



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104039320 B

(45)授权公告日 2019.10.15

(21)申请号 201280066551.7

(22)申请日 2012.11.09

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104039320 A

(43)申请公布日 2014.09.10

(30)优先权数据

61/557,815 2011.11.09 US

61/569,113 2011.12.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/064395 2012.11.09

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/071068 EN 2013.05.16

(73)专利权人 百时美施贵宝公司  
地址 美国新泽西州

(72)发明人 M.R.库恩 C.潘 J.M.卡德雷利

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 31/454(2006.01)

A61K 31/69(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 101528259 A, 2009.09.09, 说明书第12页第2段

第87页第2段;第7页第4段;第18页第3段;第19页第1段;第77页倒数第2段;第82页最后1段至第83页第1段;第17页第3-4段;第78页第2段;第84页最后1段;实施例9;说明书附图1A-1B;.

Mathieu Wemeau et al. Increased sensitivity to bortezomib after mobilization of multiple myeloma cells with the CXCR4 antagonist AMD3100. 《Hematologie》.2009,第15卷(第3期),第194-196页.

审查员 雷锋林

权利要求书2页 说明书44页

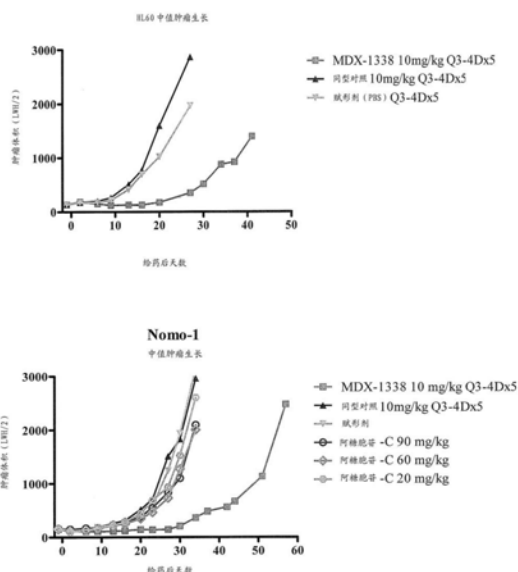
序列表28页 附图40页

### (54)发明名称

血液恶性肿瘤用抗-CXCR4抗体的治疗

### (57)摘要

本披露提供以高亲和力特异性结合CXCR4的人单克隆抗体。本披露还提供用于治疗患有CXCR4-表达的癌症,尤其是血液恶性肿瘤诸如多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病或非-霍奇金氏淋巴瘤的受试者的方法,包括将治疗有效量的包含本披露的抗-CXCR4抗体的药物组合物施用于受试者。本披露进一步提供用于治疗受试者中癌症的试剂盒,其包含一剂抗-CXCR4抗体和在本披露的治疗方法中使用所述抗-CXCR4抗体的说明书。



1. 特异性结合患有多发性骨髓瘤的受试者中多发性骨髓瘤细胞表面表达的CXCR4受体的抗体或其片段在制备用于直接抑制多发性骨髓瘤细胞的生长和/或抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖和/或诱导受试者中的多发性骨髓瘤细胞凋亡的药物组合物中的用途。

2. 权利要求1的用途,其中所述受试者是人并且所述抗体或其片段结合人CXCR4受体。

3. 权利要求1的用途,其中所述多发性骨髓瘤是复发的或难治的多发性骨髓瘤。

4. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述药物组合物中的所述抗体或其片段供用于作为单一疗法施用于所述受试者。

5. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述抗体或其片段抑制CXCR4受体的活性并且提高多发性骨髓瘤细胞对化疗剂的敏感性。

6. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述药物组合物中的所述抗体或其片段供用于与外科手术、放射和/或一种或多种治疗剂联合施用于受试者。

7. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述药物组合物中的所述抗体或其片段供用于与至少一种化疗剂联合施用于受试者。

8. 权利要求7的用途,其中所述至少一种化疗剂是:

(a) 雷利度胺和/或地塞米松;和/或

(b) 硼替佐米和/或地塞米松。

9. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述抗体或其片段是嵌合的、人源化的、或人抗体或其片段。

10. 权利要求1-3任一项的用途,其中所述抗体或其片段包括重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25中所述序列的连续相连氨基酸,和轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:29中所述序列的连续相连氨基酸。

11. 权利要求1-3任一项的用途,其中所述抗体或其片段包括包含具有SEQ ID NO:1所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1,具有SEQ ID NO:5所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2,具有SEQ ID NO:9所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3,具有SEQ ID NO:13所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1,具有SEQ ID NO:17所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2,和具有SEQ ID NO:21所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3。

12. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述抗体或其片段包含:包含具有SEQ ID NO:25所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区;和包含具有SEQ ID NO:29所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区。

13. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述抗体或其片段是BMS-936564或其片段。

14. 权利要求1-3中任一项的用途,其中所述抗体或其片段是IgG1或IgG4抗体或其片段。

15. 权利要求4的用途,其中所述药物组合物中的所述抗体或其片段供用于以0.3,1,3或10mg/kg的剂量施用于所述受试者。

16. 权利要求8的用途,其中所述药物组合物包含BMS-936564或其片段,供用于与雷利度胺和地塞米松联合施用于受试者,其给药方案包括:

(a) BMS-936564在周期1中的第1、8、15、22、29和36天和周期2以及随后的周期中的第1、

8、15和22天以1,3,或10mg/kg作为静脉内输注给药;

(b) 雷利度胺在周期1中的第15-35天以及周期2和随后的周期中的第1-21天以25mg口服给药21天;以及

(c) 地塞米松在周期1中的第15、22、29和36天和周期2和随后的周期中的第1、8、15和22天以40mg给药。

17. 权利要求8的用途,其中所述药物组合物包含BMS-936564或其片段,供用于与硼替佐米和地塞米松联合施用于受试者,其给药方案包括:

(a) BMS-936564在周期1中的第1、8、15、22和29天和周期2以及随后的周期中的第1、8和15天以1,3,或10mg/kg作为静脉内输注给药;

(b) 硼替佐米在周期1中的第15、18、22和25天和周期2和随后的周期中的第1、4、8、11天以1.3mg/m<sup>2</sup>作为静脉内推进给药;以及

(c) 地塞米松在周期1中的第15、16、18、19、22、23、25和26天和周期2和随后的周期中的第1、2、4、5、8、9、11和12天以20mg给药。

18. 依照权利要求1-3中任一项的特异性结合多发性骨髓瘤细胞表面表达的CXCR4受体的抗体或其片段在制备用于在患有多发性骨髓瘤的受试者中直接抑制多发性骨髓瘤细胞的生长和/或抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖和/或直接诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的试剂盒中的用途,所述抑制多发性骨髓瘤细胞的生长和/或增殖、或诱导多发性骨髓瘤细胞的凋亡包括对受试者施用在所述受试者中直接抑制多发性骨髓瘤细胞的生长和/或抑制多发性骨髓瘤细胞增殖、和/或直接诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的量的所述抗体或其片段,其中所述试剂盒进一步包括所述抗体或其片段的用途的说明书。

19. 权利要求17的用途,其中所述抗-CXCR4抗体或其片段包括具有SEQ ID NO:25所述氨基酸序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:29所述氨基酸序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

20. 权利要求17的用途,其中所述抗-CXCR4抗体或其片段是BMS-936564或其片段。

## 血液恶性肿瘤用抗-CXCR4抗体的治疗

[0001] 贯穿本申请,通过括号中作者名字和日期,或通过专利号或公开号引用各种出版物。可在说明书结尾处权利要求之前找到这些出版物的全部引用。这些出版物的公开内容在此通过引用整体并入本申请,以更充分地描述此处所述和要求保护的本发明日期之前其中本领域技术人员所知的现有技术状况。然而,此处参考文献的引用将不会被认为承认所述参考文献为本发明的现有技术。

### 发明领域

[0002] 本申请涉及特异性结合至在细胞表面表达的天然人CXCR4的人单克隆抗体,和这些抗体在治疗癌症,尤其是血液恶性肿瘤,包括急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)和非-霍奇金氏淋巴瘤(NHL)诸如慢性淋巴性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)和弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的方法中的用途。

### [0003] 发明背景

[0004] 趋化因子是约50种小蛋白质的家族,其调节细胞运输以及血管发生,并且在肿瘤微环境中也起重要的作用(Vicari等.,2002)。根据它们的结构,趋化因子被分为C-C趋化因子(包含半胱氨酸-半胱氨酸基序)或C-X-C趋化因子(包含半胱氨酸-X-半胱氨酸基序)。结合这种趋化因子的受体因而分别分为CCR家族或CXCR家族的成员。

[0005] CXCR家族的一个成员是CXCR4受体(CXCR4),亦称为CD184,一种由细胞外N端尾和三个细胞外环组成的七个-跨膜结构域G-蛋白偶联受体。CXCR4的细胞内羧基端与由β和γ亚基以及百日咳毒素-敏感的G<sub>iα</sub>亚基组成的异三聚体G蛋白偶联(Loetscher等.,1994)。至今,仅鉴定了CXCR4的一种配体,称为CXCL12的趋化因子(也已知为基质细胞-来源的因子-1或SDF-1,且本文中可互换使用)(Bleul等.,1996;Oberlin等.,1996)。结合CXCR4的CXCL12刺激磷脂酶C的活化并且随后导致胞质游离钙的上升。CXCR4的连接最终导致趋化性的诱发和迁移(Tachibana等.,1998;Zou等.,1998)。CXCR4也在胚胎形成、体内平衡和炎症中起作用。利用经工程处理的CXCR4或CXCL12缺乏的小鼠的研究提示在器官血管形成以及在免疫及造血系统中的CXCR4/CXCL12途径(Tachibana等.,1998)。此外,已显示CXCR4作为一种辅助受体针对T淋巴营养HIV-1分离物发挥作用(Feng等.,1996)。

[0006] 在健康成人中,CXCR4主要在造血系统细胞上表达,包括B和T细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK和树突状细胞,以及CD34<sup>+</sup>骨髓(BM)祖细胞(Lee等.,1999)。低水平的CXCR4也在内皮和上皮细胞、星细胞和神经元上表达(Gupta等.,1998;Hesselgesser等.,1997)。已显示CXCL12诱导内皮细胞迁移和增殖,并且已显示与VEGF一起提高新血管生成(Guleng等.,2005)。也已在75%的癌症中发现CXCR4的过表达,包括白血病、淋巴瘤、胰腺、乳房、卵巢、肺、前列腺和结肠直肠癌,并且与CXCL12之间的相互作用对于在BM微环境内归巢和维持造血干细胞是必不可少的(Mohle等.,1998)。普乐沙福(Plerixafor)(AMD3100;Mozobil),CXCR4的双环拉胺类(bicyclam)拮抗剂,已显示动员干细胞进入血流中(Dar等.,2011)。AMD3100和AMD3465,另一种CXCR4拮抗剂双环拉胺类,通过阻断CXCR4/CXCL12信号提高AML肿瘤细胞的化疗增敏(Nervi等.,2009;Zeng等.,2009)。



[0007] AML是血细胞骨髓系的快速生长的癌症,以积聚在BM中并且妨碍正常血细胞产生的异常白细胞的迅速生长为特征。AML中,CXCR4在BM细胞的CD34<sup>+</sup>部分上高表达。AML细胞上CXCR4的较低水平与导致更长的无复发和总存活率的更好的预后有关。较低CXCR4受体表达减弱主要的AML细胞向在化疗-保护BM环境中表达的CXCL12迁移(Tavor等.,2004)。

[0008] 多发性骨髓瘤(MM)为由浆细胞的恶性增殖引起的一种癌症形式。非-霍奇金氏淋巴瘤后,其为第二种最常见的血液癌症,每年全世界大约80,000例新病例(美国20,000例),并且大约62,000例死亡(美国10,500例死亡/年)(Jemal等.,2008;2009)。MM细胞优选在BM中生长,其中其妨碍正常血细胞安德正常抗体的产生,导致免疫缺陷、骨骼破坏、低钙血症、BM和肾衰竭。除了AML,CXCL12的血清水平在MM患者中升高,并且CXCR4表达在MM晚期阶段的表现,髓外浆细胞瘤中提高。此外,CXCL12/CXCR4轴的阻滞减弱MM细胞的迁移并且将这些细胞归巢至BM(Alsayed等.,2007)。

[0009] 非-霍奇金氏淋巴瘤包括除霍奇金氏淋巴瘤以外的淋巴细胞癌症不同组的任何一种。NHL可以出现在任何年龄并且常常通过淋巴结比正常更大、发烧和重量减轻为标志。许多不同类型的NHL在其严重程度显著差异,从非常侵袭性的(生长迅速的)至懒惰的(生长迟缓的)类型,并且其可以由B细胞或T细胞的任一种组成。B细胞NHL包括伯基特氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴淋巴瘤(CLL/SLL)、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、成免疫细胞大细胞淋巴瘤、前体B-成淋巴细胞性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。T细胞NHL包括蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤和前体T-成淋巴细胞性淋巴瘤。据估计在2012美国将有大约70,000例新的NHL病例,其将导致约19,000例死亡。已经证实在检测的19种主要的NHL细胞系中的18种中高水平的CXCR4表达(Bertolini等.,2002)。也已表明CXCL12提高滤泡NHL细胞的迁移(Corcione等.,2000),并且所述CXCR4-CXCL12回路似乎对于CLL细胞的迁移是至关重要的(Burger等.,1999)。

[0010] 表现出许多合乎需要性质的人抗-CXCR4单克隆抗体之前已在PCT国际公开W02008/060367(申请号PCT/US2007/021152)中描述,其要求2006年10月2日提交的美国临时申请No.60/827,851的优先权。这两个申请的公开内容在此通过引用整体并入本申请中。如W02008/060367中公开的,体外试验证实这些单克隆抗体以低纳摩尔亲和力和结合CXCR4-表达细胞,阻断CXCL12结合CXCR4-表达细胞,并且以低纳摩尔EC<sub>50</sub>值抑制CXCL12-诱导的迁移和钙流动。一种完全人单克隆抗体,BMS-936564,(W02008/060367中命名为F7,并且之前也命名为MDX-1338,本文的所有三种命名可互换使用),其在临床前研究中呈现出意料有益的抗-实体瘤特性,已选择用于进一步的调查以确定其体内抗血液癌症的活性并且进一步阐明其抗-癌症活性下的机理。BMS-936564抗体也已进入患有复发的/难治的AML、MM和NHL患者中的I期临床研究。

## 发明概要

[0011] 本披露提供了分离的单克隆抗体,特别是结合人类CXCR4并且表现出多种治疗抗体所希望的性质的人类单克隆抗体。这些特性包括以低nM亲和力和结合在细胞表面表达的天然人CXCR4、以50nM或更小的用于抑制的EC<sub>50</sub>抑制SDF-1结合人CXCR4、以3nM或更小的用于抑制的EC<sub>50</sub>抑制在表达CXCR4的细胞中SDF-1诱导的钙流动、以50nM或更小的用于抑制的EC<sub>50</sub>抑制SDF1诱导的表达CXCR4的细胞的迁移、抑制由人脐静脉内皮细胞(HuVEC)形成毛细管、

在表达CXCR4的多种细胞中诱导凋亡、在体外抑制肿瘤细胞增殖、在体内抑制肿瘤细胞生长、抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞的转移和/或增加CXCR4<sup>+</sup>肿瘤携带者的存活时间的能力。

[0012] 在优选的方面中,本披露涉及分离的单克隆抗体,优选人单克隆抗体,或其抗原-结合部分,其中所述单克隆抗体:

[0013] (a) 结合细胞表面表达的天然的人CXCR4;

[0014] (b) 抑制SDF-1 (CXCL12) 结合至人CXCR4;

[0015] (c) 抑制SDF-1-诱导的表达人CXCR4的细胞中的钙流动;

[0016] (d) 抑制SDF-1-诱导的表达人CXCR4的细胞的迁移;和

[0017] (e) 抑制由人脐静脉内皮细胞形成毛细管。

[0018] 甚至更优选地,所述抗体还诱导表达人CXCR4的细胞的凋亡,诱导体内肿瘤细胞凋亡和/或抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞的生长。

[0019] 本披露还提供用于治疗患有CXCR4-表达的癌症,包括血液恶性肿瘤的受试者的方法,包括将治疗有效量的特异性结合细胞表面表达的人CXCR4的抗-CXCR4抗体施用于受试者。在某些实施方案中,所述抗-CXCR4抗体抑制CXCR4的活性。在优选的实施方案中,所述抗-CXCR4抗体诱导CXCR4-表达靶细胞的凋亡。因此,所述抗-CXCR4抗体作为单一疗法用于某些实施方案中。在其他的实施方案中,所述抗-CXCR4抗体与其他的抗-癌症药剂组合使用。在优选的实施方案中,所述血液恶性肿瘤为MM、AML或NHL。在优选的实施方案中,所述抗体为人抗体。更优选地,所述抗体为BMS-936564。

[0020] 所述披露进一步提供CXCR4抗体用于制备用于处理患有癌症,包括血液恶性肿瘤的受试者的药物组合物的用途。

[0021] 本披露还提供用于治疗受试者中癌症的试剂盒,所述试剂盒包括:(a) 一剂抗-CXCR4抗体;和(b) 以本文所述的任何方法使用所述抗-CXCR4抗体的说明书。在优选的实施方案中,所述抗-CXCR4抗体为BMS-936564。

[0022] 本披露的其他特征和优点根据以下详细说明和实施例将会是显而易见的,其不应理解为限制性的。贯穿本申请引用的所有参考文献、**GENBANK®** 条目、专利和公开的专利申请的内容明确地通过引用并入本文。

[0023] 附图简述

[0024] 图1显示F7 (BMS-936564) 人单克隆抗体的重链可变区(A)的核苷酸序列(SEQ ID NO:33)和氨基酸序列(SEQ ID NO:25)。描绘出了CDR1(SEQ ID NO:1)、CDR2(SEQ ID NO:5)和CDR3(SEQ ID NO:9)区域,并指明了V、D和J的种系来源。还显示了F7轻链可变区(B)的核苷酸序列(SEQ ID NO:37)和氨基酸序列(SEQ ID NO:29)。描绘出了CDR1(SEQ ID NO:13)、CDR2(SEQ ID NO:17)和CDR3(SEQ ID NO:21)区域,并指明了V、D和J的种系来源。

[0025] 图2显示人抗-CXCR4抗体至F7、F9、D1和E2结合在细胞表面表达天然的人CXCR4的CEM细胞。

[0026] 图3显示FITC-标记的抗-CXCR4抗体F9和一组未标记的人抗-CXCR4抗体之间抗体竞争结合CEM细胞。

[0027] 图4显示BMS-936564结合的流式细胞分析。所述抗体结合AML细胞系Nomo-1和HL-60 (A)、CXCR4-转染的R1610、CEM和Ramos细胞系(B)、MM细胞系、JJN-3R和MOLP8 (C) 以及主要的AML患者血细胞(D)。

[0028] 图5显示由抗-CXCR4人抗体F7 (BMS-936564)、F9和D1的抑制<sup>125</sup>I-标记的CXCL12与CEM细胞上表达的CXCR4的结合。所述E2抗体不抑制CXCL12与CEM细胞的结合。

[0029] 图6显示由抗-CXCR4抗体MDX-1338 (BMS-936564) (A) 或抗-CXCL12抗体 (B) 的抑制<sup>125</sup>I-标记的CXCL12与CEM细胞的结合, 以及由MDX-1338 (6C) 的抑制<sup>125</sup>I-标记的CXCL12与Ramos细胞的结合。通过将100pM<sup>125</sup>I-CXCL12与CEM细胞在渐增浓度的MDX-1338、抗-CXCL12或同型对照抗体的情况下与CEM细胞温育而进行配体结合测定。未标记的CXCL12以1000倍摩尔过量(100nM)添加以建立非特异性结合(NSB)。添加无<sup>125</sup>I-CXCL12抗体或未标记的竞争剂以建立总的可实现的结合(总计)。

[0030] 图7显示由抗-CXCR4人抗体F7 (BMS-936564)、F9和D1的抑制CXCL12 (SDF-1)-诱导的CEM细胞中的钙流动。E2没有明显抑制CXCL12-诱导的钙流动。

[0031] 图8显示由抗-CXCR4抗体MDX-1338 (BMS-936564) 或抗-CXCL12抗体的抑制CXCR4<sup>+</sup>细胞中的CXCL12-诱导的钙流动。通过将Ramos细胞 (A) 或CEM细胞 (B) 的任一与钙4染料在有或无检测抗体或同型对照时温育而进行钙流动测定。染料-负载细胞在室温下以50nM和5nM CXCL12分别与Ramos 和CEM细胞温育。定量20至200秒之间荧光曲线下的面积并且计算EC<sub>50</sub>。

[0032] 图9显示由抗-CXCR4人抗体F7 (BMS-936564) 和F9的抑制CXCL12-诱导的CEM细胞的迁移, 而抗体D1和E2不明显抑制迁移。

[0033] 图10显示由抗-CXCR4抗体MDX-1338 (BMS-936564) 或抗-CXCL12抗体的抑制CXCL12-诱导的CXCR4<sup>+</sup>细胞的迁移。分别在1.25nM和0.05nM CXCL12的情况下进行Ramos (A) 和CEM (B) 细胞的迁移测定。在融合 (PerkinElmer) 平板读数器上测量已迁移进入较低区室的标记细胞的数目。每个点代表n=3。

[0034] 图11显示相比通过抗-CXCL12的无抑制, (A) Ramos肿瘤细胞体外增殖通过抗-CXCR4人抗体F7 (BMS-936564)、F9和E2的抑制, 和 (B) Ramos细胞增殖通过MDX-1338 (BMS-936564) 的抑制。(B) 中, 还显示了不同肽CXCR4拮抗剂的作用。

[0035] 图12显示皮下肿瘤模型中Ramos肿瘤细胞体内增殖通过抗-CXCR4人抗体F7 (BMS-936564) 和F9的抑制。图12A显示平均肿瘤体积生长曲线; 图12B显示中值肿瘤体积生长曲线; 并且图12C显示中值%体重改变。

[0036] 图13显示在Ramos系统肿瘤细胞模型中, 用抗-CXCR4人抗体F9 (A) 或抗-CXCR4抗体, BMS-936564, 和抗-CXCL12抗体 (B) 处理的小鼠的百分比存活率。BMS-936564在该Ramos系统模型中非常有效, 而抗-CXCL12Ab显示无效力。

[0037] 图14显示通过将Ramos细胞在37℃与10μg/mLMDX-1338 (BMS-936564) 或同型对照温育24小时而进行的凋亡测定的结果。细胞用膜联蛋白-FITC和丙锭碘 (A) 染色。测定仅对膜联蛋白阳性或对膜联蛋白和PI双阳性的细胞百分比 (B)。

[0038] 图15显示通过MDX-1338 (BMS-936564) 的凋亡诱导为CXCR4-特异性的。MDX-1338或同型对照加至CXCR4-转染的细胞 (A) 或R1610亲本细胞 (B) 并且用膜联蛋白-FITC和PI染色。例举说明了仅对膜联蛋白阳性或对膜联蛋白和PI双阳性的细胞百分比。

[0039] 图16显示Ramos细胞淋巴瘤异种移植通过阻断CXCR4抗体、MDX-1338 (BMS-936564) 和利妥昔 (嵌合抗-CD20单克隆抗体) 阳性对照的体内肿瘤生长抑制, 以及通过阻断抗-CXCL12抗体的肿瘤生长抑制缺乏。

[0040] 图17显示HL60细胞 (A) 和Nomo-1 (B) 急性骨髓性白血病异种移植物通过MDX-1338

(BMS-936564) 的体内肿瘤生长抑制。阿糖胞苷果然不抑制阿糖胞苷-抗性Nomo-1肿瘤的肿瘤生长。

[0041] 图18显示多种CXCR4<sup>+</sup>多发性骨髓瘤细胞异种移植通过MDX-1338 (BMS-936564) 的体内肿瘤生长抑制。A, 仅用MDX-1338或与雷利度胺或硼替佐米联合处理的MOLP8细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; B, 用MDX-1338或雷利度胺或硼替佐米处理的JJN-3R细胞的肿瘤生长抑制; C, 仅用MDX-1338或与硼替佐米联合处理的亲本JJN-3细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; D, 仅用MDX-1338或与雷利度胺联合处理的亲本JJN-3细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; E, 仅用MDX-1338或与雷利度胺 (REVLIMID®) 联合处理的RPMI-8226细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; F, 仅用MDX-1338或与硼替佐米 (VELCADE®) 联合处理的RPMI-8226细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; G, 仅用MDX-1338或与雷利度胺联合处理的MM.1S细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; H, 仅用MDX-1338或与硼替佐米联合处理的OMP-2细胞异种移植物的肿瘤生长抑制; I, 仅用MDX-1338或与雷利度胺联合处理的OMP-2细胞异种移植物的肿瘤生长抑制。

[0042] 发明详述

[0043] 本披露涉及分离的单克隆抗体, 特别是人单克隆抗体, 其特异地结合至在细胞表面表达的天然人CXCR4。在某些实施方案中, 本披露的抗体来源于特定的重链及轻链种系序列和/或包含特定的结构特征, 例如包括特定氨基酸序列的可变区或CDR。本披露还涉及使用所述抗体以调节与CXCR4的表达有关或涉及CXCR4/CXCL12途径的疾病或病症中CXCR4活性, 或相反治疗所述疾病或病症的方法, 所述疾病或病症诸如癌症, 尤其是血液恶性肿瘤、肿瘤转移、HIV感染、炎症和血管生成。

[0044] 术语

[0045] 为了使本披露可以更容易地得到理解, 首先对一些术语进行了定义。如本申请中所用的, 除非本文另外明确提供, 每一下列术语应当具有以下阐述的含义。其他定义在整个申请中阐述。

[0046] “给药”指使用本领域技术人员所知的任何不同方法和投递系统将包含治疗剂的组合物物理导入受试者。用于本发明抗体的优选的给药途径包括静脉内、肌内、皮下、腹腔内、脊髓或其他肠胃外的给药途径, 例如通过注射或输注。本文所使用的短语“肠胃外给药”是指除了肠内及局部给药外的给药方式, 通常通过注射, 并包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、经淋巴、病灶内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外及胸骨内注射及输注, 以及体内电穿孔。作为替代, 可经非肠胃外途径给予本发明的抗体, 诸如局部、表皮或粘膜途径给药, 例如经鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部给药。例如还可以一次、多次和/或超过一个或多个延长期进行给药。

[0047] “抗体” (Ab) 应该包括, 但不限于特异性结合抗原, 并且包括通过二硫键相连的至少两条重链 (H) 及两条轻链 (L) 的糖蛋白免疫球蛋白, 或其抗原结合部分。每一条H链包括重链可变区 (在此缩写为V<sub>H</sub>) 及重链恒定区。该重链恒定区包括三个结构域 (domain), CH1、CH2和CH3。每一条轻链由轻链可变区 (在此缩写为V<sub>L</sub>) 及轻链恒定区组成。该轻链恒定区包括一个结构域, CL。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区域能进一步被分成多个高可变性区域, 被称为互补决定区 (CDR), 散布有更保守的被称为构架区 (FR) 的多个区域。每个V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>均由3个CDR及4个FR构成, 按照以下顺序从氨基端至羧基端排布: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区

包含与抗原相互作用的结合域。这些抗体的恒定区可能介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,这些宿主组织或因子包括免疫系统的不同细胞(如效应细胞)及经典补系统的第一成分(C1q)。

[0048] 抗体通常以高亲和力特异性结合其同源抗原,高亲和力通过 $10^{-5}$ 至 $10^{-11}\text{M}^{-1}$ 或更小的离解常数( $K_D$ )反映。任何大于约 $10^{-4}\text{M}^{-1}$ 的 $K_D$ 通常认为表明是非特异性结合。如此处所用的,“特异性结合”抗原的抗体指以高亲和力结合所述抗原和基本相同的抗原,但不以高亲和力结合无关抗原的抗体,所述高亲和力指具有 $10^{-7}\text{M}$ 或更小,优选 $10^{-8}\text{M}$ 或更小,甚至更优选 $5\times 10^{-9}\text{M}$ 或更小,并且最优选 $10^{-8}\text{M}$ 和 $10^{-10}\text{M}$ 或更小之间的 $K_D$ 。如果抗原呈现对给定抗原的高度序列同一性,例如其对给定抗原的序列呈现至少80%,至少90%,优选至少95%,更优选至少97%,或甚至更优选至少99%序列同一性,则该抗原为与给定的抗原“基本相同的”。举例来说,特异性结合人CXCR4的抗体还可以与来自某些灵长类物种的CXCR4抗原具有交叉-反应性,但不会与来自某些啮齿类物种的CXCR4抗原或与除CXCR4以外的抗原,例如人PD-L1抗原反应。

[0049] 免疫球蛋白可以源自任何通常已知的同型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。本领域技术人员也清楚地知晓IgG亚类,并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同型”指通过重链恒定区基因编码的抗体种类(例如IgM或IgG1)。“抗体”包括,举例来说,天然存在的和非-天然存在的抗体;单克隆和多克隆抗体;嵌合和人源化抗体;人或非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。非人抗体可以通过重组方法人源化以降低其在人中的免疫原性。其中未明确声明,并且除非上下文另外表明,术语“抗体”还包括任何上述免疫球蛋白的抗原-结合片段或抗原-结合部分,并且包括单价和二价片断或部分,以及单链抗体。

[0050] “分离的抗体”指一种抗体,它基本上没有其他的具有不同抗原特异性的抗体(例如,特异地结合CXCR4的分离的抗体基本上没有特异地结合除CXCR4之外的抗原的抗体)。然而,特异地结合CXCR4的分离的抗体对其他抗原,例如来自不同物种的CXCR4分子,可能具有交叉反应性。此外,分离的抗体可能基本上没有其他细胞材料和/或化学物。

[0051] 短语“抗-抗原的抗体”、“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文中与术语“特异性结合抗原的抗体”可互换地使用。

[0052] 术语“单克隆抗体”(“mAb”)指单一分子组分的抗体分子的制剂,即抗体分子其基本序列实质相同,并且呈现针对特定表位的单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体可以通过杂交瘤细胞、重组、转基因或本领域技术人员已知的其他技术产生。

[0053] “人”抗体(HuMAb)指具有多个可变区,其中框架区及CDR区均来自人种系免疫球蛋白序列的抗体。此外,如果该抗体含有恒定区,则该恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括不通过人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外由随机或定点特异性诱变或在体内由体细胞突变引入的突变)。然而,在此所用的术语“人抗体”并非旨在包括这样的抗体,其中来自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植至人框架序列上。术语“人”抗体和“完全人”抗体同义地使用。

[0054] “人源化”抗体指其中非-人抗体CDR结构域外的一些,大多数或所有氨基酸替换为源自人免疫球蛋白的对应的氨基酸的抗体。在抗体人源化形式的一个实施方案中,CDR结构域外的一些,大多数或所有氨基酸已替换为来自人免疫球蛋白的氨基酸,而一个或多个CDR区内的一些,大多数或所有氨基酸不变。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修饰是

允许的,只要其不废除所述抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保持与原始抗体类似的抗原特异性。

[0055] “嵌合抗体”指其中可变区源自一个物种而恒定区源自另一个物种的抗体,例如其中可变区源自小鼠抗体而恒定区源自人抗体的抗体。

[0056] 抗体的“抗原-结合部分”(也称为“抗原-结合片段”)指保持特异性结合由完整抗体结合的抗原的能力的抗体的一个或多个片段。

[0057] “癌症”指以体内异常细胞不受控制的生长为特征的各种疾病的大组。未调节的细胞分裂和生长导致形成侵袭邻近组织的恶性肿瘤并且还可以经由淋巴系统或血流转移至身体远端部分。

[0058] 术语“CXCR4”(“C-X-C趋化因子受体4”)包括变异体、同种型、同系物、同源物(ortholog)以及类似物(paralog)。例如,在某些情况下,对CXCR4特异的抗体可能与来自非人物种的CXCR4进行交叉反应。在其他实施方案中,对人CXCR4特异的抗体可能对人类CXCR4是完全特异的,并且不显示物种或其他类型的交叉反应活性。术语“人CXCR4”是指人序列CXCR4,诸如具有Genbank®登录号P61073的人CXCR4的全部氨基酸序列(SEQ ID NO:51)。在本领域中,CXCR4来作为,例如,LESTR、Fusin或CD184为人所知。通过具有例如保守突变或在非保守区的突变,人CXCR4序列可能不同于SEQ ID NO:51的人CXCR4,并且该CXCR4具有基本上与SEQ ID NO:51的人CXCR4相同的生物功能。例如,人CXCR4的生物功能是在CXCR4的胞外域中具有表位,该表位与本披露的抗体特异地结合,或者人CXCR4的生物功能是趋化因子结合或参与新陈代谢过程。

[0059] 具体的人CXCR4序列与SEQ ID NO:51的人CXCR4在氨基酸序列上通常会有至少90%的同一性,并且含有多个氨基酸残基,当与其他物种(例如鼠类)的CXCR4氨基酸序列相比时,这些氨基酸残基鉴定该氨基酸序列是人源的。在某些情况下,人CXCR4可能与SEQ ID NO:51的CXCR4在氨基酸序列方面具有至少95%、或甚至至少96%、97%、98%、或99%的同一性。在某些实施方案中,人CXCR4序列将显示与SEQ ID NO:51的CXCR4不超过10个氨基酸的差异。在某些实施方案中,人CXCR4序列将显示与SEQ ID NO:51的CXCR4不多于5个、或甚至不多于4个、3个、2个、或1个氨基酸的差异。同一性的百分数可以如本文所述而确定。

[0060] “CXCR4-表达癌症”或“CXCR4<sup>+</sup>癌症”为其中恶性肿瘤细胞表征该癌症在细胞表面表达CXCR4,优选表达高水平CXCR4的癌症。

[0061] 本文的术语“血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤,以及脾和淋巴结癌症。顺从用本发明公开的抗-CXCR4抗体治疗的示例性的淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金氏淋巴瘤和大部分非-霍奇金氏淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非-限制性实例包括弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、粘膜-关联的淋巴组织淋巴瘤(MALT)、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特氏淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、Waldenström巨球蛋白血症、结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、脾脏边缘区淋巴瘤(SMZL)、血管内大B细胞淋巴瘤、原发渗出淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非-限制性实例包括结节外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病,诸如但不限于,继发白血病、慢性淋巴细胞性白血病(CLL;也称为慢性淋巴性白血病)、急性髓性白血病(AML;也称为急性淋巴性白血病)、慢性粒性白血病(CML)、B细胞幼淋

巴细胞白血病(B-PLL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和脊髓发育不良(MDS)。血液恶性肿瘤进一步包括骨髓瘤,诸如但不限于,多发性骨髓瘤(MM)和郁积多发性骨髓瘤(SMM)。其他的血液和/或B细胞或T细胞-相关的癌症由术语血液恶性肿瘤所涵盖。例如,血液恶性肿瘤还包括另外的造血细胞癌症,所述造血细胞包括树突状细胞、血小板、红细胞、nk细胞和多形核白血球,例如嗜碱细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞。对本领域技术人员清楚的是这些前-恶性肿瘤和恶性肿瘤由于改变分类体系而常常具有不同的名称,而且患有以不同名称分类的淋巴瘤的患者也可以受益于本发明的治疗方案。

[0062] 术语“SDF-1”指间质细胞来源的因子1,它是CXCR4的配体。术语“SDF-1”包括SDF-1的不同的同种型,例如SDF-1 $\alpha$ 及SDF-1 $\beta$ 。人SDF-1 $\alpha$ 的氨基酸序列的Genbank®登录号为NP\_954637。人SDF-1 $\beta$ 的氨基酸序列的Genbank®登录号为NP\_000600。人SDF-1还在美国专利No.5,756,084中描述。SDF-1也被称为CXCL12。如本文对CXCR4的描述,人SDF-1的氨基酸序列可不同于NP\_954637或NP\_000600的SDF-1。

[0063] “信号转导途径”指在多种信号转导分子之间的生物化学关系,这些分子在信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分的传递中发挥作用。如此处所用的,短语“细胞表面受体”包括,例如,能够接受信号并将这种信号传递穿过细胞的细胞膜的分子及分子复合物。本披露的细胞表面受体的实例是CXCR4受体。

[0064] “受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于,脊椎动物诸如非人灵长类、绵羊、狗、猫、兔、白鼬,啮齿类诸如小鼠、大鼠和豚鼠,鸟类种类诸如鸡,两栖类和爬行动物。在优选的实施方案中,受试者为哺乳动物诸如非人灵长类、绵羊、狗、猫、兔、白鼬或啮齿类。在更优选的实施方案中,受试者为人。术语“受试者”、“患者”和“个体”在此可互换地使用。

[0065] 药物或治疗剂,诸如本发明的抗体的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”为当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时促进疾病衰退的任何药物量,所述疾病衰退迹象由病症严重程度降低、无病症期频率和持续时间的增加或由于疾病折磨的损害或残疾的预防证明。药物治疗有效量或剂量包括“预防有效量”或“预防有效剂量”,其为单独给药或与另一种治疗剂联合给药至处于疾病发展或遭受疾病复发的风险中的受试者时,抑制疾病发展或复发的任何药物量。可利用熟练的从业者已知的各种方法,诸如在临床试验期间的人受试者中,在预示人中效力的动物模型系统中,或通过分析所述药剂在体外分析法中的活性而评估治疗剂促进疾病衰退的能力。

[0066] 举例来说,抗癌剂促进受试者中癌症的衰退。在优选的实施方案中,治疗有效量的所述药物促进癌症衰退至清除癌症的程度。“促进癌症衰退”指单独或与抗-肿瘤剂联合给予有效量的所述药物,导致肿瘤生长或大小的降低、肿瘤坏死、至少一种病症严重程度降低、无病症周期的频率和持续时间增加、由于疾病折磨的损害或残疾的预防,或相反患者中病症的改善。此外,在治疗方面的术语“有效的”和“有效性”包括药理学有效性和生理学安全性。药理学有效性指所述药物促进患者中癌症衰退的能力。生理学安全性指由施用所述药物引起的对细胞、器官和/或生物体水平的毒性水平,或其他不利的生理作用(副作用)。

[0067] 肿瘤治疗举例来说,所述药物的治疗有效量或剂量优选相对于未治疗的受试者,抑制细胞生长或肿瘤生长至少约20%,更优选至少约40%,甚至更优选至少约60%和仍更优选至少约80%。大多数优选的实施方案中,所述药物的治疗有效量或剂量完全抑制细胞

生长或肿瘤生长,即优选100%抑制细胞生长或肿瘤生长。抑制肿瘤生长的化合物的能力可以在预示在人肿瘤中效力的动物模型系统中评估。或者,组合物的该特性可以通过检查所述化合物抑制细胞生长的能力而评估,所述抑制可以通过熟练的从业者已知的分析法体外测量。在本发明其他的优选实施方案中,可以观察到肿瘤衰退并且持续至少约20天,更优选至少约40天,或甚至更优选至少约60天的时期。

[0068] 受试者的“治疗”或“疗法”指以反转、减轻、改善、抑制、减缓或预防症状、并发症、病情或与疾病有关的生化标记的发作、进展、发展、严重程度或复发为目的而对受试者进行的干预或处理,或将活性剂给予受试者。

[0069] 本披露的各个方面在下列分段中进一步详细描述。

[0070] 抗-CXCR4抗体

[0071] 使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠,可以产生直接本披露的人单克隆抗-CXCR4抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括本文分别提到的小鼠,如 **HUMABMOUSE®** (Lonberg等., 1994) 和 **KMMOUSE®** (W002/43478)。本发明示例性抗-CXCR4抗体的产生在W02008/060367中详细描述。本发明的抗体特征为特定的功能特征或特性。例如,所述抗体结合细胞表面表达的天然的人CXCR4。优选,本发明的抗体以高亲和力,例如以 $1 \times 10^{-7}$ M或更小的 $K_D$ 结合CXCR4。本发明的抗-CXCR4抗体优选表现出一种或多种以下特征:

[0072] (a) 结合细胞表面表达的天然的人CXCR4;

[0073] (b) 抑制SDF-1结合人CXCR4;

[0074] (c) 抑制SDF-1-诱导的表达CXCR4的细胞中的钙流动;

[0075] (d) 抑制SDF-1-诱导的表达人CXCR4的细胞的迁移;

[0076] (e) 抑制由人脐静脉内皮细胞形成毛细管;

[0077] (f) 以 $1 \times 10^{-7}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4;

[0078] (g) 诱导表达CXCR4的细胞中的凋亡;

[0079] (h) 体外抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞的增殖;

[0080] (i) 体内抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞增殖和/或诱导CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞凋亡;

[0081] (j) 抑制CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞的转移;和/或

[0082] (k) 提高CXCR4<sup>+</sup>肿瘤-负荷受试者的存活时间。

[0083] 优选地,本披露的一个抗体以 $5 \times 10^{-8}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4,以 $2 \times 10^{-8}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4,以 $5 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4,以 $4 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4,以 $3 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4,或以 $2 \times 10^{-9}$ M或更小的 $K_D$ 结合人CXCR4。

[0084] 优选地,本披露的抗体以50nM或更小的用于抑制的 $EC_{50}$ 抑制SDF-1与人CXCR4结合,更优选为30nM或更小、或15nM或更小、或10nM或更小、或5nM或更小、或3nM或更小(例如,用于抑制的 $EC_{50}$ 为28.60nM或更小、或12.51nM或更小、或2.256nM或更小)。

[0085] 优选地,本披露的抗体以3nM或更小的用于抑制的 $EC_{50}$ 在表达人CXCR4的细胞中抑制SDF-1诱导的钙流动,更优选为2nM或更小,或1nM或更小,或0.9nM或更小,或0.8nM或更小,或0.7nM或更小,或0.6nM或更小,或0.5nM或更小,或0.4nM或更小(例如,0.9046nM或更小,0.5684或更小,或0.3219nM或更小)。

[0086] 优选地,本披露的抗体以50nM或更小的用于抑制的 $EC_{50}$ 抑制SDF-1诱导的表达人



CXCR4的细胞的迁移,更优选为30nM或更小,或20nM或更小,或15nM或更小(例如,18.99nM或更小,或12.44或更小)。

[0087] 评估抗体与在细胞表面表达的天然人CXCR4的结合能力的标准测定在本领域内是已知的,包括例如,使用细胞系的流式细胞分析,该细胞系自然地表达天然CXCR4或该细胞系已被转染以表达天然CXCR4。在这些实施例中详细地说明了适宜的测定。表达天然CXCR4的优选的细胞系是CEM T细胞系。用于评价SDF-1的结合的抑制作用、SDF-1诱导的钙流动的抑制作用、SDF-1诱导的细胞迁移的抑制作用、对由HuVEC形成毛细管的抑制作用、在体内和/或在体外在表达CXCR4的细胞中凋亡的诱导作用、在体外和/或在体内CXCR4阳性的肿瘤细胞的生长的抑制作用、和/或对CXCR4阳性的肿瘤细胞的转移的抑制作用的适宜测定在这些实例中也有详细的说明。该抗体的结合亲和力也可以通过标准方法例如通过Scatchard分析而进行测定。

[0088] 本发明的抗-CXCR4抗体还包括上述抗体的抗原-结合部分。已充分证明抗体的抗原-结合功能可以通过全长抗体的片段来进行。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL及 CH1结构域构成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包括通过在铰链区的二硫桥连接两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 $V_H$ 及CH1结构域组成的Fd片段;和(iv) 由抗体单臂的 $V_L$ 及 $V_H$ 结构域组成的Fv片段。

[0089] 这些片段,最初经由用酶诸如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的蛋白质水解获得,随后已设计为单价和多价抗原结合片段。例如,虽然Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 由单独的基因编码,其可通过合成接头肽利用重组方法连接,所述合成接头肽能使其作为其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区域配对形成单价分子的单个蛋白质链产生,称为单链可变片段(scFv)。二价或双价scFv(di-scFv或bi-scFv)可通过将两个scFv连接在包含两个 $V_H$ 和两个 $V_L$ 区域的称为串联scFv的单个肽链内而设计。还可以利用少于10个氨基酸的连接肽产生ScFv二聚体和更高的多聚体,所述连接肽对于两个可变区折叠在一起太短,其迫使scFv二聚化并且产生二聚体或形成其他的多聚体。已显示二聚体以比对应的scFv高得多的亲和力结合其同源抗原,具有比对scFv的 $K_D$ 值低至40倍的解离常数。非常短的接头( $\leq 3$ 个氨基酸)导致形成对其抗原表现出比二聚体甚至更高的亲和力的三价三链抗体或四价四链抗体。其他的变体包括微抗体,其为scFv-CH3二聚体,并且大scFv-Fc片段(scFv-CH2-CH3二聚体),以及甚至分离的CDR可以表现出抗原-结合功能。这些抗体片段利用本领域技术人员已知的常规重组技术设计,并且以相同的方法筛查片段作为完整的抗体的功用。上述所有蛋白水解的和设计的抗体和相关变体的片段(参见Hollinger等.,2005;Olafsen等.,2010,为了更多细节)意图包括在术语抗体的“抗原-结合部分”内。

[0090] 单克隆抗体F7、F9、D1和E2

[0091] 本披露的优选抗体是人单克隆抗体F7(BMS-936564)、F9、D1及E2,按照实施例1和2的说明分离并结构表征。F7、F9、D1及E2的 $V_H$ 氨基酸序列分别如在SEQ ID NO:25、26、27及28中所示。F7、F9、D1及E2的 $V_L$ 氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29、30、31及32所示。另外,产生了F7、F9、D1及E2的可替代的形式(其中某些框架残基被种系残基替换),并且在此是指F7GL、F9GL、D1GL及E2GL。F7GL、F9GL、D1GL及E2GL的 $V_H$ 氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:41、42、43及44。F7GL、F9GL、D1GL及E2GL的 $V_L$ 氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:45、46、47及48。本披露的其他抗-CXCR4抗体包括由“混合并匹配”不同的 $V_H$ 和 $V_L$ 区域或不同的CDR,以产生如

W02008/060367中所述的特异性结合CXCR4的抗体而产生的抗体。

[0092] 因此,在一个方面中,本披露提供了抗体,其包括F7、F9、D1或E2的重链及轻链的CDR1、CDR2及CDR3,或其组合。F7、F9、D1及E2的V<sub>H</sub> CDR1的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:1至4中。F7、F9、D1及E2的V<sub>H</sub> CDR2的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:5至8中。F7、F9、D1及E2的V<sub>H</sub> CDR3的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:9至12中。F7、F9、D1及E2的V<sub>K</sub> CDR1的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:13至16中。F7、F9、D1及E2的V<sub>K</sub> CDR2的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:17至20中。F7、F9、D1及E2的V<sub>K</sub> CDR3的氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:21至24中。以上鉴定的CDR区是用Kabat系统绘出的(Kabat等.,1991)。

[0093] 在一个方面中,本披露提供单克隆抗体或其抗原-结合部分,其特异性结合CXCR4,优选人CXCR4,并且包含V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区域的组合,每个区域包含三个互补决定区(CDR)。在优选的实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原-结合部分包含:

[0094] (a) 具有SEQ ID NO:25或41所述序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:29或45所述序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;

[0095] (b) 具有SEQ ID NO:26或42所述序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:30或46所述序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;

[0096] (c) 具有SEQ ID NO:27或43所述序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:31或47所述序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;或

[0097] (d) 具有SEQ ID NO:28或44所述序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:32或48所述序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0098] 在其他优选的实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原-结合部分包含:

[0099] (a) 包含具有SEQ ID NO:1所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:5所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:9所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:13所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:17所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2或其保守修饰;和包含具有SEQ ID NO:21所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3;

[0100] (b) 包含具有SEQ ID NO:2所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:6所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:10所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:14所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:18所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2或其保守修饰;和包含具有SEQ ID NO:22所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3;

[0101] (c) 包含具有SEQ ID NO:3所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:7所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:11所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:15所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:19所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2或其保守修饰;和包含具有SEQ ID NO:23所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3;或

[0102] (d) 包含具有SEQ ID NO:4所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1或其保

守修饰;包含具有SEQ ID NO:8所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:12所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:16所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1或其保守修饰;包含具有SEQ ID NO:20所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2或其保守修饰;和包含具有SEQ ID NO:24所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3。

[0103] 在另外的实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原-结合部分包含:

[0104] (a) 包含具有SEQ ID NO:25或41所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区或其保守修饰,和包含具有SEQ ID NO:29或45所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区或其保守修饰;

[0105] (b) 包含具有SEQ ID NO:26或42所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区或其保守修饰,和包含具有SEQ ID NO:30或46所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区或其保守修饰;

[0106] (c) 包含具有SEQ ID NO:27或43所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区或其保守修饰,和包含具有SEQ ID NO:31或47所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区或其保守修饰;或

[0107] (d) 包含具有SEQ ID NO:28或44所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区或其保守修饰,和包含具有SEQ ID NO:32或48所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区或其保守修饰。

[0108] 在优选的实施方案中,所述抗-CXCR4抗体或其抗原-结合部分包含:

[0109] (a) 包含具有SEQ ID NO:1所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1;

[0110] (b) 包含具有SEQ ID NO:5所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2;

[0111] (c) 包含具有SEQ ID NO:9所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3;

[0112] (d) 包含具有SEQ ID NO:13所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1;

[0113] (d) 包含具有SEQ ID NO:17所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2;和

[0114] (d) 包含具有SEQ ID NO:17所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3。

[0115] 在另一个优选的实施方案中,所述抗-CXCR4抗体或其抗原-结合部分包含:

[0116] (a) 包含具有SEQ ID NO:2所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区 CDR1;

[0117] (b) 包含具有SEQ ID NO:6所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2;

[0118] (c) 包含具有SEQ ID NO:10所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3;

[0119] (d) 包含具有SEQ ID NO:14所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1;

[0120] (d) 包含具有SEQ ID NO:18所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2;和

[0121] (d) 包含具有SEQ ID NO:22所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3。

[0122] 结合至与抗-CXCR4抗体相同表位的抗体

[0123] 在另一个实施方案中,本披露提供抗体或其抗原-结合部分,其如本披露的抗-CXCR4单克隆抗体的任一个同样地结合人CXCR4上的相同表位(即相同的或重叠的表位)(即,有能力与本披露的单克隆抗体中的任何一个交叉竞争结合CXCR4的抗体)。在优选的实施方案中,用于交叉竞争研究的参照抗体可以是单克隆抗体F7(BMS-936564)(具有分别示于SEQ ID NO:25及29的V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>序列),或单克隆抗体F9(具有分别示于SEQ ID NO:26及30的V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>序列),或单克隆抗体D1(具有分别示于SEQ ID NO:27及31的V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>序列),或单克隆

抗体E2(具有分别示于SEQ ID NO:28及32的V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>序列)。因此,本披露提供人单克隆抗体或其抗原-结合部分,其与参照抗体或其参照抗原-结合部分交叉竞争结合人CXCR4,其中所述参照抗体或其部分包含:

[0124] (a) 包含具有SEQ ID NO:25所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:29所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区;

[0125] (b) 包含具有SEQ ID NO:26所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:30所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区;

[0126] (c) 包含具有SEQ ID NO:27所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:31所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区;或

[0127] (d) 包含具有SEQ ID NO:28所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区, 和包含具有SEQ ID NO:32所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区。

[0128] 在优选的方面中,本发明的交叉竞争抗-CXCR4单克隆抗体包含V<sub>H</sub>区,其包含具有源自如SEQ ID NO:49所述人V<sub>H</sub>3-48种系序列的序列的连续相连氨基酸,和/或V<sub>L</sub>区,其包含具有源自如SEQ ID NO:50所述人VK L15种系序列的序列的连续相连氨基酸。

[0129] 可以在标准的CXCR4结合测定,例如用CEM细胞的流式细胞术中,基于所述交叉竞争抗体与本发明的F7、F9、D1、E2或任何其他参照抗-CXCR4抗体交叉竞争的能力而鉴定之,其中所述参照抗体用FITC标记并且评估测试抗体抑制FITC-标记的参照抗体结合CEM细胞的能力。

#### [0130] 药物组合物

[0131] 在另一方面,本披露提供了一种组合物(例如一种药物组合物),包含本披露的一种单克隆抗体或其一种抗原结合部分,或单克隆抗体或其抗原结合部分的组合,并与药学可接受载体一起配制。如此处所用的,“药学可接受载体”包括任何及全部的在生理学上相容的溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延缓剂等。优选地,该载体适宜于经静脉、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮给药(例如通过注射或输注)。本发明的药物组合物可以包含一种或多种药学可接受的盐、抗-氧化剂、含水和无水载体,和/或佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂及分散剂。

[0132] 调整给药方案以提供最佳期望的应答,例如治疗应答或最小的副作用。

[0133] 对于人抗-CXCR4抗体的给药,剂量范围从约0.0001至100mg/kg,优选从约0.01至约20mg/kg,并且更优选0.1至10mg/kg所述受试者的体重。例如,剂量可以是0.1、0.3、1、3、5或10mg/kg体重,并且更优选0.3、1、3或10mg/kg体重。所述剂量表通常设计成实现暴露,其基于抗体的一般药物动力学特性产生持续的受体占有。一种示例性治疗方案限定为每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每三个月一次或每3至6个月一次。因为IgG4抗体通常具有2-3周的半衰期,本披露的抗-CXCR4抗体的优选的剂量方案包括通过静脉给药0.3-20mg/kg体重,优选1-mg/kg体重,直至6周、8周或12周周期中每7或14天给予所述抗体直至完全应答或证实的进行性疾病。

[0134] 所述剂量和安排表可以在治疗过程期间改变。例如,对于本披露的抗-CXCR4抗体的给药方案包括通过静脉(IV)给药1、3或10mg/kg体重,利用以下剂量方案之一使用被给予的抗体:(i) 每7天直至6周周期;(ii) 每两周给予6个剂量,之后每3个月给药;(iii) 每三周给药;(iv) 1-10mg/kg体重一次给药,接着每2-3周按1mg/kg体重给药。

[0135] 在一些方法中,两种或多种具有不同结合特异性的单克隆抗体被同时给药,在这种情况下,所给予的每种抗体的剂量都在所给出的范围之内。通常在多个时间点给予抗体。单个剂量之间的间隔可以是,例如一周、一个月、每三个月或一年。通过测量患者的针对靶抗原的抗体的血液水平所示,间隔也是不规则的。在一些方法中,调整剂量使血浆抗体浓度大约是1至1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,并且在一些方法中大约是25至300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0136] 可替代地,抗体可以作为缓释制剂给药,在这种情况下中需要以较低频率给药。剂量及频率随抗体在患者体内的半衰期而变。人抗体的半衰期最长,其次是人源化抗体、嵌合抗体、以及非人抗体。给药的剂量及频率可根据治疗是预防性的或是治疗性的而变化。预防性的应用中,在很长的一段时间内以相对较不频率的间隔给予相对少的剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在治疗性的应用中,有时需要在相对短的间隔内的相对高的剂量,直至病情缓减或终止,并且优选地直至患者表现出部分或完全的疾病症状的改善。此后,可以给予患者预防性的方案。

[0137] 可以改变本披露的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以获得针对特定患者、组合物,及给药方式实现希望的治疗应答的有效的活性组分的量,而对患者无毒。所选的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素,包括所采用的本披露的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所采用的特定化合物的排泄速率、疗程、以及在本披露的特定组合物的组合中使用的其他药物、化合物和/或材料、正在接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、总体健康状态和病史,以及在医学领域熟知的类似因素。使用本领域已知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径可以对本披露的组合物进行给药。如本领域技术人员可以理解的,给药途径和/或给药方式将随所希望的结果而变化。

[0138] 活性化合物可用载体制备,该载体将保护化合物免于快速释放,例如控释制剂,包括植入剂、经皮贴剂、以及微囊化递送系统。可利用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯-乙酸乙烯共聚物、聚酐、聚乙二醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的许多方法已获得专利,或者是本领域技术人员所熟知的。参见,例如Robinson (1978)。

[0139] 可利用本领域中已知的医用装置给予治疗性组合物。例如,在优选的实施方案中,可利用无针皮下注射装置给予本披露的治疗性组合物,例如在美国专利号5,399,163、5,383,851或4,941,880中披露的装置。这些专利通过引用并入本文。许多其他这类植入剂、递送系统,及模块是本领域技术人员已知的。

[0140] 本发明的用途和方法

[0141] 本披露的抗体、抗体组合物以及方法具有与CXCR4相关病症的诊断和治疗相关的多种体外和体内诊断和治疗用途,包括例如用于治疗患有CXCR4-表达癌症的受试者的方法,其包括将治疗有效量的特异性结合细胞表面表达的CXCR4的抗体或其片段给予所述受试者。优选的受试者包括人患者,其患有与CXCR4活性有关、由CXCR4活性介导或调节的,或涉及CXCR4/CXCL12途径的病症诸如血液恶性肿瘤。用于治疗癌症患者的这些方法的某些实施方案中,所述抗-CXCR4抗体或其片段作为单一疗法给予,而在其他的实施方案中,其与另一种药剂诸如抗-肿瘤化疗剂联合给予。当针对CXCR4的抗体与另一种药剂联合给药时,这两种物质可相继或者同时给药。

[0142] 已知CXCR4表达于种类广泛的肿瘤细胞类型上,并且还已知参与了肿瘤的转移。此外,作为HIV进入T细胞的一种辅助受体,已知CXCR4参与了HIV感染。另外,已经显示CXCR4/

CXCL12途径参与了炎性的病症。再者,已经显示CXCR4/CXCL12途径参与了血管发生或新生血管形成。因此,本披露的抗-CXCR4抗体(和免疫偶联物以及双特异性分子)可用于各种临床情形中,包括以下:

[0143] A. 癌症

[0144] 已证实CXCR4在约75%的癌症中过表达,并且在某些情况下,在CXCR4表达与患者的预后或存活之间已经建立了负相关。与CXCR4表达或CXCR4/CXCL12途径相关的癌症类型的非限制性实例包括实体瘤诸如乳房(Muller等.,2001)、卵巢(Scotton等.,2001)、前列腺(Taichman等.,2002)、非-小细胞肺(Spano等.,2004)、胰腺(Koshiba等.,2000)、结肠直肠(Zeelenberg等.,2003)、肾(Schrader等.,2002)肿瘤和甲状腺癌(Hwang等.,2003)、鼻咽癌(Wang等.,2005)、黑色素瘤(Scala等.,2005)、肾细胞癌(Staller等.,2003)、成神经细胞瘤(Geminder等.,2001)、成胶质细胞瘤(Rempel等.,2000)、横纹肌肉瘤(Libura等.,2002)和骨肉瘤(Laverdiere等.,2005),以及血液恶性肿瘤诸如急性淋巴母细胞性白血病(Crazzolara等.,2001)、急性骨髓性白血病(Mohle等.,1998;Rombouts等.,2004)、多发性骨髓瘤(Alsayed等.,2007;Azab等.,2009)、慢性淋巴性白血病(Mohle等.,1999;Burger等.,1999)、慢性粒细胞性白血病(Jin等.,2008)和非-霍奇金氏淋巴瘤(Bertolini等.,2002;Weng等.,2003)。

[0145] 另外,该途径涉及刺激多个赘生物中的转移性过程(Murphy,2001)。临床研究中,CXCR4与提高的转移倾向和降低的存活率有关,并且已经确定为急性骨髓性白血病、乳房、结肠直肠、非-小细胞肺、卵巢和胰腺癌的预后指标,其中CXCR4更大的表达与疾病严重程度有关(Spoo等.,2007;Hiller等.,2011;Ottaiano等.,2006;Spano等.,2004;Jiang等.,2006;Marechal等.,2009)。

[0146] 骨髓基质细胞(BMSC)分泌CXCL12并且与CXCR4的相互作用是在BM微环境内归巢和维持造血干细胞必不可少的(Mohle等.,1998)。白血病细胞表达高水平的CXCR4,并且所述途径在白血病细胞迁移进入BM,其随后支持其生长和存活中起关键作用。CXCR4对转移性蔓延至器官例如BM(其中表达CXCL12)是必不可少的。总的来说,CXCR4在BM中造血干细胞的归巢和保持中起重要作用,并且CXCR4的拮抗剂调动干细胞进入血流,如用小分子CXCR4拮抗剂、AMD3100(普乐沙福;Mozobil)证实的,其经FDA批准用于与粒性白细胞-集落刺激因子联合用于NHL和MM患者中的自体移植(Dar等.,2011)。另一种CXCR4抑制剂,AMD3465显示拮抗CXCL12-和基质-诱导的趋化性,并且抑制白血病细胞中CXCL12-诱导的促存活信号途径的活化(Zeng等.,2009)。进一步,据证实AMD3465单独或与粒性白细胞集落刺激因子联合,诱导AML细胞和祖细胞调动进入循环中,并且提高化疗和索拉非尼的抗白血病作用,导致动物显著降低的白血病负担和延长的存活(Zeng等.,2009)。所述发现提示CXCR4/CXCL12相互作用的破坏可以用于通过靶向其保护的骨髓微环境而使得白血病细胞对化疗敏感。

[0147] 如实施例所述,已开发了针对CXCR4的新的第一类人治疗性单克隆抗体。这些单克隆抗体以低纳摩尔亲和力结合CXCR4-表达细胞,阻断CXCL12结合CXCR4-表达细胞,并且以低纳摩尔EC<sub>50</sub>值抑制CXCL12-诱导的迁移和钙流动。显然,除了阻断CXCL12-诱导的钙流动和迁移,实施例中提供的数据还表明抗体依赖的CXCR4-表达肿瘤细胞的凋亡的诱导为这些人抗-CXCR4抗体的作用机理。抗体-诱导的凋亡导致穿过多个造血肿瘤异种移植模型的加强的体内效力。基于小分子CXCR4拮抗剂在提高调动来自BM的CXCR4<sup>+</sup>肿瘤细胞且由此提高化

疗增敏,但不直接杀死所述肿瘤细胞中的作用,本抗-CXCR4抗体在杀死癌细胞中的效力是令人惊讶的和意外的。

[0148] 因为CXCR4在癌症的多个基本方面中起作用,包括增殖、迁移/侵袭和血管生成,拮抗剂在表达CXCR4的恶性肿瘤中具有潜在的多种干预方式。为了开始剖解所述途径,开发了分别针对CXCR4和CXCL12的完全人单克隆抗体。抗-CXCR4和抗-CXCL12抗体都抑制配体结合CXCR4,导致配体-诱导的细胞应答的抑制,例如钙流动和迁移(实施例4-6)。除了这些功能,CXCR4/CXCL12轴已涉及促进血管生成(Guleng等.,2005);Ping等.,2011)。抗-CXCR4(实施例7)和抗-CXCL12(数据没有显示)抗体还都抑制内皮血管形成,血管生成的体外验证。

[0149] 为了调查CXCR4/CXCL12相互作用的破坏的作用,在不同的体内异种移植模型中检测所述抗体在减弱肿瘤生长中的功效。在NHL(伯基特氏淋巴瘤)模型中,Ramos细胞移植入SCID小鼠中并且利妥昔用作阳性对照。令人惊讶的是,抗-CXCL12抗体不控制肿瘤生长并且似乎与赋形剂和同型对照不可区分。相反,抗-CXCR4抗体BMS-936564证实具有以与利妥昔类似的活性的几乎完全的肿瘤生长控制(实施例14)。因为两个抗体之间的趋化性体外阻滞类似(实施例6),抗-肿瘤控制不太可能取决于CXCL12/CXCR4轴的阻滞。因此,在Ramos细胞增殖测定中检测BMS-936564直接的细胞毒作用。CXCL12作为自分泌因子涉及促进细胞生长并且在独立的研究中CXCL12siRNA抑制BR5-1生长(Liu等.,2011;Righi等.,2011)。虽然生长抑制是部分的,观察到了用抗-CXCR4的剂量依赖的增殖抑制,而AMD3100和抗-CXCL12抗体没有效果(实施例8)。近来,报告为特异性CXCR4拮抗剂的14-残基多肽(BKT140)显示抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖(Beider等.,2011)。其已提示AMD3100为弱的部分激动剂而BKT140用作反向组织(Zhang 等.,2002)。

[0150] 考虑到上述,本披露的抗-CXCR4抗体可用于用于治疗患有CXCR4-表达癌症的受试者的方法中,包括将治疗有效量的特异性结合癌细胞表面表达的CXCR4受体的抗体或其片段给予所述受试者。在某些实施方案中,所述治疗方法对受试者预防性地使用,其之前患有癌症或其处于患癌症的风险中。在优选的实施方案中,其中所述受试者是人并且所述抗体或其片段结合人CXCR4受体。其他的优选实施方案中,结合CXCR4受体的所述抗体或其片段抑制所述受体的活性。因此,所述抗体或其片段破坏BM微环境内造血干细胞的归巢和维持和/或提高来自BM的细胞调动至外周,并且由此提高造血癌细胞对化疗剂的敏感性。其他的优选实施方案中,抗-CXCR4抗体或其片段诱导CXCR4-表达细胞的凋亡。靶癌细胞的凋亡允许所述抗体作为单一疗法使用。

[0151] 某些实施方案中,所述抗体或其片段为嵌合的、人源化的或人抗体或其片段。优选的实施方案中,所述抗体或其片段为人抗体或其片段。在其他的优选实施方案中,所述抗体或其片段包括重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25所述序列的连续相连的氨基酸,和轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:29所述序列的连续相连的氨基酸。

[0152] 某些实施方案中,根据Kabat系统描绘的CDR序列,所述抗-CXCR4抗体或其片段包括包含SEQ ID NO:1所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR1,包含SEQ ID NO:5所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR2,包含SEQ ID NO:9所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区CDR3,包含SEQ ID NO:13所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR1,包含SEQ ID NO:17所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR2,包含SEQ ID NO:21所述序



列的连续相连氨基酸的轻链可变区CDR3。

[0153] 本方法的其他实施方案中,所述抗-CXCR4抗体或其片段包含包含具有SEQ ID NO: 25所述序列的连续相连氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:29所述序列的连续相连氨基酸的轻链可变区。优选实施方案中,所述抗-CXCR4抗体或其片段为IgG1或IgG4抗体或其片段。更优选的实施方案中,所述抗体或其片段为BMS-936564或其CXCR4-结合片段。

[0154] 顺从本文所述治疗方法的癌症包括实体瘤和血液恶性肿瘤。某些实施方案中,实体瘤选自乳房、卵巢、前列腺、非-小细胞肺、胰腺、甲状腺、结肠直肠和肾癌、鼻咽癌、黑色素瘤、肾细胞癌、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤。其他的实施方案中,所述血液恶性肿瘤选自多发性骨髓瘤、非-霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、成免疫细胞大细胞淋巴瘤、前体B-成淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性骨髓淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴性白血病、蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤和前体T-成淋巴细胞性淋巴瘤。优选实施方案中,所述血液恶性肿瘤为多发性骨髓瘤、非-霍奇金氏淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、急性骨髓淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病或慢性淋巴性白血病。

[0155] 多发性骨髓瘤(MM)为以骨髓内恶性的免疫球蛋白分泌浆细胞的累积为特征的浆细胞恶性肿瘤,其可以导致骨组织破坏、髓衰竭、肾损伤和外周神经病。常规治疗后的中值存活率为3-4年并且可以用高-剂量治疗继之以自体造血干细胞迁移(HSCT)而延长至5-7年(Raab等.,2009)。

[0156] 目前批准的通常用于MM的方案包括用于诱导的基于美法仑的方案,和用于诱导并且用于复发受试者的基于硼替佐米(VELCADE®)或免疫调节药物(IMiD)包括镇静剂或雷利度胺(REVLIMID®)的方案。对于有复发或难治的MM的受试者,治疗选项包括HSCT、上述化疗治疗方案的重复或新的方案。HSCT与治疗相关的发病率有关。此外,由于差的行为状态或并存病,一些受试者没有顺从HSCT。目前没有治愈,并且当前的疗法仅能减缓疾病进展、延长存活和将症状减到最低。几乎所有的MM受试者,其在最初的治疗复发或变得难治时生存下来,不论治疗系,其需要另外的疗法(Jemal等.,2005)。因此,对于MM受试者存在明显未满足的医疗需求。在本治疗方法的优选实施方案中,所述血液恶性肿瘤为多发性骨髓瘤,包括复发的或难治的MM。

[0157] 急性骨髓性白血病(AML)为成人中最常见的急性白血病,占病例的80%。美国每年超过13,000例患者诊断随着有AML,超过8,820例死亡(Cancer Facts and Figures,2008)。对成人AML的治疗包括诱导化疗以实现缓解和缓解后化疗(有或无干细胞移植)以避免复发。缓解诱导率在50%至85%的范围。大部分受试者中疾病复发。复发的AML的治疗与几乎没有患者获得持久的益处的相对低的缓解率有关(Breems等.,2005)。

[0158] 治疗有复发的或难治的AML的成人的当前选择包括化疗和HSCT。对于原发的诱导衰竭或超过第一次完全缓解(CR)后考虑同种异体HSCT为选择的治疗,且其导致仅约20%患者长期无病生存。然而,HSCT因为种种理由而对很多患者不合适或难以实现(例如早期复发、移植设备的不方便性)。这与已复发或常规化疗难治的患者相比那些患有新诊断急性白血病的患者具有对化疗的不良预后和应答的事实一起,要求对该患者群体需要开发新的靶向剂。在本治疗方法的优选实施方案中,所述血液恶性肿瘤为急性骨髓性白血病,包括复发的AML。



[0159] 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 为西方国家最常见的白血病并且在美国占有所有白血病的30%。2011年诊断了大约14,570例新的CLL病例 (Siegel等., 2011), 并且4,400名患者将死亡。该疾病特征为机能不全的单克隆淋巴细胞的进展, 导致淋巴结病、脾大、肝肿大和外周血和骨髓中显著的淋巴球增多。大多数CLL患者最初证实对化疗的完全或部份缓解, 但除通过HSCT治疗的那些外, 几乎所有的在治疗中止后复发或发展为难治的疾病。当前对CLL的初期治疗包括常规化疗和/或单克隆抗体 (利妥昔) 治疗。大多数患者的存活为5-10年, 过去发病率提高。对患有复发的/难治的CLL的患者, 当前的治疗选择没有治愈该疾病并且估计的中值存活为16个月。在本治疗方法的优选实施方案中, 所述血液恶性肿瘤为慢性淋巴细胞性白血病, 包括复发的CLL。

[0160] 滤泡性淋巴瘤 (FL) 为美国和西欧第二最常见的淋巴瘤, 占NHL的约20% (总的说来), 并且大多数为低级淋巴瘤。尽管大多数患者响应初期治疗 (约40-80%完全缓解), 取决于使用的方案, 几乎所有的患者后来发展进行性疾病。此外, 上至10%对其初期治疗是难治的。因此, 需要新更有效的疗法。在本治疗方法的优选实施方案中, 所述血液恶性肿瘤为滤泡性淋巴瘤, 包括复发的FL。

[0161] 弥漫大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 为最常见的NHL类型, 占成人病例的25-30% (患者中40%的NHL超过75岁)。DLBCL具有一些亚型, 包括但不限于次级淋巴小结B (GCB) 类型, 活化的B细胞类型 (ABC) 和原发的纵隔亚型 (Gisselbrecht等., 2011)。治疗的患者中GCB和ABC的3-年总的存活率 (OS) 分别为84%和56%。大多数DLBCL患者用常规疗法没有治愈。复发后, 虽然至少60%患者保持对常规治疗敏感, 用二线治疗方案, 少于10%的患者具有延长的无病存活率 (Gisselbrecht等., 2010)。对于患有化学敏感疾病的患者子集, 复发的或难治的 (r/r) DLBCL用化疗治疗 (有或无利妥昔), 目的是随后高-剂量的化疗和移植。大约50%的第二化疗方案应答者继之以HSCT, 维持其应答2年。对于二线疗法失败或移植后复发的非-移植候选者, 治疗减轻。无移植时, 化疗在r/r DLBCL中提供短期疾病控制。主要的难治患者用第二化疗方案不太可能实现CR, 并且复发后第二缓解通常不是持久的 (Singer等., 1986)。由于DLBCL为最初的化疗应答疾病, 添加药剂例如本披露的抗-CXCR4抗体以恢复化学感受性为用于治疗该疾病的合理策略。在本治疗方法的优选实施方案中, 所述血液恶性肿瘤为弥漫大B细胞淋巴瘤, 包括复发的或难治的DLBCL。

[0162] 受来自HIV-1研究的数据提示, 该研究显示通过HIV-1包膜糖蛋白-gp120结合至CXCR4的CXCR4-介导的凋亡 (Garg等., 2006; Berndt等., 1998), 测量本披露的抗-CXCR4抗体, BMS-936564诱导CXCR4-表达细胞系凋亡的能力。在超过20种不同的CXCR4-表达细胞系中证实BMS-936564-诱导的凋亡 (参见实施例11, 以及表3和4), 证实该机理不限于一种细胞类型。

[0163] 对于慢性淋巴细胞性白血病, 在微小残留病 (MRD) 的体外模型中也证实了凋亡 (Kashyap等., 2012)。MRD的根除为CLL治疗的大部分攻击目的的一种。MRD模型中, 其以表达和分泌CXCL12并且对来自CLL患者的主要白血病细胞提供存活支持的基质细胞的共培养为基础, CLL细胞表现出提高的存活力 (20-60%对48小时), 并且显示对化疗剂的抗性。然而, 纳摩尔浓度 (2-200nM) 的BMS-936564诱导单独的CLL细胞培养物以及利用MRD模型温育的细胞培养物中的细胞死亡。在来自具有17p缺失和体外氟达拉滨抗性的患者的CLL细胞中观察到似乎是作为凋亡的p53独立的BMS-936564的促凋亡活性。BMS-936564也以低于AMD-3100,

一种小分子CXCR4抑制剂的浓度抑制CLL细胞中CXCL12-介导的F-肌动蛋白聚合。这些数据提示BMS-936564能有效地靶向存在于体内肿瘤微环境的CLL细胞,其引起MRD (Kashyap等., 2012)。

[0164] 本公开的抗-CXCR4抗体的凋亡作用,小分子CXCR4拮抗剂,例如AMD3100不表现出的特性,表明这些抗体能作为单一疗法单独使用以治疗有癌症的患者。上述在体内AML和MM肿瘤模型中对CXCR4拮抗剂作用的研究提示这些拮抗剂在提高肿瘤细胞对化疗的敏感性是有效的 (Azab 等., 2009; Zeng等., 2009)。相反,本文实施例中呈现的数据表明当BMS-936564作为单一疗法在多种AML、NHL和MM模型中给予时实现了统计上显著的肿瘤生长抑制。因此,本治疗方法的某些实施方案中,抗-CXCR4抗体或其片段作为单一疗法给药。优选实施方案中,所述抗体或其片段诱导CXCR4-表达细胞的凋亡。因此,本披露提供了诱导CXCR4-表达癌细胞凋亡的方法,包括大多数血液恶性肿瘤的细胞,包括将治疗有效量的特异性结合细胞表面表达的CXCR4受体的抗体或其片段给予患有癌症的受试者。

[0165] 由于BMS-936564为IgG4抗体,其体内功效不能通过ADCC或CDC解释。然而,有可能所述抗体一旦结合CXCR4-表达细胞,使得抗原呈递细胞上表达的Fc $\gamma$ R1受体引起噬菌作用。所述细胞系,其中在体内观察BMS-936564功效,需要对BMS-936564的次级抗-Fc抗体以诱导体外凋亡(实施例11)。这可能是那些特定细胞系上较低的CXCR4表达的结果。如果凋亡起始的机理取决于将CXCR4分子紧密接近,并且细胞表面的CXCR4密度相对于抗-CXCR4抗体跨越的结合间隔较低,则可能需要次级高-亲和力抗-Fc抗体弥合那些间隙,将受体带至一起以驱动凋亡信号。在体内,这可能经由Fc $\gamma$ R1受体实现。

[0166] 本文描述的数据提示新的作用机理,对于抗-CXCR4抗体除了其在细胞动员中的作用外,涉及CXCR4-表达靶细胞的凋亡。这些数据表明BMS-936564可以提供对血液恶性肿瘤包括MM、AML和各种NHL,例如FL和DLBCL,以及对实体瘤恶性肿瘤的有效治疗。然而,本方法不一定限于本披露的抗-CXCR4抗体的任何特定的作用机理。例如,MM细胞中CXCR4可以调节上皮向间充质的转变(EMT)并且本披露的抗-CXCR4抗体可以抑制EMT,如通过BMS-936564抑制EMT-相关蛋白Twist、Snail和Slug,并且上调E-钙粘蛋白的验证所证实的 (Roccaro等., 2012)。这些数据确证了由于CXCR4调节EMT的能力,其可以代表有效的治疗靶标的观点。

[0167] 之前已显示CXCR4/CXCL12轴在归巢和运输MM细胞至BM中起重要的作用,并且肿瘤细胞与BM的相互作用的破坏导致提高的对治疗剂的敏感性 (Alsayed等., 2007; Azab等., 2009)。这些发现提示所述新的抗-CXCR4人抗体BMS936564,可以防止MM细胞向BM的归巢和粘附并且使这些细胞对治疗剂敏感。值得注意的是,对靶向CXCR4的基础的有效性进一步通过Roccaro等 (2012) 的体内报告数据证实,其使用原发MM细胞(CD138<sup>+</sup>)、MM 细胞系(MM.1S、RPMI.8226)和原发MM骨髓基质细胞(BMSC)以评估向CXCL12和BMSC的迁移。分别通过MTT和胸腺嘧啶摄取测量细胞毒性和DNA合成。体内黑色素瘤小鼠模型用于验证抗-CXC4对调节肿瘤细胞转移的作用。证实(1)相比赋形剂-治疗的小鼠,用BMS-936564治疗的小鼠呈现更少的MM细胞向远的骨髓生境的扩散,支持CXCR4可能代表肿瘤细胞扩散关键调整的假设;(2)在黑色素瘤异种移植模型中BMS-936564-治疗的小鼠表现出相比赋形剂-治疗的小鼠降低的转移数;和(3)在迁移、粘附和存活方面,BMS-936564在体外功能上靶向MM细胞 (Roccaro等., 2012)。

[0168] 其进一步证实BMS936564以剂量-依赖的方式抑制MM细胞向CXCL12和原发的MM

BMSC迁移。原发的MM细胞向BMSC的粘附也通过BMS936564以剂量-依赖的方式抑制,虽然其也诱导对原发BM-来源的CD138<sup>+</sup>细胞的细胞毒性。BMS936564抗体通过克服BMSC-诱导的肿瘤细胞增殖而在BM周围环境中靶向MM细胞。此外,BMS936564协同提高MM细胞中的硼替佐米-诱导的细胞毒性(Roccaro等.,2012)。如实施例11所述,BMS936564-依赖的MM细胞中凋亡途径的活化通过级联-9和PARP的裂解证实。CXCL12-诱导的ERK-、Akt-和Src-磷酸化通过BMS936564以剂量-依赖的方式抑制。重要的是,如实施例16所述,BMS936564抑制异种移植小鼠模型中体内MM细胞的增殖。

[0169] 总体,这些数据清楚地表明通常对治疗癌症并且尤其是MM,用抗-CXCR4抗体靶向CXCR-4至MM细胞提供了有效的方法,可能运用了多个机理。

[0170] 本披露的抗-CXCR4抗体还可以用于其他癌症治疗的组合,例如外科手术和/或放射,和/或能与一种或其他更多的治疗剂共-给药,例如细胞毒剂、放射性毒剂或免疫抑制剂,其提高或增强抗-CXCR4抗体的治疗作用。所述抗体能连接至所述药剂(作为)或能独立于所述药剂给药。在后者情况中(独立给药),所述抗体能在所述药剂之前、之后或同时给药或能与其他已知的治疗剂,包括常规化疗药物和结合肿瘤-相关抗原或免疫调节靶标的抗体共-给药。其中化疗药物包括多柔比星(阿霉素)、顺氯氨铂、博来霉素硫酸盐、卡氮芥、瘤可宁、环磷酰胺、雷利度胺、硼替佐米、地塞米松、米托蒽醌、依托泊苷、阿糖胞苷、苯达莫司汀、利妥昔、异环磷酰胺、卡铂和依托泊苷。本披露的抗-CXCR4抗体或其抗原结合片段与化疗剂的共同-给药提供了两种抗-癌症剂通过不同机理起作用,其产生对人肿瘤细胞的细胞毒作用。所述共同-给药能解决由于抗药性的发展或肿瘤细胞抗原性改变的问题,其将赋予他们不与抗体反应。

[0171] 其他的实施方案中,所述受试者所述受试者可以另外用调节例如提高或抑制Fc $\gamma$ 或Fc $\gamma$ 受体表达或活性的药剂治疗,通过例如用细胞因子治疗所述受试者。用多特异性分子治疗期间对于给药的优选的细胞因子包括粒细胞集落-刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子(GM-CSF)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0172] 本披露的抗体还可用于与一种或多种另外的治疗抗体或其他的结合剂,例如Ig融合蛋白组合。本披露的抗-CXCR4抗体可以与之以组合给药的其他的抗体或结合剂的非-限制性实例包括CTLA-4、PSMA、CD30、IP-10、IFN- $\gamma$ 、CD70、PD-1、PD-L1、KIR、TNF、TNF-R、VEGF、VEGF-R、CCR5、IL-1、IL-18、IL-18R、CD19、CD25、CS1、EGFR、CD33、CD20、Her-2、CD25、gp11b/IIIa、IgE、CD11a、 $\alpha$ 4整联蛋白、IFN $\alpha$ 、以及IFNAR1的抗体或结合剂。

[0173] 有证据表明CXCR4途径的破坏和血液癌细胞例如MM细胞和其骨髓微环境之间相互作用的破坏赋予对抗-癌症治疗的更大的致敏作用,例如雷利度胺和硼替佐米对MM。如实施例所述,MM细胞系和异种移植物研究中作为单一疗法和与化疗联合的BMS-936564的非临床数据表明BMS-936564在MM是有活性的并且可以提高方案例如雷利度胺/地塞米松和硼替佐米的功效。临床前研究还表明用AMD3100的CXCR4抑制导致MM细胞从骨髓基质细胞脱粘附并且动员这些细胞进入外周,其导致对硼替佐米提高的敏感性(Azab等.,2009)。本披露的抗-CXCR4抗体通过从BM保护性环境释放恶性肿瘤细胞的能力类似地增强化学疗法的作用。除了动员MM细胞并且提高其化疗增敏,这些抗体具有通过凋亡直接杀死MM细胞的另外的作用(实施例11),连同其它可能的机理一起。BMS-936564已显示在单独或与雷利度胺或硼替佐米联合给药时在体内抑制MM肿瘤生长(实施例16)。

[0174] 在本文描述的治疗方法的某些实施方案中,所述方法进一步包括将至少一种化疗剂与抗-CXCR4抗体或其片段联合给予所述受试者。某些实施方案中,所述癌症为MM并且所述至少一种化疗剂为雷利度胺加低-剂量的地塞米松或硼替佐米加地塞米松。这些化疗组合为具有在复发或难治的MM受试者中已证实的治疗价值的标准方案,并且很好地表征了这些化疗剂的安全性概貌。某些优选实施方案中,所述抗-CXCR4抗体每周给药,在周期1中作为单一疗法第一个两周给药,并且随后与化疗方案联合给药,包括雷利度胺加低-剂量地塞米松,或硼替佐米加地塞米松。

[0175] 例如,用BMS-936564与雷利度胺和地塞米松联合治疗MM,示例性的给药方案包括:(1)在第1、8、15、22、29和36天(周期1)和第1、8、15和22天(周期2以及随后的周期)BMS-936564(1、3、或10mg/kg)作为单个60分钟IV输注给药;(2)雷利度胺(25mg po)给药21天(第15-35天;周期1)和第1-21天(周期2和随后的周期);以及(3)地塞米松(40mg)在第15、22、29和36天(周期1)和第1、8、15和22天(周期2和随后的周期)给药。

[0176] 对于用BMS-912564与硼替佐米和地塞米松联合治疗MM,示例性的给药方案包括:(1)在第1、8、15、22、-29天(周期1)和第1、8、和15天(周期2以及随后的周期)BMS-936564(1、3、或10mg/kg)作为单个60分钟IV输注给药;(2)在第15、18、22和25(周期1)和在第1、4、8、11天(周期2和随后的周期)硼替佐米( $1.3\text{mg}/\text{m}^2$ )作为3-5秒IV推进给药;以及(3)地塞米松(20mg)在第15、16、18、19、22、23、25和26天(周期1)和第1、2、4、5、8、9、11和12天(周期2和随后的周期)给药。

[0177] 某些实施方案中,所述癌症为AML并且由于该方案认为是复发的、难治的AML患者的标准护理方案,所述与本披露的抗-CXCR4抗体或其片段联合给予癌症患者的至少一种化疗剂为米托蒽醌、依托泊苷和/或阿糖胞苷(Amadori等.,1991)。某些优选实施方案中,所述抗-CXCR4抗体每周给药,在周期1中作为单一疗法第一个两周给药,并且随后与化疗方案联合给药,包括米托蒽醌依托泊苷和阿糖胞苷。

[0178] 例如,对于BMS-936564作为单一疗法的AML治疗,示例性的方案包括BMS-936564(0.3、1、3或10mg/kg)在周期1的第1天和随后的周期的第1、8和15天作为单个60-分钟IV输注给药。

[0179] 对于BMS-936564与化疗联合的AML的治疗,示例性的给药方案包括:(1)在第一个化疗剂量之前化疗的第一天给予BMS-936564。在周期2和随后的周期的第1、8和15天给予BMS-936564。此外,对于周期2-13,由以下方案组成化疗(28-天周期):(2)在第1至5天米托蒽醌( $8\text{mg}/\text{m}^2\text{IV}$ )历时15分钟;(3)在第1至5天依托泊苷( $100\text{mg}/\text{m}^2\text{IV}$ )历时1小时;和(4)在第1至5天阿糖胞苷(Ara-C; $1\text{g}/\text{m}^2\text{IV}$ )历时1小时。

[0180] 某些实施方案中,所述癌症为CLL或FL并且与本披露的抗-CXCR4抗体或其片段联合给予癌症患者的所述至少一种化疗剂为苯达莫司汀和/或利妥昔。临床前的研究表明一些白血病和淋巴瘤细胞系中苯达莫司汀和利妥昔之间有抗-肿瘤协同作用(Rummel等.,2002)使得后者将B细胞淋巴瘤对通过化疗,包括苯达莫司汀诱导的凋亡变得敏感(Chow等.,2002)。苯达莫司汀加利妥昔(BR)组合在淋巴瘤患者中显示功效,其为对利妥昔首次的、预处理的或难治的(Friedberg等.,2008)。某些优选实施方案中,所述抗-CXCR4抗体与苯达莫司汀和利妥昔联合给予。

[0181] 用于治疗DLBCL的方法的优选实施方案中,所述抗-CXCR4抗体与利妥昔、异环磷酰

胺。卡铂和/或依托泊苷联合使用 (Kewalramani等., 2004)。复发的或难治的DLBCL中没有化疗方案显示优势。由于相对其他方案可比的功效和对于应答患者相对于R-DHAP (地塞米松、高-剂量阿糖胞苷、顺氯氨铂) 继之以高-剂量化疗和自体HSCT的降低的毒性, R-ICE (利妥昔、异环磷酰胺、卡铂和依托泊苷) 为r/r DLBCL中一种最通常使用的方案 (Gisselbrecht等., 2010)。某些优选实施方案中, 所述抗-CXCR4抗体与利妥昔、异环磷酰胺、卡铂和依托泊苷联合给药。

[0182] 例如, 对于FL、DLBCL和CLL受试者用BMS-936564作为单一疗法的治疗, 优选的方案包括BMS-936564 (0.3-10mg/kg) 作为单个60-分钟IV输注在周期1的第1天和在随后的周期的第1、8、15、22、29、36、43和50天给药。

[0183] 当与化疗联合给药用于CLL、FL和DLBCL受试者的治疗时, 示例性的实施方案包括BMS-936564在第一个剂量化疗之前的化疗第一天给药, 和BMS-936564输注完成至少1小时后的化疗给药。BMS-936564在周期2和随后的周期的第1和8天给药。

[0184] 用于CLL的化疗由以下方案组成 (28-天周期): 利妥昔 (375mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2和随后的周期的第1天, 随后在随后的周期的第1天500mg/m<sup>2</sup>给药; 和苯达莫司汀 (70mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2的第1天给药超过60分钟。

[0185] 用于FL的化疗由以下方案组成 (28-天周期): 利妥昔 (375mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2和随后的周期的第1天, 随后在随后的周期的第1天500mg/m<sup>2</sup>给药; 和苯达莫司汀 (90mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2的第1天给药超过60分钟。

[0186] 用于DLBCL的化疗由以下方案组成 (28-天周期): 利妥昔 (375mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2和随后的周期的第1天; 异环磷酰胺 (5000mg/m<sup>2</sup>) 在第4天与巯乙磺酸钠 (2-巯乙磺酸钠盐; 5000mg/m<sup>2</sup>) 连续IV输注一起连续IV输注超过24h, 从周期2和随后的周期第4天开始; 卡铂 (产生通过Calvert公式计算的靶AUC5mg/mL.min的剂量; 最大剂量=800mg) 在周期2和随后的周期的第4天; 依托泊苷 (100mg/m<sup>2</sup>IV) 在周期2和随后的周期的第3-5天每天。

[0187] 本发明的一个方面为本披露的抗-CXCR4抗体或其抗原-结合部分在制备用于治疗患有CXCR4<sup>+</sup>癌症的受试者的药物中的用途。本披露的任何抗-CXCR4抗体或其抗原-结合部分用于制备药物的用途广泛适用于本文公开的全部范围的癌症。这些用途的优选实施方案中, 所述癌症包括血液恶性肿瘤, 例如复发的或难治的多发性骨髓瘤、复发的急性骨髓淋巴瘤、复发的慢性淋巴细胞性白血病、复发的滤泡性淋巴瘤或难治的弥漫大B细胞淋巴瘤。本披露还提供本披露的任何抗-CXCR4抗体或其抗原-结合部分对应于应用本文所述抗-CXCR4抗体的治疗方法所有实施方案的医药用途。

[0188] 还在本披露范围内的是包含本披露的任何抗-CXCR4抗体或其抗原-结合片段或其组合以及使用说明书的试剂盒。因此, 本披露提供用于治疗受试者中癌症的试剂盒, 所述试剂盒包括 (a) 一种或多种剂量的本披露的任何抗-CXCR4抗体或其CXCR4-结合片段和 (b) 用于在本文所述的任何治疗方法中使用所述抗-CXCR4抗体或其片段的说明书。例如, 某些实施方案中试剂盒中的抗-CXCR4抗体包括具有SEQ ID NO: 所述氨基酸序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域, 和具有SEQ ID NO: 29所述氨基酸序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。优选实施方案中, 所述抗-CXCR4抗体为BMS-936564。所述试剂盒可以进一步包含本文所述的一种或多种另外的治疗试剂, 例如免疫抑制试剂、化疗剂或放射性毒剂, 或靶向不同抗原的一种或多种另外的抗体。

[0189] 试剂盒通常包括表明试剂盒内容物所需用途的标签和使用说明书。术语标签包括提供给试剂盒,或另外附随试剂盒的任何文字或记录资料。药物试剂盒的某些实施方案中,所述抗-CXCR4抗体可以与其他的治疗剂以单位剂型共同包装。

#### [0190] B. 病毒感染,包括HIV感染

[0191] 已经显示CXCR4作为HIV进入T细胞的辅助受体并且,另外,已经证明某些鼠类抗-CXCR4抗体能够抑制HIV分离物进入T细胞(参见Hou,等.,1998;Carnec等.,2005)。因此,CXCR4可以作为一种受体被病毒使用,用于进入该细胞,并且针对CXCR4的抗体可以被用于抑制这种将CXCR4用作受体的病毒进入细胞。已经报告了通过HIV-1包膜糖蛋白-gp120结合CXCR4的CXCR4-介导的凋亡(Garg等.,2006)。

[0192] 调查揭示交联CXCR4的抗体可以模拟用gp120-诱导观察到的细胞死亡(Berndt等.,1998),其提示使用抗-趋化因子受体抗体防止HIV-1感染可能导致受体表达T细胞有效的和迅速的破坏。因此,本披露的人抗-CXCR4抗体可以被用于抑制病毒进入细胞,其中该病毒将CXCR4用作进入细胞的受体,使得病毒的感染受到抑制。在优选的实施方案中,这些抗体被用于抑制HIV病毒进入T细胞,例如,在治疗或预防HIV/AIDS时。该抗体可以被单独使用或与其他抗病毒试剂(例如抗逆转录病毒药物,例如AZT或蛋白酶抑制剂)联合使用。

#### [0193] C. 炎性病症

[0194] 已经显示CXCR4/CXCL12途径在多种炎性病症中发挥作用,包括但不限于炎性肝脏疾病(Terada等.,2003);自身免疫性关节炎(Matthys,等.,2001);过敏性气道疾病(Gonzalo,等.,2000);以及牙周疾病(Hosokawa,等.,2005)。

[0195] 因此,抑制CXCL12与CXCR4结合的本披露的人抗-CXCR4抗体,可以被用于抑制炎性疾病中的炎症,包括选自下组的疾病:炎性肝脏疾病、自身免疫性关节炎、过敏性气道疾病、牙周疾病、类风湿性关节炎、炎性肠病、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、炎性皮肤病(例如,银屑病、扁平苔藓)、自身免疫性甲状腺疾病、干燥综合征、肺部炎症(例如,慢性阻塞性肺病、肺结节病、淋巴细胞性肺炎)以及炎性肾脏疾病(例如,IgA肾病、肾小球肾炎)。该抗体可以被单独使用或与其他抗炎试剂联合使用,其他抗炎试剂例如非甾体抗炎药物(NSAID)、皮质类固醇(例如,泼尼松、氢化可的松)、甲氨蝶呤、COX-2抑制剂、TNF拮抗剂(例如,依那西普、英利昔单抗、阿达木单抗)以及免疫抑制剂(例如,6-巯嘌呤、硫唑嘌呤以及环孢霉素A)。

#### [0196] D. 血管生成

[0197] 已经证明CXCL12通过募集表达CXCR4的成血管细胞而诱导新生血管形成(Jin等.,2006)。此外,阻断CXCR4/CXCL12途径可以在体内以一种非VEGF依赖的方式通过抑制血管发生,在体内缓解肿瘤生长(Guleng等.,2005)。再者,如实施例7所证明,本披露的抗体能够在体外抑制毛细管的形成。因此,可以使用抑制CXCL12结合到CXCR4的本披露的抗-CXCR4抗体通过干扰CXCR4/CXCL12途径而抑制血管发生。对血管发生的抑制作用可以被用于,例如,抑制肿瘤生长或肿瘤转移(无论该肿瘤是否是CXCR4阳性的)。该抗体可以被单独使用或其他抗血管原的试剂(例如抗-VEGF抗体)联合使用。

#### [0198] E. 自体干细胞移植

[0199] 外周血干细胞是用于自体干细胞移植(例如在某些血液恶性肿瘤的治疗中)的优选的干细胞来源。从外周血收集干细胞需要动员CD34<sup>+</sup>的干细胞从骨髓进入外周血。这一过

程的调节中涉及不同的细胞因子、趋化因子以及粘附分子(在Gazit,2001中进行综述),包括CXCR4与SDF-1的相互作用。而且,已经证实小分子CXCR4拮抗剂刺激CD34<sup>+</sup>干细胞从骨髓向外周血的快速动员(参见,例如Devine等.,2004;Broxmeyer等.,2005;Flomenberg等.,2005)。因此,抑制CXCR4活性(即,拮抗剂抗体)的本披露的抗-CXCR4抗体,可以被用于刺激CD34<sup>+</sup>干细胞从BM向外周血的动员,以允许这种干细胞用于移植(例如,自体的移植),例如在诸如多发性骨髓瘤及非-霍奇金氏淋巴瘤的血液病症的治疗中。该抗体可以被单独使用或与用于刺激干细胞动员的其他试剂联合使用,这些试剂例如G-CSF和/或GM-CSF。因此,在另一个实施方案中,本发明提供了刺激CD34<sup>+</sup>干细胞从受试者体内的BM向外周血动员的方法,该方法包括给予该受试者本发明的抗-CXCR4抗体,使得CD34<sup>+</sup>干细胞从BM向外周血的动员受到刺激。该方法可以进一步包括从外周血收集CD34<sup>+</sup>干细胞,例如用于自体的干细胞移植。

[0200] 通过以下不应被解释为进一步限定的实施例,对本发明进行了进一步阐述。本申请通篇引用的所有附图及所有参考文献、专利及已公开的专利申请的内容均通过引用明确地并入本文。

#### [0201] 实施例1

[0202] 针对CXCR4和CXCL12的人单克隆抗体的产生

[0203] 使用组合方法产生抗-CXCR4人单克隆抗体,其中首先,用人CXCR4-转染的R1610细胞免疫表达人抗体基因的小鼠(Medarex **KMMOUSE**®, Milpitas, CA, PCT公开No. W002/43478和美国专利No. 7,041,870中所述的),以在小鼠中产生对人CXCR4特异的人类免疫球蛋白的表达谱,并接着第二步,从小鼠的脾细胞制备人抗体文库,并展示于噬菌体,使得该噬菌体接着通过用结合入磁性蛋白磷脂体的人CXCR4 (CXCR4-MPL) 筛选对CXCR4具有亲和力的可变区片段的表达特异的抗体的表达。目的可变区片段重新克隆入Fab表达载体并且对结合转染的CXCR4-表达细胞的抗原再测试Fab。选择Fab克隆F7 (后来重命名为MDX-1338或BMS-936564)、F9、D1和E2用于进一步分析。利用标准的分子生物学技术从所述Fab产生完整的抗体。该组合方法在美国专利No. 6,794,132中一般性描述,并且在W02008/060367中特别地详细描述。

[0204] 为了产生抗-CXCL12抗体, Medarex **KM**® 转基因小鼠用重组人CXCL12免疫(Peprotech, Rocky Hill, NJ)。如之前所述合并脾裂解物并且处理(美国专利No. 6,794,132)。利用专有的噬菌体展示方法Biosite产生抗体片段(Fab库)。利用生物素化的CXCL12选择结合CXCL12的噬菌体。选择的抗原-反应性Fab转化为全长IgG4 (S228P) 并且在CHO细胞中重表达。

[0205] 包含S228P铰链突变以降低半抗体形成的的同型对照抗体IgG4 (Angal等., 1993) 在Biologics Discovery California, Sunnyvale, CA产生。

#### [0206] 实施例2

[0207] 人抗-CXCR4单克隆抗体F7、F9、D1以及E2的结构表征

[0208] 使用标准的DNA测序技术,如实例1所述,从噬菌体展示文库筛中选获得编码F7、F9、D1以及E2Fab克隆的重链及轻链可变区的cDNA序列进行测序。

[0209] F7的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如图1A以及SEQ IDNO:33及25所示。F7的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如图1B以及SEQ IDNO:37及29所示。



[0210] 将F7的重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列进行比较,证明F7重链利用来自人种系V<sub>H</sub>3-48的一个V<sub>H</sub>区段、来自人种系4-23的一个D区段、以及来自人种系JH6B的一个JH区段。使用CDR区测定的Kabat系统对F7的V<sub>H</sub>序列进一步分析,得到分别如图1A与SEQ ID NO:1、5以及9所示的重链CDR1、CDR2以及CD3区的描述。将F7轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列进行比较,证明F7轻链利用了来自人种系VK L15的V<sub>L</sub>区段,以及来自人种系JK1的JK区段。使用CDR区的Kabat系统对F7V<sub>L</sub>序列进一步分析,得到分别如图1B与SEQ ID NO:13、17以及21所示的轻链CDR1、CDR2以及CD3区的描述。

[0211] F9的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ IDNO:34及26所示。F9的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ IDNO:38及30所示。将F9的重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列进行比较,证明F9重链利用来自人种系V<sub>H</sub>3-48的一个V<sub>H</sub>区段、来自人种系4-23的一个D区段、以及来自人种系JH6B的一个JH区段。使用CDR区测定的Kabat系统对F9的V<sub>H</sub>序列进一步分析,得到分别如2A与SEQ ID NO:2、6以及10所示的重链CDR1、CDR2以及CD3区的描述。将F9轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列进行比较,证明F9轻链利用了来自人种系VK L15的V<sub>L</sub>区段,及来自人种系JK1的JK区段。使用CDR区的Kabat系统对F9V<sub>L</sub>序列进一步分析,得到分别如SEQ ID NO:14、18及22所示的轻链CDR1、CDR2及CD3区的描述。

[0212] D1的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ IDNO:35及27所示。D1的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ IDNO:39及31所示。将D1的重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列进行比较,证明D1重链利用来自人种系V<sub>H</sub>3-48的一个V<sub>H</sub>区段、来自人种系4-23的一个D区段、以及来自人种系JH6B的一个JH区段。使用CDR区测定的Kabat系统对D1的V<sub>H</sub>序列进一步分析,得到分别如SEQ ID NO:3、7以及11所示的重链CDR1、CDR2以及CD3区的描述。将D1轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列进行比较,证明D1轻链利用了来自人种系VK L15的V<sub>L</sub>区段,及来自人种系JK1的JK区段。使用CDR区的Kabat系统对D1V<sub>L</sub>序列进一步分析,得到分别如SEQ ID NO:15、19及23所示的轻链CDR1、CDR2及CD3区的描述。

[0213] E2的重链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ ID NO:36及28所示。E2的轻链可变区的核苷酸及氨基酸序列分别如SEQ ID NO:40及32所示。将E2的重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列进行比较,证明E2重链利用来自人种系V<sub>H</sub>3-48的一个V<sub>H</sub>区段、来自人种系4-23的一个D区段、以及来自人种系JH6B的一个JH区段。使用CDR区测定的Kabat系统对E2的V<sub>H</sub>序列进一步分析,得到分别如SEQ ID NO:4、8以及12所示的重链CDR1、CDR4以及CD3区的描述。将E2轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列进行比较,证明E2轻链利用了来自人种系VK L15的V<sub>L</sub>区段,及来自人种系JK1的JK区段。使用CDR区的Kabat系统对E2V<sub>L</sub>序列进一步分析,得到分别如SEQ ID NO:16、20及24所示的轻链CDR1、CDR2及CD3区的描述。

[0214] 对F7、F9、D1以及E2的V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>区的框架序列进行分析,与源自它们的种系序列相比,鉴定了不同于种系的不同框架氨基酸残基。选择在V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>区段的氨基末端区域的某些框架残基用于“回复突变”,以恢复对该种系序列的框架残基,因为在氨基末端位置的这些非种系残基是由用于产生实施例1中所述噬菌体展示文库的引物编码。具体而言,利用标准的分子生物学技术以替换在指定的框架位置上的种系氨基酸残基,产生F7、F9、D1以及E2的V<sub>H</sub>与



V<sub>L</sub>区段(针对种系,称之为“GL”形式)的修饰形式。具体地回复突变氨基酸,以及具有F7、F9、D1和E2原始可变区序列的GL变体的序列比对在W02008/060367中提供。

[0215] 使用标准的重组DNA技术将F7、F9、D1以及E2片段转变成全长抗体。例如,可以将编码一种Fab片段的V<sub>H</sub>和V<sub>K</sub>区的DNA克隆进入表达载体,该表达载体携带该重链及轻链恒定区,使得这些可变区被可操作地连接到恒定区。作为替代,单独的载体可以被用于该全长重链及全长轻链的表达。适宜用于产生全长抗体的表达载体的非限制性实例包括在美国专利No.7,674,618中描述的pIE载体。F7 (BMS-936564) Fab片段转化为全长IgG4 (S228P) 抗体并且在CHO细胞中重表达。

[0216] 实施例3

[0217] 抗-CXCR4人单克隆抗体的结合特征

[0218] 在这一实施例中,通过流式细胞术检测抗-CXCR4抗体的结合特征。

[0219] 人T细胞系CEM,在它的细胞表面表达天然人CXCR4,被用于检测 F7、F9、D1以及E2抗体与天然的、细胞表面CXCR4相结合的能力。将全长F7、F9、D1以及E2按1:3连续稀释进行滴定,得到从300nM至5pM的浓度范围。然后将这些抗体与CEM细胞混合,并且在用FITC偶联的抗人IgG的二级抗体进行检测之前允许结合该抗体。然后通过流式细胞术分析这些细胞。这些在图2的曲线图中所示得到的平均荧光强度,该曲线图证明所有四种抗-CXCR4抗体结合CEM细胞。结合F7、F9、D1以及E2的EC<sub>50</sub>分别是21nM、14nM、80nM以及290nM。

[0220] 为确定一组抗-CXCR4抗体竞争而结合CXCR4的能力,进行了竞争性研究。使用这四种人抗-CXCR4抗体F9、F7、E2以及D1,以及四种可商购的鼠类单克隆抗-CXCR4抗体 (12G5、708、716以及717;R&D系统目录#:分别是MAB170、MAB171、MAB172以及MAB173)。在恒定浓度的经FITC标记的抗-CXCR4抗体F9存在的条件下,将抗-CXCR4抗体按1:3连续稀释系列进行滴定,产生从300nM至5pM的浓度范围。然后将抗体的混合物加入CEM细胞并且允许结合。通过流式细胞仪及FITC的检测,评估了每个抗体与F9竞争而结合CEM细胞的能力。得到的平均荧光强度如图3的曲线图所示,该曲线图证明所测试的全部七种抗体 (F7、E2、D1、12G5、708、716以及717) 都能与F9竞争而结合CEM细胞,尽管与这些其他抗体相比,该抗体E2只在高浓度时证明部分抑制作用。

[0221] 在另一类试验中,通过流式细胞术、通过执行FACS滴定,检测BMS-936564mAb与多种不同细胞系结合的能力。用100,000个细胞与数量渐增的mAb (从小于0.001μg/ml至超过100μg/ml) 进行孵育,并用流式细胞术评估结合。还测定了B<sub>max</sub>值,该值表明在每个细胞上大约有多少CXCR4分子。根据结合曲线,测定了用于抗体结合的EC<sub>50</sub>,该结果概述于下列表1中。

[0222] 表1:F7 (BMS-936564) 结合不同细胞系的FACS滴定结果

[0223]

| 细胞类型    | EC <sub>50</sub> (μg/ml) | B <sub>max</sub> |
|---------|--------------------------|------------------|
| Ramos   | 0.48                     | 106,000          |
| Raji    | 0.34                     | 52,536           |
| Namalwa | 1.57                     | 116,000          |
| L540    | 3.69                     | 31,868           |
| DMS79   | 3.99                     | 24,587           |

[0224]

| 细胞类型       | EC <sub>50</sub> (μg/ml) | B <sub>max</sub> |
|------------|--------------------------|------------------|
| MDA-MB-231 | 9.24                     | 14,186           |

[0225] B<sub>max</sub> = 最大结合 (GMFI单位)

[0226] 这些结果显示F7 (BMS-936564) 能够有效地结合所测试的六种细胞系的每种, 具有用Ramos以及Raji细胞系观察到的最低的EC<sub>50</sub>。这些数据也显示对于Ramos及Namalwa细胞, CXCR4受体的表达最高, 并且对于MDA-MB-231细胞及DMS79细胞, CXCR4受体的表达最低。

[0227] 在其他结合实验中, 检测了F7MAb结合人外周血单核细胞 (PBMC) 的不同亚型的能力。使用标准方法分离人PBMC, 并且用FACS分离不同的细胞亚型。具体而言, 分离了下列细胞亚型: (i) CD3<sup>+</sup>; (ii) CD20<sup>+</sup>; (iii) CD11b<sup>+</sup>; 以及 (iv) CD14<sup>+</sup>。由BMS-936564mAb (在33μg/ml) 进行的流式细胞术实验证明, 与同种型匹配的对照抗体相比, 其能够有效地结合这四种亚型中的每一种。

[0228] 另一个实验中, 利用流式细胞术评估不同组的人CXCR4<sup>+</sup>细胞系对BMS-936564的结合。在抗体与具有羊抗-人FCγ-PE或PE-偶联的链霉亲和素的细胞的混合物温育之前, 通过以裸露BMS-936564或生物素化的BMS-936564的显示浓度悬浮细胞而制备用于流式细胞术 (FACS) 染色的细胞。通过FACS分析细胞, 通过开启由FSC和SSC鉴定的活细胞群。以下细胞系看到剂量-依赖的结合, 细胞系R1610-huCXCR4 (用人CXCR4转染的R1610仓鼠纤维原细胞并且保持在G418选择下); Ramos (人B成淋巴细胞伯基特氏淋巴瘤); CEM (人T成淋巴细胞急性淋巴细胞性白血病); Nomo-1 (人急性骨髓性白血病); HL-60 (人早幼粒细胞); MOLP8 (人MM); 和JJN-3R (选择用于对硼替佐米抗性的人MM细胞系)。参见图4。未检测到R1610亲本细胞的结合。以几何平均荧光强度 (GMFI) 为基础, CXCR4水平在R1610-huCXCR4和Ramos细胞上最高, 继之以CEM (图4B), Nomo-1和HL60 (图4A)。多发性骨髓瘤细胞系MOLP-8和JJN-3R表达最小数目的受体 (图4C)。用于结合的EC<sub>50</sub>值在表2中显示。此外, BMS-936564结合健康供体PBMC (数据没有显示) 以及收集自具有可变GMFI的AML患者的7/8PBMC标本 (图4D)。本数据表明CXCR4在多个造血细胞上表达并且在AML患者中不定地表达。

[0229] 表2: 结合人CXCR4<sup>+</sup>细胞系的BMS-936564的结合

[0230]

| 细胞类型          | EC <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|-----------------------|
| R1610-huCXCR4 | 2.3                   |
| Ramos         | 4.2                   |
| CEM           | 10.3                  |
| Nomo-1        | 40                    |
| HL-60         | 5.3                   |
| MOLP-8        | 6.5                   |
| JJN-3R        | 2.0                   |

[0231] 实施例4

[0232] 用抗-CXCR4和抗-CXCR4抗体抑制CXCL12结合CXCR4

[0233] 为确定抗-CXCR4的人抗体对CXCL12与CXCR4结合的抑制能力, 使用<sup>125</sup>I标记的CXCL12 (PerkinElmer, Waltham, MA) 及天然地表达CXCR4的CEM细胞进行了竞争性研究。通过

标准的放射性标记的配体结合测定,对抗-CXCR4抗体对CXCL12结合到CEM细胞上的阻断作用进行了比较。将抗-CXCR4抗体进行1:3系列稀释以得到从300nM至137pM的浓度范围。在具有2000Ci/mmol的特异活性的100pM<sup>125</sup>I-CXCL12 (Amersham, 目录#IM314-25UCI) 存在下,将这些抗体加入100μl 750,000个CEM细胞。使用相同的同种型的无关抗体作为阴性对照。通过在4℃下、在没有这些抗体达2小时的条件下,允许<sup>125</sup>I CXCL12结合至CEM细胞而确定可能结合了放射性标记的配体总数。通过在1μM未标记的CXCL12 (Peprotech, 目录#300-28A) 的存在下,允许<sup>125</sup>I-CXCL12结合至CEM细胞而确定放射性标记的配体的非特异性结合。使用标准方法确定了细胞相关的<sup>125</sup>I-CXCL12的量值。该结果显示在图5,其表明对于CXCL12结合至在CEM细胞表达的CXCR4而言,该F7抗体 (BMS-936564) 提供了最大有效阻断作用。F9及D1抗体也阻断CXCL12的结合,尽管比F7更缓和。E2抗体,尽管它确实结合至CEM细胞上的CXCR4 (如实例3所证明),但不能有效地阻断CXCL12与CEM细胞上的CXCR4的结合。由F7、F9以及D1阻断CXCL12的EC<sub>50</sub>分别是2.3nM、12.5nM以及28.6nM。

[0234] 另一个实验中,比较了CXCL12结合CXCR4由BMS-936564和抗-CXCL12抗体的阻断。检测BMS-936564的系列稀释,抗-CXCL12和对照抗体对<sup>125</sup>I-CXCL12结合CXCR4<sup>+</sup>CEM细胞的阻断。结合CEM细胞上CXCR4的<sup>125</sup>I-CXCL12 (PerkinElmer, WalthamMA) 的竞争作用利用固定浓度的<sup>125</sup>I-CXCL12 (100pM) 和从5pM至300nM的BMS-936564滴定法证实。同型抗体用作阴性对照并且未标记的CXCL12用作阳性对照。在室温下温育平板1小时,洗涤,移去过滤器并且通过PerkinElmer **WIZARD**® γ 粒子计数管 (Waltham, MA) 每分钟计数读取。对于所有体外试验,绘制数据图并且用GraphPad Prism软件 (San Diego, CA), 利用非线性回归和S形剂量反应曲线分析。

[0235] 利用放射性标记的CXCL12和CXCR4hi CEM细胞进行饱和结合研究。<sup>125</sup>I-CXCL12结合CEM细胞的K<sub>D</sub>测定为4.3nM (数据没有显示), 其与报告的CXCL12对CXCR4从3.0到5.4nM的K<sub>D</sub>类似 (DiSalvo等., 2000)。利用次优的固定浓度的<sup>125</sup>I-CXCL12 (100pM), 用滴定法测量BMS-936564并且观察到具有大约2nM的EC<sub>50</sub>值的剂量-依赖的<sup>125</sup>I-CXCL12结合抑制 (图6A)。感兴趣的是,所述抗-CXCL12抗体更有效并且以大约90pM EC<sub>50</sub>值诱导剂量-依赖的<sup>125</sup>I-CXCL12结合CEM细胞的抑制 (图6B)。

[0236] BMS-936564还显示以具有大约11nM的EC<sub>50</sub>值的剂量-依赖的方式阻断<sup>125</sup>I-CXCL12结合Ramos细胞 (图6C)。

[0237] 实施例5

[0238] 由抗-CXCR4和抗-CXCR4抗体抑制CXCL12-诱导的钙流动

[0239] 为了确定抗-CXCR4人抗体在CEM细胞对CXCL12诱导的钙流动的抑制能力,首先用荧光染料Calcium3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 标记CEM细胞。抗-CXCR4抗体按1:3连续稀释系列以从100nM至1pM的浓度范围内被滴定,并且允许结合至200μl的200,000CEM细胞,在室温下孵育10分钟,然后上样进入**FLEXSTATION**® 仪器 (Molecular Devices)。使用相同的同型的无关抗体作为阴性对照。然后用终浓度是50nM的重组的人CXCL12α (Peprotech), 加入22μl体积的500nM、直到终体积是222μl, 刺激细胞。测量每个孔在200秒产生的钙流动。作为阳性对照,用CXCL12α刺激没有抗体的细胞 (在加入了1%BSA的Hank's缓冲盐水 (HBS) 中或 HBS中制备) 以获得最大可能的钙流动信号。用加入了1%BSA的HBS刺激细胞以确定基线。通过钙依赖的荧光随时间显影测量CXCL12α刺激的钙的释放。得

到的荧光轨迹的曲线以下的面积被报告为钙流动的读数。得到的由抗-CXCR4抗体对钙流动的抑制作用展示在图7中。将这些数据进行绘图并用GraphPad Prism软件以及非线性的曲线拟合、S形曲线剂量反应公式计算这些EC<sub>50</sub>。抗体F7、F9以及D1抑制CXCL12α诱导的钙流动。虽然抗体E2确实结合CXCR4(如实例3所证明),但它对CXCL12α诱导的钙流动的抑制不显著。由F7、F9以及D1抑制CXCL12诱导的钙流动的EC<sub>50</sub>分别是0.90nM、0.32nM以及0.57nM。

[0240] 另一个实验中,比较了BMS-936564和抗-CXCL12抑制 CXCL12诱导的钙流动的能力。Ramos和CELL细胞用**FLIPR®**钙4 染料(Molecular Devices)装载,使用固定浓度的CXCL12以刺激钙流动。从50pM至100nM的BMS-936564或抗-CXCL12的滴定用于抑制应答。最大的钙应答设置为CXCL12减抗体。用无CXCL12的细胞缓冲液刺激建立基线应答。在**FLEXSTATION®**(Molecular Devices)上读取钙流动。CXCL12显示诱导细胞内钙剂量-依赖的升高,Ramos 和CEM细胞的其峰值钙流动分别达到50nM和5nM。利用最适浓度的CXCL12刺激钙流动,BMS-936564或抗-CXCL12的滴定用于抑制 所述应答(图6C)。BMS-936564和抗-CXCL12都以剂量依赖的方式阻断CXCL12-诱导的钙流动。Ramos和CEM中BMS-936564阻断分别 具有大约10nM和8nM的EC<sub>50</sub>(图8A和8B),而抗-CXCL12阻断具有大约35nM(Ramos)和2nM(CEM)的EC<sub>50</sub>(图8A和8B)。

[0241] 实施例6

[0242] 由抗-CXCR4和抗-CXCL12抗体抑制CXCL12诱导的CEM细胞迁移

[0243] 为了确定抗-CXCR4人抗体抑制CXCL12诱导的CEM细胞的迁移的能力,首先用BATDA(二(甲基酯)2,2',6',2"-三联吡啶-6,6"-乙基酯)化学发光迁移试剂(PerkinElmer)标记CEM细胞。将抗-CXCR4抗体按1:3连续稀释系列进行滴定,产生从100nM至1pM的浓度范围,并允许以每毫升一千万个细胞的密度结合经标记的CEM细胞。使用相同的同型的无关抗体作为阴性对照。将重组人CXCL12α(Peprotech)以5nM每孔30μl加入96孔神经探针迁移板的较低的腔室,其中每孔滤光片直径5.7mm。每个孔含有5μm的细孔。将有或没有抗体的经标记的CEM细胞以每孔50万个细胞(50μl)的浓度上载至这些滤光片上。将该迁移板在37℃下孵育2.5小时。已迁移的细胞捕获于该板较低的腔室中,进行裂解并且用**DELTA®**检测溶液(PerkinElmer)进行检测。将该化学发光信号记录在融合仪器上。抗-CXCR4抗体对CXCL12α诱导迁移的抑制作用如图9所示。这些结果证明抗体F7及F9有效地抑制迁移,而抗体D1及E2对迁移的抑制不显著。由F7及F9抑制CXCL12诱导的CEM细胞迁移的EC<sub>50</sub>分别是12.44nM及18.99nM。

[0244] 另一个实验中,比较了BMS-936564和抗-CXCL12抑制CXCL12诱导的Ramos和CEM细胞迁移的能力。细胞装载BATDA。固定浓度的CXCL12用于刺激细胞迁移经过包含来自Neuro Probe的迁移平板上5μM孔的过滤器(Gaithersburg,MD)。从20pM至300nM的BMS-936564或抗-CXCL12的滴定加至所述细胞。无抗体的CXCL12用于建立最大的迁移。无CXCL12仅向培养基的迁移用于测量背景迁移。37℃温育后2小时,通过添加 **DELTA®**检测溶液(Perkin Elmer)至所述裂解的细胞而检测迁移的细胞,并且在融合仪器上按时间解析荧光检测。诱导Ramos迁移的CXCL12的最适浓度确立为10ng/mL(1.25nM)虽然CEM细胞对CXCL12更敏感并且表现出0.05nM CXCL12的最大迁移。BMS-936564显示以Ramos细胞中接近1nM和CEM细胞中接近4nM的EC<sub>50</sub>值阻断CXCL12诱导的迁移(图10A和10B)。抗-CXCL12以接近0.9nM(Ramos)和0.13nM(CEM)细胞的EC<sub>50</sub>值抑制CXCL12诱导的迁移(图10A和10B)。

**[0245] 实施例7**

**[0246]** 由抗-CXCR4抗体抑制HuVEC毛细管形成

**[0247]** 在这一实施例中,检测了抗-CXCR4人抗体抑制由人脐静脉内皮细胞 (HuVEC) 形成毛细管的能力。将 **MATRIGEL®** 用RPMI按1:1稀释,并且平铺于96孔板的孔中,并允许在37℃下聚合30分钟。当HuVEC (来自Cambrex, 目录#CC-2519) 处于80%融合时,对HuVEC进行胰蛋白酶消化并重悬于含有0.5%FBS的RPMI中 (每毫升 $1 \times 10^6$ 个细胞)。将抗体与HuVEC充分混匀,终浓度是3μg/ml,并且允许在室温孵育30分钟。使用相同的同型无关抗体或仅有培养基作为阴性对照。使用小鼠抗人类αvβ3 (CD51/CD61) 抗体 (R&D Systems, 目录#MAB3050) 作为管形成抑制作用的 阳性对照。将有或无抗体的HuVEC平铺于**MATRIGEL®**包被的孔中,并且在37℃条件下孵育18小时。

**[0248]** 仅用培养基或用与同型匹配的对照抗体孵育的HuVEC形成了毛细管,结果出现了相邻孔的细胞跨过该板,每孔具有3至5个连接点或分支点。用抗-CXCR4人抗体或抗αvβ3抗体孵育的HuVEC都没有形成毛细管。这些细胞看似是分离的并且具有少量或没有分支点。对阻断CXCL12结合、CXCL12诱导的钙流动、以及CXCL12诱导的迁移最为有效的抗-CXCR4抗体,被称为F7及F9,它们对抑制毛细管形成也是最有效的。抗-CXCR4抗体E2,其结合CXCR4,但不阻断CXCL12结合或者CXCL12诱导的效应,不抑制毛细管形成。

**[0249] 实施例8**

**[0250]** 由抗-CXCR4抗体而不是抗-CXCL12抗体在体外抑制CXCR4-表达细胞的增殖

**[0251]** 在本实施例中,检测了抗-CXCR4人抗体在体外抑制Ramos肿瘤细胞 (人伯基特氏淋巴瘤细胞系) 增殖的能力。在该测定中,将每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞与剂量逐渐增加 ( $10^{-3}$ 至300nM) 的F7IgG4抗体、F9IgG1抗体、E2IgG1抗体、F9Fab' 抗体或同型对照一起孵育。将细胞与抗体孵育72小时,在最后24小时的孵育中加入<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷孵育,以允许监测细胞的增殖。孵育后,通过标准技术检测这些细胞与<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的结合。该结果如图11A的曲线图所示。这些结果证明F7IgG4、F9IgG1以及E2IgG1抗体每一种均能抑制Ramos细胞增殖,如当与这些抗体孵育时<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的结合降低所指,而F9Fab' 片段不抑制细胞增殖。这些结果表明抗-CXCR4人抗体在体外对肿瘤细胞具有直接的抗增值作用,并因此不需要二级交联以达到抗增值的效应。

**[0252]** 另一个实验中,比较了MDX-1338,抗-CXCL12和小分子CXCR4拮抗剂AMD3100和BKT140对Ramos细胞的增殖作用。Ramos细胞以 $1 \times 10^5$ 细胞/mL悬浮于生长培养基中,与有关抗体一起温育,包括同型对照,以及其他的测试试剂,并且在37℃培养72小时。Cell-Titer-Glo (Promega) 加至孔,混和并且在室温下温育10分钟。在GloMax光度计上读取平板 (Promega)。结果在图11B中显示。相比同型对照,40nM BMS-936564观察到最大的约 50% Ramos细胞增殖的抑制,但抗-CXCL12没有抑制细胞增殖。此外,AMD3100小分子CXCR4拮抗剂没有抑制增殖。近来所述的14-残基肽拮抗剂,BKT140确实抑制增殖但以高得多的浓度 (100 μM)。喜树碱 (CPT) 以10μM完全抑制细胞增殖。

**[0253] 实施例9**

**[0254]** 由抗-CXCR4抗体在体内抑制实体瘤细胞增殖

**[0255]** 在本实施例中,使用Ramos皮下肿瘤细胞模型,检测了抗-CXCR4人抗体在体内对已建立的实体肿瘤的增殖进行抑制的能力。在这一测定中, $10 \times 10^6$  Ramos细胞/小鼠被植入每

只小鼠的面侧区,并允许生长至平均大小为 $40\text{mm}^3$ (由肿瘤的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 高度/2算得)。然后这些小鼠接受首次剂量的抗体的腹腔注射(i.p.) (表示为处理的第0天),并且在第7天接受第二次i.p.的剂量的抗体。用Fab' 片段抗体处理的小鼠在第3天及第10天也接受i.p. 抗体剂量。各组的小鼠( $n=8$ )接受以下处理(i) 赋形剂;(ii) 同型对照(15mg/kg);(iii) F7IgG4(15mg/kg);(iv) F9IgG1(15mg/kg);(v) F9Fab' (10mg/kg);或(vi) 抗-CD20阳性对照(15mg/kg)。在第0天与注射后30天之间的有规律的间隔时间点(大约2至3次/星期)对肿瘤体积及小鼠体重进行测量。该试验的结果如图12A、12B和12C所示,其显示了平均肿瘤体积(图12A)、中值肿瘤体积(图12B)以及中值%体重变化(图12C)。这些结果证明,与该阳性对照相似,如增大的肿瘤体积所测量,F7IgG4及F9IgG1抗体显著抑制肿瘤细胞生长,而与该同型对照相比,F9Fab' 片段不抑制肿瘤细胞生长。体重变化不显著所说明,所有的处理都有较好的耐受性。治疗组之间的体重的差异更可能是由于这些肿瘤的重量造成的。这些结果说明抗-CXCR4人抗体在体内能抑制已建立的实体瘤的生长。

#### [0256] 实施例10

[0257] 通过抗-CXCR4抗体,而不是抗-CXCL12抗体处理提高小鼠系统肿瘤细胞模型的存活时间

[0258] 在该实施例中,使用Ramos系统肿瘤细胞模型检测了抗-CXCR4人抗体增加小鼠存活时间的能力。在这一测定中,在第0天将 $1 \times 10^6$  Ramos细胞/小鼠经静脉内注射(i.v.)入每只小鼠。然后在第1天对这些小鼠进行首次剂量的抗体的腹膜内(i.p.)注射(即,在静脉给予肿瘤细胞一天后),并且在第5、8、15以及22天又进行四次i.p.的剂量的抗体(接受阳性对照抗体处理的小鼠仅在第一天接受处理)。各组小鼠( $n=8$ )接受以下处理(i) 赋形剂;(ii) 同型对照(15mg/kg);(iii) F9IgG1(15mg/kg);或(iv) 抗-CD19阳性对照(15mg/kg)。剂量应答研究之前已发现15mg/kg为抗-CD19的有效剂量(数据没有显示)。在第0天至注射后第50天的有规则的间隔来测量存活百分数(后肢瘫痪作为本试验的终点)。本实验的这些结果如图13A所示,其显示了随时间变化的存活百分数。经赋形剂或同型对照处理的小鼠的存活中值天数分别是23及25.5天,而经一个剂量的抗-CD19阳性对照处理的小鼠的存活中值天数是39天。显著地,用5个剂量的F9IgG1抗体处理的组中的小鼠100%存活至该实验结束。这些结果表明抗-CXCR4人抗体能够增加系统肿瘤细胞模型中小鼠的存活时间。

[0259] 进行类似的实验以比较BMS-936564和抗-CXCL12抗体提高小鼠存活时间的能力。如上所述,SCID小鼠负荷系统Ramos肿瘤异种移植用15mg/kg BMS-936564、抗-CXCL12抗体、抗-CD19阳性对照、人IgG4或IgG1同型控制或赋形剂(PBS)对照处理。发现BMS-936564在该Ramos系统模型中延长小鼠存活非常有效,比抗-CD19阳性对照更有效(参见图13B)。用赋形剂或同型对照处理的小鼠存活中值天数为23-24天,而用一个剂量抗-CD19阳性对照处理的小鼠的存活中值天数为39天。显著地,移植后120天实验结束时,用五个剂量BMS-936564处理的组中的小鼠100%存活。相反,抗-CXCL12抗体令人惊讶地显示没有功效,其存活时间几乎同于赋形剂和同型对照的。这些数据表明不同于或除了CXCL12-诱导作用的阻断以外,体内还必然有运作的机理。

#### [0260] 实施例11

[0261] BMS-936564诱导CXCR4-表达细胞的凋亡

[0262] BMS-936564加强的体内抗-肿瘤活性促使进一步针对了解BMS-936564作用机理的

研究。具体地,一组实验集中于抗-CXCR4MAb F7 (BMS-936564) 诱导不同细胞系中凋亡的能力。在凋亡测定中,将10 $\mu$ g/ml的F7mAb与Ramos细胞 (500,000个细胞)、Namalwa细胞 (500,000个细胞) 或经转染的表达CXCR4的R1610细胞 (100,000个细胞) 进行孵育。未经转染的R1610细胞 被用作阴性对照。将抗-CXCR4mAb F7或者同型对照抗体与细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育,并且在24、48以及72小时去除250 $\mu$ l样品。为了测定凋亡,将来自不同时间点的细胞与膜联蛋白-FITC-FL1以及丙锭碘-FL3进行孵育,随后用流式细胞术检测。在FL1、FL3以及FL1-FL3双阳性象限中收集的细胞的组合百分数被认为是凋亡。为了去除背景,将同型抗体诱导的凋亡细胞的百分数从BMS-936564诱导的凋亡的细胞的百分数中扣除。

[0263] 这些结果归纳于以下表3中,表明F7MAb能够在Ramos、Namalwa以及R1610-CXCR4细胞内诱导凋亡,而F7对亲本R1610细胞的凋亡的诱导无效,表明该应答是CXCR4特异的。

[0264] 表3:由抗-CXCR4mAb F7诱导的凋亡

[0265]

| 细胞          | 时间 (小时) | %凋亡 |
|-------------|---------|-----|
| R1610       | 72      | <1  |
| R1610-CXCR4 | 24      | 39  |
| R1610-CXCR4 | 48      | 58  |
| R1610-CXCR4 | 72      | 46  |
| Ramos       | 24      | 22  |
| Ramos       | 48      | 31  |
| Ramos       | 72      | 22  |
| Namalwa     | 24      | 17  |
| Namalwa     | 48      | 24  |
| Namalwa     | 72      | 44  |

[0266] 总%凋亡值通过同型对照抗体诱导的基线变化进行校正。

[0267] 另一个实验中,检查了BMS-936564诱导多种细胞系凋亡的能力 (参见表4)。所述细胞 (5 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞/mL) 与10nM-330nM的BMS-936564或同型对照在37 $^{\circ}$ C温育24小时。对于细胞子集 (参见表4),添加六倍过量的交联抗体 (羊抗-人IgG Fc特异性多克隆Ab)。对于所有细胞类型,喜树碱 (CPT),抑制DNA拓扑异构酶I的细胞毒喹啉生物碱,作为凋亡诱导的阳性对照在37 $^{\circ}$ C以10 $\mu$ M添加24小时。随后细胞重悬浮于膜联蛋白结合缓冲液中 (10mm HEPES, pH7.4, 140mm NaCl, 2.5mm CaCl<sub>2</sub>) 并且用膜联蛋白-APC和7-氨基放线菌素D (7-AAD) 或丙锭碘 (PI) 染色。洗涤细胞,重悬浮于膜联蛋白结合缓冲液中, 并且通过流式细胞术 (FACSArray system, BD Biosciences, San Jose CA) 和FlowJo软件 (Treestar, Inc., San Carlos, CA) 分析。

[0268] Ramos人B成淋巴细胞伯基特氏淋巴瘤 (目录CRL-1596), CCRF-CEM人T成淋巴细胞急性淋巴母细胞性白血病 (CCL-119), HL-60人早幼粒细胞 (CCL-240), Namalwa人B成淋巴细胞伯基特氏淋巴瘤 (CRL-1432), Raji人B成淋巴细胞伯基特氏淋巴瘤CCL-86), RPMI8226人骨髓瘤 (CCL-155), MM.1S人B成淋巴细胞MM (CRL-2974), U226B1人骨髓瘤 (TIB-196), MV-4-11人双表型B单核细胞性白血病 (CRL-9591), MJ人T细胞淋巴瘤 (CRL-8294), HH人T细胞淋巴瘤 (CRL-2105), HuT78人成淋巴细胞皮肤淋巴瘤 (TIB-161), NK92人NK细胞非-霍奇金氏淋巴

瘤 (CRL-2407) 细胞系购自 ATCC, Manassas, VA。

[0269] Nomo-1 人急性骨髓性白血病 (ACC542), MOLP-8mm (ACC569), SU-DHL6 人 B 细胞非-霍奇金氏淋巴瘤 (ACC572), L540 人霍奇金氏淋巴瘤 (ACC72), KG-1 人 AML (ACC14), MOLP-8 人 MM (ACC569), OPM-2 人 MM (ACC50), L-363 人血浆细胞白血病 (ACC49) 细胞系购自 DSMZ, Braunschweig, 德国。

[0270] 表 4: BMS-936564 对细胞系组凋亡的诱导

[0271]

| 细胞系       | 细胞类型 | CXCR4 表达 | 调整的凋亡百分比 | %肿瘤生长抑制(单一疗法) |
|-----------|------|----------|----------|---------------|
| Ramos*    | 淋巴瘤  | ++++     | 71       | 80            |
| Namalwa*  | 淋巴瘤  | ++++     | 30       | 66            |
| Raji*     | 淋巴瘤  | ++++     | 15       | 35            |
| DHL6*     | 淋巴瘤  | +        | 3        | 55/77         |
| L540*     | 淋巴瘤  | +++      | 35       |               |
| HL60      | AML  | ++       | 31       | 60/82         |
| Nomo-1    | AML  | ++++     | 34       | 88            |
| KG-1      | AML  | ++       | 8        | 23            |
| MOLP-8    | MM   | ++       | 19       | 66            |
| RPMI 8226 | MM   | ++       | 17       |               |



[0272]

| 细胞系       | 细胞类型        | CXCR4 表达 | 调整的凋亡百分比 | %肿瘤生长抑制(单一疗法) |
|-----------|-------------|----------|----------|---------------|
| MM.1S     | MM          | +        | 15       | 49            |
| U226      | MM          | +        | 22       |               |
| JJN3R     | MM          | ++       | 31       | 97            |
| OPM2      | MM          | ++       | 17       |               |
| L-363     | MM          | +        | 16       |               |
| MV-4-11   | MM          | ++       | 1        |               |
| MJ        | TCL         | ++       | 9        |               |
| HH        | TCL         | +++      | 9        |               |
| HuT78     | TCL         | +        | 22       |               |
| CCRF-CEM* | ALL         | +++      | 45       | 72            |
| NKL       | NK          | +++      | 36       |               |
| KHYG-1    | NK          | +        | 10       |               |
| NK-92     | NK          | ++       | 48       |               |
| 人原代*      | B(CD19+)    | ++       | 17       |               |
| 人原代*      | T(CD3+)     | +        | 6        |               |
| 人原代*      | 单核细胞(CD14+) | ++       | 24       |               |

[0273] \*无交联剂

[0274]

| CXCR4 表达关键     |       |
|----------------|-------|
| MFI 用 10nM Ab  | 得分(+) |
| 400-2000       | +     |
| 2000-10,000    | ++    |
| 10,000-50,000  | +++   |
| 50,000-250,000 | ++++  |

[0275] 购自ATCC的R1610仓鼠纤维原细胞(CRL-1657)用人CXCR4转染并且保持在500μg/mL的G418选择下。选择处于BMS的购自DSMZ的JJN-3细胞(ACC541)用于硼替佐米抗性。NKL人NK细胞大粒细胞白血病细胞系由Dana-Farber Cancer Institute许可;KHYG-1人NK细胞白血病细胞系(JCRB0156)购自Health Science Research Resources Bank, Japan Health Sciences Foundation。

[0276] 将BMS-936564诱导CXCR4<sup>+</sup>细胞凋亡的能力与小分子CXCR4-拮抗剂AMD3100的凋亡能力相比较。通过Ramos细胞与10μg/mL BMS-936564或同型对照抗体在37℃温育24小时调查凋亡。用于对比,Ramos细胞与6μM AMD3100温育,对应于抑制CXCL12-诱导钙流动和迁移的浓度。细胞用膜联蛋白-FITC和丙锭碘(PI)染色。测定仅对膜联蛋白阳性或对膜联蛋白和PI双阳性的细胞百分比。相比未处理的(1.7%和4.1%),与同型对照抗体温育的(0.5%和2.8%),或用AMD3100处理的(2.0%和2.7%)细胞,BMS-936564诱导膜联蛋白(31.2%)和膜联蛋白/PI双阳性染色(27.3%)的提高。

[0277] 为了检验对BMS-936564的凋亡应答的特异性,不结合BMS-936564的亲本R1610细胞(数据没有显示)和用人CXCR4转染的结合BMS-936564的R1610(图4)用于测量凋亡。MDX-1338(BMS-936564)或同型对照在37℃加至R1610细胞和CXCR4转染的细胞24小时,随后用膜联蛋白-FITC和丙锭碘(PI)染色。测定仅对膜联蛋白阳性或对膜联蛋白和PI双阳性的细胞百分比。响应于与BMS-936564温育,转染的细胞R1610-hCXCR4表现出提高的膜联蛋白染色和膜联蛋白/PI染色水平(24.3%和11.4%),而同型对照抗体(2.5%和0.9%)或未处理时(2.6%和0.9%)具有最小的作用(图15A)。BMS-936564治疗后亲本R1610细胞不表现出凋亡(图15B),提示对hCXCR4的特异性。这些发现之后BMS-936564显示对一些CXCR4<sup>+</sup>细胞系以及正常PBMC诱导凋亡(表4)。

[0278] 通过BMS-936564诱导的不同CXCR4<sup>+</sup>细胞系的凋亡对比同型对照的数据概要在表5中提供。

[0279] 表5. 多发性骨髓瘤细胞系中体外BMS-936558-诱导的凋亡

[0280]

| 细胞系    | CXCR4<br>表达 | 抗体处理       | 膜联蛋白<br>阳性% | 膜联蛋白 +<br>7AAD 阳性% |
|--------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| MOLP-8 | ++          | 同型         | 16.4        | 11.9               |
|        |             | BMS-936564 | 32.7        | 14.2               |

[0281]

| 细胞系       | CXCR4<br>表达 | 抗体处理       | 膜联蛋白<br>阳性% | 膜联蛋白 +<br>7AAD 阳性% |
|-----------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| RPMI-8226 | ++          | 同型         | 27.1        | 16.9               |
|           |             | BMS-936564 | 36.3        | 24.6               |
| MM.1S     | +           | 同型         | 20.5        | 8.4                |
|           |             | BMS-936564 | 34.1        | 9.8                |
| JJN-3R    | ++          | 同型         | 15.0        | 4.8                |
|           |             | BMS-936564 | 46.8        | 25.1               |
| OPM-2     | ++          | 同型         | 14.4        | 2.8                |
|           |             | BMS-936564 | 31.1        | 3.7                |

[0282] 表4和5中概括的数据表明BMS936564诱导凋亡,并且因此可以是实际上表达CXCR4的每种肿瘤细胞的有效治疗剂。

[0283] 实施例12

[0284] 显示的由抗-CXCR4抗体在体内抑制实体肿瘤细胞增殖的其他研究

[0285] 在该实施例中,使用其他的肿瘤细胞模型(类似于以上在实例9中所述的Ramos模型)检测了抗-CXCR4人类抗体在体内对已建立的实体肿瘤的增殖抑制的能力或诱导凋亡的能力。检测了不同的肿瘤细胞系。代表性的实验及结果如下。

[0286] 在一个实验中,将 $7.5 \times 10^6$ MDA-MB231人乳房癌细胞/小鼠植入每只小鼠的面侧区,并允许生长到平均大小为 $100\text{mm}^3$ (移植后7天,由肿瘤的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 高度/2算出)。将这些小鼠随机分入不同的处理组,并且在移植后7天接受第一剂量的抗体的经腹膜内(i.p.)注射,移植14天后接受第二i.p.剂量的抗体,并接着在移植后46天接受第三剂量。各组小鼠(n=9)接受以下处理(i)赋形剂(PBS);(ii)IgG1同型对照(15mg/kg);(iii)IgG4同型对照(15mg/kg);或(iv)F7IgG1(15mg/kg);或(v)F7IgG4(15mg/kg)。在规则的间隔测量肿瘤的体积,并且确定在每个间隔对每个处理组的平均肿瘤体积及中值肿瘤体积。本实验的这些结果概述于以下表6中,其显示了移植后52天平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )以及%肿瘤正常抑制(TGI),以及移植59天后中值肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )以及%TGI。另外,F7IgG4处理组中的一只小鼠在第59天无肿瘤。结果表明 F7MAb能够在体内抑制MDA-MB231乳癌细胞的生长。

[0287] 在第二个实验中,将 $5 \times 10^6$ DMS79人小细胞肺癌细胞/小鼠植入每只小鼠的面侧区,并允许生长到平均大小为 $160\text{mm}^3$ (移植后7天,由肿瘤的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 高度/2算出)。将这些小鼠随机分入不同的处理组,并且按Q3Dx5的剂量表接受抗体的经腹膜内(IP)注射(每三天五次)。各组小鼠(n=10)接受以下处理(i)赋形剂(PBS);(ii)IgG4同型对照(10mg/kg);或(iii)F7IgG4(10mg/kg)。在规则的间隔测量肿瘤的体积,并且确定在每个间隔对每个处理组的平均肿瘤体积及中值肿瘤体积。本实验的这些结果概述于以下表7中,其显示了移植后34天平均肿瘤体积和中值肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )以及%肿瘤生长抑制(TGI)。结果表明

F7MAb能够在体内抑制DMS79人小细胞肺癌的生长。

[0288] 表6:由mAb F7在体内抑制MDA-MB231细胞的肿瘤生长

[0289]

| 处理              | 第 52 天 |        | 第 59 天 |        |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|
|                 | 均值     | TGI(%) | 中值     | TGI(%) |
| 赋形剂             | 154    |        | 187    |        |
| IgG1 同型对照       | 172    |        | 216    |        |
| IgG4 同型对照       | 188    |        | 226    |        |
| F7 抗-CXCR4 IgG1 | 86     | 50     | 130    | 40     |
| F7 抗-CXCR4 IgG4 | 79     | 58     | 108    | 52     |

[0290] 表7:由mAb F7在体内抑制DMS79细胞的肿瘤生长

[0291]

| 处理              | 第 34 天 |        |     |        |
|-----------------|--------|--------|-----|--------|
|                 | 均值     | TGI(%) | 中值  | TGI(%) |
| 赋形剂             | 900    |        | 882 |        |
| IgG4 同型对照       | 992    |        | 903 |        |
| F7 抗-CXCR4 IgG4 | 620    | 38     | 599 | 34     |

[0292] 在多个实验中(类似于以上所述的那些实验及实施例的实验),对其他皮下异种移植肿瘤模型抗-CXCR4抗体对肿瘤生长进行抑制的能力进行了检测。在使用SU-DHL-6B细胞淋巴瘤细胞的实验中,结果显示用15mg/kg的F7IgG4mAb进行处理,结果大约抑制了60%的肿瘤生长。类似地,在使用Namalwa伯基特氏淋巴瘤细胞的实验中,结果显示以3mg/kg的F7IgG4mAb进行处理,结果大约抑制了70%的肿瘤生长。相反,在使用NIH-H226肺癌细胞或HPAC人胰腺腺癌细胞的实验中,没有观察到由F7MAb对肿瘤生长的抑制作用。然而,在流式细胞仪实验中,用F7MAb对这些细胞进行染色显示了体外最小化的表达。虽然通过免疫组织化学通过mAb该肿瘤细胞在体内是可被染色,但是不清楚CXCR4在其肿瘤生长的什么阶段开始被表达。这提示这两种细胞系中CXCR4的表达不足以在体内允许由抗-CXCR4抑制的肿瘤生长或诱导凋亡。

[0293] 实施例13

[0294] 由抗-CXCR4抗体在体内抑制肺转移

[0295] 在该实施例中,使用C57系统肿瘤细胞模型,检测了F7抗-CXCR4mAb对肺转移进行抑制的能力。更具体地说,对30只C57种系小鼠,将 $0.4 \times 10^6$  B16-CXCR4细胞(经转染的表达人类CXCR4的B16细胞)由静脉注射进入每只小鼠。将这些小鼠随机分成3组,每组10只,然后各组小鼠接受以下处理(i) 赋形剂(PBS); (ii) IgG4同型对照(5mg/kg); 或(iii) F7IgG4(5mg/kg)。由静脉注射B16-CXCR4细胞30分钟后,将抗体或赋形剂由腹膜下注射。第14天收

集肺,并且对肺转移结节的个数进行定量。这些结果概述于以下表8中,其显示了各组肺转移结节数的平均数与中值。这些结果显示用F7MAb处理导致了肺转移瘤的数目的平均数下降了56%,而用该同型对照抗体处理仅下降了15%,证明F7MAb能够在系统性肿瘤模型中抑制肺转移。

[0296] 表8:由mAb F7在体内抑制肺转移

[0297]

| 处理              | 肺转移数 |     | 肺转移抑制%(均值) |
|-----------------|------|-----|------------|
|                 | 均值   | 中值  |            |
| 赋形剂             | 364  | 397 |            |
| IgG4 同型对照       | 309  | 294 | 15%        |
| F7 抗-CXCR4 IgG4 | 157  | 186 | 56%        |

[0298] 实施例14

[0299] BMS-936564抑制体内非-霍奇金氏淋巴瘤(NHL)模型中的肿瘤生长

[0300] 在荷瘤异种移植SCID小鼠中检测BMS-936564和抗-CXCL12抑制肿瘤生长的体内活性。SCID小鼠利用1-cm<sup>3</sup>注射器和25-规格半英寸针皮下植入0.1ML磷酸缓冲盐溶液(PBS)和0.1 0.1MLMATRIGEL®中的一千万个Ramos细胞(人B成淋巴细胞伯基特氏淋巴瘤细胞系)。当达到80mm<sup>3</sup>均值和中值肿瘤大小时,小鼠根据肿瘤体积随机分组(n=8)。在第0天和第7天每个动物经腹膜(IP)注射~200μLBMS-936564(15mg/kg/剂),抗-CXCL12(15mg/kg/剂),人IgG4同型对照(15mg/kg/剂),利妥昔(15mg/kg/剂)或以0.3mL IP注射PBS(赋形剂对照)。剂量应答研究之前已发现15mg/kg为利妥昔的有效剂量(数据没有显示)。所有抗体剂量是良好耐受的并且没有观察到体重损失。每周两次测量肿瘤重量和体量。用Fowler Electronic Digital Caliper(Model62379-531;Fred V.Fowler Co.,Newton,MA)三维测量肿瘤体积(L×W×H/2),并且利用来自StudyLog Systems,Inc.(South San Francisco,CA)的Study Director软件电子记录数据。每天检查动物姿势、仪态和呼吸变化,以及嗜睡。当肿瘤达到2000mm<sup>3</sup>终点或出现溃烂时安乐处死小鼠。

[0301] 当与赋形剂和同型对照相比较时,BMS-936564和阳性对照利妥昔,抑制肿瘤生长。用BMS-936564的处理在第21天导致99%的中值生长抑制并且所述抑制维持60天(图16)。相反,抗-CXCL12不抑制肿瘤生长并且同型对照抗体表现类似。

[0302] 实施例15

[0303] BMS-936564在体内抑制急性骨髓性白血病(AML)模型的肿瘤生长

[0304] 为了评估所述抗体在AML中的功效,使用两种阿糖胞苷-抗性小鼠异种移植模型,HL-60和Nomo-1。通过FACS染色证实每种细胞系中CXCR4的表达(图4A)。如实施例14所述用1000万HL-60细胞皮下植入SCID小鼠。当所述肿瘤体积达到大约136mm<sup>3</sup>,所述小鼠随机分组(n=10)并且在第0、3、7、10和14天用BMS-936564(mg/kg/剂)、人IgG4同型对照(10mg/kg/剂)或PBS(赋形剂对照)IP用药,并且监测41天。在第27天,当相比同型和赋形剂组时中值肿瘤生长抑制分别为88%和83%(图17A)。

[0305] Nomo-1模型中(如实施例14皮下植入750万细胞),当肿瘤体积达到大约84mm<sup>3</sup>时,

小鼠随机分组 ( $n=9$ ) 并且在第0、3、7、10和14天用BMS-936564 (10mg/kg/剂)、IgG4同型对照 (10mg/kg/剂)、PBS (赋形剂对照) 或阿糖胞苷 (20、60或90mg/kg/剂) 用药, 并且监测57天。第34天, BMS-936564-处理的小鼠的中值肿瘤生长抑制相比同型或赋形剂对照显著延缓88% (图17B)。正如所料, 阿糖胞苷 (亦称阿糖胞啶或Ara-C) 不抑制肿瘤生长 (图17B)。

#### [0306] 实施例16

[0307] BMS-936564在体内抑制多发性骨髓瘤(MM)模型的肿瘤生长

[0308] 检测各种CXCR4<sup>+</sup>骨髓瘤细胞, 即MOLP8、JJN-3R、JJN-3、RPMI-8226、MM.1S和OPM-2在SCID异种移植肿瘤模型中对BMS-936564的敏感性。所有实验中, 在第0和7天用IgG4同型对照和PBS赋形剂对照经腹膜注射小鼠。如实施例14所述, MOLP-8细胞 (250万) 植入SCID小鼠。当肿瘤体积达到大约100mm<sup>3</sup>时, 小鼠随机分入8组 ( $n=8$ ) 并且在第0、3、7、10和14天用BMS-936564 (10mg/kg/剂) 单独或与50mg/kg雷利度胺 (REVLIMID®) 联合或与0.8mg/kg 硼替佐米(VELCADE®)联合用药。在第25天 (当所述研究中最后一天每组中所有小鼠仍在时), 相比同型抗体对照BMS-936564显著延缓66%和56%均值肿瘤生长 (图18A)。MOLP8肿瘤对雷利度胺和硼替佐米相对耐受并且当与任一药物联合时BMS-936564的功效没有改善 (图18A)。在研究第42天结束时, 8只中5只小鼠仍在BMS-936564组中而同型-治疗组中没有小鼠在。

[0309] 硼替佐米-耐受的JJN-3R细胞 (500万) 如之前所述植入SCID小鼠。在肿瘤体积大约100mm<sup>3</sup>时, 小鼠随机分组 ( $n=8$ ), 用BMS-936564 (10或30mg/kg/剂IP) 或雷利度胺 (50mg/kg/剂IP) 或硼替佐米 (0.8mg/kg/剂IV) 在第0、4、7、11和14天用药, 并且监测25天。中值肿瘤随时间的生长显示在图18B中。雷利度胺或硼替佐米单独均不抑制肿瘤生长, 而相比用同型对照处理的小鼠, 用BMS-936564在第25天处理的小鼠中值肿瘤生长抑制为100%。在研究结束时, BMS-93656430mg/kg组中7只小鼠中的4只无肿瘤。

[0310] 利用亲本JJN-3细胞, 硼替佐米和雷利度胺都表现出几乎没有肿瘤-抑制功效。500万JJN-3细胞/小鼠植入SCID小鼠并且当肿瘤体积达到大约77mm<sup>3</sup>时小鼠随机分入8组。所述小鼠用MDX-1338 (10mg/kg/剂IP) 单独或与硼替佐米联合 (0.8mg/kg/剂IV) 或与雷利度胺联合 (50mg/kg/剂IP) 在第0、3、7、10和14天用药。相比用赋形剂对照处理的小鼠第25天MDX-1338抑制肿瘤生长52% (图18C)。在该JJN-3细胞模型中硼替佐米表现出抑制肿瘤生长的临界功效, 但相比赋形剂对照, 在第25天其与MDX-1338联合略微提高MDX-1338诱导的抑制水平至58% (图18C)。雷利度胺对抑制肿瘤生长无效, 并且雷利度胺和MDX-1338的组合同样无效, 表现出比MDX-1338单独更少的抑制 (图18D)。

[0311] 如实施例14所述, RPMI-8226细胞 (1000万) 植入SCID小鼠。当肿瘤体积达到大约20mm<sup>3</sup>时, 小鼠随机分组 ( $n=8$ ), 在第0、3、7、10和14天用MDX-1338 (10mg/kg/剂) 单独或与50mg/kg雷利度胺(REVLIMID®)联合或与0.8mg/kg硼替佐米(VELCADE®)联合用药。相比赋形剂对照在第44天MDX-1338显著延缓53%的均值肿瘤生长 (图18E)。在该RPMI-8226模型中, 雷利度胺单独表现出临界功效, 但其提高MDX-1338-肿瘤生长抑制的功效, 相比同型对照, 在第44天, 50mg/kg雷利度胺与10mg/kgMDX-1338联合功效为79% (图18E)。相比同型对照在第44天硼替佐米表现出抑制70%均值肿瘤生长的良好的功效 (图18F), 并且稍微提高MDX-1338的功效, 相比同型对照在第44天其从61%均值肿瘤生长抑制提高至82% (图

18F)。

[0312] MM.1S细胞(1000万)植入SCID小鼠,并且当肿瘤体积达到大约30mm<sup>3</sup>时,小鼠随机分组(n=8),在第0、4、7、11和14天用MDX-1338(10mg/kg/剂)单独或与100mg/kg雷利度胺联合用药。相比同型对照在第25天MDX-1338显著延缓60%的均值肿瘤生长。雷利度胺单独甚至更有效,在第25天延缓70%的均值肿瘤生长,并且在第25天MDX-1338和雷利度胺的组合抑制86%均值肿瘤生长(图18G)。

[0313] 表9:多发性骨髓瘤细胞系中的CXCR4表达、凋亡和肿瘤生长抑制

[0314]

| 细胞系   | CXCR4<br>表达 | 通 过 仅<br>MDX-1338<br>的凋亡 | 存在交联<br>Ab 时的凋<br>亡 | 肿瘤生长抑制                                    |
|-------|-------------|--------------------------|---------------------|---|
| MOLP8 | ++          | -                        | +                   | MDX-1338=56%<br>仅 REVLIMID®=35%<br>组合=68% |

[0315]

| 细胞系       | CXCR4<br>表达 | 通 过 仅<br>MDX-1338<br>的凋亡 | 存在交联<br>Ab 时的凋<br>亡 | 肿瘤生长抑制  |
|-----------|-------------|--------------------------|---------------------|---|
| JJN-3R    | ++          | -                        | +++                 | MDX-1338=100%   |
| JJN-3     | ++          | -                        | +++                 |   |
| RPMI-8226 | ++          | -                        | ++                  | MDX-1338=61%<br>组合 w/Lenalid.=90%<br>组合 w/Bortez.=82% |
| MM.1S     | +           | -                        | ++                  | MDX-1338=60%<br>REVLIMID®=70%<br>组合=86%               |
| OPM-2     | ++          | -                        | ++                  | MDX-1338=46%<br>组合 w/Bortez.=92%                      |

[0316] 如之前所述OPM-2细胞(1000万)植入SCID小鼠。在肿瘤体积大约77mm<sup>3</sup>时,小鼠随机分组(n=8),在第0、4、7、11和14天用MDX-1338(10mg/kg/剂IP)单独或与硼替佐米(0.8mg/kg/剂IV)联合或与雷利度胺(50mg/kg/剂IP)联合用药。在第24天相比用赋形剂对照处理的小鼠,MDX-1338抑制45%中值肿瘤生长(图18H)。在第24天硼替佐米抑制75%肿瘤

生长,并且MDX-1338和硼替佐米的组合非常有效,在第24天抑制99%中值肿瘤生长(图18H)。雷利度胺在该OPM-2模型中表现出最小的功效,并且其不显著地提高MDX-1338的功效(图18I)。

[0317] 与通过MDX-1338的CXCR4表达和对凋亡诱导的敏感性一起,这些MM细胞异种移植获得的肿瘤生长抑制结果概括在表9中。

[0318] 实施例14-16证明了当作为单一疗法对已建立的肿瘤给予时,BMS-936564在多个NHL、AML和MM异种移植模型中表现出抗-肿瘤活性。由于BMS-936564为IgG4抗体,其不引起补体-依赖的细胞毒性(CDC)或抗体-依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。实施例11中提供的数据提示作为肿瘤生长抑制的机理,BMS-936564诱导凋亡。

[0319] 参考文献

[0320] Alsayed Y et al. (2007) Blood109 (7):2708-17.

[0321] Amadori S et al. (1991) J Clin Oncol9 (7):1210<sup>-4</sup>.

[0322] Angal S et al. (1993) Mol Immunol30 (1):105-8.

[0323] Azab AK et al. (2009) Blood113 (18):4341-51.

[0324] Beider K et al. (2011) Exp Hematol39 (3):282-92.

[0325] Berndt C et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA95:12556-61.

[0326] Bertolini F et al. (2002) Cancer Res62 (11):3106-12.

[0327] Bleul CC et al. (1996) Nature382 (6594):829-33.

[0328] Breems DA et al. (2005) J Clin Oncol23 (9):1969-78.

[0329] Broxmeyer HE et al. (2005) J ExpMed201:1307-18.

[0330] Burger JA et al. (1999) Blood94:3658-67.

[0331] Cancer Facts and Figures2008,American Cancer Society,Atlanta GA (2008).

[0332] Carnec X et al. (2005) J Virol79:1930-8.

[0333] Chow KU et al. (2002) Haematologica87:33-43.

[0334] Corcione A et al. (2000) J Natl Cancer Inst92:628-35.

[0335] Corvata N et al. (2011) Poster presented at102nd AnnualMeeting of the American Association for Cancer Research, April2-6,2011,Orlando,FL.

[0336] Crazzolara R et al. (2001) Br J Haematol115:545-53.

[0337] Dar A et al. (2011) Leukemia25 (8):1286-96.

[0338] Devine SM et al. (2004) J Clin Oncol22:1095-102.

[0339] Di Salvo J et al. (2000) Eur J Pharmacol409:143-154.

[0340] Feng Y et al. (1996) Science272:872-7.

[0341] Flomenberg N et al. (2005) Blood106:1867-74.

[0342] Friedberg JW et al. (2008) J Clin Oncol26 (2):204-10.

[0343] Garg H et al. (2006) J Leukocyte Biol79:351-62.

[0344] Gazitt Y (2001) J Hematother Stem Cell Res10:229-36.

[0345] Geminder et al. (2001) J Immunol167:4747-57.

[0346] Gisselbrecht C et al. (2011) Novel Agents for Diffuse Large B-cell



Lymphoma, ASCO Education Book2011, page321.

- [0347] Gisselbrecht C et al. (2010) J Clin Oncol28:4184-90.
- [0348] Gonzalo JA et al. (2000) J Immunol165:499-508.
- [0349] Guleng B et al. (2005) Cancer Res65(13):5864-71.
- [0350] Gupta SK et al. (1998) J Biol Chem273(7):4282-7.
- [0351] Hesselgesser J et al. (1997) Curr Biol7(2):112-21.
- [0352] Hiller DJ et al. (2011) Surgery150(3):459-65.
- [0353] Hollinger et al. (2005) Nature Biotech23(9):1126-36.
- [0354] Hosokawa Y et al. (2005) Clin Exp Immunol141:467-74.
- [0355] Hou T et al. (1998) J Immunol160:180-8.
- [0356] Hwang JH et al. (2003) J Clin Endocrinol Metab88:408-16.
- [0357] Jemal A et al. (2005) CA Cancer J Clin55:10<sup>-5</sup>0.
- [0358] Jemal A et al. (2008) CA Cancer J Clin58:71-96.
- [0359] Jemal A et al. (2009) CA Cancer J Clin59:225-49.
- [0360] Jiang YP et al. (2006) Gynecol Oncol103(1):226-33.
- [0361] Jin DK et al. (2006) NatMed12:557-67.
- [0362] Jin L et al. (2008) Mol Cancer Ther7:48-58.
- [0363] Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242.
- [0364] KashyapMK, Kumar D, Jones H, Melo-Cardenas J, KuhneMR, Sabbatini P, Cohen LJ, Cardarelli JM, Kipps TJ and Castro JE (2012) Abstract for presentation at American Society of Hematology (ASH) 54th Annual Meeting, December8-11, 2012, Atlanta, GA.
- [0365] Kewalramani T et al. (2004) Blood103(10):3684-8.
- [0366] Koshiba T et al. (2000) Clin Cancer Res6:3530-5.
- [0367] Laverdiere C et al. (2005) Clin Cancer Res11:2561-7.
- [0368] Lee B et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA96(9):5215-20.
- [0369] Libura J et al. (2002) Blood100:2597-606.
- [0370] LoetscherM et al. (1994) J Biol Chem269(1):232-7.
- [0371] Lonberg N et al. (1994) Nature368(6474):856-859.
- [0372] Liu Z et al. (2011) Diabetologia54(8):2067-76.
- [0373] Marechal R et al. (2009) Brit J Cancer100(9):1444-51.
- [0374] Matthys P et al. (2001) J Immunol167:4686-92.
- [0375] Mohle R et al. (1998) Blood91(12):4523-30.
- [0376] Mohle R et al. (1999) Leukemia13:1954-9.
- [0377] Muller A et al. (2001) Nature410:50-6.
- [0378] MurphypM (2001) New Engl JMed345(11):833-5.
- [0379] Nervi B et al. (2009) Blood113:6206-14.

- [0380] Oberlin E et al. (1996) Nature 382:833-5.
- [0381] Olafsen et al. (2010) Semin Nucl Med 40 (3):167-81.
- [0382] Ottaiano A et al. (2006) Clin Cancer Res 12 (9):2795-803.
- [0383] PCT Publication No. W002/43478, published June 6, 2002 by Medarex, Inc. and Kirin Beer Kabushiki Kaisha.
- [0384] PCT Publication No. W02008/060367, published May 22, 2008 by Medarex, Inc..
- [0385] PCT Publication No. W02008/142303, published November 27, 2008 by Pierre Fabre Medicament.
- [0386] PCT Publication No. W02009/140124, published November 19, 2009 by Eli Lilly and Co.
- [0387] PCT Publication No. W02010/043650, published April 22, 2010 by Ablynx NV.
- [0388] Ping YF et al. (2011) J Pathol 224 (3):344-54.
- [0389] Porvasnik S et al. (2009) The Prostate 69:1460-9.
- [0390] Raab MS et al. (2009) Lancet 374 (9686):324-39.
- [0391] Rempel SA et al. (2000) Clin Cancer Res 6:102-11.
- [0392] Richert M et al. (2009) Oncol Rep 21:76-7.
- [0393] Righi E et al. (2011) Cancer Res 71 (16):5522-34.
- [0394] Robinson JR (ed.) (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York.
- [0395] Roccaro AM, Sacco A, Kuhne M, Azab A, Maiso P, Zhang Y, Liu Y, Michaela R, Ngo HT, Quang P, Cardarelli JA and Ghobrial IM (2012) Abstract for presentation at American Society of Hematology (ASH) 54th Annual Meeting, December 8-11, 2012, Atlanta, GA.
- [0396] Rombouts EJC et al. (2004) Blood 104:550-7.
- [0397] Rummel MJ et al. (2002) Semin Oncol 29 (Suppl. 13):12-4.
- [0398] Scala S et al. (2005) Clin Cancer Res 11:1835-41.
- [0399] Scotton C et al. (2001) Br. J. Cancer 85:891-7.
- [0400] Schrader AJ et al. (2002) Br J Cancer 86:1250-6.
- [0401] Siegel R et al. (2011) CA Cancer J Clin 61 (4):212-36.
- [0402] Singer CR and Goldstone AH (1986) Clin Haematol 15:105.
- [0403] Spano JP et al. (2004) Ann Oncol 15:613-7.
- [0404] Spoo AC et al. (2007) Blood 109 (2):786-91.
- [0405] Staller P et al. (2003) Nature 425:307-11.
- [0406] Tachibana K et al. (1998) Nature 393 (6685):591-4.
- [0407] Taichman RS et al. (2002) Cancer Res 62:1832-7.
- [0408] Tavor S et al. (2004) Cancer Res 64 (8):2817-24.
- [0409] Terada R et al. (2003) Lab Invest 83:665-72.
- [0410] U.S. Patent No. 5,399,163, issued March 21, 1995 to Petersen SF et al.
- [0411] U.S. Patent No. 5,383,851, issued January 24, 1995 to McKinnon, Jr. CN et al.

- [0412] U.S.Patent No.4,941,880,issued July17,1990to BurnsM.
- [0413] U.S.Patent No.6,794,132,issued September21,2004to Buechler J et al.
- [0414] U.S.Patent No.7,041,870,issuedMay9,2006to Tomizuka K et al.
- [0415] U.S.Patent No.7,674,618,issuedMarch9,2010to Black A.
- [0416] U.S.Publication2012/0052097,publishedMarch1,2012by Fetzer OS et al.
- [0417] Vicari AP et al. (2002) Cytokine Growth Factor Rev13:143-154.
- [0418] Wang N et al. (2005) J TranslMed3:26-33.
- [0419] Weng AP et al. (2003) Am J Clin Pathol119:424-30.
- [0420] Zeelenberg IS et al. (2003) Cancer Res63:3833-9.
- [0421] Zeng Z et al. (2009) Blood113 (24) :6215-24.
- [0422] Zhang et al. (2002) J Biol Chem277 (27) :24515-21.
- [0423] Zou Y et al. (1998) Nature393 (6685) :595-9.

## 序列表

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> 血液恶性肿瘤用抗-CXCR4 抗体的治疗

<130> 11900-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/557,815

<151> 2011-11-09

<150> 61/569,113

<151> 2011-12-09

<160> 51

<170> PatentIn Ver. 3.3

[0001]

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

[0002]

<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> 人

<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> 人

<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> 人

<400> 8  
Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

[0003] Gly

<210> 9  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人

<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> 人

<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> 人

<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> 人

<400> 12  
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

[0004]

<210> 13  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 13  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 14  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 14  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 15  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 15

Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

[0005] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5



<210> 20  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 20  
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 21  
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
1 5

[0006]

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 22  
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 23  
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 24  
<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1

5

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> 人

<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

[0007]

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> 人

&lt;400&gt; 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

[0008]

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 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> 人

<400> 28

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

[0009]

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> 人

<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 80

[0010]

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> 人

<400> 30  
 Glu Ile Val Leu 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> 31  |     |       |
|        | <211> 107   |     |       |
|        | <212> PRT   |     |       |
|        | <213> 人   |     |       |
|        | <400> 31  |     |       |
|        | Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |     |       |
|        | 1   | 5   | 10 15 |
| [0011] | 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> 32  |     |       |
|        | <211> 107   |     |       |
|        | <212> PRT   |     |       |
|        | <213> 人   |     |       |

&lt;400&gt; 32

Glu Ile Val Leu 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

[0012]

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (375)

&lt;400&gt; 33

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144  
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

| 35  | 40  | 45  |     |
|---|-----|-----|-----|
| tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg |     |     | 192 |
| Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tat |     |     | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt |     |     | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg |     |     | 336 |
| Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca             |     |     | 375 |
| Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser             |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |

[0013]

<210> 34  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(375)

<400> 34  
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45



|   |     |
|---|-----|
| tca tac att agt agt aga agt aga agc ata tac tac gca gac tct gtg | 192 |
| Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60  |     |
| aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tac | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95  |     |
| gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg | 336 |
| Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met |     |
| 100 105 110   |     |
| gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca             | 375 |
| Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser             |     |
| 115 120 125   |     |

[0014]

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(375)

&lt;400&gt; 35

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48

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

1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96

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

20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144

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

35 40 45

tca tac att agt agt cgt agt aaa acc ata tac tac gca gac tct gtg 192  
 Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc agg aac tca ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg 336  
 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

[0015]

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (375)

&lt;400&gt; 36

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

|   |     |
|---|-----|
| tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg | 192 |
| Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60  |     |
| aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tat | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95  |     |
| gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac cac tac tac tac ggt atg | 336 |
| Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met |     |
| 100 105 110   |     |
| gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca             | 375 |
| Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser             |     |
| 115 120 125   |     |

[0016]

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(321)

&lt;400&gt; 37

gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48

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

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttt gta act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288  
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg  
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 38

<211> 321

<212> DNA

<213> 人

[0017]

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (321)

<400> 38

gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca cca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

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

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg  
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 39

[0018] gtc atc tgg gtg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48  
Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
gac aga gtc acc atc act tgt cgg acg agt cag ggt att agc agc tgg 96  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct gag ctc ctg atc 144  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg  
85 90 95

|        |   |     |
|--------|---|-----|
|        | acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                     | 321 |
|        | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys                     |     |
|        | 100 105   |     |
|        | <210> 40  |     |
|        | <211> 321   |     |
|        | <212> DNA   |     |
|        | <213> 人   |     |
|        | <220>   |     |
|        | <221> CDS   |     |
|        | <222> (1)..(321)  |     |
|        | <400> 40  |     |
|        | gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta ggg | 48  |
|        | Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |     |
|        | 1 5 10 15   |     |
|        | gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc aac tgg | 96  |
| [0019] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp |     |
|        | 20 25 30  |     |
|        | tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc | 144 |
|        | Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile |     |
|        | 35 40 45  |     |
|        | tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc | 192 |
|        | Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |     |
|        | 50 55 60  |     |
|        | agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct | 240 |
|        | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |     |
|        | 65 70 75 80   |     |
|        | gaa gat ttt gcg act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg | 288 |
|        | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg |     |
|        | 85 90 95  |     |
|        | acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                     | 321 |
|        | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys                     |     |
|        | 100 105   |     |

<210> 41  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> 人

<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 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

[0020]

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> 42  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 42  
 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> 43  |     |     |    |
| <211> 125   |     |     |    |
| <212> PRT   |     |     |    |
| <213> 人   |     |     |    |
| [0021]  |     |     |    |
| <400> 43  |     |     |    |
| 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 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> 44

<211> 125

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

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

[0022]

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> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

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 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> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

[0023]

<400> 46

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

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 47

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

[0024]

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

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 48

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> 49

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

[0025] <400> 49

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> 50  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 50

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

[0026]

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

<210> 51  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 51

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  |  |
|        | Ser | Val | Ala | Asp | Leu | Leu | Phe | Val | Ile | Thr | Leu | Pro | Phe | Trp | Ala | Val |  |
|        |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |  |
|        | Asp | Ala | Val | Ala | Asn | Trp | Tyr | Phe | Gly | Asn | Phe | Leu | Cys | Lys | Ala | Val |  |
|        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |
|        | His | Val | Ile | Tyr | Thr | Val | Asn | Leu | Tyr | Ser | Ser | Val | Leu | Ile | Leu | Ala |  |
|        |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
|        | Phe | Ile | Ser | Leu | Asp | Arg | Tyr | Leu | Ala | Ile | Val | His | Ala | Thr | Asn | Ser |  |
|        |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
|        | Gln | Arg | Pro | Arg | Lys | Leu | Leu | Ala | Glu | Lys | Val | Val | Tyr | Val | Gly | Val |  |
|        | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|        | Trp | Ile | Pro | Ala | Leu | Leu | Leu | Thr | Ile | Pro | Asp | Phe | Ile | Phe | Ala | Asn |  |
|        |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| [0027] | Val | Ser | Glu | Ala | Asp | Asp | Arg | Tyr | Ile | Cys | Asp | Arg | Phe | Tyr | Pro | Asn |  |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|        | Asp | Leu | Trp | Val | Val | Val | Phe | Gln | Phe | Gln | His | Ile | Met | Val | Gly | Leu |  |
|        |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|        | Ile | Leu | Pro | Gly | Ile | Val | Ile | Leu | Ser | Cys | Tyr | Cys | Ile | Ile | Ile | Ser |  |
|        |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|        | Lys | Leu | Ser | His | Ser | Lys | Gly | His | Gln | Lys | Arg | Lys | Ala | Leu | Lys | Thr |  |
|        | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|        | Thr | Val | Ile | Leu | Ile | Leu | Ala | Phe | Phe | Ala | Cys | Trp | Leu | Pro | Tyr | Tyr |  |
|        |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
|        | Ile | Gly | Ile | Ser | Ile | Asp | Ser | Phe | Ile | Leu | Leu | Glu | Ile | Ile | Lys | Gln |  |
|        |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |  |
|        | Gly | Cys | Glu | Phe | Glu | Asn | Thr | Val | His | Lys | Trp | Ile | Ser | Ile | Thr | Glu |  |
|        |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|        | Ala | Leu | Ala | Phe | Phe | His | Cys | Cys | Leu | Asn | Pro | Ile | Leu | Tyr | Ala | Phe |  |
|        |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |

---

|        |   |             |
|--------|---|-------------|
|        | Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val |             |
|        | 305   | 310 315 320 |
| [0028] | Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly |             |
|        | 325   | 330 335     |
|        | His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser |             |
|        | 340   | 345 350     |

## 抗-CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VH

V 片段: 3-48  
D 片段: 4-23  
J 片段: JH6b

Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L  
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

## CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W  
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

## CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R  
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

## CDR2

S R T I Y Y A D S V K G R F T I S R  
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D  
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

## CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y  
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

## CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S  
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

图1A



## 抗 -CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VK

V 片段: L15

J 片段: JK1

A I R M T Q S P S S L S A S V G D R  
1 GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

## CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y  
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

## CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L  
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

## CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T  
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

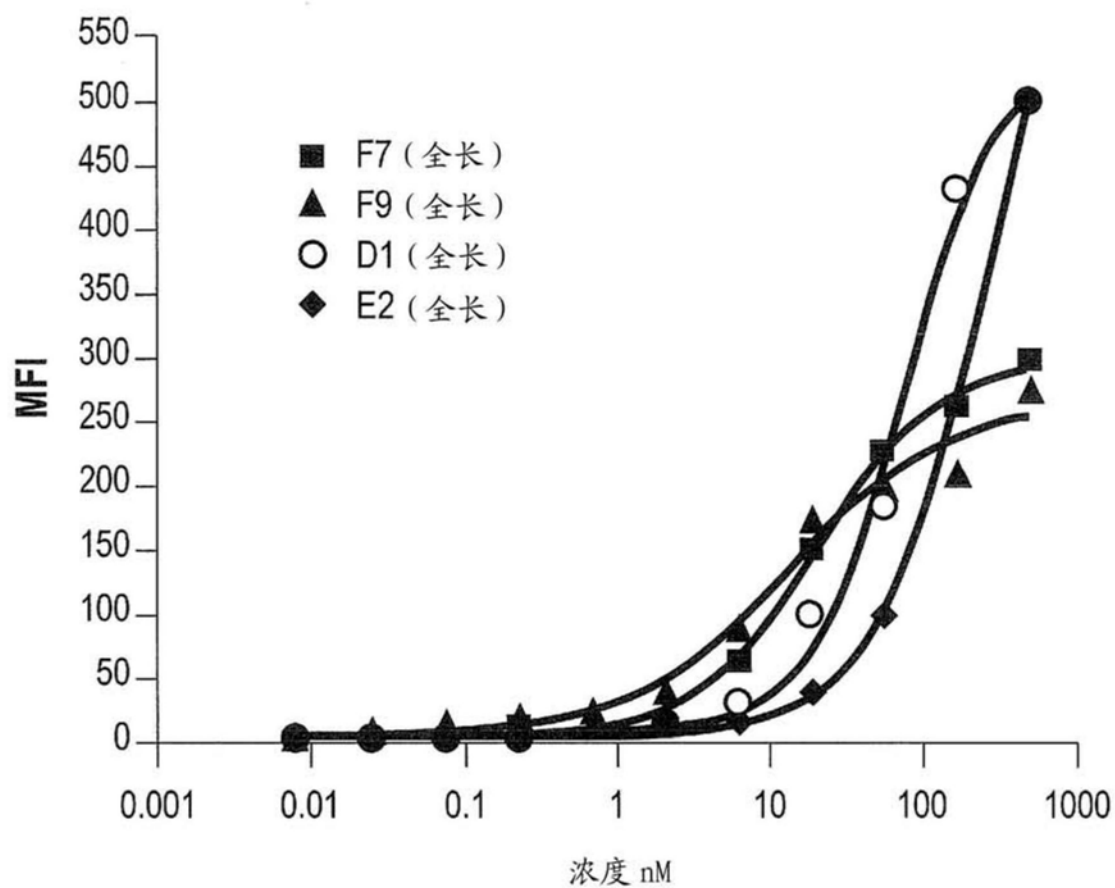
## CDR3

L T I S S L Q P E D F V T Y Y C Q Q  
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

## CDR3

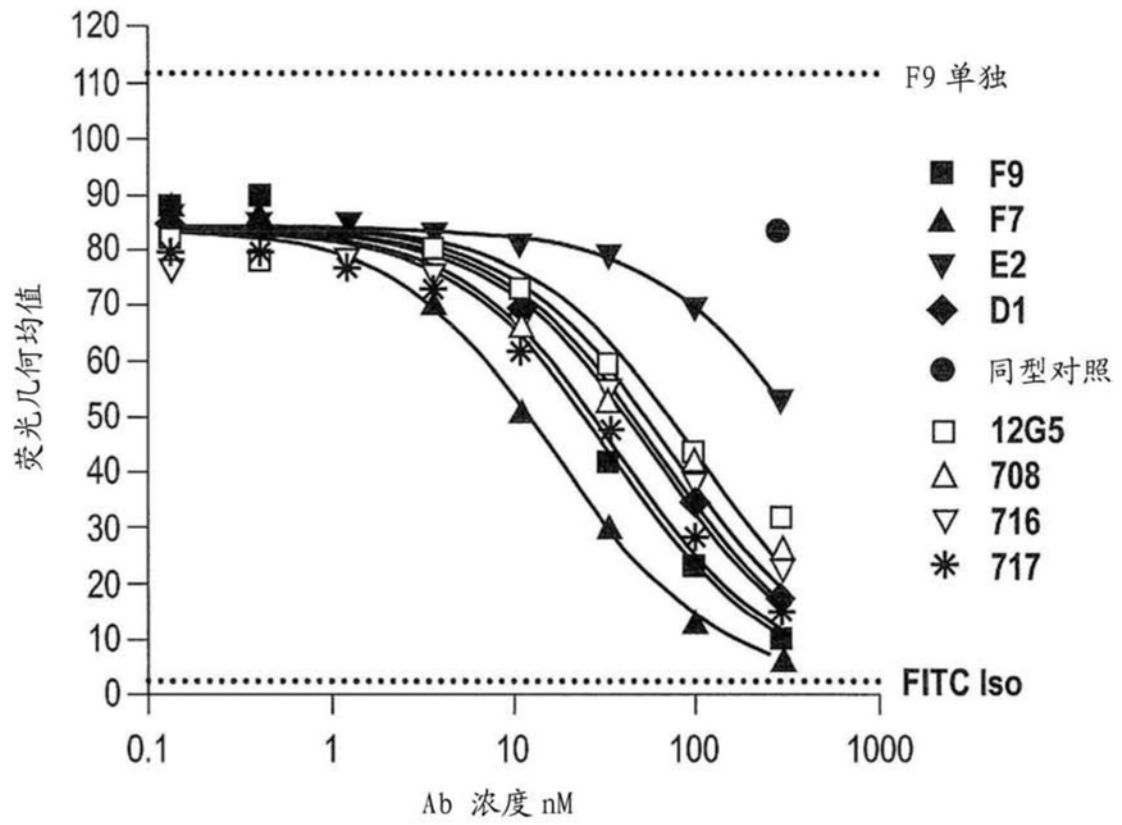
Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K  
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

图1B



|      | F7 (全长) | F9 (全长) | D1 (全长) | E2 (全长) |
|------|---------|---------|---------|---------|
| EC50 | 21.11   | 13.96   | 79.87   | 289.8   |

图2



|      | F9    | F7    | E2    | D1    | 12G5  | 708   | 716   | 717   |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EC50 | 34.39 | 17.01 | 468.8 | 59.17 | 101.9 | 76.32 | 64.68 | 38.79 |

图3

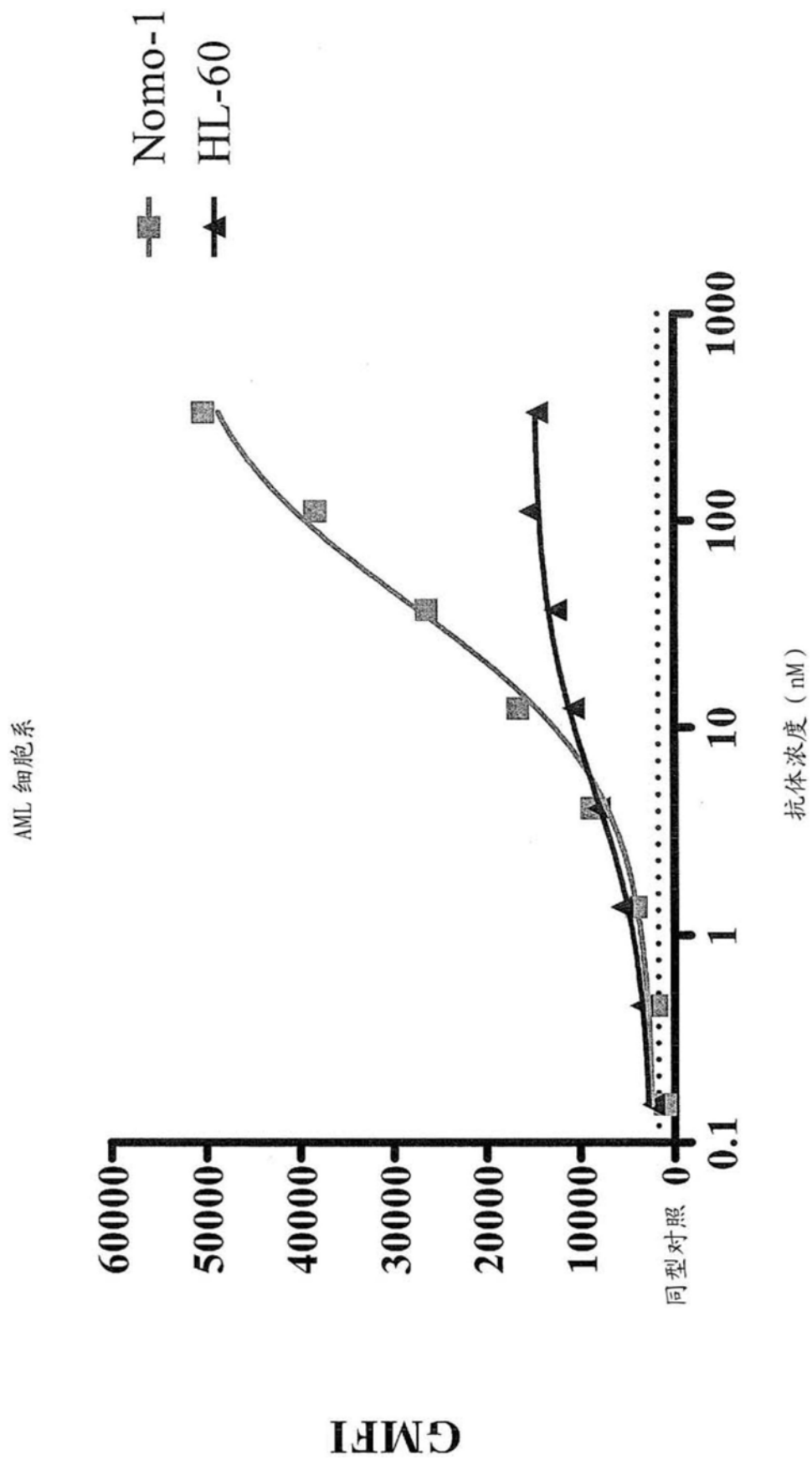


图4A

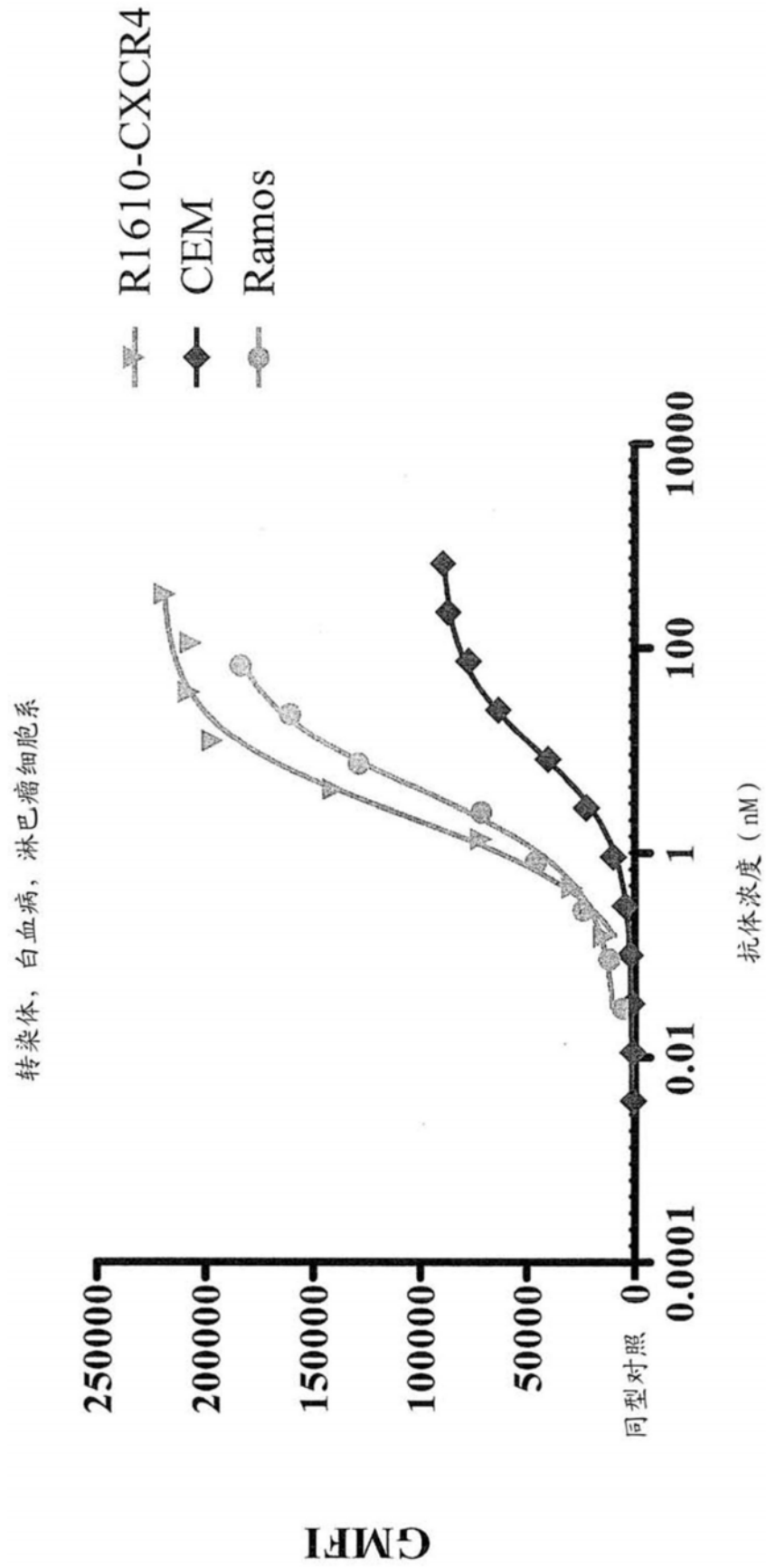


图4B

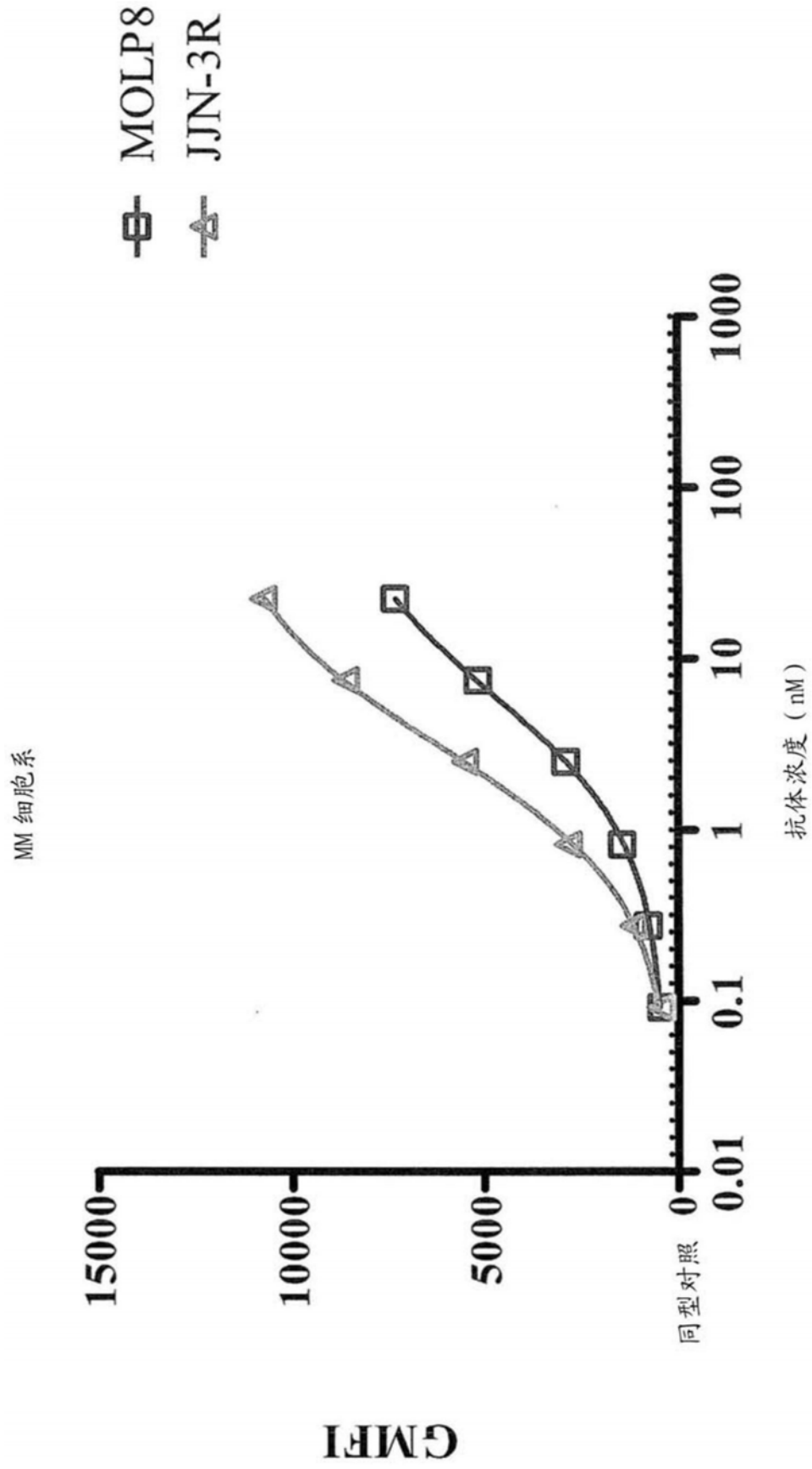


图4C

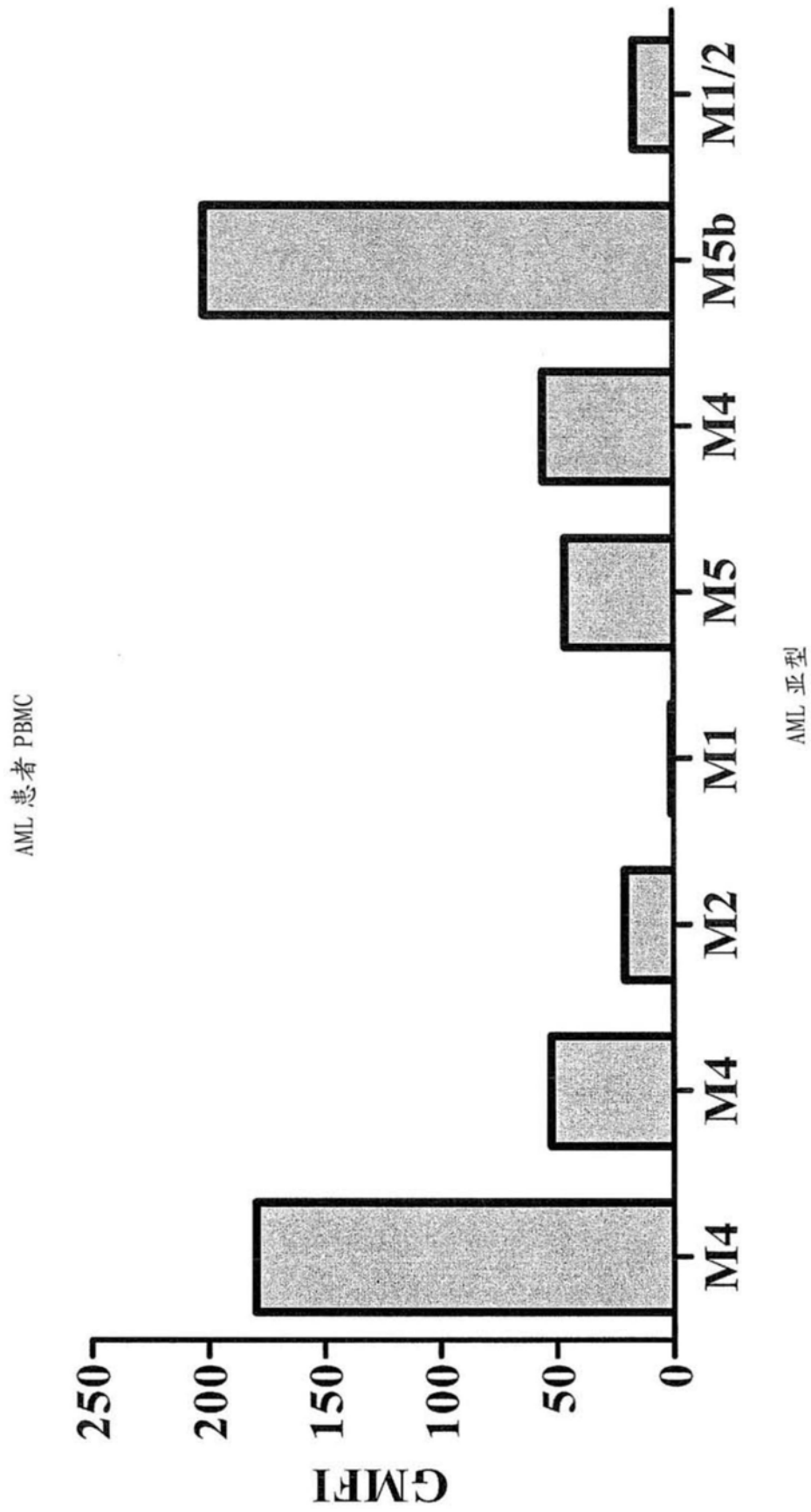


图4D

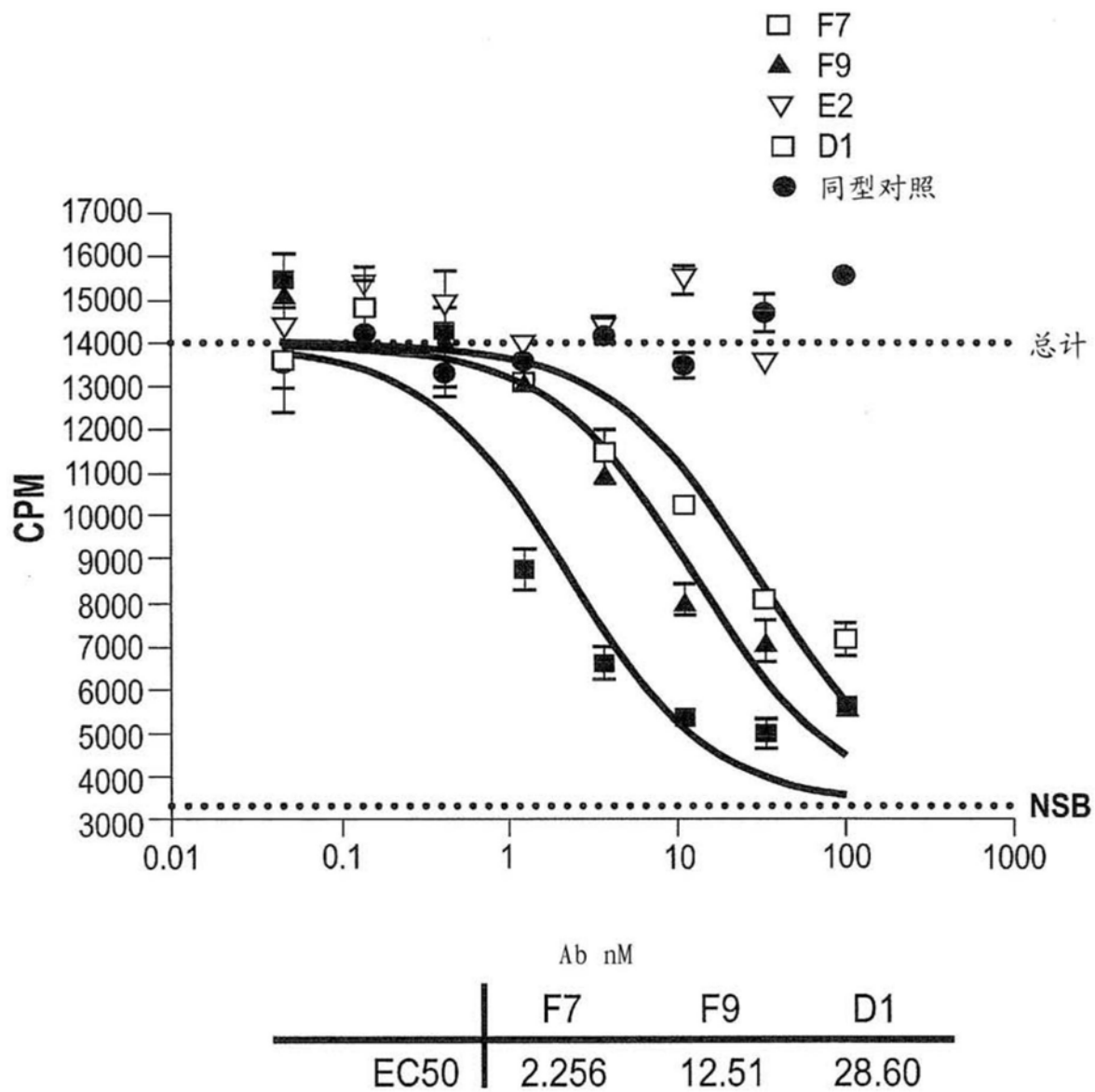


图5



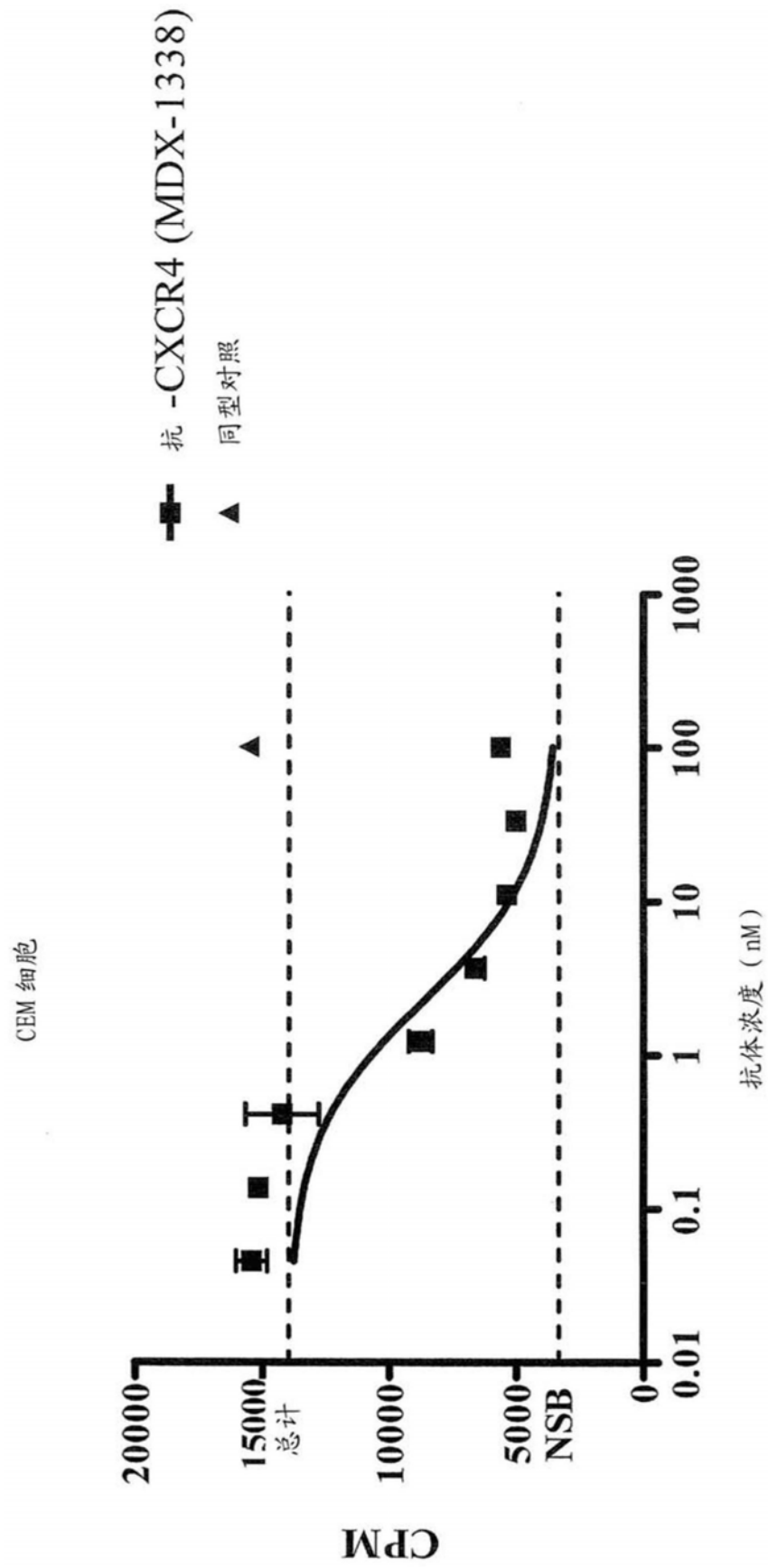


图6A

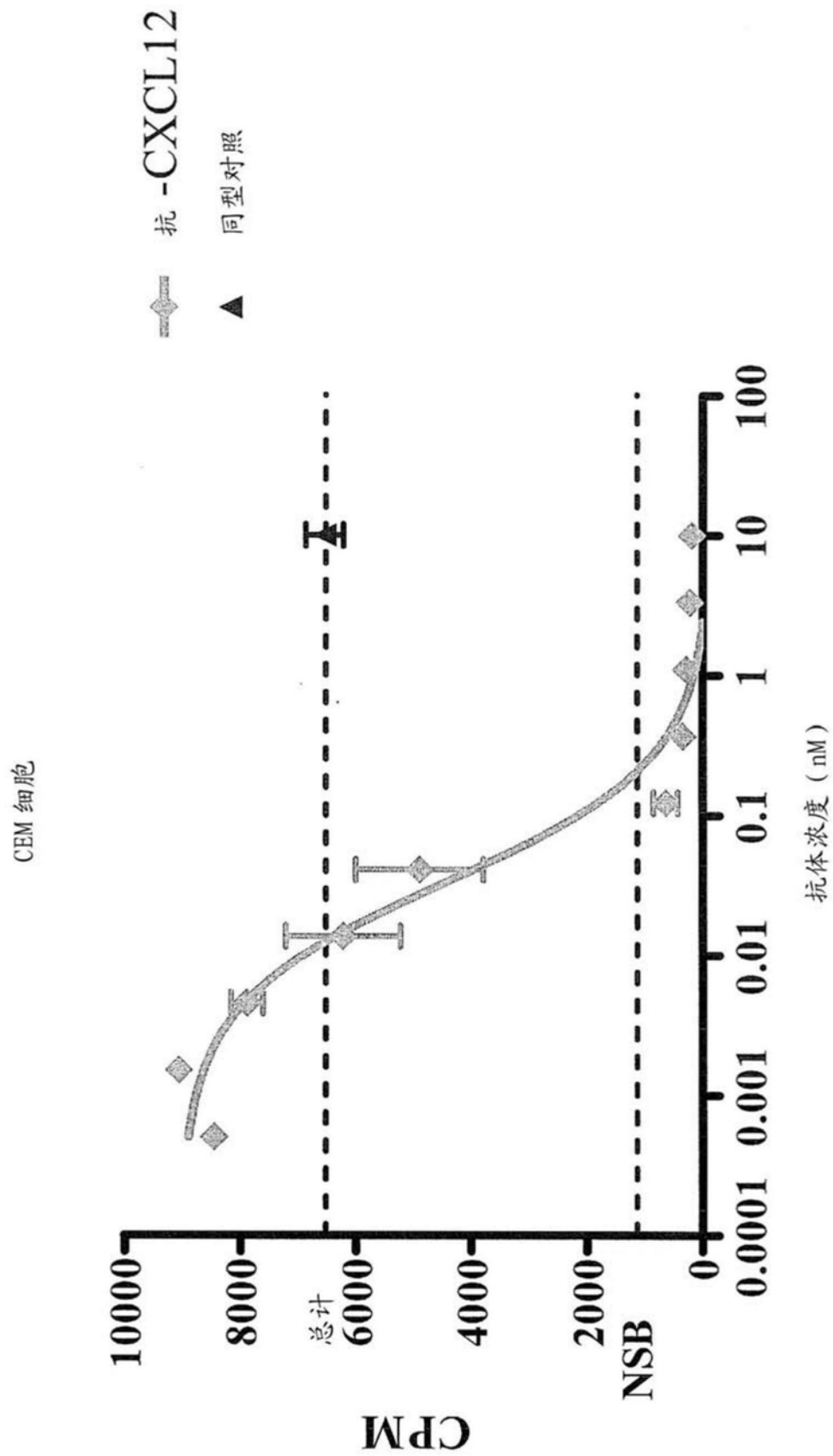


图6B

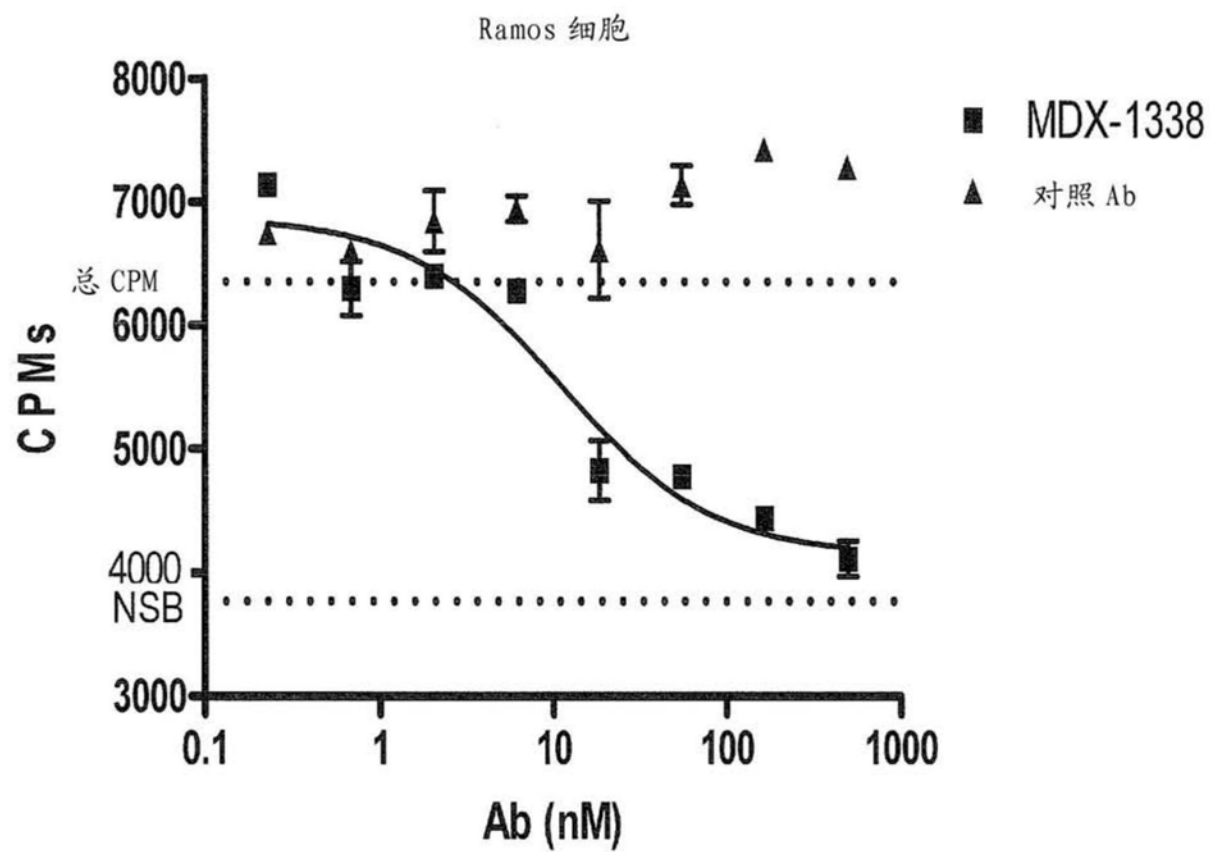


图6C

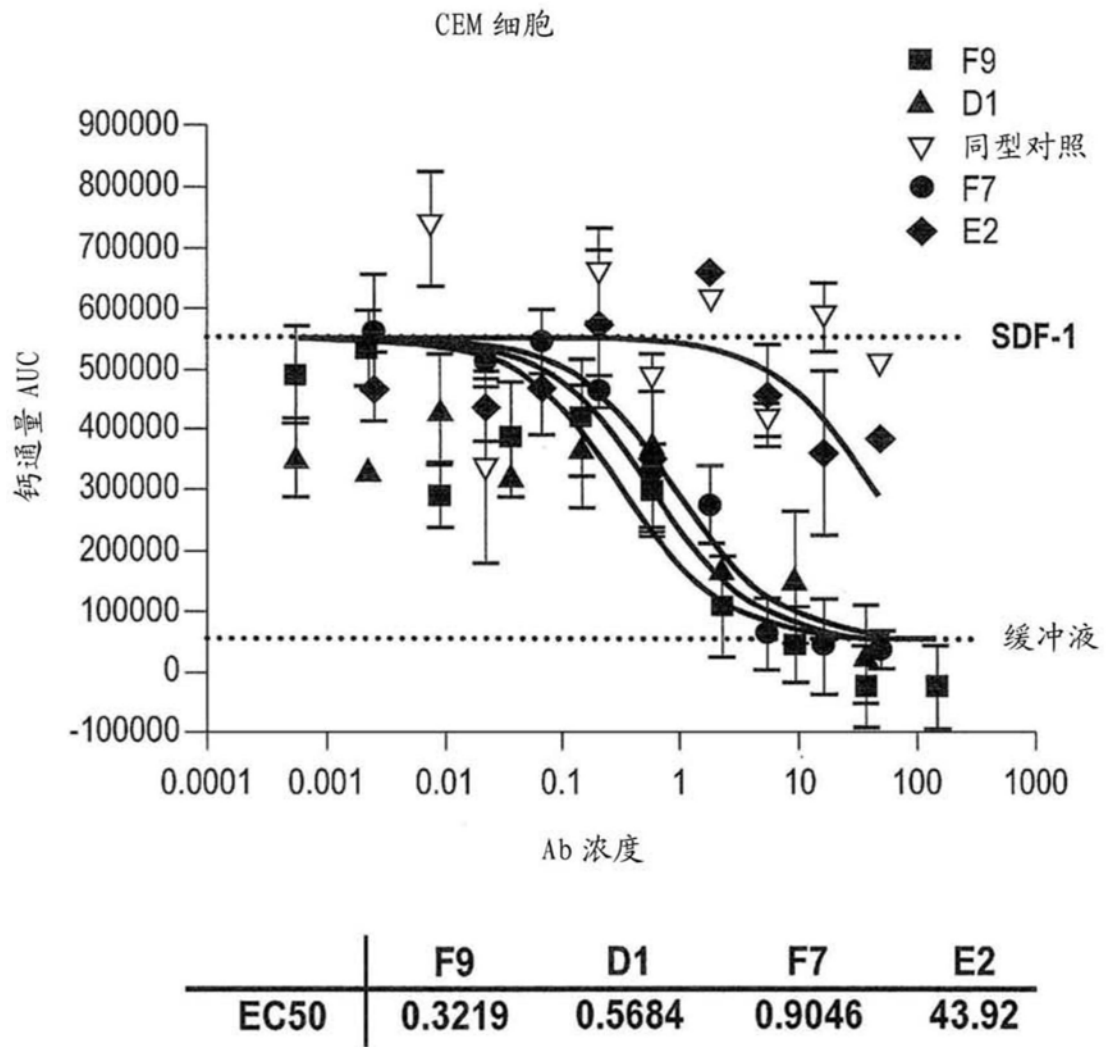


图7

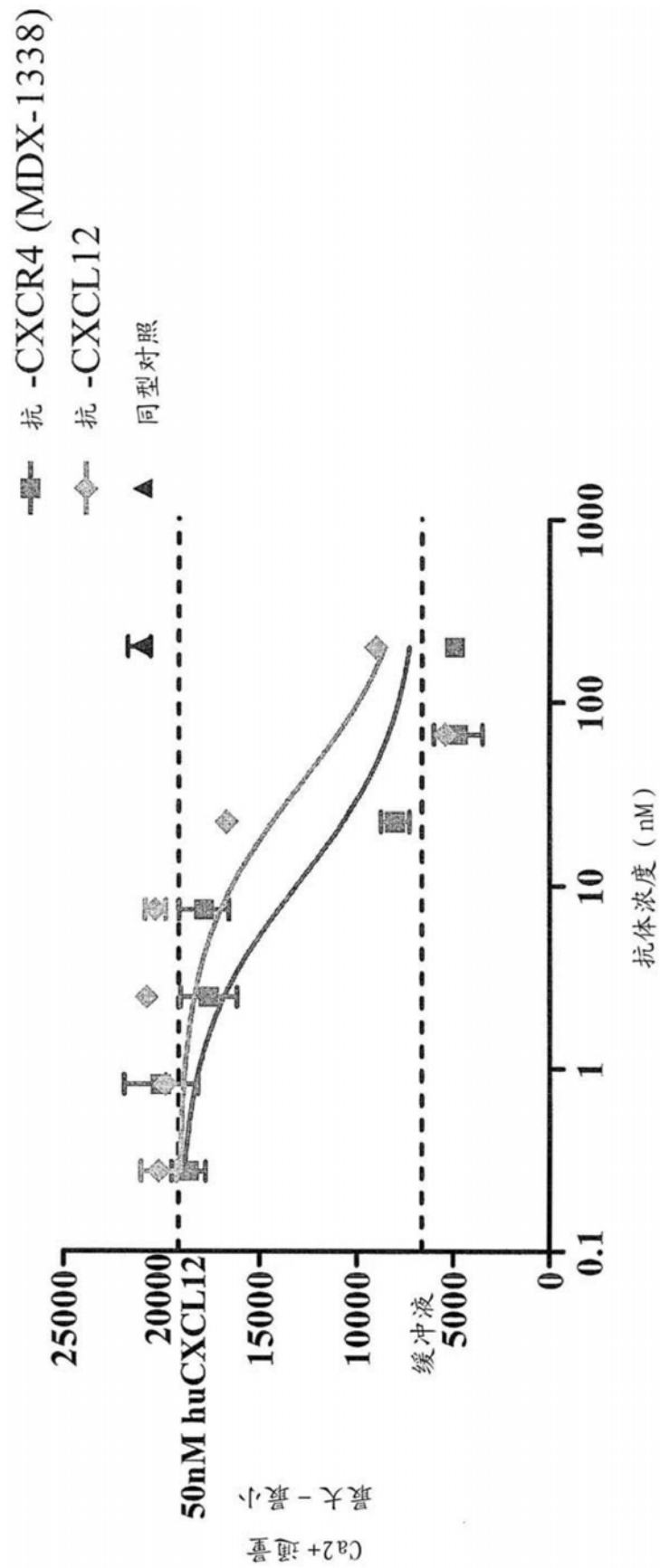


图8A

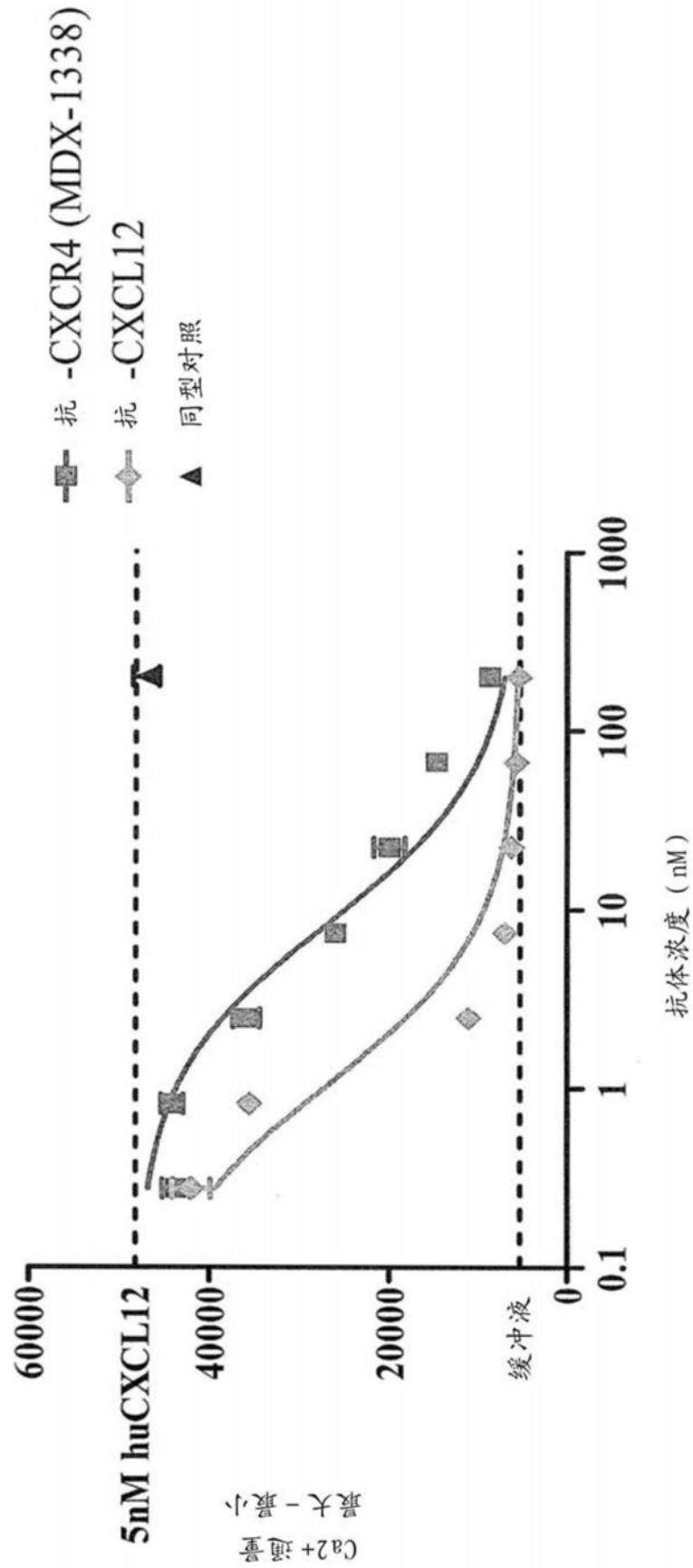
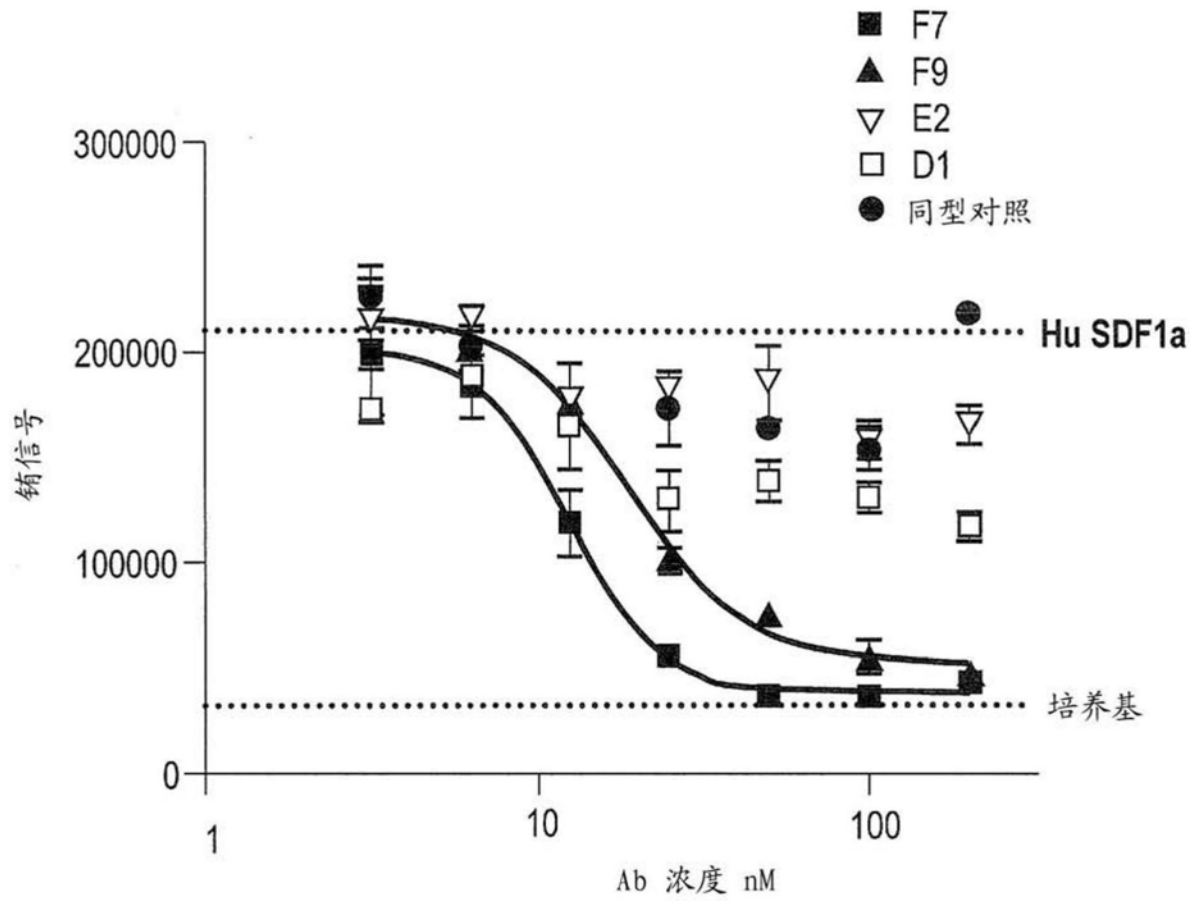


图8B



|      | F7    | F9    |
|------|-------|-------|
| EC50 | 12.44 | 18.99 |

图9

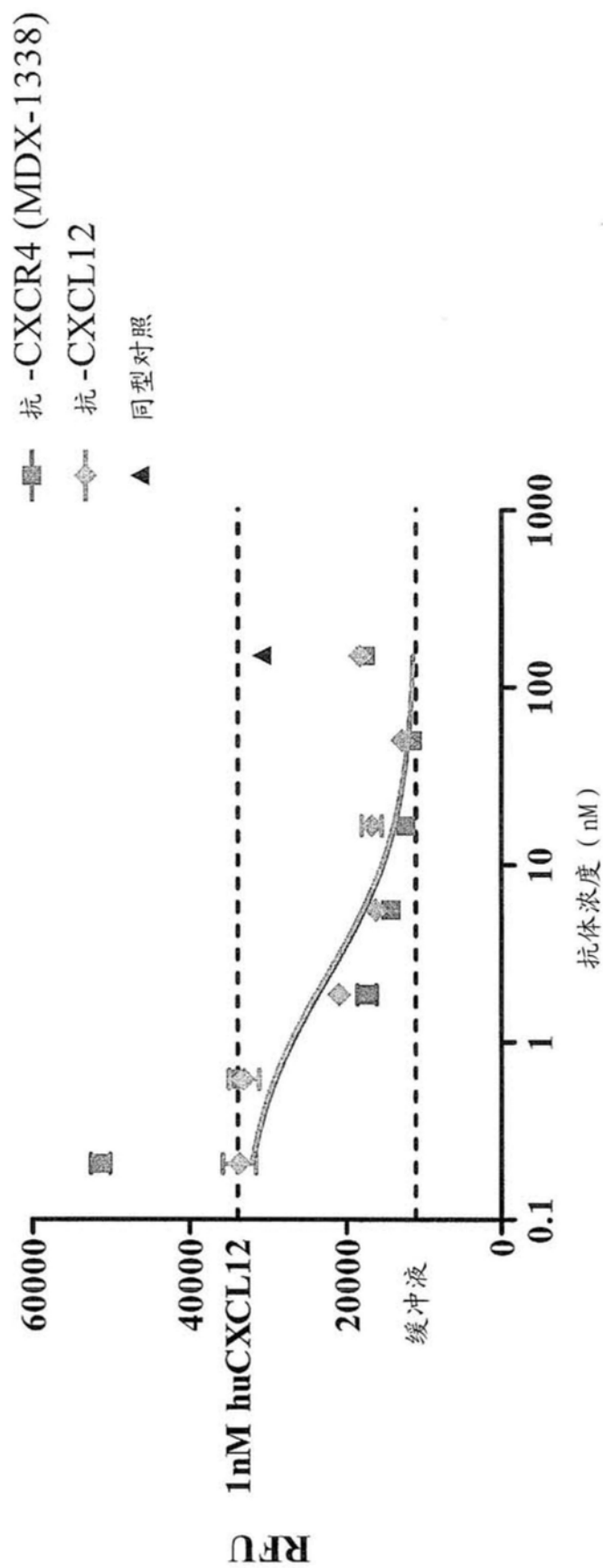


图10A



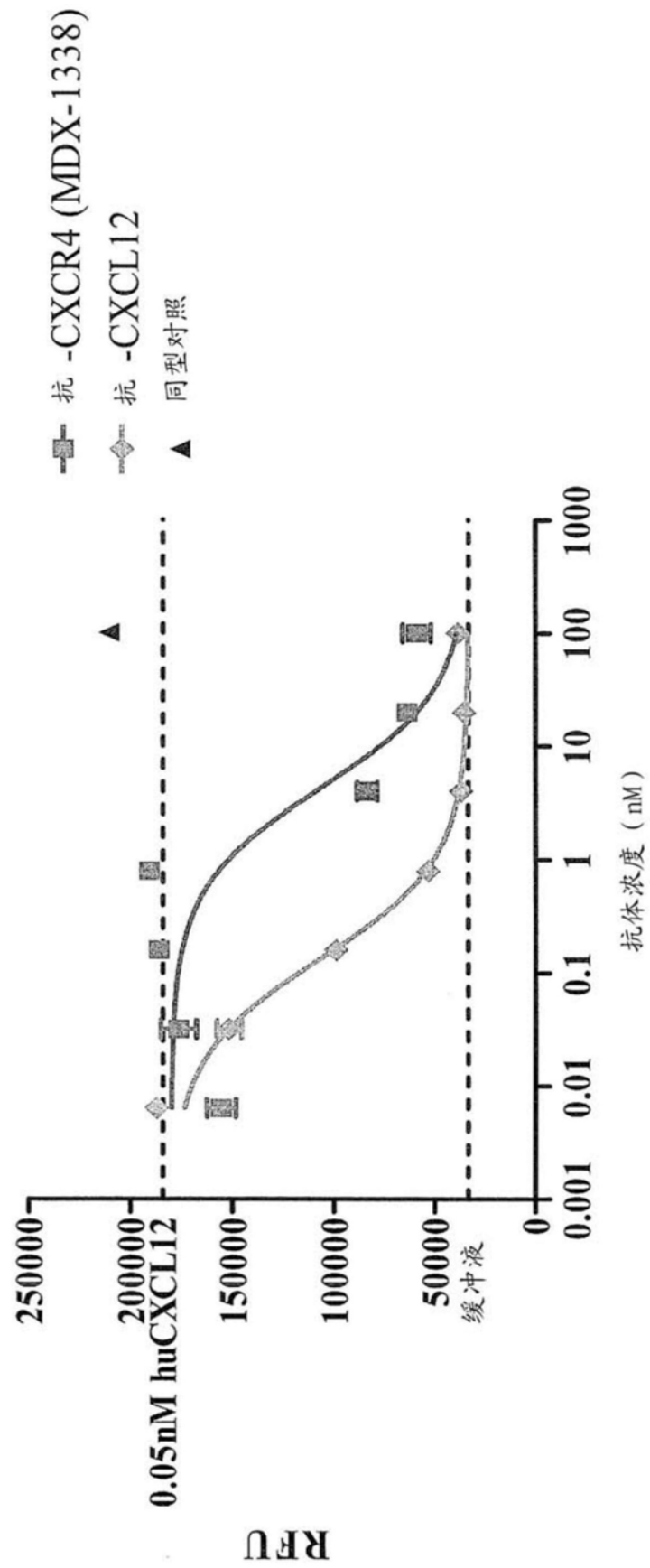


图10B

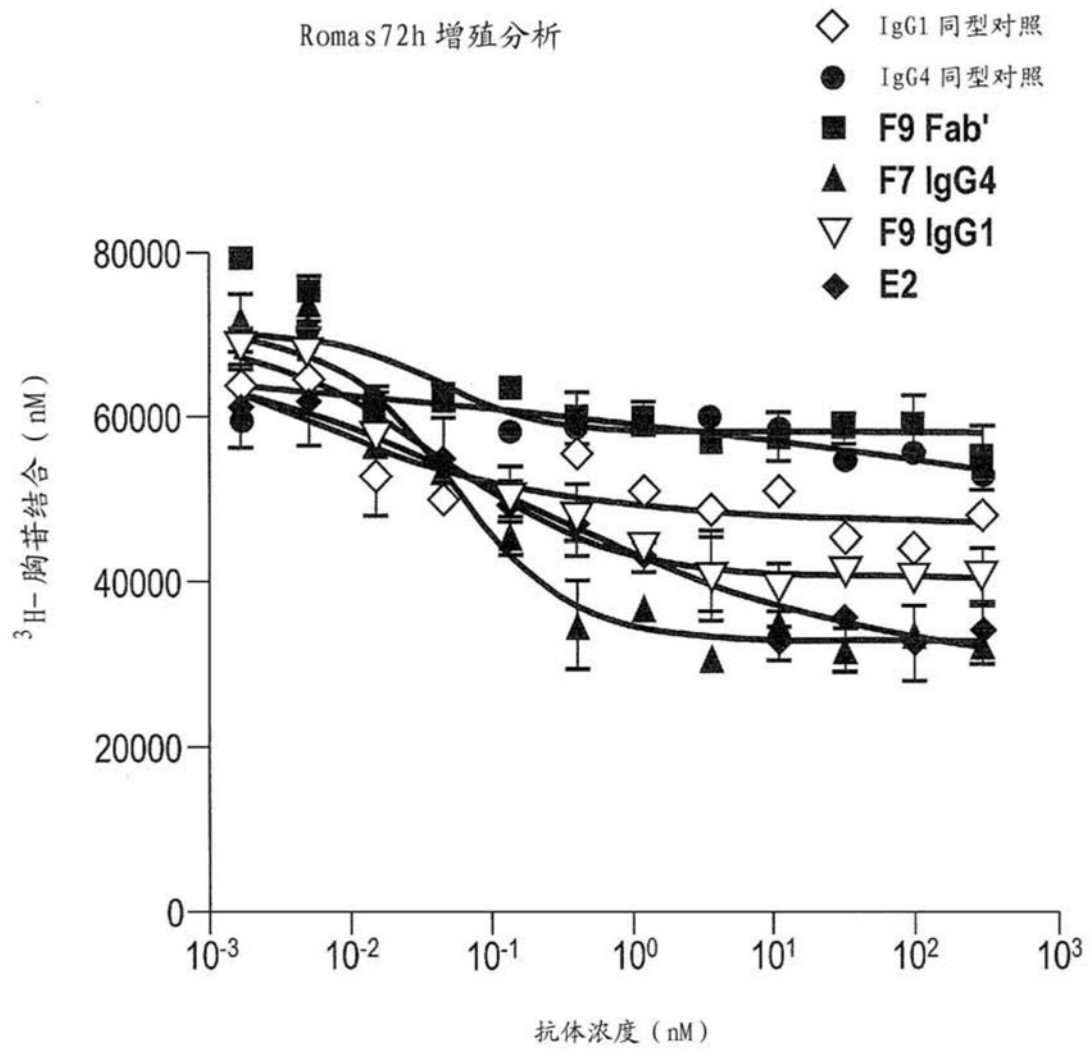


图11A

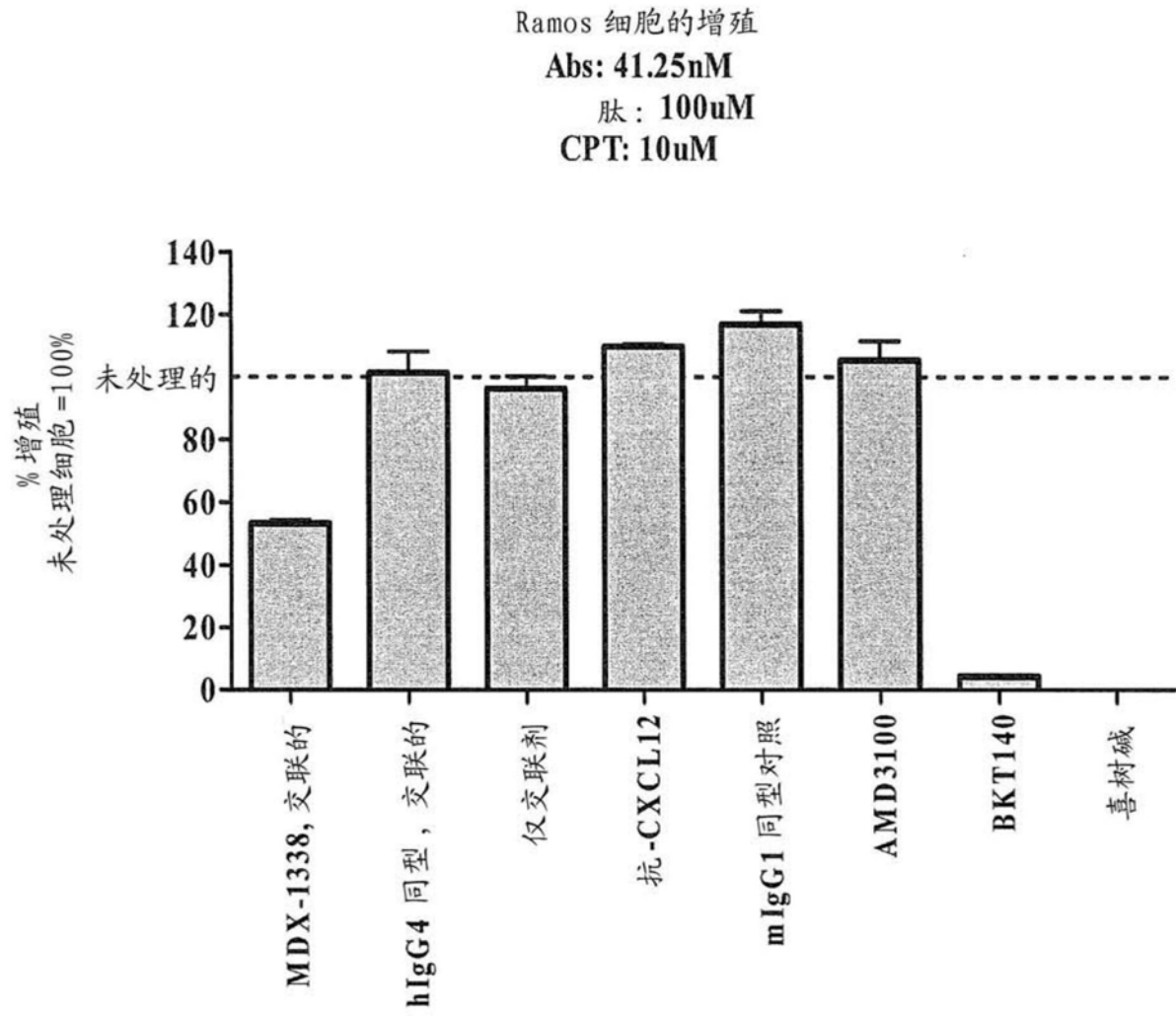


图11B

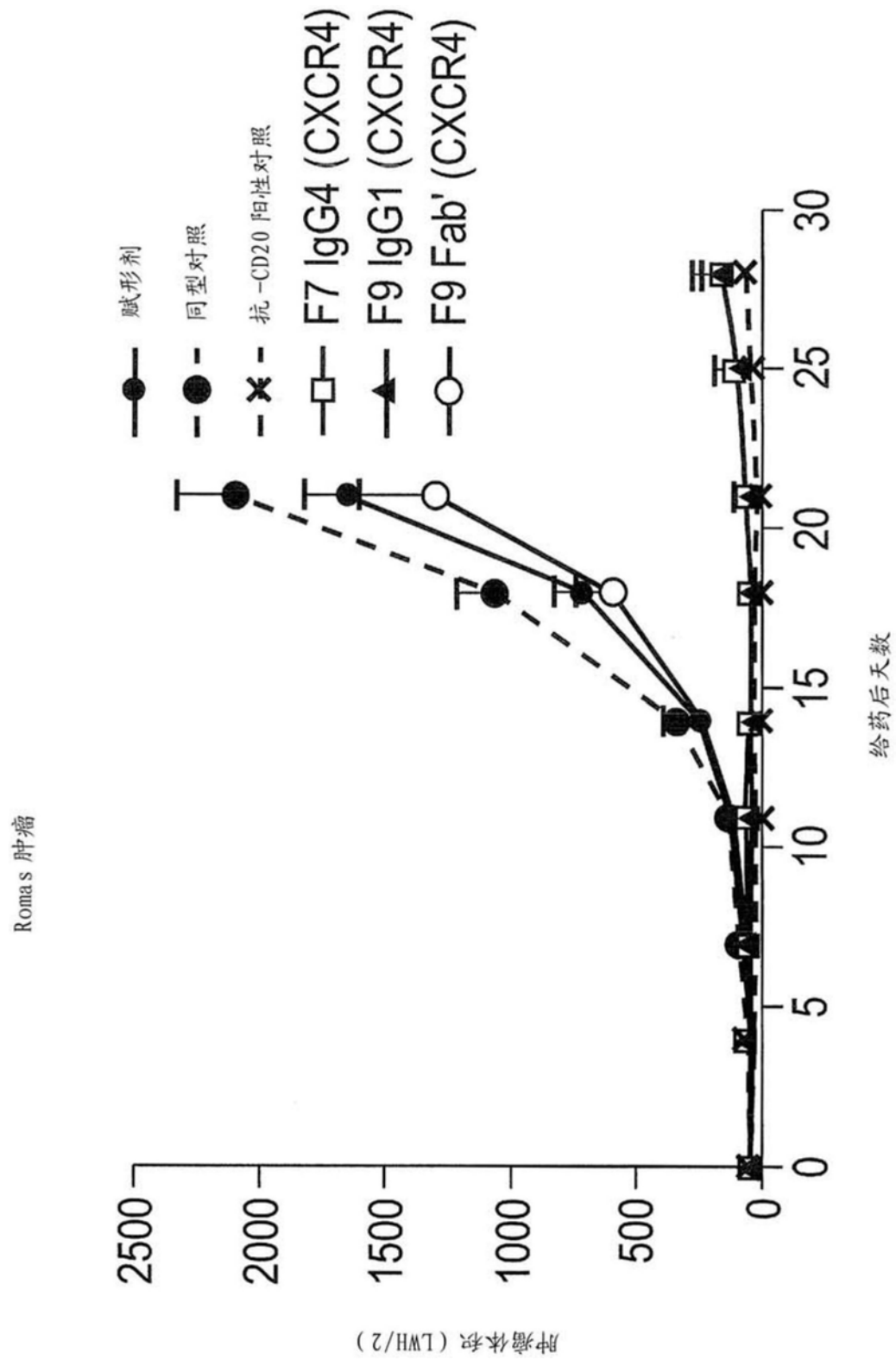


图12A

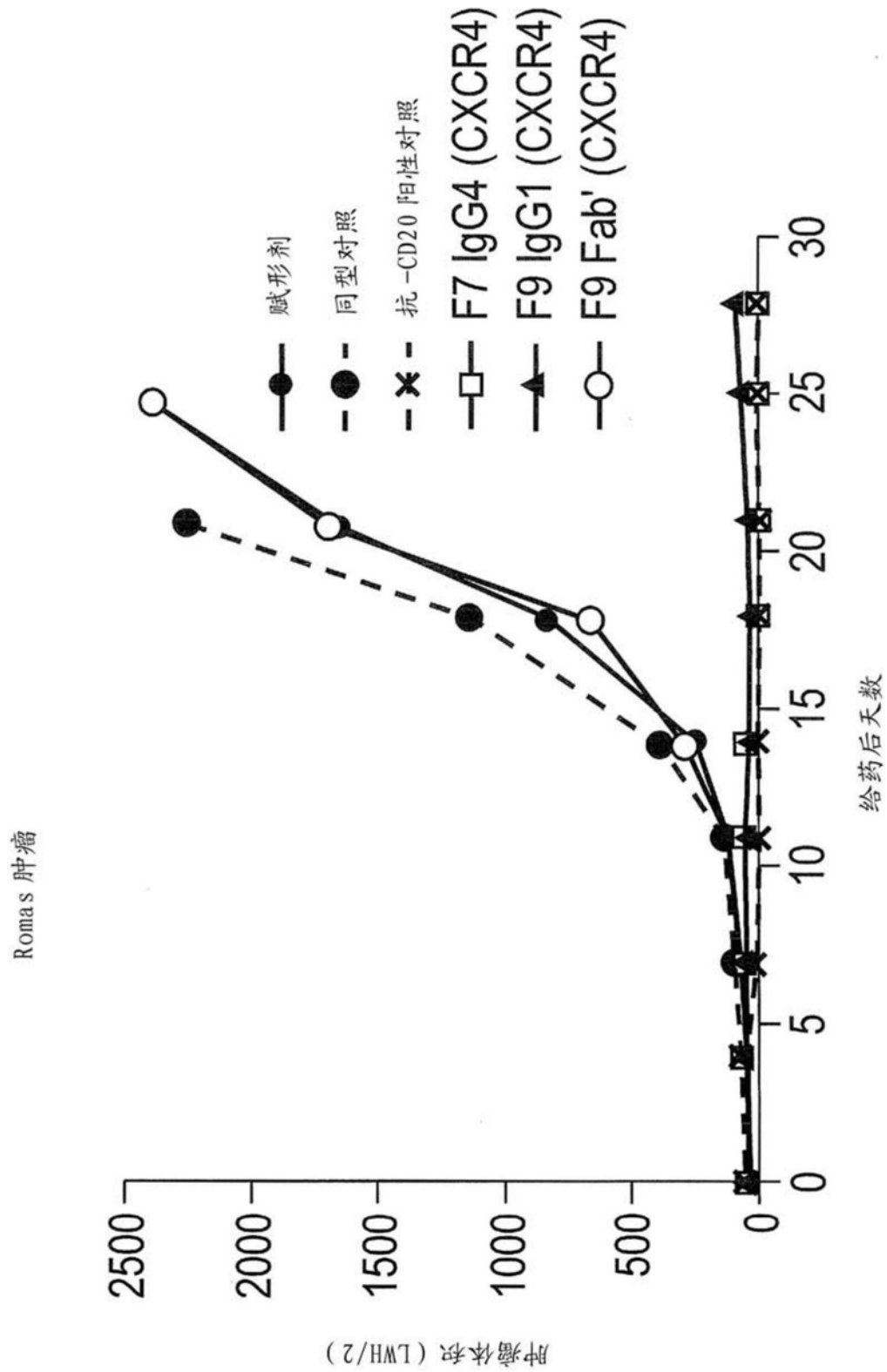


图12B

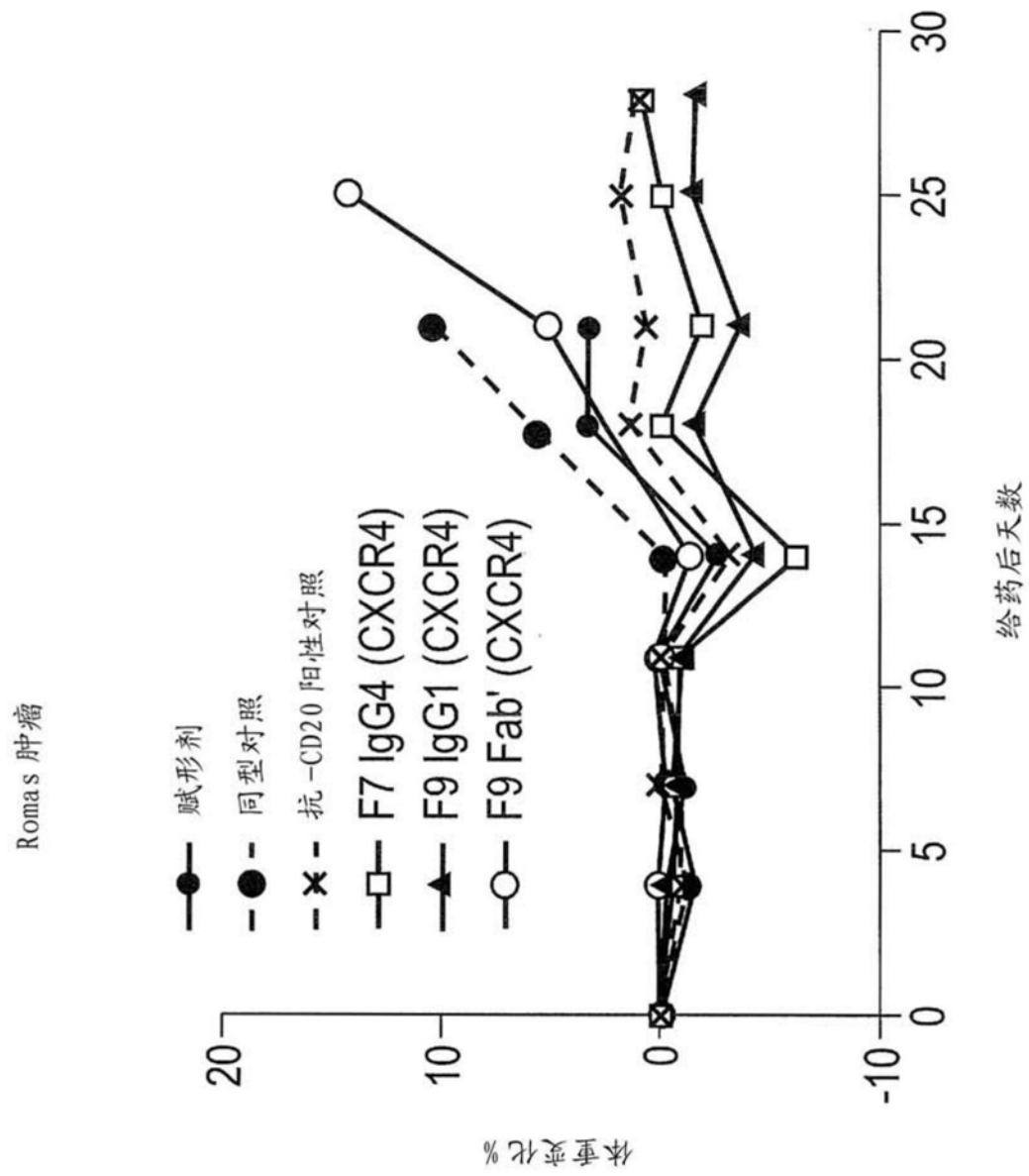


图12C

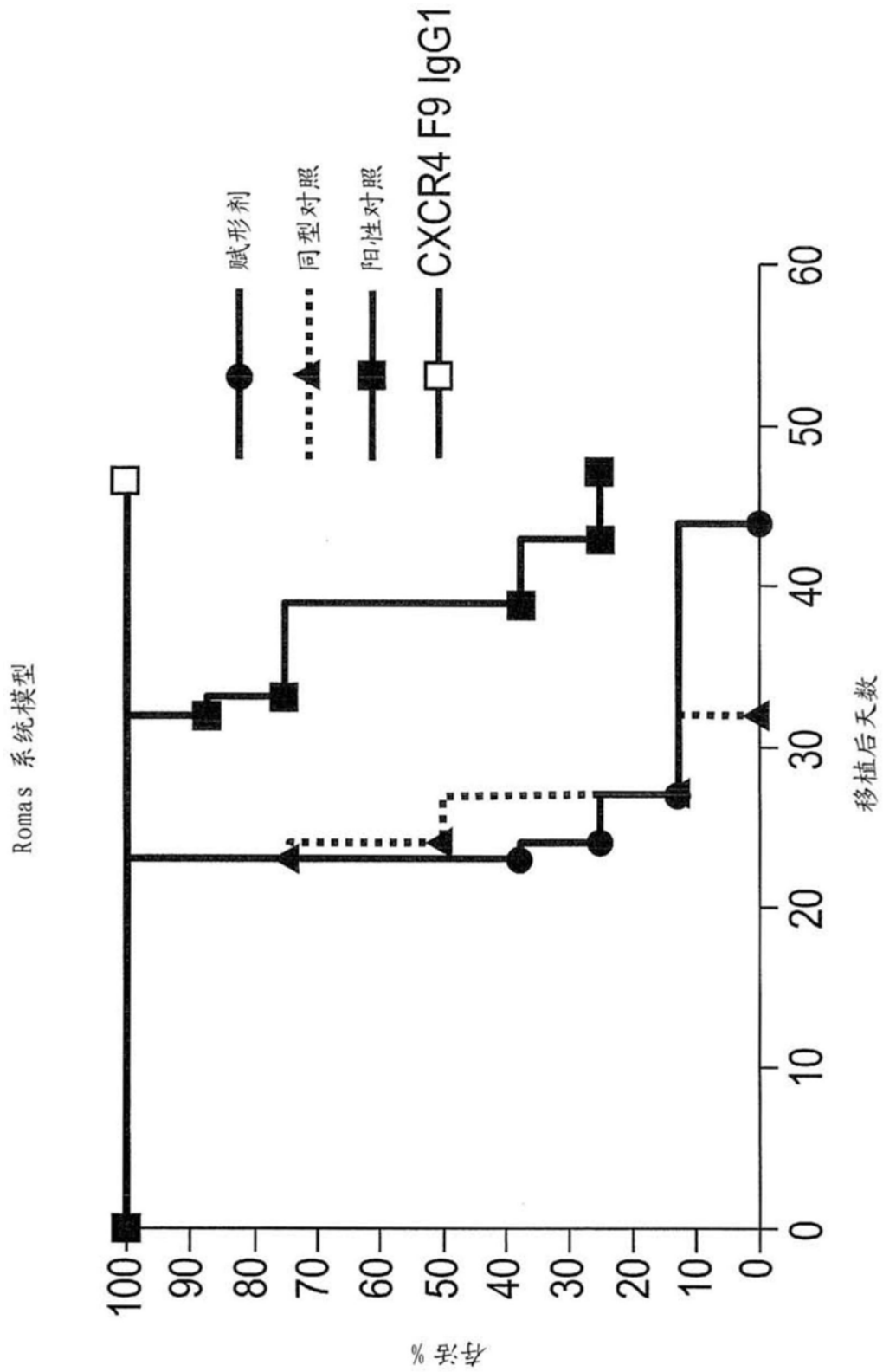


图13A

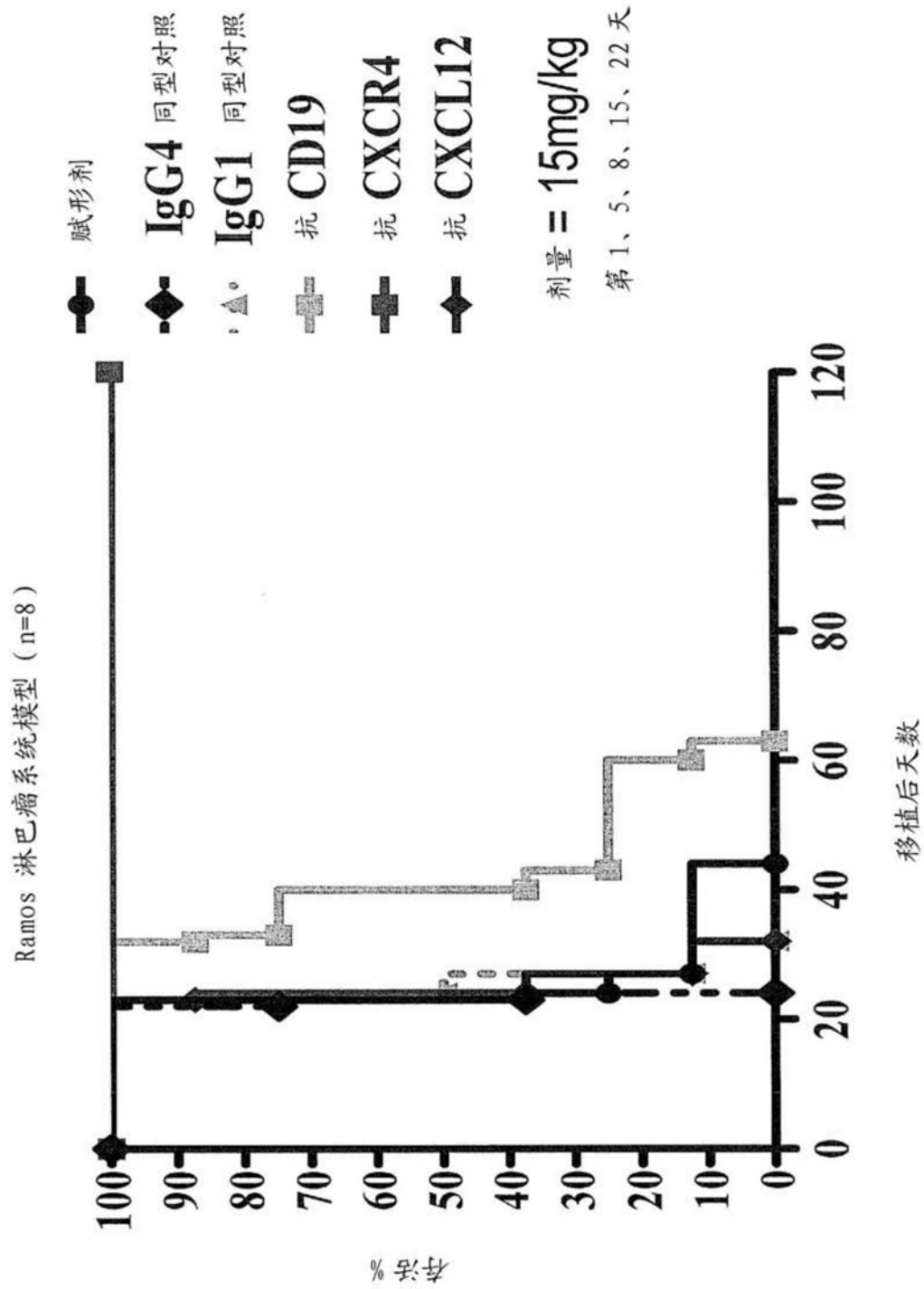


图13B



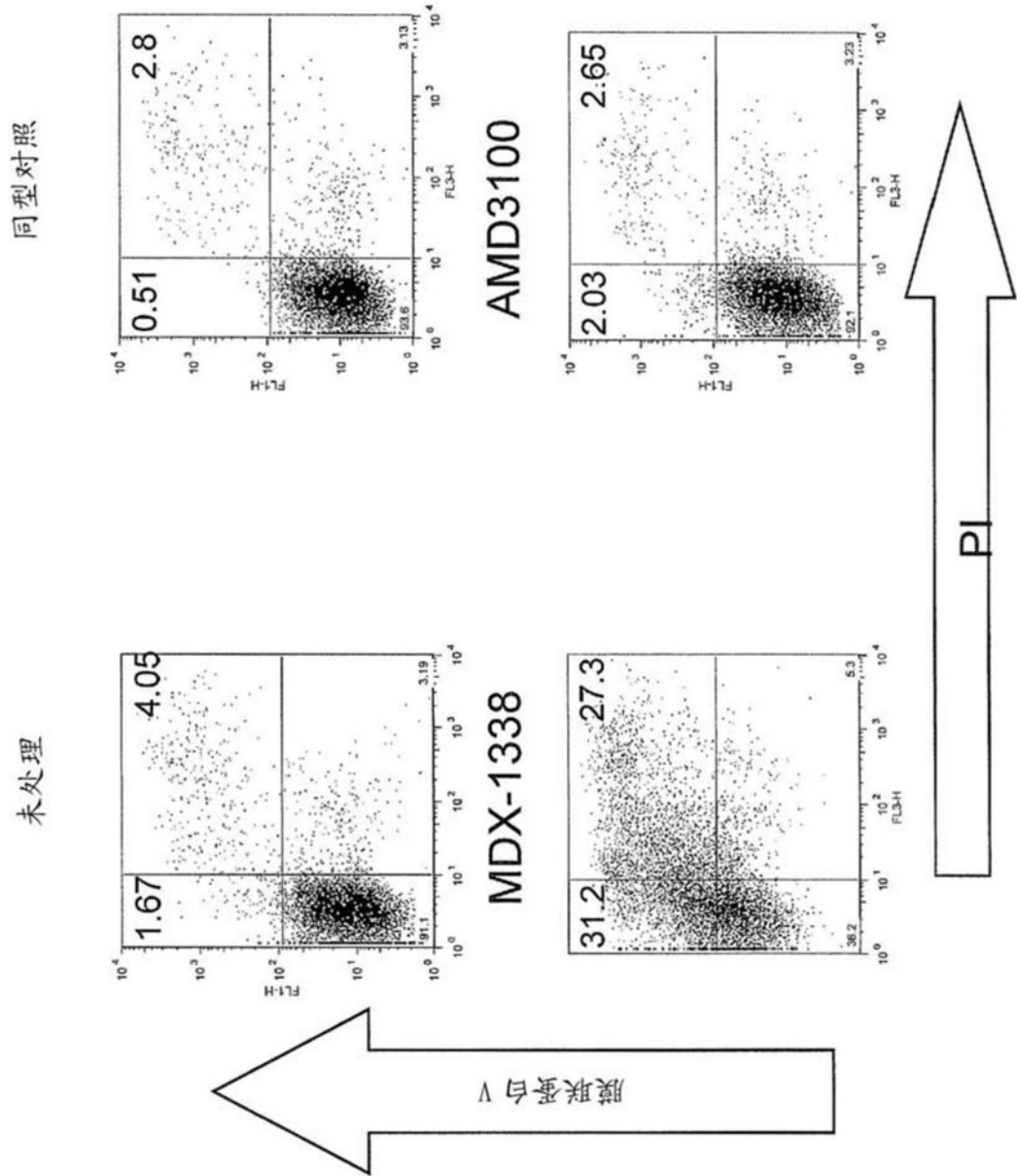


图14A

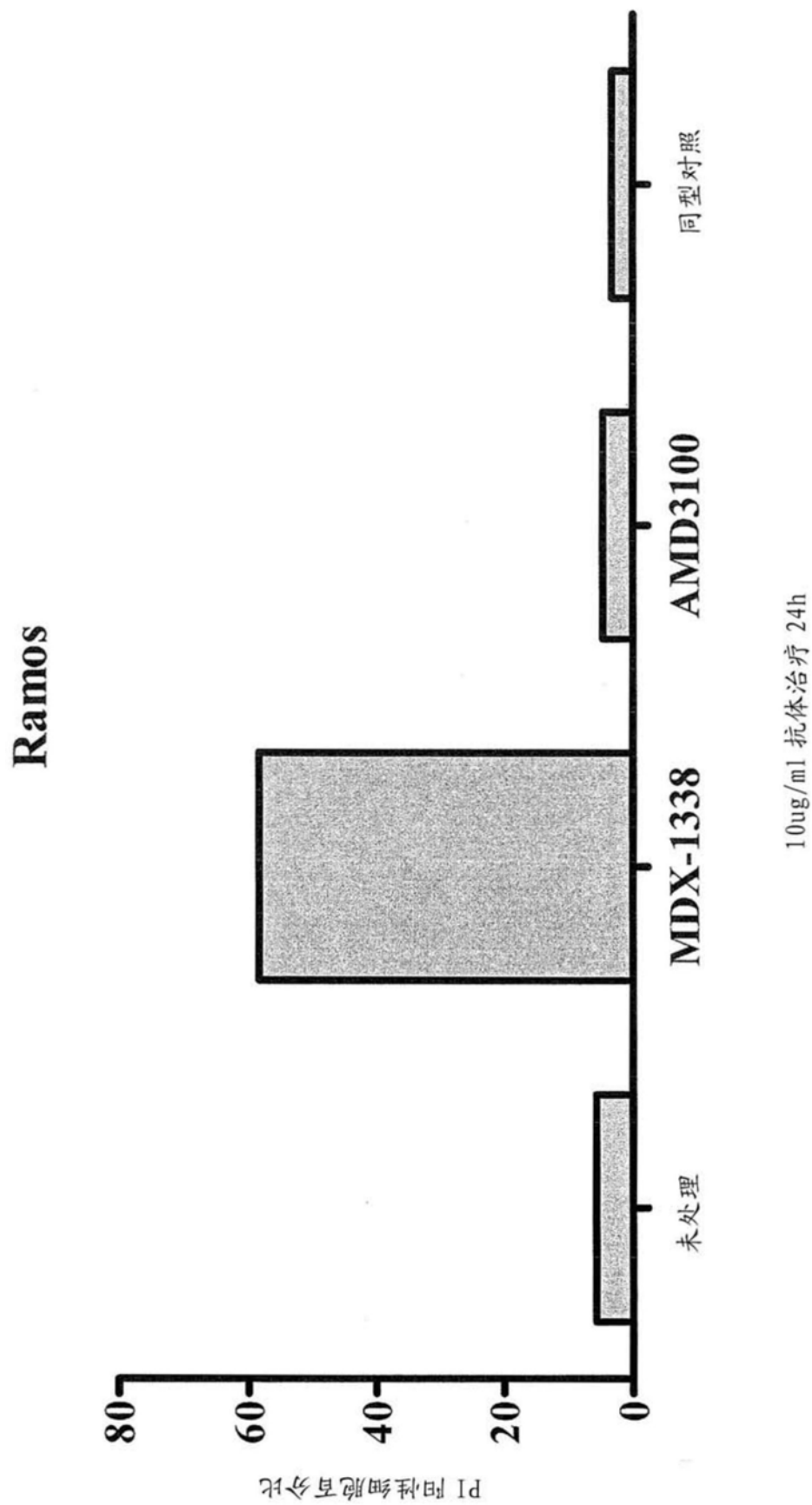


图14B

R1610-CXCR4 细胞

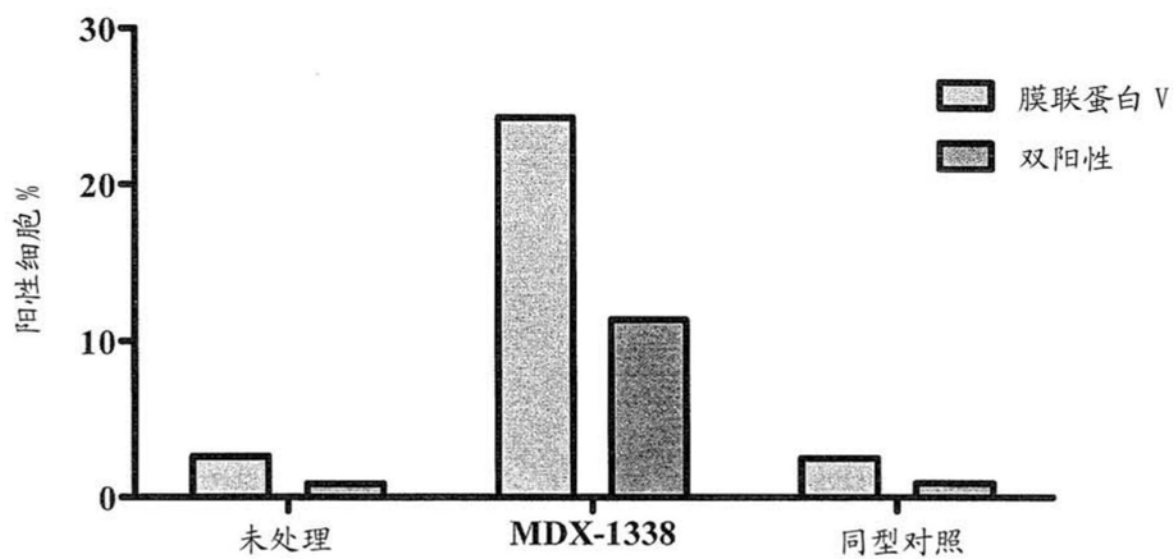


图15A

R1610 细胞

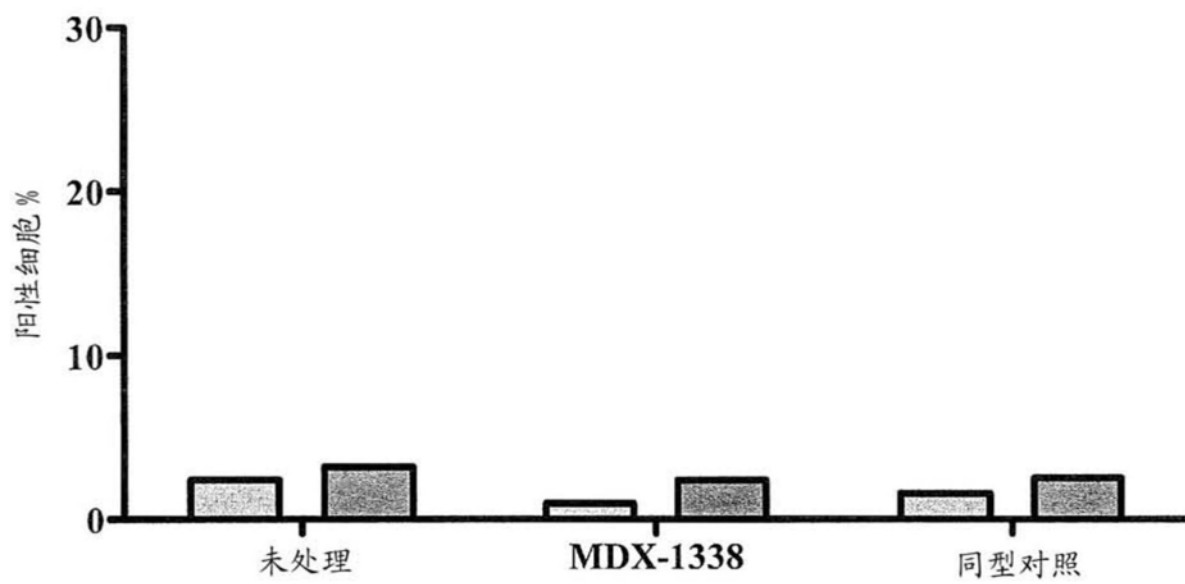


图15B

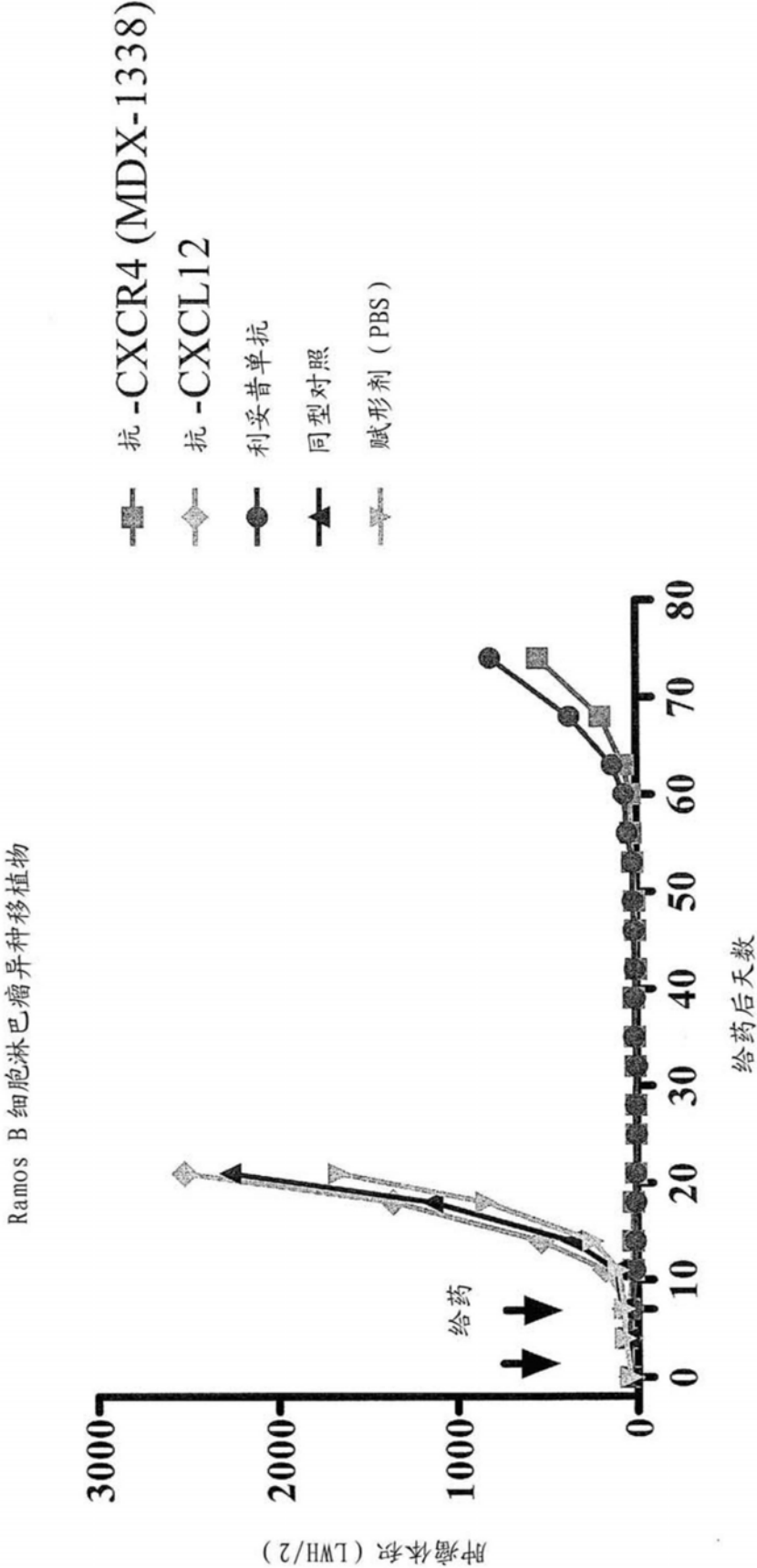


图16

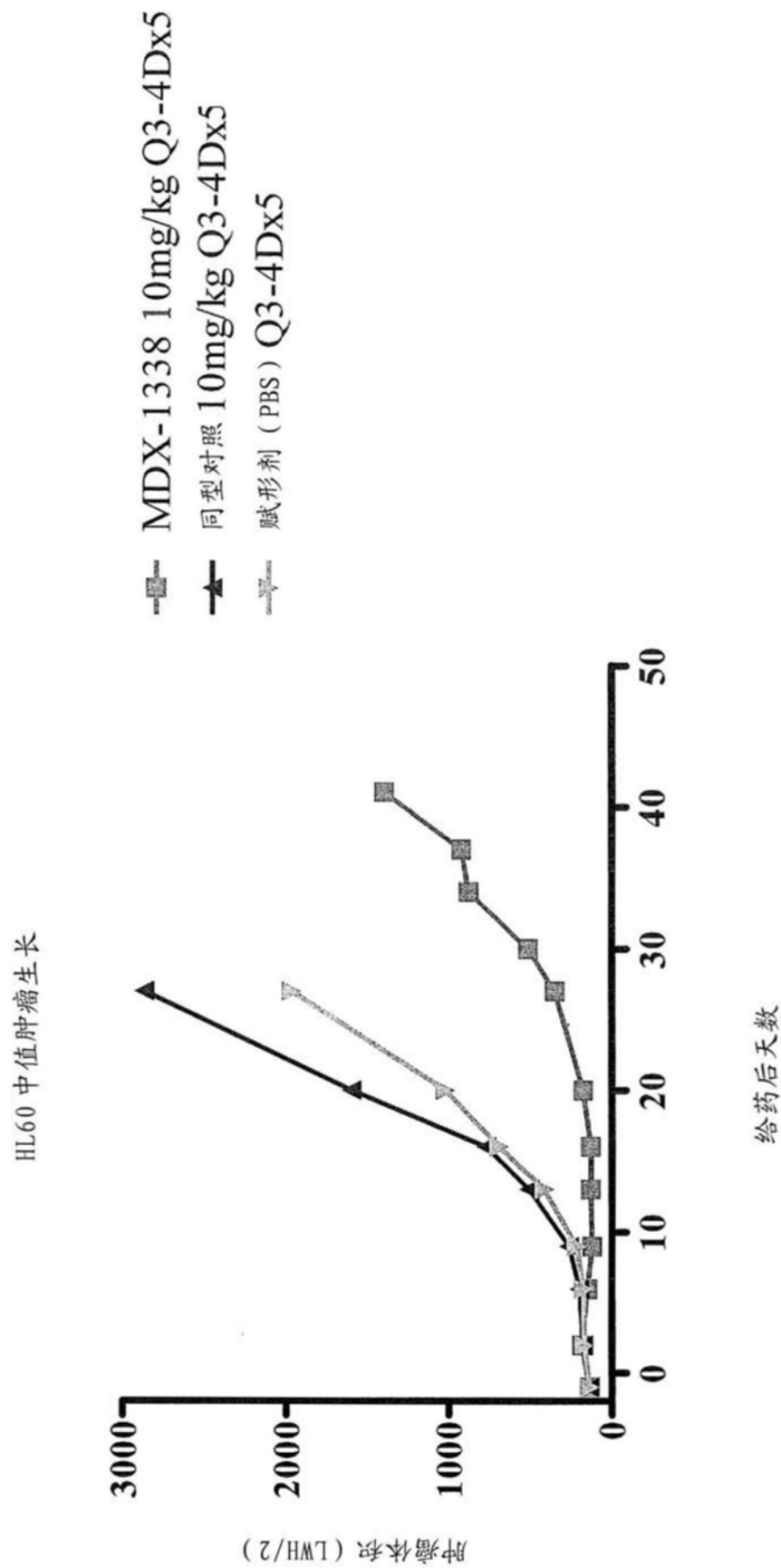


图17A

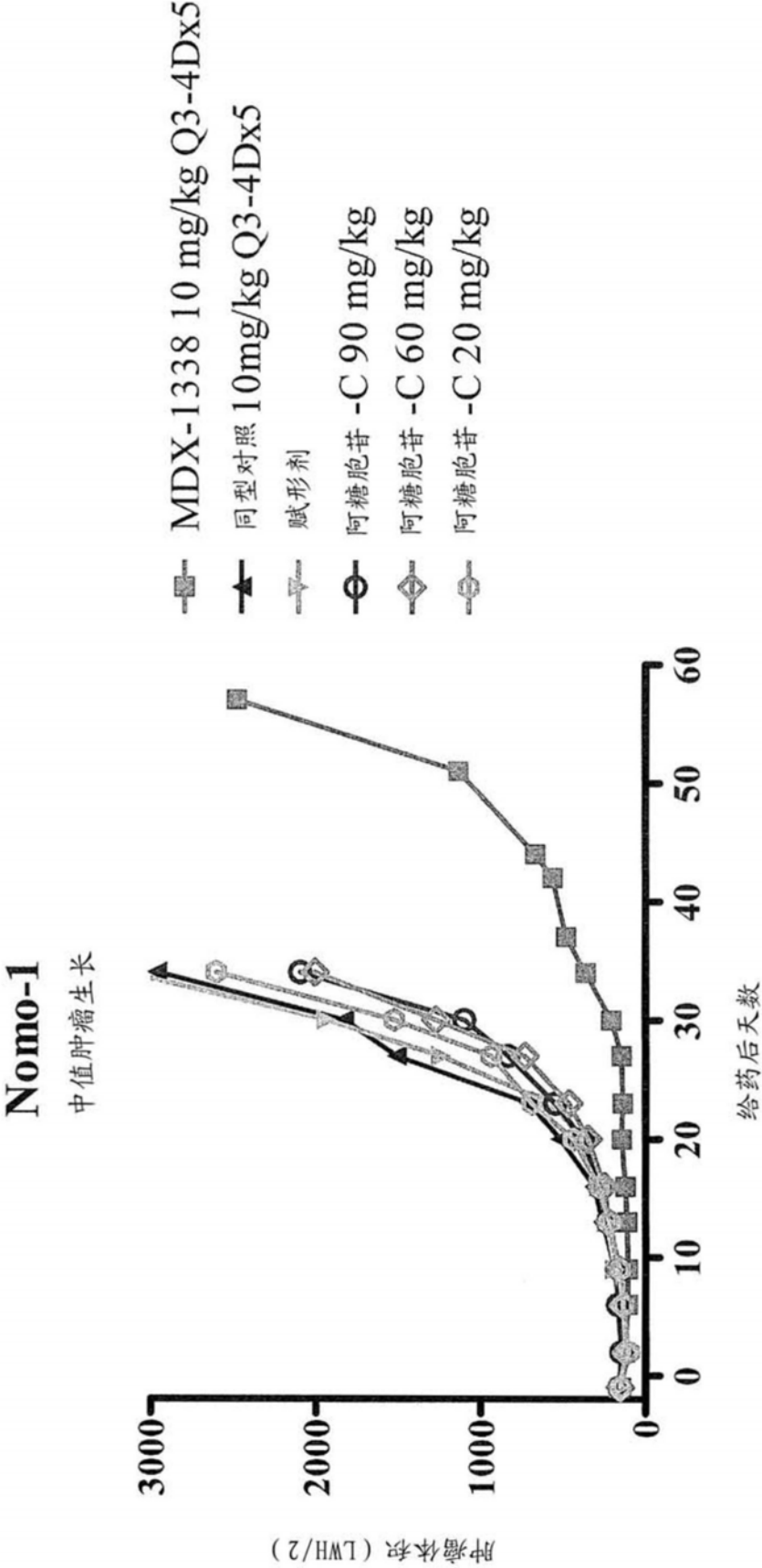


图17B

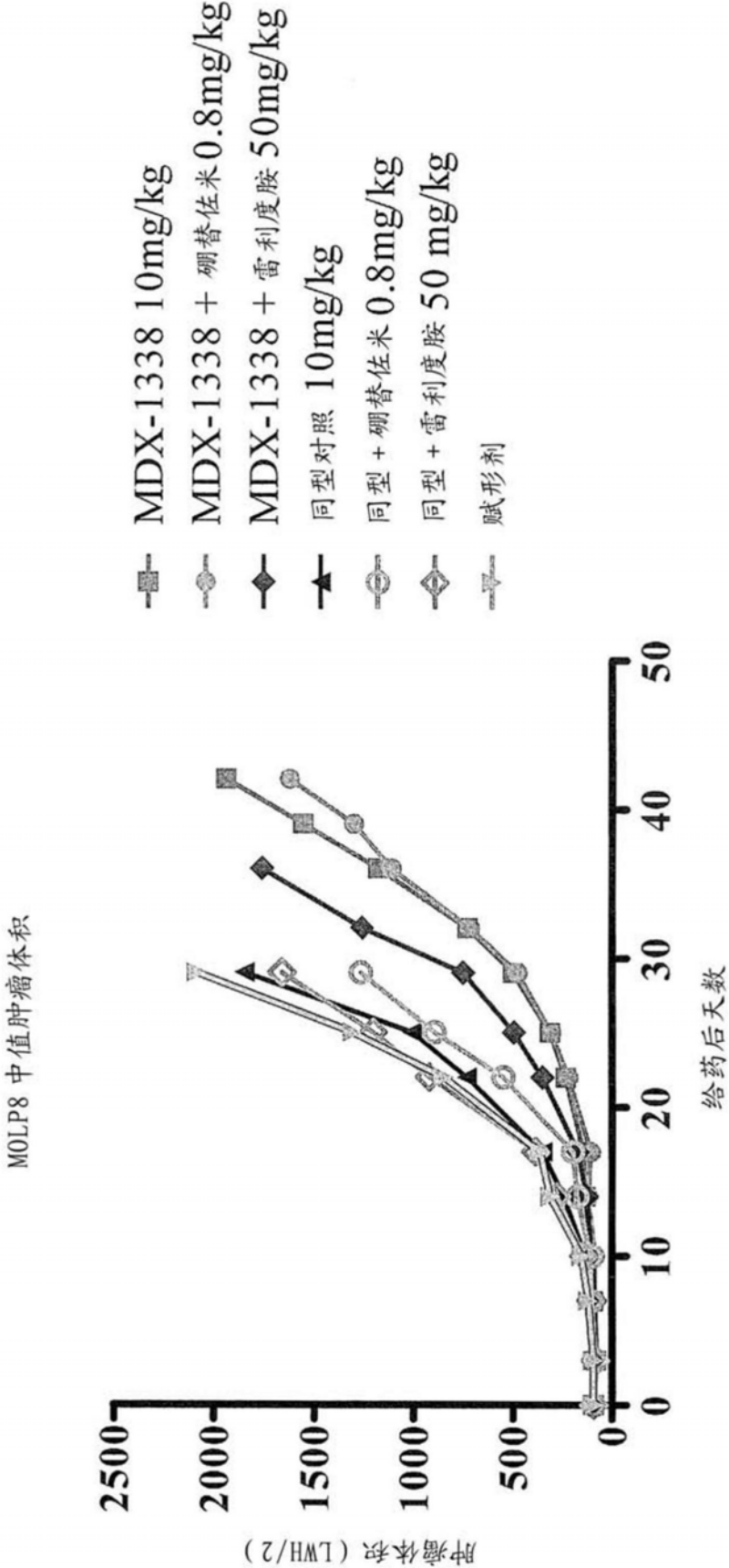


图18A

## JJN3-R

中值肿瘤生长

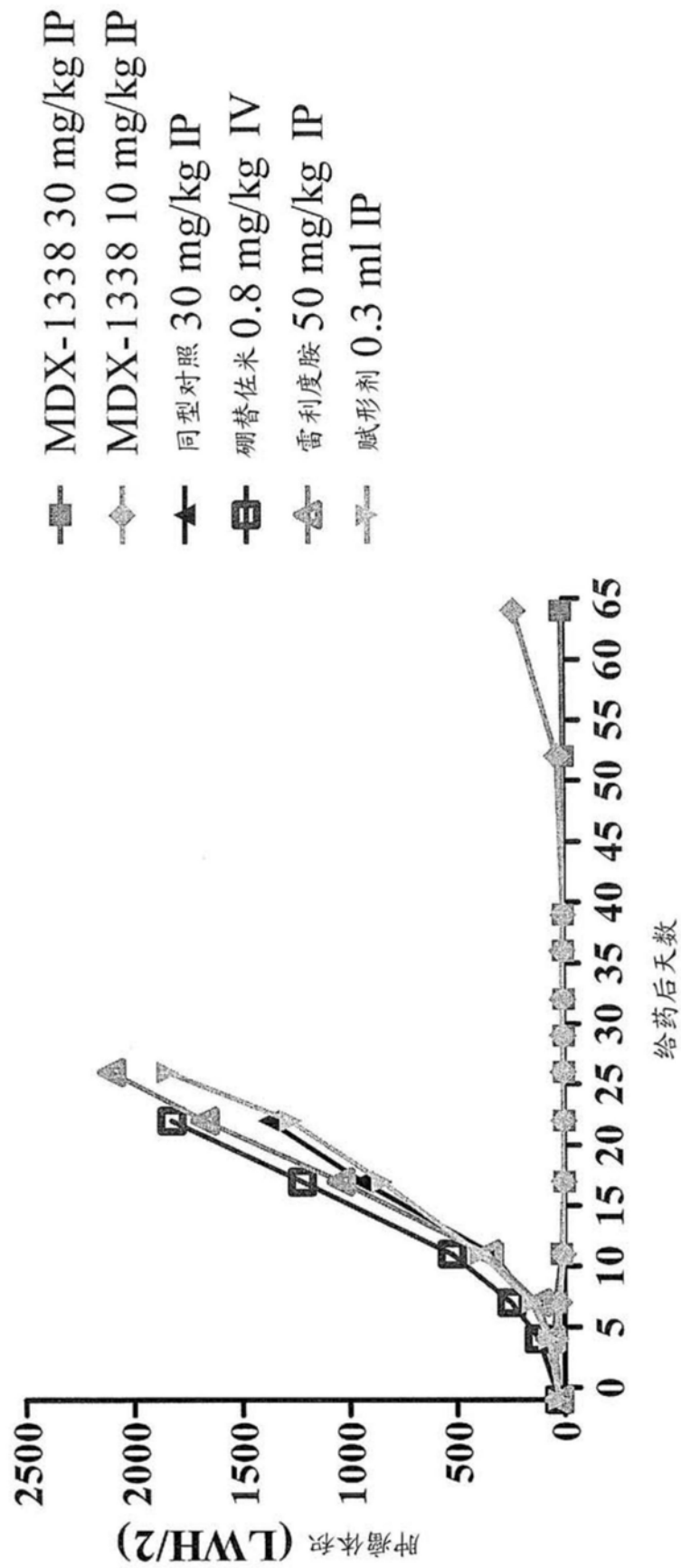


图18B



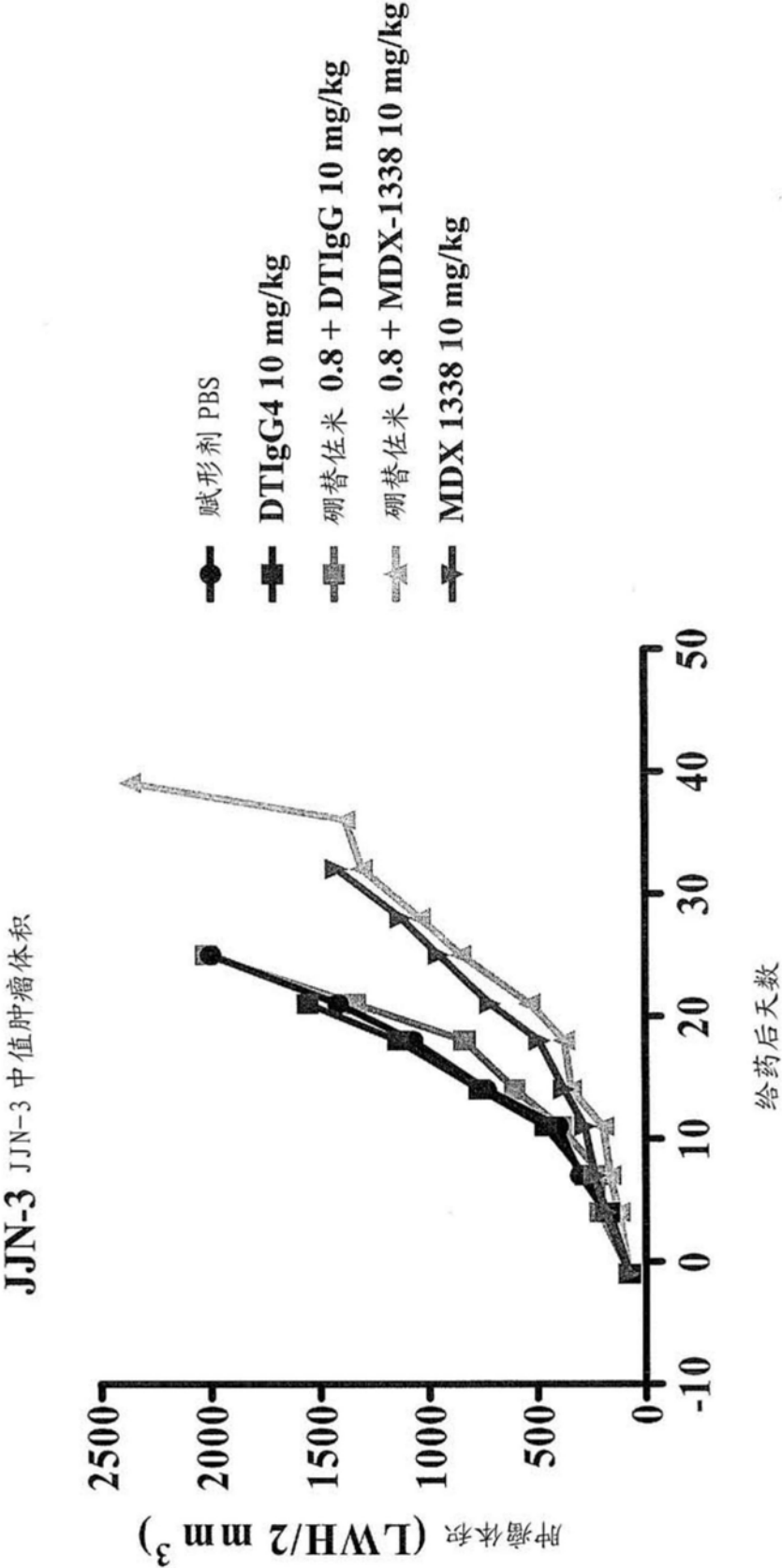


图18C

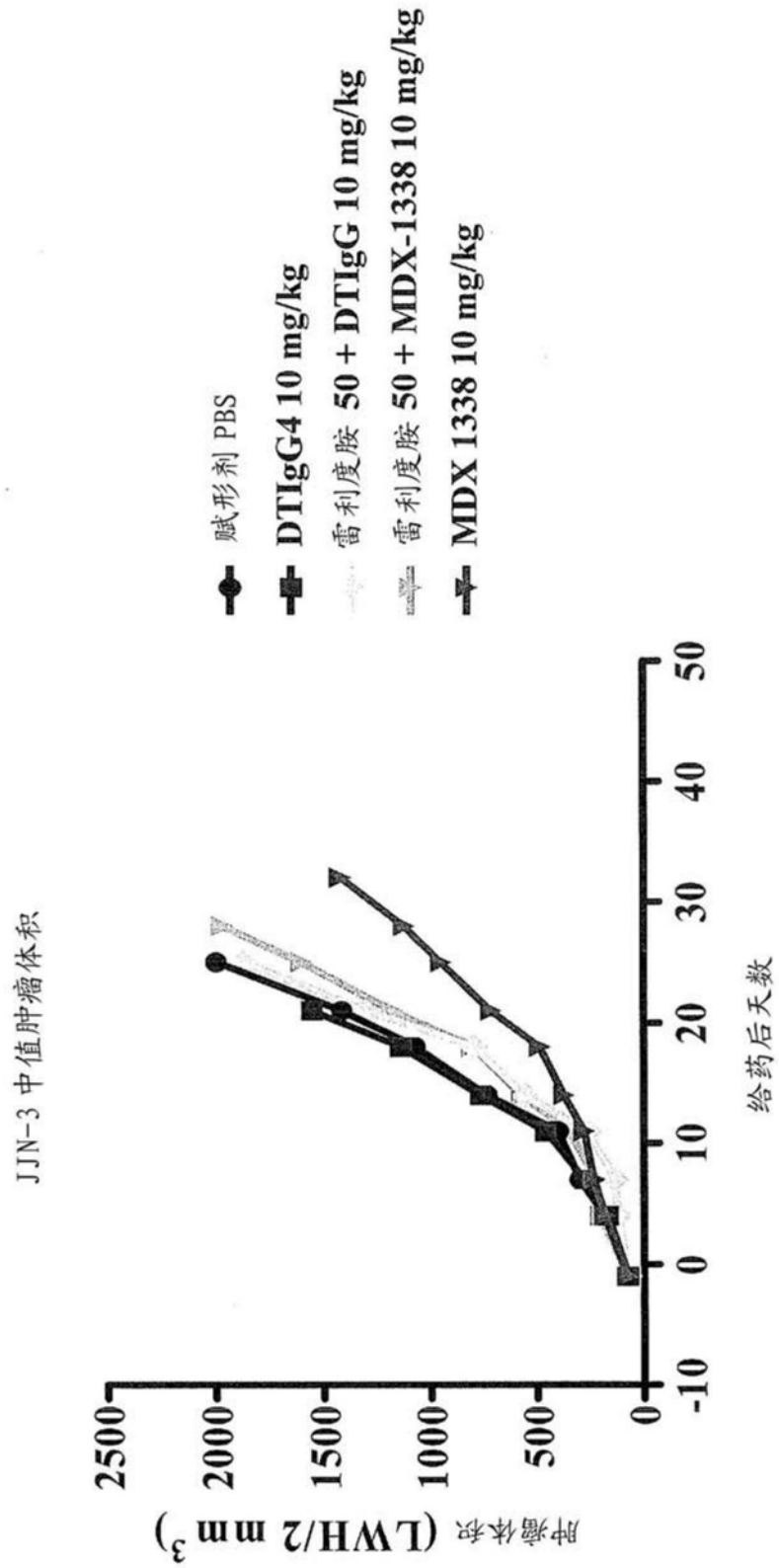


图18D

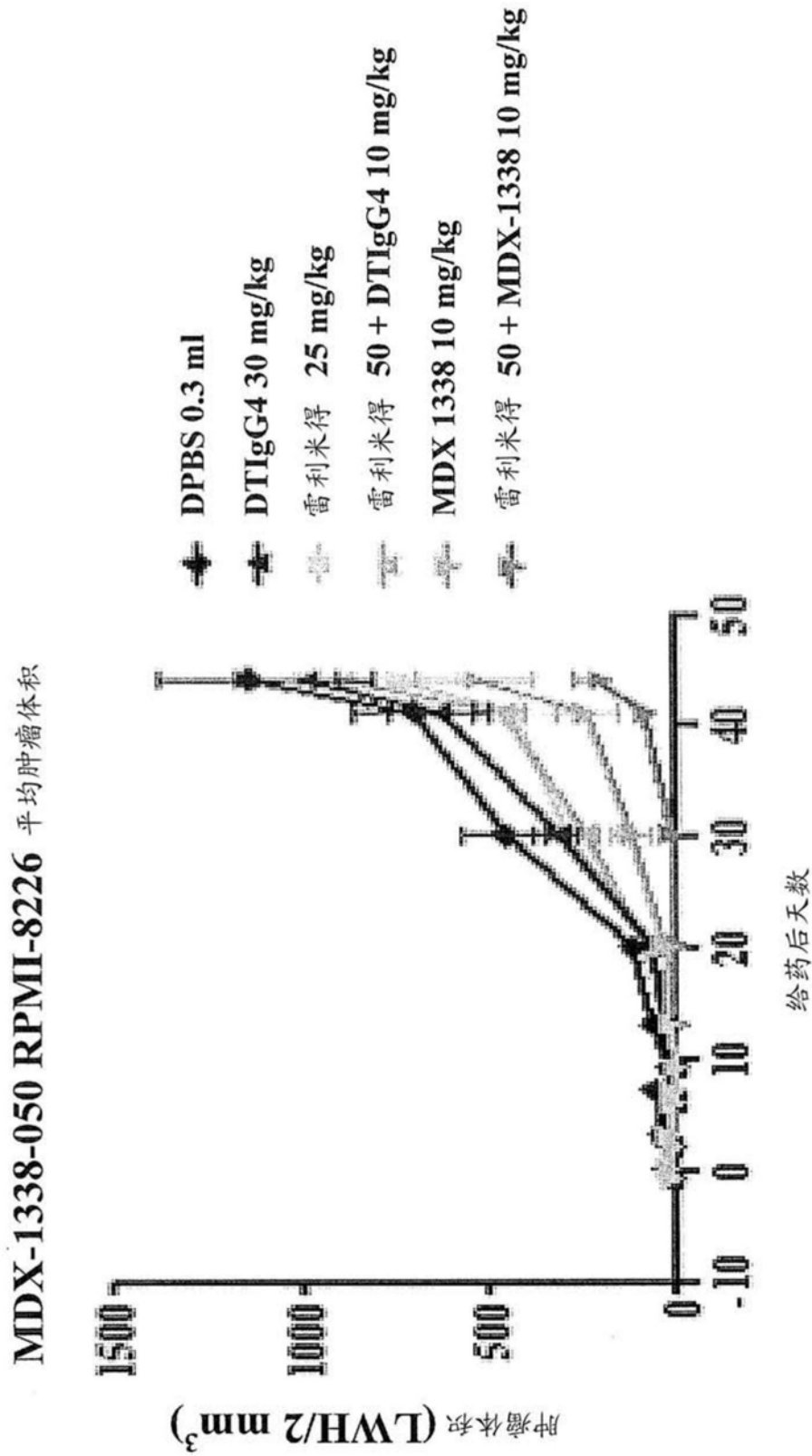


图18E

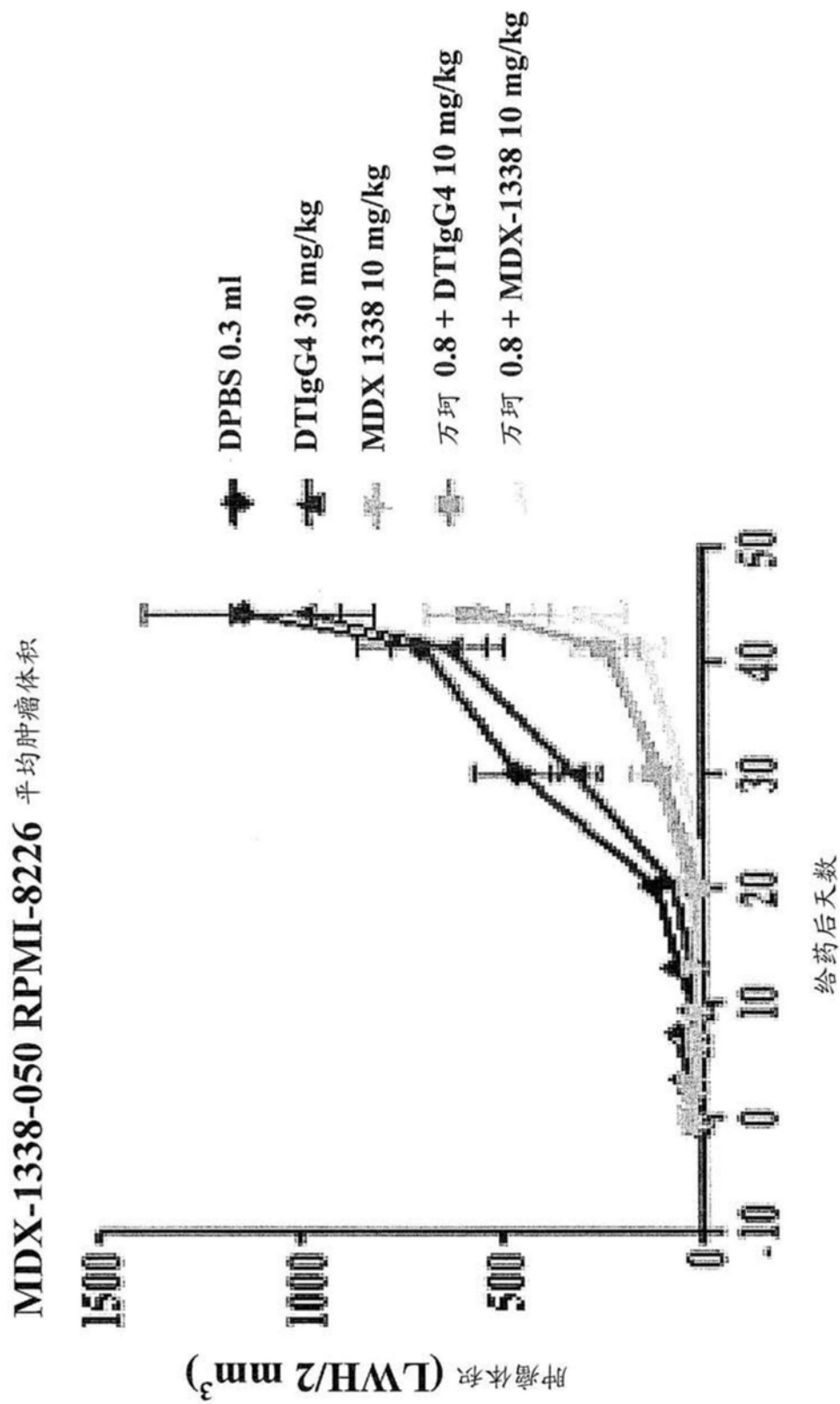


图18F

MDX-1338-049 MM1S 中值肿瘤体积

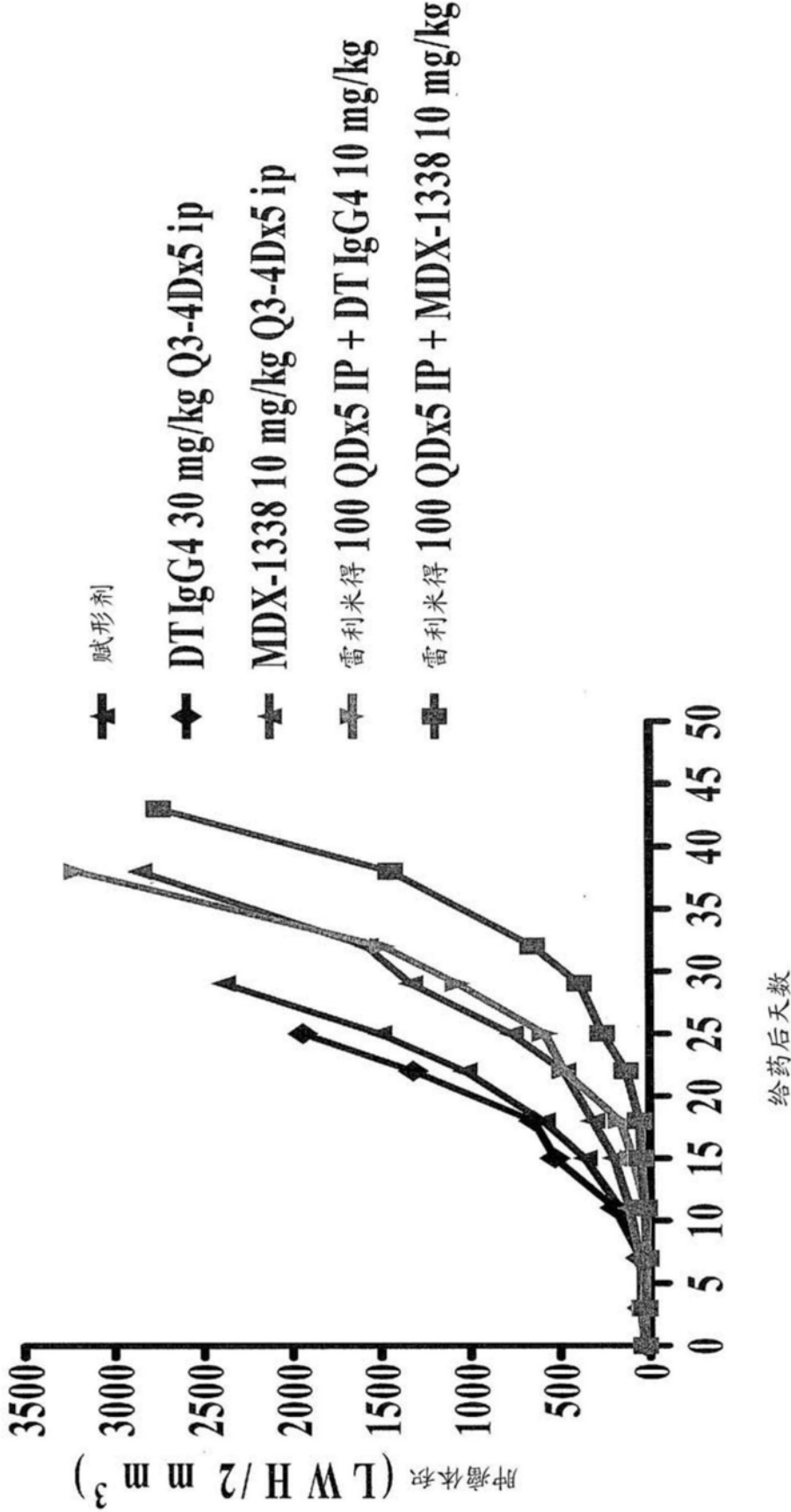


图18G

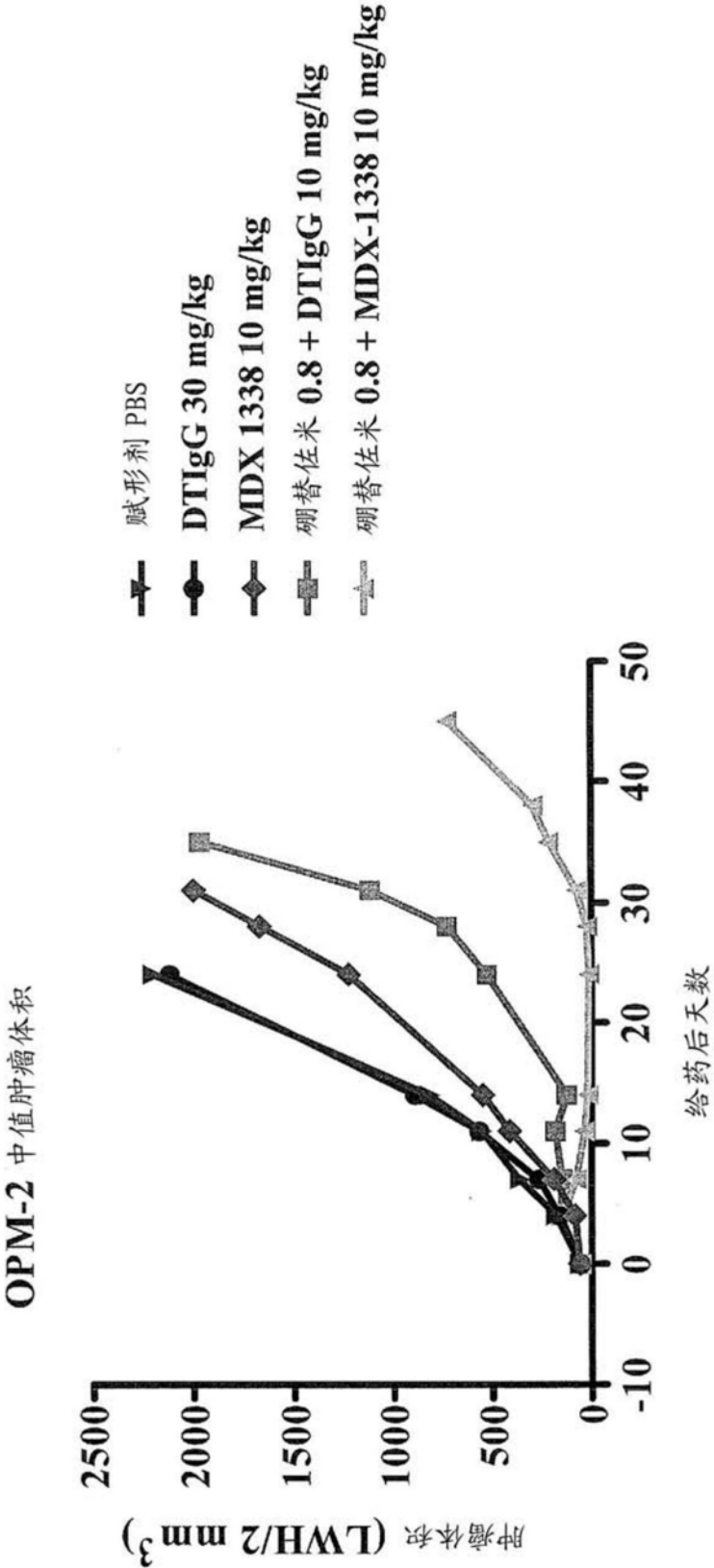


图18H

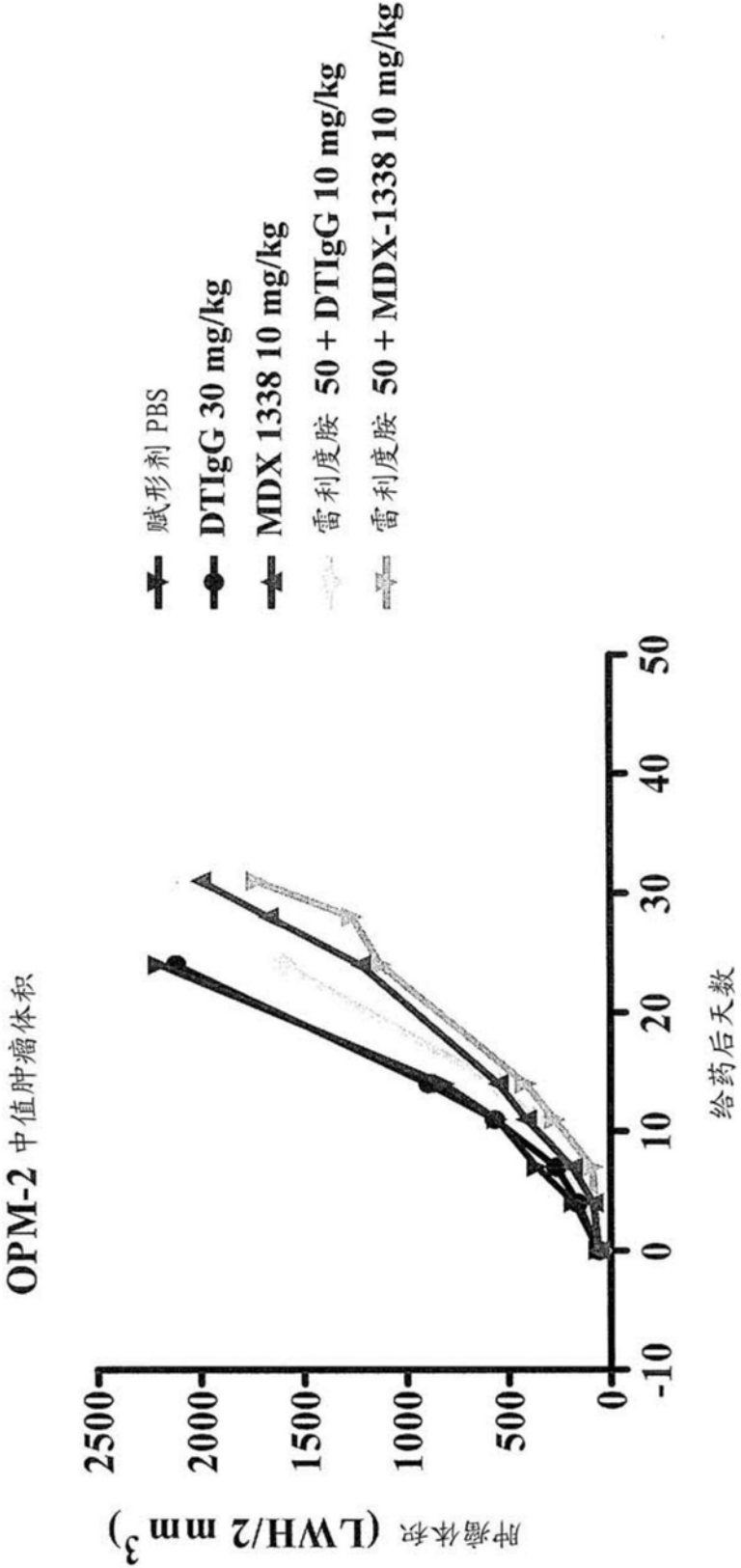


图18I