



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0058583
(43) 공개일자 2020년05월27일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7014299(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년08월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2019-7026462
원출원일자(국제) 2012년08월14일
심사청구일자 2019년09월09일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년05월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/065906</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/024097
국제공개일자 2013년02월21일</p> <p>(30) 우선권주장
11177658.9 2011년08월16일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
모르포시스 아게
독일 프라네그 디-82152, 제멜바이스스트라쎄 7</p> <p>(72) 발명자
아멜스도르페르, 유타
독일, 85421 헤베르트샤우젠, 게오르그-랑-에스티알. 9
슈테이들, 슈테판
독일, 81241 뮌헨, 에벤비크에스티알. 25
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
허용특</p> |
|--|---|

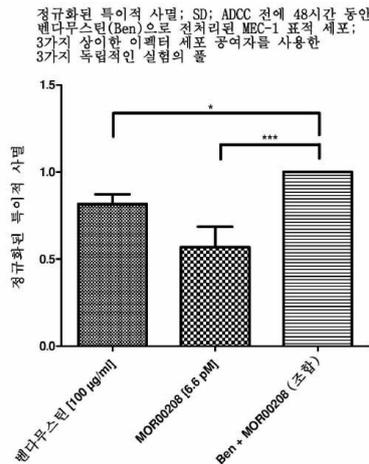
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD19 항체 및 질소 머스타드를 사용한 조합 요법**

(57) 요약

본 개시내용은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료를 위한 항-CD19 항체 및 질소 머스타드의 약제학적 조합을 기재한다.

대표도 - 도5



이 도면은 표 2에 나타난 데이터로부터의 평균을 보여준다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

빈테리히, 마르크

독일, 81371 뮌헨, 임플레르에스티알. 52

크론, 수잔

독일, 81241 뮌헨, 하이델백 22a

로즈크예르, 리사

스위스, 씨에이치-8908 헤딩엔, 프로무스슈트라쎄
38에이치

(30) 우선권주장

61/523,861 2011년08월16일 미국(US)

61/647,539 2012년05월16일 미국(US)

61/654,097 2012년06월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 상호 경쟁하는 항체를 포함하는 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴(bendamustine)의 상승적 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 조합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 서열 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYKNEKFKGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYYGTRVFDYWQGT LVTVSS(SEQ ID NO: 10)의 가변 중쇄 및 서열 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 11)의 가변 경쇄를 포함하는 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 서열 ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPDVFLFPPKPKDITLMI SRTPETVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYCKKVSNAKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 12)의 중쇄 불변 도메인을 포함하는 조합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD19에 특이적인 상기 항체 및 벤다무스틴이 따로 투여되는 조합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 벤다무스틴이 CD19에 특이적인 상기 항체의 투여 전에 투여되는 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 인간 PBMC의 존재 하에서 단독의 벤다무스틴보다 적어도 2배 더 나은 효능으로 ADCC에 의한 MEC-1 세포사를 매개할 수 있는 조합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 비호지킨 림프종의 치료에 사용하기 위한 조합으로서, 상기 비호지킨 림프종이 여포성 림프종, 소림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma), 점막-관련 림프 조직, 가장자리 구역, 미만성 거대 B 세포, 버킷 및 맨틀 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 조합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제61/654,097호(출원일: 2012년 6월 1일), 미국 가출원 제61/647,539호(출원일: 2012년 5월 16일) 및 미국 가출원 제61/523,861호(출원일: 2011년 8월 16일)의 이익을 주장하며, 이들 전문은 참조로 포함된다.

[0004] 기술 분야

[0005] 본 개시내용은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료를 위한 항-CD19 항체 및 질소 머스타드의 약제학적 조합에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] B 세포는 체액성 면역 반응에서 큰 역할을 수행하는 림프구이다. 이들은 대부분의 포유류의 골수에서 생성되며, 순환하는 림프구 풀(pool)의 5% 내지 15%를 나타낸다. B 세포의 주요 기능은 다양한 항원에 대한 항체를 만드는 것이며, 후천성 면역계의 필수 성분이다.

[0007] 면역계의 조절에서의 이들의 결정적인 역할 때문에, B 세포의 조절이상 (dysregulation)은 다양한 장애, 예를 들어, 림프종 및 백혈병과 관련이 있다. 이들에는 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL)이 포함된다.

[0008] NHL은 림프구로부터 비롯된 이종 악성종양이다. 미국에서, 이환수는 연간 65,000명이며, 사망률은 대략 20,000명인 것으로 추산된다(문헌[American Cancer Society, 2006]; 및 문헌[SEER Cancer Statistics Review]). 질환은 모든 연령에서 발생할 수 있으며, 보통 발병은 40세가 넘는 성인에서 시작하며, 연령에 따라 이환수가 증가한다. NHL은 림프절, 혈액, 골수 및 비장에서 축적되는 림프구의 클론 증식을 특징으로 하지만, 임의의 주요 기관이 연루될 수 있다. 병리학자 및 임상가의 의해 사용되는 현행의 분류 시스템은 NHL을 전구체 및 성숙 B-세포 또는 T-세포 신생물로 체계화하는 세계보건기구(WHO) 종양 분류이다. PDQ는 현재 임상 시험으로의 도입을 위해 NHL을 저위험군(indolent) 또는 고위험군(aggressive)으로 나눈 것이다. NHL 저위험군은 주로 여포성 하위유형, 소림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma), MALT(점막-관련 림프 조직) 및 가장자리 구역으로 이루어지며; 저위험군은 새로 진단된 B-세포 NHL 환자의 대략 50%를 포함한다. NHL 고위험군에는 주로 미만성 거대 B 세포(DLBL, DLBCL 또는 DLCL)(모든 새로 진단된 환자의 40%가 미만성 거대 세포를 가짐), 버킷(Burkitt's) 및 맨틀 세포(mantle cell)의 조직학적 진단을 갖는 환자가 포함된다. NHL의 임상 경과는 매우 가변적이다. 임상 경과의 주요 결정인자는 조직학적 하위유형이다. 대부분의 NHL의 저위험군 유형은 불치 질환인 것으로 여겨진다. 환자는 초기에는 화학요법 또는 항체 치료법 중 어느 하나에 반응하며, 대부분은 재발할 것이다. 현재까지의 연구는 초기의 중재(intervention)를 사용하여 생존의 향상을 입증하지 못하였다. 무증후성 환자에서, 환자가 증후를 보이거나 질환 속도가 가속되는 것으로 보일 때까지 " 지켜보고 기다리는 " 것을 허용할 수 있다. 시간이 지남에 따라, 질환은 보다 고위험군인 조직학으로 변환될 수 있다. 생존 중간값은 8년 내지 10년이며, 저위험군 환자는 이들의 질환의 치료 단계 동안 종종 3회 이상의 치료를 제공받는다. 조직학적으로 증후성인 저위험군 NHL 환자의 초기의 치료는 조합 화학요법이다. 가장 통상적으로 사용되는 작용제에는 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 빈크리스틴(vincristine) 및 프레드니손(prednisone)(CVP); 또는 사이클로포스파미드, 아드리아마이신(adriamycin), 빈크리스틴, 프레드니손(CHOP)이 포함된다. 환자의 대략 70% 내지 80%는 이들의 초기의 화학요법에 반응할 것이며, 관해의 기간은 대략 2년 내지 3년 지속된다. 궁극적으로, 대다수의 환자는 재발한다. 항-CD20 항체, 리툭시맙(rituximab)의 발견 및 임상적 이용은 반응 및 생존률의 유의미한 향상을 제공한다. 대부분의 환자를 위한 현행의 표준 진료(care)는 리툭시맙 + CHOP(R-CHOP) 또는 리툭시맙 +

CVP(R-CVP)이다. 인터페론은 알킬화제와 조합하여, NHL의 초기 치료를 위해 승인되었으나, 미국에서 이용이 제한된다. 리툭시맙 치료법은 몇몇 유형의 NHL에서 유효한 것으로 보이며, 현재 저위험군(여포성 림프종) 및 고위험군 NHL(미만성 거대 B 세포 림프종) 둘 모두를 위한 1차 치료(first line treatment)로 승인되었다. 그러나, 원발성 내성(primary resistance)(재발된 저위험군 환자에서 50% 반응), 획득된 내성 (acquired resistance)(재치료시 50% 반응률), 희귀한 완전 반응(재발된 집단에서의 2%의 완전한 반응률) 및 지속적인 재발 패턴을 포함하는 항-CD20 모노클로날 (monoclonal) 항체(mAb)의 상당한 한계점이 존재한다. 마지막으로, 많은 B 세포는 CD20을 발현하지 않으며, 이에 따라, 많은 B 세포 장애는 항-CD20 항체 치료법을 사용하여 치료할 수 없다.

[0009] NHL에 더하여, B 세포의 조절이상으로부터 야기되는 몇몇 유형의 백혈병이 존재한다. 만성 림프구성 백혈병("만성 림프구 백혈병" 또는 "CLL"로도 공지되어 있음)은 B 림프구의 비정상적인 축적에 의해 야기되는 성인 백혈병의 유형이다. CLL에서 악성 림프구는 정상 및 성숙을 보일 수 있으나, 이들은 감염에 효과적으로 대항할 수 없다. CLL은 성인에서 가장 통상적인 형태의 백혈병이다. 남성은 여성의 2배만큼 CLL이 발병할 가능성이 있다. 그러나, 주요 위험 인자는 연령이다. 새로운 사례가 75% 넘게 50세 초과 환자에서 진단된다. 10,000건이 넘는 사례가 매년 진단되며, 사망률은 연간 거의 5,000건이다(문헌[American Cancer Society, 2006]; 및 문헌[SEER Cancer Statistics Review]). CLL은 치유할 수 없는 질환이나, 대부분의 경우에 천천히 진행된다. CLL에 걸린 많은 사람들은 다년간 정상적이고 활동적인 생활을 한다. 이의 느린 발병 때문에, 초기 단계 CLL은 일반적으로 치료하지 않는데, 이는 초기의 CLL 증세가 생존 시간 또는 삶의 질을 향상시키지 않는 것으로 여겨지기 때문이다. 대신에, 증상(condition)을 시간에 따라 모니터링한다. 초기의 CLL 치료는 질환의 정확한 진단 및 진행에 따라 달라진다. CLL 치료법에 사용되는 많은 작용제(agent)가 존재한다. 조합 화학치료 요법, 예를 들어, FCR(플루다라빈(fludarabine), 사이클로포스파미드 및 리툭시맙) 및 BR(벤다무스틴(bendamustine) 및 리툭시맙)은 새로 진단된 CLL과 재발된 CLL 둘 모두에서 효과적이다. 동종 골수(줄기 세포) 이식은 이의 위험 때문에 CLL에 대한 1차 치료로서 드물게 사용된다.

[0010] 다른 유형의 백혈병은 급성 림프구성 백혈병으로도 공지되어 있는 급성 림프모구성 백혈병(ALL)이다. ALL은 골수에서의 악성 및 미성숙 백혈구(림프모구로도 알려져 있음)의 과다생성 및 지속적인 증식을 특징으로 한다. '급성'은 미분화, 미성숙 상태의 순환 림프구("모구")를 지칭하며, 질환은 빠르게 진행하며, 치료되지 않고 남겨진다면 기대 수명은 수주 내지 수개월이다. ALL은 소아에서 가장 흔하며, 최대 발병률은 4세 내지 5세이다. 12세 내지 16세의 어린이는 다른 이들보다 ALL로 인해 보다 쉽게 사망한다. 현재, 소아 ALL의 80% 이상이 치유할 수 있는 것으로 여겨진다. 매년 4,000건 미만의 사례가 진단되며, 사망률은 연간 거의 1,500명이다(문헌[American Cancer Society, 2006]; 및 문헌[SEER Cancer Statistics Review]).

[0011] 인간 CD19 분자는 프레(pre)-B 세포, 조기 발생 중 B 세포(즉, 미성숙 B 세포), 형질 세포로의 최종 분화를 통한 성숙 B 세포 및 악성 B 세포를 포함하나 이들에 한정되지 않는 인간 B 세포의 표면에 발현되는 구조적으로 구분되는 세포 표면 수용체이다. CD19는 대부분의 프레-B 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 비호지킨 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병(CLL), 프로(pro)-림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병, 일반 급성 림프구성 백혈병(common acute lymphocytic leukemia) 및 일부 무반응(Null)-급성 림프모구성 백혈병에 의해 발현된다(문헌[Nadler et al, J. Immunol., 131 :244-250 (1983)], 문헌[Loken et al, Blood, 70:1316-1324 (1987)], 문헌[Uckun et al, Blood, 71 :13- 29 (1988)], 문헌[Anderson et al, 1984. Blood, 63:1424-1433 (1984)], 문헌[Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397(1995)]). 형질 세포상의 CD19의 발현에 의해, 이것이 분화된 B 세포 종양, 예를 들어, 다발성 골수종, 형질세포종, 발덴스트롬 종양(Waldenstrom's tumor)상에서 발현될 수 있는 것이 추가로 뒷받침된다(문헌[Grossbard et al., Br. J. Haematol, 102:509-15(1998)]; 문헌[Treon et al, Semin. Oncol, 30:248-52(2003)]).

[0012] 그러므로, CD19 항원은 비호지킨 림프종(본 명세서에 기재된 하위유형 각각 포함), 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 있어서 면역요법에 대한 표적이다.

[0013] 특정 CD19 치료법을 나타내었다. CD3- ζ 및 4-BB 동시자극 도메인 둘 모두를 포함하는 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포를 진행된 CLL이 있는 3명의 환자에게 투여하였다. 문헌[Kalos et al., T cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia, Science Translational Medicine, vol. 3, no. 95 (10 August 2011)]은 전문이 참조로 포함된다. 전문이 참조로 포함되는 문헌 [Sadelain et al., The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors, Current Opinion in Immunology, Elsevier, vol. 21, no.2, 2 April 2009]은 또한, 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 기술하고 있다. 그러나, 칼로스 (Kalos) 등의 문헌 또는 사텔라인

(Sadelain) 등의 문헌 중 어느 것도 본 명세서에 예시된 바와 같이 벤다무스틴(bendamustine)과 조합되는 CD19에 특이적인 항체를 기술하지 않았다.

- [0014] 비호지킨 림프종의 치료에서의 치료법으로서의 벤다무스틴은 전문이 참조로 포함되는 문헌[Bremer et al., High rates of long lasting remission after 5-day bendamustine chemotherapy cycles in pre-treated low-grade non-Hodgkin's lymphomas, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Springer International, Berlin, DE, vol. 128, no. 11, 1 November 2002] 및 전문이 참조로 포함되는 제W02006065392호에 기술되어 있으나, 어느 것도 본 명세서에 예시된 바와 같이 벤다무스틴과 조합되는 CD19에 특이적인 항체를 제시하지 않는다.
- [0015] 비특이적 B 세포 림프종에서의 CD19 항체의 용도는 가능한 조합 파트너의 긴 목록에서의 벤다무스틴의 피상적인 언급과 함께, 전문이 참조로 포함되는 제W02007076950호(제US2007154473호)호에 논의되어 있으나, 본 명세서에 예시된 항체를 교시하거나, 또는 본 명세서에 예시된 바와 같은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에서의 조합의 상승 효과를 제시하지 못하였다.
- [0016] CLL, NHL 및 ALL에서의 CD19 항체의 이용은 전문이 참조로 포함되는 문헌[Scheuermann et al., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995)]에 기술되어 있으나, 본 명세서에 예시된 조합을 시사하지 못하였다.
- [0017] CD19에 특이적인 추가의 항체는 모두 전문이 참조로 포함되는 제W02005012493호(제US7109304호), 제W02010053716호(제US12/266,999호)(Immunomedics); 제W02007002223호(제US US8097703호)(Medarex); 제W02008022152호(제12/377,251호) 및 제W02008150494호(Xencor), 제W02008031056호(제US11/852,106호)(Medimmune); 제W02007076950호(제US11/648,505호)(Merck Patent GmbH); 제W02009/052431호(제US12/253,895호)(Seattle Genetics); 및 제W02010095031호(제12/710,442호)(Glenmark Pharmaceuticals)에 기술되어 있다.
- [0018] CD19에 특이적인 항체 및 다른 작용제의 조합은 모두 전문이 참조로 포함되는 제W02010151341호(제US13/377,514호)(The Feinstein Institute); 제US5686072호(University of Texas) 및 제W02002022212호(제PCT/US01/29026호)(IDEC Pharmaceuticals)에 기술되어 있다.
- [0019] 항암제의 발견 및 개발에서의 최근의 진전에도 불구하고, CD19-발현 종양을 포함하는 많은 형태의 암은 여전히 예후가 불량하다. 따라서, 이러한 암의 형태를 치료하기 위한 개선된 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0020] 본 발명은 항-CD19 항체 및 질소 머스타드를 사용한 조합 요법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0021] 단독 또는 종래 기술에서 행한 단독 또는 조합 중 어느 것도 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에서 예시된 항체 및 벤다무스틴의 조합의 상승 효과를 제시하지 않는다.
- [0022] 일 태양에서, 본 개시내용은 CD19에 특이적인 항체 및 질소 머스타드의 상승적 조합에 관한 것이다. 이러한 조합은 B 세포 악성종양, 예를 들어, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 유용하다.
- [0023] 특정 화합물 또는 화합물의 조합이 인간에서 어떻게 거동할지를 나타내는 시험관내 및 생체내 모델이 고려된다. 또한, 화합물이 시험관내에서 또는 생체내에서 조합되는 경우, 조합이 오직 상가적 효과만을 갖는 것으로 예상된다. 놀랍게도, 본 발명자들은 CD19에 특이적인 특정 항체 및 벤다무스틴의 조합이 단독의 항체 및 벤다무스틴과 비교하여, 만성 B-세포 백혈병 세포주(MEC-1)에서 상승적 수준의 특이적 세포사를 매개하는 것을 발견하였다. 이러한 시험관내 모델은 조합이 인간에서의 만성 림프구 백혈병(CLL)의 치료에서 어떻게 작동할지를 나타낸다. 게다가, 또한 예상치 않게, 본 발명자들은 CD19에 특이적인 특정 항체 및 벤다무스틴의 조합이 단독의 항체 및 벤다무스틴에 비하여 버킷 림프종 SCID 마우스 모델에서 종양 성장을 저해하며, 생존 일수 중간값 및 수명 증가 중간값 둘 모두를 상승적으로 증가시키는 것을 발견하였다. 이들 생체내 모델은 조합이 인간에서의 비호지킨 림프종의 치료에서 어떻게 작동할지를 나타낸다. 요약하면, 예시된 항-CD19 항체 및 벤다무스틴의

조합은 NHL 및 CLL과 관련이 있는 모델에서 상승적으로 거동하였다. NHL 및 CLL 둘 모두가 B 세포 관련 장애이고, CD19가 B-세포 상에서 고도로 발현되기 때문에, 예시된 조합은 동일한 작용 메커니즘을 가질 것이며, 또한 기타 B 세포 관련 장애, 예를 들어, ALL의 치료에서 상승적으로 거동할 것이다.

[0024] 따라서, 예시된 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴의 조합은 인간의 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 유효할 것이다. 또한, 본 발명의 상세한 설명에 예시된 CD19에 특이적인 항체는 이미 임상 시험에 들어갔고, 여기서, 이러한 조합이 인간에서 확인될 수 있다.

[0025] 벤다무스틴 및 기타 질소 머스타드가 DNA 염기 사이에 가닥간(interstrand) 교차-결합(ICL)을 형성하여, 이에 따라, 기초 과정, 예를 들어, 복제 및 전사를 차단하는 알킬화제임에 따라, 벤다무스틴 및 기타 질소 머스타드의 작용 메커니즘이 유사하기 때문에, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병에 걸린 인간을 예시된 항-CD19 항체 및 벤다무스틴 이외의 질소 머스타드의 조합으로 치료하는 경우에도 또한 상승효과가 관찰될 것으로 여겨진다.

[0026] 예시된 항-CD19 항체 및 기타 항-CD19 항체가 CD19에 결합함에 따라, 임의의 항-CD19 항체 및 질소 머스타드, 예를 들어, 벤다무스틴의 조합으로 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병에 걸린 인간을 치료하는 경우에도 상승효과가 관찰될 것으로 여겨진다.

[0027] 예시된 항-CD19 항체가 CD19의 특정 에피토프에 결합함에 따라, 예시된 항체와 상호 경쟁하거나, 예시된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체도 또한 질소 머스타드, 예를 들어, 벤다무스틴과 조합하여 사용되는 경우, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병에 걸린 인간을 치료하는 때에 상승적으로 거동할 것으로 여겨진다.

[0028] 본 개시내용의 일 태양은 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴의 상승적 조합을 포함한다. 바람직한 태양에서, 조합이 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료를 위해 사용된다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 MEC-1 세포 상에서의 단독 및 조합의 MOR00208 및 벤다무스틴의 세포독성 효과를 보여준다.
- 도 2는 MEC-1 세포에서 MOR00208 및 벤다무스틴의 조합의 ADCC 용량 반응 곡선을 보여준다.
- 도 3은 MOR00208의 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 4는 MOR00208의 Fc 영역의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 5는 표 2의 정규화된 특이적 사멸 데이터를 보여준다.
- 도 6은 실시예 3에 기재된 바와 같은 SCID 마우스에서의 인간 라모스(Ramos) 버킷 B-세포 림프종 생존 모델의 결과를 보여준다. 이 도면은 표 6에 보여준 데이터를 나타내나, 처리 관련 사망을 배제한다.
- 도 7은 실시예 2에 기재된 바와 같은, SCID 마우스에서의 피하(SC)-이식 인간 라모스 버킷 B-세포 림프종 종양 성장 모델의 결과의 통계적 분석을 보여준다.
- 도 8은 실시예 2에 기재된 바와 같은, SCID 마우스에서의 피하(SC)-이식 인간 라모스 버킷 B-세포 림프종 종양 성장 모델의 결과를 보여준다.
- 도 9는 실시예 2에 기재된 바와 같은, SCID 마우스에서의 피하(SC)-이식 인간 라모스 버킷 B-세포 림프종 종양 성장 모델의 결과를 보여준다. 이러한 도면에서, BEN 용량은 13mg/kg이다.
- 도 10은 실시예 2에 기재된 바와 같은, SCID 마우스에서의 피하(SC)-이식 인간 라모스 버킷 B-세포 림프종 종양 성장 모델의 결과를 보여준다. 이러한 도면에서, BEN 용량은 16mg/kg이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

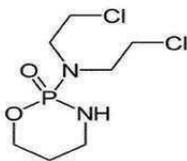
[0030] "상승효과", "상승작용" 또는 "상승적"은 예상되는 조합의 상가적 효과를 초과하는 것을 의미한다. 조합의 "상승효과", "상승작용" 또는 "상승적" 효과는 본 명세서에서 초우(Chou) 등, 클라케(Clarke) 등 및/또는 웨브

(Webb) 등의 방법으로 결정된다. 전문이 참조로 포함되는 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 참조한다. 또한, 전문이 참조로 포함되는 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 참조한다. 또한, 전문이 참조로 포함되는 문헌[Webb, J. L. (1963) Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York]을 참조한다.

[0031] 용어 "항체"는 임의의 아이소형, 예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 포함하는 모노클로날 항체를 의미한다. IgG 항체는 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄로 구성된다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역을 함유한다. 각각의 가변 영역은 항원의 에피토프에 결합하는데 주원인이 있는 "상보성-결정 영역"("CDR") 또는 "초가변 영역"으로 지칭되는 3개의 세그먼트(segment)를 함유한다. 이들은 N-말단으로부터 순차적으로 넘버링되어, CDR1, CDR2 및 CDR3로 지칭된다. CDR 외측의 가변 영역의 더욱 고도로 보존된 부분은 "프레임워크 영역"으로 지칭된다. "항체 단편"은 Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab')₂ 단편 또는 다른 단편을 의미하며, 이는 적어도 하나의 가변 중쇄 또는 가변 경쇄를 함유하고, 각각은 CDR 및 프레임워크 영역을 함유한다.

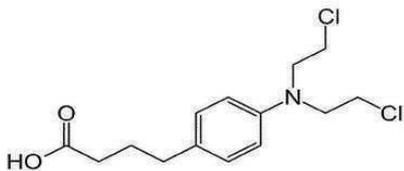
[0032] "질소 머스타드"는 화학요법에 사용되는 비특이적 DNA 알킬화제이다. 알킬화제는 알킬기(C_nH_{2n+1})를 핵산 염기에 부가하는데, 예를 들면, 알킬기를 이미다졸 고리의 7번 질소 원자에서 DNA의 구아닌 염기에 부가한다. 알킬화 단계는 가닥간 교차-결합(ICL)의 형성을 야기한다. 이들 ICL은 고도로 세포독성인데, 이는 이들이 기초 대사 과정, 예를 들어, 복제 및 전사를 차단하기 때문이다. 질소 머스타드는 사이클로포스파미드, 클로람부실(chlorambucil), 우라무스틴(uramustine), 아이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan) 및 벤다무스틴을 포함한다.

[0033] 사이클로포스파미드는 엔독산(Endoxan), 사이톡산(Cytoxan), 네오사르 (Neosar), 프로사이톡스(Procytox) 및 레브이뮴(Revimmune)으로 시판되며, 사이토포스판(cytophospane)으로도 알려져 있다. 사이클로포스파미드 또는 사이클로포스파미드를 포함하는 조합은 림프종, 백혈구 및 일부 고형 종양의 치료에 사용된다. 사이클로포스파미드는 하기의 구조를 갖는다:



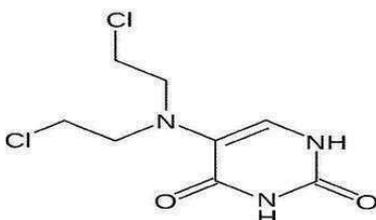
[0034]

[0035] 클로람부실은 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)에 의해 류케란 (Leukeran)으로 시판된다. 이는 주로 만성 림프구성 백혈병의 치료에 사용된다. 클로람부실은 하기의 구조를 갖는다:



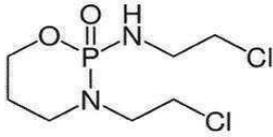
[0036]

[0037] 우라무스틴은 비호지킨 림프종의 치료에 사용된다. 우라무스틴은 하기의 구조를 갖는다:



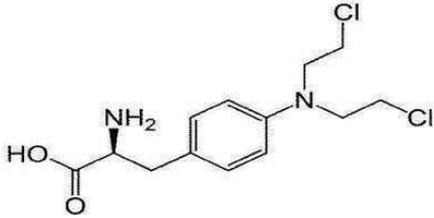
[0038]

[0039] 아이포스파미드는 미톡사나(Mitoxana) 및 아이팩스(Ifex)로 시판된다. 아이포스파미드는 하기의 구조를 갖는다:



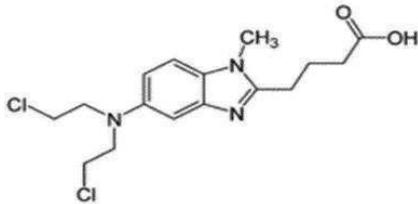
[0040]

[0041] 벨팔란은 알케란(Alkeran)으로 시판된다. 벨팔란은 하기의 구조를 갖는다:



[0042]

[0043] 벤다무스틴은 명칭 리보무스틴(Ribomustin)® 및 트레안다(Treanda)® 하에 시판되며, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 저위험군 B-세포 비호지킨 림프종(NHL) 및 기타 림프종의 치료를 위한 먼디파마 인터내셔널 코퍼레이션 리미티드(Mundipharma International Corporation Limited)(아스텔라스 파마 게엠베하(Astellas Pharma GmbH)의 피허가자)에 의한 SDX-105 및 세팔론(Cephalon)으로도 알려져 있다. 벤다무스틴은 하기의 구조를 갖는다:



[0044]

[0045] 본 명세서에 사용되는 경우, "BEN"은 벤다무스틴을 의미한다.

[0046] "VH"는 항체 또는 항체 단편의 변형글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. "VL"은 항체 또는 항체 단편의 변형 글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0047] 용어 "CD19"는 하기의 약어를 갖는 CD19로 공지되어 있는 단백질을 지칭한다: B4, B-림프구 항원 CD19, B-림프 구 표면 항원 B4, CVID3, 분화 항원 CD19, MGC12802 및 T-세포 표면 항원 Leu-12.

[0048] 인간 CD19는 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

[0049] MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVQLCKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLCGLKNRSSEGPS SPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPP DSVSRGPLSWTHVHPKPKSLLSLELKDDRPARDMWMETG LLLPRATAQDAGKYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCS LVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVT PPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGP EEEEEGEG YEEDPSEEDSEFYENDSNLGDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFNSAESYENEDEELTQP VARTMDFLSPHGS AWDP SREATSLGSQSYEDMRGILYAA PQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMG TWSTR (SEQ ID NO: 7).

[0050] "MOR00208"은 항-CD19 항체이다. 가변 도메인의 아미노산 서열은 도 3에 제공되어 있다. MOR00208의 중쇄 및 경쇄 Fc 영역의 아미노산 서열은 도 4에 제공되어 있다. "MOR00208" 및 "XmAb 5574"는 도 3 및 4에 나타난 항체를 기술하기 위해 동의어로 사용된다. MOR00208 항체는 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 출원 제12/377,251호에 기술되어 있다.

[0051] CD19에 특이적인 추가의 항체는 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 제7,109,304호(Immunomedics); 전문이 참조로 포함되는 미국 출원 제11/917,750호 (Medarex); 전문이 참조로 포함되는 미국 출원 제11/852,106호 (Medimmune); 전문이 참조로 포함되는 미국 출원 제11/648,505호(Merck Patent GmbH); 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 제7,968,687호(Seattle Genetics); 및 전문이 참조로 포함되는 미국 출원 제12/710,442호(Glenmark

Pharmaceuticals)에 기술되어 있다.

- [0052] "Fc 영역"은 인간에서 IgG1, 2, 3, 4 하위분류(subclass) 또는 기타의 것일 수 있는 항체의 불변 영역을 의미한다. 인간 Fc 영역의 서열은 IMGT, 인간 IGH C-영역, http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html (검색일: 2011년 5월 16일)에서 이용가능하다.
- [0053] "RefmAb33"은 아미노산 서열이 하기와 같은 항체이다:
- [0054] 하기의 Fc 영역을 포함하는 중쇄:
- [0055] QVTLRESGPALVKPTQLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMPADATATYYCARDMI
FNFYFDVWGGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8),
- [0056] 하기의 Fc 영역을 포함하는 경쇄:
- [0057] DIQMTQSPSTLSASVGDVRTITCSASSRVGMHWYQQKPKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAFYCFQSGYPTFFGGGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9).
- [0058] RefmAb33은 RSV에 대해 특이적이며, 이것이 MOR00208과 동일한 Fc 영역을 공유하기 때문에, 아이소타입 (isotype) 대조군으로 사용된다.
- [0059] "조합"은 1가지 초과와 물품, 예를 들어, 화합물, 이를 테면, 항체 및 벤다무스틴을 의미한다.
- [0060] 또한, 본 개시내용은 조합, 기재된 조합을 포함하는 약제 및 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 상승적 조합의 2가지 성분, 예를 들어, CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴이 동시에 또는 따로 함께 투여될 수 있다. 2가지 성분은 함께 투여되는 경우, 약제학적 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있는 하나의 약제학적 조성물 중에 함께 제형화될 수 있다. 대안적으로, 2가지 성분은 또한 상이한 약제학적 조성물 중에 제형화될 수 있다. 이러한 경우에, 2가지 성분은 동시에 또는 따로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 벤다무스틴은 CD19에 특이적인 항체, 예를 들어, MOR00208의 투여 전에 및/또는 이와 따로 투여된다.
- [0061] 약제학적 조성물은 활성 작용제, 예를 들어, 인간에서의 치료적 이용을 위한 항체를 포함한다. 약제학적 조성물은 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0062] "투여되는" 또는 "투여"는 주사가능한 형태, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피내 또는 피하 경로, 또는 예를 들어, 흡입용 비강 스프레이 또는 에어로졸로서 또는 섭취가능한 용액, 캡슐 또는 정제로서의 점막 경로에 의한 전달을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0063] 화합물 또는 조합의 "치료적 유효량"은 주어진 질환 또는 장애 및 이의 합병증의 임상적 징후를 치유하거나, 완화시키거나 또는 부분적으로 저지하기에 충분한 양을 지칭한다. 특정 치료적 목적에 유효한 양은 질환 또는 손상의 중증도뿐 아니라, 대상체의 체중 및 일반 상태에 좌우될 것이다. 적절한 용량의 결정이 값의 매트릭스를 구축하고, 매트릭스 내의 상이한 점을 시험함으로써, 통상적인 실험을 사용하여, 달성될 수 있음이 이해될 것이며, 이들 모두는 숙련된 전문의 또는 임상 과학자의 통상의 기술 내에 있다.
- [0064] 본 명세서에서 "CDR"은 초티아(Chothia) 등 또는 카바트(Kabat) 등에 의해 정의된다. 전문이 참조로 포함되는 문헌[Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol., 196(4):901-17]을 참조한다. 전문이 참조로 포함되는 문헌[Kabat E.A, Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. and 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 참조한다.
- [0065] "상호 경쟁한다"는 표준 경쟁 결합 검정에서 CD19에 대한 다른 항체 또는 결합체의 결합을 방해하는 항체 또는 다른 결합체의 능력을 의미한다. 항체 또는 다른 결합 작용제가 CD19에 대한 다른 항체 또는 결합 분자의 결합을 방해할 수 있는 능력 또는 정도와, 이에 따라, 이것을 본 발명에 따라 상호 경쟁하는 것으로 말할 수 있는지는 표준 경쟁 결합 검정을 사용하여 결정할 수 있다. 적절한 하나의 검정법은 (예를 들어, 비아코어(BIAcore) 3000 기기(스웨덴 옘살라 소재의 비아코어(Biacore))의 사용에 의한) 비아코어 기술의 사용을 수반하며, 이는

표면 플라스몬 공명 기술을 사용하여 상호작용의 정도를 측정할 수 있다. 상호 경쟁을 측정하기 위한 다른 검정은 ELISA-기반의 방법을 사용한다. 상호 경쟁을 기반으로 하는 "에피토프 비닝(epitope binning)" 항체들을 위한 고효율 과정은 국제 특허 출원 제WO 2003/48731호에 기술되어 있다.

[0066] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있거나, 다르게는 분자와 상호작용할 수 있는 임의의 단백질 결정인자를 포함한다. 에피토프 결정인자는 일반적으로 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹화(grouping)로 구성되며, 특이적인 3차원적 구조 특징뿐 아니라 비전하(specific charge) 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 "선형" 또는 "입체형태"일 수 있다. 용어 "선형 에피토프"는 단백질과 상호작용 분자(예를 들어, 항체) 간의 상호작용점 모두가 단백질의 일차 아미노산 서열을 따라 선형으로 존재하는 에피토프를 지칭한다(연속적). 용어 "입체형태적 에피토프"는 불연속 아미노산이 3차원 입체형태에서 합쳐지는 에피토프를 지칭한다. 입체형태적 에피토프에서, 상호작용점은 서로 분리된 단백질 상의 아미노산 잔기에 걸쳐 존재한다.

[0067] "-와 동일한 에피토프에 결합하는"은 예시된 항체와 동일한 에피토프를 가지며, CD19에 대하여 결합하는 항체 또는 다른 결합 작용제의 능력을 의미한다. CD19에 대한 예시된 항체 및 다른 항체의 에피토프는 표준 에피토프 맵핑(mapping) 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 당업계에 널리 공지되어 있는 에피토프 맵핑 기술은 문헌 [Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E.Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey]에서의 에피토프 맵핑 프로토콜을 포함한다. 예를 들어, 선형 에피토프는 예컨대 단백질 분자의 부분에 상응하는 다수의 펩티드를 고체 지지체 상에서 동시에 합성하는 단계 및 펩티드가 여전히 지지체에 부착되는 동안 펩티드를 항체와 반응시키는 단계에 의해 결정될 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제4,708,871호; 문헌[Geysen et al, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:3998-4002]; 문헌[Geysen et al, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182]; 문헌[Geysen et al, (1986) Mol. Immunol. 23 :709-715]에 기술되어 있다. 유사하게, 입체형태적 에피토프는 예를 들어, 수소/중수소 교환, x-선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명에 의해서와 같이 아미노산의 공간적 입체형태를 결정함으로써 용이하게 확인된다. 예를 들어, 상기 에피토프 맵핑 프로토콜을 참조한다. 또한 단백질의 항원 영역은 예를 들어, 옥스포드 몰레큘라 그룹(Oxford Molecular Group)으로부터 입수할 수 있는 오미가(Omega) 버전 1.0 소프트웨어 프로그램을 사용하여 계산되는 것들과 같이, 표준 항원성 및 소수성 플롯을 사용하여 확인할 수 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램은 항원성 프로파일의 결정을 위해서는 문헌[Hopp/Woods method, Hopp et al, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828]을 사용하고, 소수성 플롯을 위해서는 문헌[Kyte-Doolittle technique, Kyte et al, (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132]을 사용한다.

[0069] 구현예

[0070] 본 개시내용의 일 태양은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한, CD19에 특이적인 항체 및 질소 머스타드의 조합을 포함한다. 구현예들에서, 조합은 상승적이다.

[0071] 본 명세서에서, 예시된 항-CD19 항체 및 벤다무스틴의 조합은 NHL 및 CLL과 관련된 시험관내 및 생체내 모델에서 상승적으로 거동하였다. NHL 및 CLL 둘 모두가 B 세포 관련 장애이고, CD19가 B-세포 상에서 고도로 발현되기 때문에, 예시된 조합은 동일한 작용 메커니즘을 갖고, 또한, 다른 B 세포 관련 장애, 예를 들어, ALL의 치료에서 상승적으로 거동할 것이다. 따라서, 예시된 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴의 조합은 인간의 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료에 유효할 것이다.

[0072] 벤다무스틴 및 기타 질소 머스타드가 DNA 염기 사이에 가닥간 교차-결합(ICL)을 형성하여, 기초 과정, 예를 들어, 복제 및 전사를 차단하는 알킬화제임에 따라, 벤다무스틴 및 기타 질소 머스타드의 작용 메커니즘이 유사하기 때문에, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병에 걸린 인간을 예시된 항-CD19 항체 및 벤다무스틴 이외의 질소 머스타드, 예를 들어, 사이클로포스파미드, 클로람부실, 우라무스틴, 아이포스파미드 및 멜팔란의 조합으로 치료하는 경우에도 또한 상승효과가 관찰될 것으로 여겨진다.

[0073] 예시된 항-CD19 항체 및 기타 항-CD19 항체가 CD19에 결합함에 따라, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병에 걸린 인간을 임의의 항-CD19 항체 및 질소 머스타드의 조합으로 치료하는 경우에도 상승효과가 관찰될 것으로 여겨지며, 여기서, 항-CD19 항체는 예를 들어, 모든 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 출원 제12/377,251호(Xencor), 제WO2005012493호, 제WO2010053716호(Immunomedics); 제WO2007002223호(Medarex); 제WO2008022152호(Xencor); 제WO2008031056호(Medimmune); 제WO2007/076950호(Merck Patent

GmbH); 제W02009/052431호(Seattle Genetics); 및 제W02010095031호(Glenmark Pharmaceuticals)에 기술되어 있다.

- [0074] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 상호 경쟁하는 항체를 포함한다.
- [0075] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.
- [0076] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한다.
- [0077] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 서열 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSKAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTYNEKFGQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS(SEQ ID NO: 10)의 가변 중쇄 및 서열 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK(SEQ ID NO: 11)의 가변 경쇄를 포함한다.
- [0078] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 하기의 서열의 중쇄 불변 도메인을 포함한다:
- [0079] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPKEETISKTGKQPREEPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 12).
- [0080] 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 하기의 서열의 경쇄 불변 도메인을 포함한다:
- [0081] RTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 13).
- [0082] 구현예들에서, 질소 머스타드는 벤다무스틴이다.
- [0083] 구현예들에서, 조합의 구성성분, CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴은 따로 투여된다. 일 구현예에서, 벤다무스틴은 CD19에 특이적인 항체의 투여 전에 투여된다.
- [0084] 구현예들에서, 조합은 약제학적 조성물이다. 구현예들에서, 조성물은 허용가능한 담체를 포함한다. 구현예들에서, 조합은 유효량으로 투여된다.
- [0085] 다른 태양에서, 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴의 상승적 조합은 단리된 인간 PBMC의 존재 하에 ADCC에 의한 MEC-1 세포사를 단독의 벤다무스틴보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 나은 효율로 매개할 수 있다.
- [0086] 본 개시내용의 일 태양은 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료를 위한 서열 SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD19에 특이적인 항체 및 벤다무스틴의 상승적 조합을 포함한다. 구현예들에서, 비호지킨 림프종은 여포성 림프종, 소림프구성 림프종, 점막-관련 림프조직, 가장자리 구역, 미만성 거대 B 세포, 버킷 및 맨틀 세포로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0087] 다른 태양은 CD19에 특이적인 항체 및 질소 머스타드의 투여를 포함하는, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료를 필요로 하는 개체에서의 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및/또는 급성 림프모구성 백혈병의 치료 방법을 포함한다. 방법의 구현예들에서, CD19에 특이적인 항체는 서열

SYVMH(SEQ ID NO: 1)의 HCDR1 영역, 서열 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)의 HCDR2 영역, 서열 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)의 LCDR1 영역, 서열 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)의 LCDR2 영역 및 서열 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한다. 방법의 구현예들에서, 항체는 예시된 CD19에 특이적인 항체를 포함한다. 방법의 구현예들에서, 질소 머스타드는 벤다무스틴이다.

[0089] 실시예

[0090] 실시예 1: 단독 및 조합의 MOR00208 및 벤다무스틴을 사용한 MEC-1 세포의 증식의 저해

[0091] 재료

[0092] MEC-1 세포: 만성 B-세포 백혈구 세포주 DSMZ# ACC497; 세포 배지: 글루타맥스(GlutaMAX)TM가 있는 이스코브스 변형 돌베코스 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM), 인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 번호: 31980-048, 20% FCS; PBMC: 고정된 글루타민이 있는 RPMI1640, 팬 바이오테크 게엠베하(PAN Biotech GmbH), 카탈로그 번호: P04-13500, 10% FCS 보충; 비오콜(Biocoll): 바이오크롬 아게(Biochrome AG) 카탈로그 번호: L6115 롯데 번호: 1050T; 벤다무스틴: 먼디파마 롯데 번호: 88018; FCS: 팬 카탈로그 번호: 3302-P282403 롯데 번호: P282403; 및 MOR00208과 동일한 Fc 영역이 있는 RefmAb33(항-RSV).

[0093] 방법

[0094] 단독 및 조합의 MOR00208 및 벤다무스틴의 세포독성을 MEC-1 세포에서 시험하였다. BEN은 알킬화제이며, 이에 따라, MEC-1 세포에서 직접적인 세포독성을 통해 기능한다. MOR00208은 CD19를 표적화하며, 또한 MEC-1 세포사에 있어서, ADCC를 통해 기능한다. 하기의 그룹에 대하여 MEC-1 세포사를 측정하였다: 100µg/ml에서의 BEN; 6,6pm에서의 MOR00208, 및 6,6pm에서의 MOR00208 및 100µg/ml에서의 BEN의 조합. 이들 농도가 MOR00208 및 BEN에 대한 EC50에 존재하거나 그 근처에 존재하기 때문에, 이들 농도를 선택하였다. 다음의 것을 대조군으로 사용하였다: 단독의 RefmAb33 또는 PBMC. BEN 그룹 및 MOR00208+BEN 조합 그룹 둘 모두에서, MEC-1 세포를 ADCC 검정 측정 48시간 전에 BEN과 사전-인큐베이션시켰다. MEC-1 세포를 1mg/ml 칼세임(Calcein) AM을 사용하여 염색한 다음, 계수하고, 2×10⁵ 개/ml로 조정하였다. PBMC를 계수하고, 6×10⁶ 개/ml로 조정하였다. 세포사 검정을 하기와 같이 행하였다: 96 웰 플레이트를 사용하여, MEC-1 세포의 100µl의 세포 현탁액을 웰마다 첨가한 다음, PBMC의 100µl의 세포 현탁액을 각 웰에 첨가하여, 30:1의 E:T 비를 초래하였다. 항체를 배지에 1µg/ml로 희석하였다. 세포를 원심분리하고 재현탁시켰다. 표적:이펙터 세포-켈렛에, 100µl의 항체 용액 또는 해당 대조군 용액을 첨가하였다. 혼합물을 37°C에서 CO2 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포사 측정을 하기와 같이 취하였다: 인큐베이션시킨 세포 용액(약 100µl)을 FACS 튜브로 옮기고, 200µl의 FACS 완충제(DPBS + 3% FCS) 및 0,5µl PI 스투 용액을 각 튜브에 첨가하였다. FACS-Calibur를 사용하였다. 사멸된 MEC-1 세포를 프로피듐 아이오다이드로 염색하였다. 표 1 및 도 1은 미가공 데이터를 보여준다.

[0095] [표 1]

	대조군	MOR00208 6,6pm	BEN 100 µg/ml	BEN+MOR00208 조합
실험 1	25,2	73,6	83,6	94,0
실험 2	18	41,5	53,3	64,9
실험 3	30,9	57,2	75,6	83,6

[0096] 값은 세포사%로 나타낸다. 각 실험은 상이한 공여자 유래의 PBMC를 나타낸다. 각 실험을 위해 사용된 대조군은 RefMab33이었다.

[0098] 표 2는 특이적인 사멸에 대하여 정규화시킨 표 1의 미가공 데이터 및 상승작용의 결정에서 행한 초우(Chou) 계산의 결과를 보여준다.

[0099] [표 2]

	벤다무스틴 100 µg/ml	MOR00208 6.6 µM	Ben + MOR00208 (조합)	초우 인덱스
실험 1	0.85	0.70	1.0	0.2
실험 2	0.75	0.50	1.0	0.7
실험 3	0.85	0.50	1.0	0.8
평균	0.8	0.6	1.0	0.6

[0100]

[0101]

표 2에 나타난 값은 하기와 같이 계산된다: 1) 표 1에 나타난 미가공 데이터(세포사%)로부터, 백그라운드(대조군)를 제외하여, 각 처리군에 대한 특이적인 사멸을 야기한 다음; 2) MOR00208 + BEN의 조합을 1로 설정함으로써 특이적인 사멸 값을 정규화시켰다. 표 2의 평균은 도 5에 도시되어 있다. MOR00208 + BEN 조합의 초우 팩터(factor) 계산에 사용되는 예시적인 ADCC 용량 반응 곡선은 도 2에 나타나 있다.

[0102]

초우 인덱스(CI) 계산을 완료하여, 단독의 MOR00208 및 BEN에 비한 예시된 항-CD19 항체 및 벤다무스틴의 조합의 상승효과를 결정하였다. 이러한 계산은 전문이 참조로 포함되는 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 전문이 참조로 포함되는 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 기재되어 있다. CI-아이소볼(isobol) 방법을 사용하여 Chou-Talalay의 방법을 수행한다.

[0103]

중간-효과 방정식

[0104]

$F_a/F_u = (D/D50)^m$ 으로서의 저해제(예를 들어, 약물)의 효과의 중간-효과 방정식 모델에서, D는 용량이고, F_a 및 F_u 는 용량 D에 의해 영향을 받는 시스템의 분율 및 영향을 받지 않는 시스템의 분율이며($F_a + F_u = 1$); D50은 중간효과를 생성하는 용량이다(예를 들어, IC50, ED50, LD50). 상수 m은 용량-효과 곡선의 형상을 결정한다. 본 발명자들은 엑셀 핏(Excel Fit) 소프트웨어를 사용하여, 선형 회귀 계산을 수행하여, 파라미터 m 및 D50을 추산하였다.

[0105]

MEC-1 세포에 대한 조합의 효과는 상기 기재된 바와 같이 측정된 세포사%이다. 본 발명자들은 분율 F_u 를 처리된 세포주의 세포사% 대 대조군에 노출되는 세포주의 세포사%의 비인 것으로 정의하였다. 즉,

[0106]

$F_u = \text{세포사\% (처리 세포주)} / \text{세포사\% (미처리 세포주)}$ 이다.

[0107]

이어서, 세포주의 세포사%는 중간 효과 방정식에서 상수 D50이며, 이는 상기 기재된 선형 회귀에 의해 추산될 수 있다.

[0108]

CI-아이소볼 방법

[0109]

CI-아이소볼 방법은 약물 간의 상승작용의 정량적 평가를 제공한다. 조합 인덱스(CI)는 단일 및 조합 약물 처리의 용량-효과 데이터로부터 추산된다. 1 미만의 CI 값은 상승작용을 나타내고; CI = 1은 상가적 효과를 나타내며; 1 초과 CI는 길항작용을 나타낸다. 약물 상호작용(상승작용 또는 길항작용)은 CI 값이 1로부터 더 멀어질수록 더 확연해진다.

[0110]

공식적으로, 조합된 약물 처리의 조합 인덱스(CI)는

[0111]

$CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$ 로 정의되며, 여기서, D1 및 D2는 각각 조합의 약물 1 및 약물 2의 용량이며; D_{x1} 및 D_{x2} 는 조합의 효과와 동일한 효과를 제공할 단독의 약물 1 및 약물 2를 사용한 처리의 용량이다. 용량 D_{x1} 및 D_{x2} 는 단일 약물 처리의 용량-효과 데이터로부터 추산할 필요가 있다. 본질적으로, 중간 효과 방정식을 각각의 약물의 데이터에 대하여 핏팅시킨다. 본 발명자들은 약물의 중간 효과 방정식으로부터, 소정의 효과(즉, F_a , F_u)를 생성하는데 필요한 용량(즉, D)을 추산할 수 있다. 소정의 점이 상가적 라인으로부터 더 멀리 놓인다면, 1과 이의 CI 간의 차이가 더 크며, 이에 따라, (상승적 또는 길항적) 효과가 더 강력하다.

[0112]

결과

[0113]

표 2에 나타난 바와 같이, 초우 인덱스 값은 단독의 MOR00208 및 벤다무스틴에 비하여 특이적인 MEC-1 세포사에서 MOR00208 및 벤다무스틴의 조합의 명백한 상승작용을 나타낸다. 이러한 결론은 0.6의 평균을 갖는 각 3가지

실험 각각의 0.2, 0.7 및 0.75의 초우 계산을 기반으로 하며, 여기서, 1 미만의 CI는 상승작용을 나타낸다. 따라서, MOR00208 및 벤다무스틴의 조합은 또한 인간의 비호지킨 림프종(NHL), 만성 림프구 백혈병(CLL) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL)의 치료에서 상승적으로 거동할 것이다. 상기 초우 계산의 결과를 확인하기 위하여, 본 페로니의 다중 비교 시험(Bonferroni's Multiple Comparison Test)을 사용하여, 통계적 유의성에 대하여 표 2의 정규화된 데이터를 평가하였다. 전문이 참조로 포함되는 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 참조한다. 결과가 표 3에 나타나 있다.

[0114] [표 3]

본페로니의 다중 비교 시험	평균차	T 값	유의적인가? (P < 0.05)	요약
벤다무스틴 (100µg/ml) 대 BEN + MOR208 조합	-0.1834	2.997	예	*
MOR00208(6.6µM) 대 BEN + MOR00208 조합	-0.4321	7.060	예	***

** p < 0,05

*** p < 0,001

[0115]

[0116] 결과

[0117] 표 3에 나타난 바와 같이, 본페로니의 다중 비교 시험은 BEN + MOR00208의 조합 치료가 단독의 BEN 및 MOR00208의 치료보다 특이적인 MEC-1 세포사에 통계적으로 더욱 효과적임을 보여준다.

[0119] 실시예 2: 피하(SC)-이식 인간 라모스 버킷 B-세포 림프종 종양 성장 모델에서의 단독의 및 조합된 MOR00208 및 BEN.

[0120] 재료

[0121] 라모스 인간 버킷 림프종 세포(ATCC 번호 CRL-1596, lot# 3953138); 비히클 대조군: 150mM NaCl, 25mg/ml 만니톨, pH 5.5-6.0; (0.01M NaOH를 사용하여 조정). Ref_mAb_33_lgG_Xen(PBS 중 10mg/ml, Ref_mAb_33으로 지칭). 6주령 암컷 C.B-17 SCID 마우스(CB17/lcr-Prkdcscid/lcr1coCr1)를 찰스 리버 래보러터리즈(Charles River Laboratories)(미국 매사추세츠주 윌밍턴 소재)로부터 구입하고, 실험 전에 9일 동안 실험실에 적응시켰다.

[0122] 방법

[0123] SCID 마우스에 라모스 세포를 피하 이식하였다(약 5×10^6 개 세포/마우스). 마우스가 대략 150 mm³ 크기의 종양을 갖는 경우 또는 접종 후 약 14일에, 이들을 그룹들로 분리하였으며, 여기서, 각 그룹은 비교적 동일한 크기의 종양 체적을 가졌다. 처리를 15일에 시작하였다. 처리 요법은 표 4에 제공되어 있다. 연구 기간은 60일이었다.

[0124] [표 4]

그룹명	동물 마리수	시험 물질	용량 (mg/kg)	치리 경로 및 일정
A/B	10	벤다무스틴	13 및 16	IP, Q1Dx5
D	10	MOR00208	6/10	IV, 6 mg/kg Q3Dx2; 22일에 시작하여 10mg/kg Q3Dx2/3 주
E	10	비히클 / Ref_mAb_33	6/10	IP, Q1Dx5 IV, 6 mg/kg Q3Dx2 ; 22일에 시작하여 10mg/kg Q3Dx2/3 주
F/G	10	MOR00208/ 벤다무스틴	6 또는 10/13 및 6 또는 10/16	상기와 같은 MOR00208 및 BEN

기술자 실수로, 18일에 MOR00208을 투여하지 않았다.

[0125]

[0126]

MOR00208 및 벤다무스틴을 체중 10g당 0.1ml의 부피로 투여하였다. 0.6/1.0mg/ml의 농도의 MOR00208 및 비히클 대조군/Ref_mAb_33 및 1.3 및 1.6mg/ml의 농도의 벤다무스틴.

[0127]

관독 정보는 1) 로그 순위 검정을 사용하여 통계적 분석을 행한, 4000mg 크기에 도달하는 일수 중간값 및 2) 일원분산분석(One-Way-ANOVA) 및 본페로니의 사후 검증을 사용하여 통계적 분석을 행한 연구 34일의 종양 크기였다(미가공 데이터는 미도시). 종양 중량을 식 $(I \times w^2)/2$ (여기서, I 및 w는 각 측정 시에 수집된 보다 큰 직경 및 보다 작은 직경을 말한다)를 사용하여 계산하였다. 결과는 도 7 내지 도 10에 나타나 있다. 조합 요법은 하기 동위 생존 모델에서 나타난 명백한 상승효과에 비하여, 이러한 피하 모델에서 각각의 단일요법에 대해 유의적으로 뛰어나지 않았다. 이것은 이러한 모델에서 효과 없는 MOR00208 투여 요법과 관련이 있는 것으로 여겨진다. 그러나, 하기에 기재된 동위 생존 모델은 상기 피하, 고휘 종양 모델에 비하여, 혈관계의 연루를 포함하여, 다원성 질환 특성을 더 잘 모방하기 때문에, 인간에서의 CLL, NHL 및 ALL의 치료에서 조합 치료가 어떻게 잘 작용할지를 더 잘 예측하는 것으로 여겨진다.

[0129]

실시에 3SCID 마우스, 생존 모델에서의 인간 비호지킨 라모스 종양에서, 단독의 및 조합된 MOR00208 및 벤다무스틴

[0130]

재료

[0131]

사이클로포스파미드(박스터(Baxter), 롯데 번호 1A548C); 비히클 대조군: 0.9% 염화나트륨, 25mg/ml 만니톨, pH 6.5 내지 pH 6.8(0.01M NaOH를 사용하여 조정); SCID 마우스(오스트레일리아 사우스오스트레일리아주 우러브레 소재의 애들레이드 대학, 웨이트 캠퍼스, 스트레인(Strain) C.B.-17-1gh-1^b-Prkdc^{scid}); 라모스 인간 버킷 림프종 세포(ATCC 번호 CRL-1596); Ref_mAb_33_IgG_Xen(PBS 중 10mg/ml, Ref_mAb_33으로 지칭); 벤다무스틴(먼디파마, 롯데 번호 83889).

[0132]

방법

[0133]

SCID 마우스를 라모스 세포 접종 전에(-2일 및 -1일), 사이클로포스파미드(75mg/kg, i.p., 1일 2회)로 2일 동안 전처리하였다. 접종일(0일)에, 마우스를 각각 10마리 마우스의 7개 그룹으로 분리하고, 각각 1 × 10⁶개의 라모스 세포를 꼬리 정맥으로 정맥내로 접종하였다. 각 그룹에 대하여 계획된 투여 요법은 표 5에 나타나 있으며, 3일에 시작한다. 연구 기간은 60일이었다.

[0134] [표 5]

투여 요법

그룹	화합물	처리	일정
2 및 3	벤다무스틴	13/16 mg/kg, i.p, 10 mL/kg	1일 1회(5 내지 9일)
1	MOR00208	3 mg/kg, i.v., 10 mL/kg	3주 동안 주 2회(3, 6, 10, 13, 17 및 20일)
10	비허클 대조군	i.p., 10 mL/kg	1일 1회(5 내지 9일)
5 및 6	벤다무스틴 /MOR00208	13/16 mg/kg, i.p; 3 mg/kg, i.v. 10 mL/kg;	1일 1회(5 내지 9일) /3주 동안 주 2회(3, 6, 10, 13, 17 및 20일)
4	벤다무스틴	26 mg/kg, i.p, 10 mL/kg	1일 1회(5 내지 9일)
10	Ref mAb	3 mg/kg, i.v.	3, 6, 10, 13, 17 및 20일

[0135]

[0136] 생존 데이터는 표 6 및 도 6에 나타나 있다.

[0137] [표 6]

마우스의 사망

그룹	화합물	처리	연구 과정에 걸친 마우스의 사망 [결종 후 일수]
1	MOR00208	3 mg/kg, i.v.	25; 29; 29; 30; 31; 33; 35; 38; 38; 39
2	벤다무스틴	13 mg/kg, i.p.	10*; 21; 21; 23; 24; 24; 24; 24; 25; 26
3	벤다무스틴	16 mg/kg, i.p.	24; 24; 24; 24; 24; 24; 25; 26; 26; 27
4	벤다무스틴	26 mg/kg, i.p.	10*; 10*; 10*; 10*; 10*; 12*; 12*; 14*; 16*; 23
5	벤다무스틴 / MOR00208	13/3 mg/kg, i.p. / i.v.	12*; 30; 33; 33; 35; 40; 45; 45; 56; 56
6	벤다무스틴 / MOR00208	16/3 mg/kg, i.p. / i.v.	33; 35; 38; 39; 40; 40; 45; 45; 45; 45
10	비허클 / Ref_mAb	i.p. / 3 mg/kg, i.v.	24; 24; 25; 25; 25; 26; 26; 26; 26; 29

* 화합물 독성 관련 사망

[0138]

[0139] 표 6에 나타난 미가공 데이터로부터 생존 일수 중간값 및 수명 증가 중간값 둘 모두를 계산하였다. 모든 처리 관련 사망을 계산에서 배제하였다. 결과는 표 7에 나타나 있다.

[0140] [표 7]

그룹	처리	생존 중간값 (집중후 일수)	수명 증가 (ILS) 중간값% [§]	조합 효과의 평가
1	MOR00208	32 ^a	25.5	해당 없음
2	벤다무스틴 13 mg/kg	24 ^b	-5.88	해당 없음
3	벤다무스틴 16 mg/kg	24 ^b	-5.88	해당 없음
4	벤다무스틴 26 mg/kg	해당 없음	해당 없음	해당 없음
5	벤다무스틴/ MOR00208 13/3 mg/kg	40 ^d	56.86	상승작용/강화작용*
6	벤다무스틴/ MOR00208 16/3 mg/kg	40 ^d	56.86	상승작용/강화작용**
10	비히클 / Ref_mAb 3 mg/kg	25.5	해당 없음	해당 없음

^a 비히클 대조군/Ref_mAb_33(그룹 10)(p<0.001), 13 mg/kg의 벤다무스틴(그룹 2)(p<0.001), 13/3 mg/kg의 벤다무스틴/MOR00208(그룹 5)(p<0.05) 및 16/3 mg/kg의 벤다무스틴/MOR00208(그룹 6)(p<0.001)과 유의적으로 상이함.

^b 비히클 대조군/Ref_mAb_33(그룹 10)(p<0.05) 및 13/3 mg/kg의 벤다무스틴/MOR00208(그룹 5)(p<0.001)과 유의적으로 상이함.

^c 16/3 mg/kg의 벤다무스틴/MOR00208(그룹 6)(p<0.001)과 유의적으로 상이함.

^d 비히클 대조군 / Ref_mAb_33(그룹 10) (p<0.001)과 유의적으로 상이함.

[§] 비히클 대조군/Ref_mAb_33 에 대한

* ILSCombo (56.86%) > ILSMOR00208 3mg/kg + ILSBendamustine 13mg/kg (25.5% + (-5.88)% = 19.62%)로서, 각각의 단일요법 그룹에 대한 상승작용/강화작용.

** ILSCombo (56.86%) > ILSMOR00208 3mg/kg + ILSBendamustine 16mg/kg (25.5% + (-5.88)% = 19.62%)로서, 각각의 단일요법 그룹에 대한 상승작용/강화작용.

[0141]

[0142] 수명 증가(ILS) 중간값%는 하기와 같이 계산한다:

[0143] 수명 증가 평균% = (생존_{처리} - 평균 생존_{대조군})/평균 생존_{대조군} * 100.

[0144] 생존 시간은 집중 후 일수로 측정한다.

[0146] 조합 효과의 분류

[0147] 조합의 ILS를 각각의 단일요법의 부가되는 ILS와 비교함으로써, MOR00208/벤다무스틴 조합 요법(콤보(combo)) 효과의 분류를 평가하였다:

[0148] 상승효과/강화작용*: ILSCombo > ILSMOR00208 3mg/kg + ILSBendamustine. 단일요법 중 적어도 하나가 효과를 갖지 않는다면, 상승 효과는 강화작용으로 분류된다. 가산성(additivity): ILSCombo = ILSMOR00208 3mg/kg + ILSBendamustine. 길항작용: ILSCombo < ILSMOR00208 3mg/kg + ILSBendamustine.

[0149] 상승효과를 확인하기 위한 데이터의 분석에 더하여, 하기의 통계적 분석도 또한 완료하였다. 중간값을 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. 시험 물품 처리 그룹에서 예상치 못하게 사망하거나 연구 17일 전에 도태된 임의의 동물을 생존 분석 계산으로부터 배제시켰다. 이들 동물의 사망/도태는 비히클 대조군 동물에서 처음의 사망에 앞서 이들이 발생하였기 때문에, 질환 진행보다는 화합물 독성 때문이었다. 카플란 및 마이어(Kaplan and Meier)의 승법 극한(product limit)을 사용하여 생존 곡선을 생성하고, 로그-순위(맨틀-콕스) 검정을 사용하여 생존 곡선을 비교하였다. 유의적인 차이가 관찰되는 경우, 모든 쌍의 다중 비교(홀름-시닥 검정(Holm-Sidak Test))를 수행하였다. 모든 그룹 간의 비교를 행하였다. 또한, 하기의 그룹의 비교를 각 시험 물품에 대한 개별 도면에 요약하였다: 벤다무스틴 그룹(그룹 2, 3 및 4)에 대한 비히클 대조군/Ref_mAb(그룹 10), 및 조합 그룹(그룹 5 및 6)에 대한 비히클 대조군/Ref_mAb(그룹 10), 또는 각각의 MOR00208 단일요법 그룹(그룹 1). 0.05 미만의 p 값은 유의적인 것으로 여겨진다. 결과는 표 8 내지 표 10에 나타나 있다.

[0150] [표 8]

비히클 대조군, MOR00208 및 벤다부스틴 단일요법;
 로그-순위(맨틀-콕스) 검정: 유의적 차이가 존재함($p < 0.001$)
 모든 쌍의 다중 비교 절차(홀름-시달 방법):

그룹	처리	그룹 1	그룹 2	그룹 3
10	비히클 대조군/ Ref_mAb (3 mg/kg)	***유	*유	무
1	MOR00208 (3 mg/kg)		***유	***유
2	벤다부스틴 (13 mg/kg)			무
3	벤다부스틴 (16 mg/kg)			

***유: 통계적으로 유의적인 차이가 존재함 ($p < 0.001$).
 *유: 통계적으로 유의적인 차이가 존재함 ($p < 0.05$).
 무: 통계적으로 유의적인 차이가 존재하지 않음 ($p \geq 0.05$).

[0151]

[0152] [표 9]

비히클 대조군, MOR00208/벤다부스틴 조합 요법 및 각각의 단일 요법;
 로그-순위(맨틀-콕스) 검정: 유의적 차이가 존재함($p < 0.001$)
 모든 쌍의 다중 비교 절차(홀름-시달 방법):

그룹	처리	그룹 1	그룹 5	그룹 2
10	비히클 대조군/ Ref_mAb (3 mg/kg)	***유	***유	*유
1	MOR00208 (3 mg/kg)		*유	***유
5	MOR00208/벤다부스틴 (3/13 mg/kg)			***유
2	벤다부스틴 (13 mg/kg)			

***유: 통계적으로 유의적인 차이가 존재함 ($p < 0.001$).
 *유: 통계적으로 유의적인 차이가 존재함 ($p < 0.05$).

[0153]

[0154] [표 10]

비히클 대조군, MOR00208/벤다부스틴 조합 요법 및 각각의 단일 요법;
 로그-순위(맨틀-콕스) 검정: 유의적 차이가 존재함($p < 0.001$)
 모든 쌍의 다중 비교 절차(홀름-시달 방법):

그룹	처리	그룹 1	그룹 6	그룹 3
10	비히클 대조군/ Ref_mAb (3 mg/kg)	***유	***유	무
1	MOR00208 (3 mg/kg)		***유	***유
6	MOR00208/벤다부스틴 (3/16 mg/kg)			***유
3	벤다부스틴 (16 mg/kg)			

***유: 통계적으로 유의적인 차이가 존재함 ($p < 0.001$).
 무: 통계적으로 유의적인 차이가 존재하지 않음 ($p \geq 0.05$).

[0155]

[0156] **결과**

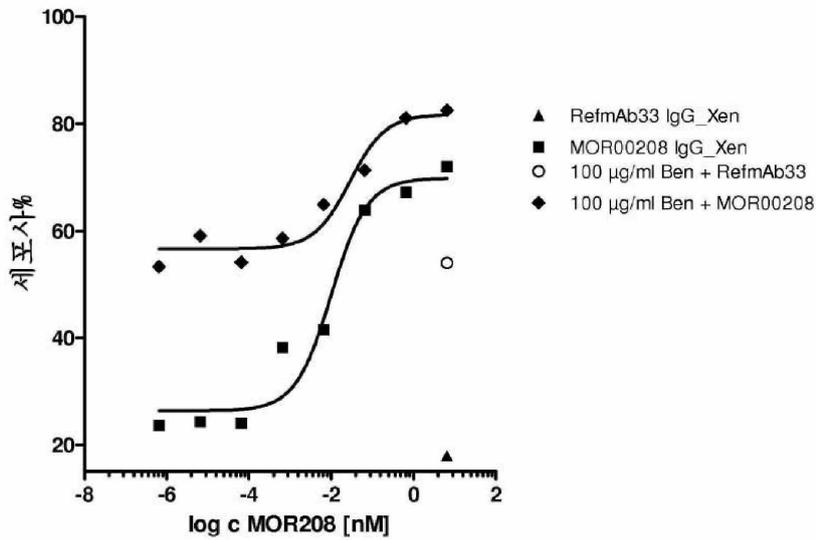
[0157] 표 7 내지 표 10 및 도 6에 나타낸 바와 같이, MOR00208 및 벤다부스틴의 조합은 상승적으로 거동하였으며, 단독의 MOR00208 및 벤다부스틴에 비하여 비호지킨 라모스 동위 종양 생존 모델에서 통계적으로 유의적이었다.

[0158] 설명, 특정 실시예 및 데이터가 예시적인 구현예들을 나타내면서, 예시에 의해 제공되며, 본 발명을 제한하고자 하지 않는 것이 이해되어야 한다. 본 발명에서 다양한 변이 및 변형이 본 명세서에 포함되어 있는 논의, 개시내용 및 데이터로부터 당업자에게 명백해질 것이며, 이에 따라, 본 발명의 일부로 고려된다.

도면

도면1

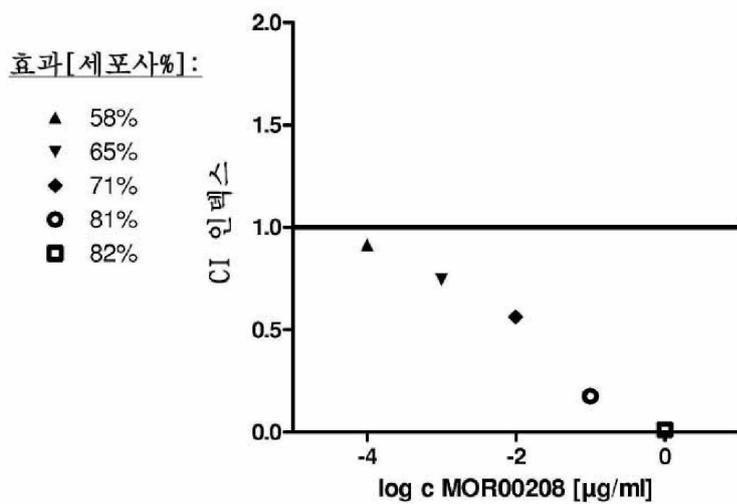
단독의 및 조합된 MOR00208 및 BEN의 세포독성



도면2

ADCC 용량 반응 곡선

100 µg/ml 벤다무스틴과 MOR00208의 조합



도면3

MOR00208 가변 중쇄 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:
(CDR은 볼드체로 되어 있고, 밑줄이 그어져 있음)

EVQLVESGGGLV^KPGGSLKLSCAASGYTFT**SYVMHW**V^RQAPGKGLEWIGY**INPY**
NDGTKYNEK**FQGRVT**ISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR**GTYYYGTRVFDY**WG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

MOR00208 가변 경쇄 도메인의 아미노산 서열은 다음과 같다:
(CDR은 볼드체로 되어 있고, 밑줄이 그어져 있음)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSC**RSSKSLQNVNGNTYLY**WFQQKPGQSPQLLI**YR**
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYC**MQHLEY**PITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 11)

- MOR00208 HCDR1의 아미노산 서열은 SYVMH(SEQ ID NO: 1)이다.
- MOR00208 HCDR2의 아미노산 서열은 NPYNDG(SEQ ID NO: 2)이다.
- MOR00208 HCDR3의 아미노산 서열은 GTYYYGTRVFDY(SEQ ID NO: 3)이다.
- MOR00208 LCDR1의 아미노산 서열은 RSSKSLQNVNGNTYLY(SEQ ID NO: 4)이다.
- MOR00208 LCDR2의 아미노산 서열은 RMSNLNS(SEQ ID NO: 5)이다.
- MOR00208 LCDR3의 아미노산 서열은 MQHLEYPIT(SEQ ID NO: 6)이다.

도면4

Fc 영역의 서열

MOR00208 중쇄 Fc 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:

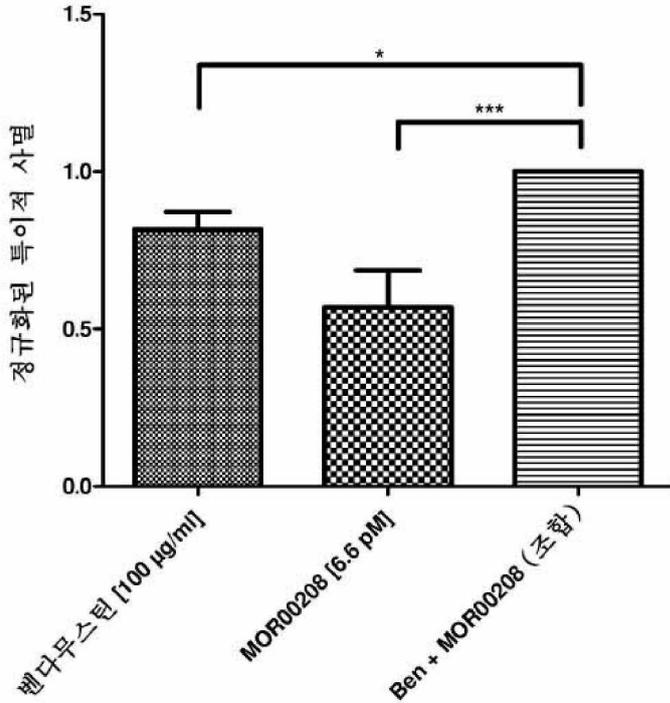
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTFRVVS^LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12)

MOR00208 경쇄 Fc 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKD STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13)

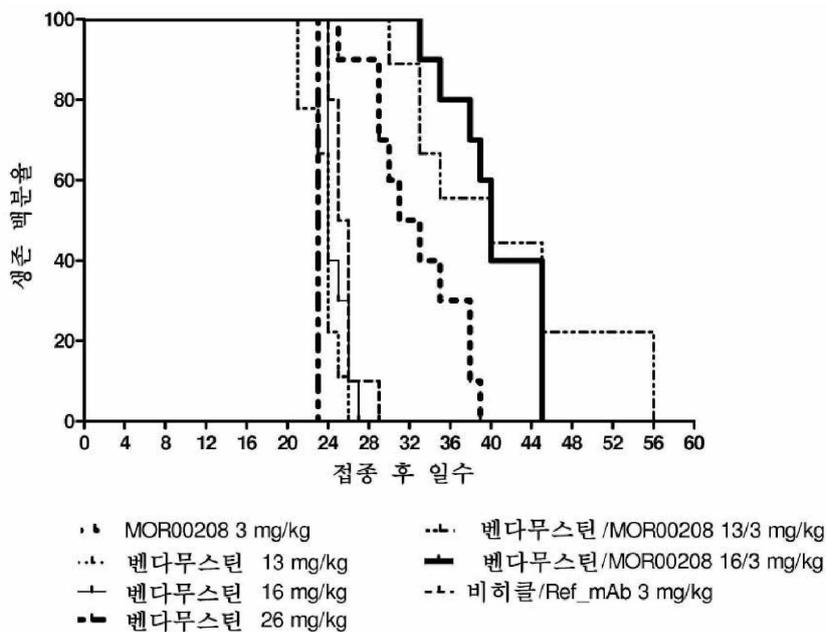
도면5

정규화된 특이적 사멸; SD; ADCC 전에 48시간 동안 벤다무스틴(Ben)으로 전처리된 MEC-1 표적 세포; 3가지 상이한 이펙터 세포 공여자를 사용한 3가지 독립적인 실험의 풀



이 도면은 표 2에 나타낸 데이터로부터의 평균을 보여준다.

도면6



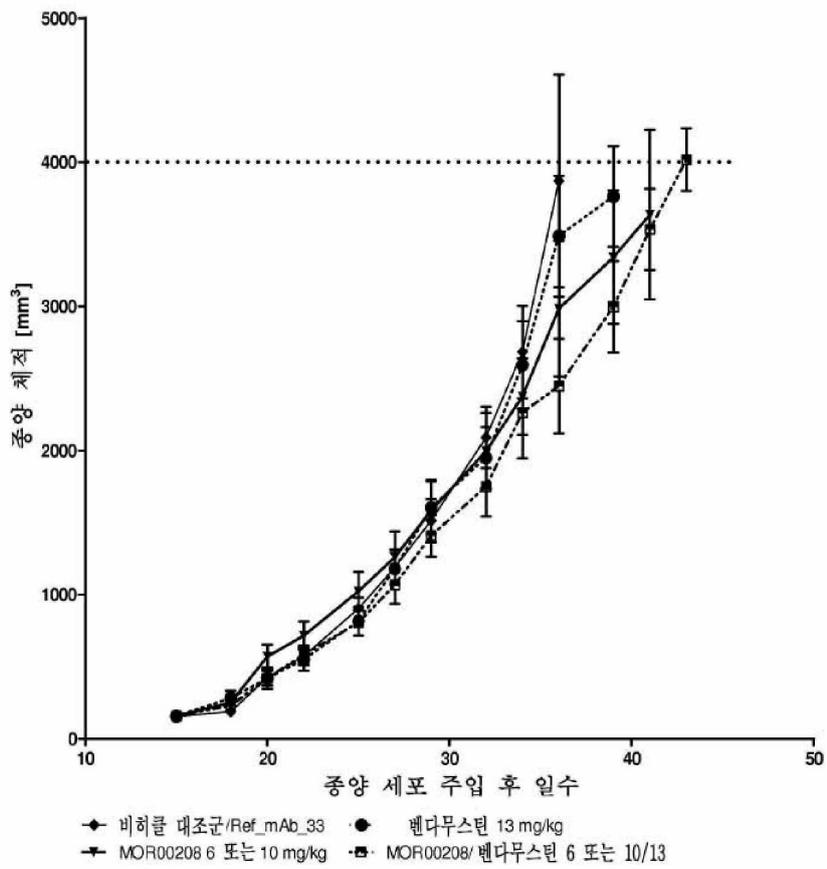
도면7

	로그 순위 검정 [카플란 마이어 곡선의 비교]	일원분산분석 + 본페로니 다중 비교 검정
비히클 대조군 대 MOR00208 [6 또는 10mg/kg]	유의성 없음(ns)	유의성 없음
비히클 대조군 대 벤다무스틴 [13mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
비히클 대조군대 벤다무스틴 [16mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
비히클 대조군 대 MOR00208/벤다무스틴 [10/13mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
비히클 대조군 대 MOR00208/벤다무스틴 [6 또는 10/16mg/kg]	* p = 0.048	유의성 없음
MOR00208 10mg/kg 대 MOR00208/벤다무스틴 [6 또는 10/16mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
MOR00208 10mg/kg 대 MOR00208/벤다무스틴 [6 또는 10/13mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
벤다무스틴 16mg/kg 대 MOR00208/벤다무스틴 [6 또는 10/16mg/kg]	유의성 없음	유의성 없음
벤다무스틴 13mg/kg 대 MOR00208/벤다무스틴 [6 또는 10/13mg/kg]	* p = 0.0266	유의성 없음

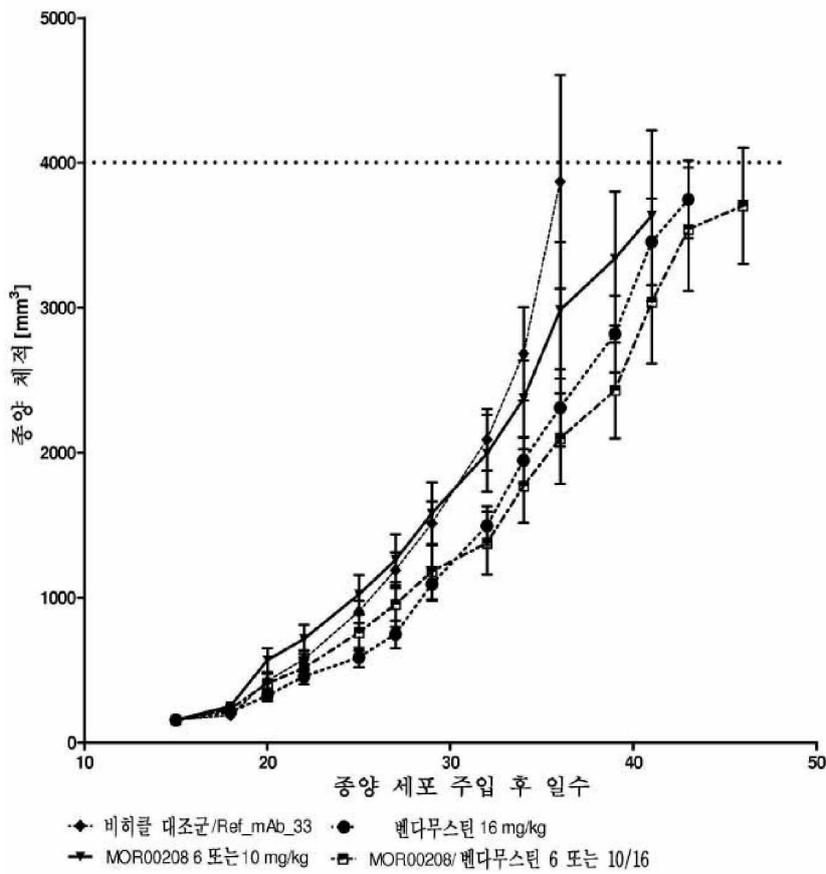
도면8

	4000mg에 대한 일수 중간값	4000mg에 대한 증가 시간[%]	연구 34일에 평균 종양 크기[mg]	연구 34일에 감소된 종양 크기[%]
비히클 대조군/Ref_mAb_33	38.1	0.00	2683	0.0
MOR00208 [6 또는 10 mg/kg]	39.7	4.20	2375	11.5
벤다무스틴 [13 mg/kg]	38.3	0.52	2593	3.4
벤다무스틴 [16 mg/kg]	40.8	7.09	1948	27.4
MOR208/벤다무스틴 [6 또는 10/13 mg/kg]	42.2	10.76	2261	15.7
MOR208/벤다무스틴 [6 또는 10/16 mg/kg]	42.5	11.55	1771	34.0

도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MorphoSys AG

<120> Combinations and uses thereof

<130> MS155

<140> 14/126,928

<141> 2012-08-14

<150> EP11177658.9

<151> 2011-08-16

<150> US 61/523,861

<151> 2011-08-16

<150> US 61/647,539

<151> 2012-05-16

<150> US 61/654,097

<151> 2012-06-01

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Ser Tyr Val Met His

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 2

Asn Pro Tyr Asn Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<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> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 5

Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 6

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Ile Thr

1 5

<210> 7

<211> 556

<212> PRT

<213> 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

<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

<220><223> Unknown

<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> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<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> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<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> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<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 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

 165 170 175
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <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

<210> 14

<211> 451

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> unknown

<400> 14

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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 15
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> unknown
 <220><223> unknown
 <400> 15

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330