



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820825.0

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1635896A

[22] 申请日 2002.8.20 [21] 申请号 02820825.0

[30] 优先权

[32] 2001.8.20 [33] US [31] 60/313,629

[32] 2001.12.6 [33] US [31] 60/337,222

[86] 国际申请 PCT/US2002/026573 2002.8.20

[87] 国际公布 WO2003/015712 英 2003.2.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.20

[71] 申请人 康涅狄格大学健康中心

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 P·K·斯里瓦斯塔瓦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 孟凡宏

权利要求书 8 页 说明书 57 页

[54] 发明名称 包含用于治疗癌症及感染性疾病的热休克蛋白或 $\alpha 2$ - 巨球蛋白的组合物制备方法

[57] 摘要

本发明涉及预防和治疗感染性疾病及癌症的方法及组合物。本发明的方法包括将抗原细胞或病毒颗粒的一组抗原蛋白或抗原肽与一种或几种不同的热休克蛋白在体外形成复合物。该组抗原蛋白或抗原肽或用于产生抗原肽的蛋白制品至少包括抗原细胞或病毒颗粒中不同蛋白的至少 50% 或是至少 50 种不同的蛋白。抗原肽的制备方法包括用一种或几种蛋白酶消化抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品,或将蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中。

1. 一种制备热休克蛋白与抗原蛋白复合物的方法，该方法包括将
5 一组来源于抗原细胞或病毒颗粒的抗原蛋白与一种或几种不同的热休
克蛋白在体外形成复合物，其中该组抗原蛋白分别包含抗原细胞或病
毒颗粒，或存在于抗原细胞的细胞组分中不同蛋白的至少 50%，或
至少 50 种不同蛋白。

2. 一种制备热休克蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括将一
10 组抗原肽与一种或几种不同的热休克蛋白在体外形成复合物，其中该
组抗原肽的生成方法包括用一种或几种蛋白酶消化蛋白制品，所述蛋
白制品包含抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中不同蛋白的至少
50%，或至少 50 种不同蛋白。

3. 一种制备热休克蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括将一
15 组抗原肽与一种或几种不同的热休克蛋白在体外形成复合物，其中该
组抗原肽的生成方法包括将包含抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中
不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品暴露于 ATP、
盐酸胍和/或酸性条件中。

4. 一种制备热休克蛋白与抗原蛋白复合物的方法，该方法包括将
20 蛋白制品与一种或几种不同的热休克蛋白在一定条件下进行体外接
触，使蛋白制品中的蛋白与所述热休克蛋白形成复合物，其中蛋白制
品包含抗原细胞或病毒颗粒，或存在于抗原细胞的细胞组分中不同蛋
白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白。

5. 一种制备热休克蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括下列
步骤：

25 (a) 用一种或几种蛋白酶对包含抗原细胞、其细胞组分或病毒
颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品进行
消化，以产生一组抗原肽；及

(b) 将该组抗原肽与一种或几种不同的热休克蛋白形成复合
物。

30 6. 一种制备 $\alpha 2$ -巨球蛋白与抗原蛋白复合物的方法，该方法包括
将一组来源于抗原细胞或病毒颗粒的抗原蛋白与 $\alpha 2$ -巨球蛋白在体外

形成复合物，其中该组抗原蛋白分别包含抗原细胞或病毒颗粒，或存在于抗原细胞的细胞组分中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白。

5 7. 一种制备 $\alpha 2$ -巨球蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括将一组抗原肽与 $\alpha 2$ -巨球蛋白在体外形成复合物，其中该组抗原肽的生成方法包括用一种或几种蛋白酶消化蛋白制品，所述蛋白制品包含抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白。

10 8. 一种制备 $\alpha 2$ -巨球蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括将一组抗原肽与 $\alpha 2$ -巨球蛋白在体外形成复合物，其中该组抗原肽的生成方法包括将包含抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中。

15 9. 一种制备 $\alpha 2$ -巨球蛋白与抗原蛋白复合物的方法，该方法包括将蛋白制品与 $\alpha 2$ -巨球蛋白在一定条件下进行体外复合，使蛋白制品中的蛋白与所述 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物，其中蛋白制品包含抗原细胞或病毒颗粒，或存在于抗原细胞的细胞组分中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白。

20 10. 一种制备 $\alpha 2$ -巨球蛋白与抗原肽复合物的方法，该方法包括下列步骤：

(a) 用一种或几种蛋白酶对包含抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品进行消化，以产生一组抗原肽；及

(b) 将该组抗原肽与 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

25 11. 权利要求 1 或 5 的方法，其中该组抗原蛋白包括胞浆蛋白。

12. 权利要求 2、3、7 或 8 的方法，其中蛋白制品包括胞浆蛋白。

13. 权利要求 1 或 5 的方法，其中该组抗原蛋白包括膜来源蛋白。

30 14. 权利要求 2、3、7 或 8 的方法，其中蛋白制品包括膜来源蛋白。

15. 权利要求 1 或 5 的方法，其中该组抗原蛋白是分离的。

16. 权利要求 2、3、7 或 8 的方法，其中蛋白制品是分离的。

17. 权利要求 1、2、3、5、7 或 8 的方法，其中该组抗原蛋白或蛋白制品包括癌细胞或其细胞组分中不同蛋白的至少 50% 或至少 50 种不同蛋白。

18. 权利要求 1、2、3、5、7 或 8 的方法，其中该组抗原蛋白或蛋白制品包含细胞中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白，所述细胞显示对感染性疾病致病原的抗原性。

19. 权利要求 1、2、3、5、7 或 8 的方法，其中该组抗原蛋白或蛋白制品包含细胞中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白，所述细胞为用编码感染性病原的抗原的核酸分子转化的细胞以及表达该抗原的细胞。

20. 权利要求 1、2、3、5、7 或 8 的方法，其中该组抗原蛋白或蛋白制品包括细胞中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白，所述细胞为用编码肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的核酸分子转化的细胞以及表达肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的细胞。

21. 权利要求 1、2、3、5、7 或 8 的方法，其中该组抗原蛋白或蛋白制品包含人类细胞不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白。

22. 权利要求 2 或 7 的方法，其中消化步骤在使该组抗原肽大小为 7 个氨基酸残基至 20 个氨基酸残基之间的条件下实施。

23. 权利要求 2 或 7 的方法，其中蛋白酶选自胰酶、葡萄球菌肽酶 I、糜蛋白酶、胃蛋白酶、组织蛋白酶 G、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶。

24. 权利要求 2 或 7 的方法，其中在所述消化步骤中使用蛋白酶混合物。

25. 权利要求 3 或 8 的方法，其中蛋白制品暴露于 ATP 后于 0.1% 三氟乙酸中超声处理。

26. 权利要求 1、2 或 3 的方法，其中热休克蛋白是分离的。

27. 权利要求 1、2 或 3 的方法，其中热休克蛋白选自 HSP60、HSP70、HSP90、gp96、钙网蛋白、grp78、蛋白二硫键异构酶 (PDI)、

HSP110 及 grp170。

28. 权利要求 1、2 或 3 的方法，其中所述不同热休克蛋白是选自 HSP60、HSP70、HSP90、gp96、钙网蛋白、grp78、蛋白二硫键异构酶 (PDI)、HSP110 及 grp170 的不同热休克蛋白的组合。

5 29. 权利要求 6、7 或 8 的方法，其中 α 2-巨球蛋白是分离的。

30. 权利要求 5 或 10 的方法，其中在单独的反应中用不同的蛋白酶重复 (a) 步骤，将不同消化体系产生的抗原肽在实施 (b) 步骤前组合。

10 31. 权利要求 4 的方法，其中所述接触包括用交联剂处理蛋白质制品及热休克蛋白。

32. 权利要求 9 的方法，其中所述接触包括用交联剂处理蛋白质制品及 α 2-巨球蛋白。

33. 权利要求 5 或 10 的方法，其中在实施 (b) 步骤前还包括将该组抗原肽分离的步骤。

15 34. 权利要求 2 或 7 的方法，其还包括灭活蛋白酶或将蛋白酶从该组抗原肽中分离的步骤。

35. 权利要求 1 的方法，其还包括分离热休克蛋白和该组抗原蛋白的复合物。

20 36. 权利要求 2 或 3 的方法，其还包括分离热休克蛋白和该组抗原肽的复合物。

37. 权利要求 6 的方法，其还包括分离 α 2-巨球蛋白和该组抗原蛋白的复合物。

38. 权利要求 7 或 8 的方法，其还包括分离 α 2-巨球蛋白和该组抗原肽的复合物。

25 39. 一种在受试者中诱导针对第一抗原细胞或病毒颗粒的免疫应答的方法，包括对该受试者施用包含免疫原性量的复合物的组合物，其中复合物包含与抗原蛋白复合的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白，复合物的生成方法包括将热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白与抗原蛋白形成复合物，所述抗原蛋白来源于第二抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白，所述第二抗原
30 细胞或病毒颗粒表达至少一种与第一抗原细胞或病毒颗粒共同的抗原

决定簇。

40. 一种在受试者中诱导针对第一抗原细胞或病毒颗粒的免疫应答的方法，包括对该受试者施用包含免疫原性量的复合物的组合物，其中复合物包含与抗原肽复合的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白，复合物的生成方法包括（a）用一种或几种蛋白酶对包含表达至少一种与第一抗原细胞或病毒颗粒共同的抗原决定簇的第二抗原细胞、其细胞组分或第二病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品进行消化，产生一组抗原肽；及（b）将该组抗原肽与热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白形成复合物。

41. 一种在受试者中诱导针对第一抗原细胞或病毒颗粒的免疫应答的方法，包括对该受试者施用包含免疫原性量的复合物的组合物，其中复合物包含与抗原肽复合的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白，其生成方法包括（a）将包含表达至少一种与第一抗原细胞或病毒颗粒共同的抗原决定簇的第二抗原细胞、其细胞组分或第二病毒颗粒中不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中，产生一组抗原肽；（b）将该组抗原肽回收；及（c）将该组抗原肽与热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白形成复合物。

42. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白的复合物的组合物，以治疗或预防有效量施用于需要这种治疗或预防的受试者，所述热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白与抗原蛋白形成复合物，所述复合物的生成方法包括将热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白与来源于该类癌症细胞中不同蛋白的至少 50%或至少 50 种不同蛋白的抗原蛋白形成复合物。

43. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白的复合物的组合物，以治疗或预防有效量施用于需要这种治疗或预防的受试者，所述热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白与抗原肽形成复合物，其中复合物的生成方法包括（a）用一种或几种蛋白酶消化包含存在于该类癌症细胞中不同蛋白的至少 50%或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品，产生一组抗原肽；及（b）将该组抗原肽与热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白形成复合物。

44. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含热休

48. 权利要求 39、40 或 41 的方法，其中所述第一抗原细胞及第二抗原细胞是同一种细胞。

49. 权利要求 45、46 或 47 的方法，其中抗原细胞用感染性疾病的致病原感染。

5 50. 权利要求 45、46 或 47 的方法，其中抗原细胞用具有该致病病原抗原性的致病原变异性感染。

51. 权利要求 42、43、44、45、46 或 47 的方法，其中组合物还包括佐剂。

10 52. 权利要求 42、43、44、45、46 或 47 的方法，其中所述施用以一周的间隔重复。

53. 权利要求 42、43、44、45、46 或 47 的方法，其中所述施用在受试者的同一部位上重复。

54. 权利要求 42、43、44、45、46 或 47 的方法，其中所述施用是真皮内施用。

15 55. 权利要求 42、43、44、45、46 或 47 的方法，其中所述施用是皮下施用。

56. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含治疗或预防有效量的抗原呈递细胞的组合物施用于需要这种治疗或预防的受试者，其中该抗原呈递细胞预先用复合物致敏，该复合物包含与抗原蛋白形成复合物的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白，其生成方法包括将热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白与来源于该类癌症细胞的不同蛋白的至少 50%，或至少 50 种不同蛋白的抗原蛋白形成复合物。

20

57. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含治疗或预防有效量的抗原呈递细胞的组合物施用于需要这种治疗或预防的受试者，其中该抗原呈递细胞预先用复合物致敏，该复合物包含与抗原肽形成复合物的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白，其生成方法包括用一种蛋白酶或多种不同蛋白酶消化包含存在于该类癌症细胞中不同蛋白的至少 50%或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品，产生一组抗原肽；及将该组抗原肽与热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白形成复合物。

25

30 58. 一种治疗或预防一类癌症的方法，该方法包括将包含治疗或预防有效量的抗原呈递细胞的组合物施用于需要这种治疗或预防的

受试者，其中该抗原呈递细胞预先用复合物致敏，该复合物包括与抗原肽形成复合物的热休克蛋白和/或 $\alpha 2$ -巨球蛋白，其生成方法包括
5 (a) 将包含存在于该类癌症细胞中不同蛋白的至少 50%或至少 50 种不同蛋白的蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中，产生一组抗原肽；(b) 将该组抗原肽回收；及 (c) 将该组抗原肽与热休克蛋白或 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

59. 权利要求 1 的方法，其中该组抗原蛋白通过共价键与热休克蛋白形成复合物。

10 60. 权利要求 1 的方法，其中该组抗原蛋白通过非共价键与热休克蛋白形成复合物。

61. 权利要求 2 或 3 的方法，其中该组抗原肽通过共价键与热休克蛋白形成复合物。

62. 权利要求 2 或 3 的方法，其中该组抗原肽通过非共价键与热休克蛋白形成复合物。

15 63. 权利要求 6 的方法，其中该组抗原蛋白通过共价键与 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

64. 权利要求 6 的方法，其中该组抗原蛋白通过非共价键与 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

20 65. 权利要求 7 或 8 的方法，其中该组抗原肽通过共价键与 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

66. 权利要求 7 或 8 的方法，其中该组抗原肽通过非共价键与 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物。

67. 权利要求 3 或 8 的方法，其中在形成复合物之前还包括将该组抗原肽回收。

25

包含用于治疗癌症及感染性疾病的热休克蛋白 或 $\alpha 2$ -巨球蛋白的组合物制备方法

5

本发明要求 2001 年 8 月 21 日提交的美国临时专利申请 No. 60/313,629 和 2001 年 12 月 6 日提交的 No. 60/337,222 的权益，上述两项申请在此完整地引入作为参考。

10 本发明是在政府的支持下完成的，国立卫生院授权号为 CA/A184479。政府享有本发明的某些权利。

1、引言

15 本发明涉及预防和治疗感染性疾病，及原发性和转移性肿瘤疾病的方法和组合物。在感染性疾病及癌症的预防和治疗实践中，将包含来源于抗原细胞和/或其消化产物的胞浆及膜来源蛋白的组合物，与热休克蛋白和/或 $\alpha 2$ -巨球蛋白形成复合物，以增强对肿瘤及感染性病原(agent)的免疫应答。

2、发明背景

20 2.1 热休克蛋白

热休克蛋白 (HSPs)，亦称为应激蛋白，最初鉴定为细胞在热休克反应时合成的蛋白。根据分子量的不同将 HSPs 分为五大家族：HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和 smHSP。随后发现家族中的许多成员可在包括营养缺失、代谢紊乱、氧自由基、缺氧和细胞内病原体感染在内的其他应激性刺激反应中诱导产生 (见 Welch, 1993, 5, Scientific American, 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol., 8: 401-420; Craig, 1993, Science, 260: 1902-1903; Gething 等, 1992, Nature 355: 33-45; Lindquist 等, 1988, Annu. Rev. Genetics 22: 631-677)。

30 对热休克及其他生理性应激产生的细胞反应进行研究，发现 HSPs 不仅参与这些不利情况下的细胞保护，而且参与未应激细胞中的基本

生化和免疫过程。HSPs 可完成各种不同的分子伴侣功能。例如，定位于细胞胞浆、细胞核、线粒体或内质网的 HSP70 家族成员 (Lindquist 等, 1988, *Ann. Rev. Genetics*, 22: 631-677) 参与正常细胞的蛋白转运、折叠和装配。HSPs 可与蛋白或多肽结合，在酸性条件或有三磷酸腺苷存 (ATP) 存在的条件下释放所结合的蛋白或多肽 (Udono 和 Srivastava, 1993, *J. Exp. Med.* 178: 1391-1396)。

Srivastava 等研究了针对甲基胆蒽所诱导近亲繁殖小鼠肉瘤的免疫应答 (1998, *Immunol. Today*, 9: 78-83)。在这些研究中发现负责对这些肿瘤产生不同免疫原性的分子是 96kDa 的糖蛋白 (gp96) 和 84~86kDa 的细胞内蛋白 (Srivastava 等, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 3407-3411; Ullrich 等, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 3121-3125)。用从特定肿瘤分离的 gp96 或 p84/86 接种小鼠可使该小鼠对这种特定的肿瘤产生免疫力，但对抗原截然不同的肿瘤则无免疫力。对编码 gp96 和 p84/86 的基因进行分离、鉴定，发现两者之间有着明显的同源性，显示 gp96 和 p84/86 分别为同一热休克蛋白在内质网和胞浆的存在形式 (Srivastava 等, 1988, *Immuogenetics*, 28: 205-207; Srivastava 等, 1991, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 167: 109-123)。另外，发现 HSP70 可激发对其源性肿瘤的免疫应答，对抗原性截然不同的肿瘤则不能激发免疫应答。但是，和肽相脱离的 HSP70 丧失了其免疫原活性 (Udono 和 Srivastava, 1993, *J. Exp. Med.*, 178: 1391-1396)。这些观察结果表明单独的热休克蛋白本身不具备免疫原性，但可与抗原肽形成非共价复合物，该复合物激发对该抗原肽的特异性免疫应答 (Srivastava 等, 1993, *Adv. Cancer Res.*, 62: 153-177; Udono 等, 1994, *J. Immunol.*, 152: 5398-5403; Suto 等, 1995, *Science*, 269: 1585-1588)。

从肿瘤细胞提纯的 HSPs 和肽的非共价复合物可用于治疗和预防癌症，其见于 1996 年 4 月 11 日提交的 WO96/10411 号 PCT 出版物和 1997 年 3 月 20 日提交的 WO97/10001 号 PCT 出版物(分别为于 1998 年 5 月 12 日公布的 No. 5,750,119 号美国专利和于 1998 年 11 月 17 日公布的 No. 5,837,251 号美国专利，将其完整在此引入作为参考)。HSP-肽复合物的分离和纯化已有描述，如从病原体感染细胞分离，

并应用于诸如病毒、包括细菌、原生动物、真菌和寄生虫在内的其他细胞内病原体等所致感染的治疗和预防（实例见 1995 年 9 月 21 日提交的 WO95/24923 号 PCT 出版物）。也可将应激蛋白和抗原肽形成复合物来制备免疫原性应激蛋白-抗原复合物，1997 年 3 月 20 日提交的 WO97/10001 号 PCT 出版物（于 2000 年 2 月 29 日公布的 No. 6,030,618 号美国专利）描述了该类化合物在癌症和感染性疾病治疗和预防中的应用。1997 年 3 月 20 日提交的 WO97/10002 号 PCT 出版物（同时见于 1999 年 11 月 16 日公布的 No. 5,985,270 号美国专利）描述了使用应激蛋白-抗原复合物在体外致敏用于过继免疫治疗的抗原呈递细胞。

2.2. α 2-巨球蛋白

α 2-巨球蛋白是包含 C3、C4、C5 补体成分的结构相关蛋白超家族的成员。人类血浆蛋白 α 2-巨球蛋白 (α 2M) 是 720 kDa 的同源四聚体蛋白，最初认为它是蛋白酶及血浆和炎性流体蛋白酶清道夫分子（综述见 Chu 和 Pizzo, 1994, Lab. Invest., 71: 792）。 α 2M 以包含 1474 个氨基酸残基的前体形式合成。前 23 个氨基酸充当信号肽，将其切割后产生包含 1451 个氨基酸残基的成熟蛋白（Kan 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 2282-2286）。

α 2M 以共价结合的方式与含亲核氨基酸侧链的蛋白和肽链混杂地结合（Chu 等, 1994, Ann. N.Y. Acad. Sci., 737: 291-307），并将它们导向表达 α 2M 受体 (α 2MR) 的细胞（Chu 和 Pizzo, 1993, J. Immunol., 150: 48）。 α 2M 和 α 2M 受体的结合由 α 2M 羧基端部分介导（Holtet 等, 1994, FeBS Lett., 344: 242-246），关键的残基已得以鉴定（Nielsen 等, 1996, J. Biol. Chem., 271: 12909-12912）。

众所周知， α 2M 具有抑制蛋白酶的活性，它通过多个结合位点与各种蛋白酶结合（例如 Hall 等, 1981, Biochem. Biophys. Res. Commun., 100 (1): 8-16）。蛋白酶与 α 2M 的相互作用，导致复杂的结构重排，称作“转化”。这是蛋白酶被硫酯捕获后在 α 2M 的“饵 (bait)”区内切割的结果。构象的改变暴露出受体结合所需的残基，使 α 2M-蛋白酶复合物可以与 α 2MR 结合。甲胺可以诱导与蛋白酶类

似的构象改变和切割。 $\alpha 2M$ 在未切割前的形态不能被其受体识别，这种形态称为“慢形态”（s- $\alpha 2M$ ）。切割后的形态则称为“快形态”（f- $\alpha 2M$ ）（综述见 Chu 等，1994，Ann. N.Y. Acad. Sci., 737: 291-307）。最近也发现 $\alpha 2MR$ 可与 gp96、hsp90、hsp70、钙网蛋白等 HSPs 结合（Basu 等，2001，Immunity, 14 (3) : 303-13）。

研究显示，除了抑制蛋白酶活性外， $\alpha 2M$ 与抗原形成复合物时可使抗原呈递细胞如巨噬细胞摄取该抗原、呈递给 T 淋巴细胞的能力提高到原来的 2 个数量级（Chu 和 Pizzo, 1994, Lab. Invest., 71: 792），也可使该抗原诱导 T 细胞增殖（Osada 等，1987, Biochem. Biophys. Res. Commun., 146: 26-31）。进一步的证据显示抗原与 $\alpha 2M$ 形成复合物可促进未成熟的脾细胞生成抗体（Osada 等，1988, Biochem. Biophys. Res. Commun., 150: 883），在实验兔（Chu 等，1994, J. Immunol., 152: 1538-1545）和小鼠（Mitsuda 等，1993, Biochem. Biophys. Res. Commun., 101: 1326-1331）中激发体外抗体反应。 $\alpha 2M$ -抗原肽复合物还可诱导体外细胞毒 T 细胞反应（Binder 等，2001, J. Immunol., 166: 4698-49720）。

3、发明概述

本发明包括用于预防和治疗癌症和感染性疾病的抗原蛋白和肽与热休克蛋白（HSP）或 $\alpha 2$ -巨球蛋白（ $\alpha 2M$ ）的复合物的制备方法。

在一个实施方案中，本发明提供了一种制备 HSPs 和抗原细胞或病毒颗粒的一组(population)抗原蛋白的复合物的方法。该方法包括将一组来源于抗原细胞或病毒颗粒的抗原蛋白与一种或几种不同的热休克蛋白在体外形成复合物，其中该组抗原蛋白包括存在于抗原细胞、病毒颗粒或抗原细胞的细胞组分(cellular fraction)中不同蛋白的至少 50%或至少 50 种不同蛋白。在另一个实施方案中，该方法包括将蛋白制品与一种或几种不同的热休克蛋白在一定条件下体外接触，使得蛋白制品中的蛋白与热休克蛋白形成复合物。

在另一个实施方案中，本发明提供了包含 HSPs 和抗原细胞或病毒颗粒的一组抗原肽的复合物，其中分别使用一种或多种不同的蛋白酶消化抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品而生成该组抗原

肽。也可将抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品充分暴露于 ATP、盐酸胍(guanidium hydrochloride)和/或酸性条件中，从蛋白制品中的蛋白复合物中洗脱抗原肽，从而产生该组抗原肽。使用任意一种或同时使用两种方法产生的抗原肽在体外与一种或几种不同的 HSPs 形成复合物。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种制备 α 2M 和抗原细胞的一组抗原蛋白的复合物的方法。该方法包括将一组来源于抗原细胞或病毒颗粒的抗原蛋白与 α 2M 在体外形成复合物，其中该组抗原蛋白包含存在于抗原细胞或病毒颗粒，或抗原细胞的细胞组分中不同蛋白的至少 50%或至少 100 种不同蛋白。在另一个实施方案中，该方法包括在使蛋白制品中的蛋白与 α 2M 形成复合物的条件下，将蛋白制品与 α 2M 进行体外接触。

在另一个实施方案中，本发明提供了包含 α 2M 和抗原细胞或病毒颗粒的一组抗原肽的复合物，其中分别使用一种蛋白酶或多种蛋白酶消化抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品而生成该组抗原肽。也可将抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中，从而生成该组抗原肽。使用任意一种或同时使用两种方法产生的抗原肽在体外与 α 2M 形成复合物。

在各种实施方案中，抗原细胞可以是癌细胞或受病原体或感染性病原(agent)感染的细胞，优选人细胞。抗原细胞也可以是病原体或感染性病原的细胞，或其变体。抗原细胞的蛋白制品可仅包含胞浆蛋白，或仅包含膜来源蛋白，也可同时包含胞浆和膜来源蛋白。蛋白制品可以是粗制的、未分级分离的细胞裂解液。在一个具体的实施方案中，可以利用本领域中已知方法裂解抗原细胞、去除细胞碎片及非蛋白物质，任选地纯化蛋白，从而制备蛋白制品。在某些实施方案中，没有使用选择性地去除或保留抗原细胞其他蛋白中一种或几种特定蛋白的制备方法来制备所需蛋白制品。

在某些实施方案中，抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品可在适合酶反应的条件用各种蛋白酶水解，蛋白酶可以是但不限于胰酶、葡萄球菌肽酶 I (亦称为 V8 蛋白酶)、糜蛋白酶、胃蛋白酶、组织蛋白酶 G、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶。可

取样并利用已知技术进行分析以确定肽链长度，从而监测消化程度。优选在使所得包含抗原肽的该组肽的平均长度为约 7~20 个氨基酸残基的条件下实施消化步骤。利用不同蛋白酶消化蛋白制品的等分试样从蛋白制品产生不同组的肽也是合乎要求的。在与 HSP 或 α 2M 形成复合物之前，对用不同消化手段所得肽可以进行组合。在包含抗原肽的该组肽与 HSP 或 α 2M 形成复合物之前，将蛋白酶灭活或从该组肽中分离出来，及任选地纯化该组肽也是合乎需要的。

在某些实施方案中，将抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品与三磷酸腺苷 (ATP)、盐酸胍和/或酸性条件接触，使得可以洗脱抗原肽，而不必先分离 HSP 复合物。此法洗脱的抗原肽包含与 HSPs 及 I 类和 II 类 MHC 分子内源性相关的肽。

在本发明的各个实施方案中，根据该组抗原肽与 HSP 或 α 2M 形成复合物所用的方法，反应可以产生以共价或非共价键与 HSP 或 α 2M 形成复合物的抗原肽。预期用于形成复合物的热休克蛋白包括但不限于 HSP60、HSP70、HSP90、gp96、钙网蛋白、grp78 (或 BiP)、蛋白二硫键异构酶 (PDI)、HSP110 及 grp170。通常优选人 HSPs 及人 α 2M。HSP 和抗原肽的复合物在用于或用作治疗性或预防性组合物之前可进一步纯化。本发明也提供了包含 HSP 和/或 α 2M、抗原细胞、蛋白制品和/或蛋白酶的试剂盒。

在本发明的另一个实施方案中，提供了一种在受试者中诱导针对第一抗原细胞或病毒颗粒的免疫应答的方法，该方法包括将包含免疫原用量的、与一组抗原蛋白/肽形成复合物的 HSP 和/或 α 2M 的组合物施用于个体，其中该组抗原蛋白/肽由第二抗原细胞或病毒颗粒制备。抗原肽的获得方法包括用蛋白酶消化抗原细胞的蛋白制品，或是将蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件中。第一和第二抗原细胞或病毒颗粒表达至少一种共同的(common)抗原决定簇。

在另一个实施方案中，提供了一种治疗或预防一类癌症或感染性疾病的方法，该方法包括将包含与一组抗原肽形成复合物的 HSP 和/或 α 2M 的组合物以治疗或预防有效量施用于需要这种治疗或预防的受试者。抗原蛋白/肽是从癌细胞或病原体感染的细胞制备的，所述细胞与癌症或感染性疾病在抗原上相关(antigenically related)。病原体

或感染性病原（包括病毒颗粒）也可用于制备抗原肽。抗原肽的获得方法包括用蛋白酶消化抗原细胞、其细胞组分或病毒颗粒的蛋白制品，或是将蛋白制品暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸如三氟乙酸中。

在另一个实施方案中，提供了一种治疗或预防一类癌症或感染性疾病的方
5 法，该方法包括将已用 HSP 和/或 α 2M 和一组抗原蛋白/肽的复合物致敏的抗原呈递细胞施用于需要这种治疗或预防的受试者。除了致敏的抗原呈递细胞外，HSP 和/或 α 2M 和一组抗原肽的复合物也可施用于该受试者。

在各个实施方案中，受试者可在同一部位周期性地，如间隔一周，
10 重复地施用复合物。组合物也可经多种途径，如真皮内或皮下施用。

4、发明详述

本发明提供了包含用于治疗癌症及感染性疾病之热休克蛋白（HSP）或 α 2-巨球蛋白（ α 2M）的组合物制备方法。本发明的方法
15 包括在体外制备 HSP 或 α 2M 与抗原细胞的抗原蛋白及抗原肽的复合物。在一个实施方案中，该方法包括制备含一组抗原蛋白的抗原细胞蛋白制品，将这组抗原蛋白在体外与 HSP 或 α 2M 形成复合物。在另一个实施方案中，该方法还包括在该组抗原肽在体外与 HSP 或 α 2M 形成复合物之前，用至少一种蛋白酶消化该组抗原细胞的蛋白制品以
20 产生一组抗原肽。本发明利用了抗原细胞的全部抗原性潜能。

本发明的治疗或预防方法基于在需要预防或治疗感染性疾病或癌症的受试者体内激发免疫应答。免疫应答特异性针对癌细胞的抗原决定簇、导致感染性疾病之感染性病原感染的细胞的抗原决定簇或感染性病原的抗原决定簇。将包含 HSP 和/或 α 2M 与抗原细胞的肽形成复
25 合物的组合物施用于个体后，包含 HSP 和/或 α 2M 与抗原肽形成复合物的组合物刺激产生免疫应答，如细胞毒 T 细胞反应。抗原细胞可以是癌细胞或受感染细胞，或是具有与癌细胞或受感染细胞相同的抗原决定簇或类似抗原性的细胞。免疫应答的结果之一是，个体的各种免疫效应机制作用于癌细胞或受感染细胞，从而使这类疾病得以治疗
30 或预防。

需要治疗或预防感染性疾病或癌症的个体或受试者是动物，优选

哺乳动物、非人类灵长类动物，最优选人类。本文所用术语“动物”包括但不局限于牧场动物或其成对动物，如猫、狗、牛、猪、羊、马、鸡等。

5 本发明的治疗方案和药物组合物可与其他免疫应答增强剂或生理反应调节剂联用，如 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF 等细胞因子或其他影响免疫细胞的细胞因子，但不局限于这些。

10 本发明的组合物和方法是对其他使用天然生成之 HSP-抗原肽复合物来治疗或预防癌症或感染疾病之组合物和方法的改进。在这些其他方法中，从癌细胞或受感染细胞分离出特异性的 HSP 及其与抗原肽的复合物，然后将它们施用于病人以在体内诱导针对该癌细胞或受感染细胞的免疫应答（实例见美国专利 No. 5,750,119 和 No. 5,961,979）。依据所需 HSP 类型而规定的方法分离天然生成的复合物。因此，天然生成的一类 HSP 和抗原肽复合物仅包含与该类 HSP 共同定位于抗原细胞某一区室中的那些抗原肽。某些类型 HSP 普遍
15 存在于癌细胞的区室中，而某些抗原肽仅存在于癌细胞的某些区室中。例如，HSP90 和 HSP70 仅在胞浆中发现。因此，它们仅与位于胞浆中的抗原肽形成复合物，而不与定位于其他位置如内质网的抗原肽形成复合物。也就是说，对于每一特定的 HSP 来说，仅有一部分抗原细胞的抗原肽可与之结合。因此，为了激发针对癌细胞或受感染
20 细胞中大量抗原决定簇的免疫应答，必须利用各自的分离方法从癌细胞或受感染细胞分离出各种 HSP 及其肽复合物，然后将它们施用于病人。这种方法非常费力，且可能需要大量抗原细胞，而这些抗原细胞在某些情况下无法获得。本发明在体外生成实际上代表抗原细胞所有抗原的肽，然后将这些肽与一种或几种不同的 HSP 和/或 α 2M 形成
25 复合物，所形成的复合物可用于在病人中激发免疫应答，从而解决了这一问题。利用本发明的方法，即使不是共同定位于抗原细胞同一区室中的抗原肽和 HSP 也可形成复合物。本发明的方法使得特定类型的 HSP 与抗原细胞中的大部分甚至每一抗原肽形成复合物成为可能。相应地，利用本发明制备的组合物可以更有效地诱导针对抗原细
30 胞的免疫应答。此外，本方法不需要预先将 HSP 复合物与相关肽分离，因此可以使用很少量的起始材料，而起始材料常受供应限制。

而且，癌细胞、受感染细胞或病原体的抗原特征(profile)经过一段时间后如在治疗的过程中可能会改变。许多病原体突变并合成宿主的免疫细胞和抗体不能识别的突变蛋白来逃避宿主的免疫系统。已知癌细胞可以发生突变，合成突变蛋白，其中一些不能为宿主的免疫系统所识别，从而对某些药物产生耐药性。本发明中一个实施方案的优势之一是对来源于癌细胞、受感染细胞或病原体的胞浆和/或膜的蛋白进行消化，可以使更大范围及更具多样性的抗原肽与 HSPs 及 α 2M 形成复合物。结果免疫应答受抗原细胞上更大量的抗原决定簇介导，从而使抗原细胞如癌细胞或受感染细胞更难躲过免疫系统的识别和作用。

在另一个具体的实施方案中，本发明的方法产生非天然存在的 α 2M-肽复合物。已知 α 2M 是一种可与各种细胞外蛋白尤其是蛋白酶结合的细胞外蛋白，然后将它们灭活并将它们带至细胞内。通常 α 2M 不能接近抗原细胞的所有抗原肽，因而也不能与所有抗原肽形成复合物。本发明的方法使 α 2M 可以与范围更大的胞浆或膜来源、或抗原细胞之胞浆或膜来源蛋白消化而产生的肽形成复合物。

第 4.1 部分所述的是抗原细胞的来源，蛋白制品可由这些抗原细胞制备。第 4.2 部分提供了制备抗原细胞之不同类型蛋白制品的方法及消化蛋白制品的方法。第 4.3 和 4.4 部分分别描述了用于与抗原肽形成复合物之 HSP 或 α 2M 的分离或生产。第 4.5 部分描述了 HSP 和抗原肽复合物的体外形成。第 4.6 部分描述的是使用复合物预防和治疗癌症及感染性疾病的方法，以及所治疗的癌症和感染性疾病类别。第 4.7 部分描述了利用本发明方法制备的组合物在过继免疫中的应用。第 4.7 部分提供了本发明的复合物在预防性保护动物免受癌细胞生长的效果的实验数据。

4.1、抗原细胞的来源

本发明的抗原细胞包含受试者免疫应答所需的抗原决定簇。

为预防或治疗癌症或感染性疾病，本发明的方法提供了与抗原蛋白及抗原肽形成复合物的 HSP 和 α 2M，其中抗原蛋白及抗原肽，如肿瘤特异性抗原及肿瘤相关抗原的片段来源于癌细胞，优选人类癌细

胞。将来源于癌细胞或具有与该癌细胞相同抗原决定簇或显示类似抗原性之细胞的蛋白（如胞浆和/或膜来源蛋白）进行蛋白分解消化而生成这些抗原肽。也可将蛋白暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件下而产生抗原肽。本文所用的术语“同种癌”的细胞或组织指同一组织或由相同组织癌症转移的癌症组织或细胞。

为治疗或预防感染性疾病，本发明的方法提供了 HSP 及 α 2M 与抗原肽相复合的组合物，其中抗原肽来源于受病原体或可致感染性疾病的感染性病原，或来源于包括但不限于下列病原体：病毒、细菌、真菌、原生动物和寄生虫等等。优选感染人类的病原体。将从癌细胞、包含病毒颗粒的细胞或具有与该癌细胞相同抗原决定簇或显示类似抗原性的细胞获得的蛋白（如胞浆和/或膜来源蛋白）进行蛋白分解消化而产生了这些抗原肽。也可将蛋白暴露于 ATP、盐酸胍和/或酸性条件下而产生抗原肽。抗原肽也可从显示感染性疾病致病原（病原体）或其变体所具有抗原性的抗原细胞获得。

既然本发明要用到癌细胞、受感染细胞或其他抗原细胞的整体，在使用这些方法前就没必要将抗原肽进行分离或鉴定其特征，甚至不需要对其鉴定。依据疾病与何种抗原相关的本性来选择抗原细胞的来源。在本发明的一个实施方案中，任何组织或从包括已转移到多个部位之肿瘤的任何肿瘤分离的细胞均可用作该方法的抗原细胞。例如，血液循环中的白血病细胞、淋巴液或其他体液均可使用，也可使用实体瘤组织（如活检的原始组织）。本文的术语癌细胞也包括前瘤细胞，这种细胞处于由正常细胞转化成瘤细胞的过渡形态。从非瘤性细胞生长过渡到肿瘤通常由过度增生、化生、发育异常这些步骤组成（这种非正常生长情况的综述见 Robbins 及 Angell, 1976, Basic Pathology, 第二版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79）。下文第 4.5.2 部分提供了可在这里应用的非限制性癌症及其细胞的列表。

在本发明的另一个实施方案中，任何被病原体或感染性病原感染的细胞，即受感染细胞均可充当制备抗原肽的抗原细胞。尤其优选被诸如病毒、细菌、真菌、原生动物或寄生虫等细胞内病原体感染的细胞。第 4.5.1 部分提供了可感染在这里应用的细胞的示范性感染病原列表。

在本发明的另一个实施方案中，任何可导致感染性疾病的病原体或感染性病原均可充当制备抗原肽的抗原细胞。病原体或感染性病原的变异体也可用作此目的的抗原细胞，如缺乏复制能力的变异体、非变原性变异体或减弱变异体、非感染性变异体等，但并不局限于这些。

5 例如，许多可在体外培养或从受感染物质分离的病毒、细菌、真菌、原生动物或寄生虫可充当抗原细胞的来源。可以使用该领域中用来繁殖这类病原体，包括病毒颗粒的已知方法。

来源于癌组织、癌细胞或受感染细胞的细胞系可以用作抗原细胞。优选人类癌组织或受感染组织、细胞或细胞株。可用该领域内任何已知方法鉴定、分离这些癌细胞、受感染细胞或抗原细胞。例如，
10 可以用形态学、酶检方法或在病原体或致癌病毒存在的条件下对癌细胞或受感染细胞加以鉴定。如果感兴趣的抗原其特征是已知的，也可利用本领域内任何已知的生化或免疫方法对抗原细胞加以鉴定或分离。例如，可以用外科手术、内窥镜检查、其他活检技术、亲和层析
15 及荧光激活细胞分选法（例如使用针对细胞所表达抗原的荧光标记抗体）。表现出类似抗原性的抗原细胞具有一种或几种共同的抗原决定簇，这些抗原决定簇在受试者的免疫应答中是必需的（如为了其治疗性或预防性目的）。

如果从受试者获得的抗原细胞数量不够充足，可在应用于本方法前将其于体外用标准方法培养以增加其数量。抗原细胞不需要克隆或
20 纯化或具备同源性。只要细胞混合物有基本数量的含感兴趣之抗原即可使用细胞混合物。在一个具体的实施方案中，对抗原细胞和/或免疫细胞进行了纯化。

为了制备病原体感染的细胞，在体外对易被病原体或引发疾病的感染性病原感染的未感染细胞进行感染。根据病原体或感染性病原的传播模式和生物学性质，可用标准的技术促进病原体或感染性病原的
25 感染及受感染细胞的繁殖。例如，可以用流感病毒感染正常的人成纤维细胞，用分支杆菌感染正常的人施旺细胞。在各种实施方案中，诸如缺乏复制能力的变异体、非病原性变异体或减弱变异体、温度敏感
30 变异体等的感染性病原变异体也可用于感染或转化细胞以产生用于制备抗原肽的抗原细胞。如果需要将大量病原体感染细胞或病原体直接

充当抗原细胞，则可使用本领域内的任何已知方法对病原体加以繁殖和培育。这类方法依病原体不同而异，可能不包括感染宿主。例如，在本领域内，许多培育处于培养中的病原性细菌、真菌及其他非病毒微生物的技术包括大规模发酵是已知的。

5 此外，如果编码肿瘤抗原（如肿瘤特异抗原及肿瘤相关抗原）或病原体抗原的基因可以获得，也可用含编码该抗原核酸分子的表达构建体在体外转化或转染来源于预计接受者之适当类型的正常细胞，以便该抗原在接受者的细胞内得以表达。在一个实施方案中，肿瘤相关抗原为在肿瘤细胞内以相对于正常细胞高水平表达的抗原；肿瘤特异
10 抗原为仅在肿瘤细胞表达、正常细胞不表达的抗原。用这种方式，一种或几种这样的抗原可任选地在接受者的细胞内表达，本领域技术人员应能理解这一点。可用诸如 Ausubel 等所述（1989, Current protocols in molecular biology, Wiley Interscience）的任何已知技术实施转化或转染及随后抗原基因在接受者细胞的重组表达。

15 可在该类细胞表达的适当蛋白及肽包括但不限于那些显示（用于治疗或预防癌症的）抗原性的蛋白及肽——包括酪氨酸酶、gp100、melan-A、gp75 及粘蛋白在内的肿瘤抗原；和（用于治疗或预防感染性疾病的）抗原性的蛋白及肽——包括 I 型免疫缺陷病毒（HIV-I）、II 人型免疫缺陷病毒（HIV-II）、A 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒、C
20 型肝炎病毒、流感病毒、水痘、腺病毒、II 型单纯疱疹病毒（HSV-II）、牛瘟、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒及脊髓灰质炎病毒的蛋白，以及感染性病原的蛋白或其片段，感染性病原包括但不限于分枝杆菌、立克次氏体、支原体、奈瑟菌、军团菌、利什曼原虫、kokzidioa、
25 锥虫、衣原体、及立克次氏体。

4.2、抗原蛋白及肽的制备

依照本发明，本发明的组合物包括与 HSPs 形成复合物的抗原蛋白，其中该抗原蛋白来源于感兴趣之抗原细胞的蛋白制品。本发明的
30 组合物还包括与 $\alpha 2M$ 形成复合物的抗原蛋白，其中该抗原蛋白来源于感兴趣之抗原细胞的蛋白制品。本发明的组合物和包括 HSPs 与抗

原肽的复合物或 $\alpha 2M$ 与抗原肽的复合物，其中由抗原细胞蛋白制品生成一组肽，然后将肽与HSPs或 $\alpha 2M$ 形成所需复合物。

在各种实施方案中，为保留抗原蛋白及肽的多样性并使之最大化，制备蛋白制品的制备方法不能选择性地去除或保留抗原细胞蛋白及肽中的任意特定蛋白或肽。即使在某些使用胞浆来源或膜来源蛋白的实施方案中，用于制备蛋白制品的方法也不会选择性的去除或保留胞浆蛋白或膜蛋白的任何特定蛋白。因此，存在于膜或胞浆内的大部分蛋白也存在于抗原细胞蛋白及肽的各蛋白制品中。在优选实施方案中，基本上抗原细胞的全部抗原蛋白及肽，和基本上胞浆或膜内的所有蛋白及肽均参与复合反应并和HSPs和/或 $\alpha 2M$ 形成复合物。

4.2.1、抗原细胞的蛋白制品

在本发明一个实施方案中，我们提供了一种来源于癌细胞、受感染细胞或病原体的蛋白制品。例如，为治疗癌症，从癌症患者手术后获得的肿瘤细胞制备出蛋白制品。在本发明的另一个实施方案中，所感兴趣的一种或几种抗原蛋白在引入编码该抗原的重组表达系统的改造细胞系中合成，同时该细胞用于制备蛋白。蛋白可从一种或几种细胞组分获得，如抗原细胞的胞浆；也可从抗原细胞的细胞膜及细胞壁提取或溶解而获得。可使用本领域中任何已知的细胞裂解、细胞内容物分离及蛋白富集或分离技术。实例见 Coligan 等编《当代免疫学实验方案》第2卷第8章，John Wiley & Sons, Inc.; Rowland 等《病理及临床微生物学：实验手册》，Little Brown & Co., 1994年6月；将其完整在此引入作为参考。依据分离细胞内容物的方法不同，细胞组分包含至少20、50、100、500、1000、5,000、10,000或20,000种不同的蛋白。

本文所用术语“蛋白制品”指从抗原细胞、抗原细胞的细胞组分或病毒颗粒获得的蛋白混合物。蛋白也可由细胞组分如胞浆获得。蛋白也可以是非胞浆蛋白（如来源于细胞壁、细胞膜或细胞器的蛋白），或同时具有这两类蛋白。细胞组分可以包括但不局限于胞浆组分、膜组分及诸如内源于细胞核、线粒体、溶媒体及内质网等的细胞器组分。蛋白制品可从重组细胞或非重组细胞获得。这里术语“抗原蛋白”还包

括可能存在于制品中的抗原多肽及抗原肽。从抗原细胞或其细胞组分或病毒颗粒获得的蛋白制品可以利用本领域内已知方法选择性地从其他非蛋白性物质纯化至各种程度。蛋白制品可包括至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 存在于抗原细胞或病毒颗粒或抗原细胞组分的不同蛋白及肽。

5 在一个具体的实施方案中，对蛋白制品没有使用任何制备方法来选择性去除或保留抗原细胞中一种或几种特定蛋白。

在一个具体的实施方案中，蛋白制品为未分离的全部细胞裂解液，可能包含细胞的其他非蛋白性物质。在另一具体的实施方案中，蛋白制品为一细胞组分的全部蛋白，该组分没有经过进一步分离或纯化，可能包含细胞的其他非蛋白性物质。在另一个实施方案中，蛋白制品为病毒颗粒制品的全部蛋白。在具体的实施方案中，蛋白制品包含抗原细胞的全部细胞蛋白、全部胞浆蛋白或全部膜结合蛋白。在各种实施方案中，蛋白制品包括至少 20、50、100、500、1000、5,000、10,000 或 20,000 种不同的蛋白。大部分不同的抗原蛋白存在于抗原细胞的蛋白制品中。而且，蛋白制品中的蛋白在体外与 HSPs 或 α 2M 形成复合物前可以进行蛋白酶消化。蛋白制品的蛋白在体外与 HSPs 或 α 2M 形成复合物前也可以不进行蛋白酶消化。

为制备抗原细胞或病毒颗粒的蛋白制品，可利用本领域中已知的标准方法实施抗原细胞的裂解或细胞壁、细胞膜、病毒颗粒结构的解体。例如，在各种实施方案中，可用机械切割、超声、冻融、调节细胞周围渗透压或各种技术联合的方法裂解抗原细胞。在较不优选的实施方案中，可以用诸如变性剂的化学物质裂解抗原细胞。

一旦细胞被裂解，最好是去除细胞碎片、非蛋白性物质或不含胞浆和/或膜来源蛋白（包括细胞器膜中的蛋白）的物质。可以用诸如低速离心或过滤之类的技术去除这些成分。细胞碎片及完整的细胞去除后，可进行高速离心将留在上清液的胞浆蛋白和沉积于沉淀中的膜来源蛋白分离。可用本领域内众所周知的标准方法将病毒蛋白从病毒颗粒中提取出来。在一些实施方案中，所用方法不会或不设计用来选择性地去

30 除或保留抗原细胞、胞浆或膜中的任意一种或几种特定蛋白。

在其他实施方案中，来源于抗原细胞的蛋白可通过通常的生化及生物物理性质任选地分开来，如大小、电荷或其组合。可用本领域中任何一种已知技术实施分离。选择包含至少 20、50、100、500、1000、5,000、10,000 或 20,000 种不同蛋白，或包括至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 存在于抗原细胞或病毒颗粒或抗原细胞组分之不同蛋白及肽的蛋白/肽组分，与 HSPs 或 $\alpha 2M$ 形成复合物。

一种用于制备包含胞浆蛋白的蛋白制品的示范性而不是限制性方法如下：

10 将细胞悬浮于 3 倍体积的 1×裂解缓冲液中于冰上孵育 20 分钟；其中裂解缓冲液包含 pH7.5 的 30 mM 碳酸氢钠和 1 mM PMSF，细胞可以是来源于病人活检的肿瘤细胞或体外培养的肿瘤细胞，或是受病原体感染的细胞。然后在一个杜恩斯匀浆器中将低渗-肿胀的细胞匀浆直到超过 95% 的细胞裂解。作为切割的替代选择，也可在冰上将
15 细胞超声至镜检超过 99% 的细胞裂解。使用超声方法时，在超声前将细胞悬浮于诸如磷酸盐缓冲液 (PBS) 的缓冲液中，其中缓冲液包含 1 mM PMSF。

裂解液于 1000×g 离心 10 分钟以除去完整的细胞、细胞核及其他细胞碎片。所得上清液在约 100,000×g 离心约 1 小时，重新获得上清液。100,000×g 的上清可在 4°C 用 PBS 或其他适当的缓冲液透析 36
20 小时 (3 次，每次 100 倍体积) 以提供本发明中可溶的胞浆蛋白。如果需要的话，可通过过滤或低速离心去除制品中的不溶性物质。

一种用于制备包含膜来源蛋白的蛋白制品的示范性而不是限制性方法如下：

25 将细胞悬浮于 3 倍体积的 1×裂解缓冲液中，于冰上孵育 20 分钟；其中裂解缓冲液包含 pH7.5 的 30 mM 碳酸氢钠和 1 mM PMSF，细胞可以是来源于病人活检的肿瘤细胞或体外培养的肿瘤细胞，或是受病原体感染的细胞。然后在一个杜恩斯匀浆器中将低渗-肿胀的细胞匀浆直到超过 95% 的细胞裂解。作为切割的替代选择，也可在冰上将
30 细胞超声直到显微镜观察超过 99% 的细胞裂解。使用超声方法时，在超声前将细胞悬浮于诸如磷酸盐缓冲液 (PBS) 的缓冲液中，其中

缓冲液可包含 1 mM PMSF。

裂解液于 100,000×g 离心 10 分钟以收集细胞膜。将 100,000×g 离心沉淀用含 1%去氧胆酸钠（不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）的 5 倍体积 PBS 溶解，于冰上孵育 1 小时，这样就可使膜来源蛋白从脂质双层脱离并得以分离。所得悬液于 20,000g 离心 30 分钟，收集所得上清用数种不同的 PBS（不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）透析以除去变性剂。所得透析产物于 100,000×g 离心 90 分钟，将上清进一步纯化。然后将钙和镁同时加入上清，使其终浓度为 2 mM。如果需要的话，可通过过滤或低速离心去除制品中的不溶性物质。

10 在一个具体的实施方案中，从抗原细胞获得的该组胞浆和/或膜来源蛋白可直接与 HSP 或 $\alpha 2\text{M}$ 形成复合物而不需蛋白酶处理或任何进一步的提取或选择步骤。作为替代选择，蛋白在形成复合物前可进行蛋白酶处理。

15 4.2.2、来源于抗原细胞的肽

依据本发明，可将从抗原细胞获得的胞浆蛋白或膜来源蛋白选择性地消化以产生抗原肽。在一个实施方案中，将胞浆蛋白或膜来源蛋白进行消化。在另一个实施方案中，消化反应中同时使用胞浆蛋白和膜来源蛋白来产生抗原肽。在优选实施方案中，用于蛋白酶消化的蛋白制品没有经过任何选择性地去除或保留抗原细胞、胞浆或膜中的任意一种或几种特定蛋白的制备步骤。

20 本发明中可用各种蛋白酶或蛋白分解酶从抗原细胞的蛋白制品产生一组包含抗原肽的肽。酶消化可以单独进行，也可与本领域众所周知的任意蛋白分解酶中联用，这些酶包括但不限于胰酶、葡萄球菌肽酶 I（亦称为 V8 蛋白酶）、糜蛋白酶、胃蛋白酶、组织蛋白酶 G、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶。胰酶是一种切割赖氨酸及精氨酸羧端的特异性丝氨酸蛋白酶。受切割位点的数目所限，可以预计会保留许多完整的 MHC 结合表位。葡萄球菌肽酶 I 也是一种丝氨酸蛋白酶，可特异性在谷氨酸及天冬氨酸残基后进行切割。可用单一的蛋白酶或蛋白酶混合物实施切割。所用的蛋白酶或蛋白分解酶在该特定酶的合适条件下孵育。优选纯化的酶。也可用非酶学方法如溴化

1 氰切割产生肽。要消化的蛋白制品可等分成多份反应液，每一反应液
使用一种不同的酶，所得肽可以任意合在一起使用。在酶反应中将蛋
白完全消化可能是不必要的。反应的结果是每一种存在于蛋白制品中
的蛋白均生成了一组多样的、不同的肽。不同肽组的生成使得当这些
5 肽与 HSPs 或 α 2M 形成复合物时产生可诱导针对蛋白制品中抗原之蛋
白免疫应答的抗原肽更为可能。在一个优选实施方案中，要消化的蛋
白制品等分成两份单独的反应液，并用两种不同的蛋白分解酶从蛋白
制品中的蛋白生成两组不同的肽。根据蛋白、酶及反应条件的不同，
反应液中可能仍含未消化的蛋白。在一优选实施方案中，分别用胰酶
10 和葡萄球菌肽酶 I 消化蛋白制品。

在另一个优选实施方案中，本发明所用的蛋白分解酶呈现出与蛋
白酶体中发现的蛋白分解活性类似的活性。蛋白酶体负责将细胞中错
误折叠或损伤的胞浆或核蛋白进行溶酶体外的内催化降解。蛋白酶体
可将蛋白最终完全降解成单一氨基酸，也可产生最佳的 I 类主要组织
15 相容复合物 (MHC I) 结合表位，也可产生更长肽前体，该前体可能
在细胞的其他地方进一步修剪成细胞毒 T 细胞表位。蛋白酶体偏向
于切割碱性、酸性及两性氨基酸的羧基端 (COOH)。存在于蛋白酶
体中的已知三种蛋白分解酶活性为糜蛋白酶样活性、胰蛋白酶活性和
肽-谷氨酰胺-肽水解活性 (Uebel 和 Tampe, 1999, Curr. Opin.
20 Immunol., 11: 2203-208)。这样，具有如此活性及特异性的酶可以
单独使用或联合使用来消化蛋白制品。在一个优选实施方案中，使用
了胰蛋白酶、糜蛋白酶和/或肽-谷氨酰胺-肽水解酶。

所得肽消化液包括抗原肽、非抗原肽及单一氨基酸残基。反应液
也可能包含未消化或未完全消化的抗原蛋白。对本发明的分解性酶消
25 化液进行监测以便产生长度在理想范围内的肽。在一个优选实施方案
中，所产生的肽约为 7 个到 20 个氨基酸残基。大部分被 I 类及 II 类
MHC 呈递至 T 细胞的抗原肽在此范围内。在各种实施方案中，该组
肽包括长度在 6~21、8~19、10~20 或至少 7、8、9、10、11、12、15、
20、25、30、40、45 或 50 个氨基酸残基的肽。在优选实施方案中，
30 抗原肽含有 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或
20 个氨基酸残基。为监测蛋白消化的进度，可进行检验反应，即从

反应液中取出蛋白消化液的一小份并通过 tricine-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (“tricine-PAGE”)、高效液相色谱 (“HPLC”) 或质谱、或其他任何本领域内已知方法测定肽链长度来监测消化的进度。利用这样的检验反应可以决定在特定条件下什么时候可以产生特定长度范围的肽链片段。其他可控制的反应变量包括反应中蛋白的量、温度、孵育持续时间及辅助因子存在与否，等等。

一旦从一种抗原细胞生成特定长度范围之肽链片段的合适条件得以建立，酶反应条件可以加以复制以产生可汇合的抗原肽。在肽链与 HSPs 或 $\alpha 2M$ 形成复合物前宜终止酶消化反应。在本发明的一个实施方案中，可用抑制剂终止酶消化。依据用于蛋白消化的酶，可用于本发明的酶抑制剂包括但不限于 PMSF、苯丁抑制素、氨肽酶抑制剂、亮抑酶肽、半胱氨酸蛋白酶抑制剂。大部分蛋白酶的抑制剂在本领域内是众所周知的。此外，另一种终止酶消化的方法是用物理方法将酶从反应液去除。可使所选酶吸附到固相上，如树脂或易于通过本领域内离心或过滤之类众所周知的方法除去的物质，达到清除该酶的目的。蛋白制品可与固相接触或流过固相一段时间。这种固定酶可通过商业途径购买，或利用本领域内众所周知的固定酶的方法生成。

酶消化结束时，可任选地将这些肽与制品中的低分子物质如二肽或单一氨基酸残基分离开来。例如，可通过离心使肽通过诸如 Centriprep-3 之类的膜而达到分离目的。任选地，利用其生化和/或生物物理性质，如长度、电荷或其组合来分离肽。可用本领域内任何已知技术来实施分离，从而产生包含至少 50、100、500、1000、5,000、10,000、20,000、50,000 或 100,000 种不同肽的消化了的蛋白制品。

在本发明的另一个实施方案中，存在于抗原细胞的内源肽可单独用于本发明中，也可与胞浆蛋白或膜来源蛋白进行分解消化后产生的肽联合使用。存在于抗原细胞的内源肽包括在体内与 HSP 和/或 I 类和 II 类 MHC 分子形成复合物的肽。依照本发明，从抗原细胞直接分离的肽可与 HSPs 和/或 $\alpha 2M$ 形成复合物。

在具体的实施方案中，分离过程中使用胞浆蛋白或膜来源蛋白。在另一个实施方案中，分离过程联合使用胞浆蛋白和膜来源蛋白。在优选实施方案中，分离过程所用的蛋白制品没有经过选择性地去除或

保留抗原细胞、胞浆或膜中任意一种或几种特定蛋白的方法处理。抗原肽可直接从细胞的蛋白制品中分离而不预先将抗原肽和 HSP 或 MHC 分子的复合物分离出来。优选的蛋白制品包括包含至少 20、50、100、500、1000、5,000、10,000 或 20,000 种不同蛋白，或包含至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 存在于抗原细胞或病毒颗粒或抗原细胞组分之不同蛋白。

在各种实施方案中，该方法包括将蛋白制品用 ATP、盐酸胍处理，和/或将蛋白制品暴露于酸性条件下，以便可以将蛋白制品中与蛋白相关的抗原肽如 HSPs 和 I 类及 II 类 MHC 分子提取出来。可用多种不同的酸，包括但不局限于三氟乙酸。将肽从 HSP-肽复合物中分离出来的方法在本领域中已是众所周知，如 Menoret 等，1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262 (3): 813-8, 将其整体在此引入作为参考。也可应用诸如 Marston 和 Hartley 所述 (1990, *Meth. Enzymol.*, 182: 264-276) 之类的本领域内已知方法来解离蛋白聚积体。

具体地说，分离过程包括将抗原细胞的蛋白制品与 ATP 接触。例如于室温接触 1 小时，和/或用三氟乙酸 (TFA) 如 0.1%TFA 处理抗原细胞的蛋白制品。处理优选包括在 0.1%TFA 中对蛋白制品进行超声。在一个最优选实施方案中，蛋白制品先暴露于 ATP 中，然后在 0.1%TFA 中超声。本发明可在细胞裂解和分离前使用各种蛋白酶抑制剂以防止或减少与 HSPs 或 α 2M 无内源性相关的细胞蛋白切割。例如，可使用 14 种蛋白酶抑制剂的混合物：2 mM 的苯甲磺酰氟 (PMSF)、1 mM 的乙二胺四乙酸 (EDTA)、1 mM 的乙二醇双 (P-氯乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸 (EGTA) (均购自 Sigma, Louis, MO) 及 20 mg/ml 的抗蛋白酶、5 mg/ml 的苯丁抑制素、20 ptg/ml 的 Chemostatin、20 Jig/ml 的 E64、1 ttg/ml 的亮抑酶肽、1 gg/ml 的胃蛋白酶抑制素、40 Ag/ml 的 Pefabloc 及 10 tkg/ml 的脱辅蛋白 (以上全购自 Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)。来源于蛋白制品的肽包括至少 7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、40、45 或 50 个氨基酸残基长度的抗原肽及非抗原肽。分离过程结束时，优选在与 HSP 或 α 2M 形成复合物之前将肽从制品中的蛋白分开而加以回收。例如，肽的回收方法包括通过离心使肽通过诸如 Centriprep-3 之类的

膜、真空干燥、反相层析如在 BioCad20 微分 HPLCPoros RH2 柱 (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA) 进行分离、在水中用 0.1%TFA 平衡及用乙腈提取。相应地, 内源性存在于抗原细胞中及从蛋白制品直接分离的抗原肽可与 HSPs 和/或 α 2M 形成复合物。此外, 包含内源性存在于抗原细胞的肽及经胞浆和膜来源蛋白消化所得肽的一组混合肽也可与 HSPs 和/或 α 2M 形成复合物。

4.3、HSPs 和 α 2M 的制备

依据本发明, 来源于抗原细胞的抗原肽与 HSPs 和/或 α 2M 形成复合物。本文描述了可用于分离和制备 HSPs 及 α 2M 的示范性方法。

在本发明实践中有用的热休克蛋白, 本文中亦可称为应激蛋白, 可以选自满足下列标准的任何蛋白。当细胞暴露于应激性刺激剂时该蛋白在细胞内的浓度上升, 该蛋白能与其他蛋白或肽结合, 在三磷酸腺苷存在的条件下或酸性条件下可释放所结合的蛋白或肽; 或其与有上述性质的细胞蛋白的同源性至少为 35%。

热休克蛋白 (HSPs) 是最先得以鉴定的应激蛋白。正如其名称所示, HSPs 由对热休克应答的细胞所合成。以家族成员的分子量为基础, 至今已鉴定出五大类 HSPs。这五大类命名为 sHSPs (小热休克蛋白)、HSP60、HSP70、HSP90、HSP100, 其中数字表示 HSPs 近似的千道尔顿分子量。除了主要的 HSP 家族外, 一种驻留于内质网的蛋白, 称为钙网蛋白, 是另一种热休克蛋白, 当它形成复合物形式的抗原分子时可引发免疫应答 (Basu 及 Srivastava, 1999, J. Exp. Med., 189: 797-202)。其他可在本发明使用的应激蛋白包括但不限于 grp78 (或 BiP)、蛋白二硫键异构酶 (PDI)、HSP110 及 grp170 (Lin 等, 1993, Mol. Biol. Cell, 4: 1109-1119; Wang 等, 2001, J. Immunol., 165: 490-497)。随后发现 HSP 家族中的许多成员可在包括营养剥夺、代谢紊乱、氧自由基、缺氧和细胞内病原体感染在内的其他应激性刺激反应中诱导产生 (见 Welch, 1993. 5, Scientific American, 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol., 8: 401-420; Craig, 1993, Science, 260: 1902-1903; Gething 等, 1992, Nature 355: 33-45; Lindquist 等, 1988, Annu. Rev. Genetics 22: 631-677), 将其

内容在此引入作为参考。可以预期属于这些家族的所有 HSPs/应激蛋白可在本发明实践中使用。

主要 HSPs 在应激细胞内蓄积的水平很高，但在非应激细胞内的蓄积水平为低到中等。举例来说，正常温度下强诱导性的哺乳动物 HSP70 几乎检测不到，但在热休克时则成为合成最为活跃的蛋白之一（Welch 等，1985, *J. Cell. Biol.*, 101: 1198-1211）。相比之下，正常温度下大部分，但非全部哺乳动物的细胞内存在丰富的 HSP90 及 HSP60 蛋白，且可进一步被热刺激所诱导（Lai 等，1984, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2802-10; van Bergen en henegouwen 等，1987, *Genes Dev.*, 1: 525-31）。

热休克蛋白属于现有最保守的蛋白。例如，DnaK 为来自大肠杆菌的 HSP70，其氨基酸序列约 50%与来自脱皮(excoriates)的 HSP70 蛋白相同（Bardwell 等，1984, *Proc Natl. Acad. Sci.*, 81: 848-852）。HSP60 及 HSP90 家族也显示类似的家族内高度保守性（Hickey 等，1989, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2615-2626; Jindal, 1989, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2279-2283）。此外，发现 HSP60、HSP70 及 HSP90 家族由与应激蛋白序列相关但表达水平不因应激而改变的蛋白组成，例如其氨基酸有 35%以上是完全相同的。因此，本文预期的热休克蛋白或应激蛋白定义包括氨基酸至少有 35%与这三大家族中细胞内表达水平在对应激性刺激物应答时升高之成员相同的其他蛋白、突变蛋白、类似物及其变异体，优选有 55%至 75%氨基酸相同者，最优选有 75%至 85%氨基酸相同者。

在一个实施方案中，HSP-抗原肽复合物中的 HSP 部分需要从细胞纯化，下文第 4.3.~4.3.3 部分所描述的示范性纯化方法可用于纯化 HSP-抗原肽复合物，然后在 ATP 存在的条件下或酸性条件下使 HSPs 从内源性 HSP-抗原肽复合物分开，随后在体外与一组抗原肽形成复合物。见 Pen 等，1997, *J. Immunol. Methods.*, 204: 13-21; Li 及 Srivastava, 1993, *EMBO J.*, 12: 3143-3151; 将其整体在此引入作为参考。尽管所述的是用于肿瘤细胞，本文所述的方案可用于将 HSPs 从任何受感染细胞及真核细胞分离出来，如细胞内病原体感染的组织、分离细胞或永生细胞，及肿瘤细胞或肿瘤细胞系。

4.3.1、HSP70-肽复合物的制备及纯化

HSP70-肽复合物的纯化以前已有描述,例如可见 Udono 等,1993, J. Exp. Med., 178: 1391-1396。下文以实施例的方式描述了一种可以使用的方
5 使用的方法,但不局限于此。

开始,将肿瘤细胞悬浮于3倍体积的1×裂解缓冲液中,于冰上孵育20分钟;其中裂解缓冲液包含pH7.5的30 mM碳酸氢钠、1 mM PMSF。然后,将沉淀置于冰上超声,直到镜检超过99%的细胞裂解为止。作为超声的替代选择,可在杜恩斯匀浆器中用机械切割的方法
10 将细胞匀浆将细胞裂解,直到超过95%的细胞裂解为止。

然后将细胞裂解液于1,000 g离心10分钟以除去未裂解的细胞、细胞核及其他细胞碎片。所得上清液于100,000 g离心90分钟,收集上清液与已用含2 mM Ca^{2+} 及2mM Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液(PBS)平衡的Con A琼脂糖凝胶混合。当细胞以机械切割裂解时,在与Con A
15 琼脂糖凝胶混合前用等体积2×裂解缓冲液稀释。将上清液于4°C和Con A琼脂糖凝胶结合2至3小时。收集不能结合的物质,在pH为7.5、含20 mM Tris-乙酸、0.1 mM EDTA、10 mM NaCl及1 mM PMSF的缓冲液中透析36小时(三次,每次100倍体积)。透析液以17,000 rpm (Sorvall SS34离心机)的速度离心20分钟。收集上清液,加到
20 已用pH为7.5、含20 mM Tris-乙酸、20 mM NaCl、0.1 mM EDTA及15 mM 2-巯基乙醇的缓冲液平衡的Mono Q FPLC层析柱上。该层析柱以20 mM至500 mM的NaCl进行浓度梯度洗脱,洗脱的组分通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,用适当的抗HSP70抗体(如来自N27F3-4克隆的抗体,产自StressGen)
25 进行免疫印迹加以鉴定。

汇集对抗HSP70抗体具有强免疫应答性的组分,用硫酸铵沉淀HSP70-肽复合物,具体地说是用50%~70%的硫酸铵。以17,000 rpm (Sorvall SS34离心机)离心,收集沉淀并用70%硫酸铵洗涤。溶解洗涤后的沉淀,并于Sephadex^R G24层析柱(Pharmacia)上进行凝胶
30 过滤以除去残留的硫酸铵。如有必要,由此获得的HSP70制品可再用上述的Mono Q FPLC层析柱纯化。

利用该方法，HSP70-肽复合物可纯化至明显的均质性。典型地说，1 g 细胞/组织可提纯出 1 mg HSP70-肽复合物。

改进的 HSP70 纯化方法包括将细胞蛋白与附于固体底物的 ATP 或其不可水解类似物接触，以便裂解液中的 HSP70 可以与 ATP 或其不可水解类似物结合，并提取所结合的 HSP70。优选的方法使用 ATP 附于固体基底（如 ATP-琼脂糖）的柱层析。所得 HSP70 制品纯度更高，不含污染肽。HSP70 的收率也显著提高，约大于 10 倍。

此外，用 ADP 不可水解类似物代替 ATP 的层析方法来纯化 HSP70-肽复合物。举例来说，但不限于此，按下述方法通过 ATP-琼脂糖层析纯化不含肽的 HSP70：

Meth A 肉瘤细胞（500 万个细胞）在低渗缓冲液中匀浆，裂解液在 4°C 于 100,000 g 离心 90 分钟。上清液加至 ATP-琼脂糖柱。该柱在缓冲液中洗涤，并用 5 倍于柱容积的 3 mM ATP 洗脱。在总数为 15 级份的洗脱液中，HSP70 在第 2 至第 10 级级分中得以洗脱。所洗脱的级分通过 SDS-PAGE 分析。HSP70 可用本方法纯化至明显的均质性。

4.3.2、HSP90-肽复合物的制备及纯化

下文以实施例的方式描述了一种可以使用的方法，但不局限于此。

首先将肿瘤细胞悬浮于 3 倍体积的 1×裂解缓冲液中；其中裂解缓冲液包含 30 mM 碳酸氢钠和 1 mM PMSF，pH7.5。然后，将沉淀置于冰上超声，直到镜检超过 99%的细胞裂解为止。作为超声的替代选择，可在杜恩斯匀浆器中用机械切割的方法将细胞匀浆，直到超过 95%的细胞裂解为止。

然后将细胞裂解液于 1,000 g 离心 10 分钟以除去未裂解的细胞、细胞核及其他细胞碎片。所得上清液于 100,000 g 离心 90 分钟，收集上清液与已用含 2 mM Ca^{2+} 及 2 mM Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液（PBS）平衡的 Con A 琼脂糖凝胶混合。当细胞以机械切割裂解时，在与 Con A 琼脂糖凝胶混合前用等体积 2×裂解缓冲液稀释。将上清于 4°C 和 Con A 琼脂糖凝胶结合 2 至 3 小时。收集不能结合的物质在 pH 为 7.5、

含 20 mM Tris-乙酸、0.1 mM EDTA、10 mM NaCl 及 1mM PMSF 的缓冲液中透析 36 小时(三次,每次 100 倍体积)。透析液以 17,000 rpm (Sorvall SS34 离心机)的速度离心 20 分钟。收集上清液,加到已用 pH 为 7.5、含 20 mM Tris-乙酸、20 mM NaCl、0.1mM EDTA 及 15 mM 2-巯基乙醇的缓冲液平衡的 Mono Q FPLC 层析柱上。该层析柱用 20 mM 至 500 mM 的 NaCl 进行盐浓度梯度洗脱。

洗脱的级分用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离,用适当的抗 HSP70 抗体,如 3G3 (Affinty Bioreagents) 对含 HSP90-肽复合物进行免疫印迹加以鉴定。利用该方法, HSP90-肽复合物可纯化至明显的均质性。典型地说, 1 g 细胞/组织可提纯出 150 μ g ~200 μ g HSP70-肽复合物。

4.3.3、GP96-肽复合物的制备及纯化

下文以实施例的方式描述了一种可以使用的方法,但不局限于此。

首先将肿瘤块悬浮于 3 倍体积的 1 \times 裂解缓冲液中,置冰上孵育 20 分钟使细胞胀大;其中裂解缓冲液包含的 30 mM 碳酸氢钠和 1 mM PMSF, pH7.5。然后,将肿瘤块置于杜恩斯匀浆器(依据各型号不同匀浆器合适的清除率各不相同)中匀浆直到超过 95%的细胞裂解为止。

然后将细胞裂解液于 1,000 g 离心 10 分钟以除去未裂解的细胞、细胞核及其他细胞碎片。所得上清液于 100,000 g 离心 90 分钟。gp96-肽复合物可从 100,000 g 离心后的沉淀中纯化,也可从离心上清液中纯化。

当从上清液纯化时,上清液用等体积 2 \times 裂解缓冲液稀释。将上清液于 4 $^{\circ}$ C 和 Con A 琼脂糖凝胶结合 2 至 3 小时。将混悬液加到层析柱上,用 1 \times 裂解缓冲液洗涤,直到 OD₂₈₀ 降至基线。将 1/3 柱床体积的 10% α -甲基甘露糖苷 (α -MM) 溶于含 2 mM Ca²⁺ 及 2mM Mg²⁺ 的磷酸盐缓冲液中,洗涤层析柱。然后用一片石蜡膜封柱,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。将柱凉至室温,从柱底部移去石蜡膜。将 5 倍柱容积的 α -MM 缓冲液加至层析柱并洗脱,洗脱液通过 SDS-PAGE 分析。

典型地说，所得物质的纯度约为 60%~95%，但纯度随细胞类型及所用组织裂解液的不同而不同。然后将样品上样到已用含 5 mM 磷酸钠、pH7 的缓冲液平衡的 Mono Q FPLC 层析柱 (Pharmacia)。用 0~1 M 的 NaCl 浓度梯度将蛋白从层析柱洗脱下来，gp96 级分于 NaCl 浓度为 440 mM~550 mM 时洗脱。

但是可通过两个额外的步骤对此法加以改进，以便始终产生明显均一的 gp96-肽复合物。可使用任意一步或两步同时使用。一个可选择的步骤包括在 Con A 纯化步骤前进行硫酸铵沉淀，另一个可选择的步骤包括在 Con A 步骤之后、Mono Q FPLC 步骤之前进行 DEAE-琼脂糖凝胶纯化。

如下文以实施例方式所述的第一步可选择步骤中，往 100,000g 离心步骤所获得上清液中加入硫酸铵至终浓度为 50%。装溶液的烧杯置于冰水浴槽内，硫酸铵需缓慢加入，同时轻轻搅拌溶液。溶液于 4°C 搅拌约 0.5~12 小时，然后以 6000 rpm (Sorvall SS34 离心机) 离心。取上清，加入硫酸铵溶液使硫酸铵饱和度达到 70%，以 6000 rpm (Sorvall SS34 离心机) 离心。取沉淀，悬于含 70%硫酸铵的 PBS 洗涤。混合物以 6000 rpm (Sorvall SS34 离心机) 离心，沉淀溶于含 2 mM Ca^{2+} 及 2 mM Mg^{2+} 的 PBS 中。以 15,00 rpm (Sorvall SS34 离心机) 稍离心除去未溶解的物质。所得溶液与 Con A 琼脂糖凝胶混合，以下步骤与前面方法相同。

如下文以实施例方式所述的第二步可选择步骤中，将从 Con A 层析柱洗脱下来的级分中含有 gp96 的级分汇集，将该缓冲液用透析方法与 pH 为 7 的、含 5 mM 磷酸钠缓冲液和 300 mM NaCl 的缓冲液进行交换，优选在 Sephadex G25 层析柱上进行缓冲液交换。缓冲液交换后，将溶液与预先用 pH 为 7 的、5 mM 磷酸钠缓冲液、300 mM NaCl 平衡的 DEAE-琼脂糖凝胶混合。蛋白溶液及磁珠轻轻地混合 1 小时，装入层析柱。用 pH 为 7 的 5 mM 磷酸钠缓冲液、700 mM NaCl 洗柱，到 280nm 处的吸光度回落至基线为止。然后用 5 倍容积的 pH 为 7 的 5 mM 磷酸钠缓冲液、700 mM NaCl 将所结合的蛋白洗脱下来。汇集含蛋白的级分，用 pH 为 7 的 5 mM 磷酸钠缓冲液稀释，使盐浓度降至 175mM。所得物质上样到预先用 pH 为 7 的 5 mM 磷酸钠缓冲液平衡

的 Mono Q FPLC 层析柱 (Pharmacia)，用前述方法将结合至 Mono Q FPLC 层析柱 (Pharmacia) 的蛋白洗脱下来。

然而，本领域的技术人员可能利用常规的实验来评估将第二个可选步骤引入纯化方案的效益，这是可以理解的。此外，加入每一个可选步骤所带来的效益依起始材料的不同而不同，这也是可以理解的。

gp96 组分从 100,000 g 离心沉淀分离后，将沉淀悬于含 1% 去氧胆酸钠或 1% oxtyl 吡喃葡萄糖苷 (但不含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+}) 的 5 倍体积 PBS 中，置冰上孵育 1 小时。悬液于 20,000 g 离心 30 分钟，所得上清液用 PBS (也不含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+}) 透析交换数次以除去变性剂。透析液于 100,000 g 离心 90 分钟，收集上清液，加入钙离子或镁离子使其终浓度分别为 2 mM。根据从 100,000 g 离心上清液分离 gp96-肽复合物的未改进方法或改进方法来纯化样品，方法见前文。

利用本方法，gp96-肽复合物可纯化至明显的均质性。典型地说，1 g 细胞/组织可提纯出 10 μg ~ 20 μg gp96。

15

4.3.4、 $\alpha 2\text{M}$ 的制备及纯化

$\alpha 2$ -巨球蛋白可通过商业途径购买或从人类血液中提纯、制备。可利用下文以实施例方式描述的、不具有限制性的实验方案纯化血液来源的 $\alpha 2\text{M}$ ：

从受试者采集血液，让其凝结成块。以 14,000 g 离心 30 分钟以获得血清。将血清上样到已用 pH 为 7.6 的 0.04 M Tris 缓冲液及 0.3 mmM NaCl 平衡的凝胶过滤层析柱 (Sephacryl S-300R)。血清量约为 10 ml 时需用 65 ml 的层析柱。收集 3 ml 为一级分，对各级分用 $\alpha 2\text{M}$ 特异性抗体进行点印迹来检验 $\alpha 2\text{M}$ 的存在与否。汇集 $\alpha 2\text{M}$ 阳性的级分，上样到 PD10 层析柱以便将缓冲液与含 PMSF 的、PH 为 7.5 的 0.01M 磷酸钠缓冲液进行交换。然后将汇集的级分上样到已用磷酸盐缓冲液平衡的 Con A 层析柱 (10 ml)。洗柱，用 5% 甲基甘露糖吡喃糖苷进行洗脱。洗脱液流过 PD10 层析柱以便将缓冲液与醋酸钠缓冲液 (0.05 mmM; pH6.0) 进行交换。将 DEAE 层析柱用醋酸缓冲液平衡，然后将样品上样到该层析柱。洗柱，用 0.13 M 的醋酸钠将蛋白洗脱。汇集含 $\alpha 2\text{M}$ 的组分。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明，

用本方法可将 $\alpha 2M$ 纯化至明显的均质性。

4.3.5、热休克蛋白及 $\alpha 2M$ 的重组表达

在本发明的一些实施方案中，可从高水平表达 HSPs 及 $\alpha 2M$ 的细胞中制备 HSPs 及 $\alpha 2M$ ，这些细胞是通过重组方法而得到的。许多 HSPs 及 $\alpha 2M$ 的氨基酸序列和核苷酸序列通常可从序列库获得，如 GenBank。可使用计算机程序，如 Entrez 等来浏览数据库，并通过登记号来检索任意感兴趣的氨基酸序列及核苷酸序列。也可利用诸如 FASTA 及 BLAST 之类的程序搜索该数据库以鉴定及查询有着不同程度相似性的序列，这些程序以序列对比得分及统计将相似的序列分级。这类可用于本发明的组合物、方法和 HSP-肽复合物制备的 HSPs 核苷酸序列的非限制性实例如下：人 HSP70，GenBank 登记号 No.M24743，Hunt 等，1995，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，82：6455-6489；人 HSP90，GenBank 登记号 No.X15183，Yamazaki 等，15 Nucl. Acids Res.，17：7108；人 gp96，GenBank 登记号 No.X15187，Maki 等，1990，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，87：5658-5562；人 Bip：GenBank 登记号 No.M19645；Ting 等，1988，DNA，7：275-286；人 HSP27，GenBank 登记号 No.M24743；Hickey 等，1986，Nucleic Acids Res. 14:4127-45；小鼠 HSP70：GenBank 登记号 No.M 35021，Hunt 20 等，1990，Gene，87：199-204；小鼠 gp96，GenBank 登记号 No.M16370，Srivastava 等，1987，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，85：3807-3811；及小鼠 BiP：GenBank 登记号 No.U16277，Haas 等，1988，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，85：2250-2254。也可使用编码 HSPs 的简并序列。

本文中术语“ $\alpha 2M$ ”包括 $\alpha 2M$ 的其他多肽片段、类似物及变体，25 它们与 $\alpha 2M$ 至少有 35%至 55%，优选 55%至 75%，最优选有 75%至 85%氨基酸相同性，可与抗原肽形成复合物，抗原呈递细胞可摄取该复合物并激发针对该抗原分子的免疫应答。本发明的 $\alpha 2M$ 分子可通过商业途径购买、从天然来源提纯而得（Kurecki 等，1979，Anal. Biochem.，99：415-420）、化学合成或重组产生。可用于制备本发 30 明 $\alpha 2M$ 多肽的非限制性 $\alpha 2M$ 核苷酸序列实例如下：GenBank 登记号 Nos. M11313、P01023、AAA51551；Kan 等，1985，Proc. Nat. Acad. Sci.，

82: 2282-2286。也可使用编码 α 2M的简并序列。

一旦编码所选 HSPs 或 α 2M 的核苷酸序列得以鉴定, 则可获得该核苷酸序列或其片段, 并将之克隆到用于重组表达的表达载体中。然后将表达载体引入宿主细胞使 HSPs 或 α 2M 增殖。本文详细描述了 HSPs 或 α 2M 的重组生产方法。

可以利用标准的分子生物学技术(例如参见《酶学方法》, 1987, 第 154 卷, Academic 出版社; Sambrook 等, 1989, 分子克隆-实验手册, 第二版, Cold Spring Harbor 出版社, New York, 及 Current protocols in molecular biology, Ausubel 等编, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York。将其整体在此引入作为参考。), 通过 DNA 扩增或直接从组织、细胞培养物或克隆的 DNA (如 DNA 文库) 进行分子克隆而获得所需 DNA。除了编码区外, 来源于基因组 DNA 的克隆还可能包含调控区及内含子 DNA 区; 来源于 cDNA 的克隆则只含外显子序列。不管采用何种来源, HSPs 或 α 2M 基因应该克隆到一个用于基因增殖的合适载体中。

在一个优选实施方案中, 可利用从相关或内源性 HSPs 或 α 2M 已知序列设计的引物和聚合酶链反应(PCR)扩增技术从基因组或 cDNA 扩增得到 DNA。在筛选前, 用 PCR 扩增 DNA 克隆或基因组文库或 cDNA 文库中的所需序列。例如, 可利用热循环仪和 Taq 聚合酶(Gene Amp[®]) 实施 PCR。通常通过聚合酶链反应(PCR)来获得感兴趣的基因或基因片段。例如, 利用编码开放阅读框的核苷酸序列两侧的 PCR 引物可以获得任意目标长度的、编码 HSPs 或 α 2M 的核苷酸序列。此外, 如果存在合适的切割位点, 可用限制性内切酶在 HSPs 或 α 2M 基因序列合适的位点切割使编码 HSPs 或 α 2M 的 DNA 片段释放出来。如果适宜的限制性位点不存在, 可利用本领域内已知的定点突变和/或 DNA 扩增方法在合适的位置产生这样的位点(例如, 可见 Shankarappa 等, 1992, PCR Method Appl., 1: 277-278)。然后分离编码 HSPs 或 α 2M 的 DNA 片段, 将其接入合适的表达载体, 小心操作以确保合适的翻译阅读框得以保持。

在另一个实施方案中, 为了从基因组 DNA 进行 HSPs 或 α 2M 基因

的分子克隆, 从基因组文库产生 DNA 片段。既然一些编码相关 HSPs

或 $\alpha 2M$ 的序列可以获得并可以纯化、标记,可通过与标记探针进行核酸杂交来筛选基因组DNA文库中所克隆的DNA片段(Benton及Davis, 1977, Science, 196: 180; Grunstein及Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 3961)。与探针具有基本同源性的DNA片段将发生杂交。也可用限制性酶消化,及将片段大小与依据已知限制性酶切图谱预测之片段相比,来鉴定合适的片段。

HSPs或 $\alpha 2M$ 基因组的替代性分离方法包括但不限于从已知序列化学合成基因序列本身,或合成编码HSPs或 $\alpha 2M$ 的mRNA所对应的cDNA。例如,用于HSPs或 $\alpha 2M$ cDNA基因克隆的RNA可以从表达HSPs或 $\alpha 2M$ 的细胞分离。利用本领域中已知方法构建cDNA文库并用例如已公布的基因组DNA文库筛选方法进行筛选。如果针对该HSPs或 $\alpha 2M$ 的抗体可获得,则将标记抗体与合成HSPs或 $\alpha 2M$ 的克隆相结合而鉴定HSPs或 $\alpha 2M$ 。

下面以实施例方式但不加限制地描述了其他克隆编码HSPs或 $\alpha 2M$ 的核苷酸序列的具体实施方案:在一个具体的实施方案中,将包含编码HSPs或 $\alpha 2M$ 核苷酸序列的探针在本领域内众所周知的各种严格条件(包括那些种属交叉杂交的情况)下进行杂交而鉴定和获得编码HSPs或 $\alpha 2M$ 的核苷酸序列。

可用本领域内任何已知的突变技术修饰DNA序列中的一个核苷酸,以在所表达的肽序列中产生氨基酸替换,或生成/删除限制性位点以方便进一步的操作。这类技术包括但不限于化学诱变、体外定点诱变(Hutchinson等, 1978, J. Biol. Chem., 253: 6551)、寡核苷酸指导的诱变(Smith, 1985, Ann. REv. Genet., 19: 423-463; Hill等, 1987, Methods Enzymol., 155: 558-568)、基于PCR的重叠延伸(Ho等, 1989, Gene, 77: 51-59)、基于PCR的引物突变(Sarkar等, 1990, Biotechniques, 8: 404-407),等等。可用双链双脱氧核苷酸DNA测序法确认修饰成功与否。

在一些实施方案中,使用编码非分泌型HSP的分泌形式的核酸来实践本发明中的方法。可以切除ER驻留信号——KDEL的编码序列来构建这种核酸。可选择的是,用分子标记代替编码KDEL的序列以促进HSP的识别和纯化,如鼠IgG1的Fc部分。在另一个实施

方案中,在天然分泌的 HSPs 或 α 2M 中加入分子标记。No.WO99/42121 的 PCT 出版物说明 gp96 的 ER 驻留信号缺失导致 gp96-Ig 肽复合物从转染的肿瘤细胞中分泌, KDEL 缺失的 gp96 与鼠 IgG1 的融合促进其通过 ELISA 及 FACS 分析检测, 利用蛋白 A 辅助的亲合层析纯度也得以改进。

4.3.5.1、表达系统

编码 HSPs 或 α 2M 的核苷酸序列可以插入表达载体, 在重组细胞中得以增殖和表达。本文中表达构建体指合适的宿主细胞中与一种或几种调控区操纵性相关、编码 HSPs 或 α 2M 的一段核苷酸序列。“操纵性相关”指调控区和需表达的 HSPs 或 α 2M 多肽序列以这样一种相关的方式相连并定位, 以保证持续转录并最终翻译该 HSPs 或 α 2M 序列。用于 HSPs 或 α 2M 表达的载体的种类包括但不限于质粒、粘粒、噬菌体、噬菌粒或改良病毒。实例包括细菌噬菌体如 λ -衍生物, 质粒如 pBR322 或 pUC 质粒衍生物, 或 Bluescript 载体 (Stratagene)。

典型地说, 这样的载体包括一个使载体在宿主细胞中繁殖的功能性复制起点、一个或多个用于插入 HSPs 或 α 2M 基因序列的限制性内切酶位点及一个或多个选择标记。

为在哺乳动物宿主细胞中表达 HSPs 或 α 2M, 可使用各种调控区, 例如 SV40 早启动子及晚启动子、巨细胞病毒 (CMV) 即早启动子和劳氏肉瘤病毒长末端重复序列 (RSV-LTR) 启动子。可用于哺乳动物的可诱导启动子包括但不限于金属硫蛋白 II 基因、小鼠乳腺肿瘤病毒糖皮质激素基因反应性长末端重复序列 (MMTV-LTR)、 β -干扰素基因及 HSP70 基因相关的启动子 (Williams 等, 1989, *Cancer Res.*, 49: 2735-42; Taylor 等, 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 165-75)。

在表达载体中包含合适的转录增强子可提高 HSPs 或 α 2M 在宿主细胞中的表达效率, 如在 SV40 病毒、B 型肝炎病毒、巨细胞病毒、免疫球蛋白基因、金属硫蛋白及 β 肌动蛋白中发现的增强子 (见 Bittner 等, 1987, *Methods in Enzymol.*, 153: 516-544; Gorman, 1990, *Curr. Op. in Biotechnol.*, 1: 36-47)。

表达载体也可包含使载体在不只一种宿主细胞中维持和复制的序

列，或将载体整合入宿主染色体的序列。这样的序列可包括但不局限于复制起点、自我复制序列（ARS）、着丝点序列及端粒 DNA。使用可在至少两种宿主细胞内复制与维持的穿梭载体也可能是一大优势。

- 5 另外，表达载体可能包含用于包含编码 HSPs 或 α 2M 的 DNA 的宿主细胞初步分离或鉴定的可选择或筛选标记基因。为了长期、高产率生产 HSPs 或 α 2M，优选将这些蛋白在哺乳动物细胞稳定表达。大量可用于哺乳动物细胞的选择系统包括但不局限于疱疹单纯病毒胸苷激酶（Wigler 等，1977，Cell，11：223）、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（Szybalski 及 Szybalski，1962，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，48：2026）和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶（Lowy 等，1980，Cell，11：223）；这些基因可分别用于 tk、hgp_rt 或 ap_rt 细胞。也可根据下列对抗代谢药的耐药性进行选择，如对氨甲蝶呤产生耐药性的二氢叶酸还原酶（dhfr）（Wigler 等，1980，Natl. Acad. Sci. U.S.A.，77：3567；10 O'hare 等，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，78：1527）、对霉酚酸产生耐药性的 gpt（Mulligan 及 Berg，1981，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，78：2072）、对氨基糖甙 G-418 产生耐药性（Colberre-Garapin 等，1981，J. Mol. Biol.，150：1）的新霉素磷酸转移酶基因（neo）、对潮霉素产生耐药性（Santerre 等，1984，Gene，30：147）的潮霉素磷酸转移酶基因（hyg）。还可使用其他可选择的标记，例如但不限于组氨酸及 ZeocinTM。

包含编码 HSP 或 α 2M 的序列、与调控区操纵性相关的表达构建体可直接导入用于表达及生产本发明 HSPs 或 α 2M 复合物的合适细胞中，而不需进一步克隆（例如可见 No. 5,580,859 号美国专利）。表达构建体也可包含促进编码序列整合入宿主细胞基因组的 DNA 序列，例如通过同源重组而整合。在此实例中，不必使用包含适合于合适宿主细胞的复制启动起点的表达载体以在宿主细胞中增殖和表达 HSP 或 α 2M 分子。

可利用本领域内已知的各种技术将包含所克隆的编码 HSP 或 α 2M 序列的表达构建体导入哺乳动物宿主细胞，这些方法包括但不局限于磷酸钙介导的转染（Wigler 等，1977，Cell，11：223-232）、脂质

体介导的转染 (Schaefer-Ridder 等, 1982, *Science*, 215: 166-168)、电穿孔 (Wolff 等, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 3344) 及微注射法 (Cappechi, 1980, *Cell*, 22: 479-488)。

5 本文所述的任何克隆载体或表达载体可利用本领域内众所周知的方法从已知的 DNA 序列合成。调控区及增强子元件可从各种来源获得, 可以是天然的也可以是合成的。一些载体及宿主细胞可通过商业途径获得。Current Protocols in Molecular Biology 第二版中附录 5 中描述了可使用载体的非限制性实例, 该书由 Ausubel 等于 1988 年编著, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience 出版, 将其整体在此
10 引入作为参考。这些实例也可在商业供应商的目录内找到, 如 Clontech Laboratories、Stratagen Inc. 及 Invitrogen Inc.。

此外, 哺乳动物细胞也可利用一些基于病毒的表达系统来重组表达 HSPs 或 $\alpha 2M$ 。使用 DNA 病毒骨架的载体来自于猿病毒 40 (SV40) (Hamer 等, 1979, *Cell*, 17: 725)、腺病毒 (Van Doren 等, 1988,
15 *J. Virol.*, 62: 1963) 及牛乳头状瘤病毒 (Zinn 等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 4879)。在腺病毒作为表达载体的情况下, 可将供体 DNA 序列连接入腺病毒转录/翻译控制区如晚启动子和三叶形前导序列。然后用体外或体内重组的方法将嵌合基因插入腺病毒基因组。插入到病毒基因组非必需区 (如 E1 或 E3 区) 时得到可存活的重组病毒,
20 并能在感染细胞中表达异源产物 (例如见 Logan 及 Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3655-3659)。

牛乳头状瘤病毒 (BPV) 可感染包括人类的许多高级脊椎动物, 它以附加体的形式进行 DNA 复制。已发现许多穿梭载体用于重组基因表达, 其以稳定的多拷贝 (每个细胞有 20~300 拷贝) 染色体外元
25 件在哺乳动物细胞内存在。典型地说, 这些载体包含一段 BPV DNA (整相基因组或 69%转化片段)、具广谱宿主的启动子、聚腺苷酸化信号、剪接信号、选择性标记及可使载体在大肠杆菌内繁殖的“无毒”质粒序列。在细菌中构建及扩增后, 表达性基因构建体转染入培养
30 的哺乳动物细胞, 如利用磷酸钙共转化或电穿孔技术。对于那些不显示转化表型的宿主细胞而言, 可利用显性选择标记如组氨酸及 G418 耐药性来选择转化体。例如, 诸如可使用 pBCMGSNeo 及 pBCMHis

之类的 BPV 载体来表达 HSPs 或 $\alpha 2M$ (Karasuyama 等, *Eur. J. Immunol.*, 18: 97-104; Ohe 等, *Human Gene Therapy*, 6: 325-33), 将其转化多种细胞实现 HSPs 或 $\alpha 2M$ 的表达。

此外, 在使用人宿主细胞时可使用牛痘的 7.5K 启动子 (例如, 5 可见 Mackett 等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7415-7419; Mackett 等, 1984, *J. Virol.*, 49: 857-864; Panicali 等, 1982, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 4927-4931), 也可使用基于 EB 病毒(EBV)起点 (OriP) 及 EBV 核抗原 1 (EBNA-1, 一种反式作用复制因子) 的载体。这样的载体可使用广泛的人宿主细胞, 如 EBO-pCD (Spickofsky 10 等, 1990, *DNA Prot. Eng. Tech.*, 2: 14-18)、pDR2 及 λ DR2 (可从 Clontech Laboratories 获得)。

也可用基于逆转录病毒的表达系统来达到重组 HSP 或 $\alpha 2M$ 表达的目的。与转化相比, 逆转录病毒可有效感染并将基因转移入广泛的细胞类型, 举例来说, 包括原代造血细胞。在诸如莫洛尼氏鼠白血病 15 毒之类的逆转录病毒中, 大部分病毒基因序列可以去除并取代为编码 HSP 或 $\alpha 2M$ 的序列, 所丧失的病毒功能可以反式(in trans)提供。逆转录病毒载体的感染宿主范围也可通过选择用于包装的包膜来控制。

例如, 逆转录病毒载体可以包括 5'长末端重复序列 (LTR)、3'LTR、包装信号、细菌复制起点及选择标记。ND-相关的抗原肽 DNA 20 插入 5'LTR 和 3'LTR 间的位置, 以便自 5'LTR 的转录物转录所克隆的基因。5'LTR 按顺序含有一个包括但不限于 LTR 启动子的启动子、R 区、U5 区及引物结合位点。这些 LTR 元件的核苷酸序列在本领域内众所周知。表达载体也可包含异源启动子及多个药物选择标记以利于感染细胞的选择 (见 McLauchlin 等, 1990, *Nucleic Acid Res.*18: 25 3587-3596; Choulika 等, 1996, *J. Virol.*, 70:1792-1798; Boesen 等, 1994, *Biotherapy* 6: 291-302; Salmons 和 Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy*, 4: 129-141; 及 Grossman 和 Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3: 110-114)。

重组细胞可在标准的温度、孵育时间、光密度及培养基条件下进行 30 培养。此外, 细胞也可在仿效内源性表达 HSP 的细胞所需的营养及生理需求条件下培养。改进的培养条件和培养基可用于增强 HSP-

肽复合物的产生。例如，重组细胞可在促进诱导性 HSP 表达的条件下培养。

本发明的 α 2-巨球蛋白及 HSP 多肽可以融合蛋白的形式表达，以利于其从所表达的细胞中回收和纯化。例如，HSP 或 α 2M 多肽可包含信号序列前导肽以引导其转运至内质网膜，从而分泌入培养基中。另外，HSP 或 α 2M 多肽可包含亲和标记，例如与 HSP 或 α 2M 多肽中不参与和抗原肽结合的任何部分如羧基端相融合的亲和标记。该亲和标记可通过结合亲和伴侣分子而促进蛋白的纯化。

产生这类融合蛋白的方法在本领域内众所周知。导致融合蛋白产生的操作可在基因或蛋白水平上发生，优选于基因水平上发生。例如，可利用本领域大量已知重组 DNA 方法中的任意方法对克隆的 HSP 或 α 2M 多肽编码区进行改造（Sambrook 等，1990，Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Ausubel 等，Current protocols in Molecular Biology 第 8 章, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York）。将替换、缺失、插入或其任意组合引入或组合以达到最终的编码 HSP 或 α 2M 多肽的核苷酸序列，下文的讨论将会使这一点变得直观。

在各个实施方案中，包含 HSP 或 α 2M 多肽的融合蛋白可以用重组 DNA 技术来制备。例如，编码 HSP 或 α 2M 多肽的重组基因的构建包括将位于合适开放阅读框内的 HSP 或 α 2M 多肽片段插入含亲和标记的载体中，使 HSP 或 α 2M 多肽以肽-标记融合蛋白的方式表达。可被特异性结合伴侣所识别的亲和标记可用于 HSP 或 α 2M 多肽的亲和层析纯化。

在一个优选实施方案中，亲和标记氨基端融合入 HSP 或 α 2M 的羧基端。羧基端融合的精确定点并不关键。最佳位点可通过常规实验确定。

可使用本领域内已知的各种亲和标记，例如免疫球蛋白保留区、多聚组氨酸序列（Petty, 1996, Current Protocols in Molecular Biology 中的 Metal-chelate affinity chromatography, 第 2 卷, Ausubel 等编著, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience）、谷胱甘肽 S-转移酶

(GST; Smith, 1993, *Methods Mol. Cell Bio.*, 4: 220-229)、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 (Guan 等, 1987, *Gene*, 67: 21-30) 及各种纤维素结合域 (No. 5,496,935、No. 5,202,247、No. 5,137,819 号美国专利; Tomme 等, 1994, *Protein Eng.*, 7: 117-123), 等等。其他亲和标记可赋予 HSP 或 $\alpha 2M$ 多肽荧光特征, 如绿色荧光蛋白部分等等。其他可能的亲和标记为可购得相应单克隆抗体的短氨基酸序列, 如下列这些众所周知的实例: FLAG 表位、408~439 位氨基酸的 myc 表位、流感病毒血凝素 (HA) 表位, 但不局限于此。其他亲和标记可用特异性结合伴侣识别, 和固定于固体支持物上的结合伴侣的亲和结合促进其分离。一些亲和标记可赋予 HSP 或 $\alpha 2M$ 多肽全新的结构特性, 如形成多聚体的能力。HSP 或 $\alpha 2M$ 多肽与所结合的肽形成二聚体, 可提高抗原呈递过程中 HSP 或 $\alpha 2M$ 多肽与其伴侣相互作用的亲和力。这些亲和标记通常来源于正常时以同聚体存在的蛋白。诸如 CD8 细胞外结构域 (Shiue 等, 1988, *J. Exp. Med.*, 168: 1993-2005)、CD28 细胞外结构域 (Lee 等, 1990, *J. Immunol.*, 145: 344-352)、免疫球蛋白分子中含绞链二硫键部分的亲和标记可导致多聚体的形成。正如将为本领域技术人员所理解的那样, 可用许多方法获取前面提及的亲和标记的编码区, 包括但不限于 DNA 克隆、DNA 扩增及合成方法。通过商业途径可获得一些亲和标记及其检测、分离的试剂。

优选的亲和标记为免疫球蛋白分子的非可变部分。典型地说, 该部分包含至少一个功能性可操作的免疫球蛋白重链不变区的 CH2 及 CH3 域。也可用不变区 Fc 部分、紧接重链或轻链 CH1 区氨基端之后的区域来制备融合体。可从 IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4 亚型、IgA、IgE、IgD 或 IgM 获得以免疫球蛋白为基础的合适亲和标记, 但优选 IgG1。当计划将 HSP 或 $\alpha 2M$ 多肽在人体内使用时, 优选人免疫球蛋白。许多编码免疫球蛋白轻链或重链不变区的 DNA 是已知的, 或可从 cDNA 文库获得。例如, 可见 Adams 等, *Biochemistry*, 1980, 19: 2711-2719; Gough 等, *Biochemistry*, 1980, 19: 2702-2710; Dolby 等, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 6027-6031; Rice 等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7862-7865; Falkner 等, 1982, *Nature*, 298: 286-288; 和 Morrison 等, 1984, *Ann. Rev. Immunol.*

2: 239-256。因为许多免疫学试剂及标记系统可用于检测免疫球蛋白，所以用本领域内已知的各种免疫学技术，如酶联免疫吸收测定、免疫共沉淀、荧光激活的细胞分选（FACS）等，可以很容易地检测 HSP 或 α 2M 多肽-Ig 融合蛋白并加以定量。类似地，如果亲和标记是易获得抗体的表位，这些试剂也可在上述提及的对含亲和标记的 HSP 或 α 2M 多肽进行检测、定量及分离的技术中使用。在许多实例中，不需要研发针对 HSP 或 α 2M 多肽的特异性抗体。

一个优选的实施方案是将 HSP 或 α 2M 多肽与人免疫球蛋白 G-1（IgG-1，见 Bowen 等，1996，*J. Immunol.*，156: 442-49）的铰链区、CH2 及 CH3 域形成融合蛋白。该铰链区含有三个半胱氨酸残基，其在正常情况下与 Ig 分子中其他半胱氨酸形成二硫键。由于三者中任何一个都不是肽的标记功能所必需的，因而可选择性地用其他氨基酸残基替换其中的一个或多个半胱氨酸残基，如用丝氨酸代替。

可使用本领域内已知的各种前导序列使细胞及哺乳动物细胞有效分泌 HSP 或 α 2M 多肽（von Heijne，1985，*J. Mol. Biol.*，184: 99-105）。前导序列的选择基于计划所用的宿主细胞，可包括细菌、酵母、病毒、动物及哺乳动物的序列。用于哺乳动物的优选前导肽从小鼠免疫球蛋白 κ 链获得（Bernard 等，1981，*Proc. Natl. Acad. Sci.*，78: 5812-5816）。用于在细菌细胞靶向 HSP 或 α 2M 多肽表达的优选前导序列包括但不限于大肠杆菌蛋白 OmpA（Hobom 等，1995，*Dev. Bio. Stand.*，84: 255-262）、Pho A（Oka 等，1985，*Proc. Natl. Acad. Sci.*，82: 7212-16）、OmpT（Johnson 等，1996，*Protein Expression* 7:104-113）、LamB 和 OmpF（Hoffman 及 Wright，1985，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*，82: 5107-5111）、 β -内酰胺酶（Kadonaga 等，1984，*J. Biol. Chem.*，259: 2149-54）、肠毒素（Morioka-Fujimoto 等，1991，*J. Biol. Chem.*，266-1728-32）、金黄色葡萄球菌蛋白 A（Abrahmsen 等，1986，*Nucleic Acids Res.*，14: 7487-7500）、*B. subtilis* 内切葡聚糖酶（Lo 等，*Appl. Environ. Microbiol.*，54: 2287-2292）的前导肽，以及人工合成信号序列（MacIntyre 等，*Mol. Gen. Genet.*，221: 446-74；Kaiser 等，1987，*Science*，235: 312-317）。

编码所需亲和标记或前导肽的 DNA 序列，只要易于从文库获得、

人工合成或从商业供应商获得，均适宜在本发明实践中使用。这些方法在本领域内众所周知。

4.4 蛋白及肽与 HSP 或 α 2M 复合

5 本文所描述的是用于在体外将 HSP 或 α 2M 与一组蛋白和/或肽形成复合物的示范性方法，其中这些蛋白和/或肽从抗原细胞或其组分、病毒颗粒制备。该组蛋白和/或肽来自于如第 4.2.1 部分所述的抗原细胞蛋白制品。在上些实施方案中，这些肽是抗原细胞或其组分、病毒颗粒的蛋白制品消化产物。复合反应的结果可以是在 HSP 和抗原细胞或病毒颗粒的蛋白或肽之间形成共价键。复合反应的结果可以是在 α 2M 和抗原细胞或病毒颗粒的蛋白或肽之间形成共价键。复合反应的结果也可以是在 HSP 和蛋白和/或肽之间，或在 α 2M 和蛋白和/或肽之间形成非共价键。

15 在复合反应前可用 ATP 预处理 HSPs 或将其暴露于酸性条件下，以去除以非共价方式与目标 HSP 相连的所有肽。当使用 ATP 处理时，加入 apyranase 以去除制品中过量的 ATP，见 Levy 等，1991，Cell，67：265-274。当用酸性条件处理时，加入 pH 调节剂使缓冲液的 pH 重新调到中性。下面讨论了一个使一组肽（平均长度为 7~20 个氨基酸）与 HSP 或 α 2M 形成非共价键复合物的优选实验方案：

20 将该组肽（1）与预处理过的 HSP(9 μ g)混合，使其摩尔比大约为 5 个肽（或蛋白）：1 个 HSP。混合物置于合适的连接缓冲液中，如含有 20 mM 磷酸钠、350 mM NaCl、3 mM $MgCl_2$ 及 1 mM 苯甲磺酰氟（PMSF），pH7.2 的缓冲液，于 4°C~45°C 孵育 15 分钟至 3 小时。将制品置 Centricon 10 收集器（Millipore）离心以去除所有未结合的肽。用高效液相色谱（HPLC）或质谱（MS）检测蛋白/肽与 HSPs 之间的非共价结合。

30 在本发明的一个替换实施方案中，优选使 HSP 与蛋白/肽形成非共价复合物。5~10 μ g 纯化的 HSP70 与等量蛋白/肽在缓冲液中于 37°C 孵育 1 小时，该缓冲液含 20 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl、3 mM $MgCl_2$ 及 1 mM ADP，pH7.5，体积为 100 ml。如有必要可用 Centricon 10 收集器（Millipore）将孵育混合物离心一次或多次以去除所有未结合

的肽。

在本发明的另一个替换实施方案中，优选使 gp96 或 HSP90 与蛋白/肽形成非共价复合物。5~10 μg 纯化的 gp96 或 HSP90 与等量蛋白/肽在缓冲液中于 60°C~65°C 孵育 5~20 分钟，该缓冲液含 20 mmM 磷酸钠、0.5 M NaCl、3 mmM MgCl_2 及 1 mmM ADP，pH7.5，体积为 100 ml。使孵育混合物凉至室温，如有必要可用 Centricon 10 收集器 (Millipore) 将孵育混合物离心一次或多次以去除所有未结合的肽。

抗原蛋白和/或抗原肽形成复合物后，可用下述的混合淋巴细胞靶细胞试验 (mixed lymphocyte target cell assay, MLTC) 检测免疫原性 HSP 复合物或 $\alpha 2\text{M}$ 复合物。一旦分离出 HSP-肽复合物及 HSP-蛋白复合物并加以稀释，即可用下文所讨论的优选施用方案及赋形剂在动物模型中任选地鉴定这些复合物。

作为制备 HSPs 和蛋白/肽非共价复合物的替代选择，一组蛋白/肽可以共价方式和 HSPs 相结合。

在一个实施方案中，HSPs 通过化学交联以共价方式偶联至蛋白制品中的蛋白和/或肽上。化学交联方法在本领域内众所周知。例如，在一个优选实施方案中使用了戊二醛交联法。戊二醛交联法已用于在肽和 HSPs 之间形成共价复合物(见 Barrios 等, 1992, Eur. J. Immunol., 22: 1365-1372)。优选的方案是将 1~2 mg HSP-肽复合物在 0.002% 戊二醛存在的条件下交联 2 小时。在磷酸缓冲盐 (PBS) 中透析过夜以除去戊二醛 (Lussow 等, 1991, Eur. J. Immunol., 21: 2297-2302)。此外，也可在本领域内已知条件下用紫外 (UV) 交联方法将 HSP 与一组蛋白/肽交联起来。

在本发明的另一个实施方案中，将蛋白制品中的一组蛋白和/或肽与 $\alpha 2\text{M}$ 以 50:1 的摩尔比于 50°C 孵育 10 分钟，然后在 25°C 孵育 30 分钟，从而两者形成非共价复合物。可用大小排阻过滤除去游离的(未形成复合物的)肽。优选用闪烁扫描计数器测定复合物，以确定以每摩尔 HSP 或 $\alpha 2\text{M}$ 结合了等量的蛋白/肽 (约为肽起始量的 0.1%)。细节见 Binder, 2001, J. Immunol., 166 (8): 4968-72, 在此将其完整引入作为参考。为了减小这些反应体系中 $\alpha 2\text{M}$ 与蛋白及肽形成共价复合物的倾向，需要在复合反应前抑制或除去蛋白酶活性。可用

蛋白酶抑制剂按照第 4.2.1 部分所述方法达到这一目的。可能还需要在反应液中加入还原剂（如 2-巯基乙醇）以中和存在于蛋白制品中的亲核化合物，因为这些亲核化合物可能会激活 α 2M 而发生共价相连。

5 在另一个实施方案中，用 PCT 出版物 WO94/14976 和 WO99/50303 中所述肽与 α 2M 形成复合物的方法，将一组蛋白制品中的抗原蛋白和/或抗原肽与 α 2M 以共价方式形成复合物，在此将该 PCT 出版物完整引入作为参考。例如，使用加热方法，可在亲核反转过程中用氨或甲胺（或其他小分子胺亲核体如乙胺）将抗原蛋白和/或抗原肽连接到 α 2M 上（Grøn 及 Pizzo, 1998, Biochemistry, 37: 6009-6014）。
10 使用能够使 α 2M 偶然捕获肽的条件来制备本发明的 α 2M 复合物。也可用双功能交联剂实现一组抗原蛋白/肽与 α 2M 的共价连接。这类交联剂及其使用方法在本领域内也是众所周知。优选在复合物形成后将交联剂灭活或除去。

15 在另一个实施方案中，利用上文所述同样方法，一组蛋白/肽可与 HSP 和 α 2M 的混合物在同一反应中形成混合物。

在施用于受试者前，来源于单一共价和/或非共价复合反应体系的 HSP 与抗原蛋白和/或肽的复合物可任意组合形成组合物。在施用于受试者前，来源于单一共价和/或非共价复合反应体系的 α 2M 与抗原蛋白和/或肽的复合物可任意组合形成组合物。
20

4.5 癌症及感染性疾病的预防和治疗

依据本发明，将包含抗原肽与 HSP 和/或 α 2M 所形成复合物的本发明组合物施用于患有癌症或感染性疾病的受试者，其中抗原肽由抗原细胞或病毒颗粒的胞浆和/或膜来源蛋白消化而来。在一个实施方案中，“治疗”指癌症或感染性疾病得到缓解，或至少其中的一个可辨别症状得到缓解。在另一个实施方案中，“治疗”指至少一个与癌症或感染性疾病相关的可测定身体参数得到缓解，受试者不一定可辨别。
25 在另一个实施方案中，“治疗”指癌症或感染性疾病的恶化得到抑制，可以是体格性的，如可辨别症状的稳定，也可以是生理学上的，如身体参数，也可以是两者均得到缓解。
30

5 在一些特定的实施方案中，本发明的组合物作为这类癌症或感染性疾病的预防性措施施用于受试者。本文中“预防”指降低患某种特定癌症或感染性疾病的危险性。在实施方案的一种模式里，本发明的组合物作为这类癌症或感染性疾病的预防性措施施用于具有癌症遗传易感性的受试者。在实施方案的另一种模式里，本发明的组合物作为这类癌症或感染性疾病的预防性措施施用于直接暴露于致癌剂或感染性疾病病原的受试者，致癌剂包括但不局限于化学试剂和/或辐射。

在本发明的治疗性及预防性方法中优选人类受试者。

10 用本发明的方法所制备的组合物包含热休克蛋白和一组抗原肽的复合物，和/或 α 2-巨球蛋白和一组抗原肽的复合物。组合物似乎在所治疗癌症患者的肿瘤部位诱导炎症反应，最终可导致其肿瘤负荷消退。用本发明的方法所制备的组合物可增强受试者的免疫活性并激发针对感染性病原或前瘤细胞及瘤细胞的特异性免疫应答。这些组合物具有预防感染性疾病发生、进展及抑制肿瘤细胞生长恶化的能力。

15 本发明中治疗方案及含胞浆及膜来源蛋白的药物组合物可与另外的免疫应答增强剂或生理反应调节剂联用，包括 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF 等细胞因子或其他影响免疫细胞的细胞因子，以及热休克蛋白和抗原分子的复合物，但不局限于这些。另外，本发明的复合物也可与佐剂同时使用，或在优选实施方案中单独使用。

20

4.5.1、目标感染性疾病

可用本发明的方法治疗或预防的感染性疾病由感染性病原所致，病原包括但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物和寄生虫。本发明并不局限于治疗或预防由细胞内病原体所致的感染性疾病。

25 可用本发明的方法治疗或预防的病毒性疾病包括不局限于由甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、流行性感冒、水痘、腺病毒、I 型单纯疱疹 (HSV-I)、II 型单纯疱疹 (HSV-II)、牛痘、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞体病毒、乳头状瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒、巨细胞病毒、echinovirus、虫媒病毒、huntavirus、柯萨奇病毒、
30 流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病、I 型人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 及 II 型人免疫缺陷病毒 (HIV-II) 所致的疾病。

可用本发明的方法治疗或预防的细菌性疾病由细胞所致，包括但不限于生命周期具有细胞内时期的细菌、分支杆菌、立克次体、支原体及军团菌。

5 可用本发明的方法治疗或预防的原生动物性疾病由原生动物所致，包括但不限于利什曼原虫、kokzidioa 及锥虫。

可用本发明的方法治疗或预防的寄生虫疾病由寄生虫所致，包括但不限于衣原体和立克次体。

4.5.2、目标癌症

10 可用本发明的方法治疗或预防的癌症种类包括但不限于人恶性肉瘤及癌症，例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing 瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、内胚窦瘤、Wilms 瘤、子宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤；和白血病，例如
15 急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞白血病（原粒细胞、早幼粒细胞、骨髓单核细胞、单核细胞和红白血病）、慢性白血病（慢性粒细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病）；以及真性红细胞增多症、淋巴瘤（何杰金氏病和非何杰金氏病）、多发性骨髓瘤、Waldenstrom 巨球蛋白血症、重链病。
20
25

在一具体的实施方案中，癌症是可转移的。在另一具体的实施方案中，癌症患者在施用 HSP 和/或 α 2M 复合物或 HSP 和/或 α 2M 致敏的 APC 之前因进行抗癌治疗（如放化治疗）而免疫功能受到抑制。

30 有多种原因可以说明本发明提供的免疫治疗用于治疗癌症非常理想。首先，如果病人的免疫功能受到抑制，麻醉手术及随后的化疗可能加重免疫抑制。在手术前期采取合理的免疫治疗可预防或逆转这种

免疫抑制。这样可使感染性并发症发生更少并加速伤口愈合。其次，手术后肿瘤体积很小，此时免疫治疗最有可能起效。第三个原因是，手术时肿瘤细胞可能逃逸入血液循环中，此时采取有效的免疫治疗可清除这些细胞。

- 5 本发明提供的预防性及治疗性方法致力于在术前或术后增强癌症患者的免疫功能，并诱导针对癌细胞的肿瘤特异性免疫应答，目标是抑制癌症，最终的临床目标是肿瘤的完全消退和根除。本发明的方法也可用于某种特定癌症的高危险性个体，例如因家族史或环境危险因素所致的高危险性个体。

10

4.5.3、自身实施方案

HSPs 及 α 2M 的免疫原性并非来自于 HSPs 或 α 2M 本身，而是来自于与之结合的抗原肽。在本发明的一个优选实施方案中，用作肿瘤疫苗的本发明组合物中的复合物是自身固有的复合物，因而越过了癌症免疫治疗中两个最棘手的障碍。第一个障碍是与实验动物的癌症类似，人类癌症的抗原性存在有多多样性。为了克服这一障碍，在本发明的一个优选实施方案中，HSPs 及 α 2M 与抗原蛋白及抗原肽形成复合物，并将复合物用于治疗蛋白或肽来源的同一受试者的癌症。第二个障碍是，目前大部分癌症免疫治疗途径均集中于确定癌细胞系中 CTL 15 识别的表位。这种方法需要细胞系及针对癌症的 CTLs 的获得。但這些试剂对于绝大部分人类癌症都是无法获得的。在本发明一个使用自身抗原肽的优选实施方案中，癌症的免疫治疗不依赖于细胞系或 CTLs 的获得，也不需要界定癌细胞的抗原表位。这些优势使结合有自身抗原肽的 HSPs 和/或 α 2M 复合物成为有吸引力的癌免疫原。

- 20 在其他实施方案中，治疗性或预防性复合物中的抗原肽可由来源于一个受试者的癌组织制备，施用于患同种癌症的其他受试者。

4.6、过继(adoptive)免疫治疗

过继免疫治疗指的是一种用于治疗癌症或感染性疾病的治疗方法，这种方法将免疫细胞施用于宿主，目的是使细胞介导直接的或间接的针对肿瘤细胞和/或抗原组分的特异性免疫应答，或是使肿瘤消 30

退，或是治疗感染性疾病，及类似的情况（例如可见于1999年11月16日公布的 No. 5,985,270 号美国专利，在此将其完整引入作为参考）。

在一个实施方案中，使用与依照本文所述方法制备的抗原蛋白及肽结合的 HSPs 和/或 α 2M 致敏用于过继免疫治疗的抗原呈递细胞（APC）。复合物可由热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白与抗原蛋白复合而得，其中抗原蛋白来源于抗原细胞或病毒颗粒中存在的至少 50%不同蛋白或至少 100 种不同蛋白，其中抗原细胞或病毒颗粒表达导致该感染性疾病的抗原决定簇。复合物也可这样制备：（a）将来源于该种癌细胞的蛋白制品用蛋白酶消化，或与 ATP、盐酸胍和/或酸接触，产生一组抗原肽；（b）使该组抗原肽与热休克蛋白或 α 2-巨球蛋白形成复合物。

在另一个实施方案中，使用本发明方法体外制备的抗原肽与 HSP 和/或 α 2M 复合物的治疗可以与用本领域内任何已知方法（例如见 No. 5,985,270 号美国专利）制备的 HSP 和/或 α 2M 复合物所致敏 APC 的过继免疫治疗联用，其中抗原肽显示出所需抗原性（如同类型癌或病原体的抗原性）。致敏的 APC 可单独使用、与体外形成的 HSP 和/或 α 2M 复合物联用，或在 HSP 和/或 α 2M 复合物施用前、后使用。特别地，使用致敏的 APC 预防和治疗癌症还包括将有效治疗或预防量的含结合有抗原蛋白/肽的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白复合物施用于受试者，其中复合物由前述方法制备。类似地，使用致敏的 APC 预防和治疗感染性疾病还包括将有效治疗或预防量的含结合有抗原蛋白/肽的热休克蛋白和/或 α 2-巨球蛋白复合物施用于受试者。

另外，尽管优选的施用方式是真皮内施用，体外形成的抗原蛋白/肽和 HSPs 和/或 α 2M 复合物的施用模式是可以改变的，如包括但不限于皮下、静脉内注射或肌肉内施用。在另一具体的实施方案中，施用依照本发明制备的复合物致敏抗原呈递细胞的过继免疫治疗可与施用用本领域内任何已知方法（例如见 No.5,750,119、No.5,837,251、No.5,961,979、No.5,935,576 号美国专利，WO94/14976 或 WO99/50303 号 PCT 出版物）制备的 HSP 和/或 α 2M 复合物的治疗联用，其中抗原肽显示出所需抗原性（如同类型癌或病原体的抗原性）。

4.6.1、抗原呈递细胞的获得

5 优选在体外从人外周血或骨髓的干细胞和祖细胞生产而获得抗原呈递细胞，包括但不限于巨噬细胞、树突状细胞及 B 细胞，详见 Inaba, K 等，1992, J. Exp. Med., 176: 1693-1702。可用本领域内各种已知方法的任何一种方法来获得树突状细胞。作为实例而不是限制，可由 Sallusto 等，1994, J Exp. Med., 179: 1109-1118 及 Caux 等，1992, Nature, 360: 258-261 中所述方法获得树突状细胞，在此将其完整引入作为参考。在优选的方面，使用从人血细胞获得的树突状细胞。

10 可用本领域内已知的各种方法获取 APC。一方面可使用从人血细胞获取的巨噬细胞。作为实例而不是限制，可按下列方法获取巨噬细胞：

15 用 Ficoll-Hypaque 梯度离心方法从患者（优选需治疗的患者）的外周血分离单核细胞，并接种到预先用患者本人血清或其他 AB+人血清包被的组织培养皿中。细胞于 37°C 孵育 1 小时，用吸管除去非贴壁细胞。对于皿中剩下的贴壁细胞，加入 1 mM 溶于磷酸缓冲液中的冷（4°C）EDTA，室温放置 15 分钟。收集细胞，用 RPMI 缓冲液洗涤细胞，重悬于 RPMI 缓冲液中。于 37°C 与巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）一起孵育可增加巨噬细胞的数量。

20

4.6.2、用 HSP-肽复合物或 α 2M-肽复合物致敏巨噬细胞及抗原呈递细胞

25 优选在体外与 HSP-肽复合物或 α 2M-肽复合物一起孵育来致敏 APC。用 HSP 或 α 2M 与抗原分子的复合物致敏 APC 的方法包括在体外与 HSP-肽复合物或 α 2M-肽复合物于 37°C 孵育 15 分钟至 24 小时。作为实例而不是限制， 4×10^7 个树突状细胞与 gp96-肽复合物在 1 ml RPMI 培养基中于 37°C 孵育 15 分钟至 24 小时，其中每 ml 培养基含 10 μ g gp96-肽复合物或每 ml 含 100 μ g gp96-肽复合物。细胞洗涤三次，以适当的浓度（如 1×10^7 /ml）重悬于生理溶媒中以注射入患者体内，优选无菌的生理溶媒。将要注入致敏树突状细胞的患者最好与最初分离树突状细胞的患者是同一人（自身实施方案）。

30

例如，致敏 APC 刺激抗原特异性、I 类限制细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的能力可通过其刺激 CTL 释放肿瘤坏死因子的能力及作为 CTLs 靶细胞的能力而加以监测。

5 4.6.3、致敏 APC 的重新注入

用传统的临床方法将致敏 APCs 重新注入患者身体组织，优选真皮内。优先选用自体患者的系统实施活化细胞的重新注入。根据患者的情况，患者通常接受约 10^6 至 10^{12} 个致敏树突状细胞。在一些治疗方案中，患者可选择性地添加适量生理反应调节剂，包括但不限于 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF 等细胞因子或细胞因子、生长因子。

4.7、药物制剂及施用方法

15 以有效治疗或缓解细胞增殖紊乱或感染性疾病的剂量，将根据本发明中方法制备的结合 HSPs 和/或 α 2M 的抗原肽复合物施用于患者。有效治疗剂量指可使疾病症状缓解的足够的复合物量。

4.7.1、有效剂量

20 将包含有效量、具有免疫原性的一组抗原肽与 HSP 和/或 α 2M 所形成复合物的本发明组合物施用于需要抗癌治疗或抗感染治疗的受试者，作为诱导针对该癌症或感染性疾病的免疫应答的一种方法。可用细胞培养物或实验动物中的标准药理学方法来测定这类复合物的毒性及疗效，如测定 LD₅₀ (使总体 50% 致死的剂量) 及 ED₅₀ (对总体 50% 有效的剂量) 的方法。毒性与疗效的剂量比为治疗指数，可用 LD₅₀/ED₅₀ 25 比值表示。优选治疗指数大的复合物。虽然可以使用显示毒性副作用的复合物，但应小心设计输送系统，将这些复合物导向受感染的靶组织部位，以使未感染细胞的损伤最小化，从而减少副作用。

30 在一个实施方案中，从细胞培养物分析及动物研究获得的数据可用于阐明人类使用的剂量范围。复合物剂量优选在包括 ED₅₀ 在内的循环浓度范围内，毒性极低或没有毒性。剂量可根据所用剂型和施用途径在该范围内变动。对于在本发明的方法中所使用的任何复合物来

说，开始时可用细胞培养物检测其有效治疗剂量。可在动物模型中计算剂量以便获得包括由细胞培养物测定的 IC_{50} （即受试化合物可使症状抑制到半数最高抑制作用的浓度）在内的循环血浆浓度范围。这些信息可用于更精确地决定人类有用剂量。例如，可用高效液相色谱测定血浆中的浓度。

5 在另一个实施方案中，在人类患者中施用的 hsp70-抗原分子复合物和/或 gp96-抗原分子复合物用量约 $10 \mu\text{g}$ 至约 $600 \mu\text{g}$ 。本发明所提供人类患者使用的 hsp90-抗原分子复合物的剂量约 $50 \mu\text{g}$ 至 $5000 \mu\text{g}$ ，优选剂量为 $100 \mu\text{g}$ 。上述剂量优选每周施用一次，持续 4~6 周，优选每次施用时变换给药部位或模式。这样，举例而不作限制，首次注射可在左臂皮下进行，第二次在右臂，第三次在左腹部，第四次在右腹部，第五次在左股，而第六次则在右股，等等。同一部位可在一次或多次注射间隙后重复。同样，注射可分开进行。例如，将一半药物在一个部位施用，另一半在同一天内在另一部位施用。此外，按顺序改变给药模式，例如每周的注射可按真皮注射、肌肉注射、静脉注射或腹腔注射的顺序实施。4~6 周后，优选每两周注射一次，持续一个月。以后可每月注射一次。后继注射的间隔可根据患者对免疫治疗的临床进展及反应加以调整。

10 在另一个实施方案中，在人类患者中施用的 hsp70-抗原肽复合物和/或 gp96-抗原肽复合物用量约 $0.1 \mu\text{g}$ 至约 $60 \mu\text{g}$ 。在另一具体的实施方案中，hsp70-抗原分子复合物和/或 gp96-抗原分子复合物的有效量低于 $10 \mu\text{g}$ ，例如 $0.1 \mu\text{g} \sim 9 \mu\text{g}$ ；优选的人用剂量与 25 g 小鼠所用剂量基本相当，如 $0.5 \mu\text{g} \sim 2.0 \mu\text{g}$ 。本发明所提供人类患者使用的 hsp90-抗原分子复合物剂量约为 $5 \mu\text{g}$ 至 $500 \mu\text{g}$ 。在一个具体的实施方案中，hsp90-抗原分子复合物的有效量低于 $50 \mu\text{g}$ ，例如 $5 \mu\text{g} \sim 49 \mu\text{g}$ ；优选剂量为 $5 \mu\text{g} \sim 40 \mu\text{g}$ 。优选真皮或肌肉注射。例如，优选每隔一天真皮注射，共 5 次。在一个优选实施方案中，上述剂量每周一次，约持续 4~6 周，优选每次施用时变换给药部位或模式。在一个优选的实例中，采用真皮注射方式，同时按顺序变换施用部位。

25 相应地，本发明提供了预防及治疗受试者癌症或感染性疾病的方法，该方法包括使用组合物刺激宿主个体免疫力，激发针对前瘤细胞

和/或瘤细胞或感染细胞的特异性免疫应答。

4.7.2、制剂及用法

依据本发明，所用药物组合物可利用一种或几种生理上可接受的载体或赋形剂以常规方法制成。

因此，复合物及其生理学上可接受的盐及溶剂可制成以吸入或吹入（通过口或鼻）或口服、口腔、肠道外或直肠给药方式施用的剂型。

对于口服，药物组合物可采用片剂或胶囊的形式，片剂或胶囊可利用药用赋形剂如粘合剂（如预先凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）、填充剂（如乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙）、润滑剂（如硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅）、崩解剂（如马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠）或润湿剂（如十二烷基硫酸钠）以常规方法制成。片剂可用本领域内众所周知的方法进行包衣。例如，用于口服的液体制剂可采用溶液、糖浆或悬浮液等形式；或以干品存在，在使用前用水或其他合适的溶媒制成液体制剂。这些液体制剂可用药用添加剂如悬浮剂（如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪）、乳化剂（如卵磷脂或阿拉伯胶）、非水性溶媒（如杏仁油、油性脂类、乙醇或部分植物油）及防腐剂（如甲基-对羟基苯甲酸或丙基-对羟基苯甲酸或山梨酸）以常规方法制成。这些制剂还可包含合适的缓冲盐、调味剂、着色剂及甜味剂。

口服制剂可适当地制成活性复合物控释剂型。

对于口腔施用，组合物可以是以常规方法制成的片剂或锭剂。

对于吸入给药，依据本发明所用复合物可方便地以喷雾剂形式释放，该喷雾剂可用合适的推进剂如二氯二氟甲烷、三氟氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体制成气溶胶包装或喷雾器。在加压气体情况下，通过提供一个阀门释放计量器所定的量来确定剂量单位。吸入剂或吹入剂中所用的胶囊及囊芯（如明胶的）可制成含复合物及恰当粉末基质如乳糖或淀粉等粉末混合物的制剂。

复合物可制成注射制剂，经肠道外施用，如团丸式注射或连续输液。注射制剂可以单剂量形式存在，如安瓿内；或多剂量形式存在于添加防腐剂的容器中。组合物可以是诸如悬浮液、溶液或油性或水性

载体中的乳剂，同时可含诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂之类的成形剂。此外，活性成分可以是粉末状，在使用前用合适的溶媒如无菌、无致热原的水制成液体制剂。

5 复合物也可制成诸如栓剂、滞留灌肠剂之类的直肠施用制剂，如该制剂可含常规栓剂基质如可可脂或其他甘油酯。

除了前面所述的剂型，复合物也可制成长效制剂。这类长效剂型可通过植入法（例如埋入皮下或肌肉内）或肌肉内注射施用。因此，复合物可与合适的多聚材料或疏水材料（如可用油的乳剂）或离子交换树脂或少量可溶性衍生物，如少量可溶性盐制成制剂。

10 如果需要，组合物可以存在与一个包装中，或者存在于包含一个或多个含活性成分的单位剂量形式的分配器中。例如该包装可包括金属或塑料箔，如泡沫塑料包装。包装或分配器可附有使用说明。

4.7.3、试剂盒

15 本发明还提供了实施本发明方法和/或治疗方案的试剂盒。在一个实施方案中，试剂盒的一个或多个容器内包括含抗原蛋白及抗原肽的蛋白制品，其中抗原蛋白及抗原肽用于结合第二个容器所提供的 HSPs 和/或 α 2M。在另一个实施方案中，试剂盒的一个或多个容器中包括含抗原肽的消化肽，其中抗原肽用于结合第二个容器所提供的 HSPs 和/或 α 2M。此外，一个或多个容器提供蛋白和/或肽，用于和来自特定患者的 HSPs 和/或 α 2M 形成复合物。可选的是，第二个容器中还提供了与蛋白及肽形成复合物的纯 HSP。

20 在另一个实施方案中，试剂盒包括装于一个或多个容器内的、治疗性或预防性有效量的、与 HSPs 和/或 α 2M 复合在一起的蛋白/肽，优选纯化的、药学上可接受的形式。试剂盒还可选择性地包括装于第二容器内的的致敏 APCs，优选装有纯化的致敏 APCs。

30 在本发明试剂盒容器内的 HSP 或 α 2M 复合物可以是药学上可接受的形式，如与无菌盐水、葡萄糖溶液或缓冲溶液组合，或其他药学上可接受的无菌流体组合。此外，HSP 或 α 2M 复合物可以冻干或干燥；在本实施例中，试剂盒还可选择性地包括装于容器内的药用溶液（如盐水、葡萄糖溶液等等），优选无菌原者，以便将含有 HSPs

及 α 2M 的复合物或含有 α 2M 及 HSP 的复合物重构成可用于注射的溶液。

在另一个实施方案中，本发明的试剂盒还包括一个用于注射 HSP 及 α 2M 复合物的针头或注射器，优选无菌形式包装者，和/或包装好的酒精垫。可选择性地包括临床医生或患者使用的 α 2M-肽复合物及 HSP-肽复合物施用说明。

4.8、HSP 及 α 2M 复合物的免疫原性测定

本发明的 HSP-蛋白复合物、HSP-肽复合物、 α 2M-蛋白复合物及 α 2M-肽复合物可用本领域内已知的任意方法测定其免疫原性。可以使用下文以实例而不是限制的方式描述的一种测定方法。在一个优选实施方案中，使用 ELISPOT 测定法（见下文第 4.9.4 部分）。

4.8.1、MLTC 测定法

简单地说，小鼠用任何常规给药途径注射一定量的 HSP 复合物和/或 α 2M 复合物。对小鼠注射和正常组织的蛋白和/或肽相复合的 HSP，作为阴性对照。已知含有特异性抗原的细胞可作为测定中的阳性对照，如肿瘤细胞或受感染性疾病致病因子感染的细胞。小鼠注射两次，间隔 7~10 天。距最后一次注射 10 天后，取脾脏，分离淋巴细胞。随后通过加入表达感兴趣抗原的死细胞，再次对所分离的淋巴细胞进行体外刺激。

例如，对培养在 3ml 含 10%胎牛血清的 RPMI 培养基中的 8×10^6 个免疫脾细胞来说，用 4×10^4 个丝裂霉素 C 处理或 γ 射线（5~10,000 拉德）照射过、含有感兴趣抗原的细胞（或用合适基因转化的细胞，根据具体情况而定）加以刺激。在一些情况下，可将 33%次级混合淋巴细胞培养上清液加到培养基中，作为 T 细胞生长因子的来源（见 Glasebrook 等 1980, J. Exp. Med., 151: 876）。为测定免疫后的原发性细胞毒 T 细胞反应，脾细胞的培养不加刺激物。在一些实验里，还可用抗原性截然不同的细胞对免疫小鼠的脾细胞进行再次刺激，以测定细胞毒 T 细胞反应的特异性。

6 天后，用 4 小时 ^{51}Cr -释放分析法测定细胞培养物的细胞毒性（见

Palladino 等, 1987, *Cancer Res.*, 47: 5074-5079 及 Blachere 等, 1993, *J. Immunotherapy*, 14: 352-356)。测定时, 以效应细胞 : 靶细胞 (E : T) 比值不同的比率 (通常 1 : 1 至 40 : 1), 将混合淋巴细胞培养物加入靶细胞悬浮液。将 1×10^6 个靶细胞在含 20 mCi $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ 的培养基中于 37°C 孵育 1 小时预先加以标记。标记后细胞洗涤三次。每一测定点 (E : T 比值) 重复三次, 同时包含合适的对照组以衡量自发性 ^{51}Cr 释放 (不加淋巴细胞测定) 及 100% 释放 (用去垢剂将细胞裂解)。细胞混合物孵育 4 小时后, 以 200 g 离心 5 分钟以沉淀细胞。用 γ 计数器对释放入上清液的 ^{51}Cr 量进行测定。测试样品 cpm 减去自发性释放 cpm 所得值除以总释放 cpm 减去自发性释放 cpm 所得值, 衡量百分率细胞毒。

为了阻断 I 类 MHC 分子级联反应, 将来源于 K-44 杂交瘤细胞 (一种抗 I 类 MHC 杂交瘤) 的浓缩杂交瘤上清液加到受试样品中, 终浓度为 12.5%。

4.8.2、CD4+T 细胞增殖测定

原代 T 细胞取自脾、新鲜血液或 CSF, 并基本上按 Kruse 及 Sebald, 1992, *EMBO J.*, 11: 3237-3244 所述, 用 FICOLL-PAQUE PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 离心加以纯化。外周血单核细胞与表达抗原分子的细胞裂解液共孵育 7~10 天。测定前 24~48 小时, 可选择性地在培养物中加入抗原呈递细胞以便对裂解液中的抗原进行加工和呈递。然后离心收集细胞, 用 RPMI 1640 培养基 (BibcoBRL, Gaithersburg, Md.) 洗涤。将活化 T 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种入 96 孔板中, 于 37°C 孵育 72 小时, 其中细胞悬于含 10% 胎牛血清、10mM HEPES、2mM PH7.5 L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素 G 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸链霉素的 RPMI 1640 培养基中。加入 1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$ 的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷 (Dupont NEN, Boston, Mass.), 6 小时后收集细胞, 在 TOPCONT 闪烁液计数器 (Packard Instrument Co., Meriden, Conn.) 中测定放射活性

4.8.3、抗体反应测定

在本发明的一个特定实施方案中，测定用复合物接种后所产生的抗体，以此确定 HSP 复合物或 α 2M 复合物的免疫原性。在一个实施模式里，用 0.75 μ g/ml 纯化的、用于疫苗的、存在于 PBS 中的、未复合有 HSP 或 α 2M 的蛋白/肽以 50 μ l/孔的量将微量滴定板（96 孔免疫板 II，Nunc）于 4°C 包被 16 小时，然后在 20°C 包被 1 小时。然后倾掉包被液，用 PBS-T-BSA 以每孔 200 μ l 的量（含 0.05% (v/v) 吐温 20 及 1% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBS）于 20°C 封闭 1 小时，PBS-T 洗涤 3 次。加入 50 μ l/孔来自于接种动物（如模型小鼠或人类患者）的血浆或 CSF，20°C 放置 1 小时，PBS-T 洗涤 3 次。与 50 μ l/孔的羊抗鼠或羊抗人免疫球蛋白于 20°C 孵育 1 小时，并（如上用 PBS-T 洗涤 3 次后）用 50 μ l 邻苯二胺（OPD）-过氧化氢底物溶液，然后以量热法测定抗肽的抗体活性。只要合适也可将免疫球蛋白与用 PBS-T-BSA 以 1:1500 稀释的辣根过氧化物酶（Amersham）连接。5 分钟后用 150 μ l 2 M H_2SO_4 终止反应，用 Kontron SLT-210 光度计测定 492 nm 处的吸光度（参比波长为 620 nm）。

4.8.4、细胞因子检测试验

本发明中 CD4+ T 细胞对 HSP 复合物或 α 2M 复合物的增殖反应可通过检测和定量特异性细胞因子的水平而确定。例如在一个实施方案中，可用检验本发明复合物免疫原性的 IFN- γ 检测试验来测定细胞内的细胞因子。在本发明的一个实施例中，对来源于 HSP-肽复合物或 α 2M-肽复合物治疗过的受试者的外周血液单核细胞用特定肿瘤的肽抗原或感染性疾病致病原的肽抗原刺激。然后用可以通过流式细胞检测的 T 细胞特异性标记抗体对细胞染色，例如 FITC 标记的抗 CD8 抗体及 PerCP 标记的抗 CD4 抗体。细胞洗涤后，固定，渗透，然后与染料标记的抗体反应，其中该抗体对人 IFN- γ 具有反应性（PE-抗-IFN- γ ）。用标准方法对样品进行流式细胞分析。

此外，可用过滤免疫测定法、酶联免疫印迹反应（ELISPOT）检测 T 细胞周围的特异性细胞因子。例如在一个实施方案中，用纯化的细胞因子特异性一级抗体，即抗-IFN- γ 包被硝酸纤维素作背衬的微量滴定板，然后封闭，避免其他蛋白非特异结合产生的背景。将从 HSP-

肽复合物或 α 2M-肽复合物治疗过的受试者获得的、含分泌细胞因子的细胞的单核血细胞样品于微量滴定板的孔中稀释。加入标记好的，如生物素标记的二抗，即细胞因子抗体。然后通过目检、镜检或电子检测方法检测抗体细胞因子的复合物，和酶偶联的链霉抗生素蛋白-5 细胞因子分泌细胞将显示为“点”。

4.8.5、四聚物检测

在另一个实施方案中，可用“四聚物染色”试验(Altman等, 1996, Science, 274: 94-96)鉴定抗原特异性的 T 细胞。例如，在一个实施方案中，使含特异性肽抗原，如肿瘤特异抗原的 MHC 分子形成多10 聚体以制备可溶的肽四聚物，并使之与链霉抗生素蛋白形成复合物加以标记。将 MHC-肽抗原复合物与一组从 HSP 复合物或 α 2M 复合物治疗过的受试者获得的 T 细胞混合。然后用生物素对表达感兴趣抗原，即肿瘤特异抗原的 T 细胞加以染色。

15

4.9、癌症预防及免疫治疗期间的效果监测

可用本领域技术人员所熟知的方法监测 HSP 复合物或 α 2M 复合物在肿瘤疾病的发展及恶化中的免疫治疗效果，包括但不限于测量下列指标：a) 作为细胞免疫的迟发型过敏性，b) 细胞毒 T 淋巴细胞的体外活性；c) 肿瘤特异抗原如癌胚抗原(CEA)的水平；；d) 利用诸如计算机 X 射线断层造影(CT)扫描之类的技术所观察的肿瘤形态学改变；e) 高危个体中特定癌症的推定的(putative)危险生物标记水平的变化；以及 f) 声波图谱的形态学改变。20

下面各部分描述了可选择的示范性方法。

25

4.9.1、迟发型过敏性皮肤试验

迟发型过敏性皮肤试验在总体免疫力及对某种抗原的细胞免疫力方面占有重要位置。不对一组通用皮肤抗原产生反应称为无反应性(Sato, T等, 1995, Clin. Immunol. Pathol., 74: 35-43)。

30 适当的皮肤试验技术需要将抗原于 4°C 无菌、避光储存，使用前迅速重构。用 25 号或 27 号规格的针头确保将抗原经真皮内而不是皮

下施用。抗原经真皮内施用 24 及 48 小时后，用尺测量红斑及硬结的最大范围。通过使用更高浓度抗原，或者在有分歧的情况下重复中间试验来确定对任何特定抗原或一组抗原的低活性。

5 4.9.2、细胞裂解 T 淋巴细胞的体外活性

对于在 3ml 含 10%胎牛血清的 RPMI 培养基中培养的 8×10^6 个通过 Ficoll-hypaque 梯度离心技术分离的外周血来源 T 淋巴细胞来说，用 4×10^4 个丝裂霉素 C 处理的肿瘤细胞刺激。在一些实验里，将 33% 二级混合淋巴细胞培养上清液或 IL-2 作为 T 细胞生长因子加入培养基中。

10 为了测量免疫后细胞裂解 T 淋巴细胞的初级反应，T 细胞培养时不加作为刺激物的肿瘤细胞。在其他试验中，用抗原性截然不同的细胞重新刺激 T 细胞。6 天后，用 4 小时 ^{51}Cr -释放法测定细胞培养物的细胞毒性。靶细胞的自发性 ^{51}Cr 释放水平应低于 20%。对于抗 I 类
15 MHC 分子阻断活性，在试验品中加入 W6/32 杂交瘤 10 倍浓缩上清液，终浓度为 12.5% (Heike M 等, J. Immunotherapy, 15: 165-174)。

4.9.3、肿瘤特异抗原的水平

20 尽管有可能检测所有肿瘤的独特抗原，许多肿瘤显示出与正常细胞相区别的抗原。单克隆抗体试剂可以实现抗原的分离和生化鉴定，对于区分非转化细胞和转化细胞的诊断及转化细胞系的界定来说有着无法衡量的价值。鉴定最清楚的人类肿瘤相关抗原是癌胚抗原。这些抗原在胚胎发生过程表达，但在正常的成人组织中缺失或很难检测到。典型抗原是癌胚抗原 (CEA)，是一种在人胚胎的结肠癌细胞上
25 发现的糖蛋白，但在正常成年结肠癌细胞未发现。既然 CEA 起源于结肠癌细胞，并在血清中发现，最初人们认为血清中该抗原的存在可用于筛选结肠癌患者。然而，患有其他肿瘤如胰腺癌及乳腺癌的患者血清 CEA 水平也升高。因此，对于预测肿瘤的进展及对治疗的反应来说，监测治疗中癌症患者 CEA 水平的下降与升高已证明是有用的。

30 其他数种癌胚抗原在诊断和监测人类肿瘤方面也是非常有用的，如 α -胎儿蛋白，它是一种正常情况下由胚肝细胞及卵黄囊细胞分泌的

α -球蛋白，可在肝癌及生发细胞肿瘤患者的血清中发现，并可作疾病状态的一个指标。

4.9.4、计算机 X 射线断层造影 (CT) 扫描

5 CT 仍然是对癌症精确分级的可选技术。在检测癌症转移方面，已证明 CT 比其他任何成像方式更敏感、更特异。

4.9.5、推定的生物标记的测定

测定特定癌症危险性的推定的生物标记水平来监测含胞浆来源及膜来源蛋白的组合物的效果。例如，用 Brawer, M. K.等, 1992, J. Urol., 147: 841-845, 及 Catalona, W.J.等, 1993, JAMA, 270: 948-958 所述方法测定前列腺癌高危个体的血清中前列腺特异抗原 (PSA)；或用 Schneider, J.等, 1982, Proc. Acad. Sci. ISA, 79: 3047-3051 所述方法测定乳癌高危个体的雌二醇的 16- α -羟基化。上述所引用文献
15 在此将其完整引入作为参考。

4.9.6、声波图谱

声波图谱仍然是对癌症精确分级的替代选择技术。

20 5、实施例

下面的试验说明，a) 来源于细胞组分的抗原肽，与 b) HSP 或 α 2-巨球蛋白 (α 2M) 形成的复合物对于预防性地保护动物免受癌细胞生长是有效的。

25 5.1、材料与方法

5.1.1、蛋白纯化

对于 α 2M的纯化，来自于小鼠的血清用 pH7.6 的 0.04 M Tris 及 0.15 M NaCl 以 1: 1 比例稀释，然后上样到一个已用同样缓冲液平衡和洗脱的 65 ml Sephacryl S300R (SIGMA) 柱。用点印迹的方法测定 α 2M
30 阳性级份，级分中的缓冲液用 PD-10 层析柱交换成 pH7.5 的 0.01 M 的磷酸钠缓冲液。含蛋白的级分上样到刀豆蛋白 A 琼脂糖凝胶层析

柱上。所结合的蛋白用 0.2 M 甲基甘露糖吡喃糖苷洗脱，并上样至用 0.05 M 醋酸钠缓冲液平衡的 DEAE 层析柱上。将 α 2M 洗脱，经 SDS-PAGE 及 0.13M 醋酸钠免疫印迹法分析证实其纯度。

在一些试验中， α 2M 购自 SIGMA。

5 Gp96 由第 4.3.3 部分所述方法获得。

5.1.2、肿瘤排斥试验

10 用 100 μ l 体积的 PBS 完成所有的真皮内接种。在一周内分两次进行接种。每次注射使用 7 μ g α 2M 或 1 μ g gp96， α 2M 或 gp96 以复合物形式使用或单独使用。活肿瘤细胞（100,000 个）洗至不含培养基并悬浮于 PBS 中，于最后一次接种后真皮内注射。对肿瘤进行二维测量。均值的一半作为肿瘤的半径以计算肿瘤体积。用单分类变量方差分析（ANOVA）确定 P 值。

15 5.1.3、复合物的生成

用杜恩斯匀浆器从肝 Meth A 细胞获取裂解液，然后加以超速离心。用 0.1%三氟乙酸及 3 mM ATP 对 100,000 g 离心上清液处理 10 小时，然后用 10 kDa 的截流范围的 CENTRICON 膜滤器（Millipore）离心。将小于 10 kDa 的肽（称为“MethA10”）与 C18 反相层析柱结合，用甲醇洗脱，真空干燥，并用适合于形成复合物的缓冲液重构，
20 进一步分离。在过量 50 摩尔 MethA10 存在的条件下，将 Gp96、 α 2M 或白蛋白（作为对照）加热至 50°C。含有所得复合物的反应物室温放置 30 分钟，然后置冰上。用 CENTRICON 50（Millipore）去除未形成复合物的游离肽。如此制得的复合物用来接种。

25

5.2、结果

本试验用 Meth A 肿瘤模型来说明 gp96-肽复合物及 α 2M-肽复合物所激发的抗肿瘤免疫。该肿瘤的抗原 I 型 MHC 表位尚不清楚。Meth A 细胞裂解液用 ATP、三氟乙酸（TFA）处理，收集小于 10 kDa 的肽级分（MethA10），按上述方法与 α 2M 或 gp96 形成复合物。用与
30 MethA10 形成复合物或不形成复合物的 α 2M 或 gp96 免疫 BALB/c 小

鼠。同时用白蛋白-MethA10 或 PBS 免疫小鼠作为阴性对照。免疫接种间隔一周,分两次完成。距最后一次接种一周后,所有小鼠用 100,000 个活 Meth A 细胞攻击。攻击后每 5 天监测肿瘤生长情况,总共 20 天。

5

表 1

免疫小鼠所用组合物	第 0 天用肿瘤细胞攻击的小鼠个数	第 20 天时含可测量肿瘤的小鼠个数
仅 MethA10	5	5
白蛋白-MethA10	5	5
PBS	5	5
α 2M-MethA10 复合物	5	0
Gp96-MethA10 复合物	5	0
从肝纯化的 Gp96	5	5
从血清纯化的 α 2M	5	4

表 1 中的数据显示用 α 2M-MethA10 复合物免疫或 gp96-MethA10 复合物免疫对小鼠具显著的保护作用 (p 值均小于 0.05), 但单独用
10 α 2M、gp96、白蛋白-MethA10 或 PBS 免疫对小鼠则没有保护作用。

5.3、讨论

本文所述的针对肿瘤的免疫试验演示了一种全新的肿瘤免疫治疗方法,其中包括自身肽及抗原肽在内的一组肿瘤的总细胞肽与 HSP
15 或 α 2M 形成复合物。正如本文所示,这样的复合物有效地刺激宿主免疫系统产生特异性反应。数据表明本方法在预防中的用途可扩展到治疗已患疾病,治疗和预防病原性感染。

这里引用的所有文献均被完整引入作为参考及用于相同程度的所有目的,正如每一单独出版物、专利或专利申请特定地、单独地指出
20 以将其完整引入作为参考那样。

显然,本领域技术人员可在不背离本发明精神和范围的前提下对

本发明作出许多修改和变更。这里所述的具体实施方案仅以实例的方式提供，本发明仅受所附权利要求书的条款及权利要求所赋予的全部等同范围的限制。