

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 7/06

A61K 39/29 A61P 1/16



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01104060.2

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1107681C

[22] 申请日 2001.2.20 [21] 申请号 01104060.2
 [30] 优先权
 [32] 2000. 8. 11 [33] CN [31] 00121270.2
 [71] 专利权人 中国科学院微生物研究所
 地址 100080 北京市海淀区中关村北一条 13 号
 [72] 发明人 田 波 孟颂东 高 福
 审查员 陈晓平

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
 司
 代理人 胡交宇

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称 乙肝病毒抗原多肽与热休克蛋白的复合物及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一类与热休克蛋白结合的乙肝病毒抗原，包括核心抗原、表面抗原和聚合酶抗原。本发明还提供了乙肝病毒抗原与热休克蛋白 gp96 和 hsp78 的复合物及其制备方法，复合物包括 gp96 和 hsp78 与抗原多肽以非共价键结合的复合体，和二者以共价键连接形成的融合蛋白。这种复合物可用于制备治疗乙肝及乙肝继发性肝癌的治疗性疫苗。

ISSN 1008-4274

1. 一种乙肝病毒抗原与热休克蛋白 gp96 或 hsp78 的复合物，其中的乙肝病毒抗原是核心抗原、表面抗原或者聚合酶抗原。

2. 按照权利要求 1 所述的复合物，其中，所述的乙肝病毒抗原为 YVNTNMG，YVNVNMG，YVNTNMGLK，STLPETTVVRR，FLPSDFFPSV，IPIPSSWAF，WLSLLVPFV，和/或 FLLSLGIHL。

3. 按照权利要求 1 所述的复合物，其中，热休克蛋白以非共价键与乙肝病毒抗原结合，或者热休克蛋白以共价键与乙肝病毒抗原结合成融合蛋白。

4. 一种制备权利要求 1 所述的乙肝病毒抗原与热休克蛋白 gp96 或 hsp78 的复合物的方法，包括将浓度为 0.1-0.15 $\mu\text{mol/L}$ 的 gp96 蛋白和浓度为 2.5-3.5 $\mu\text{mol/L}$ 的乙肝病毒抗原在含有 5-10%(v/v)甘油的浓度不高于 100mmol/L 的低盐缓冲液中，在 30-39 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10-30 分钟。

5. 按照权利要求 4 所述的方法，其中，反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间为 15 分钟。

6. 按照权利要求 4 所述的方法，其中，gp96 蛋白和 hsp78 的浓度均为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ ，乙肝病毒抗原的浓度为 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

7. 权利要求 1 所述的乙肝病毒抗原与热休克蛋白 gp96 或 hsp78 的复合物在制备治疗乙肝及乙肝继发性肝癌的治疗性疫苗中的应用。

5 乙肝病毒抗原多肽与热休克蛋白的复合物及其应用

技术领域

本发明涉及乙肝病毒抗原多肽与热休克蛋白 gp96 和 hsp78 的复合物及其应用。

10

背景技术

热休克蛋白(hsp) gp96 (glycoprotein 96)又称作 grp94 (glucose-regulated protein 94), 是位于细胞内质网膜上 hsp90 家族中的成员, 分子量约 96 KDa, 在细胞蛋白折叠和运输过程中发挥重要作用。近几年研究发现它还存在于某些癌细胞表面。gp96 分子含有 2 个保守区, C 端区为多肽结合区, 能结合 5-25 个氨基酸的多肽序列, N 端区能结合 ATP, 具有 ATP 酶活性。热休克蛋白 hsp78 是细胞质中 hsp70 家族中的成员, 分子量约 78kDa, 在细胞蛋白折叠和运输过程中发挥重要作用。hsp78 分子作为分子伴侣能与细胞中各种短肽结合, 它有二个功能区: N 端区有 ATP 酶活性, C 端区结合多肽底物。

近年来研究发现从肿瘤组织或病毒感染的细胞中分离纯化的 gp96 和 hsp78 分子免疫动物后能引起机体产生针对该肿瘤或病毒的特异性免疫排斥反应, 进一步研究表明 gp96 和 hsp78 能结合细胞内产生的全部肽库, 其中包括抗原多肽, 这种特异性免疫反应取决于 gp96 分子和 hsp78 分子结合的多肽而非热休克蛋白本身, 来自肿瘤或病毒感染的细胞中的 gp96 分子和 hsp78 分子通常结合有肿瘤或病毒特异性多肽, gp96 分子和 hsp78 分子能将其结合的抗原肽呈递给主要组织相容性抗原 (MHC) 分子, 从而激活细胞毒性 T 细胞 (CTL) 引发机体产生细胞免疫反应。由于 gp96 和 hsp78 在细胞抗原呈递过程中发挥重要作用, 因此 gp96-多肽复合物和 hsp78-多肽复合物可用于防治自体肿瘤和某些传染性疾病。

美国纽约大学的 Pramod K. Srivastava 在自己的研究基础上分别申请了 6 项美国专利 (专利号为 6017544, 6017540, 6007821, 5837251, 5830464), 这些专利主要内容是利用热休克蛋白 (hsp) 与非共价结合的

抗原分子二者形成的复合物对原发性和已转移的肿瘤以及传染性疾病进行治疗，激发机体产生免疫反应，其中抗原分子既包括来自于体内与 hsp 结合的多肽，又包括在体外能与 hsp 形成复合物的体外抗原或免疫原性片段。Hsp 主要包含 hsp70, hsp90 和 gp96 蛋白。

目前已证实 gp96 和 hsp70 分子能结合泡状口炎病毒抗原区肽、鼠 H-2K^b 限制的卵清蛋白抗原表位肽和 L^d 限制的白血病 CTL 表位肽等抗原多肽。但目前为止未见从病毒感染的病人组织中分离鉴定与 hsp 结合的抗原多肽。

据估计全世界有 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒(HBV)，我国约有 1.2 亿，HBV 是导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌的首要原因，因此它是一类严重危害我国人民生命健康的传染病。由乙型肝炎继发肝癌的几率也很高，乙肝病毒核心抗原 (HBcAg) 在肝癌内和肝癌周围组织中的阳性率分别为 62.5%和 29.2%。CTL 引发的细胞免疫反应是机体清除病毒和治愈乙肝的主要途径，在乙肝感染的病人体内 HBV 抗原多肽在肝细胞中被加工后呈递给 I 类 MHC 分子，激活特异 CTL 引发细胞免疫反应，目前已鉴定出人的一些 HBV 核心蛋白上的 CTL 表位，包括 HLA-A2 限制的 HBcAg18-27, HLA-A11 限制的 HBcAg88-96 等。因此研制预防和治疗乙肝和乙肝继发性肝癌的新型药物，尤其是能主动激发机体产生 CTL 免疫反应的药物具有非常重要的意义。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种与 gp96 和 hsp78 结合的乙肝病毒抗原的复合物。所述的乙肝病毒抗原可以分别是乙肝病毒核心蛋白上第 88 至第 94 位的氨基酸序列，其序列可以是 YVNTNMG，或其变异序列；乙肝病毒核心蛋白上第 88 至 96 位的氨基酸序列，其序列可以是 YVNTNMGLK，或其变异序列；乙肝病毒核心蛋白上第 141 至 151 位的氨基酸序列，其序列可以是 STLPETTVVRR，或其变异序列；乙肝病毒核心蛋白上第 18 至 27 位的氨基酸序列，其序列可以是 FLPSDFFPVS，或其变异序列；乙肝病毒表面蛋白上第 313 至 321 位的氨基酸序列，其序列可以是 IPIPSSWAF，或其变异序列；乙肝病毒表面蛋白上第 355 至 363 位的氨基酸序列，其序列可以是 WLSLLVPFV，或其变异序列；乙肝病毒聚合酶蛋白上第 575 至 583 位的氨基酸序列，其序列可以是

FLLSLGIHL，或其变异序列。

本发明的复合物既包括热休克蛋白以非共价键与多肽结合，又包括热休克蛋白以共价键与多肽结合。

5 本发明的再一个目的是提供一种制备本发明的如上所述乙肝病毒抗原多肽与热休克蛋白 gp96 和 hsp78 的复合物的方法。

本发明的又一个目的是提供本发明的这些复合物在制备治疗乙肝及乙肝继发性肝癌的药物中的应用。

本实验室首次从六例 HBV 感染的人肝癌组织中与热休克蛋白 gp96 结合的多肽中分离出一特异 7 肽，经氨基酸序列分析为“YVNTNMG，
10 或 YVNVNMG”，经查询发现该序列位于 HBV 核心蛋白 88-94 位 (HBcAg88-94)，人工合成该序列并与体外表达的 gp96 蛋白组装，体外合成 gp96-7 肽复合物，将 7 肽与 gp96-7 肽复合物免疫小鼠，均能刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL)，gp96-7 肽复合物免疫原性比单独使用肽高 200 倍以上。实验结果表明 gp96-7 肽复合物可开发成为一种
15 新型乙型肝炎及其继发性肝癌的治疗性药物。

使用人工合成 7 肽“YVNTNMG，或 YVNVNMG”和 N 端带荧光素标记的 7 肽，在体外建立 gp96 蛋白与荧光素标记的 7 肽二者结合的反应体系，根据反应公式



其中 G 代表 gp96 蛋白，P 代表 7 肽，GP 代表 gp96 蛋白-7 肽复合物， k_1 、 k_2 为反应正反方向的速度常数。该结合反应的平衡常数 k 可由以下关系式得出：

$$25 \quad k = k_1/k_2 = [GP]/[G][P]$$

[GP]、[G]和[P]分别表示反应产物 GP 和底物 G、P 的浓度。确定结合反应体系最佳的温度、盐浓度、pH 值、添加剂与催化剂、gp96 蛋白与 7 肽最佳反应浓度比等因子，测定反应常数，构建最佳反应体系。

在最佳反应体系条件下，体外合成 gp96 蛋白-7 肽复合物。

30 本发明还提供了一种制备乙肝病毒抗原 7 肽与热休克蛋白 gp96 的

复合物的方法，包括将浓度为 0.1-0.15 $\mu\text{mol/L}$ 的 gp96 蛋白和浓度为 2.5-3.5 $\mu\text{mol/L}$ 的乙肝病毒抗原在含有 5-10%(v/v)甘油的浓度不高于 100mmol/L 的低盐缓冲液中，在 30-39°C 下反应 10-30 分钟。

在本发明的方法中，反应温度最好为 37°C，反应时间最好为 15 分钟。

在本发明的方法中，gp96 蛋白的浓度最好为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ ，乙肝病毒抗原的浓度最好为 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

本发明还提供了该乙肝病毒抗原 7 肽与热休克蛋白 gp96 以共价键形成的融合蛋白。人工合成对应于该肽的核酸序列，采用分子生物学常用的方法将该序列与 gp96 基因 5' 端连接后在大肠杆菌中融合表达。例如，引入限制性酶切位点 BglII 将该 7 肽的核酸序列与 gp96 基因 5' 端用 T4 连接酶连接，连接产物的 5' 和 3' 端引入 2 个限制性酶切位点 BamHI 和 SacI，连接到表达载体 pET30a 中在大肠杆菌中表达，表达产物是 gp96 与 7 肽的融合蛋白。

本发明的 gp96 蛋白-7 肽复合物，包括上述 gp96 以非共价键与 7 肽体外结合形成的复合物，和上述 gp96 以共价键与 7 肽结合形成的融合蛋白，可以使用任何一种公知的免疫方式进行免疫，例如，通过皮下注射、皮内注射、腹腔注射等。gp96 蛋白-7 肽复合物免疫剂量可以是，例如 0.01 nmol、0.05 nmol、0.10 nmol 和 0.50 nmol。当 7 肽被单独用于免疫时，免疫剂量可以为 0.2 nmol、2 nmol、20 nmol。

gp96 蛋白-7 肽复合物和 7 肽在被用于免疫时可以不使用佐剂，或者使用任何公知的佐剂，例如弗氏佐剂、铝明矾等。

本实验室还人工合成了 9 肽“YVNTNMGLK”，按照上述最佳反应体系体外合成 gp96 蛋白-9 肽复合物，使用任何一种公知的免疫方式进行免疫，例如皮下注射、皮内注射、腹腔注射等，gp96 蛋白-9 肽复合物免疫剂量可以是，例如 0.01 nmol, 0.05 nmol, 0.10 nmol 和 0.50 nmol。当 9 肽被单独用于免疫时，免疫剂量可以为 0.2 nmol、2 nmol、20 nmol。免疫时可以不使用佐剂，或者使用任何公知的佐剂，例如弗氏佐剂、铝明矾等。gp96-9 肽复合物和 9 肽用于免疫小鼠后均能刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL)。gp96-9 肽复合物免疫原性比单独使用肽高 300

倍以上。实验结果表明 gp96-9 肽复合物可开发成为一种新型乙型肝炎和乙肝继发性肝癌的治疗性药物。

本实验室还人工合成了 11 肽 “STLPETTVVRR”， 10 肽 “FLPSDFFPSV”； 9 肽 “IPIPSSWAF”； 9 肽 “WLSLLVPFV”； 和 9 肽 “FLLSLGIHL”。按照上述最佳反应体系体外合成 gp96 蛋白-多肽复合物，使用任何一种公知的免疫方式分别进行免疫，例如皮下注射、皮内注射、腹腔注射等，gp96 蛋白-多肽肽复合物免疫剂量可以是，例如 0.01 nmol, 0.05 nmol, 0.10 nmol 和 0.50 nmol。当多肽被单独用于免疫时，免疫剂量可以为 0.2 nmol、2 nmol、20 nmol。免疫时可以不使用佐剂，或者使用任何公知的佐剂，例如弗氏佐剂、铬明矾等。gp96-多肽复合物和多肽用于免疫小鼠后均能刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL)。gp96-多肽肽复合物免疫原性比单独使用肽高均在 150 倍以上。实验结果表明 gp96-多肽肽复合物可开发成为一种新型乙型肝炎和乙肝继发性肝癌的治疗性药物。

本实验室还将上述合成的多种多肽，包括 “YVNTNMG”； “YVNTNMGLK”； “STLPETTVVRR”； “FLPSDFFPSV”； “IPIPSSWAF”； “WLSLLVPFV”； “FLLSLGIHL”。按照上述最佳反应体系体外合成 hsp78 蛋白-多肽复合物，使用任何一种公知的免疫方式分别进行免疫，例如皮下注射、皮内注射、腹腔注射等，hsp78 蛋白-多肽复合物免疫剂量可以是，例如 0.01 nmol, 0.05 nmol, 0.10 nmol 和 0.50 nmol。当 7 肽被单独用于免疫时，免疫剂量可以为 0.2 nmol、2 nmol、20 nmol。免疫时可以不使用佐剂，或者使用任何公知的佐剂，例如弗氏佐剂、铬明矾等。hsp78-多肽复合物和多肽用于免疫小鼠后均能刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL)。hsp78-多肽复合物免疫原性比单独使用肽高均在 150 倍以上。实验结果表明 hsp78-多肽肽复合物可开发成为一种新型乙型肝炎和乙肝继发性肝癌的治疗性药物。

附图简要说明

图 1.以 7 肽和 gp96-7 肽复合物免疫小鼠 BALB/cJ(H-2^d)7 天后引发的特异性 CTL 反应。效应细胞 CTL 对特异性靶细胞的裂解百分率以 4

小时标准 ^{51}Cr 释放测定，效应细胞与靶细胞之比分别是 4、8、12、25、50 和 100，图中裂解率为 10 只小鼠平均值。

具体实施方式

5 实施例

1. 从肝组织中纯化 gp96 蛋白

将三份 HBV 感染的肿瘤组织和一份未感染的正常组织匀浆后离心，用 50%-70%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀，沉淀溶解后采用 ConA Sepharose (Pharmacia 公司) 进行亲和层析，结合的蛋白用 10%的 α -甲基葡萄糖苷洗脱，洗脱液上 POROS 20QE (PE 公司 BioCAD 灌注层析系统) 进行阴离子层析，经过这三步纯化获得 >95%纯度的 gp96 蛋白。gp96 蛋白用 gp96/grp94 单克隆抗体 (NeoMarkers 公司) 进行 Western 鉴定。其纯度用 SDS-PAGE、银染和反相 HPLC 鉴定。

15 2. 从 gp96 蛋白释放非共价结合的多肽

将纯化的 gp96 蛋白加入三氟乙酸(TFA)使其终浓度达到0.2%(pH 约 2.0)，然后用超滤法 (分子截留为 10KDa, Pall Filtron 公司) 分离多肽，将多肽混合物进行 MALDI-TOF 质谱 (PE 公司 Voyager-DE 系统) 分析，多肽分子量大多在 600-1100 Da 之间。

20

3. 反相 HPLC 分析多肽

多肽混合物冻干后溶于溶液 A (0.065%TFA, 2%乙腈)，上样于 C18 反相柱 (Sephasil peptide C18; 5 nm 粒度; $4.6 \times 250\text{nm}$, Pharmacia 公司)，从 0 至 65%溶液 B (0.05%TFA, 100%乙腈) 进行梯度洗脱，流速为 1ml/min, 用 214nm 波长检测。比较肝癌组织和正常组织 HPLC 图谱，发现一个三份肝癌组织共有而正常组织中没的肽峰。

25

4. 多肽微量测序与序列分析

收集该特异肽峰用 MALDI-TOF 质谱 (PE 公司 Voyager-DE 系统) 鉴定其纯度，只发现分子量为 798 Da 的单一峰。对该肽微量测序 (Procise™ 491 蛋白测序仪, PE 公司)，其氨基酸序列为 “YVNTNMG，或

30

YVNVNMG”，三份肝癌组织得到的序列一致。将该序列在 PubMed 网上蛋白数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查询，发现它位于 HBV 核心蛋白 88-94 位。

5. gp96 基因克隆

采用宝生物工程(大连)有限公司的 RNA 提取试剂盒(Catrimox-14™ RNA Isolation Kit Ver.2.11)从 0.5mL 经 42°C 热激 2 小时的人血液中用异硫氰酸胍法提取总 RNA,步骤按试剂盒说明。

采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 克隆人 gp96 基因，使用宝生物工程(大连)有限公司的 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa RNA LA PCR™ Kit AMV Ver.1.1)，步骤按试剂盒说明，所用引物为：

引物 1: 5' CCGGATCCGAACTTGATGTGGATGGTACA 3'

引物 2: 5' CCGAGCTCCCAAATGGTGAGAGTATAATTTAC 3'

PCR 反应条件如下：94°C 4 分钟；94°C 50 秒，55°C 50 秒，72°C 3 分钟，共 30 循环；72°C 5 分钟。

PCR 产物为约 2.4 Kd 的片段，片段的 5'端和 3'端人为引入二个酶切位点 BamHI 和 SacI，将扩增片段进行测序，gp96 基因包含 2343 bp，碱基序列与文献报导 (Maki, RG, et al. GeneBank, 编号: 003299) 一致。

6. gp96 基因及 gp96 基因与乙肝病毒抗原多肽核酸的连接片段在大肠杆菌中表达与蛋白纯化

将扩增片段经 BamHI 与 SacI 酶切后连接到表达载体 pET30a(+)转化大肠杆菌 BL21。同时人工合成下列多肽对应的核酸序列：

“ YVNTNMG ”；“ YVNTNMGLK ”；“ STLPETTVVRR ”；
“FLPSDFFPSV”；“IPIPSSWAF”；“WLSLLVPFV”；“FLLSLGIHL”。并在上述核酸序列两端引入限制性酶切位点 BglIII，插入到含有 gp96 基因的 pET30a(+)中。

将构建的载体经 1mM IPTG 诱导 4 小时后产物表达，以 10% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色检测表达产物分子量约 100 Kda，与理论值基本一致。

将 gp96 蛋白和 gp96 蛋白与乙肝病毒抗原多肽的融合蛋白用 Ni 亲和层析柱 (Pharmacia 公司) 亲和层析和 POROS 20QE (PE 公司 BioCAD 灌注层析系统) 进行阴离子层析纯化, 以 10% SDS-PAGE 电泳和银染鉴定纯度, 得到大于 95%纯度的 gp96 蛋白及其融合蛋白。表达的 gp96 蛋白产物和 gp96 蛋白与乙肝病毒抗原多肽的融合蛋白用 gp96/grp94 单克隆抗体 (NeoMarkers 公司) 进行 Western 鉴定。

7. gp96 蛋白与人工合成的多肽体外组装条件试验

人工合成 N 端带有荧光素标记的 7 肽“YVNTNMG, 或 YVNVNMG” (委托赛百盛生物工程公司合成), 将 gp96 蛋白与多肽体外组装, 进行以下一系列试验以确立最佳反应条件:

反应体系温度试验: 55°C、39°C、37°C、30°C、或 28°C

反应体系盐浓度试验: 低盐缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH7.9, 20、100 或 500 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂), 高盐缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH7.9, 0.5、1.0、或 2.2 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂)

反应体系 pH 值试验: pH6.0、pH7.0、pH7.9 和 pH9.0

反应体系添加剂与催化剂: 10 mmol/L ADP, 10 mmol/L ATP, 和 10%(V/V)甘油

gp96 蛋白与 7 肽最佳反应浓度及其浓度比率: 反应体系 7 肽浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 μmol/L, 反应体系 gp96 蛋白浓度分别为 0.06、0.09、0.12、0.15、0.18、0.21 μmol/L。测定反应常数 k 。gp96 蛋白含量由以下公式计算, $c=1.45A_{280}-0.74A_{260}$, c 为蛋白浓度, A_{280} 和 A_{260} 分别为 280nm 和 260nm 光吸收。荧光素标记的 7 肽含量以 378nm 处的吸收值计。结合反应后用超滤法 (分子截留为 10KDa, Pall Filtron 公司) 去除未结合的 7 肽, gp96 蛋白-7 肽复合物的含量以 378nm 处的吸收值计。

8. gp96 蛋白与人工合成的多肽体外组装最佳反应体系构建

通过多组分方差分析优化反应条件, 确定最佳反应条件。

人工合成 7 肽 “YVNTNMG, 或 YVNVNMG” (委托赛百盛生物工

程公司合成), 建立最佳体外结合反应体系: 20 mmol/L HEPES, pH7.9, 20 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$, 10%(V/V)甘油, 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 7 肽, 0.12 $\mu\text{mol/L}$ gp96 蛋白, 37°C 反应 15 分钟, 超滤法(分子截留 10KDa, Pall Filtron 公司) 去除未结合的多肽。通过分析测定 gp96 与 7 肽在体外有较高的亲和力, 该结合反应的平衡常数 k 约为 5-10。

9. gp96 蛋白-7 肽稳定性分析

将体外组装的 gp96 蛋白-7 肽复合物于磷酸缓冲液 (PBS) 中 4°C、-20°C、-70°C 保存均不稳定, 以 10% SDS-PAGE 电泳和银染鉴定, 30 天后 gp96 蛋白开始形成二聚体或多聚体。冷冻干燥后于 4°C 保存, 复合物稳定性较好, 90 天后用 10% SDS-PAGE 电泳和银染以及反相 HPLC 检测, 其降解率 <5%。

10. 免疫小鼠

选用生长 12-16 周的 BALB/cJ 小鼠 (H-2^d) 用于本实验。

免疫方式采用将样品溶于 100 μl 的 PBS 中颈背皮下注射。皮内注射虽然需要的免疫剂量较低, 但不易操作, 故没有采用。腹腔注射则要求免疫剂量较大, 约需 0.5 nmol 才有效, 故也没有采用。

gp96 蛋白-7 肽复合物的最适免疫剂量为 0.1 nmol。

免疫时间为第一次免疫一周后进行第二次免疫效果优于免疫一次的效果。

免疫佐剂使用实验发现 gp96 蛋白-7 肽复合物使用弗氏不完全佐剂 (FIA)、弗氏完全佐剂、使用铬明矾不仅没有免疫增效作用, 而且使其免疫原性降低, 原因可能佐剂对 gp96 蛋白-7 肽复合物结构有破坏作用。对于 7 肽使用弗氏佐剂、使用铬明矾均能显著提高其免疫活性, 弗氏佐剂效果优于铬明矾。

因此采用皮下注射免疫, 将 7 肽溶于缓冲液 (90%PBS, 10%DMSO/0.1% TFA), gp96-7 肽复合物溶于 PBS 中, 注射前剧烈振荡 1 分钟, 每支小鼠免疫剂量 7 肽分别为 0.2 nmol, 2 nmol 和 20 nmol, 将肽与弗氏佐剂乳化后免疫小鼠。gp96-7 肽复合物免疫剂量分别是 0.01nmol,

0.05nmol, 0.10 nmol 和 0.50nmol,采用颈背皮下注射, 第一次免疫一周后进行第二次加强免疫, 7 天后进行细胞毒性分析。每一处理使用 10 只小鼠。

5 11. 细胞毒性 (CTL) 分析

小鼠免疫 7 天后,从每只小鼠收获得约 3×10^7 脾细胞悬于含有 10mM HEPES 缓冲液、 5×10^{-5} M 巯基乙醇, 抗生素和 10% (V/V) FCS 培养液中, 于培养瓶中与经辐照 (4500 Rad) 的同源 LPS-刺激的 B 淋巴细胞 (3:1) 和 1 μ g/ml 肽在完全培养基中 37°C 培养。6 天后收集脾细胞进行 4 小时标准 ^{51}Cr 释放实验 (具体方法见 Kuhrober, A, et al. 1997. International Immunology, 9(8):1203-1212) 测定细胞毒性活性。简而言之, 靶细胞用 10ug/ml 肽于 37°C 致敏 30 分钟后加入不同数量的效应细胞, 反应体系为 100 ul 的完全培养基。37°C 共培养 4 小时后收集上清测定特异裂解率。

从 ^{51}Cr 释放实验可以看出 7 肽和 gp96-7 肽复合物均可刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞, 但 gp96-7 肽复合物免疫原性为 7 肽的 200 倍以上, 每只小鼠免疫 0.1 nmol (约 10ug) 的 gp96-7 肽复合物即能诱发机体产生强烈的细胞免疫反应,细胞毒性测定靶细胞的裂解率在 60%以上。实验结果表明 gp96-7 肽复合物可开发成为一种新型抗 HBV 感染和 HBV 感染的肝癌的治疗药物。

20

实施例 12. 其它 gp96- 多肽复合物的免疫活性测定

除上述抗原 7 肽之外,我们又选取其它 6 个乙肝病毒抗原多肽与 gp96 体外组装并测定其免疫活性, 这 6 个抗原多肽分别是 (1) 核心抗原多肽 “YVNTNMGLK” (位于核心蛋白氨基酸序列 88-96 位); (2) 核心抗原多肽 “STLPETTVVRR” (位于核心蛋白氨基酸序列 141-151 位); (3) 核心抗原多肽 “FLPSDFFPSV” (位于核心蛋白氨基酸序列 18-27 位); (4) 表面抗原多肽 “IPIPSSWAF” (位于表面蛋白氨基酸序列 313-321); (5) 表面抗原多肽 “WLSLLVPFV” (位于表面蛋白氨基酸序列 355-343); (6) 聚合酶抗原多肽 “FLLSLGIHL” (位于聚合酶蛋白氨基酸序列 575-583)。分别人工合成这 6 种多肽, 采用实施例 8 中所述的最佳反

30

应体系在体外与 gp96 结合，这 6 种多肽与 gp96 均有较高的亲和力，通过测定结合反应平衡常数 K，6 种肽与 gp96 结合反应中 K 值均在 5 以上。采用实施例 10 中所述的方法用上述 6 种乙肝病毒抗原多肽与 gp96 形成的复合物，和上述 gp96 与 7 种乙肝病毒抗原多肽的融合蛋白分别免疫小鼠，并采用实施例 11 中所述的方法分别对这 6 种复合物进行 CTL 分析，从 ^{51}Cr 释放实验可以看出这 6 种乙肝病毒抗原多肽与 gp96 形成的复合物均可刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞，6 种多肽与 gp96 形成的复合物的免疫活性比单独多肽高 150-300 倍。每只小鼠免疫剂量为 0.1nmol(约 10 μg)时即能诱发机体产生强烈的细胞免疫反应，通过对这 6 种多肽与 gp96 形成的复合物的细胞毒性测定发现靶细胞的裂解率在 60%-85%之间。

以上实验结果表明 gp96 与乙肝病毒抗原多肽体外组装合成的复合物可开发成为一种新型抗 HBV 感染和 HBV 感染的肝癌的治疗药物。由于实验条件所限本发明专利不可能对每一种乙肝病毒抗原多肽进行体外组装及免疫活性测定，但我们通过选取 7 种有代表性的乙肝病毒核心抗原、表面抗原及聚合酶抗原作研究对象，在体外与 gp96 结合并进行免疫活性测定，大量实验表明 gp96 与这些乙肝病毒抗原多肽形成的复合物均能刺激小鼠产生强烈的免疫反应，gp96 可作为乙肝病毒抗原多肽的新型良好佐剂，可开发成为一种新型治疗疫苗。因此，除上述 7 种乙肝病毒抗原多肽之外，其它任何乙肝病毒抗原多肽与 gp96 结合作为新型疫苗也应当在本发明的保护范围之内。

实施例 13. 热休克蛋白 hsp70 基因克隆与表达

采用宝生物工程(大连)有限公司的 RNA 提取试剂盒(Catlimox-14TM RNA Isolation Kit Ver2.11)从 200mg 的人肝癌组织中用异硫氰酸法提取总 RNA，步骤按试剂盒说明。

采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)克隆人 hsp70 家族中 hsp78，使用宝生物工程(大连)有限公司的 RT-PCR 试剂盒，步骤按试剂盒说明。

所用引物为：

引物 1: GG GGATCC ATG AAG TTC ACT GTG GTG GCG GCG

引物 2: GG GTCGAC CTA CTA CTC ATC TTT TTC TGA TGT

PCR 反应条件如下: 94°C 4 分钟; 94°C 50 秒, 55°C 50 秒, 72°C 2 分钟, 其 30 循环; 72°C 5 分钟。

- 5 PCR 产物为约 2.0kb 的片段, 片段的 5'端和 3'端人为引入二个酶切位点 BamHI 和 Sall, 将扩增片段进行测序, hsp78 基因包含 1965bp, 碱基序列与文献报导(Mech. Ageing Dev. 1998, 104(2):149-158)一致。

将扩增片段经 BamHI 与 Sall 酶切连接到表达载体 PET30a(+)转化大肠杆菌 BL21, 同时人工合成下列多肽对应的核酸序列: “YVNTNMG”;

- 10 “ YVNTNMGLK ” ; “ STLPETTVVRR ” ; “ FLPSDFFPVS ” ; “ IPIPSSWAF ” ; “ WLSLLVPFV ” ; “ FLLSLGIHL ”。并在上述核酸序列两端引入限制性酶切位点 BglII, 插入到含有 hsp78 基因的 pET30a(+)中。将构建的载体经 1mM IPTG 诱导 4 小时后表达, 以 10% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色检测表达产物分子量约 80 kDa, 与理论值基本一致。

- 15 将表达产物用 ADP-Agarose 亲和层析 (Sigma) 和 MonoQ(Pharmacia)阴离子层析纯化, 以 10% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色 (电泳上样量约 5 μ g) 鉴定纯度, 得到大于 95%纯度的蛋白。表达的 HSP78 极其融合蛋白用 hsp70 单克隆抗体 (Sigma) 进行 Western 鉴定。

20 实施例 14. hsp 78-多肽免疫原性测定

- 将 hsp78 与 7 种多肽体外组装形成的复合物, 最佳反应体系同 gp96 (见实施例 8), 将体外合成的复合物和 hsp78 与 7 种多肽的融合蛋白免疫小鼠。小鼠免疫方式、免疫剂量以及免疫程序同 gp96 (见实施例 10)。细胞毒性 (CTL) 分析方法同 gp96(见实施例 11)。从 51Cr 释放实验可以
- 25 看出 hsp78-7 肽复合物可刺激小鼠产生特异性细胞毒性 T 细胞, hsp78-7 肽复合物的免疫原性为单独 7 肽的 150 倍以上, 每只小鼠免疫 0.1nmol(约 10 μ g)即能诱发机体产生强烈的细胞免疫反应, 细胞毒性测定靶细胞的裂解率在 50%以上。实验表明 hsp78-7 肽复合物可开发成为一种新型抗 HBV 感染和 HBV 感染的肝癌的治疗药物。

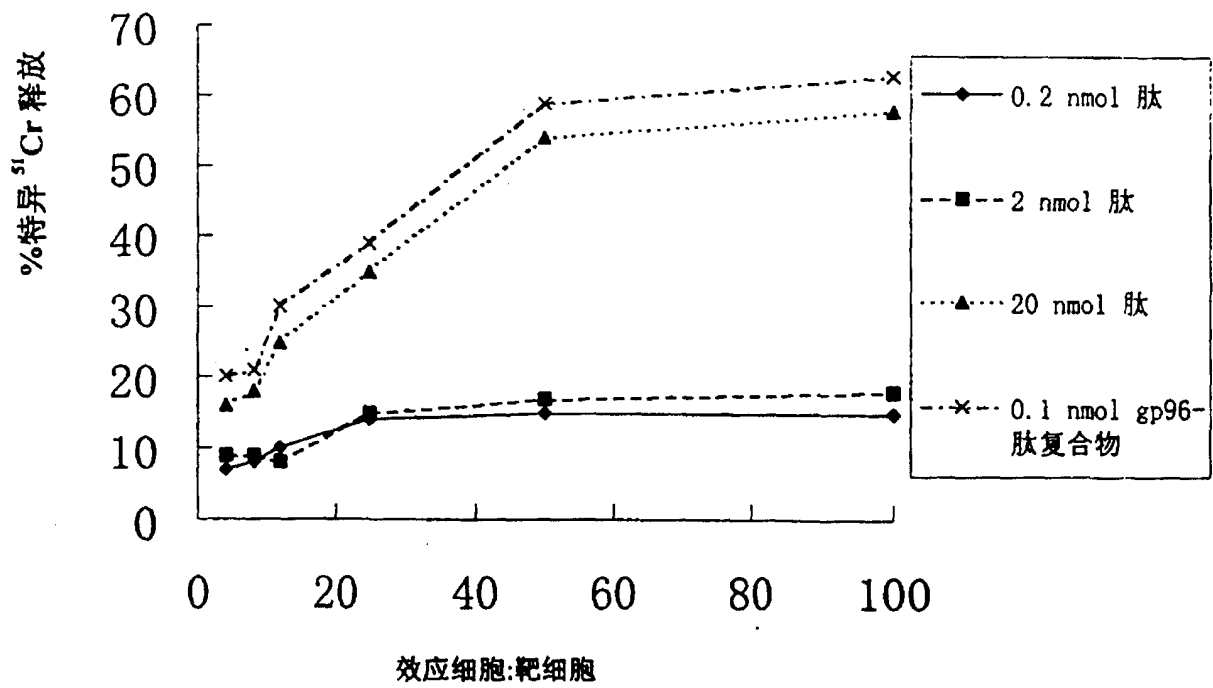


图 1