



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0071368
(43) 공개일자 2014년06월11일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7076 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7006942</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년08월14일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년03월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/065904</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/024095 국제공개일자 2013년02월21일</p> <p>(30) 우선권주장 11177660.5 2011년08월16일 유럽특허청(EPO)(EP) 61/523,862 2011년08월16일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인 모르포시스 아게 독일 플라네그-마르틴스리드 레나-크리스트-스트 라쎬 48 (우: 82152)</p> <p>(72) 발명자 아메르스도르페르, 주타 독일, 82152 마르틴스리드 /플라넬크, 레나-크리 스트-에스티알. 48 슈테이들, 슈테판 독일, 81241 뮌헨, 에벤비크에스티알. 25 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 허용특</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

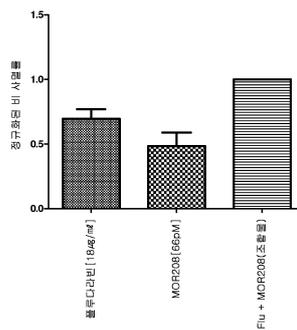
(54) 발명의 명칭 **항CD19 항체 및 퓨린 유사체를 이용한 병용 요법**

(57) 요약

본 개시 내용은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료를 위한 항CD19 항체 및 퓨린 유사체의 약학 조합물을 기술한다.

대표도 - 도5

정규화된 비 사멸률; SD; ADCC 전 72시간 동안 플루다리빈(Flu)으로 전처리된 MEC-1 표적 세포; 3개의 상이한 효과기 세포 공여체를 사용한 3가지 독립의 실험의 결과.



본 도면은 표 2에 나타난 데이터의 평균을 나타낸다.

(72) 발명자

빈테리히, 마르크

독일, 81371 뮌헨, 임플레르에스티알. 52

크론, 수잔

독일, 81241 뮌헨, 하이델백 22a

로즈크예르, 리사

스위스, 씨에이치-8908 헤딩엔, 프로무스슈트라쎄
38에이치

특허청구의 범위

청구항 1

비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한, 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 상호 경쟁하는 항체를 포함하는 CD19 에 특이적인 항체와 플루다라빈의 상승적 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 조합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체는 서열이 EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGYFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGRVTISDDKSI STAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYY YGTRVFDYWG QGTLVTVSS(서열 번호 10)인 가변 중쇄와, 서열이 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPIT FGAGTKLEIK(서열 번호 11)인 가변 경쇄를 포함하는 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체는 서열이 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKHTHTCPPEPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCK VSNKALPAPEEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 12)인 중쇄 불변 도메인을 포함하는 조합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 CD19에 특이적인 항체와 플루다라빈은 별도로 투여되는 조합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 플루다라빈은 CD19에 특이적 항체의 투여 전에 투여되는 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 분리된 사람 PBMC의 존재 하에 ADCC에 의해 MEC-1 세포의 사멸을, 플루다라빈 단독에 비하여 2배 이상 우수한 효능으로 매개할 수 있는 조합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 비호지킨 림프종의 치료에 사용하기 위한 조합물로서, 상기 비호지킨 림프종은 여포성 림프종, 소 림프구성 림프종, 점막 연관 림프 조직 림프종, 변연부 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종, 버킷 림프종 및 외투 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조합물.

명세서

기술분야

- [0001] 상호 참조
- [0002] 본 출원은, 2011년 8월 16일 출원된 미국 가출원 일련 번호 US 제61/523,862호의 이익을 주장하며, 이는 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0003] 본 발명의 분야
- [0004] 본 개시 내용은, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료를 위한 항 CD19 항체 및 퓨린 유사체의 약학 조합물에 관한 것이다.

배경기술

- [0005] B 세포는 체액성 면역 반응에 있어서 중요한 역할을 하는 림프구이다. B 세포는 대부분의 포유동물의 골수에서 생산되며, 순환성 림프계 풀(lymphoid pool)의 5% 내지 15%에 해당한다. B 세포의 주기능은 다양한 항원에 대해 항체를 만들어내는 것으로서, 상기 B 세포는 후천적 면역계의 필수 성분이다.
- [0006] B 세포는 면역계를 조절하는데 중요한 역할을 하므로, B 세포의 조절 장애는 다양한 장애들, 예를 들어 림프종 및 백혈병과 연관되어 있다. 이러한 장애로서는 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 급성 림프아구성 백혈병(ALL)을 포함한다.
- [0007] NHL은 림프구에서 비롯되는 이질성 악성 종양이다. 미국(U.S.) 내에서 발병자 수는 연간 65,000명이고, 사망자 수는 약 20,000명인 것으로 추산된다(미국 암 학회, 2006; 및 SEER Cancer Statistics Review). 상기 질병은 모든 연령에서 발생할 수 있으나, 보통 발병은 40세 이상의 성인들에서 시작하고, 연령이 증가함에 따라서 발병률도 증가한다. NHL은, 임의의 주요 장기들과 관련되어 있을 수 있지만, 림프절, 혈액, 골수 및 비장에 축적된 림프구의 클론성 증식에 의해 특징지어진다. 최근 병리학자와 임상의학에 의해 사용되고 있는 분류 체계는 종양에 대한 세계 보건 기구(WHO) 분류 체계(World Health Organization(WHO) Classification of Tumors)이며, 이 분류 체계는 NHL을 전구체 및 성숙 B 세포 또는 T 세포 신생물로 체계화한다. PDQ는 현재 NHL을 임상 실험에 들어가는 것에 대하여 지연형(indolent) 또는 공격형(aggresive)으로 나누고 있다. 지연형 NHL군은 주로 여포성 아형(follicular subtype), 소 림프구 림프종, MALT(점막 연관 림프 조직) 및 변연부 림프종으로 이루어져 있으며, 지연형은 새로 진단된 B 세포 NHL 환자들의 약 50%를 차지한다. 공격형 NHL은 주로 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBL, DLBCL 또는 DLCL)(새로이 진단된 모든 환자들 중 40%가 미만성 거대 세포 림프종임), 버킷 림프종 및 외투 세포 림프종이라는 조직학적 진단을 받은 환자를 포함한다. NHL의 임상 경과는 매우 가변적이다. 임상 경과와 주요 결정기는 조직학적 아형이다. NHL의 대부분의 지연형은 불치병으로 간주된다. 환자들은 처음에는 화학 요법이나 항체 요법에 반응을 보이지만, 거의 대부분의 환자들은 병이 재발할 것이다. 현재 행해지고 있는 연구들은 초기에 의학적 개입이 있을 때 생존율이 높아짐을 입증하지 못하고 있다. 무증상 환자들에 있어서 이들 환자들에서 증상이 나타나거나 질병의 진행 속도가 가속화되는 것으로 보일 때까지 “관찰 및 대기(watch and wait)” 하는 것이 허용된다. 시간이 경과함에 따라서 상기 질병은 더 공격적인 조직 구조로 변형될 수 있다. 평균 생존 기간은 8년 내지 10년이고, 지연형 환자들은 종종 질병의 치료 기간 동안 3회 이상의 처치를 받게 된다. 증상성 지연형 NHL 환자들의 초기 조직학적 치료법은 병용 화학 요법이었다. 가장 일반적으로 사용되는 체계로서는 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(CVP); 또는 사이클로포스파미드, 아드리아마이신, 빈크리스틴, 프레드니손(CHOP)을 포함한다. 환자들 중 약 70% 내지 80%는 초기 화학 요법에 반응을 보이고, 질병의 소강 상태는 대략 2년 내지 3년간 지속할 것이다. 궁극적으로 대다수의 환자들은 병이 재발한다. 항CD20 항체인 리툽시맷의 개발 및 이의 임상 사용으로 치료법에 대한 반응 및 생존율에 있어서 상당한 개선을 제공하였다. 대부분의 환자들에 대한 현재의 치료 기준은 리툽시맷+CHOP(R-CHOP) 또는 리툽시맷+CVP(R-CVP)이다. 인터페론은 알킬화제와 함께 NHL의 초기 치료에 대하여 승인되었지만, 이는 미국에서의 사용이 한정되어 있다. 리툽시맷 요법은 NHL의 몇 가지 유형에 있어서 효과적인 것으로 나타났으며, 현재는 지연형 NHL(여포성 림프종) 및 공격형 NHL(미만성 거대 B 세포 림프종) 둘 다에 대한 1차적 치료법으로서 승인되어 있다. 그러나, 항CD20 모노

클로날 항체(mAb)의 상당한 한계점이 있는데, 이는 1차 내성(재발된 지연형 환자들이 있어서 반응이 50%), 획득 내성(재치료시 반응률이 50%), 희귀 완전 반응(rare complete response)(재발된 개체군에 있어서 완전 반응률이 2%), 및 지속적 재발 패턴(continued pattern of relapse)을 포함한다. 마지막으로, 다수의 B 세포들은 CD20을 발현하지 않으므로, 다수의 B 세포 장애들은 항CD20 항체 요법을 사용하여서는 치료될 수 없다.

[0008] NHL에 더하여, B 세포의 조절 장애로 인해 생기는 백혈병의 유형이 몇 가지 있다. 만성 림프구성 백혈병(“만성 림프성 백혈병” 또는 “CLL”이라고도 알려짐)은 B 림프구의 비정상적 축적에 의해 야기되는 성인 백혈병의 하나의 유형이다. CLL에 있어서, 악성 림프구는 정상이면서 성숙한 것으로 보일 수 있지만, 악성 림프구는 감염에 효과적으로 대처할 수 없다. CLL은 성인에서의 백혈병 중 가장 일반적인 형태이다. 남자는 CLL 발병 가능성이 여성의 2배이다. 그러나, CLL의 중요 위험 인자는 연령이다. 새로운 사례의 중 75% 이상은 50세 이상의 환자에서 진단된다. 매년 10,000건 초과의 사례가 진단되고 있으며, 사망자 수는 매년 거의 5,000명이다(미국 암 학회, 2006; 및 SEER Cancer Statistics Review). CLL은 불치병이긴 하지만 대부분의 경우 서서히 진행된다. 다수의 CLL이 있는 사람은 여러 해 동안 정상적이고 활동적인 삶을 산다. CLL은 늦게 발병되기 때문에 CLL 초기에는 일반적으로 치료가 행해지지 않는데, 그 이유는 초기 CLL의 의학적 개입은 생존 시간이나 삶의 질을 개선시키지 못하는 것으로 여겨지기 때문이다. 그 대신, 병태는 경시적으로 모니터링된다. 초기 CLL 치료법은 정확한 진단과 질병의 진행 정도에 따라서 달라진다. CLL 요법에 사용되는 제제로서는 수 십개가 있다. 병용 화학 요법의 치료 계획, 예를 들어 FCR(플루다라빈, 사이클로포스파미드 및 리투시맵) 및 BR(벤다무스틴 및 리투시맵)은 새로이 진단된 CLL과 재발된 CLL 둘 다에 효과적이다. 동종 골수(줄기 세포) 이식은 위험하기 때문에 CLL에 대한 1차 치료법으로서는 거의 사용되지 않는다.

[0009] 백혈병의 또 다른 유형으로서는 급성 림프아구성 백혈병(ALL)(급성 림프구성 백혈병이라고도 알려짐)이 있다. ALL은 골수 내 악성 및 미성숙 백혈구 세포(림프아구라고도 알려짐)의 과다 생산 및 연속 증식을 특징으로 한다. ‘급성’이란, 순환성 림프구(“아구”)의 미분화된 미성숙 상태를 말하고, 질병이 치료되지 않은 채 방치될 경우 기대 수명이 수 주에서 수 개월로 빠르게 진행되는 질병의 것을 말한다. ALL은 가장 일반적으로 어린이에서 발병하며, 4세 내지 5세에서 발병률이 가장 높다. 12세 내지 16세의 어린이들은 다른 연령대의 어린이들보다 사망률이 더 높다. 현재 어린이 ALL 어린이들 중 80% 이상은 치료 가능한 것으로 간주되고 있다. 매년 4,000건 미만의 사례가 진단되고 있으며, 사망자 수는 매년 거의 1,500명이다(미국 암 학회, 2006; 및 SEER Cancer Statistics Review).

[0010] 사람의 CD19 분자는 사람 B 세포, 예를 들어 전 B 세포, 발달 초기의 B 세포(즉, 미성숙 B 세포), 성숙 B 세포(혈장 세포로의 마지막 분화 과정을 포함) 및 악성 B 세포(이에 한정되는 것은 아님)의 표면 상에 발현되는, 구조적으로 분명한 세포 표면 수용체이다. CD19는 대부분의 전 B 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 비호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 후 림프구성 백혈병, 모양 세포 백혈병, 일반적인 급성 림프구성 백혈병 및 몇몇 늘 급성 림프아구성 백혈병에 의해 발현된다(Nadler et al, J. Immunol., 131 :244-250 (1983); Loken et al, Blood, 70:1316-1324 (1987); Uckun et al, Blood, 71 :13-29 (1988); Anderson et al, 1984. Blood, 63:1424-1433 (1984); Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397(1995)). 혈장 세포 상에서 CD19의 발현은 이 CD19가 분화된 B 세포 종양, 예를 들어 다발성 골수종, 형질 세포종, 발덴스트롬 종양 상에서 발현될 수 있음을 추가로 시사한다(Grossbard et al., Br. J. Haematol, 102:509-15(1998); Treon et al, Semin. Oncol, 30:248-52(2003)).

[0011] 그러므로, CD19 항원은 비호지킨 림프종(본원에 기술된 각각의 아종들을 포함함), 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 있어서 면역 요법의 표적이다. CD19는 또한, WO 제2000074718호에서 자가 면역성 장애의 치료에 있어서 면역 요법에 대한 표적으로서 제안된 바 있으며, 상기 출원은 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0012] 임의의 CD19 요법이 밝혀져 있다. 항CD19 키메라 항원 수용체(CAR)(CD3 ζ 및 CD28 분자를 둘 다 포함함)를 발현하는 T 세포가 여포성 림프종이 있는 환자에 투여되었다. 문헌[Kochenderfer et al., Eradication of B lineage cell and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19, Blood, vol. 116, no: 20 (2010년 11월)]. 전체가 참조로 포함되어 있는, 문헌[Sadelain et al., The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors, Current Opinion in Immunology, Elsevier, vol. 21, no.2, 2009년 4월 2일]은 또한 항CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 기술한다. 전체가 참조로 포함되어 있는, 문헌[Rosenberg et al, Treatment of B cell Malignancies with T cells expressing an anti-CD19 chimeric receptor: Assessment of the Impact of Lymphocyte Depletion Prior to T cell Transfer, (2008년 9월), www.gemcris.od.nih.gov/Abstracts/940_s.pdf (2012년 1월 13일 검색)]은 플루

다라빈과 함께 사용되는 항CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 기술한다. 또한, 문헌[Eshhar et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, National Academy of Science, Washington, D.C.:, vol. 90, no.2 (1993년 1월 15일)]을 참조한다. 그러나 문헌[Kochenderfer et al.], [Sadelain et al.], [Rosenberg et al.] 및 [Eshhar et al.] 중 어느 것도 본원에 예시된 바와 같이 플루다라빈과 조합하여 CD19에 특이적인 항체를 기술하지 않는다.

- [0013] CLL의 치료에 있어서 치료법으로서의 플루다라빈은 문헌[Montserrat et al., Chronic lymphocytic leukemia treatment, Blood Review, Churchill Livingstone, vol. 7, no. 3 (1993년 9월 1일)]에 기술되었으나, 이 문헌은 본원에 예시된 바와 같이 플루다라빈과 조합하여 CD19에 특이적인 항체를 시사하지 않는다.
- [0014] B 세포 장애에 있어서 CD19 항체의 사용은, 잠재적인 병용 파트너 다수의 목록 내에서 플루다라빈의 개략적인 언급과 함께 전체가 참조로 포함되어 있는 US 제2011104150호에 개시되어 있으나, 본원에 예시된 바와 같이 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 있어서 조합의 상승 효과를 시사하지도 또는 예시적인 항체를 교시하지도 않는다.
- [0015] 비 특이적 B 세포 림프종에서 CD19 항체의 사용은, 잠재적인 병용 파트너 다수의 목록 내에서 플루다라빈의 개략적인 언급과 함께 전체가 참조로 포함되어 있는 WO 제2007076950호에 개시되어 있으나, 본원에 예시된 바와 같이 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 있어서 조합의 상승 효과를 시사하지도 또는 예시적인 항체를 교시하지도 않는다.
- [0016] 백혈병 및 림프종에서 CD19 항체의 사용은, 잠재적인 병용 파트너 다수의 목록 내에서 플루다라빈의 개략적인 언급과 함께 전체가 참조로 포함되어 있는 WO 제2005012493호에 개시되어 있으나, 본원에 예시된 바와 같이 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 있어서 조합의 상승 효과를 시사하지도 또는 예시적인 항체를 교시하지도 않는다.
- [0017] CLL, NHL 및 ALL에서 CD19 항체의 사용은, 전체가 참조로 포함되어 있는 문헌[Scheuermann et al., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995)]에 기술되어 있으나, 본원에 예시된 조합을 시사하지 않는다.
- [0018] CD19에 특이적인 추가적인 항체는 WO 제2005012493호(US 제7109304호), WO 제2010053716호(US 제12/266,999호)(이뮤노메딕스(Immunomedics)); WO 제2007002223호(US 제8097703호)(메다렉스(Medarex)); WO 제2008022152호(제12/377,251호) 및 WO 제2008150494호(젠코(Xencor)), WO 제2008031056호(US 제11/852,106호)(메디문(Medimmune)); WO 제2007076950호(US 제11/648,505호)(머크 특허 주식회사(Merck Patent GmbH)); WO 제2009/052431호(US 제12/253,895호)(시애틀 제네틱스(Seattle Genetics)); 및 WO 제2010095031호(제12/710,442호)(글렌마크 파마슈티컬스(Glenmark Pharmaceuticals))에 기술되어 있으며, 이들은 모두 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0019] CD19에 특이적인 항체와 기타 다른 제제들의 조합은 WO 제2010151341호(US 제13/377,514호)(더 파인슈타인 인스티튜트(The Feinstein Institute)); US 제5686072호(유니버시티 오브 텍사스(University of Texas)) 및 WO 제2002022212호(PCT/US01/29026호)(IDEC 파마슈티컬스(IDEC Pharmaceuticals))에 기술되어 있으며, 이들은 모두 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0020] 항암제 발견 및 개발에 있어서 최근의 발전에도 불구하고, CD19 발현 종양을 포함하는 다수의 암 형태들은 여전히 예후가 좋지 않음이 분명하다. 따라서, 이와 같은 형태의 암을 치료하는 개선된 방법과 조성물에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명은 항CD19 항체 및 퓨린 유사체를 이용한 병용 요법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0022] 선행 기술의 단독 요법이나 병용 요법 중 그 어느 것도 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병 치료에 있어서 예시된 항체와 플루다라빈 조합의 상승 효과를 시사하지 않는다.
- [0023] 하나의 양태에서, 본 개시 내용은 CD19에 특이적인 항체와 퓨린 유사체의 상승적 조합물에 관한 것이다. 이와

같은 조합물은 B 세포 악성 종양, 예를 들어 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 유용하다.

[0024] 시험관 내 및 생체 내 모델은, 임의의 화합물 또는 화합물들의 조합물이 사람의 체내에서 어떻게 거동할 것인지를 나타내는 것으로 간주된다. 추가적으로, 화합물들이 시험관 내 또는 생체 내에서 조합될 때, 이 조합물은 오히려 부가 효과만을 나타낼 것으로 예상된다. 놀랍게도 본 발명자들은, CD19에 특이적인 특정 항체와 플루다라빈의 조합이 만성 B 세포 백혈병 세포주(MEC-1)에서 항체와 플루다라빈을 단독으로 사용하는 경우에 비하여, 비세포 사멸의 수준 상승을 매개하였다는 것을 발견하였다. 이러한 시험관 내 모델은, 사람의 체내에서 만성 림프성 백혈병(CLL)의 치료에 있어서 상기 조합물이 어떻게 작용할 것인지를 나타낸다. 추가적으로 또한 예상외로, 본 발명자들은 버킷 림프종 SCID 마우스 모델에서 CD19에 특이적인 특정 항체와 플루다라빈의 조합물이 항체와 플루다라빈을 단독으로 사용하는 경우에 비하여 종양의 성장을 상승적으로 억제하고, 생존 일 수의 중앙 값을 상승적으로 증가시킨다는 것을 발견하였다. 이러한 생체 내 모델은, 사람에게 있어서 비호지킨 림프종의 치료에 있어서 상기 조합물이 어떻게 작용할 것인지를 나타낸다. 요약하면, 예시된 항CD19 항체와 플루다라빈의 조합물은 NHL 및 CLL과 관련된 모델에서 상승적으로 거동하였다. NHL 및 CLL은 둘 다 B 세포 관련 장애이고, CD19는 B 세포 상에서 고도로 발현되므로, 예시된 조합물은 작용 기작이 동일할 것이며 또한 기타 다른 B 세포 관련 장애, 예를 들어 ALL의 치료에 있어서 상승적으로 거동할 것이다.

[0025] 그러므로, CD19에 특이적인 예시된 항체와 플루다라빈의 조합물은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병에서 사람의 치료에 효과적일 것이다. 추가적으로, 본 명세서에 예시된 CD19에 특이적인 항체는 이미 임상 실험에 들어갔으며, 임상 실험에서 이와 같은 조합물은 사람에게서 확인될 수 있다.

[0026] 플루다라빈과 기타 다른 퓨린 유사체들의 작용 기작은 퓨린 유사체들이 핵산의 합성을 방해하는 경우와 유사하므로, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병이 있는 사람들을, 예시된 항CD19 항체와 플루다라빈 이외의 퓨린 유사체의 조합물로 치료할 때 상승 효과가 또한 보여질 것으로 여겨진다.

[0027] 예시된 항CD19 항체와 기타 다른 항CD19 항체는 CD19와 결합하므로, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병이 있는 사람들을, 임의의 항CD19 항체와 퓨린 유사체(예를 들어, 플루다라빈)의 조합물로 치료할 때 상승 효과가 보여질 것으로 여겨진다.

[0028] 예시된 항CD19 항체는 CD19의 특이적 에피토프와 결합하므로, 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈과 조합하여 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병이 있는 사람들을 치료할 때, 예시된 항체와 상호 경쟁하거나 예시된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 또한 상승적으로 거동할 것으로 여겨진다.

[0029] 본 개시 내용의 하나의 양태는 상승적 조합물을 포함하는데, 여기서 CD19에 특이적인 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역과 플루다라빈을 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 조합물은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료에 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 MOR208과 플루다라빈을 각각 단독으로 투여하거나, 조합하여 투여하였을 때 MEC-1 세포에 미치는 세포 독성 효과를 나타낸다.

도 2는 MEC-1 세포에 있어서 MOR208과 플루다라빈을 조합하여 투여하였을 때의 ADCC 용량 반응 곡선을 나타낸다.

도 3은 MOR208의 가변 도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 MOR208의 Fc 영역의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 5는 72시간 동안 플루다라빈(FLU)으로 전처리된 MEC-1 표적 세포의 정규화된 비 사멸률을 나타낸다. 데이터는 3개의 상이한 효과기 세포 공여체를 사용하여 3가지의 독립적 실험의 풀을 나타낸다.

도 6은 실시예 2에 기술된 SCID 마우스 모델 군에서 MOR208, FLU 및 조합물(MOR208/FLU)의 종양 성장의 평균을 나타낸다.

도 7은 실시예 3에 기술된 SCID 마우스 모델 군에서 MOR208, FLU 및 조합물(MOR208/FLU)의 생존 시간의 중앙 값

을 나타낸다.

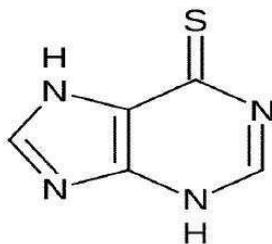
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] “상승 효과”, “상승 작용” 또는 “상승 작용의”란, 조합물의 예상된 부가 효과를 넘는 것을 의미한다. 본원에서 조합물의 “상승 효과”, “상승 작용” 또는 “상승 작용의” 효과는 문헌[Chou et al.], [Clarke et al.], 및/또는 [Webb et al.]의 방법에 의해 결정된다. 문헌[Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006)]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다. 또한, 문헌[Clarke et al., Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents *in vivo* in breast cancer and other models, Breast Cancer Research and Treatment 46:255-278 (1997)]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다. 또한, 문헌[Webb, J. L. (1963) Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다.

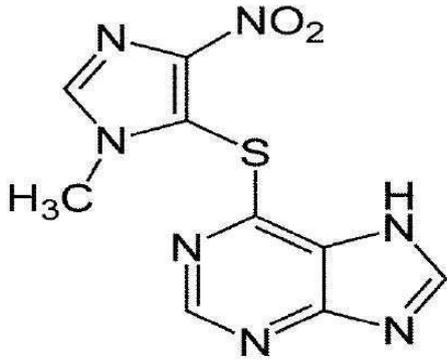
[0032] “항체”란 용어는, 모노클로날 항체, 예를 들어 임의의 이소타입(isotype), 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 의미한다. IgG 항체는 이황화 결합에 의해 연결되어 있는 2개의 동일한 중쇄와 2개의 동일한 경쇄로 구성된다. 각각의 중쇄와 경쇄는 불변 영역과 가변 영역을 포함한다. 각각의 가변 영역은, 주로 항원 에피토프와의 결합에 관여하는 “상보성 결정 영역”(“CDR”) 또는 “초가변 영역”이라고 불리는 3개의 분절을 포함한다. 상기 분절은 CDR1, CDR2 및 CDR3(N 말단으로부터 차례대로 번호가 매겨짐)으로 지칭된다. CDR 외부에 있는 가변 영역의 매우 높게 보존된 일부는 “구조틀 영역(“framework region”)”이라고 불린다. “항체 단편”이란, 1개 이상의 가변 중쇄 또는 가변 경쇄를 포함하는(여기서, 중쇄 및 경쇄는 각각 CDR과 구조틀 영역을 포함함) Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab')₂ 단편, 또는 기타 다른 단편을 의미한다.

[0033] 퓨린 유사체는 대사성 퓨린의 구조를 모의하여 핵산의 합성을 방해하는 항대사물질이다. 예를 들어, 플루다라빈은 퓨린계 뉴클레오티드인 아데닌 및 구아닌을 치환함으로써 RNA 및 DNA에 혼입될 수 있다. 퓨린 유사체는 개체의 급속 증식성 세포, 예를 들어 암 세포, 골수 세포 또는 위장관에 존재하는 세포의 성장을 억제한다. 퓨린 유사체로서는 메르캅토피린, 아자티오프린, 티오구아닌 및 플루다라빈을 포함한다.

[0034] 메르캅토피린은 급성 백혈병, 림프종, 류머티즘성 관절염 및 염증성 장 질환, 예를 들어 크론병 및 궤양성 대장염 각각의 치료에 사용된다. 메르캅토피린은 다음과 같은 구조를 가진다.

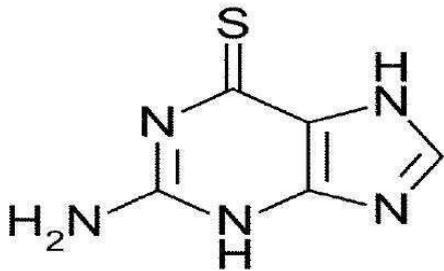


[0035] 아자티오프린은 주요 면역 억제 세포 독성 물질이다. 아자티오프린은 조직 이식에서 거부 반응을 억제하는데 널리 사용된다. 아자티오프린은 퓨린 유사체와 DNA 합성 억제제로서 작용을 하는 6-메르캅토피린으로 비 효소 절단된다. 면역 반응의 유도 과정에 있어서 림프구의 클론 확대(clonal expansion)를 억제함으로써 세포 면역성과 체액 면역성 둘 다에 영향을 미친다. 아자티오프린은 또한 자가 면역성을 성공적으로 억제한다. 아자티오프린은 다음과 같은 구조를 가진다.



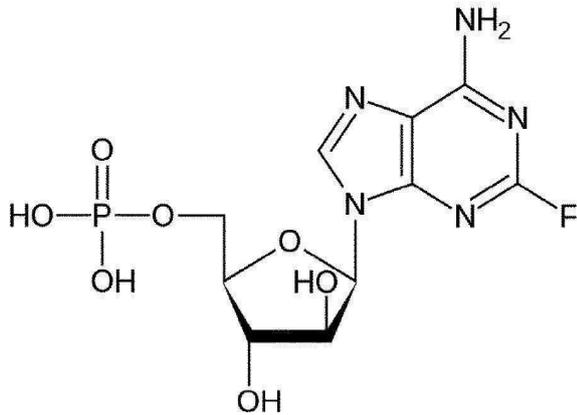
[0037]

[0038] 티오구아닌은 소아 급성 림프아구성 백혈병(ALL)의 초기 및/또는 말기 강화 요법에 사용되었던 반면에, 6-메르 캅토피린은 주로 치료의 상이한 시점에서, 즉 ALL의 유지 치료 기간 동안 사용된다. 티오구아닌은 다음과 같은 구조를 가진다.



[0039]

[0040] 플루다라빈 또는 플루다라빈 인산염(플루다라(Fludara)[®])은 만성 림프구성 백혈병과 지연형 비호지킨 림프종 치료에 사용되는 화학 요법 약물이다. 플루다라빈은 퓨린 유사체이다. 플루다라빈은, 리보뉴클레오티드 리덕타제와 DNA 중합 효소를 방해하여 DNA의 합성을 억제하고, (이러한 효소들은 DNA 복제 동안 활성이 매우 크므로) S기 특이적이다. 플루다라빈은 다음과 같은 구조를 가진다.



[0041]

[0042] “FLU”가 본원에 사용될 때, 이는 플루다라빈을 의미한다.

[0043] “VH”는 항체 또는 항체 단편의 변이 글로불린 중쇄의 가변 영역을 말한다. “VL”은 항체 또는 항체 단편의 변이 글로불린 경쇄의 가변 영역을 말한다.

[0044] “CD19”라는 용어는, CD19로 알려진 단백질을 말하며, B4, B 림프구 항원 CD19, B 림프구 표면 항원 B4, CVID3, 분화 항원 CD19, MGC12802 및 T 세포 표면 항원 Leu-12라는 동의어를 가진다.

[0045] 사람 CD19는 다음과 같은 아미노산 서열을 가진다:

[0046] MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSL

- [0047] GLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLG
- [0048] GLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSQDLTMAPGS
- [0049] TLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVWVETGLLLPRATAQDAGK
- [0050] YYCHRGNLMTSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRK
- [0051] RMTDPTRRFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQA
- [0052] DGALGSRSPPGVGPPEEEEGEGYEEPDEEDSEDFYENDSNLGDQLSQDGSYENPEDEPLGPE
- [0053] DEDSFSAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSWDPSPREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLR
- [0054] SIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGWSTR(서열 번호 7).
- [0055] “MOR208”은 항CD19 항체이다. 가변 도메인의 아미노산 서열은 도 3에 제공되어 있다. MOR208의 중쇄 및 경쇄 Fc 영역의 아미노산 서열은 도 4에 제공되어 있다. “MOR208” 및 “XmAb5574”는 도 3 및 도 4에 나타난 항체를 기술하는 동의어로서 사용된다. MOR208 항체는 미국 특허 출원 일련 번호 제12/377,251호에 기술되어 있으며, 상기 출원은 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0056] CD19에 특이적인 추가적인 항체는, 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 특허 제7,109,304호(이뮤노메딕스); 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 출원 일련 번호 제11/917,750호(메다텍스); 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 출원 일련 번호 제11/852,106호(메디문); 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 출원 일련 번호 제11/648,505호(머크 특허 주식회사); 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 특허 제7,968,687호(시애틀 제네틱스); 및 전체가 참조로 포함되어 있는 미국 출원 일련 번호 제12/710,442호(글렌마크 파마슈티컬스)에 기술되어 있다.
- [0057] “Fc 영역”이란, 사람에서 IgG1, 2, 3, 4 하위군 등의 것일 수 있는 항체의 불변 영역을 의미한다. 사람 Fc 영역의 서열은 IMGT, 휴먼 IGH C-리전스(Human IGH C-REGIONS), http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html (2011년 5월 16일 검색)에서 입수할 수 있다.
- [0058] “RefmAb33”은 아미노산 서열이 다음과 같은 항체이다:
- [0059] Fc 영역 포함 중쇄:
- [0060] QVTLRESGPALVKPTQLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKHH
 YNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWVGQTTVTVSSASTKG
 PSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKE
 YKCKVSNKALPAAPEEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPMMLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 8)
- [0061] Fc 영역 포함 경쇄:
- [0062] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASSRVGYMHWYQKPKGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRF
 SGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSYFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호 9)
- [0063] RefmAb33은 RSV에 특이적이며, MOR208의 Fc 영역과 동일한 Fc 영역을 공유하므로, 이소타입 대조군으로서 사용된다.
- [0064] “조합물”이란, 1개 초과 물질(예를 들어, 화합물), 예를 들어 항체 및 플루다라빈을 의미한다.
- [0065] 본 개시 내용은 또한 조합물, 기술된 조합물을 포함하는 약학 조성물 및 약제에 관한 것이다. 본 발명의 상승적 조합물을 이루는 성분들 2개(예를 들어, CD19에 특이적인 항체와 플루다라빈)는 함께, 동시에 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 상기 성분들 2개가 함께 투여될 때, 이 성분들은 하나의 약학 조성물로 함께 제형화될 수 있으며, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 2개의 성분들은 또한 상이한 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 경우, 상기 2개의 성분들은 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 하나의 구체예에서, 플루다라빈은 CD19에 특이적인 항체, 예를 들어 MOR208의 투여 전 및/

또는 이의 투여와 별도로 투여된다.

- [0066] 약학 조성물은 사람에게 있어서 치료제로 사용될 활성 제제, 예를 들어 항체를 포함한다. 약학 조성물은 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0067] “투여된” 또는 “투여”는 주사 가능한 형태, 예를 들어 정맥 내, 근육 내, 진피 내 또는 피하 경로 또는 점막 경로, 예를 들어 흡입형 비강 스프레이 또는 에어로졸, 또는 섭취 가능한 용액, 캡슐 또는 정제에 의한 전달을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 화합물 또는 조합물의 “치료학적 유효량”이란, 소정의 질병 또는 장애 및 이의 합병증의 임상학적 징후를 치유, 경감 또는 부분적으로 지연시키는데 충분한 양을 말한다. 구체적인 치료 목적에 유효한 양은, 질병 또는 손상의 심각성과, 피험체의 체중 및 전반적인 상태에 좌우될 것이다. 적절한 투약량의 결정은 통상의 실험을 사용하여, 수치 매트릭스를 구성하고, 매트릭스 중 상이한 지점들을 테스트함으로써 이루어질 수 있음이 이해될 것이며, 이들 모두 숙련된 전문의나 임상학의 통상적인 기술 범위 내에 포함된다.
- [0069] 본원에서 “CDR”은 Chothia et al. 또는 Kabat et al.에 의해 정의된다. 문헌[Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.*, 196(4):901-17]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다. 문헌[Kabat E.A, Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. 및 Foeller C. (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th edit., NIH Publication no. 91-3242, US Dept. of Health and Human Services, Washington, DC]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0070] “상호 경쟁하다”란, 표준적인 경쟁 결합 분석법에서 기타 다른 항체 또는 결합 제제와 CD19의 결합을 방해하는 항체 또는 기타 다른 결합 제제의 능력을 의미한다. 항체 또는 기타 다른 결합 제제가, 또 다른 항체 또는 결합 분자와 CD19의 결합을 방해할 수 있는 능력 또는 그 정도와, 그 결과 본 발명에 따라서 상호 경쟁한다고 할 수 있는지 여부는, 표준적인 경쟁 결합 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 적당한 분석법은, 표면 플라즈몬 공명 기법을 사용하여 상호 작용의 정도를 측정할 수 있는, 바이어코어(Biacore) 기법(예를 들어, 바이어코어 3000(BIACore 3000) 장치(바이어코어(Biacore), 스웨덴 옘살라 소재)의 사용을 포함한다. 상호 경쟁을 측정하는 또 다른 분석법은 ELISA 기반 접근법을 이용한다. “에피토프 결합성” 항체의 상호 경쟁성을 기반으로 하는 “에피토프 결합성” 항체의 고용량 처리 방법은 국제 특허 출원 WO 제2003/48731호에 기술되어 있다.
- [0071] “에피토프”란 용어는 항체와 특이적으로 결합할 수 있거나 아니면 분자와 상호 작용할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 포함한다. 에피토프 결정기는 일반적으로 분자, 예를 들어 아미노산이나 탄수화물의 화학 활성 표면기 또는 당 측쇄로 이루어져 있으며, 특이적인 3차원 구조 특징을 가질뿐만 아니라, 특이적 하전 특징도 가질 수 있다. 에피토프는 “선형” 또는 “입체 구조형”일 수 있다. “선형 에피토프”란 용어는, 단백질 및 상호 작용성 분자(예를 들어, 항체) 간 상호 작용 지점이 모두 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라서 직선으로 존재하는(연속으로 존재하는) 에피토프를 말한다. “입체 구조형 에피토프”란 용어는, 불연속 아미노산들이 3차원 입체 구조로 합쳐지는 에피토프를 말한다. 입체 구조형 에피토프에 있어서, 상호 작용 지점은 단백질 상에 서로 떨어져 존재하는 아미노산 잔기들에 걸쳐 존재한다.
- [0072] “~와 동일한 에피토프와 결합하다”란, 예시된 항체와 동일한 에피토프를 가지고 CD19와 결합하는 항체 또는 기타 다른 결합 제제의 능력을 의미한다. 예시된 항체 및 CD19에 대한 기타 다른 항체의 에피토프는, 표준적인 에피토프 맵핑 기법을 사용하여 결정될 수 있다. 당업계에 널리 알려져 있는 에피토프 맵핑 기법으로서는 에피토프 맵핑 프로토콜(Epitope Mapping Protocols)(*Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E.Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey)을 포함한다. 예를 들어, 선형 에피토프는 예를 들어 고품 지지체 상에 다수의 펩티드들(단백질 분자의 일부에 상응하는 펩티드들)을 동시에 합성하여 항체와 이 펩티드들을 반응시킴으로써 결정될 수 있는데, 이 때 상기 펩티드는 상기 지지체 상에 여전히 부착되어 있다. 이와 같은 기법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 미국 특허 제4,708,871호; 문헌[Geysen et al, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002]; [Geysen et al, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182]; [Geysen et al, (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715]에 기술되어 있다. 이와 유사하게, 입체 구조형 에피토프는, 예를 들어 수소/중수소 교환, X선 결정 분석법 및 2차원 핵 자기 공명법에 의해 아미노산의 공간적 입체 구조를 결정함으로써 용이하게 확인된다. 예를 들어, 상기 에피토프 맵핑 프로토콜을 참조한다. 단백질의 항원성 영역은 또한 표준적 항원성 및 소수성 관련 플롯(예를 들어, 옥스포드 몰리큘러 그룹(Oxford Molecular Group)으로부터 입수 가능한 오미가(Omega) 버전 1.0 소프트웨어 프로그램을 사용하여 산출되는 것)을 사용하여 확인될 수도 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램은 호프/우즈 법(Hopp/Woods method)(항원성 프로파일 분석)[Hopp et al, (1981) *Proc.*

Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828]; 그리고 카이트-두리클 기법(Kyte-Doolittle technique)(소수성 분석 플롯)[Kyte et al, (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132]을 이용한다.

- [0073] **구체예**
- [0074] 본 개시 내용의 양태는 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병 치료에 사용될 퓨린 유사체 및 CD19 특이적 항체의 조합물을 포함한다. 구체예에서, 상기 조합물은 상승적 조합물이다.
- [0075] 본원에서, 예시된 항CD19 항체와 플루다라빈의 조합물은 NHL 및 CLL과 관련된 시험관 내 및 생체 내 모델에서 상승적으로 거동하였다. NHL 및 CLL은 둘 다 B 세포 관련 장애이고, CD19는 B 세포 상에서 고도로 발현되므로, 예시된 조합물은 작용 기작이 동일할 것이며 또한 기타 다른 B 세포 관련 장애, 예를 들어 ALL의 치료에 있어서 상승적으로 거동할 것이다. 그러므로, CD19에 특이적인 예시된 항체와 플루다라빈의 조합물은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병에서 사람의 치료에 효과적일 것이다.
- [0076] 플루다라빈과 기타 다른 퓨린 유사체들의 작용 기작은 퓨린 유사체들이 핵산의 합성을 방해한다는 점에서 유사하므로, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병이 있는 사람들을, 예시된 항 CD19 항체와 플루다라빈 이외의 퓨린 유사체, 예를 들어 메르캅토피린, 아자티오프린 및 티오구아닌의 조합물로 치료할 때 상승 효과가 또한 보여질 것으로 여겨진다.
- [0077] 예시된 항CD19 항체와 기타 다른 항CD19 항체는 CD19 항원과 결합하므로, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병이 있는 사람들을, 임의의 항CD19 항체와 퓨린 유사체의 조합물로 치료할 때 상승 효과가 또한 보여질 것으로 여겨지며, 여기서 항CD19 항체는 예를 들어 미국 특허 출원 일련 번호 제 12/377,251호(젠코), WO 제2005012493호, WO 제2010053716호(이뮤노메딕스); WO 제2007002223호(메다렉스); WO 제2008022152호(젠코), WO 제2008031056호(메디문); WO 제2007/076950호(머크 특허 주식회사); WO 제 2009/052431호(시아틀 제네틱스); 및 WO 제2010095031호(글렌마크 파마슈티컬스)에 기술되어 있으며, 이들은 모두 전체가 참조로 포함되어 있다.
- [0078] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 상호 경쟁하는 항체를 포함한다.
- [0079] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.
- [0080] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함한다.
- [0081] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 EVQLVESGGGLVPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKYNEKFQGRVTISSDKSI STAYMELSSLRSEDTAMYYCARGIYYGTRVFDYWG QGTLVTVSS(서열 번호 10)인 가변 중쇄와, 서열이 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLL IYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK(서열 번호 11)인 가변 경쇄를 포함한다.
- [0082] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYCK VSNKALPAPEEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 12)인 중쇄 불변 도메인을 포함한다.
- [0083] 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호 13)인 경쇄 불변 도메인을 포함한다.

- [0084] 구체예에서, 퓨린 유사체는 플루다라빈이다.
- [0085] 구체예에서, 조합물의 성분들, 즉 CD19에 특이적인 항체와 플루다라빈은 별도로 투여된다. 하나의 구체예에서, 플루다라빈은 CD19에 특이적인 항체를 투여하기 전에 투여된다.
- [0086] 구체예에서, 조합물은 약학 조성물이다. 구체예에서, 조성물은 허용 가능한 담체를 포함한다. 구체예에서, 조합물은 유효량으로 투여된다.
- [0087] 하나의 양태에서, 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 CD19에 특이적인 항체와 플루다라빈의 상승적 조합물은, 분리된 사람 PBMC의 존재 하에 ADCC에 의해 MEC-1 세포의 사멸을, 플루다라빈 단독에 비하여 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상 또는 5배 이상 우수한 효능으로 매개한다.
- [0088] 본 개시 내용의 하나의 양태는, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료를 위한, 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함하는 CD19에 특이적인 항체와 플루다라빈의 상승적 조합물을 포함한다. 구체예에서, 비호지킨 림프종은 여포성 림프종, 소 림프구성 림프종, 점막 연관 림프 조직 림프종, 변연부 림프종, 미만성 거대 B세포 림프종, 버킷 림프종 및 외투 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0089] 또 다른 양태는 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프아구성 백혈병의 치료를 필요로 하는 개체 내에서 상기 병을 치료하는 방법을 포함하는데, 여기서 상기 방법은 CD19에 특이적인 항체와 퓨린 유사체의 투여를 포함한다. 상기 방법의 구체예에서, CD19에 특이적인 항체는 서열이 SYVMH(서열 번호 1)인 HCDR1 영역, 서열이 NPYNDG(서열 번호 2)인 HCDR2 영역, 서열이 GTYYYGTRVFDY(서열 번호 3)인 HCDR3 영역, 서열이 RSSKSLQNVNGNTYLY(서열 번호 4)인 LCDR1 영역, 서열이 RMSNLNS(서열 번호 5)인 LCDR2 영역 및 서열이 MQHLEYPIT(서열 번호 6)인 LCDR3 영역을 포함한다. 상기 방법의 구체예에서, 퓨린 유사체는 플루다라빈이다.
- [0090] **실시예**
- [0091] 실시예 1: MOR208과 플루다라빈을 단독 또는 조합하여 사용하였을 때 MEC-1 세포 증식의 억제
- [0092] 재료
- [0093] MEC-1 세포: 만성 B 세포 백혈병 세포주 DSMZ# ACC497; 세포 배지: 이스코브의 개질 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM)(글루타맥스(GlutaMAX)TM(인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 번호: 31980-048), 20% FCS; PBMC: RPMI1640, 안정적인 글루타민(판 바이오텍 게엠베하(PAN Biotech GmbH), 카탈로그 번호: P04-13500)(10% FCS 보충됨); 바이오콜(Bioco11)(바이오크롬 아게(Biochrome AG) 카탈로그 번호: L6115 로트 번호: 1050T; 플루다라빈(바이엘(Bayer)사, ddH₂O 1ml당 25mg, 로트 번호: 9100ST); 및 RefmAb33(항 RSV)(MOR208의 Fc 영역과 동일한 영역을 가짐) 포함).
- [0094] 방법
- [0095] MOR208 및 플루다라빈을 단독으로 투여하였을 때와 조합하여 투여하였을 때의 세포 독성을 MEC-1 세포 내에서 테스트하였다. FLU는 퓨린 유사체이므로, MEC-1 세포 내에서 직접적인 세포 독성을 나타냄으로써 작용한다. MOR208은 CD19를 표적화하고, 추가적으로 MEC-1 세포 사멸에 있어서 ADCC를 통해 작용한다. FLU(18 μ g/ml); MOR208(66pm), 그리고 MOR208(66pm)과 FLU(18 μ g/ml)의 조합물 군에 대하여 MEC-1 세포를 사멸을 측정하였다. 이들 농도가 MOR208 및 FLU에 대한 EC50 근처이거나 EC50이므로, 이들 농도를 선택하였다.
- [0096] FLU 군과 MOR208+FLU 조합물 군에 있어서, ADCC 분석 측정 전 MEC-1 세포를 FLU와 함께 72시간 동안 예비 항온 처리하였다. MEC-1 세포를 칼세인 AM 1mg/ml를 사용하여 염색한 다음, 계수하여 2×10^5 /ml로 조정하였다. PBMC를 계수하여 6×10^6 /ml로 조정하였다. ADCC 분석은 다음과 같이 수행하였다: 96웰 평판을 사용하였으며, 웰당 MEC-1 세포의 세포 현탁액 100 μ l를 첨가한 다음, 각각의 웰에 PBMC의 세포 현탁액 100 μ l를 첨가하여, E:T의 비율을 30:1로 만들었다. 항체를 배지 중 1 μ g/ml로 희석하였다. 세포를 원심 분리하여 재현탁하였다. 표적:효과 기 세포 펠렛에 100 μ l 항체 용액 또는 이에 따른 대조군 용액을 첨가하였다. 이 혼합물을 CO₂ 항온

처리기(37℃) 내에서 4시간 동안 항은 처리하였다. 다음과 같이 ADCC를 측정을 수행하였다: 항은 처리된 세포 용액 약 100 μ l를 FACS 튜브들에 옮겨담은 후, 각각의 튜브에 FACS 완충액(DPBS+3% FCS) 200 μ l와 PI 스톱 용액 0.5 μ l를 첨가하였다. FACS-캘리버를 사용하였다. 사멸된 MEC-1 세포를 요오드화프로피듐으로 염색하였다.

[0097] 이하 표 1 및 도 1은 미가공 데이터를 나타낸다.

[0098] [표 1]

| | 대조군 | MOR208 66pm | FLU 18 μ g/ml | FLU+MOR208 조합물 |
|------|------|-------------|-------------------|-------------------|
| 실험 1 | 11 | 35.2 | 36.39 | 52.14 |
| 실험 2 | 19.5 | 29.8 | 38.48 | 46.9 |
| 실험 3 | 29.9 | 47.01 | 57.27 | 65.63 |

[0099]

[0100] 상기 수치들은 세포 사멸률(%)을 나타낸다. 각각의 실험은 상이한 공여체로부터의 PBMC를 나타낸다. 실험 1과 실험 2에 사용된 대조군은 RefMab33이었다. 실험 3에 사용된 대조군은 PBMC만이였다.

[0101] 표 2는, 비 사멸률에 대해 정규화한 표 1의 미가공 데이터 및 상승 효과를 측정하기 위해 수행된 추(Chou)의 산정 결과를 나타낸다.

[0102] [표 2]

| | 플루다라빈 18 μ g/ml | MOR208 66pm | FLU+MOR208 (조합물) | 추 지수 (Chou Index) |
|------|------------------------|-------------|---------------------|----------------------|
| 실험 1 | 0.6 | 0.6 | 1.0 | 0.03 |
| 실험 2 | 0.7 | 0.4 | 1.0 | 0.3 |
| 실험 3 | 0.8 | 0.5 | 1.0 | 0.3 |
| 평균 | 0.7 | 0.5 | 1.0 | 0.2 |

[0103]

[0104] 상기 표 2에 나타난 수치들은 다음과 같이 산정하였다: 1) 표 1에 나타난 미가공 데이터(세포 사멸률 %)로부터 백그라운드(대조군)를 공제하여, 각각의 처리군에 대한 비사멸률을 구한 다음; 2) MOR208+FLU의 조합 투여시 비 사멸률 값을 1로 설정하여 비 사멸률 수치들을 정규화하였다. 표 2의 평균 수치들은 도 5에 도시하였다. MOR208+FLU의 조합 투여시 추 인자 산정에 사용된 ADCC 용량 반응 곡선의 일례가 도 2에 나타내어져 있다.

[0105] MOR208 및 FLU를 각각 단독으로 투여하였을 때와 비교하여 본원에 예시된 항CD19 항체와 플루다라빈을 조합하여 투여하였을 때의 상승 작용을 분석하기 위해서 추 지수(CI)를 산정하였다. 산정법은 전체가 참조로 포함되어 있는 문헌[Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006)], 및 전체가 참조로 포함되어 있는 문헌 문헌[Chou TC, Talalay P, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22: 27-55 (1984)]에 기술되어 있다. CI-이소볼법(CI-Isobol method)을 사용하여 추-텔러레이법(Chou-Talalay method)을 수행하였다.

[0106] 중앙 효과 등식(Median-effect equation)

[0107] 억제제(예를 들어, 약물)의 효과에 대한 중앙 효과 등식 모델은 $F_a/F_u = (D/D50)^m$ 로서, 이 식 중 D는 용량이고, F_a 및 F_u 는 용량 D에 의해 영향을 받거나 영향을 받지 않은 시스템의 비율이며($F_a + F_u = 1$); D50은 중앙 효과를 나타내는 용량(예를 들어, IC50, ED50, LD50)이다. 상수 m은 용량-효과 곡선의 모양을 결정한다. 본 발명자들은 엑셀 핏(Excel Fit) 소프트웨어를 사용하여 선형 회귀 연산을 수행하여 매개 변수 m 및 D50을 추정하였다.

[0108] MEC-1 세포에 대한 조합물의 효과는 상기 기술된 바와 같이 세포 사멸률(%)로서 측정된다. 본 발명자들은 비율 F_u 를, 처리된 세포주의 세포 사멸률(%) 대 대조군에 노출된 세포주의 세포 사멸률(%)의 비율로서 정의하였다. 즉,

[0109] $F_u = (\text{처리된 세포주의}) \text{ 세포 사멸률}(\%) / (\text{미처리 세포주의}) \text{ 세포 사멸률}(\%).$

[0110] 여기서, 세포주의 세포 사멸률(%)은 상기 중앙 효과 등식에서 상수 D50으로서, 이 D50은 상기 기술된 선형 회귀 법에 의해 추정될 수 있다.

[0111] CI-이소볼법

[0112] CI-이소볼법은 약물간 상승 작용의 정량적인 평가를 제공한다. 조합 지수(combination index; CI)는 단일 약물 치료 및 조합된 약물 치료의 용량-효과 데이터로부터 추정하였다. CI 수치가 1 미만인 것은 상승 작용을 나타내고; CI 수치가 1인 것은 부가 효과를 나타내며; CI 수치가 1보다 큰 것은 길항 작용을 나타낸다. CI 수치가 1에서 멀어질수록 약물의 상호 작용(상승 작용 또는 길항 작용)은 더 뚜렷하게 된다.

[0113] 공식적으로 조합된 약물 치료의 조합 지수(CI)는 $CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$ 로 정의된다. 상기 식 중, D1 및 D2는 각각 조합물을 이루는 약물 1과 약물 2의 용량이고; Dx1 및 Dx2는 조합물과 동일한 효과를 제공할 약물 1과 약물 2를 단독으로 이용한 치료시의 용량이다. 용량 Dx1 및 Dx2는 단일 약물 치료의 용량-효과 데이터로부터 추정되어야 한다. 본질적으로, 중앙 효과 등식은 각각의 약물의 데이터에 맞추어진다. 약물의 중앙 효과 등식으로부터 효과 (즉, Fa, Fu)를 나타내는데 필요한 용량(즉, D)을 추정할 수 있다. 지점이 부가 선으로부터 멀리 떨어져 있을수록 1과 CI 간 차이가 더욱 큰 것이므로, (상승 또는 길항) 효과가 더욱 강력하게 된다.

[0114] 결과

[0115] 표 2에 나타낸 바와 같이, 추 지수 수치는 MEC-1 세포의 비 사멸에 있어서 MOR208 및 플루다라빈의 조합물이, MOR208 및 플루다라빈 단독과 비교하여 명확한 상승 효과를 나타낸다. 이러한 결론은, 각각 3회의 실험에서 추 산정치가 각각 0.03, 0.3 및 0.3이고, 평균치는 0.21이며, CI는 1 미만(상승 효과)이라는 데이터를 바탕으로 한다. 그러므로, MOR208 및 플루다라빈의 조합물은 또한 사람에서 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프성 백혈병 (CLL) 및/또는 급성 림프아구성 백혈병(ALL)의 치료에 있어서 상승적으로 거동할 것이다.

[0116] 상기 추 산정법의 결과를 확인하기 위해서, 표 2의 정규화된 데이터를 본페로니 중다비교검정법을 사용하여 통계학적 유의성에 대해 평가하였다. 문헌[James, et al, Antibody-mediated B-cell depletion before adoptive immunotherapy with T cells expressing CD20-specific chimeric T-cell receptors facilitates eradication of leukemia in immunocompetent mice, Blood, 114(27): 5454-63 (Epub 2009 Oct 30)]을 참조하며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다. 결과는 이하 표 3에 나타내어져 있다.

[0117] [표 3]

| 본페로니 중다비교검정법 | 평균 편차 | T 수치 | 유의성 여부 (P<0.05) | 요약 |
|----------------------------------|---------|-------|-----------------|-----|
| 플루다라빈(18 µg/ml) 대 FLU+MOR208 조합물 | -0.3067 | 5.039 | 유 | ** |
| MOR208(66pm) 대 FLU+MOR208 조합물 | -0.5167 | 8.490 | 유 | *** |
| ** p<0.01 | | | | |
| *** p<0.001 | | | | |

[0118]

[0119] 결과

[0120] 표 3에 나타낸 바와 같이 본페로니 중다비교검정법은, FLU+MOR208의 병용 치료가 FLU와 MOR208의 단독 치료보다 MEC-1 세포의 비 사멸에 있어서 통계적으로 더 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0121] 실시예 2: 피하(SC) 이식된 사람의 라모스 버킷 B 세포 림프종 중앙 성장 모델에서 MOR208과 FLU 단독 및 병용

[0122] 재료

[0123] RAMOS 사람 버킷 림프종 세포(ATCC 번호 CRL-1596, 로트 번호 3953138); 비히클 대조군: 0.9% 염화나트륨, 25 mg/ml 만니톨, pH 7.0; SCID 마우스(애들레이드 대학교 웨이트 캠퍼스, 오스트레일리아 남호주주 얼바리에 소재; 변종 C.B.-17-1gh-1^b-Prkdc^{scid}).

[0124] 방법

[0125] 6주령 내지 7주령 암컷 C.B-17 SCID 마우스에 RAMOS 세포(약 5×10⁶ 세포/마우스)를 피하 주입하였다. 접종한 후 14일 경과시 마우스들을 10개의 군(군당 8마리)으로 나누었는데, 여기서 각각의 군은 중앙 부피가 비교적 동일한 크기이었다. 치료는 제14일 경과시에 시작하였다. 치료 계획은 표 4에 제공되어 있다. 본 연구 지속기간은 63일이었다.

[0126] [표 4]

| 동물의 수 | 테스트 약물 | 용량(mg/kg) | 치료 경로 및 스케줄 |
|-------|--------------|---------------|--|
| 8 | 플루다라빈 | 125 | IP, Q1D×5 |
| 8 | 플루다라빈 | 250 | IP, Q1D×5 |
| 8 | MOR208 | 1* → 10 | 14일*, 17일*, 21일*, 24일, 28일, 31일, 35일 및 38일 |
| 8 | 비히클 | | IP, Q1D×5 |
| 8 | MOR208/플루다라빈 | 1* → 10 / 125 | 14일*, 17일*, 21일*, 24일, 28일, 31일, 35일 및 38일 / IP, Q1D×5 |

[0127]

[0128] MOR208, 플루다라빈 및 비히클을 체중 10g당 0.1ml의 부피로 투여하였다. 초기 관독값은 종양 성장, 구체적으로 연구 시작한 지 38일 경과시의 종양 부피이었다. 등식 $(I \times w^2) / 2$ (식 중, I 및 w는 각각의 측정 시점에서 수집한 큰 치수들 및 작은 치수들임)을 사용하여 종양의 중량을 산정하였다.

[0129] 그 결과는 표 5에 나타내어져 있으며, 평균값은 도 6에 도시되어 있다.

[0130] [표 5]

| 연구 시작후 38일 경과시 종양 부피(mm ³) | 비히클 대조군 | MOR208 10mg/kg | 플루다라빈 125mg/kg | 플루다라빈 250mg/kg | 조합물: MOR208/FLU 125 |
|--|---------|----------------|----------------|----------------|---------------------|
| 제1군 | 2890 | 2138 | 1666 | 1352 | 1268 |
| 제2군 | 4400 | 2025 | 2560 | 1352 | 750 |
| 제3군 | 4200 | 3179 | 864 | 2816 | 726 |
| 제4군 | 4152 | 1764 | 1913 | 1764 | 446 |
| 제5군 | 3791 | 1862 | 3564 | 650 | 936 |
| 제6군 | 4513 | 3402 | 2560 | 787 | 1268 |
| 제7군 | 4152 | 2560 | 2025 | 1800 | 787 |
| 제8군 | | 2816 | 1437 | 787 | |
| 평균 | 4014 | 2468 | 2073 | 1413 | 883 |

[0131]

[0132] 연구 시작후 38일 경과시 종양 부피의 최종 값 이외에, 매개 변수, 즉 1) 38일 경과시 종양 성장 감소율(%) 및 2) 종양이 4000mg이 될 때까지의 시간 증가율(%)을 평가하였다. 그 결과는 표 6에 나타내어져 있다.

[0133] [표 6]

| 처리군 | 연구 시작후 38일 경과시 종양 성장 감소율(%) | 4000mg이 될 때까지의 시간 증가율(%) |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| MOR208 | 38.5 | 17.52 |
| FLU125 | 48.3 | 22.37 |
| FLU250 | 64.8 | 30.19 |
| MOR208 및 FLU125의 조합물 | 78 | 59.3 |
| 대조군 | 0 | 0 |

[0134]

[0135] 분할 적 개념(Fractional Product Concept; FPC)을 사용하여 표 6에 나타낸 최종 값 둘 다를 분석함으로써, MOR208 및 FLU 단독 치료와 비교하여 MOR208 및 FLU 치료의 병용 치료를 이용하여 상승 작용이 존재하는지 여부를 결정하였다. 조합 치료군이 FPC 산정값보다 더 효과적이라면, 상승 작용이 존재한다. 분할 적 개념은 문헌 [Webb, J. L. (1963) Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York]에 의해 기술된 바와 같은 공식 $1 - [(1-A)^* (1-B)] = fpc(\%)$ 를 사용하여 산정하였으며, 상기 문헌은 전체가 참조로 포함되어 있다. FPC 산정을 완료한 후, FPC 수치를 1로 설정함으로써 구하여진 FPC 수치와 표 6에 제시된 수치들을 정규화하였다. 이러한 산정 결과들은 표 7에 나타내어져 있다.

[0136] [표 7]

| | MOR208 (10mg/kg) | 플루다라빈 (125mg/kg) | 플루다라빈 (250mg/kg) | 분할 적 조합물 | MOR208+ FLU125 조합물 | 효과 |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|--------------------------|-------|
| 연구 시작후 38일 경과시 종양 성장 감소율(%) | 0.57 | 0.75 | 0.9 | 1 | 1.15 | 상승 작용 |
| 4000mg이 될 때까지의 시간 증가율(%) | 0.48 | 0.62 | 0.8 | 1 | 1.65 | 상승 작용 |

[0137]

[0138] **결과**

[0139] 2개의 최종 값들, 즉 연구 시작후 38일 경과시 감소된 종양 성장율(%)과 4000mg이 될 때까지의 시간 증가율(%)은 둘 다 모두 종양 성장 억제에 대한 척도였으며, MOR208+FLU125의 조합물은 MOR208과 FLU 단독에 비하여 분명한 상승 작용을 나타내었다.

[0140] 상기 FPC 산정값 결과를 확인하기 위해서, 연구 시작후 38일 경과시 평균 종양 부피(mm³)에 대한 데이터(표 5에 나타냄)를 본페로니 중다비교검정법을 사용하여 통계학적 유의성에 대해 평가하였다. 그 결과들은 표 8에 나타내어져 있다.

[0141] [표 8]

| 처리군 | 본페로니 중다비교검정법; p 수치 |
|-----------------------------|--------------------|
| FLU125 대 FLU125+MOR208(조합물) | p<0.01 |
| FLU250 대 FLU125+MOR208(조합물) | n.s. |
| MOR208 대 FLU125+MOR208(조합물) | p<0.001 |
| 대조군 대 FLU125 | p<0.001 |
| 대조군 대 FLU250 | p<0.001 |
| 대조군 대 FLU125+MOR208(조합물) | p<0.001 |
| 대조군 대 MOR208 | p<0.001 |

[0142]

[0143] p 수치가 < 0.05임은 통계학적으로 유의함을 나타낸다.

[0144] **결과**

[0145] 표 5 및 표 6에 나타낸 바와 같이, 모든 매개 변수에서 MOR208과 플루다라빈 125mg/kg의 조합물은 MOR208 또는 플루다라빈 단독보다 생체 내 종양 성장 억제에 있어서 더 효과적이었다. MOR208 및 플루다라빈 단독보다 MOR208과 플루다라빈 125mg/kg 조합물의 생체 내 종양 성장 억제에서의 유효성의 이러한 증가는 표 8에 나타낸 바와 같이 통계적으로 유의한 것으로 확인되었다. 추가적으로, 분할 적 개념 산정은, 표 7에 나타낸 바와 같이 MOR208 또는 플루다라빈 단독보다 생체 내 종양 성장 억제에 있어서 MOR208과 플루다라빈 125mg/kg 조합물의 분명한 상승 작용을 나타낸다. 그러므로, MOR208과 플루다라빈의 조합물은 또한 사람의 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및/또는 급성 림프아구성 백혈병(ALL)의 치료에서 상승적으로 거동할 것이다.

[0146] 추가적으로, MOR208과 플루다라빈 125mg/kg의 조합물은 더 높은 용량인 플루다라빈 250mg/kg 단독보다 생체 내 종양 성장 억제에 있어서 더 효과적이었다. 플루다라빈은 더 높은 용량에서 상당한 부작용을 나타내었으므로, 이러한 결과는 고용량의 플루다라빈에 대한 더 안전하고 더 효과적인 대안이 MOR208과 플루다라빈의 조합물이라는 것을 나타낸다.

[0147] **실시예 3:** SCID 마우스 중 사람 비호지킨 RAMOS 종양 생존 모델에서 MOR208과 FLU 단독 및 병용

[0148] **재료**

[0149] 사이클로포스파미드(플루카(Fluka), 스위스 부쉬 소재, 로트 번호 07551661); 비히클 대조군: 0.9% 염화나트륨, 25mg/ml 만니톨, pH 7.0; SCID 마우스(애들레이드 대학교 웨이트 캠퍼스, 오스트레일리아 남호주주 얼바리에 소

재; 변종 C.B.-17-1gh-1^b-Prkdc^{scid}); RAMOS 사람 림프종 세포(ATCC 번호 CRL-2638).

[0150] 방법

[0151] SCID 마우스를 사이클로포스파미드(18mg/kg, i.p., 매일 2회)로 2일(-4일 및 -5일) 동안 예비 처리한 다음, RAMOS 세포를 접종하였다. 접종한 날(-3일) 마우스를 10개의 군(각 군당 8마리 마우스)으로 분리하고 나서, 이 개체들에 1×10^6 개의 RAMOS 세포를 각각 꼬리 정맥에 정맥 내 주사로 접종하였다. 각각의 군에 있어서의 투약 계획은 표 9에 나타내었으며, 0일에 시작하였다. 연구 지속 기간은 3주였다.

[0152] [표 9]

[0153] 투약 계획

| 군 | 화합물 | 치료 | 계획된 스케줄 |
|----|--------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| A | 플루다라빈 | 125mg/kg, i.p., 10ml/kg | 매일 1회(0일 내지 5일) |
| B | MOR208 | 3mg/kg, i.v., 10ml/kg | 매주 2회, 총 3주 |
| C | 비히클 대조군 | i.p., 10ml/kg | 매일 1회(0일 내지 5일) |
| AB | 플루다라빈/MOR208 | 125mg/kg, i.p.; 3mg/kg, i.v., 10ml/kg | 매일 1회(0일 내지 5일)/ 매주 2회, 총 3주 |
| E | 플루다라빈 | 250mg/kg, i.p., 10ml/kg | 매일 1회(0일 내지 5일) |

[0154]

[0155] 관독값은 생존 시간의 중앙 값(일 수)이다. 개별 처리군에 비하여 조합물의 효과가 상승적인지 여부를 평가하기 위하여, Clark et al.의 방법을 사용하였다.

[0156] Clarke et al. 상승 작용 분석법

[0157] 본 방법은 유방암과 기타 다른 모델에서 행하여진 실험적 세포 독성 제제의 생체 내 연구에서 실험 설계 및 최종 분석에 관한 간행물[Breast Cancer Research and Treatment 46:255-278 (1997)]에 기술되어 있으며, 상기 간행물은 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0158] 데이터는 다음과 같은 방법으로 분석되며,

[0159] 길항 작용: $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$

[0160] 부가 작용: $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$

[0161] 상승 작용: $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$

[0162] 상기 식 중, A는 MOR208을 이용한 치료이고; B는 FLU를 단독으로 이용한 치료이며; C는 치료 비히클에 대한 반응이고; AB는 치료 A와 B의 조합이다. 각각의 연구 군에 대한 생존 시간의 중앙 값(일 수)과 Clarke et al. 분석값은 표 10에 나타내어져 있다.

[0163] [표 10]

| | 생존 시간의 중앙 값(일 수) |
|-----------------------|------------------|
| A = MOR208 치료에 대한 반응성 | 23.5 |
| B = FLU 치료에 대한 반응성 | 22 |
| C = 치료 비히클에 대한 반응성 | 18.5 |
| AB = 치료 A와 B의 조합 | 31 |
| (AB) / C | 1.675675676 |
| | 더 큼 |
| (A/C)×(B/C) | 1.510591673 |
| | = 상승 작용 |

[0164]

[0165] 결과

[0166] MOR208과 FLU의 조합물은 MOR208과 FLU 단독에 비하여 생존일 중앙 값에서 분명한 상승 작용을 나타내었다.

[0167] 상기 상승 작용 산정값의 결과를 확인하기 위해서, MOR208과 플루다라빈 125mg/kg의 조합물의 생존 시간의 중앙

값(일 수)을 맨텔-헨첼 테스트(Mantel-Haenszel test)[P 수치] 및 게한-윌콕슨 테스트(Gehan-Wilcoxon test)[P 수치]를 사용하여 MOR208과 플루다라빈 단독과 비교하였다. 결과는 표 11에 나타내어져 있다.

[0168] [표 11]

| 처리군 | 맨텔-헨첼 테스트[P 수치] | 게한-윌콕슨 테스트[P 수치] |
|------------------|-----------------|------------------|
| FLU/MOR 대 FLU125 | 0.0008 | 0.0012 |
| FLU/MOR 대 MOR | 0.0001 | 0.0004 |
| FLU/MOR 대 FLU250 | 0.0011 | 0.0016 |
| FLU/MOR 대 대조군 | 0.0001 | 0.0004 |
| 대조군 대 FLU125 | 0.0061 | 0.0162 |
| 대조군 대 FLU250 | 0.0061 | 0.0162 |
| 대조군 대 MOR208 | <0.0001 | 0.0002 |

[0169]

[0170] 결과

[0171] 도 10은, MOR208과 플루다라빈 125mg/kg의 조합물이 MOR208 및 플루다라빈 단독 둘 다에 비하여 버킷 림프종 SCID 마우스 모델에 있어서 생존 시간 중앙 값을 상승적으로 증가시켰음을 나타낸다. MOR208과 플루다라빈 125 mg/kg 조합물의 생체 내 생존 시간 중앙 값의 이러한 증가는 표 11에 나타낸 바와 같이 MOR208 및 플루다라빈 단독 둘 다에 비하여 통계적으로 유의한 것으로 확인되었다. 그러므로, MOR208과 플루다라빈의 조합물은 또한 사람의 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 급성 림프아구성 백혈병(ALL)의 치료에서 상승적으로 거동할 것이다.

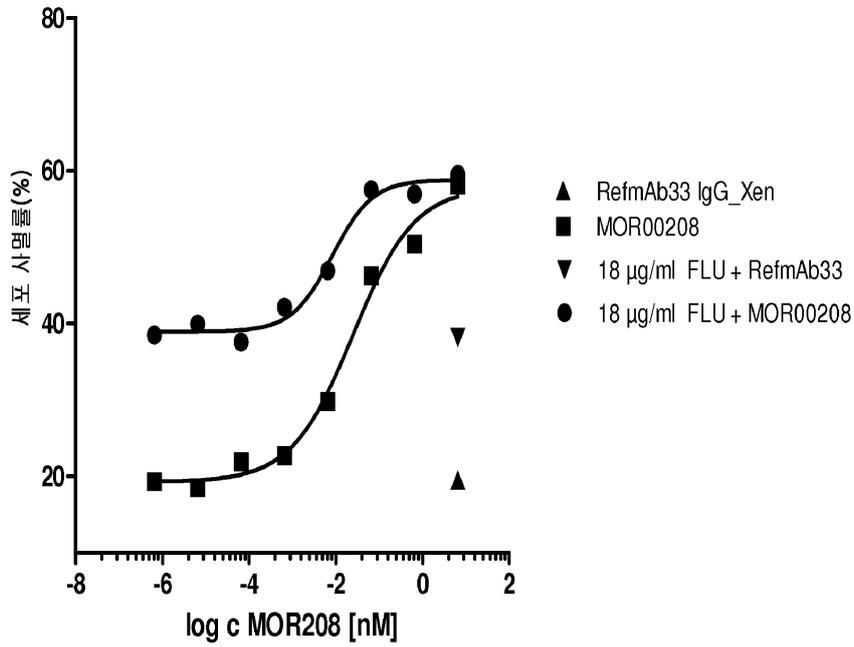
[0172] 추가적으로, MOR208과 플루다라빈 125mg/kg의 조합물은 더 높은 용량인 플루다라빈 250mg/kg 단독보다 생체 내 생존 시간 중앙 값의 증가에 있어서 더 효과적이었다. 플루다라빈은 자체의 효능에도 불구하고 더 높은 용량에서 상당한 부작용을 나타내었으므로, 이러한 결과는 고용량의 플루다라빈에 대한 더 안전하고 더 효과적인 대안이 MOR208과 플루다라빈의 조합물이라는 것을 나타낸다.

[0173] 상세한 설명, 구체적 실시예 및 데이터(예시적인 구체예를 나타냄)는 본 발명의 예시로서 제공된 것이지만 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 발명의 범위 내의 다양한 변화와 변형은 본원에 포함된 논의, 개시 내용 및 데이터로부터 당업자들에게 명백하게 될 것이며, 따라서 본 발명의 일부로 간주된다.

도면

도면1

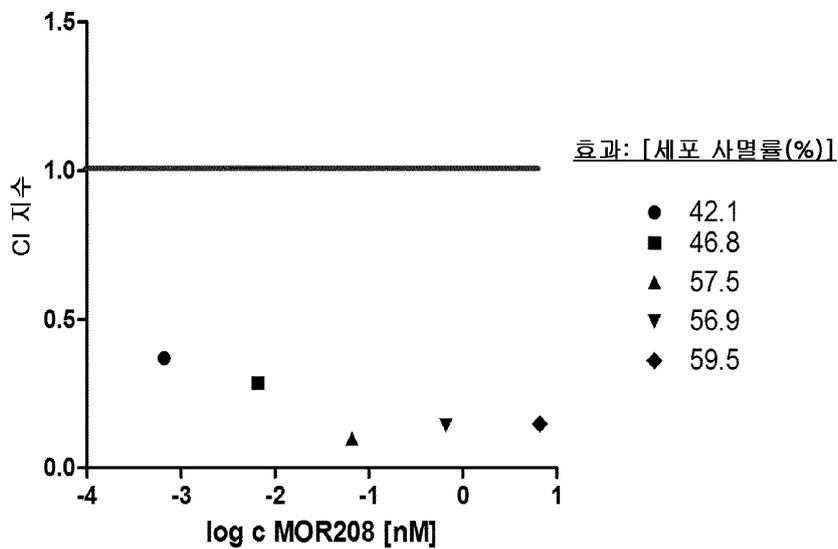
MOR208 및 FLU 단독 및 조합시의 세포 독성



도면2

ADCC 용량 반응 곡선

플루다라빈 18 µg/ml 와 MOR208의 조합물



도면3

MOR208 가변 중쇄 도메인의 아미노산 서열:
(CDR들은 굵은 글씨에 밑줄을 쳐서 표시됨)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLKLSCAASGYTFT**SYVMH**WVRQAPGKGLEWIGY**INPY**
NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYICAR**GTYYYGTRVFDY**WG
QGTLVTVSS (서열 번호 10)

MOR208 가변 경쇄 도메인의 아미노산 서열:
(CDR들은 굵은 글씨에 밑줄을 쳐서 표시됨)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSC**RSSKSLQNVNGNTYLY**WFQQKPGQSPQLLI**YR**
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYC**MQHLEYPIT**FGAGTKLEIK
(서열 번호 11)

MOR208 HCDR1의 아미노산 서열: SYVMH (서열 번호 1)

MOR208 HCDR2의 아미노산 서열: NPYNDG (서열 번호 2)

MOR208 HCDR3의 아미노산 서열: **GTYYYGTRVFDY**
(서열 번호 3)

MOR208 LCDR1의 아미노산 서열: **RSSKSLQNVNGNTYLY**
(서열 번호 4)

MOR208 LCDR2의 아미노산 서열: RMSNLNS (서열 번호 5)

MOR208 LCDR3의 아미노산 서열: **MQHLEYPIT** (서열 번호 6)

도면4

Fc 영역들의 서열

MOR208 중쇄 Fc 영역의 아미노산 서열:

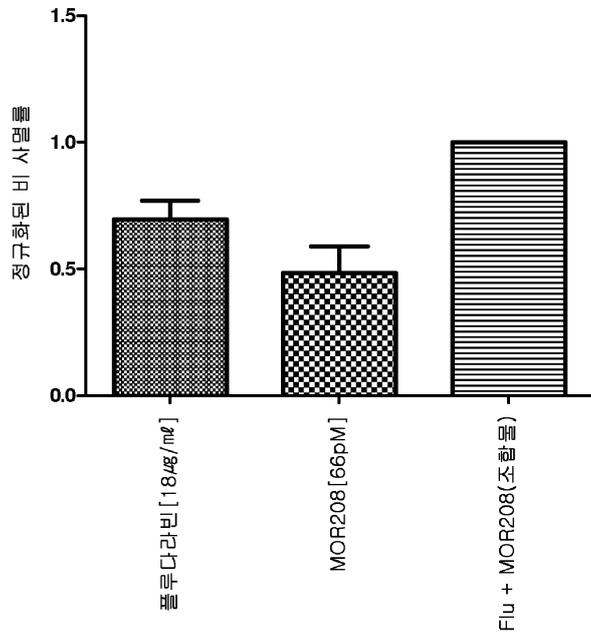
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호 12)

MOR208 경쇄 Fc 영역의 아미노산 서열:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 13)

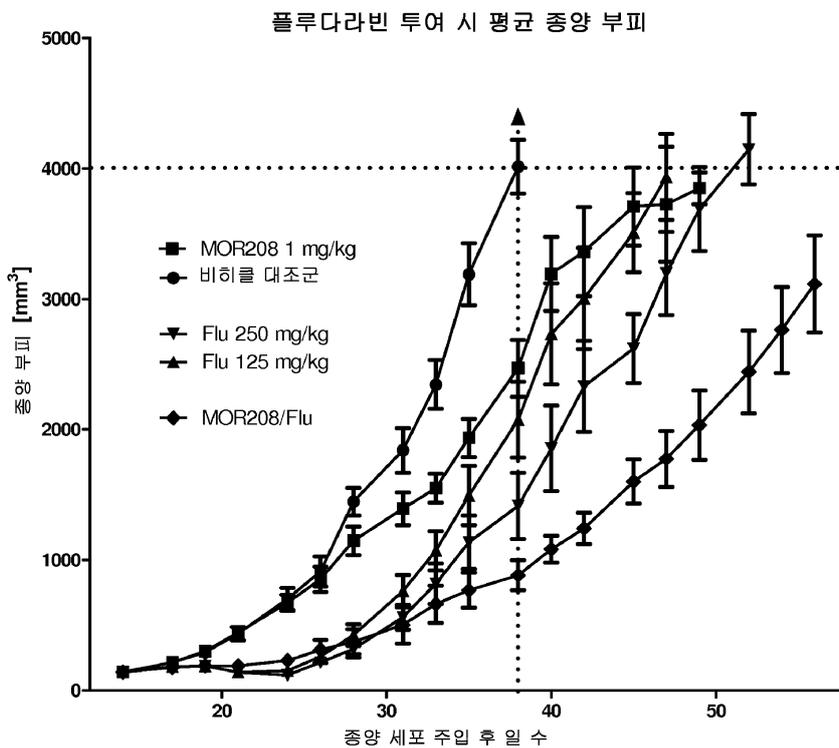
도면5

정규화된 비 사멸률; SD; ADCC 전 72시간 동안 플루다라빈(Flu)으로 전처리된 MEC-1 표적 세포; 3개의 상이한 효과기 세포 공여체를 사용한 3가지 독립적 실험의 플.



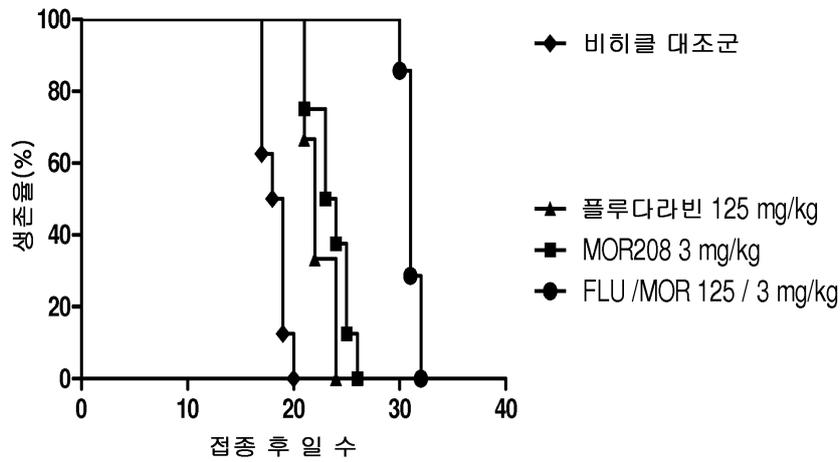
본 도면은 표 2에 나타난 데이터의 평균을 나타낸다.

도면6



도면7

SCID 마우스 모델에서 생존 시간의 중앙 값



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MorphoSys AG
 <120> Combinations and uses thereof
 <150> EP11177660.5
 <151> August 16, 2011
 <150> US 61/523,862
 <151> August 16, 2011
 <160> 13
 <170> BiSSAP 1.0
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> synthetic construct
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..5
 <223> /mol_type="protein"
 /note="HCDR1"
 /organism="synthetic construct"
 <400> 1
 Ser Tyr Val Met His

1 5
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> synthetic construct

 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..6
 <223> /mol_type="protein"
 /feature="HCDR2 "
 /organism="synthetic construct"

<400> 2
 Asn Pro Tyr Asn Asp Gly
 1 5
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> synthetic construct
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..12
 <223> /mol_type="protein"
 /feature="HCDR3 "
 /organism="synthetic construct"

<400> 3
 Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 16
 <212>
 PRT
 <213> synthetic construct
 <220>
 <221> SOURCE

```

<222> 1..16
<223> /mol_type="protein"
      /note="LCDR1 "
      /organism="synthetic construct"
<400> 4
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1           5           10           15
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> synthetic construct
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..7
<223> /mol_type="protein"
      /note="LCDR2 "
      /organism="synthetic construct"
<400> 5
Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser

1           5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> synthetic construct
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..9
<223> /mol_type="protein"
      /note="LCDR3 "
      /organism="synthetic construct"
<400> 6
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Ile Thr
1           5
<210> 7

```

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..556

<223> /mol_type="protein"

/note="CD19 "

/organism="Homo sapiens"

<400> 7

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met

1 5 10 15
 Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp

 20 25 30
 Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln

 35 40 45
 Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu

 50 55 60
 Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile

65 70 75 80
 Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu

 85 90 95
 Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr

 100 105 110
 Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp

 115 120 125
 Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro

 130 135 140
 Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala

145 150 155 160
 Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro

 165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
 245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu

420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly

435 440 445
 Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu

450 455 460
 Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
 485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
 500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala

515 520 525
 Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp

530 535 540
 Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg

545 550 555

<210> 8

<211> 450

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..450

<223> /mol_type="protein"

/note="Heavy chain RefmAb33"

/organism="synthetic construct"

<400> 8

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala

20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His


```

/organism="synthetic construct"
<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
           20           25           30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
           35           40           45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65           70           75           80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
           85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
           100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
           115          120          125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
           130          135          140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145          150          155          160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
           165          170          175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
           180          185          190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
           195          200          205
Asn Arg Gly Glu Cys
           210
<210> 10
<211> 121

```

```

<212> PRT
<213> synthetic construct
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..121
<223> /mol_type="protein"
      /note="heavy chain "

      /organism="synthetic construct"
<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

           50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
           100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

```

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> synthetic construct
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112

```

```

<223> /mol_type="protein"
      /note=" light chain "
      /organism="synthetic construct"
<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Gln Asn Val
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
65           70           75           80
Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
           85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..329

```

<223> /mol_type="protein"
      /note="heavy chain constant domain"
      /organism="synthetic construct"

```

<400> 12

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

```


Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..107

<223> /mol_type="protein"

/note="light chain constant domain"

/organism="synthetic construct"

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105