



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201930880 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：107146481

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/533 (2006.01)**G01N33/536 (2006.01)**

(30)優先權：2017/12/22 義大利

102017000148959

(71)申請人：瑞士商艾迪安納股份有限公司(瑞士) ADIENNE S. A. (CH)

瑞士

(72)發明人：迪那羅 安東尼奧弗朗西斯 DI NARO, ANTONIO FRANCESCO (IT)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：12 共 54 頁

(54)名稱

用於測定抗－C D 2 6 配體的生物學活性之定量的細胞法

QUANTITATIVE CELLULAR METHOD FOR DETERMINING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF
AN ANTI-CD26 LIGAND

(57)摘要

本發明係與用於在活體外測定一抗-CD26 配體之功效的定量細胞法有關，較佳地為例如貝格洛姆單抗(begelomab)之抗-CD26 單株抗體。

The present invention relates to a quantitative cellular method for the in vitro determination of the effect of an anti-CD26 ligand, preferably of an anti-CD26 monoclonal antibody, such as begelomab.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於測定抗-CD26 配體的生物學活性之定量的細胞法
QUANTITATIVE CELLULAR METHOD FOR
DETERMINING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF AN
ANTI-CD26 LIGAND

【技術領域】

【0001】本發明係與用於在活體外測定一抗-CD26 配體之功效的定量細胞法有關，較佳地為例如貝格洛姆單抗(begelomab)之抗-CD26 單株抗體。

【先前技術】

【0002】CD26 係為一種在細胞表面上且以可溶形式表現的 110-kDa 多功能糖蛋白。例如肺、內皮細胞、心臟、腦、肝、腸、腎、胎盤、胰腺和骨骼肌之許多種組織與器官，都會表現該 CD26 抗原(Abbott C.A. 等人，1994)。在細胞層級中，CD26 的表現已經被發現在淋巴細胞群中，特別是在活化的 T 淋巴細胞、T 休止與 B 淋巴細胞中，會具有較強的共活化性(Cordero OJ 等，2007)。事實上，在特定的記憶 T 細胞的子集合中，CD26 的表現於 T 細胞自身的活化後增加(森本 C.等人，1989)。CD26 在 T 細胞上的表現係與這些細胞產生大量的 IL-2 之能力有關，且因應促有絲分裂刺激而強烈增殖。但是，CD26 的表現與輔助 T 淋巴細胞的活性為負相關(Mattern T.等人，1991)。

【0003】CD26 之特徵在於二肽基肽酶 IV(DPP-IV)之酶活性。上述之酶活性係特別地促進 X-Pro 位置之 N-端胺基酸與相鄰胺基酸之間的肽鍵水解(Gorrel M.D.等人，2001)。CD26 係屬於寡肽酶的子集合，其可以切割例如細胞介素、多胜肽、賀爾蒙與趨化介素等許多生物學活性受質中之 N-末端二肽(De Meester I.等人，1999；Hildebrandt M.等人，2000)。

【0004】在人類中，CD26 還與腺苷去胺酶(ADA)之結合(Franco R.等，1998)有關。ADA 缺陷不僅通過免疫失調的一般機制，而且還會通過在細胞內累積嘌呤代謝之毒性代謝物而易於罹患免疫缺陷性疾病(Sauer A.V.等人，2012)。

【0005】CD26 與 ADA 之間的連結之可能作用，實際上是通過細胞表面的腺苷受體，來調節在 T 細胞間提供負向訊息之局部細胞外腺苷濃度。有一些對 CD26 具有專一性的單株抗體，能夠對 T 細胞傳遞活化訊息，並在活體外調節免疫反應(Morimoto C.與 Schlossman S.F 等人，1998)。因此，CD26 係與發炎、免疫內分泌及神經功能的調節有關，且亦與 AIDS 的病理生理學有關。

【0006】由於其係普遍地分佈，許多病理狀態都與 CD26 之表現及/或活性改變有關，其係與各別的病理狀況之嚴重程度相關。這些疾病可以分為至少五類：自體免疫疾病與發炎性疾病、惡性血液腫瘤、精神神經內分泌失調、傳染病與固態腫瘤。許多研究人員觀察到，在各種免疫媒介的疾病中，CD26 的血清酶活性水平似乎有

所改變(Klemann C.等人，2016)。在臨床研究中，已經觀察到在 CD26 之表現/活性的變化，係與例如類風濕關節炎、多發性硬化症、I 型糖尿病、與在宿主中之移植排斥疾病(GvHD)之各種自體免疫疾病有關。

【0007】在給予高選擇性 CD26 抑制劑之各種研究中，都顯示其延遲糖尿病的發作、減緩胰島炎、增加了調節性 T 細胞的數量，這代表 CD26 在免疫調節中發揮了重要的作用。

【0008】一些與患有類風濕性關節炎之患者有關的報導，顯示其在 CD26 表現/酶活性、疾病的嚴重程度、與治療之間的關聯性。這些發現可以為針對抑制 CD26 的酶活性之新治療方法，開啓了康莊大道。此外，已觀察到在罹患多發性硬化的患者之血液與腦脊液中，T 細胞表面上 CD26 的表現為更高(Ohnuma K.等人，2011)。GvHD 是造血幹細胞移植(HSCT)後的主要併發症，其係為許多血液疾病的重要治療方法(Ferrara J.L.M.等人，2009)。GvHD 可以根據發病時間而區分為急性或慢性，並且係由捐贈者所移植的骨髓衍生之初始 T 細胞所導致，其損傷受贈者的組織(Henden A.S., Hill G.R., 2015)。GvHD 表示於使用骨髓移植作為挽救生命之治療法上的嚴重限制(Welniak L.A. 等人，2007)。

【0009】GvHD 的發展通常需要三個條件：(1)捐贈者的骨髓必須含有免疫活性細胞(immunocompetent cell)、(2)受贈者必須表現在捐贈者中不存在的組織抗原、(3)受贈者不應該誘發會破壞移植細胞之有效反應。

【0010】 GvHD 的特徵在於 3 個不同階段：1)在第一階段，因為放射性療法與化學療法而破壞宿主內的組織，並釋放例如 TNF- α 與 IFN- γ 之促炎性細胞介素；2)在第二活化階段，捐贈者的異體反應性 T 細胞，係被呈現受贈者抗原(APC)的細胞所暴露之組織抗原活化；3)最後，隨著胞毒型 T 細胞與效應 T 細胞所產生之細胞介素的進一步分泌作用，而發生細胞增殖現象。(Ferrara J.L.M.等人，2009)。

【0011】急性 GvHD(aGvHD)的病理學、嚴重程度、與器官專一性，係由 T 淋巴細胞的不同亞群(Th1、Th2 與 Th17)之間的平衡來決定。事實上，Th1 亞型已經被證實相較於其他亞型，更依賴捐贈者 T 細胞在與宿主的 APC 細胞相互作用，以及其等隨後分化為輔助 T 細胞時之細胞介素環境來進行活化。

【0012】主要的 Th1 細胞介素有 IFN- γ 、IL-2 與 TNF α 。例如 TNF 和 IFN- γ 的 Th1 細胞介素含量增加，因為其等誘導調升趨化介素與能夠促進發炎反應之受體的能力，而與此疾病之更加早發而嚴重之發病情況有關。Th2 細胞介素係為 IL-4、IL-5、IL-10 與 IL-13。以 Th2 細胞來阻斷該反應，已經被觀察到係與胃腸道症狀增加，還有肝臟及皮膚損傷程度水平的減低有關。IL-6 係為一種促炎性細胞介素，其可控制 Th17 細胞與調節性 T 細胞之間的平衡。IL-6 抑制可能是透過誘導免疫耐受性來減低 HCT 中之 GvHD 嚴重性的潛在有效策略(Henden A.S., Hill G.R., 2015)。

【0013】因此，釐清 CD26 在 T 細胞反應期間與改變細胞介素含量上所扮演的角色，無疑地將有助於了解 GvHD 之發病與發展進程(Henden A.S., Hill G.R., 2015; Yi T. 2009)。

【0014】在此一前提的基礎上，一種爲了防止 GvHD 發病的新療法，係以使用抗-CD26 單株抗體爲基礎(Hatano R., 2013; Bacigalupo A., 2016)。最近在臨床前模型已經開發出抗-CD26 抗體，以在該疾病的動物模型中防止 GvHD 發作。雖然在 GVHD 中 CD26/DPPIV 的角色還需要進一步調查，以抗人類 CD26 小鼠抗體(也就是貝格洛姆單抗)來進行治療，已經被報導對於治療患有急性類固醇抵抗型 GvHD 患者的 GvHD 係爲有效的(美國專利第 9,376,498 號)。因此，臨床數據證實藉由單株抗體來使得 CD26 失去活性，會呈現出消除自身反應性 T 細胞亞群，接著解決 GVHD 症狀之有效治療方法。

【0015】有鑑於上述情況，將該 CD26 受體作爲新治療方法中之分子靶標的重要性將不證自明。

【0016】效價測試提供了一種對於特定藥物之生物學活性的定量測量，並且代表一種在藥學分子的研發進程中之關鍵性質參數。

【0017】有許各種方法都可以用於開發效價測試，其包括有配體-受體試驗、動物測定法、體外細胞測定法、或是其他的生化分析法(例如酶測定法)。如果其能夠再現特定藥物之作用機制，則此效價測試會是特別重要的。

【0018】對於生物產品來說，較佳地係使用配體-受體測定法或活體外細胞實驗。前者，是因為其能夠直接測量藥物與其之分子靶標的親和力，也適合作為效價測試。

【0019】然而，就只是因為效價試驗應該要依據藥物的作用機制來進行開發，而這些資訊對於特別是單株抗體來說並不總是可取得的，因此使用這些類型的測試方法並不總是可行的。這種方法由於生物藥通常在活體內具有多種作用機制而更形複雜，例如其係特別難以在體外系統中重現。

【發明內容】

【0020】本發明之作者目前已經發現抗-CD26 單株抗體(貝格洛姆單抗)，能夠在專一性結合之後誘發 CD26 受體的內化作用，其之作用機制係被稱為「加帽作用(capping)」。該內化現象會抑制促炎性細胞介素的釋放，從而在發炎過程中扮演關鍵角色，這是由該抗-CD26 配體所誘發之直接下游功能性事件。因此，所描述之作用機制，因而可以支持在所有自體免疫疾病中之單株抗體的所有應用，在該自體免疫疾病中自身反應性 T 淋巴細胞係失去活性，而同時仍保持其之免疫活性者。

【0021】因此，在藥學產品之效價測試係為了以功能性方式，來測定樣本中之活性化合物的含量而產生時，CD26 的內化與抑制發炎細胞介素之分泌，都代表其係為可以用來評估任何抗-CD26 配體的效價之新測試方法，較佳地為一種被開發以治療及/或診斷應用之單株抗體。

【0022】所描述的方法可以被應用於評估任何抗-CD26 的效價，其係以貝格洛姆單抗之作用機制的革命性發現為基礎。此外，使用此種方法與允許對 CD26 的內化以及對抑制所得之細胞介素的分泌/產生之作用進行定量。

【0023】總之，這些發現可以在 1)再現性、2)易於在特定樣本中對於抗-CD26 配體的活性進行定量，以及 3)對於該抗-CD26 配體之活性進行定量測量等等面向上，製備出非常有利的效價測試法，無論該配體係為被稱作貝格洛姆單抗者或係為新發現者。

【0024】因此，本發明係與活體外抗-CD26 配體之效價測定方法有關，其包括以下步驟：

- a) 在 37°C 下以濃度範圍落在 0.001 μ g/ml 至 150 μ g/ml；較佳地為 0.01 μ g/ml 至 100 μ g/ml，更佳地為 0.01 μ g/ml 至 2 μ g/ml，甚至更佳地為 0.01 μ g/ml 至 0.5 μ g/ml 之抗-CD26 配體，溫育以高於 75%的比例表現該 CD26 受體之人類 T 淋巴細胞群；
- b) 與抗-CD26 抗體一起溫育，該抗體係以會辨識在該 CD26 受體上之一抗原決定區的螢光染料來標記，該抗原決定區係與步驟 a)的抗-CD26 配體所識別者不同；
- c) 藉由細胞螢光分析的方式，來測定以抗-CD26 配體來處理的細胞樣本之 CD26 的 MFI 值(MFI_T)(螢光強度中位數值)，以及未經處理細胞的 MFI 值(MFI_{NT})；

- d) 以 RFI(相對螢光強度，即為相對於基線來標準化之 MFI 值)來評估該 CD26 受體之內化百分比，其係以抗-CD26 配體來處理的細胞樣本之 CD26 的 MFI 值 (MFI_T)，以及未經處理細胞的 MFI 值 (MFI_{NT})之間的比值，乘以 100，然後以 100 來相減，如以下公式所示：

$$RFI = \%int\ CD26 = 100 - \left(\frac{MFI_T}{MFI_{NT}} \times 100 \right)$$

其中「%int CD26」或 RFI，係為 CD26 的內化百分比，「 MFI_T 」係為以 CD26 配體來處理的細胞(測試細胞)之 MFI 值，而「 MFI_{NT} 」則為未以 CD26 配體處理的細胞(對照細胞)之 MFI 值。

【0025】此等百分比(%int CD26 或 RFI)：

- 如果低於 20%代表該抗-CD26 配體之效價低；
- 如果範圍落在 20%至 30%，則代表該抗-CD26 配體具有中等效價；
- 如果其高於 30%則代表該抗-CD26 配體為高效價。

【0026】在圖 12 中，A 組係為分別用於指定「低」、「中等」、與「高」效價之標準的緣由。明確地說，可以觀察到 CD26 的內化 %所呈現之反應，係為劑量相關的 S 形(S 形曲線)，其中在該配體之較低濃度下(在該圖中係標示為「RS」)，係具有較低的「%int CD26」值，同時反之亦然，在該配體之較高濃度下，其具有較高的「%int CD26」值，直到達到 30%-35%之最大值(高原

區)。如果這個高原區被視為 100%的「%int CD26」值，則可以如圖 12B 組所示將該曲線的所有值標準化。

【0027】在這一層的意義上，可以觀察到從 0%到 100%內化曲線，且因此其可以定義出三個不同的效價範圍：

- 1.「低」即是指具有範圍落在相對於該高原區 0%至 50%之內化百分比內的配體。
- 2.「中等」即是指具有範圍落在相對於該高原區 50%至 90%之內化百分比內的配體。
- 3.「高」即是指具有範圍落在相對於該高原區高於 90%之內化百分比內的配體。

【0028】換句話說，此一概念可被歸納於以下表 1 中：

表 1

效價	RFI	%高原區
低	0%-20%	0%-50%
中等	20%-30%	50%-90%
高	> 30%的	90%-100%

【0029】在本發明的替換具體實施例中，步驟 a)的人類淋巴細胞群可在室溫下溫育。

【0030】該抗-CD26 配體係為能夠與 CD26 受體專一性結合之任何分子，較佳地為抗-CD26 單株抗體或其片段，更佳地為貝格洛姆單抗。

【0031】在本發明的方法之一較佳具體實施例中，步驟 a)的抗-CD26 配體之濃度為 0.001μg/ml、0.01μg/ml、0.5μg/ml、或 2μg/ml。

【0032】在本發明的方法之一較佳具體實施例中，步驟 b)之抗-CD26 的抗體係為小鼠抗人類 CD26 APC 螢光標記共軛類型(BD Pharmingen 公司；目錄型號：563670，細胞株編號：M-A261)，並且係以 2.5 μ g/ml 的濃度來進行培養。

【0033】依據本發明之方法的另一較佳具體實施例，在步驟 b)中所使用之螢光染料係為可用於細胞螢光分析中之任何螢光染料，其係選自於由 FITC、APC、PE、PE-Cy7、APC-H7、PerCP 與 PE-Cy5.5 所構成的群組。該螢光染料係較佳地為 APC。

【0034】再一次，依據本發明之方法的一較佳具體實施例，步驟 a)的 CD26+T 淋巴細胞群，係選自於初代 T 淋巴細胞，以及人類 T 淋巴細胞之腫瘤細胞株的群落。較佳地，該人類 T 淋巴細胞腫瘤細胞株係是 Karpas 299 細胞株。

【0035】在依據本發明之方法的一較佳具體實施例中，步驟 c)的細胞螢光分析係藉著 FACS 來進行。

【0036】依據本發明之方法也提供了該抗-CD26 配體的效價之進一步驗證步驟，其提供了一種上述配體所釋放的細胞介素之抑制試驗，該細胞介素係選自於由 IL-8、IL-1 β 、IL-6、IL-2、GM-CSF、IL-6 與 TNF- α 所構成的群組，其等係作用於步驟 a)之 CD26+人類 T 淋巴細胞的群落上。在較佳具體實施例中，該細胞介素係為 IL-8 及/或 IL-1 β 。步驟 a)的該 CD26+人類 T 淋巴細胞群，係選自於初代 T 淋巴細胞，以及人類 T 淋巴細胞之腫瘤細胞株。

胞株的群落。較佳地，該人類 T 淋巴細胞腫瘤細胞株係為 Karpas 299 細胞株。

【0037】在一較佳具體實施例中，該細胞介素生產的抑制試驗係藉由 MesoScale Discovery(MSD)分析來進行。

【圖式簡單說明】

【0038】本發明現在將基於例示而非限制之目的，而依據較佳具體實施例特別是參照隨附圖式來加以描述，其中：

-圖 1 顯示以 MSD 分析來分析促炎性細胞介素含量之細胞培養流程。

-圖 2 顯示在周邊血液之初代單核細胞與經純化的 CD4+T 細胞(A)以及人類 T 細胞株 Karpas 299(B)中，CD4+細胞(深色柱)與 CD26+細胞(淺色柱)之百分比的細胞螢光分析。

-圖 3 顯示在溫育 8 小時之後 Karpas 299 細胞中(A組)，以及在 4°C 與 37°C 下溫育初代 CD3+、CD4+、CD8+T 細胞 6 小時與 24 小時之後(B、C、D 組)，貝格洛姆單抗對 CD26 受體之內化的影響。

-圖 4 顯示貝格洛姆單抗在 T 細胞株中 Karpas 299(A 組)與在初代 T 細胞中(B 組)中，所誘發之細胞介素 IL-2、IL-8，IL-1 β 、GM-CSF、IL-6 和 TNF- α 抑制程度。在該等圖式中，在縱坐標軸的左側標示電化學發光訊號值，而在橫坐標軸則標示對應的濃度。

-圖 5 顯示在 Karpas 299 細胞中以貝格洛姆單抗處理 24 小時後，與 CD26 有關之螢光減少現象。

-圖 6 顯示在 Karpas 299 細胞中，以從 $0.0005\mu\text{g/mL}$ ($3\times 10^{-12}\text{M}$) 之低劑量開始，至等 $150\mu\text{g/mL}$ ($1\times 10^{-6}\text{M}$) 之較高濃度的貝格洛姆單抗處理 24 小時後，與 CD26 有關之螢光減少現象。

-圖 7 顯示通過 FACS 分析所獲得之 CD26 的劑量反應的內化曲線 (RFI)，其係針對在不同的溫度條件下 (SVI-STB 係為效價減低之樣本，其係為置於 32.5°C 下 6 個月之安定性加速樣本) 儲存之貝格洛姆單抗來進行。

-圖 8 顯示針對於不同的細胞螢光計，通過 FACS 分析所獲得之該 CD26 內化曲線 (RFI)。

-圖 9 顯示所觀察的相對於貝格洛姆單抗 (WS-BEG-013)，小鼠單株抗-hCD26 抗體 (細胞株 202.36) 之相對效價。

-圖 10 顯示所觀察的相對於貝格洛姆單抗 (WS-BEG-013)，該 IgG2b 小鼠抗體的 K 同型抗體 (細胞株 MG2b-57) 的相對效價。

-圖 11 顯示測試樣本 (TEST) 的效價值，其係相對於參考標準 RS (貝格洛姆單抗) 來進行計算，以證實被命名為 TEST 之任何未知樣本的相對活性是如何相對於該參考標準 (RS) 來進行定量測量。

-圖 12 顯示被用來測定低、中等或高效價之標準的兩個範例圖式。

【實施方式】

【0039】爲了要更充分地說明本發明，現在提供以下應被視爲是例示說明且並非限制性之實施例。

【0040】

實施例 1：針對單株抗體貝格洛姆單抗的作用機制之研究

【0041】爲了產生用於在活體外評估該抗體之有效性的測試，針對貝格洛姆單抗(抗-CD26)的作用機制進行了研究。

【0042】該被稱爲效價測試的測試方法之研發，對於測量特定藥物之生物學活性來說非常重要，因爲在作爲批次放行檢測之品質管制的範疇內，該活性在早期開發、先導研發、以及市場行銷等階段，均係爲分子品質管制的重要構成部分。

【0043】具體來說，例如單株抗體之許多生物產品，係透過與細胞或可溶性靶標結合來發揮其之作用，隨後在該分子靶標的下游誘發適當的細胞事件。

【0044】因此其評估了以下內容：

- CD26 在人類 T 細胞株與人類初代 T 細胞中之表現 / 過度表現。
- CD26 在與貝格洛姆單抗結合之後的內化作用。
- 貝格洛姆單抗對於促炎性細胞介素的產生與釋放之影響。

【0045】

材料和方法

初代細胞與細胞株

【0046】該人類 T 細胞株係自購自於 SIGMA(Cat. 06072604-1VL)的 Karpas299 淋巴瘤之 T 細胞。將該 Karpas 299 細胞培養在含有 GlutaMAX 的 RPMI1640 中(Gibco, cat.#72400)，其係補充了 10% 高溫滅菌小牛血清(Sigma, cat.#F2442，該高溫滅菌作業係在實驗室中進行)、1 IU/ml 盤尼西林/鏈黴素(Gibco, cat.#15140)、2 mM 的 L-麩醯胺酸(Gibco, cat.#2503)、以及 50 μ M 的 β -巰基乙醇(Sigma-Aldrich 公司, cat.#M3148)。在解凍後，將該細胞增殖並冷凍保存。

【0047】將該細胞株加以分析，來評估黴漿菌是否存在(MycoAlertTM, Lonza, cat.#LT-07)，而並未發現後者。周邊血液單核細胞(PBMC)係係依據聖拉斐爾倫理委員會(IRB)批准的方案，在知情同意後通過葡聚糖－泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)分離梯度(Lymphoprep, Fresenius)，而自三個健康捐贈者得到的膚色血球層分離。爲了要評估細胞存活率，將該 PBMC 以萘胺藍染色，並在血球計算盤中進行計數。將該 PBMC 係在開始實驗之前，係在 37°C 下於具有低劑量的 IL-2(50 IU/mL)與 IL-7(5 μ g/mL)之完全培養基(RPMI 10%FBS+1%PenStrep 與麩醯胺酸)中，培養隔夜(o/n)。

【0048】爲了測定 CD26 在人類初代 CD4+T 細胞與 T 細胞株之細胞表面上的表現，購入該抗體 α -CD26-FITC 株 BA5b(Biolegend, cat.#302704)。在三個捐贈者的初代

T 細胞與 Karpas 299 細胞上，於稀釋範圍內測試抗體，以確定進行細胞螢光測定的最佳濃度。該最佳濃度將用於測定 CD26 在人類初代 CD4+T 細胞與 T 細胞株上表現之百分比，並用於測定 CD26 的內化作用。

CD26 在 T 細胞株與人類初代 CD4+ T 細胞中之表現

【0049】將來自兩個捐贈者的初代 CD4+ 細胞與 Karpas 299 細胞，以 100,000 個細胞/孔之密度，於 96 孔 V 型底板 (Costar, cat.#3598) 中，接種於添加 0.2%BSA(Miltenyi 公司, cat.#130-091-376)的 autoMACS 緩衝液 (Miltenyi, cat.#130-091-222)內。該等細胞係於一定濃度範圍之 α -CD26-FITC 或 α -IgG2a-FITC (Biolegend, cat.#400208)內培養 15 分鐘，該範圍係為從 2.5 μ g/ml 至 31.3ng/ml。該等細胞接著係於 4%甲醛中清洗並固定。陽性反應之 CD26 細胞的百分比，係使用 FACSCanto II 而藉由細胞螢光來測定。IgG-FITC 係被用來測定非專一性鍵結。

在人類初代細胞與 T 細胞株上之 CD26 表現的定量

【0050】細胞螢光係用於測定在初代周邊血單核細胞 (PBMC)與 CD4+T 細胞，並且還有該 Karpas 299 細胞株的細胞膜上，CD26 的表現量。CD4+標記係被加入以作為 T 細胞標記。來自三個捐贈者的初代 CD4+ T 細胞與 Karpas 299 細胞，係以 100,000 個細胞/孔之密度，於 96 孔 V 型底板 (Costar, cat.#3598)內，接種於 MACS 緩衝液中。該等細胞係以 10 μ g/ml 的 α -CD26-FITC 與 2.5 μ g/ml 的 α -CD4，培養 15 分鐘。加入 10 μ g/ml 的 α -IgG2a-FITC

與 2.5µg/ml 的 α -IgG2b-APC(Biolegend, cat.400612), 以允許其進行圈選。該等細胞接著係於 4%甲醛中清洗並固定。CD4+與 CD26+細胞的百分比, 係使用 FACSCanto II 藉由細胞螢光來測定。

測定 CD26 的內化作用

【0051】貝格洛姆單抗誘導在 T 細胞中之 CD26 受體的內化能力(在人類初代 T 細胞以及在 T 細胞株兩者內), 係透過細胞螢光分析來進行測定。該測定係在兩項獨立的實驗中進行。每次實驗係自三個膚色血球層分離 CD4+ T 細胞。接著, PBMC 與所分離的細胞都以抗-CD4 與抗-CD26 抗體來進行標記, 以測定所分離之細胞群落的純度, 以及在實驗前之 CD26 細胞的百分比。此外, 也可加入存活染料, 以確保該實驗是在活細胞中進行。該等細胞係透過細胞螢光測定法來進行分析。

【0052】該 CD4+細胞係因為 CD4+群落的純度為 >95%; 在該 CD4+群落中之 CD26+細胞的百分比>75%, 而被評估為具有良好的品質。該 T-細胞株係以 100,000 個細胞/孔, 接種於塗覆有 2µg/ml 的抗-CD3/抗-CD28(分別為 eBioscience, cat.#16-0037-85 與 16-0289-85)之 96 孔平底板(Corning Costar, cat.#3598)內, 並在 37°C 下培養 2 小時。在培養隔夜之後更換培養基, 並將該等細胞以總體積為 100µl 的 0.03mg/ml(2×10^{-7} M)的貝格洛姆單抗、做為對照組之 IgG2b (Sigma-Aldrich, cat.#SAB4700729 或 Biolegend, cat.#401202)、或是做為對照載體之 PBS(Gibco, cat.#10010)來進行培養。各條

件試驗三次(三個細胞孔/條件)。該等處理係在 4°C 與 37°C 下進行 8 小時。接著將該等細胞標記，並以細胞螢光測定法來測定在 CD4+細胞中，CD26+細胞的百分比。此外，在該處理開始前將一組細胞加以標記並在進行分析，以測定在 0 時之時 CD4+CD26+細胞之百分比。在進行實驗當天，藉著 1,500 rpm 離心 5 分鐘來分離 PBMC，並分別與不同濃度的貝格洛姆單抗培養 6 和 24 小時。在以貝格洛姆單抗培養之後，清洗 PBMC 並用以下單株抗體來標記：與 FITC-、PE-、APC、APC-H7-(Biolegend) 拼合之 CD3、CD4、CD8 和 CD26 之人類抗體。前述已經說明，抗-CD26 單株抗體可以與和貝格洛姆單抗不同之抗原決定區結合。與該螢光團拼合之對應於貝格洛姆單抗 (IgG2b) 的同型抗體，總是被用來作為陰性對照組。使用 FACS Canto II 流式細胞儀(BD Biosciences)來分析樣本。運用 Flow Jo 軟體(Tree Star Inc.)來分析所有數據，並以 CD4+或 CD8+細胞的相對螢光強度(RFI)來呈現。此一數值係藉著把標記了抗-CD26 的樣本之平均螢光強度，除以對應的同型對照組來加以計算。

用於促炎性細胞介素的 9-叢 MSD(9-plex MSD assay)測定法

【0053】為了評估貝格洛姆單抗在 T 細胞活化中的作用，其針對促炎性細胞介素的產生進行了評估。

【0054】為了此一目的，係採用 MesoScale Discovery(MSD)測定法，也就是 9-叢測定法來分析人類促炎性細胞介素(cat.#15007B-2)。該初代 T 細胞與該

Karpas 299 T 細胞株，係如以上(第 4.1.1.2 節)所描述的，以 100,000 個細胞/孔接種於塗覆有抗-CD3/抗-CD28 之 96 孔平底板，並培養隔夜。

【0055】將該等細胞保持在含有 GlutaMAX 之 RPMI 1640 培養基中，並補充 10%HI-FBS、1%青黴素/鏈黴素、2mM L-麩醯胺酸、以及 50 μ M β -巯基乙醇。該等細胞係如圖 1 中所示，以 IL-12 和貝格洛姆單抗進行處理。簡而言之，將該等細胞以 20 ng/ml di IL-12(R&D systems, cat.#219-IL-0059)與對照載體(0.1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma-Aldrich, cat.#A2153-1kg)-PBS)預培養隔夜，或者是在沒有 IL-12/對照載體的情況下培養隔夜。第二天，將沒有以 IL-12 隔夜預培養之細胞，與 20 ng/ml 的 IL-12 一起培養 2 小時。接著，將這些所有的細胞以 0.03 mg/ml(2×10^{-7} M)的 IgG2b(Biolegend 公司)、貝格洛姆單抗或 PBS 對照載體，一起培養 6 小時或 24 小時。在所有的實驗中，在該預定時間後收集該上清液，並冰凍在 -80°C 下直到需要進行新的分析。

【0056】爲了要測試以抗-CD3 和抗-CD28「塗覆」對於細胞介素分泌之影響，在經塗覆與未經塗覆的接種板上測試該等細胞，並以 IL-12 預培養隔夜，隨後以貝格洛姆單抗/IgG2b/PBS 進行處理 24 小時。

【0057】細胞介素 MSD 分析可以檢測白細胞介素 2(IL-2)、IL-8、IL-1 β 、顆粒球巨噬細胞株刺激因子(GM-CSF)、干擾素- γ (IFN- γ)、IL-6、IL-10、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)以及 IL-12p70 的含量。該 MSD 細胞介素分

析係依據製造商的說明來進行，該接種板係在 4°C 而不是在室溫下封阻 1 小時，以防止可能發生之非專一性鍵結。採用該實驗之細胞培養適應期來製備該標準化曲線。MSD Discovery Workbench 4.0.12 軟體，係用於生成標準化曲線並用於計算細胞介素濃度(pg/ml)。將該樣本的數值輸入該標準化曲線，以測定其等是否落在其之範圍內。以 GraphPad Prism 6 來製備所有細胞介素的圖式。最初，用於進行統計分析之比 IgG2b 對照組高兩倍之貝格洛姆單抗的抑制作用，係被任意地設定為閾值含量。

【0058】然而，由於在各種條件下均呈現出 1.9 倍的抑制作用，該閾值係被改變為 1.9。為了在處理條件中評估統計顯著差異，在 Graph Pad Prism 6.0 中係以事後比較土耳其測試來運用雙向 ANOVA 測試，而獲得可以在多個試驗上調整的 p 值。

【0059】

結果

CD26 在人類 T 細胞株與人類初代 T 細胞中之表現/過度表現

【0060】圖 2 顯示在純化的 CD4+ T 細胞與 Karpas 299 細胞株中，來自周邊血的單核初代細胞群中，CD4+和 CD26+細胞的百分比。通過細胞螢光測定法所獲得之結果，顯示在初代單核細胞中 CD4+和 CD26+細胞的百分比，係分別為大約>45%與>35%，而在分離 CD4+ T 細胞之後，此等百分比係分別變成>95%與>75%(圖 2，A 組)。幾乎所有的 Karpas 299 細胞都表現出 CD4(>95%)以及高

含量之 CD26(>95%)(圖 2, B 組)。總之, 在分離的初代 CD4+ T 細胞群與 Karpas 299 細胞株中, CD26 陽性細胞的百分比係分別為大約 75%與 95%。上述百分比也足夠用來在隨後的實驗步驟中, 用於測量 CD26 含量的變化。

CD26 的內化作用

【0061】細胞螢光分析係用來測定在初代 T 細胞與 T 細胞株中, 貝格洛姆單抗誘導的 CD26 內化作用。相同的分析方法也被用來確認, 在所存在之 CD26 減少與貝格洛姆單抗的濃度之間的劑量相關關係。在 Karpas 299 T 細胞株中, 測定 CD26+細胞的百分比, 以及在該 CD4+群落中 CD26+的平均螢光強度(MFI)。在 T Karpas 299 細胞株中, 僅會在 37°C 下, 8 小時後可以在 CD4+群落中觀察到 CD26 MFI 減少的現象(分別為在 4 小時後出現 7%的抑制作用-未在圖中報導之數據-以及在 8 小時後達 22.3%)(圖 3, A 組)。此一減少現象在 CD4+群落於 37°C 下, 以貝格洛姆單抗培養 8 小時後, 相對於以在 4°C 下進行的培養作業, 也就是在所有的生物過程都受到低溫抑制時, CD26 的 MFI 中係為統計學上顯著的。所獲得的數據顯示, 在 37°C 下接著與貝格洛姆單抗結合之 Karpas 299 細胞質中, 每個單一細胞的 CD26 受體數量會減少。由於在 4°C 下完全沒有觀察到相同的生物學現象, 可以推斷 CD26 受體在與貝格洛姆單抗結合之後, 會呈現在 Karpas 299 T 細胞株中之抗體作用機制。為了確保在 Karpas 299 細胞中與貝格洛姆單抗結合, 所誘導的 CD26 受體的內化作用, 可以用來作為臨床開發之批

次放行的效價測試，而進行劑量反應實驗。在上述實驗中，Karpas 299 細胞係在 37°C 下以遞增之貝格洛姆單抗濃度來處理，請具體地係以 $0.5\mu\text{g/ml}(3\times 10^{-9}\text{M})$ 、 $5\mu\text{g/ml}(3\times 10^{-8}\text{M})$ 、與 $30\mu\text{g/ml}(2\times 10^{-7}\text{M})$ 來處理 24 小時(圖 5)。所得到之結果已經顯示，不斷遞增之抗-CD26 濃度，可以在細胞膜中誘發逐漸增加之 CD26 內化現象，係具有極大的益處。明確地說，劑量為 $0.5\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/mL}$ 與 $30\mu\text{g/ml}$ 的貝格洛姆單抗(其等分別為 $3\times 10^{-9}\text{M}$ 、 $3\times 10^{-8}\text{M}$ 與 2×10^{-7})，係對應於 26.9%、34.5%、與 43.8%之內化百分比。此一劑量反應效應係為開發效價測試之必要條件。

【0062】爲了評估貝格洛姆單抗對於初代 T 細胞的影響，將衍生自周邊血的單核細胞在 37°C 下，以貝格洛姆單抗在三種不同條件($6\mu\text{g/ml}$ ； $30\mu\text{g/ml}$ 與 $150\mu\text{g/ml}$ ； $4\times 10^{-8}\text{M}$ 、 $2\times 10^{-7}\text{M}$ 與 $1\times 10^{-6}\text{M}$)下培養 6 小時和 24 小時。在進行培養之後，立即標記該等細胞以評估其等之 CD26 表現。作為對照組，該單核細胞係在 4°C 下，以最高濃度的貝格洛姆單抗($150\mu\text{g/ml}$ ，也就是 $1\times 10^{-6}\text{M}$)進行培養。在 6 小時之後，相較於在 CD4+與 CD8+T 細胞中之 CD26 基線含量，可以觀察到 CD26 內化程度顯然減低(雖然並不顯著)(圖 3，B 組)。然而，在 24 小時還是可以獲得了統計學上顯著之結果(*， $P<0.05$)，特別是對於 CD8+T 細胞(圖 3，C 組)。如先前在 Karpas 299 細胞株所觀察到的，該單核細胞在 4°C 下以貝格洛姆單抗培養時，會減低 CD26 的調減功效(圖 3，D 組)，這說明了該抗體 CD26 複合物之內化作用的主動阻斷現象。簡而言

之，在以貝格洛姆單抗培養 24 小時之後，當其以濃度為 $30\mu\text{g/ml}(2\times 10^{-7}\text{M})$ 的貝格洛姆單抗處理時，Karpas 299 細胞中之 CD26 的表現係減低至 43.8%，而此一現象係與抗-CD26 的劑量有關(圖 5)。正如所預期的，在 4°C 下在所分析之細胞表面上，並未在 CD26 的表現上觀察到變化。所獲得的結果清楚地說明，CD26 受體係因應於與貝格洛姆單抗的結合而內化，隨後消除 CD26+T 細胞亞群的關鍵活化訊息。

促炎性細胞介素之釋放

【0063】考量到 CD26 的內化作用，可能會對該 T 細胞活化作用造成各種下游效應，於初代 T 細胞與 Karpas 299 細胞中，係針對某些促炎性細胞介素的含量，以貝格洛姆單抗加以處理之後來進行評估。

【0064】促炎性細胞介素可以被區分為兩組：第 1 組係與急性發炎有關；第 2 組則涉及慢性發炎。例如 IL-1、TNF- α 、IL-6、IL-11、IL-8 之細胞介素與 G-CSF 和 GM-CSF 之其他趨化介素係屬於第一組。第二組可以進一步區分為例如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-7 和 IL-13 之可以介導體液反應的細胞介素，以及例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12、干擾素、轉變生長因子- β 以及腫瘤壞死因子 α 與 β 之可以介導細胞反應的那些細胞介素(Shaikh PZ, 2011)。

【0065】促炎性細胞介素係為涉及例如類風濕性關節炎、多發性硬化症、GvHD 等等一系列自體免疫疾病之分子。在這些疾病的致病機轉中，特別是在發炎過程中，

CD26 扮演著關鍵角色。基於此一理由，我們將對貝格洛姆單抗某些促炎性細胞介素的抑制作用進行評估。更具體地說，其將分析以下細胞介素的含量：白細胞介素-2(IL-2)、IL-8、IL-1 β 、顆粒球巨噬細胞株刺激因子(GM-CSF)、干擾素- γ (IFN- γ)、IL-6、IL-10、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)以及 IL-12p70。上清液樣本的一系列稀釋液係被在該測定中用來作為預先測試，對於所有的細胞介素來說，結果顯示除了在暴露在作為訊息之 IL-12 的 IL-12p70 細胞之上清液以外，該未經稀釋的樣本均係落在標準化曲線範圍內(未顯示)。基於此一理由，25 μ l 之未經稀釋的標準上清液，係在 MSD 測定中進行測試。在這兩個實驗中，在所有測定板中之所有細胞介素的標準曲線，均呈現出經過充分校準的曲線。

【0066】將待分析的樣本插入至該標準化圖表內，以確認其等是否是落在檢測範圍內。測量並分析除了 IL-12p70 以外的所有細胞介素含量，雖然在初代 T 細胞捐贈者和 Karpas 299T 細胞株之間，有觀察到細胞介素含量的改變，而在一定條件下的含量則係低於檢測極限水平。在兩個實驗中，所分析之所有細胞群中之 IL-1 β 和 IL-6 含量都非常低。如先前在文獻中所報導的 (Vacaflores A. 等人，2016)，以 IL-12 來處理該等細胞，在許多種條件下都清楚地誘導了 IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-10 的生產。因此，在 IL-2、IL-8、IL-1 β 、顆粒球巨噬細胞株刺激因子(GM-CSF)、IL-6 與腫瘤壞死因子 α (TNF- α)，都可以觀察到在以貝格洛姆單抗處理之後的細胞介素的抑制作用(圖 4)。

【0067】在 Karpas 299 細胞與初代 T 細胞中，於相同條件下都可以觀察到以貝格洛姆單抗培養之後，在 IL-8 與 IL-1 β 含量強烈降低現象。

【0068】以下表 2 概要描述了貝格洛姆單抗在初代 T 細胞與 Karpas 299 細胞中，對於分泌不同細胞介素之抑制作用，其明確顯示了在 37°C 下培養該等細胞 6 或 24 小時之後，由貝格洛姆單抗所誘導之促炎性細胞介素含量的抑制作用。

【0069】表 2

細胞類型	細胞介素					
	IL-2	IL-6	IL-8	GM-CSF	IL-1 β	TNF α
初代 T 細胞	+	+	-	+	+	+
Karpas 299 細胞株	-	-	+	+	-	+

-：沒有抑制作用
+：有抑制作用

【0070】此外，爲了測試「塗覆」對於細胞介素分泌之影響，該等細胞係如「材料與方法」一節所述，在以抗-CD3/抗-CD28 來塗覆，以 IL-12、貝格洛姆單抗或適當的對照載體來處理之測定板上進行測試。一般來說，可以觀察到該細胞介素含量係無法被檢測出，或者係被證實在未經塗覆之測定板中係比經塗覆測定板還要低。這說明了該塗層對於構成用於研究貝格洛姆單抗在細胞介素含量中之功效的測定窗口來說，係不可或缺的。使用未經塗覆的測定板來測量貝格洛姆單抗對於細胞介素含量的功效，並未被進一步分析。在此一實驗的基礎上，所得到的結果說明該貝格洛姆單抗能夠強烈地降低在初

代 T 細胞與 Karpas 299 的兩種細胞中，例如 IL-8、IL-1 β 與 IL-6 之特定細胞介素的生產，其彰顯了抗-CD26(貝格洛姆單抗)在治療自體免疫性疾病中之作用機制。

實施例 2：建立用以測定 該抗-CD26 配體的效價之細胞分析法

【0071】本實驗部分之目的係要建立一種抗-CD26 配體之活性的細胞測定法，其係由已知的抗-CD26 單株抗體-貝格洛姆單抗開始。

【0072】貝格洛姆單抗係為一種由雜交瘤細胞所產生的抗-CD26 單株抗體，其之臨床標的係為抑制在同種異體移植中，捐贈者之 T 淋巴細胞的活化。

【0073】該分析法之目的係要測量存在於 T 淋巴細胞細胞膜上之 CD26 含量的變化(Karpas 299，CD4 陽性)，其係在活體外以遞增之貝格洛姆單抗濃度來處理後者。

【0074】CD26 係為一種與 T 淋巴細胞的活化有關，具有二肽基肽酶活性之膜糖蛋白。初步的數據證實在 24 小時的處理之後，貝格洛姆單抗誘導人類 T 淋巴細胞與 Karpas 299 細胞的表面上之 CD26 內化作用的能力。

【0075】具體來說，該等細胞係在 37°C 下以濃度遞增的貝格洛姆單抗來培養 24 小時，並接著以能夠分別與 CD4 和 CD26 受體結合，並且係與會在不同波長發光之螢光團拑合的兩種抗體來染色。在該 FACS 分析期間，對於所測試之各種濃度的貝格洛姆單抗，所測量之該螢光強度係與存在於每個單一細胞的該細胞表面上的 CD26 含量成比例。此一參數然後以儀器藉著計算選自陽

性 CD4 細胞群上，所得到之 20,000 單一螢光訊號擷取事件的中位數來量化。

細胞樣本的染色程序與 FACS 分析

【0076】在預先設定之貝格洛姆單抗培養時間到期時，該等細胞樣本係依據以下染色方法以與螢光團拼合之抗體來處理，然後透過 FACS 來分析表面 CD26 之表現：

- 將每個孔中之物質轉移至 1.5mL 的微量離心中；
- 在 10,000 rpm 下離心 5 分鐘；
- 以 1mL 之冷 DPBS 來洗滌該片狀沈澱物；
- 在 10,000rpm 下離心 5 分鐘；
- 將該片狀沈澱物乾燥並依據以下表 3 中所描述之 FACS 分析之培養程序，以後續抗體染色。

【0077】表 3

抗體	螢光團	標的	微升/管	DPBS-5%FBS/管	細胞/管	溫育時間
FITC 小鼠抗-人類 CD4，RPA-T4 細胞株(BD Pharmigen cat.555534)	FITC	CD4	20μ	100 微升	1.00E+06	30 分鐘。
APC 小鼠抗-人類 CD26，M-A261 細胞株 (RUO)(BD Pharmigen cat.563670)	APC	CD26	5μ	100 微升	1.00E+06	30 分鐘。

- 將該樣本渦旋震盪並在室溫下於黑暗中培養 30 分鐘；
- 加入 1 毫升的 DPBS 並在 10,000rpm 下離心 5 分鐘；
- 倒掉上清液並以 1mL 之冷 DPBS 來洗滌該片狀沈澱物；
- 在 10,000rpm 下離心 5 分鐘；
- 將該細胞片狀沈澱物在 0.7-1E6 細胞/mL 的濃度下，重新懸浮於 DPBS-5%FBS 中並將該樣本儲存在

黑暗中於 4°C 下，直到讀取 FACS 讀數。如果無法在白天進行讀取，則藉由添加最終濃度為 0.36% 之聚甲醛來固定細胞。

【0078】在進行 FACS 分析期間，對於所測試之每種濃度的貝格洛姆單抗，均測量其與每個單一 CD4 陽性細胞之細胞表面上，所存在的 CD26 含量有關之螢光強度。此一參數然後由儀器以選自陽性 CD4 細胞群上，所獲取的 20,000 個事件的螢光所衍生之平均值來量化。為了獲得與 FITC 和 APC 有關的兩種螢光數據，由於這兩種螢光團係以不同波長發射，因此並不需要進行補償動作。

【0079】該數據接著運用 BD FACS Diva 程式進行再處理，其允許將 CD26 的表現含量，計算為在獲取數據時所記錄之所有事件的平均值(選自陽性 CD4 細胞群上)。

結果

【0080】貝格洛姆單抗的生物學活性，係以誘導 Karpas 299 細胞之細胞膜表面上所存在的 CD26 內化之能力來進行測量。

【0081】CD26 在以遞增的貝格洛姆單抗濃度來處理之後的內化量，係以結合至該細胞膜表面所表現的 CD26 之該專一性抗體，所放射之平均螢光值的減低程度來測量(APC 小鼠抗人類 CD26，細胞株 M-A261 RUO BD Pharmigen 代碼 563670)。

【0082】其之目的是要藉由批次與 WS 的比對效價測試，來產生每一批次產品之濃度-反應曲線，來與藉由將

該細胞以工作標準(WS)來處理所獲得之濃度-反應曲線進行比較，其中該曲線的平行度係為該測定之適用性的必備條件(以 PLA.3 分析軟體來進行平行檢定)。

【0083】如可以從圖 5 之該圖式中所看到的，在以貝格洛姆單抗處理 24 小時後，Karpas 299 細胞減少大約 40%之 CD26 相關螢光。

【0084】此外，此一在 Karpas 299 細胞中之作用係被證實為濃度-反應，這是研發細胞試驗所必需之條件。

【0085】所觀察到的功效係為貝格洛姆單抗專有的，因為 IgG2b 池(貝格洛姆單抗所歸屬的 IgG 類型)在任何測試條件下都不會誘導 CD26 內化。

【0086】為了獲得該生物效應的最佳生長條件之評估，決定以貝格洛姆單抗重複培養 24 小時，並在以 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 刺激後(Gibco kit, Life Technologies, code 11131D)，使用 CD3+T 淋巴細胞來進行。

CD26 的內化百分比

【0087】從圖 6 中的圖式可以發現，在以貝格洛姆單抗處理 24 小時後，採用最高濃度的貝格洛姆單抗來處理後之 Karpas 299 細胞，其之 CD26 相關螢光減少大約 48%(相當於 $150\mu\text{g/mL}$ ，或 $1 \times 10^{-6}\text{M}$)。

【0088】該濃度-反應曲線的擴展允許其得到較低的反應極限，其係相當於 $0.01\mu\text{g/mL}$ ($7 \times 10^{-11}\text{M}$)。

【0089】確認 IgG2b 池係缺乏效果(用來作陰性對照組)。

【0090】隨後的試驗係被設計以減少曲線的複雜性(以驗證該曲線是否具有單相或多相模式)。

不同樣本的貝格洛姆單抗之效價評估

【0091】然後進行三種貝格洛姆單抗樣本的效價評估，其中一種係置於 32.5°C 之安定性加速條件下儲存 6 個月(SVI-STB 製備)。

【0092】依據 FACS 分析，批次 1 與批次 2 兩個獨立製備物之間，於 CD26 的內化動力學方面並沒有實質差異。

【0093】相反地，SVI-STB 的製備物，藉著在 32.5°C 下培養 6 個月之貝格洛姆單抗降解樣本，在誘導 CD26 的內化方面似乎比其他者較沒有效果(圖 7)。該結果可以支持改變貝格洛姆單抗樣本之方法的功能。

【0094】如可在圖 7 的圖式中看見的，貝格洛姆單抗所選擇的 8 個濃度，顯示儲存在 4°C 下之貝格洛姆單抗樣本，以及長時間承受至 32.5°C 之熱偏移的貝格洛姆單抗樣本，於曲線的中心區域呈現高變異性。

【0095】均儲存在 4°C 之最佳條件下的兩種貝格洛姆單抗樣本，在曲線的中心區域則沒有變異。

以不同的流式細胞儀來評估效價

【0096】爲了要確保在以抗 -C26 培養後所獲得之 CD26 內化作用的結果，在改變讀取技術後也可以再現，我們使用兩種不同製造商之細胞螢光計來進行該內化實驗。

【0097】所獲得的結果(圖 8)清楚地顯示，屬於不同細胞螢光計之技術，並不會改變內化曲線的結果。

【0098】具體而言，在這兩項實驗中可以輕易地辨識出，並非保存於最佳條件下之該貝格洛姆單抗樣本(SVI-STB)，相較於另外 2 個保存於最佳條件下之該貝格洛姆單抗樣本時，其在該曲線的中央部分顯示出高的變異性。

結論

【0099】藉著使用 Karpas 299 細胞株來進行的實驗測試，證實以貝格洛姆單抗誘導細胞膜之 CD26 的內化作用為基礎的細胞分析法，具有臨床運用藥物之批次放行測試功能的所有特性。

【0100】明確地說，該以貝格洛姆單抗培養之後的 CD26 內化作用為基礎之測試，允許對於臨床運用藥物之批次放行的各種特性中之任何可能的偏差，以專一且可再現的方式來進行鑑定。

【0101】

實施例 3：以其他抗-CD26 抗體進行之效價測定驗證

【0102】該效價測定係以另外兩種抗-CD26 抗體來進行測試：

- 小鼠抗-hCD26-mAb，(抗體株 202.36)Thermo Fisher 公司代碼：MA1-35147；批次：311030F
- IgG2b，小鼠同種異型 K(抗體株 MG2b-57)BioLegend 公司代碼：M1395 係作為陰性對照組。

【0103】爲了檢測在細胞膜中之 CD26，係使用該與 APC(抗體株 M-A261)BD Pharmingen 公司代碼：563670；批次：8116645 拼合之小鼠抗人類 CD26 抗體。

【0104】圖 9 與圖 10 顯示相對於貝格洛姆單抗 (WS-BEG-013)所觀察到之相對效價。依據所獲得的結果，該抗體株 202.36 呈現出大約 0.01 的相對效價，而抗體株 MG2b-57 則呈現顯示爲完全不具活性。如所觀察到的，依據本發明之效價測試因此也適用於其他 CD26 配體。

【0105】同樣在圖 9 中，在比較 CD26 於接近參考化合物 WS-BEG-013($2\mu\text{g/mL}$)之漸近線濃度的內化作用時，僅觀察到 WS26-BEG-013 (32.5%)出現大於 30%之最大內化作用，而專一性地測試之抗體株 202.36 的該抗體，則是要比 20%低得多(11.5%)，依據所宣稱的標準，這證明其係爲具有低效價(即 $<20\%$ ，也就是 $<$ 高原區%的 50%)的抗體。

【0106】圖 11 顯示測試樣本(TEST)之效價值，其係相對於參考標準(RS)來進行計算，以顯示如何相較於貝格洛姆單抗來定量測量相對活性。在此一情況下，該參考標準品(RS)係濃度爲 1.8 mg/ 之貝格洛姆單抗，而測試樣本則是濃度爲 1.26 mg/mL 的貝格洛姆單抗，也就是 RS 濃度的 70%，其具有等於 TEST/RS 的濃度比之相對於 RS 之預期效價(例如 $1.26/1.8=0.7$ ，也就是 70%)。在圖 11 中，證實了在濃度比爲 70%，是如何如預期地觀察到爲 70%之相對效價(依據指南 USP 1034「生物頻評估分析」中位數軟體 PLA 3.0 來進行計算)。

【0107】在圖 11 的圖式中，MFI 值 170 代表細胞膜 CD26 的最大表現值(最大的水平漸近線)，而該數值 110 則代表達到 CD26 的最大內化值之該 MFI 值，因此其係對應於最小細胞膜表現之該數值(最小水平漸近線)。在此一範圍內，每個測定中均以絕對值來界定，且係藉由測量測試曲線與貝格洛姆單抗參考曲線的相對距離來進行效價估計。

【0108】在該圖式所顯示之直方圖中，顯示 CD26 相對於其最大細胞膜表現之內化百分比，其係由所測量到之最大 MFI 值來呈現(170)。在參照測試化合物時，此一百分比係與相對效價有關：

- 在 MFI 值為 130 時，RS 內化了在細胞膜中存在之 23.1%的 CD26，相較之下測試組僅內化 18.5%(測試組/參考組比 = 0.80)；
- 在 MFI 值為 110(細胞膜 CD26 的存在最小)時，RS 內化了在細胞膜中存在之 12.1%的 CD26，相較之下測試組僅內化 9.9%(測試組/參考組比 = 0.82)。

【0109】可以觀察到，效價值不僅僅是在一點上之內化比，而是計算在兩個 EC_{50} s 之間的相對比率，其等分別為參考組 $0.04342\mu\text{g/mL}$ ，測試組 $0.06644\mu\text{g/mL}$ 。

【0110】事實上，在所討論的範例中之該效價可以 $EC_{50\text{ RS}}/EC_{50\text{ 測試組}}$ 來估計，而得到等於 0.65 之數值，也就是能夠確認該測試組的效價係為 RS 的效價之大約 70%。

【0111】此外，藉著比較在接近於 RS($2\mu\text{g/ml}$)之該最低水平漸近線的濃度處之 CD26 內化作用，所觀察到之高於 30%的 CD26 最大內化作用 RS(36%)與測試組(35.9%)兩者，依據所宣稱的標準，這兩種案例都係為高效價，也就是 $>30\%$ 。

【0112】

參考書目

- Abbott C.A., Baker E., Sutherland G.R., McCaughan G.W. Immunogenetics 1994 40: 331-338.
- Cordero OJ, Yang CP, Bell EB. Immunobiology 2007, 212:85-94.
- Morimoto C., Torimoto Y., Levinson G., Rudd C.E., Schrieber M., Dang N.H., Letvin N.L. J. Immunol. 1989, 143: 3430-3439.
- Mattern T., Scholz W., Feller A.C, Flad H.-D., Ulme, A.J. Scand. J. Immunol. 1991, 33:737-48.
- Gorrel M.D., Gysbers V., Mccaughan G. W. Scand. J. Immunol. 2001, 54: 249-264.
- De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpe' S. Immunol. Today 1999, 20:367-375.
- Hildebrandt M., Reutter W., Arck P., Rose M., Klapp B.F. Clin. Sci. 2000, 99:93-104.
- Franco R., Valenzuela A., Lluís C., Blanco J Immunol. Rev. 1998, 161:27-42.

- Sauer A.V., Brigida I., Carriglio N., Aiuti A. Front Immunol. 2012, 3: 265.
- Morimoto C., Schlossman S.F. Immunol. Rev. 1998, 161:55-70.
- Klemann C., Wagner L., Stephan M., von Horsten S. Clin Exp Immunol. 2016, 185(1):1-21.
- Ohnuma K., Hosono O., Dang NH., Morimoto C. Adv Clin Chem. 2011, 53:51-84.
- Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P and Holler E. Lancet 2009, 373:1550-1561.
- Welniak LA, Blazar BR and Murphy WJ. Annu Rev Immunol 2007, 25:139-170.
- Henden A.S., Hill G.R. J Immunol 2015; 194:4604-4612.
- Yi T., Chen Y., Wang L., Du G., Huang D., Zhao D., Johnston H., Young J., Todorov I., Umetsu D.T., Chen L., Iwakura Y., Kandeel F., Forman S., Zeng D. Blood. 2009, 114(14):3101-12.
- Hatano R., Ohnuma K., Yamamoto J., Dang N.H., Yamada T., Morimoto C. Br J Haematol. 2013, 162(2):263-77.
- Bacigalupo A., Deeg J., Caballero D., Gualandi F., Raiola A.M., Varaldo R., Di Grazia C., Van Lint M.T. Abstract 671. ASH Meeting December 2016.
- Brevetto US 9,376,498.

- Shaikh P. Z. Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS) 2011, 2(11):1247-1263.
- Vacaflores, A., Chapman, N. M., Harty, J. T., Richer, M. J., & Houtman, J. C. PLoS One. 2016, 9;11(6):e0157175.
- Seidel U.J.E., SchlegelP., Lang P. Front Immunol. 2013, 4: 76.

【符號說明】

無。

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

用於測定抗-CD26 配體的生物學活性之定量的細胞法
QUANTITATIVE CELLULAR METHOD FOR DETERMINING THE
BIOLOGICAL ACTIVITY OF AN ANTI-CD26 LIGAND

【中文】

本發明係與用於在活體外測定一抗-CD26 配體之功效的定量細胞法有關，較佳地為例如貝格洛姆單抗(begelomab)之抗-CD26 單株抗體。

【英文】

The present invention relates to a quantitative cellular method for the *in vitro* determination of the effect of an anti-CD26 ligand, preferably of an anti-CD26 monoclonal antibody, such as begelomab.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種用於活體外測定抗-CD26 配體之效價的方法，其包括以下步驟：

- a) 在 37°C 或在室溫下，以濃度範圍落在 0.001 μg/ml 至 150 μg/ml 之抗-CD26 配體，來溫育會以高於 75% 的比例，表現該 CD26 受體之人類 T 淋巴細胞群；
- b) 與抗-CD26 抗體一起溫育，該抗體係以會辨識在該 CD26 受體上之一抗原決定區的螢光染料來標記，該抗原決定區係與步驟 a) 的抗-CD26 配體所識別者不同；
- c) 藉由細胞螢光分析的方式，來測定以抗-CD26 配體來處理的細胞樣本之 CD26 的 MFI 值 (MFI_T)，以及未經處理細胞的 MFI 值 (MFI_{NT})；
- d) 評估 CD26 受體的內化百分比 (%int CD26) 或依據以下方程式來計算之 RFI：

$$\%int\ CD26 = 100 - \left(\frac{MFI_T}{MFI_{NT}} \times 100 \right)$$

其中，如果 %intCD26 的值為：

- 小於 20%，則代表該抗-CD26 配體係為低效價；
- 範圍落在 20% 至 30%，則代表該抗-CD26 配體係為中等效價；
- 高於 30%，則代表該抗-CD26 配體係為高效價。

- 2.如請求項 1 之方法，其中該步驟 a)的抗-CD26 配體濃度係落在 $0.01\mu\text{g/ml}$ 至 $100\mu\text{g/ml}$ ，更佳地為 $0.01\mu\text{g/ml}$ 至 $2\mu\text{g/ml}$ ，甚至更佳地為 $0.01\mu\text{g/ml}$ 至 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的範圍內。
- 3.如請求項 1 至 2 中任一項之方法，其中步驟 a)的該抗-CD26 配體係為一抗體或其片段。
- 4.如請求項 3 之方法，其中該抗-CD26 抗體係為單株抗體貝格洛姆單抗(begelomab)。
- 5.如前述請求項中任一項之方法，其中該步驟 b)的螢光染料係選自由 FITC、APC、PE、PE-Cy7、APC-H7、PerCP 與 PE-Cy5.5 所構成的群組，較佳地為 APC。
- 6.如前述請求項中任一項之方法，其中步驟 a)的該人類 CD26+T 淋巴細胞群係選自於一初始 T 淋巴細胞群及人類 T 淋巴細胞的腫瘤細胞株。
- 7.如請求項 6 之方法，其中該人類 T 淋巴細胞的腫瘤細胞株係為 Karpas 299 細胞株。
- 8.如前述請求項中任一項之方法，其中該步驟 c)的細胞螢光分析係藉由 FACS 來進行。
- 9.如前述請求項中任一項之方法，其進一步包含：
在步驟 a)的人類 CD26+T 淋巴細胞群上進行之一炎性細胞介素之生產抑制作用的測定步驟，該炎性細胞介素係選自由 IL-8、IL- 1β 、IL-6、IL-2、GM-CSF、IL-6 與 TNF- α 所構成的群組。
- 10.如請求項 9 之方法，其中該細胞介素生產的抑制作用係藉由 MesoScale Discovery(MSD)試驗的方式來進行評估。

11.如請求項 9 或 10 之方法，其中該人類 CD26+T 淋巴細胞係為 Karpas 299 細胞株。

