

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533449

(P2004-533449A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	L 4 C O 8 5
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 161 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-589043 (P2002-589043)	(71) 出願人	591217403
(86) (22) 出願日	平成14年5月8日 (2002.5.8)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		バーシティ オブ テキサス システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014462		BOARD OF REGENTS, TH
(87) 国際公開番号	W02002/092127		E UNIVERSITY OF TEX
(87) 国際公開日	平成14年11月21日 (2002.11.21)		AS SYSTEM
(31) 優先権主張番号	60/290, 531		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス
(32) 優先日	平成13年5月11日 (2001.5.11)		オースティン ダブリュー. セブンス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ストリート 2 0 1
		(71) 出願人	502206795
			ダナーファーバー キャンサー インステ
			イチュート
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2 1 1 5 ボストン ビンネイ ストリー
			ト 4 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD 2 6 を発現している細胞に関連する疾患の治療としての抗CD 2 6モノクローナル抗体

## (57) 【要約】

抗CD 2 6 抗体を投与する工程を包含する、CD 2 6 発現に関連する癌および免疫疾患の予防および処置のための治療方法が提供される。本発明は、種々の型の抗CD 2 6 抗体および投与方法を記載する。本発明は、CD 2 6 を発現する癌を有する患者を処置する方法を提供し、この方法は、患者に、抗CD 2 6 抗体を含有する薬学的処方物を投与する工程を包含し、これによって、抗CD 2 6 抗体は、CD 2 6 を結合し、そして細胞周期を停止させる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C D 2 6 を発現する癌を有する患者を処置する方法であって、該患者に、抗 C D 2 6 抗体を含有する薬学的処方物を投与する工程を包含し、これによって、該抗 C D 2 6 抗体は、C D 2 6 を結合し、そして細胞周期を停止させる、方法。

## 【請求項 2】

細胞周期の停止を検出する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記抗 C D 2 6 抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記抗体が、組換え的に産生された C D 2 6 タンパク質、C D 2 6 融合タンパク質、精製された C D 2 6 タンパク質、部分的に精製された C D 2 6 タンパク質、または天然に存在する C D 2 6 タンパク質に対して調製されている、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記抗 C D 2 6 抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記抗 C D 2 6 モノクローナル抗体が、1 F 7、5 F 8、1 0 F 8 A、1 2 E 3 B、1 4 D 1 0、2 F 9、4 G 8、1 1 H 9、1 8 H 3 A、9 C 1 1、または 1 6 D 4 B である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記抗 C D 2 6 モノクローナル抗体が、1 F 7 である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記抗 C D 2 6 モノクローナル抗体が、5 F 8 である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗 C D 2 6 モノクローナル抗体が、アメリカンタイプカルチャーコレクション (A T C C) に寄託されたハイブリドーマ H B 1 0 2 9 7 から分泌される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 1 0】

前記モノクローナルがヒト化されている、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記抗 C D 2 6 抗体が、非結合体化抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記抗 C D 2 6 抗体が、化学療法剤、放射性核種、造影剤、毒素、生物学的因子、酵素インヒビター、または二次抗体に結合体化されている、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記酵素インヒビターが、アデノシンデアミナーゼインヒビター、またはジペプチジルペプチダーゼ I V インヒビターである、請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記癌が、T 細胞癌、B 細胞癌、血液学的癌、甲状腺癌、T 細胞リンパ腫、肺腺癌、甲状腺癌腫、黒色腫、B 細胞リンパ腫、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、脳癌、リンパ癌、皮膚癌、骨癌、直腸癌、または肉腫である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記 T 細胞癌が、T 細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、T 細胞 C D 3 0 + 未分化大細胞リンパ腫、末梢 T 細胞リンパ腫、T 細胞慢性リンパ性白血病、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、血管中心 T 細胞リンパ腫、H T L V 関連 T 細胞白血病、または成人 T 細胞白血病である、請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記 B 細胞癌が、B 細胞慢性リンパ球白血病、または B 細胞リンパ腫である、請求項 1 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

前記患者を第二の薬剤で処置する工程をさらに包含し、ここで、該第二の薬剤が、治療ポリペプチド、治療ポリペプチドをコードする核酸、化学療法剤、免疫療法剤、放射線療法剤、サイトカイン、ケモカイン、活性化剤、または生物学的応答改変剤である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記第二の薬剤が、前記抗 CD 26 抗体と同時に投与される、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記第二の薬剤が、前記抗 CD 26 抗体とは異なる時点で投与される、請求項 17 に記載の方法。

10

## 【請求項 20】

前記癌が、前記患者における腫瘍形成によって特徴付けられる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記投与する工程が、静脈内、動脈内、腹腔内、皮内、腫瘍内、筋肉内、皮下、関節内、鞘内、経口、皮膚的、鼻孔的、頰的、直腸的、または腔的である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 22】

癌を有する患者を処置する方法であって、該癌の細胞内での CD 26 発現の誘導、および該患者に抗 CD 26 抗体を含有する薬学的処方物を投与する工程を包含し、これによって、該抗 CD 26 抗体が CD 26 を結合し、そして細胞周期を停止させる、方法。

20

## 【請求項 23】

前記癌の細胞内での前記 CD 26 発現の誘導が、該細胞を生物学的因子と接触させることによる、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記生物学的因子が、サイトカイン、ケモカイン、レチノイド、インターフェロン、化学療法剤、抗体、または抗原である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記癌細胞における CD 26 の発現の誘導が、該細胞を化学薬剤と接触させることによる、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 26】

CD 26 を発現する癌を有する患者を処置する方法であって、該患者に、抗 CD 26 抗体を含有する薬学的処方物を投与する工程を包含し、これによって、該 CD 26 抗体が CD 26 を結合し、そして該癌を構成する細胞の増殖を阻害する、方法。

30

## 【請求項 27】

細胞増殖の阻害を検出する工程をさらに包含する、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

腫瘍の後退を誘導する方法であって、腫瘍の後退を必要とする患者に、抗 CD 26 抗体を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 29】

腫瘍の壊死を誘導する方法であって、腫瘍の壊死を必要とする患者に、抗 CD 26 抗体を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

40

## 【請求項 30】

CD 26 + 細胞において p 21 発現を増加させるための方法であって、該細胞を抗 CD 26 抗体と接触させる工程を包含する、方法。

## 【請求項 31】

前記 CD 26 + 細胞が癌細胞である、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記癌細胞が、血液学的癌細胞、T 細胞癌細胞、B 細胞癌細胞、甲状腺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膀胱癌細胞、肺癌細胞、肝臓癌細胞、胃癌細胞、精巣癌細胞、子宮癌細胞、脳癌細胞、リンパ癌細胞、皮膚癌細胞、骨癌

50

細胞、直腸癌細胞、または肉腫細胞である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記癌細胞が、T細胞リンパ腫細胞、肺腺癌細胞、甲状腺癌腫細胞、黒色腫細胞、B細胞慢性リンパ球白血病、またはB細胞リンパ腫である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記T細胞リンパ腫が、リンパ芽球性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、T細胞CD30+未分化大細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、T細胞慢性リンパ性白血病、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心T細胞リンパ腫、HTLV関連T細胞白血病、または成人T細胞白血病である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記抗CD26抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記抗CD26抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記抗CD26モノクローナル抗体が、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に寄託されたハイブリドーマHB10297から分泌される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗CD26モノクローナル抗体が、1F7、5F8、10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、または16D4Bである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗CD26モノクローナル抗体が、1F7である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記抗CD26モノクローナル抗体が、5F8である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記モノクローナルがヒト化されている、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記抗CD26抗体が、非結合体化抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記抗CD26抗体が、化学療法剤、放射性核種、造影剤、毒素、生物学的因子、酵素インヒビター、または二次抗体にさらに付着されている、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記酵素インヒビターが、アデノシンデアミナーゼインヒビター、またはジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターである、請求項 4 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、同時係属中の米国特許出願60/290,531号(2001年5月11日に  
出願)に対する優先権を主張する。上記関連の開示の全ての文章が、平等に、本明細書中  
で具体的に参照として援用される。

(1、本発明の分野)

本発明は、一般的に、癌、免疫学、および免疫治療の分野に関する。より詳細には、癌お  
よび免疫疾患の予防および処置のための、抗CD26抗体(モノクローナル抗CD26抗  
体、ヒト化抗CD26抗体、およびポリクローナル抗CD26抗体を含む)の治療上の使用  
に関する。投与の種々の形態、および用量が、記載される。

【背景技術】

【0002】

(2、関連分野の説明)

10

20

30

40

50

癌は、西洋世界において、心疾患に次いで第二位の、主な死亡原因の1つである。現在の評価は、米国において3人に1人が癌を発生し、そして5人に1人が癌で死亡すると推定している。現在、癌の処置に対して、少数の有効な選択肢が存在する。最も通常の癌の処置の選択肢は、手術、放射線治療および化学療法である。代表的に、外科的方法が、診断（外科生検による）および癌の処置（癌性増殖物を取り除くための手術）のために使用される。しかし、癌が転移し、そして広範囲に及ぶ場合、外科手術は、結果として治癒するには有効ではなく、代替のアプローチが取られなければならない。放射線治療および化学療法は、癌処置の他の形態である。しかし、全身治療である放射線治療および化学療法の両方が、多くの副作用に関連する。なぜなら、正常な細胞もまた影響を受けるからである。現在使用されている癌治療の副作用としては、いくつかを挙げると、皮膚過敏、嚥下困難、口渇、吐気、下痢、脱毛症、ただれ口、疲労、出血が挙げられる。従って、かなりの挑戦が、癌治療を克服するために残っている。

10

#### 【0003】

治療剤として特定抗体を使用するような標的指向治療（Target-directed therapy）が、非標的化治療（例えば、薬物の経口投与または静脈内投与を介する全身性化学療法または放射線治療）を越える利点を提供する。2つの型の抗体ベースの治療が存在する。より一般的な型は、腫瘍抗原（すなわち、正常細胞においてではなく、腫瘍および癌細胞において発現されるタンパク質）を同定し、そして腫瘍抗原に対して指向された抗体（好ましくはモノクローナル抗体（mAb））を開発することである。次いで、任意の治療薬剤（例えば、化学療法剤、放射性核種、変性毒（modified toxin）など）を、腫瘍に対する治療薬剤による標的化治療を達成するためのこの抗体に結合体化し得る。他の種類の抗体ベースの治療は、抗体が標的化する腫瘍/癌細胞に対する治療特性をそれ自身で有する抗体を提供することによるものである。この第2の形態の抗体ベースの治療のさらなる利点は、より効果的な処置を達成するために、別の治療薬剤を治療抗体にさらに結合体化し得ることである。

20

#### 【0004】

任意の抗体指向治療、および特に、モノクローナル抗体（mAb）を用いた任意の治療による主要な利点は、より多くの正常組織を治療薬剤の副作用から免れさせながら、増加した用量の治療薬剤を腫瘍に送達する能力である。癌治療に対するいくつかの抗体の同定に関わらず、なお、種々の癌型に対する治療を提供するために、新しくかつより効果的な治療抗体を同定する必要性が存在する。

30

#### 【0005】

多数の免疫関連機能に関連する、膜タンパク質であるCD26は、いくつかのヒトの癌（特に、進行段階にある癌）の表面に発現されており、従って、患者のよくない予後に関連していることが知られている。例えば、肺の腺癌は、CD26の酵素活性に対して陽性であるが、他の組織学的型の肺癌は、CD26活性に対して陰性であり（Asadaら、1993）；CD26発現は、分化した甲状腺癌において高く、そして良性の甲状腺疾患においては存在せず（Tanakaら、1995）；高レベルのCD26のタンパク質およびmRNAの発現は、B-慢性リンパ球性白血病細胞において見出され（Bauvoisら、1999）；そしてCD26発現は、攻撃的T細胞悪性疾患（例えば、T細胞リンパ芽球性リンパ腫/急性リンパ芽球性白血病（LBL/ALL）、T細胞CD30+未分化大細胞型リンパ腫）において高い。これらの癌型は、それらが現在の処置様式に対して特に耐性である場合、処置することが難しい。このような攻撃的疾患の処置および予防に有用な治療を見出す大きな必要性が存在する。

40

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

#### （発明の要旨）

本発明は、抗CD26抗体の増殖阻害特性を同定することによって、当該分野の欠点を克服する。従って、本発明は、癌が、それらの表面上にCD26タンパク質を発現する場合

50

、治療用の抗CD26抗体組成物を用いる、癌治療のための方法を提供する。本発明の抗CD26抗体ベースの治療は、非接合型抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、抗体フラグメント、ヒト化mAb、裸の（naked）抗体を含む）の使用を含む。接合型抗体の使用もまた提供され、ここで抗体は、薬物、他の標的化抗体、毒素、酵素インヒビター、放射性核種、中性子捕獲剤（例えば、ホウ素追補（addend））、化学物質、および他の生物学的因子と結合体化される。

#### 【0007】

従って、いくつかの実施形態において、本発明は、CD26を発現する癌を有する患者を処置する方法を提供する。この方法は、抗CD26抗体を含む薬学的処方物をこの患者に投与する工程を包含し、ここで抗CD26抗体はCD26に結合し、そして細胞周期を停止させ、このことにより細胞増殖を阻害する。 10

#### 【0008】

種々の癌および腫瘍は、本発明の方法によって処置し得ると企図され、そして、種々の癌および腫瘍としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：T細胞癌、B細胞癌、血液学的癌、甲状腺癌、T細胞リンパ腫、肺腺癌、甲状腺癌、黒色腫、B細胞リンパ腫、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸癌、膀胱癌、肺癌、肝癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、脳の癌、リンパ性の癌、皮膚癌、骨肉腫、直腸癌、または肉腫。

#### 【0009】

より特定の実施形態において、T細胞癌は、T細胞リンパ腫（例えば、リンパ芽球性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、T細胞CD30+未分化大細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、T細胞慢性リンパ球性白血病、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心T細胞リンパ腫、HTLV関連T細胞白血病、または成人T細胞白血病であり得る。他の特定の実施形態において、B細胞癌は、B細胞急性リンパ球性白血病またはB細胞リンパ腫であり得る。 20

#### 【0010】

本発明はまた、併用治療を企図し、ここで、2つ以上の処置レジメンが、治療の効力を改善するために、同時に適用される。従って、抗CD26抗体による処置に加えて、患者は、第2の治療薬剤を用いて処置され得、ここで第2の薬剤は、治療用ポリペプチド、治療用ポリペプチドをコードする核酸、化学療法剤、免疫治療薬剤、サイトカイン、ケモカイン、活性化因子、放射線治療薬剤、または生物学的応答調節因子である。 30

#### 【0011】

第2治療薬剤は、抗CD26抗体と同時に投与され得る。あるいは、この第2治療薬剤は、抗CD26抗体とは異なる時点で投与され得る。従って、この第2治療薬剤は、抗CD26抗体処置の前または後に投与され得る。

#### 【0012】

抗CD26抗体のいくつかの投与経路が企図され、そしてこの投与経路としては、とりわけ、例えば、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮内投与、腫瘍内投与、筋内投与、皮下投与、鞘内投与、関節内（intraarticular）投与、経口投与、皮膚投与、経鼻投与、頬投与、直腸投与または腔投与が挙げられる。

#### 【0013】

1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 1  $\text{g}/\text{kg}$  の投薬範囲で投与される抗CD26抗体が、治療に有効であることが企図される。従って、1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、または5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 1  $\text{mg}/\text{kg}$ 、1  $\text{mg}/\text{kg}$  ~ 10  $\text{mg}/\text{kg}$ 、10  $\text{mg}/\text{kg}$  ~ 20  $\text{mg}/\text{kg}$ 、20  $\text{mg}/\text{kg}$  ~ 30  $\text{mg}/\text{kg}$ 、30  $\text{mg}/\text{kg}$  ~ 40  $\text{mg}/\text{kg}$  40 50

kg、40mg/kg～50mg/kg、50mg/kg～60mg/kg、70mg/kg～80mg/kg、90mg/kg～100mg/kg、100mg/kg～200mg/kg、200mg/kg～300mg/kg、300mg/kg～400mg/kg、400mg/kg～500mg/kg、500mg/kg～600mg/kg、600mg/kg～700mg/kg、700mg/kg～800mg/kg、または900mg/kg～1g/kgの範囲を使用し得ることが企図される。中間の範囲もまた企図され、例えば、1μg/kg、または2μg/kg、または3μg/kg、または4μg/kg、または5μg/kgなどで使用し得る。投与の正確な方法および投与の投薬量が決定され、そして考慮因子（例えば、年齢、疾患、性別、状態を示す指標（performance status）など）を取り入れて、患者の個々の必要性に依存した治療時間に調節されることが理解され、そしてこのような調節は、訓練を積んだ医師によってなされ得る。従って、本発明は、示される用量によって決して制限されない。

10

#### 【0014】

いくつかの実施形態において、抗CD26抗体は、モノクローナル抗体であり得る。特定の実施形態において、この抗CD26モノクローナル抗体は、American Type Culture Collection（ATCC）に寄託されているハイブリドーマHB10297から分泌される1F7モノクローナル抗体である。この1F7抗体およびこれを作製する方法は、米国特許第5,120,642号（本明細書中に参照として援用されている）に詳細に記載されている。

#### 【0015】

他の特定の実施形態において、抗CD26モノクローナル抗体は、5F8モノクローナル抗体である。有用であると企図されるいくつかの他のmAbとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、および/または16D4B。しかし、CD26タンパク質の任意のエピトープに対して特異的である任意の他のモノクローナル抗体は、本発明の文脈において有用であると企図され、そして本発明は、上記の例に制限されない。さらに、モノクローナル抗体は、フラグメントとして投与され得るか、またはヒト患者に対する免疫原性を減少させるために、ヒト化され得る。

20

#### 【0016】

なお他の実施形態において、本発明は、ポリクローナル抗CD26抗体の使用を企図する。

30

#### 【0017】

本発明の抗体は、天然に存在するCD26タンパク質/ポリペプチド/ペプチド、精製されたCD26タンパク質/ポリペプチド/ペプチド、特に精製されたCD26タンパク質/ポリペプチド/ペプチド、組み換え的に産生されたCD26タンパク質/ポリペプチド/ペプチド、またはCD26融合タンパク質/ポリペプチド/ペプチドに対して調製され得る。

#### 【0018】

なお他の実施形態において、抗CD26抗体がさらに、別の因子（例えば、これらに限定されないが、化学療法剤、放射性核種、免疫治療薬剤、サイトカイン、ケモカイン、造影剤、毒素、生物学的因子、酵素インヒビターまたは二次抗体）に付着され得ることが企図される。いくつかの特定の実施形態において、酵素インヒビターは、アデノシンデアミナーゼインヒビター、またはジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターである。他の特定の実施形態において、化学療法剤は、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートもしくはアミノプテリン；アントラサイクリン；マイトマイシンC；ピンカアルカロイド；デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；またはアルキル化剤（例えば、クロラムブシルまたはメルファラン）、あるいは本明細書中の後の節に記載される他のものであり得る。

40

#### 【0019】

なお他の特定の実施形態において、毒素は、植物由来、真菌由来、または細菌由来の毒素

50

(例えば、ごくわずかの例を述べると、A鎖毒素、リボソーム不活化タンパク質、-サルシン(sarcin)、アスペルギリン、レスチリクトシン(restriotin)、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素またはpseudomonas体外毒素)であり得る。抗CD26抗体と結合体化され得る放射性核種および造影剤は、後の節に記載される。他の特定の実施形態は、他の生物学的因子(例えば、これらに限定されないが、ケモカイン、サイトカイン、レチノイン酸およびそれらの誘導体、インターフェロン、増殖因子)を企図する。

#### 【0020】

本発明はまた、腫瘍退化を誘導するための方法を提供し、この方法は、抗CD26抗体を含む組成物を、腫瘍退化を必要とする患者に投与する工程を包含する。

10

#### 【0021】

さらに、本発明は、腫瘍壊死を誘導するための方法を提供し、この方法は、抗CD26抗体を含む組成物を、腫瘍壊死を必要とする患者に投与する工程を包含する。

#### 【0022】

いくつかの実施形態において、本発明者らは、癌を有する患者を処置する方法を企図し、この方法は、癌細胞でのCD26の発現の誘導、および抗CD26抗体を含む薬学的処方物を患者に投与する工程(これによって、抗CD26抗体はCD26に結合し、そして細胞周期を停止する)、および/または増殖阻害、および/または細胞死および/または腫瘍退化を含む。細胞上でのCD26発現の誘導は、細胞を生物学的因子(例えば、これらに限定されないが、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、レチノイド、インターフェロン、インターロイキン、ホルボールエステル、免疫系を活性化し得る因子、化学療法剤、抗体、または抗原)と接触させることによって、達成され得る。あるいは、細胞を、化学薬剤と接触させることによって、細胞上にCD26の発現を誘導し得る。細胞においてCD26の発現を誘導するための方法は、当業者に公知である。

20

#### 【0023】

本発明はまた、CD26を発現する細胞においてp21の発現を増加させるための方法を提供、この方法は、この細胞を、抗CD26抗体と接触させる工程を包含する。1つの実施形態において、CD26を発現している細胞は、癌細胞である。特定の実施形態において、この癌細胞は、血液学的癌細胞、T細胞癌細胞、B細胞癌細胞、甲状腺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膀胱癌細胞、肺癌細胞、肝癌細胞、胃癌細胞、精巣癌細胞、子宮癌細胞、脳の癌細胞、リンパ性癌細胞、皮膚癌細胞、骨肉腫細胞、直腸癌細胞、肉腫細胞、T細胞リンパ腫細胞、肺腺癌細胞、甲状腺癌細胞、黒色腫細胞、B細胞慢性リンパ球性白血病またはB細胞リンパ腫であり得る。T細胞癌は、攻撃的なT細胞癌(例えば、T細胞リンパ腫)であり得る。他の特定の実施形態において、このT細胞リンパ腫は、リンパ芽球性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、T細胞CD30+未分化大細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、T細胞慢性リンパ球白血病、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心T細胞リンパ腫、HTLV関連T細胞白血病、または成人T細胞白血病であり得る。

30

#### 【0024】

他の実施形態において、CD26発現細胞は、CD26をトランスフェクトしたJurkat細胞株あるいはヒトT細胞(例えば、ヒトT細胞クローン、または活性化T細胞もしくはは活性化T細胞クローン)である。なお他の実施形態において、CD26発現細胞は、活性化された免疫細胞である。このような細胞は、活性化過剰の免疫細胞(例えば、活性化T細胞)、自己免疫疾患および活性化された免疫系に関する疾患の発生において役割を有する活性化T細胞、自己抗原を認識する活性化T細胞、同種移植片を認識する活性化T細胞、宿主組織を認識するドナー由来の活性化T細胞、CD26認識自己抗原を発現している活性化免疫細胞、同種移植片、自己免疫疾患および活性化された免疫系に関連する疾患の発生において役割を有するCD26を発現している活性化免疫細胞、宿主組織を認識するドナー由来の活性化された免疫細胞などであり得る。

40

#### 【0025】

50



いくつかの実施形態において、抗CD26抗体は、モノクローナル抗体である。1つの特定の実施形態において、抗CD26モノクローナル抗体(mAb)は、American Type Culture Collection(ATCC)に寄託されているハイブリドーマHB 10297から分泌される。このmAbはまた、1F7抗体と呼ばれる。別の特定の実施形態において、抗CD26モノクローナル抗体(mAb)は、5F8抗体である。有用であると企図されるいくつかの他のmAbとしては、10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、16D4Bが挙げられるが、これらに限定されない。モノクローナル抗体はさらに、免疫原性を減少させるために、ヒト化され得る。

#### 【0026】

他の実施形態において、抗CD26抗体は、ポリクローナル抗体である。本発明のなお他の実施形態は、抗CD26抗体がさらに、別の因子(例えば、これらに限定されないが、化学療法剤、放射性核種、免疫治療薬剤、サイトカイン、ケモカイン、造影剤、毒素、生物学的因子、酵素インヒビターまたは二次抗体)に付着/または結合体化され得ることを企図する。特定の実施形態において、酵素インヒビターは、アデノシンデアミナーゼインヒビター、またはジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターである。

#### 【0027】

また、細胞増殖を阻害するための方法も提供され、この方法は、CD26を発現している細胞を抗CD26抗体と接触させる工程を包含する。この方法のいくつかの実施形態において、CD26を発現している細胞は、癌細胞である。特定の実施形態において、この癌細胞は、血液学的癌細胞、T細胞癌細胞、B細胞癌細胞、甲状腺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膀胱癌細胞、肺癌細胞、肝癌細胞、胃癌細胞、精巣癌細胞、子宮癌細胞、脳の癌細胞、リンパ性癌細胞、皮膚癌細胞、骨肉腫細胞、直腸癌細胞、または肉腫細胞である。なお特定の実施形態において、癌細胞は、T細胞リンパ腫細胞、肺腺癌細胞、甲状腺癌細胞、黒色腫細胞、B細胞慢性リンパ球性白血病またはB細胞リンパ腫であり得る。

#### 【0028】

なお他の特定の実施形態において、T細胞癌は、予後の良くないT細胞癌であり得、そしてT細胞リンパ腫(例えば、リンパ芽球性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、T細胞CD30+未分化大細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、T細胞慢性リンパ球白血病、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心T細胞リンパ腫、HTLV関連T細胞白血病、または成人T細胞白血病)によって例示されるが、これらに限定されない。

#### 【0029】

この方法の1つの局面において、阻害される細胞増殖は、転移性細胞増殖である。この方法の他の局面において、細胞増殖を阻害することは、細胞増殖を停止することを含む。

#### 【0030】

なお他の実施形態において、CD26発現細胞は、CD26をトランスフェクトされたJurkat細胞株またはヒトT細胞(例えば、ヒトT細胞クローン)、あるいは活性化T細胞または活性化T細胞クローンである。なお他の実施形態において、このCD26発現細胞は、活性化免疫細胞である。このような細胞は、活性化過剰の免疫細胞(例えば、活性化T細胞)、自己免疫疾患および活性化された免疫系に関する疾患の発生において役割を有する活性化T細胞、自己抗原を認識する活性化T細胞、同種移植片を認識する活性化T細胞、宿主組織を認識するドナー由来の活性化T細胞、CD26認識自己抗原を発現している活性化免疫細胞、同種移植片、自己免疫疾患および活性化された免疫系に関連する疾患の発生において役割を有するCD26を発現している活性化免疫細胞、宿主組織を認識するドナー由来の活性化された免疫細胞などであり得る。従って、この方法は、活性化過剰の免疫細胞に関連する免疫系の疾患(例えば、自己免疫疾患、臓器移植、対宿主性移植片病など)のための治療の提供において有用であると企図される。このような疾患としては、アディソン病、脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体、ベーチェット病、慢性疲労症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、糖尿病、線維筋痛、グッドパスチャー症候群、グ

10

20

30

40

50

レーヴズ病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、狼瘡、メニエル多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、硬皮症、脈管炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症のような疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

本発明はまた、CD26を発現している癌細胞においてアポトーシスを誘導する方法を提供し、この方法は、細胞を抗CD26抗体を含む組成物と接触させる工程を包含する。

【0032】

本明細書中で使用される場合、「a」または「an」は、1つ以上を意味する。本明細書中で使用される場合、特許請求の範囲において、単語「含む」と組み合わせて使用される場合、これらの単語「a」または「an」は、1または1つ以上を意味し得る。本明細書中で使用される場合、「別の」は、少なくとも2つ以上を意味し得る。

10

【0033】

本発明の他の目的、特性、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかし、本発明の好ましい実施形態が示される一方、詳細な説明および特定の実施例は、例示のみの目的で示されることが、理解されるべきである。なぜなら、本発明の精神および範囲内での種々の変化および改変が、この詳細な説から、当業者に明らかになるからである。

【0034】

添付の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに実施するように含まれる。本発明は、本明細書中に示される特定の実施形態の詳細な説明と合わせて、これらの1以上の図面を参照することによって、よりよく理解され得る。

20

【0035】

（例示的实施形態の説明）

本発明は、癌の予防および処置のために抗CD26抗体を使用する治療方法を提供する。可溶性抗CD26 mAb（例えば、1F7、または5F8）の結合が、インビトロおよびインビボの両方での研究において、細胞（Karpas 299細胞、ヒトCD30+未分化大細胞T細胞リンパ腫細胞株、およびJurkat細胞により例示される）の増殖を阻害することが示されている。抗CD26結合は、デノボタンパク質合成に依存するp21発現（細胞周期タンパク質）の増加に関連して、G1/Sチェックポイントでの増殖の停止を生じる。さらに、本発明者らは、SCIDマウス腫瘍モデルを使用して、抗CD26抗体を用いた処理により、腫瘍保有マウスの有意に増加した生存率がもたらされることを示した。従って、本発明は、CD26を発現するヒトの癌の処置のための、抗CD26抗体を使用する抗癌治療を提供する。

30

【0036】

CD26の発現は、攻撃的（aggressive）T細胞性悪性腫瘍（これは、現在の処置様式に対して耐性である）を含むいくつかのヒトの癌において検討されてきた。従って、本発明は、腫瘍増殖を阻害するために抗CD26抗体を用いてそのような癌を処置する方法を提供する。いくつかの型の抗CD26抗体が、処置レジメに有用であることが企図され、そしてこの抗CD26抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（いくつかの非限定の例として、mAb 1F7；およびmAb 5F8である）、ヒト

40

【0037】

CD26タンパク質が、種々の機能的局面に含まれることが知られているが、抗26抗体の結合後の、細胞中でのp21発現の増加は、CD26と、癌における細胞周期のレギュレーターとの間の機能的な関連を初めて示す。

【0038】

本発明者らはまた、可溶性抗CD26モノクローナル抗体の結合が、CD26でトランスフェクトされたJurkat細胞株およびヒトT細胞クローンにおいてG1/S停止を誘導することを実証した。CD26が、休止CD4+記憶T細胞の部分集合上で発現されること、およびこの発現が、T細胞の活性化の際に増加することは、公知である。さらに、

50

CD26は、後期 (late-stage) のT細胞クローンの増加した抗原感受性に直接寄与する。過剰活性化 (hyperactive) 免疫疾患 (例えば、対宿主性移植片病 (GVHD) および自己免疫疾患) は、過剰活性化T細胞を含む。従って、CD26を発現する癌に対して有効な治療を提供することに加えて、本発明者らは、自己免疫疾患、器官移植および対宿主性移植片病を含む過剰活性化免疫状態の処置についての、抗CD26抗体の治療的有用性を企図する。自己免疫疾患としては、例えば、アディソン病、脱毛症、強直性脊髄炎、抗リン脂質症候群 (antiphospholipid syndrome)、ベーチェット病、慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome)、クローン病、潰瘍性結腸炎、糖尿病、繊維筋痛 (fibromyalgia)、グッドパスチャー症候群、グレーブズ病、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、狼瘡、メニエール多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、脈管炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症などが挙げられるがこれらに限定されない。現在、米国単独で、毎年、推定1千万~2千万のケースの自己免疫疾患が診断されている。従って、免疫関連疾患の抗CD26抗体処置は、重要な発展である。

10

#### 【0039】

(A. CD26および抗CD26抗体)

CD26は、多数の組織 (上皮細胞および白血球の部分集合を含む) で発現される一群の種々の機能特性を有する110kdの表面糖タンパク質である (MorimotoおよびSchlössman、1998; von Boninら、1998)。CD26タンパク質は、その細胞外ドメインにおいてジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) 活性を有する膜結合エクトペプチダーゼであり、その末端から2番目の位置のL-プロリンまたはL-アラニンのいずれかで、ポリペプチドからアミノ末端のジペプチドを切断し得る。

20

#### 【0040】

過去10年間にわたる研究は、CD26は、基本的なヒトのT細胞生理学において過剰の機能を有する分子であることを示している。例えば、CD26は、T細胞の機能および単球の機能に関連する特定のケモカインを切断する (Oravecら、1997; Proostら、1998)。他の研究は、CD26を、アデノシンデアミナーゼ (ADA) の表面発現を調節するADA結合タンパク質であると同定した。CD26/ADA複合体は、免疫系機能を調節するための局所的なアデノシンの触媒的除去において重要な役割を果たすと考えられている (Dangら、1996; Kameokaら、1993; Morrisonら、1993)。

30

#### 【0041】

肝臓、腸および腎臓において構成的に発現されるが、CD26発現レベルは、T細胞上できちんと調節され、そしてその密度は、T細胞の活性化後に著しく増大される。休止T細胞において、CD26は、CD4+記憶T細胞の部分集団上で発現され、そしてこのCD4+CD26高T細胞集団が、抗原を想起するための最大限応答をすることが示されている。実際、CD26自体は、特定の実験条件下で、T細胞のシグナル伝達プロセスに関与する。CD26およびCD3と固定化モノクローナル抗体 (mAb) との架橋は、T細胞の活性化およびIL-2の産生を誘導し得る。さらに、T細胞の抗CD26抗体処置は、CD26のインターナリゼーションを介してCD26の表面発現の減少を誘導し、そしてT細胞でのCD26の、この抗体に誘導されるモジュレーションは、抗CD3刺激または抗CD2刺激に対する増加された増殖応答を生じる。抗CD26 mAbである、1F7によるCD26分子の連結は、シグナル伝達物質 (例えば、CD3 およびp56lck) の増加されたチロシンリン酸化を誘導するが、可溶性抗CD26 mAbおよびDPP-IVインヒビターは、特定の場において、T細胞の増殖および機能を抑制する。

40

#### 【0042】

さらに、種々の刺激によるT細胞の活性化は、CD26表面発現を増加させ、従って、CD26は、T細胞活性化マーカーとして用いられる (Foxら、1984; Morimo

50

t o ら、1989)。CD26 はまた、T 細胞活性化の CD3 経路および CD2 経路に關与する同時刺激表面分子である。

#### 【0043】

免疫調節における關与に加えて、CD26 は、特定のヒト腫瘍の發生において役割を有し得ると考えられていた。ほとんどの肺腺癌は、DPPIV 陽性であり、一方で、他の組織学的な型の肺癌は、DPPIV 陰性である (Asada ら、1993)。さらに、CD26 発現は、分化した甲状腺癌において高いが、良性の甲状腺疾患においては存在しない (Tanaka ら、1995)。CD26 の発現はメラノサイトの悪性変態により失われているので、CD26 はまた、黒色腫の発症において役割を有するようである (Morrison ら、1993; Wesley ら、1999)。正常な休止 B 細胞と比較して高いレベルの CD26 タンパク質発現および mRNA 転写が、B 慢性リンパ球性白血病細胞および活性化 B 細胞において見出されている (Bauvois ら、1999)。一方で、T 細胞悪性腫瘍上での CD26 発現は、攻撃的病原性実体 (例えば、T 細胞リンパ芽球性リンパ腫 / 急性リンパ芽球性白血病 (LBL / ALL) および T 細胞 CD30 + 未分化大細胞リンパ腫) に制限されるようであり、不活性の疾患 (例えば、菌状息肉腫) では低い百分率でのみ検出される。特に、T 細胞 LBL / ALL 部分集団内で、CD26 発現は、乏しい予後の患者の独立したマーカーである (Carbone ら、1995; Carbone ら、1994)。

10

#### 【0044】

CD26 に対する多数の抗体が、作製され、そして記載されている。その抗体としては、標準的なハイブリドーマ技術により發生した 1F7、Ta1、5F8、10F8A、12E3B、14D10、2F9、4G8、11H9、18H3A、9C11、16D4B、TA5、9 のようなモノクローナル抗体が挙げられる (Morimoto ら、1989; Torimoto ら、1992; 米国特許第 5,120,642 号; DeMeester ら、1994; Dong ら、1998 (これらの全ては本明細書中に参考として援用される))。

20

#### 【0045】

CD26 の多数の役割に対応して、CD26 抗体は、多形性の細胞性機能を媒介する。例えば、特定の mAb に架橋された場合、CD26 は、おそらく CD45 (膜貫通タンパク質チロシンフォスファターゼ) とのその物理学的結合に起因して T 細胞活性化の代替的な経路を活性化し得る (Dang ら、1990a; Dang ら、1990b; Dang ら、1990c; Dang ら、1991; Fleischer、1987; Hegen ら、1997; Dang ら、1990d; Torimoto ら、1991)。なお他の研究は、可溶性抗 CD26 mAb および DPPIV インヒビターが、特定の場において、T 細胞の増殖および機能を抑制することを示している (Dang ら、; 1996; Kahne ら、1998; Kubota ら、1992; Matteren ら、1993)。これらの研究および上で記載される他の研究は、CD26 が、免疫調節分子である他に、強度の T 細胞血液悪性腫瘍 (Carbone ら、1995; Carbone ら、; 1994) を含む特定の新生物の発症において、潜在的な役割を有し得ることを示唆する。

30

#### 【0046】

Dong および共同研究者は、13 の抗 CD26 抗体を、CD26 欠失変異体の欠失分析、免疫プロッティング、および直接的な結合アッセイに基づいて、CD26 タンパク質の 1~247 アミノ酸残基、248~358 アミノ酸残基、359~449 アミノ酸残基、450~577 アミノ酸残基、および 359~653 アミノ酸残基の間に位置する 5 つの異なるエピトープ群に分類した。この研究において、本明細書中に参考として援用される Dong ら (1998) は、種々の抗 CD26 mAb に特異的な別のエピトープが、CD26 の種々の機能性ドメインに関連することを示している。例えば、これらの群のうちの 2 つ (248~358 アミノ酸領域および 359~449 アミノ酸領域) に対する mAb は、CD26 のモジュレーションを誘導し、そして T 細胞増殖に対する同時刺激効果を有していたが、これらの抗体のうちの 359~449 アミノ酸領域に対応する 1 つのみは

40

50

また、A D A 結合に関連していた。このことは、種々の抗 C D 2 6 抗体により示されるいくつかの異なる機能性効果について説明する。

【 0 0 4 7 】

従って、C D 2 6 およびその抗体は、種々の範囲の機能を有する複合体分子である。本発明は、C D 2 6 が、腫瘍の発生において重要な役割を有すること、ならびに C D 2 6 に対する抗体が、表面に C D 2 6 を含有する癌細胞における増殖停止および増殖阻害を引き起こすことを明白に実証する。

【 0 0 4 8 】

さらに、以前の報告は、活性化シグナルを媒介するための C D 2 6 の能力が、機能的 C D 3 / T c R 複合体に依存していること示したが ( v o n B o n i n ら、1998 ; D a n g ら、1990 d )、本発明者らは、C D 2 6 が、機能的 C D 3 / T c R 複合体の非存在下で、シグナルを伝達して、T 細胞の生物学的応答の変化を生じ得ることを示す。正常な T 細胞において、C D 2 6 の連結は、部分的に C D 2 6 および C D 4 5 の物理的結合を介して媒介される、T 細胞シグナル伝達に関連するタンパク質の増加したリン酸化を生じる ( H e g e n ら、1997 ; T o r i m o t o ら、1991 )。本発明者らは、現在、C D 2 6 の連結が関連し細胞周期を誘導する機構を調査している。強制された C D 2 6 発現の後の G 1 休止が、黒色腫細胞において観察されたが ( W e s l e y ら、1999 )、本発明者らは、C D 2 6 媒介 G 1 / S 休止と変化した p 2 1 発現との間の機能的関連を実証した。

【 0 0 4 9 】

( B . p 2 1 )

真核生物細胞において、細胞周期の進行は、サイクリン依存性キナーゼ ( C D K ) として知られている関連する酵素の群により G 1 / S チェックポイントで制御されるが、ここで C D K は、サイクリンと呼ばれる調節サブユニットとのこれらの物理的結合によって正に制御される ( Y a n g および K o r n b l u t h、1999 )。しかし、C D K - サイクリン複合体の酵素活性は、C D K インヒビターと称されるタンパク質のセットにより負に調節されている。これらの C D K インヒビターの 1 つは、p 2 1 ( W A F 1、C i p 1、S D I 1 と呼ばれる ) であり、これは、複数のサイクリン - C D K 複合体の構造と p 2 1 との物理的結合を介して、複数のサイクリン - C D K 複合体をブロックする ( E l - D e i r y ら、1993 ; X i o n g ら、1993 )。さらに、増殖細胞核抗原 ( P C N A ) とのその直接的な相互作用を介して、p 2 1 は、DNA 複製を阻害し得る ( W a g a ら、1994 )。種々の刺激は、p 2 1 発現 ( 細胞損傷、血清因子およびホルボールエステルを含む ) を誘導し得、そして p 2 1 誘導は、p 5 3 依存性および刺激に依存する p 5 3 非依存性の両方であり得ることが示されている ( E l - D i e r y ら ; 1993 ; E l - D i e r y ら ; 1994 ; D a t t o ら、1995 )。

【 0 0 5 0 】

p 5 3 腫瘍抑制遺伝子の下流の標的として、p 2 1 は、悪性形質転換において間接的に関連付けられてきた。DNA 損傷に対する応答における p 5 3 の誘導は、G 1 チェックポイントでの停止を生じ、そのポイントで、DNA 修復は、S 期における DNA 複製の前に達成される。p 5 3 の下流のエフェクターとして推定されるその役割と一致して、p 2 1 は、増殖細胞核抗原 ( P C N A ) 依存性 DNA 複製を阻害するが、インビトロでの DNA 修復は、阻害しないことが示されている。

【 0 0 5 1 】

米国特許第 6 , 2 1 8 , 3 7 2 号 ( 本明細書中に参考として援用される ) は、腫瘍形成における p 2 1 の役割およびインビボで悪性表現型を反転する能力を記載している。p 2 1 発現は、腫瘍抑制効果および再狭窄抑制効果を生産するのに十分であり、そして p 2 1 発現は、遺伝子の発現に影響を及ぼす N F - B ( 例えば、細胞の分化に関連する接着分子 ) による転写活性化を促進する。

【 0 0 5 2 】

本発明は、抗 C D 2 6 抗体の投与が、細胞増殖阻害を生じることおよび p 2 1 の発現にお

10

20

30

40

50

ける対応する増加を実証する。

【0053】

(C. 免疫疾患における役割)

免疫調節におけるCD26機能は、十分に研究されているが、利用可能なデータは、CD26が特定のヒトの疾患の発症に関連し得ることを示唆しているものの、臨床設定におけるその役割は、いまだ明確には規定されていない。CD26がT細胞活性化のマーカーであり、かつこのプロセスにおいて機能的な役割を有するという知見と一致して、CD26は、特定の自己免疫疾患(慢性関節リウマチ、グレーブズ病、および多発性硬化症を含む)において、T細胞の活性化およびリンホカイン合成のレギュレーターとしての役割を有し得る(Haflerら、1985; Mizokamiら、1996; Eguchiら、1989; Gerliら、1996)。これらの自己免疫疾患に罹患した患者由来の循環Tリンパ球は、高レベルのCD26表面発現を発現し、そしていくつかの例において、発現されたCD26のレベルは、疾患の活性と相関する(Haflerら、1985; Mizokamiら、1996; Eguchiら、1989; Gerliら、1996)。さらに、慢性関節リウマチに罹患している患者において、CD26発現の抗体誘導性モジュレーションは、末梢血T細胞において増加されたIL-2合成およびIFN合成を生じ、そして滑液T細胞においては、減少したIFN産生を生じるが、IL-2産生に対する効果は全く示さない(Gerliら、1996)。さらに、インビボでのCD26/DPP-IV酵素活性の阻害は、ラットレシピエントにおおける心臓同種移植での生存を延長し、このことは、インビボでの同種抗原媒介性免疫調節および同種移植片拒絶の機構におけるCD26の役割を示唆する(Koromら、1997)。

10

20

【0054】

以前の研究は、有効用量の抗CD26モノクローナル抗体を用いた処置が、重篤な毒性を誘導することなく、患者において十分に許容されることを示す。予備的研究において、Baccigalupoら、(1985)は、重篤な難治性の対宿主性移植片病に罹患した8人の患者を、ヒトCD26を認識するマウス抗CD26モノクローナル抗体を用いて処置した(De Meesterら、1993)。循環するCD26+T細胞の数が減少するにつれて、疾患の重篤度は有意に改善した。2人の完全な応答者(responder)および2つの部分的な応答者がおり、そして8人の患者のうち5人が、処置後、少なくとも1年間生存した。重要なことに、抗CD26モノクローナル抗体を用いた処置は、受容可能な即時的な有害反応を伴って十分に許容され、このことは、抗CD26モノクローナル抗体を含む将来の治療が、許容可能な副作用を伴い投与され得ることを示唆する。

30

【0055】

本発明者らは、可溶性CD26モノクローナル抗体(例えば、1F7)の結合が、CD26でトランスフェクトされたJurkat細胞株およびヒトT細胞クローンのような細胞においてG1/S停止を誘導し得ることを実証した。従って、抗CD26抗体処置が、活性化免疫系疾患(自己免疫疾患、対宿主性移植片病、および器官移植を含む)の臨床設定において治療的に有益であり、実施者は、過剰活性化免疫細胞における細胞周期の停止を誘導し得ることを、本発明者らは、想像する。

【0056】

抗CD26抗体が、対宿主性移植片病を処置するために、その疾患における他の処置様式と組み合わせて用いられることが想像される。さらに、対宿主性移植片病の種々の状態または臨床的重篤度の患者が、抗CD26治療を用いた処置のために選択され得る。そのような処置において、いくつかの実施形態においては、実施者は、単独の抗CD26抗体を使用し得、そして他の実施形態においては、実施者は、適切に改変された(例えば、対宿主性移植片病を処置するために、特定の活性化T細胞またはその疾患の原因である他の免疫細胞を標的化する薬剤に結合体化された)抗CD26抗体を使用することが想像される。その疾患を処置するために抗CD26抗体と結合体化され得る薬剤としては、他の特異的な抗体、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、トキシン、またはこれらのエフェクター細胞上の特定の標的を認識する薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。結合体化

40

50

に加えて、抗CD26 mAbが、その疾患の原因であるエフェクター細胞を標的化する薬剤と組み合わせて用いられ得る。抗CD26抗体はまた、他の薬学的/臨床的薬剤（例えば、これらの疾患または抗CD26処置レジメから生じる潜在的な感染を最小限にするよう選択された抗生物質/抗菌物質/抗ウイルス剤）と組み合わせて、これらの疾患において使用され得る。さらに、抗CD26モノクローナル抗体により認識される特定のエピトープが、CD26シグナル伝達、およびCD26の結合における種々の効果を有することが示されている。従って、本発明者らは、別個のエピトープを認識する種々の抗CD26 mAbが、種々の効力および毒性のプロファイルを導き得ることを企図する。

【0057】

(D. 抗体)

10

(a. 抗体産生)

本発明は、抗CD26抗体の治療使用を提供する。しかし、いくつかの実施形態において、本発明は、IF7モノクローナル抗体および5F8モノクローナル抗体、CD26抗原に対する他のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が、本発明により提供される予防方法および治療方法において有効に使用され得ることを記載する。従って、本発明は、いずれの特定の抗CD26抗体にも限定されず、かつCD26タンパク質、CD26ポリペプチドまたはCD26ペプチドに特異的な任意の抗体が使用され得ることが企図される。本発明はまた、抗CD26抗体の生物学的に機能性の等価物の使用を企図する。本明細書中において、用語「CD26タンパク質/CD26ペプチド/CD26ポリペプチド」または「CD26抗原」は、それが天然に存在するか、精製されているか、部分的に精製されているか、または組換えDNA法、融合タンパク質法、タンパク質合成法などにより産生されるか、またはそれらの生物学的に機能性の等価物であるかに拘わらず、CD26タンパク質、CD26ペプチド、CD26ポリペプチドを示すために使用される。

20

【0058】

生物学的に機能的な等価物は、分子であり、ここで改変および/または変更が、この分子をコードするポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質の構造においてなされ得る一方で、類似または改善された特徴を有する分子を獲得する。この発明の文脈において、この分子は、CD26抗原またはCD26抗体のいずれかであり得る。この生物学的に機能的な等価物は、異なる配列を含む一方で、同時に「野生型」または標準的なタンパク質をコードする能力を保持するように操作されているポリヌクレオチドを含み得る。これは、遺伝コードの縮重（すなわち、同じアミノ酸をコードする複数のコドンの存在）を達成し得る。このような等価物を調製する方法は、当該分野において周知である。

30

【0059】

抗体を調製する手段および特徴づける手段は、当該分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 本明細書中で参考として援用されている、を参照のこと）。

【0060】

この節は、抗体を生成するための方法についての簡単な考察を示す。

【0061】

40

((i) ポリクローナル抗体)

簡潔には、ポリクローナル抗体は、本発明に従って免疫原性組成物（この場合、CD26抗原を含む）で動物を免疫し、そしてこの免疫動物から抗血清を収集することによって調製される。

【0062】

広範な動物種が、抗血清の生成のために使用され得る。代表的に、抗-抗血清の生成のために使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。ウサギは比較的血液量が多いので、ウサギは、ポリクローナル抗体の産生のために好んで選択される。

【0063】

50

当該分野において周知のように、所定の組成物は、その免疫原性を变化させ得る。故に、キャリアに対してペプチド免疫原またはポリペプチド免疫原を結合させることによって達成され得るような、宿主免疫系への追加免疫がしばしば必要である。例示的かつ好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) およびウシ血清アルブミン (B S A) である。他のタンパク質 (例えば、オボアルブミン、マウス血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシンインヒビター) もまた、キャリアとして使用され得る。ポリペプチドを、キャリアタンパク質に結合体化する手段は、当該分野において周知であり、そしてグルタルアルデヒド、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス - ピアゾ化ベンジジンが挙げられる。他の二官能剤または誘導体化剤もまた、結合のために使用され得る。例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介する結合体)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介する)、グリタルアルデヒド、無水スクシン、 $\text{SOCl}_2$ 、または  $\text{R}^1 \text{N} = \text{C} = \text{NR}$  (ここで、R および  $\text{R}^1$  は異なるアルキル基)。

10

#### 【0064】

また当該分野で周知のように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的ステイミュレーターの使用によって増大され得る。例示的かつ好ましいアジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント (殺傷した *Mycobacterium tuberculosis* を含む免疫応答の非特異的ステイミュレーター)、フロイントの不完全アジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げら

20

#### 【0065】

ポリクローナル抗体の産生において使用される免疫原組成物の量は、免疫原の性質および免疫に使用される動物によって変化する。種々の経路が、免疫原を投与するために使用され得る (皮下、筋内、皮内、静脈内および腹腔内 (intraperitoneal))。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の種々の時点で免疫動物の血液をサンプリングすることによってモニターされ得る。

#### 【0066】

2 番目に、追加免疫の注射もまた、与えられ得る。追加免疫および力価測定のプロセスは、適切な力価が達成されるまで反復される。所望のレベルの免疫原性が獲得された場合、免疫動物は採血され得、そして血清は単離されて保存され得、そして / または動物は、mAb を生成するために使用され得る。

30

#### 【0067】

ウサギポリクローナル抗体の産生のために、耳の静脈を介してか、または心臓の穿刺によって動物から採血され得る。得られた血液は、凝集させられ、次いで全ての細胞および血液塊から血清成分を分離するために遠心分離される。この血清は、種々の適用のために使用され得るか、さもなくば、所望の抗体画分が、周知の方法 (例えば、固体マトリクスまたはプロテイン A に結合した別の抗体またはペプチドを用いるアフィニティークロマトグラフィー) によって精製され、その後精製のための抗原 (ペプチド) アフィニティークラムが続き得る。

40

#### 【0068】

( (i i) モノクローナル抗体 )

「モノクローナル抗体」は、CD 26 タンパク質に特異的に結合し得る免疫グロブリンの相同性集団をいう。CD 26 タンパク質が、1 つ以上の抗原決定基を有し得ることが理解される。本発明の抗体は、これらの 1 つ以上決定基のに対して指向され得る。

#### 【0069】

モノクローナル抗体 (mAb) は、周知の技術 (例えば、本明細書中で援用される、米国特許第 4, 196, 265 号に例示されるような技術) の使用を介して容易に調製され得る。代表的にこの技術は、選択された免疫原組成物 (例えば、精製されたか、または部分的に精製された CD 26 抗原タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド) での適切な動物

50



の免疫を含む。この免疫組成物は、抗体生成細胞を刺激するのに有効な様式で投与される。

#### 【0070】

mAbを生成するための方法は、ポリクローナル抗体を調製するための方法と同じ流れに沿って、一般に開始される。げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）は、好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サル細胞の使用もまた、可能である。ラットの使用は、特定の利点を提供し得る（Goding, 1986, pp. 60~61）が、マウスが好ましく、BALB/cマウスが最も好ましく、これは最も日常的に使用され、そして一般に高いパーセンテージの安定な融合を与える。

#### 【0071】

動物は、一般に上記されるように抗原を注射される。この抗原は、必要な場合、キーホールリンペットヘモシアニンのようなキャリア分子に結合され得る。この抗原は、代表的に、アジュバント（例えば、フロイントの完全アジュバントまたは不完全アジュバント）と混合される。同じ抗原での追加免疫注射は、約2週間の間隔で生じる。

#### 【0072】

免疫後、抗体を産生する可能性を有する体細胞（具体的には、Bリンパ細胞（B細胞））は、mAb生成プロトコルにおける使用のために選択される。これらの細胞は、生検した脾臓またはリンパ節から獲得され得る。脾臓細胞およびリンパ節細胞が好ましい。なぜならば、前者は、分裂段階にある形質芽球の抗体産生細胞の豊富な供給源であるからである。

#### 【0073】

しばしば、動物のパネルは、免疫され、そして最高の抗体力価を有する動物の脾臓が取り出され、そしてシリンジを用いて脾臓を均一化することによって脾臓リンパ細胞が得られた。代表的に、免疫されたマウス由来の脾臓は、約  $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$  個のリンパ細胞を含む。

#### 【0074】

次いで、免疫動物由来の抗体産生Bリンパ細胞が、不死化骨髓腫細胞の細胞（一般に、免疫された動物と同じ種の細胞）と融合される。ハイブリドーマ生成融合手順における使用に適した骨髓腫細胞株は、好ましくは非抗体産生細胞であり、高い融合効率を有し、そして所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地で増殖不可能になるよう、酵素を欠損する。

#### 【0075】

多数の骨髓腫細胞の任意の1つが、当業者に公知のように、使用され得る（Goding, pp. 65~66, 1986; Campbell, pp. 75~83, 1984; それぞれ本明細書中で参考として援用される）。例えば、免疫動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7およびS194/5XX0 Bu1が使用され得る；ラットのために、R210、RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983Fおよび4B210が使用され得る；そしてU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2およびUC729-6は全て、ヒト細胞融合との関連において有用である。

#### 【0076】

1つの好ましいマウス骨髓腫細胞は、NS-1骨髓腫細胞株（P3-NS-1-Ag4-1ともいわれる）であり、これらは、細胞株の保管番号GM3573を請求することによって、NIGMS Human Genetic Mutant-cell Repositoryから容易に入手可能である。使用され得る別のマウス骨髓腫細胞株は、8-アザグアニン-耐性マウス骨髓腫SP2/0非産生細胞株である。

#### 【0077】

抗体産生脾臓細胞またはリンパ節細胞および骨髓腫細胞のハイブリッドを生成するための方法は、通常2:1の割合で体細胞と骨髓腫細胞とを混合する工程を包含し、この割合は

10

20

30

40

50

、細胞膜の融合を促進する因子（化学的または電氣的）の存在下で、それぞれ約20：1～約1：1に変化し得る。センダイウイルスを使用する融合方法は、K o h l e rおよびM i l l s t e i n（1975；1976）によって記載され、そしてポリエチレングリコール（PEG）（例えば、37%（v/v）PEG）を用いる方法は、G e f t e rら（1977）によって記載される。電氣的に誘導された融合方法の使用もまた、適切である（G o d i n g p p . 71～74、1986）。

#### 【0078】

融合手順は、通常低い頻度（約 $1 \times 10^{-6}$ ～ $1 \times 10^{-8}$ ）で生存可能なハイブリッドを産生する。しかし、これは、生存のような問題を生じず、融合されたハイブリッドは、選択培地中で培養されることによって、親の注入された細胞（特に、正常に、無制限に分裂を続ける注入された骨髄腫細胞）から分化される。この選択培地は、一般に、組織培養培地中で、デノボでのヌクレオチド合成をブロックする薬剤を含む培地である。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートが、プリンおよびピリミジン両方のデノボ合成をブロックする一方で、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキセートが使用される場合、培地は、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンを補充される（ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン（HAT）培地）。アザセリンが使用される場合、培地は、ヒポキサンチンを補充される。

10

#### 【0079】

好ましい選択培地は、HATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動し得る細胞のみが、HAT培地中で生存し得る。骨髄腫細胞は、サルベージ経路の鍵酵素（例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T））を欠損し、生存不可能である。B細胞は、この経路を作動し得るが、これらは、培地中では限られた生存期間を有し、一般に約2週間以内に死滅する。故に、選択培地で生存し得る細胞は、骨髄腫細胞とB細胞から形成されたハイブリッド細胞のみである。

20

#### 【0080】

この培養工程は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中で、細胞を、単一クローン希釈することによって培養し、続いて所望の反応性について、個々のクローンの上清（約2～3週間後）を試験することによって実行される。このアッセイは、感度が高く、単純かつ迅速であるべきである（例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイなど）。

30

#### 【0081】

次いで、選択されたハイブリドーマは、連続希釈され、そして個々の抗体産生細胞株にクローン化され、次いで、これらのクローンは、無制限に増殖してmAbを提供し得る。この細胞株は、2つの基本的な方法でmAb産生に活用され得る。

#### 【0082】

ハイブリドーマのサンプルは、元々の融合（例えば、同系のマウス）に体細胞および骨髄腫細胞を提供するために使用された型の組織適合性動物に（しばしば、腹腔腔に）注射され得る。必要に応じて、動物は、注射の前に炭化水素（特に、プリスタン（テトラメチルペンタデカン）のような油状物）でプライムされる。注射された動物は、融合された細胞ハイブリッドによって生成される特異的なmAbを分泌する腫瘍を発達させる。次いで、動物の体液（例えば、血清または腹水）は、穿刺されて高濃度のmAbを提供し得る。

40

#### 【0083】

個々の細胞株はまた、インビトロで培養され得、ここでmAbは、これらが迅速に高濃度で得られ得る培養培地中に自然に分泌される。

#### 【0084】

いずれかの手段によって生成されたmAbは、所望の場合、ろ過、遠心分離、および種々のクロマトグラフィーの方法（例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー）を用いて、さらに精製され得る。本発明のmAbのフラグメントは、酵素（例えば、

50

ペプシンまたはパパイン)を用いる消化、および/あるいは化学的還元によるジスルフィド結合の切断を含む方法によって、精製されたmAbから獲得され得る。あるいは、本発明によって包含されるmAbフラグメントは、自動化ペプチド合成機を用いて合成され得る。

#### 【0085】

分子クローニングアプローチが、モノクローナルを生成するために使用され得ることもまた、企図される。このために、コンビナトリアルな免疫グロブリンファージミドライブラリーが、免疫動物の脾臓から単離されたRNAから調製され、そして適切な抗体を発現するファージミドが、抗原およびコントロール細胞(例えば、正常な細胞 対 腫瘍細胞)を発現する細胞を用いるパニングによって選択される。従来のハイブリドーマ技術を越えるこのアプローチの利点は、約 $10^4$ 倍の多さの抗体が、一回で生成され、そしてスクリーニングされ得る点、および新しい特異性が、H鎖とL鎖との組み合わせによって生成される点であり、これらは適切な抗体を発見する機会をさらに増加させる。

10

#### 【0086】

CD26抗原に対する抗体は、このような標準の技術を用いて、すでに生成されている。例えば、本明細書中で参考として援用される、米国特許第5,120,642号は、IF7 mAbの生成、およびその特徴づけを記載する。CD4+リンパ細胞集団中のヘルパーインデューサ細胞およびサプレッサーインデューサ細胞の間の違いの補助が開発され、mAb IF7を、新世界の霊長類種Aotus trivirgatus由来の刺激されたT細胞株を用いたBalb/c Jマウスの免疫化から発展された、ハイブリッド細胞株から生成した。手短には、標準的なハイブリドーマ手順を用いて、Balb/c Jマウスを、新世界の霊長類種Aotus trivirgatus由来のPHA刺激T細胞株の細胞を用いて免疫した。マウス脾細胞を、収集し、そして骨髓腫細胞株NS-1と融合させた。細胞集団を、HAT培地中で培養して、クローン化されるハイブリドーマ細胞を得た。ヒトT細胞と反応性の抗体を含むハイブリドーマ培養物を、選択した。ヒトT細胞と反応性のmAbを含むハイブリドーマ培養物のクローニングおよび再クローニングを、支持細胞の存在下で限界希釈方法によって実行した。次いで、悪性の腹水を、発展させ、そして分析のために使用した。mAbのアイソタイプを、フルオレセイン標識化ヤギ抗マウスIgG1を用いた染色、および他のサブクラスのマウスIgに対するフルオレセイン標識化抗体での染色の失敗によってマウスアイソタイプIgG1と決定した。抗IF7 mAbを産生するハイブリドーマ細胞の培養物は、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852に1989年11月21日に寄託され、ATCC番号HB10297として受託されている。

20

30

#### 【0087】

本発明者らによって、標準的なハイブリドーマ技術で生成されたCD26に対する他のmAbとしては、10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11および16D4Bが挙げられる(Dongら、1998、本明細書中で参考として援用される)。なお別の抗CD26 mAbは、5F8である(Morimotoら、1989; Torimotoら、1992、本明細書中で参考として援用される)。

40

#### 【0088】

((iii) ヒト化抗体)

ヒト化mAbは、定常領域および/または可変領域のフレームワーク配列をヒト配列と置換する遺伝子操作技術を用いて改変された一方で、その元の抗原特異性を維持する、動物起源の抗体である。このような抗体としてはまた、ドナーと結合したヒト化重鎖、またはアクセプター非改変軽鎖もしくはキメラ軽鎖、またはその逆が挙げられ得る。このような抗体は、一般にヒト抗原に対する特異性を有するげっ歯類抗体(例えば、本発明のマウスAb)由来であり、そして一般にインビボでの治療適用について有用である。このストラテジーは、外来の抗体に対する宿主応答を減少させ、そしてヒトエフェクター機能の選択

50

を可能にする。

【0089】

ヒト化免疫グロブリンを生成するための技術は、当業者に周知である。例えば、米国特許第5,693,762号は、1つ以上の相補的な決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリンを生成する方法、およびその組成物を開示する。「CDR」は、抗体のアミノ酸配列の相補的な決定領域として規定される。CDRは、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域内に含まれる。CDRは、抗原またはエピトープへの抗体の結合のための主な接触残基を提供する。本発明の目的のCDRは、ドナー抗体の可変重鎖配列および軽鎖配列に由来し、そして天然に存在するCDRの機能的フラグメントおよびアナログを含み、これらのフラグメントおよびアナログはまた、これらが由来するドナー抗体と同じ抗原結合特異性および/もしくは中和能力を共有または保持する。インタクトな抗体に結合される場合、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして抗原に対するドナー免疫グロブリン(例えば、タンパク質またはエピトープを含む他の化合物)と実質的に同じ親和性を維持する。

10

【0090】

一般に、ヒト化抗体は、非ヒトの供給源からこれに導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「重要な」残基といわれ、これらは、代表的に「重要な」可変ドメインから採取される。ヒト化抗体は、抗原認識部位または相補的決定超可変領域(CDR)のみが非ヒト起源であり、一方で可変ドメインの全てのフレームワーク領域(FR)が、ヒト遺伝子の産物である、抗体である。

20

【0091】

ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に対するげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよびその共同研究者の方法(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; Verhoeyenら、1988)に従って、本質的に実行され得る。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない抗体が、非ヒト種由来の対応する配列によって、置換されている。実際に、ヒト化抗体は、代表的にヒト抗体であり、ここで、いくつかのCDR残基および可能性のあるいくつかのフレームワーク領域(FR)残基は、げっ歯類抗体におけるアナログ部位由来の残基によって置換される。

30

【0092】

本発明において有用な抗体の産生を教示する他の米国特許(本明細書中で、参考としてそれぞれ援用される)としては、米国特許第5,565,332号(コンビナトリアルなアプローチを用いるキメラ抗体の産生を記載する);米国特許第4,816,567号(組換え免疫グロブリン調製を記載する)、および米国特許第4,867,973号(抗体治療剤結合体を記載する)が挙げられる。

【0093】

米国特許第5,565,332号は、抗体または抗体フラグメントを産生するための方法を記載し、これらは親抗体とおなじ結合特異性を有するが、これらは増大されたヒトの特徴を有する。ヒト化抗体は、同発明において有用なこのような方法と同程度の同じような、ファージディスプレイ技術を用いる鎖シャッフリングによっておそらく獲得され得、米国特許第5,565,332号の文書の全体が、本明細書中で参考として援用される。ヒト抗体はまた、Hoonら(1993)によって記載されるように、B細胞を、EBVおよびその後の分泌者のクローニングで形質転換することによって生成され得る。

40

【0094】

抗体が、抗原について高い親和性を保持し、そして他の好ましい生物学的特性でヒト化されることが、重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体は、親の配列およびヒト化配列の3次元モデルを用いた、親の配列および種々の概念的なヒト化産物の分析のプロセスによって調製される。3次元の免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、そして当業者によく知られている。コンピュータプログラムは利用可能であり、これは、選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある3次元配座構

50

造を例示および表示する。これらの表示の検査は、候補免疫グロブリン配列の機能決定における残基の役割の傾向の分析（すなわち、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響する残基の分析）を可能にする。この方法において、FR残基は、コンセンサス配列および重要な配列から選択および組み合わせられ得、その結果、所望の抗体の特徴（例えば、標的抗原に対する親和性の増加）が達成される。一般に、CDR残基は、抗原結合への影響に直接かつ最も実質的に関連する。

#### 【0095】

（（iv）ヒト抗体）

ヒトmAbは、ハイブリドーマ方法によって作製され得る。ヒトmAbの産生のためのヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株は、例えば、Kozbor（1984）およびBrodeurら（1987）によって記載されている。

#### 【0096】

免疫の際に、内因性免疫グロブリン産生のない状態で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが、現在可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J<sub>H</sub>）遺伝子のホモ接合性の欠失が、内因性抗体産生の完全な阻害を生じることが、記載されている。このような生殖細胞系変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの移動は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の産生を生じる（Jakobovitsら、1993）。

#### 【0097】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCaffertyら、1990）が、非免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体および抗体フラグメントを生成するために使用され得る。この技術に従って、抗体Vドメイン遺伝子は、線維状バクテリオファージ（例えば、M13またはfd）のメジャーなコートタンパク質遺伝子またはマイナーなコートタンパク質遺伝子のいずれかヘインフレームでクローン化され、そしてファージ粒子の表面で機能的抗体フラグメントとして提示される。

#### 【0098】

線維状粒子は、ファージゲノムの1本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的特性に基づく選択はまた、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択を生じる。従って、ファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々の形式で実行され得る（Johnsonら、1993）。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源が、ファージディスプレイのために使用され得る。Clacksonら（1991）は、免疫マウスの脾臓由来のV遺伝子の小さなランダムなコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。非免疫ヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーが構築され得、そして抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体は、Marksら（1991）またはGriffithら（1993）に記載される技術に従って基本的に単離され得る。

#### 【0099】

天然の免疫応答において、抗体遺伝子は、高い比での変異を蓄積する（体細胞の過剰変異）。導入された変化のいくつかは、高い親和性を与え、そして高い親和性の表面免疫グロブリンを提示するB細胞は、好ましくは、その後の抗原チャレンジの間に複製され、そして分化される。この天然のプロセスは、「鎖シャッフリング」として公知の技術を用いることによって模倣され得る（Marksら、1992）。この方法において、ファージディスプレイによって得られた「1次」ヒト抗体の親和性は、重鎖および軽鎖V領域遺伝子を、非免疫ドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然に存在する改変体（レパートリー）のレパートリーで連続的に置換することによって、改善され得る。この技術は、nM範囲での親和性を有する抗体および抗体フラグメントの生成を可能にする。非常に大きいファージ抗体レパートリーを作製するための戦略は、Waterhouseら（1993）によって記載されており、そしてこのような大きなファージライブラリーに直接

由来する高い親和性のヒト抗体の単離は、Griffithら(1993)によって報告される。遺伝子シャッフリングもまた、げっ歯類抗体からヒト抗体を誘導するために使用され得、ここでヒト抗体は、始めのげっ歯類抗体に類似の親和性および特異性を有する。本方法に従って、これらはまた、「エピトープ刷り込み」といわれ、ファージディスプレイ技術によって得られたげっ歯類抗体の重鎖または軽鎖のVドメイン遺伝子は、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置換され、げっ歯類-ヒトキメラを作製する。抗原の選択は、機能的抗原結合部位を修復し得るヒト可変部位(すなわち、パートナーの選択を支配(刷り込む)エピトープ)の単離を生じる。残りのげっ歯類Vドメインを置換するためにプロセスが反復される場合、ヒト抗体が得られる(PC特許出願WO93/06213)。CDR移植によるげっ歯類抗体の伝統的なヒト化とは異なり、この技術は、げっ歯類起源のフレームワークまたはCDR残基を有さない、完全なヒト抗体を提供する。

10

#### 【0100】

##### ((v)二重特異性抗体)

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体である。本発明の場合では、結合特異性の一方は、CD26抗原に対してであり、他方は、任意の他の抗原に対して、そして好ましくは、別のレセプターまたはレセプターサブユニットに対してである。例えば、CD26抗原に特異的に結合する二重特異性抗体は、本発明の範囲内である。二重特異性抗体を作製する方法は、当該分野において公知である。

#### 【0101】

伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づく(MillsteinおよびCuello, 1983)。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組合せから、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生じ、これらのうちの1つのみが、正確な二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる正確な分子の精製は、幾分厄介であり、そして生成物の収量が低い。同様の手順は、WO93/08829およびTrauneckerら(1991)に開示されている。

20

#### 【0102】

異なるより好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。好ましくは、融合物は、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有する。少なくとも1つの融合物に存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む、第1重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および必要に応じて免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物中に同時トランスフェクトされる。構築に使用される異なる比率の3つのポリペプチド鎖が、最適な収量を提供する実施形態において、これは3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率の調整における大きな自由度を提供する。しかし、等しい比率で少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率を生じる場合、またはこの比率が特に重要でない場合、1つの発現ベクターにおいて2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖についてのコード配列を挿入することが可能である。このアプローチの好ましい実施形態において、二重特異性抗体は、一方のアームにおいて第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおいてハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を提供する)から構成される。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が、容易な分離方法を提供する場合、この非対称構造が、不要な免疫グロブリン鎖の組合せから所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。二重特異性抗体を作製するさらなる詳細については、例えば、Sureshら(1986)を参照のこと。

30

40

#### 【0103】

##### ((vi)ヘテロ結合抗体)

50

ヘテロ結合抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合抗体は、2つの共有結合された抗体から構成される。このような抗体は、例えば、不要な細胞に免疫系細胞を標的化するため（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のため（WO91/00360；WO92/200373；EP03089）に提案されてきた。ヘテロ結合抗体は、任意の都合よい架橋方法を用いて作製され得る。適切な架橋剤は、当該分野において周知であり、そして多くの架橋技術とともに米国特許出願第4,676,980号に開示されている。

#### 【0104】

（b．交差反応性の抗体およびエピトープ）

本発明は、さらに、本明細書中に開示される抗体のように、同じ抗原および／またはエピトープ（すなわち、CD26抗原）に結合する、他の抗CD26抗体ベースの組成物（例えば、抗体結合体および免疫毒素）を包含する。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル型の抗体であり得、モノクローナルが一般的に好ましい。

#### 【0105】

本発明の抗体と実質的に同じ様式で、癌の抗原またはエピトープ（例えば、CD26抗原またはそのエピトープ）に対して結合する抗体の同定は、全く直接的な事項である。これは、抗体競合が評価され得る種々の免疫学的スクリーニングアッセイのいずれか1つを用いて容易に決定され得る。

#### 【0106】

例えば、試験される試験抗体が、異なる供給動物から入手されるか、または異なるアイソタイプの抗体であってさえも、単純な競合アッセイが、利用され得、コントロール抗体および試験抗体があらかじめ混合され、次いで抗原組成物に適用される。「抗原組成物」とは、CD26抗原または本明細書中に記載される関連癌抗原を含む任意の組成物を意味する。従って、ELISAおよびウエスタンブロットに基づくプロトコルは、このような単純な競合研究における使用について適切である。

#### 【0107】

このような実施形態において、抗原組成物（例えば、ELISAプレートの抗原がコーティングされたウェルまたは膜に吸着した抗原（ドットブロットおよびウエスタンブロットにおける場合））に適用する前の期間に、コントロール抗体は、変動する量の試験抗体（例えば、1:1、1:10および1:100）とあらかじめ混合される。種またはアイソタイプ二次抗体を使用することによって、結合したコントロール抗体のみを検出し得、この結合は、同じエピトープ／抗原を認識する試験抗体の存在によって減少される。

#### 【0108】

コントロール抗体（例えば、抗CD26抗体）と任意の試験抗体との間の抗体競合研究の実施において、まず、引き続く同定を可能にするために、コントロールを検出可能な標識（例えば、ビオチンまたは酵素標識、放射活性標識もしくは蛍光性標識のように）で標識し得る。これらの場合において、標識化コントロール抗体を、種々の比率（例えば、1:1、1:10および1:100）で試験されるべき試験抗体とともにインキュベートし、そして適切な期間の後、次いで標識化コントロール抗体の反応性をアッセイし、そしてこれをコントロール値と比較する。ここで、強力に競合する試験抗体は、インキュベーション中に含まれなかった。

#### 【0109】

このアッセイはまた、抗体ハイブリダイゼーションに基づく免疫学的アッセイの範囲の任意の1つであり得、そしてコントロール抗体は、それらの標識を検出すること（例えば、ビオチン化抗体の場合においてストレプトアビジンを使用して、または酵素標識と関連する発色性基質を使用することによってか、または放射活性標識もしくは蛍光性標識を単に検出することによって）によって検出される。コントロール抗体のように実質的に同一のエピトープに結合する抗体は、結合について効果的に競合し得、従って結合標識の減少によって証明されるように、コントロール抗体結合を有意に減少させる。

#### 【0110】

10

20

30

40

50

任意の試験抗体の非存在下、標識化コントロール抗体の反応性は、コントロール高値である。コントロール低値は、競合が起こり、そして標識化抗体の結合を減少させる場合、標識化抗体を、同じ型の標識していない抗体とインキュベートすることによって入手された。試験抗体の存在下、標識化抗体の反応性における有意な減少は、同一のエピトープを認識する、すなわち、標識化抗体と「交差反応する」試験抗体を示している。有意な減少は、再現性があり、すなわち、結合の減少が一貫して観測される。

【0111】

(c. 抗体結合体)

抗体結合体は、本発明のさらなる局面を形成する、別の薬剤（例えば、治療剤、検出可能標識、細胞傷害性因子、化学物質、毒素（toxic）、酵素インヒビター、医薬品など）に連結されるCD26抗体を包含する。診断抗体結合体は、種々の免疫アッセイにおけるようにインビトロでの診断および画像化技術におけるようにインビボでの診断の両方で使用され得る。

10

【0112】

特定の抗体結合体としては、主にインビトロでの使用のために意図されたものが挙げられ、ここでこの抗体は、第2の結合リガンドまたは酵素（酵素タグ）に連結され、発色性基質との接触の際に有色産物を生成する。適切な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（セイヨウワサビ）ハイドロジェンペルオキシダーゼおよびグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい二次結合リガンドは、ビオチン化合物およびアビジン化合物またはストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は、例えば、米

20

【0113】

機能的有用性について意図された他の抗体結合体としては、抗体が、酵素インヒビター（例えば、アデノシンデアミナーゼインヒビター、またはジペプチジルペプチダーゼI V インヒビター）に結合体化されたものが挙げられる。

【0114】

((i) 放射標識化抗体結合体)

抗体ベースの分子の使用において、例えば、脳癌、甲状腺癌、胸部癌、胃癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、肝臓癌、および肺癌または各々の転移体の画像、磁気共鳴画像化、X線画像化、コンピュータエミッション断層撮影ならびにこのような技術を提供する、インビボでの診断剤として利用され得る。本発明の抗体画像化構築物において、使用される抗体部分は、一般的に、癌マーカー（例えば、CD26抗原）に結合し、そして画像化剤は、画像化の際に検出可能な薬剤（例えば、常磁性、放射活性または蛍光性の薬剤）である。

30

【0115】

多くの適切な画像化剤は、抗体へのこれらの結合についての方法であるように、当該分野で公知である（例えば、米国特許第5,021,236号および同第4,472,509号（両方とも本明細書中に参考として援用される））。特定の結合方法は、例えば、有機キレート化剤（例えば、抗体に結合されるDTPA）を利用する、金属キレート錯体の使用に関する（米国特許第4,472,509号）。Mabはまた、カップリング剤（例えば、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩）の存在下で酵素と反応させられ得る。フルオレseinマーカーを有する結合体は、これらのカップリング剤の存在下か、またはイソチオシアネートとの反応によって調製される。

40

【0116】

常磁性イオンの場合、例えば、以下のイオンが、例示の目的で言及され得る：クロム（III）、マンガン（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（III）、サマリウム（III）、イッテルビウム（II）

50



II)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)。

【0117】

他の関係(例えば、X線画像化)で有用なイオンとしては、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が挙げられるが、これらに限定されない。ガドリニウムが特に好ましい常磁性イオンである。

【0118】

治療適用および/または診断適用のための放射活性同位体の場合、以下が言及され得る：アスタチン<sup>211</sup>、<sup>14</sup>炭素、<sup>51</sup>クロム、<sup>36</sup>塩素、<sup>57</sup>コバルト、<sup>58</sup>コバルト、銅<sup>67</sup>、<sup>152</sup>Eu、ガリウム<sup>67</sup>、<sup>3</sup>水素、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、インジウム<sup>111</sup>、<sup>59</sup>鉄、<sup>32</sup>リン、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、<sup>75</sup>セレン、<sup>35</sup>硫黄、テクネチウム<sup>99m</sup>およびイットリウム<sup>90</sup>。<sup>125</sup>Iは、特定の実施形態における使用についてしばしば好ましく、そしてテクネチウム<sup>99m</sup>およびインジウム<sup>111</sup>もまた、これらの低いエネルギーおよび長期的検出についての適合性に起因してしばしば好ましい。

10

【0119】

本発明の放射活性標識化mAbは、当該分野に周知の方法に従って作製され得る。例えば、mAbは、ヨウ化ナトリウムもしくはヨウ化カリウム、および化学酸化剤(例えば、次亜塩素酸ナトリウム)または酵素的酸化剤(例えば、ラクトペルオキシダーゼ)と接触させることによってヨウ素化され得る。本発明に従うmAbは、リガンド交換プロセス(例えば、パーテクネート(pertechnate)を錫溶液で還元する工程、還元したテクネチウムをSephadexカラム上でキレート化する工程、およびこの抗体をこのカラムに適用する工程)によってか、または直接標識技術(例えば、パーテクネート、還元剤(例えば、SnCl2)、緩衝溶液(例えば、ナトリウム-カリウムフタル酸溶液、および抗体をインキュベートすることによる))によって、テクネチウム<sup>99m</sup>で標識化され得る。

20

【0120】

金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合するために頻繁に使用される中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

30

【0121】

蛍光標識としては、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネートおよびレノグラフィン(renographin)が挙げられる。

【0122】

((ii)免疫毒素)

本発明は、さらに、免疫毒素を提供し、ここで、癌マーカー(例えば、CD26抗原)に結合する抗体は、細胞傷害性因子に連結される。免疫毒素技術は、かなり進歩しており、かつ当業者に公知である。免疫毒素は、抗体成分が、細胞の増殖もしくは細胞分裂を停止(kill)するかまたは抑制する能力を有する別の因子(特に、細胞傷害性因子、またはそうでなければ抗細胞性因子)に連結された薬剤である。

40

【0123】

本明細書中で使用される場合、用語「毒素」および「毒素部分」は、このような死滅特性または抑制特性を有する任意の細胞傷害性因子またはそうでなければ抗細胞性因子をいうために使用される。従って、毒素は、抗体に結合体化され得、細胞に活性形態で送達され得る、薬理的因子であり、ここで、これらは、有意な有害な作用を発揮する。

【0124】

免疫毒素の調製は、一般的には、当該分野に周知である(例えば、本明細書中で参考として援用される米国特許第4,340,535号を参照のこと)。IgGベースの免疫毒素が、代表的には、これらのFab'対応物よりも、よりよい結合能力およびより遅い血液クリアランスを示すが、Fab'フラグメントベースの免疫毒素は、一般的に、IgGベ

50

ースの免疫毒素と比較した場合、よりよい組織浸透能力を示すことが知られている。

【0125】

例示的な抗細胞性因子としては、化学療法剤、放射性同位体および細胞毒素が挙げられる。化学療法剤の例としては、以下が挙げられる：ホルモン（例えば、ステロイド）；代謝拮抗物質（例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノプテリン）；アントラサイクリン；マイトマイシンC；ピンカアルカロイド；デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；またはアルキル化剤（例えば、クロラムブシルまたはメルファラン）。

【0126】

好ましい免疫毒素としては、ごくわずかな例を言及すると、しばしば以下が挙げられる：植物、真菌もしくは細菌に由来する毒素（例えば、A鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、 $\alpha$ -サルシン、アスペルギリン、リスチリクトシン（*restriictocin*）、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素または*pseudomonas*外毒素）。毒素-抗体構築物の使用は、これらの抗体への結合のように、免疫毒素の分野において周知である。言うまでもなく、種々の毒素の組合せもまた、1つの抗体分子に結合され得、これによって、変動するかまたは増強されもする細胞傷害性に適応する。

10

【0127】

抗体への結合のための1つの型は、リシンであり、脱グリコシル化リシンA鎖が特に好ましい。本明細書中で使用される場合、用語「リシン」は、天然供給源および組換え手段の両方から調製されたリシンをいうことが意図される。リシン分子の種々の「組換え」形態または「遺伝子操作」形態は、当業者に公知であり、これらの全ては、本発明に従って利用され得る。

20

【0128】

脱グリコシル化リシンA鎖（dgA）が、好ましい。なぜなら、dgAの極度な効力、より長い半減期のため、そしてdgAを臨床等級および規模で製造することが経済的に可能であるからである。30N末端アミノ酸を、ナガラーゼ（*Nagarse*）（*Sigma*）から除去した短縮化リシンA鎖もまた、利用され得る。

【0129】

1つ以上の毒素部分を抗体に連結または結合することは、種々の機構（例えば、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合および複合体形成）によって達成され得る。好ましい結合方法は、例えば、化学的架橋、天然のペプチドまたはジスルフィド結合を使用する共有結合に関する結合である。

30

【0130】

共有結合は、存在する側鎖の直接的な縮合によってか、または外部架橋分子の組込みによってのいずれかで達成され得る。多くの二価因子または多価因子は、タンパク質分子を他のタンパク質、ペプチドまたはアミン官能基に結合するのに有用である。カップリング剤の例としては、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン、およびヘキサメチレンジアミンが挙げられる。この列挙は、当該分野で公知の種々のカップリング剤を網羅することを意図するものではなく、むしろ、使用され得るより一般的なカップリング剤の例示である。

40

【0131】

好ましい実施形態において、まず、抗体を誘導体化することが所望さえ得、次いで誘導体化産物に毒素成分を結合し得ることが企図される。本明細書中で使用される場合、用語「誘導体化」は、適切な架橋剤を用いる抗体基質の化学修飾を記載するために使用される。この様式で使用するための架橋剤の例としては、ジスルフィド結合を含むリンカー（SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）およびSMPPT（4-スクシンイミジル-オキシカルボニル- $\alpha$ -メチル-（2-ピリジルジチオ）トルエン）が挙げられる。

【0132】

生物学的に放出可能な結合は、臨床的に活性な免疫毒素の実現に特に重要であり、ここで

50

、毒素部分は、一旦、毒素部分が標的細胞に入ると、抗体から放出され得なければならない。種々の型の連結構築物が公知であり、この構築物としては、システインのようなアミノ酸に含まれるか、またはそうでなければ、各々のタンパク質構造に導入された、スルフヒドリル基間の単なる直接的なジスルフィド結合形成、および利用可能なリンカー部分もしくは設計されたリンカー部分を使用するジスルフィド結合が挙げられる。

#### 【0133】

多数の型のジスルフィド結合を含むリンカーが公知であり、この結合は、毒素部分を抗体に結合体化するために首尾良く利用され得る。しかし、特定のリンカーが一般的に好ましく、例えば、立体的に込み入ったジスルフィド結合リンカーは、インビボでのこれらのより高い安定性に起因して好ましく、従って作用部位での結合の前に毒素部分から放出されるのを妨げる。特に好ましい架橋試薬は、S M P Tであるが、他のリンカー（例えば、S A T A、S P D Pおよび2 - イミノチオラン）もまた使用され得る。

10

#### 【0134】

一旦結合体化されると、夾雑物（例えば、未結合体化A鎖または抗体）を除去するために、結合体を精製することが重要である。増加した毒性の可能性のために、未結合体化A鎖を除去することが重要である。さらに、結合体化種と未結合体化種との間の抗原に対する競合の可能性を避けるために未結合体化抗体を除去することが重要である。いずれの事象においても、これらを臨床的に有用にさせるのに十分な程度の純度の結合体を提供するための多数の精製技術が見出されている。

#### 【0135】

一般的には、最も好ましい技術は、ゲル濾過またはゲル浸透工程にBlue - Sepharoseの使用を組み込む。Blue - Sepharoseは、Cibacron Blue 3 GAおよびアガロースから構成されるカラムマトリクスであり、これは、免疫結合体の精製において有用であることが見出されている。Blue - Sepharoseの使用は、A鎖結合とのイオン交換の特性を組み合わせ、未結合体化結合から結合体化結合の良好な分離を提供する。Blue - Sepharoseは、結合体化調製物から遊離（非結合体化）抗体の除去を可能にする。遊離（未結合体化）毒素（例えば、d g A）を除去するために、分子排除クロマトグラフィー工程が、従来のゲル濾過手順または高速液体クロマトグラフィーのいずれかを用いて使用され得る。

20

#### 【0136】

十分に精製された結合体が調製された後、一般的に、非経口的に投与され得る薬学的組成物中にこれを調製することが望まれる。このことは、適切な薬学的組成物を有する媒体を最終精製工程として使用することによってなされる。このような処方物は、代表的には、賦形剤、安定剤などと一緒に薬学的緩衝液を含む。薬学的に受容可能な組成物は、滅菌、非免疫原性および非発熱性である。これらの調製の詳細は、当該分野において周知であり、そして本明細書中においてさらに記載される。内毒素汚染は、安全レベル（例えば、タンパク質1 mgあたり0.5 ng未満）で最小限に維持されるべきであることが理解される。

30

#### 【0137】

本発明に従う適切な薬学的組成物は、一般的に、受容可能な薬学的希釈剤または賦形剤（例えば、滅菌水溶液）と混合された約10 ~ 約100 mgの所望の結合体を含み、この結合体に対して約0.25 ~ 約2.5 mg / mlの最終濃度を与える。

40

#### 【0138】

上記されるように、本発明の癌マーカー抗体は、1つ以上の化学療法剤（例えば、抗腫瘍薬物、サイトカイン、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ホルモン、核酸など）に連結され得、従ってこれは、この抗体結合体を用いてCD26抗原発現癌細胞に標的化され得る。これらの非抗体結合体化対応物を越える抗体結合体化薬剤の利点は、抗体によって与えられたさらなる選択性である。

#### 【0139】

抗体に結合体化するために利用可能な種々の化学療法剤および薬理学的因子の分析におい

50

て、これまでに、抗体に首尾良く結合体化され、そして薬理学的に機能することが示されたものを特に考慮することを望み得る。使用されてきた例示的な抗腫瘍性薬剤としては、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンブラスチンが挙げられる。さらに、他の薬剤（例えば、ネオカルジノスタチン、マクロマイシン、トレニモンおよび - アマニチン）の結合もまた、記載されている。本明細書中に示される適切な薬物の列挙は、言うまでもなく、単に例示であり、ここで、組織への特異的な送達のために抗体に薬学的因子を結合する技術は、十分に確立されている。

#### 【0140】

従って、一般的に、抗体のアミノ酸または炭水化物基に対する結合または架橋について利用可能な、一級アミン基もしくは二級アミン基、ヒドラジド基もしくはヒドラジン基、カルボキシルアルコール基、リン酸基、またはアルキル化基を有する任意の薬理学的因子を抗体に結合体化することが可能であると考えられる。タンパク質構造の場合において、これは、免疫毒素について上記されるように、架橋薬剤によって最も容易に達成される。結合はまた、薬物と抗体との間の酸に不安定なアシルヒドラゾンまたはシスアコニチル連結によってか、または薬物の - カルボキシル基と抗体のアミノ酸との間のペプチドスペーサー（例えば、L - L e u - L - A l a - L - L e u - L - A l a ）を使用することによって、達成され得る。

10

#### 【0141】

（E．免疫学的検出）

（a．イムノアッセイ）

20

治療用抗CD26抗体はまた、癌の検出および分析に関連する種々の診断適用および予後適用において有用である。従って、なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的成分の結合、精製、同定、除去、定量化またはそうでなければ、一般的な検出のための免疫検出方法を企図する。従って、例えば、CD26を発現する癌細胞の数の減少によって反映される治療効力の予後または診断を得るために、一連の免疫検出を用いる本発明の抗CD26抗体治療を併用または追跡し得る。

#### 【0142】

種々の有用な免疫検出法の工程が、例えば、N a k a m u r a ら（1987）（本明細書中に参考として援用される）のような科学文献に記載されている。これらの最も単純で直接的な意味においてイムノアッセイは、結合アッセイである。特定の好ましいイムノアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、放射免疫アッセイ（R I A）およびイムノビーズ捕捉アッセイの種々の型である。組織片を使用する免疫組織化学的検出がまた、特に有用である。しかし、検出がこのような技術に制限されず、ウエスタンブロッティング、ドットブロッティング、F A C S 分析もまた、本発明と関連して使用され得ることは、容易に認識される。

30

#### 【0143】

一般的に、免疫結合法は、タンパク質、ペプチド、または抗体を含むと思われるサンプルを得る工程、およびそのサンプルを、場合によっては免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、本発明に従って抗体またはタンパク質またはペプチドと接触させる工程を含む。

40

#### 【0144】

本発明の免疫結合法は、サンプル中の反応成分の量を検出または定量化するための方法を含み、この方法は、結合プロセスの間に形成される任意の免疫複合体の検出または定量化を必要とする。ここで、CD26抗原または癌に関連するマーカータンパク質、ペプチドもしくは対応する抗体を含有すると思われるサンプルを得、そしてそのサンプルを、抗体またはコードされたタンパク質もしくはペプチドと接触させ、場合によっては、次いで、特定の条件下で形成される免疫複合体の量を検出または定量化する。

#### 【0145】

抗原検出に関して、分析される生物学的サンプルは、癌特異的抗原（例えば、CD26抗原）を含有する任意のサンプル（例えば、T - 細胞癌、黒色腫、グリア芽細胞腫、星状細胞

50

胞腫、ならびに胸部、胃、結腸、脾臓、腎臓、卵巣、肺、前立腺、肝臓、リンパ節または骨髓組織片もしくは骨髓組織試料、ホモジェナイズされた組織抽出物、単離された細胞、細胞膜調製物、上記のタンパク質のいずれかを含有する組成物の分離形態もしくは精製形態、の癌腫、あるいは癌組織と接触する任意の生物学的流体（血液、リンパ液、精液および尿を含む））などであり得る。

#### 【0146】

選択された生物学的サンプルを、免疫複合体（1次免疫複合体）が形成し得るのに有効な条件下でかつ免疫複合体（1次免疫複合体）が形成し得るのに十分な時間、タンパク質、ペプチドまたは抗体と接触させる工程は、一般的には、単に、サンプルに組成物を加え、抗体が、存在する任意の抗原（例えば、CD26抗原）と免疫複合体を形成する（すなわち抗原に結合する）のに十分な時間、その混合物をインキュベートする工程である。この時間の後、サンプル-抗体組成物（例えば、組織片、ELISAプレート、ドットプロットまたはウエスタンプロット）は、一般的には洗浄され、任意の非特異的結合抗体種を除去し、1次免疫複体内で特異的に結合されるこれらの抗体のみが検出されるのを可能にする。

10

#### 【0147】

一般的に、免疫複合体形成の検出は、当該分野において周知であり、多くのアプローチの適用を通して達成され得る。これらの方法は、一般的には標識またはマーカー（例えば、放射活性、蛍光、生物学的タグもしくは酵素タグまたは当該分野で一般に使用される標識）の検出に基づく。このような標識の使用に関する参考文献としては、以下が挙げられる：米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号および同第4,366,241号（これらの各々は、本明細書中に参考として援用される）。もちろん、当該分野で公知のように、配列に結合する、2次抗体のような2次結合リガンドまたはビオチン/アビジンリガンドの使用を通して、さらなる利点が見出され得る。

20

#### 【0148】

検出に使用されるコードされるタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体は、それ自体が検出可能な標識に連結され得、次いで、この標識を単に検出し、それによって組成物中の1次免疫複体の量を決定することを可能にする。

30

#### 【0149】

あるいは、1次免疫複体内で結合される最初に加えられる成分は、コードされるタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体に対して結合親和性を有する2次結合リガンドによって検出され得る。これらの場合において、2次結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。この2次結合リガンドは、しばしばそれ自体が抗体であり、従って、「2次」抗体と呼ばれ得る。1次免疫複合体は、2次免疫複合体が形成し得るのに有効な条件下でかつ2次免疫複合体が形成し得るのに十分な時間、標識された2次結合リガンドまたは抗体と接触させられる。次いで、この2次免疫複合体は、一般的に洗浄され、任意の、非特異的に結合された、標識された2次抗体またはリガンドを除去し、次いで2次免疫複合体中の残りの標識が検出される。

40

#### 【0150】

さらなる方法は、2つの工程のアプローチによる1次免疫複合体の検出を含む。抗体のような2次結合リガンドは、コードされるタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体に対して結合親和性を有しており、上記のように2次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄後、この2次免疫複合体は、再び、免疫複合体（3次免疫複合体）を形成し得るのに有効な条件下および免疫複合体（3次免疫複合体）を形成し得るのに十分な時間、2次抗体に対して結合親和性を有する3次結合リガンドまたは抗体と接触される。この3次リガンドまたは3次抗体は、検出可能な標識と連結され、従って、形成される3次免疫複合体の検出を可能にする。このシステムは、所望される場合、シグナル増幅を提供し得る。

#### 【0151】

50

本発明の免疫検出法は、癌の診断において明らかな有用性を有する。ここで、コードされるタンパク質、ペプチドまたは対応する抗体のいずれかを含有すると思われる生物学的サンプルまたは臨床サンプルが、使用される。しかし、これらの実施形態はまた、非臨床サンプルに対する用途（例えば、抗原サンプルまたは抗体サンプルの検定（t i t e r i n g）、ハイブリドーマの選択など）も有している。

【 0 1 5 2 】

（（ i ） E L I S A ）

示されるように、E L I S Aのような免疫検出技術は、抗C D 2 6抗体処置の必要性を決定するための、臨床サンプルにおけるC D 2 6の存在の検出と合わせて有用であり得る。あるいは、本明細書中で提供されるような、癌細胞が、C D 2 6を発現するように誘導され、処置を可能にする実施形態におけるこのような技術が、使用され得る。

10

【 0 1 5 3 】

例示的なE L I S Aにおいて、本発明のコードされるタンパク質に結合する抗体は、タンパク質親和性を阻害する、選択された表面上（例えば、ポリスチレンマイクロタイタ - プレート中のウェル）に固定化される。次いで、臨床サンプルのような、癌疾患マーカー抗原（例えば、C D 2 6抗原）を含むと思われる試験組成物が、ウェルに加えられる。結合および非特異的に結合された免疫複合体を除去するための洗浄の後、その結合された抗原が、検出され得る。

【 0 1 5 4 】

一般的に、検出は、検出可能な標識と連結する標的タンパク質に特異的な2次抗体の付加によって達成され得る。このタイプのE L I S Aは、単純な「サンドイッチE L I S A」である。検出はまた、2次抗体の付加、続く3次抗体（これは、2次抗体に対する結合親和性を有する）の付加によっても達成され得、この3次抗体は、検出可能な標識に連結される。

20

【 0 1 5 5 】

別の例示的なE L I S Aにおいて、C D 2 6抗原を含有すると思われるサンプルは、ウェル表面上に固定化され、次いで、本発明の抗体と接触される。結合および非特異的に結合された免疫複合体を除去するための洗浄の後、その結合された抗原が、検出され得る。最初の抗体が検出可能な標識に連結される場合、免疫複合体は、直接検出され得る。また、この免疫複合体は、1次抗体に対して結合親和性を有する2次抗体を使用して検出され得、この2次抗体は、検出可能な標識に連結される。

30

【 0 1 5 6 】

別のE L I S Aにおいて、C D 2 6抗原のようなタンパク質またはペプチドが、固定化され、このE L I S Aは、検出における抗体競合の使用を含む。このE L I S Aにおいて、標識された抗体は、ウェルに加えられ、C D 2 6抗原への結合およびこれらの標識による検出が可能となる。次いで、未知のサンプルにおけるマーカー抗原の量は、コーティングされたウェルでのインキュベーションの前またはインキュベーション中の、サンプルと標識された抗体との混合によって決定される。サンプル中のマーカー抗原の存在は、抗体の量を減少させるように作用し、ウェルへの結合に便利であり、最終的なシグナルを減少させる。このことは、未知のサンプルにおける抗体の検出に適切であり、ここで、未標識抗体は、抗原でコーティングされたウェルに結合し、また標識された抗体を結合するのに便利な抗原の量を減少させる。

40

【 0 1 5 7 】

使用される形式とは無関係に、E L I S Aは、通常、コーティング、インヒビターキューベーションまたは結合、非特異的に結合される種を除去するための洗浄、および結合された免疫複合体の検出のような特定の特徴を有する。これらは、以下に記載されるとおりである。

【 0 1 5 8 】

抗原または抗体のいずれかによるプレートのコーティングにおいて、一般的に、プレートのウェルは、抗原または抗体の溶液と共に、一晚または特定の時間のいずれかで、インキ

50

ュベートされる。次いで、このプレートのウェルは、不完全に吸着された物質を除去するために洗浄される。次いで、ウェルの利用可能な残りの表面のいくらかは、抗血清の試験に関して、抗原的に中性 (neutral) である非特異的タンパク質で「コーティング」される。このタンパク質は、ウシ血清アルブミン (BSA)、カゼインおよび粉ミルクの溶液を含む。このコーティングは、免疫化表面における非特異的吸着部位のブロッキングを可能にし、従って、その表面上の抗血清の非特異的結合によって引き起こされるバックグラウンドを減少させる。

#### 【0159】

ELISAにおいて、直接手段よりも2次検出手段または3次検出手段を使用することの方が、おそらくより慣習的である。従って、ウェルへのタンパク質または抗体の結合、バックグラウンドを減少させるための非反応性材料でのコーティング、および非結合物質を除去するための洗浄の後、固定化表面は、免疫複合体 (抗原 / 抗体) 形成を有効にし得る条件下で、コントロールのヒト癌および / または試験されるべき臨床サンプルもしくは生物学的サンプルと接触される。次いで、免疫複合体の検出は、標識される2次結合リガンドもしくは抗体、または標識される3次抗体もしくは3次結合リガンドと結合する2次結合リガンドもしくは抗体を必要とする。

10

#### 【0160】

「免疫複合体 (抗原 / 抗体) を形成し得るのに有効な条件下」とは、その条件が、好ましくは、BSA、ウシグロブリン (BGG) およびリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) / Tweenのような溶液で抗原および抗体を希釈する工程を含むことを意味する。これらの添加された試薬はまた、非特異的バックグラウンドの減少を補助する傾向にある。

20

#### 【0161】

「適切な」条件とはまた、インキュベーションが、効果的な結合を可能にする温度でかつ効果的な結合を可能にするのに十分な時間であるインキュベーションであることを意味する。インキュベーション工程は、典型的には、好ましくは、25 ~ 27 の温度で約1 ~ 2 ~ 4時間、あるいは約4では一晩であり得る。

#### 【0162】

ELISAにおける全てのインキュベーション工程に続いて、接触された表面は、洗浄され、非複合体化物質が除去される。好ましい洗浄手段としては、PBS / Tweenまたはホウ酸緩衝液のような溶液で洗浄する工程を含む。試験サンプルと元の結合物質との特異的な免疫複合体の形成、それに続く洗浄に続いて、ごく少量の免疫複合体の発生が測定され得る。

30

#### 【0163】

検出法を提供するために、2次抗体または3次抗体は、関連する標識を有し、検出を可能にする。好ましくは、これは、適切な色素生産性物質とのインキュベーションによって着色展開を生じる酵素である。従って、例えば、さらなる免疫複合体形成の展開に好ましい期間および条件下 (例えば、PBS - TweenのようなPBS含有溶液中、室温での2時間のインキュベーション) で、1次免疫複合体または2次免疫複合体の、ウレアーゼ、グルコース、オキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたは水素ペルオキシダーゼ結合抗体との接触およびインキュベーションが望まれる。

40

#### 【0164】

標識された抗体とのインキュベーション、それに続く未結合物質を除去するための洗浄の後、標識の量が定量化される (例えば、酵素標識のようなペルオキシダーゼの場合における、尿素およびプロモクレゾールパープルまたは2,2'-アジド-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸 [ABTS] およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のような色素生産性物質とのインキュベーションによって)。次いで、定量化は、着色の程度を測定することによって (例えば、可視スペクトル分光光度計を使用して) 達成される。

#### 【0165】

他の実施形態において、液相競合ELISAがまた、意図される。液相ELISAは、ビーズ (例えば、磁性ビーズ) へのCD26抗原の結合を含む。次いで、このビーズは、ヒ

50

トおよび動物起源由来の血清とともにインキュベーションされる。適切なインキュベーション期間によって、特定の相互作用が生じ得る後に、ビーズが洗浄される。この特定の型の抗体は、抗体指標結合体によって検出される。このビーズは、洗浄され、そして分類される。この複合体は、結合部分に依存して、適切な装置（蛍光、エレクトロルミネセント、分光光度計）で読み取られる。従って、抗体結合レベルは、定量化されそして存在するシグナルの量に直接的に関連する。

#### 【0166】

((ii) 免疫組織化学)

抗CD26抗体が、免疫組織化学(IHC)による研究から調製される新鮮凍結組織ブロックおよびホルマリン固定組織ブロック、パラフィン包埋組織ブロックの全てと結合して使用され得る。例えば、各組織ブロックは、50mgの残渣「微粉碎」腫瘍からなる。これらの特定の試料由来の組織ブロックの調製法は、種々の予後因子（例えば、胸部における）の以前のIHC研究において好首尾に使用されており、当業者に周知である(Brownら、1990; Abbondanzioら、1990; Allredら、1990)。

10

#### 【0167】

手短に言うと、凍結片は、50ngの凍結された「微粉碎」腫瘍を、室温で、小さいプラスチックカプセル中のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中で再水和し；遠心分離によって粒子をペレット状にし；そのペレットを粘性包埋培地(OC T)中に再懸濁し；カプセルをひっくり返して、遠心分離によって再びペレット状にし；-70のイソペンタン中で急速凍結し；プラスチックカプセルを切断して凍結した組織シリンダーを取り出し；その組織シリンダーをクリオスタットマイクロームチャック状に固定し；そして平均して約500の著しくインタクトな腫瘍細胞を含む25~50のシリアルセクション(serial section)を切断することによって調製され得る。

20

#### 【0168】

パーマネントセクション(permanent section)が、以下の工程を含む類似の方法によって、調製され得る；プラスチック微量遠心管中の50mgの再水和；ペレット化；4時間の固定化のための10%ホルマリン中への再懸濁；洗浄/ペレット化；温かい2.5%の寒天中への再懸濁；ペレット化；寒天を硬化するための氷水中での冷却；チューブからの組織/寒天ブロックの除去；パラフィン中のブロックの浸潤および包埋；および50のシリアルパーマネントセクションを切り取る。

30

#### 【0169】

((iii) FACS分析)

蛍光活性化セルソーティング、フローサイトメトリーまたはフローマイクロフルオロメトリーが、CD26抗原のような抗原の存在のために個々の細胞をスキャンする手段を提供する。この方法は、活性化し得、液体培地中の標識された細胞の発光の励起を検出し得る装置を使用する。

#### 【0170】

FACSは、生存細胞または固定された細胞のいずれかにおいて、迅速で、信頼性があり、定量的でありかつ多重パラメーターの分析を提供する能力において特有である。細胞は、一般に、生検材料、血液または培養物中の単一の細胞懸濁物から得られる。FACS分析は、おそらく、所定の時間（例えば、疾患の進行の間の抗原プロファイルに続くため）で多数の癌抗原を分析することが望まれる場合に、最も有用である。

40

#### 【0171】

((iv) インビボ画像化)

本発明はまた、抗体結合体を使用して、インビボでの、癌の画像化方法を提供する。用語「インビボ画像化」とは、動物またはヒト被験体の体内に局在する癌細胞に特異的に結合する、標識された抗体またはそのフラグメントを検出し得る任意の非侵襲性方法のことをいう。

#### 【0172】

この画像化方法は、一般的には、画像化に有効な量の（薬学的に有効なキャリア中の）検

50



出可能に標識された癌特異的抗体（例えば、抗CD26抗体）またはそのフラグメントを、動物または被験体に投与し、次いでその標識された抗体の癌組織への結合を検出する工程を包含する。この検出可能な標識は、好ましくは、非侵襲性方法によって検出可能である、スピン共鳴分子または放射活性同位体である。

#### 【0173】

「画像化に有効な量」は、投与が、抗体またはフラグメントの、癌組織への結合のより遅い検出に十分である場合の、検出可能に標識された抗体またはそのフラグメントの量である。この有効量の抗体-マーカー結合体は、十分な時間、患者の組織内に存在する反応性抗原と接触させられ、次いで、患者は、検出可能なマーカーを同定するための検出デバイスに供される。

10

#### 【0174】

従って、画像化のための抗体結合体または抗体構築物は、例えば、磁気共鳴像、x線画像、コンピュータ化されたエミッショントモグラフィーなどを通して、腫瘍の画像を提供するための能力を有する。磁気共鳴像（「MRI」）に特に有用な要素としては、核磁性スピン共鳴同位体<sup>157</sup>Gd、<sup>55</sup>Mn、<sup>162</sup>Dy、<sup>52</sup>Cr、および<sup>56</sup>Feが挙げられ、ガドリニウムがしばしば好ましい。テクニシウム（technetium）<sup>99m</sup>またはインジウム<sup>111</sup>のような放射活性物質は、シンチレーションカメラまたは検出器を使用して検出され得、また使用され得る。本発明における使用に適切なさらなる金属イオンの例は、<sup>123</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>97</sup>Ru、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>125</sup>I、<sup>68</sup>Ga、<sup>72</sup>As、<sup>89</sup>Zr、および<sup>201</sup>Tlである。

20

#### 【0175】

インビボでの診断のための放射性核種を選択する際に考慮する要因は、核種の半減期が、十分に長ければ標的による取りこみの最大時間においてもなお検出可能であるが、短いと宿主およびバックグラウンドへの有害な照射が最小化される。理想的には、インビボの画像化のために使用される放射性核種は、特定の発光を欠くが、大量の140～2000 keVの範囲の光子（これは、従来のカメラによる検出を容易にし得る）を生成する核種である。

#### 【0176】

放射性核種は、中間官能基を使用することによって、直接的であるかまたは間接的であるかのいずれかで抗体に結合し得る。しばしば抗体に対する代謝イオンとして存在する放射性同位体に結合するために使用される中間官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）およびエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）である。

30

#### 【0177】

標識された抗体の投与は、局所的であるか全身性であり得、髄液を介して、静脈内、動脈内で達成され得る。投与はまた、検査下の身体部位に依存して皮内または腔内であり得る。標識された抗体またはフラグメントが疾患した組織に結合するための十分な経過時間（癌組織の場合においては、例えば、30分～48時間）後、研究下の被験体の領域は、画像化技術によって試験される。MRI、SPECT、平面シンチレーション画像化および他の新興の画像化技術が全て使用され得る。

#### 【0178】

結合された放射性同位体の分布および時間経過によるその増加または減少は、モニターされそして記録される。臨床的に正常な個体の研究から得られたデータの結果を比較することによって、疾患した組織の存在および範囲が測定され得る。

40

#### 【0179】

この正確な画像化プロトコルは、患者に特有の因子に依存して、および試験下の身体部位、投与方法、使用される標識の型などに依存して、変化させる必要がある。しかし、特定の手順の決定は、当業者にとっては日常的なことである。画像化実施形態のための用量は、患者の年齢および体重に依存するが、一度の用量は、患者あたり、約0.1～約20 mgの抗体、より好ましくは、約1.0～約2.0 mgの抗体が、有用であると考えられる。

50

## 【 0 1 8 0 】

( F . 併用癌治療 )

本発明により提供される抗 C D 2 6 抗体処置の効果をさらに増強するために、併用療法が企図される。従って、抗 C D 2 6 抗体ベースの治療に加えて、第 2 の治療薬が使用され得る。この第 2 の治療薬は、化学治療薬、放射性治療薬、遺伝子治療薬、タンパク質 / ペプチド / ポリペプチド治療薬、別の免疫治療薬などであり得る。このような薬剤は、当該分野で周知である。

## 【 0 1 8 1 】

本発明によって処置され得る癌としては、以下の血液性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない：B細胞慢性リンパ性白血病、またはB細胞白血病、リンパ芽球T細胞リンパ腫、急性リンパ性白血病、T - 細胞 C D 3 0 + 未分化大細胞リンパ腫、未梢性T - 細胞リンパ腫、T - 細胞慢性リンパ性白血病、血管免疫芽球性T - 細胞リンパ腫、血管中心 ( a n g i o c e n t r i c ) T - 細胞リンパ腫、H T L V - 関連T - 細胞白血病、または成人T - 細胞白血病、血液癌、骨髓性白血病、単球白血病、骨髓球白血病、プロ骨髓球白血病、骨髓芽球性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、リンパ芽球白血病、毛様細胞白血病。処置され得る固体細胞腫瘍および癌としては、脳 ( グリア芽細胞種、髄芽種、星状細胞種、稀突起神経膠細胞種、上衣細胞腫 )、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、膵臓、結腸、胃、乳房、骨、内分泌線、子宮内膜、前立腺、精巣、甲状腺、卵巣、皮膚、頭および首、食道などの腫瘍および癌が挙げられる。さらに、この癌は、前癌、転位性および / または非転位性癌である。

10

20

## 【 0 1 8 2 】

「効果的な ( 有効 ) 量」は、癌細胞の増殖、静止細胞増殖、アポトーシスの誘導、代謝の阻害、腫瘍壊死の誘導、細胞の殺傷または細胞中の細胞毒の誘導を低下、減少、阻害、そうでなければ抑制する薬剤の量として定義される。

## 【 0 1 8 3 】

第 2 の治療剤の投与は、数分から数日、数週間にわたる間隔で、抗 C D 2 6 抗体を使用する治療に先行するかまたはその治療に続き得る。実施形態において、第 2 の治療剤および抗 C D 2 6 抗体は、一緒に投与され、一般的には有効な時間が、各送達時間の間に終了しないことを保証する。このような例において、患者への投与は、それぞれ約 1 2 ~ 2 4 時間以内、より好ましくはそれぞれ約 6 ~ 1 2 時間の両方のモーダリティであり、約 1 2 時間のみの遅延時間が最も好ましい。いくつかの場合において、処置の期間が有意に延びることが所望され得るが、それぞれの投与の間は、数日 ( 2、3、4、5、6、または 7 日 ) ~ 数週間 ( 1、2、3、4、5、6、7 または 8 週間 ) おかれる。

30

## 【 0 1 8 4 】

第 2 の治療剤と抗 C D 2 6 抗体の両方の 1 回より多くの投与が、完全な癌治療を達成するために必要とされることもまた想定される。以下に例示されるように、種々の組み合わせを使用し得る ( ここで、第 2 の治療剤は「 A」、そして抗 C D 2 6 抗体は「 B」である )：

## 【 0 1 8 5 】

【 化 1 】

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

40

別の組み合わせもまた企図される。各々の薬剤の正確な投与量およびレジメンは、当業者によって適切に変更され得る。

## 【 0 1 8 6 】

癌の処置において有効ないくつかの他の薬剤の記載を、以下に提供する。

## 【 0 1 8 7 】

50

## ( a ) 放射性治療剤 )

放射性治療剤および放射性因子は、DNA損傷を誘発する放射線および波動（例えば、線照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出、放射性同位体など）を含む。治療は、放射線の上記の形態を用いて、局在する腫瘍部位を照射することによって達成され得る。これらの因子の全てが、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の組立および維持に対して広範な損傷DNAをもたらす可能性が最も高い。

## 【 0 1 8 8 】

X線の照射量範囲は、長期の期間（3～4週間）の間の1日当たりの線量の50～200レントゲンの範囲から、2000～6000レントゲンの単回線量の範囲である。放射性同位体の線量範囲は、幅広く変化し、そして同位体の半減期、強度および放出される放射線の型、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

10

## 【 0 1 8 9 】

## ( b ) 外科手術 )

癌を患う人の約60%は、いくつかの型の外科手術を受け、この外科手術としては、予防的、診断的またはステージ決め、治療的および対症的な外科手術が挙げられる。治療的外科手術は、他の治療法（例えば、本発明の処置、化学治療法、放射線治療法、ホルモン治療、遺伝子治療、免疫治療および/または代替の治療法）と組み合わせて使用され得る癌の処置である。

## 【 0 1 9 0 】

治療的外科手術は、癌性組織の全部または一部を物理的に除去し、切除し、そして/または破壊する、切除術を包含する。腫瘍切除術は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去をいう。腫瘍切除術に加えて、外科手術による処置としては、レーザー手術、冷凍手術、電気手術、および顕微鏡（*microscopically*）から制御される外科手術（モース氏手術）が挙げられる。本発明が、表面性の癌、前癌、または正常組織の偶発的な量の除去と組み合わせて使用され得ることが、さらに企図される。

20

## 【 0 1 9 1 】

癌性細胞、組織または腫瘍の一部または全部の除去の際、空洞が体内に形成され得る。さらなる抗癌治療を用いて、その領域の灌流、直接注入または局所適用によって、処置を達成し得る。例えば、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、もしくは7日毎、または1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、および5週間毎、または1ヶ月毎、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、7ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、10ヶ月毎、11ヶ月毎、もしくは12ヶ月毎に、このような処置を繰り返し得る。これらの処置は、同様に投与量を変化し得る。

30

## 【 0 1 9 2 】

## ( c ) 化学的治療剤 )

DNAに損傷を起こす薬剤は、化学的治療剤である。これらは、例えば、直接的にDNAを架橋する薬剤、DNA中にインターカレートする薬剤、および核酸合成に影響することによって染色体異常または分裂異常を導く薬剤であり得る。核酸、特にDNAを直接的に架橋する薬剤が考えられて、そして、シスプラチンおよび他のDNAアルキル化剤によって例示される。DNAに損傷を起こす薬剤としてはまた、DNA複製、有糸分裂および染色体の分離に干渉する化合物が挙げられる。

40

## 【 0 1 9 3 】

化学的治療剤のいくつかの例として、以下が挙げられる：例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン（またミュータマイシンおよび/またはマイトマイシン-Cとして公知である）アクチノマイシンD（ダクチノマイシン）、ブレオマイシン、プリコマイシンのような、抗生物質化学的治療剤。タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチンのような植物アルカロイド。シスプラチン、VP16、腫瘍壊死因子ののようなような多方面の薬剤。カルムスチン（*Carmustine*）、メルファラン（またはアルケラン、L-フェニルアラニンマスタード、フェニルアラニンマスタード、L-PAMもしくはL-サルコリシンとして公知であり、ナイトロジェンマスタードのフェニルアラニン誘

50

導体である)、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン(またはマイラランとして公知である)、ロムスチンのようなアルキル化剤。そして他の薬剤、例えば、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、カンプトセシン、イホスファミド、ニトロソウレア(Nitrosurea)、エトポシド(VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲンレセプター結合剤、ジェムシタビエン(Gemcitabine)、ナベルピン(Navelbine)、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、およびメトトレキサート、テマゾロミド(DTICの水溶液形態)、または上記のものの任意のアナログもしくは誘導化改変体。

【0194】

10

(d)他の免疫治療)

他の免疫治療剤が、抗CD26抗体と組み合わせて使用され得る。免疫治療剤は、一般的に、癌細胞を標的化してそして破壊するための、免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター分子の使用に依存する。他の免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞表面上のいくつかの他のマーカーに特異的な別の抗体であり得る。この第2の抗体は、それ自体で治療のエフェクターとして作用し得るか、またはこれは、他の細胞を集合させて実際にT細胞の殺傷をもたらす。この第2の抗体はまた、薬物または毒素(化学的治療剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)と接合体化され得、そして標的化薬剤としてのみ作用し得る。あるいは、このエフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的または間接的のいずれかで相互作用する表面分子を保有するリンパ球であり得る。種々のエフェクター細胞としては、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。免疫治療は、抗CD26抗体ベースの治療と組み合わせる、併用治療の一部として使用され得る。

20

【0195】

併用治療の一般的なアプローチは、以下に論じられる。1つの局面において、免疫治療を使用して腫瘍細胞を標的化し得る。多くの腫瘍マーカーが存在し、そしてこれらのうちのいずれも本発明の文脈における標的化に適切であり得る。通常の腫瘍マーカーとしては、癌胎児性抗原、前立腺特異的抗原、泌尿器腫瘍関連抗原、胎児性抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲンレセプター、ラミニンレセプター、erbBおよびp155が挙げられる。代替の免疫刺激分子もまた存在し、以下に挙げられる: サイトカイン(例えば、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、-IFN)、ケモカイン(例えば、MIP-1、MCP-1、IL-8)および増殖因子(例えば、FLT3リガンド)。本発明の抗CD26抗体ベースの治療法と組み合わせて、タンパク質として、または遺伝子送達を使用するか、のいずれかで免疫刺激分子を併用することは、抗腫瘍効果を増強する。

30

【0196】

((i)受動的免疫治療)

癌の受動的免疫治療のための多くの種々のアプローチが存在する。これらは以下に大きく分類され得る: 抗体単独の注入; 毒素または化学的治療剤と結合した抗体の注入; 放射性同位体と結合した抗体の注入; 抗イデオタイプ抗体の注入; そして最後に、骨髓中の腫瘍細胞の一掃(purging)。

40

【0197】

((ii)能動的免疫治療)

能動的免疫治療において、一般的には、明確に識別される細菌のアジュバントと一緒に、抗原性のペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、または自系もしくは同種族の腫瘍細胞組成物、または「ワクチン」を投与する(RavindranaathおよびMorton、1991; Mortonら、1993)。

【0198】

((iii)養子免疫療法)

養子免疫療法において、患者の循環中のリンパ球または腫瘍に浸潤されたリンパ球をイン

50

ビトロで単離し、IL-2のようなリンホカインで活性化するかまたは腫瘍壊死のための遺伝子で形質導入し、そして再度投与する(Rosenbergら、1988; 1989)。このことを達成するために、本明細書中に記載されるようなアジュバント含有抗原ペプチド組成物と組み合わせて、活性化リンパ球の免疫学的に有効な量を、動物またはヒトの患者に投与する。この活性化リンパ球は、最も好ましくは患者自身の細胞であり、これは前もって血液サンプルまたは腫瘍サンプルから単離され、そしてインビトロで活性化される(または「増殖される」)

(e) 遺伝子治療)

なお別の実施形態において、本発明に記載される抗CD26抗体治療法と組み合わせた遺伝子治療法が、企図される。種々の核酸および核酸によりコードされる種々のタンパク質は、本発明内に包含され、そのいくつかを以下に記載する。表1は、本発明と組み合わせた、いくつかの形態の遺伝子治療法のために標的化され得る種々の遺伝子を列挙する。

10

【0199】

(表1)

【0200】

【表1】

遺伝子	供給源	ヒトの疾患	機能
増殖因子			FGFファミリーのメンバー
<i>HST/KS</i>	トランスフェクション		
<i>INT-2</i>	MMTVプロモーターの挿入		FGFファミリーのメンバー
<i>INT1/WNT1</i>	MMTVプロモーターの挿入		因子様
<i>SIS</i>	サル肉腫ウイルス		PDGF B
レセプターチロシンキナーゼ			
<i>ERBB/HER</i>	鳥類の赤芽球症ウイルス; <i>ALV</i> プロモーターの挿入; 増幅されたヒト腫瘍	増幅または欠損されて扁平上皮細胞癌; グリオブラストーマ	EGF/TGF- $\alpha$ / アンフィレグリン/ ヘタセルリンレセプター
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	ラットグリオブラストーマからトランスフェクションされた	増幅されて乳癌、卵巣癌、胃癌	NDF/ヘレギュリン およびEGF-関連因子 により調節される
<i>FMS</i>	<i>SM</i> ネコ肉腫ウイルス		CSF-1レセプター
<i>KIT</i>	<i>HZ</i> ネコ肉腫ウイルス		MGF/Steelレセプター

20

30

遺伝子	供給源	ヒトの疾患	機能	
<i>TRK</i>	ヒト結腸癌からの トランスフェクション		造血 (Hematopoiesis) NGF (神経成長因子) レセプター	
<i>MET</i>	ヒト骨肉種からの トランスフェクション		分散因子/HGFレセプター	
<i>RET</i>	転座および点突然変異	散発性甲状腺癌; 家族性髄様甲状腺癌; 多発性内分泌 新生組織形成2Aおよび2B	オーファンレセプター Tyr キナーゼ	
<i>ROS</i>	URII トリ肉腫ウイルス		オーファンレセプター Tyr キナーゼ	10
<i>PDGF</i> レセプター	転座	慢性骨髄 単球性 白血病	TEL(ETS-様転写因子)/ PDGFレセプター遺伝子 の融合	
<i>TGF-β</i> レセプター		結腸癌 ミスマッチ変異標的		
非レセプターチロシンキナーゼ				
<i>ABL</i>	Abelson MuLV	BCR で転座した 慢性骨髄性白血病	RB, RNA ポリメラーゼ, CRK, CBL と相互作用	20
<i>FPS/FES</i>	トリ Fujinami SV; GA FeSV			
<i>LCK</i>	MuLV (マウス白血病ウイルス) プロモーター挿入		Srcファミリー; T-細胞 シグナル伝達; CD4/ CD8 T-細胞と相互作用	
<i>SRC</i>	トリラウス肉腫ウイルス		シグナル伝達機能を有する 膜会合性 Tyr キナーゼ; レセプターキナーゼにより 活性化される	
<i>YES</i>	トリ Y73 ウイルス		Srcファミリー; シグナル伝達	
SER/THR タンパク質キナーゼ				
<i>AKT</i>	AKT8 マウスレトロウイルス		PI(3)Kにより調節される?; 70-kd S6 kを調節する?	30
<i>MOS</i>	Maloney マウス SV		GVBD; 嚢胞静止 (cystostatic) 因子; MAP キナーゼキナーゼ	
<i>PIM-1</i>	プロモーター挿入 マウス			
<i>RAF/MIL</i>	3611 マウス SV; MH2 トリ SV		RAS 経路における シグナル伝達	
種々の細胞表面 <sup>1</sup>				
<i>APC</i>	腫瘍サプレッサ	結腸癌	カテニン CAMドメイン との相互作用	40
<i>DCC</i>	腫瘍サプレッサ	結腸癌		
E-カドヘリン	腫瘍サプレッサの候補	乳癌	細胞外ホモ性結合; カテニンとの細胞内 相互作用	
<i>PTC/NBCCS</i>	腫瘍サプレッサおよび <i>Drosophila</i> の相同性	母斑性基底細胞癌症候群 (Gorline 症候群)	12回の膜貫通ドメイン; ヘッジホッグ経路 に拮抗するための Gli相同体(homologue) CIを介したシグナル	
<i>TAN-1 Notch</i>	転座	T-ALL	シグナル伝達?	

遺伝子	供給源	ヒトの疾患	機能	
相同体				
種々のシグナル伝達				
<i>BCL-2</i> <i>CBL</i>	転座 Mu Cas NS-1 V	B-細胞リンパ腫	アポトーシス チロシンリン酸化 RINGフィンガーが Ablと相互作用	10
<i>CRK</i>	CT1010 ASV		適合した SH2/SH3が Ablと相互作用	
<i>DPC4</i>	腫瘍サプレッサ	膵臓癌	TGF-β 関連シグナル伝達 経路	
<i>MAS</i>	トランスフェクション および腫瘍形成性		可能性ある脈管新生 レセプター	
<i>NCK</i>			SH2/SH3アダプター	
グアニンヌクレオチド交換体およびグアニンヌクレオチド結合タンパク質				
<i>BCR</i>		CMLにおいて ABLと 一緒に転座	交換体; タンパク質 キナーゼ	20
<i>DBL</i> <i>GSP</i> <i>NF-1</i>	トランスフェクション		交換体	
<i>OST</i> Harvey-Kirsten, N-RAS	遺伝性腫瘍 サプレッサー	腫瘍サプレッサー 神経繊維腫症	RAS GAP	
<i>VAV</i>	トランスフェクション HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; トランスフェクション	多くのヒトの腫瘍における 点突然変異	交換体 シグナル伝達カスケード	
	トランスフェクション		S112/S113; 交換体	
核タンパク質および転写因子				
<i>BRCA1</i>	遺伝性サプレッサー	乳癌/卵巣癌	不定の局在	30
<i>BRCA2</i> <i>ERBA</i>	遺伝性サプレッサー トリ赤芽球症ウイルス	乳癌	機能未知 甲状腺ホルモン レセプター (転写)	
<i>ETS</i> <i>EVII</i>	トリ E26 ウイルス MuLV プロモーター挿入	AML	DNA結合 転写因子	
<i>FOS</i>	FBI/FBR マウス 骨肉腫ウイルス		c-JUN と一緒になった 1 転写因子	
<i>GLI</i>	増幅したグリオーム	グリオーム	ジンクフィンガー; ひじ中断相同物は、ヘ ッジホッグシグナル伝 達経路において存在す る; PTC とヘッジホッグ とのインヒビター性の 結合	
<i>HMGI/LIM</i>	t(3:12) t(12:15) の転座	脂肪腫	高移動度群 HMGI-C (XT-hook) と転写因子 LIM または酸性ドメ インとの遺伝子融合体	
<i>JUN</i>	ASV-17		FOSと一緒にあって 転写因子 AP-1	
<i>MLL/VHRX + ELI/MEN</i>	転座/MLL Trithorax 様 遺伝子との ELL の融合	急性骨髄性白血病	DNA結合性のメチル トランスフェラーゼ MLL の ELI RNA pol II 伸長因子との 遺伝子融合	
<i>MYB</i>	トリミエロプラストーシス ウイルス		DNA 結合	

10

20

30

40

遺伝子	供給源	ヒトの疾患	機能	
<i>MYC</i>	トリMC29; 転座 B-細胞リンパ腫; プロモーター挿入 トリ 白血病 ウイルス	バーキットリンパ腫	MAX パートナーとの DNA 結合;サイクリン の調節; RB と相互作用? アポトーシスの調節?	
<i>N-MYC</i> <i>L-MYC</i> <i>REL</i>	増幅される  トリ Reticuloendotheliosis ウイルス	ニューロblastoma 肺癌	NF-κBファミリー転写因子	10
<i>SKI</i>	トリ SKV770 レトロウイルス		転写因子	
<i>VHL</i>	遺伝性サプレッサー	フォン・ヒッペル- リンドウ症候群	ネガティブレギュレーター またはエロンギン; 転写伸長複合体	
<i>WT-1</i>		ウィルムス腫瘍	転写因子	
細胞周期/DNA損傷応答 10-21				
<i>ATM</i>	遺伝性障害	毛細血管拡張性運動失調症	タンパク質/脂質キナーゼ 相同性; p53 経路の上流 のDNA 損傷応答	
<i>BCL-2</i> <i>FACC</i>	転座 点突然変異	濾胞性リンパ腫 Fanconi's 貧血群 C (白血病の素因)	アポトーシス	20
<i>MDA-7</i>	脆弱部位 3p14.2	肺癌	ヒスチジン三つ組関連 ジアデノシン 5',3'- 四リン酸 非対称性ヒドロラーゼ	
<i>hMLI/MutL</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	
<i>hMSH2/MutS</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutS 相同体	
<i>hPMS1</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	30
<i>hPMS2</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	
<i>INK4/MTS1</i>	9p21 の INK-4B に隣接; CDK 複合体	MTS1サプレッサーおよび MLM 黒色腫の遺伝子 の候補	p16 CDKインヒビター	
<i>INK4B/MTS2</i> <i>MDM-2</i> p53	増幅される SV40 T 抗原と結合	サプレッサー候補 肉腫 遺伝性 Li-Fraumeni 症候群を含むヒトの腫瘍で 50%より多くが変異	p15 CDKインヒビター p53のネガティブレギュレーター 転写因子; チェックポイント制御; アポトーシス	
<i>PRAD1/BCL1</i>	副甲状腺ホルモンまたは IgGとの転座	副甲状腺アデノーマ; B-CLL	サイクリンD	40
<i>RB</i>	遺伝性網膜芽腫; 多くのDNAウイルス腫 瘍抗原と結合	網膜芽腫; 骨肉腫;乳癌; 他の散発性癌	サイクリン/cdkと 相互作用; E2F 転写因子を調節	
<i>XPA</i>		色素性乾皮症; 皮膚癌の素因	除去修復;光生成物の 認識;ジंकフィンガー	

( f ) 他の薬剤)

他の薬剤を本発明と組み合わせて使用して、処置の治療効率を向上させ得ることが企図さ 50



れる。化学治療と組み合わせた使用のための治療の1形態には、温熱療法が挙げられ、これは患者の組織が高温（106°Fまで）に曝される処置である。外部または内部の加熱デバイスが、局所的温熱療法、領域性温熱療法または全身性温熱療法の適用に必要とされ得る。局所的温熱療法は、小さな領域（例えば腫瘍）への熱の適用を必要とする。熱は、体外のデバイスから腫瘍を標的化する高周波を用いて、外部で形成される。内部加熱は、滅菌したプローブを必要とし得、このプローブとしては、薄い、加熱されるワイヤーまたは温水で満たされた中空チューブ、移植されるマイクロ波アンテナ、または高周波電極が挙げられる。

#### 【0201】

患者の組織または四肢が領域的治療のために加温され、このことは高エネルギーを生じるデバイス（例えば、磁石）を使用して達成される。あるいは、患者の血液のいくらかを取り出して、そして加熱し、その後ある領域中に灌流し、この領域を内部から加熱する。全身の加温はまた、癌が全身にわたって広がった場合に実施され得る。温水ブランケット、熱ワックス、誘導コイル、およびサーマルチャンバーが、この目的のために使用され得る。

10

#### 【0202】

ホルモン治療もまた、本発明と組み合わせて使用され得る。ホルモンの使用は、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、または子宮頸癌のような、特定の腫瘍の処置において使用されて、テストステロンまたはエストロゲンのような特定のホルモンのレベルを低下させ得るか、またはそれらの効果をブロックし得、そしてこれはしばしば転移のリスクを低減させる。

20

#### 【0203】

（G．医薬品）

有効量の抗CD26抗体、または抗体接合体を含む薬学的組成物を、薬学的に受容可能なキャリアまたは媒体に溶解させるかまたは分散させて、治療的処方物および/または診断的処方物を形成し得、これらの処方物は次いで本発明の方法に従って投与され得る。

#### 【0204】

本発明の治療抗体は、これを必要とする患者への投与のために、標準的な薬学的キャリアにおいて処方され得る。これらとしては、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、および他の水性キャリア、ならびにリポソーム、ポリマーミクロスフェア、および当該分野で周知な他の調節性放出送達デバイスが挙げられる。

30

#### 【0205】

句「薬学的または薬理学的に受容可能な」とは、適切に動物またはヒトに投与された場合に、有害な反応、アレルギー反応または他の都合の悪い反応を生じない分子実体または組成物をいう。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、任意の全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な基質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の慣用的な媒体または薬剤が、活性な成分と不適合性である場合を除いてそれ以外は、治療組成物においてこの媒体または薬剤の使用が企図される。補助的な活性な成分もまた、この組成物中に組み込まれ得る。

#### 【0206】

活性な化合物は、一般的に、非経口投与のために処方される（例えば、静脈内、関節内、くも膜下腔内、筋肉内、皮下的、病巣内、またはさらに腹腔内の経路を介した注入のために処方される）。活性な成分または内容物として、癌マーカー抗体、接合体、インヒビターまたは他の薬剤を含む水性組成物の調製は、本発明の開示を考慮すれば当業者に分かる。代表的に、このような組成物は、液状溶液または液状懸濁物のいずれかとして、注入物として調製され得；注入前の液体の添加により溶液または懸濁物を調製するための使用に適した固体形態もまた、調製され得；そしてこれらの調製物はまた、乳化され得る。

40

#### 【0207】

注入使用に適した薬学的形態としては、滅菌した水溶液または水性分散液；ゴマ油、ピーナツ油または水性プロピレングリコールを含む処方物；および滅菌した注入可能な溶液ま

50

たは分散液の即時調製のための滅菌した粉剤が挙げられる。全ての場合において、この形態は滅菌されねばならず、そして容易なシリンジ注入可能性が存在する程度に流動性でなければならない。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならない、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保護されなければならない。

#### 【0208】

遊離塩基または薬理的に受容可能な塩として活性な化合物の溶液を、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合された水中で調製し得る。分散剤をまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物中ならびに油中において調製し得る。貯蔵および使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を阻害する防腐剤を含有する。

10

#### 【0209】

中性形態または塩形態の処方物をまた、提供する。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（acid addition salt）（この酸付加塩は、タンパク質の遊離アミノ基を用いて形成される）、無機酸（例えば、塩酸もしくはリン酸）、または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）を用いて形成される塩が挙げられる。遊離カルボキシル基を使用して形成される塩はまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄）、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来し得る。

#### 【0210】

キャリアはまた、溶媒または分散媒体（例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合液、および植物油が挙げられる）であり得る。適切な流動度を、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子の大きさの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持し得る。微生物の作用の予防を、種々の抗細菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によって引き起こし得る。多くの場合において、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含有することが好ましい。注射可能な組成物の長期の吸収作用を、吸収遅延薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の組成物における使用によって、引き起こし得る。

20

#### 【0211】

注射可能な滅菌溶液を、活性化合物を必要とされる用量で、上に列挙された種々の他の成分を有する適切な溶媒中に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製し得る。一般的に、分散剤を、種々の滅菌活性成分を、基本となる分散溶媒および上記に列挙された成分からの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルへと組み込むことによって調製する。注射可能な滅菌溶液の調製のための滅菌散剤の場合、好ましい調製の方法は、活性成分の散剤および前に濾過滅菌されたこの散剤の溶液からの任意のさらなる所望の成分を生じる真空乾燥技術および凍結乾燥技術である。

30

#### 【0212】

局所的注射のための、より（すなわち、または高度）濃縮された溶液の調製もまた企図される。この点において、溶媒としてのDMSOの使用は、これが、極端に迅速な浸透を生じ、小さな領域へ高濃度の活性因子を送達するので、好ましい。

40

#### 【0213】

処方の際に、溶液を、投薬処方物に適合する方法で、診断的に有効であるかまたは治療的に有効であるような量で、投与する。水溶液の非経口的投与のために、例えば、溶液を、必要に応じて適宜緩衝化すべきであり、希釈液をまず、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にする。これらの特定の水溶液は、静脈内投与、筋内投与、皮下投与および腹腔内投与に、特に適する。他の実施形態において、直接の腫瘍内注入が、企図される。あるいは、腫瘍を、任意の適切な送達ビヒクルを使用して治療化合物と共に、注入しても、灌流してもよい。腫瘍に関して、局所（local）投与または局部（regional）投与はまた、企図される。最終的に、全身投与が実施され得る。連続的投与をま

50

た、適切な場合、例えば、腫瘍が切除され、腫瘍ベッドが、残存する微視的疾患を除去するために処理される場合に適用し得る。シリンジまたはカテーテル法を使用する送達もまた企図される。

#### 【0214】

この点について、使用され得る滅菌水性媒体は、本開示に照らして、当業者に理解される。例えば、1用量を、1 mLの等張NaCl溶液中に溶解し、そして1000 mLの皮下注入流体へと添加するかまたは計画された注入部位で注射するかのいずれかをし得る（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035頁 - 1038頁および1570頁 - 1580頁を参照のこと）。用量のいくつかの変化は、処理されるまたは診断される被験体の状態に依存して、必然的に生じる。投与の責任者は、いかなる場合でも、個々の被験体について適切な用量を決定する。

10

#### 【0215】

（H. 投与の経路）

投与の経路は、もちろん病巣の位置および性質と共に変化し、このような経路としては、例えば、皮内、髄腔内、関節内（intrarthricular）、経皮的（transdermal）、非経口、静脈内、動脈内、筋内、鼻腔内、皮下、経皮（percutaneous）、気管内、腹腔内、腫瘍内、灌流、洗浄、直接注射、局所適用、ならびに経口投与および経口処方が挙げられる。腫瘍内注射または腫瘍脈管構造への注射は、別々の接近可能な固体腫瘍に対して特に企図される。局所的投与、局部的投与または全身的投与はまた、適切であり得る。外科的介入の場合において、本発明は、手術の前、手術の時、および/またはその後使用され、残存疾患または転移疾患を処置し得る。例えば、切除された腫瘍ベッドは、抗CD26抗体を含有する処方物で注射され得るかまたは灌流され得る。灌流は、切除後に、例えば、手術の部位に埋め込まれたカテーテルを残すことによって、継続され得る。周期的な手術後の処置もまた、想定される。

20

#### 【0216】

継続的投与はまた、適切な場合、例えば、腫瘍が摘出される場合に、適用され得、腫瘍ベッドは、残存する微視的疾患を除去するために処理される。送達は、シリンジまたはカテーテル法を介する送達であり得る。このような継続的な灌流は、処理の開始後、約1～2時間から約2～6時間までか、約6～12時間までか、約12～24時間までか、約1～2日までか、約1～2週間までか、またはそれを超える期間、実施され得る。一般的に、連続的な灌流を介しての治療組成物の用量は、灌流を実施する期間にわたって調整された、単回注射または複数回注射によって与えられる、用量に等しい。四肢灌流が、特に、黒色腫および肉腫の処置において、本発明の治療組成物を投与するために使用され得ることは、さらに企図される。

30

#### 【0217】

処置レジメンもまた変化し得、腫瘍の型、腫瘍の位置、疾患の進行、ならびに患者の健康状態および年齢にしばしば依存し得る。明らかに、特定の型の腫瘍は、より攻撃的な処置を必要とする一方、同時に特定の患者は、より面倒なプロトコールを許容し得ない。臨床医は、治療組成物の、公知の効率および毒性（必要な場合）に基づいて、このような決定をなすために最も適任である。

40

#### 【0218】

いくつかの実施形態において、抗CD26抗体を含有するリポソーム処方物が、企図される。薬学的薬剤のリポソーム被包は、従来の薬物送達系に比した場合、その半減期を長くする。より多い量が保護パッケージされ得るので、このリポソーム被包は、そのように細胞へと送達される薬剤の用量を高める機会を提供する。

#### 【0219】

「リポソーム」は、封入された脂質二重層の生成によって形成される、種々の単層脂質ビヒクルおよび多層脂質ビヒクルを含む総称である。リン脂質は、本発明に従って、リポソームを調製するために使用され、正味の正電荷、正味の負電荷を保持し得るかまたは中性

50

である。ジセチルホスフェートは、リポソームに負電荷を付与するために使用され得、ステアリルアミンは、リポソームに正電荷を付与するために使用され得る。リポソームは、リン脂質二重膜および内部水性媒体によって特徴付けられる。多層リポソームは、水性媒体によって分離された多重脂質層を有する。これら多層リポソームは、リン脂質が、過剰の水溶液中に懸濁される場合、自発的に形成する。脂質成分は、密閉構造の形成の前に自己再配置し、脂質二重膜の間に、水および溶解された溶質を閉じ込める (G h o s h および B a c h h a w a t , 1 9 9 1 ) 。カチオン性脂質 - 核酸複合体 (例えば、リポフェクトアミン - 核酸複合体) もまた企図される。

#### 【実施例】

#### 【0220】

10

#### (I. 実施例)

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれる。続いての実施例中に開示される技術は、本発明の実施において良好に機能するように、本発明者らによって発見された技術を示し、従って、この技術の実施の好ましい様式を構成すると考えられ得ることが当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本発明の開示に照らして、多くの変化が、開示された特定の実施形態においてなされ得ることを理解するはずであり、そしてなお、本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様の結果または類似する結果を得るはずである。

#### 【0221】

20

#### (実施例1)

(抗CD26モノクローナル抗体のインビトロおよびインビボでの抗腫瘍効果)

(材料および方法)

(動物)

3 ~ 4 週齢のメス C . B - 1 7 S C I D マウスを、T a c o n i c F a r m s , I n c . から得、微小隔離カゴ中に収容した。全ての食物、水および敷き藁を、使用の前にオートクレーブした。

#### 【0222】

(細胞)

ヒトCD30 + 未分化大細胞T細胞リンパ腫細胞株 K a r p a s 2 9 9 を、t ( 2 ; 5 ) トランスロケーションおよび再配置されたT細胞レセプター 鎖遺伝子を有する、表面マーカーCD4、CD5、HLA-DRおよびCD30を保有する、CD30 + 未分化大細胞T細胞リンパ腫の診断を受けた、25歳の白人の末梢血芽細胞から確立した ( F i s c h e r ら、1988 ; T i a n ら、1995 ) 。細胞を、10% F C S 、ペニシリン ( 1 0 0 単位 / m l ) およびストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m l ) ( G I B C O B R L , R o c k v i l l e , M D ) を補充されたRPMI 1640からなる培養培地中で、37 °C でインキュベートした。

30

#### 【0223】

(抗体)

使用された抗CD26モノクローナル抗体 ( m A b ) は、1 F 7 および 5 F 8 であり、これらの両方は、ヒトCD26を認識するマウス抗体であり、以前に記載された ( M o r i m o t o ら、1989 ; D a n g ら、1990b ; T o r i m o t o ら、1992 ) 。使用されるコントロールmAbは、K a r p a s 2 9 9 細胞株上に発現されないCD45 R A エピトープを認識するアイソタイプコントロールマウスIgG1であり、これを、以前に記載されたとおりに発生させた ( M o r i m o t o ら、1989 ) 。抗CD3mAb および抗CD2mAbを、C o u l t e r から購入した。ウェスタンブロッティング研究のために、抗p21および抗p27を、T r a n s d u c t i o n L a b o r a t o r i e s から入手し；抗p53を、C a l b i o c h e m から入手し；抗cdk2、抗cdk4、抗サイクリンDを、U p s t a t e B i o t e c h n o l o g y から入手し；抗サイクリンEおよび抗PCNAを、S a n t a . C r u z B i o t e c h n o l o g y から入手し；そして抗アクチンを、S i g m a から入手した。

40

50

## 【0224】

## (試薬)

テトラゾリウム塩MTT(3, (4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)2, 5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド)(Sigma)を、室温で滅菌PBS中に5mg/mlの濃度で溶解し、この溶液をさらに、濾過によって滅菌し、暗闇中で4℃で貯蔵した。抽出緩衝液を、以下のように調製した：20%重量/体積のSDSを、N, N-ジメチルホルムアミド(DMF)(Sigma)および滅菌水各50%の37℃の溶液中に溶解し；pHを1M HClの添加によって4.7に調整した。シクロヘキシミドCHX(Sigma)を、20μg/mlの濃度で使用した。

## 【0225】

## (インビボ研究)

全てのマウスを、腫瘍移植の1日前に、0.2mlの抗アシロ(asilo)GM1ポリクローナル抗血清25%(体積/体積)(Wako, Richmond, VA)で、腹腔内に前処理し、宿主の天然のキラー細胞活性を除去し、腫瘍移植を容易にした(Tianら、1995)。生存の研究のために、次いで、腫瘍細胞を、i.p.注射によって接種された。腫瘍細胞接種の1日後、次いで、SCIDマウスは、示された用量およびスケジュールで、0.1ml滅菌生理食塩水中の生理食塩水、アイソタイプコントロールAbまたは抗CD26mAb 1F7のi.p.注射を受容した。次いで、腫瘍保有マウスを、腫瘍発達および腫瘍進行についてモニターし、瀕死のマウスを、安楽死させ、腫瘍の証拠を検死した。さらに、最大寸法で2cmの大きさをとる可視的でかつ触知できる腫瘍を有するマウスをまた、動物に対する苦しみを最小化するために、安楽死させ、検死した。何匹かの動物について、器官をまた、組織病理学的分析のために回収した。いくつかの研究のために、SCIDマウスに、s.c.注射によって腫瘍細胞を注射し、腫瘍の大きさが、最大寸法で0.5cmに到達した後、生理食塩水または1F7(1回の注射当たり5μg)を、7回の注射について、1日おきに腫瘍内注射した。次いで、マウスを安楽死させ、注射の部位での腫瘍の塊を、組織病理学的分析のために回収した。

## 【0226】

他の研究において、SCIDマウスに、単独の生理食塩水中でインキュベートされた $1 \times 10^6$  Karpas 299腫瘍細胞を注射し、100μgの1F7またはアイソタイプコントロールAbをs.c.注射によって注射した。続いて、腫瘍細胞注射の1日後から開始して、SCIDマウスに、10回の注射について、1日おきに、s.c.注射のものととの部位に配置された0.1mlの滅菌生理食塩水中の生理食塩水の、アイソタイプコントロールAb(20μg/1回の注射)または1F7(20μg/1回の注射)のs.c.注射をした。目に見える腫瘍が最初に出現した日を、処理の効果を評価するために記録した。

## 【0227】

## (インビトロ研究)

## (MTTアッセイ)

細胞増殖アッセイを、以前に記載されるように実施した(Hansenら、1989)。細胞を、培養培地単独または記載されるような培養培地および抗体の存在下で、100μlの全容積(50,000細胞/ウェル)でマイクロプレート上でインキュベートした。37℃での48時間のインキュベーションの後、25μlのMTTを、1mg/mlの最終濃度でウェルに添加した。次いで、マイクロプレートを、37℃で2時間インキュベートし、続いて100μlの抽出緩衝液を添加した。37℃で一晩インキュベーションした後、570nmでのOD測定を実施した。報告された値は、3つのウェルの平均を示し、標準誤差の平均は、15%未満であった。

## 【0228】

## (免疫蛍光)

全ての過程を、4℃で実施し、フローサイトメトリー分析(FACSscan, Becton Dickinson)を、以前に記載されるように(Dangら、1990d)実施

10

20

30

40

50

した。細胞を、適切な抗体を用いて染色し、2回PBSを用いて洗浄し、次いで、ヤギ抗マウスIgG FITCを用いて洗浄した。次いで、細胞を、フローサイトメトリー分析の前に、2回PBSを用いて洗浄した。ネガティブコントロールを、二次抗体単独で洗浄した。いくつかの研究のために、SCIDマウスに、上記に記載されるように、腫瘍細胞をi.p.接種した( $1 \times 10^6$ 細胞/マウス)。腫瘍を触知できる場合、動物を安楽死させ、腫瘍の塊を回収した。次いで、単一細胞懸濁物を、腫瘍の塊から単離し、次いで、フローサイトメトリーを実施した。

#### 【0229】

(細胞周期分析)

細胞を、37 で、培地単独または5  $\mu$ g/mlの濃度の抗体の存在下のいずれかでインキュベートした。適当な時間間隔で、細胞を、回収し、PBSで2回洗浄し、そして10  $\mu$ g/mlヨウ化プロピジウム、0.5% Tween-20および0.1% RNaseを含むPBS中で、室温で30分間再懸濁した。次いで、サンプルを、DNA含量について分析した(FACScan, Becton Dickinson)。組織破片および固定アーティファクトを捨て、G0/G1集団、S集団およびG2/M集団を、CellQuestおよびModFit LTプログラムを使用して定量した。

#### 【0230】

(SDS-PAGEおよび免疫ブロッティング)

37 でのインキュベーションの後、細胞を、ウェルから回収し、PBSを用いて洗浄し、1% Brij 97、5mM EDTA、0.02M HEPES pH7.3、0.15M NaCl、1mM PMSF、0.5mM NaF、10  $\mu$ g/mlアプロチニン、および0.2mMオルソバナジン酸ナトリウムからなる溶解緩衝液中で溶解した。氷上での15分間のインキュベーションの後、核を遠心分離によって除去し、そして上清を回収した。20%グリセロール、4.6% SDS、0.125M Tris (pH6.8)および0.1%プロモフェノールブルーからなる2xサンプル緩衝液を、上清の適当なアリコートに添加した。タンパク質サンプルを、ミニ-Protean IIシステム(Bio-Rad Hercules, CA)を使用して、標準的な条件下で、20%ゲル上のSDS-PAGE分析へと供した。免疫ブロッティングのために、タンパク質を、ニトロセルロース上に移した(Immobilon-P, Millipore)。0.1% Tween 20および5%ウシ血清アルブミンからなるTBS中のブロッキング溶液中での、4 での一晩のブロッキングの後に、膜を、ブロッキング溶液中に希釈された適切な一次抗体を用いて、室温で1時間、ブロッティングした。次いで、膜を、ブロッキング溶液で洗浄し、次いで、ブロッキング溶液中に希釈された適切な二次抗体を、室温で1時間適用した。二次抗体は、ヤギ抗マウスHRP結合体およびヤギ抗ウサギHRP結合体(Dako)であった。次いで、膜を、ブロッキング溶液で洗浄し、続いて、タンパク質を、化学ルミネセンスによって検出した(Amersham Pharmacia Biotech)。

#### 【0231】

(結果)

(Karpas 299リンパ腫細胞株上でのCD26の発現)

CD30+未分化大細胞T細胞リンパ腫細胞株Karpas 299上でのCD26の発現を、SCIDマウスへの腫瘍移植の前に、フローサイトメトリーによって評価した。図1Aに示されるように、Karpas 299細胞は、CD26の高い表面発現を有する一方、CD3表面発現およびCD2表面発現は、検出不可能である。さらに、1F7を用いた一晩インキュベーションは、CD26表面発現の発現の減少を誘導し(図1B)、このことは、正常なT細胞上でのCD26の表面発現の抗CD26媒介性調節における、以前に報告された発見と一致する(Dangら、1990d)。

#### 【0232】

(細胞増殖のG1/SチェックポイントでのCD26媒介性阻害)

Karpas 299細胞およびH9細胞の成長に対する、可溶性抗CD26抗体結合の

効果を、インビトロ研究において試験した。図 2 A および図 2 B に示されるように、1 F 7 の添加によって、MTT 還元によって測定されるように細胞増殖が減少する。5 F 8 モノクローナル抗体はまた、細胞増殖において有意な阻害効果を示すが、より高い濃度の 5 F 8 を、1 F 7 との比較において使用した。抗 CD 2 6 m A b は、試験された濃度で、CD 2 6 ネガティブ細胞株に対して増殖阻害効果を示さなかった。細胞増殖における 1 F 7 の阻害効果のさらなる証拠を、細胞周期分析を通して得た。表 2 に示されるように、1 F 7 の結合は、G 1 / S チェックポイントで、細胞周期の進行の遮断の強化を生じ、MTT 取り込みの減少によって検出される、細胞代謝および細胞増殖の減少を最終的に導いた。

【 0 2 3 3 】

( 表 2 )

( G 1 / S での抗 CD 2 6 媒介性細胞周期停止 )

【 0 2 3 4 】

【 表 2 】

%Go/G1			%S			%G2/M			
	培地	コントロールAb	1F7	培地	コントロールAb	1F7	培地	コントロールAb	1F7
1日目	26.71	25.04	36.04	47.81	47.52	35.98	25.48	27.44	27.98
2日目	56.55	53.81	73.52	24.71	25.96	14.04	18.74	20.23	12.44

K a r p a s 2 9 9 細胞を、培地または抗体 ( 2  $\mu$  g / m l ) と共に 3 7 でインキュベートした。指示された時間間隔で、細胞を回収し、細胞周期分析を実施した。データは、3 つの別個の研究の代表である。

【 0 2 3 5 】

( C D 2 6 媒介性細胞周期停止の後の p 2 1 発現の強化 )

G 1 / S チェックポイントでサイクリン依存性キナーゼインヒビターによって果たされる不可欠な役割の点において、抗 CD 2 6 抗体結合後の、p 2 1、p 2 7 および p 1 6 の発現を試験した。抗 CD 2 6 処理後の強化された p 2 1 発現は、培地のみ、アイソタイプコントロール m A b またはアイソタイプコントロール 1 F 7 ( 2  $\mu$  g / m l ) を含む培地のいずれかをを用いて 3 7 で一晩インキュベートされた K a r p a s 2 9 9 細胞において示され、次いで、細胞を回収し、S D S - P A G E および免疫ブロッティング研究を実施した。他の実験において、K a r p a s 2 9 9 細胞を、種々の時間間隔で 1 F 7 ( 2  $\mu$  g / m l ) または培地単独を用いて処理し、p 2 1 発現を検出した。p 2 7 発現は、抗 CD 2 6 m A b 結合によって影響されず、そして p 1 6 発現は、培地単独またはコントロール抗体および抗 CD 2 6 m A b の存在下でインキュベートされた細胞において検出可能ではないことが示された。一方、p 2 1 発現は、CD 2 6 ライゲーション後に強化された。コントロール条件下でのインキュベーションに比べると、抗 1 F 7 を用いた処理は、p 2 1 の発現の増加を生じた。抗 p 2 1 m A b を用いたウエスタンブロッティングは、2 1 k d 位置に移動する、期待されるバンドの出現を示した。特定の条件下で、p 2 1 発現の誘導は、p 5 3 に依存することが知られている ( E l - D e i r y ら、1 9 9 3 ; E l - D e i r y ら、1 9 9 4 )。K a r p a s 2 9 9 細胞株において、コントロールと比較する場合、抗 CD 2 6 処理細胞中において、p 5 3 発現の変化は見出されなかった。しかし、p 5 3 の機能状態は、なお決定されないままである。

【 0 2 3 6 】

p 2 1 が、G 1 / S で細胞周期の進行を阻害するために、サイクリンと C D K との複合体を形成することは、公知である。抗 CD 2 6 抗体結合は、p 2 1 発現を強化するが、サイクリン D、サイクリン E、c d k 2 および c d k 4 ( これら全ては、サイクリン / C D K / p 2 1 複体内に存在する ) のタンパク質レベルを変化させない。さらに、P C N A タンパク質レベルは、抗 CD 2 6 を用いた処理によって影響されない。類似するデータは、

抗CD26がCD26+H9細胞株へと結合した後に得られた。強化されたp21発現を、1F7を用いた3時間の処理内に検出し、抗体処理が継続される間、発現レベルは上昇することまた示された。

#### 【0237】

(強化されたp21発現は、デノボタンパク質合成に依存する)

抗CD26結合後のp21発現の強化が、タンパク質合成の増加に依存するかどうかを決定するために、p21発現を、タンパク質合成インヒビター(シクロヘキシミド(CHX))の存在下および非存在下で試験した。p21発現は、1F7を用いて処理された細胞内で見られるが、1F7およびCHXを用いて処理された細胞内では見られない。従って、CD26連結後のp21の発現は、デノボタンパク質合成に依存する。

10

#### 【0238】

(インビボ腫瘍モデルでのKarpas 299保有SCIDマウスにおける1F7の抗腫瘍効果)

Karpas 299増殖における抗CD26mAb 1F7の効果はまた、SCIDマウス腫瘍モデルにおいて試験された。このために、 $1 \times 10^6$  Karpas 299細胞を、i.p.注射によってSCIDマウスへと移植し、そして腫瘍を、発達させた。続いて、腫瘍の塊を取り出し、単一の細胞懸濁物を、確立した。インビボモデルにおける腫瘍形成のプロセスは、CD26表面発現に影響しない。例えば、図3Aおよび図3Bに示されるように、SCIDマウスへの腫瘍移植の後のCD26発現は、腫瘍移植前のこのCD26のレベルと類似した。腹腔内の塊の組織切片の死後組織病理学分析はまた、CD26の存在を示した。

20

#### 【0239】

次いで、SCIDマウスに、Karpas 299細胞を、i.p.注射によって移植し( $1 \times 10^6$ 細胞/マウス)、腫瘍接種の1日後に開始して、生理食塩水、アイソタイプコントロールAbまたは1F7を用いた処理が、指示された用量で1日おきの全部で10回のi.p.注射で開始された。図4Aに示されるように、 $5 \mu\text{g}$ /注射で1F7を用いて処理されたマウスは、生理的食塩水( $p < 0.0001$ )または $5 \mu\text{g}$ /注射でアイソタイプコントロールAb( $p < 0.0001$ )を用いて処理されたマウスを超える、統計的に有意な生存的優位を有した。同様に、 $10 \mu\text{g}$ /注射で1F7を用いて処理されたマウスの生存的優位は、生理食塩水处理マウス( $p < 0.0001$ )または $10 \mu\text{g}$ /注射でアイソタイプコントロールAbを用いて処理されたマウス( $p < 0.0001$ )と比較した場合、統計的に有意であった。このデータはまた、 $5 \mu\text{g}$ /注射の1F7用量と $10 \mu\text{g}$ /注射の1F7用量( $p = 0.7$ )との間で、生存に統計的に有意な差を示さない。

30

#### 【0240】

腫瘍細胞のより高いi.p.用量( $3 \times 10^6$ 細胞/マウス)を注射され、次いで、全10回の注射について、一日おきに与えられる、生理食塩水のみのi.p.注射、アイソタイプコントロールAb( $20 \mu\text{g}$ /注射)あるいは $5 \mu\text{g}$ /注射( $p < 0.05$ )か、 $10 \mu\text{g}$ /注射( $p < 0.05$ )かまたは $20 \mu\text{g}$ /注射( $p < 0.01$ )の用量での1F7のi.p.注射によって処理されたマウスはまた、より低い用量の腫瘍細胞で最初に注射された処理マウスを超える、統計的に有意な生存的優位を示さない。 $20 \mu\text{g}$ /注射の1F7用量で処理されたマウスは、 $20 \mu\text{g}$ /注射( $p < 0.01$ )の用量でアイソタイプコントロールAbを用いて処理されたマウスを超える、統計的に有意な生存的優位を有した。

40

#### 【0241】

異なる1F7用量で処置されたマウスを比較すると、 $20 \mu\text{g}$ /注射で処置されたマウスは、 $5 \mu\text{g}$ /注射の1F7用量で処置されたマウスを超えた、統計的に有意な生存効果を有した( $p < 0.01$ )。 $10 \mu\text{g}$ /注射の用量で処置されたマウスと比較した場合、 $20 \mu\text{g}$ /注射の用量の1F7で処置されたマウスにおいて、より大きな生存効果についての傾向がまたあった( $p = 0.2$ )。同様に、 $5 \mu\text{g}$ /注射と比較して、 $10 \mu\text{g}$ /注射の1F7用量で処置されたマウスにおいて、より大きな生存効果の傾向があった( $p = 0$

50



・ 09) (図 4 B)。これらのデータは、抗体処置の効力は存在する腫瘍の相対量に依存したことを意味する。

#### 【0242】

組織断片の死後組織病理学的分析は、コントロール条件下で処置された腫瘍を有するマウスが局部部位および遠隔器官で腫瘍浸潤を進行させることを示した。一方で、1F7処置マウスにおいて、これらの部位で腫瘍併発の証拠はなかった。従って、抗CD26抗体はまた、転移性腫瘍増殖を防ぐ。

#### 【0243】

SCIDマウスモデルにおける1F7の抗腫瘍効果がまた実証された。これについて、SCIDマウスは、s.c.投与によって、 $1 \times 10^6$ のKarpas 299細胞を接種された。可視的な腫瘍の塊の成長の後、次いでマウスを、隔日に7回の注射で与えられる、生理食塩水のみ、または1F7(5  $\mu$ g/注射)のいずれかの腫瘍内注射によって処置した。ほとんどの腫瘍が凝固壊死を引き起こしたように、組織病理学的分析は、1F7処置が腫瘍壊死を生じることを示した。対照的に、生理食塩水の処置は、腫瘍の塊の大部分で可視的な腫瘍細胞を生じた。ほとんどの腫瘍細胞が、腫瘍の塊で可視的であると見出されたように、5  $\mu$ g/注射のアイソタイプコントロールAbでの処置は、生理食塩水処置で得られるものと同様の結果を導いた。

#### 【0244】

腫瘍細胞のs.c.注射および生理食塩水、1F7またはアイソタイプコントロールAbでのs.c.処置の後、Karpas 299腫瘍の最初の出現に要する時間もまた決定された。これらの研究において、SCIDマウスを、生理食塩水のみ、100  $\mu$ gの1F7または100  $\mu$ gのアイソタイプコントロールAbでインキュベートされた $1 \times 10^6$ Karpas 299細胞をs.c.で注射した。引き続いて、腫瘍細胞接種後の第1日目を開始し、SCIDマウスはその後、s.c.腫瘍注射の最初の部位に、隔日に10回の注射にわたり、0.1ml 無菌生理食塩水の、生理食塩水s.c.注射、アイソタイプコントロールAb s.c.注射(20  $\mu$ g/注射)、または1F7 s.c.注射(20  $\mu$ g/注射)を投与された。可視的な腫瘍の最初の出現の日は、処置の効果を評価するために記録された。

#### 【0245】

図5に示されるように、異なる条件で処置されたマウスのなかで、可視的な腫瘍の増殖の速度において統計的に有意な差異があった。1F7で処置された群は、アイソタイプコントロールAbまたは生理食塩水のみで処置された群より、遅い速度の腫瘍の増殖を有し(それぞれ、 $p < 0.001$ と $p < 0.001$ )、1F7処置マウスの大部分は、研究の期間中、腫瘍なしのままであった。

#### 【0246】

##### (実施例2)

(抗CD26MAb 1F7は、Tリンパ球の増殖を阻害し、促進されたp21<sup>Cip1</sup>発現に関連したG1/Sで細胞周期を停止する。)

##### (方法)

(細胞の調製および培養) ヒトT細胞クローンを、これまでに記載された方法(Sugitaら、1992)に従い、ヒト末梢血リンパ球のインビトロ刺激によって樹立した。ヒトJurkat T細胞を、ATCCから入手した。Jurkat細胞株は以下を含む：1) 野生型CD26トランスフェクト化Jurkat細胞株(J.C26/DP+)、2) 変異CD26ポジティブ/DPPIVネガティブJurkatトランスフェクト体(J.C26/DP-)を生じる、630位置の推定触媒セリン残基にアラニンを含む変異CD26でトランスフェクトされたJurkat細胞株、および3) 非トランスフェクト化Jurkat親細胞(Jwt)(Tanakaraら、1992; Tanakaraら、1993)。10% FCS、ペニシリン(100 単位/ml)、ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml)(Life Technologies Inc.)およびG418(500  $\mu$ g/ml)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を補充さ

れた、RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) からなる培地で、Jurkat 転染細胞を、 $1 \times 10^6$  / ml の濃度で 37 でインキュベートした。非転染細胞化 Jurkat 親細胞を、G418 非存在の同じ培地で保持した。健康な成人志願者から採取された、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を Ficoll / Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) での、遠心分離によって単離した。高純度の T 細胞集団を入手するために、PBMC を E-rosette ポジティブ集団に分け、FITC 標識化抗 CD3 mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA) を用いる、フローサイトメトリック分析し FACS Calibur<sup>TM</sup>、Nippon Becton Dickinson Co. Ltd., Tokyo, Japan) によって純度が 95 % 以上より高いと測定される、休止 T 細胞として使用した。T 細胞クローンを、IL-2 ( $10 \text{ ng/ml}$ ; Pepro Tech EC Ltd., London, U.K.) を含む培地で保持し、照射 ( $30 \text{ Gy}$ ) された異質遺伝子型 PBMC ( $1.0 \times 10^5$  / ml) (Sugita ら、1992) で、2 ~ 3 週ごとに再刺激した。細胞の生存度をトリパンブルー (Sigma-Aldrich) 色素除去法を用いて検査した。

#### 【0247】

(抗体および試薬) 抗 CD26 mAb、1F7 および 5F8、ならびにアイソタイプコントロール mAb 4B4 (CD29 mAb) は、これまでに記載されている (Morimoto ら、1989; Torimoto ら、1992; Morimoto ら、1985、本明細書に参考として援用される)。抗 CD3 mAb (OKT3) はまた他でも記載されている (Kung ら、1979、本明細書に参考として援用される)。以下の抗体および試薬を BD Pharmingen から購入した: FITC 標識化抗プロモデオキシウリジン (BrdU)、抗 p21<sup>Cip1</sup>、抗 p27<sup>Kip1</sup>、抗 p53、抗サイクリン D1、抗 CDK4、抗 CDK-6、抗 ERK, および 7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD)。マウスモノクローナル抗ホスホチロシン 4G10 および抗アクチンは Sigma-Aldrich から購入し、抗リン酸化 ERK は Santa Cruz (Delaware Avenue, CA) から購入した。シグナル伝達の細胞刺激および阻害に使用される試薬の供給源および作業濃度は以下である: OKT3 ( $0.05 \mu\text{g/ml}$ )、PMA ( $10 \text{ ng/ml}$ ; Sigma-Aldrich)、Nocodazole (DMSO の  $1 \text{ mg/ml}$  ストック溶液から  $500 \text{ ng/ml}$ ; Sigma-Aldrich)、PD98059 (DMSO の  $10 \text{ mM}$  ストック溶液から  $10 \mu\text{M}$ ; BIOMOL, Plymouth Meeting, PA) および U0126 (DMSO の  $10 \text{ mM}$  ストック溶液から  $10 \mu\text{M}$ ; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA)。mAb との培養の開始 30 分前に、細胞を各インヒビターで処置した。

#### 【0248】

(フローサイトメリー分析) 全ての手順を 4で行い、フローサイトメリー (FCM) 分析を、標準 CELL Quest<sup>TM</sup> 取得 / 分析ソフトウェア (Becton-Dickinson) を使用する FACS Calibur<sup>TM</sup> (Nippon Becton-Dickinson) で実施した。細胞を、適切な抗体で染色し、FCM 分析の前に氷冷 PBS で 2 回洗浄した。

#### 【0249】

(細胞周期分析) 細胞 ( $1 \times 10^6$  / ウェル) を、37 で Nocodazole を用いてか、あるいは用いないで、指定の濃度で、培地のみか、あるいは 1F7、5F8 またはアイソタイプコントロール mAb (4B4) の存在下で、インキュベートした。インヒビターを用いる実験において、 $1 \times 10^6$  の細胞を、抗 CD26 mAb とのインキュベーション前に、37 で 30 分間、指定の濃度で様々なインヒビターと共にインキュベートした。適切な時間間隔で、細胞を 37 で最後の 1 時間、 $10 \mu\text{M}$  の濃度で BrdU と共にパルスした。次いで、細胞を回収し、氷冷 PBS で 2 回洗浄した。FITC 標識化抗 Br

d Uおよび7 - A A Dによる細胞の固定化、透過化処理、および免疫染色は、B r d U Flow C y t o m e t r y K i tのB D P h a r M i n g e nの説明書に従い行なった。次いで、試料を、調製後1時間以内にF A C S C a l i b u r <sup>T M</sup>によって分析した。細胞片および固定化アーチファクトをゲートから放出した後、7 - A A Dドットプロットに対しB r d Uに適用された領域ゲートによって、F C M分析は、細胞周期のG 0 / G 1期、G 2 / M期およびS期に存在する、細胞サブセットの区別化を可能にした。G 0 / G 1集団、S集団およびG 2 / M集団を、C E L L Q u e s t <sup>T M</sup>プログラム(B e c t o n - D i c k i n s o n)を使用して定量した。

#### 【0250】

(細胞溶解物の調製およびウェスタンブロット分析) 37 でのインキュベーション後、細胞をウェルから収集し、P B Sで洗浄し、R I P A溶解緩衝液(1% N P - 40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% S D S、5mM E D T A、10mM T r i s - H C l (pH 7.4)、0.15M N a C l、1mM P M S F、0.5mM N a F、10μg/ml アプロチニンおよび0.02mM N a <sub>3</sub> V O <sub>4</sub> からなる)で溶解した。ホスホチロシンタンパク質を検出するために、インキュベーション後の細胞を、氷冷P B S(5mM E D T A、10mM N a F、10mM ピロリン酸ナトリウムおよび0.4mM N a <sub>3</sub> V O <sub>4</sub>を含む)で洗浄した。細胞を遠心分離し、次いで溶解緩衝液(1% N P - 40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、5mM E D T A、50mM T r i s - H C l (pH 8.0)、0.15M N a C l、1mM P M S F、10mM ヨードアセトアミド、10mM N a F、10μg/ml アプロチニンおよび0.4mM N a <sub>3</sub> V O <sub>4</sub>)に溶解させた。超遠心分離機による沈殿物を取り除いた後、次いで細胞溶解物を、mini - P r o t e a n I I s y s t e m (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s、H e r c u l e s、C A)を使用して、還元条件下で適切な濃度のゲルで、S D S - P A G E分析した。免疫ブロットするために、タンパク質を、25mM T r i s、192mM グリシンおよび20%メタノール中の重合ポリフッ化ビニリデン膜(Immobilon - P; Millipore、Bedford、MA)に移し、そして5%脱脂乳を含む0.05% Tween 20を有するP B Sで、室温で1時間、膜をブロックした。特定の抗体を、対応するm A b、そしてその後のH R P - 結合抗マウスI g (A m e r s h a m P h a r m a c i a)によってプローブした。ウェスタンブロットを、向上した化学発光技術(N E N、B o s t o n、MA)によって可視化した。

#### 【0251】

(インビトロ細胞増殖アッセイ)細胞増殖を、[<sup>3</sup>H] - チミジン取り込み(I C N R a d i o c h e m i a l s、I r v i n e、C A)を使用して測定した。各実験の全ての増殖アッセイを3連行なった。各マイクロプレートウェルの0.2 × 10<sup>6</sup>の細胞は、37 でのO K T 3およびP M Aの刺激ありか、またはなしかで、培地のみの存在下で、あるいは、1 F 7 (1μg/ml)の存在下で、インキュベートした。72時間のインキュベートの後、細胞を培養の最後の8時間、[<sup>3</sup>H] - チミジン(1μCi/ウェル)と共にパルスした。次いで、細胞をガラス製フィルター(W a l l a c、T u r k、F i n l a n d)上に収集し、液体シンチレーションカウンター(W a l l a c)を用いて放射能をカウントした。[<sup>3</sup>H] - チミジン取り込みは、3連のサンプルの平均c p mとして表した。

#### 【0252】

(統計) スチューデントt検定を、コントロールとサンプルとの差異が有意であるか(p < 0.05を有意とする)を決定するために使用した。

#### 【0253】

(結果)

(抗C D 2 6 M A b処置は、G 1 / Sチェックポイントで細胞周期の進行を阻害する。) D P P I V活性ドメイン(J . C 2 6 / D P +)を有するが、D P P I V活性ドメイン(J . C 2 6 / D P -)を有しない、C D 2 6のc D N AでトランスフェクトしたJ u r

k a t細胞の細胞周期における、可溶性抗C D 2 6抗体結合の効果が検査された(21、22)。細胞周期の状態を分析するために、細胞をB r d Uと共にパルスした後、F I T C標識化B r d Uおよび7 - A A Dの2色染色を有するF C Mを使用した。細胞周期の効果をよりよく可視化するために、細胞をN o c o d a z o l eで処置し、これは細胞がG 0 / G 1期で停止されない限り、M期で細胞を停止させる。トリパンブルー染色除去法によって検査された細胞生存度は、N o c o d a z o l eの存在下または非存在下で95%より高いのままであった。図6Aに示すように、J . C 2 6 / D P +への抗C D 2 6 m A b 1 F 7の添加は、G 1 / Sチェックポイントでの細胞周期の進行の遮断を生じた。注目すべきことは、G 1 / Sチェックポイントでの細胞周期の停止が、J . C 2 6 / D P - またはJ u r k a t親細胞(J w t)で観察されなかったことという事実である(図6A)。図6Bにおいて、N o c o d a z o l eによるG 2 / M蓄積は、1 F 7非処理J . C 2 6 / D P +で観察されたが、1 F 7処理J . C 2 6 / D P +では観察されなかった。N o c o d a z o l eによるG 2 / M蓄積のこの効果はまた、1 F 7の存在下または非存在下で、J . C 2 6 / D P - およびJ w tにおいて観察されなかった(図6B)。一方で、S期は、1 F 7処理によって影響されなかった(図6C)。これらの発見は、G 1 / Sチェックポイントでの細胞周期の進行の効果は、C D 2 6分子に内在するD P P I Vの酵素活性に依存したことを示唆する。

10

#### 【0254】

(抗C D 2 6 M A b処理の後のG 1 / Sチェックポイントでの細胞周期の停止に關与するp 2 1の発現の増強) F C M分析による、1 F 7に対するJ u r k a t細胞の細胞応答の厳密な検査は、J . C 2 6 / D P +が、1 F 7との培養の開始後6時間のG 1停止において約25%の増加を示すことを明らかにした(図7)。1 F 7処理後12時間および24時間で、J . C 2 6 / D P +は次第にその初期のG 0 / G 1停止を損失した。特に、J . C 2 6 / D P - において、細胞周期の停止は観察されなかった。これらの発見は再び、G 1 / Sチェックポイントでの細胞周期の進行への効果がD P P I Vの酵素活性に依存することを示唆した。1 F 7の効果は、0 . 1 ~ 10 . 0  $\mu$ g / m lの濃度で用量依存性であった。1 F 7からの別のC D 2 6エピトープを認識する、別の抗C D 2 6 m A b 5 F 8は、1 F 7で観察されるような効果はなかったことが注目されるべきである(T o r i m o t oら、1992)。

20

#### 【0255】

細胞周期の停止は、C D K Iの増加および/またはサイクリンまたはC D Kの減少に伴って起こり得るため、1 F 7結合後の様々な細胞周期制御タンパク質の発現を検査した。コントロール条件(培地のみ、またはアイソタイプを適合したコントロールm A b処理としての4 B 4)下でのインキュベーションと比較して、1 F 7でのJ . C 2 6 / D P +の処置は、タンパク質の相対レベルのウェスタンブロット分析によって示された、p 2 1<sup>C i p 1</sup>の発現の増加を生じた。

30

#### 【0256】

ウェスタンブロット法において、J . C 2 6 / D P +およびJ . C 2 6 / D P -を、1 F 7と共にインキュベートした。次いで、細胞を指定の培養期間で収集し、p 2 1<sup>C i p 1</sup>の発現を、適切なm A bを用いるウェスタンブロット法によって評価した。細胞抽出物の等しい添加を、抗アクチンm A bを用いて確認した。培地のみ、または4 B 4において、p 2 1<sup>C i p 1</sup>の発現の効果は観察されなかった。1 F 7でのJ . C 2 6 / D P -の処置は、p 2 1<sup>C i p 1</sup>の発現の増加を生じなかった。増強したp 2 1<sup>C i p 1</sup>の発現が、1 F 7での処理の6時間以内に検出され、次いで図6Aに示されるように細胞周期の分析に一致するように、次第に減少した。

40

#### 【0257】

さらに、J . C 2 6 / D P +およびJ . C 2 6 / D P -を、6時間、培地のみ、アイソタイプコントロールm A b 4 B 4(I s o)または、1 F 7と共にインキュベートした。次いで、細胞を収集し、p 2 1<sup>C i p 1</sup>、p 2 7<sup>K i p 1</sup>、p 5 3、サイクリンD 1、C D K 4、およびC D K 6の発現を、適切なm A bを用いるウェスタンブロット法によって

50

評価した。細胞抽出物の等しい添加を、抗 アクチン m A b を用いて確認した。p 2 1<sup>C i p 1</sup> と対照的に、G 1 調節サイクリン複合体に関連した、サイクリン D 1、C D K 4、C D K 6、p 2 7<sup>K i p 1</sup>、および p 5 3 の発現は、1 F 7 での処置の 6 時間後で変化しなかった。

#### 【0258】

これらのタンパク質の発現は、1 F 7 との培養の開始後 0 ~ 2 4 時間、変化しなかったことが注目されるべきである。これらの結果は、1 F 7 刺激が、C D 2 6 の D P P I V 酵素活性を通して、p 2 1<sup>C i p 1</sup> の上方制御および G 1 / S チェックポイントでの細胞周期の停止を導くことを示唆した。

#### 【0259】

( M E K - E R K 経路は、G 1 / S チェックポイントでの 1 F 7 媒介細胞周期停止において重要な役割を果たす。 ) C D 2 6 分子はまた、膜脂質ラフトに存在することが示され、1 F 7 による C D 2 6 の連結は、ラフトへの C D 2 6 分子の補充を増加させることが示された ( I s h i i ら、2 0 0 1 )。脂質ラフトの T 細胞受容体 ( T C R ) はまた、シグナル伝達分子と相互作用し ( J a n e s ら、1 9 9 9 ; C h e u k u r i ら、2 0 0 1 )、それによってシグナル伝達分子のチロシンリン酸化の増加を導いた。C D 2 6 は、重要な細胞の構造との物理的および機能的関連を通して、必須 T 細胞シグナル伝達の事象に関与する ( M o r i m o t o および S c h l o s s m a n、1 9 9 8 ; v o n B o n i n ら、1 9 9 8 ; D e M e e s t e r ら、1 9 9 9 )。他の研究は、T 細胞および他の細胞系統の R a f - M E K - E R K 経路の活性化過剰が、G 1 / S チェックポイントで重要細胞周期制御因子の発現および細胞周期の停止を交互に引き起こすことを示した ( B o u s s i o t i s ら、1 9 9 7 ; S e w i n g ら、1 9 9 7 ; C h e n ら、1 9 9 9 )。従って、T 細胞の C D 2 6 に関連するシグナル伝達分子のチロシンリン酸化を、p 2 1<sup>C i p 1</sup> の発現について検査した。J . C 2 6 / D P +、J . C 2 6 / D P - および J w t を、様々な時間周期 (すなわち、0 分、5 分、および 1 0 分) で、1 F 7 とともにインキュベートした。次いで、細胞を収集し、5 ~ 2 0 % 勾配 S D S - P A G E によって単離し、チロシンリン酸化の状態を、抗ホスホチロシン m A b 4 G 1 0 ( p Y ) を用いるウェスタンブロット法によって評価した。細胞抽出物の等しい添加は、アクチンを認識する A b を用いて確認した。J . C 2 6 / D P + の 1 F 7 処理は、培養開始後 5 ~ 1 0 分で、約 4 0 k D a の分子量を有するタンパク質のチロシンリン酸化を誘導した。しかし、J . C 2 6 / D P - および J w t において、1 F 7 の処置後、チロシンリン酸化の誘導は観察されなかった。これらの変化は、アイソタイプの一一致したコントロール m A b 4 B 4 を使用する実験では観察されなかった。

#### 【0260】

以前の研究が R a f - M E K - E R K 経路が、抗 C D 3 m A b 誘導 G 1 停止を媒介することを示したので ( C h e n ら、1 9 9 9 )、4 0 k D a のリン酸化タンパク質を特徴づけるために、E R K のリン酸化状態を検査した。E R K タンパク質は、1 F 7 での J . C 2 6 / D P + 処理の後、リン酸化されることが示された。この実験において、J . C 2 6 / D P + を、様々な時間周期 (すなわち、0 分、5 分および 1 0 分) で、培地のみ、アイソタイプコントロール m A b 4 B 4 ( I s o ) または 1 F 7 と共にインキュベートした。細胞溶解物を、抗リン酸 E R K と共にブロットし、抗 E R K m A b で再びブローブした。J . C 2 6 - または J w t を用いた実験において、差異は観察されなかった。

#### 【0261】

これらの結果を確認するために、p 2 1<sup>C i p 1</sup> 発現における M E K - E R K 経路を阻害する効果を検査した。細胞を、M E K 特異的インヒビター P D 9 8 0 5 9 の非存在下または存在下で、6 時間、1 F 7 で処理した。E R K のリン酸化に関連する p 2 1<sup>C i p 1</sup> の増強した発現は、M E K インヒビターの存在によって明確に阻害された。E R K を認識する抗体を用いるウェスタンブロット法をブローブすることによって、ゲルレーンの等しい添加を確認したことが注目されるべきである。これらの結果は、1 F 7 処理後の p 2 1<sup>C i p 1</sup> の誘導が M E K - E R K 経路を介して媒介されたことを示唆した。

10

20

30

40

50

## 【0262】

1F7での処理後、T細胞の細胞周期調節におけるMEK-EKK経路の役割をさらに決定するために、FCMによる細胞周期分析を、MEK特異的インヒビターPD98059およびU0126の非存在下または存在下で行なった。p21<sup>Cip1</sup>発現についての結果と一致して、1F7処理J.C26/DP+のG0/G1停止は、MEK特異的インヒビターの存在によって妨害され(図8)、これはJ.C26/DP-およびJw tにおいて観察されなかった。これらの発見は、抗CD26処理が、MEK-EKK経路を活性化し、CDKI p21<sup>Cip1</sup>の発現の増強を導くことによって、G1/Sチェックポイントで細胞周期停止を誘導したことを示した。

## 【0263】

(抗CD26MAb 1F7処置は、T細胞クローンの増幅を阻害する。) p21<sup>Cip1</sup>の上方制御は、T細胞増殖中および自己免疫性ブローンBXS BのCD4+免疫記憶T細胞について記載されている(Nourseら、1994; Sabzevariら、1997)。さらに、p21<sup>Cip1</sup>欠損マウスは、異常な量のCD4+免疫記憶T細胞を蓄積し、核抗原に対する耐性を損失した(Sabzevariら、1997)。これらの発見について、ヒト末梢T細胞の増殖への1F7媒介p21<sup>Cip1</sup>増強の生物学的効果を規定するために、PBMC由来のヒトT細胞クローンの増殖への可溶性抗CD26抗体結合の効果が検査された。図9に示されるように、ヒトT細胞クローンへの1F7の付加は、<sup>[3H]</sup>-チミジン取り込みによってアッセイされるように細胞増殖の減少を導いた。注目すべきことは、抗CD26 mAb 5F8(Morimotoら、1992; Dongら、1998)、またはアイソタイプコントロール抗体4B4での処置後、阻害効果がなかった。Jurkatトランスフェクト体を使用した実験について上記の結果と同様に、T細胞クローンのp21<sup>Cip1</sup>発現はまた、1F7での処置後、増強された(図4B)。増強されたp21<sup>Cip1</sup>発現の1F7の効果はまた、小さい程度だがPHA T芽細胞で観察されたが、静止T細胞では観察されなかった。この実験において、T細胞クローン、10日目PHA T芽細胞および新しい単離T細胞を、培地のみまたは1F7と共に、72時間インキュベートした。次いで、細胞溶解物を、p21<sup>Cip1</sup>を認識するmAbを用いてウェスタンブロット法のために調製した。細胞の抽出物の等しい添加を、アクチンを認識するmAbを用いて確認した。これらの結果は、T細胞クローンおよびPHA T芽細胞のような活性化T細胞において、T細胞増殖は、p21<sup>Cip1</sup>の誘導を介して1F7の処置によって阻害されたことを示す。

## 【0264】

本発明者らは、抗CD26 mAb 1F7結合が、G1/Sチェックポイントで細胞周期停止を導き、そしてCD26の関与は、細胞周期調節タンパク質p21<sup>Cip1</sup>の増強した発現を介して、CD26 Jurkat トランスフェクト体のG1停止を誘導することを実証した。この効果は、MEK-EKK経路の活性化によって媒介される。CD26 Jurkat トランスフェクト体に加え、増殖の阻害およびp21<sup>Cip1</sup>発現の増強はまた、ヒトPBMC由来のT細胞クローンおよびPHA T芽細胞において観測された。

## 【0265】

クラスII MHC制限ヒトCD4+ T細胞クローンの抗原感受性が、刺激後、時間とともに次第に増大することが実証される。これは、培養中の少ない抗原の要求、およびT細胞活性化における抗体提示細胞(APC)毎のペプチドMHC複合体の減少した数、およびクラスII MHC遮断による阻害への増大した耐性によって明らかである(Lehmanら、1989)。抗原の感受性の増大は、CD26、LFA-1およびVLA-1の増大した細胞表面発現に伴うが、TCRの発現および一連の他のT細胞表面分子は変化しないままであることが、以前実証された(Falcioniら、1996)。本発明はまた、後期免疫記憶T細胞表現型が、インビボで活性化されるT細胞で起こることを実証した。さらに、適切なmAbを使用し、MHC遮断でのCD26 mAbによる処理は、活性化免疫記憶T細胞の増殖の阻害に貢献することが実証されている(Falcio

10

20

30

40

50

n i ら、1996)。さらに、抗CD26 mAbによるT細胞増殖の阻害効果の分子機構は、MEK - ERK経路の活性化による、G1/Sチェックポイントでの細胞周期停止およびp21<sup>Cip1</sup>の誘導を介することが示されている。

#### 【0266】

さらに、T細胞のCD26分子は、膜脂質ラフトに存在し、従って、抗CD26 mAbでのCD26の架橋は、脂質ラフトへのCD26分子の凝集を誘導する。この工程は最終的に、シグナル伝達分子（例えば、Cb1、ZAP-70、ERK、p56<sup>Lck</sup>およびCD2-）のチロシンリン酸化を介して、T細胞の活性化を導いた（Ishiiら、2001）。TCRはまた、脂質ラフトへの様々な表面およびサイトゾルアダプタータンパク質の補充を介して、そのシグナル伝達の効果を及ぼす（Janesら、1999；Ch 10  
eukuriら、2001）。TCRシグナル伝達のネガティブ調節として、Rap1、RafおよびCb1-bが、脂質ラフトで凝集することが示されている（Boussioisら、1997；Sewingら、1997；LeoおよびSchraven、2001）。この点に関して、Raf-MEK-ERKシグナル伝達の増大した強度は、p21<sup>Cip1</sup>の発現の増大に関連する、G1/SチェックポイントでのT細胞周期停止を誘発し得ることが実証されている。一方で、高用量の抗CD3 mAbは、Raf-MEK-ERK経路を活性化することによって細胞周期停止を誘導し、T細胞のp21<sup>Cip1</sup>の発現およびP27<sup>Kip1</sup>の発現を下方制御の失敗を導く（Sewingら、1997；Chenら、1999）。

#### 【0267】

積み重なる証拠は、DPPIV酵素活性がCD26媒介T細胞同時刺激およびT細胞免疫応答において重要な役割を果たすことを示唆する（MorimotoおよびSchlossman、1998；von Boninら、1998；De Meesterら、1999）。本発明は、DPPIV酵素活性が、抗CD26 mAb 1F7でのT細胞の処理の後、p21<sup>Cip1</sup>を誘導する役割を果たすことを示す。CD26/DPPIVは、生物学的機能を改変するために、N末端で選択されたケモイカンを開裂することによって、様々な細胞の機能を制御することが報告されている（De Meesterら、1999；Oravecraら、1997；Proostら、1998）。セリンプロテアーゼとして、特定の生物学的要素を開裂する能力から見て、CD26のDPPIV酵素活性が、T細胞の関連する生物学的要素の開裂を介し、ERKのリン酸化およびp21<sup>Cip1</sup>の 30  
誘導を制御するようであることが考えられる。p21<sup>Cip1</sup>の発現を調節することを担うCD26/DPPIV関連因子を同定することを目的とした実験が、企図される。

#### 【0268】

1F7が5F8より強力な効果を有するという知見は、CD26の選択されたエピトープの係合が、細胞周期の停止を媒介する際、細胞増殖を阻害する際、およびmAb処理の後のp21<sup>Cip1</sup>発現を誘導する際に重要な因子であることを実証した。1F7は、強い同時有糸分裂促進能力を有するのに対し、5F8はこのような活性を有さないことにもまた、注目すべきである（Dongら、1998）。従って、1F7および5F8によって認識される、CD26分子上のエピトープは、異なる機能的効果を有する。

#### 【0269】

活性化された記憶T細胞は、高レベルのCD26を発現し、そして後期記憶T細胞のこの表現型は、インビボとインビトロとの両方で増加する抗原感受性に関連する（Fallcioniら、1996）。インビボ研究は、多数のCD26+T細胞が、多発性硬化症および慢性関節リウマチに罹患する患者の炎症組織において見出されることを明らかにし（Mizokamiら、1996；Eguchiら、1989；Haflerら、1985）、このことは、CD26+T細胞がエフェクターT細胞として機能することを示す。従って、CD26は、免疫療法剤として有用である。実際に、抗CD26処置は、同種異系の骨髄移植後のステロイド耐性急性GVHDの発症を減少させる際に有効であることが報告されているが（Bacigalupoら、1985；De Meesterら、1993）、これらの臨床結果に關与する正確な機構は未だに明らかではない。本発明のデータ 40 50

は、CD26による活性化T細胞の細胞周期の調節が、細胞増殖を阻害することによって、急性GVHDを制御するために有用であることを示す。p21遺伝子のトランスフェクションが、リンパ球増殖のシクロスポリンA媒介阻害を増強させたという観察(Ashwaniら、2000)と一緒に考慮すると、抗CD26mAb治療は、免疫抑制を誘導する代替のストラテジーを提供し、これは、従来の薬剤を用いて現在見られる副作用より潜在的に毒性が低いものである。

#### 【0270】

(実施例3)

(臨床試験)

この節は、抗CD26抗体を単独でかまたは他の治療剤と組み合わせてかのいずれかで使用する、抗癌治療のためのヒト処置プロトコルの開発に関する。癌に関連する処置のみが本明細書に記載されるが、この実施例はまた、自己免疫、GVHCのような免疫疾患の処置、および器官移植拒絶反応の防止に適用可能である。

10

#### 【0271】

臨床試験を実施する種々の要素(患者の処置およびモニタリングが挙げられる)は、本開示を考慮して、当業者に公知となる。以下の情報は、本明細書中に記載される、抗CD26抗体に基づく治療を、単独でかまたは他の付属処置(癌治療において臨床試験で慣習的に使用される)と組み合わせて樹立する際に使用するための一般的な指針として提供される。

#### 【0272】

第1相臨床試験のための候補は、全ての従来の治療が失敗した患者である。約100人の患者が、最初に処置される。これらの患者の年齢は、16~90歳(中央値65歳)の範囲である。性別、人種、または民族集団に対する先入観なしに、患者が処置され、そしてサンプルが得られる。この患者の集団について、約41%が女性であり、6%が黒人であり、13%がヒスパニックであり、そして3%が他の少数派である。これらの推定は、過去5年間にわたってMD Anderson Cancer Centerにおいて見られた連続的症例に基づく。

20

#### 【0273】

最適には、患者は、十分な骨髓機能( $1,000/mm^3$ を超える末梢絶対顆粒球計数および $100,000/mm^3$ の血小板計数(骨髓における腫瘍の包含に起因して減少しない限り)によって定義されるような)、十分な肝臓機能( $1.5mg/dl$ 以下のビリルビン、正常な上限の4倍未満のSGOT/SGPT)、および十分な腎臓機能( $1.5mg/dl$ 以下のクレアチニン)を示す。

30

#### 【0274】

研究サンプルは、既存の認可された計画およびプロトコルの下で、末梢血または骨髓から得る。研究材料のいくらかは、患者の看護の一部として採取された標本から得られる。

#### 【0275】

上記抗CD26抗体処置は、試験的な週間の基礎で、局所的にかまたは全身的に患者に施される。代表的な処置経過は、7~21日の期間にわたって送達された、約6用量を含み得る。臨床医による選択の際に、レジメンが、3週間毎またはより少ない頻度(1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月など)の基礎での6用量で続けられ得る。もちろん、これらはほんの例示的な処置時間であり、そして熟練した開業医は、他の多くの時間経過が可能であることを容易に認識する。

40

#### 【0276】

投与の様式は、局所投与(腫瘍内注射および/または腫瘍脈管構造への注射によるもの、気管内、鞘内、内視鏡的、皮下、ならびに/あるいは経皮が挙げられる)であり得る。投与の様式は、全身的(静脈内、動脈内、腹腔内、および/または経口投与が挙げられる)であり得る。

#### 【0277】

抗CD26抗体は、 $1\mu g/kg \sim 1g/kg$ の範囲の投薬量で静脈内に投与されるが、

50



正確な投薬量は、引き続く試験に依存する。いくつかの実施形態において、抗体は、リポソーム処方物としてか、または潜在的に、他の人工キャリアを介して投与される。抗体はまた、CD26発現腫瘍細胞に遭遇する際に活性化されるように、不活性部分として投与され得る。例えば、抗体のリポソーム処方物は、 $0.01 \sim 100 \text{ mg/m}^2 / \text{1日の範囲}$ で静脈内に投与される。もちろん、熟練した開業医は、これらの投薬範囲が有用な指針を提供するが、疾患、性別、動作状態、年齢および他の一般的な健康状態を考慮した、個々の患者の必要性に依存する投薬量の適切な調節は、患者に投与される時点で、訓練された医師によってなされること理解する。同じことが、投与の手段、投与経路についてもまた真実である。

#### 【0278】

疾患の経過をモニタリングし、そして癌細胞の殺傷を評価するために、患者が毎月、適切な試験について検査されるべきであることが意図される。薬物の有効性を評価するために、医師は、癌/腫瘍の型に依存して、モニタリングされるべきパラメータを決定し、そして例えば、コンピュータ連動断層撮影(CT)スキャン、PETスキャン、ガリウムスキャン、細胞表面上および血清中のCD26抗原の存在の検出、ならびにいくつかの場合においては、他の腫瘍マーカー(例えば、前立腺癌におけるPSA(前立腺(prostate)特異的抗原)、胚の腫瘍におけるHCG、結腸癌におけるCEA、卵巣癌におけるCA125、リンパ腫におけるLDHおよびB2ミクログロブリンなど)のさらなる検出、によって、腫瘍質量の減少をモニタリングするための方法を含む。患者の経過および処置の有効性をモニタリングするために使用される試験としては、以下が挙げられる：物理学的検査、X線、血液研究(work)、骨髓研究、および他の臨床的な実験室方法。第1相研究において与えられる用量は、標準的な第1相臨床試験においてなされるように、次第に増大される。すなわち、最大の許容範囲に達するまで、用量が増大される。

#### 【0279】

臨床的応答は、認容可能な測定によって規定され得る。例えば、完全な応答は、癌細胞の完全な消滅によって規定され得、一方で部分的な応答は、癌細胞または腫瘍質量の50%の減少によって規定され得る。

#### 【0280】

代表的な処置の経過は、個々の患者および処置される疾患に依存して、当業者に公知の様式で変動する。例えば、T細胞リンパ腫を罹患する患者は、4週間の周期で処置され得る。処置の持続時間は、同様に変動するが、その患者について有害な影響が観察されない場合は、潜在的により長い持続時間が使用され得、そしてその患者が応答しないか、または許容不可能な毒性を被る場合には、より短期間の処置となり得る。

#### 【0281】

本明細書中に開示され、そして特許請求される、組成物および/または方法の全ては、本開示を考慮して、過度の実験なしに作製および実施され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態の観点で記載されたが、本明細書中に記載される組成物および/または方法、ならびに方法の工程または工程の順序に対して、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、改変が適用され得ることが、当業者に明らかである。より具体的には、化学的と生理学的との両方で関連する特定の薬剤が、本明細書中に記載される薬剤の代わりに用いられ得るが、同じかまたは類似の結果が達成されることが明らかである。当業者に明らかであるような類似の代用物および改変の全ては、添付の特許請求の範囲によって規定されるような本発明の精神、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

#### 【0282】

##### (参考文献)

以下の参考文献は、本明細書中に記載されるものを補足する、例示的な手順的または他の詳細を提供する程度まで、具体的に本明細書中に参考として援用される。

#### 【0283】

##### 【表3】

10

20

30

40

米国特許番号 3,817,837  
 米国特許番号 3,850,752  
 米国特許番号 3,939,350  
 米国特許番号 3,996,345  
 米国特許番号 4,196,265  
 米国特許番号 4,275,149  
 米国特許番号 4,277,437  
 米国特許番号 4,340,535  
 米国特許番号 4,366,241  
 米国特許番号 4,472,509  
 米国特許番号 4,676,980  
 米国特許番号 4,816,567  
 米国特許番号 4,867,973  
 米国特許番号 5,021,236  
 米国特許番号 5,120,642  
 米国特許番号 5,565,332  
 米国特許番号 5,693,762  
 米国特許番号 6,218,372  
 米国特許番号 6,218,372

10

20

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.*, *J Immunol.* 165:1882-1888, 2000.

Bacigalupo *et al.*, *Acta haematol.* 73:185-186, 1985.

Bauvois *et al.*, *Br. J. Cancer*, 79:1042-1048, 1999.

Boussiotis *et al.*, *Science*, 278:124-127, 1997.

30

- 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.*, *J Immunol.*, 163:5796-5805, 1999.
- Cheukuri *et al.*, *Immunity*, 2001;14: 657-660. 10
- 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. Immunol.*, 145:3963-3971, 1990.
- Dang *et al.*, *J. Immunol.*, 147:2825-2832, 1991.
- Dang *et al.*, *J. Immunol.*, 156:1349-1355, 1996. 20
- 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.
- Eguchi *et 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. 30
- 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 and Ligands*. Wu *et al.*, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 87-104, 1991. 40
- 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.*, *N Engl J Med.*, 312: 1405-1411, 1985.
- Hafler *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 312:1405-1411, 1985.
- Hansen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 119:203-210, 1989.
- Hegen *et al.*, *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 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255, 1993. 10
- 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. 20
- 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 J Immunol.* 19:1071-1077, 1989.
- Leo and Schraven, *Curr Opn Immunol.* 13:307-316, 2001.
- Marks *et al.*, *Bio/Technol.* 10, 779-783, 1992.
- Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222, 581-597, 1991. 30
- Mattern *et al.*, *Immunobiol.*, 188:36-50, 1993.
- McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-553 [1990]
- Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539 (1983).
- Mizokami *et al.*, *J Rheumatol.* 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.
- Morimoto *et al.*, *J. Immunol.*, 143:3430-3439, 1989. 40
- Morimoto *et al.*, *J Immunol.*, 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* (4<sup>th</sup> 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 出願 WO 91/00360
- PCT 出願 WO 92/200373
- PCT 出願 WO 93/08829
- Proost *et al.*, *J Biol Chem*. 273:7222-7227, 1998. 10
- 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, pages 1035-1038 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.
- Sabzevari *et al.*, *Eur J Immunol*. 27:1901-1910, 1997. 20
- Sewing *et al.*, *Mol Cell Biol*. 17: 5588-5597, 1997.
- Sugita *et al.*, *J Immunol.*, 149: 3208-3216, 1992.
- Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 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. 30
- 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. 40
- Xiong *et al.*, *Nature*, 366:701-704, 1993.
- Yang and Kornbluth, *Trends Cell Biol.*, 9:207-210, 1999.

# 【図面の簡単な説明】

【0284】

【図1A】図は、Karpas 299の表現型の特徴付けを示す。(図1A)細胞を、フローサイトメトリーによって、CD26、CD3およびCD2の発現について評価した。特定の表面マーカーを発現する細胞の%を示す。(図1B)抗CD26 mAb 1F7 (1 μg/ml)と一緒に37 °Cで一晩インキュベーションした後、Karpas 29 50

9細胞を、CD26発現について評価し、そして1F7と一緒に一晚インキュベーションする前のCD26発現と比較した。a = 陰性コントロール、b = 抗CD26処理前、c = 抗CD26処理後。

【図1B】図は、Karpas 299の表現型の特徴付けを示す。(図1A)細胞を、フローサイトメトリーによって、CD26、CD3およびCD2の発現について評価した。特定の表面マーカーを発現する細胞の%を示す。(図1B)抗CD26 mAb 1F7 (1  $\mu$ g/ml)と一緒に37℃で一晩インキュベーションした後、Karpas 299細胞を、CD26発現について評価し、そして1F7と一緒に一晚インキュベーションする前のCD26発現と比較した。a = 陰性コントロール、b = 抗CD26処理前、c = 抗CD26処理後。

10

【図2A】図2は、細胞増殖に対する可溶性抗CD26 mAbの阻害効果を示す。Karpas 299細胞(図2A)およびH9細胞(図2B)を、可溶性の抗CD26 mAb 1F7、抗CD26 mAb 5F8またはアイソタイプコントロールmAbを含む培地と一緒にインキュベートし、そしてMTT取り込みアッセイを実施した。データは、各細胞株についての3回の実験の代表である。細胞傷害性インデックス(指標)(%コントロール) = 処理した細胞の1 - OD  $\times$  100 - 細胞培地のみでインキュベートされた細胞のOD。

【図2B】図2は、細胞増殖に対する可溶性抗CD26 mAbの阻害効果を示す。Karpas 299細胞(図2A)およびH9細胞(図2B)を、可溶性の抗CD26 mAb 1F7、抗CD26 mAb 5F8またはアイソタイプコントロールmAbを含む培地と一緒にインキュベートし、そしてMTT取り込みアッセイを実施した。データは、各細胞株についての3回の実験の代表である。細胞傷害性インデックス(指標)(%コントロール) = 処理した細胞の1 - OD  $\times$  100 - 細胞培地のみでインキュベートされた細胞のOD。

20

【図3】(SCIDマウスにおける、腫瘍形成後のKarpas 299細胞上でのCD26の表面発現)(図3A)SCIDマウスへの腫瘍の注射の前のCD26表面発現。1  $\times$  10<sup>6</sup>腫瘍細胞が、SCIDマウスにi.p.注射され、そして続けて、触知可能な腫瘍の発生後に、腫瘍の塊が回収された。次いで、単一細胞の懸濁物が作製され、そしてCD26表面発現が、フローサイトメトリーにより決定された(a = 陰性コントロール、b = CD26)。(図3B)SCIDマウスから回収した腫瘍の塊からの単一細胞の懸濁液でのCD26表面発現。1  $\times$  10<sup>6</sup>腫瘍細胞が、SCIDマウスにi.p.注射され、そして続けて、触知可能な腫瘍の発生後に、腫瘍の塊が回収された。次いで、単一細胞の懸濁物が作製され、そしてCD26表面発現が、フローサイトメトリーにより決定された(a = 陰性コントロール、b = CD26)。

30

【図4A】(1F7処理後の、Karpas 299保有SCIDマウスの増強された生存率)(図4A)マウス1匹あたり1  $\times$  10<sup>6</sup>のKarpas 299細胞を用いたSCIDマウスのi.p.接種の1日後、次いで、生理食塩水単独でのi.p.処理、アイソタイプコントロールAb (5  $\mu$ g/注射1回または10  $\mu$ g/注射1回)でのi.p.処理、1F7 (5  $\mu$ g/注射1回または10  $\mu$ g/注射1回)でのi.p.処理が、1日おきに合計10回の注射で投与された。アーム1：生理食塩水単独(n = 13)；アーム2：アイソタイプコントロールAb (5  $\mu$ g/注射1回、n = 10)；アーム3：アイソタイプコントロールAb (10  $\mu$ g/注射1回、n = 5)；アーム4：抗CD26 mAb 1F7 (10  $\mu$ g/注射1回、n = 10)；アーム5：抗CD26 mAb 1F7 (5  $\mu$ g/注射1回、n = 14)。

40

【図4B】(1F7処理後の、Karpas 299保有SCIDマウスの増強された生存率)(図4B)マウス1匹あたり3  $\times$  10<sup>6</sup>のKarpas 299細胞を用いたSCIDマウスのi.p.接種の1日後、次いで、生理食塩水単独でのi.p.処理、アイソタイプコントロールAb (20  $\mu$ g/注射1回)でのi.p.処理、1F7 (5  $\mu$ g/注射1回、10  $\mu$ g/注射1回または20  $\mu$ g/注射1回)でのi.p.処理が、1日おきに合計10回の注射で投与された。アーム1：生理食塩水単独(n = 5)；アーム2：アイソ

50

タイプコントロールAb (20 µg / 注射1回、n = 5) ; アーム3 : 1F7 (5 µg / 注射1回、n = 5) ; アーム4 : 1F7 (10 µg / 注射1回、n = 5) ; アーム5 : 1F7 (20 µg / 注射1回、n = 5) 。

【図5】(腫瘍細胞のs.c.接種および抗体を用いたs.c.処理の後の、SCIDマウスにおける初期腫瘍の発生) SCIDマウスは、生理食塩水単独、100 µgの1F7またはアイソタイプコントロールAbの中でインキュベートされた $1 \times 10^6$ のKarpas 299腫瘍細胞を、s.c.注射により接種された。続いて、腫瘍細胞接種後の1日後に始めて、SCIDマウスが、元々の腫瘍のs.c.注射の位置に、生理食塩水のs.c.注射、0.1 ml滅菌生理食塩水中のアイソタイプコントロールAb (20 µg / 注射1回)のs.c.注射または1F7 (20 µg / 注射1回)のs.c.注射の、1日おきに10回の注射を受けた。目に見える腫瘍の最初の発生の日が、処理の効果を評価するために検証された。アーム1 : 生理食塩水単独 (n = 10) ; アーム2 : アイソタイプコントロールAb (n = 10) ; アーム3 : 抗CD26 mAb 1F7 (n = 10) 。

【図6】(CD26でトランスフェクトされたJurkat T細胞の、抗CD26 mAb 1F7を用いた処理は、G1/Sでの細胞周期の停止を生じた) J.C26/DP+が、ノコダゾール(Nocodazole)(Noc)の存在下または非存在下で、培地単独、アイソタイプコントロールmAb 4B4(Iso)または1F7と共にインキュベートされた。細胞培養物、染色、および細胞周期分析は、(物質および方法)に記載されるように実施された。G0/G1(図6A)細胞、G2/M(図6B)細胞およびS(図6C)細胞の測定値を示す。バーは、3回の独立して実施された実験でのG0/G1細胞、G2/M細胞およびS細胞の百分率の平均値 ± 標準誤差の表示である。アスタリスクは、J.C26/DP-およびJwtについての結果と有意に異なる( $p < 0.05$ )結果を有するサンプルを示す。

【図7】(抗CD26 mAb 1F7処置後の増加されたp21発現)ノコダゾールの存在下での、1F7とのインキュベーション後のG0/G1増加の%のタイムコース分析。細胞周期分析は、(物質および方法)に実施されるように実施された。G0/G1の百分率の増加は、mAb処理細胞と非mAb処理細胞との間でのG0/G1含有率の%の差である。バーは、3回の独立して実施された実験でのG0/G1増加の%の平均値 ± 標準誤差を表す。アスタリスクは、J.C26/DP-およびJwtについての結果と有意に異なる( $p < 0.05$ )結果を有するサンプルを示す。

【図8】(ERKのリン酸化は、抗CD26 mAb 1F7処理後の増加したp21<sup>Cip1</sup>発現を生じた) J.C26/DP+細胞が、MEKキナーゼインヒビターPD98059およびU0126とのインキュベートの後、ノコダゾールの存在下または非存在下で、培地単独、アイソタイプコントロールmAb 4B4(Iso)またはmAb 1F7と共にインキュベートされた。6時間のインキュベーションの後、細胞周期分析が、(物質および方法)に記載されるように実施された。データは、3回の独立して実施された実験を表す。G0/G1停止に対するPD98059およびU0126の効果は、J.C26-またはJwtにおいて全く観察されなかった。

【図9】(p21<sup>Cip1</sup>発現の増加を伴うヒトT細胞クローンでの抗CD26 mAb 1F7による細胞増殖の阻害)ヒトTクローンは、抗CD3 mAb (OKT3)およびPMAによる刺激を伴うかあるいは伴わずに、培地のみを用いてか、あるいは抗CD26 mAb 1F7もしくは抗CD26 mAb 5F8またはアイソタイプコントロールmAb 4B4(Iso)を示される濃度で含む培地と共にインキュベートされた。 $0.2 \times 10^5$ 細胞が、インキュベートされ、そして[<sup>3</sup>H]-チミジンでパルスされた。[<sup>3</sup>H]-チミジン取り込みは、標準誤差と共に3連のサンプルの平均cpmとして表された。

【図 1 A】

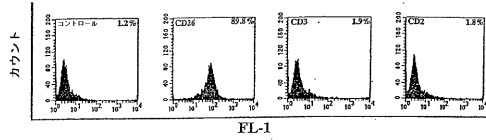


FIG. 1A

【図 1 B】

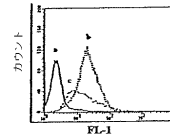


FIG. 1B

【図 2 A】

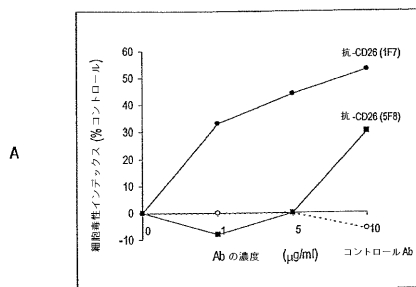


FIG. 2A

【図 2 B】

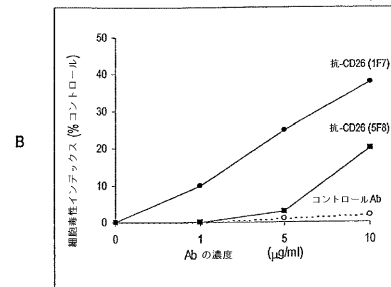


FIG. 2B



【 図 3 】

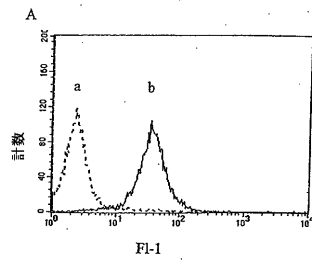


FIG. 3A

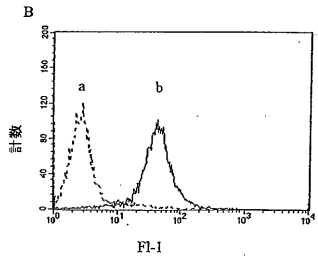


FIG. 3B

【 図 4 A 】

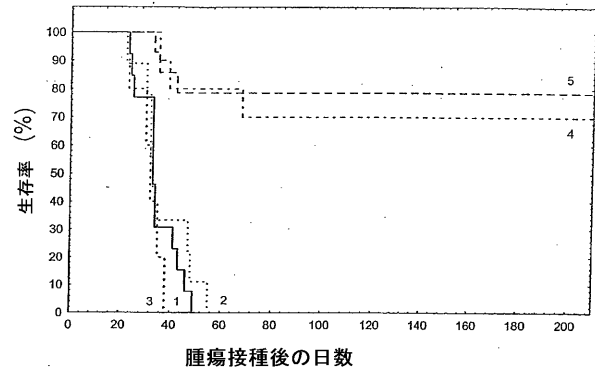


FIG. 4A

【 図 4 B 】

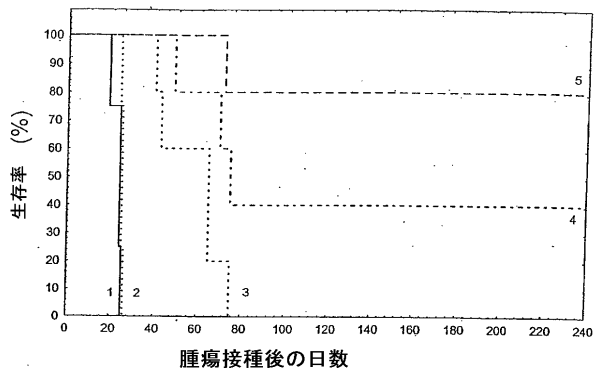


FIG. 4B

【 図 5 】

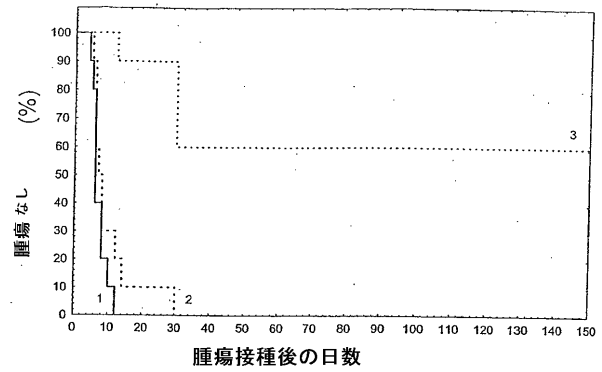


FIG. 5

【 図 6 】

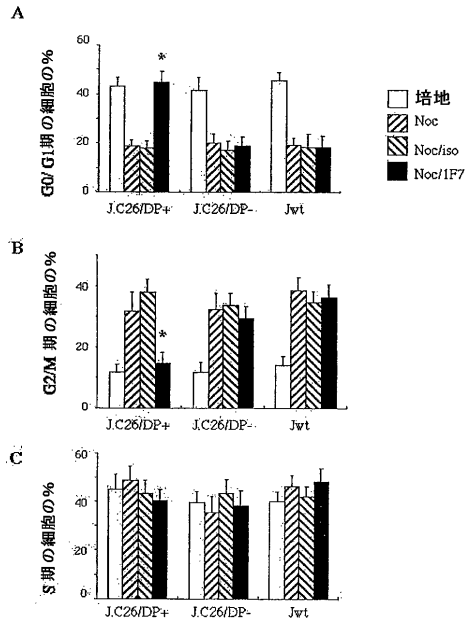


FIG. 6A, 6B, 6C

【 図 7 】

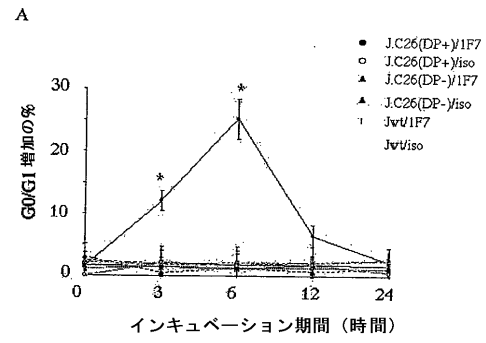


FIG. 7

【 図 8 】

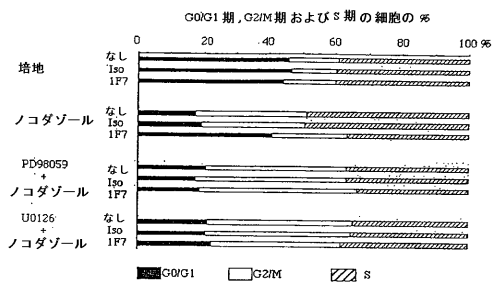


FIG. 8

【 図 9 】

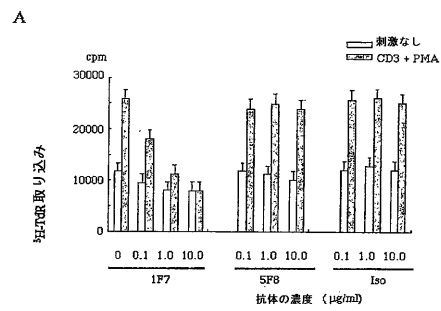


FIG. 9

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/092127 A1**(51) International Patent Classification: **A61K 39/395**(74) Agent: **HIGHLANDER, Steven, L.**; Fulbright & Jaworski, L.L.P., 600 Congress Avenue, Suite 2400, Austin, Texas 78701 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/14462

(22) International Filing Date: 8 May 2002 (08.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/290,531 11 May 2001 (11.05.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 60/290,531 (CON)  
Filed on 11 May 2001 (11.05.2001)(81) Designated States (*national*): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).Published:  
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(71) Applicants (*for all designated States except US*): **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM** [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US); **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE** [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **DANG, Nam, H.** [US/US]; 4101 Marlowe, Houston, TX 77005 (US); **MORIMOTO, Chikao** [JP/JP]; 5-25-16 Matsubara, Setagaya-ku, Tokyo (JP); **SCHLOSSMAN, Stuart** [US/US]; One Fox Place, Newton Centre, MA 02459 (US).

(54) Title: ANTI-CD26 MONOCLONAL ANTIBODIES AS THERAPY FOR DISEASES ASSOCIATED WITH CELLS EXPRESSING CD26

(57) Abstract: Therapeutic methods comprising administering anti-CD26 antibodies for the prevention and treatment of cancers and immune diseases associated with expressing CD26 are provided. The invention describes various types of anti-CD26 antibodies and modes of administration.



WO 02/092127 A1

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**DESCRIPTION****ANTI-CD26 MONOCLONAL ANTIBODIES AS THERAPY FOR DISEASES  
ASSOCIATED WITH CELLS EXPRESSING CD26**

5

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

The present application claims priority to co-pending U.S. Patent Application Serial No. 60/290,531, filed May 11, 2001. The entire text of the above-referenced disclosure is specifically incorporated by reference herein without disclaimer.

10

**1. Field of the Invention**

The present invention relates generally to the fields of cancer, immunology and immunotherapy. More particularly, it concerns the therapeutic use of anti-CD26 antibodies, including monoclonal, humanized, and polyclonal anti-CD26 antibodies, for the prevention and treatment of cancers and immune diseases. Various modes of administration, and doses are described.

15

**2. Description of Related Art**

Cancer has become one of the leading causes of death in the western world, second only behind heart disease. Current estimates project that one person in three in the U.S. will develop cancer, and that one person in five will die from cancer. Currently, there are few effective options for the treatment of cancer. The most conventional options of cancer treatment are surgery, radiation therapy and chemotherapy. Typically, surgical methods are used for the diagnosis (by surgical biopsy) and treatment of cancer (surgery to remove cancerous growths). However, if the cancer has metastasized and is widespread, surgery is unlikely to result in a cure and an alternate approach must be taken. Radiation therapy and chemotherapy are other forms of cancer treatments. However, both radiation therapy and chemotherapy being systemic therapies are associated with numerous side effects since normal cells are also affected. Side effects of the currently used cancer therapies include skin irritation, difficulty swallowing, dry mouth, nausea, diarrhea, hair loss, mouth sores, fatigue, bleeding to name a few. Thus, major challenges remain to be overcome for cancer therapy.

25

30

Target-directed therapies, such as those using specific antibodies as therapeutic agents, offers advantages over the non-targeted therapies such as systemic chemotherapy via oral or

WO 02/092127

PCT/US02/14462

intravenous administration of drugs or radiation therapy. There are two types of antibody-based therapies. The more common type is to identify a tumor antigen (*i.e.*, a protein expressed on tumors and cancer cells and not in normal tissues) and develop an antibody, preferably a monoclonal antibody (mAb) directed to the tumor antigen. One can then conjugate any therapeutic agent, such as a chemotherapeutic agent, a radionuclide, modified toxin, *etc.*, to this antibody to achieve targeted therapy by the therapeutic agent to the tumor. The other kind of antibody based therapy is by providing an antibody which in itself has therapeutic properties against the tumor/cancer cells it targets. The added advantage of this second form of antibody-based therapy is that one may additionally conjugate another therapeutic agent to the therapeutic antibody to achieve a more effective treatment.

The major advantage with any antibody-directed therapy, and of therapy using monoclonal antibodies (mAbs) in particular, is the ability to deliver increased doses of a therapeutic agent to a tumor, with greater sparing of normal tissue from the side effects of the therapeutic agent. Despite the identification of several antibodies for cancer therapies, there is still a need to identify new and more effective therapeutic antibodies to provide therapy for various cancer types.

A membrane protein, CD26, associated with numerous immune-related functions, is known to be expressed on the surface of several human cancers, particularly cancers that are in advanced stages and hence, associated with poor patient prognosis. For example, lung adenocarcinomas are positive for the enzymatic activity of CD26 while other histological types of lung carcinomas are negative for CD26 activity (Asada *et al.*, 1993); CD26 expression is high in differentiated thyroid carcinomas and absent in benign thyroid diseases (Tanaka *et al.*, 1995); high levels of CD26 protein and mRNA expression are found in B-chronic lymphocytic leukemia cells (Bauvois *et al.*, 1999); and CD26 expression is high in aggressive T-cell malignancies, such as T-cell lymphoblastic lymphomas/acute lymphoblastic leukemias (LBL/ALL), T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphomas. These cancer types are difficult to treat as they are particularly resistant to current treatment modalities. There is a great need to find therapies that would be useful in treating and preventing such aggressive diseases.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the defects in the art by identifying growth inhibitory properties of anti-CD26 antibodies. The invention therefore provides methods for cancer therapy, where the cancers express a CD26 protein on their surface, using a therapeutic anti-

WO 02/092127

PCT/US02/14462

CD26 antibody composition. The anti-CD26 antibody-based therapies of the present invention include the use of unconjugated antibodies including polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAbs), antibody fragments, humanized mAbs, naked antibodies. The use of conjugated antibodies, where the antibody is conjugated to drugs, other targeted antibody, toxins, enzyme inhibitors, radionuclides, neutron-capturing agents, such as boron addends, chemicals, and other biological agents, is also provided.

Therefore, in some embodiments, the invention provides methods of treating a patient having a cancer that expresses CD26 which comprise administering to the patient, a pharmaceutical formulation comprising an anti-CD26 antibody, where the anti-CD26 antibody binds CD26 and arrests cell cycle which inhibits cell growth.

Various cancers and tumors are contemplated treatable by methods of this invention and include, but are not limited to, T-cell cancers, B-cell cancers, hematological cancers, thyroid cancers, T-cell lymphoma, lung adenocarcinoma, thyroid carcinoma, melanoma, B-cell lymphoma, breast cancers, an ovarian cancers, pancreatic cancers, prostate cancers, colon cancers, bladder cancers, lung cancers, liver cancers, stomach cancers, testicular cancers, uterine cancers, brain cancers, lymphatic cancers, skin cancers, bone cancers, rectal cancers, or sarcomas.

In more specific embodiments, the T-cell cancer may be a T-cell lymphoma such as, a lymphoblastic lymphoma, an acute lymphoblastic leukemia, a T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, a peripheral T-cell lymphoma, a T-cell chronic lymphocytic leukemia, an angioimmunoblastic T-cell lymphoma, an angiocentric T-cell lymphoma, a HTLV-related T-cell leukemia, or an adult T-cell leukemia. In other specific embodiments, the B-cell cancer may be a B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma.

The invention also contemplates combination therapies, where two or more treatment regimens are applied concurrently to improve the efficacy of the therapy. Thus, in addition to treatment with an anti-CD26 antibody, a patient can be treated with a second therapeutic agent, wherein the second agent is a therapeutic polypeptide, a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide, a chemotherapeutic agent, an immunotherapeutic agent, a cytokine, a chemokine, an activating agent, a radiotherapeutic agent, or a biological response modifier.

The second therapeutic agent may be administered simultaneously with the anti-CD26 antibody. Alternatively, the second agent may be administered at a different time than the anti-CD26 antibody. Thus, the second agent may be administered prior to or after the anti-CD26 antibody treatment.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Several routes for administration of the anti-CD26 antibody are contemplated and include among others, intravenous, intra-arterial, intraperitoneal, intradermal, intratumoral, intramuscular, subcutaneous, intrathecal, intraarticular, oral, dermal, nasal, buccal, rectal, or vaginal administration.

5 It is contemplated that the antiCD26 antibody, administered at a dosage range of 1 µg/kg to 1g/kg will be useful for therapy. Thus it is contemplated that one may use, ranges from 1µg/kg to 5µg/kg, or 5µg/kg to 10µg/kg, 10µg/kg to 20µg/kg, 20µg/kg to 30µg/kg, 30µg/kg to 40µg/kg, 40µg/kg to 50µg/kg, 50µg/kg to 60µg/kg, 70µg/kg to 80µg/kg, 90µg/kg to 100µg/kg, 100µg/kg to 200µg/kg, 200µg/kg to 300µg/kg, 300µg/kg to 400µg/kg, 400µg/kg to 500µg/kg, 10 500µg/kg to 600µg/kg, 600µg/kg to 700µg/kg, 700µg/kg to 800µg/kg, 900µg/kg to 1mg/kg, 1mg/kg to 10mg/kg, 10mg/kg to 20mg/kg, 20mg/kg to 30mg/kg, 30mg/kg to 40mg/kg, 40mg/kg to 50mg/kg, 50mg/kg to 60mg/kg, 70mg/kg to 80mg/kg, 90mg/kg to 100mg/kg, 100mg/kg to 200mg/kg, 200mg/kg to 300mg/kg, 300mg/kg to 400mg/kg, 400mg/kg to 500mg/kg, 500mg/kg to 600mg/kg, 600mg/kg to 700mg/kg, 700mg/kg to 800mg/kg, or 900mg/kg to 1g/kg are 15 contemplated. Intermediate ranges are also contemplated, for example one may use 1µg/kg, or 2µg/kg, or 3µg/kg, or 4µg/kg or 5µg/kg and so on. It will be understood that the exact method of administration and dosages of administration will be decided and adjusted at the time of therapy, depending on the individual needs of a patient, taking into consideration factors such as, age, disease, gender, performance status, *etc.*, and such adjustments will be made by a trained 20 physician. Therefore, the invention is in no way limited by the doses set forth.

In some embodiments, the anti-CD26 antibody maybe a monoclonal antibody. In specific embodiments, the anti-CD26 monoclonal antibody is the 1F7 monoclonal antibody secreted from hybridoma HB 10297 deposited at the American Type Culture Collection (ATCC). This 1F7 antibody and the methods of making it are described in detail in U.S. Patent 5,120,642, 25 incorporated herein by reference.

In other specific embodiments, the anti-CD26 monoclonal antibody is the 5F8 monoclonal antibody. Some other mAb's contemplated as useful include, but are not limited to, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, and/or 16D4B. However, any other monoclonal antibody, specific to any epitope of a CD26 protein is contemplated as useful in 30 context of this invention and the present invention is not limited to the above mentioned examples. Additionally, the monoclonal antibody can be administered as a fragment or may be humanized to decrease immunogenicity to human patients.

In yet other embodiments, the invention contemplates the use of a polyclonal anti-CD26 antibodies.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

The antibodies of the invention may be prepared against a naturally occurring CD26 protein/polypeptide/peptide, a purified CD26 protein/polypeptide/peptide, a partially purified CD26 protein/polypeptide/peptide, a recombinantly produced CD26 protein/polypeptide/peptide, or a CD26 fusion protein/polypeptide/peptide.

5 In still other embodiments, it is contemplated that the anti-CD26 antibody will further be attached to another agent, such as but not limited to, a chemotherapeutic agent, a radionuclide, an immunotherapeutic agent, a cytokine, a chemokine, an imaging agent, a toxin, a biological agent, an enzyme inhibitor, or a second antibody. In some specific embodiments, the enzyme inhibitor is an adenosine deaminase inhibitor, or a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. In other specific  
10 embodiments, the chemotherapeutic agent may be cytosine arabinoside, fluorouracil, methotrexate or aminopterin; anthracycline; mitomycin C; vinca alkaloids; demecolcine; etoposide; mithramycin; or alkylating agents such as chlorambucil or melphalan or others described in later sections in this specification.

In still other specific embodiments, the toxin may be a plant-, a fungal- or bacterial-  
15 derived toxin, such as an A chain toxin, a ribosome inactivating protein,  $\alpha$ -sarcin, aspergillin, restirictocin, a ribonuclease, diphtheria toxin or *pseudomonas* exotoxin, to mention just a few examples. Radionuclides and imaging agents that may be conjugated to anti-CD26 antibodies are described in sections *infra*. Other specific embodiments contemplate that other biological agents, such as but not limited to, chemokines, cytokines, retinoic acid and its derivatives,  
20 interferons, growth factors.

The invention also provides methods for inducing tumor regression comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an anti-CD26 antibody.

Additionally, the invention provides methods for inducing tumor necrosis comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an anti-CD26 antibody.

25 In some embodiments, the inventors contemplate methods of treating a patient having a cancer comprising, induction of CD26-expression in cells of the cancer, and administering to the patient a pharmaceutical formulation comprising an anti-CD26 antibody, whereby the anti-CD26 antibody binds CD26 and arrests cell cycle, and/or growth inhibition, and/or cell death and/or tumor regression. The induction of CD26 expression on the cell may be achieved by contacting  
30 the cell with a biological factor such as but not limited to a cytokine, a chemokine, growth factor, a retinoid, an interferon, an interleukin, a phorbol ester, an agents that can activate the immune system, a chemotherapeutic agent, an antibody, or an antigen. Alternatively, one may induce the expression of CD26 on a cell by contacting the cell with a chemical agent. Methods for inducing the expression of CD26 in cells are known to the skilled artisan.



WO 02/092127

PCT/US02/14462

The invention also provides a method for increasing the expression of p21, in a cell that expresses CD26 comprising contacting the cell with an anti-CD26 antibody. In one embodiment the cell expressing CD26 is a cancer cell. In specific embodiments, the cancer cell may be a hematological cancer cell, a T-cell cancer cell, a B-cell cancer cell, a thyroid cancer cell, a breast cancer cell, an ovarian cancer cell, a pancreatic cancer cell, a prostate cancer cell, a colon cancer cell, a bladder cancer cell, a lung cancer cell, a liver cancer cell, a stomach cancer cell, a testicular cancer cell, an uterine cancer cell, a brain cancer cell, a lymphatic cancer cell, a skin cancer cell, a bone cancer cell, a rectal cancer cell, a sarcoma cell, a T-cell lymphoma cell, a lung adenocarcinoma cell, a thyroid carcinoma cell, a melanoma cell, a B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma. The T-cell cancer may be an aggressive T-cell cancer such as a T-cell lymphoma. In other specific embodiments, the T-cell lymphoma may be a lymphoblastic lymphoma, an acute lymphoblastic leukemia, a T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, a peripheral T-cell lymphoma, a T-cell chronic lymphocytic leukemia, an angioimmunoblastic T-cell lymphoma, an angiocentric T-cell lymphoma, an HTLV-related T-cell leukemia, or an adult T-cell leukemia.

In other embodiments, the CD26-expressing cell is a CD26-transfected Jurkat cell line or a human T-cell, such as a human T-cell clone, or activated T-cells or activated T-cell clones. In yet other embodiments, the CD26 expressing cell is an activated immune cell. Such a cell may be a hyperactivated immune cell, such as an activated T-cells, an activated T-cell with a role in the development of autoimmune diseases and diseases involving activated immune system, an activated T-cell recognizing self antigens, an activated T-cell recognizing allografts, an activated T-cell from donors recognizing host tissues, an activated immune cell expressing CD26-recognizing self antigens, allografts, an activated immune cell expressing CD26 with a role in the development of autoimmune diseases and diseases involving activated immune system, an activated immune cell from donors recognizing host tissues, *etc.*

In some embodiments, the anti-CD26 antibody is a monoclonal antibody. In one specific embodiment, the anti-CD26 monoclonal antibody (mAb) is secreted from hybridoma HB 10297 deposited at the American Type Culture Collection (ATCC). This mAb is also called as the 1F7 antibody. In another specific embodiment, the anti-CD26 monoclonal antibody (mAb) is the 5F8 antibody. Some other mAb's contemplated as useful include, but are not limited to, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, 16D4B. The monoclonal antibody may further be humanized to reduce immunogenicity.

In other embodiments, the anti-CD26 antibody is a polyclonal antibody. Yet other embodiments of the invention, contemplate that the anti-CD26 antibody may be further

WO 02/092127

PCT/US02/14462

attached/conjugated to another agent, such as, but not limited to, a chemotherapeutic agent, a radionuclide, an immunotherapeutic agent, a cytokine, a chemokine, an imaging agent, a toxin, a biological agent, an enzyme inhibitor, or a second antibody. In specific embodiments, the enzyme inhibitor is an adenosine deaminase inhibitor, or a dipeptidyl peptidase IV inhibitor.

5 Also provided are methods for inhibiting cell growth comprising contacting a cell expressing CD26 with an anti-CD26 antibody. In some embodiments of this method, the cell expressing CD26 is a cancer cell. In specific embodiments the cancer cell can be a hematological cancer cell, a T-cell cancer cell, a B-cell cancer cell, a thyroid cancer cell, a breast cancer cell, an ovarian cancer cell, a pancreatic cancer cell, a prostate cancer cell, a colon cancer cell, a bladder cancer cell, a lung cancer cell, a liver cancer cell, a stomach cancer cell, a testicular cancer cell, an uterine cancer cell, a brain cancer cell, a lymphatic cancer cell, a skin cancer cell, a bone cancer cell, a rectal cancer cell, or a sarcoma cell. In more specific  
10 embodiments, the cancer cell can be a T-cell lymphoma cell, a lung adenocarcinoma cell, a thyroid carcinoma cell, a melanoma cell, a B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma.

15 In yet other specific embodiments, the T-cell cancer can be a T-cell cancer with poor prognosis and is exemplified, in non-limiting examples, by T-cell lymphomas such as lymphoblastic lymphoma, acute lymphoblastic leukemia, T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma, T-cell chronic lymphocytic leukemia, angioimmunoblastic T-cell lymphoma, angiocentric T-cell lymphoma, HTLV-related T-cell leukemia, and adult T-cell leukemia.

In one aspect of the method, the cell growth inhibited is metastatic cell growth. In other aspects of the method, inhibiting cell growth comprises arresting cell growth.

25 In yet other embodiments, the CD26 expressing cell is a CD26-transfected Jurkat cell line or a human T-cell, such as a human T-cell clone, or activated T-cells or activated T-cell clones. In yet other embodiments, the CD26 expressing cell is an activated immune cell. Such a cell may be a hyperactivated immune cell, such as an activated T-cell, an activated T-cell with a role in the development of autoimmune diseases and diseases involving activated immune system, an activated T-cell recognizing self antigens, an activated T-cell recognizing allografts, an activated  
30 T-cell from donors recognizing host tissues, an activated immune cell expressing CD26 recognizing self antigens, allografts, an activated immune cell expressing CD26 with a role in the development of autoimmune diseases and diseases involving activated immune system, an activated immune cells from donors recognizing host tissues, *etc.* Thus, the method is contemplated useful in providing therapy for diseases of the immune-system associated with

WO 02/092127

PCT/US02/14462

hyperactive immune cells, such as, autoimmune diseases, organ transplantation, graft versus host diseases etc. This includes diseases such as, but not limited to, Addison's disease, alopecia, ankylosing spondylitis, antiphospholipid syndrome, Behcet's disease, chronic fatigue syndrome, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, fibromyalgia, Goodpasture syndrome, Graves' disease, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), lupus, Meniere's multiple sclerosis, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, primary biliary cirrhosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, rheumatic fever, sarcoidosis, scleroderma, vasculitis, vitiligo, Wegener's granulomatosis.

The invention also provides a method of inducing apoptosis in a cancer cell expressing CD26, comprising contacting the cell with a composition comprising an anti-CD26 antibody.

As used herein the specification, "a" or "an" may mean one or more. As used herein in the claim(s), when used in conjunction with the word "comprising", the words "a" or "an" may mean one or more than one. As used herein "another" may mean at least a second or more.

Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

**FIGS. 1A. & 1B.** Phenotypic characterization of Karpas 299. **(FIG. 1A)** Cells were evaluated for CD26, CD3 and CD2 expression by flow cytometry. Percentage of cells expressing the particular surface marker is indicated. **(FIG. 1B)** Following overnight incubation with the anti-CD26 mAb 1F7 (1 µg/ml) at 37° C, Karpas 299 cells were evaluated for CD26 expression and compared to CD26 expression before overnight incubation with 1F7. a= negative control, b= before anti-CD26 treatment, c= after anti-CD26 treatment.

**FIGS. 2A. & 2B.** Inhibitory effect of soluble anti-CD26 mAb on cell growth. Karpas 299 cells **(FIG. 2A)** and H9 cells **(FIG. 2B)** were incubated with media containing soluble anti-CD26 mAb 1F7, anti-CD26 mAb 5F8 or isotype control mAb, and MTT uptake

WO 02/092127

PCT/US02/14462

assay was performed. Data are representative of three experiments for each cell line. Cytotoxicity index (% of Control) =  $1 - \text{OD of treated cells} \times 100 - \text{OD of cells incubated in cell culture medium alone}$ .

**FIGS. 3A. & 3B.** CD26 surface expression on Karpas 299 cells following tumor formation in SCID mouse. **(FIG. 3A)** CD26 surface expression prior to tumor injection into SCID mice.  $1 \times 10^6$  tumor cells were injected i.p. in SCID mice, and tumor mass was subsequently harvested following the development of palpable tumors. Single cell suspensions were then created and CD26 surface expression was determined by flow cytometry. (a=negative control, b=CD26) **(FIG. 3B)** CD26 surface expression on single cell suspensions from tumor mass harvested from SCID mice.  $1 \times 10^6$  tumor cells were injected i.p. in SCID mice, and tumor mass was subsequently harvested following the development of palpable tumors. Single cell suspensions were then created and CD26 surface expression was determined by flow cytometry. (a=negative control, b=CD26).

**FIGS. 4A. & 4B.** Enhanced survival of Karpas 299-bearing SCID mice following 1F7 treatment. **(FIG. 4A)** One day following i.p. inoculation of SCID mice with  $1 \times 10^6$  Karpas 299 cells per mouse, i.p. treatment with saline alone, isotype control Ab (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$  or 10  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ), 1F7 (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$  or 10  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ) was then administered every other day for a total of 10 injections. Arm 1: saline alone (n=13); arm 2: isotype control Ab (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=10); arm 3: isotype control Ab (10  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=5); arm 4: anti-CD26 mAb 1F7 (10  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=10); arm 5: anti-CD26 mAb 1F7 (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=14) **(FIG. 4B)** One day following i.p. inoculation of SCID mice with  $3 \times 10^6$  Karpas 299 cells per mouse, i.p. treatment with saline alone, isotype control Ab (20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ) or 1F7 (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{injection}$  or 20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ) was then administered every other day for a total of 10 injections. Arm 1: saline alone (n=5); arm 2: isotype control Ab (20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=5); arm 3: 1F7 (5  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=5); arm 4: 1F7 (10  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=5); arm 5: 1F7 (20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ , n=5).

**FIG. 5.** Initial tumor appearance in SCID mice following s.c. tumor cell inoculation and s.c. treatment with antibodies. SCID mice were injected with  $1 \times 10^6$  Karpas 299 tumor cells incubated in saline alone, 100  $\mu\text{g}$  of 1F7 or isotype control Ab by s.c. injection. Subsequently, starting 1 day after tumor cell inoculations, SCID mice then received saline, isotype control Ab (20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ) or 1F7 (20  $\mu\text{g}/\text{injection}$ ) s.c. injections in 0.1 ml sterile saline every other day for 10 injections, placed at the original site of s.c. tumor injection. The day of initial appearance of a visible tumor was documented to evaluate treatment effects. Arm 1: saline alone (n=10); arm 2: isotype control Ab (n=10); arm 3: anti-CD26 mAb 1F7 (n=10).

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**FIGS. 6A, 6B & 6C.** Treatment of CD26 transfected Jurkat T-cells with anti-CD26 mAb 1F7 resulted in cell cycle arrest at G1/S. J.C26/DP+ were incubated with media alone, isotype control mAb 4B4 (Iso) or 1F7 in the presence or absence of Nocodazole (Noc). Cell culture, staining and cell cycle analyses were performed as described in Materials and Methods. The measurement of G0/G1 (**FIG. 6A**), G2/M (**FIG. 6B**) and S (**FIG. 6C**) cells is shown. Bars are representative of mean values of percentage of G0/G1, G2/M and S cells  $\pm$  standard errors of three independently performed experiments. Asterisks indicate samples with results significantly different from those for J.C26/DP- and Jwt ( $p < 0.05$ ).

**FIG. 7.** Enhanced p21 expression following anti-CD26 mAb 1F7 treatment. Time course analysis of % G0/G1 increase following incubation with 1F7 in the presence of Nocodazole. Cell cycle analyses were performed as described in Materials and Methods. The percentage increase in G0/G1 is the difference in percent G0/G1 content between mAb and non-mAb treated cells. Bars are representative of mean values of %G0/G1 increase  $\pm$  standard errors of three independently performed experiments. Asterisks indicate samples with results significantly different from those for J.C26/DP- and Jwt ( $p < 0.05$ ).

**FIG. 8.** Phosphorylation of ERK resulted in enhanced p21<sup>Cip1</sup> expression following anti-CD26 mAb 1F7 treatment. J.C26/DP+ cells were incubated with media alone, isotype control mAb 4B4 (Iso) or 1F7 in the presence or absence of Nocodazole after incubation with MEK kinase inhibitors PD98059 and U0126. After a 6-hour incubation, cell cycle analyses were performed as described in Materials and Methods. Data are representative of three independently performed experiments. No effect of PD98059 and U0126 on G0/G1 arrest was observed in J.C26- or Jwt.

**FIG. 9.** Inhibition of cell proliferation by the anti-CD26 mAb 1F7 on human T-cell clones with enhancement of p21<sup>Cip1</sup> expression. Human T clones were incubated with media or media containing the anti-CD26 mAbs 1F7 or 5F8, or isotype control mAb 4B4 (Iso) at the indicated concentrations, with or without stimulation by anti-CD3 mAb (OKT3) and PMA.  $0.2 \times 10^5$  cells were incubated and were pulsed with [<sup>3</sup>H]-thymidine. [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was expressed as the mean cpm of triplicate samples with standard errors.

#### **DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS**

The present invention provides therapeutic methods that employ anti-CD26 antibodies for the prevention and treatment of cancers. Binding of a soluble anti-CD26 mAb, such as 1F7, or 5F8, has been shown to inhibit growth of cells, exemplified by Karpas 299 cells, a human

WO 02/092127

PCT/US02/14462

CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma cell line, as well as Jurkat cells both in *in vitro* and *in vivo* studies. Anti-CD26 binding results in growth arrest at the G1/S checkpoint, associated with an increased p21 expression (a cell cycle protein) that is dependent on *de novo* protein synthesis. Furthermore, the inventors have shown, using a SCID mouse tumor model, that treatment with the anti-CD26 antibody leads to significantly enhanced survival of tumor bearing mice. Thus, the present invention provides anticancer therapies which use an anti-CD26 antibody for the treatment of human cancers that express CD26.

The expression of CD26 has been documented in several human cancers, including aggressive T-cell malignancies, which are resistant to current treatment modalities. The present invention, therefore, provides methods of treatment for such cancers using an anti-CD26 antibodies to inhibit tumor growth. Several types of anti-CD26 antibodies are contemplated as useful for treatment regimens and include, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mAb 1F7; and mAb 5F8 as some non-limiting examples), humanized versions of antibodies as well as antibody conjugates.

Although, the CD26 protein is known to be involved in a variety of functional aspects, the increase in p21 expression in cells, following the binding of the anti-CD26 antibody, shows for the first time a functional association between CD26 and regulators of the cell cycle in cancer.

The present inventors have also demonstrated that binding of a soluble anti-CD26 monoclonal antibody induces a G1/S arrest in CD26-transfected Jurkat cell lines and in human T-cell clones. It is known that CD26 is expressed on a subset of resting CD4+ memory T-cells and that this expression is enhanced upon T-cell activation. In addition, CD26 contributes directly to increased antigen sensitivity of late-stage T-cell clones. Hyperactive immune diseases, such as graft-versus-host disease (GVHD) and autoimmune diseases, involve hyperactivated T-cells. Therefore, in addition to providing effective therapy against cancers that express CD26, the present inventors contemplate therapeutic utility of the anti-CD26 antibodies for the treatment of for hyperactive immune conditions, including autoimmune diseases such as but not limited to Addison's disease, alopecia, ankylosing spondylitis, antiphospholipid syndrome, Behcet's disease, chronic fatigue syndrome, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, fibromyalgia, Goodpasture syndrome, Graves' disease, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), lupus, Meniere's multiple sclerosis, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, primary biliary cirrhosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, rheumatic fever, sarcoidosis, scleroderma, vasculitis, vitiligo, Wegener's granulomatosis, *etc.*, organ transplants and graft versus host diseases. Currently, in the U.S. alone, there are an estimated 10-20 million cases of

WO 02/092127

PCT/US02/14462

autoimmune diseases diagnosed every year. Therefore, the anti-CD26 antibody treatments for immune related diseases is an important development.

#### A. CD26 and Anti-CD26 Antibodies

5 CD26 is a 110-kd surface glycoprotein with an array of diverse functional properties that is expressed on a number of tissues, including epithelial cells and leukocyte subsets (Morimoto and Schlossman, 1998; von Bonin *et al.*, 1998). The CD26 protein is a membrane-associated ectopeptidase that possesses dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) activity in its extracellular domain and is able to cleave amino-terminal dipeptides from polypeptides with either L-proline or L-

10 alanine at the penultimate position.

Work over the past decade has shown CD26 to be a molecule with a plethora of functions in basic human T-cell physiology. For example, CD26 cleaves certain chemokines involved in T-cell and monocyte function (Oravecz *et al.*, 1997; Proost *et al.*, 1998). Other studies have identified CD26 as the adenosine deaminase (ADA) binding protein which regulates ADA

15 surface expression. It is believed that the CD26/ADA complex plays a key role in the catalytic removal of local adenosine to regulate immune system function (Dang *et al.*, 1996; Kameoka *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1993).

Although constitutively expressed in the liver, intestine and kidney, CD26 expression level is tightly regulated on T-cells, and its density is markedly enhanced after T-cell activation. In resting T-cells, CD26 is expressed on a subset of CD4+ memory T-cells, and this CD4+CD26

20 high T-cell population has been shown to respond maximally to recall antigens. In fact, CD26 itself is involved in the signal transducing process of T-cells under certain experimental conditions. Cross-linking of CD26 and CD3 with immobilized monoclonal antibodies (mAbs) can induce T-cell activation and IL-2 production. Moreover, anti-CD26 antibody treatment of T-

25 cells leads to a decrease in the surface expression of CD26 via its internalization, and this antibody-induced modulation of CD26 on T-cells results in an enhanced proliferative response to anti-CD3 or anti-CD2 stimulation. While ligation of the CD26 molecule by anti-CD26 mAb, 1F7, induces increased tyrosine phosphorylation of signaling molecules such as CD3zeta and p56lck, soluble anti-CD26 mAbs and DPPIV inhibitors suppress T-cell growth and function in

30 certain instances.

In addition, activation of T-cell by various stimuli increases CD26 surface expression and thus, CD26 is used as a T-cell activation marker (Fox *et al.*, 1984; Morimoto *et al.*, 1989). CD26 is also a co-stimulatory surface molecule involved in the CD3 and CD2 pathways of T-cell activation.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Besides its involvement in immunoregulation, it was believed that CD26 may have a role in the development of certain human tumors. Most lung adenocarcinomas are DPPIV-positive, while other histological types of lung carcinoma are DPPIV-negative (Asada *et al.*, 1993). In addition, CD26 expression is high in differentiated thyroid carcinomas but is absent in benign thyroid diseases (Tanaka *et al.*, 1995). It also appears to have a role in melanoma development as its expression is lost with malignant transformation of melanocytes (Morrison *et al.*, 1993; Wesley *et al.*, 1999). High levels of CD26 protein expression and mRNA transcripts are found in B-chronic lymphocytic leukemia cells and activated B-cells, as compared to normal resting B-cells (Barvois *et al.*, 1999). Meanwhile, CD26 expression on T-cell malignancies appears to be restricted to aggressive pathologic entities such as T-cell lymphoblastic lymphomas/acute lymphoblastic leukemias (LBL/ALL) and T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphomas, being detected only on a small percentage of indolent diseases such as mycosis fungoides. Significantly, within the T-cell LBL/ALL subset, CD26 expression is an independent marker of poor prognosis patients (Carbone *et al.*, 1995; Carbone *et al.*, 1994).

Numerous antibodies against CD26 have been generated and described including the monoclonal antibodies such as 1F7, Ta1, 5F8, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, 16D4B, TA5.9, developed by standard hybridoma techniques (Morimoto *et al.*, 1989; Torimoto *et al.*, 1992; U.S. Patent 5,120,642; DeMeester *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1998, all incorporated herein by reference).

Corresponding to the diverse role of CD26, CD26 antibodies mediate pleomorphic cellular functions. For example, when crosslinked with specific mAbs, CD26 is capable of activating an alternate pathway of T-cell activation, possibly due to its physical association with CD45, a transmembrane protein tyrosine phosphatase (Dang *et al.*, 1990a; Dang *et al.*, 1990b; Dang *et al.*, 1990c; Dang *et al.*, 1991; Fleischer, 1987; Hegen *et al.*, 1997; Dang *et al.*, 1990d; Torimoto *et al.*, 1991). Yet other studies have shown that soluble anti-CD26 mAbs and DPPIV inhibitors suppress T-cell growth and function in certain instances (Dang *et al.*, 1996; Kahne *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 1992; Mattern *et al.*, 1993). These studies, and others described *supra*, suggest that CD26 may have a potential role in the development of certain neoplasms, including aggressive T-cell hematologic malignancies (Carbone *et al.*, 1995; Carbone *et al.*, 1994), besides being an immunoregulatory molecule.

Dong and co-workers, divided 13 anti-CD26 antibodies into 5 different epitope groups located between the 1-247, 248-358, 359-449, 450-577 and 359-653 amino acid residues of the CD26 protein based on deletion analysis of CD26 deletion mutants, immunoblotting and direct binding assays. In that study, Dong *et al.* (1998), incorporated herein by reference, have shown



WO 02/092127

PCT/US02/14462

that distinct epitopes specific to different anti-CD26 mAbs are associated with different functional domains of CD26. For example, while the mAbs against two of these groups, the 248-358 and the 359-449 amino acid regions, induced the modulation of CD26 and had a co-stimulatory effect on T-cell proliferation, only one of these antibodies against the 359-449 amino acid region was also associated with ADA binding. This accounts for some different functional effects shown by different anti-CD26 antibodies.

Thus, CD26 and its antibodies are complex molecules with a diverse range of functions. The present invention demonstrates unequivocally that CD26 has a significant role in tumor development and that antibodies to CD26 cause growth arrest and growth inhibition in cancer cells bearing CD26 on the surface.

In addition, while previous reports showed that CD26 ability to mediate activation signals is dependent on a functional CD3/TcR complex (von Bonin *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 1990d), the present inventors show that CD26 can transmit signals resulting in alterations of T-cell biological responses in the absence of a functional CD3/TcR complex. In normal T-cells, engagement of CD26 results in an increased phosphorylation of proteins involved in T-cell signal transduction, mediated in part through the physical association of CD26 and CD45 (Hegen *et al.*, 1997; Torimoto *et al.*, 1991). The inventors are currently investigating the mechanism involved in CD26 engagement leading to cell cycle. Although, G1 arrest following enforced CD26 expression was observed in melanoma cells (Wesley *et al.*, 1999), the present inventors have demonstrated the functional association between CD26-mediated G1/S arrest and altered p21 expression.

#### B. p21

In eukaryotic cells, cell cycle progression is controlled at the G1/S checkpoint by a group of related enzymes known as the cyclin-dependent kinases (CDKs), which are positively regulated by their physical association with regulatory subunits called cyclins (Yang and Kornbluth, 1999). However, enzymatic activities of the CDK-cyclin complexes are negatively regulated by a set of proteins termed CDK inhibitors. One of these CDK inhibitors is p21 (also called WAF1, Cip1, SDI1) which blocks multiple cyclin-CDK complexes through its physical association with these structures (El-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993). In addition, through its direct interaction with proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p21 can inhibit DNA replication (Waga *et al.*, 1994). Various stimuli can induce p21 expression, including cellular damage, serum factors, and phorbol esters, and p21 induction has been shown to be both p53-

WO 02/092127

PCT/US02/14462

dependent and p53-independent, depending on the stimuli (El-Diery *et al.*; 1993; El-Diery *et al.*; 1994; Datto *et al.*, 1995).

As a downstream target of the p53 tumor suppressor gene, p21 has been implicated indirectly in malignant transformation. Induction of p53 in response to DNA damage results in G1 checkpoint arrest, at which point DNA repair is accomplished prior to DNA replication in S phase. Consistent with its presumed role as a downstream effector for p53, p21 has been shown to inhibit proliferating cell nuclear antigen (PCNA) dependent DNA replication but not DNA repair *in vitro*.

United States Patent 6,218,372, incorporated herein by reference, describes the role of p21 in tumor formation and its ability to reverse malignant phenotypes *in vivo*. p21 expression is sufficient to produce tumor and restenosis suppressor effects and p21 expression facilitates transcriptional activation by NF- $\kappa$ B which influences the expression of genes, such as adhesion molecules, associated with cell differentiation.

The present invention demonstrates that the administration of anti-CD26 antibodies results in cell growth inhibition and a corresponding increase in the expression of p21.

### C. Role in Immune Diseases

While CD26 function in immune regulation has been well-studied, its role in the clinical setting is not yet clearly defined, although available data suggest that it may be involved in the development of certain human diseases. Consistent with the findings that CD26 is a marker of T-cell-activation and has a functional role in this process, CD26 may have a role in certain autoimmune diseases as a regulator of T-cell activation and lymphokine synthesis, including rheumatoid arthritis, Graves' disease, and multiple sclerosis (Hafler *et al.*, 1985; Mizokami *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1989; Gerli *et al.*, 1996). Circulating T lymphocytes from patients with these autoimmune diseases express high level of CD26 surface expression and in several instances, the level of expressed CD26 correlates with disease activity (Hafler *et al.*, 1985; Mizokami *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1989; Gerli *et al.*, 1996). Furthermore, in patients with rheumatoid arthritis, antibody-induced modulation of CD26 expression results in enhanced IL-2 and gamma-IFN synthesis in peripheral blood T-cells, and a decreased gamma-IFN production while having no effect on IL-2 production in synovial fluid T-cells (Gerli *et al.*, 1996). In addition, inhibition of CD26/DPP-IV enzymatic activity *in vivo* prolongs cardiac allograft survival in rat recipients, suggesting a role for CD26 in alloantigen-mediated immune regulation *in vivo* and in the mechanism of allograft rejection (Korom *et al.*, 1997).

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Previous work has shown that treatment with anti-CD26 monoclonal antibody at effective doses is well-tolerated in patients without inducing severe toxicity. In a pilot study, Bacigalupo *et al.* (1985) treated 8 patients with severe refractory graft-versus-host-disease with a murine anti-CD26 monoclonal antibody recognizing human CD26 (De Meester *et al.*, 1993). Along with a decrease in the number of circulating CD26+ T-cells, there was a significant improvement in the severity of the disease. There were 2 complete responders and 2 partial responders, with 5 of 8 patients surviving at least 1 year post treatment. Importantly, treatment with anti-CD26 monoclonal antibody was well-tolerated with acceptable immediate adverse reactions, suggesting that future therapies involving anti-CD26 monoclonal antibody can be administered with tolerable side effects.

The present inventors have demonstrated that binding of a soluble anti-CD26 monoclonal antibody, such as 1F7, can induce G1/S arrest in cells such as CD26-transfected Jurkat cell lines as well as human T-cell clones. Thus, the present inventors envision that anti-CD26 antibody treatments will be of therapeutic use in clinical setting involving activated immune system disorders, including autoimmune diseases, graft-versus-host disease, and organ transplants, where one can induce cell cycle arrest in hyperactivated immune cells.

It is envisioned that, anti-CD26 antibodies will be used in conjunction with other treatment modalities in graft versus host diseases to treat the disease. Additionally, patients with different stages or clinical severity of graft versus host diseases can be selected for treatment with a anti-CD26 therapy. In such therapies it is further envisioned that while in some embodiments, one may employ an anti-CD26 antibody alone, in other embodiments one will employ an anti-CD26 antibody that has been suitably modified, such as being conjugated to agents targeting specific activated T-cells or other immune cells responsible for graft versus host diseases, to treat the disease. The agents that may be conjugated with an anti-CD26 antibody to treat the disease include, but not are limited to, other specific antibody, growth factors, chemokine, cytokine, toxins, or agents that recognize specific targets on these effector cells. Besides conjugation, an anti-CD26 mAb can be used in combination with agents targeting the effector cells responsible for the disease. Anti-CD26 antibody can also be used in these diseases in combination with other pharmaceutical/clinical agents such as selected antibiotics/antifungal/antiviral agents to minimize potential infections arising from the diseases or from the anti-CD26 treatment regimen. In addition, the specific epitopes recognized by anti-CD26 monoclonal antibodies have been shown to have differential effects in CD26-signaling, and binding. Thus, the inventors contemplate that different anti-CD26 mAb recognizing distinct epitopes may lead to different efficacy and toxicity profiles.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**D. Antibodies****a. Antibody Generation**

The present invention provides therapeutic uses for anti-CD26 antibodies. Although, in some embodiments, the invention describes the IF7 and the 5F8 monoclonal antibodies, other monoclonal antibodies as well as polyclonal antibodies against the CD26 antigen may be used effectively in the preventive and therapeutic methods provided by the present invention. Thus, the present invention is not limited to any specific anti-CD26 antibody/antibodies and it is contemplated that any antibody specific for a CD26 protein, polypeptide or peptide may be used.

The invention also contemplates the use of a biologically functional equivalent of an anti-CD26 antibody. The term "CD26 protein/peptide/polypeptide" or "CD26 antigen" is used herein to refer to a CD26 protein, polypeptide or peptide, irrespective of whether the it occurs naturally, is purified, is partially purified, or is produced by recombinant DNA methods, fusion-protein methods, protein synthesis methods, *etc.*, or is a biological functional equivalent thereof.

A biologically functional equivalent is molecule where modifications and/or changes may be made in the structure of the polynucleotides and and/or proteins encoding the molecule, while obtaining molecules having similar or improved characteristics. In context of this invention the molecule may be either a CD26 antigen or a CD26 antibody. The biological functional equivalent may comprise a polynucleotide that has been engineered to contain distinct sequences while at the same time retaining the capacity to encode the "wild-type" or standard protein. This can be accomplished to the degeneracy of the genetic code, *i.e.*, the presence of multiple codons, which encode for the same amino acids. Methods for preparing such equivalents are well known in the art.

Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (See, *e.g.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporated herein by reference).

This section presents a brief discussion on the methods for generating antibodies.

**(i) Polyclonal Antibodies**

Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an immunogenic composition (comprising a CD26 antigen in this case) in accordance with the present invention and collecting antisera from that immunized animal.

A wide range of animal species can be used for the production of antisera. Typically the animal used for production of anti-antisera is a rabbit, a mouse, a rat, a hamster, a guinea pig or a

WO 02/092127

PCT/US02/14462

goat. Because of the relatively large blood volume of rabbits, a rabbit is a preferred choice for production of polyclonal antibodies.

As is well known in the art, a given composition may vary in its immunogenicity. It is often necessary therefore to boost the host immune system, as may be achieved by coupling a peptide or polypeptide immunogen to a carrier. Exemplary and preferred carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Other proteins such as ovalbumin, mouse serum albumin, rabbit serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor can also be used as carriers. Means for conjugating a polypeptide to a carrier protein are well known in the art and include glutaraldehyde, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biotinized benzidine. Other bifunctional or derivatizing agent may also be used for linking, for example maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glytaraldehyde, succinic anhydride,  $\text{SOCl}_2$ , or  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , where R and  $\text{R}^1$  are different alkyl groups.

As also is well known in the art, the immunogenicity of a particular immunogen composition can be enhanced by the use of non-specific stimulators of the immune response, known as adjuvants. Exemplary and preferred adjuvants include complete Freund's adjuvant (a non-specific stimulator of the immune response containing killed *Mycobacterium tuberculosis*), incomplete Freund's adjuvants and aluminum hydroxide adjuvant.

The amount of immunogen composition used in the production of polyclonal antibodies varies upon the nature of the immunogen as well as the animal used for immunization. A variety of routes can be used to administer the immunogen (subcutaneous, intramuscular, intradermal, intravenous and intraperitoneal). The production of polyclonal antibodies may be monitored by sampling blood of the immunized animal at various points following immunization.

A second, booster injection, also may be given. The process of boosting and titering is repeated until a suitable titer is achieved. When a desired level of immunogenicity is obtained, the immunized animal can be bled and the serum isolated and stored, and/or the animal can be used to generate mAbs.

For production of rabbit polyclonal antibodies, the animal can be bled through an ear vein or alternatively by cardiac puncture. The procured blood is allowed to coagulate and then centrifuged to separate serum components from whole cells and blood clots. The serum may be used as is for various applications or else the desired antibody fraction may be purified by well-known methods, such as affinity chromatography using another antibody or a peptide bound to a solid matrix or protein A followed by antigen (peptide) affinity column for purification.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**(ii) Monoclonal Antibodies**

A "monoclonal antibody" refers to homogenous populations of immunoglobulins which are capable of specifically binding to a CD26 protein. It is understood that the CD26 protein may have one or more antigenic determinants. The antibodies of the invention may be directed against one or more of these determinants.

Monoclonal antibodies (mAbs) may be readily prepared through use of well-known techniques, such as those exemplified in U.S. Patent 4,196,265, incorporated herein by reference. Typically, this technique involves immunizing a suitable animal with a selected immunogen composition, e.g., a purified or partially purified CD26 antigen protein, polypeptide or peptide. The immunizing composition is administered in a manner effective to stimulate antibody producing cells.

The methods for generating mAbs generally begin along the same lines as those for preparing polyclonal antibodies. Rodents such as mice and rats are preferred animals, however, the use of rabbit, sheep, goat, monkey cells also is possible. The use of rats may provide certain advantages (Goding, 1986, pp. 60-61), but mice are preferred, with the BALB/c mouse being most preferred as this is most routinely used and generally gives a higher percentage of stable fusions.

The animals are injected with antigen, generally as described above. The antigen may be coupled to carrier molecules such as keyhole limpet hemocyanin if necessary. The antigen would typically be mixed with adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant. Booster injections with the same antigen would occur at approximately two-week intervals.

Following immunization, somatic cells with the potential for producing antibodies, specifically B lymphocytes (B-cells), are selected for use in the mAb generating protocol. These cells may be obtained from biopsied spleens or lymph nodes. Spleen cells and lymph node cells are preferred, the former because they are a rich source of antibody-producing cells that are in the dividing plasmablast stage.

Often, a panel of animals will have been immunized and the spleen of animal with the highest antibody titer will be removed and the spleen lymphocytes obtained by homogenizing the spleen with a syringe. Typically, a spleen from an immunized mouse contains approximately  $5 \times 10^7$  to  $2 \times 10^8$  lymphocytes.

The antibody-producing B lymphocytes from the immunized animal are then fused with cells of an immortal myeloma cell, generally one of the same species as the animal that was immunized. Myeloma cell lines suited for use in hybridoma-producing fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and enzyme deficiencies

WO 02/092127

PCT/US02/14462

that render then incapable of growing in certain selective media which support the growth of only the desired fused cells (hybridomas).

Any one of a number of myeloma cells may be used, as are known to those of skill in the art (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984; each incorporated herein by reference).

5 For example, where the immunized animal is a mouse, one may use P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 and S194/5XX0 Bul; for rats, one may use R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F and 4B210; and U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 and UC729-6 are all useful in connection with human cell fusions.

10 One preferred murine myeloma cell is the NS-1 myeloma cell line (also termed P3-NS-1-Ag4-1), which is readily available from the NIGMS Human Genetic Mutant-cell Repository by requesting cell line repository number GM3573. Another mouse myeloma cell line that may be used is the 8-azaguanine-resistant mouse murine myeloma SP2/0 non-producer cell line.

15 Methods for generating hybrids of antibody-producing spleen or lymph node cells and myeloma cells usually comprise mixing somatic cells with myeloma cells in a 2:1 proportion, though the proportion may vary from about 20:1 to about 1:1, respectively, in the presence of an agent or agents (chemical or electrical) that promote the fusion of cell membranes. Fusion methods using Sendai virus have been described by Kohler and Milstein (1975; 1976), and those using polyethylene glycol (PEG), such as 37% (v/v) PEG, by Gefter *et al.* (1977). The use of  
20 electrically induced fusion methods also is appropriate (Goding pp. 71-74, 1986).

Fusion procedures usually produce viable hybrids at low frequencies, about  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-8}$ . However, this does not pose a problem, as the viable, fused hybrids are differentiated from the parental, infused cells (particularly the infused myeloma cells that would normally  
25 continue to divide indefinitely) by culturing in a selective medium. The selective medium is generally one that contains an agent that blocks the *de novo* synthesis of nucleotides in the tissue culture media. Exemplary and preferred agents are aminopterin, methotrexate, and azaserine. Aminopterin and methotrexate block *de novo* synthesis of both purines and pyrimidines, whereas azaserine blocks only purine synthesis. Where aminopterin or methotrexate is used, the media is  
30 supplemented with hypoxanthine and thymidine as a source of nucleotides (hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium). Where azaserine is used, the media is supplemented with hypoxanthine.

The preferred selection medium is HAT. Only cells capable of operating nucleotide salvage pathways are able to survive in HAT medium. The myeloma cells are defective in key

WO 02/092127

PCT/US02/14462

enzymes of the salvage pathway, *e.g.*, hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), and they cannot survive. The B-cells can operate this pathway, but they have a limited life span in culture and generally die within about two weeks. Therefore, the only cells that can survive in the selective media are those hybrids formed from myeloma and B-cells.

5 This culturing provides a population of hybridomas from which specific hybridomas are selected. Typically, selection of hybridomas is performed by culturing the cells by single-clone dilution in microtiter plates, followed by testing the individual clonal supernatants (after about two to three weeks) for the desired reactivity. The assay should be sensitive, simple and rapid, such as radioimmunoassays, enzyme immunoassays, cytotoxicity assays, plaque assays, dot  
10 immunobinding assays, and the like.

The selected hybridomas would then be serially diluted and cloned into individual antibody-producing cell lines, which clones can then be propagated indefinitely to provide mAbs. The cell lines may be exploited for mAb production in two basic ways.

A sample of the hybridoma can be injected (often into the peritoneal cavity) into a  
15 histocompatible animal of the type that was used to provide the somatic and myeloma cells for the original fusion (*e.g.*, a syngeneic mouse). Optionally, the animals are primed with a hydrocarbon, especially oils such as pristane (tetramethylpentadecane) prior to injection. The injected animal develops tumors secreting the specific mAb produced by the fused cell hybrid. The body fluids of the animal, such as serum or ascites fluid, can then be tapped to provide  
20 mAbs in high concentration.

The individual cell lines could also be cultured *in vitro*, where the mAbs are naturally secreted into the culture medium from which they can be readily obtained in high concentrations.

mAbs produced by either means may be further purified, if desired, using filtration, centrifugation and various chromatographic methods such as HPLC or affinity chromatography.  
25 Fragments of the mAbs of the invention can be obtained from the purified mAbs by methods which include digestion with enzymes, such as pepsin or papain, and/or by cleavage of disulfide bonds by chemical reduction. Alternatively, mAb fragments encompassed by the present invention can be synthesized using an automated peptide synthesizer.

It also is contemplated that a molecular cloning approach may be used to generate  
30 monoclonals. For this, combinatorial immunoglobulin phagemid libraries are prepared from RNA isolated from the spleen of the immunized animal, and phagemids expressing appropriate antibodies are selected by panning using cells expressing the antigen and control cells *e.g.*, normal-versus-tumor cells. The advantages of this approach over conventional hybridoma techniques are that approximately  $10^4$  times as many antibodies can be produced and screened in



WO 02/092127

PCT/US02/14462

a single round, and that new specificities are generated by H and L chain combination which further increases the chance of finding appropriate antibodies.

Antibodies to CD26 antigen have already been generated using such standard techniques. For example, U.S. Patent 5,120,642, incorporated herein by reference, describes the generation of the IF7 mAb, and its characterization. Developed to aid the distinction between helper-inducer and suppressor-inducer cells in a CD4+ lymphocyte population, mAb IF7 was produced from a hybrid cell line developed from immunization of Balb/c J mice with a stimulated T-cell line derived from the new world primate species *Aotus trivirgatus*. Briefly, Balb/c J mice were immunized with cells of a PHA-stimulated T-cell line derived from the new world primate species *Aotus trivirgatus* using standard hybridoma procedures. The mouse splenocytes were harvested and fused with the myeloma cell line NS-1. The cell population was cultured in HAT medium to obtain hybridoma cells to be cloned. Hybridoma cultures containing antibodies reactive with human T-cells were selected. Cloning and recloning of hybridoma cultures containing mAbs reactive with human T-cells were performed by limiting dilution methods in the presence of feeder cells. Malignant ascites then were developed and used for analysis. The isotype of the mAb was determined to be mouse isotype IgG1 by staining with fluorescein-labeled goat anti-mouse IgG1 and failure to stain with fluorescein-labeled antibodies directed against other subclasses of mouse Ig. A culture of hybridoma cells which produce the anti-IF7 mAb, deposited as of Nov. 21, 1989, with the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, and has been assigned ATCC No. HB 10297.

Other mAbs against CD26 that have been generated, by standard hybridoma techniques, by the present inventors, include, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, and 16D4B (Dong *et al.*, 1998, incorporated herein by reference). Yet another anti-CD26 mAb is 5F8 (Morimoto *et al.*, 1989; Torimoto *et al.*, 1992, incorporated herein by reference).

### (iii) Humanized Antibodies

Humanized mAbs are antibodies of animal origin that have been modified using genetic engineering techniques to replace constant regions and/or variable region framework sequences with human sequences, while retaining the original antigen specificity. Such antibodies can also include a humanized heavy chain associated with a donor or acceptor unmodified light chain or a chimeric light chain, or vice versa. Such antibodies are commonly derived from rodent antibodies, for example, the murine Ab of the present invention, with specificity against human antigens and are generally useful for *in vivo* therapeutic applications. This strategy reduces the host response to the foreign antibody and allows selection of the human effector functions.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

The techniques for producing humanized immunoglobulins are well known to those of skill in the art. For example U.S. Patent 5,693,762 discloses methods for producing, and compositions of, humanized immunoglobulins having one or more complementarity determining regions (CDR's). "CDRs" are defined as the complementarity determining region amino acid sequences of an antibody. CDRs are contained within the hypervariable regions of immunoglobulin heavy and light chains. CDRs provide the majority of contact residues for the binding of the antibody to the antigen or epitope. CDRs of interest in this invention are derived from donor antibody variable heavy and light chain sequences, and include functional fragments and analogs of the naturally occurring CDRs, which fragments and analogs also share or retain the same antigen binding specificity and/or neutralizing ability as the donor antibody from which they were derived. When combined into an intact antibody, the humanized immunoglobulins are substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen, such as a protein or other compound containing an epitope.

Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. A humanized antibody is one in which only the antigen-recognized sites, or complementarity-determining hypervariable regions (CDRs) are of non-human origin, whereas all framework regions (FR) of variable domains are products of human genes.

Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeven *et al.*, 1988), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies, wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some framework region (FR) residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

Other U.S. patents, each incorporated herein by reference, that teach the production of antibodies useful in the present invention include U.S. Patent 5,565,332, which describes the production of chimeric antibodies using a combinatorial approach; U.S. Patent 4,816,567 which describes recombinant immunoglobulin preparations and U.S. Patent 4,867,973 which describes antibody-therapeutic agent conjugates.

U.S. Patent 5,565,332 describes methods for the production of antibodies, or antibody fragments, which have the same binding specificity as a parent antibody but which have

WO 02/092127

PCT/US02/14462

increased human characteristics. Humanized antibodies may be obtained by chain shuffling, perhaps using phage display technology, in as much as such methods will be useful in the present invention the entire text of U.S. Patent No. 5,565,332 is incorporated herein by reference. Human antibodies may also be produced by transforming B-cells with EBV and subsequent cloning of secretors as described by Hoon *et al.*, (1993).

It is important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three dimensional models of the parental and humanized sequences. Three dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e. the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequence so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

#### (iv) Human Antibodies

Human mAbs can be made by the hybridoma method. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines for the production of human mAbs have been described, for example, by Kozbor (1984), and Brodeur *et al.* (1987).

It is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy chain joining region ( $J_H$ ) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge (Jakobovits *et al.*, 1993).

Alternatively, the phage display technology (McCafferty *et al.*, 1990) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V

WO 02/092127

PCT/US02/14462

domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle.

Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimicks some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats (Johnson *et al.*, 1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.* (1991), isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.* (1991), or Griffith *et al.* (1993).

In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B-cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling" (Marks *et al.*, 1992). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires has been described by Waterhouse *et al.* (1993), and the isolation of a high affinity human antibody directly from such large phage library is reported by Griffith *et al.* (1993). Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e. the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (PCT patent application WO 93/06213). Unlike traditional

WO 02/092127

PCT/US02/14462

humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

(v) **Bispecific Antibodies**

5 Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for a CD26 antigen, the other one is for any other antigen, and preferably for another receptor or receptor subunit. For example, bispecific antibodies specifically binding a CD26 antigen are within the scope of the present invention. Methods for making bispecific  
10 antibodies are known in the art.

Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Millstein and Cuello, 1983). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential  
15 mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 and Trautnecker *et al.* (1991).

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with  
20 the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain  
25 fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are cotransfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide  
30 chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance. In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the

WO 02/092127

PCT/US02/14462

other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.* (1986).

(vi) **Heteroconjugate Antibodies**

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

b. **Cross-Reactive Antibodies and Epitopes**

The invention further encompasses other anti-CD26 antibody-based compositions, such as antibody conjugates and immunotoxins, that bind to the same antigens and/or epitopes as the antibodies disclosed herein, *i.e.*, to a CD26 antigen. Such antibodies may be of the polyclonal or monoclonal type, with monoclonals being generally preferred.

The identification of an antibody that binds to a cancer antigen or epitope, such as to CD26 antigen or an epitope thereof, in substantially the same manner as an antibody of the invention is a fairly straightforward matter. This can be readily determined using any one of variety of immunological screening assays in which antibody competition can be assessed.

For example, where the test antibodies to be examined are obtained from different source animals, or are even of a different isotype, a simple competition assay may be employed in which the control and test antibodies are premixed and then applied to an antigen composition. By "antigen composition" is meant any composition that contains a CD26 antigen or related cancer antigen as described herein. Thus, protocols based upon ELISAs and Western blotting are suitable for use in such simple competition studies.

In such embodiments, one would pre-mix the control antibodies with varying amounts of the test antibodies (*e.g.*, 1:1, 1:10 and 1:100) for a period of time prior to applying to an antigen composition, such as an antigen-coated well of an ELISA plate or an antigen adsorbed to a membrane (as in dot blots and Western blots). By using species or isotype secondary antibodies

WO 02/092127

PCT/US02/14462

one will be able to detect only the bound control antibodies, the binding of which will be reduced by the presence of a test antibody that recognizes the same epitope/antigen.

In conducting an antibody competition study between a control antibody, such as an anti-CD26 antibody, and any test antibody, one may first label the control with a detectable label, such as, *e.g.*, biotin or an enzymatic, radioactive or fluorescent label, to enable subsequent identification. In these cases, one would incubate the labeled control antibodies with the test antibodies to be examined at various ratios (*e.g.*, 1:1, 1:10 and 1:100) and, after a suitable period of time, one would then assay the reactivity of the labeled control antibodies and compare this with a control value in which no potentially competing test antibody was included in the incubation.

The assay may again be any one of a range of immunological assays based upon antibody hybridization, and the control antibodies would be detected by means of detecting their label, *e.g.*, using streptavidin in the case of biotinylated antibodies or by using a chromogenic substrate in connection with an enzymatic label or by simply detecting a radioactive or fluorescent label. An antibody that binds to substantially the same epitope as the control antibodies will be able to effectively compete for binding and thus will significantly reduce control antibody binding, as evidenced by a reduction in bound label.

The reactivity of the labeled control antibodies in the absence of any test antibody would be the control high value. The control low value would be obtained by incubating the labeled antibodies with unlabelled antibodies of the same type, when competition would occur and reduce binding of the labeled antibodies. A significant reduction in labeled antibody reactivity in the presence of a test antibody is indicative of a test antibody that recognizes the same epitope, *i.e.*, one that "cross-reacts" with the labeled antibody. A significant reduction is a reproducible, *i.e.*, consistently observed, reduction in binding.

#### c. Antibody Conjugates

Antibody conjugates comprising a CD26 antibody linked to another agent, such as but not limited to a therapeutic agent, a detectable label, a cytotoxic agent, a chemical, a toxic, an enzyme inhibitor, a pharmaceutical agent, *etc.* form further aspects of the invention. Diagnostic antibody conjugates may be used both in *in vitro* diagnostics, as in a variety of immunoassays, and in *in vivo* diagnostics, such as in imaging technology.

Certain antibody conjugates include those intended primarily for use *in vitro*, where the antibody is linked to a secondary binding ligand or to an enzyme (an enzyme tag) that will generate a colored product upon contact with a chromogenic substrate. Examples of suitable

WO 02/092127

PCT/US02/14462

enzymes include urease, alkaline phosphatase, (horseradish) hydrogen peroxidase and glucose oxidase. Preferred secondary binding ligands are biotin and avidin or streptavidin compounds. The use of such labels is well known to those of skill in the art in light and is described, for example, in U.S. Patents 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241; each incorporated herein by reference.

Other antibody conjugates, intended for functional utility, include those where the antibody is conjugated to an enzyme inhibitor such as an adenosine deaminase inhibitor, or a dipeptidyl peptidase IV inhibitor.

#### (i) Radiolabeled Antibody Conjugates.

In using an antibody-based molecule as an *in vivo* diagnostic agent to provide an image of, for example, brain, thyroid, breast, gastric, colon, pancreas, renal, ovarian, lung, prostate, hepatic, and lung cancer or respective metastases, magnetic resonance imaging, X-ray imaging, computerized emission tomography and such technologies may be employed. In the antibody-imaging constructs of the invention, the antibody portion used will generally bind to the cancer marker, such as CD26 antigen, and the imaging agent will be an agent detectable upon imaging, such as a paramagnetic, radioactive or fluorescent agent.

Many appropriate imaging agents are known in the art, as are methods for their attachment to antibodies (see, *e.g.*, U.S. Patents 5,021,236 and 4,472,509, both incorporated herein by reference). Certain attachment methods involve the use of a metal chelate complex employing, for example, an organic chelating agent such as DTPA attached to the antibody (U.S. Patent 4,472,509). MAbs also may be reacted with an enzyme in the presence of a coupling agent such as glutaraldehyde or periodate. Conjugates with fluorescein markers are prepared in the presence of these coupling agents or by reaction with an isothiocyanate.

In the case of paramagnetic ions, one might mention by way of example ions such as chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II), copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium (III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) and erbium (III), with gadolinium being particularly preferred.

Ions useful in other contexts, such as X-ray imaging, include but are not limited to lanthanum (III), gold (III), lead (II), and especially bismuth (III).

In the case of radioactive isotopes for therapeutic and/or diagnostic application, one might mention astatine<sup>211</sup>, <sup>14</sup>carbon, <sup>51</sup>chromium, <sup>36</sup>chlorine, <sup>57</sup>cobalt, <sup>58</sup>cobalt, copper<sup>67</sup>, <sup>152</sup>Eu, gallium<sup>67</sup>, <sup>3</sup>hydrogen, iodine<sup>123</sup>, iodine<sup>125</sup>, iodine<sup>131</sup>, indium<sup>111</sup>, <sup>59</sup>iron, <sup>32</sup>phosphorus, rhenium<sup>186</sup>, rhenium<sup>188</sup>, <sup>75</sup>selenium, <sup>35</sup>sulphur, technetium<sup>99m</sup> and yttrium<sup>90</sup>. <sup>125</sup>I is often being preferred for



WO 02/092127

PCT/US02/14462

use in certain embodiments, and technetium<sup>99m</sup> and indium<sup>111</sup> are also often preferred due to their low energy and suitability for long range detection.

Radioactively labeled mAbs of the present invention may be produced according to well-known methods in the art. For instance, mAbs can be iodinated by contact with sodium or potassium iodide and a chemical oxidizing agent such as sodium hypochlorite, or an enzymatic oxidizing agent, such as lactoperoxidase. MAbs according to the invention may be labeled with technetium-<sup>99m</sup> by ligand exchange process, for example, by reducing pertechnetate with stannous solution, chelating the reduced technetium onto a Sephadex column and applying the antibody to this column or by direct labeling techniques, *e.g.*, by incubating pertechnetate, a reducing agent such as  $\text{SnCl}_2$ , a buffer solution such as sodium-potassium phthalate solution, and the antibody.

Intermediary functional groups which are often used to bind radioisotopes which exist as metallic ions to antibody are diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA).

Fluorescent labels include rhodamine, fluorescein isothiocyanate and renographin.

#### (ii) Immunotoxins

The invention further provides immunotoxins in which an antibody that binds to a cancer marker, such as CD26 antigen, is linked to a cytotoxic agent. Immunotoxin technology is fairly well-advanced and known to those of skill in the art. Immunotoxins are agents in which the antibody component is linked to another agent, particularly a cytotoxic or otherwise anticellular agent, having the ability to kill or suppress the growth or cell division of cells.

As used herein, the terms "toxin" and "toxic moiety" are employed to refer to any cytotoxic or otherwise anticellular agent that has such a killing or suppressive property. Toxins are thus pharmacologic agents that can be conjugated to an antibody and delivered in an active form to a cell, wherein they will exert a significant deleterious effect.

The preparation of immunotoxins is, in general, well known in the art (see, *e.g.*, U.S. Patent 4,340,535, incorporated herein by reference). It also is known that while IgG based immunotoxins will typically exhibit better binding capability and slower blood clearance than their Fab' counterparts, Fab' fragment-based immunotoxins will generally exhibit better tissue penetrating capability as compared to IgG based immunotoxins.

Exemplary anticellular agents include chemotherapeutic agents, radioisotopes as well as cytotoxins. Example of chemotherapeutic agents are hormones such as steroids; antimetabolites such as cytosine arabinoside, fluorouracil, methotrexate or aminopterin; anthracycline;

WO 02/092127

PCT/US02/14462

mitomycin C; vinca alkaloids; demecolcine; etoposide; mithramycin; or alkylating agents such as chlorambucil or melphalan.

Preferred immunotoxins often include a plant-, fungal- or bacterial-derived toxin, such as an A chain toxin, a ribosome inactivating protein,  $\alpha$ -sarcin, aspergillin, restirictocin, a ribonuclease, diphtheria toxin or *pseudomonas* exotoxin, to mention just a few examples. The use of toxin-antibody constructs is well known in the art of immunotoxins, as is their attachment to antibodies. Of course, combinations of the various toxins could also be coupled to one antibody molecule, thereby accommodating variable or even enhanced cytotoxicity.

One type of toxin for attachment to antibodies is ricin, with deglycosylated ricin A chain being particularly preferred. As used herein, the term "ricin" is intended to refer to ricin prepared from both natural sources and by recombinant means. Various 'recombinant' or 'genetically engineered' forms of the ricin molecule are known to those of skill in the art, all of which may be employed in accordance with the present invention.

Deglycosylated ricin A chain (dgA) is preferred because of its extreme potency, longer half-life, and because it is economically feasible to manufacture it a clinical grade and scale. Truncated ricin A chain, from which the 30 N-terminal amino acids have been removed by Nagarase (Sigma), also may be employed.

Linking or coupling one or more toxin moieties to an antibody may be achieved by a variety of mechanisms, for example, covalent binding, affinity binding, intercalation, coordinate binding and complexation. Preferred binding methods are those involving covalent binding, such as using chemical cross-linkers, natural peptides or disulfide bonds.

The covalent binding can be achieved either by direct condensation of existing side chains or by the incorporation of external bridging molecules. Many bivalent or polyvalent agents are useful in coupling protein molecules to other proteins, peptides or amine functions. Examples of coupling agents are carbodiimides, diisocyanates, glutaraldehyde, diazobenzenes, and hexamethylene diamines. This list is not intended to be exhaustive of the various coupling agents known in the art but, rather, is exemplary of the more common coupling agents that may be used.

In preferred embodiments, it is contemplated that one may wish to first derivatize the antibody, and then attach the toxin component to the derivatized product. As used herein, the term "derivatize" is used to describe the chemical modification of the antibody substrate with a suitable cross-linking agent. Examples of cross-linking agents for use in this manner include the disulfide-bond containing linkers SPDP (*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) and SMPT (4-succinimidyl-oxycarbonyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridyldithio)toluene).

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Biologically releasable bonds are particularly important to the realization of a clinically active immunotoxin in that the toxin moiety must be capable of being released from the antibody once it has entered the target-cell. Numerous types of linking constructs are known, including simply direct disulfide bond formation between sulfhydryl groups contained on amino acids such as cysteine, or otherwise introduced into respective protein structures, and disulfide linkages using available or designed linker moieties.

Numerous types of disulfide-bond containing linkers are known which can successfully be employed to conjugate toxin moieties to antibodies, however, certain linkers are generally preferred, such as, for example, sterically hindered disulfide bond linkers are preferred due to their greater stability *in vivo*, thus preventing release of the toxin moiety prior to binding at the site of action. A particularly preferred cross-linking reagent is SMPT, although other linkers such as SATA, SPDP and 2-iminothiolane also may be employed.

Once conjugated, it will be important to purify the conjugate so as to remove contaminants such as unconjugated A chain or antibody. It is important to remove unconjugated A chain because of the possibility of increased toxicity. Moreover, it is important to remove unconjugated antibody to avoid the possibility of competition for the antigen between conjugated and unconjugated species. In any event, a number of purification techniques have been found to provide conjugates to a sufficient degree of purity to render them clinically useful.

In general, the most preferred technique will incorporate the use of Blue-Sepharose with a gel filtration or gel permeation step. Blue-Sepharose is a column matrix composed of Cibacron Blue 3GA and agarose, which has been found to be useful in the purification of immunoconjugates. The use of Blue-Sepharose combines the properties of ion exchange with A-chain binding to provide good separation of conjugated from unconjugated binding. The Blue-Sepharose allows the elimination of the free (non conjugated) antibody from the conjugate preparation. To eliminate the free (unconjugated) toxin (e.g., dgA) a molecular exclusion chromatography step may be used using either conventional gel filtration procedure or high performance liquid chromatography.

After a sufficiently purified conjugate has been prepared, one will generally desire to prepare it into a pharmaceutical composition that may be administered parenterally. This is done by using for the last purification step a medium with a suitable pharmaceutical composition. Such formulations will typically include pharmaceutical buffers, along with excipients, stabilizing agents and such like. The pharmaceutically acceptable compositions will be sterile, non-immunogenic and non-pyrogenic. Details of their preparation are well known in the art and

WO 02/092127

PCT/US02/14462

are further described herein. It will be appreciated that endotoxin contamination should be kept minimally at a safe level, for example, less than 0.5 ng/mg protein.

Suitable pharmaceutical compositions in accordance with the invention will generally comprise from about 10 to about 100 mg of the desired conjugate admixed with an acceptable pharmaceutical diluent or excipient, such as a sterile aqueous solution, to give a final concentration of about 0.25 to about 2.5 mg/ml with respect to the conjugate.

As mentioned above, the cancer marker antibodies of the invention may be linked to one or more chemotherapeutic agents, such as anti-tumor drugs, cytokines, antimetabolites, alkylating agents, hormones, nucleic acids and the like, which may thus be targeted to a CD26 antigen expressing cancer cell using the antibody conjugate. The advantages of antibody-conjugated agents over their non-antibody conjugated counterparts is the added selectivity afforded by the antibody.

In analyzing the variety of chemotherapeutic and pharmacologic agents available for conjugating to an antibody, one may wish to particularly consider those that have been previously shown to be successfully conjugated to antibodies and to function pharmacologically. Exemplary antineoplastic agents that have been used include doxorubicin, daunomycin, methotrexate, vinblastine. Moreover, the attachment of other agents such as neocarzinostatin, macromycin, trenimon and  $\alpha$ -amanitin has also been described. The lists of suitable agents presented herein are, of course, merely exemplary in that the technology for attaching pharmaceutical agents to antibodies for specific delivery to tissues is well established.

Thus, it is generally believed to be possible to conjugate to antibodies any pharmacologic agent that has a primary or secondary amine group, hydrazide or hydrazine group, carboxyl alcohol, phosphate, or alkylating group available for binding or cross-linking to the amino acids or carbohydrate groups of the antibody. In the case of protein structures, this is most readily achieved by means of a cross linking agent, as described above for the immunotoxins. Attachment also may be achieved by means of an acid labile acyl hydrazone or *cis* aconityl linkage between the drug and the antibody, or by using a peptide spacer such as L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala, between the  $\gamma$ -carboxyl group of the drug and an amino acid of the antibody.

#### E. Immunological Detection

##### a. Immunoassays

The therapeutic anti-CD26 antibodies, are also useful in various diagnostic and prognostic applications connected with the detection and analysis of cancer. In still further

WO 02/092127

PCT/US02/14462

embodiments, the present invention thus contemplates immunodetection methods for binding, purifying, identifying, removing, quantifying or otherwise generally detecting biological components. Thus, one may for example, combine or follow up the anti-CD26 antibody therapy of the invention with a round of immunodetection to obtain a prognosis or diagnosis of the efficacy of therapy reflected by the decrease in the number of CD26 expressing cancer cells.

The steps of various useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, *e.g.*, Nakamura *et al.* (1987), incorporated herein by reference. Immunoassays, in their most simple and direct sense, are binding assays. Certain preferred immunoassays are the various types of enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIA) and immunobead capture assay. Immunohistochemical detection using tissue sections also is particularly useful. However, it will be readily appreciated that detection is not limited to such techniques, and Western blotting, dot blotting, FACS analyses, and the like also may be used in connection with the present invention.

In general, immunobinding methods include obtaining a sample suspected of containing a protein, peptide or antibody, and contacting the sample with an antibody or protein or peptide in accordance with the present invention, as the case may be, under conditions effective to allow the formation of immunocomplexes.

The immunobinding methods of this invention include methods for detecting or quantifying the amount of a reactive component in a sample, which methods require the detection or quantitation of any immune complexes formed during the binding process. Here, one would obtain a sample suspected of containing a CD26 antigen or related cancer marker protein, peptide or a corresponding antibody, and contact the sample with an antibody or encoded protein or peptide, as the case may be, and then detect or quantify the amount of immune complexes formed under the specific conditions.

In terms of antigen detection, the biological sample analyzed may be any sample that is suspected of containing a cancer-specific antigen, *e.g.*, CD26 antigen, such as a T-cell cancer, melanoma, glioblastoma, astrocytoma and carcinoma of the breast, gastric, colon, pancreas, renal, ovarian, lung, prostate, hepatic, lung, lymph node or bone marrow tissue section or specimen, a homogenized tissue extract, an isolated cell, a cell membrane preparation, separated or purified forms of any of the above protein-containing compositions, or even any biological fluid that comes into contact with cancer tissues, including blood, lymphatic fluid, seminal fluid and urine.

Contacting the chosen biological sample with the protein, peptide or antibody under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of immune

WO 02/092127

PCT/US02/14462

complexes (primary immune complexes) is generally a matter of simply adding the composition to the sample and incubating the mixture for a period of time long enough for the antibodies to form immune complexes with, *i.e.*, to bind to, any antigens present, such as CD26 antigen. After this time, the sample-antibody composition, such as a tissue section, ELISA plate, dot blot or Western blot, will generally be washed to remove any non-specifically bound antibody species, allowing only those antibodies specifically bound within the primary immune complexes to be detected.

In general, the detection of immunocomplex formation is well known in the art and may be achieved through the application of numerous approaches. These methods are generally based upon the detection of a label or marker, such as any radioactive, fluorescent, biological or enzymatic tags or labels of standard use in the art. References concerning the use of such labels include U.S. Patents 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 and 4,366,241, each incorporated herein by reference. Of course, one may find additional advantages through the use of a secondary binding ligand such as a second antibody or a biotin/avidin ligand binding arrangement, as is known in the art.

The encoded protein, peptide or corresponding antibody employed in the detection may itself be linked to a detectable label, wherein one would then simply detect this label, thereby allowing the amount of the primary immune complexes in the composition to be determined.

Alternatively, the first added component that becomes bound within the primary immune complexes may be detected by means of a second binding ligand that has binding affinity for the encoded protein, peptide or corresponding antibody. In these cases, the second binding ligand may be linked to a detectable label. The second binding ligand is itself often an antibody, which may thus be termed a "secondary" antibody. The primary immune complexes are contacted with the labeled, secondary binding ligand, or antibody, under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of secondary immune complexes. The secondary immune complexes are then generally washed to remove any non-specifically bound labeled secondary antibodies or ligands, and the remaining label in the secondary immune complexes is then detected.

Further methods include the detection of primary immune complexes by a two step approach. A second binding ligand, such as an antibody, that has binding affinity for the encoded protein, peptide or corresponding antibody is used to form secondary immune complexes, as described above. After washing, the secondary immune complexes are contacted with a third binding ligand or antibody that has binding affinity for the second antibody, again under conditions effective and for a period of time sufficient to allow the formation of immune

WO 02/092127

PCT/US02/14462

complexes (tertiary immune complexes). The third ligand or antibody is linked to a detectable label, allowing detection of the tertiary immune complexes thus formed. This system may provide for signal amplification if this is desired.

The immunodetection methods of the present invention have evident utility in the diagnosis of cancer. Here, a biological or clinical sample suspected of containing either the encoded protein or peptide or corresponding antibody is used. However, these embodiments also have applications to non-clinical samples, such as in the titering of antigen or antibody samples, in the selection of hybridomas, and the like.

(i) **ELISAs**

As noted, it is contemplated that an immunodetection technique such as an ELISA may be useful in conjunction with detecting presence of CD26 on a clinical sample to determine the need for an anti-CD26 antibody treatment. Alternatively, one may use such a technique in embodiments where a cancer cell is induced to express CD26 to enable a treatment as provided herein.

In one exemplary ELISA, antibodies binding to the encoded proteins of the invention are immobilized onto a selected surface exhibiting protein affinity, such as a well in a polystyrene microtiter plate. Then, a test composition suspected of containing the cancer disease marker antigen, *e.g.*, CD26 antigen, such as a clinical sample, is added to the wells. After binding and washing to remove non-specifically bound immunocomplexes, the bound antigen may be detected.

Detection is generally achieved by the addition of a second antibody specific for the target protein, that is linked to a detectable label. This type of ELISA is a simple "sandwich ELISA". Detection also may be achieved by the addition of a second antibody, followed by the addition of a third antibody that has binding affinity for the second antibody, with the third antibody being linked to a detectable label.

In another exemplary ELISA, the samples suspected of containing the CD26 antigen, are immobilized onto the well surface and then contacted with the antibodies of the invention. After binding and washing to remove non-specifically bound immunocomplexes, the bound antibody is detected. Where the initial antibodies are linked to a detectable label, the immunocomplexes may be detected directly. Again, the immunocomplexes may be detected using a second antibody that has binding affinity for the first antibody, with the second antibody being linked to a detectable label.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Another ELISA in which the proteins or peptides, such as CD26 antigen, are immobilized, involves the use of antibody competition in the detection. In this ELISA, labeled antibodies are added to the wells, allowed to bind to the CD26 antigen, and detected by means of their label. The amount of marker antigen in an unknown sample is then determined by mixing the sample with the labeled antibodies before or during incubation with coated wells. The presence of marker antigen in the sample acts to reduce the amount of antibody available for binding to the well and thus reduces the ultimate signal. This is appropriate for detecting antibodies in an unknown sample, where the unlabeled antibodies bind to the antigen-coated wells and also reduces the amount of antigen available to bind the labeled antibodies.

Irrespective of the format employed, ELISAs have certain features in common, such as coating, incubating or binding, washing to remove non-specifically bound species, and detecting the bound immunocomplexes. These are described as follows:

In coating a plate with either antigen or antibody, one will generally incubate the wells of the plate with a solution of the antigen or antibody, either overnight or for a specified period of hours. The wells of the plate will then be washed to remove incompletely adsorbed material. Any remaining available surfaces of the wells are then "coated" with a nonspecific protein that is antigenically neutral with regard to the test antisera. These include bovine serum albumin (BSA), casein and solutions of milk powder. The coating allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by nonspecific binding of antisera onto the surface.

In ELISAs, it is probably more customary to use a secondary or tertiary detection means rather than a direct procedure. Thus, after binding of a protein or antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with the control human cancer and/or clinical or biological sample to be tested under conditions effective to allow immunocomplex (antigen/antibody) formation. Detection of the immunocomplex then requires a labeled secondary binding ligand or antibody, or a secondary binding ligand or antibody in conjunction with a labeled tertiary antibody or third binding ligand.

"Under conditions effective to allow immunocomplex (antigen/antibody) formation" means that the conditions preferably include diluting the antigens and antibodies with solutions such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) and phosphate buffered saline (PBS)/Tween. These added agents also tend to assist in the reduction of nonspecific background.

The "suitable" conditions also mean that the incubation is at a temperature and for a period of time sufficient to allow effective binding. Incubation steps are typically from about



WO 02/092127

PCT/US02/14462

1 to 2 to 4 h, at temperatures preferably on the order of 25° to 27°C, or may be overnight at about 4°C or so.

Following all incubation steps in an ELISA, the contacted surface is washed so as to remove non-complexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween, or borate buffer. Following the formation of specific immunocomplexes between the test sample and the originally bound material, and subsequent washing, the occurrence of even minute amounts of immunocomplexes may be determined.

To provide a detecting means, the second or third antibody will have an associated label to allow detection. Preferably, this will be an enzyme that will generate color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Thus, for example, one will desire to contact and incubate the first or second immunocomplex with a urease, glucose oxidase, alkaline phosphatase or hydrogen peroxidase-conjugated antibody for a period of time and under conditions that favor the development of further immunocomplex formation (*e.g.*, incubation for 2 h at room temperature in a PBS-containing solution such as PBS-Tween).

After incubation with the labeled antibody, and subsequent to washing to remove unbound material, the amount of label is quantified, *e.g.*, by incubation with a chromogenic substrate such as urea and bromocresol purple or 2,2'-azido-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid [ABTS] and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in the case of peroxidase as the enzyme label. Quantitation is then achieved by measuring the degree of color generation, *e.g.*, using a visible spectra spectrophotometer.

In other embodiments, solution phase competition ELISA is also contemplated. Solution phase ELISA involves attachment of CD26 antigen to a bead, for example a magnetic bead. The bead is then incubated with sera from human and animal origin. After a suitable incubation period to allow for specific interactions to occur, the beads are washed. The specific type of antibody is detected with an antibody indicator conjugate. The beads are washed and sorted. This complex is then read on an appropriate instrument (fluorescent, electrochemiluminescent, spectrophotometer, depending on the conjugating moiety). The level of antibody binding can thus be quantitated and is directly related to the amount of signal present.

#### (ii) Immunohistochemistry

The anti-CD26 antibodies may be used in conjunction with both fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks prepared from study by immunohistochemistry (IHC). For example, each tissue block consists of 50 mg of residual "pulverized" tumor. The method of preparing tissue blocks from these particulate specimens has been successfully used in

WO 02/092127

PCT/US02/14462

previous IHC studies of various prognostic factors, *e.g.*, in breast, and is well known to those of skill in the art (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

Briefly, frozen-sections may be prepared by rehydrating 50 ng of frozen "pulverized" tumor at room temperature in phosphate buffered saline (PBS) in small plastic capsules; pelleting the particles by centrifugation; resuspending them in a viscous embedding medium (OCT); inverting the capsule and pelleting again by centrifugation; snap-freezing in -70°C isopentane; cutting the plastic capsule and removing the frozen cylinder of tissue; securing the tissue cylinder on a cryostat microtome chuck; and cutting 25-50 serial sections containing an average of about 500 remarkably intact tumor cells.

Permanent-sections may be prepared by a similar method involving rehydration of the 50 mg sample in a plastic microfuge tube; pelleting; resuspending in 10% formalin for 4 h fixation; washing/pelleting; resuspending in warm 2.5% agar; pelleting; cooling in ice water to harden the agar; removing the tissue/agar block from the tube; infiltrating and embedding the block in paraffin; and cutting up to 50 serial permanent sections.

#### (iii) FACS Analyses

Fluorescent activated cell sorting, flow cytometry or flow microfluorometry provides the means of scanning individual cells for the presence of an antigen, such as CD26 antigen. The method employs instrumentation that is capable of activating, and detecting the excitation emissions of labeled cells in a liquid medium.

FACS is unique in its ability to provide a rapid, reliable, quantitative, and multiparameter analysis on either living or fixed cells. Cells would generally be obtained by biopsy, single cell suspension in blood or culture. FACS analyses would probably be most useful when desiring to analyze a number of cancer antigens at a given time, *e.g.*, to follow an antigen profile during disease progression.

#### (iv) *In vivo* Imaging

The invention also provides *in vivo* methods of imaging cancer using antibody conjugates. The term "*in vivo* imaging" refers to any non-invasive method that permits the detection of a labeled antibody, or fragment thereof, that specifically binds to cancer cells located in the body of an animal or human subject.

The imaging methods generally involve administering to an animal or subject an imaging-effective amount of a detectably-labeled cancer-specific antibody or fragment thereof (in a pharmaceutically effective carrier), such as a anti-CD26 antibody, and then detecting the

WO 02/092127

PCT/US02/14462

binding of the labeled antibody to the cancerous tissue. The detectable label is preferably a spin-labeled molecule or a radioactive isotope that is detectable by non-invasive methods.

An "imaging effective amount" is an amount of a detectably-labeled antibody, or fragment thereof, that when administered is sufficient to enable later detection of binding of the antibody or fragment to cancer tissue. The effective amount of the antibody-marker conjugate is allowed sufficient time to come into contact with reactive antigens that be present within the tissues of the patient, and the patient is then exposed to a detection device to identify the detectable marker.

Antibody conjugates or constructs for imaging thus have the ability to provide an image of the tumor, for example, through magnetic resonance imaging, x-ray imaging, computerized emission tomography and the like. Elements particularly useful in Magnetic Resonance Imaging ("MRI") include the nuclear magnetic spin-resonance isotopes  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ , and  $^{56}\text{Fe}$ , with gadolinium often being preferred. Radioactive substances, such as technetium<sup>99m</sup> or indium<sup>111</sup>, that may be detected using a gamma scintillation camera or detector, also may be used. Further examples of metallic ions suitable for use in this invention are  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , and  $^{201}\text{Tl}$ .

A factor to consider in selecting a radionuclide for *in vivo* diagnosis is that the half-life of a nuclide be long enough so that it is still detectable at the time of maximum uptake by the target, but short enough so that deleterious radiation upon the host, as well as background, is minimized. Ideally, a radionuclide used for *in vivo* imaging will lack a particulate emission, but produce a large number of photons in a 140-2000 keV range, which may be readily detected by conventional gamma cameras.

A radionuclide may be bound to an antibody either directly or indirectly by using an intermediary functional group. Intermediary functional groups which are often used to bind radioisotopes which exist as metallic ions to antibody are diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and ethylene diaminetetracetic acid (EDTA).

Administration of the labeled antibody may be local or systemic and accomplished intravenously, intra-arterially, *via* the spinal fluid or the like. Administration also may be intradermal or intracavitary, depending upon the body site under examination. After a sufficient time has lapsed for the labeled antibody or fragment to bind to the diseased tissue, in this case cancer tissue, for example 30 min to 48 h, the area of the subject under investigation is then examined by the imaging technique. MRI, SPECT, planar scintillation imaging and other emerging imaging techniques may all be used.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

The distribution of the bound radioactive isotope and its increase or decrease with time is monitored and recorded. By comparing the results with data obtained from studies of clinically normal individuals, the presence and extent of the diseased tissue can be determined.

The exact imaging protocol will necessarily vary depending upon factors specific to the patient, and depending upon the body site under examination, method of administration, type of label used and the like. The determination of specific procedures is, however, routine to the skilled artisan. Although dosages for imaging embodiments are dependent upon the age and weight of patient, a one time dose of about 0.1 to about 20 mg; more preferably, about 1.0 to about 2.0 mg of antibody-conjugate per patient is contemplated to be useful.

#### F. Combination Cancer Therapies

In order to further enhance the efficacy of the anti-CD26 antibody treatment provided by the invention, combination therapies are contemplated. Thus, a second therapeutic agent in addition to the anti-CD26 antibody based therapy may be used. The second therapeutic agent may be a chemotherapeutic agent, a radiotherapeutic agent, a gene therapeutic agent, a protein/peptide/polypeptide therapeutic agent, another immunotherapeutic agent, etc. Such agents are well known in the art.

Cancers that can be treated by the present invention include, but are not limited to, hematological malignancies including: B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma, lymphoblastic T-cell lymphoma, an acute lymphoblastic leukemia, a T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, a peripheral T-cell lymphoma, a T-cell chronic lymphocytic leukemia, an angioimmunoblastic T-cell lymphoma, an angiocentric T-cell lymphoma, an HTLV-related T-cell leukemia, or an adult T-cell leukemia, blood cancer, myeloid leukemia, monocytic leukemia, myelocytic leukemia, promyelocytic leukemia, myeloblastic leukemia, acute myelogenous leukemic, chronic myelogenous leukemic, lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia. Solid cell tumors and cancers that can be treated include those such as tumors of the brain (glioblastomas, medulloblastoma, astrocytoma, oligodendroglioma, ependymomas), lung, liver, spleen, kidney, lymph node, small intestine, pancreas, colon, stomach, breast, bone, endocrine glands, endometrium, prostate, testicle, thyroid, ovary, skin, head and neck, esophagus. Furthermore, the cancer may be a precancer, a metastatic and/or a non-metastatic cancer.

"Effective amount" is defined as an amount of the agent that will decrease, reduce, inhibit or otherwise abrogate the growth of a cancer cell, arrest-cell growth, induce apoptosis, inhibit metastasis, induce tumor necrosis, kill cells or induce cytotoxicity in cells.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

The administration of the second therapeutic agent may precede or follow the therapy using anti-CD26 antibody by intervals ranging from minutes to days to weeks. In embodiments where the second therapeutic agent and the anti-CD26 antibody are administered together, one would generally ensure that a significant period of time did not expire between the time of each delivery. In such instances, it is contemplated that one would administer to a patient both modalities within about 12-24 hours of each other and, more preferably, within about 6-12 hours of each other, with a delay time of only about 12 hours being most preferred. In some situations, it may be desirable to extend the time period for treatment significantly, however, where several days (2, 3, 4, 5, 6 or 7) to several weeks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) lapse between the respective administrations.

It also is conceivable that more than one administration of either the second therapeutic agent and the anti-CD26 antibody will be required to achieve complete cancer cure. Various combinations may be employed, where the second therapeutic agent is "A" and the anti-CD26 antibody is "B", as exemplified below:

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

Other combinations also are contemplated. The exact dosages and regimens of each agent can be suitably altered by those of ordinary skill in the art.

Provided below is a description of some other agents effective in the treatment of cancer.

#### a) Radiotherapeutic Agents

Radiotherapeutic agents and factors include radiation and waves that induce DNA damage for example,  $\gamma$ -irradiation, X-rays, UV-irradiation, microwaves, electronic emissions, radioisotopes, and the like. Therapy may be achieved by irradiating the localized tumor site with the above described forms of radiations. It is most likely that all of these factors effect a broad range of damage DNA, on the precursors of DNA, the replication and repair of DNA, and the assembly and maintenance of chromosomes.

Dosage ranges for X-rays range from daily doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 weeks), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**b) Surgery**

Approximately 60% of persons with cancer will undergo surgery of some type, which includes preventative, diagnostic or staging, curative and palliative surgery. Curative surgery is a cancer treatment that may be used in conjunction with other therapies, such as the treatment of the present invention, chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy, gene therapy, immunotherapy and/or alternative therapies.

Curative surgery includes resection in which all or part of cancerous tissue is physically removed, excised, and/or destroyed. Tumor resection refers to physical removal of at least part of a tumor. In addition to tumor resection, treatment by surgery includes laser surgery, cryosurgery, electrosurgery, and microscopically controlled surgery (Mohs' surgery). It is further contemplated that the present invention may be used in conjunction with removal of superficial cancers, precancers, or incidental amounts of normal tissue.

Upon excision of part of all of cancerous cells, tissue, or tumor, a cavity may be formed in the body. Treatment may be accomplished by perfusion, direct injection or local application of the area with an additional anti-cancer therapy. Such treatment may be repeated, for example, every 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 days, or every 1, 2, 3, 4, and 5 weeks or every 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 months. These treatments may be of varying dosages as well.

**c) Chemotherapeutic Agents**

Agents that damage DNA are chemotherapeutics. These can be, for example, agents that directly cross-link DNA, agents that intercalate into DNA, and agents that lead to chromosomal and mitotic aberrations by affecting nucleic acid synthesis. Agents that directly cross-link nucleic acids, specifically DNA, are envisaged and are exemplified by cisplatin, and other DNA alkylating agents. Agents that damage DNA also include compounds that interfere with DNA replication, mitosis, and chromosomal segregation.

Some examples of chemotherapeutic agents include antibiotic chemotherapeutics such as, Doxorubicin, Daunorubicin, Mitomycin (also known as mutamycin and/or mitomycin-C), Actinomycin D (Dactinomycin), Bleomycin, Plicomycin. Plant alkaloids such as Taxol, Vincristine, Vinblastine. Miscellaneous agents such as Cisplatin, VP16, Tumor Necrosis Factor. Alkylating Agents such as, Carmustine, Melphalan (also known as alkeran, L-phenylalanine mustard, phenylalanine mustard, L-PAM, or L-sarcosine, is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard), Cyclophosphamide, Chlorambucil, Busulfan (also known as myleran), Lomustine. And other agents for example, Cisplatin (CDDP), Carboplatin, Procarbazine, Mechlorethamine, Camptothecin, Ifosfamide, Nitrosurea, Etoposide (VP16), Tamoxifen,

WO 02/092127

PCT/US02/14462

Raloxifene, Estrogen Receptor Binding Agents, Gemcitabine, Navelbine, Farnesyl-protein transferase inhibitors, Transplatinum, 5-Fluorouracil, and Methotrexate, Temazolomide (an aqueous form of DTIC), or any analog or derivative variant of the foregoing.

5                    **d) Other Immunotherapy**

Other immunotherapeutics may be used in conjunction with the anti-CD26 antibody. Immunotherapeutics, generally, rely on the use of immune effector cells and molecules to target and destroy cancer cells. The other immune effector may be, for example, another antibody specific for some other marker on the surface of a tumor cell. This second antibody in itself may  
 10 serve as an effector of therapy or it may recruit other cells to actually effect T-cell killing. This second antibody also may be conjugated to a drug or toxin (chemotherapeutic, radionuclide, ricin A chain, cholera toxin, pertussis toxin, *etc.*) and serve merely as a targeting agent. Alternatively, the effector may be a lymphocyte carrying a surface molecule that interacts, either directly or indirectly, with a tumor cell target. Various effector cells include cytotoxic T-cells and NK cells.  
 15 Immunotherapy could be used as part of a combined therapy, in conjunction with the anti-CD26 antibody-based therapy.

The general approach for combined therapy is discussed below. In one aspect the immunotherapy can be used to target a tumor cell. Many tumor markers exist and any of these may be suitable for targeting in the context of the present invention. Common tumor markers  
 20 include carcinoembryonic antigen, prostate specific antigen, urinary tumor associated antigen, fetal antigen, tyrosinase (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Sialyl Lewis Antigen, MucA, MucB, PLAP, estrogen receptor, laminin receptor, *erb B* and p155. Alternate immune stimulating molecules also exist including: cytokines such as IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, chemokines such as MIP-1, MCP-1, IL-8 and growth factors such as FLT3 ligand. Combining  
 25 immune stimulating molecules, either as proteins or using gene delivery in combination with the anti-CD26 antibody-based therapy of this invention will enhance anti-tumor effects.

(i) **Passive Immunotherapy**

A number of different approaches for passive immunotherapy of cancer exist. They may  
 30 be broadly categorized into the following: injection of antibodies alone; injection of antibodies coupled to toxins or chemotherapeutic agents; injection of antibodies coupled to radioactive isotopes; injection of anti-idiotypic antibodies; and finally, purging of tumor cells in bone marrow.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

## (ii) Active Immunotherapy

In active immunotherapy, an antigenic peptide, polypeptide or protein, or an autologous or allogenic tumor cell composition or "vaccine" is administered, generally with a distinct bacterial adjuvant (Ravindranath & Morton, 1991; Morton *et al.*, 1993).

## (iii) Adoptive Immunotherapy

In adoptive immunotherapy, the patient's circulating lymphocytes, or tumor infiltrated lymphocytes, are isolated *in vitro*, activated by lymphokines such as IL-2 or transduced with genes for tumor necrosis, and readministered (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). To achieve this, one would administer to an animal, or human patient, an immunologically effective amount of activated lymphocytes in combination with an adjuvant-incorporated antigenic peptide composition as described herein. The activated lymphocytes will most preferably be the patient's own cells that were earlier isolated from a blood or tumor sample and activated (or "expanded") *in vitro*.

## e) Gene Therapy

In yet another embodiment, gene therapy in conjunction with the anti-CD26 antibody therapy described in the invention are contemplated. A variety of nucleic acids and proteins encoded by nucleic acids are encompassed within the invention, some of which are described below. Table 1 lists various genes that may be targeted for gene therapy of some form in combination with the present invention.

Table 1

Gene	Source	Human Disease	Function
<b>Growth Factors</b>			FGF family member
<i>HST/KS</i>	Transfection		
<i>INT-2</i>	MMTV promoter		FGF family member
	Insertion		
<i>INT1/WNT1</i>	MMTV promoter		Factor-like
	Insertion		
<i>SIS</i>	Simian sarcoma virus		PDGF B
<b>Receptor Tyrosine Kinases</b>			
<i>ERBB/HER</i>	Avian erythroblastosis virus; ALV promoter insertion; amplified human tumors	Amplified, deleted squamous cell cancer; glioblastoma	EGF/TGF- $\alpha$ / Amphiregulin/ Heteracellularin receptor
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	Transfected from rat Glioblastomas	Amplified breast, ovarian, gastric cancers	Regulated by NDF/ Heregulin and EGF-Related factors
<i>FMS</i>	SM feline sarcoma virus		CSF-1 receptor
<i>KIT</i>	HZ feline sarcoma virus		MGF/Steel receptor



WO 02/092127		PCT/US02/14462	
Gene	Source	Human Disease	Function
<i>TRK</i>	Transfection from human colon cancer		Hematopoiesis
<i>MET</i>	Transfection from human osteosarcoma		NGF (nerve growth factor) receptor
<i>RET</i>	Translocations and point mutations	Sporadic thyroid cancer; familial medullary thyroid cancer; multiple endocrine neoplasias 2A and 2B	Scatter factor/HGF Receptor Orphan receptor Tyr Kinase
<i>ROS</i>	URII avian sarcoma Virus		Orphan receptor Tyr Kinase
<i>PDGF</i> receptor	Translocation	Chronic Myelomonocytic Leukemia	TEL(ETS-like transcription factor)/PDGF receptor gene Fusion
<i>TGF-<math>\beta</math></i> receptor		Colon carcinoma mismatch mutation target	
<b>NONRECEPTOR TYROSINE KINASES</b>			
<i>ABL</i>	Abelson MuLV	Chronic myelogenous leukemia translocation with BCR	Interact with RB, RNA polymerase, CRK, CBL
<i>FPS/FES</i>	Avian Fujinami SV; GA FeSV		
<i>LCK</i>	MuLV (murine leukemia virus) promoter insertion		Src family; T-cell signaling; interacts CD4/CD8 T-cells
<i>SRC</i>	Avian Rous sarcoma Virus		Membrane-associated Tyr kinase with signaling function; activated by receptor kinases
<i>YES</i>	Avian Y73 virus		Src family; signaling
<b>SER/THR PROTEIN KINASES</b>			
<i>AKT</i>	AKT8 murine retrovirus		Regulated by PI(3)K?; regulate 70-kd S6 k?
<i>MOS</i>	Mafoney murine SV		GVBD; cystostatic factor; MAP kinase kinase
<i>PIM-1</i>	Promoter insertion Mouse		
<i>RAF/MIL</i>	3611 murine SV; MH2 avian SV		Signaling in RAS Pathway
<b>MISCELLANEOUS CELL SURFACE<sup>1</sup></b>			
<i>APC</i>	Tumor suppressor	Colon cancer	Interacts with catenins
<i>DCC</i>	Tumor suppressor	Colon cancer	CAM domains
E-cadherin	Candidate tumor Suppressor	Breast cancer	Extracellular homotypic binding; intracellular interacts with catenins
<i>PTC/NBCCS</i>	Tumor suppressor and <i>Drosophila</i> homology	Nevoid basal cell cancer syndrome (Gorline syndrome)	12 transmembrane domain; signals through Gli homologue CI to antagonize hedgehog pathway
<i>TAN-1</i> Notch	Translocation	T-ALL	Signaling?

WO 02/092127		PCT/US02/14462	
Gene	Source	Human Disease	Function
homologue			
<b>MISCELLANEOUS SIGNALING</b>			
BCL-2	Translocation	B-cell lymphoma	Apoptosis
CBL	Mu Cas NS-1 V		Tyrosine-Phosphorylated RING finger interact Abl
CRK	CT1010 ASV	Pancreatic cancer	Adapted SH2/SH3 interact Abl
DPC4	Tumor suppressor		TGF- $\beta$ -related signaling Pathway
MAS	Transfection and Tumorigenicity		Possible angiotensin Receptor
NCK			Adaptor SH2/SH3
<b>GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGERS AND BINDING PROTEINS</b>			
BCR		Translocated with ABL in CML	Exchanger; protein Kinase
DBL	Transfection		Exchanger
GSP			
NF-1	Hereditary tumor Suppressor	Tumor suppressor neurofibromatosis	RAS GAP
OST	Transfection		Exchanger
Harvey-Kirsten, N-RAS	HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; Transfection	Point mutations in many human tumors	Signal cascade
VAV	Transfection		S112/S113; exchanger
<b>NUCLEAR PROTEINS AND TRANSCRIPTION FACTORS</b>			
BRCA1	Heritable suppressor	Mammary cancer/ovarian cancer	Localization unsettled
BRCA2	Heritable suppressor	Mammary cancer	Function unknown
ERBA	Avian erythroblastosis Virus		thyroid hormone receptor (transcription)
ETS	Avian E26 virus		DNA binding
EVII	MuLV promoter Insertion	AML	Transcription factor
FOS	FB1/FBR murine osteosarcoma viruses		1 transcription factor with c-JUN
GLI	Amplified glioma	Glioma	Zinc finger; cubitus interruptus homologue is in hedgehog signaling pathway; inhibitory link PTC and hedgehog
HMG1/LIM	Translocation t(3:12) t(12:15)	Lipoma	Gene fusions high mobility group HMG1-C (XT-hook) and transcription factor LIM or acidic domain
JUN	ASV-17		Transcription factor AP-1 with FOS
MLLVHRX + ELI/MEN	Translocation/fusion ELL with MLL Trithorax-like gene	Acute myeloid leukemia	Gene fusion of DNA-binding and methyl transferase MLL with ELI RNA pol II elongation factor
MYB	Avian myeloblastosis Virus		DNA binding

WO 02/092127		PCT/US02/14462	
Gene	Source	Human Disease	Function
<i>MYC</i>	Avian MC29; Translocation B-cell Lymphomas; promoter Insertion avian leukosis Virus	Burkitt's lymphoma	DNA binding with MAX partner; cyclin regulation; interact RB?; regulate apoptosis?
<i>N-MYC</i> <i>L-MYC</i> <i>REL</i>	Amplified	Neuroblastoma Lung cancer	
	Avian Reticuloendotheliosis Virus		NF- $\kappa$ B family transcription factor
<i>SKI</i>	Avian SKV770 Retrovirus		Transcription factor
<i>VHL</i>	Heritable suppressor	Von Hippel-Lindau syndrome	Negative regulator of elongin; transcriptional elongation complex
<i>WT-1</i>		Wilms' tumor	Transcription factor
<b>CELL CYCLE/DNA DAMAGE RESPONSE<sup>18-21</sup></b>			
<i>ATM</i>	Hereditary disorder	Ataxia-telangiectasia	Protein/lipid kinase homology; DNA damage response upstream in P53 pathway
<i>BCL-2</i> <i>FACC</i>	Translocation Point mutation	Follicular lymphoma Fanconi's anemia group C (predisposition leukemia)	Apoptosis
<i>MDA-7</i>	Fragile site 3p14.2	Lung carcinoma	Histidine triad-related diadenosine 5',3'''- tetraphosphate asymmetric hydrolase
<i>hMLI/MutL</i>		HNPCC	Mismatch repair; MutL Homologue
<i>hMSH2/MutS</i>		HNPCC	Mismatch repair; MutS Homologue
<i>hPMS1</i>		HNPCC	Mismatch repair; MutL Homologue
<i>hPMS2</i>		HNPCC	Mismatch repair; MutL Homologue
<i>INK4/MTS1</i>	Adjacent INK-4B at 9p21; CDK complexes	Candidate MTS1 suppressor and MLM melanoma gene	p16 CDK inhibitor
<i>INK4B/MTS2</i> <i>MDM-2</i> <i>p53</i>	Amplified Association with SV40 T antigen	Candidate suppressor Sarcoma Mutated >50% human tumors, including hereditary Li-Fraumeni syndrome	p15 CDK inhibitor Negative regulator p53 Transcription factor; checkpoint control; apoptosis
<i>PRAD1/BCL1</i>	Translocation with Parathyroid hormone or IgG	Parathyroid adenoma; B-CLL	Cyclin D
<i>RB</i>	Hereditary Retinoblastoma; Association with many DNA virus tumor Antigens	Retinoblastoma; osteosarcoma; breast cancer; other sporadic cancers	Interact cyclin/cdk; regulate E2F transcription factor
<i>XPA</i>		xeroderma pigmentosum; skin cancer predisposition 48	Excision repair; photo- product recognition; zinc finger

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**f) Other Agents**

It is contemplated that other agents may be used in combination with the present invention to improve the therapeutic efficacy of treatment. One form of therapy for use in conjunction with chemotherapy includes hyperthermia, which is a procedure in which a patient's tissue is exposed to high temperatures (up to 106°F). External or internal heating devices may be involved in the application of local, regional, or whole-body hyperthermia. Local hyperthermia involves the application of heat to a small area, such as a tumor. Heat may be generated externally with high-frequency waves targeting a tumor from a device outside the body. Internal heat may involve a sterile probe, including thin, heated wires or hollow tubes filled with warm water, implanted microwave antennae, or radiofrequency electrodes.

A patient's organ or a limb is heated for regional therapy, which is accomplished using devices that produce high energy, such as magnets. Alternatively, some of the patient's blood may be removed and heated before being perfused into an area that will be internally heated. Whole-body heating may also be implemented in cases where cancer has spread throughout the body. Warm-water blankets, hot wax, inductive coils, and thermal chambers may be used for this purpose.

Hormonal therapy may also be used in conjunction with the present invention. The use of hormones may be employed in the treatment of certain cancers such as breast, prostate, ovarian, or cervical cancer to lower the level or block the effects of certain hormones such as testosterone or estrogen and this often reduces the risk of metastases.

**G. Pharmaceuticals**

Pharmaceutical compositions comprising effective amounts of anti-CD26 antibodies, or antibody conjugates, may be dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or medium to form therapeutic and/or diagnostic formulations that may then be administered according to methods of the invention.

The therapeutic antibodies of the present invention can be formulated in standard pharmaceutical carriers for administration to patients in need thereof. These include saline, phosphate buffered saline, and other aqueous carriers, and liposomes, polymeric microspheres and other controlled release delivery devices, as are well known in the art.

The phrases "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal, or a human, as appropriate. As used herein, "pharmaceutically

WO 02/092127

PCT/US02/14462

acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

The active compounds will generally be formulated for parenteral administration, e.g., formulated for injection *via* the intravenous, intraarticular, intrathecal, intramuscular, sub-cutaneous, intra-lesional, or even intraperitoneal routes. The preparation of an aqueous composition that contains a cancer marker antibody, conjugate, inhibitor or other agent as an active component or ingredient will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Typically, such compositions can be prepared as injectibles, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for using to prepare solutions or suspensions upon the addition of a liquid prior to injection can also be prepared; and the preparations can also be emulsified.

The pharmaceutical forms suitable for injectible use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectible solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi.

Solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

Formulations of neutral or salt forms are also provided. Pharmaceutically acceptable salts, include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectible compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectible solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectible solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

The preparation of more, or highly, concentrated solutions for local injection also is contemplated. In this regard, the use of DMSO as solvent is preferred as this will result in extremely rapid penetration, delivering high concentrations of the active agents to a small area.

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is diagnostically or therapeutically effective. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In other embodiments, direct intratumoral injection is contemplated. Alternatively, the tumor may be infused or perfused with the therapeutic compounds using any suitable delivery vehicle. Local or regional administration, with respect to the tumor, also is contemplated. Finally, systemic administration may be performed. Continuous administration also may be applied where appropriate, for example, where a tumor is excised and the tumor bed is treated to eliminate residual, microscopic disease. Delivery *via* syringe or catheterization is also contemplated.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 mL of isotonic NaCl solution and either added to 1000mL of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated or diagnosed. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

#### 10 H. Routes of Administration

The routes of administration will vary, naturally, with the location and nature of the lesion, and include, *e.g.*, intradermal, intrathecal, intrarthricular, transdermal, parenteral, intravenous, intra-arterial, intramuscular, intranasal, subcutaneous, percutaneous, intratracheal, intraperitoneal, intratumoral, perfusion, lavage, direct injection, topical application, and oral administration and formulation. Intratumoral injection, or injection into the tumor vasculature is specifically contemplated for discrete, solid, accessible tumors. Local, regional or systemic administration also may be appropriate. In the case of surgical intervention, the present invention may be used before surgery, at the time of surgery, and/or thereafter, to treat residual or metastatic disease. For example, a resected tumor bed may be injected or perfused with a formulation comprising the anti-CD26 antibody. The perfusion may be continued post-resection, for example, by leaving a catheter implanted at the site of the surgery. Periodic post-surgical treatment also is envisioned.

Continuous administration also may be applied where appropriate, for example, where a tumor is excised and the tumor bed is treated to eliminate residual, microscopic disease. Delivery may be *via* syringe or catheterization. Such continuous perfusion may take place for a period from about 1-2 hours, to about 2-6 hours, to about 6-12 hours, to about 12-24 hours, to about 1-2 days, to about 1-2 wk or longer following the initiation of treatment. Generally, the dose of the therapeutic composition *via* continuous perfusion will be equivalent to that given by a single or multiple injections, adjusted over a period of time during which the perfusion occurs. It is further contemplated that limb perfusion may be used to administer therapeutic compositions of the present invention, particularly in the treatment of melanomas and sarcomas.

Treatment regimens may vary as well, and often depend on tumor type, tumor location, disease progression, and health and age of the patient. Obviously, certain types of tumors will require more aggressive treatment, while at the same time, certain patients cannot tolerate more

WO 02/092127

PCT/US02/14462

taxing protocols. The clinician will be best suited to make such decisions based on the known efficacy and toxicity (if any) of the therapeutic formulations.

In some embodiments, liposomal formulations comprising anti-CD26 antibodies are contemplated. Liposomal encapsulation of pharmaceutical agents prolongs their half-lives when compared to conventional drug delivery systems. Because larger quantities can be protectively packaged, this allows the opportunity for dose-intensity of agents so delivered to cells.

"Liposome" is a generic term encompassing a variety of single and multilamellar lipid vehicles formed by the generation of enclosed lipid bilayers. Phospholipids are used for preparing the liposomes according to the present invention and can carry a net positive charge, a net negative charge or are neutral. Dicetyl phosphate can be employed to confer a negative charge on the liposomes, and stearylamine can be used to confer a positive charge on the liposomes. Liposomes are characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachhawat, 1991). Also contemplated are cationic lipid-nucleic acid complexes, such as lipofectamine-nucleic acid complexes.

#### I. Examples

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

#### EXAMPLE 1

##### *In Vitro and In Vivo* Antitumor Effects of an Anti-CD26 Monoclonal Antibody

##### Materials And Methods

*Animals.* Female C.B-17 SCID mice were obtained from Taconic Farms, Inc. at 3-4 weeks of age and were housed in microisolator cages, and all food, water and bedding were autoclaved before use.



WO 02/092127

PCT/US02/14462

*Cells.* The human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma cell line Karpas 299 was established from the peripheral blood blast cells of a 25-year-old white man with the diagnosis of CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma, bearing surface markers CD4, CD5, HLA-DR and CD30, with the t(2;5) translocation and with rearranged T-cell receptor beta-chain gene (Fischer *et al.*, 1988; Tian *et al.*, 1995). Cells were incubated at 37°C in culture medium, consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (GIBCO BRL, Rockville, MD).

*Antibodies.* The Anti-CD26 monoclonal antibodies (mAbs) used are 1F7 and 5F8, both of which are murine antibodies recognizing human CD26 and have been described previously (Morimoto *et al.*, 1989; Dang *et al.*, 1990b; Torimoto *et al.*, 1992). Control mAb used is an isotype control mouse IgG1 recognizing a CD45 RA epitope not expressed on Karpas 299 cell line and was developed as described previously (Morimoto *et al.*, 1989). Anti-CD3 and anti-CD2 mAbs were purchased from Coulter. For Western blotting studies, anti-p21 and anti-p27 were obtained from Transduction Laboratories; anti-p53 was obtained from Calbiochem; anti-cdk2, anti-cdk4, anti-cyclin D were obtained from Upstate Biotechnology; anti-cyclin E and anti-PCNA were obtained from Santa Cruz Biotechnology; and anti-actin was obtained from Sigma.

*Reagents.* Tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) was dissolved at a concentration of 5 mg/ml in sterile PBS at room temperature, with the solution being further sterilized by filtration and stored at 4°C in the dark. Extraction buffer was prepared as follows: 20% w/v of SDS was dissolved at 37°C in a solution of 50% each of N,N-dimethyl formamide (DMF) (Sigma) and distilled water; pH was adjusted to 4.7 by the addition of 1M HCl. Cycloheximide CHX (Sigma) was used at a concentration of 20 µg/ml.

#### *In Vivo Studies*

All mice were pretreated intraperitoneally with 0.2 ml of anti-asilo GM1 polyclonal antisera 25% (v/v) (Wako, Richmond, VA) 1 day before tumor transplant to eliminate host natural killer cell activity and facilitate tumor engraftment (Tian *et al.*, 1995). For survival studies, tumor cells were then inoculated by i.p. injection. 1 day following tumor cell inoculation, SCID mice then received saline, isotype control Ab or anti-CD26 mAb 1F7 i.p. injections in 0.1 ml sterile saline at the indicated doses and schedules. Tumor-bearing mice were then monitored for tumor development and progression, and moribund mice were euthanized and necropsied for evidence of tumors. In addition, mice with visible or palpable tumors measuring 2 cm at its greatest dimension were also euthanized and necropsied to minimize suffering to the

WO 02/092127

PCT/US02/14462

animals. For some animals, organs were also harvested for histopathologic analyses. In some studies, SCID mice were injected with tumor cells by s.c. injection and after tumor size has reached 0.5 cm at its greatest dimension, saline or 1F7 (5 µg per injection) was injected intratumorally every other day for 7 injections. Mice were then euthanized, and tumor mass at the site of injection was harvested for histopathologic analyses.

In other studies, SCID mice were injected with  $1 \times 10^6$  Karpas 299 tumor cells incubated in saline alone, 100 µg of 1F7 or isotype control Ab by s.c. injection. Subsequently, starting 1 day after tumor cell inoculations, SCID mice were given saline, isotype control Ab (20 µg/injection) or 1F7 (20 µg/injection) s.c. injections in 0.1 ml sterile saline every other day for 10 injections, placed at the original site of s.c. tumor injection. The day of initial appearance of a visible tumor was documented to evaluate treatment effects.

#### *In Vitro Studies*

**MTT Assay.** Cell growth assay was performed as described previously (Hansen *et al.*, 1989). Cells were incubated in microplates in the presence of culture medium alone or culture medium plus antibodies as described, to a total volume of 100 µl (50,000 cells/well). Following 48 hours of incubation at 37°C, 25 µl of MTT was added to the wells at a final concentration of 1 mg/ml. The microplates were then incubated for 2 hours at 37°C, followed by the addition of 100 µl of extraction buffer. Following overnight incubation at 37°C, OD measurements at 570 nm were performed. Values reported represent the means of triplicate wells, and the standard errors of the mean were less than 15%.

**Immunofluorescence.** All procedures were carried out at 4°C, and flow cytometry analyses were performed (FACScan, Becton Dickinson) as previously described (Dang *et al.*, 1990d). Cells were stained with the appropriate antibodies, washed 2 times with PBS, and then with goat anti-mouse IgG FITC. Cells were then washed 2 times with PBS prior to flow cytometry analyses. Negative controls were stained with second antibody alone. For some studies, SCID mice were inoculated with tumor cells i.p. ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) as described above. When tumors were palpable, animals were euthanized and tumor mass was harvested. Single cell suspensions were then isolated from tumor mass, and flow cytometry was then performed.

**Cell Cycle Analysis.** Cells were incubated in either medium alone or in the presence of antibodies at a concentration of 5 µg/ml at 37°C. At the appropriate time intervals, cells were collected, washed twice with PBS and resuspended in PBS containing 10 µg/ml propidium iodide, 0.5% Tween-20 and 0.1% RNase at room temperature for 30 minutes. Samples were

WO 02/092127

PCT/US02/14462

then analyzed (FACScan, Becton Dickinson) for DNA content. Cell debris and fixation artifacts were gated out and Go/G1, S and G2/M populations were quantified using the CellQuest and ModFit LT programs.

**SDS-PAGE and Immunoblotting.** After incubation at 37°C, cells were harvested from wells, washed with PBS and lysed in lysis buffer, consisting of 1% Brij 97, 5 mM EDTA, 0.02 M HEPES pH 7.3, 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF, 0.5 mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, and 0.2 mM sodium orthovanadate. After incubating on ice for 15 minutes, nuclei were removed by centrifugation and supernatants were collected. 2X Sample buffer consisting of 20% glycerol, 4.6% SDS, 0.125 M Tris, pH 6.8 and 0.1% Bromophenol Blue was added to the appropriate aliquots of supernatants. Protein samples were submitted to SDS-PAGE analysis on a 20% gel under standard conditions using a mini-Protean II system (Bio-Rad Hercules, CA). For immunoblotting, the proteins were transferred onto nitrocellulose (Immobilon-P, Millipore). Following overnight blocking at 4°C in blocking solution consisting of 0.1% Tween 20 and 5% bovine serum albumin in TBS, membranes were blotted with the appropriate primary antibodies diluted in blocking solution for 1 hour at room temperature. Membranes were then washed with blocking solution, and appropriate secondary antibodies diluted in blocking solution were then applied for 1 hour at room temperature. Secondary antibodies were goat anti-mouse or goat anti-rabbit HRP conjugate (Dako). Membranes were then washed with blocking solution and proteins were subsequently detected by chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

## Results

**CD26 Expression on the Karpas 299 Lymphoma Cell Line.** Expression of CD26 on the CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma cell line Karpas 299 was evaluated by flow cytometry prior to tumor implantation into the SCID mouse. As shown in FIG. 1A, Karpas 299 cells have high surface expression of CD26, while CD3 and CD2 surface expression is not detectable. In addition, overnight incubation with 1F7 led to a decrease in expression of CD26 surface expression (FIG. 1B), consistent with previously reported findings of anti-CD26-mediated modulation of CD26 surface expression on normal T-cells (Dang *et al.*, 1990d).

**CD26-Mediated Inhibition of Cell Growth at the G1/S Checkpoint.** The effect of soluble anti-CD26 antibody binding on growth of Karpas 299 cells and H9 cells were examined in *in vitro* studies. As shown in FIG. 2A. and FIG. 2B., the addition of 1F7 resulted in decreased cell growth as measured by MTT reduction. The 5F8 monoclonal antibody also exerted significant inhibitory effect on cell growth, however, higher concentrations of 5F8 were used in comparison to 1F7. The anti-CD26 mAbs did not exert any growth inhibitory effect on CD26-negative cell

WO 02/092127

PCT/US02/14462

lines at the concentrations tested. Additional evidence of the inhibitory effect of 1F7 on cell growth was obtained through cell cycle analysis. As shown in Table 2, binding of 1F7 resulted in enhanced blockade of cell cycle progression at the G1/S checkpoint, leading eventually to decreased cell metabolism and cell growth as detected by reduction in MTT uptake.

5

Table 2

## Anti-CD26-mediated cell cycle arrest at G1/S

	%Go/G1			%S			%G2/M		
	Media	Control Ab	1F7	Media	Control Ab	1F7	Media	Control Ab	1F7
Day 1	26.71	25.04	36.04	47.81	47.52	35.98	25.48	27.44	27.98
Day 2	56.55	53.81	73.52	24.71	25.96	14.04	18.74	20.23	12.44

Karpas 299 cells were incubated at 37°C with media or antibodies (2 µg/ml). At the indicated time intervals, cells were harvested and cell cycle analyses were performed. Data are representative of three separate studies.

10 *Enhancement of p21 Expression Following CD26-Mediated Cell Cycle Arrest.* In view of the integral role played by cyclin-dependent kinase inhibitors at the G1/S checkpoint, the expression of p21, p27 and p16 following anti-CD26 antibody binding was examined. Enhanced p21 expression following anti-CD26 treatment was shown in Karpas 299 cells were incubated overnight at 37°C with either media alone, media containing isotype control mAb or 1F7  
15 (2 µg/ml), cells were then harvested, and SDS-PAGE and immunoblotting studies were performed. In other experiments, Karpas 299 cells were treated with 1F7 (2 µg/ml) or media alone at various time intervals and p21 expression was detected. It was found that p27 expression is not affected by anti-CD26 mAb binding, and that p16 expression was not detectable in cells incubated in medium alone or in the presence of control antibodies as well as  
20 anti-CD26 mAbs. On the other hand, p21 expression was enhanced following CD26 ligation. Compared to incubation under control conditions, treatment with anti-1F7 resulted in increased expression of p21. Western blotting with an anti-p21 mAb showed the appearance of the expected band migrating at the 21 kd position. It is known that under certain conditions, induction of p21 expression is dependent on p53 (El-Deiry *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1994). In  
25 the Karpas 299 cell line, no change in p53 expression was seen in anti-CD26-treated cells when compared with controls. However, the functional status of p53 has not yet been determined.

It is known that p21 forms complexes with cyclins and CDKs to inhibit cell cycle progression at G1/S. Although, anti-CD26 antibody binding enhanced p21 expression, protein

WO 02/092127

PCT/US02/14462

levels of cyclin D, cyclin E, cdk2 and cdk4, all of which are present within the cyclin/CDK/p21 complex, remain unchanged. In addition, PCNA protein levels were unaffected by treatment with anti-CD26. Similar data were obtained following anti-CD26 binding to the CD26+ H9 cell line. It was also shown that enhanced p21 expression is detected within 3 hours of treatment with 1F7, with its level rising during continued antibody treatment.

*Enhanced p21 Expression is Dependent on de novo Protein Synthesis.* To determine whether the enhancement in p21 expression following anti-CD26 binding is dependent on increased protein synthesis, p21 expression was examined in the presence and absence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). p21 expression was seen in the cells treated with 1F7 but not in those treated with 1F7 and CHX. Thus, expression of p21 following CD26 ligation is dependent on *de novo* protein synthesis.

*Anti-Tumor Effects of 1F7 in SCID Mice Bearing Karpas 299 in an in vivo Tumor Model.* The effect of the anti-CD26 mAb 1F7 on Karpas 299 growth was also examined in a SCID mouse tumor model. For this,  $1 \times 10^6$  Karpas 299 cells were implanted by i.p. injection into the SCID mouse, and tumors were allowed to develop. Subsequently, the tumor mass was removed and single cell suspensions were established. The process of tumor formation in the *in vivo* model did not effect CD26 surface expression. For example, as shown in FIG. 3A & FIG.3B, CD26 expression following tumor implantation into the SCID mouse was similar to its level prior to tumor implantation. Postmortem histopathologic analyses of tissue sections of the intraperitoneal mass also showed the presence of CD26.

SCID mice were then inoculated with Karpas 299 cells by i.p. injection ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) and starting at day 1 after tumor inoculation, treatment with saline, isotype control Ab or 1F7 was started at the indicated doses every other day for a total of 10 i.p. injections. As shown in FIG. 4A, mice treated with 1F7 at 5  $\mu$ g/injection had statistically significant survival advantage over those treated with saline ( $p < 0.0001$ ) or isotype control Ab at 5  $\mu$ g/injection ( $p < 0.001$ ). Similarly, the survival advantage of mice treated with 1F7 at 10  $\mu$ g/injection was statistically significant as compared to saline-treated mice ( $p < 0.0001$ ) or mice treated with isotype control Ab at 10  $\mu$ g/injection ( $p < 0.001$ ). The data also shows no statistically significant difference in survival between 1F7 doses of 5  $\mu$ g/injection and 10  $\mu$ g/injection ( $p = 0.7$ ).

Mice that were injected with higher i.p. doses of tumor cells ( $3 \times 10^6$  cells/mouse) and then subsequently treated by i.p. injections of saline alone, isotype control Ab (20  $\mu$ g/injection) or 1F7 at doses of 5  $\mu$ g/injection ( $p < 0.05$ ), 10  $\mu$ g/injection ( $p < 0.05$ ) or 20  $\mu$ g/injection ( $p < 0.01$ ) given every other day for a total of 10 injections, again showed no statistically significant survival advantage over mice treated initially injected with lower doses of tumor cells. Mice

WO 02/092127

PCT/US02/14462

treated at 1F7 dose of 20 µg/injection had statistically significant survival advantage over those treated with isotype control Ab at a dose of 20 µg/injection ( $p < 0.01$ ).

Comparing mice treated with different 1F7 doses, those treated with 20 µg/injection had statistically significant survival advantage over those treated with 1F7 dose of 5 µg/injection ( $p < 0.01$ ). There was also a trend for greater survival advantage for mice treated with 1F7 at a dose of 20 µg/injection when compared to those treated at a dose of 10 µg/injection ( $p = 0.2$ ). Likewise, there was a trend for greater survival advantage for those treated with 1F7 dose of 10 µg/injection as compared to 5 µg/injection ( $p = 0.09$ ) (FIG. 4B). These data indicate that the efficacy of antibody treatment was dependent on the relative amount of tumor present.

Postmortem histopathologic analyses of tissue sections showed that tumor bearing mice treated under control conditions developed tumor infiltrates at local sites as well as distant organs. On the other hand, 1F7-treated mice had no evidence of tumor involvement at these sites. Thus, the anti-CD26 antibody also prevents metastatic tumor growth.

The antitumor effect of 1F7 in the SCID mouse model were also demonstrated. For this, SCID mice were inoculated with  $1 \times 10^6$  Karpas 299 cells by s.c. administration. Following the development of a visible tumor mass, mice were then treated by intratumoral injections of either saline alone or 1F7 (5 µg/injection) given every other day for 7 injections. Histopathologic analyses showed that 1F7 treatment resulted in tumor necrosis, as most of the tumor had undergone coagulative necrosis. In contrast, saline treatment resulted in tumor cells being viable in the vast majority of the tumor mass. Treatment with isotype control Ab at 5 µg/injection led to similar results as those obtained with saline treatment, as most of the tumor cells were found to be viable in the tumor mass.

The time required for initial appearance of Karpas 299 tumors following s.c. injection of tumor cells and s.c. treatment with saline, 1F7 or isotype control Ab was also determined. For these studies, SCID mice were injected s.c. with  $1 \times 10^6$  Karpas 299 cells incubated in saline alone, 100 µg of 1F7 or 100 µg of isotype control Ab. Subsequently, starting 1 day after tumor cell inoculations, SCID mice then received saline, isotype control Ab (20 µg/injection) or 1F7 (20 µg/injection) s.c. injections in 0.1 ml sterile saline every other day for 10 injections, placed at the original site of s.c. tumor injection. The day of initial appearance of a visible tumor was documented to evaluate treatment effects.

As shown in FIG. 5, there was a statistically significant difference in the rate of visible tumor development among the mice treated with different conditions. The group treated with 1F7 had a lower rate of tumor development than those treated with isotype control Ab or saline

WO 02/092127

PCT/US02/14462

alone ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively), with the majority of 1F7-treated mice remaining free of tumor during the length of the study.

## EXAMPLE 2

5        **Anti-CD26 MAb 1F7 Inhibits T Lymphocyte Proliferation and Arrests Cell Cycle at  
GI/S Associated with Enhanced p21<sup>Cip1</sup> Expression**

## Methods

10        *Preparation and Culture of Cells.* Human T-cell clones were established by *in vitro* stimulation of human peripheral blood lymphocytes according to the methods described previously (Sugita *et al.*, 1992). Human Jurkat T-cell line was obtained from ATCC. The Jurkat cell lines include: 1) wild type CD26-transfected Jurkat cell lines (J. C26/DP+), 2) Jurkat cell lines transfected with mutant CD26 containing an alanine at the putative catalytic serine residue at position 630, resulting in a mutant CD26-positive/DPPIV-negative Jurkat transfectant  
15        (J.C26/DP-), and 3) non-transfected parental Jurkat cells (Jwt) (Tanaka *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1993). Jurkat transfectants were incubated at 37°C at a concentration of  $1 \times 10^6$ /ml in culture media, consisting of RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Grand Island, NY) supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) (Life Technologies Inc.), and G418 (500 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Non-transfected parental Jurkat cells were  
20        maintained in the same culture media without G418. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), collected from healthy adult volunteers, were isolated by centrifugation on Ficoll/Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). To obtain a highly purified T-cell population, PBMC were separated into an E rosette-positive population and were used as resting T-cells as determined by flow cytometric analysis (FACScalibur™, Nippon Becton  
25        Dickinson Co., Ltd., Tokyo, Japan) using an FITC-labeled anti-CD3 mAb (BD PharMingen, San Diego, CA), with purity being >95%. T-cell clones were maintained in culture media containing IL-2 (10 ng/ml; PeproTech EC Ltd., London, U.K.), and restimulated every 2-3 weeks with irradiated (30 Gy) allogeneic PBMC ( $1.0 \times 10^5$ /ml) (Sugita *et al.*, 1992). Viability of cells was examined using trypan blue (Sigma-Aldrich) dye exclusion method.

30        *Antibodies and Reagents.* Anti-CD26 mAbs, 1F7 and 5F8, and isotype control mAb 4B4 (CD29 mAb) are previously described (Morimoto *et al.*, 1989; Torimoto *et al.*, 1992; Morimoto *et al.*, 1985, incorporated herein by reference). Anti-CD3 mAb (OKT3) is also described elsewhere (Kung *et al.*, 1979, incorporated herein by reference). The following antibodies and reagents were purchased from BD PharMingen: FITC labeled anti-bromodeoxyuridine (BrdU),

WO 02/092127

PCT/US02/14462

anti-p21<sup>Cip1</sup>, anti-p27<sup>Kip1</sup>, anti-p53, anti-cyclin D1, anti-CDK4, anti-CDK-6, anti-ERK, and 7-aminocinomycin D (7-AAD). Mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10, and anti- $\beta$ -actin were purchased from Sigma-Aldrich, and anti-phosphorylated ERK was from Santa Cruz (Delaware Avenue, CA). The source and working concentration of reagents used for cell stimulation and inhibition of signal transduction are as follows: OKT3 (0.05 $\mu$ g/ml), PMA (10ng/ml; Sigma-Aldrich), Nocodazole (500ng/ml from 1mg/ml stock solution in DMSO; Sigma-Aldrich), PD98059 (10 $\mu$ M from 10mM stock solution in DMSO; BIOMOL, Plymouth Meeting, PA), and U0126 (10 $\mu$ M from 10mM stock solution in DMSO; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). Cells were treated with each inhibitors 30 minutes before initiation of culture with mAbs.

*Flow Cytometry Analysis.* All procedures were carried out at 4°C, and flow cytometry (FCM) analyses were performed with FACSCalibur™ (Nippon Becton-Dickinson) using standard CELLQuest™ acquisition/analysis software (Becton-Dickinson). Cells were stained with the appropriate antibodies, and washed two times with ice-cold PBS prior to FCM analysis.

*Cell Cycle Analysis.* Cells (1x10<sup>5</sup>/well) were incubated in media alone or in the presence of 1F7, 5F8 or isotype control mAb (4B4) at indicated concentrations with or without Nocodazole at 37°C. In experiments using inhibitors, 1x10<sup>6</sup> cells were incubated with various inhibitors at the indicated concentrations for 30 minutes at 37°C prior to incubation with anti-CD26 mAbs. At the appropriate time interval, cells were pulsed with BrdU at a concentration of 10 $\mu$ M for final 1 hour at 37°C. Cells were then collected and washed twice with ice-cold PBS. Fixation, permeabilization, and immunostaining of cells by FITC labeled anti-BrdU and 7-AAD were performed according to the BD PharMingen instruction manual of BrdU Flow Cytometry Kit. Samples were then analyzed by FACSCalibur™ within 1 hour after preparation. By the region gates applied to BrdU versus 7-AAD dot plot after gating out cell debris and fixation artifacts, FCM analysis allowed for the discrimination of cell subsets that resided in G0/G1, G2/M, and S phases of the cell cycle. G0/G1, S and G2/M populations were quantified using the CELLQuest™ program (Becton-Dickinson).

*Preparation of Cell Lysates and Western Blot Analysis.* After incubation at 37°C, cells were harvested from wells, washed with PBS and lysed in RIPA lysis buffer, consisting of 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 1mM PMSF, 0.5mM NaF, 10 $\mu$ g/ml aprotinin and 0.02mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. For detecting phosphotyrosine proteins, cells after incubation were washed with ice-cold PBS containing 5mM EDTA, 10mM, NaF, 10mM Na-pyrophosphate and 0.4mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Cells were centrifuged and then solubilized in lysis buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA, 50mM



WO 02/092127

PCT/US02/14462

Tris-HCl (pH 8.0), 0.15M NaCl, 1mM PMSF, 10mM iodoacetamide, 10mM NaF, 10µg/ml aprotinin and 0.4mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>). After removal of precipitation by ultracentrifugation, cell lysates were then submitted to SDS-PAGE analysis on an appropriate concentration gel under reducing condition using a mini-Protean II system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For immunoblotting, the proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA) in 25mM Tris, 192mM glycine, and 20% methanol, and the membrane was blocked for 1 hour at room temperature in PBS with 0.05% Tween 20 containing 5% non-fat milk. Specific antigens were probed by the corresponding mAbs, followed by HRP-conjugated anti-mouse Ig (Amersham Pharmacia). Western blots were visualized by the enhanced chemiluminescence technique (NEN, Boston, MA).

*In Vitro Cell Proliferation Assay.* Cell proliferation was determined using [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (ICN Radiochemicals, Irvine, CA). All proliferation assays of each experiment were performed in triplicate. 0.2x10<sup>6</sup> of cells in each microplate well were incubated in the presence of media alone or in the presence of 1F7 (1µg/ml) at 37°C with or without stimulation of OKT3 and PMA. After being incubated for 72 hours, cells were pulsed with [<sup>3</sup>H]-thymidine (1µCi/well) for the final 8 hours of culture. Cells were then harvested onto a glass filter (Wallac, Turku, Finland), and radioactivity was counted using a liquid scintillation counter (Wallac). [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake was expressed as the mean cpm of triplicate samples.

*Statistics.* Student's *t* test was used to determine whether the difference between control and sample was significant (*p* < 0.05 being significant).

## Results

*Anti-CD26 Mab Treatment Inhibits Cell Cycle Progression at the G1/S Checkpoint.* Effects of soluble anti-CD26 antibody binding on cell cycle of Jurkat cells transfected with cDNA of a CD26 with DPPIV active domain (J.C26/DP+), and without DPPIV active domain (J.C26/DP-) were examined (21,22). To analyze cell cycle status, FCM with two-color staining of FITC labeled-BrdU and 7-AAD after cells were pulsed with BrdU was used. To better visualize cell cycle effects, cells were treated with Nocodazole, which arrests cells in M phase unless they are arrested in G0/G1 phase. Cell viability validated by trypan blue dye exclusion method remained to be >95% in the presence or absence of Nocodazole. As shown in FIG. 6A, the addition of anti-CD26 mAb 1F7 to J.C26/DP+ resulted in blockade of cell cycle progression at the G1/S checkpoint. Of note is the fact that cell cycle arrest at the G1/S checkpoint was not observed in J.C26/DP- or parental Jurkat (Jwt) (FIG. 6A). In FIG. 6B, G2/M accumulation by Nocodazole was observed in 1F7 non-treated J.C26/DP+, but not in 1F7 treated J.C26/DP+.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

This effect of G2/M accumulation by Nocodazole was also observed in J.C26/DP- and Jwt in the presence or absence of 1F7 (FIG. 6B). On the other hand, S phase was not influenced by 1F7 treatment (FIG. 6C). These findings suggested that the effect of cell cycle progression at the G1/S checkpoint was dependent on the enzymatic activity of DPPIV intrinsic to the CD26 molecule.

*Enhancement of p21 Expression Associated with Cell Cycle Arrest at the G1/S Checkpoint Following Anti-CD26 MAb Treatment.* Close examination of the cellular response of Jurkat cells to 1F7 by FCM analysis revealed that J.C26/DP+ exhibited an approximately 25% increase in G1 arrest 6 hours after initiation of culture with 1F7 (FIG. 7). At 12 and 24 hours after 1F7 treatment, J.C26/DP+ gradually lost their initial G0/G1 arrest. Notably, in J.C26/DP-, cell cycle arrest was not observed. These findings again suggested that the effect on cell cycle progression at the G1/S checkpoint was dependent on the enzymatic activity of DPPIV. The effect of 1F7 was dose-dependent at concentrations 0.1 - 10.0 µg/ml. It should be noted that another anti-CD26 mAb 5F8 recognizing a distinct CD26 epitope from 1F7 had no such effect as observed with 1F7 (Torimoto *et al.*, 1992).

Because cell cycle arrest can be accompanied by increases in CDKI and/or decreases in cyclins or CDKs, the expression of various cell cycle regulatory proteins following 1F7 binding was examined. Compared to incubation under control conditions (media alone or 4B4 as isotype matched control mAb treatment), treatment of J. C26/DP+ with 1F7 resulted in increased expression of p21<sup>Cip1</sup> shown by Western blotting analysis of the relative levels of the protein.

For the Western blotting, J.C26/DP+ and J.C26/DP- were incubated with 1F7. Cells were then harvested at the indicated periods of culture, and expression of p21<sup>Cip1</sup> was assessed by Western blotting with the appropriate mAbs. Equal loading of cell extracts was confirmed using anti-β-actin mAb. No effect on p21<sup>Cip1</sup> expression was observed with media alone or 4B4. Treatment of J.C26/DP- with 1F7 did not result in increased expression of p21<sup>Cip1</sup>. Enhanced p21<sup>Cip1</sup> expression was detected within 6 hours of treatment with 1F7, and then gradually decreased, being compatible with the cell cycle analysis shown in FIG. 6A.

Further, J.C26/DP+ and J.C26/DP- were incubated with media alone, isotype control mAb 4B4 (Iso) or 1F7 for 6 hours. Cells were then harvested, and expression of p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p53, cyclin D1, CDK4, and CDK6 was assessed by Western blotting with the appropriate mAbs. Equal loading of cell extracts was confirmed using anti-β-actin mAb. In contrast to p21<sup>Cip1</sup>, the expression of Cyclin D1, CDK4, CDK6, p27<sup>Kip1</sup>, and p53, which are associated with G1-regulation cyclin complex, did not change at 6 hours after treatment with 1F7.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

It should be noted that the expression of these proteins did not change between 0 - 24 hours after initiation of culture with 1F7. These results suggested that 1F7 stimulation led to the upregulation of p21<sup>Cip1</sup> and cell cycle arrest at the G1/S checkpoint through the DPPIV enzymatic activity of CD26.

5        *MEK-ERK Pathway Plays an Important Role in 1F7-Mediated Cell Cycle Arrest at the G1/S Checkpoint.* CD26 molecules were also shown to be present in membrane lipid rafts and ligation of CD26 by 1F7 was shown to increase the recruitment of CD26 molecules to rafts (Ishii *et al.*, 2001). T-cell receptors (TCR) in lipid rafts also interacts with other signaling molecules (Janes *et al.*, 1999; Cheukuri *et al.*, 2001), thereby inducing increased tyrosine phosphorylation of signaling molecules. CD26 is involved in essential T-cell signaling events through its physical  
10        and functional association with key cellular structures (Morimoto and Schlossman, 1998; von Bonin *et al.*, 1998; De Meester *et al.*, 1999). Other studies demonstrated that hyperactivation of the Raf-MEK-ERK pathway in T-cells and other cell lineages led to alterations in the expression of key cell cycle regulators and cell cycle arrest at the G1/S check point (Boussiotis *et al.*, 1997;  
15        Sewing *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). Therefore, tyrosine phosphorylation of signaling molecules related to CD26 in T-cells was examined with respect to expression of p21<sup>Cip1</sup>. J.C26/DP+, J.C26/DP- and Jwt were incubated with 1F7 for the various time periods, *i.e.*, 0, 5, and 10 minutes. Cells were then harvested, separated by 5-20% gradient SDS-PAGE, and the status of tyrosine phosphorylation was assessed by Western blotting with the anti-phosphotyrosine mAb 4G10 (pY). Equal loading of cell extracts was confirmed using an Ab that  
20        recognizes  $\beta$ -actin. 1F7 treatment of J.C26/DP+ induced tyrosine phosphorylation of proteins with molecular weights of approximately 40 kDa at 5 to 10 minutes after initiation of culture. However, no induction in tyrosine phosphorylation was observed following 1F7 treatment in J.C26/DP- and Jwt. These changes were not observed in experiments using isotype matched  
25        control mAb 4B4.

To characterize the 40 kDa phosphorylated protein, the phosphorylation status of ERK was examined, since previous work showed that the Raf-MEK-ERK pathway mediates anti-CD3 mAb-induced G1 arrest (Chen *et al.*, 1999). ERK proteins were shown to be phosphorylated following treatment of J.C26/DP+ with 1F7. For this experiment, J.C26/DP+ were incubated  
30        with media alone, isotype control mAb 4B4 (Iso) or 1F7 for the various time periods, *i.e.*, 0, 5 and 10 minutes. Cell lysates were blotted with anti-phospho-ERK, and reprobed with anti-ERK mAb. No difference was observed with experiments using J.C26- or Jwt.

To confirm these results, the effect of inhibiting the MEK-ERK pathway on p21<sup>Cip1</sup> expression was examined. Cells were treated with 1F7 for 6 hours in the absence or presence of

WO 02/092127

PCT/US02/14462

the MEK-specific inhibitor PD98059. The enhanced expression of p21<sup>Cip1</sup> associated with phosphorylation of ERK was clearly inhibited by the presence of the MEK inhibitor. It should be noted that equal loading of the gel lanes was confirmed by probing the Western blots with an antibody that recognizes ERK. These results suggested that induction of p21<sup>Cip1</sup> following 1F7 treatment was mediated via the MEK-ERK pathway.

To further determine the role of the MEK-ERK pathway in cell cycle regulation of T-cells after treatment with 1F7, cell cycle analysis by FCM was performed in the absence or presence of the MEK-specific inhibitors PD98059 and U0126. Consistent with results regarding p21<sup>Cip1</sup> expression, G0/G1 arrest of 1F7- treated J.C26/DP+ was disrupted by the presence of the MEK specific inhibitors (FIG. 8), which was not observed in J.C26/DP- and Jwt. These findings indicate that anti-CD26 treatment induced cell cycle arrest at G1/S checkpoint in T-cells by activating MEK-ERK pathway, leading to enhanced expression of the CDKI p21<sup>Cip1</sup>.

*Anti-CD26 mAb 1F7 Treatment Inhibits Proliferation of T-cell Clones.* Upregulation of p21<sup>Cip1</sup> has been described during T-cell proliferation and in CD4+ memory T-cells of autoimmune-prone BXSB (Nourse *et al.*, 1994; Sabzevari *et al.*, 1997). Moreover, p21<sup>Cip1</sup>-deficient mice accumulated abnormal amounts of CD4+ memory T-cells and developed loss of tolerance towards nuclear antigens (Sabzevari *et al.*, 1997). In view of these findings, to define the biological effect of 1F7-mediated p21<sup>Cip1</sup> enhancement on the proliferation of human peripheral T-cells, the effect of soluble anti-CD26 antibody binding on proliferation of human T-cell clones derived from PBMC was examined. As shown in FIG. 9, the addition of 1F7 to human T-cell clones resulted in a reduction of cellular proliferation, as assayed by [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake. Of note is the fact that there was no inhibitory effect following treatment with the anti-CD26 mAb 5F8 (Morimoto *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 1998), or an isotype control antibody 4B4. Similar to results described above in experiments using Jurkat transfectants, p21<sup>Cip1</sup> expression in T-cell clones was also enhanced following treatment with 1F7 (Figure 4B). 1F7 effect of enhanced p21<sup>Cip1</sup> expression was also observed in PHA blast T-cells, albeit to a lesser degree, but not in resting T-cells. For this experiment, T-cell clones, 10-day PHA blast T-cells, and freshly isolated T-cells were incubated for 72 hours with media alone or 1F7. Cell lysates were then prepared for Western blotting with mAbs recognizing p21<sup>Cip1</sup>. Equal loading of cell extracts was confirmed using mAbs that recognize  $\beta$ -actin. These results indicate that in activated T-cells such as T-cell clones and PHA blast T-cells, T-cell proliferation was inhibited by the treatment of 1F7 via the induction of p21<sup>Cip1</sup>.

The inventors have demonstrated that anti-CD26 mAb 1F7 binding led to cell cycle arrest at the G1/S check point, and that engagement of CD26 induced G1 arrest on CD26 Jurkat

WO 02/092127

PCT/US02/14462

transfectants through enhanced expression of the cell cycle regulatory protein p21<sup>Cip1</sup>. This effect is mediated by activation of the MEK-ERK pathway. In addition to CD26 Jurkat transfectants, inhibition of proliferation and enhancement of p21<sup>Cip1</sup> expression was also observed in T-cell clones and PHA blast T-cells derived from human PBMC.

5 The antigen sensitivity of class II MHC-restricted human CD4+ T-cell clones is demonstrated to increase gradually with time after stimulation. This is manifest by requirement of less antigen in culture, as well as decreased numbers of peptide-MHC complexes per antigen-presenting cells (APC) for T-cell activation, and increased resistance to inhibition by class II MHC blockade (Lehaman *et al.*, 1989). It was previously demonstrated that the increase in  
10 antigen sensitivity was accompanied by increased cell-surface expression of CD26, LFA-1 and VLA-1, whereas the expression of TCR and a series of other T-cell surface molecules remains unchanged (Falcioni *et al.*, 1996). The present invention also demonstrates that the late-memory T-cell phenotype occurs among T-cells activated *in vivo*. Moreover, using appropriate mAbs, treatment by CD26 mAb with MHC blockade is demonstrated to contribute to inhibition of  
15 proliferation of activated memory T-cells (Falcioni *et al.*, 1996). Furthermore, the molecular mechanism of the inhibitory effect of T-cell proliferation by anti-CD26 mAb has been shown to be via cell cycle arrest at G1/S check point and induction of p21<sup>Cip1</sup> by activation of MEK-ERK pathway.

In addition, CD26 molecules in T-cells exist in membrane lipid rafts, hence, cross-linking  
20 of CD26 with anti-CD26 mAbs induces aggregation of CD26 molecules into lipid rafts. This process results eventually in the activation of T-cells through tyrosine phosphorylation of signaling molecules, such as Cbl, ZAP-70, ERK, p56<sup>Lck</sup> and CD3-zeta (Ishii *et al.*, 2001). TCR also exerts its signaling effects through the recruitment of various surface and cytosolic adapter proteins into lipid rafts (Janes *et al.*, 1999; Cheukuri *et al.*, 2001). As negative regulators of  
25 TCR signaling, Rap1, Raf and Cbl-b have been shown to aggregate in lipid rafts (Boussiotis *et al.*, 1997; Sewing *et al.*, 1997; Leo and Schraven, 2001). Relating to this point, it has been demonstrated that increased intensity of Raf-MEK-ERK signaling can elicit T-cell cycle arrest at G1/S check point associated with an increase in the expression of p21<sup>Cip1</sup>. Meanwhile, high dose of anti-CD3 mAb induced cell cycle arrest by activating the Raf-MEK-ERK pathway, leading to  
30 the expression of p21<sup>Cip1</sup> in T-cells and a failure to down-regulate the expression of p27<sup>Kip1</sup> (Sewing *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999).

Accumulating evidence suggests that DPPIV enzyme activity plays an essential role in CD26-mediated T-cell costimulation as well as T-cell immune responses (Morimoto and Schlossman, 1998; von Bonin *et al.*, 1998; De Meester *et al.*, 1999). The present invention shows

WO 02/092127

PCT/US02/14462

that DPPIV enzyme activity plays a role in the induction of p21<sup>Cip1</sup> following treatment of T-cells with the anti-CD26 mAb 1F7. It is reported that CD26/DPPIV regulates various cellular functions by cleaving selected chemokines at the N-terminus to modify their biological functions (De Meester *et al.*, 1999; Oravecz *et al.*, 1997; Proost *et al.*, 1998). In view of its ability to cleave certain biological factors as a serine protease, it is conceivable that DPPIV enzyme activity of CD26 appears to regulate phosphorylation of ERK and induction of p21<sup>Cip1</sup> through cleavage of relevant biological factors in T-cells. Experiments aimed at identifying the CD26/DPPIV-associated factors responsible for regulating the expression of p21<sup>Cip1</sup> are contemplated.

The finding that 1F7 has a more potent effect than 5F8 demonstrated that engagement of selected epitopes of CD26 is an important factor in mediating cell cycle arrest, inhibiting cell proliferation and inducing p21<sup>Cip1</sup> expression following mAb treatment. It should also be noted that 1F7 has a strong co-mitogenic capacity whereas 5F8 has no such activity (Dong *et al.*, 1998). Thus, the epitopes recognized by 1F7 and 5F8 on the CD26 molecule have distinct functional effects.

Activated memory T-cells express high levels of CD26, and this phenotype of late-memory T-cells is associated with both *in vivo* and *in vitro* increased antigen sensitivity (Falcioni *et al.*, 1996). *In vivo* studies revealed that a large number of CD26+ T-cells are found in inflamed tissues of patients with multiple sclerosis and rheumatoid arthritis (Mizokami *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1989; Hafler *et al.*, 1985), indicating that CD26+ T-cells function as effector T-cells. Thus, CD26 is useful as an immunotherapy agent. In fact, anti-CD26 treatment was reported to be effective in decreasing the incidence of steroid-resistant acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation (Bacigalupo *et al.*, 1985; De Meester *et al.*, 1993), although the precise mechanism involved in these clinical results is not yet elucidated. The present data indicate that cell cycle regulation of activated T-cells via CD26 is useful for controlling acute GVHD by inhibiting cellular proliferation. Taken together with the observation that transfection of p21 gene enhanced cyclosporin A-mediated inhibition of lymphocyte proliferation (Ashwani *et al.*, 2000), anti-CD26 mAb therapy provides an alternative strategy to induce immunosuppression, one that is potentially less toxic than the side effects currently seen with conventional agents.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

**EXAMPLE 3****Clinical Trials**

This section is concerned with the development of human treatment protocols for anticancer therapy using the anti-CD26 antibodies either alone or in combination with other therapeutic agents. Although only cancer related treatments are described here, this Example, is also applicable to the treatment of immune diseases such as autoimmunity, GVHD, and prevention of organ transplant rejection reactions.

The various elements of conducting a clinical trial, including patient treatment and monitoring, will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. The following information is being presented as a general guideline for use in establishing the anti-CD26 antibody based therapies described herein alone or in combinations with other adjunct treatments used routinely in cancer therapy in clinical trials.

Candidates for the phase 1 clinical trial will be patients on which all conventional therapies have failed. Approximately 100 patients will be treated initially. Their age will range from 16 to 90 (median 65) years. Patients will be treated, and samples obtained, without bias to sex, race, or ethnic group. For this patient population of approximately 41% will be women, 6% will be black, 13% Hispanic, and 3% other minorities. These estimates are based on consecutive cases seen at MD Anderson Cancer Center over the last 5 years.

Optimally the patient will exhibit adequate bone marrow function (defined as peripheral absolute granulocyte count of  $> 1,000/\text{mm}^3$  and platelet count of  $100,000/\text{mm}^3$  (unless decreased due to tumor involvement in the marrow), adequate liver function (bilirubin  $\leq 1.5\text{mg/dl}$ , SGOT/SGPT  $< 4\times$  Upper Limit of Normal) and adequate renal function (creatinine  $\leq 1.5\text{mg/dl}$ ).

Research samples will be obtained from peripheral blood or marrow under existing approved projects and protocols. Some of the research material will be obtained from specimens taken as part of patient care.

The anti-CD26 antibody treatments described above will be administered to the patients regionally or systemically on a tentative weekly basis. A typical treatment course may comprise about six doses delivered over a 7 to 21 day period. Upon election by the clinician the regimen may be continued with six doses every three weeks or on a less frequent (monthly, bimonthly, quarterly, *etc.*) basis. Of course, these are only exemplary times for treatment, and the skilled practitioner will readily recognize that many other time-courses are possible.

The modes of administration may be local administration, including, by intratumoral injection and/or by injection into tumor vasculature, intratracheal, intrathecal, endoscopic,

WO 02/092127

PCT/US02/14462

subcutaneous, and/or percutaneous. The mode of administration may be systemic, including, intravenous, intra-arterial, intra-peritoneal and/or oral administration.

The anti-CD26 antibody will be administered at dosages in the range of of 1  $\mu\text{g/kg}$  to 1 g/kg intravenously, although exact dosage will depend on subsequent testings. In some embodiments the antibodies are administered as liposomal formulations or potentially via other artificial carriers. Antibodies may also be administered as inactive moieties to be activated upon encountering CD26 expressing tumor cells. For example, a liposomal formulation of the antibody is administered a range of 0.01 to 100 mg/m<sup>2</sup>/day intravenously. Of course, the skilled artisan will understand that while these dosage ranges, provide useful guidelines appropriate adjustments in the dosage depending on the needs of an individual patient factoring in disease, gender, performance status, age and other general health conditions will be made at the time of administration to a patient by a trained physician. The same is true for means of administration, routes of administration as well.

To monitor disease course and evaluate the cancer cell killing it is contemplated that the patients should be examined for appropriate tests every month. To assess the effectiveness of the drug, the physician will determine parameters to be monitored depending on the type of cancer/tumor and will involve methods to monitor reduction in tumor mass by for example computer tomography (CT) scans, PET scans, gallium scans, detection of the presence of the CD26 antigen on cell surface and in serum, and in some cases the additional detection of other tumor markers such as PSA (prostate specific antigen) in prostate cancer, HCG in germ tumor, CEA in colon cancer, CA125 in ovarian cancer, LDH and B2 microglobulin in lymphomas, and the like. Tests that will be used to monitor the progress of the patients and the effectiveness of the treatments include: physical exam, X-ray, blood work, bone marrow work and other clinical laboratory methodologies. The doses given in the phase 1 study will be escalated as is done in standard phase 1 clinical phase trials, i.e. doses will be escalated until maximal tolerable ranges are reached.

Clinical responses may be defined by acceptable measure. For example, a complete response may be defined by complete disappearance of the cancer cells whereas a partial response may be defined by a 50% reduction of cancer cells or tumor mass.

The typical course of treatment will vary depending upon the individual patient and disease being treated in ways known to those of skill in the art. For example, a patient with T-cell lymphoma might be treated in four week cycles. The duration of treatment will similarly be varied, although potentially longer duration may be used if no adverse effects are observed with the patient, and shorter terms of treatment may result if the patient does not respond or suffers from intolerable toxicity.



WO 02/092127

PCT/US02/14462

\*\*\*\*\*

All of the compositions and/or methods disclosed and claimed herein can be made and  
5 executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the  
compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred  
embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the  
compositions and/or methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described  
herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically,  
10 it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may  
be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be  
achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are  
deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended  
claims.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

5

U.S. Patent No. 3,817,837

U.S. Patent No. 3,850,752

10

U.S. Patent No. 3,939,350

U.S. Patent No. 3,996,345

0

U.S. Patent No. 4,196,265

U.S. Patent No. 4,275,149

15

U.S. Patent No. 4,277,437

U.S. Patent No. 4,340,535

U.S. Patent No. 4,366,241

5

U.S. Patent No. 4,472,509

U.S. Patent No. 4,676,980

U.S. Patent No. 4,816,567

U.S. Patent No. 4,867,973

U.S. Patent No. 5,021,236

10

U.S. Patent No. 5,120,642

U.S. Patent No. 5,565,332

U.S. Patent No. 5,693,762

U.S. Patent No. 6,218,372

U.S. Patent No. 6,218,372

15

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.

30

Ashwani *et al.*, *J Immunol.* 165:1882-1888, 2000.Bacigalupo *et al.*, *Acta haematol.* 73:185-186, 1985.Bauvois *et al.*, *Br. J. Cancer*, 79:1042-1048, 1999.Boussiotis *et al.*, *Science*, 278:124-127, 1997.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

- 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.
- 5 Carbone *et al.*, *Blood*, 86:4617-4626, 1995.
- Carbone *et al.*, *Human Pathol.*, 25:1360-1365, 1994.
- Chen *et al.*, *J Immunol.*, 163:5796-5805, 1999.
- Cheukuri *et al.*, *Immunity*, 2001;14: 657-660.
- Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628, 1991.
- 10 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. Immunol.*, 145:3963-3971, 1990.
- Dang *et al.*, *J. Immunol.*, 147:2825-2832, 1991.
- 15 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.
- 20 Eguchi *et al.*, *J Immunol.*, 142:4233-4240, 1989.
- Eguchi *et 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
- 25 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.
- Geffer *et al.*, *Somatic Cell Genet*, 3(2):231-6, 1977.
- 30 Gerli *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 80:31-37, 1996.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and 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.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

- Hafler *et al.*, *J Experi. Med.*, 167:1313-1322, 1988.
- Hafler *et al.*, *N Engl J Med.*, 312: 1405-1411, 1985.
- Hafler *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 312:1405-1411, 1985.
- Hansen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 119:203-210, 1989.
- 5 Hegen *et al.*, *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 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255, 1993.
- James *et al.*, *J Cell Biol.* 147: 447-461, 1999.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 Lehaman *et al.*, *Eur J Immunol.* 19:1071-1077, 1989.
- Leo and Schraven, *Curr Opin Immunol.* 13:307-316, 2001.
- Marks *et al.*, *Bio/Technol.* 10, 779-783, 1992.
- Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222, 581-597, 1991.
- Mattern *et al.*, *Immunobiol.*, 188:36-50, 1993.
- 25 McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-553 [1990]
- Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539 (1983).
- Mizokami *et al.*, *J Rheumatol.* 23:2022-2026, 1996.
- Mizokami *et al.*, *J. Rheumatol.*, 23:2022-2026, 1996.
- Morimoto and Schlossman, *Immunol. Rev.*, 161:55-70, 1998.
- 30 Morimoto *et al.*, *Immunol Rev.* 161:55-70, 1998.
- Morimoto *et al.*, *J. Immunol.*, 143:3430-3439, 1989.
- Morimoto *et al.*, *J Immunol.*, 134: 3762-3769, 1985.
- Morrison *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177:1135-1143, 1993.
- Morton *et al.*, *Cancer*, 71:3737-3743, 1993.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

- Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4<sup>th</sup> 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.
- 5 PCT Application WO 91/00360
- PCT Application WO 92/200373
- PCT Application WO 93/08829
- Proost *et al.*, *J Biol Chem*. 273:7222-7227, 1998.
- Proost *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:7222-7227, 1998.
- 0 Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*" 15th Edition, pages 1035-1038 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.
- 5 Sabzevari *et al.*, *Eur J Immunol*. 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 Enzymology* 121, 210, 1986.
- Tanaka *et al.*, *Int. J. Cancer*, 64:326-331, 1995.
- 10 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.
- 25 Traunecker *et al.*, *EMBO* 10, 3655-3659, 1991.
- Verhoeven *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.
- 30 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.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

CLAIMS

1. A method of treating a patient having a cancer that expresses CD26 comprising administering to said patient, a pharmaceutical formulation comprising an anti-CD26 antibody, whereby the anti-CD26 antibody binds CD26 and arrests cell cycle.
2. The method of claim 1, further comprising detecting cell cycle arrest.
3. The method of claim 1, wherein the anti-CD26 antibody is a polyclonal antibody.
4. The method according to claim 1, wherein the antibody was prepared against a recombinantly produced CD26 protein, a CD26 fusion protein, a purified CD26 protein, a partially purified CD26 protein or a naturally occurring CD26 protein.
5. The method of claim 1, wherein the anti-CD26 antibody is a monoclonal antibody.
6. The method of claim 5, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 1F7, 5F8, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, or 16D4B.
7. The method of claim 5, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 1F7.
8. The method of claim 5, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 5F8.
9. The method of claim 5, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is secreted from hybridoma HB 10297 deposited at the American Type Culture Collection (ATCC).
10. The method according to claim 5, wherein the monoclonal antibody is humanized.
11. The method of claim 1, wherein the anti-CD26 antibody is an unconjugated antibody.
12. The method of claim 1, wherein the anti-CD26 antibody is conjugated to a chemotherapeutic agent, a radionuclide, an imaging agent, a toxin, a biological agent, an enzyme inhibitor, or a second antibody.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

13. The method of claim 12, wherein the enzyme inhibitor is an adenosine deaminase inhibitor, or a dipeptidyl peptidase IV inhibitor.
14. The method of claim 1, wherein the cancer is a T-cell cancer, a B-cell cancer, a hematological cancer, a thyroid cancer, a T-cell lymphoma, a lung adenocarcinoma, a thyroid carcinoma, a melanoma, a B-cell lymphoma, a breast cancer, an ovarian cancer, a pancreatic cancer, a prostate cancer, a colon cancer, a bladder cancer, a lung cancer, a liver cancer, a stomach cancer, a testicular cancer, a uterine cancer, a brain cancer, a lymphatic cancer, a skin cancer, a bone cancer, a rectal cancer, or a sarcoma.
15. The method of claim 14, wherein the T-cell cancer is a T-cell lymphoma, a lymphoblastic lymphoma, an acute lymphoblastic leukemia, a T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, a peripheral T-cell lymphoma, a T-cell chronic lymphocytic leukemia, an angioimmunoblastic T-cell lymphoma, an angiocentric T-cell lymphoma, an HTLV-related T-cell leukemia, or an adult T-cell leukemia.
16. The method of claim 14, wherein the B-cell cancer is a B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma.
17. The method of claim 1, further comprising treating the patient with a second agent, wherein the second agent is a therapeutic polypeptide, a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide, a chemotherapeutic agent, an immunotherapeutic agent, a radiotherapeutic agent, a cytokine, a chemokine, an activating agent, or a biological response modifier.
18. The method of claim 17, wherein the second agent is administered simultaneously with the anti-CD26 antibody.
19. The method of claim 17, wherein the second agent is administered at a different time than the anti-CD26 antibody.
20. The method of claim 1, wherein the cancer is characterized by tumor formation in said patient.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

21. The method of claim 1, wherein the administering is intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intradermal, intratumoral, intramuscular, subcutaneous, intraarthricular, intrathecal, oral, dermal, nasal, buccal, rectal, or vaginal.
- 5 22. A method of treating a patient having a cancer comprising, induction of CD26 expression in cells of said cancer, and administering to said patient a pharmaceutical formulation comprising an anti-CD26 antibody, whereby the anti-CD26 antibody binds CD26 and arrests cell cycle.
- 10 23. The method of claim 22, wherein the induction of CD26 expression in cells of said cancer is by contacting the cells with a biological factor.
- 15 24. The method of claim 23, wherein the biological factor is a cytokine, a chemokine, a retinoid, an interferon, a chemotherapeutic agent, an antibody, or an antigen.
- 25 25. The method of claim 22, wherein the induction of CD26 expression in said cancer cells is by contacting the cells with a chemical agent.
- 20 26. A method of treating a patient having a cancer that expresses CD26 comprising, administering to said patient, a pharmaceutical formulation comprising an anti-CD26 antibody, whereby the anti-CD26 antibody binds CD26 and inhibits growth of cells comprising said cancer.
- 25 27. The method of claim 26, further comprising detecting inhibition of cell growth.
28. A method of inducing tumor regression comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an anti-CD26 antibody.
- 30 29. A method of inducing tumor necrosis comprising administering to a patient in need thereof a composition comprising an anti-CD26 antibody.
- 30 30. A method for increasing p21 expression in a CD26+ cell comprising contacting the cell with an anti-CD26 antibody.
- 35 31. The method of claim 30, wherein the CD26+ cell is a cancer cell.



WO 02/092127

PCT/US02/14462

32. The method of claim 31, wherein the cancer cell is a hematological cancer cell, a T-cell cancer cell, a B-cell cancer cell, a thyroid cancer cell, a breast cancer cell, an ovarian cancer cell, a pancreatic cancer cell, a prostate cancer cell, a colon cancer cell, a bladder cancer cell, a lung cancer cell, a liver cancer cell, a stomach cancer cell, a testicular cancer cell, an uterine cancer cell, a brain cancer cell, a lymphatic cancer cell, a skin cancer cell, a bone cancer cell, a rectal cancer cell, or a sarcoma cell.
33. The method of claim 31, wherein the cancer cell is a T-cell lymphoma cell, a lung adenocarcinoma cell, a thyroid carcinoma cell, a melanoma cell, a B-cell chronic lymphocytic leukemia, or a B-cell lymphoma.
34. The method of claim 33, wherein the T-cell lymphoma is a lymphoblastic lymphoma, an acute lymphoblastic leukemia, a T-cell CD30+ anaplastic large cell lymphoma, a peripheral T-cell lymphoma, a T-cell chronic lymphocytic leukemia, an angioimmunoblastic T-cell lymphoma, an angiocentric T-cell lymphoma, an HTLV-related T-cell leukemia, or an adult T-cell leukemia.
35. The method of claim 30, wherein the anti-CD26 antibody is a polyclonal antibody.
36. The method of claim 30, wherein the anti-CD26 antibody is a monoclonal antibody.
37. The method of claim 36, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is secreted from hybridoma HB 10297 deposited at the American Type Culture Collection (ATCC).
38. The method of claim 36, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 1F7, 5F8, 10F8A, 12E3B, 14D10, 2F9, 4G8, 11H9, 18H3A, 9C11, or 16D4B.
39. The method of claim 36, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 1F7.
40. The method of claim 36, wherein the anti-CD26 monoclonal antibody is 5F8.
41. The method according to claim 36, wherein the monoclonal antibody is humanized.

WO 02/092127

PCT/US02/14462

42. The method of claim 30, wherein the anti-CD26 antibody is an unconjugated antibody.

43. The method of claim 30, wherein the anti-CD26 antibody is further attached to a  
chemotherapeutic agent, a radionuclide, an imaging agent, a toxin, a biological agent, an enzyme  
5 inhibitor, or a second antibody.

44. The method of claim 43, wherein the enzyme inhibitor is an adenosine deaminase  
inhibitor, or a dipeptidyl peptidase IV inhibitor.

WO 02/092127

1/12

PCT/US02/14462

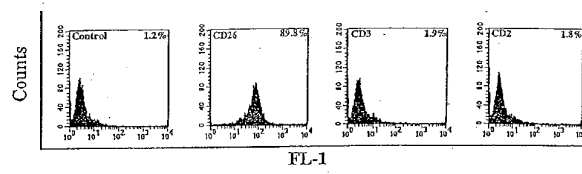
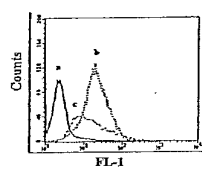


FIG. 1A

WO 02/092127

2/12

PCT/US02/14462

**FIG. 1B**

WO 02/092127

3/12

PCT/US02/14462

A

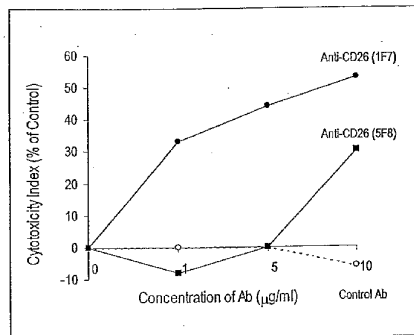


FIG. 2A

WO 02/092127

4/12

PCT/US02/14462

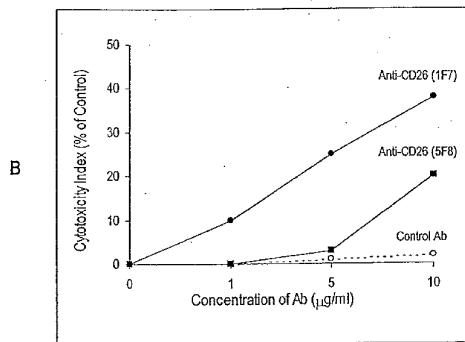


FIG. 2B

WO 02/092127

5/12

PCT/US02/14462

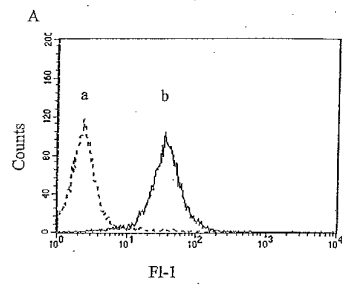


FIG. 3A

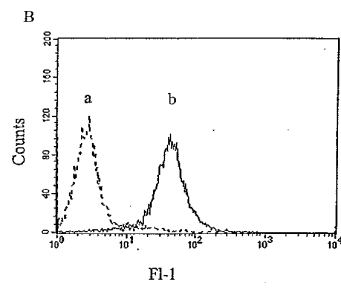


FIG. 3B

WO 02/092127

6/12

PCT/US02/14462

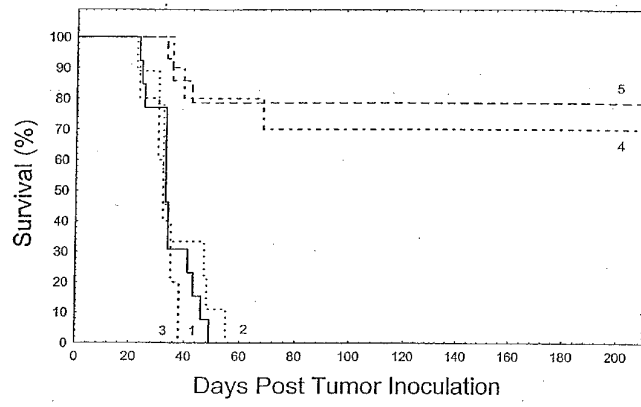


FIG. 4A



WO 02/092127

7/12

PCT/US02/14462

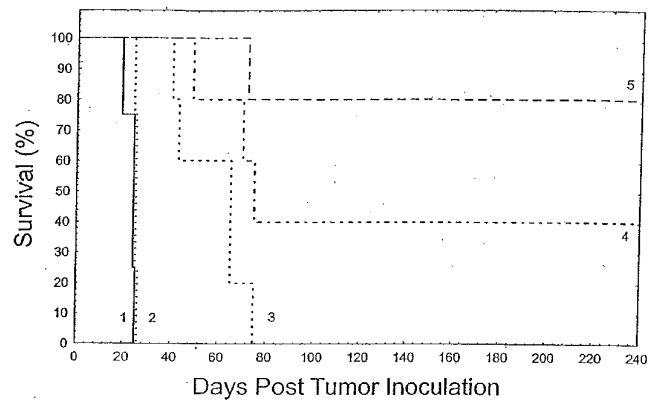


FIG. 4B

WO 02/092127

8/12

PCT/US02/14462

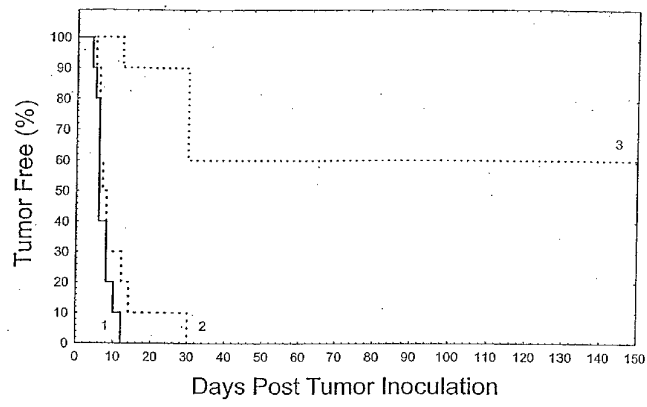


FIG. 5

WO 02/092127

9/12

PCT/US02/14462

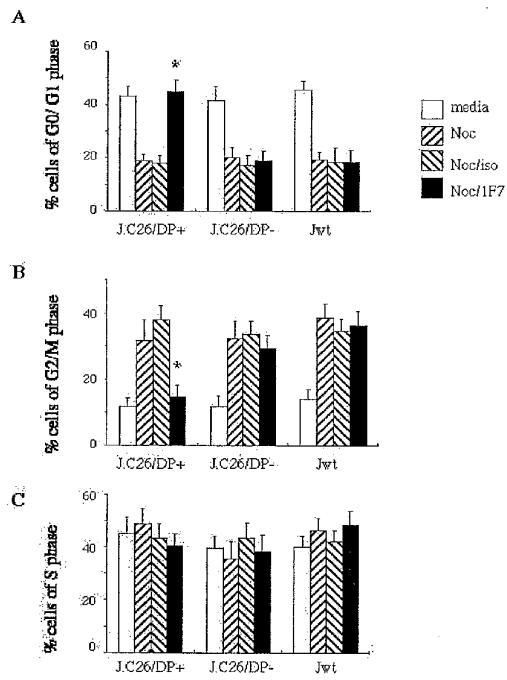


FIG. 6A, 6B, 6C

WO 02/092127

10/12

PCT/US02/14462

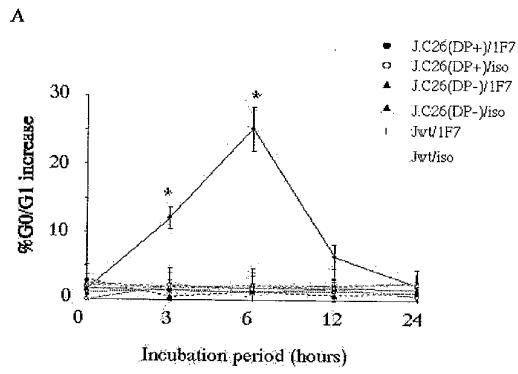


FIG. 7

WO 02/092127

11/12

PCT/US02/14462

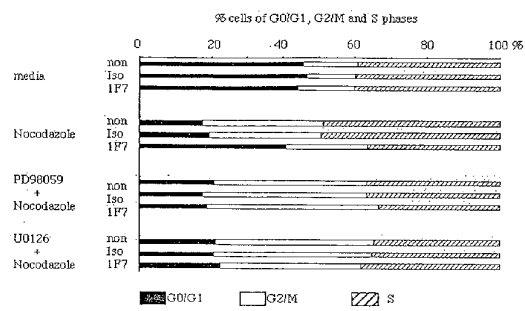


FIG. 8

WO 02/092127

12/12

PCT/US02/14462

A

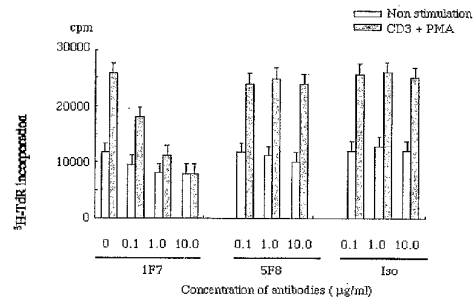


FIG. 9

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/14492
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K39/395 US CL : 424/130.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WEST search terms: cancer or tumor, antibodies, edos, dipeptidyl peptidase		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	HO, L. In vitro and In vivo Antitumor Effect of the Anti-CD26 Monoclonal Antibody 1F7 on Human CD30+ Anaplastic large Cell T-Cell Lymphoma Karpas 299. Clin. Cancer REsearch. July 2001, Vol. 7, pages 2031-2040, see entire document.	1-44
X,P	WO 01/74299 A2 (RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 11 October 2001 (11-10-01), see abstract.	1-44
X,P	WO 01/04610 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 17 January 2002 (17-01-02), see abstract.	1-44
X,P	WO 01/31134 A2 (FERRING BV) 18 April 2002 (18-04-02) see abstract.	1-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel, or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"G" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 JULY 2002	Date of mailing of the international search report 07 AUG 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (705) 905-9250	Authorized officer SHEELA J HUFF Telephone No. (705) 906-0198	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/14402
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTTERN T. AntiCD26 Monoclonal Antibodies Can Reversibly Arrest Human T Lymphocytes in the Late G1 Phase of the Cell Cycle. Immunobiology. 1993, Vol. 169, pages 56-60, see abstract.	1-44



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 K 43/00	
	A 6 1 K 37/66	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ダン , ナム エイチ .

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 0 5 , ヒューストン , マーロウ 4 1 0 1

(72)発明者 森本 幾夫

東京都世田谷区松原 5 - 2 5 - 1 6

(72)発明者 シュロスマン , スチュアート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9 , ニュートン センター , ワン フォックス  
プレイス

F ターム(参考) 4C084 AA17 AA22 DA01 DA21 MA16 MA66 NA14 ZB262 ZC201 ZC231

4C085 AA11 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 AA27 BB01 CC22 CC23

EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10