



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105021814 B

(45)授权公告日 2018.02.16

(21)申请号 201510413443.8

(22)申请日 2004.11.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105021814 A

(43)申请公布日 2015.11.04

(30)优先权数据
60/518,790 2003.11.10 US

(62)分案原申请数据
200480040183.4 2004.11.10

(73)专利权人 阿尔特生物科学公司
地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 S·A·普日思奇维 H·J·本蒙特
K·F·卡德 X·朱

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.
G12N 15/12(2006.01)

审查员 舒霏霏

权利要求书2页 说明书30页 附图19页

(54)发明名称

可溶性TCR分子及其用途

(57)摘要

本发明涉及可溶性TCR分子及其用途。具体地,本发明公开了一种非用于疾病诊断或治疗目的的检测含有p53肽抗原的细胞或组织的方法,所述p53肽抗原在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上,其中所述肽抗原为内源性抗原,该方法包括:固定所述细胞或组织;然后使所述细胞或组织与至少一种可溶性TCR分子或其功能性片段在使被提呈的p53肽抗原与可溶性TCR分子或其片段间形成特异性结合的复合物的条件下接触;之后洗涤和检测步骤。本发明具有高度灵敏度,且可用来检测与视需要定量非常低量的MHC/肽复合物。

1. 一种非用于疾病诊断或治疗目的的检测含有p53肽抗原的细胞或组织的方法,所述p53肽抗原在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上,其中所述肽抗原为内源性抗原,该方法包括:

a) 使细胞或组织与至少一种变性剂接触,从而固定所述细胞或组织;

b) 固定所述细胞或组织之后,使所述细胞或组织与至少一种可溶性TCR分子或其功能性片段在使被提呈的p53肽抗原与可溶性TCR分子或其片段间形成特异性结合的复合物的条件下接触,其中所述可溶性TCR分子或片段含有至少一个单链TCR,且其中所述单链TCR或片段进一步包含至少一个共价键结合的免疫球蛋白区域;

c) 在可移除任何未结合至被提呈的p53肽抗原的可溶性TCR分子或其片段的条件下洗涤所述细胞或组织;

d) 检测作为含有被提呈的p53肽抗原的细胞或组织的指示的所述特异性结合的复合物。

2. 如权利要求1的方法,其中所述细胞或组织进一步与至少一种阻断剂接触。

3. 如权利要求2的方法,其中所述方法进一步包括在步骤a) 前使所述细胞或组织与所述阻断剂接触,以降低可溶性TCR或片段与细胞的非特异性结合。

4. 如权利要求2的方法,其中所述阻断剂为过氧化物、血清蛋白质、抗体或其片段。

5. 如权利要求1的方法,其中所述方法进一步包括在与结合至复合物的可溶性TCR或片段互相竞争及特异性结合的条件下,使复合物与竞争型MHC分子或其片段接触。

6. 如权利要求5的方法,其中所有可溶性TCR或片段主要地结合至竞争型MHC分子或其片段以形成竞争型复合物。

7. 如权利要求6的方法,其中所述方法进一步包括检测所述竞争型复合物,及测定所述MHC分子或所述可溶性TCR的结合特异性。

8. 如权利要求5的方法,其中所述MHC分子或片段为单链。

9. 如权利要求5的方法,其中所述MHC分子或片段负载有所述p53肽抗原。

10. 如权利要求1的方法,其中所述方法进一步包括在列阵中放置多个细胞或组织。

11. 如权利要求10的方法,其中所述方法在含有细胞或组织的列阵的每一个要素中进行。

12. 如权利要求10的方法,其中所述方法基本上在所述列阵的每一个要素中同时进行。

13. 如权利要求10的方法,其中步骤d) 进一步包括扫描所述列阵,并产生指示所述特异性结合复合物存在的成像信号。

14. 如权利要求13的方法,其中步骤d) 进一步包括实时向使用者输出信号,并视需要地对所述成像信号的储存图像作索引。

15. 如权利要求1的方法,其中存在于细胞上的所述p53肽抗原的量小于100,000个拷贝。

16. 如权利要求15的方法,其中存在于细胞上的所述p53肽抗原的量小于400个拷贝。

17. 如权利要求1的方法,其中所述p53肽抗原为与肿瘤相关的肽抗原。

18. 如权利要求1的方法,其中所述细胞或组织为悬浮性。

19. 如权利要求1的方法,其中所述可溶性TCR分子或片段被可检测地标记。

20. 如权利要求19的方法,其中所述可检测的标记为生物素、链霉亲和素、酶或其催化

活性的片段、放射性核素、纳米粒子、顺磁金属离子或荧光、磷光或化学发光分子。

21. 如权利要求1的方法,其中可溶性TCR分子或片段为含有一共价键结合的免疫球蛋白区域或其片段的单链TCR。

22. 如权利要求21的方法,其中单链TCR或片段包含编码IgG1区域或其片段的序列。

23. 如权利要求1的方法,其中所述MHC复合物为HLA-A2限制性的。

24. 如权利要求1的方法,其中所述方法进一步包括对照组的进行以检测任何可溶性TCR或片段与不含p53肽抗原的细胞间的结合。

25. 如权利要求1的方法,其中所述被提呈的p53肽抗原为p53aa 149-157或p53aa264-272。

26. 如权利要求1的方法,其中所述方法是在活体外或试管内进行。

可溶性TCR分子及其用途

[0001] “本发明是申请号为200480040183.4,申请日为2004年11月10日,发明名称为“可溶性TCR分子及其用途”的中国专利申请的分案申请。”

技术领域

[0002] 本发明的特征为用于检测含有肽抗原的细胞或组织的组成物与方法,该肽抗原在MHC或HLA复合物作用下被提呈于细胞或组织上。

[0003] 本发明具有广泛的应用,包括提供用于检测癌细胞的高灵敏度方法。

[0004] 本案相关的前案资料

[0005] 本申请案主张2003年11月10日申请的美国临时申请案号60/518,790的优先权,此案名为“可溶性TCR分子及其用途”,且其全部内合并于此以资参考。

[0006] 美国政府利益的声明

[0007] 本发明的发现部分系来自美国政府的国家卫生研究院授权码1R43CA88615-01与1R43CA105816-01所提供。因此,美国政府具有某些权利参与此处所主张的本发明。

背景技术

[0008] 免疫治疗有可能为治疗癌症的方法,此为众人逐渐达成的共识。业已提出各种策略,包括以细胞激素(例如白介素-2(interleukin-2,IL-2))来治疗。IL-2对各种免疫细胞种类有所影响,包括T细胞、B细胞、单核球(monocyte)、巨噬球(macrophage)、经淋巴激素活化的杀手细胞(Lymphokine activated killer cell,LAK)与NK细胞[10,40]。

[0009] 已有建议在肿瘤处集中细胞激素以助于增加功效。典型方法包括对肿瘤直接注射细胞激素或编码该细胞激素的基因,或是藉由使细胞激素融合至肿瘤抗原特定抗体来将该细胞激素传递至标的[20]。然而,此等方法皆具有其缺点。

[0010] 举例而言,当肿瘤通常为小肿瘤(微转移(micrometastases))时,难以使用大多数直接注射的方法,尤其是在癌症初期。再者,此等方法通常费力且较无治疗成功的保证,这使大部分病患的治疗不合乎实际且价格昂贵。

[0011] 抗体-细胞激素融合的模式已被用于治疗癌症的方法中。然而,此方法的限制在于抗体具有受限的结合范围。意即,该抗体只能辨识某些细胞表面抗原。不幸的是,许多肿瘤抗原并不正确地展现抗体的辨识,因此依据此方法使抗体能力受到限制。再者,有报告指出许多肿瘤特定抗原衍生自细胞特定蛋白的异常表现。这仅可存在于少部份的肿瘤类型,此缺点使根据治疗甚至更进一步的抗体能力受到限制。

[0012] 此有报告指出p53蛋白在周期的G1/S期藉由阻止异常细胞而扮演细胞内肿瘤抑制的角色。咸信此蛋白的过度表现系为大多数人类恶性肿瘤的重要肿瘤标志,且已有共识其为肿瘤免疫治疗为主的大范围的良好标的。p53蛋白通常在有主要组织相容性复合物蛋白(MHC)的细胞的表面上展现。此等蛋白复合物已知为T细胞受体(TCRs)的结合标的[49]。

[0013] 过去曾企图使用某些TCRs来检测有胜肽的MHC/胜肽复合物(EpeI et al.,2002;HoIIer et al.,2003;Lebowitz et al.,1999;PIaksin et al.,1997;Wataya et al.,

2001;O'Herron et al.,1997)。然而,彼等与相关的方法皆具有重大的缺失。

[0014] 举例而言,许多需要多元体(multimerize)TCR模型的方法(即设计成具有多个TCR复本)推测能增强肽抗原以人为的方式与肽抗原结合。标的(抗原提呈)细胞常藉由表现相对大量的肽抗原的方法予以使用。有时肽抗原的密度高达 10^4 至 10^5 复合物/细胞(Wataya et al.,2001)。咸信此等高肽抗原密度能增进结合与藉由TCR的检测。然而,此等含量的肽抗原系为人造,且通常较包括大部份肿瘤相关抗原(TAAs)的MHC/肽复合物的含量为高。对于一些TAAs而言,存在小于约50HLA/肽复合物/细胞(Pascolo et al.,2001;Schirle et al.,2000)。因此,已了解到仅管不全是TAA,先前方法没有足以检测大部份的灵敏度。

[0015] 已企图使用某些TCRs来检测表现特定肽抗原的细胞。譬如依据许多抗原为主的方法,此等方法缺乏足够检测肽抗原的灵敏度,或无法完全检测此等抗原。

[0016] 举例而言,HoIIer等人于2003年某些可溶性TCRs的发展报告指出其可与MHC/肽复合物发生反应。虽然TCRs能检测具有以人造方式“装填”抗原的细胞的抗原,但该分子无法检测肿瘤细胞的内源性抗原。HoIIer等人的结论认为当抗原存在的密度小于600复本/细胞时,TCR为主的方法不灵敏或不足以检测抗原。

[0017] 尤其TCR为主的方法曾被用来检测在MHC环境中的病毒肽(Strominger等人的W09618105)。然而,彼等与相关方法有其缺点。例如,一般了解病毒感染常制造异常高密度的MHC/肽复合物,通常接近 >1000 至 $>10^5$ 复合物/细胞。请参见Herberts et al.,2001;van EIs et al.,2000。因此像许多其它肽抗原检测方法、检测病毒抗原用的TCR为主的方法非常仰赖针对处理该检测方法的相对大量的抗原。

[0018] 虽然一些TCR为主的方法曾被用来检测相对大量的肽抗原,但无法确定当TCR与其它分子(例如激素、譬如IgG免疫球蛋白区域、抗生物素(biotin)、链霉生物素(streptavidin))融合时该分子是否发生作用。因此,无法确定所产生的融合分子将如何影响TCR肽结合槽(TCR peptide binding groove),尤其是当需要分析低密度TAA时。虽然TCR肽结合槽中有小的形变,但是当分析相对大量的肽抗原时,可降低TAA结合特异性与选择性,此并非必要的问题。甚至TCR肽结合槽功能有小的变化才可能危及表现低密度TAA的癌细胞检测。

[0019] 具有灵敏度、选择性、再生性的检测TAAs的方法系为有助益性,尤其当该肽抗原以低密度存在时。倘若此等方法可与各种可溶性TCRs(包括譬如融合成可检测标定的分子或细胞激素)使用乃为特别有助益性。

发明内容

[0020] 本发明通常涉及检测含有肽抗原的细胞或组织的方法,该肽抗原在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上。在一具体实例中,本发明包括下列步骤的至少一个,较佳为包括下列所有步骤:

[0021] a) 使该细胞或组织与至少一种可溶性TCR分子或其功能性片段在使该被提呈的肽抗原与可溶性TCR分子或其片段间形成特异性结合的复合物的条件下接触,

[0022] b) 在可移除任何未结合至该被提呈的肽抗原的可溶性TCR分子或其片段的条件下洗涤所述细胞或组织;

[0023] c) 检测作为含有被提呈的抗原的细胞或组织的指示的所述特异性结合的复合物。

[0024] 在较佳的操作中,本发明用来检测小于100000拷贝的细胞或组织上肽抗原的量,较佳为约于1000拷贝,譬如约100至约800拷贝。

[0025] 使用本发明具有若干优点,举例而言,本发明有高度灵敏度,且可用来检测与视需要定量非常低量的MHC/肽复合物,包括含有内源性肽,更较为提呈于未经处理的肿瘤细胞上的肿瘤相关肽抗原。相对地,用于检测MHC/肽复合物的先前技术指出具有检测相对高密度复合物的能力。

[0026] 另外,本发明可用来检测与视需要定量经固定的细胞和组织,例如此等常规地发现于组织生物列阵(hitsoarray)(例如肿瘤组织生物列阵)的细胞和组织。有检测MHC/肽复合物的能力(有时称为“染色”)系为优点,尤其是在临床或其它医学环境中,此环境一般操作经固定的细胞、组织或其它来自病患的生物样品。相反地,许多先前以TCR为主的检测方法无法容纳经固定的组织,此乃由于该组织操作步骤中,常规地遗失非共价结合的肽。

[0027] 本发明又进一步提供好处。举例而言,该方法企图在使用单元体与/或多元体的可溶性TCR分子仍有适应性与兼容性。不幸的是,过去的操作倚重具有有限的适应性与灵敏度的多元体TCRs的使用。尤其是,此等多元体TCRs可能难以用于活体内影像,此乃由于它们本身降解或凝集的潜在性、缺乏辅助至标的位置、增加免疫的产生与清除。

[0028] 本发明的操作着重长期需要的范畴,系藉由提供检测提呈于MHC/肽复合物环境中细胞表面上的内源性肽抗原的能力。此方法具有各种重要的用途,例如帮助监控细胞活性、病理与感染。举例而言,藉由本发明来检测细胞或组织上内源性肿瘤相关的肽抗原,可提供检测与视需要定量癌症的存在/程度的方法。过去的操作常仰赖抗体做为诊断工具以检测癌细胞表面上的蛋白抗原。然而,抗体通常受限于细胞膜蛋白的检测。另外,由于抗原遮蔽或抗原蛋白分泌至循环系统中常使利用抗体的检测被影响。抗体亦具有受限的标的辨识。本发明的操作避免彼等与其它困难,系藉由提供灵敏且可靠的使用可溶性TCRs及其片段的检测方法检测标的肽抗原。

[0029] 可使用本发明此等用途与优点以检测各种环境的胜汰抗原,包括活体内(例如,成像或诊断方法)或活体外(例如,组织生物晶偶或FACS分析法)。

[0030] 本发明的其它态样如下所述。

附图说明

[0031] 第1A图至第1B图显示264scTCR/IL-2融合蛋白的图标结构(第1A图)与胺基酸序列(第1B图)。

[0032] 第2图为尺寸筛选凝胶(sizing gel),系显示经转染CHO细胞的264scTCR/IL-2融合蛋白的制造。

[0033] 第3A图至第3C图显示264scTCR/IL-2融合蛋白的TCR部分的MHC/胜汰结合能力的图表。

[0034] 第4A图至第4B图显示264scTCR/IL-2融合蛋白的IL-2部分的IL-2受体结合能力的图表。

[0035] 第5A图至第5B图显示264scTCR/IL-2融合蛋白生物活性的图表。

[0036] 第6A图至第6D图显示264scTCR/IL-2融合蛋白所媒介的CTLL-2细胞与经胜汰装载的T2细胞的结合的图表。

- [0037] 第7A图至第7C图为显示264scTCR/IL-2融合蛋白的血清半衰期的图表。
- [0038] 第8图为显示以264scTCR/IL-2融合蛋白使肿瘤细胞染色的图表。
- [0039] 第9图为显示264scTCR/IL-2融合蛋白的抗肿瘤效果的图表。
- [0040] 第10A图至第10B图为图表,系显示以非特定p53胜汰装载的T2细胞的染色结果(第10A图);或是以具有264scTCR试剂的特定p53胜汰装载的T2细胞的染色结果(第10B图)。
- [0041] 第11A图至第11D图为显示以各种264srTCR试剂和二级试剂使肿瘤细胞染色的图表。
- [0042] 第12A图至第12B图为在有或无另外竞争型可溶胜汰-MHC分子(以264-Tet所标定)时,显示以264scTCR/IgG1和CMVscTCR/IgG1(对照组)试剂使经固定A375细胞(第12A图)或T2细胞(第12B图)染色的图表。
- [0043] 第13图一系列的图片,显示以264scTCR/IgG1和CMVscTCR/IgG1融合蛋白使A2与p53抗原的经固定肿瘤细胞(A375、HT29与Saos2)染色的图案。
- [0044] 第14图为显示T2细胞与264scTCR/BirA四元体反应的定量染色的图表。
- [0045] 第15图为显示T2细胞与264scTCR/IgG1融合蛋白反应的定量染色的图表。
- [0046] 第16图为随着经装载p53胜汰的量增加,显示与264scTCR/BirA四元体或264scTCR/IgG1融合蛋白发生反应的复合物/细胞的数目的图表
- [0047] 第17A图至第17B图为显示A375肿瘤细胞与264scTCR/BirA四元体(第17A图)或264scTCR/IgG1(第17B图)融合蛋白发生反应的定量染色的图表。
- [0048] 第18图为显示三个肿瘤细胞株与264scTCR/BirA四元体发生反应的定量染色(复合物/细胞的数目)的图表。
- [0049] 第19图显示如第18图,三个肿瘤细胞株与264scTCR/IgG1融合蛋白发生反应的定量染色的图表。
- [0050] 第20图为三张200放大倍率下的图片,系显示以二级抗体、CVMscTCR/IgG1(对照组)或264TCR/IgG1融合蛋白使A375肿瘤细胞染色的经固定区域。
- [0051] 第21图为三张400放大倍率下的图片,系显示第20图的肿瘤区域。

具体实施方式

[0052] 如上所讨论,本发明通常涉及检测含有胜汰抗原的细胞或组织的方法,该胜汰抗原在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上。在一具体实例中,本发明包括使该细胞或组织与至少一种可溶性TCR分子或其功能性片段在使该被提呈的抗原与该可溶性TCR分子或其片段间形成特异性结合的复合物的条件下接触;在可移除任何未结合至被经提呈的抗原的可溶性TCR分子或其片段的条件下洗涤所述细胞或组织;以及检测作为含有被提呈的抗原的细胞或组织的指示的所述特异性结合的复合物。

[0053] 一般而言,目前可溶性TCRs的制备可藉由本文所揭示的程序以及藉由已习知的DNA重组技术来完成。举例而言,质体DNA的制备、以限制(restriction enzyme)将DNA做剪切、DNA的结合(ligation)、将dna导入细胞中、培养细胞,及单离与纯化经表现蛋白(expressed protein)系为已习知的技术。通常参见Sambrook等人的Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版,1989年);与Ausubel等人的Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York(1989)。

[0054] 各种可溶性TCR构造的一般结构与制造方法及其用途,系揭示于审查中的美国专利申请案第08/813,781和08/943,086号。

[0055] 与例而言,特定的可溶性TCR为异二元体(heterodimer),其中至少一个V链(较佳为两个V链)的穿膜序列(transmembrane sequence)被删除。然而为了方便,常将其较佳地以单链(“sc-”)构造来使用,例如此等由审查中的美国专利申请案第08/813,781和08/943,086号所报导者。

[0056] 简单地讲,单链(“-sc”)TCR分子包括V- α 与V- β 链,两者透过合适的连接序列共价地相连。举例而言,V- α 链可透过合适的连接序列共价地连接至V- β 链,此连接序列系将V- α 链的C端与V- β 链的N端融合。该sc-TCR融合蛋白的V- α 与V- β 链长度通常约200至400个氨基酸,较佳长度为约300至350个氨基酸,且为自然发生的TCR的V- α 与V- β 链的至少90%相同,较佳为100%相同。术语“相同”意指V- α 或V- β 链的氨基酸与相对应的自然发生的TCR的V- α 或V- β 链有100%系为同源(homologous)。

[0057] 如08/943,086号的申请案所揭示,sc-TCR分子的V- α 链进一步包括融合至V- β 链的C端的C- β 链或其片段。再者,该V- α 链超包括融合至V- α 链的C端的C- α 链或其片段,与该连接序列的N端。一般而言,此等包括C- β 链片段的融合蛋白,该片段具有约50至130氨基酸的长度,且通常不包括C- β 链的最后的半胱氨酸(cysteine)残基(在老鼠的第127个氨基酸位置或在人类的第131个氨基酸位置)。此等包括C- α 链片段的融合蛋白,其长度可于约1至90个氨基酸间(即该C- α 链最多但不包括后最后的半胱氨酸)。举例而言,在一具体实例中,包括C- α 链片段的融合蛋白,从第1至72个氨基酸开始的约1至72个氨基酸间。另一具体实例中,该C- α 链片段在从第1至22个(白胺酸(Leucine))氨基酸开始的约1至22个氨基酸间。该C- α 链片段通常不包括任何半胱氨酸残基,除了包括2个半胱氨酸残基的C₉₀变体与包括1个半胱氨酸残基的C₇₂变体。在大部分的实例中,C α 与C β 链长度的选择将藉由好几个变量予以控制,包括经选择与意图用在可溶性融合蛋白分子的特定V链。

[0058] 如申请案08/943,086进一步所揭示,本发明的其它sc-TCR分子部分系包括,举例而言,两个连接子序列,其中第一连接子序列在V- α 链的C端与V- β 链的N端间予以融合。V- β 链的C端可融合成为C- β 链的N端片段。第二连接子再融合成为V- β 链或C- β 链片段的C端,或若有需要融合成为下述标记分子。在其它例示性具体实施例中,sc-TCR分子可透过适当的连接子将V- β 链融合成为V- α 链而予以制造,其中其V- β 链或C- β 链片段的C端及V- α 链的N端可共价连接。

[0059] 本发明的可溶性TCR蛋白可包括一个或一个以上的融合蛋白标记。在此类“可检测性”标记的具体实施例中,该可溶性TCR将称为“可检测的标志”,举例而言,关于可溶性融合蛋白,蛋白标记可融合成为sc-TCR的V- β 链(或C- β 链片段)的C端。若有需要,此等可溶性TCR蛋白可融合成为审查中的专利申请案08/943,086所发表的免疫球蛋白链,进一步说明于如下的实施例。

[0060] 用于本发明的较佳可溶性融合蛋白系有完整功能与可溶性。术语“有完整功能”或相似术语意指特别与配位体(Ligand)相连的融合蛋白。检测此等特定蛋白用的分析法系揭露于本文,并包括标准免疫墨点技术,例如西方墨点法。此等可溶性TCRs的功能性片段能以相对应具有全长TCR的亲和性的至少70%,较佳为约80%至90%或更多,来连接抗原,系由西方墨点法或表面电浆共振(Surface Plasma Resonance)分析法来决定。

[0061] 合适TCR链的核酸与蛋白序列已被揭示,请参见,例如Fundamental Immunology, (1933)第三版,作者W.Paul,出版社Rosen Press股份有限公司,纽约;以及Kabat,E.A.等人的(1991)Sequences Interest Public Health Services,National Institutes of Health亦请参见审查中的专利申请案08/813,781与08/943,086,以及如下的实施例。

[0062] 本发明的特定具体实施例,进一步包括使该细胞或组织与至少一种阻断剂接触的方法。该接触步骤可于该方法中任何一个时间点予以进行,包括步骤a)的前、期间或的后,以降低该可溶性TCR或其片段与该细胞之间的非特异性结合。几乎任何阻断剂皆适用于本发明,举例而言,过氧化物、血清蛋白、抗体或抗原-结合其片段。

[0063] 在某些具体实施例中,确认TCR与MHC复合物的结合特异性常有利于检测细胞或组织。在此等例子中,本发明可进一步包括在与结合至特定复合物(形成于可溶性TCR与被提呈于细胞或组织上的MHC复合物之间)的可溶性TCR或其片段互相竞争或特异性结合的条件下,使该复合物与竞争型MHC(或HLA)分子或其片段接触。已揭露各种可溶性的MHC分子。

[0064] 此方法的一具体实施例中,藉由添加MHC分子或其片段来降低或基本上排除该可溶性TCR或其片段的特异性结合,使得该可溶性TCR或其片段结合至该竞争型MHC分子或其片段以形成竞争型复合物。此方法的一特定具体实施例中,该竞争型MHC分子所添加的浓度范围为该可溶性TCR莫耳浓度的0.01至1000倍,或较佳为1至100倍。在另一具体实施例中,该竞争型MHC分子所添加的单一浓度(例如该可溶性TCR莫耳浓度的1倍、10倍或100倍)系足以降低该可溶性TCR特异性结合。倘若有需要,藉由习知方法的一者或组合可检测竞争型复合物及测定MHC分子或可溶性TCR的特异性结合。特定MHC分子或其片段可为单链,但在大部分例子中将为可溶性的异质双体(heterodimeric)分子,例如此等系揭示于美国专利第5,869,270、6,309,645号以及审查中的申请案号为09/848,164。请参见另外揭示于PCT申请案第PCT/US95/09816号,以及下述所提供的实施例。典型的MHC分子或其片段将负载抗原。

[0065] 请参见下列已公开的美国专利申请案,其揭露用于本发明操作上的其它相关可溶性TCR和MHC分子:20020198144、20020091079、20020034513、20030171552、20030144474、20030082719及其所引用的参考资料。

[0066] 在所欲的特异性结合构形的典型方法中,以可检测方式标记该TCR分子或其片段的一或多个卷标。合适的卷标包括EE或myc抗原决定位置(epitope),其系藉由市售可获得的单株抗体来进行特异性地结合。一般而言,许多抗原决定位置具有与抗体特异性结合的能力,举例而言,能做为蛋白质卷标的单株抗体。其它适当的合成物质包括,此等具有能特异性结合该分子的结合抗体。此卷标系进一步包括具有肠激酶(enterokinase)、第10a因子(Factor Xa)、蛇毒(snake venom)或凝血剪切位置。请参见,例如已公开的PCT申请案W096/13593。

[0067] 其它以可检测方式标记TCR分子或其片段的合适卷标,系包括生物素(biotin);链霉亲和素(streptavidin);例如源自植物或细菌的细胞毒素,譬如白喉毒素(diphtheria toxin,DT)、志贺菌毒素(shiga toxin)、霍乱毒素、蓖麻毒素(ricinI)、肥皂草毒素(saporin)、绿浓杆菌外毒素(pseudomonas exotoxin,PE)、商陆木抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein)或细胞毒素(geIonin)。此技术领域已知的此等毒素的生物活性片段包括,举例而言,白喉毒素A链和蓖麻毒素A链。另外,该毒素可为对该细胞表面翻有活性的试剂,例如磷脂(phospholipase)(譬如磷脂C)。请参见,例如Moskaug等人的

J. BioI. Chem., 264, 15709 (1989); Pastan 等人的 CeII, 641, 1986; Pastan 等人的 Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem., 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" OIsnes 和 Phil, Ther., 25, 355; 已公开的 PCT 申请案 W0 94/29350 号; 已公开的 PCT 申请案 W094/04689 号; 以及用于揭示关于含有作用细胞 (effector) 或卷标的蛋白质的制作与使用的美国专利第 5,620,939 号。扮演生物素受体功能的卷标实例为 BirA tag, 如 Beckett, D 等人的 Protein Sci. 1999 Apr; (4): 921-9 所述。进一步描述于下述的实施例中, BirA 卷标的序列可包涵于 TCR 分子中以促进蛋白质的生物素化 (biotinylation)。再者, 卷标可为化学治疗药物, 举例而言, 长春地辛 (vindesine)、长春地碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、阿霉素 (adriamycin)、博莱霉素 (bleomycin) 或顺铂 (cisplatin)。

[0068] 另外, 卷标可为放射性核素 (radionuclide) 或螯合物 (chelate), 适于诊断或成像研究用者, 举例而言, 碘-131, 钷-90, 铯-188, 碘-133, 铟-111, 镓-99m, 镓-67, 铊-201, 或铋-212。所使用者中, 最适于定位为伽玛 (gamma)-发射器、正子-发射器、x-射线发射器和荧光发射器, 然而亦可使用贝它 (beta)-发射器和阿尔发 (alpha)-发射器。其它适用于本发明方法的放射性同位素包括, 但不限于此, 镅-109, 铷-225, 铷-227, 铷-211, 碘-125, 碘-126, 碘-133, 镱-165, 镱-166, 铋-212, 铋-213, 溴-77, 铟-113m, 镓-67, 镓-68, 钷-95, 钷-97, 钷-101, 钷-103, 钷-105, 汞-107, 汞-203, 铯-186, 铯-188, 碲-99m, 碲-121m, 碲-122m, 碲-125m, 铊-165, 铊-167, 铊-168, 氟-18, 银-111, 铂-197, 钷-109, 铜-67, 磷-32, 磷-33, 钷-90, 钷-47, 钷-153, 镱-177, 铊-105, 镱-142, 镱-143, 铊-149, 铊-161, 钷-166, 金-198, 金-199, 钷-57, 钷-58, 钷-51, 铁-59, 硒-75 和 铊-169。较佳为放射出 10 至 5000 (千电子伏) 范围的放射性同位素, 更佳为放射出 50 至 1500 千电子伏范围的放射性同位素, 最佳为放射出 50 至 500 千电子伏范围的放射性同位素。

[0069] 适当的正子发射器 (positron emitters) 与其它有用的放射性核种 (radionuclides), 包括但不限于 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{63}Zn 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{76}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{110}In 、 ^{120}I 、 ^{124}I 、 ^{122}Xe 、 ^{128}Ba 、 ^{131}Ba 、 ^7Be 、 ^{204}Bi 、 ^{205}Bi 、 ^{206}Bi 、 ^{14}C 、 ^{36}Cl 、 ^{48}Cr 、 ^{51}Cr 、 ^{155}Eu 、 ^{153}Gd 、 ^{66}Ga 、 ^{72}Ga 、 ^3H 、 $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 ^{189}Ir 、 $^{191\text{m}}\text{Ir}$ 、 ^{192}Ir 、 ^{194}Ir 、 ^{55}Fe 、 ^{59}Fe 、 $^{119\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{42}K 、 ^{226}Ra 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{46}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{72}Se 、 ^{105}Ag 、 ^{22}Na 、 ^{24}Na 、 ^{89}Sr 、 ^{35}S 、 ^{38}S 、 ^{177}Ta 、 ^{96}Tc 、 ^{201}Tl 、 ^{202}Tl 、 ^{113}Sn 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{121}Sn 、 ^{166}Yb 、 ^{174}Yb 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{62}Zn 和 ^{65}Zn 。

[0070] 适当的螯合剂 (chelate) 包括但不限于, 二伸乙三胺五醋酸 (DTPA)、4,7,4,10-四醋酸 (DOTA)、经取代的 1,4,7,-三羧基甲基 1,4,7,10-四氮杂环十二烷三醋酸 (D03A)、伸乙二胺四醋酸 (EDTA) 及 4,8,11-四氮杂环四癸烷-1,4,8,11-四醋酸 (TETA)。其它的螯合配位体为伸乙基二-(2-羟基-苯基甘氨酸) (EHPG) 及其衍生物, 包括 5-Cl-EHPG、5-Br-EHPG、5-Cl-EHPG、5-Me-EHPG、5-t-Bu-EHPG 和 5-二叔丁基-EHPG; 苯并二伸乙三胺五醋酸 (benzo-DTPA) 及其衍生物, 包括二苯并-DTPA、苯基-DTPA、二苯基-DTPA、苯甲基-DTPA 与二苯甲基-DTPA; 二-(2-羟基苯甲基)-伸乙基-二胺二醋酸 (HBED) 及其衍生物; 含有至少 3 个碳原子, 较佳为至少 6 个碳原子, 和至少 2 个杂原子 (O 与/或 N) 的巨环化合物种类, 该巨环化合物可由与杂环元素相连接的一环或二或三环所组成, 例如, 苯并-DOTA、二苯并-DOTA 和 苯并-NOTA, 其中 NOTA 为 1,4,7-三氮杂环壬烷 N', N'', N'''-三醋酸; 苯并-TETA、苯并-DOTMA, 其中 DOTMA 为 1,4,7,10-四氮杂环四癸烷-1,4,7,10-四(甲基四醋酸); 以及 苯并-TETMA, 其中 TETMA 为 1,4,8,11-四

氮杂环四癸烷-1,4,8,11-四(甲基四醋酸);1,3-伸丙二胺四醋酸(PDTA)和三伸乙四胺六醋酸(TTHA)的衍生物;1,5,10-N,N',N"-三(2,3-二羟基苯甲醯基)-三儿茶酸(LICAM)和1,3,5-N,N',N"-三(2,3-二羟基苯甲醯基)胺基甲基苯(MECAM)。

[0071] 其它适当的卷标包括聚组胺酸、荧光卷标、化学发光卷标、核磁共振活性卷标、发色基(chromophore)卷标、可藉正子发射造影(PET)扫描仪检测的正子发射同位素、性卷标例如 β -半乳糖和过氧化氢(包括山葵过氧化氢)、纳米粒子、顺磁金属离子(paramagnetic metal ion)、显影剂(contrast agent)或抗原决定卷标(antigenic tag)。

[0072] 适当的荧光卷标可包括但不限于, ^{152}Eu 卷标、荧光卷标、异硫氰酸(isothiocyanate)卷标、若丹明卷标、藻红蛋白卷标、藻蓝蛋白卷标、别藻蓝蛋白(allophycocyanin)卷标、邻苯二甲醛卷标(o-phthaldehyde)卷标、德州红(Texas Red)卷标、荧光胺卷标、镧系磷光卷标、荧光蛋白卷标例如绿色荧光蛋白(GFP)卷标、或量子点卷标。化学发光卷标包括鲁米那(Luminal)卷标、异鲁米那卷标、芳族啉酯(acridinium ester)卷标、咪唑卷标、啉盐卷标、草酸酯卷标、荧光素(Luciferin)卷标、荧光卷标、水母荧光蛋白(aequorin)卷标等。

[0073] 适当的顺磁金属离子包括但不限于, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Ti^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 、 Pa^{4+} 和 Eu^{2+} 。

[0074] 可利用的卷标包括任何可轻易检测活性或基质者。此等包括马来酸去氢、葡萄球菌核酸、 δ -5-类固醇异构、醇类去氢、甘油磷酸去氢、磷酸丙糖异构、过氧化、碱性磷酸、天门冬醯胺、葡萄糖氧化、 β -半乳糖、核糖核酸、尿素、抗氧化、葡萄糖-6-磷酸去氢、葡萄糖淀粉、乙醯胆碱酯化、荧光素和DNA聚合。

[0075] 适当的纳米粒子包括但不限于,固体胶体粒子、分枝状分子(dendrimer)、脂质体(liposome)、微纤维(micelles)、陶瓷粒子、铝胶囊、乳化蜡或Brij 72粒子、铁磁(ferromagnetic)粒子、金或银粒子、可生物降解粒子包括聚(乳-共-甘醇)酸(poly(lactic-co-glycolic) acid)、聚甘醇酸、聚D-或L-乳酸、聚己内酯或血清白蛋白,以及包含聚(乙烷基咯烷酮)、聚苯乙烯、聚丙烯乙醯胺或聚(氰基丙烯酸丁酯)或其衍生物的粒子。在本发明一些应用中,纳米粒子上可使用试剂予以覆盖,例如聚伸乙二醇、多醣、聚、脂质、氧化硅等。此等经覆盖的纳米粒子可具有经改良的吸收值、可生物利用性、组织分散性、组织交叉反应性、毒性、药物动力学或肿瘤定位。已揭示使标的配位体接触纳米粒子的方法,其可应用于以可溶性TCR为主的药剂(请参见,例如,Nob et al.2004.J Pharm Sci.93:1980-92)。

[0076] 本发明的可溶性TCRs包括单体的和多体的TCRs。多体的TCR分子包括融合至促进多聚化(multimerization)的聚区域或卷标的TCR蛋白。此区域包括可促进蛋白质二聚体化(dimerization)的免疫球蛋白、亮氨酸拉炼区域(leucine zipper)、螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)及桶型-桶型模体(barrel-barrel motif)。此等卷标包括抗体结合的抗原表位、链霉亲和素(streptavidin)结合、6xHis模体、生物素(biotin)连接标的模体等。多体的TCR分子亦包括透过化学交连反应性的胺基酸或多醣所产生者。该胺基酸(或多醣)可为原本在TCR结构中,或可透过基因修饰予以添加。多体的TCRs亦包括透过连接至其它分子(或复数个分子)所产生者,其可或不可包括如本文所述的可检测的卷标。此类连接分子包括链霉亲和素、生物素、抗原、蛋白质A或包括蛋白质、脂质和多醣所覆盖的核骨架

(scaffolds) 或如上述未经覆盖的珠子、纳米粒子、固相表面、列阵 (array)、基质 (matrices)。举例而言,在各种具体实施例中,可检测的卷标为生物素,该方法进一步包括使该TCR分子与链霉亲和素组合成多体的TCR分子。

[0077] 将了解到本文所述的任何一种卷标可用来检测用于本发明方法中的可溶性TCRs的卷标,尤其是检测表现有兴趣的抗原的细胞或组织。

[0078] 本发明的目的是提供利用与足以“固定”细胞或组织的变性剂接触的细胞或组织来进行抗原检测方法。已知在此技术领域中的该药剂的实例,包括甲醛(福尔马林)、戊二醛、醇类譬如甲醇、丙醇等,及有机溶剂例如苯和二甲苯。如前述,已发现本发明方法非实质地干扰所述细胞上MHC分子与其同源的抗原间的交互作用,甚至当固定该细胞或组织时。因此,本发明可用经固定的细胞或组织,因而有助于预防结构的完整及增强本方法的可靠性。

[0079] 因此,在一具体实施例中,本发明进一步包括使该细胞或组织与至少一种变性剂接触。此等接触可于几乎是任何时间进行,包括在步骤a)和使该细胞或组织变性(固定)的前。

[0080] 亦如前述,本发明与在列阵(譬如技术领域中所称的组织列阵)中使用细胞或组织一致。也就是说,本发明具有在重复方式中需要扫描细胞或组织样品(例如在临床中所遇见者)的灵敏性和可靠性。在此技术领域已知有许多这样的芯片,例如美国专利第6,466,690;4,384,193;6,602,661;6,594,432;6,566,063;6,406,840;6,246,785中所述者,及其所引用的参考资料。

[0081] 因此,在一具体实施例中,本发明的方法进一步包括在列阵中放置复数个细胞或组织。较佳地,该细胞或组织为已知或疑似含有肿瘤细胞。该方法可于包含细胞或组织的该列阵的各成分中进行。倘若有需要,该方法是在该列阵的各成分中同时地实质进行着。在一具体实施例中,该方法的步骤c)进一步包括扫描该列阵及产生指示特异性结合复合物存在的影像讯号。倘若有需要,此步骤可进一步包括将该讯号实时输出给使用者,且视需要地将该影像讯号的储存影像编入索引中。

[0082] 本发明可用来检测各种抗原,包括指称为与肿瘤相关的抗原或TAAs。细胞或组织可为悬浮、半悬浮(semi-suspended)或根据本方法所固定者。

[0083] 如上所述,该可溶性TCR分子或片段可包括至少一种单链的TCR,或可为异二聚体(heterodimeric)结构例如曾以重组的方式调整过以除去跨膜区(transmembrane)者。请参见仍在审查中的第08/813,781和08/943,086号申请案,以及下述的实施例。该可溶性TCR分子或片段可藉由以本文所述的一或组合两种以上的方法所标记而予以检测,包括以生物素、链霉亲和素、或其催化活性片段、放射性核种、或荧光、磷光或化学冷光分子化学发光分子所标定。例子包括知的绿色(或红色)萤光蛋白或其片段。

[0084] 在一些具体实施例中,该可溶性TCR为共价连接到至少一细胞因子的单链TCR分子。此细胞因子的例子包括但不限于,IL-2、群落刺激因子例如GM-CSF、IFN γ 、IFN- α 等。因此,该可溶性TCR分子或片段为包括至少一细胞因子或其片段的单链TCR,较佳为一共价相连的细胞因子或其片段的单链TCR。

[0085] 在一些其它应用的例子中,该可溶性TCR为包括至少一共价相连的免疫球蛋白区或其片段的单链TCR或片段。在一些具体实施例中,该单链的TCR或片段经融合至含有IgG1区或片段的序列。

[0086] 在其它具体实施例中,该MHC复合物为HLA-A2所限制。

[0087] 常将使用包括本方法的对照组,举例而言,藉由检测任何结合至细胞(不包括该抗原)的该可溶性TCR或片段。

[0088] 本发明所使用的特定抗原,包括p53(aa149-157)或p53(aa264-272)。

[0089] 本发明方法可在活体内、活体外或试管内进行。

[0090] 举例而言,HLA配型请参见A.K.Abbas, Cellular and Molecular Immunology, 第328页(W.B.Saunders Co.1991)可与本发明操作。关于活体内成像的应用,可溶性TCR将可如愿地包括放射性核种(例如¹²⁵I、³²P、⁹⁹Tc)或其它可授予哺乳类动物的可检测卷标,且该病患藉由已知用于结合该TCR或其片段的方法来扫描。此对哺乳类动物的分析有助于诊断和治疗多种疾病,包括例如伴随免疫系统疾病和癌症的非所欲的APCs的表现。

[0091] 本发明亦可用于在具有或疑似有肿瘤的病体内提供与肿瘤相关抗原的活体内肿瘤成像。在本方法的操作中,授予该病患一包含可检测的经标定可溶性TCR分子或其片段的组成物,该可溶性TCR分子或其片段在肿瘤上的/MHC复合物的背景中和与肿瘤相关的抗原特异性地结合。该组成物于活体内授予一段时间,而足以使其积聚在肿瘤部位,该积聚的组成物因此可被检测而使该肿瘤成像。

[0092] 该含有TCR的组成物可于标的处以非经肠授予(例如静脉注射、肌肉注射、皮下注射、肿瘤注射等)与/或藉由通往有兴趣的组织、器官或细胞所提供的途径。在其它应用中,该含有TCR的组成物可经鼻、经口或穿皮授予。

[0093] 该可溶性TCR所积聚的组成物可藉由各种方法予以检测。此包括藉由选自传统闪光相机、伽玛照相机(gamma camera)、直线运动扫描器、PET扫描器、SPECT扫描器、MRI扫描器、NMR扫描器、超音波仪、X射线仪、发光成像系统和荧光成像系统。

[0094] 本发明的成像方法进一步涵盖定出目标物前的方法(pretargeting method),其在一些应用中可促进肿瘤细胞或组织的检测。此方法使用多步骤的方法。举例而言,将定目标物用的TCR与亲和素(avidin)或生物素结合后授予,譬如藉由注射,因而定位出有兴趣的肿瘤。此后,注射带有卷标的生物素或亲和素(端视所要结合的定目标物用的抗体),藉由亲和素或生物素分别地结合而定位出一级抗体所在位置。其它能进行交互作用的分子对亦可取代该生物素/链霉亲和素分子。一些定出目标物前的方法已朝向抗体发展(请参见Chang等人,2002.Mol.Cancer Therap.1:553-563),该抗体可为用于定出目标物前的TCR为主反应物。

[0095] 本发明亦可用于涉及荧光活性细胞分类术(FACS)的应用。FACS可用来检测该可溶性TCRs或其片段与目标细胞间的交互作用。举例而言,该可溶性TCR可根据标准方法与生物素相结合,并合并例如链霉亲和素藻红蛋白(PE)以形成经标定的sc-TCR四聚体。然而,如上述的多聚合化作用将不常需要。FACS可用于定量测量该可溶性TCR和适当标的细胞(例如T2细胞与肿瘤细胞株)的交互作用。

[0096] 下述实施例显示通常连接至人类IL-2的新颖融合蛋白的组成和特性,该融合蛋白含有可溶性单链HLA-A2.1所限制的TCR,其能辨识跨p53氨基酸残基264-272的未经突变p53。经调查该分子TCR部分的特异性结合位连接至负载的HLA-A2,以及该分子IL-2部分有结合能力与生物活性的特定IL-2受体。此实施例显示TCR为主的融合蛋白的此等类型可做为其它抗体为主的标的肿瘤治疗,或做为新增其它标的肿瘤治疗例如抗体为主的免疫细胞

因子。能定出单独的肿瘤标的细胞且显著的方法可证实额外的或增效的抗癌效果。

[0097] 该实施例进一步显示可溶性含三域的老鼠scTCR (mouse scTCR)的组成和表现,其能在HLA-A2.1的背景中辨识人类p53(aa264-272)。将该三域scTCR融合至人类IL-2而产生可溶性264scTCR/IL-2融合蛋白,该融合蛋白于高含量表现并从哺乳动物体内分泌出。该264scTCR/IL-2融合蛋白的TCR部分仍有其MHC所限制的特定抗原结合特性,以及该IL-2部分连接至IL-2受体而具生物活性。再者,该实施例进一步显示该融合蛋白有结合标的和作用细胞的能力,在老鼠体内表现出良好的药物动力学,该融合蛋白可连接至标的肿瘤细胞并具有抗癌效果。因此,可溶性scTCR融合蛋白将提供已标定出的免疫治疗法其所用抗体的其它种类的方法。TCR为主的治疗将做为其它抗体为主的治疗,或做为有利且新增的其它已标定出肿瘤的免疫治疗法。

[0098] 本揭示显示可溶性TCR具有用于抗原的充份亲和力以允许良好的检测。尤其,该264scTCR的亲和力足以连接至未经调整的肿瘤细胞,并有效地连接标的细胞和作用细胞。

[0099] 涉及全身授予细胞因子以治疗肿瘤的经报导问题为短的血清半生期,以及此等蛋白的毒性。重要的是,本发明的264scTCR/IL-2融合蛋白具有显著的血清半生期约3小时,并在血液中出现依然完整的状态。因此,该264scTCR/IL-2融合蛋白能有效地增加IL-2的半生期,并完整存活于血液中,此暗示该264scTCR/IL-2为免疫调节性癌症治疗法的新药。使用比实施例更高的剂量,应增加该融合蛋白的血清半生期,因此进一步改良该分子抗癌的效果。

[0100] 已确认集中于肿瘤位置的IL-2应能活化局部的T细胞及其它对IL-2有反应的细胞,因而重新补充作用细胞至该肿瘤位置。因此,藉由于肿瘤位置集中IL-2,该TCR融合分子可帮助强化正常健康的免疫反应,系包括各种T细胞株的活化和增殖及NK细胞的活化或其它先天免疫系统的成员。此类多方面的抗癌反应对于初生成的肿瘤和明显转移的照射更有效果。

[0101] 资料显示有可能建构一含有TCR和细胞因子的生物活性双官能分子。该融合蛋白具有结合至肿瘤、媒介标的细胞和作用细胞的结合的能力,以及具有合理的药物动力学的特性。除了p53外,其它经过负调节的基因产物且被提呈于MHC背景中的肿瘤或经病毒感染的细胞上,可做为用于该TCR为主免疫治疗法的标的细胞。再者,其它免疫调节分子例如GM-CSF、IFN γ 或IFN α ,可连接至该TCR以活化其它抗癌或抗病毒反应的作用细胞。此等新颖TCR融合蛋白将形成一种治疗癌症和病毒感染用的免疫治疗法的新类型。

[0102] 术语“特异性结合”或相关术语意指本文所揭示可结合其它分子的分子,因而形成一特异性结合对。然而,该分子无法辨识或结合至其它藉由下述方法所测定的分子,例如西方墨点ELISA、RIA、电泳迁移率变动分析法(mobility shift assay)、免疫分析法、竞争型分析法、饱和分析法或其它本技术领域已知蛋白质结合分析法。一般请参见,Ausubel等人supra;Harlow和Lane in,Antibodies:4Laboratory Manual(1988)及其检测分子间特异性结合用的方法中实施例所引用的参考文献。

[0103] 术语“完全可溶”或相关术语意指在低G下非容易沉降的TCR-来自水性缓冲液的离心力,例如细胞基质。再者,倘若该融合蛋白仍存在大于约5至37 $^{\circ}$ C的水溶液中,以及在低或无阴离子性或无非离子性清洁剂存在下处于或接近中性pH的情况,该sc-TCR融合蛋白为可溶性。在此等情况下,可溶性蛋白常将有低的沉降值,例如小于约10至50斯韦德贝里

(svedberg unit)。本文所引用的水溶液通常具有缓冲性化合物以建立pH,典型的pH范围约5至9,且离子强度范围在约2mM与500mM之间。有时添加蛋白抑制剂或轻度非离子性清洁剂,倘若需要牛血清白蛋白(BSA)达到低mg/ml时,还可添加载体蛋白。例示性缓冲水溶液包括标准磷酸缓冲盐水溶液、Tris缓冲盐水溶液或其它已知的缓冲液和细胞基质配方。

[0104] 下述非局限性实施例是为说明本发明。

[0105] 实施例1:TCR融合蛋白结构体的产生

[0106] 制造融合蛋白,其含有三域且融合至人类IL-2对p53抗原有特异性的所限制的老鼠TCR。关于该TCR融合蛋白结构体,藉由能对人类p53(aa264-272)有特异性的TCRs的老鼠T细胞株从RT-PCR产生制造的V α 和V β /C β 区域。该TCR α 链(V α 3)可变区的羧酸端经由有伸缩性的连接子((G₄S)₄)融合至V β 的N端(V β 3),以产生TCR抗原结合部位。将直接连至该V β 区的C β 区中正好在决定性的半胱氨酸前的氨基酸残基截短,而除去穿膜和胞浆区域,以产生可溶性单链TCR分子(第1A图和第1B图)。使人类IL-2经由短连接子(氨基酸序列VNAKTTAPSVYPLAPV;序列编号:1)融合至该TCR部分。将EE卷标(氨基酸序列EEEEYMPME;序列编号:2)插入该融合蛋白IL-2部分的下游处,以允许倘若需要藉由抗-EE卷标的mAb来检测TCR/-2合蛋白。藉由CMV激活子驱动使哺乳类动物细胞的表现,直接藉由抗体轻链先驱物来分泌,并藉由G418抗性来完成选择性。

[0107] 第1图详细说明如下。1A) 264scTCR/IL-2融合蛋白区域结构的图标说明。1B) 264scTCR/IL-2融合蛋白的氨基酸序列。该融合蛋白各区域的胺基群酸数于图中指出。

[0108] 实施例2:哺乳动物中TCR/IL-2融合蛋白的表现

[0109] 为了解该264scTCR/IL-2融合蛋白的特性,该264scTCR/IL-2结构体将适当地转染至CHO-K1细胞。适当的分泌264scTCR/IL-2融合蛋白的转染剂是利用见述于Materials and Methods的ELISA分析法予以选择。适当的此等ELISAs的阳性讯号指出该经转染分泌264scTCR/IL-2融合蛋白,该融合蛋白是藉由抗-鼠科TCR和抗-人类IL-2抗体所辨识,此暗示该经分泌的264scTCR/IL-2能正确地组合并在转染细胞内折迭,且当从该细胞分泌出该融合蛋白时,它仍将完整。

[0110] 藉由具有产生约1.8mg/l悬浮物的免疫亲和层析法从细胞悬浮物中纯化出264scTCR/IL-2融合蛋白。将经纯化的融合蛋白进行SDS-PAGE和考马斯染色法(Coomassie staining)。在还原或非还原的状况下,该主要的染色带位移至约60kDa(第2图),此与该蛋白主要的分子量一致,且当该融合蛋白从细胞分泌出时,指出融合蛋白依仍完整并具有非未预期的细胞内分子双硫键。在非还原凝胶中较大的带状物可为该融合蛋白的二聚体形式。此结论是根据观察而来,即较大的带状物具有该融合蛋白约二倍大的分子量,且该带状物在还原状态下还原成该融合蛋白的大小。此资料显示该经转染的CHO细胞制造出所预期分子量大小的264scTCR/IL-2融合蛋白,且经正确地折迭、组合及分泌成为可溶性融合蛋白。

[0111] 第2图详细说明如下。CHO细胞以该64scTCR/IL-2表现载体稳定地转染。该经分泌的融合蛋白藉由免疫亲和层析法予以纯化,且在如图上端所示的还原或非还原状态下进行SDS-PAGE。以考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)来染SDS-PAGE凝胶。

[0112] 实施例3:264scTCR/IL-2融合蛋白的TCR部分的MHC/结合能力

[0113] 264scTCR/IL-2融合蛋白结合至负载MHC的能力是藉由流式细胞仪所决定。当以

抗-TCR C β mAb或抗-IL-2检测抗体来做检测时,将负载p53(aa264-272)或p53(aa149-157)的T2细胞(对照组)以264scTCR/IL-2融合蛋白做正染(第3A图和第3B图)。以p53(aa149-157)对照组负载的细胞不用以抗-TCR C β mAb或抗-IL-2检测抗体来做染色。为了证实负载p53(aa149-157)的T2细胞无法染色的原因并非由于p53(aa149-157)没有能力结合至HLA-A2,而将未负载、负载p53(aa149-157)或负载p53(aa264-272)的T2细胞以BB7.2 α -HLA-A2单株抗体予以染色。负载这两种p53的细胞,其染色结果大于未负载的细胞,此暗示这两种有结合至HLA-A2分子的能力(第3C图)。为了IL-2受体亦将T2细胞染色,且发现T2细胞不表现IL-2受体;因此,此资料指出该264scTCR/IL-2融合蛋白的结合是藉由该融合蛋白的TCR部分所媒介。当T2细胞负载该对照组时,该融合蛋白缺乏染色,此亦指出藉由TCR部分所媒介的染色以及该染色对正确的有特异性。此等资料指出该264scTCR/IL-2融合蛋白的TCR部分在HLA-A2的背景中有辨识其特异性蛋白的能力。

[0114] 第3图详细说明如下。负载p53(aa264-272)(灰线)或负载p53(aa149-157)(黑线)的T2细胞,并以下述其中一种予以染色:3A) 264scTCR/IL-2融合蛋白与抗-TCR C β mAb;或3B) 264scTCR/IL-2融合蛋白与抗-IL-2mAb。3C):以抗-HLA-A2BB7.2mAb使负载p53(aa264-272)(深灰线)、负载p53(aa149-157)(浅灰线)或未负载(黑线)的T2细胞染色,然后再以经FITC标记的抗老鼠的山羊IgG。此暗色峰形为未经染色的T2细胞。

[0115] 实施例4: IL-2受体结合至264scTCR/IL-2融合蛋白的IL-2部分的能力

[0116] IL-2受体结合至264scTCR/IL-2融合蛋白的IL-2部分的能力是藉由流式细胞仪来研究。分离出初级的老鼠脾脏细胞,并以rIL-2与抗-CD3予以刺激以产生T细胞丛(T cell blasts)。经刺激的脾脏细胞只在264scTCR/IL-2融合蛋白的存在下,表现以负载HLA-A2四聚体的p53(aa264-272)使IL-2受体呈正染(第4A图)。同样地,基本上表现IL-2受体的CTLL-2老鼠毒杀型T淋巴球,以264scTCR/IL-2融合蛋白呈正染,但并非以264scTCR/kappa融合蛋白(第4B图)。当CTLL-2细胞先与 α -人类CD25阻断抗体(blocking antibody)或同型对照抗体,再以264scTCR/IL-2培育时,倘若该细胞与该阻断抗体培育而非与同型对照抗体,染色将实质地减少。缺少来自与264scTCR/老鼠 κ 链融合蛋白或与IL-2受体阻断抗体培育的CTLL-2细胞的讯号,此指出此等细胞的染色藉由该264scTCR/IL-2融合蛋白的IL-2部分所媒介。此等资料暗示264scTCR/IL-2融合蛋白的IL-2部分具有结合至该IL-2受体的能力。

[0117] 第4图详细说明如下。4A):以IL-2和抗-CD3 ϵ mAb刺激老鼠脾脏细胞,然后在264scTCR/IL-2融合蛋白的存在(灰线)或不存在(黑线)下培育。利用经PE标记的HLA-A2p53(aa264-272)四聚体检测经结合的融合蛋白。4B):将CTLL-2细胞先与 α -人类CD25阻断抗体或同型对照抗体,再与264scTCR/IL-2或264scTCR/kappa融合蛋白培育。利用经PE标记的 α -TCR-V β 3抗体检测经结合的融合蛋白。此暗色峰形为未经染色的CTLL-2细胞。黑线:仅以264scTCR/IL-2染色的CTLL-2细胞。灰点线:先与 α -人类CD25封阻抗体再与264scTCR/IL-2培育的CTLL-2细胞。深灰线:以264scTCR/kappa融合蛋白染色的CTLL-2细胞。黑点线:以 α -TCR-V β 3染色的CTLL-2细胞。

[0118] 实施例5: 264scTCR/IL-2融合蛋白的生物活性

[0119] 为了证实264scTCR/IL-2融合蛋白的生物活性,将IL-2依赖型CTLL-2细胞(IL-2 dependent CTLL-2 cell)与各种浓度下的264scTCR/IL-2融合蛋白或重组IL-2培养,利用WST-1对细胞生长力予以评估。如第5A图所示,rIL-2或264scTCR/IL-2支持CTLL-2细胞生长

的能力呈剂量依赖性,其中在愈高剂量的重组IL-2或264scTCR/IL-2存在下,就有愈多的细胞增生。再者,当使用等莫耳浓度量的重组IL-2或264scTCR/IL-2时,有相似的细胞增生程度。特别进一步的对照下,CTLL-2细胞与具有 α -人类CD25阻断抗体或同型对照抗体的264scTCR/IL-2培育。当将该阻断抗体培育于该培养基中,增生将随着封阻断体的浓度而减少,然而CTLL-2细胞的增生不会受到控制抗体浓度的影响(第5B图)。此资料指出264scTCR/IL-2的IL-2部分在活体内具有与重组IL-2相似的活性,且该融合蛋白的增生活性是依赖该分子的IL-2部分。

[0120] 利用表面电浆共振检测术已发现该264scTCR/IL-2与其同源MHC/的解离常数在生理状况下为约 10^{-7} M。

[0121] 第5图完整说明如下。5A):将CTLL-2细胞与如同图底下所示各种浓度下的264scTCR/IL-2(实线)或重组IL-2(虚线)培养,。5B):将CTLL-2细胞如同图底下所示与264scTCR/IL-2及同时具有 α -人类CD25阻断抗体或同型对照抗体予以培育。细胞生长力是藉由与WST-1培育所量测到,并读取450nm的吸收值。Cab+5:5 μ g对照抗体;Cab+50:50 μ g对照抗体;Bab+5:5 μ g阻断抗体;Bab+50:50 μ g阻断抗体。

[0122] 实施例6:由264scTCR/IL-2融合蛋白所媒介的细胞结合

[0123] 264scTCR/IL-2融合蛋白的有利性质为透过其TCR和细胞因子部分而个别带给标的细胞和作用细胞能力。为证实该264scTCR/IL-2融合蛋白可有效地结合细胞,T2细胞负载p53(aa264-272)或p53(aa149-157),然后以二氢乙锭(dihydroethidium,HE)标记。以钙黄绿色AM(calcein AM)标记CTLL-2细胞,将这两种经标记细胞群混合,并在264scTCR/IL-2融合蛋白存在或不存在下培育。以流式细胞仪分析样品。当这两种细胞群在264scTCR/IL-2融合蛋白不存在下培育时(第6A图和第6B图),或当负载对照的T2细胞在264scTCR/IL-2融合蛋白存在下与CTLL-2细胞培育时(第6C图),此等细胞在流式细胞仪的直方图上,各细胞群总数约45%仍为两种不同的细胞群(第6A、6B和6C图,第1和3区),仅有细胞群总数约0.46%落在双染色的细胞区块(第6A、6B和6C图,第2区)。然而,当负载p53(aa264-272)的T2细胞在264scTCR/IL-2融合蛋白存在下与CTLL-2细胞培育时(第6D图,第2区,已结合细胞),此暗示T2细胞经由该264scTCR/IL-2融合蛋白而结合至CTLL-2细胞。

[0124] 第6图完整说明如下。将负载p53(aa264-272)(第6B和6D图)或p53(aa149-157)(对照组)(第6A和6C图)的T2细胞以HE染色。将CTLL-2细胞以钙黄绿素AM标记。混合经标记的细胞,并在264scTCR/IL-2融合蛋白存在(第6C和6D图)或不存在(第6A和6B图)下培育,利用流式细胞仪分析样品。各直方图底下指出分析情况,包括所使用的负载,与融合蛋白的存在或不存在。单一染色区标示为1和3,而双染色细胞群标示为2。

[0125] 实施例7:老鼠体内264scTCR/IL-2的药物动力学

[0126] 在BALB/c老鼠体内量测264scTCR/IL-2融合蛋白的药物动力学。以静脉内注射的方式采集各时间点的老鼠血清样品。利用ELISA来量测264scTCR/IL-2融合蛋白的血清含量。使用抗-TCR捕捉用mAb/抗-IL-2检测用Ab(第7A图)、抗-TCR捕捉用mAb/抗-TCR检测用Ab(第7B图)或抗-IL-2捕捉用mAb/抗-IL-2检测用Ab(第7C图)来进行ELISA的量测,以测定融合蛋白在活体内是否被修饰或被剪切。以264scTCR/IL-2融合蛋白注射老鼠,显示无明显毒性。在此等分析中,量测到264scTCR/IL-2有0.75至2.5 μ g/ml的最大浓度,及根据所使用ELISA型式有1.6至3.0小时的显着血清半衰期(第7图)。由于所报导的游离IL-2其血清半衰

期仅约5分钟,此资料暗示该融合蛋白在活体内未经剪切,反而依然完整而相对于长时间在血液中。此研究中所量测到264scTCR/IL-2半衰期小幅度的变化大多是由于ELISA分析法灵敏度的差异。

[0127] 第7图完整说明如下。将264scTCR/IL-2融合蛋白注射至BALB/c老鼠,并于注射后15分钟、30分钟、1小时、4小时、8小时和24小时采集其血清样品。利用下述型式的ELISA来量了264scTCR/IL-2的血清浓度:7A):抗-TCR捕捉用mAb/抗-IL-2检测用Ab;抗-TCR捕捉用mAb/抗-TCR检测用Ab;以及抗-IL-2捕捉用mAb/抗-IL-2检测用Ab。

[0128] 实施例8:以264scTCR/IL-2使肿瘤细胞染色

[0129] 倘若264scTCR/IL-2融合蛋白能辨识并结合至其标的肿瘤细胞,是为相当有助益。为了测试该264scTCR/IL-2是否有能力结合至肿瘤细胞,其为同时表现HLA-A2.1和p53A375的人类黑色素肿瘤(meIanoma)细胞,以264scTCR/IL-2或3C8(一种不相关的264scTCR/IL-2融合蛋白)将该黑色素肿瘤细胞染色。不以H57-597检测用抗体使未与融合细胞培育的细胞和与3C8培育的细胞染色,然而与264scTCR/IL-2培育的细胞与该检测用抗体呈现正染(第8图)。此结果暗示该264scTCR/IL-2融合蛋白有辨识和结合至其替的肿瘤细胞的能力,并有助于活体内的抗癌治疗。

[0130] 第8图完整说明如下。未与融合细胞培育的A375人类黑色素肿瘤细胞(黑色虚线)、与5 μ g3C8TCR/IL-2融合蛋白培育的A375人类黑色素肿瘤细胞(对照组)(虚线),或与5 μ g 264scTCR/IL-2融合蛋白培育的A375人类黑色素肿瘤细胞(黑色实线),再以H57-597mAb染色。此暗色峰形为未经染色的细胞。

[0131] 实施例9:264scTCR/IL-2融合蛋白的抗癌效果

[0132] 为了测量该264scTCR/IL-2融合蛋白在活体内是否有抗癌活性,是进行实验上的转移分析法。对无胸线的脱毛母鼠注射高度转移性的A375人类黑色素肿瘤细胞亚克隆(subclone),A375-C15N,并以各种浓度的264scTCR/IL-2或重组IL-2处理。注射肿瘤细胞42天后计算肺小节(Lung nodules)。264scTCR/IL-2和重组IL-2两者皆以随着剂量而降低肺转移(第9图)。然而,所有肺转移都随着该264scTCR/IL-2融合蛋白而降低至较大程度,暗示将该细胞因子标记成肿瘤可提供较大的癌症治疗效能。

[0133] 以264scTCR/IL-2或重组IL-2处理的老鼠显示无明显的毒性。两种处理导致肺转移的下降;然而,以264scTCR/IL-2处理的所有剂量较重组IL-2处理的较为有效。

[0134] 第9图完整说明如下。对无胸线的脱毛母鼠注射高度转移性的A375-C15N细胞,并以264scTCR/IL-2、重组IL-2或PBS处理。注射肿瘤细胞42天后,移除肺并计算肺小节,绘制相对于PBS处理对照组的肺小节平均数。

[0135] 实施例10:将负载的T2细胞藉由单体和多体的264scTCR融合蛋白染色,并以流式细胞仪分析

[0136] 制备各种264scTCR融合蛋白的单体或多体型式,如下述的Methods,第11和12节所述,藉由流式细胞仪分析它们与t2细胞的结合。此结果示于第10图,证实以经p53(aa264-273)负载的T2细胞使264scTCR融合蛋白染色(第10B图)至较经p53(aa264-273)负载的细胞(第10A图)为较高含量。此图中,未经染色的T2细胞显示于标记为T2_149未经染色.001的直方图中;以二级试剂(H57-PE)染色的负载p53(aa149-157)的T2细胞与负载p53(aa264-273)的T2细胞,分别显示于标记为“T2_149H57.002”与“T2_264H57.009”的直方图中;先以多体

264scTCR/IgG1再以H57-PE染色的负载p53 (aa149-157)的T2细胞与负载p53 (aa264-273)的T2细胞,分别显示于标记为“T2 149IgG H57.003”与“T2 264IgG H57.010”的直方图中;先以264scTCR/IL-2再以H57-PE染色的负载p53 (aa149-157)的T2细胞与负载p53 (aa264-273)的T2细胞,分别显示于标记为“T2 149IL2H57.004”与“T2 264IL2H57.001”的直方图中;先以多体264scTCR/trunIgG1再以H57-PE染色的负载p53 (aa149-157)的T2细胞与负载p53 (aa264-273)的T2细胞,分别显示于标记为“T2 149trun H57.005”与“T2 264trun H57.012”的直方图中;以及先以多体264scTCR/BirA再以H57-PE染色的负载p53 (aa149-157)的T2细胞与负载p53 (aa264-273)的T2细胞,分别显示于标记为“T2 149H57.006”与“T2 264H57.013”的直方图中。此结果确认观察到的染色为对有特异性。

[0137] 264scTCR单体型式能染色成某些程度。举例而言,用于与该264scTCR/trunIgG染色的平均信道荧光(MCF)从负载p53 (aa149-157)的细胞所用的10.95增加至负载p53 (aa264-273)的细胞所用的55.34。同样地,用于与该264scTCR/BirA染色的MCF从负载p53 (aa149-157)的细胞所用的13.41增加至负载p53 (aa264-273)的细胞所用的95.14。264scTCR单体型式能将负载的T2细胞特异性地染色成甚至更高的程度。举例而言,用于与该264scTCR/IgG1染色的MCF从负载p53 (aa149-157)的细胞所用的119增加至负载p53 (aa264-273)的细胞所用的863。

[0138] 实施例11:利用264scTCR融合蛋白将肿瘤细胞染色

[0139] 亦测试264scTCR药剂将肿瘤细胞染色的能力。经培养的A375细胞以10mM EDTA的PBS (pH7.4)分散,并以洗涤缓冲液洗涤两次。使用4 μ g的264scTCR/IgG1融合蛋白于23 $^{\circ}$ C进行细胞染色45分钟。洗涤该细胞一次,并以3 μ g的抗人类的山羊IgG Fc的经FITC结合的F(ab')₂片段(anti IgG-FITC)染色。洗涤两认后,使该经染色的细胞悬浮,并于FACScan上分析。将A375细胞单独以anti IgG-FITC染色以做为对照组。

[0140] 关于第11A图,此分析结果显示A375肿瘤细胞能以264scTCR/IgG1融合蛋白染色。在此项(11A)中,单独以anti IgG-FITC使A375细胞染色,或在anti IgG-FITC后用264scTCR/IgG1,分别显示于“A375-FITC.005”与“A375-264.FITC.006”标记为的直方图中。进行另外使用A375肿瘤细胞的实验,以进一步定出理想的染色情况。举例而言,经PE结合的抗人类IgG抗体(anti IgG-PE)(第11B图)或经PE结合的H57mAb(第11D图)用于取代做为二级抗体的经FITC结合的抗体。第11B图中,单独以anti IgG-PE或先以264scTCR/IgG1再以anti IgG-PE染色的A375细胞,分别地显示于标示为“A375-PE.007”与“A375-264.PE.008”的直方图中。第11D图中,单独以H57-PE或先以264scTCR/IgG1再以H57-PE染色的A375细胞,分别地显示于标示为“A375-H57-PE.009”与“A375-264.H57-PE.010”的直方图中。各例子中,以264scTCR/IgG1使该A375肿瘤细胞染色。经生物素结合的264scTCR/BirA以链霉亲和素-PE(SA-PE)进行多聚合化,亦使用来将A375细胞染色(第11C图),且其染色程度较单独以链霉亲和素-PE染色的细胞为增加。关于第11C图,单独以SA-PE染色的A375细胞,或经以SA-PE复合的经生物素结合的264scTCR/BirA,分别显示于标示为“A375-SAPE.001”与“A375-264BttnSaPE.002”的直方图中。

[0141] 实施例12:以流式细胞仪检测由264scTCR融合蛋白所固定的细胞的染色

[0142] 如所讨论者,在经保留或“经固定”样品中,有检测MHC/复合物的能力是为有利,尤其在临床或其它典型实行固定细胞、组织或其它取自病患的生物样品的医学环境中。然而,

因为该MHC/复合物代表由三个不同多链所组成的细胞表面抗原,所以不确定MHC/复合物的结构完整性仍充分地完整而用以藉由该可溶性TCR接着典型固定程序的检测。为了确定可溶性TCR是否可在经固定细胞、负载的T2细胞和未经调整的A375肿瘤细胞上进行染色,是藉由流式细胞仪来分析。经培养的A375细胞以10mM EDTA的PBS (pH7.4)分散,并以洗涤缓冲液洗涤两次。将T2细胞与50 μ M的p53(aa264-273)培育3小时,并以洗涤缓冲液洗涤两次。以3.7%的甲醛固定此两种细胞,并洗涤两次。在2050 μ g的HLA-A2.1/p53(aa264-272)四聚体的存在或不存在下,使用4 μ g的264scTCR/IgG1或CMVscTCR/IgG1融合蛋白于23 $^{\circ}$ C进行细胞染色45分钟。洗涤该细胞一次,并以3 μ g的抗人类的山羊IgG Fc的经FITC结合的F(ab')₂片段染色。洗涤两次后,使该经染色的细胞悬浮,并于FACScan上分析。

[0143] 关于第12a图,此结果显示264scTCR/IgG1融合蛋白使经甲醛固定的A375细胞呈正染(直方图标示为“2A375F-264.006”),然而以CMVscTCR/IgG1染色者(直方图标示为“2A375F-CMV.005”)在上述背景中无法检测到。因为该CMV未被提呈于A375细胞上,CMVscTCR/IgG1对照组药剂的使用提供该TCR或IgG1区与该肿瘤细胞间任何非特异交互作用的量测。藉由测定以264scTCR/IgG1融合蛋白与CMVscTCR/IgG1对照组使肿瘤细胞染色之间的差异,该方法允许直接量测该经固定肿瘤细胞样品的表面上所存在的肿瘤细胞含量。

[0144] 为了确定以264scTCR/IgG1融合蛋白染色的A375细胞为对TCR有特异性,以HLA-A2.1/p53(aa264-272)四聚体做为阻断剂。藉由添加HLA-A2.1/p53(aa264-272)四聚体阻断剂(于直方图标示为”A375F-264TET.264.008”)来降低以264scTCR/IgG1染色的A375细胞,进一步指出264scTCR/IL-2可特异性地结合至肿瘤细胞。如所预期者,添加HLA-A2.1/pCMV四聚体药剂至以264scTCR/IgG1染色的A375细胞,对以264scTCR/IgG1药剂特异性染色(于直方图标示为”A375F-264TET.CMV.007”)并不会有任何影响。在负载的T2细胞可见到相似的结果(第12B图)。

[0145] 此等结果证实单体与多体的可溶性TCR药剂可在MHC复合物的背景中使被提呈的的细胞特异性地染色。再者,可溶性TCR药剂可使未经固定与经固定的肿瘤细胞进行特异性地染色。另外,藉由添加能结合该可溶性TCR药剂的竞争型MHC分子,可降低该可溶性TCR药剂所特异性染色的细胞。在对照染色反应中,添加超过该可溶性TCR药剂1至100倍莫耳浓度的竞争型MHC分子尤其有利于区分可溶性TCR药剂的特异性结合成分(即结合至-MHC)与非特异性结合成分。相当明显,当比较不同细胞的染色可表现非特异性与特异性的可溶性TCR结合的不同程度。举例而言,不同样品(细胞或组织)中该可溶性TCR的非特异性结合之间的变化,能使其很难以测定对照染色反应中未使用正确的竞争型MHC分子的特异性可溶性TCR结合的程度。

[0146] 实施例13:以免疫荧光显微镜检测由264scTCR融合蛋白所固定细胞的染色

[0147] 选择针对HLA-A2和p53表现(即A375、HT29与Saos2)相当不同的某些细胞株来分析,并以264scTCR/IgG1融合蛋白或对照组融合蛋白CMVscTCR/IgG1染色。将该等细胞培养在盖片24小时,再以3.7%的甲醛固定5分钟,并以洗涤缓冲液(0.5%BSA与0.1%迭氮钠的PBS)洗涤两次。该BSA为封阻剂以降低非特异性蛋白的结合。以10 μ g的264scTCR/IgG1或CMVscTCR/IgG1融合蛋白在含5%正常山羊血清(NGS)的200 μ l的PBS中于23 $^{\circ}$ C进行细胞染色45分钟。该NGS为封阻剂以降低非特异性蛋白的结合。洗涤该细胞两次,并以3 μ g的抗人类的山羊IgG Fc的经FITC结合的F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)染

色。洗涤该等细胞两次后,并以平衡缓冲液(MoIecular Probes,Eugene,OR)洗涤一次。利用抗褪色药剂的甘油缓冲液(MoIecular Probes,Eugene,OR)使盖片置于玻片上,并以指甲油密封。使用配有SPOT RT照相机的Nikon落射荧光显微镜(epi-fluorescence microscope)(Nikon,Tokyo,Japan)以及SPOT RT软件v3.2(Diagnostic Instrument,Sterling Heights,MI)来证实该片。

[0148] 关于HLA-A2染色,以10 μ g的BB7.2(一种抗人类的老鼠HLA-A2抗体)使该经固定细胞在含5%正常山羊血清(NGS)的200 μ I的PBS中于23 $^{\circ}$ C进行染色45分钟。洗涤该细胞两次,并以4 μ g的抗老鼠的山羊IgG Fc的经FITC结合的F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)染色。洗涤该等细胞两次后,并以平衡缓冲液(MoIecular Probes,Eugene,OR)洗涤一次。将盖片如上所述的置放和证明。

[0149] 关于p53染色,使0.2%的TrintonX-100渗透该经固定细胞20分钟,然后以10 μ g的Pab122、老鼠抗-p53抗体在含5%正常山羊血清(NGS)的200 μ I的PBS中于23 $^{\circ}$ C进行染色45分钟。洗涤该细胞两次,并以4 μ g的抗老鼠的山羊IgG Fc的经FITC结合的F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)染色。洗涤该等细胞两次后,并以平衡缓冲液(MoIecular Probes,Eugene,OR)洗涤一次。将盖片如上所述的置放和证明。

[0150] 如第13图所示,HLA-A2与p53使A375细胞呈正染,p53但非HLA-A2使HT29呈正染,HLA-A2但非p53使Saos2呈正染。仅检测到A375细胞有264scTCR/IgG1的免疫发光染色,而未有细胞以CMVscTCR/IgG1呈正染。此结果确定以264scTCR药剂进行正染需要HLA-A2与p53的存益。在任何肿瘤细胞株中以非特异性CMVscTCR药剂,或当HLA-A2与p53抗原不表现时以264scTCR药剂皆未见到有背景染色。

[0151] 实施例14:使用264scTCR融合蛋白的定量染色

[0152] 测定能结合负载的T2细胞的264scTCR复合物的数量。将T2细胞与各种数量的p53(aa267-273)培育3小时,再以洗涤缓冲液洗避两次。使用3.7 μ g的264scTCR/BirA-链霉亲和素-PE四聚体于23 $^{\circ}$ C进行细胞染色45分钟。洗涤两次后,使该经染色的细胞悬浮,并于FACScan上分析。另外,使用3.76 μ g的264scTCR/IgG1融合蛋白于23 $^{\circ}$ C进行染色45分钟。洗涤该细胞一次,并以3 μ g的经PE结合的抗-人类IgG抗体染色。洗涤两次后,使该经染色的细胞悬浮,并于FACScan上分析。

[0153] 264scTCR/BirA四聚体的分析结果显示于第14图,而264scTCR/IgG1融合蛋白显示于第15图。观察264scTCR/BirA四聚体与264scTCR/IgG1融合蛋白两者,以增加的p53量使染色程度提高。为了定量复合物使细胞染色的数目,将经染色细胞上荧光强度的量与具有已知每珠子(QuantIBRITE PE beads;BD Biosciences)上PE分子数的校正珠子荧光强度相比较,然后提供利用流式细胞仪来定量经PE染色的细胞的方法。

[0154] 在264scTCR/BirA四聚体和264scTCR/IgG1融合蛋白所用的各种浓度下与复合物/细胞的经计算数目绘图于第16图。此结果显示可在经染色细胞上检测到低至400scTCR复合物的结合。另外,相较于以264scTCR/BirA四聚体染色所观察到的结果,先以264scTCR/IgG1融合蛋白再以经PE结合的抗-人类IgG1抗体染色将有其4至10倍的增加。此等增加可能来自PE结合至该抗体与/或和相同264scTCR/IgG1融合蛋白反应的聚合抗体的高程度。

[0155] 有鉴于上述,了解到例如上述定量检测TCR结合的方法将有益于充分利用少量抗体的检测。施用此方法以检测264scTCR药剂结合至肿瘤细胞。如上述所制备的细胞,以

264scTCR/BirA-链霉亲和素-PE四聚体于23℃染色45分钟。洗涤两次后,使该经染色细胞悬浮,并于FACScan上分析。另外,以各种量的264scTCR/IgG1融合蛋白于23℃进行细胞染色45分钟。洗涤该细胞一次,并以2.5μg的经PE结合的H57抗体染色。洗涤两次后,使该经染色的细胞悬浮,并于FACScan上分析。

[0156] 在各例子中,藉由比较经染色细胞上荧光强度的程度与已知各珠子PE分子数的校正珠子的荧光强度,来测定使该细胞染色的复合物的数目。第17A和17B图显示具有264scTCR药剂增量的A375肿瘤细胞的染色。第18和19图各别地显示具有264scTCR/BirA与264scTCR/IgG1药剂增量的三种肿瘤细胞株(A375、HT29和Saos2)所观察得到的染色的定量。以这两种药剂使HLA-A2/p53阳性A375肿瘤细胞株染色,比起HT29(HLA-A2-阴性)和Saos2(p53-阴性)的细胞株而言结合有高于2至5倍的264scTCR药剂。另外,当264scTCR药剂的量增加,该A375细胞的特异性染色亦增加。藉由比较A375细胞的染色与其它肿瘤细胞株的染色可测定低至500染色复合物的特异检测。这些定量染色研究的结果指出可轻易地检测出每个细胞低至300至500HLA-A2/复合物的264scTCR的特异性结合。再者,可增加此等染色反应的灵敏度,并充分利用以不同TCR和二级药剂的使用。

[0157] 实施例15:未经调整的肿瘤组织藉由264scTCR融合蛋白的免疫组织化学染色

[0158] 为了制造皮下肿瘤,将A375人类色素肿瘤细胞(1×10^6)经皮下注射至脱毛老鼠的左侧肩膀。允许肿瘤生长至500mm³,并使该老鼠以人道的方式牺牲。连同下层皮肤将肿瘤切除,并在中性的福尔马林缓冲液中固定一夜。关于转移的肺小节的制造,胍MDA-MB-231细胞(1×10^6)注射至脱毛老鼠的侧尾静脉,并允许转移的肺小节的生长。18天后,使该老鼠以人道的方式牺牲。移出肺并固定在中性的福尔马林缓冲液中。经固定的组织藉由连续30分钟在70%、90%、95%、100%(两次)酒精中培育,然后在二甲苯中培两次30分钟,而予以脱水。再将组织嵌于石蜡中,制备成5μm切片,并置于显微镜玻片上。

[0159] 关于免疫组织化学染色,以二甲苯每次润洗切片5分钟,接着藉由再氢化(rehydration)连续地在100%(两次)、95%和85%酒精中各培育两分钟。在以PBS洗涤5分钟两次及以二次水洗涤5分钟一次后,切片培育于3% H₂O₂ 5分钟以使内源性过氧化去活化,然后以二次水洗涤5分钟一次。将切片置于抗原补充溶液(antigen retrieval solution, Dako)中,并加热至97℃ 20分钟。允许该切片于室温的抗原补充溶液中冷却20分钟,然后以二次水洗涤5分钟一次。

[0160] 倘若使用非经HRP标记的二级抗体,将切片于亲和素/生物素封阻溶液中培育(各溶液中10分钟),然后以PBS洗涤5分钟两次。使切片于室温在1%的NGS的PBS中封阻30分钟。需要该封阻步骤来降低由于二级山羊抗体药剂的非特异性交互作用造成的背景染色。然后在10μg的264scTCR/IgG1融合蛋白或对照组CMVscTCR/IgG1融合蛋白(在1% NGS中各100μI)的存在或不存在下,将该切片于室温培育45分钟。在以PBS洗涤5分钟两次后,使切片于室温下1.6μg(200μI于1% NGS)的山羊抗人类IgG Fc γ F(ab')₂经HRP标记的片段培育45分钟。将切片各以PBS洗涤5分钟两次。使切片于DAB溶液(Dako)培育直到出现光背景。将切片以水龙头的水润洗,并以苏木精(hematoxylin)复染15分钟。以水龙头的水润洗后,在3个100%乙醇槽和3个二甲苯槽各润洗切片三分钟,然后以封盖剂(permount)(Fisher)安置。藉由光学显微镜来评估组织染色的程度,使用SPOT RT照相机以及SPOT RT软件v3.2(Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI)来证实该片。

[0161] 使用A375肿瘤切片的典型免疫组织化学分析显示于第20和21图。此结果显示以264scTCR/IgG1融合蛋白培育的A375组织切片染色强度比起单独使用CMVscTCR/IgG1融合蛋白或二级抗体为强(即出现较深的颜色)。利用CMVscTCR/IgG1融合蛋白所观察到的背景染色相当于先利用人类IgG1抗体再以经HRP标记的抗人类IgG1抗体的培育法,此指出该背景染色可能由于IgG1区与该组织区的交互作用。另外,该老鼠间质组织藉由264scTCR/IgG1融合蛋白的染色比起在相同区域的A375肿瘤组织的染色少了许多。此等结果指出该264scTCR/IgG1药剂藉由典型用于辨别人类肿瘤样品免疫组织化学方法对经固定的人类肿瘤组织区域有特异性染色的能力。

[0162] 实施例16-藉由264scTCR/IgG1融合蛋白的肿瘤组织列阵的免疫组织化学染色

[0163] 从商业来源或从组织列阵研究会(Tissue Array Research Program, NCI)得到人类肿瘤组织列阵。关于染色,该组织列阵以二甲苯各润洗二次,接着藉由再氢化连续地在100%(两次)、95%和85%酒精中各培育两分钟。在以PBS洗涤5分钟两次及以二次水洗涤5分钟一次后,切片培育于3% H_2O_2 5分钟以使内源性过氧化去活化,然后以二次水洗涤5分钟一次。将切片置于抗原补充溶液(Dako)中,并加热至97°C 20分钟。允许该切片于抗原补充溶液中冷却20分钟,然后以PBS洗涤5分钟两次。倘若使用非经HRP标记的二级抗体,将切片于亲和素/生物素阻断溶液中培育(各溶液中10分钟),然后以PBS洗涤5分钟两次。使切片于室温在1%的NGS的PBS中封阻30分钟,然后在264scTCR/IgG1融合蛋白或CMVscTCR/IgG1融合蛋白(或其它非结合性的scTCR药剂)的存在或不存在下,将该切片于室温培育45分钟。在以PBS洗涤5分钟两次后,使切片于室温下在二级抗体(经HRP标记的山羊抗人类IgG或经生物素结合的抗-TCR CB抗体)中培育45分钟。将切片各以PBS洗涤5分钟两次。

[0164] 倘若使用非-HRP的二级抗体,以链亲和素过氧化溶液于室温培育15分钟,接着以PBS洗涤5分钟两次。或者,使用scTCR/BirA-链亲和素过氧化药剂取代如上所述的药剂。

[0165] 使切片于DAB溶液(Dako)培育直到出现光背景。将切片以水龙头的水润洗,并以苏木精(hematoxylin)复染15分钟。以水龙头的水润洗后,在3个100%乙醇槽和3个二甲苯槽各润洗切片三分钟,然后以封盖剂(permount)(Fisher)安置。藉由光学显微镜来评估组织染色的程度,例如使用SPOT RT照相机以及SPOT RT软件v3.2(Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI)来证实该片。

[0166] 与该264scTCR/IgG1融合蛋白培育时,预期表现HLA-A2和p53的肿瘤的染色会比与CMVscTCR/IgG1融合蛋白培育时有特异性。当组织列阵未与融合蛋白培育时,预期较少或没有染色。另外,预期对HLA-A2和/或p53呈阴性的肿瘤组织与264scTCR/IgG1融合蛋白培育显示染色较对HLA-A2/p53呈阳性的肿瘤组织为下降。此可提供关于肿瘤类型与其相对比例的有利信息,此可藉由264scTCR融合蛋白予以辨识,帮助决定有关利用264scTCR为主的治疗来适当治疗所给予的肿瘤类型。

[0167] 实施例17-利用荧光TCR药剂的活体内肿瘤的成像

[0168] 表现载体被构筑为产生经264scTCR融合至GFP(绿色荧光蛋白)或Luc(萤火虫的荧光素(Luciferase))。此等载体可藉由以GFP或Luc所编码序列来取代IgG1基因片段藉由本文所述的264scTCR/IgG1表现载体予以产生。此等编码序列的来源可商业可得者(例如,HPF基因的Pegfp-c1(Clonetech),及Luc基因的pSP-Luc(Promega))。此载体做为模板以藉由标准PCR方法来分离正确的DNA序列。控制组TCR(例如CMVscTCR)融合至GFP和Luc的表现载体

可藉由相同方法来产生。在相同的应用中,此等表现载体可用于转染细胞(例如CHO细胞),以及所产生的表现蛋白如上文所述的纯化。

[0169] 此等经纯化蛋白系用于使活体内肿瘤成像。将随HLA-A2和p53表现而改变的人类肿瘤细胞以皮下或静脉输入,如上述实施例15所述允许肿瘤或转移的肺小节生长。关于scTCR/Luc蛋白,将scTCR/Luc融合蛋白的增加量静脉注射至老鼠体内。在经过允许该融合蛋白循环全身一段时间后,将2.0毫克用于荧光素的右旋萤光素(D-Luciferin)基质的100 μ I PBS静脉注射至老鼠体内,然后以二甲苯(3毫克/毫升)和K他命(ketamine)(7毫克/毫升)的PBS以120 μ I/20克体重的量来麻醉。关于该scTCR/GFP融合蛋白,将scTCR/GFP融合蛋白的增加量静脉注射至老鼠体内。在经过允许该融合蛋白循环全身一段时间后,以二甲苯(3毫克/毫升)和K他命(7毫克/毫升)的PBS如上述予以麻醉。

[0170] 关于活体内肿瘤检测,经麻醉的老鼠放置在NightOwl LB 981分子光成像仪(Molecular Light Imager)中。利用两阶段方法(two-step process)与WinLight软件(Berthold Technologies, Oak Ridge TN)来进行成像。首先,使用15毫秒曝光,接着利用具有背景扣除的5分钟光子融合法(photon integration period)进行萤光成像截取来获得黑色和白色照片。用软件处理该发光成像以色化(colorize)该荧光强度,然后覆于该黑白照片上用以显像。在某些例子的老鼠被牺牲,并进行病理评估以测定该肿瘤的大小、位置和特性(即抗原阳性或阴性)。

[0171] 来自成像研究的结果证实264scTCR/Luc或264scTCR/GFP药剂在带有HLA-A2/p53阳性肿瘤细胞的肿瘤位置上,比起CMVscTCR/Luc或CMVscTCR/GFP(对照组)药剂有特异性检测,此将进一步指出该等scTCR药剂有特异性检测体内肿瘤的能力。成像结果证实该264scTCR/Luc或264scTCR/GFP药剂在带有HLA-A2/p53阳性肿瘤细胞的肿瘤位置上,比起在带有HLA-A2阴性或p53阴性肿瘤细胞的肿瘤位置上有特异性检测,此将进一步指出该等scTCR药剂有特异性检测体内肿瘤的能力。

[0172] 实施例18-利用经放射性标记TCR的活体内肿瘤的检测

[0173] 在其它具体实施例中,264scTCR融合蛋白系经放射性标记,例如藉由直接以¹³¹I予以碘化。使用标准方法进行碘化。随着HLA-A2和p53表现而改变的人类肿瘤细胞以皮下或静脉输入,如上述所述允许肿瘤或转移的肺小节生长。将经放射性标记的264scTCR融合蛋白以皮下或静脉注射至老鼠体内,并在例如注射经放射性标记的264scTCR融合蛋白后的1、2、4、8和12小时以及1至14天予以成像。关于全身扫描,以100毫克/公斤的戊巴比妥钠(sodium pentobarbital)的量来麻醉老鼠,并以例如将配有4mm针孔瞄准仪的大视野Sopha DSX照相机连接至微电脑而予以成像。来自成像研究的结果证实经放射性核酸标记的264scTCR药剂于肿瘤位置比起于其它组织有特异性的检测,此将指出此等经放射性核素标记的264scTCR药剂有利于活体内肿瘤特异性检测。

[0174] 下述材料和方法的使用系为进行上述实施例的实验所必需。

[0175] 1. 材料

[0176] 将HLA-A2.1转殖鼠体内所产生的对人类p53 264-272有特异性的CTL株藉由序列稀释而衍生的A2.1 264CTL克隆#5。从American Type Culture Collection(Rockville, MD)获得的CHO.K1中国仓鼠卵巢、Jurkat人类T淋巴球、CTLL-2老鼠T淋巴球、T2人类淋巴瘤细胞、A375人类黑色素细胞瘤、融合瘤及BB7.2融合瘤细胞株。该T2人类细胞对HLA-A2.1呈

阳性,但缺乏TAP 1和2白,而使其表现无用的MHC分子,该MHC分子可负载外生性。该A375在我们实验室进行对HLA-A2.1与p53的测试,发现对这两种抗原皆呈阳性。该H57-597融合瘤制造能辨识鼠科动物TCRB恒定区抗原决定部位的单株抗体,而该BB7.2融合瘤制造能特异性辨识在HLA-A2的 α 2区上抗原决定部位的BB7.2单株抗体。人类黑色素细胞瘤的细胞株A375、A375-C15N的高度转移次克隆,如先前所报导维持在只用于活体内转移的研究。用于药物动力学研究的ELISA的重组人类IL-2和经生物素结合的抗人类IL-2多株抗体,系购自R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)。抗TCR C β mAb H57-597,抗鼠科动物TCR mAb,抗鼠科动物mAb,抗人类IL-2mAb,抗人类CD25封阻抗体与异构物对照组抗体以及经FITC标记的山羊抗老鼠IgG系由PharMingen (San Diego, CA) 所获得。除非有特别说明,所有细胞培养基和添加物系购自CellGro (Herndon, VA), 而所有细胞材料系购自Nunc (Rochester, NY)。所有老鼠是购自Harlan Labs (Indianapolis, IN)。

[0177] 2. 细胞培养

[0178] 所有细胞株维持在37°C与5%CO₂下,由补充10%热不活化FBS、2Mm左旋麸醯胺酸和1mg/ml G418 (仅用于经转染CHO细胞) 的IMDM所组成的完整培养基中。CTLL-2细胞维持在具有9U/ml:重组人类IL-2的添加物的相同培养基中。A375-C15N细胞维持在具有10%热不活化FBS、盘尼西林和链霉素 (Life Technologies) 的RPMI-1640中。

[0179] 老鼠脾脏细胞是从BALA/c老鼠无菌解剖下来的细胞制品分离出,透过尼龙网孔并以培养介质洗涤。以Gey's溶液溶解红血球细胞2分钟,接着添加培养介质来停止该溶淘。将单一细胞沉降物 (pellet) 洗涤两次,在培养基中以 2.5×10^6 /细胞悬浮,并于含有50 μ M 2-ME、100IU/ml重组人类IL-2和50ng/ml抗鼠科动物CD3 ϵ mAb的完整培养基中培养。

[0180] 3. 模型

[0181] 引子-寡核酸引子是从老鼠T细胞受体和人类IL-2基因的序列配对或补充予以合成。

[0182] KC228:5' -GAGGTGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGTCAGTGACGCAGC-3' ;

[0183] (SEQ ID NO:3)

[0184] KC229:5' -GAGGTGACTAGTGTCTGGCTTTATAATTAG-3' ; (SEQ ID NO:4)

[0185] PRIB4:5' -GGGGGGCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTCAGACTC-3' ; (SEQ ID NO:5)

[0186] KC176:5' -GAGGTGGAGCCCGGGTCTGCTCGGCCCCAGGC-3' ; (SEQ ID NO:6)

[0187] ET-TCRF1:5' -CCCACCGTCAGTCAGTGACGCAGCCC-3' ; (SEQ ID NO:7)

[0188] KC-170:5' -GTGGAGTTCGAAAAGGTGACTTACGTTTGTCTGCTCGGCCCCAG-3' ; (SEQ ID NO:8)

[0189] KC231:5'

[0190] CGATAAGTGTACTIONTACGTTTTTATTATTCCATCGGCATGTACTCTTCTTCTCTCG-3' ; (SEQ ID NO:9)

[0191] KC208:5'

[0192] GTGGAGATCGATAAGTGTACTIONTACGTTTTTATTATTTCGCGATCCGGAGTTAACGTCTGCTCGGCCCCAG-3' ; (SEQ ID NO:10)

[0193] KC327B:5' -TAGGTGTCCGAGCACCTACTTCAAGTTCTAC-3' ; (SEQ ID NO:11)

[0194] KC328B:5' -TAGGTGTCCGAAGTTAGTGTGAGATGATG-3' ; (SEQ ID NO:12)

[0195] AP2:5' -ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' ; (SEQ ID NO:13)

[0196] CaHYB:5' GCTGTCCTGAGACCGAGGATCTTTTAACTG3' ; (SEQ ID NO:14)

[0197] CBHYB:5' -TTGTTTGTGGCAATCTGTGCTTTTGATGG-3' . (SEQ ID NO:15)

[0198] 该TCR基因是从T细胞克隆A2.1 264#5予以克隆。我们标明从该T细胞克隆264scTCR衍生的单链TCR。聚(A)+RNA利用MicroFast Track kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) 予以萃取, 利用Marathon Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA) 制备双链cDNA并结合双链转接子(adaptor)寡核酸。为了分辨V α 和V β 区段, 使用A2.1 264#5cDNA制品以及上列的引子AP2(对转接子DNA具特异性)和CaHYB(对 α 链恒定区有特异性)或CBHYB(对 β 链恒定区有特异性)来进行5'-RACE PCR。使用TA克隆套组(Invitrogen)将PCR片段克隆至pCR2.1载体, 并利用M13正向和逆向引子来测定该序列。使用引子KC228和KC229来放大该T细胞受体V α 链以制造SfiI/SpeI片段, 而使用引子PRIB4和KC176来放大该V β CB链以制造XhoI/XmaI片段。将全长CB链第127氨基酸残基的半胱氨酸前的CB链截短。将SfiI/SpeI V α 链片段次克隆至经SfiI/SpeI所分解的pKC60, 一种编码不相干TCR的E. coli表现载体, 取代原本的TCR插入。然后将该XhoI/XmaI片段结合至该载体的XhoI/XmaI V β CB分解物以产生编码可溶性三区域264scTCR的载体。来自此模型的此三区域T细胞受体是利用引子ET-TCRF1和KC170予以放大, 以产生AgeI/ClaI DNA片段, 其做为具有KC231和KC208的PCR模板以制造AgeI/HpaI片段。

[0199] 人类IL-2编码序列利用Mini Total RNA Kit (Qiagen, Valencia CA) 和Qiashredder (Qiagen, Valencia CA) 藉由从Jurkat细胞分离出的RNA来进行RT-PCR而予以克隆。使用引子KC328来进行反转录作用, 而使用引子KC327B和KC328B来进行PCR, 以产生BspEI/NruI人类IL-2片段。将该BspEI/NruI人类IL-2片段克隆至经BspEI/NruI所分解的p149B1SP, 一种编码不相干TCR/抗体融合蛋白的克隆载体, 取代该融合蛋白的抗体部分。该经IL-2修饰的载体以AgeI和HpaI来分解, 将如上述的该AgeI/HpaI 264scTCR片段结合至它, 最后, 将AgeI/ClaI 264scTCR/IL-2融合蛋白片段克隆至经AgeIBstBI所分解的pSUN27, 一种scTCR/老鼠kappa融合载体, 取代原本克隆在载体中的不相干TCR, 以产生264scTCR/IL-2融合蛋白表现载体, pSUN38。做为一些流式细胞分析的阴性对照组的264scTCR/kappa融合蛋白是藉由将AgeIBstBI 264scTCR片段克隆至经AgeIBstBI所分解的pSUN27取代原本的TCR而产生。

[0200] 关于哺乳动物中融合蛋白的产生, 利用Bio-Rad Gene Pulser使CHO.K1细胞电穿孔(electroporate), 非序列稀释克隆及在含有1毫克/毫升的G418培养基中选择。

[0201] 4. 蛋白质萃取

[0202] 使用单株的抗鼠科动物TCR抗体H57-597藉由免疫亲和性层析法从细胞培养上清液来纯化出264scTCR/IL-2, 该264scTCR/IL-2能辨识在TCR β 链恒定区的抗原决定部位, 而结合至Sepharose 4B column (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)。然后将该经纯化的样品浓缩, 并使用配有30kDa分子量决定膜(Millipore, Bedford, MA)的Ultrafree-15离心过滤仪使经缓冲液交换至PBS。使该TCR融合蛋白样品储存于2至8 $^{\circ}$ C(短时间)或-80 $^{\circ}$ C(长时间)以作为生化或功能分析。在还原或非还原状态下使用4至12% Nu-PAGE聚丙烯酰胺凝胶(Novex, San Diego, CA)和Novex EX-Cel II II系统进行SDS-PAGE。以Coomassie blue使SDS-PAGE染色。

[0203] 5. ELISA

[0204] 使用披覆100-200ng/孔的抗人类IL-2mAb或抗鼠科动物的TCR V β 3mAb的Maxisorb 96孔盘(Nunc, Rochester, NY)来进行所有的ELISA。以经生物素结合的抗鼠科动物TCR H57mAb、抗鼠科动物TCR V β 3mAb或抗IL-2多株Ab来检测融合蛋白,再以链霉亲和素-HRP (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)、TMB基质和0.18M的H₂SO₄来终止该反应(BioFX, Owings Mills, MD)。使用96孔盘读取仪(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)量测在450nm的吸收值。

[0205] 6. 利用TCR融合蛋白的细胞染色

[0206] 将殖入p53(aa149-157)或p53(aa264-272)的T2细胞与0.5微克的264scTCR/IL-2融合蛋白于1%FBS的PBS中在室温培育30分钟。然后使该细胞与0.5微克的抗IL-2Ab或0.5微克的经生物结合的抗CR通H57-597mAb于室温培育30分钟,接着各别以1微克的抗鼠科动物的kappa-PE或5ng的链霉亲和素-PE(两者皆来自Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ)。在进行FACScan分析(Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ)前,以1%的FBS的PBS洗涤样品。为了测定两个p53是否皆同样地结合至HLA-A2,于室温下将装载的细胞以BB7.230分钟,接着藉由经FITC标记的山羊抗老鼠IgG并于FACScan仪器分析。

[0207] 将CTLL-2细胞与0.5微克的融合蛋白于室温下培育30分钟。为了测量经结合的融合蛋白,加入0.5微克的经生物素结合的抗TCRV β 3mAb,并于室温下培育30分钟,接着与5n的链霉亲和素-PE培育,或皮用用0.5微克的经PE标记的HLA-A2.1p53(aa 264-272)四聚体检测该蛋白质30分钟。如上述制备装载的经结合HLA-A2四聚体。在FACScan分析前,以1%FBS的PBS洗涤样品。关于IL-2受体封阻实验,在与264scTCR/IL-2或264scTCR/kappa融合蛋白培育前,将CTLL-2细胞与 α -人类CD25封阻抗体或异构物对照抗体培育30分钟。关于BALA/c老鼠脾脏细胞的染色,如上所述使用HLA-A2.1p53(aa 264-272)四聚体对CTLL-2细胞进行染色,以检测经结合的融合蛋白。

[0208] 以不含的细胞解离缓冲液(Sigma, St. Louis, MO)将A375细胞采收。 5×10^5 的样品以1%FBS的PBS洗涤,并且与不具融合蛋白、5微克的3C8(不相干的TCR/IL-2融合蛋白)或5微克的264scTCR/IL-2于室温培育30分钟,接着以1微克的经生物素结合的H57-597mAb培育。然后于室温与1微克的经PE标记的链霉亲和素培育15分钟,洗涤,并藉由FACScan分析。

[0209] 7. 细胞结合

[0210] 将殖入p53(aa149-157)或p53(aa264-272)的T2细胞以7.88ng/ml(HE)(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)予以标定,而CTLL-2细胞以50ng/ml calcein AM(Molecular Probes, Inc., Eugene OR)予以标定。洗涤后,在2微克的264scTCR/IL-2融合蛋白存在或不存在下,将这两个经标记细胞群以1:1比例于室温混合20分钟。然后藉由FACScan分析。

[0211] 8. 生物分析

[0212] 将CTLL-2细胞以 4×10^3 细胞/孔接种于含有重组IL-2或264scTCR/IL-2的各种浓度的培冠基中,并于37°C和5%CO₂中培育21小时。在5或50微克的抗人类CD25阻断抗体或异构物对照抗体有存在或不存在下,将对CTLL-2细胞有特异性的对照组与264scTCR/IL-2培育,并在37°C和5%CO₂中培育21小时。以20微升/孔的量加入细胞增殖剂WST-1(Roche Inc., Indianapolis, IN),并在37°C和5%CO₂中培育4小时。使用96孔盘读取仪量测在450nm的吸收值。

[0213] 9. 老鼠体内的药物动力学

[0214] 有关所有涉及动物的实验,是遵从实验室动物照护规范(NIH公开号85-23,于1985年修订),以及适用的特别国家法律。经由侧尾静脉对母BALA/c老鼠进行以PBS稀释32微克的264scTCR/IL-2融合蛋白至总量为100微升的静脉注射。从一群未注射264scTCR/IL-2的老鼠收集血清以建立背景值。从已注射的群体中于15、30分钟及1、2、4、8和24小时藉由尾部血液来收集血清。在4℃14000Xg下使血液样品离心10分钟,收集血清,并存放于-80℃直到使用。264scTCR/IL-2浓度的测定是藉由ELISA,使用捕捉用的抗TCR VB3或抗IL-2单株抗体,以及检测用的经生物素结合的抗TCR H57单株抗体或抗IL-2多株抗体,接着以链霉亲和素HRP。

[0215] 10. 活体内研究

[0216] 脱毛的去胸腺母鼠(nu/nu)是经由侧尾静脉注射 5.0×10^5 A375-C15N细胞。以264scTCR/IL-2(32、10、3、1或0.1微克于100毫升总体积)或重组人类IL-2(8、2.50.75、0.25或0.025微克于100毫升总体积)的各种体积注射动物,并于肿瘤细胞注射后第1、2、3、4、7、10、14、17、21、28和35天量测。肿瘤细胞注射后第42天,所有动物皆以人道方式牺牲,取出肺并固定在Bouin's溶液,计算表通的肺肿瘤小节。在各肺的肿瘤小节经由两个观察者的计算,并记镜其平均数。

[0217] 11. 含有IgG与Bir A卷标序列的TCR模型和融合蛋白

[0218] 该TCR基因是从T细胞克隆A2.1 264#5予以克隆。我们标明从该T细胞克隆衍生的单链TCR为264scTCR。使用264scTCR/IL-2融合蛋白模做为模板来放大三区域单链的264scTCR。为了产生该264scTCR/IgG1表现模型,将该单链TCR片段结合至抗体重链表现载体,取代该抗体可变区以造成单链TCR融合至人类IgG1重链区。为了产生该264scTCR/tunIgG1,使该TCR片段结合至含有IgG1重链区的表现载体,其在允许双硫键结合的枢纽区前被截短。

[0219] 为了产生该264scTCR/BirA表现模型,将该链的TCR片段结合至含有该BirA卷标序列(Beckett,D.et al.Protein Sci.1999Apr;8(4):921-9)的表现载体,以修得该卷标序列在该264scTCR分子的C区段表现。

[0220] 由利用HLA-A2所限制的CMV-pp65所刺激的CTLs中克隆该巨细胞病毒单链TCR(CMVscTCR)。从264scTCR/IgG1DNA将IgG1片段放大以制造该CMVscTCR/IgG1模型。

[0221] 关于哺乳动物的融合蛋白的制造,利用Bio-Rad Gene PuIser使CHO.K1细胞电穿孔(electroporate),接着非序列稀释克隆和在含有1毫克/毫升的G418培养基中选择。

[0222] 蛋白纯化进行如下。使用连接在Sepharose 4B column(Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ)的H57-597单株抗体,藉由免疫亲和性层析法从细胞培养上清液来纯化出264scTCR/IgG1、264scTCR/BirA和264scTCR/tunIgG。使用连接在Sepharose 4B column(Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ)的BF1单株抗体,藉由免疫亲和性层析法从细胞培养上清液来纯化出CMVscTCR/IgG1。264scTCR/BirA在经由制造商的建议状况下,与生物素-蛋白(Avidity)经生物素结合。

[0223] 12. 藉由流式细胞仪进行264scTCR药剂的细胞染色检测

[0224] 264scTCR药剂使经固定和未经固定细胞染色的能力在某些研究被定出特性。包括带有各种可检测区域的264scTCR融合蛋白的细胞染色方法,以及检测此等融合蛋白与各种

经萤光标记引子的细胞交互作用。某些对照组用于评估特异性染色。包括染色细胞的对照组缺乏具有264scTCR药剂的p53(aa 264-272)抗原、具有CMV scTCR的p53-阳性染色细胞、单独具有二级染色药剂的p53-阳性染色细胞及具有264scTCR的p53-阳性染色细胞,具有或不具有竞争型封阻药剂(后可溶性HLA-A2/p53多聚体)。

[0225] 测试264scTCR的单体或多体型式关于它们使细胞特异性染色的能力。T2细胞在37℃用2.5小时装载100微克/毫升的p53(aa264-273)或p53(aa149-157)。洗涤以除去多余的步骤后,该细胞与125Pm的264scTCR/IL-2、264scTCR/IgGI、264scTCR/trIgGI或264scTCR/BirA(未经生物素结合)培育30至45分钟。还原与未还原样品的SDS-PAGE分析指出264scTCR/trIgGI与264scTCR/BirA蛋白为多体,而264scTCR/IgGI为二聚体。在另一个洗涤步骤后,细胞与2.5微克的经PE结合的H57mAb(H57-PE)培育30分钟。洗涤该细胞,并使用CellQuest软件(BD Biosciences, San Jose, CA)于FACScan流式细胞仪(BD Sciences, San Jose, CA)分析。亦分析未经染色和经H57-PE染色的T2细胞以建立背景染色。

[0226] 下述文件是为本揭示全文所引用之参考资料(藉由如下所显示的数字)。各文件合并于此以资参考。

[0227] 1. Aitman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94

[0228] 2. Anderson KS, Alexander J, Wei M, Cresswell P (1993) Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines. *J Immunol* 151:3407

[0229] 3. Bauer RJ, Dedrick RL, White ML, Murray MJ, Garovoy MR (1999) Population pharmacokinetics and of the anti-CD1 Ia antibody in human subjects with psoriasis. *J Biopharm* 27:397

[0230] 4. Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA (1996) Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 98:2801

[0231] 5. Chung S, KW, Friedman SM, Hafler DA, Strominger JL (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12654

[0232] 6. Donohue JH, Rosenberg SA (1983) The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol* 130:2203

[0233] 7. Dummer R, Gore ME, Hancock BW, Guillou PJ, Grob H, Becker JC, Oskam R, Dieleman JP, Burg G (1995) A multicenter phase II clinical trial using dacarbazine and continuous infusion interleukin-2 for metastatic melanoma. Clinical data and immunomonitoring. *Cancer* 75:1038

[0234] 8. Engel Ottenhoff TH, Klausner RD (1992) High-efficiency expression and solubilization of functional T cell antigen receptor heterodimers. *Science* 256:1318

[0235] 9. Gregoire C, Rebai N, Schweisguth F, Necker A, Mazza G, Auphan N, Millward A, AM, Malissen B (1991) Engineered secreted T-cell receptor alpha beta

heterodimers. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8077

[0236] 10. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 155:1823

[0237] 11. T, Scheidtmann Hutchinson MA, Eckhart W, Walter G Complexes of polyoma virus medium T antigen and cellular proteins. Proc Natl Acad Sci:7952

[0238] 12. Hank JA, Albertini MR, Schiller J, Sondel PM (1993) Activation of multiple effector mechanisms to enhance tumor immunotherapy. J Immunother 14: 329

[0239] 13. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. Cancer Res 50:5234

[0240] 14. Hank JA, Sosman JA, Kohler PC, R, Storer B, Sondel PM (1990b) Depressed in vitro T cell responses concomitant with augmented interleukin-2 responses by lymphocytes from cancer patients following in vivo treatment with interleukin-2. J Biol Response Mod 9:5

[0241] 15. Hank JA, Surfus J, Gan J, Chew TL, Hong R, Tans K, Reisfeld R, Seeger RC, Reynolds CP, Bauer M, et al. (1994) Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. J Immunother 15:29

[0242] 16. Harville ET, Fleming JM, Morrison SL (1996) In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation. J Immunol 157:3165

[0243] 17. Harville ET, Morrison SL (1995) An IgG3-IL2 fusion protein activates complement, binds Fc gamma RI, generates LAK activity and shows enhanced binding to the high affinity IL-2R. Immunotechnology 1:95

[0244] 18. Hilliard KL, H, Chung S, Bell JI, Strominger JL (1994) Binding of soluble natural ligands to a soluble human T-cell receptor fragment produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9057

[0245] 19. Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER., Vogelstein B, Levine AJ (1990) Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. Cell Growth Differ 1:571

[0246] 20. Hurford RK Jr, Mulligan RC, Tepper RI (1995) Gene therapy of metastatic cancer by in vivo retroviral gene targeting. Nat Genet 10:430

[0247] 21. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, RE, Haber E, Crea R, et al (1988) Protein engineering of antibody

- binding sites:recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli.Proc Natl Acad Sci U S A 85:5879
- [0248] 22.Iggo R,Gatter K,Bartek J,Lane D,Harris AL(1990) Increased expression of mutant forms in primary lung cancer.Lancet 335:675
- [0249] 23.Kendra K,Gan J,Ricci M,Surfus J,Shaker A,Super M,Frost JD, Rakhmievich A,Hank JA,Gillies SD,Sondei PM(1999) Pharmacokinetics and stability interleukin-2 fusion protein in mice.Cancer Immunol Immunother 48: 219
- [0250] 24.Klausner RD,Lippincott-Schwartz J,Bonifacino JS(1990) The T cell antigen receptor:insights into organelle biology.Annu Rev Cell Biol 6:403
- [0251] 25.Lewis LD,Coie BF,Wallace PK,Fisher JL,Waugh M,Guyre PM,Fanger MW, Curnow RT,PA,Ernstoff MS(2001)relationships of the bispecific antibody when administered in combination with interferon gamma:a multiple-dose phase-I study in patients with advanced cancer which overexpresses HER-2/neu.J Immunol Methods 248:149
- [0252] 26.Lin AY,Devaux B,Green A,Sagerstrom C,Elliott JF,Davis MM(1990) Expression cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form.Science 249:677
- [0253] 27.Lode HN,Xiang R,Dreier T,Varki NM,Gillies SD,Reisfeld RA(1998) Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy.Blood 91:1706
- [0254] 28.Lode HN,Xiang R,Varki NM,DoIman CS,Gillies SD,Reisfeld RA(1997) Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow.J Natl Cancer Inst 89:1586
- [0255] 29.Lustgarten J,Marks J,Sherman LA(1999) Redirecting effector T cells through their IL-2 receptors.J Immunol 162:359
- [0256] 30.McLaughlin R,O'Hanlon D,McHale T,Connolly CE,Given HF(2001) Prognostic implications of p53 and expression in 108 women with stage two breast cancer.Ir J:11
- [0257] 31.Motzer RJ,Rakhit A,Ginsberg M,Rittweger K,Vuky J,Yu R,Fettner S,L (2001)Phase I trial of 40-kd branched pegylated interferon alfa-2a for patients with advanced renal cell carcinoma.J Clin Oncol 19:1312
- [0258] 32.Motzer RJ,Rakhit A,Schwartz LH,Olencki T,Malone TM,Sandstrom K, Nadeau R,Parmer H,Bukowski R(1998)Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma.Clin Cancer Res 4:1183
- [0259] 33.Nastala CL,Edington HD,McKinney TG,Tahara H,Nalesnik MA,Brunda MJ, Gately MK,Schreiber RD,Storkus WJ,et al.(1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma

production. *J Immunol* 153:1697

[0260] 34. Pardo DM (1995) Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13:399

[0261] 35. Peng LS, Penichet ML, Morrison SL (1999) A single-chain IL-12IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity. *J Immunol* 163:250

[0262] 36. Penichet ML, Harville ET, Morrison SL (1997) Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 8:106

[0263] 37. Posey JA, Raspet R, U, Deo YM, Keller T, Marshall JL, Hodgson J, A, Hawkins MJ (1999) A pilot trial of GM-CSF and in patients with erbB-2-positive advanced malignancies. *J Immunother* 22:371

[0264] 38. Pullarkat V, Deo Y, Link J, Spears L, Marty V, Curnow R, Groshen S, Gee C, Weber JS (1999) A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu. *Cancer Immunol Immunother* 48:9

[0265] 39. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, et al. (2001) Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 33:433

[0266] 40. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, et al (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316:889

[0267] 41. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebbersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE (1989) Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 210:474

[0268] 42. Rosenberg SA, Spiess PJ, Schwarz S (1983) In vivo administration of Interleukin-2 enhances specific alloimmune responses. *Transplantation* 35:631

[0269] 43. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*:307

[0270] 44. Royce RE, Steinberg SM, Krouse RS, Heywood G, White DE, Hwu P, Marincola FM, Parkinson DR, DJ, Topalian SL, et al. (1996) Correlates of Response to IL-2 Therapy in Patients Treated for Metastatic Renal Cancer and Melanoma. *Cancer J Sci Am* 2:91

[0271] 45. Sherman LA, Hesse SV, Irwin MJ, La Face D, Peterson P (1992) Selecting T cell receptors with high affinity for by decreasing the contribution of Science 258:815

[0272] 46. Sondel PM, Kohler PC, Hank JA, Moore KH, Rosenthal NS, Sosman JA,

Bechhofer R, Storer B (1988) Clinical and immunological effects of recombinant interleukin 2 given by repetitive weekly cycles to patients with cancer. *Cancer Res* 48:2561

[0273] 47. Sosman JA, Hank JA, Moore KH, Borchert A, Schell K, Kohler PC, Goldstein D, R, Storer B, Albertini MR, et al. Prolonged interleukin-2 (IL-2) treatment can augment immune activation without enhancing antitumor activity in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 9:35

[0274] 48. Temmim L, Baker H, Sinowatz F (2001) detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res* 21:743

[0275] 49. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA (1995) Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11993

[0276] 50. Theobald M, Biggs J, Hernandez J, Lustgarten J, Labadie C, Sherman LA (1997) Tolerance to p53 by A2.1-restricted T lymphocytes. *J Exp Med* 185:833

[0277] 51. Straten P, Guldborg P, Schrama D, Andersen MA, Moerch U, Seremet T, Siedel C, Reisfeld RA, Becker JC (2001) In situ cytokine therapy: redistribution of clonally expanded T cells. *Eur J Immunol* 31:250

[0278] 52. Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA (1997) induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158:3359

[0279] 53. van Golen KL, Risin S, Staroselsky A, Berger D, Tainsky MA, Pathak S, Price JE (1996) Predominance of the metastatic phenotype in hybrids formed by fusion of mouse and human melanoma clones. *Clin Exp Metastasis*.14:95

[0280] 54. Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K (1992) Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356:793

[0281] 55. Weil-Hillman G, Voss SD, Fisch P, Schell K, Hank JA, Sosman JA, Sugamura K, Sondel PM (1990) Natural killer cells activated by interleukin 2 treatment in vivo respond to interleukin 2 primarily through the p75 receptor and maintain the p55 (TAC) negative phenotype. *Cancer Res* 50:2683

[0282] 56. Wiebke EA, Rosenberg SA, (1988) Acute immunologic effects of interleukin-2 therapy in cancer patients: decreased delayed type hypersensitivity response and decreased proliferative response to soluble antigens. *J Clin Oncol* 6:1440.

[0283] 57. Herron SM, Lebowitz MS, Bieler JG, al-Ramadi BK, Utz U, Bothwell ALM and Schneck JP (1997) Analysis of the expression of peptide-major histocompatibility complexes using high affinity soluble divalent T cell receptors. *J Exp Med* 186:1333.

[0284] 本文所指的所有参考资料的揭示是合并于此以资参考。本发明已藉由参考资料来描述其较佳的具体实施例。然而,将了解到熟习此技艺之人士,在不超该揭露之条件下,可做本发明之精神和范畴内进行修饰和改良。

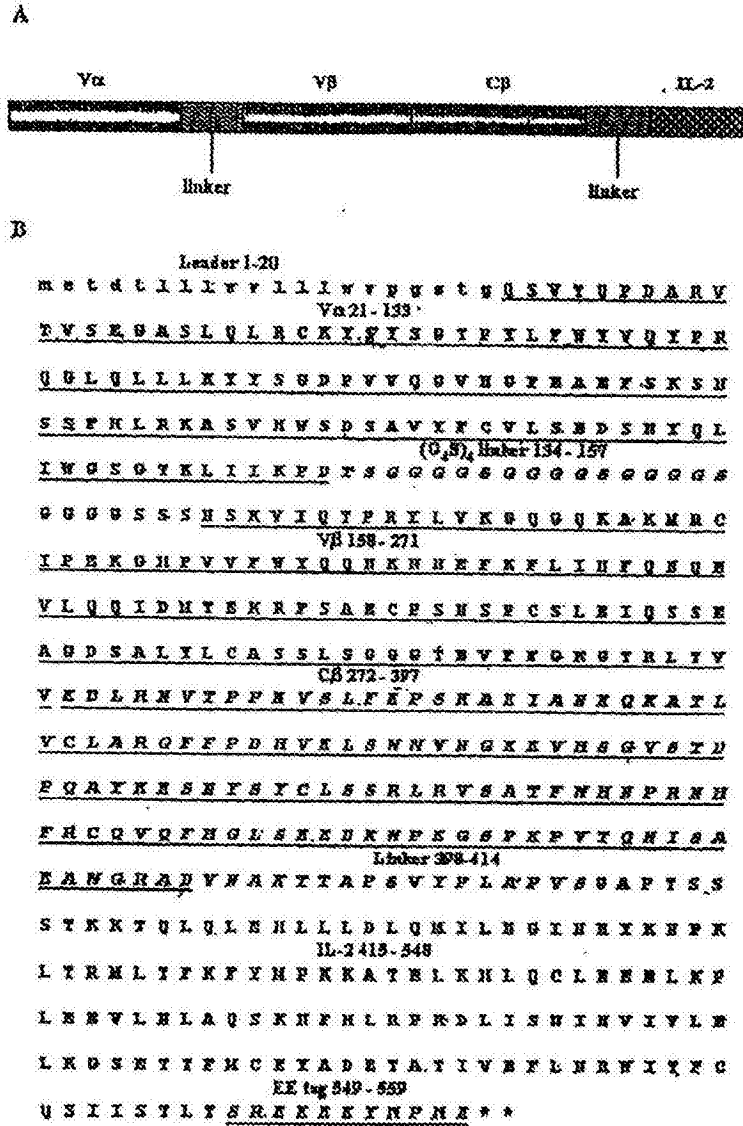


图1

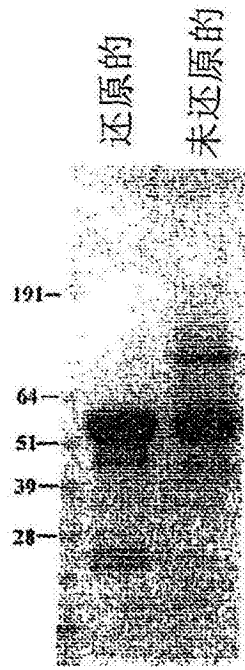


图2

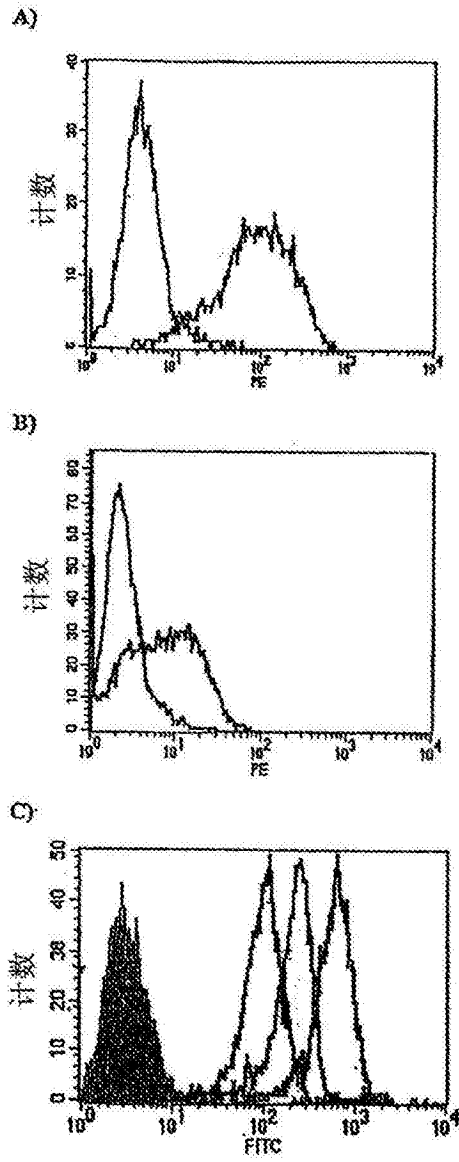


图3

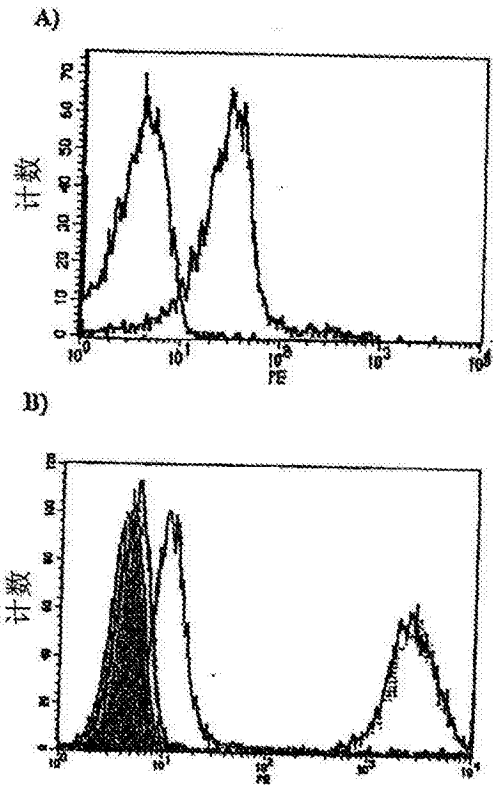


图4

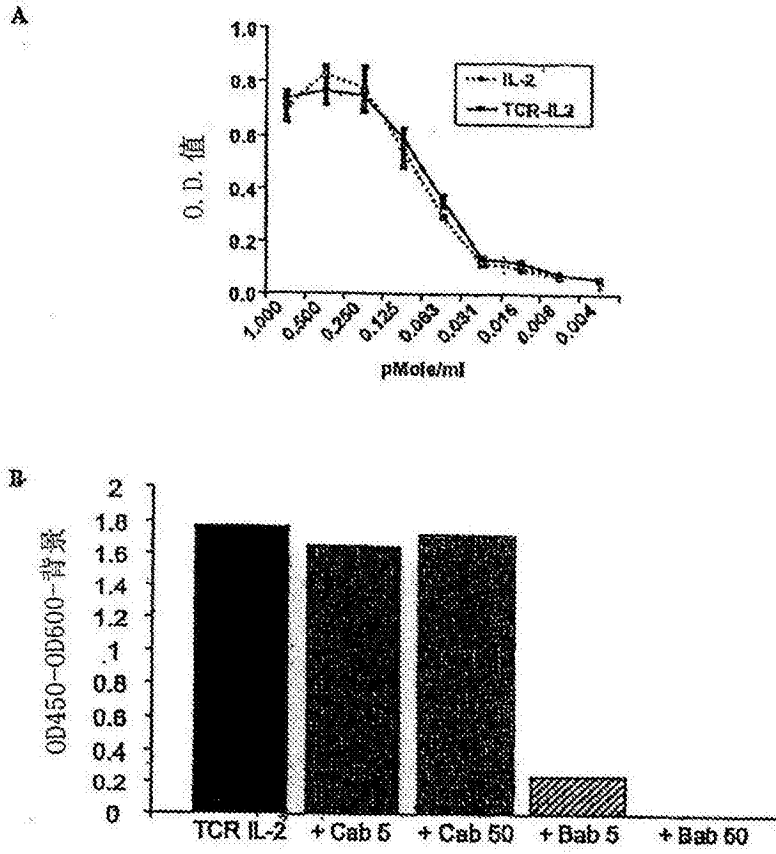


图5

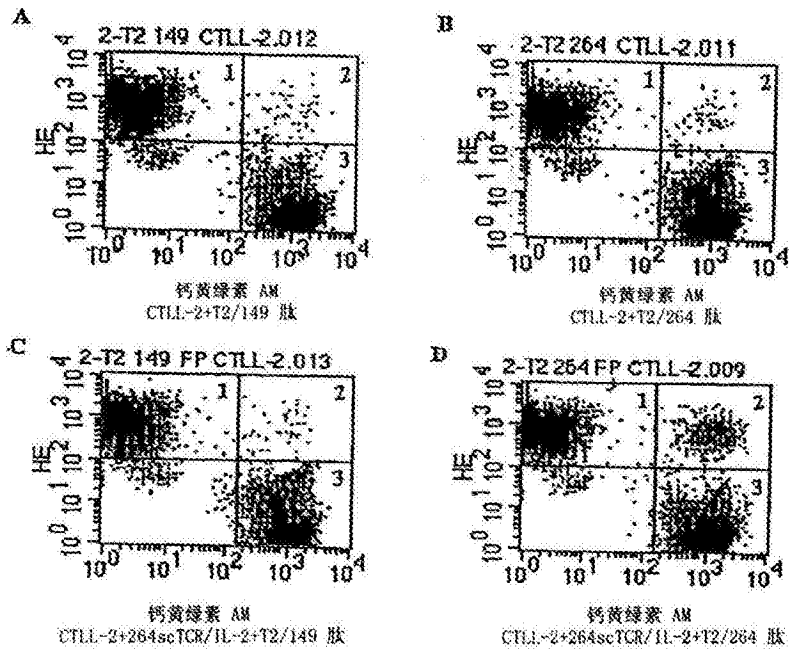


图6

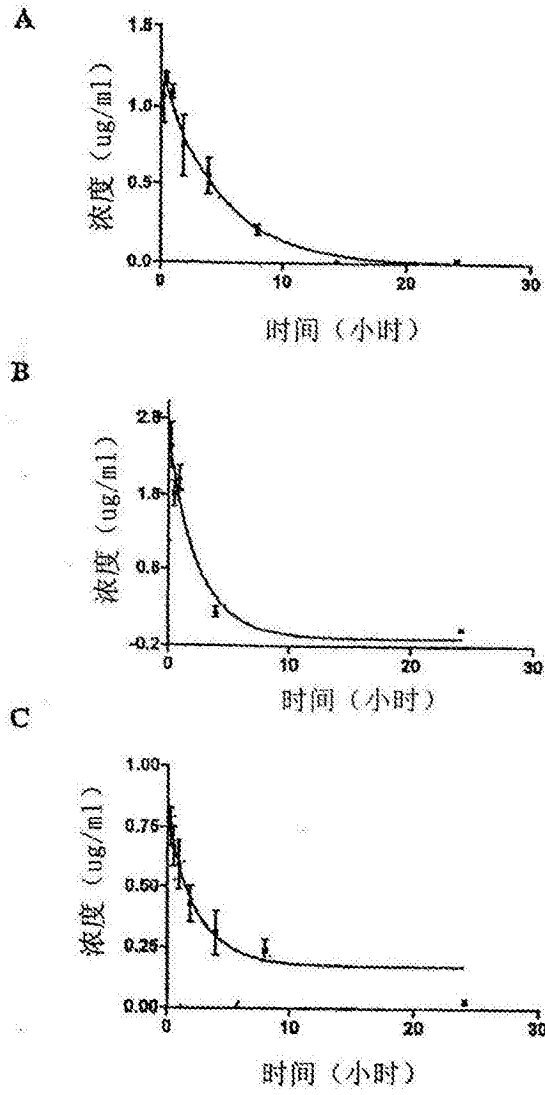


图7

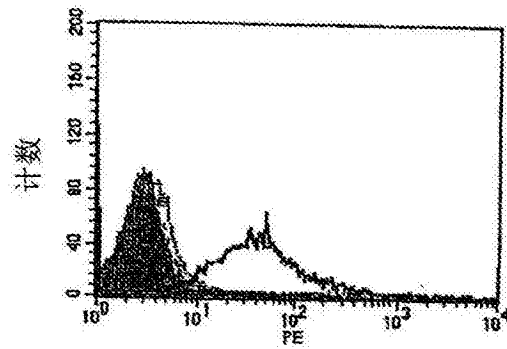


图8

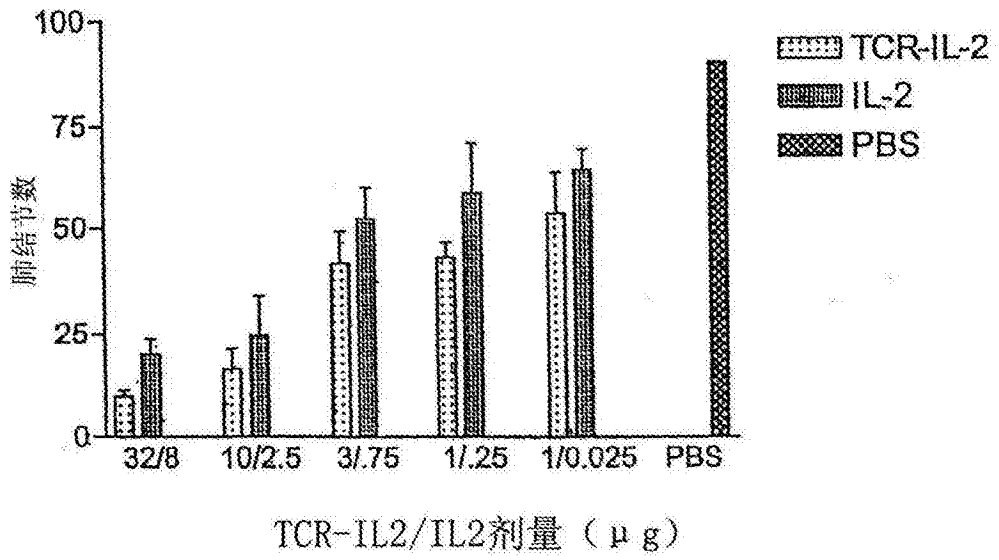


图9

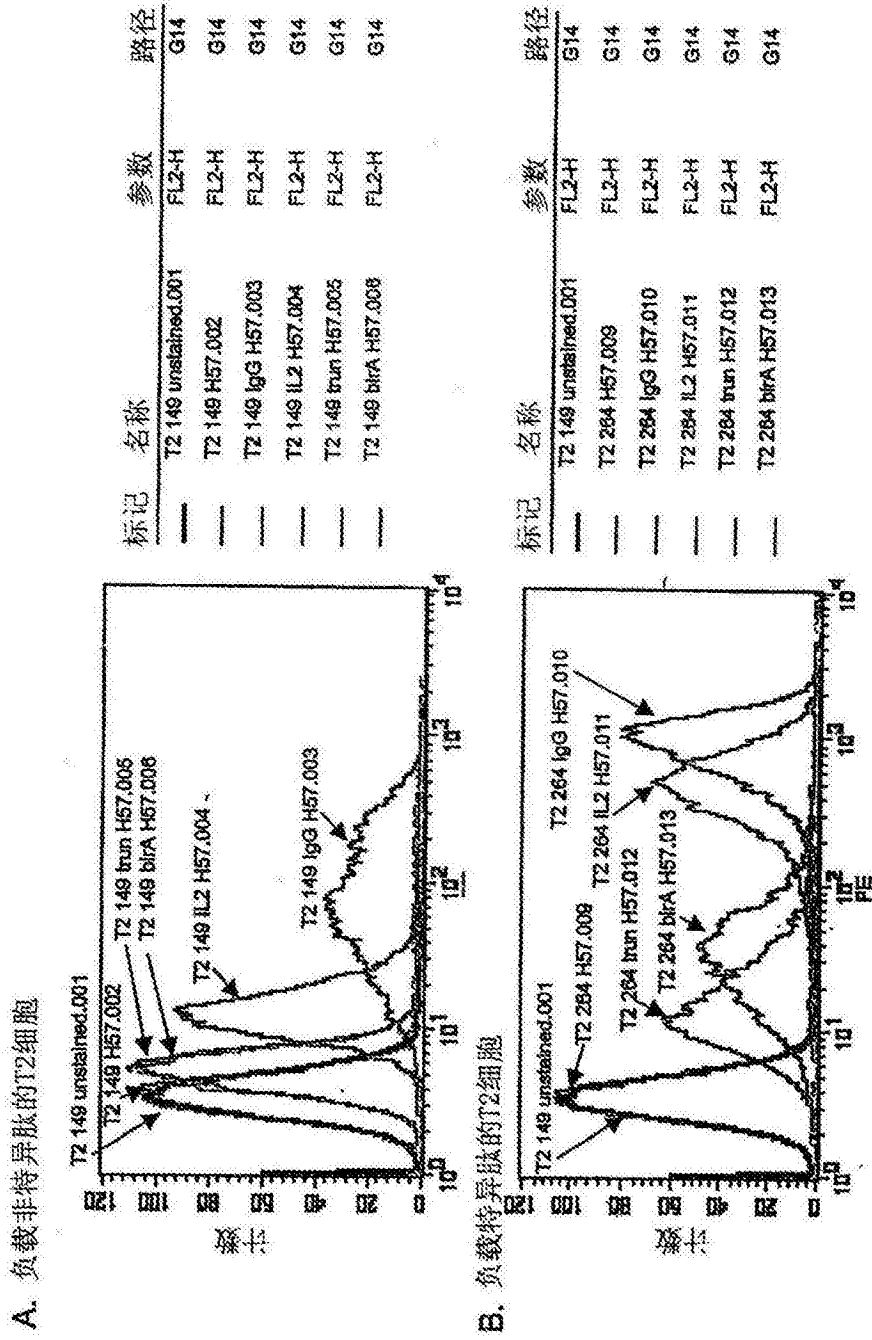


图10

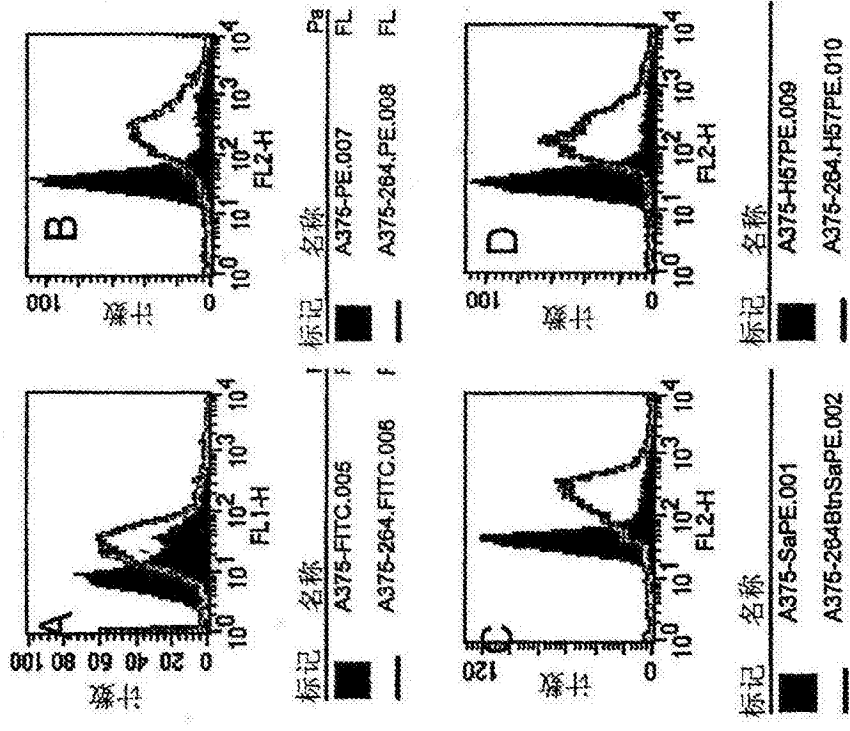


图11

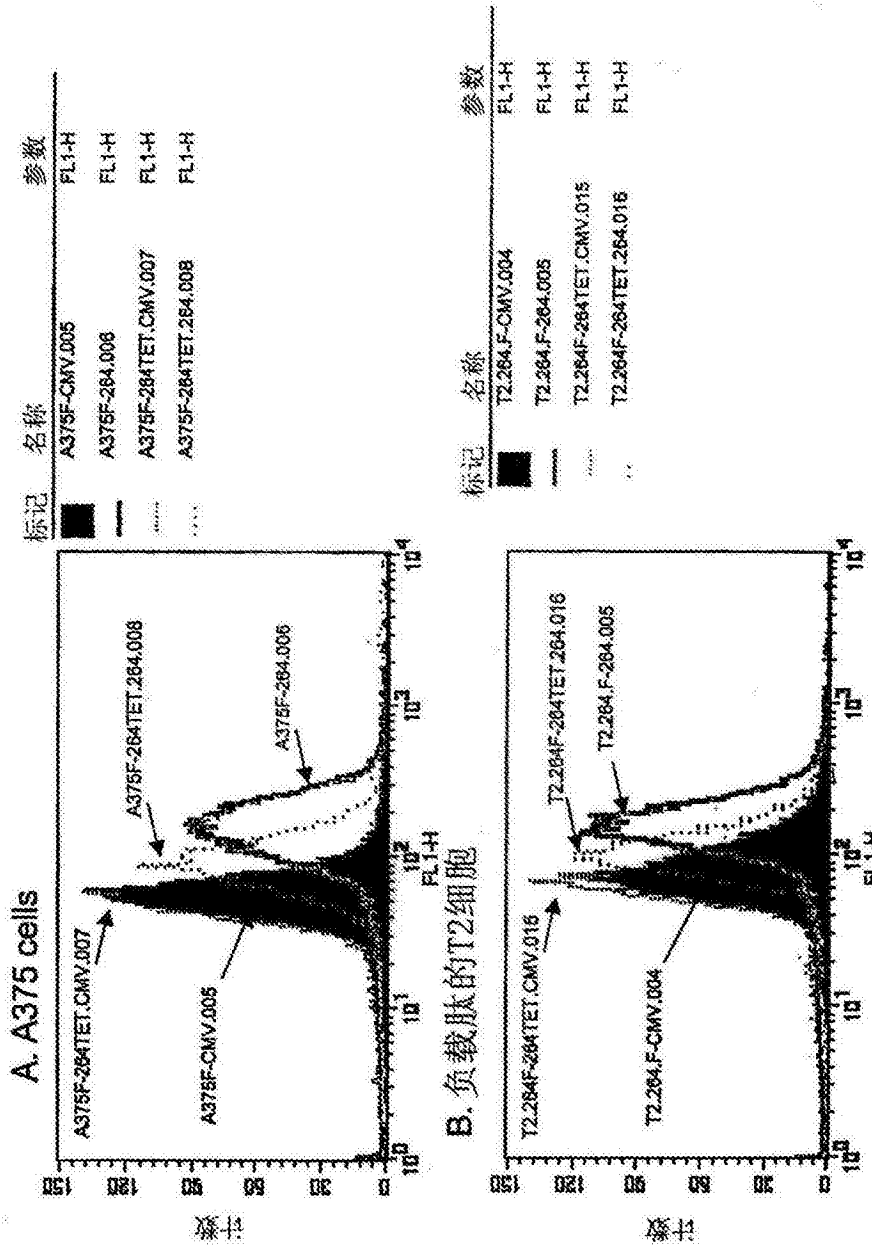


图12

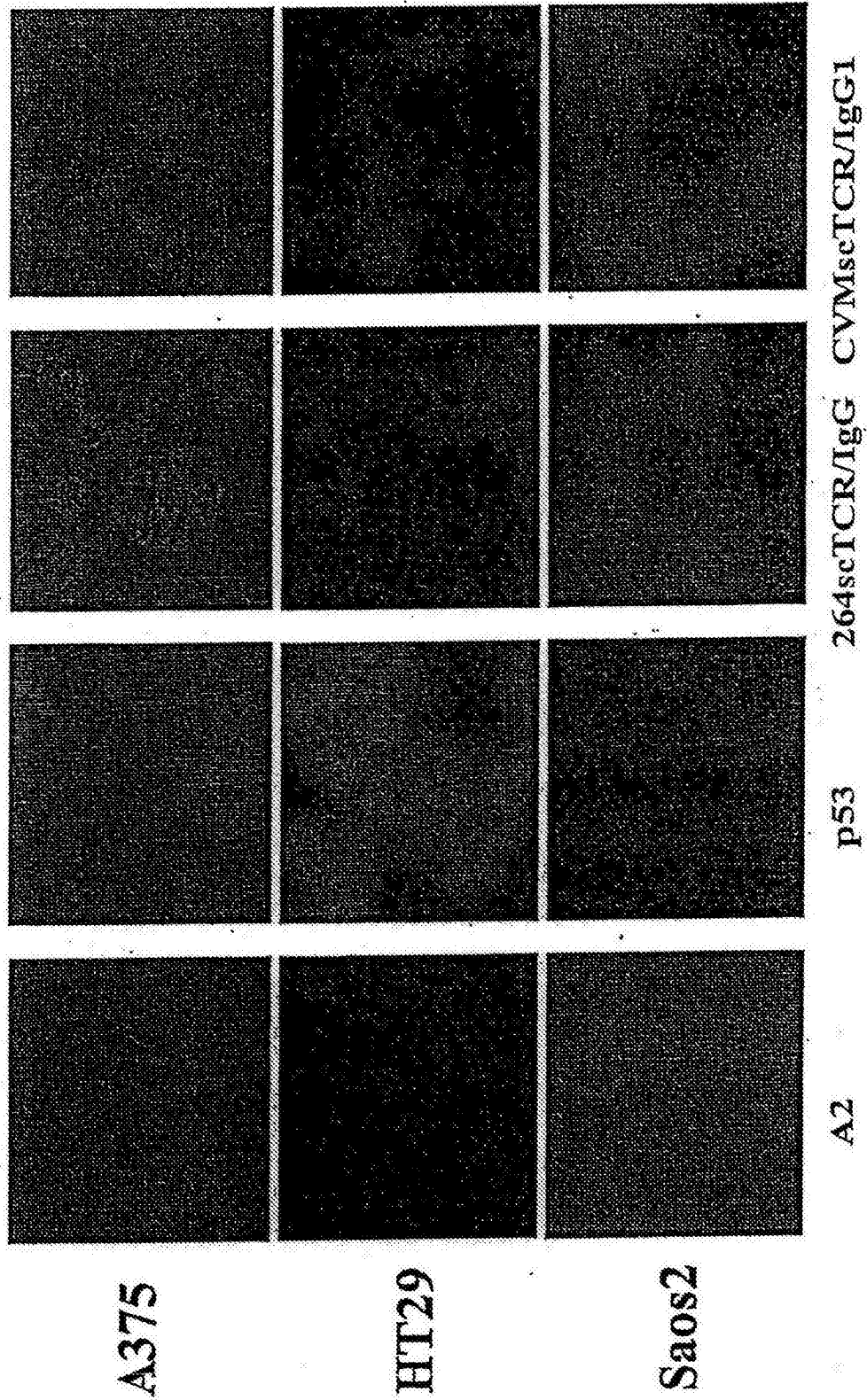


图13

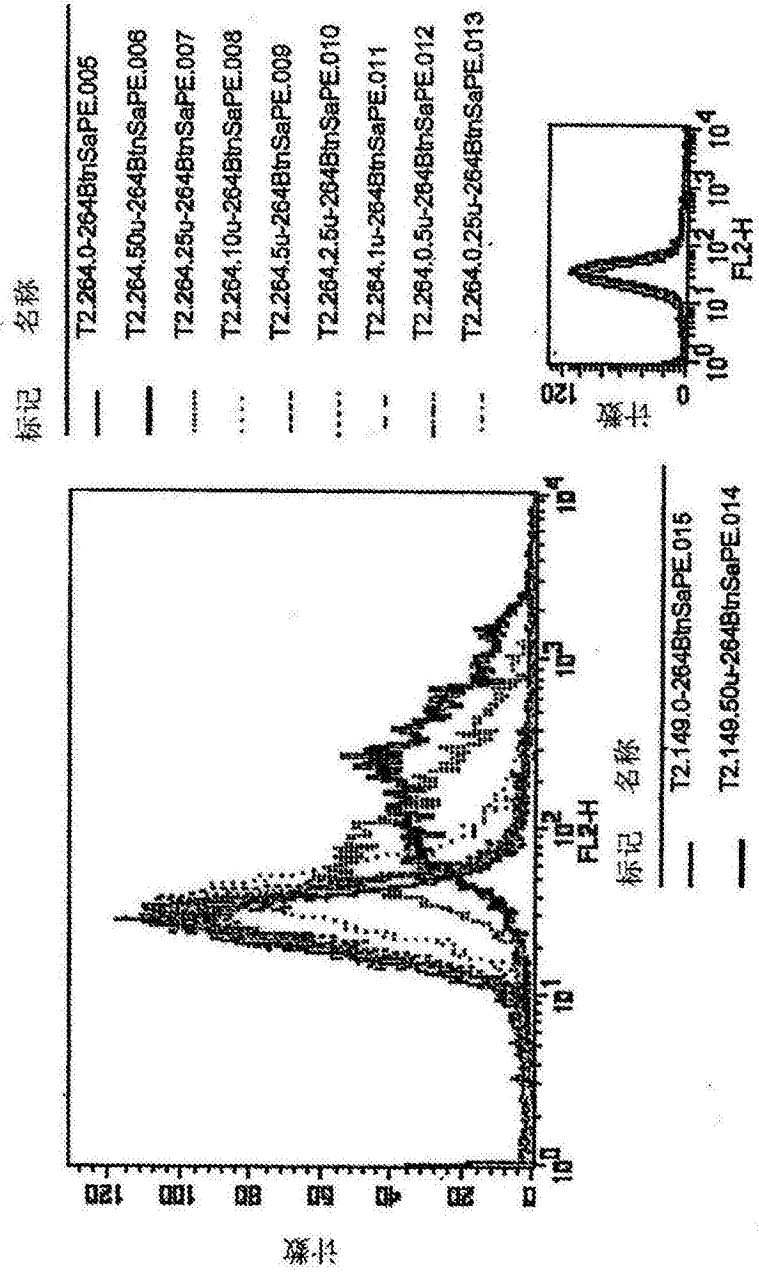


图14

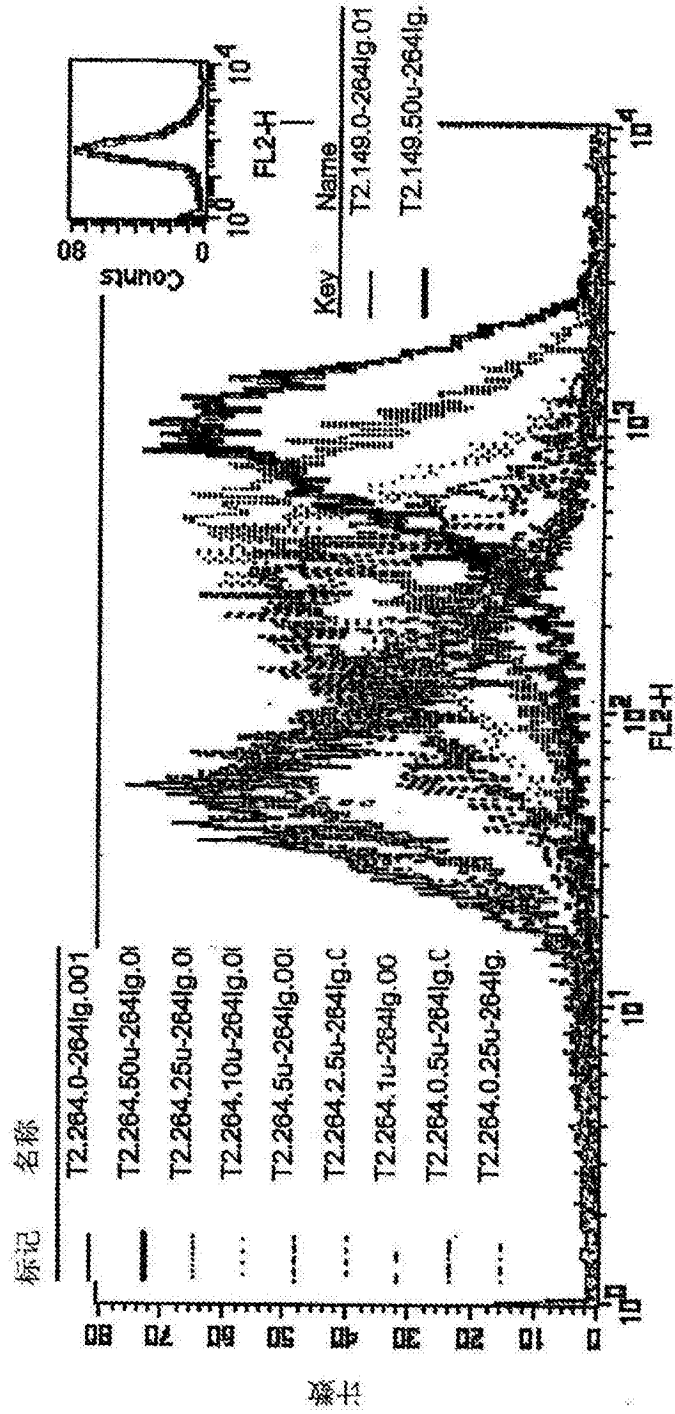


图15

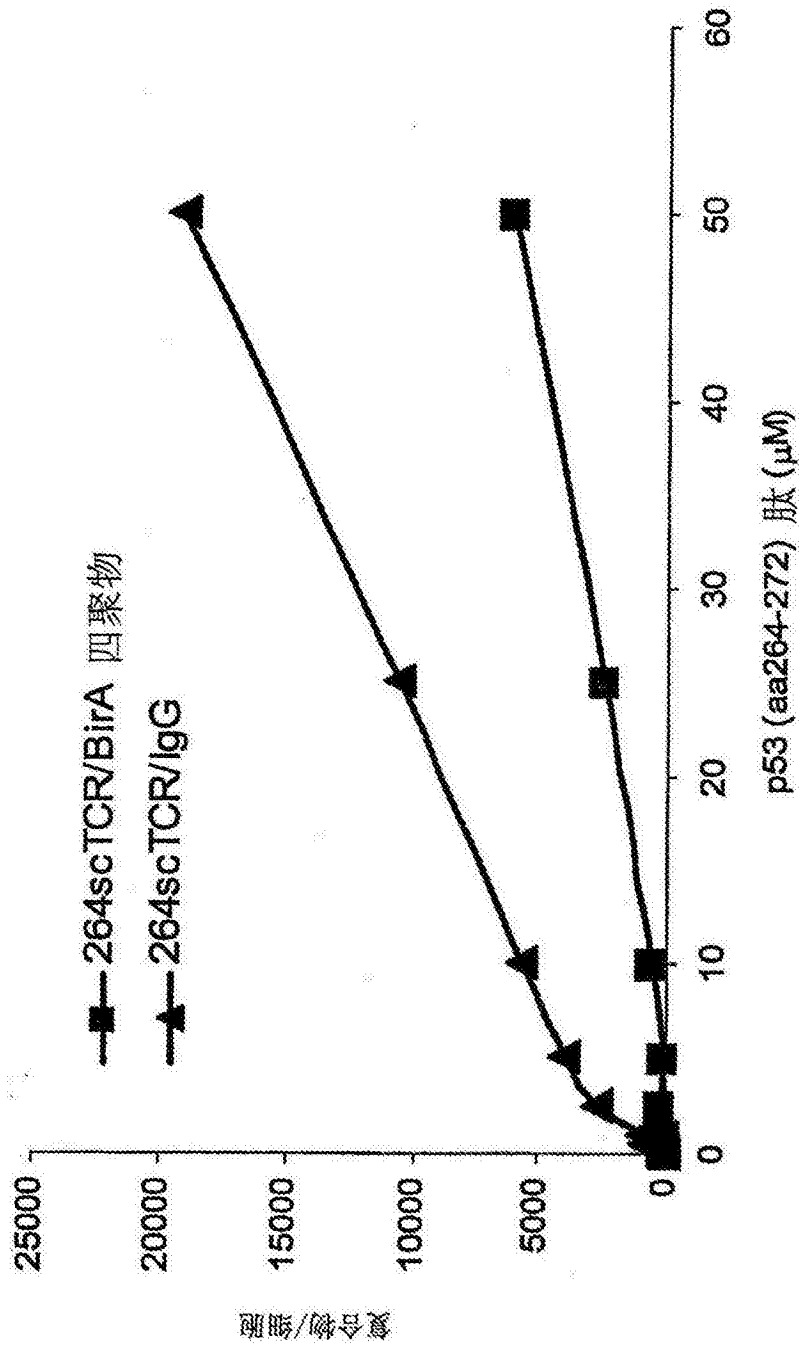


图16

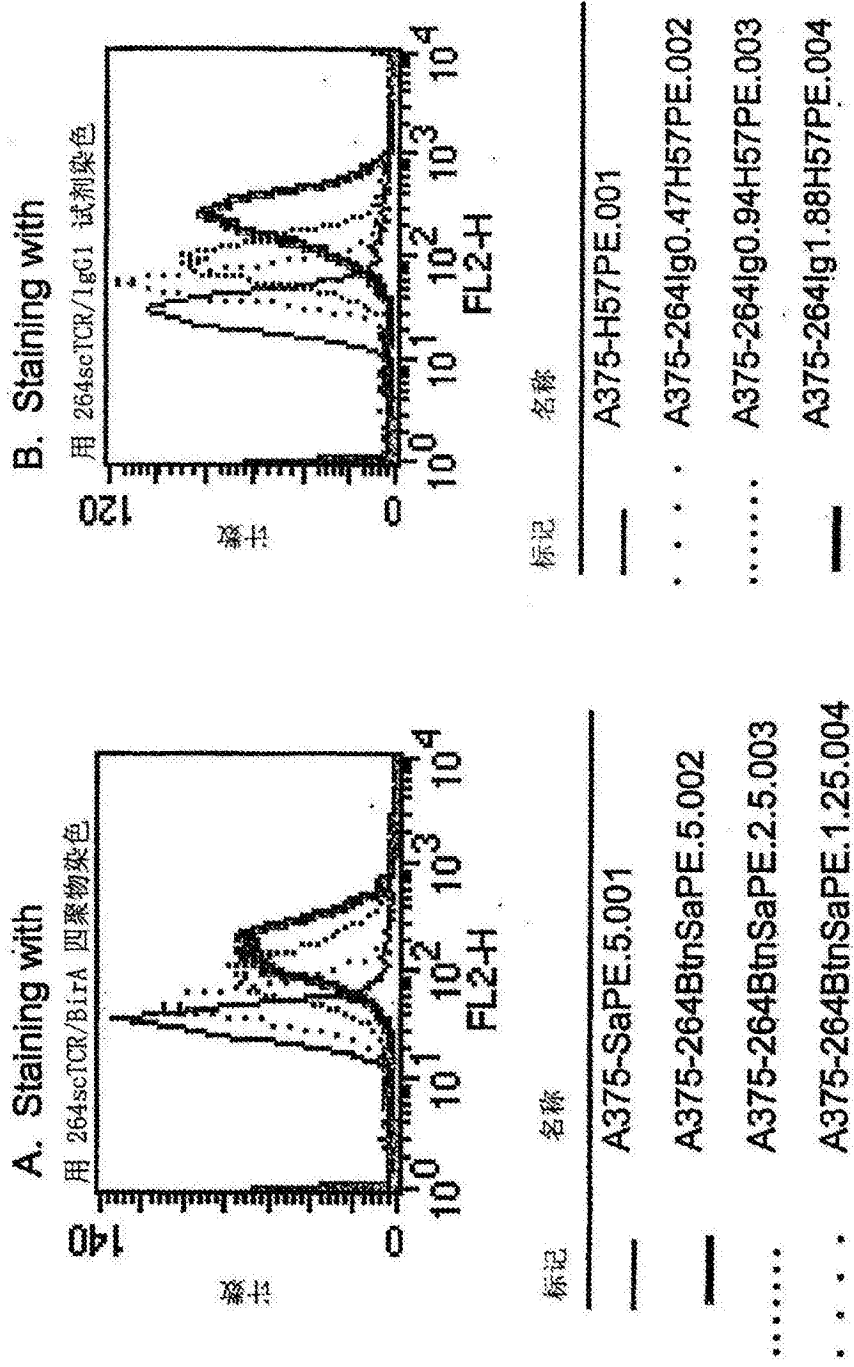


图17

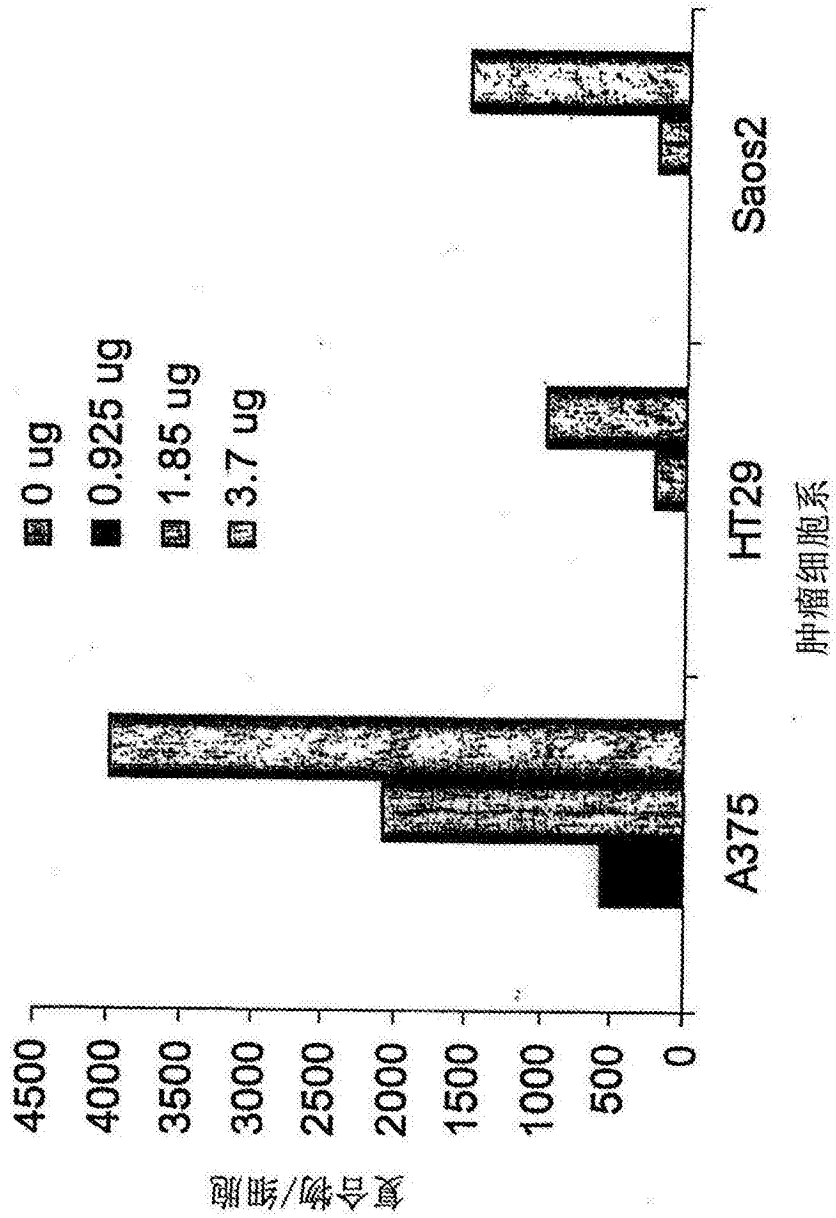


图18

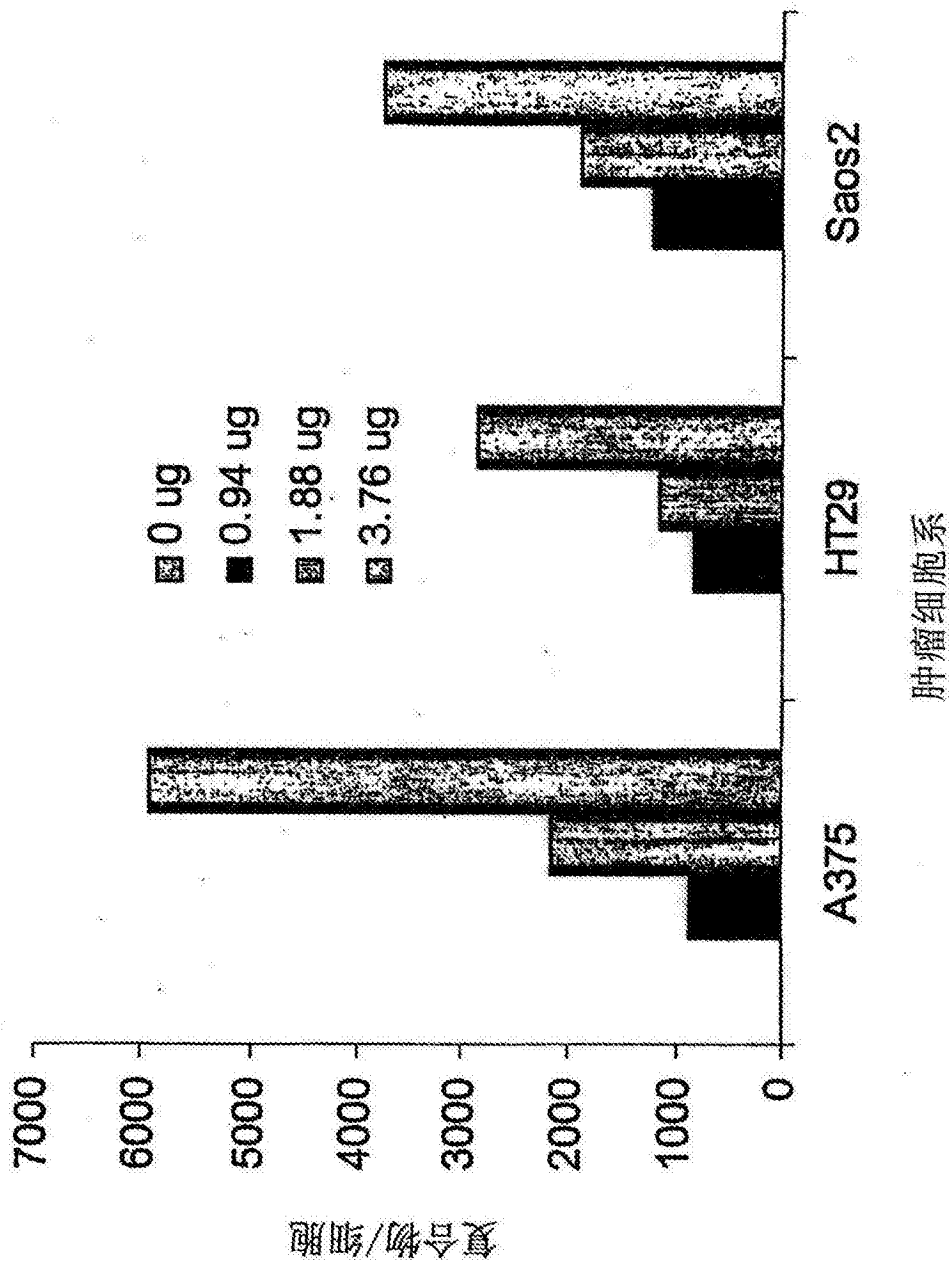


图19

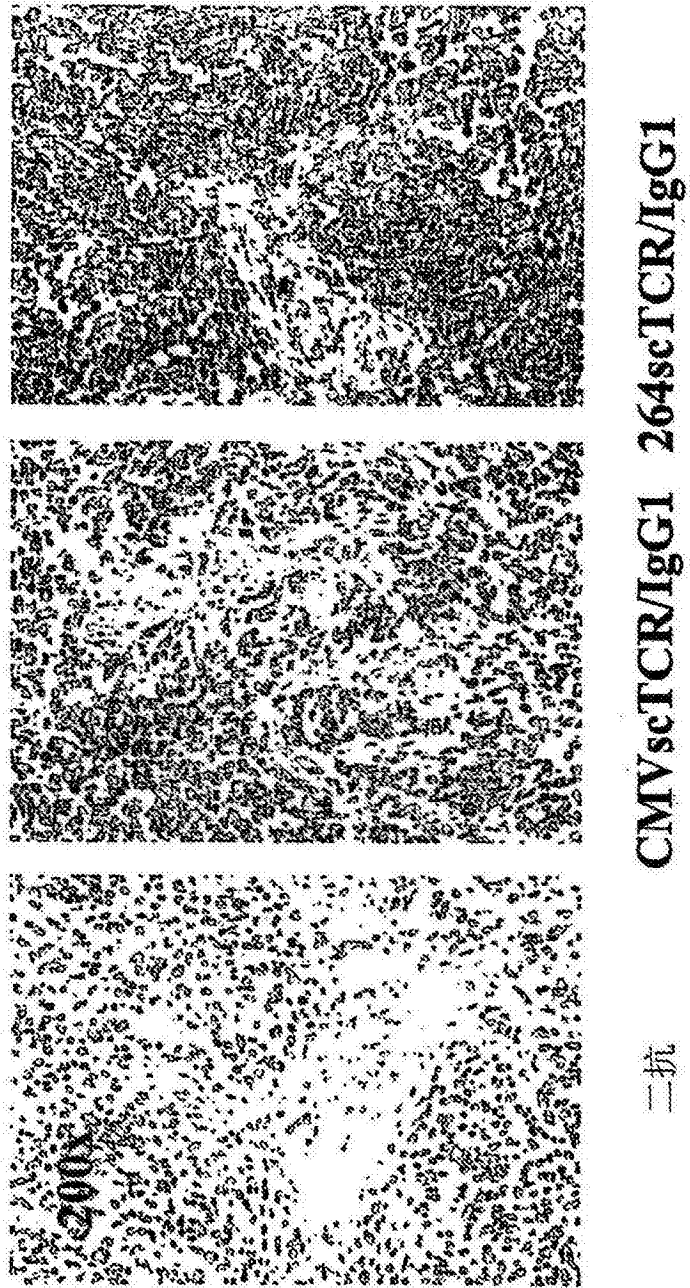


图20

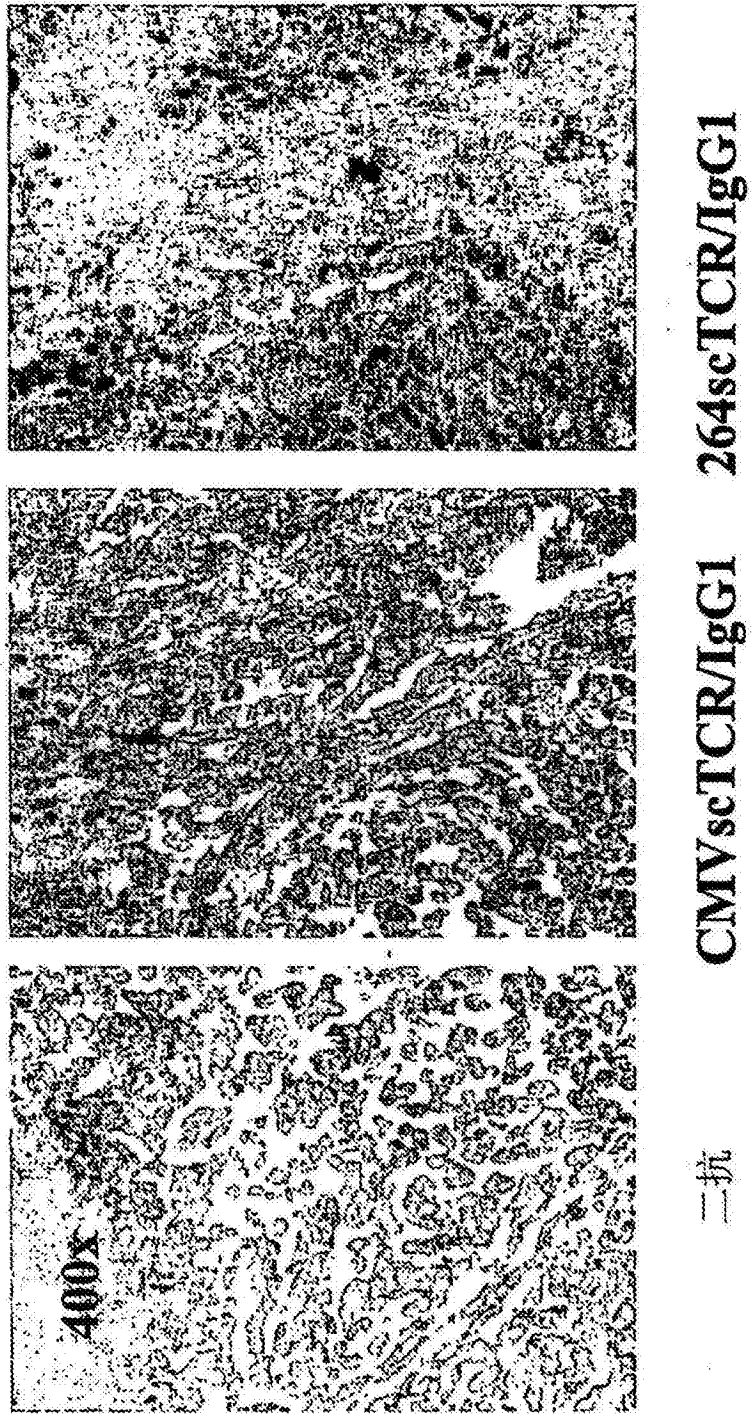


图21

专利名称(译)	可溶性TCR分子及其用途		
公开(公告)号	CN105021814B	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN201510413443.8	申请日	2004-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔特生物科学公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔特生物科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿尔特生物科学公司		
[标]发明人	SA普日思奇维 HJ本蒙特 KF卡德 X朱		
发明人	S·A·普日思奇维 H·J·本蒙特 K·F·卡德 X·朱		
IPC分类号	C12N15/12 A61B A61K39/395 A61K47/48 A61K51/08 C07K14/55 C07K14/725 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/574 G01N33/68		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/518790 2003-11-10 US		
其他公开文献	CN105021814A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及可溶性TCR分子及其用途。具体地，本发明公开了一种非用于疾病诊断或治疗目的的检测含有p53肽抗原的细胞或组织的方法，所述p53肽抗原在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上，其中所述肽抗原为内源性抗原，该方法包括：固定所述细胞或组织；然后使所述细胞或组织与至少一种可溶性TCR分子或其功能性片段在使被提呈的p53肽抗原与可溶性TCR分子或其片段间形成特异性结合的复合物的条件下接触；之后洗涤和检测步骤。本发明具有高度灵敏度，且可用来检测与视需要定量非常低量的MHC/肽复合物。

