980, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6114—6118)和gP87(Khosravi et al, 1985, Int, J. Cancer 35: 73—80)，用序列免疫沉淀法分析发现它们与P97相同。

P97 N末端氨基酸顺序与铁传递蛋白同源，而且类似于铁传递蛋白，P97结合铁(Brown et al, 1982, Nature, London, 296: 171—173)。体细胞杂交和原位杂交分析表明P97基因正如铁传递蛋白和铁传递蛋白受体基因一样位于染色体3q21—3q29区(Plowman et al, 1983, Nature, London, 303: 70—72; Yanq et al, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 81: 2752—2756)。这些结果意味着P97在铁代谢中起作用。

2·3 癌疫苗

实验动物(通常是小鼠)的研究表明用活的或死的癌细胞免疫可导致抵制对活癌细胞随后发生的用接触性传染物所进行的免疫性试验。用无细胞物质免疫很少成功，但也有成功的报道。(见Hellstrom and Brown, 1979, in The Antigen,)

M. Sela ed. Academic Press, Vol. V: 1-66)。在许多情况下负责保护效应的靶抗原由病毒编码，但在其它情形下不清楚诱发保护性免疫反应的该抗原的特性。

对人类的研究更为困难，对于癌疫苗的有效性尚有争议，尽管已有成功的报道。在许多情形下疫苗的制备由辐照癌细胞或暴露于某些化学试剂下杀死癌细胞组成。由于尚未得到纯的人类癌相关抗原，未见有它们应用于疫苗的报道。

对于上述人类癌疫苗应用的一个理论上主要异议是，“接种”了疫苗的人类，例如用杀死的癌细胞或无细胞制剂，将由于可能成为免疫应答的靶的癌抗原的出现而免疫无应答性，这种抗原尽管是痕量的，但出现在正常细胞中被免疫系统认为是“自己”。即使不是全部也是大多数的用单克隆抗体在人类癌症中检测的癌相关抗原也出现于一些正常组织，很少有证据表明癌症患者在体内有效地应答它们。有证据表明抑制细胞在向下调节对癌抗原的免疫应答方面起主要作用 (NePom et al., 1983, *Experientia*, 39: 235-242)。此外，由一系列癌抗原诱导的抑制细胞的应答可避免引入对于另一系列癌抗原的有效的癌-摧毁性应答，这些抗原本身不诱导抑制作用。

(Hellstrom et al., 1983, in *Biomembrane*, A. Nowotny ed, Plenum Press, pp. 365-388)。

2.4 重组DNA技术和疫苗病毒

采用重组DNA技术生产疫苗亚单位以防感染包括在合适的遗传信息载体上进行分子克隆和表达，该遗传信息编码一些蛋白质，其能在宿主动物体内诱发抗该蛋白质的免疫反应。最近，在有效地生产疫苗亚单位方面取得了一项新进展。(Mackett et al., 1982,

Proc Natl Acad Sci 79: 7415—7419; Mackett et al, 1984, J Virol 49: 857—864; Panicali, D and Paolletti, E, 1982, Proc Natl Acad Sci 79:4927—4931)。这项研究包括使用疫苗病毒作为载体表达插入此病毒基因组的外源基因。引入宿主动物以后，重组疫苗病毒表达插入的外源基因，从而诱发宿主抗该基因产物的免疫反应。因为活的重组疫苗病毒可用作疫苗，这项研究结合了亚单位和活疫苗两者的优点

疫苗病毒含一线型双链DNA基因组，约有187,000碱基对，在感染细胞的细胞质中复制。这些病毒在病毒核内含有病毒感染所必需的完整的转录酶体系（包括戴帽酶，甲基化酶和聚腺苷酶）。疫苗病毒转录调节顺序（起动机）允许疫苗的RNA聚合酶而不允许宿主细胞的RNA聚合酶转录起始。

外源DNA在重组疫苗病毒中的表达需要疫苗起动机与编码蛋白质的外源DNA顺序连接。质粒载体，又叫插入载体，已经构建将嵌合基因插入疫苗病毒的载体。一种插入载体包括：（a）含转录起始位点在内的疫苗病毒起动机；（b）几个单一的限制性内切酶克隆位点，其位于转录起始位点的下游，用以插入外源DNA片段；（c）位于起动机和克隆位点侧翼的非必需疫苗病毒DNA（如TK基因），其引导嵌合基因插入病毒基因组的同源非必须区域；（d）细菌的复制起始及在大肠杆菌中用于复制和选择的抗生素抗性标记。Mackett叙述了这些载体实例（Mackett et al, 1984, J Virol 49: 857—864）。

重组疫苗病毒是将含有外源基因的重组细菌插入质粒转染至予先用疫苗病毒感染的细胞中而产生。同源重组发生于感染细胞，结果使外源

基因插入病毒基因组。所感染的细胞可通过免疫学技术，DNA噬菌斑杂交作用及重组病毒的遗传选择筛选，然后重组病毒可被分离。这些疫苗重组体保持它们的基本功能和感染性，而且可构建容纳近35,000碱基对的外源DNA。

外源基因的表达可用酶学或免疫学方法检测（例如，免疫沉淀法，放射免疫或免疫空斑法）。由重组疫苗感染的细胞所产生的天然膜糖脂蛋白被糖基化并转移到细胞表面。用强起动机或单基因克隆多拷贝可以得到高表达水平。

3.

叙述了诱发选择性摧毁接种疫苗个体内黑素瘤细胞的免疫应答的疫苗系统。更特别地，本发明的疫苗系统包括一免疫原，其能诱发直接抗一黑素瘤相关抗原如黑素瘤相关P97抗原的免疫应答。据此发明，可能有许多疫苗系统。例如，本发明的“亚单位疫苗”免疫原包括一个与P97相关的肽或蛋白质，其可用适当的佐剂制配。这样的肽段或蛋白质含有自P97全部或部分氨基酸顺序衍生的氨基酸顺序。P97的氨基酸顺序大体如图3所示。这种衍生包括但不限于改变的氨基酸残基序列在该顺序中功能上等价的氨基酸残基代替那些引起不活动变化序列中的残基，和/或修饰或加工P97氨基酸顺序（如糖基化的氨基酸顺序，磷酸化的氨基酸顺序等），或是化学修饰该氨基酸顺序。在下文中，本项发明的与黑素瘤相关抗原P97有关的肽或蛋白质，不论其是改变的还是未改变的，修饰的还是未修饰的，均称为“P97相关肽”。这里P97相关肽是一半抗原（例如有抗原性无免疫原性），该半抗原可与能引起免疫原性的载体分子相耦联。

本发明的P97相关肽可用重组DNA技术和/或化学合成方法生产。如果P97相关肽由化学合成方法得到，则其含有P97的所期望

抗原性的氨基酸顺序的衍生顺序 (H o p p a n d W o o d s , 1 9 8 1 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 7 8 : 3 8 2 4 - 3 8 2 8) 。这里本发明的 P 9 7 相关肽用重组 D N A 技术得到, 则一段编码整个或部分 P 9 7 的核苷酸顺序被插入一重组表达载体。例如一病毒或质粒, 其在适当的宿主体内指导一个 P 9 7 相关肽的表达, 该肽可在培养基中纯化得到。插入的核苷酸顺序是从大体如图 3 所示的全部或部分 P 9 7 核苷酸顺序衍生得到, 包括但不限于用功能等价的核苷酸密码子取代那些导致不活动变化间的密码子核苷酸; 换言之, 在图 3 顺序中编码同一氨基酸或其功能等价氨基酸的不同核苷酸可被取代。使用适合于真核细胞中表达的质粒表达载体, 也可用适合在原核细胞中表达的载体。

在本发明的另一实例中表达载体是一重组病毒, 疫苗又可被制成病毒疫苗, 这种情况下免疫原包括表达 P 9 7 相关肽的重组病毒。依赖于用作免疫原的重组病毒的性质, 可制备成非激活的病毒疫苗或活病毒疫苗。用本发明的疫苗体系进行适当免疫可引起诱导免疫应答, 在免疫动物体内导致杀死黑素瘤细胞。

本发明还叙述了检测疫苗体系的系统, 以及如何进行检测。例如, 疫苗体系可根据其在动物模型中的效能来评估, 首先是啮齿类动物, 然后是非人类灵长类动物, 最后是人类, 最好是那些处于缓减状态但由于微体移动酶而尚具有很高复发可能性的病人。

图 1 表示 S D S (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 溶解的 P 9 7 m R N A 无细胞翻译产物的放射自显影术。在图 1 A 中, 线 1 代表 P 9 7 富集 M R N A 的翻译产物, 而线 2 代表非富集 M R N A 的翻译产物, 都是从 5 n g M R N A 的 0 . 5 μ l 总翻译产物得到。在图 1 B 中, 线 1 代表 P 9 7 富集 M R N A 的翻译产物, 线 2 代表非富集 M R N A 的翻译产

物，均为用抗P97血清免疫沉淀法得到的5 ng mRNA的5 μ l 翻译产物。

图2A.B示P97 mRNA的图式结构。该图表示了编码区(从信号序列至终止序列)和非编码区(3'UT)以及P97前体(虚线)的复制区结构的排列。在mRNA上方标出了不同限制性酶识别的序列的位置。在mRNA结构下方标出了四个cDNA克隆的相对位置。cDNA克隆P97-3a2f1(3a2f1)是从一cDNA库中分离得到的，在该基因库中cDNA是在寡T-引导的P97富集mRNA转录，并克隆到PBR322；而cDNA克隆P97-2f1(2f1)，P97-1j1(1j1)，和P97-10a1(10a1)是通过用寡聚核甘酸由引导cDNA合成并将所得到的cDNA片段克隆到X-gt10(lambda-gt10)而分离得到，这些寡聚核甘酸编码P97外显子序列。图2B图示了在lambda L47.1中克隆得到的基因组克隆子B15，H17，B6.6和E7.7。

图3A.B表示人类P97前体cDNA核甘酸序列及其推演出的氨基酸顺序。予先用蛋白质测序确定的N末端氨基酸残基与从核甘酸顺序预言的完全一样(氨基酸残基数目21-30)。潜在的糖基化位点(残基38，135，515〔虚线〕)以及C末端的膜终止区(实线)也在图中示出。在位置3847检测到一个多聚腺甘酸化信号序列(方框中表示AATAA)，该信号是在一聚腺甘酸区域上游50碱基对处。

图4比较了P97前体和人血清铁传递蛋白的预言的氨基酸顺序(Yanq et al, 1984, Proc, Natl Acad Sci USA 81: 2752-2756; Davis et al 1985, J Mol Biol, 181: 111-121)。保守的残基用方框画出。用星号(*)示出了包含与铁传递蛋白结合的铁的

酪氨酸, 组氨酸和精氨酸残基 (Mertz-Boutique et al, 1984, Eur J Biochem, 145: 659-676)。

图5表示了保存于铁传递蛋白总科成员之间的半胱氨酸出现时 P97 结构的二维模型。用星号 * 显示了三个潜在的糖基化位点。疏水的膜终止区出现于 P97 的 C 末端 (COOH)。

本发明有关防止和治疗黑素瘤的疫苗的生产。这基于下列观察事实：黑素瘤具有癌相关细胞表面抗原，如 P 9 7 抗原，其大量出现于黑素瘤细胞而不是正常组织。根据本发明，与黑素瘤相关 P 9 7 抗原有关的肽或蛋白质（即，P 9 7 相关肽）是用重组 DNA 技术和/或化学合成技术得到。本发明的 P 9 7 相关肽含有从 P 9 7 全部或部分氨基酸顺序（大体如图 3 所示）衍生的氨基酸顺序。这种衍生包括在图 3 所示的氨基酸顺序中，用具有相似极性的功能等价氨基酸取代一个或多个氨基酸残基而发生不活动变化。在该顺序中对某一氨基酸的取代，可在该氨基酸附属的类中挑选合适氨基酸。例如，非极性（疏水性）氨基酸包括丙氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，色氨酸和蛋氨酸。极性天然氨基酸包括甘氨酸，丝氨酸，苏氨酸，半胱氨酸，酪氨酸，天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷（碱性）氨基酸包括精氨酸，赖氨酸和组氨酸。带负电荷（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。此外，本发明的 P 9 7 相关肽，不论被取代的氨基酸残基改变与否，均可以被糖基化、磷酸化等加工或进行化学修饰作进一步修饰和加工。在疫苗体系中这些 P 9 7 相关肽可被用作免疫原，其可引发抗接种患者体内出现的黑素瘤细胞的免疫应答。

根据本发明的一项实例，采用重组 DNA 技术将编码 P 9 7 抗原

图6 是p97 cDNA克隆和用于p97 表达载体组建的染色体克隆 λ E 7.7 片段的基因结构图解，和 pSV2 p97a载体。使用下列缩写词：E, Eco R I； P, Pvu II； Sal, Sal I； S, Sst I； B, BamH I。

图7 表明重组体 p97蛋白的特性和免疫纯化凝胶电泳的结果。用 ^{35}S -半胱氨酸标记转染 CHO克隆 (CHO3+) 和 SK-MEL28人黑素瘤细胞，标记时有衣霉素 (TM) 存在 (+ TM) 或缺失 (- TM)。将细胞植入100mm²的平板中并使之接近融合。除去培养基并用3ml 无半胱氨酸的培养基代之，加入或不加入1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素。37 $^{\circ}\text{C}$ 下30分钟之后，加入每毫升250 微居里的 ^{35}S -半胱氨酸 (每毫摩尔为1016居里，NEW ENGLAND NUCLEAR) 再培养6 小时。细胞的收集，细胞溶解产物的制备，免疫沉淀，和 SDS-PAGE如上所述。用p97-特异性抗体使提取物免疫沉淀，用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白质。(a),考马斯兰染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。泳道1, 蛋白标记物；泳道2, 从转染鼠 B16细胞中排出的免疫纯化p97；泳道3, SK-MEL28细胞+ TM；泳道4, SK-MEL28细胞- TM；泳道5, CHO3+细胞+ TM；泳道6, CHO3+细胞- TM。(b) 与(a) 相同的凝胶的放射自显影照片。

图8 表明在转染细胞或 Vp97a- NY受感染细胞中表达的p97 的放射免疫沉淀结果。用野生型牛痘病毒或p97 重组体牛痘病毒感染 BSC细胞过夜。这些病毒或转染细胞株 CHO-p97 A在有或没有2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素 (Sigma产品) 时与 ^{35}S -标记的蛋氨酸一起温育。使细胞溶解6 小时以后，用单克隆抗体96 S沉淀，并通过10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将凝胶放射性自显影过夜。衣霉素处理组在各组的右边

图9 描绘在用p97 疫苗免疫的鼠中血清抗体的效价 Tp97 表示5 只用 5×10^6 受辐射M2s vp97a, A细胞 (受转染的和表达表面p97 的有性生殖肿瘤细胞) 在完全弗洛因德佐剂中免疫 并用相同数目的细胞在磷酸盐缓

冲盐水中增强免疫力的属。p97 是一组用100 μg 纯化p97 蛋白在完全弗洛因德佐剂中免疫，并用50 μg 蛋白水溶液增加免疫力的5 只鼠。Vp97 是一组用 10^7 噬菌斑形成单位的 Vp97a- N Y通过尾部划痕免疫并增加免疫力的5 只鼠。

图10描绘用重组体p97 牛痘病毒 (Vp97a- N Y) 给受肿瘤攻击的鼠种痘的疗效。用 10^5 或 10^4 p97 表达肿瘤细胞 (M2s vp97a. E) 通过静脉注射攻击鼠。两天后，用 Vp97a- N Y或 Vwt - N Y通过尾部划痕给鼠接种。通过尾部划痕每周重新接种一次，并记录存活的鼠。

的核甘酸顺序插入表达载体，其将指导在适当的宿主细胞中 P 9 7 相关肽的表达。编码 P 9 7 抗原的核甘酸序列包括从 P 9 7 核甘酸序列（大体如图 3 所示）全部或部分衍生的核甘酸序列。由于 D N A 编码氨基酸的简并性（即大多数氨基酸可被多于一个的密码子编码），功能等价密码子（即不同密码子编码同一氨基酸或其功能等价氨基酸）可以在图 3 中提供引起不活动变化取代的 P 9 7 序列中被取代。含有编码全部或部分 P 9 7 的核甘酸序列的表达载体——宿主细胞体系可用来在体外大量生产纯 P 9 7 相关肽，基因产物可自细胞培养基中得到，并用作亚单位疫苗体系中的免疫原。可采用不同的生物化学方法完成纯化 P 9 7 的相关肽，包括用单克隆抗体进行免疫亲和纯化。此外，修饰编码 P 9 7 相关肽的 D N A 顺序以便移去负责蛋白质固着于质膜的顺序而不移去负责运输蛋白质于细胞膜的顺序，这样宿主细胞就向培养基分泌截断的抗原分子，从而简化了 P 9 7 相关肽的纯化。在原核细胞产生 P 9 7 相关肽的情况下，缺少适当的翻译后修饰工作可能导致抗原非活性产物，该产物可能必须用化学处理或其它处理方法激活。

在特定例子中，表达载体是病毒，病毒自身可被制配为疫苗。在这种情形下可制备非激活的重组病毒疫苗。当表达载体为一感染性但不在宿主内致病的重组病毒时，要么制配成非激活病毒疫苗要么活的病毒疫苗，它们提供有实用价值的免疫性。用于这一目的的一个特别有用的表达载体是一重组疫苗病毒，其表达本发明的 P 9 7 相关肽。最后编码全部或部分 P 9 7 抗原的核甘酸顺序可被插入一个疫苗病毒载体，其能在适当宿主内指导该序列的表达。本发明包括采用其它病毒表达载体作为疫苗，尤其是腺病毒。

在本发明的另一实例中，检验推断的 P 9 7 氨基酸顺序是否具有某种性质的序列，特别是亲水性，该性质预言一段出现于蛋白质分子表面

的序列，以及它的可能的抗原性和/或免疫原性。这些 P 9 7 相关肽可用化学方法合成，在疫苗体系中用作免疫原。

本发明还提供了一种生产 P 9 7 相关肽的方法，它可用于除疫苗生产外的目的。P 9 7 相关肽用来免疫动物，以便产生特异于所关心的黑素瘤细胞的抗血清或单克隆抗体。这些可作为诊断检测中的试剂成分，或亲和纯化放射性标记的药物耦联或毒素耦联抗体，这些抗体要用于癌症治疗。

本项发明是用例子叙述的，其中我们描述了抗人黑素瘤的 P 9 7 一基础疫苗的构建。然而，这里所描述的方法和组成并不限于使用 P 9 7 的疫苗构建，还可应用于其它癌相关抗原。

为叙述清楚起见，本项发明包括：(1) P 9 7 的核甘酸顺序和氨基酸顺序；(b) 用化学合成方法制备 P 9 7 相关肽；(c) 用表达载体—宿主体系生产 P 9 7 相关肽；(d) P 9 7 相关肽的免疫学特性；(e) 疫苗制配。

5 · 1 黑素瘤相关 P 9 7 抗原顺序分析

图 3 表示了编码 P 9 7 基因的核甘酸顺序及其衍生氨基酸顺序。本发明也包括功能等价顺序。即包括但不限于含有图 3 中全部或部分核甘酸顺序，被编码相同氨基酸或其功能等价氨基酸残基的不同密码子取代从而产生不活动变化；以及含有图 3 所示全部或部分氨基酸顺序，其中被功能等价氨基酸残基取代而发生不活动变化；以及被修饰或加工过的衍生物，例如糖基化、磷酸化，或化学修饰。

下一小节描述了用来确定图 3 所示 P 9 7 顺序的策略思想以及用来确定 P 9 7 顺序或其它癌抗原顺序的不同技术，这些抗原在疫苗体系中十分有用。

5 · 1 · 1 黑素瘤相关 P 9 7 抗原的鉴定与特性

黑素瘤相关 P 9 7 抗原的活性和氨基酸顺序尚属未知；于是，鉴定 P 9 7 抗原要用直接抗 P 9 7 的单克隆抗体来完成。很多技术可用来产生特异于 P 9 7 的单克隆抗体。例如，由 Kohler 和 Milstein 发展的杂交瘤技术 (1975, Nature 250: 495—497) 可以这样采用：用人类黑素瘤细胞免疫小鼠或大鼠，将所免疫动物收集到的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合；或者，黑素瘤病人的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合 (Cote, et al, 1983, Proc Natl Acad Sci 80: 2026; Haspel et al; 1985, Cancer Res, 45: 3951), 或用 Epstein—Barr 病毒生产单克隆抗体的技术来产生直接抗 P 9 7 的单克隆抗体。(Cole et al, 1985, The EBV—Hybridoma Technique and its Application to Human Lung Cancer, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77—96)。在任何情况下，所产生的杂交瘤由抗体的产生来筛选，它们能与黑素瘤细胞结合但不与正常细胞结合。

上面叙述的直接抗 P 9 7 的单克隆抗体可以多种途径用来简化核苷酸顺序的鉴定，特性化，克隆和表达，这些序列允许大量生产相关于 P 9 7 抗原的肽和蛋白质。例如，该单克隆抗体可通过放射标记癌细胞生产的全部蛋白质，免疫沉淀癌蛋白质，并用凝胶电泳法分级免疫沉淀蛋白质来进一步鉴定 P 9 7 抗原。在放射自显影结果中蛋白质抗原作为显著的条带而被鉴定 (Brown et al, 1980, J. Biol Chem 255: 4980—4983)。此外，直接抗 P 9 7 的单克隆抗体可用来使克隆变容易；(a) 免疫纯化多核糖体以

便识别并得到出现在黑素瘤细胞中的编码P 97抗原的M R N A转录样；(b)在C D N A表达文库中识别表达与P 97相关的肽或蛋白质的克隆子；(c)纯化P 97抗原以便制备用于前面二项工作中的多余的单克隆抗体或抗血清；或(d)识别由转染作用引入P 97抗原基因的细胞。

单克隆抗体还可用于简化P 97抗原的结构和免疫化学鉴定，以便识别该分子的细胞外区和抗原区，纯化该分子以便分析其氨基酸顺序(B r o w n e t a l , 1 9 8 1 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 7 8 : 5 3 9 — 5 4 3 ; B r o w n e t a l , 1 9 8 2 , N a t u r e , L o n d o n , 2 9 6 : 1 7 1 — 1 7 3)

P 97的进一步定性包括细胞定位，绘制抗原决定区和功能域图谱。可用免疫荧光显微镜和细胞分级实验定位亚细胞。最好用P 97这样的出现于细胞表面的抗原构造疫苗，尽管细胞内抗原可能也是有用的。如果多种单克隆抗体是有效的，则可通过竞争实验绘制抗原决定簇图谱，其中每个抗体都用放射性标记，并试验每个与其它抗体的竞争。用蛋白酶有限消化，然后走S D S — P A G E，即可识别该分子区域。这些数据合在一起可以鉴定出该分子最具免疫原性的区域。如果单克隆抗体是用整体细胞免疫得到，则该分子的这些区域极有可能位于细胞外，且对于疫苗构造极为有用。

氨基酸顺序分析使蛋白质明确鉴定及其与其它蛋白质的比较成为可能(B r o w n , e t a l , 1 9 8 2 , N a t u r e , L o n d o n , 2 9 6 : 1 7 1 — 1 7 3)。如果该蛋白质含有多于50个氨基酸残基，则有可能仅确定一部分氨基酸顺序，常为N末端。用来测定氨基酸顺序的蛋白质抗原可以这样纯化：用单克隆抗体对溶胞产物进行免疫亲和层析，然后走S D S — P A G E。已纯化的蛋白质的N末端氨基酸顺序就

可由一自动氨基酸顺序仪确定，特别是具有高灵敏度的气相仪。

5 · 1 · 2 编码黑素瘤相关 P 9 7 抗原的 D N A 的鉴定，克隆和测定顺序

早先克隆研究集中于含量丰富的蛋白质如球蛋白和卵清蛋白，其 M R N A 常占总体 M R N A 的 1 0 % 到 5 0 %。这些 M R N A 可通过大小分级纯化至均质，纯 C D N A 探针通过菌落杂交用数百个克隆子来筛选。对于那些 M R N A 占总 M R N A 1 % 到 1 0 % 的蛋白质，可采用两个 C D N A 探针的分别杂交，其中一个 C D N A 探针含有所关心的顺序，另一个为负对照。编码低含量蛋白质的信使 R N A，如癌相关抗原，其可能仅含 0 · 0 1 % 的细胞 M R N A，很难克隆，因为必须筛选上万个克隆，C D N A 探针不给出特异的杂交信号。这两个困难通过富集编码所需顺序的 M R N A 而得到缓和。

下面叙述了用来克隆编码人类黑素瘤相关抗原 D N A 的几项进展。分析所得到的克隆以便识别跨越 P 9 7 的整个编码区的一个或多个克隆。如此鉴定的克隆的 P 9 7 核苷酸插入部分可用本文中所述的任何一种方法测知顺序。下面将更详述一些进展。

(a) 通过多核糖体免疫纯化方法分离 M R N A

在这项技术中，多核糖体（其由 M R N A，核糖体和新生多肽链组成）是这样纯化的，用识别出现在新生链上的抗原决定区的抗体进行免疫亲和层析。在很多情形下用整个细胞或细胞提取物免疫得到的单克隆抗体识别处于其天然构象的抗原，但这种单克隆抗体不适于多核糖体的免疫纯化，因为只有一个有效的机会，即所识别的抗原决定区不出现于新生链上。因为翻译过程开始于多肽 N 末端，靠近 C 末端的抗原决定基就可能不出现于大部分新生链上。这个问题可这样避免：或是采用识别 N 末端抗原决定区的抗体，或是用阻断终止反应的蛋白合成抑制剂处理

细胞，再从中提取多核糖体。

一个更严重的问题是，由于翻译后修饰而使那些成熟的蛋白质不同于新生链。这个问题对于细胞表面蛋白质显得更为重要，因为细胞表面蛋白质得到了更为强烈的修饰：移去信号肽，加上糖类侧链，形成双硫桥等。如果一多克隆抗血清用于多核糖体免疫纯化，新生链和成熟蛋白质之间的抗原性差异可能只有很小的后果，因为在免疫过程中兔子或其它动物不只暴露于天然蛋白质，还暴露于部分或全部变性的形式，特别是在加付氏佐剂的情况下。甚至当这些抗体仅代表抗体群的一小部分仍足以结合新生链。不幸的是，很难制备对低含量蛋白的多克隆抗血清。尽管一单克隆抗体可用来纯化抗原以进行进一步免疫，每克培养细胞只能得到 $1 \mu\text{g}$ 抗原。这足以免疫几只小鼠，但不够免疫一只兔子。

对这一问题的另一解决方法是获得用变性的 P 97 抗原作为免疫原制备识别新生链上抗原决定区的单克隆抗体。本发明的实例中得到一组识别 P 97 分子 N 末端 40, 000 道尔顿分子量区上的三个显著抗原决定区的单克隆抗体，我们使用了一些具有不同特异性的单克隆抗体，希望其中一个或多个能与新生链结合。所选择的抗体对 P 97 有很高的特异性，其中每个抗体都能从放射性标记的整个细胞溶胞产物中免疫沉淀一条单一带，并具有高的亲和力。为了克隆的目的，我们选择了三个 I g G 2 a 抗体，对三个抗原决定区的每一个都有一个特异的。通常使用大量抗体识别抗原决定区可有较高的成功可能性。

使用单抗的问题是如何预言一已知单克隆抗体或抗体结合物是否识别新生链并适于多核糖体免疫纯化。一项进展是确定在网织细胞溶胞体系中单克隆抗体是否免疫沉淀已翻译的抗原，这是基于这样的假设即：在体外得到的未加工翻译产物相象于新生链。另一项研究是从小范围免疫沉淀多核糖体入手然后进行体外翻译确定所关心的 M R N A 片段是否

已被富集。

当使用多核糖体免疫纯化技术时，测量 mRNA 活性而控制纯化过程是很重要的。这可以这样达到：在网织细胞溶胞体系中翻译 mRNA，用 SDS—PAGE 分析翻译产物。尽管癌相关抗原在未富集的 mRNA 的翻译产物中是成分太少，以致成百个更为富集的样品中也不能看到，然而它在自富集的 mRNA 样品衍生出的翻译产物中应该是可检测的。此外当可得到检测翻译的癌相关抗原的灵敏免疫反应时，可采用 *Xenopus* 卵母细胞翻译体系。正由于这一目的，对于 P 97 采用高灵敏性双决定簇免疫测定 (DDIA)，采用了两个特异于 P 97 两个不同的抗原决定簇的单克隆抗体。

与琼脂糖结合的蛋白 A 可用于多核糖体免疫纯化。在此过程中蛋白 A 吸收剂有二项应用：其一是从粗腹水中纯化单克隆抗体，移去污染核酸酶活性；其二是与纯化的抗体耦联来免疫纯化带有特异新生链的多核糖体。

在网织细胞溶胞体系中 mRNA 的翻译使翻译产物的生物化学鉴定和其纯度的估价成为可能。

(b) 寡聚核苷酸探针

根据本实验，另一用于克隆编码癌相关抗原 (如 P 97) 的 cDNA 的方法是确定该抗原的全部或部分氨基酸顺序。基于从氨基酸顺序推导出的核苷酸顺序合成一寡聚核苷酸探针。该寡聚核苷酸即可作为 cDNA 合成的引物及筛选所得到 cDNA 文库的探针。因此，黑素瘤相关 P 97 抗原可方便地采用特异单克隆抗体用亲和层析方法从黑素瘤细胞溶胞产物中纯化出来。然后合成能作为引物和/或探针的编码部分已确定的氨基酸顺序的核苷酸顺序 (Brown, et al, 1982, *Nature*, London 296: 171—173)。含有由一个

或二个密码子编码的氨基酸残基的部分氨基酸顺序最适合于这个目的。一项研究是合成一较长序列，典型的是25~60核苷酸，基于已知的人类密码子使用频率，这个数字代表了最可能的编码序列。基于该氨基酸序列的不同部分合成的两条寡聚核苷酸链使人们识别假的阳性杂交信号而简化了筛选。此外，采用能降低GC含量对DNA杂合体熔点的效应的杂交条件也能简化筛选。一旦用这种方法得到了一部分cDNA克隆，它就可以作为探针来得到全长cDNA的克隆。

(C) cDNA表达文库

现已研制了能表达插入细菌的cDNA的克隆载体。用来得到癌相关蛋白质(如P97)的cDNA克隆的一项研究进展是通过反转录从上面提到过的黑素瘤细胞中分离的mRNA(富集的或是富集的)来制备cDNA文库，采用寡聚(T)-核苷酸引物或上文提到的合成寡聚核苷酸引物，并用直接抗黑素瘤相关P97蛋白的单克隆抗体筛选这个cDNA文库。那些含有编码在正确取向和解码中被单克隆抗体识别的抗原决定簇的DNA的克隆将表达与黑素瘤相关P97抗原有关的肽或蛋白质，并通过转移该克隆所表达的蛋白质至硝酸纤维素滤膜并将滤膜与抗体一起培养，然后用标记的抗-免疫球蛋白试剂显影而检测该克隆。

一个潜在的问题是许多单克隆抗体不能识别细菌表达的蛋白质，因为在许多情形下只有一部分cDNA含于插入顺序而细菌不以真核细胞的方式对蛋白质进行加工。这个问题对于瘤细胞表面蛋白质尤为重要，因为它被强烈加工：移去信号肽，加上糖基侧链，形成双硫桥。因此有必要生产已知能识别变性抗原的单克隆抗体或用纯化抗原免疫制备多价抗血清。

一旦鉴定了一个重组病毒或质粒，确信它含有来自黑素瘤相关P97

抗原衍生得到的 C D N A 插入片段，那末该 C D N A 插入片段可用来筛选附加文库以便鉴定全长克隆或跨越编码 P 9 7 的 C D N A 全长的一组克隆。所克隆的 C D N A 的同一性可通过序列分析以及比较所衍生的 N 末端氨基酸顺序和直接分析 P 9 7 蛋白质所确定的氨基酸顺序而建立。

(d) 基因组克隆

下列方法使克隆 D N A 采用了直接抗一个仅出现于天然蛋白质不出现在于细菌表达的新生链或蛋白质上的抗原决定簇的单克隆抗体。最后用转染方法将人类黑素瘤细胞衍生 D N A 引入小鼠 L 细胞。随后，表达黑素瘤相关 P 9 7 抗原的小鼠细胞或是用荧光激活细胞分类器或是用产生 P 9 7 相关肽的菌落免疫学鉴定而得到分离，后一种方法是采用放射性标记的直接抗 P 9 7 的单克隆抗体检测转移至聚酯被膜上的菌落复制物。需要以后几次转染以移去不相关的人 D N A 序列，然后在 $-\lambda$ 噬菌体载体上制备基因组文库，并筛选含有发生在大多数基因内含子的人类重复序列的克隆。一旦鉴定出一基因组克隆子，它就可以用作标志含有编码 P 9 7 的 D N A 的克隆的杂交探针。

5 . 2 合成黑素瘤相关 P 9 7 抗原的片段及免疫原性评估

合成肽可用作免疫原以诱发抗天然蛋白质的免疫应答，以提供一定程度的抗数种致病原的保护作用。这样的肽序列是从蛋白质抗原的已知氨基酸序列中挑选出来的，先鉴定极可能出现于分子表面的氨基酸段，暴露于外介质。用已建立的氨基酸水疗法参数，由计算机分析氨基酸序列而很容易地得到。附加的准则如预计的二次结构或挠性也可采用。

据此，黑素瘤相关 P 9 7 蛋白的含 5 到 5 0 个氨基酸残基的合成肽在实验动物体内试验其免疫原性（常用小鼠或兔）。这样的合成肽包括但不限于大体如图 3 所示的部分或全部氨基酸序列，包括改变了的序列，如用功能等价氨基酸取代顺序中的氨基酸只引起不活动变化和/或修饰

加工该序列如糖基化序列，磷酸化序列等，或化学修饰序列。这些 P 97 相关肽或单独使用或与载体蛋白联合使用，如海威血兰蛋白 (K L H)。在这两种使用方法中佐剂是可任意选择的，虽然最好采用。免疫的动物被加强免疫并检测抗免疫肽的抗体。对那些具有抗肽抗体的再试验有无结合天然 P 97 蛋白质的抗体。在癌相关抗原如 P 97 的情况下，试验细胞免疫应答具有意义，例如，通过寻找迟发型超敏反应 (D T H)，寻找体外抗原刺激的增殖，溶胞性 T 细胞，或适当模型中癌排泄物。所谓适当模型应该是一个表达人类癌相关抗原的小鼠的癌，它是用一适当 C D N A 表达载体构建进行转染的结果。

目的是鉴别那些诱发直接抗黑素瘤相关 P 97 抗原的强烈免疫应答的肽。一旦鉴别出来，这些肽将按本文所叙述的化学合成方法大量生产。另外，通过表达在表达载体—宿主细胞体系中编码这些肽的核苷酸顺序也可大量生产这些鉴定出的肽。

5 · 3 用表达载体—宿主体系生产 P 97 相关肽

通过插入编码序列核苷酸到一适当表达载体可以大量生产蛋白质和肽。这个表达载体再引入宿主细胞，包括但不限于细菌，酵母，昆虫细胞及哺乳类细胞。尽管细菌宿主有很多优点，它们并不适宜加工真核细胞的蛋白质，在表达癌相关蛋白质方面也不如真核细胞合适。然而，在细菌中产生的重组蛋白质在引入 T 细胞应答方面很有用，因为这种应答被认为需要蛋白质抗原的起始降解。

为在一载体—宿主体系表达一 P 97 相关肽，需将编码黑素瘤相关 P 97 抗原或其一部分的核苷酸顺序插入合适的表达载体。这样的核苷酸顺序包括但不限于大体如图 3 所示的部分或全部 P 97 D N A 序列，包括改变了的序列，即该顺序中一个或多个密码子被编码同一或功能等价氨基酸的密码子所取代，而导致在该顺序上发生中性变化或不活动变

化。表达载体包含转录和翻译插入的蛋白质编码顺序所必须的组份。这些组份在强度和特异性方面是变化的。依赖于所用的宿主—载体体系，可以使用大量适合转录和翻译的组份中的任何一个。例如，在哺乳类细胞体系中进行克隆时，可采用从哺乳类细胞基因组分离得到的起动机（如小鼠金属硫因起动机）或从病毒中分离得到的能在哺乳类细胞中生长的起动机（如疫苗病毒 7·5 K 起动机）。用重组 DNA 或合成技术产生的起动机也可用于插入序列的转录。

对于插入的编码序列的蛋白质有效翻译过程，还需要特异的起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子及邻近序列。当或是基因或是 C D N A 序列插入一适当表达载体时，不需要附加的翻译控制信号。然而，当只是编码序列的一部分插入时，必须提供包括 ATG 密码子在内的外源翻译控制信号。而且起始密码子又定是同时协调的，在蛋白质编码序列的解读密码以保证整个插入片段的翻译方面。这些外源翻译控制顺序和起始密码子可有很多来源，或是天然的或是合成的。

任何—那些在本文中擅长的已知的将 DNA 片段插入载体的方法均可用来构造包含嵌合基因的表达载体，该嵌合基因含有适当的转录和翻译控制信号和蛋白质编码序列。这些方法包括用于体外的重组 DNA 技术，合成技术，以及用于体内的重组技术（基因重组）。

表达载体包括但不限于下列载体及其衍生物：疫苗病毒，腺病毒，昆虫病毒，酵母载体，噬菌体载体，质粒 DNA 载体。文献中已常见细菌体系中基因的克隆和表达。例如，在大肠杆菌中克隆时，它的细菌噬菌体或质粒的起动机（如 lac 起动机，trp 起动机，rec A 起动机，核糖体 RNA 起动机及大肠杆菌噬菌体 lambda 的 PR 和 PL 起动机）和其它一些起动机包括但不限于 lacuv5，trp—lacuv5 (tac) 杂种起动机，ompF，bla，lpp 及其

类似物可用作指导邻近DNA片段高水平转录。然而由于真核细胞和原核细胞加工过程不同，最好在真核细胞中表达本发明的P97相关肽。在真核细胞中表达蛋白质的最好方法是（a）与一抗药基因一起将该蛋白质基因引入细胞，然后用药物选择，得到如用二氢叶酸还原酶-氨基蝶呤体系的扩增；（b）在质粒载体中cDNA的表达，通常基于PB322，使用强的真核细胞起动机和其他调节顺序；（c）在一病毒载体中表达cDNA，通常是SV40衍生物，再次使用一强的起动机，在这种情况下是SV40起动机。重组质粒载体常用于产生这样的细胞系，其能在一长周期内生产蛋白质，而SV40载体用来得到瞬间表达。尽管哺乳类细胞最常用做宿主细胞，昆虫细胞及某些情形下酵母细胞也能适用。下面将详细叙述。

为了构建一表达黑素瘤相关P97抗原的重组疫苗病毒，将cDNA编码序列与疫苗病毒的7.5K起动机连接形成嵌合基因。此嵌合基因和与病毒胸腺甘激酶基因同源的附加疫苗病毒序列侧面相接，载于质粒DNA载体上。构造嵌合基因包括使用癌相关抗原序列转录与翻译的天然和合成的控制信号。然后通过体外重组同源胸腺甘激酶区（此区出现在质粒载体和疫苗病毒基因组上）将嵌合基因引入疫苗病毒表达载体上。这些含有嵌合基因的重组病毒能指导在感染的宿主中P97相关肽的表达，并被用作疫苗成份。

当用腺病毒作为表达载体时，所关心的DNA序列与一腺病毒转录/翻译控制复合物连接，这个复合物例如是迟起动机和三部分先导序列。然后用体外或体内重组技术将此嵌合基因插入腺病毒基因组。插入病毒基因组的一个非必需区（如，E1或E3区）将得到一重组病毒，其能存活并在感染的宿主内表达P97相关肽。目前，使用两种腺病毒（型4和7）并作为军人的疫苗。它们是用作表达插入DNA序列的载体引

物候选者。

昆虫体系也可用来表达 P 9 7 相关肽。在其中一个体系，自体移植 California 核多角体病毒 (A c N P V) 用作表达外源基因的体系。该病毒生长于 Spodoptera frugiperda 细胞。所关心的 D N A 序列可被克隆入该病毒的非必需区 (如多角基因) 并且是在一 A c N P V 起动机 (如多角起动机) 控制下插入的。 D N A 序列的成功插入将得到钝化多角基因，并产生非封闭性重组病毒 (即，缺乏由多角基因编码的蛋白外壳。) 这些重组病毒用来感染 Spodoptera frugiperda 细胞，插入的基因在其中表达。

此外，可选择调节插入顺序表达的宿主细胞系，或是以所需特殊方式修饰和加工嵌合基因的产物。在特定诱导物的存在下某些特定起动机引起的表达可得到加强 (如对金属硫因起动机来讲锌离子和钙离子是诱导物)。这样就可以控制基因工程的蛋白质的表达。当克隆基因的蛋白质产物使宿主细胞致死时，这一点极为重要。此外，蛋白质产物的修饰 (即糖基化，磷酸化等) 和加工 (如切断) 对蛋白质的结构和功能是重要的。不同的宿主细胞有特异的翻译后加工和修饰蛋白质的专一的机制。可以选择适当的细胞系或宿主体系来保证表达外源蛋白质的正确的加工和修饰。

在此处描述的 P 9 7 的特例中，我们将 P 9 7 C D N A 序列连接到一表达质粒载体，该载体是从含有金属硫因起动子的 P B R 3 2 2 衍生得到的。 P 9 7 全部编码的序列 (包括信号肽和膜终止被插入至载体。)

5 · 3 · 1 具有复制和指导 P 9 7 D N A 序列表达的重组表达载体的鉴定

含有外源插入基因的表达载体可用三个常规方法鉴别： (a) D N A — D N A 杂交， (b) 有无标记基因功能， (c) 插入序列的表达。在

第一个方法中，采用含有与外源插入基因同源序列的探针进行 D N A—D N A 杂交来检测插入表达载体的外源基因的存在。在第二种方法中通过检测由载体中插入基因引起的某种“标记”基因功能是否存来鉴定和选择重组载体/宿主体系（例如，胸苷激酶的活性，对抗生素的抗性，转化表现型等）。例如，如果外源基因插入载体的标记基因序列中，则含有 D N A 插入片的重组子就可根据标记基因功能的缺失而鉴别，第三种方法中，通过检测重组子表达的外源基因产物来鉴定重组表达载体。这种检测基于基因产物的物理性质、免疫学性质和功能特性。

例如，当根据本发明构建一重组疫苗病毒时，含有 P 9 7 编码序列的嵌合基因被插入胸苷激酶基因上，从而引起钝化并赋予病毒一 T K⁻ 缺陷型。这样的重组子可用它们在培养基中空长能力来挑选，该培养基含有——核苷酸类似物——5 溴脱氧尿嘧啶，它能使 T K⁺ 细胞致死而不杀死 T K⁻ 细胞。进一步用特异于癌相关蛋白质的 C D N A 探针进行 D N A—D N A 杂交鉴定重组子。T K⁻ 重组病毒可用空斑——纯化方法分离，并从感染的培养细胞中制备原种。检测重组病毒诱导 P 9 7 相关肽的合成能力。为此，感染细胞可生长在放射标记的氨基酸中，然后所感染的放射标记的细胞的溶胞产物和亚细胞组份与抗天然黑素瘤相关 P 9 7 抗原的抗体做免疫沉淀试验。免疫沉淀的产物用 S D S—PAGE 分辨。感染的细胞还可用单克隆抗体进行免疫荧光检测。

由转染作用引入了质粒载体的细胞可方便地用 F A C S 分析方法或聚酯被膜上细胞菌落复制物结合实验来鉴别。所出现的 P 9 7 相关肽的量可用定量免疫荧光方法确定，其亚细胞水平定位可通过细胞分级及免疫荧光显微技术确定。所表达的 P 9 7 相关肽的结构可用 S D S—PAGE 和氨基酸顺序分析确定。

5 · 3 · 2 从表达载体——宿主体系中纯化 P 9 7 相关肽

许多癌相关抗原例如 P 9 7 是细胞表面糖蛋白，含有一个 N 末端信号肽和一个 C 末端终止肽 (Davis et al, 1985, J Mol Biol 181: 111-121)。在一适当载体中表达时，希望此蛋白质被转移到细胞表面。为简化该蛋白质的纯化，最好删除编码膜终止区的 DNA 序列，这样成熟的蛋白质就被释放至培养基中。

P 9 7 相关肽可以从那些宿主细胞中纯化，用去污剂溶胞，然后用单克隆抗体亲和层析。如果要从培养基中纯化一个截断的蛋白质，建议使用无血清培养基然后用单克隆抗体进行亲和层析。重要的是使抗原从抗体吸附物上洗脱下来而不降低其抗原性，也不变性。这一点可通过升高或降低 PH 值也可用 — Chaotropic 而实现。可能需要选择一种单克隆抗体，其在相对温和条件下即释放抗原。亲和 — 纯化的抗原可用 HPLC 进一步纯化。

5 · 4 P 9 7 相关肽的免疫学特性

首先在实验动物体内评价合成的或重组抗原诱发抗癌应答的能力。是这样实现的：构建一个模型体系，其中人类黑素瘤相关 P 9 7 蛋白质在实验动物的适当纯系种细胞中表达。然后采用不同的方法将本发明的 P 9 7 相关肽给动物免疫，接着检测直接抗黑素瘤相关 P 9 7 抗原的抗体的发育情况，对 P 9 7 抗原的细胞介导的免疫反应如迟发型过敏反应，及排泄表达 P 9 7 抗原的活的同源瘤细胞能力。此外，体外检测细胞免疫反应以测量 P 9 7 相关肽引起的淋巴细胞增生，以及免疫的动物或人类黑素瘤患者的淋巴细胞杀死表达 P 9 7 抗原的癌细胞的能力。更多地，通过用小鼠 P 9 7 免疫小鼠可以确定诱发 — 仅以痕量存在于正常组织的抗原的免疫应答的可能程度。

用非人类灵长动物建立本发明的 P 9 7 相关肽的安全性。为此目的，免疫动物时采用那些能合理应用于人类癌症患者的免疫方式，然后象上

面所述那样测试，但瘤移植实验将是不适宜的，因为这样需要采用纯系动物。检查免疫对所免疫动物一般健康的效应（体重变化，热度，食欲，行为）及尸检病理学变化以确定免疫程序的安全性。

最后本发明的 P 9 7 相关肽可在人类癌症患者体内试验。在起始阶段 I 试验癌症重患者，确认无毒性，再试验恢复期但有高可能性复发的癌症病人。他们的免疫应答可以用上面叙述过的非人类灵长动物的实验方法来评价，除去还要检测治疗对于确认的疾病或其复发的频率的效应。在黑素瘤抗原 P 9 7 良性痣（痣）的情况下，其表达该抗原，也将被检测。

5 · 5 疫苗配方

本发明的这个实例目的在于用合成或重组 DNA 技术生产——合成肽，一纯化的蛋白质或一重组病毒其可用作免疫原和疫苗来保护癌症病人冒复发疾病之险，治疗所确认疾病，最后预防性接种于“冒险”患者。事实上，合成的或重组的黑素瘤相关 P 9 7 抗原用来与其它免疫原结合制备多价疫苗防治黑素瘤和其它癌症。下面讨论了不同疫苗配方的实例。

5 · 5 · 1 病毒疫苗配方

当本项发明的 P 9 7 相关肽由一重组病毒产生，可以配制成活重组疫苗病毒或失活的重组疫苗病毒。这种选择取决于用来表达 P 9 7 相关肽的重组病毒的特性。当重组病毒感染至一被免疫的宿主细胞但并不致病时，最好用活疫苗，因为在宿主中的多重复制会导致与发生于天然无症状感染具有相似种类和幅度的延长的刺激，于是给出了相当大的持久免疫。感染的重组病毒引入宿主以后，可以从它的嵌合基因表达 P 9 7 相关肽，刺激一免疫应答。活重组病毒本身可以作为抗黑素瘤的防治疫苗。生产用于这些配方的这类重组病毒可包括体内和体外两种体系（体

外例如组织培养细胞，体内如天然宿主动物比如奶牛)。制配活重组病毒疫苗可以采用制备天花疫苗的方便的方法。

多价活疫苗病毒可以一个或多个感染的重组病毒制备，这些病毒表达不同瘤或癌细胞的多种抗原。例如，一疫苗病毒（其可容纳35,000碱基对的外源DNA）可被加工使含有编码其他抗原决定簇的序列；在多价疫苗中这样一重组疫苗本身可作为一免疫原。另外，疫苗和/或其他病毒的混合物，每种均具有指导编码不同抗原决定区的不同基因的表达，可制配成为多价疫苗。

无论重组病毒是否感染所免疫的宿主，均可制备一失活疫苗。失活疫苗损失了感染性，通常是用甲醛处理，在此意义上它们是“死”的。理想情况下该病毒的感染性被损坏，但并未影响该病毒携带免疫原性的衣壳或包被蛋白。为制备失活疫苗，要在培养基中生长大量重组病毒以便提供所需相关抗原的量。表达不同抗原决定簇的失活病毒混合物可用来制配“多价”疫苗。在一些例子中这也最好用于活疫苗的配制，由于一起施用的活病毒的相互干扰这个潜在的困难。在两种情形下失活的重组病毒或病毒混合物可用适当佐剂制配以便增强其对它们的抗原的免疫应答。合适的佐剂包括但不限于：矿物胶如氢氧化铝凝胶；表面活性物质如溶血卵磷脂；多元醇；多阴离子；肽；及油乳剂。

可用许多方法引入上述疫苗配方；包括但不限于皮下，肌肉，腹膜，静脉，皮下和鼻内通道。采用一活重组病毒疫苗配方时可通过亲本野生型病毒天然感染通道引入，这种野生病毒在疫苗配制中用于制备重组病毒。

5·5·2 亚单位疫苗配制

在一可供选择的病毒疫苗方案中，在亚单位疫苗配方中P97相关肽本身可作为免疫原。亚单位疫苗只包括免疫宿主所必需的有关的免疫

原物质。据此，P 9 7 相关肽可从表达该肽的重组子中纯化。这类重组子包括前面描述的任何一种病毒—感染培养细胞，细菌转化体或酵母转化体。在本发明的另一例子中 P 9 7 一相关肽或蛋白质可用化学方法合成。

不论 P 9 7 相关肽是从重组子中纯化或是化学方法合成，最后产物均可调节至合适浓度与适当疫苗佐剂配制，包装待用。适当佐剂包括（但不限于）：矿物胶如氢氧化铝凝胶；表面活性物质如溶血卵磷脂；多元醇；多阴离子；肽；油乳剂。P 9 7 相关肽还可混合至脂质体，或与多糖及其他聚合物偶联而用于疫苗体系。

在 P 9 7 相关肽为一半抗原的例子中，即一个这样的分子，在与选择性地相关抗体反应时具有抗原性，但没有免疫原性，不能引起一个免疫应答，该半抗原可以共价地结合于一载体或免疫原分子，半抗原—载体可作为疫苗；例如，一个大蛋白质分子如血清清蛋白将给出与之耦联的半抗原所免疫原性。

6 实例：黑素瘤相关 P 9 7 抗原

在下面描述的例子中，从 P 9 7 M R N A 不同区域衍生的 C D N A 克隆一起收集并插入一指导 P 9 7 相关肽的表达的表达载体。由表达载体—宿主细胞产生的 P 9 7 相关肽可制备在一疫苗中。

6 · 1 P 9 7 M R N A 的纯化

多核糖体是用 Mg 沉淀方法从 S K—M E L 2 8 黑素瘤细胞制备的 (C a r e y e t a l, 1 9 7 6, P r o c N a t l A c a d S c i U S A 7 3: 3 2 7 0—3 2 8 2)。这样制备的多核糖体带有 P 9 7 新生链，将其与特异于 P 9 7 不同抗原决定簇 (B r o w n e t a l, 1 9 8 0, J B i o l C h e m 2 5 5: 4 9 8 0—4 9 8 3; B r o w n e t a l, 1 9 8 1, J I m m u n o l

127: 539—546; Brown et al, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 539—543; Plowman et al, 1983, Nature London 303: 70—72)的3种IgG2a单克隆抗体(96·5, 118·1, 133·2)培养, 再用蛋白A—琼脂糖亲和层析而纯化。P97—富集的mRNA用EDTA洗脱下来再在寡聚(T)—纤维素(Bethesda Research Labs, Bethesda MD)上亲和层析纯化。在一典型的实验中, 150 E₂₆₀单位的多核糖体得到260ng P97—富集的mRNA, 其代表0·23%全部mRNA, 在Xenopus卵细胞中翻译并检测P97(见Brown et al, 1981, Proc, Natl Acad Sci USA 78: 539—543; Plowman et al, 1983, Nature London, 303: 70—72), 每ng mRNA得到80Pg P97富集的mRNA, 而每ng mRNA只得到0·44Pg P97—未富集mRNA, 表明P97 mRNA活性被加强了180倍。P97 mRNA活性产率为42%。在网织细胞溶胞体系中的翻译过程表明(Pelham & Jackson, 1976, Eur J Biochem 67: 247—256), P97富集的mRNA编码了一个主要多肽, SDS—PAGE分析表明其分子量为84,000道尔顿, 在非富集mRNA翻译产物中检测不到, 被特异于P97的抗血清免疫沉淀。(图1)。我们断定这是P97的未经糖基化的前体。

6·2 CDNA克隆的制备和构建

下面叙述了两项技术用来构建从上面分离得到的mRNA模板转录的CDNA克隆。

6·2·1 寡聚(T)引导的CDNA克隆的构建

上面制备的P97—富集的mRNA用来作为寡聚(T)引导的CDNA合成之模板。CDNA按如下方式克隆到：PBR322为合成第一条CDNA，P97富集mRNA，四种dNTPS和寡聚(T) (Collaborative Research, Waltham, MA)与反转录酶培育(分子遗传学来源)。合成第二条链是与大肠杆菌大片段DNA聚合酶培育(Bethesda Research Labs, Bethesda MD), 双链CDNA用SI核酸酶消化(核酸酶由D Durnam of The Fred Hutchinsen Cancer Research Center, Seattle, WA提供)。然后用末端脱氧核甘酸转移酶加上dC尾巴(Bethesda Research Labs Bethesda, MD), 与PstI 消化过的dG—尾的PBR322退火(Bethesda Research Labs, Bethesda, MD) (Villa—Komaroff et al, 1978, Proc Natl Acad Sci USA 75: 3727—3731), 然后用来转化CaCl₂ 处理过的大肠杆菌RR1。转化细菌的菌落中得到的DNA被结合到纸上(Taub & Thompson, 1982, Anal Biochem 126: 222—230), 用在P97—富集的和未富集的mRNA模板上合成的CDNA探针进行分化杂交来进行筛选。

一个243碱基对的克隆子，P97—3a2f1已被鉴定，其能与P97—富集CDNA杂交而未检出与未富集CDNA的杂交，在杂交—选择翻译实验中选择P97 mRNA。一个多腺甘酸化信号(AATAA)和一个多聚(A)片段出现于CDNA的3'末端(见图2)。缺刻翻译的P97—3a2f1与P97富集mRNA杂交强

于与未富集黑素瘤 mRNA 100倍，检测不到其与成纤维细胞 mRNA 的杂交。用克隆的 cDNA 作为探针进行 Northern 吸印分析鉴别出一段约 4 kb 的 mRNA，其出现于 SK-MEL 28 黑素瘤细胞而不出现在成纤维细胞。

6·2·2 P97 基因组克隆及合成寡聚核苷酸引导 cDNA 合成

试图从多腺苷酸化位点得到多于 1 kb 的 cDNA 克隆没有成功，可能是由于一个具有伸展的二次结构高 GC 含量区（多于 80%）。基因组克隆用来克服这一困难。从 lambda L47·1 文库中分离得到四个交叉的基因组克隆，其含有富集了一特异的 P97 限制性片段的按大小分级得到的 SK-MEL 28 的 DNA。这四个基因组克隆跨越 28 kb 并含有 P97 的整个编码区，包括该基因的调节区。这些基因组克隆从 5' 到 3' 按顺序排列为：lambda B15，lambda H17，lambda B6·6，和 lambda E7·7。命名中含有的字母代表用来产生该片段的限制酶，数字表示被克隆入 lambda L47·1 的片段的大小（kb）。因此从 5' 末端开始，lambda 克隆子 B15 含有一个 15 kb BamHI P97 片段；lambda 克隆子 H17 含有一个 17 kb HindIII P97 片段；lambda 克隆 B6·6 含有一个 6·6 kb BamHI P97 片段；lambda 克隆 E7·7 含有一个 7·7 kb EcoRI P97 片段（见图 2A）。该克隆的在 Northern 吸印上与 4 kb P97 mRNA 杂交的限制性片段被测了序列，并借助于计算机检查了人和鸡的铁传递蛋白的预言的编码顺序和氨基酸顺序间的同源现象从而鉴定了 P97 外显子。（Yanq et al, 1984, Proc Natl, Acad, Sci USA 81:

2752—2756; McGilivray et al, 1982
Proc Natl Acad Sci USA 79: 2504—
2508; Jetsch & Chambon, 1982, Eur
J Biochem 122: 291—295)。

三个合成的寡聚核苷酸(其顺序是基于P97基因组外显子序列)用来引导在SK—MEL28 mRNA上cDNA的合成,按下法将所得到的cDNA克隆入lambda—qt10: P97 cDNA是有dG尾巴并与一桥式寡聚核苷酸(AATTC C C C C C C C C C C C C)和预先用EcoRI限制切割的lambda—qt10连接。桥式寡聚核苷酸允许dG—结尾的cDNA序列插入并连接到lambda qt10的EcoRI位点。lambda噬菌体被包装(Gisvold et al 1981, Gene 13: 227—237),倒平板于大肠杆菌C600 r⁻mk⁺hfl。lambda—qt10中的cDNA文库用空斑杂交(Benton & Davis, 1977, Science 196: 180)以基因组外显子片段作为探针筛选是否有P97插入。该探针通过缺刻—翻译用³²P—TTP(New England Nuclear, 3200 Ci/mmole)放射标记,比活为5—10×10⁸ Cpm/μg。跨越了P97 mRNA的2,368核苷酸的三个重叠cDNA克隆(10a11j1, 2f1),包括全部编码区,用P97外显子特异性片段作为探针来鉴定。(见图2)

6.3 P97的DNA序列分析

切断cDNA插入片,再克隆入大肠杆菌中的质粒载体PEMBL18+ (Dente et al, 1983, Nucleic Acids Res 11: 1645—1655)以便进一步增殖和

做限制酶切图谱。CDNA也被再克隆入M13mp18噬菌体克隆载体(Yanish-Perrone et al, 1985, Gene 33: 103-119)并用Sanger的双脱氧方法测定序列(Sanger et al, 1977, Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467)。含有大插入片段的M13克隆是用DNase I产生缺失而测序列(Hong, 1982, J Mol Biol 158: 539-549)或是用核酸外切酶III(Henikoff, 1984, Gene 28: 351-359),或是用合成的21一个寡聚核苷酸引物产生这种缺失。

P97 CDNA顺序示于图3。一个2, 214核苷酸的开放解读密码始于第一个ATG, 其周围的顺序与Kozak确定的最初序列一致(Kozak, 1980, Nucleic Acids Res 8: 127-142), 到2, 215位上的TGA。大多数5' CDNA克隆在起始ATG上游含有一个附加的60核苷酸。P97 mRNA的3'非编码区, 其不能作为一CDNA克隆得到, 是作为含1, 667核苷酸的单个基因组外显子而被识别的。预言的氨基酸顺序的20-32残基是与已知的P97 N末端氨基酸顺序一致的(Brown et al, 1982, Nature, London 296: 171-173), 证明了所克隆的CDNA的均一性。此外, 该前体的预计的分子量是80, 196道尔顿, 与体外翻译产物中观察到的分子量极为一致。

6.4 构建一含有P97编码序列的重组表达质粒

P97基因的大片段需要拼合CDNA克隆, 该克隆是用反转录酶特异地引导黑素瘤mRNA而得到的。使用了包含从信号肽到膜终止序列的编码区的三个CDNA lambda gt10克隆(10al,

1 j 1, 1 f 1; 见图 2)。克隆 1 0 a 1 的 P 9 7 插入片段用 E c o R I 消化切割, C D N A 1 0 a 1 5' 端的寡聚 (d G) 序列用核酸外切酶 III 消化而移去, 得到一个带有在 P 9 7 前蛋白起始蛋氨酸上游 3 0 b p 处的 H i n d III 位点的克隆 1 0 a 1 b。三个 C D N A 克隆 1 0 a 1 b, 1 j 1, 2 f 1 及基因组克隆 E 7 · 7 的 P 9 7 插入片段在 P v u II, S s t I 和 E c o R I 限制性酶位点连接并插入质粒载体 P E M B L 1 8 + 的 H i n d III - E c o R I 位点 (D e n t e, e t a l, 1 9 8 3, N u c, A c i d R e s 1 1: 1 6 4 5 - 1 6 5 5) 如图 2 所示。P 9 7 b 的最后的结构, 含有质粒载体 P E M B L 1 8 + 中 4 · 4 k b P 9 7 插入片段, 该载体用来转化大肠杆菌 H B 1 0 1。P 9 7 b 中的插入片段含有 P 9 7 m R N A 的 3 0 b p 的 5' 未翻译区, 全部编码序列, 以及 3' 未翻译区, 被 5' H i n d III 区和 3' E c o R I 区连接。

4 · 4 k b p 的 P 9 7 插入片段用 H i n d III 和 E c o R I 从 P 9 7 b 切下, 末端用大肠杆菌 D N A 聚合酶大片段填补。平整末端片段插入真核细胞 C D N A 表达载体 1 9 9 5 · 1 2 P U C 1 3 的唯一的 S m a I 位点, 该载体是从 m T h G H - 1 1 2 衍生得到, (P a l m i t e r e t a l, 1 9 8 3, S c i e n c e 2 2 2: 8 6 9 - 1 4), 从 D r R i c h a r d P a l m i t e r 得来 (U n i v o f W a s h i n s t o n, S e a t t l e, W a s h i n g t o n)。这个载体使用小鼠金属硫因启动子在真核细胞中表达外源基因。用限制分析鉴定正确取向的 P 9 7 插入片段的结构, 并记作 P M T P 9 7 b。

重组质粒转染至 L M T K⁻细胞, 由在 H A T 培养基中生长来挑选转染物。从转染皿上挑出的克隆放在 9 6 孔板上铺展, 复制板上用过的培养基和溶胞产物采用两点放射免疫方法检测 P 9 7。再克隆也被铺展并再一次检测。每细胞约表达近 4, 0 0 0, 0 0 0 分子 P 9 7 的

TKMP97-12克隆生长起来，用镉诱发，作为免疫用P97来源。

6.5 用P97相关肽免疫小鼠

TKMP97-12细胞在镉诱发下生长，(14.49)冰浴下与70ml TNE N (20mM Tris-HCl, PH8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40) 培育10分钟而溶解。溶胞产物在200,000×g 4℃下超速离心45分钟，一半溶胞产物通过特异于P97的1ml免疫亲和柱(抗体96.5的Fab片段与琼脂糖耦联。)广泛冲洗免疫吸附物，先用TNE N，再用20mM Tris-HCl, PH6.8。

为进行免疫，0.5ml如上所述制备的吸附免疫亲和柱与0.5ml 20mM Tris-HCl混合，PH6.8，再与1ml完全的付氏佐剂乳化。BALB/c小鼠四只，每只腹腔注射0.4ml乳剂。三周后用这个不完全付氏佐剂抗原量的1/4给小鼠以增强免疫力。对照小鼠是用一不相关P97的抗体的免疫亲和柱免疫，在鉴定上另外处理。增强免疫力的辅助佐剂施用后一星期将4只P97免疫小鼠与两只对照小鼠放血，血清用来采用免疫沉淀法测放射性碘处理过的SK-MEL黑素瘤细胞P97的抗体，然后走SDS-PAGE。结果表明4只P97免疫小鼠的血清能沉淀P97，而对照小鼠的血清是阴性的。该血清还可用来在戊二醛—固定SK-MEL28黑素瘤细胞上用ELISA方法检测直接抗P97的抗体的出现(每微孔20,000细胞)。固定的细胞与稀释1/10,000的0.5ml血清室温下温育1小时，冲洗，再与0.05ml辣根过氧化物酶连接的羊抗小鼠IgG温育(Southern Biotech)。P97免疫小鼠的血清密度(在490nm读)为0.350, 0.243, 0.343, 0.200, 对照小鼠的先密度为0.036和0.057。

6·6 P97的特性

6·6·1 P97结构

P97结构是从含4个结构域的P97前体的氨基酸序列确定的。由于前体顺序的残基20对应于成熟P97的N末端，残基1—19可能构成一信号肽，它的长度和疏水性支持这一结论。氨基酸20—361和362—713含有第342和352位氨基酸的两个同源区。潜在的N连接的糖基化区出现于N—末端区的位置38和135，及C末端区的515位。最后，我们相信氨基酸714—738，主要是不带电荷的疏水残基的区域，固着P97于细胞膜上(Davis et al, 1985, J Mol, Biol, 181: 111: 127)并可延伸至细胞质。

蛋白酶消化实验支持了上述P97域的结构。用胰酶，木瓜蛋白酶(Brown et al, 1981, J Immunol 127: 539—546)或凝血酶消化P97得到一糖基化的分子量约40,000道尔顿的抗原片段。该片段从P97的凝血酶消化产物中纯化得到，此时P97就代谢讲用³⁵S—蛋氨酸或³⁵S—半胱氨酸标记，如已叙述的那样测定了其顺序。(Brown et al, 1982, Nature, London 296: 171—173)。在7和17位鉴定为半胱氨酸残基，2及20位是蛋氨酸残基。鉴定结果是用完整P97获得的，并与从CDNA顺序预言的N末端顺序完全一致。我们认为40,000道尔顿分子量的抗蛋白酶片段对应于P97 N末端区。我们不能分离出P97 C末端区，可能因为它对蛋白酶敏感。

6·6·2 P97与铁传递蛋白同源

检查蛋白质鉴定源的氨基酸序列库(Release 5·0; Dayhoff et al, 1981, Nature, London

290: 8) 表明 P97 与铁传递蛋白总科的三个成员惊人地相似, 人血清铁传递蛋白, 人乳清铁传递蛋白和鸡铁传递蛋白 (37%—39% 同源性, 见图 4)。由于人类和鸡铁传递蛋白彼此呈现 50% 同源性, P97 一定在超过 300, 000, 000 年前就与血清铁传递蛋白歧化了。P97 有 14 个半胱氨酸残基位于每个域的同源位置。人铁传递蛋白在两个区的同源位置上含有全部这些半胱氨酸残基, 而人乳清铁传递蛋白和鸡铁传递蛋白缺少两个这样的半胱氨酸残基 (在它们的 C 末端区)。与 P97 不同, 这些蛋白质在 C 末端区含有 4—7 个另外的半胱氨酸, 而在 N 末端区没有对应的成员。人铁传递蛋白在 N 末端区还含有二个额外的半胱氨酸。已直接确定了人血清铁传递蛋白, 乳清铁传递蛋白和鸡铁传递蛋白中大部分双硫链的位置 (McGillivray et al, 1982, Proc Natl Acad Sci USA 79: 2504—2508; Metz-Boutique et al, 1984, Eur J Biochem 145: 659—676; Mazurier et al, 1983, Experientia (Basel) 39: 135—141; MacGillivray et al, 1983, J Biol Chem 258: 3543—3552; Williams et al, 1982, Eur J Biochem 122: 297—303; Williams et al, 1974, Biochem J 141: 745—752)。因此, 可预料在 P97 的每个域中将存在 7 个双硫链 (见图 5)。

P97 域之间的氨基酸同源性 (46%—将 9 个残基插入 7 个空档中) 比人传递铁蛋白 (43%—16 个空档, 45 残基) 或鸡铁蛋白 (35%—12 个空档, 49 个残基) 更显著。给出 P97 与转铁蛋白之间伸展序列同源性, 及其相似的弯折形式, 基于半胱氨酸的保守性,

我们相信如果铁传递蛋白的低分辨率X射线扫描结构 (G o r i n s k y e t a l, 1 9 7 9, N a t u r e, L o n d o n 2 8 1:1 5 7 — 1 5 8) 可以多精制的话, 则有可能推导出P 9 7 三级结构。

6 · 6 · 3 P 9 7 的功能

它是铁传递蛋白总科中的一个成员, 它能结合铁 (B r o w n e t a l, 1 9 8 2, N a t u r e L o n d o n 2 9 6:1 7 1 — 1 7 3) 以及它与铁传递蛋白一般的染色体定位和铁传递蛋白受体 (P l o w m a n e t a l, 1 9 8 3, N a t u r e, L o n d o n, 3 0 3: 7 0 — 7 2; Y a n g e t a l, 1 9 8 4, P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 1: 2 7 5 2 — 2 7 5 6) 所有这些表明P 9 7 在铁转运过程中起作用。认为铁传递蛋白结合铁的口袋含有2—3个酪氨酸, 1—2个组氨酸和一个碳酸氢盐结合的精氨酸 (M e t z — B o u t i q u e e t a l, 1 9 8 4, E u r J B i o c h e m, 1 4 5: 6 5 9 — 6 7 6)。这些氨基酸在P 9 7 中的保存支持了它参与铁代谢这一假设 (见图 4)。由于P 9 7 是一膜结合的类 传递蛋白分子, 并且与铁传递蛋白受体 有同源 (S c h n e i d e r e t a l, 1 9 8 4, N a t u r e, L o n d o n, 3 1 1: 6 7 5 — 6 7 8), 它在细胞铁代谢中所起的作用可能不同于由血清循环的铁传递蛋白和铁传递蛋白细胞受体所给出的那种作用。在真核细胞中克隆P 9 7 C D N A 的表达使有可能实验检测它的功能性质。

6 · 6 · 4 结论

基于以上事实, 很明显已得到了构建黑素瘤相关P 9 7 的C D N A, 它可在哺乳类细胞中有效表达而大量生产P 9 7 抗原。

7. 克隆 p97 的表达和疫苗试验

这些实验详细描述了克隆的 p97 蛋白的表达及其疫苗试验。p97 蛋白以分泌形式的表达 (通过受转染鼠细胞克隆 B16svp97a .14) 使毫克数量的标准长度的 p97 蛋白的纯化成为可能。将纯化形式的蛋白用于诱导细胞免疫的体外试验和作为亚单位疫苗它的潜力试验。p97 基因产物也在复代鼠黑素瘤细胞的细胞表面上得到表达, 为检测在防止肿瘤在有性生殖系统中生长方面疫苗的效能提供模型。

将 p97 基因插入到活牛痘重组体病毒中用作为能够导致有效的细胞免疫的疫苗配方。用各种证实体液免疫和细胞免疫的测定法评价重组体牛痘病毒, Vp97a- N Y 导致鼠免疫性的能力。利用如上所述的有性生殖鼠肿瘤模型, 证明 Vp97a- N Y 重组体病毒疫苗对肿瘤细胞的攻击有防止作用。该疫苗在具有现存的发育肺转移的鼠中也提供治疗作用, 这一特性类似于所提出的将疫苗用于在黑素瘤患者中免疫治疗抗肿瘤应答。

除了鼠的研究之外, 在人的 p97 和鼠的同源蛋白之间仅有 91% 的同源性之外 (在迄今所测验的区域中), 已在非人类的灵长类动物中试验了 Vp97a- N Y 疫苗。在人的 p97 和猴的蛋白之间有更为接近的同源性 (如在单克隆抗体水平上的交叉反应性所展现的)。由于在对“自身”蛋白产生疫苗应答的潜在困难, 所以使用近亲猕猴试验 Vp97a- N Y 疫苗的免疫原性。重组牛痘疫苗在猴中进行试验并表明可诱导对 p97 蛋白的体液免疫。到目前为止, 猴在 6 个星期内接受两次活重组牛痘疫苗接种以后, 没有表现出由于暴露于疫苗中而产生的毒副作用的明显症状。

7.1. 质粒表达

由 S V-40 早期启动子 S V 引发的表达质粒由 c D A N 质粒克隆 p97a 组建, p97a 与质粒 p97b 是相似的, 所不同的是整个 3' U T 区都被利用 (图 6)。从带有如前所述的合成 Eco R I-d G (9-17) 衔接物的 λ gt 10 库中最初分离出全部 c D A N 克隆。用 Eco R I 切除插入物并再克隆成为 p E M

B L18+, 然后繁殖并记录特性。再将克隆10a1克隆为M13mp18并用 Bam H I 和 Sph I 水解 R F 形式, 用外切核酸酶 III 简单处理, 用 S 核酸酶使之钝圆, 用 Klenow 处理, 并重新连接。使几个噬菌斑分离并序列化, 其中之一除去 dG 尾并保留插入到 M13mp18 的 Hind III 位点上的 p97s' 未翻译区的 33 对碱基。该亚克隆 (10a1a) 的 R F 被用来产生完整的 p97 cDNA; 另外, 从质粒亚克隆中分离出所有片段。将来自 10a1a 的 550bp Hind III - Pvu II 片段和来自 1j1 的 735bp Pvu II - Sal I 片段从琼脂糖凝胶中分离出来并连接到 Sal I 和 Hind III 位点的 pEMBL18+ 上, 生成 p5'p97。在 pEMBL18+ 中的 E7.7 染色体克隆被 Eco R I 水解完全并用 Sst I 部分水解, 通过 0.8% LMP 琼脂糖的分馏分离 4.5kb 片段。将 4.5kb 3' 片段与来自 2f1 的 404bp Sst I 片段和来自 1j1 的 535bp Bam H I - Sst I 片段连接到 Sal I 和 Eco R I 位点的 pEMBL18+ 上, 生成 p3'p97。然后将 ps p97 的 1285bp Hind III - Sal I 片段连接到 p3'p97 上, 生成 pp97a。将来自该克隆的 Eco R I - 部分 Hind III 片段插入到 Hind III 和 Eco R I 位点上的 psv2neo 中 (Southern, 等人, 1982, J. Mol. App. Genet. 1: 327-341), 排除新霉素编码区和 sv40 拼接/poly A 序列而保留 sv40 早期启动子和 72bp 增强病毒, 33bp p97 5' UTR, 整个 p97 编码区, 3' UTR 和 1.4 Kb 3' 侧面 DNA。生成的质粒被称为 psvp97a。

SV 引发的质粒通过磷酸钙沉淀转染到各种真核细胞株中, 将表达细胞克隆并用显性因子可选择标记的共转染筛选。为此, 在含有 15% 小牛胎儿血清 (FCS), 4mM L- 谷氨酰胺, 1.3mM 脯氨酸, 和抗生素的 Hank's F₁ 培养基中培养中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在含有 0.15% 碳酸氢盐的培养基中培养 B16 细胞并且在 DMEM 培养基 (Gibco) 中培养 1735 细胞, 两种培养基都补充有 15% FCS, 和抗生素。通过修饰的磷酸钙技术 (Wigler M. 等人, 1978, Cell 14: 725-731) 分别用每个平板 20 μg 的 pSV2p97a 质粒 DNA 和 0.5 μg 的 pSV2DHFR 或

p S V2neo使细胞转染。在 Eco R I位点上使所有质粒线性化用 CHO细胞所用的次黄嘌呤缺陷 (H A T-)培养基或 B₁₆ 和1735细胞所用的0.5 μg/ml Geneticin (G418, Gibco) 筛选合适的转染子。转染7天后存活细胞开始形成可见的集落并用固定在玻璃珠上的无菌聚酯滤纸覆盖。滤纸在适当的位置保持5天,使细胞生长到聚酯基质中,在平板上生成集落拷贝。然后除去滤纸并用于活细胞与碘化抗p97单克隆抗体的结合测定。在10ml F C S中将10微克标记的单克隆抗体与20张滤纸一起在4℃温育1小时。用磷酸盐缓冲盐水 (P B S) 充分洗涤滤纸,干燥并在-70℃下暴露于 X A R-5薄膜上过夜。然后用7%亚甲基兰染色使细胞集落可见。除 B鼠细胞株外,所用的所有细胞株中,表达细胞在其细胞表面都含有抗原 p97 蛋白。

在 B₁₆ 转染细胞中, p97 是该细胞类型释放到培养基中的唯一发现物。p97的分泌使得从细胞培养基中提纯标准长度的p97蛋白成为可能。克隆 B₁₆svp97a.14 在余下的培养基中表达了大约4 μg/ml的p97。从用过的转染 B₁₆ S Vp97a.14 克隆的培养基中提纯出重组p97,该克隆将大量p97抗原排到培养基中。在850cm²的摇瓶中不断加入少量新鲜培养基使细胞维持在接近于融合状态(10⁷细胞)。它们可以不必分离而几星期连续排出抗原,并可连续收集并冷冻用过的培养基。用免疫亲和层析法,用与单克隆抗体96.5的 Fab片段键合的琼脂糖完成p97的纯化。为此,使3升用过的培养基流过三个系列的30ml柱。第一个柱装有15ml G-25 超细葡聚糖

(Pharmacia产品),第二个柱装有20ml琼脂糖4b (Pharmacia产品),第三个柱装有8ml 连接单克隆抗体96.5的 Fab片段上的溴化氰活化琼脂糖

(Sigma产品)(10mg蛋白/ml琼脂糖)。然后,用冷 P B S彻底洗涤亲和柱并用30ml 0.1M的柠檬酸盐(pH5)和30ml 0.1M的柠檬酸盐(pH4)洗脱抗原。这些条件不会改变抗原的免疫活性,同时还能将抗原从单克隆抗体96.5上完全洗脱下来。分别用3.0ml和4.5ml的 2M Tris (pH8)中

和这两种洗脱液。用带有 PM10 滤器的 Amicon 装置浓缩纯化的洗脱液，并用两份 10ml 体积的 P B S 洗涤，用 Bradford 测定法 (Biorad) 测得最终产率为 4.5ml 内含 4.95mg。用 15 μ g 产物进行 SDS-PAGE (图7) 并同时用考马斯兰和银染色法使产物显色。双决定簇免疫测定法

(DDIA) (Brown, 等人, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:539) 提供了克分子数量纯化蛋白的唯一证据。用亲代 B₁₆ 细胞株所用的培养基同时进行对照制备，未看出可检测的蛋白质。在后面的制备中，从 300mg 连接到琼脂糖上的单克隆抗体 96.5 Fab 片段中提纯出 30mg 95% 纯 p97 蛋白。纯化 p97 蛋白是致免疫的，可在用如在下文 7.3 节中所述的蛋白免疫的鼠中产生强烈的抗体应答。

7.2 重组 p97 疫苗病毒的构建和表达

p97 的编码区用 Hind III 切，将末端转变为平整末端，然后插入到疫苗插入载体 pGS-20 (Mackett et al., 1984, J. Virol. 49:857-864)，而该载体的 Sma I 位点已被打开。PGS-20 载体使用 7.5 K 启动子，并含有疫苗胸苷激酶 (TK) 基因来的侧翼序列。用 Mackett et al., (上述) 的方法产生重组病毒，并分离出 Vp97a-NY，它能使被浸染的细胞表达具有正确大小的 p97 蛋白质和糖基化 (图8)。在重组 p97 病毒侵染的细胞中也确定了 p97 的表面表达 (下表 I)。

表 I

转染的小鼠细胞和用重组疫苗病毒 1 侵染的细胞的表面 p97 表达

细胞种类	侵染细胞用的病毒	每个细胞所表达的 p97 的分子量
M2s vp97a . A	无	3,210,000
M2s vp97a . E/ F2	无	434,000
M2 亲本	无	2,000-
B S C	无	5.590

B S C	Vwt - N Y疫苗	5,220
B S C	Vp97a- N Y疫苗	1,140,000

1. 先对细胞稍稍胰化，清洗后，再以等分试样加到含 10^3 至 10^4 或 10^5 个细胞的试管中。再向试管中加入少量的非表达运载细胞，使每管中的细胞总量为 10^5 。将 1×10^6 cpm 的碘化了的单克隆抗体96.5 (123ng) 与细胞一起在冰上保育60分钟，总体积为50微升。清洗细胞，在P B S+ 10% 小牛血清中离心4次，再悬浮，于Micromedic 4/600 plus gamma计数器上计数。

(一) 明显小于。

7.3 重组p97 疫苗病毒在小鼠中为免疫性

用 Vp97a- N Y接种小鼠产生了强烈的体液抗体应答。小鼠免疫一次，在第4周时补一次，在第5周时放血。用E L I S A方法确定效价，使用抗原包被的板，并用结合有辣根过氧化酶的蛋白质A作为检测试剂。与用抗-p97单克隆抗体133.2制作的E L I S A结合标准曲线相比较，将数据换算为单克隆抗体等同物。其结果表明了强烈的血清抗体的诱导作用

(图9)。细胞免疫性是用体外增殖检测和以纯化的p97蛋白作为刺激剂来测定的(表II)。

表II

小鼠脾细胞的增殖检测

刺激剂	V P97重组体免疫 脾细胞的增殖指数	对照脾细胞 的增殖指数
Con A (10 μ g/ml)	71	50
p97 蛋白质 (3 μ g/ml)	27	2
(10 μ g/ml)	43	2
(20 μ g/ml)	56	2

(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	44	3
紫外光灭活的疫苗病毒 (10^7 pfu/ml)	91	2
p97 转染的辐射过的同基因的瘤细胞 (10^4)	86	2
亲代辐射过的瘤细胞 (10^4)	3	1

1. 脾细胞取自小鼠，小鼠经尾部切口以 10^7 pfu Vp97a- NY 重组病毒接种，一个月后以相同剂量补一次，其后一周杀死。以首次用作试验的脾细胞为对照。在 96 孔圆底盘上的每个孔中培养 10^5 个细胞，孔中含 0.22 ml RPM I 并补加有 0.5% 正常鼠血清，青霉素/链霉素，谷氨酰胺，碳酸氢盐和 2.5×10^{-5} M 2-巯基乙醇。在第 4 天，每孔用 25 μCi 氘化胸苷 (New England Nuclear) 对培养物进行脉冲标记 6 小时，用 PHD 细胞收集器收集，用 Optifluor Beckman LS 3801 计数器计数。用对照的平均 cpm 值除以用每种抗原刺激的 4 孔的平均 cpm 值来计算出增殖指数。

表 II 中的结果表明 T 细胞对 p97 蛋白质抗原的应答为增殖。

为了确定免疫小鼠脾细胞中的重组病毒是否也刺激助细胞，则在体外刺激细胞，并且分析上清液来确定白细胞介素 2 (IL-2)，即一种助 T 细胞因子的产生。脾细胞取自预先用 Vp97a- NY 疫苗或亲代疫苗免疫过两次的小鼠。在 96 孔圆底盘中，以与增殖检测所用相同的培养基 0.2 ml 培养细胞 48 小时，可以有或没有刺激剂存在。收集上清液，每四孔合并在一起，在检测 IL-2 之前先冰冻。IL-2 检测使用 10 个预先去除了 IL-2 的小鼠 T 细胞系，即 CTL 细胞，将其在各个孔中与不同稀释度的检测上清液以及 Click's 培养基一起培养，重复三次。用从 Genentech, CA 处获得的重组 IL-2 建立一条标准曲线。在 24 小时培养期的最后 6 小时，根据常规增殖检测技术用胸苷对 CTL 细胞进行脉冲标记，然后按增殖检测方法所述收集并计数。表 III 中的结果表明，用重组 p97 疫苗病毒免疫的小鼠

脾细胞的 I L-2的生产是在体外受p97 刺激的结果。

表 III

用p97 免疫脾细胞刺激生产 I L-2

接种的免疫原	体外刺激	产生的 I L-2单位
Vp97a- N Y	p97 蛋白质 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	4.4
Vp97a- N Y	介质	0.25
Vwt - N Y	p97 蛋白质 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.25
Vwt - N Y	介质	0.25

此外，迟型超敏应答用 Vp97a- N Y接种的小鼠足垫肿胀检测法进行了测定。每组5 只小鼠，尾部切口接种重组的或亲代品系的疫苗病毒。6 天后，每只小鼠的后足接种20 μl P B S或20 μl 细胞存在于 P B S中 (5×10^6 细胞/ 每只鼠) 进行攻击。24小时后用 Fowler 测微仪以双闭式测量足垫。每只鼠受试足所测定的足垫厚度减去注射 P B S的足垫厚度，并计算肿大足垫的平均值和标准差。结果列于表 IV，这些结果表明了用重组 p97 疫苗病毒免疫小鼠对p97 特异性迟型超敏应答的诱导。

表 IV

p97 免疫小鼠的抗原特异性足垫肿胀

接种的免疫原	攻击抗原	足垫肿胀 ($\text{mm} \times 10^{-2}$)
Vp97a- N Y	p97 转染的同基因型瘤细胞	40.3 (+/-6.8)
Vp97a- N Y	亲代同基因型瘤细胞	3.0 (+/-2.8)
Vwt - N Y	p97 转染的同基因型瘤细胞	1.5 (+/-2.3)
Vwt - N Y	亲代同基因型瘤细胞	5.5 (+/-5.0)

7.4 p97 疫苗病毒在鼠瘤中的保护和诊断

为评价接种效率，使用本发明的重组p97 疫苗病毒以不同剂量接种小鼠，然后用p97 转染的同基型瘤细胞 (M2 S Vp97.a.2 E) 攻击。为此，用 Vp97a- N Y重组活疫苗病毒或亲代系 (Vwt- N Y) 在小鼠尾部切口接种；或用100 μg 纯化的p97 蛋白质或 5×10^6 个经辐射的M2- K1735瘤细胞与弗氏完全佐剂腹膜内接种。最后一次接种2 周后，静脉内注射M2 S Vp97a .2 E进行瘤细胞攻击，M2 S Vp97a .2 E是复代瘤克隆，是用含在受 S V40早期启动子控制的表达载体中的人p97 编码序列转染的M2- K1735 (鼠黑素瘤型) 制备的。筛选各种表达克隆，而用于瘤攻击的一种即M2 S Vp97a .2 E克隆，以中等水平表达p97,约为每个细胞400,000 分子或与人黑素瘤p97 抗原密度相等。使用了2 种静脉内瘤攻击剂量, 5×10^5 或 1×10^5 细胞，是从尾静脉注射给同基因型 C3 H/ Hen小鼠。瘤攻击后的第16天处死小鼠，取出肺脏。用墨汁染色后，能用肉眼看见肺部有瘤的小鼠被认为是阳性的。结果列于表 V。

表 V

用同基因型p97 转染的黑素瘤细胞攻击接重的小鼠

疫苗	免疫次数	攻击细胞量	明显肺转移的小鼠数
Vp97a- N Y	2	5×10^5	1/5
Vp97a- N Y	1	5×10^5	2/4
辐射过的同基因型 黑素瘤细胞	2	5×10^5	0/4
Vwt- N Y	2	5×10^5	9/10
p97 蛋白质	2	5×10^5	3/3
Vp97a- N Y	2	1×10^5	0/1
Vp97a- N Y	1	1×10^5	0/4

空白 0 1×10^5 5/6

表 V 中的结果表明，虽然用纯化的 p97 蛋白质疫苗未见有保护作用，但用 Vp97a. NY 免疫 2 次则有相当可观的免疫作用（不计引出的极高的抗体效价）。重组病毒引起细胞免疫的能力可能是负责它的保护性瘤免疫性。

在诊断试验中，用低剂量的 p97-表达瘤细胞接种小鼠，2 天后，用重组疫苗接种。用 10^5 或 10^4 p97-表达瘤细胞 (M2 S Vp97.a. E) 静脉内攻击小鼠。2 天后，小鼠尾部切口接种 Vp97a- NY 或 Vwt- NY。每周重复一次尾部切口接种，记录存活小鼠。结果见图 10，其说明了重组 p97 疫苗病毒接种有肺部转移的小鼠的诊断效应。

7.5 重组 p97 疫苗病毒在猴中为致免疫原的

2 只猴 (*Macaca fascicularis*) 用 2×10^8 噬菌斑形成单位 (pfu) 的 Vp97a- NY 重组疫苗或相同剂量的亲代系疫苗划线接种。2 周后用 ELISA 方法测试血清对疫苗和 p97 的效价。结果列于表 VI，其表明在用 Vp97a- NY 一次接种后 2 周时，可检测到对 p97 的体液抗体。

表 VI

接种疫苗的猴的血清抗体效价

免疫原 / 周	抗疫苗效价 (以 2 倍底物稀释血清)	抗 p97 效价 ($\mu\text{g/ml}$ 单抗等同物)
Vp97- NY / 周 0	1/20	0.54
Vp97- NY / 周 2	1/2000	6.54
Vwt - NY / 周 0	1/20	0.50
Vwt - NY / 周 2	1/2000	0.34

8. 微生物保藏

如下带有所列质粒的大肠杆菌已保存在美国样板培养物收集中心 (ATCC), 并获得了保藏号:

E. Coli 品系	质粒	保藏号
-----	-----	-----
E. Coli HB101	p97b	53,403

下述重组疫苗病毒已保藏于 ATCC, 保藏号如下:

病毒	保藏号
-----	-----
Vp97a- NY	VR2159

下述带有所列质粒的细胞系已被保藏于 ATCC, 保藏号如下:

细胞系	质粒	保藏号
-----	-----	-----
TKMp97-12 (鼠细胞)	PM Tp97b	CR L8985
B16 S Vp97a .14 (鼠黑素瘤细胞)	p S Vp97a	CR L9304

本发明并不受所保藏的微生物和细胞的限制, 因为这些保藏只是说明本发明的一个方面, 而且任何具有相同功能的微生物和细胞也都在本发明范围之内。的确, 本专业领域的技术人员根据前边的描述及附图可以明显地看出另外一些本发明的改型。这些改型均应落在权利要求的范围之内。

还应理解的是所给出的关于核苷酸的碱基对的大小均为大约的数字而且是为了描述的目的。

图. 1A

图. 1B

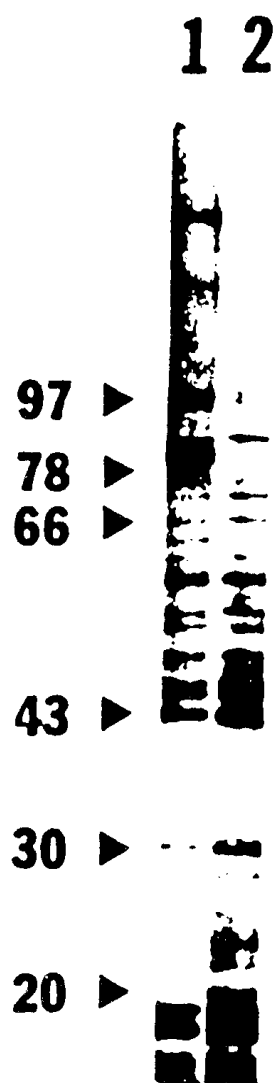


图 2A

p97 cDNA 构建

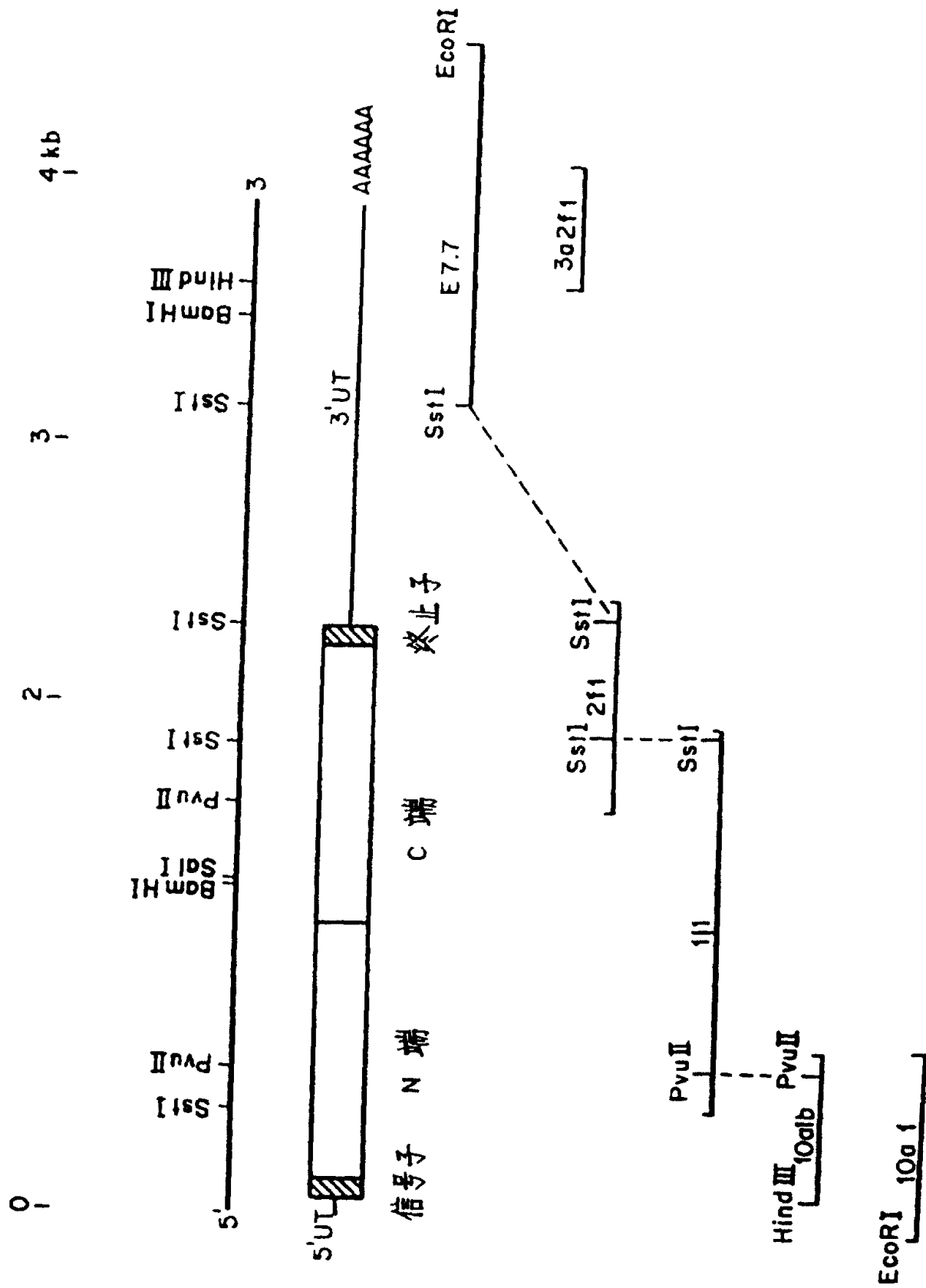
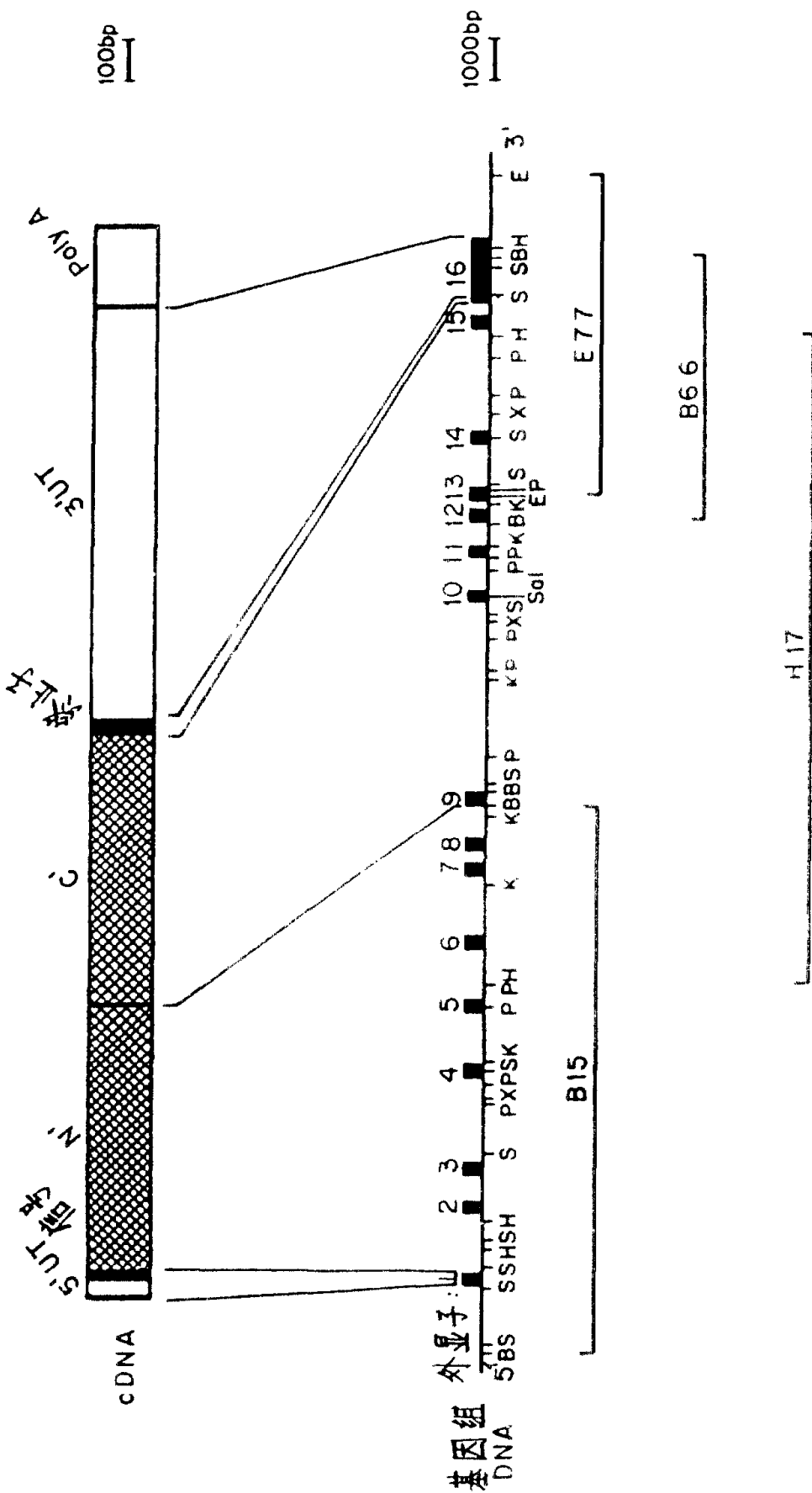


图. 2B



ATG CGG GGT CCC AGC GGG GCT CTC TCG TCG CTC GCG GAC TTC CTC GGA CCC AGC CCC AGC GGG GCG CCA GCG ACC CCC GAC GCG GCC
 MET ARG Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Ala Leu Arg Thr Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp 90 30
 UCA GAG CAG CAC AAG TCC GGC AAC ATG AGC GAG GCC TTC CCG GAA GCG GGC ATC CAG CCC TCC CTC CTC TCC GTC CCG GGC ACC TCC GCC
 Pro Glu Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala 180 60
 AAC CAG TCC GTC CAG CTT ATC GCG GCG CAG GCT GCT GAC CCC ATC ACT CTC GAT GGA GGA GGC ATC TAT GAG GCG GGA AAG GAG CAC GCG
 Asp His Cys Val Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly 270 90
 TCG AAG CCC GTC GTC GGC GAA CTC TAC GAT CAA GAG CTC GGT ACC TCC TAT TAC GCG GTC GCT GTG GTC AGC AGG ACC TCC CAT CTC ACC
 Phe Lys Pro Val Val Gly Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr 360 120
 GAG AAC ACC CTC AAA GCG GTC AAG TCC TCC GAG ACC GGC GGC ATC AAA GCG GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu Val Glu Ser 450 150
 GAG CGC CTC TCG GTC ATC GCG TCC GAT GTA CTC AAA GCT GTC AGC GAC TAT TTT GGG GCG AGC TCC GTC CCG GGG GCA GGA GAG ACC AGT
 Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu Thr Ser 540 180
 TAC TCT CAG TCC CTC TGT GCG CTC TCC AGG GGT GAC ACC TCT GCG GAA GCG GTC TCT GAC AAG ACC CCC CTC GAG AGA TAC TAC GAC TAC
 Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp His Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr 630 210
 GAG CGG GCG TTC CCG TCC CTC GCG GAA GCG GCT TTT GTC AAC CAC AGC ACC GTA CTC GAG AAC ACC GAT GGG AAG ACC
 Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr 720 240
 GGT CCC TCC TCG GCG CAG GCG GCT CAC CCC GCT CAC CCC GCT GTC GAG CTC TCC GCG GAT GGT AGC CCG GCG GAT GTC ACC CAG TCC AGC CAG
 Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln 810 270
 GAG CAG CTG GCG CCG GTC GCT CAC CCC GCT CAC CCC GCT CAC ACA GAT GCG GCG GCG CTC ATC TTC CCG CTC CTC AAC GAA GCG CAG
 Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln 900 300
 GGT CTC TTC AGC CAC GAG GCG ACC AGC TTC CAG ATG TTC AGC TCT GAG GCG TAT GCG CAG AAG GAT GTA CTC TTC AAA GAC TCT ACC TCG
 Arg Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser 990 330
 GAG CTT CTC CCC ATC GCG ACA CAC ACC TAT GAG CCG TCG CTC GCG CAT GAG TAC CTC CAC GCC ATC AAG GGT CTC CTC TGT GAC CCC AAC
 Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Gln Tyr Leu His Ala Met Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn 1080 360
 GAG CTT CTC CCC TAC CTC GCG TCC TGT GTC CTC TCC ACT CCC CAG ATC CAC AAC TCT GCA GAC ATC GCG GTC GCG TTC CCC CCG CAG CCG
 Arg Leu Val Pro Ile Phe Tyr Leu Arg Trp Cys Val Leu Ser Thr Pro Gln Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg Arg Gln Arg 1170 390
 CTC AAG CCA GAG ATC CAG TCC GTC TCA GCG AAG TCC CCC CAA CAC TCC ATC CAG CCG ATC CAG CCT GAG CAG GTC GCT GTC ACC GTA
 Thr Lys Met Gly Thr Gln Cys Val Ser Ala Lys Ser Pro Gln His Cys Met Gln Arg Ile Gln Ala Gln Val Asp Ala Val Thr Leu 1260 420
 AGT GCC CAG CAC ATT TAC ACC GCG GCG AAG AAG TAC GCG CTC GCT CCC GCA GCG GCG GAG CAC TAT GCC CCC GAA GAG ACC AAC TCG
 Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Lys Tyr Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Gln His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser 1350 450

3A

TAC TAC CTC CTC GCC CTC GTC AGA CGG GAC ACC TCC CAC GCC TTC ACC TTG GAT GAG CTT CGG GCC AAG CGC TCC TCC CAC GCC GGT TTC 1440
Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe 480
GGC ACC CCI GCA GGC TGG GAT GTC CCC CTG GGT GCC CTT ATT CAC ACA GGC TTC ATC CGG CCC AAC GAC TGT GAC GTC CTC ACA GCA GTG 1530
Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Glu Arg Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val 510
ACC GAG TTC TTC AAT GCC ACC TGC GTC GCC Ser Glu Phe Phe Asp Ala Ser Cys Val Pro Val Asp Aas Pro Lys Asp Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp GAG CAG 1620
Ser Glu Phe Phe Asp Ala Ser Cys Val Pro Val Asp Aas Pro Lys Asp Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Glu 540
GGC GCC AAC AAG TGT GTG GCC AAC AGC CAG Gly Arg Asp Lys Cys Val Gly Asp Ser Glu ACC TAT TAC GCC TAC CCC GGC CTT ACC TCC CTC GTG CAG AAT GCC GGT GAC GTT 1710
Gly Arg Asp Lys Cys Val Gly Asp Ser Glu ACC TAT TAC GCC TAC CCC GGC CTT ACC TCC CTC GTG CAG AAT GCC GGT GAC GTT 570
GCC TTC GTC ACC CAC ACA ACC GTC TTT GAC Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe Asp AAC ACA AAC GCC CAC AAT TCC GAG CCC TGG GCT GCT GAC CTC ACC TCA GAG GAC TAT GAA 1800
Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe Asp AAC Thr Asp Glu His Asp Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu 600
CTG CTC TCC GCC AAC GCG CCC CGA GGC GAG Leu Leu Cys Pro Asp Glu Ala Arg Ala Glu Val Ser Glu Phe Ala CCA CCC CAC GCC GTG ATG GTC CGC 1890
Leu Leu Cys Pro Asp Glu Ala Arg Ala Glu Val Ser Glu Phe Ala Ala Cys Asp Leu Ala Glu Ile Pro Pro His Ala Val Met Val Arg 630
CCC GAC ACC AAC ATC TTC ACC GTG TAT GGA TTC GAC TCC AAC GAT GCC ACC GTC CGG CCG CAC CAC AAT AAC AAC GCC TTC AAA ATG 1980
Pro Asp Thr Asp Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys Ala Glu Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asp Lys Asp Glu Phe Lys Met 660
TTC GAC TCC AAC TAT CAT GCC CAA CAC Phe Asp Ser Asp Tyr His Gly Glu Asp CTC CTT TTC AAG CAT GCC ACC GTC CGG CCG Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Tyr Arg 2070
Phe Asp Ser Asp Tyr His Gly Glu Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Tyr Arg 690
GGC TGG CTC GCG CTC GAC TAC GTC GCG GCG Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala CAG GAA GGC ATG TCG TCT CAG CAG TCC TCC GGC GCA GCC CCC CGC CCC GCG CCC 2160
Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met Ser Ser Glu Glu Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro 720
CTG CTC GCG CTC GTC GCG GCG CTC GCG Ala Leu Pro Leu Leu Leu Pro Pro Ala Leu Ala Arg Leu Leu Pro Pro Ala Leu CGC CCC CCC GCG CCC AGA GCT CCG ATG CCC 2250
Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Arg Leu Leu Pro Pro Ala Leu CGC CCC CCC GCG CCC AGA GCT CCG ATG CCC 738
GGC GCG GGA GTT TCC GCG CCC TCT GCG (1280 bp) 2308
... ..
... ..
... ..
GAC GAT TCC TTC GTT TTT TCA AAA GGG AGT YTT GTG GGG TGA GAA GTG TCT TTC TGT GTG GGT AAC TCT GCG GTA GCG TGC GGT GGC CAT 3678
TGA ACC TGT GCG CTC GGT GGG TGG AGT GTA AGT GAC GGT GGA TTT TCA GGT GGC ACC AGG GGG CCC CTC CTC TGT CAG TGC TAA TCA AAC 3768
ATG TTC GGT TTC TAA AAT AAA GCC AAA CAA GCC AGC ACA TCC CGA GGC TTC GAC CCT GAT AAA AAA AAA 3840

 3B

497
 TI
 MRCP S GAL W L L L A L R Y V L - G G H Z V R W C A I S D P E Q H K C G N H S E A F R Z A G I Q - P S L L C V R 56
 MR L A V G A L L V C A V L C L C L A V P D K Y V R W C A V S E R E A I K C Q S F R D H M K S V I P S D C P S V A C V K 60

497
 TI
 G T S A D H C V Q L I A A Q E A D A I T L D C C A Y I E A C K E H - C L K P V V G E V Y D Q E V G - I S Y Y A V A V V 113
 K A S Y L D C I R A I A A N E A D A V T L D A G L V Y D A Y L A P N M L K P V V A E P Y C S K E D P Q I P Y Y A V A V V 120

497
 TI
 E S S H Y I A D I L K G V E S C R T C I A R I Y G W M V P V C Y L V Z S C R L S V M G C D V L K A V S D Y F C G S C V 173
 E K D S C F Q M Q L R G K K S C H T G L C R S A G W M I P I C L L Y C D L P E P R K P L E - - K A V A N P P S C S C A 178

497
 TI
 P C A G E T I S I S E S L C R L C R C D S S G E G V C D E S P L E M Y Y D Y S G A P R C L A E G A C D V A P V K B S T I V L 233
 P C A D C G I D Y P - O L C Q L C P C G - C S T : W Q Y P P G Y S G A P R C L K D C A C D V A P V K B S T I F 230

497
 TI
 E N T D C K I L P S W G Y K L L S Q D P E L L C R D C S R A D V I E W R Q Q C B L A R V P A B A V V V R A D I D G G - L I 292
 E N L A N K - - - - A D R D Q Y E L L C L D N T R K P V D E Y E D C C B L A Q V P S H I V V A R S H G C K E D L I 282

497
 TI
 S R L L M Z C Q R L P - S H Z G S S F Q M P S S P A Y G Q K D L L P K D S T S E L V P I A I - Q I Y E A W L C H E Y L L R 350
 W E L L M Q A O E R H P G E D K S E P Q L P S S P B - G E D L L P K D S A B C F L K V P P R M D A K M Y L C Y E Y T 340

497
 TI
 A M K G L L - - C - - D P N R L P P Y L R W C V L S Y P E I Q K C G D H A V A F R R Q R L K P E I O C V S A K S P Q B 405
 A I R K L R E G T C P E A P T D E C K P V K W C A L S H B E R L K C D E W S V - - - - G K I R C V S A E T T E D 395

497
 TI
 C M E R I Q A E Q V D A V Y L S C E D I : Y I A G K K Y G L V P A A G E H Y A P E D - - - S S M S Y Y V V A V V R E D 460
 C I A K I M N G E A D A M S L D G C P Y Y I A G E C - G L V P V L A E M Y N K S D N C E D I P E A C Y P A V A V V K R S 454

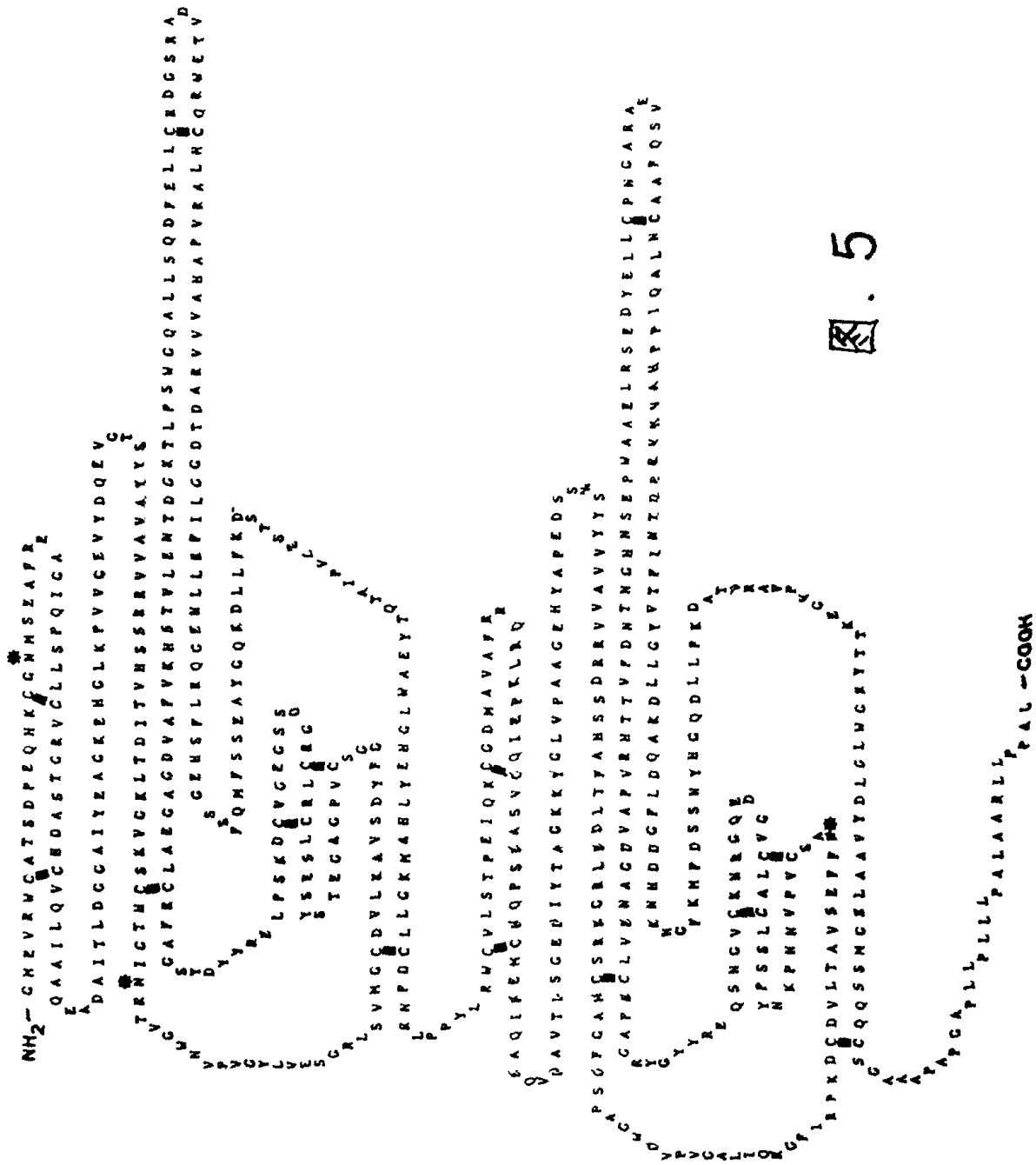
497
 TI
 S S A P T L D E L R G K R S C H A C V G S P A G W D V P V G A L I Q R G P I E P K D C D V L T A P S E P P N A S C V P 520
 S S D L T I W D N L K G E K S C H T A S G R T A G W N I P M C L L Y N K I - - - N B C R P - - - D E P P S E G C A P 505

497
 TI
 V M N P K N Y P S S L C A L C V G D E Q G R M K C V G N S Q R K Y Y G Y R G A P R C L V E N A C D V A P V R H I T I V P D 580
 - G S K K D S S L C K L C M P S - - C L R L C E P M M K E A Y Y G Y T C A P R C L V E - K C G D V A F V K R Q T V P Q 559

497
 TI
 R T A G C H M S E P W A A Z L R S E D Y E L L C C F N G A R A E V S Q P A C M L A Q I P P B A V M V R P P D I N I P I V Y G 640
 N T C G E M P P D P W A K M L L N E E D Y E L L C L D C T R K P P E Z Y A N C H L A R A P M H A V V I E R K D - K E A C V R K 618

497
 TI
 L J D K A Q D L P G D D B H K M G - - Y K M P D S S N Y H G O D L L P K D A T V R A V P V G E K T I Y R C W L C L D Y V 698
 I J L R Q Q N L P G S N V T D C S G M P C L P R S - - E T R D L L P R D D T V C L A K L H D R M T Y E K Y L G E Y V 675

497
 TI
 A A L E C H S S Q Q C S G A A A P A P G A P L L P L L L P A L A A R L L P P A L 738
 K A V G N L R E - - C S T S S L L E A C T P R E P 698



 . 5

图. 6

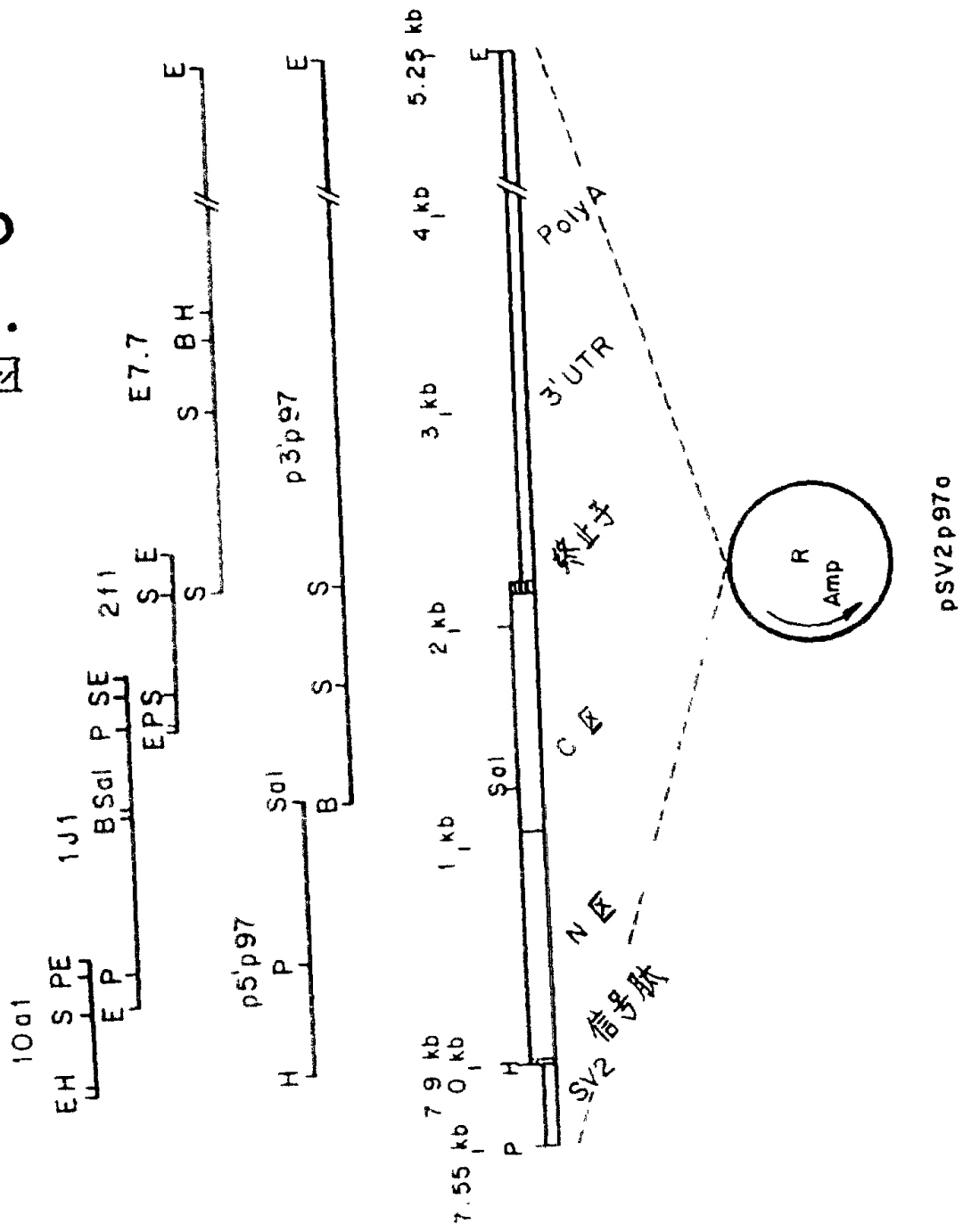


图. 7A

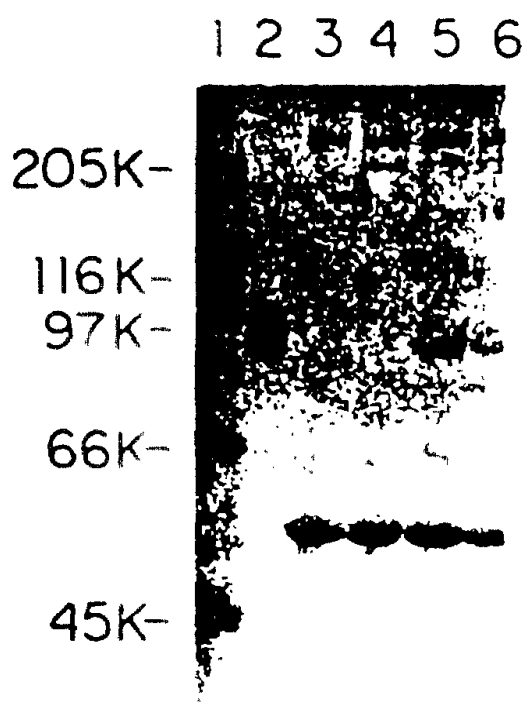


图. 7B





图. 8

图. 9

用P97疫苗免疫的小鼠
的血清抗体效价

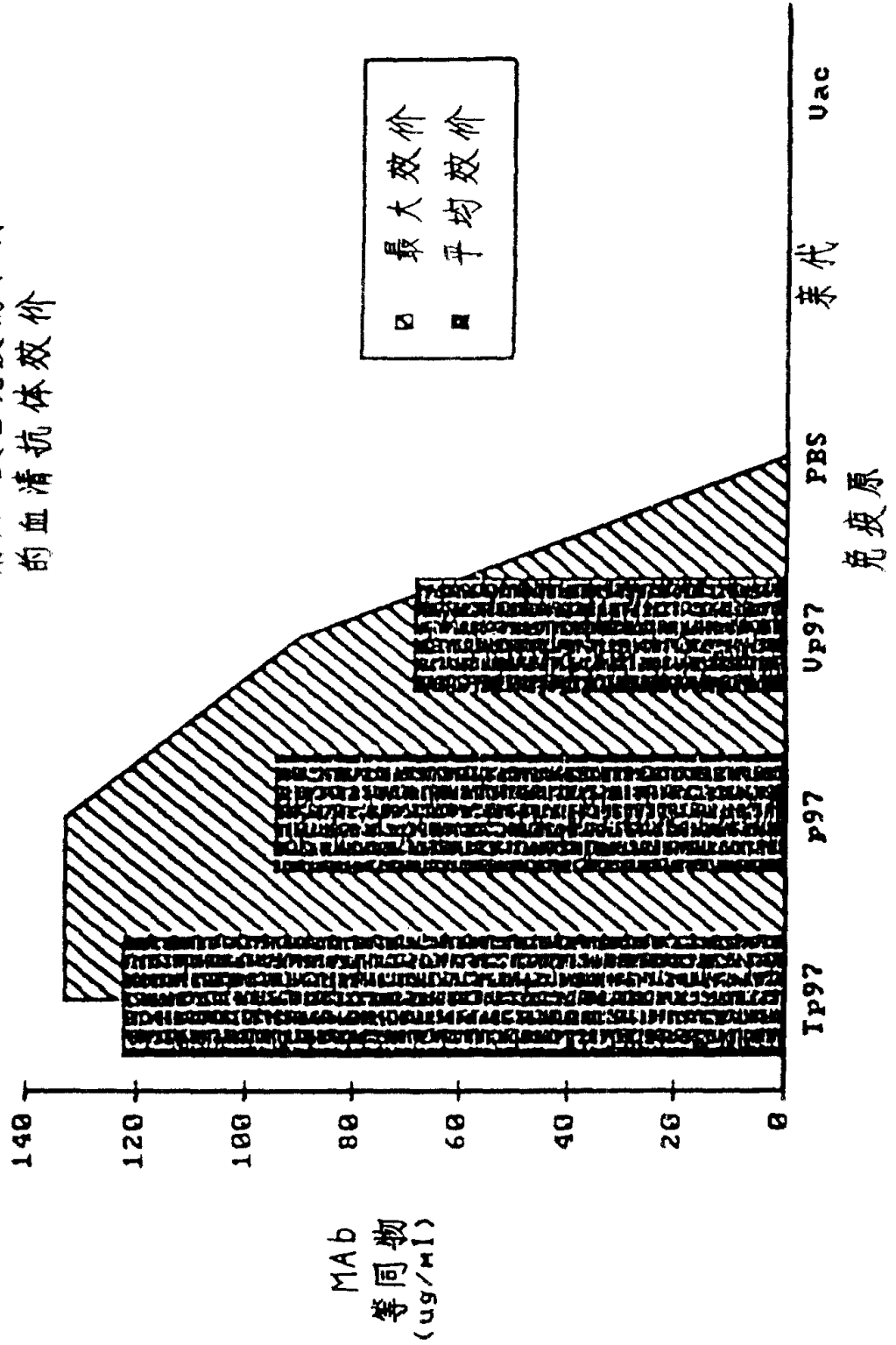


图 10

