

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040183.4

[51] Int. Cl.

A61B 10/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月24日

[11] 公开号 CN 1901839A

[22] 申请日 2004.11.10

[21] 申请号 200480040183.4

[30] 优先权

[32] 2003.11.10 [33] US [31] 60/518,790

[86] 国际申请 PCT/US2004/037569 2004.11.10

[87] 国际公布 WO2005/046449 英 2005.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.10

[71] 申请人 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 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书4页 说明书65页 附图21页

[54] 发明名称

可溶性 TCR 分子及其用途

[57] 摘要

本发明系揭示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。

- 1.一种检测含有肽抗原的细胞或组织的方法，所述肽抗原在 MHC 复合物作用下被提呈于细胞或组织上，该方法包括：
 - a) 使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，
 - b) 在可移除任何未结合至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；
 - c) 检测作为含有被提呈的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 分子或片段负载有肽抗原。
10. 如权利要求 1 的方法，其中所述方法进一步包括使细胞或组织与至少一种变性剂接触。
11. 如权利要求 10 的方法，其中所述方法进一步包括在步骤 a) 前使细胞或组织与变性剂接触以及使细胞或组织变性（固定）。
12. 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。
13. 如权利要求 12 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。
14. 如权利要求 12 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。
15. 如权利要求 12 的方法，其中步骤 c) 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。
16. 如权利要求 15 的方法，其中步骤 c) 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。
17. 如权利要求 1 的方法，其中存在于细胞上的任何肽抗原的量小于约 100,000 个拷贝。
18. 如权利要求 17 的方法，其中存在于细胞上的任何肽抗原的量小于约 400 个拷贝。
19. 如权利要求 1 的方法，其中所述肽抗原为与肿瘤相关的肽抗原。
20. 如权利要求 1 的方法，其中所述细胞或组织为悬浮性。
21. 如权利要求 1 的方法，其中所述可溶性 TCR 分子或片段含有至少一个单链 TCR。
22. 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检测。

23. 如权利要求 22 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、纳米纳米粒子、顺磁金属离子或荧光、磷光或化学发光分子。
24. 如权利要求 21 的方法，其中单链 TCR 或片段进一步包括至少一个共价键结合的细胞因子。
25. 如权利要求 24 的方法，其中可溶性 TCR 分子或片段为含有一共价键结合的细胞因子或其片段的单链 TCR。
26. 如权利要求 25 的方法，其中单链 TCR 或片段包含编码白介素-2(IL-2)的序列。
27. 如权利要求 21 的方法，其中单链 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。
28. 如权利要求 27 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。
29. 如权利要求 28 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。
30. 如权利要求 1 的方法，其中所述 MHC 复合物为 HLA-A2 限制性的。
31. 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 或片段与不含肽抗原的细胞间的结合。
32. 如权利要求 1 的方法，其中所述被提呈的肽抗原为 p53 (aa 149-157)或 p53(aa264-272)。
33. 如权利要求 1 的方法，其中所述方法是在活体内、活体外或体外进行。
34. 如权利要求 1 的方法，其中所述细胞或组织为肿瘤细胞或组织。

35. 一种检测对象体内肿瘤细胞或组织的方法，其中所述细胞或组织含有在MHC复合物作用下被提呈于细胞或组织上的与肿瘤相关的肽抗原，所述方法包括：

- a) 在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，向所述对象投药可溶性 TCR 分子或其功能性片段；以及
- b) 检测作为包含被提呈的肿瘤相关肽抗原的肿瘤细胞或组织的指示的特异性结合的复合物。

36. 如权利要求 35 的方法，其中所述可溶性 TCR 分子或片段含有至少一个单链 TCR。

37. 如权利要求 35 的方法，其中所述可溶性 TCR 分子或片段被可检测地标记。

38. 如权利要求 37 的方法，其中所述可检测标记为生物素、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。

可溶性TCR分子及其用途

技术领域

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。

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。

本案相关的前案资料

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。

美国政府利益的声明

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

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]。

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。

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。

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。

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兼容性复合物蛋白(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]。

过去曾企图使用某些 TCRs 来检测有胜肽的 MHC/胜肽复合物(Epel et al. , 2002; Holler et al. , 2003; Lebowitz et al. , 1999 ; Plaksin 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。

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。

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。

举例而言,Holler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。Holler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。

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 Els 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。

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。

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

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:

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

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。

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。

另外，本发明可用来检测与视需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。

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。

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。

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)。

本发明的其它态样如下所述。

附图说明

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)。

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。

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

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

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

第 6A 图至第 6D 图为显示 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。

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。

第 8 图为显示以 264scTCR/IL-2 融合蛋白使肿瘤细胞染色的图表。

第 9 图为显示 264scTCR/IL-2 融合蛋白的抗肿瘤效果的图表。

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)。

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。

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。

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。

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。

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。

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

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。

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。

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。

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。

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

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肽抗原与该可溶性 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;以及检测作为含有被提呈的肽抗原的细胞或组织的指示的所述特异性结合的复合物。

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)。

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。

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。

简单地说，单链(“-sc”) TCR 分子包括 V- α 与 V- β 链，两者透过合适的肽连接序列共价地相连。举例而言，V- α 链可透过合适的肽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 个胺基酸，较佳长度为约 300 至 350 个胺基酸，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 链的胺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)。

如 08/943,086 号的申请案所揭示，sc-TCR 稠分子的 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 胺基酸的长度，且通常不包括 C- β 链的最后的半胱胺酸(cysteine)残基(在老鼠的第 127 个胺基酸位置或在人类的第 131 个胺基酸位置)。此等包括 C- α 链片段的融合蛋白，其长度可于约 1 至 90 个胺基酸间(即该 C- α 链最多但不包括后最后的半胱胺酸)。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 个胺基酸开始的约 1 至 72 个胺基酸间。另一具体实例中，该 C- α 链

片段在从第 1 至 22 个(白胺酸(leucine))胺基酸开始的约 1 至 22 个胺基酸间。该 C- α 链片段通常不包括任何半胱胺酸残基,除了包括 2 个半胱胺酸残基的 C₉₀变体与包括 1 个半胱胺酸残基的 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。

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,两个肽连接子序列,其中第一肽连接子序列在 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。第二肽连接子再融合成为 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 分子可透过适当的肽连接子将 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。

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。

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。

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 Rsen 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。

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。

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。

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肽抗原。

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。

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素(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。

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 (ricin)、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 (gelonin)。此技术领域中的已知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有活性的试剂, 例如磷脂酶 (phospholipase) 酶 (譬如磷脂酶 C)。请参见, 例如 Moskaug 等人的 J. Biol. Chem., 264, 15709 (1989); Pastan 等人的 Cell, 64, 1986; Pastan 等人的 Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem., 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes 和 Phil, Ther., 25, 355; 已公开的 PCT 申请案 WO 94/29350 号; 已公开的 PCT 申请案 WO 94/04689 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)。

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、镱-188、碘-133、铟-111、镓-99m、镱-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、铀-225、铀-227、钍-211、碘-125、碘-126、碘-133、镱-165、镱-166、铋-212、铋-213、溴-77、铟-113m、镱-67、镱-68、钷-95、钷-97、钷-101、钷-103、钷-105、汞-107、汞-203、镱-186、镱-188、碲-99m、碲-121m、碲-122m、碲-125m、铊-165、铊-167、铊-168、氟-18、银-111、铂-197、钯-109、铜-67、磷-32、磷-33、钷-90、钷-47、钷-153、镱-177、铊-105、镱-142、镱-143、钷-149、铋-161、钷-166、金-198、金-199、钴-57、钴-58、铬-51、铁-59、硒-75 和铋-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。

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 。

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-CI-EHPG、5-Me-EHPG、5t-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(2,3-二羟基苯甲酰基)-三儿茶酸(LICAM)和1,3,5-N,N',N''-三(2,3-二羟基苯甲酰基)胺基甲基苯(MECAM)。

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、酶性卷标例如 β -半乳糖苷酶和过氧化氢酶(包括山葵过氧化氢酶)、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)。

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、芳族吖啶鎓酯(acridinium ester)卷标、咪唑卷标、吖啶鎓盐卷标、草酸酯卷标、荧光素(luciferin)卷标、荧光酶卷标、水母荧光蛋白(aequorin)卷标等。

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+} 。

可利用的酶卷标包括任何可轻易检测酶活性或酶基质者。此等酶包括马来酸去氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、醇类去氢酶、甘油磷酸去氢酶、磷酸丙糖异构酶、过氧化酶、碱性磷酸酶、天门冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、抗氧化酶、葡萄糖-6-磷酸去氢酶、葡萄糖淀粉酶、乙酰胆碱酯化酶、荧光素酶和 DNA 聚合。

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(乙烯基吡咯烷酮)、聚苯乙烯、聚丙烯乙酰胺或聚(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、聚肽、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)。

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)的聚肽区域或卷标的 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)结合肽、6xHis 模体、生物素(biotin)连接酶标的模体等。多体的 TCR 分子亦包括透过化学交连反应性的胺基酸或多糖所产生者。该胺基酸(或多糖)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、脂质和多糖所覆盖的核骨架(scaffold)或如上述未经覆盖的珠子、纳米粒子、固相表面、阵列(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。

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肽抗原的细胞或组织。

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肽抗原检测方法。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 分子与其同源的肽抗原间的交互作用, 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。

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。

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。

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。

本发明可用来检测各种肽抗原，包括指称为与肿瘤相关的肽抗原或 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。

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、酶或其催化活性片段、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。

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。

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。

在其它具体实施例中,该 MHC 复合物为 HLA-A2 所限制。

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(不包括该肽抗原)的该可溶性 TCR 或片段。

本发明所使用的特定肽抗原,包括 p53(aa149-157)或 p53(aa264-272)。

本发明方法可在活体内、活体外或试管内进行。

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 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{99}Tc)或其它可投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。

本发明亦可用于在具有或疑似有肿瘤的患者体内提供与肿瘤相关肽抗原的活体内肿瘤成像。在本方法的操作中，抗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肽/MHC 复合物的背景中和与肿瘤相关的肽抗原特异性地结合。该组成物于活体内投予一段时间，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。

该含有 TCR 的组成物可于标的处以非经肠投予(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、经口或穿皮投予。

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照相机、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。

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)或生物素结合后投予，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。

本发明亦可用于涉及荧光活性细胞分类术(FACS)的应用。FACS 可用于检测该可溶性 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。

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 胺基酸残基 264-272 的未经突变 p53 肽。经调查该分子 TCR 部分的肽特异性结合位连接至肽负载的 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。

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 肽(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 所限制的肽特定抗原结合特性,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。

本揭示显示可溶性 TCR 具有用于肽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。

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 融合蛋白具有显着的血清半生期约 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。

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。

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。

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)、酶免疫分析法、竞争型分析法、饱和分析法或其它本技术领域已知的蛋白质结合分析法。一般请参见，Ausubel 等人 *supra* ; Harlow 和 Lane in, *Antibodies : 4 Laboratory 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。

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°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。有时添加蛋白酶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。

下述非局限性实施例是为说明本发明。

实施例 1: TCR 融合蛋白结构体的产生

制造融合蛋白，其含有三域且融合至人类 IL-2 对 p53 肽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)肽有特异性的 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 EEEEEYMPME; 序列编号: 2)插入该融合蛋白 IL-2 部分的下流处, 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。

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。

实施例 2: 哺乳动物中 TCR/IL-2 融合蛋白的表现

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。

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型式。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。

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。

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

264scTCR/IL-2 融合蛋白结合至负载 MHC 的肽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)肽的 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)对照组肽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)肽没有能力结合至 HLA-A2,而将未负载肽、负载 p53(aa149-157)肽或负载 p53(aa264-272)肽的 T2 细胞以 BB7.2 α -HLA-A2 单株抗体予以染色。负载这两种 p53 肽的细胞,其染色结果大于未负载肽的细胞,此暗示这两种肽有结合至 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 细胞负载该对照组肽时，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肽有特异性。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。

第 3 图详细说明如下。负载 p53(aa264-272)肽(灰线)或负载 p53(aa149-157)肽(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-2 mAb。3C)：以抗-HLA-A2 BB7.2mAb 使负载 p53(aa264-272)肽(深灰线)、负载 p53(aa149-157)肽(浅灰线)或未负载肽(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。

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

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。

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-A2 p53(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。

实施例 5：264scTCR/IL-2 融合蛋白的生物活性

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。

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

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。

实施例 6：由 264scTCR/IL-2 融合蛋白所媒介的细胞结合

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)肽或 p53(aa149-157)肽，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)，或当负载对照肽的 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)肽的 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。

第 6 图完整说明如下。将负载 p53(aa264-272)肽(第 6B 和 6D 图)或 p53(aa149-157)肽(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,包括所使用的负载肽,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。

实施例 7: 老鼠体内 264scTCR/IL-2 的药物动力学

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。

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。

实施例 8：以 264scTCR/IL-2 使肿瘤细胞染色

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 (melanoma) 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。

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 g 3C8 TCR/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。

实施例 9：264scTCR/IL-2 融合蛋白的抗癌效果

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。

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。

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。

实施例 10: 将负载肽的 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

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 149 H57.002”与“T2 264 H57.009”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 149 IgG H57. 003”与“T2 264 IgG 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 149 IL2 H57.004”与“T2 264 IL2 H57.001”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 149 trun H57. 005”与“T2 264 trun 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 149 H57. 006”与“T2 264 H57.013”的直方图中。此结果确认观察到的染色为对肽有特异性。

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 单体型式能将负载肽的 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。

实施例 11: 利用 264scTCR 融合蛋白将肿瘤细胞染色

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 $4\mu\text{g}$ 的 264scTCR/IgG1 融合蛋白于 23°C 进行细胞染色 45 分钟。洗涤该细胞一次，并以 $3\mu\text{g}$ 的抗人类的山羊 IgG Fc 的经 FITC 结合的 $\text{F(ab}')_2$ 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。

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 H57 mAb (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“A375-264BtnSaPE.002”的直方图中。

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

如所讨论者, 在经保留或”经固定”样品中, 有检测 MHC/肽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/肽复合物代表由三个不同多肽链所组成的细胞表面抗原, 所以不确定 MHC/肽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、负载肽的 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。

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 肽未被提呈于 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。

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)。

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肽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(即结合至肽-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。

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

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(Molecular Probes, Eugene, OR)洗涤一次。利用抗褪色药剂的甘油缓冲液(Molecular 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。

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 l 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(Molecular Probes, Eugene, OR)洗涤一次。将盖片如上所述的置放和证明。

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 l 的 PBS 中于 23 $^{\circ}$ C 进行染色 45 分钟。洗涤该细胞两

次，并以 $4\mu\text{g}$ 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 (Molecular Probes, Eugene, OR) 洗涤一次。将盖片如上所述的置放和证明。

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。

实施例 14: 使用 264scTCR 融合蛋白的定量染色

测定能结合负载肽的 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 $3.7\mu\text{g}$ 的 264scTCR/BirA-链霉亲和素-PE 四聚体于 23°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 $3.76\mu\text{g}$ 的 264scTCR/IgG1 融合蛋白于 23°C 进行染色 45 分钟。洗涤该细胞一次，并以 $3\mu\text{g}$ 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。

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。

在 264scTCR/ BirA 四聚体和 264scTCR/ IgG1 融合蛋白所用的各种肽浓度下与复合物/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。

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°C 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°C 进行细胞染色 45 分钟。洗涤该细胞一次, 并以 2.5 μ g 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。

在各例子中, 藉由比较经染色细胞上萤光强度的程度与已知各珠子 PE 分子数的校正珠子的萤光强度, 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/肽复合物的 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。

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

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 500mm^3 , 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 $5\ \mu\text{m}$ 切片, 并置于显微镜玻片上。

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 $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 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(antigen retrieval solution, Dako)中, 并加热至 97°C 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。

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 $10\ \mu\text{g}$ 的 264scTCR/ IgG1 融合蛋白或对照组 CMVscTCR/ IgG1 融合蛋白(在 1%NGS 中各 $100\ \mu\text{l}$)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 $1.6\ \mu\text{g}$ ($200\ \mu\text{l}$ 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。

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。

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

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 C β 抗体)中培育 45 分钟。将切片各以 PBS 洗涤 5 分钟两次。

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

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。

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。

实施例 17-利用荧光 TCR 药剂的活体内肿瘤的成像

表现载体被构筑为产生经 264scTCR 融合至 GFP (绿色荧光蛋白) 或 Luc (萤火虫的荧光素酶 (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, HFP 基因的 Pegfp-cl (Clontech), 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。

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 毫克用于荧光素酶的右旋萤光素

(D-luciferin)基质的 100 μ l 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 l/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。

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 RidgeTN) 来进行成像。首先, 使用 15 毫秒暴光, 接着利用具有背景扣除的 5 分钟光子融合法 (photon integration period) 进行荧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)。

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。

实施例 18-利用经放射性标记 TCR 的活体内肿瘤的检测

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 ^{125}I 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 Sopa 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。

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。

1. 材料

将 HLA-A2.1 转殖鼠体内所产生的对人类 p53 264-272 肽 有特异性的 CTL 株藉由序列稀释而衍生的 A2.1 264 CTL 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 人类淋巴母细胞、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 分子可负载外生性肽。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 TCR β 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 $\alpha 2$ 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-2 mAb, 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)。

2. 细胞培养

所有细胞株维持在 37°C 与 5%CO₂ 下，由补充 10%热不活化 FBS、2 Mm 左旋麸醯胺酸和 1 mg/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/m: 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。

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。

3. 模型

引子-寡核 酸引子是从老鼠 T 细胞没体和人类 IL-2 基因的序列配对或补充予以合成。

KC228: 5' -GAGGTGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGTCAGTGACGCAGC-3';

(SEQ ID NO:3)

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

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

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

ET-TCRF1: 5' -CCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCC-3'; (SEQ ID NO:7)

KC-170: 5' -GTGGAGTTCGAAAAGGTGACTTACGTTTGTCTGCTCGGCCCCAG-3';

(SEQ ID NO:8)

KC231: 5'

CGATAAGTGTACTTACGTTTTTCATTATCCATCGGCATGTACTCTTCTTCCTCTCG-3'

; (SEQ ID NO:9)

KC208: 5'

GTGGAGATCGATAAGTGTACTTACGTTTTTCATTATCGCGATCCGGAGTTAACGTCTGCT

CGGCCCCAG-3'; (SEQ ID NO:10)

KC327B: 5' -TAGGTGTCCGGAGCACCTACTTCAAGTTCTAC-3'; (SEQ ID NO:11)

KC328B: 5' -TAGGTGTCGCGAAGTTAGTGTGAGATGATG-3'; (SEQ ID NO:12)

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

C α HYB: 5' GCTGTCCTGAGACCGAGGATCTTTAACTG3'; (SEQ ID NO:14)

C β HYB: 5' -TTGTTTGTGTTGCAATCTGTGCTTTTGATGG-3' . (SEQ ID NO:15)

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)寡核苷酸。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 C α HYB (对 α 链恒定区有特异性) 或 C β HYB (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 C β 链以制造 XhoI/XmaI 片段。将全长 C β 链第 127 氨基酸残基的半胱氨酸前的 C β 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 C β 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。

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 AgeI/BstBI 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 AgeI/BstBI 264scTCR 片段克隆至经 AgeI/BstBI 所分解的 pSUN27 取代原本的 TCR 而产生。

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。

4. 蛋白质萃取

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°C (短时间)或-80°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

胺凝胶 (Novex, San Diego, CA) 和 Novex EX-Cell II 系统进行 SDS-PAGE。以 Coomassie blue 使 SDS-PAGE 染色。

5. ELISA

使用披覆 100-200 ng/孔的抗人类 IL-2 mAb 或抗鼠科动物的 TCR V β 3 mAb 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 H57 mAb、抗鼠科动物 TCR V β 3 mAb 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。

6. 利用 TCR 融合蛋白的细胞染色

将殖入 p53 (aa149-157) 或 p53 (aa264-272) 肽的 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-2 Ab 或 0.5 微克的经生物结合的抗 CR 通 H57-597 mAb 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 5 ng 的链霉亲和素-PE (两者皆来自 Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ)。在进行 FACSscan 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, 于室温下将装载肽的细胞以 BB7. 230 分钟, 接着藉由经 FITC 标记的山羊抗老鼠 IgG 并于 FACSscan 仪器分析。

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 TCR V β 3 mAb, 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-A2.1 p53 (aa 264-272) 四聚体检测该蛋白质 30 分钟。如上述制备装载肽的经结合 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-A2.1 p53 (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。

以不含酶的细胞解离缓冲液(Sigma, St. Louis, MO)将 A375 细胞采收。5 x 10⁵ 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 H57-597 mAb 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。

7. 细胞结合

将殖入 p53(aa149-157)或 p53(aa264-272)肽的 T2 细胞以 7.88 ng/ml (HE) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 予以标定，而 CTLL-2 细胞以 50 ng/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。

8. 生物分析

将 CTLL-2 细胞以 4×10³ 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。

9. 老鼠体内的药物动力学

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 年修定),以及适用的特别国家法律。经由侧尾静脉对母的 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°C 14000Xg 下使血液样品离心 10 分钟,收集血清,并存放于 -80°C 直到使用。264scTCR/IL-2 浓度的测定是藉由 ELISA,使用捕捉用的抗 TCR V β 3 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。

10. 活体内研究

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、0.75、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。

11. 含有 IgG 与 Bir A 卷标序列的 TCR 模型和融合蛋白

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。

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. 1999 Apr; 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。

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

关于哺乳动物的融合蛋白的制造，利用 Bio-Rad Gene Pulser 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。

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。

12. 藉由流式细胞仪进行 264scTCR 药剂的细胞染色检测

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)。

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°C 用 2.5 小时装载 100 微克/毫升的 p53 (aa264-273) 或 p53 (aa149-157)。洗涤以除去多余肽的步骤后, 该细胞与 125Pm 的 264scTCR/IL-2、264scTCR/IgG1、264scTCR/trIgG1 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/trIgG1 与 264scTCR/BirA 蛋白为多体, 而 264scTCR/IgG1 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 H57 mAb (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。

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。

1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, MG, Bell JL, McMichael AJ, Davis MM (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94
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
3. Bauer RJ, Dedrick RL, White ML, Murray MJ, Garovoy MR (1999) Population pharmacokinetics and of the anti-CD1 la antibody in human subjects with psoriasis. *J Biopharm* 27: 397
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
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
6. Donohue JH, Rosenberg SA (1983) The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol* 130: 2203
7. Dummer R, Gore ME, Hancock BW, Guillou PJ, Grobden HC, 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
8. Engel Ottenhoff TH, Klausner RD (1992) High-efficiency expression and solubilization of functional T cell antigen receptor heterodimers. Science 256: 1318
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
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
11. T, Scheidtmann Hutchinson MA, Eckhart W, Walter G Complexes of polyoma virus medium T antigen and cellular proteins. Proc Natl Acad Sci : 7952
12. Hank JA, Albertini MR, Schiller J, Sondel PM (1993) Activation of multiple effector mechanisms to enhance tumor immunotherapy. J Immunother 14: 329
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
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
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
16. Harvill 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
17. Harvill 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

18. Hilyard 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
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
20. Hurford RK Jr, Mulligan RC, Tepper RI (1995) Gene therapy of metastatic cancer by in vivo retroviral gene targeting. *Nat Genet* 10: 430
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
22. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675
23. Kendra K, Gan J, Ricci M, Surfus J, Shaker A, Super M, Frost JD, Rakhmievich A, Hank JA, Gillies SD, Sondel PM (1999)

- Pharmacokinetics and stability interleukin-2 fusion protein in mice.
Cancer Immunol Immunother 48: 219
24. Klausner RD, Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS (1990) The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol* 6: 403
25. Lewis LD, Cole 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
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
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
28. Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA (1997) Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 89: 1586

-
29. Lustgarten J, Marks J, Sherman LA (1999) Redirecting effector T cells through their IL-2 receptors. *J Immunol* 162: 359
 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
 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
 32. Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, Nadeau R, Parmar 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
 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
 34. Pardoll DM (1995) Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13: 399

35. Peng LS, Penichet ML, Morrison SL (1999) A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity. *J Immunol* 163: 250
36. Penichet ML, Harvill ET, Morrison SL (1997) Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. *Hum Antibodies* 8: 106
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
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
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
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
41. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold 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
42. Rosenberg SA, Spiess PJ, Schwarz S (1983) In vivo administration of Interleukin-2 enhances specific alloimmune responses. *Transplantation* 35: 631
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
44. Royal 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
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

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
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
48. Temmim L, Baker H, Sinowatz F (2001) detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res* 21: 743
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
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
51. thor Straten P, Guldberg 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

-
52. Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA (1997)
induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158: 3359
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
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
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
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.
57. O'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.

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 2

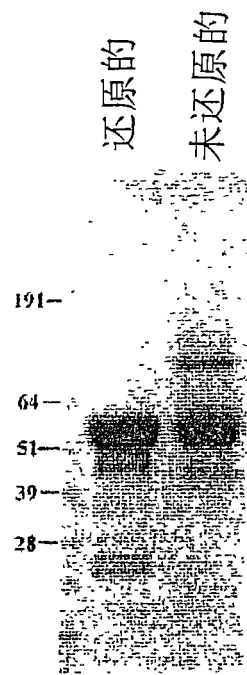


图 3

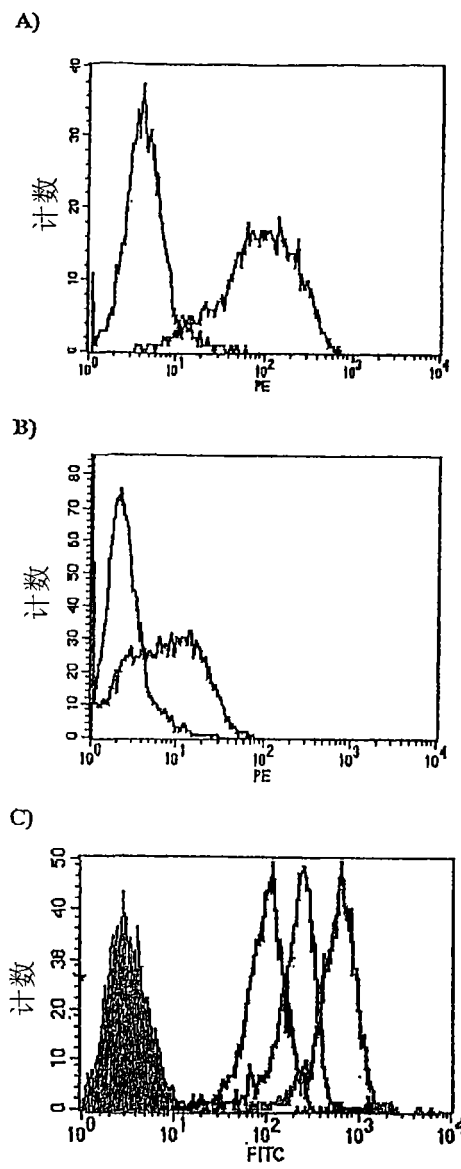


图 4

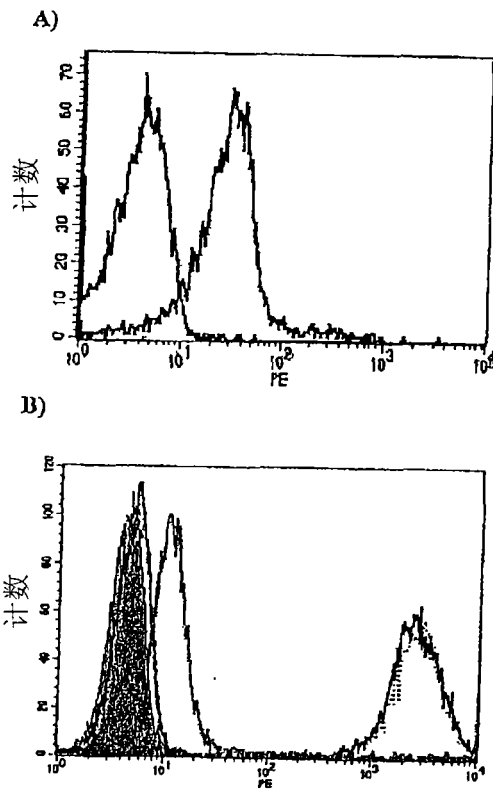


图 5

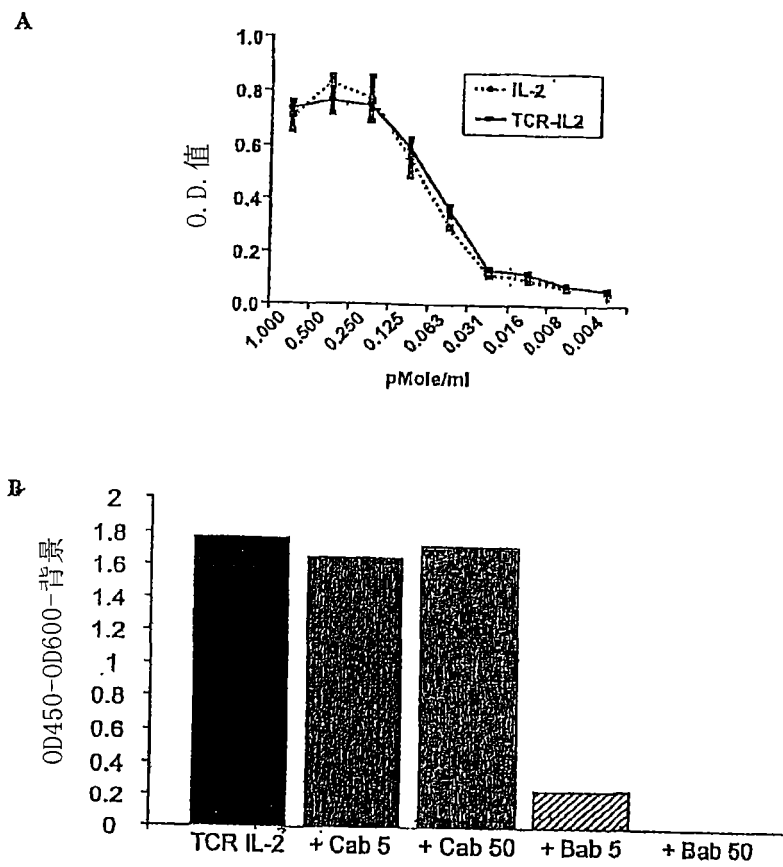


图 6

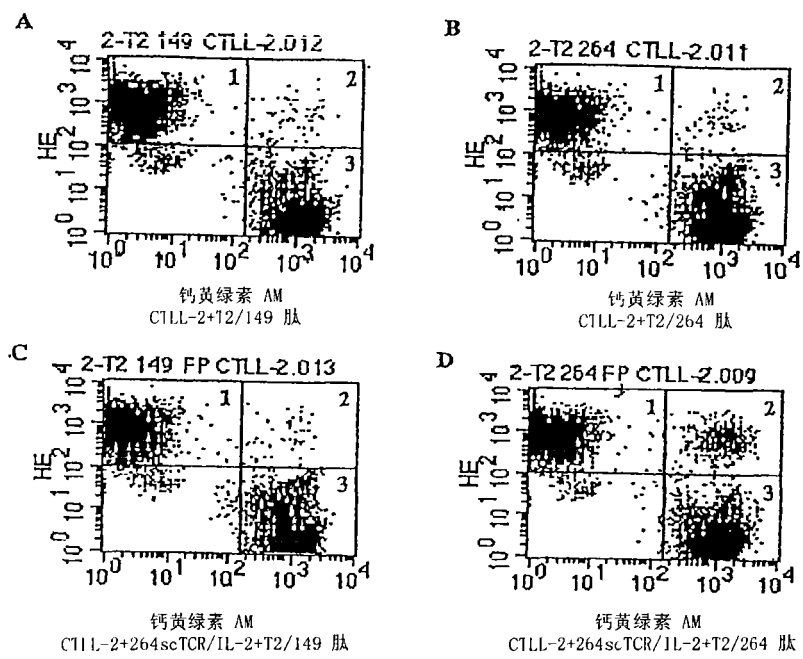


图 7

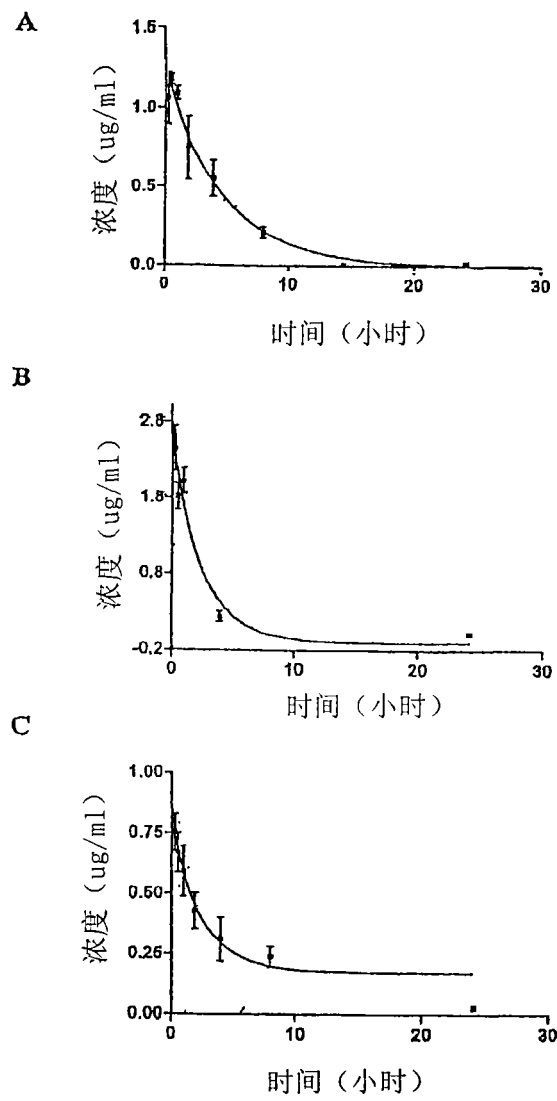


图 8

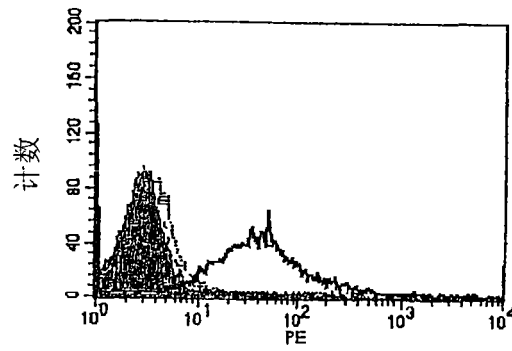


图 9

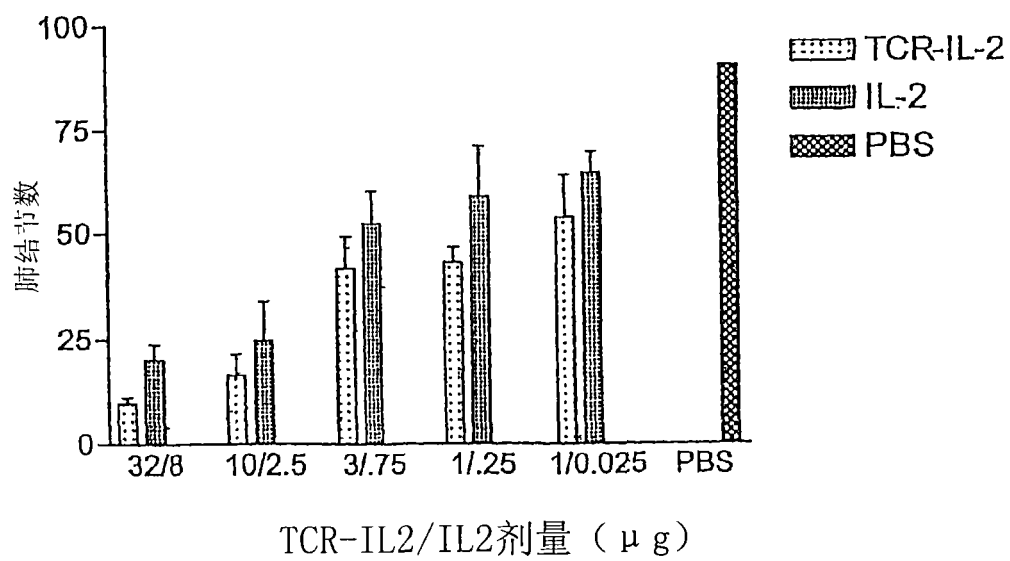
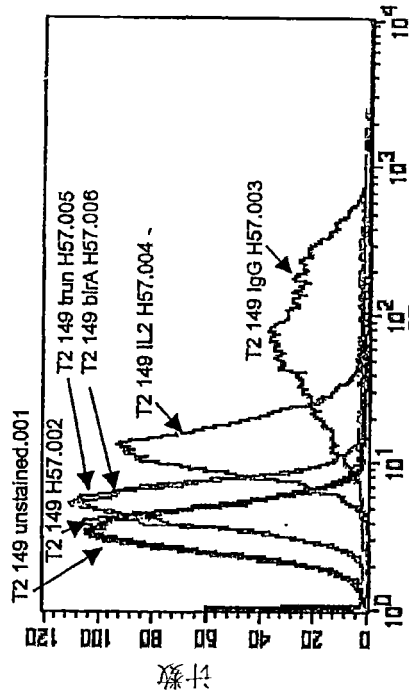


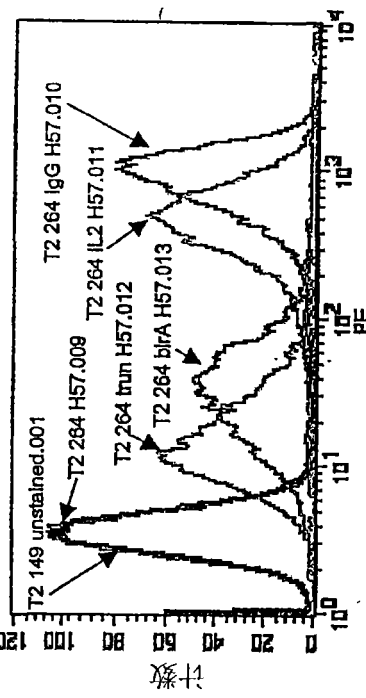
图 10

A. 负载非特异肽的T2细胞



标记	名称	参数	路径
—	T2 149 unstained.001	FL2-H	G14
—	T2 149 H57.002	FL2-H	G14
—	T2 149 IgG H57.003	FL2-H	G14
—	T2 149 IL2 H57.004	FL2-H	G14
—	T2 149 trun H57.005	FL2-H	G14
—	T2 149 birA H57.006	FL2-H	G14

B. 负载特异肽的T2细胞



标记	名称	参数	路径
—	T2 149 unstained.001	FL2-H	G14
—	T2 264 H57.008	FL2-H	G14
—	T2 264 IgG H57.010	FL2-H	G14
—	T2 264 IL2 H57.011	FL2-H	G14
—	T2 264 trun H57.012	FL2-H	G14
—	T2 264 birA H57.013	FL2-H	G14

图 11

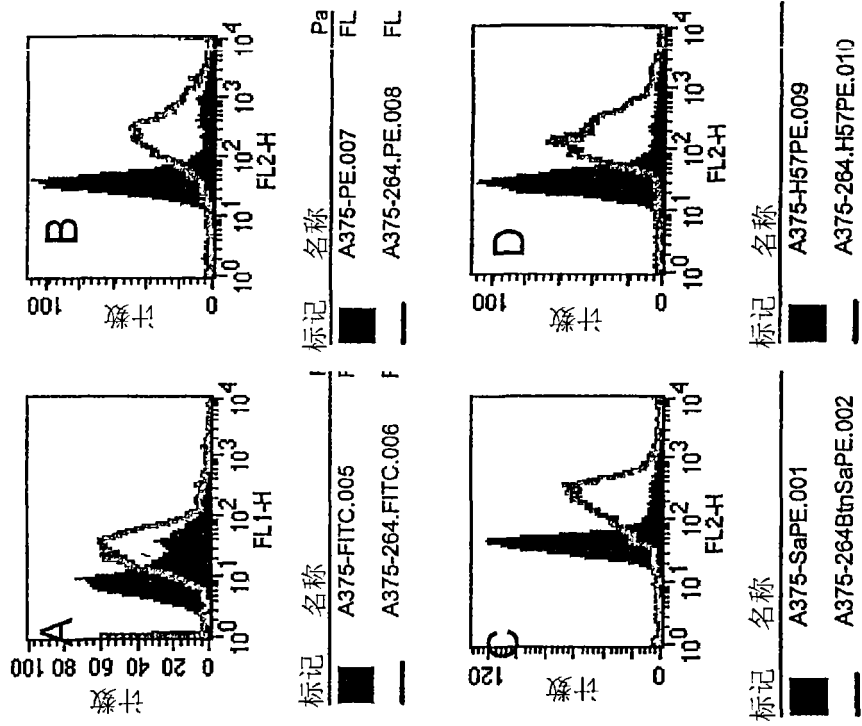


图 12

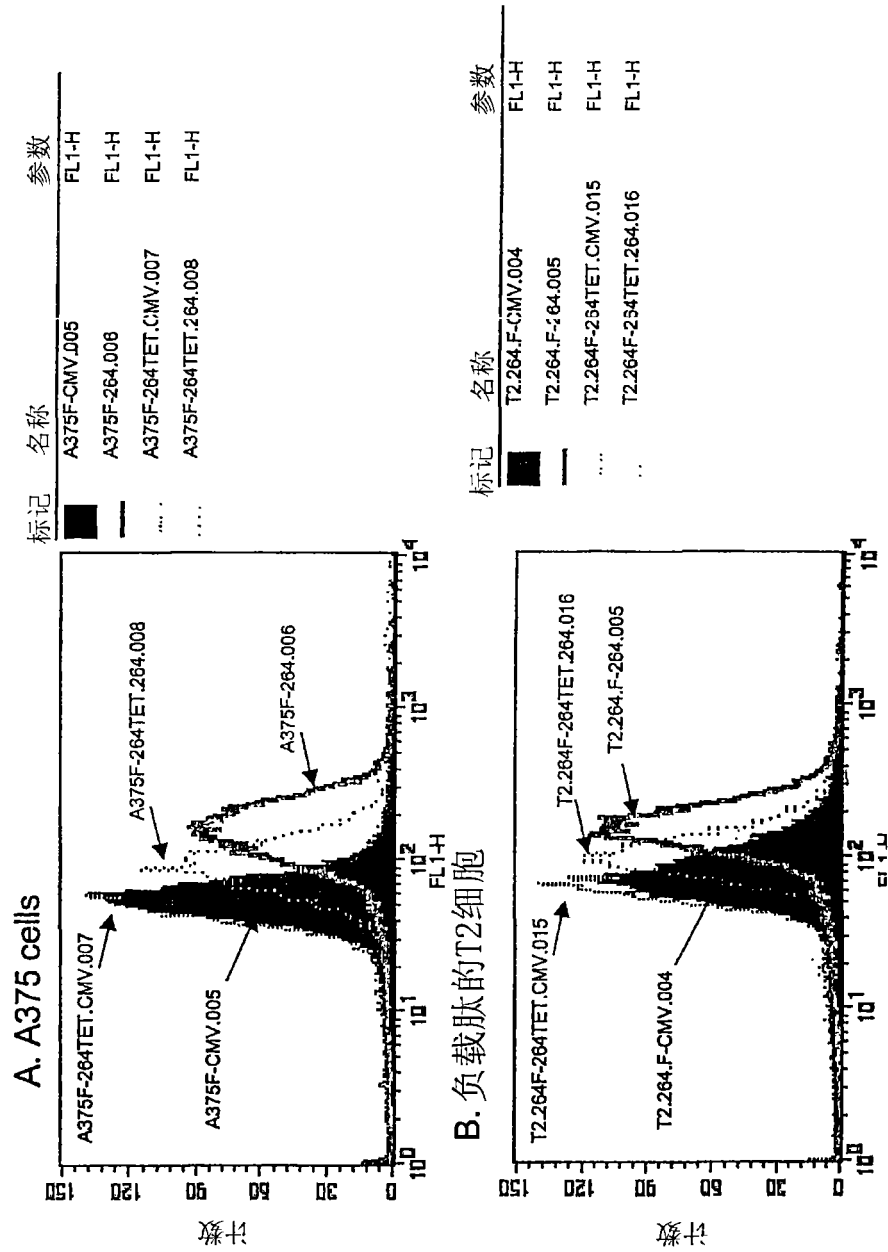


图 13

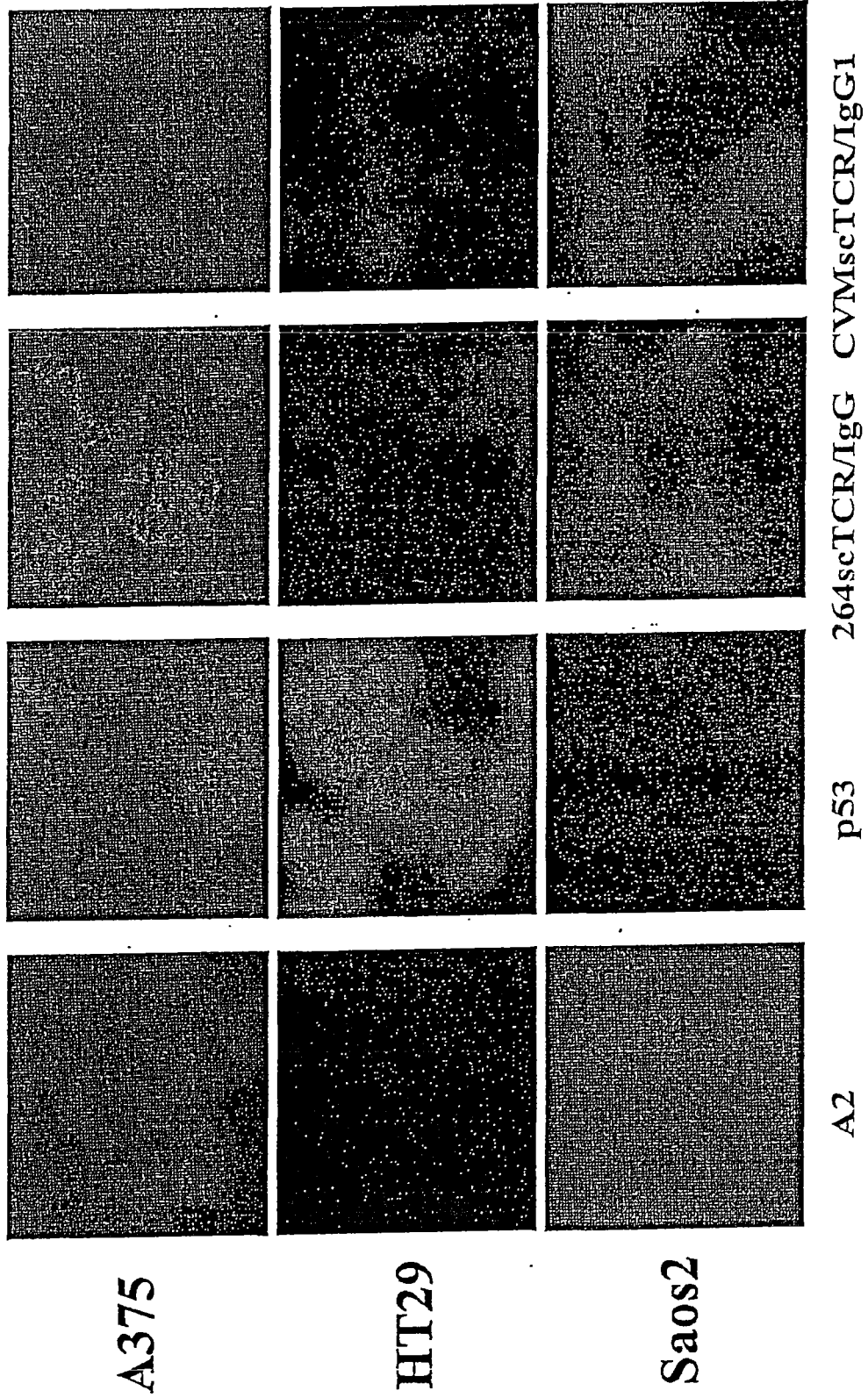


图 14

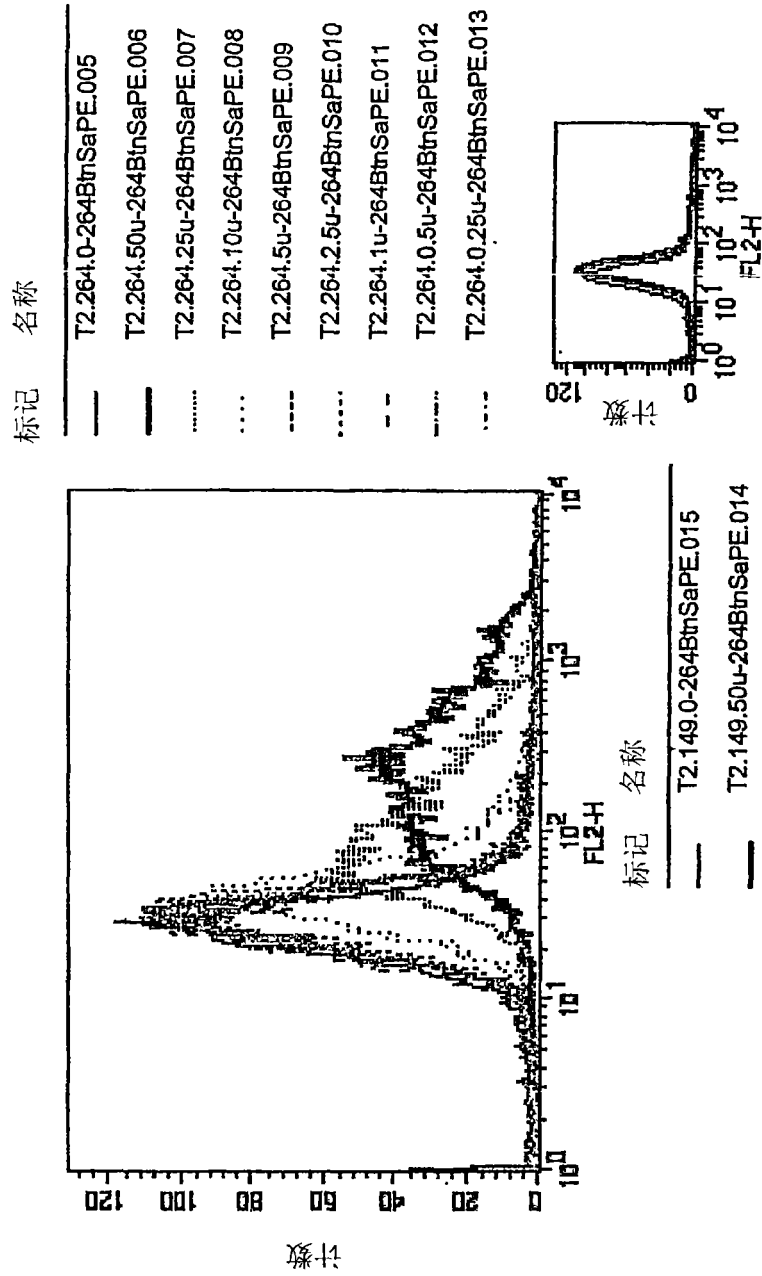


图 15

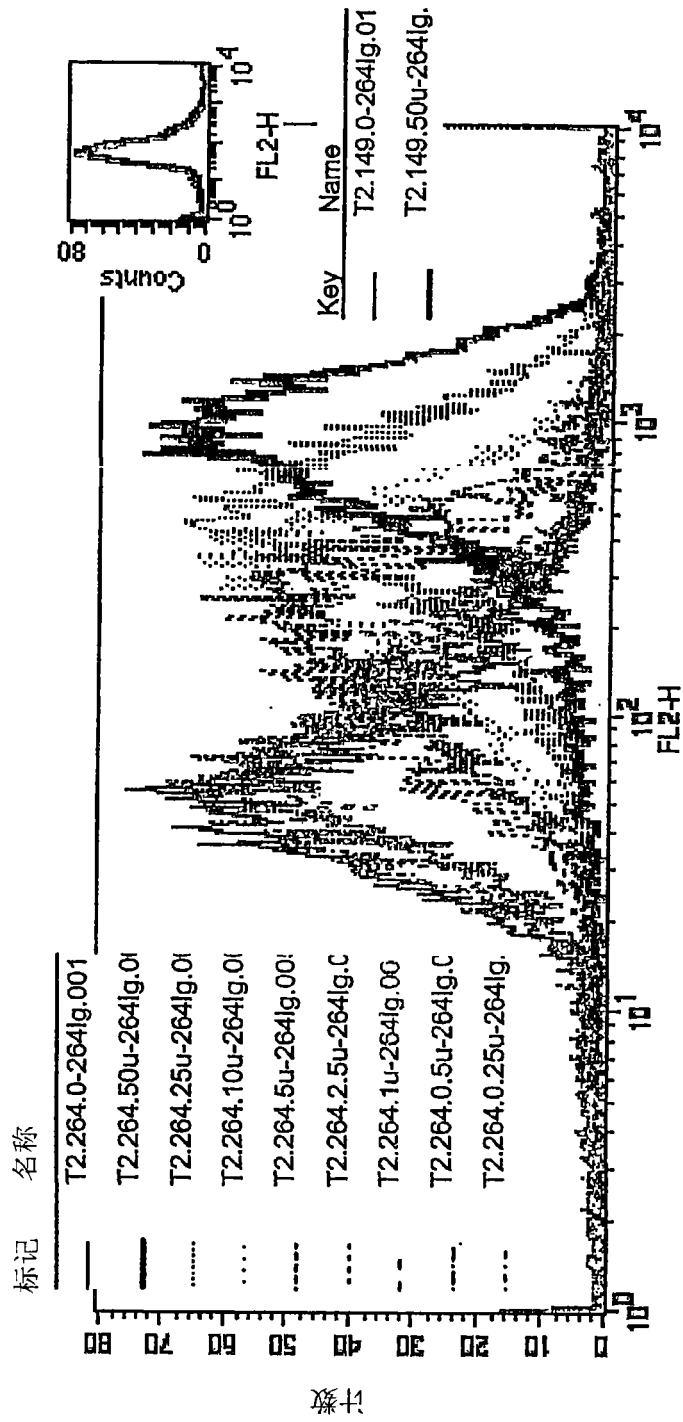


图 16

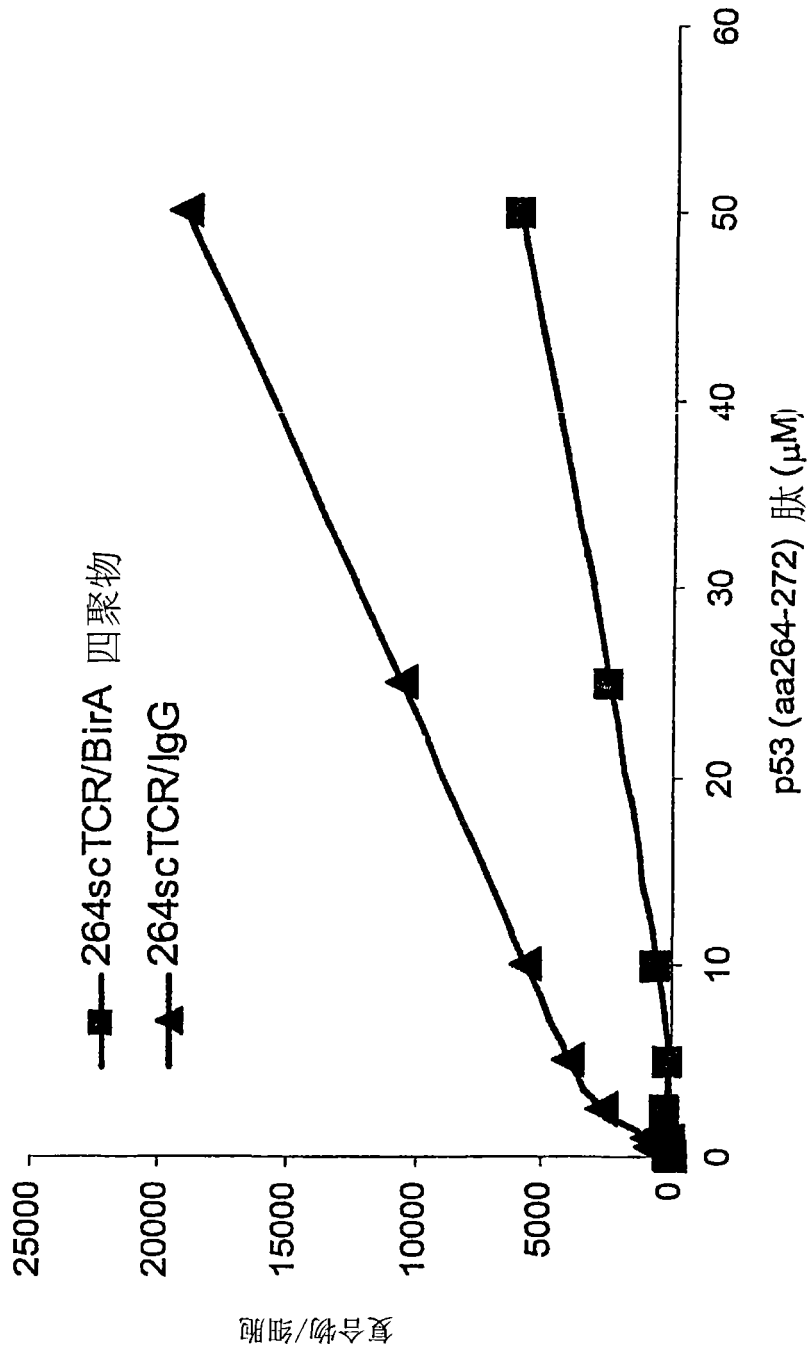


图 17

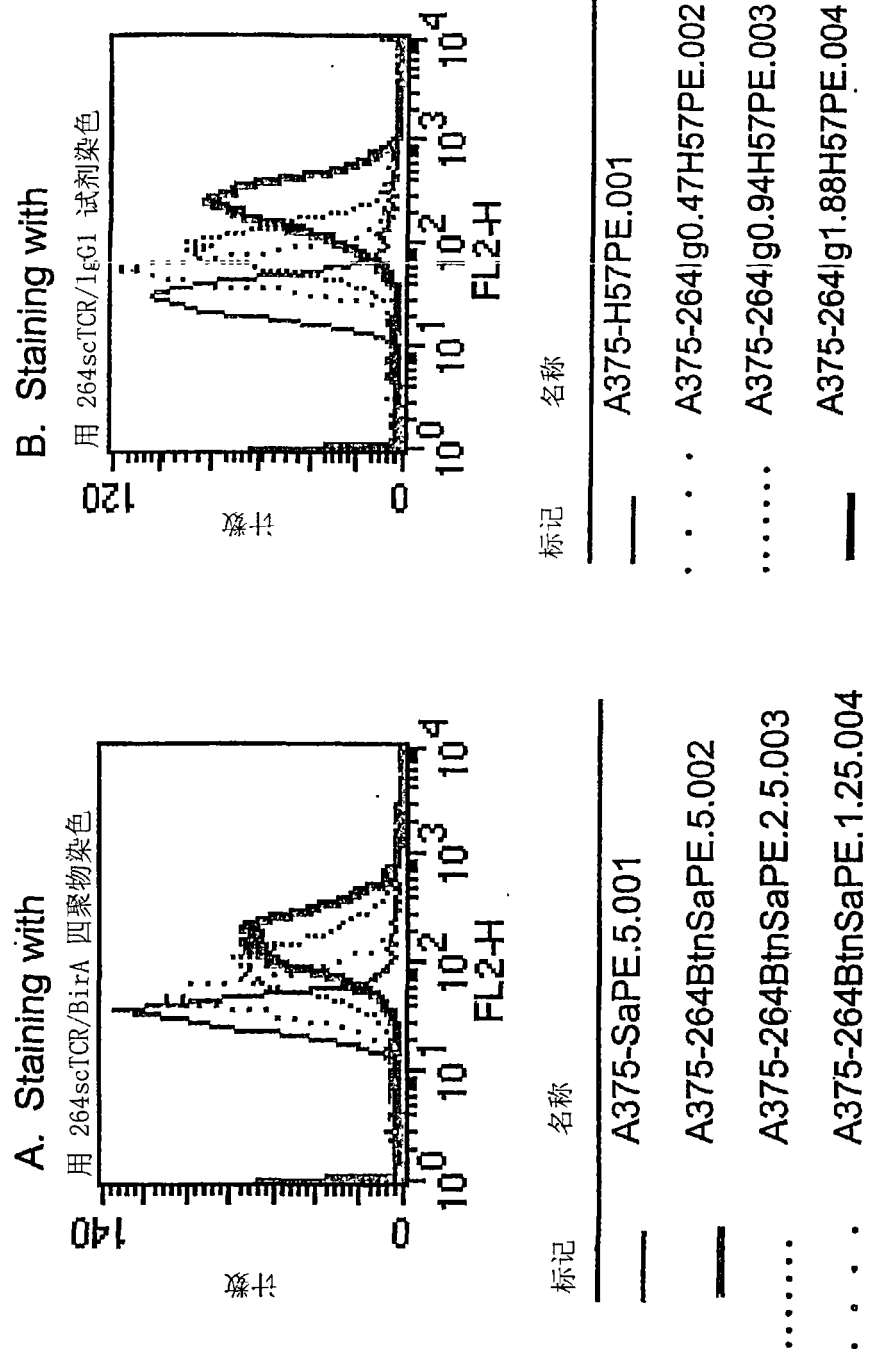


图 18

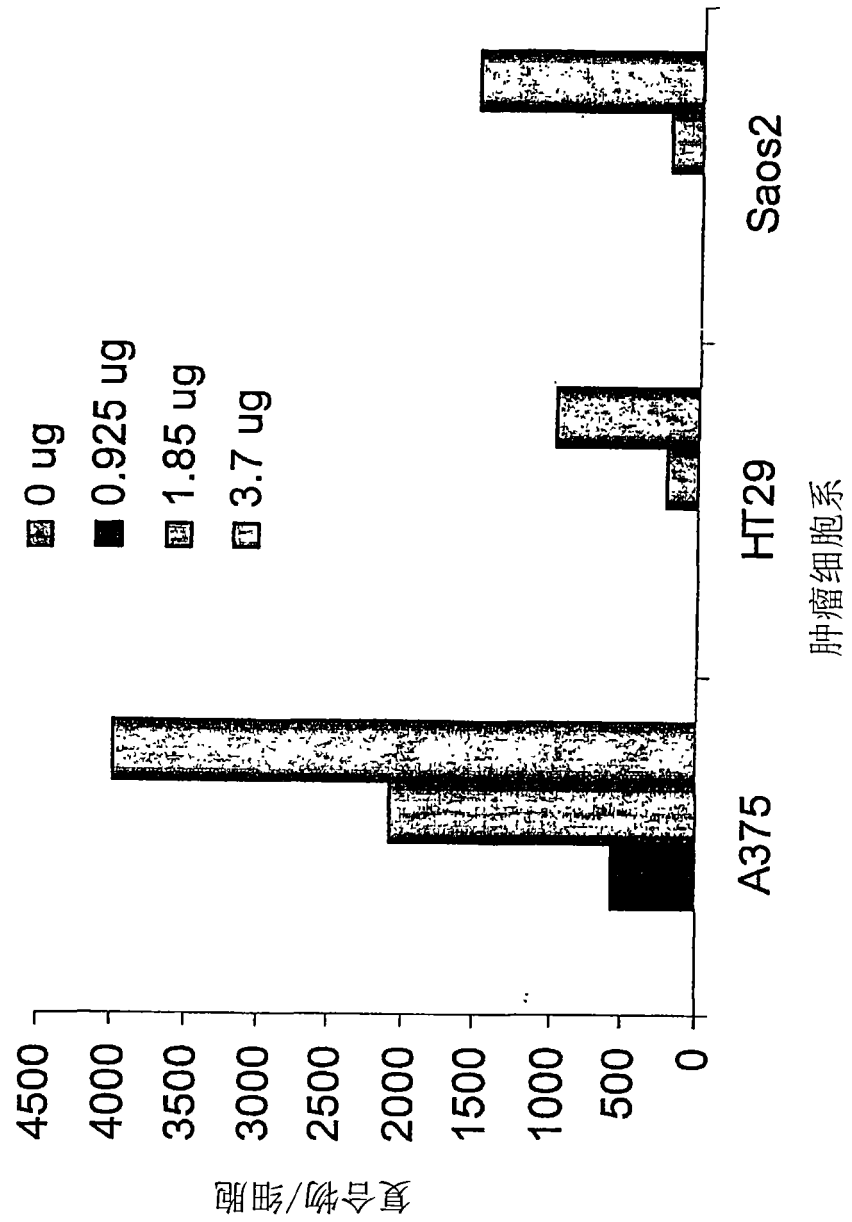


图 19

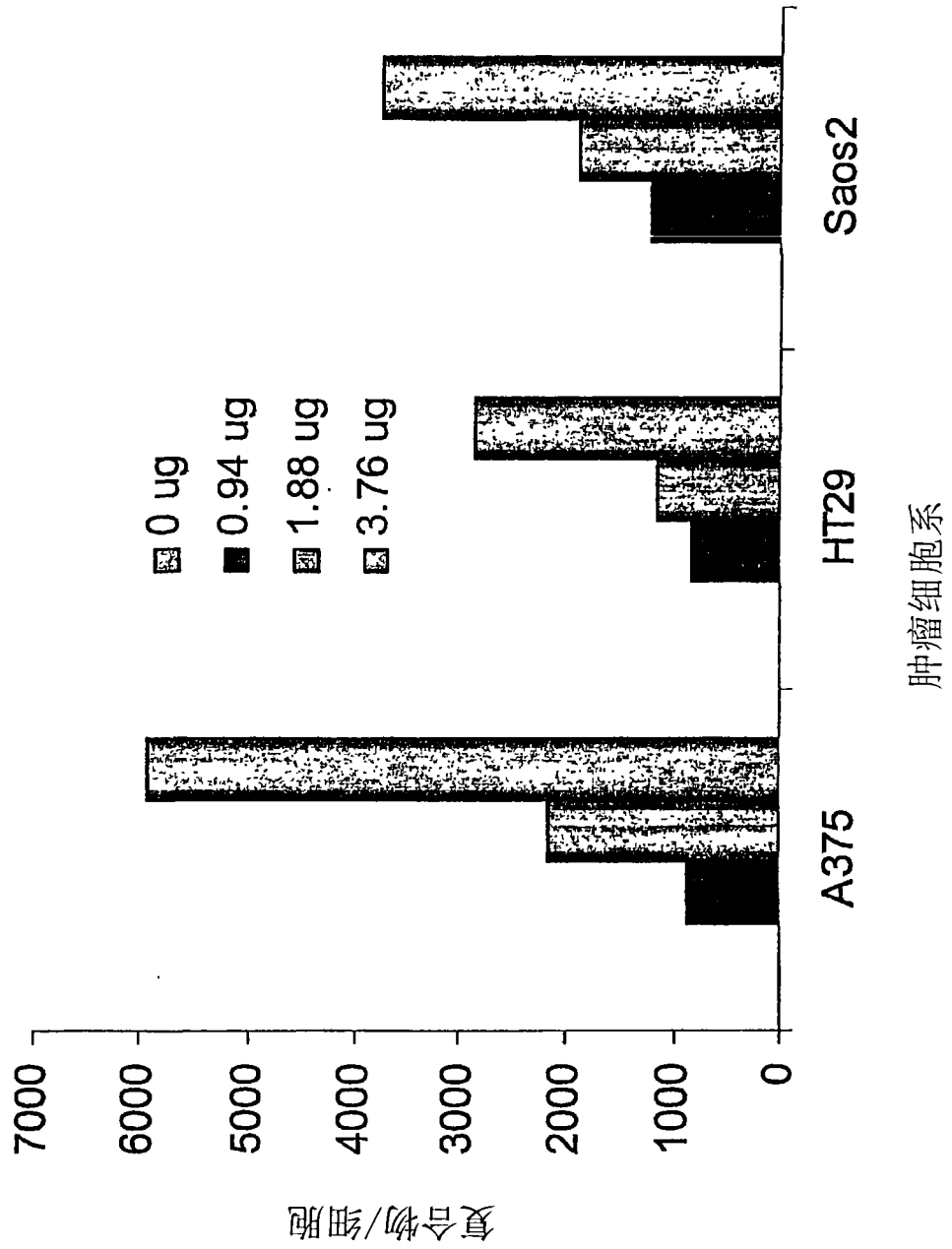
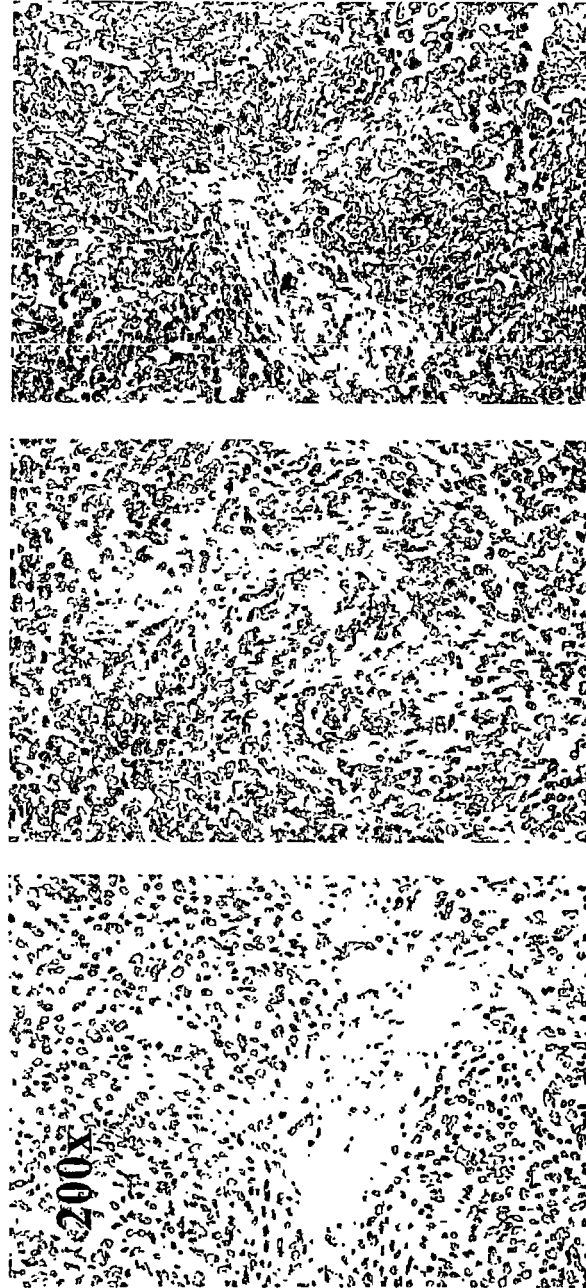


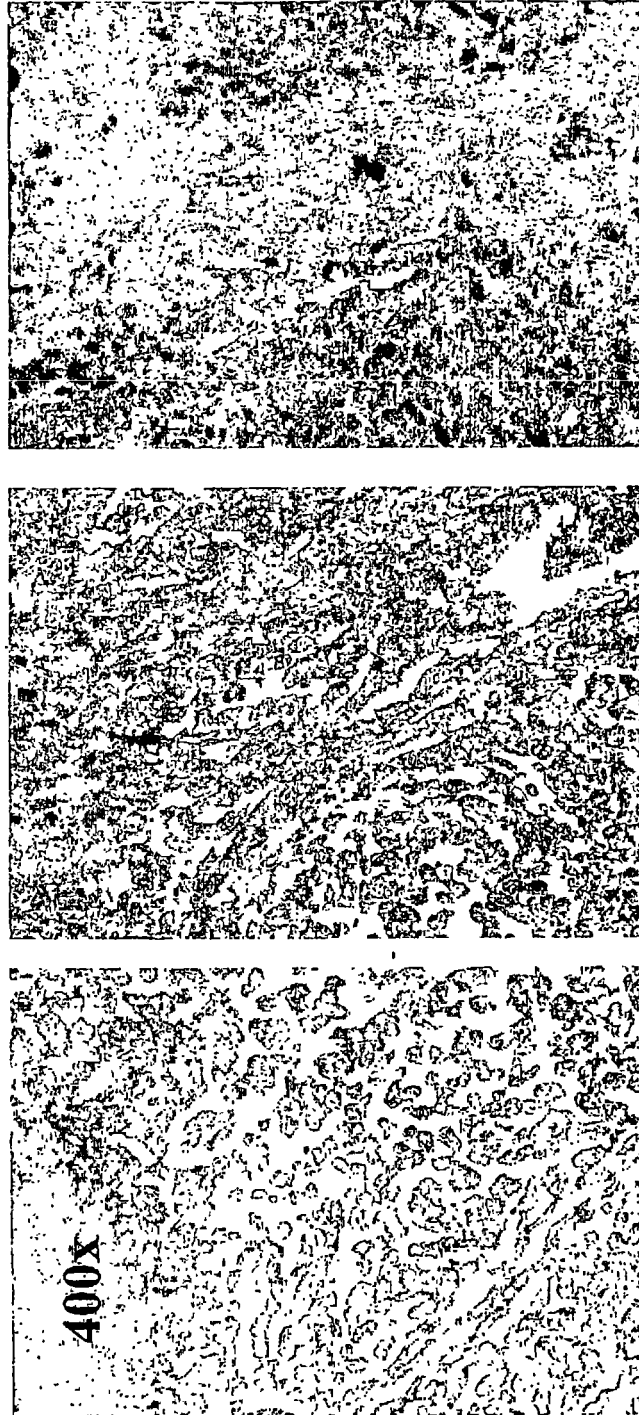
图 20



CMV_{sc}TCR/IgG1 264_{sc}TCR/IgG1

二抗

图 21



二抗
CMVscTCR/IgG1 264scTCR/IgG1 264scTCR/IgG1

专利名称(译)	可溶性TCR分子及其用途		
公开(公告)号	CN1901839A	公开(公告)日	2007-01-24
申请号	CN200480040183.4	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	A61B10/00 G01N33/53 C12Q1/00 A61B A61K39/395 A61K47/48 A61K51/08 C07K14/55 C07K14/725 G01N33/567 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K47/48353 C07K2319/20 C07K2319/00 G01N2333/70539 C07K2319/32 G01N33/57484 B82Y5/00 G01N33/57492 A61K47/48261 C07K2319/30 C07K14/7051 G01N2333/7051 C07K14/55 A61K47/48269 A61K47/48276 G01N33/6875		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/518790 2003-11-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明系揭示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。

