



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월07일
(11) 등록번호 10-2693317
(24) 등록일자 2024년08월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7029169
- (22) 출원일자(국제) 2019년03월13일
심사청구일자 2022년03월14일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월12일
- (65) 공개번호 10-2020-0132915
- (43) 공개일자 2020년11월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2019/052042
- (87) 국제공개번호 WO 2019/175802
국제공개일자 2019년09월19일
- (30) 우선권주장
62/642,313 2018년03월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2014525899 A
WO2016201425 A1
WO2017049228 A1

- (73) 특허권자
폰다시온 파라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈 유니베르시타리오 라 파즈
스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나 261 플라타-1
폰다시온 델 섹토르 푸블리코 에스타탈 센트로 나시오날 데 인베스티가시오네스 온콜로지카스 카를로스 3 (에프.에스.피 씨엔아이오)
스페인 28029 마드리드 멜코르 페르난데즈 알마그로 3
- (72) 발명자
벨라 쿠엔카, 마리아
스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나 261 에디피시오 노르테(안티구오 에디피시오 에스 쿠엘라 데 엔페르메라스)4에이 플라타 폰다시온 파라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈 유니베르시타리오 라 파즈 내
곤잘레즈 나바로, 파블로
스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나 261 에디피시오 노르테(안티구오 에디피시오 에스 쿠엘라 데 엔페르메라스)4에이 플라타 폰다시온 파라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈 유니베르시타리오 라 파즈 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준

전체 청구항 수 : 총 19 항

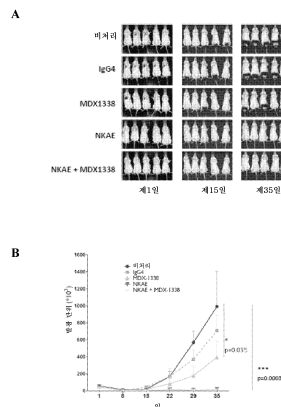
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 암 면역요법을 위한, 활성화되고 확장된 자연 킬러 세포와 조합된 항-CXCR4 항체

(57) 요약

본 개시내용은 암을 앓는 대상체에게 치료 유효량의, 자연 킬러 (NK) 세포, 바람직하게는 활성화되고 확장된 NK (NKAE) 세포의 단리된 집단, 및 암 세포의 표면 상에 발현된 C-X-C 케모카인 수용체 4 (CXCR4)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 조합을 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

발렌틴 퀴로가, 자이메

스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나
261 에디피시오 노르테(안티구오 에디피시오 에스
쿠엘라 데 엔페르메라스)4에이 플란타 푼다시온 파
라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈
우니베르시타리오 라 파즈 내

에스쿠데로 로페즈, 아델라

스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나
261 에디피시오 노르테(안티구오 에디피시오 에스
쿠엘라 데 엔페르메라스)4에이 플란타 푼다시온 파
라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈
우니베르시타리오 라 파즈 내

페르난데즈 카사노바, 루시아

스페인 28029 마드리드 마드리드 칼레 벨코르 페르
난데즈 알마그로 3 스페니쉬 내셔널 캔서 리서치
센터 (씨엔아이오)) 내

페레즈 마르티네즈, 안토니오

스페인 28046 마드리드 파세오 데 라 카스텔라나
261 에디피시오 노르테(안티구오 에디피시오 에스
쿠엘라 데 엔페르메라스)4에이 플란타 푼다시온 파
라 라 인베스티가시온 바이오메디카 델 호스피탈
우니베르시타리오 라 파즈 내

명세서

청구범위

청구항 1

치료 유효량의

(a) 자연 킬러 (NK) 세포의 단리된 집단; 및

(b) 암 세포의 표면 상에 발현된 C-X-C 케모카인 수용체 4 (CXCR4)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분

의 조합을 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2

암 세포의 표면 상에 발현된 C-X-C 케모카인 수용체 4 (CXCR4)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 치료 유효량을 포함하는 제약 조성물과 함께 조합하여 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한, 자연 킬러 (NK) 세포의 단리된 집단의 치료 유효량을 포함하는 제약 조성물.

청구항 3

자연 킬러 (NK) 세포의 단리된 집단의 치료 유효량을 포함하는 제약 조성물과 함께 조합하여 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한, 암 세포의 표면 상에 발현된 C-X-C 케모카인 수용체 4 (CXCR4)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 치료 유효량을 포함하는 제약 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포의 집단이 활성화되고 확장된 NK (NKAE) 세포를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, NKAE 세포가 NK 세포를 피더 세포와 함께 조합하여 IL-2, IL-12, IL-15, 및/또는 IL-21로 자극함으로써 생산되는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, NKAE 세포가 건강한 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포를 (i) 막-결합된 형태의 인터류킨-15 (IL-15) 및 41BB 리간드를 발현하도록 변형된 방사선조사된 β -림프모구성 세포, 및 (ii) 인터류킨-2 (IL-2)와 함께 공동배양함으로써 생산되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 변형된 β -림프모구성 세포가 K562-mb15-41BBL 세포인 제약 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포가 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 척수강내 주사, 또는 종양 절제 공동 내로의 주사에 의해 대상체에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 약 10^6 내지 약 10^{14} 개 범위의 용량의 상기 NK 세포가 매주 대상체에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 하기 특징 중 하나 이상을 나타내는 것인 제약 조성물:

- (a) 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분임;
- (b) 인간 CXCR4 수용체에 결합하고, 여기서 대상체는 인간임;
- (c) 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 결정 시, 약 1×10^{-8} M 이하의 K_D 로 암 세포의 표면 상의 CXCR4에 결합함;
- (d) CXCR4와 C-X-C 모티프 케모카인 12 (CXCL12) 사이의 상호작용을 붕괴시키고, CXCR4/CXCL12 신호전달을 억제함;
- (e) 약 30 nM 미만의 EC_{50} 으로 CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제함;
- (f) 약 1 nM 미만의 EC_{50} 으로 CXCR4 발현 세포에서 CXCL12-유도된 칼슘 유입을 억제함;
- (g) 약 20 nM 미만의 EC_{50} 으로 CXCR4 발현 세포의 CXCL12-유도된 이동을 억제함;
- (h) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제함;
- (i) CXCR4 발현 세포에서 아포토시스를 유도함;
- (j) 시험관내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 증식을 억제함;
- (k) 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포 증식을 억제하고/거나 CXCR4⁺ 종양 세포 아포토시스를 유도함;
- (l) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제함;
- (m) CXCR4⁺ 종양-보유 대상체의 생존 기간을 증가시킴;
- (n) 인간 CXCR4에의 결합에 대해 울로쿠플루맙과 교차-경쟁함;
- (o) 울로쿠플루맙이 결합하는 것과 실질적으로 동일한 인간 CXCR4 에피토프에 결합함;
- (p) 키메라, 인간화 또는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 부분임;
- (q) 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 이소타입의 중쇄 불변 영역을 포함함;
- (r) 울로쿠플루맙 또는 그의 항원-결합 부분임;
- (s) 울로쿠플루맙의 인간 IgG1 변이체 또는 그의 항원-결합 부분임; 및
- (t) c414H5, c515H7, 항체 I, 6C7, 및 h3G10.A57.A58로 지정된 Ab로부터 선택되거나, 또는 그의 항원-결합 부분임.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 부분이 서열식별번호: 25에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 29에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 부분이 서열식별번호: 25 또는 33에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 29 또는 37에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 부분이 서열식별번호: 1에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 5에 기재된 서열을 갖는 연

속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, 서열식별번호: 9에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열식별번호: 13에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 17에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열식별번호: 21에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 고형 종양이고, 임의적으로 여기서 고형 종양이 소아 종양이고, 임의적으로 여기서 소아 종양이 횡문근육종, 골육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 유잉 육종인 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 고형 종양이 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 NSCLC, 비-편평 NSCLC, 편평 세포암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 췌장암, 췌장관 선암종 (PDAC), 난소암, 자궁경부암, 난관 암종, 자궁 (자궁내막) 암, 자궁내막 암종, 자궁 육종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 요도암, 요관암, 전립선암, 전이성 거세-저항성 전립선암 (mCRPC), 고환암, 음경암, 방광암, 유방암, 삼중 음성 유방암 (TNBC), 남성 유방암, 배세포 종양, 육종, 피부암, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 골암, 흑색종, 두경부암, 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 갑상선암, 경구암, 구강암, 타액선암, 인후암, 식도암, 위장암, 위암, 소장암, 담낭 및 담관 암, 결장직장암, 결장 암종, 직장암, 항문암, 간암, 간세포암종, 신장암, 신세포 암종, 내분비계암, 흉선 종양, 흉선종, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 중피종, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS) 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌암, 신경교종, 뇌간 신경교종, 교모세포종, 다형성 교모세포종 (GBM), 신경모세포종, 뇌하수체 선종, 표피양암, 소아기 고형 종양, 소아 육종, 전이성 암, 원발 부위 불명 암, 환경-유발 암, 바이러스-관련 암, AIDS-관련 암, 카포시 육종, 바이러스 기원의 암, 진행성, 불응성 및/또는 재발성 고형 종양, 및 상기 고형 종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암인 제약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 혈액 악성종양이고, 임의적으로 여기서 혈액 악성종양이 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 만성 림프모구성 백혈병 (CLL), 만성 골수 백혈병 (CML), 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 버킷 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종 (FL), 면역모세포성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종, 외투 세포 림프종, 균상 식육종, 역형성 거대 세포 림프종, 전구체 T 림프모구성 림프종, 부비동비강 자연 킬러/T 세포 림프종, 다발성 골수종 (MM), 골수이형성 증후군 (MDS), 무증상 골수종, 의미 불명 모노클로날 감마병증 (MGUS), 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양, 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분이

(a) 약 매주 1회 또는 2회, 약 매 2주마다 1회, 또는 약 매 3주마다 1회로 약 50 내지 약 2000 mg의 균일 용량으로;

(b) 약 매주 1회 또는 약 매 2주마다 1회로 약 200, 약 400, 약 800, 약 1600, 또는 약 2000 mg의 균일 용량으로; 및/또는

(c) 정맥내 또는 피하 투여에 의해 대상체에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) NK 세포 및 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 대상체에게 순차적으로 투여되거나;

(b) NK 세포가 항체 또는 그의 항원-결합 부분 전에 투여되거나;

- (c) 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 NK 세포 전에 투여되거나;
- (d) NK 세포 및 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 별개의 조성물로 공동으로 투여되거나; 또는
- (e) NK 세포 및 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 단일 조성물로 혼합되고 공동으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 19

하기를 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 키트:

- (a) 약 50 내지 약 2000 mg 범위의 하나 이상의 투여량의, 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분;
- (b) 약 10⁶ 내지 약 10¹⁴ 개 범위의 하나 이상의 투여량의, NKAE 세포의 집단; 및
- (c) 제4항의 제약 조성물 중의 항체 또는 그의 부분 및 NKAE 세포를 사용하는 것에 대한 설명서.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원 전반에 걸쳐 다양한 공개문헌이 괄호 안에 저자명 및 일자에 의해, 또는 특허 번호 또는 특허 공개 번호에 의해 참조된다. 이들 공개문헌에 대한 전체 인용문은 본 청구범위 바로 앞의 본 명세서 말미에서 살펴볼 수 있다. 이들 공개문헌의 개시내용은 본원에서 기재되고, 주장하는 본 발명의 발명일 당시, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 그 시점의 기술적 수준을 보다 상세하게 설명하기 위해 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다. 그러나, 이들 개시내용은 단지 인용된 정보와, 본원의 명백한 개시내용에 의해 제공되는 정보가 서로 상충하지 않는 정도로만 본 출원에 참조로 포함된다. 추가로, 본원에서의 참고문헌 인용은 상기 참고문헌이 본 발명에 대한 선행 기술임을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 2018년 3월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 62/642,313의 이익을 주장하며, 상기 가출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0004] 서열 목록

[0005] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. ASCII 카피는 2019년 3월 11일에 작성되었고, 파일명은 20190311_SEQ13108WOPCT.txt이며, 그 크기는 26,678 바이트이다.

[0006] 본 발명의 분야

[0007] 본 발명은 대상체에게 활성화되고 확장된 자연 킬러 (NKAE) 세포 면역요법과 함께 조합된 항-C-X-C 케모카인 수용체 4 (CXCR4) 항체 (Ab)를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0008] 암 세포의 원발성 종양으로부터 주변 조직으로 및 원위 기관으로의 확산인 전이는 암 이환 및 사망의 주요 원인이며, 암 사망의 약 90%의 원인이 되는 것으로 추정되고 있다 (Chaffer and Weinberg, 2011; Seyfried and

Huysentruyt, 2013). 육종은 주로 아동 및 청소년에서 발병되지만, 공격적인 치료에도 불구하고, 고품 종양, 예컨대 횡문근육종, 골육종, 유잉 육종, 및 신경모세포종을 가진 아동 중 거의 절반은 진행성 질환을 갖는다. 예후는 특히 전이성 질환을 가진 상기 환자의 경우에 불량하며, 그의 적어도 2/3는 질환 진행을 보인다 (Oberlin *et al.*, 2008; Heare *et al.*, 2009; Matthay *et al.*, 2009). 그러므로, 특히, 전이성 질환과 같이 고위험 특징을 보이는 환자를 위한, 약물 내성의 세포 메카니즘을 우회하는 새로운 치료적 접근법이 절실히 요구되고 있다.

[0009] 전이는, 전이성 세포의 국소 조직 침습, 순환에서의 그의 생존, 2차 기관으로의 "귀소" 및 혈관외유출, 및 전이 부위에서의 증식/성장을 포함하는 복잡한 다단계 프로세스이다 (Nguyen *et al.*, 2009). 종양 세포를 전이시킴으로써 발현되는 케모카인 수용체와 상호작용하는 케모카인은 세포의 2차 기관 방향으로의 이동을 지시하는데 있어 중요한 역할을 한다. 이는 케모카인 CXCL12 및 그의 수용체인 CXCR4에 대하여 문서상으로 잘 입증되어 있다. 뮐러(Mueller)와 동료들은 처음에 암 전이에서의 CXCL12-CXCR4 귀소 축을 가정하고, 그를 발견하였다 (Mueller *et al.*, 2001). 그들은 CXCR4를 발현하는 유방암 세포는 CXCL12를 풍부하게 발현하는 폐의 단백질 추출물 방향으로 우선적으로 이동하였다는 것을 입증하였다.

[0010] 본원에서는 암 환자에게 NKAE 세포 요법과 함께 조합하여 항-CXCR4 Ab를 투여하는 것을 포함하는, 전이성 암을 비롯한, 암을 치료하는 신규한 면역요법적 접근법을 개시한다.

[0011] CD184로도 공지되어 있는 CXCR4는 대다수의 인간 암에서 과다발현되는 7-막횡단 도메인, G-단백질 커플링, 세포 표면 수용체이고, 그의 내인성 리간드인 CXCL12와 함께, 종양 성장 및 증식, 부착, 침습, 전이, 혈관신생 및 생존에 기여하는 것을 포함하여, 암 발병기전에서 근본적인 역할을 한다 (Domanska *et al.*, 2013; Duda *et al.*, 2011; Balkwill, 2004; Pitt *et al.*, 2015; Passoro *et al.*, 2015; WO 2008/060367). CXCL12의 CXCR4에의 결합이 세포내 칼슘 유입을 자극하고, AKT 및 ERK 신호전달 경로를 활성화시키고, 국소 부착 형성을 상향조절하여, 최종적으로는 국소적으로 발현 및 분비된 케모카인의 구배를 따른 이동을 증가시킨다 (Chatterjee *et al.*, 2014). 이는 또한 세포 생존 및 증식을 촉진시키는 유전자 전사를 유도한다. CXCR4는 다양한 조직에서 발견되며, 대개는 B 및 T 세포, 단핵구, 대식세포, 자연 킬러 (NK), 및 수지상 세포를 비롯한 조혈 계통 세포 뿐만 아니라, CD34⁺ 골수 전구 세포 상에서 발현된다 (Lee *et al.*, 1999).

[0012] 울로쿠플루맙 (이전에 BMS-936564 또는 MDX-1338로 지정되고, WO 2008/060367에서 F7GL로 명명됨)은 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 완전한 인간 IgG4 (S224P) 모노클로날 항체 (mAb)이다. 울로쿠플루맙은 각각 서열식별번호 (SEQ ID NO): 33 및 37로서 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 V_L 영역을 포함한다. 울로쿠플루맙에 의한 CXCR4 신호전달 차단이 종양-기질 상호작용을 붕괴할 수 있고, 세포독성체에 대해 종양 세포를 감작시킬 수 있고, 전이 부담을 감소시킬 수 있다. 추가로, 울로쿠플루맙은 직접적으로 CXCR4 발현 종양 세포의 종양 성장 및 증식을 억제하고, 상기 세포의 아포토시스를 유도한다 (WO 2008/060367; WO 2013/071068; Kuhne *et al.*, 2013).

[0013] 종양 세포를 인식하고 사멸시키는 면역 세포의 공지된 잠재능이 항암 치료에서의 그의 잠재적인 역할을 제안하며, 이는 최근 킬러 T 세포의 세포독성을 증강시키는 체크포인트 억제제의 개발로 실현되었다 (Chen and Mellman, 2013; Lesokhin *et al.*, 2015). 자연 킬러 (NK) 세포는 면역 및 숙주 면역 감시 시스템에 수반되는 단핵성 림프구의 하위-집단이다. 그의 생물학적 특성은 "자기" 구조적합성 복합체 (MHC)/인간 백혈구 항원 (HLA) 단백질을 발현하지 못하는 세포, 및/또는 종양 세포 또는 NK 수용체를 활성화시키기 위해 리간드를 발현하는 다른 이환된 세포를 표적화하고 사멸시키는 것을 포함한다. 건강한 세포에 대해서는 관용을 유지시키면서, 선행 면역화 또는 활성화에 대한 필요 없이, 암 줄기 세포 및 유전독성 방식으로 변경된 세포를 정확하게 표적화하고 사멸시키는 상기 세포의 능력을 통해 세포는 전이를 비롯한 모든 암 형태에 대해 관심의 대상이 되는 치료적 이펙터가 된다 (Vivier *et al.*, 2011). 추가로, 화학요법 약물 및 국소 방사선조사와 함께 수행된 그의 조합이 면역 관용을 파괴하고, 입양 세포 요법에 바람직한 미세환경을 생성하는데 도움이 되는 것으로 보고되었다 (Zheng *et al.*, 2015). 그러나, NK 세포 활성화는 자극성 신호 및 억제성 신호 둘 다를 수반하는 복잡한 메카니즘에 조절되고, 활성화 수용체 및 억제성 수용체 사이의 균형은 NK 세포에 의한 종양 인식 및 사멸에서, 및 이로써, 그의 치료적 효능에서 중요한 역할을 한다. 막 결합된 킬러-세포 활성화 수용체 (KAR)는 KIR 리간드 (KIRL)로서 HLA 부류 I 대립유전자의 알로타입 변이체를 인식하는 억제성 수용체 및 활성화 수용체 둘 다를 포함하는 킬러-세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 리간드 (KIR)와 함께 작용하여, NK 세포 기능을 조절한다 (Lanier, 2005; Pegram *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2013). 종양에서 발견되는 활성화/억제성 리간드의 패턴이 NK 세포 요법에 대한 그의 반응을 예측하는데 중요한 요소가 될 수 있다고 가정하였다.

[0014] NK 세포 활성화 상태의 증가, 억제 신호의 감소 (예를 들어, 변경 또는 미스매칭된 MHC 부류 I을 사용함), 또는 이들 둘 다는 NK 세포 세포독성을 강화시켜야 한다. 추가로, NK 세포 세포독성의 규모는 NK 세포의 수와 표적 세포의 수 사이의 비 (즉, 이펙터/표적 비 또는 E:T)에 정비례한다. 따라서, NK 세포 요법과 관련하여, 다수의 미리 활성화된 동종이계 NK 세포의 주입을 통해 최대 항암 효과가 달성될 것으로 예측된다. 이를 위해, 말초 혈액으로부터의 인간 NK 세포를 특이적으로 활성화시키고 확장시키는 방법이 개발되었다 (예를 들어, 문헌 [Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009; Somanchi and Lee, 2016] 참조). 이들 그룹은, 막-결합된 인터류킨 (IL)-15 및 4.1-BB 리간드 (K562-mb15-4.1BBL)를 발현하도록 유전적으로 변형된 K562 백혈병 세포주가 특이적으로 인간 NK 세포를 활성화시키고 그를 세포 주기로 인도하여 고도로 세포독성인 NK 세포를 유도한다고 보고하였다. 추가로, 임상 GMP 가이드라인을 사용하여, 고도로 세포독성인 NKAE 세포를 다수 생성하면서, 대규모 임상 등급 조건하에서 K562-mb15-4.1BBL을 자극하는 방법을 확립하였다. 추가로, 반일치 공여자 NK 세포는 부분적으로는 KIR-HLA 공여자-수용자 미스매치와 연관된 동종이식-대-종양 효과에 기반하여 동종이계 조혈 줄기 세포 이식을 받은 고형 종양 환자에서 항종양 활성을 발휘할 수 있다는 것이 데이터를 통해 제안된다 (Pende *et al.*, 2009; Moretta *et al.*, 2011). 따라서, 임상 시험에서는 현재 혈액 악성종양 및 고형 종양 환자에 대해 NKAE 세포를 사용하는 것이 활발하게 연구되고 있다 (예를 들어, 클리니칼 트라이얼즈 웹사이트(Clinical Trials Website), <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&cond=cancer> 참조). 이들 연구는 다양한 유형의 종양 치료를 위한 안전하고 유효한 요법으로서의 NKAE의 잠재능을 입증하는 것을 목표로 한다.

[0015] 개시된 발명은 종양 세포 이동, 침습, 착상 및 전이를 방지하는데 있어 NKAE 세포 요법과 항-CXCR4 Ab를 이용하는 치료 사이의 시너지를 입증하는 시험관내 및 생체내 임상전 연구에 관한 것이다. CXCR4⁺ 종양 세포의 이동 및 침습을 억제할 수 있는 상기 조합 요법의 능력은 시험관내에서 분석되었다. 면역결핍 마우스에서 폐포형 횡문근육종의 동소 모델을 이용하여 생체내 항-종양 및 항-전이 시너지 효과를 평가하였다. 추가로, CXCR4 발현을 소아 횡문근육종 환자의 종양에서 분석하였다. 본원에 제시된 데이터는 상기 조합 면역요법이 다양한 암을 치료하고 전이를 예방하는데 유효하다는 것을 제안한다.

발명의 내용

[0016] 본 개시내용은 암을 앓는 대상체에게 치료 유효량의 (a) NK 세포의 단리된 집단; 및 (b) 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 조합을 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정한 바람직한 실시양태에서, NK 세포의 집단은 활성화되고 확장된 NK (NKAE) 세포를 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 CXCR4와 C-X-C 모티프 케모카인 12 (CXCL12) 사이의 상호작용을 붕괴하고, CXCR4/CXCL12 신호전달을 억제한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, Ab는 서열식별번호: 33 및 37로 제시된 아미노산 서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 포함하는 올로클루루마이다.

[0017] 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 암은 소아 종양, 예컨대 횡문근육종, 골육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 유잉 육종을 비롯한, 고형 종양이다. 다른 실시양태에서, 암은 혈액 악성종양이다.

[0018] 본 개시내용은 (a) 약 50 내지 약 2000 mg 범위의 하나 이상의 투여량의, 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 Ab 또는 그의 항원-결합 부분; (b) 10⁶ 내지 10¹⁴개 범위의 하나 이상의 투여량의, NKAE 세포의 집단; 및 (c) 본원에 개시된 방법 중 임의의 것에서 Ab 또는 그의 부분 및 NKAE 세포를 사용하는 것에 대한 설명서를 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0019] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하는 하기의 상세한 설명 및 실시예로부터 자명해질 것이다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 과학 논문, 진뱅크 엔트리(GenBank entry), 특허 및 특허 출원을 비롯한, 모든 인용된 참고문헌의 전체 내용이 본원에 참조로 명백하게 포함되지만, 이는 단지 참조로 인용된 정보와, 본 출원에서 명백한 개시내용에 의해 제공되는 정보가 서로 상충하지 않는 정도로만 그러하다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 (A) 유세포 분석법, 및 (B) 정량적 역전사효소-증합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)에 의한 6개의 육종 세포주 (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 및 143B)에서의 CXCR4 발현 분석을 제시한다. 폐포형 횡문근육종 RH30 세

포주는 가장 높은 CXCR4 발현을 보였다.

도 2는 (A) 우태아 혈청 (FBA) 또는 (B) CXCL12 (100 ng/ml) 방향으로의 상이한 육종 세포주 (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 및 143B)의 이동 및 침습 능력을 제시한다. RH30 세포주는 CXCL12에 대하여 가장 높은 이동 및 침습 지수를 보였다 (도 2B). 이동 능력은 8 μ m-포어 막 트랜스웰 검정법을 사용하여 시험하였고, 침습 능력은 동일한 조건하에 매트릭셀-코팅된 트랜스웰 막을 사용하여 측정하였다.

도 3은 시험관내에서 횡문근육종 (RH30) 세포에서의 NKAE 및 항-CXCR4 요법 단독으로 또는 조합으로의 그에 의한 세포독성 및 이동 및 침습 억제를 제시한다. A, NKAE 세포는 RH30 세포에 대하여 높은 세포독성을 보였다. Ab 부재 하에서의, 울로쿠플루맙 (MDX1338; 100 μ g/ml) 또는 IgG4 대조군 mAb (100 μ g/ml) 경우의, 명시된 NKAE: RH30 이펙터:표적 (E:T) 비에서의 비용해를 결정하였다. B-C, 울로쿠플루맙 (MDX1338) 및 NKAE 세포는 각각 CXCL12 방향으로의 RH30 세포의 이동 및 침습을 효율적으로 감소시켰을 뿐만 아니라, 두 작용제의 조합은 그를 완전히 폐기시켰다. 트랜스웰 플레이트를 이용하여 인간 재조합 CXCL12 케모카인 구배로의 RH30 세포 이동을 시험하였다. Ab 농도는 100 μ g/ml이고, NKAE: RH30 E:T 비는 5:1이었다 (B). 침습 능력은 동일한 조건하에 매트릭셀-코팅된 트랜스웰 막을 사용하여 측정하였다 (C).

도 4는 NKAE 세포 및 항-CXCR4 요법이 개별적으로 또는 조합하여 면역결핍 NSG 마우스의 복부 중의 GFP⁺ Luc⁺ RH30 횡문근육종 종양 이식물의 성장에 미치는 효과를 제시한다. A, RH30 종양 이식물의 성장. 5개의 처리 아암을 확립하였다: 비처리; IgG4; 울로쿠플루맙 (MDX1338); NKAE 세포; NKAE 세포 및 울로쿠플루맙의 조합. 마우스는 6회 용량의 mAb (15 mg/kg, 주 2회), 및 3회 용량의 NKAE (5 x 10⁶개 세포, 주 1회)를 받았다. 35일 동안 발광 종양을 모니터링하였다. B, 처리된 마우스에서의 이식된 GFP⁺ Luc⁺ RH30 세포의 발광에 의해 측정된 종양 세포의 존재 정량화. 울로쿠플루맙 처리는 단독으로는 RH30 종양 이식물의 성장을 중간 정도로 억제한 반면, NKAE 처리는 상기 성장을 완전히 방지하였다.

도 5는 NKAE 세포 및 울로쿠플루맙이 개별적으로 또는 조합하여 마우스에서 RH30 종양으로부터의 폐 미세전이 형성에 미치는 효과를 제시한다. A, 인간 CXCR4 특이적인 프로브를 이용하여 qRT-PCR에 의해 측정된, 마우스에서 RH30 폐 전이성 병변에서의 인간 CXCR4의 상대적 발현. 명시된 값은 10⁶개의 RH30 세포 펠릿에 의한 명시된 유전자의 발현에 대해 상대적인 값이다. 울로쿠플루맙 (MDX1338)은 RH30 폐 미세전이 발생을 감소시킨 반면, 울로쿠플루맙 및 NKAE의 조합은 그를 완전히 제거하였다. B, qRT-PCR에 의해 측정된, 마우스에서 RH30 폐 전이성 병변에서의 인간 GUS의 상대적 발현. NKAE 세포 요법 및 울로쿠플루맙 (MDX1338)을 이용한 치료 둘 다의 조합은 생체내에서 RH30 폐 미세전이를 완전히 억제하는데 요구된다.

도 6은 조직학적 방법에 의해 횡문근육종 RH30 미세전이 억제 확인을 제시한다. 비처리된 마우스 폐 중의 폐 미세전이를 헤마톡실린 및 에오신 염색 (a), *Alu* 서열 동소 하이브리드화 (b), 및 CXCR4-특이적 mAb 염색 (c)에 의해 확인하였다. 화살표 표시는 검출된 미세전이를 나타낸다. NKAE 세포 요법 및 울로쿠플루맙을 이용한 치료 둘 다의 조합은 생체내에서 RH30 폐 미세전이를 완전히 억제하는데 요구된다 (d).

도 7은 횡문근육종 환자의 종양에서의 CXCR4 발현 수준을 제시한다. A, 음성 (a), 중간 (b) 및 높은 (c) CXCR4 세포질 발현을 보이는 샘플에 상응하는 대표 염색. 높은 핵 CXCR4 염색을 보이는 시편이 또한 제시되어 있다 (d). B, 진단 시 시편의 CXCR4 발현 점수. C, 진단 대 화학요법 후 및 재발 시편. 중간값 \pm SD가 제시되어 있다. 비모수 비대응 만-휘트니(Mann-Whitney) 검정이 적용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 대상체에게 NKAE 세포 면역요법 및 항-CXCR4 Ab의 조합을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 용어

[0023] 본 개시내용을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위해, 특정 용어를 먼저 정의한다. 본원에서 달리 명확하게 제공되는 경우를 제외하고는, 본 출원에 사용된 바와 같이, 하기 용어는 각각 하기 기재되는 의미를 가져야 한다. 추가 정의는 본 출원 전반에 걸쳐 기재된다.

[0024] "투여하는"이란, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입시키는 것을 지칭한다. 치료적 Ab, 예컨대 항-

CXCR4 Ab의 바람직한 투여 경로는 정맥내 또는 피하 투여이다. 다른 투여 경로는 근육내, 복강내, 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "비경구 투여"라는 용어는 경장 및 국소 투여 이외의 투여 모드를 의미한다. NKAE 세포의 바람직한 투여 경로는 정맥내 투여이다. 다른 투여 경로는 동맥내, 대퇴부내, 복강내, 또는 척수강내 주사, 종양내 또는 종양 절제 공동 내로의 주사를 포함한다. 투여는 또한, 예를 들어, 1회, 다수회, 및/또는 1회 이상의 연장된 기간 동안에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0025] "항체" (Ab)는 제한 없이, 항원에 특이적으로 결합하고, 디설피드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질 이뮤노글로불린 (Ig), 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하여야 한다. 각각의 H 쇠는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. IgG Ab의 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. IgG Ab의 경쇄 불변 영역은 1개의 불변 도메인 C_L 을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은 추가로, 프레임워크 영역 (FR)으로 명명되는, 보다 보존적인 영역 사이에 산재하는, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명되는, 초가변 영역으로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기 순서: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. Ab의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체계의 제1 보체 (C1q)를 비롯한, 숙주 조직 또는 인자에의 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0026] 이뮤노글로불린은 IgA, 분비성 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 일반적으로 공지된 이소타입 중 임의의 것으로부터 유래된 것일 수 있다. IgG 하위부류는 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 Ab 부류 또는 하위부류 (예를 들어, IgM, IgG1, 또는 IgG4)를 지칭한다. "항체"라는 용어는 예로서, 자연적으로 발생된 Ab 및 비-자연적으로 발생된 Ab 둘 다; 모노클로날 및 폴리클로날 Ab; 키메라 및 인간화 Ab; 인간 또는 비인간 Ab; 전체 합성 Ab; 및 단일 쇠 Ab를 포함한다. 비인간 Ab는 인간에서 그의 면역원성을 감소시키기 위해 재조합 방법에 의해서 부분적으로 또는 전체적으로 인간화될 수 있다. 달리 명확하게 언급되지 않을 경우, 및 문맥상 달리 명시되지 않는 한, "항체"라는 용어는 또한 상기 언급된 이뮤노글로불린 중 임의의 것의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 부분을 포함하고, 1가 및 2가 단편 또는 부분, 및 단일 쇠 Ab를 포함한다.

[0027] "단리된" Ab란, 상이한 항원 특이성을 가진 다른 Ab가 실질적으로 없는 Ab를 지칭한다 (예를 들어, CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab에는 CXCR4 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 Ab는 실질적으로 없다). 그러나, 예를 들어, 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab는 다른 항원, 예컨대 상이한 종으로부터의 CXCR4 분자에 대하여 교차-반응성을 가질 수 있다. 추가로, "단리된" Ab는 또한 실질적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 없도록 정제된 Ab를 지칭할 수 있다.

[0028] "모노클로날" Ab (mAb)라는 용어는 단일 분자 조성으로 이루어진 Ab 분자, 즉, 그의 1차 서열이 본질적으로 동일하며, 이는 특정한 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화성을 보이는 것인 Ab 분자로 이루어진 비-자연적으로 발생된 제제를 지칭한다. mAb는 단리된 Ab의 한 예이다. mAb는 하이브리도마, 재조합, 트랜스제닉 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 기술에 의해 생산될 수 있다.

[0029] "키메라" Ab는, 가변 영역은 한 종으로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 종으로부터 유래된 것인 Ab, 예컨대 가변 영역은 마우스 Ab로부터 유래되고 불변 영역은 인간 Ab로부터 유래된 것인 Ab를 지칭한다.

[0030] "인간" mAb (HuMAb)는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 mAb를 지칭한다. 추가로, Ab가 불변 영역을 함유한다면, 불변 영역도 또한 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것이다. 본 발명의 인간 Ab는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발법에 의해, 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, "인간" Ab라는 용어는, 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 배선로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식된 것인 Ab를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. "인간" Ab 및 "완전 인간" Ab라는 용어는 동의어로 사용된다.

[0031] "인간화" mAb란, 비-인간 mAb의 CDR 도메인 밖의 아미노산 중 일부, 그 대부분 또는 그 모두가 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 상응하는 아미노산으로 대체된 mAb를 지칭한다. 인간화 형태의 Ab의 한 실시양태에서,

CDR 도메인 밖의 아미노산 중 일부, 그 대부분 또는 그 모두 인간 이뮤노글로불린으로부터의 아미노산으로 대체된 반면, 하나 이상의 CDR 영역 내의 일부, 대부분 또는 모든 아미노산에는 변함이 없다. 아미노산의 작은 부가, 결실, 삽입, 치환 또는 변형은 그가 Ab가 특정한 항원에 결합할 수 있는 능력을 폐기시키지 않는 한, 허용 가능하다. "인간화" Ab는 원 Ab의 것과 유사한 항원 특이성을 보유한다.

- [0032] "항-항원" Ab란, 항원에 특이적으로 결합하는 Ab를 지칭한다. 예를 들어, 항-CXCR4 Ab는 CXCR4에 특이적으로 결합하는 Ab이다.
- [0033] Ab의 "항원-결합 부분" (이는 "항원-결합 단편"으로 명명됨)란, 완전 Ab가 결합하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는 Ab의 하나 이상의 단편을 지칭한다.
- [0034] "암"이란, 체내에서 비정상적인 세포의 비제어된 성장을 특징으로 하는 광범위한 각종 질환 군을 지칭한다. 비 조절된 세포 분열 및 성장으로 분열 및 성장하여 이웃 조직을 침습하는 악성 종양을 형성하며, 이는 림프계 또는 혈류를 통해 신체 원위부로 전이될 수도 있다.
- [0035] "C-X-C 케모카인 수용체 4" (CXCR4; 이는 또한 관련 기술분야에서, 예를 들어, LESTR, 푸신(Fusin) 또는 CD184로도 공지됨)란, 백혈구, 혈소판 및 중앙 기질 미세환경을 포함하는 다른 비-조혈 세포 상에서 발현된 7-막횡단 G-단백질 커플링 수용체를 지칭한다. 이는 또한 대부분의 인간 암에서 및 Treg 및 MDSC 상에서도 과다발현된다. CXCR4는 단일 리간드 CXCL12에 결합한다. 본원에 사용된 바와 같이, "CXCR4"라는 용어는 인간 CXCR4 (hCXCR4), 변이체, 이소폼, 및 hCXCR4의 종 호몰로그, 및 hCXCR4와 적어도 하나의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hCXCR4 아미노산 서열은 진뱅크® 수탁 번호(GENBANK® Accession No.) CAA12166에서 살펴볼 수 있으며, 이는 서열식별번호: 43에 기재되어 있다.
- [0036] "면역요법"이라는 용어는 면역 반응을 유도하거나, 증강시키거나, 억제하거나, 또는 다르게 변형시키는 것을 포함하는 방법에 의해 질환을 앓고 있거나, 또는 질환에 걸릴 위험에 있거나, 또는 질환의 재발을 앓고 있는 대상체의 치료를 지칭한다. 대상체의 "치료" 또는 "요법"이란, 질환과 연관된 증상, 합병증, 또는 병태, 또는 생화학적 징후의 발병, 진행, 발생, 중증도 또는 재발을 역전, 경감, 호전, 억제, 저속화 또는 예방하기 위한 목적으로 대상체에게 수행되는, 활성제 투여를 비롯한, 임의의 유형의 개입 또는 프로세스를 지칭한다.
- [0037] "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. "비인간 동물"이라는 용어는 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개 및 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 및 기니아 피그를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. "대상체" 및 "환자"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0038] 약물 또는 치료제의 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 단독으로 또는 또 다른 치료제와 함께 조합하여 사용되었을 때, 대상체를 질환 발병으로부터 보호하거나, 또는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간의 증가, 또는 이환으로 인한 손상 또는 장애 예방 또는 감소로 입증되는 질환 퇴행을 촉진시키는 약물 또는 치료제의 임의의 양이다. 추가로, 치료와 관련하여 "유효한" 및 "유효성"이라는 용어는 약리학적 유효성 및 생리학적 안전성 둘 다를 포함한다. 약리학적 유효성이란, 약물이 환자에서 질환 퇴행, 예컨대 암 퇴행을 촉진시킬 수 있는 능력을 지칭한다. 생리학적 안전성이란, 허용되는 수준의 독성, 또는 약물 투여로부터 초래되는 세포, 기관 및/또는 유기체 수준에서 다른 유해한 생리학적 효과 (부작용)를 지칭한다. 치료제의 효능은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법을 사용하여, 예컨대 시험관내 검증법에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 임상 시험 동안 인간 대상체에서 작용제의 활성을 검증함으로써 평가될 수 있다.
- [0039] 종양 치료에 대한 예로서, 치료 유효량의 항암제는 바람직하게는 세포 성장 또는 종양 성장을 비처리 대상체와 비교하여 적어도 약 20%만큼, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%만큼, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 60%만큼, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 80%만큼 억제한다. 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 종양 퇴행은 적어도 약 20일, 보다 바람직하게는 적어도 약 40일, 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 약 60일의 기간 동안 관찰되고, 계속 진행될 수 있다. 치료적 유효성에 대한 이러한 궁극적인 평가에도 불구하고, 면역요법 약물의 평가는 또한 "면역-관련" 반응 패턴을 참작하여야 한다.
- [0040] 약물의 치료 유효량은, 질환 발생 위험이 있는 대상체 (예를 들어, 암 발생 위험이 있는, 전암성 병태를 갖는 대상체), 또는 질환 재발을 앓을 위험이 있는 대상체에게 단독으로 또는 또 다른 치료제와 함께 조합하여 투여되었을 때, 질환 (예를 들어, 암)의 발생 또는 그의 재발을 억제하는 약물의 임의의 양인 예방 유효량을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 예방 유효량은 질환의 발생 또는 재발을 전적으로 방지한다. 질환의 발생 또는 재발을 "억제한다"는 것은 질환의 발생 또는 재발 가능성을 감소시키거나, 또는 질환의 발생 또는 재발을

전적으로 방지한다는 것을 의미한다.

- [0041] 양자택일 (예를 들어, "또는") 사용은 양자택일 중 하나, 그 둘 다, 또는 그의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해하여야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 "하나 이상의" 임의의 언급된 또는 열거된 성분을 지칭하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0042] "약"이라는 용어는 부분적으로는 수치 값, 조성, 또는 특징이 측정되거나 또는 결정되는 방식, 즉, 측정 시스템의 한계에 의존하게 되는 상기 값, 조성, 또는 특징이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 특정한 값, 조성, 또는 특징에 대해 허용가능한 오차 범위 내에 있음을 나타낸다. 예를 들어, "약"은 관련 기술분야의 관행에 따라 1 이내 또는 1 초과의 표준 편차 이내임을 의미할 수 있다. 대안적으로, 이는 $\pm 20\%$ 범위, 보다 통상적으로는 $\pm 10\%$ 범위를 의미할 수 있다. 본 출원 및 청구범위에서 특정한 값, 조성, 또는 특징이 제공될 때, 달리 언급되지 않는 한, "약"이라는 의미는 상기 특정한 값, 조성, 또는 특징에 대해 허용가능한 오차 범위 내에 있는 것으로 간주되어야 한다. 투약 투여 요법에서의 투약 빈도에서, 본원에 사용된 바와 같이, "약 매주 1회," "약 매 2주마다 1회"라는 용어, 또는 투약 기간을 나타내는 임의의 다른 유사 용어는 대략적인 횟수를 의미한다. 예를 들어, "약 매주 1회"는 매 7일 \pm 1일마다, 즉, 매 6일 내지 매 8일마다인 것을 포함할 수 있다. "약 매 2주마다 1회"는 매 14일 \pm 3일마다, 즉, 매 11일 내지 매 17일마다인 것을 포함할 수 있다. 유사한 근사법이, 예를 들어, 약 매 3주마다 1회, 약 매 4주마다 1회, 또는 약 매월 1회인 것에도 적용된다.
- [0043] "실질적으로 동일한" 또는 "본질적으로 동일한"이라는 용어는, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 측정된 특성과 관련하여 2개 이상의 수치 값, 조성, 또는 특징 사이의 차이는 거의 없거나, 또는 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 없다고 간주할 정도로, 상기 값, 조성, 또는 특징이 충분히 높은 정도로 유사하다는 것을 지칭한다. 측정된 수치 값 사이의 차이는, 예를 들어, 약 30% 미만, 바람직하게는 약 20% 미만, 보다 바람직하게는 약 10% 미만일 수 있다.
- [0044] 본원에 기재된 바와 같이, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 명시되지 않는 한, 언급된 범위 내의 임의의 정수 값, 및 적절한 경우, 그의 분수값 (예컨대, 정수의 1/10 내지 1/100)을 포함하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0045] 본 발명의 다양한 측면은 하기의 서브섹션에서 추가로 상세하게 기재된다.
- [0046] *치료적 방법*
- [0047] 주로 유잉 육종, 골육종 및 연부 조직 육종을 포함하는 육종은 비교적 드문 중간엽 유래 종양의 한 그룹이다 (Stiller *et al.*, 2013). 인간 악성종양 중에서 그의 낮은 발병률, 아주반트 화학요법의 진보 및 수술상의 전 범위 절제에도 불구하고, 대개는 육종 환자의 주된 사망 원인이 되는 폐 전이 성향이 높기 때문에, 예후는 여전히 불량하다.
- [0048] 케모카인 및 그의 상응하는 수용체와의 그의 상호작용이 암 발생 및 전이 출현의 메카니즘에서 근본적인 역할을 하는 것으로 제시된 바 있다 (Vela *et al.*, 2015). 악성 세포에서는 케모카인 및 그의 수용체의 발현 수준이 변경된다. 이는 종양 세포에서 가장 빈번하게 과발현되는 케모카인 수용체인 CXCR4의 경우이다. CXCR4와 그의 리간드인 CXCL12 사이의 상호작용은 그를 발현하는 종양 세포의 생존, 증식, 부착 및 이동을 촉진시키는 세포 신호전달의 캐스케이드를 활성화시킨다. 이는 모두 원발성 종양의 재발, 및 리간드가 분비되는 기간, 특히 골수 및 폐에서 원위 전이를 생성할 수 있는 그의 능력의 증가를 유도할 수 있다 (Chatterjee *et al.*, 2014; Duda *et al.*, 2011).
- [0049] 전이 및 아포토시스로부터의 보호를 위해 종양 세포에 의해 이루어지는 CXCL12/CXCR4 신호전달 경로를 잃게 만드는 것이 암 요법을 위한 신규한 기회로서 상기 축을 차단하는 것이라고 오랜 전에 확인되었다. 문헌 [Mueller *et al.*, 2001]에 의한 선구적인 보고에서는 유방 암종 중 CXCR4의 발현과 국소 림프절 및 폐 전이를 생성시킬 수 있는 그의 능력과 연관시키면서, 암 요법을 위한 표적으로서의 CXCR4의 생체내 관련성이 입증되었다. 상기 데이터는 중화 무린 항-인간 CXCR4 mAb, 크론 44717.111이 폐, 서혜부 및 액와 림프절 전이를 유의적으로 감소시킨 실험을 통해 뒷받침되었다. 이어서, 또 다른 무린 항-인간 CXCR4 Ab (클론 12G5)로 인간 비-호지킨 림프종의 이종이식편 (Bertolini *et al.*, 2002) 및 원발성 인간 급성 골수성 백혈병의 이종이식편 (Tavor *et al.*, 2004)을 치료하였을 때에도 유사한 결과를 얻었다. 상기 두 모델 모두에서 종양 진행의 유의적인 감소가 보고되었다. 자궁내막암 이종이식편에서, 12G5 mAb로 치료하였을 때, 간 및 폐에서의 자발적 전이는 완전히 억제되었고, 복막에서 전이 지수는 28배 감소되었다 (Gelmini *et al.*, 2009). 흥미롭게도, 경골내 인간 골육종 이종이식편 모델에서, 12G5 mAb는 폐로의 전이성 확산을 감소시켰다 (Brennecke *et al.*, 2014).

- [0050] 입양 전달된 NK 세포, 대개는 휴지 NK 세포 (Rubnitz *et al.*, 2010; Curti *et al.*, 2011) 또는 IL-2-배양 NK 세포 (Bachanova *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2005)가 임상 시험에서 사용되어 왔다. 인간 유래 항원 제시 세포와 함께 공동-배양된 활성화되고 확장된 NK 세포 사용이 신흥 대안이다 (Szmania *et al.*, 2015; Leivas *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2004; Vela *et al.*, 2018). 이들 시험의 결과는 자가 및 반일치 NKAE 둘 다 심각한 부작용도 없는 안전한 요법이고, 상이한 암 유형의 치료를 위해 실현가능한 접근법이라는 것을 제시한다.
- [0051] 본원에 제시된 데이터는 CXCR4/CXCL12 축을 차단하는 인간 mAb인 울로쿠플루맵이 시험관내 실험에서는 전이성 황문근육종 RH30 세포의 이동 및 침습 지수를 효율적으로 감소시키지만, 이동 및 침습을 완전히 폐기하기 위해서는 NKAE 세포와 울로쿠플루맵의 조합을 필요로 하는 것으로 제시한다. 유사하게, 생체내 실험에서, 폐 미세전이 형성을 억제하면서, 이식된 RH30 종양의 성장 뿐만 아니라, 그의 파종 능력을 제거하기 위해서는 울로쿠플루맵 및 NKAE 요법의 조합이 요구되었다. 따라서, 본 개시내용은 암을 앓는 대상체에게 치료 유효량의 (a) NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포의 단리된 집단; 및 (b) 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 조합을 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법의 임의의 것의 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 환자이다.
- [0052] 실시예 3에 제시된 바와 같이, 단독요법으로서 투여된 항-CXCR4 Ab (울로쿠플루맵) 및 NKAE 세포 요법은 각각 시험관내에서 RH30 폐포형 황문근육종 세포의 CXCL12 방향으로의 이동 (도 3B) 및 시험관내에서 상기 세포의 침습 능력 (도 3C) 둘 다를 강력하게 감소시켰다. 특히, 항-CXCR4 및 NKAE 세포 요법의 조합에 의해 RH30 세포의 이동 및 침습은 훨씬 더 큰 수준으로 억제된 것으로 나타났고, 즉, 항-CXCR4는 이동 및 침습 둘 다를 완전히 폐기하기 위해 NKAE 세포 요법과 시너지적으로 상호작용하였다 (도 3B 및 C). 두 요법의 조합은, 상기 조합의 항종양 효과가 보다 효과적인 치료를 이용하는 단독요법 시에 관찰된 효과보다 더 크거나, 또는 개별적으로 각 치료에 의해 나타내는 억제 수준의 총합보다 더 클 경우, 시너지적인 것으로 간주된다. 항-CXCR4 Ab 인 울로쿠플루맵이 직접적으로 암 세포의 성장 및 증식을 억제하고, 아폽토시스를 유도하는 것으로 입증되었고 (WO 2008/060367; WO 2013/071068; Kuhne *et al.*, 2013), 이들 종양-억제 특성은 본원에 개시된 조합 요법의 효능에 기여할 수 있다.
- [0053] 항-CXCR4와 NKAE 세포 요법 사이의 유사한 시너지 효과가 생체내에서 입증되었다 (실시예 4). 단독요법으로서, 또는 조합하여 투여된 항-CXCR4 Ab 및 NKAE 세포 요법의 항-종양 활성을 마우스 RH30 폐포형 황문근육종 모델에서 측정하였다. 울로쿠플루맵은 종양 성장에 대해 중간 정도의 억제 효과를 보인 반면, NKAE 세포 요법은 상기 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 완전히 억제하였다 (도 4). 그러나, qRT-PCR 분석 (도 5) 및 면역조직화학 염색 및 동소 하이브리드화 (도 6)에서는 NKAE-처리된 마우스에서 RH30 폐 미세전이가 나타났다. NKAE 요법은 폐 전이에 대해 단지 극소수로 얼마 되지 않는 효과만을 보인 반면, 울로쿠플루맵은 보다 현저한 효과를 나타내었지만 (도 5), 상기 두 요법의 조합은 폐 전이를 완전히 제거하는데 있어 강력한 시너지 효과를 보였다 (도 5 및 6).
- [0054] *NK 세포 집단*
- [0055] NK 세포 활성의 조정에 기반하여 다양한 치료제 및 백신 전략법이 제안되어 왔다. 그러나, NK 세포 활성은 자극성 신호 및 억제성 신호 둘 다를 수반하는 복잡한 메카니즘에 의해 조절된다. 중요한 조절 수용체 세트는 KIR 리간드 (KIRL)로서 HLA 클래스 I 대립유전자의 알로타입 변이체를 인식하는, 억제성 및 활성화 패밀리를 구성원 둘 다를 포함하는 HLA 클래스 I-제한, 킬러-세포 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR) 패밀리아이다. 단일 개체의 NK 세포는 전형적으로 HLA 클래스 I 분자에 대해 상이한 특이성을 갖는 NK 세포의 레퍼토리를 제공하면서, KIR의 상이한 조합을 발현한다.
- [0056] 막 결합된 킬러-세포 활성화 수용체 (KAR)는 KIR과 함께 작용하여 NK 세포 기능을 조절한다 (Lanier, 2005). 처음에는 단 하나의 KAR과 하나의 KIR (2-수용체 모델)이 존재한다고 생각되었지만, 지난 10년에 걸쳐 다중의 상이한 KAR 및 KIR, 예컨대 활성화 NKp46 및 NKG2D 수용체 및 억제성 KIR2DL 수용체 (하기 표 1 참조) (반대-신호 모델)이 발견되었다. 다수의 인간 암은 NKG2D 리간드 (NKG2DL)를 발현한다 (Nausch and Cerwenka, 2008; Perez-Martinez *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2013). 실제로, NKG2D/NKG2DL 상호작용에 의해 매개되는 항종양 효과가 다발성 골수종 및 육종 모델 둘 다에서 주로 종양-개시 세포 또는 줄기 종양 세포를 표적화하는 것으로 최근 제시된 바 있다 (Fernandez *et al.*, 2015). 종양에서 발견되는 활성화/억제성 리간드의 패턴이 NK 세포 요법에 대한 그의 반응을 예측함에 있어 중요한 요소가 될 수 있다고 가정되었다.

[0057] 표 1. NK 세포 내의 활성화 수용체 (KAR) 및 억제성 수용체 (KIR)의 요약

수용체	기능	리간드
KIR (CD158)	활성인자 또는 억제인자	MHC 클래스 I 분자
NKG2D (CD314)	활성인자	MICA, MICB, ULBP1-6
DNAM1 (CD226)	활성인자	PVRL2 (CD112), PVR (CD155)
NKp46 (CD335)	활성인자	헤파란 술페이트, 헤마글루티닌 등
NKp44 (CD336)	활성인자	헤파란 술페이트, PCNC 등
NKp30 (CD337)	활성인자	B7-H6 등
PD-1 (CD279)	억제인자	PD-L1, PD-L2
4-1BB (CD137)	활성인자	4-1BBL

[0058]

[0059] NK 세포는 백혈병 세포를 사멸시킬 수 있고, 조혈 줄기 세포 이식 환경에서 또는 비-골수체거 면역억제 요법 이후, 급성 백혈병 환자에서 화학요법의 효과를 증강시키기 위해 투여되어 왔으며, 이는 고무적인 결과를 가져왔다 (Hsu *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Rubnitz *et al.*, 2010). 밀러(Miller) 등의 연구에서 예후가 불량한 19명의 급성 골수성 백혈병 (AML) 환자 중 5명이 반일치 NK 세포 요법 이후에 완전히 완화되었다. 상기 결과는 문헌[Rubnitz *et al.* (2010)]에 의한 연구에서는 AML 위험이 중간 정도 및 낮은 10명의 환자가 100%의 완화를 보였다고 보호한 바와 같이 훨씬 더 우수하였다.

[0060]

NK 세포는 또한 시험관내 및 생체내에서 유잉 육종, 신경모세포종, 골육종 및 간세포 암종 세포주에 대한 NK 세포 세포독성을 나타내는 보고에 의해 제시된 바와 같이, 악성 비-조혈 세포를 용해시킬 수 있다 (Fernandez *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2010; Verhoeven *et al.*, 2008; Perez-Martinez *et al.*, 2015b; Kamiya *et al.*, 2016). 추가로, 반일치 공여자 NK 세포는 부분적으로는 KIR-HLA 공여자-수용자 미스매치와 연관된 동종이식-대-종양 효과에 기반하여 동종이체 조혈 줄기 세포 이식을 받은 고형 종양을 가진 아동에서 항종양 활성을 발휘할 수 있다는 것이 임상 데이터를 통해 제안된다 (Perez-Martinez *et al.*, 2009; Perez-Martinez *et al.*, 2015a).

[0061]

본 방법은 NK 세포의 종양에 대하여 입증된 세포독성을 항-CXCR4 Ab에 의한 CXCR4/CXCL12 신호전달 차단과 조합한다. 본원에 개시된 치료적 방법의 특징의 바람직한 실시양태에서, NK 세포의 집단은 NKAE 세포를 포함한다. IL-2, 및 IL-12, IL-15 및/또는 IL-21을 비롯한, 다른 시토카인은 인간 NK 세포에서 증식 반응을 유도할 수 있지만, 오직 극히 일부만이 계속해서 성장을 지속한다 (London *et al.*, 1986; Lanier *et al.*, 1988). NK 세포의 지속된 확장은 추가 신호, 예컨대 β-림프모구성 세포의 존재를 필요로 하는 것으로 제시된 바 있다 (London *et al.*, 1986; Rabinowich *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 2004). 말초 혈액으로부터의 인간 NK 세포의 특이적 활성화 및 확장을 허용하는 방법, 예를 들어, NK 세포 집단의 확장 및 활성화를 허용하면서, 건강한 공여자의 말초 단핵 세포에 대한 피더로서 유전적으로 변형된 K562 세포를 사용하는 것에 기반한 방법이 개발되었다 (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009; Somanchi and Lee, 2016).

[0062]

개시된 발명의 특정 실시양태에서, NKAE 세포는 건강한 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 (i) 막-결합된 형태의 활성화 시토카인, 예컨대 인터류킨-15 (IL-15) 또는 인터류킨-21 (IL-21)을 발현하도록 변형된 방사선조사된 β-림프모구성 세포, 및 (ii) 인터류킨-2 (IL-2)와 함께 공동배양함으로써 생산된다. 특징의 바람직한 실시양태에서, β-림프모구성 세포는 K562-mb15-41BBL 세포이다 (Fujisaki *et al.*, 2009). K562-mb15-41BBL 세포주에는 억제성 KIR NK 세포 수용체에 대한 MHC-I 리간드가 결합되어 있고, 막-결합된 형태의 NK 활성화 시토카인 IL-15 및 4-1BB 수용체에 대한 활성화 리간드 CD137을 NK 세포 상에 발현하도록 변형된 K562 세포를 포함한다. 본원에 기재된 실험에서 (실시에 3 및 4 참조), 건강한 공여자의 PBMC를 K562-mb15-41BBL 세포 (Fujisaki *et al.*, 2009) 및 IL-2와 공동배양함으로써 NKAE 세포를 수득하였다 (실시에 3 참조). 다른 바람직한 실시양태에서, NKAE 세포를 제조하는데 사용되는 β-림프모구성 세포는 막-결합된 형태의 IL-21을 발현하도록 변형된 K562 세포를 포함하는 K562 mb.IL21 세포이다 (Somanchi and Lee, 2016).

[0063]

개시된 방법에서 사용하는 데 적합한 항-CXCR4 Ab

[0064]

본 발명은 시험관내 및 생체내에서 종양에 대한 NK 세포의 입증된 세포독성과 항-CXCR4 요법을 조합함으로써 전

이성 암을 비롯한, 암을 치료하기 위한 신규한 면역요법 접근법을 제공한다. 상기 조합 요법 방법은 CXCR4/CXCL12 신호전달을 차단하는 항-CXCR4 Ab를 이용함으로써 종양-기질 상호작용을 붕괴하고, NK 세포의 세포독성에 대해 육종 세포를 감작시키고, 종양 성장 및 전이 부담을 감소시킨다.

[0065] CXCR4는 23개 초과인 인간 암에서 과다발현되고, 그의 과다발현은 종양 성장, 침습, 혈관신생, 전이, 재발, 및 치료제 내성의 원인이 된다. CXCR4 발현 또는 CXCR4/CXCL12 경로와 연관된 암 유형의 비제한적인 예는 고품종 양, 예컨대 유방암 (Dewan *et al.*, 2006), 난소암 (Kajiyama *et al.*, 2008), 전립선암 (Hirata *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2007), 폐암 (Cavallaro, 2013; Gangadhar *et al.*, 2010), 췌장암 (Billadeau *et al.*, 2006), 신장암 (Jones *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2006), 경구암 (Ishikawa *et al.*, 2006; Onoue *et al.*, 2006), 식도암 (Wu *et al.*, 2014), 위암 (Han *et al.*, 2014), 결장직장암 (Lv *et al.*, 2014), 간암 (Schimanski *et al.*, 2006), 뇌암 (Bian *et al.*, 2007), 및 갑상선암 (De Falco *et al.*, 2007), 흑색종 (Scala *et al.*, 2005), 횡문근육종 (Libura *et al.*, 2002), 및 골육종 (Laverdiere *et al.*, 2005) 뿐만 아니라, 혈액 악성종양, 예컨대 급성 림프모구성 백혈병 (Crazzolaro *et al.*, 2001), 급성 골수성 백혈병 (Kalinkovich *et al.*, 2006), 다발성 골수종 (Alsayed *et al.*, 2007; Azab *et al.*, 2009) 및 만성 골수성 백혈병 (Jin *et al.*, 2008)을 포함한다.

[0066] CXCR4와 CXCL12 사이의 상호작용은 조혈 줄기 세포의 귀소 및 BM 미세환경 내의 유지를 위해서는 필수적인 것이다 (Mohle *et al.*, 1998). 골 및 연부 조직 육종을 가진 환자에서 CXCR4의 예후 중요성이 광범위하게 연구되었다. 특정 상황에서, CXCR4 발현과 환자 예후 또는 생존 사이에 역상관계가 확립되었고, 임상 연구에서, CXCR4는 전이 성향 증가 및 생존 감소와 연관이 있었다. 997명의 육종 환자를 이용한 12개의 연구를 포함하는 최근의 메타 분석에서, CXCR4 발현은 불량한 전체 생존률과 유의적으로 연관이 있는 것으로 밝혀졌다 (HR 2.37, 95% CI 1.86-3.01; P < 0.001). 임상병리학적 특징과 관련하여, CXCR4 발현은 더 높은 전이율 (OR 6.97, 95% CI 2.28-21.31; P = 0.001) 및 더 높은 종양 단계 (OR 7.55, 95% CI 1.25-45.47; P = 0.027)와 유의적인 연관이 있었다 (Li *et al.*, 2015)). 실시예 5에 기재된 소아 횡문근육종 환자 중 단기 코호트에서, 진단 시 더 높은 CXCR4 발현과 재발 및 치명적 결과 사이에 약간의 상관관계가 있었다. 종양-개시 세포 (TIC)는 종양 재발 및 전이를 유발하는 것으로 제시된 화학내성 종양 세포의 하위집단이고, CXCR4 상향조절이 상기 세포의 특징 중 하나이다 (Duda *et al.*, 2011). 일관되게, 화학요법 이후에도 여전히 성장하는 종양 및 조합된 수술 및 화학요법 접근법 이후에도 출현하는 종양은 명백하게 CXCR4를 최고 수준으로 발현하는 종양인 것으로 관찰되었다 (도 7C). 그러므로, TIC를 표적화하고 제거하는 것이 새로운 치료제 패러다임 개발을 위한 우선 과제가 된다.

[0067] 실시예 1은 시험된 6개의 상이한 육종 세포주 중에서 RH30 폐포형 횡문근육종 세포주는 CXCL12 방향으로의 가장 높은 이동 및 침습 지수를 보임과 동시에 (도 2), 가장 높은 수준의 CXCR4 발현을 나타내었다 (도 1)는 것을 제시한다. 전이는 다른 암에서와 같은 육종 환자의 20-55%에서 발생하고 (Chaffer and Weinberg, 2011; Seyfried and Huysentruyt, 2013), 여전히 사망의 주요 원인인 것으로 남아 있다. NKAE 플러스 항-CXCR4 조합의 효능이 횡문근육종 세포주의 사용으로 본원에서 입증된 반면, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 암을 치료하는 방법이 CXCR4를 과다발현하는 임의의 암에도 적용가능하다는 것을 쉽게 이해할 것이다.

[0068] 개시된 방법에서 사용하는데 적합한 항-CXCR4 Ab는 높은 특이도 및 친화도로 CXCR4에 특이적으로 결합하는 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 mAb 또는 그의 항원-결합 부분이다. 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 키메라 Ab, 바람직하게는 인간화 Ab, 또는 보다 바람직하게는 인간 Ab 또는 그의 부분이다. 상기 키메라, 인간화 또는 인간 mAb는 관련 기술분야에 널리 공지된, 예를 들어, WO 2008/060367에 기재된 바와 같은 방법에 의해 제조되고, 단리될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이고, Ab 또는 그의 단편은 인간 CXCR4 수용체에 결합한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 CXCR4 및 CXCL12의 결합을 차단하고, CXCR4의 활성을 억제하고, 즉, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 CXCR4와 CXCL12 사이의 상호작용을 붕괴하고, CXCR4/CXCL12 신호전달을 억제한다. 특정의 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 (WO 2013/071068에 기재된 바와 같이) 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 아포토시스를 유도하고/거나, 그의 성장을 억제한다.

[0069] 높은 친화도로 CXCR4에 특이적으로 결합하는 항-CXCR4 mAb, 구체적으로, mAb F7GL (울로쿠플루맷; 또한 이전에 BMS-936564 및 MDX-1338로 지정됨), F7, F9, F9GL, D1, D1GL, E2 및 E2GL은 WO 2008/060367에 예시되어 있고, 상세하게 기재되었다. 상기 Ab를 이용하여 혈액 악성종양을 치료하는 방법이 또한 WO 2008/060367, WO 2013/071068 및 WO 2015/069874에 기재되어 있다. NKAE 세포와 함께 조합하여 본 치료적 방법에서 사용하는데 적합한 다른 항-CXCR4 mAb는, 예를 들어, WO 2008/142303, WO 2010/037831, WO 2009/140124, WO 2013/013025,

및 미국 공개 번호 2015/0037328에 기재된 바 있다.

- [0070] 본 방법에서 사용하는데 적합한 항-CXCR4 Ab는 바람직하게는 치료적 적용에 바람직한 하기 특징 중 하나 이상을 나타낸다: (a) 세포 표면 상에 발현된 인간 CXCR4에 높은 친화도로 결합함; (b) SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제함; (c) CXCR4 발현 세포에서 SDF-1-유도된 칼슘 유입을 억제함; (d) CXCR4 발현 세포의 SDF-1-유도된 이동을 억제함; (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제함; (f) CXCR4 발현 세포에서 아포토시스를 유도함; (g) 시험관내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 증식을 억제함; (h) 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포 증식을 억제하고/거나 CXCR4⁺ 종양 세포 아포토시스를 유도함; (i) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제함; 및 (j) CXCR4⁺ 종양-보유 대상체의 생존 기간을 증가시킴.
- [0071] 본 방법에서 사용하는데 적합한, WO 2008/060367에 개시된 항-CXCR4 mAb는 하기 특징 중 하나 이상을 나타내는 것으로 입증되었다: (a) 약 100 nM 미만 (예를 들어, 약 20-80 nM)의 EC₅₀으로 세포의 표면 상의 인간 CXCR4에 결합함; (b) 약 30 nM 이하 (예를 들어, 약 1-30 nM)의 EC₅₀으로 CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제함; (c) 약 1 nM 이하 (예를 들어, 약 0.1-1.0 nM)의 EC₅₀으로 CXCR4 발현 세포에서 CXCL12-유도된 칼슘 유입을 억제함; (d) 약 20 nM 이하 (예를 들어, 약 10-20 nM)의 EC₅₀으로 CXCR4 발현 세포의 CXCL12-유도된 이동을 억제함; (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제함; (f) CXCR4 발현 세포에서 아포토시스를 유도함; (g) 시험관내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 증식을 억제함; (h) 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포 증식을 억제하고/거나 CXCR4⁺ 종양 세포 아포토시스를 유도함; (i) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제함; 및 (j) CXCR4⁺ 종양-보유 대상체의 생존 기간을 증가시킴.
- [0072] 본 발명의 방법에서 사용가능한 항-CXCR4 Ab는 높은 친화도로, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 결정 시, 1×10^{-8} M 이하의 K_D로, 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하의 K_D로 세포 표면 상에 발현된 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하고, 상기의 다른 특징 중 적어도 5개, 및 바람직하게는 그들 모두를 나타내는 mAb를 포함한다.
- [0073] 예를 들어, 개시된 치료 방법에서 사용하는데 적합한 항-CXCR4 Ab는 (a) 표면 플라즈몬 공명 (비아코어 (Biacore))에 의해 결정 시, 약 5×10^{-9} 내지 1×10^{-10} M의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하고; (b) 약 10 nM 미만 (예를 들어, 약 1-10 nM)의 EC₅₀으로 CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제하고; (c) CXCR4를 발현하는 세포에서 아포토시스를 유도하고; (d) 시험관내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 증식을 억제하고; (e) 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포 증식을 억제하고/거나 CXCR4⁺ 종양 세포 아포토시스를 유도하고; (f) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제한다.
- [0074] 따라서, 본 개시내용은 암을 앓는 대상체에게 치료 유효량의 (a) NKAE 세포의 단리된 집단; 및 (b) (i) 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 높은 친화도로, 예를 들어, 약 5×10^{-9} M 이하의 K_D로 특이적으로 결합하고, (ii) CXCL12의 CXCR4에의 결합을, 예를 들어, 약 10 nM 미만의 EC₅₀으로 억제하고, (iii) CXCR4/CXCL12 신호전달을 억제하고, 예를 들어, CXCR4 발현 세포의 CXCL12-유도된 이동을, 예를 들어, 약 20 nM 이하의 EC₅₀으로 억제하는 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 조합을 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 또한 CXCR4를 발현하는 세포에서 아포토시스를 유도한다.
- [0075] 특정 측면에서, 치료적 용도의 본원에 개시된 항-CXCR4 Ab는 F7, F9, D1 또는 E2의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 그의 조합을 포함한다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR1의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 1-4에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR2의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 5-8에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 9-12에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR1의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 13-16에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR2의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 17-20에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 21-24에 제시되어 있다. 배선 복귀 돌연변이화된 "GL" 변이체, 즉, F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL은 각각 F7, F9, D1 및 E2와 동일한 CDR을 갖는다. 본 개시내용 전반에 걸쳐 확인된 CDR 영역은 카바트 (Kabat) 시스템 (Kabat *et al.*, 1991)을 사용하여 기재되었다.

- [0076] 특정의 다른 측면에서, 치료적 용도의 본원에 개시된 항-CXCR4 Ab는 하기를 포함한다:
- [0077] (a) 서열식별번호: 25 또는 33에 기재된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 29 또는 37에 기재된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인;
- [0078] (b) 서열식별번호: 26 또는 34에 기재된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 30 또는 38에 기재된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인;
- [0079] (c) 서열식별번호: 27 또는 35에 기재된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 31 또는 39에 기재된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인; 또는
- [0080] (d) 서열식별번호: 28 또는 36에 기재된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 32 또는 40에 기재된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인.
- [0081] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CXCR4 Ab는 하기를 포함한다:
- [0082] (a) 서열식별번호: 1에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 5에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 9에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 13에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 17에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 21에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0083] (b) 서열식별번호: 2에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 6에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 10에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 14에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 18에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 22에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0084] (c) 서열식별번호: 3에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 7에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 11에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 15에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 19에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 23에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- [0085] (d) 서열식별번호: 4에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 8에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 12에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 16에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 20에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 24에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산 또는 그의 보존적 변형을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0086] 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 1에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 5에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 9에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열식별번호: 13에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 17에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열식별번호: 21에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- [0087] 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:

- [0088] (a) 서열식별번호: 2에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 6에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 10에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열식별번호: 14에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 18에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열식별번호: 22에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0089] (b) 서열식별번호: 3에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 7에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 11에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열식별번호: 15에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 19에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열식별번호: 23에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- [0090] (c) 서열식별번호: 4에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 8에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 12에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 서열식별번호: 16에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열식별번호: 20에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열식별번호: 24에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0091] 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 F7GL, F7, F9GL, F9, D1GL, D1, E2GL 및 E2 mAb의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 25 또는 33에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 29 또는 37에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0092] 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:
- [0093] (a) 서열식별번호: 25 또는 33에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 29 또는 37에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0094] (b) 서열식별번호: 26 또는 34에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 30 또는 38에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0095] (c) 서열식별번호: 27 또는 35에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 31 또는 39에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0096] (c) 서열식별번호: 28 또는 36에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 32 또는 40에 기재된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0097] 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소타입의 것인 중쇄 불변 영역을 포함한다. 추가 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 비롯한 이펙터 기능을 갖는 중쇄 불변 영역 (예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG3)을 포함하고, 예를 들어, 이는 인간 IgG3, 또는 바람직하게는 인간 IgG1 이소타입의 것이거나, 또는 이펙터 기능을 증가시키고, 면역억제 조절 T 세포 (Treg) 및 골수-유래 억제 세포 (MDSC)의 고갈을 매개하는 돌연변이 (예를 들어, E333A 또는 E333S; 문헌 [Idusogie *et al.*, 2001])를 포함한다. 이들 면역억제 세포는 CXCR4를 과다발현하는 것으로 공지되어 있고 (WO 2016/201425), 항-CXCR4-매개의 Treg 및/또는 MDSC의 고갈은 항-종양 효과의 증강에 기여할 수 있다.
- [0098] 특정의 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab는 이펙터 기능이 없는 중쇄 불변 영역 (예를 들어, 인간 IgG2, 또는 바람직하게는 IgG4)을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 IgG4 중쇄 불변 영역은, 힌지 영역 내의 세린 잔기를 IgG1 이소타입 Ab의 상응하는 위치에서 일반적으로 발견되는 프롤린 잔기로 대체하는 S228P 돌연변이 (카바트 시스템을 이용하여 넘버링; 문헌 [Kabat *et al.*, 1991])를 함유한다. 울로쿠플루마에 존재하는 상기 돌연변이는 야생형 IgG4 Ab와 연관된 Fc 수용체 활성화에 대한 낮은 친화성은 유지

하면서, 내인성 IgG4 Ab와의 Fab 아암 교환을 방지한다.

- [0099] 다른 실시양태에서, Ab는 인간 카파 또는 람다 불변 영역인 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0100] 본원에 개시된 방법에서 사용하는데 적합한 항-CXCR4 Ab는 울로쿠플루맙이다. 울로쿠플루맙은 2개의 1상 임상 시험에서 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 여포성 림프종 (FL) 및 미만성 거대 B 세포 림프종 (DLBCL)을 비롯한 각종 혈액 악성종양을 대상체에서 안전하고 허용가능한 프로파일을 갖는 것으로 평가되었다. AML 및 MM 코호트로부터의 효능 데이터가 제시되었으며, 이는 울로쿠플루맙을 표준 요법에 추가하는 것에 관하여 고무적인 결과를 나타내며 (Becker *et al.*, 2014; Ghobrial *et al.*, 2014), AML 및 돌연변이화된 CXCR4 발덴스트롬 거대글로불린혈증 환자에서 1/2 상 임상 시험이 계속 진행되고 있다 (클리니칼 트라이얼즈 웹사이트, <http://www.clinicaltrials.gov>에서 NCT02305563 및 NCT03225716 참조). 특정 실시양태에서, 울로쿠플루맙의 인간 IgG1 변이체가 사용된다.
- [0101] 다른 적합한 항-CXCR4 Ab는, 예를 들어, c414H5 및 c515H7로 지정된 항체 (WO 2010/037831), 항체 I, 항체 II, 항체 III, 항체 IV, 및 항체 V로 지정된 Ab (미국 특허 번호 7,892,546), 6C7로 지정된 Ab (WO 2013/013025), 및 인간화 3G10 Ab, 예를 들어, h3G1 0.A57.A58, h3G10.1.91.A58A 및 h3G10.1.91.A58B로 지정된 Ab (미국 공개 번호 2015/0037328)를 포함한다.
- [0102] 개시된 발명의 방법에서 사용가능한 항-CXCR4 Ab는 또한 상기 Ab의 항원-결합 부분을 포함한다. Ab의 항원-결합 기능은 전장의 Ab의 단편에 의해서 수행될 수 있다는 것은 충분히 입증되어 왔다. Ab의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설피드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 및 (iv) Ab의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편을 포함한다.
- [0103] 처음에 효소, 예컨대 과산화 및 펩신에 의한 단백질분해를 통해 수득된 상기 단편은 이후 1가 및 다가 항원-결합 단편으로 조작되었다. 예를 들어, Fv 단편의 두 도메인, V_L 및 V_H 는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이는 재조합 방법을 사용하여, 상기 두 도메인이 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 형성하는 단일 단백질 쇄로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커 펩티드에 의해 연결됨으로써 단일 쇄 가변 단편 (scFv)으로 공지된 1가 분자를 형성할 수 있다. 2가 또는 이가 scFv (디-scFv 또는 비-scFv)는 2개의 V_H 및 2개의 V_L 영역을 함유하는 tandem scFv로 공지된 단일 펩티드 쇄 내에서 2개의 scFv를 연결함으로써 조작될 수 있다. ScFv 이량체 및 그 초과와 다량체가 또한 두 가변 영역이 함께 폴딩하기에는 너무 짧은 10개 미만의 아미노산으로 이루어진 링커 펩티드를 사용하여 생성될 수 있으며, 상기와 같이 너무 짧기 때문에 scFv는 이량체화되고, 디아바디를 생산하거나, 또는 다른 다량체를 형성하게 된다. 디아바디는 상응하는 scFv에 대한 K_D 값보다 최대 40배 더 낮은 해리 상수를 가지며, 상기 scFv보다 훨씬 더 높은 친화도 그의 동족 항원에 결합하는 것으로 나타났다. 매우 짧은 링커 (≤ 3 개 아미노산)를 통해, 그의 항원에 대하여 디아바디보다 훨씬 더 높은 친화도를 보이는 3가 트리아바디 또는 4가 테트라아바디가 형성된다. 다른 변이체는 scFv- C_{H3} 이량체인 미니바디, 및 더 큰 scFv-Fc 단편 (scFv- C_{H2} - C_{H3} 이량체)를 포함하고, 심지어 단리된 CDR도 항원-결합 기능을 나타낼 수 있다.
- [0104] 따라서, 특정 실시양태에서, Ab 단편은 Fab, $F(ab')_2$, Fd 및 Fv 단편, 단일 도메인 Ab (sdAb), 단일-쇄 가변 단편 (scFv), 2가 scFv (디-scFv) 및 이가 scFv (비-scFv), 디아바디, 미니바디, 및 단리된 CDR로부터 선택된다. 특정의 바람직한 실시양태에서, Ab 단편은 Fab, $F(ab')_2$, Fd 및 Fv 단편 및 단일 쇄 가변 단편 (scFv)으로부터 선택된다. 상기 Ab 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상의 재조합 기술을 사용하여 조작되고, 단편은 무손상 Ab와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다. Ab 및 관련된 변이체의 상기 단백질 분해 및 조작된 단편은 모두 (추가적 상세한 설명을 위해, 문헌 [Hollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010] 참조) Ab의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0105] 교차-경쟁 Ab
- [0106] 개시된 방법에서 사용가능한 추가의 항-CXCR4 Ab는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하고, 인간 CXCR4에의 결합에 대하여 참조 Ab, 예를 들어, 울로쿠플루맙 (F7GL) 또는 F7, F9, D1 및 E2로 지정된 Ab 중 임의의 것 (예를 들어, WO 2008/060367; WO 2013/071068 참조)과 경쟁하는 Ab를 포함한다. 항원에의 결합에 대하여 "교차-경쟁"할 수 있는 한쌍의 Ab의 능력은 제1 Ab가 제2 Ab와 실질적으로 동일한 항원 에피토프 영역에 결합하

고, 제2 Ab의 상기 특정한 에피토프 영역에의 결합을 감소시키고, 반대로, 제2 Ab가 제1 Ab와 실질적으로 동일한 항원 에피토프 영역에 결합하고, 제1 Ab의 상기 특정한 에피토프 영역에의 결합을 감소시키는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 울로쿠플루맵의 인간 CXCR4에의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있는 시험 Ab의 능력은 참조 Ab가 울로쿠플루맵이 결합하는 것과 실질적으로 동일한 인간 CXCR4 에피토프 영역에 결합한다는 것을 입증한다. 따라서, 개시된 방법에서 사용가능한 항-CXCR4 Ab는 참조 Ab, 예를 들어, 울로쿠플루맵과 실질적으로 동일한 항원 에피토프 영역에 결합하는 Ab를 포함한다.

[0107] 제1 Ab가 제2 Ab의 항원에의 결합을 적어도 약 40%만큼 감소시킨다면, 제1 Ab는 제2 Ab이 결합하는 것과 "실질적으로 동일한 에피토프" 또는 "실질적으로 동일한 결정기"에 결합하는 것으로 간주된다. 바람직하게는, 제1 Ab는 제2 Ab의 항원에의 결합을 약 50% 초과 (예를 들어, 적어도 약 60% 또는 적어도 약 70%)만큼 감소시킨다. 보다 바람직한 실시양태에서, 제1 Ab는 제2 Ab의 항원에의 결합을 약 70% 초과 (예를 들어, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%)만큼 감소시킨다. 제1 및 제2 Ab의 순서는 역전될 수 있고, 즉, "제2" Ab가 먼저 표면에 결합될 수 있고, 이후 "제1"이 "제2" Ab의 존재 하에서 표면과 접촉하게 된다. Ab가 항원에 첨가된 순서와 상관없이 항원에의 결합이 경쟁적으로 감소된 것으로 관찰되었다면, Ab는 "교차-경쟁"하는 것으로 간주된다.

[0108] 교차-경쟁 Ab는 그가 실질적으로 동일한 항원, 예컨대 CXCR4 수용체 에피토프 영역에 결합함에 따라 유사한 기능적 특성을 갖을 것으로 예상된다. 교차-경쟁 정도가 높을수록, 기능적 특성은 더 유사할 것이다. 예를 들어, 2개의 교차-경쟁 Ab는 그들이 각각 나머지 다른 한 Ab의 에피토프에의 결합을 적어도 약 80%만큼 억제하였다면, 이는 본질적으로 동일한 기능적 특성을 갖을 것으로 예상된다. 교차-경쟁 Ab가 해리 상수 (K_D)에 의해 측정 시, 에피토프에의 결합에 대해 유사한 친화도를 나타낸다면, 이러한 기능상의 유사성은 훨씬 더 가까울 것으로 예상된다.

[0109] 교차-경쟁 항-항원 Ab는 재조합 항원 분자 또는 세포-표면 발현된 항원 분자를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (비아코어®) 분석, ELISA 검정법 또는 유세포 분석법을 비롯한, 표준 항원 결합 검정법에서 검출가능하게 경쟁할 수 있는 그의 능력에 기반하여 쉽게 확인될 수 있다. 예로서, 참조 Ab가 인간 CXCR4에의 결합에 대하여 울로쿠플루맵과 경쟁하는지 여부를 확인하기 위한 간단한 경쟁 검정법은 하기를 수반할 수 있다: (1) 포화 농도로 적용된 울로쿠플루맵의, 인간 CXCR4가 그 위에 고정화되어 있는 비아코어 칩 (또는 표면 플라즈몬 공명 분석을 위한 다른 적합한 매체)에의 결합 측정, 및 (2) 울로쿠플루맵의, 시험 Ab가 미리 그에 결합되어 있는 인간 CXCR4-코팅된 비아코어 칩 (또는 다른 적합한 매체)에의 결합 측정. 시험 Ab의 존재 및 부재 하에서의 울로쿠플루맵의 CXCR4-코팅된 표면에의 결합이 비교된다. 시험 Ab의 존재 하에서의 울로쿠플루맵 결합의 유의적인 (예를 들어, 약 40% 초과) 감소는 두 Ab 모두 그가 CXCR4 표적에의 결합에 대해 경쟁하는 것과 실질적으로 동일한 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. 제2 Ab에 의한 제1 Ab의 항원에의 결합 억제 백분율은 $[1 - (\text{제2 Ab 존재 하에서 검출된 제1 Ab 결합}) / (\text{제2 Ab 부재 하에서 검출된 제1 Ab 결합})] \times 100$ 과 같이 계산될 수 있다. Ab가 교차-경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, 울로쿠플루맵의 존재 하에서 시험 Ab의 CXCR4-코팅된 칩에의 결합을 측정하는 것을 제외하고, 경쟁 결합 검정법이 반복된다.

[0110] 한 측면에서, 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 항-CXCR4 Ab는 CXCR4에의 결합에 대하여 mAb F7GL (울로쿠플루맵; 각각 서열식별번호: 33 및 37에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), F7 (각각 서열식별번호: 25 및 29에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), mAb 79GL (각각 서열식별번호: 34 및 38에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), mAb F9 (각각 서열식별번호: 26 및 30에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), mAb D1GL (각각 서열식별번호: 35 및 39에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), mAb D1 (각각 서열식별번호: 27 및 31에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), mAb E2GL (각각 서열식별번호: 36 및 40에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐), 및 mAb E2 (각각 서열식별번호: 28 및 32에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가짐) 중 임의의 것과 교차-경쟁한다. CXCR4에의 결합에 대해 교차-경쟁하는 Ab는 CXCR4 상의 동일한 에피토프 영역 (즉, 동일 또는 중복 에피토프)에 결합한다.

[0111] 특정 실시양태에서, 교차-경쟁 항-CXCR4 mAb는 서열식별번호: 41에 기재된 인간 V_H 3-48 배선 서열로부터 유래된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 영역 및/또는 서열식별번호: 42에 기재된 인간 V_L L15 배선 서열로부터 유래된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 영역을 포함한다.

[0112] *개시된 방법에 의해 치료가능한 광범위한 암*

- [0113] 암 세포를 공격하고, 파괴하는 면역계의 유연성 이용에 의존하는 면역-종양 학은 매우 넓은 범위의 암을 치료하는데 적용가능하다 (예를 들어, 문헌 [Guillerey *et al.*, 2016; Lowry and Zehring, 2017; Callahan *et al.*, 2016; Kamta *et al.*, 2017; Farkona *et al.*, 2016] 참조). 따라서, CXCR4/CXCL12 신호전달 경로 차단과 조합된, NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포 투여를 이용하는 개시된 방법은 매우 다양한 고형 종양 및 액상 종양 둘 다를 치료하는데 적용가능하다.
- [0114] 특정 실시양태에서, 개시된 조합 요법 방법은 고형 종양인 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 소아 종양이다. 추가 실시양태에서, 소아 종양은 횡문근육종, 골육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 유잉 육종이다. 공격적인 치료에도 불구하고, 상기 종양을 가진 아동 중 거의 절반은 진행성 질환을 갖는다. 전이성 질환을 가진 상기 환자의 경우에 예후는 특히 불량하며, 상기 환자 중 적어도 2/3는 질환 진행을 보인다. 재발 이후의 결과는 일반적으로 암울하다. 재발성 유잉 육종 환자의 경우, 예를 들어, 장기간 생존 가능성은 현재 20% 미만이며, 2년 이내에 재발이 발생한다면, 10% 미만이 된다 (Leavey *et al.*, 2008). 그러므로, 특히, 예컨대 전이성 또는 재발성 질환과 같이 고위험 특징을 보이는 환자의 경우, 약물 내성의 세포 메커니즘을 우회하는 새로운 치료적 접근법이 절실히 요구되고 있다.
- [0115] 다른 실시양태에서, 고형 종양은 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 NSCLC, 비-편평 NSCLC, 편평 세포암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 췌장암, 췌장관 선암종 (PDAC), 난소암, 자궁경부암, 난관 암종, 자궁 (자궁내막) 암, 자궁내막 암종, 자궁 육종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 요도암, 요관암, 전립선암, 전이성 거세-저항성 전립선암 (mCRPC), 고환암, 음경암, 방광암, 유방암, 삼중 음성 유방암 (TNBC), 남성 유방암, 배세포 종양, 육종, 피부암, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 골암, 흑색종, 두경부암, 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 갑상선암, 경구암, 구강암, 타액선암, 인후암, 식도암, 위장암, 위암, 소장암, 담낭 및 담관 암, 결장직장암, 결장 암종, 직장암, 항문암, 간암, 간세포암종, 신장암, 신세포 암종, 내분비계 암, 흉선 종양, 흉선종, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 중피종, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS) 신 생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌암, 신경교종, 뇌간 신경교종, 교모세포종, 다형성 교모세포종 (GBM), 신경모세포종, 뇌하수체 선종, 표피양암, 소아기 고형 종양, 소아 육종, 전이성 암, 원발 부위 불명 암, 환경-유발 암, 바이러스-관련 암, AIDS-관련 암, 카포시 육종, 바이러스 기원의 암, 진행성, 불응성 및/또는 재발성 고형 종양, 및 상기 고형 종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 진행성, 절제불가능, 전이성, 불응성 암, 및/또는 재발성 암이다.
- [0116] 특정의 다른 실시양태에서, 본 조합 요법 방법은 혈액 악성종양인 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 혈액 악성 종양은 모든 유형의 백혈병, 림프종, 및 골수종을 비롯한, 2개의 주요 혈액 세포 계통, 즉, (과립구, 적혈구, 혈소판, 대식세포 및 비만 세포를 생산하는) 골수성 세포주, 또는 (B, T, NK 및 형질 세포를 생산하는) 림프 세포주로부터 유래된 액상 종양을 포함한다. 본 조합 요법 방법을 사용하여 치료될 수 있는 혈액 악성종양은, 예를 들어, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), AML, CLL, 만성 골수 백혈병 (CML), 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), MM, 무증상 골수종, 의미 불명 모노클로날 감마병증 (MGUS), 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양, 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암을 포함한다.
- [0117] 다른 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성, 만성, 림프구성 (림프모구성) 및/또는 골수 백혈병, 예컨대 ALL, AML, CLL, 및 CML; 림프종, 예컨대 HL, NHL, 그 중 약 85%는 B 세포 림프종인 것으로서, 예컨대 DLBCL, FL, CLL/소 림프구성 림프종 (SLL), 외투 세포 림프종, 변연부 B 세포 림프종 (점막 연관 림프 조직 (MALT) 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 및 비장 변연부 B 세포 림프종), 버킷 림프종, 림프형질세포양 림프종 (LPL; 이는 또한 발덴스트롬 거대글로불린혈증 (WM)으로도 공지됨), 모발상 세포 림프종, 및 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종, T 세포 림프종인 NHL, 예컨대 전구체 T 림프모구성 림프종/백혈병, T 림프모구성 림프종/백혈병 (T-Lbly/T-ALL), 말초 T 세포 림프종 예컨대 피부 T 세포 림프종 (CTLC, 즉, 균상 식육종, 세자리 증후군 등), 성인 T 세포 림프종/백혈병, 혈관면역모세포 T 세포 림프종, 비형 림프절외 자연 킬러/T 세포 림프종, 장병증 연관 장 T 세포 림프종 (EATL), 역형성 거대 세포 림프종 (ALCL), 및 상세불명의 말초 T 세포 림프종, 급성 골수성 림프종, 림프형질세포양 림프종, 단구양 B 세포 림프종, 혈관중심성 림프종, 장 T 세포 림프종, 원발성 종격동 B 세포 림프종, 이식 후 림프증식성 장애, 진성 조직구성 림프종, 원발성 삼출 림프종, 미만성 조직구성 림프종 (DHL), 면역모세포성 거대 세포 림프종, 및 전구체 B-림프모구성 림프종; 골수종, 예컨대 다발성 골수종, 무증상 골수종 (이는 또한 무통형 골수종으로도 명명됨), 의미 불명 모노클로날 감마병증 (MGUS), 고립 형질세포종, IgG 골수종, 경쇄 골수종, 비분비성 골수종, 및 아밀로이드증; 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암이다. 본 방법은 또한 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양의 치료에도 적용 가능하다.

- [0118] 제약 조성물 및 투여량 요법
- [0119] 본원에 개시된 방법에서 사용되는 Ab 및 NK 세포는 조성물, 예를 들어, Ab 또는 NKAE 세포의 집단 및 제약상 허용되는 담체를 함유하는 제약 조성물을 구성할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "제약상 허용되는 담체"는 생리적으로 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, Ab를 함유하는 조성물을 위한 담체는 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해) 정맥내, 피하, 근육내, 비경구, 척추 또는 표피 투여하는데 적합하다.
- [0120] SC 주사를 위한 옵션은 세포의 매트릭스에 기인하여 피하로 전달될 수 있는 생물체제 및 약물의 부피에 대한 종래 제한을 제거하는, Ab와 재조합 인간 히알루로니다제 효소 (rHuPH20)와의 공동-제제화를 수반하는, 할로자임 테라퓨틱스(Halozyme Therapeutics)의 인헨즈(ENHANZE)[®] 약물 전달 기술에 기반한다 (미국 특허 번호 7,767,429).
- [0121] 바람직하게는, NK 세포를 함유하는 조성물을 위한 담체는 정맥내, 동맥내, 복강내, 대퇴부내, 척수강내, 또는 중앙내 주사, 또는 중앙 절제 공동 내로의 주사에 적합하다.
- [0122] 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 허용되는 염, 항산화제, 수성 및 비-수성 담체, 및/또는 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤화제, 유화제, 및 분산제를 포함한다.
- [0123] 투여량 요법은 최적의 원하는 반응, 예를 들어, 최대 치료적 반응 및/또는 최소 부작용을 제공하기 위해 조정된다. 항-CXCR4 Ab의 투여를 위한 투여량은 대상체의 체중 kg당 약 0.01 내지 약 20 mg, 바람직하게는 약 1.0 내지 약 15 mg 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 체중 kg당 약 0.1, 0.3, 1, 2, 3, 5, 10, 15 또는 20 mg, 및 바람직하게는 체중 kg당 약 1, 3, 5, 10 또는 15 mg일 수 있다. 대안적으로, 체중 기준 용량 대신, 고정 또는 균일 용량, 예를 들어, 약 50 내지 약 2000 mg의 Ab가 투여될 수 있다. 예를 들어, 투여량은 약 200, 약 400, 약 800, 약 1600, 또는 약 2000 mg, 및 바람직하게는 약 400, 약 800, 약 1600일 수 있다. NKAE 세포는 약 10^6 내지 약 10^{14} 개 세포 범위의 세포 절대 수에 기초한 용량으로 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 세포는 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} , 또는 1×10^{14} 개 세포인 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, NKAE 세포는 약 1×10^7 내지 5×10^{10} 개 세포, 바람직하게는 1×10^8 내지 5×10^9 개 세포, 보다 바람직하게는 약 5×10^8 개 세포인 용량으로 대상체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, NKAE 세포는 체중 kg당 약 1×10^5 내지 1×10^8 개 세포, 바람직하게는 약 1×10^6 내지 5×10^7 개 세포, 보다 바람직하게는 약 7.5×10^6 개 세포인 용량으로 대상체에게 투여된다. NKAE 세포는 환자에 다수회에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 환자는 1 내지 4회 주입, 전형적으로, 2 또는 3회 주입을 받을 수 있다. 상기 주입은 일반적으로 적어도 1주 간격을 두고 진행된다.
- [0124] Ab에 대한 투약 스케줄은 전형적으로 Ab의 전형적인 약동학적 특성에 기반하여 수용체 점유 (RO)를 지속시키는 노출을 달성하도록 디자인된다. 예시적인 치료 요법은 약 매주 2회, 약 매주 1회, 약 매 2주마다 1회, 약 매 3주마다 1회, 약 매 4주마다 1회, 또는 약 매월 1회 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분을 투여하는 것을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR Ab는 대략 매주 대상체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, Ab는 약 매 2주마다 1회 또는 약 매 3주마다 1회 투여된다. 특정의 바람직한 실시양태에서, NK 세포는 환자에게 약 매주 투여된다. 다른 실시양태에서, NK 세포는 환자에게 약 매주 2회 또는 약 매 2주마다 1회 투여된다. 투여량 및 스케줄링은 치료가 진행되는 과정 동안 바뀔 수 있다.
- [0125] 본원에 개시된 방법들 중 임의의 방법의 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 정맥내 또는 피하 투여에 의해 환자에게 투여된다. 추가 실시양태에서, NK 세포 및 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 대상체에게 순차적으로 투여된다. "순차적" 투여란, NK 세포 및 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분 중 하나를 그 나머지 하나 이전에 투여한다는 것을 의미한다. 어느 치료제든 먼저 투여될 수 있고; 즉, 특정 실시양태에서, NK 세포가 Ab 또는 그의 항원-결합 부분 이전에 투여되는 반면, 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이 NK 세포 이전에 투여된다. 전형적으로, Ab는 약 60분 기간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여된다.
- [0126] 특정 실시양태에서, NK 세포 및 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 별개의 조성물로 공동으로 투여되는 반면, 다른

실시양태에서, NK 세포 및 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 단일 조성물로 혼합되고 공동으로 투여된다.

- [0127] 본원에 개시된 치료적 방법 중 임의의 방법의 특정 실시양태에서, NK 세포 및 Ab 또는 그의 항원-결합 부분 조합의 투여는, 임상적 이익이 관찰되는 한, 또는 처리불가능한 독성 또는 질환 진행이 존재할 때까지 계속 진행된다.
- [0128] *NK 세포 및 항-CXCR4 Ab 조합의 의학적 용도*
- [0129] 본 개시내용은 또한 암을 앓는 대상체 치료에서 조합하여 사용하기 위한 NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포의 집단, 및 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 이들 치료제는 본원에 개시된 전 범위의 암의 조합 요법에서 사용될 수 있다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 암은 소아 종양, 예를 들어, 횡문근육종, 골육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 유잉 육종이다.
- [0130] 개시된 발명의 한 측면은 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 의약 제조를 위한 NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포의 집단, 및 항-CXCR4 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 조합된 용도이다. 의약 제조를 위한, 조합된 임의의 상기 NKAE 세포 및 항-CXCR4 Ab의 용도는 본원에 개시된 전 범위의 암에 광범위하게 적용될 수 있다. 상기 용도의 특정의 바람직한 실시양태에서, 암은 소아 종양, 예를 들어, 횡문근육종, 골육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 유잉 육종이다.
- [0131] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 치료제의 상기 조합을 이용하는 치료 방법의 모든 실시양태에 상응하는 항-CXCR4 Ab와 함께 조합하여 NKAE 세포의 집단을 사용하는 의학적 용도를 제공한다.
- [0132] *키트*
- [0133] 치료적 용도를 위한 NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포의 집단, 및 항-CXCR4 Ab 및 그의 항원-결합 부분을 포함하는 키트가 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 명시하는 라벨 및 사용 설명서를 포함한다. 라벨이라는 용어는 임의의 필기 자료, 또는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되는 기록된 자료를 포함하며, 이는 다르게는 키트를 수반한다. 따라서, 본 개시내용은 (a) 약 50 내지 약 2000 mg 범위의 하나 이상의 투여량의, 암 세포의 표면 상에 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 Ab 또는 그의 항원-결합 부분; (b) 약 10^6 내지 약 10^{14} 개 범위의 하나 이상의 투여량의, NK 세포, 바람직하게는 NKAE 세포의 집단; 및 (c) 본원에 개시된 조합 요법 방법 중 임의의 것에서 Ab 또는 그의 부분 및 NK 세포를 사용하는 것에 대한 설명서를 포함하는, 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, Ab는 단위 투여 형태로 공동-패키징될 수 있다. 인간 환자를 치료하기 위한 특정의 바람직한 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 항-인간 CXCR4 Ab 중 어느 하나, 예를 들어, 울로쿠플루맙, 또는 인간 CXCR4에의 결합에 대해 울로쿠플루맙과 경쟁하는 Ab를 포함한다.
- [0134] 본 발명은, 추가로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌의 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.
- [0135] 실시예 1
- [0136] 상이한 육종 세포주에 의한 CXCR4의 발현
- [0137] 상이한 육종 세포주: 2개의 횡문근육종 세포주 (RH30 및 CW9019), 2개의 유잉 육종 세포주 (A4573 및 A673) 및 2개의 골육종 세포주 (MG-63 및 143B)의 전면생장 세포 배양물 상에서 유세포 분석법에 의해 CXCR4의 표면 발현을 분석하였다. 143B (CRL-8303), MG-63 (CRL-1427) 및 A673 (CRL1598) 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 입수하였다. RH30 (ACC-489)은 라이프니츠-인스티튜트 DSMZ(Leibniz-Institut DSMZ)로부터 입수하였다. A4573 및 CW9019는 각각 하비에르 알론소 박사(Dr. Javier Alonso) (카를로스 III세 건강 연구소(Institute of Health Carlos III)) 및 조셉 로마 박사(Dr. Josep Roma) (발 헤브론 연구소(Vall d'Hebron Research Institute))로부터 기증받았다. 염색을 위해, 2×10^5 개 세포/웰을 V-바닥 96-웰 플레이트에서 원심분리하고, 0.5% 소혈청 알부민 (BSA, 론자(Lonza)), 1% FBS 및 0.1% 아지드화 나트륨 (PBSst)을 함유하는 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS, 론자)로 세척하였다. 세포를 40 μ g/ml 래트 IgG (시그마(Sigma)); 100 μ l 최종 부피, 20 min, 4 $^{\circ}$ C)와 함께 미리 인큐베이션함으로써 비-특이적 결합을 차단하였다. 세포를 항-CXCR4-APC mAb (BD 파밍겐(BD Pharmingen); 클론 12G5) 또는 이소타입-매칭된 mAb (30 min, 4 $^{\circ}$ C)와 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 나비오스 사이토미터(Navios cytometer) (베크만 쿨터(Beckman Coulter))에서 분석하였다.

- [0138] qRT-PCR을 위해, 제조사의 프로토콜에 따라 RN이지 미니 키트(RNeasy Mini Kit) (퀴아젠(Qiagen))을 이용하여 세포 배양 RNA를 수득하였다. 260 nm에서 추출물의 흡광도를 측정함으로써 RNA를 정량화하였다. 인간 CXCR4를 코딩하는 mRNA의 상대적 발현 수준은 내부 대조군으로서 GUS 유전자 발현을 사용하여 qRT-PCR에 의해 결정하였다. 슈퍼스크립트 IV 퍼스트-스트랜드 신테시스 시스템(Superscript IV First-Strand Synthesis System) (인비트로젠(Invitrogen)) 및 공급업체의 프로토콜을 이용하여 1 µg의 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 인간 CXCR4 (Hs00237052_m1, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)) 및 인간 GUS (Fw: 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3', Rv: 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA-3'; Probe: 5'-[6FAM]CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTC[TAMRA]-3'; 모두 시그마로부터 입수)에 대한 프라이머를 이용하여 cDNA를 이중으로 증폭시켰다. 로슈 라이트사이클러 480(Roche LightCycler 480) 상에서 6-FAM 염료 및 비-형광성 소광제로 표지된 패스트 스타트 택맨 프로브 마스터(Fast Start TaqMan Probe Master) (로슈(Roche))를 이용하여 증폭 (50 사이클; 95°C에서 15 s 동안, 60°C에서 1 min 동안)을 모니터링하였다. $2^{-\Delta CT}$ 방법 (여기서, $\Delta CT = (Ct \text{ 관심 유전자} - Ct \text{ 내부 대조군})$)을 사용하여 상대적 발현을 분석하였다.
- [0139] 도 1A에 제시된 바와 같이, RH30 폐포형 횡문근육종 세포 배양물 중에서 가장 높은 비율의 CXCR4⁺ 세포가 관찰되었고, CXCR4 발현은 $98.6 \pm 0.7\%$ 의 세포에서 검출되었다.
- [0140] 본 결과는 qRT-PCR 분석에 의해 결정된 바와 같이 CXCR4 mRNA의 발현과 일치하였다. RH30 배양물은 GUS 대조군 유전자 발현 대비 1.38 ± 0.014 를 보였다 (도 1B).
- [0141] 실시예 2
- [0142] CXCL12 구배방향으로의 상이한 육종 세포주의 이동 및 침습
- [0143] 생체내 전이 잠재능의 시험관내 지표로 간주되는 CXCL12 (100 ng/ml) 또는 우태아 혈청 (FBS, 10%) 방향으로의 상이한 육종 세포주 (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 및 143B)의 이동 능력을 트랜스웰 검정법 (48 h)으로 시험하였다. 세포를 24 h 동안 고갈 완충제 (DMEM-1% FBS) 중에 인큐베이션하였다. 이어서, 2×10^5 개 세포를 80 µl의 이동 완충제 [DMEM-1% 인간 혈청 알부민 (HSA); 그리폴스(Grifols)] 중에 현탁시키고, 96-웰 트랜스웰 플레이트 (8.0 µm 포어 크기, 뉴로프로브(Neuroprobe))의 상부 구획에 배치하였다. 하부 구획은 300 µl의 이동 완충제 단독 (비조건화 배지), 100 ng/ml CXCL12 (알앤디 시스템즈(R&D Systems))를 포함하는 이동 완충제, 또는 10% FBS를 포함하는 이동 완충제로 충전시켰다. 동일한 조건하에서 침습 능력을 측정하였고, 여기서, 트랜스웰 막의 상부는 20 µl의 0.2 mg/ml 매트릭젤 (코닝(Corning))로 코팅하였다.
- [0144] 48 h 동안 인큐베이션하여 세포가 막을 통해 이동/침습할 수 있도록 한 후, 막의 상단면에 남아있는 세포는 탈지면 스왑을 사용하여 제거한 반면, 막의 하부 측 상의 세포는 메탄올로 고정시키고, 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. PBS로 세척한 후, 칼 자이스 액시오 200(Carl Zeiss Axiovert 200) 현미경을 사용하여 이동/침습 세포의 수를 결정하였다. 웰당 4개 시야를 200x로 계수하였다. 하기 공식에 따라 이동 및 침습 지수를 계산하였다: $\text{지수} = 100 \times [(\text{조건화 배지 방향으로 이동한 것으로 계수된 세포의 수} - \text{비조건화 배지 방향으로 이동한 것으로 계수된 세포의 수}) / (100 - \text{비조건화 배지 방향으로 이동한 것으로 계수된 세포의 수})]$.
- [0145] 결과는 도 2에 제시되어 있다. 상이한 육종 세포주는 고도의 화학주성인자 FBS 방향으로는 중간 정도 수준의 이동 및 침습 능력을 보였지만 (도 2A), 검정 조건하에서는 무시해도 될 정도의 이동 및 침습 능력을 보였다 (도 2B). 오직 RH30 세포만이 그의 비교적 높은 CXCR4 발현 수준에 부수적으로, 특이적으로 CXCR4 리간드, CXCL12 방향으로 이동 및 침습할 수 있다 (도 2B). CXCL12 방향으로의 RH30의 이동 및 침습 지수는 각각 35.23 ± 8.3 및 104.04 ± 16.4 였다.
- [0146] 그래프패드 프리즘 7(GraphPad Prism 7) 소프트웨어를 이용하여 통계 분석을 수행하였다. 달리 명시되지 않는 한, 비대응 스튜던츠 t 검정에 의해 평가된 바와 같이 $p < 0.05$ 로 통계적 유의도를 확립하였다. 달리 명시하지 않는 한, 결과는 평균 \pm SEM로 제시되어 있다.
- [0147] 실시예 3
- [0148] NKAЕ 세포는 RH30 세포에 대하여 세포독성을 띠고, NKAЕ 세포와 함께 조합된 항-CXCR4는 시험관내에서 RH30 세포의 이동 및 침습 능력을 시너지적으로 폐기한다
- [0149] 울로쿠플루맵은 완전한 인간 IgG4 항-CXCR4 mAb이기 때문에, ADCC를 유도할 것으로 예상되지는 않는다 (Davies and Sutton, 2015). 울로쿠플루맵으로, 이소타입 대조군 mAb로 미리 코팅되거나, 또는 어떤 mAb로도 코팅되지

많은 RH30 세포의 사멸 백분율로서 NKAE 세포의 세포용해 활성을 측정하였다. 건강한 공여자로부터의 NK 세포를 방사선조사된 K562-mb15-41BBL 세포 (Fujisaki *et al.*, 2009) 및 IL-2로 활성화 및 확장시켰다. 간략하면, 건강한 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 밀도 구배로 원심분리하여 (피콜-플라크(Ficoll-Paque), 지이 헬스케어(GE Healthcare)) (400 g, 30 min) 단리하였다. 싱가포르 국립 대학교(National University of Singapore)의 디. 캄파냐 교수(Professor D. Campana)로부터 기증받은, 유전적으로 변형된 K562mbIL15-41BBL 세포주에 100 Gy로 방사선조사하였다. 공여자의 PBMC를 방사선조사된 K562-mb15-41BBL 세포와 함께 1:1.5 비로 추가로 100 U/ml의 IL-2를 더하여 14-21일 동안 10% 인간 AB 혈청 (시그마) 및 100 IU/mL IL-2 (밀테니이 (Miltenyi))로 보충된 줄기 세포 성장 배지 (SCGM, 셀게닉스(Cellgenix)) 중에서 공동-배양하여 NKAE 세포를 수득하였다. 최종 농도가 1×10^6 개 세포/ml가 될 때까지 매 2-3일마다 신선한 배지를 첨가하였다. 유세포 분석법 (나비오스, 베크만 쿨터)에 의해 매주 NK 세포 ($CD3^+$, $CD56^+$), T 세포 ($CD3^+$, $CD56^-$) 및 NKT 세포 ($CD3^+$, $CD56^+$)의 백분율 및 표현형을 모니터링하였다. 본 연구에서 사용된 표지된 Ab는 하기 표 2에 열거되어 있다.

[0150] 표 2. 연구에서 사용된 표지된 Ab.

특이성	클론	이소타입	형광색소	제조업체
CD3	UCHT1	mIgG1	PE/Cy7	바이오레전드
CD45	J33	mIgG1	FITC	베크만 쿨터
CD56	B159	mIgG1	APC	BD 바이오사이언시스
CXCR4	12G5	mIgG2a	APC	BD 바이오사이언시스
이소타입 대조군	20102	mIgG2a	APC	알앤디 시스템즈

[0151]

[0152]

다양한 치료가 횡문근육종 세포에 미치는 효과를 연구하기 위해, EF1a 프로모터하에 녹색 형광 단백질 (GFP) 및 반딧불이 루시페라제 (Luc)를 코딩하는 재조합 레티바이러스 및 네오마이신 내성 마커 (암스바이오(Amsbio))로 감염시켜 생체발광 RH30 세포 (RH30-GFP-Luc)를 생성하였다. GFP를 높은 수준으로 발현하는 감염된 세포를 형광 활성화 세포 분류에 의해 단리하고, 클로닝하고, 확장시키고, 생체내 생체발광 검정법을 위해 사용하였다. RH-30-GFP-Luc 세포는 표면 CXCR4 발현을 유지하였고, 모체 RH30 세포와 유사한 성장 동적 성질을 나타내었다. 10% 열-불활성화된 우태아 혈청 (FBS, 깁코(Gibco)), 2 mM L-글루타민, 50 U/ml 페니실린, 및 50 µg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM, 론자) (완전 배지) 중에서 세포를 배양하였다.

[0153]

RH30-GFP-Luc 세포를 명시된 농도를 갖는 mAb와 함께 미리 인큐베이션하였다 (30 min). NKAE 및 표적 세포를 20:1 또는 5:1 비로 DMEM-10% FBS 중에서 공동-배양 (4 h)한 후, 이어서, 7-AAD로 염색하고 (10 min, 4°C), 유세포 분석법에 의해 분석하였다. GFP⁺ 집단 내에서 7-AAD-양성 세포에 대한 게이팅이 죽은 표적 세포의 비율을 나타내었다. 특이적 사멸을 $100 \times [(\text{샘플 중 죽은 표적 세포의 비율}(\%) - \text{자발적으로 죽은 표적 세포의 비율}(\%))/100 - \text{자발적으로 죽은 표적 세포의 비율}(\%)]$ 로서 계산하였다. 이펙터 세포 부재 하에 인큐베이션된 표적 세포를 사용하여 자발적 세포 사멸을 평가하였다.

[0154]

도 3A에서 알 수 있는 바와 같이, NKAE 세포는 20:1 E:T 비에서 23.0 ± 1.8 의 특이적인 RH30 세포 사멸을 유도한 반면, 울로쿠플루맙 및 대조군 mAb는 관찰된 세포독성에 대하여 거의 영향을 미치지 않거나, 또는 어떤 영향도 미치지 않았다.

[0155]

울로쿠플루맙 (MDX1338) 및 NKAE 세포가 개별적으로 및 조합으로 인간 재조합 CXCL12 구배 방향으로의 RH30 폐포형 횡문근육종 세포의 이동에 미치는 효과에 대해서도 또한 시험하였고, 시험관내에서의 이들 세포의 침습 능력을 트랜스웰 플레이트 및 매트릭셀을 이용하여 시험하였다. 상기 실험을 위해, 10^5 개의 RH30 세포를 명시된 최종 농도의 울로쿠플루맙, 대조군 IgG4 mAb 및/또는 500,000개의 NKAE 세포 (이펙터:표적 비, E:T = 5:1)와 함께 최종 부피 90 µl의 이동 완충제 중에서 혼합하고, 상기 기재된 바와 같이 검정법을 수행하였다.

[0156]

울로쿠플루맙 및 NKAE는 각각 시험관내 RH30 세포 이동 (도 3B) 및 침습 (도 3C)을 효율적으로 감소시켰지만, 두 요법의 조합은 시너지적으로 상호작용하여 이동 및 침습 둘 다를 완전히 폐기시켰다 (도 3B 및 3C). 항종양 효과가 단독요법으로서 투여된 항-CXCR4 또는 NKAE 세포 요법에 대해 관찰된 효과보다 더 크고, 개별적으로 각 처리에 의해 나타난 억제 수준의 합산보다 더 크기 때문에, 상기 항-CXCR4 및 NKAE 세포 요법의 조합은 시너지

적인 것으로 간주된다.

- [0157] 실시예 4
- [0158] 전이성 육종 마우스 종양 모델에서 항-CXCR4는 NKAE 세포의 생체내 항-종양 활성을 증강시킨다
- [0159] 단독으로 또는 항-CXCR4 Ab와의 조합으로 NKAE 세포 요법의 항-종양 활성을 평가하기 위해, 면역결핍 NSGTM 마우스에 이식되었을 때 복강 이식편으로서 성장하는 CXCR4⁺ RH30 폐포형 횡문근육종 세포를 이용하여 전이성 육종의 생체내 모델을 생성하였다. NSGTM 마우스 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ, 찰스 리버 라보라토리즈 (Charles River Laboratories))를 알베르토 솔로스 생물 의학 연구소(Alberto Sols Biomedical Research Institute) 동물 시설에서 유지시켰다. 모든 절차는 마드리드 동물 보호 구역(Comunidad de Madrid Animal Protection Area) (PROEX 220/16) 및 CSIC 윤리 위원회(CSIC Ethics Committee)의 승인을 받았다.
- [0160] 실시예 3에 기재된 바와 같이 K562-mb15-41BBL 세포를 이용하여 PBMC로부터 NKAE 세포를 제조하였다.
- [0161] GFP 및 루시페라제를 발현하는 렌티바이러스 입자를 사용하여 RH30 폐포형 횡문근육종 세포를 형질도입시켰다. 0일째 0.5 x 10⁶개의 RH30- GFP⁺Luc⁺ 세포를 6주령된 암컷 마우스에 정맥내로 (i.v.) 접종하여 전이성 육종의 생체내 모델을 생성하였다. 5개의 처리군을 확립하였다 (5마리 마우스/군): 비처리; 이소타입 대조군 IgG4 mAb; 항 CXCR4 울로쿠플루맷; NKAE 세포; 울로쿠플루맷 및 NKAE 조합. 3회 용량의 NKAE 세포 (각각 5 x 10⁶개 세포, 매주)를 0일째 (종양 이식 당일), 7일째 및 14일째에 마우스에 투여하였고, 6회 용량이 울로쿠플루맷 (15 mg/kg, 주 2회)을 0, 3, 7, 10, 14 및 18일째에 투여하였다. 발광 신호에 의해 결정되는 발생 종양의 크기를 35일째까지 측정하였고, 이 시점에서 마우스를 희생시켰다.
- [0162] 간략하면, D-루시페린 (150 mg/kg; 퍼킨 엘머(Perkin Elmer))을 분석 10 min 전에 복강내로 (i.p.) 투여하였다. 영상화하는 동안, 마우스를 IVIS-루미나 II(IVIS-Lumina II) (캘리퍼 라이프사이언시스(Caliper Lifesciences))를 사용하여 차광형 챔버에서 이소플루란으로 마취시켰다. 노출 시간은 100 s였다. 리빙 이미지 v4.5.2(Living Image v4.5.2) (퍼킨 엘머)를 사용하여 데이터를 정량화하고, 슈도컬러 영상을 생성하였다.
- [0163] 이어서, 폐, 간, 골수 및 비장 중의 미세전이를 인간 CXCR4-특이적 및 인간 GUS 택맨(TaqMAN) 프로브를 이용하여 qRT-PCR에 의해 검출하고, 정량화하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 RNA이지 미니 키트 (퀴아젠)를 이용하여 전체 RNA 추출을 위해 마우스 해부 기관 중 1/3을 사용하였다. 260 nm에서 추출물의 흡광도를 측정함으로써 RNA를 정량화하였다. 인간 CXCR4 및 인간 GUS를 코딩하는 mRNA의 상대적 발현 수준을 반정량적 RT-PCR에 의해 결정하였다. cDNA 합성 및 인간 CXCR4 및 인간 GUS 증폭을 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였다. 명시된 값은 10⁶개의 RH30 세포 펠렛에 의한 hCXCR4 및 hGUS 발현에 대해 상대적인 값이다.
- [0164] 헤마톡실린-에오신 염색 및 hCXCR4-특이적 Ab를 사용하는 면역조직화학법에 의해, 및 프로브로서 Alu-DNA를 사용하는 형광 동소 하이브리드화에 의해 미세전이를 또한 검출하였다. 마우스 해부 기관을 4% 파라포름알데히드 (pH 7.4)에서 밤새도록 고정시키고, PBS 중에서 세척하고, 파라핀에 포매시켰다. 연속 절편을 커팅하고 (3 μm), 표준 방법을 사용하여 헤마톡실린/에오신으로 염색하였다. 항-인간 CXCR4 Ab (알앤디 시스템즈, 클론 44716, 희석률 1:50), 엔비전 FLEX+ 시각화 시스템 (마우스, 높은 pH; 애질런트(Agilent))을 이용하여 면역 염색하고, 헤마톡실린/에오신으로 대조 염색하여 폐 중 RH30 세포의 존재를 연구하였다. 동소 하이브리드화를 위해, 먼저 낮은 pH 완충제 (리보CC(RiboCC), 로슈) 및 프로테아제 III (로슈)항원 복원을 수행하였다. 이어서, 슬라이드를 프로브 Alu 양성 대조군 프로브 II (벤타나(Ventana), 로슈 05272041001)와 함께 인큐베이션하였다. 3개의 엄격형 세척을 수행하고, 슬라이드를 중간 정도의 토끼 항-DNP와 함께 인큐베이션하였다. 시각화하기 위해 호스래디쉬 퍼옥시다제와 접합된 옴니래빗(OmniRabbit) (벤타나, 로슈)을 사용하였다. 크로모젠으로서 은 (실버 키트(Silver kit), 벤타나, 로슈)을 이용하여 면역조직화학 반응을 발생시키고, 핵을 카라찌(Carazzi) 헤마톡실린으로 대조 염색하였다. 액시오캠 ERC5S(AxioCam ERC5S) 디지털 카메라 (칼 자이스)가 장착된 칼 자이스 랩.A1(Carl Zeiss Lab.A1) 현미경 상에서 모든 영상을 포착하였다.
- [0165] 처리가 발광 종양의 성장에 미치는 효과는 도 4A 및 정량적으로 도 4B에 제시되어 있다. 도 4B에 제시되어 있는 바와 같이, 울로쿠플루맷 (MDX1338) 단독은 대조군과 비교하였을 때 RH30 종양 이식물 성장을 중간 정도로 억제한 반면 (비처리된 마우스 마우스에서, 992.8 x 10³ ± 416.0 x 10³ 대 MDX1338-처리된 마우스에서, 394.7 x 10³ ± 192.1 x 10³; p = 0.035), NKAE 처리는 상기 성장을 완전히 방지할 정도로 충분하였다 (p = 0.0003).

- [0166] 비록 RH30 복강 원발성 종양이 발광 검출 시스템을 이용하여 쉽게 모니터링될 수 있기는 하지만, 그의 감수성은 원위 기관 중의 RH30 GFP+ Luc+ 미세전이의 존재를 결정하는데 불충분하다. 그러므로, 마우스 폐, 간, 비장 및 골수에서 인간 GUS 또는 인간 CXCR4 mRNA 둘 다를 증폭시켜 qRT-PCR에 의해 인간 세포의 존재를 평가하였다. 인간 유전자 발현은 오직 마우스 폐에서만 검출되었는데, 이는 상기 기관에 RH30이 존재함을 시사하는 것이다 (도 5). NKAE 요법은 폐 전이에 대해서는 최소의 영향을 미친 반면, 단독요법으로서 투여된 울로쿠플루맵은 hCXCR4 (도 5A) 및 hGUS (도 5B)의 상대적 발현에 의해 측정 시, 폐 미세전이의 발생을 감소시키는데 있어 더욱 뚜렷한 영향을 미쳤다. 인간 CXCR4 상대적 발현 수준의 경우, 비처리된 마우스는 $11.4 \times 10^{-3} \pm 4.7 \times 10^{-3}$ 을 보인 것과의 대비로 울로쿠플루맵 (MDX1338)-처리된 마우스는 $2.0 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3}$ 을 보였다. 인간 GUS 상대적 발현이 울로쿠플루맵-처리된 마우스에서는 $2.5 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3}$ 인 것과 대비로 비처리된 마우스에서는 $14.5 \times 10^{-3} \pm 5.4 \times 10^{-3}$ 이었다. 그러나, 울로쿠플루맵 및 NKAE 둘 다의 조합을 통해 분석된 마우스 폐에서 인간 CXCR4 및 인간 GUS 유전자 둘 다의 수준은 검출불가능한 수준에 이르게 되었고 (도 5A 및 5B), 이는 상기 조합이 폐 전이를 완전히 제거하였다는 것을 시사하는 것이다. 따라서, 항-CXCR4 및 NKAE 세포 요법의 조합은 RH30 폐포형 횡문근육종의 성장을 억제하는데 있어서 및 폐 전이를 폐기하는데 있어서 강력한 시너지 효과를 보인다.
- [0167] 면역조직화학 및 동소 하이브리드화 분석을 통해 상기 결과를 추가로 확인하였다 (도 6). 비처리된 마우스의 폐에서 헤마톡실린 및 에오신 염색 (도 6a), *Alu* 서열 하이브리드화 (도 6b), 및 CXCR4-특이적 Ab 염색 (도 6c)에 의해 육종 폐 미세전이를 확인한 반면, NKAE 및 울로쿠플루맵의 조합으로 처리된 마우스는 미세전이의 부재를 보였다 (도 6d).
- [0168] 실시예 5
- [0169] 소아 횡문근육종 환자의 샘플에서의 CXCR4 발현은 진단 샘플에서보다 화학요법 후 및 재발 후 샘플에서 더 높다
- [0170] 2010년부터 2017년까지 라 파스 대학 병원 바이오뱅크(La Paz University Hospital Biobank)에 기탁된 23개의 소아 횡문근육종 시편에서 면역조직화학법에 의해 CXCR4의 발현을 평가하였다. 추적관찰 기간의 중간값은 7.9 년이고 (범위 0.6-18.4), 환자 연령의 중간값은 6.6세 (범위 0.2-14.1)였다. 14개의 시편은 진단 샘플이고, 5 개의 샘플은 화학요법 처리 이후에 수집한 것이고, 4개의 시편은 재발 샘플이었다. 헬싱키 선언(Helsinki Declaration)에 따라 환자의 사전 동의 이후에 인간 세포 샘플을 취득하였다. 연구는 라 파스 병원 임상 연구 윤리 위원회(La Paz Hospital Ethics Committee for Clinical Research) (PI-2295)의 승인을 받았다. 종양 CXCR4 면역조직화학법을 위해, 포르말린-고정, 파라핀-포매 종양 슬라이드에서 파라핀을 제거하고, 수화시키고, 항-인간 CXCR4 mAb (희석률 1:10; 클론 44716; 알앤디 시스템즈) 및 엔비전 FLEX+ 시각화 시스템 (마우스, 높은 pH; 애질린트)을 사용하여 염색하고, 헤마톡실린-에오신으로 대조 염색하였다.
- [0171] 편도선 조직의 면역염색에 의해 Ab의 특이성을 확인하였다. CXCR4⁺ 종양 세포 비율에 대해 0부터 5 사이의 점수를 부여하였고, 염색 강도에 대해서는 0부터 3 사이의 점수를 부여하였다. 상기 2개 값을 합산하여 최종 염색 점수를 얻었다. 일부 암에서의 CXCR4의 핵 국제화를 기재하는 최근의 연구를 고려하여 (Krook *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), 세포질 및 핵 염색 둘 다를 평가하고, 동일하게 가중화하였다. CXCR4의 핵 염색은 시험된 시리즈에서 사례 중 15%에 존재하였고, 세포질 염색은 68%에 존재하였다.
- [0172] 진단 샘플에서, 배아형 대 폐포형 횡문근육종 사이에도, 국제화된 종양으로부터의 샘플 대 이미 전이된 원발성 종양 사이에도 CXCR4 발현에 있어서 어떤 차이도 없었다 (도 7A). 상기 환자의 결과와 관련하여, 후속하여 재발이 이루어진 환자로부터의, 및 최종적으로는 그의 질환으로 사망한 상기 환자로부터의 샘플에서 약간 더 높은 CXCR4 점수가 관찰되었다.
- [0173] 흥미롭게도, 진단 샘플로부터의 CXCR4 발현 점수 (2.8 ± 2.1)를 화학요법 후 샘플 (4.4 ± 0.7) 및 재발 샘플 (6.1 ± 4.4)과 비교하였을 때, 후자의 샘플에서 CXCR4 발현은 더 높아지는 강력한 추세가 관찰되었다 (도 7B).

서열 목록 요약

SEQ ID NO:	설명
1	F7의 중쇄 CDR1 서열
2	F9의 중쇄 CDR1 서열
3	D1의 중쇄 CDR1 서열
4	E2의 중쇄 CDR1 서열
5	F7의 중쇄 CDR2 서열
6	F9의 중쇄 CDR2 서열
7	D1의 중쇄 CDR2 서열
8	E2의 중쇄 CDR2 서열
9	F7의 중쇄 CDR3 서열
10	F9의 중쇄 CDR3 서열
11	D1의 중쇄 CDR3 서열
12	E2의 중쇄 CDR3 서열
13	F7의 경쇄 CDR1 서열
14	F9의 경쇄 CDR1 서열
15	D1의 경쇄 CDR1 서열
16	E2의 경쇄 CDR1 서열
17	F7의 경쇄 CDR2 서열
18	F9의 경쇄 CDR2 서열
19	D1의 경쇄 CDR2 서열
20	E2의 경쇄 CDR2 서열
21	F7의 경쇄 CDR3 서열
22	F9의 경쇄 CDR3 서열
23	D1의 경쇄 CDR3 서열
24	E2의 경쇄 CDR3 서열
25	F7의 V _H 아미노산 서열
26	F9의 V _H 아미노산 서열
27	D1의 V _H 아미노산 서열
28	E2의 V _H 아미노산 서열
29	F7의 V _L 아미노산 서열

[0174]

SEQ ID NO:	설명
30	F9의 V _L 아미노산 서열
31	D1의 V _L 아미노산 서열
32	E2의 V _L 아미노산 서열
33	F7GL의 V _H 아미노산 서열
34	F9GL의 V _H 아미노산 서열
35	D1GL의 V _H 아미노산 서열
36	E2GL의 V _H 아미노산 서열
37	F7GL의 V _L 아미노산 서열
38	F9GL의 V _L 아미노산 서열
39	D1GL의 V _L 아미노산 서열
40	E2GL의 V _L 아미노산 서열
41	V _H 3-48 배선 아미노산 서열
42	V _K L15 배선 아미노산 서열
43	인간 CXCR4 아미노산 서열

[0175]

참고문헌

- Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK *et al.* (2007) Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 109(7):2708-17.
- Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, Moreau AS, Azab F *et al.* (2009) CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* 113(18):4341-51.
- Bachanova V, Cooley S, Defor TE, Verneris MR, Zhang B *et al.* (2014) Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood* 123, 3855-3863.
- Balkwill F (2004) The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14:171-9.
- Bertolini I, Dell'Agnola C, Mancuso P *et al.* (2002) CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *62(11):3106-12.*
- Bian XW, Yang SX, Chen JH *et al.* (2007) Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery* 61:570-8.
- Billadeau DD, Chatterjee S, Bramati P *et al.* (2006) Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells. *Int J Gastrointest Cancer* 37:110-9.
- Becker PS, Foran J, Altman J *et al.* (2014) Targeting the CXCR4 pathway: Safety, tolerability and clinical activity of BMS-936564 (ulocuplumab), an anti-CXCR4 antibody, in relapsed refractory acute myeloid leukemia. *56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting*, San Francisco, December 6-9, 2014, Oral Presentation No. 386.
- Brennecke P, Arlt MJ, Campanile C *et al.* (2014) CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. *Clin Exp Metastasis* 31, 339-49.
- Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44(5):1069-78.
- Cavallaro S (2013) CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain. *Int J Mol Sci* 14:1713-27.
- Chaffer CL, Weinberg RA (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331:1559-64.

[0176]

- Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S (2014) The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res* 124:31-82.
- Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39(1):1-10.
- Cho D, Shook DR, Shimasaki N (2010) Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res* 16(15):3901-9.
- Clinical Trials Website,
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&cond=cancer>, last accessed March 9, 2019.
- Crazzolara R, Kreczy A, Mann G *et al.* (2001) High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 115:545-53.
- Davies AM, Sutton BJ (2015) Human IgG4: A structural perspective. *Immunological Reviews* 268:139-159.
- De Falco V, Guarino V, Avilla E *et al.* (2007) Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer. *Cancer Res* 67:11821-9.
- Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y *et al.* (2006) Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 60:273-276.
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast *et al.* (2013) A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur J Cancer* 49:219-30.
- Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND *et al.* (2011) CXCL12 (SDF-1)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: An emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res* 17:2074-80.
- Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM *et al.* (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.
- Fernández L, Portugal R, Valentín J *et al.* (2013) In vitro natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma. *Front Oncol* 3(April):94.
- Fernández L, Valentín J, Zalacain M (2015) Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett* 368(1):54-63.

[0177]

- Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N *et al.* (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69(9):4010-7.
- Gangadhar T, Nandi S, Salgia R (2010) The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer Biol Ther* 9:409-16.
- Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F *et al.* (2009) The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clin Exp Metastasis* 26, 261-268.
- Ghobrial I, Perez R, Baz R *et al.* (2014) Phase Ib study of the novel anti-CXCR4 antibody ulocuplumab (BMS-936564) in combination with lenalidomide plus low-dose dexamethasone, or with bortezomib plus dexamethasone in subjects with relapsed or refractory multiple myeloma. *56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting*, San Francisco, December 6-9, 2014, Poster Presentation No. 3483.
- Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ *et al.* (2016) Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunol* 1025-36.
- Han M, Lv S, Zhang Y *et al.* (2014) The prognosis and clinicopathology of CXCR4 in gastric cancer patients: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35:4589-97.
- Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N *et al.* (2007) CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility. *Clin Cancer Res* 13:5056-62.
- Hollinger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.
- Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A *et al.* (2005) Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105(12):4878-84.
- Idusogie EE, Wong PY, Presta LG *et al.* (2001) Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol* 166(4):2571-5.
- Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R *et al.* (2004) Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* 104:170-7.
- Imai C, Iwamoto S, Campana D (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106(1):376-83.
- Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K *et al.* (2004) Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 24:1861-1871.
- Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S *et al.* (2006) CXCR4 expression is associated with

[0178]

- lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 28:61-66.
- Jin L, Tabe Y, Konoplev S *et al.* (2008) CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 7:48-58.
- Jones J, Marian D, Weich E *et al.* (2007) CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 313:4051-65.
- Kabat EA, Wu TT, Perry H *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242.
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M *et al.* (2008) Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 122:91-99.
- Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A *et al.* (2006) Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 66:11013-20.
- Kamiya T, Chang Y-H, Campana D (2016) Expanded and activated natural killer cells for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res* 4(7):547-81.
- Kamta J, Chaar M, Ande A (2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches. *Front Oncol* 18(7):64.
- Krook MA, Nicholls LA, Scannell CA *et al.* (2014) Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma. *Mol Cancer Res* 12:953-64.
- Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B *et al.* (2013) BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis *in vitro* and shows antitumor activity *in vivo* in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 19: 357-66.
- Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-74.
- Lanier LL, Buck DW, Rhodes L *et al.* (1988) Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med* 167:1572-85.
- Laverdiere C, Hoang BH, Yang R *et al.* (2005) Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 11(7):2561-7.

[0179]

- Leavey PJ, Mascarenhas L, Marina N *et al.* (2008) Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 51(3):334-8.
- Lee B, Sharron, M, Montaner LJ *et al.* (1999) Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5215-20.
- Leivas A, Perez-Martinez A, Blanchard MJ *et al.* (2016) Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology* 5(12):e1250051.
- Lesokhin AM, Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2015) On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med* 7(280):280sr1.
- Li Y-J, Dai Y-L, Zhang WB *et al.* (2015) Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 9:11101-12.
- Libura J, Drukala J, Majka M *et al.* (2002) CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 100:2597-606.
- London L, Perussia B, Trinchieri G (1986) Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol* 137:3845-54.
- Long EO, Kim HS, Liu D *et al.* (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31:227-58.
- Lowry LE, Zehring WA (2017) Potentiation of natural killer cells for cancer immunotherapy: a review of literature. *Front Immunol* 8:1061.
- Lv S, Yang Y, Kwon S *et al.* (2014) The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis. *Histopathol* 64:701-712.
- Miki J, Furusato B, Li H *et al.* (2007) Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* 67:3153-61.

[0180]

- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A *et al.* (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105(8):3051-7.
- Mohle R, Failenschmid C, Bautz F *et al.* (1999) Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13:1954-9.
- Moretta L, Locatelli F, Pende D *et al.* (2011) Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117(3):764-71.
- Nausch N, Cerwenka A (2008) NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27(45):5944-58.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J (2009) Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9:274-84.
- Olafsen T, Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.
- Onoue T, Uchida D, Begum NM *et al.* (2006) Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 29:1133-8.
- Pan J, Mestas J, Burdick MD *et al.* (2006) Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 5:56.
- Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C *et al.* (2015) CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 27(6):769-79.
- PCT Publication No. WO 2008/060367, published May 22, 2008 by Medarex, Inc.
- PCT Publication No. WO 2013/071068, published May 16, 2013 by Bristol-Myers Squibb.
- PCT Publication No. WO 2015069874, published May 14, 2015 by Bristol-Myers Squibb and Dana-Farber Cancer Institute.
- PCT Publication No. WO 2016/201425, published December 15, 2016 by Bristol-Myers Squibb.
- Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ *et al.* (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89(2):216-24.
- Pende D, Marcenaro S, Falco M *et al.* (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients:

[0181]

evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113(13):3119-29.

- Pérez-Martínez A, de Prada Vicente I, Fernández L *et al.* (2012) Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Exp Hematol* 40(11):882-91.
- Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentín J *et al.* (2015a) A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haploidentical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. *Cytotherapy* 17(11):1594-603.
- Pérez-Martínez A, Leung W, Muñoz E *et al.* (2009) KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 53(1):120-4.
- Pérez-Martínez A, Valentín J, Fernández L *et al.* (2015b) Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity against neuroblastoma *in vitro* and *in vivo*. *Cytotherapy* 17(5):601-12.
- Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H *et al.* (2015) CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. *Cancer Cell* 27(6):755-68.
- Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL (1991) Increased proliferative activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. *Cell Immunol* 135:454-70.
- Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S *et al.* (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28(6):955-9.
- Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA *et al.* (2005) Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 11:1835-41.
- Schimanski CC, Bahre R, Gockel I *et al.* (2006) Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer* 95:210-7.
- Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013) On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 18(1-2):43-73.
- Shi J *et al.* (2013) NIH Public Access 143:641-653.
- Somanchi SS, Lee DA (2016) *Ex vivo* expansion of human NK cells using K562 engineered to express membrane bound IL21. *Methods Mol Biol* 1441:175-93.
- Stiller CA, Trama A, Serraino D *et al.* (2013) Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE project. *Eur J Cancer* 49:684-695.

[0182]

Szmania S, Lapteva N, Garg T *et al.* (2015) Fresh *ex vivo* expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma (MM) patients. *J Immunother* 38(1):24-36.

Tavor S, Petit I, Porozov S *et al.* (2004) CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res* 64:2817-24.

U.S. Patent No. 7,767,429, issued August 3, 2010 to Bookbinder *et al.*

Vela M, Aris M, Llorente M *et al.* (2015) Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: Achievements and challenges. *Front Immunol* 6:12.

Vela M, Corral D, Carrasco P *et al.* (2018) Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett* 422:107-17.

Verhoeven DHJ, de Hooge ASK, Mooiman ECK *et al.* (2008) NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol* 45(15):3917-25.

Vivier E, Raulet DH, Moretta A *et al.* (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331(6013):44-9.

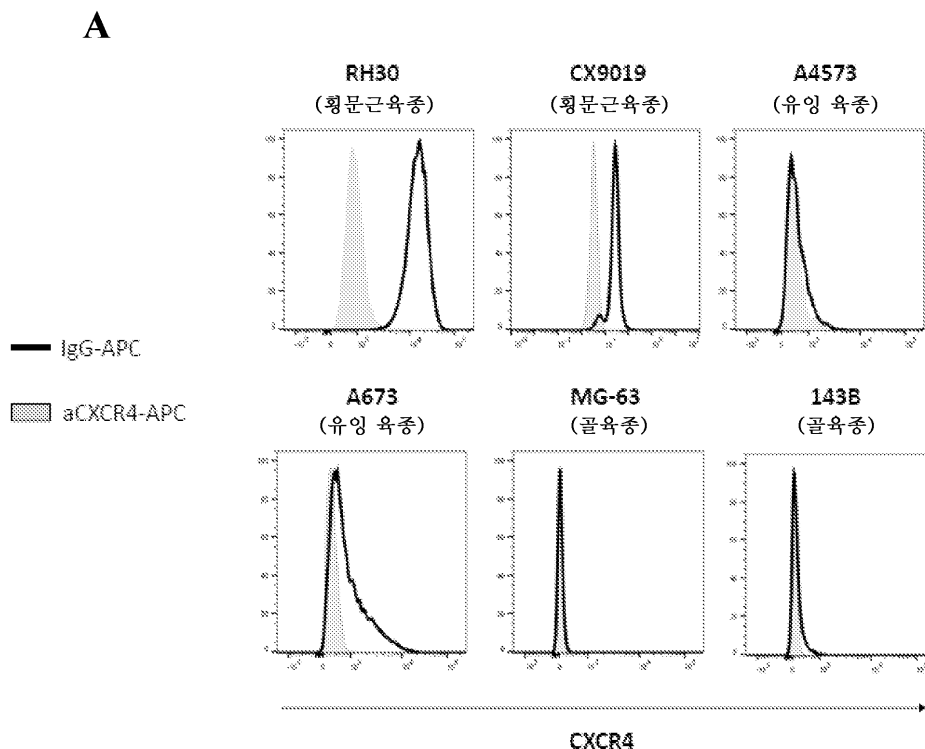
Wu J, Wu X, Liang W *et al.* (2014) Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35:3709-15.

Zheng Y, Dou Y, Duan L *et al.* (2015) Using chemo-drugs or irradiation to break immune tolerance and facilitate immunotherapy in solid cancer. *Cell Immunol* 294:54-59.

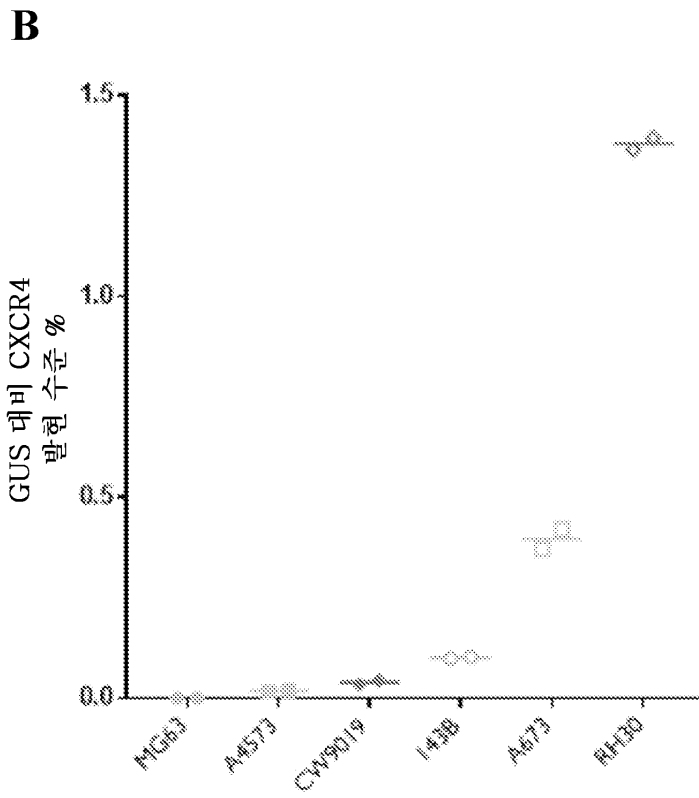
[0183]

도면

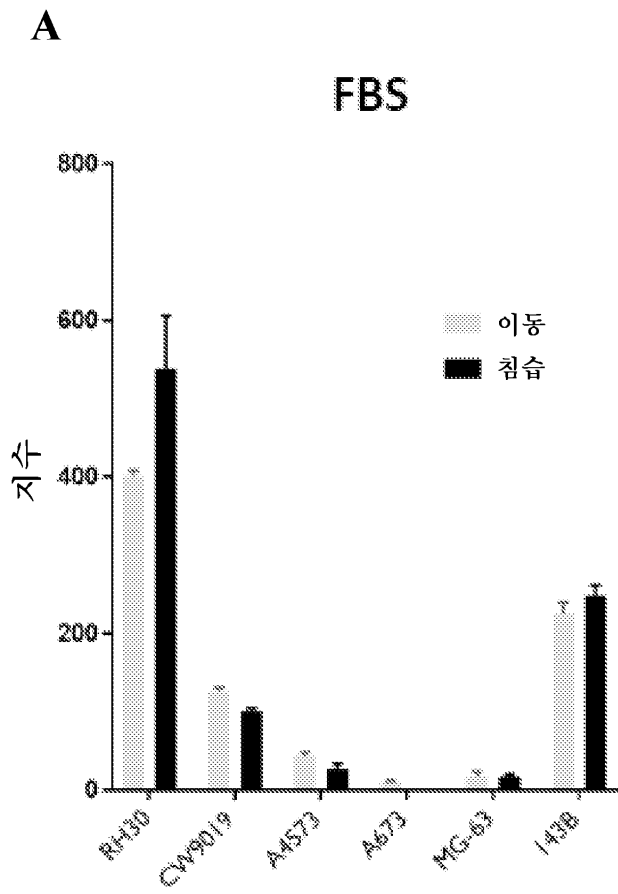
도면1i



도면1ii

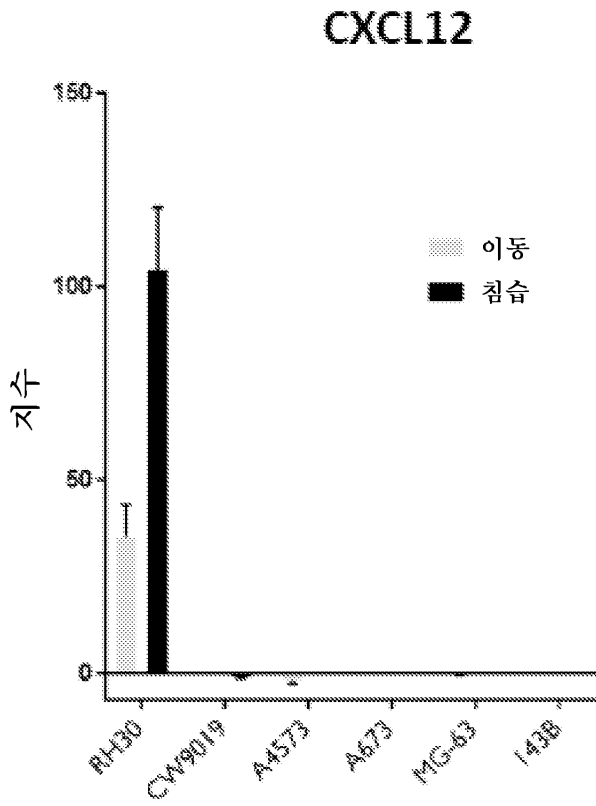


도면2i



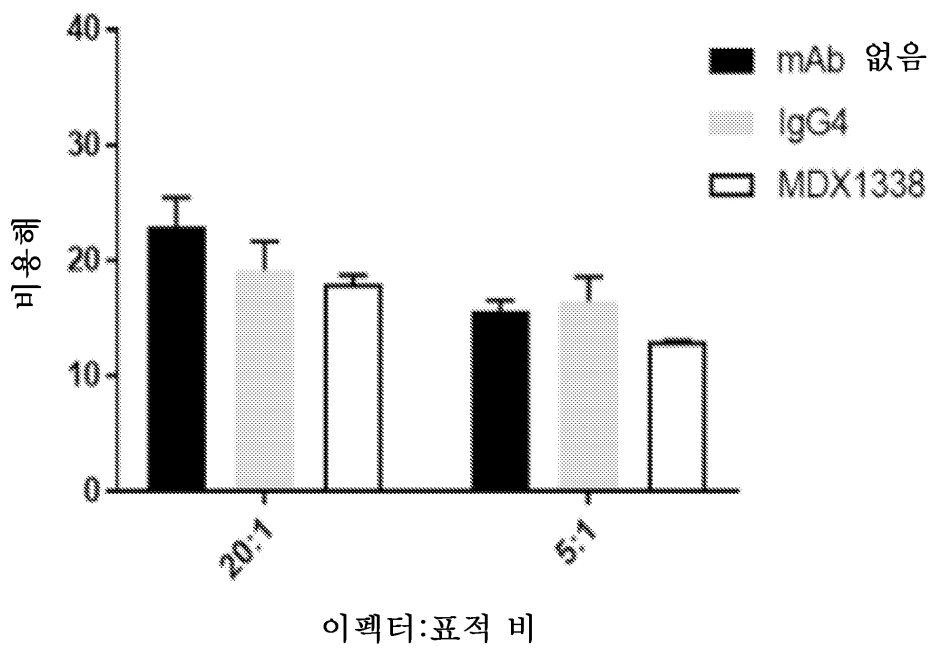
도면2i

B



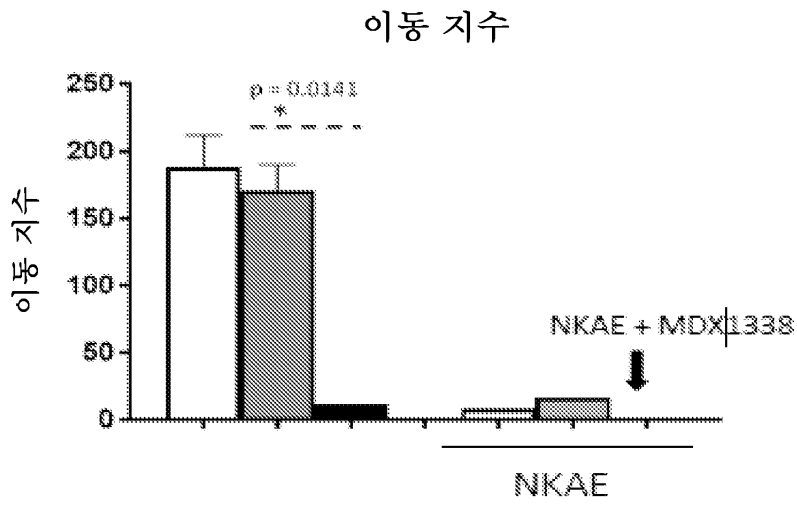
도면3i

A

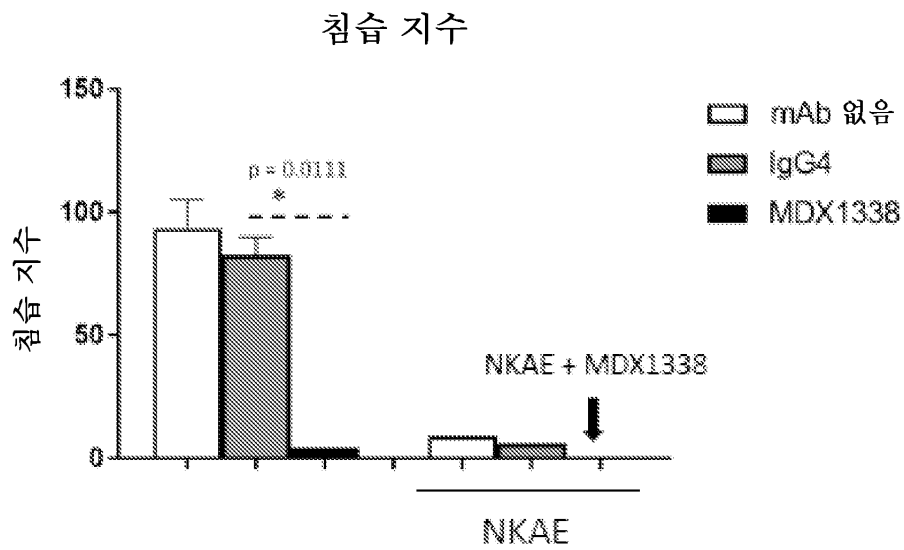


도면3ii

B

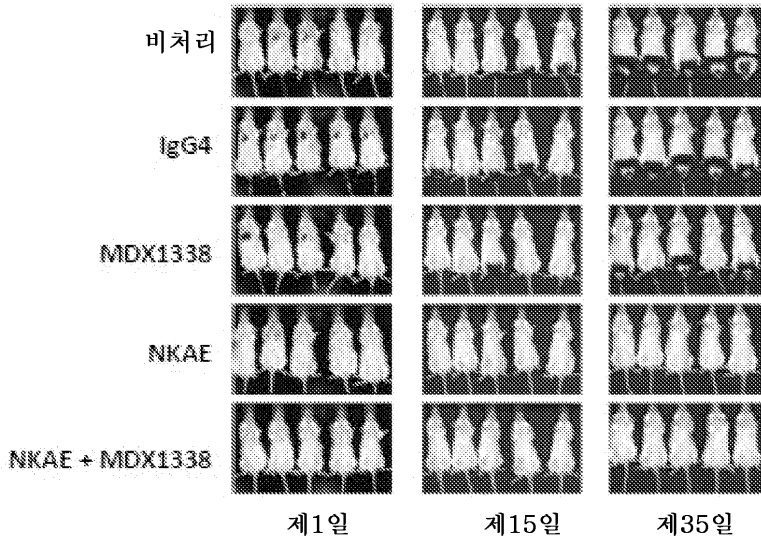


C

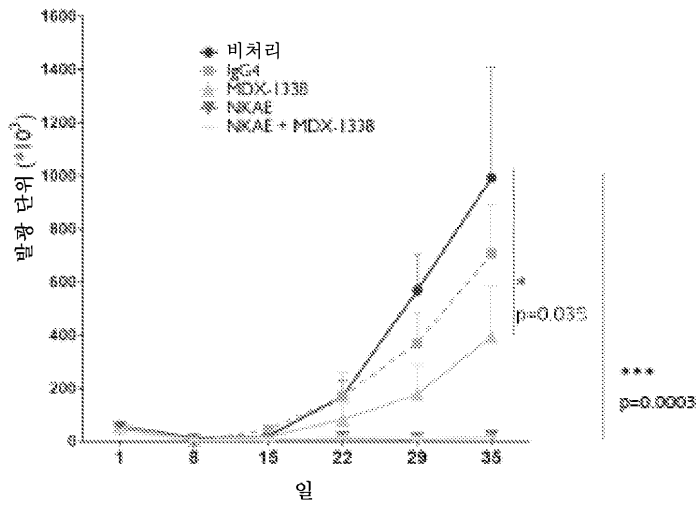


도면4

A



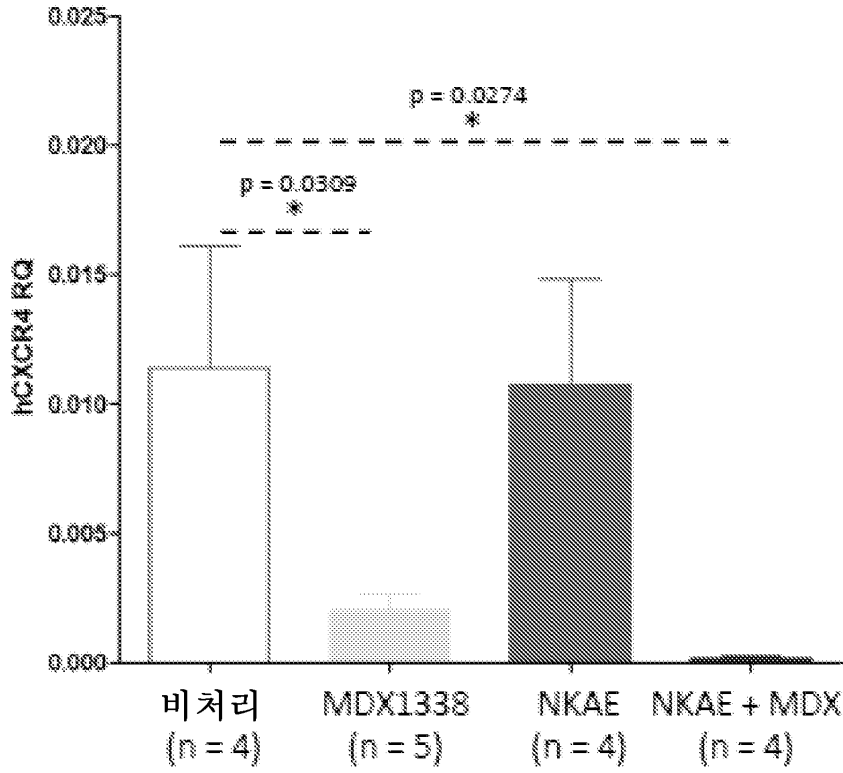
B



도면5i

A

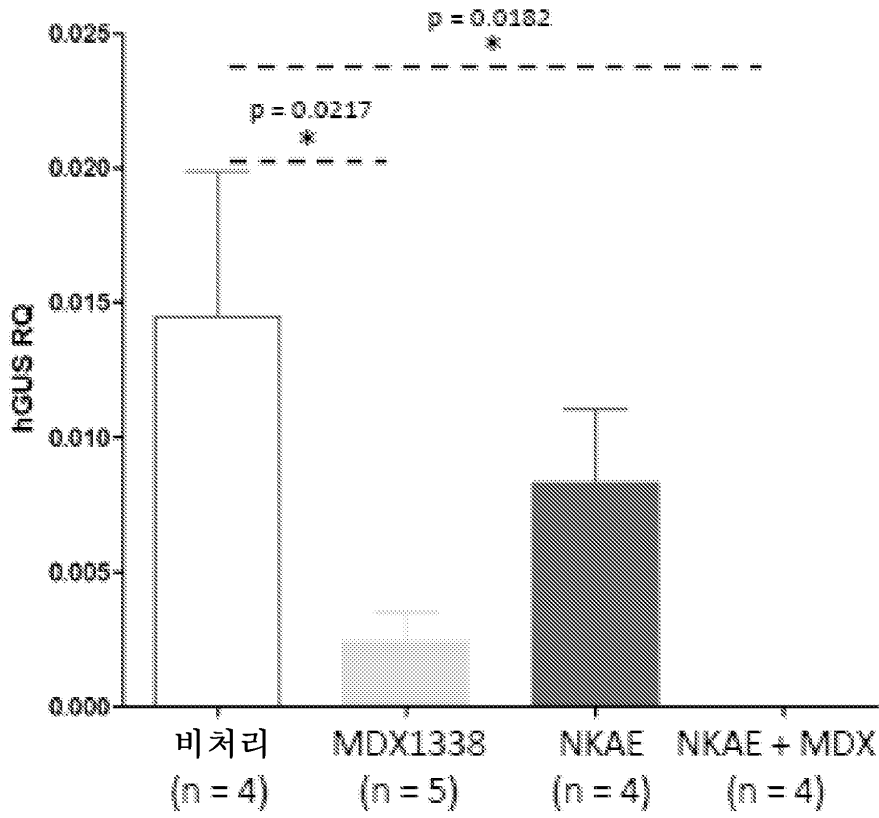
폐 hCXCR4 상대적 발현



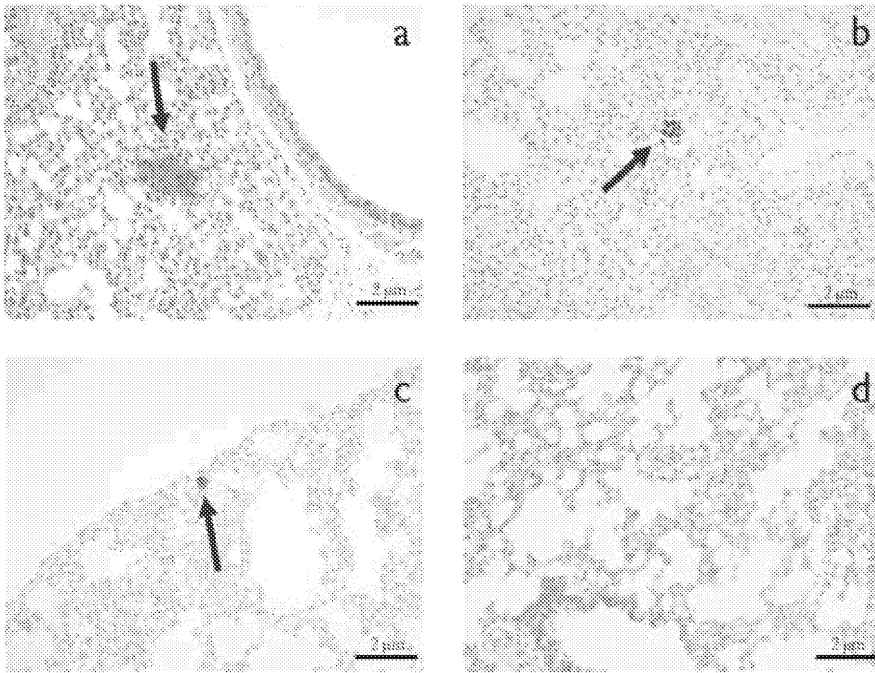
도면5i

B

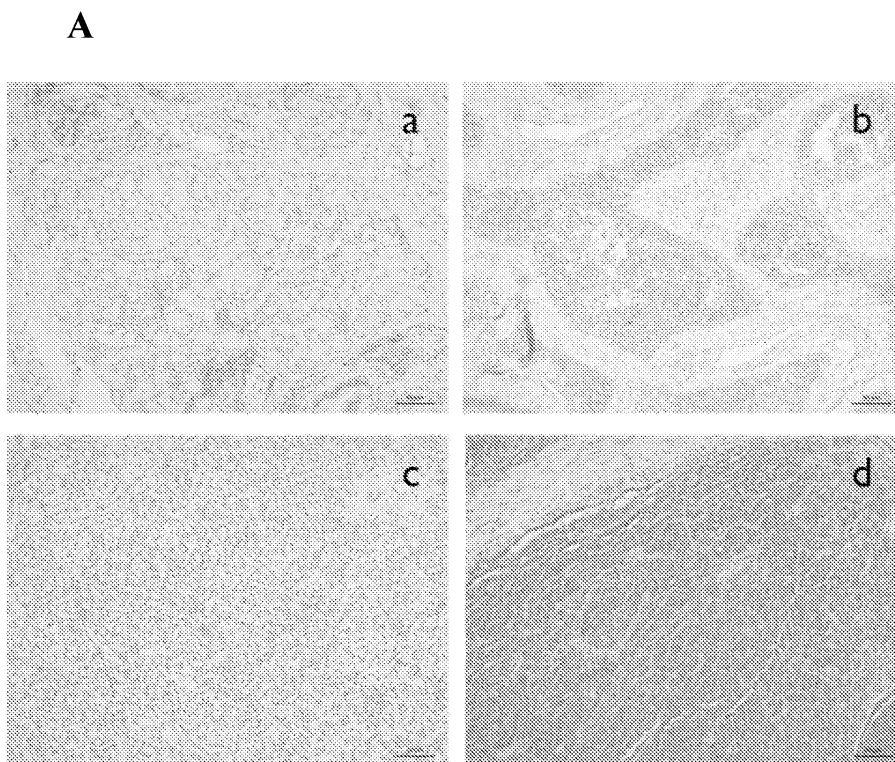
폐 hGUS 상대적 발현



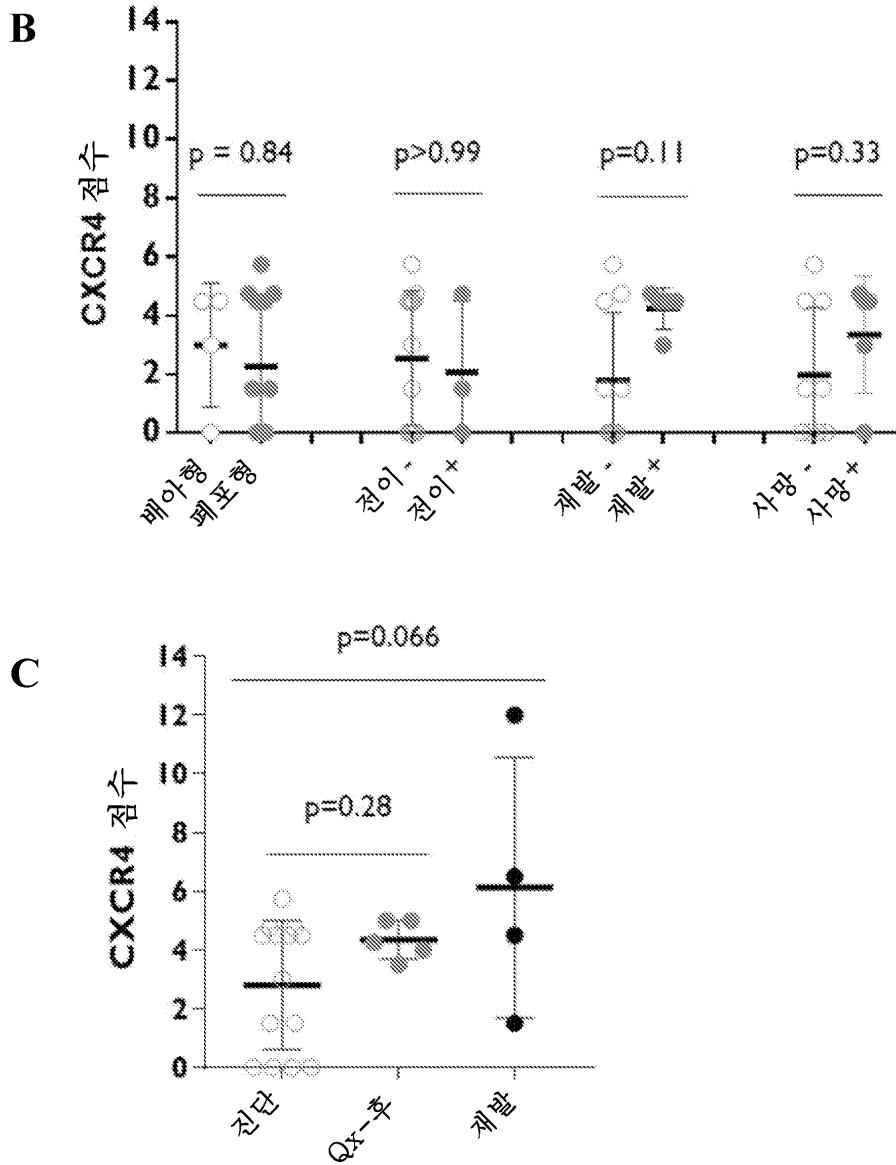
도면6



도면7i



도면7i



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> FUNDACI? PARA LA LNVESTIGACI? BIOM?ICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (FIBHULP)

<120> ANTI-CXCR4 ANTIBODY COMBINED WITH ACTIVATED AND EXPANDED NATURAL KILLER CELLS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

<130> 13108-W0-PCT

<140><141><150>

<151>

<150>

<151>

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210

> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala

1 5 10
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Gly Ile Ser	Ser Trp
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro	Lys Ser Leu Ile	
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly	
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro	
	65	70	75
Glu Asp Phe Val	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser	Tyr Pro Arg	
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Gly Ile Ser	Ser Trp
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro	Lys Ser Leu Ile	
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro	Arg Phe Ser Gly	
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro	

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 34

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 35

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Gly Ile Ser	Ser Trp
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro	Lys Ser Leu Ile	
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly	
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro	
	65	70	75
Glu Asp Phe Val	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser	Tyr Pro Arg	
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala Ser	Gln Gly Ile Ser	Ser Trp
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro	Lys Ser Leu Ile	
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro	Arg Phe Ser Gly	
	50	55	60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 42

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 43

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
 20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
 35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
 50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
 65 70 75 80

325

330

335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser

340

345

350