(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112513079 A
(43)申请公布日 2021.03.16

(21)申请号 201980018712.7
(22)申请日 2019.03.13
(30)优先权数据
62/642,313 2018.03.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2019/052042 2019.03.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/175802 EN 2019.09.19
(71)申请人 拉巴斯大学医院生物医学研究基金会
地址 西班牙马德里
申请人 卡洛斯三世肿瘤研究中心公共资产基金会

(72)发明人 M·维拉昆卡 P·冈萨雷斯纳瓦罗 J·瓦伦丁基罗加 A·埃斯库德罗洛佩兹 L·费尔南德斯卡萨诺娃 A·佩雷斯马丁内斯

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 史文静 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

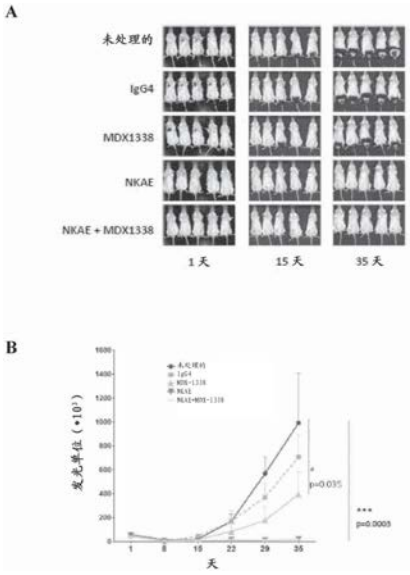
权利要求书3页 说明书33页
序列表13页 附图12页

(54)发明名称

用于癌症免疫疗法的联合激活和扩增的自然杀伤细胞的抗CXCR4抗体

(57)摘要

本公开内容提供了一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括将治疗有效量的分离的自然杀伤(NK)细胞(优选激活的和扩增的NK(NKAE)细胞)群和特异性结合癌细胞的表面上表达的C-X-C趋化因子受体4(CXCR4)的抗体或其抗原结合部分的组合施用于受试者。



CN 112513079 A

1.一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法,包括将治疗有效量的以下的组合施用于受试者:

(a)分离的自然杀伤(NK)细胞群;和

(b)分离的特异性结合癌细胞表面上表达的C-X-C趋化因子受体4(CXCR4)的抗体或其抗原结合部分。

2.权利要求1的方法,其中NK细胞群包括激活和扩增的NK(NKAE)细胞。

3.权利要求2的方法,其中通过用IL-2、IL-12、IL-15和/或IL-21联合饲养细胞刺激NK细胞来产生NKAE细胞。

4.权利要求2或3的方法,其中通过用(i)照射过的经修饰来表达膜结合形式的白细胞间介素-15(IL-15)和41BB配体的β-类淋巴母细胞和(ii)白细胞介素-2(IL-2)培养来自健康供体的外周血单核细胞来产生NKAE细胞。

5.权利要求4的方法,其中修饰的β-类淋巴母细胞是K562-mb15-41BBL细胞。

6.权利要求1-5任一项的方法,其中通过静脉内、动脉内、腹膜内或鞘内注射,或注射至肿瘤切除腔中,将NK细胞施用于受试者。

7.权利要求1-6任一项的方法,其中每周将范围为约10^6至约10^{14}个的所述NK细胞的剂量施用于受试者。

8.权利要求1-5任一项的方法,其中抗体或其抗原结合部分是单克隆抗体或其抗原结合部分。

9.权利要求1-8任一项的方法,其中受试者是人,并且抗体或其片段结合人CXCR4受体。

10.权利要求1-9任一项的方法,其中抗体或其抗原结合部分破坏CXCR4和C-X-C基序趋化因子12(CXCL12)之间的相互作用并抑制CXCR4/CXCL12信号传导。

11.权利要求10的方法,其中抗体或其抗原结合部分呈现以下的一个或多个特征:

(a)以约1×10^{-8}M或更低的K_D结合癌细胞表面上的CXCR4,如通过表面等离子体共振(SPR)测定的;

(b)以低于约30nM的EC_{50}抑制CXCL12与CXCR4的结合;

(c)以低于约1nM的EC_{50}抑制表达CXCR4的细胞中CXCL12诱导的钙通量;

(d)以低于约20nM的EC_{50}抑制CXCL12-诱导的表达CXCR4的细胞的迁移;

(e)抑制通过人脐静脉内皮细胞的毛细管形成;

(f)诱导表达CXCR4的细胞中的凋亡;

(g)在体外抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的增殖;

(h)在体内抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞增殖和/或诱导$CXCR4^+$肿瘤细胞凋亡;

(i)抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的转移;和

(j)增加带有$CXCR4^+$肿瘤的受试者的存活时间。

12.权利要求1-11任一项的方法,其中抗CXCR4抗体或其部分包括具有SEQ ID NO:25中所示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所示氨基酸序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3。

13.权利要求1-12任一项的方法,其中抗CXCR4抗体或其部分包括包含具有SEQ ID NO:25或33所示序列的连续连接的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:29或37所示序列的连续连接的氨基酸的轻链可变区。

14.权利要求1-11任一项的方法,其中抗CXCR4抗体或其部分包括包含具有SEQ ID NO:1所示序列的连续连接的氨基酸的重链可变区CDR1,包含具有SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸的重链可变区CDR2,包含具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸的重链可变区CDR3,包含具有SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸的轻链可变区CDR1,包含具有SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸的轻链可变区CDR2,包含具有SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸的轻链可变区CDR3。

15.权利要求1-14任一项的方法,其中抗体或其抗原结合部分:

(a)与ulocuplumab交叉竞争与人CXCR4的结合;

(b)与ulocuplumab结合人CXCR4中基本上相同的表位;

(c)是嵌合的、人源化的或人单克隆抗体或其部分;

(d)包含其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区;

(e)是ulocuplumab或其抗原结合部分;

(f)是ulocuplumab的人IgG1变体或其抗原结合部分,和/或

(g)选自称为c414H5、c515H7、抗体I、6C7和h3G10.A57.A58的Ab,或其抗原结合部分。

16.权利要求1-15任一项的方法,其中癌症是实体瘤,任选其中实体瘤是小儿肿瘤,任选其中小儿肿瘤是横纹肌肉瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或尤因肉瘤。

17.权利要求16的方法,其中实体瘤是选自小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,鳞状细胞癌,非小细胞肺癌(NSCLC),胰腺癌,胰管腺癌(PDAC),卵巢癌,宫颈癌,输卵管癌,子宫(子宫内膜)癌,子宫内膜癌,子宫肉瘤,子宫颈癌,阴道癌,外阴癌,尿道癌,输尿管癌,前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC),睾丸癌,阴茎癌,膀胱癌,乳腺癌,三阴性乳腺癌(TNBC),男性乳腺癌,生殖细胞瘤,肉瘤,皮肤癌,基底细胞癌,鳞状细胞癌,Merkel细胞癌,骨癌,黑色素瘤,头颈癌,头颈部鳞状细胞癌(SCCHN),甲状腺癌,口癌,口腔癌,唾液腺癌,咽喉癌,食道癌,胃肠道癌,胃癌,小肠癌,胆囊和胆管癌,结直肠癌,结肠癌,直肠癌,肛门癌,肝癌,肝细胞癌,肾癌,肾细胞癌,内分泌系统癌,胸腺肿瘤,胸腺淋巴肉瘤(thymona),甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,间皮瘤,肾盂癌,中枢神经系统肿瘤(CNS),原发性CNS淋巴瘤,肿瘤血管生成,脊椎轴肿瘤,脑癌,神经胶质瘤,脑干神经胶质瘤,胶质母细胞瘤,多形性胶质母细胞瘤(GBM),神经母细胞瘤,垂体腺瘤,表皮样癌,儿童实体瘤,小儿肉瘤,转移性癌,初始来源不明的原发性癌,环境诱发的癌,病毒相关的癌症,与AIDS相关的癌症,卡波西肉瘤,病毒起源的癌症,晚期、难治和/或复发性实体瘤,以及先前实体瘤的任何组合的癌症。

18.权利要求1-15任一项的方法,其中癌症是血液学恶性疾病。

19.权利要求18的方法,其中血液学恶性疾病选自急性淋巴母细胞性白血病(ALL),急性粒细胞性白血病(AML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),慢性粒细胞性白血病(CML),霍奇金淋巴瘤(HL),非霍奇金淋巴瘤(NHL),伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),免疫原性大细胞淋巴瘤,前体B淋巴母细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,蕈样真菌病,间变性大细胞淋巴瘤,前体T淋巴母细胞淋巴瘤,鼻窦自然杀伤/T细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤(MM),骨髓增生异常综合征(MDS),阴燃骨髓瘤,意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病,以及上述血液学恶性疾病的任意组合。

20.权利要求1-19任一项的方法,其中抗体或其抗原结合部分以以下方式施用:

(a)约50至约2000mg的平剂量,约每周一次或两次,约每2周一次或约每3周一次;

(b)约200,约400,约800,约1600,或约2000mg的平剂量,约每周一次或约每2周一次,和/或

(c)通过静脉内或皮下施用于受试者。

21.权利要求1-20任一项的方法,其中:

(a)将NK细胞和抗体或其抗原结合部分按序施用于受试者;

(b)在抗体或其抗原结合部分之前施用NK细胞;

(c)在NK细胞之前施用抗体或其抗原结合部分;

(d)在分开的组合物中同时施用NK细胞和抗体或其抗原结合部分;或

(e)在单一组合物中混合NK细胞和抗体或其抗原结合部分并同时施用。

22.一种用于治疗罹患癌症的受试者的药物,所述药盒包括:

(a)一个或多个范围为约50至约2000mg的特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4的抗体或其抗原结合部分的剂量;

(b)一个或多个范围约10^{6}至约10^{14}的NKAE细胞群的剂量;和

(c)在权利要求2-21任一项的方法中使用抗体或其部分和NKAE细胞的说明。

用于癌症免疫疗法的联合激活和扩增的自然杀伤细胞的抗CXCR4抗体

[0001] 在整个本申请中,在作者姓名和日期或专利号或专利公开号的括号中引用了各种出版物。就在权利要求前的说明书末尾可以找到这些出版物的完整引文。这些出版物的公开内容通过引用以其整体结合到本申请中,以便更全面地描述截至本文所述和要求保护的发明的日期时本领域技术人员已知的现有技术水平。然而,仅在并入的信息与本文明确的公开内容所提供的信息之间不存在冲突的程度上,将这些公开内容通过引用并入本申请中。此外,本文引用的参考文献不应被理解为承认该参考文献是本发明的现有技术。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2018年3月13日提交的美国临时申请No.62/642,313的权益,将其内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用以其整体结合到本文中。ASCII副本生成于2019年3月11日,命名为20190311_SEQL_13108WOPCT.txt,并且大小为26,678个字节。

发明领域

[0006] 本发明涉及用于治疗受试者癌症的方法,包括联合激活和扩增的自然杀伤(NKAE)细胞免疫疗法,将抗C-X-C趋化因子受体4(CXCR4)抗体(Ab)施用于受试者。

[0007] 发明背景

[0008] 转移是癌细胞从原发性肿瘤向周围组织和远端器官的扩散,是癌症发病率和死亡率的主要原因,据估计引起约90%的癌症死亡(Chaffer和Weinberg,2011;Seyfried和Huysentruyt,2013)。肉瘤主要影响儿童和年轻人,但是尽管积极治疗,近一半患有实体瘤(如横纹肌肉瘤,骨肉瘤,尤因肉瘤和神经母细胞瘤)的儿童仍患有进行性疾病。对于那些患有转移性疾病的患者,其预后特别差,其中至少三分之二具有疾病进展(Oberlin等,2008;Heare等,2009;Matthay等,2009)。因此,迫切需要绕开耐药性细胞机制的新治疗方法,特别是对于具有高风险特征(如转移性疾病)的患者。

[0009] 转移是一个复杂的多步骤过程,其包括转移细胞的局部组织浸润,它们在循环中的存活,在次级器官中的“归巢”和外渗以及在转移部位的增殖/生长(Nguyen等,2009)。与通过正在转移中的肿瘤细胞表达的趋化因子受体相互作用的趋化因子在指引细胞向次级器官迁移中具有关键作用。对于趋化因子CXCL12及其受体CXCR4,这已得到了充分证明。Müller及其同事最初推测并发现了癌症转移中的CXCL12-CXCR4归巢轴(Müller等,2001)。他们证明了表达CXCR4的乳腺癌细胞优先向肺的蛋白质提取物迁移,肺的蛋白质提取物大量表达CXCL12。

[0010] 本文公开了一种用于治疗癌症(包括转移性癌)的新免疫疗法,其包括联合NKAE细胞疗法,将抗CXCR4 Ab施用于癌症患者。

[0011] CXCR4,也称为CD184,是七个跨膜结构域,结合G-蛋白的细胞表面受体,其在大部

分的人类癌症中过表达，并且，与其内源性配体CXCL12一起在癌症发病机理中起着重要作用，包括促进肿瘤生长和增殖、粘附、侵袭、转移、血管生成和存活(Domanska等，2013；Duda等，2011；Balkwill，2004；Pitt等，2015；Passoro等，2015；WO 2008/060367)。CXCL12与CXCR4的结合刺激胞内钙通量，激活AKT和ERK信号通路，并上调粘着斑的形成，最终导致沿局部表达和分泌的趋化因子梯度的迁移增加(Chatterjee等，2014)。它还导致促进细胞存活和增殖的基因转录。在各种组织中发现了CXCR4，其主要在造血谱系细胞上表达，包括B和T细胞，单核细胞，巨噬细胞，自然杀伤(NK)和树突细胞，以及$CD34^+$骨髓祖细胞(Lee等，1999)。

[0012] Ulocuplumab(之前称为BMS-936564或MDX-1338，并且在WO 2008/060367中称为F7GL)是一种与细胞表面上表达的CXCR4特异性结合的完全人IgG4(S224P)单克隆抗体(mAb)。Ulocuplumab包含V_H和V_L区，其包含分别具有如SEQ ID NO:33和37所示序列的连续连接的氨基酸。Ulocuplumab阻断CXCR4信号传导可破坏肿瘤-基质相互作用，使肿瘤细胞对细胞毒剂敏感，并减少转移负担。另外，ulocuplumab直接抑制表达CXCR4的肿瘤细胞的肿瘤生长和增殖，并诱导凋亡(WO 2008/060367；WO 2013/071068；Kuhne等，2013)。

[0013] 免疫细胞识别和杀灭肿瘤细胞的已知潜力表明了它们在抗癌治疗中的潜在作用，近来随着检查点抑制剂的发展被实现以增强杀伤T细胞的细胞毒性(Chen和Mellman，2013；Lesokhin等，2015)。天然杀伤(NK)细胞是单核淋巴细胞的亚群，涉及免疫和宿主免疫监视系统。它们的生物学特性包括靶向和杀灭不能表达“自身”主要组织相容性复合物(MHC)/人白细胞抗原(HLA)蛋白的细胞，和/或表达用于激活NK受体的配体的肿瘤细胞或其他患病细胞。这些细胞精确靶向并杀死癌症干细胞和遗传毒性改变的细胞而无需事先免疫或激活，同时保持对健康细胞的耐受性的能力使其成为对所有癌症形式(包括转移)都具有吸引力的治疗效应子(Vivier等，2011)。此外，据报道将其与化疗药物和局部辐射相结合有助于打破免疫耐受并为过继细胞疗法创造良好的微环境(Zheng等，2015)。但是，NK细胞活性受到涉及刺激和抑制信号的复杂机制的调节，并且激活和抑制受体之间的平衡在NK细胞的肿瘤识别和杀灭中起着作用，因此在其治疗功效中也起着作用。膜结合的杀伤细胞激活受体(KAR)与杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)一起工作，以调节NK细胞功能，所述杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)包含抑制和激活受体，这些受体将HLA I类等位基因的同种异型变体识别为KIR配体(KIRL)(Lanier，2005；Pegram等，2011；Long等，2013)。推测在肿瘤中发现的激活/抑制配体的模式可能是预测其对NK细胞疗法反应的关键因素。

[0014] NK细胞激活状态的提高，抑制信号的减少(例如，使用改变或错配的I类MHC)，或两者，都应当导致NK细胞的细胞毒性增强。此外，NK细胞的细胞毒性的大小与NK细胞和靶细胞数目之间的比率(即效应子/靶比率或E:T)直接成比例。因此，在NK细胞疗法的情况中，预计大量预先激活的同种异体NK细胞的输注可达到最大的抗癌作用。为此，已经开发了用于特异性地激活和扩增来自外周血的人NK细胞的方法(参见，例如，Imai等，2005；Fujisaki等，2009；Somanchi和Lee，2016)。这些小组报道了经过基因修饰以表达膜结合白介素(IL)-15和4.1-BB配体(K562-mb15-4.1BBL)的K562白血病细胞系特异性地激活人类NK细胞并驱使它们进入细胞周期，从而导致高度细胞毒性的NK细胞。此外，使用临床GMP指南建立了在大规模临床等级条件下刺激K562-mb15-4.1BBL细胞的方法，可产生大量高度细胞毒性的NKAE细胞。另外，数据表明单倍体相同的供体NK细胞可能在经历过同种异体造血干细胞移植的

实体瘤患者中发挥抗肿瘤活性，部分是基于与KIR-HLA供体-受体错配相关的同种异体移植物与肿瘤效应(Pende等，2009;Moretta等，2011)。因此，在血液学恶性疾病和实体瘤患者的临床试验中正在积极探索NKAE细胞的用途(参见，例如，临床试验网站https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&cond=cancer)。这些研究目的在于证明NKAE作为安全且有效的用于各种类型肿瘤治疗的疗法的潜能。

[0015] 所公开的发明涉及证明了在预防肿瘤细胞迁移、侵袭、植入和转移中NKAE细胞治疗和使用抗CXCR4 Ab的治疗之间的协同作用的体外和体内临床前研究。在体外分析了这种联合治疗抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的迁移和侵袭的能力。使用免疫缺陷小鼠中的肺泡横纹肌肉瘤的原位模型来评估体内的抗肿瘤和抗转移协同作用。另外，分析了小儿横纹肌肉瘤患者肿瘤中的CXCR4表达。本文提供的数据表明这种联合免疫疗法可有效治疗多种癌症并预防转移。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明的公开内容提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法，包括将治疗有效量的以下的组合施用于受试者：(a)分离的NK细胞群；和(b)特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4的分离的Ab或其抗原结合部分。在某些优选实施方案中，NK细胞群包含激活和扩增的NK(NKAE)细胞。在其他优选实施方案中，Ab或其抗原结合部分破坏CXCR4和C-X-C基序趋化因子12(CXCL12)之间的相互作用并抑制CXCR4/CXCL12信号传导。在更多优选实施方案中，Ab是ulocuplumab，其包含具有分别如SEQ ID NO:33和37所示氨基酸序列的V_H和V_L区。

[0018] 在所公开方法的某些实施方案中，癌症是实体瘤，包括小儿肿瘤，如横纹肌肉瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或尤因肉瘤。在其他实施方案中，癌症是血液学恶性疾病。

[0019] 这个公开内容还提供了用于治疗患有癌症的受试者的试剂盒，所述试剂盒包含：(a)一个或多个范围为约50至约2000mg剂量的特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4的Ab或其抗原结合部分；(b)一个或多个范围为10^6至10^{14}剂量的NKAE细胞群；和(c)在本文公开的任一个方法中使用Ab或其部分和NKAE细胞的说明书。

[0020] 通过下面的详细描述和实施例，本发明的其他特征和优点将变得显而易见，所述详细描述和实施例不应被解释为限制性的。在本申请中引用的所有引用的参考文献的全部内容，包括科学论文、GenBank条目、专利和专利申请，均明确地通过引用并入本文中，但仅限于通过引用并入的信息与通过本申请中明确公开提供的信息之间不存在冲突的程度。

[0021] 附图简述

[0022] 图1显示了通过(A)流式细胞术和(B)定量逆转录酶聚合酶链式反应(qRT-PCR)在六个肉瘤细胞系(RH30、CW9019、A4573、A673、MG-63和143B)中分析了CXCR4表达。肺泡横纹肌肉瘤RH30细胞系显示出最高的CXCR4表达。

[0023] 图2显示了不同的肉瘤细胞系(RH30、CW9019、A4573、A673、MG-63和143B)向(A)胎牛血清(FBA)或(B)CXCL12(100ng/ml)的迁移和侵袭能力。RH30细胞系显示出最高的向CXCL12迁移和侵袭指数(图2B)。使用8-μm孔膜Transwell试验测试了迁移能力，并在相同条件下使用Matrigel包被的Transwell膜测量了侵袭能力。

[0024] 图3显示了单独的或联合的NKAE和抗CXCR4治疗在体外对横纹肌肉瘤(RH30)细胞

的迁移和侵袭的细胞毒性和抑制。A,NKAE细胞显示出对抗RH30细胞的高细胞毒性。在所示的NKAE:RH30效应子:靶(E:T)比率下,测定了不存在Ab、使用ulocuplumab(MDX1338;100μg/ml)或IgG4对照mAb(100μg/ml)的特异性裂解。B-C,Ulocuplumab(MDX1338)和NKAE细胞各自有效地降低了RH30细胞向CXCL12的迁移和侵袭,但只有两种活性剂的组合才完全消除了所述的迁移和侵袭。使用Transwell平板测试了RH30细胞向一定梯度的人重组CXCL12趋化因子的迁移。Ab浓度为100μg/ml,并且NKAE:RH30 E:T比率为5:1(B)。在相同条件下使用Matrigel包被的Transwell膜测量了侵袭能力(C)。

[0025] 图4显示了单独的或联合的NKAE细胞和抗CXCR4治疗对免疫缺陷型NSG小鼠的腹部区域中的$GFP^{+}Luc^{+}$RH30横纹肌肉瘤肿瘤植入物生长的作用。A,RH30肿瘤植入物的生长。建立了五个处理臂:未处理的;IgG4;ulocuplumab(MDX1338);NKAE细胞;NKAE细胞和ulocuplumab的组合。小鼠接受了6剂mAb(15mg/kg,一周两次)和3剂NKAE(5×10^{6}个细胞,一周一次)。检测发光肿瘤35天。B,通过治疗过的小鼠中植入的$GFP^{+}Luc^{+}$RH30细胞的发光测量的肿瘤细胞存在的定量。单独的ulocuplumab治疗适度地抑制了RH30肿瘤植入物的生长,而NKAE治疗完全阻止了其生长。

[0026] 图5显示了单独的或联合的NKAE细胞和ulocuplumab对小鼠中从RH30肿瘤的肺微转移形成的作用。A,使用人CXCR4特异性探针通过qRT-PCR测量的小鼠中RH30肺转移损伤中人CXCR4的相对表达。所示的值是相对于由10^{6}个RH30细胞沉淀物对所示基因的表达。Ulocuplumab(MDX1338)降低了RH30肺微转移发生率,而ulocuplumab和NKAE的联合完全消除了RH30肺微转移发生率。B,通过qRT-PCR测量的小鼠中RH30肺转移损伤中人GUS的相对表达。在体内完全抑制RH30肺微转移需要NKAE细胞治疗和使用ulocuplumab(MDX1338)的治疗的联合。

[0027] 图6显示了通过组织学方法证实对横纹肌肉瘤RH30微转移的抑制。通过苏木精和曙红染色(a),Alu序列原位杂交(b)和CXCR4特异性mAb染色(c)鉴定未处理的小鼠肺中的肺微转移。箭头标识检测到的微转移。在体内完全抑制RH30肺微转移需要NKAE细胞疗法和使用ulupuplumab的治疗的联合(d)。

[0028] 图7显示了横纹肌肉瘤患者肿瘤上的CXCR4表达水平A,代表性染色对应于CXCR4细胞质表达阴性(a),中等(b)和高(c)的样品。还显示了高核CXCR4染色的样本(d)。B,诊断时样本的CXCR4表达得分。C,诊断相对化疗后和复发的样本。显示了中位数±SD。应用非参数不成对的Mann-Whitney检验。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明涉及用于治疗受试者癌症的方法,包括将NKAE细胞免疫疗法和抗CXCR4 Ab的组合施用于受试者。

[0031] 术语

[0032] 为了可以更容易地理解本发明的公开内容,首先定义某些术语。如在本申请中使用的,除非本文另有明确规定,否则以下每个术语应具有以下阐述的含义。在整个申请中阐述了附加的定义。

[0033] “施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何,将包含治疗剂的组合物物理引入受试者中。治疗性Ab(如抗CXCR4 Ab)的优选施用途径是静脉内或皮下施用。其他施用途径包括肌内、腹膜内或其他胃肠外施用途径,例如,通过注射或输注。如

本文使用的术语“胃肠外施用”表示肠和局部施用以外的其他施用方式。NKAE细胞的优选施用途径是静脉内施用。其他施用途径包括动脉内、股内、腹膜内或鞘内注射，肿瘤内或注射至肿瘤切除腔中。施用也可以例如进行一次、多次和/或在一个或多个延长的时间段内进行。

[0034] “抗体”(Ab)应当包括，不限于，特异性结合抗原并包含由二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白免疫球蛋白(Ig)，或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区(在本文缩写为V_H)和重链恒定区。IgG Ab的重链恒定区包括三个恒定结构域，C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每条轻链包含轻链可变区(在本文缩写为V_L)和轻链恒定区。IgG Ab的轻链恒定区包括一个恒定结构域，C_L。V_H和V_L区可以进一步细分成超变区，称为互补决定区(CDR)，间插着更保守的称为框架区(FR)的区域。每个V_H和V_L包括三个CDR和四个FR，以以下顺序从氨基末端排列至羧基末端：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。Ab的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0035] 免疫球蛋白可以源自任何通常已知的同种型，包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员公知的并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的Ab类别或亚类(例如，IgM、IgG1或IgG4)。术语“抗体”包括例如天然产生的和非天然产生的Ab；单克隆和多克隆Ab；嵌合和人源化Ab；人或非人Ab；完全合成的Ab；和单链Ab。非人Ab可以是通过重组方法部分或完全人源化的，以降低其在人类中的免疫原性。在没有明确陈述的情况中，并且除非文中另外表示，术语“抗体”还包括上述任一种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段或部分，和单链Ab。

[0036] “分离的”Ab是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他Ab的Ab(例如，分离的特异性结合CXCR4的Ab基本上不含特异性结合CXCR4以外的其他抗原的Ab)。然而，分离的特异性结合例如人CXCR4的Ab可以与其他抗原具有交叉反应性，如来自不同物种的CXCR4分子。此外，“分离的”Ab还可以指纯化的使得基本上不含其他细胞材料和/或化学物质的Ab。

[0037] 术语“单克隆”Ab(mAb)是指非天然产生的单分子组成的Ab分子的制备物，即，一级序列基本相同的Ab分子，其呈现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。mAb是分离的Ab的实例。mAb可以通过本领域技术人员已知的杂交瘤、重组、转基因或其他技术来生产。

[0038] “嵌合”Ab是指其中可变区源自一个物种而恒定区源自另一个物种的Ab，如其中可变区源自小鼠Ab而恒定区源自人Ab的Ab。

[0039] “人”mAb(HuMAb)是指具有其中框架和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的mAb。此外，如果Ab含有恒定区，则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人Ab可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，如本文使用的，术语“人”Ab不意图包括其中源自另一个哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列已经嫁接到人框架序列上的Ab。术语“人”Ab和“完全人”Ab同义使用。

[0040] “人源化”mAb是指其中非人mAb的CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸被相应的源自人免疫球蛋白的氨基酸替代的mAb。在人源化形式的Ab的一个实施方案中，CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸已经被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代，而一个或多

个CDR区内的一些、大部分或全部氨基酸是未改变的。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的，只要它们没有消除Ab结合特定抗原的能力。“人源化”Ab保留与原始Ab相似的抗原特异性。

[0041] “抗-抗原”Ab是指特异性结合抗原的Ab。例如，抗CXCR4 Ab是特异性结合CXCR4的Ab。

[0042] Ab的“抗原结合部分”(也称为“抗原结合片段”)是指保留了特异性结合由完整Ab结合的抗原的能力的一个或多个Ab片段。

[0043] “癌症”是指特征在于体内异常细胞不受控制生长的各种各样的疾病。不受调节的细胞分裂和生长分裂和生长导致恶性肿瘤的形成，其侵入相邻组织，并且还可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。

[0044] “C-X-C趋化因子受体”(CXCR4;在本领域也称为例如LESTR、Fusin或CD184)是指在包含肿瘤基质微环境的白细胞、血小板和其他非造血细胞上表达的7-跨膜G-蛋白偶联受体。其在大部分人类癌症中以及Treg和MDSC上也是过表达的。CXCR4结合单个配体，CXCL12。本文使用的术语“CXCR4”包括人CXCR4(hCXCR4)，hCXCR4的变体、同工型和物种同源物，以及与hCXCR4具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCXCR4氨基酸序列可以依据GENBANK®登录号No.CAA12166找到并列于SEQ ID NO:43中。

[0045] 术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或另外改变免疫应答的方法治疗患有疾病或处于感染疾病或遭受疾病复发的风险中的受试者。受试者的“治疗(treatment)”或“疗法(therapy)”是指是对受试者进行的任何类型的干预或过程，包括将活性剂施用于受试者，目的在于逆转、减轻、缓解、抑制、减缓或防止与疾病相关的症状、并发症或病症，或生物化学指标的发作、进展、发展、严重程度或复发。

[0046] “受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物，如非人灵长类、绵羊、狗和啮齿动物，如小鼠、大鼠和豚鼠。在优选实施方案中，受试者是人类。术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。

[0047] 药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是单独或联合另一种治疗剂使用时保护受试者对抗疾病发作或促进疾病消退的药物或活性剂的任何含量，所述疾病消退通过疾病症状严重程度的降低、无疾病症状阶段的频率或持续时间的增加或对由于疾病折磨引起的损伤或残疾的预防或减少来证明。此外，关于治疗的术语“有效的”和“有效性”包括药理有效性和生理安全性。药理有效性是指药物促进患者疾病消退(例如，癌症消退)的能力。生理安全性是指可接受的毒性水平，或由药物施用引起的在细胞、器官和/或生物体水平的其他不良生理作用(不良作用)。可以使用熟练的从业人员已知的各种方法来评价治疗剂的效力，如通过在体外测定中、在预测在人类中的效力的动物模型系统中，或在临床试验阶段在人类受试者中，测定活性剂的活性。

[0048] 作为肿瘤治疗的实例，治疗有效量的抗癌剂优选相对于未治疗的受试者将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20％，更优选至少约40％，甚至更优选至少约60％，再更优选至少约80％。在本发明的其他优选实施方案中，可以观察到肿瘤消退并且持续至少约20天，更优选至少约40天，或甚至更优选至少约60天的时间段。尽管对治疗有效性进行了最终测量，但对免疫治疗药物的评估也必须允许“免疫相关”的反应模式。

[0049] 药物的治疗有效量包括预防有效量，其是单独或联合另一种治疗剂施用于处于患

病风险的(例如患有前恶性病症的受试者,其处于发展为癌症的风险中)或遭受疾病复发的受试者时,抑制了疾病(例如癌症)的发展或复发的任何药物含量。在优选实施方案中,预防有效量完全防止疾病的发展或复发。“抑制”疾病的发展或复发是指降低疾病的发展或复发的可能性,或完全防止疾病的发展或复发。

[0050] 选择性词(例如,“或”)的使用应当理解为表示选择对象中的任一个、两个或其任意组合。如本文使用的,不定冠词“一个(a)”或“一个(an)”应当理解是指“一个或多个”任何所述的或列举的成分。

[0051] 术语“约”是指对于特定值、组成或特征在可接受误差范围内的数值、组成或特征,如通过本领域普通技术人员所确定的,其将部分取决于怎样测量或测定数值、组成或特征,即,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示1个标准偏差内或大于1个标准偏差内。或者,它可以表示正负20%的范围,更通常是正负10%的范围。在本申请和权利要求中提供特定的值、组成或特性时,除非另有说明,否则应将“约”的含义假定为在对于该特定的值、组成或特征的可接受误差范围内。在药物施用方案中的给药频率中,术语“约每周一次”,“约每两周一次”或本文中使用的任何其他类似的给药间隔术语是指近似数。例如,“约每周一次”可以包括每7天±1天,即每6天至每8天。“约每两周一次”可以包括每14天±3天,即每11天到每17天。类似的近似值适用于,例如,约每3周一次,约每4周一次或约每月一次。

[0052] 术语“基本上相同的”或“实质上相同的”是指两个或更多个数值、组成或特征之间足够高的相似度,使得本领域技术人员认为这些值、组成或特征之间的差异在所测量的属性背景范围内具有很小的或没有生物学和/或统计学显著性。被测量的数值之间的差异可以例如小于约30%,优选地小于约20%,并且更优选地小于约10%。

[0053] 如本文所述的,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围理解为包括所述范围内的任何整数值,并且合适时,包括其分数(如整数的十分之一和百分之一),除非另外指出。

[0054] 在以下分段中进一步详细地描述本发明的各个方面。

[0055] 治疗方法

[0056] 肉瘤,主要包括尤因肉瘤、骨肉瘤和软组织肉瘤,是一组相对罕见的间充质来源的肿瘤(Stiller等,2013)。尽管它们在人类恶性肿瘤中的发病率较低,并且在辅助化学疗法和全手术切除方面取得了进展,但预后仍然很差,主要原因是肺转移的可能性很高,而肺转移是肉瘤患者死亡的主要原因。

[0057] 已表明趋化因子及其与相应受体的相互作用在癌症发展和转移出现的机制中起着基本作用(Vela等,2015)。趋化因子及其受体的表达水平在恶性细胞中发生改变。CXCR4就是这种情况,CXCR4是肿瘤细胞中最常过表达的趋化因子受体。CXCR4与其配体CXCL12的相互作用激活了细胞信号传导的级联,从而促进了表达其的肿瘤细胞的存活、增殖、粘附和迁移。所有这些都可能导致原发性肿瘤的复发,并增加其中分泌配体的器官(尤其是骨髓和肺)发生远端转移的起始能力(Chatterjee等,2014;Duda等,2011)。

[0058] 肿瘤细胞侵占CXCL12/CXCR4信号传导通路用于转移和保护免于凋亡很早以前就已经确定了将该轴的阻断作为癌症疗法的新机会。Müller等(2001)的开创性报告证明了CXCR4作为癌症疗法靶标的体内相关性,将CXCR4在乳腺癌中的表达与其产生局部淋巴结和

肺转移的能力联系起来。这些数据得到了实验的支持，其中中和鼠抗人CXCR4 mAb克隆44717.111导致肺、腹股沟和腋窝淋巴结转移明显减少。随后，另一种鼠抗人CXCR4 Ab(克隆12G5)处理人非霍奇金淋巴瘤(Bertolini等，2002)和原发性人急性髓性白血病(Tavor等，2004)的异种移植物获得了相似的结果。在两个模型中，均报告了肿瘤进展的显著降低。在子宫内膜癌异种移植物中，用12G5 mAb处理可完全抑制肝和肺的自发转移，并使腹膜转移指数降低28倍(Gelmini等，2009)。有趣的是，在胫骨内人骨肉瘤异种移植模型中，12G5 mAb减少了至肺的转移扩散(Brennecke等，2014)。

[0059] 过继转移的NK细胞，主要是静止的NK细胞(Rubnitz等，2010;Curti等，2011)或IL-2培养的NK细胞(Bachanova等，2014;Shi等，2013;Miller等，2005年)，已用于临床试验。与人源抗原呈递细胞共同培养的激活和扩增的NK细胞的使用是新兴的替代方法(Szmania等，2015;Leivas等，2016;Ishikawa等，2004;Vela等，2018)。这些试验的结果表明自体和单倍体相同的NKAE都是安全的疗法，没有严重的不良影响，并且是治疗不同类型癌症的可行方法。

[0060] 本文提供的数据表明ulocuplumab(一种阻断CXCR4/CXCL12轴的人mAb)在体外实验中有效降低了转移性横纹肌肉瘤RH30细胞的迁移和侵袭指数，但需要将ulupuplumab与NKAE细胞联合使用才能完全消除迁移和侵袭。相似地，在体内实验中，需要联合ulocuplumab和NKAE疗法，不仅消除了植入的RH30肿瘤的生长，而且消除了其扩散能力，从而抑制了肺微转移的形成。因此，本公开内容提供了一种用于治疗罹患癌症的受试者的方法，包括将治疗有效量的以下组合施用于受试者：(a)分离的NK细胞群，优选NKAE细胞；(b)分离的特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4的Ab或其抗原结合部分。在任何本发明方法的优选实施方案中，受试者是人类患者。

[0061] 如实施例3中所示，抗CXCR4 Ab(ulocuplumab)和NKAE细胞疗法，作为单一疗法施用，各自有效地降低了在体外RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞向CXCL12的迁移(图3B)和在体外这些细胞的侵袭能力(图3C)。值得注意的是，通过联合抗CXCR4和NAKE细胞疗法呈现出甚至更高水平的RH30细胞的迁移和侵袭的抑制，即，抗CXCR4与NKAE细胞疗法协同作用来完全消除迁移和侵袭(图3B和C)。如果联合的抗肿瘤效果高于使用更有效治疗的单一疗法观察到的效果，或高于每种治疗单独呈现的抑制水平的总和，则认为两种疗法的联合是协同的。已经证明了抗CXCR4 Ab ulocuplumab直接抑制癌细胞的生长和增殖，并诱导凋亡(WO2008/060367;WO2013/071068;Kuhne等，2013)，并且这些肿瘤抑制特性可能有助于本文公开的联合疗法的功效。

[0062] 在体内证明了抗CXCR4和NKAE细胞疗法之间相似的协同作用(实施例4)。在RH30肺泡横纹肌肉瘤的小鼠模型中测量了作为单一疗法或联合施用的抗CXCR4 Ab和NKAE细胞疗法的抗肿瘤活性。在这个小鼠肿瘤模型中，ulocuplumab呈现出对肿瘤生长的适度抑制作用，而NAKE细胞疗法完全抑制了肿瘤生长(图4)。然而，qRT-PCR分析(图5)以及免疫组织化学染色和原位杂交(图6)揭示了NKAE处理的小鼠中的RH30肺微转移。NKAE疗法对肺转移只具有非常适度的作用，而ulocuplumab具有更明显的作用(图5)，但两种疗法的联合在完全消除的肺转移中呈现出强烈的协同作用(图5和6)。

[0063] NK细胞群

[0064] 已经基于NK细胞活性的调节提出了各种治疗和疫苗策略。然而，NK细胞活性受到

涉及刺激和抑制信号的复杂机制的调节。一组重要的调节受体是HLA I类限制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)家族,它既包含抑制家族又包含激活家族成员,这些成员将HLA I类等位基因的同种异型变体识别为KIR配体(KIRL)。单个个体的NK细胞通常表达不同的KIR组合,从而提供了对HLA I类分子具有不同特异性的NK细胞库。

[0065] 膜结合的杀伤细胞激活受体(KAR)与KIR共同作用来调节NK细胞功能(Lanier,2005)。最初认为只有一个KAR和一个KIR(两个受体模型),但是在过去的十年中,已经发现了多种不同的KAR和KIR,如激活NKp46和NKG2D受体以及抑制性KIR2DL受体(参见表1)(对立信号模型)。许多人类癌症表达NKG2D配体(NKG2DL)(Nausch和Cerwenka,2008;Pérez-Martínez等,2012;Fernández等,2013)。实际上,最近已经表明了由NKG2D/NKG2DL相互作用介导的抗肿瘤作用主要靶向多发性骨髓瘤和肉瘤模型中的肿瘤起始细胞或干肿瘤细胞(Fernández等,2015)。推测在肿瘤中发现的激活/抑制性配体的模式可能是预测其对NK细胞疗法反应的关键因素。

[0066] 表1.NK细胞中的激活(KAR)和抑制性(KIR)受体概述

[0067]

受体	功能	配体
KIR（CD158）	激活剂或抑制剂	MHC I 类分子
NKG2D（CD314）	激活剂	MICA、MICB、ULBP1-6
DNAM1（CD226）	激活剂	PVRL2（CD112）、PVR（CD155）
NKp46（CD335）	激活剂	硫酸乙酰肝素、血凝素等
NKp44（CD336）	激活剂	硫酸乙酰肝素、PCNC 等
NKp30（CD337）	激活剂	B7-H6 等
PD-1（CD279）	抑制剂	PD-L1、PD-L2
4-1BB（CD137）	激活剂	4-1BBL

[0068] NK细胞可以杀灭白血病细胞,并且已经在造血干细胞移植的环境中或在非骨髓摘除免疫抑制剂疗法后施用,以增强急性白血病患者的化疗效果,产生了令人鼓舞的结果(Hsu等,2005;Miller等,2005;Rubnitz等,2010)。在Miller等的研究中,在19位预后差的急性髓性白血病(AML)患者中,有5位在单倍体相同的NK细胞疗法后获得了完全缓解。Rubnitz等(2010)的研究结果甚至更好,报告了10例中低危AML患者的100%缓解。

[0069] NK细胞还可以裂解恶性非造血细胞,如报道显示NK细胞在体外和体内对尤因肉瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤和肝细胞癌细胞系显示细胞毒性(Fernández等,2015;Cho等,2010;Verhoeven等,2008;Pérez-Martínez等,2015b;Kamiya等,2016)。此外,临床数据表

明,单倍体相同的供体NK细胞可能在正经历同种异体造血干细胞移植的患实体瘤儿童中发挥抗肿瘤活性,部分是基于与KIR-HLA供体-受体错配有关的同种异体移植物对肿瘤效应(Pérez-Martínez等2009年;Pérez-Martínez等,2015a)。

[0070] 本方法组合了已证明的NK细胞对抗肿瘤的细胞毒性与通过抗CXCR4抗体对CXCR4/CXCL12信号传导的阻断。在本文公开的治疗方法的某些优选实施方案中,NK细胞群包含NKAE细胞。IL-2和其他细胞因子(包括IL-12、IL-15和/或IL-21)可以诱导人NK细胞的增殖反应,但只有一小部分维持持续的生长(London等,1986;Lanier等,1988)。已经显示NK细胞的持续扩增需要额外的信号,如β-类淋巴母细胞的存在(London等,1986;Rabinowich等,1991;Igarashi等,2004)。已经开发出允许从外周血中特异性激活和扩增人NK细胞的方法,例如,基于将基因修饰的K562细胞用作健康供体的外周单核细胞的饲养细胞的方法,从而允许NK细胞群体的扩增和激活(Imai等,2005;Fujisaki等,2009;Somanchi和Lee,2016)。

[0071] 在公开的本发明的某些实施方案中,NKAE细胞是通过用(i)照射过的经修饰以表达膜结合形式的激活细胞因子(如白介素15(IL-15)或白介素-21(IL-21)的β-类淋巴母细胞和(ii)白介素2(IL-2),共培养健康供体的外周血单核细胞(PBMC)来产生的。在某些优选的实施方案中,β-类淋巴母细胞是K562-mb15-41BBL细胞(Fujisaki等,2009)。K562-mb15-41BBL细胞系缺少用于抑制性KIR NK细胞受体的MHC-I配体,并且包含经修饰以在NK细胞上表达膜结合形式的NK激活细胞因子IL-15和用于4-1BB受体的激活配体CD137的K562细胞。在本文所述的实验中(请参见示例3和4),通过将健康供体的PBMC与K562-mb15-41BBL细胞(Fujisaki等,2009)和IL-2(参见实施例3)共同培养来获得NKAE细胞。在其他优选的实施方案中,用于制备NKAE细胞的β-类淋巴母细胞是K562 mb.IL21细胞(Somanchi和Lee,2016),其包含经修饰以表达膜结合形式的IL-21的K562细胞。

[0072] 适用于所公开方法中的抗CXCR4 Ab

[0073] 本发明提供了新的用于治疗癌症(包括转移癌)的免疫治疗方法,通过在体外和体内联合抗CXCR4疗法与已证明的NK细胞对抗肿瘤的细胞毒性。这种联合疗法方法使用抗CXCR4 Ab来阻断CXCR4/CXCL12信号传导,由此破坏肿瘤-基质相互作用,使肉瘤细胞对NK细胞的细胞毒性敏感,并且降低肿瘤生长和转移负担。

[0074] CXCR4在超过23种的人癌症中是过表达的,并且其过表达有助于肿瘤生长、侵袭、血管生成、转移、复发和治疗抗性。与CXCR4表达或CXCR4/CXCL12通路相关的癌症类型的非限制性实例包括实体瘤,如乳房(Dewan等,2006),卵巢(Kajiyama等,2008)、前列腺(Hirata等,2007;Miki等,2007)、肺(Cavallaro,2013;Gangadhar等2010)、胰腺(Billadeau等,2006)、肾脏(Jones等,2007;Pan等,2006)、口(Ishikawa等,2006;Onoue等,2006)、食道(Wu等,2014)、胃(Han等,2014)、结直肠(Lv等,2014)、肝(Schimanski等,2006)、脑(Bian等,2007)和甲状腺癌(De Falco等,2007)、黑素瘤(Scala等,2005)、横纹肌肉瘤(Libura等,2002)和骨肉瘤(Laverdiere等,2005),以及血液学恶性疾病,如急性淋巴细胞性白血病(Crazzolara等,2001)、急性髓性白血病(Kalinkovich等,2006)、多发性骨髓瘤(Alsayed等,2007;Azab等,2009)和慢性髓性白血病(Jin等,2008)。

[0075] CXCR4和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至关重要(Mohle等,1998)。已经广泛研究了CXCR4在骨肉瘤和软组织肉瘤患者中的预后意义。在某些情况下,CXCR4的表达与患者的预后或生存之间存在反向关联,并且在临床研究中,CXCR4

与增加的转移倾向和降低的生存相关。在最近的一项荟萃分析中，包括对997名肉瘤患者的12项研究，发现CXCR4的表达与差的整体生存显著相关(HR 2.37，95％CI 1.86-3.01；P<0.001)。至于临床病理特征，CXCR4表达与较高的转移率(OR 6.97，95％CI 2.28-21.31；P＝0.001)和较高的肿瘤分期(OR 7.55，95％CI 1.25-45.47；P＝0.027)显著相关(Li等，2015))。在实施例5中描述的小儿横纹肌肉瘤患者的短期群中，在诊断和复发时较高的CXCR4表达与致命结果之间存在轻微的相关性。肿瘤起始细胞(TIC)是化学抗性肿瘤细胞的一个亚群，其已经显示出可引起肿瘤复发和转移，并且CXCR4上调是这些细胞的标志之一(Duda等，2011)。一直以来观察到，在化疗后仍然生长的肿瘤以及在手术和化疗法相联合后出现的肿瘤是明显表达出最高CXCR4水平的那些肿瘤(图7C)。因此，靶向和消除TIC是开发新治疗范例的重点。

[0076] 实施例1显示，在所测试的六个不同肉瘤细胞系中，RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞系显示出最高水平的CXCR4表达(图1)，同时具有最高的向CXCL12的迁移和侵袭指数(图2)。转移发生在20-55％的肉瘤患者中，并且与其他癌症一样(Chaffer和Weinberg，2011；Seyfried和Huysentruyt，2013)，仍然是主要的死亡原因。尽管本文已经用横纹肌肉瘤细胞系证明了NKAE加抗CXCR4的组合的功效，但是本领域技术人员将容易认识到，本发明的用于治疗癌症的方法适用于任何过表达CXCR4的癌症。

[0077] 适用于所公开方法中的抗CXCR4 Ab是以高特异性和亲和力特异性结合CXCR4的Ab或其抗原结合部分。在某些优选实施方案中，Ab或其抗原结合部分是mAb或其抗原结合部分。在某些实施方案中，抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分是嵌合Ab，优选人源化Ab，或更优选，人Ab或其部分。这样的嵌合的、人源化的或人mAb可以通过本领域公知的方法来制备和分离，例如，如WO 2008/060367中所述的。在优选实施方案中，受试者是人，并且Ab或其片段结合人CXCR4受体。在更优选的实施方案中，抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分阻断CXCR4与CXCL12的结合，并抑制CXCR4的活性，即，Ab或其抗原结合部分破坏CXCR4和CXCL12之间的相互作用并抑制CXCR4/CXC12信号传导。在某些其他实施方案中，抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分在体内诱导$CXCR4^+$肿瘤细胞的凋亡和/或抑制其生长(如WO 2013/071068中所述的)。

[0078] 以高亲和力特异性结合CXCR4的抗CXCR4 mAb，具体为mAb F7GL(ulocuplumab；之前也称为BMS-936564和MDX-1338)、F7、F9、F9GL、D1、D1GL、E2和E2GL，已经在WO2008/060367中举例说明并详细描述。使用这些Ab来治疗血液学恶性疾病的方法也描述于例如WO2008/060367、WO 2013/071068和WO 2015/069874中。适用于本发明的治疗方法中与NKAE细胞联合的其他抗CXCR4 mAb已经描述于例如WO2008/142303、WO2010/037831、WO2009/140124、WO2013/013025和美国公开No.2015/0037328中。

[0079] 适用于本发明方法中的抗CXCR4 Ab优选呈现出以下一个或多个对于治疗应用理想的特征：(a)以高亲和力结合细胞表面上表达的人CXCR4；(b)抑制SDF-1与CXCR4的结合；(c)抑制表达CXCR4的细胞中的SDF-1诱导的钙通量；(d)抑制表达CXCR4的细胞的SDF-1诱导的迁移；(e)抑制通过人脐静脉内皮细胞的毛细管形成；(f)诱导表达CXCR4的细胞的凋亡；(g)在体外抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的增殖；(h)在体内抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞增殖和/或诱导$CXCR4^+$肿瘤细胞凋亡；(i)抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的转移；和(j)增加带有$CXCR4^+$肿瘤的受试者的存活时间。

[0080] WO2008/060367中公开的抗CXCR4 mAb，其适用于本发明的方法中，已经被证明了

呈现出以下的一个或多个特征：(a)以低于约100nM(例如，约20-80nM)的EC_{50}结合细胞表面上的人CXCR4；(b)以等于或低于约30nM(例如，约1-30nM)的EC_{50}抑制CXCL12与CXCR4的结合；(c)以等于或低于约1nM(例如，约0.1-1.0nM)的EC_{50}抑制表达CXCR4的细胞中的CXCL12诱导的钙通量；(d)以等于或低于约20nM(例如，约10-20nM)的EC_{50}抑制CXCL12-诱导的表达CXCR4的细胞的迁移；(e)抑制通过人脐静脉内皮细胞的毛细管形成；(f)诱导表达CXCR4的细胞中的凋亡；(g)在体外抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的增殖；(h)在体内抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞增殖和/或诱导$CXCR4^+$肿瘤细胞凋亡；(i)抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的转移；和(j)增加带有$CXCR4^+$肿瘤的受试者的存活时间。

[0081] 本发明方法中可用的抗CXCR4 Ab包括以高亲和力特异性结合细胞表面上表达的人CXCR4的mAb，例如，以1×10^{-8}M或更低的K_D，如通过表面等离子体共振(SPR)测定的，优选以5×10^{-9}M或更低的K_D，并且呈现出至少五个且优选全部前述的其他特征。

[0082] 例如，适用于公开的治疗方法中的抗CXCR4 Ab(a)以5×10^{-9}至1×10^{-10}M的K_D结合人CXCR4，如通过表面等离子体共振(Biacore)测定的；(b)以低于约10nM(例如，约1-10nM)的EC_{50}抑制CXCL12与CXCR4的结合；(c)诱导表达CXCR4的细胞中的凋亡；(d)在体外抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的增殖；(e)在体内抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞增殖和/或诱导$CXCR4^+$肿瘤细胞凋亡；和(f)抑制$CXCR4^+$肿瘤细胞的转移。

[0083] 因此，本公开内容提供了用于治疗罹患癌症的受试者的方法，包括将治疗有效量的以下的组合施用于受试者：(a)分离的NKAE细胞群；和(b)分离的Ab或其抗原结合部分，其：(i)以高亲和力特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4，例如，以5×10^{-9}M或更低的K_D，(ii)抑制CXCL12与CXCR4的结合，例如，以低于约10nM的EC_{50}；和(iii)抑制CXCR4/CXCL12信号传导，例如，抑制CXCL12诱导的表达CXCR4的细胞的迁移，例如，以等于或低于约20nM的EC_{50}。在某些实施方案中，Ab或其抗原结合部分还诱导表达CXCR4的细胞中的凋亡。

[0084] 在某些方面中，本文公开的用于治疗用途的抗CXCR4 Ab包括F7、F9、D1或E2的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3，或其组合。F7、F9、D1和E2的V_H CDR1的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.1-4中。F7、F9、D1和E2的V_H CDR2的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.5-8中。F7、F9、D1和E2的V_H CDR3的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.9-12中。F7、F9、D1和E2的V_k CDR1的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.13-16中。F7、F9、D1和E2的V_k CDR2的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.17-20中。F7、F9、D1和E2的V_k CDR3的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO.21-24中。种系回复突变“GL”变体，即，F7GL、F9GL、D1GL和F2GL，分别具有与F7、F9、D1和E2相同的CDR。使用Kabat系统(Kabat等，1991)来限定通过本公开内容鉴定的CDR区。

[0085] 在某些其他方面中，本文公开的用于治疗用途的抗CXCR4 Ab包括：

[0086] (a)具有SEQ ID NO:25或33中所列序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID NO:29或37中所列序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

[0087] (b)具有SEQ ID NO:26或34中所列序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID NO:30或38中所列序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

[0088] (c)具有SEQ ID NO:27或35中所列序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID NO:31或39中所列序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域；或

[0089] (d)具有SEQ ID NO:28或36中所列序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID NO:32或40中所列序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0090] 在其他优选实施方案中,本公开内容的抗CXCR4 Ab包括:

[0091] (a)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:1所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:5所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:9所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:13所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:17所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:21所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;

[0092] (b)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:2所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:6所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:10所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:14所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:18所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:22所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;

[0093] (c)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:3所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:7所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:11所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:15所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:19所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:23所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;或

[0094] (d)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:4所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:8所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:12所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:16所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:20所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:24所示序列或其保守修饰的连续连接的氨基酸。

[0095] 在某些优选实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分包括重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:1所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸。

[0096] 在其他实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分包括:

[0097] (a)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:2所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ

ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:22所示序列饰的连续连接的氨基酸;

[0098] (b)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;或

[0099] (c)重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;和轻链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸。

[0100] 在某些实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分包括F7GL、F7、F9GL、F9、D1GL、D1、E2GL和E2 mAb的重链和轻链可变区。在某些优选实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分包括重链可变区,其包含具有SEQ ID NO.25或33所示序列的连续连接的氨基酸,和轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO.29或37所示序列的连续连接的氨基酸。

[0101] 在其他实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分包括:

[0102] (a)重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:25或33所示序列的连续连接的氨基酸,和轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO.29或37所示序列的连续连接的氨基酸;

[0103] (b)重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:26或34所示序列的连续连接的氨基酸,和轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO.30或38所示序列的连续连接的氨基酸;

[0104] (c)重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:27或35所示序列的连续连接的氨基酸,和轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO.31或39所示序列的连续连接的氨基酸;

[0105] (c)重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:28或36所示序列的连续连接的氨基酸,和轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO.32或40所示序列的连续连接的氨基酸。

[0106] 在所公开方法的某些实施方案中,抗CXCR4 Ab或其结合部分包括其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的重链恒定区的重链恒定区。在更多实施方案中,Ab或其抗原结合部分包括具有效应子功能(包括ADCC、ADCP和/或CDC)的重链恒定区(例如,人IgG1或IgG3),例如,其是人IgG3同种型的,或优选是人IgG1同种型的,或包括提高效应子功能和介导免疫抑制调节T细胞(Treg)和髓源性抑制细胞(MDSC)耗尽的突变(例如,E333A或E333S;Idusogie等,2001)。已知这些免疫抑制细胞过表达CXCR4(WO 2016/201425),并且抗CXCR4介导的Treg和/或MDSC耗尽可能有助于抗肿瘤效果的增强。

[0107] 在某些其他实施方案中,抗CXCR4 Ab包括不具有效应子功能的重链恒定区(例如,人IgG2或,优选IgG4)。在更多实施方案中,抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分的IgG4重链恒定区含有S228P突变(使用Kabat系统编号的;Kabat等,1991),其用通常在IgG1同种型Ab中相应位置发现的脯氨酸残基替代了铰链区中的丝氨酸残基。这种存在于ulocuplumab中的突

变防止Fab臂与内源性IgG4 Ab交换，同时对于激活与野生型IgG4 Ab相关的Fc受体保持了低亲和力。

[0108] 在其他实施方案中，Ab包括其是人κ或λ恒定区的轻链恒定区的轻链恒定区。

[0109] 用于本文公开方法中的合适的抗CXCR4 Ab是ulocuplumab。已经在患有各种血液学恶性疾病受试者的两个1期临床试验中评价了ulocuplumab，具有安全和可耐受的特征，所述血液学恶性疾病包括急性髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。已经提出了AML和MM群的功效数据，并显示了针对以下的令人鼓舞的结果，即在标准治疗中添加ulupuplumab(Becker等，2014;Ghobrial等，2014)，以及AML和突变的CXCR4 Waldenström 巨球蛋白血症的1/2期临床试验(参见正在进行的患者(参见Clinical Trials网站上的NCT02305563和NCT03225716)，http://www.clinicaltrials.gov)。在某些实施方案中，使用了ulucuplumab的人IgG1变体。

[0110] 其他合适的抗CXCR4 Ab包括例如称为c414H5和c515H7的Ab(WO 2010/037831)、称为抗体I、抗体II、抗体III、抗体IV和抗体V的Ab(美国专利No.7,892,546)、称为6C7的Ab(WO2013/013025)和人源化3G10 Ab，例如，称为h3G1 0.A57.A58、h3G10.1.91.A58A和h3G10.1.91.A58B的Ab(美国公开No.2015/0037328)。

[0111] 在所公开发明的方法中有用的抗CXCR4 Ab还包括以上Ab的抗原结合部分。已经充分地证明了Ab的抗原结合功能可以通过全长Ab的片段来执行。术语Ab的“抗原结合部分”内包括的结合片段的实例包括(i)Fab片段，由V_L、V_H、V_L和C_{H1}结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')$_2$片段，包括在铰链区由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)由V_H和C_{H1}结构域组成的Fd片段；和(iv)由Ab的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段。

[0112] 这些片段，最初通过用酶(如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶)的蛋白水解获得，随后工程化成单价和多价抗原结合片段。例如，尽管Fv片段的两个结构域，V_L和V_H，通过分开的基因编码，但它们可以使用重组方法通过合成的接头肽连接在一起，所述合成的接头肽能够使它们制成单个蛋白链，其中V_L和V_H区配对形成称为单链可变片段(scFv)的单价分子。可以通过连接单个肽链内的两个scFv来工程化二价或双价scFv(di-scFv或bi-scFv)，称为串联scFv，其含有两个V_H和两个V_L区。可以使用少于10个氨基酸的接头肽来形成scFv二聚体和高阶多聚体，少于10个氨基酸的肽接头对于两个可变区折叠在一起太短，这迫使scFv二聚化并产生双链抗体(diabody)或形成其他多聚体。双链抗体已经显示出以高于相应scFv高得多的亲和力结合其同源抗原，解离常数比scFv的K_D值低40倍。非常短的接头(≤3氨基酸)导致三价三链抗体(t riabody)或四价四链抗体(tetrabody)的形成，其呈现出比双抗更高的针对其抗原的亲和力。其他变体包括微型抗(minibodies)，其是scFv-CH3二聚体，和较大的scFv-Fc片段(scFv-C_{H2}-C_{H3}二聚体)，并且甚至分离的CDR可以呈现出抗原结合功能。

[0113] 因此，在某些实施方案中，Ab片段选自Fab，F(ab')$_2$，Fd和Fv片段，单结构域Ab(sdAb)，单链可变区片段(scFv)，二价scFv(di-scFv)和双价scFv(bi-scFv)，双链抗体，微型抗体和分离的CDR。在某些优选实施方案中，Ab片段选自Fab，F(ab')$_2$，Fd和Fv片段，以及单链可变片段(scFv)。使用本领域技术人员已知的常规重组技术来工程化这些Ab片段，并且以与完整Ab相同的方式针对实用性来筛选片段。意图将以上所有蛋白水解和工程化的Ab片段和相关变体(对于更多详细内容，参见Hollinger和Hudson，2005;Olafsen和Wu，2010)包括

在术语Ab的“抗原结合部分”内。

[0114] 交叉竞争Ab

[0115] 在所公开方法中有用的其他抗CXCR4 Ab包括特异性结合人CXCR4并与参照Ab交叉竞争与人CXCR4结合的Ab，所述参照Ab例如ulocuplumab(F7GL)或称为F7、F9、D1和E2的任一种Ab(参见，例如，WO2008/060367;WO2013/071068)。一对Ab“交叉竞争”结合抗原的能力表明第一Ab结合与第二Ab基本上相同的抗原表位区域，并减少了第二Ab与该特定表位区域的结合，反过来，第二Ab结合与第一Ab基本上相同的抗原表位区域，并减少了第一Ab与该表位区域的结合。因此，测试Ab竞争性地抑制例如ulucuplumab与人CXCR4结合的能力证明了测试Ab结合与ulocuplumab基本上相同的人CXCR4表位区域。因此，在所公开的方法中可用的抗CXCR4 Ab包括特异性结合与参照Ab(例如ulocuplumab)基本上相同的抗原表位区域的Ab。

[0116] 如果第一Ab将第二Ab与抗原的结合减少至少约40％，则认为第一Ab结合与第二Ab“基本上相同的表位”或“基本上相同的决定子”。优选，第一Ab将第二Ab与抗原的结合减少超过约50％(例如，至少约60％或至少约70％)。在更优选的实施方案中，第一Ab将第二Ab与抗原的结合减少超过约70％(例如，至少约80％，至少约90％，或约100％)。第一和第二Ab的顺序可以颠倒，即，“第二”Ab可以首先结合表面，而“第一”之后在“第二”Ab的存在下接触表面。如果不考虑其中将Ab添加至抗原的顺序就观察到结合抗原的竞争性减少，则认为Ab是“交叉竞争”的。

[0117] 由于交叉竞争Ab结合基本上相同的抗原(如CXCR4受体)表位区域，因此有望具有相似的功能特性。交叉竞争的程度越高，功能特性就越相似。例如，如果两个交叉竞争的Ab各自抑制另一个与表位的结合至少约80％，则预期它们具有基本相同的功能特性。如果交叉竞争Ab显示出通过解离常数(K_D)测定的相似的结合表位的亲和力，则该功能的相似性将更加接近。

[0118] 可以使用重组抗原分子或细胞表面表达的抗原分子，基于标准抗原结合测定(包括表面等离振子共振(BIAcore®)分析、ELISA测定或流式细胞术)中可检测地竞争的能力，很容易地识别出交叉竞争的抗抗原Ab。举例来说，可以确定测试Ab是否与ulocuplumab竞争与人CXCR4的结合的简单竞争测定法包括：(1)测量以饱和浓度施用的ulocuplumab与其上固定了人类CXCR4的BIAcore芯片(或其他合适的用于表面等离子共振分析的介质)的结合；和(2)测量ulocuplumab与先前已结合了测试Ab的人类CXCR4覆盖的BIAcore芯片(或其他合适的介质)的结合。比较了存在和不存在测试Ab的情况下，ulocuplumab与CXCR4覆盖的表面的结合。在存在测试Ab的情况下，ulocuplumab的结合显著降低(例如，超过约40％)，表明两种抗体识别基本上相同的表位，从而它们竞争与CXCR4靶的结合。第一Ab与抗原的结合被第二Ab抑制的百分比可以计算为：[1-(第二Ab存在时检测到的第一Ab的结合)/(第二Ab不存在时检测到的第一Ab的结合)]×100。为了确定Ab是否交叉竞争，重复竞争性结合测定，除了测量了存在ulocuplumab的情况下，测试Ab与CXCR4包被的芯片的结合。

[0119] 在一个方面中，用于本公开内容方法中的抗CXCR4 Ab与mAb F7GL(ulocuplumab；具有分别显示于SEQ ID NO.33和37中的V_H和V_L)、F7(具有分别显示于SEQ ID NO.25和29中的V_H和V_L)、mAb 79GL(具有分别显示于SEQ ID NO.34和38中的V_H和V_L)、mAb F9(具有分别显示于SEQ ID NO.26和30中的V_H和V_L)、mAb D1GL(具有分别显示于SEQ ID NO.35和39中的V_H

和V_L)、mAb D1(具有分别显示于SEQ ID NO.27和31中的V_H和V_L)、mAb E2GL(具有分别显示于SEQ ID NO.36和40中的V_H和V_L)和mAb E2(具有分别显示于SEQ ID NO.28和32中的V_H和V_L)中的任一个交叉竞争与CXCR4的结合。交叉竞争与CXCR4结合的Ab结合CXCR4上的相同表位区域(即,相同或重叠的表位)。

[0120] 在某些实施方案中,交叉竞争抗CXCR mAb包括V_H区,其包括具有源自SEQ ID NO:41所示的人V_H 3-48种系序列的序列的连续连接的氨基酸,和/或V_L区,其包括具有源自SEQ ID NO:42所示的人V_K L15种系序列的序列的连续连接的氨基酸。

[0121] 适于通过所公开方法治疗的广谱癌症

[0122] 依靠利用免疫系统的灵活性来攻击和破坏癌细胞的免疫肿瘤学适用于治疗非常广泛范围的癌症(例如,参见Guillerey等,2016;Lowry和Zehring,2017;Callahan等,2016;Kamta等,2017;Farkona等,2016)。因此,所公开的采用NK细胞(优选NKAE细胞)的施用与CXCR4/CXCL12信号传导途径的阻断相结合的方法适用于治疗各种各样的实体瘤和液体瘤。

[0123] 在某些实施方案中,所公开的联合疗法可以用于治疗是实体瘤的癌症。在某些优选实施方案中,实体瘤是小儿肿瘤。在更多实施方案中,小儿肿瘤是横纹肌肉瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或尤因肉瘤。尽管进行了积极的治疗,近一半患有此类肿瘤的儿童仍患有进行性疾病。对于那些患有转移性疾病的患者,其预后特别差,其中至少三分之二具有疾病进展。复发后的结果通常令人沮丧。例如,对于复发性尤因肉瘤的患者,长期存活的可能性目前小于20%,如果两年内复发,则小于10%(Leavey等,2008)。因此,迫切需要绕开抗药性细胞机制的新治疗方法,特别是对于具有高风险特征(如转移性或复发性疾病)的患者。

[0124] 在其他实施方案中,实体瘤是选自小细胞肺癌(SCLC),非小细胞肺癌(NSCLC),鳞状NSCLC,非鳞状NSCLC,鳞状细胞癌,非小细胞肺癌(NSCLC),胰腺癌,胰管腺癌(PDAC),卵巢癌,宫颈癌,输卵管癌,子宫(子宫内膜)癌,子宫内膜癌,子宫肉瘤,子宫颈癌,阴道癌,外阴癌,尿道癌,输尿管癌,前列腺癌,转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC),睾丸癌,阴茎癌,膀胱癌,乳腺癌,三阴性乳腺癌(TNBC),男性乳腺癌,生殖细胞瘤,肉瘤,皮肤癌,基底细胞癌,鳞状细胞癌,Merkel细胞癌,骨癌,黑色素瘤,头颈癌,头颈部鳞状细胞癌(SCCHN),甲状腺癌,口癌(oral cancer),口腔癌(mouth cancer),涎腺癌,咽喉癌,食道癌,胃肠道癌,胃癌,小肠癌,胆囊和胆管癌,结直肠癌,结肠癌,直肠癌,肛门癌,肝脏癌,肝癌,肾癌,肾细胞癌,内分泌系统癌,胸腺肿瘤,胸腺癌,甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,间皮瘤,肾盂癌,中枢神经系统肿瘤(CNS),原发性CNS淋巴瘤,肿瘤血管生成,脊髓轴肿瘤,脑癌,神经胶质瘤,脑干神经胶质瘤,胶质母细胞瘤,多形性胶质母细胞瘤(GBM),神经母细胞瘤,垂体腺瘤,表皮样癌,儿童实体瘤,小儿肉瘤,转移性癌,来源不明的原发性癌,环境诱发的癌,病毒相关的癌症,与AIDS相关的癌症,卡波西肉瘤,病毒起源的癌症,晚期、难治和/或复发性实体瘤,以及先前实体瘤的任何组合的癌症。在某些实施方案中,癌症是晚期、不可切除、转移性、难治性癌症和/或复发性癌症。

[0125] 在某些其他实施方案中,本发明的联合疗法方法可用于治疗其是血液学恶性疾病的癌症。血液学恶性疾病包括源自两种主要血细胞谱系的液体肿瘤,即髓样细胞系(其产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴样细胞系(其产生B、T、NK和浆细胞),包括所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。可以使用本发明的联合疗法方法治疗的血

液学恶性疾病包括例如选自急性淋巴母细胞白血病(ALL),AML,CLL,慢性髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤(HL),非霍奇金淋巴瘤(NHL),MM,阴燃骨髓瘤,意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病,以及所述血液学恶性疾病的任何组合的癌症。

[0126] 在其他实施方案中,血液学恶性疾病是选自以下的癌症:急性、慢性、淋巴细胞性(淋巴母细胞性)和/或骨髓性白血病,如ALL、AML、CLL和CML;淋巴瘤,如HL、NHL,其中约85%是B细胞淋巴瘤,包括DLBCL、FL、CLL/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL),套细胞淋巴瘤,边缘区B细胞淋巴瘤(黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤,结节边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区B细胞淋巴瘤),伯基特淋巴瘤,淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL;也称为Waldenström巨球蛋白血症(WM),毛细胞淋巴瘤和原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤,是T细胞淋巴瘤的NHL,包括前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病,T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL),外周T细胞淋巴瘤,如皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC,即蕈样真菌病,Sezary综合征等),成人T细胞淋巴瘤/白血病,血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤,结节外天然杀伤/T细胞淋巴瘤鼻型,与肠病相关的肠T细胞淋巴瘤(EATL),间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)和未明确的外周T细胞淋巴瘤,急性髓细胞样淋巴瘤,淋巴浆细胞样淋巴瘤,单核细胞样B细胞淋巴瘤,血管中心性淋巴瘤,肠T细胞淋巴瘤,原发性纵隔B细胞淋巴瘤,移植后淋巴增生性疾病,真性组织细胞淋巴瘤,原发性渗出性淋巴瘤,弥漫性组织细胞淋巴瘤(DHL),免疫母细胞性大细胞淋巴瘤和前体B淋巴母细胞淋巴瘤;骨髓瘤,如多发性骨髓瘤,阴燃骨髓瘤(也称为无痛性骨髓瘤),意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),孤立性浆细胞瘤,IgG骨髓瘤,轻链骨髓瘤,非分泌性骨髓瘤和淀粉样变性;以及所述血液学恶性疾病的任何组合。本方法还适用于治疗晚期、转移性、难治性和/或复发性血液学恶性疾病。

[0127] 药物组合物和剂量方案

[0128] 本文公开的方法中使用的Ab和NK细胞可以构成组合物,例如,药物组合物,其含有Ab或一群NKAE细胞和药学上可接受的载体。如本文使用的,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选,用于含有Ab的组合物的载体适用于静脉内、皮下、肌内、胃肠外、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注)。

[0129] SC注射的选择基于Halozyme Therapeutics的ENHANZE®药物递送技术,其涉及将Ab与重组人透明质酸酶(rHuPH20)共同配制,从而消除了由于胞外基质传统上对可皮下递送的生物制剂和药物体积的限制(美国专利No.7,767,429)。

[0130] 优选,用于含有NK细胞的组合物的载体适用于静脉内、动脉内、腹膜内、股内、鞘内或肿瘤内注射,或注射至肿瘤切除腔中。

[0131] 本发明的药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的盐、抗氧化剂、水性和非水性载体和/或佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0132] 剂量方案可以调节,以提供最佳的所需应答,例如,最大的治疗应答和/或最小的不良影响。用于抗CXCR4 Ab施用的剂量范围可以为约0.01至约20mg/kg受试者体重,优选约1.0至约15mg/kg受试者体重。例如,剂量可以为约0.1,0.3,1,2,3,5,10,15或20mg/kg体重,并且优选约1,3,5,10或15mg/kg体重。或者,可以施用固定的或平剂量,例如,约50至约2000mg Ab,替代基于体重的剂量。例如,剂量可以为约200,约400,约800,约1600或约

2000mg，并且优选，约400，约800，约1600。可以基于范围为约10^6至约10^{14}个细胞的绝对细胞数的剂量，将NAKE细胞施用于患者。例如，可以以约1×10^5，5×10^5，1×10^6，5×10^6，1×10^7，5×10^7，1×10^8，5×10^8，1×10^9，5×10^9，1×10^{10}，5×10^{10}，1×10^{11}，5×10^{11}，1×10^{12}，5×10^{12}，1×10^{13}，5×10^{13}或1×10^{14}个细胞的剂量，将细胞施用于受试者。在优选实施方案中，以约1×10^7至5×10^{10}个细胞，优选约1×10^8至5×10^9个，更优选约5×10^8个细胞的剂量，将NKAE细胞施用于受试者。在其它实施方案中，以约1×10^5至1×10^8细胞/kg体重，优选约1×10^6至5×10^7细胞/kg，更优选约7.5×10^6细胞/kg的剂量，将NKAE细胞施用于受试者。NKAE细胞可以多次施用给患者。例如，患者可以接受一次至四次输注，通常两次或三次输注。这些输注通常间隔至少一周。

[0133] 用于Ab的施用时间表通常设计成基于Ab的典型药代动力学特性获得导致持续的受体占据(RO)的暴露。示例性治疗方案需要约每周两次，约每周一次，约每2周一次，约每3周一次，约每4周一次，或约每月一次，施用抗CXCR4Ab或其抗原结合部分。在某些优选实施方案中，大约每周将抗CXCR Ab施用于受试者。在其他实施方案中，约每2周一次或约每3周一次施用Ab。在某些优选实施方案中，约每周将NK细胞施用于患者。在其他实施方案中，约每周两次或约每2周一次，将NK细胞施用于患者。剂量和时间表在治疗过程中可以改变。

[0134] 在本文公开的任何方法的某些实施方案中，通过静脉内或皮下施用，将抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分施用于患者。在其它实施方案中，将NK细胞和Ab或其抗原结合部分按序施用于受试者。“按序”施用表示NK细胞和抗CXCR4Ab或其抗原结合部分中的一个在另一个之前施用。任一种治疗剂可以首先施用；即，在某些实施方案中，在Ab或其抗原结合部分之前施用NK细胞，而在其他实施方案中，在NK细胞之前施用抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分。通常，在约60分钟的时间段内通过静脉内输注来施用Ab。

[0135] 在某些实施方案中，NK细胞和Ab或其抗原结合部分在分开的组合物中同时施用，而在其他实施方案中，NK细胞和Ab或其抗原结合部分混合在单一组合物中并同时施用。

[0136] 在本文公开的任一个治疗方法的某些实施方案中，持续施用NK细胞和Ab或其抗原结合部分的组合物，只要观察到临床益处或直到出现难以控制的毒性或疾病进展。

[0137] NK细胞和抗CXCR4 Ab组合的医学用途

[0138] 本公开内容还提供了NK细胞(优选NKAE细胞)群和抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分，联合用于治疗罹患癌症的受试者。这些治疗剂可以用于本文公开的所有癌症范围的联合疗法中。在某些优选实施方案中，癌症是小儿肿瘤，例如，横纹肌肉瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或尤因肉瘤。

[0139] 所公开发明的一个方面是NK细胞(优选NKAE细胞)群和抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分的联合用途，用于制备用于治疗罹患癌症的受试者的药物。任何这样的NKAE细胞和抗CXCR4 Ab联合用于制备药物的用途宽泛地适用于本文公开的所有范围的癌症。在这些用途的某些优选实施方案中，癌症是小儿肿瘤，例如，横纹肌肉瘤、骨肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或尤因肉瘤。

[0140] 本公开内容还提供了NKAE细胞群联合抗CXCR4 Ab的医学用途，对应于使用这种本文所述的治疗剂组合的治疗方法的全部实施方案。

[0141] 药盒

[0142] 用于治疗用途的包含NK细胞(优选NKAE细胞)群和抗CXCR4 Ab或其抗原结合部分

的药盒也在本发明的范围内。药盒通常包含表明药盒内容物的预期用途和使用说明的标签。术语标签包括药盒上提供的或随药盒提供的或另外随药盒附带的任何文字或记录材料。因此，本公开内容提供用于治疗罹患癌症的受试者的药盒，所述药盒包括：(a)一个或多个的范围为约50至约2000mg的剂量的特异性结合癌细胞表面上表达的CXCR4的Ab或其抗原结合部分；(b)一个或多个的范围为约10^6至约10^{14}的剂量的NK细胞群，优选NKAE细胞；和(c)在本文公开的任何联合疗法方法中使用Ab或其部分和NK细胞的说明。在某些实施方案中，Ab可以以单位剂型共同包装。在用于治疗人类患者的某些优选实施方案中，药盒包含本文公开的任一种抗人CXCR4 Ab，例如，ulocuplumab，或与ulocupmab竞争与人CXCR4结合的Ab。

[0143] 通过以下实施例来进一步说明本发明，其不应当解释为进一步的限制。将整个申请中引用的所有参考文献的内容明确按引用并入本文中。

[0144] 实施例1

[0145] 不同肉瘤细胞系的CXCR4的表达

[0146] 通过对不同肉瘤细胞系的汇合细胞培养物的流式细胞术分析了CXCR4的表面表达：两个横纹肌肉瘤细胞系(RH30和CW9019)、两个尤因肉瘤细胞系(A4573和A673)和两个骨肉瘤细胞系(MG-63和143B)。143B(CRL-8303)、MG-63(CRL-1427)和A673(CRL1598)细胞系来自美国典型培养物保藏中心。RH30(ACC-489)来自Leibniz-Institut DSMZ。A4573和CW9019分别是来自Dr.Javier Alonso(Institute of Health Carlos III)和Dr.Josep Roma(Vall d'Hebron Research Institute)的善意馈赠。为了染色，将2×10^5个细胞/孔在V-底96孔平板中离心，并用含有0.5％牛血清白蛋白(BSA，Lonza)、1％FBS和0.1％叠氮化钠(PBSst)的磷酸盐缓冲盐水(PBS，Lonza)洗涤。通过用40μg/ml大鼠IgG(Sigma；100μl终体积，20min，4℃)预孵育细胞来阻断非特异性结合。用抗CXCR4-APC mAb(BD Pharmingen；克隆12G5)或同种型匹配的mAb孵育细胞(30min，4℃)。在Navios细胞计数器(Beckman Coulter)上分析样品。

[0147] 对于qRT-PCR，根据制造商的方案，使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)获得了细胞培养物RNA。通过测量提取物在260nm处的吸光值来定量RNA。使用GUS基因表达作为内部对照，通过qRT-PCR测定了编码人CXCR4的mRNA的相对表达水平。使用Superscript IV First-Strand合成系统(Invitrogen)和供应商的方案，从1μg总RNA合成了cDNA。使用用于人CXCR4(Hs00237052_m1，Applied Biosystems)和用于人GUS(Fw：5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'；Rv：5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3'；探针：5'-[6FAM]CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA[TAMRA]-3'；全部来自Sigma)的引物，重复两次扩增了cDNA。使用Fast Start TaqMan Probe Master(Roche)监测扩增(50个循环；95℃，15s，60℃，1min)，使用6-FAM染料标记和Roche LightCycler 480上的非荧光淬灭剂。使用$2^{-\Delta CT}$方法分析了相对表达，其中ΔCT＝(Ct目标基因-Ct内部对照)。

[0148] 如图1A中所示，在RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞培养物中发现了最高比例的$CXCR4^+$细胞，而在98.6±0.7％的细胞中检测到了CXCR4表达。

[0149] 这些结果与通过qRT-PCR分析测定的CXCR4 mRNA的表达相一致。RH30培养物显示出相对于GUS对照基因表达的1.38±0.014(图1B)。

[0150] 实施例2

[0151] 不同肉瘤细胞系向CXCL12梯度的迁移和侵袭

[0152] 在Trasnwell测定中测试了不同肉瘤细胞系(RH30、CW9019、A4573、A673、MG-63和143B)向CXC12(100ng/ml)或胎牛血清(FBS,10%)的迁移能力(48h),其被认为是体内转移性可能的体外指示剂。将细胞在饥饿缓冲液(DMEM-1%FBS)中孵育24小时。接着,将2×10^5个细胞悬浮在80μl迁移缓冲液[DMEM-1%人血清白蛋白(HSA);Grifols]中,并置于96孔transwell平板(8.0μm孔径,Neuroprobe)的上层隔室中。下部隔室装有单独的300μl迁移缓冲液(非条件培养基),迁移缓冲液具有100ng/ml的CXCL12(R&D Systems)或迁移缓冲液具有10%的FBS。在相同条件下测量侵袭能力,Transwell膜的上部用20μl 0.2mg/ml Matrigel(Corning)包被。

[0153] 孵育48小时以使细胞通过膜迁移/侵袭后,用脱脂棉签除去残留在膜上表面上的细胞,同时用甲醇固定膜下侧的细胞并用水晶紫染色。用PBS洗涤后,使用Carl Zeiss Axiovert 200显微镜确定了迁移/侵袭细胞的数量。在200×下计数每孔四个视野。根据以下公式计算迁移和侵袭指数:指数=100×[(朝向条件培养基的计数的细胞数-朝向非条件培养基的计数的细胞数)/(100-朝向非条件培养基的计数的细胞数)]。

[0154] 结果显示于图2中。不同的肉瘤细胞系显示出中等水平的朝向高化学吸引剂FBS的迁移和侵袭(图2A),但在测定条件下的迁移和侵袭能力微不足道(图2B)。伴随相对高水平的CXCR4表达,只有RH30细胞能够特异性地朝向CXCR4配体CXCL12迁移和侵袭(图2B)。RH30朝向CXCL12的迁移和侵袭指数分别为35.23±8.3和104.04±16.4。

[0155] 使用GraphPad Prism 7软件进行了统计学分析。除非另有说明,否则统计学显著性设定为$p<0.05$,如通过未配对的Student's t检验评价的。除非另有说明,否则结果显示为平均±SEM。

[0156] 实施例3

[0157] NKAE细胞具有对抗RH30细胞的细胞毒性,并且抗CXCR4联合NKAE细胞在体外协同消除了RH30细胞的迁移和侵袭能力。

[0158] 由于ulocuplumab是完全人IgG4抗CXCR4 mAb,因此预期不会诱导ADCC(Davies和Sutton,2015)。量NKAE细胞的细胞裂解活性被测量为预先包被了ulocuplumab、同种型对照mAb或无mAb的RH30细胞的杀灭百分比。将来自健康供体的NK细胞激活,并用照射过的K562-mb15-41BBL细胞(Fujisaki等,2009)和IL-2来扩展。简而言之,通过在密度梯度(Ficoll-Paque,GE Healthcare)(400g,30分钟)上离心分离来自健康供体的外周血单核细胞(PBMC)。用100Gy照射由D.Campana教授(新加坡国立大学)善意提供的经基因修饰的K562mbIL15-41BBL细胞系。NKAE细胞是通过将供体的PBMC与照射过的K562-mb15-41BBL细胞以1:1.5的比例加100U/ml IL-2在补充了10%的人AB血清(Sigma)和100IU/mL IL-2(Miltenyi)的干细胞生长培养基(SCGM,Cellgenix)上共同培养超过14-21天获得的。每2-3天添加新鲜培养基至终浓度为1×10^6细胞/ml。每周通过流式细胞术(Navios,Beckman Coulter)监测NK细胞($CD3^-$,$CD56^+$)、T细胞($CD3^+$,$CD56^-$)和NKT细胞($CD3^+$,$CD56^+$)的百分比和表型。表2列出了这个研究中使用的标记的Ab。

[0159] 表2.研究中使用的标记的Ab

[0160]

特异性	克隆	同种型	荧光色素	制造商
CD3	UCHT1	mIgG1	PE/Cy7	BioLegend
CD45	J33	mIgG1	FITC	Beckman Coulter
CD56	B159	mIgG1	APC	BD Biosciences
CXCR4	12G5	mIgG2a	APC	BD Biosciences
同种型对照	20102	mIgG2a	APC	R&D Systems

[0161]

[0162] 为了研究各种治疗对横纹肌肉瘤细胞的作用,通过在EF1a启动子下并使用新霉素抗性标记(Amsbio),用编码绿色荧光蛋白(GFP)和萤火虫荧光素酶(Luc)的重组慢病毒感染来产生生物发光的RH30细胞(RH30-GFP-Luc)。通过荧光激活细胞分选法分离表达高GFP水平的感染细胞,克隆,扩展并用于体内生物发光测定。RH-30-GFP-Luc细胞保留了表面CXCR4表达,并表现出与亲代RH30细胞相似的生长动力学。将细胞在补充有10%热灭活的胎牛血清(FBS,Gibco),2mM L-谷氨酰胺,50U/ml青霉素和50μg/ml链霉素的Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM,Lonza)中培养(完全培养基)。

[0163] 将RH30-GFP-Luc细胞与所示的mAb浓度预孵育(30min)。将NKAE和靶细胞以20:1或5:1的比例在DMEM-10%FBS中共同培养(4小时),然后用7-AAD染色(10min,4℃)并通过流式细胞术进行分析。GFP^+群内的7-AAD阳性细胞的门控表明了死亡靶细胞的比例。特异性杀伤计算为100×[(样品中的死亡靶细胞%-自发性死亡靶细胞%/(100-自发性死亡靶细胞%)]。在没有效应细胞情况下孵育的靶细胞用于评估自发性细胞死亡。

[0164] 如图3A中看到的,在20:1E:T比例下,NKAE细胞诱导了23.0±1.8特异性RH30细胞杀灭,而ulocuplumab和对照mAb对观察到的细胞毒性具有很小的作用或无作用。

[0165] 还测试了单独的和组合的ulocuplumab(MDX1338)和NKAE细胞对RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞朝向人重组CXCL12梯度迁移的作用,并且使用Transwell平板和Matrigel测试了这些细胞在体外的侵袭能力。对于这些实验,将10^5个RH30细胞与所示终浓度的ulocuplumab、对照IgG4 mAb和/或500,000个NKAE细胞(效应子:靶比例,E:T=5:1)在90μl终体积的迁移缓冲液中混合并如上进行测定。

[0166] Ulocuplumab和NKAE每种都有效地减少了体外RH30细胞迁移(图3B)和侵袭(图3C),但这两种疗法的联合相互协同作用,完全消除了迁移和侵袭(图3B和3C)。认为这种抗CXCR4和NKAE细胞疗法的联合是协同的,因为观察到的抗肿瘤效果大于使用作为单一疗法施用的抗CXCR4或NKAE细胞疗法观察到的效果,并且大于通过每种单独的治疗呈现的抑制水平的总和。

[0167] 实施例4

[0168] 抗CXCR4在转移性肉瘤小鼠肿瘤模型中增强了NKAE细胞的体内抗肿瘤活性

[0169] 为了评价NKAE细胞疗法单独的或联合抗CXCR4 Ab的抗肿瘤活性,使用$CXCR4^+$RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞产生了体内转移性肉瘤模型,所述细胞植入免疫缺陷型NSG™小鼠中时作为腹膜异种移植物生长。将NSG™小鼠(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ,Charles River

Laboratories)饲养在Alberto Sols Biomedical Research Institute动物机构。所有程序均由Comunidad de Madrid Animal Protection Area(PROEX 220/16)和CSIC Ethics Committee批准。

[0170] 按照实施例3中所述的,使用K462-mb15-41BBL细胞,从PBMC制备了NKAE细胞。

[0171] 将表达GFP和荧光素酶的慢病毒颗粒用于转导RH30肺泡横纹肌肉瘤细胞。在第0天给六周大的雌性小鼠静脉内(i.v.)接种0.5×10^6个RH30-GFP^+Luc^+细胞,以产生体内转移性肉瘤模型。建立了五个治疗组(5只小鼠/组):未处理的;同种型对照IgG4 mAb;抗CXCR4 ulocuplumab;NKAE细胞;ulocuplumab和NKAE组合。在第0(肿瘤植入那天)、7和14天,将三个剂量的NKAE细胞(每次5×10^6个细胞,每周)施用于小鼠;并且在第0、3、7、10、14和18天施用6个剂量的ulocuplumab(15mg/kg,每周两次)。测量通过发光信号测定的发展中肿瘤的大小直至第35天时小鼠处死。

[0172] 简而言之,在分析之前10min腹膜内(i.p.)施用D-荧光素(150mg/kg;Perkin Elmer)。在成像过程中,使用IVIS-Lumina II(Caliper Lifesciences)在不透光的室内用异氟烷麻醉小鼠。曝光时间为100s。使用Living Image v4.5.2(Perkin Elmer)来量化数据并生成伪彩色图像。

[0173] 随后,检测肺、肝、骨髓和脾中的微转移,并使用人CXCR4特异性和人GUS TaqMAN探针通过qRT-PCR定量。根据制造商的方案,使用RNAeasy Mini试剂盒(Qiagen)将解剖了器官的小鼠的三分之一用于总RNA提取。通过测量提取物在260nm处的吸光度来定量RNA。通过半定量RT-PCR测定了编码人CXCR4和人GUS的mRNA的相对表达水平。如实施例1所述的进行了cDNA合成以及人CXCR4和人GUS扩增。所示的值是相对于10^6个RH30细胞沉淀的hCXCR4和hGUS表达。

[0174] 还通过使用苏木精-曙红染色和hCXCR4特异性抗体的免疫组织化学,以及通过使用Alu-DNA作为探针的荧光原位杂交,检测了微转移。将小鼠解剖的器官在4%多聚甲醛(pH 7.4)中固定过夜,在PBS中洗涤并包埋在石蜡中。使用标准程序,切割连续切片(3μm),并使用苏木精/曙红染色。通过使用抗人CXCR4Ab(R&D Systems,Clone 44716,1:50稀释),EnVision FLEX+可视化系统(小鼠,高pH;Agilent),并用苏木精/曙红复染,进行了免疫染色,研究了肺中RH30细胞的存在。对于原位杂交,首先用低pH缓冲液(RiboCC,Roche)和蛋白酶III(Roche)进行抗原恢复。然后将载玻片与探针Alu阳性对照探针II(Ventana,Roche 05272041001)一起温育。进行三次严格洗涤,并将载玻片与中间产物兔抗DNP孵育。将与辣根过氧化物酶缀合的OmniRabbit(Ventana,Roche)用于可视化。使用银作为色原(Silver kit,Ventana,Roche)来开展免疫组化反应,并且核用Carazzi的苏木精复染。所有图像均在带有AxioCam ERC5S数码相机(Carl Zeiss)的Carl ZeissLab.A1显微镜上拍摄。

[0175] 该处理对发光肿瘤的生长的作用示于图4A,并且定量地示于图4B。如图4B所示,与对照相比,单独的ulocuplumab(MDX1338)适度地抑制了RH30肿瘤植入物生长(未治疗的小鼠小鼠为$992.8\times10^3\pm416.0\times10^3$,而在MDX1338治疗的小鼠中为$394.7\times10^3\pm192.1\times10^3$;$p=0.035$),而NKAE治疗足以完全预防($p=0.0003$)。

[0176] 尽管可以使用发光检测系统容易地监测RH30腹膜原发性肿瘤,但其敏感性不足以确定远端器官中RH30 GFP+Luc+微转移的存在。因此,通过扩增小鼠肺、肝、脾和骨髓中的人GUS或人CXCR4 mRNA,通过qRT-PCR来评价人细胞的存在。仅在小鼠肺中检测到人类基因表

达,表明该器官中存在RH30(图5)。NKAE疗法对肺转移的影响微乎其微,而作为单一疗法施用的ulocuplumab在降低肺微转移发生率方面具有更明显的作用,如通过hCXCR4(图5A)和hGUS(图5B)的相对表达测量的。对于人CXCR4相对表达水平,未治疗的小鼠显示出$11.4\times10^{-3}\pm4.7\times10^{-3}$vs.ulocuplumab(MDX1338)治疗的小鼠的2.0

[0177] $\times10^{-3}\pm0.6\times10^{-3}$。人GUS相对表达为未治疗的小鼠中$14.5\times10^{-3}\pm5.4\times10^{-3}$vs.ulocuplumab治疗的小鼠中$2.5\times10^{-3}\pm1.1\times10^{-3}$。然而,ulocuplumab和NKAE的组合导致被分析的小鼠肺中人CXCR4和人GUS基因的水平均检测不到(图5A和5B),表明该组合完全消除了肺转移。因此,抗CXCR4和NKAE细胞疗法的组合在抑制RH30肺泡横纹肌肉瘤的生长和消除肺转移中显示出强劲的协同作用。

[0178] 免疫组织化学和原位杂交分析进一步证实了这些结果(图6)。通过苏木精和曙红染色(图6a)、Alu序列杂交(图6b)和CXCR4特异性Ab染色(图6c)在未治疗的小鼠的肺中鉴定出肉瘤肺微转移,而用NKAE和ulocuplumab组合治疗的小鼠显示出不存在微转移(图6d)。

[0179] 实施例5

[0180] 小儿横纹肌肉瘤患者样品中的CXCR4表达在化疗后和复发后样品中高于诊断样品

[0181] 2010年至2017年,通过免疫组织化学对La Paz大学医院生物库中存放的23例小儿横纹肌肉瘤样本中CXCR4的表达进行了评估。中位随访时间为7.9年(范围0.6-18.4),患者中位年龄为6.6岁(范围0.2-14.1)。14个样本为诊断样品,5个样本是化疗治疗后收集的,和4个样本是复发样品。根据Helsinki Declaration,在患者知情同意后获得人细胞样品。该研究已获得La Paz Hospital Ethics Committee for Clinical Research(PI-2295)的批准。对于肿瘤CXCR4免疫组织化学,将福尔马林固定,石蜡包埋的肿瘤切片经脱蜡、水合、使用抗人CXCR4mAb(1:10稀释;克隆44716;R&D Systems)和EnVision FLEX+可视化系统(小鼠,高pH;Agilent)染色,并用苏木精-曙红复染。

[0182] 通过扁桃体组织的免疫染色证实了Ab的特异性。将$CXCR4^{+}$肿瘤细胞的比例指定为0到5之间的分数,并将染色强度指定为0到3之间的分数。将这两个值相加以产生最终的染色分数。鉴于最近的研究描述了CXCR4在某些癌症中的核定位(Krook等,2014;Li等,2015),对细胞质和核染色均进行了评估并加权平均。在所测试的系列中,有15%的病例存在CXCR4的核染色,在68%的病例中存在细胞质染色。

[0183] 在诊断样品中,在胚胎vs.肺泡横纹肌肉瘤之间不存在CXCR4表达的差异,在来自局部的肿瘤vs.已经转移的原发性肿瘤的样品之间也不存在CXCR4表达的差异(图7A)。关于那些患者的结果,在来自随后复发的患者,以及还来自最终死于该疾病的那些患者的那些样品中,观察到了略高的CXCR4评分。

[0184] 有趣的是,从诊断样品对CXCR4表达评分时(2.8±2.1),我们比较了化疗后样品(4.4±0.7)和复发样品(6.1±4.4),在之后的样品中观察到了朝向较高CXCR4表达的强烈趋势(图7B)。

[0185] 序列表概述

[0186]

SEQ ID NO:	描述
1	F7 的重链 CDR1 序列
2	F9 的重链 CDR1 序列
3	D1 的重链 CDR1 序列

[0187]

SEQ ID NO:	描述
4	E2 的重链 CDR1 序列
5	F7 的重链 CDR2 序列
6	F9 的重链 CDR2 序列
7	D1 的重链 CDR2 序列
8	E2 的重链 CDR2 序列
9	F7 的重链 CDR3 序列
10	F9 的重链 CDR3 序列
11	D1 的重链 CDR3 序列
12	E2 的重链 CDR3 序列
13	F7 的轻链 CDR1 序列
14	F9 的轻链 CDR1 序列
15	D1 的轻链 CDR1 序列
16	E2 的轻链 CDR1 序列
17	F7 的轻链 CDR2 序列
18	F9 的轻链 CDR2 序列
19	D1 的轻链 CDR2 序列
20	E2 的轻链 CDR2 序列
21	F7 的轻链 CDR3 序列
22	F9 的轻链 CDR3 序列
23	D1 的轻链 CDR3 序列
24	E2 的轻链 CDR3 序列
25	F7 的 V_H 氨基酸序列
26	F9 的 V_H 氨基酸序列
27	D1 的 V_H 氨基酸序列
28	E2 的 V_H 氨基酸序列
29	F7 的 V_L 氨基酸序列
30	F9 的 V_L 氨基酸序列
31	D1 的 V_L 氨基酸序列
32	E2 的 V_L 氨基酸序列
33	F7GL 的 V_H 氨基酸序列
34	F9GL 的 V_H 氨基酸序列
35	D1GL 的 V_H 氨基酸序列
36	E2GL 的 V_H 氨基酸序列
37	F7GL 的 V_L 氨基酸序列
38	F9GL 的 V_L 氨基酸序列
39	D1GL 的 V_L 氨基酸序列
40	E2GL 的 V_L 氨基酸序列

[0188]

SEQ ID NO:	描述
41	V_H 3-48 种系氨基酸序列
42	V_K L15 种系氨基酸序列
43	人 CXCR4 氨基酸序列

[0189] 参考文献

[0190] Alsayed Y,Ngo H,Runnels J,Leleu X,Singha UK等,(2007)Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1(CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma.Blood 109(7):2708-17.

[0191] Azab AK,Runnels JM,Pitsillides C,Moreau AS,Azab F等,(2009)CXCR4inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy.Blood 113(18):4341-51.

[0192] Bachanova V,Cooley S,Defor TE,Verneris MR,Zhang B等,(2014)Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2diphtheria toxin fusion protein.Blood 123,3855-3863.

[0193] Balkwill F(2004)The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4.Semin Cancer Biol 14:171-9.

[0194] Bertolini 1,Dell'Agnola C,Mancuso P等,(2002)CXCR4 neutralization,a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma.62(11):3106-12.

[0195] Bian XW,Yang SX,Chen JH等,(2007)Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival.Neurosurgery 61:570-8.

[0196] Billadeau DD,Chatterjee S,Bramati P等,(2006)Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells.Int J Gastrointest Cancer 37:110-9.

[0197] Becker PS,Foran J,Altman J等,(2014)Targeting the CXCR4 pathway:Safety,tolerability and clinical activity of BMS-936564(ulocuplumab),an anti-CXCR4antibody,in relapsed refractory acute myeloid leukemia.56th American Society of Hematology(ASH)Annual Meeting,San Francisco,December 6-9,2014,Oral Presentation No.386.

[0198] Brennecke P,Arlt MJ,Campanile C等,(2014)CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice.Clin Exp Metastasis 31,339-49.

[0199] Callahan M,Postow MA,Wolchok JD(2016)Targeting T cell co-receptors for cancer therapy.Immunity 44(5):1069-78.

[0200] Cavallaro S(2013)CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain.Int J Mol Sci 14:1713-27.

[0201] Chaffer CL,Weinberg RA(2011)A perspective on cancer cell metastasis.Science 331:1559-64.

[0202] Chatterjee S,Behnam Azad B,Nimmagadda S(2014)The intricate role of CXCR4 in cancer.Adv Cancer Res 124:31-82.

[0203] Chen DS,Mellman I(2013)Oncology meets immunology:the cancer-immunity cycle.Immunity 39(1):1-10.

[0204] Cho D,Shook DR,Shimasaki N(2010)Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors.Clin Cancer Res 16(15):3901-9.

[0205] Clinical Trials Website,https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&cond=cancer,last accessed March 9, 2019.

[0206] Crazzolara R,Kreczy A,Mann G等,(2001)High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia.Br J Haematol 115:545-53.

[0207] Davies AM,Sutton BJ(2015)Human IgG4:A structural perspective.Immunological Reviews 268:139-159.

[0208] De Falco V,Guarino V,Avilla E等,(2007)Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer.Cancer Res 67:11821-9.

[0209] Dewan MZ,Ahmed S,Iwasaki Y等,(2006)Stromal cell-derived factor-1and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer.Biomed Pharmacother 60:273-276.

[0210] Domanska UM,Kruizinga RC,Nagengast等,(2013)A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology:No place to hide.Eur J Cancer 49:219-30.

[0211] Duda DG,Kozin SV,Kirkpatrick ND等,(2011)CXCL12(SDF-1)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition:An emerging sensitizer for anticancer therapies?Clin Cancer Res 17:2074-80.

[0212] Farkona S,Diamandis EP,Blasutig IM等,(2016)Cancer immunotherapy:the beginning of the end of cancer?BMC Medicine 14:73.

[0213] Fernández L,Portugal R,Valentín J等,(2013)In vitro natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma.Front Oncol 3(April):94.

[0214] Fernández L,Valentín J,Zalacain M(2015)Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner.Cancer Lett 368(1):54-63.

[0215] Fujisaki H,Kakuda H,Shimasaki N等,(2009)Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy.Cancer Res 69(9):4010-7.

[0216] Gangadhar T,Nandi S,Salgia R(2010)The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer.Cancer Biol Ther 9:409-16.

[0217] Gelmini S,Mangoni M,Castiglione F等,(2009)The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer.Clin Exp Metastasis 26,261-268.

[0218] Ghobrial I,Perez R,Baz R等,(2014)Phase Ib study of the novel anti-

CXCR4 antibody ulocuplumab(BMS-936564)in combination with lenalidomide plus low-dose dexamethasone,or with bortezomib plus dexamethasone in subjects with relapsed or refractory multiple myeloma.56th American Society of Hematology (ASH)Annual Meeting,San Francisco,December 6-9,2014,Poster Presentation No.3483.

[0219] Guillerey C,Huntington ND,Smyth MJ等,(2016)Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy.Nature Immunol 1025-36.

[0220] Han M,Lv S,Zhang Y等,(2014)The prognosis and clinicopathology of CXCR4 in gastric cancer patients:a meta-analysis.Tumour Biol 35:4589-97.

[0221] Hirata H,Hinoda Y,Kikuno N等,(2007)CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility.Clin Cancer Res 13:5056-62.

[0222] Hollinger P,Hudson PJ(2005)Engineered antibody fragments and the rise of single domains.Nature Biotech 23(9):1126-36.

[0223] Hsu KC,Keever-Taylor CA,Wilton A等,(2005)Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes.Blood 105(12):4878-84.

[0224] Idusogie EE,Wong PY,Presta LG等,(2001)Engineered antibodies with increased activity to recruit complement.J Immunol 166(4):2571-5.

[0225] Igarashi T,Wynberg J,Srinivasan R等,(2004)Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells.Blood 104:170-7.

[0226] Imai C,Iwamoto S,Campana D(2005)Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells.Blood 106(1):376-83.

[0227] Ishikawa E,Tsuboi K,Saijo K等,(2004)Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma.Anticancer Res 24:1861-1871.

[0228] Ishikawa T,Nakashiro K,Hara S等,(2006)CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma.Int J Oncol 28:61-66.

[0229] Jin L,Tabe Y,Konoplev S等,(2008)CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia(CML)cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells.Mol Cancer Ther 7:48-58.

[0230] Jones J,Marian D,Weich E等,(2007)CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells.Exp Cell Res 313:4051-65.

[0231] Kabat EA,Wu TT,Perry H等,(1991)Sequences of Proteins of Immunological

Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242.

[0232] Kajiyama H,Shibata K,Terauchi M等,(2008)Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma.Int J Cancer 122:91-99.

[0233] Kalinkovich A,Tavor S,Avigdor A等,(2006)Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells.Cancer Res 66:11013-20.

[0234] Kamiya T,Chang Y-H,Campana D(2016)Expanded and activated natural killer cells for immunotherapy of hepatocellular carcinoma.Cancer Immunol Res 4(7):547-81.

[0235] Kamta J,Chaar M,Ande A(2017)Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches.Front Oncol 18(7):64.

[0236] Krook MA,Nicholls LA,Scannell CA等,(2014)Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma.Mol Cancer Res 12:953-64.

[0237] Kuhne MR,Mulvey T,Belanger B等,(2013)BMS-936564/MDX-1338:a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies.Clin Cancer Res 19:357-66.

[0238] Lanier LL(2005)NK cell recognition.Annu Rev Immunol 23:225-74.

[0239] Lanier LL,Buck DW,Rhodes L等,(1988)Interleukin 2activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen.J Exp Med 167:1572-85.

[0240] Laverdiere C,Hoang BH,Yang R等,(2005)Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma.Clin Cancer Res 11(7):2561-7.

[0241] Leavey PJ,Mascarenhas L,Marina N等,(2008)Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma(EWS)at first recurrence following multi-modality therapy:A report from the Children's Oncology Group.Pediatr Blood Cancer 51(3):334-8.

[0242] Lee B,Sharron,M,Montaner LJ等,(1999)Quantification of CD4,CCR5,and CXCR4 levels on lymphocyte subsets,dendritic cells,and differentially conditioned monocyte-derived macrophages.Proc Natl Acad Sci USA 96:5215-20.

[0243] Leivas A,Perez-Martinez A,Blanchard MJ等,(2016)Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma.Oncoimmunology 5(12):e1250051.

[0244] Lesokhin AM,Callahan MK,Postow MA,Wolchok JD(2015)On being less tolerant:enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation.Sci Transl Med 7(280):280sr1.

[0245] Li Y-J,Dai Y-L,Zhang WB等,(2015)Clinicopathological and prognostic

significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma:a meta-analysis.Clin Exp Med 9:11101-12.

[0246] Libura J,Drukala J,Majka M等,(2002)CXCR4-SDF-1signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion,chemotaxis,and adhesion.Blood 100:2597-606.

[0247] London L,Perussia B,Trinchieri G(1986)Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells:IL 2induces into cell cycle most peripheral blood NK cells,but only a minor subset of low density T cells.J Immunol 137:3845-54.

[0248] Long EO,Kim HS,Liu D等,(2013)Controlling natural killer cell responses:integration of signals for activation and inhibition.Annu Rev Immunol 31:227-58.

[0249] Lowry LE,Zehring WA(2017)Potentiation of natural killer cells for cancer immunotherapy:a review of literature.Front Immunol 8:1061.

[0250] Lv S,Yang Y,Kwon S等,(2014)The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients:a meta-analysis.Histopathol 64:701-712.

[0251] Miki J,Furusato B,Li H等,(2007)Identification of putative stem cell markers,CD133 and CXCR4,in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens.Cancer Res 67:3153-61.

[0252] Miller JS,Soignier Y,Panoskaltsis-Mortari A等,(2005)Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer.Blood 105(8):3051-7.

[0253] Mohle R,Failenschmid C,Bautz F等,(1999)Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1(SDF-1).Leukemia 13:1954-9.

[0254] Moretta L,Locatelli F,Pende D等,(2011)Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation.Blood 117(3):764-71.

[0255] Nausch N,Cerwenka A(2008)NKG2D ligands in tumor immunity.Oncogene 27(45):5944-58.

[0256] Nguyen DX,Bos PD,MassaguéJ(2009)Metastasis:From dissemination to organ-specific colonization.Nat Rev Cancer 9:274-84.

[0257] Olafsen T,Wu AM(2010)Antibody vectors for imaging.Semin Nucl Med 40(3):167-81.

[0258] Onoue T,Uchida D,Begum NM等,(2006)Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous

cell carcinoma cells.Int J Oncol 29:1133-8.

[0259] Pan J,Mestas J,Burdick MD等,(2006)Stromal derived factor-1(SDF-1/CXCL12)and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis.Mol Cancer 5:56.

[0260] Passaro D,Irigoyen M,Catherinet C等,(2015)CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.Cancer Cell 27(6):769-79.

[0261] PCT Publication No.WO 2008/060367,published May 22,2008by Medarex,Inc.

[0262] PCT Publication No.WO 2013/071068,published May 16,2013 by Bristol-Myers Squibb.

[0263] PCT Publication No.WO 2015069874,published May 14,2015 by Bristol-Myers Squibb and Dana-Farber Cancer Institute.

[0264] PCT Publication No.WO 2016/201425,published December 15,2016 by Bristol-Myers Squibb.

[0265] Pegram HJ,Andrews DM,Smyth MJ等,(2011)Activating and inhibitory receptors of natural killer cells.Immunol Cell Biol 89(2):216-24.

[0266] Pende D,Marcenaro S,Falco M等,(2009)Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients:evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity.Blood 113(13):3119-29.

[0267] Pérez-Martínez A,de Prada Vicente I,Fernández L等,(2012)Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors.Exp Hematol 40(11):882-91.

[0268] Pérez-Martínez A,Fernández L,Valentín J等,(2015a)A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haploidentical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors.Cytotherapy 17(11):1594-603.

[0269] Pérez-Martínez A,Leung W,Muñoz E等,(2009)KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors.Pediatr Blood Cancer 53(1):120-4.

[0270] Pérez-Martínez A,Valentín J,Fernández L等,(2015b)Arabinoxylan rice bran(MGN-3/Biobran)enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity against neuroblastoma in vitro and in vivo.Cytotherapy 17(5):601-12.

[0271] Pitt LA,Tikhonova AN,Hu H等,(2015)CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance.Cancer Cell 27(6):755-68.

[0272] Rabinowich H,Sedlmayr P,Herberman RB,Whiteside TL(1991)Increased proliferation,lytic activity,and purity of human natural killer cells

cocultured with mitogen-activated feeder cells.Cell Immunol 135:454-70.

[0273] Rubnitz JE,Inaba H,Ribeiro RC,Pounds S等,(2010)NKAML:a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia.J Clin Oncol 28(6):955-9.

[0274] Scala S,Ottaiano A,Ascierto PA等,(2005)Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma.Clin Cancer Res 11:1835-41.

[0275] Schimanski CC,Bahre R,Gockel I等,(2006)Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4.Br J Cancer 95:210-7.

[0276] Seyfried TN,Huysentruyt LC(2013)On the origin of cancer metastasis.Crit Rev Oncog 18(1-2):43-73.

[0277] Shi J等,(2013)NIH Public Access 143:641-653.

[0278] Somanchi SS,Lee DA(2016)Ex vivo expansion of human NK cells using K562 engineered to express membrane bound IL21.Methods Mol Biol 1441:175-93.

[0279] Stiller CA,Trama A,Serraino D等,(2013)Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe:Report from the RARECARE project.Eur J Cancer 49:684-695.

[0280] Szmania S,Lapteva N,Garg T等,(2015)Fresh ex vivo expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma(MM)patients.J Immunother 38(1):24-36.

[0281] Tavor S,Petit I,Porozov S等,(2004)CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice.Cancer Res 64:2817-24.

[0282] U.S.Patent No.7,767,429,issued August 3,2010to Bookbinder et al.

[0283] Vela M,Aris M,Llorente M等,(2015)Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy:Achievements and challenges.Front Immunol 6:12.

[0284] Vela M,Corral D,Carrasco P等,(2018)Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia.Cancer Lett 422:107-17.

[0285] Verhoeven DHJ,de Hooge ASK,Mooiman ECK等,(2008)NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1receptor dependent pathways.Mol Immunol 45(15):3917-25.

[0286] Vivier E,Raulet DH,Moretta A等,(2011)Innate or adaptive immunity?The example of natural killer cells.Science 331(6013):44-9.

[0287] Wu J,Wu X,Liang W等,(2014)Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer:a meta-analysis.Tumour Biol 35:3709-15.

[0288] Zheng Y,Dou Y,Duan L等,(2015)Using chemo-drugs or irradiation to break immune tolerance and facilitate immunotherapy in solid cancer.Cell Immunol 294:54-59.

序列表

<110>拉巴斯大学医院生物医学研究基金会; 卡洛斯三世肿瘤研究中心公共资产基金会

<120>用于癌症免疫疗法的联合激活和扩增的自然杀伤细胞的抗CXCR4抗体

<130> 13108-WO-PCT

<140>
<141>

<150>
<151>

<150>
<151>

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 1
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

[0001]

<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

<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
[0002] <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

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 Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<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

[0003]

<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
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

[0004]

<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
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

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0005]

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

[0006]

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

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

[0007]

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

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

<400> 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

<210> 33
<211> 125
[0008] <212> PRT
<213> 人

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 35
[0009] 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> 36
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 37
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

[0010]

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> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

50 55 60

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

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

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

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 39
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

[0011]

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

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

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 98
<212> PRT
<213> 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 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

[0012]

<210> 42
<211> 95
<212> PRT
<213> 人

<400> 42
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 352
<212> PRT
<213> 人

<400> 43
Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
180 185 190

[0013]

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

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

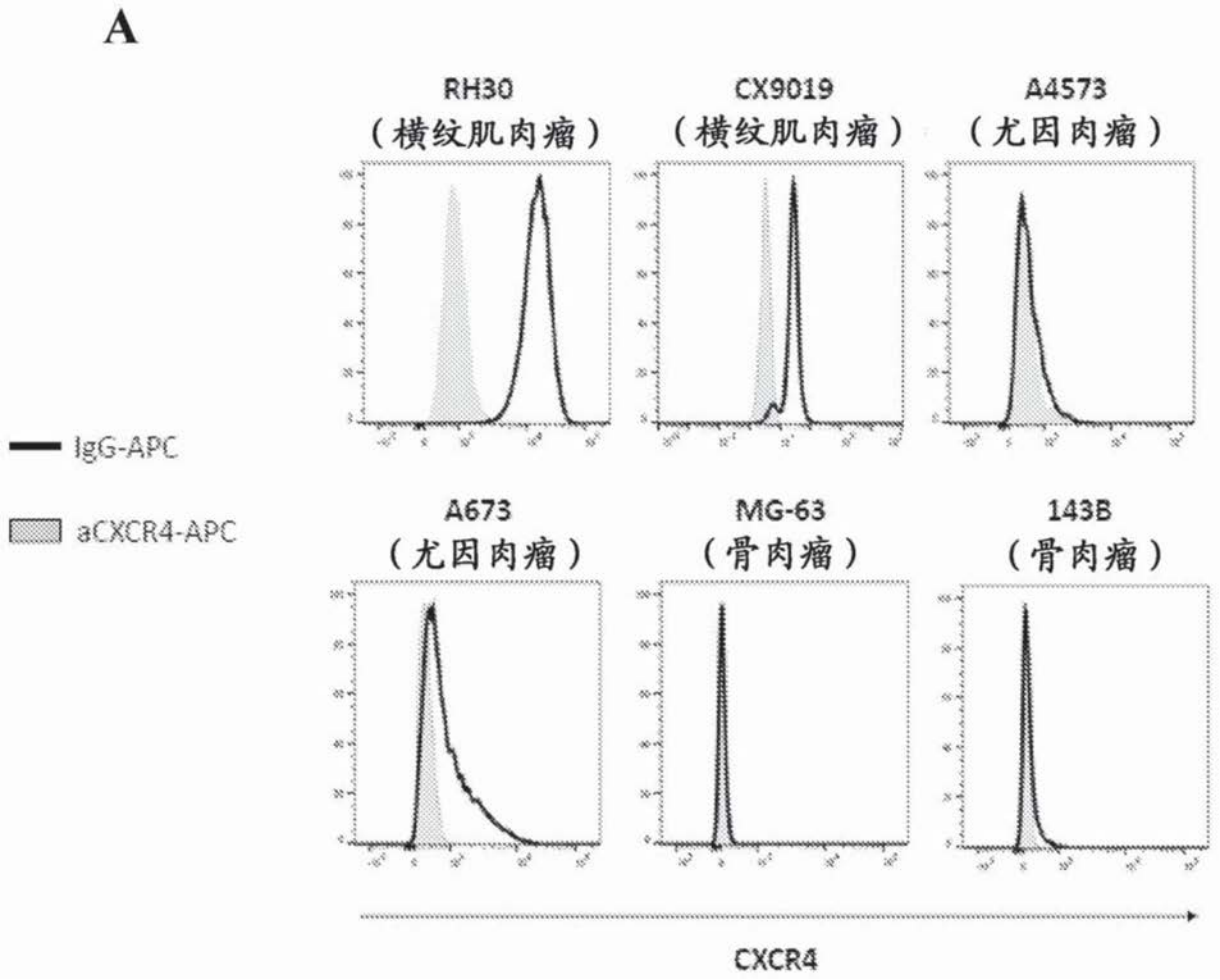

A
RH30
（横纹肌肉瘤）
CX9019
（横纹肌肉瘤）
A4573
（尤因肉瘤）
IgG-APC
aCXCR4-APC
A673
（尤因肉瘤）
MG-63
（骨肉瘤）
143B
（骨肉瘤）
CXCR4

图1A

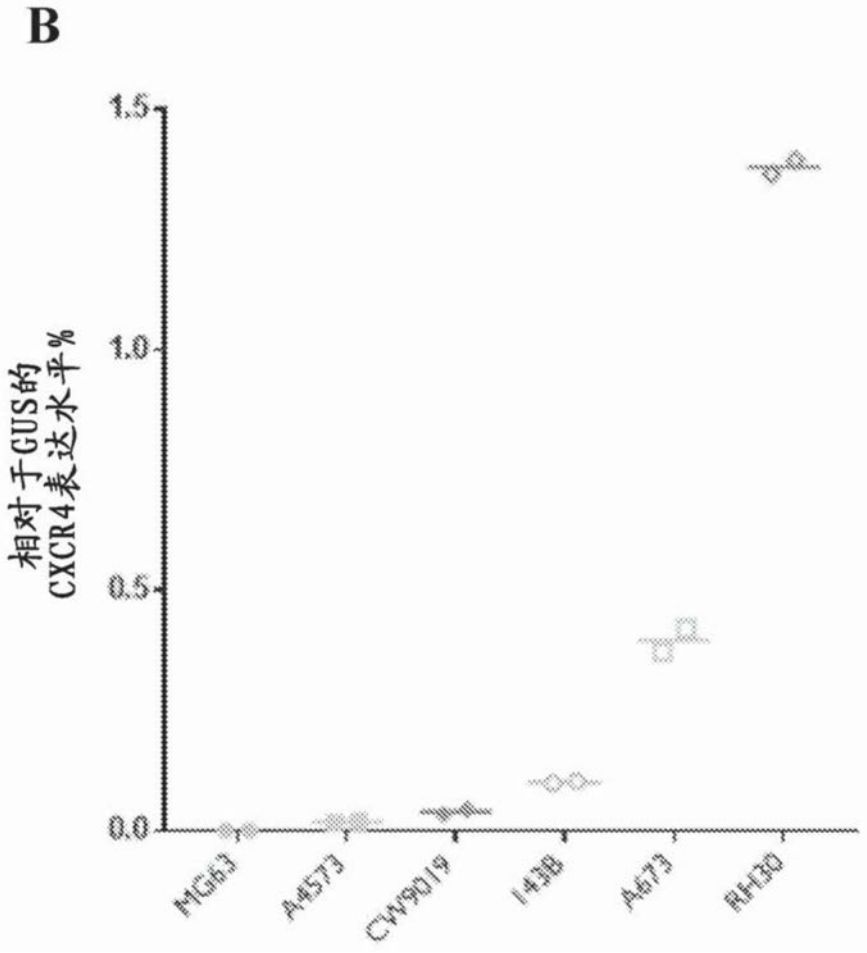

B
相对于GUS的
CXCR4表达水平%
1.5
1.0
0.5
0.0
MG63
A4573
CW9019
143B
A673
RH30

图1B

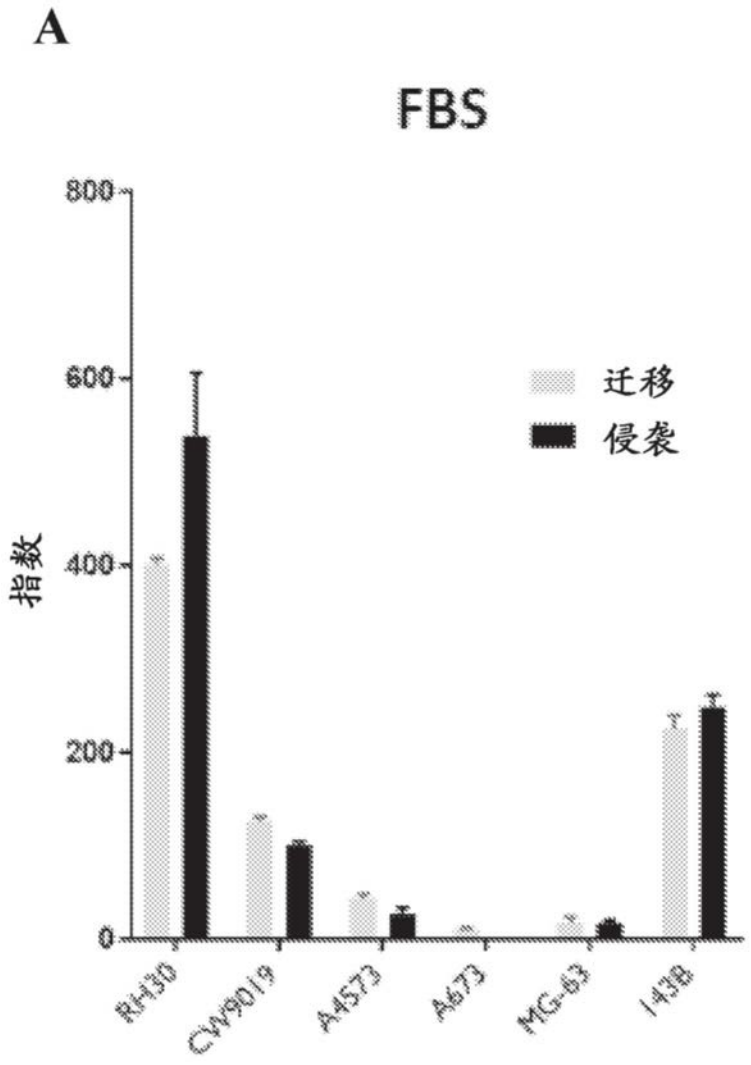

A
FBS
800
600
400
200
0
指数
迁移
侵袭
RH30
CW9019
A4573
A673
MG-63
143B

图2A

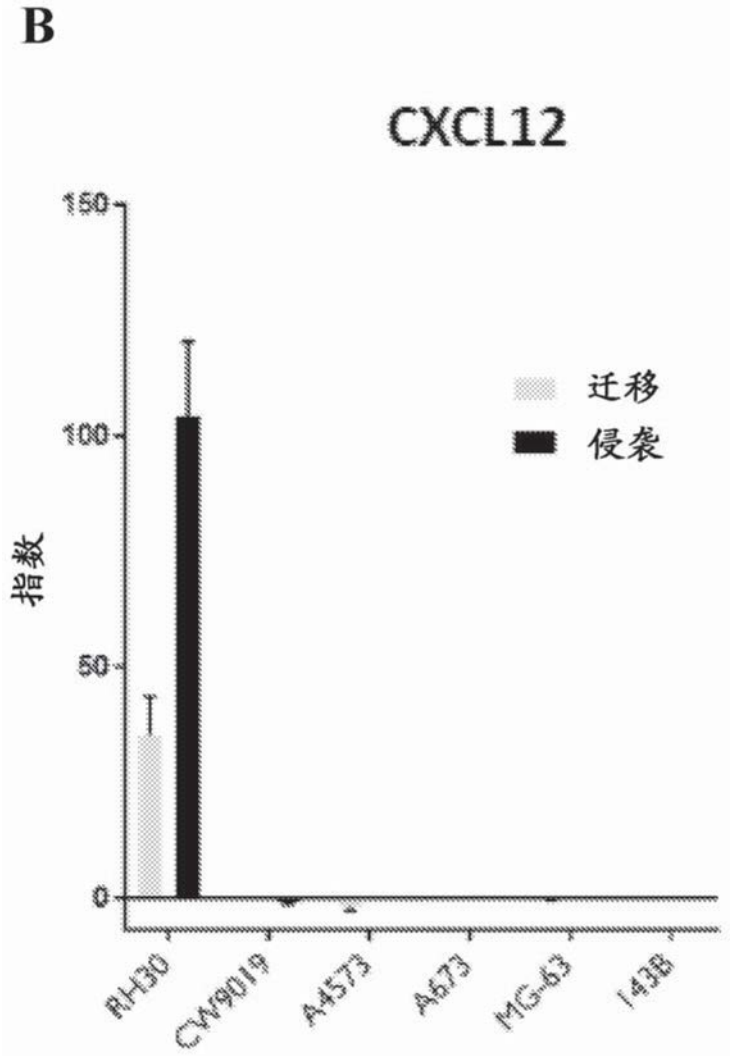


图2B

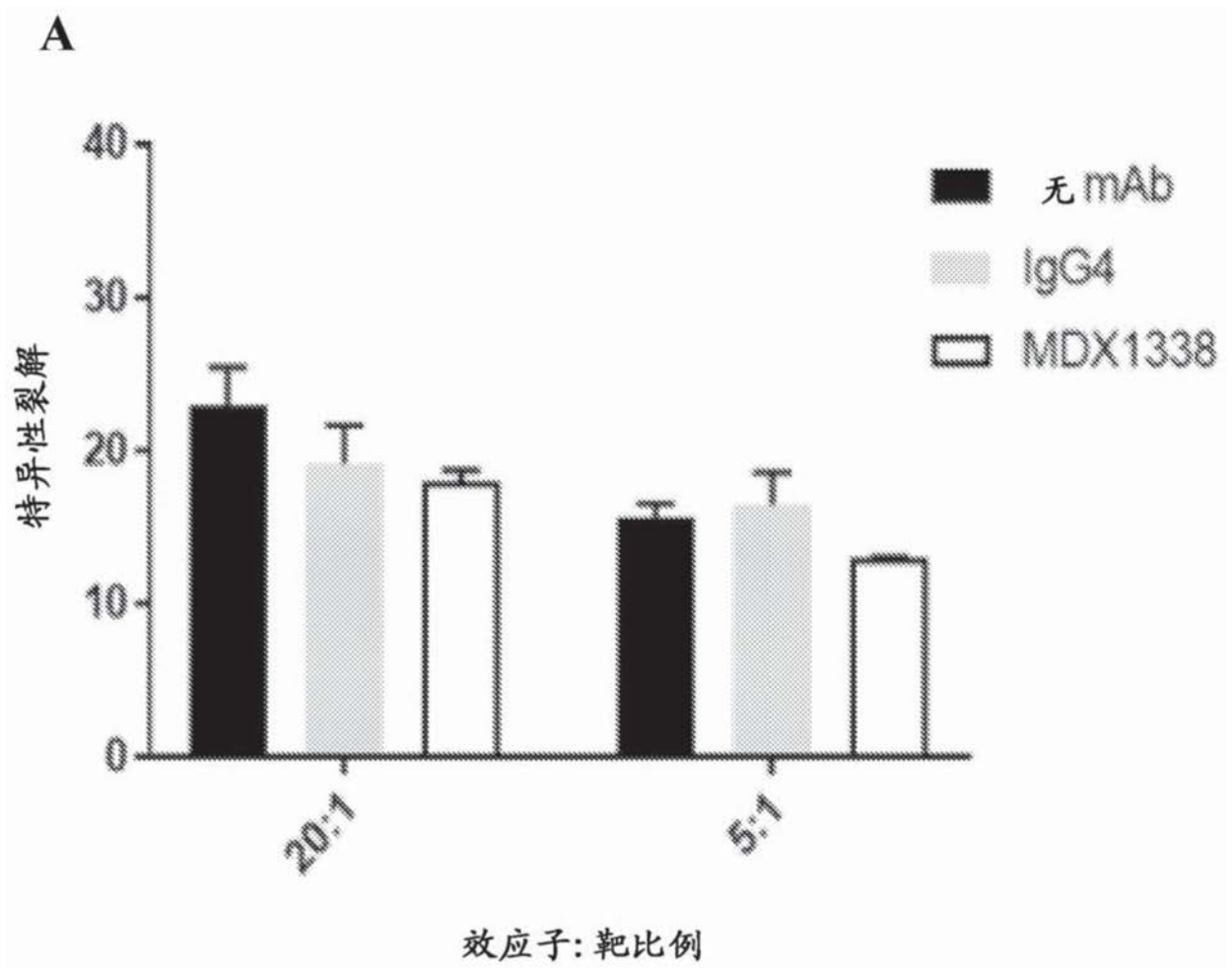


图3A

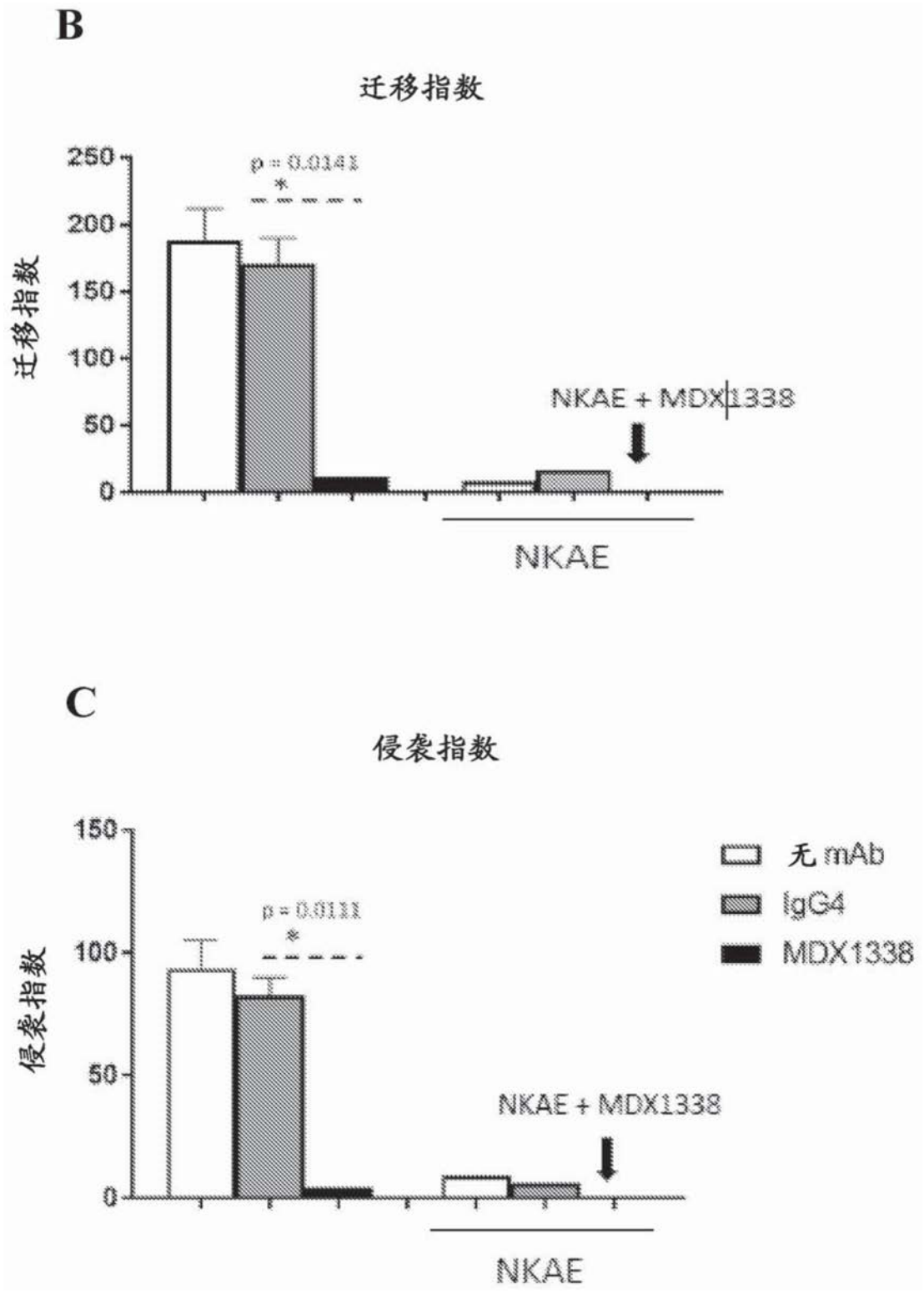

B
迁移指数
迁移指数
250
200
150
100
50
0
p = 0.0141
*
NKAE + MDX1338
NKAE
C
侵袭指数
侵袭指数
150
100
50
0
p = 0.0111
*
无 mAb
IgG4
MDX1338
NKAE + MDX1338
NKAE

图3B-C

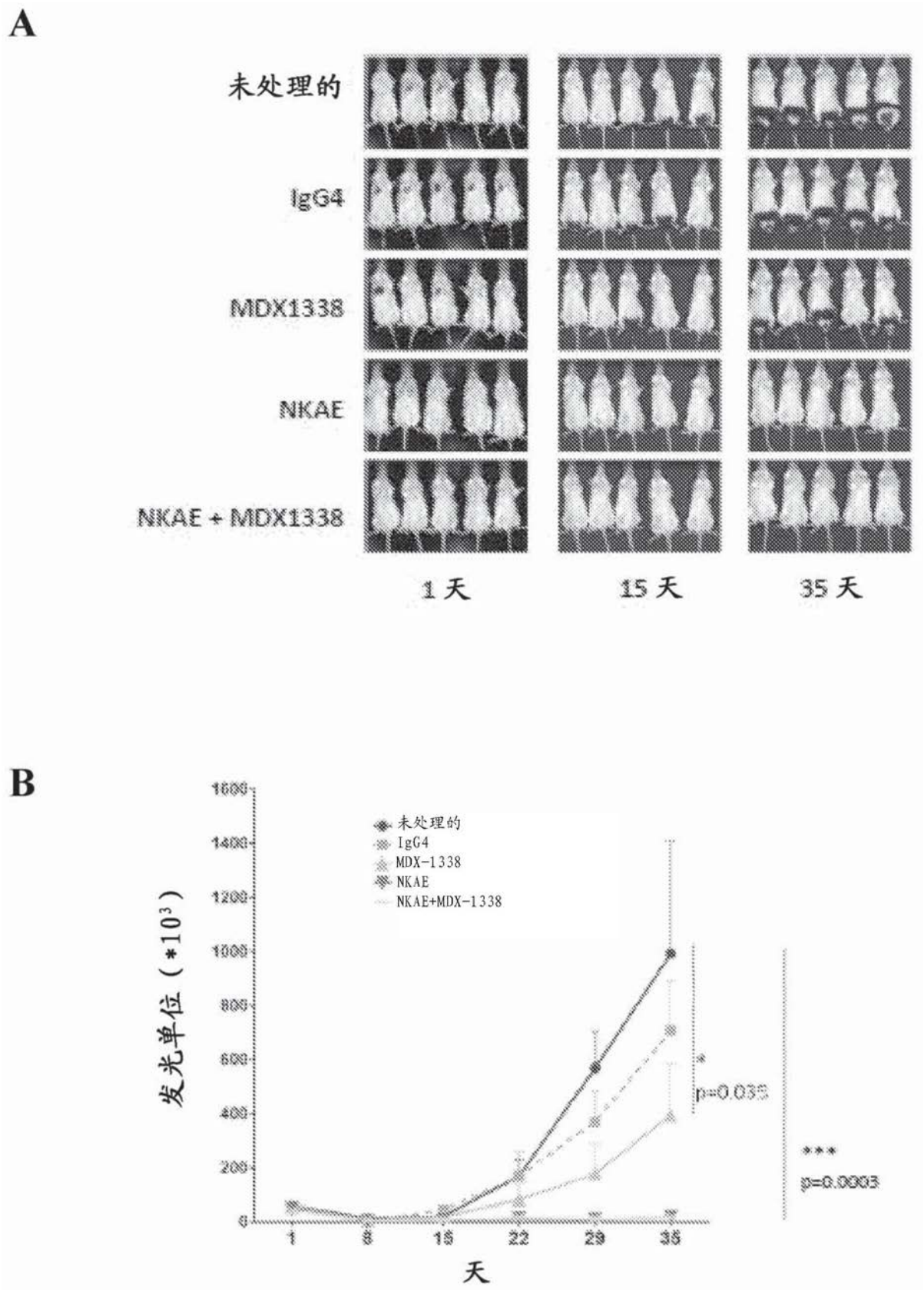

A
未处理的
IgG4
MDX1338
NKAE
NKAE + MDX1338
1 天
15 天
35 天
B
发光单位（*10³）
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
未处理的
IgG4
MDX-1338
NKAE
NKAE+MDX-1338
1
8
15
22
29
35
天
*
p=0.035
***
p=0.0003

图4A-B

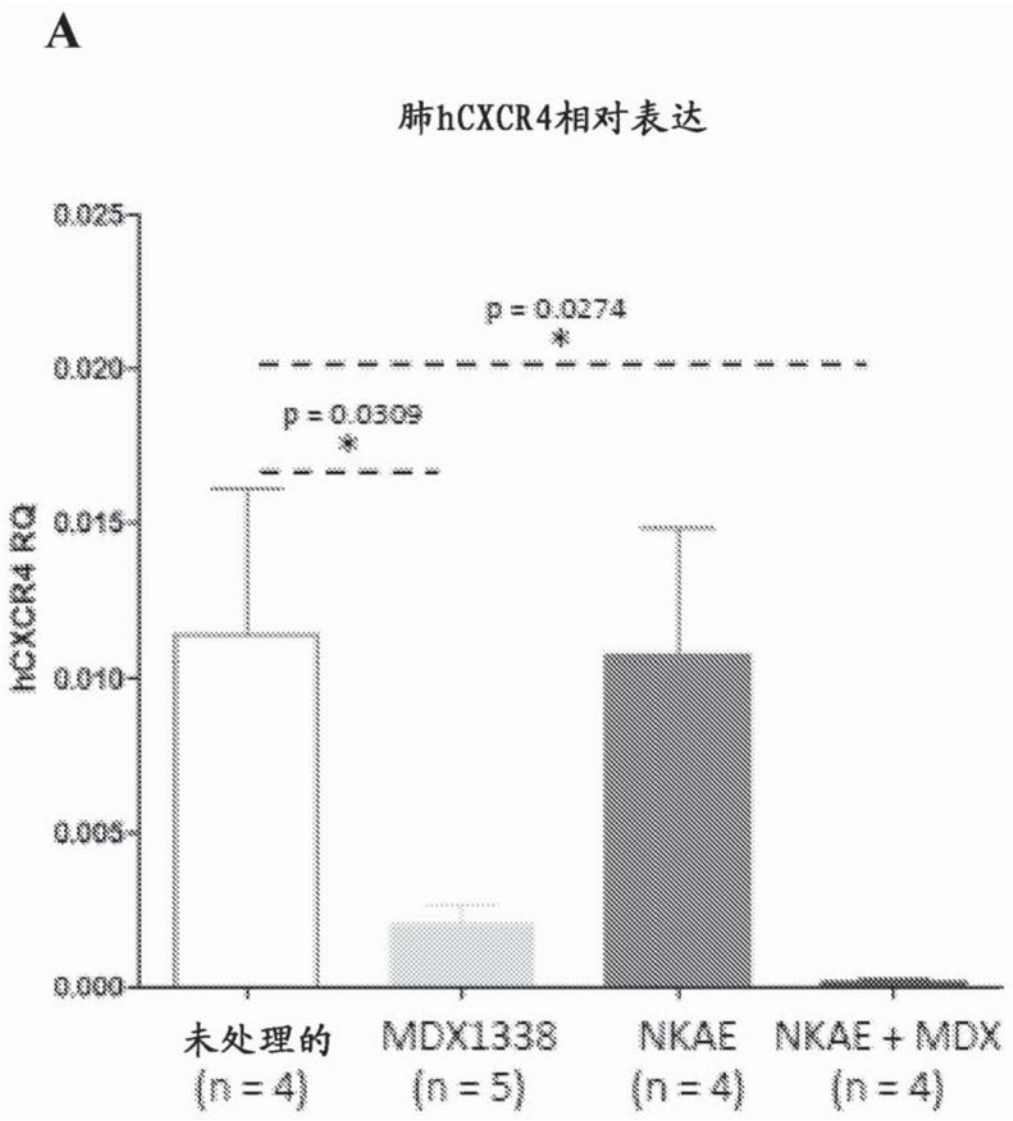

A
肺hCXCR4相对表达
hCXCR4 RQ
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
p = 0.0274
*
p = 0.0309
*
未处理的
(n = 4)
MDX1338
(n = 5)
NKAE
(n = 4)
NKAE + MDX
(n = 4)

图5A

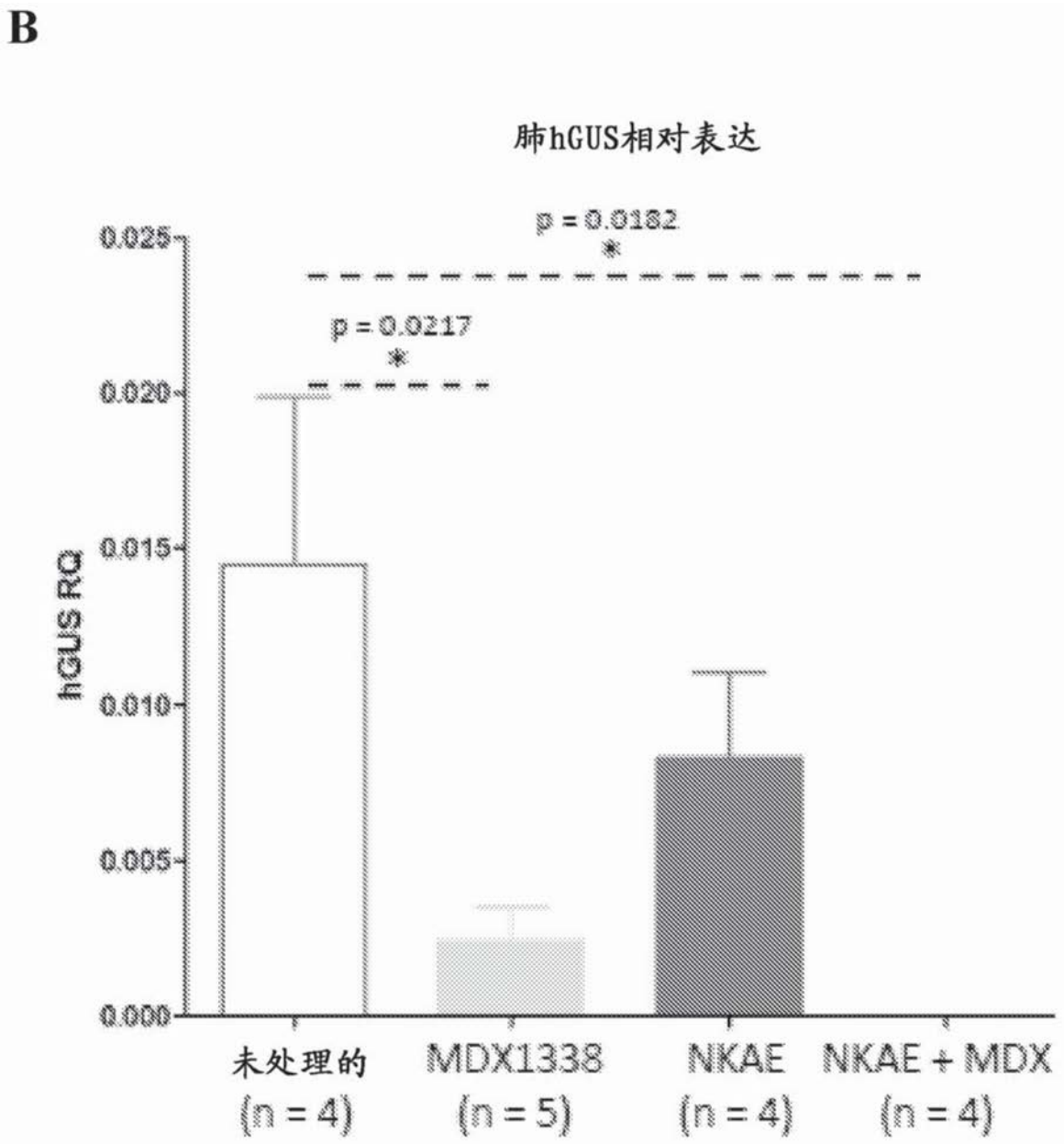

B
肺hGUS相对表达
p = 0.0182
*
p = 0.0217
*
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
hGUS RQ
未处理的
(n = 4)
MDX1338
(n = 5)
NKAE
(n = 4)
NKAE + MDX
(n = 4)

图5B

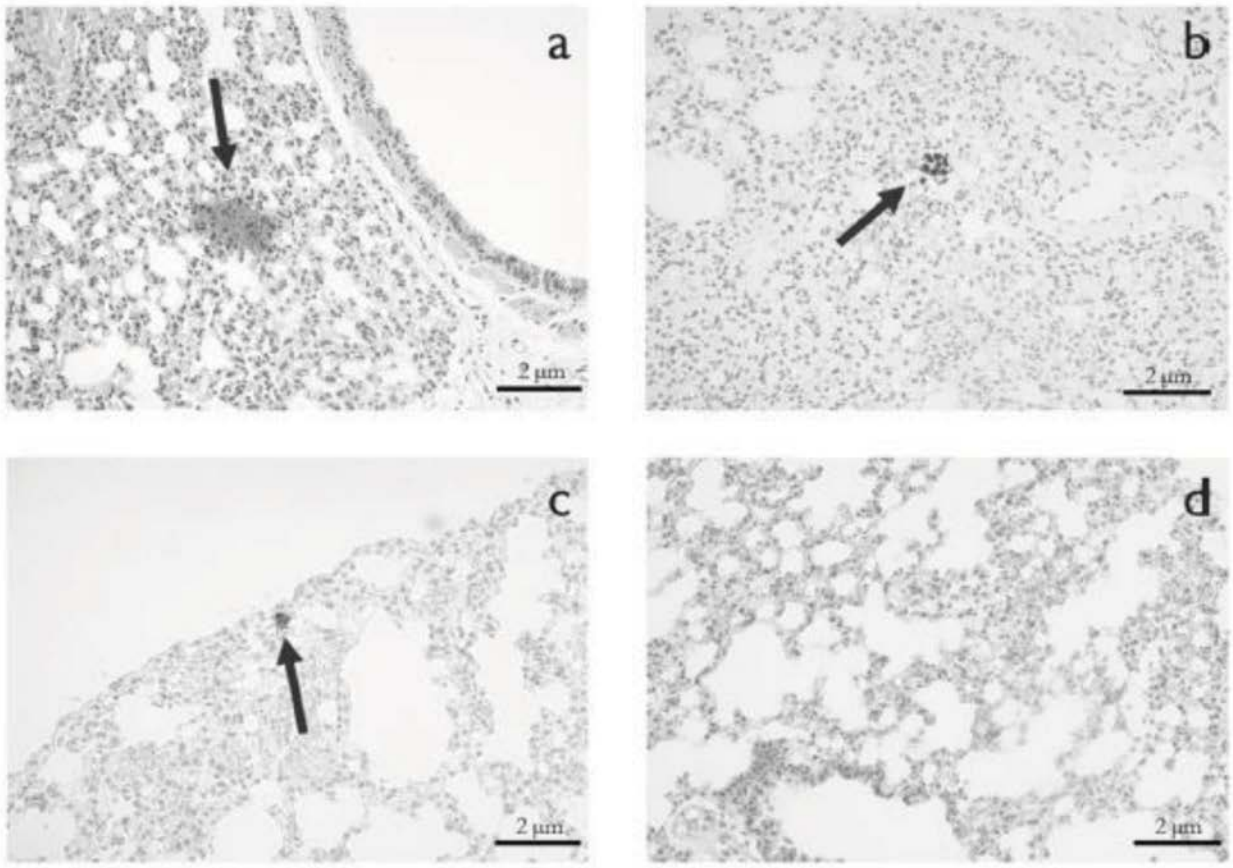


图6a-d

A

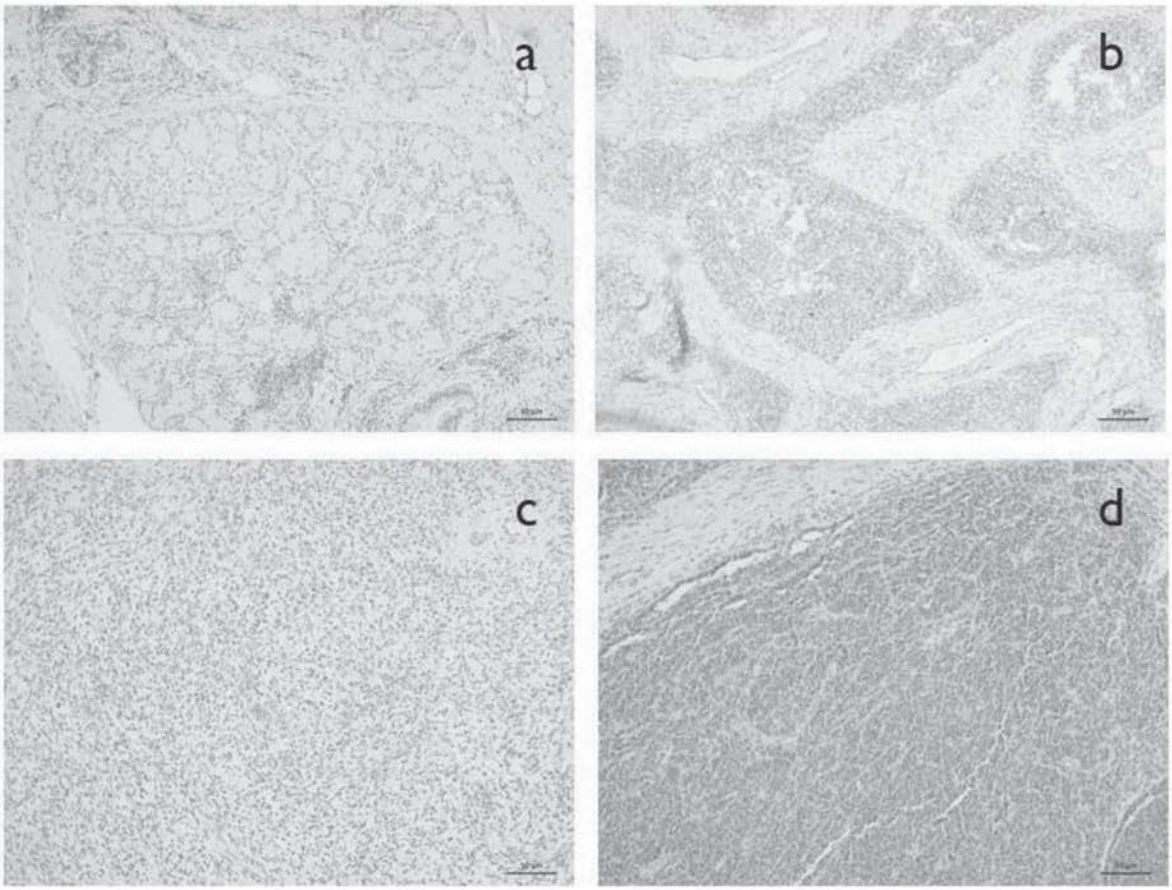


图7A

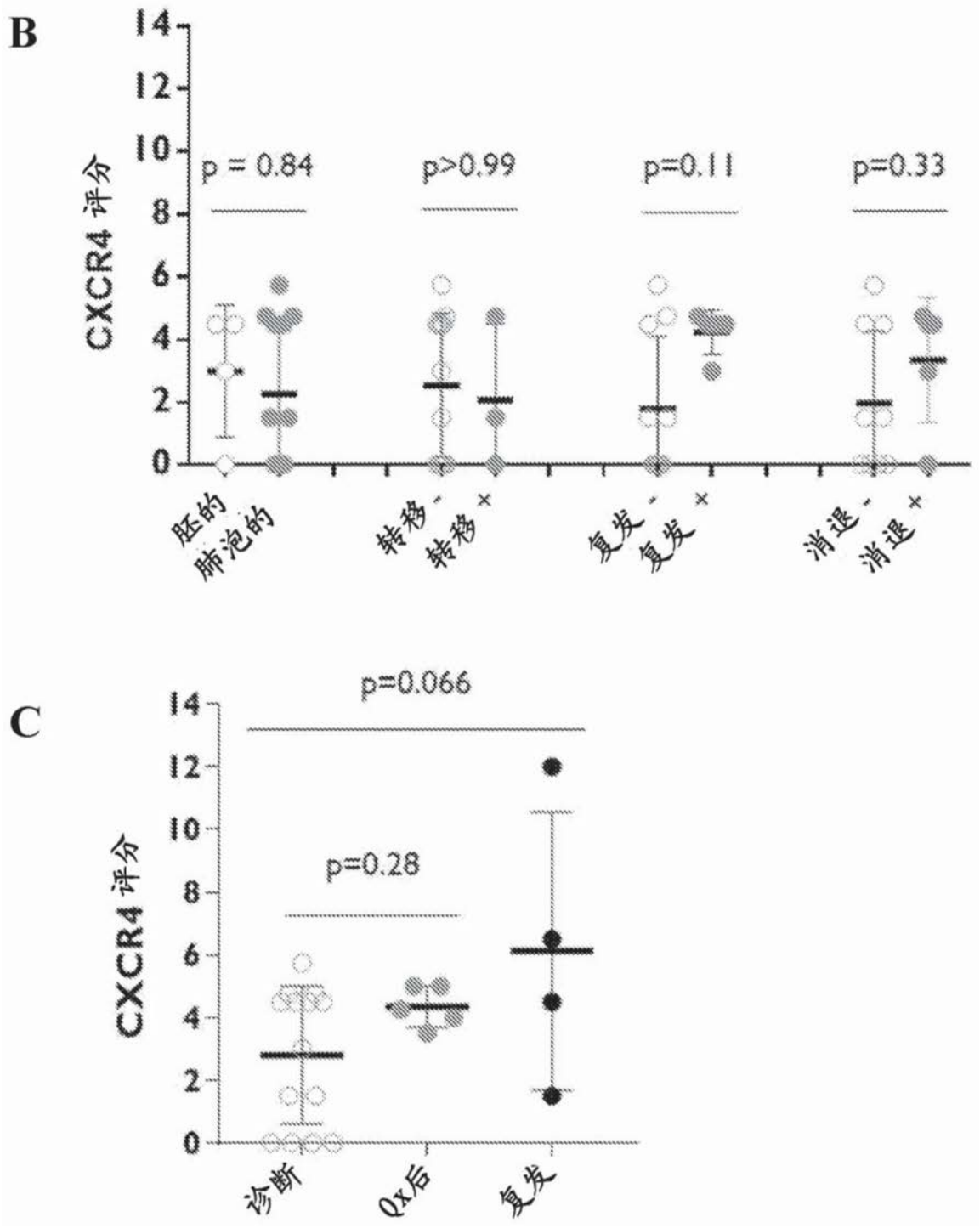

B
CXCR4 评分
14
12
10
8
6
4
2
0
p = 0.84
p>0.99
p=0.11
p=0.33
胚的
肺泡的
转移 -
转移 +
复发 -
复发 +
消退 -
消退 +
C
CXCR4 评分
p=0.066
p=0.28
诊断
Qx后
复发

图7B-C