



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103703027 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201280036572. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 14

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

11177660. 5 2011. 08. 16 EP

61/523, 862 2011. 08. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/065904 2012. 08. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/024095 EN 2013. 02. 21

(71) 申请人 莫佛塞斯公司

地址 德国马丁斯瑞德 / 普兰奈格

(72) 发明人 J·阿默斯道费尔 S·施泰德尔

M·温德尔里奇 S·科龙

L·罗伊杰尔

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

公司 11322

代理人 龙淳 顾小曼

权利要求书1页 说明书19页

序列表11页 附图7页

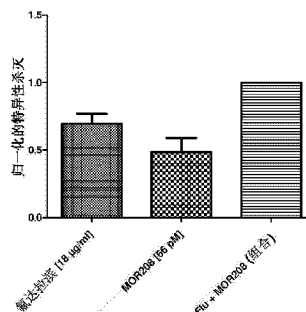
(54) 发明名称

使用抗 CD-19 抗体和嘌呤类似物的联合治疗

(57) 摘要

本公开内容描述了一种用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的抗 -CD19 抗体和嘌呤类似物的药物组合。

归一化的特异性杀灭; SD, 在ADCC之前经氟达拉滨 (Flu) 预处理72 h的MEC-1靶细胞; 使用3种不同效应细胞供体的3个独立实验的汇集



该图显示表2所示数据的均值

1. 一种用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨的协同组合,所述特异性抗体包括与包含序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区的抗体交叉竞争的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的组合,其中所述抗体包括与包含序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区的抗体结合相同表位的抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合,其中所述抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其中所述抗体包括序列 EVQLVESGGGLVKPG GSKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTA MYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10) 的可变重链和序列 DIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCM QHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:11) 的可变轻链。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其中所述抗体包括序列 ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO:12) 的重链恒定域。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其中所述 CD19 特异性抗体和氟达拉滨是分别给药的。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其中在施用所述 CD19 特异性抗体之前施用氟达拉滨。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其能够在分离的人 PBMC 的存在下以至少比单独的氟达拉滨好两倍的效力介导经由 ADCC 杀灭 MEC-1 细胞。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合,其用于治疗非何杰金氏淋巴瘤,其中所述非何杰金氏淋巴瘤选自滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织、边缘区、弥漫性大 B 细胞、Burkitt's 和套细胞。

使用抗 CD-19 抗体和嘌呤类似物的联合治疗

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于 2011 年 8 月 16 日提交的美国临时专利申请第 US61/523,862 号的权益,在此将其全文并入作为参考。

发明领域

[0003] 本公开涉及用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的抗 -CD19 抗体和嘌呤类似物的药物组合。

背景技术

[0004] B 细胞是在体液免疫应答中发挥重大作用的淋巴细胞。它们在大多数哺乳动物的骨髓中产生,并代表着循环淋巴池(lymphoid pool)的 5-15%。B 细胞的主要功能是使抗体针对不同的抗原,是适应性免疫系统的必要组成部分。

[0005] 由于其在调节免疫系统中的关键作用,B 细胞的调节异常(disregulation)与多种障碍相关,例如淋巴瘤和白血病。这些障碍包括非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴样白血病(CLL)和急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。

[0006] NHL 是源自淋巴细胞的异质性恶性肿瘤。在美国(U. S.),发病率预计在 65,000/年,死亡人数大约为 20,000 (美国癌症协会(American Cancer Society),2006;和 SEER Cancer Statistics Review)。该疾病可能在所有年龄发生,通常在 40 岁以上的成人中开始发作,发病率随着年龄增加。NHL 的特征是淋巴结、血液、骨髓和脾中累积的淋巴细胞的克隆增殖,尽管其可以涉及到任何主要器官。目前病理学家和临床医生使用的分类系统是世界卫生组织(WHO)的肿瘤分类法,其将 NHL 组织成前体和成熟的 B- 细胞或 T- 细胞赘生物。PDQ 目前将 NHL 分成对于进入临床试验是惰性(indolent)的或侵袭性的。惰性 NHL 组主要包括滤泡亚型、小淋巴细胞性淋巴瘤、MALT (粘膜相关淋巴样组织)和边缘区;惰性包括大约 50% 新诊断的 B- 细胞 NHL 患者。侵袭性 NHL 包括组织学诊断为原发性弥漫性大 B 细胞(DLBL、DLBCL 或 DLCL) (所有新诊断的患者中 40% 具有弥漫性大细胞)、Burkitt's 和套细胞的患者。NHL 的临床过程是高度变化的。临床过程的主要决定因素是组织学亚型。大多数惰性型 NHL 被视作是不能治愈的疾病。患者最初对化学疗法或抗体疗法有响应,大多数将会复发。迄今的研究尚未表明早期干预对存活率的改善。在无症状的患者中,“观察并等待”是可接受的,直至患者表现出症状或疾病进展看起来在加速。随着时间的推移,疾病可以转化为更加侵袭性的组织型(histology)。中位存活期为 8-10 年,惰性型的患者在其疾病的治疗期间常常接受 3 次或更多次治疗。对有症状的惰性型 NHL 患者的初始治疗在历史上已经结合化学疗法进行。最常用的药物包括:环磷酰胺、长春新碱和强的松(CVP);或环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松(CHOP)。大约 70% 到 80% 的患者将会对其初始的化疗有反应,缓解时间将会持续 2-3 年的量级。最终大多数患者会复发。抗 -CD20 抗体利妥昔单抗(rituximab)的发现和临床使用已经提供了响应和存活率的显著改善。目前大多数患者的护理标准是利妥昔单抗 +CHOP (R-CHOP) 或利妥昔单抗 +CVP (R-CVP)。干扰素获准与烷

基化药物结合用于 NHL 的最初治疗,但在美国的应用有限。利妥昔单抗疗法已经在若干种 NHL 显示出是有效的,目前获准作为惰性(滤泡性淋巴瘤)和侵袭性 NHL (弥漫性大 B 细胞淋巴瘤)二者的一线治疗。但是,抗-CD20 单克隆抗体(mAb)有明显的局限性,包括原发性耐药(复发惰性患者中 50% 响应)、获得性耐药(再治疗时 50% 响应率)、罕有完全响应(复发群体中 2% 完全响应率)和连续的复发模式。最后,许多 B 细胞并不表达 CD20,因此许多 B- 细胞障碍使用抗-CD20 抗体疗法是不能治疗的。

[0007] 除 NHL 以外,还有几种类型的由 B 细胞调节异常引起的白血病。慢性淋巴细胞性白血病(也称作“慢性淋巴样白血病”或“CLL”)是一种 B 淋巴细胞异常累积造成的成人白血病。在 CLL 中,恶性淋巴细胞可能看起来是正常和成熟的,但它们不能有效地应对感染。CLL 是成人中最常见的白血病形式。男性发展 CLL 的可能性是女性的两倍。但是,关键风险因素是年龄。75% 以上的新病例在年龄 50 岁以上的患者中诊断出。每年诊断出多于 10,000 例病例,死亡数为几乎 5,000 例每年(美国癌症协会,2006 ;和 SEER Cancer Statistics Review)。CLL 是不能治愈的疾病,但大多数情况下进展缓慢。许多患有 CLL 的人正常、积极地生活许多年。由于其发病缓慢,早期 CLL 通常不予治疗,因为据信早期 CLL 干预不会提高生存时间或生活质量。取而代之地,随时间对病情进行监控。初始的 CLL 治疗取决于确切的诊断和疾病的发展而变化。有数十种药物用于 CLL 治疗。组合化疗方案例如 FCR (氟达拉滨(fludarabine)、环磷酰胺和利妥昔单抗)和 BR (苯达莫司汀(bendamustine)和利妥昔单抗)在新诊断的和复发的 CLL 中均有效。异基因骨髓(干细胞)移植由于其风险性极少作为 CLL 一线治疗使用。

[0008] 另一类型的白血病是急性成淋巴细胞性白血病(ALL),也称作急性淋巴细胞性白血病。ALL 的特征是骨髓中的恶性、不成熟的白细胞(也称作成淋巴细胞)过度产生和连续增殖。“急性”是指循环的淋巴细胞(“胚细胞”(blasts))的未分化、不成熟的状态,以及疾病迅速发展,如果不予治疗预期寿命为数周至数月。ALL 最常见于儿童,发病高峰为年龄 4-5 岁。年龄 12-16 岁的儿童更易死于该病。目前,至少 80% 的儿童 ALL 被视为是可治愈的。每年诊断出少于 4,000 例病例,死亡数为几乎 1,500 例每年(美国癌症协会,2006 ;和 SEER Cancer Statistics Review)。

[0009] 人 CD19 分子是在人 B 细胞表面上表达的结构确切的细胞表面受体,这些 B 细胞包括但不限于,前 B 细胞——早期发育的 B 细胞(即不成熟 B 细胞)、通过终末分化成为浆细胞的成熟 B 细胞以及恶性 B 细胞。CD19 由大多数前-B 急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、前淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、常见的急性淋巴细胞性白血病和一些 Nu11 型急性成淋巴细胞性白血病表达(Nadler 等人, J. Immunol., 131:244-250(1983) ;Loken 等人, Blood, 70:1316-1324(1987) ; Uckun 等人, Blood, 71:13-29(1988) ;Anderson 等人, 1984. Blood, 63:1424-1433(1984) ; Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397(1995))。CD19 在浆细胞上的表达进一步表明其可以在分化的 B 细胞肿瘤例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、Waldenstrom's 肿瘤上表达(Grossbard 等人, Br. J. Haematol, 102:509-15(1998) ;Treon 等人, Semin. Oncol, 30:248-52(2003))。

[0010] 因此, CD19 抗原是非何杰金氏淋巴瘤(包括本文所述的各种亚型)、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的治疗中的免疫疗法靶标。在 W02000074718 中

还已建议 CD19 作为自体免疫疾病治疗中的免疫疗法靶标,在此将其全文并入作为参考。

[0011] 已经显示了某些 CD19 疗法。对患有滤泡性淋巴瘤的患者施用表达包括 CD3- ζ 和 CD28 分子的抗-CD19 嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞。Kochenderfer 等人,在用基因工程改造成识别 CD19 的自体 T 细胞治疗的患者中 B 细胞系的根除和淋巴瘤的消退(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 (2010 年 11 月)。Sadelain 等人,嵌合抗原受体的希望和潜在障碍(The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors),*Current Opinion in Immunology*, Elsevier, vol. 21, no. 2, 2009 年 4 月 2 日,在此将其全文并入作为参考,该文献也描述了抗-CD19 嵌合抗原受体(CAR)。Rosenberg 等人,用表达抗-CD19 嵌合受体的 T 细胞治疗 B 细胞恶性肿瘤:对 T 细胞转移之前淋巴细胞减少的影响进行评估(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), (2008 年 9 月), www.gemcris.od.nih.gov/Abstracts/940_s.pdf (2012 年 1 月 13 日检索),在其将其全文并入作为参考,描述了与氟达拉滨一起使用的抗-CD19 嵌合抗原受体(CAR)。另外参见 Eshhar 等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, National Academy of Science, Washington, D. C., vol. 90, no. 2 (1993 年 1 月 15 日)。但是, Kochenderfer 等人、Sadelain 等人、Rosenberg 等人或 Eshhar 等人均没有描述本文所例示的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨的组合。

[0012] 以下文献中描述了氟达拉滨作为 CLL 治疗中的疗法: Montserrat 等人,慢性淋巴细胞性白血病的治疗(Chronic lymphocytic leukemia treatment), *Blood Review*, Churchill Livingstone, vol. 7, no. 3 (1993 年 9 月 1 日),但其没有提出如本文所例示的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨组合。

[0013] US2011104150 中讨论了 CD19 抗体在 B 细胞障碍中的应用,在此将其全文并入作为参考,该文献一并在一长列可能的组合配偶体名单中粗略地提到氟达拉滨,但没有教导本文所例示的抗体,也没有说明本文所例示的组合在治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病中的协同效果。

[0014] W02007076950 中讨论了 CD19 抗体在非特异性 B 细胞淋巴瘤中的应用,在此将其全文并入作为参考,该文献一并在一长列可能的组合配偶体名单中粗略地提到氟达拉滨,但没有教导本文所例示的抗体,也没有说明本文所例示的组合在治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病中的协同效果。

[0015] W02005012493 中讨论了 CD19 抗体在白血病和淋巴瘤中的应用,在此将其全文并入作为参考,该文献一并在一长列可能的组合配偶体名单中粗略地提到氟达拉滨,但没有教导本文所例示的抗体,也没有说明本文所例示的组合在治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病中的协同效果。

[0016] CD19 抗体在 CLL、NHL 和 ALL 中的应用描述于以下文献: Scheuermann 等人,白血病和淋巴瘤诊断和免疫疗法中的 CD19 抗原(CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy) *Leukemia and Lymphoma*, Vol. 18, 385-397 (1995),在此将其全文并入作为参考,但该文献没有建议本文所例示的组合。

[0017] 其他的 CD19 特异性抗体描述于以下文献中:W02005012493 (US7109304)、W02010053716 (US12/266, 999) (Immunomedics);W02007002223 (USUS8097703) (Medarex);W02008022152 (12/377, 251) 和 W02008150494 (Xencor)、W02008031056 (US11/852, 106) (Medimmune);W02007076950 (US11/648, 505) (Merck Patent GmbH);W02009/052431 (US12/253, 895) (Seattle Genetics); 和 W02010095031 (12/710, 442) (Glenmark Pharmaceuticals),在此将其均全文并入作为参考。

[0018] 以下文献中描述了 CD19 特异性抗体与其他药物的组合:W02010151341 (US13/377, 514) (The Feinstein Institute);US5686072 (University of Texas) 和 W02002022212 (PCT/US01/29026) (IDEC Pharmaceuticals),在此将其均全文并入作为参考。

[0019] 很明显,尽管近来在抗癌药剂的发现和开发方面取得进展,许多形式的涉及表达 CD19 的肿瘤的癌症仍然预后很差。因此,需要有治疗这些形式癌症的改善的组合物和方法。

发明内容

[0020] 现有技术中没有单独地或组合地说明所例示的抗体和氟达拉滨的组合在非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的治疗中的协同效果。

[0021] 在一方面,本公开涉及 CD19 特异性抗体与嘌呤类似物的协同组合。这样的组合可用于治疗 B 细胞恶性肿瘤,例如,非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病。

[0022] 体外和体内模型被视为指示着某些化合物或化合物的组合将如何在人体内发挥作用。此外,当化合物在体外或在体内组合时,预计组合只具有累加的效果。出人意料地,本发明的发明人发现,与单独的抗体和氟达拉滨相比较,特定的 CD19 特异性抗体和氟达拉滨的组合在慢性 B 细胞白血病细胞系(MEC-1)中介导协同水平的特异性细胞杀灭。该体外模型指示了该组合将如何在人体内慢性淋巴样白血病(CLL)的治疗中发挥作用。此外,同样出乎意料地,本发明的发明人发现,与单独的抗体和氟达拉滨相比较,特定的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨的组合在 Burkitt's 淋巴瘤 SCID 小鼠模型中协同地抑制肿瘤的生长,并协同地提升中位生存天数。这些体内模型指示该组合将如何在人体内非何杰金氏淋巴瘤的治疗中发挥作用。简而言之,所例示的抗-CD19 抗体和氟达拉滨的组合在与 NHL 和 CLL 有关的模型中协同地作用。由于 NHL 和 CLL 均为与 B 细胞有关的障碍,CD19 在 B 细胞上高度表达,所例示的组合将具有相同的作用机制,并也应当在其他 B 细胞相关障碍例如 ALL 的治疗中协同地发挥作用。

[0023] 因此,所例示的 CD19 特异性抗体和氟达拉滨的组合在人类非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的治疗中将会有效的。此外,本说明书中例示的 CD19 特异性抗体已经进入临床试验,其中这些组合可以在人体内得以证实。

[0024] 由于氟达拉滨和其他嘌呤类似物的作用机制类似,因为嘌呤类似物干扰核酸合成,因此,相信当使用所例示的抗-CD19 抗体和氟达拉滨以外的嘌呤类似物的组合来治疗患有非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性淋巴细胞性白血病的人时,也应当看到协同效果。

[0025] 由于所例示的抗-CD19 抗体和其他的抗-CD19 抗体与 CD19 结合,相信当使用任何抗-CD19 抗体和嘌呤类似物例如氟达拉滨的组合来治疗患有非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性淋巴细胞性白血病的人时,也应当看到协同效果。

[0026] 由于所例示的抗-CD19 抗体与 CD19 的特定表位结合,相信在与嘌呤类似物例如氟达拉滨组合用于治疗患有非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性淋巴细胞性白血病的人时,与所例示的抗体交叉竞争或者与所例示的抗体结合相同表位的抗体也应当协同地发挥作用。

[0027] 本公开内容的一方面包括一种协同组合,其中 CD19 特异性抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区,以及氟达拉滨。在优选的方面,该组合用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病。

附图说明

[0028] 图 1 显示了 MOR208 和氟达拉滨单独以及组合时对 MEC-1 细胞的细胞毒性作用。

[0029] 图 2 显示了 MOR208 和氟达拉滨的组合在 MEC-1 细胞中的 ADCC 剂量响应曲线。

[0030] 图 3 显示了 MOR208 的可变结构域的氨基酸序列。

[0031] 图 4 显示了 MOR208 的 Fc 区的氨基酸序列。

[0032] 图 5 显示了用氟达拉滨 (Flu) 预处理 72h 的 MEC-1 靶细胞的归一化特异性杀灭。数据表示使用 3 种不同效应细胞供体的 3 个独立实验的汇集 (pool)。

[0033] 图 6 显示了实施例 2 中所述的 SCID 小鼠模型 MOR208、FLU 和组合 (MOR208/FLU) 组的平均肿瘤生长。

[0034] 图 7 显示了实施例 3 中所述的 SCID 小鼠模型 MOR208、FLU 和组合 (MOR208/FLU) 组的中位存活时间。

具体实施方式

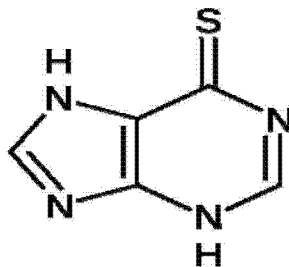
[0035] “协同性”、“协同作用”或“协同的”是指超过组合的预期叠加效果。在本文中,组合的“协同性”、“协同作用”或“协同的”效果通过 Chou 等人、Clarke 等人和 / 或 Webb 等人的方法确定。参见:Ting-Chao Chou, 药物组合研究中协同作用和拮抗作用的理论基础、实验设计和计算模拟(Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies), Pharmacol Rev 58:621-681 (2006), 在此将其全文并入作为参考。另外参见:Clarke 等人, 乳腺癌和其他模型中实验细胞毒性剂体内研究中实验设计和终点分析中的问题(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), 在此将其全文并入作为参考。另外参见:Webb, J. L. (1963) 酶和代谢抑制剂(Enzyme and Metabolic Inhibitors), Academic Press, New York, 在此将其全文并入作为参考。

[0036] 术语“抗体”是指单克隆抗体,包括任意同种型,例如, IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。IgG 抗体由两个相同的重链和两个相同的轻链组成,其通过二硫键连接。每个重链和轻链均含有恒定区和可变区。每个可变区含有三个称作“互补决定区”(“CDR”)或“高变区”的区段,其主要负责与抗原表位结合。它们被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N-端依次编号。可变区的在 CDR 外部的更加高度保守的部分称作“骨架区”。“抗体片段”是指 Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab' F(ab')₂ 片段或其他片段,其含有至少一个均含有 CDR 和骨架区的可变重链或可变轻链。

[0037] 嘌呤类似物是模拟代谢的嘌呤的结构从而干扰核酸合成的抗代谢物。例如,氟达拉滨可以通过取代嘌呤核苷酸腺嘌呤和鸟嘌呤而引入到 RNA 和 DNA 中。嘌呤类似物抑制个体中快速增殖细胞例如癌细胞、骨髓细胞或胃肠道中存在的细胞的生长。嘌呤类似物包括巯嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、硫鸟嘌呤和氟达拉滨。

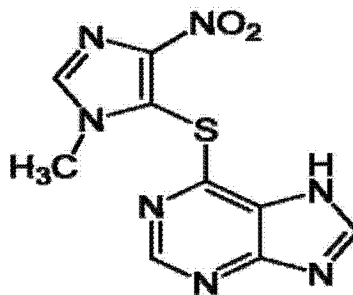
[0038] 巯嘌呤用于治疗急性白血病、淋巴瘤、类风湿性关节炎和炎性肠病,分别例如克罗恩氏病(Crohn's Disease)和溃疡性结肠炎。巯嘌呤具有以下结构:

[0039]



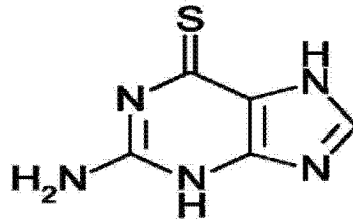
[0040] 硫唑嘌呤是主要的免疫抑制性的细胞毒性物质。其广泛用于移植,以控制排斥反应。其被非酶促地切割成发挥嘌呤类似物和 DNA 合成抑制剂作用的 6-巯基嘌呤。通过在免疫反应的诱导期防止淋巴细胞的克隆扩增,其对细胞和体液免疫均有影响。其也能成功地抑制自体免疫。硫唑嘌呤具有以下结构:

[0041]



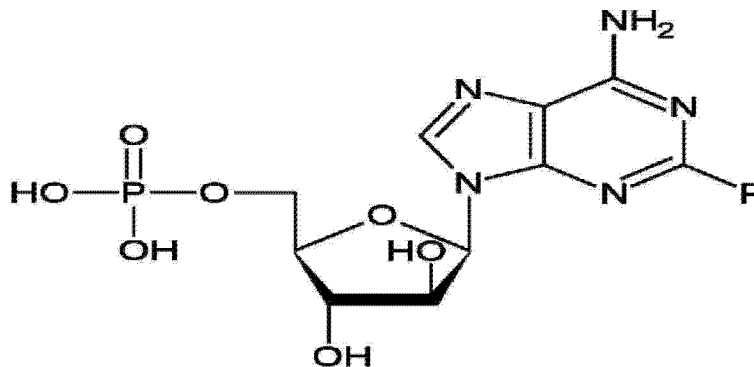
[0042] 硫鸟嘌呤用于儿童急性成淋巴细胞性白血病(ALL)早期和/或晚期强化治疗过程中,而 6-巯嘌呤主要在疗法的不同时间点使用,即在 ALL 的维持治疗过程中。硫鸟嘌呤具有以下结构:

[0043]



[0044] 氟达拉滨或磷酸氟达拉滨(Fludara®)是慢性淋巴细胞性白血病和惰性非何杰金氏淋巴瘤的治疗中使用的化学疗法药物。氟达拉滨是嘌呤类似物。氟达拉滨通过干扰核糖核苷酸还原酶和 DNA 聚合酶而抑制 DNA 合成,并且具有 S 期特异性(因为这些酶在 DNA 复制过程中呈高度活性)。氟达拉滨具有以下结构:

[0045]



[0046] 本文所用的“FLU”是指氟达拉滨。

[0047] “VH”是指抗体或抗体片段的免疫球蛋白重链的可变区。“VL”是指抗体或抗体片段的免疫球蛋白轻链的可变区。

[0048] 术语“CD19”是指称作 CD19 的蛋白,其具有以下同义词: B4、B- 淋巴细胞抗原 CD19、B- 淋巴细胞表面抗原 B4、CVID3、分化抗原 CD19、MGC12802 和 T 细胞表面抗原 Leu-12。

[0049] 人 CD19 具有以下氨基酸序列:

[0050] MPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPLGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQP GWTVNVEGSGELFRWNVSDLGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPK SLLSLELKDDRPARDMWMVETGLLLPRATAQDAGKY YCHRG NLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRRFFKVT PPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGP EEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQP VARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLG SQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR (SEQ ID NO:7)。

[0051] “MOR208”是一种抗 -CD19 抗体。可变结构域的氨基酸序列提供于图 3 中。MOR208 的重链和轻链 Fc 区的氨基酸序列提供于图 4 中。“MOR208”和“XmAb5574”用作描述图 3 和图 4 所示抗体的同义词。MOR208 抗体描述于 US 专利申请第 12/377, 251 号,在此将其全文并入作为参考。

[0052] 其他 CD19 的特异性抗体描述于以下中: US 专利第 7, 109, 304 号 (Immunomedics), 在此将其全文并入作为参考; US 专利申请第 11/917, 750 号 (Medarex), 在此将其全文并入作为参考; US 专利申请第 11/852, 106 号 (Medimmune), 在此将其全文并入作为参考; US 专

利申请第 11/648,505 号 (Merck Patent GmbH), 在此将其全文并入作为参考; US 专利第 7,968,687 号 (Seattle Genetics), 在此将其全文并入作为参考; 和 US 申请第 12/710,442 号 (Glenmark Pharmaceuticals), 在此将其全文并入作为参考。

[0053] “Fc 区”是指抗体的恒定区, 在人中可以是 IgG1、2、3、4 亚类或其它。人 Fc 区的序列可自 IMGT, Human IGH C-REGIONS, http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html (2011 年 5 月 16 日检索) 获得。

[0054] “RefmAb33”是氨基酸序列如下所示的抗体:

[0055] 重链包括 Fc 区:

[0056] QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGIWIRQPPGKALEWLADIWDDKKHYNPSLKDRLLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPKEETISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ IDNO:8)

[0057] 轻链包括 Fc 区:

[0058] DIQMTQSPSTLSASVIGDRVITCSASSRVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLSASVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQSGYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ IDNO:9)。

[0059] RefmAb33 对 RSV 是特异性的, 因其与 MOR208 享有相同的 Fc 区, 用作同种型对照。

[0060] “组合”是指多于一项, 例如, 化合物例如抗体和氟达拉滨。

[0061] 本公开内容还涉及含有所述组合的组合、药物和药物组合物。本发明协同组合的两种组分, 例如, CD19 特异性抗体和氟达拉滨可以一起、同时或分别给药。当一起给药时, 两种组分可以一起配制在一种药物组合物中, 其可以包括药学可接受的载体或赋形剂。另外可选地, 两种组分也可以配制在不同的药物组合物中。在该情况下, 两种组分可以同时给药或随后给药。在一实施方式中, 氟达拉滨在施用 CD19 特异性抗体例如 MOR208 之前施用和 / 或与其分别施用。

[0062] 药物组合物包括活性剂, 例如用于人的治疗用途的抗体。药物组合物可以包括可接受的载体或赋形剂。

[0063] “施用”或“给药”包括但不限于, 通过可注射的形式递送, 例如, 如静脉内、肌肉内、皮内或皮下途径, 或通过粘膜途径, 例如作为鼻用喷雾或吸入用气溶胶, 或作为可摄入的溶液、胶囊或片剂。

[0064] 化合物或组合的“治疗有效量”是指足以治愈、缓解或部分控制指定疾病或障碍及其并发症的临床表现的量。对于特定治疗用途来说有效的量将取决于疾病或损伤的严重性以及受试者的重量和一般状况。应当理解到, 通过构建数值矩阵并对矩阵中不同的点进行试验, 可以使用常规实验来实现合适剂量的确定, 其均在受训医师或临床科学家普通技术能力范围内。

[0065] 本文中的“CDR”由 Chothia 等人或 Kabat 等人定义。参见 Chothia C, Lesk

AM. (1987) 免疫球蛋白高变区的正则结构(Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins). *J Mol Biol.*, 196(4):901-17, 在此将其全文并入作为参考。参见 Kabat E. A, Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. 和 Foeller C. (1991). 免疫学研究的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest). 5th edit., NIH Publication no. 91-3242, US Dept. of Health and Human Services, Washington, DC 在此将其全文并入作为参考。

[0066] “交叉竞争”是指抗体或其他结合试剂在标准竞争结合测定中干扰其他抗体或结合试剂与 CD19 结合的能力。抗体或其他结合试剂能够干扰另一抗体或结合分子与 CD19 结合的能力或程度, 以及相应地是否能根据本发明称为交叉竞争, 可以使用标准竞争结合测定来确定。一种合适的测定涉及到使用 Biacore 技术(例如, 通过使用 BIAcore3000 仪器(Biacore, Uppsala, Sweden)), 其可以使用表面等离子体共振技术测量相互作用的程度。另一种测量交叉竞争的测定使用基于 ELISA 的方法。国际专利申请第 W02003/48731 号中描述了基于其交叉竞争的“表位结合”抗体的高通量方法。

[0067] 术语“表位”包括任何能够与抗体特异性结合或与分子以其他方式相互作用的蛋白决定子(determinant)。表位决定子通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物类或糖侧链组成, 其可以具有特定的三维结构特征, 以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。术语“线性表位”是指蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿蛋白质的一级氨基酸序列(连续的)线性出现的表位。术语“构象表位”是指其中不连续的氨基酸在三维构象中集合在一起的表位。在构象表位中, 相互作用点跨过蛋白质上彼此隔开的氨基酸残基出现。

[0068] “结合相同表位”是指抗体或其他结合试剂与 CD19 结合的能力, 且其与所例示的抗体具有相同表位。所例示的抗体和其他抗体对于 CD19 的表位可以使用标准表位图谱技术确定。表位图谱技术是本领域公知的, 其包括以下文献中的表位图谱方案: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例如, 线性表位可以通过以下方法确定: 例如, 在固体支撑物上同时合成大量的肽——与蛋白分子的一部分对应的肽, 并在肽仍然连接在支撑物上的同时使肽与抗体反应。这些技术是本领域已知的, 并描述于以下文献中: 例如, U. S. 专利第 4, 708, 871 号; Geysen 等人, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002; Geysen 等人, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182; Geysen 等人, (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715。类似地, 构象表位很容易通过确定氨基酸的空间构象来鉴定, 例如, 通过如氢/氘交换、x-射线晶体学和二维核磁共振。参见, 例如, 表位图谱方案, 同上。蛋白的抗原区也可以使用标准抗原性和亲水性图来鉴定, 例如, 使用如获自 Oxford Molecular Group 的 Omiga1.0 版软件程序来计算的那些。该计算机程序采用 Hopp/Woods 方法(Hopp 等人, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828) 用于抗原性图谱的确定, 并采用 Kyte-Doolittle 技术(Kyte 等人, (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132) 用于亲水性图。

[0069] 实施方式

[0070] 本公开内容的一个方面包括用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和/或急性成淋巴细胞性白血病的 CD19 特异性抗体与嘌呤类似物的组合。在实施方式中, 该组合是协同的。

[0071] 在此,所例示的抗-CD19 抗体与氟达拉滨的组合在与 NHL 和 CLL 相关的体外和体内模型中协同发挥作用。由于 NHL 和 CLL 二者都是 B 细胞相关的障碍,且 CD19 在 B 细胞上高度表达,所例示的组合在其他 B 细胞相关障碍例如 ALL 的治疗中应当具有相同的作用机制,也应当协同地发挥作用。因此,所例示的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨的组合在人类非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的治疗中将会是有效的。

[0072] 由于氟达拉滨和其他嘌呤类似物的作用机制是类似的,均在于嘌呤类似物干扰核酸的合成,因此,相信当使用所例示的抗-CD19 抗体和氟达拉滨以外的嘌呤类似物(例如硫嘌呤、硫唑嘌呤和硫鸟嘌呤)的组合来治疗患有非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性淋巴细胞性白血病的人时,也应当看到协同效果。

[0073] 由于所例示的抗-CD19 抗体和其他的抗-CD19 抗体均与 CD19 抗原结合,据信当使用任何抗-CD19 抗体和嘌呤类似物的组合来治疗患有非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和 / 或急性淋巴细胞性白血病的人时,也应当看到协同效果,其中抗-CD19 抗体描述于,例如,US 专利申请第 12/377,251 号(Xencor)、W02005012493、W02010053716 (Immunomedics);W02007002223 (Medarex);W02008022152 (Xencor);W02008031056 (Medimmune);W02007/076950 (Merck Patent GmbH);W02009/052431 (Seattle Genetics);和 W02010095031 (Glenmark Pharmaceuticals),在此将其全文均并入作为参考。

[0074] 在实施方式中,CD19 的特异性抗体包括与以下抗体交叉竞争的抗体,所述抗体包含序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区。

[0075] 在实施方式中,CD19 的特异性抗体包括与以下抗体结合相同表位的抗体,所述抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区。

[0076] 在实施方式中,CD19 的特异性抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区。

[0077] 在实施方式中,CD19 的特异性抗体包括序列 EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10) 的可变重链和序列 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:11) 的可变轻链。

[0078] 在实施方式中,CD19 的特异性抗体包括序列 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV

VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPPEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:12) 的重链恒定域。

[0079] 在实施方式中, CD19 的特异性抗体包括序列 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:13) 的轻链恒定域。

[0080] 在实施方式中, 嘌呤类似物是氟达拉滨。

[0081] 在实施方式中, 组合的成分——CD19 特异性抗体和氟达拉滨是分别给药的。在一
实施方式中, 在施用 CD19 特异性抗体之前施用氟达拉滨。

[0082] 在实施方式中, 该组合是药物组合物。在实施方式中, 组合物包括可接受的载体。
在实施方式中, 该组合以有效的量给药。

[0083] 在一方面, 包含序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2)
的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ
ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID
NO:6) 的 LCDR3 区的 CD19 特异性抗体和氟达拉滨的协同组合能够在分离的人 PBMC 的存在
下以至少比单独的氟达拉滨好两倍、三倍、四倍或五倍的效力介导 MEC-1 细胞经由 ADCC 被
杀灭。

[0084] 本公开内容的一个方面包括用于治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病
和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的 CD19 特异性抗体与氟达拉滨的协同组合, 该 CD19 特异
性抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1 区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2
区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3 区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4)
的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的 LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6)
的 LCDR3 区。在实施方式中, 非何杰金氏淋巴瘤选自滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、
粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、Burkitt's 淋巴瘤和
套细胞淋巴瘤。

[0085] 另一方面包括一种治疗对其有需要的个体的非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性
白血病和 / 或急性成淋巴细胞性白血病的方法, 该方法包括施用 CD19 特异性抗体和嘌呤类
似物。在该方法的实施方式中, CD19 的特异性抗体包括序列 SYVMH (SEQ ID NO:1) 的 HCDR1
区、序列 NPYNDG (SEQ ID NO:2) 的 HCDR2 区、序列 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO:3) 的 HCDR3
区、序列 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO:4) 的 LCDR1 区、序列 RMSNLNS (SEQ ID NO:5) 的
LCDR2 区和序列 MQHLEYPIT (SEQ ID NO:6) 的 LCDR3 区。在该方法的实施方式中, 嘌呤类似
物是氟达拉滨。

[0086] 实施例

[0087] 实施例 1: 单独以及组合使用 MOR208 和氟达拉滨抑制 MEC-1 细胞的增殖

[0088] 材料

[0089] MEC-1 细胞: 慢性 B 细胞白血病细胞系 DSMZ#ACC497; 细胞培养基: 具有 GlutaMAX™
的 Iscove 改良的 Dulbecco 培养基 (IMDM), Invitrogen, Cat No.: 31980-048, 20%FCS; PBMC:
RPMI1640, 具有稳定的谷氨酰胺, PAN Biotech GmbH, Cat No.: P04-13500 补充有 10%FCS;
Biocoll: Biochrome AG CAT No.: L6115LOT No.: 1050T; 氟达拉滨: Bayer, 25mg/ml 于 ddH2O

中, LOT No. :9100ST ;和 RefmAb33 (抗 -RSV), Fc 区与 MOR208 相同。

[0090] 方法

[0091] 在 MEC-1 细胞中测试单独以及组合的 MOR208 和 氟达拉滨的细胞毒性。FLU 是嘌呤类似物,因此在 MEC-1 细胞中经由直接的细胞毒性发挥作用。MOR208 靶向 CD19,在 MEC-1 细胞的杀灭中另外经由 ADCC 发挥作用。测量以下几组中的 MEC-1 细胞杀灭 :FLU, 18 μ g/ml ; MOR208, 66pm ;以及 66pm MOR208 和 18 μ g/ml FLU 的组合。这些浓度选择成其接近于或达到 MOR208 和 FLU 的 EC50。

[0092] 在 FLU 组和 MOR208+FLU 组合组中,在 ADCC 检验测量之前将 MEC-1 细胞与 FLU 一起预孵育 72 小时。使用 1mg/ml 钙黄绿素 AM 将 MEC-1 细胞染色,然后进行计数,并调节至 2×10^5 /ml。对 PBMC 进行计数,并调节至 6×10^6 /ml。ADCC 测定如下进行 :使用 96 孔板,每孔加入 100 μ l MEC-1 细胞的细胞悬浮液,然后向每孔加入 100 μ l PBMC 的细胞悬浮液,导致 E:T 比为 30:1。将抗体在介质中稀释至 1 μ g/ml。将细胞离心,并再悬浮。向靶标 :效应细胞 - 球块中,加入 100 μ l 抗体溶液或相应的对照溶液。将混合物在 CO2- 孵育器中在 37°C 下孵育 4 小时。ADCC 测量如下进行 :将孵育的细胞溶液 (~ 100 μ l) 转移到 FACS 管中,向每个管中加入 200 μ l FACS 缓冲液 (DPBS+3%FCS) 和 0.5 μ l PI 储液。使用 FACS-Calibur。死亡的 MEC-1 细胞用碘化丙啶染色。

[0093] 表 1 和图 1 显示了原始数据。

[0094] 表 1

[0095]

	对照	MOR208 66pm	FLU 18 μ g/ml	FLU+MOR208 组合
实验1	11	35,2	36,39	52,14
实验2	19,5	29,8	38,48	46,9
实验3	29,9	47,01	57,27	65,63

[0096] 数值表示 % 死亡细胞。每个实验代表来自不同供体的 PBMC。用于实验 1 和 2 的对照是 RefMab33。用于实验 3 的对照是单独的 PBMC。

[0097] 表 2 显示对于特异性杀灭归一化的表 1 的原始数据以及确定协同作用时进行的 Chou 计算结果。

[0098] 表 2

[0099]

	氟达拉滨 18 μ g/ml	MOR208 66 pM	FLU + MOR208 (组合)	Chou 指数
实验 1	0.6	0.6	1.0	0.03
实验 2	0.7	0.4	1.0	0.3
实验 3	0.8	0.5	1.0	0.3
平均	0.7	0.5	1.0	0.2

[0100] 表 2 所示的数值计算如下 :从表 1 所示的原始数据 (% 死亡细胞) 减去本底 (对照),

得到每个治疗组的特异性杀灭 ;然后 2) 通过将 MOR208+FLU 的组合设定为 1, 将特异性杀灭数值归一化。表 2 的平均值绘于图 5 中。图 2 显示了在 MOR208+FLU 组合的 Chou 因子计算中使用的实例 ADCC 剂量反应曲线。

[0101] 进行 Chou 指数(CI)的计算, 以便确定所例示的抗 -CD19 抗体和氟达拉滨的组合与单独的 MOR208 和 FLU 比较时的协同性。该计算描述于以下文献中 :Ting-Chao Chou, 药物组合研究中协同作用和拮抗作用的理论基础、实验设计和计算模拟(Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies), Pharmacol Rev58:621 - 681(2006), 在此将其全文并入作为参考 ;以及 Chou TC, Talalay P, 剂量 - 效果关系的量化分析 : 多种药物或酶抑制剂的组合效果(Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors). Adv Enzyme Regul22:27-55(1984), 在此将其全文并入作为参考。使用 CI-isobol 方法进行 Chou-Talalay 的方法。

[0102] 中效方程式

[0103] 中效方程式模拟抑制剂(例如药物)的效果 : $F_a/F_u = (D/D50)^m$, 其中 D 是剂量, F_a 和 F_u 是体系受剂量 D 影响和不受该剂量影响的部分 ($F_a + F_u = 1$) ; D50 是产生中效的剂量(例如 IC50、ED50、LD50)。常数 m 决定剂量 - 效果曲线的形状。

[0104] 我们使用 Excel Fit 软件来进行线性回归计算, 以估计参数 m 和 D50。

[0105] 如上所述, 组合对 MEC-1 细胞的效果测量为 % 细胞死亡。我们将部分 F_u 定义成被处理的细胞系的 % 细胞死亡与暴露于对照物的细胞系的 % 细胞死亡的比例。即 :

[0106] $F_u = \% \text{ 细胞死亡(被处理的细胞系) } / \% \text{ 细胞死亡(不经处理的细胞系)}$

[0107] 然后, 细胞系的 % 细胞死亡是中效方程式中的常数 D50, 其可以通过上述的线性回归估算。

[0108] CI-isobol 方法

[0109] CI-isobol 方法提供了对药物间协同作用的量化评估。组合指数(CI)由单独的和组合的药物处理的剂量 - 效果数据估算。CI 值小于 1 表示协同作用 ; CI=1 表示叠加效果 ; CI>1 表示拮抗作用。CI 值与 1 越远, 药物相互作用(协同作用或拮抗作用) 就越显著。

[0110] 通常, 组合药物治疗的组合指数(CI) 定义为 :

[0111] $CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$

[0112] 在此 D1 和 D2 分别是组合的药物 1 和药物 2 的剂量 ; Dx1 和 Dx2 是仅用药物 1 和药物 2 治疗给出与组合同样效果时的剂量。剂量 Dx1 和 Dx2 需要由单独药物治疗的剂量 - 效果数据估算。基本上, 中效方程式适合于每种药物的数据。由药物的中效方程式, 我们可以估算出产生效果(即 F_a 、 F_u) 所需的剂量(即 D)。点距离叠加线越远, 1 及其 CI 之间的差别就越大, 因此(协同或拮抗) 效果就越强。

[0113] 结果

[0114] 如表 2 所示, Chou 指数值清楚地表明, 与单独的 MOR208 和氟达拉滨相比, MOR208 和氟达拉滨的组合在 MEC-1 细胞的特异性杀灭方面有协同作用。该结论基于三次实验每一次分别为 0.03、0.3 和 0.3 的 Chou 计算结果, 其平均值为 0.21, 其中 CI<1 表明有协同作用。因此, MOR208 和氟达拉滨的组合在人非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴样白血病(CLL) 和

/或急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的治疗中也将会协同地发挥作用。

[0115] 为了证实上述 Chou 计算的结果,使用 Bonferroni 多重比较检验对表 2 的归一化数据进行统计学显著性评价。参见 James 等人,在用表达 CD20 特异性嵌合 T 细胞受体的 T 细胞进行过继免疫疗法之前的抗体介导的 B 细胞消耗促进免疫活性小鼠中白血病的根除(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(Epub2009年10月30日),在此将其全文并入作为参考。结果示于表 3 中。

[0116] 表 3

[0117]

Bonferroni多重比较检验	平均差值	T值	显著性? (P < 0.05)	总结
氟达拉滨 (18 μ g/ml) vs. FLU + MOR 208 组合	-0.3067	5.039	有	**

[0118]

MOR208 (66pM) vs. FLU +MOR208组合	-0.5167	8.490	有	***
-----------------------------------	---------	-------	---	-----

[0119] **p<0, 01

[0120] ***p<0, 001

[0121] 结果

[0122] 如表 3 所示, Bonferroni 多重比较检验表明,比起单独的 FLU 和 MOR208 治疗, FLU+MOR208 的组合治疗在 MEC-1 细胞的特异性杀灭中在统计学上更加有效。

[0123] 实施例 2:将单独的以及组合的 MOR208 和 FLU 皮下 (SC)-植入人 Ramos Burkitt's B 细胞淋巴瘤肿瘤生长模型中。

[0124] 材料

[0125] RAMOS 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞(ATCC 编号 CRL-1596, lot#3953138);载体对照:0.9%NaCl,25mg/mL 甘露醇, pH7.0;SCID 小鼠(University of Adelaide, Waite Campus, Urrbarraie, SA, 澳大利亚, 品系 C. B. -17-Igh-1^b-Prkdc^{scid})。

[0126] 方法

[0127] 对 6-7 周龄的雌性 C. B-17SCID 小鼠皮下植入 RAMOS 细胞($\sim 5 \times 10^6$ 细胞 / 小鼠)。在接种后 14 天,将小鼠分成 10 组,每组 8 只,其中每组具有大小相对相同的肿瘤体积。在第 14 天开始治疗。治疗方案提供于表 4 中。该研究持续时间为 63 天。

[0128] 表 4

[0129]

动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	治疗途径和计划
8	氟达拉滨	125	IP, Q1Dx5
8	氟达拉滨	250	IP, Q1Dx5
8	MOR208	1*->10	第 14*、17*、21*、24、28、31、35 和 38 天
8	载体		IP, Q1Dx5
8	MOR208/ 氟达拉滨	1*->10/125	第 14*、17*、21*、24、28、31、35 和 38 天/ IP, Q1Dx5

[0130] MOR208、氟达拉滨和载体均以 0.1mL/10g 体重的体积给药。初始读数为肿瘤生长，具体为研究第 38 天的肿瘤体积。使用公式 $(l \times w^2)/2$ 计算肿瘤重量，其中 l 和 w 是指每次测量收集的较大和较小的尺寸。

[0131] 结果显示于表 5 中，均值绘于图 6 中。

[0132] 表 5

[0133]

研究第 38 天的肿瘤体 积[mm ³]	载体对照	MOR208 10 mg/kg	氟达拉滨 125 mg/kg	氟达拉滨 250 mg/kg	组合： MOR208/FLU 125
第 1 组	2890	2138	1666	1352	1268
第 2 组	4400	2025	2560	1352	750
第 3 组	4200	3179	864	2816	726
第 4 组	4152	1764	1913	1764	446
第 5 组	3791	1862	3564	650	936
第 6 组	4513	3402	2560	787	1268
第 7 组	4152	2560	2025	1800	787
第 8 组		2816	1437	787	
平均值	4014	2468	2073	1413	883

[0134] 除研究第 38 天的肿瘤体积终点之外，还对以下参数进行评价：1) 第 38 天降低的肿瘤生长 [%]，和 2) 达到 4000mg 肿瘤增加的时间 [%]。结果显示于表 6 中。

[0135] 表 6

[0136]

治疗组别	研究第38天降低的肿瘤生长 (%)	达到4000 mg增加的时间 [%]
MOR208	38.5	17.52
FLU 125	48.3	22.37
FLU 250	64.8	30.19
MOR208和FLU 125组合	78	59.3
对照	0	0

[0137] 表 6 所示的两种终点均使用部分乘积概念 (Fractional Product Concept, FPC) 评价, 以确定 MOR208 和 FLU 治疗的组合治疗与单独的 MOR208 和氟达拉滨相比较是否存在协同作用。当组合治疗组比 FPC 计算更有效时, 则存在协同作用。部分乘积概念使用公式 $1 - [(1-A) * (1-B)] = fpc (%)$ 计算, 如以下文献所述: Webb, J. L. (1963) Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York, 在此将其全文并入作为参考。完成 FPC 计算之后, 通过将 FPC 值设为 1, 将得到的 FPC 值和来自表 6 的数值归一化。这些计算的结果显示于表 7 中。

[0138] 表 7

[0139]

	MOR208 [10 mg/kg]	氟达拉滨 [125 mg/kg]	氟达拉滨 [250 mg/kg]	部分乘积组合	MOR208 + FLU125 组合	效果
研究第38天降低的肿瘤生长 (%)	0.57	0.75	0.9	1	1.15	协同作用
达到4000 mg 增加的时间 [%]	0.48	0.62	0.8	1	1.65	协同作用

[0140] 结果

[0141] 两种终点均是抑制肿瘤生长的度量, 在两种终点即研究第 38 天降低的肿瘤生长 (%) 和达到 4000mg 增加的时间 (%) 中, 与单独的 MOR208 和 FLU 相比, MOR208+FLU125 组合表现出明显的协同作用。

[0142] 为了证实上述 FPC 计算的结果, 使用 Bonferroni 多重比较检验对研究第 38 天平均肿瘤体积 [mm³] 的数据 (如表 5 所示) 进行统计学显著性评价。结果示于表 8 中。

[0143] 表 8

[0144]

治疗组别	Bonferroni 多重比较检验 ;p 值
FLU125vs FLU125+MOR208 (组合)	p<0.01
FLU250vs FLU125+MOR208 (组合)	n. s.
MOR208vs FLU125+MOR208 (组合)	p<0.001

对照 vs. FLU125	p<0.001
对照 vs. FLU250	p<0.001
对照 vs. FLU125+MOR208 (组合)	p<0.001
对照 vs. MOR208	p<0.001

[0145] p 值 <0.05 表明统计学上的显著性。

[0146] 结果

[0147] 如表 5 和表 6 所示,对于所有的参数,MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合在体内抑制肿瘤生长方面均比单独的 MOR208 或氟达拉滨更加有效。MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合相比于单独的 MOR208 和氟达拉滨在体内抑制肿瘤生长方面的有效性增加被证实在统计学上是显著的,如表 8 所示。此外,部分乘积概念计算表明,在体内抑制肿瘤生长方面 MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合与单独的 MOR208 或氟达拉滨相比较具有明显的协同作用,如表 7 所示。因此,MOR208 和氟达拉滨的组合在人类非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴样白血病(CLL)和急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的治疗中也将会协同地发挥作用。

[0148] 此外,MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合在体内抑制肿瘤生长方面比单独的更高剂量氟达拉滨 250mg/kg 更加有效。由于氟达拉滨在较高的剂量下表现出明显的副作用,这一结果表明高剂量氟达拉滨的一种更加安全、更加有效的替代方式是 MOR208 和氟达拉滨的组合。

[0149] 实施例 3 在 SCID 小鼠存活模型中在人非何杰金氏 RAMOS 肿瘤中的单独的以及组合的 MOR208 和氟达拉滨

[0150] 材料

[0151] 环磷酰胺(Fluka,Buchs Switzerland, Lot. No. 07551661); 载体对照: 0.9% 氯化钠, 25mg/ml 甘露醇, pH7.0; SCID 小鼠(University of Adelaide, Waite Campus, Urrbarraie, SA, 澳大利亚, 品系 C. B. -17-Igh-1^b-Prkdc^{scid})。RAMOS 人淋巴瘤细胞(ATCC 编号 CRL-2638)。

[0152] 方法

[0153] 在 RAMOS 细胞接种之前(第 -5 和 -4 天),将 SCID 小鼠用环磷酰胺预处理(18mg/kg, i. p., 一天两次)两天。在接种日(第 -3 天),将小鼠分成 10 组,每组 8 只小鼠,每只用 1x10⁶RAMOS 细胞静脉内接种至尾部静脉中。每组的给药方案提供于表 9 中,并在第 0 天开始。

[0154] 该研究持续时间为 3 周。

[0155] 表 9:给药方案

[0156]

组别	化合物	治疗	计划
A	氟达拉滨	125 mg/kg, i.p, 10 mL/kg	每天 1 次 (第 0-5 天)
B	MOR208	3 mg/kg, i.v., 10 mL/kg	每周两次, 3 周
C	载体对照	i.p., 10 mL/kg	每天 1 次 (第 0-5 天)
AB	氟达拉滨 /	125 mg/kg, i.p; 3 mg/kg, i.v.,	每天 1 次 (第 0-5 天) /每
[0157]			
	MOR208	10 mL/kg;	周两次, 3 周
E	氟达拉滨	250 mg/kg, i.p, 10 mL/kg	每天 1 次 (第 0-5 天)

[0158] 读取值是以天数计的中位存活时间。为了评价组合的效果与单独的治疗组相比是否是协同的,使用 Clark 等人的方法。

[0159] Clarke 等人的协同作用

[0160] 该方法描述于以下文献中:乳腺癌和其他模型中体内实验细胞毒性剂研究中实验设计和终点分析中的问题(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),在此将其全文并入作为参考。

[0161] 数据以如下方式加以分析:

[0162] 拮抗作用 $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$

[0163] 叠加作用 $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$

[0164] 协同作用 $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$

[0165] 其中 A 是用 MOR208 治疗 ;B 使用单独的 FLU 治疗 ;C 是对治疗载体的反应 ;AB 是 A 和 B 的组合治疗。每个研究组以天数计的中位存活时间和 Clarke 等人的分析结果显示于表 10 中。

[0166] 表 10

[0167]

	中位存活时间(天)
A= 对 MOR208 治疗的反应	23.5
B= 对 FLU 治疗的反应	22
C= 对载体治疗的反应	18.5
AB=A 和 B 组合治疗	31
(AB)/C	1.675675676
	大于

(A/C) x (B/C)	1.510591673
	= 协同作用

[0168] 结果

[0169] 与单独的 MOR208 和 FLU 相比较, MOR208 和 FLU 的组合在中位存活天数方面表现出明显的协同作用。

[0170] 为了证实上述协同作用计算的结果, 使用 Mantel-Haenszel 检验 [P 值] 和 Gehan-Wilcoxon 检验 [P 值], 将 MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 组合的以天数计的中位存活时间与单独的 MOR208 和氟达拉滨进行比较。结果显示于表 11 中。

[0171] 表 11

[0172]

治疗组别	Mantel-Haenszel 检验 [P 值]	Gehan-Wilcoxon 检验 [P 值]
FLU/MOR vs. FLU 125	0,0008	0,0012
FLU/MOR vs. MOR	0,0001	0,0004
FLU/MOR vs. FLU250	0,0011	0,0016
FLU/MOR vs. 对照	0,0001	0,0004
对照 vs. FLU125	0,0061	0,0162
对照 vs. FLU250	0,0061	0,0162
对照 vs. MOR208	< 0,0001	0,0002

[0173] 结果

[0174] 表 10 表明, 与单独的 MOR208 和氟达拉滨相比较, MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合在 Burkitt 淋巴瘤 SCID 小鼠模型中协同地增加了中位存活时间。MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合相比较于单独的 MOR208 和氟达拉滨在体内使中位存活时间增加被证实在统计学上是显著的, 如表 11 所示。因此, MOR208 和氟达拉滨的组合在人类非何杰金氏淋巴瘤 (NHL)、慢性淋巴样白血病 (CLL) 和急性成淋巴细胞性白血病 (ALL) 的治疗中也将会协同地发挥作用。

[0175] 此外, MOR208 和氟达拉滨 125mg/kg 的组合在体内在增加中位存活时间方面比单独的更高剂量的氟达拉滨 250mg/kg 更加有效。由于氟达拉滨在较高的剂量下尽管有效但表现出明显的副作用, 这一结果表明高剂量氟达拉滨的一种更加安全、更加有效的替代方式是 MOR208 和氟达拉滨的组合。

[0176] 应当理解到, 尽管说明了示例性的实施方式, 但说明书、具体实施例和数据均以例证的方式给出, 并无意于对本发明进行限定。从本文包含的讨论、公开内容和数据, 本发明中的各种变化和修改对于技术人员来说将会是显而易见的, 因此视作本发明的一部分。

[0001]

序列表

<110> 莫佛塞斯公司

<120> 组合及其用途

<150> EP11177660.5

<151> 2011年8月16日

<150> US 61/523,862

<151> 2011年8月16日

<160> 13

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..5

<223> /mol_type="蛋白"
/注解="HCDR1"
/生物体="合成构建体"

<400> 1

Ser Tyr Val Met His
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..6

<223> /mol_type="蛋白"
/注解="HCDR2 "

[0002]

/生物体="合成构建体"

<400> 2

Asn Pro Tyr Asn Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..12

<223> /mol_type="蛋白"

/注解="HCDR3 "

/生物体="合成构建体"

<400> 3

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..16

<223> /mol_type="蛋白"

/注解="LCDRL "

/生物体="合成构建体"

<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> 合成构建体

<220>

[0003]

<221> SOURCE
 <222> 1..7
 <223> /mol_type="蛋白"
 /注解="LCDR2 "
 /生物体="合成构建体"

<400> 5
 Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 合成构建体

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..9
 <223> /mol_type="蛋白"
 /注解="LCDR3 "
 /生物体="合成构建体"

<400> 6
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..556
 <223> /mol_type="蛋白"
 /注解="CD19 "
 /生物体="智人"

<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

[0004]

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
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
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
Val Met Glu Thr Gly Leu	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
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

[0005]

```

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> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..450

<223> /mol_type="蛋白"

/注解="重链 RefmAb33"

/生物体="合成构建体"

<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

```

[0006]

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						
		275		280		285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg						
		290		295		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys						
305		310		315		320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu						
		325		330		335
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr						
		340		345		350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu						
		355		360		365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp						
		370		375		380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met						
385		390		395		400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp						
		405		410		415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His						

[0007]

```

          420          425          430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
          435          440          445
Gly Lys
          450

<210> 9
<211> 213
<212> PRT
<213> 合成构建体

<220>
<221> SOURCE
<222> 1, . 213
<223> /mol_type="蛋白"
        /注解="轻链 RefmAb33"
        /生物体="合成构建体"

<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

```

[0008]

```

          195                200                205
Asn Arg Gly Glu Cys
      210

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> 合成构建体

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..121
<223> /mol_type="蛋白"
      /注解="重链"
      /生物体="合成构建体"

<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> 合成构建体

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..112
<223> /mol_type="蛋白"
      /注解="轻链"

```

[0009]

/生物体="合成构建体"

<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> 合成构建体

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..329

<223> /mol_type="蛋白"

/注解="重链恒定域"

/生物体="合成构建体"

<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
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Trp Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

[0010]

	100		105		110										
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
	115		120		125										
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
	130		135		140										
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
145			150		155										160
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
			165		170										175
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His
	180		185		190										
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
	195		200		205										
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln
	210		215		220										
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
225			230		235										240
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
			245		250										255
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
	260		265		270										
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> 合成构建体

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1. . 107
 <223> /mol_type="蛋白"
 /注解="轻链恒定域"
 /生物体="合成构建体"

<400> 13
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0011]

I	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
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	

MOR208和FLU单独以及组合时的细胞毒性

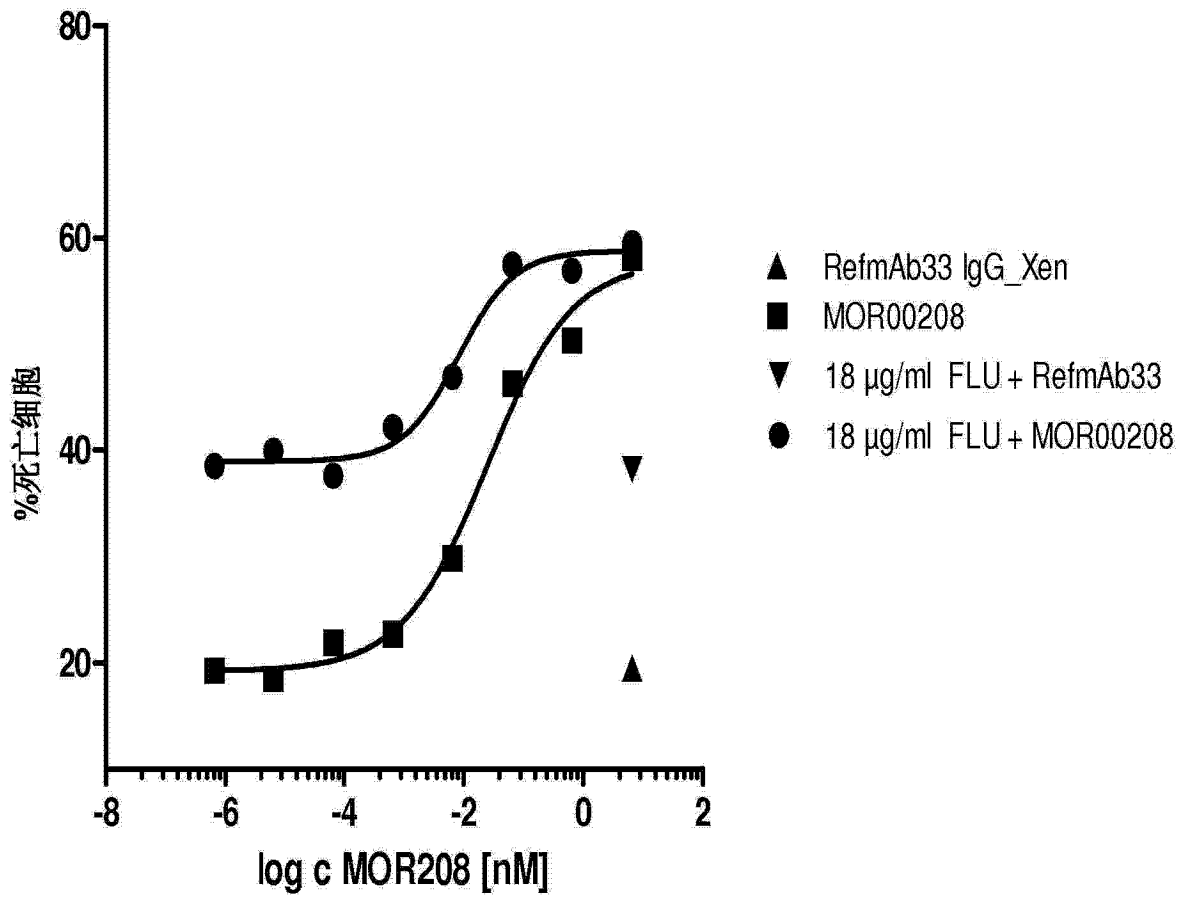


图 1

ADCC剂量响应曲线

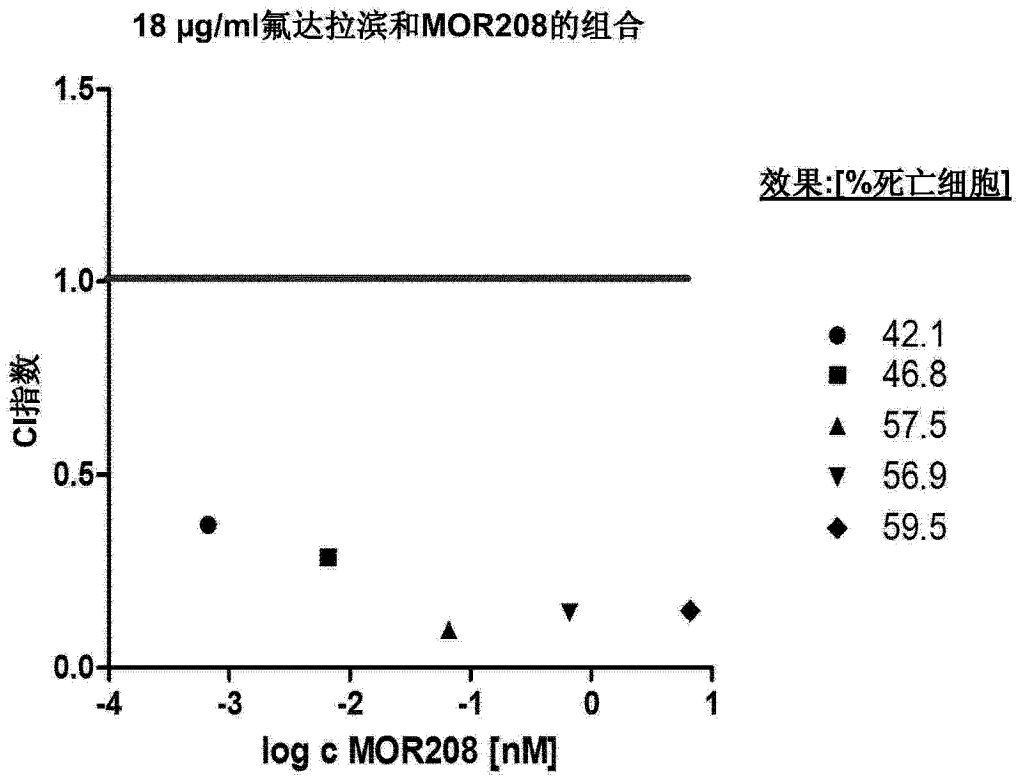


图 2

MOR208重链可变域的氨基酸序列为：
(**CDR以黑体和下划线示出**)

EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLKLS~~CAASGYTFT~~**SYVMHW**V~~RQAPGKGLEWIGYINPY~~
NDGT~~KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARG~~**GTYYYYGTRVFDYWG**
Q~~GT~~L~~V~~T~~V~~S~~S~~ (SEQ ID NO: 10)

MOR208轻链可变域的氨基酸序列为：
(**CDR以黑体和下划线示出**)

DIVMTQSPATLSLSPGERATL~~SC~~**RSSKSLQNVNGNTYLY**W~~FQ~~Q~~K~~PG~~Q~~SP~~Q~~LLI~~YR~~
MSNLNSG~~V~~P~~D~~R~~F~~S~~G~~S~~G~~S~~G~~T~~E~~F~~T~~L~~I~~S~~S~~L~~E~~P~~E~~D~~F~~A~~V~~Y~~Y~~C~~M~~**QHL****EYPIT**~~F~~G~~A~~G~~T~~K~~L~~E~~I~~K (SEQ
ID NO: 11)

MOR208 HCDR1的氨基酸序列为：SYVMH (SEQ ID NO: 1)

MOR208 HCDR2的氨基酸序列为：NPYNDG (SEQ ID NO: 2)

MOR208 HCDR3的氨基酸序列为：GTYYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3)

MOR208 LCDR1的氨基酸序列为：RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4)

MOR208 LCDR2的氨基酸序列为：RMSNLNS (SEQ ID NO: 5)

MOR208 LCDR3的氨基酸序列为：MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6)

图 3

Fc区的序列

MOR208重链Fc区的氨基酸序列为:

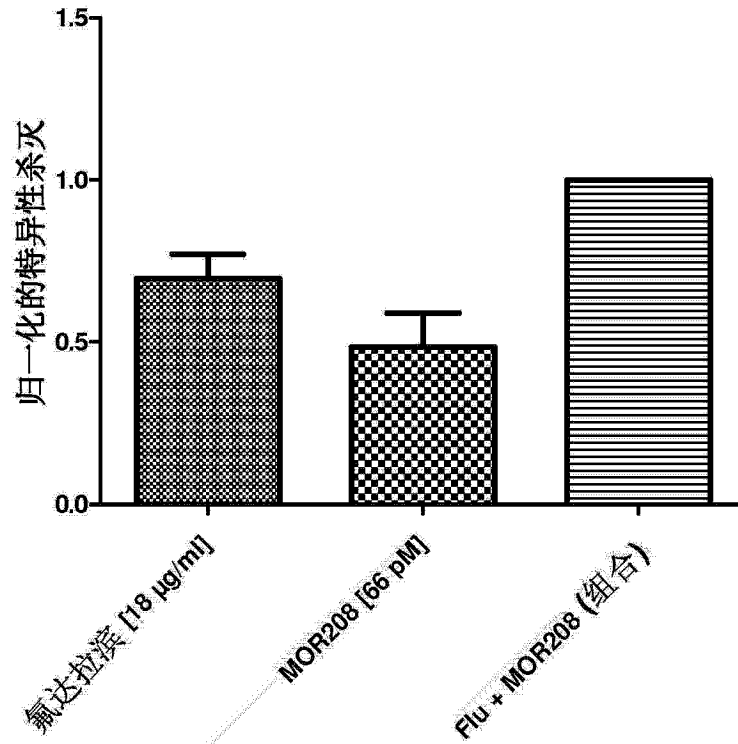
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12)

MOR208轻链Fc区的氨基酸序列为:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKD STYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

图 4

归一化的特异性杀灭；SD；在ADCC之前经氟达拉滨（Flu）预处理72 h的MEC-1靶细胞；使用3种不同效应细胞供体的3个独立实验的汇集



该图显示表2所示数据的均值

图 5

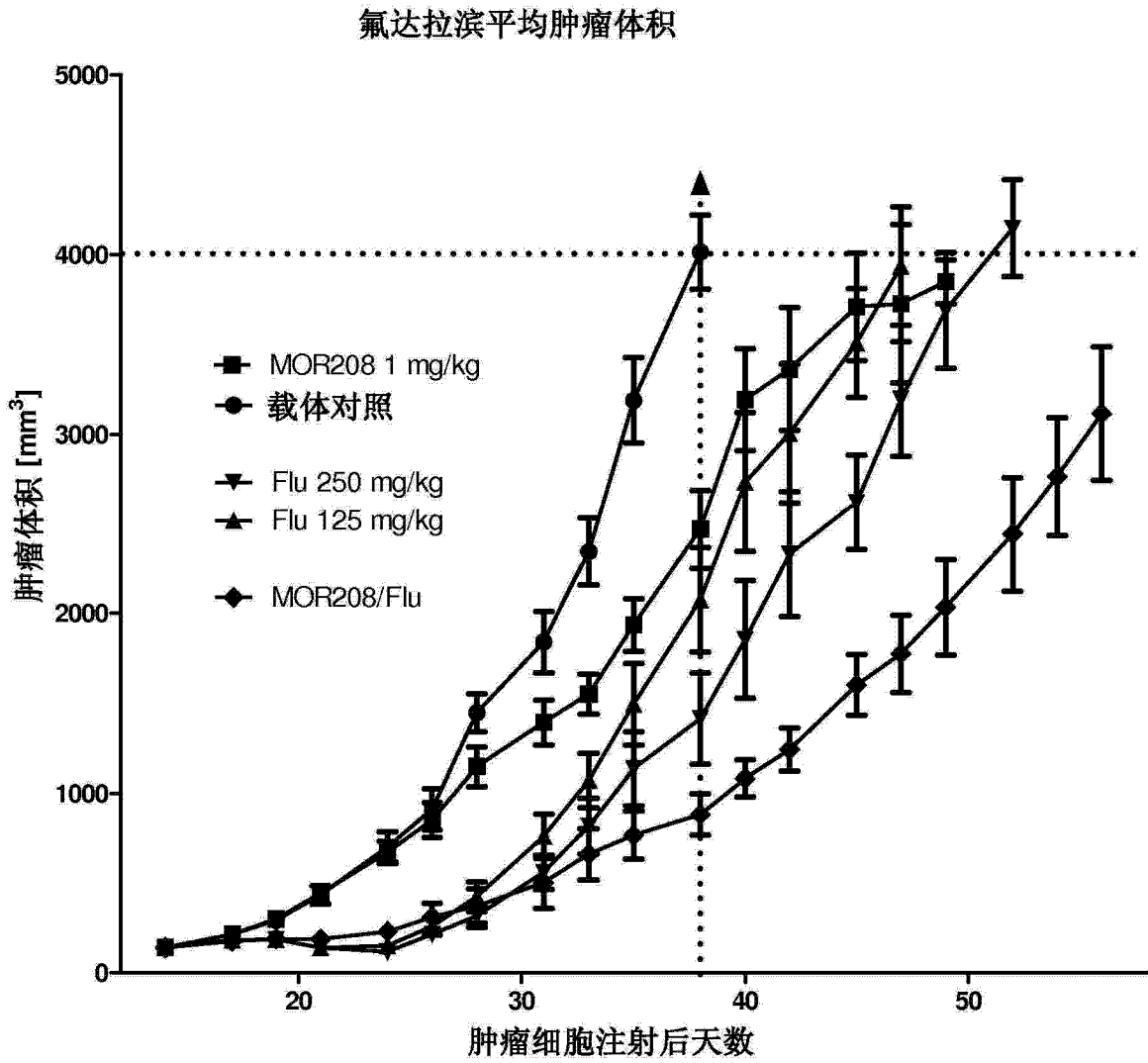


图 6

SCID小鼠模型中的中位存活时间

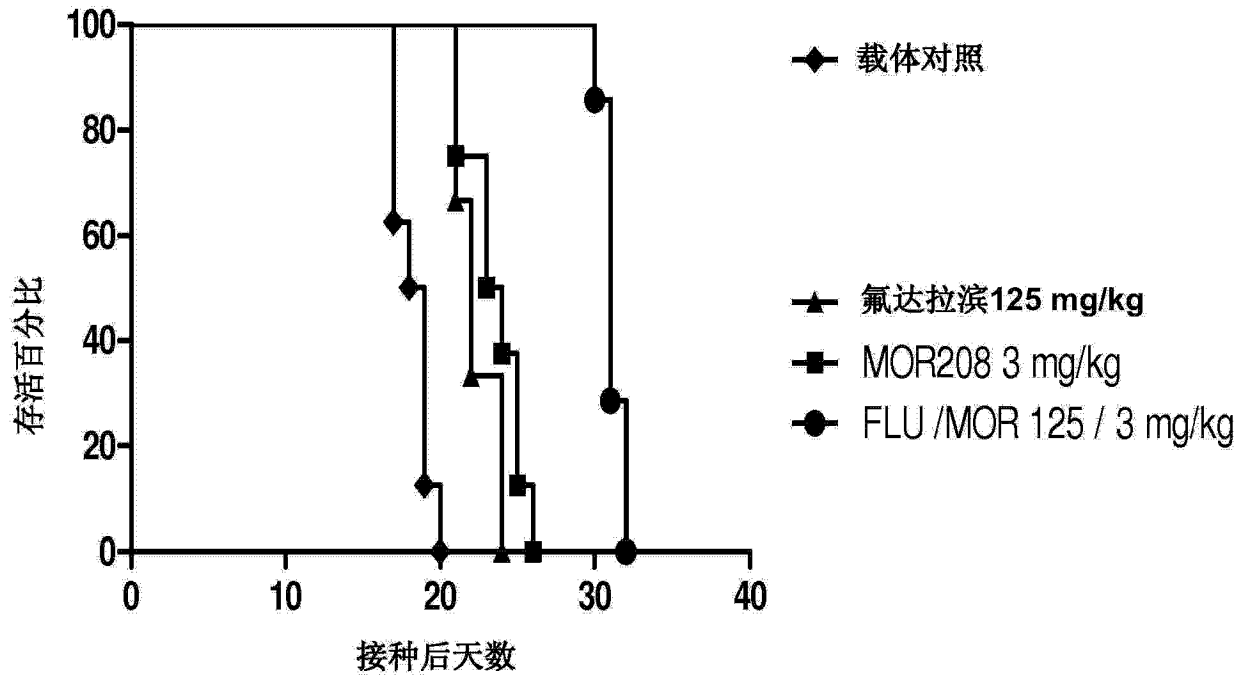


图 7