(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월29일
(11) 등록번호 10-1912957
(24) 등록일자 2018년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7010537
(22) 출원일자(국제) 2011년09월26일
심사청구일자 2016년09월23일
(85) 번역문제출일자 2013년04월25일
(65) 공개번호 10-2014-0045288
(43) 공개일자 2014년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/066648
(87) 국제공개번호 WO 2012/041800
국제공개일자 2012년04월05일
(30) 우선권주장
10180485.4 2010년09월27일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008037357 A1
WO2007042309 A1

(73) 특허권자
모르포시스 아게
독일 프라네그 디-82152, 제멜바이스스트라쎄 7
(72) 발명자
로즈크제이어, 리사
스위스, 씨에이치-8908 헤딩겐, 프로무스슈트라쎄 38에이치
복스하머, 라이네르
독일, 85653 아잉, 에그마팅게르 슈트라쎄 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
허용록

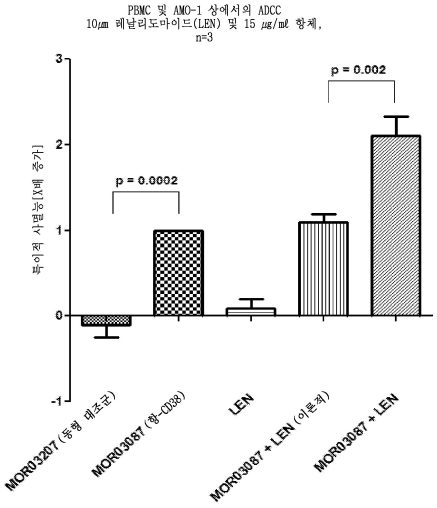
전체 청구항 수 : 총 39 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **다발성 골수종 및 NHL 치료를 위한 항-CD38 항체 및 레날리도마이드 또는 보르테조밉**

(57) 요 약

본 개시는 항-CD38 항체와 레날리도마이드의 약학적 조합, 및 항-CD38 항체와 보르테조밉의 약학적 조합에 대해 기술한다.

대 표 도 - 도3



MOR202로 치료 하기 전에 PBMC 및 AMO-1 세포를 레날리도마이드로 치료함.

(72) 발명자
엔델, 얀
독일, 80333 뮌헨, 바레르 슈트라쎄 36
빈델리히, 마크
독일, 81371 뮌헨, 임플레르슈트라쎄 52
사무엘손, 크리스토퍼
독일, 83607 홀츠키르헨, 다이센베르거슈트라쎄.1

(30) 우선권주장
61/386,619 2010년09월27일 미국(US)
61/437,696 2011년01월31일 미국(US)
61/468,607 2011년03월29일 미국(US)
61/486,814 2011년05월17일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는,

(i) 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

(ii) (a) 탈리도마이드, 레날리도마이드, 또는 포말리도마이드, 또는 (b) 프로테아좀 억제제로서 보르테조밉

의 조합물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 항체는

서열

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 10)

의 가변 중쇄, 및

서열

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO:
11)

의 가변 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 항체는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 항체는 개질된 Fc 영역을 포함하고, 상기 개질은 ADCC 활성을 증강시키는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 CD38-특이적 항체; 및 상기 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 또는 프로테아좀 억제제로서 보르테조밉은 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 조합물은 레날리도마이드 또는 프로테아좀 억제제로서 보르테조밉 단독보다 적어도 2배 더 좋은 효능으로 골용해를 감소시킬 수 있는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조합물은 탈리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서, 조합물은 레날리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 조합물은 포말리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 11

제 7항에 있어서, 탈리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 탈리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전 적어도 72시간에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 9항에 있어서, 레날리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 레날리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전 적어도 72시간에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 17

제 9항에 있어서, 조합물은 단리된 인간 PBMCs의 존재 하에, CD38-발현 AMO-1 세포 또는 NCI-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 레날리도마이드 단독보다 적어도 2배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 18

제 10항에 있어서, 포말리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 19

제 18항에 있어서, 포말리도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여 전 적어도 72시간에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 20

제 1항에 있어서, 조합물은 상기 CD38-특이적 항체 및 프로테아좀 억제제로서 보르테조밉을 포함하는, 조합물.

청구항 21

삭제

청구항 22

제 20항에 있어서, 조합물은 단리된 인간 PBMCs의 존재 하에, CD38-발현 LP-1 세포 또는 NCI-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 보르테조밉 단독보다 적어도 2배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 23

삭제

청구항 24

제 20항에 있어서, 보르테조밉은 CD38-특이적 항체의 투여 전에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 25

제 24항에 있어서, 보르테조밉은 CD38-특이적 항체의 투여 전 적어도 72시간에 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는,

(i) 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

(ii) 레날리도마이드

의 조합물.

청구항 29

다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는,

(i) 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

(ii) 포말리도마이드

의 조합물.

청구항 30

삭제

청구항 31

다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는,

(i) 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

(ii) 보르테조밉

의 조합물.

청구항 32

삭제

청구항 33

(i) 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

(ii) (a) 탈리도마이드, 레날리도마이드, 또는 포말리도마이드, 또는 (b) 프로테아좀 억제제로서 보르테조밉

의 조합물을 포함하는, 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종의 치료용 약학 조성물.

청구항 34

제 33항에 있어서, 상기 항체는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 35

제 33항에 있어서, 상기 항체는 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1)의 HCDR1 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 36

제 33항에 있어서, 상기 항체는

서열

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 10)

의 가변 중쇄, 및

서열

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO:
11)

의 가변 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 37

제 33항에 있어서, 상기 항체는 IgG 항체인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 38

제 33항에 있어서, 상기 항체는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 39

제 33항에 있어서, 상기 항체는 개질된 Fc 영역을 포함하고, 상기 개질은 ADCC 활성을 증강시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

제 33항에 있어서, 상기 조합물은 상기 항체 및 탈리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 42

제 33항에 있어서, 상기 조합물은 상기 항체 및 레날리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 43

제 33항에 있어서, 상기 조합물은 상기 항체 및 포말리도마이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 44

제 33항에 있어서, 상기 조합물은 상기 항체 및 보르테조밉을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 45

삭제

청구항 46

제 33항에 있어서, 상기 항체; 및 상기 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 또는 보르테조밉은 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 47

삭제

청구항 48

제 41항에 있어서, 상기 항체 및 탈리도마이드는 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 49

제 42항에 있어서, 상기 항체 및 레날리도마이드는 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 50

제 43항에 있어서, 상기 항체 및 포말리도마이드는 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 51

제 44항에 있어서, 상기 항체 및 보르테조밉은 개별적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 52

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 5월 17일에 출원된 미국 가출원 일련번호 61/486,814, 2011년 3월 29일에 출원된 미국 가출원 일련번호 61/468,607, 2011년 1월 31일에 출원된 미국 가출원 일련번호 61/437,696, 및 2010년 9월 27일에 출원된 미국 가출원 일련번호 61/386,619의 이점을 주장하며, 이들 모두의 전체 내용을 참조로 통합한다.

[0003] 본 발명은 다발성 골수종 및 NHL 치료를 위한 항-CD38 항체 및 레날리도마이드 또는 보르테조밉에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 다발성 골수종은 증식지수가 낮고 수명이 긴 분비성 형질 세포의 골수 내에 잠복 축적되는 것을 특징으로 하는 B 세포 악성종양이다. 이 질환은 궁극적으로 뼈와 골수를 공격하여, 골격계 전반에 걸쳐 다발성 종양 및 병변을 일으킨다.

[0005] 다발성 골수종(MM)은 모든 암의 대략 1%, 그리고 모든 혈액암의 10%를 약간 넘는 부분을 차지한다. MM 발병률은 노령화 인구에서 증가하고 있으며, 진단 받는 시점의 중간 연령(median age)은 약 61세이다. 다발성 골수종을 위해 현재 통용되고 있는 치료법으로는 화학요법, 줄기세포 이식, Thalomid®(탈리도마이드), Velcade®(보르테조밉), Aredia®(파미드로네이트) 및 Zometa®(졸레드론산)이 있다. 빈크리스틴, BCNU, 멜팔란, 사이클로포스파미드, 아드리아마이신, 및 프로드니손 또는 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 화학치료제들을 병용하는 것을 비롯한, 현 치료 방식의 완전관해율(complete remission rate)은 단지 약 5%이며, 중간 생존율은 진단 받은 시점으로부터 대략 36 내지 48개월이다. 고용량 화학요법 이후 자가 골수 이식 또는 말초혈 단핵세포 이식을 이용하는 최근 진전된 방식 덕분에 완전관해율과 관해기간이 증가되었다. 그러나, 전체 생존기간만이 약간 늘어났을 뿐, 치유되었다는 증거를 얻을 수 없었다. 결국, MM 환자가 인터페론-알파(IFN-α) 단독 치료 또는 스테로이드와의 병행 치료를 계속 받음에도 불구하고, 종종 병이 재발된다.

[0006] 비-호지킨 림프종은 광범위한 림프종 유형으로, 림프구(B-세포 또는 T-세포)가 악성으로 된 후 제어불가능하게 증식하여 종양 덩어리를 형성할 때 림프계에서 유래되는 암이다. 전체적으로 NHL은, 미만성 대형 B-세포 림프종(DLBCL) 및 소포림프종을 비롯하여, 약 30가지로 다양한 림프종 아종을 포함한다. NHL 발병은 2019년까지 주요 시장에서 140,000건을 넘을 것이다. 이용가능한 치료 선택안으로는 Rituxan/MabThera, 이들의 조합, 이를테면, R-CHOP(리툭시맙, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손), R-CVP(리툭산, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손), 및 화학요법이 있다. 그 밖에도, 관해 후 또는 재발 후에, 조혈 줄기세포 이식을 고려해볼 수 있다. 현 치료 선택안들에도 불구하고, 공격적 NHL 고위험군 내의 생존율은 5년에 걸쳐 30% 정도로 낮을 수 있다. 따라서, 효과적인 치료 및 병합 치료에 대해 충족되지 않은 높은 요구가 여전히 있다.

[0007] CD38은 이러한 악성 형질 세포, 및 기타 다른 림프구에 발현되는 항원의 일종이다. CD38이 하는 기능으로는 부착 및 신호전달 이벤트에서의 수용체 매개와, (외부(ecto)-)효소 활성이 있다. 외부효소(ectoenzyme)로서, CD38은 NAD+를 고리형 ADP-리보오스(cADPR) 및 ADPR의 형성 뿐만 아니라 니코틴아미드 및 니코틴산-아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(NAADP)의 형성을 위한 기질로서 사용한다. cADPR 및 NAADP는 Ca^{2+} 동원을 위한 2차 메신저로 작용하는 것으로 나타났다. NAD+를 cADPR로 변환시킴으로써 CD38은 세포외 NAD+ 농도를 조절하고, 이에 따라 NAD-유도된 세포사멸(NCID)을 조정함으로써 세포 생존을 조절한다. Ca^{2+}를 통한 신호전달 외에도, CD38 신호전달은 T 및 B 세포 상의 항원-수용체 복합체나 또는 기타 다른 종류의 수용체 복합체(예컨대, MHC 분자)와의 상호작용(cross-talk)을 통해 발생하며, 이러한 방식으로 여러 세포성 반응은 물론 IgG의 전환 및 분비에도 관여된다.

[0008] CD38 특이적 항체에 대해 WO1999/62526(Mayo Foundation); WO200206347(Crucell Holland); 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 US2002164788(Jonathan Ellis); 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2005/103083(Morphosis AG), US 일련번호 10/588,568; 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2006/125640(MorphoSys AG), US 일련번호 11/920,830; 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2007/042309(MorphoSys AG), US 일련번호 12/089,806; 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2006099875(Genmab), US 일련번호 11/886,932; 및 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO08/047242(Sanofi-Aventis), US 일련번호 12/441,466에 기재되어 있다.

[0009] CD38-특이적 항체 및 기타 다른 작용제의 조합에 대해 WO200040265(Research Development Foundation); WO2006099875 및 WO2008037257(Genmab); 및 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2010061360, WO2010061359, WO2010061358 및 WO2010061357(Sanofi Aventis)에 기재되어 있다.

[0010] 최근 항암제의 발견 및 개발이 진전되었음에도 불구하고, CD38-발현 종양을 포함하는 많은 형태의 암에 대한 예후(prognosis)는 여전히 부족하다. 따라서, 이러한 형태의 암을 치료하기 위한 개선된 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 다발성 골수종 및 NHL 치료를 위한 항-CD38 항체 및 레날리도마이드 또는 보르테조밉을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양태에서, 본 개시는 CD38-특이적 항체와 탈리도마이드 또는 그의 유사체(예컨대, 레날리도마이드)와의 시너지적 조합에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 개시는 CD38-특이적 항체 및 보르테조밉 또는 기타 다른 프로테아좀 억제제를 포함하는 시너지적 조합에 관한 것이다. 이러한 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종과 같은 암의 치료에 유용하다.

[0013] 체외 및 체내 모델은 특정 화합물, 또는 화합물들의 조합이 인간 내에서 어떻게 작용하는 지에 대한 지표로 여겨진다. 여기서는, CD38-특이적 항체와 레날리도마이드의 조합을 인간 다발성 골수종 세포주에 실험한 결과 시너지 효과가 확인되었다. CD38-특이적 항체와 레날리도마이드의 조합 외에도, CD38-특이적 항체와 보르테조밉의 조합을 다발성 골수종 및 Burkitt 림프종(NHL의 한 형태) 모두에 대해 마우스 모델에 시험한 결과 시너지 효과가 확인되었다. 따라서, 상기 조합들은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종을 앓는 인간을 치료하는데 효과적일 수 있다. 또한, 본 명세서에 예시되는 CD38-특이적 항체는 임상시험 단계에 진입하고 있는 중이며, 이를 통해 상기 조합들의 인간 내 효과를 확인할 수 있을 것이다.

[0014] 화합물이 체외 또는 체내에서 조합될 때, 혹자는 상기 조합이 단지 부가 효과를 가지는 것으로 예상한다. 아주 예상밖으로, 본 발명가들은 특정 항-CD38 항체와 레날리도마이드의 조합이 AMO-1 및 NC1-H929 다발성 골수종 세포주 모두에서의 항체-의존 세포-매개 세포독성(ADCC)의 시너지 수준을 달성한다는 것을 발견하였다. 그 밖에도, 또한 예상밖으로, 레날리도마이드와 조합되거나 또는 보르테조밉과 조합되는 경우의 특정 항-CD38 항체는 NC1-H929 SCID 마우스 모델의 골용해를 감소시키는 시너지 수준을 이뤄 내고, RAMOS SCID 마우스 모델 내 중간 생존 일수를 시너지적으로 증가시켰다. 따라서, CD38-특이적 항체와 레날리도마이드의 예시적 조합, 및 CD38-특이적 항체와 보르테조밉의 예시적 조합 둘 다, 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종과 관련하여 체외 및/또는 체내에서 시너지적으로 작용하였다.

[0015] 본 개시의 일 양태는, CD38-특이적 항체가 서열 GFTFSSYYMN(SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN(SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY(SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY(SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS(SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL(SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함하고, 탈리도마이드 또는 그의 유사체가 레날리도마이드인, 조합을 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용된다.

[0016] 본 개시의 일 양태는, CD38-특이적 항체가 서열 GFTFSSYYMN(SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN(SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY(SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY(SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS(SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL(SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함하고, 프로테아좀 억제제가 보르테조밉인, 조합을 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 AMO-1 세포 내 CD38의 발현에 미치는 레날리도마이드의 단독 효과를 보여준다.

도 2는 다양한 다발성 골수종 세포주 내 세포 증식에 미치는 레날리도마이드의 단독 효과를 보여준다. 본 측정은 각 세포주 상에서의 레날리도마이드의 상대적 세포독성을 보여준다.

도 3은 MOR03087과 레날리도마이드의 조합에 의한 AMO-1 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. PBMC 및 AMO-1 세포를 MOR03087로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. MOR03207은 라이소자임에 결합하고, IgG1인 것과 같이 동형 대조군으로 사용된다. LEN은 레날리도마이드를 나타낸다. "이론적"은 MOR03087 단독값 및 LEN 단독값의 합계를 나타낸다. 제공된 자료는 표 3b로부터의 표준값들이다.

도 4는 MOR03087과 레날리도마이드의 조합에 의한 AMO-1 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. PBMC만 MOR03087로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. MOR03207은 라이소좀에 결합하며, IgG1인 것과 같이 동형 대조군으로 사용된다. LEN은 레날리도마이드를 나타낸다. "이론적"은 MOR03087 단독값 및 LEN 단독값의 합계를 나

타낸다. 제공된 자료는 표 4b로부터의 표준값들이다. 자료

도 5는 NCI-H929 세포 내 CD38의 발현에 미치는 레날리도마이드의 단독 영향을 보여준다.

도 6은 MOR03087과 레날리도마이드의 조합에 의한 NCI-H929 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. PBMC 및 NCI-H929 세포를 MOR03087로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. "이론적"은 Chou et al.의 생성 분율 개념을 이용하여 계산된 조합을 나타낸다. 제공된 자료는 표 7b로부터의 표준값들이다.

도 7은 MOR03087과 레날리도마이드의 조합에 의한 NCI-H929 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. PBMC만 MOR03087로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. "이론적"은 Chou et al.의 생성 분율 개념을 이용하여 계산된 조합을 나타낸다. 제공된 자료는 표 8b로부터의 표준값들이다

도 8은 보르테조밉 단독에 의한, 다양한 다발성 골수종 세포주의 성장 억제를 나타낸다. AMO-1 세포 상의 IC_{50}은 3.9nM이었다. LP-1 세포 상의 IC_{50}은 6.1nM이었다. NCI-H929 세포 상의 IC_{50}은 3.3nM이었다. RPMI-8226 세포 상의 IC_{50}은 9.0nM이었다

도 9는 15 μg/ml의 MOR03087과 Velcade®(보르테조밉)의 조합에 의한 NCI-H929 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. 두 차트는 두 명의 다른 기증자를 나타낸다.

도 10은 15 μg/ml의 MOR202과 Velcade®(보르테조밉)의 조합에 의한 LP-1 세포 상의 ADCC 매개효과를 보여준다. 두 차트는 두 명의 다른 기증자를 나타낸다.

도 11은 MOR202의 아미노산 서열을 보여준다.

도 12는 Chou et al.에 기재된 바와 같이, AMO-1 세포 상의 ADCC 매개에 있어서 MOR202와 레날리도마이드의 조합의 최적 곡선을 보여주며, 상기 곡선은 NCI-H929 세포 상의 ADCC 매개효과를 분석하기 위해 생성된 최적 곡선을 또한 대표한다.

도 13 내지 도 18은 AMO-1 세포 상의 ADCC 매개에 있어서 MOR202와 레날리도마이드의 조합을 사용한 6가지 개별 실험에 대한 Chou 인자 시너지 분석을 보여 준다. 도 13은 실험 1을 보여 준다. 도 14는 실험 2를 보여 준다. 도 15는 실험 3을 보여 준다. 도 16은 실험 4를 보여 준다. 도 17은 실험 5를 보여 준다. 도 18은 실험 6을 보여 준다. 도 13 내지 도 15는 표 3a 내지 표 3c 및 도 3에 제공된 3가지 실험으로부터 얻었다. 도 16 내지 도 18은 표 4a 내지 표 4c 및 도 4에 제공된 3가지 실험으로부터 얻었다.

도 19는 실시예 7에 기술된 각 연구군의 MicroCT Scan 평균 총 골부피를 보여주며, 그 결과는 표 11에 제공되어 있다.

도 20은 실시예 11에 기술된 각 연구군의 MicroCT Scan 평균 총 골부피를 보여주며, 그 결과는 표 17에 제공되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] "시너지", "시너지 작용" 또는 "시너지적"은 조합의 예상된 부가 효과보다 많은 것을 뜻한다. 여기서 조합의 "시너지", "시너지 작용" 또는 "시너지적" 효과는 Chou et al. 및/또는 Clarke et al.의 방법을 통해 결정된다. 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Ting-Chao Chou의 Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Angatonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58: 621-681(2006)을 참조한다. Chou et al.에는, 시너시즘을 결정하는 많은 방법이 개시되어 있으며, 그 중 하나 이상을 본원에 이용하였다. 또한 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Clarke et al.의 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.

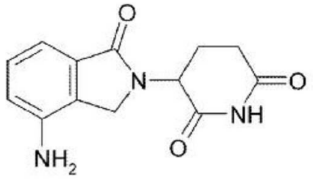
[0019] "항체"란 용어는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 모든 동형을 포함하는 단일클론 항체를 뜻한다. IgG 항체는 디설파이드 결합으로 연결된 2개의 동일한 중쇄(heavy chain)와 2개의 동일한 경쇄(light chain)로 구성되어 있다. 각 중쇄 및 경쇄는 불변영역과 가변영역을 포함한다. 각 가변영역은 주로 항체의 에피토프에 결합하는 담당을 하는 "상보성-결정 영역"("CDR") 또는 "고도가변영역"이라 불리는 세개의 부분을 포함한다. 이들 부분은 N-말단으로부터 순차적으로 번호를 붙여 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지칭된다. CDR 외부측 가변영역의 훨씬 더 보존된 부분은 "프레임워크(지지) 영역"으로 불린다. "항체 조각"은 Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab

’)2 조각, 또는 적어도 하나의 가변 중쇄 또는 가변 경쇄를 포함하는 기타 다른 조각을 뜻하며, 각각은 CDR 및 프레임워크 영역을 포함한다.

[0020] 덱사메타손과 조합된 THALOMID®(탈리도마이드)는 갓 다발성 골수종을 진단 받은 환자의 치료를 위한 것을 표시하며, Celgene사가 시판 중이다.

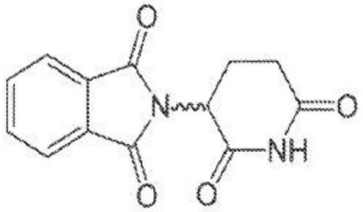
[0021] “탈리도마이드 유사체”로는 탈리도마이드 자체, 레날리도마이드(CC-5013, Revlimid™), 포말리도마이드(CC4047, Actimid™) 및 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2002068414 및 WO2005016326에 개시된 화합물이 있되, 이에 한정되지 않는다. 탈리도마이드 유사체란 용어는 탈리도마이드 구조를 주쇄로 사용하는(예컨대, 곁기(side group)들이 첨가되거나 또는 이들 기가 모체 구조로부터 제거됨) 합성 화학 합성물을 가리킨다. 이러한 유사체는 탈리도마이드 및 그의 대사물질과 알킬 사슬의 길이 차이와 같은 구조, 분자 조각, 1개 이상의 관능기, 또는 이온화 변화면에서 상이하다. “탈리도마이드 유사체”란 용어는 탈리도마이드의 대사물질을 또한 포괄한다. 탈리도마이드 유사체로는 각 화합물의 S- 및 R-거울상 이성질체의 라세미 혼합물, 그리고 S-거울상 이성질체 또는 R-거울상 이성질체 각각이 포함된다. 라세미 혼합물이 바람직하다. 탈리도마이드 유사체는 하기 구조의 화합물을 포함한다:

[0022] (A) 레날리도마이드



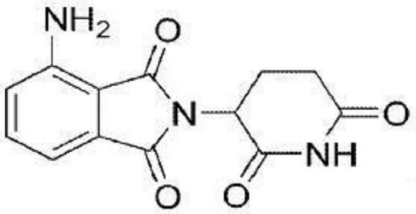
[0023] (화학식 1)

[0024] (B) 탈리도마이드



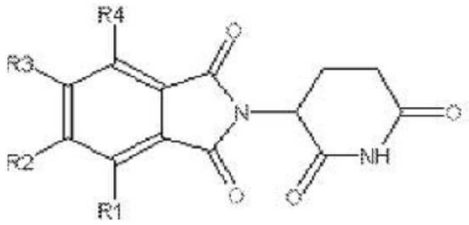
[0025] (화학식 2)

[0026] (C) 포말리도마이드



[0027] (화학식 3)

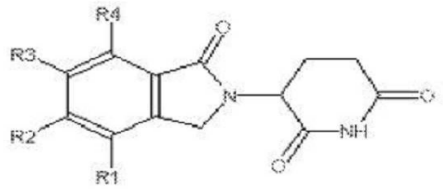
[0028] (D)



[0029] (화학식 4)

[0030] (화학식에서 R21, R22, R23 및 R24는 각각 독립적으로 H, 알콕시, 아미노 또는 알킬아민임), 및

[0031] (E)



[0032] (화학식 5)

[0033] (화학식에서, R21, R22, R23 및 R24는 각각 독립적으로 H, 알콕시, 아미노 또는 알킬아민임).

[0034] 레날리도마이드는 다발성 골수종 치료용으로 현재 Celgene사가 Revlimid®로 시판 중에 있다. 레날리도마이드는 종양 치료와 관련하여 적어도 다음과 같은 특성들을 가지는 것으로 묘사된다: a) 종양 세포에 대한 세포독성을 나타낸다 - Gandhi et al., 레날리도마이드는 Namalwa CSN.70 세포의 증식을 억제시키고, Gab1 인산화반응 및 어댑터 단백질 복합체 조합을 방해한다 - Leuk Res., 30(7):849-58(2006), 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합됨; b) 자연살해(Nk) 세포를 활성화시킨다 - Gandhi et al., 덱사메타손은 레날리도마이드와 시너지화되어 다발성 골수종의 종양 성장을 억제시키지만, T- 및 NK 세포 기능의 레날리도마이드-유도 면역 제어를 감소시킨다 - Curr Cancer Drug Targets, 1;10(2):155-67(2010년 3월), 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합됨; 및 c) 종양 세포에서의 CD38 발현을 상향조절(upregulate)한다 - Lapolombella et al.을 참조함. 레날리도마이드는 CD20 항원을 하향조절하고, 일차 만성 림프성 백혈병 세포에서 리툭시맵의 직접적인 항체-의존적 세포독성에 길항작용을 한다 - Blood, 112:13, 5180-5189(2008년 12월 15일), 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합됨. "LEN"은 레날리도마이드를 표현하는데 이용되었다.

[0035] 설명한 바와 같이, 탈리도마이드 유사체는 종양 세포에서의 CD38 발현을 상향조절한다. 종양 세포의 표면에서의 CD38 발현을 상향조절하는 기타 다른 작용제에 대해 WO00/40265, 미국 일련번호 09/226,895(Research Development Foundation)에 기재되어 있으며, 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합되었다.

[0036] "프로테아좀 억제제"는 프로테아좀(즉, 단백질을 분해하는 세포 복합체)의 작용을 차단하는 화합물, 예를 들면 p53 단백질을 가리킨다. 여러 등급의 프로테아좀 억제제가 알려져 있다. 펩타이드 보로네이트 등급으로는, 재발된 다발성 골수종의 치료용으로 미국 내에서 승인된 화합물인 보르테조밉(INN, PS0341; Velcade)이 있다. 또 다른 펩타이드 보로네이트로, CEP-18770이 있다. 기타 다른 등급의 프로테아좀 억제제로는 펩타이드 알데하이드(예컨대, MG132), 펩타이드 비닐 설폰, 펩타이드 에폭시케톤(예컨대, 에폭소미신, 카르필조밉), β 락톤 억제제(예컨대, 락토시스틴, MLN 519, NPI-0052, 살리노스포르아미드 A), 금속과 함께 디티오카바메이트 복합체를 생성하는 화합물(예컨대, 만성 알코올 중독 치료에도 사용되는 의약품인 디설피람), 및 특정 항산화제(예컨대, 에피갈로카테킨-3-갈레이트) 카테킨-3-갈레이트, 및 살리노스포르마이드 A가 있다.

[0037] "VH"는 항체 또는 항체 조각의 면역글루불린 중쇄의 가변영역을 가리킨다. "VL"은 항체 또는 항체 조각의 면역글루불린 경쇄의 가변영역을 가리킨다.

[0038] "CD38"이란 용어는 CD38로 알려져 있으며 다음과 같은 동의어를 가진 단백질을 가리킨다: ADP-리보실 고리화효소 1, cADPr 가수분해효소 1, 환형 ADP-리보오스 가수분해효소 1, T10.

[0039] 인간 CD38은 하기와 같은 아미노산 서열을 가진다:

[0040] MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQ
TVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPD
WRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEK
VQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSC
TSEI (SEQ ID NO: 7).

[0041] "MOR202"는 도 11에 제공된 아미노산 서열을 가진 항-CD38 항체이다. "MOR202" 및 "MOR03087"은 도 11에 예시된 항체를 설명하기 위한 동의어로 사용된다.

[0042] MOR202 가변 중(heavy) 영역을 인코딩하는 DNA 서열은 하기와 같다:

[0043] CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCT
GCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTATATGAATTGGGTGCGC
CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTGATCCTAGCAATAC
CTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACC
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT
GATCTTCCTCTTGTTTATACTGGTTTTGCTTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTA
GCTCA (SEQ ID NO: 12)

[0044] MOR202 가변 경(light) 영역을 인코딩하는 DNA 서열은 하기와 같다:

[0045] GATATCGAACTGACCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCGCGC
GTATCTCGTGTAGCGGCGATAATCTTCGTCATTATTATGTTTATTGGTACCAGCAGAAACC
CGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGGTGATTCTAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGA
ACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAGCGGCACTCAGG
CGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGACTTATACTGGTGGTGCTTCTCTTGTGTTTGG
CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGGCCAG (SEQ ID NO: 13)

[0046] 항체 "Ref mAB5"는 하기에 제공된 아미노산 서열을 가진 항-CD38 항체이다(진하고 굵게 밑줄쳐진 부분이 CDR 이다):

[0047] VH:

[0048] QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFT**DYWMQ**WVKQRPGQGLEWIG**TIYPG**
DGDTGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSSLASEDSAVYYCAR**GDYYGSNSLDY**WGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 21)

[0049] VL:

[0050] DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITC**KASQDVSTVVA**WYQQKPGQSPRRLIY**SASYRYI**
GVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC**QQHYSPPYT**FGGGTKLEIKRT (SEQ ID
NO: 22)

[0051] Ref mAB5의 CDR은 Kabat et al.에 의해 정의되었으며, Ref mAB5의 것과 동일한 CDR을 가진 항체에 대해서는, 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 WO2008/047242, US 12/441,466에 기재되어 있다.

[0052] "Fc 영역"은 항체의 불변영역을 뜻하며, 인간의 경우, IgG1, 2, 3, 4 아강 및 기타 다른 것의 불변영역일 수 있다. 인간 Fc 영역의 서열은 IMGT, Human IGH C-REGIONs, http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html(2011년 5월 15일에 검색함)에서 찾아볼 수 있다.

[0053] "ADCC 활성을 증강시킨다"는 항체-의존 세포-매개 세포독성의 매개효과를 증가시킨다는 것을 뜻한다. ADCC 활성의 증강을 가져오는 Fc 영역 내부의 아미노산 개질에 대해 Genentech사의 WO200042072, Xencor사의 WO2004029207A2, 및 Macrogenics사의 WO2004063351A2에 개시되어 있으며, 이들의 전체 내용을 모두 본원에 참조로 통합한다.

[0054] "MOR03207"은 하기에 제공된 아미노산 서열을 가진 항체이다:

[0055] VH:

[0056] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWSWIRQSPGRGLEWLGRIYY
RSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARLDHRYHEDTVYPGM
DVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)

[0057] VL:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLPAYTVTWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASWDPSSGVVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 9).

[0058]

[0059] MOR03207은 라이소자임에 결합하며, IgG1인 것과 같이 동형 대조군으로 사용된다.

[0060] "조합"은 둘 이상의 품목, 예컨대, 항체 및 레날리도마이드와 같은 화합물을 뜻한다.

[0061] 본 개시는 또한 조합, 제약, 및 전술된 조합을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 시너지적 조합의 두 성분, 예컨대 CD38-특이적 항체 및 레날리도마이드를 함께, 또는 개별적으로 투여할 수 있다. 함께 투여하는 경우, 상기 두 성분을 하나의 약학 조성물로 조제할 수 있으며, 이러한 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 대안으로, 상기 두 성분을 상이한 약학 조성물로도 조제할 수 있다. 이 경우에는 두 성분을 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 일 구현예에 의하면, 탈리도마이드 또는 그의 유도체, 예컨대 레날리도마이드를 CD38-특이적 항체(예컨대, MOR202)의 투여가 이루어지기 전에 투여하고/하거나 개별적으로 투여한다. 또 다른 구현예에 의하면, 레날리도마이드를 CD38-특이적 항체(예컨대, MOR202)의 투여가 이루어지기 적어도 72시간 전에 투여한다. 이러한 기간은 레날리도마이드가 표적 세포 내에서 CD38를 상향조절 매개할 수 있도록 한다.

[0062] 약학 조성물은 활성제, 예컨대 인간의 치료 용도를 위한 항체를 포함한다. 약학 조성물은 허용가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0063] "투여되는" 또는 "투여"는 주입가능한 형태를 통한 전달, 이를테면 가령 정맥내, 근육내, 피내 또는 피하 경로, 또는 예를 들어 흡입용 비강 분무제 또는 에어로졸, 또는 섭취가능한 용액, 캡슐 또는 정제 형태로서의 점막 경로를 포함하되, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 화합물 또는 조합의 "치료적 유효량"은 주어진 질병 또는 장애 및 그 합병증의 임상 증상을 치료하거나, 완화시키거나 일부 저지시키기에 충분한 양을 가리킨다. 특정 치료 목적에 효과적인 양은 질병 또는 부상의 심각도뿐만 아니라 치료대상의 체중 및 전반적 상태에 따라 좌우된다. 적절한 투여량을 결정하는 일은 여러 수치의 행렬을 만든 후 행렬 내에서의 다양한 지점들을 시험함으로써 관례적 실험을 이용하여 달성될 수 있다는 것을 이해할 것이며, 이들 모두는 숙달된 내과의나 임상 과학자의 통상적 지식 범위 내에 속한다.

[0065] 놀랍게도, 특정 항-CD38 항체 및 레날리도마이드의 조합이 AMO-1 및 NCI-H929 다발성 골수종 세포 모두에서의 항체-의존 세포-매개 세포독성(ADCC)의 시너지 수준을 매개한다는 점이 발견되었다. 그 밖에, 또한 예상외로, 레날리도마이드와 조합된 경우의 특정 항 CD-38 항체는 NCI-H929 SCID 마우스 모델의 골용해를 감소시키는 시너지 수준을 매개하고, RAMOS SCID 마우스 모델 내 중간 생존 일수를 시너지적으로 증가시켰다. 따라서, 예시적 CD38-특이적 항체와 레날리도마이드의 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종과 관련하여 체외 및 체내 모델 둘 다에서 시너지적으로 작용하였다. 이와 같이, 이러한 조합은 인간의 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료에 시너지적 결과를 가져온다.

[0066] 레날리도마이드는 탈리도마이드 유사체이므로, 기타 다른 탈리도마이드 유사체(이를테면, 포말리도마이드) 또는 탈리도마이드 자체도 항-CD38 항체와 조합되어 사용되면 시너지 효과를 나타내는 것으로 예상된다. 더욱이, 탈리도마이드나 그 유사체는 다발성 골수종 세포주에서 CD38의 발현을 상향조절하므로, 종양 세포의 표면에서 CD38의 발현을 상향조절하는 기타 다른 작용제, 예컨대 레티노산, 및 항-CD38 항체가 조합되어 사용되면 시너지가 발생할 것으로 예상된다.

[0067] 놀랍게도, 특정 항-CD38 항체와 보르테조밉의 조합이 NCI-H929 및 LP-1 다발성 골수종 세포주 내 높은 수준의 항체-의존 세포-매개 세포독성(ADCC)을 매개한다는 것이 발견되었다. 그 밖에, 또한 예상외로, 특정 항-CD38 항체와 보르테조밉의 조합은 NCI-H929 SCID 마우스 모델의 골용해를 감소시키는 시너지 수준을 달성했고, RAMOS SCID 마우스 모델 내 중간 생존 일수를 시너지적으로 증가시킨다는 것이 발견되었다. 따라서, 예시적 CD38-특이적 항체와 보르테조밉의 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종과 관련하여 체외 및 체내 모델 둘 다에서 시너지적으로 작용하였다. 이와 같이, 이러한 조합은 인간의 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료에 시너지적 결과를 가져온다.

[0068] 기타 다른 프로테아좀 억제제, 이를테면 디설피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트, 및 살리노스포르마이드 A를 항-

CD38 항체와 조합하여 사용하면 유시한 효과에 이를 것이라 예상된다.

[0069] 본원에서 "CDR"은 Chothia et al., Kabat et al.에 의해 정의되거나, 또는 내부 넘버링 전환법에 의해 정의된다. 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Chotia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglubulins. J Mol Biol., 196(4):901-17을 참고한다. 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Kabat E.A, Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. 및 Foeller C. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th edit., 워싱턴 DC, 미국 건강 및 인간 서비스부, NIH 공개 번호 91-3242를 참고한다.

[0070] **구현예**

[0071] 본 개시의 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는, CD38-특이적 항체와 (a) 탈리도마이드 또는 그의 유사체, 또는 (b) 프로테아좀 억제제의 시너지적 조합을 포함한다.

[0072] 본 개시의 일 양태는 CD38-특이적 항체와 탈리도마이드 또는 그의 유사체의 조합을 포함한다. 구현예에서, 상기 조합은 시너지적이다.

[0073] 구현예에서, CD38-특이적 항체는 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한다.

[0074] 구현예에서, CD38-특이적 항체는 서열 DYWMQ (SEQ ID NO:15)의 HCDR1 영역, 서열 TIYPGDGDTGYAQKFQG (SEQ ID NO:16)의 HCDR2 영역, 서열 GDYYGSNSLDY (SEQ ID NO:17)의 HCDR3 영역, 서열 KASQDVSTVVA (SEQ ID NO:18)의 LCDR1 영역, 서열 SASYRYI (SEQ ID NO:19)의 LCDR2 영역, 및 QQHYSPPYT (SEQ ID NO:20)의 LCDR3 영역을 포함한다.

[0075] 일 양태에 의하면, 본 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용된다. 구현예로는, 탈리도마이드 유사체가 레날리도마이드인 조합이 포함된다.

[0076] 일 양태는 상기 조합을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 구현예에서, 상기 조성물은 허용가능한 운반체를 포함한다. 구현예에서, 상기 조성물은 유효량으로 투여된다.

[0077] 본 개시의 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료를 위한, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드의 시너지적 조합을 포함한다.

[0078] 또 다른 일 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는 서열

[0079] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

[0080] 의 가변 중쇄, 및 서열

[0081] DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 11)

[0082] 의 가변 경쇄를 포함한다.

[0083] 본 개시의 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료를 위한, 서열 DYWMG (SEQ ID NO:15)의 HCDR1 영역, 서열 TIYPGDGDTGYAQKFQG (SEQ ID NO:16)의 HCDR2 영역, 서열 GDYYGSNSLDY (SEQ ID NO:17)의 HCDR3 영역, 서열 KASQDVSTVVA 9SEQ ID NO:18)의 LCDR1 영역, 서열 SASYRYI (SEQ ID NO:19)의 LCDR2 영역, 및 서열 QQHYSPPYT (SEQ ID NO:20)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드의 시너지적 조합을 포함한다.

[0084] 또 다른 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는 서열

[0085] QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDT GYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSV TVSS (SEQ ID NO: 21)

[0086] 의 가변 중쇄, 및 서열

[0087] DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPD RFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 22)

[0088] 의 가변 경쇄를 포함한다.

[0089] 구현예에서, 항체는 IgG1 Fc 영역을 가진다. 구현예에서, 항체는 개질된 Fc 영역을 포함하며, 상기 개질은 ADCC 활성을 증강시킨다.

[0090] 다른 양태에서는, CD38-특이적 항체와 레날리도마이드로 된 조합의 성분들을 개별적으로 투여한다. 일 구현예에서는, 레날리도마이드를 CD38-특이적 항체의 투여가 이루어지기 전에 투여한다. 또 다른 구현예에서, 레날리도마이드를 CD38-특이적 항체의 투여가 이루어지기 72시간 전에 투여한다.

[0091] 다른 양태에 의하면, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드의 시너지적 조합은, 단리된 인간 PBMC의 존재 하에, CD38-발현 AMO-1 세포 및/또는 NC1-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 레날리도마이드 단독보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있다.

[0092] 다른 양태에 의하면, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드의 시너지적 조합은 골용해를 레날리도마이드 단독보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 좋은 효능으로 감소시킬 수 있다.

[0093] 다른 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료가 필요한 개인의 치료 방법을 포함하며, 상기 방법은 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드를 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종에 걸린 개인에게 투여하는 것을 포함한다. 구현예에서, 조합은 유효량으로 투여된다.

[0094] 다른 양태는 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드를 포함하는 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 조합은 암 치료에 사용된다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 다발성 골수종, 및 비-호지킨 림프종 중에서 선택된다.

[0095] 다른 양태는 CD38-특이적 항체와 프로테아좀 억제제의 조합을 포함한다. 구현예에서, 상기 조합은 시너지적이다. 구현예에서, CD38-특이적 항체는 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO: 3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한다.

[0096] 일 양태에서, 조합은 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용된다. 구현예에서, 상기 조합은 보르테조밉인 프로테아좀 억제제를 포함한다. 일 양태는 상기 조합을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 구현예에서, 상기 조성물은 허용가능한 운반체를 포함한다. 구현예에서, 상기 조성물은 유효량으로 투여된다.

[0097] 본 개시의 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료를 위한, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉의 시너지적 조합을 포함한다.

[0098] 또 다른 일 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는 서열

[0099] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

[0100] 의 가변 중쇄, 및 서열

[0101] DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 11)

[0102] 의 가변 경쇄를 포함한다.

[0103] 구현예에서, 항체는 IgG1 Fc 영역을 가진다. 구현예에서, 항체는 개질된 Fc 영역을 포함하며, 상기 개질은 ADCC 활성을 증강시킨다.

[0104] 구현예에서, 상기 조합은 암 치료에 사용한다. 또 다른 구현예에서, 상기 암은 다발성 골수종, 및 비-호지킨 림프종 중에서 선택된다.

[0105] 다른 양태에서는, 항체와 프로테아좀 억제제로 된 조합의 성분들을 개별적으로 투여한다.

[0106] 다른 양태에 의하면, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉의 시너지적 조합은, 단리된 인간 PBMC의 존재 하에, CD38-발현 AMO-1 세포 및/또는 NCI-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 보르테조밉 단독보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있다.

[0107] 다른 양태에 의하면, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉의 시너지적 조합은 골용해를 보르테조밉 단독보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 좋은 효능으로 감소시킬 수 있다.

[0108] 다른 양태에서, 본 개시는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료가 필요한 개인의 치료 방법을 포함하며, 상기 방법은 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉을 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종에 걸린 개인에게 투여하는 것을 포함한다.

[0109] 구현예에서, 조합은 유효량으로 투여된다.

[0110] 다른 양태는 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉을 포함하는 조합을 포함한다.

[0111] 일 양태는, 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종의 치료에 사용되는, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ

ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6)의 LCDR3 영역을 포함하는 CD38-특이적 항체, 및

[0112] (a) 탈리도마이드 또는 그의 유사체, 또는

[0113] (b) 프로테아좀 억제제

[0114] 의 시너지적 조합을 포함한다.

[0115] 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는

[0116] 서열

[0117] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

[0118] 의 가변 중쇄, 및 서열

[0119] DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 11)

[0120] 의 가변 경쇄를 포함한다.

[0121] 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는 IgG1 Fc 영역을 가진다. 구현예는 조합을 포함하며, 이때 항체는 개질된 Fc 영역을 포함하고, 상기 개질은 ADCC 활성을 증강시킨다.

[0122] 구현예는 조합을 포함하며, 이때 상기 CD38-특이적 항체와 상기 탈리도마이드 또는 그의 유사체, 또는 프로테아좀 억제제는 개별적으로 투여한다.

[0123] 구현예는 레날리도마이드 및/또는 보르테조밉 단독보다 적어도 2배 더 좋은 효능으로 골용해를 감소시킬 수 있는 조합을 포함한다.

[0124] 구현예는 조합을 포함하며, 이때 상기 CD38-특이적 항체는 탈리도마이드 또는 그의 유사체와 병용된다. 구현예는 조합을 포함하며, 이때 상기 탈리도마이드 유사체는 레날리도마이드를 포함한다. 구현예는 조합을 포함하며, 이때 레날도마이드는 CD38-특이적 항체의 투여가 이루어지기 적어도 72시간 전에 투여된다.

[0125] 구현예는 CD38-특이적 항체 및 레날리도마이드의 조합을 포함하며, 이러한 조합은, 단리된 인간 PBMC의 존재 하에, CD38-발현 AMO-1 세포 및/또는 NC1-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 레날리도마이드 단독보다 적어도 2배, 3배, 4배 또는 5배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있다

[0126] 구현예는 상기 CD38-특이적 항체와 프로테아좀 억제제를 포함하는 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프로테아좀 억제제는 보르테조밉이다. 구현예는 CD38-특이적 항체와 보르테조밉을 포함하는 조합을 포함하며, 이러한 조합은 단리된 인간 PBMC의 존재 하에, CD38-발현 AMO-1 세포 및/또는 NC1-H929 세포가 ADCC에 의해 사멸되는 것을 보르테조밉 단독보다 적어도 2배 더 좋은 효능으로 매개할 수 있다

[0127] 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료에 사용되는, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 레날리도마이드 또는 기타 다른 탈리도마이드 유사체의 시너지적 조합을 포함한다.

[0128] 일 양태는 다발성 골수종 및/또는 비-호지킨 림프종 치료에 사용되는, 서열 GFTFSSYYMN (SEQ ID NO:1) 또는 서열 SYYMN (SEQ ID NO:14)의 HCDR1 영역, 서열 GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)의 HCDR2 영역, 서열 DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO:3)의 HCDR3 영역, 서열 SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO:4)의 LCDR1 영역, 서열 GDSKRPS (SEQ ID NO:5)의 LCDR2 영역, 및 서열 QTYTGGASL (SEQ ID NO:6)의 LCDR3 영역을 포함한 CD38-특이적 항체와, 보르테조밉 또는 기타 다른 프로테아좀 억제제의 시너지적 조합을 포함한다.

[0129] **실시예**

[0130] 실시예 1: 다양한 세포주의 표면에서의 CD38 발형

[0131] 표 1의 세포주들의 CD38 발현 수준을 시험하였다.

[0132] [표 1]

[0133]

세포주	공급처	배양조건
AMO-1: 다발성 골수종 세포주	DSMZ #ACC 538	RPMI1640, L-글루타민,(PAN Biotech GmbH, Cat 번호:P04-16500 배지)
LP1: 다발성 골수종 세포주	DSMZ #ACC 41	Iscove의 개질된 Dulbecco 배지(IMDM), GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat 번호: 31980-048)
NCI-H929: 다발성 골수종 세포주	DSMZ #ACC 163	Rpmi1640 (AMO-1과 동일), 1mM Na-Pyruvate, 50 μM β-머갑토에탄올이 추가됨
RPMI8226: 다발성 골수종 세포주	DSMZ #ACC 402	RPMI1640 (AMO-1과 동일)
OPM-2: 다발성 골수종 세포주	DSMZ #ACC 50	RPMI1640 (AMO-1과 동일)
플라즈마시토마: 다발성 골수종 세포주	Klinikum rechts der Isar	RPMI1640 (AMO-1과 동일)

[0134] 다발성 골수종 환자로부터의 골수 샘플(4-10ml 흡입) 및 골수외 종양 플라즈마시토마 샘플을 Klinikum rechts der Isar("Krdl")(독일, 뮌헨)의 동의 하에 수득하였다. 이들 샘플을 원심분리시키고, 자성-활성 세포 분류법을 통해 더 풍부한 형질 세포를 얻었다.

[0135] 세포들을 CD38에 특이적인, 직접 표지된 QuantiBRITETM CD38-PE 항체(Becton Dickinson GmbH, Clone HB7, CAT #342371)로 염색하였다. 세포 당 기하평균(GeoMean)을 측정하는 유동 세포분석법에 기반한 QuantiBRITETM 시스템을 이용하여 "세포 당 결합된 항체"(ABC' s)를 구하였다. GraphPad PRISM™ 소프트웨어의 도움으로, 상기 측정된 GeoMean을 세포 당 관련된 ABC 양으로 환산하였다. QuantiBRITE™ CD38-PE가 항체 당 하나의 PE 분자를 운반하기 때문에, ABC값이 세포 당 CD38 분자수와 상관있다는 것이 추정된다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0136] 실시예 2: 다양한 세포주에서 CD38의 상향조절에 미치는 레날리도마이드의 효과에 대한 평가

[0137] 레날리도마이드가 표 1의 다발성 골수종 및 플라즈마시토마 세포에서 CD38의 상향조절을 유도하였는지 결정하기 위해, 세포주를 100 μM 레날리도마이드로 배양시킨 후, CD38 표면 발현을 FACS로 분석하였다.

[0138] 재료 및 방법

[0139] 표 1에 제공된 각 세포주의 약 2 x 10^5개 세포를 표준 RPMI 배지가 담긴 48-well 접시에 분주하였다. Selleck Chemicals (LLC S1029, CAS 번호 191732-6; 배치: S10290)으로부터 구입한 레날리도마이드를 각 well에 넣어, 20% FCS 및 0.1% DMSO를 함유하는 750μl의 부피 중 최종 농도가 100 Mm이 되도록 하였다. 음성 대조군으로는, FCS-추가된 배지 중의 0.1% DMSO를 사용하였으며, 접시를 37℃, 5% CO_2 조건 하에 가습 배양기 내에서 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하였다.

[0140] 세포를 미세 피펫 작업에 의해 재현탁시키고, 250 μl의 세포 현탁액을 배양 기간마다 96-well 환저형 접시의 각 well로 옮겼다. 세포를 원심분리법에 의해 1분 동안 700 x g으로 세척한 후, 150 μl의 차가운 FACS 완충액(1 x 3% FCS가 추가된 PBS)에 재현탁시켰다. 세포를 다시 한번 원심분리시켜 펠렛(pellet)을 형성하고, 15 μg/ml의 항-CD38 항체(MOR202, IgG1) 또는 대조군 항체 MOR03207을 함유한 150 μl의 FACS 완충액에 재현탁시키고, 1시간 동안 얼음 위에서 배양하였다. 그런 후에는 세포를 원심분리에 의해 3번 세척하고, PE-표지된 이차 항체(PE-Fab_2 조각, 염소 anti-인간 IgG, Fc-조각 특이; Jackson Immuno Research; CAT: 109-116-098; Lot: 80938)가 추가된 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 세포를 45분 동안 얼음 위에서 배양한 후, 원심분리에 의해 3번 세척하고, FACS 완충액에 재현탁시켰다. 그런 후에는 FACS 어레이 장치를 이용하여 세포 현탁액에 FACS 분석을 시행하였다.

[0141] 각 세포주의 기저(basal) CD38 발현 및 CD38 발현에 미치는 레날리도마이드의 영향을 표 2에 나타내었다. 또한, AMO-1 세포의 CD38 발현에 미치는 레날리도마이드의 영향을 도 1에 예시하였고, NCI-H929 세포의 CD38 발현에 미치는 레날리도마이드의 영향을 도 5에 예시하였다.

[0142] [표 2]

[0143]

	ABC의 절대수 (CD38 발현)		증가	증가 배수	영향
세포주	기저	LEN (추정값)			
AMO-1	25,000	115,000	90,000	4.6	현저함
LP-1	125,000	162,500	37,500	1.3	없음
NCI-H929	195,000	390,000	195,000	2.0	약함
RPMI-8226	670,000	871,000	199,000	1.3	약함
OPM-2	38,000	98,800	60,800	2.6	현저함
Plasmacytoma	30,000	69,000	39,000	2.3	현저함

[0144] 실시예 3: 레날리도마이드 단독 사용을 통해 AMO-1 세포의 증식 억제

[0145] AMO-1 세포에서의 레날리도마이드 세포독성을 시험하였다. 세포를 모아서 96-well 접시에, well 당 5000개 세포를 분주하였다. 레날리도마이드의 양을 증가시키면서 well에 첨가하고, 접시를 37℃, 5% CO2 조건 하에 가습 배양기 내에서 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하였다.

[0146] 배양이 끝나면, 세포 증식 kit II (ROCHE, 세포 증식 Kit II, Cat 번호: 11465015001)를 이용하는 정량적 열량 측정 XTT-기초 평가로, 접시의 세포 증식을 분석하였다. 후속 측정을 위해, 접시를 Tecan Genois Reader에 넣고, 492nm에서의 흡광도를 검출하였다.

[0147] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0148] 실시예 4: AMO-1 세포에서의 MOR0202와 레날리도마이드의 시너지적 조합

[0149] MOR202와 레날리도마이드의 조합 시험을 위해 AMO-1 세포를 선택하였다. AMO-1 세포는 기저 CD38 발현이 낮다는 점에서 인간의 플라즈마시토마 세포와 비슷하며, 표 2에 나타낸 바와 같이 레날리도마이드를 사용하여 치료한 경우 둘 모두에서의 CD38이 현저하게 상향조절되었다.

[0150] 새로 단리시킨 인간 혈액을 밀도 구배 원심분리시켜 PBMC를 단리시켰다. 서로 다른 기증자들로부터의 단리된 혈액을 Falcon 튜브 내 정해진 부피의 Biocoll(Biochrome AG; CAT 번호: L6115; LOT 번호: 1050T) 상에 적층한 후, 380g에서 원심분리시켰다. PBMC가 단리되었으며, 여기에 RPMI 배지를 추가하였다.

[0151] 72시간이 지난 후, 세포수를 세고, PBMC를 6.6 x 10^6/ml의 농도까지 조절한 한편, AMO-1 세포를 최종 농도 2.5 x 10^5/ml까지 조절하였다. 유동 세포분석법으로 나중에 확인하기 위해, AMO-1 세포를 3분 동안 0.1 μg/ml의 CalceinAM(Calcein: 1 mg/ml 모액, Invitrogen, Cat 번호: C3099)으로 염색한 후, 저속 원심분리로 세 번 세척하였다. 100 μl의 표적 세포 현탁액을 100 μl의 PBMC와 1:30 비율로 혼합하였다. 항체 MOR202 또는 항체 MOR03207(음성 대조군)을 첨가하여 최종 농도를 15 μg/ml로 만들었다. 세포 현탁액을 4시간 동안 37℃에서 더 배양하였다. 죽은 AMO-1 세포를 검출하기 위해, 프로피디움 요오드화물(PI)을 사용하여 세포 현탁액을 염색한 후, 유동 세포분석기에서 분석하였다. CalceinAm 양성 세포군을 통문(gating)하여 표적 세포를 분리하고, ADCC를 통해 사멸된 세포들을 세었다.

[0152] MOR202와 레날리도마이드의 조합에 의한 AMO-1 세포 상의 ADCC 매개효과를 측정하기 위해, 총 6개의 실험을 수행하였다. 3개 실험에서는, PBMC 및 AMO-1 세포를 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였으며, 그 결과를 표 3a-c와 도 3에 나타내었다. 3개의 추가 실험에서는, PBMC만 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였으며, 그 결과를 표 4a-c와 도 4에 나타내었다.

[0153] 표 3 주효 세포(effector cell) 및 AMO-1 세포 모두 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. 10 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 MOR202를 단독 및 병용 투여하였다.

[0154] 해당 자료를 하기의 3가지 방식으로 제공하였다: a) 원자료(죽은 세포%), b) 정규화 특이적 사멸능 자료, MOR202 치료군을 1(100%)로 설정함, 및 c) 정규화 특이적 사멸능 자료, 이론적 조합을 1(100%)로 설정함. 표 3a

는 원자료를 나타낸다.

[0155] [표 3a

[0156]

AMO-1	LEN 10μM 단독	MOR202 단독 (15μg/ml)	LEN(10uM) 및 MOR202 (15ug/ml) 의 조합	DMSO	MOR03207 (15μg/ml)	MOR03207 (15μg/ml) - DMSO	LEN (0μM)	PBMC 없이 LEN (10uM) 단독	PBMC 없이 DMSO 대조군
Exp.1	12.89	23.69	35.98	13.10	14.15	15.12	15.45	15.41	11.07
Exp.2	10.13	22.53	29.09	7.94	10.52	6.99	13.22	8.44	8.45
Exp.3	22.80	49.56	80.39	19.93	24.04	22.24	22.63	22.38	26.43

[0157] 열거된 값들의 단위는 죽은 세포%이다. DMSO, MOR03207, MOR03207 + DMSO, LEN0, PBMC 없는 LEN10, PBMC군이 없는 DMSO를 대조군으로 하였다.

[0158] 표 3b는 표 3a의 자료를 나타내되, MOR202 치료군을 1(100%)로 설정하여 정규화하였다.

[0159] [표 3b]

[0160]

AMO-1	MOR03207 (15μg/ml)	MOR202 (15μg/ml)	LEN 단독 (10μM)	이론적 조합	MOR202 (15μg/ml) 및 LEN (10μM)
Exp.1	-0.1	1.0	0.0	1.0	2.2
Exp.2	0.2	1.0	0.2	1.2	1.8
Exp.3	0.1	1.0	0.1	1.1	2.3

[0161] 표 3b-c에서, "이론적 조합"은 MOR202 단독 값과 LEN 단독 값의 합계를 나타낸다. 표 3b의 정규화 자료는 아래와 같이 계산하였다. 표 3a는 죽은 세포수를 나타낸다. 따라서, 표 3b의 특이적 사멸능 값은 대조군 값을 뺌으로서 계산하였다. 그런 후에는 특이적 사멸능 값을 1로 설정된 MOR202군과 비교하였다. 표 3b에 제공된 결과의 평균값을 도 3에 나타내었다.

[0162] 1. <u>시너지 작용 결정</u>

[0163] 1.1 <u>Chou et al.</u>

[0164] 시너지 작용을 결정하기 위해 Chou-Talalay의 방법을 이용하였다. 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 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)를 참조한다. CI-이소볼 방법을 이용하여 시너지 작용 분석을 수행하였다.

[0165] <u>중간-효과 공식</u>

[0166] 중간-효과 공식은 아래와 같은 (약물과 같은) 억제제의 효과를 모델로 한다:

[0167] $F_a/F_u = (D/D50)^m$

[0168] 식에서 D는 용량이고; F_a 및 F_u는 용량 D에 의해 영향받는/영향받지 않는 시스템의 분율($F_a + F_u = 1$)이고; D50은 중간 효과를 생성하는 용량(예컨대, IC50, ED50, LD50)이다. 상수 m은 용량-효과 곡선의 모양을 결정한다. 매개변수 *m* 및 D50을 예측하기 위한 선형 회귀 산출을 수행하기 위해 Excel Fit 소프트웨어를 이용하였다.

[0169] AMO-1 세포에 대한 조합의 효과를 전술한 바와 같이 세포 사멸%로 측정하였다. 분율 F_u는, 대조군으로 처해지는 세포주의 세포 사멸%에 대한 치료받은 세포주의 세포 사멸%로 정의하였다. 즉:

[0170] F_u = (치료된 세포주) 세포 사멸% / (치료받지 않은 세포주) 세포 사멸%.

[0171] 세포주의 세포 사멸%은 중간 효과 공식에서의 상수 D50이 되며, 이는 전술된 선형회귀법에 의해 측정가능하다.

[0172] <u>CI-이소볼 방법</u>

[0173] CI-이소볼 방법은 약물 간의 시너지 작용에 대한 정량적 평가를 제공한다. 병용지수(CI)는 단일 및 병용 약물 치료의 용량-효과 자료로부터 예측된다. 1 미만의 CI값은 시너지 작용을 나타내고; CI = 1은 부가 효과를 나타

내고; CI > 1은 길항작용을 나타낸다. 시너지 범위 또한 Chou 및 Talahay에 의해, 0 미만의 CI값은 매우 강한 시너지 작용, 0.1 내지 0.3의 CI값은 강한 시너지 작용, 0.3 내지 0.7의 CI값은 시너지 작용, 0.7 내지 0.9의 CI값은 중간 내지 약한 시너지 작용으로 정의된다. 약물 상호작용(시너지 작용 또는 길항작용)은 CI값이 1에서 멀수록 더 확연해진다.

[0174] 공식적으로, 조합된 약물 치료의 병용지수(CI)는 아래와 같이 정의된다:

[0175] $CI = D_1/Dx_1 + D_2/Dx_2$.

[0176] 식에서 D_1 및 D_2는 조합 내 약물 1 및 약물 2 각각의 용량이고; D_{x1} 및 D_{x2} 각각은 조합과 동일한 효과를 제공하는 약물 1 및 단독 약물 2 각각의 단독 치료 용량이다. D_{x1} 및 D_{x2}의 용량은 단독 약물 치료의 용량-효과 자료로부터 예측할 필요가 있다. 기본적으로, 중간 효과 공식은 각 약물의 자료에 들어맞는다. 한 약물의 중간 효과 공식으로부터, 효과(즉, F_a, F_u)를 생성하는데 필요한 용량(즉, D)을 예측할 수 있다. 한 지점이 부가작용 직선(additive line)으로부터 더 멀수록, 1과 그의 CI 사이의 차이가 더 커지고, 이에 따라 (시너지 또는 길항적) 효과가 더 강해진다.

[0177] 상기 방법은, 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Chou TC, Talalay P, Quantitive analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22:27-55 (1984)에 기재되어 있다. 상기 Chou 방법의 추가 평론 또한 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006)에 제공되어 있다.

[0178] Chou에 기반한 시너지 계산결과로 생성된 곡선들을 도 12 내지 도 18에 예시하였다. 도 12에서는, a) MOR202의 농도가 어떤 효과든 내기에 너무 낮은 경우와 b) 상기 농도가 포화도에 가까운 경우, 자료점(측정점)들을 제거함으로써 최적 곡선을 구하였다. 약 80% 세포 사멸에 해당하는 적절한 측정점에서, CI값은 1보다 작았으며, 이는 확실한 시너지를 증거한다. 도 13 내지 도 18은 도 3 및 도 4로부터의 6가지 실험을 나타내며, 각각에서 MOR202와 레날리도마이드의 조합이 제공하는 100% 효과에 이르기 위해 필요한 D_{x1}(MOR202의 용량)은 무한대가 되고; 따라서 D_1/D_{x1}은 1보다 작고, 세포 사멸과 관련하여 레날리도마이드가 AMO-1 세포에 아무런 영향을 미치지 않기 때문에 Dx2값 역시 무한대가 되어, D_2/D_{x2}는 대략 0이고, 따라서 상기 6가지 실험 각각의 CI값은 1보다 작으며, 이는 확실한 시너지를 증거한다.

[0179] 표 3c는 자료의 정규화를 나타내는데, 이때 이론적 조합은 1(100%)로 설정되며 CI Chou 계산결과를 포함한다.

[0180] [표 3c]

[0181]

세포주	실험	MOR202 (0.42μg/ml)	LEN (5μM)	이론적 배합	MOR202 (0.42μg/ml) 및 LEN (5μM)	병용지수 (CI)	결론
AMO-1	실험 1	0.6	0.4	1.0	1.0	<< 0.1	시너지
	실험 2	0.9	0.1	1.0	2.4	<< 0.1	시너지
	실험 3	0.9	0.1	1.0	1.8	<< 0.1	시너지
	평균	0.8	0.2	1.0	1.7	-	-

[0182] 표 3c에 보여진 자료는 표 3a 및 표 3b의 것과 다르다. 표 3c에서 선택된 농도가 항체의 EC_{50}(원자료는 미제공됨)에 더 근접하므로, 표 3c는 표 3a에 보여진 것과 다른 원자료점을 기반으로 한다. "이론적 조합"은 MOR202 단독 값과 LEN 단독 값의 합계를 나타낸다.

[0183] 표 4 주효 세포만 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. 10 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 MOR202를 단독 및 병용 투여하였다.

[0184] 해당 자료를 하기의 3가지 방식으로 제공하였다: a) 원자료(죽은 세포%), b) 정규화 특이적 사멸능 자료, MOR202 치료군을 1(100%)로 설정함, 및 c) 정규화 특이적 사멸능 자료, 이론적 조합을 1(100%)로 설정함. 표 4a는 원자료를 나타낸다.

[0185] [표 4a]

[0186]

AMO-1	LEN 10μM 단독	MOR202 단독 (15μg/ml)	LEN(10uM)과 MOR202 (15ug/ml)의 조합	DMSO	MOR03207 15μg/ml	MOR03207 15μg/ml + DMSO	LEN (0μM)
Exp.1	15.33	23.09	23.46	14.62	16.17	15.97	12.87
Exp.2	12.98	21.08	25.75	10.24	12.17	11.45	9.78
Exp.3	17.93	48.28	56.49	16.75	17.42	15.77	18.16

[0187] 열거된 값들의 단위는 죽은 세포%이다. DMSO, MOR03207, MOR03207 + DMSO, LEN0, PBMC 없는 LEN10, PBMC가 없는 DMSO를 대조군으로 하였다.

[0188] [표 4b]

[0189]

AMO-1	MOR03207 (15μg/ml)	MOR202 (15μg/ml)	LEN 단독 (10μM)	이론적 조합	MOR202 (15μg/ml) 및 LEN (10μM)
Exp.1	0.5	1.0	0.1	1.1	1.1
Exp.2	0.3	1.0	0.3	1.3	1.6
Exp.3	0.0	1.0	0.0	1.0	1.3

[0190] 표 4b는 표 4a의 자료를 나타내되, MOR202 치료군을 1(100%)로 설정하여 정규화하였다. 표 4b-c에서, "이론적 조합"은 MOR202 단독 값과 LEN 단독 값을 나타낸다.

[0191] 표 4b에 제공된 자료의 정규화는 표 3b에 기술한 바와 같이 대조군을 뺌으로써 계산하였다. 표 4b에 제공된 결과의 평균값을 도 4에 나타내었다.

[0192] [표 4c]

[0193]

세포주	실험	MOR202 (0.42μg/ml)	LEN (5μM)	이론적 조합	MOR202 (0.42μg/ml) 및 LEN (5μM)	병용지수 (CI)	결론
AMO-1	실험 1	1.2	-0.2	1.0	1.7	<< 0.1	시너지
	실험 2	0.7	0.3	1.0	1.4	<< 0.1	시너지
	실험 3	0.8	0.2	1.0	1.3	<< 0.1	시너지
	평균	0.9	0.1	1.0	1.5	-	-

[0194] 표 4c는 자료의 정규화를 나타내며, 이때 이론적 조합은 1(100%)로 설정되며, 실시예 4에서 전술한 방법론을 이용한 Cl Chou et al. 계산결과를 포함한다.

[0195] 표 4c는 표 4a 및 표 4b와 다르다. 표 4c에서 선택된 농도가 항체의 EC_{50}(원자료는 미제공됨)에 더 근접하므로, 표 4c는 표 4a에 보여진 것과 상이한 원자료점을 기반으로 한다.

[0196] 1. <u>시너지 작용 결정</u>

[0197] 1.2 <u>Clarke et al. 시너지 작용</u>

[0198] 레날리도마이드 단독으로는 AMO-1 세포에 대항하여 낮은 세포독성을 가지는 본원에서와 같이, 한 약물이 낮은 활성을 가지는 경우, 조합이 억제성 약물 단독과는 현저하게 다르다는 통계적 증거에 의해 시너지를 또한 결정할 수 있다. 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 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. 위에 나타낸 바와 같은 Chou et al. 및 Clarke et al.의 방법 모두를 시너지 작용을 결정하는데 이용하였다.

[0199] 해당 자료를 아래와 같은 방식으로 분석하였다:

[0200] 길항작용 (AB)/C < (A/C) x (B/C)

[0201] 부가효과 (AB)/C = (A/C) x (B/C)

[0202] 시너지 작용 (AB)/C > (A/C) x (B/C)

[0203] 여기서 A는 LEN 단독 치료이고; B는 MOR202 단독 치료이고; C는 부형제 치료에 대한 반응이고; AB는 A 치료와 B 치료의 조합이다.

[0204] 표 5: 표 5에 보여진 원자료 값은 표 3a에 보여준 것과 동일한데, 이는 이들 값이 동일한 3가지 실험 - 주효 세포 및 AMO-1 세포 모두 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하고, 10 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 MOR202를 단독 및 병용 투여함 - 으로부터 얻어진 것이기 때문이다. 유일한 차이점은 Chou et al. 대신에 Clarke et al.을 이용하여 자료를 분석하였다는 것이다.

[0205]

	실험 1	실험 2	실험 3
A: LEN 단독	15.41	8.44	22.38
B: MOR202 단독	23.69	22.53	49.56
C: 대조군	11.07	8.45	26.43
AB: LEN과 MOR202의 조합물	35.98	29.09	80.39
(AB)/C	3.25	3.44	3.04
(A/C) x (B/C)	2.98	2.66	1.59

[0206] A = LEN 단독 치료에 대한 반응

[0207] B = MOR202 단독 치료에 대한 반응

[0208] C = 대조군 치료에 대한 반응

[0209] AB = A 치료와 B 치료의 조합

[0210] A, B, C 및 AB 값은 세포 사멸능%를 나타낸다.

[0211] 각 실험에서 (AB)/C는 (A/C) x (B/C)보다 크며, 이는 확실한 시너지를 증거한다.

[0212] 표 6: 표 6에 보여진 원자료 값은 표 4a에 보여준 것과 동일한데, 이는 이들 값이 동일한 3가지 실험 - 주효 세포만 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하고, 10 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 MOR202를 단독 및 병용 투여함 -으로부터 얻어진 것이기 때문이다. 유일한 차이점은 Chou et al. 대신에 Clarke et al.을 이용하여 자료를 분석하였다는 것이다.

[0213]

	실험 1	실험 2	실험 3
A: LEN 단독	15.33	12.98	17.93
B: MOR202 단독	23.09	21.08	48.28
C: 대조군	15.97	11.45	15.77
AB: LEN과 MOR202의 조합물	23.46	25.75	56.49
(AB)/C	1.47	2.25	3.58
(A/C) x (B/C)	1.39	2.09	3.48

[0214] A = LEN 단독 치료에 대한 반응

[0215] B = MOR202 단독 치료에 대한 반응

[0216] C = 대조군 치료에 대한 반응

[0217] AB = A 치료와 B 치료의 조합

[0218] 각 실험에서 (AB)/C는 (A/C) x (B/C)보다 크며, 이는 확실한 시너지를 증거한다.

[0219] 결과

[0220] Clarke et al.의 분석을 적용한 결과, LEN은 6가지 실험 모두에서 AMO-1 세포 내 MOR202 ADCC의 활성을 시너지적으로 증강시켰다. Chou et al.의 분석을 적용한 결과, LEN은 6가지 실험 중 여섯 모두에서 AMO-1 세포 내 MOR202 ADCC의 활성을 시너지적으로 증강시켰다. 이러한 활성 증강은 직접 세포독성, 주효 세포의 활성 및 MM 세포에서의 CD38 발현 수준 상향조절을 비롯한 여러 기전을 통해 확인되었다.

[0221] 기타 다른 CD38-특이적 항체, 예를 들면, "Ref mAB5" 항체를 사용하여 실시예 4에 따른 실험들을 또한 수행하였다.

[0222] 실시예 5: 레날리도마이드 단독 사용을 통한 NCI-H929 세포의 증식 억제

[0223] 실시예 3에 기술한 방법을 이용하여, NCI-H929 내 레날리도마이드의 세포독성을 시험하였다. 그 결과를 도 2에 예시하였다. 요약하자면, 레날리도마이드 단독 치료는 NCI-H929 세포 내 세포 증식을 상당히 억제하였다.

[0224] 실시예 6: NCI-H929 세포에서의, MOR202와 레날리도마이드의 시너지적 조합

[0225] MOR202와 레날리도마이드의 조합을 시험하기 위해 NCI-H929 세포를 선택하였다. NCI-H929 세포는 AMO-1 세포보다 더 높은 수준의 CD38을 발현하기 때문에, 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종에 걸린 인간 환자에서 발견되는 특정 세포 유형을 대표한다.

[0226] MOR202와 레날리도마이드의 조합에 의한 NCI-H929 세포 상의 ADCC 매개효과를 결정하기 위해 실시예 4에 기술된 방법을 이용하여, 전체 6가지 실험을 수행하였다. 3가지 실험에서는, PBMC 및 NCI-H929 세포를 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였으며, 그 결과를 표 7a 내지 7b 및 도 6에 나타내었다. 3가지 추가 실험에서는, PBMC만 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하엿으며, 그 결과를 표 8a 내지 8b 및 도 7에 나타내었다.

[0227] 표 7 주효 세포 및 MOR929 세포 모두 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. 5 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 0.2 또는 0.7 μg/ml의 MOR202를 단독 및 병용 투여하였다.

[0228] 해당 자료를 다음과 같은 방식으로 제공하였다: a) 원자료(죽은 세포%), 및 b) 정규화 특이적 사멸능 자료, 생성 분율 조합을 1(100%)로 설정함. 표 7a는 원자료를 나타낸다.

[0229] [표 7a

[0230]

NCI-H929	LEN 5μM 단독	MOR202 단독 (0.2* 또는 0.07 μg/ml)	LEN(5uM)과 MOR202 (0.2* 또는 0.07 ug/ml)의 조합	DMSO	LEN (0μM)	MOR03207 (15μg/ml) + DMSO	MOR03207 (15μg/ml)
Exp.1	38.65	30.64*	60.20*	18.01	18.42	18.27	17.81
Exp.2	41.92	43.08	66.62	18.77	19.92	20.26	19.20
Exp.3	39.92	32.54	64.58	12.32	12.44	13.74	14.09

[0231] 열거된 값들의 단위는 죽은 세포%이다. DMSO, MOR03207, MOR03207 + DMSO, LEN0, PBMC 없는 LEN10, 및 PBMC 없는 DMSO를 대조군으로 하였다.

[0232] 표 7b는 정규화 자료를 나타내되, 생성 분율 조합을 1(100%)로 설정하였다.

[0233] [표 7b]

[0234]

NCI-H929	MOR202 단독 (0.2* 또는 0.07 μg/ml)	LEN 5μM 단독	생성 분율 개념에 기반한 조합	LEN(5uM)과 MOR202 (0.2* 또는 0.07 ug/ml)의 조합	병용지수 (CI)	결론
Exp.1	0.42*	0.67	1.00	1.36*	<<0.1	시너지 작용
Exp.2	0.58	0.56	1.00	1.12	<<0.1	시너지 작용
Exp.3	0.45	0.67	1.00	1.24	<<0.1	시너지 작용
평균	0.48	0.63	1.00	1.24		

[0235] 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Ting-Chao Chou, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006)에 기재된 바와 같이, 1-[(1-A)*(1-B)] = fpc(%) 공식을 이용하여 생성 분율 조합을 계산하였다. 표 7b는 표 7a에 제공된 원자료를 기반으로 한다. 표 7b에 제공된 자료의 정규화는 표 3b에 기술한 바와 같이 대조군을 뺌으로써 계산하였다. 표 7b에서, LEN과 MOR202의 조합이 생성 분율 개념에 기반한 조합보다 크므로, 확실한 시너지가 존재한다. 그 밖에, 병용지수 값은 실시예 4에 기술한 바와 같이 Chou et al.의 방법을 이용하여 계산하였다. 표 7b에 제공된 결과의 평균값을 도 6에 나타내었다.

[0236] 표 8 주효 세포만 MOR202로 치료하기 전에 레날리도마이드로 치료하였다. 5 μM LEN 및 15 μg/ml의 MOR03207과 0.2* 또는 0.7 μg/ml의 MOR202를 단독 및 병용 투여하였다.

[0237] 해당 자료를 다음과 같은 방식으로 제공하였다: a) 원자료(죽은 세포%), 및 b) 정규화 특이적 사멸능 자료, 생성 분율 조합을 1(100%)로 설정함. 표 8a는 원자료를 나타낸다.

[0238] [표 8a]

[0239]

NCI-H929	LEN 5μM 단독	MOR202 단독 (0.2* 또는 0.07 μg/ml)	LEN(5uM)과 MOR202 (0.2* 또는 0.07 ug/ml)의 조합	DMSO	LEN (0μM)	MOR03207 (15μg/ml) + DMSO	MOR03207 (15μg/ml)
Exp.1	17.50	26.60*	29.11*	18.36	17.56	19.52	17.07
Exp.2	25.72	47.00	51.23	22.55	24.90	24.16	23.19
Exp.3	26.27	53.74	67.99	25.29	25.16	24.43	27.10

[0240] 열거된 값들의 단위는 죽은 세포%이다. DMSO, MOR03207, MOR03207 + DMSO, LEN0, PBMC 없는 LEN10, 및 PBMC 없는 DMSO를 대조군으로 하였다.

[0241] 표 8b는 정규화 자료를 나타내되, 생성 분율 조합을 1(100%)로 설정하였다.

[0242] [표 8b]

[0243]

NCI-H929	MOR202 단독 (0.2* 또는 0.07 μg/ml)	LEN 5μM 단독	생성분율 개념에 기반한 조합	LEN(5uM)과 MOR202 (0.2* 또는 0.07 ug/ml)의 조합	병용지수 (CI)	결론
Exp.1	1.09*	-0.10	1.00	1.10*	0.07	시너지 작용
Exp.2	0.91	0.12	1.00	1.03	0.81	시너지 작용
Exp.3	0.97	0.04	1.00	1.59	<<0.1	시너지 작용
평균	0.99	0.02	1.00	1.24		

[0244] 표 8b는 표 8a에 제공된 원자료를 기반으로 한다. 표 8a에 제공된 자료의 정규화는 표 3b에 기술한 바와 같이 대조군을 뺌으로써 계산하였다. 표 8b에서, LEN과 MOR202의 조합이 생성 분율 개념에 기반한 조합보다 크므로, 확실한 시너지가 존재한다. 그 밖에, 병용지수 값은 실시예 4에 기술한 바와 같이 Chou et al.의 방법을 이용하여 계산하였다. 표 8b에 제공된 결과의 평균값을 도 7에 나타내었다.

[0245] 시너지 작용 결정

[0246] 1.3 생성 분율 개념

[0247] 본 실시예에서의 자료는 실시예 4에서 AMO-1 세포 상에 MOR202와 LEN의 조합이 미치는 영향의 분석에 사용된 자

료와 상이한 것으로 평가되었다. 여기서는 NCl-H929 세포를 시험하였으며, LEN만이 실시예 5에 보여진 바와 같이 NCl-H929 세포의 증식에 현저한 효과를 가지며, 이에 따른 생성 분율 개념을 활용하였다. 생성 분율 개념은 그 전체 내용이 본원에 참조로 통합된 Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, 및 Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006)에 기재되어 있다. 본 문헌에서 Chou et al.은, A 및 B 각각이 60%를 억제하는 경우, 부가 효과가 84% 억제라고 말하는 것은 지나치게 단순화시키는 것이라고 명시하였다. Webb (1963)에 의한 논증에 근거하여, 이러한 종류의 문제점은 (1-0.6)(1-0.6) = 0.16, 1-0.16 = 0.84라는 것에 의해 해결될 수 있다. Chou 및 Talalay (1984)는 이를 생성 분율 방법이라 칭하였다. 이 방법으로는 결코 100% 억제를 넘는 조합 효과에 이르지 못하게 된다. 그러나, Chou 및 Talalay (1984)는 또한 상기 방법이 효능(예컨대, 단편적 억제)을 고려하지만 용량-효과 곡선의 모양(예컨대, 쌍곡선 또는 S자형)을 고려하지 않기 때문에 유효성에 제한이 있다는 것을 증거한다. 용량-효과 분석에서 "모양"의 중요성을 도 1에 나타내었다. Chou 및 Talalay (1984)는 Webb의 방법이 두 약물 모두가 쌍곡선 (즉, 용량-효과 곡선이 쌍곡선인 경우, 즉 중간-효과 선도에서 m=1인 경우의 단순 Michaelis-Menten 동역학)일 때에만 유효하고; m이 1이 아닐 때에, 이를테면 S자형(m>1)이거나 편평한 S자형(m<1) 곡선인 경우에는 유효하지 않다는 것을 지적하였다. 또한, Webb의 방법은 두 약물의 효과가 상호간에 비배타적일 때에는(예컨대, 전적으로 독립적임) 유효하며, 상호간에 배타적일때에는(예컨대, 전형적인 아이소볼로그램에 대해 가정되는 바와 같이 작용 기전 또는 모드가 유사함, 하기를 참조함) 유효하지 않다.

[0248] Clarke은 하나의 단독치료의 효과가 낮을 때 가장 적합하기 때문에, Clark et al.은 활용하지 않았다.

[0249] 도 12를 참조하면, a) MOR202의 농도가 어떤 효과든 내기에 너무 낮은 경우와 b) 상기 농도가 포화도에 가까운 경우, 자료점들을 제거함으로써 최적 곡선을 구하였다. 약 80% 세포 사멸에 해당하는 적절한 측정점에서, CI값은 1보다 작았으며, 이는 확실한 시너지를 증거한다.

[0250] 결과

[0251] 생성 분율 개념의 분석을 적용한 결과, LEN은 6가지 실험 중 여섯 모두에서 NCl-H929 세포 내 MOR202 활성을 시너지적으로 증강시켰다. Chou et al.의 분석을 적용한 결과, LEN은 6가지 실험 중 여섯 모두에서 NCl-H929 세포 내 MOR202 활성을 시너지적으로 증강시켰다. 표 7a 내지 표 7b, 및 표 8a 내지 표 8b를 참조한다.

[0252] 실시예 7: NCl-H929 SCID 마우스 MM 모델의 골용해에 대항한 MOR202 단독, LEN 단독 및 이들의 병용

[0253] 재료

[0254] 레날리도마이드(SYNthesis med chem; 중국, 상하이; Lot 번호: ZHM-066-051). MOR202(MorphoSys AG, Lot 100706-5KLE18). 부형제 대조군: Ora-Plus: Ora-Sweet SF(Paddock Laboratories, 미국 미네소타주 미네아폴리스, Lot 번호. 9499528). SCID 마우스(오스트레일리아, SA, Urrbaraie, 웨이트 캠퍼스, 아델라이드 대학, Strain C.B.-17-lgh-1^{b}-Prkdc^{scid}). NCl-H929 인간 다발성 골수종 세포(표 1을 참조함). Invitrogen Australia (오스트레일리아, VIC, 마운트 웨이버레이)로부터 수득한 RPMI 1640 세포 배지, 소 태아 혈청(FBS), 머캅토에탄올, 행크 평형 염 용액(HBSS) 및 페니실린-스트렙토마이신; 그리고 Sigma-Aldrich(오스트레일리아, NSW, 캐슬힐)로부터 수득한 Trypan Blue 및 글루코오스.

[0255] 방법

[0256] 골용해 현상을 유도하기 위해, SCID 마우스 63 마리의 우측 경골에 2.5 x 106 NCl-H929 MM 세포(5 μl)를 정위적으로 (-7)일째에 접종하였다. 접종 후 3일이 지나면(-4일째), SCID 마우스 60 마리를 표 13에 보여진 바와 같이 체중에 따라 무작위로 여러 그룹(그룹 당 10마리)으로 나누었다. 복용 계획을 표 9에 제공하였다. 레날리도마이드(A 그룹 및 D 그룹) 및 부형제 대조군(C 그룹) 치료를 (-1)일째에 시작하였다. MOR202 치료(B 그룹 및 D 그룹)는 0일째에 시작하였다. 치료를 6주간 지속하였다.

[0257] [표 9]

그룹	화합물	치료	스케쥴
A	레날리도마이드	50 mg/kg, p.o. in 10 mL/kg	6주간 매일 한번
B	MOR202	3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	6주간 매주 3번
C	부형제(Vehicle Control)	10 mL/kg, p.o. (Ora-Plus:Ora-Sweet SF (1:1, w/w))	6주간 매일 한번
D	레날리도마이드/ MOR202 배합물	50 mg/kg, p.o. in 10 mL/kg 3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	6주간 매일 한번 6주간 매주 3번

[0258]

[0259] 골용해를 분석하기 위해 사용되는 MicroCT Scan은 총 골부피(TBV), 지주골의 골부피(Tb.BV), 해면골 패턴 인자(Tb. Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)를 비롯한 3차원 분석을 포함한다. 표 10에는 각 매개변수의 정의가 주어져 있다. 각 MicroCT Scan 매개변수의 결과를 표 11에 나타내었다. 총 골부피(TBV) 결과를 도 19에 나타내었다.

[0260] [표 10]

[0261] MicroCT Scan 매개변수

[0262]

매개변수:	정의:
총 골부피(mm^3)	관심대상의 부피 내 피질골 및 지주골의 총 부피(횡단면)
해면질의 골부피	관심대상의 부피 내 지주골 부피(횡단면)
^해면질 패턴 인자(Tb.Pf)	균열 지수: 지주골에 특이적으로 적용되는 연결성의 역지수. Tb.Pf가 낮을수록, 지주골 격자에 더 잘 연결되며, Tb.Pf가 높을수록 지주골 구조가 더 분리되인다(즉, 골용해가 높음)는 것을 뜻한다.
××구조 모델 지수(SMI)	지주골과 같은 3D 구조에서의 로드 및 플레이트의 상대적 유병률의 지표. 이 매개변수는 플레이트형(정상)에서 로드형(분해) 구조로의 전이를 특징으로 하는 뼈의 골용해에 있어 중요하다. 이상적 플레이트, 원통형 및 구형의 SMI값은 각각 0, 3 및 4이며, 값이 클 수록 더 많은 손상이 있다.

[0263] [표 11]

[0264] MicroCT Scan 결과: 총 골부피(TBV), 지주골 부피(Tb.BV), 지주골 패턴 인자(Tb.Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)

[0265]

그룹	치료	마우스 ID	총 골부피 (TBV) mm^3	지주골 부피 (Tb.BV) mm^2	지주골 패턴 인자 (Tb.Pf) mm^{-1}	구조 모델 지수 (SMI)
대조군	접종 안한 기준 경골*	38045	2.748	0.244	15.354	1.756
		38596	2.839	0.295	12.373	1.542
		39565	2.930	0.314	14.703	1.847
		38325	2.964	0.309	13.538	1.653
		33746	2.751	0.293	13.270	1.624
		38770	2.567	0.307	13.025	1.645
		37966	2.967	0.410	12.125	1.557
		38604	3.087	0.327	11.902	1.658
		38023	2.775	0.270	18.005	1.889
		38594	2.830	0.311	13.293	1.589
		Mean	**2.846**	**0.308**	**13.759**	**1.676**
		SEM	**0.047**	**0.014**	**0.583**	**0.037**
A	레날리도마이드 50 mg/kg	33150	1.604	0.107	24.329	2.679
		38027	1.742	0.100	23.561	2.667
		38314	2.506	0.256	22.893	2.335
		38446	2.466	0.213	28.280	2.560
		38562	2.688	0.385	22.213	2.086
		38626	2.869	0.293	30.739	2.619
		38748	1.786	0.114	24.016	2.562
		39192	1.988	0.081	29.454	2.592
		39364	1.741	0.155	24.205	2.547
		39512	2.007	0.219	38.360	3.125
		Mean	**2.140**	**0.192**	**26.805**	**2.577**
		SEM	**0.143**	**0.031**	**1.584**	**0.083**
B	MOR03087, 3 mg/kg	32094	2.233	0.190	27.049	2.386
		32548	2.893	0.310	15.631	1.818
		33564	2.760	0.356	27.631	2.423
		38016	1.635	0.118	27.523	2.450
		38023	2.681	0.248	17.887	1.860
		38510	1.838	0.260	21.405	2.461
		38599	2.884	0.382	26.348	2.888
		39086	3.068	0.566	20.327	2.247
		39666	2.547	0.316	25.843	2.318
		39715	2.135	0.284	22.402	2.275
		Mean	**2.467**	**0.323**	**23.204**	**2.280**
		SEM	**0.153**	**0.043**	**1.365**	**0.079**
C	부형제 (Ora Plus:Ora Sweet SI (1:1, w/v))	33090	1.821	0.159	26.537	2.714
		33131	1.863	0.132	28.129	2.681
		33746	1.577	0.130	29.171	2.652
		37966	1.865	0.231	18.276	2.327
		38325	2.030	0.096	30.839	2.591
		38596	1.870	0.154	33.079	2.783
		38604	1.904	0.232	23.234	2.607
		38770	2.461	0.210	19.149	2.137
		39426	1.886	0.184	21.846	2.348
		39568	2.235	0.286	23.848	2.365
		Mean	**1.918**	**0.179**	**25.510**	**2.521**
		SEM	**0.087**	**0.017**	**1.567**	**0.067**
AB	레날리도마이드 50 mg/kg + MOR03087, 3 mg/kg	32695	2.471	0.168	21.323	2.028
		37854	2.527	0.265	15.938	1.758
		38276	3.212	0.220	29.046	2.197
		38550	2.833	0.186	17.907	1.892
		38594	3.044	0.268	16.530	1.787
		38994	2.896	0.408	13.633	1.683
		39256	2.308	0.304	24.513	2.280
		39555	3.227	0.215	19.753	2.497
		39677	3.205	0.518	12.313	1.799
		39750	2.961	0.281	14.981	1.752
		Mean	**2.868**	**0.286**	**17.794**	**1.967**
		SEM	**0.105**	**0.036**	**1.152**	**0.086**

[0266] 시너지적 활성에 대한 각 매개변수의 분석을 Clarke et al.의 정리에 의거하여 수행하였다. 표 12는 MOR202와 레날리도마이드의 조합의 시너지를 결정하기 위해 이루어진 계산을 보여준다.

[0267] [표 12]

[0268]

POSITIVE EFFECT가 높은 값을 가진 경우	POSITIVE EFFECT가 낮은 값을 가진 경우
길항작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)	길항작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)
부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)	부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)
시너지 작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)	시너지 작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)

A = LEN 50 mg/kg 치료에 대한 반응
B = MOR202 3 mg/kg 치료에 대한 반응
C = 부형제 치료에 대한 반응
AB = 제1 및 제2 치료 병용

그룹	총 BV	지주골BV	지주골패턴인자	구조 모델 지수
A	2.14	0.192	26.805	2.577
B	2.467	0.323	23.204	2.28
C	1.918	0.179	25.51	2.521
AB	2.868	0.286	17.794	1.967
(AB)/C	1.495307612	1.597765363	0.69753038	0.780245934
	초과	미만	미만	미만
(A/C) x (B/C)	1.44	1.94	0.96	0.92

[0269] 표 12에 제공된 수치들은 각 그룹에서의 각 매개변수에 대해 표 11에 제공된 평균값으로부터 직접 얻은 것이다. A, B, C 및 AB로 표현된 그룹들은 표 9, 표 11 및 표 12에서 동일한 치료군이다.

[0270] 총 골부피 (AB)/C는 (A/C) X (B/C)보다 크며, 이는 확실한 시너지 작용을 보여준다. 지주골 패턴 인자 및 구조 모델 지수는, 표 10에 기술된 바와 같이, 더 낮은 값이 골용해(처리시 효능)를 나타내며, 이로써 (A/C) X (B/C)

보다 낮은 (AB)/C는 두 매개변수에서의 확실한 시너지 작용을 보여준다.

[0271] 결과

[0272] MicroCT Scan을 통한 골용해 측정으로 지적된 바와 같이, NCI-H929 다발성 골수종 세포를 접종시키자, 본 연구에서는 암컷 SCID 마우스의 경골에 상당한 골분해가 유도되었다. MicroCT Scan을 통해 보여진 바와 같이, MOR202와 레날리도마이드를 조합하여 치료한 마우스의 경골 내 골용해도는 현저하게 감소되었다. MicroCT Scan의 각 매개변수, 총 골부피(TBV), 지주골 부피(Tb.BV), 지주골 패턴 인자(Tb.Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)에서, MOR202와 레날리도마이드의 조합(AB 그룹)은 NCI-H929 다발성 골수종 세포에 의해 생긴 골용해 감소에 있어서 확실한 시너지를 보여 주었다.

[0273] 표 11의 값들을 조절하여 대조군(종양이 없는, 접종 안한 반대쪽 경골)은 골용해가 0%인 것으로 여겨지며, C 그룹(부형제 대조군(0.9% 염화나트륨 주사)은 골용해가 100%인 것으로 여겨지는 한편, 부형제 대조군과 비교하여, 12 mg/kg MOR202 단독으로 골용해를 용량-의존적으로 최대 55%만큼 감소시켰다. 50 mg/kg LEN 단독으로는 골용해를 20%만큼 억제시켰다. 3 mg/kg MOR202와 50 mg/kg LEN의 조합은 골용해를 완전히 없앴다. 이들 발견은 병용 치료의 시너지 효과를 증거한다. 또한, 조합 그룹에서 M-단백 혈청이 감소(>90%)되었으며, 이는 종양의 크기가 현저하게 감소되었음을 표시한다.

[0274] 실시예 8 암컷 SCID 마우스, 생존 모델에서의 인간 비-호지킨 RAMOS 종양에 대항한 MOR202 단독, 레날리도마이드 단독 및 이들의 병용

[0275] 재료

[0276] 사이클로포스파미드(Fluka, Buchs 스위스, Lot 번호. 07551661). 레날리도마이드(SYNthesis med chem; 중국, 상하이; Lot #ZHM-066-051). MOR202(MorphoSys AG, Lot 100706-5KLE18). 부형제 대조군: Ora-Plus: Ora-Sweet SF, 1:1, v/v(SYNthesis Med Chem, 중국 상하이). SCID 마우스(오스트레일리아, SA, Urrbaraie, 웨이트 캠퍼스, 아델라이드 대학, Strain C.B.-17-lgh-1^{b}-$Prkdc^{scid}$).

[0277] RAMOS 세포(Oncodesign, 프랑스 Dijon Cedex)를 RPMI1640 + 20% 열비활성화된 대체 공급원 FBS + 1% Glutamax (배지 #2)에서 배양하였다. RAMOS 비-호지킨 림프종 세포 배양을 위한 시약을 다음과 같은 공급업체로부터 수득하였다: Invitrogen Australia(오스트레일리아, VIC, 마운트 웨이버레이)로부터의 RPMI 1640 세포 배지, FBS, Glutamax, HEPES, 소듐 피루빈산염, HBSS 및 페니실린-스트렙토마이신, 및 Sigma-Aldrich(오스트레일리아, NSW, 캐슬 힐)로부터의 Trypan Blue 및 글루코오스.

[0278] 방법

[0279] SCID 마우스 68 마리를 사이클로포스파미드(75 mg/kg, i.p., 매일 두번)로 이틀 동안 미리 치료한 후 RAMOS 세포 접종(-5일째 및 -4일째)을 실시하였다. 접종일(-3일째)에, 모든 마우스에 1 x 10^{6} RAMOS 세포를 접종시키되, 각 마우스의 꼬리 혈관에 정맥내 주사하였다. 마우스 64 마리를 체중에 따라 무작위로 8마리씩 여덟 그룹으로 나누었다. 각 그룹에 대한 복용 계획을 표 13에 제공하였다.

[0280] [표 13]

[0281] 복용 계획

그룹	화합물	치료	계획된 스케줄	실제 스케줄
A	레날리도마이드	50 mg/kg, p.o., in 10 mL/kg	매일 한번(0-20일)	0-20일
B	MOR03087	1 mg/kg, i.v., in 10 mL/kg	매주 두번(0,4,7, 11,14 및 18일째)	매주 두번(0,4,7, 11,14 및 18일째)
C	부형제 대조군 (Ora-Plus:Ora-Sweet, 1:1, v/v)	p.o., 10 mL/kg	매일 한번(0-20일)	0-18일
AB	레날리도마이드 /MOR03087	100/1 mg/kg, p.o./i.v., in 10 mL/kg	매일 한번/매주 두번 (상기와 같음)	0-13일 및 16-20일/ 0,4,7,11,14 및 18일째

[0282]

[0283] 98일간 연구를 지속한 후, 측정의 종료점은 생존으로 하였다. 각 그룹의 결과를 표 14에 나타내었다.

[0284] [표 14]

[0285] 각 그룹의 생존수 및 생존기간

	사망 일자 (접종 후)				% ILS(중간 사망일에 기준함)	연구 말기(98일째)에 생존하고 있는 마우스 마리수
	중간값	범위	평균값	95% CI		
A: LEN 100 mg/kg	22	18-23	21.4	19.8-23.0	10	0/7
B: MOR202 1mg/kg	51	35-65	49.6	41.9-57.3	155	0/8
C: 부형제 제어	20	18-21	19.8	18.7-20.8	X	0/8
AB: LEN/MOR 배합	65	32-98	66.5	41.9-91.2	225	3/8

[0286]

[0287] 시너지적 활성에 대한 분석을 실시예 4에 기술한 바와 같이 Clarke et al.의 정리에 의거하여 수행하였다. 표 15는 MOR202와 레날리도마이드의 조합의 시너지를 결정하기 위해 이루어진 계산을 보여준다.

[0288] [표 15]

POSITIVE EFFECT 가 높은 값을 가진 경우	POSITIVE EFFECT 가 낮은 값을 가진 경우
길항작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)	길항작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)
부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)	부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)
시너지 작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)	시너지 작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)

A = LEN 100 mg/kg 치료에 대한 반응
B = MOR202 1 mg/kg 치료에 대한 반응
C = 부형제 치료에 대한 반응
AB = A 및 B 치료 병용

	중간 생존
A	22
B	51
C	20
AB	65
(AB)/C	3.25
초과	
(A/C) x (B/C)	2.805

[0289]

[0290] 표 15에 제공된 수치들은 각 그룹에 대해 표 14에 제공된 중간 생존일로부터 직접 얻은 것이다. A, B, C 및 AB로 표현된 그룹들은 표 13 내지 표 15에서 동일한 치료군이다.

[0291] RAMOS 세포 접종은 대조군의 경우 20일의 중간 시간 이내에서 치명적이었다. 그러나, MOR202와 레날리도마이드의 조합은 중간 생존일을 증가시키는 데 있어서 확실한 시너지 효과를 보여 주었다.

[0292] 실시예 9: 다양한 다발성 골수종 세포주의 증식을 보르테조밉 단독으로 억제시킴

[0293] 많은 세포주에 대해, 다발성 골수종 세포의 증식에 대한 보르테조밉의 억제 효과를 분석하였다. 보르테조밉(Velcade®, Lot #9AZSY00)의 양을 증가시키면서 AMO-1, LP-1, NCI-H929 및 RPMI-8226 세포들에 적용하고, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양시켰다. 배양이 끝나면, 세포 증식 kit II (ROCHE, 세포 증식 Kit II, Cat 번호: 11465015001)를 이용하는 정량적 열량측정 XTT-기초 평가로, period 접시의 세포 증식을 분석하였다. 후속 측정을 위해, 접시를 Tecan Genois Reader에 넣고, 492nm에서의 흡광도를 검출하였다.

[0294] 도 8에 나타낸 바와 같이, 시험된 세포주 모두의 세포 증식을 억제시키되, AMO-1 세포의 경우에는 IC_{50} 농도가 3.9nM인 보르테조밉으로, LP-1 세포의 경우에는 IC_{50} 농도가 6.1nM인 보르테조밉으로, NCI-H929 세포의 경우에는 IC_{50} 농도가 3.3nM인 보르테조밉으로, RPMI-8226 세포의 경우에는 IC_{50} 농도가 9.0nM인 보르테조밉으로 각각 억제시켰다.

[0295] 실시예 10: MOR202와 보르테조밉의 조합이 ADCC에 미치는 영향

[0296] 실시예 4에 기술된 방법을 이용하여, 보르테조밉과 MOR202의 조합이 ADCC에 미치는 영향을 분석하였다. 여기서는, 표적 세포를 MOR202로 치료하기 전에 보르테조밉으로 치료하였다. 표적 세포, NCI-H929 세포 및 LP-1 세포 모두를 시험하였다. 그 결과를 도 9와 도 10에 나타내었다. MM 세포 상에 미치는 직접적인 세포독성 영향을 통해, 보르테조밉은 MOR202 활성 증강을 매개하였다.

[0297] 실시예 11: NCI-H929 골용해 SCID 마우스 모델에서의 인간 다발성 골수종에 대항한 MOR202 단독, BOR 단독 및 이들의 병용

[0298] 재료

[0299] 보르테조밉(SYNthesis med chem; 중국, 상하이; Lot #ZHM-066-054). 투여 목적으로, 보르테조밉을 멸균된 0.9% 염화나트륨 용액에서 조제하였다. MOR202(MorphoSys AG, Lot 100706-5KLE18). 부형제 대조군: 0.9% 염화나트륨 주사. SCID 마우스(오스트레일리아, SA, Urrbaraie, 웨이트 캠퍼스, 아델라이드 대학, Strain C.B.-17-lgh-1^{b}-Prkdc^{scid}).

[0300] 방법

[0301] 골용해 현상을 유도하기 위해, SCID 마우스 63 마리의 경골 내에 2.5 x 106 NCI-H929 MM 세포(5 μl)를 (-7)일째에 접종하였다. 접종 후 3일이 지나면(-4일째), SCID 마우스 60 마리를 표 16에 보여진 바와 같이 체중에 따라 무작위로 여러 그룹(그룹 당 10마리)으로 나누었다. 복용 계획을 표 16에 제공하였다. 보르테조밉(A 그룹 및 AB 그룹) 및 부형제 대조군(C 그룹) 치료를 (-1)일째에 시작하였다. MOR202 치료(B 그룹 및 AB 그룹)는 0일째에 시작하였다. 치료를 6주간 지속하였다.

[0302] [표 16]복용 계획

그룹	화합물	치료	스케쥴
A	보르테조밉	0.6 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	매주 두번
B	MOR202	3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	매주 세번
C	부형제 대조군 (0.9% 염화나트륨 주사)	i.p., 10 mL/kg	매주 두번
AB	보르테조밉/MOR202	0.6/3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	격일로 매주 두번/세번

[0303]

[0304] 골용해를 분석하기 위해 사용되는 MicroCT Scan은 총 골부피(TBV), 지주골의 골부피(Tb.BV), 해면골 패턴 인자(Tb. Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)를 비롯한 3차원 분석을 포함한다. 표 10에는 각 매개변수의 정의가 주어져 있다. 각 MicroCT Scan 매개변수의 결과를 표 17에 나타내었다. 총 골부피(TBV) 결과를 도 20에 나타내었다.

[0305] [표 17]

[0306] MicroCT Scan 결과: 총 골부피(TBV), 지주골 부피(Tb.BV), 지주골 패턴 인자(Tb.Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)

[0307]

그룹	치료	마우스 ID	총 골부피 (TBV) mm^{-3}	지주골 부피 (Tb.BV) mm^{-2}	지주골 패턴 인자 (Tb.Pf) mm^{-1}	구조 모델 지수 (SMI)
대조군: 종양이 없는 접종안한 반대쪽 경골	기준 경골, A, B, C 및 AB 군에서 각각 마우스 한 마리	115898	2.771	0.400	12.097	1.525
		116259	3.255	0.598	7.999	1.264
		109482	3.194	0.566	5.596	1.025
		107508	2.945	0.346	16.910	1.860
		평균	3.041	0.477	10.650	1.419
		SEM	0.112	0.062	2.481	0.179
A	보르테조밉 0.6 mg/kg 매주 두번	101426	2.351	0.307	25.893	2.443
		105949	2.025	0.191	26.044	2.374
		107598	3.109	0.557	16.877	2.156
		109560	3.146	0.588	23.179	2.262
		113302	1.790	0.067	32.463	2.700
		115836	1.893	0.076	33.152	2.981
		116981	2.201	0.100	34.609	3.007
		117585	1.617	0.093	31.813	2.553
		117750	2.300	0.284	27.147	2.337
		117793	2.448	0.329	23.582	2.273
		평균	2.288	0.259	27.476	2.509
		SEM	0.162	0.061	1.756	0.094
B	MOR202, 3 mg/kg, 매주 세번	106136	1.924	0.082	27.363	2.846
		109482	1.987	0.388	19.479	2.079
		112220	2.155	0.394	21.858	2.296
		113668	1.958	0.276	23.814	2.429
		115187	2.089	0.440	16.347	1.871
		115956	2.207	0.460	19.748	2.193
		116312	1.885	0.234	25.212	2.368
		116798	1.882	0.254	21.276	2.436
		116944	1.937	0.276	24.031	2.368
		117273	1.862	0.160	28.056	2.511
		평균	1.988	0.296	22.418	2.310
		SEM	0.038	0.039	1.044	0.066
C	대조군 (0.9% 염화나트륨 주사), 매주 두번	107097	1.619	0.248	22.779	2.246
		112122	1.608	0.178	26.534	2.505
		113971	1.637	0.241	21.693	2.485
		116259	1.880	0.369	19.334	2.176
		116585	2.060	0.379	21.120	2.369
		116779	1.624	0.190	23.939	2.417
		117054	1.782	0.331	23.000	2.54
		117110	1.838	0.281	22.632	2.312
		117242	1.929	0.281	21.162	2.193
		117375	1.899	0.283	23.455	2.338
		평균	1.786	0.238	23.148	2.358
		SEM	0.050	0.022	0.615	0.041
AB	보르테조밉/ MOR202, 0.6/3 mg/kg 매주 두세 번	107508	3.303	0.927	16.902	2.158
		112625	4.254	1.661	3.009	0.772
		113322	3.684	1.332	3.888	0.884
		116030	2.422	0.192	30.272	2.842
		116198	3.837	1.037	8.023	1.217
		116376	1.933	0.255	22.059	2.321
		116820	2.793	0.654	22.439	2.336
		117077	3.402	0.658	7.207	1.241
		117093	2.436	0.643	17.484	1.927
		117135	3.026	0.627	13.689	1.775
		평균	3.079	0.799	14.494	1.717
		SEM	0.220	0.144	2.836	0.204

[0308] 시너지적 활성에 대한 각 매개변수의 분석을 실시예 4에 기술된 바와 같이 Clarke et al.의 정리에 의거하여 수행하였다. 표 18은 MOR202와 보르테조밉의 조합의 시너지를 결정하기 위해 이루어진 계산을 보여준다.

[0309] [표 18]

[0310]

POSITIVE EFFECT 가 더 높은 값을 가진 경우	POSITIVE EFFECT 가 더 낮은 값을 가진 경우
길항작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)	길항작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)
부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)	부가적 효과 = (AB)/C = (A/C) x (B/C)
시너지 작용 = (AB)/C > (A/C) x (B/C)	시너지 작용 = (AB)/C < (A/C) x (B/C)

A = BOR 0.6 mg/kg 치료에 대한 반응
B = MOR202 3 mg/kg 치료에 대한 반응
C = 부형제 0.9% 염화나트륨을 사용한 치료에 대한 반응
AB = A 및 B 치료 병용

그룹	총 BV	지주골 BV	지주골 패턴 인자	구조 모델 지수
A	2.288	0.259	27.476	2.509
B	1.988	0.296	22.418	2.31
C	1.786	0.238	23.148	2.358
AB	3.079	0.799	14.494	1.717
(AB)/C	1.723954166	3.357142857	0.626144807	0.728159457
	초과	초과	미만	미만
(A/C) x (B/C)	1.425967052	1.353435492	1.149538246	1.042377527

[0311] 표 18에 제공된 수치들은 각 그룹에서의 각 매개변수에 대해 표 17에 제공된 평균값으로부터 직접 얻은 것이다. A, B, C 및 AB로 표현된 그룹들은 표 표 16 내지 표 18에서 동일한 치료군이다.

[0312] 총 골부피 및 지주골 부피에 있어서, (AB)/C는 (A/C) X (B/C)보다 크며, 이는 확실한 시너지 작용을 보여준다.

지주골 패턴 인자 및 구조 모델 지수는, 표 10에 기술된 바와 같이, 더 낮은 값은 더 낮은 골용해(처리시 효능)를 나타내며, 이로써 (A/C) X (B/C) 보다 낮은 (AB)/C는 두 매개변수에서의 확실한 시너지 작용을 보여준다.

[0313] 결과

[0314] MicroCT Scan을 통한 골용해 측정으로 지적된 바와 같이, NCI-H929 다발성 골수종 세포를 접종시키자, 본 연구에서는 암컷 SCID 마우스의 경골에 상당한 골분해가 유도되었다. MicroCT Scan을 통해 보여진 바와 같이, MOR202와 보르테조밉을 조합하여 치료한 마우스의 경골 내 골용해도는 현저하게 감소되었다. MicroCT Scan의 각 매개변수, 총 골부피(TBV), 지주골 부피(Tb.BV), 지주골 패턴 인자(Tb.Pf) 및 구조 모델 지수(SMI)에서, MOR202와 보르테조밉의 조합(AB 그룹)은 NCI-H929 다발성 골수종 세포에 의해 생긴 골용해 감소에 있어서 확실한 시너지를 보여 주었다.

[0315] 표 17의 값들을 조절하여 대조군(종양이 없는, 접종 안한 반대쪽 경골)은 골용해가 0%인 것으로 여겨지며, C 그룹(부형제 대조군(0.9% 염화나트륨 주사)은 골용해가 100%인 것으로 여겨지는 한편, 부형제 대조군과 비교하여, 12 mg/kg MOR202 단독으로 골용해를 용량-의존적으로 최대 55%만큼 감소시켰다. 0.6 mg/kg BOR 단독으로 골용해를 40%만큼 억제시켰고, 더 적은 용량의 3 mg/kg MOR202와 0.6 mg/kg BOR의 조합은 골용해를 완전히 없앴다. 이들 발견은 병용 치료의 시너지 효과를 증거한다. 또한, 조합 그룹에서 M-단백 혈청이 감소(>90%)되었으며, 이는 종양의 크기가 현저하게 감소되었음을 표시한다.

[0316] 실시예 12 암컷 SCID 마우스, 생존 모델에서의 인간 비-호지킨 RAMOS 종양에 대항한 MOR202 단독, 보르테조밉 단독 및 이들의 병용

[0317] 재료

[0318] 사이클로포스파미드(Fluka, Buchs 스위스, Lot 번호 WB10468). 보르테조밉(SYNthesis med chem; 중국, 상하이; Lot #ZHM-066-054). 투여 목적으로, 보르테조밉을 멸균된 0.9% 염화나트륨 용액에서 조제하였다. MOR202(MorphoSys AG, Lot 100706-5KLE18). 부형제 대조군: 0.9% 염화나트륨 주사. SCID 마우스(오스트레일리아, SA, Urrbaraie, 웨이트 캠퍼스, 아델라이드 대학, Strain C.B.-17-lgh-1^{b}-Prkdc^{scid}).

[0319] RAMOS 세포(Oncodesign, 프랑스 Dijon Cedex)를 RPMI1640 + 20% 열비활성화된 대체 공급원 FBS + 1% Glutamax (배지 #2)에서 배양하였다. RAMOS 비-호지킨 림프종 세포에 대한 시약을 다음과 같은 공급업체로부터 수득하였다: Invitrogen Australia(오스트레일리아, VIC, 마운트 웨이버레이)로부터의 RPMI 1640 세포 배지, FBS, Glutamax, HEPES, 소듐 피루빈산염, HBSS 및 페니실린-스트렙토마이신, 및 Sigma-Aldrich(오스트레일리아, NSW, 캐슬 힐)로부터의 Trypan Blue 및 글루코오스.

[0320] 방법

[0321] SCID 마우스 55 마리를 사이클로포스파미드(75 mg/kg, i.p., 매일 두번)로 이틀 동안 미리 치료한 후 RAMOS 세포 접종(-5일째 및 -4일째)을 실시하였다. 접종일(-3일째)에, 모든 55마리의 마우스에 1 x 106 RAMOS 세포(100 Ml)를 접종시키되, 각 마우스의 꼬리 혈관에 정맥내 주사하였다. 마우스 48 마리를 체중에 따라 무작위로 8마리씩 여섯 그룹으로 나누었다. 각 그룹에 대한 복용 계획을 표 19에 제공하였다.

[0322] [표 19]

[0323] 복용 계획

그룹	화합물	치료	계획된 스케쥴	실제 스케쥴
A	보르테조밉	0.6 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	-1,3,6,10,13 및 17일째	-1,3,6 및 13일째
B	MOR202	1 mg/kg, i.v., in 10 mL/kg	0,4,7,11,14 및 18일째	0,4,7,11,14 및 18일째
C	부형제 제어 (0.9% 주사용 염수)	i.p., 10 mL/kg	-1,3,6,10,13 및 17일째	-1,3,6,13 및 17일째
AB	보르테조밉/MOR202	0.6/1 mg/kg, i.p./i.v., in 10 mL/kg	-1,3,6,10,13 및 17일째/ 0,4,7,11,14 및 18일째	-1,3,6,13,17 및 20일째/ 0,4,7,11,14 및 18일째

[0324]

[0325] 98일간 연구를 지속한 후, 측정의 종료점은 생존으로 하였다. 각 그룹의 결과를 표 20에 나타내었다.

[0326] [표 20]각 그룹의 생존수 및 생존기간

	사망일 (접종 후)				% ILS (중간 사망일에 기준함)	연구 말기(98일째)에 생존해 있는 마우스 마리수
	중간값	범위	평균값	95% CI		
A: BOR 0.6 mg/kg	19	18-20	19.1	18.4-19.8	-7	0/8
B: MOR202 1mg/kg	43.5	38-52	43.6	39.0-48.3	112	0/8
C: 대조군	20.5	20-22	20.8	20.0-21.5	x	0/8
AB: BOR/MOR 배합물	45	29-98	61.6	19.7-103.5	120	2/5

[0327]

[0328] 시너지적 활성에 대한 분석을 Clarke et al.의 정리에 의거하여 수행하였다. 표 21은 MOR202와 보르테조밉의 조합의 시너지를 결정하기 위해 이루어진 계산을 보여준다.

[0329] [표 21]

POSITIVE EFFECT가 더 높은 값을 가진 경우:

길항작용 – (AB)/C < (A/C) x (B/C)

부가적 효과 – (AB)/C – (A/C) x (B/C)

시너지 작용 – (AB)/C > (A/C) x (B/C)

A – BOR 0.6 mg/kg 치료에 대한 반응

B – MOR202 1 mg/kg 치료에 대한 반응

C – 부형제 0.9% 염화나트륨을 사용한 치료에 대한 반응

AB – A 및 B 치료 병용

	중간 생존
A	19
B	43,5
C	20,5
AB	45
(AB)/C	2,195121951
	초과
(A/C) x (B/C)	1,966686496

[0330]

[0331] 표 21에 제공된 수치들은 각 그룹에 대해 표 20에 제공된 중간 생존일로부터 직접 얻은 것이다. A, B, C 및 AB로 표현된 그룹들은 표 19 내지 표 21에서 동일한 치료군이다.

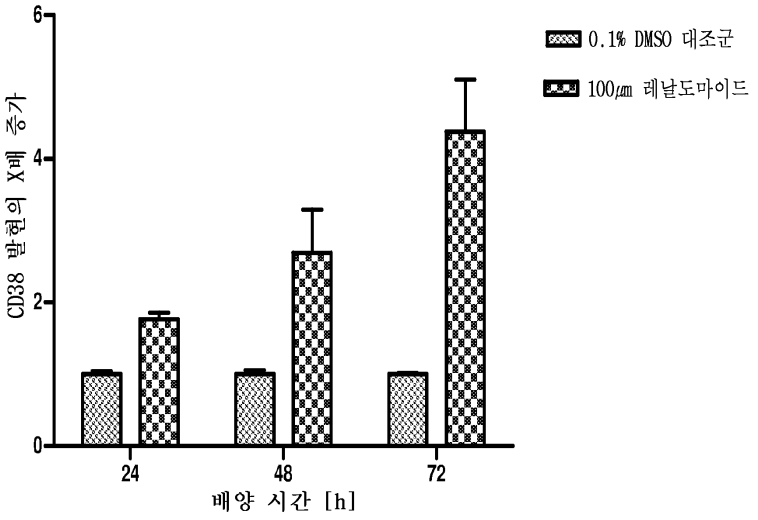
[0332] RAMOS 세포 접종은 대조군의 경우 20.5일의 중간 시간 이내에서 치명적이었다. 그러나, MOR202와 보르테조밉의 조합은 중간 생존일을 증가시키는 데 있어서 확실한 시너지 효과를 보여 주었다. 중요하게는, MOR202와 보르테조밉(AB 그룹)을 조합시키면, 마우스 다섯 마리 중 두 마리는 연구 기간 동안 생존하였다. 이는 MOR202와 보르테조밉의 조합에 대한 시너지적 발견을 강하게 증거한다.

[0333] 본 명세서, 예시적 구현예들을 나타내는 특정 실시예 및 자료는 예시 목적으로 제공된 것으로, 본 발명을 제한하고자 함이 아니다. 당업자에게는 본원에 포함된 설명, 개시 및 자료로부터 본 발명의 범주 이내의 다양한 변경예 및 수정예가 명백할 것이며, 이에 따라 이들은 본 발명의 일부로 간주된다.

도면

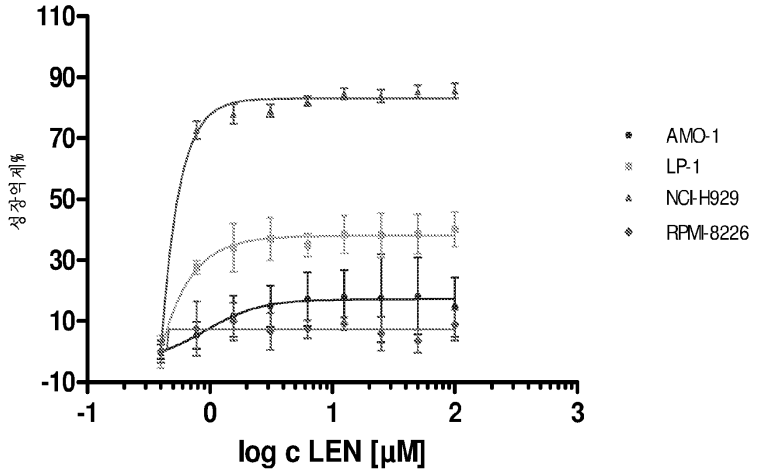
도면1

레날리도마이드에 의한 AMO-1 세포에서의 CD38 상향 조절

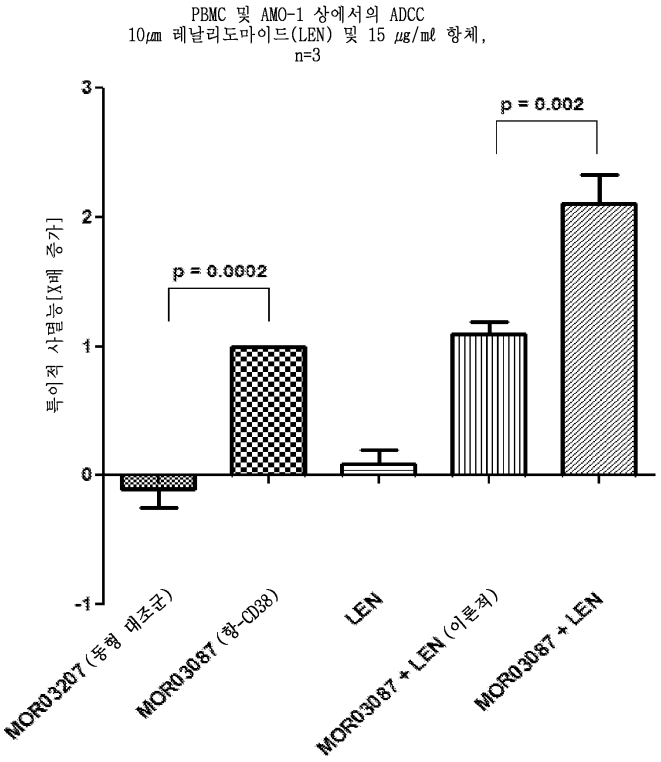


도면2

세포 증식에 미치는 단독 레날리도마이드의 영향

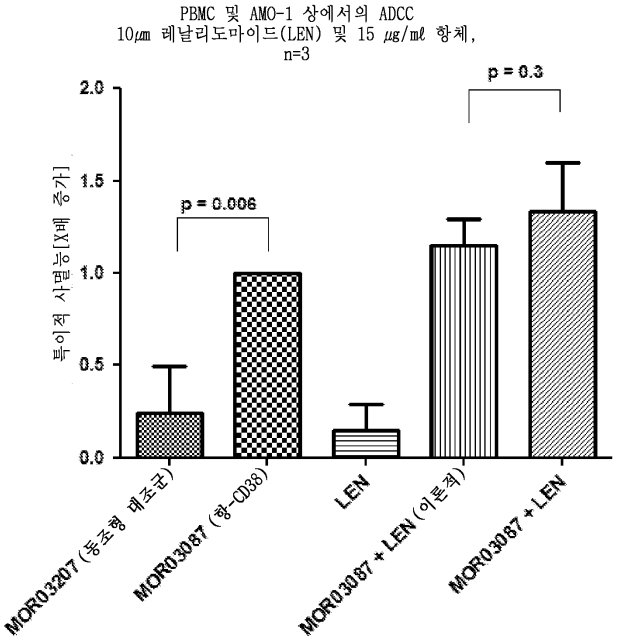


도면3



MOR202로 치료 하기 전에 PBMC 및 AMO-1 세포를 레날리도마이드로 치료함.

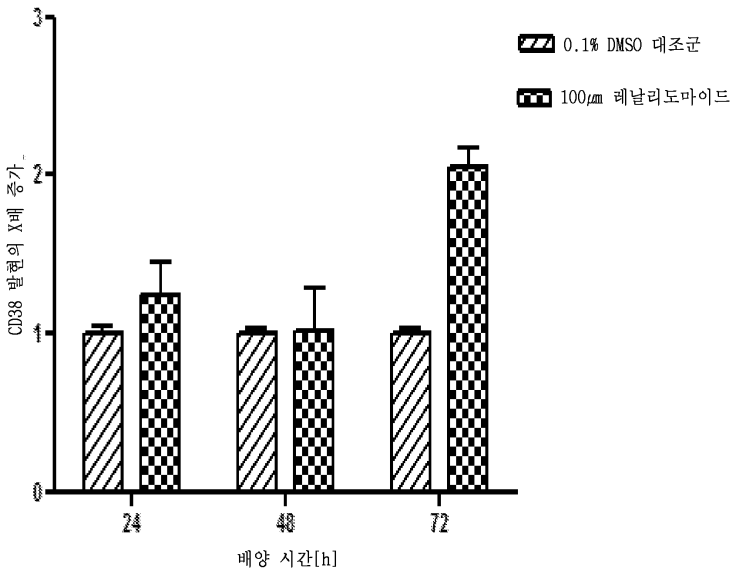
도면4



MOR202로 치료 하기 전에 PBMC만 레날리도마이드로 치료함.

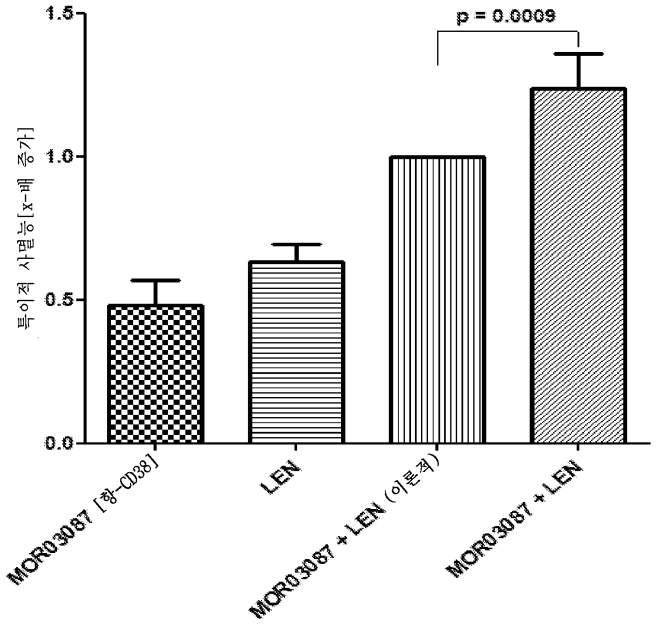
도면5

레날리도마이드에 의한 NCI-H929 세포에서의 CD38 상향 조절



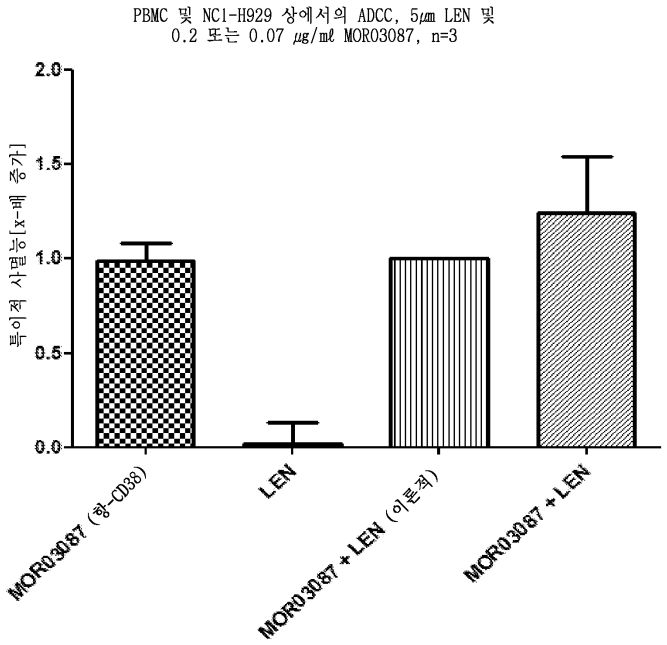
도면6

PBMC 및 NCI-H929 상에서의 ADCC, 5㎛ LEN 및
0.2 또는 0.07㎍/㎖ MOO3087, n=3



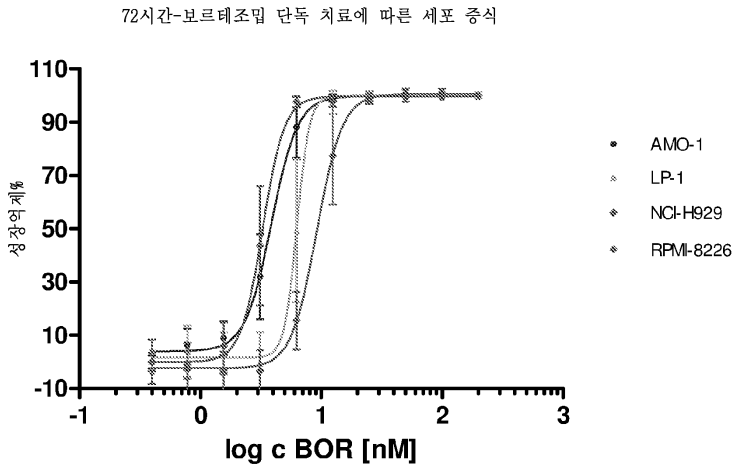
MOR202로 치료하기 전에 PBMC 및 NCI-H929 세포를 레날리도마이드로 치료함.

도면7



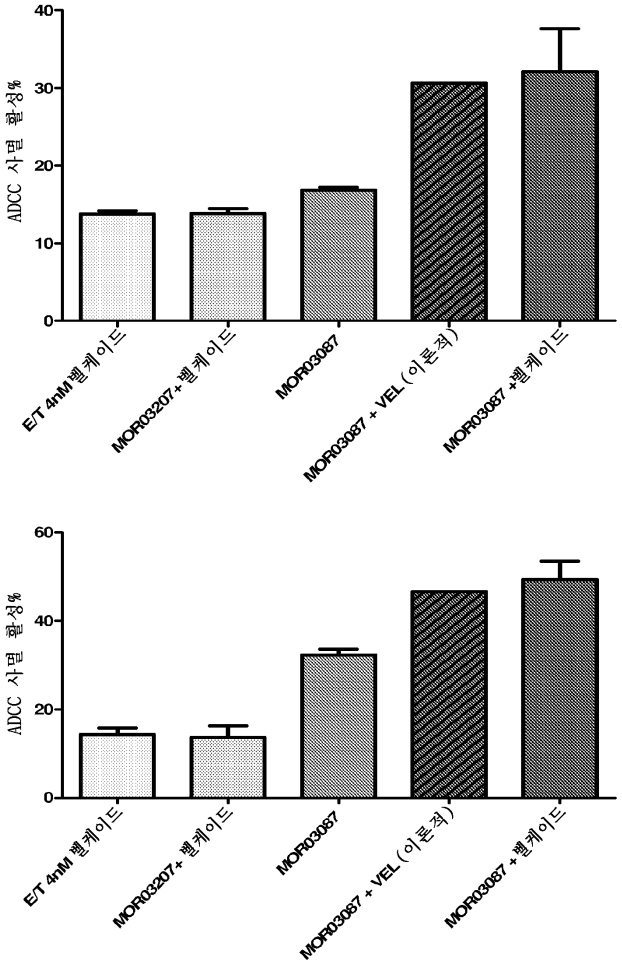
MOR202로 치료하기 전에 PBMC만 레날리도마이드로 치료함.

도면8



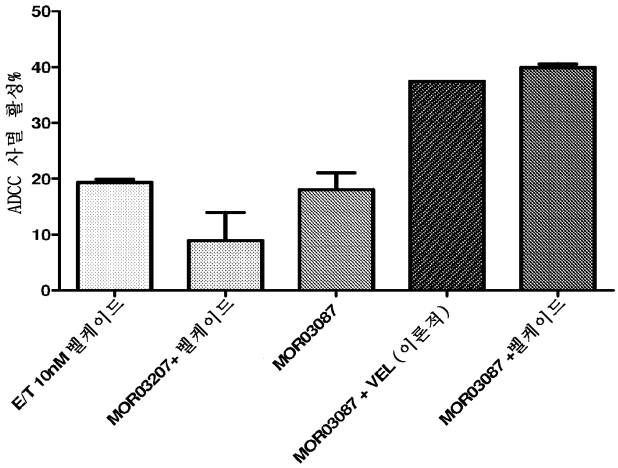
도면9

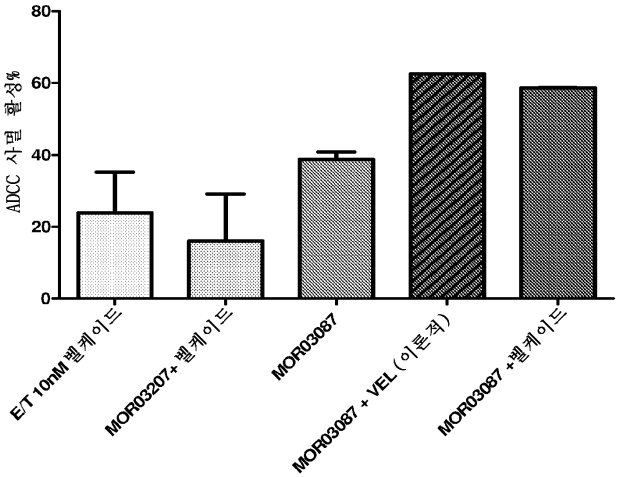
NCI-H929 세포의 ADCC에 미치는 MOR202 및 벨케이드의 영향



도면10

LP-1 세포의 ADCC에 미치는 MOR202 및 벨케이드의 영향





도면11

MOR202 중쇄 영역의 아미노산 서열:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPS NTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 10)

MOR202 가변 경쇄 영역의 아미노산 서열:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 11)

내부 명명법에 의해 정의된 MOR202 HCDR1의 아미노산 서열:

GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1)

kabat에 의해 정의된 MOR202 HCDR1의 아미노산 서열:

SYYMN (SEQ ID NO: 14)

kabat에 의해 정의된 MOR202 HCDR2의 아미노산 서열:

GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)

kabat에 의해 정의된 MOR202 HCDR2의 아미노산 서열:

DLPLVYTGFAY (SEQ ID NO: 3)

kabat에 의해 정의된 MOR202 LCDR1의 아미노산 서열:

SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4)

kabat에 의해 정의된 MOR202 LCDR2의 아미노산 서열:

GDSKRPS (SEQ ID NO: 5)

kabat에 의해 정의된 MOR202 LCDR3의 아미노산 서열:

QTYTGGAS (SEQ ID NO:6)

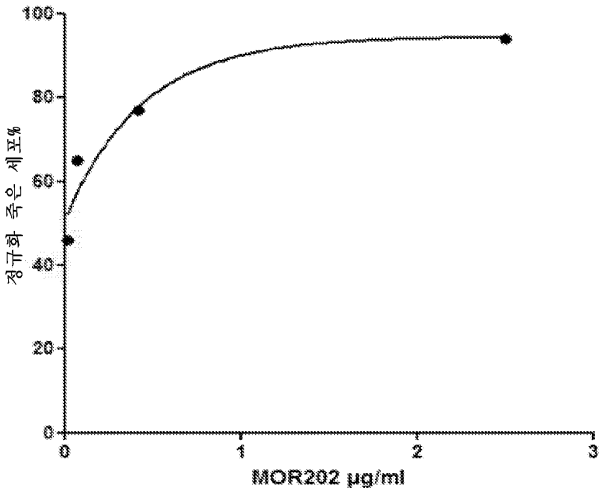
도면12

AMO-1 세포의 ADCC 매개에 있어서 MOR202와 레날리도마이드의 조합에 대한 "최적"의 곡선

MOR202 μg/ml	효과(사멸능%)
0.011574	46.000000
0.069444	65.000000
0.416667	77.000000
2.500000	94.000000

Y=100/(1+10^((Dm-X)*m))

미치료 MOR202



도면13

Y Exp 1

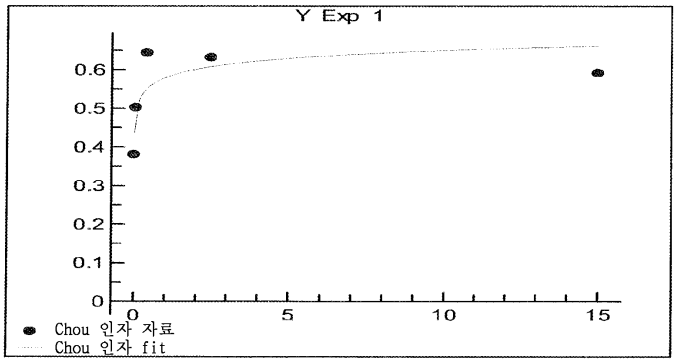
원자료

X	Y
0.012	0.37997
0.07	0.501679
0.42	0.643211
2.5	0.631401
15	0.59145

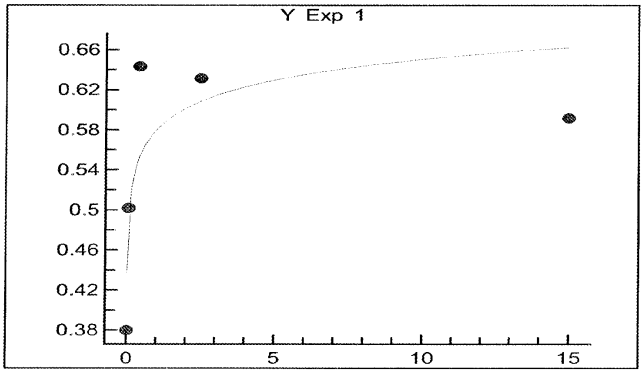
XL fit 계산

chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.083866
m	0.129731
r^2	0.644434
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))



자료 및 fit의 확대 선도



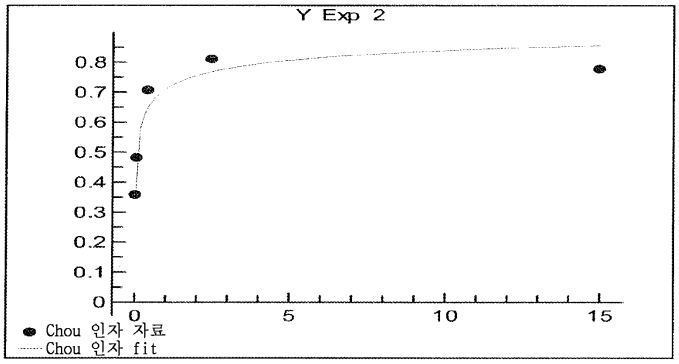
도면14

Y Exp 2

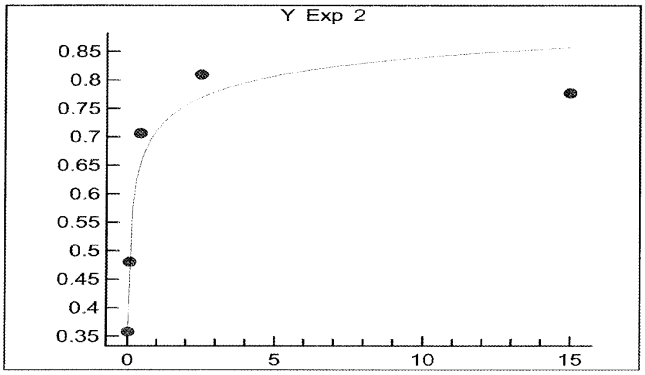
원자료	
X	Y
0.012	0.357662
0.07	0.480497
0.42	0.706076
2.5	0.809306
15	0.7768

XL fit 계산	
chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.062255
m	0.32594
r^2	0.924687
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))



자료 및 fit의 확대 선도



도면15

Y Exp 3

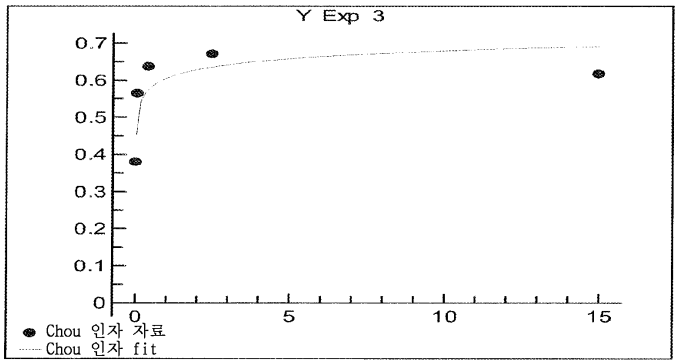
원자료

X	Y
0.012	0.378846
0.07	0.562988
0.42	0.635872
2.5	0.669822
15	0.61643

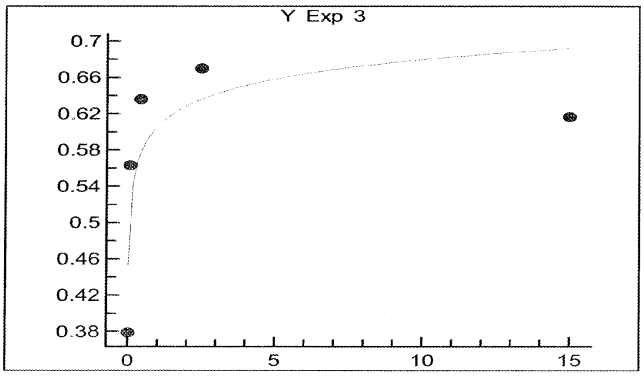
XL fit 계산

chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.04629
m	0.139915
r^2	0.657161
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))



자료 및 fit의 확대



도면16

Y Exp 4

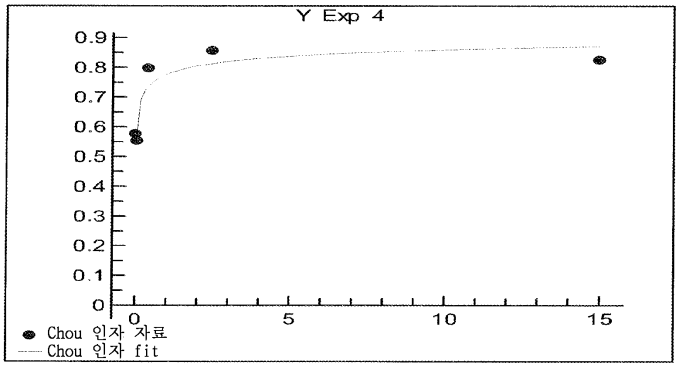
원자료

X	Y
0.012	0.575381
0.07	0.551706
0.42	0.797069
2.5	0.855131
15	0.824584

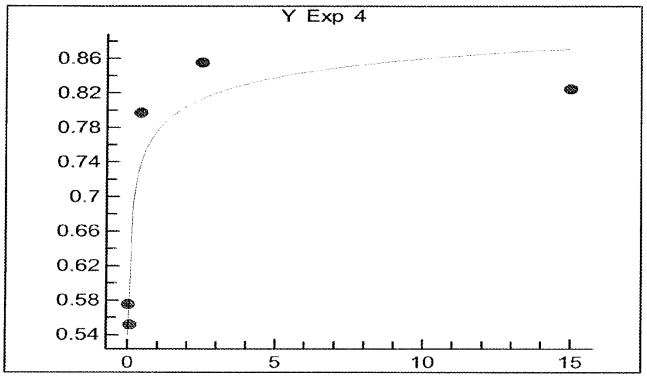
XL fit 계산

chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.006182
m	0.245157
r^2	0.795756
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))



자료 및 fit의 확대 선도



도면17

Y Exp 5

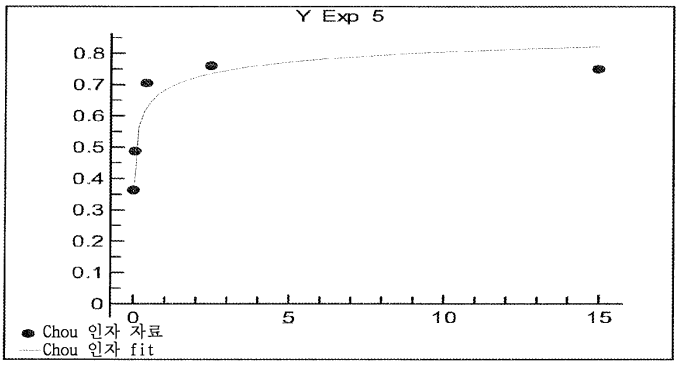
원자료

X	Y
0.012	0.361208
0.07	0.486295
0.42	0.703533
2.5	0.759272
15	0.747995

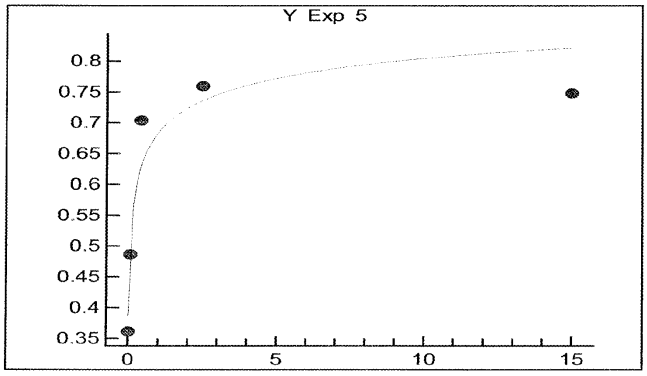
XL fit 계산

chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.063193
m	0.278814
r^2	0.90303
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))



자료 및 fit의 확대 선도



도면18

Y Exp 6

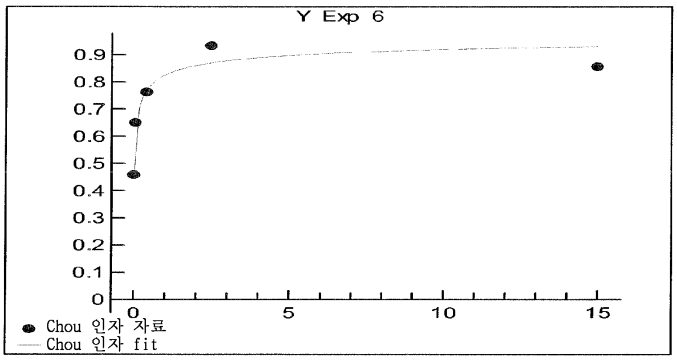
원자료

X	Y
0.012	0.456555
0.07	0.649115
0.42	0.761269
2.5	0.93137
15	0.85444

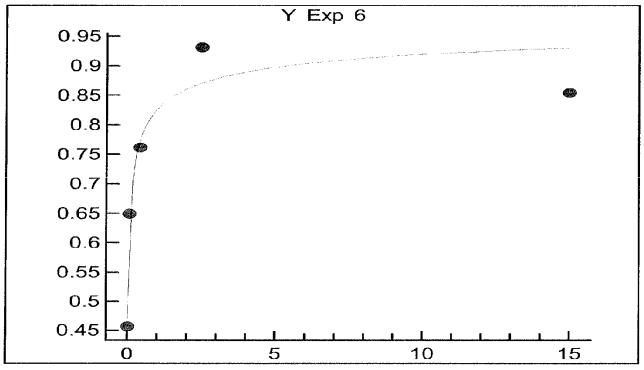
XL fit 계산

chart	#Ok
fit	#Ok
Dm	0.016501
m	0.379718
r^2	0.930189
(선형 상관계수)	

데이터 피팅 y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))

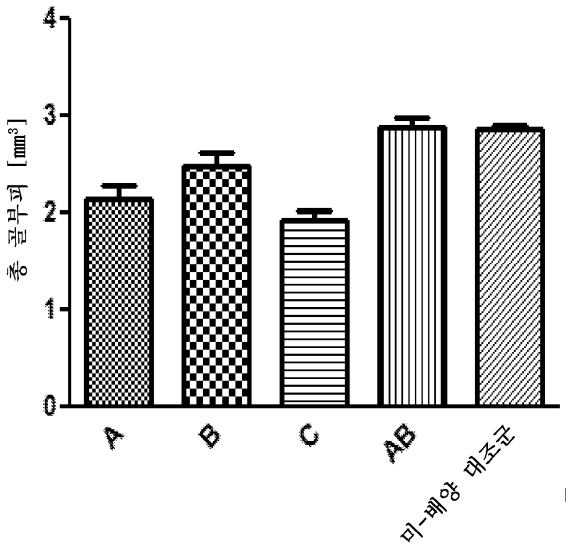


자료 및 fit의 확대 선도



도면19

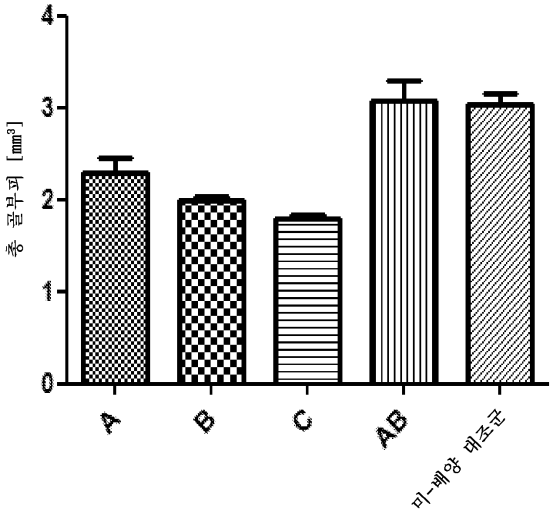
각 연구 그룹에 대한 평균 총 골 부피 +/- SEM



A: LEN 50mg/kg, p.o. in 10mL/kg
B: MOR202 3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg
C:부형 대조군 (Ora Plus: Ora Sweet) 10mL/kg, p.o.
AB: LEN 50mg/kg p.o. in 10mL/kg + MOR202 3 mg/kg i.p., in 10 mL/kg

도면20

각 연구 그룹에 대한 평균 총 골 부피 +/- SEM



A 그룹 보르테조밉 0.6 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg
B 그룹 MOR202 1 mg/kg, i.v., in 10 mL/kg
C 그룹 부형제 대조군(주사용 0.9% 염수) i.p., 10 mL/kg
AB 그룹 보르테조밉/MOR202 0.6/1 mg/kg, i.p./i.v., in 10 mL/kg

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MorphoSys AG

<120> Combinations and uses thereof

<150> EP10180485.4

<151> 2010-09-27

<150> US61/386,619

<151> 2010-09-27

<150> US61/437,696

<151> 2011-01-31

<150> US61/468,607

<151> 2011-03-29

<150> US61/486,814

<151> 2011-05-17

<160> 22

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..10

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR1"

/organism="synthetic construct"

<

400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..17

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR2"

/organism="synthetic construct"

<400> 2

Gly Ile Ser Gly Asp Pro Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR3"

/organism="synthetic construct"

<400> 3

Asp Leu Pro Leu Val Tyr Thr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR1"

/organism="synthetic construct"

<400> 4

Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR2"

/organism="synthetic construct"

<400> 5

Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR3"

/organism="synthetic construct"

<400> 6

Gln Thr Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Leu

1 5

<210> 7

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..300

<223> /mol_type="protein"

/note="CD38"

/organism="Homo sapiens"

<400> 7

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
115 120 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
195 200 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala

225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
245 250 255
Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
260 265 270
Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
275 280 285
Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
290 295 300

<210> 8

<211> 128

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..128

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

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Asp His Arg Tyr His Glu Asp Thr Val Tyr

100 105 110

Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..109

<223> /mol_type="protein"

/note="variable light chain"

/organism="synthetic construct"

<400> 9

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Ala Tyr Thr Val

20 25 30

Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Pro Ser Ser Gly Val

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..120

<223> /mol_type="protein"

/note="variable heavy chain"

/organism="synthetic construct"

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Asp Pro Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Pro Leu Val Tyr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..109

<223> /mol_type="protein"

/note="variable light chain"

/organism="synthetic construct"

<400> 11

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg His Tyr Tyr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Leu

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

<210> 12

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..360

<223> /mol_type="DNA"

/note="variable heavy domain"

/organism="Homo sapiens"

<400> 12

caggtgcaat tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cctccggatt tacctttct tcttattata tgaattgggt gcgccaagcc 120

cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggt atctctggtg atcctagcaa tacctattat 180

gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatctt 300

cctcttgttt atactggttt tgcttattgg ggccaaggca ccctggtgac ggttagctca 360

<210> 13

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..327

<223> /mol_type="DNA"

/note="variable light chain"

/organism="Homo sapiens"

<400> 13

gatatcgaac tgacccagcc gccttcagtg agcgttgcac caggtcagac cgcgcgtatc 60

tcgtgtagcg gcgataatct tcgtcattat tatgtttatt ggtaccagca gaaacccggg 120

caggcgccag ttcttgtgat ttatggtgat tctaagcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180

tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240

gacgaagcgg attattattg ccagacttat actggtggtg cttctcttgt gtttggcggc 300

ggcacgaagt taaccgttct tggccag 327

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..5

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR1"

/organism="synthetic construct"

<400> 14

Ser Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..5

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR1"

/organism="synthetic construct"

<400> 15

Asp Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..17

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR2"

/organism="synthetic construct"

<400> 16

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"

/note="HCDR3"

/organism="synthetic construct"

<400> 17

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR1"

/organism="synthetic construct"

<400> 18

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val Val Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..7

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR2"

/organism="synthetic construct"

<400> 19

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..9

<223> /mol_type="protein"

/note="LCDR3"

/organism="synthetic construct"

<400> 20

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr

1 5

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> synthetic construct

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..120

<223> /mol_type="protein"

/note="varaible heavy chain"

/organism="synthetic construct"

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> synthetic construct
<220>
<221> SOURCE
<222> 1..109
<223> /mol_type="protein"
/note="variable light chain"
/organism="synthetic construct"
<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105