



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월24일
(11) 등록번호 10-2024957
(24) 등록일자 2019년09월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/454* (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7012396
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월09일
심사청구일자 2017년11월09일
- (85) 번역문제출일자 2014년05월08일
- (65) 공개번호 10-2014-0093945
- (43) 공개일자 2014년07월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/064395
- (87) 국제공개번호 WO 2013/071068
국제공개일자 2013년05월16일
- (30) 우선권주장
 61/557,815 2011년11월09일 미국(US)
 61/569,113 2011년12월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2008060367 A2*
Hematologie. 2009, 15(3):194-196.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 23 항

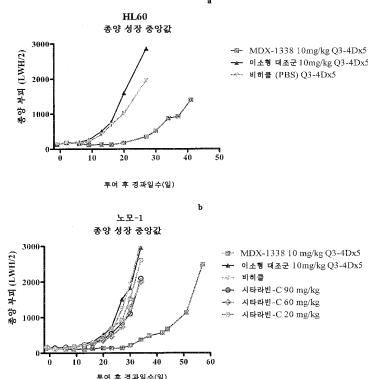
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 항-CXCR4 항체를 이용한 혈액 악성종양의 치료

(57) 요약

본 개시내용은 고 친화도로 CXCR4에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 CXCR4-발현 암, 특히 혈액 악성종양, 예컨대 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 또는 비-호지킨 림프종을 앓는 대상체에게 본 개시내용의 항-CXCR4 항체를 포함하는 제약 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 추가로 일정 용량의 항-CXCR4 항체 및 본 개시내용의 치료 방법에서 항-CXCR4 항체를 사용하는 것에 관한 지침서를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공한다.

대 표 도



명세서

청구범위

청구항 1

다발성 골수종 세포 표면 상에 발현된 CXCR4 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 치료 유효량을 포함하며, 다발성 골수종을 앓는 대상체에서 다발성 골수종 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/거나 다발성 골수종 세포의 아폽토시스를 유도함으로써 다발성 골수종을 앓는 대상체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체가 인간이고, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 인간 CXCR4 수용체에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 다발성 골수종이 재발성 또는 불응성 다발성 골수종인 제약 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 단독요법으로 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 CXCR4 수용체의 활성을 억제시키고, 다발성 골수종 세포의 화학요법제에 대한 감수성을 증가시키는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 수술, 방사선 및/또는 1종 이상의 치료제와 조합하여 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 1종 이상의 화학요법제와 조합하여 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 1종 이상의 화학요법제가

- (a) 레날리도미드 및 텍사메사손; 또는
- (b) 보르테조립 및 텍사메사손

인 제약 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 키메라 항체, 인간화된 항체, 또는 인간 항체, 또는 그의 항원-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열 25에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 29에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 것인

제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열 1에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 서열 5에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, 서열 9에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 서열 17에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 서열 21에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열 25에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 29에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 BMS-936564 또는 그의 항원-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 IgG1 또는 IgG4 항체 또는 그의 항원-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 15

제4항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg의 투여량으로 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 16

제8항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 BMS-936564 또는 그의 항원-결합 단편이고,

- (a) 1, 8, 15, 22, 29 및 36일째 (사이클 1) 및 1, 8, 15 및 22일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 정맥내 주입으로서 투여되는 BMS-936564 (1, 3 또는 10 mg/kg);
- (b) 21일 동안 (15-35일째; 사이클 1) 및 1-21일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 투여되는 레날리도미드 (25 mg po); 및
- (c) 15, 22, 29 및 36일째 (사이클 1) 및 1, 8, 15 및 22일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 투여되는 텍사메사손 (40 mg)

을 포함하는 투여량 요법으로 레날리도미드 및 텍사메사손과 조합하여 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 17

제8항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 BMS-936564 또는 그의 항원-결합 단편이고,

- (a) 1, 8, 15, 22 및 29일째 (사이클 1) 및 1, 8 및 15일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 정맥내 주입으로서 투여되는 BMS-936564 (1, 3 또는 10 mg/kg);
- (b) 15, 18, 22 및 25일째 (사이클 1) 및 1, 4, 8, 11일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 급속 정맥내 주입으로서 투여되는 보르테조맙 (1.3 mg/m²); 및
- (c) 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25 및 26일째 (사이클 1) 및 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 및 12일째 (사이클 2 및 후속 사이클)에 투여되는 텍사메사손 (20 mg)

을 포함하는 투여량 요법으로 보르테조닙 및 텍사메사손과 조합하여 대상체에게 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 18

(a) 다발성 골수종 세포 표면 상에 발현된 CXCR4 수용체에 특이적으로 결합하는 일정 용량의 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 및

(b) 제1항의 제약 조성물에서 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하는 것에 관한 지침서를 포함하는,

다발성 골수종을 앓는 대상체에서 다발성 골수종 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/거나 다발성 골수종 세포의 아폽토시스를 유도함으로써 다발성 골수종을 앓는 대상체를 치료하기 위한 키트.

청구항 19

제18항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열 25에 기재된 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 29에 기재된 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 것인 키트.

청구항 20

제18항에 있어서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 BMS-936564 또는 그의 항원-결합 단편인 키트.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제를 더 포함하는 키트.

청구항 22

제21항에 있어서, 1종 이상의 추가의 치료제가 1종 이상의 화학요법제인 키트.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 항원-결합 단편이 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, scFv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 미니바디인 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원 전역에 걸쳐, 다양한 공개문헌이 팔호 안에 저자명 및 일자에 의해, 또는 특허 번호 또는 공개 번호에 의해 언급된다. 이러한 공개문헌에 대한 전체 인용은 특허청구범위 바로 앞에 명시해 살펴볼 수 있다. 이러한 공개문헌의 개시내용은, 본원에서 기술되고 청구되는 본 발명의 발명일 현재 상기 문헌 안의 당업자에게 공지되어 있는 바와 같은 최신 기술을 보다 충분하게 기술하기 위하여 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다. 그러나, 본원에서 문헌을 인용한다는 것은 상기 문헌이 본 발명에 대한 선행 기술이라는 것을 인정하는 것으로서 해석되서는 안된다.

본 발명의 분야

[0003] 본 개시내용은 세포 표면 상에서 발현된 천연 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체, 및 암, 특히 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 및 비-호지킨(Hodgkin) 림프종 (NHL), 예컨대 만성 림프성 백혈병 (CLL), 여포성 림프종 (FL), 및 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL)을 비롯한, 혈액 악성종양을 치료하는 방법에 있어서 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 케모카인은 세포 수송 및 혈관신생을 조절하는 약 50개의 소형 단백질로 이루어진 패밀리이며, 이는 또한 종양 미세 환경에서 매우 중요한 역할을 한다 (문헌 [Vicari et al., 2002]). 케모카인은 그의 구조에 따라 (시스테

인-시스테인 모티프를 함유하는) C-C 케모카인 또는 (시스테인-X-시스테인 모티프를 함유하는) C-X-C 케모카인으로 분류된다. 따라서, 상기 케모카인에 결합하는 수용체는 각각 CCR 패밀리 또는 CXCR 패밀리의 구성원으로서 분류된다.

[0005] CXCR 패밀리의 한 구성원으로는 CD184로도 알려져 있는 CXCR4 수용체 (CXCR4)가 있는데, 이는 세포외 N-말단 테일 및 3개의 세포외 루프로 구성된 7-막횡단 도메인 G-단백질 커플링된 수용체이다. CXCR4의 세포내 카르복시말단은 β 및 γ 서브유닛 및 백일해 독소-감수성 Gi α 서브유닛으로 구성된 이종삼량체 G-단백질에 커플링된다 (문헌 [Loetscher et al., 1994]). 현재까지는 CXCR4에 대하여 단 하나의 리간드만이 확인되어 있는데, 이는 CXCL12로 알려져 있는 케모카인 (이는 또한 기질 세포-유래 인자-1 또는 SDF-1로도 알려져 있으며, 본원에서 상호교환적으로 사용된다)이다 (문헌 [Bleul et al., 1996]; [Oberlin et al., 1996]). CXCL12의 CXCR4에의 결합은 포스포리파제 C의 활성화를 자극시키고, 이어서 그 결과로 세포질 유리 칼슘은 상승하게 된다. CXCR4의 라이케이션은 최종적으로 주화성 및 이동을 유도하게 된다 (문헌 [Tachibana et al., 1998]; [Zou et al., 1998]). CXCR4는 또한 배발생, 항상성 및 염증에서도 중요한 역할을 한다. CXCR4 또는 CXCL12가 결핍되도록 조작된 마우스를 이용한 연구를 통해 CXCR4/CXCL12 경로가 기관 혈관화 뿐만 아니라, 면역계 및 조혈계와 연루되어 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Tachibana et al., 1998]). 추가로, CXCR4는 T 림프영양성 HIV-1 단리물에 대한 공수용체로서의 역할도 하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Feng et al., 1996]).

[0006] 건강한 성인에서 CXCR4는 주로, B 및 T 세포, 단핵구, 대식세포, NK, 및 수지상 세포 뿐만 아니라, CD34⁺ 골수 (BM) 전구 세포를 포함하는 조혈 계통 세포 상에서 발현된다 (문헌 [Lee et al., 1999]). 내피 및 상피 세포, 성상세포, 및 뉴런 상에서도 또한 CXCR4는 저수준으로 발현된다 (문헌 [Gupta et al., 1998]; [Hesselgesser et al., 1997]). CXCL12는 내피 세포 이동 및 증식을 유도하는 것으로 밝혀졌으며, VEGF와 함께 신혈관신생을 증진시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Guleng et al., 2005]). CXCR4의 과발현은 또한 백혈병, 림프종, 췌장, 유방, 난소, 폐, 전립선 및 결장직장 종양을 포함하는 암의 75%에서, 및 CXCL12 사이의 상호작용에서 발견되었고, 이는 BM 미세 환경 내에서의 조혈 줄기 세포를 귀소 및 유지시키는 데 필수적이다 (문헌 [Mohle et al., 1998]). CXCR4의 비시클란 길항제인 플레리사포르(Plerixafor) (AMD3100; 모조빌(Mozobil))는 줄기 세포를 혈류 내로 동원하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Dar et al., 2011]). 또 다른 CXCR4 길항제 비시클람인 AMD3100 및 AMD3465는 CXCR4/CXCL12 신호전달을 차단함으로써 AML 종양 세포의 화학감작을 증가시킨다 (문헌 [Nervi et al., 2009]; [Zeng et al., 2009]).

[0007] AML은 BM에 축적되고, 정상 혈액 세포의 생산을 방해하는 비정상적인 백혈구의 신속한 성장을 특징으로 하는, 성장 속도가 빠른 골수성 혈액 세포주의 암이다. AML에서, CXCR4는 BM 세포의 CD34⁺ 분획 상에서 고도로 발현된다. AML 세포 상의 더 낮은 수준의 CXCR4는 무재발성 전체 생존기간을 연장시키는, 보다 우수한 예후와 상관관계가 있다. 더 낮은 CXCR4 수용체 발현은 BM의 화학-보호 환경에서 발현되는 CXCL12쪽으로의 1차 AML 세포의 이동을 약화시킨다 (문헌 [Tavor et al., 2004]).

[0008] 다발성 골수종 (MM)은 형질 세포의 악성 증식으로부터 유발되는 암 형태이다. 비-호지킨 림프종 다음으로 다발성 골수종은 2번째로 가장 빈번한 혈액암으로서, 전세계에서 매년 대략 80,000여 건 (미국에서 20,000건)의 새로운 사례가 발생하고 있으며, 매년 대략 62,000여 명이 사망하고 있다 (미국에서 매년 10,500여 명이 사망) (문헌 [Jemal et al., 2008; 2009]). MM 세포는 우선적으로 BM에서 성장하는데, 상기 세포는 여기서 정상적인 혈액 세포 및 정상적인 항체의 생산을 방해함으로써 면역 결핍, 골격 파괴, 저칼슘혈증, BM 및 신부전을 유발한다. AML 이외에도, MM 환자에서 CXCL12의 혈청 수준은 증가되어 있으며, CXCR4 발현은 MM의 진행 단계의 소견인 골수외성 형질세포종에서 증가되어 있다. 추가로, CXCL12/CXCR4 축의 차단은 MM 세포의 이동 및 상기 세포의 BM으로의 귀소를 약화시킨다 (문헌 [Alsayed et al., 2007]).

[0009] 비-호지킨 림프종은 호지킨 림프종 이외에도 다양한 그룹의 림프구 암 중 임의의 것을 포함한다. NHL은 어느 연령대에서나 발생될 수 있고, 이는 대개는 정상보다 큰 림프절, 발열, 체중 감소를 특징으로 한다. (성장 속도가 빠른) 매우 침습성인 유형에서부터 (성장 속도가 느린) 무통성 유형에 이르기까지, 많은 상이한 유형의 NHL은 그 중증도가 상당히 다양하고, B 세포 또는 T 세포로부터 형성될 수 있다. B 세포 NHL로는 버킷 (Burkitt) 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프성 림프종 (CLL/SLL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종 (FL), 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종, 및 외투 세포 림프종을 포함한다. T 세포 NHL로는 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 전구체 T-림프모구성 림프종을 포함한다. 2012년 미국에서 대략 70,000여 건의 신규 NHL 사례가 발생하고, 이로 인해 약 19,000여 명이 사망하게 될 것으로 추정된다. 고수준의 CXCR4 발현은 시험된 19개의 1차 NHL 세포주 중 18개에서 입증되었다 (문헌 [Bertolini

et al., 2002]). CXCL12가 소포 NHL 세포의 이동을 증진시킨다는 것 (문헌 [Corcione et al., 2000]), 및 CXCR4-CXCL12 회로망이 CLL 세포의 이동에 중요한 것으로 보인다는 것 또한 밝혀졌다 (문헌 [Burger et al., 1999]).

[0010] 다수의 바람직한 특성을 보이는 인간 항-CXCR4 모노클로날 항체는 앞서, 2006년 10월 2일 출원된 미국 가출원 번호 제60/827,851호를 우선권 주장하는 PCT 국제 공개 번호 WO 2008/060367 (출원 번호 PCT/US2007/021152)에 기술된 바 있다. 상기 두 출원 모두의 개시내용은 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다. WO 2008/060367에서 개시된 바와 같이, 시험관내 연구를 통해 상기 모노클로날 항체는 낮은 나노몰 친화도로 CXCR4-발현 세포에 결합하고, CXCL12의 CXCR4-발현 세포에의 결합을 차단하고, 낮은 나노몰 EC₅₀ 값으로 CXCL12-유도성 이동 및 칼슘 흐름을 억제시킨다는 것이 입증되었다. 생체내에서의 혈액암에 대한 그의 활성을 측정하고, 그의 항암 활성의 근간이 되는 기전을 추가로 밝혀내는 추가 조사를 위해, 임상전 연구에서 예상 밖의 유익한 항-고형 종양 특성을 보인, 완전 인간 모노클로날 항체 중 하나인 BMS-936564 (WO 2008/060367에서는 F7로 지명되었고, 이는 또한 앞서 MDX-1338로도 지명되었으며, 본원에서는 상기 3가지 명칭 모두가 상호교환적으로 사용된다)를 선택하였다. BMS-936564 항체는 또한 재발성/불응성 AML, MM, 및 NHL 환자에서의 I상 임상 연구에 진입하였다.

발명의 내용

[0011] 본 개시내용은 인간 CXCR4에 결합하고, 치료 항체에서 바람직한 다수의 특성들을 보이는 단리된 모노클로날 항체, 특히 인간 모노클로날 항체를 제공한다. 이러한 특성으로는 세포 표면 상에서 발현된 천연 인간 CXCR4에 낮은 친화도 (nM)로 결합할 수 있는 능력, 50 nM 이하의 억제 EC₅₀으로 SDF-1의 인간 CXCR4에의 결합을 억제시킬 수 있는 능력, 3 nM 이하의 억제 EC₅₀으로 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도성 칼슘 흐름을 억제시킬 수 있는 능력, 50 nM 이하의 억제 EC₅₀으로 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도성 이동을 억제시킬 수 있는 능력, 인간 제대 정맥 내피 세포 (HuVEC)에 의한 모세관 형성을 억제시킬 수 있는 능력, CXCR4를 발현하는 매우 다양한 세포에서 아폽토시스를 유도할 수 있는 능력, 시험관내에서 종양 세포 증식을 억제시킬 수 있는 능력, 생체내 종양 성장을 억제시킬 수 있는 능력, CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제시킬 수 있는 능력, 및/또는 CXCR4⁺ 종양을 보유하는 대상체에서 생존기간을 연장시킬 수 있는 능력을 포함한다.

[0012] 바람직한 측면에서, 본 개시내용은 모노클로날 항체가

[0013] (a) 세포 표면 상에서 발현된 천연 인간 CXCR4에 결합하고;

[0014] (b) SDF-1 (CXCL12)의 인간 CXCR4에의 결합을 억제시키고;

[0015] (c) 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도성 칼슘 흐름을 억제시키고;

[0016] (d) 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도성 이동을 억제시키고;

[0017] (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제시키는 것인, 단리된 모노클로날 항체, 바람직하게는 인간 모노클로날 항체, 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 더욱더 바람직하게, 항체는 또한 CXCR4를 발현하는 세포의 아폽토시스를 유도하고/거나, 생체내 종양 세포 아폽토시스를 유도하고/거나, CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제시킨다.

[0018] 본 개시내용은 또한 혈액 악성종양을 비롯한 CXCR4-발현 암을 앓는 대상체에게 세포 표면 상에 발현된 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 항-CXCR4 항체의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 혈액 악성종양을 비롯한 CXCR4-발현 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 CXCR4의 활성을 억제시킨다. 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 CXCR4를 발현하는 표적 세포의 아폽토시스를 유도한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 단독요법으로 사용된다. 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 다른 항암제와 조합하여 사용된다. 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 MM, AML, 또는 NHL이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 더욱 바람직하게, 항체는 BMS-936564이다.

[0019] 본 개시내용은 추가로 혈액 악성종양을 비롯한 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 제약 조성물의 제조에 있어서 CXCR4 항체의 용도를 제공한다.

[0020] 본 개시내용은 또한 (a) 일정 용량의 항-CXCR4 항체; 및 (b) 본원에 기술된 방법 중 임의의 방법으로 항-CXCR4 항체를 사용하는 것에 관한 지침서를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공한다. 바람직한 실

시양태에서, 항-CXCR4 항체는 BMS-936564이다.

[0021] 본 개시내용의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 실시예로부터 자명해질 것이며, 이를 상세한 설명 및 실시예는 제한적인 것으로 해석되서는 안된다. 본 출원 전역에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 진뱅크(GENBANK)[®] 엔트리, 특히 및 공개된 특히 출원의 내용이 본원에 참조로 명백하게 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 F7 (BMS-936564) 인간 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역 (a)의 뉴클레오티드 서열 (서열 33) 및 아미노산 서열 (서열 25)을 보여주는 것이다. CDR1 (서열 1), CDR2 (서열 5) 및 CDR3 (서열 9) 영역이 윤곽 표시되어 있고, V, D 및 J 배선 유래가 표시되어 있다. F7의 경쇄 가변 영역 (b)의 뉴클레오티드 서열 (서열 37) 및 아미노산 서열 (서열 29) 또한 제시되어 있다. CDR1 (서열 13), CDR2 (서열 17) 및 CDR3 (서열 21) 영역이 윤곽 표시되어 있고, V 및 J 배선 유래가 표시되어 있다.

도 2는 세포 표면 상에 천연 인간 CXCR4를 발현하는 CEM 세포에의 인간 항-CXCR4 항체 F7, F9, D1 및 E2의 결합을 보여주는 것이다.

도 3은 CEM 세포에의 결합에 대한 FITC-표지된 항-CXCR4 항체 F9와 비표지된 인간 항-CXCR4 항체 패널 사이의 항체 경쟁을 보여주는 것이다.

도 4는 BMS-936564 결합의 유동 세포측정법 분석을 보여주는 것이다. 항체는 AML 세포주 노모(Nomo)-1 및 HL-60 (a), CXCR4로 형질감염된 R1610, CEM 및 라모스(Ramos) 세포주 (b), MM 세포주, JJN-3R, 및 MOLP8 (c), 및 1차 AML 환자 혈액 세포 (d)에 결합한다.

도 5는 항-CXCR4 인간 항체 F7 (BMS-936564), F9 및 D1에 의한, CEM 세포 상에 발현된 CXCR4에의 ¹²⁵I-표지된 CXCL12의 결합 억제를 보여주는 것이다. E2 항체는 CXCL12의 CEM 세포에의 결합을 억제시키지 못했다.

도 6은 항-CXCR4 항체 MDX-1338 (BMS-936564) (a) 또는 항-CXCL12 항체 (b)에 의한 ¹²⁵I-표지된 CXCL12의 CEM 세포에의 결합 억제, 및 MDX-1338 (6c)에 의한 ¹²⁵I-표지된 CXCL12의 라모스 세포에의 결합 억제를 보여주는 것이다. MDX-1338, 항-CXCL12, 또는 이소형 대조군 항체의 농도를 증가시켜 가면서 그의 존재하에서 100 pM ¹²⁵I-CXCL12를 CEM 세포와 함께 인큐베이션시킴으로써 리간드 결합 검정법을 수행하였다. 비표지된 CXCL12를 1,000 배 몰 과량 (100 nM)으로 첨가하여 비-특이적 결합 (NSB)을 확립하였다. 항체 또는 비표지된 경쟁자 부재하에 ¹²⁵I-CXCL12를 첨가하여 달성가능한 전체 결합을 확립하였다 (전체).

도 7은 항-CXCR4 인간 항체 F7 (BMS-936564), F9 및 D1에 의한 CEM 세포에서의 CXCL12 (SDF-1)-유도성 칼슘 흐름 억제를 보여주는 것이다. E2는 CXCL12-유도성 칼슘 흐름을 유의적으로 억제시키지 못했다.

도 8은 항-CXCR4 항체 MDX-1338 (BMS-936564) 또는 항-CXCL12 항체에 의한 CXCR4⁺ 세포에서의 CXCL12-유도성 칼슘 흐름 억제를 보여주는 것이다. 시험 항체 또는 이소형 대조군의 존재 또는 부재하에서 라모스 세포 (a) 또는 CEM 세포 (b)를 칼슘 4 염료와 함께 인큐베이션시킴으로써 칼슘 흐름 검정법을 수행하였다. 염료 로딩된 세포를 각각 라모스 및 CEM 세포와 50 nM 및 5 nM CXCL12와 함께 실온에서 인큐베이션시켰다. 20 내지 200초 사이의 형광의 곡선하 면적을 정량화하고, EC₅₀을 계산하였다.

도 9는 항-CXCR4 인간 항체 F7 (BMS-936564) 및 F9에 의한 CEM 세포의 CXCL12-유도성 이동 억제를 보여주는 것으로서, 이에 반해 항체 D1 및 E2는 이동을 유의적으로 억제시키지 못했다.

도 10은 항-CXCR4 항체 MDX-1338 (BMS-936564) 또는 항-CXCL12 항체에 의한 CXCR4⁺ 세포의 CXCL12-유도성 이동 억제를 보여주는 것이다. 라모스 (a) 및 CEM (b) 세포를 이용한 이동 검정법을 각각 1.25 nM 및 0.05 nM CXCL12의 존재하에서 수행하였다. 하부 구획으로 이동한 표지화된 세포의 개수를 퓨전(Fusion) (퍼킨엘머 (PerkinElmer)) 플레이트 판독기 상에서 측정하였다. 각각의 점은 n = 3을 나타낸다.

도 11은 (a) 항-CXCR4 인간 항체 F7 (BMS-936564), F9 및 E2에 의한 시험관내 라모스 종양 세포 증식 억제, 및 (b) 항-CXCL12에 의해서는 억제되지 않은 것과 비교되는, MDX-1338 (BMS-936564)에 의한 라모스 세포 증식 억제를 보여주는 것이다. (B)에서, 다양한 웹티드 CXCR4 길항체의 효과 또한 제시되어 있다.

도 12는 피하 종양 모델에서의 항-CXCR4 인간 항체 F7 (BMS-936564) 및 F9에 의한 생체내 라모스 종양 세포 증식 억제를 보여주는 것이다. 도 12a는 평균 종양 부피 성장 곡선을 보여주는 것이고; 도 12b는 종양 부피 성장 중앙값 곡선을 보여주는 것이고; 도 12c는 체중 변화율(%) 중앙값을 보여주는 것이다.

도 13은 라모스 전신 종양 세포 모델에서 항-CXCR4 인간 항체 F9 (a), 또는 항-CXCR4 항체, BMS-936564, 및 항-CXCL12 항체 (b)로 처리된 마우스의 생존율(%)을 보여주는 것이다. BMS-936564는 상기 라모스 전신 모델에서 고도로 효과적이었고, 항-CXCL12 Ab는 어떤 효능도 보이지 않았다.

도 14는 라모스 세포를 10 µg/mL MDX-1338 (BMS-936564) 또는 이소형 대조군과 함께 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션시킴으로써 수행된 아폽토시스 검정법의 결과를 보여주는 것이다. 세포를 아넥신(Annexin) V-FITC 및 프로파이드 아이오다이드로 염색하였다 (a). 오직 아넥신 V에만 양성이거나, 또는 아넥신 V 및 PI 둘 모두에 대해 이중 양성인 세포의 비율(%)을 측정하였다 (b).

도 15는 MDX-1338 (BMS-936564)에 의한 아폽토시스의 유도가 CXCR4-특이적이라는 것을 보여주는 것이다. MDX-1338 또는 이소형 대조군을 CXCR4로 형질감염된 세포 (a) 또는 R1610 모체 세포 (b)에 첨가하고, 아넥신 V-FITC 및 PI로 염색하였다. 오직 아넥신 V에만 양성이거나, 또는 아넥신 V 및 PI 둘 모두에 대해 이중 양성인 것에 이중으로 양성을 띠는 세포의 비율(%)도 도시되어 있다.

도 16은 차단 CXCR4 항체, MDX-1338 (BMS-936564), 및 리툭시맙 (키메라 항-CD20 모노클로날 항체) 양성 대조군에 의한 라모스 세포 텁프종 이종이식편의 생체내 종양 성장 억제, 및 차단 항-CXCL12 항체에 의한 종양 성장 억제 부재를 보여주는 것이다.

도 17은 MDX-1338 (BMS-936564)에 의한 HL60 세포 (a) 및 노모-1 (b) 급성 콜수성 백혈병 이종이식편의 생체내 종양 성장 억제를 보여주는 것이다. 시타라빈은 예상대로 시타라빈-내성 노모-1 종양의 종양 성장을 억제시키지 못했다.

도 18은 MDX-1338 (BMS-936564)에 의한 다양한 CXCR4⁺ 다발성 콜수종 세포 이종이식편의 생체내 종양 성장 억제를 보여주는 것이다. a, MDX-1338 단독으로, 또는 레날리도미드 또는 보르테조닙과 조합하여 처리된 MOLP8 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; b, MDX-1338 또는 레날리도미드 또는 보르테조닙으로 처리된 JJN-3R 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; c, MDX-1338 단독으로, 또는 보르테조닙과 조합하여 처리된 모체 JJN-3 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; d, MDX-1338 단독으로, 또는 레날리도미드와 조합하여 처리된 모체 JJN-3 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; e, MDX-1338 단독에 의한, 또는 레날리도미드 (레블리미드(REVLIMID)[®])와의 조합에 의한 RPMI-8226 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; f, MDX-1338 단독에 의한, 또는 보르테조닙 (VELCADE)[®]과의 조합에 의한 RPMI-8226 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; g, MDX-1338 단독에 의한, 또는 레날리도미드와의 조합에 의한 MM. 1S 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; h, MDX-1338 단독에 의한, 또는 보르테조닙과의 조합에 의한 OMP-2 세포 이종이식편의 종양 성장 억제; i, MDX-1338 단독에 의한, 또는 레날리도미드와의 조합에 의한 OPM-2 세포 이종이식편의 종양 성장 억제.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 개시내용은 세포 표면 상에 발현된 천연 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체, 특히 인간 모노클로날 항체에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 배선 서열로부터 유래된 것이고/거나, 특정 구조적 특징, 예컨대 특정 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 또는 CDR을 포함한다. 본 개시내용은 또한 CXCR4 발현과 연관된, 또는 CXCR4/CXCL12 경로에 관여하는 질환 또는 장애, 예컨대 암, 특히 혈액 악성종양, 종양 전이, HIV 감염, 염증 및 혈관신생에서 CXCR4 활성을 조절하기 위해, 또는 다르게는 그를 치료하기 위해 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0024]

용어

[0025]

본 개시내용이 보다 쉽게 이해될 수 있도록 하기 위해, 먼저 특정 용어들을 정의한다. 본 출원에서 사용되는 바, 본원에서 달리 명확하게 제공되는 것을 제외하면, 각각의 하기 용어들은 하기 진술되는 의미를 가져야 한다. 추가의 정의는 본 출원 전역에 걸쳐 진술된다.

[0026]

"투여하는"이란 당업자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 항체에 대해 바람직한 투여 경로로는 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척수 또는 다른 비경구적 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한

다. 본원에서 사용되는 바, "비경구 투여"라는 어구는 일반적으로 주사에 의한, 장관 및 국부 투여 이외의 투여 모드를 의미하고, 이는 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 램프관내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입 뿐만 아니라, 생체내 전기천공을 포함한다. 별법으로, 본 발명의 항체는 비경구 경로, 예컨대 국부, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어 비내로, 경구적으로, 질로, 직장으로, 설하로 또는 국부적으로 투여될 수 있다. 투여는 또한 예를 들어, 1회, 다회, 및/또는 1회 이상의 장기간에 걸쳐서 수행될 수 있다.

[0027] "항체" (Ab)는 제한 없이, 항원에 특이적으로 결합하고, 적어도, 이황화 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)을 포함하는 당단백질 이谬노글로불린, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하여야 한다. 각각의 H 쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약칭된다) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3 개의 도메인, C_{H1} , C_{H2} , 및 C_{H3} 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로 약칭된다) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)이라고 명명되는, 보존성이 더욱 큰 영역이 그 사이에 산재되어 있는, 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 명명되는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노-말단에서부터 카르복시-말단 방향으로 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대, 이펙터 세포) 및 고전적 보체계의 제1 성분 (C1q)을 비롯한, 숙주 조직 또는 인자에의 이谬노글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0028] 항체는 전형적으로, 10^{-5} 내지 $10^{-11} M^{-1}$ 이하인 해리 상수 (K_D)로 반영되는 고 친화도로 그의 동족 항원에 특이적으로 결합한다. 약 $10^{-4} M^{-1}$ 초파의 임의의 K_D 는 일반적으로 비특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 본원에서 사용되는 바, 항원에 "특이적으로 결합하는" 항체란, K_D 가 $10^{-7} M$ 이하, 바람직하게는 $10^{-8} M$ 이하, 더욱더 바람직하게는 $5 \times 10^{-9} M$ 이하, 및 가장 바람직하게는 $10^{-8} M$ 내지 $10^{-10} M$ 이하라는 것을 의미하는 고 친화도로 항원 및 실질적으로 동일한 항원에 결합지만, 비관련 항원에는 고 친화도로 결합하지 않는 항체를 의미한다. 항원이 주어진 항원과 고도한 정도의 서열 동일성을 보인다면, 예를 들어 항원이 주어진 항원의 서열과 80% 이상, 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 97% 이상, 또는 더욱 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 보인다면, 상기 항원은 주어진 항원과 "실질적으로 동일한" 것이다. 일례로, 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 특정의 영장류 종으로부터의 CXCR4 항원과 교차 반응성을 가질 수 있지만, 특정 설치류 종으로부터의 CXCR4 항원과는, 또는 CXCR4 이외의 다른 항원, 예컨대 인간 PD-L1 항원과는 교차 반응하지 않을 수 있다.

[0029] 이谬노글로불린은 IgA, 분비성 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 보편적으로 알려져 있는 이소형 중 임의의 것으로부터 유래된 것일 수 있다. IgG 하위부류 또한 당업자에게 주지되어 있고, 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. "이소형"이란 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩된 항체 부류 (예컨대, IgM 또는 IgG1)를 의미한다. "항체"는 일례로 천연적으로 발생된 및 비-천연적으로 발생된 항체 둘 모두; 모노클로날 및 폴리클로날 항체; 키메라 및 인간화된 항체; 인간 또는 비인간 항체; 완전 합성 항체; 및 단일 쇄 항체를 포함한다. 비인간 항체는 인간에서 그의 면역원성을 감소시키는 재조합 방법에 의해 인간화될 수 있다. 명확하게 언급되지 않을 경우, 및 문맥상 달리 명시되지 않는다면, "항체"라는 용어는 또한 상기 언급된 이谬노글로불린 중 임의의 것의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 부분을 포함하고, 1가 및 2가 단편 또는 일부, 및 단일 쇄 항체를 포함한다.

[0030] "단리된 항체"란 다른 항원 특이성을 가지는 다른 항체는 실질적으로 없는 항체를 의미한다 (예컨대, CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 CXCR4 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 실질적으로 없다). 그러나, CXCR4에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 CXCR4에 대해 교차 반응성을 가질 수 있다. 또한, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질도 실질적으로 없을 수 있다.

[0031] "항-항원 항체," "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"라는 어구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호교환적으로 사용된다.

[0032] "모노클로날 항체" ("mAb")라는 용어는 단일 문자 조성의 항체 문자 제제, 즉, 그의 1차 서열이 본질적으로 동

일하고, 특정 에피토프에 대하여 단일의 결합 특이성 및 친화도를 보이는 항체 분자를 의미한다. 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 트랜스제닉 또는 당업자에게 공지되어 있는 다른 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0033] "인간" 항체 (HuMAb)란 프레임워크 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 가지는 항체를 의미한다. 추가로, 항체가 불변 영역을 포함할 경우, 불변 영역 또한 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것이다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예컨대, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용되는 바, "인간 항체"라는 용어는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체는 포함하지 않는 것으로 한다. "인간" 항체 및 "완전 인간" 항체라는 용어는 동의어로 사용된다.

[0034] "인간화된" 항체란 비-인간 항체의 CDR 도메인 바깥쪽 아미노산 중 일부, 대부분, 또는 그들 모두가 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 상응하는 아미노산으로 치환된 항체를 의미한다. 인간화된 형태의 항체의 한 실시 양태에서, CDR 도메인 바깥쪽 아미노산 중 일부, 대부분, 또는 그들 모두는 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 아미노산으로 치환된 반면, 하나 이상의 CDR 영역 내의 아미노산 중 일부, 대부분, 또는 그들 모두에는 변함이 없다. 특정 항원에 결합할 수 있는 항체의 능력을 무효화시키지 않는 한, 아미노산의 작은 부가, 결실, 삽입, 치환 또는 변형은 허용될 수 있다. "인간화된" 항체는 원래의 항체의 것과 유사한 항원 특이성을 보유하다.

[0035] "키메라 항체"란 가변 영역은 한 종으로부터 유래되고, 불변 영역은 또 다른 종으로부터 유래된 것인 항체, 예컨대 가변 영역은 마우스 항체로부터 유래되고, 불변 영역은 인간 항체로부터 유래된 것인 항체를 의미한다.

[0036] 항체의 "항원-결합 부분" (이는 또한 "항원-결합 단편"으로도 명명된다)이란 전체 항체가 결합하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다.

[0037] "암"이란 신체내 비정상적인 세포의 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 각종 질환의 광범위한 군을 의미한다. 조절되지 않는 세포 분열 및 성장은 이웃 조직을 침습하고, 림프계 또는 혈류를 통해 원거리에 있는 신체 일부로 전이될 수 있는 악성종양을 형성하는 결과를 초래한다.

[0038] "CXCR4" ("C-X-C 케모카인 수용체 4")라는 용어는 변이체, 이소폼, 호모로그, 오르토로그, 및 파라로그를 포함한다. 예를 들어, 특정 경우에서, CXCR4에 특이적인 항체는 인간 이외의 다른 종으로부터의 CXCR4와 교차 반응 할 수 있다. 다른 실시양태에서, 인간 CXCR4에 특이적인 항체는 인간 CXCR4에 대해 경쟁적으로 특이적일 수 있고, 종 또는 다른 유형의 교차 반응성을 보이지 않을 수 있다. "인간 CXCR4"라는 용어는 인간 서열 CXCR4, 예컨대 진뱅크® 등록 번호 P61073 (서열 51)을 가지는 인간 CXCR4의 완전한 아미노산 서열을 의미한다. CXCR4는 또한 예를 들어, LESTR, 푸신(Fusin) 또는 CD184로서 당업계에 공지되어 있다. 인간 CXCR4 서열은 예를 들어, 보존된 돌연변이, 또는 비-보존된 영역 중에 돌연변이를 가짐으로써 서열 51의 인간 CXCR4와 상이할 수 있고, CXCR4는 서열 51의 인간 CXCR4와 실질적으로 동일한 생물학적 기능을 가진다. 예를 들어, 인간 CXCR4의 생물학적 기능은 본 개시내용의 항체가 특이적으로 결합하는 CXCR4의 세포외 도메인 중의 에피토프를 가지는 것, 또는 인간 CXCR4의 생물학적 기능은 케모카인 결합 또는 전이 과정에의 관여이다.

[0039] 특정 인간 CXCR4 서열은 일반적으로 서열 51의 인간 CXCR4와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 가질 것이며, 다른 종 (예컨대, 뮤린)의 CXCR4 아미노산 서열과 비교하였을 때, 아미노산 서열이 인간의 것인 것으로 확인된 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 경우에서, 인간 CXCR4는 서열 51의 CXCR4와 95% 이상, 또는 심지어는 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 CXCR4 서열은 서열 51의 CXCR4와 10개 이하의 아미노산 차이를 보일 것이다. 특정 실시양태에서, 인간 CXCR4는 서열 51의 CXCR4와 5개 이하, 또는 심지어는 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 보일 수 있다. 동일성(%)은 본원에 기술된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0040] "CXCR4-발현 암" 또는 "CXCR4⁺ 암"은 상기 암을 특징으로 하는 악성 세포가 세포 표면 상에 CXCR4를 발현하는, 바람직하게는 고수준의 CXCR4를 발현하는 암이다.

[0041] 본원에서 "혈액 악성종양"이라는 용어는 림프종, 백혈병, 골수종 또는 림프성 악성종양 뿐만 아니라, 비장암 및 림프절 암을 포함한다. 본 발명의 개시된 항-CXCR4 항체를 이용한 치료법을 잘 따를 수 있는 예시적인 림프종으로는 B 세포 림프종 및 T 세포 림프종 둘 모두를 포함한다. B 세포 림프종으로는 호지킨 림프종 및 대부분의 비-호지킨 림프종 둘 모두를 포함한다. B 세포 림프종의 비제한적인 예로는 미만성 거대 B-세포 림프종

(DLBCL), 여포성 림프종 (FL), 점막-연관 림프 조직 림프종 (MALT), 소세포 림프구 림프종 (만성 림프구성 백혈병과 중복), 외투 세포 림프종 (MCL), 버킷 림프종, 종격동 거대 B 세포 림프종, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 결절 변연부 B 세포 림프종 (NMZL), 비장 변연부 림프종 (SMZL), 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출액 림프종, 림프종양 육아종증을 포함한다. T 세포 림프종의 비제한적인 예로는 림프절외 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종, 및 혈관면역모세포 T 세포 림프종을 포함한다. 혈액 악성종양은 또한 백혈병, 예컨대 제한하는 것은 아니지만, 속발성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 (CLL; 이는 또한 만성 림프성 백혈병으로도 명명된다), 급성 골수성 백혈병 (AML; 이는 또한 급성 림프성 백혈병으로도 명명된다), 만성 골수성 백혈병 (CML), B 세포 전림프구성 백혈병 (B PLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL) 및 척수형성이상증 (MDS)을 포함한다. 혈액 악성종양은 추가로 골수종, 예컨대 제한하는 것은 아니지만, 다발성 골수종 (MM) 및 아급성 다발성 골수종 (SMM)을 포함한다. 다른 혈액 및/또는 B 세포 또는 T 세포 연관 암은 혈액 악성종양이라는 용어에 포함된다. 예를 들어, 혈액 악성종양은 수지상 세포, 혈소판, 적혈구, 자연살세포, 및 다형핵 백혈구, 예컨대 호염기구, 호산구, 호중구 및 단핵구를 비롯한, 추가의 조혈 세포의 암을 포함한다. 상기 전암성 종양 및 악성종양은 대개 분류 체계 변경에 따라 다른 명칭을 가질 수 있으며, 다른 명칭하에 분류된 림프종을 앓는 환자 또한 본 발명의 치료학적 요법으로부터 이익을 얻을 수 있다는 것이 당업자에게는 명백하여야 한다.

[0042] "SDF-1"이라는 용어는 기질 세포-유래 인자 1로서, CXCR4에 대한 리간드인 것을 의미한다. "SDF-1"이라는 용어는 SDF-1의 상이한 이소폼, 예컨대 SDF-1 α 및 SDF-1 β 를 포함한다. 인간 SDF-1 α 의 아미노산 서열은 진뱅크® 등록 번호 NP_954637을 가진다. 인간 SDF-1 β 의 아미노산 서열은 진뱅크® 등록 번호 NP_000600을 가진다. 인간 SDF-1은 또한 미국 특허 번호 제5,756,084호에 기술되어 있다. SDF-1은 CXCL12로도 알려져 있다. 인간 SDF-1의 아미노산 서열은 CXCR4에 대해 본원에 기술되어 있는 바와 같이, NP_954637 또는 NP_000600의 SDF-1과 상이할 수 있다.

[0043] "신호전달 경로"란 세포의 한 부위에서 세포의 또 다른 부위로 신호를 전달하는 데 있어 중요한 다양한 신호전달 문자 사이의 생화학적 관계를 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "세포 표면 수용체"라는 어구는 예를 들어, 신호를 받고, 그 신호를 세포의 형질막을 가로질러 전달할 수 있는 문자 및 문자의 복합체를 포함한다. 본 개시내용의 세포 표면 수용체의 예로는 CXCR4 수용체가 있다.

[0044] "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. "비인간 동물"이라는 용어는 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 토끼, 흰족제비, 설치류, 예컨대 마우스, 래트 및 기니아 피그, 조류 종, 예컨대 닭, 양서류, 및 과충류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 더 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. "대상체," "환자" 및 "개체"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0045] 약물 또는 치료제, 예컨대 본 발명의 항체의 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 단독으로, 또는 다른 치료제와 조합하여 사용되었을 때, 질환 증상의 중증도 감소로 입증되는 질환 퇴행, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간 증가, 또는 질환 고통에 기인한 손상 또는 장애 예방을 촉진시키는 약물의 임의의 양이다. 약물의 치료 유효량 또는 투여량은 "예방 유효량" 또는 "예방 유효 투여량"을 포함하는데, 이는 질환이 발생될 위험에 있거나, 질환이 재발될 위험에 있는 대상체에게 단독으로, 또는 다른 치료제와 조합하여 투여되었을 때, 질환의 발생 또는 재발을 억제시키는 약물의 임의의 양이다. 질환 퇴행을 촉진시킬 수 있는 치료제의 능력은 숙련된 의사에게 공지되어 있는 다양한 방법을 사용함으로써, 예컨대 임상 시험 중에 있는 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 데 사용되는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 검정법으로 상기 치료제의 활성을 검정함으로써 평가될 수 있다.

[0046] 일례로, 항암제는 대상체에서 암 퇴행을 촉진시킨다. 바람직한 실시양태에서, 약물의 치료 유효량은 암이 제거되는 시점까지 암 퇴행을 촉진시킨다. "암 퇴행을 촉진시킨다"라는 것은 유효량의 약물을 단독으로 또는 항신생물제와 조합하여 투여함으로써 환자에서 종양 성장 또는 크기의 감소, 종양의 괴사, 또는 1개 이상의 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간 증가, 질환 고통에 기인한 손상 또는 장애 예방, 또는 다르게는 질환 증상의 호전을 유도한다는 것을 의미한다. 추가로, 치료와 관련하여 "유효" 및 "유효성"이라는 용어는 약리학적 유효성 및 생리학적 안전성 둘 모두를 포함한다. 약리학적 유효성이란 환자에서 암 퇴행을 촉진시킬 수 있는 약물의 능력을 의미한다. 생리학적 안전성이란 독성 수준, 또는 약물 투여로부터 유발되는 세포, 기관, 및/또는 유기체 수준의 다른 유해한 생리학적 효과 (부작용)을 의미한다.

[0047] 종양 치료에 대한 일례로, 치료 유효량 또는 투여량의 약물은 바람직하게는 세포 성장 또는 종양 성장을 치료받지 못한 대상체와 비교하여 약 20% 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 40% 이상만큼, 더욱더 바람직하게는 약 60% 이상만큼, 및 더욱더 바람직하게는 약 80% 이상만큼 억제시킨다. 가장 바람직한 실시양태에서, 치료 유효량 또

는 투여량의 약물은 세포 성장 또는 종양 성장을 완전히 억제시키고, 즉, 바람직하게는 세포 성장 또는 종양 성장 100%만큼 억제시킨다. 종양 성장을 억제시킬 수 있는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예측하는 데 사용되는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 별법으로, 화합물의 이러한 특성은 세포 성장을 억제시킬 수 있는 화합물의 능력을 조사함으로써 평가될 수 있으며, 상기 억제는 숙련된 의사에게 공지되어 있는 검정법에 의해서 시험관내에서 측정될 수 있다. 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 종양 퇴행은 약 20일 이상, 더욱 바람직하게는 약 40일 이상, 또는 더욱더 바람직하게는 약 60일 이상의 기간 동안 관찰되고, 지속될 수 있다.

[0048] 대상체의 "치료" 또는 "요법"이란 질환과 연관된 증상, 합병증, 병태 또는 생화학적 징후를 역전시키거나, 완화시키거나, 호전시키거나, 억제시키거나, 진행 속도를 저속화시키거나, 또는 그의 발병, 진행, 발생, 중증도 또는 재발을 예방하고자 하는 목적을 가지고, 대상체에서 수행되는, 또는 그에게 활성체를 투여하는 임의 유형의 중재 또는 과정을 의미한다.

[0049] 본 개시내용의 다양한 측면은 하기 세부 항목에서 추가로 상세하게 기술된다.

항-CXCR4 항체

[0051] 본 개시내용의 인간 모노클로날 항-CXCR4 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 사용함으로써 생성될 수 있다. 이러한 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스로는 본원에서 각각 HUMAB 마우스(HUMAB MOUSE)[®] (문헌 [Lonberg et al., 1994]) 및 KM 마우스(KM MOUSE)[®] (WO 02/43478)로 언급되는 마우스를 포함한다. 본 발명의 예시적인 항-CXCR4 항체를 제조하는 것은 WO 2008/060367에 상세하게 기술되어 있다. 본 개시내용의 항체는 특정 기능상의 특징 또는 특성을 특징으로 한다. 예를 들어, 항체는 세포 표면 상에 발현된 천연 인간 CXCR4에 결합한다. 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 고 친화도로, 예를 들어 1×10^{-7} M 이하의 K_D로 CXCR4에 결합한다. 본 개시내용의 항-CXCR4 항체는 바람직하게는 하기 특징들:

[0052] (a) 세포 표면 상에서 발현된 천연 인간 CXCR4에 결합하고/거나;

[0053] (b) SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제시키고/거나;

[0054] (c) CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도성 칼슘 흐름을 억제시키고/거나;

[0055] (d) CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도성 이동을 억제시키고/거나;

[0056] (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제시키고/거나;

[0057] (f) 1×10^{-7} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하고/거나;

[0058] (g) CXCR4를 발현하는 세포에서 아폽토시스를 유도하고/거나;

[0059] (h) 시험관내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 증식을 억제시키고/거나;

[0060] (i) CXCR4⁺ 종양 세포 증식을 억제시키고/거나, 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포 아폽토시스를 유도하고/거나;

[0061] (j) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제시키고/거나;

[0062] (k) CXCR4⁺ 종양-보유 대상체의 생존기간을 연장시키는 특징 중 하나 이상을 나타낸다.

[0063] 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 5×10^{-8} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하거나, 2×10^{-8} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하거나, 5×10^{-9} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하거나, 4×10^{-9} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하거나, 3×10^{-9} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합하거나, 2×10^{-9} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합한다.

[0064] 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 50 nM 이하, 더욱 바람직하게는 30 nM 이하, 또는 15 nM 이하, 또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 3 nM 이하의 억제 EC₅₀ (예컨대, 28.60 nM 이하, 또는 12.51 nM 이하, 또는 2.256 nM 이하의 억제 EC₅₀)으로 SDF-1의 인간 CXCR4에의 결합을 억제시킨다.

- [0065] 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 3 nM 이하, 더욱 바람직하게는 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.9 nM 이하, 또는 0.8 nM 이하, 또는 0.7 nM 이하, 또는 0.6 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하, 또는 0.4 nM 이하 (예컨대, 0.9046 nM 이하, 0.5684 nM 이하, 또는 0.3219 nM 이하)의 억제 EC₅₀으로 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도성 칼슘 흐름을 억제시킨다.
- [0066] 바람직하게, 본 개시내용의 항체는 50 nM 이하, 더욱 바람직하게는 30 nM 이하, 또는 20 nM 이하, 또는 15 nM 이하 (예컨대, 18.99 nM 이하, 또는 12.44 nM 이하)의 억제 EC₅₀으로 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도성 이동을 억제시킨다.
- [0067] 예를 들어, 천연적으로 천연 CXCR4를 발현하거나, 천연 CXCR4를 발현하도록 형질감염된 세포주를 사용하는 유동 세포측정법 분석을 비롯한, 세포 표면 상에 발현된 천연 인간 CXCR4에 대한 항체의 결합 능력을 평가하는 표준 검정법은 당업계에 공지되어 있다. 적합한 검정법은 실시예에 상세하게 기술되어 있다. 천연 CXCR4를 발현하는 바람직한 세포주는 CEM T 세포주이다. SDF-1의 결합 억제, SDF-1 유도성 칼슘 흐름 억제, SDF-1 유도성 세포 이동 억제, HuVEC에 의한 모세관 형성 억제, 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4를 발현하는 세포에서의 아폽토시스 유도, 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포 성장 억제, 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포 전이 억제를 평가하는 데 적합한 검정법 또한 실시예에 상세하게 기술되어 있다. 항체의 결합 친화도 또한 표준 방법, 예컨대 스캐챠드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 항-CXCR4 항체는 또한 상기 항체의 항원-결합 부분을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것은 충분히 입증되었다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함된 결합 단편의 예로는 (i) V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 Fd 단편; 및 (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 Fv 단편을 포함한다.
- [0069] 처음에 효소, 예컨대 파파인 및 펩신에 의한 단백질분해를 통해 수득된 상기 단편들을 이어서 1가 및 다가 항원-결합 단편으로 조작할 수 있다. 예를 들어, 비록 Fv 단편의 두 도메인인, V_L 및 V_H는 별개의 유전자에 의해 코딩되는 것이지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 형성하여 단일 쇄 가변 단편(scFv)으로 알려져 있는 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄로 상기 유전자를 제조할 수 있는 합성 링커 펩티드에 의해 연결될 수 있다. 2개의 V_H 및 2개의 V_L 영역을 포함하는 탠덤 scFv로도 알려져 있는 단일 펩티드 쇄 내에서 두 scFv를 연결시킴으로써 2가(divalent 또는 bivalent) scFv (디-scFv 또는 비-scFv)를 조작할 수 있다. 2개의 가변 영역이 함께 폴딩하기에는 너무 짧기 때문에, 이로써 scFv가 이량화하여 디아바디를 제조하거나, 다른 다량체를 형성하도록 가압하는 10개 미만의 아미노산으로 이루어진 링커 펩티드를 사용함으로써 ScFv 이량체 및 고차 다량체 또한 생성될 수 있다. 디아바디는 상응하는 scFv보다 훨씬 더 높은 친화도로 그의 동족 항원에 결합하며, 해리 상수는 scFv에 대한 K_D 값보다 최대 40배 더 낮은 것으로 밝혀졌다. 가장 짧은 링커 (\leq 3개의 아미노산)는 그의 항원에 대한 친화도가 디아바디보다 훨씬 더 높은, 3가 트리아바디 또는 4가 테트라바디의 형성을 유도한다. 다른 변이체로는 scFv-C_{H3} 이량체인 미니바디, 및 보다 큰 scFv-Fc 단편 (scFv-C_{H2}-C_{H3} 이량체)을 포함하고, 심지어 단리된 CDR은 항원-결합 기능을 보일 수 있다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 종래 재조합 기법을 사용하여 조작되고, 온전한 항체와 동일한 방식으로 그 유용성에 대해 스크리닝된다. 항체의 상기 단백질 가수분해 및 조작 단편들 및 관련 변이체들 모두 (추가의 상세한 설명을 위해 문헌 [Hollinger et al., 2005]; [Olafsen et al., 2010] 참조) 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함시키고자 한다.
- [0070] 모노클로날 항체 F7, F9, D1 및 E2
- [0071] 본 개시내용의 바람직한 항체는 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같이 단리되고, 구조상의 특징이 규명된, 인간 모노클로날 항체 F7 (BMS-936564), F9, D1 및 E2이다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H 아미노산 서열은 각각 서열 25, 26, 27 및 28에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_L 아미노산 서열은 각각 서열 29, 30, 31 및 32에 제시되어 있다. 추가로, 특정 프레임워크 잔기가 배선 잔기로 치환되어 있는 F7, F9, D1 및 E2의 대체 형태를 제조하고, 이를 본원에서는 F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL로 지칭한다. F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL의 V_H 아미노산 서열은 각각 서열 41, 42, 43 및 44에 제시되어 있다. F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL의 V_L 아미노산 서열은 각각 서열 45, 46, 47 및 48에 제시되어 있다. 본 개시내용의 다른 항-CXCR4 항체는 WO 2008/060367에 기술된 바와 같이,

CXCR4에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하기 위해, 상이한 V_H 및 V_L 영역, 또는 상이한 CDR를 "혼합 및 매칭시키는 것"으로부터 수득되는 항체를 포함한다.

[0072] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 F7, F9, D1 또는 E2의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 그의 조합을 포함하는 항체를 제공한다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR1의 아미노산 서열은 각각 서열 1-4에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR2의 아미노산 서열은 각각 서열 5-8에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열 9-12에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_k CDR1의 아미노산 서열은 각각 서열 13-16에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_k CDR2의 아미노산 서열은 각각 서열 17-20에 제시되어 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_k CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열 21-24에 제시되어 있다. 상기 확인된 CDR 영역은 카바트 체계를 사용하여 윤곽 표시하였다 (문헌 [Kabat et al., 1991]).

[0073] 한 측면에서, 본 개시내용은 CXCR4, 바람직하게는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하고, 각각 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 V_H 및 V_L 영역의 조합을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분은

[0074] (a) 서열 25 또는 41에 기재된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 29 또는 45에 기재된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인;

[0075] (b) 서열 26 또는 42에 기재된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 30 또는 46에 기재된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인;

[0076] (c) 서열 27 또는 43에 기재된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 31 또는 47에 기재된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인; 또는

[0077] (d) 서열 28 또는 44에 기재된 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 32 또는 48에 기재된 서열을 가지는 경쇄 가변 영역 중의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다.

[0078] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분은

[0079] (a) 서열 1에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 5에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 서열 9에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형; 서열 13에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 17에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 및 서열 21에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형;

[0080] (b) 서열 2에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 6에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 서열 10에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형; 서열 14에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 18에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 및 서열 22에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형;

[0081] (c) 서열 3에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 7에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 서열 11에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형; 서열 15에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 19에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 및 서열 23에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형; 또는

[0082] (d) 서열 4에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 8에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 또는

그의 보존적 변형; 서열 12에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형; 서열 16에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 또는 그의 보존적 변형; 서열 20에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 또는 그의 보존적 변형; 및 서열 24에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 또는 그의 보존적 변형을 포함한다.

[0083] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분은

(a) 서열 25 또는 41에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형, 및 서열 29 또는 45에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형;

(b) 서열 26 또는 42에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형, 및 서열 30 또는 46에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형;

(c) 서열 27 또는 43에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형, 및 서열 31 또는 47에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형; 또는

(d) 서열 28 또는 44에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형, 및 서열 32 또는 48에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 또는 그의 보존적 변형을 포함한다.

[0088] 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 부분은

(a) 서열 1에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

(b) 서열 5에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

(c) 서열 9에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

(d) 서열 13에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

(e) 서열 17에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

(f) 서열 21에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.

[0095] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 부분은

(a) 서열 2에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

(b) 서열 6에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

(c) 서열 10에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

(d) 서열 14에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

(e) 서열 18에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

(f) 서열 22에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.

[0102] 항-CXCR4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-CXCR4 모노클로날 항체 중 어느 것과 동일한, 인간 CXCR4 상의 에피토프 영역 (즉, 동일 또는 중복 에피토프)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분 (즉, CXCR4에의 결합에 대하여 본 개시내용의 모노클로날 항체 중 어느 것과 교차 경쟁할 수 있는 능력을 가지는 항체)을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 교차 경쟁 연구를 위한 참조 항체는 모노클로날 항체 F7 (BMS-936564) (각각 서열 25 및 29에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가지는 것), 또는 모노클로날 항체 F9 (각각 서열 26 및 30에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가지는 것) 또는 모노클로날 항체 D1 (각각 서열 27 및 31에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가지는 것) 또는 모노클로날 항체 E2 (각각 서열 28 및 32에 제시된 V_H 및 V_L 서열을 가지는 것)일 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 인간 CXCR4에의 결합에 대하여 참조 항체 또는 그의 참조 항원-결합 부분과 교차

경쟁하며, 여기서 참조 항체 또는 그의 일부는

- [0104] (a) 서열 25에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 29에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역;
 - [0105] (b) 서열 26에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 30에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역;
 - [0106] (c) 서열 27에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 31에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
 - [0107] (d) 서열 28에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 32에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 인간 모노클로날 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.
- [0108] 바람직한 측면에서, 본 발명의 교차 경쟁하는 항-CXCR4 모노클로날 항체는 서열 49에 기재된 인간 V_H 3-48 배선 서열로부터 유래된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 영역, 및/또는 서열 50에 기재된 인간 V_K L15 배선 서열로부터 유래된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 영역을 포함한다.
- [0109] 교차 경쟁하는 항체는 표준 CXCR4 결합 검정법, 예를 들어 참조 항체는 FITC로 표지화되고, FITC로 표지화된 참조 항체의 CEM 세포에의 결합을 억제시킬 수 있는 시험 항체의 능력을 평가하는, CEM 세포를 이용하는 유동 세포측정법에서 본 발명의 F7, F9, D1, E2 또는 임의의 다른 참조 항-CXCR4 항체와 교차 경쟁할 수 있는 능력에 기초하여 확인할 수 있다.
- [0110] 제약 조성물
- [0111] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본 개시내용의 모노클로날 항체, 또는 그의 항원-결합 부분(들) 하나 또는 그의 조합을 함유하는 조성물, 예컨대 제약 조성물을 제공한다. 본원에서 사용되는 바, "제약상 허용되는 담체"로는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제, 및 생리학상 화합성인 것을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예컨대, 주사 또는 주입에 의한 것)에 적합하다. 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 허용되는 염, 항산화제, 수성 및 비수성 담체, 및/또는 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제를 포함할 수 있다.
- [0112] 투여량 요법은 최적의 원하는 반응, 예컨대 치료학적 반응 또는 최소의 부작용을 제공할 수 있도록 조정된다.
- [0113] 인간 항-CXCR4 항체의 투여를 위한 투여량 범위는 약 0.0001 내지 100 mg/kg (대상체의 체중), 바람직하게는 약 0.01 내지 약 20 mg/kg (대상체의 체중), 및 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg (대상체의 체중)이다. 예를 들어, 투여량은 0.1, 0.3, 1, 3, 5 또는 10 mg/kg (대상체의 체중), 및 더욱 바람직하게는 0.3, 1, 3, 또는 10 mg/kg (대상체의 체중)일 수 있다. 투여 스케줄은 전형적으로는 항체의 전형적인 약동학적 특성에 기초하여 수용체 점유가 지속될 수 있는 노출을 달성을 할 수 있도록 디자인된다. 예시적인 치료 요법은 주 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 매 4주마다 1회, 월 1회, 매 3개월마다 1회, 또는 매 3 내지 6개월마다 1회 투여하는 것을 수반한다. IgG4 항체의 반감기가 전형적으로는 2-3주라는 것을 고려해 볼 때, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체에 대해 바람직한 투여량 요법은 정맥내 투여를 통한 0.3-20 mg/kg (체중), 바람직하게는 1-10 mg/kg (체중)을 포함하며, 항체는 반응 완료시까지 또는 진행성 질환 확인시까지 최대 6주, 8주 또는 12주 사이클로 매 7 또는 14일마다 투여된다.
- [0114] 투여량 및 스케줄은 치료 진행 과정 동안 변할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체에 대한 투여량 요법은 1, 3 또는 10 mg/kg (체중)을 정맥내 (IV)로 투여하는 것을 포함하며, 항체는 하기 투여 스케줄 중 하나로 투여된다: (i) 최대 6주 사이클로 매 7일마다; (ii) 최대 6회 투여를 위해 매 2주마다, 이어서 매 3개월마다; (iii) 매 3주마다; (iv) 1-10 mg/kg (체중)으로 1회, 이어서 매 2-3주마다 1 mg/kg (체중)씩.
- [0115] 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 가지는 2종 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되며, 이러한 경우, 투여되는 각 항체의 투여량은 명시된 범위 내에 포함되어 있다. 항체는 보통 다회에 걸쳐 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 예를 들어, 매주, 매월, 매 3개월마다, 또는 매년일 수 있다. 간격은 환자에서 표적 항원에 대한 항체의 혈중 수준을 측정함으로써 제시되는 바와 같이, 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 약

1-1,000 µg/ml의 혈장 항체 농도, 및 일부 방법에서, 약 25-300 µg/ml를 달성할 수 있도록 조정된다.

[0116] 별법으로, 항체는 지속 방출형 제제로서 투여될 수 있으며, 이러한 경우, 덜 빈번하게 투여될 필요가 있다. 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체의 반감기가 가장 길고, 그 다음은 인간화된 항체, 키메라 항체, 및 비인간 항체순이다. 투여의 투여량 및 빈도는 치료가 예방학적인지 또는 치료학적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방학적 적용에서는 상대적으로 저투여량이 장기간 동안에 걸쳐 상대적으로 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그의 여생 동안에 계속해서 치료를 받는다. 치료학적 적용에서는, 질환 진행이 감소되거나, 종결될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전 호전을 보일 때까지, 상대적으로 짧은 간격으로 상대적으로 고투여량이 종종 요구된다. 이후, 환자는 예방학적 요법으로 투여받을 수 있다.

[0117] 본 개시내용의 제약 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에 대한 독성없이, 특정 환자에 대한 원하는 치료학적 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양, 조성, 및 투여 모드를 수득하기 위해 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 개시내용의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 상태 및 이전 병력, 및 의약 분야에 주지되어 있는 유사 인자를 비롯한, 다양한 약동학적 인자에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 조성물은 당업계에 주지되어 있는 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 모드는 원하는 결과에 따라 달라질 수 있다.

[0118] 예컨대, 임플란트, 경피용 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 방출 조절형 제제와 같이, 활성 화합물은 화합물을 신속한 방출로부터 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 상기 제제를 제조하는 다수의 방법이 특허를 받았거나, 일반적으로는 당업자에게 주지되어 있다. 예컨대, 문헌 [Robinson (1978)]을 참조할 수 있다.

[0119] 치료학적 조성물은 당업계에 공지되어 있는 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 치료학적 조성물은 피하용 무침 주사 장치, 미국 특허 번호 제5,399,163호, 제5,383,851호, 또는 제4,941,880에 개시된 장치로 투여될 수 있다. 상기 특허의 대상은 본원에 참조로 포함된다. 상기와 같은 많은 다른 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

본 발명의 용도 및 방법

[0121] 본 개시내용의 항체, 항체 조성물 및 방법은, 예를 들어 CXCR4-발현 암을 앓는 대상체에게 세포 표면 상에서 발현된 CXCR4에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 비롯한, CXCR4 연관된 장애의 진단 및 치료를 포함하는 다수의 시험관내 및 생체내 진단학적 및 치료학적 유용성을 가진다. 바람직한 대상체로는 CXCR4 활성과 연관되거나, 그에 의해 매개되거나, 또는 조절되거나, 또는 CXCR4/CXCL12 경로를 포함하는 장애, 예컨대 혈액 악성종양을 앓는 인간 환자를 포함한다. 암 환자를 치료하는 상기 방법에 관한 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 단독요법으로 투여되는 반면, 다른 실시양태에서는 또 다른 작용제, 예컨대 항신생물성 화학요법제와 조합하여 투여된다. CXCR4에 대한 항체가 또 다른 작용제와 조합하여 투여될 때, 상기 두 작용제는 임의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0122] CXCR4는 매우 다양한 종양 세포 유형 상에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, 이는 또한 종양 전이에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, CXCR4는 T 세포 내로의 HIV 진입을 위한 공수용체로서 HIV 감염에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 추가로, CXCR4/CXCL12 경로는 염증성 병태에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 추가로, CXCR4/CXCL12 경로는 혈관신생 또는 신생혈관화에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체 (및 면역접합체 및 비특이적 분자)는 하기를 비롯한, 다양한 임상 상태에서 사용될 수 있다:

A. 암

[0124] CXCR4의 과다발현 또한 암의 약 75%에서 입증되었으며, 특정 상황에서는 CXCR4 발현과 환자 예후 또는 생존 사이에는 역의 상관관계가 있는 것이 확립되었다. CXCR4 발현 또는 CXCR4/CXCL12 경로와 연관된 암 유형의 비제한적인 예로는 고형 종양, 예컨대 유방암 (문헌 [Muller et al., 2001]), 난소암 (문헌 [Scotton et al., 2001]), 전립선암 (문헌 [Taichman et al., 2002]), 비-소세포 폐암 (문헌 [Spano et al., 2004]), 췌장암

(문헌 [Koshiba et al., 2000]), 결장직장암 (문헌 [Zeelenberg et al., 2003]), 신장암 (문헌 [Schrader et al., 2002]), 및 갑상선암 (문헌 [Hwang et al., 2003]), 비인두 암종 (문헌 [Wang et al., 2005]), 흑색종 (문헌 [Scala et al., 2005]), 신세포 암종 (문헌 [Staller et al., 2003]), 신경모세포종 (문헌 [Geminder et al., 2001]), 횡문근육종 (문헌 [Rempel et al., 2000]), 횡문근육종 (문헌 [Libura et al., 2002]), 및 골육종 (문헌 [Laverdiere et al., 2005]) 뿐만 아니라, 혈액 악성종양, 예컨대 급성 램프모구성 백혈병 (문헌 [Cazzolara et al., 2001]), 급성 골수성 백혈병 (문헌 [Mohle et al., 1998]; [Rombouts et al., 2004]), 다발성 골수종 (문헌 [Alsayed et al., 2007; Azab et al., 2009]), 만성 램프성 백혈병 (문헌 [Mohle et al., 1999; Burger et al., 1999]), 만성 골수성 백혈병 (문헌 [Jin et al., 2008]), 및 비-호지킨 램프종 (문헌 [Bertolini et al., 2002]; [Weng et al., 2003])을 포함한다.

[0125] 추가로, 상기 경로는 다중 신생물에서 전이 과정을 자극시키는 데 연루되어 있다 (문헌 [Murphy, 2001]). 임상 연구에서, CXCR4는 전이 성향의 증가 및 생존 감소와 관련이 있으며, 더 큰 CXCR4의 발현이 질환 중증도와 상관관계가 있는 급성 골수성 백혈병, 유방 암종, 결장직장 암종, 비-소세포 폐 암종, 난소 암종 및 췌장 암종에 대한 예후 지표인 것으로 확인되었다 (문헌 [Spoo et al., 2007]; [Hiller et al., 2011]; [Ottaiano et al., 2006]; [Spano et al., 2004]; [Jiang et al., 2006]; [Marechal et al., 2009]).

[0126] 골수 기질 세포 (BMSC)는 CXCL12를 분비하고, CXCR4와의 상호작용은 BM 미세 환경 내에서의 조혈 줄기 세포를 귀소 및 유지시키는 데 필수적이다 (문헌 [Mohle et al., 1998]). 백혈병 세포는 고수준의 CXCR4를 발현하고, 그 경로는 BM 내로의 백혈병 세포 이동과, 이로써 결국에는 그의 성장과 생존을 지원하는 데 있어 중요한 역할을 한다. CXCR4는 예컨대, CXCL12가 발현된 BM과 같은 기관으로의 전이성 확산에 필수적이다. 종합해 보면, CXCR4는 BM에서 조혈 줄기 세포의 귀소 및 유지 둘 모두에서 중요한 역할을 하며, NHL 및 MM 환자에서 자가 이식편에 대한 과립구-콜로니 자극 인자와 조합하여 사용하기 위한 것으로 FDA 승인을 받은 소형 분자 CXCR4 길항제인 AMD3100 (플레릭사포르; 모조빌)을 이용하여 입증된 바와 같이, CXCR4의 길항제는 줄기 세포를 혈류로 동원시킨다 (문헌 [Dar et al., 2011]). 또 다른 CXCR4 억제제인 AMD3465는 CXCL12- 및 기질-유도성 주화성을 길항시키는 것으로 밝혀졌으며, 백혈병 세포에서 생존촉진성(prosurvival) 신호전달 경로의 CXCL12-유도성 활성화를 억제시켰다 (문헌 [Zeng et al., 2009]). 추가로, AMD3465는 단독으로, 또는 과립구 콜로니-자극 인자와 조합하여 AML 세포 및 전구 세포의 순환으로의 동원을 유도하였고, 화학요법 및 소라페닙의 항백혈병 효과를 증진시킴으로써 동물의 백혈병 부담을 현저히 감소시켰고, 생존기간을 연장시켰다는 것이 입증되었다 (문헌 [Zeng et al., 2009]). 상기 관찰 결과는 CXCR4/CXCL12의 상호작용 파괴를 사용함으로써 백혈병 세포의 보호 골수 미세 환경을 표적화함으로써 상기 세포를 화학요법에 대해 감작화시킬 수 있다는 것을 제안한다.

[0127] 본 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, CXCR4에 대한, 신규의 1등급 인간 치료학적 모노클로날 항체가 개발되었다. 상기 모노클로날 항체는 낮은 나노몰 친화도로 CXCR4-발현 세포에 결합하고, CXCL12의 CXCR4-발현 세포에의 결합을 차단하고, 낮은 나노몰 EC₅₀ 값으로 CXCL12-유도성 이동 및 칼슘 흐름을 억제시킨다. 유의적으로, CXCL12-유도성 칼슘 흐름 및 이동을 차단하는 것 이외에도, 본 실시예에서 제공된 데이터는 또한 CXCR4 발현 종양 세포의 아폽토시스의 항체-의존적 유도는 상기 인간 항-CXCR4 항체의 작용 기전이라는 것이 제시되어 있다. 항체-유도성 아폽토시스를 통해 다중 조혈 종양 이종이식편 모델 간에 걸쳐 강력한 생체내 효능을 얻었다. CXCR4⁺ 종양 세포를 직접적으로 사멸시키는 것이 아니라, BM으로부터의 CXCR4⁺ 종양 세포 동원을 증가시켜 화학감작을 증가시키는 데 있어서 소형 분자 CXCR4 길항제의 작용에 기초해 보면, 암 세포를 사멸시키는 데 있어서의 본 항-CXCR4 항체의 효능은 놀랍고도 예상 밖의 것이었다.

[0128] CXCR4가 증식, 이동/침습 및 혈관신생을 비롯한, 암의 다중의 기본적 측면에서 중요한 역할을 하기 때문에, 길항제는 CXCR4가 발현되는 악성종양에서 중재를 위해 잠재적으로 다중의 수단을 가진다. 먼저 경로 분석을 위해, 각각 CXCR4 및 CXCL12에 대한 완전 인간 모노클로날 항체를 개발하였다. 항-CXCR4 및 항-CXCL12 항체 둘 모두 리간드의 CXCR4에의 결합을 억제시켜 리간드-유도성 세포 반응, 예컨대 예컨대, 칼슘 흐름 및 이동을 억제시킨다 (실시예 4-6). 상기 기능 이외에도, CXCR4/CXCL12는 혈관신생을 촉진시키는 데 연루되어 있었다 (문헌 [Guleng et al., 2005]; [Ping et al., 2011]). 항-CXCR4 (실시예 7) 및 항-CXCL12 (데이터는 나타내지 않음) 항체 둘 모두는 또한 혈관신생의 시험판내 증거인, 내피 관 형성을 억제시켰다.

[0129] CXCR4/CXCL12 상호작용 파괴가 미치는 효과를 조사하기 위해, 다양한 생체내 이종이식편 모델에서 종양 성장을 약화시키는 항체의 효능을 시험하였다. NHL (버킷 램프종) 모델에서, 라모스 세포를 SCID 마우스에 이식하고, 리툭시맙을 양성 대조군으로서 사용하였다. 놀랍게도, 항-CXCL12 항체는 종양 성장을 제어하지 못했고, 비히를 및 이소형 대조군으로부터 구별하기 어려운 것으로 보였다. 대조적으로, 항-CXCR4 항체 BMS-936564는 리툭시맙

과 유사한 활성으로, 종양 성장을 거의 완전하게 제어하는 것으로 입증되었다 (실시예 14). 주화성의 시험관내 차단은 두 항체 서로 유사하였는 바 (실시예 6), 항-종양 제어가 CXCL12/CXCR4 축 차단에 의존할 가능성은 없어 보였다. 따라서, 라모스 세포 증식 검정법으로 BMS-936564의 직접적인 세포독성 효과를 시험하였다. CXCL12는 세포 성장을 촉진시키는 자가분비 인자로서 연루되었고, 별개의 연구에서 CXCL12 siRNA는 BR5-1 성장을 억제시켰다 (문헌 [Liu et al., 2011]; [Righi et al., 2011]). 비록 성장 억제가 부분적이기는 하였지만, 항-CXCR4를 이용한, 용량-의존적 증식 억제가 관찰된 반면, AMD3100 및 항-CXCL12 항체는 어떤 효과도 없었다 (실시예 8). 최근, 특이적인 CXCR4 길항제 (BKT140)인 것으로 보고된 14개의 잔기로 된 폴리펩티드는 다발성 골수종 세포의 증식을 억제시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Beider et al., 2011]). 이는 AMD3100은 약한 부분적인 효능 제인 반면, BKT140은 역 효능제로서 작용한다고 제안하였다 (문헌 [Zhang et al., 2002]).

[0130] 상기 내용을 고려해 볼 때, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체는, CXCR4-발현 암을 앓는 대상체에게 암 세포 표면 상에 발현된 CXCR4 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, CXCR4-발현 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 치료 방법은 이전에 암을 앓았던 대상체, 또는 암과 접촉할 위험에 있는 대상체에서 예방학적으로 사용된다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이고, 항체 또는 그의 단편은 인간 CXCR4 수용체에 결합한다. 다른 바람직한 실시양태에서, CXCR4 수용체에 결합하는 항체 또는 그의 단편은 수용체의 활성을 억제시킨다. 따라서, 항체 또는 그의 단편은 BM 미세 환경 내에서 조혈 줄기 세포의 귀소 및 유지를 파괴시키고/거나, 세포의 BM으로부터 주변부로의 동원을 증가시키고, 이로써, 조혈 암 세포의 화학요법제에 대한 감수성을 증가시킨다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 CXCR4-발현 세포의 아폽토시스를 유도한다. 표적 암 세포의 아폽토시스를 통해 항체는 단독요법으로서 사용될 수 있다.

[0131] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 키메라, 인간화된, 또는 인간 항체 또는 그의 단편이다. 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 인간 항체 또는 그의 단편이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 서열 25에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 중 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 29에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 중 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다.

[0132] 특정 실시양태에서, 카바트 체계에 의한 CDR 서열의 윤곽 표시에 따른, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 그의 서열은 서열 1에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1, 그의 서열은 서열 5에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2, 그의 서열은 서열 9에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3, 그의 서열은 서열 13에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1, 그의 서열은 서열 17에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2, 및 그의 서열은 서열 21에 기재되어 있는 것인 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.

[0133] 본 방법의 다른 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 서열 25에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 29에 기재된 서열을 가지는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 IgG1 또는 IgG4 항체 또는 그의 단편이다. 더 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 BMS-936564 또는 CXCR4-결합 단편이다.

[0134] 본원에 기술된 치료 방법을 잘 따를 수 있는 암으로는 고형 종양 및 혈액 악성종양을 포함한다. 특정 실시양태에서, 고형 종양은 유방, 난소, 전립선, 비-소세포 폐, 췌장, 갑상선, 결장직장, 및 신장 암, 비인두 암종, 흑색종, 신세포 암종, 신경모세포종, 횡문근육종, 횡문근육종, 및 골육종으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 혈액 악성종양은 다발성 골수종, 급성 골수성 림프종, 비-호지킨 림프종, 만성 림프성 백혈병, 여포성 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 베킷 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B-лим프모구성 림프종, 외투 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 전구체 T-лим프모구성 림프종으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 급성 골수성 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프성 백혈병이다.

[0135] 다발성 골수종 (MM)은 골 파괴, 골수 부전, 신손상, 및 말초 신경병증을 유발할 수 있는, 골수내 악성의 이뮤노글로불린 분비성 형질 세포의 축적을 특징으로 하는 형질 세포 악성종양이다. 종래 치료법 실시 후 생존기간의 중앙값은 3-4년이고, 이는 고용량의 치료법 이후, 자가 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)에 의해 5-7년까지 연장될 수 있다 (문헌 [Raab et al., 2009]).

[0136]

현재, MM에 대하여 보편적으로 사용되는 승인받은 요법으로는 유도용 멜팔란-기반 요법, 및 보르테조립 (벨케이드[®]) 또는 면역조절 약물 (IMiD)(탈리도마이드 포함) 또는 유도용 및 재발된 대상체용의 레날리도미드 (레블리미드[®])-기반 요법을 포함한다. 재발성 또는 불응성 MM을 앓는 대상체를 위한 치료 옵션으로 HSCT, 이전 화학요법 치료 요법 반복, 또는 신규 요법을 포함한다. HSCT는 치료와 관련하여 이환될 위험이 더 높은 것과 연관성을 가진다. 추가로, 일부 대상체는 성능 상태가 불량하거나, 동시 이환 상태이기 때문에 HSCT에 대한 자격이 없다. 현재는 어떤 치유법도 없으며, 현 요법은 단지 질환 진행을 저속화시키고, 생존기간을 연장시키고, 증상을 최소화시킬 뿐일 수 있다. 그의 초기 요법을 통해 생존한 MM 대상체는 거의 모두 그 요법 방식과는 상관없이 재발되거나, 불응성이고, 추가 요법을 필요로 한다 (문헌 [Jemal et al., 2005]). 그러므로, MM을 앓는 대상체에 대한 의학적 요구는 유의적으로 충족되지 않은 상태이다. 본 치료 방법의 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 재발성 또는 불응성 MM을 비롯한, 다발성 골수종이다.

[0137]

급성 골수성 백혈병 (AML)은 성인에서 가장 일반적인 급성 백혈병으로, 사례 중 80%를 차지한다. 미국에서는 매년 13,000명 초파의 환자가 AML 진단을 받고 있으며, 8,820명 초파의 환자는 사망한다 (문헌 [Cancer Facts and Figures, 2008]). 성인 AML을 위한 치료법으로는 관해를 달성하기 위한 유도 화학요법, 및 재발을 막기 위한 관해 이후의 화학요법 (줄기 세포 이식 포함 또는 비포함)을 포함한다. 관해 유도율 범위는 50% 내지 85%이다. 질환은 대상체 대다수에서 재발한다. 재발성 AML의 치료법은 상대적으로 낮은 관해율과 관련이 있으며, 지속적인 이익을 취하는 환자는 거의 없다 (문헌 [Breams et al., 2005]).

[0138]

재발성 또는 불응성 AML을 앓는 성인을 치료하기 위한 현 옵션으로는 화학요법 및 HSCT를 포함한다. 동종이계 HSCT는 1차 유도 실패에 대한, 또는 1차 완전 관해 (CR) 이상의 것을 위한 최상의 치료법인 것으로 간주되며, 이로써 단지 약 20%의 환자에서는 장기간 동안 무질환 생존기간이 이루어졌다. 그러나, 다양한 이유 (예컨대, 조기 재발, 이식 시설의 비접근성)에서 많은 환자에서는 HSCT가 부적절하거나, 이용불가능하다. 이는, 재발성이거나, 또는 종래 화학요법에 대해 불응성인 환자는 새로 진단받은 급성 백혈병 환자와 비교하여 화학요법에 대해 예후 및 반응이 더 불량하다는 사실과 함께, 상기 환자 집단을 위한 신규하고, 표적화된 작용제가 개발되어야 할 필요가 있음을 요구한다. 본 치료 방법의 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 재발성 AML을 비롯한, 급성 골수성 백혈병이다.

[0139]

만성 림프구성 백혈병 (CLL)은 서방 국가에서 가장 일반적인 백혈병이고, 미국에서는 전체 백혈병 중 30%를 차지한다. 2011년에서는 대략 14,570여 건의 신규 CLL 사례가 진단받고 (문헌 [Siegel et al., 2011]), 및 4,400명의 환자가 사망하게 될 것이다. 상기 질환은 기능상 무능한 모노클로날 림프구의 진행을 특징으로 하며, 이는 림프절병, 비장비대, 간비대, 및 말초 혈액 및 골수에서의 현저한 림프구증가를 유도한다. 대부분의 CLL 환자는 처음에는 화학요법에 대하여 완전 또는 부분 관해를 보이지만, HSCT로 치료받은 환자의 경우에는 예외적으로, 거의 모든 환자에서 치료 중단 이후에는 재발이 일어나거나, 불응성 질환이 발생하게 된다. CLL에 대한 현 초기 치료법으로는 종래 화학요법 및/또는 모노클로날 항체 (리툭시맙) 요법을 포함한다. 대부분의 환자의 생존기간은 5-10년이고, 시간 경과에 따라 이환율은 증가한다. 재발성/불응성 CLL을 앓는 환자를 위한 현 치료 옵션으로는 상기 질환이 치유되지 못하고 있으며, 생존기간 중앙값의 추정치는 16개월이다. 본 치료 방법의 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 재발성 CLL을 비롯한, 만성 림프구성 백혈병이다.

[0140]

여포성 림프종 (FL)은 미국 및 서부 유럽에서 두번째 가장 일반적인 림프종으로서, (전체) NHL의 약 20%를 차지하고, 대다수는 저등급 림프종이다. 대부분의 환자는 사용되는 요법에 따라 초기 요법에 대해 반응한다는 사실에도 불구하고 (약 40-80% 완전 관해), 거의 모든 환자에서는 추후에 진행성 질환이 발생한다. 또한, 최대 10% 까지는 그의 초기 치료법에 대하여 불응성이다. 그러므로, 신규의 보다 효과적인 요법이 요구되고 있다. 본 치료 방법의 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 재발성 FL을 비롯한 여포성 림프종이다.

[0141]

미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL)은 가장 일반적인 유형의 NHL로서, 성인 사례의 25-30%를 차지한다 (75세 초파의 환자 중 NHL 환자는 40%). DLBCL은 배중심 B (GCB)형, 활성화된 B 세포 유형 (ABC) 및 원발성 종격동을 포함하나, 이에 한정되지 않는 수개의 서브유형을 가진다 (문헌 [Gisselbrecht et al., 2011]). 치료받은 환자에서 GCB 및 ABC에 대한 전체 생존기간 (OS)이 3년인 환자는 각각 84% 및 56%이다. 종래 요법으로는 대부분의 DLBCL 환자가 치유되지 못한다. 재발 후, 60% 이상의 환자는 종래 치료법에 대하여 감수성인 상태 그대로 남아 있고, 10% 미만의 환자에서 무질환 생존기간은 제2선의 치료 요법으로 연장되었다 (문헌 [Gisselbrecht et al., 2010]). 화학감수성 질환을 앓는 환자의 서브세트를 위해 후속하여 고용량의 화학요법 및 이식을 수행하기 위한 목적으로 재발성 또는 불응성 (r/r) DLBCL을 화학요법 (리툭시맙 사용 또는 비사용)으로 치료하였다. 제2 화학요법 치료법에 이어서, HSCT를 수행한 것에 대한 반응자 중 대략 50%는 2년째에도 그의 반응을 유지하였다.

제2선 요법에 실패한 비-이식 후보, 또는 이식 후 재발된 후보의 경우, 요법은 완화적이다. 이식을 수행하지 않을 경우, 화학요법은 r/r DLBCL에서 단기간 질병을 관리한다. 1차 불응성 환자가 제2 화학요법 치료법으로 CR을 달성할 가능성은 거의 없고, 재발 후, 제2 관해는 보통 오래가지 못한다 (문헌 [Singer et al., 1986]). DLBCL은 초기에는 화학 반응성 질환이며, 작용제, 예컨대 화학감수성을 복원시키기 위해 본 개시내용의 항-CXCR4 항체를 첨가하는 것이 상기 질환을 치료하는 데 있어 적당한 전략법이다. 본 치료 방법의 바람직한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 재발성 또는 불응성 DLBCL을 비롯한, 미만성 거대 B-세포 림프종이다.

[0142] HIV-1 외피 당단백질-gp120의 CXCR4에의 결합에 의한 CXCR4-매개 아폽토시스를 보여주는 HIV-1 연구로부터의 데이터에 의해 촉구되었는 바 (문헌 [Garg et al., 2006]; [Berndt et al., 1998]), CXCR4-발현 세포주의 아폽토시스를 유도할 수 있는 본 개시내용의 항-CXCR4 항체인 BMS-936564의 능력을 측정하였다. BMS-936564-유도성 아폽토시스는 20개 초과의 상이한 CXCR4-발현 세포주에서 입증되었고 (하기 실시예 11, 및 표 3 및 4 참조), 이를 통해 상기 기전은 한 세포 유형으로만 제한되는 것이 아니라는 것이 확인되었다.

[0143] 아폽토시스는 만성 림프구성 백혈병에 대한 최소 잔류 질환 (MRD)이 시험관내 모델에서도 또한 입증되었다 (문헌 [Kashyap et al., 2012]). MRD를 균절시키는 것이 CLL 치료에서 가장 도전적인 목표이다. CXCL12를 발현하고, 분비하여, CLL 환자로부터의 1차 백혈병 세포에 생존 지원을 제공하는 기질 세포의 공배양물에 기초한, 상기 MRD 모델에서, CLL 세포의 생존능이 증가한 것으로 나타났고 (48시간째 20-60%), 화학요법제에 대한 내성을 보이는 것으로 나타났다. 그러나, 나노몰 농도 (2-200 nM)의 BMS-936564는 단독으로 배양된 CLL 세포 뿐만 아니라, MRD 모델을 사용하여 인큐베이션된 것에서도 세포 사멸을 유도하였다. 17p가 결실되고, 시험관내에서 플루다라빈 내성인 환자로부터의 CLL 세포에서 아폽토시스가 관찰되었는 바, BMS-936564의 아폽토시스유발 활성은 P53 비의존적인 것으로 보였다. BMS-936564는 또한 소형 분자 CXCR4 억제제인 AMD-3100이 사용된 경우에서 보다 더 낮은 농도에서 CLL 세포에서의 CXCL12-매개 F-액틴 중합화를 억제시켰다. 이러한 데이터는 BMS-936564가 MRD에 기여할 수 있는, 생체내 종양 미세 환경 중에 존재하는 CLL 세포를 효과적으로 표적화할 수 있다는 것을 제안한다 (문헌 [Kashyap et al., 2012]).

[0144] 소형 분자 CXCR4 길항제, 예컨대 AMD3100에서는 나타나지 않는 특성인, 개시된 항-CXCR4 항체의 아폽토시스성 효과는 상기 항체가 암 환자를 치료하는 데 단독요법으로서 단독으로 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 생체내 AML 및 MM 종양 모델에서 CXCR4 길항제의 효과에 관한 이전 연구는 상기 길항제가 화학요법에 대한 종양 세포의 감수성을 증진시키는 데 효과적이라는 것을 제안하였다 (문헌 [Azab et al., 2009]; [Zeng et al., 2009]). 대조적으로, 본원 실시예에서 제시된 데이터를 통해, BMS-936564는 매우 다양한 AML, NHL 및 MM 모델에서 단독 요법으로 투여되었을 때, 통계학상 유의적인 종양 성장 억제를 달성하였다는 것이 입증되었다. 따라서, 본 치료 방법의 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편은 단독요법으로 투여된다. 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 CXCR4-발현 세포의 아폽토시스를 유도한다. 따라서, 본 개시내용은 암을 앓는 대상체에게 세포 표면 상에 발현된 CXCR4 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 대다수가 혈액 악성종양인 것의 세포를 비롯한, CXCR4-발현 암 세포의 아폽토시스를 유도하는 방법을 제공한다.

[0145] BMS-936564가 IgG₄ 항체이기 때문에, ADCC 또는 CDC에 의해서는 생체내 효능을 설명할 수 없다. 그러나, 일단 항체가 CXCR4-발현 세포에 결합하고 나면, 이 항체는 항원 제시 세포 상에 발현된 Fc_γR1 수용체를 고용하여 포식작용을 유도할 수 있다. 생체내에서 BMS-936564 효능이 관찰된 세포주는 시험관내에서 아폽토시스를 유도하기 위하여 BMS-936564에 대한 2차 항-Fc 항체를 필요로 하였다 (실시예 11). 이는 상기 특정 세포주에서 CXCR4가 더 낮은 수준으로 발현되는 것에 대한 결과일 수 있다. 아폽토시스 개시 기전이 CXCR4 분자가 매우 인접하게 위치하게 되는지 여부에 의존할 경우, 세포 표면 상의 CXCR4의 밀도는 항-CXCR4 항체가 걸쳐 있는 결합 거리에 비하여 상대적으로 낮고, 이어서 2차 고 친화도 항-Fc 항체는 수용체를 함께 결합시켜 아폽토시스성 신호를 구동시키면서, 상기 캡을 가교화시키는 것을 필요로 할 수 있다. 생체내에서, 이는 Fc_γR1 수용체를 통해 달성될 수 있다.

[0146] 본원에 기술된 데이터는 항-CXCR4 항체의 세포 동원에서의 역할 이외에도, 상기 항체에 대한 CXCR4를 발현하는 표적 세포의 아폽토시스를 비롯한 신규의 작용 기전을 제안한다. 상기 데이터는 BMS-936564가 MM, AML, 및 다양한 NHL, 예컨대 FL 및 DLBCL을 비롯한 혈액 악성종양 뿐만 아니라, 고형 종양 악성종양에 대해 효과적인 요법을 제공할 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나, 본 방법이 반드시 본 개시내용의 항-CXCR4 항체의 임의의 특정 작용 기전으로 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, CXCR4는 MM 세포에서의 상피에서 중간엽 세포로 전이 (EMT)를 조절할 수 있고, BMS-936564는 EMT 관련 단백질인 트위스트(Twist), 스네일(Snail) 및 슬러그(Slug)를 억제

시키고, E-카드레린을 상향조절한다는 증거 (문헌 [Roccaro et al., 2012])에 의해 입증된 바와 같이, 본 개시 내용의 항-CXCR4 항체는 EMT를 억제시킬 수 있다. 상기 데이터는 CXCR4가 EMT를 조절할 수 있는 그의 능력에 기인하여 유효한 치료학적 표적을 나타낼 수 있다는 견해를 입증한다.

[0147] CXCR4/CXCL12 축이 MM 세포의 귀소 및 BM으로의 수송에서 중요한 역할을 하고, 종양 세포와 BM의 상호작용 과정이 치료제에 대한 감수성을 증진시킨다는 것이 앞서 밝혀졌다 (문헌 [Alsayed et al., 2007]; [Azab et al., 2009]). 이러한 관찰 결과는 신규한 항-CXCR4 인간 항체인 BMS-936564가 MM 세포의 귀소 및 BM에의 부착을 방해할 수 있고, 치료제에 대해 상기 세포를 감작화시킬 수 있다는 것을 제안한다. 특히, CXCR4를 표적화하는 것에 대한 이러한 근거의 타당성은 CXCL12 및 BMSC로의 이동을 평가하기 위해 1차 MM 세포 ($CD138^+$), MM 세포주 (MM.1S, RPMI.8226), 및 1차 MM 골수 기질 세포 (BMSC)를 이용한, 로카로(Roccaro) 등 (2012)에 의해 보고된 생체내 데이터에 의해 추가로 입증된다. 세포독성 및 DNA 합성은 각각 MTT 및 티미딘 흡수에 의해 측정하였다. 생체내 흑색종 마우스 모델을 사용하여 항-CXCR4가 종양 세포 전이 조절에 미치는 효과를 입증하였다. (1) 비히클로 처리된 마우스와 비교하여 BMS-936564로 처리된 마우스에서는 MM 세포의 원위부 골수 나이트로의 파종이 더 적게 나타났고, 이는 CXCR4가 종양 세포 파종을 조절하는 데 있어 중요할 수 있다는 가설을 지지하고; (2) 흑색종 이종이식편 모델에서, 비히클로 처리된 마우스와 비교하여 BMS-936564로 처리된 마우스는 전이 수가 감소된 것으로 나타났으며; (3) BMS-936564는 이동, 부착 및 생존기간에 있어서 시험관내에서 MM 세포를 기능적으로 표적화한다는 것이 입증되었다 (문헌 [Roccaro et al., 2012]).

[0148] BMS-936564는 용량에 의존하는 방식으로 MM 세포의 CXCL12 및 1차 MM BMSC로의 이동을 억제시켰다는 것이 추가로 입증되었다. 1차 MM 세포의 BMSC에의 부착 또한 용량에 의존하는 방식으로 BMS-936564에 의해 억제되었으며, 동시에 1차 BM-유래 $CD138^+$ 세포에 대한 세포독성 또한 유도되었다. BMS-936564 항체는 종양 세포의 BMSC-유도성 증식을 극복함으로써 BM 환경 상황하에서 MM 세포를 표적화하였다. 추가로, BMS-936564는 MM 세포에서 보르테조립-유도성 세포독성을 시너지 방식으로 증진시켰다 (문헌 [Roccaro et al., 2012]). 실시예 11에 기술되는 바와 같이, MM 세포에서 아폽토시스성 경로의 BMS-936564-의존적 활성화는 카스파제-9 및 PARP의 절단에 의해 입증되었다. CXCL12-유도성 ERK-, Akt-, 및 Src-인산화는 용량에 의존하는 방식으로 BMS-936564에 의해 억제되었다. 실시예 16에서 기술되는 바와 같이, BMS-936564가 이종이식편 마우스 모델에서 생체내 MM 세포 증식을 억제시켰다는 점은 중요하다.

[0149] 종합해 보면, MM 세포 상의 CXCR-4를 항-CXCR4 항체로 표적화하는 것은 일반적으로는 암, 및 특히 MM를 치료하는 데 효과적인 수단으로서, 가능하게는 다중 기전을 사용하는 것인, 유효 수단을 제공한다는 것이 상기 데이터를 통해 명확하게 입증되었다.

[0150] 본 개시내용의 항-CXCR4 항체는 또한 다른 암 치료법, 예컨대 수술 및/또는 방사선과 조합하여 사용될 수 있고/거나, 항-CXCR4 항체의 치료학적 효과를 증진 또는 증강시키는 하나 또는 다른 추가의 치료제, 예컨대 세포독성제, 방사선 독성제 또는 면역억제제와 함께 공동 투여될 수 있다. 항체는 (면역접합체로서) 작용제로서 연결될 수 있거나, 상기 작용제로부터 별개로 투여될 수 있다. 후자 (별개로 투여)의 경우, 항체는 상기 작용제 이전, 이후, 또는 그와 동시에 투여될 수 있거나, 종양 관련 항원에 결합하는 종래의 화학요법 약물 및 항체 또는 면역조절 표적을 비롯한 다른 공지된 치료제와 함께 공동투여될 수 있다. 화학요법 약물로는 특히 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 슬레이트, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 레날리도미드, 보르테조립, 엑사메사손, 미톡산트론, 에토포시드, 시타라빈, 벤다무스틴, 리툭시맙, 이포스파미드, 카르보플라틴, 및 에토포시드를 포함한다. 화학요법제와 함께, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 공동 투여하는 것은 인간 종양 세포에 대해 세포 독성 효과를 발휘하는 상이한 기전을 통해 작동되는 2 가지 항암제를 제공한다. 상기와 같은 공동 투여가 약물에 대한 내성 발생, 또는 그와 항체가 비반응성이 되도록 만드는 종양 세포의 항원성의 변화에 기인한 문제들을 해결할 수 있다.

[0151] 다른 실시양태에서, 대상체는 예를 들어, 대상체를 시토카인으로 처리함으로써 $Fc\gamma$ 또는 $Fc\gamma$ 수용체의 발현 또는 활성을 조절, 예컨대, 증진 또는 억제시키는 작용제로 추가로 치료될 수 있다. 다중 특이성 분자를 이용하여 치료하는 동안 투여하는 데 바람직한 시토카인으로는 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구- 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 인터페론- γ (IFN- γ), 및 종양 피사 인자 (TNF)의 것을 포함한다.

[0152] 본 개시내용의 항체는 또한 하나 이상의 추가의 치료 항체 또는 다른 결합체, 예컨대 Ig 용합 단백질과 조합하여 사용될 수 있다. 본 개시내용의 항-CXCR4 항체와 조합하여 투여될 수 있는 다른 항체 또는 결합체의 비-제한적인 예로는 CTLA-4, PSMA, CD30, IP-10, IFN- γ , CD70, PD-1, PD-L1, KIR, TNF, TNF-R, VEGF, VEGF-R, CCR5, IL-1, IL-18, IL-18R, CD19, CD52, CS1, EGFR, CD33, CD20, Her-2, CD25, gpIIb/IIIa, IgE, CD11a, α 4

인테그린, IFN α 및 IFNAR1에 대한 항체 또는 결합체를 포함한다.

[0153] CXCR4 경로 과과, 및 혈액 암 세포, 예컨대 MM 세포와 그의 골수 미세 환경 사이의 상호작용 과과가 예컨대, MM에 대해 레날리도미드 및 보르테조립을 사용하는 항암 요법에 대해 더욱 큰 감작화를 부여한다는 증거가 증가하고 있다. 실시예에서 기술된 바와 같이, MM 세포주 및 이종이식편 연구에서 단독요법으로서의 BMS-936564, 및 화학요법과 조합된 BMS-936564에 관한 비임상 데이터는 BMS-936564가 MM에서 활성을 띠고, 요법, 예컨대 레날리도미드/덱사메사손 및 보르테조립의 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 임상전 연구를 통해서 AMD3100을 이용한 CXCR4 억제는 골수 기질 세포로부터 MM 세포의 분리 및 상기 세포의 주변부로의 동원을 유도하여 보르테조립에 대한 감수성을 증가시켰다는 것 또한 밝혀졌다 (문헌 [Azab et al., 2009]). 본 개시내용의 항-CXCR4 항체는 유사하게 BM의 보호 환경으로부터 악성 세포를 유리시킬 수 있는 그의 능력에 의해 화학요법제의 효과를 증가시킨다. MM 세포를 동원하고, 그의 화학감작을 증가시키는 것 이외에도, 본 항체는 다른 가능한 기전들 중에서도 아폽토시스에 의해 MM 세포를 직접적으로 사멸시키는 추가의 효과 (실시예 11)를 가진다. BMS-936564는 단독으로, 또는 레날리도미드 또는 보르테조립과 조합하여 투여되었을 때, MM 생체내 종양 성장을 억제시키는 것으로 밝혀졌다 (실시예 16).

[0154] 본원에 기술된 치료 방법의 특정 실시양태에서, 본 방법은 대상체에게 1종 이상의 화학요법제를 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편화 조합하여 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 MM이고, 1종 이상의 화학요법제는 레날리도미드 + 저용량의 덱사메사손, 또는 보르테조립 + 덱사메사손이다. 이러한 화학요법 조합은 재발성 또는 불응성 MM을 앓는 대상체에서 치료학적 가치가 입증된 표준 요법이고, 이를 화학요법제의 안전성 프로파일은 특징이 잘 규명되어 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 사이클 1에서 처음 2주 동안은 단독요법으로서 매주 투여되고, 이어서 레날리도미드 + 저용량의 덱사메사손, 또는 보르테조립 + 덱사메사손을 포함하는 화학요법 치료법과 조합하여 투여된다.

[0155] 예를 들어, 레날리도미드 및 덱사메사손과 조합하여 BMS-936564로 MM을 치료하는 경우, 예시적인 투여량 요법은 (1) 1, 8, 15, 22, 29 및 36일째 (사이클 1) 및 1, 8, 15, 및 22일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 단일로 60분 동안 IV 주입으로서 BMS-936564 (1, 3, 또는 10 mg/kg) 투여; (2) 21일 (15-35일째; 사이클 1) 및 1- 21일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 레날리도미드 (25 mg po) 투여; 및 (3) 15, 22, 29, 및 36일째 (사이클 1) 및 1, 8, 15, 및 22일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 덱사메사손 (40 mg) 투여를 포함한다.

[0156] 예를 들어, 보르테조립 및 덱사메사손과 조합하여 BMS-936564로 MM을 치료하는 경우, 예시적인 투여량 요법은 (1) 1, 8, 15, 22, 및 29일째 (사이클 1) 및 1, 8, 및 15일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 단일로 60분 동안 IV 주입으로서 BMS-936564 (1, 3, 또는 10 mg/kg) 투여; (2) 15, 18, 22, 및 25일째 (사이클 1) 및 1, 4, 8, 11일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 3-5초 동안 급속 IV 주입으로서 보르테조립 ($1.3 \text{ mg}/\text{m}^2$) 투여; 및 (3) 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25 및 26일째 (사이클 1) 및 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 및 12일째 (사이클 2 및 후속 사이클) 덱사메사손 (20 mg) 투여를 포함한다.

[0157] 특정 실시양태에서, 암은 AML이고, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편화 조합하여 암 환자에게 투여되는 1종 이상의 화학요법제는 미토크산트론, 에토포시드, 및/또는 시타라빈인데, 그 이유는 상기 요법이 재발성, 불응성 AML 환자에 대한 표준 치료 요법으로 간주되기 때문이다 (문헌 [Amadori et al., 1991]). 특정 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 사이클 1에서 처음 2주 동안은 단독요법으로서 매주 투여되고, 이어서 미토크산트론, 에토포시드, 및 시타라빈을 포함하는 화학요법 치료법과 조합하여 투여된다.

[0158] 예를 들어, 단독요법으로서 BMS-936564로 AML을 치료하는 경우, 예시적인 요법은 사이클 1에서 1일째, 및 후속 사이클에서 1, 8, 및 15일째 단일로 60분 동안 IV 주입으로서 BMS-936564 (0.3, 1, 3, 또는 10 mg/kg)를 투여하는 것을 포함한다.

[0159] 예를 들어, 화학요법과 조합하여 BMS-936564로 AML을 치료하는 경우, 예시적인 투여량 요법은 (1) 1회차 화학요법을 수행하기 전, 화학요법 첫날 BMS-936564 투여를 포함한다. 사이클 2 및 후속 사이클에서 1, 8, 및 15일째 BMS-936564를 투여한다. 추가로, 사이클 2-13 동안 화학요법은 하기 요법으로 구성된다 (28일 사이클): (2) 1일째부터 5일째까지 15분 동안에 걸쳐 미토크산트론 ($8 \text{ mg}/\text{m}^2$ IV); (3) 1일째부터 5일째까지 1시간 동안에 걸쳐 에토포시드 ($100 \text{ mg}/\text{m}^2$ IV); 및 (4) 1일째부터 5일째까지 1시간 동안에 걸쳐 시타라빈 (Ara-C; $1 \text{ g}/\text{m}^2$ IV).

[0160] 특정 실시양태에서, 암은 CLL 또는 FL이고, 본 개시내용의 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편화 조합하여 암 환자에게 투여되는 1종 이상의 화학요법제는 벤다무스틴 및/또는 리툭시맙이다. 임상전 연구를 통해 수개의 백혈병 및 림프종 세포주에서 벤다무스틴과 리툭시맙 사이에는 항-종양 시너지가 존재하며 (문헌 [Rummel et al.,

2002]), 후자는 벤다무스틴을 비롯한 화학요법에 의해 유도되는 아폽토시스에 대해 B 세포 림프종을 감작화시켰다는 것이 나타났다 (문헌 [Chow et al., 2002]). 벤다무스틴 + 리툭시맙 (BR) 조합은 나이브, 치료받지 않은 또는 리툭시맙에 대해 불응성인 림프종 환자에서 효능이 있는 것을 밝혀졌다 (문헌 [Friedberg et al., 2008]). 특정 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 벤다무스틴 및 리툭시맙과 조합하여 투여된다.

[0161] DLBCL을 치료하는 방법의 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 리툭시맙, 이포스파미드, 카르보플라틴, 및/또는 에토포시드와 조합하여 사용된다 (문헌 [Kewalramani et al., 2004]). 재발성 또는 불응성 DLBCL에서는 어떤 화학요법 치료법도 우수성을 보이지는 못했다. R-ICE (리툭시맙, 이포스파미드, 카르보플라틴, 및 에토포시드)는 다른 요법과 그 효능이 유사하고, R-DHAP (헥사메사손, 고용량의 시타라빈, 시스플라틴)에 이어서 고용량의 화학요법 및 자가 HSCT로 반응 환자에 대해 수행되는 것에 비하여 독성이 감소되어 있기 때문에 r/r DLBCL에서 가장 보편적으로 사용되는 요법 중 하나이다 ([Gisselbrecht et al., 2010]). 특정 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 리툭시맙, 이포스파미드, 카르보플라틴, 및 에토포시드와 조합하여 투여된다.

[0162] 예를 들어, 단독요법으로서 BMS-936564로 FL, DLBCL 및 CLL 대상체를 치료하는 경우, 바람직한 요법은 사이클 1에서 1일째, 및 후속 사이클에서 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 및 50일째 단일로 60분 동안 IV 주입으로서 BMS-936564 (0.3–10 mg/kg)를 투여하는 것을 포함한다.

[0163] CLL, FL, 및 DLBCL 대상체 치료를 위해 화학요법과 조합하여 투여되는 경우, 예시적인 실시양태는 1회차 화학요법을 수행하기 전, 화학요법 첫날 BMS-936564를 투여하고, BMS-936564 주입 완료 후 적어도 1시간 이내에 화학요법을 투여하는 것을 포함한다. BMS-936564는 사이클 2 및 후속 사이클에서 1 및 8일째 투여된다.

[0164] CLL에 대한 화학요법은 하기 요법으로 구성된다 (28일 사이클): 사이클 2 및 후속 사이클의 1일째 리툭시맙 (375 mg/m^2 IV), 이어서 후속 사이클의 1일째 500 mg/m^2 ; 및 사이클 2의 1일째 60분 동안에 걸쳐 벤다무스틴 (70 mg/m^2 IV).

[0165] FL에 대한 화학요법은 하기 요법으로 구성된다 (28일 사이클): 사이클 2 및 후속 사이클의 1일째 리툭시맙 (375 mg/m^2 IV), 이어서 후속 사이클의 1일째 500 mg/m^2 ; 및 사이클 2의 1일째 60분 동안에 걸쳐 벤다무스틴 (90 mg/m^2 IV).

[0166] DLBCL에 대한 화학요법은 하기 요법으로 구성된다 (28일 사이클): 사이클 2 및 후속 사이클의 1일째 리툭시맙 (375 mg/m^2 IV); 사이클 2 및 후속 사이클의 4일째를 시작으로 24 hr 동안에 걸친 Mesna (2-머캅토에탄 술포네이트 Na; $5,000 \text{ mg/m}^2$) 연속 IV 주입과 함께, 4일째 이포스파미드 (5000 mg/m^2) 연속 IV 주입; 사이클 2 및 후속 사이클의 4일째 카르보플라틴 (칼버트(Calvert) 공식으로 계산된 표적 AUC $5 \text{ mg/mL} \cdot \text{min}$ 을 수득하기 위한 투여량; 최대 용량 = 800 mg); 사이클 2 및 후속 사이클의 3–5일째 매일 에토포시드 (100 mg/m^2 IV).

[0167] 본 발명의 한 측면은 CXCR4⁺ 암을 앓는 대상체를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서, 본 개시내용의 임의의 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 용도이다. 약제 제조를 위한, 본 개시내용의 임의의 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 용도는 본원에 개시된 전 범위의 암에 광범위하게 적용될 수 있다. 상기 용도의 바람직한 실시양태에서, 암은 혈액 악성종양, 예컨대 재발성 또는 불응성 다발성 골수종, 재발성 급성 골수성 림프종, 재발성 만성 림프구성 백혈병, 재발성 여포성 림프종 또는 불응성 미만성 거대 B-세포 림프종을 포함한다. 본 개시내용은 또한 본원에 기술된 항-CXCR4 항체를 사용하는 치료 방법의 모든 실시양태에 상응하는, 본 개시내용의 임의의 항-CXCR4 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 의학적 용도를 제공한다.

[0168] 본 개시내용의 임의의 항-CXCR4 항체 또는 항원-결합 단편 또는 그의 조성물, 및 사용 지침서를 포함하는 키트 또한 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 따라서, 본 개시내용은 (a) 1회 이상 용량의, 본 개시내용의 임의의-CXCR4 항체 또는 그의 CXCR4-결합 단편, 및 (b) 본원에 기술된 치료 방법 중 임의의 것에서 항-CXCR4 항체 또는 그의 단편을 사용하는 것에 관한 지침서를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 키트 중의 항-CXCR4 항체는 서열 25에 기재된 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 중 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열 29에 기재된 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역 중 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 BMS-936564이다. 키트는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료학적 시약, 예컨대 면역억제 시약, 화학요법제 또는 방사성 독성제, 또는 상이한 항원을 표적화하는 하나 이상의 추가의 항체를 추가로 포함한다.

[0169] 키트는 전형적으로 키트 내용물의 사용 목적 및 사용 지침서를 명시하는 라벨을 포함한다. 라벨이라는 용어는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 또는 다르게는 키트를 첨부하는 임의의 문서 또는 기록물을 포함한다. 제약 키트의 특정 실시양태에서, 항-CXCR4 항체는 단위 투여 형태의 다른 치료제와 함께 공동으로 패키징될 수

있다.

[0170] B. HIV 감염을 비롯한, 바이러스 감염

CXCR4는 T 세포 내로의 HIV 진입을 위한 공수용체인 것으로 밝혀졌으며, 추가로, 특정 뮤린 항-CXCR4 항체가 HIV 단리물의 T 세포 내로의 진입을 억제시킬 수 있는 것으로 입증되었다 (문헌 [Hou et al., 1998]; [Carnec et al., 2005] 참조). 따라서, CXCR4는 상기 세포 내로의 진입을 위한 바이러스에 의한 수용체로서 사용될 수 있으며, CXCR4에 대한 항체는 수용체로서 CXCR4를 사용하는 상기 바이러스의 세포 진입을 억제시키는 데 사용될 수 있다. HIV-1 외피 당단백질-gp120의 CXCR4에의 결합에 의한 CXCR4-매개 아폽토시스가 보고된 바 있다 (문헌 [Garg et al., 2006]).

[0172] 연구 결과, CXCR4에 가교된 항체는 gp120 유도로 관찰되는 세포 사멸을 모사할 수 있는 것으로 밝혀졌으며 (문헌 [Berndt et al., 1998]), 이를 통해, HIV-1 감염을 막기 위해 항-케모카인 수용체 항체를 사용함으로써 수용체를 발현하는 T 세포를 효율적으로 및 신속하게 파괴시킬 수 있다는 것이 제안되었다. 따라서, 세포 진입을 위한 수용체로서 CXCR4를 사용하는 바이러스의 세포 내로의 진입을 억제시키기 위해 본 개시내용의 인간 항-CXCR4 항체를 사용함으로써 바이러스 감염을 억제시킬 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 예컨대, HIV/AIDS의 치료 또는 예방에서 HIV의 T 세포 내로의 진입을 억제시키는 데 사용된다. 항체는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 다른 항-바이러스제, 예컨대 항-레트로바이러스 약물, 예컨대 AZT 또는 프로테아제 억제제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0173] C. 염증성 병태

CXCR4/CXCL12 경로는 염증성 간 질환 (문헌 [Terada et al., 2003]; 자가면역 관절 염증 (문헌 [Matthys et al., 2001]; 알레르기성 기도 질환 (문헌 [Gonzalo et al., 2000]); 및 치주 질환 (문헌 [Hosokawa et al., 2005])을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 염증성 병태에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

[0175] 따라서, CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제시키는, 본 개시내용의 인간 항-CXCR4 항체를 사용하여 염증성 간 질환, 자가면역 관절 염증, 알레르기성 기도 질환, 치주 질환, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 전신 홍반성 루푸스, I형 당뇨병, 염증성 피부 장애 (예컨대, 건선, 편평태선), 자가면역 갑상선 질환, 쇼그렌 증후군, 폐 염증 (예컨대, 만성 폐쇄성 폐 질환, 폐 사르코이드증, 림프구 폐포염) 및 염증성 신장 질환 (예컨대, IgA 신장 병, 사구체신염)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 장애를 비롯한, 염증성 장애에서의 염증을 억제시킬 수 있다. 항체는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 다른 항-염증제, 예컨대 비-스테로이드성 항염증성 약물 (NSAID), 코르티코스테로이드 (예컨대, 프레드니손, 히드로코르티손), 메토트렉세이트, COX-2 억제제, TNF 길항제 (예컨대, 에타너셉트, 인플릭시맙, 아달리무맙) 및 면역억제제 (예컨대, 6-머캅토퓨린, 아자티오프린 및 시클로스포린 A)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0176] D. 혈관신생

[0177] CXCL12는 CXCR4를 발현하는 혈관생성세포의 동원을 통해 신생혈관화를 유도하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Jin et al., 2006]). 또한, CXCR4/CXCL12 경로 차단은 VEGF-비의존적 방식으로 혈관신생을 억제시킴으로써 생체내 종양 성장을 약화시킬 수 있다 (문헌 [Guleng et al., 2005]). 추가로, 실시예 7에서 입증되는 바와 같이, 본 개시내용의 항체는 시험관내 모세관 형성을 억제시킬 수 있다. 따라서, CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제시키는 본 개시내용의 항-CXCR4 항체를 사용하여 CXCR4/CXCL12 경로를 방해함으로써 혈관신생을 억제시킬 수 있다. 혈관신생 억제는 예를 들어, (종양이 CXCR4⁺인지 여부와는 상관없이) 종양 성장 또는 종양 전이를 억제시키는 데 사용될 수 있다. 항체는 단독으로, 또는 다른 항-혈관신생제, 예컨대 항-VEGF 항체와 조합하여 사용될 수 있다.

[0178] E. 자가 줄기 세포 이식

[0179] 말초 혈액 줄기 세포는 예를 들어, 특정 혈액 악성종양의 치료에서 자가 줄기 세포 이식에 사용하기에 바람직한 줄기 세포 공급원이다. 말초 혈액으로부터 줄기 세포를 수집하기 위해서는 CD34⁺ 줄기 세포가 BM으로부터 말초 혈액으로 동원되어야 한다. 다양한 시토카인, 케모카인 및 부착 분자가, CXCR4와 SDF-1의 상호작용을 포함하는 상기 과정을 조절하는 데 연루되어 있다 (문헌 [Gazitt, 2001] 리뷰). 또한, 소형 분자 CXCR4 길항제가 CD34⁺ 줄기 세포의 BM으로부터 주변부로의 신속한 동원을 자극하는 것으로 입증되었다 (예컨대, 문헌 [Devine et al., 2004]; [Broxmeyer et al., 2005]; [Flomenberg et al., 2005] 참조). 따라서, CXCR4 활성을 억제시키는, 본

발명의 항-CXCR4 항체 (즉, 길항체 항체)를 사용하여 CD34⁺ 줄기 세포의 BM으로부터 말초 혈액으로의 동원을 자극하여 이식 (예컨대, 자가 이식)에서, 예를 들어 혈액 장애, 예컨대 다발성 골수종 및 비-호지킨 림프종 치료에서, 상기 줄기 세포가 사용될 수 있도록 할 수 있다. 항체는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 줄기 세포의 동원을 자극하는 데 사용되는 다른 작용제, 예컨대 G-CSF 및/또는 GM-CSF와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 항-CXCR4 항체를 투여하여 CD34⁺ 줄기 세포의 BM으로부터 말초 혈액으로의 동원이 자극받을 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD34⁺ 줄기 세포의 BM으로부터 말초 혈액으로의 동원을 자극시키는 방법을 제공한다. 본 방법은 추가로 예컨대, 자가 줄기 세포 이식에서 사용하기 위해 CD34⁺ 줄기 세포를 말초 혈액으로부터 수집하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0180] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이 실시예는 추가로 제한적인 것으로서 해석되지 않아야 한다. 본 출원 전역에 걸쳐 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특히 및 공개 특허 출원의 내용은 본원에 참조로 명백하게 포함된다.

[0181] 실시예 1

[0182] CXCR4 및 CXCL12에 대한 인간 모노클로날 항체 생성

[0183] 첫번째로, 인간 항체 유전자를 발현하는 트랜스제닉 트랜스염색체 마우스 (메다렉스 KM 마우스(Medarex KM MOUSE)[®] (미국 캘리포니아주 밀피타스), PCT 공개 번호 WO 02/43478 및 미국 특허 번호 제7,041,870호에 기술되어 있다)를 인간 CXCR4로 형질감염된 R1610 세포로 면역화시켜 마우스에서 인간 CXCR4에 특이적인 인간 이뮤노글로불린 레퍼토리를 상승시킨 후, 이어서 두번째로, 마우스의 비장 세포로부터 인간 항체 라이브러리를 제조하고, 과지 상에 디스플레이하여, 이어서 자기 프로테오리포솜 내로 혼입된 인간 CXCR4 (CXCR4-MPL)로 패닝함으로써 CXCR4에 대하여 친화성을 가지는 가변 영역 단편의 발현에 대해 상기 과지를 스크리닝하는 것인 조합 접근법을 사용하여 항-CXCR4 인간 모노클로날 항체를 생성하였다. 관심 가변 영역 단편을 Fab 발현 벡터로 재클로닝하고, 형질감염된 CXCR4-발현 세포에 대한 항원 결합에 대하여 Fab를 다시 시험하였다. (MDX-1338 또는 BMS-936564로 다시 지명되는 바) Fab 클론 F7, F9, D1 및 E2를 추가 분석을 위해 선택하였다. 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 Fab로부터 전체 항체를 생성하였다. 이러한 조합 접근법은 일반적으로 미국 특허 번호 제 6,794,132호에 기술되어 있고, WO 2008/060367에 구체적으로 상세하게 기술되어 있다.

[0184] 항-CXCL12 항체를 생성하기 위해, 메다렉스 KM[®] 트랜스제닉 마우스를 재조합 인간 CXCL12 (펩프로테크 (Peprotech: 미국 뉴저지주 로키 힐))로 면역화시켰다. 앞서 기술된 바와 같이 (미국 특허 번호 제6,794,132호) 비장 용해물을 풀링하고, 프로세싱하였다. 바이오사이트(Biosite)는 사유 과지 디스플레이 방법을 사용하여 항체 단편 (Fab 라이브러리)을 생성하였다. 비오티닐화된 CXCL12를 사용하여 CXCL12에 결합한 과지를 선별하였다. 선별된 항원-반응성 Fab를 전장의 IgG₄ (S228P)로 전환시키고, CHO 세포에서 다시 발현시켰다.

[0185] 절반 항체의 형성을 감소시키기 위하여 S228P 헌지 돌연변이를 함유하는 이소형 대조군 항체 IgG₄ (문현 [Angal et al., 1993])를 바이올로직스 디스커버리 캘리포니아(Biologics Discovery California: 미국 캘리포니아주 서니베일)에서 제조하였다.

[0186] 실시예 2

[0187] 인간 항-CXCR4 모노클로날 항체 F7, F9, D1 및 E2의 구조적 특징규명

[0188] 실시예 1에 기술된 바와 같이 스크리닝된 과지 디스플레이 라이브러리로부터 수득된, F7, F9, D1 및 E2 Fab 클론의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA 서열을 표준 DNA 서열 분석 기법을 사용하여 서열 분석하였다.

[0189] F7의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 도 1a, 및 서열 33 및 25에 제시되어 있다. F7의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 도 1b, 및 서열 37 및 29에 제시되어 있다.

[0190] F7 중쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 중쇄 서열과 비교함으로써 F7 중쇄가 인간 배선 V_H 3-48로부터의 V_H 절편, 인간 배선 4-23으로부터의 D 절편, 및 인간 배선 JH 6B로부터의 JH 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 F7 V_H 서열을 추가로 분석함으로써 각각 도 1a 및 서열 1, 5, 및 9에 제시된 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다. F7 경쇄 이뮤

노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 경쇄 서열과 비교함으로써 F7 경쇄가 인간 배선 V_K L15로부터의 V_L 절편, 및 JK 1로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 F7 V_L 서열을 추가로 분석함으로써 각각 도 1b 및 서열 13, 17 및 21에 제시된 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다.

[0191] F9의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 34 및 26에 제시되어 있다. F9의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 38 및 30에 제시되어 있다. F9 중쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 중쇄 서열과 비교함으로써 F9 중쇄가 인간 배선 V_H 3-48로부터의 V_H 절편, 인간 배선 4-23으로부터의 D 절편, 및 인간 배선 JH 6B로부터의 JH 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 F9 V_H 서열을 추가로 분석함으로써 각각 2, 6 및 10에 제시된 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다. F9 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 경쇄 서열과 비교함으로써 F9 경쇄가 인간 배선 V_K L15로부터의 V_L 절편, 및 JK 1로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 F9 V_L 서열을 추가로 분석함으로써 각각 14, 18 및 22에 제시된 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다.

[0192] D1의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 35 및 27에 제시되어 있다. D1의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 39 및 31에 제시되어 있다. D1 중쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 중쇄 서열과 비교함으로써 D1 중쇄가 인간 배선 V_H 3-48로부터의 V_H 절편, 인간 배선 4-23으로부터의 D 절편, 및 인간 배선 JH 6B로부터의 JH 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 D1 V_H 서열을 추가로 분석함으로써 각각 3, 7 및 11에 제시된 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다. D1 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 경쇄 서열과 비교함으로써 D1 경쇄가 인간 배선 V_K L15로부터의 V_L 절편, 및 JK 1로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 D1 V_L 서열을 추가로 분석함으로써 각각 15, 19 및 23에 제시된 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다.

[0193] E2의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 36 및 28에 제시되어 있다. E2의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 40 및 32에 제시되어 있다. E2 중쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 중쇄 서열과 비교함으로써 E2 중쇄가 인간 배선 V_H 3-48로부터의 V_H 절편, 인간 배선 4-23으로부터의 D 절편, 및 인간 배선 JH 6B로부터의 JH 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 E2 V_H 서열을 추가로 분석함으로써 각각 4, 8 및 12에 제시된 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다. E2 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 공지된 인간 배선 이뮤노글로불린 경쇄 서열과 비교함으로써 E2 경쇄가 인간 배선 V_K L15로부터의 V_L 절편, 및 JK 1로부터의 JK 절편을 이용한다는 것을 입증하였다. CDR 영역 결정의 카바트 체계를 사용하여 E2 V_L 서열을 추가로 분석함으로써 각각 16, 20 및 24에 제시된 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 윤곽 표시하였다.

[0194] F7, F9, D1 및 E2의 V_H 및 V_L 영역의 프레임워크 서열을, 상기 항체의 기원이 된 배선 서열과 비교하여 분석함으로써 배선과 다른 다양한 프레임워크 아미노산 잔기를 확인하였다. 프레임워크 잔기를 배선 서열로 수복시키는 "역-돌연변이"를 위해 V_H 및 V_L 절편의 N-말단 영역 중의 특정 프레임워크 잔기를 선택하였는데, 그 이유는 N-말단부의 상기 비-배선 잔기는 실시예 1에 기술된 과시 디스플레이 라이브러리를 생성하는 데 사용된 프라이머에 의해 코딩되었기 때문이다. 특히, 명시된 프레임워크 위치에서 배선 아미노산 잔기를 치환하는 표준 문자 생물학 기법을 사용하여 (배선의 경우, "GL" 형태로도 지칭되는) F7, F9, D1 및 E2의 V_H 및 V_L 절편의 변형된 형태를 생성하였다. F7, F9, D1 및 E2의 원래의 가변 영역의 서열과 함께, GL 변이체의 서열의 특별히 역-돌연변이화된 아미노산, 및 정렬이 WO 2008/060367에 제공되어 있다.

[0195] 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 F7, F9, D1 및 E2 Fab 단편을 전장의 항체로 전환시킨다. 예를 들어, Fab 단편 중 하나의 V_H 및 V_K 영역을 코딩하는 DNA를 가변 영역이 불변 영역에 작동적으로 연결되도록, 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 보유하는 발현 벡터로 클로닝할 수 있다. 별법으로, 전장의 중쇄 및 전장의 경쇄의 발현을 위해 별개의 벡터를 사용할 수 있다. 전장의 항체를 생성하는 데 사용하기에 적합한 발현 벡터에 대한 비제한적인 예로는 미국 특허 번호 제7,674,618호에 기술된 pIE 벡터를 포함한다. F7 (BMS-936564) Fab 단편을 전장의

IgG₄ (S228P) 항체로 전환시키고, CHO 세포에서 다시 발현시켰다.

[0196] 실시예 3

항-CXCR4 인간 모노클로날 항체의 결합 특징

본 실시예에서는 유동 세포측정법에 의해 항-CXCR4 항체의 결합 특징을 조사하였다.

그의 세포 표면 상에 천연 인간 CXCR4를 발현하는 인간 T 세포주 CEM을 사용하여 천연의 세포-표면 CXCR4에 결합할 수 있는 F7, F9, D1 및 E2 항체의 능력에 대해 조사하였다. 전장의 F7, F9, D1 및 E2를 1:3 일련의 희석 액 시리즈로 적정하여 농도 범위가 300 nM 내지 5 pM이 되도록 만들었다. 이어서, 항체를 CEM 세포와 혼합하고, 결합되도록 한 후, FITC-접합된 항-인간 IgG 2차 항체로 검출하였다. 이어서, 세포를 형광 세포 측정법에 의해 분석하였다. 생성된 평균 형광 강도는 도 2의 그래프에 제시되어 있으며, 이는 4가지 항-CXCR4 항체 모두 CEM 세포에 결합한다는 것을 입증한다. F7, F9, D1 및 E2에 대한 결합 EC₅₀은 각각 21 nM, 14 nM, 80 nM 및 290 nM였다.

CXCR4에의 결합에 대하여 경쟁할 수 있는 항-CXCR4 항체 패널의 능력을 측정하기 위해, 경쟁 연구를 수행하였다. 4개의 상업적으로 이용가능한 뮤린 모노클로날 항-CXCR4 항체 (12G5, 708, 716 및 717; R&D 시스템즈(R&D Systems) 카탈로그 번호 각각 MAB170, MAB171, MAB172 및 MAB173)와 함께 4가지 인간 항-CXCR4 항체 F9, F7, E2 및 D1을 사용하였다. 일정한 농도의 FITC-표지된 항-CXCR4 항체 F9의 존재하에서, 항-CXCR4 항체를 1:3 일련의 희석액 시리즈로 적정하여 농도 범위가 300 nM 내지 5 pM이 되도록 만들었다. 이어서, 항체 혼합물을 CEM 세포에 첨가하고, 결합되도록 하였다. CEM 세포에의 결합에 대하여 F9와 경쟁할 수 있는 각 항체의 능력을 형광 세포 측정법 및 FITC 검출에 의해 평가하였다. 생성된 평균 형광 강도는 도 3의 그래프에 제시되어 있으며, 이는 비록 유일하게 E2 항체는 다른 항체와 비교하여 고농도에서 부분적인 억제를 나타내기는 하였지만, 조사된 7가지 모두 (F7, E2, D1, 12G5, 708, 716 및 717) CEM 세포에의 결합에 대하여 F9와 경쟁할 수 있었다는 것을 입증한다.

또 다른 실험 세트에서, FACS 적정을 수행함으로써 유동 세포측정법에 의해 각종의 상이한 세포주에 결합할 수 있는 BMS-936564 mAb의 능력을 조사하였다. (0.001 µg/ml 미만에서부터 100 µg/ml 초과까지로) mAb의 양을 증가시켜 가면서 100,000개의 세포와 함께 인큐베이션시키고, 유동 세포측정법에 의해 결합을 평가하였다. 각 세포 상에 대략 몇 개의 CXCR4 분자가 존재하는지를 나타내는 것인 B_{최대} 값 또한 측정하였다. 결합 곡선에 기초하여, 항체 결합에 대한 EC₅₀을 측정하였고, 그 결과는 하기 표 1에 요약되어 있다

표 1

상이한 세포주에의 F7 (BMS-936564) 결합에 대한 FACS 적정 결과

세포 유형	EC ₅₀ (µg/ml)	B _{최대}
라모스	0.48	106,000
라지	0.34	52,536
나말바	1.57	116,000
L540	3.69	31,868
DMS79	3.99	24,587
MDA-MB-231	9.24	14,186

B_{최대} = 최대 결합 (GMFI 단위)

[0202]

그 결과, F7 mAb (BMS-936564)는 시험된 각각의 6개의 세포주에 효과적으로 결합할 수 있는 것으로 나타났으며, 가장 낮은 EC₅₀은 라모스 및 라지(Raji) 세포주에서 관찰되었다. 또한, 상기 데이터를 통해서 CXCR4 수용체의 발현은 라모스 및 나말바(Namalwa) 세포에서 가장 높고, MDA-MB 231 세포 및 DMS79 세포에서 가장 낮은 것으로 나타났다.

또 다른 결합 실험에서, 인간 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)의 다른 서브세트에 결합할 수 있는 BMS-936564 mAb의 능력을 조사하였다. 표준 방법에 의해 인간 PBMC를 단리시키고, FACS에 의해 상이한 세포 서브세트를 단리시켰다. 특히, 하기 세포 서브세트: (i) CD3⁺, (ii) CD20⁺; (iii) CD11b⁺ 및 (iv) CD14⁺를 단리시켰다. (33 µg

/m1의) BMS-936564 mAb를 이용하여 수행된 유동 세포측정법 실험을 통해 상기 항체는 이소형이 매칭되는 대조군 항체와 비교하여 4개의 서브세트 각각에 효과적으로 결합할 수 있는 것으로 입증되었다.

[0205] 또 다른 실험에서, 유동 세포측정법을 사용하여 인간 CXCR4+ 세포주의 다른 세트를 BMS-936564 결합에 대하여 평가하였다. 유동 세포측정법 (FACS) 염색을 위해 세포를 명시된 농도의 네이키드 BMS-936564 또는 비오티닐화된 BMS-936564와 함께 혼탁시킨 후, 항체 혼합물 및 세포를 염소 항-인간 FC γ-PE 또는 PE-접합된 스트렙타비딘과 함께 인큐베이션시킴으로써 세포를 제조하였다. FSC 및 SSC에 의해 확인된 살아있는 세포 집단에 대해 케이팅함으로써 FACS에 의해 세포를 분석하였다. 세포주 R1610-huCXCR4 (인간 CXCR4로 형질감염되고, G418 선별하여 유지된 R1610 햄스터 섬유모세포); 라모스 (인간 B 림프모세포 버킷 림프종); CEM (인간 T 림프모세포 급성 림프모구성 백혈병); 노모-1 (인간 급성 골수성 백혈병); HL-60 (인간 전골수모세포); MOLP8 (인간 MM); 및 JJN-3R (보르테조립에 대한 내성에 대하여 선별된 인간 MM 세포주)의 경우, 용량-의존성 결합이 관찰되었다. 도 4를 참조할 수 있다. R1610 모체 세포에 대해서는 어떤 결합도 이루어지지 않은 것이 검출되었다. 기하 평균 형광 강도 (GMFI)에 기초하여, CXCR4 수준은 R1610-huCXCR4 및 라모스 세포에서 가장 높았고, 다음으로 CEM (도 4b), 노모-1 및 HL60 (도 4a) 순이었다. 다발성 골수종 세포주 MOLP-8 및 JJN-3R은 가장 적은 개수의 수용체를 발현시켰다 (도 4c). 결합에 대한 EC₅₀ 값은 하기 표 2에 제시되어 있다. 추가로, BMS-936564는 건강한 기증자 PBMC (데이터는 나타내지 않음) 뿐만 아니라, AML 환자로부터 수집된 PBMC 샘플 8개 중 7개에 가변적인 GMFI로 결합하였다 (도 4d). 상기 데이터는 CXCR4가 다중의 조혈 세포주에서 발현되고, AML 환자에서 가변적으로 발현된다는 것을 시사한다.

표 2

인간 CXCR4+ 세포주에 결합하는 BMS-936564의 결합

세포 유형	EC ₅₀ (nM)
R1610-huCXCR4	2.3
라모스	4.2
CEM	10.3
노모-1	40
HL-60	5.3
MOLP-8	6.5
JJN-3R	2.0

[0206]

[0207] 실시예 4

[0208] 항-CXCR4 및 항-CXCL12 항체에 의한 CXCL12의 CXCR4에의 결합 억제

[0209] CXCL12의 CXCR4에의 결합을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 측정하기 위해, ¹²⁵I-표지된 CXCL12 (퍼킨엘머: 미국 매사추세츠주 월섬)), 및 천연적으로 CXCR4를 발현하는 CEM 세포를 이용하여 경쟁 연구를 수행하였다. 표준 방사성 표지된 리간드 결합 검정법에 의해 CXCL12의 CEM 세포에의 결합에 대한 항-CXCR4 항체와의 비교를 수행하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3으로 일련으로 희석시켜 300 nM 내지 137 pM 농도 범위를 수득하였다. 비활성이 2,000 Ci/mmol인 100 pM ¹²⁵I-CXCL12 (아머샴(Amersham), 카탈로그 번호 IM314-25UCI)의 존재하에 100 μl 중 750,000개의 CEM 세포에 항체를 참가하였다. 같은 이소형의 비관련 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 4°C에서 2시간 동안 항체 부재하에서 ¹²⁵I-CXCL12가 CEM 세포에 결합할 수 있게 함으로써 전체 가능한 결합된 방사성 표지된 리간드를 측정하였다. 1 μM 비표지된 CXCL12 (펩프로테크, 카탈로그 번호 300-28A)의 존재하에서 ¹²⁵I-CXCL12가 결합하도록 함으로써 방사성 표지된 리간드의 비-특이적 결합을 측정하였다. 표준 방법에 의해 세포-희합된 ¹²⁵I-CXCL12의 양을 측정하였다. 그 결과는 도 5에 제시되어 있으며, 이는 F7 항체 (BMS-936564)가 CEM 세포 상에서 발현된 CXCR4에의 CXCL12의 결합을 가장 효과적으로 차단시킨다는 것을 입증한다. 비록 F7보다는 더 중간 정도로 차단시키기는 하였지만, F9 및 D1 항체 또한 CXCL12 결합을 차단시켰다. E2 항체는 비록 (실시예 3에서 입증되는 바와 같이) CEM 세포 상의 CXCR4에 결합하기는 하였지만, CEM 세포 상의 CXCR4에의 CXCL12의 결합을 효과적으로 차단시키지는 못했다. F7, F9 및 D1에 의한 CXCL12 차단

에 대한 EC₅₀은 각각 2.3 nM, 12.5 nM 및 28.6 nM이었다.

[0210] 또 다른 실험에서, BMS-936564 및 항-CXCL12 항체에 의한 CXCL12의 CXCR4에의 결합 차단을 비교하였다. ¹²⁵I-CXCL12의 CXCR4⁺ CEM 세포에의 결합 차단에 대하여 BMS-936564, 항-CXCL12 및 대조군 항체의 일련의 희석액을 시험하였다. 고정 농도의 ¹²⁵I-CXCL12 (100 pM) 및 5 pM 내지 300 nM으로 적정된 BMS-936564를 사용하여 CEM 세포 상의 CXCR4에의 ¹²⁵I-CXCL12 (퍼킨엘머: 미국 매사추세츠주 월섬)의 결합에 관한 경쟁을 수행하였다. 이소형 항체를 음성 대조군으로서 사용하고, 비표지된 CXCL12를 양성 대조군으로서 사용하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시키고, 필터를 세척하고, 제거하고, 퍼킨엘머 위자드(WIZARD)[®] 감마 계수기 (미국 매사추세츠주 월섬)에 의해 분당 계수 (CPM)를 판독하였다. 모든 시험판내 연구를 위해, 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism) 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 샌디에고)로 비선형 회귀 및 S자형 용량-반응 곡선을 사용하여 데이터를 그래프로 작성하고, 분석하였다.

[0211] 방사성 표지된 CXCL12 및 CXCR4⁺ CEM 세포를 사용하여 포화 결합 연구를 수행하였다. ¹²⁵I-CXCL12의 CEM 세포에의 결합의 K_D는 4.3 nM인 것으로 측정되었으며 (데이터는 나타내지 않음), 이는 CXCL12의 CXCR4에 대한 K_D가 3.0 내지 5.4 nM 범위인 것으로 보고된 것과 유사한 값이었다 (문헌 [DiSalvo et al., 2000]). 차선의 고정 농도의 ¹²⁵I-CXCL12 (100 pM)를 사용하여, BMS-936564를 적정하고, 대략 2 nM의 EC₅₀ 값의 ¹²⁵I-CXCL12 결합의 용량-의존적 억제가 관찰되었다 (도 6a). 흥미롭게도, 항-CXCL12 항체는 효능이 더 커졌고, 대략 90 pM의 EC₅₀ 값의 ¹²⁵I-CXCL12의 CEM 세포에의 결합에 대한 용량-의존적 억제를 유도하였다 (도 6b).

[0212] BMS-936564는 또한 대략 11 nM의 EC₅₀ 값으로 용량에 의존하는 방식으로 ¹²⁵I-CXCL12의 라모스 세포에의 결합을 차단시키는 것으로 나타났다 (도 6c).

[0213] 실시예 5

항-CXCR4 및 항-CXCL12 항체에 의한 CXCL12-유도성 칼슘 흐름 억제

[0214] CXCL12에 의해 유도된 칼슘 흐름을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 측정하기 위해, 먼저 CEM 세포를 형광 염료 칼슘 3 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices: 미국 캘리포니아주 서니베일))으로 표지화하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3 일련의 희석액 시리즈로 적정하여 농도 범위가 100 nM 내지 1 pM이 되도록 만들고, 200 μl 중 200,000개의 CEM 세포에 결합하도록 하고, 실온에서 10분 동안 인큐ベ이션시킨 후, 플렉스테이션 (FLEXSTATION)[®] 기계 (몰레큘라 디바이시스) 새로 로딩하였다. 같은 이소형의 비관련 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 이어서, 세포를 최종 농도 50 nM의 재조합 인간 CXCL12 α (펩프로테크)로 자극시키고, 최종 부피 222 μl에 대하여 22 μl 부피 중 500 nM로 첨가하였다. 생성된 칼슘 흐름을 웰당 200초 동안 측정하였다. 양성 대조군으로서, 항체 부재하의 세포를 (0.1% BSA를 포함하는 행크스 완충 염수 (HBS), 또는 HBS 중에서 구성된) CXCL12 α로 자극시켜 최대 가능 칼슘 흐름 신호를 달성하였다. 기준선을 측정하기 위해, 세포를 0.1% BSA를 포함하는 HBS로 자극시켰다. CXCL12 α에 의해 자극받은 칼슘 방출을 시간 경과에 따른 칼슘-의존적 형광 발생에 의해 측정하였다. 생성된 형광 트레이스의 곡선하 면적을 칼슘 흐름의 표시로서 기록하였다. 항-CXCR4 항체에 의해 생성된 칼슘 흐름 억제는 도 7에 제시되어 있다. 데이터를 플롯팅하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어 및 비선형 곡선 피트, S자형 용량 반응식을 사용하여 EC₅₀을 계산하였다. 항체 F7 (BMS-936564), F9 및 D1은 CXCL12 α-유도성 칼슘 흐름을 억제시켰다. (실시예 3에서 입증된 바와 같이) 항체 E2는 CXCR4에 결합하기는 하였지만, CXCL12 α-유도성 칼슘 흐름을 유의적으로 억제시키지는 못했다. F7, F9 및 D1에 의한 CXCL12-유도성 칼슘 흐름의 억제에 관한 EC₅₀은 각각 0.90 nM, 0.32 nM 및 0.57 nM이었다.

[0215] 또 다른 실험에서, BMS-936564 및 항-CXCL12의 CXCL12-유도성 칼슘 흐름을 억제시킬 수 있는 능력을 비교하였다. 라모스 및 CELL 세포에 플립R(FLIPR)[®] 칼슘 4 염료 (몰레큘라 디바이시스)를 로딩하고, 고정 농도의 CXCL12를 사용하여 칼슘 흐름을 자극시켰다. 50 pM 내지 100 nM으로 적정된 BMS-936564 또는 항-CXCL12를 사용하여 반응을 억제시켰다. 항체 부재하의 CXCL12를 사용하여 최대 칼슘 반응을 설정하였다. CXCL12 없이 세포를 완충액으로 자극시킴으로써 기준선 반응을 확립하였다. 플렉스테이션[®] (몰레큘라 디바이시스) 상에서 칼슘 흐름을 판독하였다. CXCL12는 용량에 의존하는 방식으로 세포내 칼슘 상승을 유도하는 것으로

나타났으며, 라모스 및 CEM 세포의 경우, 최대 칼슘 흐름은 각각 50 nM 및 5 nM일 때 도달하였다. 칼슘 흐름을 자극시키는 데 최적인 농도의 CXCL12를 사용하여, 적정된 BMS-936564 또는 항-CXCL12를 사용함으로써 억제시켰다 (도 6c 및 6d). BMS-936564 및 항-CXCL12 둘 모두 용량에 의존하는 방식으로 CXCL12-유도성 칼슘 흐름을 차단시켰다. BMS-936564는 라모스 및 CEM에서 각각 대략 10 nM 및 8 nM의 EC₅₀으로 차단시킨 반면 (도 8a 및 8b), 항-CXCL12는 대략 35 nM (라모스) 및 2 nM (CEM)의 EC₅₀으로 세포를 차단시켰다 (도 8a 및 8b).

[0217] 실시예 6

항-CXCR4 및 항-CXCL12 항체에 의한 CEM 세포의 CXCL12-유도성 이동 억제

CXCL12에 의해 유도된 CEM 세포의 이동을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 측정하기 위해, 먼저 CEM 세포를 BATDA (비스(아세톡시메틸)2,2':6',2"-터피리딘-6,6"-디카르복실레이트) 화학발광성 이동 시약 (퍼킨엘머)으로 표지화하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3 일련의 희석액 시리즈로 적정하여 농도 범위가 100 nM 내지 1 pM이 되도록 만들고, $1 \times 10^7/\text{mL}$ 밀도로 표지화된 CEM 세포에 결합되도록 하였다. 같은 이소형의 비관련 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 웰당 30 μl 씩 5 nM로 재조합 인간 CXCL12 α (펩프로테크)를 웰당 직경이 5.7 mm인 필터가 있는 96웰 뉴로프로브(Neuroprobe) 이동 플레이트의 하부 챔버에 첨가하였다. 각 웰은 5 μM 공극을 포함하였다. 항체를 포함 및 포함하지 않는, 표지화된 CEM 세포를 50 μl 부피 중 웰당 0.5×10^6 개의 세포인 농도로 필터 상에 로딩하였다. 이동 플레이트를 37°C에서 2.5시간 동안 인큐베이션시켰다. 이동된 세포를 플레이트의 하부 챔버에서 포획하고, 용해시키고, 멜피아® 유로퓸(DELFIA® Europium) 검출용 용액 (퍼킨엘머)을 이용하여 검출하였다. 퓨전 장치 상에서 화학발광성 신호를 기록하였다. 항-CXCR4 항체에 의해 생성된 CXCL12 α-유도성 이동 억제는 도 9에 제시되어 있다. 본 결과는 항체 F7 및 F9는 이동을 효과적으로 억제시킨 반면, 항체 D1 및 E2는 이동을 유의적으로 억제시키지 못하였다는 것을 입증하였다. F7 및 F9에 의한 CXCL12-유도성 CEM 세포 이동 억제 EC₅₀은 각각 12.44 nM 및 18.99 nM이었다.

또 다른 실험에서, 라모스 및 CEM 세포의 CXCL12-유도성 이동을 억제시킬 수 있는 BMS-936564 및 항-CXCL12의 능력을 비교하였다. 세포에 BATDA를 로딩하였다. 고정 농도의 CXCL12를 사용하여 뉴로프로브 (미국 메릴랜드 주 게이더스버그)로부터의 이동 플레이트 상에 5 μm 공극을 포함하는 필터를 통과하는 세포의 이동을 자극시켰다. 20 pM 내지 300 nM으로 적정된 BMS-936564 또는 항-CXCL12를 세포에 첨가하였다. 항체 부재하의 CXCL12를 사용하여 최대 이동을 확립하였다. CXCL12 없이 단독으로 배지쪽으로 이루어지는 이동을 사용하여 배경 이동을 측정하였다. 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 멜피아® 유로퓸 검출용 용액 (퍼킨엘머)을 용해된 세포에 첨가함으로써 이동된 세포를 검출하고, 퓨전 장치 상에서 시분해 형광에 의해 검출하였다. 라모스 이동을 유도하는 데 최적인 CXCL12의 농도는 10 ng/mL (1.25 nM)인 것으로 확립되었고, CEM 세포는 CXCL12에 대한 감수성이 더 커졌고, 0.05 nM CXCL12에서 최대 이동을 보였다. BMS-936564는 라모스 세포에서는 1 nM 및 CEM 세포에서는 4 nM의 EC₅₀ 근사치로 CXCL12-유도성 이동을 차단시킨 것으로 나타났다 (도 10a 및 10b). 항-CXCL12는 0.9 nM (라모스) 및 0.13 nM (CEM)의 EC₅₀ 근사치로 CXCL12-유도성 이동을 억제시켰다 (도 10a 및 10b).

[0221] 실시예 7

항-CXCR4 항체에 의한 HuVEC 모세관 형성 억제

본 실시예에서는 인간 제대 정맥 내피 세포 (HuVEC)에 의한 모세관 형성을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 조사하였다. 마트리겔(MATRIGEL)®을 RPMI를 이용하여 1:1로 희석시키고, 96웰 플레이트의 웰 상에 풀레이팅하고, 37°C에서 30분 동안 중합화시켰다. 80% 전면생장된 HuVEC (캄브렉스(Cambrex), 카탈로그 번호 CC-2519)를 트립신으로 처리하고, 0.5% FBS를 포함하는 RPMI 중 1×10^6 개의 세포/mL로 재현탁시켰다. 항체를 HuVEC와 함께 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 잘 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 같은 이소형의 비관련 항체, 또는 배지 단독의 것을 음성 대조군으로서 사용하였다. 관 형성 억제에 대한 양성 대조군으로서는 마우스 항-인간 α v β3 (CD51/CD61) 항체 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 MAB3050)를 사용하였다. 항체 존재 또는 부재하에 HuVEC를 마트리겔®로 코팅된 웰에 풀레이팅하고, 37°C에서 18시간 동안 인큐베이션시켰다.

배지 단독, 또는 이소형이 매칭되는 대조군 항체와 함께 인큐베이션된 HuVEC는 모세관을 형성하였고, 그 결과, 플레이트를 가로질러 연결된 세포가 출현하였으며, 세포 1개당 3-5개의 연결점 또는 분지점이 있었다. 항-CXCR4 인간 항체 또는 항-α v β3 항체와 함께 인큐베이션된 HuVEC는 모세관을 형성하지 못했다. 세포는 단리

된 상태로 보였고, 분지점은 거의 없거나, 전혀 없었다. CXCL12 결합, CXCL12-유도성 칼슘 흐름 및 CXCL12-유도성 이동을 차단시키는 데 가장 효과적인 항-CXCR4 항체, 즉, F7 및 F9가 모세관 형성을 억제시키는 데에서도 또한 가장 큰 효과가 있었다. CXCL4에 결합은 하지만, CXCL12 결합 또는 CXCL12-유도성 효과를 차단하지는 못하는 항-CXCR4 항체인 E2는 모세관 형성을 억제시키지 못했다.

[0225] 실시예 8

항-CXCL12가 아닌, 항-CXCR4 항체가 CXCR4를 발현하는 세포의 시험관내 증식을 억제시킨다

본 실시예에서는 시험관내에서 라모스 종양 세포 (인간 버킷 램프종 세포주)의 증식을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 조사하였다. 본 검정법에서, F7 IgG4 항체, F9 IgG1 항체, E2 IgG1 항체, F9 Fab' 항체 또는 이소형 대조군의 용량을 증가시켜 가면서 (10^{-3} 내지 300 nM) 그와 함께 1×10^4 개의 세포/웰을 인큐베이션시켰다. 세포를 72시간 동안 항체와 함께 인큐베이션시키고, 세포 증식을 모니터링할 수 있도록 하기 위해 마지막 24시간의 인큐베이션 동안 ^3H -티미딘을 첨가하였다. 인큐베이션 후, 세포에 의한 ^3H -티미딘 혼입을 표준 기법에 의해 측정하였다. 결과는 도 11a의 그래프에 제시되어 있다. 본 결과는 각각의 F7 IgG4, F9 IgG1 및 E2 IgG1 항체는 이들 항체와 함께 인큐베이션되었을 때, ^3H -티미딘 혼입이 감소된 것으로 나타난 바와 같이, 라모스 세포 증식을 억제시킬 수 있는 반면, F9 Fab' 단편은 세포 증식을 억제시키지 못했다는 것을 입증한다. 상기 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 시험관내에서 종양 세포에 대하여 직접적인 항-증식 효과를 가지며, 따라서, 항-증식 효과를 달성하기 위해 2차 가교를 필요로 하지 않는다는 것을 시사한다.

또 다른 실험에서, MDX-1338, 항-CXCL12, 및 소형 분자 CXCR4 길항체인 AMD3100 및 BKT140이 라모스 세포의 증식에 미치는 효과를 비교하였다. 라모스 세포를 성장 배지 중 1×10^5 개의 세포/mL로 혼탁시키고, 이소형 대조군을 비롯한 관련 항체, 및 다른 시험 작용제와 함께 인큐베이션시키고, 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 셀-타이터-글로(Cell-Titer-Glo) (프로메가(Promega))를 웰에 첨가하고, 혼합하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 글로맥스 르미노미터(GloMax Luminometer) (프로메가) 상에서 판독하였다. 결과는 도 11b에 제시되어 있다. 이소형 대조군과 비교하여 40 nM BMS-936564 처리군에서 라모스 세포 증식이 최대로 약 50% 억제된 것이 관찰되었지만, 항-CXCL12는 세포 증식을 억제시키지 못했다. 또한, AMD3100, 소형 분자 CXCR4 길항체는 증식을 억제시키지 못했다. 최근 기술된 14개의 잔기로 이루어진 웹티드 길항체인 BKT140은 증식을 억제시키지 못했지만, 훨씬 더 높은 고농도 (100 μM)에서는 억제시켰다. 캄토테신 (CPT)은 10 μM 에서 세포 증식을 완전하게 억제시켰다.

[0229] 실시예 9

항-CXCR4 항체에 의한 생체내 고형 종양 세포 증식 억제

본 실시예에서는 라모스 피하 종양 세포 모델을 사용하여 생체내에서 확립된 고형 종양의 증식을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 조사하였다. 본 검정법에서, 마우스 1마리당 10×10^6 개의 라모스 세포를 각각의 마우스의 옆구리 부위에 이식하고, 종양의 길이 x 너비 x 높이/2로 계산되는 평균 크기가 40 mm^3 가 될 때 까지 성장시켰다. 이어서, 마우스에 제1 용량의 항체를 복강내 (IP) 주사하고 (처리 0일째로 지정), 7일째 제2 IP 용량의 항체를 투여하였다. Fab' 단편 항체로 처리된 마우스에 또한 3일 및 10일째에 IP 용량의 항체를 투여하였다. 마우스 군들 (n=8)을 (i) 비허클; (ii) 이소형 대조군 (15 mg/kg); (iii) F7 IgG4 (15 mg/kg); (iv) F9 IgG1 (15 mg/kg); (v) F9 Fab' (10 mg/kg); 또는 (vi) 항-CD20 양성 대조군 (15 mg/kg)으로 처리하였다. 투여 후 0일째 내지 30일째 사이에 일정 간격으로 (대략 매주 2-3회씩) 종양의 부피 및 마우스 체중을 측정하였다. 실험 결과는 평균 종양 부피 (도 12a), 종양 부피 중앙값 (도 12b) 및 체중 변화율(%) 중앙값 (도 12c)을 보여주는 도 12a, 12b 및 12c에 제시되어 있다. 본 결과는 F7 IgG4 및 F9 IgG1 항체가 양성 대조군과 같이, 종양 부피 증가로 측정되는 종양 세포 성장을 유의적으로 억제시킨 반면, F9 Fab' 단편은 이소형 대조군과 비교하여 종양 세포 성장을 억제시키지 못했다는 것을 입증한다. 모든 처리는 어떤 유의적인 체중 변화가 없는 것으로 보여지는 바와 같이, 우수한 내성을 띠었다. 처리군들 사이의 체중 차이는 종양 중량이 원인이 될 가능성이 가장 커다. 본 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 생체내에서 확립된 고형 종양의 성장을 억제시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0232] 실시예 10

항-CXCL12 항체가 아닌, 항-CXCR4 항체를 이용한 처리에 의한 마우스 전신 종양 세포 모델에서의 생존기간 연장

- [0234] 본 실시예에서는 라모스 전신 종양 세포 모델을 사용하여 마우스의 생존기간을 연장시킬 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 조사하였다. 본 검정법에서, 마우스 0일째 1마리당 1×10^6 개의 라모스 세포를 각 마우스에 정맥내로 (IV) 주사하였다. 이어서, 1일째 (즉, 종양 세포 IV 투여 후 1일째) 마우스에 제1 용량의 항체를 복강내 (IP) 주사하고, 5, 8, 15 및 22일째 4회 추가로 더 IP 용량의 항체를 투여하였다 (양성 대조군 항체로 처리된 마우스는 단 1일째에만 처리하였다). 마우스 군들 ($n=8$)을 (i) 비히클; (ii) 이소형 대조군 (15 mg/kg); (iii) F9 IgG1 (15 mg/kg); 또는 (iv) 항-CD19 양성 대조군 (15 mg/kg)을 처리하였다. 앞서 용량 반응 연구를 통해 15 mg/kg이 항-CD19의 유효량인 것으로 밝혀졌다 (데이터는 나타내지 않음). 투여 후 0일째 내지 50일째 사이에 일정 간격으로 생존율(%)을 측정하였다 (뒷다리 마비가 실험의 종점으로 사용되었다). 본 실험의 결과는 시간 경과에 따른 생존율(%)을 보여주는 도 13a에 제시되어 있다. 비히클 또는 이소형 대조군으로 처리된 마우스에 대한 생존일수 중앙값은 각각 23일 및 25.5일인 반면, 1회 용량의 항-CD19 양성 대조군으로 처리된 마우스에 대한 생존일수 중앙값은 39일이었다. 유의적으로, 5회 용량의 F9 IgG1 항체로 처리된 군에 있는 마우스는 100%가 실험 종료시까지 생존해 있었다. 본 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 전신 종양 세포 모델에서 마우스의 생존기간을 연장시킬 수 있다는 것을 시사한다.
- [0235] 마우스의 생존기간을 연장시킬 수 있는 BMS-936564 및 항-CXCL12 항체의 능력을 비교하기 위해 유사 실험을 수행하였다. 전신 라모스 종양 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스를 상기기술된 바와 같이, 15 mg/kg의 BMS-936564, 항-CXCL12 항체, 항-CD19 양성 대조군, 인간 IgG4 또는 IgG1 이소형 대조군, 또는 비히클 (PBS) 대조군으로 처리하였다. 상기 라모스 전신 모델에서 마우스의 생존기간을 연장시키는 데 있어서 BMS-936564가 고도로 효과적이며, 항-CD19 양성 대조군보다 효과가 훨씬 더 큰 것으로 밝혀졌다 (도 13b 참조). 비히클 또는 이소형 대조군으로 처리된 마우스에 대한 생존일수 중앙값은 23-24일인 반면, 1회 용량의 항-CD19 양성 대조군으로 처리된 마우스에 대한 생존일수 중앙값은 39일이었다. 유의적으로, 이식 후 120일째인 실험 종료시까지 5회 용량의 BMS-936564로 처리된 군에 있는 마우스는 100%가 생존해 있었다. 대조적으로, 항-CXCL12 항체는 놀랍게도 어떤 효능도 보이지 않았으며, 생존기간은 사실상 비히클 및 이소형 대조군과 동일하였다. 본 결과는 CXCL12-유도성 효과 차단 이외의, 또는 그뿐만 아니라, 추가의 기전(들)도 생체내에서 가동되어야 한다는 것을 시사한다.
- [0236] 실시예 11
- [0237] BMS-936564는 CXCR4-발현 세포의 아폽토시스를 유도한다
- [0238] BMS-936564의 강한 생체내 항-종양 활성이 BMS-936564의 작용 기전 이해를 목표로 한 추가 연구를 자극하였다. 구체적으로, 실험 세트는 상이한 세포주에서 아폽토시스를 유도할 수 있는 항-CXCR4 mAb F7 (BMS-936564)의 능력에 중점을 두었다. 아폽토시스 검정법에서, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 F7 mAb를 라모스 세포 (500,000개의 세포), 나말바 세포 (500,000개의 세포) 또는 CXCR4를 발현하도록 형질감염된 R1610 세포 (100,000개의 세포)와 함께 인큐ベ이션시켰다. 형질감염되지 않은 R1610 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. 항-CXCR4 mAb F7 또는 이소형 대조군 항체를 37°C 에서 상기 세포와 함께 인큐베이션시키고, 24, 48 및 72시간째에 $250 \mu\text{l}$ 샘플을 제거하였다. 아폽토시스를 평가하기 위해, 다양한 시점에 얻은 세포를 아넥신 V- FITC-FL1 및 프로파이不得已 FL3와 함께 인큐베이션시킨 후, 유동 세포측정법을 수행하였다. FL1, FL3 및 FL1-FL3 이중 양성 사분면에서 수집된 세포의 종합 비율(%)을 아폽토시스성인 것으로 간주하였다. 배경을 제거하기 위해, 이소형 항체-유도성 아폽토시스성 세포의 비율(%)을 BMS-936564-유도성 아폽토시스성 세포의 비율(%)로부터 감산하였다.
- [0239] 하기 표 3에 요약되어 있는 결과는 F7 mAb가 라모스, 나말바 및 R1610-CXCR4 세포에서 아폽토시스를 유도할 수 있지만, F7는 모체 R1610 세포의 아폽토시스 유도에는 어떤 영향도 미치지 않았으며, 이는 상기 반응이 CXCR4-특이성이라는 것을 나타낸다는 것을 입증한다.

표 3

항-CXCR4 mAb F7에 의한 아폽토시스 유도

세포	경과시간 (시간)	아폽토시스율 (%)
R1610	72	<1
R1610-CXCR4	24	39
R1610-CXCR4	48	58
R1610-CXCR4	72	46
라모스	24	22
라모스	48	31
라모스	72	22
나말바	24	17
나말바	48	24
나말바	72	44

총 아폽토시스율(%) 값은 이소형 대조군 항체에 의해 유도된 기준선 변화에 대해 보정된 값이다.

[0240]

[0241] 또 다른 실험에서, 보다 다양한 세포주에서 아폽토시스를 유도할 수 있는 BMS-936564의 능력 (하기 표 4 참조)을 조사하였다. 세포 (5×10^5 개의 세포/mL)를 37°C에서 24시간 동안 10 nM - 330 nM의 BMS-936564 또는 이소형 대조군과 함께 인큐베이션시켰다. 세포 서브세트의 경우 (표 4 참조), 가교 항체 (염소 항-인간 IgG Fc 특이적 폴리클로날 Ab)를 6배 과량으로 첨가하였다. 모든 세포 유형에 대해, DNA 효소 토포이소머라제 I를 억제시키는 세포독성 퀴놀린 알카로이드인 캄토테신 (CPT) 10 μ M 을 아폽토시스 유도에 대한 양성 대조군으로서 37°C에서 24시간 동안 첨가하였다. 이어서, 세포를 아넥신 V 결합 완충제 (10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 중에 재현탁시키고, 아넥신 V-APC 및 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD) 또는 프로피듐 아이오다이드 (PI)로 염색하였다. 세포를 세척하고, 아넥신 V 결합 완충제 중에 재현탁시키고, 유동 세포측정법 (FACScan Array 시스템(FACSArray system), BD 바이오사이언시스(BD Biosciences: 미국 캘리포니아주 산호세)) 및 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 (트리스타 인크.(Treestar, Inc.: 미국 캘리포니아주 샌 카를로스))에 의해 분석하였다.

[0242]

라모스 인간 B 림프모세포 버킷 림프종 (카탈로그 CRL-1596), CCRF-CEM 인간 T 림프모세포 급성 림프모구성 백혈병 (CCL-119), HL-60 인간 전골수모세포 (CCL-240), 나말바 인간 B 림프모세포 버킷 림프종 (CRL-1432), 라지 인간 B 림프모세포 버킷 림프종 (CCL-86), RPMI 8226 인간 골수종 (CCL-155), MM.1S 인간 B 림프모세포 MM (CRL-2974), U226B 1 인간 골수종 (TIB 196), MV-4-11 인간 이중표현형 B 골수단핵구성 백혈병 (CRL-9591), MJ 인간 T 세포 림프종 (CRL-8294), HH 인간 T 세포 림프종 (CRL-2105), HuT78 인간 림프모세포 피부 림프종 (TIB 161), NK92 인간 NK 세포 비-호지킨 림프종 (CRL-2407) 세포주를 ATCC (미국 버지니아주 매너서스)로부터 구입하였다.

[0243]

노노-1 인간 급성 골수성 백혈병 (ACC 542), MOLP-8 MM (ACC 569), SU-DHL6 인간 B 세포 비-호지킨 림프종 (ACC 572), L540 인간 호지킨 림프종 (ACC 72), KG-1 인간 AML (ACC 14), MOLP-8 인간 MM (ACC 569), OPM-2 인간 MM (ACC 50), L-363 인간 형질 세포 백혈병 (ACC 49) 세포주는 DSMZ (독일 브라운슈바이크)로부터 구입하였다.

표 4

BMS-936564의 의한 세포주 폐널에서의 아폽토시스 유도

세포주	세포 유형	CXCR4 발현	아≋토시스율(%) (조정된 값)	종양 성장 억제율(%) (단독요법)
라모스*	림프종	++++	71	80
나말바*	림프종	++++	30	66
Raji*	림프종	++++	15	35
DHL6*	림프종	+	3	55/77
L540*	림프종	+++	35	
HL60	AML	++	31	60/82
노노-1	AML	++++	34	88
KG-1	AML	++	8	23
MOLP-8	MM	++	19	66
RPMI 8226	MM	++	17	
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	
인간 1차*	B (CD19+)	++	17	
인간 1차*	T (CD3+)	+	6	
인간 1차*	단핵구 (CD14+)	++	24	

* 가교제 불포함.

[0244]

CXCR4 발현 기호 해설	
10 nM Ab를 이용하였을 때의 MFI	점수 (+)
400-2000	+
2000-10,000	++
10,000 - 50,000	+++
50,000 - 250,000	++++

[0245]

ATCC로부터 구입한 R1610 햄스터 섬유모세포 (CRL-1657)를 인간 CXCR4로 형질감염시키고, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418을 사용하여 선별 조건하에서 유지시켰다. DSMZ로부터 구입한 JJN-3 세포 (ACC 541)를 BMS에서 보르테조립에 대한 내성에 대하여 선별하였다. 다나 파버 암 연구소(Dana-Farber Cancer Institute)로부터 허가받은 NKL 인간 NK 세포 거대 과립구 백혈병 세포주; KHYG-1 인간 NK 세포 백혈병 세포주 (JCRB0156)를 헬쓰 사이언스 리서치 리소스 시즈 뱅크, 재팬 헬쓰 사이언시스 파운데이션(Health Science Research Resources Bank, Japan Health Sciences Foundation)으로부터 구입하였다.

[0247]

CXCR4⁺ 세포의 아≋토시스를 유도할 수 있는 BMS-936564의 능력을 소형 분자 CXCR4-길항체, AMD3100의 아≋토시스 능력과 비교하였다. 라모스 세포를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BMS-936564 또는 이소형 대조군 항체와 함께 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션시킴으로써 아≋토시스를 조사하였다. 비교를 위해, CXCL12-유도성 칼슘 흐름 및 이동을 억제시킨 농도에 상응하는 6 μM 의 AMD3100과 함께 라모스 세포를 인큐베이션시켰다. 세포를 아넥신 V-FITC 및 프로파이듬 아이오다이드 (PI)로 염색하였다. 오직 아넥신 V에만 양성이거나, 또는 아넥신 V 및 PI 둘 모두에 대

해 이중 양성인 세포의 비율(%)을 측정하였다. 비처리된 세포 (1.7% 및 4.1%), 이소형 대조군 항체와 함께 인큐베이션된 세포 (0.5% 및 2.8%), 또는 AMD3100으로 처리된 세포 (2.0% 및 2.7%)와 비교하였을 때, BMS-936564는 아넥신 V (31.2%) 및 아넥신 V/PI 이중 양성 염색 (27.3%) 증가를 유도하였다 (도 14a 및 14b).

[0248] BMS-936564에 대한 아폽토시스성 반응의 특이성을 확인하기 위해, BMS-936564에 결합하지 않는 모체 R1610 세포 (데이터는 나타내지 않음) 및 BMS-936564에 결합하지 않는, 인간 CXCR4로 형질감염된 R1610 (도 4)을 사용하여 아폽토시스를 측정하였다. MDX-1338 (BMS-936564) 또는 이소형 대조군을 37°C에서 24시간 동안 R1610 세포 및 CXCR4로 형질감염된 세포에 첨가한 후, 아넥신 V-FITC 및 프로파碇 아이오다이드 (PI)로 염색하였다. 오직 아넥신 V에만 양성이거나, 또는 아넥신 V 및 PI 둘 모두에 대해 이중 양성인 세포의 비율(%)을 측정하였다. 형질감염된 세포 R1610-hCXCR4는 BMS-936564와의 인큐베이션에 대한 반응으로 아넥신 V 염색 및 아넥신 V/PI 염색 수준이 증가한 것으로 나타난 반면 (24.3% 및 11.4%), 이소형 대조군 항체 (2.5% 및 0.9%) 또는 비처리된 경우에는 (2.6% 및 0.9%) 최소의 효과를 보였다 (도 15a). 모체 R1610 세포는 BMS-936564 처리 이후, 아폽토시스를 보이지 않았는데 (도 15b), 이는 hCXCR4에 대한 특이성을 제안하는 것이다. 상기 관찰 결과에 이어서, BMS-936564는 수개의 CXCR4⁺ 세포주 뿐만 아니라, 정상적인 PBMC 상에서의 아폽토시스도 유도하는 것으로 나타났다 (표 4).

[0249] BMS-936564 대 이소형 대조군에 의해 유도된 상이한 CXCR4⁺ 세포주의 아폽토시스에 대한 데이터에 관한 요약은 하기 표 5에 제공되어 있다.

표 5

다발성 끌수종 세포주에서의 시험관내 BMS-936558-유도성 아폽토시스

세포주	CXCR4 발현	항체 처리	아넥신 V 양성(%)	아넥신 V + 7ADD 양성(%)
MOLP-8	++	이소형	16.4	11.9
		BMS-936564	32.7	14.2
RPMI-8226	++	이소형	27.1	16.9
		BMS-936564	36.3	24.6
MM.1S	+	이소형	20.5	8.4
		BMS-936564	34.1	9.8
JJN-3R	++	이소형	15.0	4.8
		BMS-936564	46.8	25.1
OPM-2	++	이소형	14.4	2.8
		BMS-936564	31.1	3.7

[0250]

표 4 및 5에 요약되어 있는 데이터는 BMS-936564가 아폽토시스를 유도하고, 따라서, 이는 사실상 CXCR4를 발현하는 모든 세포에서 효과적인 치료제가 될 수 있다는 것을 시사한다.

[0252]

실시예 12

[0253]

항-CXCR4 항체에 의한 생체내 종양 세포 증식 억제를 보여주는 추가 연구

[0254]

본 실시예에서는 상기 실시예 9에 기술된 라모스 모델과 유사한 추가의 종양 세포 모델을 사용하여 생체내에서 확립된 고형 종양의 증식을 억제시키거나, 아폽토시스를 유도할 수 있는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 조사하였다. 다양한 종양 세포를 조사하였다. 대표적인 실험 및 결과는 하기와 같다.

[0255]

한 실험에서, 마우스 1마리당 7.5×10^6 개의 MDA-MB231 인간 유방 암 세포를 각각의 마우스의 옆구리 부위에 이식하고, 종양의 길이 x 너비 x 높이/2로 계산되는 평균 크기가 100 mm³가 될 때까지인 이식 후 7일째 정도까지 성장시켰다. 마우스를 상이한 처리군으로 무작위화하고, 이식 후 7일째 마우스에 제1 용량의 항체를 복강내 (IP) 주사하고, 이식 후 14일째 제2 IP 용량의 항체를 투여한 후, 이식 후 46일째 제3 용량을 투여하였다. 마우스 군들 (n=9)을 (i) 비히클 (PBS); (ii) IgG1 이소형 대조군 (15 mg/kg); (iii) IgG4 이소형 대조군 (15 mg/kg); (iv) F7 IgG1 (15 mg/kg); 또는 (v) F7 IgG4 (15 mg/kg)로 처리하였다. 일정 간격으로 종양 부피를 측정하고, 매 간격마다 각 처리군에 대한 평균 종양 부피 및 종양 부피 중앙값을 측정하였다. 상기 실험의 결

과는, 이식 후 52일째의 평균 종양 부피 (mm^3) 및 종양 성장 억제율(%) (TGI), 및 이식 후 59일째의 종양 부피 중앙값 (mm^3) 및 TGI(%)를 보여주는 하기 표 6에 요약되어 있다. 추가로, F7 IgG4 처리군의 마우스들 중 1마리는 59일째 무종양이었다. 본 결과는 F7 mAb가 생체내에서 MDA-MB231 유방 암 세포의 성장을 억제시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0256] 두번째 실험에서, 마우스 1마리당 5×10^6 개의 DMS79 인간 소세포 폐 암종 세포를 각각의 마우스의 옆구리 부위에 이식하고, 종양의 길이 x 너비 x 높이/2로 계산되는 평균 크기가 160 mm^3 가 될 때까지인 이식 후 7일째 정도 까지 성장시켰다. 마우스를 상이한 처리군으로 무작위화하고, Q3Dx5 (매 3일마다 1회씩 총 5회)인 투여 스케줄로 항체를 복강내 (IP) 주사하였다. 마우스 군들 (n=10)을 (i) 비히클 (PBS); (ii) IgG4 이소형 대조군 (10 mg/kg); 또는 (iii) F7 IgG4 (10 mg/kg)로 처리하였다. 일정 간격으로 종양 부피를 측정하고, 매 간격마다 각 처리군에 대한 평균 종양 부피 및 종양 부피 중앙값을 측정하였다. 상기 실험의 결과는, 34일째의 평균 종양 부피 및 종양 부피 중앙값 (mm^3) 및 종양 성장 억제율(%) (TGI)을 보여주는 하기 표 7에 요약되어 있다. 본 결과는 F7 mAb가 생체내에서 DMS79 인간 소세포 폐 암종 세포의 성장을 억제시킬 수 있다는 것을 입증한다.

표 6

mAb F7에 의한 생체내 MDA-MB231 세포의 종양 성장 억제

처리	52일째		59일째	
	평균	TGI (%)	중앙값	TGI (%)
비히클	154		187	
IgG4 이소형 대조군	172		216	
IgG4 이소형 대조군	188		226	
F7 항-CXCR4 IgG1	86	50	130	40
F7 항-CXCR4 IgG4	79	58	108	52

[0257]

표 7

mAb F7에 의한 생체내 DMS79 세포의 종양 성장 억제

처리	34일째			
	평균	TGI (%)	중앙값	TGI (%)
비히클	900		882	
IgG4 이소형 대조군	992		903	
F7 항-CXCR4 IgG4	620	38	599	34

[0258]

[0259] 상기 및 실시예 9에 기술된 것과 유사한 실험으로 종양 성장을 억제시킬 수 있는 항-CXCR4 항체의 능력에 대해 추가의 피하 이종이식편 종양 모델을 시험하였다. SU-DHL-6 B 세포 림프종 세포를 사용한 실험에서, 15 mg/kg의 F7 IgG4 mAb로 처리하였을 때, 종양 성장이 대략 60% 억제되었다는 결과가 나타났다. 유사하게, 나말바 버킷 림프종 세포를 사용한 실험에서, 3 mg/kg의 F7 IgG4 mAb로 처리하였을 때, 종양 성장이 대략 70% 억제되었다는 결과가 나타났다. 대조적으로, NIH-H226 폐 암종 세포 또는 HPAC 인간 췌장 샘암종 세포를 사용한 실험에서는 F7 mAb에 의한 어떤 종양 성장 억제도 관찰되지 않았다. 그러나, 유동 세포측정법 실험에서는 F7 mAb에 의한 상기 세포의 염색은 시험관내 발현에서 최소로 나타났다. 비록 생체내 종양 세포는 면역조직화학법에 의해 mAb에 의해 염색이 가능하였지만, 그의 종양 성장의 어느 단계에서 CXCR4가 발현하기 시작하였는지는 불분명하다. 이는 상기 두 세포주에 의한 CXCR4의 발현이 항-CXCR4 처리에 의한 생체내 종양 성장 억제 또는 아폽토시스 유도를 허용하기에는 불충분하였다는 것을 제안한다.

[0260]

실시예 13

항-CXCR4 항체에 의한 생체내 폐 전이 억제

[0262]

본 실시예에서는 C57 마우스 전신 종양 모델을 사용하여 폐 전이를 억제시킬 수 있는 F7 항-CXCR4 mAb의 능력을

조사하였다. 더욱 구체적으로, 0.4×10^6 개의 B16-CXCR4 세포 (인간 CXCR4를 발현하도록 형질감염된 B16 세포)를 C57 계통의 30마리의 마우스 각각에 정맥내 주사하였다. 마우스를 각각 마우스 10마리씩 3개의 군으로 무작위화한 후, (i) 비히클 (PBS); (ii) IgG4 이소형 대조군 (5 mg/kg); 또는 (iii) F7 IgG4 (5 mg/kg)로 처리하였다. B16-CXCR4 세포를 정맥내 주사한 후 30분 경과하였을 때, 항체 또는 비히클을 복강내로 주사하였다. 14일째 폐를 수거하고, 폐 전이성 결절을 측량하였다. 결과는 각 군의 평균 폐 전이 개수 및 폐 전이 개수 중앙값을 보여주는 하기 표 8에 요약되어 있다. 그 결과, F7 mAb 처리가 폐 전이성 결절의 평균 개수를 56% 감소시킨 반면, 이소형 대조군 항체의 경우에는 단지 15%만 감소시켰다는 것으로 나타났으며, 이는 F7 mAb가 전신 종양 모델에서 폐 전이를 억제시킬 수 있다는 것을 입증한다.

표 8

mAb F7에 의한 생체내 폐 전이 억제

처리	폐 전이 개수		폐 전이 억제율(%) (평균)
	평균	중앙값	
비히클	364	397	
IgG4 이소형 대조군	309	294	15%
F7 항-CXCR4 IgG4	157	186	56%

[0263]

[0264] 실시예 14

[0265] BMS-936564는 비-호지킨 림프종 (NHL) 모델에서 생체내 종양 성장을 억제시킨다.

[0266] BMS-936564 및 항-CXCL12의 생체내 종양 성장 억제 활성을 종양 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 시험하였다. 1-cm³ 시린지 및 25-케이지 ½ 인치 니들을 사용하여 SCID 마우스에 0.1 mL 포스페이트 완충 염수 (PBS) 및 0.1 mL 마트리겔® 중의 10×10^6 개의 라모스 세포 (인간 B 림프모세포 버킷 림프종 세포주)를 피하로 이식하였다. 평균 종양 크기 및 종양 크기 중앙값이 80 mm³에 도달하였을 때, 종양 부피에 따라 마우스를 무작위화하였다 (n = 8). 0 및 7일째, 각 동물에 ~200 µL의 BMS-936564 (15 mg/kg/용량), 항-CXCL12 (15 mg/kg/용량), 인간 IgG4 이소형 대조군 (15 mg/kg/용량), 리툭시맙 (15 mg/kg/용량)을 복강내 (IP) 주사하거나, 0.3 mL PBS (비히클 대조군)를 IP로 주사하였다. 앞서 용량 반응 연구를 통해 15 mg/kg이 리툭시맙의 유효량인 것으로 밝혀졌다 (데이터는 나타내지 않음). 모든 항체 용량은 우수한 내성을 띠었고, 어떤 체중 감소도 관찰되지 않았다. 종양 및 체중은 매주 2회씩 측정하였다. 종양 부피는 파울러 일렉트로닉 디지털 캘리퍼(Fowler Electronic Digital Caliper) (모델 62379-531; 프레드 V. 파울러 캄파니(Fred V. Fowler Co.: 미국 매사추세츠주 뉴턴))를 이용하여 3차원 (LxWxH/2)으로 측정하고, 스터디로그 시스템즈, 인크.(StudyLog Systems, Inc.: 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 입수한 스터디 디렉터(Study Director) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 전자 기록하였다. 자세, 그루밍(grooming), 및 호흡 변화 뿐만 아니라, 기면에 대해 동물을 매일 체크하였다. 종양이 2,000 mm³ 종점에 도달하거나, 궤양성인 것으로 보였을 때, 마우스를 안락사시켰다.

[0267] 비히클 및 이소형 대조군과 비교하였을 때, BMS-936564 및 양성 대조군인 리툭시맙은 종양 성장을 억제시켰다. BMS-936564로 처리한 결과, 21일째 성장 억제 중앙값은 99%에 달하였고, 억제는 60일 동안 유지되었다 (도 16). 대조적으로, 항-CXCL12는 종양 성장을 억제시키지 못했고, 이소형 대조군 항체와 유사한 성능을 보였다.

[0268] 실시예 15

[0269] BMS-936564는 급성 골수성 백혈병 (AML) 모델에서 생체내 종양 성장을 억제시킨다

[0270] AML에서의 항체의 효능을 평가하기 위해, 두 시타라빈-내성 마우스 이종이식편 모델, HL-60 및 노모-1을 사용하였다. FACS 염색에 의해 각 세포주에서의 CXCR4 발현을 확인하였다 (도 4a). 실시예 14에 기술된 바와 같이, SCID 마우스에 10×10^6 개의 HL-60 세포를 피하로 이식하였다. 종양 부피가 대략 136 mm³에 도달하였을 때, 마우스를 (n = 10으로) 무작위화하고, 0, 3, 7, 10 및 14일째 BMS-936564 (10 mg/kg/용량), 인간 IgG4 이소형 대조군 (10 mg/kg/용량), 또는 PBS (비히클 대조군)를 IP 투여하고, 41일 동안 모니터링하였다. 27일째, 이소형 및 비히클 군과 비교하였을 때, 종양 성장 억제 중앙값은 각각 88% 및 83%였다 (도 17a).

[0271] (실시예 14에서 7.5×10^6 개 세포를 피하로 이식받은) 노노-1 모델에서, 종양 부피가 대략 84 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 ($n = 9$ 로) 무작위화하고, 0, 3, 7, 10 및 14일째 BMS-936564 (10 mg/kg/용량), IgG4 이소형 대조군 (10 mg/kg/용량), PBS (비히클 대조군) 또는 시타라빈 (20, 60 또는 90 mg/kg/용량)을 투여하고, 57일 동안 모니터링하였다. 34일째, 이소형 또는 비히클 대조군과 비교하였을 때, BMS-936564로 처리된 마우스의 종양 성장 억제 중앙값은 88%만큼 유의적으로 지연되었다 (도 17b). 예상대로, (아라비노푸라노실 시티딘 또는 Ara-C로도 알려져 있는) 시타라빈은 종양 성장을 억제시키지 못했다 (도 17b).

[0272] 실시예 16

[0273] BMS-936564는 다발성 골수종 (MM) 모델에서 생체내 종양 성장을 억제시킨다

[0274] SCID 이종이식편 종양 모델에서 다양한 CXCR4⁺ 골수종 세포, 즉, MOLP8, JJN-3R, JJN-3, RPMI-8226, MM.1S 및 OPM-2를 BMS-936564에 대한 감수성에 대하여 시험하였다. 모든 실험에서, 0 및 7일째 마우스에 IgG4 이소형 대조군 및 PBS 비히클 대조군을 복강내로 주사하였다. 실시예 14에 기술된 바와 같이, MOLP-8 세포 (2.5×10^6 개)를 SCID 마우스에 이식하였다. 종양 부피가 대략 100 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 군당 마우스 8마리 씩으로 ($n = 8$ 로) 무작위화하고, 0, 3, 7, 10 및 14일째 BMS-936564 (10 mg/kg/용량)만을 단독으로, 또는 50 mg/kg 레날리도미드 (레블리미드[®])와 조합하여, 또는 0.8 mg/kg 보르테조 mip (벨케이드[®])과 조합하여 투여하였다. 25일째 (각 코호트의 모든 마우스가 본 연구에 남아있는 최종일) 이소형 항체 대조군과 비교하였을 때, BMS-936564는 66% 및 56%만큼 평균 종양 성장을 유의적으로 지연시켰다 (도 18a). MOLP8 종양은 레날리도미드 및 보르테조 mip에 대하여 상대적으로 내성을 띠었고, 상기 약물 중 어느 것과 조합되었을 때에도 BMS-936564의 효능은 개선되지 않았다 (도 18a). 42일째 연구 종료시, BMS-936564 군에는 8마리의 마우스 중 5마리가 남아있는 반면, 이소형 처리군에는 단 1마리의 마우스도 남아있지 않았다.

[0275] 보르테조 mip 내성인 JJN-3R 세포 (5×10^6 개)를 기술된 바와 같이 SCID 마우스에 이식하였다. 종양 부피가 대략 100 mm^3 일 때, 마우스를 ($n = 8$ 로) 무작위화하고, 0, 4, 7, 11 및 14일째 BMS-936564 (10 또는 30 mg/kg/용량 IP) 또는 레날리도미드 (50 mg/kg/용량 IP) 또는 보르테조 mip (0.8 mg/kg/용량 IV)을 투여하고, 25일 동안 모니터링하였다. 시간 경과에 따른 종양 성장 중앙값은 도 18b에 제시되어 있다. 레날리도미드도 보르테조 mip도 어느 것도 단독으로는 종양 성장을 억제시키지 못한 반면, 25일째 BMS-936564로 처리된 마우스의 경우, 종양 성장 억제 중앙값은 이소형 대조군으로 처리된 마우스와 비교하였을 때 100%였다. 연구 종료시, BMS-936564 30-mg/kg 군에는 7마리의 마우스 중 4마리는 무종양이었다.

[0276] 모체 JJN-3 세포를 사용하였을 때, 보르테조 mip 및 레날리도미드 둘 모두 사실상은 어떤 종양 억제 효능도 보이지는 않았다. 마우스 1마리당 5×10^6 개 JJN-3 세포를 SCID 마우스에 이식하고, 종양 부피가 대략 77 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 군당 8마리씩 무작위화하였다. 0, 3, 7, 10, 및 14일째 MDX-1338 (10 mg/kg/용량 IP)만을 단독으로, 또는 보르테조 mip (0.8 mg/kg/용량 IV) 또는 레날리도미드 (50 mg/kg/용량 IP)과 조합하여 마우스에 투여하였다. 25일째 비히클 대조군으로 처리된 마우스와 비교하여 MDX-1338은 52%만큼 종양 성장을 억제시켰다 (도 18c). 상기 JJN-3 세포 모델에서 보르테조 mip은 종양 성장을 억제시키는 데 있어서 미미한 효능을 보인 반면, MDX-1338과 조합되었을 때에는 25일째 비히클 대조군과 비교하여 MDX-1338-유도성 억제 수준을 58%까지 미미하게 증가시켰다 (도 18c). 레날리도미드는 종양 성장을 억제시키는 데 있어서 효과가 없었고, 레날리도미드와 MDX-1338의 조합도 유사하게 효과가 없었으며, MDX-1338 단독인 경우보다 억제가 더 적은 것으로 나타났다 (도 18d).

[0277] RPMI-8226 세포 (10×10^6 개)를 실시예 14에 기술된 바와 같이 SCID 마우스에 이식하였다. 종양 부피가 대략 20 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 ($n = 8$ 로) 무작위화하고, 0, 3, 7, 10, 및 14일째 MDX-1338 (10 mg/kg/용량)만을 단독으로, 또는 50 mg/kg 레날리도미드와 조합하여, 또는 0.8 mg/kg 보르테조 mip과 조합하여 마우스에 투여하였다. 44일째 비히클 대조군으로 처리된 것과 비교하여 MDX-1338은 53%만큼 평균 종양 성장을 유의적으로 지연시켰다 (도 18e). 상기 RPMI-8226 모델에서 레날리도미드가 단독으로 투여된 경우에는 미미한 효능이 있는 것으로 나타났지만, 이는 MDX-1338의 효능을 증진시켰는데-50 mg/kg 레날리도미드의 경우, 10 mg/kg MDX-1338과 함께 조합되었을 때, 종양 성장 억제는 44일째 이소형 대조군과 비교하여 79%였다 (도 18e). 보르테조 mip은 44일째 이소형 대조군과 비교하여 평균 종양 성장을 70%만큼 억제시키는 우수한 효능을 보였고 (도 18f), MDX-1338의 효능을 약간 증진시켰는데, 즉, 44일째 이소형 대조군과 비교하여 평균 종양 억제를 61%에서

82%로 증가시켰다 (도 18f).

[0278] MM.1S 세포 (10×10^6 개)를 SCID 마우스에 이식하고, 종양 부피가 대략 30 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 (n = 8로) 무작위화하고, 0, 4, 7, 11, 및 14일째 MDX-1338 (10 mg/kg/용량)만을 단독으로, 또는 100 mg/kg 레날리도미드와 조합하여 마우스에 투여하였다. 25일째 이소형 대조군과 비교하여 MDX-1338은 60%만큼 평균 종양 성장을 유의적으로 지연시켰다 (도 21). 레날리도미드는 25일째 평균 종양 성장을 70%만큼 지연시키면서, 더욱더 큰 효능을 보였고, MDX-1338과 레날리도미드의 조합은 25일째 평균 종양 성장을 86%만큼 억제시켰다 (도 18g).

표 9

다발성 골수종 세포주에서의 CXCR4 발현, 아폽토시스 및 종양 성장 억제

세포주	CXCR4 발현	MDX-1338 단독에 의한 아폽토시스	가교 Ab 존재하의 아≋토시스	종양 성장 억제
MOLP8	++	-	+	MDX-1338 = 56% 레날리도미드® 단독 = 35% 조합 = 68%
JJN-3R	++	-	+++	MDX-1338 = 100%
JJN-3	++	-	+++	
RPMI-8226	++	-	++	MDX-1338 = 61% 레날리도미드와 함께 조합 = 90% 보르테조립과 함께 조합 = 82%
MM.1S	+	-	++	MDX-1338 = 60% 레날리도미드® = 70% 조합 = 86%
OPM-2	++	-	++	MDX-1338 = 46% 보르테조립과 함께 조합 = 92%

[0279]

[0280] 기술된 바와 같이, OPM-2 세포 (10×10^6 개)를 SCID 마우스에 이식하였다. 종양 부피가 대략 77 mm^3 일 때, 마우스를 (n = 8로) 무작위화하고, 0, 4, 7, 11, 및 14일째 MDX-1338 (10 mg/kg/용량 IP)만을 단독으로, 또는 보르테조립 (0.8 mg/kg/용량 IV) 또는 레날리도미드 (50 mg/kg/용량 IP)와 조합하여 마우스에 투여하였다. 24일째 비히클 대조군으로 처리된 마우스와 비교하여 MDX-1338은 종양 성장을 45%만큼 억제시켰다 (도 18h). 보르테조립은 24일째 종양 성장을 75%만큼 억제시켰고, MDX-1338과 보르테조립의 조합은 24일째 종양 성장을 99%만큼 억제시키는 고도의 효능을 보였다 (도 18h). 레날리도미드는 상기 OPM-2 모델에서 최소의 효능을 보였으며, MDX-1338의 효능을 유의적으로 증진시키지는 못했다 (도 18i).

[0281] 상기 MM 세포 이종이식편에 대해 수득된 종양 성장 억제 결과는, CXCR4 발현 및 MDX-1338에 의해 유도된 아폽토시스에 대한 감수성과 함께 표 9에 요약되어 있다.

[0282] 실시예 14-16은 BMS-936564가 확립된 종양에 대한 단독요법으로 제공되었을 때, 다중 NHL, AML 및 MM 이종이식 편 모델에서 항-종양 활성을 보인다는 것을 입증한다. BMS-936564가 IgG4 항체이기 때문에, 이는 보체-의존적 세포독성 (CDC) 또는 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도하지는 않는다. 실시예 11에서 제공된 데이터는 BMS-936564가 종양 성장 억제의 한 기전으로서 아폽토시스를 유도한다는 것을 제안한다.

[0283]

참고문헌

- Alsayed Y *et al.* (2007) *Blood* 109(7):2708-17.
 Amadori S *et al.* (1991) *J Clin Oncol* 9(7):1210-4.
 Angal S *et al.* (1993) *Mol Immunol* 30(1):105-8.
 Azab AK *et al.* (2009) *Blood* 113(18):4341-51.
 Beider K *et al.* (2011) *Exp Hematol* 39(3):282-92.
 Berndt C *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12556-61.
 Bertolini F *et al.* (2002) *Cancer Res* 62(11):3106-12.
 Bleul CC *et al.* (1996) *Nature* 382(6594):829-33.
 Breems DA *et al.* (2005) *J Clin Oncol* 23(9):1969-78.
 Broxmeyer HE *et al.* (2005) *J Exp Med* 201:1307-18.
 Burger JA *et al.* (1999) *Blood* 94:3658-67.
Cancer Facts and Figures 2008, American Cancer Society, Atlanta GA (2008).
 Carnec X *et al.* (2005) *J Virol* 79:1930-8.
 Chow KU *et al.* (2002) *Haematologica* 87:33-43.
 Corcione A *et al.* (2000) *J Natl Cancer Inst* 92:628-35.
 Corvata N *et al.* (2011) Poster presented at 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 2-6, 2011, Orlando, FL.
 Cazzolara R *et al.* (2001) *Br J Haematol* 115:545-53.
 Dar A *et al.* (2011) *Leukemia* 25(8):1286-96.
 Devine SM *et al.* (2004) *J Clin Oncol* 22:1095-102.
 Di Salvo J *et al.* (2000) *Eur J Pharmacol* 409:143-154.
 Feng Y *et al.* (1996) *Science* 272:872-7.
 Flomenberg N *et al.* (2005) *Blood* 106:1867-74.
 Friedberg JW *et al.* (2008) *J Clin Oncol* 26(2):204-10.
 Garg H *et al.* (2006) *J Leukocyte Biol* 79:351-62.
 Gazitt Y (2001) *J Hematother Stem Cell Res* 10:229-36.
 Geminder *et al.* (2001) *J Immunol* 167:4747-57.
 Gisselbrecht C *et al.* (2011) Novel Agents for Diffuse Large B-cell Lymphoma, ASCO Education Book 2011, page 321.
 Gisselbrecht C *et al.* (2010) *J Clin Oncol* 28:4184-90.
 Gonzalo JA *et al.* (2000) *J Immunol* 165:499-508.
 Guleng B *et al.* (2005) *Cancer Res* 65(13):5864-71.
 Gupta SK *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273(7):4282-7.

[0284]

- Hesslgesser J et al. (1997) *Curr Biol* 7(2):112-21.
- Hiller DJ et al. (2011) *Surgery* 150(3):459-65.
- Hollinger et al. (2005) *Nature Biotech* 23(9):1126-36.
- Hosokawa Y et al. (2005) *Clin Exp Immunol* 141:467-74.
- Hou T et al. (1998) *J Immunol* 160:180-8.
- Hwang JH et al. (2003) *J Clin Endocrinol Metab* 88:408-16.
- Jemal A et al. (2005) *CA Cancer J Clin* 55:10-50.
- Jemal A et al. (2008) *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
- Jemal A et al. (2009) *CA Cancer J Clin* 59:225-49.
- Jiang YP et al. (2006) *Gynecol Oncol* 103(1):226-33.
- Jin DK et al. (2006) *Nat Med* 12:557-67.
- Jin L et al. (2008) *Mol Cancer Ther* 7:48-58.
- 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.
- Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Melo-Cardenas J, Kuhne MR, Sabbatini P, Cohen LJ, Cardarelli JM, Kipps TJ and Castro JE (2012) Abstract for presentation at American Society of Hematology (ASH) 54th Annual Meeting, December 8-11, 2012, Atlanta, GA.
- Kewlramani T et al. (2004) *Blood* 103(10):3684-8.
- Koshiba T et al. (2000) *Clin Cancer Res* 6:3530-5.
- Laverdiere C et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11:2561-7.
- Lee B et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9):5215-20.
- Libura J et al. (2002) *Blood* 100:2597-606.
- Loetscher M et al. (1994) *J Biol Chem* 269(1):232-7.
- Lonberg N et al. (1994) *Nature* 368 (6474):856-859.
- Liu Z et al. (2011) *Diabetologia* 54(8):2067-76.
- Marechal R et al. (2009) *Brit J Cancer* 100(9):1444-51.
- Matthys P et al. (2001) *J Immunol* 167:4686-92.
- Mohle R et al. (1998) *Blood* 91(12):4523-30.
- Mohle R et al. (1999) *Leukemia* 13:1954-9.
- Muller A et al. (2001) *Nature* 410:50-6.
- Murphy PM (2001) *New Engl J Med* 345(11):833-5.
- Nervi B et al. (2009) *Blood* 113:6206-14.
- Oberlin E et al. (1996) *Nature* 382:833-5.
- Olafsen et al. (2010) *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.

[0285]

[0286] Ottaiano A et al. (2006) *Clin Cancer Res* 12(9):2795-803.

[0287]

PCT 공보 번호 WO 02/43478 (공개 일자: 2002년 6월 6일, 출원인: 메다렉스 인크.(Medarex, Inc.) 및 기린 비어 가부시키 가이샤(Kirin Beer Kabushiki Kaisha)).

[0288]

PCT 공보 번호 WO 2008/060367 (공개 일자: 2008년 5월 22일, 출원인: 메다렉스 인크.).

[0289]

PCT 공보 번호 WO 2008/142303 (공개 일자: 2008년 11월 27일, 출원인: 피에르 파브르 메디카먼트(Pierre Fabre Medicament)).

[0290]

PCT 공보 번호 WO 2009/140124 (공개 일자: 2009년 11월 19일, 출원인: 일라이 릴리 앤드 캄파니(Eli Lilly and Co)).

[0291] PCT 공보 번호 WO 2010/043650 (공개 일자: 2010년 4월 22일, 출원인: 애블린스 NV.(Ablynx NV.)).

- Ping YF et al. (2011) *J Pathol* 224(3):344-54.
- Porvasnik S et al. (2009) *The Prostate* 69:1460-9.
- Raab MS et al. (2009) *Lancet* 374 (9686):324-39.
- Rempel SA et al. (2000) *Clin Cancer Res* 6:102-11.
- Richert M et al. (2009) *Oncol Rep* 21:76-7.
- Righi E et al. (2011) *Cancer Res* 71(16):5522-34.
- Robinson JR (ed.) (1978) *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 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.
- Rombouts EJC et al. (2004) *Blood* 104:550-7.
- Rummel MJ et al. (2002) *Semin Oncol* 29(Suppl. 13):12-4.
- Scala S et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11:1835-41.
- Scotton C et al. (2001) *Br. J. Cancer* 85:891-7.
- Schrader AJ et al. (2002) *Br J Cancer* 86:1250-6.
- Siegel R et al. (2011) *CA Cancer J Clin* 61(4):212-36.
- Singer CR and Goldstone AH (1986) *Clin Haematol* 15:105.
- Spano JP et al. (2004) *Ann Oncol* 15:613-7.
- Spoo AC et al. (2007) *Blood* 109(2):786-91.
- Staller P et al. (2003) *Nature* 425:307-11.
- Tachibana K et al. (1998) *Nature* 393(6685):591-4.
- Taichman RS et al. (2002) *Cancer Res* 62:1832-7.
- Tavor S et al. (2004) *Cancer Res* 64(8):2817-24.
- Terada R et al. (2003) *Lab Invest* 83:665-72.

[0292]

[0293] 미국 특허 번호 제5,399,163호 (등록일자: 1995년 3월 21일, 출원인: 피터슨 SF(Petersen SF) 등).

[0294]

미국 특허 번호 제5,383,851호 (등록일자: 1995년 1월 24일, 출원인: 맥킨논 주니어 CN(McKinnon, Jr. CN) 등).

[0295]

미국 특허 번호 제4,941,880호 (등록일자: 1990년 7월 17, 출원인: 번즈 M.(Burns M)).

[0296]

미국 특허 번호 제6,794,132호 (등록일자: 2004년 9월 21일, 출원인: 부歇러 J(Buechler J) 등).

[0297]

미국 특허 번호 제7,041,870호 (등록일자: 2006년 5월 9일, 출원인: 토미주카 K(Tomizuka K) 등).

[0298]

미국 특허 번호 제7,674,618호 (등록일자: 2010년 3월 9일, 출원인: 블랙 A(Black A)).

[0299]

미국 공보 2012/0052097 (공개일자: 2012년 3월 1일: 출원인: 펫저 OS(Fetzer OS) 등).

- Vicari AP et al. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev* 13:143-154.
- Wang N et al. (2005) *J Transl Med* 3:26-33.
- Weng AP et al. (2003) *Am J Clin Pathol* 119:424-30.
- Zeelenberg IS et al. (2003) *Cancer Res* 63:3833-9.
- Zeng Z et al. (2009) *Blood* 113(24):6215-24.
- Zhang et al. (2002) *J Biol Chem* 277(27):24515-21.
- Zou Y et al. (1998) *Nature* 393(6685):595-9.

[0300]

도면**도면1a****항-CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VH**

V 절편 : 3-48
 D 절편 : 4-23
 J 절편 : 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 GCC 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

도면1b**항-CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VK**

V 절편 : L15
 J 절편 : 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

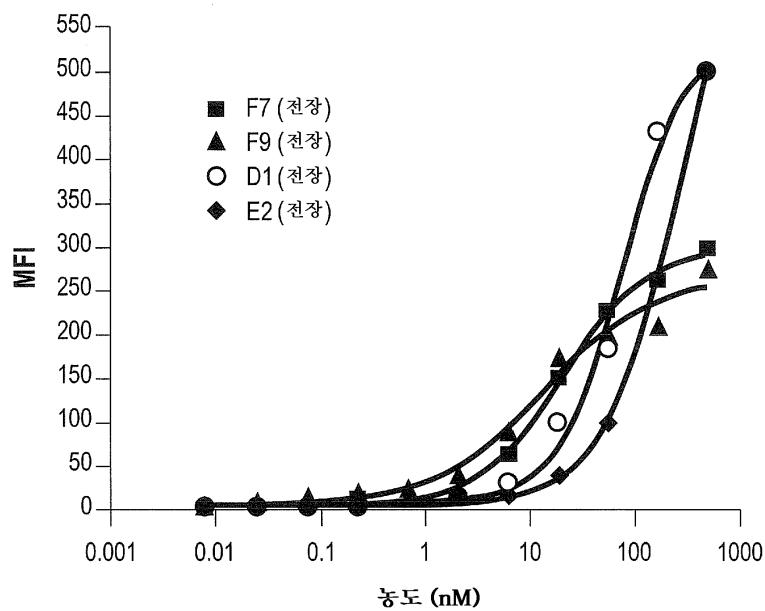
CDR3

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

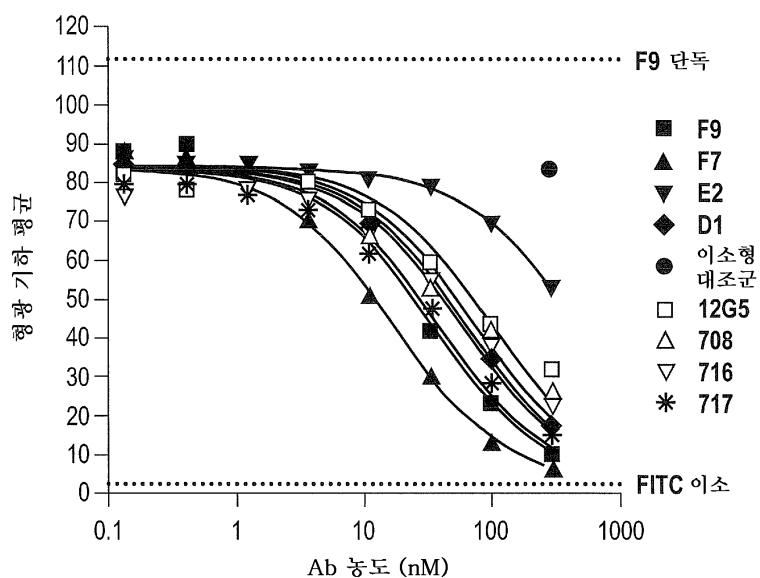
CDR3

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

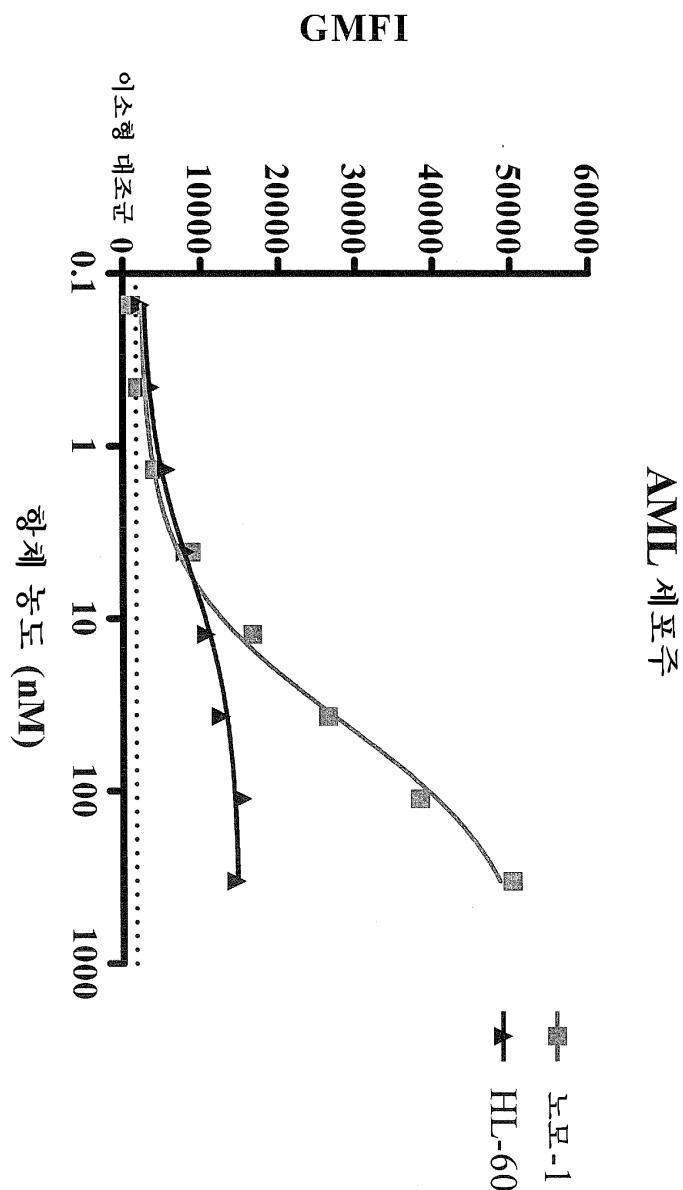
도면2



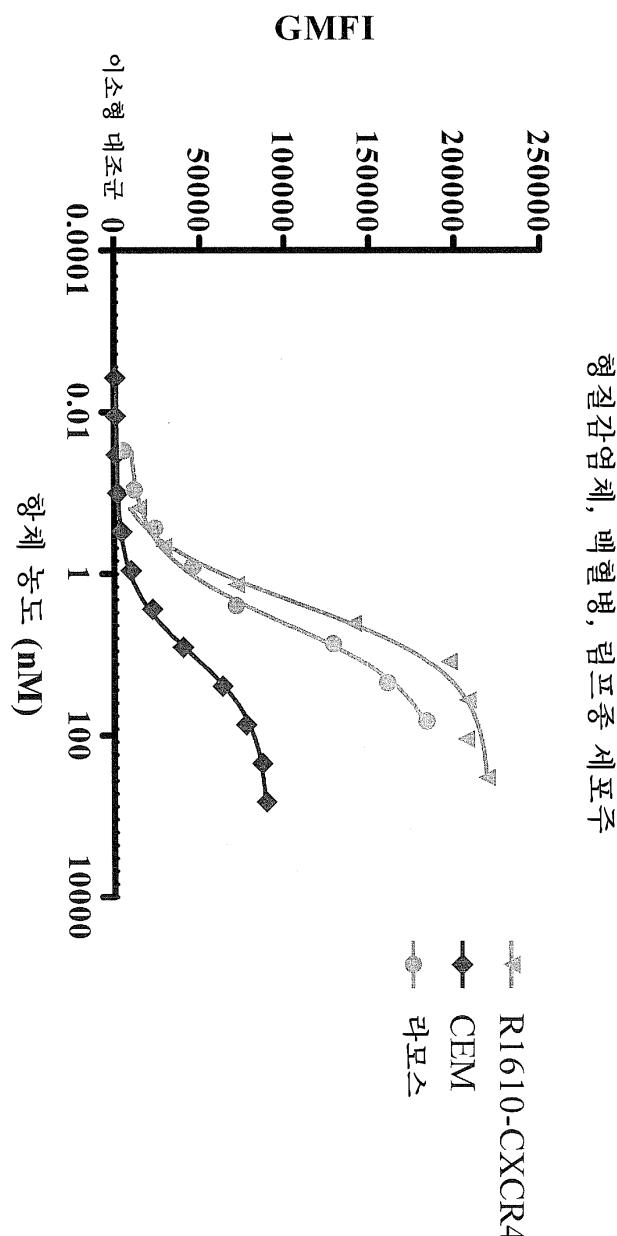
도면3



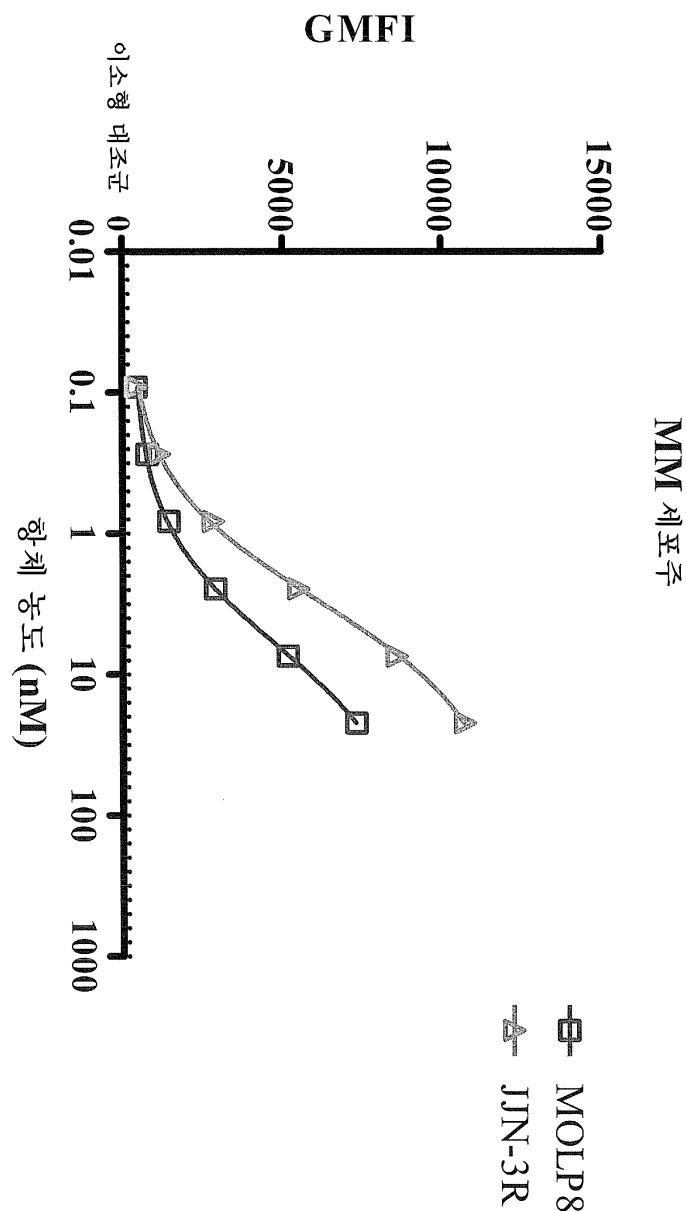
도면4a



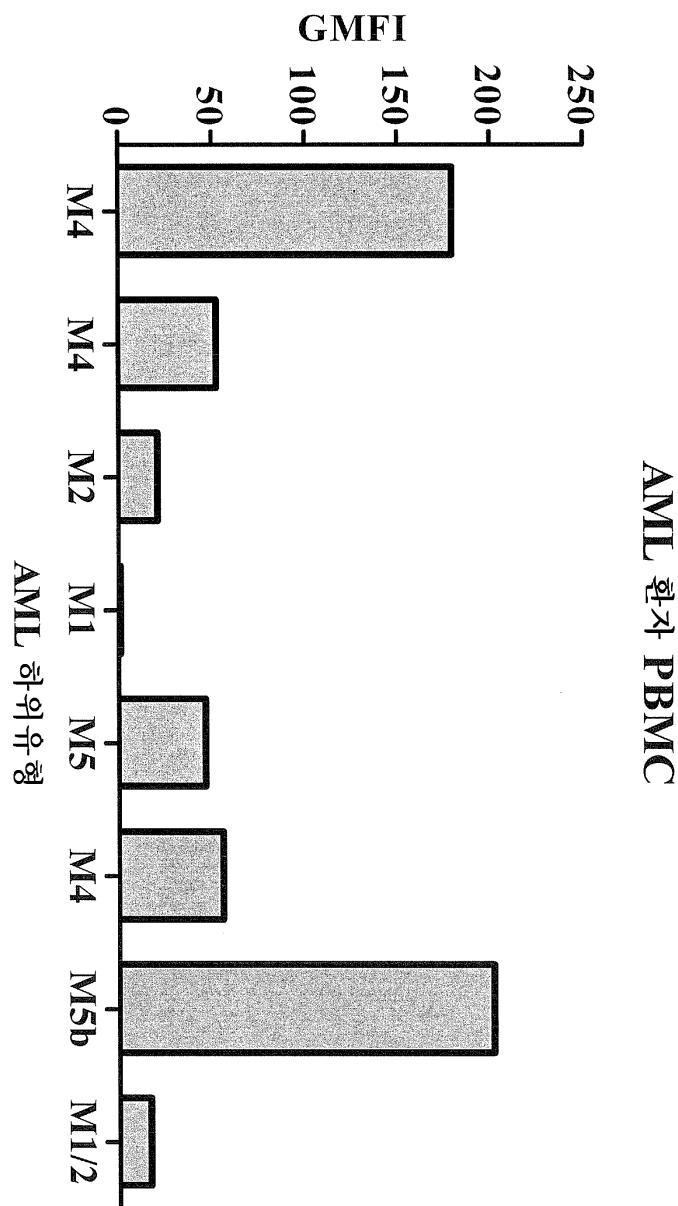
도면4b



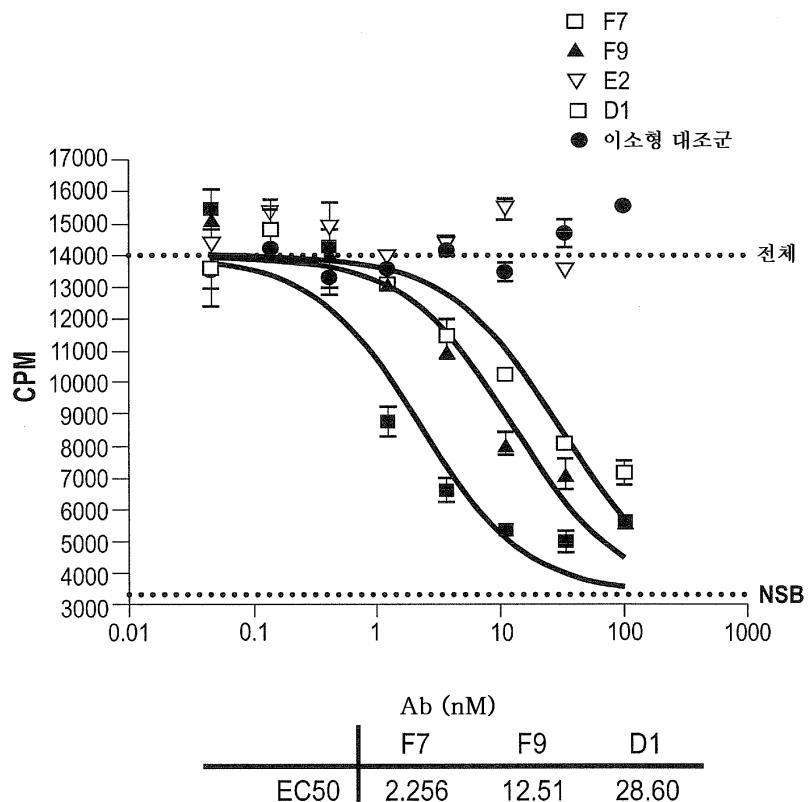
도면4c



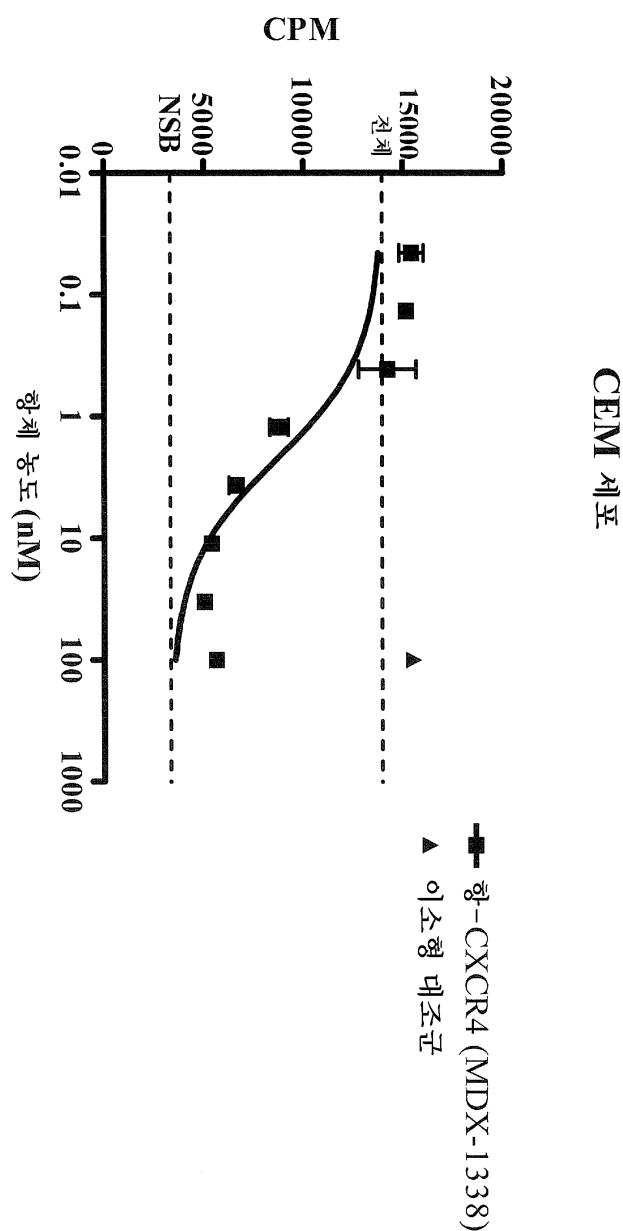
도면4d



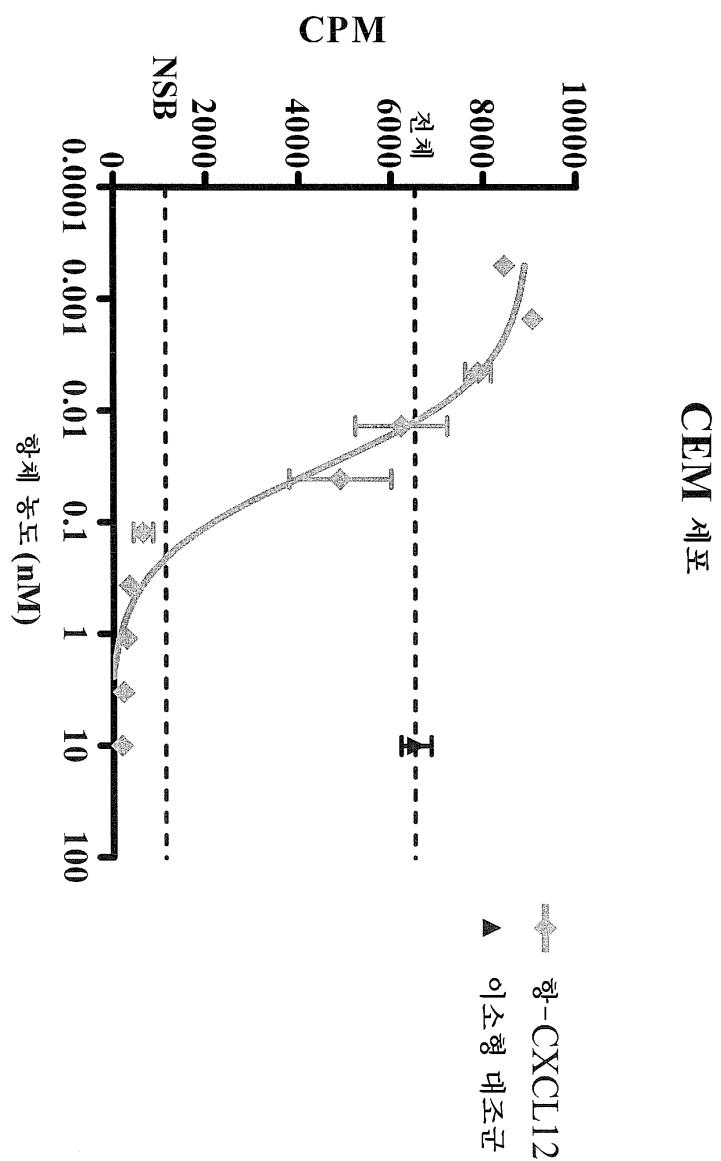
도면5



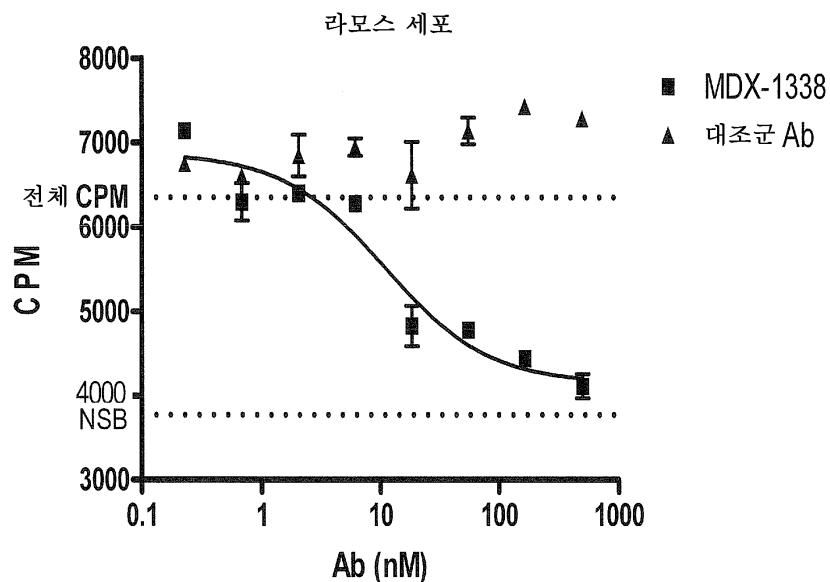
도면6a



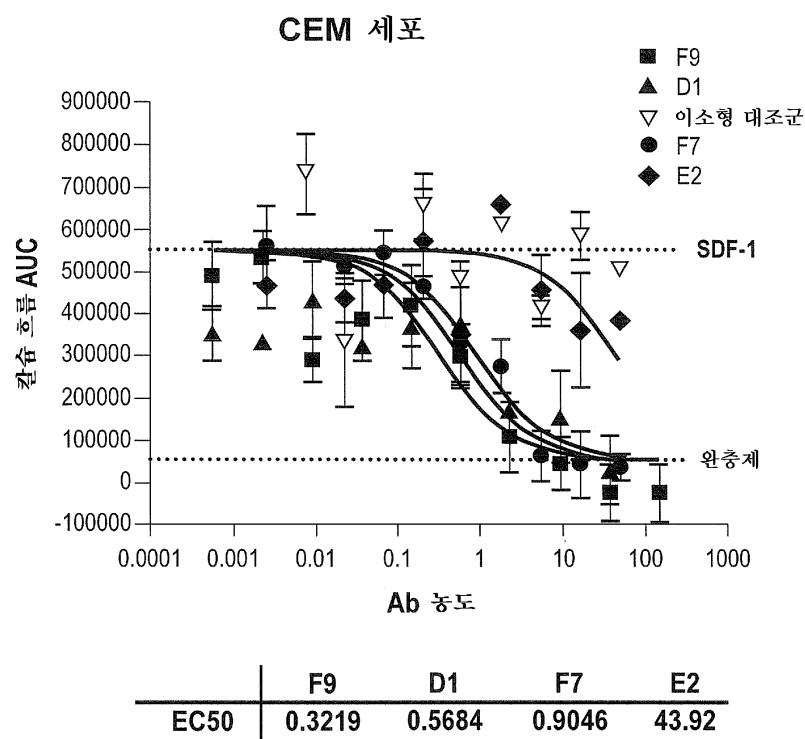
도면6b



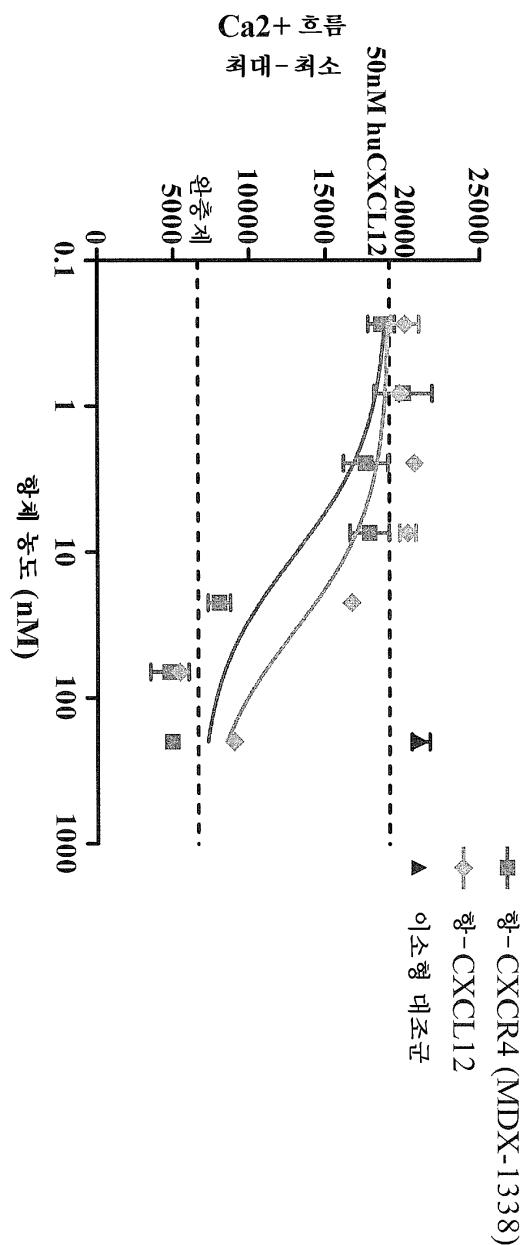
도면6c



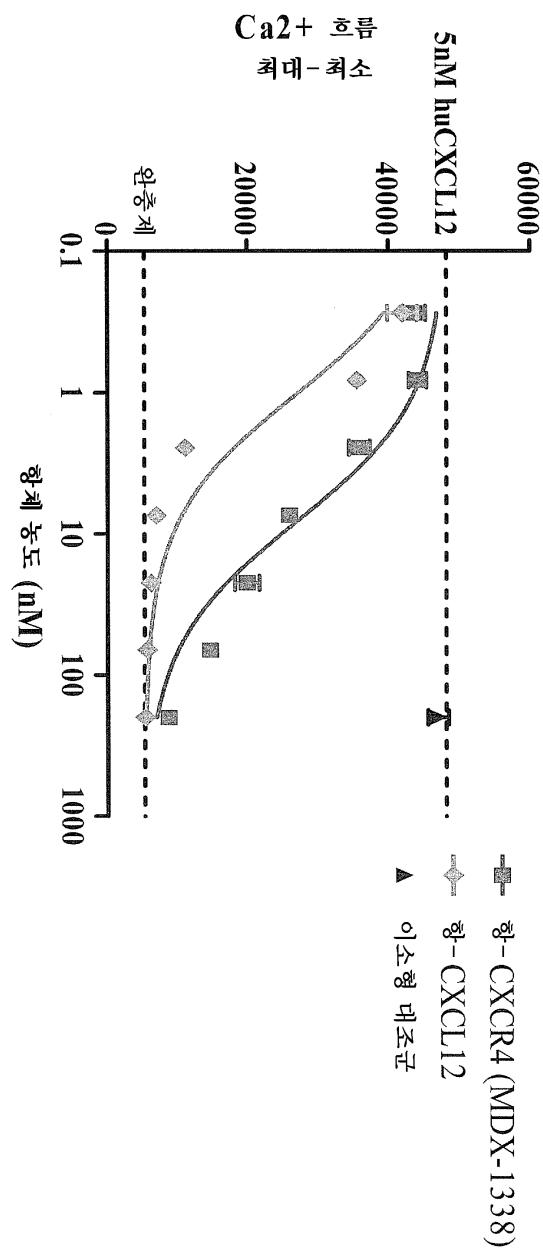
도면7



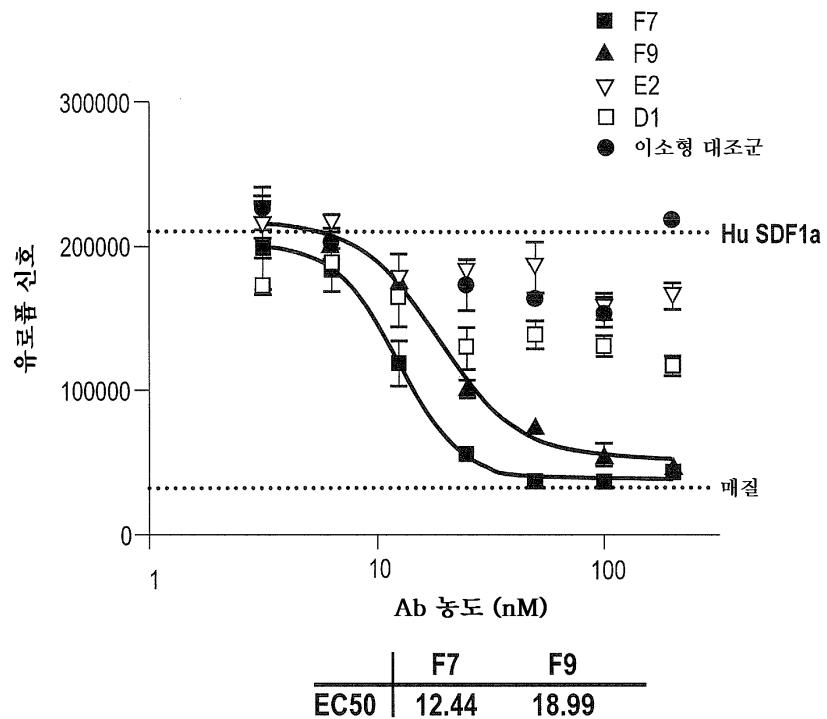
도면8a



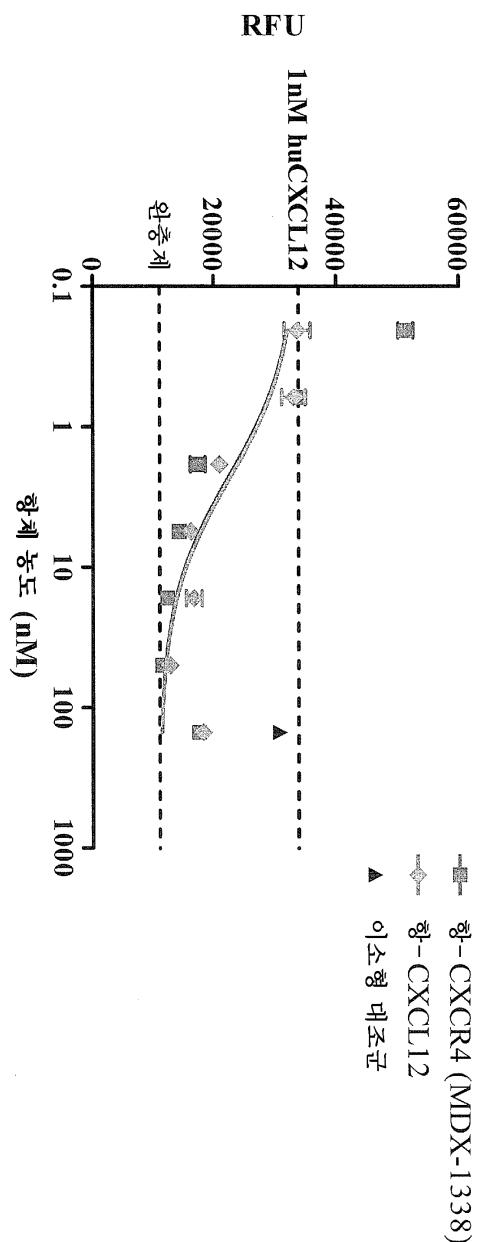
도면8b



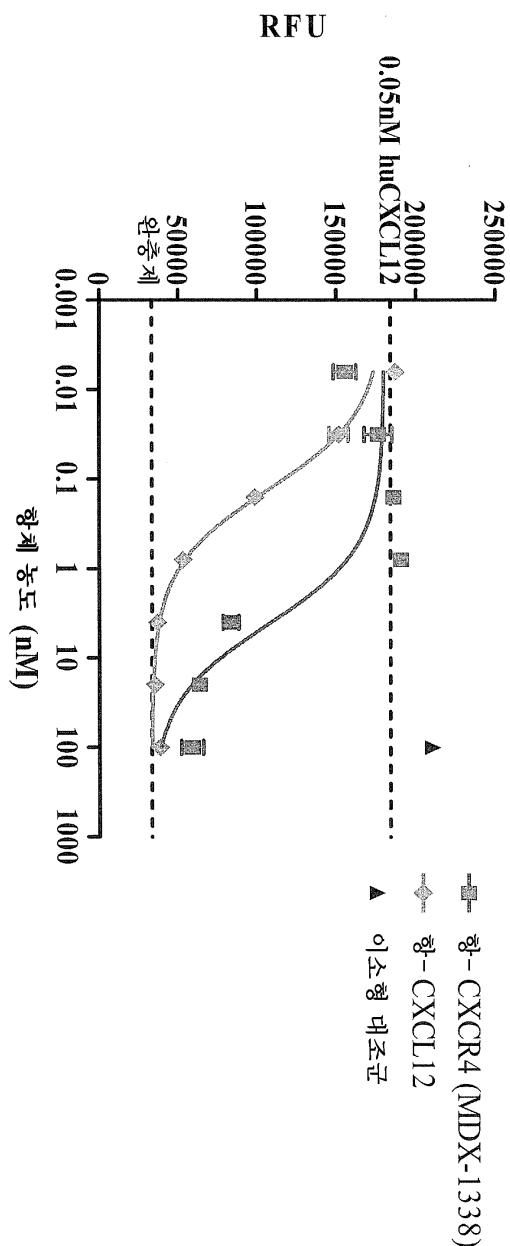
도면9



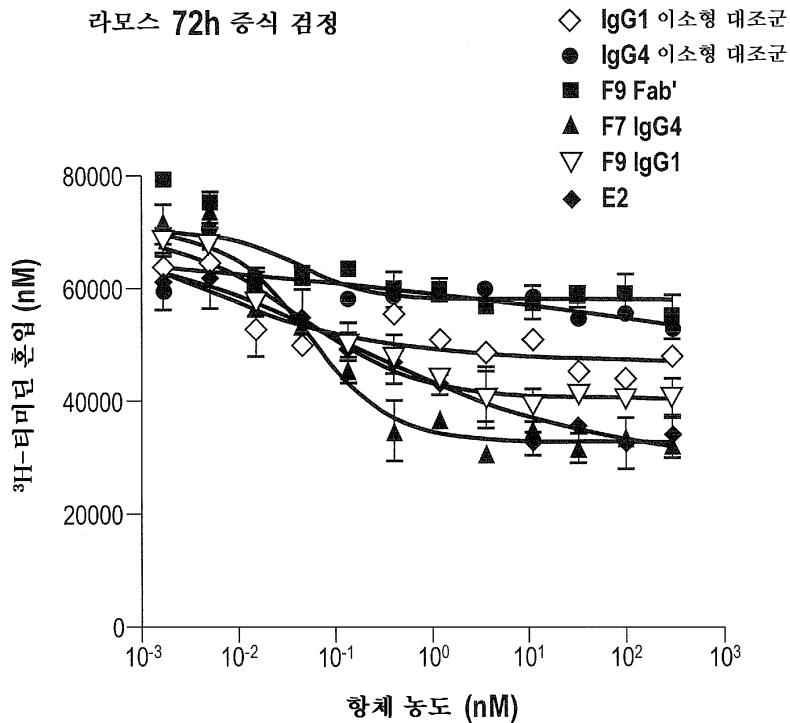
도면 10a



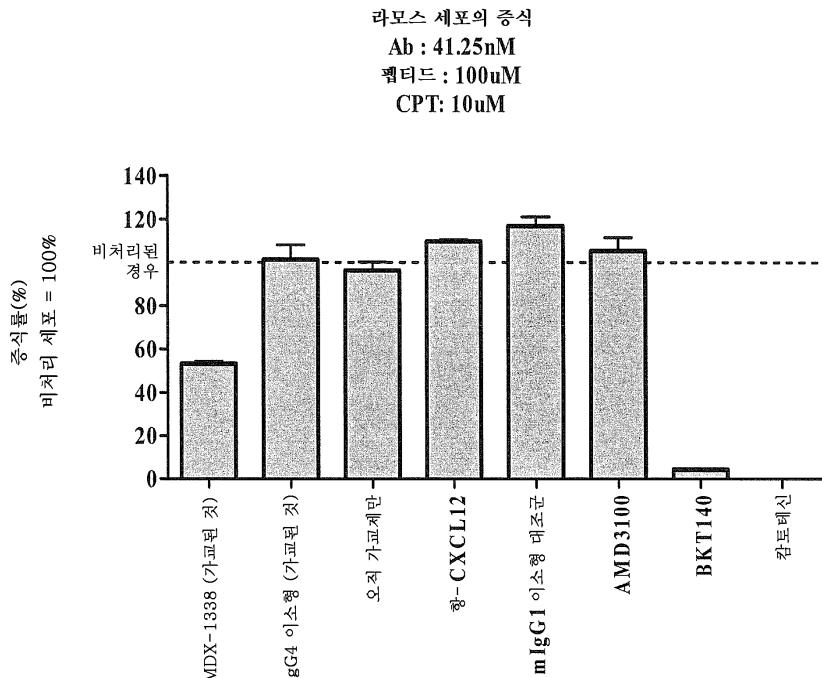
도면10b



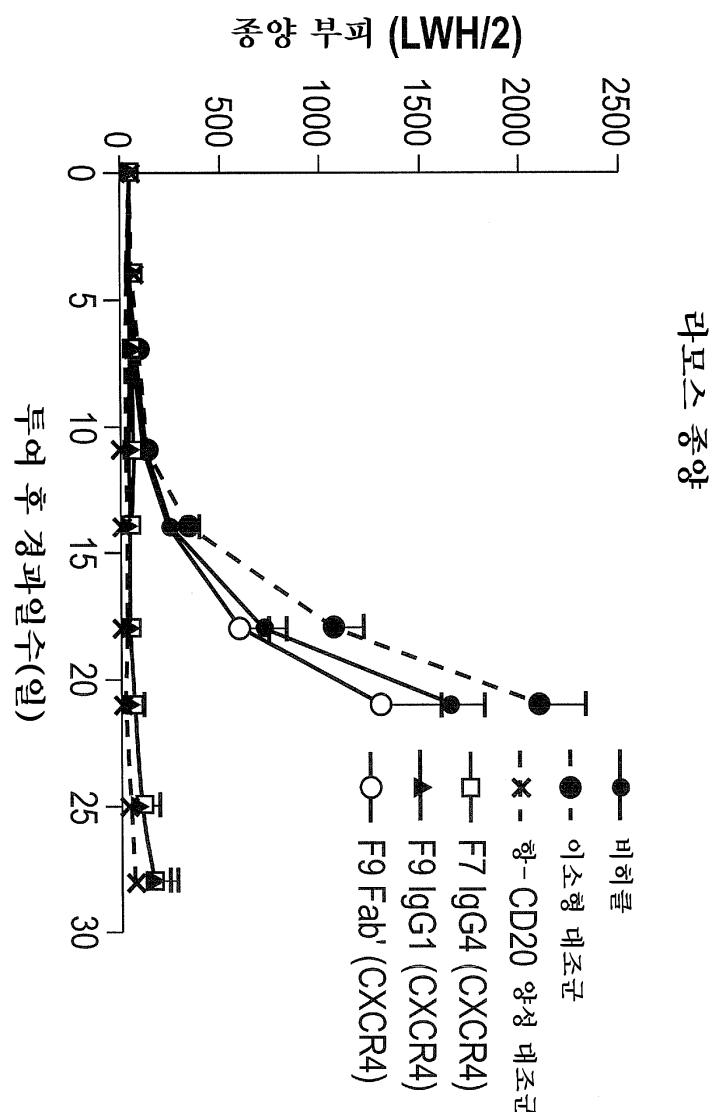
도면11a



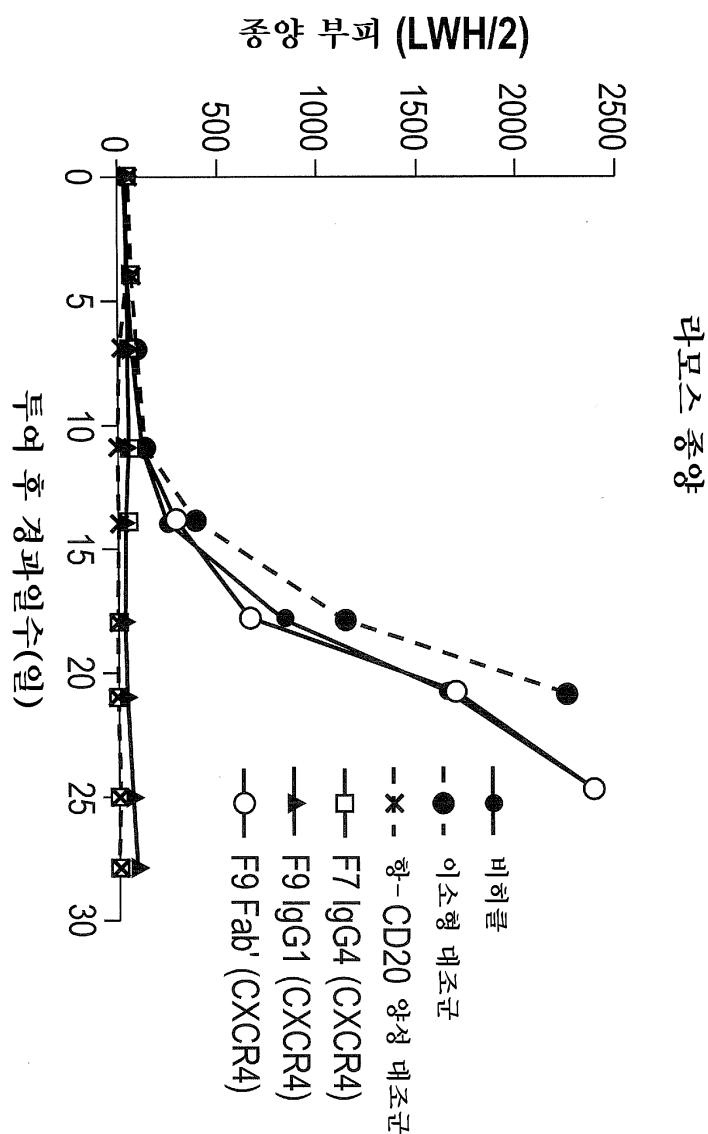
도면11b



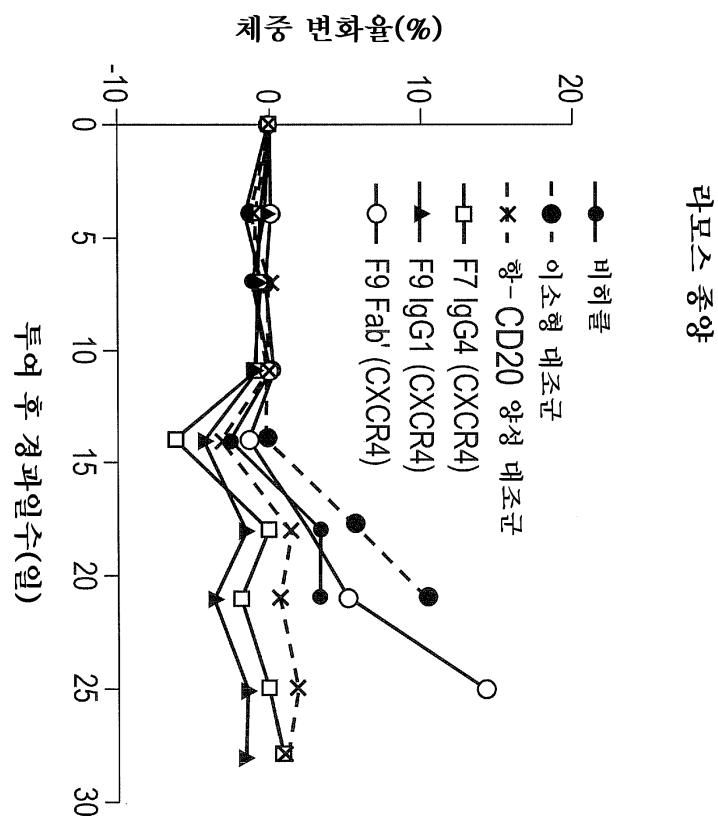
도면12a



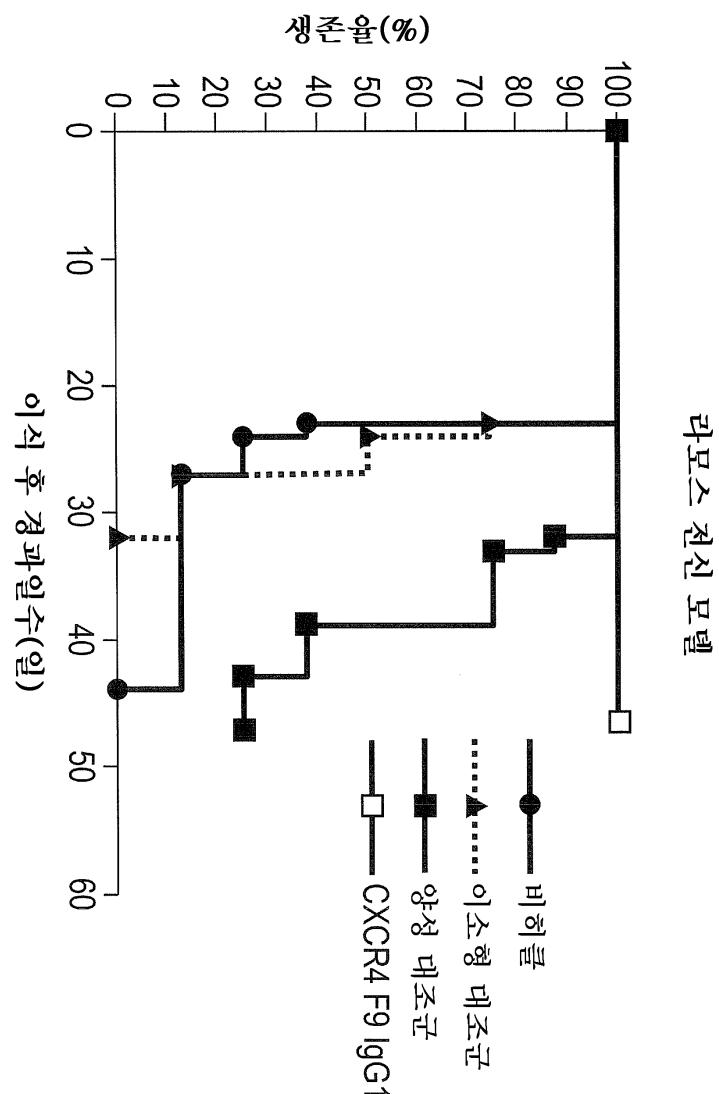
도면 12b



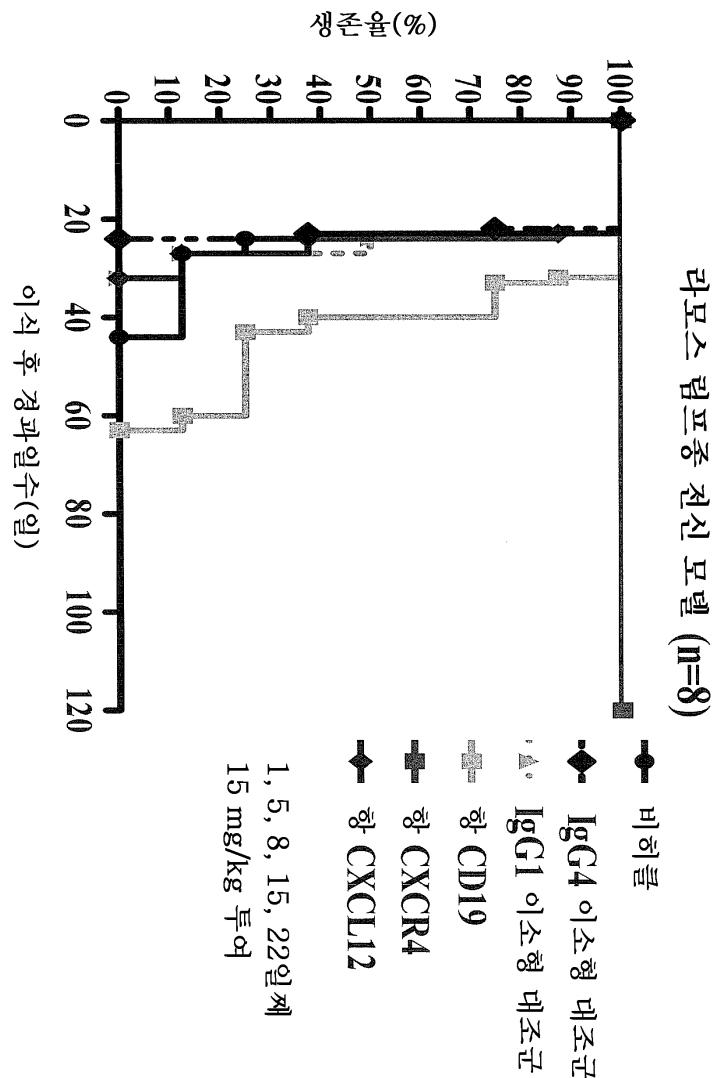
도면12c



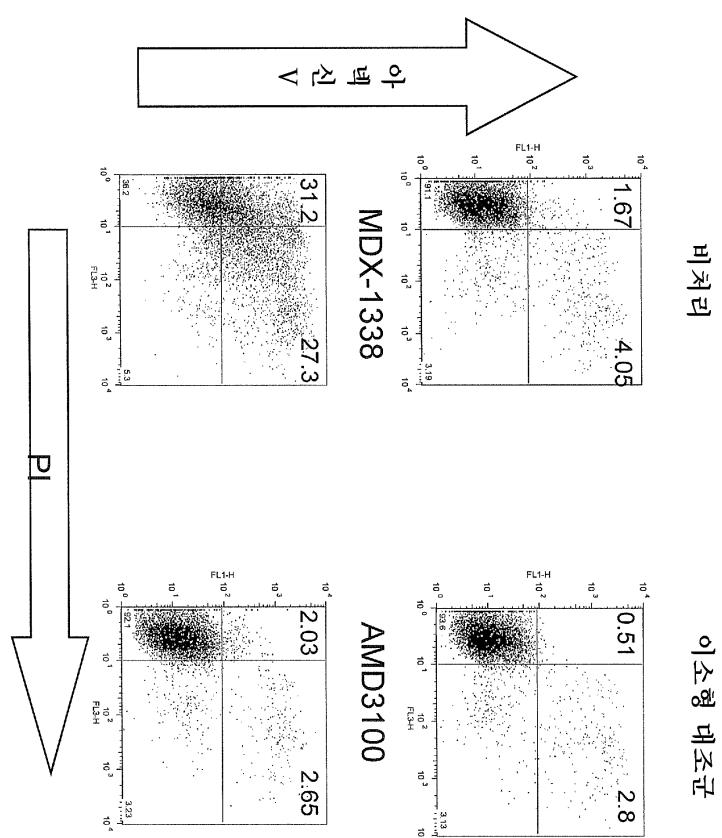
도면13a



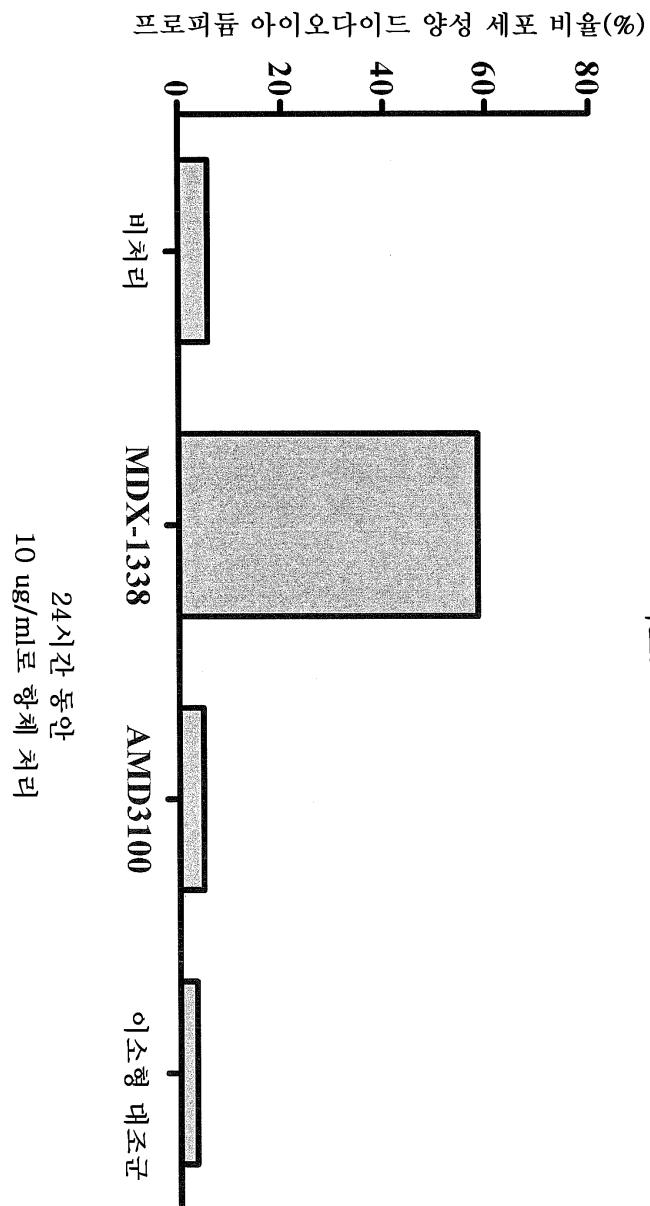
도면13b



도면14a

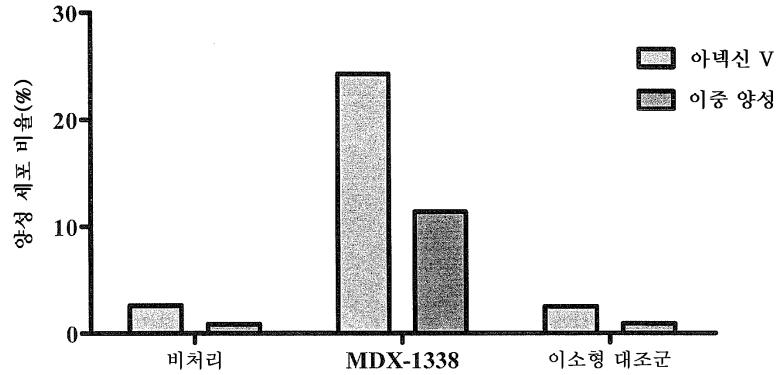


도면14b



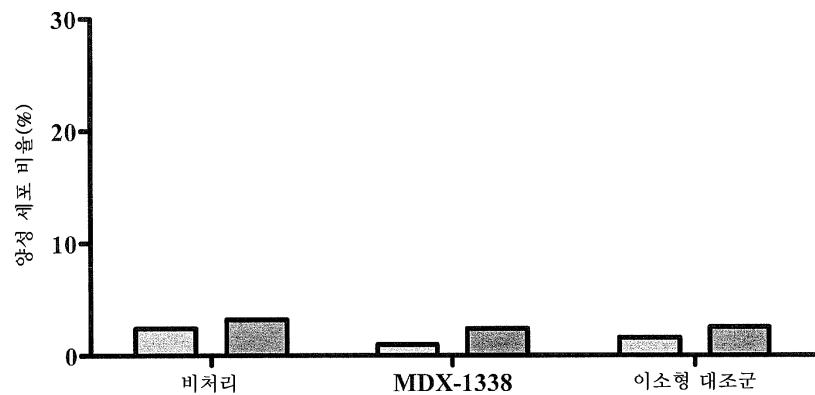
도면15a

R1610-CXCR4 세포

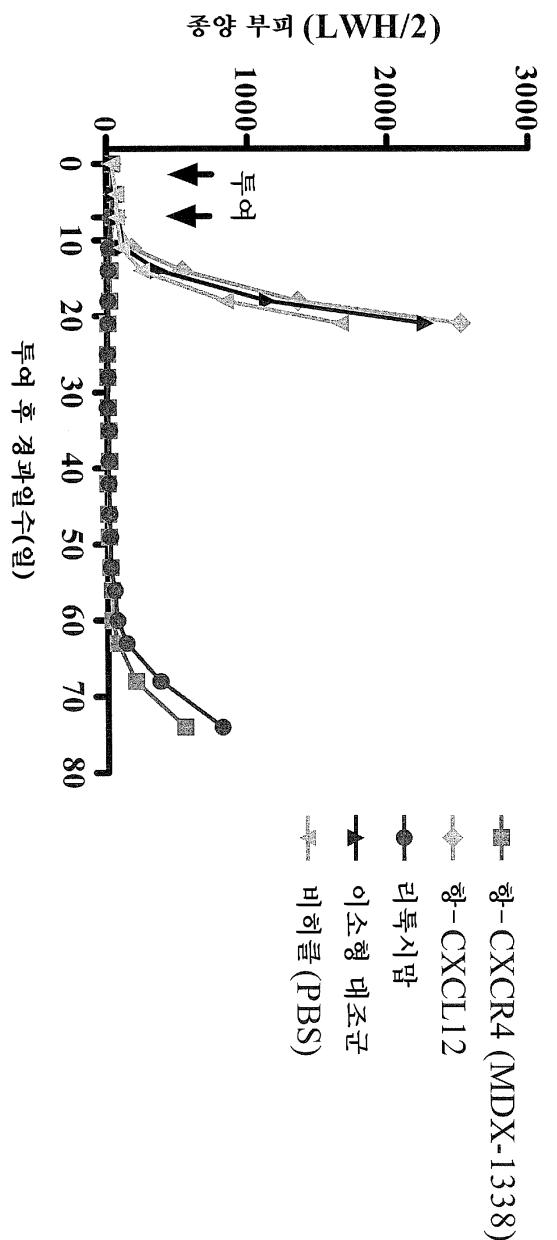


도면15b

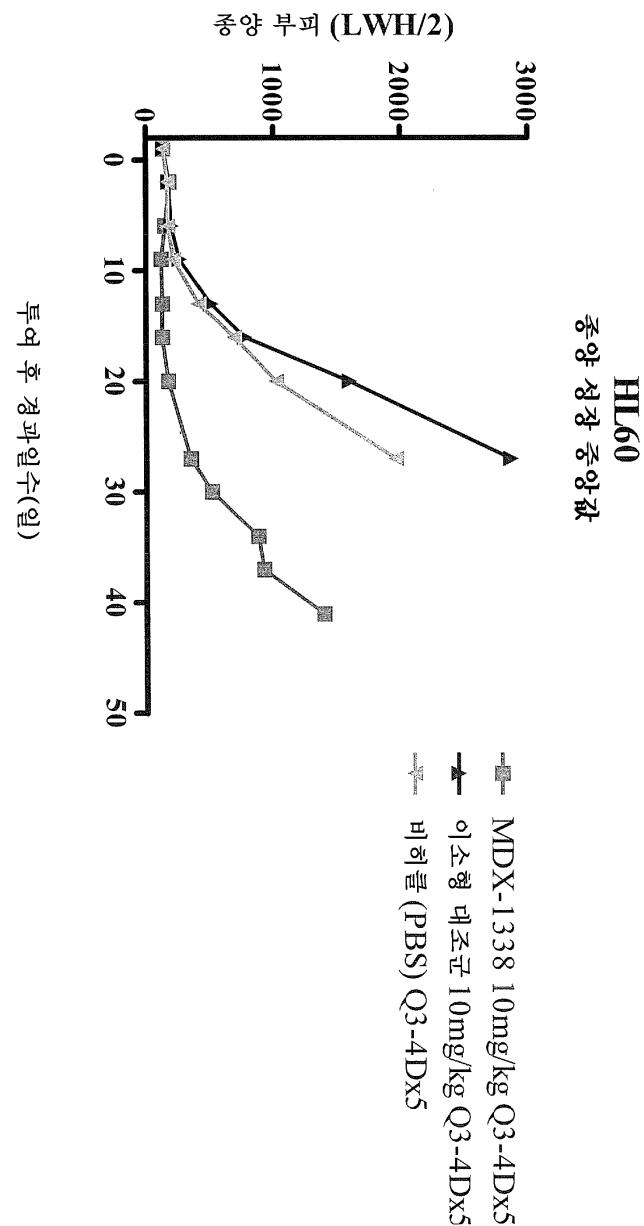
R1610 세포



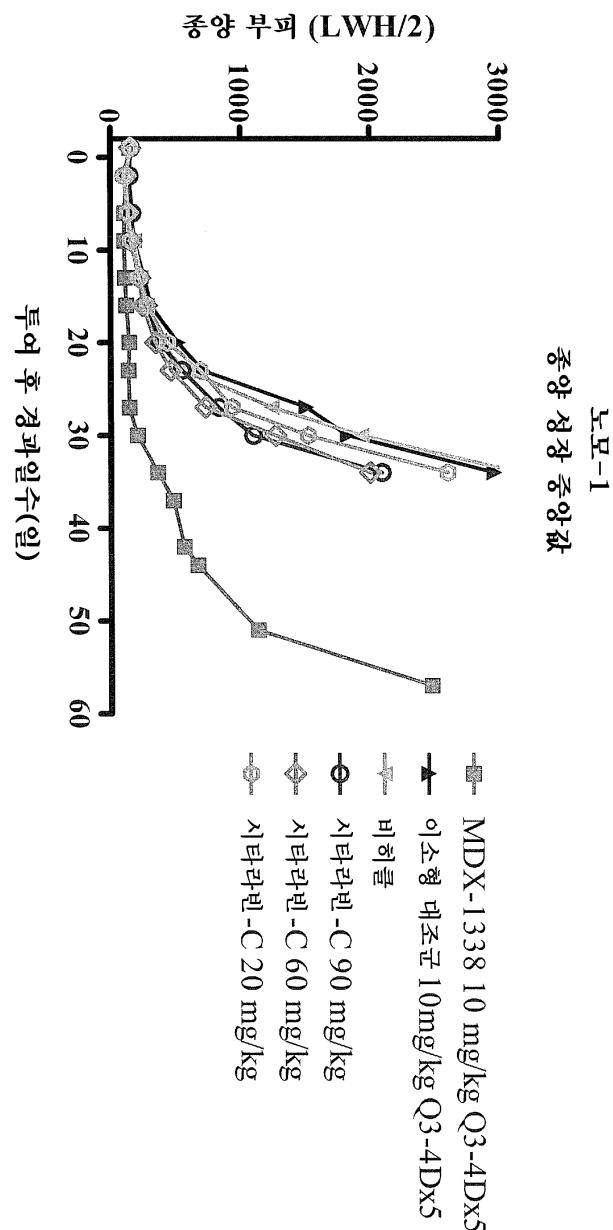
도면16



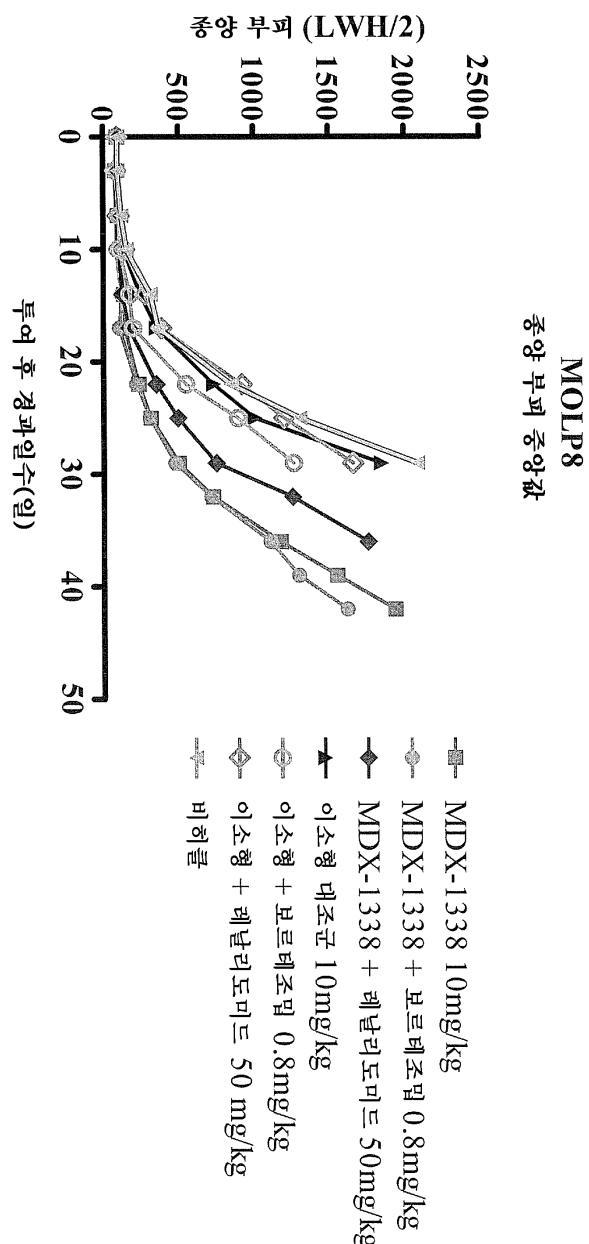
도면17a



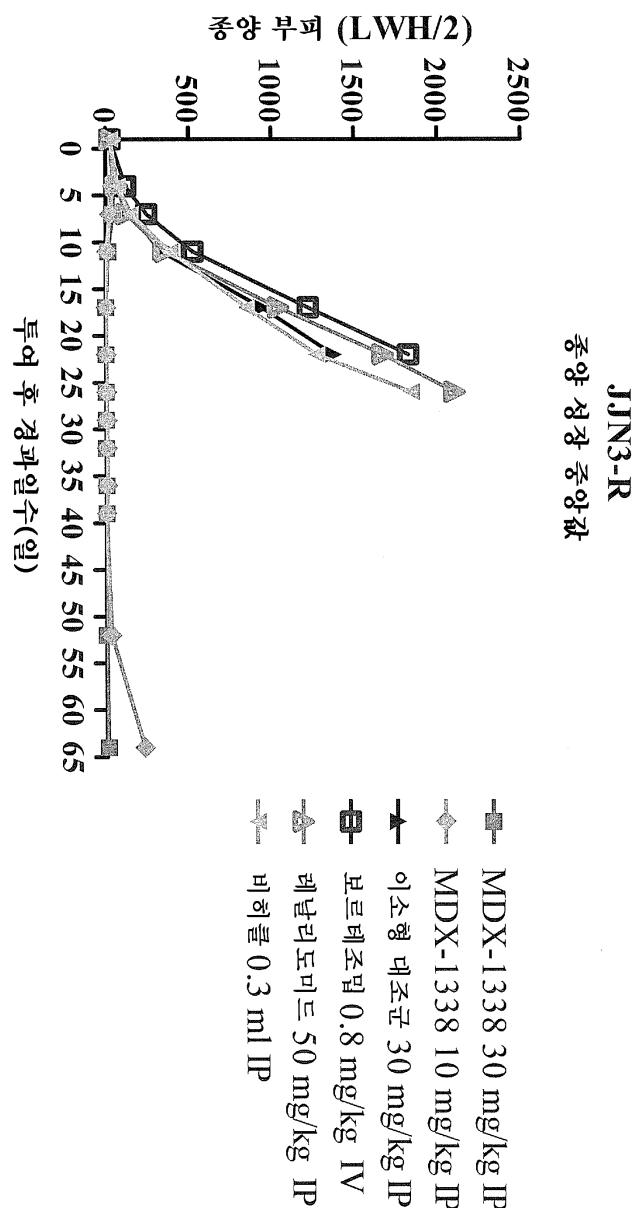
도면17b



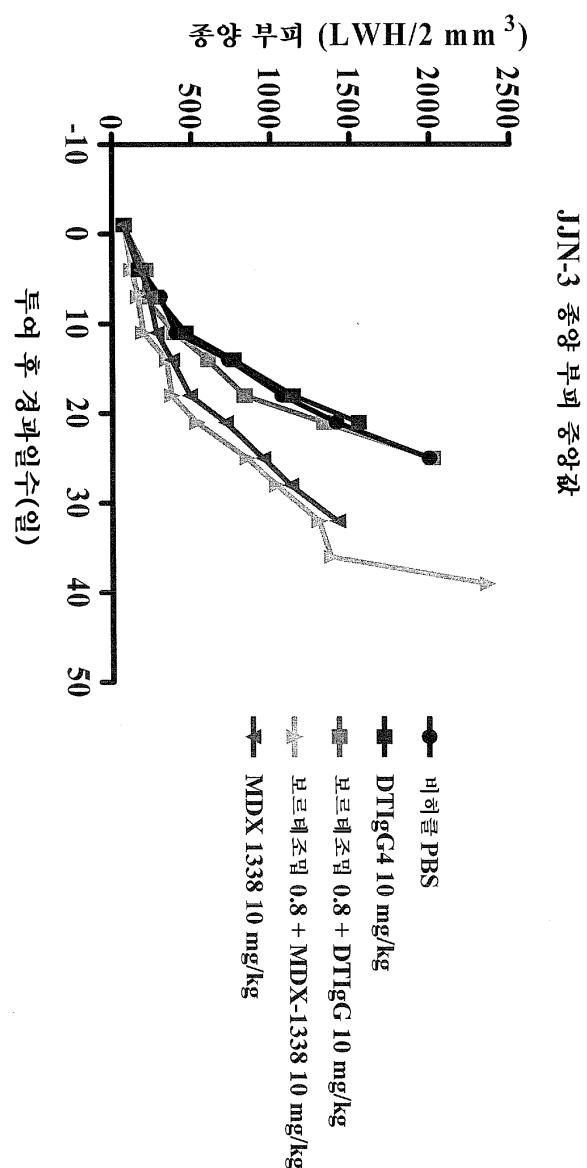
도면18a



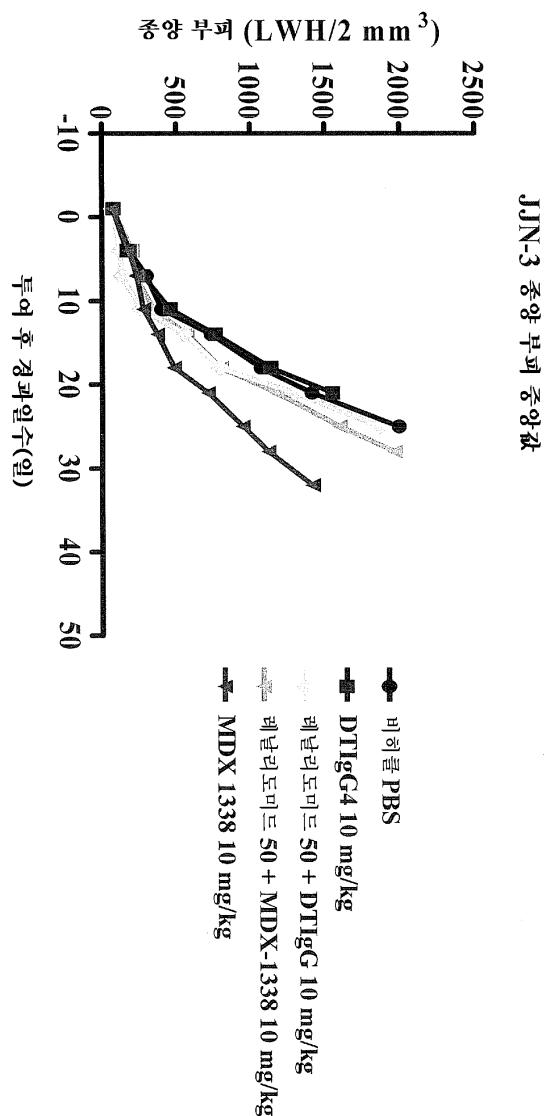
도면18b



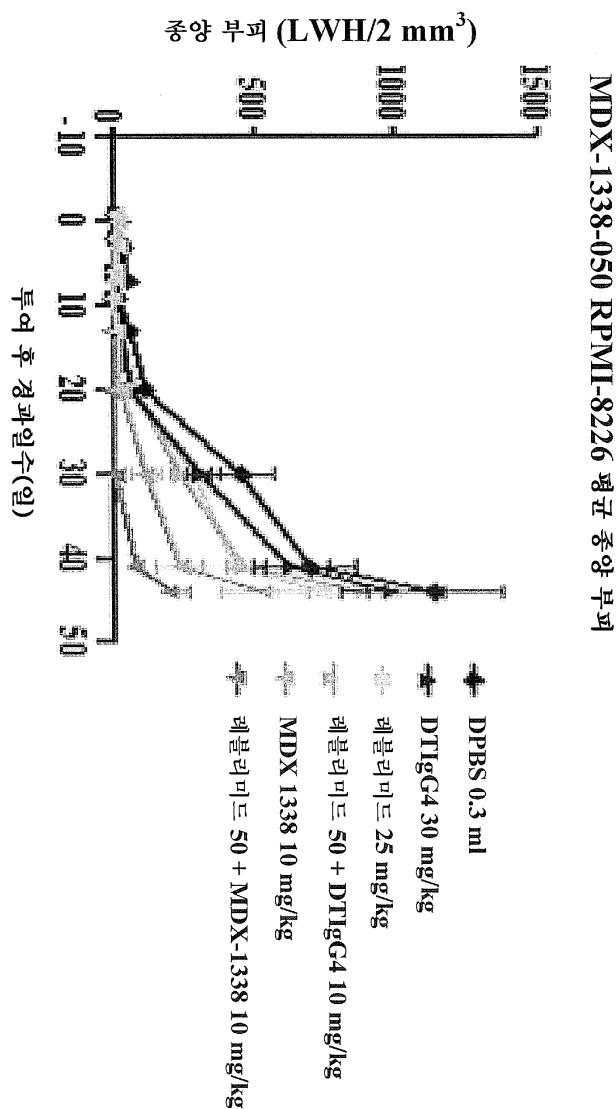
도면18c



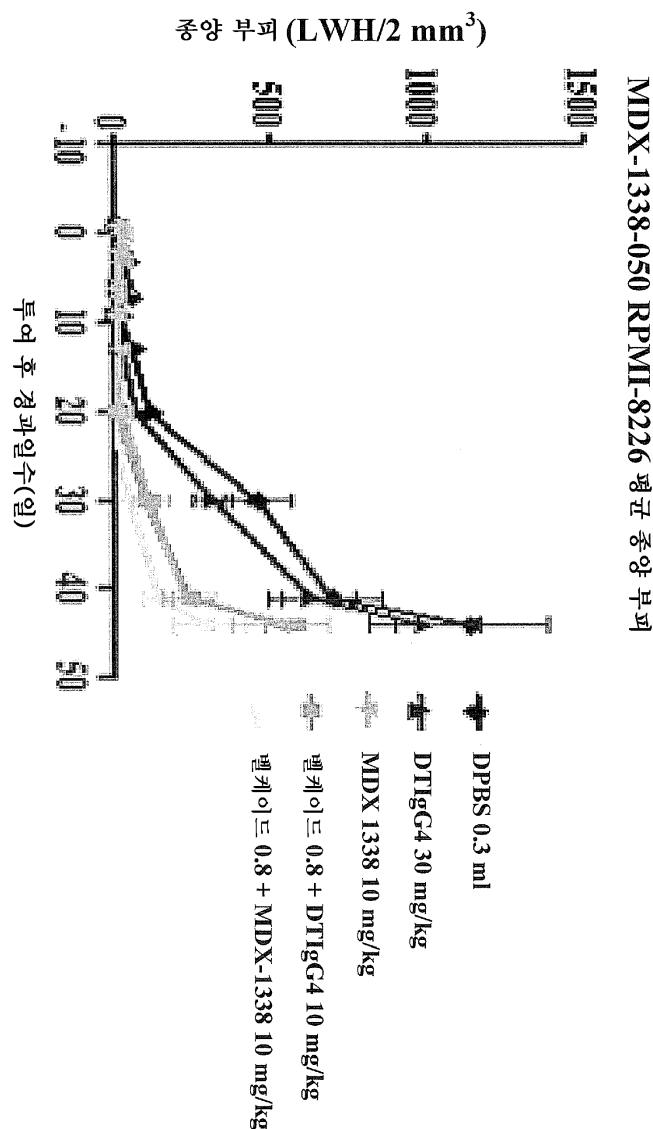
도면18d



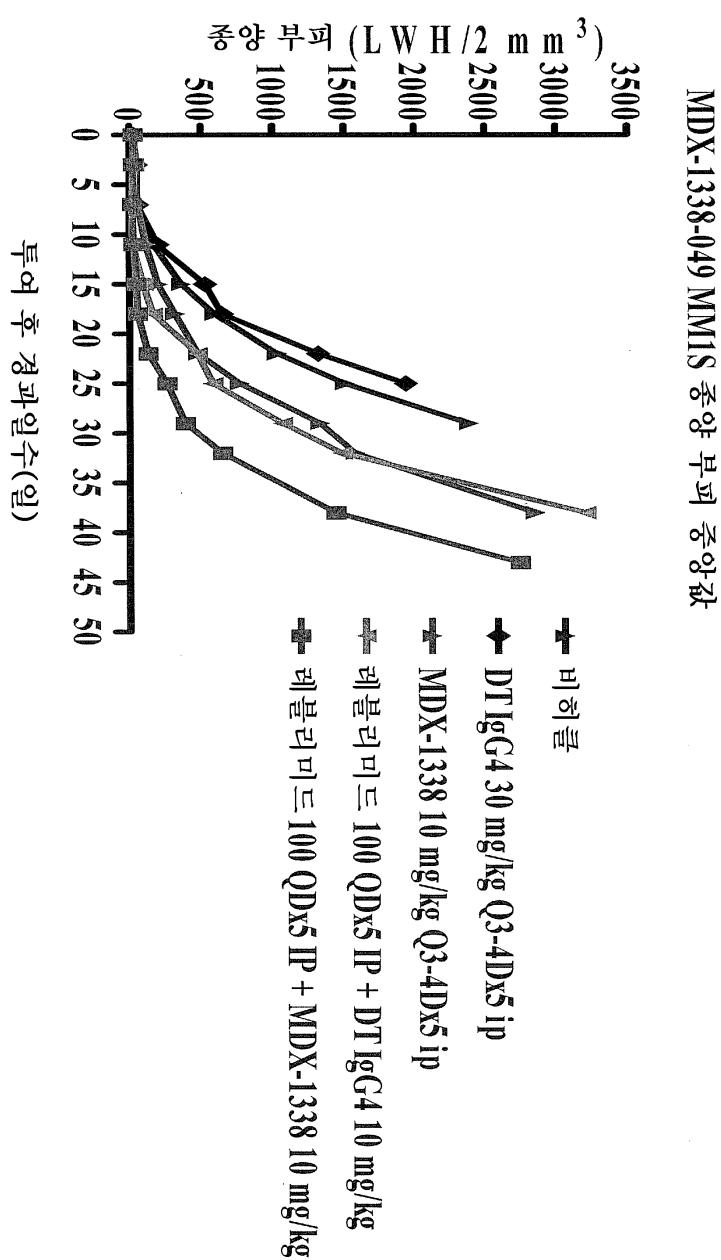
도면18e



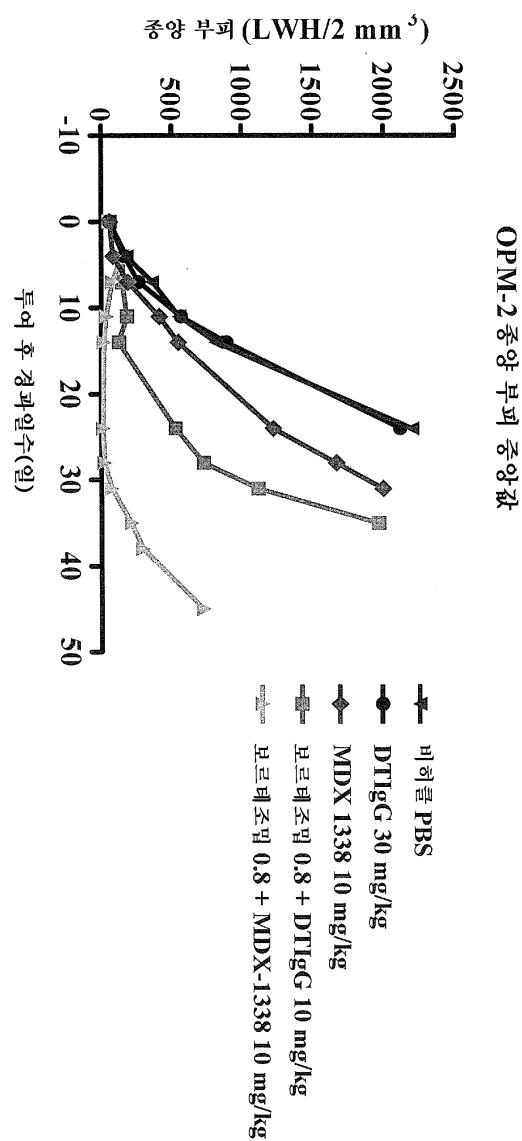
도면18f



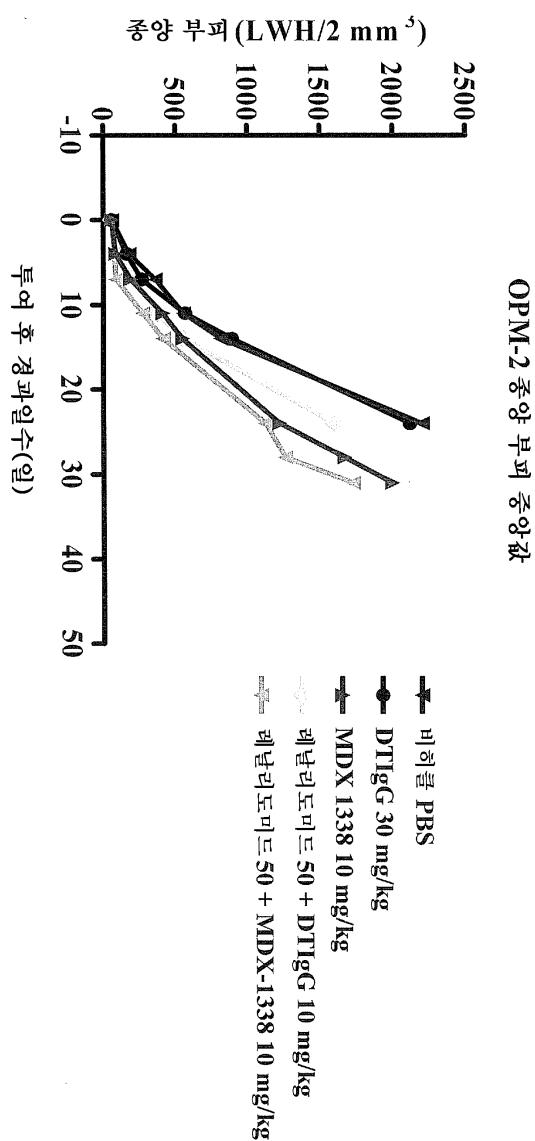
도면18g



도면 18h



도면18i



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
<120> TREATMENT OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES WITH
AN ANTI-CXCR4 ANTIBODY
<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

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 17

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly 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 Gly Met

100 105 110

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

115 120 125

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly 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 Gly Met

100 105 110

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

115 120 125

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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
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> 375		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(375)		
<400> 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 Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
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 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

<210> 34

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<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 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 ggt atg 336
 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro 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

<210> 35

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 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 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 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 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	

<210> 36

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 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 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 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

<210> 37

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 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 cg 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> Homo sapiens

<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 cg			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> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 39

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> Homo sapiens

<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

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> Homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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> Homo sapiens

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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	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> Homo sapiens

<

400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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	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 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> Homo sapiens

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser 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 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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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

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> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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> Homo sapiens

<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 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> Homo sapiens

<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

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> Homo sapiens

<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

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

180 185 190

Asp Leu Trp 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