

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02818351.7

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100335121C

[22] 申请日 2002.7.19 [21] 申请号 02818351.7

[30] 优先权

[32] 2001.7.20 [33] US [31] 60/306,809

[86] 国际申请 PCT/US2002/023198 2002.7.19

[87] 国际公布 WO2003/008649 英 2003.1.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.19

[73] 专利权人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

[72] 发明人 J·K·萨斯特里

G·托特雷罗-露纳 M·弗伦

[56] 参考文献

US5665535A 1997.1.1

STUDIES ON IN VIVO INDUCTION OF CYTOTOXIC TLYMPHOCYTE REPOSSES BY SYNTHETIC PEPTIDES FROM E6 AND E7 ONCOPROTEINS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 SARKAR et al, VIRAL IMMUNOLOGY, Vol. 8 No. 3 1995

审查员 柯 珂

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 101 页 附图 4 页

[54] 发明名称

涉及 HPV 相关的癌前期的和癌的生长(包括 CIN)的方法和组合物

[57] 摘要

本发明涉及来自人乳头瘤病毒(HPV)的 E6 和 E7 肽的用途，用于评价感染 HPV 的患者体内的细胞介导的应答以确定该患者关于发生或复发包括子宫颈上皮内瘤(CIN)的癌前期或癌的生长的预测。

1. 至少一种 HPV 的 E6 或 E7 肽在制备用于确定感染有人乳头瘤病毒 (HPV) 或疑似感染有 HPV 的患者癌前期的或癌的生长的复发可能性的试剂中的应用，其中所述患者也在宫颈上或宫颈周围有或曾经有过癌前期的或癌的生长，包括：

- a) 来自患者的样品与至少一种 HPV 的 E6 或 E7 肽温育；和
- b) 测定该样品针对该肽的细胞介导的免疫应答；

其中所述样品含有能够产生细胞介导的免疫应答的外周血单核细胞，并且其中所述 E6 肽是 K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R 或 G10S, E7 肽是 T10Q, M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C 或 D20C。

2. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品与至少两种 E6 肽或至少两种 E7 肽温育。

3. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品与 HPV 的 E6 肽温育。

4. 权利要求 1 所述的用途，其中所述 E6 肽是 K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C 或其组合。

5. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品与 HPV 的 E7 肽温育。

6. 权利要求 1 所述的用途，其中所述 E7 肽是 Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C 或其组合。

7. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品与至少一种 E6 肽和至少一种 E7 肽温育。

8. 权利要求 1 所述的用途，其中所述患者已知感染了 HPV。

9. 权利要求 1 所述的用途，进一步包括确定所述患者是否感染有 HPV。

10. 权利要求 1 所述的用途，其中所述患者有或有过癌前期的生长。

11. 权利要求 10 所述的用途，其中所述癌前期的生长是宫颈上皮内瘤 (CIN)。

12. 权利要求 1 所述的用途，其中所述患者不再有癌前期的或癌的生长。

13. 权利要求 12 所述的用途，其中所述患者不再有癌前期的生长。

14. 权利要求 13 所述的用途，其中所述癌前期的生长是 CIN。

15. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品是血液。

16. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品通过阴道擦拭签获得。

17. 权利要求 1 所述的用途，进一步包括在获得样品之后在介质中温育该样品。

18. 权利要求 1 所述的用途，其中所述测定包括将样品与肽接触并测量样品的 T 细胞增殖。

19. 权利要求 18 所述的用途，其中通过测定氟化胸腺嘧啶核昔的掺入测定所述 T 细胞的增殖。

20. 权利要求 19 所述的用途，其中所述样品具有大于或等于 2.0 的 SI 值，表明细胞介导的免疫应答。

21. 权利要求 20 所述的用途，其中所述样品具有大于或等于 3.0 的 SI 值，表明细胞介导的免疫应答。

22. 权利要求 1 所述的用途，其中所述测定包括测量 TH1 或 TH2 细胞因子的量。

23. 权利要求 22 所述的用途，其中 TH1 细胞因子的量被测量。

24. 权利要求 23 所述的用途，其中所述 TH1 细胞因子是 IL-2, IFN- γ , TNF- α 或 TNF- β 。

25. 权利要求 22 所述的用途，其中 TH2 细胞因子的量被测定。

26. 权利要求 25 所述的用途，其中所述 TH2 细胞因子是 IL-4, IL-5, IL-10 或 IL-13。

27. 权利要求 22 所述的用途，其中所述 TH1 或 TH2 细胞因子通过免疫测定测量。

28. 权利要求 27 所述的用途，其中所述免疫测定是 ELISA 或放射免疫测定法。

29. 权利要求 22 所述的用途，其中所述 TH1 或 TH2 细胞因子用流

式细胞仪测量。

30. 权利要求 1 所述的用途，其中所述样品被测定不止一次。

31. 权利要求 30 所述的用途，其中所述样品用不同的测定法测定。

32. 权利要求 1 所述的用途，其中进一步包括从患者获得第二份样品并检测该第二份样品针对至少一种 HPV 的 E6 或 E7 肽的细胞介导的免疫应答。

33. 权利要求 1 所述的用途，其中在治疗其癌前期的或癌的生长后至少一个月以后从患者获得样品。

34. 权利要求 1 所述的用途，其中所述患者对其泌尿生殖道内的癌前期的或癌的生长已经受过烧蚀治疗。

35. E6 或 E7 肽在制备用于鉴别有危险复发癌前期的或癌的生长的 HPV 感染患者的试剂中的应用，包括：

a) 用 E6 或 E7 肽温育来自患者的血液样品；

b) 评价所述样品针对该肽的细胞介导的免疫应答；

其中所述 E6 肽是 K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R 或 G10S, E7 肽是 T10Q, M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C 或 D20C。

36. 权利要求 1 所述的用途，其中所述的人乳头瘤病毒是高级型。

37. 权利要求 36 所述的用途，其中所述的人乳头瘤病毒是 HPV 16。

涉及 HPV 相关的癌前期的和癌的生长 (包括 CIN) 的方法和组合物

发明背景

本申请要求于 2001 年 7 月 20 日提交的美国临时专利申请 60/306,809 的优先权，在此其全文作为参考。依据从国家癌症研究院 (NCI) 的授权号 CA65561 和 CA77378 以及国家健康研究院 (NIH) 的授权号 CA16672，美国政府可拥有本发明的权利。

1. 发明领域

本发明一般涉及免疫学，病毒学和肿瘤学。具体来说，涉及诊断和治疗由人乳头瘤病毒 (HPV) 引起的癌前期的和癌的生长或损伤(包括子宫颈上皮内瘤 (CIN))发生和复发的方法。

2. 相关技术描述

全世界女性中，子宫颈癌是第二恶性癌，占到所有女性癌症患者的 15% (Parkin 等, 1993)。在美国，子宫颈癌是女性生殖道最为普遍的瘤之一。实验室和流行病学的研究已经集中于一些种类的人乳头瘤病毒 (HPV) 在子宫颈瘤发病机理中的病原学作用上 (Brinton, 1992; Munoz 等, 1992)。一般的，在超过 79% 的确诊患有子宫颈疾病的妇女的样品中检测出 HPV 的 DNA。最普遍的 HPV 类型是 HPV 16，它发现于高度鳞状上皮内损伤和癌症中 (Lorincz 等, 1992)。流行病学研究结论支持了子宫颈瘤与 HPV 之间的相关性，在 HPV 型 16 中，这一关系更为显著 (Morrison 等, 1991; Koutsky 等, 1992; 和 Munoz 等, 1992)。肿瘤由细胞的非正常生长形成，它通常导致入侵正常组织，如原发性肿瘤，或导致向远处组织的传播，如转移瘤。

HPV 16 的 E6 和 E7 基因经常共同表达，且它们在 HPV 16 阳性宫

颈癌的活组织的病毒转录产物中异常丰富 (Wettstein, 1990; Seedorf 等, 1987)。充分的证据表明, E6 和 E7 可读框的共同表达对于多种哺乳动物细胞的恶性转化是必要且充分的 (Munger 等, 1989)。而且, 病毒基因组的 E6 和 E7 区域的连续表达似乎是保持恶性表型所必需的 (von Knebel Doeberitz 等, 1988)。

一些 HPV 感染患者会产生子宫颈瘤, 而另一些则不会。也观察到很大比例的自发消退, 这表明宿主的免疫作用。引入一种细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的反应建立了针对病毒感染的主要防御机制; 有时, 一种病毒特异的 CTL 反应可起到完全的保护作用而无需抗体反应伴随 (Sastry 等, 1992; Bevan, 1989; Lukacher, 1984)。基于现有文献关于抗 HPV 抗体, 尤其是那些直接抗 E7 癌蛋白的抗体的广泛增长和子宫颈疾病严重性之间的关系 (Cason 等, 1992; Hamsikova 等, 1994; Jha 等, 1993), 表明了 HPV 特异的体液反应可能不会对 HPV 相关的子宫颈疾病起到保护作用 (Nakagawa 等, 1996)。另一方面, 已经报导带有 CMI 缺陷个体的 HPV 相关子宫颈瘤的发病率增长, 证明了 T 细胞参与控制人 HPV 相关的瘤的形成 (Nakagawa 等, 1996; Tsukui 等 ; 1996; Feltkamp 等, 1993 和 Clerici 等, 1997)。在侵入性宫颈癌患者体内, 已经观察到 IL-2 产生量和对于促细胞分裂剂如 PHA 和伴刀豆球蛋白-A 的增殖反应的减少 (Park 等, 1992)。已经描述了大量体外和体内策略从 HPV-16 的 E6、E7 肽, 和 LI 蛋白鉴别诱导小鼠和人的 T 细胞活性的肽 (Feltkamp 等, 1993; Strang 等, 1990; Tindel 等, 1991; Shepherd 等, 1992; Stauss 等, 1992; Kast 等, 1993)。典型地, 诱导病毒特异的 CTL 可以通过感染表达病毒基因产物的病毒或重组病毒来实现。该病毒基因产物经加工且以肽的形式存在于受感染细胞的表面, 与 MHC I 类分子相结合, 被 CTL 识别 (Unanue, 1989)。

另外, 研究也集中在引起病毒特异的 CTL 反应的 HIV 肽的鉴别和描述上。Townsend 等阐明了用蛋白质中 T 细胞抗原决定基作为疫苗候补物质的观念, 当时他们的小组证明了流感核蛋白中的短合成肽作为抗原决定基对 CTL 反应的作用 (Townsend 等, 1986)。本发明者和其

他人已经报导了用合成肽体内产生病毒特异的 CTL (Kast 等, 1991; Aichele 等, 1990; Deres 等, , 1989; Sastry 等, 1992; Sastry 等, 1994; Casement 等, 1995) 以抵抗流感, 淋巴细胞脉络丛脑膜炎, 仙台病毒和 HIV.

超过 90% 的宫颈癌表达人乳头瘤病毒 (HPV) E6 和 E7 蛋白。这些独特的抗原是开发细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 用于抗癌免疫疗法的理想目标。相应于 HPV-16 的 E6 和 E7 癌蛋白的合成肽已经鉴别出来了, 它对于体内诱导 HPV 特异的 CTL 反应是有效的 (Sarkar 等, 1995)。最近, Nakagawa 等报导了在许多没有子宫颈损伤的处女和有性生活的妇女中, 可检测到针对 HPV-16 肽和蛋白的全身 T 细胞增殖反应和 CTL 反应, 而在患有疾病的妇女体内则检测不出 (Nakagawa 等, 1997)。类似地, Tsukui 等报导了对 HPV 抗原的 TH 淋巴细胞反应, 尤其是 IL-2 的产生, 在细胞学正常的妇女中比在有不同程度宫颈瘤进程的妇女中要多 (Tsukui 等, 1996)。而且, Clerici 等发现, 能潜在增强 CMI 的 TH1 细胞因子 (IL-2 和 IFN- γ) 的产生在感染大量 HPV 的妇女体内有缺陷, 并且发现 CIN 的进展与从 TH1 到 TH2 细胞因子产生的转变相关 (Clerici 等, 1997)。使用长期体外刺激方案确定 TH 活性, Kadish 等报导了对特定 HPV 肽的淋巴增殖反应与 HPV 的清除和 CIN 的退化有关 (Kadish 等, 1997)。另一方面, de Gruijil 等报导了针对 HPV 16 E7 肽的 T 细胞增殖反应与 HPV 的持续感染相关, 但是抗原特异的 IL-2 生产与病毒清除和宫颈损伤进程均相关 (de Gruijil 等, 1996)。

对于 CIN 患者的普通临床治疗方案包括切除或烧蚀治疗。然而, 进一步的研究证明, 有相当数量的患者会复发。目前, 在接受过针对 CIN 的烧蚀或切除治疗的患者中, 关于癌前期的或癌的生长, 复发或康复状况的发生不存在明确的认识。需要更好且改进的方法来有效治疗与 HPV 相关的癌前期的或癌的生长和损伤疾病。

发明概述

本发明基于观察到感染人乳头瘤病毒 (HPV) 的患者对 HPV 的 E6

和/或 E7 肽的细胞介导的免疫 (CMI) 应答与其预后相关。对于泌尿生殖道，尤其对于子宫颈的癌前期的或癌的生长的发生，表现细胞介导的免疫应答比那些不表现出细胞介导的免疫的患者危险性减少；换句话说，尤其针对 E6 和/或 E7 肽显示出阳性的细胞介导的免疫应答的患者，就发展 HPV 相关的癌前期的或癌的生长来说，会有良好的预后情况。或者说，一个对 HPV 的 E6 或 E7 蛋白质化合物显示无或低 CMI 反应的患者，就 HPV 感染结果的生理性效应而言，预后不良的危险性会更大。因而，本发明涉及鉴别患者有危险患 HPV 相关的高增殖性病情（包括疣, CIN

和恶性肿瘤或其它癌前期的或癌的生长）的组合物和方法，；本发明尤其适于评价患者复发高增殖性病情的可能性。此处，术语“生长”和“损伤”可交替使用。并且，术语“癌前期的或癌的生长”指与 HPV 相关的生长。除子宫颈的癌前期的或癌的生长或损伤，这样的肿瘤或损伤也可以出现在尿生殖道，包括会阴，阴户和阴茎的瘤生长或损伤。适用于本方法的患者可以包括任何能够感染 HPV 病毒的哺乳动物；在一些实施方案中，患者被特定为人，男性或女性。

在一些实施方案中，本发明涉及能确定感染人乳头瘤病毒的患者发展或复发癌前期的或癌的生长的可能性的方法。在一些案例中，患者已经治疗了瘤生长。该方法包括以下步骤：从患者体内获得样品，用至少一种 HPV 的 E6 或 E7 肽温育该样品；以及测定样品针对这些肽的细胞介导的免疫 (CMI) 应答。对 E6 或 E7 肽或其组合有细胞介导的免疫应答，则表明比不显示这一反应的人，复发的危险性减少。在宫颈癌的发展中频繁观察到的一种前癌生长是宫颈上皮内瘤样病变或 CIN。在本发明的一些实施方案中，本发明方法可适用于处于 CIN 任何阶段 (CIN1, CIN2, CIN3 或鳞状上皮内损伤 (SIL)，低度 SIL (L-SIL) 和高度 SIL (HSIL)) 的患者。进一步，在其它实施方案中，该方法可以适用于患有 CIN 以外的更严重的高增殖性生长的患者，如恶性或癌生长。在本发明中，术语“复发”是指癌前期的或癌的生长的出现，或最初生长的再现，或最初癌前期的或癌的生长在退化，消除，或治

疗之后的显现。此处，术语“温育”指将样品露置或接触含有肽的组合物。

要求保护的方法适用于人乳头瘤病毒的感染。所述人乳头瘤病毒可以是高等级或高危型，如 HPV16, 18, 31, 45, 56 或 58。在一些实施方案中，人乳头瘤病毒是 HPV16。在另一些实施方案中，人乳头瘤病毒是中危型，如 HPV33, 35, 37, 51, 52, 59, 66 或 68。更进一步的实施方案中，HPV 是与疣相关的低危或低等型，如类型 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 55, 62, 或 66。

所述样品包括能够引起细胞介导的免疫应答的细胞。在一些实施方案中，样品是血液样品或血清样品，而在其它实施方案中，样品通过灌洗，涂片或拭抹疑似感染或已感染的区域，如阴道，宫颈或阴茎的区域而获得。外周血单核细胞（PBMC）能导致细胞介导的免疫应答，且含有这种细胞的任何样品也能用于本发明的方法。在一些实施方案中，考虑来自样品的细胞在获得之后和检定之前在培养基中培养。考虑在检定之前在培养基中该样品可以培养 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或更多小时和多达 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 天，并多达 1, 2, 3, 4, 5 或更多星期，并且多达 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12 个月。也考虑细胞在检定之前在培养基中培养和/或在低于零摄氏度保藏。细胞自身或细胞培养上清液（培养液，不完整的细胞）可以用于随后细胞介导的免疫应答的分析。在一些实施方案中，先在培养基中培养细胞 2-8 小时（一些情况下 6 小时），然后用流式细胞仪分析胞内细胞因子。在其它实施方案中，先在培养基中培养细胞 2 天到 20 天（一些情况下 15 天），然后用铬释放分析以确定细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）活性。

本发明的方法涉及确定患者是否显示对 HPV 肽的细胞介导的免疫应答。在个别实施方案中，所述肽是 E6 或 E7 肽，意味着它们的氨基酸序列在其长度上与 E6 或 E7 多肽的连续氨基酸序列具有至少 90% 的相同性。具体地，考虑使用 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,

37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 或更多的 SEQ ID NO : 19 (来自 HPV 16 的 E6) 或 SEQ ID NO : 20 (来自 HPV 16 的 E7) 的连续氨基酸。考虑在一些实施方案中，仅有一个序列的肽被检测 (如 E6 肽，或另一个实例，E7 肽)，而在其他实施方案中，多序列可被检测。在一个实施方案中，E6 肽和 E7 肽在本发明中被使用。在其它实施方案中，至少两个 E6 肽 (指至少两个不同的 E6 序列)，至少两个 E7 肽 (指至少两个不同的 E7 序列)，或二者同时被检测。可以考虑使用 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 或更多的 E6 或 E7 肽，也可以是任何 E6 或 E7 肽的组合。在更具体的方式中，E6 肽是 K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R, 或 G10S, 或其组合。在特定的实施方案中，以下的 E6 肽将单独使用或作为包括以下一个或多个肽的混合物来使用，这些肽是 K9L, E10I, C10R, Q15L, 或 V10C。而在其它实施方案中，E7 肽是 T10Q, M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C 或 D20C, 或其混合物。在特定的实施方案中，以下的 E7 肽 Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C 单独或作为混合物使用。此外，以下肽中包括至少一个 E6 肽和一个 E7 肽的混合物：K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, Q19D, R9F, R9V, L9V 或 G10C。在一些实施方案中，特别考虑排除上述混合物中一个或多个肽。特别考虑涉及本发明诊断方法的组合物还可适用于本发明的预防和治疗方法。

本发明方法涉及抗人乳头瘤病毒的细胞介导的免疫 (CMI) 应答。有不同的方法可以鉴别和评价细胞介导的免疫应答 (区别于血清或抗体介导的免疫应答)。在本发明的实施方案中，测定 T 细胞的增殖。T 细胞增殖可通过测定氚化胸昔的掺入来分析。针对至少一个 E6 或 E7 肽的 SI 数值范围等于或大于 2.0 的增殖反应被认为是阳性，它表示患者的癌前期的或癌的生长或损伤复发的危险减少。针对至少一个 E6 或 E7 肽的 SI 值等于或大于 3.0 的增殖反应表明了细胞介导的应答，因此鉴定患者癌前期的或癌的生长方面改良的预后进展。换句话说，SI 低于 2.0，包括 SI 值为零的患者被认为对 E6 或 E7 肽具有低的或没有

细胞介导的免疫应答，并认为他们的癌前期的或癌的生长有增加的发展或复发危险。

细胞介导应答也可用非放射性方法如 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)染料或还原测定法，这是一种活细胞(T细胞增殖)比色分析法(daCosta 等, 1999)，或 alamar Blue 分析法，它是另外一种测定 IL-2-应答性细胞的比色分析法(Gloeckner 等, 2001; Kwack 等, 2000)。

在本发明的另一实施方案中，测定细胞介导的免疫应答包括测量 TH1 或 TH2 细胞因子量。即使患者由 T 细胞增殖测定没有显示 CMI 应答，复发增长的危险性仍与 TH2 细胞因子的产生相关，如 IL-10。对 E6 和/或 E7 肽显示产生 TH1 细胞因子的应答的患者，如 IFN- γ 和 IL-2，观察到他们复发的危险性减少。在一些实例中，TH1 细胞因子的量被测量，如 IL-2，干扰素 (IFN) γ ，肿瘤坏死因子 (TNF) α ，或 THF- β ，IL-3，IL-12，IL-15，IL-16，IL-17 或 IL-18。在一个具体的实施方案中，测量 IL-18 的量。在另外的实例中，测量 TH2 细胞因子的量，如 IL-1，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-7，IL-9，IL-10，IL-11，IL-13 或 IL-14。

可以通过免疫测定法测定 CMI 应答，如 ELISA 或放射免疫测定法或通过流式细胞仪。在一些实施方案中，来自患者的样品可测试不止一次，以备份样品或不同的测试。在一些实施方案中，来自患者的样品可有多份。多份样品可以是同类型的，如多份的血液样品，或者它们可以是不同类型，如一份血液样品和一份阴道拭擦样品。

适用于本发明方法的患者包括那些还没有诊断出 HPV 但认为有 HPV 的患者，曾经感染有 HPV 但再也没有显示感染 HPV 征象的患者，已知感染了 HPV 的患者，在宫颈或其它泌尿生殖器区域或周围有癌前期的或癌的生长，而她自己并不知道感染了 HPV 的患者，癌前期的或癌的生长已经成功或不成功治疗的患者，和至少一个癌前期的或癌的生长复发的患者。癌前期的或癌的生长或损伤是指生长不能控制的高增殖性细胞，包括前期瘤形成，如 CIN 和瘤形成（良性或恶性），涉

及鳞状上皮细胞和不确定显著的非典型鳞状细胞(ASCUS)。考虑患者有不止一个肿瘤或损伤。任何肿瘤的治疗既涉及外科(烧蚀或切除)手术，又涉及抗HPV的常规癌症治疗。这种治疗包括化学疗法，放射疗法，激素疗法，免疫疗法，施用磷酸胆碱钙，Thiovir，thiovir类似物(BioKeys)，podofilox，鬼白脂，三氯乙酸(TCA)，或5氟尿嘧啶(5-FU)，损伤内或intransal干扰素，Imiquimod霜剂。烧蚀技术包括使用液氮，电炙或电解剖，外科切除，或激光技术。成功的治疗指完全除去任何肿瘤征象的治疗，而部分成功治疗指影响肿瘤使其大小或生长率变小，或防止肿瘤的增大，或如果有多个肿瘤，减少肿瘤生长的数量。曾经感染HPV的患者随后可以不显示HPV感染的迹象。然而，相信这样的患者仍然经受癌前期的或癌的生长复发的可能，象连续感染HPV征象的患者。

本发明的一些实施方案中，评价了患者是否确定感染HPV。具体的，也包括HPV的血清型鉴定或其成为最初确定感染的部分。进一步实施方案中，评价了患者是否有癌前期的或癌的生长，如果是癌症，评价肿瘤为良性还是恶性。

本发明的方法包括其中在治疗癌前期的或癌的生长至少一个月后，从患者获得样品的实施方案。患者可以对至少一个癌前期的或癌的生长接受治疗，如通过某些形式的烧蚀。

本发明也包括跟本发明的诊断方法一起使用的治疗方法。在本发明的一些实施方案中，癌前期的或癌的生长的复发进展危险性增加的患者被鉴别。可以采用在患者被认为具有增长的危险性之前未考虑的措施。在一些实施方案中，对没有另外被治疗的患者进行抗癌前期的或癌的生长的预防性治疗或进行经常性检查，或二者同时进行。预防性治疗是对缺乏癌前期的或癌的生长生理性病征时进行的治疗；“治疗方法”包括对患者显示的生理情况进行内科治疗。预防性治疗包括如上所述的，对HPV感染和与HPV相关的癌前期的和癌的生长治疗的使用。

在一些实施方案中，防御或减少癌前期的和癌的生长进展危险的

预防方法包括用本发明公开的 HPV 的 E6 和 E7 肽的免疫疗法。如果患者被鉴定为对特别是 E6 或 E7 肽，或对这些肽的组合具有低的或没有细胞介导的免疫应答，那么给患者施用 E6 或 E7 的肽序列，用以引发 CMI 应答。这些肽包括任何 E6 或 E7 肽，尤其包括表 3 的全部或部分肽。并且，来自 E6 或 E7 多肽的肽，如本发明诊断方法中所论述的，也可以在预防性方法中施用。考虑患者施用含有一或多种肽序列的组合物，在一些实施方案中，还包括辅药，基于脂质体的组合物，或二者。在其它实施方案中，患者不止一次被施用肽。

在一些实施方案中，对感染了 HPV 的患者有一种通过用本发明方法中公开的方法鉴定患者有危险复发 HPV 相关肿瘤生长的防止癌前期的或癌的生长（如 CIN）复发的方法；以及防止或治疗任何复发的方法。治疗方法包括外科手术（烧蚀或切除术），以及上述常规抗 HPV 的癌症治疗方法。在一些实施方案中，所述方法是至少包括上述一个来自 HPV 的 E6 或 E7 肽的免疫疗法治疗。

此外，本发明还包括确定曾感染有 HPV 并治疗肿瘤生长的患者体内癌前期的或癌的生长的复发可能性的试剂盒，该试剂盒在适当的试剂容器中包括至少一个来自 HPV 的 E6 或 E7 肽，和能够检测针对肽的细胞介导的免疫应答的抗体。在一些实施方案中，抗体附着在不起反应的结构上，样品施加于其中，如带有孔的板。在另一些实施方案中，不起反应的结构具有膜，这种膜能粘贴或附着在该结构上。在一些实施方案中，试剂盒可用于酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定来检测，一些实施方案中，测定细胞因子分泌细胞的数量。在另一些实施方案中，试剂盒包括一种本发明公开的抗 TH1 或 TH2 细胞因子抗体。其它方式包括检测所含抗体的检测试剂。检测试剂是任何能检测另一化合物的化合物，包括能在视觉上检测的试剂，如比色检测试剂。

权利要求和/或说明书中使用“一”与术语“包括”连接可表示“一种”但也有“一或多种”，“至少一种”，“一种或更多”的意思。

本发明的其它目的，特征和有益效果将通过以下详细的描述清楚表明。然而，应该理解，说明本发明特殊实施方案的详细描述和特殊

实施例仅为描述而给出，因此属于本发明精神和范围之内的各种变更和更改，本领域技术人员从这一详细描述都可清楚得到。

附图简要说明

以下附图形成本说明书的一部分，并且成为本发明某方面的进一步说明。通过参考这些附图的一幅或多幅结合本发明的特殊实施方案的详细描述，本发明可以得到更好的理解。

图 1A-B 各不相同的四组被研究妇女的 PBMC 对不同 E6 和 E7 合成肽的增殖反应。第 1 组妇女正常 ($\text{CIN}^{(-)}/\text{HPV}^{(-)}$, $n = 6$), 第 2 组妇女刚诊断为 HPV 相关的 CIN ($\text{CIN}^{(+)} / \text{HPV}^{(+)}$, $n = 31$), 第 3 组是疗后无疾病 ($\text{Recur}^{(-)}$, $n = 22$), 且第 4 组是有疾病复发的 ($\text{Recur}^{(+)}$, $n = 10$)。测定来自四个不同组妇女的 PBMC 对来自 HPV-16 的癌蛋白 E6 或 E7 的肽的增殖反应。A. 显示了每个患者对各种被测肽的刺激指数 (SI) 值，该值是根据 ^3H 胸腺嘧啶掺入肽处理过的样品超过培养基对照的倍数的增加来计算。B. 各组对 E6, E7 肽或这两种肽的阳性反应的汇总。组数表示于 x 轴上，而阳性反应的百分数表示于 y 轴上。

图 2A-D. 第 3 组 ($\text{Recur}^{(-)}$) 和第 4 组 ($\text{Recur}^{(+)}$) 对来自 HPV-16 癌蛋白 E6 和 E7 的合成肽的 PBMC 的增殖反应。检测这些组妇女的 PBMC 相对对照肽 (对照) 的，分别针对来自 HPV-16 癌蛋白 E6 和 E7 的 7 和 8 肽的增殖反应。显示表现 SI 值的代表数据，它们分别来自第 3 组 (图 A 和 B) 和第 4 组 (图 C 和 D) 的两位患者。

图 3. 第 3 组妇女的 PBMC 对所选 E6 和 E7 肽刺激响应的 TH1 细胞因子生产。第 3 组 ($\text{Recur}^{(-)}$) 和第 4 组 ($\text{Recur}^{(+)}$) 妇女的 PBMC 在 E6 肽 Q15L 和 E7 肽 Q19D 的存在下培养两天，并且通过 ELISA 在各自的上清液中检测各种 TH1 (IL-2, IFN- γ , IL-12) 和 TH2 (IL-4, IL-10) 细胞因子的存在。经与培养基对照调节后，显示第 3 和 4 组各被测患者产生的细胞因子数量。

说明性实施方案的描述

人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是宫颈癌的主要危险因素，并且强的

HPV-特异的细胞介导的免疫和CIN较小严重程度之间有关联。对于CIN患者的普通临床治疗策略包括切除或烧蚀治疗，然而随后的研究表明相当数量的患者经历了复发。目前，对于这些患者的病情复发或无病情况并没有明确的认识。对感染，没有感染和复发患者而言，对CIN的预测和治疗或预防性治疗是关键。多数治疗方法已经试验并实施，但是它们还不能排除疾病或防止疾病复发。有相当数量的患者CIN复发，但是还没有可测试复发可能性的方法。

本发明提供了一种确定CIN复发可能性的方法，该方法作为感染HPV并治疗CIN患者的预后性和生物标记物。该方法涉及检测和分析针对HPV癌蛋白肽，如E6和E7，的细胞介导的免疫应答。该方法也帮助鉴别有复发CIN危险的感染有HPV的患者。进一步，本发明利用定向传输系统，试剂盒和免疫疗法来防止CIN复发并诊断有高度危险患CIN的患者。

I. HPV

在宫颈瘤形成和癌症发展阶段，人乳头瘤病毒(HPV)先被作为一种重要的辅因子鉴别出来。然而感染HPV并不足以导致宫颈癌。并不是所有感染HPV的女性都会发展成宫颈癌。妇女通常治疗在每年的巴氏(Pap)涂片中检测到的宫颈发育异常疾病。尽管存在巴氏涂片检测，流行病学研究继续暗示HPV是产生宫颈瘤和癌症仅有的最大危险因素。宫颈上皮内瘤(CIN)是由人乳头瘤病毒(HPV)引起的一种宫颈癌。HPV与宫颈癌的发展相关，尤其是HPV型16, 18, 31, 45, 56和58。它们构成HPV的高级型/高危型。中级/中危型包括HPV 33, 35, 37, 51, 52, 59, 66和68。其它与疣相关的低级/低危型是类型6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62和66。这些低级型性质上不是恶性的。HPV基因组目前以游离基因形式(不完整的，环状的)存在于CIN中，而在侵入性宫颈癌中，基因组通常完整地整合到宿主DNA中。HPV的高危型表达的E6和E7癌蛋白对于宫颈鳞状上皮的恶性转化起关键作用，因为它们能够结合然后失活两个重要肿瘤抑制基因，p53和成视网膜细胞瘤基因(Rb)。这些肿瘤抑制蛋白的失活成为HPV致癌潜力

的关键因素。

A. 宫颈癌的诊断和治疗

人乳头瘤病毒被鉴定为与宫颈癌的发展有关，宫颈癌是宫颈上皮瘤(CIN)经若干阶段表现出恶性状况。尽管存在巴氏涂片检测，流行病学研究连续暗示 HPV 是发展 CIN 仅有的最大危险因素，许多研究继续寻找能够帮助鉴别处于 CIN 危险中的感染 HPV 的妇女的宿主和/或病毒标记物。与此同等重要的是经过治疗的患者复发 CIN 的可能性。对经过切除或烧蚀治疗的患者跟踪研究表明有相当数量的患者复发。因此，能够评价 CIN 复发可能性是非常重要的。预知复发可允许医生考虑预防或治疗的选择。

自从二十世纪八十年代初，HPV 与宫颈癌相关的首次报导出现以来(zur Hausen, 1994)，人们已经普遍承认了高危 HPV 型有助于侵袭前的上皮内损伤到癌症的启动和进展。事实上，已经注意到，在 Pap 涂片上明显的细胞病理中 HPV 感染达到顶点，其特征为相关核异型性的核周清除(Kurman 等, 1994)。在修订的 Bethesda 术语中，这些 HPV 改变与轻度发育不良结合定义为 LSIL(Kurman 和 Solomon, 1994)。HPV 试验的有效性是复杂的，因为需要区分低危(L-SIL)和高危(H-SIL)HPV 型(仅有后者引起与发育异常→癌进展相关的重要危险)，和实际的进展危险。在以前的病例中，新的针对 HPV 的杂种捕获检测区分了高危 HPV 型(Sherman 等, 1995; Poiak 等, 1999; Clavel 等, 2000)。除了本发明的方法，DNA 图象细胞计数也可用来诊断处于宫颈损伤的患者(Lorenzato 等, 2001)。

1. 巴氏涂片

在过去的五十年中，巴氏涂片(Papaniclaou Smear, "Pap Smear")已经成为减少宫颈癌死亡率的基础。巴氏涂片是有效的，因为它能鉴别出宫颈癌的最早期阶段。目前估算，在美国每年要做 6-7 千万个巴氏涂片。巴氏涂片因此成为检验宫颈癌的标准。尽管它在医学界有广泛的可接受性，但研究表明巴氏涂片筛选未能发现 50-80% 的低级癌损伤和甚至 15-30% 的高级癌损伤。

任何细胞学诊断方法的第一步是获得合适的巴氏涂片细胞来观察。在常规的巴氏涂片试验，细胞学家检测到了脱落细胞样品，它们获自宫颈内衬刮下的细胞，涂抹细胞于载玻片，并用巴氏染料染色。细胞学家在染了色的涂片上检测到异常形态的细胞，这表明存在恶性病症。术语“恶性病症”指存在发育异常，包括原位腺癌（AIS），侵入性癌（CA），肿瘤，或类似的恶性或肿瘤细胞。

在本发明方法中，脱落细胞样品来自有或没有恶性病症的患者。这些样品可以通过旋转宫颈取样装置获得，如沿宫颈或阴道粘膜部分的擦拭签，刮刀，或细胞刷以获得细胞样品。合适的样品应含带有鳞状和/或腺细胞的宫颈内膜细胞。

脱落细胞样品通常涂于载玻片，在载玻片表面形成一薄层样品。然而，手工操作观察细胞异常或自动化分析细胞学物质可以通过在样品载玻片上制备“单层”细胞来优化。“单层”的定义实质上是均匀分布的细胞物质的二维的层，主要由单个细胞和小细胞簇组成。

当进行巴氏涂片检测时，妇科学家从宫颈表面收集到脱落细胞，并把它们置于载玻片上，交给细胞学家进行进一步检测。然后细胞学家观察置于载玻片上的细胞，并寻找异常细胞。如果发现异常细胞，则认为该巴氏涂片为阳性。如果没有异常细胞，则认为该巴氏涂片为阴性。对于早期宫颈癌检测，巴氏涂片筛选通常作为一种实用并经济的方法。在本发明中，通过 Virapap/Viratype 分析（Technologies Inc.，Gaithersburg, MD）来确定 HPV 阳性。

2. 阴道镜检

巴氏涂片处理设计为初期筛检之用，而阴道镜检查及其相关方法通常用于确定巴氏涂片异常，癌症等级和潜在癌损伤。自从 1925 年阴道镜检查被引进以来，它作为经巴氏涂片检测有宫颈异常可能性患者的后继诊断方法，已经被广泛认识。通常认为利用阴道镜检查评价巴氏涂片异常的患者是非常有效的，因此它已成为西方社会对这种病情的医疗标准。在美国每年估计会进行 4 百万次阴道镜检查。

3. 荧光分光镜检查

另一种检测癌前期的和癌的生长或损伤的方法是荧光分光镜检查，其能快速的，非侵袭性的，定量探测出组织变为肿瘤时，其生物化学和形态学变化。肿瘤组织改变了的生物化学和形态学状态反射为可测量的荧光的特性。美国专利 6,258,576 和 6,135,965 论述了宫颈鳞状上皮 (CIN) 损伤的诊断并特别引入作为参考。

3. 癌前期的和癌的生长的治疗

治疗意指肿瘤生长的消除，减少或延迟效果。癌生长可通过切除或烧蚀方法治疗。除了下面将要详细描述的免疫疗法之外，也可以在本发明方法中使用以下治疗或预防方法。

i) 化学疗法

癌症疗法还包括基于化学和放射治疗两者结合的多种组合疗法。组合的化学疗法，如顺铂 (CDDP)，卡铂，甲基苄肼，盐酸氮芥，环磷酰胺，喜树碱，异环磷酰胺，苯丙氨酸氮芥，苯丁酸氮芥，白消安，亚硝基脲 (nitrosurea)，放线菌素 D，红比霉素，阿霉素，博来霉素，plicomycin，丝裂霉素，鬼臼亚乙昔 (VP16)，他莫昔芬，雷洛昔芬，雌激素受体粘合剂，紫杉醇，gemcitabien，诺威本，法呢基蛋白转移酶抑制剂，反铂 (transplatinum)，5 氟尿嘧啶，长春新碱，长春灭癌碱和氨甲蝶呤，或上述药物的任何类似物或衍生物变异体。

ii) 放射疗法

其它导致 DNA 损伤的因素并广泛使用的方法包括通常所说的 γ 射线，X 射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞定向的输送。还包括其它形式的 DNA 损伤因素，如微波和 UV 照射。所有这些因素很可能影响大范围的 DNA 损伤，前体 DNA，和 DNA 的复制和修复，以及染色体的装配和维持。X 射线的剂量值从每日在 50 至 200 伦琴持续一段时间 (3 至 4 周) 到 2000 至 6000 伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量值改变范围很大，并且它依赖同位素的半衰期，放射的强度和类型，以及肿瘤细胞的吸收。

当用于细胞时，此处的术语“接触”和“暴露于”描述的是治疗的或诊断的肽或多核苷酸，或化学疗法或放射性疗法的试剂被送达靶细胞或直接与靶细胞并列放置的过程。为了获得细胞致死或停滞，两种试剂以有效杀死细胞或防止其分裂的结合总量送达细胞。

iii) 基因

在另外一个实施方案中，次级治疗采用基因疗法，其中治疗性多肽在本发明的嵌合多肽之前，之后或同时施用。嵌合多肽与编码以下基因产物的第二载体结合的传输会在靶肿瘤上产生联合的抗高增殖性效应。或者，可以使用编码两个基因的单个载体。本发明包括多种蛋白，包括细胞增殖诱导物（如生长因子受体），细胞增殖抑制剂（如肿瘤抑制剂），和细胞死亡调节剂。

iv) 烧蚀方法

多数患有癌症的人一般都要进行一些类型的手术，包括预防性的，诊断性或分级的，治疗或减轻性的手术。治疗手术是对癌前期的或癌的治疗方法，它可与其它疗法结合应用，如本发明所述的，化学疗法，放射性疗法，激素疗法，基因疗法，免疫和/或另外的疗法。

有疗效的手术包括切除术，该手术中所有或部分的癌前期的或癌的组织被物理割除，切离，和/或破坏。肿瘤切除术指至少物理切除至少肿瘤的部分。除了肿瘤切除术，手术治疗包括激光手术，冷冻手术，电外科手术和基因错录受控的手术(Mohs' surgery)。进一步考虑本发明可联合表面癌，前期癌或附带一定正常组织的除去而使用。

切除癌细胞，组织或肿瘤的所有和部分后，在体内会形成一个腔。通过灌注，直接注射或在该区域局部施用另外的抗癌治疗来完成治疗。这样的治疗可以重复，如每1, 2, 3, 4, 5, 6或7天，或每1, 2, 3, 4和5周，或每1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11或12个月。这种治疗也可以改变剂量。

v) 其它药剂

也考虑其它药剂与本发明的方法结合使用来改进治疗效果。这些附加药剂包括免疫调节试剂，影响细胞表面受体和 GAP 连接的增量调节的药剂，抑制细胞增长的和分化药剂，细胞粘附抑制剂，或增加高增殖性细胞对细胞凋亡诱导剂敏感性的药剂。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子，干扰素 α ， β ， γ ；IL-2 和其它细胞因子；F42K 和其它细胞因子类似物；或 MIP-1，MIP-1 β ，MCP-1，RANTES，以及其他趋化因子。进一步还包括通过对高增殖性细胞建立自分泌或旁分泌效应，细胞表面受体或它们的配体，如 Fas /Fas 配体，DR4 或 DR5/TRAIL，的增量调节能加强本发明的细胞凋亡诱导能力。通过增加 GAP 连接数目增加细胞间信号传导会提高相邻高增殖性细胞群体的抗高增殖性效应。在其它实施方案中，细胞生长抑制的或分化的药剂可以与本发明联合使用以提高该方法的抗高增殖效应。还考虑使用细胞粘附抑制剂提高本发明的疗效。考虑的细胞粘附抑制剂有粘着斑激酶（FAKs）抑制剂和洛伐他汀。此外还包括增加高增殖性细胞对凋亡的敏感性的其它试剂，如抗体 c225 可以结合本发明使用来提高疗效。

激素疗法也可与本发明方法或上述其它任何癌症疗法结合使用。激素疗法可用于治疗某些癌症如乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌或宫颈癌，以使某些激素，如睾丸素或雌激素的水平降低或阻止其作用。这种疗法通常与至少一种其它癌症疗法结合使用，作为一种治疗方法或减少转移的危险性。

v) 抗病毒剂

感染 HPV 的患者可以单独使用抗病毒剂治疗或与抗癌疗法结合治疗。“抗病毒剂”指一类组合物，它能防止或抑制病毒感染；防止或抑制病毒感染进展；减少病毒的侵染性；防止，抑制或减少病毒感染的生理学症状；防止或减少病毒活化的发生率；抑制病毒宿主细胞；诱导宿主细胞凋亡；从全身或局部清除病毒；诱导病毒失活；或上述作用的任意结合。

抗 HPV 剂包括施用如下药物，磷酸胆碱钙，Thiovir，thiovir 类似物 (BioKeys)，坡多非洛，鬼白脂，三氯乙酸 (TCA)，5 氟尿嘧啶

(5-FU)，损伤部内或 intranasal 干扰素，或 Imiquimod 霜剂。其它试剂公开于美国专利 6,245,568、6,238,659, 和 6,214,874。

II. 蛋白和肽的选择、合成和应用

本发明中，肽被应用于诊断和治疗的方法。这些肽与 HPV16 癌蛋白相关。

A. 蛋白质组合物

在某些实施方案中，本发明涉及的新的组合物，其至少包括一种如以下肽序列的蛋白质分子：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 以及多肽 SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21。此处，“蛋白质分子”，“蛋白质组合物”，“蛋白质化合物”，“蛋白质链”或“蛋白质物质”通常包括，但不限于，一种多于 200 个氨基酸的蛋白质或从一个基因翻译来的全长内源性序列的蛋白质；多于约 100 个氨基酸的多肽，和/或来自约 3 至约 100 个氨基酸的肽。上述所有的“蛋白质”术语可在此交替使用。

在某些实施方案中，至少一种蛋白质分子包括的氨基酸长度是，但不限于，1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400,

1500, 1750, 2000, 2250, 2500 或更多氨基分子残基, 以及其中任何可变范围。本发明的肽包括 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 或直到包括 100 个来自 SEQ ID NOS: 1-21 的相邻氨基酸。SEQ ID NOS: 1-10 的肽来自 HPV 的 E6 多肽, SEQ ID NOS: 11-19 的肽来自 HPV 的 E7 多肽。SEQ ID NOS: 20 和 21 分别是来自 HPV 痘蛋白 E6 和 E7 的多肽。HPV 16 中 E6 的 GenBank 编号为 AF327851 (SEQ ID NO : 26), HPV16 中 E7 的编号为 U76404 (SEQ ID NO : 27), 它们都特别引入作为参考。根据表 3 可知, 特别考虑作为本发明一部分的肽包括以下的 E6 肽: K9L (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 18-26), E10I (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 23-34), C10R (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 37-46), Q15L (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 43-57), VIOC (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 49-58), P9L (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 66-74), P10I (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 102-111), Q20P (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 97-116), R16R (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 131-146), G10S (SEQ ID NO : 26 的氨基酸 141-150), 或其组合。根据表 3, 进一步可知, 特别考虑作为本发明的一部分的肽包括如下 E7 肽: T10Q (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 7-15), M9T (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 12-20), D9L (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 14-22), Q19D (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 44-62), R9F (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 49-57), R9V (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 66-74), L9V (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 82-90), G10C (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 85-94), D20C (SEQ ID NO : 27 的氨基酸 75-94), 或其组合。

此处, “氨基分子”指任何本领域技术人员公知的氨基酸, 氨基酸衍生物或氨基酸类似物。在某些实施方案中, 蛋白质分子的残基是连续的, 不存在任何非氨基分子中断氨基分子残基的序列。在其它实施方案中, 所述序列可以包括一个或多个非氨基分子部分。在特定的实施方案中, 蛋白质分子的残基序列可以被一个或多个非氨基分子部分中断。

因此, 术语“蛋白质组合物”包括氨基分子序列, 该序列含有存

在于天然合成蛋白质中 20 个普通氨基酸的至少一个氨基酸，或包括但不限于下表 1 所示的至少一个修饰的或非常见的氨基酸。

修饰和非常见氨基酸			
缩写	氨基酸	缩写	氨基酸
Aad	2 - 氨基己二酸	EtAsn	N - 乙基天冬酰胺
Baad	3 - 氨基乙己二酸	Hyl	羟赖氨酸
Bala	β - 丙氨酸, β - 氨基丙酸	AHyl	异羟赖氨酸
Abu	2 - 氨基丁酸	3Hyp	3 - 羟脯氨酸
4Abu	4 - 氨基丁酸, γ - 氨基丁酸 (piperidinic acid)	4Hyp	4 - 羟脯氨酸
Acp	6 - 氨基己酸	Ide	异锁链(赖氨)酸
Ahe	6 - 氨基庚酸	AIle	异亮氨酸
Aib	2 - 氨基异丁酸	MeGly	N - 甲基甘氨酸, 肌氨酸
Baib	3 - 氨基异丁酸	MeIle	N - 甲基异亮氨酸
Apm	2 - 氨基庚二酸	MeLys	6 - N - 甲基赖氨酸
Dbu	2, 4 - 二氨基丁酸	MeVal	N - 甲基缬氨酸
Des	锁链(赖氨)素	Nva	正缬氨酸
Dpm	2, 2' - 二氨基庚二酸	Nle	正亮氨酸
Dpr	2, 3 - 二氨基丙酸	Orn	鸟氨酸
EtGly	N - 乙基甘氨酸		

在某些实施方案中，蛋白质组合物包括至少一种蛋白质，多肽或肽。进一步的实施方案中，蛋白质组合物包括一种生物相容的蛋白质，多肽或肽。此处所用的术语“生物相容的”指以这里描述的方式和剂量施用或用药到给定的生物体时，不产生明显的不适反应。生物体包括，但不限于，这样的不适或不利反应例如显著毒性或不利的免疫反应。在优选的实施方案中，含有生物相容的蛋白质，多肽或肽的组合物通常是哺乳动物蛋白或肽或合成的蛋白或肽，它们基本上不含毒素，

病原体或有害免疫原。

蛋白质组合物也可由任何本领域公知的技术制备，包括通过标准分子生物学技术表达蛋白质，多肽或肽，从天然原料中分离蛋白质化合物，或化学合成蛋白质物质。不同基因的核苷酸和蛋白质，多肽和肽序列已经公开了，并可由本领域普通技术人员从计算机数据库获得。其中一个数据库是美国国家生物技术信息中心 Genbank 和 GenPept 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。可以用本发明公开的技术或本领域公知的技术对这些已知基因的编码区域进行扩增和/或表达。

在某些实施方案中，蛋白质组合物可以为纯化的。通常“纯化的”指经分级分离除去不同的其它蛋白质，多肽，或肽的某一特定蛋白质，多肽，或肽组合物，并且该组合物基本仍保持其活性，并可测定，如通过本领域普通技术人员公知的，针对特殊的或目的蛋白质，多肽或肽的蛋白质测定。

事实上可以使用含有任何蛋白质，多肽或肽的成分用于本发明的组合物和方法。然而，蛋白质物质优选为生物相容性的。在某些实施方案中，考虑形成更粘的组合物有利于组合物更加精确或更易施用于组织，并在整个过程中保持接触组织。在这种情况下，考虑使用肽组合物，或更优选地，使用多肽或蛋白质组合物。粘度范围包括，但不限于，大约 40 至 100 泊。在某些方面，优选粘度为 80 至 100 泊。

B. 肽的选择，合成和使用

根据与现有文献中描述的已知 T 细胞表位相关的两亲性结构和信息，选择与 HPV 16 的 E6 和 E7 癌蛋白相应的肽序列。

本发明的肽可以按照常规方法在溶液中或固体支持物上合成。各种自动合成器可以通过商业获得并按照已知的步骤使用。通常，长度小于 100 个残基的小的合成的肽序列通常通过逐步的固相合成法制备。这种固相合成法利用不溶性树脂支撑低聚物的生长。预定包含目的聚合物的亚基序列在支持物上依次共同反应。在起始反应中末端氨基酸直接或通过连接剂连结在固体支持物上。该末端残基依次与一系

列进一步的残基如氨基酸类或阻断的氨基酸部分反应，以得到通过该末端残基附着在固相物上的生长的寡聚体。在合成方案的每一步，未反应的反应物被洗掉或从与固相接触中除去。这一循环以预选残基序列一直持续直到所需聚合物完全形成，但仍保持与固相接触。然后从固相支持物上切割该聚合物并纯化有待使用。上述的常规合成方案是由 R. B. Merrifield 发明并用于制备某些肽 (Merrifield, 1986)。这些肽可以在改良的 Vega 250 自动肽合成器中合成 (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) 或利用 Houghten 提及的“口袋法”(“bag method”) 合成 (Houghten, 1985)。也可参见，如 Stewart 和 Young, (1984); Tam 等, (1983); 和 Barany 和 Merrifield (1979)，这些都在此处引入作为参考。

符合所述所选区域的短肽序列，或重叠肽的文库，通常由 6 至 35 到 50 个氨基酸组成，能容易地合成，并且然后通过设计用来鉴定反应肽的筛选方法进行筛选。本发明包括 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 中至少含有 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或多达约 100 个连续的氨基酸残基的肽。

本发明使用的组合物可包括一种经修饰能增强其活性或使其具有生物防护性的肽。如美国专利 5,028,592 (引入本申请作为参考) 中公开的，生物防护性肽与非防护性肽相比在给病人施用时具有某些优点，防护性肽通常显示出增强的药理学活性。

用于本发明的组合物也可包含包括有所有 L- 氨基酸，所有 D- 氨基酸，或其混合物的肽。使用 D- 氨基酸可以对天然存在于人体的蛋

白酶具有额外的抗性并且具有较少的免疫原性，因此预期能具有较长的生物半衰期。

III. 蛋白质纯化

来自 HPV 的肽和蛋白质可以通过多种方法纯化。通常，“纯化”是指经分级除去各种其它的蛋白质，多肽或肽的特定的蛋白质，多肽或肽组合物，该组合物基本仍保持其活性，可通过如下文所述的蛋白质测定，或通过本领域普通技术人员公知的方法评估目的蛋白质，多肽或肽。

蛋白质纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术在一个水平上包括，粗分级细胞成分与多肽和非多肽部分。从其它蛋白中分离出多肽后，可利用层析和电泳技术对目的多肽进一步纯化，达到部分或完全纯化(纯化至均质)。尤其适合制备纯肽的分析方法是离子交换层析，排阻层析；聚丙稀酰胺凝胶电泳；等电聚焦电泳。尤其有效的纯化肽的方法是快速蛋白液相层析甚至是 HPLC。

本发明的某方面涉及纯化，在特定的实施方案中，实质上涉及纯化编码的蛋白质和肽，尤其来自 E6 或 E7 癌蛋白的肽。本发明使用的术语“纯化的蛋白质或肽”是指一种可从其它组分分离的成分，其中蛋白质或肽纯化到相对于其天然状态的任何程度。因此纯化的蛋白质或肽也指离开其天然环境的蛋白质或肽。

通常，“纯化的”指经分级分离去除各种其它成分的蛋白质或肽组合物，这些组合物实质上仍保持其表达的生物活性。而术语“基本纯化的”的使用，指蛋白质或肽形成该组合物的主要成分，如占该组合物的蛋白质的约 50%，约 60%，约 70%，约 80%，约 90%，约 95% 或更多。

根据本发明公开的内容，本领域技术人员将了解定量蛋白质或肽的纯度的不同方法。这些方法包括，如确定一个活性级分的特定活性，或通过 SDS/PAGE 分析评估一个级分中的多肽数量。评估一个级分纯度的优选方法是算出这个级分的特定活性，将其与初提取物中的特定活性相比较，从而算出纯度，此处通过“纯化倍数”(-fold purification

number) 估值。当然用来体现活性值的真实单位有赖于纯化之后选择的特定分析技术，以及表达的蛋白质或肽是否显示可检测的活性。

各种适用于蛋白质纯化的技术是本领域技术人员公知的。这些技术包括，如，用硫酸铵，PEG，抗体等沉淀，或通过加热变性，然后离心；层析步骤如离子交换，凝胶过滤，反相，羟磷灰石，和亲水层析；等电聚焦；凝胶电泳；以及这些技术和其他技术的结合。正如本领域所公知的，可改变实施各纯化步骤的顺序，或可省略某些步骤，仍能得到基本纯化的蛋白质或肽的合适方法。

通常不需要总是提供最纯净状态的蛋白质或肽。事实上，在某些实施方案中，基本不纯的产物也具有可利用性。部分纯化可以联合使用较少的纯化步骤，或使用相同常规纯化方案的不同形式来完成。如，利用 HPLC 装置进行阳离子交换柱层析分离相比利用低压层析系统的同样技术通常会导致更高级别的纯化。显示相对较低纯化程度的方法对于蛋白产物的总回收或保持所表达的蛋白的活性是有利的。

已知多肽的迁移随着 SDS/PAGE 的不同情况而变，有时会很明显 (Capaldi 等, 1977)。因此在不同的电泳条件下，须知纯化的或部分纯化的表达产物所表现的分子重量会不同。

高效液相层析 (HPLC) 表征为具有非凡的峰分辨率的非常快速的分离。这是通过使用非常精细的微粒和高压来保持足够的流速达到的。分离可以在大约几分钟或至一小时内完成。此外，只需要很少量的样品，因为微粒非常小且填充密实，柱床体积中只有很小的部分是空隙体积。而且样品的浓度也不需要很高，因为谱带很窄，样品仅有很小的扩散。

凝胶层析或分子筛层析是基于分子大小的一种特殊类型的分离层析方法。凝胶层析法分离技术所依据的理论是，所述柱由含有小孔的惰性物质微粒制成，当溶液通过或路过孔隙时，柱根据分子大小将大分子物质从小分子物质中分离出来。只要微粒制成的物质不吸收分子，决定流速的唯一因素就是分子大小。因此，只要性状相对不变，分子按照减小的大小顺序从柱中洗脱。对于分离不同大小的分子，凝胶层

析是最好的，因为该分离不依赖其它所有因素，如 PH，离子强度，温度等。并且该方法不存在吸收，较少有区带扩散，洗脱体积与分子量简单相关。

亲和层析是一种依赖于被分离物质与它能特定结合的分子之间的特定亲和力的层析操作。这是一种受体 - 配体型相互作用。柱材料通过将其中的结合伙伴之一共价结合到不溶基质上而合成。然后柱材料能特定吸附溶液中的物质。通过将条件改为不发生结合的情况而发生洗脱（如改变 PH，离子强度和温度）。

用于纯化含糖化合物的特殊型亲和层析是凝集素亲和层析。凝集素是能结合各种多糖和糖蛋白的一类物质。凝集素通常通过溴化氰连结到琼脂糖上。“偶联葡聚糖的伴刀豆球蛋白 A”是第一种应用并已广泛应用于分离多糖和糖蛋白的这类物质，其它凝集素包括扁豆凝集素，用于纯化 N-乙酰葡糖胺残基小麦胚芽凝集素和盖罩大蜗牛 (*Helix pomatia*) 凝集素。凝集素自身用带有糖配体的亲和层析方法纯化。乳糖已用于从蓖麻子和花生中纯化凝集素；麦芽糖用于从扁豆和刀豆中提取凝集素；N-乙酰-D 半乳糖胺用于从大豆中纯化凝集素；N-乙酰葡糖胺从小麦胚芽中结合凝集素；D-半乳糖胺用于从蛤和 L-岩藻糖从莲中结合凝集素。

基质应是一种自身不以任何明显度吸收分子并具宽范围的化学，物理和热稳定性的物质。配体应以不影响其结合性的方式被偶联。配体也应提供相对紧密的结合。洗脱该物质时应尽可能不损伤样品或配体。最常见的亲和层析之一是免疫亲和层析。适合用于本发明的抗体的生产在下文中论述。

IV. 核酸

A. 筛选 DNA

在本发明中，核酸筛选不仅用于筛选受感染的样品，而且用于发现疾病复发的可能性。依赖核酸杂交的筛选方式使得可能从任何生物体中分离任何基因序列，只要有适合的探针。与一部分编码目的蛋白质的序列相应的寡核苷酸探针可以用化学法合成。这需要知道短的寡

肽的氨基酸序列。编码蛋白质的 DNA 序列能从遗传密码中推出，然而必须考虑该密码的简并性。当序列简并时有可能进行混合加成反应。包括变性双链 DNA 的异质性混合。对于这种筛选，杂交作用最好在单链 DNA 或变性的双链 DNA 上进行。杂交是在检测 cDNA 克隆中尤为有用，其中 cDNA 克隆源于存在有极少量与目的多肽有关的 mRNA 序列的来源。换句话说，通过利用避免非特异结合的严紧杂交条件，有可能使得，如允许通过将靶 DNA 杂交混合物中与它完全互补的单个探针而自显影特定 cDNA (Wallace 等, 1981)。使用 13 到 100 个核酸的探针或引物，尤其是长度介于 17 至 100 个核酸的，或在本发明的一些方面，多达 1 至 2 千个碱基对或更长的探针或引物，可以形成既稳定又有选择性的双链分子。通常优选具有连续长度多于 20 个碱基的互补序列的分子，以增强所得杂交分子的稳定性和/或选择性。通常优选设计用于杂交的核苷酸分子具有一个或多个含 20 至 30 个核苷酸或所需更长的互补序列。这样的片段容易制备，如通过化学方法直接合成或通过将选择性序列引入重组载体重组成得。

因此，本发明的核酸序列根据其能力可用于选择性形成具有 DNA 和/或 RNA 的互补序列的双链分子，或为从样品中扩增 DNA 或 RNA 而提供引物。根据使用需要，希望使用各种杂交条件获得探针和引物对靶序列的不同等级的选择性。

对于需要高选择性的应用，典型地希望使用相对高度严紧的条件形成杂交物。例如，相对低盐和/或高温条件，如提供 0.02M 至约 0.10M 的 NaCl 浓度和约 50°C 至约 70°C 的温度。这种高度严紧的条件几乎不允许（如果存在的话）探针或引物与模板或靶链之间的错配，特别适合分离特定基因或检测特定 mRNA 转录。通过附加增加量的甲酰胺，可以致使条件更加严紧。

对于某些应用，如定点诱变，须知优选使用较低严紧性的条件。在这种情况下，虽然杂交链的序列并没有完全互补，也会发生杂交，只是在一个或多个位置错配。通过增加盐浓度和/或降低温度，条件会变得不严紧。如，中等严紧程度的条件是 0.1 至 0.25M 的 NaCl 浓度在

约 37°C 至约 55°C，而低严紧度条件可以提供约 0.15M 至约 0.9M 的盐浓度，和约 20°C 至 55°C 范围的温度。杂交条件可依据需要的结果方便的控制。

在其它实施方案中，杂交可以在下述条件下进行，如 50 mM Tris-HCl (pH 8.3)，75 mM KC1，3 mM MgCl₂，1.0 mM 二硫苏糖醇，温度在约 20°C 至约 37°C 之间。其它使用的杂交条件包括约 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)，50 mM KC1，1.5 mM MgCl₂，温度范围在约 40°C 至约 72°C 之间。

在某些实施方案中，使用本发明确定的核酸序列结合适当的方法（如标记物）确定杂交是有利的。各种适当的指示剂为本领域公知，包括发荧光的，放射性的，酶的或其它配体的，如亲和素/生物素，这些试剂能用于检测。在优选的实施方案中，宜使用荧光标记物或酶标记，如尿素酶，碱性磷酸酶或过氧化物酶，而不使用放射性的或其它对环境不利的试剂。在使用酶试剂的例子中，已知比色指示物能够提供可看得见的或可分光光度检测的检测试剂，从而检测同含互补核酸的样品的特定杂交。

通常，考虑这里描述的探针或引物在杂交溶液中作为试剂使用，如在 PCR™ 中，用于检测相应基因的表达，也用于利用固相的实施方案。在涉及固相的实施方案中，测试的 DNA (或 RNA) 被吸收或粘贴到所选择的基质或表面上。该固定的单链核酸然后在所需条件下与所选的探针进行杂交。这种条件的选择取决于特定的环境（如取决于 G+C 的含量，靶核酸的类型，核酸的来源，杂交探针的大小等）。根据具体目的应用来优化杂交条件是本领域技术人员是公知的。洗脱杂交分子去除非特异性结合的探针分子后，检测杂交，和/或通过确定结合标记的数量来定量。典型的固相杂交方法已经公开于美国专利 5,843,663、5,900,481 和 5,919,626 中。其它可在本发明实践中使用的杂交方法公开于美国专利 5,849,481、5,849,486 和 5,851,772 中。说明书这部分确定的这些或其它相关参考部分在此引入作为参考。

B. 合成 DNA

当目的多肽产物的氨基酸残基全序列已知时，合成 DNA 序列是经常选择的方法。当目的多肽产物的氨基酸残基全序列未知时，不可能直接合成 DNA 序，选择的方法是合成 cDNA 序列。分离目的 cDNA 序列的标准程序是形成由质粒或噬菌体携带的 cDNA 文库，该文库获自富合于供体细胞的 mRNA 的逆转录，该供体细胞具有高水平的基因表达。若使用聚合酶链反应技术合成时，即使稀有的表达产物也能被克隆。在多肽氨基酸序列的主要部分已知的情况下，可以使用同靶 cDNA 中推定存在的序列的相同的已标记的单链或双链 DNA 或 RNA 探针序列的进行 DNA/DNA 杂交，这种杂交对已变性为单链形式的 cDNA 的克隆的拷贝进行。

1. 生物芯片

在各种支持物上分离生物分子阵列（称为生物芯片）的方法已经发展并已用于 DNA 合成，测序，突变研究，基因表达分析和基因发现中。生物芯片可在本发明中使用，因为它能使我们鉴定出病理状态的标记，在此是 HPV 感染，其可能具有后续诊断学价值。

生物芯片的使用涉及将标记的分子或分子集合杂交在生物芯片上固定的靶。标记的分子通常是细胞或组织的 mRNA 的 cDNA 拷贝。在这种情况下，每种不同类型的 cDNA 的拷贝数反映了在最初分离物中相应 mRNA 种类的拷贝数。通常，杂交到在生物芯片固定的靶上的强度与 cDNA 浓度成比例，因而杂交密度的测量能够推算出最初分离物中 mRNA 的相对数量。不同 mRNA 分离物中相同 mRNA 的相对数量能通过比较两个样品之间的对该相同靶点的杂交密度来确定。这些测量方法可用于鉴别能具有后续诊断价值的特定细胞类型或病理状态。或者，在给定的疾病中，特定 mRNA 的突然增加可能表明药物攻击的可能目标，这样提供了新的治疗目标。

C. 核酸扩增反应

核酸分子可通过使用多种技术检测，包括扩增反应。本发明包括使用这种扩增反应来检测细胞介导的免疫应答或鉴别感染 HPV 和/或有癌前期的或癌的生长的患者的。如，细胞介导的免疫应答能通过本发明公开的 TH1 或 TH2 细胞因子的 RT-PCR 检测。

1. 聚合酶链反应 (PCRTM)

根据标准操作方法 (Sambrook, 1989)，用作扩增模板的核酸从生物样品包含的细胞中分离。核酸可以是基因组 DNA 或部分或整体的细胞 RNA。当使用 RNA 时，需要将 RNA 转变为 cDNA。

在允许选择性杂交的条件下，选择性杂交相应于 K_{ATP} 通道蛋白质或其实变体的核酸的引物对与分离的核酸相接触。此处定义的术语“引物”包括在依赖模板的过程中能够引发新生核酸合成的任何核酸。一般，引物是长度为 10 至 20 个碱基对的寡核苷酸，但也可使用更长的序列。引物可以单链或双链形式供给，但优选单链形式。

一旦杂交，核酸：引物复合物就接触一个或多个促进依赖模板的核酸合成的酶。多轮扩增，也称为“循环”被实施直到产生足够数量的扩增产物。

下一步，检测扩增产物。在某些应用中，检测可通过可视的方法进行。或者，检测可涉及通过化学发光法，引入放射性标记物的放射性闪烁法或荧光标记法或甚至通过电或热脉冲信号的方法 (Affymax 工艺) 间接识别产物。

许多依赖于模板的方法可以用来扩增存在于给定模板样品中的标记序列。最著名的扩增方法是聚合酶链反应 (称为 PCRTM)，该方法已在美国专利 4,683,195、4,683,202 和 4,800,159 中详细描述了，此处都完全引入作为参考。

简要地，在 PCRTM 中，制得互补于标记序列的相反互补链区域的两条引物序列。过量的脱氧核苷三磷酸与 DNA 聚合酶 (如 Tap 聚合酶) 加入到反应混合物中。如果标记序列存在于样品中，引物将结合标记物，且聚合酶将通过增加核苷酸使引物沿着标记序列延长。通过提高

和降低反应混合物的温度，延伸的引物会从标记物中分离出来形成反应物，过量的引物将结合标记物以及反应物，并且重复该过程。

为了量化 mRNA 扩增数量或从目的 mRNA 制备 cDNA，可以采用反转录酶 PCRTM (RT-PCRTM) 扩增过程。反转录 RNA 为 cDNA 的方法是公知的并描述于 Sambrook 等, 1989。可选择的反转录方法利用耐热的，依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶。这些方法描述在 1990 年 12 月 21 日提交的 WO90/07641 中，此处引入作为参考。聚合酶链反应是本领域公知的方法。

2. 其它核酸扩增反应

另一个扩增方法是连接酶链反应 ("LCR")，公开于 EPA No. 320 308，此处全部引入作为参考。在 LCR 中，制备两个互补探针对，在靶序列存在下，各对将结合靶序列相反的互补链使得它们相邻。在连接酶存在下，两个探针对将连成单个序列。通过温度循环（如同在 PCR 中），结合的连接序列从靶上分离，然后作为“靶序列”连接过量的探针对。美国专利 4,883,750 描述了类似于 LCR 的方法以结合探针对到靶序列上。

Qbeta 复制酶也可用作本发明的另一种扩增方法，该方法描述于 PCT 申请 PCT/US87/00880 中，此处全文引入作为参考。该方法中在 RNA 聚合酶存在时，将具有互补于靶的区域的 RNA 的复制序列加入到样品中。聚合酶将拷贝该复制序列，其然后被检测出。

本发明还可使用了等温扩增方法扩增核酸，该方法使用限制性内切核酸酶和连接酶完成靶分子的扩增，所述靶分子在酶切位点的一条链上包含核苷酸 5'-[α-硫代]-三磷酸。

链置换扩增 (SDA) 是进行核酸等温扩增的另一方法，包括链置换和合成的多次循环，即切口平移。类似的方法，称为修复链反应 (RCR)，包括在扩增的靶区域中退火若干探针，然后在仅有四种碱基中的两种碱基存在时发生修复反应。另外两种碱基可作为生物素化的衍生物被加入以便于检测。类似的方法也应用于 SDA 中。靶特异性的序列也可

用循环探针反应(CPR)检测。在CPR中，具有非特定DNA的3'和5'序列和特定RNA的中间序列的探针与样品中存在的DNA杂交。杂交后，就用RNase H处理反应，且探针的产物鉴定为消化后释放的不同产物。原始模板退火到另一个循环探针上，并重复反应。

还有另外的扩增方法可用于本发明，这些方法公开于英国申请202 328和PCT申请PCT/US89/01025中，它们都全部引入本文作为参考。开始使用时，“修饰的”引物用于PCRTM类的，依赖模板和酶的合成。引物可通过标记捕获部分(如生物素)和/或检测部分(如酶)来修饰。随后的使用中，过量的标记探针加入样品中。靶序列存在下，探针结合并被催化切割。切割后，靶序列完整释放以结合过量的探针。标记探针的切割显示了靶序列的存在。

其它的核酸扩增方法包括基于转录的扩增系统(TAS)，包括基于核酸序列的扩增(NASBA)和3SR Gingeras等人，PCT申请WO 88/10315，在此引入作为参考。在NASBA中，制备用于扩增的核酸可通过标准苯酚/氯仿提取，临床样品热变性，用裂解缓冲液处理和小自旋柱分离DNA和RNA或氯化胍提取RNA。这些扩增技术涉及将具有靶特定序列的引物退火。聚合之后，DNA/RNA杂交体被RNase H消化，而双链DNA分子再次加热退火。在任一条件下，单链DNA通过添加第二靶特定引物完全双链化，之后进行聚合。然后双链DNA分子通过RNA聚合酶如T7或SP6多重转录。在等温循环反应中，RNA反转录为单链DNA，然后该DNA转变成双链DNA，于是再次用RNA聚合酶如T7或T6转录。不论合成产物是截短的或完整的，都能指示靶特定序列。

Davey等(EPA No. 329 822，此处全文引入作为参考)公开了一种核酸扩增方法，其包括循环合成单链RNA("ssRNA")，ssDNA，和双链DNA(dsDNA)，该方法可用于本发明。ssRNA是第一引物寡核苷酸的模板，它通过反转录酶延长(依赖RNA的DNA聚合酶)。然后通过核糖核酸酶H(RNase H，一种特异于与DNA或RNA配对中的RNA的核糖核酸酶)的作用将RNA从所得DNA:RNA双链体中去除。得到的ssDNA是第二引物的模板，也包括在其与模板的同源序列5'端的RNA聚合

酶启动子（以 T7 RNA 聚合酶为例）的序列。该引物然后通过 DNA 聚合酶延长（以 E. coli DNA 聚合酶 I 的大“Klenow”片断为例），得到的双链 DNA (“dsDNA”) 分子具有和最初引物之间的 RNA 相同的序列，此外在一端含有启动子序列。通过适当的 RNA 聚合酶，该引物序列可用于制备该 DNA 的许多 RNA 拷贝。这些拷贝然后再进入循环中导致非常迅速的扩增。用适当选择的酶，这一扩增能在等温条件下进行而不需在每个循环中添加酶。因为这一过程的循环本质，起始序列可选择为 DNA 或 RNA 形式之任一。

Miller 等 (PCT 申请 WO 89/06700, 此处完全引入作为参考) 公开了一种核酸序列扩增方案，该方案基于杂交启动子/引物序列到靶单链 DNA (“ssDNA”), 然后转录该序列的许多 RNA 拷贝。该方案不循环，即不从合成的 RNA 转录物产生新模板。其它扩增方法包括“RACE”和“单侧 PCR”(Frohman, 1990, 引入作为参考)。

基于两个（或多个）寡核苷酸连接的方法也可以用于本发明的扩增步骤中，该方法在含有得到的“双-寡核苷酸”序列的核酸存在的情况下扩增双-寡核苷酸。

D 核酸检测

经过任何扩增后，需要从模板和/或过量的引物中分离扩增产物。核苷酸的检测可用于鉴别细胞介导的免疫应答，和感染 HPV 和/或有癌前期的或癌的生长的患者。

在一个实施方案中，扩增产物通过琼脂糖，琼脂糖丙稀酰胺或聚丙稀酰胺凝胶电泳用标准方法分离 (Sambrook 等, 1989)。可从凝胶中切下并洗脱来分离的扩增产物。用低熔点琼脂糖凝胶，分离带可通过加热凝胶取出，然后提取该核酸。

核酸分离也可利用本领域公知的层析分离技术。本发明的实例中可使用许多种层析技术，包括吸附层析，分配层析，离子交换层析，羟磷灰石层析，分子筛层析，反相层析，柱层析，纸层析，薄层层析，气相层析和 HPLC。

在某些实施方案中，可显现扩增产物。典型的显现方法包括用溴化乙锭染色凝胶和在紫外光下的显现条带。或者，如果用放射性标记或荧光标记的核苷酸整体标记扩增产物，分离的扩增产物可以暴光 x-射线胶片或在合适的激发光谱下显影。

在一个实施方案中，扩增产物分离之后，标记的核酸引物与扩增的标记序列接触。该引物最好缀合发色团，但也可放射性标记。在另一个实施方案中，引物与结合伙伴缀合，如抗体或生物素，或其它带有可检测部分的结合伙伴。

在特定的实施方案中，通过 DNA 印迹用标记引物杂交进行检测。涉及 DNA 印迹杂交的技术是本领域技术人员公知的(参见 Sambrook 等, 1989)。上述实例在美国专利 5,279,721 中已描述，其中公开了自动电泳和核酸转移的仪器和方法，此处引入作为参考。允许电泳和印迹且不需要额外操作凝胶的仪器对于适合实施本发明方法是理想的。

HPV 感染也能通过催化放大 DNA 原位杂交比色信号而检测 (CSAC-ISH) (GenPoint system, DAKO) (Birner 等, 2001)。

其它用于实践本发明核酸检测的方法公开于美国专利 5,840,873、5,843,640、5,843,651、5,846,708、5,846,717、5,846,726、5,846,729、5,849,487、5,853,990、5,853,992、5,853,993、5,856,092、5,861,244、5,863,732、5,863,753、5,866,331、5,905,024、5,910,407、5,912,124、5,912,145、5,919,630、5,925,517、5,928,862、5,928,869、5,929,227、5,932,413 和 5,935,791 中，均引入此处作为参考。

V. 细胞介导的免疫 (CMI)

本发明要求保护的一些方法通过将 T 细胞应答用作复发诊断指示或作为防止 CIN 发展的预防治疗方法而利用 T 细胞应答。更具体地，这些方法测定针对 HPV 16 的 E6 和 E7 癌蛋白合成肽的 CMI 应答。HPV 16 的 E6 和 E7 基因常常共同表达，且它们在 HPV 16 阳性的宫颈癌活组织的病毒转录产物中最为丰富 (Wettstein, 1990; Seedorf 等，

1987)。充分的证据表明, E6 和 E7 可读框的共同表达对于各种哺乳动物细胞的恶性转化是必要且充分的 (Munger 等, 1989)。而且, 病毒基因组的 E6 和 E7 区域的连续表达似乎保持恶性表型所必须的 (von Knebel Doeberitz 等, 1988)。

大多数有免疫能力的哺乳动物的病毒感染导致针对感染该病毒的细胞的细胞介导的免疫应答, 并且最终效应为细胞溶解。病毒感染期间, 为了包进新的病毒粒子, 病毒蛋白在细胞中合成。一些这样的内源性病毒蛋白也降解并传送到 I 型抗原呈递途径, 在这里结合与 MHC I 类分子相结合的外来抗原。该肽-MHC 复合物然后传送到呈现外来抗原的细胞表面, 经由自身 MHC, 达到细胞毒性 T 细胞 (CTL)。

CTL 是特定抗原效应物细胞。淋巴细胞表面标记物的研究可用于分析这种 T 细胞表面标记物的存在, 用本领域普通技术人员公知的各种方法, 包括使用免疫荧光法和流式细胞仪。一旦识别出外来抗原, CTL 就溶解靶细胞, 破坏其完整性, 通过诱导细胞凋亡的分子相互作用或通过分泌在质膜上产生洞的形成微孔的酶。这样, CTL 介导的免疫应答对于清除感染病毒的细胞起了关键的作用。

CTL 效应物细胞溶解病毒感染的靶细胞的能力通过基因和抗原的限制来调节。靶细胞必须携带与最初诱导 CTL 的病毒相同或等同的病毒抗原。靶细胞和诱导的 CTL 也必须带有相同的 I 型 MHC 分子。

A. 外周血单核细胞 (PBMC)

增殖反应从 PBMC 获得。有少数方法可以分离 PBMC。

单核细胞在含 20% 胎牛血清 (FCS) 的 RPMI 1640 中, 通过附着于有或无胶原涂层的玻璃或聚乙烯组织培养容器上从非莲座细胞中分离出来, 通过鲎变形溶解分析确定其不含内毒素; 或者, 自体血清, 或 10% AB+ 的正常供体血清作为血清源。不附着的细胞轻洗除去。利用这种方法, 附着细胞通常有>90% 的单体细胞。如果组织分析暗示有 T 细胞, B 细胞, 或 NK 细胞的明显污染, 这些污染细胞用抗体混合物除去, 包括抗-leu 5b, 抗-leu 12 和抗-leul 1b 和幼兔补体 (Rosser

等, 1985)。

在 Teflon 涂层容器中在 37°C 潮湿的含 5% CO₂ 的空气中附着 1 小时或更长时间后, 释放单核细胞进行悬浮培养 (Crowe 等, 1987)。对细胞铺于胶原涂层表面的情况, 1 mg/ml 的 I 型胶原酶加入到培养基中。通过在含有 5% FCS 和 EDTA 的, 不含钙和镁的 Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液中培养 15 分钟或更长时间来释放细胞。用 EDTA 培养在冰上进行。使用一次性细胞刮刀帮助去除细胞。刮下的细胞在不含钙和镁的 Dulbecco 的 PBS 中清洗两次, 并在 Teflon 培养罐中培养于 RPMI 1640 和 10% 的 AB+人血清, 如 Crowe 等所述 (1987)。

分离外周血单核细胞的第二策略是根据 Hester 和 Walker (1981) 的 Percoll 密度梯度法, 以增加非莲座细胞群中单核细胞的浓度。富含单核细胞的群体, 如需要用上文所述的抗体混合物和补体处理, 以尽可能去除污染的 T 细胞, B 细胞和 NK 细胞残余物。通过这种方法回收的单核细胞直接培养在 Teflon 涂层的容器中, 不存在单核细胞开始表面附着时必须出现的“活化作用”。然而, Percoll 密度梯度步骤和/或暴露于抗体和补体也可“活化”这些细胞, 可能以不同的方式进行。

分离外周血单核细胞的第三策略是利用单核细胞的折射性质, 用流式细胞仪的高速细胞分类功能以前向角光散射为基础将其分类。它具有生产高纯度细胞的潜力, 而不会因与抗体或补体接触受影响。

B. T 细胞应答

T 细胞应答可以通过本领域普通技术人员公知的各种方法检测。一些分析方法将在下文中详细描述。

1. ³[H]胸腺嘧啶核昔掺入分析

来自不同样品的 PBMC 的增殖反应可按照公开文献中标准的 ³[H] 胸腺嘧啶掺入分析确定 (Nehete, 1996; Nehete, 1995)。T 细胞对个别 E6 和 E7 肽的增殖反应的显著性 (根据刺激指数 [SI]) 可以暴露于肽的细胞超过没有肽加入的对照组细胞的 ³[H] 胸腺嘧啶核昔掺入的增加倍

数来计算。当 SI 值至少为 2.0，包括至少 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0 或更多时，认为是阳性反应。通常，SI 值的计算通过测量培养基中用肽温育的细胞的放射性 (cpm) 数量，除以无肽温育 (仅培养基) 的细胞的放射性数量 (只有培养基) 得到。

2. 利用⁵¹ [Cr] 溶解

细胞介导淋巴溶解 (CML) 可以用来指示 T 细胞反应。靶细胞在暴露于效应物细胞之前，可以用放射性铬-51 (⁵¹ [Cr]) 标记。释放到培养基中的⁵¹ [Cr] 的数量与细胞介导的溶解水平成比例。

3. γ - 干扰素的产生

伽马干扰素 (γ -干扰素) 也称为 II 型免疫干扰素，由 T 细胞和 NK 细胞产生。它对于辅助性 T 细胞发展是关键的。因为是最初的巨噬细胞激活因子，其在细胞介导的免疫中是的强大细胞因子。 γ -干扰素增加了 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的表达水平，这两种分子能提高抗原呈递和其它识别反应。而且它能放大 TNF- α 的效应并能增加血管内皮细胞表面粘附分子的表达水平，这些分子使得 T 细胞粘附并外渗。

4. 四聚物分析

四聚物分析方法对于本领域技术人员是公知的。参见 Altman, 1996.

5. 细胞因子的产生

细胞因子是在免疫应答和不同细胞型分化途径中起重要作用的蛋白质。它们对 T 细胞调节和发育起关键作用，并且包括 γ -干扰素，白介素 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, 淋巴毒素, MIF, TGF- β , TNF- α 和其它趋化细胞因子。TH1 细胞因子包括 IL-2, 干扰素 (IFN) γ , 肿瘤坏死因子 (TNF) α , 或 TNF- β , IL-3, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, 或 IL-18。TH2 细胞因子包括 IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13, IL-14 或 IL-18。细胞因子的分析是本领域公知的，其中的一些在本发明中公开。

6. 细胞因子分析

对 TH1 和 TH2 细胞因子可以通过 ELISA, 放射性免疫分析 (RIA) 或流式细胞仪 (FACS) 检测。各种有用的免疫检测方法的步骤已在科学文献中有描述, 如 Doolittle 和 Ben-Zeev, 1999; Gulbis 和 Galand, 1993; 以及 De Jager 等, 1993, 此处都引入作为参考。

7. 免疫分析

在更具体的实施方案中, 本发明涉及结合, 纯化, 去除, 量化和/或其它一般检测生物组分蛋白质, 多肽或肽的免疫检测方法。在一些实施方案中, 免疫测定用于检测针对 HPV 肽的细胞介导的免疫应答。一些提到的免疫检测方法包括酶联免疫吸附测定 (ELISA), 放射性免疫测定 (RIA), 免疫放射测定, 荧光免疫测定, 化学发光测定, 生物发光测定, 和蛋白质印迹。各种有用的免疫检测方法的步骤已公开于科学文献如 Doolittle MH 和 Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B 和 Galand P, 1993; 和 De Jager R 等, 1993; 此处都引入作为参考。

通常, 免疫结合方法包括获得疑似含有蛋白质、多肽和/或肽的样品, 并在能有效形成免疫复合物的条件下 (视情况而定) 将根据本发明的样品与抗体接触。例如, 在本发明中, E6 或 E7 肽可用来激发细胞产生 T 细胞应答。抗体可以针对作为细胞介导的免疫应答结果产生的细胞因子, 或针对 T 细胞上的细胞因子受体。或者, 可采用抗 CD69 或 CD45, 或抗它们二者的抗体。

这些方法包括从细胞器, 细胞, 组织或生物体样品中纯化蛋白质, 多肽和/或肽。在这些例子中, 抗体从样品中去除蛋白质, 多肽和/或肽。抗体优选与固相支持物相连, 如柱状基质, 并且将疑似含有蛋白质, 多肽和/或肽抗原成分的样品施加到固定化的抗体上。不需要的成分将从柱上洗掉, 留下免疫复合于固定化的抗体上的抗原, 将被洗脱。

对于细胞因子应答的检测, 被测生物样品可以是疑似含有细胞因子的任何样品, 例如, 组织切片或标本, 均质的组织提取物, 细胞, 细胞器, 上述任何含抗原成分的分离和/或纯化形式, 或甚至是任何与细胞或组织接触的生物流体, 包括血液和/或血浆, 尽管如此, 优选组织

样品或提取物。

在有效条件下，经过足以允许形成免疫复合物(初级免疫复合物)的一段时间，将所选择的生物样品与抗体接触通常是简单地将抗体成分加入到样品中并培养混合物足够长的时间，使抗体与存在的任何抗原形成(即，结合为)免疫复合物。之后，通常冲洗样品-抗体复合物，如组织切片，ELISA板，斑点印迹或蛋白质印迹，以除去任何非特异性结合的抗体种类，而只允许留下与初级免疫复合物特异性结合的待测抗体。

通常，检测免疫复合物的形成是本领域公知的，并可通过许多方法实现。这些方法通常基于检测标记或标记物，如任何放射性的，荧光的，生物的和酶促的标记。美国专利，包括3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 和 4,366,241涉及这些标记的应用，它们均引入此处作为参考。当然，正如本领域所知的，通过利用第二结合配体可得到附加益处，如第二抗体和/或生物素/亲和素配体结合方案。

用于检测的抗原抗体可以本身连接有可检测的标记，然后我们仅需检测该标记，由此确定混合物中初级免疫复合物的量。或者，与初级免疫复合物结合的第一抗体可以通过对该抗体有结合亲和性第二结合配体检测。在这种情况下，第二结合配体可与可检测的标记结合。第二结合配体本身通常是一种抗体，它可称为“第二”抗体。在有效条件下，初级免疫复合物与标记的第二结合配体或抗体相接触足够长的时间以形成第二免疫复合物。然后第二免疫复合物通常洗掉任何非特异性结合的标记的第二抗体或配体，且然后在第二免疫复合物中检测出保留的标记物。

进一步的方法包括用两步法检测初级免疫复合物。用对抗体有结合亲和性的第二结合配体，如一种抗体，形成第二免疫复合物，如上文所述。漂洗过后，再次在有效条件下，第二免疫复合物与与对第二抗体有结合亲和性的第三结合配体或抗体接触足够的时间以第三级免疫复合物。该第三配体或抗体连接到可检测的标记物上，能检测到这样

形成第三级免疫复合物。如果需要，这一系统可提供信号放大作用。

由 Charles Cantor 设计的一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。第一步生物素化的单克隆或多克隆抗体，用于检测靶抗原，第二步，抗体然后用于检测与复合的生物素相连的生物素。在该方法中，要检测的样品首先在含有第一步的抗体的溶液中温育。如果靶抗原存在，一些抗体结合抗原形成生物素化的抗体/抗原复合物。然后通过在链霉抗生物素蛋白（或亲和素），生物素化的 DNA，和/或互补的生物素化的 DNA 的连续溶液中培养该抗体/抗原复合物将其放大，每一步在抗体/抗原复合物上增加生物素位点。重复放大步骤，直到获得适当的放大水平，在此将样品在含有抗生素的第二步抗体的溶液中培养。该第二步抗体被标记，如用酶，其可通过组织酶学用显色底物能检测抗体/抗原复合物存在。经过适当的放大，产生肉眼可见的缀合。

另一个已知的免疫检测方法利用了免疫-PCR（聚合酶链反应）方法。PCR 方法与 Cantor 方法类似，直到与生物素化的 DNA 培养的步骤，然而，该方法并没有使用多次循环的链霉抗生物素蛋白和生物素化的 DNA 培养，而是用释放抗体的低 PH 或高盐缓冲液清洗 DNA/生物素/链霉抗生物素蛋白/抗体复合物。用适当的引物和适当的对照对所得到的洗出液进行 PCR 反应。该方法提供了一种有用的鉴定感染 HPV 的妇女群体患有宫颈癌或 CIN 的方式。

另一种确定感染 HPV 的患者是否有癌前期的或癌的生长的方法是通过杂交捕获，如公开于 Birner 等，2001 和 Clavel 等，2000，二者均引入作为参考。

本发明的免疫检测方法对于疾病的诊断和预后具有明显的效用，疾病如特异性表达如癌症特异性基因产物等的各种疾病。这里使用疑似感染了能导致 CIN 的 HPV 的生物学的和/或临床样品。然而，这些实施方案也应用于非临床样品，如在抗原或抗体样品中效价的测定中，如对杂交瘤的选择中。

a. ELISA

如上所述，免疫检测，以其最简单和/或直接的含义，指结合测定。

某些优选的免疫检测是本领域公知的各种类型的酶联免疫吸附测定(ELISAs)和/或放射性免疫检测(RIA)。利用组织切片的免疫组织化学检测也非常有用。然而，容易理解，检测并没有局限于这些技术，和/或蛋白质印迹，斑点印迹，FACS检测等的技术也可以使用。

在一个典型的 ELISA 中，本发明中针对细胞介导的免疫应答产物的抗体(包括抗原)被固定化于所选择的显示蛋白质亲和性质的表面，如聚苯乙烯微量滴定板上的孔中。然后，向孔中加入疑似含有抗原的被测组分，如一份临床样品。结合和/或清洗以除去非特异性结合的免疫复合物后，可以检测出结合的抗原。检测是通过加入另一个连接于可检测标记上的抗体实现。这种 ELISA 是一种简单的“三明治 ELISA”，检测也可以通过加入第二抗体，然后加入对第二抗体有结合亲和力的第三抗体，第三抗体与可检测标记连接。

在另一个典型的 ELISA 中，疑似含有抗原的样品固定于孔表面和/或然后将其与抗体接触，该抗体通过抗细胞介导免疫应答的产物(包括抗原)产生。经过结合和/或清洗除去非特异性结合的免疫复合物后，检测出结合抗体。在最初的抗体结合于可检测标记的地方，可以直接检测到免疫复合物。同样，免疫复合物也可用与第一抗体具有结合亲和性的第二抗体检测，该第二抗体连接有可检测标记。

另一个其中抗原被固定的 ELISA 涉及在检测中利用抗体竞争。在这种 ELISA 中，标记的抗一种抗原的抗体被加入到孔中，使其结合，和/或通过其标记来检测。在用被包被的孔培养的过程中，通过将样品与标记的抗该抗原的抗体混合，可确定未知样品中的抗原数量。样品中抗原的存在产生减少了能够结合孔上的抗该抗原抗体数量的作用，从而减少了最终的信号。这种方法也适合检测未知样品中的抗某个抗原的抗体，其中未标记的抗体结合到抗原包被的孔上，并且也减少了能够结合标记的抗体的抗原数量。

不管利用何种形式，ELISA 具有某些共同的特征，如包被，温育和结合，清洗除去非特异性吸附物质种类，和检测结合的免疫复合物。这些将在下文中描述。

在用抗原或抗体包被一块板时，通常用抗原或抗体溶液温育板内的小孔，过夜或经过数小时。然后清洗板上的小孔以除去不完全吸附的物质。然后用非特异性蛋白“包被”小孔的任何残留的可利用的表面。这种非特异性蛋白对于试验的抗血清是抗原中性的，其包括牛血清蛋白（BSA），酪蛋白或奶粉溶液。这种包被能封闭固定化的表面的非特异性吸附位点，从而减少抗血清在表面的非特异性吸附所导致的背景。

在 ELISA 中，可能更常使用第二或第三级检测方法，胜于使用直接方法。这样，将蛋白质或抗体结合到小孔上之后，用非反应材料包被板以减少背景，清洗以除去未结合的材料，在允许免疫复合物（抗原/抗体）形成的有效条件下，将固定化的表面与待测生物样品接触。需要标记的第二结合配体或抗体来检测免疫复合物，并且第二结合配体或抗体与标记的第三抗体或第三结合配体连接。

“在允许免疫复合物（抗原/抗体）形成的有效条件下”意指该条件优选包括用溶液如 BSA，牛丙球蛋白（BGG）或磷酸缓冲盐（PBS）/Tween 稀释的抗原和/或抗体。这些加入的试剂也倾向于帮助减少非特异性背景。

“合适的”条件也指培养是在足以允许有效结合的一定温度或一段时间。典型的培养步骤是从约 1 至 2 至 4 小时左右，优选温度大约是 25°C 至 27°C，或如在约 4°C 过夜。

在 ELISA 的所有温育步骤之后，清洗接触表面以除去非复合物质。优选的清洗方法包括用溶液如 PBS/Tween，或硼酸盐缓冲液来清洗。在待测样品和原先的结合物质之间形成特异性的免疫复合物，并随之清洗后，即使微小数量的免疫复合物的存在也可以被检测到。

为提供一种检测方法，第二或第三抗体将与标记物结合用于检测。优选地，标记物是一种当与适当的发光物质培养时能显色的酶。从而，需要在适于进一步形成的免疫复合物显影的条件下（例如在含有 PBS 的溶液中，如 PBS-Tween 中，室温下培养 2 小时），第一或第二免疫复合物与尿素酶，葡萄糖氧化酶，碱性磷酸酶或过氧化物酶缀合的抗

体接触或培养一段时间。

与标记的抗体培养过后，并且接下来清洗去除未结合的物质，定量标记数量，如在酶标记的情况，通过与发光基质如尿素，或溴甲酚紫，或 2, 2'-连氨基-二-(3-乙基-苯噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)，或 H₂O₂ 培养。然后通过测量产生的颜色程度来定量，如，用可视光谱的分光光度计。

b. 免疫组织化学法

抗体也可用于与新鲜-冷冻的和/或福尔马林固定的，石蜡包埋的组织块结合，该组织块为免疫组织化学法(IHC)的研究而制备。从这些特殊标本制备组织块的方法已经成功地用于先前的各种预测因素的IHC研究，和/或为本领域技术人员公知 (Brown 等, 1990; Abbondanzo 等, 1990; Allred 等, 1990)。

简要地，冷冻切片可通过以下步骤制备，在室温下，于磷酸盐缓冲液(PBS)中，在小塑料胶囊中将50ng的冷冻的“粉碎”组织再水化；离心沉淀微粒；在粘性包埋介质(OCT)中将其再悬浮；翻转胶囊和/或再次离心沉淀；迅速冷冻于70°C的异戊烷中；切割塑料胶囊和/或取出冷冻柱状组织；将该柱状组织固定于低温恒温器切片机卡盘上；和/或切割25-50个连续切片。

永久切片可通过类似的方法制备，包括在一个塑料微夏普列斯超速离心管(microfuge tube)再水化50mg样品；沉淀；在10%的福尔马林中再悬浮4小时以固定；清洗/沉淀；在2.5%的暖琼脂中再悬浮；沉淀；在冰水中冷却以固化琼脂；从管中取出组织/琼脂块；将块浸润和/或包埋于石蜡中；和/或切割成50个连续的永久切片。

c. 荧光分类细胞谱

蛋白质也可以通过流式细胞仪检测，如在 Fujishima 等, 1996 中所述。在该方法的实例中，细胞被固定，然后与抗要检测的所表达蛋白的单克隆抗体温育。结合抗体然后与标记的抗体 IgG (举例来说) 接触以检测。典型的标记物是 FITC。然后用流式细胞仪检测荧光密度，如 Ortho Cytron, Ortho diagnostics, 或 FACScan; Becton

Dickinson.

FACS 可以最初分离细胞的亚群，根据细胞经过激光束时它们的光散射性质。前向光散射（FALS）与细胞大小相关，并且直角光散射与细胞浓度，细胞轮廓和核质比相关。由于细胞被荧光标记的抗体标记，因而它们能被进一步检测，通过荧光强度以及设置于 FACS 上收集明亮荧光和暗荧光的阳性和阴性窗口。细胞以大约 3000 个细胞每秒的流速被分类，并收集阳性细胞和阴性细胞。

d. 蛋白质印迹

本发明的组合物可用于免疫印迹和蛋白质印迹分析。肽可用来刺激细胞产生细胞因子。本发明的抗体可用作高亲和性初始试剂来检测蛋白质，该蛋白质固定于固相支持物上，如硝酸纤维素，尼龙或其联合。与免疫沉淀反应相结合，之后采用凝胶电泳，其可以作为单步试剂用于检测抗原，用于检测该抗原的第二试剂针对该抗原引起不利背景。当被研究的抗原是免疫球蛋白时，该方法尤其有用（排除使用结合细菌的细胞壁成分的免疫球蛋白），被研究抗原与检测试剂交叉反应，或者它们以作为交叉反应信号的相同的相对分子量迁移。

用于协同蛋白质印迹的基于免疫学的检测方法包括酶促的-，放射性标记-，或荧光标记抗蛋白质部分的第二抗体，在此认为有特殊作用。

VIII 免疫疗法

作为一种感染或癌症治疗的方法，免疫疗法基于携带抗原的肿瘤细胞刺激产生特异性的抗体和/或细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）的前提。

A. 免疫疗法的类型

如下文所述，癌症的免疫疗法可广义地分为继承型，被动和主动型。

1. 被动免疫

存在许多不同的被动免疫途径。它们可以广泛分为以下几类：仅注射抗体；注射偶联有毒素或化疗剂的抗体；注射偶联有放射性同位素的抗体；注射抗-个体基因型的抗体；以及最后，清除骨髓中的肿瘤细胞。

优先地，在被动免疫中应用人单克隆抗体，因为它们在患者体内产生很少或不产生副作用。然而，其应用在某种程度上因缺乏而受局限，并迄今为止仅在损害内施用人单克隆抗体。抗神经节苷脂抗原的人单克隆抗体已经被施用到患有皮肤性复发黑色素瘤的患者创伤内(Irie & Morton, 1986)。经过每天或每周对损害部位的注射，10位患者中，其中6位观察到消退。在另一个研究中，经向损害部位注射两种人单克隆抗体，取得了一定成功(Irie 等, 1989)。

优先施用直接抗两个不同抗原的一种以上的单克隆抗体或甚至带有多种抗原特异性的抗体。治疗方案也包括施用淋巴因子或其它免疫增强剂，如 Bajorin 等 (1988) 中所述。说明书的其它部分进一步详细描述人单克隆抗体的开发。

2. 主动免疫

在主动免疫中，抗原的肽，多肽或蛋白质，或自体或异源的肿瘤细胞组合物或“疫苗”，通常与独特的细菌辅助剂一起施用(Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindranath, 1996; Morton 等, 1992; Mitchell 等, 1990; Mitchell 等, 1993)。在黑色素瘤的免疫治疗中，引起高 IgM 反应的患者经常比不引起或引起低 IgM 抗体的患者活的更好(Morton 等, 1992)。IgM 抗体往往是短暂抗体，与常规例外的是抗神经节苷脂或抗糖的抗体。

3. 继承性免疫疗法

在继承性免疫疗法中，患者的循环淋巴细胞，或肿瘤渗透的淋巴细胞在体外被分离，通过淋巴因子如 IL-2 被活化，或用基因转换以使肿瘤坏死，并且再给药(Rosenberg 等, 1988; 1989)。为达到这点，向动物，或人类患者施用免疫学有效量的活性淋巴细胞，结合此处描述的整合有辅助剂的抗原性肽组合物。活性淋巴细胞最优先是患者自己的细胞，它较早地从血液或肿瘤样品中分离出来并在体外活化(或“扩展”)。这种形式的免疫治疗已经产生了一些黑色素瘤和肾癌消退的病例，但是有应答的百分率相比那些没有应答的百分率要少。

B. 疫苗注射

本发明包括使用来自 HPV 的 E6 和 E7 肽诱导或改善细胞介导的免疫应答的免疫疗法。针对 HPV 的 E6 和/或 E7 肽不产生或产生低 CMI 应答的患者，这种方法尤为显著。包含所有或部分 SEQ ID NO : 1 至 19 氨基酸的肽或多肽作为治疗和防止 HPV 感染的有效疫苗在临幊上很重要，包括防止与 HPV 相关的癌前期的和癌的生长，诱导患者体内的细胞介导的免疫应答。

一旦生产、合成和/或纯化，本发明的肽和多肽可以制成疫苗施用于患者。本发明的肽，多肽和疫苗也与其它疫苗或疫苗成分结合，如其它额外的抗原，以刺激抗原的免疫应答。在这种实施方案中，优选的附加抗原是那些暗示在癌和高增殖性条件下特异或优选表达的抗原。考虑与本发明的肽，多肽和疫苗结合的额外抗原和疫苗包括那些在美国专利 5,840, 317 和 5,882, 654 中所述的，此处引入作为参考。

本领域普通技术人员能预想用于测试的一些潜在的治疗剂和输送方式。如，潜在的抗 HPV 和抗肿瘤试剂可以是天然产物或是由人工设计的合分子。此外，该模式提供了从一组已知的和新的化合物中选择有效试剂的手段。任何特定的潜在治疗剂的剂量和输送方式可基于已确立的制备药学活性成分的指南来确定。例如，试验的化合物可以通过静脉内，皮内，肌内，局部，口服的方式，或其它药学上有效的方式给药。使用由本发明的方法产生的动物，研究者首次能够评价针对高危人乳头瘤病毒诱导的疾病，可能包括病毒的复制和传播的预防和治疗试剂。其中包括化学型药物，基因治疗，反义抑制策略，或预防或治疗性疫苗。许多对评价建议疗法的实验室测试结果的方法是公知的。

根据宿主种类，也可使用各种佐剂以增加免疫应答，它们包括但不限于，弗氏（完全和不完全），无机凝胶剂如氢氧化铝，表面活性物质如溶血卵磷脂，聚醚多元醇，聚阴离子，肽，油乳剂，钥孔戚血蓝蛋白，二硝基酚，和对人非常有用的佐剂如 BCG（细菌

Calmette-Guerin) 和小棒杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。佐剂除了用于本发明的免疫治疗，还可用于在本发明范围内增强细胞介导的免疫应答的检测。

C. 定向输送系统

在本发明要求的一些实施方案中，为了检测病毒特异性 T 细胞应答，HPV 多肽或肽可以被输送到靶细胞，在它们的表面表达病毒蛋白片段，以达到产生 T 细胞应答的目的。不同的输送方法包括灌注，表达结构的转染，病毒载体，和下文公开的其它方法。

1. 通过灌注转移

本发明要求的一个实施方案通过灌注法转移肽或肽的组合物到细胞中。也包括表达构建体和病毒构建体的连续灌注。在连续灌注中传输的构建体或肽数量可由所需摄取的数量决定。本发明公开了一个灌注的实例，其中初始浓度为 10^6 个细胞/ml 的细胞培养物可先被标记，清洗，并且然后在 100ug 的合成肽中培养两小时。

2. 表达载体

治疗肽的输送可利用表达载体来完成。在本发明的实施方案中，HPV 多肽和肽通过使用表达构建体被输送到靶细胞。这一应用过程中，术语“表达构建体”指包括含有编码 HPV 多肽的核酸的任何遗传结构。

“病毒载体”指主要从病毒序列中衍生出的表达构建体。为了构建体有效地表达，编码 HPV 多肽的多核苷酸将受启动子的转录控制。“启动子”指被宿主细胞的合成机器或引入的合成机器识别的 DNA 序列，该机器是启动特定基因转录所必须的。短语“受转录控制”指启动子在相对于多核苷酸的正确位点上，以控制 RNA 多聚酶的启动和多核苷酸的表达。

术语启动子用于此处指聚簇于 RNA 聚合酶 II 启动位点的一组转录控制基序。许多关于启动子怎样组织的思考得自对一些病毒的分析，包括 HSV 胸腺嘧啶激酶 (tk) 和 SV40 早期转录单元。通过最近工作的扩展，这些研究已经显示启动子由不连续的功能基序组成，每个由将

近 7-20bp 的 DNA 组成，并包含一个或多个转录激活蛋白或阻遏蛋白识别位点。

在每个启动子中至少一个基序的功能是定位 RNA 合成的起始位点。其中最著名的实例是 TATA 框，但在一些缺少 TATA 框的启动子中，如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因和 SV40 晚期基因的启动子，覆盖于起始位点的不连续元件本身帮助固定起始位置。

另外的启动子元件调节转录启动的频率。典型地，它们位于起始位点上游 30-110bp 的区域，尽管最近已显示出许多启动子在起始位点的下游也含有功能元件。启动子元件之间的间隔是灵活的，以至于当元件颠倒或彼此之间相对移动时，启动子功能仍保存。在 tk 启动子中，启动子元件间的间隔在活性开始下降之前可以增加到相隔 50bp。依赖于启动子，各个元件可协同地或独立地对激活转录起作用。

用于控制 HPV 多核苷酸表达的特殊启动子并非关键，只要它能在靶细胞中表达该多肽。这样，当以人细胞为目标时，最好将多核苷酸的区域编码置于邻近并受控制于能在人细胞中表达的启动子的位置。一般而言，这样的启动子包括人启动子或病毒启动子。利用其它病毒或哺乳动物细胞的或细菌噬菌体的启动子（本领域公知的）来获得多核苷酸的表达也被考虑，只要表达水平足以诱导 T 细胞应答。

通过利用具有公知性质的启动子，可以优化转染后的多核苷酸的表达水平和模式。如，选择在特定细胞中有活性的启动子，如酪氨酸酶（黑色素瘤）， α -胎蛋白和清蛋白（肝肿瘤），CC10（肺肿瘤）和前列腺特异性抗原（前列腺肿瘤）允许 HPV 多核苷酸的组织特异性表达。进一步，选择针对特异生理信号应答被调节的启动子允许可诱导的 HPV 多肽构建物的表达。

增强子最初作为增强位于相同 DNA 分子远处位点的启动子转录的遗传因子被发现。在对原核生物转录调节的经典研究中，这一远距离起作用的能力几乎没有先例。后来的工作显示，有增强子活性的 DNA 区域组织形式很像启动子。即，它们由很多单独的元件组成，每个都结合一个或多个转录蛋白质。

增强子和启动子之间的基本差别是操作性的。所有的增强子区域作为一个整体必须能激发远处的转录，对于启动子区域或它的组成元件则不必具备这点。另一方面，启动子必须具有一个或多个直接启动 RNA 合成的元件，尤其在特殊位点或特殊定向，而增强子缺少这些特征。启动子和增强子经常重叠并接近，往往表面上具有相似的基序组织。

此外，可用任何启动子/增强子的结合(按照 Eukaryotic Promoter Data Base EPDB)来驱动 HPV 多核苷酸构建体的表达。使用 T3, T7 或 SP6 细胞质表达系统是另一种可能的实施方案。如果提供适当的细菌噬菌体聚合酶，真核细胞能支持从某一细菌噬菌体启动子的细胞质转录，或作为输送复合物的一部分，或作为附加的基因表达载体。

在本发明的某些实施方案中，细胞内表达载体的输送可通过在表达载体内包含的标记在体外或体内鉴定。对于允许鉴别表达的受转染细胞，标记会产生可识别的变化。通常，包括药物选择性标记帮助克隆和选择转化体。或者，可使用酶，如单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶(tk) (真核的)或氯霉素乙酰基转移酶(CAT) (原核的)。也可使用免疫标记。可选择性标记的使用并非重要，只要它能与编码 HPV 多肽的多核苷酸一起表达。可选择性标记更多的实例是本领域技术人员公知的。

人们一般以包括多腺苷酸化信号来实现转录产物适当的聚腺苷酸化。多腺苷酸化信号的性质对于成功实践本发明并非重要，可以使用任何这样的序列。发明者已使用了 SV40 多腺苷酸化信号，因为它很方便，并且已知在靶细胞的使用中功能良好。也作为表达结构的要素之一的是终止子。这些要素可用来增强信号水平并使减少从构建体到其它序列的通读。

3. 病毒载体

在本发明的一些实施方案中，表达构建体包括病毒或来源于病毒基因的改造的构建体。某些病毒经受体介导的胞吞作用进入细胞的能力，在一些情况下，与细胞染色体整合的能力，已使它们成为将基因转至哺乳动物细胞的有吸引力的候选物。然而，由于已经证明，直接

摄入裸 DNA 疫苗，和受体介导的 DNA 复合物（下文论述），表达载体的摄入不必是病毒的，却可以是在哺乳动物细胞中能支持编码基因表达的任何质粒，粘粒，或噬菌体结构，如 pUC 或 BluescriptTM 质粒系列。

a. 逆转录病毒

逆转录病毒被细分为三个主要的组：肿瘤病毒，如鼠白血病病毒；慢病毒，和泡沫病毒。逆转录病毒是单链 RNA 病毒，由在受感染细胞中通过反向转录将其 RNA 转为双链 DNA 的能力而表征(Coffin, 1990)。然后，得到的 DNA 作为前病毒整合到细胞的染色体中，并指导合成病毒蛋白质。这种整合导致病毒基因序列保留于受体细胞与其后代。

逆转录病毒基因组含有三种基因 *gag*, *pol*, 和 *env* 分别编码衣壳蛋白，聚合酶，和包膜成分。发现于 *gag* 基因上游的序列，称为λ，功能是将包裹基因组到病毒中的信号。两个长末端重复 (LTR) 序列存在于该病毒基因组的 5' 和 3' 末端。它们包含强启动子和增强子序列并且也必需整合到宿主细胞基因组中(Coffin, 1990)。

为了构建逆转录病毒载体，编码 HPV 多肽的核苷酸被插入到病毒基因组的某些病毒序列中以产生复制缺陷的病毒。或者，可使用不能导致 HPV 感染的突变的 HPV 病毒。为了产生病毒粒子，构造含有 *gag*, *pol* 和 *env* 基因，但没有 LTR 和 λ 组分的包装细胞系(Mann, 1983)。当含有人的 cDNA 重组质粒连同逆转录病毒 LTR 和 λ 序列，被引入到该细胞系（例如通过磷酸钙沉淀）时，λ 序列允许重组质粒的 RNA 转录产物被包装到病毒粒子中，然后分泌到培养基中(Nicolas 和 Rubenstein, 1988; Mann, 1983)。然后收集含有重组的逆转录病毒的培养基，任选浓缩，用于基因转移。逆转录病毒能感染多种类型的细胞。然而，整合和稳定表达要求宿主细胞分裂(Paskind, 1975)。

最近开发了一种设计为允许逆转录病毒载体的特异性靶向的新方法，该方法基于通过化学添加乳糖残基到病毒包膜来化学修饰逆转录病毒。这一修饰可允许通过唾液酸糖蛋白受体特异地感染肝细胞。

设计了一种不同的重组逆转录病毒的靶向方法，其中应用抗逆转

录病毒包膜蛋白和抗特定细胞受体的生物素化的抗体。通过使用链霉抗生物素蛋白，抗体经生物素成分偶联起来(Roux, 1989)。通过使用抗主要组织相容性复合物 I 类和 II 类抗原的抗体，他们表明在体外用外生的病毒感染带有那些表面抗原的人细胞。(Roux, 1989)。

b. 腺病毒

人的腺病毒是双链DNA肿瘤病毒，其基因组长度接近36kb(Tooze, 1981)。作为真核生物基因表达的模式系统，腺病毒被广泛地研究和充分鉴定，这使得发展腺病毒成为有吸引力的基因转移系统。这类病毒相对容易生长和复制，并在体内和体外显示了较宽的宿主范围。在裂解感染的细胞时，腺病毒能关闭宿主的蛋白合成，指导细胞机器合成大量的病毒蛋白，并产生大量的病毒。

基因组的E1区域包括E1A和E1B和一些细胞基因，E1A和E1B编码负责调节病毒基因转录的蛋白。E2的表达（包括E2A和E2B）能合成病毒复制功能，如DNA结合蛋白，DNA聚合酶，和最初引发复制的末端蛋白。E3基因产物通过CTL和肿瘤坏死因子防止细胞溶解，并对病毒增殖显示重要性。与E4相关的功能包括DNA复制，后期基因表达，和宿主细胞关闭。后期基因产物主要包括病毒衣壳蛋白，它们仅在大多数从主要晚期启动子的一次主要转录过程出现之后表达。主要晚期启动子(MLP)在感染的晚期显示高效性(Stratford-Perricaudet和Perricaudet, 1991)。

由于仅有一小部分的病毒基因组显示需要顺式(Tooze, 1981)，所以当使用与如293细胞相关的细胞系时，腺病毒衍生载体对于取代大DNA片段显示了极好的潜力。Ad5-转化的人胚肾细胞系(Graham, 1977)已被开发以提供必要的反式病毒蛋白。腺病毒的性质使得它们成为用于体内靶向细胞的良好的后选物(Grunhaus和Horwitz, 1992)。

用腺病毒体系输送外源蛋白到细胞的特别优势包括：(i)由外源DNA取代相对大片段病毒DNA的能力；(ii)腺病毒重组体结构的稳定性；(iii)腺病毒感染人类的安全性；(iv)腺病毒感染与癌症或

恶性肿瘤之间无任何已知的相关性；(v) 获得高效价病毒重组体的能力；(vi) 腺病毒的高感染性。

通常，腺病毒基因传输体系基于重组体，它为由于一部分基因组缺失而不能复制的改造的腺病毒，如缺失 E1，但还保留它的感染能力。当在腺病毒基因组中增加缺失时，编码相对大的异源蛋白的序列可以被表达。如，缺失 E1 和 E2 区域的腺病毒能携带 10kb 的外源 DNA 并能在 293 细胞中高效价产生 (Stratford-Perricaudet 和 Perricaudet, 1991)。腺病毒感染后，转基因意外的永久表达也已被报导。

c. AAV 载体

腺伴随病毒 (AAV) 是本发明用于细胞转导的一种有吸引力的载体系统，由于它能高频整合并能感染非分裂的细胞，这使得它具有输送基因到哺乳动物细胞的用途，如，在组织培养中 (Muzyczka, 1992) 或在体内。AAV 具有广泛的宿主感染范围 (Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Laughlin, 1986; Tratschin, 1984)。关于 rAAV 的产生和使用的详细资料在美国专利 5, 139, 941 和美国专利 4, 797, 368 中描述，此处均引入作为参考。

说明 AAV 用于基因传输的研究包括 LaFace 等 (1988); Zhou 等 (1993); Flotte 等 (1993); 和 Walsh 等 (1994)。重组 AAV 载体已成功地用于体外和体内转导标记基因 (Kaplitt, 1994; Shelling 和 Smith, 1994; Yoder, 1994; Zhou, 1994; Samulski, 1989; Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Tratschin, 1985; Hermonat 和 Muzyczka, 1984) 和涉及人疾病的基因 (Luo, 1994; Walsh, 1994; Wei, 1994; Flotte, 1992; Ohi, 1990)。近来，AAV 载体已经允许用于囊性纤维化病治疗的 I 期人体试验。

AAV 是一种需要在培养细胞中与其它病毒（腺病毒或疱疹病毒的成员之一）协同感染才能有效感染的依赖性细小病毒 (Muzyczka, 1992)。在缺少辅助病毒协同感染时，野生型 AAV 基因组通过它的末端整合到人染色体 19 中，它以潜伏状态作为前病毒驻留于此处 (Samulski, 1991 ; Kotin, 1990)。然而 rAAV 并没有因整合被限制

到染色体 19 上，除非 AAV Rep 蛋白也被表达(Shelling 和 Smith, 1994)。当运输 AAV 前病毒的细胞被辅助细胞双重感染，AAV 基因组从染色体或重组质粒中被“援救”出来，从而建立了通常的有效感染(Muzyczka, 1992; Kotin, 1990; Samulski, 1989; McLaughlin, 1988)。

典型地，重组 AAV 病毒(rAAV)通过协同转染一个在目的基因两翼含有两个 AAV 末端重复序列的质粒(McLaughlin, 1988; Samulski, 1989; 分别引入此处作为参考)，和一个含有无末端重复序列的野生型 AAV 编码序列的表达质粒制成，例如 pIM45(McCarty, 1991; 此处引入作为参考)。细胞也可感染或转染载有 AAV 所需辅助功能的腺病毒基因的腺病毒或质粒。以这种方式制得的 rAAV 病毒原液被腺病毒污染，后者必须从 rAAV 微粒中物理分离(如通过氯化铯密度离心)。或者，可使用含有 AAV 编码区域的腺病毒载体或含有 AAV 编码区域的细胞系和一些或所有的腺病毒辅助基因(Clark, 1995; Yang, 1994)。也可以使用载有 rAAV DNA 作为一种整合前病毒的细胞系(Flotte, 1995)。

d. 其它作为表达构建体的病毒载体

在本发明中可以使用其它病毒载体作为表达构建体。可以使用来自病毒的载体如牛痘病毒(Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)和疱疹病毒。这些病毒对各种哺乳动物细胞提供了一些有吸引力的特性(Horwitz, 1990; Friedmann, 1989; Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal 和 Sugden, 1986)。

随着近来对乙型肝炎病毒的认识，对于不同的病毒序列的结构功能也产生了新的认识。体外试验显示，尽管缺失了基因组的 80%，病毒仍能保持其依赖辅助病毒包装和反转录的能力(Horwitz, 1990)。这意味着大部分的基因组可以通过外源基因物质代替。对于肝定向基因的转移，趋肝性和存活率(整合)是尤为有吸引力的特性。Chang (1991) 最近将氯霉素转乙酰酶(CAT)基因引入到鸭乙型肝炎病毒基因组中聚合酶的位置，表面和前表面编码区域。它在鸟类肝癌细胞系中与野生型病毒协同转染。含有高效价病毒重组体的培养基被用来感染原代小

鸭肝细胞。在转染后的至少 24 天, 检测到稳定的 CAT 基因表达 (Chang, 1991)。

e. 非病毒转移方法

本发明也设计了一些非病毒方法以转移表达载体到培养的哺乳动物细胞中。它们包括磷酸钙沉淀 (Graham 和 Van Der Eb, 1973; Chen 和 Okayama, 1987; Rippe, 1990) DEAE-右旋糖 (Gopal, 1985), 电穿孔 (Tur-Kaspa, 1986; Potter, 1984), 直接显微注射 (Harland 和 Weintraub, 1985), 负载 DNA 的脂质体 (Nicolau 和 Sene, 1982; Fraley, 1979) 和脂转染胺-DNA 复合物, 细胞超声处理 (Fechheimer, 1987), 用高速微粒轰击基因 (Yang, 1990), 聚阳离子 (Boussif, 1995), 和受体介导的转染 (Wu 和 Wu, 1988; Wu 和 Wu, 1987)。这些技术中的一些可以成功地适于体内或离体的应用。

D. 胶态分散体系

胶态分散体系构成定向传输载体。这些分散体系包括大分子复合物, 毫微囊复合物, 毫微囊, 微球体, 小珠, 和包括水包油型乳剂, 胶粒, 混合的胶粒和脂质体的脂基系统。本发明中优选的胶态体系就是脂质体。脂质体是一种人工膜泡囊, 用作体外和体内的输送载体。已经显示, 范围在 0.2-4.0um 的大单层泡囊 (LUV) 可以包裹足够量的大分子的水缓冲液。RNA, DNA 和完整的病毒粒子可被包裹到水性内部, 并以生物学活性的形式输送到细胞 (Fraley, 等)。除了哺乳动物细胞, 脂质体已经用于在植物、酵母和细菌细胞中输送多核苷酸。为了使脂质体成为有效的基因传递载体, 需要存在如下特征: (1) 以高精度包裹目的基因, 而不破坏它们的生物学活性; (2) 同非靶细胞比较, 优先并充分结合靶细胞; (3) 高效输送泡囊的水状内含物到靶细胞质; 和 (4) 正确而有效地表达遗传信息 (Manning, 等, Biotechniques, 6 : 682, 1988)。本发明的实施方案提出合成肽可以制剂为脂质体。脂质体的组成通常是磷脂, 尤其是高相转移温度的磷脂的组合, 通常结合类固醇, 尤其是胆固醇。也可使用其它磷脂或其它磷脂。脂质体的物理性质取决于 PH, 离子强度, 和二价阳离子的存在。

在脂质体生产中有用的脂类的例子包括磷脂酰化合物，如磷脂酰甘油，磷脂酰胆碱，磷脂酰丝氨酸，磷脂酰乙醇胺，鞘脂，脑苷脂，和神经节苷脂。尤其有用的是二酰基磷脂酰甘油，其中脂质部分含有14-18个碳原子，尤其是16-18个碳原子，并且是饱和的。例证性的磷脂包括蛋卵磷脂，二棕榈酰卵磷脂，二硬脂酰卵磷脂。

脂质体的靶向可以基于结构分类和机制因素分类。结构学的分类是基于选择性水平，如器官特异的，细胞特异的和细胞器特异的。机制靶向目标的区分是基于它是主动或被动的。在含有窦状毛细管的器官中，被动靶向目标利用脂质体向网状内皮系统（RES）细胞分配的天然趋势。相反，主动靶向目标涉及脂质体的改变，通过将脂质体与特定配体如，单克隆抗体，糖，糖脂或蛋白质结合，或通过改变组成或脂质体的大小以靶向器官和细胞型，而不是定位于自然发生的位点。

被定向的传输体系的表面可以各种方式修改。在脂质体的定向传输体系中，为了使定向配体保持与脂质体双分子层稳定接触，脂基可以被结合到脂质体的脂质双分子层中。各种连接基因可被用于将质链结合到定向配体上。

E. 药物组合物

本发明包括合成肽在形成药物组合物中的使用。一般来讲药物组合物包括有效量的一或多种蛋白质序列、核酸或抗体或溶解或分散在药学可接受载体中的附加试剂。短语“药物或药学可接受的”是指分子实体和组分，当它们被适当地施用于某种动物时，如人，不会产生不利的、过敏性的或其它不良反应。根据本发明的公开内容，本领域技术人员可知包含至少一种蛋白质序列、核酸或抗体或附加活性成分的药物组合物的制备，如 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990) 所示的，此处引入作为参考。此外，对于动物（例如人）的给药，应该了解，制备应符合 FDA 所要求的无菌、致热性、一般安全性和纯度的生物学标准。

如在这里所用的，“药学可接收的载体”包括任何和所有溶剂、分散培养基、涂料、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂（比如抗细菌剂、

抗真菌剂），吸收延迟剂、盐类、防腐剂、麻醉剂、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、分散剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等或其组合，正如本领域普通技术人员公知的（例如参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack 印刷公司, 1990, pp. 1289-1329, 此处引入作为参考）。除了任何常规的载体与活性成分不相容的情况，考虑其在治疗性的或药物组合物中的使用。

蛋白质序列、核酸或抗体可包含不同的载体类型，这取决于它是否以固体、液体或气雾剂的形态被施用，也取决于在以某种方式施用，如注射方式时，是否需要无菌。本发明可以通过静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、损伤内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、叶鞘内、直肠内、局部、肿瘤内、肌内、腹膜内、皮下、泡内、粘膜内、心包内、口服、局部、局部地施药，使用气雾剂、注射、输注、连续输注、直接局部灌注浸浴靶细胞，通过导液管、通过灌洗、在乳液内、在脂类组合物中（例如脂质体），或通过其它的方式或本领域普通技术人员公知的前述方法的结合（参见，如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Ed. Mack 印刷公司, 1990, 此处引入作为参考）。

本发明的组合物施用于动物患者的用量取决于身体和生理因素，如体重、病情的严重程度、被治疗的疾病类型、先前或并存治疗的干涉、患者原发病和给药途径。在任何情况下，负责施药的专业医生决定组合物中活性成分的浓度和针对个体患者的适当剂量。

在某些具体方式中，药物组合物可包含，例如，约 0.1% 的活性化合物。在其它实施方案中，例如，一种活性化合物可能包含 2% 左右到 75% 左右的单位重量，或 25% 左右到 60% 左右，或其中可导出的任何范围。在其它非限制性的例子中，剂量可以包含从约 1 微克/千克/体重、5 微克/千克/体重、10 微克/千克/体重、50 微克/千克/体重、100 微克/千克/体重、200 微克/千克/体重、350 微克/千克/体重、500 微克/千克/体重、1 毫克/千克/体重、5 毫克/千克/体重、10 毫克/千克/体重、50 毫克/千克/体重、100 毫克/千克/体重、200 毫克/千克/

体重、350 毫克/千克/体重、500 毫克/千克/体重、到约 1000 毫克/千克/体重或更多，也可以是其中可导出的任何范围。基于上文所描述的数量，从此处所列出的数字可导出的非限制性的例子中，可以施用范围从约 5 毫克/千克/体重到约 100 毫克/千克/体重、约 5 微克/千克/体重到约 500 微克/千克/体重的范围等。

在任何情况下，该组合物可包括各种抗氧化剂来阻止一种或多种组分的氧化。另外，通过防腐剂可以防止微生物的作用，例如各种抗细菌和抗真菌试剂，包括但不局限于对羟基苯甲酸酯类（如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯）、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、二汞硫代水杨酸钠或其组合。

蛋白质序列、核酸或抗体可以配制成游离碱，中性的或盐形式的组合物。药学上可接受的盐，包括酸加成盐，如，与蛋白质的游离氨基形成的，或与无机酸形成的，如盐酸或磷酸，或某种有机酸如醋酸，草酸，酒石酸或苦杏仁酸。带有游离羧基的盐形式也可由无机碱衍生，如钠，钾，铵，钙或铁的氢氧化物；或某种有机碱如异丙胺，三甲胺，组氨酸或普鲁卡因。

在组合物为液体形式的实施方案中，载体可以是一种溶剂或分散介质，包括但不局限于水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）、类脂（如甘油三酯、植物油、脂质体）及其组合。保持适当的流动性，例如，通过使用如磷脂酰胆碱的包衣；通过由在载体例如液体多元醇或脂类中的分散保持所需颗粒的大小；通过使用如羟丙基纤维素的表面活性剂；或这些方式的组合。在许多情况下，优选包括等渗试剂，如，糖，氯化钠或其组合。

在其它实施方案中，本发明中也可施用滴眼液，鼻溶液或喷雾剂，或气雾剂或吸入剂。某些组合物通常被设计为与靶组织型相兼容的。在非限制性的实例中，鼻溶液是一种水溶液，通常被设计为以滴加或喷洒方式施用到鼻通道上。制备鼻溶液使其在很多方面类似于鼻分泌物，并由此保持正常的纤毛功能。因此，在优选的实施方案中，水性鼻溶液通常是等渗的或有轻微缓冲以保持约 5.5 至约 6.5 的 PH。此外，

如果需要，该制剂可包括类似用于眼药制剂的抗微生物防腐剂，药品，或适当的药物稳定剂。例如，各种商品鼻制剂已知的并包括药品，如抗生素或抗组胺剂等。

在某些实施方案中，蛋白质序列，核酸或抗体的给药可以通过某些途径如口服。在这些实施方案中，该固体组合物可包括如，溶液，悬浮液，乳剂，片剂，丸剂，胶囊（如硬或软壳胶囊），持续释放制剂，含服组合物、锭剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂或其组合。口服组合物可直接与食物结合。口服给药的优选载体包含惰性稀释液、可吸收的食用载体或其组合。本发明的其它方面，口服组合物可被作为糖浆剂或酏剂制备。糖浆剂或酏剂也可包括，如，至少一种活性成分，甜味剂，防腐剂，风味剂，染料，防腐剂，或其组合。.

在某些优选的实施方案中，口服组合物可包括一或多种粘合剂，赋形剂，分散剂，润滑剂，风味剂，及其组合。在某些实施方案中，组合物可包括一或多种如下试剂：粘合剂，如，黄蓍胶，阿拉伯树胶，玉米淀粉，明胶或其组合；赋形剂，如，磷酸二钙，甘露醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素，碳酸镁，或其组合；分散剂，如，玉米淀粉，马铃薯淀粉，海藻酸或其组合；润滑剂，如硬脂酸镁；甜味剂，如蔗糖，乳糖，糖精，或其组合；风味剂，如薄荷，鹿蹄草油，樱桃香料，桔子香料等；或上述物质的组合。当所述单位的剂型是胶囊时，除了上述类型的物质，它可包括载体，如液体载体。各种其它物质可以作为包衣存在，或以不同的方式改变单位药剂的物理形式。

适用于其它给药方式的另一剂型包括栓剂。栓剂是各种重量和形状的固体制剂形式，通常通过插入直肠，阴道或尿道用药。插入后，栓剂变软，融化或溶解到腔内体液中。通常，对于栓剂可使用常规载体，如，聚（亚烷基）二醇，甘油三酯或其组合。在某些实施方案中，栓剂可混合物形成，其包括如，活性成分约0.5%至约10%，并优选约1%至约2%。

无菌可注射溶液是通过在过滤灭菌后，在适当的溶剂中加入所需量的活性化合物和各种上文列举的其它成分制备而成。通常，通过加入

各种无菌活性成分到含有基础分散介质和/或其它成分的无菌载体中制备分散体。当无菌粉末用于制备无菌可注射溶液，悬浮液或乳状液时，优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术，它能从先前的无菌过滤的液体介质中产生出活性成分加任何所需附加成分的粉末。如果必要，液态介质应该被适当缓冲，并且在注射之前，液体稀释剂首先用足够的盐或糖进行等渗。也设计制备用于直接注射的高浓度组合物，其中考虑使用 DMSO 作为溶剂以导致非常快速的渗透，输送高浓度的活性成分到小面积。组合物在制造和贮藏条件下必须稳定，并保存于抗微生物如细菌和真菌污染条件下。应该了解，内毒素污染应该控制到最小水平，如少于 0.5ng/mg 蛋白质。

在特定实施方案中，可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收剂，如一硬脂酸铝，明胶或其组合而实现。

由于肽可以作为一种免疫治疗剂施用于患者，基于脂类的组合物也与本发明相关。这些将在下文中详细论述。

在某些实施方案中，本发明涉及一种新的组合物，其包括与至少一种肽联合的一或多种类脂。脂类是一种特性不溶于水并可用有机溶剂萃取的物质。脂类包括，如天然出现于细胞质的脂肪滴，以及这类本领域技术人员公知的化合物种类，它们都含有长链脂肪族烃类及其衍生物，如脂肪酸，醇，胺，氨基醇和醛。当然，不同于在此特别描述的化合物，其它本领域技术人员了解的作为脂类的化合物也包括在本发明的化合物和方法中。

脂类可以是天然存在的或合成的（如人工设计或生产的）。然而，脂类通常是生物物质。生物脂类是本领域公知的，包括如中性脂肪，磷脂，磷酸甘油酯，类固醇，萜，溶血脂类（lysolipid），鞘糖脂，糖脂，硫化物（sulphatide），带有醚和脂连接脂肪酸的脂类和可聚合的脂类，以及其组合。

II. 脂类类型

中性脂肪包括甘油和脂肪酸。典型的甘油是三碳醇。脂肪酸通常

由末端带有酸性部分（如，羧酸）的长碳链组成。典型的脂肪酸碳链可以是任何长度的，但是，优选的碳链长度是从约 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 到约 30 或更多的碳原子，以及由它们导出的任何范围。然而，脂肪酸的链部分优选的范围是从约 14 至 24 个碳原子，在某些实施方案中尤其优选约 16 至约 18 个碳原子。在某些实施方案中，脂肪酸碳链可包括奇数个碳原子，而在某些实施方案中优选包括偶数个碳原子。在碳链上仅含有单键的脂肪酸被称为饱和的，而在碳链上包含至少一个双键的脂肪酸被称为不饱和的。

具体的脂肪酸包括，但不限于亚油酸，油酸，棕榈酸，亚麻酸，硬脂酸，月桂酸，豆蔻酸，花生酸，棕榈油酸，花生四烯酸，蓖麻油酸，结核硬脂酸，乳杆菌。一个或多个脂肪酸的酸性基团共价结合到甘油的一个或多个羟基上。因此，单脂酰甘油酯由一个甘油和一个脂肪酸组成，一个二脂酰甘油酯由一个甘油和两个脂肪酸组成，一个三脂酰甘油酯由一个甘油和三个脂肪酸组成。

磷脂通常包括甘油或鞘氨醇部分，产生两性化合物的磷酸盐离子基团，和一或多个脂肪酸。磷脂的类型包括，如甘油磷酯，其中磷酸盐基团与二脂酰甘油酯中甘油的第一个碳原子相连；和鞘磷脂（如神经鞘磷脂），其中磷酸基团被鞘氨醇的氨基醇酯化。另一个鞘磷脂的实例是硫苷脂，其中包括一个硫酸盐离子基团，它使得该分子具有两性。当然，磷脂也包括更多的化学基团，例如，与磷酸基团相连的醇。这些醇基团包括丝氨酸，乙醇胺，胆碱，甘油和肌醇。因此，特定的磷酸甘油酯包括磷脂酰丝氨酸，磷脂酰乙醇胺，磷脂酰胆碱，磷脂酰甘油或磷脂酰肌醇。其它的磷脂包括磷脂酸或二乙酰磷酸。一方面，磷脂酰胆碱包括二油酰基磷脂酰胆碱（如心磷脂），蛋磷脂酰胆碱，二棕榈酰磷脂酰胆碱，单豆蔻酰磷脂酰胆碱，单棕榈酰磷脂酰胆碱，单硬脂酰磷脂酰胆碱，单油酰磷脂酰胆碱，二丁酰磷脂酰胆碱，二戊酰磷脂酰胆碱，二癸酰磷脂酰胆碱，二庚酰磷脂酰胆碱，二辛酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱。

糖脂与鞘磷脂相关，但包含连接鞘氨脂的伯羟基的糖基团而不是磷酸基团。一种类型的糖脂称为脑苷脂，包含一个糖基（如，葡萄糖或半乳糖）连接伯羟基。另一个糖脂的实例是神经节苷脂（如，单唾液酸神经节苷脂，GM1），它包含大约2, 3, 4, 5, 6, 7左右个糖基，其可为支链的，连接伯羟基。在另外的实施方案中，糖脂是神经酰胺（如，乳糖酰神经酰胺）。

类固醇是菲的四元环体系衍生物。类固醇通常在细胞，组织和有机体中有调节功能，包括如，结合孕激素中的激素和相关的化合物（如孕酮），糖皮质激素（如氢化可的松），盐皮质激素（如醛甾酮），雄激素（如睾酮）和雌激素（如雌酮）系列。胆固醇是类固醇的另一实例，并通常提供结构而非调节功能。维生素D是另一个固醇的实例，它涉及从小肠内吸收钙。

萜是包含一或多个五碳异戊二烯基团的脂类。萜有各种生物功能，包括，如维生素A，辅酶Q和类胡萝卜素（如番茄红素和β-胡萝卜素）。

B. 带电荷的和中性的脂类组合物

在某些实施方案中，组合物的脂类成分是不带电的或原本不带电的。在一个实施方案中，组合物的脂类成分包括一或多种中性脂类。另一方面，组合物的脂类成分实质上可以不含阴离子的和阳离子的脂类，如某些磷脂（如磷脂酰基胆碱）和胆固醇。在某些方面，不带电的或原本不带电的脂类组合物包含约95%，96%，97%，98%，99%，100%的不带任何电荷的脂类成分，基本不带电的脂类，和/或带有等量正电荷和负电荷的脂类混合物。

在其它方面，脂类组合物可以是带电荷的。如，根据本发明，带电荷的磷脂可用于制备脂类组合物，并可以带有阳性净电荷或阴性净电荷。在非限制性实例中，二乙酰磷酸可用来使脂类组合物带负电荷，且硬脂酰胺可用来使脂类组合物带正电荷。

C. 制造脂类

如本领域普通技术人员公知的，脂类可由天然来源，商品或化学合成获得。例如，磷脂可从天然来源获得，如鸡蛋或大豆磷脂酰胆碱，

脑磷脂酸，脑或植物磷脂酰肌醇，心磷脂和植物或细菌磷脂酰乙醇胺。在另一个实例中，适于根据本发明使用的脂类可以从商业来源中获得。例如，二肉豆蔻基磷脂酰胆碱（“DMPC”）可从 Sigma Chemical Co. 获得，联十六烷基磷酸（“DCP”）从 K & K 实验室（Plainview, NY）获得，胆固醇从 Calbiochem-Behring 获得，二肉豆蔻基磷脂酰甘油（“DMPG”）和其它可以从 Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) 获得的脂类。在某些实施方案中，在氯仿或氯仿/甲醇中的脂类原液可贮存于约-20℃下。优选地，氯仿作为唯一的溶剂，因为它比甲醇更易蒸发。

D. 脂类组合物结构

在本发明的优选实施方案中，肽与脂类相连。与脂类相连的肽可被分散到含有脂类的溶液中，用脂类溶解、乳化、混合、联合，共价结合到脂类上，以悬浮液包含于脂类中，用胶束或脂质体包含或混合，或与脂类或脂类结构相连。本发明的脂类或脂类/嵌合多肽联合的组合物不局限于任何特殊结构。例如，它们也可仅被散布在溶液中，可能形成大小或性状不统一的聚合体。在另一个实例中，它们可以存在于一个双层结构中，如胶束，或用一个“塌陷的”结构。在另一个非限制性的实例中，脂转胺（Gibco BRL）-嵌合多肽或 Superfect (Qiagen)-嵌合多肽复合物也被考虑。

在某些实施方案中，脂类组合物可包括约 1%，约 2%，约 3%，约 4% 约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 11%，约 12%，约 13%，约 14%，约 15%，约 16%，约 17%，约 18%，约 19%，约 20%，约 21%，约 22%，约 23%，约 24%，约 25%，约 26%，约 27%，约 28%，约 29%，约 30%，约 31%，约 32%，约 33%，约 34%，约 35%，约 36%，约 37%，约 38%，约 39%，约 40%，约 41%，约 42%，约 43%，约 44%，约 45%，约 46%，约 47%，约 48%，约 49%，约 50%，约 51%，约 52%，约 53%，约 54%，约 55%，约 56%，约 57%，约 58%，约 59%，约 60%，约 61%，约 62%，约 63%，约 64%，约 65%，约 66%，约 67%，约 68%，约 69%，约 70%，约 71%，

约 72%， 约 73%， 约 74%， 约 75%， 约 76%， 约 77%， 约 78%， 约 79%， 约 80%， 约 81%， 约 82%， 约 83%， 约 84%， 约 85%， 约 86%， 约 87%， 约 88%， 约 89%， 约 90%， 约 91%， 约 92%， 约 93%， 约 94%， 约 95%， 约 96%， 约 97%， 约 98%， 约 99%， 约 100%或从中导出的任何范围的特定脂类，脂类型或非脂类成分，如药物，蛋白质，糖，核苷酸或其它本发明公开的或本领域技术人员公知的物质。在非限制性的实例中，脂类组合物可包括约 10% 到约 20% 的中性脂类，和约 33% 至约 34% 的脑苷脂类，和约 1% 的胆固醇。在另一个非限制性的实施方案中，脂质体可以包括约 4% 至约 12% 的萜，其中约 1% 的胶束是特定的番茄红素，剩余约 3% 至约 11% 的脂质体由其它萜组成；且还包括约 10% 至约 35% 的磷脂酰胆碱和约 1% 的药。因此，本发明的脂类组合物可以以任何组合或百分比范围包括任何脂类，脂类型或其它成分。

1. 乳剂

脂类可被包含于乳剂中。脂类乳剂基本永久的异源液体混合物，它由两种或多种通常互不溶解的液体通过机械搅拌或通过加入少量已知的乳化剂添加物质获得。制备脂类乳剂的方法和加入的添加成分是本领域公知的（如，Modern Pharmaceutics, , 1990, 此处引入作为参考）。

例如，一种或多种脂类被加入到乙醇或氯仿或任何其它合适的有机溶剂中并用手工或机械技术搅拌。然后该溶剂从混合物中蒸发，留下干的脂类光滑面。该脂类在水性介质中重悬，如磷酸缓冲盐，最后得到乳剂。为了得到大小分布更均质的乳化脂类，可以用常规的超声处理技术超声处理该混合物，使用显微流态化处理进行进一步乳化（如，使用 Mierofluidizer, Newton, Mass.），和/或高压（如在 600psi）下挤压利用 Extruder Device (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada)。

2. 胶束

脂类可被包含在胶束中。胶束是脂类组合物的群集物或聚集体，

通常是脂单层形式，并通过使用本领域技术人员公知的任何胶束生产步骤制备（如，Canfield et al., 1990; El-Gorab et al, 1973; Shinoda et al., 1963; 和 Fendler et al., 1975, 分别引入此处作为参考）。例如，一或多种脂类在有机溶剂中一般制成悬浮液，蒸发该溶剂，该脂类重悬在水溶液中，超声处理，然后离心。

3. 脂质体

在特定实施方案中，脂类由脂质体组成。“脂质体”是一个专业术语包括通过产生封闭的脂类双分子层或聚集体形成的各种单或多层脂类媒介物。脂质体可以表征为带有双分子层膜的膜泡结构，通常包括磷脂，和通常包含水性组合物的内部介质。

多层脂质体具有由水性介质分开的多个脂类层。当含有磷脂的脂类悬浮于过量的水溶液中时，多层脂质体自然形成。在形成封闭结构之前，脂类组分进行自身重排，并且在脂类双分子层之间捕获水和溶解的溶质 (Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。亲脂性或带有亲脂区域的分子也可以溶解或结合到脂类双分子层中。

在某些较不优选的实施方案中，天然来源的磷脂，如蛋或大豆磷脂酰胆碱，脑磷脂酸，脑或植物磷脂酰肌醇，心磷脂和植物或细菌磷脂酰乙醇胺最好不要用作主要的磷脂，即不构成 50% 或更多的总磷脂组成或脂质体，因为得到脂质体会不稳定性和有易漏性。

在特定的实施方案中，脂类和/或嵌合多肽可以，例如，包裹在脂质体的水性内部，散布在脂质体的脂类双分子层内，通过与脂质体和嵌合多肽相连的连接分子连接到脂质体上，被脂质体捕获，与脂质体复合等。

a. 制备脂质体

如本领域普通技术人员公知，根据本发明使用的脂质体可以通过不同的方法制备。当磷脂分散到水中时，根据脂类与水的比例，它可以形成非脂质体的各种结构。低比率时，脂质体是优选结构。

例如，磷脂 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)，如中性磷脂，二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC) 溶解于叔丁醇中。该脂类然后混合嵌

合多肽，和/或其它成分。在该脂类混合物中加入 Tween 20，使得 Tween 20 占组合物重量的 5%。过量的叔丁醇加入到该混合物中，使得该叔丁醇的体积至少占 95%。该混合物被涡旋混合，冷冻在干冰/丙酮浴中并过夜冻干。该冻干的制剂贮存于-20℃，并可使用三个月。当需要时，冻干的脂质体在 0.9% 的盐水中重构。用于封闭嵌合多肽的微粒用 Tween 20 获得，它们的平均粒径是约 0.7 至 1.0um。

或者，脂质体可以在容器中通过在溶剂中混合脂类制备，如，玻璃的，梨形烧瓶。该容器的体积应该大于要求的脂质体悬浮液体积的十倍。通过使用旋转蒸发器，溶剂在真空中接近 40℃ 时被除去。该溶剂通常在约 5 分钟至 2 小时之内被除去，这取决于需要的脂质体的体积。该组合物可以在干燥器中进一步被干燥。由于随着时间有变质的趋势，干燥的脂类通常在约一周后丢弃。

在无菌的、无热原的水中以 25-50mM 的磷脂重构干燥的脂类，通过振荡直到所有的脂类薄层被重悬。该含水脂质体然后被等分，分别装入到小瓶中，冻干并在真空中密封。

在其它可选择性的方法中，脂质体可以按照其它已知的实验方法制备（如，参见 Bangham et al., 1965; Gregoriadis, 1979; Deamer 和 Uster 1983, Szoka 和 Papahadjopoulos, 1978，分别在相关部分引入作为参考）。这些方法因它们各自捕获含水物质的能力以及它们各自的间隙与脂类的比率而不同。

按照上文制得的干燥的脂类或冻干的脂质体可以在抑制肽的溶液中脱水和重构，并可用适当的溶剂稀释到合适的浓度，如 DPBS。然后在涡旋混合器中用力晃动该混合物。未包封的添加物质，如药剂（包括但不限于激素，药物，核苷酸组成等等）通过在 29,000 X g 下离心除去，而脂质体沉淀被清洗。清洗的脂质体以适当的总磷脂浓度重悬，如约 50-200mM。包封的添加物质或活性剂的数量可根据标准方法确定。脂质体制备中包封的附加物质或活性剂的数量确定后，脂质体可溶解于适当的浓度并贮存于 4℃ 备用。包含脂质体的药物组合物通常包括一种无菌的药学可接受的载体或稀释剂，如水或盐水。

根据合成方法，脂质体的大小可变。本发明的脂质体可以是多种大小。在某些实施方案中，脂质体很小，如外径小于约 100nm，约 90nm，约 80nm，约 70nm，约 60nm，或小于约 50nm。制备这种脂质体时，可以使用此处描述的任何方法或本领域普通技术人员公知的方法。其它制备脂质体的非限制性实施例描述于美国专利 4,728,578、4,728,575, 4,737, 323、4, 533, 254、4, 162, 282、4, 310, 505 和 4,921, 706; 国际申请 PCT/US85/01161 和 PCT/US89/05040; 英国专利申请 GB2193095 A; Mayer et al., 1986; Hope et al., 1985; Mayhew et al. 1987; Mayhew et al., 1984; Cheng et al., 1987; 和 Gregoriadis, 1984, 分别引入此处作为参考)。

悬浮于水溶液的脂质体通常是球形囊泡状，具有一或多个脂类双层分子的同心层。每层由式 XY 代表的分子的平行排列组成，其中 X 是亲水部分，Y 是疏水部分。在水悬浮液中，同心层排列使亲水部分倾向于保持与水相接触而疏水区域倾向于自联合。例如，当水相既存在于脂质体内又存在于脂质体外时，脂类分子可以形成一个排列为 XY-YX 的双分子层，即通常所说的薄层。当一个以上的脂类分子的亲水和疏水部分开始互相结合时，可以形成脂类聚集体。这些聚集体的大小和形状依赖许多不同的变量，如溶剂的性质和溶液中其它化合物的存在。

在(I) 反相蒸发 (II) 脱水-再水合 (III) 洗涤剂透析和(IV) 薄膜水合之后，通常通过超声处理或脂质体混合物的连续排出得到脂类制剂产品。一方面，在某些实施方案中制备脂质体的方法包括热超声处理，和通过过滤器或孔径减小的膜的连续排出，从而得到小的，稳定的脂质体结构。这种制备只产生适当和均一大小的脂质体/嵌合多肽或脂质体，它们的结构稳定并且产生极大的活性。该技术是本领域技术人员公知的（参见，如 Martin, 1990）。

只要生产出来，脂类结构可用于包裹有毒性的（如化学疗法）或在循环中不稳定的（如核酸）化合物。脂质体的物理性质依赖 PH，离子强度和/或二价阳离子的存在。脂质体可显示对离子和/或极性物质的低渗透性，但是相变过程温度的升高明显地改变了它们的渗透性。

相变涉及从密集的，有序的结构（称为明胶态）到松散包裹的，无序的结构（称为液态）。该现象发生于特有的相变温度和/或导致对离子，糖和/或药物的渗透性的增长。脂质体包裹已经使得这些化合物的毒性降低并且血清半衰期增长 (Gabizon et al., 1990)。

脂质体通过四种不同的机制影响细胞传输药剂：通过网状内皮系统吞噬细胞的胞吞作用，如巨噬细胞和/或嗜中性粒细胞；通过非特异性的弱疏水力和/或静电力吸附到细胞表面，和/或通过与细胞表面组分的特异性相互作用；通过将脂质体的脂类双分子层插入质膜与质膜融合，同时释放脂质体内含物到细胞质中；和/或通过转移脂质体脂类到细胞膜和/或亚细胞膜上，和/或反过来同样，而不需要与任何脂质体内含物联合。虽然不止一种机制可以同时操作，但脂质体制剂可以改变哪种机制有效。

许多疾病的治疗使用基于脂类的基因转移策略以强化常规疗法或建立新的疗法，尤其是针对高增殖性疾病的疗法。脂质体制剂的进展已经改善了体内基因转移的效率 (Templeton et al., 1997) 并且考虑通过这些方法制备脂质体。为传输核酸的基于脂质体的另一制备方法已有描述 (WO 99/18933)。

在另一个脂质体制剂中，一种称为溶剂稀释微载体 (SDMC) 的两性载体能够将特定分子整合到脂类载体的双分子层中 (美国专利 5,879,703)。SDMC 可用于传输脂多糖，多肽，核酸等。当然，制备脂质体的任何其它方法可被技术人员使用以获得本发明中需要的脂质体配方。

b. 定向配体

定向配体既可以被固定于复合物的疏水部分，也可以连接到复合物亲水部分的反应性末端基团上。定向配体可通过一个对反应基团的连接而结合脂质体，如在亲水聚合物的远端。优选的反应基团包括氨基，羧基，酰基和硫醇基。定向配体与亲水聚合物的结合可以通过本领域技术人员公知的有机化学方法进行。在某些实施方案中，定向配体的总浓度可从约 0.01 至约 10 % mol。

定向配体是对目标区域特定组分特异的任何配体。优选的定向配体包括蛋白质如多克隆或单克隆抗体、抗体片断或嵌合抗体，酶或激素类，或糖类如单-，寡-和多糖(参见 Heath et al., 1986)。例如，二唾液酸神经节苷脂 GD2 是一种肿瘤抗原，它已经鉴别为神经外胚层起源的肿瘤，如成神经细胞瘤，黑色素瘤，小细胞肺癌瘤，胶质瘤和某些肉瘤(Mujoo et al., 1986, Schulz et al., 1984)。含有抗二唾液酸神经节苷脂 GD2 单克隆抗体的脂质体已经被用于辅助将脂质体定向到表达肿瘤抗原的细胞上(Montaldo et al., 1999; Pagan et al., 1999)。在另一个非限制性的实施例中，乳腺癌和妇科癌症抗原特异的抗体描述于美国专利 5,939,277 中，此处引入作为参考。在进一步非限制性的实施例中，前列腺癌特异抗体公开于美国专利 6,107,090 中，此处引入作为参考。因此，考虑此处描述的或本领域普通技术人员公知的抗体可以用于与本发明组合物和方法结合靶向特异的组织和细胞型。在本发明的某些实施方案中，考虑的定向配体与整联蛋白，蛋白多糖，糖蛋白，受体和转运蛋白相互作用。合适的配体包括任何对目标器官细胞特异的物质，或对目标器官的结构特异的物质，该目标器官由于局部病理如肿瘤而暴露于循环。

在本发明的某些实施方案中，为了提高细胞的转导，增加对目标细胞的转导，或为了限制不需要细胞的转导，抗体或环状肽的定向部分(配体)与脂类复合物相连。这种方法是本领域公知的。例如，特异性靶向哺乳动物中枢神经系统细胞的脂质体已被进一步描述(美国专利 5,786,214，此处引入作为参考)。脂质体基本由 N-戊二酰磷脂酰乙醇胺，胆固醇和油酸组成，其中对神经胶质特异的单克隆抗体与脂质体缀合。一种单克隆抗体或抗体片断可用于向动物体内的特异性细胞，组织或器官如脑，心脏，肺，肝等的定向传输。

更进一步，通过受体介导的传输和/或含有脂类或脂质体的定向载体，嵌合多肽可以输送到靶细胞。它们利用，发生在靶细胞上的受体介导的胞吞作用对大分子选择性的摄取。鉴于各种受体的细胞型特异的分布，这一传输方法另外增加了本发明的特异性程度。

因此，在本发明的某些方面，选择相应于特异性表达于目标细胞群受体的配体。细胞特异性的嵌合多肽输送和/或定向载体可包括与脂质体结合的特定的结合配体。将要传输的嵌合多肽包封于脂质体中并且特异的结合配体功能性地结合于脂质体膜上。从而该脂质体特异性的结合到目标细胞的受体上并将内含物传输到细胞中。这一系统已显示其功能，使用其中例如上皮生长因子（EGF）用于将核酸经受体介导传输到显示 EGF 受体上调的细胞中。

在某些实施方案中，受体介导的传输和/或定向载体包括细胞受体特异的配体和肽。其它包括细胞受体特异的配体，将要传输的肽有效连接到该配体上。例如，一些受体已被用于受体介导的基因转移(Wu 和 Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EP0 0273085)，它证实了该技术的可操作性。在另一个实施例中，在另一种哺乳动物细胞类型中的特异性的传输已经被公开(Wu 和 Wu, 1993；此处引入作为参考)。

在更进一步的实施方案中，特异性的结合配体可以包括一或多种指导细胞特异性结合的脂类或糖蛋白。例如，乳酰神经酰胺，半乳糖末端去唾液酸神经节苷脂，已经结合到脂质体中并观察到肝细胞对胰岛素基因摄取量的增加(Nicolau et al., 1987)。含有末端半乳糖残基的去唾液酸糖蛋白，去唾液酸胎球蛋白也已被证明了将脂质体靶向肝脏的作用(Spanjer and Scherphof, 1983; Hara et al., 1996)。当与多肽的主链结合时，糖类甘露糖、海藻糖或 N-乙酰葡萄糖胺结合高亲和性甘露糖 (mannose) 受体上(美国专利 5,432, 260, 此处整体特别引入作为参考)。本发明的细胞或组织特异性的转化构建体可以类似的方式被特异地传输到目标细胞。

在另一个实施例中，乳酰神经酰胺和靶向 LDL 受体相关蛋白的肽，如载脂蛋白 E3("Apo E") 用于将脂质体靶向肝 (Spanjer and Scherphof, 1983; WO 98/0748)。

叶酸和叶酸受体用于细胞定向也已被公开 (美国专利 5,871,727)。在此实施例中，维生素叶酸结合到复合物上。叶酸受体

对其配基具有高亲和性，并且在一些哺乳动物细胞系中过量表达，包括肺、乳房和脑肿瘤中。抗叶酸，如氨基蝶呤也可用作定向配体。转铁蛋白介导的传输系统靶向大范围的表达转铁蛋白受体的复制性细胞 (Gilliland et al., 1980)。

c. 脂质体/核酸组合物

在某些实施方案中，脂质体/嵌合多肽可包括核酸，如一种寡核苷酸，多核苷酸或核酸构建体（如一种表达载体）。当在将要转染真核细胞的 DNA 构建体中应用细菌启动子时，在脂质体中包含一种合适的细菌聚合酶是有利的。

当脂质体/嵌合多肽组合物考虑为包括细胞或组织特异的核酸时，该技术在本发明中具有适用性。在某些实施方案中，基于脂类的非病毒制剂提供了病毒基因治疗的另一方案。尽管许多细胞培养研究已经证明了基于脂类的非病毒基因转移，但通过基于脂类的制剂的系统性基因传输有限制。非病毒的基于脂类的基因传输的主要限制是阳离子脂类的毒性，该阳离子脂类包含非病毒传输载体。脂质体的体内毒性说明了体外和体内之间基因转移结果的差异。另一个构成这一对立数据的因素是在和无血清蛋白时脂质体稳定性的差异。脂质体和血清蛋白之间的相互作用对脂质体的稳定性具有惊人的影响 (Yang 和 Huang, 1997)。阴离子脂质体吸引并结合带负电的血清蛋白。包有血清蛋白的脂质体被溶解或被巨噬细胞吸收，使得它们从循环中清除。现有的体内脂质体传输方法使用烟雾化，皮下、皮内、肿瘤内或颅内注射，以避免循环中阳离子脂类相关的毒性和稳定性问题。脂质体和血浆蛋白之间的相互作用是造成体外 (Felgner et al., 1987) 与体内基因转移效果差异的重要原因 (Zhu et al., 1993; Philip et al., 1993; Solodin et al., 1995; Liu et al., 1995; Thierry et al., 1995; Aksentijevich et al., 1996)。

d. 脂类的施用

施于患者的脂类组合物（如，脂质体-嵌合多肽）的实际剂量取决于身体或生理因素，如体重，病情的严重性，患者的原发病和给药

的途径。考虑到这些因素，可以容易的确定适于特定患者和/或治疗过程的脂类组合物的剂量。

本发明可以通过静脉那，皮内，动脉内，腹膜内，损伤内，颅内，关节内，前列腺内，胸膜内，气管内，鼻内，玻璃体内，叶鞘内，直肠内，局部，肿瘤内，肌内，腹膜内，皮下，膜泡内，粘膜，心包内，口服，局部，局部地给药和/或利用气雾剂，注射，连续灌注，直接局部灌注浸浴靶细胞或通过导管和/或灌洗。

IX. 试剂盒

本发明的某些实施方案关于诊断和治疗试剂盒。肽可以试剂盒的形式利用来确定带有 HPV 的患者发展和复发癌前期的或癌的生长的可能性。试剂盒可以确定 T 细胞淋巴细胞增殖的激发和/或 T 辅助 1 细胞因子产量的增加。各种试剂盒的组分可以贮藏于合适的容器中。该容器通常包括至少一个小瓶，试管，烧瓶，瓶子，注射器或其它容器，肽试剂被放置于其内，优选适当地分配。试剂盒也包括第二容器，用来盛放无菌的，药学可接受的缓冲液或其它溶液。本发明的试剂盒也典型地包括一种紧密盛放小瓶的器具，用于商业销售，如注射剂或吹模制的塑料容器，其中所需小瓶被保留。

试剂盒可含有检测样品与抗体之间的相互作用的试剂（检测试剂）。提供的试剂可被放射性物质，荧光或酶标记。试剂盒可包含一种已知的放射性标记的试剂，能够与抗体结合或相互作用，该抗体允许检测和/或测量细胞介导的免疫应答。通常，这些方法包括首先获得疑似含有这些蛋白质，肽或抗体的样品，按照本发明的方法将样品与抗体或肽接触，根据具体情况，在允许免疫复合物形成的有效条件下，检测免疫复合物的形成。

在一些实施方案中，在一个合适的容器中包括一或多种 E6 和/或 E7 肽。样品可与该肽接触或温育，然后检测该样品针对该肽的细胞介导的免疫应答。这样，在一些实施方案中，试剂盒中含有一种非反应性结构，在一些实施方案中，该非反应性结构可以是塑料或一些其它

的合成材料。非反应性结构可以是一种盛样品的容器，如带有小孔的容器。作为本发明的一部分，也包括带有多孔的容器。在一些情况下，该结构被划线或附有膜。一个用膜划线分割的小孔可用于温育 E6 或 E7 肽，然后用同样的容器检测细胞介导的免疫应答。这一过程可通过利用检测细胞介导的免疫应答的抗体来进行。该抗体包括抗 TH1 或 TH2 细胞因子，细胞因子受体或任何其它 T 细胞上指示细胞介导的免疫应答的受体的抗体。检测试剂也包括在试剂盒中。

试剂盒的试剂可以液体溶液，附着于固相支持物的或干粉的形式被供给。当试剂以液体溶液形式被供给时，该液体溶液是水溶液。优选地，当试剂被附着到固相支持物上被供给时，固相支持物可以是层析介质，多孔检测板，或载玻片。当被供给的试剂是一种干粉时，粉末通过添加合适溶剂重构的方式供给。

通常，对免疫复合物形成的检测是本领域公知的并可通过使用许多方法获得。例如，本发明考虑使用 ELISA，RIA，免疫印迹（如斑点印迹），ELISPOT，间接免疫荧光技术以及类似方法。通常免疫复合物的形成通过使用标记物来检测，如放射性标记或酶标记（如碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，或其类似物）。当然，我们发现使用第二结合配体，如第二抗体或生物素/亲和素配体的结合配置时具有附加的优点，正如本领域公知的。

为了达到检测目的，事实上可以使用任何疑似含有能发生细胞介导的免疫应答的样品，视情况而定。样品可包括细胞，细胞上清液，细胞悬浮液，细胞提取物，酶级分，蛋白提取物，或其它疑似含有能产生细胞介导的免疫应答的细胞的非细胞组合物。一般而言，符合本发明的试剂盒包括至少一种 E6 或 E7 肽和抗与细胞介导的免疫相关的蛋白质组合物的抗体，以及免疫检测试剂和容纳抗体，肽，和试剂的容器。免疫检测试剂典型地包括与抗体或抗原，或与第二结合配体相连的标记物。示例的配体可包括与标记物相连的抗第一抗体或抗原或生物素或亲和素（或链霉抗生物素蛋白）配体的第二抗体。当然，如上文提到的，许多典型的标记物是本领域公知的并且所有这些标记物

都可在本发明的相关之处应用。

容器中通常包括其中可以放置抗体、抗原或检测试剂的小瓶，优选容器被适当地等分。本发明的试剂盒也典型地包括用来紧密容纳抗体、抗原、和试剂的容器的器具，用于商业销售。容器可包括注射剂或吹模制的塑料容器，所需小瓶被保留在里面。

在一个实施方案中，诊断试剂盒包括探针和引物，用于核酸的检测方法。在生物样品中检测肽标记物必需的所有材料和试剂都一起装配到试剂盒中。这通常包含为特定标记物预选的引物。也包括适合扩增核酸的酶，这些酶包括各种聚合酶(RT, Taq, etc.)，以及脱氧核苷酸和缓冲液，以提供扩增所必需的反应混合物。

这样的试剂盒通常以适当的方式在不同容器中包含各种单独的试剂和酶，以及针对各种标记物的引物对。优选的扩增核苷酸的引物被选择用来扩增 SEQ ID NO: 1-19 或其互补序列中的特定序列。

在另一个实施方案中，这种试剂盒包含特异性于与 SEQ ID NO: 1-19 描述的序列或其互补序列相应的杂交探针。以适当的方式，这种试剂盒通常在不同容器中包含各种单独的试剂和酶，以及杂交探针。

在其它的实施方案中，本发明涉及用于上述免疫检测方法的免疫检测试剂盒。由于所述肽通常是蛋白质、多肽或肽，因此该肽优选包括在试剂盒中。免疫检测试剂盒因此在适当的容器中包括该肽，和任选的免疫检测试剂。

试剂盒的免疫检测试剂可以有一或多种形式，包括那些与给出的抗体相联系或连接的可检测的标记物。与第二结合配体相联系或结合的可检测的标记物也被考虑。典型的第二配体是与第一抗体有结合亲和力的第二抗体。

试剂盒可进一步包括被合适等分的野生型或突变体蛋白、多肽或肽组合物，标记的或非标记的，用于绘制检测分析的标准曲线。试剂盒也包含抗体标记缀合物，以完全缀合形式、以中间物形式，或作为单独部分由试剂盒使用者缀合的形式。试剂盒的成分可以包装于水介质中或为冻干形式。

本发明的治疗试剂盒是包含肽序列 SEQIDNO: 1-19 肽的试剂盒。上述试剂盒通常在适当的容器中含有药学可接受的多肽、肽、生物功能等效物、免疫片断、功能区、抑制因子、抗体、基因、多核苷酸，核酸或补体的制剂或以药学可接受的形式表达上述任何物质的载体。试剂盒可以只有一个容器，或者每种化合物可具有不同的容器。

当试剂盒的组分在一或多种液体溶液中供给时，该液体溶液是水溶液，尤其优选无菌水溶液。肽组分也可以被制成可注射组和物的形式。在这种情况下，容器本身可以是注射器，移液管，或其它类似的仪器，制剂可以从中应用到身体的感染部位，注射到动物体内，或甚至应用于试剂盒的其它组分中并与之混合。

然而，试剂盒的成分还可以干粉的形式供给。当以干粉提供试剂或成分时，粉末通过添加适当的溶剂被重构。预想该溶剂可以在另一个容器中供给。

试剂盒的容器通常包括至少一个小瓶，试管，烧瓶，瓶子，注射器或其它容器，其中可放置抗体，且优选适当地等分。当多肽或肽，或第二或第三结合配体或附加组分被供给时，试剂盒也通常包括第二，第三或其它附加容器，其中可以放置这种配体或组分。本发明的试剂盒也典型地包括一种器具，用来紧密容纳抗体，抗原和任何其它试剂的容器，用于商业销售。容器可以包括注射剂或吹模制的塑料容器，所需小瓶被保留在其中。

不管容器的数量或类型，本发明的试剂盒也可包含或被包装有仪器来辅助注射/给药或在体内放置最终的肽。这种仪器可以是注射器，移液管，镊子，或任何医学上允许的输送工具。

实施例

以下包括的实例显示了本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该了解，由发明者揭示的公开于实施例的技术在实践本发明时功能很好，该技术是代表技术，因而被认为它构成了实践的优选方式。然而，本领域技术人员应根据本发明的公开内容了解到，在公开的特定

实施方案中，可以做出一些改变，并仍能获得类似或同样的结果，而不脱离本发明的精神和范围。

实施例 1

材料和方法

患者

本发明的实施方案中包含一组被研究群体，她们选自在德克萨斯州大学 M.D. 安德森癌症中心的阴道镜检查诊所受诊的患者。征得病人的同意，根据研究院内伦理委员会批准的协议，实施所有规程。这些妇女年龄为 17 岁或更大，且没有怀孕，没有免疫病史。该研究鉴定了四组妇女。第 1 组由六个无 CIN 细胞学或组织学诊断并且具有 HPV 阴性试验的妇女组成 (CIN⁽⁻⁾/HPV⁽⁻⁾)。第 2 组包括 31 个带有 CIN 组织学诊断并且 HPV 阳性试验 (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾) 的妇女。第 3 和 4 组选自在研究之前在阴道镜检查诊所经过 CIN 烧蚀或切除治疗至少 6 个月的妇女。第 3 和 4 组的妇女在 CIN 治疗之前是 (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾)。然而，在登记时，也就是 CIN 治疗后最少 6 个月之后，这些妇女仅被评估病情。第 3 组由 22 个没有复发 CIN 迹象的妇女组成 (Recur⁽⁻⁾)，第 4 组包括 10 个组织学诊断复发 CIN 的妇女 (Recur⁽⁺⁾)。HPV 阳性利用 Virapap/Viratype 检测确定的 (Technologies Inc., Gaithersburg, MD)。在这一程序中，对 HPV 的 RNA 的斑点印迹杂交是利用来自宫颈擦拭签的脱落的宫颈上皮细胞完成的。检测方法包括使用 ³²P 标记 DNA 探针组，它鉴定 HPV 型号：6/11, 16/18, 和 31/33/35。根据厂商的说明书分离并处理细胞。在研究时，这种检测被用作阴道镜检查时的标准护理步骤的部分。HPV 阳性通过 PCR 进一步被确定，该 PCR 使用从如先前所述的石蜡包被的组织活检中提取的 DNA (Ting 等, 1990; Schiffman 等, 1991)。用于 PCR 分析的一致引物来自乳头瘤病毒的 L1 开放可读框 (MY11, GCMCAGGGWCATAAYAATGG (SEQ ID NO: 23) 和 MY09, CGTCCMARRGGAACTGATC (SEQ ID NO: 24)；其中 M = A+C, R = A+G, W = A+T, Y = C+T)。HPV-16 阳性利用特异寡核苷酸探针 CATAACCTCCAGCACCTAA (SEQ ID NO: 25) 证实。研究的受检者的临

床性状，包括 HPV 状态列于表 2。

研究受检者的性状

性状	总计	第 1 组	第 2 组	第 3 组
第 4 组				
患者数量	69	6	31	22
平均年龄	31	31	31	27
年龄范围	17-54	17-43	21-50	18-54
人种				
白色人种	52 (75. 4%)	3 (50%)	26 (83. 9%)	15 (68. 2%)
西班牙人	8 (12. 6%)	3 (50%)	1 (3. 2%)	4 (18. 2%)
非洲-美洲人	8 (12. 6%)	0 (0%)	3 (9. 7%)	3 (13. 6%)
亚洲人	1 (1. 4%)	0 (0%)	1 (3. 2%)	0 (0%)
HPV 状态				
阴性	6 (8. 7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
阳性	63 (91. 3%)	0 (0%)	31 (100%)	22 (100%)
HPV-16	57 (90. 5%)	0 (0%)	31 (100%)	17 (77. 3%)
其它 HPV 类型	6 (9. 5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (22. 7%)
最初诊断结果*				
阴性	6 (8. 7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
CIN1	4 (5. 8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (18. 2%)
CIN2&3	59 (85. 5%)	0 (0%)	31 (100%)	18 (81. 8%)
				10 (100%)

*注：第 3 组中，在招来研究时对 CIN 诊断是阴性，而第 4 组中，对于 CIN2/3 的诊断为阳性。

肽

基于相关现有文献中描述的已知的 T 细胞表位的两性结构和信息选择相应于 HPV-16 的 E6 和 E7 癌蛋白的肽序列。表 3 列出了用于本发明研究的肽。所有的肽的制备如早期报导的 (Sarkar 等, 1995) 用 Merrifield 固相方法 (Merrifield, 1963) 或者在改良的 Vega 250 自

动肽合成机上合成 (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) 或利用 Houghten, 1985 描述的“袋”方法合成。在大多数实验中，使用的肽的纯度近似为 70-80%，在一些实验中，使用显示纯度>95% 的肽，也具有同样的结果。除了 E6 和 E7 肽之外，我们使用了来自 *c-mos* 原癌基因的肽 [氨基酸 158-170, STRTPEDSNSLGT (SEQ ID NO 22)]作为阴性对照。肽的贮存液在 PBS (pH7.0) 中制备并过滤灭菌。

T 细胞增殖分析

通过静脉穿刺从研究的参与者中收集肝素化的血，在 Ficoll-Hypaque 密度梯度下离心分离 PBMC (Histopaque-1073 ; Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO)。用 PHA, *c-mou* 肽，或个别的 E6 和 E7 肽刺激以后，不同个体中的 PBMC 增殖反应用先前描述的 [³H] 胸腺嘧啶掺入分析来确定 (Nehete 等, 1996) (表 4)。简要地，各样品在 96 孔微量滴定板上接种三份，并于 37°C 在潮湿的含 5% CO₂ 的空气中培养 7 天。在最后的 16-18 小时，加入 1 μCi 的 ³[H] 胸腺嘧啶 (6.7 Ci/mmol; ICN Biomedicals, Inc. , Costa Mesa, CA)。在过滤条上收集细胞以估计 ³[H] 胸腺嘧啶的掺入。经各种添加剂处理的细胞的特异放射性在所有情况下通过减去仅在培养基中培养的细胞的每分钟的计数 (cpm) 值来计算。预实验的数据显示，在 5 ug/ml，各种肽产生一致的增殖水平。针对个别 E6 和 E7 肽的 T 细胞增殖反应的显著性(根据刺激指数 [SI])，可以计算为暴露于肽的细胞超过未加入肽的对照组细胞的 ³[H] 胸腺嘧啶掺入的增加倍数。当 SI 值>3.0 时，被认为是阳性反应，它可用于所有的统计学分析以确定增殖反应的显著性与疾病解除或疾病复发状况的关系。在所有的实验中，三份样品的数据相当，其标准误差<10%。在已测试的四个研究组中，没有妇女显示出特异于对照 *c-mos* 肽的增殖反应 (SI < 2.0)。

表 3
来自 HPV-16 的 E6 和 E7 肽的氨基酸序列

肽	残基	序列
E6 肽		
K9L(SEQ ID NO:1)	(氨基酸 18-26)	KLPQLCTEL
E10I(SEQ ID NO:2)	(氨基酸 25-34)	ELQTTIHDI
C10R(SEQ ID NO:3)	(氨基酸 37-46)	CVYCKQQLLR
Q15L(SEQ ID NO:4)	(氨基酸 43-57)	QLLRREVYDFAFRDL
V10C(SEQ ID NO:5)	(氨基酸 49-58)	VYDFAFRDLC
P9L(SEQ ID NO:6)	(氨基酸 66-74)	PYAVCDKCL
P10I(SEQ ID NO:7)	(氨基酸 102-111)	PLCDLLIRCI
Q20P(SEQ ID NO:8)	(氨基酸 97-116)	QQYNKPLCDLLIRCINCQKP
R16R(SEQ ID NO:9)	(氨基酸 131-146)	RWTGRCMSCCRSSLTR
G10S(SEQ ID NO:10)	(氨基酸 141-150)	GRCMSCCRSSL
E7 肽		
T10Q(SEQ ID NO:11)	(氨基酸 7-15)	TLHEYMLELQ
M9T(SEQ ID NO:12)	(氨基酸 12-20)	MLDLQPETT
D9L(SEQ ID NO:13)	(氨基酸 14-22)	DLQPETTDL
Q19D(SEQ ID NO:14)	(氨基酸 44-62)	QAEPDRAHYNIVTFCCCKCD
R9F(SEQ ID NO:15)	(氨基酸 49-57)	RAHYNIVTF
R9V(SEQ ID NO:16)	(氨基酸 66-74)	RLCVQSTHV
L9V(SEQ ID NO:17)	(氨基酸 82-90)	LLMGTLGIV
G10C(SEQ ID NO:18)	(氨基酸 85-94)	GTLGIVCPIC
D20C(SEQ ID NO:19)	(氨基酸 75-94)	DIRTLEDLLMGTLGIVCPIC

aa, 氨基酸

细胞因子分析

在该检测中使用冷藏的 PBMC。PBMC (1×10^5) 与各种 HPV 肽在

RPMI-1640 培养基（含有 10% 的胎牛血清）中，于 37°C 在 96 孔圆底板的三个等同的孔中培养 48 小时。离心后，上清液（100ul）从各孔中取出，并于 -70°C 冷冻贮存在另一块 96 孔板中。然后解冻该板，并按照厂商的说明，用细胞筛选免疫分析试剂盒（Biosource International, Camarillo, CA）检测上清液的各种细胞因子（IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 和 IL-12）。

统计分析

利用 Pearson X^2 和 Fisher 精确试验（exact test）评估患者组之间的 SI 值的差别。为了统计分析，显著的增殖反应被定义为 SI ≥ 3.0 。统计显著性被设置在 $p < 0.05$ 。

实施例 2

年龄范围从 17 至 54 岁（平均 31 岁）的一共 69 个妇女参与该研究。在这些 69 个妇女中，52 个白种人，非洲裔美国人和西班牙人各 8 人，1 个亚洲人（表 2）。分析来自这些妇女的 PBMC 针对合成的肽的增殖反应，这些肽相应于 HPV-16 癌蛋白 E6 和 E7 的抗原序列（表 3）（图 1A）。

在不同的四组患者中，对各种 E6 和 E7 肽特异的增殖反应的分析显示：第 3 组的大多数患者（Recur $(-)$ ）对所有测试的七种 E6 肽和 7/8 的 E7 肽显示阳性反应（SI ≥ 3.0 ）（图 1A）。另一方面，在第 2 组（CIN $(+)$ / HPV $(+)$ ）中仅 5/31 的未治疗患者显示了对任何测试的肽的反应，第 1 组（CIN $(-)$ / HPV $(-)$ ）和第 4 组（Recur $(+)$ ）中对任何测试的肽没有反应。图 1B 概括了上述内容。

在第 3 和 4 组的妇女中，对 E6 和/或 E7 肽的增殖反应与治疗后疾病状况之间的关系显示于表 4。尽管第 4 组（Recur $(-)$ ）的患者没有显示出对任何试验的 E6 或 E7 肽的反应，但在第 3 组中，有 64% 的患者对于 E6 肽 ($p = 0.001$) 具有显著的增殖反应，82% 对 E7 肽 ($p < 0.001$)，和 86% 对 E6 或 E7 肽 ($p < 0.001$) 中的至少一种显示明显的增殖反应。

第 3 组和第 4 组对普通的促细胞分裂原如 PHA ($p = 0.912$, 未显示数据) 的增殖反应没有区别, 这表明这些患者的先天免疫状况并没有损伤。这些结论强烈表明针对来自 HPV-16 的 E6 和 E7 癌蛋白的合成肽的增殖反应与 CIN 治疗后的无疾病情况有关。

发明者确定了针对两种分别来自 E6 ((Q15L 和 V10C) 和 E7 (Q19D 和 R9F) 肽的高水平增殖反应。据 SI 值, 典型的增殖反应示于图 2, 它们分别来自第 3 和 4 组的 2 个患者对 HPV-16 的 E6 癌蛋白的 7 个合成肽和 E7 癌蛋白的 8 个合成肽的增殖反应。针对这四个肽的增殖反应的比较显示了第 3 组和第 4 组的妇女之间统计学上的明显差异 (表 5)。虽然在第 4 组中没有观察到对这些肽的增殖反应, 但在第 3 组中总计 11 个妇女对肽 Q15L ($p = 0.006$) 显示出反应, 10 人对肽 V10C ($p = 0.006$), 13 人对肽 Q19D ($p = 0.002$), 和 10 人对肽 R9F ($p = 0.013$) 有反应。如表 3 所示, 在 E6 肽 V10C 中 10 个氨基酸中有 9 个与 Q15L 肽的重叠。同样地, E7 肽 R9F 的 9 个氨基酸与 Q19D 肽的氨基酸重叠。对这四种肽特异的增殖反应一起包括了在第 3 组 (Recur⁽⁻⁾) 中观察到的所有反应 (19/22 的妇女)。这些结果表明, 对于 HPV 特异的细胞免疫反应, 分别在 HPV-16 癌蛋白 E6 和 E7 中的 Q15L 和 Q19D 肽可能是免疫决定区域。

在被研究群体的分样品中, 发明者也测试这些肽是否也诱导各种 TH1 和 TH2 细胞因子的生产。来自第三组 (Recur⁽⁻⁾) 的 8 位妇女和第四组 (Recur⁽⁺⁾) 6 位妇女的冷藏的 PBMC 在体外用肽 Q15L 和 Q19D 刺激。培养物上清液中各种 TH1 细胞因子 (IL-2, IL-12, 和 IFN- \square), 和 TH2 细胞因子 (IL-4 和 IL-10) 的数量在相对未刺激培养物矫正以后, 示于图 3。第三组 (Recur⁽⁻⁾) 中 8 位中的 7 位 (87.5%), 和 8 位中的 5 位 (62.5%) 妇女的 PBMC 显示 IFN- \square 和 IL-2 的生产, 分别响应于 Q15L 和 Q19D 两者 (表 6)。另外, 在这一组 8 位妇女的 3 位中观察到响应于 Q15L 的 IL-12 的产生, 而 Q19D 介导的 IL-12 生产在 8 位妇女的 6 位中明显。另一方面, 这一组妇女的 PBMC 不响应于用肽 Q15L 或 Q19D 刺激而分泌 IL-4, 而只有 3 个妇女显示出响应于上述任一肽的

IL-10 的生产。与第三组 (Recur⁽⁻⁾) 的妇女相反, 第四组 (Recur⁽⁺⁾) 的妇女突出显示 IL-10 的生产 (5/6 由于 Q15L, 6/6 由于 Q19D)。当用两种试验肽中任一刺激 PBMC 时, 观察到这组的 6 位妇女中的 1 位显示 IL-4 的生产 (表 6)。总的来说, 这些结果显示, 第三组 (Recur⁽⁻⁾) 中的患者主要显示出 TH1 细胞因子生产 (IL-2, IFN-γ 和 IL-12), 而第四组 (Recur⁽⁺⁾) 中的妇女尽管不显示直接针对 HPV 肽的特定增殖反应, 但却显示一种 TH2 细胞因子, IL-10 的生产。

表 4

针对 HPV-16 癌蛋白 E6 和/或 E7 的所有合成肽的增殖反应与 CIN 治疗后的病情之间的相关性

增殖反应	第 3 组 (无疾病)	第 4 组 (复发)	显著性
E6 肽			
是 ^a	14 (64%)	0	
否 ^b	8 (36%)	10 (100%)	p = 0.001
E7 肽			
是 ^a	18 (82%)	0	
否 ^b	4 (18%)	10 (100%)	p < 0.001
任何 E6 或 E7 肽			
是 ^a	19 (86%)	0	
否 ^b	3 (14%)	10 (100%)	p < 0.001

^aSI ≥ 3.0 ^bSI < 3.0

表 5

对 HPV-16 癌蛋白 E6 和/或 E7 的特定的合成肽的增殖反应与 CIN 治疗后的病情之间的相关性

增殖反应	第 3 组		第 4 组 (复发) (n = 10)	显著性
	(无疾病) (n = 22)			
E6 肽				
Q15L	是 ^a	11 (50%)	0	P = 0.006
	否 ^b	11 (50%)	10 (100%)	
V10C	是 ^a	11 (50%)	0	P = 0.006
	否 ^b	11 (50%)	10 (100%)	
E7 肽				
Q19D	是 ^a	13 (59%)	0	P = 0.002
	否 ^b	9 (41%)	10 (100%)	
R9F	是 ^a	10 (46%)	0	P = 0.013
	否 ^b	12 (54%)	10 (100%)	

^aSI > 3.0 ^bSI < 3.0

表 6

响应于 HPV-16^a 的 E6 和 E7 癌蛋白合成肽刺激的
第 3 和 4 组患者 PBMC 细胞因子生产

细胞因子 ^b	第 3 组 (n = 8)		第 4 组 (n = 6)	
	Q15L ^c	Q19D ^d	Q15L	Q19D
IFN-γ	7/8	7/8	0/6	0/6
IL-2	5/8	5/8	0/6	0/6
IL-12	3/8	6/8	0/6	0/6
IL-4	0/8	0/8	1/6	1/6
IL-10	3/8	3/8	5/6	6/6

^a 阳性患者数量/测试人数

^b 细胞因子生产的阳性是基于用于每个细胞因子的检测试剂盒的灵敏度的值，按照浓度 pg/ml: IL-2 = 8.7, IFN-γ = 4.0, IL-12 = 1.0, IL-4 = 2.0, 和 IL-10 = 5.0。

^c 来自 HPV-16 中 E6 癌蛋白的 Q15L 肽

^d 来自 HPV-16 中 E7 癌蛋白的 Q19D 肽

根据本发明的公开，不需要过多的实验就可以制成和实施此处公开和要求保护的所有组合物和方法。虽然根据优选方式已经描述了本发明的组合物和方法，但是对于本领域技术人员很显然，可以改变所述组合物和方法和方法的步骤和步骤的顺序，而不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地，某些化学上和物理上相关的试剂明显地可替代本发明在此所述的试剂，并且可获得相同或相似的结果。本领域技术人员将明显了解所有这些类似的取代和改变都包含于本发明的精神、范围和概念内，作为附加的权利被限定。

参考文献

下列参考文献特别引入本文作为参考。

U.S. Patent 3,817,837

U.S. Patent 3,850,752

U.S. Patent 3,939,350

U.S. Patent 3,996,345

U.S. Patent 4,162,282

U.S. Patent 4,275,149

U.S. Patent 4,277,437

U.S. Patent 4,310,505

U.S. Patent 4,533,254

U.S. Patent 4,683,195

U.S. Patent 4,683,202

U.S. Patent 4,728,575

U.S. Patent 4,728,578

U.S. Patent 4,737,323

U.S. Patent 4,797,368

U.S. Patent 4,800,159

U.S. Patent 4,883,750

U.S. Patent 4,921,706

U.S. Patent 5,028,592

U.S. Patent 5,139,941

U.S. Patent 5,279,721

U.S. Patent 5,432,260

U.S. Patent 5,786,214

U.S. Patent 5,840,317

U.S. Patent 5,840,873

U.S. Patent 5,843,640

U.S. Patent 5,843,651

U.S. Patent 5,843,663

U.S. Patent 5,846,708

U.S. Patent 5,846,717

U.S. Patent 5,846,726

U.S. Patent 5,846,729

U.S. Patent 5,849,481

U.S. Patent 5,849,486

U.S. Patent 5,849,487

U.S. Patent 5,851,772

U.S. Patent 5,853,990

U.S. Patent 5,853,992

U.S. Patent 5,853,993

U.S. Patent 5,856,092

U.S. Patent 5,861,244

U.S. Patent 5,863,732

U.S. Patent 5,863,753

U.S. Patent 5,866,331

U.S. Patent 5,871,727

U.S. Patent 5,879,703

U.S. Patent 5,882,654

U.S. Patent 5,900,481

U.S. Patent 5,905,024

U.S. Patent 5,910,407

U.S. Patent 5,912,124

U.S. Patent 5,912,145

U.S. Patent 5,919,626

U.S. Patent 5,919,630

U.S. Patent 5,925,517

U.S. Patent 5,928,862

U.S. Patent 5,928,869

U.S. Patent 5,929,227

U.S. Patent 5,932,413

U.S. Patent 5,935,791

U.S. Patent 5,939,277

U.S. Patent 6,107,090

U.S. Patent 6,135,965
U.S. Patent 6,214,874
U.S. Patent 6,238,659
U.S. Patent 6,245,568
U.S. Patent 6,258,576
EPA No. 320,308
EPA No. 329,822
EPO 0273085
GB Application No. 2202328
GB Application No. 2193095 A
PCT Application No. PCT/US85/01161
PCT Application No. PCT/US87/00880
PCT Application No. PCT/US89/01025
PCT Application No. PCT/US89/05040;
PCT Application WO 88/10315
PCT Application WO 89/06700
WO 90/07641
WO 98/0748
WO 99/18933

Abbondanzo, *et al.*, Am J Clin Pathol., 93(5):698-702, 1990.

Abe, *et al.*, Neurosci Res., 38(4):325-9, 2000.

Aichele, *et al.*, J Exp Med., 171(5):1815-20, 1990.

Aksentijevich *et al.*, Hum Gene Ther., 7(9):1111-22, 1996.

Allred, *et al.*, Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13. Review.

Altman *et al.*, Science, 274:94-96, 1996.

Baichwal *et al.*, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: *Gene Transfer*, Kucherlapati, R., ed.,

Bajorin, *et al.*, J Clin Oncol., 6(5):786-92, 1988.

Bangham, *et al.*, J. Mol. Biol., 13:238-252, 1965.

Barany, *et al.*, "Solid-Phase Peptide Synthesis," In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meinhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 3-284, 1980.

Bevan, *et al.*, *Nature*, 342(6249):478-9, 1989.

Birner, *et al.*, *Mod. Pathol.*, 14(7):702-9, 2001.

Boussif *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92:7297-7301, 1995.

Brinton, *et al.*, In: N. Munoz, F.X. Bosch, K.V. Shah, and A. Meheus (eds.), *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus* (IARC Scientific Publications, 119), pp. 3-23. Lyon: Oxford University Press, 1992.

Brown, *et al.*, *Am J Vet Res.*, 51(9):1476-80, 1990.

Canfield *et al.*, *Methods in Enzymology*, 189, 418-422, 1990.

Capaldi, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

Casement, *et al.*, *Virology*, 211(1):261-7, 1995

Cason, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 50: 349-355, 1992.

Chang *et al.*, *Hepatology*, 14:134A, 1991.

Chen, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

Cheng, *et al.*, *Investigative Radiology*, vol. 22, pp. 47-55 (1987).

Clark *et al.*, *Human Gene Therapy*, 6:1329-1341.1995

Clave, *et al.*, *Diagn. Mol. Pathol.*, 9(3) 145-150, 2000.

Clerici, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 245-250, 1997.

Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.

Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.

Crowe, *et al.*, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 3(2):135-45, 1987.

da Costa, *et al.*, *Biocell*, 23(1): 65-72, 1999.

De Gruijil, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 77, 2183-2191, 1996.

De Jager, *et al.*, *Semin Nucl Med.* 1993 Apr;23(2):165-79. Review.

Deamer, *et al.*, in *Liposomes* (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (1983), pp. 27-52.

- Deres, et al., *Nature*. 1989 Nov 30;342(6249):561-4.
- Doolittle, et al., *Methods Mol Biol*. 1999;109:215-37. Review
- el Gorab, et al., *Biochim Biophys Acta*, 306(1):58-66, 1973.
- Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Felgner et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413-7, 1987.
- Feltkamp, et al., *Eur. J. Immunol.*, 23: 2242-2249, 1993.
- Fendler et al., *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975.
- Flotte et al., *Gene Therapy*, 2:29-37, 1995.
- Flotte, et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7:349-356, 1992.
- Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Fraley, et al., *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frohman, *PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990.
- Fujishima, et al., *Cytometry*, 24(4):382-9, 1996.
- Gabizon et al., *Cancer Res.*, 50(19):6371-8, 1990.
- Ghosh, et al., In: Wu G. Wu C ed., Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, New York: Marel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Gilliland et al., *Cancer Res.*, 40(10):3564-9, 1980.
- Gloeckner, et al., *J. Immunol. Methods*, 252(1-2):131-8, 2001.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- Graham, et al., *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Gregoriadis, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 89(4):1287-1293, 1979.

Gregoriadis, G., ed., *Liposome Technology*, vol. I, pp. 30-35, 51-65 and 79-107, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984.

Grunhaus, et al., *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.

Gulbis, et al., *Hum Pathol*. 1993 Dec;24(12):1271-85. Review.

Hamsikova, et al., *J. Infect. Dis.*, 170: 1424-1431, 1994

Hara et al., *Biochim Biophys Acta*, 1278(1):51-8, 1996

Harland, et al., *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.

Heath, et al., *Chem. Phys. Lipids*, 40:347, 1986.

Hermonat, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.

Hope et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 55-65, 1985.

Horwich et al. *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.

Irie, et al., *Lancet*, 1(8641):786-7, 1989.

Irie, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22):8694-8, 1986.

Jha, et al., *Lancet*, 341: 1116-1118, 1993.

Kadish, et al., *J. Natl. Cancer. Inst.* 89:1285-1293, 1997.

Kaplitt et al., *Nature Genetics*, 8:148-154, 1994

Kast, et al., *Immunol Lett.*, 30(2):229-32, 1991.

Kast, et al., *J. Immunotherapy*, 14: 115-120, 1993.

Kotin et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.

Koutsky, et al., *N Engl J Med*. 327(18):1272-8, 1992

Kurman, et al., *JAMA*, 271:1866-1869, 1994.

Kurman, et al., The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag. pp,30-43, 1994.

Kwack, et al., *Mol Cells*, 10(5):575-8, 2000.

LaFace et al., *Virology*, 162:483-486, 1988.

- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60:515-524, 1986.
- Lebkowski, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996, 1988.
- Liu *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1240(2):277-84, 1995.
- Lorenzato *et al.*, *J. Pathol.*, 194(2):171-6, 2001.
- Lorincz, *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 79: 328-337, 1992.
- Lukacher, *et al.*, *J Exp Med.*, 160(3):814-26, 1984.
- Luo *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:303A, 1994.
- Manning, *et al.*, *Biotechniques*, 6:682, 1988.
- Martin *et al.*, *Nature*, 345(6277):739-743, 1990.
- Mayer *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 858, pp. 161-168, 1986.
- Mayhew *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 775, pp. 169-174, 1984.
- Mayhew *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 149, pp. 64-77, 1987.
- McCarty *et al.*, *J. Virol.*, 65:2936-2945, 1991.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Mitchell, *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.*, 690:153-66, 1993.
- Mitchell, *et al.*, *J Clin Oncol.*, 8(5):856-69, 1990.
- Morrison, *et al.*, *Int J Cancer*. 49(1):6-13, 1991
- Morton, *et al.*, *Ann Surg.*, 216(4):463-82, 1992.
- Morton, *et al.*, *CA Cancer J Clin.*, 46(4):225-44, 1996.
- Munger, *et al.*, *J. Virol.*, 63: 4417-4421, 1989.
- Munoz, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 52: 743-749, 1992.
- Muzyczka, N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- Nakagawa, *et al.*, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3: 205-210, 1996.
- Nakagawa, *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 175: 927-931, 1997.
- Nehete *et al.*, *J. Clin. Immunol.*, 16:115-124, 1996.

Nehete, et al., *Cell Immunol.*, 160(2):217-23, 1995.

Nicolas, et al., In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 494-513, 1988.

Nicolau et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Ohi et al., *Gene*, 89:279-282, 1990.

Park, et al., *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 18: 171-175, 1992.

Parkin, et al., *Int. J. Cancer*, 84:827-841, 1999.

Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975.

Plenum Press, New York, pp. 117-148, 1986.

Poijak, et al., *J. Clin. Microbiol.* 37:796-797, 1999.

Potter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Ravindranath, et al., *Int Rev Immunol*, 7(4):303-29, 1991.

Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez R.L., Denhardt D.T., eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 467-492, 1988.

Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rosenberg, et al., *N Engl J Med.*, 319(25):1676-80, 1988.

Rossen, et al., *J Immunol.*, 135(5):3289-97, 1985.

Roux et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.

Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, N.Y., 1989.

Samulski et al., *EMBO J.*, 10:3941-3950, 1991.

Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989.

Sarkar, et al., *Viral Immunol.*, 8: 165-174, 1995.

Sastry, et al., *Vaccine*, 12(14):1281-7, 1994.

Sastry, et al., *Virology*, 188: 502-509, 1992.

- Seedorf, et al., *EMBO J.*, 6: 139-144, 1987.
- Shelling, et al., *Gene Therapy*, 1:165-169, 1994.
- Shepherd, et al., *J. Gen. Virol.*, 73: 1269-1274, 1992.
- Shinoda et al., *Colloidal Surfactant*, Academic Press, especially "The Formation of Micelles", Ch. 1, 1-96, 1963.
- Solodin et al., *Biochemistry*, 34(41):13537-44, 1995.
- Spanjer et al., *Biochim Biophys Acta*, 734(1):40-7, 1983.
- Stauss, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7871-7875, 1992.
- Strang, et al., *J. Gen. Virol.*, 71: 423-431, 1990.
- Stratford-Perricaudet, et al., In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenauer and M. Boiron, eds., John Libbey Eurotext, France, p. 51-61, 1991.
- Szoka, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:4194-4198, 1978.
- Tam, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- Templeton et al., *Nat. Biotechnol.*, 15(7):647-52, 1997.
- Thierry et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(21):9742-6, 1995.
- Tindle, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5887-5891, 1991.
- Tobery, et al., *J. Immunol. Methods*, 254(1-2):59-66, 2001.
- Tooze, J., ed., *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1991.
- Townsend, et al., *Cell*, 44:949-968, 1986.
- Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.
- Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:32581-3260, 1985.
- Tsukui, et al., *Cancer Res.*, 56: 3967-3974, 1996.
- Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Unanue, et al., *FASEB J.*, 13:2496-502, 1989.
- Von Knebel Doeberitz, et al., *Cancer Res.*, 48: 3780-3786, 1988.

Wagner *et al.*, *Mol. Cell* 40: 281-286, 1999.

Wallace, *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9:879, 1981

Walsh *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:7257-7261, 1994.

Wei *et al.*, *Gene Therapy*, 1:261-268, 1994.

Wettstein, *et al.*, In: H. Pfister (ed.), Papillomaviruses and Human Cancer, pp. 145.
Florida: CRC Press, 1990.

Wu, *et al.*, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.

Wu, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

Yang *et al.*, *J. Virol.*, 68:4847-4856, 1994.

Yoder *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:347A, 1994.

Zhou *et al.*, *Exp. Hematol. (NY)*, 21:928-933, 1993.

Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:1867-1875, 1994.

Zhu *et al.*, *Chin J Biotechnol*, 9(4):257-61, 1993.

Zur Hausen, *et al.*, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 186:131-156, 1994.

序列表

<110> SASTRY, K. JAGANNADHA
TORTOLERO-LUNA, GUILLERMO
FOLLEN, MICHELE

<120> 涉及 HPV 相关的癌前期的癌的生长（包括 CIN）的方法和组合物

<130> UTFC:560CN

<140> PCT/US02/23198

<141> 2002-07-13

<150> 60/306, 809

<151> 2001-07-20

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人乳头瘤病毒

<400> 1

Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人乳头瘤病毒

<400> 2

Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile

1

5

10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人乳头瘤病毒

<400> 3

Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg

1

5

10

<210> 4

<211> 15
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 4
Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 5
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 6
Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 7
Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 8
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
1 5 10 15
Cys Gln Lys Pro
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 9
Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg
1 5 10 15

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 10
Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 11
Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Glu Leu Gln
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 12
Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 13
Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu
1 5

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 14
Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
1 5 10 15
Lys Cys Asp

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 15
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 16
Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 17
Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 18
Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
1 5 10

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 19
Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
1 5 10 15

Cys Pro Ile Cys
20

<210> 20
<211> 151
<212> PRT
<213> 人乳头瘤病毒

<400> 20
Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150

<210> 21
 <211> 590
 <212> PRT
 <213> 人乳头瘤病毒

<400> 21

Met	Ser	Leu	Pro	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Val	Lys	Ile	Glu	Thr	Arg	Glu
1															

Arg Ile Trp Val Arg Arg Val Asn Gly Glu Thr Gly Val Tyr Asp Thr

20															
	25														

Arg Ala Gly Ser Phe Glu Thr Val Ser Cys Gln Glu Phe Glu Ala Ala

35															
	40														

Ala Asp Thr Val Pro Ser Val Pro Val Phe Cys Asp Arg Cys Phe Gly

50															
	55														

Thr Ser Leu Tyr Glu Val Pro Leu Thr Gly Phe Gly Thr Phe Val Val

65															
	70														

75

	80														
--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Gly Thr Cys Cys Ile Phe Ser Pro Gly Asp Pro Val Asp Asp Pro Ser

85															
	90														

95

Ile Pro Ala His Met Arg Lys Tyr Gln Gln Pro Ile Glu Ala His Gln

100															
	105														

110

Thr Met Val Gln Val Ala Pro Gly Thr Leu Lys Tyr Ser His Gln Ile

115															
	120														

125

Pro Met Gly Lys Val Leu Gly Tyr Trp His Val His Met Glu Asp Arg

130															
	135														

140

Val Tyr Leu Asn Met Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ser Glu Asp Thr Gly

145															
	150														

155

	160														
--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Lys Arg Cys Val Glu Thr Phe Thr Glu Ala Asp Ile Pro Cys Ala Leu

165															
	170														

175

Ser Leu Gly Thr Leu Asp Val Gly Leu Asn Glu Val Ile Leu Glu Cys

180															
	185														

190

Ser Val Val Val Ile Pro Ala Arg Arg Gly Cys His Ala Lys Leu Phe

195															
	200														

205

Thr Arg Asp Thr Val Ser Asp Gly Leu Glu Lys Phe Cys Phe Gln Ser

210															
	215														

220

His Ala Thr Leu Pro Pro Thr Leu Leu Ala Ser Phe Gly Ser Thr Ser

225															
	230														

235

	240														
--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Phe Tyr Glu Ala His Val Asp Ala Leu
 245 250 255

Asn Asn Tyr Ile Lys Leu Leu Arg Thr Ile Tyr Ser His Lys Gly Glu
 260 265 270

Thr Glu Ile Glu Gln Tyr Leu Ile Glu Gly Ser Lys Leu Tyr Ser Glu
 275 280 285

Leu Ile Gly Glu Pro Ser Arg Val Leu Asp Ala Thr Met Lys Ala Ala
 290 295 300

Gln Ile Ala Glu Pro Gln Thr His Thr Gly Gly Ala Asp Arg Gln Arg
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Pro Asp Gly Ile Pro Tyr Ser Val Pro Asp Arg Phe Pro
 325 330 335

Met Thr Gly Tyr Pro Phe Ala Pro Gln Phe Cys Gly Asp Pro Gly Leu
 340 345 350

Val Ser His Tyr Asn Pro Phe Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Gln Gly
 355 360 365

Tyr Gly Pro Glu Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Pro Gln Pro Pro Asn Pro
 370 375 380

Tyr Val Leu Pro Ile Ser Tyr Gly Gln Gln Pro Tyr Pro Gly His Pro
 385 390 395 400

Gln Pro His Gly His His Gln Gln Arg Ser Gly Gly Asp Leu Lys
 405 410 415

Ala Glu Leu Ile Glu Thr Leu Gly Leu Ala Pro Lys Thr Asn Ala Val
 420 425 430

Gln Glu Ser Leu Lys Ser Phe Ile Ser Glu Ile Leu Glu Ser Glu Leu
 435 440 445

Lys Asn Cys Gly Ile Lys Arg Ala Ala Gly Asn Ile Glu Arg Asn Cys
 450 455 460

Asp Val Asp Glu Glu Pro Pro Arg Thr Lys Arg Ala Arg Pro Glu Pro
 465 470 475 480

Lys Thr Ala Val Glu Ala Ile Val Arg Ala Pro Tyr Gly Asp Phe Asp
 485 490 495

Ser Thr Ala Leu Thr Thr Lys Ile Gly Gln Val Ser Asp Thr Val Glu
 500 505 510

Lys Leu Asn Lys Val Ile Glu Thr Leu Leu Thr Gln Ser Ser Ala Gln
 515 520 525

Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Gln Ala Ala Pro Val Gln Pro Ser
 530 535 540

Leu Pro Gln Pro Val Pro Glu Pro Leu Ala Pro Gln Glu Pro Pro Pro
 545 550 555 560

Pro Gly Thr Ser Ala Pro Thr Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gln Gln Lys
 565 570 575

Pro Val Val Ser Lys Gly Ala Phe Glu Thr Leu Met Asn Leu
 580 585 590

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 22

Ser Thr Arg Thr Pro Glu Asp Ser Asn Ser Leu Gly Thr
 1 5 10

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人乳头瘤病毒

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)

<223> M = A, C, 或 R

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)

<223> W = A 和 T

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (15)

<223> Y = C 和 T

<400> 23

gcmcagggwccataayaatgg

20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (6)
 <223> M = A, C, 或 R

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (8)..(9)
 <223> R = A 和 G

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (13)
 <223> W = A 和 T

<400> 24
 cgtccmarrg gawactgatc 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人乳头瘤病毒

<400> 25
 catacacctc cagcacctaa 20

<210> 26
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人乳头瘤病毒 16 型

<400> 26
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 27

<211> 151

<212> PRT

<213> 人乳头瘤病毒 16 型

<400> 27

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150

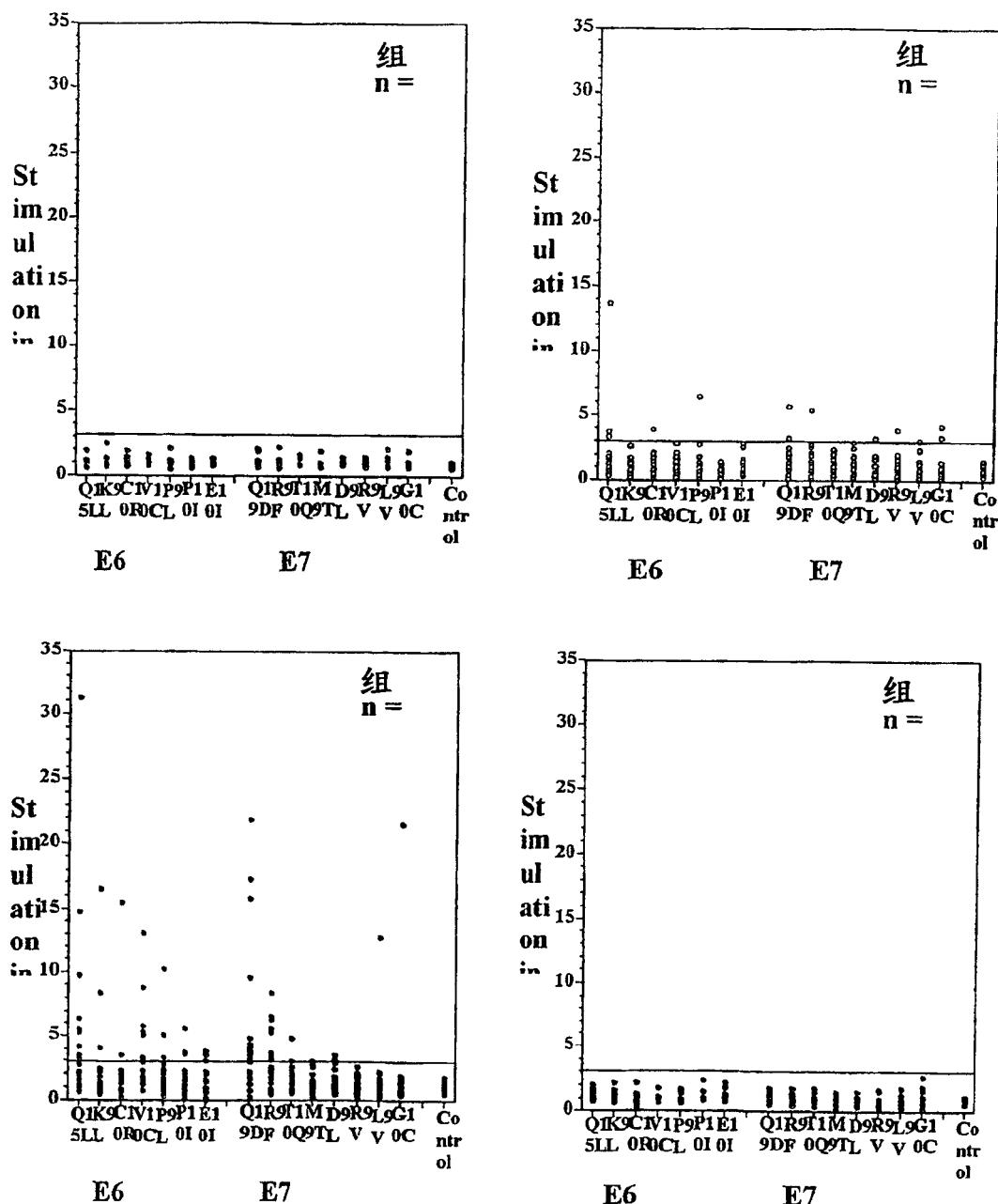


图 1A

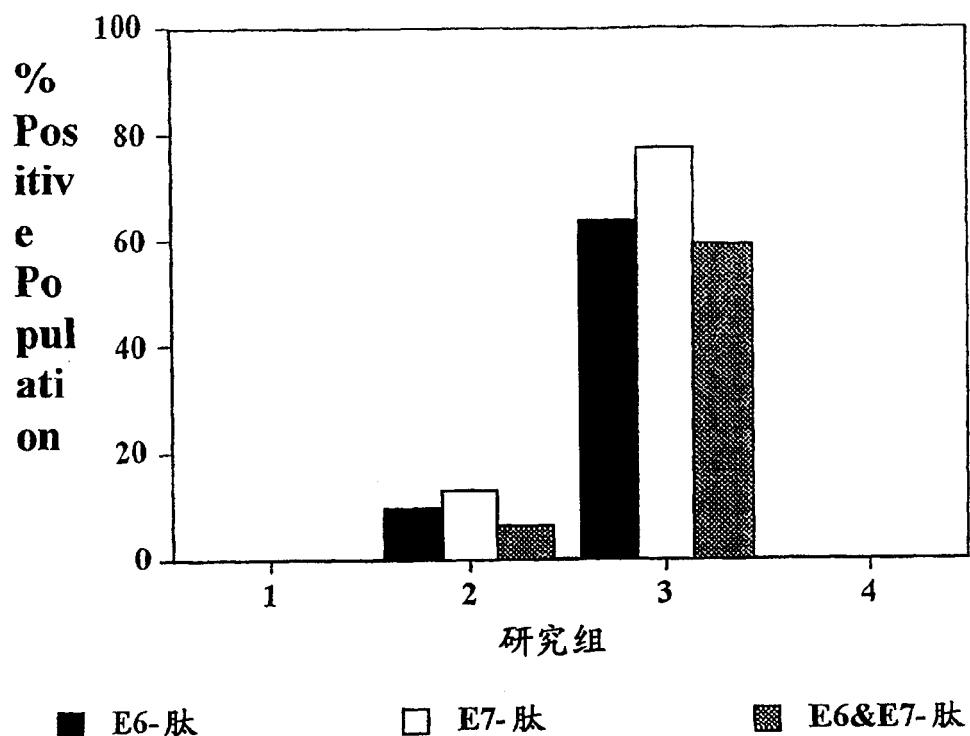


图 1B

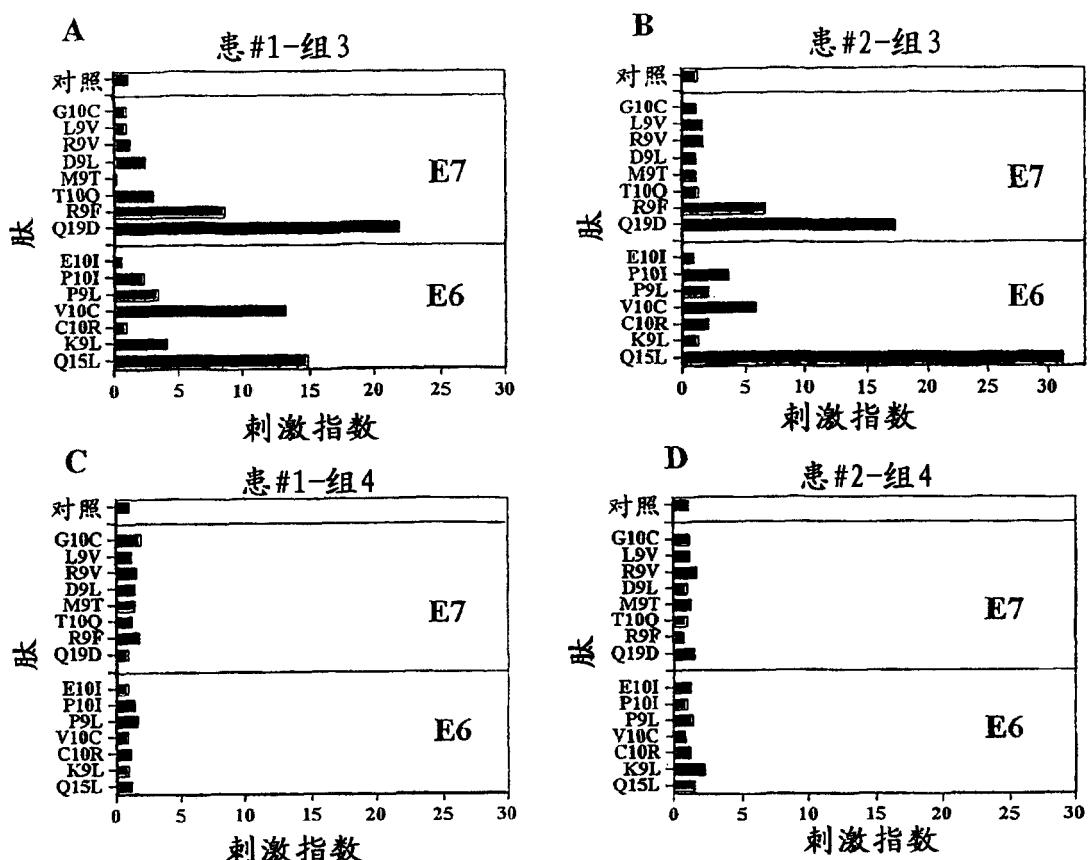


图 2

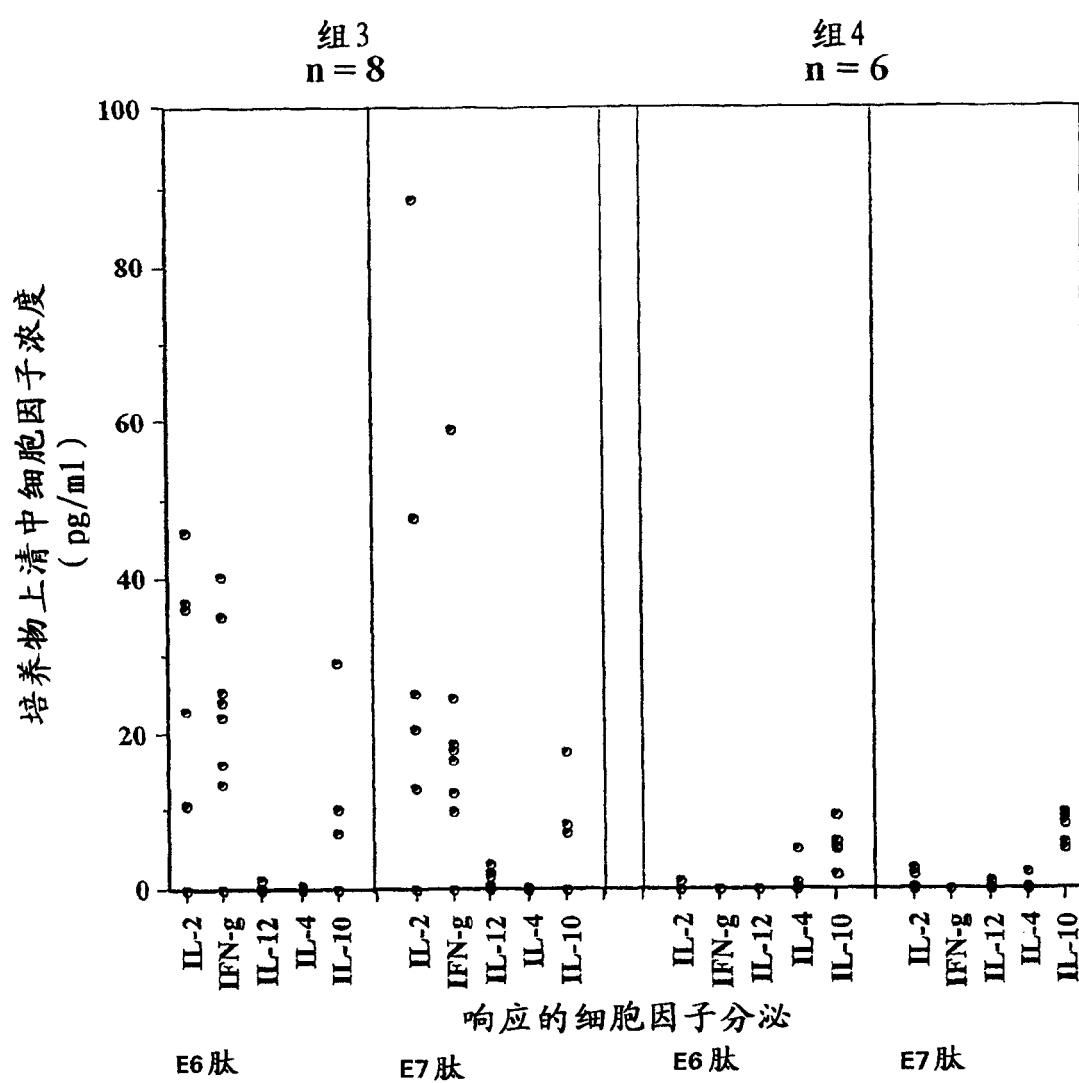


图 3

专利名称(译)	涉及HPV相关的癌前期的和癌的生长(包括CIN)的方法和组合物		
公开(公告)号	CN100335121C	公开(公告)日	2007-09-05
申请号	CN02818351.7	申请日	2002-07-19
申请(专利权)人(译)	得克萨斯大学体系董事会		
当前申请(专利权)人(译)	得克萨斯大学体系董事会		
[标]发明人	JK萨斯特里 M·弗伦		
发明人	J·K·萨斯特里 G·托特雷罗-露纳 M·弗伦		
IPC分类号	A61K38/04 A61P35/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 C07K14/025 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1 /70 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	C12N2710/20022 G01N33/6863 G01N33/56983 G01N33/571 G01N33/505 A61K2039/525 G01N2333 /025 C07K14/005		
代理人(译)	唐伟杰		
审查员(译)	柯珂		
优先权	60/306809 2001-07-20 US		
其他公开文献	CN1556863A		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及来自人乳头瘤病毒(HPV)的E6和E7肽的用途，用于评价感染HPV的患者体内的细胞介导的应答以确定该患者关于发生或复发包括子宫颈上皮内瘤(CIN)的癌前期或癌的生长的预测。

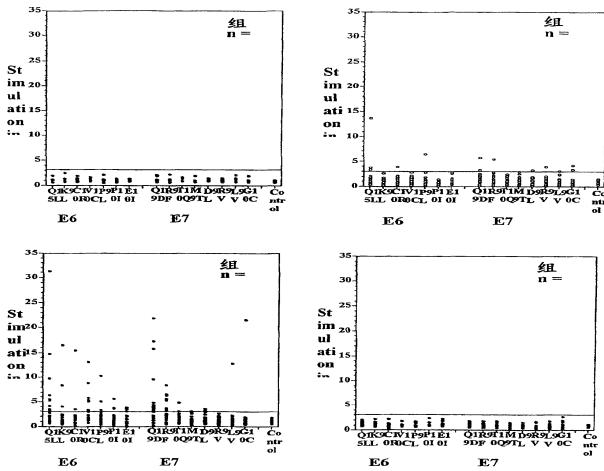


图 1 A