

[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 200710141067.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101172158A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 3/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.5.8

[21] 申请号 200710141067.7

分案原申请号 02811707.7

[30] 优先权

[32] 2001.5.11 [33] US [31] 60/290,531

[71] 申请人 得克萨斯州立大学董事会

地址 美国得克萨斯

共同申请人 达娜-法勃肿瘤研究所

[72] 发明人 N·H·党 C·莫里莫托

S·施罗斯曼

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李华英

权利要求书1页 说明书78页 附图12页

[54] 发明名称

抗 CD26 单克隆抗体作为对与表达 CD26 的细胞相关疾病的治疗

[57] 摘要

本发明提供了包括给予抗 CD26 抗体的治疗方法，用于预防和治疗与表达 CD26 相关的癌症和免疫疾病。本发明描述了多种不同类型的抗 CD26 抗体和给药方式。

1. 抗 CD26 抗体在制备用于治疗免疫疾病的药物中的用途。
2. 权利要求 1 的用途, 其中所述免疫疾病选自自身免疫病、器官移植和移植物抗宿主疾病。
3. 权利要求 2 的用途, 其中所述自身免疫病选自阿狄森氏病、脱发、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、白塞氏病、慢性疲劳综合征、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、糖尿病、纤维肌痛、肺出血肾炎综合征、突眼性甲状腺肿、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、狼疮、梅尼埃氏多发性硬化症、重症肌无力、寻常性天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、风湿热、结节病、硬皮病、脉管炎、白斑和韦格纳肉芽肿病。
4. 权利要求 1 的用途, 其中的抗 CD26 抗体为多克隆抗体。
5. 权利要求 1 的用途, 其中的抗体是针对重组制备的 CD26 蛋白、CD26 融合蛋白、纯化的 CD26 蛋白、部分纯化的 CD26 蛋白或者天然存在的 CD26 蛋白制备的。
6. 权利要求 1 的用途, 其中的抗 CD26 抗体为单克隆抗体。
7. 权利要求 6 的用途, 其中的抗 CD26 单克隆抗体是 1F7、5F8、10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11 或 16D4B。
8. 权利要求 6 的用途, 其中的抗 CD26 单克隆抗体是由保藏在美国模式培养物保藏所 (ATCC) 的杂交瘤 HB 10297 分泌的 1F7。
9. 权利要求 6 的用途, 其中的单克隆抗体是人源化的。
10. 权利要求 1 的用途, 其中所述免疫疾病为移植物抗宿主疾病。

抗 CD26 单克隆抗体作为对与表达 CD26 的细胞相关疾病的治疗

本申请是申请日为 2002 年 5 月 8 日、发明名称为“抗 CD26 单克隆抗体作为对与表达 CD26 的细胞相关疾病的治疗”的中国发明专利申请 No. 02811707.7 的分案申请。

发明背景

本申请要求 2001 年 5 月 11 日递交的同时待审的美国专利申请序号 60/290,531 的优先权。上述公开内容的全文不加放弃地特别引入本文作为参考。

1. 发明领域

本发明总地涉及癌症、免疫学和免疫治疗领域。更特别地，其涉及抗 CD26 抗体的治疗用途，包括单克隆、人源化以及多克隆抗 CD26 抗体，用于预防和治疗癌症和免疫疾病。描述了多种不同的给药模式以及剂量。

2. 相关技术的描述

癌症已成为西方世界死亡的主要原因之一，仅次于心脏病位居第二。当前的估计预测美国每三人中有一个将会患上癌症，并且每五人中有一个将会死于癌症。目前，用于治疗癌症的有效选择很少。最常规的癌症治疗选择是外科手术、放射疗法和化学疗法。通常，外科手术方法被用于癌症的诊断（通过手术活检）和治疗（手术去除癌性生长）。然而，如果癌症已转移并扩散，则手术不太可能导致痊愈，而必须采取替代的途径。放射疗法和化学疗法是其他形式的癌症治疗。不过，放射疗法和化学疗法两者都是全身疗法，伴有数目众多的副作用，因为正常细胞也受到影响。目前所用的癌症疗法的副作用包括皮肤刺激、吞咽困难、口干、恶心、腹泻、脱发、口腔溃疡、疲劳、出血等等。因此，有关癌症治疗的重大挑战仍有待克服。

靶向疗法例如那些利用特异体抗体作为治疗剂的方法，提供了超越非靶向疗法例如经由口服或静脉内给予药物的全身化学疗法或者放射疗法的优势。有两类基于抗体的疗法。较为常见的类型是识别肿瘤抗原（也就是表达于肿瘤和癌细胞上而非正常组织中的蛋白）并开发抗体，优选是针对该肿瘤抗原的单克隆抗体(单抗)。随后可将任何治疗剂例如化学治疗剂、放射性核素、修饰的毒素等偶联到该抗体上，以通过到达肿瘤的治疗剂实现靶向治疗。另一类基于抗体的疗法是通过提供本身具有治疗特性的抗体来对抗其靶向的肿瘤/癌细胞。这第二种形式的基于抗体的疗法的附加优势在于可额外再偶联另外的治疗剂到该治疗抗体上以实现更为有效的治疗。

抗体定向的疗法特别是利用单克隆抗体(单抗)的疗法的主要优点是其能递送增加剂量的治疗剂到肿瘤，并更好地使正常组织免受治疗剂的副作用。尽管已鉴定了若干用于癌症治疗的抗体，仍需要鉴定新的和更为有效的治疗抗体以提供对各种不同类型癌症的治疗。

一种膜蛋白 CD26 与很多免疫相关功能有联系，已知其在数种人类癌表面表达，尤其是处于晚期阶段并因而伴随着患者预后差的癌症。例如肺腺癌呈 CD26 酶活性阳性，而其他组织学类型的肺癌呈 CD26 活性阴性(Asada 等, 1993); CD26 在分化的甲状腺癌中高表达而在良性甲状腺疾病中无表达(Tanaka 等, 1995); 高水平的 CD26 蛋白和 mRNA 表达发现于 B-慢性淋巴细胞白血病细胞中(Bauvois 等, 1999); 而且 CD26 表达在侵袭性 T 细胞恶性肿瘤中高，例如 T 细胞成淋巴细胞淋巴瘤/急性成淋巴细胞白血病 (LBL/ALL)、T 细胞 CD30+ 退行性大细胞淋巴瘤。这些癌症类型难于治疗，因为它们对当前的治疗方式特别耐受。亟需寻找可用于治疗和预防这种侵袭性疾病的治疗方法。

发明概述

本发明通过鉴定抗 CD26 抗体的生长抑制特性，克服了本领域现有技术的缺陷。本发明从而提供了癌症治疗的方法，其中所述癌症在

其表面表达 CD26 蛋白，该方法利用治疗性抗 CD26 抗体组合物。本发明的这种以抗 CD26 抗体为基础的疗法包括应用非偶联抗体，包括多克隆抗体、单克隆抗体(单抗)、抗体片段、人源化单抗、裸露抗体。还提供了偶联抗体的应用，其中抗体偶联于药物、其他靶向抗体、毒素、酶抑制剂、放射性核素、中子俘获剂例如硼附加物、化学品以及其他生物活性剂。

所以，在有些实施方案中，本发明提供了一种治疗患有表达 CD26 的癌症患者的方法，包括向所述患者给予一种包含抗 CD26 抗体的药物制剂，其中该抗 CD26 抗体结合 CD26 并使细胞周期停滞，抑制细胞生长。

多种不同的癌症和肿瘤预期可以通过本发明的方法治疗，其包括但不限于，T 细胞癌、B 细胞癌、血液系统癌症、甲状腺癌症、T 细胞淋巴瘤、肺腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、B 细胞淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌、肝癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、脑癌、淋巴瘤、皮肤癌、骨癌、直肠癌或肉瘤。

在更具体的实施方案中，T 细胞癌可以是 T 细胞淋巴瘤如成淋巴细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、T 细胞 CD30+ 滤泡性大细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、T 细胞慢性淋巴细胞白血病、血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤、血管中心性 T 细胞淋巴瘤、HTLV-相关 T 细胞白血病或成人 T 细胞白血病。在其他具体实施方案中，B 细胞癌可以是 B 细胞慢性淋巴细胞白血病或 B 细胞淋巴瘤。

本发明还构想联合治疗，其中同时应用两种或多种治疗方案以改善疗效。从而，除了用抗 CD26 抗体治疗之外，患者可以用第二治疗剂进行治疗，其中的第二治疗剂是治疗性多肽、编码治疗性多肽的核酸、化学治疗剂、免疫治疗剂、细胞因子、趋化因子、活化剂、放射治疗剂或生物反应调节物。

第二治疗剂可与抗 CD26 抗体同时给药。作为选择，第二治疗剂可在不同于抗 CD26 抗体的时间给药。这样，第二治疗剂可以在抗 CD26 抗体治疗之前或之后给药。

可构想若干抗 CD26 抗体的给药路径,其中包括静脉内、动脉内、腹膜内、真皮内、肿瘤内、肌肉内、皮下、鞘内、关节内、口服、经皮、经鼻、口含、直肠或阴道给药。

预期 1 μ g/kg 到 1g/kg 剂量范围的抗 CD26 抗体可用于治疗。从而,预期人们可用 1 μ g/kg 到 5 μ g/kg、或 5 μ g/kg 到 10 μ g/kg、10 μ g/kg 到 20 μ g/kg、20 μ g/kg 到 30 μ g/kg、30 μ g/kg 到 40 μ g/kg、40 μ g/kg 到 50 μ g/kg、50 μ g/kg 到 60 μ g/kg、70 μ g/kg 到 80 μ g/kg、90 μ g/kg 到 100 μ g/kg、100 μ g/kg 到 200 μ g/kg、200 μ g/kg 到 300 μ g/kg、300 μ g/kg 到 400 μ g/kg、400 μ g/kg 到 500 μ g/kg、500 μ g/kg 到 600 μ g/kg、600 μ g/kg 到 700 μ g/kg、700 μ g/kg 到 800 μ g/kg、900 μ g/kg 到 1mg/kg、1mg/kg 到 10mg/kg、10mg/kg 到 20mg/kg、20mg/kg 到 30mg/kg、30mg/kg 到 40mg/kg、40mg/kg 到 50mg/kg、50mg/kg 到 60mg/kg、70mg/kg 到 80mg/kg、90mg/kg 到 100mg/kg、100mg/kg 到 200mg/kg、200mg/kg 到 300mg/kg、300mg/kg 到 400mg/kg、400mg/kg 到 500mg/kg、500mg/kg 到 600mg/kg、600mg/kg 到 700mg/kg、700mg/kg 到 800mg/kg 或者 900mg/kg 到 1g/kg 的范围。还可考虑中间范围,例如人们可用 1 μ g/kg、或 2 μ g/kg、或 3 μ g/kg、或 4 μ g/kg 或 5 μ g/kg 等等。应当理解给药的确切方法和给药剂量可在治疗时予以确定并加以调整,取决于患者的个体需要,考虑诸如年龄、疾病、性别、体能状态等因素,而且这种调整可由经过培训的医师做出。所以,本发明绝非局限于列出的剂量。

在有些实施方案中,抗 CD26 抗体可以是单克隆抗体。在具体实施方案中,抗 CD26 单克隆抗体是由保藏在美国模式培养物保藏所(ATCC)的杂交瘤 HB 10297 分泌的 1F7 单克隆抗体。该 1F7 抗体及其制备方法在美国专利 5,120,642 中有详细的描述,在此引为参考。

在其他具体实施方案中,抗 CD26 单克隆抗体是 5F8 单克隆抗体。一些其他被认为是有用的单抗包括但不限于 10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11 和/或 16D4B。不过,对 CD26 蛋白的任何表位特异性的任何其他单克隆抗体,均被认为可用于本发明中,并且本发明不局限于上述的实例。此外,所述单克隆抗体可作为片段

给药或者可被人源化以降低对人类患者的免疫原性。

在其它实施方案中，本发明构想应用多克隆抗 CD26 抗体。

本发明的抗体可针对天然存在的 CD26 蛋白/多肽/肽、纯化的 CD26 蛋白/多肽/肽、部分纯化的 CD26 蛋白/多肽/肽、重组产生的 CD26 蛋白/多肽/肽或者 CD26 融合蛋白/多肽/肽而制备。

在其它实施方案中，构想抗 CD26 抗体还进一步连接于其他的物质，例如但不限于化学治疗剂、放射性核素、免疫治疗剂、细胞因子、趋化因子、显象剂、毒素、生物活性剂、酶抑制剂或者二抗。在一些具体实施方案中，酶抑制剂是腺苷脱氨酶抑制剂或者二肽基肽酶 IV 抑制剂。在其他具体实施方案中，化学治疗剂可以是阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氮甲蝶呤或氨基蝶呤；蒽环类抗生素；丝裂霉素 C；长春花生物碱；秋水仙胺；依托泊苷；光辉霉素；或烷化剂例如苯丁酸氮芥或苯丙氨酸氮芥或其他本说明书后面部分所描述的药剂。

在其它实施方案中，毒素可以是植物、真菌或细菌来源的毒素，例如 A 链毒素、核糖体失活蛋白、 α -八叠球菌素、曲霉菌素、局限曲霉菌素、核糖核酸酶、白喉毒素或假单胞菌外毒素，这仅是其中一些实例。可与抗 CD26 抗体偶联的放射性核素和显象剂在下面部分描述。其他具体实施方案考虑其他生物活性剂，例如但不限于趋化因子、细胞因子、视黄酸及其衍生物、干扰素、生长因子。

本发明还提供了诱导肿瘤消退的方法，包括向需要的患者给予一种包含抗 CD26 抗体的组合物。

此外，本发明提供了诱导肿瘤坏死的方法，包括向需要的患者给予一种包含抗 CD26 抗体的组合物。

在一些实施方案中，发明人构想了治疗癌症患者的方法，包括诱导癌细胞中 CD26 表达，并向所述患者给予一种包含抗 CD26 抗体的药物制剂，藉此抗 CD26 抗体结合 CD26 并使细胞周期停滞、和/或生长抑制、和/或细胞死亡和/或肿瘤消退。诱导 CD26 在细胞上表达可通过使细胞与生物因子接触来完成，例如但不限于细胞因子、趋化因子、生长因子、类视黄醇、干扰素、白介素、佛波酯、可激活免疫系统的

物质、化学治疗剂、抗体或抗原。作为选择，人们可通过使细胞同化学剂接触来诱导 CD26 在细胞上表达。诱导 CD26 在细胞中表达的方法是熟练技术人员所公知的。

本发明还提供了在表达 CD26 的细胞中增加 p21 表达的方法，包括使该细胞与抗 CD26 抗体接触。在一个实施方案中，表达 CD26 的细胞是癌细胞。在具体实施方案中，癌细胞可以是血液系统癌细胞、T 细胞癌细胞、B 细胞癌细胞、甲状腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、膀胱癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞、睾丸癌细胞、子宫癌细胞、脑癌细胞、淋巴瘤细胞、皮肤癌细胞、骨癌细胞、直肠癌细胞、肉瘤细胞、T 细胞淋巴瘤细胞、肺腺癌细胞、甲状腺癌细胞、黑素瘤细胞、B 细胞慢性淋巴细胞白血病或 B 细胞淋巴瘤。T 细胞癌可以是侵袭性 T 细胞癌例如 T 细胞淋巴瘤。在其他具体实施方案中，T 细胞淋巴瘤可以是成淋巴细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、T 细胞 CD30+ 退行性大细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、T 细胞慢性淋巴细胞白血病、血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤、血管中心性 T 细胞淋巴瘤、HTLV-相关 T 细胞白血病或成人 T 细胞白血病。

在其它实施方案中，表达 CD26 的细胞是 CD26 转染的 Jurkat 细胞系或人 T 细胞，例如人 T 细胞克隆，或活化的 T 细胞或活化的 T 细胞克隆。而在其它实施方案中，表达 CD26 的细胞是活化的免疫细胞。这样的细胞可以是超活化的免疫细胞，例如活化的 T 细胞，在自身免疫病和涉及活化的免疫系统的疾病的发病中起作用的活化的 T 细胞，识别自身抗原的活化的 T 细胞，识别同种异体移植物的活化的 T 细胞，来自识别宿主组织的供体的活化的 T 细胞，识别自身抗原、同种异体移植物的表达 CD26 的活化的免疫细胞，在自身免疫病和涉及活化的免疫系统的疾病的发病中起作用的表达 CD26 的活化的免疫细胞，来自识别宿主组织的供体的活化的免疫细胞等。

在一些实施方案中，抗 CD26 抗体是单克隆抗体。在一个具体实施方案中，抗 CD26 单克隆抗体(单抗)是由保藏在美国模式培养物保藏

所(ATCC)的杂交瘤 HB 10297 分泌的。该单抗也被称为 1F7 抗体。在另一个具体实施方案中, 抗 CD26 单克隆抗体(单抗)是 5F8 抗体。一些其他被认为有用的单抗包括但不限于 10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、16D4B。该单克隆抗体可进一步被人源化以降低免疫原性。

在其它实施方案中, 抗 CD26 抗体是多克隆抗体。而本发明的其它实施方案想到所述抗 CD26 抗体可进一步连接/偶联于另一种物质, 例如但不限于化学治疗剂、放射性核素、免疫治疗剂、细胞因子、趋化因子、显象剂、毒素、生物活性剂、酶抑制剂或者二抗。在具体实施方案中, 酶抑制剂是腺苷脱氨酶抑制剂或者二肽基肽酶 IV 抑制剂。

还提供了抑制细胞生长的方法, 包括使表达 CD26 的细胞与抗 CD26 抗体接触。在该方法的一些实施方案中, 表达 CD26 的细胞是癌细胞。在具体实施方案中, 癌细胞可以是血液系统癌细胞、T 细胞癌细胞、B 细胞癌细胞、甲状腺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、膀胱癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞、睾丸癌细胞、子宫癌细胞、脑癌细胞、淋巴癌细胞、皮肤癌细胞、骨癌细胞、直肠癌细胞或肉瘤细胞。在更具体的实施方案中, 癌细胞可以是 T 细胞淋巴瘤细胞、肺腺癌细胞、甲状腺癌细胞、黑素瘤细胞、B 细胞慢性淋巴细胞白血病或 B 细胞淋巴瘤。

而在其他具体实施方案中, T 细胞癌可以是预后差的 T 细胞癌, 非限制性的例子例如 T 细胞淋巴瘤, 如成淋巴细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、T 细胞 CD30+ 退行性大细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、T 细胞慢性淋巴细胞白血病、血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤、血管中心性 T 细胞淋巴瘤、HTLV-相关 T 细胞白血病以及成人 T 细胞白血病。

在本方法的一个方面, 被抑制的细胞生长是转移性细胞生长。在本方法的其它方面, 抑制细胞生长包括使细胞生长停滞。

而在其他实施方案中, 表达 CD26 的细胞为 CD26 转染的 Jurkat 细胞系或人 T 细胞, 例如人 T 细胞克隆, 或活化的 T 细胞或活化的 T

细胞克隆。而在另外的实施方案中，表达 CD26 的细胞是活化的免疫细胞。这样的细胞可以是超活化的免疫细胞，例如活化的 T 细胞，在自身免疫病和涉及活化的免疫系统的疾病的发病中起作用的活化的 T 细胞，识别自身抗原的活化的 T 细胞，识别同种异体移植物的活化的 T 细胞，来自识别宿主组织的供体的活化的 T 细胞，识别自身抗原、同种异体移植物的表达 CD26 的活化的免疫细胞，在自身免疫病和涉及活化的免疫系统的疾病的发病中起作用的表达 CD26 的活化的免疫细胞，来自识别宿主组织的供体的活化的免疫细胞等。从而，本方法预期可用于提供对与超活化免疫细胞相关的免疫系统疾病的治疗，例如自身免疫病、器官移植、移植物抗宿主疾病等。这包括的疾病有，例如但不限于阿狄森氏病、脱发、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、白塞氏病、慢性疲劳综合征、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、糖尿病、纤维肌痛、肺出血肾炎综合征、突眼性甲状腺肿、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、狼疮、梅尼埃氏多发性硬化症、重症肌无力、寻常性天疱疮、原发性胆汁性肝硬变、牛皮癣、类风湿性关节炎、风湿热、结节病、硬皮病、脉管炎、白斑、韦格纳肉芽肿病。

本发明还提供了诱导表达 CD26 的癌细胞凋亡的方法，包括使该细胞与包含抗 CD26 抗体的组合物接触。

如本说明书中所用的“一个”或“一种”可以指一个（种）或多个（种）。如本文权利要求中所用的，当与“包括/包含”一词连用时，词语“一个”或“一种”可以指一个（种）或多于一个（种）。如本文所用的“另一个（种）”可以指至少第二个（种）或更多。

本发明的其他目的、特征和优点由下面的详细描述会变得更明显。不过，应当理解，这些详细的描述和具体的实施例，尽管意味着本发明的优选实施方案，但仅仅是用于解释，因为根据这种详细描述，在本发明精神和范围内的各种变化和修正对于本技术领域的熟练技术人员来说是显然的。

附图的简要说明

下列附图构成本说明书的一部分并用于进一步阐释本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一张或多张，并结合本文提供的具体实施方案的详细描述，可以更好理解本发明。

图 1A 和 1B. Karpas 299 的表型表征。(图 1A)通过流式细胞仪评估细胞的 CD26、CD3 和 CD2 表达。显示了表达特定表面标志的细胞百分比。(图 1B)在与抗 CD26 单抗 1F7 (1 μ g/ml)于 37 $^{\circ}$ C 过夜温育之后，评估 Karpas 299 细胞的 CD26 表达，并和与 1F7 温育过夜之前的 CD26 表达进行比较。a = 阴性对照，b = 抗 CD26 处理前，c = 抗 CD26 处理后。

图 2A 和 2B. 可溶性抗 CD26 单抗对细胞生长的抑制作用。Karpas 299 细胞(图 2A)和 H9 细胞(图 2B)与含有可溶性抗 CD26 单抗 1F7、抗 CD26 单抗 5F8 或同型对照单抗的培养基温育，并进行 MTT 摄取分析。数据代表每种细胞系的三次实验。细胞毒性指数(% 对照) = 1-处理细胞的 OD \times 100-在单独的细胞培养基中温育的细胞的 OD。

图 3A 和 3B. SCID 小鼠中肿瘤形成之后在 Karpas 299 细胞上的 CD26 表面表达。(图 3A)将肿瘤注射入 SCID 小鼠前的 CD26 表面表达。将 1×10^6 的肿瘤细胞腹膜内注射到 SCID 小鼠中，在形成可触及的肿瘤后接着收集瘤块。然后制备单细胞悬液并用流式细胞仪测定 CD26 表面表达。(a=阴性对照，b=CD26) (图 3B)来自从 SCID 小鼠收获的瘤块的单细胞悬液的 CD26 表面表达。将 1×10^6 的肿瘤细胞腹膜内注射到 SCID 小鼠中，在形成可触及的肿瘤后接着收集瘤块。然后制备单细胞悬液并用流式细胞仪测定 CD26 表面表达。(a=阴性对照，b=CD26)。

图 4A 和 4B. 1F7 处理后携带 Karpas 299 的 SCID 小鼠存活提高。(图 4A) SCID 小鼠以每鼠 1×10^6 的 Karpas 299 细胞腹膜内接种后 1 天，接着用单独的盐水、同型对照抗体(5 μ g/注射或 10 μ g/注射)、1F7 (5 μ g/注射或 10 μ g/注射)腹膜内注射处理，隔天给药，共计 10 次注射。臂 1：单独盐水(n=13)；臂 2：同型对照抗体(5 μ g/注射，n=10)；臂 3：同型对照抗体(10 μ g/注射，n=5)；臂 4：抗 CD26 单抗 1F7 (10 μ g/注射，n=10)；

臂 5: 抗 CD26 单抗 1F7 (5 μ g/注射, n=14) (图 4B) SCID 小鼠以每鼠 3×10^6 的 Karpas 299 细胞腹膜内接种后 1 天, 接着用单独盐水、同型对照抗体(20 μ g/注射)、1F7 (5 μ g/注射、10 μ g/注射或 20 μ g/注射)腹膜内注射处理, 隔天给药, 共计 10 次注射。臂 1: 单独盐水(n=5); 臂 2: 同型对照抗体(20 μ g/注射, n=5); 臂 3: 1F7 (5 μ g/注射, n=5); 臂 4: 1F7 (10 μ g/注射, n=5); 臂 5: 1F7 (20 μ g/注射, n=5)。

图 5. 在肿瘤细胞皮下接种和用抗体皮下处理后 SCID 小鼠中最初的肿瘤显现。对 SCID 小鼠皮下注射在单独盐水、100 μ g 1F7 或同型对照抗体中温育的 1×10^6 的 Karpas 299 肿瘤细胞。随后, 从肿瘤细胞接种后 1 天开始, SCID 小鼠接着隔天接受盐水、同型对照抗体(20 μ g/注射)或 1F7 (20 μ g/注射) 皮下注射, 溶在 0.1 ml 无菌盐水中, 共 10 次注射, 位置在皮下注射肿瘤的原部位。记录最初出现可见肿瘤的日子以评价治疗效果。臂 1: 单独盐水(n=10); 臂 2: 同型对照抗体(n=10); 臂 3: 抗 CD26 单抗 1F7 (n=10)。

图 6A、6B 和 6C. 用抗 CD26 单抗 1F7 处理被 CD26 转染的 Jurkat T 细胞导致细胞周期停滞于 G1/S。在诺考达唑(Noc)存在或缺乏的条件下, J. C26/DP+与单独培养基、同型对照单抗 4B4 (Iso)或 1F7 温育。依材料和方法中所述进行细胞培养、染色以及细胞周期分析。显示了 G0/G1 (图 6A)、G2/M (图 6B)以及 S (图 6C)细胞的测量。条柱代表独立进行的三次实验的 G0/G1、G2/M 和 S 细胞百分比的平均值 \pm 标准误差。星号表示样品结果与 J. C26/DP-和 Jwt 的结果有显著差异($p < 0.05$)。

图 7. 抗 CD26 单抗 1F7 处理后 p21 表达增加。在诺考达唑存在下与 1F7 温育后 G0/G1 增加%的时间过程分析。依材料和方法中所述进行细胞周期分析。G0/G1 增加百分比是单抗和非单抗处理的细胞之间 G0/G1 百分含量的差值。条柱代表 3 次独立进行的实验的 G0/G1 增加%的平均值 \pm 标准误差。星号表示样品结果与 J. C26/DP-和 Jwt 的结果有显著差异($p < 0.05$)。

图 8. 抗 CD26 单抗 1F7 处理后 ERK 磷酸化导致 p21^{Cip1} 表达增强。

与 MEK 激酶抑制剂 PD98059 和 U0126 温育后, J. C26/DP+细胞在诺考达唑存在或缺乏的条件下与单独培养基、同型对照单抗 4B4 (Iso)或 1F7 温育。温育 6 小时后, 依材料和方法中所述进行细胞周期分析。数据代表三次独立进行的实验。在 J. C26-或 JwT 中未观察到 PD98059 和 U0126 对 G0/G1 停滞的影响。

图 9. 抗 CD26 单抗 1F7 抑制人 T 细胞克隆的细胞增殖, 伴有 p21^{Cip1} 表达增强。 人 T 克隆与培养基或含有图示浓度的抗 CD26 单抗 1F7 或 5F8、或者同型对照单抗 4B4 (Iso)的培养基进行温育, 有或无抗-CD3 单抗(OKT3)和 PMA 的刺激。将 0.2×10^5 个细胞温育并用 [³H]-胸苷脉冲。 [³H]-胸苷掺入表示为一式三份样品的平均 cpm 和标准误差。

例示性实施方案的说明

本发明提供了使用抗 CD26 抗体预防和治疗癌症的治疗方法。已证明可溶性抗 CD26 单抗例如 1F7 或 5F8 的结合可以抑制细胞生长, 这通过 Karpas 299 细胞, 一种人 CD30+ 移行性大细胞 T 细胞淋巴瘤细胞系, 以及 Jurkat 细胞的体外和体内研究得到例证。抗 CD26 结合导致生长停滞在 G1/S 关卡(checkpoint), 伴随着依赖于蛋白重新(de novo)合成的 p21 (一种细胞周期蛋白) 表达增加。此外, 发明人已利用 SCID 小鼠肿瘤模型显示, 用抗 CD26 抗体处理导致荷瘤小鼠的存活显著提高。从而, 本发明提供了抗癌疗法, 其利用抗 CD26 抗体治疗表达 CD26 的人类癌症。

已证实 CD26 在一些人类癌症中表达, 包括侵袭性 T 细胞恶性肿瘤, 其对当前的治疗方式耐受。本发明因而提供了利用抗 CD26 抗体抑制肿瘤生长而治疗这类癌症的方法。预期几种类型的抗 CD26 抗体可用于治疗方案, 包括多克隆抗体、单克隆抗体(单抗 1F7; 以及单抗 5F8, 作为某些非限制性的例子)、人源化的抗体以及抗体偶联物。

虽然公知 CD26 蛋白参与多方面的功能, 在结合抗 CD26 抗体后细胞中 p21 表达的增加首次显示出在癌症中 CD26 与细胞周期的调节

物之间的功能联系。

本发明人还证明可溶性抗 CD26 单克隆抗体的结合在 CD26 转染的 Jurkat 细胞系和人 T 细胞克隆中诱导 G1/S 停滞。已知 CD26 在一个静息 CD4⁺记忆 T 细胞亚群上表达，而且这种表达在 T 细胞活化时增强。此外，CD26 直接有助于增强晚期 T 细胞克隆的抗原敏感性。活动过强的免疫病，例如移植物抗宿主疾病(GVDH)和自身免疫病，涉及超活化的 T 细胞。所以，除了提供有效治疗对抗表达 CD26 的癌症之外，本发明人考虑抗 CD26 抗体治疗活动过强的免疫病症的治疗应用，包括自身免疫病例如但不限于阿狄森氏病、脱发、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、白塞氏病、慢性疲劳综合征、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、糖尿病、纤维肌痛、肺出血肾炎综合征、突眼性甲状腺肿、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、狼疮、梅尼埃氏多发性硬化症、重症肌无力、寻常性天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、风湿热、结节病、硬皮病、脉管炎、白斑、韦格纳肉芽肿病等，器官移植以及移植物抗宿主疾病。目前，仅在美国，每年诊断的自身免疫病估计有 1-2 千万例。因此，抗 CD26 抗体治疗用于免疫相关疾病是一个重要发展。

A. CD26 和抗 CD26 抗体

CD26 为 110-kd 的表面糖蛋白，具有一系列多种多样的功能特性，其在许多组织中表达，包括上皮细胞和白细胞亚群(Morimoto 和 Schlossman, 1998; von Bonin 等, 1998)。CD26 蛋白是一种膜结合的外肽酶(ectopeptidase)，在其胞外结构域具有二肽基肽酶 IV(DPPIV)活性，并且能够从倒数第二位是 L-脯氨酸或 L-丙氨酸的多肽上裂解氨基末端的二肽。

过去十年的工作表明 CD26 是一个在基础的人 T 细胞生理中具有过多功能的分子。举例来说，CD26 能裂解某些参与 T 细胞和单核细胞功能的趋化因子(Oravecz 等, 1997; Proost 等, 1998)。其他研究确定 CD26 为腺苷脱氨酶(ADA)结合蛋白，调节 ADA 表面表达。据信

CD26/ADA 复合体在催化去除局部腺苷以调节免疫系统功能方面起着关键作用(Dang 等, 1996; Kameoka 等, 1993; Morrison 等, 1993)。

虽然 CD26 在肝、肠和肾中组成性表达, 在 T 细胞上的 CD26 表达水平被紧密调控, 并且其密度在 T 细胞活化后显著增加。在静息 T 细胞中, CD26 表达于 CD4⁺记忆 T 细胞亚群, 而且这种 CD4⁺CD26 高 T 细胞群已经被证明对记忆抗原产生最大的应答。事实上, 某些实验条件下 CD26 本身参与 T 细胞信号转导过程。CD26 和 CD3 与固定化单克隆抗体(单抗)的交联可诱导 T 细胞的活化和 IL-2 的产生。此外, 抗 CD26 抗体处理 T 细胞经由其内化而导致 CD26 表面表达的下降, 并且这种抗体诱导的 T 细胞上 CD26 的调节导致针对抗-CD3 或抗-CD2 刺激的增殖反应增强。尽管抗 CD26 单抗 1F7 对 CD26 分子的连接诱导信号分子例如 CD3 ζ 和 p56lck 的酪氨酸磷酸化增加, 可溶性抗 CD26 单抗和 DPPIV 抑制剂在某些情况下抑制 T 细胞生长和功能。

此外, 各种不同刺激对 T 细胞的活化增加 CD26 表面表达, 从而 CD26 被用作为 T 细胞活化标志(Fox 等, 1984; Morimoto 等, 1989)。CD26 还是参与 T 细胞活化的 CD3 和 CD2 途径的共刺激表面分子。

除了参与免疫调节之外, 认为 CD26 可能在某些人类肿瘤的发病中起着作用。大多数肺腺癌是 DPPIV-阳性的, 而其他组织学类型的肺癌是 DPPIV-阴性的(Asada 等, 1993)。此外, CD26 表达在分化的甲状腺癌中高, 但是在良性甲状腺疾病中缺失(Tanaka 等, 1995)。它似乎还在黑素瘤的发病中起作用, 因为其表达随着黑素细胞的恶性转化而丧失(Morrison 等, 1993; Wesley 等, 1999)。与正常静息 B 细胞相比, 于 B-慢性淋巴细胞白血病细胞和活化的 B 细胞中发现高水平的 CD26 蛋白表达和 mRNA 转录(Bauvois 等, 1999)。同时, T 细胞恶性肿瘤上的 CD26 表达似乎局限于侵袭性病理实体, 例如 T 细胞成淋巴细胞淋巴瘤/急性成淋巴细胞白血病(LBL/ALL)以及 T 细胞 CD30⁺退行性大细胞淋巴瘤, 而仅仅在小比例的惰性病例如蕈样霉菌病中检测到。值得注意的是, 在 T 细胞 LBL/ALL 亚群中, CD26 表达为预后差的患者的独立标志(Carbone 等, 1995; Carbone 等, 1994)。

已经产生和描述了数目众多的抗 CD26 抗体, 包括单克隆抗体例如 1F7、Ta1、5F8、10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、16D4B、TA5.9, 是通过标准的杂交瘤技术形成的(Morimoto 等, 1989; Torimoto 等, 1992; U. S.专利 5,120,642; DeMeester 等, 1994; Dong 等, 1998,全部并入本文作为参考)。

与 CD26 多样的作用相应, CD26 抗体介导多形的细胞功能。举例来说, 当与特异性单抗交联时, CD26 能够激活 T 细胞活化的或选途径, 很可能是归因于其与 CD45, 一种跨膜蛋白酪氨酸磷酸酶的物理结合(Dang 等, 1990a; Dang 等, 1990b; Dang 等, 1990c; Dang 等, 1991; Fleischer, 1987; Hegen 等, 1997; Dang 等, 1990d; Torimoto 等, 1991)。而其他的研究证明可溶性抗 CD26 单抗和 DPPIV 抑制剂在某些状况下抑制 T 细胞生长和功能(Dang 等; 1996; Kahne 等, 1998; Kubota 等, 1992; Mattern 等, 1993)。这些研究, 以及上文描述的其他研究, 提示 CD26 除了是一个免疫调节分子之外, 可能在某些肿瘤的发病中具有潜在的作用, 包括侵袭性 T 细胞血液系统恶性肿瘤(Carbone 等, 1995; Carbone 等; 1994)。

Dong 及其同事, 基于对 CD26 缺失突变体的缺失分析、免疫印迹和直接结合测定, 将 13 种抗 CD26 抗体分成定位于 CD26 蛋白的第 1-247、248-358、359-449、450-577 以及 359-653 位氨基酸残基间的 5 个不同的表位组。在该研究中, Dong 等(1998) (并入本文作为参考) 证明对不同的抗 CD26 单抗特异性的不同表位与 CD26 的不同功能结构域相关。举例来说, 尽管抗其中的两组 - 第 248-358 和第 359-449 位氨基酸区域的单抗诱导 CD26 的调节并对 T 细胞增殖具有共刺激作用, 这些抗第 359-449 位氨基酸区域的抗体中仅有一个还与 ADA 结合相关。这解释了不同的抗 CD26 抗体所显示出的一些不同的功能效应。

因此, CD26 及其抗体是具有广泛功能的复杂分子。本发明明确地证明了 CD26 在肿瘤发病中具有重要作用以及 CD26 抗体导致表面带有 CD26 的癌细胞的生长停滞和生长抑制。

此外, 虽然先前的报道表明 CD26 介导活化信号的能力取决于功

能性 CD3/TcR 复合体(von Bonin 等, 1998; Dang 等, 1990d), 本发明人显示 CD26 可以在缺乏功能性 CD3/TcR 复合体的条件下传递信号, 导致 T 细胞生物反应的改变。在正常 T 细胞中, CD26 的参与导致 T 细胞信号转导所涉及的蛋白的磷酸化增加, 部分是通过 CD26 和 CD45 的物理结合介导的 (Hegen 等, 1997; Torimoto 等, 1991)。发明人目前正在研究 CD26 参与导致细胞周期所涉及的机制。尽管在黑素瘤细胞中观察到强制 CD26 表达之后停滞在 G1 (Wesley 等, 1999), 本发明人证明了 CD26-介导的 G1/S 停滞和 p21 表达改变之间的功能联系。

B. p21

在真核细胞中, 细胞周期进程在 G1/S 关卡受一组公知为依赖于细胞周期蛋白的激酶(CDK)的相关酶调控, 该酶通过其与称为细胞周期蛋白的调节亚基的物理结合而被正调节(Yang 和 Kornbluth, 1999)。不过, 该 CDK-细胞周期蛋白复合体的酶活性被一组称为 CDK 抑制剂的蛋白负调节。p21 为这些 CDK 抑制剂中的一个(也称为 WAF1, Cip1, SDI1), 通过它与这些结构的物理结合而阻断多种细胞周期蛋白-CDK 复合体 (El-Deiry 等, 1993; Xiong 等, 1993)。此外, 通过它与增殖细胞核抗原(PCNA)直接的相互作用, p21 可抑制 DNA 复制(Waga 等, 1994)。多种不同的刺激物可诱导 p21 表达, 包括细胞损伤、血清因子和佛波酯, 而且 p21 诱导被证明既是 p53 依赖性的又是 p53 非依赖性的, 视刺激而定(El-Diery 等; 1993; El-Diery 等; 1994; Datto 等, 1995)。

作为 p53 肿瘤抑制基因的下游靶目标, p21 间接牵涉恶性转化。应答 DNA 损伤的 p53 诱导导致 G1 关卡停滞, 在该点先完成 DNA 修复, 然后才进入 S 期的 DNA 复制。与其推测的作为 p53 下游效应分子的角色一致, 已显示 p21 抑制增殖细胞核抗原(PCNA)依赖性的 DNA 复制但不抑制体外的 DNA 修复。

美国专利 6,218,372, 并入本文作为参考, 描述了 p21 在肿瘤形成中的作用及其在体内逆转恶性表型的能力。p21 表达足以产生肿瘤和再狭窄抑制效应, 而且 p21 表达通过 NF- κ B 促进转录活化, NF- κ B 影

响基因的表达，例如与细胞分化有关的粘附分子。

本发明证明给予抗 CD26 抗体导致细胞生长抑制以及 p21 表达相应增加。

C. 在免疫疾病中的作用

虽然 CD26 在免疫调节中的功能已得到很好研究，它在临床情境中的作用尚未明确，尽管现有数据暗示它可能参与某些人类疾病的发病。与 CD26 为 T 细胞活化的标志并且在该过程中起功能性作用的发现相一致，CD26 可能在某些自身免疫病中具有 T 细胞活化和淋巴因子合成的调节物的作用，包括类风湿性关节炎、突眼性甲状腺肿及多发性硬化症 (Hafler 等, 1985; Mizokami 等, 1996; Eguchi 等, 1989; Gerli 等, 1996)。来自这些自身免疫病患者的循环 T 淋巴细胞表达高水平的 CD26 表面表达，而且在一些情况下，表达的 CD26 水平与疾病的活动相关 (Hafler 等, 1985; Mizokami 等, 1996; Eguchi 等, 1989; Gerli 等, 1996)。此外，在类风湿性关节炎患者中，抗体诱导的 CD26 表达调节导致外周血 T 细胞中 IL-2 和 γ -IFN 的合成增加，并且在滑液 T 细胞中 γ -IFN 的产生下降而对 IL-2 的产生没有影响 (Gerli 等, 1996)。此外，在体内抑制 CD26/DPPIV 酶活性延长大鼠受体中心脏同种异体移植物的存活，提示 CD26 在体内在同种抗原-介导的免疫调节和同种异体移植排斥机制中的作用 (Korom 等, 1997)。

早先的工作证明，以有效剂量的抗 CD26 单克隆抗体进行治疗可为患者很好地耐受，不会诱导产生严重的毒性。在先导研究中，Bacigalupo 等 (1985) 用识别人类 CD26 的鼠抗 CD26 单克隆抗体治疗患严重难治性移植物抗宿主疾病的 8 名患者 (De Meester 等, 1993)。随着循环 CD26+ T 细胞数目的下降，疾病的严重程度有了显著的改善。有 2 个完全响应者和 2 个部分响应者，8 个患者中有 5 个在治疗后存活至少 1 年。重要的是，用抗 CD26 单克隆抗体治疗被很好地耐受，即时的不良反应可以接受，暗示着将来可以给予具有可耐受的副作用的包括抗 CD26 单克隆抗体的疗法。

本发明人证明可溶性抗 CD26 单克隆抗体例如 1F7 的结合可诱导细胞的 G1/S 停滞，例如 CD26 转染的 Jurkat 细胞系以及人类 T 细胞克隆。从而，本发明人预见抗 CD26 抗体疗法会在涉及活化的免疫系统紊乱的临床情境中具有治疗应用，包括自身免疫病、移植物抗宿主疾病以及器官移植，其中人们可以在超活化的免疫细胞中诱导细胞周期停滞。

预期抗 CD26 抗体可以与其他治疗移植物抗宿主疾病的方式联合来治疗该病。此外，可选择处于移植物抗宿主疾病的不同阶段或临床严重程度的患者用抗 CD26 疗法予以治疗。在这样的疗法中，进一步预见在一些实施方案中，人们可单独使用抗 CD26 抗体，而在其他实施方案中，人们可使用经适当修饰的抗 CD26 抗体，例如偶联于靶向引起移植物抗宿主疾病的特定活化 T 细胞或其他免疫细胞的药剂，来治疗该病。可与抗 CD26 抗体偶联治疗该病的药剂包括但不限于其他特异性抗体、生长因子、趋化因子、细胞因子、毒素、或识别这些效应细胞上的特定靶的药剂。除了偶联，抗 CD26 单抗可与靶向引起该病的效应细胞的药剂联合使用。在这些疾病中，抗 CD26 抗体还可以联合其他药剂/临床药剂例如经挑选的抗生素/抗真菌剂/抗病毒剂以将由该病或由抗 CD26 治疗方案所引起的潜在感染降到最低限度。另外，由抗 CD26 单克隆抗体识别的特定表位已证明在 CD26-信号作用和结合中具有不同的作用。因此，发明人认为识别不同表位的不同的抗 CD26 单抗可导致不同的功效和毒性特征。

D. 抗体

a. 抗体产生

本发明提供了抗 CD26 抗体的治疗用途。虽然在一些实施方案中，本发明描述了 1F7 和 5F8 单克隆抗体，抗 CD26 抗原的其他单克隆抗体和多克隆抗体一样可以有效用于本发明提供的预防和治疗方案。因而，本发明不限于任何特定的一种/多种抗 CD26 抗体，并且认为任何对 CD26 蛋白、多肽或肽特异性的抗体均可应用。本发明还考虑应用

抗 CD26 抗体的生物功能等价物。术语"CD26 蛋白/肽/多肽"或"CD26 抗原"在这里是指 CD26 蛋白、多肽或肽，而不考虑是否其天然存在，是纯化的、部分纯化的或是通过重组 DNA 法、融合蛋白法、蛋白合成法等制备的，或者是其生物功能等价物。

生物功能等价物是一种分子，其中在编码该分子的多核苷酸和/或蛋白的结构中可以作修饰和/或改变，而得到的分子具有相似或改善的特征。在本发明的上下文中，这种分子可以是 CD26 抗原或者 CD26 抗体。生物功能等价物可以包括被改造为含有不同的序列而同时保留编码“野生型”或标准蛋白的能力的多核苷酸。这可以通过遗传密码的简并来实现，也就是存在编码同一个氨基酸的多个密码子。制备这种等价物的方法是本领域公知的。

制备和表征抗体的方法是本领域公知的(参见例如 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 并入本文作为参考)。

这部分提供对产生抗体的方法的简短讨论。

(i) 多克隆抗体

简而言之，多克隆抗体通过用根据本发明的免疫原性组合物(在本案中包括 CD26 抗原)免疫动物并从该经免疫的动物收集抗血清而制备。

广泛的动物种类可用于产生抗血清。通常，用于产生抗-抗血清的动物为家兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。由于家兔相对大的血容量，家兔为优选的制备多克隆抗体的选择。

如本领域所公知的，给定组合物的免疫原性可能会变化。因此常常需要激发宿主免疫系统，这可通过将肽或多肽免疫原偶联到载体上而实现。例示性的和优选的载体是匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他蛋白例如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白、家兔血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂也可用作载体。将多肽偶联到载体蛋白上的手段是本领域公知的，包括戊二醛、间马来酰亚胺基

苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (m-maleimido benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、碳二亚胺以及 bis-biazotized 联苯胺。其他的双官能或衍生剂也可用于连接, 举例来说, 马来酰亚胺基苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R^1 是不同的烷基基团。

如本领域同样公知的, 特定免疫原组合物的免疫原性可通过应用称为佐剂的免疫反应非特异性刺激物予以增强。例示性的和优选的佐剂包括完全弗氏佐剂 (免疫反应的非特异性刺激物, 含有杀死的结核分枝杆菌)、不完全弗氏佐剂以及氢氧化铝佐剂。

用于制备多克隆抗体的免疫原组合物的量依据免疫原的性质以及用于免疫的动物而变化。很多途径可用于给予免疫原(皮下、肌肉内、皮内、静脉内以及腹膜内)。多克隆抗体的产生可通过在免疫后的各时间点对免疫动物取血样而予以监测。

还可给予第二加强注射。重复强化和滴度测定的过程直到获得合适的滴度。当得到预期的免疫原性水平时, 免疫动物可以被放血, 并且分离血清并储存, 和/或所述动物可用于产生单抗。

为生产家兔多克隆抗体, 该动物可通过耳静脉或者通过心脏穿刺放血。使这样取得的血液凝结, 然后离心从全细胞和血块中分离出血清成分。血清可以象各种不同应用中一样使用, 或者可通过众所周知的方法纯化需要的抗体成分, 例如亲和层析, 利用另一种抗体或肽结合于固体基质或者蛋白 A, 继之以抗原(肽)亲和柱予以纯化。

(ii) 单克隆抗体

"单克隆抗体"是指能够与 CD26 蛋白特异性结合的均一免疫球蛋白群。应理解 CD26 蛋白可以具有一个或多个抗原决定簇。本发明的抗体可以针对这些决定簇中的一个或多个。

单克隆抗体(单抗)可利用众所周知的技术容易地制备, 例如美国专利 4,196,265 中所例示的那些技术, 并入本文作为参考。通常, 该技

术包括用挑选的免疫原组合物免疫合适的动物，例如纯化或部分纯化的 CD26 抗原蛋白、多肽或肽。该免疫组合物以能够有效刺激抗体产生细胞的方式给予。

产生单抗的方法通常沿着与那些制备多克隆抗体的方法相同的路线开始。啮齿类动物例如小鼠和大鼠是优选的动物，不过利用家兔、绵羊、山羊、猴细胞也是可能的。利用大鼠可提供某些优势 (Goding, 1986, pp. 60-61)，但小鼠是优选的，BALB/c 小鼠是最优选的，因为它是最常规应用的，并且通常给出更高百分比的稳定融合。

一般如上所述向动物注射抗原。如果必要，抗原可偶联于载体分子例如匙孔血蓝蛋白。抗原通常会与佐剂混合，例如弗氏完全或不完整佐剂。用相同抗原加强注射可以以大约两周的间隔进行。

免疫之后，具有产生抗体潜能的体细胞，特别是 B 淋巴细胞(B 细胞)，被选择用于单抗产生方案。这些细胞可从活检的脾脏或淋巴结获得。优选脾细胞和淋巴结细胞，前者因为它们处于分裂浆母细胞阶段的抗体产生细胞的丰富来源。

通常会免疫一组动物，并且取出具有最高抗体滴度的动物的脾脏，并用注射器匀浆脾脏而获得脾淋巴细胞。通常，来自免疫小鼠的脾脏含有大约 5×10^7 到 2×10^8 个淋巴细胞。

来自免疫动物的产生抗体的 B-淋巴细胞随后与无限增殖的骨髓瘤细胞融合，通常是与免疫动物相同的物种。适合用于产生杂交瘤的融合操作的骨髓瘤细胞系优选是不产生抗体的，具有高融合效率，和使其不能在某些仅仅支持预期的融合细胞（杂交瘤）生长的选择性培养基中生长的酶缺陷。

可利用多种骨髓瘤细胞中的任何一种，正如本领域熟练技术人员所公知的(Goding, pp. 65-66,1986; Campbell, pp. 75-83,1984; 分别并入本文作为参考)。举例来说，当免疫动物为小鼠时，人们可利用 P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag4 1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0 Bul；至于大鼠，人们可利用 R210、RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F 和 4B210；而 U-266、

GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 都可用于人细胞融合。

一种优选的鼠骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系(也被称为 P3-NS-1-Ag4-1), 通过请求细胞系保藏号 GM3573, 它可以容易地从 NIGMS 人类遗传突变细胞保藏所获得。另一种可用的小鼠骨髓瘤细胞系是 8-氮鸟嘌呤-抗性小鼠的鼠骨髓瘤 SP2/0 不产病毒性(non-producer)细胞系。

生成抗体-产生性脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体的方法通常包括在促进细胞膜融合的一种或多种因子(化学的或电的)存在的条件下, 将体细胞和骨髓瘤细胞以 2:1 的比例混合, 尽管该比例可分别从大约 20:1 到大约 1:1 变化。Kohler 和 Milstein 描述了利用仙台病毒的融合方法(1975; 1976), 而 Gefter 等描述了利用聚乙二醇(PEG), 例如 37% (v/v) PEG 的方法(1977)。利用电诱导融合方法也是适宜的(Goding pp. 71-74,1986)。

融合操作通常低频率地产生存活的杂交体, 大约 1×10^{-6} 至 1×10^{-8} 。不过, 这不构成问题, 因为该存活的融合杂交体是由亲本未融合细胞(特别是能够正常继续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)通过在选择性培养基中培养分化而来的。选择性培养基通常在组织培养的培养基中含有阻断核苷酸重新合成的试剂。例示性和优选的试剂是氨基蝶呤、氨基蝶呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和氨基蝶呤阻断嘌呤和嘧啶两者的重新合成, 而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤的合成。当利用氨基蝶呤或氨基蝶呤时, 培养基补充次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸的来源(次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基)。当利用重氮丝氨酸时, 培养基补充次黄嘌呤。

优选的选择性培养基是 HAT。只有能够运转核苷酸补救途径的细胞能够在 HAT 培养基中存活。骨髓瘤细胞缺乏补救途径的关键酶, 例如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT), 因而它们不能存活。B 细胞可运转该途径, 但它们在培养中具有有限的寿命并且通常在约两周内死亡。所以, 唯一能够在选择性培养基中存活的细胞是那些由骨髓瘤和 B 细胞形成的杂交细胞。

这种培养提供了杂交瘤种群，从中挑选特定的杂交瘤。有代表性地，杂交瘤的挑选在微量滴定板上通过单克隆稀释法培养细胞，然后对各个克隆的上清液(大约两到三周后)测试所需的反应性来进行。这种分析应当灵敏、简单和迅速，例如放射免疫分析、酶免疫分析、细胞毒性分析、噬菌斑分析、斑点免疫结合分析等等。

挑选的杂交瘤随之进行系列稀释并克隆到单个的产生抗体的细胞系中，则该克隆可以无限增殖提供单抗。可用两种基本方法使用该细胞系用于单抗产生。

杂交瘤样本可被注射到(通常注射到腹膜腔)组织相容的动物中，该动物类型是用于提供进行原始融合的体细胞和骨髓瘤细胞的类型(例如同源小鼠)。任选地，在注射前用碳氢化合物，特别是油例如降植烷(四甲基十五烷)使动物致敏。注射动物形成肿瘤分泌由融合的杂交细胞产生的特定单抗。然后动物的体液，例如血清或腹水，可以被放出以提供高浓度的单抗。

各细胞系也可以在体外培养，其中单抗自然地分泌到培养基中，从中可容易地获得高浓度单抗。

如果需要，任何一种方法产生的单抗均可进一步纯化，利用过滤、离心和各种层析方法例如 HPLC 或亲和层析。本发明的单抗的片段可通过包括用酶例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化的方法，和/或通过化学还原裂解二硫键的方法从纯化的单抗获得。作为选择，本发明包括的单抗片段可利用自动肽合成仪合成。

还认为分子克隆途径可用于产生单克隆。为此，从分离自免疫动物脾脏的 RNA 制备组合的免疫球蛋白噬菌粒文库，并且利用表达抗原的细胞和对照细胞例如正常对肿瘤细胞(normal-versus-tumor cells)通过淘选来选择表达合适抗体的噬菌粒。该方法较之于常规杂交瘤技术的优点是单轮可产生和筛选大约 10^4 倍之多的抗体，而且通过 H 和 L 链组合可产生新的特异性，这进一步增加了找到合适抗体的机会。

已经用这样的标准技术产生了针对 CD26 抗原的抗体。举例来说，美国专利 5,120,642，并入本文作为参考，描述了 1F7 单抗的产生和其

表征。被开发用于帮助区分 CD4+淋巴细胞群中的辅助-诱导和抑制-诱导细胞，单抗 1F7 是从用来源于新大陆灵长类动物夜猴 (*Aotus trivirgatus*) 的刺激的 T 细胞系免疫 Balb/cJ 小鼠所建立的杂交细胞系产生的。简而言之，利用标准杂交瘤操作，用来源于新大陆灵长类动物夜猴 (*Aotus trivirgatus*) 的 PHA-刺激的 T 细胞系的细胞免疫 Balb/cJ 小鼠。收集小鼠脾细胞并与骨髓瘤细胞系 NS-1 融合。该细胞群培养于 HAT 培养基中以获得待克隆的杂交瘤细胞。挑选含有与人 T 细胞反应的抗体的杂交瘤培养物。含有与人 T 细胞反应的单抗的杂交瘤培养物的克隆和再克隆是在饲养细胞的存在下通过有限稀释法进行的。然后建立恶性腹水并用于分析。通过用荧光素标记的山羊抗小鼠 IgG1 染色，而不能用荧光素标记的针对小鼠 Ig 其他亚群的抗体染色，该单抗的同型被确定为小鼠同型 IgG1。产生该抗 1F7 单抗的杂交瘤细胞培养物于 1989 年 11 月 21 日保藏在美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 并且指名为 ATCC No. HB 10297。

已经由本发明人通过标准杂交瘤技术产生的其他抗 CD26 的单抗包括 10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11 和 16D4B (Dong 等, 1998, 并入本文作为参考)。还有另一种抗 CD26 单抗是 5F8 (Morimoto 等, 1989; Torimoto 等, 1992, 并入本文作为参考)。

(iii) 人源化抗体

人源化抗体是动物来源的，运用遗传工程技术加以修饰，用人类序列替换恒定区和/或可变区构架序列，而保留原始的抗原特异性的抗体。这样的抗体还可包括与供体或受体未加修饰的轻链或嵌合轻链结合的人源化重链，或者反之亦然。这样的抗体通常来源于啮齿类动物抗体，举例来说，本发明的鼠源抗体，具有针对人类抗原的特异性，并且通常可用于体内的治疗应用。该策略减少宿主对外源抗体的反应，并允许对人类效应功能进行选择。

产生人源化免疫球蛋白的技术对于本领域熟练技术人员来说是众

所周知的。举例来说，美国专利 5,693,762 公开了产生具有一个或多个互补决定区(CDR)的人源化免疫球蛋白的方法，以及其组合物。"CDR"定义为抗体的互补决定区的氨基酸序列。CDR 包含在免疫球蛋白的重链和轻链的高变区内。CDR 提供了抗体结合抗原或表位的大多数接触残基。该发明感兴趣的 CDR 来源于供体抗体的可变重链和轻链序列，并且包括天然存在的 CDR 的功能片段和类似物，所述片段和类似物也享有或保留与其来源的供体抗体相同的抗原结合特异性和/或中和能力。当组合入完整抗体中时，人源化免疫球蛋白实质上在人类中是非免疫原性的，并保留与供体免疫球蛋白基本上相同的对抗原如含有表位的蛋白或其它化合物的亲和力。

一般而言，人源化抗体具有非人来源的一个或多个氨基酸残基引入其中。这些非人氨基酸残基常常被称为“输入”残基，其典型地是从一个“输入”可变结构域取出的。人源化抗体中仅仅抗原识别部位，或者互补决定高变区(CDR)是非人源的，而可变结构域的所有构架区(FR)都是人类基因的产物。

人源化可基本依据 Winter 和同事的方法进行(Jones 等, 1986; Riechmann 等, 1988; Verhoeyen 等, 1988)，用啮齿类动物的 CDR 或 CDR 序列替换人类抗体的相应序列。因此，这种“人源化”抗体是嵌合抗体，其中实质上少于一个完整的人类可变结构域被非人物种的相应序列所替代。在实践中，人源化抗体典型地是其中一些 CDR 残基和可能一些构架区(FR)残基被来自啮齿动物抗体中类似部位的残基替代的人类抗体。

其他教导了产生可用于本发明的抗体的美国专利，分别并入本文作为参考，包括描述了用组合方法生产嵌合抗体的美国专利 5,565,332；描述了重组免疫球蛋白制剂的美国专利 4,816,567 以及描述了抗体-治疗剂偶联物的美国专利 4,867,973。

美国专利 5,565,332 描述了生产抗体、或具有与亲本抗体相同的结合特异性但具有增加的人类特征的抗体片段的方法。人源化抗体可通过链改组获得，或许利用噬菌体展示技术，鉴于这种方法可用于本发

明, 美国专利 No.. 5,565,332 全文并入本文作为参考。人类抗体还可以如 Hoon 等所述 (1993) 通过用 EBV 转化 B 细胞并且接着克隆分泌者来产生。

抗体人源化并保持高的抗原亲和力和其他有利的生物特征是很重要的。为实现这个目的, 根据优选的方法, 利用亲本和人源化序列的三维模型通过分析亲本序列和各种不同的概念上的人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可以得到的, 并且其对本领域熟练技术人员来说是熟知的。可利用计算机程序图解并显示所挑选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检视这些显示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用, 也就是分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。用这种方式, 可从共有和输入序列中选择 FR 残基并组合, 以便实现所需的抗体特征, 例如增强的对靶抗原的亲和力。一般来说, CDR 残基直接地并且最为实质性地参与影响抗原结合。

(iv) 人抗体

人单抗可通过杂交瘤方法制备。用于产生人单抗的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系已有描述, 举例来说, Kozbor (1984) 及 Brodeur 等(1987)。

目前, 制备经免疫能够产生人抗体集合(repertoire)而不产生内源性免疫球蛋白的转基因动物(例如小鼠)是可能的。举例来说, 已经描述了嵌合和生殖系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致完全抑制内源抗体产生。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移至这样的生殖系突变小鼠, 经抗原攻击就会导致人抗体的产生 (Jakobovits 等, 1993)。

作为选择, 噬菌体展示技术(McCafferty 等, 1990)可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因集合产生人抗体和抗体片段。按照该技术, 抗体 V 结构域基因符合读框地克隆入丝状噬菌体例如 M13 或 fd 的主要或者次要外壳蛋白基因中, 并作为功能性

抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面。

由于该丝状颗粒含有噬菌体基因组的一个单链 DNA 拷贝,以抗体的功能特性为基础的选择还导致选择编码表现出那些特性的抗体的基因。因而,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行(Johnson 等,1993)。几种来源的 V-基因片段可用于噬菌体展示。Clackson 等(1991) 从一个来源于免疫小鼠的脾脏的 V 基因的小随机组合文库中分离了多种不同的抗-噁唑酮抗体。基本上按照 Marks 等(1991)或者 Griffith 等(1993)描述的技术,可以构建来自未免疫的人供体的 V 基因集合,并可以分离针对多种不同抗原(包括自身抗原)的抗体。

在天然免疫应答中,抗体基因以高速率累积突变(体细胞高变)。有些引入的变化会赋予高亲和力,并且显示出高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在后续的抗原攻击期间被优先复制和分化。这种天然过程可通过使用公知为“链改组”的技术来模拟(Marks 等,1992)。在这种方法中,通过用获自未免疫供体的 V 结构域基因的天然存在的变体(集合)的集合顺序替换重链和轻链 V 区基因,由噬菌体展示获得的“初级”人抗体的亲和力可得到提高。该技术使得具有 nM 级亲和力的抗体和抗体片段得以产生。Waterhouse 等(1993)描述了制备非常大的噬菌体抗体集合的策略,而 Griffith 等(1993)报道了从这种大的噬菌体文库中直接分离高亲和力人抗体。基因改组也可用于从啮齿类动物抗体获得人抗体,其中的人抗体具有与起始的啮齿类动物抗体相似的亲和力和特异性。根据这种也被称为“表位印记”的方法,由噬菌体展示技术获得的啮齿类动物抗体的重链或轻链 V 结构域基因用人类 V 结构域基因集合替换,从而创建啮齿类动物-人嵌合体。抗原选择导致分离能够恢复功能性抗原结合部位的人可变区,也就是说,表位控制(印记)配偶体的选择。当重复该过程以便替换其余的啮齿类动物 V 结构域时即获得人抗体(PCT 专利申请 WO 93/06213)。与传统的通过 CDR 移植法人源化啮齿类动物抗体不同,该技术提供了完全人的抗体,它没有啮齿类动物来源的构架或 CDR 残基。

(v) 双特异性抗体

双特异性抗体是单克隆的，优选是人或人源化的，具有对至少两个不同抗原的结合特异性的抗体。在本案中，结合特异性之一是针对 CD26 抗原的，而另一个则针对任何其他抗原，并且优选是针对另一个受体或受体亚单位的。举例来说，特异性结合 CD26 抗原的双特异性抗体落在本发明的范围之内。制备双特异性抗体的方法是本领域公知的。

传统上，双特异性抗体的重组制备是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达，其中的两个重链具有不同的特异性(Millstein 和 Cuello, 1983)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤(quadroma)产生 10 种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。该正确分子的纯化，通常通过亲和层析步骤完成，相当繁琐，而且产量低。相似的操作在 WO 93/08829 和 Traunecker 等(1991)中公开。

根据一种不同的和更优选的方法，具有所需的结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合部位)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选是与免疫球蛋白重链恒定结构域，包括至少一部分绞链区、CH2 和 CH3 区。优选具有包含轻链结合必需部位的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一个融合体中。编码免疫球蛋白重链融合体的 DNA，以及如果需要，编码免疫球蛋白轻链的 DNA 被插入到分别的表达载体中，并共转染至合适的宿主生物体中。在用于构建的三个多肽链的不等比例给出最佳产量的实施方案中，这提供了调节这三个多肽片段的相互比例的极大灵活性。不过，当至少两个多肽链等比表达导致高产率时，或者当比例没有特殊的重要意义时，有可能将两个或所有三个多肽链的编码序列插入到一个表达载体中。在该方法的一个优选实施方案中，双特异性抗体由一个位于一个臂上的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链，以及一个位于另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种不对称结构可易化

目的双特异性化合物从不需要的免疫球蛋白链组合中的分离，因为免疫球蛋白轻链仅存在于双特异性分子的一半提供了容易的分离方法。关于产生双特异性抗体的进一步细节，参见例如 Suresh 等(1986)。

(vi) 杂缀合抗体

杂缀合抗体也在本发明的范围之内。杂缀合抗体由两个共价连接的抗体组成。这种抗体被提出可以，例如，使免疫系统细胞靶向于不需要的细胞 (美国专利 4,676,980)，和治疗 HIV 感染(WO 91/00360 ; WO 92/200373; EP 03089)。杂缀合抗体可由任何便利的交联方法制备。合适的交联剂是本领域众所周知的，并且连同许多交联技术公开在美国专利 4,676,980 中。

b. 交叉反应性抗体和表位

本发明进一步包括其他基于抗 CD26 抗体的组合物，例如抗体偶联物和免疫毒素，其结合与本文公开的抗体相同的抗原和/或表位，即结合 CD26 抗原。这种抗体可以是多克隆或单克隆类型，一般优选单克隆抗体。

以与本发明的抗体基本上相同的方式鉴定结合癌抗原或表位例如 CD26 抗原或其表位的抗体，是一个相当直接的事情。这可利用免疫学筛选分析中的任何一种容易地加以确定，在所述分析中可评估抗体竞争。

举例来说，当待检测的测试抗体是从不同来源的动物获得、或者甚至是不同的同型时，可使用简单的竞争分析，其中预先混合对照和测试抗体然后用于抗原组合物。“抗原组合物”是指含有如本文所述的 CD26 抗原或相关癌抗原的任何组合物。因此，基于 ELISA 和蛋白质印迹的方案适用于这种简单的竞争研究。

在这种实施方案中，人们可以将对照抗体与不同量的测试抗体(例如 1:1、1:10 和 1:100) 在用于抗原组合物之前预先混合一段时间，所述抗原组合物例如 ELISA 板上抗原包被的孔，或者吸附到膜上的抗原

(如在斑点印迹和蛋白质印迹中)。利用种或同型二抗,人们只能够检测到结合的对照抗体,其结合会由于存在识别相同表位/抗原的测试抗体而下降。

在进行对照抗体如抗 CD26 抗体和任何测试抗体之间的抗体竞争研究时,人们可以首先用可检测的标记标记对照,例如生物素或酶、放射性或荧光标记,以能够进行随后的鉴定。在这些情况下,人们可以以不同的比例(如 1:1、1:10 和 1:100)温育标记的对照抗体和待检测的测试抗体,在合适的一段时间后,人们可以接着分析标记的对照抗体的反应性,并将其与温育中不包括潜在竞争性测试抗体的对照值进行比较。

这种分析同样可以是任何一种基于抗体杂交的免疫分析,对照抗体可通过检测其标记的方法加以检测,例如在生物素化抗体的情况下用链霉抗生物素,或者与酶标有关的用显色底物,或者简单地检测放射性或荧光标记。结合与对照抗体基本上相同的表位的抗体能够有效竞争结合,从而如结合标记的减少所证明的,显著减少对照抗体的结合。

标记的对照抗体在没有任何测试抗体时的反应性应该是对照高值。对照低值可通过温育标记抗体和相同类型的未标记抗体获得,此时可能发生竞争并减少标记抗体的结合。存在测试抗体时标记抗体反应性的显著下降意味着识别相同表位的测试抗体,也就是说,与标记抗体“交叉反应”的抗体。显著下降是可重复的即一致观察到的结合减少。

c. 抗体偶联物

抗体偶联物包括连接于另一种物质的 CD26 抗体,例如但不限于治疗剂、可检测的标记、细胞毒性剂、化学品、毒素、酶抑制剂、药剂等,构成了本发明更深层的方面。诊断性抗体偶联物既可用于体外诊断,如在各种免疫分析中,又可用于体内诊断,例如显象技术中。

某些抗体偶联物包括主要旨在用于体外的那些,其中抗体连接于

第二结合配体或接触显色底物能产生有色产物的酶(酶标)。合适的酶的例子包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶以及葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素和抗生物素蛋白或链霉抗生物素化合物。这种标记的应用对本领域的熟练技术人员来说是公知的,并且描述在例如美国专利 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149 和 4,366,241 中,分别并入本文作为参考。

旨在功能性应用的其他抗体偶联物包括抗体偶联于酶抑制剂如腺苷脱氨酶抑制剂或者二肽基肽酶 IV 抑制剂的那些。

(i) 放射性标记的抗体偶联物

当利用基于抗体的分子作为体内诊断剂,提供例如脑、甲状腺、乳房、胃、结肠、胰、肾、卵巢、肺、前列腺、肝脏以及肺癌或者相应转移的图像时,可使用磁共振成像、X-射线成像、计算机化的发射断层摄影术以及诸如此类的技术。在本发明的抗体显象构建体中,所用的抗体部分一般结合于癌标志,例如 CD26 抗原,而显象剂是在成像时可检测的物质,例如顺磁性、放射性或荧光物质。

许多合适的显象剂是本领域公知的,正如将它们连接到抗体的方法一样(参见例如美国专利 5,021,236 和 4,472,509,均并入本文作为参考)。某些连接方法涉及金属螯合络合物的应用,使用例如有机螯合剂如 DTPA 连接于抗体(美国专利 4,472,509)。单抗也可以与酶在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的存在下反应。带荧光素标记的偶联物在这些偶联剂存在的条件下或者通过与异硫氰酸酯反应而制备。

在顺磁性离子的情况下,作为举例人们可提到离子例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钆(III)、钆(III)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、镧(III)、钆(III)以及铈(III),特别优选钆。

在其他背景例如 X-射线成像中有用的离子,包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II),特别是铋(III)。

在放射性同位素用于治疗和/或诊断应用的情况下,人们可以提

到砷²¹¹、¹⁴碳、⁵¹铬、³⁶氯、⁵⁷钴、⁵⁸钴、铜⁶⁷、¹⁵²Eu、镓⁶⁷、³氢、碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹³¹、铟¹¹¹、⁵⁹铁、³²磷、铈¹⁸⁶、铈¹⁸⁸、⁷⁵硒、³⁵硫、镓^{99m}以及钇⁹⁰。¹²⁵I 常常优选用于某些实施方案中，并且镓^{99m}和铟¹¹¹因为它们的低能量和适合长范围检测也常常是优选的。

本发明放射性标记的单抗可根据本领域众所周知的方法制备。例如，单抗的碘化可通过接触碘化钠或碘化钾以及化学氧化剂例如次氯酸钠、或者酶氧化剂例如乳过氧化物酶。根据本发明的单抗可通过配体交换过程用镓^{99m}标记，举例来说，通过用亚锡溶液还原高镓酸盐、将还原的镓整合到 Sephadex 柱上并将抗体施加到该柱上，或者通过直接的标记技术，例如温育高镓酸盐、还原剂例如 SnCl_2 、缓冲溶液例如邻苯二甲酸钠-钾溶液以及抗体。

常用于将作为金属离子存在的放射性同位素结合到抗体上的中间官能团是二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 和乙二胺四乙酸 (EDTA)。

荧光标记包括若丹明、异硫氰酸荧光素和泛影酸钠。

(ii) 免疫毒素

本发明进一步提供了免疫毒素，其中结合癌标志如 CD26 抗原的抗体连接于细胞毒性剂。免疫毒素技术相当先进，并且是本领域熟练技术人员公知的。免疫毒素是这样的制剂，其中抗体成分连接于另一种物质，特别是细胞毒性剂或者以不同方式抗细胞的物质，具有杀伤细胞或抑制细胞生长或细胞分裂的能力。

如本文所用，术语“毒素”和“毒性部分”用来指任何具有这样的杀伤或抑制特性的细胞毒性剂或者以不同方式抗细胞的物质。毒素因此是能够与抗体偶联，并以活性形式递送到细胞的药剂，在那里它们发挥显著的有害效应。

免疫毒素的制备一般而言是本领域公知的(参见例如美国专利 4,340,535，并入本文作为参考)。还已知虽然基于 IgG 的免疫毒素通常显示出比其 Fab' 对应物更好的结合能力和更慢的血液清除，基于 Fab' 片段的免疫毒素一般可显示出比基于 IgG 的免疫毒素更好的组织穿透

能力。

例示性的抗细胞剂包括化学治疗剂、放射性同位素和细胞毒素。化疗剂的例子有激素例如类固醇；抗代谢药例如阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氨基蝶呤或氨基蝶呤；蒽环类抗生素；丝裂霉素 C；长春花生物碱；秋水仙胺；依托泊苷；光辉霉素；或烷化剂例如苯丁酸氮芥或苯丙氨酸氮芥。

优选的免疫毒素常常包括植物、真菌或细菌来源的毒素，例如 A 链毒素、核糖体失活蛋白、 α -八叠球菌素、曲霉菌素、局限曲菌素、核糖核酸酶、白喉毒素或假单胞菌外毒素，不一一而列了。毒素-抗体构建物的应用，如同它们连接到抗体一样，是免疫毒素领域众所周知的。当然，各种不同毒素的组合也可以偶联到一个抗体分子，从而适应可变化的甚至是增强的细胞毒性。

一类连接到抗体的毒素是蓖麻毒素，特别优选去糖基化的蓖麻毒素 A 链。如本文所用的，术语“蓖麻毒素”意指从天然来源和通过重组手段制备的蓖麻毒素。各种不同的“重组”或“遗传工程”形式的蓖麻毒素分子对本领域熟练技术人员来说是公知的，根据本发明它们都可以使用。

优选去糖基化的蓖麻毒素 A 链(dgA)是因为它极强的效力、更长的半衰期，并且因为以临床级别和规模生产它是经济上可行的。还可以使用截短的蓖麻毒素 A 链，其中由 Nagarase (Sigma)除去了 30 个 N-末端氨基酸。

将一个或多个毒素部分连接或偶联到抗体上可通过许多机制实现，举例来说，共价结合、亲和结合、嵌入、协同结合以及复合。优选的结合方法是那些涉及共价结合，例如利用化学交联剂、天然肽或二硫键的方法。

共价结合可通过现有侧链的直接缩合作用或者通过引入外部架桥分子实现。许多二价或多价试剂可用于将蛋白分子偶联到其他蛋白、肽或胺官能团上。偶联剂的例子有碳二亚胺、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯以及六亚甲基二胺。该列表不意在穷尽本领域公知的各种偶联

剂，而是例示可以使用的较为常用的偶联剂。

在优选的实施方案中，考虑到人们可能希望首先将抗体衍生化，然后将毒素成分连接到该衍生产物上。如本文所用的，术语“衍生”用于描述用合适的交联剂对抗体底物进行化学修饰。该方法中可用的交联剂的例子包括含有二硫键的接头 SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基连硫基)丙酸盐)和 SMPT(4-琥珀酰亚胺基-氧羰基- α -甲基- α (2-吡啶基连硫基)甲苯)。

可生物释放键对临床活性免疫毒素的实现尤为重要，在于它一旦进入靶 T 细胞后，毒素部分必须能够从抗体中释放出来。已知众多类型的连接构建体，包括简单地在氨基酸例如半胱氨酸所含的巯基之间直接形成二硫键，或者将其引入各自的蛋白结构中，以及利用现有的或设计的接头部分的二硫键合。

已知众多类型包含二硫键的接头，可成功地使用它将毒素部分偶联到抗体上，不过，某些接头通常是优选的，例如，举例来说，空间位阻二硫键接头由于其在体内更好的稳定性而被优选，从而防止在结合于作用部位之前释放毒素部分。一个特别优选的交联试剂是 SMPT，尽管也可以使用其他接头例如 SATA、SPDP 和 2-亚氨基硫杂环戊烷。

一旦偶联，纯化该偶联物以除去污染物例如非偶联的 A 链或抗体变得很重要。除去非偶联的 A 链很重要是因为毒性增加的可能。此外，除去非偶联的抗体很重要，以避免偶联及非偶联种类之间竞争抗原的可能。在任何情况下，发现许多纯化技术提供偶联物以足够的纯度，使其在临床上可用。

一般而言，最优选的技术将引入 Blue-Sepharose 的应用和凝胶过滤或凝胶渗透步骤。Blue-Sepharose 是由 Cibacron Blue 3GA 和琼脂糖组成的柱基质，它被发现可用于免疫偶联物的纯化。Blue-Sepharose 的应用结合了离子交换和 A 链结合的特征，对于偶联的与非偶联的结合提供很好的分离。Blue-Sepharose 允许从偶联制备物中消除游离(未偶联)抗体。为消除游离(非偶联)毒素(例如 dgA)，可利用分子排阻层析，利用常规的凝胶过滤步骤，或者利用高效液相色谱法。

制备出足够纯的偶联物之后，人们通常希望将其制备成为可经肠胃外给药的药物组合物。这通过在最后的纯化步骤中应用含有合适的药物组合物的介质来完成。这种配方典型地包括药学缓冲溶液，连同赋形剂、稳定剂以及诸如此类的物质。药学上可接受的组合物应当是无菌、非免疫原性和无致热原的。其制备的细节是本领域众所周知的，并在本文进一步描述。应理解内毒素污染应当被最低限度地控制在安全水平，例如，少于 0.5 ng/mg 蛋白。

根据本发明的合适的药物组合物一般包括从大约 10 到大约 100 mg 目的偶联物，与可接受的药学稀释剂或赋形剂例如无菌水溶液混合，使偶联物的终浓度为大约 0.25 到大约 2.5 mg/ml。

如前所述，本发明的癌标志抗体可连接于一种或多种化学治疗剂，例如抗肿瘤药物、细胞因子、抗代谢药、烷化剂、激素、核酸等等，从而利用该抗体偶联物其可以靶向于表达 CD26 抗原的癌细胞。抗体偶联的药剂与其非抗体偶联的对应物相比，优势在于增加了由抗体所赋予的选择性。

在分析可用于偶联到抗体的化学治疗剂和药剂的种类时，人们可能希望特别考虑那些先前证明可成功偶联到抗体上并发挥药理学功能的药剂。已经被用过的例示性的抗肿瘤剂包括阿霉素、柔红霉素、氨甲蝶呤、长春碱。此外，其他药剂如新制癌菌素、大分子霉素、三亚胺醌以及 α -鹅膏蕈碱的连接也已有描述。这里所提供的适合药剂的列表当然仅仅是例示性的，将药剂连接到抗体上用于特异性递送到组织的技术已经很好地建立了。

因而，通常认为将具有可用于结合或交联到抗体的氨基酸或碳水化合物基团上的伯胺或仲胺基、酰肼或肼基、羧基醇、磷酸或烷化基团的任何药剂偶联到抗体上是可能的。至于蛋白结构，这可通过如上文关于免疫毒素所述的交联剂的方式很容易地实现。连接也可以通过药物和抗体之间的酸不稳定酰基脲或者顺乌头酰(cis aconityl)连接，或者利用药物 γ -羧基和抗体氨基酸之间的肽间隔臂例如 L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala 实现。

E. 免疫检测

a. 免疫分析

治疗性抗 CD26 抗体还可用于与癌症检测和分析有关的各种诊断和预后应用。在更进一步的实施方案中，本发明因此考虑了对于结合、纯化、鉴定、去除、定量或其他通常用于检测生物组分的免疫检测方法。从而，人们可以，举例来说，将本发明的抗 CD26 抗体疗法结合或继之以一轮免疫检测，以获得由表达 CD26 的癌细胞数目的下降所反映出来的疗效的预后或诊断。

各种有用的免疫检测方法的步骤在科技文献中已有描述，例如参见 Nakamura 等(1987)，并入本文作为参考。免疫分析，就其最简单和最直接的意义而言，是结合分析。某些优选的免疫分析是各种类型的酶联免疫吸附测定(ELISAs)、放射免疫测定(RIA)以及免疫珠捕获分析。利用组织切片的免疫组化检测也尤为有用。不过，很容易理解检测不局限于这些技术，蛋白质印迹、斑点印迹、FACS 分析等等同样可用于本发明。

一般而言，免疫结合方法包括获得怀疑含有某一蛋白、肽或抗体的样品，并在有效促成免疫复合物形成的条件下，使该样品与根据本发明的抗体或蛋白或肽接触，视情形而定。

本发明的免疫结合方法包括检测或定量样品中反应性组份的量的方法，该方法需要检测或定量在结合过程中形成的任何免疫复合物。这里，人们可以获得怀疑含有 CD26 抗原或相关癌标志蛋白、肽或相应抗体的样品，并使该样品与抗体或编码蛋白或肽接触，视情形而定，然后检测或定量在特定条件下形成的免疫复合物的量。

有关抗原检测，待分析的生物样品可以是怀疑含有癌特异性抗原如 CD26 抗原的任何样品，例如 T 细胞癌、黑素瘤、成神经胶质细胞瘤、星形细胞瘤以及乳腺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、淋巴结或骨髓组织切片或标本、匀浆的组织提取物、分离的细胞、细胞膜制备物、含有分离或纯化形式的

任何上述蛋白的组合物、或者甚至是任何接触癌组织的生物液体，包括血液、淋巴液、精液和尿。

使选择的生物样品与蛋白、肽或抗体在有效条件下接触足以形成免疫复合体（第一免疫复合体）的一段时间，通常是简单地将组合物加到样品中并将混合物温育足够长的一段时间，以使抗体与存在的任何抗原，例如 CD26 抗原形成免疫复合体，即结合。这段时间后，样品-抗体组合物，例如组织切片、ELISA 板、斑点印迹或蛋白质印迹，通常进行冲洗以除去任何非特异性结合的抗体物质，仅允许检测那些特异性结合在第一免疫复合体之内的抗体。

一般而言，免疫复合体形成的检测是本领域公知的，并且可通过应用众多方法实现。这些方法通常建立在检测标记或标志的基础上，例如本领域中标准使用的任何放射性、荧光、生物学或酶标签或标记。有关这种标记的使用的参考文献包括美国专利 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 以及 4,366,241，分别并入本文作为参考。当然，人们通过利用第二结合配体，例如二抗或生物素/抗生物素蛋白配体结合排列，可以发现其他的优势，正如本领域所公知的。

该检测中所使用的编码蛋白、肽或相应的抗体可以本身连接于一种可检测的标记，其中人们于是可以简单地检测该标记，从而使该组合物中第一免疫复合体的量得以确定。

作为选择，首先加入的结合在第一免疫复合体中的组份可通过对编码蛋白、肽或相应的抗体具有结合亲和力的第二结合配体的方式加以检测。在这些情况下，第二结合配体可以连接于一个可检测的标记。第二结合配体本身常常是抗体，它因此可被称之为“第二”抗体。第一免疫复合体与标记的第二结合配体或抗体在有效条件下接触足以形成第二免疫复合体的一段时间。然后第二免疫复合体通常进行洗涤以除去任何非特异性结合的标记的第二抗体或配体，然后检测第二免疫复合体中剩余的标记。

其它的方法包括两步法检测第一免疫复合体。第二结合配体，例

如抗体，其对编码蛋白、肽或相应的抗体具有结合亲和力，被用于形成第二免疫复合体，如前所述。洗涤后，第二免疫复合体与对第二抗体具有结合亲和力的第三结合配体或抗体再次在有效条件下接触足以使免疫复合体（第三免疫复合体）形成的一段时间。第三配体或抗体连接于一个可检测的标记，允许对这样形成的第三免疫复合体加以检测。如果需要该系统可提供信号放大。

本发明的免疫检测方法在癌症诊断中具有明显的实用性。这里，利用的是怀疑含有编码蛋白或肽或者是相应抗体的生物或临床样品。不过，这些实施方案也适用于非临床样品，例如在抗原或抗体样品的滴度测定中，在杂交瘤的选择中，等等。

(i) ELISAs

正如所指出的，我们认为免疫检测技术例如 ELISA 可用于检测临床样品中 CD26 的存在，以确定是否需要进行抗 CD26 抗体治疗。作为选择，人们可在癌细胞被诱导表达 CD26 以使本文提供的疗法可行的实施方案中利用这种技术。

在一个例示性的 ELISA 中，结合于本发明的编码蛋白的抗体被固定到挑选的表现出蛋白亲和性的表面上，例如聚苯乙烯微量滴定板的孔中。然后，怀疑含有癌症标志抗原，例如 CD26 抗原的测试组合物，例如临床样品，被加到孔中。在结合并冲洗除去非特异性结合的免疫复合体后，可检测结合抗原。

检测通常通过加入对靶蛋白特异性的二抗来实现，其连接于一可检测的标记。这类 ELISA 是一种简单的“夹心 ELISA”。检测还可通过加入二抗、接着加入对二抗具有结合亲和力的三抗来实现，其中三抗连接于一可检测的标记。

在另一个例示性 ELISA 中，怀疑含有 CD26 抗原的样品被固定到孔表面，然后与本发明的抗体接触。在结合并冲洗除去非特异性结合的免疫复合体后，检测结合抗体。当最初的抗体连接于一可检测的标记时，该免疫复合体可直接检测。同样，该免疫复合体可利用对第一

抗体具有结合亲和力的二抗进行检测，其中二抗连接于一可检测的标记。

在另一类的 ELISA 中，蛋白或肽例如 CD26 抗原被固定化，检测中涉及应用抗体竞争。在这种 ELISA 中，向孔中加入标记抗体，使其结合 CD26 抗原，通过检测其标记的方式加以检测。未知样品中标志抗原的量可以通过将样品与标记抗体在与包被孔温育之前或期间混合来确定。样品中存在的标志抗原起的作用是减少可结合孔的抗体量，从而降低最终的信号。这适于检测未知样品中的抗体，其中未标记的抗体结合抗原包被的孔，并且还降低了可结合标记抗体的抗原量。

与所使用的形式无关，ELISA 具有某些共同特征，例如包被、温育或结合，洗涤除去非特异性结合的物质，并检测结合的免疫复合体。这些特征描述如下：

用抗原或抗体包被板时，人们通常可以用抗原或抗体的溶液温育板孔，或者过夜或者指定的数小时时间。然后可以洗涤板孔以去除不完全吸附的材料。接着用非特异性蛋白“包被”孔中任何余下的可用表面，该蛋白对于测试抗血清是抗原中性的。这些蛋白包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白以及奶粉溶液。这种包被可以封闭固定表面上的非特异性吸附部位，从而降低由于抗血清非特异性结合到表面上所造成的背景本底。

在 ELISA 中，可能更惯常使用第二或第三检测手段而不是一个直接的步骤。因此，在蛋白或抗体与孔结合，用非反应性材料包被以降低背景，并洗涤除去非结合材料后，固定表面与对照人癌和/或待测试的临床或生物学样品在有效使免疫复合体（抗原/抗体）形成的条件下相接触。然后免疫复合体的检测需要标记的第二结合配体或抗体，或者第二结合配体或抗体连同标记的第三抗体或第三结合配体。

“在有效使免疫复合体（抗原/抗体）形成的条件下”是指这种条件优选包括用溶液稀释抗原和抗体，所述溶液如 BSA、牛丙种球蛋白(BGG)以及磷酸缓冲盐水(PBS)/吐温。这些加入的试剂也趋向有助于降低非特异性背景。

“合适”的条件还意味着温育是在一定温度下持续一段时间，所述温度和时间足以允许有效结合。温育步骤典型地是从大约 1 到 2 到 4 小时，优选是在 25 到 27℃ 数量级的温度下，或者可以在大约 4℃ 左右温育过夜。

在 ELISA 所有的温育步骤之后，洗涤接触表面以便除去未复合的材料。优选的洗涤过程包括用溶液例如 PBS/吐温、或者硼酸盐缓冲液洗涤。在测试样品和原始结合材料之间形成特异性的免疫复合体，以及随后洗涤后，即使是微量的免疫复合体也可以被测定。

为提供检测手段，第二或第三抗体可带有结合的标记以允许检测。优选地，这可以是与合适的显色底物温育后就会产生颜色变化的酶。因此，举例来说，人们可以预期将第一或第二免疫复合体与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶偶联的抗体接触并温育一段时间，并且是在有利于发生进一步的免疫复合体形成的条件下（例如在室温下在含 PBS 的溶液例如 PBS-吐温中温育 2 小时）。

在与标记抗体温育、并且随后洗涤除去未结合的材料后，对标记的量进行定量，例如通过与显色底物如尿素和溴甲酚紫或者 2,2'-叠氮基-二-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸) [ABTS] 温育，和在过氧化物酶作为酶标记时与 H_2O_2 温育。然后通过测量颜色产生的程度实现定量，例如用可见光分光光度计。

在其他实施方案中，还考虑了溶液相竞争 ELISA，溶液相 ELISA 涉及将 CD26 抗原附到珠子上，例如磁珠。这种珠子接着与来自人或动物来源的血清温育。在合适的允许特异性相互作用发生的温育期后，洗涤珠子。用抗体指示剂偶联物检测特定类型的抗体。洗涤并分选珠子。这种复合体是合适仪器上的读数（荧光、电发光、分光光度计，取决于偶联部分）。由此抗体结合的水平可被定量，并且直接地与呈现的信号量相关。

(ii) 免疫组织化学

抗 CD26 抗体可用于新鲜冷冻的和福尔马林固定的由免疫组织化

学(IHC)研究制备的石蜡包埋的组织块。举例来说,每个组织块包括50 mg 残留的“粉碎”肿瘤。从这些颗粒标本制备组织块的方法已经成功地用于先前的各种预后因素的 IHC 研究中,例如在乳腺中,并且是本领域熟练技术人员公知的(Brown 等, 1990; Abbondanzo 等, 1990; Allred 等, 1990)。

简而言之,冷冻切片可如下制备:在小塑料囊中于室温下用磷酸缓冲盐水(PBS)再水化 50 ng 冷冻“粉碎”肿瘤;离心沉淀这些颗粒;将其重悬于粘性的包埋介质(OCT)中;颠倒该囊并再次离心沉淀;在-70℃异戊烷中迅速冷冻;切割塑料囊并取出冷冻的组织柱;将组织柱固定于冷冻切片机的夹头上;并切出 25-50 片含有平均大约 500 个明显完整的肿瘤细胞的连续切片。

永久切片可通过相似的方法制备,包括在塑料微离心管中再水化 50 mg 样品;沉淀;重悬于 10%福尔马林固定 4 小时;洗涤/沉淀;重悬于温热的 2.5%琼脂中;沉淀;在冰水中冷却以使琼脂变硬;从管中取出组织/琼脂块;将该块浸润并包埋于石蜡中;并且切出多至 50 片连续永久切片。

(iii) FACS 分析

荧光激活细胞分选、流式细胞仪或流动显微荧光测定法提供了扫描单个细胞是否存在抗原例如 CD26 抗原的手段。该方法使用了能够激活并检测液体介质中标记细胞的激发发射的仪器。

FACS 的独特之处在于它能提供对活细胞或者固定细胞的迅速、可信、定量和多参数分析。细胞通常可通过活检、血液或培养物中的单细胞悬液获得。当需要在给定的时间分析多个癌抗原,例如追踪在疾病进展过程中的抗原分布特征时, FACS 分析可能是最为有用的。

(iv)体内成像

本发明还提供了在体内利用抗体偶联物使肿瘤显像的方法。术语“体内成像”是指任何可允许检测与位于动物或人患者体内的癌细胞

特异性结合的标记抗体或其片段的非侵入性方法。

成像方法通常包括向动物或患者给予成像有效量的可检测标记的癌特异性抗体或其片段（位于药学有效载体中），例如抗 CD26 抗体，然后检测该标记抗体与癌性组织的结合。可检测的标记优选是非侵入性方法可检测的自旋标记分子或放射性同位素。

“成像有效量”是可检测标记的抗体或其片段的量，当给药时足以实施随后对抗体或片段与癌组织结合的检测。有效量的抗体-标志偶联物被允许充分的时间与存在于患者组织中的反应性抗原接触，然后患者暴露于检测装置以鉴定可检测的标志。

用于成像的抗体偶联物或构建体因此具有提供肿瘤图像的能力，举例来说，通过磁共振成像、x-射线成像、计算机化的发射断层摄影术等等。磁共振成像("MRI")中特别有用的元素包括核磁自旋共振同位素 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Cr 、以及 ^{56}Fe ，其中常优选钆。可利用 γ 闪烁相机或检测器检测的放射性物质，例如铯 $^{99\text{m}}$ 或铟 111 ，也可以应用。适用于本发明的金属离子的其它例子有 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{131}I 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{125}I 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 以及 ^{201}Tl 。

在选择放射性核素用于体内诊断时要考虑的一个因素是该核素的半衰期足够长以致于在靶达到最大摄取时其仍可以检测，但又足够短从而施加到宿主的有害辐射以及背景被最小化。理想的是，用于体内成像的放射性核素缺乏微粒发射，但在 140-2000 keV 的范围内产生大量的光子，这可以通过常规的 γ 相机容易地检测。

放射性核素可以直接地结合于抗体或者通过利用中间官能团间接地结合。常常用来将作为金属离子存在的放射同位素结合到抗体的中间官能团是二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和乙二胺四乙酸(EDTA)。

标记抗体的给药可以是局部的或全身的，并且通过静脉内、动脉内、经由脊髓液或者类似的方式完成。给药也可以是皮内或者腔内，取决于待检查的身体部位。在经过足够的时间令标记抗体或片段与患病组织（在本案中是癌组织）结合后，例如 30 分钟到 48 小时，然后通过成像技术检查待研究的患者部位。MRI、SPECT、平面闪烁成像

以及其它新兴的成像技术都可以使用。

监测并记录结合的放射性同位素的分布以及它随着时间的增减。通过将该结果与从临床正常个体的研究中所获得的数据进行比较，可以确定患病组织的存在和程度。

确切的成像方案会必要地发生变化，取决于患者特有的因素，并取决于待检查的身体部位、给药方法、所用标记类型等等。不过，具体步骤的确定是熟练技术人员的常规技术。尽管用于成像方案的剂量取决于患者的年龄和体重，大约 0.1 到大约 20 mg 的单次剂量，更优选每个患者大约 1.0 到大约 2.0 mg 抗体偶联物被认为是有用的。

F. 联合癌症疗法

为进一步增强本发明所提供的抗 CD26 抗体治疗的功效，考虑联合疗法。因此，除了基于抗 CD26 抗体的疗法之外，可利用第二治疗剂。第二治疗剂可以是化学治疗剂、放射治疗剂、基因治疗剂、蛋白/肽/多肽治疗剂、另一种免疫治疗剂等。这些治疗剂是本领域公知的。

可用本发明治疗的癌症包括但不限于，血液系统恶性肿瘤包括 B 细胞慢性淋巴细胞白血病、或 B 细胞淋巴瘤、成淋巴细胞 T 细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、T 细胞 CD30+ 退行性大细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、T 细胞慢性淋巴细胞白血病、血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤、血管中心性 T 细胞淋巴瘤、HTLV-相关 T 细胞白血病或成人 T 细胞白血病、血癌、髓细胞性白血病、单核细胞白血病、髓细胞白血病、前髓细胞白血病、原始粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、成淋巴细胞白血病、毛细胞白血病。能够治疗的实体细胞肿瘤和癌症包括例如脑(成神经胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤)、肺、肝、脾、肾、淋巴结、小肠、胰腺、结肠、胃、乳房、骨、内分泌腺、子宫内膜、前列腺、睾丸、甲状腺、卵巢、皮肤、头颈、食道的肿瘤。此外，癌可以是前期癌、转移和/或非转移癌。

“有效量”定义为降低、减少、抑制或以其它方式消除癌细胞生

长、使细胞生长停滞、诱导细胞调亡、抑制转移、诱导肿瘤坏死、杀死细胞、或者在细胞中诱导细胞毒性的药剂的量。

第二治疗剂可以在利用抗 CD26 抗体的治疗之前或之后，以从数分钟到数天到数周的时间间隔给药。在第二治疗剂和抗 CD26 抗体一起给药的实施方案中，人们通常确保在每次递送时间之间的重要时间段不失效。在这种情况下，认为可以在彼此大约 12-24 小时内向患者给予两种形式的治疗，更优选在彼此大约 6-12 小时内，最优选只有大约 12 小时的延迟期。不过，在有些情形下，可能需要显著延长治疗的时间周期，在分别给药之间要隔数天(2、3、4、5、6 或 7)到数周(1、2、3、4、5、6、7 或 8)。

还可想到需要多于一次给予第二治疗剂和抗 CD26 抗体以实现彻底的癌症治愈。可以使用各种组合，第二治疗剂表示为"A"而抗 CD26 抗体表示为"B"，例示如下：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
 A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A
 A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/A/B

还可以考虑其他组合。每种药剂确切的剂量和方案可由本领域普通技术人员适当加以改变。

下文提供的是关于一些其它在癌症治疗中有效的药剂的描述。

a) 放射治疗剂

放射治疗剂和因子包括诱导 DNA 损伤的照射和波，例如 γ -辐射、X-射线、UV-辐射、微波、电子发射、放射性同位素等等。用上述形式的辐射照射局部的肿瘤部位可实现治疗。很可能所有这些因子可对 DNA 前体、DNA 复制和修复、以及染色体的装配和维持产生宽范围的损伤 DNA。

X-射线的剂量范围从长期(3 到 4 周)的 50 到 200 伦琴的每天剂量到 2000 到 6000 伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围变化广泛，并取决于同位素的半衰期、发射的辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的

摄取。

b) 外科手术

大约 60% 癌症患者会经受某一类型的外科手术，包括预防性、诊断性或分阶段性、治疗性及姑息性手术。治疗性外科手术是一种可与其它治疗方法联合应用的癌症疗法，例如本发明的治疗方法、化学疗法、放射疗法、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或其它可供选择的疗法。

治疗性外科手术包括切除术，其中全部或部分癌组织被物理摘除、切除和/或破坏。肿瘤切除术是指物理去除至少部分肿瘤。除了肿瘤切除术，外科手术治疗还包括激光外科手术、冷冻手术、电外科手术、以及显微镜控制的(miscopically controlled)外科手术(莫氏外科手术)。还进一步考虑了本发明可与去除表浅癌、前期癌、或附带量的正常组织联合应用。

在切除部分或所有的癌细胞、组织或肿瘤后，可能在体内形成一个空腔。可通过灌注、直接注射或在该区局部应用额外的抗癌疗法实现治疗。这种治疗可以重复，例如，每 1、2、3、4、5、6 或 7 天、或每 1、2、3、4 和 5 周或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月。这些治疗同样可以变化剂量。

c) 化学治疗剂

损伤 DNA 的药剂是化疗剂。这些可以是，例如，直接交联 DNA 的药剂、嵌入到 DNA 中的药剂、以及通过影响核酸合成导致染色体和有丝分裂畸变的药剂。直接交联核酸特别是 DNA 的药剂被予以考虑，并例示为顺铂以及其他 DNA 烷化剂。损伤 DNA 的药剂还包括干扰 DNA 复制、有丝分裂以及染色体分离的化合物。

化学治疗剂的一些例子包括抗生素类化疗剂例如阿霉素、柔红霉素、丝裂霉素(也公知为突变霉素和/或丝裂霉素-C)、放线菌素 D (更生霉素)、博来霉素、plicomycin; 植物生物碱例如紫杉醇 (Taxol)、长

春新碱、长春碱；混杂药剂例如顺铂、VP16、肿瘤坏死因子；烷化剂例如卡莫司汀、马法兰(也公知为左旋溶肉瘤素、L-苯丙氨酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、L-PAM、或 L-溶肉瘤素，是氮芥的苯丙氨酸衍生物)、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安(也公知为马利兰)、洛莫司汀；以及其它药剂例如顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、喜树碱、异环磷酰胺、硝基脲、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、吉西他滨、Navelbine、法尼基-蛋白转移酶抑制剂、Transplatinum、5-氟尿嘧啶、以及氮甲蝶呤、Temazolomide(DTIC的一种含水形式)或者前述物质的任何类似物或衍生物变体。

d) 其他免疫疗法

其他免疫治疗剂可以与抗 CD26 抗体联合应用。通常，免疫治疗剂依赖于利用免疫效应细胞和分子以靶向并破坏癌细胞。另外的免疫效应物可以是，例如，另一种对肿瘤细胞表面上的某些其他标志特异性的抗体。该第二种抗体本身可能作为治疗的效应物或者它可以募集其它细胞以真正引起 T 细胞杀伤。该第二种抗体也可以偶联于药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒素 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等)并仅仅作为靶向剂。作为选择，效应物可以是携带直接或间接地与肿瘤细胞靶相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。免疫疗法可用作为联合疗法的一部分，与基于抗 CD26 抗体的疗法联合应用。

联合疗法的一般程序讨论如下。在一方面，免疫疗法可用于靶向肿瘤细胞。存在许多肿瘤标志，并且其中任何一种均可能适于本发明上下文中的靶向。常见的肿瘤标志包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酰路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、*erb B* 和 p155。还存在备选的免疫刺激分子，包括细胞因子例如 IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN、趋化因子例如 MIP-1、MCP-1、IL-8 以及生长因子例如 FLT3 配体。将免疫刺激分

子，或者作为蛋白，或者利用基因递送，与本发明基于抗 CD26 抗体的疗法相联合，可增强抗肿瘤效果。

(i) 被动免疫疗法

存在多种不同的癌症被动免疫疗法途径。它们可以被广泛地分类如下：单独注射抗体；注射偶联于毒素或化学治疗剂的抗体；注射偶联于放射性同位素的抗体；注射抗-独特型抗体；以及最后，清除骨髓中的肿瘤细胞。

(ii) 主动免疫疗法

在主动免疫疗法中，给予抗原肽、多肽或蛋白，或者自体或同种异体肿瘤细胞组合物或者“疫苗”，通常和独特的细菌佐剂一起 (Ravindranath 和 Morton, 1991; Morton 等, 1993)。

(iii) 过继免疫疗法

在过继免疫疗法中，体外分离患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润的淋巴细胞，用淋巴因子例如 IL-2 激活，或者用肿瘤坏死基因转异，并重新给予 (Rosenberg 等, 1988 ; 1989)。为实现此疗法，人们可以向动物或人类患者给予免疫有效量的活化的淋巴细胞，联合本文所述的掺入佐剂的抗原肽组合物。活化的淋巴细胞最优选是早先从血液或肿瘤样品中分离并且在体外活化(或“扩增”)的患者自身的细胞。

e) 基因治疗

在另一个实施方案中，想到将基因治疗与本发明所述的抗 CD26 抗体疗法联合。多种核酸及核酸编码的蛋白包含在本发明中，其中一些在下面描述。表 1 列举了可被靶向的多种基因，用于某种形式的基因治疗与本发明相联合。

表 1

基因	来源	人类疾病	功能
生长因子			FGF 家族成员
<i>HST/KS</i>	转染		
<i>INT-2</i>	MMTV 启动子插入		FGF 家族成员
<i>INT1/WNT1</i>	MMTV 启动子插入		因子样
<i>SIS</i>	猿猴肉瘤病毒		PDGFB
受体酪氨酸激酶			
<i>ERBB/HER</i>	鸟类成红细胞增生病毒; ALV 启动子插入; 扩增 的人肿瘤	扩增的、缺失的鳞状 细胞癌; 成神经胶质细胞瘤	EGF/TGF- α /双调蛋白/ Heteracellulin 受体
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	转染自大鼠成神经胶质 细胞瘤	扩增的乳腺癌、卵巢 癌、胃癌	受 NDF/Heregulin 及 EGF- 相关因子的调节
<i>FMS</i>	SM 猫肉瘤病毒		CSF-1 受体
<i>KIT</i>	HZ 猫肉瘤病毒		MGF/Steel 受体
<i>TRK</i>	转染自人结肠癌		造血 NGF (神经生长因子)受体
<i>MET</i>	转染自人骨肉瘤		分散因子/HGF 受体
<i>RET</i>	易位和点突变	散发性甲状腺癌; 家 族性髓样甲状腺癌; 多内分泌瘤 2A 和 2B	孤儿受体 酪氨酸激酶
<i>ROS</i>	URII 鸟肉瘤病毒		孤儿受体 酪氨酸激酶
PDGF 受体	易位	慢性粒-单核细胞 白血病	TEL(ETS-样转录因 子)/PDGF 受体基因融合
TGF- β 受体		结肠癌 错配突变靶	
非受体酪氨酸激酶			
<i>ABL</i>	Abelson MuL V	慢性髓细胞白血病	与 RB、RNA 聚合酶、CRK、

		与 BCR 易位	CBL 相互作用
<i>FPS/FES</i>	Avian Fujinami SV; GA FeSV		
<i>LCK</i>	MuLV (鼠白血病病毒) 启动子插入		Src 家族 T 细胞信号转导; 与 CD4/CD8 T 细胞相互作用
<i>SRC</i>	乌罗斯肉瘤病毒		具有信号转导功能的膜结合 酪氨酸激酶; 由受体激酶活化
<i>YES</i>	鸟 Y73 病毒		Src 家族 信号转导
SER/THR 蛋白激酶			
<i>AKT</i>	AKT8 鼠逆转录病毒		受 PI(3)K ² 调节; 调节 70-kd S6k ²
<i>MOS</i>	Maloney 鼠 SV		GVBD; 细胞静止因子; MAP 激酶激酶
<i>PIM-1</i>	启动子插入 小鼠		
<i>RAF/MIL</i>	3611 鼠 SV; MH2 鸟 SV		RAS 途径中的信号转导
混杂细胞表面¹			
<i>APC</i>	肿瘤抑制物	结肠癌	与连环蛋白 CAM 结构域相 互作用
<i>DCC</i>	肿瘤抑制物	结肠癌	
<i>E-钙粘着蛋白</i>	候选肿瘤抑制物	乳腺癌	胞外同型结合; 胞内与连环蛋 白相互作用
<i>PTC/NBCCS</i>	肿瘤抑制物及果蝇同源	痣样基底细胞癌综 合征 (Gorline 综合征)	12 跨膜结构域; 通过 Gli homologue CI 传导信号以拮抗 刺猬途径
<i>TAN-1 切迹同源物</i>	易位	T-ALL	信号转导?
混杂信号转导			

<i>BCL-2</i>	易位	B 细胞淋巴瘤	细胞调亡
<i>CBL</i>	Mu Cas NS-1 V		酪氨酸磷酸化的 RING 指 与 Ab1 相互作用
<i>CRK</i>	CT1010 ASV		适应的 SH2/SH3 与 Ab1 相互作用
<i>DPC4</i>	肿瘤抑制物	胰腺癌	TGF- β -相关的信号转导途径
<i>MAS</i>	转染及肿瘤发生		可能的血管紧张素受体
<i>NCK</i>			连接物 SH2/SH3
鸟嘌呤核苷酸交换者及 结合蛋白			
<i>BCR</i>		在 CML 中与 ABL 易位	交换者; 蛋白激酶
<i>DBL</i>	转染		交换者
<i>GSP</i>			
<i>NF-1</i>	遗传性肿瘤抑制物	肿瘤抑制物 神经纤维瘤病	RAS GAP
<i>OST</i>	转染		交换者
<i>Harvey-Kirsten, N-RAS</i>	HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; 转染	许多人类肿瘤中的 点突变	信号级联
<i>VAV</i>	转染		S112/S113; 交换者
核蛋白和转录因子			
<i>BRCA1</i>	可遗传的抑制物	乳腺癌/卵巢癌	定位未决
<i>BRCA2</i>	可遗传的抑制物	乳腺癌	功能未知
<i>ERBA</i>	鸟类成红细胞增生病毒		甲状腺激素受体 (转录)
<i>ETS</i>	鸟 E26 病毒		DNA 结合
<i>EVII</i>	MuLV 启动子插入	AML	转录因子
<i>FOS</i>	FBI/FBR 鼠骨肉瘤病毒		c-JUN 的一个转录因子

<i>GLI</i>	扩增的神经胶质瘤	神经胶质瘤	锌指, 刺猬信号传导途径中的 肘中断同源物, 抑制性连接 PTC 和刺猬
<i>HMGILIM</i>	易位 <i>t</i> (3:12) <i>t</i> (12:15)	脂肪瘤	基因融合高迁移组 HMGIL-C (XT-钩)和转录因子 LIM 或 酸性结构域
<i>JUN</i>	ASV-17		转录因子 AP-1 与 FOS
<i>MLL/VHRX+ELI/MEN</i>	易位/融合 ELL 和 MLL Trithorax-样基因	急性髓细胞白血病	DNA-结合及甲基转移酶 MLL 与 ELIRNA pol II 延伸 因子的基因融合
<i>MYB</i>	禽类成髓细胞瘤病毒		DNA 结合
<i>MYC</i>	鸟 MC29; 易位 B 细胞 淋巴瘤; 启动子插入; 禽 类白血病病毒	伯基特淋巴瘤	与 MAX 伴侣 DNA 结合; 细 胞周期蛋白调节; 与 RB? 互 作; 调节细胞调亡?
<i>N-MYC</i>	扩增的	成神经细胞瘤	
<i>L-MYC</i>		肺癌	
<i>REL</i>	禽类网状内皮组织增殖 病毒		NF-κB 家族转录因子
<i>SKI</i>	鸟 SKV770 逆转录病毒		转录因子
<i>VHL</i>	可遗传的抑制物	Von Hippel-Landau 综合征	负调节物或 elongin; 转录延 伸复合物
<i>WT-1</i>		肾母细胞瘤	转录因子
细胞周期 / DNA 损伤应			
答 ¹⁰⁻²¹			
<i>ATM</i>	遗传性异常	共济失调-毛细管 扩张症	蛋白/脂质激酶同源物, P53 途径中上游的 DNA 损伤应

答

<i>BCL-2</i>	易位	滤泡性淋巴瘤	细胞凋亡
<i>FACC</i>	点突变	C 组范康尼氏贫血症 (白血病毒素质)	
<i>MDA-7</i>	脆性位点 3p14.2	肺癌	组氨酸三联体相关的二腺苷 5',3' 四磷酸不对称水解酶
<i>hMLI/MutL</i>		HNPCC	错配修复; MutL 同源物
<i>hMSH2/MutS</i>		HNPCC	错配修复; MutS 同源物
<i>hPMS1</i>		HNPCC	错配修复; MutL 同源物
<i>hPMS2</i>		HNPCC	错配修复; MutL 同源物
<i>INK4/MTS1</i>	在 9p21 邻近 INK-4B; CDK 复合物	候选的 MTS1 抑制物以及 MLM 黑素瘤基因	p16 CDK 抑制剂
<i>INK4B/MTS2</i>		候选抑制物	p15 CDK 抑制剂
<i>MDM-2</i>	扩增的	肉瘤	负调节物 p53
<i>p53</i>	与 SV40 T 抗原关联	突变 >50% 的人肿瘤; 包括遗传性 Li-Fraumeni 综合征	转录因子; 关卡控制; 细胞凋亡
<i>PRAD1/BCL1</i>	与甲状旁腺激素或 IgG 易位	甲状旁腺腺瘤; B-CLL	细胞周期蛋白 D
<i>RB</i>	遗传性视网膜母细胞瘤; 与许多 DNA 病毒肿瘤抗原关联	视网膜母细胞瘤; 骨肉瘤; 乳腺癌; 其他散发性癌	与细胞周期蛋白/cdk 相互作用; 调节 E2F 转录因子
<i>XPA</i>		着色性干皮病; 皮肤癌素质	切除修复; 光产物识别; 锌指

f) 其他药剂

认为其他药剂可以与本发明联合应用以提高治疗的治疗功效。与化学疗法联合应用的一种治疗形式包括高热疗法，这是一个患者组织被暴露于高温 (高达 106°F) 的过程。外部或内部加热器可包括在局

部、区域、或全身的高热疗法应用中。局部高热疗法包括向小区域例如肿瘤施热。可利用来自身体外部装置的靶向肿瘤的高频波从外部产热。内热可包括无菌探针，包括细加热电线或充满热水的中空管，植入的微波天线或射频电极。

患者的器官或肢体被加热用于区域治疗，利用产生高能的装置，例如磁铁来实现。作为选择，患者的部分血液可被取出并加热，之后再灌注到将要内部加热的区域。全身加热可在肿瘤已经扩散遍布全身的情况下实施。温水毯、热蜡、感应线圈、以及温箱可用于此目的。

激素疗法也可以与本发明联合应用。激素的应用可在某些癌症例如乳腺、前列腺、卵巢、或宫颈癌的治疗中使用，以减低某些激素例如睾酮或雌激素的水平或阻断其效应，并且这通常降低转移的风险。

G. 药物

药学组合物包括有效量的抗 CD26 抗体或抗体偶联物，可溶解或分散于药学上可接受的载体或介质中，以形成治疗性和/或诊断性制剂，然后可以根据本发明的方法给药。

本发明的治疗性抗体可以用标准药学载体配制以便向需要的患者给药。这包括盐水、磷酸缓冲盐水、和其他含水载体、以及脂质体、聚合物微球体以及其他控释递送装置，如本领域所熟知的。

短语“药学或药理学上可接受的”是指当适宜地向动物或人给药时，不产生不良的、过敏的或其他不适当反应的分子实体和组合物。如本文所用的，“药学上可接受的载体”包括任何及所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。这种介质和制剂应用于药学活性物质是本领域熟知的。除了与活性成分不相容的任何常规介质或制剂外，其在治疗组合物中的应用都可以考虑。补充性活性成分也可以加入到该组合物中。

活性化合物通常配制成供肠胃外给药，例如，配制成经静脉内、关节内、鞘内、肌肉内、皮下、病损内或甚至腹膜内途径注射。本领域熟练技术人员在本发明公开内容的启示下，将会知晓含有癌标志抗

体、偶联物、抑制剂或其他药剂作为活性组分或成分的含水组合物的制备。有代表性的，这种组合物可以制备成可注射的液体溶液或者悬液；也可以制备成固体形式，适用于在注射前加入液体而制成溶液或悬液；并且制备物还可以被乳化。

适于注射用的药剂形式包括无菌水溶液或者分散体；配方包括芝麻油、花生油或含水丙二醇；以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有的情况下，所述形式必须是无菌的并且流动程度必须达到容易注射。其在制造和贮存条件下必须是稳定的，并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。

活性化合物作为游离碱或者药学上可接受的盐的溶液可在水中与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当地混合而制备。分散体还可以在甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物以及油中制备。在普通贮存和使用条件下，这些制备物含有防腐剂以阻止微生物的生长。

还提供了中性或盐形式的配方。药学上可接受的盐，包括酸加成盐（与蛋白的游离氨基形成）以及与无机酸如盐酸或磷酸，或者诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的盐。与游离羧基形成的盐还可以得自于无机碱，例如钠、钾、铵、钙、或铁氢氧化物，以及诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等有机碱。

载体还可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、以及液体丙二醇等）、其合适的混合物以及植物油的溶剂或者分散介质。适当的流动性可以通过，例如，利用包衣例如卵磷脂维持，至于分散体可通过维持所需的粒径大小，以及通过利用表面活性物质。预防微生物作用可通过各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等实现。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可通过在组合物中利用吸收延迟剂，例如单硬脂酸铝和明胶实现可注射组合物的延长吸收。

无菌可注射溶液通过在合适的溶剂中将需要量的活性化合物与多种其他上文列举的成分按照需要合并，进而过滤灭菌予以制备。一般而言，分散体通过将多种灭菌活性成分引入含有基础分散介质和需要

的来自那些上文所列举的其他成分的无菌介质中予以制备。至于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，从预先无菌过滤的溶液中，产生活性成分加上任何附加的所需成分的粉末。

还设计了用于局部注射的更为浓缩或高度浓缩的溶液。在这方面，优选利用 DMSO 作为溶剂，因为这会产生极为迅速的渗透，将高浓度活性剂递送到小区域内。

一旦配制，溶液可以与剂型匹配的方式并以诊断或治疗有效量给药。对于水溶液肠胃外给药，举例来说，如果要，溶液应当适当地加以缓冲，并且液体稀释剂首先用足够的盐水或葡萄糖使其等渗。这些特定的水溶液尤其适于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。在其他实施方案中，设计直接的肿瘤内注射。作为选择的，可以采用任何合适的递送介质用于治疗化合物输注或灌注肿瘤。还设计了关于肿瘤的局部或区域性给药。最后，可以进行全身给药。适当的时候还可以应用持续给药，举例来说，当肿瘤被切除并且处理瘤床以消除残留的显微可见的疾病时。还设计经由注射器或导管插入递送。

就这点而言，在本文公开内容的启示下，本领域熟练技术人员会知晓可以使用的无菌含水介质。举例来说，一剂量可以溶于 1 mL 等渗 NaCl 溶液中，或者加到 1000mL 皮下输液中，或注射到打算输注的部位(参见如"Remington's Pharmaceutical Sciences"第 15 版，第 1035-1038 页和第 1570-1580 页)。根据被治疗或诊断的患者的情况，必然会发生剂量的某些变化。负责给药的人将在任何情况下确定对于个体患者的合适剂量。

H. 给药路径

给药路径自然会随病损的位置和性质而变化，包括例如皮内、鞘内、关节内、经皮、肠胃外、静脉内、动脉内、肌肉内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、肿瘤内、灌注、灌洗、直接注射、局部应用、以及口服给药和配方。特别设计肿瘤内注射、或者注射到肿瘤的血管

系统内，用于分离的、实体的、可接近的肿瘤。局部、区域或全身给药也可能是合适的。关于外科手术干预，本发明可在术前、术中、和/或术后应用，以治疗残留或转移的疾病。举例来说，切除的肿瘤床可用含有抗 CD26 抗体的制剂注射或灌注。灌注可在切除后继续，例如，通过将导管留置植入手术部位。还考虑定期的术后治疗。

适当的时候还可以应用持续给药，举例来说，当肿瘤被切除并且处理瘤床以消除残留的显微可见的疾病时。可以经由注射器或导管插入递送。这种持续灌注可在治疗开始之后进行大约 1-2 小时、到大约 2-6 小时、到大约 6-12 小时、到大约 12-24 小时、到大约 1-2 天、到大约 1-2 周或更长的一段时期。一般而言，经由持续灌注的治疗组合物的剂量等同于通过单次或多次注射给予的剂量，在灌注时间内予以调整。进一步认为可通过肢体灌注给予本发明的治疗组合物，特别是在黑素瘤和肉瘤的治疗中。

治疗方案同样可以变化，并且通常取决于肿瘤类型、肿瘤位置、疾病进展、以及患者的健康和年龄。显然，某些类型的肿瘤会需要更具攻击性的治疗，但是同时，某些患者不能耐受更繁重的方案。临床医生最适合于根据治疗剂已知的功效和毒性(如果有的话)作出这样的决定。

在一些实施方案中，考虑包含抗 CD26 抗体的脂质体配方。药制剂的脂质体包囊与常规的药物递送系统相比延长其半衰期。因为较大量可以被保护性包装起来，这给予了如此递送到细胞的药剂剂量强化的机会。

“脂质体”是一个通称，包含许多种类的由围绕起来的脂双层形成的单层或多层脂质载体。利用磷脂来制备根据本发明的脂质体，其可携带净正电荷、净负电荷或者是中性的。联十六烷基磷酸盐可用于赋予脂质体负电荷，而硬脂胺可用于赋予脂质体正电荷。脂质体特征在于磷脂双层膜和内部的含水介质。多层脂质体具有被含水介质分隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮于过量的水溶液中时它们自发形成。脂质成分经历自身重排，之后形成封闭的结构，并在脂双层之间包入水

和溶解的溶质(Ghosh 和 Bachhawat, 1991)。还可以考虑阳离子脂质-核酸复合体, 例如脂质转染胺-核酸复合体。

I. 实施例

下列实施例用于显示本发明优选的实施方案。本领域熟练技术人员会理解以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本发明的实施中可很好发挥作用的技术, 从而可以被认为构成其实施的优选实施方案。不过, 在本发明公开内容的启示下, 本领域熟练技术人员应当理解, 在不偏离本发明的精神和范围的条件下, 对所公开的具体实施方案可以作出许多变化, 而依然能取得类似或相似的结果。

实施例 1

抗 CD26 单克隆抗体的体外和体内抗肿瘤效应

材料和方法

动物. 3-4 周龄雌性 C.B-17 SCID 小鼠得自 Taconic Farms, Inc. 并圈养在小分离笼中, 所有的食物、水和草垫在用前高压灭菌。

细胞. 人 CD30+ 退行性大细胞 T 细胞淋巴瘤细胞系 Karpas 299 是从诊断为 CD30+ 退行性大细胞 T 细胞淋巴瘤的 25 岁白种男性的外周血未成熟 T 细胞(blast T-cell)建立起来的, 携带表面标志 CD4、CD5、HLA-DR 和 CD30, 具有 t (2;5) 易位和重排的 T 细胞受体 β -链基因 (Fischer 等, 1988; Tian 等, 1995)。细胞在 37°C 培养于培养基中, 培养基由补充有 10%FCS、青霉素(100 单位/ml)和链霉素(100 μ g/ml)的 RPMI 1640(GIBCO BRL, Rockville, MD)组成。

抗体. 所用的抗 CD26 单克隆抗体(单抗)为 1F7 和 5F8, 两者都是识别人 CD26 的鼠源抗体, 并且先前已有描述 (Morimoto 等, 1989; Dang 等, 1990b; Torimoto 等, 1992)。所用的对照单抗是识别不在 Karpas 299 细胞系上表达的 CD45 RA 表位的同型对照小鼠 IgG1, 并如先前的描述建立 (Morimoto et 等, 1989)。抗-CD3 和抗-CD2 单抗购自

Coulter。关于蛋白质印迹研究，抗-p21 和抗-p27 获自 Transduction Laboratories；抗-p53 获自 Calbiochem；抗-cdk2、抗-cdk4、抗-细胞周期蛋白 D 获自 Upstate Biotechnology；抗-细胞周期蛋白 E 和抗-PCNA 获自 Santa Cruz Biotechnology；而抗-肌动蛋白获自 Sigma。

试剂. 四氮唑盐 MTT (3,(4,5-二甲基噻唑-2-基) 2,5-二苯基四氮唑溴) (Sigma)在室温下以 5 mg/ml 的浓度溶于无菌 PBS 中，该溶液进一步过滤灭菌并在 4℃ 贮存于暗处。抽提缓冲液制备如下：20% w/v 的 SDS 在 37℃ 溶解于 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) (Sigma)和蒸馏水各 50%的溶液中。pH 通过加入 1M HCl 调节至 4.7。环己酰亚胺 CHX (Sigma)以 20µg/ml 的浓度应用。

体内研究

在肿瘤移植前 1 天，所有的小鼠用 0.2 ml 的抗-asilo GM1 多克隆抗血清 25%(v/v) (Wako, Richmond, VA)腹膜内注射进行预处理，以消除宿主自然杀伤细胞的活性并且促进肿瘤移植 (Tian 等, 1995)。为进行存活研究，通过腹膜内注射方式接种肿瘤细胞，接种肿瘤细胞后 1 天，SCID 小鼠如所示的剂量和程序表以 0.1 ml 无菌盐水的形式接受盐水、同型对照抗体或抗 CD26 单抗 1F7 的腹膜内注射。监测荷瘤小鼠肿瘤的发生和进展，并且对垂死小鼠实施安乐死并作尸检寻找肿瘤证据。另外，对于具有最大维度测量为 2 cm 的可见或可触及肿瘤的小鼠也实施安乐死并作尸检以降低动物的痛苦。对于一些动物，还收集其器官用于组织病理学分析。在一些研究中，SCID 小鼠通过皮下注射方式注射肿瘤细胞，并且在肿瘤最大维度达到 0.5 cm 大小后，隔天肿瘤内注射盐水或 1F7 (5µg 每次注射) 共 7 次注射。然后对小鼠实施安乐死，并收集注射部位的肿瘤块进行组织病理学分析。

在其他研究中，通过皮下注射方式用温育于单独盐水、100 µg 1F7 或同型对照抗体中的 1×10^6 的 Karpas 299 肿瘤细胞对 SCID 小鼠进行注射。随后，自肿瘤细胞接种后 1 天起，对 SCID 小鼠以 0.1 ml 无菌盐水的形式隔天给予盐水、同型对照抗体(20µg/注射)或 1F7(20µg/注射)

皮下注射共 10 次注射，位于皮下肿瘤注射的原始部位。记录最初出现可见肿瘤以评价治疗效果。

体外研究

MTT 分析. 如前所述进行细胞生长分析(Hansen 等, 1989)。细胞置于微量反应板中，在总体积为 100 μ l 的单独培养基或加入所述抗体的培养基中温育(50,000 细胞/孔)。在 37 $^{\circ}$ C 温育 48 小时后，向孔中加入 25 μ l MTT 至终浓度为 1 mg/ml。微量反应板接着在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时，然后加入 100 μ l 抽提缓冲液。在 37 $^{\circ}$ C 过夜温育后，在 570 nm 进行 OD 测量。报告的数值代表一式三份孔的平均值，并且平均值的标准误差小于 15%。

免疫荧光. 所有过程在 4 $^{\circ}$ C 进行，并如以前所述 (Dang 等, 1990d) 进行流式细胞仪分析(FACScan, Becton Dickinson)。细胞用合适的抗体着色，用 PBS 冲洗 2 次，然后用山羊抗-小鼠 IgG FITC 着色。细胞在流式细胞计数分析前用 PBS 冲洗 2 次。阴性对照仅用二抗着色。在一些研究中，如上所述向 SCID 小鼠腹膜内接种肿瘤细胞(1×10^6 细胞/小鼠)。当肿瘤可触及时，对动物实施安乐死并收集肿瘤块。从肿瘤块中分离单细胞悬液，并进行流式细胞仪分析。

细胞周期分析. 细胞或者在单独培养基中、或者在 5 μ g/ml 抗体存在的条件下在 37 $^{\circ}$ C 温育。在合适的时间间隔收集细胞，用 PBS 冲洗两次，并重悬于含有 10 μ g/ml 碘化丙锭、0.5%吐温-20 和 0.1% RNA 酶的 PBS，室温放置 30 分钟。然后分析样品的 DNA 含量(FACScan, Becton Dickinson)。细胞碎片和固定物被门控在外(gated out)，并利用 CellQuest 和 ModFit LT 程序定量 G₀/G₁、S 和 G₂/M 群。

SDS-PAGE 和免疫印迹. 在 37 $^{\circ}$ C 温育后，从孔中收集细胞，用 PBS 冲洗，并在由 1% Brij 97、5 mM EDTA、0.02M HEPES pH 7.3、0.15 M NaCl、1 mM PMSF、0.5 mM NaF、10 μ g/ml 抑酶肽、以及 0.2 mM 原钒酸钠组成的裂解缓冲液裂解。在冰上温育 15 分钟后，离心去除核并收集上清液。将由 20% 甘油、4.6% SDS、0.125 M Tris、pH 6.8 和

0.1%溴酚蓝组成的 2×样品缓冲液加入适当小份的上清液中。蛋白样品在标准条件下置于 20%的凝胶上用 mini-Protean II system (Bio-Rad Hercules, CA)进行 SDS-PAGE 分析。为进行免疫印迹,将蛋白质转移到硝化纤维膜上(Immobilon-P, Millipore)。在由 0.1%吐温 20 和 5%牛血清白蛋白在 TBS 中组成的封闭液中于 4℃过夜封闭后,膜在室温下用以封闭液稀释的合适一抗印迹 1 小时。然后用封闭液冲洗膜,并接着在室温下施加以封闭液稀释的合适的二抗 1 小时。二抗是山羊抗小鼠或山羊抗兔 HRP 偶联物(Dako)。然后用封闭液冲洗膜,而且随后通过化学发光检测蛋白(Amersham Pharmacia Biotech)。

结果

CD26 在 Karpas 299 淋巴瘤细胞系上的表达。在肿瘤移植到 SCID 小鼠之前,用流式细胞仪评价 CD26 在 CD30+退行性大细胞 T 细胞淋巴瘤细胞系 Karpas 299 上的表达。如图 1A 所示, Karpas 299 细胞具有高的 CD26 表面表达,而 CD3 和 CD2 表面表达不可检测。另外,与 1F7 温育过夜导致 CD26 表面表达的下降(图 1B),与以前报导的抗 CD26 介导调节正常 T 细胞上 CD26 表面表达的发现相一致(Dang 等, 1990d)。

CD26-介导的抑制细胞生长在 G1/S 关卡。在体外研究中检测了可溶性抗 CD26 抗体的结合对 Karpas 299 细胞和 H9 细胞生长的影响。如图 2A 和图 2B 所示, 1F7 的加入导致细胞生长的下降,如 MTT 的减少所检测到的。5F8 单克隆抗体也对细胞生长施加显著的抑制效应,不过,与 1F7 相比,使用了更高浓度的 5F8。抗 CD26 单抗在测试浓度下对 CD26-阴性细胞系不施加任何生长抑制效应。1F7 对细胞生长的抑制作用的额外证据通过细胞周期分析获得。如表 2 所示, 1F7 的结合造成细胞周期进程在 G1/S 关卡的阻断增强,最终导致细胞代谢和细胞生长的下降,如 MTT 摄取的减少所检测到的。

表 2

抗 CD26-介导的细胞周期停滞在 G1/S

	%G ₀ /G ₁			%S			%G ₂ /M		
	培养基	对照抗体	1F7	培养基	对照抗体	1F7	培养基	对照抗体	1F7
第1天	26.71	25.04	36.04	47.81	47.52	35.98	25.48	27.44	27.98
第2天	56.55	53.81	73.52	24.71	25.96	14.04	18.74	20.23	12.44

Karpas 299 细胞在 37°C 与培养基或抗体(2 µg/ml)温育。在所示的时间间隔, 收集细胞并进行细胞周期分析。数据代表三次独立的研究。

在 CD26-介导的细胞周期停滞后 p21 表达的增强。鉴于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂在 G1/S 关卡所扮演的整体角色, 检测了在抗 CD26 抗体结合后 p21、p27 和 p16 的表达。Karpas 299 细胞中表现出抗 CD26 处理后 p21 表达的增强, 细胞与单独培养基、含有同型对照单抗或 1F7 (2 µg/ml) 的培养基在 37°C 过夜温育, 然后收集细胞, 并进行 SDS-PAGE 和免疫印迹研究。在其他实验中, Karpas 299 细胞用 1F7 (2 µg/ml) 或单独培养基以多种不同的时间间隔处理, 并检测 p21 的表达。发现 p27 的表达不受抗 CD26 单抗结合的影响, 而 p16 的表达在与单独培养基或者在对照抗体和抗 CD26 单抗存在下温育的细胞中不可检测。另一方面, p21 的表达在 CD26 结合后增强。与对照条件下的温育相比, 用抗-1F7 处理导致 p21 的表达增加。用抗-p21 单抗进行蛋白质印迹显示了出现预期的迁移在 21 kd 位置的条带。已知在某些条件下, p21 表达的诱导依赖于 p53 (El-Deiry 等, 1993; El-Deiry 等, 1994)。在 Karpas 299 细胞系中, 与对照相比, 在抗 CD26 处理过的细胞中没有观察到 p53 表达的变化。然而, p53 的功能状态尚未确定。

已知 p21 与细胞周期蛋白和 CDK 形成复合物而抑制 T 细胞周期进程在 G1/S。尽管抗 CD26 抗体结合增强了 p21 的表达, 细胞周期蛋白 D、细胞周期蛋白 E、cdk2 和 cdk4 的蛋白水平保持不变, 所述蛋白全部都存在于细胞周期蛋白/CDK/p21 复合物中。另外, PCNA 蛋白

水平不受抗 CD26 处理影响。在抗 CD26 结合到 CD26+ H9 细胞系后得到相似的数据。还显示了 p21 表达增强在用 1F7 处理 3 小时之内可检测到，其水平在持续的抗体处理期间升高。

p21 表达增强依赖于重新蛋白合成。为了测定在抗 CD26 结合之后 p21 表达的增强是否依赖于增加的蛋白合成，在存在和缺乏蛋白合成抑制剂环己酰亚胺(CHX)的条件下检测 p21 的表达。在用 1F7 处理的细胞中观察到 p21 的表达，而由 1F7 和 CHX 处理的细胞中没有。因此，CD26 结合后 p21 的表达依赖于重新蛋白合成。

1F7 在携带 Karpas 299 的 SCID 小鼠体内肿瘤模型中的抗瘤效果。抗 CD26 单抗 1F7 对于 Karpas 299 生长的影响也在 SCID 小鼠肿瘤模型中加以检测。为此，将 1×10^6 Karpas 299 细胞通过腹膜内注射植入 SCID 小鼠，并使肿瘤形成。随后，取出肿瘤块并建立单细胞悬液。在体内模型中肿瘤形成过程不影响 CD26 表面表达。例如，如图 3A 和图 3B 中所示，在肿瘤植入 SCID 小鼠后的 CD26 表达与肿瘤移植前其水平相似。死后对腹膜内肿块的组织切片的组织病理分析也显示了 CD26 的存在。

SCID 小鼠通过腹膜内注射接种 Karpas 299 细胞(1×10^6 细胞/小鼠)，并且自肿瘤接种后第一天起，隔天用盐水、同型对照抗体或 1F7 按照所示的剂量开始处理，总共 10 次腹膜内注射。如图 4A 所示，用 $5 \mu\text{g}$ /注射 1F7 处理的小鼠比那些用盐水 ($p < 0.0001$) 或 $5 \mu\text{g}$ /注射同型对照抗体 ($p < 0.001$) 处理的小鼠有统计学显著意义的存活优势。类似的，用 $10 \mu\text{g}$ /注射 1F7 处理的小鼠与用生理盐水处理的小鼠($p < 0.0001$) 或用 $10 \mu\text{g}$ /注射同型对照抗体处理的小鼠 ($p < 0.001$) 相比的存活优势有统计学意义。数据还显示 $5 \mu\text{g}$ /注射和 $10 \mu\text{g}$ /注射的 1F7 剂量之间在存活方面没有统计学上显著的差异($p=0.7$)。

对小鼠用更高剂量肿瘤细胞(3×10^6 细胞/小鼠)腹膜内注射，并且随后通过腹膜内注射单独盐水、同型对照抗体($20 \mu\text{g}$ /注射)、或者 1F7 以 $5 \mu\text{g}$ /注射($p < 0.05$)、 $10 \mu\text{g}$ /注射($p < 0.05$)或 $20 \mu\text{g}$ /注射($p < 0.01$)的剂量进行处理，隔天给予，共计 10 次注射，与最初用较低剂量的肿瘤细胞

注射处理的小鼠相比，再次地表现出没有统计学上显著的存活优势。用 20 μ g/注射剂量的 1F7 处理的小鼠与那些用 20 μ g/注射剂量的同型对照抗体处理的小鼠($p < 0.01$)相比具有统计学显著意义的存活优势。

比较用不同 1F7 剂量处理的小鼠，那些用 20 μ g/注射处理的比那些用 5 μ g/注射 1F7 剂量处理的具有统计学显著意义的存活优势($p < 0.01$)。用 20 μ g/注射剂量的 1F7 处理的小鼠与那些用 10 μ g/注射剂量处理的相比，也倾向于具有更大的生存优势 ($p=0.2$)。同样的，用 10 μ g/注射的 1F7 剂量处理的那些与 5 μ g/注射相比，倾向于具有更大的存活优势的趋势($p=0.09$) (图 4B)。这些数据表明抗体治疗的功效取决于存在的肿瘤的相对量。

死后组织切片的组织病理分析显示对照条件下处理的荷瘤小鼠在局部部位和远处器官发生肿瘤浸润。在另一方面，1F7 处理的小鼠在这些部位没有肿瘤涉及的迹象。因此，抗 CD26 抗体还防止转移肿瘤生长。

还证明了 1F7 在 SCID 小鼠模型中的抗癌效果。为此，对 SCID 小鼠通过皮下给药接种 1×10^6 Karpas 299 细胞。在形成可见的肿块后，对小鼠接着肿瘤内注射单独的盐水或 1F7 (5 μ g/注射)进行处理，隔天给予共 7 次注射。组织病理学分析显示 1F7 处理导致肿瘤坏死，大部分肿瘤经历凝固性坏死。相比之下，盐水处理导致肿瘤细胞在肿块的绝大部分中存活。用同型对照抗体以 5 μ g/注射处理产生与盐水处理相似的结果，发现大多数肿瘤细胞在肿块中存活。

还测定了在皮下注射肿瘤细胞以及用盐水、1F7 或同型对照抗体皮下处理之后最初出现 Karpas 299 肿瘤所需的时间。为进行这些研究，对 SCID 小鼠皮下注射在单独盐水、100 μ g 1F7 或 100 μ g 同型对照抗体中温育的 1×10^6 Karpas 299 细胞。随后，在肿瘤细胞接种后 1 天起，SCID 小鼠接着以 0.1 ml 无菌盐水的形式隔天接受盐水、同型对照抗体(20 μ g/注射) 或 1F7 (20 μ g/注射)的皮下注射，共计 10 次注射，位于皮下肿瘤注射的原始部位。记录最初出现可见肿瘤的日子以评价治疗效果。

如图 5 所示, 在用不同条件处理的小鼠之间, 在可见肿瘤形成的速率方面存在统计学显著的差异。与那些用同型对照抗体或仅用盐水处理的组(分别是 $p < 0.001$ 和 $p < 0.001$)相比, 1F7 处理组具有较低的肿瘤形成速率, 大多数 1F7 处理的小鼠在研究期间保持无瘤。

实施例 2

抗 CD26 单抗 1F7 抑制 T 淋巴细胞增殖

并使细胞周期停滞在 G1/S, 伴有增强的 p21^{Cip1} 表达

方法

细胞制备和培养. 根据以前描述的方法(Sugita 等, 1992)通过在体外刺激人外周血淋巴细胞建立人 T 细胞克隆。人 Jurkat T 细胞系源自 ATCC。Jurkat 细胞系包括: 1)野生型 CD26 转染的 Jurkat 细胞系(J. C26/DP+), 2)由在 630 位推定的催化丝氨酸残基处含有丙氨酸的突变 CD26 转染的 Jurkat 细胞系, 产生突变的 CD26 阳性/DPPIV 阴性 Jurkat 转染体(J. C26/DP-), 以及 3)未转染的亲本 Jurkat 细胞(Jwt) (Tanaka 等, 1992; Tanaka 等, 1993)。Jurkat 转染体以 1×10^6 /ml 的浓度在 37°C 培养于培养基中, 培养基由补充有 10%FCS、青霉素(100 单位/ml)、链霉素(100 μ g/ml) (Life Technologies Inc.) 和 G418 (500 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的 RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) 组成。未转染的亲本 Jurkat 细胞维持在不含 G418 的相同培养基中。人外周血单核的细胞(PBMC)从健康成年志愿者中收集, 用 Ficoll/Paque (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ) 离心分离。为获得高度纯化的 T 细胞群, PBMC 被分成 E 花结阳性群并用作为静息 T 细胞, 正如利用 FITC-标记的抗-CD3 单抗(BD PharMingen, San Diego, CA)通过流式细胞仪分析 (FACScaliburTM, Nippon Becton Dickinson Co., Ltd., Tokyo, Japan)所测定的, 纯度 > 95%。T 细胞克隆在含 IL-2(10ng/ml; PeproTech EC Ltd., London, U. K.)的培养基中维持, 并每 2-3 周用照射的(30Gy)异源 PBMC

(1.0×10^5 /ml) 再刺激 (Sugita 等, 1992)。细胞生存力用锥虫蓝 (Sigma-Aldrich) 染料排斥法检测。

抗体和试剂. 抗 CD26 单抗 1F7 和 5F8, 以及同型对照单抗 4B4 (CD29 单抗) 是以前所描述的 (Morimoto 等, 1989; Torimoto 等, 1992; Morimoto 等, 1985, 并入本文作为参考)。抗-CD3 单抗 (OKT3) 也在别处有描述 (Kung 等, 1979, 并入本文作为参考)。下列抗体和试剂购自于 BD PharMingen: FITC 标记的抗-溴脱氧尿苷 (BrdU)、抗-p21^{Cip1}、抗-p27^{Kip1}、抗-p53、抗-细胞周期蛋白 D1、抗-CDK4、抗-CDK-6、抗-ERK 以及 7-氨基放线菌素 D (7-AAD)。小鼠单克隆抗-磷酸酪氨酸 4G10 和抗- β -肌动蛋白购自于 Sigma-Aldrich, 而抗-磷酸化 ERK 来自 Santa Cruz (Delaware Avenue, CA)。用于刺激细胞和抑制信号转导的试剂的来源和工作浓度如下: OKT3 (0.05 μ g/ml)、PMA (10 ng/ml; Sigma-Aldrich)、诺考达唑 (500 ng/ml 来自 1 mg/ml 的 DMSO 贮液; Sigma-Aldrich)、PD98059 (10 μ M 来自 10 mM 的 DMSO 贮液; BIOMOL, Plymouth Meeting, PA)、以及 U0126 (10 μ M 来自 10 mM 的 DMSO 贮液; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA)。在开始与单抗培养之前细胞用每种抑制剂处理 30 分钟。

流式细胞仪分析. 所有步骤在 4 $^{\circ}$ C 进行, 并且用 FACSCaliburTM (Nippon Becton-Dickinson) 利用标准 CELLQuestTM 获取/分析软件 (Becton-Dickinson) 进行流式细胞仪 (FCM) 分析。细胞用合适的抗体着色, 并在 FCM 分析前用冰冷的 PBS 冲洗两次。

细胞周期分析. 细胞 (1×10^6 /孔) 在 37 $^{\circ}$ C 下于单独培养基中或者在所示浓度的 1F7、5F8 或同型对照单抗 (4B4) 存在下培养, 有或无诺考达唑。在应用抑制剂的实验中, 在与抗 CD26 单抗温育之前, 1×10^6 细胞与所示浓度的各种抑制剂于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。在合适的时间间隔, 细胞用 10 μ M 的 BrdU 在 37 $^{\circ}$ C 脉冲最后 1 小时。然后收集细胞, 并用冰冷的 PBS 冲洗两次。固定、透化、以及用 FITC 标记的抗-BrdU 和 7-AAD 对细胞进行免疫着色根据 BrdU 流式细胞仪试剂盒的 BD PharMingen 指导手册进行。然后样品用 FACSCaliburTM 在制备后 1

小时内进行分析。在将细胞碎片和固定物分选出去后，通过施加于 BrdU 相对 7-AAD 散点图的区域门控，FCM 分析使得能够对停留在细胞周期的 G0/G1、G2/M 以及 S 期的细胞亚群进行区分。G0/G1、S 和 G2/M 群用 CELLQuest™ 程序(Becton-Dickinson) 定量。

溶胞产物的制备和蛋白质印迹分析. 在 37℃ 温育后，从孔中收集细胞，用 PBS 冲洗，并在 RIPA 裂解缓冲液中进行裂解，该缓冲液由 1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、5mM EDTA、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、1mM PMSF、0.5mM NaF、10 µg/ml 抑酶肽以及 0.02mM Na₃VO₄ 组成。为检测磷酸酪氨酸蛋白，温育后的细胞用冰冷的含有 5mM EDTA、10mM NaF、10mM 焦磷酸钠和 0.4mM Na₃VO₄ 的 PBS 冲洗。离心细胞，然后溶解于裂解缓冲液中(1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、5mM EDTA、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.15 M NaCl、1mM PMSF、10 mM 碘乙酰胺、10mM NaF、10 µg/ml 抑酶肽以及 0.4 mM Na₃VO₄)。通过超速离心除去沉淀后，溶胞产物在还原条件下，在合适浓度的凝胶上利用 mini-Protean II system (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA) 进行 SDS-PAGE 分析。关于免疫印迹，蛋白被转移到处于 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸以及 20% 甲醇中的聚偏二氟乙烯膜上(Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA)，并且膜在有含 5% 脱脂奶的 0.05% 吐温 20 的 PBS 中于室温封闭 1 小时。特定抗原通过相应的单抗继之以 HRP-偶联的抗-小鼠 Ig (Amersham Pharmacia) 探测。蛋白质印迹通过增强化学发光技术 (NEN, Boston, MA) 观察。

体外细胞增殖分析. 细胞增殖通过 [³H]-胸苷掺入测定 (ICN Radiochemicals, Irvine, CA)。每个实验的所有增殖分析都进行一式三份。每个微量培养板孔中 0.2×10⁶ 细胞在仅有培养基或存在 1F7 (1 µg/ml) 时有或没有 OKT3 和 PMA 刺激的条件于 37℃ 温育。温育 72 小时后，细胞用 [³H]-胸苷 (1µCi/孔) 脉冲培养最后的 8 小时。然后将细胞收集到玻璃滤器 (Wallac, Turk, Finland) 上，并用液体闪烁计数器 (Wallac) 计数放射性。 [³H]-胸苷摄取表示为一式三份样品的平均 cpm。

统计学。用 Student's *t* 检验来确定对照和样品之间的差异是否显著 ($p < 0.05$ 为显著)。

结果

抗 CD26-单抗处理抑制细胞周期进展在 G1/S 关卡。检测了可溶性抗 CD26 抗体结合对用具有 DPPIV 活性结构域(J. C26/DP+)以及没有 DPPIV 活性结构域(J. C26/DP-)的 CD26 的 cDNA 转染的 Jurkat 细胞的细胞周期的影响 (21,22)。为分析细胞周期状态,应用了用 BrdU 脉冲后 FITC 标记的抗-BrdU 和 7-AAD 双色着色的 FCM。为更好地观察细胞周期效应,细胞用诺考达唑处理,其使细胞停滞在 M 期,除非细胞停滞在 G0/ G1 期。用锥虫蓝染料排斥法证实的细胞生存力在有或无诺考达唑的情况下仍然 >95%。如图 6A 所示,抗 CD26 单抗 1F7 加入到 J. C26/DP+ 导致细胞周期进程阻断在 G1/S 关卡。值得注意的是,在 J. C26/DP-或亲本 Jurkat (Jwt) 中未观察到细胞周期停滞在 G1/S 关卡 (图 6A)。在图 6B 中,由诺考达唑引起的 G2/M 积聚在 1F7 未处理的 J. C26/DP+ 中观察到,但在 1F7 处理的 J. C26/DP+ 中没有。这种由诺考达唑所致的 G2/M 积聚效应还在有或无 1F7 的情况下在 J. C26/DP-和 Jwt 中观察到(图 6B)。在另一方面, S 期不受 1F7 处理的影响(图 6C)。这些发现提示细胞周期进程在 G1/S 关卡的效应取决于 CD26 分子本身固有的 DPPIV 酶活性。

抗 CD26 单抗处理后与细胞周期停滞在 G1/S 关卡相关的 p21 表达的增强。通过 FCM 分析密切检测 Jurkat 细胞对 1F7 的细胞应答,揭示 J. C26/DP+ 在开始与 1F7 培养后 6 小时表现出 G1 停滞增加大约 25%(图 7)。在 1F7 处理后 12 和 24 小时, J. C26/DP+ 逐渐丧失其最初的 G0/G1 停滞。值得注意的是,在 J. C26/DP-中,没有观察到细胞周期停滞。这些发现再次提示对细胞周期进程在 G1/S 关卡的效应取决于 DPPIV 的酶活性。1F7 在 0.1-10.0 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的效应是剂量依赖性的。应当注意另一种识别与 1F7 不同的 CD26 表位的抗 CD26 单抗 5F8 没有如 1F7 所观察到的效应(Torimoto 等, 1992)。

因为细胞周期停滞可伴随着 CDKI 的增加和/或细胞周期蛋白或 CDK 的减少,检测了 1F7 结合后各种细胞周期调节蛋白的表达。与对照条件下温育(仅有培养基或 4B4 作为同型匹配的对照单抗处理)相比,用 1F7 处理 J. C26/DP+ 导致 p21^{Cip1} 表达增加,如对蛋白相对水平的蛋白质印迹分析所显示的。

关于蛋白质印迹, J. C26/DP+ 和 J. C26/DP- 与 1F7 温育。然后在所示的培养时期收集细胞,并用合适的单抗通过蛋白质印迹评价 p21^{Cip1} 的表达。细胞提取物的等量上样利用抗- β -肌动蛋白单抗证实。仅有培养基或 4B4 未观察到对 p21^{Cip1} 表达的影响。用 1F7 处理 J. C26/DP- 不导致 p21^{Cip1} 表达的增加。在用 1F7 处理 6 小时之内检测到 p21^{Cip1} 表达的增加,然后逐渐下降,与图 6A 中所示的细胞周期分析一致。

进一步的, J. C26/DP+ 和 J. C26/DP- 与单独培养基、同型对照单抗 4B4 (Iso) 或 1F7 温育 6 小时。然后收集细胞,并用合适的单抗通过蛋白质印迹评价 p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p53、细胞周期蛋白 D1、CDK4 以及 CDK6 的表达。细胞提取物的等量上样利用抗- β -肌动蛋白单抗证实。与 p21^{Cip1} 相比,细胞周期蛋白 D1、CDK4、CDK6、p27^{Kip1} 以及 p53 (与 G1-调节细胞周期蛋白复合物有关) 的表达在用 1F7 处理后 6 小时不变。

应指出这些蛋白的表达在开始与 1F7 培养后的 0-24 小时之间不变。这些结果表明 1F7 刺激导致 p21^{Cip1} 的增量调节,并且通过 CD26 的 DPPIV 酶活性使细胞周期停滞在 G1/S 关卡。

MEK-ERK 途径在 1F7 介导的细胞周期停滞在 G1/S 关卡中扮演重要角色。CD26 分子还显示存在于膜脂筏(raft)中,而 1F7 与 CD26 的连接显示出可增加 CD26 分子募集到筏(Ishii 等, 2001)。脂筏中的 T 细胞受体(TCR)还与其他信号分子相互作用(Janes 等, 1999; Cheukuri 等, 2001),从而诱导信号分子的酪氨酸磷酸化增加。CD26 通过其与关键细胞结构的物理和功能关联而参与必要的 T 细胞信号传导事件(Morimoto 和 Schlossman, 1998; von Bonin 等, 1998; De Meester 等, 1999)。其他研究证明 T 细胞和其他细胞谱系中 Raf-MEK-ERK 途径

的超活化导致关键细胞周期调节物表达的改变和细胞周期停滞在 G1/S 关卡 (Boussiotis 等, 1997; Sewing 等, 1997; Chen 等, 1999)。因此, 关于 p21^{Cip1} 表达, 检测 T 细胞中与 CD26 相关的信号分子的酪氨酸磷酸化。J. C26/DP+、J. C26/DP-和 JwT 与 1F7 温育多种时间段, 即 0、5 和 10 分钟。然后收集细胞, 用 5-20% 梯度 SDS-PAGE 分离, 并用抗-磷酸酪氨酸单抗 4G10 (pY) 通过蛋白质印迹评价酪氨酸磷酸化的状态。细胞提取物的等量上样利用识别 β -肌动蛋白的抗体证实。1F7 处理 J. C26/DP+ 在起始培养后 5 到 10 分钟诱导分子量大约为 40 kDa 的蛋白酪氨酸磷酸化。然而, 在用 1F7 处理 J. C26/DP-和 JwT 后, 没有观察到诱导酪氨酸磷酸化。这些变化在利用同型匹配对照单抗 4B4 的实验中并没有观察到。

为表征 40 kDa 的磷酸化蛋白, 检测了 ERK 的磷酸化状态, 因为先前的工作表明 Raf-MEK-ERK 途径介导抗-CD3 单抗诱导 G1 停滞 (Chen 等, 1999)。ERK 蛋白显示出在用 1F7 处理 J. C26/DP+ 后被磷酸化。关于这个实验, J. C26/DP+ 与单独培养基、同型对照单抗 4B4 (Iso) 或 1F7 温育多种时间段, 即 0、5 和 10 分钟。溶胞产物用抗-磷酸-ERK 印迹, 并用抗-ERK 单抗重新探测。对用 J. C26-或 JwT 的实验没有观察到差别。

为证实这些结果, 检测了抑制 MEK-ERK 途径对 p21^{Cip1} 表达的作用。细胞在缺乏或存在 MEK-特异性抑制剂 PD98059 的情况下用 1F7 处理 6 小时。与 ERK 磷酸化相关的 p21^{Cip1} 的表达增强明显地因 MEK 抑制剂的存在而受到抑制。应指出凝胶泳道的等量上样利用识别 ERK 的抗体通过探测蛋白质印迹证实。这些结果表明 1F7 处理后 p21^{Cip1} 的诱导是通过 MEK-ERK 途径介导的。

为进一步确定在用 1F7 处理后, MEK-ERK 途径在 T 细胞的细胞周期调控中的作用, 在存在或不存在 MEK-特异性抑制剂 PD98059 和 U0126 的情况下, 通过 FCM 进行细胞周期分析。与关于 p21^{Cip1} 表达的结果一致, 1F7 处理的 J. C26/DP+ 的 G0/G1 停滞因 MEK 特异性抑制剂的存在而被中断(图 8), 这在 J. C26/DP-和 JwT 中没有观察到。这

些发现表明抗 CD26 处理通过激活 MEK-ERK 途径, 在 T 细胞中诱导细胞周期停滞在 G1/S 关卡, 导致 CDKI p21^{Cip1} 表达的增强。

抗 CD26 单抗 1F7 处理抑制 T 细胞克隆的增殖。已经描述了在 T 细胞增殖期间以及在自身免疫倾向性 BXSB 的 CD4⁺记忆 T 细胞中 p21^{Cip1} 的增量调节 (Nourse 等, 1994; Sabzevari 等, 1997)。此外, p21^{Cip1} - 缺陷小鼠积聚异常量的 CD4⁺记忆 T 细胞, 并发生对核抗原的耐受丧失(Sabzevari 等, 1997)。考虑到这些发现, 为定义 1F7 介导的 p21^{Cip1} 增强对人外周 T 细胞增殖的生物学效应, 检测了可溶性抗 CD26 抗体结合对来源于 PBMC 的人 T 细胞克隆增殖的影响。如图 9 所示, 1F7 加入人 T 细胞克隆导致细胞增殖的下降, 如 [³H]-胸苷摄取所测定的。值得注意的是用抗 CD26 单抗 5F8(Morimoto 等, 1992; Dong 等, 1998)或同型对照抗体 4B4 处理后没有抑制效应的事实。与上述用 Jurkat 转染体的实验结果相似, 用 1F7 处理后, T 细胞克隆中的 p21^{Cip1} 表达也增强(图 4B)。在 PHA blast T 细胞中也观察到 1F7 增强 p21^{Cip1} 表达的效应, 虽然是较小的程度, 但不在静息 T 细胞中。关于这个实验, T 细胞克隆、10 天 PHA blast T 细胞、以及新鲜分离的 T 细胞与单独培养基或 1F7 温育 72 小时。然后制备溶胞产物, 用识别 p21^{Cip1} 的单抗进行蛋白质印迹。细胞提取物的等量上样利用识别 β -肌动蛋白的单抗证实。这些结果显示在活化的 T 细胞例如 T 细胞克隆和 PHA blast T 细胞中, T 细胞增殖由 1F7 处理通过诱导 p21^{Cip1} 而被抑制。

本发明人证明抗 CD26 单抗 1F7 结合导致细胞周期停滞在 G1/S 关卡, 并且 CD26 的参与通过增强细胞周期调节蛋白 p21^{Cip1} 的表达, 诱导 CD26 Jurkat 转染体的 G1 停滞。这种效应是通过激活 MEK-ERK 途径介导的。除了 CD26 Jurkat 转染体外, 在来源于人 PBMC 的 T 细胞克隆和 PHA blast T 细胞中也观察到增殖的抑制和 p21^{Cip1} 表达的增强。

II 类 MHC-限制性人 CD4⁺ T 细胞克隆的抗原敏感性被证明在刺激后随着时间逐渐增加。这由以下事实证实: 培养物中需要更少的抗原, 以及用于 T 细胞活化的每个抗原呈递细胞(APC)的肽-MHC 复合

体数目下降, 和对 II 类 MHC 阻断的抑制作用的抗性增加(Lehaman 等, 1989)。以前证明抗原敏感性的增加伴随着 CD26、LFA-1 和 VLA-1 的细胞表面表达增加, 而 TCR 和一系列其他 T 细胞表面分子的表达保持不变(Falcioni 等, 1996)。本发明还证明晚期记忆 T 细胞表型发生在体内活化的 T 细胞中。此外, 利用合适的单抗, 用 CD26 单抗处理及 MHC 阻断被证明有助于抑制活化的记忆 T 细胞增殖(Falcioni 等, 1996)。此外, 抗 CD26 单抗对 T 细胞增殖的抑制作用的分子机制已经证明是通过细胞周期停滞在 G1/S 关卡以及通过激活 MEK-ERK 途径诱导 p21^{Cip1}。

另外, T 细胞中的 CD26 分子存在于膜脂筏中, 因此, CD26 与抗 CD26 单抗的交联诱导 CD26 分子聚集进入脂筏。该过程通过信号分子, 例如 Cbl、ZAP-70、ERK、p56^{Lck} 和 CD3- ζ 的酪氨酸磷酸化最终导致 T 细胞活化(Ishii 等, 2001)。TCR 还通过募集各种表面和胞质衔接蛋白到脂筏中而发挥其信号转导作用(Janes 等, 1999; Cheukuri 等, 2001)。作为 TCR 信号作用的负调节物, Rap1、Raf 和 Cbl-b 已经显示在脂筏中聚集(Boussiotis 等, 1997; Sewing 等, 1997; Leo 和 Schraven, 2001)。关于这一点, 已经证明 Raf-MEK-ERK 信号传导强度增加可引发 T 细胞周期在 G1/S 关卡停滞, 伴随着 p21^{Cip1} 表达的增加。同时, 高剂量抗-CD3 单抗通过激活 Raf-MEK-ERK 途径诱导细胞周期停滞, 导致 p21^{Cip1} 在 T 细胞中表达, 并且不能下调 p27^{Kip1} 的表达 (Sewing 等, 1997; Chen 等, 1999)。

越来越多的证据表明 DPPIV 酶活性在 CD26 介导的 T 细胞共刺激以及 T 细胞免疫应答中具有重要的作用(Morimoto 和 Schlossman, 1998; von Bonin 等, 1998; De Meester 等, 1999)。本发明证明在用抗 CD26 单抗 1F7 处理 T 细胞后, DPPIV 酶活性在 p21^{Cip1} 的诱导中起作用。据报导 CD26/DPPIV 通过在 N-末端切割选择的趋化因子以修饰其生物功能, 来调节多种细胞功能(De Meester 等, 1999; Oravecz 等, 1997; Proost 等, 1998)。鉴于其作为丝氨酸蛋白酶切割某些生物因子的能力, 可以想到 CD26 的 DPPIV 酶活性似乎在 T 细胞中通过切割相关的生物

因子调节 ERK 的磷酸化并诱导 p21^{Cip1}。设计了旨在鉴定负责调节 p21^{Cip1} 表达的 CD26/DPPIV-相关因子的实验。

1F7 具有比 5F8 更强的效力这一发现证明选择的 CD26 表位的参与是在单抗处理后介导细胞周期停滞、抑制细胞增殖、以及诱导 p21^{Cip1} 表达中的重要因子。还应该注意, 1F7 具有很强的辅助促有丝分裂 (co-mitogenic) 能力, 而 5F8 没有这种活性 (Dong 等, 1998)。因而, 1F7 和 5F8 所识别的 CD26 分子上的表位具有截然不同的功能效果。

活化的记忆 T 细胞表达高水平的 CD26, 并且这种表型的晚期记忆 T 细胞与体内和体外抗原敏感性增加相关 (Falcioni 等, 1996)。体内研究揭示很多 CD26+ T 细胞发现于多发性硬化症和类风湿性关节炎患者的炎症组织中 (Mizokami 等, 1996; Eguchi 等, 1989; Hafler 等, 1985), 指示 CD26+ T 细胞作为效应 T 细胞发挥作用。因此, CD26 可作为免疫治疗剂应用。事实上, 抗 CD26 治疗据报导在同种异体骨髓移植术后可有效地降低对受体耐药的急性 GVHD 的发生率 (Bacigalupo 等, 1985; De Meester 等, 1993), 虽然这些临床结果涉及的确切机制尚未阐明。本数据显示通过 CD26 对活化 T 细胞进行细胞周期调节可用于通过抑制细胞增殖控制急性 GVHD。结合观察到 p21 基因转染增强环孢菌素 A-介导的抑制淋巴细胞增殖 (Ashwani 等, 2000), 抗 CD26 单抗疗法提供了诱导免疫抑制的可供选择的一种策略, 其可能比目前对常规药剂所见到的副作用毒性更小。

实施例 3

临床试验

这一部分涉及发展单独应用抗 CD26 抗体或联合其他治疗剂的抗癌疗法的人类治疗方案。尽管这里只描述了癌症相关的治疗, 这个实施例还可应用于治疗免疫疾病如自身免疫、GVHD 以及预防器官移植排斥反应。

在本发明公开内容的启示下, 本领域熟练技术人员会知晓进行临

床试验的各种要素，包括患者治疗和监测。下列信息是作为一般性指导给出的，用于在临床试验中建立本文所述的以抗 CD26 抗体为基础的治疗方法，单独或者与其他癌症疗法中常规使用的辅助治疗联合。

一期临床试验的候选者是所有常规疗法失败的患者。最初大约有 100 个患者得到治疗。他们的年龄范围从 16 到 90（中值 65）岁。患者将得以治疗，获得样本，无性别、种族、人种偏性。对于此患者群体，大约 41% 为妇女，6% 为黑人，13% 为西班牙人，3% 为其他少数民族。这些估计基于过去 5 年中在 MD Anderson Cancer Center 所观察到的连续病例。

最理想的是患者表现出充足的骨髓功能（定义为外周绝对粒细胞计数 $> 1,000/\text{mm}^3$ ，而且血小板计数为 $100,000/\text{mm}^3$ （除非由于骨髓中涉及肿瘤而减少）、充足的肝功能（胆红素 $\leq 1.5\text{mg/dl}$ ，SGOT/SGPT $< 4 \times$ 正常上限）以及充足的肾功能（肌酐 $\leq 1.5\text{mg/dl}$ ）。

研究样本根据现有得到许可的项目和方案从外周血或骨髓获得。有些研究材料从作为患者护理的一部分所取的标本中得到。

上述抗 CD26 抗体治疗将在试验性的一周基础上向患者局部或全身给药。典型的治疗过程可包括在 7 到 21 天的时间周期内递送大约 6 剂。经临床医生的选择，治疗方案可以每三周或在更低频率的（每月，每双月，每季度等）基础上继续 6 剂。当然，这些只是治疗的例示性时间，熟练的从业者将容易地认识到许多其他时间过程也是可能的。

给药方式可以是局部给药，包括，通过肿瘤内注射和/或者通过注射入肿瘤血管系统、气管内、鞘内、内窥镜的、皮下、和/或经皮。给药方式可以是全身的，包括，静脉内、动脉内、腹膜内和/或口服给药。

抗 CD26 抗体静脉内的给药剂量范围是从 $1\mu\text{g/kg}$ 到 1g/kg ，尽管精确的剂量将依赖于以后的测试。在一些实施方案中，抗体作为脂质体制剂或潜在地通过其他人工载体给药。抗体还可以作为无活性的部分给药，遇到表达 CD26 的肿瘤细胞才被激活。例如，抗体脂质体制剂的静脉内给药范围由 0.01 到 $100\text{mg/m}^2/\text{天}$ 。当然，熟练技术人员会理解尽管这些剂量范围提供有用的指导，取决于个体患者的需要，疾

病、性别、身体状况、年龄和其他一般健康状况方面的因素，有经验的内科医师在向患者给药时，会对剂量做出适当的调整。对于给药方法、给药路径也是同样的。

为监控疾病的过程和评估癌细胞杀伤，认为每月患者应接受合适的测试予以检查。为评估药效，内科医师根据癌/肿瘤的类型确定监控参数，并涉及监控肿块减小的方法，例如通过计算机体层摄影（CT）扫描、PET扫描、镓扫描，检测细胞表面上和血清中 CD26 抗原的存在，以及在一些情况下额外检测其他肿瘤标志如在前列腺癌中的 PSA（前列腺特异性抗原）、生殖肿瘤中的 HCG、结肠癌中的 CEA、卵巢癌中的 CA125、淋巴瘤中的 LDH 和 B2 微球蛋白等等。用于监控患者的进展和治疗效果的测试包括：体检、X 射线、验血、骨髓检查和其他临床实验室方法。在 1 期研究中给予的剂量是逐步升高的，如在标准 1 期临床期试验中所做的那样，也就是说，剂量将逐渐升高，直到达到最大可耐忍的范围。

临床反应可由可接受的测量来定义。例如，完全反应可定义为癌细胞的完全消失，而部分反应可定义为的癌细胞或肿块减少 50%。

典型的治疗过程将取决于个体患者和治疗的疾病，以本领域熟练技术人员公知的方式变化。例如，T 细胞淋巴瘤患者可能以 4 周的周期治疗。治疗持续时间也类似地变化，尽管在对患者没有观察到不良作用时可能应用较长的持续时间，而如果患者没有反应或遭遇不能耐受的毒性则治疗时间较短。

按照本发明公开内容，所有本文公开和要求保护的组合物和/或方法无需过度的试验都可以制备和执行。尽管本发明的组合物和方法是以优选的实施方案的形式描述的，对于本领域的熟练技术人员显然的是，在不偏离本发明的观念、精神和范围的情况下，对本文描述的组合物和/或方法以及该方法的步骤、步骤的顺序可施以改变。更具体地，显然某些化学和生理学相关的物质可替代本文描述的物质，而仍然达到相同或相似的结果。所有这些对本领域熟练技术人员来说是显然的相似替代和修饰均被视为是落在了本发明的精神、范围和观念之中，

如所附的权利要求中所限定的。

参考文献

下列参考文献，就其提供例示性操作细节或补充本文所阐述的那些内容的其他细节而言，被特别引入本文作为参考。

美国专利 No. 3,817,837

美国专利 No. 3,850,752

美国专利 No. 3,939,350

美国专利 No. 3,996,345

美国专利 No. 4,196,265

美国专利 No. 4,275,149

美国专利 No. 4,277,437

美国专利 No. 4,340,535

美国专利 No. 4,366,241

美国专利 No. 4,472,509

美国专利 No. 4,676,980

美国专利 No. 4,816,567

美国专利 No. 4,867,973

美国专利 No. 5,021,236

美国专利 No. 5,120,642

美国专利 No. 5,565,332

美国专利 No. 5,693,762

美国专利 No. 6,218,372

美国专利 No. 6,218,372

Abbondanzo, *Ann Diagn Pathol*, 3 (5): 318-327,1990.

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

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, 1988

- Asada et al., Histopathol., 23: 265-270,1993.**
- Ashwani et al., JImmunol. 165: 1882-1888,2000.**
- Bacigalupo et al., Actahaematol. 73: 185-186, 1985.**
- Bauvoiset et al., Br. J. Cancer, 79: 1042-1048, 1999.**
- Boussiotis et al., Science, 278: 124-127,1997.**
- Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).**
- Brown et al. Immunol Ser, 53: 69-82,1990.**
- Campbell et al., J. Mol. Biol., 180: 1-19,1984.**
- Carbone et al., Blood, 86: 4617-4626,1995.**
- Carbone et al., Human Pathol., 25: 1360-1365,1994.**
- Chen et al., JImmunol., 163: 5796-5805,1999.**
- Cheukuri et al., Immunity, 2001; 14: 657-660.**
- Clackson et al., Nature 352,624-628,1991.**
- Dang et al., Cell. Immunol., 125: 42-57,1990.**
- Dang et al., J.Exp. Med., 172: 649-652,1990.**
- Dang et al., J. Immunol., 144: 4092-4100,1990.**
- Dang et al., J linmunol., 145: 3963-3971,1990.**
- Dang et al., J. Immunol., 147:2825-2832, 1991.**
- Dang et al., J. Immunol., 156: 1349-1355,1996.**
- Datto et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 92: 5545-5549,1995.**
- De Meester et al., Immunobiol. 188: 145-158,1993.**
- De Meester et al., Immunobiol., 188: 145-158,1993.**
- Dong et al., Mol. Immunol., 35: 13-21,1998.**
- Eguchi et al., J Immunol., 142: 4233-4240,1989.**
- Eguchiet al., J. Immunol., 142:4233-4240, 1989.**
- El-Deiry et al., Cancer Res., 54: 1169-1174,1994.**

- El-Deiry et al., Cell, 75: 817-825,1993.**
- EP 03089**
- Falcioni et al., Human Immunol., 50: 79-90,1996.**
- Fischer et al., Blood, 72: 234-240,1988.**
- Fleischer, J. Immunol., 138: 1346-1350,1987.**
- Fox et al., J. Immunol., 133: 1250-1256,1984.**
- Gefter et al., Somatic Cell Genet, 3 (2):231-6, 1977.**
- Gerli et al., Clin. Immunol.Immunopathol., 80: 31-37,1996.**
- Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors ayad Ligands. Wu et al., eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104,1991.**
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 Academic Press, 1986.**
- Griffith et al., EMBO J., 12: 725-734,1993.**
- Hafler et al., J Experi. Med., 167: 1313-1322,1988.**
- Hafler et al., NEngl JMed., 312: 1405-1411,1985.**
- Hafleret al., N. Engl. J. Med., 312: 1405-1411,1985.**
- Hansen et al., J. Immunol. Methods, 119: 203-210,1989.**
- Hegen etal., Immunology, 90: 257-264,1997.**
- Ishii et al., Proc Natl. Acad Sci USA, 98 : 12138-12143,2001.**
- Jakobovits et al., Nature 362, 255-258,1993.**
- Jakobovits etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-255,1993.**
- Janes et al., J Cell Biol. 147: 447-461,1999.**
- Johnson et al., Current Opinion in Structural Biology, 3: 564-571,1993,**
- Jones et al., Nature, 321: 522-525,1986.**
- Kahne et al., Cell. Immunol., 189: 60-66,1998.**
- Kameoka et al., Science, 261: 466-469,1993.**

- Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6: 511-519,1976.**
- Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497,1975.**
- Korom et al., Transplantation, 63: 1495-1500,1997.**
- Kozbor,J Immunol. 133, 3001,1984.**
- Kubota et al., Clin. Exp. Immunol., 89: 192-197,1992.**
- Kung et al., Science., 206: 347-349,1979.**
- Lehaman et al., Eur Jltmunol. 19: 1071-1077,1989.**
- LeoandSchraven, Curr Opn Immunol. 13: 307-316,2001.**
- Marks et al., Bio/Technol. 10,779-783,1992.**
- Marks etal., J. Mol. Biol. 222,581-597, 1991.**
- Mattern et al., Immunobiol., 188: 36-50,1993.**
- McCafferty etal., Nature 348,552-553 [1990]**
- Millstein and Cuello, Nature 305,537-539 (1983).**
- Mizokami et al.,JRheumatol. 23: 2022-2026,1996.**
- Mizokami et al., J.Rheumatol., 23: 2022-2026,1996.**
- Morimoto and Schlossman, Immunol. Rev., 161: 55-70,1998.**
- Morimoto et al., Immunol Rev. 161: 55-70,1998.**
- Morimotoet al., J. Immunol., 143: 3430-3439,1989.**
- Morimotoetal., JImmunol., 134: 3762-3769,1985.**
- Morrison et aL, J Exp. Med., 177:1135-1143, 1993.**
- Morton et al., Cancer, 71: 3737-3743,1993.**
- Nakamura et al., In : Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.), Weir et al., (eds). 1: 27,
Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.**
- Nourse et al., Nature. 372: 570-573,1994.**
- Oravec et al., J.Exp. Med., 186 :1865-1872, 1997.**
- PCT Application WO91/00360**
- PCT Application WO 92/200373**
- PCT Application WO 93/08829**

- Proost et al., *JBiol Chem.* 273: 7222-7227,1998.
- Proost et al., *J. Biol. Chem.*, 273: 7222-7227,1998.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*"15th Edition, pages1035-1038 and 1570-1580, 1980.
- Riechmann et al., *Nature*, 332,323-327,1988.
- Rosenberg et al., *Ann Surg.* 210 (4): 474-548,1989
- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319: 1676,1988.
- Sabzevariet al., *Eur JImmunol.* 27: 1901-1910,1997.
- Sewing et al., *Mol Cell Biol.* 17: 5588-5597,1997.
- Sugita et al., *J immunol.*, 149: 3208-3216,1992.
- Suresh et al., *Methods in Enezymology* 121, 210,1986.
- Tanaka et al., *Int. J Cancer*, 64: 326-331,1995.
- Tanaka et al., *Journal of Immunology*, 149 : 481-486,1992.
- Tanaka et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4586-4590,1993.
- Tian et al., *Cancer Res.*, 55: 5335-5341,1995.
- Torimoto et al., *J. Immunol.*, 147: 2514-2517,1991.
- Torimoto et al., *Mol. Immunol.*, 29: 183-192, 1992.
- Traunecker et al., *EMBO* 10,3655-3659, 1991.
- Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536,1988. von Bonin et al., *Immunol Rev.* 161: 43-53,1998.. von Bonin et al., *Immunol. Rev.*, 161:43-53, 1998.
- Waga et al., *Nature*, 369: 574-578,1994.
- Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21,2265-2266 (1993)
- Wesley et al., *J. Exp. Med.*, 190: 311-322,1999.
- Xiong et al., *Nature*, 366: 701-704,1993.
- Yang and Kornbluth, *Trends Cell Biol.*, 9: 207-210,1999.

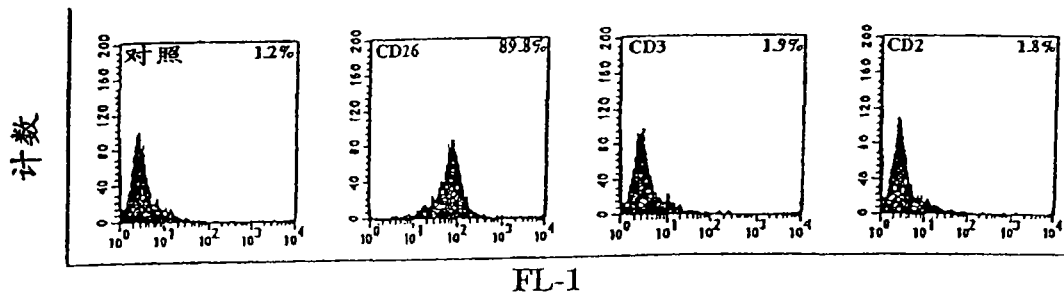


图 1A

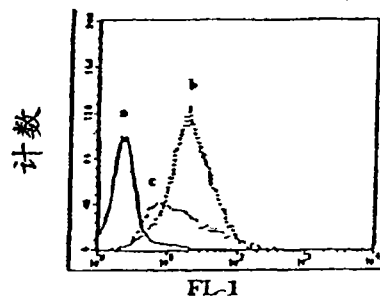


图 1B

A

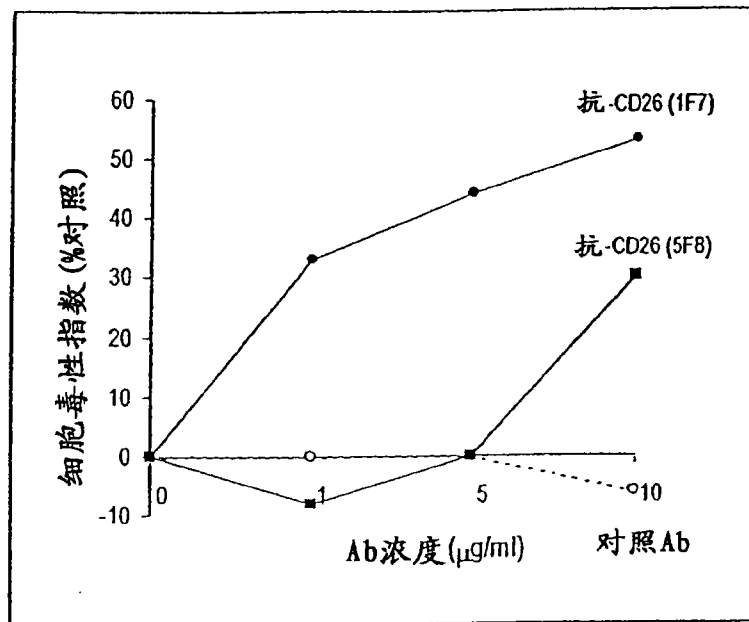


图 2A

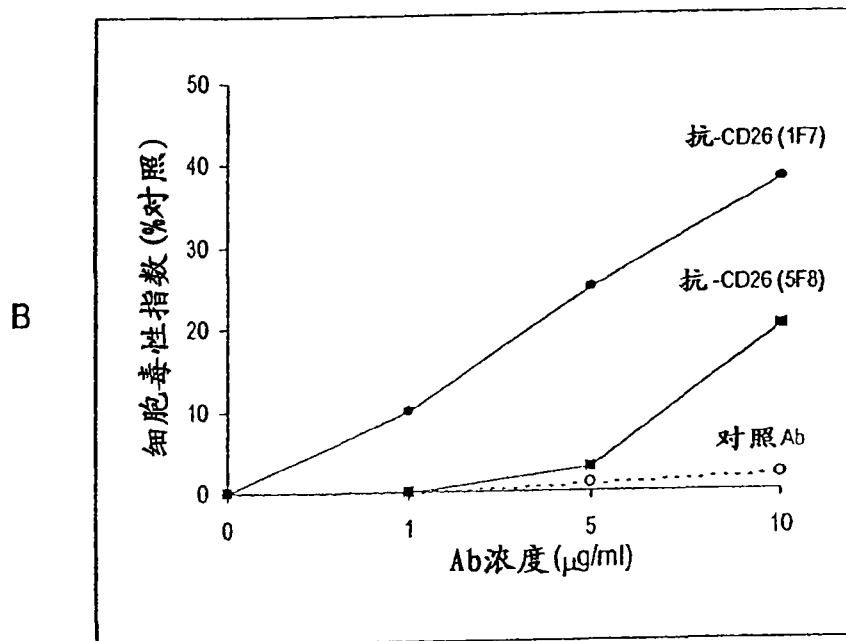


图 2B

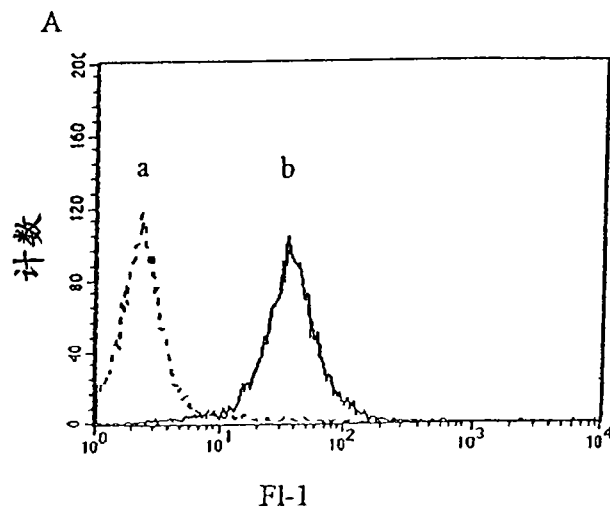


图 3A

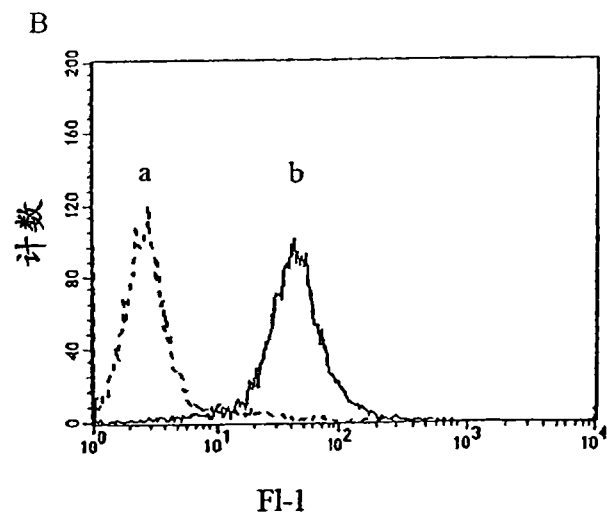


图 3B

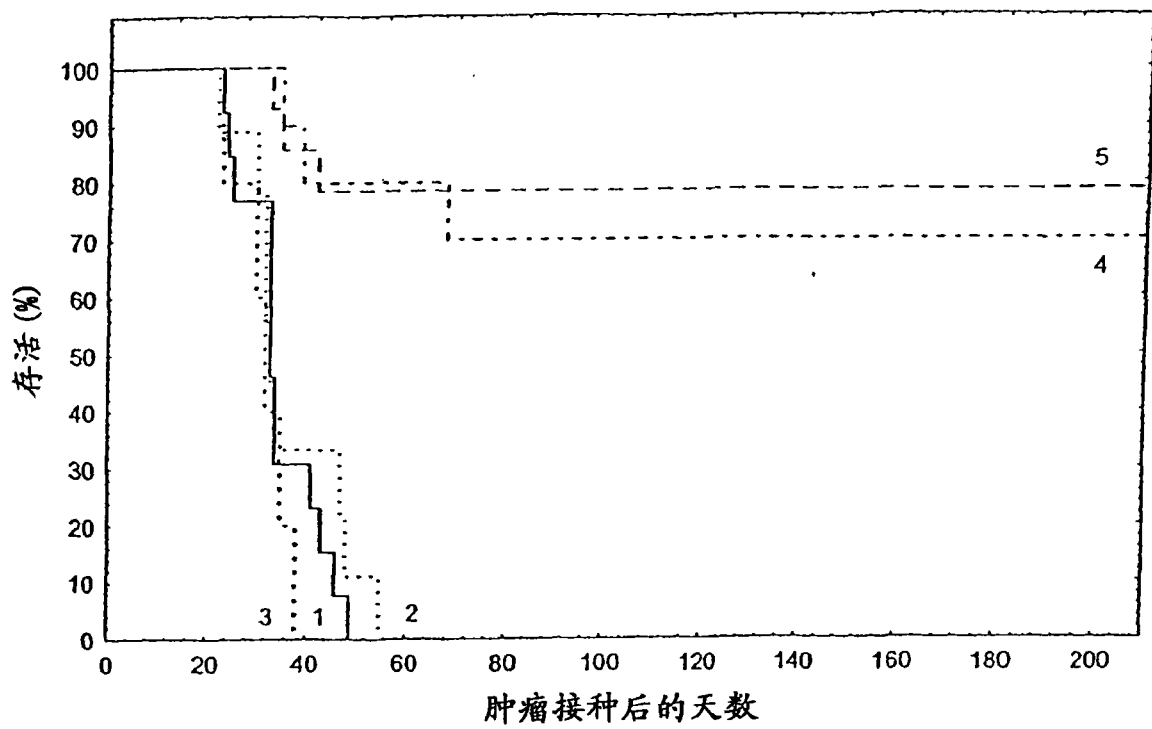


图 4A

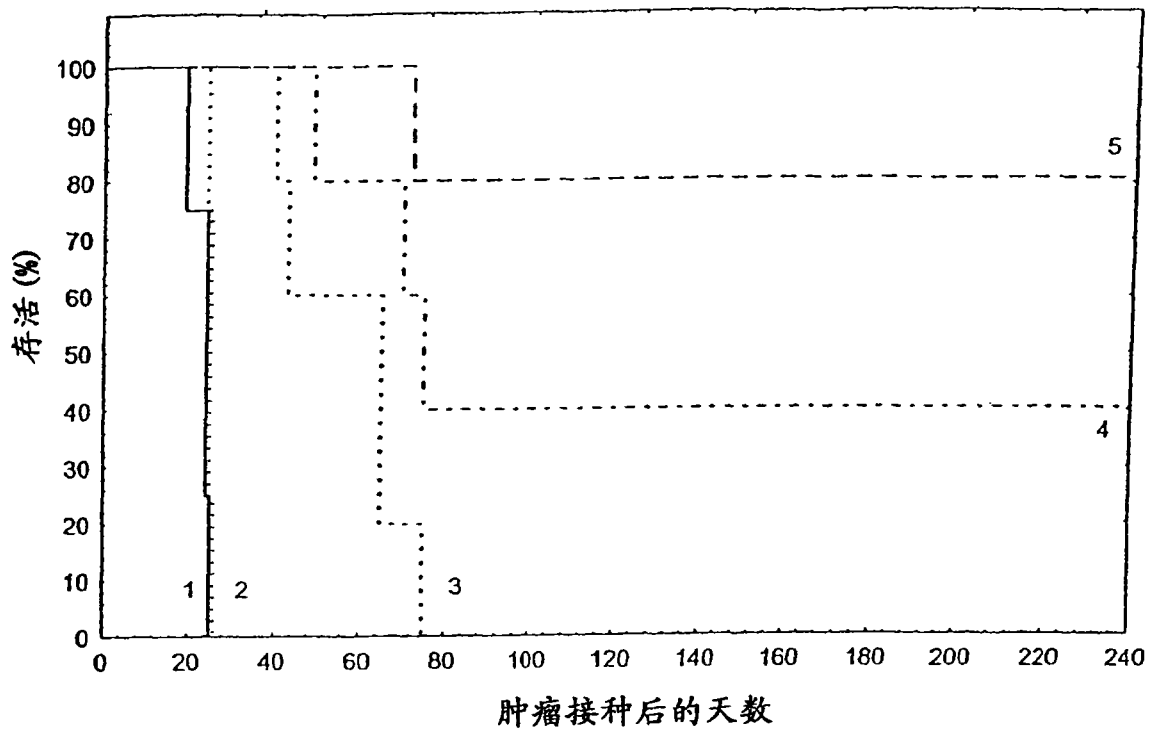


图 4B

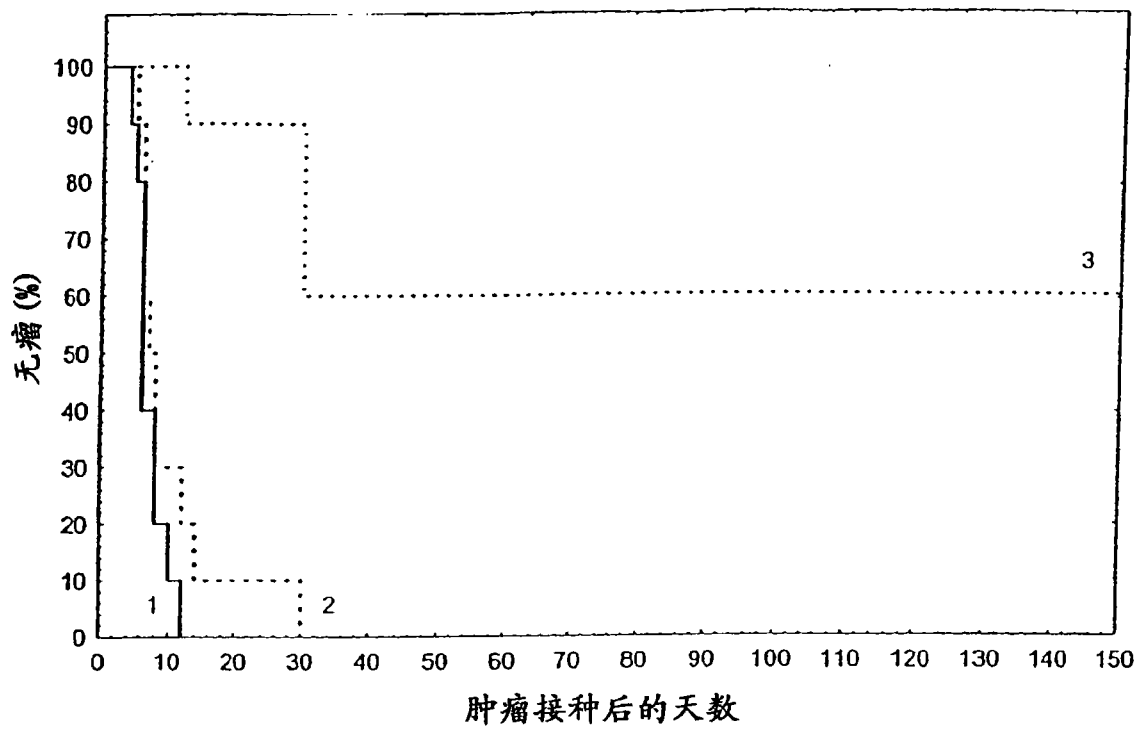


图 5

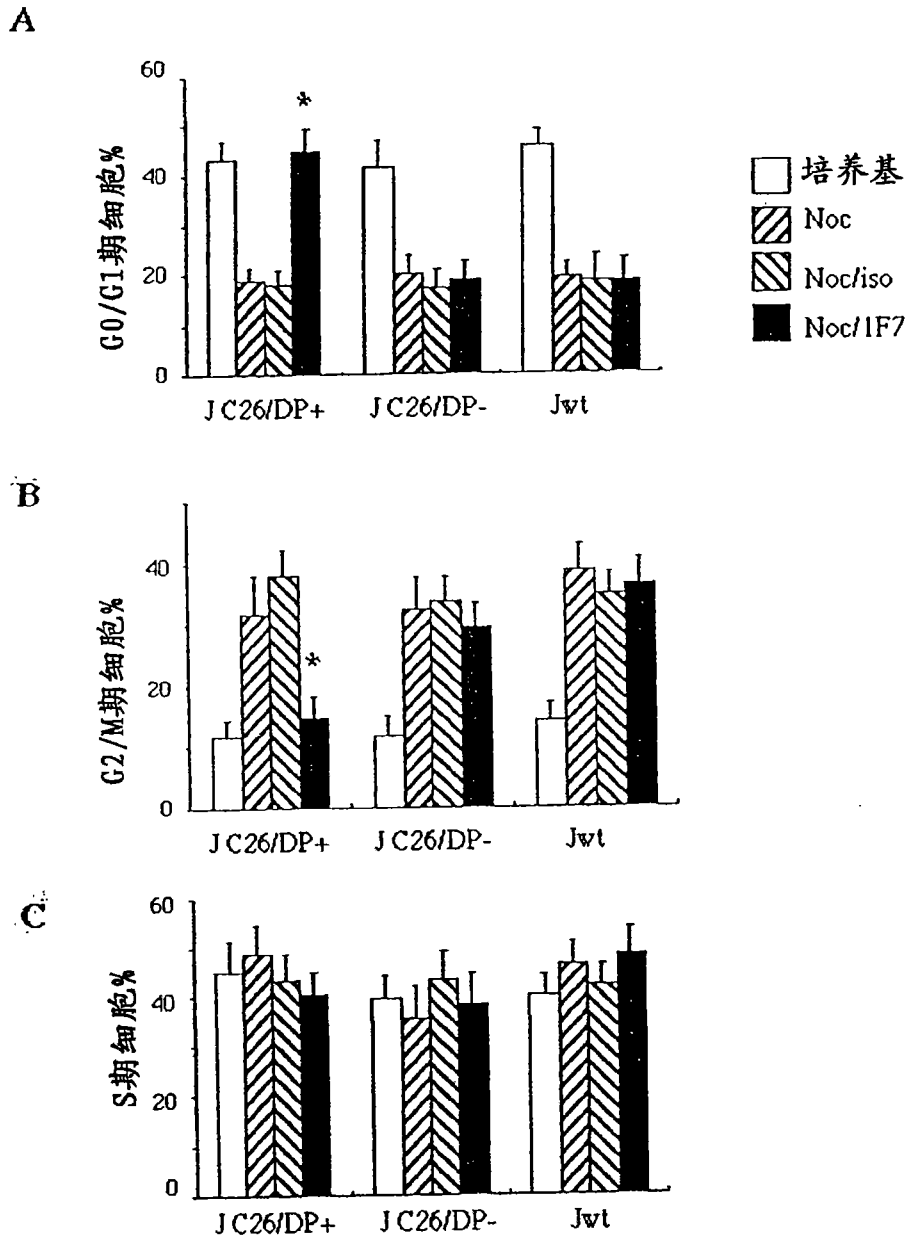


图 6A, 6B, 6C

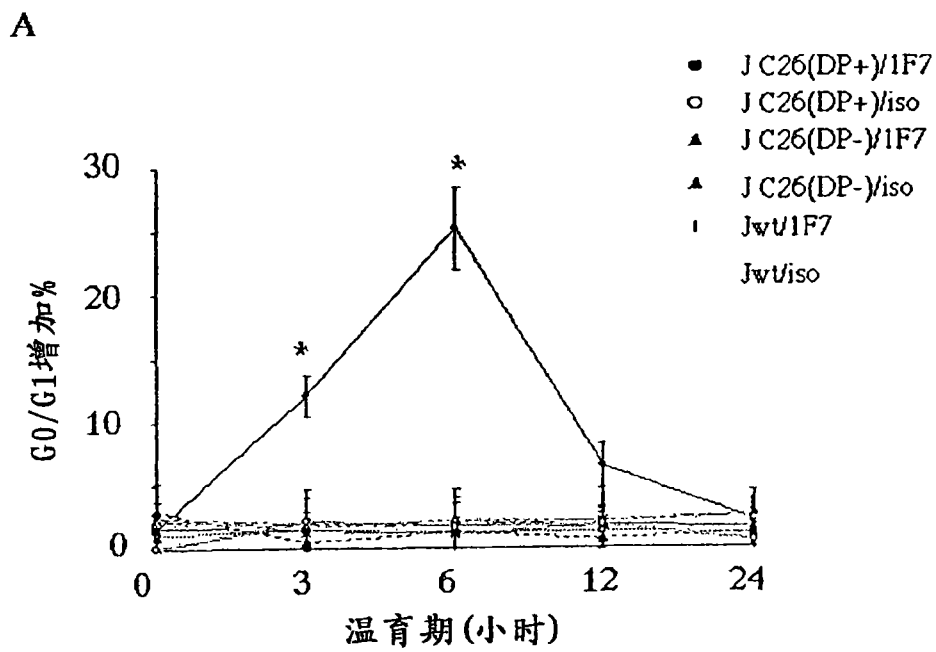


图7

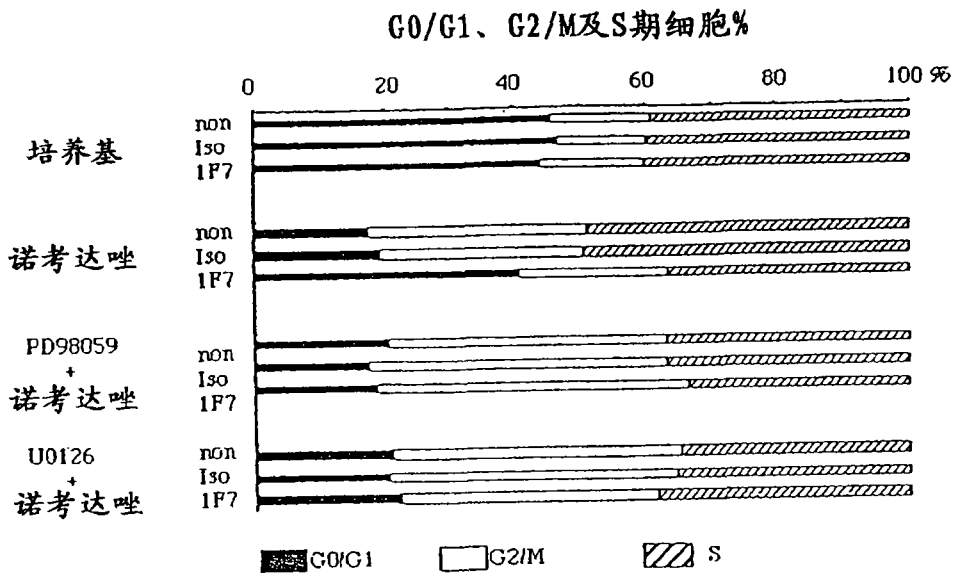


图 8

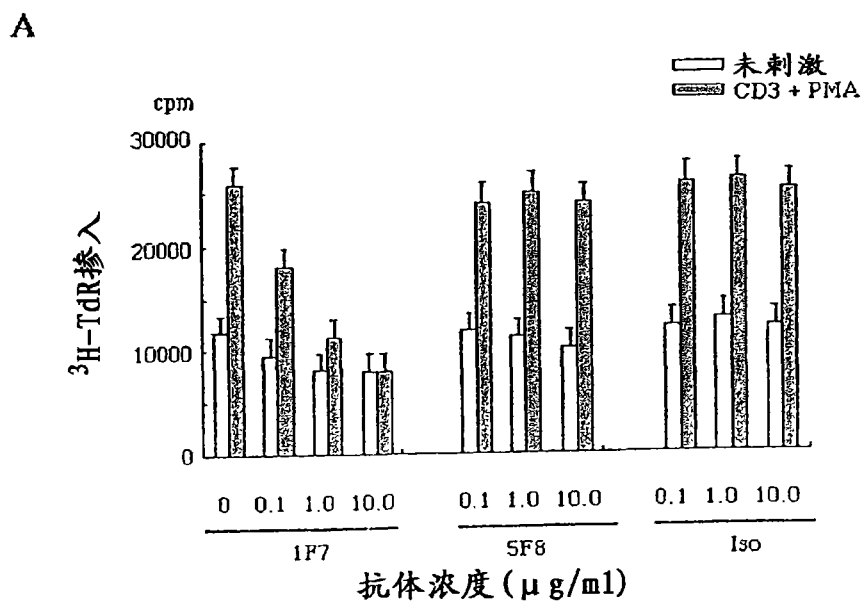


图9