(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0017758
(43) 공개일자 2025년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2869 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001888(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년04월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7033360
원출원일자(국제) 2018년04월13일
심사청구일자 2021년04월07일
(85) 번역문제출일자 2025년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/059553
(87) 국제공개번호 WO 2018/189381
국제공개일자 2018년10월18일
(30) 우선권주장
17305446.1 2017년04월14일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
엑셀리시스, 인코포레이티드
미국 94502 캘리포니아주 앨러미다 하버 베이 파크웨이 1851
엥스띠뛰 퀴리
프랑스 파리 75005 뤼 뒬므 26
(72) 발명자
바레 장-마르끄
프랑스 81100 카스뜨르 뤼 뒤 트레조르 5
프로스뜨 장-프랑수아
프랑스 78000 베르사유 아브뉘 빌뇌브 레땅 21
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **폐암을 예방 또는 치료하기 위한 AMHRII-결합 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 폐암, 특히 비소세포폐암(NSCLC), 더욱더 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 및 편평세포암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합 제제에 관한 것이다.

대 표 도

VH 도메인 |_____FR1_____| CDR1 |____FR2____| CDR2 |_____FR3_____| CDR3 |__FR4___|

서열 번호

19	3C23K	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
20	3C23KR	QV**Q**LVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
21	5B42	QV**Q**LVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRD**A**SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
22	K4D24	**R**VRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
23	K4D20	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTS**N**HIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
24	K4A12	QVRLVQSGAEVKKPG**T**SVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
25	K5D05	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFT**G**YHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
26	K5D14	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASG**S**FTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
27	K4D123	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQ**S**LEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
28	K4D127	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVT**T**TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
29	5C14	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVT**F**TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
30	5C26	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG R**M**TITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
31	5C27	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQR**P**EWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
32	5C60	QVRLVQSGA**K**V**R**KPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
33	6C13	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYP**E**DDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
34	6C18	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC**A**R GDRF--AY WGQGTLVTVSS
35	6C54	QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLR**P**EDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS

(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
(72) 발명자
라마르 메흐디
프랑스 78220 비로플레 뤼 데 프레 조 부아 154
드고브 스테빤
프랑스 93500 팡땡 뤼 쥘 오프레 21
뒤브뢰유 올리비에
프랑스 31190 모르삭 뤼 데 마로니에르 1
니꼴라 앙드레
프랑스 75020 파리 뤼 소르비에 34
메쇠르 디디에
프랑스 75012 파리 뤼 라송 13

명 세 서

청구범위

청구항 1

표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평세포암종 NSCLC, 다형성 세포암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC로 이루어진 군으로부터 선택되는 폐암이 발병한 환자에 있어 폐암을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐암 치료 분야에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐암은 폐 조직의 악성 변형 및 팽창을 일컫는 것으로서, 매년 전 세계적으로 1백 30만명을 사망에 이르게 하고 있다. 폐암은 남성의 암 관련 사망에 있어 가장 흔한 원인이고, 여성에서는 두 번째로 가장 흔한 원인이다.

[0003] 세계보건기구는 폐암을 조직학적 주요 유형 4가지, 즉 (1) 편평세포암종(SCC), (2) 선암종, (3) 대세포암종, 그리고 (4) 소세포폐암종(SCLC)으로 구분하고 있다. "비소세포 폐암종(NSCLC)"이란 용어는 편평세포암종, 선암종 및 대세포암종을 포함한다.

[0004] 비소세포 폐암(NSCLC)은 예후와 관리가 대체로 동일하기 때문에 무리지어 분류된다. 주요 하위 유형으로서는 3가지, 즉 편평세포폐암종, 선암종 및 대세포폐암종이 있다. 편평세포암종은 폐암의 29%를 차지하고 있는 것으로서, 대기관지에서 시작되지만, 그 성장은 느리다. 이 종양의 크기는 진단에 따라 다르다. 선암종은 NSCLC의 가장 흔한 하위 유형으로서, 폐암의 32%를 차지한다. 이는 폐의 가스 교환 표면 근처에서 시작되는 형태의 종양이다. 선암종의 대부분의 사례는 흡연과 연관되어 있다. 그러나 흡연을 전혀 한 적이 없는 사람들("흡연 미경험자") 가운데 선암종은 폐암의 가장 흔한 형태이다. 선암종의 하위 유형인 기관지폐포암종은 여성이면서 흡연 미경험자에서 더욱 흔히 발생하고, 치료에 대한 반응도 상이할 수 있다. NSCLC의 또 다른 하위 유형으로서는 폐의 표면 근처에서 빨리 성장하는 형태의 종양으로서, 폐암의 9%를 차지하는 신경내분비성 폐 종양(NE), 소포 폐암(AT), 대세포암종이 있다.

[0005] 소세포폐암(SCLC, "귀리세포암종"이라고도 지칭됨)은 폐암의 덜 흔한 형태이다. 이는, 대 호흡관에서 발생하고 급속하게 성장하여 꽤 크게 자란다. 가장 흔하게 수반되는 발암유전자는 L-myc이다. "귀리" 세포는, 귀리 세포 자체에 내분비/방종양성 증후군과의 연관성을 부여하는 농밀한 신경분비과립을 함유한다. 소세포폐암은 처음에 화학요법에 대해 큰 감수성을 보이지만, 궁극적으로는 더 안 좋은 예후를 보이고, 제시되었을 당시 종종 전이되어 있기도 하다. 이러한 유형의 폐암은 흡연과 매우 밀접하게 연관되어 있다.

[0006] 폐암의 다른 유형으로서는 유암종, 선낭암종(원주종) 및 점액표피양암종을 포함한다.

[0007] 이러한 질환은 종종 그 임상 증상이, 병기가 어느 정도 진행될 때까지 나타나지 않기 때문에 조기 검출이 어렵다. 현재, 진단은 흉부 x-선, 가래에 함유된 세포의 유형 분석, 그리고 기관지 통로에 대한 광 섬유검사를 이용하는 것에 의해 뒷받침되고 있다. 치료 계획은 암의 유형과 병기에 의해 결정되고, 수술, 방사선요법 및/또는 화학요법을 포함한다. 이 질환에 대한 요법에 관하여 상당한 연구가 행하여졌음에도 불구, 폐암은 여전히 치료가 어려운 질환으로 남아있다.

[0008] 공지의 폐암 치료로서는 수술, 화학요법, 방사선요법 및 표적화 약물요법을 포함한다.

[0009] 표적화 요법, 특히 표적화 면역요법은 더욱 통상적으로 행하여지는 화학요법 또는 방사선 치료가 유효하지 않은 폐암 환자들에게 혜택을 제공할 잠재성을 가진다. 표적화 면역요법은 모노클로날 항체를 사용하는 것을 포함한다.

[0010] 모노클로날 항체 베바시주맙(항VEGF 항체) 및 라무시루맙(항VEGFR2 항체)은 종양이 새 혈관을 형성하는 것을 막는 것을 목표로 하고, 네시투무맙(항EGFR)은 다른 성장 인자의 작용을 막음으로써 성장을 표적화한다.

현재, 폐암 환자에 대하여 승인된 면역 관문 억제제 표적화 항체 적어도 2가지(펨브롤리주맙/항PD1 및 니볼루맙/항PD1)가 존재한다. 오늘날에는, 이러한 면역 기반 치료, 예컨대 관문 억제제, 모노클로날 항체, 치료적 백신 및 입양 세포 요법을 통해 장기 지속적인 관해와 더 큰 생존률이 달성될 수 있다.

[0011] 그러나 당 분야에는 현존하는 요법의 대안이 될 수 있거나 이를 상호 보완할 수 있는 폐암 요법을 위한 추가의 도구들이 여전히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료하기 위해 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합 제제에 관한 것이다. 그러므로 본 발명은 폐암이 발병한 환자에 있어서 폐암을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합 제제에 관한 것이다.

[0013] 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC), 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평세포암종 NSCLC, 다형성 세포암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC를 포함하는 군에서 선택될 수 있다.

[0014] 바람직한 구현예들에서, 인간 AMHRII-결합 제제는 세포 표면에서 AMHRII를 충분한 발현 수준으로 발현하는, 상기 명시된 폐암들을 치료하기 위해 사용된다.

[0015] 가장 바람직한 구현예들에서, 상기 충분한 발현 수준은, 본 명세서 어딘가에 상세히 기술된 역치 AMHRII 발현 스코어 값으로 표현된다.

[0016] 몇몇 구현예들에서, 상기 인간 AMHRII-결합 제제는 항 AMHRII 모노클로날 항체로 이루어져 있다.

[0017] 몇몇 구현예들에서, 상기 인간 AMHRII-결합 제제는 항체-약물 컨주게이트(ADC)로 이루어져 있다.

[0018] 몇몇 구현예들에서, 상기 인간 AMHRII-결합 제제는 AMHRII-결합 조작 수용체로 이루어져 있다.

[0019] 몇몇 구현예들에서, 상기 인간 AMHRII-결합 제제는 AMHRII-결합 조작 수용체를 발현하는 세포, 예컨대 AMHRII-결합 조작 수용체를 발현하는 CAR T 세포 또는 NK T 세포로 이루어져 있다.

[0020] 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 제제는 변별적 항암제(들) 하나 이상과 합하여진다.

[0021] 본 발명은 또한 개체가 상기 정의된 바와 같은 AMHRII-결합 제제로 폐암 치료를 받기에 적격인지 여부를 확정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 개체로부터 사전에 수득한 폐 종양 조직 시료가 세포 표면에 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확정하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 본 발명은 개체가 상기 정의된 바와 같은 AMHRII-결합 제제를 사용하는 폐암 치료에 반응성인지 여부를 확정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 개체로부터 사전에 수득한 폐 종양 조직 시료가 세포 표면에 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확정하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] **도 1**은 3C23 모노클로날 항체의 변이체 다수의 VH 및 VL 도메인들의 아미노산 서열을 도시하고 있다. 도 1a는 항체 변이체 각각의 VH 도메인을 도시하고 있다. 도 1b는 항체 변이체 각각의 VL 도메인을 도시하고 있다.

도 2는 다양한 암세포주에 의한 AMHRII 발현을 도시하고 있다.

도 2a는 암세포주에 의한 AMHRII mRNA 발현을 도시하고 있다: 가로 좌표(도 2a의 좌측 → 우측): HCT116(결장의 결장직장암종), COV434-WT(인간 난소 과립막 종양), K562(인간 골수성 백혈병) 및 OV90(인간 악성 유두상 장액성 선암종). 세로 좌표: RT-qPCR에 의해 검정된 바와 같은 AMHRII mRNA 발현 수준으로서 임의 단위(RQ)로 표현됨.

도 2b ~ 도 2f: 도 2a에서와 동일한 암세포주에 의한 AMHRII 단백질 막 발현: HCT116(도 2b), COV434-WT(도 2c), K562(도 2d), NCI-H295R(도 2e) 및 OV90(도 2f). 가로 좌표: 임의 단위로 표현한 형광 신호 세기(FL2-A 염료). 세로 좌표: 세포 수.

도 3은 유세포분석법에 의해 측정된 바와 같은, 여러가지 폐암세포에 의한 AMHRII 발현을 도시하고 있다.

도 3a는 편평 세포 폐암종 환자 유래 이종이식편(Ref Lu7860)으로부터 유래한 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다. 도 3b는 대세포 폐암종 환자 유래 이종이식편(Ref Lu7166)으로부터 유래한 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다. 도 3c는 편평 세포 폐암종 환자 유래 이종이식편(Ref Lu7298)으로부터 유래한 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다. 도 3d는 편평 세포 폐암종 환자 유래 이종이식편(Ref Lu7414)으로부터 유래한 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다. 도 3e는 다형성 세포 폐암종 환자 유래 이종이식편(Ref Lu7558)으로부터 유래한 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다. 가로 좌표: 임의 단위로 표현한 형광 세기(FL2-A 염료). 세로 좌표: 세포 수.

도 3f는 수술로 절개된 인간 NSCLC의 멀쩡한(healthy) 주변부 유래 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다(FACS 프로필은 도 3g에 도시되어 있음).

도 3g는 수술로 절개된 인간 NSCLC의 새로 얻은 시료 유래 세포에 의한 AMHRII 단백질 막 발현을 도시하고 있다.

도 3에서, (i) 좌측 피크: 관련성이 없는 이소타입 항체와 함께 항온처리된 세포들; (ii) 우측 피크: 3C23K 항 AMHRII 항체와 함께 항온처리된 세포들.

가로 좌표: 임의 단위로 표현한 형광 세기(FL2-A 염료). 세로 좌표: 세포 수.

도 4는 인간 폐암세포가 이종이식된 동물의 비체중 변화를 도시한 것이다. 처리는 SC131 이식후 18일차에 개시되었다. 비이클과 GM102 20 mg/kg는 총 3주 중 2주 경과시 i.v. 투여되었다. 도세탁셀 20 mg/kg은 D0에 1회 서서히 i.v. 투여되었다. 1주 ~ 3주 동안 시스플라틴은 매주 5 mg/kg씩, 그리고 겜시타빈은 매주 100 mg/kg씩 i.p. 투여되었다. 초기 군의 크기: 동물 9마리. 세로 좌표: kg으로 표시한 비체중(평균 +/- sem). 가로 좌표: ● 비이클; ■ GM102 20 mg/kg; ▲ 도세탁셀 20 mg/kg; ▼ GM102 및 도세탁셀의 조합; ◆ 시스플라틴 5 mg/kg과 겜시타빈 100 mg/kg의 조합; ○ GM102, 시스플라틴 및 겜시타빈의 조합.

도 5는 인간 폐암세포가 이종이식된 동물에서 다른 항암제와 병용되었거나 병용되지 않았을 때 3C23K 항 AMHRII 항체에 의해 유도되는 종양 성장 변화를 도시하고 있다. 처리는 SC131 이식후 18일차에 개시되었다. 비이클과 GM102 20 mg/kg은 총 3주 중 2주 경과시 i.v. 투여되었다. 도세탁셀 20 mg/kg은 D0에 1회 서서히 i.v. 투여되었다. 1주 ~ 3주 동안 시스플라틴은 매주 5 mg/kg씩, 그리고 겜시타빈은 매주 100 mg/kg씩 i.p. 투여되었다. 초기 군의 크기: 동물 9마리. 세로 좌표: mm^3으로 표시한 종양 부피(평균 +/- sem). 가로 좌표: ● 비이클; ■ GM102 20 mg/kg; ▲ 도세탁셀 20 mg/kg; ▼ GM102 및 도세탁셀의 조합; ◆ 시스플라틴 5 mg/kg과 겜시타빈 100 mg/kg의 조합; ○ GM102, 시스플라틴 및 겜시타빈의 조합.

도 6은 인간 폐암세포가 이종이식된 동물에 있어서 다른 항암제와 병용되었거나 병용되지 않았을 때 3C23K 항 AMHRII 항체의 항종양 활성을 도시하고 있다. 처리는 SC131 이식후 18일차에 개시되었다. 비이클과 GM102 20 mg/kg은 총 3주 중 2주 경과시 i.v. 투여되었다. 도세탁셀 20 mg/kg은 D0에 1회 서서히 i.v. 투여되었다. 1주 ~ 3주 동안 시스플라틴은 매주 5 mg/kg씩, 그리고 겜시타빈은 매주 100 mg/kg씩 i.p. 투여되었다. 초기 군의 크기: 동물 9마리. 세로 좌표: 퍼센트로 표시한 TC. 가로 좌표: ● 비이클; ■ GM102 20 mg/kg; ▲ 도세탁셀 20 mg/kg; ▼ GM102 및 도세탁셀의 조합; ◆ 시스플라틴 5 mg/kg과 겜시타빈 100 mg/kg의 조합; ○ GM102, 시스플라틴 및 겜시타빈의 조합.

도 7은 편평 비소세포 폐암 종양 이종이식편이 이종이식된 동물에 있어서 GM102(저 푸코스 항 AMHRII 항체)에 의해 유도된 종양 성장 변화를 도시하고 있다. 각각의 파선 곡선: 비이클 용액이 투여된 이종이식 동물. 각각의 실선 곡선: GM102이 투여된 이종이식 동물. 가로 좌표: 처리 개시후 경과 기간("일"로 표시). 세로 좌표: 종양 부피(mm^3로 표시).

도 8은 처리 개시 후 28일차에 편평 비소세포 폐암 종양 이종이식편이 이종이식된 동물에 있어서 GM102(저 푸코스 항 AMHRII 항체)에 의해 유도된 종양 성장 변화를 도시하고 있다. 도 8a 및 도 8b에 있어서, 세로 좌표: 종양 부피(mm^3로 표시). 도 8a 및 도 8b에 있어서, 가로 좌표: (i) 좌측: 비이클 용액이 투여된 이종이식 동물; (ii) 우측: GM102이 투여된 이종이식 동물. 도 8a: 검정된 이종이식 동물 각각에 대한 절대적 결과들. 도 8b: 도 8a에 도시된 결과들로부터 산정된 평균 +/- 표준 편차.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 예상외로 AMHRII 수용체가 비소세포 폐암 조직, 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포

NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC 하위 유형의 조직의 세포막에서 발현됨을 보였다. 이와는 반대로 AMHRII는 신경내분비 또는 소포 하위 유형의 SCLC 또는 NSCLC에서는 막 수준으로 검출되지 않았다.

[0025] "AMHR-II"란 용어는, 인간 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체를 지칭한다. 인간 AMHR-II의 서열은 본원에서 서열 번호 18(신호 펩티드 MLGSLGLWALLPTAVEA(서열 번호 17) 결실)로 기재되어 있다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같은 "PDX"란 용어는 "환자 유래 이종이식편"이라는 표현의 두문자어이다. 환자 유래 이종이식편은, 환자의 종양으로부터 유래하는 조직 또는 세포가 면역 결핍 비인간 포유류, 예컨대 면역 결핍 마우스에 이식(즉 "조직이식")되는 생체 내 암 모델에서 자주 사용된다.

[0027] 본원의 실시예들에 보인 바와 같이, 본 발명자들은, 고려되는 폐암의 하위 유형에 따라서 AMHRII가 폐암 조직의 세포막에 가변적인 빈도로 발현됨을 발견하였다.

[0028] 본 발명자들이 알고 있는 바에 따르면, 폐암세포 내 AMHRII의 막 발현은 본원에 최초로 보였다.

[0029] 예시적으로 본원의 실시예에 보인 바와 같이, AMHRII는 편평 세포 또는 대세포 NSCLC 발병 환자 기원의 종양 조직으로부터 유래하는 암세포에 의해서보다 표피양 또는 선암종 NSCLC 대세포 NSCLC 폐암이 발병한 환자 기원 종양 조직으로부터 유래한 암세포에 의해서 더욱 빈번하게 발현된다. 검출된 상대적 고 빈도는, 이와 같은 폐암의 네가지 유형 중 하나가 발병한 암 환자가 AMHRII를 표적화하는 항암 치료를 받기에 더욱 빈번하게 적격임, 즉 AMHRII를 표적화하는 항암 치료에 더욱 빈번하게 반응성이지만, 이러한 항암 치료는 신경내분비 NSCLC가 발병한 환자를 치료하는 것과는 덜 빈번하게 관련될 것임을 의미한다.

[0030] 본원의 실시예에 보인 바와 같이, 임의의 NSCLC 폐암은 AMHRII-결합 제제로 치료될 수 있고, 단 상기 비 부인과 종양으로부터 유래하는 종양 세포는 자체의 막에 AMHRII를 발현하므로, 종양 세포막에 AMHRII 단백질이 존재하는지는 임의의 방법에 따라서 검출 또는 확정될 수 있다.

[0031] 그러므로 본원의 실시예에 제공된 실험 데이터는, 동일한 AMHRII-결합 제제(여기서는 항 AMHRII 모노클로날 항체)가 변별적인 NSCLC 폐암들 다수를 치료하는데 유효하고, 단 AMHRII 표적 단백질은 종양 세포막에서 발현됨을 보여준다.

[0032] 부수적으로, 표적 결합 분자, 예컨대 표적 결합 항체로 이루어진 항암 활성 성분 분야에 있어서, 동일한 활성 성분이 변별적 암 다수를 치료하는데 유효한 경우는 전례가 없다. 예시적으로 펨브롤리주맙이라고 명명된 항 PD1 항체는 다양한 변별적 종류의 암이되, 동일한 생리학적 특징들을 하는 암을 치료하는데 유용한 활성 성분으로서 미국 식품의약품안전청(FDA)에 의해 허가받은 바 있다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 폐암세포의 세포막에 AMHRII이 발현된다 함은, 상기 폐암세포가 주어진 정량 가능한 수준으로, 또는 이처럼 정량 가능한 수준보다 더 높게 AMHRII를 발현함을 의미한다.

[0034] 몇몇 구현예들에 따르면, 폐암이 발병한 개체의 AMHRII-결합 분자 치료에 대한 반응성은, 상기 개체로부터 미리 수집한 시료 유래 폐암세포가 자체의 막에 AMHRII를 발현하는지 여부를 확정함으로써 평가될 수 있다.

[0035] 몇몇 구현예들에 따르면, 폐암이 발병한 개체의 AMHRII-결합 분자 치료에 대한 반응성은, 상기 개체로부터 미리 수집한 시료 유래 폐암세포가 자체의 막에 AMHRII를 확정된 역치 값 이상으로 발현하는지 여부를 확정함으로써 평가될 수 있다.

[0036] 비 부인과 암이 발병한 환자의 AMHRII-결합 제제, 예컨대 항 AMHRII 항체 치료에 대한 반응성을 확정하기 위한 몇몇 구현예들에 사용될 수 있는 AMHRII 막 발현 수준은, (i) 자체의 막에 AMHRII를 발현하는, 종양 시료 중에 함유된 종양 세포의 퍼센트, (ii) 종양 세포막상 AMHRII 단백질의 평균 수, 그리고 (iii) 검정된 종양 세포 시료 중에 함유된 종양 세포의 FACS AMHRII 신호 프로필을 포함하는 여러가지 기술에 의해 평가될 수 있다.

[0037] 몇몇 구현예들에 따르면, 폐암이 발병한 개체에 대해 미리 수집한 종양 시료 중에 포함된 폐암세포는, 막 AMHRII가 상기 종양 시료 중에 포함된 폐 종양 세포의 5% 또는 이 이상에서 검출될 때, 막 AMHRII를 발현하는 것으로서 평가될 수 있다.

[0038] 그러므로 몇몇 구현예들에서, 폐암이 발병한 개체는, 이 개체로부터 미리 수집한 종양 시료 중에 포함된 폐 종양 세포의 5% 또는 이 이상이 자체의 막에 AMHRII를 발현할 때, AMHRII-결합 제제 치료에 반응성인 것으로서 확정된다.

[0039] 종양 세포가 막 AMHRII 단백질을 발현하는 빈도(예컨대 퍼센트)를 확정하기 위한 방법은 본원의 실시예들을 비롯하여 본 명세서의 어딘가에 개시되어 있다.

[0040] 몇몇 구현예들에 따르면, 폐암이 발병한 환자의 AMHRII-결합 제제, 예컨대 항 AMHRII 항체 암 치료에 대한 반응성은, 상기 환자로부터 미리 수집한 종양 시료 중에 함유된 종양 세포의 막에 존재하는 AMHRII 단백질의 평균 수를 확정함으로써 평가될 수 있다.

[0041] 몇몇 구현예들에서, 폐암이 발병한 환자는, 상기 환자로부터 미리 수집한 종양 시료 중에 함유된 종양 세포에 의해 발현되는 막 AMHRII 단백질의 평균 수가 AMHRII 단백질 10,000개 또는 이 이상일 때, AMHRII-결합 제제 치료에 반응성인 환자, 예컨대 항 AMHRII 항체 치료에 반응성인 환자로 분류될 수 있다.

[0042] 폐 종양 세포막에 발현된 AMHRII 단백질의 수 산정은, (a) 환자로부터 미리 수집한 종양 조직 시료로부터 유래하는 세포를 함유하는 시료를, AMHRII 단백질, 예컨대 형광 표지화 항 AMHRII 항체와 특이적으로 결합하는 검출 가능 화합물과 항온처리하는 단계와, 추가로 (b) 상기 시료로부터 유래하는 각각의 검정 세포에 결합한, 상기 검출 가능 화합물의 수, 예컨대 형광 표지화된 항 AMHRII 항체의 수를 확정하는 단계를 포함하는 종래의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 종양 세포막에 발현된 AMHRII 단백질의 수를 산정하는 것은, 본원의 실시예에 보인 바와 같이, 예를 들어 널리 공지된 형광 활성화 세포 분취(FACS) 기술을 이용하여 수행될 수 있다.

[0043] 또 다른 구현예들에서, 폐암이 발병한 환자는, 상기 환자로부터 미리 수집한 종양 시료 중에 함유된 종양 세포의 AMHRII FACS 프로필 분석에 의해 AMHRII-결합 제제 치료에 반응성인 환자, 예컨대 항 AMHRII 항체 치료에 반응성인 환자로 분류될 수 있다.

[0044] 이러한 또 다른 구현예들에 따르면, 폐암이 발병한 환자는, 형광 활성화 세포 분취(FACS) 방법에서 (i) 형광 표지화 이소타입 항체와 함께 항온처리된 종양 세포로부터 구하여진 평균 형광 세기(MFI) 값 대 (ii) 항 AMHRII 형광 표지화 항체와 함께 항온처리된 종양 세포의 평균 형광 세기(MFI) 값의 비가 1.5 또는 이 이상일 때, AMHRII-결합 제제 치료에 반응성인 환자, 예컨대 항 AMHRII 항체 치료에 반응성인 환자로 분류될 수 있다.

[0045] 상기 평균 형광 세기 비를 확정하기 위해서, 이소타입 항체와 항 AMHRII 항체 둘다는 본원의 실시예에 보인 바와 같이 동일한 형광 제제, 예컨대 Company ThermoFisher Scientific에 의해 시판되고 있는 Alexa Fluor 488 염료로 표지화된다.

[0046] 몇몇 추가의 구현예들에서, 폐암 개체의 AMHRII-결합 제제 치료에 대한 반응성은, (i) AMHRII-결합 제제로 치료될 수 있는 폐암으로부터 유래하는 막 AMHRII 발현 폐암세포와, (ii) AMHRII-결합 제제로 치료될 수 없는 폐암으로부터 유래하는 막 AMHRII 발현 폐암세포의 구별을 허용하는 AMHRII 발현 스코어를 산정함으로써 확정될 수 있다.

[0047] 그러므로 본 발명자들은, 폐암이 발병한 환자들로서, 특히 본원에 기술된 AMHRII-결합 제제 암 치료를 받기에 적격인 환자, 즉 특히 본원에 기술된 AMHRII-결합 제제 암 치료에 반응성인 환자는, 파괴될 유관 세포 표적들이 나타내기에 충분히 높은 수준으로 AMHRII를 세포막에 발현하는 암 종양을 가지는 환자를 포함함을 확정하였다.

[0048] 따라서 이러한 추가의 구현예들에 따르면, 본 발명자들은 폐암 환자 유래의 암세포 시료를 대상으로 측정된 최소 AMHRII 발현 수준은 상기 환자가 AMHRII-결합 제제 치료에 반응성이므로, 상기 환자가 본원에 기술된 AMHRII-결합 제제에 의해 치료될 수 있음을 확인시켜줄 수 있음을 확정하였다.

[0049] 그러므로 폐암이 발병한 개체의 AMHRII-결합 제제 치료에 대한 반응성은 또한, (i) 종양 세포가 막 AMHRII를 발현하는 빈도, 예컨대 종양 세포가 자체의 막에 AMHRII를 발현하는 퍼센트, 그리고 (ii) 상기 종양 세포에 의한 AMHRII 막 발현 수준, 예컨대 세포당 막 AMHRII 단백질의 평균 수 둘다를 확정함으로써, 상기 개체로부터 미리 수집한 시료 중에 포함된 폐암세포에 의한 AMHRII 발현 수준이 평가될 때, 확정될 수 있다.

[0050] 그러므로 이러한 추가의 구현예들 중 몇몇에 있어서, 본 발명자들은 폐암 환자의 인간 AMHRII-결합 제제, 예컨대 항 인간 AMHRII 항체에 대한 반응성은 상기 환자로부터 미리 수집한 종양 세포의 시료에서 (i) 상기 시료 중에 함유된 종양 세포가 자체의 막에 최소 평균 수만큼의 인간 AMHRII 단백질을 보이고, (ii) 세포가 자체의 막에 인간 AMHRII를 발현하는 빈도, 예컨대 세포가 자체의 막에 인간 AMHRII를 발현하는 퍼센트가 적어도 역치 값일 것을 필요로 함을 확정하였다.

[0051] 따라서 (i) AMHRII-결합 제제 암 치료를 받기에 적격이 아닌 폐암 환자, 즉 AMHRII-결합 제제 암 치료에 반응성이 아닌 폐암 환자와, (ii) AMHRII-결합 제제 암 치료를 받기에 적격인 폐암 환자, 즉 AMHRII-결합 제제, 예컨대 항 인간 AMHRII 항체 암 치료에 반응성인 폐암 환자의 구별을 허용하는 비 AMHRII 발현 스코어 값을 확정하

는데 사용될 수 있는 추가의 방법도 또한 본원에 기술되어 있다.

[0052] 더욱 정확하게 상기 방법에 관한 구현예들에 따르면, 본원에 기술된 폐암이 발병하였고, 본 명세서에 기술된 바와 같은 AMHRII-결합 제제로 폐암이 치료될 수 있는 환자는, 바람직하게 막 AMHRII 발현 스코어 값이 1.0 또는 이 이상인 환자임이 확정되었다.

[0053] 막 AMHRII 발현 스코어는 검정 폐암세포에 의한 AMHRII 발현에 관한 면역조직화학적 평가를 기반으로 할 수 있으며, 이는 폐암이 발병한 변별적 개체들로부터 기원하는 폐암세포 시료 다수로부터 확정된 막 AMHRII 스코어의 평균값이고, 주어진 폐암세포 시료에 대한 개별 막 AMHRII 스코어는 (i) AMHRII 발현이 검출되지 않으면 0으로 매겨지고, (ii) 유의미한 AMHRII 발현이 검출되면 1로 매겨지며, (iii) 높은 AMHRII 발현이 검출되면 2로 매겨지고, (iv) AMHRII의 과발현이 검출되면 3으로 매겨진다.

[0054] 실상, (i) 전술된 면역조직화학적 평가를 통해 막 AMHRII 발현 수준에 매겨진 스코어와, (ii) 폐암세포당 발현된 AMHRII 단백질의 평균 수 사이에는 관련성이 있다. 개별 막 AMHRII 스코어를 매기는 것을 허용하는 막 AMHRII 발현 수준은 또한 폐암 환자로부터 미리 수집한 폐 종양 세포의 시료를 필두로 하여 세포당 막 AMHRII 단백질의 평균 수를 확정함으로써 평가될 수 있음을 본원의 실시예에 보였다.

[0055] 폐암 발병 개체의 AMHRII-결합 제제 치료, 즉 항 AMHRII 항체 치료에 대한 반응성을 확정하는 상기 구현예들에 따르면, 막 AMHRII 발현 스코어는 (i) 상기 폐암세포 시료 중 세포의 AMHRII 발현 빈도와, (ii) 상기 AMHRII 발현 세포에 의한 막 AMHRII의 발현 수준 둘다를 고려하여 주어진 폐암세포 시료에 대해 확정된다. 통상적으로 주어진 폐암세포 시료의 막 AMHRII 발현 스코어는 하기 식 (I)에 의해 확정된다:

[0056] E-스코어 = FREQ x AMHRII_수준

[0057] [상기 식 중,

[0058] - E-스코어는, 주어진 폐암세포 시료에 대한 막 AMHRII 발현 스코어 값을 의미하고,

[0059] - FREQ는, 상기 폐암세포 시료 중에 함유된 세포에 의한 막 AMHRII 발현이 검출되는 빈도를 의미하며,

[0060] - AMHRII_수준은, 상기 주어진 폐암세포 시료 중에 함유된 AMHRII 발현 세포에 의한 AMHRII의 막 발현 수준을 의미함].

[0061] 예시적으로 E-스코어 1.0은, (i) 세포의 50%가 AMHRII를 발현하고(FREQ 값 0.5), (ii) AMHRII 발현 수준(AMHRII_수준)이 2인, 주어진 폐암세포 시료에 대해 확정된다.

[0062] 몇몇 구현예들에서, AMHRII 발현 스코어(또는 E-스코어)는 본원의 실시예에 보인 바와 같은 면역조직학적 방법에 의해 확정된다. 이러한 바람직한 구현예들에 따르면, AMHRII의 막 발현은 AMHRII에 특이적인 검출 가능 항체를 사용함에 의하고, (i) 세포가, 이 세포 자체에 결합한 상기 항 AMHRII 항체를 가지는 빈도를 확정하며, (ii) 상기 검출 가능 항 AMHRII 항체가 막에 발현된 AMHRII에 결합한 후 이 항체에 의해 발생되는 신호의 세기를 확정함에 의해 평가된다.

[0063] 그러나 본원의 실시예들에 보인 바와 같이, 막 AMHRII 발현 스코어가 1.0 또는 이 이상인 AMHRII 발현 폐암세포는 다양한 폐암에 대해 확정되었으나, 그 빈도는 변별적이었다.

[0064] AMHRII 막 발현 수준을 확정하기 위해, 세포막에서의 AMHRII 검출은, 가장 바람직하게 3C23K 항 AMHRII 모노클로날 항체에 의해 실시예에 예시된 바와 같이 AMHRII에 대한 친화성이 크고 특이성도 큰 항 AMHRII 모노클로날 항체를 사용함으로써 수행되어야 할 것이다.

[0065] 또한 AMHRII 스코어를 확정할 목적으로 면역조직화학적 방법에 의해 AMHRII 발현을 확정하는 것은, 가장 바람직하게 폐 조직 시료와 적당한 검출 시약(예컨대 고 친화성 항 AMHRII 모노클로날 항체, 예컨대 AMHRII와의 결합에 대한 Kd 값이 55.3 pM인 모노클로날 3C23K 항체)이 접촉하기 전에 이 시료를 조심스럽게 전처리하는 단계를 수반한다. 시료의 전처리는 세포 표면에서 발현되는 AMHRII 분자의 검출 시약에 대한 이용 가능성 증가를 허용하여야 한다. 예시적으로 본원의 실시예에 보인 바와 같이, 전처리 방법은 특정의 단계들, 예컨대 (i) 극초단파원에의 노출에 의한 고온 탈랍과, (ii) AMHRII-결합 시약, 예컨대 추후 스트렙타비딘 컨쥬게이트화 검출 가능 시약과 복합체를 형성할 수 있는, 바이오틴화 항 AMHRII 항체의 결합에 의하여 발생한 신호를 증폭시키기 위한 시스템의 적당한 조합을 포함할 수 있다. 전처리 탈랍 단계는 사전 조직 고정 단계로 말미암은 검출 신호 감쇄 효과를 역전시키는데 중요한 것으로 보였다. 본 발명자들은, AMHRII의 검출 가능성은 조직 고정 단계에 사용되는 포르말린의 작용에 특히 감수성임을 보였다.

[0066] 이는, 비록 AMHRII-결합 제제가 폐암이 발병한 환자를 치료하기 위한 유관 치료제일 수 있지만, 종양 유래 폐암 세포의 AMHRII 발현에 대해 미리 검정하여, 어떤 특정의 환자에게 본원에 기술된 바와 같은 AMHRII-결합 제제가 투여될지를 결정하는 것이 바람직할 것임을 의미한다.

[0067] 게다가 본 발명자들은 항 AMHRII 항체가 폐암을 치료하는데 유리하게 사용될 수 있음을 보였다.

[0068] 따라서 본 발명자들은 본원에서 AMHRII를 표적화하는 약학 제제가, 이러한 종류의 암, 특히 표피양 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC를 예방 또는 치료하기 위한 신규 치료 도구로서 유용함을 보였다.

[0069] 본 발명에 따르면, 예컨대 "~ 단계들을 포함하는"에서 "~를 포함하는"이란 표현은 또한, 예컨대"~ 단계들로 이루어진"에서 "~로 이루어진"으로서 이해되기도 하고, 또한, 예컨대 "~ 단계들로 이루어진"과 같이 "~으로 이루어진"으로서 이해되기도 한다.

[0070] AMH 수용체(AMHR 또는 AMHR2 또는 AMHRII)는 TGF-베타 관련 단백질들에 대한 제II형 수용체의 과에 속하는 단일 경막 도메인을 가지는 세린/트레오닌 키나아제이다. 제II형 수용체는 자체 상에 있는 리간드와 결합하되, 신호 전달을 위해서는 제I형 수용체의 존재를 필요로 한다. Imbeaud외 다수는 인간 AMH 제II형 수용체 유전자를 클로닝(cloning)하였다(1995, Nature Genet, Vol. 11: 382-388). 인간 AMH 수용체 단백질은 573개의 아미노산으로 이루어져 있는데; 이 573개의 아미노산 중 17, 127, 26 및 403개는 각각 신호 서열, 세포외 도메인(ECD), 경막 도메인, 그리고 세린/트레오닌 키나아제 도메인 각각을 함유하는 세포내 도메인을 이룬다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같은 "AMHRII"란 용어는, 서열 번호 17의 아미노산 서열을 가지는 인간 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체를 지칭한다.

[0072] 항 뮐러 호르몬 수용체(AMHRII)의 발현은 이미 당 분야에 부인과 암, 즉 주로 면역 골수 세포에 의해 침습되는 종양과 관련하여 기술되었다. AMHRII는 부인과 암을 치료하기 위한 표적 분자인 것으로 동정되었다. AMHRII에 대해 생성된 항체는 이러한 암을 치료하기 위한 치료 도구로서 제조되었다. 특히 난소암을 치료하기 위한 것으로 PCT 출원공개공보 WO 2008/053330 및 동 WO 2011/141653에 기술된 12G4 항 AMHRII 항체와 이의 변이체 뿐만 아니라 PCT 출원에 기술된 3C23K 항 AMHRII 항체가 예시될 수 있다. 이는 항 AMHRII 항체-약물 컨주게이트를 사용하는, 난소암에 대한 특정의 치료 전략을 개시한 PCT 출원공개공보 WO 2017/025458에도 또한 언급되어 있을 수 있다.

[0073] 항 뮐러 호르몬 수용체 유전자(AMHRII 유전자)의 발현은 또한 Beck외 다수에 의해 기술되었다(2016, Cell Reports, Vol. 16: 657-671). 이들 저자는 AMH 신호전달은 NSCLC에 있어서 상피 가소성(epithelial plasticity), 생존 신호전달 및 선택적 약물 내성의 중요한 원인 제공 요소였음을 보여주었다. Beck외 다수의 논문(2016)은, 특히 siRNA를 사용하여 관심 유전자 다수의 발현을 조정함으로써, 미리 한정되지 않은 NSCLC 종양 하위 세트의 자가분비 신호전달 축(항 뮐러 호르몬과 이의 제II형 수용체 수반)을 동정 및 특성규명한 결과가 Hsp90 억제제인 가네테스핍과 허가가 난 화학요법제 시스플라틴에 대한 반응에 중요하다고 보고하여, NSCLC 발병의 세포내 기작에 대한 통찰력을 제공하였다. 상기 저자들은 또한, 웨스턴 블럿팅 실험을 통해 세포주 3개의 세포들, 즉 A549 및 H1299 내에 존재하며, 그 생산이 SiRNA에 의해 각각의 유전자를 표적화함으로써 차단되는, AMH 및 AMHR2 단백질들의 존재비가 낮음을 발견하였다.

[0074] 이제 본 발명자들은, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)의 세포와, 더욱더 특히 표피양 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC을 포함하는 다양한 인간 폐암세포의 표면에서 AMHRII도 또한 발현되었음을 예상 밖에 발견하게 되었다. 본 발명자들은 또한 (i) 암세포에 의한 AMHRII 유전자 발현과, (ii) 동일한 암세포에 의한 세포막 AMHRII 단백질 발현 사이에 관련성이 없음을 보였다.

[0075] 인간 폐암세포에 의한 AMHRII 표면 발현과 관련한 본 발명자들의 발견은, 특히 폐암 환자로부터 미리 수득한 인간 폐 종양 조직 시료를 사용하여 수행되었던, 항 AMHRII 항체 사용 면역조직화학적 검정법으로부터 얻어진다.
인간 폐암세포에 의한 AMHRII 표면 발현과 관련된 본 발명자들의 발견은 또한 마우스 내 원발성 인간 폐암세포 이종이식편으로부터 기원하는 폐 종양 조직 시료를 대상으로 수행되었던 항 AMHRII 항체 사용 면역조직화학적 검정법으로부터 얻어졌다.

[0076] 본 발명자들은 또한 항 AMHRII 항체가, 종양 세포 표면에 AMHRII를 발현하는 인간 폐암, 특히 비소세포 세포 폐암, 특히 표피양 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세

포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하여 본 명세서에 개시된 AMHRII 발현 폐암들을 치료하는데 유용함을 보였다. 항 AMHRII 항체뿐만 아니라, 화학적 항암제, 예컨대 널리 공지된 항암제인 도세탁셀, 시스플라틴 및/또는 겜시타빈과 합하여진 항 AMHRII 항체에 의해 특히 우수한 항암 활성이 보였다.

[0077] 본 발명자들은 당 분야에서 AMHRII 발현 부인과 암에 대한 항종양 효능이 입증된 항 AMHRII 항체는 또한 AMHRII 발현 폐암, 특히 본 명세서에 개시된 AMHRII 발현 폐암, 예컨대 비소세포 폐암, 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 예방 또는 치료하는데 유용함을 보였다.

[0078] 더욱 정확하게, 본원의 실시예에서는 3C23K라 명명되는 항 AMHRII 항체가, 하나 이상의 변별적 항암제(들), 예컨대 도세탁셀, 시스플라틴 및/또는 겜시타빈 치료와 상기 항 AMHRII 항체 치료가 병행될 때를 포함하여 생체 내에서 인간의 폐암, 특히 본원에 개시된 비소세포 폐암에 대해 항종양 활성을 발휘함이 확인된다.

[0079] 게다가 본 발명자들은 또한 항 AMHRII 3C23K 항체가 생체 내에서는 검출 가능한 정도의 독성 반응을 유도하지 않았으며, 특히 유의미한 체중 감소도 유도하지 않았음을 보였다.

[0080] 그러므로 본 발명은 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC), 더욱 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택되는 비소세포 폐암(NSCLC)을 예방 또는 치료하기 위해 사용되는 인간 AMHRII-결합 제제에 관한 것이다.

[0081] 본 발명은 또한 폐암, 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택되는 폐암의 예방 또는 치료용 의약품을 제조하기 위한, 인간 AMHRII-결합 제제의 용도에 관한 것이기도 하다.

[0082] 본 발명은 또한 폐암, 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 폐암의 예방 또는 치료를 위한 방법으로서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 AMHRII-결합 제제를, 이의 투여를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 AMHRII-결합 제제는 MIS 천연 리간드 활성을 모의할 것을 필요로 하지 않는다. 그러므로 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 AMHRII-결합 제제가 AMHRII와 결합할 때 임의의 세포 신호전달 경로를 활성화할 필요는 없다. 그 대신, 상기 제제가 AMHRII와 결합하는 능력만이 필요할 뿐인데, 그 이유는 상기 제제, 예컨대 항 AMHRII 세포독성 면역컨주게이트, ADCC 유도성 또는 ADC 유도성 항 AMHRII 항체, 또는 AMHRII-결합 조작 수용체를 발현하는 CAR T 세포를 포함하는 세포독성 유도 실체가 세포독성 유도 활성을 표적화하는데 배타적으로 사용되기 때문이다.

[0084] AMHRII-결합 제제

[0085] 본원에 사용된 바와 같은 AMHRII-결합 제제는, AMHRII에 특이적으로 결합하고, 적당한 방식으로 제시될 때, 상기 제제가 세포막 발현 AMHRII와 결합한 후에 자체의 표면에 AMHRII를 발현하는 표적 세포의 사멸을 초래할 임의의 제제를 포함한다.

[0086] 본원에 기술된 바와 같은 폐암을 치료하는데 사용되는 AMHRII-결합 제제는 또한 본원에서 "치료적 AMHRII-결합 제제"라 칭하여질 수 있다.

[0087] 일반적으로 AMHRII-결합 제제는 AMHRII에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 핵산을 포함한다.

[0088] AMHRII-결합 단백질은 주로 항 AMHRII 항체 또는 항 AMHRII 항체의 AMHRII-결합 단편으로부터 기원하는 상보성 결정 영역(CDR) 하나 이상을 포함하는 단백질을 포함하는데, 이 경우 상기 AMHRII-결합 단백질은 조작된 세포, 예컨대 CAR-T 세포, NK T 세포 또는 CAR 대식세포에 의해 키메라 항원 수용체(CAR)로서 발현될 수 있음이 이해된다.

[0089] AMHRII-결합 핵산은 주로 AMHRII에 대한 자체의 특이적 결합 특성에 대해 특히 선택된 핵산 앱타머를 포함한다.

[0090] 몇몇 바람직한 구현예들에서, AMHRII-결합 제제는 항 AMHRII 항체 또는 이의 AMHRII-결합 단편이다.

[0091] 가장 바람직한 구현예들에서, AMHRII-결합 제제는 항 AMHRII 모노클로날 항체 또는 이의 AMHRII-결합 단편이다.

[0092] 바람직한 구현예들에 따르면, 항AMHRII 모노클로날 항체는 키메라 항 AMHRII 항체, 인간화된 항 AMHRII 항체 및 인간 AMHRII 항체뿐만 아니라, 이것들의 AMHRII-결합 단편 및 AMHRII-결합 유도체를 포함한다.

[0093] 다양한 AMHRII 항체들이 당 분야에 공지되어 있으며, 이는 본 발명에 따라서 AMHRII-결합 제제로서 사용될 수 있다. 당 업자는 본 발명을 수행하기 위해, 예를 들어 Creative Biolabs에 의해 시판되는 재조합 인간 항 AMHRII(상품 번호 MHH-57)을 사용할 수 있다.

[0094] 몇몇 구현예들에서, 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 항 AMHRII 항체는 PCT 출원공개공보 WO 2008/053330에 개시된 인간화 12G4 항체이다.

[0095] 다른 몇몇 구현예들에서, 상기 항 AMHRII 항체는 PCT 출원공개공보 WO 2011/141653에 기술된 인간화 항체, 즉 3C23 항체를 포함하는 인간화 항체뿐만 아니라, 이의 변이체, 즉 3C23K 인간화 항체를 포함하는 이의 변이체를 포함한다.

[0096] 또 다른 구현예들에서, 상기 항 AMHRII 항체는 PCT 출원공개공보 WO 2017/025458에 기술된 것이다. 이러한 추가의 구현예들에 따르면, PCT 출원공개공보 WO 2017/025458는 상기 항 AMHRII 항체가 세포독성 제제에 결합된, 항체-약물 컨주게이트(ADC)의 형태를 가지는 AMHRII-결합 제제를 개시하였다.

[0097] 난소암 치료를 위한 것으로서, 뮐러 호르몬 제II형 수용체에 대한 모노클로날 항체(그리고 이의 인간화된 유도체)가 당 분야에서 개발되었다 (본원에 전체로서 참고문헌으로 인용된 EP 2097453B1 및 미국 특허 제8,278,423호 참조).

[0098] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 AMHRII-결합 제제들 가운데, 당 업자는 약물이나 검출 가능 표지로 유도체화되어 ADC를 형성하는 항체를 비롯하여 모노클로날 항체 12G4 (mAb 12G4), 또는 이의 키메라 또는 인간화된 변이체들을 사용할 수 있다. mAb12G4를 생산하는 하이브리도마는 부다페스트 조약에 따라서 2006년 9월 26일자로 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)에 기탁되었으며, CNCM 기탁 번호 1-3673를 부여받았다. mAb 12G4의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인이 서열 결정되었으며, 이에 의해 이 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 mAb 12G4의 상보성 결정 영역(CDR)을 가지는 것으로 확인되었다(본원에 전체로서 참고문헌으로 인용된 EP 2097453B1 및 미국 특허 제8,278,423호 참조). mAb 12G4와 이의 키메라 또는 인간화된 변이체는 본원에 개시된 바와 같이 ADC의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0099] 각각 본원에 전체로서 참고문헌으로 인용된 PCT 특허출원 PCT/FR2011/050745(국제특허출원공보 WO/2011/141653) 및 미국 특허 제9,012,607호는, 마우스 12G4 항체로부터 유래하는 신규의 인간화 항체를 개시하고 있다. 이러한 인간화 항체는 본 발명을 위해 AMHRII-결합 제제로서 사용될 수 있다. 구체적인 구현예들에서, PCT 특허출원공보 WO/2011/141653에는 항체가 3C23 및 3C23K로서 동정되는 것임이 개시되어 있다. 이러한 항체의 핵산 서열과 폴리펩티드 서열은 본원의 서열 번호 1 ~ 서열 번호 16으로서 제공된다. 본 발명의 몇몇 측면들에서, 관심 항 AMHRII 항체는 "서열 번호 ~를 포함하는 경쇄와, 서열 번호 ~를 포함하는 중쇄를 포함하는" 것으로서 지칭될 수 있다. 따라서 다양한 구현예들에서, ADC를 제조하는데 특히 바람직한 항체는

[0100] a) 서열 번호 2를 포함하는 경쇄와, 서열 번호 4를 포함하는 중쇄(리더가 결실된 3C23 VL 및 VH 서열);

[0101] b) 서열 번호 6을 포함하는 경쇄와, 서열 번호 8을 포함하는 중쇄(리더가 결실된 3C23K VL 및 VH 서열);

[0102] c) 서열 번호 10을 포함하는 경쇄와, 서열 번호 12를 포함하는 중쇄(리더가 결실된 3C23 경쇄 및 중쇄);

[0103] d) 서열 번호 14를 포함하는 경쇄와, 서열 번호 16을 포함하는 중쇄(리더가 결실된 3C23K 경쇄 및 중쇄)

[0104] 를 포함한다.

[0105] 다른 항체(예컨대 인간화 또는 키메라 항체)는 도 1a 및 도 1b에 제공된 중쇄 및 경쇄 서열을 기반으로 할 수 있는데, 예컨대 항체, 예컨대 도면에 개시된 CDR 서열을 함유하는 인간화 또는 키메라 항체는 ADC 제조용 제제를 비롯하여 관심 항 MAHRII-결합 제제로서 사용될 수 있다. 그러므로 본 발명은 또한 하기 서열들을 포함하는(또는 하기 서열들로 이루어진) CDR을 포함/함유하는 항 AMHRII 항체의 용도에 관한 것이기도 하다:

[0106] - CDRL-1, 즉 RASX1X2VX3X4X5A(서열 번호 65) [단 X1 및 X2는 독립적으로 S 또는 P이고, X3은 R 또는 W 또는 G이며, X4는 Y 또는 D이고, X5는 I 또는 T임];

[0107] - CDRL-2, 즉 PTSSLX6S(서열 번호 66) [단 X6은 K 또는 E임];

[0108] - CDRL-3, 즉 LQWSSYPWT(서열 번호 67);

[0109] - CDRH-1, 즉 KASGYX7FTX8X9HIH(서열 번호 68) [단 X7은 S 또는 T이고, X8은 S 또는 G이며, X9는 Y 또는 N임];

[0110] - CDRH-2, 즉 WIYPX1ODDSTKYSQKFQG (서열 번호 69) [단 X10은 G 또는 E임], 그리고

[0111] - CDRH-3, 즉 GDRFAY(서열 번호 70).

[0112] 본 발명은 또한 폐암, 특히 비소세포 폐암 및 소세포 폐암을 치료함에 있어 이러한 항 AMHRII 항체를 사용하여 제조된 ADC의 용도에 관한 것이기도 하다.

[0113] 본 출원의 범위 내에 있는 항체(예컨대 키메라 또는 인간화 항체)는 하기 표에 개시된 것들을 포함하고: 대안적으로 AMHR-II에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체가 ADC를 제조하는데 사용될 수 있다. 3C23K 항체는

[0114] - VH 아미노산 서열에 대한 서열 번호 19

[0115] - VL 아미노산 서열에 대한 서열 번호 36

[0116] 에 의해 한정된다.

[0117] 이하 표 1은 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 항 AMHR-II 인간화 항체들을 나열하고 있다.

표 1

항 AMHRII 항체

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열목록 내 서열 번호	VL 돌연변이	서열목록 내 서열 번호
3C23K		19		36
3C23		19	L-K55E	37
3C23KR	H-R3Q	20		36
6B78	H-R3Q	20	L-T48I, L-P50S	38
5B42	H-R3Q, H-T73A	21	L-T48I, L-K55E	39
K4D-24	H-Q1R	22		36
6C59	H-Q1R	22	L-S27P, L-S28P	40
K4D-20	H-Y32N	23		36
K4A-12	H-A16T	24		36
K5D-05	H-S31G	25		36
K5D-14	H-T28S	26		36
K4D-123	H-R44S	27		36
K4D-127	H-I69T	28		36
6C07	H-I69T	28	L-M4L, L-T20A	41
5C14	H-I69F	29		36
5C26	H-V67M	30	L-S27P	42

[0118]

[0119]

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열목록 내 서열 번호	VL 돌연변이	서열목록 내 서열 번호
5C27	H-L45P	31		36
5C60	H-E10K, H-K12R	32		36
6C13	H-G53E	33		36
6C18	H-T93A	34		36
6C54	H-S84P	35	L-M4L, L-S9P, L-R31W	43
K4D-25		19	L-M4L	44
K4A-03		19	L-I33T	45
K4A-08		19	L-M4L, L-K39E	46
K5D-26		19	L-T22P	47
5C08		19	L-Y32D	48
5C10		19	L-S27P	42
5C18		19	L-Q37H	49
5C42		19	L-G97S	50
5C44		19	L-S12P	51
5C52		19	L-19A	52
5C56		19	L-T72A	53
6C03		19	L-R31W	54
6C05		19	L-M4L, L-M39K	55

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열목록 내 서열 번호	VL 돌연변이	서열목록 내 서열 번호
6C16		19	L-I2N	56
6C17		19	L-G63C, L-W91C	57
6C28		19	L-R31G	58
725C02		19	L-I75F	59
725C17		19	L-I2T	60
725C21		19	L-I2T, L-K42R	61
725C33		19	L-Y49H	62
725C42		19	L-M4L, L-T20S, L-K39E	63
725C44		19	L-S27P	42
725C57		19	L-T69P	64

[0120]

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열목록 내 서열 번호	VL 돌연변이	서열목록 내 서열 번호

[0121]

[0122] *항 AMHRII 항체, 항 AMHRII 항체의 AMHRII-결합 단편 또는 AMHRII-결합 유도체*

[0123] "항체"란 용어는 최 광의로 사용되어 (전장 또는 비변형 모노클로날 항체를 비롯한) 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중 특이적 항체(예컨대 이중 특이적 항체)를 포함하고, 원하는 생물 활성을 보이는 한 항체 단편(이하 참조)도 포함한다.

[0124] 그러므로 본원에 사용된 바와 같은 "항체"란 용어는, 예컨대 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 이것들의 조합, 그리고 유사 분자들을 포함하는 면역글로불린 또는 면역글로불린 유사 분자, 즉 임의의 척추동물, 예컨대 포유류, 예컨대 인간, 염소, 토끼 및 마우스뿐만 아니라 비 포유류 종에서 면역 반응이 일어날 때 생산되는 면역글로불린 또는 면역글로불린 유사 분자, 예컨대 상어 면역글로불린(이에 한정되는 것은 아님)을 총칭한다. 달리 구체적으로 명시되지 않는 한, "항체"란 용어는, 다른 분자(즉 AMHRII와 관련이 없는 분자)와의 결합은 실질적으로 배제하고 AMHRII와 특이적으로 결합하는 비변형 면역글로불린 및 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"을 포함한다. "항체"란 용어는 또한 유전자 조작된 형태의 것, 예컨대 키메라 항체(예를 들어 인간화 마우스 항체), 이종 컨주게이트 항체(예컨대 이중 특이적 항체)를 포함한다. 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, 111.); Kuby, J., Immunology, 7th Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 2013]도 또한 참조한다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같은 "모노클로날 항체"란 용어는, 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉 집단에 포함되는 개별 항체는 소량 일어날 수 있는 자연 발생 가능 돌연변이를 제외하였을 때 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원에 대해 유도된 것으로서 특이성이 크다. 더군다나 통상 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 유도된다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산이 요구되는 경우로 해석되어서는 안된다. 예를 들어 본 발명에 따라서 사용될 모노클로날 항체는 Kohler외 다수에 의해 처음 기술된 하이브리도마 방법(Nature 256:495 (1975))에 의해 제조될 수 있거나, 또는

재조합 DNA 방법(예를 들어 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어 문헌[Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991) 또는 Marks et al, J. MoI Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하는 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.

[0126] "항체 단편"이란 용어는, 비변형 항체의 일부분을 지칭하고, 비변형 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예들로서는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 그리고 항체 단편들로부터 생성된 다중 특이적 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 중쇄"란, 항체 분자가 자연 발생 입체구조를 가질 때 이 항체 분자 모두에 존재하는 폴리펩티드 사슬 2가지 유형 중 더 큰 사슬을 지칭한다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 경쇄"란, 항체 분자가 자연 발생 입체구조를 가질 때 이 항체 분자 모두에 존재하는 폴리펩티드 사슬 2가지 유형 중 더 작은 사슬을 지칭하고, κ 및 λ 경쇄란, 주요 항체 경쇄 이소타입(isotype) 2가지를 지칭한다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"이란 용어는, 특정의 항원을 인지하고 이에 결합하는 항체의 가변 사슬 2개(중쇄 및 경쇄)의 일부를 지칭한다. CDR은 가변 사슬들 중 가장 가변적인 일부분으로서, 항체에 특이성을 제공한다. 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 각각에는 CDR이 3개 존재하므로, 항체 분자당 CDR은 총 6개 존재한다. CDR은 주로 항원 에피토프에의 결합에 관여한다. 각각의 사슬의 CDR은 통상 CDR1, CDR2 및 CDR3(번호는 N-말단으로부터 시작되어 순차적으로 매겨짐)이라 지칭되며, 또한 통상적으로는 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 식별된다. 그러므로 VHCDR3은 그것이 발견된 항체 중쇄의 가변 도메인 내에 위치하는 반면, VLCDR1은 그것이 발견된 항체 경쇄의 가변 도메인으로부터 유래하는 CDR1이다. LHR에 결합하는 항체는 특이적인 VH 영역 및 VL 영역 서열을 가질 것이므로, 특이적인 CDR 서열을 가질 것이다. 특이성이 상이한(즉 상이한 항원들에 대한 부위들이 상이한 조합을 이루는) 항체는 상이한 CDR을 가진다. 비록 항체들 간에 CDR들은 다양하지만, CDR 내 단지 제한된 수의 아미노산 위치들만이 항원 결합에 직접 수반된다. 이러한 CDR 내 위치는 특이성 결정 잔기(SDR)라 칭하여진다.

[0130] "틀 영역"(이하 FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각각의 가변 도메인은, 통상적으로 4개의 FR(FR1, FR2, FR3 및 FR4이라 식별됨)을 가진다. 만일 CDR이 Kabat에 따라서 정의되면, 경쇄 FR 잔기들은 약 1 ~ 23번(LCFR1), 35 ~ 49번(LCFR2), 57 ~ 88번(LCFR3) 및 98 ~ 107번(LCFR4) 잔기에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기들 중 약 1 ~ 30번(HCFR1), 36 ~ 49번(HCFR2), 66 ~ 94번(HCFR3), 그리고 103 ~ 113번(HCFR4) 잔기에 위치한다.

[0131] "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 단 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로 Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하여, scFv가 항원 결합에 요망되는 구조를 형성할 수 있도록 한다. scFv에 관한 검토는 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, VoI 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0132] "다이아바디"란 용어는, 항원 결합 부위 2개를 가지는 소형의 항체 단편을 지칭하는데, 이 단편은 동일 폴리펩티드 사슬(VH 및 VL) 내 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 지나치게 짧아서 동일 사슬상 도메인 2개 간의 쌍 형성을 허용하지 않는 링커가 사용되면, 도메인들은 다른 사슬의 상보성 도메인과의 쌍 형성이 강제되고, 이로 말미암아 항원 결합 부위가 2개 형성된다. 다이아바디는 문헌, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0133] 다이아바디 또는 이중 특이적 항체는 대략 2개의 범주, 즉 면역글로불린 G(IgG)-유사 분자와 비 IgG-유사 분자로 구분될 수 있다. IgG-유사 bsAb는 Fc 매개 효과기 기능, 예컨대 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 보체 의존적 세포독성(CDC), 그리고 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)을 보유한다(Spiess et al., 2015, Mol Immunol., Vol. 67(2) : 95-106.). bsAb의 Fc 영역은 정제를 촉진하고, 가용성과 안정성을 개선한다. IgG-유사 포맷 중 이중 특이적 항체는 그 크기가 더 크고 FcRn 매개 재순환이 이루어지기 때문에, 일반적으로 혈청 중 반감기가 더 길다(Kontermann et al., 2015, Bispecific antibodies. Drug Discov Today Vol. 20(7): 838-47). 비 IgG-유사 bsAb는 그 크기가 더 작아서, 향상된 조직 침투성을 달성한다(Kontermann et al., 2015, Bispecific antibodies. Drug Discov Today Vol. 20(7): 838-47).

[0134] 몇몇 바람직한 구현예들에 따르면, 본 발명에 따른 이중 특이적 항체는 (i) AMHRII와 결합하는 제1 항원 결합

부위와, (ii) AMHRII와는 구별되는 표적 항원, 특히 암세포나 종양 미세환경의 면역 세포, 예컨대 T 세포, NK 또는 대식세포에 의해 발현될 수 있는 표적 항원과 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 이러한 이중 특이적 항체의 경우 상기 제2 항원 결합 부위는 표적 항원, 즉 CD3과 결합하여 T 세포 포획(engagement)을 허용한다. 이 표적 항원은 또한 T 세포를 풀어주는 PDL1이거나, NK 또는 대식세포를 활성화하는 CD16일 수도 있다.

[0135] 본원에 명시된 모노클로날 항체는, 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이, 특정의 종으로부터 유래하거나 특정의 항체군 또는 그 하위군에 속하는 항체 내 대응 서열과 동일하거나 상동성이면서, 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체군 또는 그 하위군에 속하는 항체 내 대응 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항 AMHRII 항체(면역글로불린)뿐만 아니라, 원하는 생물 활성을 보이는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 (1984)).

[0136] 본원에 명시된 모노클로날 항체는 또한 인간화 항 AMHRII 항체를 포함하기도 한다. 비인간(예컨대 마우스) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래하는 최소한의 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개 인간화 항체는, 수용개체의 초가변 영역으로부터 유래하는 잔기들이, 비인간 종(공여개체 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역으로부터 유래하는 잔기들로 치환되었고, 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 가지는 인간 면역글로불린(수용개체 항체)이다. 몇몇 예들에서, 인간 면역글로불린의 Fv 틀 영역(FR) 잔기들은 대응하는 비인간 잔기들로 치환된다. 더욱이 인간화 항체는 수용개체 항체 또는 공여개체 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체의 성능을 더 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로 인간화 항체는 적어도 1개, 통상적으로는 2개의 가변 도메인 실질적으로 전부를 포함할 것인데, 단 초가변 루프 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 초가변 루프에 대응하고, FR 영역 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 FR 영역이다. 인간화 항체는 또한 선택적으로 면역글로불린 불변 영역(Fc), 통상적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 것이다. 더욱 상세한 설명은 문헌[Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0137] 본원에 명시된 모노클로날 항 AMHRII 항체는 항 AMHRII 인간 항체를 추가로 포함한다. "인간 항체"는 인간에 의해 생산되는 항체의 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하고/보유하거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 기술들 중 임의의 기술을 사용하여 제조된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는, 구체적으로 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 배제한다. 인간 항체는 당 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 일 구현예에서, 인간 항체는 인간 항체를 발현하는 파지 라이브러리로부터 선택된다(Vaughan et al. Nature Biotechnology 14:309-314 (1996): Sheets et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, J. MoI. Biol, 227:381 (1991); Marks et al., J. MoI. Biol, 222:581 (1991)). 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 좌위를 유전자이식 동물, 예컨대 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로나 전체적으로 비활성화된 마우스에 도입함으로써 제조될 수 있다. 면역공격되면, 인간 항체가 생성되는 것이 관찰되는데, 이는 유전자 재배열, 조립 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 측면에서 인간에서 관찰되는 바와 매우 닮았다. 이 접근법은, 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 동 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 동 제5,661,016호와, 하기 과학 출판물들, 즉 Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)에 기술되어 있다. 대안적으로 인간 항체는 표적 항원에 대하여 유도된 항체를 생산하는 인간 B 림프구의 무한증식(immortalization)을 통해 제조될 수 있다(이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나, 또는 시험관 내에서 면역화될 수 있다). 예컨대 문헌[Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol, 147 (1):86-95 (1991); 및 미국 특허 제5,750,373호]을 참조한다.

[0138] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 돌연변이체" 또는 "항체 변이체"란, 종 의존적 항체의 아미노산 잔기들 중 하나 이상이 변형된, 종 의존적 항체의 아미노산 서열 변이체를 지칭한다. 이러한 돌연변이체는 종 의존적 항체와의 서열 동일성 또는 유사성이 반드시 100% 미만이어야 한다. 일 구현예에서, 항체 돌연변이체는 종 의존적 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 보이는 아미노산 서열을 가질 것이다. 본원에서 이 서열과 관련된 동

일성 또는 유사성은, 필요에 따라서 최대%의 서열 동일성이 달성되도록 서열 배열 및 갭 도입이 이루어진 후의, 종 의존적 항체 잔기와 동일(즉 잔기가 동일)하거나 유사한(즉 아미노산 잔기가 공통 측쇄 특성을 기반으로 동일한 군에 속하는(이하 참조)) 후보 서열 내 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실, 또는 가변 도메인 외 항체 서열로의 삽입 중 그 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로서 해석되서는 안 된다.

[0139] 인간화 항체는, 당 분야에 공지된 기술에 따라서 CDR 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 수득하고 인간화 항체를 구성함으로써 제조될 수 있다. 종래의 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기술을 기반으로 인간화 항체를 제조하기 위한 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다[예컨대 문헌(Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M S. et al. 1985) 참조]. 항체는, 예컨대 CDR-조직이식(EP 239,400; PCT 출원공개공보 WO91/09967; 미국 특허 제5,225,539호; 동 제5,530,101호; 및 동 제5,585,089호), 비니어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan E A (1991); Studnicka G M et al. (1994); Roguska M A. et al. (1994)), 그리고 사슬 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 제5,565,332호)을 비롯한 당 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 이러한 항체를 제조하기 위한 일반적인 재조합 DNA 기술도 또한 공지되어 있다(유럽 특허출원 EP 125023 및 국제특허출원공개공보 WO 96/02576를 참조한다).

[0140] 본원에 명시된 항 AMHRII 항체를 효과기 기능과 관련하여 변형하는 것은, 예를 들어 그것이 항체의 항원 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)이 향상되는 한 바람직할 수 있다. 이는, 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)는 Fc 영역에 도입될 수 있는데, 이로 말미암아 이 영역에 사슬간 이황화물 결합 형성이 허용된다. 이처럼 제조된 호모이량체성 항체는 내부화 역량이 개선될 수 있고/개선될 수 있거나 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)이 증가할 수 있다. 문헌[Caron et al, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 항종양 활성이 향상된 호모이량체성 항체는 또한 문헌[Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같은 헤테로 이작용성 가교 링커를 사용하여 제조될 수도 있다. 대안적으로 항체는 2개의 Fc 영역을 가지도록 조작될 수 있으며, 그 결과 보체 용해 및 ADCC 역량이 향상될 수 있다. 문헌[Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다. WO 00/42072 (Presta, L.)에는 인간 효과기 세포가 존재할 때 ADCC 기능이 개선되는 항체로서, 이의 Fc 영역에 아미노산 치환을 포함하는 항체가 기술되어 있다. 바람직하게 ADCC가 개선된 항체는 Fc 영역의 298, 333, 및/또는 334번 위치(잔기의 Eu 번호매김)에 치환을 포함한다.

바람직하게 변경된 Fc 영역은 이들 위치 중 한 군데, 두 군데 또는 세 군데에 치환을 포함하거나 치환으로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역이다. 이러한 치환은, 선택적으로 CIq 결합 및/또는 CDC를 증가시키는 치환(들)과 합하여진다.

[0141] CIq 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)이 변경된 항체는 WO 99/51642, 미국 특허 제6,194,551호 B1, 미국 특허 제6,242,195호 B1, 미국 특허 제6,528,624호 B1 및 미국 특허 제6,538,124호 (Idusogie et al)에 기술되어 있다. 항체는 자체의 Fc 영역의 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334번 아미노산 위치(잔기의 Eu 번호매김) 중 하나 이상에 아미노산 치환을 포함한다.

[0142] 몇몇 구현예들에서, AMHRII-결합 제제는 당 조작된 항 AMHRII 항체를 포함한다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같은 "당 조작(glycoengineering)"이란 용어는, 결합 단백질 조성물의 당형(glycoform) 프로필을 변경하기 위한 것으로서 당 분야에 인지된 임의의 방법을 지칭한다. 이러한 방법은 유전자 조작된 숙주 세포, 즉 이종의 당전이효소 또는 당질분해효소를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포(예컨대 CHO 세포) 내에서 결합 단백질 조성물을 발현시키는 단계를 포함한다. 다른 구현예들에서, 당 조작 방법은 특정 당형 프로필을 편향시키는 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0144] 본원에 사용된 바와 같은 "당 조작 항체"는, (i) 고 갈락토실화 Fc 단편을 포함하는 항체, (ii) 비 만노실화 Fc 단편을 포함하여 저 만노실화 Fc 단편을 포함하는 항체, 그리고 (iii) 비 푸코실화 Fc 단편을 포함하여 저 푸코실화 Fc 단편을 포함하는 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 당 조작 단편은 다음과 같은 변경 당화, 즉 (i) 고 갈락토실화, (ii) 저 만노실화 및 (iii) 저 푸코실화 하나 이상을 포함하는 군에서 선택된 변경 당화를 보이는 Fc 단편을 포함한다. 결과적으로 본 발명에 따라서 사용된 바와 같은 항 AMHRII 항체 유래 당 조작된 Fc 단편은 고 갈락토실화, 저 만노실화 및 저 푸코실화 Fc 단편의 예시적 예들을 포함한다.

[0145] 당 업자는 비변형 Fc 단편보다 높은 친화성으로 Fc 수용체와 결합하는 것으로 공지된, 고 갈락토실화 Fc 단편, 저 만노실화 Fc 단편 및 저 푸코실화 Fc 단편을 포함하는 항 AMHRII 항체를 수득하기 위한 것으로서 널리 공지

된 기술을 참고할 수 있다.

[0146] 당 조작된 항 AMHRII 항체는, "저 푸코스" Fc 단편이라 칭하여질 수도 있는 저 푸코실화 Fc 단편을 포함하는 항 AMHRII 항체를 포함한다.

[0147] 면역컨주게이트, 특히 항체-약물 컨주게이트(ADC)

[0148] 본 발명을 위해 사용될 수 있는 AMHRII-결합 제제는 세포독성 제제, 예컨대 화학요법제, 독소(예컨대 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 이의 단편)에 컨주게이트화되었거나, 또는 방사성동위원소에 컨주게이트화된 것(예컨대 방사성 컨주게이트)으로서, 본원에 명시된 항체를 포함한다. 이러한 항체 컨주게이트는 PCT 특허출원공개공보 WO 2017/025458에 기술된 것들을 포함한다. PCT 특허출원공개공보 WO 2017/025458는, 특히 비 산부인과 인간 암에 대한 생체 내 항암 활성이 본원에 제시되어 있는 항 AMHRII 3C23K 항체뿐만 아니라, 3C23K ADC 컨주게이트도 개시하고 있다.

[0149] 세포독성 제제는 효소 활성 독소를 포함한다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소와 이의 단편으로서는, 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래) 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알루리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 리스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다.

[0150] 방사성 컨주게이트 항체를 제조하기 위해서 다양한 방사성핵종이 사용될 수 있다.

[0151] 항체와 세포독성 제제의 컨주게이트는 다양한 이기능성 단백질 커플링 제제, 예컨대 PCT 특허출원공개공보 WO 2017/025458에 개시된 것들을 사용하여 제조된다.

[0152] 항 AMHRII ADC 항체 컨주게이트의 바람직한 면역 컨주게이트로서는 PCT 특허출원공개공보 WO 2017/025458에 기술된 것들이 있다.

[0153] CAR T 세포, CAR NK 세포 및 CAR 대식세포를 비롯한 CAR 세포

[0154] 몇몇 구현예들에서, 인간-AMHRII-결합 제제는 AMHRII-결합 수용체 또는 AMHRII-결합 수용체 발현 세포, 특히 AMHRII-결합 수용체 발현 CAR T 세포, AMHRII-결합 수용체 NK 세포, 또는 AMHRII-결합 수용체 발현 CAR 대식세포이다.

[0155] 그러므로 몇몇 구현예들에서, 인간 AMHRII-결합 제제는 AMHRII-결합 조작 수용체이고, 가장 바람직하게 자체의 AMHRII-결합 영역이 본 명세서에 개시된 모노클로날 항 AMHRII 항체로부터 유래한, AMHRII-결합 조작 수용체이다.

[0156] 통상적으로 AMHRII-결합 조작 수용체는 (i) 본 명세서에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 유래한 AMHRII-결합기인 세포외 도메인, (ii) 경막 도메인, 그리고 (iii) 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로 이루어져 있다. 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 조작 수용체의 세포외 도메인은 (i) 본원에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 유래하는 CDR들을 포함하는 항체 VH 사슬과, (ii) 본원에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 유래하는 CDR들을 포함하는 항체 VL 사슬을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 조작 수용체의 세포외 도메인은 본원에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체의 VH 사슬 및 VL 사슬을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 조작 수용체의 세포외 도메인은, 본 명세서에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체의 CH 사슬 및 VH 사슬 각각으로부터 유래하는 CDR들을 포함하는 ScFv이다. 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 조작 수용체의 세포외 도메인은 본 명세서에 개시된 항 AMHRII 모노클로날 항체의 CH 사슬 및 VH 사슬 각각을 포함하는 ScFv이다.

[0157] 이러한 AMHRII-결합 수용체를 발현하는 세포, 특히 이러한 AMHRII-결합 수용체를 발현하는 CAR T 세포, CAR NK 세포 또는 CAR 대식세포로 이루어진 AMHRII-결합 제제도 또한 본원에 포함된다.

[0158] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라 항원 수용체"(CAR)란 용어는, 항원과 결합할 수 있는 세포외 도메인, 이 세포외 도메인이 유래한 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드로부터 유래하는 경막 도메인, 그리고 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는, 융합 단백질을 지칭한다. "키메라 항원 수용체(CAR)"는 종종 "키메라 수용체", "T-바디" 또는 "키메라 면역 수용체(CIR)"라 칭하여진다. "AMHRII와 결합할 수 있는 세포외 도메인"이란, AMHRII와 결합할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. "세포내 도메인"이란, 신호를

전달하여 세포 내 생물 공정의 활성화 또는 억제를 유도하는 도메인으로서 역할을 하는 것으로 공지된 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. "경막 도메인"이란, 세포막을 가로지르는 것으로 공지되어 있으며, 세포외 도메인과 신호전달 도메인을 연결시키는 역할을 할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 키메라 항원 수용체는, 선택적으로 세포외 도메인과 경막 도메인 사이에서 링커로서 사용되는 "경첩 도메인"을 포함할 수 있다.

[0159] CAR T 세포는 단일 사슬 항체 단편(scFv) 또는 리간드가, T 세포 활성화를 촉진할 수 있는 T 세포 신호전달 도메인에 부착되어 있는, 유전자 조작된 자기유래의 T 세포다(Maher, J. (2012) ISRN Oncol.2012:278093; Curran, K.J. et al. (2012) J. Gene Med.14:405-415; Fedorov, V.D. et al. (2014) Cancer J.20:160-165; Barrett, D.M. et al. (2014) Annu. Rev. Med.65:333-347).

[0160] "세포내 신호전달 도메인"이란, T 세포 내부에서 발견되거나, T 세포 내부에서 발견되도록 조작된 CAR의 일부분을 의미한다. "세포내 신호전달 도메인"은 T 세포의 원형질막에 CAR을 고정시키는 "경막 도메인"을 함유할 수 있거나, 또한 함유할 수 없기도 하다. 일 구현예에서, "경막 도메인" 및 "세포내 신호전달 도메인"은 다른 구현예들에서와 동일한 단백질(예컨대 CD3ζ)로부터 유래하는데; 세포내 신호전달 도메인과 경막 도메인은 상이한 단백질들(예컨대 CD3ζ의 경막 도메인과 CD28 분자의 세포내 신호전달 도메인, 아니면 이와 반대)로부터 유래한다.

[0161] "공동 자극 엔도도메인"이란, T 세포 공동 자극 분자로부터 유래하는 세포내 신호전달 도메인 또는 이의 단편을 의미한다. T 세포 공동 자극 분자의 비제한적 목록은 CD3, CD28, OX-40, 4-1BB, CD27, CD270, CD30 및 ICOS를 포함한다. 공동 자극 엔도도메인은 동일하거나 상이한 공동 자극 엔도도메인으로부터 유래한 경막 도메인을 포함할 수 있거나 포함할 수 없다.

[0162] "세포외 항원 결합 도메인"이란, AMHRII를 특이적으로 인지하여 결합하는 CAR의 일부분을 의미한다.

[0163] 바람직한 구현예들에서, "세포외 결합 도메인"은 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 유래한다. 예를 들어 "세포외 결합 도메인"은 모노클로날 항체 유래 Fab 도메인 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 임의의 구현예들에서, "세포외 결합 도메인"은 특정 항 AMHRII 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, "세포외 결합 도메인"은 본원에 명시된 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 수득된 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.

[0164] 바람직한 구현예들에서, 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기술된 항 AMHRII 모노클로날 항체들 중 임의의 하나, 특히 3C23K 항 AMHRII 모노클로날 항체로부터 유래한 것이다.

[0165] *I. 세포외 항원 결합 도메인*

[0166] 일 구현예에서, 본 발명의 CAR은 본원에 기술된 항 AMHRII 모노클로날 항체들 중 하나로부터 유래한 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0167] 일 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 하기 CDR 서열들, 즉

[0168] - CDRL-1, 즉 RASX1X2VX3X4X5A(서열 번호 65) [단 X1 및 X2는 독립적으로 S 또는 P이고, X3은 R 또는 W 또는 G이며, X4는 Y 또는 D이고, X5는 I 또는 T임];

[0169] - CDRL-2, 즉 PTSSLX6S(서열 번호 66) [단 X6은 K 또는 E임];

[0170] - CDRL-3, 즉 LQWSSYPWT(서열 번호 67);

[0171] - CDRH-1, 즉 KASGYX7FTX8X9HIH(서열 번호 68) [단 X7은 S 또는 T이고, X8은 S 또는 G이며, X9는 Y 또는 N임];

[0172] - CDRH-2, 즉 WIYPX10DDSTKYSQKFQG (서열 번호 69) [단 X10은 G 또는 E임], 그리고

[0173] - CDRH-3, 즉 GDRFAY(서열 번호 70)

[0174] 을 포함한다.

[0175] *II. 카파Mab scFv의 VL 및 VH 도메인 사이의 링커*

[0176] 추가의 구현예에서, 항 AMHRII VL은 가요성 링커를 통해 항 AMHRII VH에 결합된다. 특히 가요성 링커는 약 10개 ~ 30개의 아미노산(예를 들어 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개 아미노산)으로 이루어진 글리신/세린 링커로서, 구조 $(Gly4Ser)^3$를 포함한다.

[0177] *III. 세포외 항원 결합 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이의 스페이서*

[0178] 세포외 항원 결합 도메인은 "스페이서"를 이용하여 세포내 신호전달 도메인과 결합된다. 스페이서는 항원 결합 도메인의 배향을 항원 인지와 결합을 촉진하는 방식으로 허용하기에 충분히 가요성이도록 디자인된다. 스페이서는 항 AMHRII 면역글로불린 자체로부터 유래할 수 있으며, IgG1 경첩 영역, 또는 IgG의 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함할 수 있다.

[0179] *IV. 세포내 신호전달 도메인*

[0180] 세포내 신호전달 도메인은 CD3 사슬 전부 또는 일부를 포함한다. CD247이라고도 공지된 CD는, CD4 또는 CD8 T 세포 공동 수용체 중 어느 하나와 함께 세포내 신호전달 캐스케이드에 세포외 항원 인지를 결합시키는데 관여한다.

[0181] CD3ζ 신호전달 도메인을 포함시키는 것에 더하여, 공동 자극 분자가 포함되면, CAR T 세포 활성이 향상되는 것이 마우스 모델 및 임상 실험에서 확인되었다. CD28, 4-IBB, ICOS, CD27, CD270, CD30 및 OX-40를 비롯한 몇 가지가 연구된 바 있다.

[0182] 임의의 구현예들에서, (i) 단리된 세포 집단에 CAR 암호화 핵산 서열을 형질도입시키는 단계, 및 상기 단계 (i)의 핵산 서열이 성공적으로 형질도입된 세포의 하위집단을 선택하는 단계를 포함하거나, 대안적으로는 이러한 단계들로 본질적으로 이루어진, CAR 발현 세포를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 몇몇 구현예들에서, 단리된 세포는 T 세포, 동물 T 세포, 포유류 T 세포, 고양이 T 세포, 개 T 세포 또는 인간 T 세포고, 이로써 CAR T 세포가 생산된다. 임의의 구현예들에서, 단리된 세포는 NK 세포, 예컨대 동물 NK 세포, 포유류 NK 세포, 고양이 NK 세포, 개 NK 세포 또는 인간 NK 세포고, 이로써 CAR NK 세포가 생산된다.

[0183] *CAR T 세포, CAR NK T세포 및 CAR 대식세포의 치료적 적용*

[0184] 본원에 기술된 CAR T 세포, CAR NK 세포 및 CAR 대식세포를 포함하는 CAR 세포는 AMHRII 발현 폐 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 CAR 세포는, 바람직하게 본원에 기술된 폐암, 특히 비소세포 폐암 또는 소세포 폐암이 발병한 환자에서 AMHRII 발현 폐 종양을 치료하는데 사용된다.

[0185] 본 발명의 CAR 세포는 단독으로 투여될 수 있거나, 또는 희석제, 공지의 항암 치료제 및/또는 다른 성분, 예컨대 시토카인, 또는 면역자극성인 다른 세포 집단과 함께 투여될 수 있다.

[0186] 본 발명의 방법의 측면은, 종양 성장의 억제를 필요로 하는 대상체에서 이러한 종양 성장을 억제하기 위한 방법 및/또는 암 치료를 필요로 하는 암 환자를 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 몇몇 구현예들에서, 종양은 고형 폐종양이다.

[0187] 본원에 개시된 바와 같은 CAR 세포는 단독으로 투여될 수 있거나, 또는 희석제, 공지의 항암 치료제 및/또는 다른 화합물, 예컨대 시토카인, 또는 면역자극성인 다른 세포 집단과 함께 투여될 수 있다. 이 CAR 세포는 1차 치료, 2차 치료, 3차 치료, 4차 치료 또는 이 이상의 치료제일 수 있다. 이는 다른 치료제와 병용될 수 있다. 이러한 것의 비제한적 예들로서는 화학요법제 또는 생물의약품(biologic)을 포함한다. 치료 담당 전문의 또는 수의사에 의해 적당한 치료 계획이 결정될 것이다.

[0188] 본 발명의 CAR을 포함하는 약학 조성물이, 치료 또는 예방될 질환에 적당한 방식으로 투여될 수 있다. 적당한 투여량은 임상 실험에 의해 결정될 수 있지만, 투여의 양과 투여 빈도는 환자의 상태, 환자 질환의 유형과 심각성과 같은 요인들에 의해 결정될 것이다.

[0189] 치료적 적용

[0190] 본 명세서의 어딘가에 이미 개시되어 있는 바와 같이, 본원에 개시된 것으로서, (i) 본원에 개시된 항 AMHRII 항체, (ii) 본원에 개시된 항체-약물 컨주게이트, 그리고 (iii) 본원에 개시된 CAR 세포(CAR T 세포, CAR NK 세포 및 CAR 대식세포 포함)를 포함하는 AMHRII-결합 제제는, AMHRII 발현 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC), 더욱 정확하게는 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 활성 성분들로 이루어져 있다.

[0191] 항종양 항원 항체 또는 항종양 항원 CAR 세포를 이용하는 암 치료 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다.

[0192] 몇몇 구현예들에서, 암 환자는, AMHRII-결합 제제, 예컨대 항 AMHRII 항체, 항 AMHRII ADC 또는 항 AMHRII CAR T 세포 치료가 수행되기 전, 자신의 종양 세포가 이 종양 세포의 표면에 AMHRII를 발현하는지 여부를 확정하기

위해 검정된다.

[0193] 이와 같이 AMHRII의 막에서의 발현을 검출하기 위한 예비 검정은 낮은 빈도로 AMHRII를 발현하는 폐암을 치료하는데 바람직하다. 반대로, AMHRII의 막 발현을 검출하기 위한 예비 검정은 높은 빈도로 AMHRII를 발현하는 암, 예시적으로 표피양 NSCLC를 치료하기 위해 수행될 수 없다.

[0194] 그러므로 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 비소세포 폐암(NSCLC), 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC을 포함하는 군에서 선택된 NSCLC를 포함하는 AMHRII-양성 폐암이 발병한 개체를 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 것으로 본원에 명시된 바와 같은 AMHRII-결합 제제에 관한 것이다.

[0195] 본 발명은 비소세포 폐암(NSCLC), 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC을 포함하는 군에서 선택된 NSCLC을 포함하는 폐암을 포함하는, AMHRII-양성 폐암이 발병한 개체를 예방 또는 치료하기 위한 의약품을 제조함에 있어서, AMHRII-결합 제제의 용도에 관한 것이다.

[0196] 본 발명은 또한 비소세포 폐암(NSCLC), 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC, 편평 세포 암종 NSCLC, 다형성 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC을 포함하는 군에서 선택된 NSCLC을 포함하는 AMHRII-양성 폐암이 발병한 개체를 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 상기 개체에 항 AMHRII-결합 제제를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이기도 하다.

[0197] 개체는, 이 개체로부터 미리 수득한 폐암 조직 시료에서의 세포 표면 AMHRII 단백질 발현을 검출하는 방법을 수행함으로써 AMHRII-양성 암 발병 개체로 지정될 수 있다. 세포 표면 AMHRII 단백질 발현의 검출은, 당 업자에게 널리 공지된 다수의 방법에 따라서 수행될 수 있다. 세포 표면 AMHRII 단백질 발현의 검출 방법은, 특히 본원의 실시예에 예시된 형광 활성화 세포 분취 방법뿐만 아니라 면역조직화학적 방법을 포함한다.

[0198] 본 발명은 또한 개체가 AMHRII-결합 제제 폐암 치료를 받기에 적격인지 여부, 즉 개체가 AMHRII-결합 제제 폐암 치료에 반응성인지 여부를 확정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 단 상기 방법은 상기 개체로부터 미리 수득한 폐 종양 조직 시료가 그 세포 표면에 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확정하는 단계를 포함한다.

[0199] 따라서 본 발명은 또한 폐암, 구체적으로 비소세포 폐암(NSCLC), 특히 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC를 포함하는 군에서 선택된 NSCLC 발병 개체가 AMHRII-결합 제제 암 치료를 받기에 적격인지 여부, 즉 개체가 AMHRII-결합 제제 암 치료에 반응성인지 여부를 확정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 단 상기 방법은

[0200] a) 상기 환자로부터 유래한 암세포가 이 세포의 막에 AMHRII를 발현하는지 확정하는 단계, 그리고

[0201] b) 만일 상기 폐암세포에 의한 AMHRII의 막 발현이 단계 a)에서 확정된다면, 상기 환자는 AMHRII-결합 제제 폐암 치료를 받기에 적격이라는 결론, 즉 상기 환자는 AMHRII-결합 제제 폐암 치료에 반응성이라는 결론을 내리는 단계

[0202] 를 포함한다.

[0203] 상기 방법의 바람직한 구현예들에서, (i) AMHRII 발현 스코어 값이 단계 a)에서 확정되고, (ii) 상기 AMHRII 발현 스코어 값이 역치 스코어 값 이상일 때, 단계 b)에서는 상기 환자가 AMHRII-결합 제제 폐암 치료를 받기에 적격이라는(즉 이 치료에 반응성이라는) 결론이 내려진다. AMHRII 스코어 값은, 가장 바람직하게 본 명세서의 어딘가에 기술된 식(I)을 이용하여 산정된다.

[0204] 그러므로 바람직한 구현예들에 따르면, 본 방법의 단계 a)는, 예컨대 본원의 실시예들에 보인 바와 같은 면역조직화학적 방법에 의해 수행된다.

[0205] 단계 a)에서 사용된 암세포는, 일반적으로 상기 암 환자로부터 미리 수집한 생검 조직 시료로부터 기원한다.

[0206] 바람직하게, 단계 a)는 널리 공지된 항체 검출 기술, 예컨대 본원의 실시예에 개시된 기술에 따라서 2차 표지화된 항체를 사용하여 AMHRII와의 결합이 검출될 수 있는, 본 명세서에 구체적으로 기술된 것들 가운데에서 선택된 항 AMHRII 항체, 특히 3C23K 항체를 사용하여 수행된다.

[0207] 바람직하게, 상기 나열된 폐암 군에 포함된 폐암이 발병한 환자는 하기 식 (I)에 따른 E-스코어 값의 확정을 허용하는 스코어 확정 방법이 수행되었을 때, 상기 암 환자로부터 기원하는 암세포 시료에서 막 AMHRII 발현 스코

어 값이 1.0 또는 이 이상으로 확인될 때, AMHRII-결합 제제 폐암 치료에 적격인(즉 반응성인) 것으로 확정된다:

[0208] E-스코어 = FREQ x AMHRII_수준

[0209] [상기 식 중,

[0210] - E-스코어는, 주어진 암세포 시료에 대한 막 AMHRII 발현 스코어 값을 의미하고,

[0211] - FREQ는, 상기 폐암세포 시료 중에 함유된 세포에 의한 막 AMHRII 발현이 검출되는 빈도를 의미하며,

[0212] - AMHRII_수준은, 상기 주어진 폐암세포 시료 중에 함유된 AMHRII 발현 세포에 의한 AMHRII의 막 발현 수준을 의미함]

[0213] 그러므로 본 발명은 또한 비소세포 폐암(NSCLC) 발병 환자를 치료하기 위한 방법으로서, 하기 단계들, 즉

[0214] a) 상기 개체로부터 미리 수득한 종양 조직 시료가 세포 표면에 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확정하는 단계, 그리고

[0215] b) 만일 AMHRII의 세포 표면 발현이 단계 a)에서 확정된다면, 상기 개체는 AMHRII-결합 제제로 치료되는 단계

[0216] 를 포함하는 방법에 관한 것이기도 하다.

[0217] 가장 바람직한 구현예들에서, AMHRII 발현은, 전술된 식 (I)에 따라서 산정된, 상기 종양 시료의 막 AMHRII 발현 스코어 값 "E-스코어"가 1.5 또는 이 이상의 E-스코어 값을 포함하여 1.0 또는 이 이상일 때, 단계 a)에서 확정된다.

[0218] 상기 방법의 가장 바람직한 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 제제는 본원에 명시된 바와 같은 항 AMHRII 항체 또는 이의 단편, 또는 본원에 명시된 바와 같은 CAR 세포(예컨대 CAR T 세포 또는 CAR NK 세포)로 이루어져 있다.

[0219] 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 제제는 유일한 항암 활성 성분으로서 사용된다.

[0220] 다른 몇몇 구현예들에서, 상기 AMHRII-결합 제제 항암 치료는 또한 상기 개체를, 방사선요법 치료 및 화학요법 치료를 포함하여 한 가지 이상의 추가 항암 치료를 받게 하는 단계를 포함한다.

[0221] 그러므로 이러한 다른 구현예들에 따르면, 상기 AMHRII-결합 제제 항암 치료는 또한 상기 개체에 추가의 항암 활성 성분 하나 이상을 투여하는 단계를 포함하기도 한다.

[0222] 병행 요법

[0223] 본원의 실시예에 보인 바와 같이, 효율적인 항 폐암 폐 요법은, 항 AMHRII 모노클로날 항체가 하나 이상의 변별적 항암제(들)와 합하여지는 요법을 포함한다. 본원의 실시예는, 폐암에 대한 병행요법을 예시하고 있는데, 여기서 항 AMHRII 항체는 도세탁셀과 합하여지거나, 또는 시스플라틴과 겜시타빈의 조합과 합하여진다.

[0224] "항암제"는 거대분자들(DNA, RNA, 단백질 등)의 생합성을 간섭할 수 있거나, 또는 세포 증식을 억제할 수 있거나, 또는 예를 들어 세포자살이나 세포독성에 의해 세포 사멸을 유도할 수 있는 임의의 분자로서 정의된다. 항암제들 가운데, 알킬화제, 토포이소머라아제 억제제 및 끼어들기 약물, 항대사물질, 절단제, 튜불린을 간섭하는 제제, 모노클로날 항체가 예시될 수 있다.

[0225] "약학적으로 허용 가능한 비이클"이란, 생물계, 예컨대 세포, 세포 배양액, 조직 또는 장기와 양립 가능한 무독성 물질을 지칭한다.

[0226] 특정 측면에 따르면, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제, 및 AMHR-II와 결합하는 항체, 특히 본원에 기술된 항 AMHRII 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0227] 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제, 및 AMHR-II 결합 항체, 특히 본원에 기술된 항 AMHRII 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0228] 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 도세탁셀, 시스플라틴, 겜시타빈, 그리고 시스플라틴과 겜시타빈의 조합을 포함하는 군에서 선택되는 항암제, 그리고 AMHR-II 결합 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0229] 항 AMHRII 항체와 함께 사용될 수 있는 다른 항암제로서는 파클리탁셀 또는 백금 염, 예컨대 옥살리플라틴, 시

스플라틴 및 카보플라틴을 포함한다.

[0230] 항암제는 또한 백금 염 이외의 화학요법 제제, 소분자, 모노클로날 항체 또는 기타 항혈관신생 펩티바디(anti-angiogenesis peptibody)로부터 선택될 수도 있다.

[0231] 백금 염 이외의 화학요법 제제로서는 (DNA 복제와 전사를 차단하는) 끼어들기 약물, 예컨대 안트라사이클린(독소루비신, 페길화 리포좀 독소루비신), 토포이소머라아제 억제제(캄프토테신 및 유도체: 카레니테신, 토포테칸, 이리노테칸) 또는 기타 SJG-136, 히스톤 탈아실화제의 억제제(보리노스타트, 벨리노스타트, 발프로산), 알킬화제(벤다무스틴, 글루포스파미드, 테모졸로미드), 유사분열억제 식물성 알칼로이드, 예컨대 탁산(도세탁셀, 파클리탁셀), 빈카 알칼로이드(비노렐빈), 에포틸론(ZK-에포틸론, 익사베필론), 항대사물질(겜시타빈, 엘라시타라빈, 카페시타빈), 키네신 방추체 단백질(KSP) 억제제(이스피네십), 트라벡테딘, 또는 기타 옴브라불린(컴브레타스타틴 A-4 유도체)을 포함한다.

[0232] 소분자들로서는 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 억제제, 즉 올라파립, 이니파립, 벨리파립, 루카파립, CEP-9722, MK-4827, BMN-673, 키나아제 억제제, 예컨대 티로신 키나아제 억제제(TKI)가 있는데, 이것들 중 항 VEGFR 분자(소라페닙, 수니티닙, 세디라닙, 반데타닙, 파조파닙, BIBF 1120, 세막사닙, 카보잔티닙, 모테사닙), 항 HER2/EGFR 분자(에를로티닙, 게피티닙, 라파티닙), 항 PDGFR 분자(이마티닙, BIBF 1120), 항 FGFR 분자(BIBF 1120), 오로라 키나아제/티로신 키나아제 억제제(ENMD-2076), Src/Abl 키나아제 억제제(사라카티닙), 또는 이외에도 페리포신, 템시롤리무스(mTOR 억제제), 알보시딥(사이클린 의존적 키나아제 억제제), 볼라세르팁(PLK1(폴로-유사 카나아제 1) 단백질의 억제제), LY2606368(관문 키나아제 1(chk 1)의 억제제), GDC-0449(헤지호그(Hedgehog) 경로 억제제), 지보텐탄(ETA-수용체의 길항제), 보르테조밉, 카르필조밉(프로테아좀 억제제), 시토카인, 예컨대 IL-12, IL-18, IL-21, INF-알파, INF-감마가 예시될 수 있다.

[0233] 항체들로서는 항 VEGF: 베바시주맙, 항 VEGFR: 라무시루맙, 항 HER2/EGFR: 트라스투주맙, 페르투주맙, 세툭시맙, 파니투무맙, MGAH22, 마투주맙, 항 PDGFR 알파: IMC-3G3, 항엽산 수용체: 파를레투주맙, 항 CD27: CDX-1127, 항 CD56: BB-10901, 항 CD105: TRC105, 항 CD276: MGA271, 항 AGS-8: AGS-8M4, 항 DRS: TRA-8, 항 HB-EGF: KHK2866, 항 메소텔린: 아마툭시맙, BAY 94-9343(면역독소), 카투막소맙(EpCAM/CD3 이중 특이적 항체), 항 IL2R: 다클리주맙, 항 IGF-1R: 가니투맙, 항 CTLA-4: 이필리무맙, 항 PD1: 니볼루맙 및 펨브롤리주맙, 항 CD47: 와이즈만(Weissman) B6H12 및 Hu5F9, 노비뮨 5A3M3, INHIBRX 2A1, 프레이저(Frazier) VxP037-01LC1 항체, 항 루이스(Lewis) Y: Hu3S193, SGN-15(면역독소), 항 CA125: 오레고보맙, 항 HGF: 릴로투무맙, 항 IL6: 실툭시맙, 항 TR2: 티가투주맙, 항 알파5 베타1 인테그린: 볼로식시맙, 항 HB-EGF: KHK2866이 예시될 수 있다.

항 혈관신생 펩티바디는 AMG 386 및 CVX-241로부터 선택된다.

[0234] 더욱 구체적으로는, 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 도세탁셀, 시스플라틴, 겜시타빈과, 시스플라틴 및 겜시타빈의 조합을 포함하는 군에서 선택되는 항암제, 및 AMHR-II 결합 항체를 포함하는 약학 조성물이 본원에 기술되어 있다.

[0235] 더욱더 구체적으로 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하되, 단 돌연변이된 인간화 모노클로날 항체(본원에서 3C23K라 칭하여짐) 및 항암제는 도세탁셀, 시스플라틴, 겜시타빈과, 시스플라틴 및 겜시타빈의 조합을 포함하는 군에서 선택되는 약학 조성물이 본원에 기술되어 있다.

[0236] 특정의 측면에서, 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제, 및 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 정맥내 경로 또는 복막내 경로에 의한 투여용으로 의도되는 제형의 형태인 약학 조성물이 본원에 기술되어 있다.

[0237] 또 다른 구체적 측면에서, 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 정맥내 경로 또는 복막내 경로에 의한 투여용으로 의도되는 제형의 형태인 조성물에 관한 것이다.

[0238] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 이 모노클로날 항체와 항암제는 별도, 동시 또는 순차 투여되도록 의도되는 조성물에 관한 것이다.

[0239] 항체와 항암제는 하나의 동일한 약학 조성물 중에 합하여질 수 있거나, 또는 별도의 약학 조성물의 형태로서 동시 투여 또는 순차 투여되며 사용될 수 있다. 구체적으로 제품은 별도로, 즉 부수적으로나 독립적으로, 예

를 들어 시간상 갭을 두고 투여될 수 있다.

[0240] 더욱 구체적으로 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 이 항체와 항암제는 동일한 약학 조성물 중에 합하여지는 조성물에 관한 것이다.

[0241] 또 다른 특정 측면에 따르면, 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 환자에게 투여되는 항 AMHRII 항체의 치료적 유효량이 약 0.07 mg 내지 약 35 000 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 7000 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 1400 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 700 mg, 그리고 더욱 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 70 mg의 범위인 조성물에 관한 것이다.

[0242] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 환자에게 투여되는 항암제의 치료적 유효량이 약 10 mg 내지 약 700 mg의 범위, 바람직하게 약 20 mg 내지 약 350 mg의 범위, 그리고 바람직하게 약 110 mg인 조성물에 관한 것이다.

[0243] 또 다른 특정 측면에서, 본 발명은 폐암을 예방 또는 치료함에 있어 의약 제품으로서 사용하기 위한 것으로서, 항암제와 AMHR-II 결합 항체를 포함하고, 환자에게 투여되는 항체의 치료적 유효량이 약 70 mg이며, 환자에게 투여되는 항암제의 용량은 내지 약 110 mg인 조성물에 관한 것이다.

[0244] 바람직한 구현예에서, 항암제, 구체적으로 도세탁셀, 또는 시스플라틴과 겜시타빈의 조합의 투여량은 1일에 약 0.01 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 예를 들어 0.1 mg/kg 내지 300 mg/kg, 또는 약 0.1 mg 내지 약 20 g이다.

[0245] 변형예로서, 높은 초기 부하용량만큼이 투여된 후, 이보다 더 낮은 용량만큼이 1회 이상 투여될 수 있다. 다른 변형예로서, 그다지 높지 않은 초기 부하용량만큼이 투여된 후, 이보다 더 높은 용량만큼이 1회 이상 투여될 수도 있다.

[0246] 특정 구현예에서, 항 AMHR-II 항체 및 항암제는, 약 10/1 내지 약 0.01/1, 구체적으로 약 10/1 내지 약 0.05/1, 또는 약 5/1 내지 약 0.1/1의 범위의 항체/항암제 중량비로 사용될 수 있다.

[0247] 예시적으로, 항 AMHR-II 항체 및 도세탁셀은 본원의 실시예들에 보인 바와 같이 1/1의 항체/도세탁셀 중량비로 사용될 수 있다.

[0248] 또한 예시적으로, 항 AMHR-II 항체 및 시스플라틴은 본원의 실시예들에 보인 바와 같이 4/1의 항체/시스플라틴 중량비로 사용될 수 있다.

[0249] 또한 예시적으로, 항 AMHR-II 항체 및 겜시타빈은 본원의 실시예들에 보인 바와 같이 0.2/1의 항체/겜시타빈 중량비로 사용될 수 있다.

[0250] 본 발명은 또한 인간 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체(AMHR-II) 결합 항체와, 항암제를 포함하고, AMHRII 발현 폐암을 예방 또는 치료하도록 의도된 의약 제품으로서 동시, 순차 또는 별도 사용을 위한, 합하여진 제제의 형태를 가지는 제품을 기술하고 있다.

[0251] 본원에 개시된 바와 같은 AMHRII-결합 제제, 특히 본원에 개시된 항 AMHRII 항체는 경구 투여, 피하 투여 및 정맥내 투여를 포함하는 다양한 방법으로 투여될 수 있다.

[0252] "치료적 유효량"이란 용어는, 포유류의 질환 또는 장애를 치료하는데 유효한 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암세포 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 감소시킬 수 있으며; 암세포가 주변 장기로 침습하는 것을 억제(즉 어느 정도 늦추고, 바람직하게는 중지)할 수 있고; 종양의 전이를 억제(즉 어느 정도 늦추고, 바람직하게는 중지)할 수 있으며; 종양의 성장을 어느 정도 억제할 수 있고/있거나; 장애와 연관된 증상들 중 한 가지 이상을 어느 정도 완화할 수 있다. 약물이 이미 존재하는 암세포 성장을 막을 수 있고/있거나 사멸시킬 수 있는 한, 약물은 세포증식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암요법에 있어서 생체 내 효능은, 예를 들어 생존 지속기간, 무진행생존지속기간(PFS), 응답률(RR), 반응지속기간 및/또는 삶의 질을 평가함으로써 측정될 수 있다.

[0253] 본 발명에 따라서 사용되는 제제(예컨대 항체)의 치료 제형은, 원하는 정도의 순도를 가지는 항체와, 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 혼합함으로써 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 보관되도록 제조된다[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]. 허용 가능

한 담체, 부형제 또는 안정화제는 적용된 투여량 및 농도에서 수용개체에 무독성이고, 완충제, 예컨대 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질암모늄 염화물; 헥사메토늄 염화물; 벤잘코늄 염화물, 벤제토늄 염화물; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 이하의 잔기로 이루어진) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당체, 이당체 및 기타 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 짝이온, 예컨대 나트륨이온; 금속 착제(예컨대 Zn-단백질 착제); 그리고/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 포함한다.

[0254] 활성 성분은 또한, 예를 들어 코아세르베이트화 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 각각에 포집될 수도 있거나, 콜로이드성 약물 전달계(예컨대 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에 포집될 수 있거나, 또는 마크로에멀전에 포집될 수 있다. 이러한 기술은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0255] 생체 내 투여에 사용될 제형은 멸균의 것일 수 있다. 이는, 멸균 여과막을 통해 여과함으로써 용이하게 달성된다.

[0256] 본원에 기술된 바와 같은 약학 조성물은 임의의 적합한 투여 경로, 예컨대 비경구, 경구, 설하, 질, 직장 또는 경피 경로, 바람직하게는 정맥내, 피하 또는 피내 주사에 의해 투여될 수 있다. 근육내, 복막내, 활액막내, 척추강내 또는 종양내 주사도 또한 가능하다. 주사는 볼루스의 형태로 수행될 수 있거나, 또는 연속 주입에 의해 수행될 수 있다. 항체 조성물과 항암제 조성물이 별도로 투여될 때, 이들 조성물은 동일하거나 상이한 투여형일 수 있다.

[0257] 비경구 투여용 제제로서는 멸균 수용액 또는 비수성 용액, 현탁액 또는 에멀전을 포함할 수 있다. 비수성 용매의 예들로서는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브오일, 또는 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레산염이 있다. 수성 비이클은 물, 알코올/물 용액과, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다.

[0258] 본원에 기술된 바와 같은 약학 조성물은 유리하게 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 비이클을 포함한다. 예를 들어 약학적 용도와 양립 가능하고, 당 업자에게 공지된 염수 용액, 생리 용액, 등장 용액, 완충 용액 등이 예시될 수 있다. 조성물은 분산제, 가용화제, 안정화제, 보존제 등으로부터 선택되는 제제 또는 비이클 하나 이상을 함유할 수 있다. (액체이고/액체이거나 주사 가능하고/주사 가능하거나/고체인) 제형에 사용될 수 있는 제제 또는 비이클로서는, 구체적으로 메틸셀룰로스, 하이드록시메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 폴리솔베이트 80, 만니톨, 젤라틴, 락토스, 식물성 오일, 아카시아 등이 있다. 조성물은 주사 가능한 현탁액, 젤, 오일, 정제, 좌제, 분말, 경질 젤라틴 캡슐, 연질 캡슐 등의 형태로서 제형화될 수 있다.

[0259] 특정의 측면에 따르면, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제 및 항 AMHRII 항체를 포함하되, 단 환자에게 투여되는 항체의 치료적 유효량이 약 0.07 mg 내지 약 35000 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 7000 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 1400 mg, 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 700 mg, 그리고 더욱 바람직하게 약 0.7 mg 내지 약 70 mg 범위인 약학 조성물에 관한 것이다.

[0260] 활성 성분의 투여량은, 구체적으로 투여 방법에 따라 달라지고, 이는 당 업자에 의해 용이하게 결정된다. 항체의 치료적 유효량(단위 용량)은, 수주 또는 수개월 동안 매주 1회 이상 투여될 때, 0.01 mg/kg 내지 500 mg/kg, 바람직하게 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg, 바람직하게 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 바람직하게 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg, 바람직하게 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 더욱 바람직하게 1 mg/kg 내지 10 mg/kg으로 다양할 수 있다. 그러므로 유효 단위 용량은 체중 70 kg인 환자를 "평균"으로 잡아 산정된 용량으로부터 용이하게 유추될 수 있다.

[0261] 다른 특정 측면에 따르면, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제와 항 AMHRII 항체를 포함하고, 환자에게 투여되는 항암제의 치료적 유효량이 약 10 mg 내지 약 700 mg의 범위, 바람직하게 약 20 mg 내지 약 350 mg의 범위, 바람직하게 약 110 mg인 약학 조성물에 관한 것이다.

[0262] 항암제의 투여량은, 구체적으로 투여 방법에 따라 달라지며, 당 업자에 의해 용이하게 결정된다. 치료적 유

효량(단위 용량)은 수주 또는 수개월 동안 매주 1회 이상 투여될 때, 0.2 mg/m^2 내지 10 g/m^2, 바람직하게 0.2 mg/m^2 내지 1 g/m^2, 바람직하게 2 mg/m^2 내지 1 g/m^2, 바람직하게 20 mg/m^2 내지 1 g/m^2, 더욱 바람직하게 20 mg/m^2 내지 0.5 g/m^2로 다양할 수 있다. 그러므로 유효 단위 용량은 체표면적이 약 1.8 m^2인 환자를 "평균"으로 잡아 산정된 용량으로부터 유추될 수 있다.

[0263] 더욱더 특정의 측면에 따르면, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 비이클과 함께, 활성 성분으로서 항암제와 항 AMHRII 항체를 포함하고, 환자에게 투여되는 항암제의 치료적 유효량이 약 110 mg이며, 환자에게 투여되는 항체의 치료적 유효량이 약 70 mg인 약학 조성물에 관한 것이다.

[0264] 본 발명은 또한 AMHRII 발현 폐암을 예방 또는 치료함에 있어서 의약 제품으로서 사용하기 위한, 항암제 및 인간 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체(AMHR-II)에 결합하는 항 AMHRII 항체를 포함하는 조성물을 기술하고 있다.

[0265] 본 발명은 이하 실시예들에 의해 추가로 기술되지만, 어떠한 방식으로든 이 실시예들에 한정되지 않는다.

[0266] **실시예**

[0267] **실시예 1: 차등적 AMHRII 유전자 발현 및 AMHRII 단백질 발현**

[0268] **A. 재료 및 방법**

[0269] A.1. 세포주 및 배양액

[0270] COV434 WT 세포주(ECACC 번호 07071909)를, 10% FBS, 페니실린 100 U/ml 및 스트렙토마이신 100 μg/ml를 보충한 DMEM/GlutaMax(Gibco)에 유지시켰다. 제네티신(Gibco) 400 μg/ml를 COV434 MISRII 형질감염 세포주에 첨가하였다. 적백혈병 K562 세포주(ATCC® CCL-243™)를 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신을 보충한 IMDM 배지(Sigma-Aldrich)에서 현탁액으로 배양하였으며, 이를 밀도 1 x 10^5 내지 1 x 10^6 개 세포/ml가 되도록 T75 플라스크 내에 유지시켰다. OV90 세포주(ATCC® CRL-11732™, 난소 장액성 선암종)를, 중탄산나트륨을 최종 농도 1.5 g/l만큼 함유하는 MCDB 105 배지(Sigma-Aldrich) 와, 중탄산나트륨을 최종 농도 2.2 g/l만큼 함유하고, 15% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 199 배지(Sigma-Aldrich)의 1:1 혼합물에서 배양하였다. NCI-H295R 세포주(부신피질 암종, ATCC® CRL-2128™)를, iTS†Premix(Corning), 2.5% Nu-혈청(Falcon) 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM:F12 배지(Sigma-Aldrich) 중에 유지시켰다. 세포를 37℃에서 8% CO2 함유 가습 대기 중에 생육시켰으며, 이때 세포주에 따라서 배지를 1주일에 1회 또는 2회 교체하였다.

[0271] A.2. RT-qPCR에 의한 AMHR2 mRNA의 상대적 정량

[0272] ***RNA 추출.*** 제조자의 지침에 따라서 Trizol® Plus RNA 정제 키트(Ambion)를 사용하여 1 ~ 5 x 10^6개 세포 펠릿으로부터 총 RNA를 제조하였다. 요약하면, 페놀/클로로포름 추출 후 용해된 세포의 RNA를 실리카 매트릭스 상에 흡착시키고, 이를 대상으로 DNAse로 처리한 다음, 세척하고 나서, RNAse 불포함 수 30 μl와 함께 용리하였다. 분광분석계(NanoDrop, ThermoFisher Scientific)로 RNA 농도와 품질을 평가하였다.

[0273] ***cDNA 합성.*** Maxima H Minus First Strand cDNA 합성 키트(Ambion)와 올리고-dT 프라이머를 사용하여, 25℃에서 10분 동안 항온처리하고(프라이밍(priming)), 50℃에서 15분 동안 항온처리(역전사)한 다음, 85℃에서 5분 동안 항온처리(역전사효소 비활성화)하여 RNA(1 μg)를 역전사시켰다.

[0274] ***정량적 PCR.*** Light Cycler 480(Roche)의 96웰 미세평판에서 Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix(Ambion)(최종 부피 20 μl)를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 하기 프라이머들을 사용하였다: AMHR2용, 정 프라이머 5'-TCTGGATGGCACTGGTGCTG-3'(서열 번호 71) 및 역 프라이머 5'- AGCAGGGCCAAGATGATGCT-3'(서열 번호 72), TBP용, 정 프라이머 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'(서열 번호 73) 및 역 프라이머 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'(서열 번호 74). cDNA 주형(100 ng 상당 RNA)을 사용하고 하기 프로토콜에 따라 증폭을 수행하였다: UDG 전처리(50℃ 및 2분), 변성(95℃ 및 10분) → (95℃, 15초/60℃, 30초/70℃, 30초) 40회 순환. 게놈 DNA와 이량체 프라이머의 부재를 제어하기 위해 각각의 실험 막바지에 용융 곡선 분석을 수행하였다. 각각의 cDNA 시료와 대조군("주형 불포함 시료" 및 "역전사체 RNA 불포함")을 2회씩 검정하였다.

역치 순환(Ct) 평균 값을 산정하였고, AMHR2의 상대적 양(RQ)을 $2^{-\Delta\Delta ct}$[식 중 $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{시료}-\Delta Ct_{교정인자}$이고, $\Delta Ct = Ct_{AMHR2}-Ct_{TBP}$임]로 표현하였다. HCT116 시료를 교정인자로 사용하였고, TBP를 정규화를 위한 세포유지

유전자(housekeeping gene)로 사용하였다.

[0275] 이하 표 2는, 전술한 Q-PCR 방법을 이용하여 검정한 세포주에서의 AMHRII 발현 수준을 제시하고 있다.

표 2

[0276]

세포주	평균 Ct amhr2	평균 Ct TBP	RQ
HCT116	34.27	22.25	1
COV434 WT	31.34	22.82	11.3
K562	25.31	21.36	268.7
NCI-H295R	26.16	22.83	413.0
OV90	25.65	22.67	526.4

[0277] A.3. 유세포분석에 의한 막 AMHR2 발현 평가

[0278] 형광 활성화 세포 분취(FACS) 분석을 위해, 4 x 10^5개 세포를 25 μg/ml의 3C23K와 함께 4℃에서 30분 동안 항온처리하였다. PBS-BSA 2%로 세척한 후, 형광단에 컨주게이트화된 항 종 2차 항체에 의해 1차 항체를 검출하였다. 피코에리트린(1:1000, Beckman-Coulter, IM0550)에 컨주게이트화된 항 인간 $F(ab')_2$에 의해 3C23K를 검출하였다. 이를 PBS로 세척한 다음, 재현탁한 세포의 FACS 분석을 BD Accuri™ C6 유세포분석기(BD Bioscience)의 FL2 채널 내에서 실현하였다.

[0279] **B. 결과**

[0280] 결과를 도 2에 도시하였다. 결과는, 비록 재조합 COV434-WT 세포주는 유의미한 인간 AMHRII 단백질 막 발현 수준을 보였지만, 이 세포주 COV434-WT의 AMHRII 유전자 발현 수준은 세포주 NCI-H295R에 대해 측정된 AMHRII 유전자 발현 수준의 약 3%였음을 보여주었다.

[0281] 이러한 결과는, AMHRII 유전자 발현과 막 AMHRII 단백질 발현 간의 상관성이 정확히 없음을 보여주었다.

[0282] **실시예 2: 폐암(인간 종양 시료)에 있어서의 AMHRII 발현**

[0283] **A. 재료 및 방법**

[0284] A.1.목적

[0285] 바이오틴화된 3C23K 모노클로날 항체를 사용하여 항 뮐러 호르몬 제2형 수용체(AMHR2) 발현을 검출하기 위한, 마우스 내 인간 암세포 이종이식편(PDX)에 관한 면역조직화학적 연구.

[0286] A.2. 프로토콜 및 방법

[0287] - 세포주: 셀블록을 포함하는 포름알데히드 아세트산 알코올(AFA)에 고정.

[0288] - 인간 종양: 외부 시료용으로는 포르말린 중에 고정하고, Curie Institute 슬라이드용으로는 AFA 중에 고정.

[0289] - 면역조직화학(IHC) 기술은 시료를 탈랍한 후, pH9에서 언마스킹(unmasking)(90℃에서 극초단파 EZ 리트리버, 15초→ 20초 동안 냉각)한 다음에 수행 가능하였다.

[0290] - 면역과산화효소 기술 및 DAB 발색 기질 규명에 의해 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체 검출.

[0291] - 내인성 과산화효소 활성 차단 후, 희석된 바이오틴화 1차 항체(1/800, 8 μg/mL)와 함께 슬라이드를 실온에서 90분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 조직 절편을 PBS로 세척한 다음, 아비딘/바이오틴 ABC[벡터] 복합체와 함께 30분 동안 항온처리하였다. DAB 기질 용액을 사용하여 면역반응 신호를 검출하였다(DAB+ 기질 완충제/액체 DAB+ 발색체, 10분간 항온처리). 마지막으로 절편을 메이어 헤마톡실린으로 가볍게 대비염색하였다(Lillie's Modification).

[0292] - 면역조직화학적 염색 절차에서 1차 항체를, 이소타입 대조군 면역글로불린(R565) 또는 단독의 항체 희석물(음성 완충제 대조군)과 치환하여 음성 대조군을 수득하였다.

[0293] - AMHR2 형질감염 COV434 세포와 인간 과립막 종양 시료를 사용하여 양성 대조군을 수득하였다.

[0294] - 가공 후, Philips IMS로 디지털화하여 절편을 관찰하였다. 2명의 임상병리의에 의해 표본 모두에 독립적으로 스코어를 매겼다.

[0295] - 표지의 세포질 및/또는 막에의 편재화를 상세히 기술하였다.

[0296] - 하기 스코어 체계에 따라 종양 세포막 및/또는 세포질의 뚜렷한 표지화 양상(갈색)으로 세기를 분류하였다: COV434 양성 대조군에 보인 바와 같이, 표지의 세기는, 음성일 경우 0, 약할 경우 1, 중간일 경우 2, 그리고 강할 경우 3으로 정의하였다.

[0297] - 빈도는 세포가 AMHRII를 발현하는 퍼센트로서 정의하였다. 세포괴사 구역은 분석에서 배제하였다. 전반적인 조직학적 스코어(Global Histological score)는 막 발현 및 세포질 발현을 누적시키는 "빈도 x 세기 스코어(0 내지 3)의 평균"을 사용하여 정립하였다.

[0298] - 모든 슬라이드를 적절한 절차에 따라 보관하였다.

[0299] **B. 결과**

[0300] 인간의 다양한 원발성 폐암세포에 의한 AMHRII 막 발현 결과도 또한 표 3에 제시하였는데, 여기서 AMHRII 발현 스코어를 변별적 폐암 시료들의 패널에 대해 나타내었다.

표 3

인간 폐암 조직 시료에 의한 AMHRII 발현

[0301]

종양의 유형	양성 시료의 퍼센트	검정된 시료의 수
SCLC	0%	2
NSCLC (신경내분비)	1.2%	78
NSCLC (소포형)	0%	2
NSCLC (표피양)	100%	4
NSCLC (편평 세포 암종)	35%	14
NSCLC (선암종)	45.8%	24
NSCLC (대세포)	33%	9

[0302] 결과는, AMHRII가 다수의 인간 폐암 시료, 특히 NSCLC 유래 종양 시료, 더욱 정확히는 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 편평 세포 암종 NSCLC 및 신경내분비 NSCLC로 이루어진 군에서 선택되는 NSCLC 발병 환자 기원의 종양 시료에 있어 세포 표면에 발현되었음을 보여주었다.

[0303] **실시예 3: 폐암에 있어 AMHRII 발현**

[0304] **A. 재료 및 방법**

[0305] A.1. 목적

[0306] 바이오틴화 3C23K 모노클로날 항체를 사용하여 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체(AMHR2) 발현을 검출하기 위해, 환자 유래 이종이식편(PDX) 또는 새로 공급된 인간 종양 시료 중 어느 하나로부터 구한 인간 폐암세포 연구를 개시하였다.

[0307] A.2. 유세포분석에 의한 AMHRII 막 발현 분석

[0308] 분석용 세포의 제조

[0309] - 수술 1시간 이내에 조직을 절개한 다음, 1 mm^2의 단편으로 분쇄한 후, 페니실린(10%), 스트렙토마이신(10%) 및 겐타마이신(0.1 mg/mL; Sigma-Aldrich)을 함유하는 RPMI로 세척하였다.

[0310] - 조직 단편을 37℃에서 빠르게 진탕하며 콜라게나아제와 DNAse(2 mg/mL; Sigma-Aldrich)로 2 ~ 4시간 동안 분해하였다.

[0311] - 40^{-1}m 세포 스트레이너를 통한 여과에 의해 점액질과 큰 조각들을 제거하였다.

[0312] - 생존하는 세포를 Ficoll 구배 원심분리에 의해 수득하였다.

[0313] 제조자의 지침에 따라, 재현탁한 종양 세포상 AMHRII 결합 부위의 정량을 QuantumTM Simply Cellular(Bangs Laboratory)를 사용하여 수행하였다.

[0314] - 요약하면, 인간 IgG 항체의 Fc부에 특이적인 마우스 항인간 IgG 의 상이한 교정량만큼으로 표지화한 마이크로비드 무리 4개를 AlexaFluor488 컨주게이트화 항 AMHRII 3C23K로 염색하였다. FACS 튜브에서는 키트 내 각각의 바이알 내용물 한 방울씩을 PBS 1X 50 µl에 첨가하였다:

[0315] 1- 비드 B(블랭크)

[0316] 2- 비드 1 + 3C23K-AF 10µg/mL

[0317] 3- 비드 2 + 3C23K-AF 10µg/mL

[0318] 4- 비드 3 + 3C23K-AF 10µg/mL

[0319] 5- 비드 4 + 3C23K-AF 10µg/mL

[0320] (농도는 필요에 따라서 25 µg/ml로 증가시킬 수 있음)

[0321] - 각각의 비드 무리는 다양한 양의 AlexaFluor488 컨주게이트화 항 AMHRII 3C23K와 결합하였으며, 이에 따라서 대응하는 형광 세기를 보였는데, 이를 FACS Canto II 세포계측기(BD) 상에서 분석하였다.

[0322] - 각각의 비드 무리에 대한 평균 형광 세기 대 이 무리에 할당된 항체 결합 능(Antibody Binding Capacity; ABC)을 플롯화하여 교정 곡선을 작성하였다.

[0323] 세포는, 일반적으로 1.5 ml들이 에펜도르프 튜브 내에서 염색하였다.

[0324] - 모든 원심분리 단계를 4℃에서 진행하였다.

[0325] - 항체의 내부화를 막기 위하여 모든 항온처리 단계는 4℃에서 진행하였다.

[0326] - 3백5십만개 세포(트립신처리한 COV434-MISRII 또는 새로이 분리한 종양 세포)를 200g ~ 300g에서 5분 동안 원심분리한 다음, PBS(튜브당 500 µl)로 1회 세척하였다.

[0327] - 얼음 냉각 PBS/2% FBS로 세척한 다음(200g ~ 300g에서 3분), PBS 1X 700 µl중에 재현탁하고 나서, 이하 표 4에 제시한 조건에 대해 FACS 튜브에 100 µl씩 분배하였다.

표 4

COV434-MISRII	새 종양 세포
항체 부재	
R565-AF (이소타입 대조군) 10 μg/mL	
3C23K-AF 1 ng/mL	
3C23K-AF 10 ng/mL	
3C23K-AF 100 ng/mL	
3C23K-AF 1 μg/mL	
3C23K-AF 10 μg/mL (필요에 따라 25 μg/ml 이하)	

[0328]

[0329] - PBS/1% FBS 중에서 항체 3C23K-AF488과 함께 30분 동안 4℃에서 항온처리하였다.

[0330] - PBS/2%BSA 중에서 2회 세척하였다(200g ~ 300g, 3분).

[0331] - PBS 중에서 2회 세척하였다(200g ~ 300g, 3분).

[0332] - PBS 300 μl ~ 400 μl를 첨가한 다음, 가능한한 빨리 FACS로 분석하였다.

[0333] 이 프로토콜에는, 막의 일체성을 유지시키기 위해 세포외 염색을 위한 그 어떠한 고정 단계도 포함시키지 않았다. 결과적으로 오로지 막 AMHRII만이 검출되었다.

[0334] A.3. 면역조직화학: 프로토콜 및 방법

[0335] - 세포주: 셀블록을 포함하는 포름알데히드 아세트산 알코올(AFA)에 고정.

[0336] - 인간 종양: 외부 시료용으로는 포르말린 중에 고정하고, Curie Institute 슬라이드용으로는 AFA 중에 고정.

[0337] - 면역조직화학(IHC) 기술은 시료를 탈랍한 후, pH9에서 언마스킹(90℃에서 극초단파 EZ 리트리버, 15분→ 20분 동안 냉각)한 다음에 수행 가능하였다.

[0338] - 면역과산화효소 기술 및 DAB 발색 기질 규명에 의해 항 뮐러 호르몬 제II형 수용체 검출.

[0339] - 내인성 과산화효소 활성 차단 후, 희석된 바이오틴화 1차 항체(1/800, 8 μg/mL)와 함께 슬라이드를 실온에서 90분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 조직 절편을 PBS로 세척한 다음, 아비딘/바이오틴 ABC[벡터] 복합체와 함께 30분 동안 항온처리하였다. DAB 기질 용액을 사용하여 면역반응 신호를 검출하였다(DAB+ 기질 완충제/액체 DAB+ 발색체, 10분간 항온처리). 마지막으로 절편을 메이어 헤마톡실린으로 가볍게 대비염색하였다(Lillie's Modification).

[0340] - 면역조직화학적 염색 절차에서 1차 항체를, 이소타입 대조군 면역글로불린(R565) 또는 단독의 항체 희석물(음성 완충제 대조군)과 치환하여 음성 대조군을 수득하였다.

[0341] - AMHR2 형질감염 COV434 세포와 인간 과립막 종양 시료를 사용하여 양성 대조군을 수득하였다.

[0342] - 가공 후, Philips IMS로 디지털화하여 절편을 관찰하였다. 2명의 임상병리의에 의해 표본 모두에 독립적으로 스코어를 매겼다.

[0343] - 표지의 세포질 및/또는 막에의 편재화를 상세히 기술하였다.

[0344] - 하기 스코어 체계에 따라 종양 세포막 및/또는 세포질의 뚜렷한 표지화 양상(갈색)으로 세기를 분류하였다: COV434 양성 대조군에 보인 바와 같이, 표지의 세기는, 음성일 경우 0, 약할 경우 1, 중간일 경우 2, 그리고 강

할 경우 3으로 정의하였다.

[0345] - 빈도는 세포가 AMHRII를 발현하는 퍼센트로서 정의하였다. 세포괴사 구역은 분석에서 배제하였다. 전반적인 조직화학적 스코어는 막 발현 및 세포질 발현을 누적하는 "빈도 x 세기 스코어(0 내지 3)의 평균"을 사용하여 정립하였다.

[0346] - 모든 슬라이드를 적절한 절차에 따라 보관하였다.

[0347] **B. 결과**

[0348] a) 대조군

[0349] - 음성 대조군과 이소타입 대조군은 종양 세포에 대해 반응을 보이지 않았다.

[0350] - 양성 대조군 시료(증폭된 COV434 AMHRII)는, 확산되는 양상의 세포 면역염색을 보였다(세기 스코어: 3). 표지화는 세포질 및 막 편재화와 함께 균일하게 이루어졌다(빈도 스코어: 100%).

[0351] - 양성 과립막 대조군 시료에서는 종양 세포의 강력한 면역염색이 보였다(세기 스코어: 3). 표지화는 세포질 및 막 편재화와 함께 균일하게 이루어졌다(빈도 스코어: 100%).

[0352] a) IHC에 의해 평가된 바와 같은 환자 유래 이종이식편(PDX) 시료의 AMHRII 발현.

[0353] 시료가 포르말린 중에 고정될 때 AMHR2의 막 발현은, AFA 중에서 처리된 시료에서의 AMHR2 막 발현에 비하여 저평가되는 것으로 보임을 인지하는 것은 중요하다.

[0354] 다양한 인간 종양 이종이식편에 의한 마우스 내 AMHRII의 막 발현 결과를 표 5에 제시하였는데, 여기서 AMHRII 발현 스코어를 변별적 암세포 유형의 패널에 대해 나타내었다.

[0355] 인간 종양 이종이식편에 의한 AMHRII의 발현에 관한 결과들의 일부를 이하 표 5에 요약하였다.

표 5

인간 종양 이종이식편에서의 AMHRII 발현

[0356]

종양의 유형	양성 PDX의 퍼센트	검정된 PDX의 수
SCLC	0%	13
NSCLC (명시되지 않은 하위유형)	15.4%	13
NSCLC (표피양)	26.9%	26
NSCLC (선암종)	7.7%	39
NSCLC (대세포)	40%	10

[0357] 결과는, AMHRII가 다수의 인간 폐암 이종이식편, 특히 NSCLC 유래 종양 시료, 더욱 정확히는 표피양 NSCLC, 선암종 NSCLC, 대세포 NSCLC 및 아직 확인되지 않은 하위 유형의 NSCLC 몇가지로 이루어진 군에서 선택되는 NSCLC 발병 환자 기원 종양 시료의 세포 표면에 발현되었음을 보여주었다.

[0358] c) 유세포분석(FACS)에 의해 평가된 바와 같은, 환자 유래 이종이식편(PDX)의 AMHRII 발현

[0359] 도 3a ~ 도 3e에 도시한 결과들은, 고려되는 폐암의 종류와 상관없이, 폐암 환자 유래 이종이식편으로부터 기원하는 종양 세포의 막에 AMHRII가 발현됨을 보여주고 있다. 도 3a ~ 도 3e에 도시한 결과들은, AMHRII의 막 단백질 발현이 편평 세포 폐암종(도 3a, 도 3c, 도 3d), 대세포 폐암종(도 3b) 및 다형성 세포 폐암종(도 3e)에서 발견됨을 보여주고 있다.

[0360] 또한, 동일한 폐암세포들에 대해서 (i) 세포당 AMHRII의 수뿐만 아니라, (ii) 동일한 검정 시료 중 AMHRII 암세

포 퍼센트를 측정하였다. 결과를 이하 표 6에 제시하였다.

표 6

환자 유래 이종이식편으로부터 수득한 인간 폐암 세포 내 AMHRII 발현의

FACS 분석

조직학적 유형	참조 번호	세포당 AMHRII 수용체 수	AMHRII 양성 세포 퍼센트 (%)	양성/음성
편평 세포 암종	Lu7860	519.000	100	+
대세포 암종	Lu7166	51.000	70	+
편평 세포 암종	Lu7298	150.000	87	+
편평 세포 암종	Lu7414	61.000	63	+
다형성 세포 암종	Lu7558	46.000	35	+

[0361]

[0362] 표 6에는, (i) 종양 세포막에 존재하는 AMHRII 단백질의 평균 수를 확정하고, (ii) 종양 시료 중 막 AMHRII 양성 세포 퍼센트 확정에 의해 각각의 종양 시료 중 AMHRII 발현이 평가되어 있다. 대응하는 종양 시료가 "양성" 또는 "음성"으로 설정되었는지 여부에 대한 표시는 표 6의 좌측 컬럼에 제시하였다. "양성" 표시는 폐암 환자의 종양 세포가 자체의 막에 AMHRII를 유의미하게 발현하였음을 의미한다. "음성" 표시는 종양 세포막에 AMHRII가 유의미하게 검출되지 않았음을 의미한다.

[0363] 표 6의 결과들은, 모든 종양 시료가 막 AMHRII를 (비록 발현 수준은 다양할지라도) 발현하였음을 보여주었다.

[0364] d) 유세포분석(FACS)에 의해 평가되는 바와 같은, 새 인간 종양 시료의 AMHRII 발현

[0365] 도 3f 및 도 3g에 도시한 결과들은, 수술로 절제한 인간 NSCLC로부터 기원하는 종양 세포의 막에 AMHRII가 발현되었던 반면(도 3g), 동일 환자로부터 구한 멀쩡한 주변부로부터 기원하는 세포의 막에는 AMHRII가 발현되지 않았음(도 3f)을 보여주고 있다.

[0366] e) 결론

[0367] AMHR2 전사에 대해 양성인 폐암 PDX 모델에서 AMHR2 단백질이 발현되었음이 확인되었다. 폐암으로부터 이러한 PDX(IC8LC10 및 SC131)를 조정시켰다. 발현 수준은 중간 정도였지만 유의미하였고, 전체 스코어 1 내지 1.5를 특징으로 하였다. 이러한 데이터는, 부인과 암 이외의 암은 AMHR2를 발현할 수 있었음을 암시한다.

[0368] 이러한 모델은 추후의 항 AMHR2 요법을 특성규명하기 위해 사용될 수 있었다.

[0369] **실시예 4: AMHRII 발현 폐암에 대한 항 AMHRII 항체의 생체 내 효능**

[0370] 1. 목적의 개요

[0371] 단일 제제로 사용되거나, 또는 도세탁셀과 함께, 또는 시스플라틴/겜시타빈의 조합과 함께 사용되는 Gamamab사의 검정 화합물 GM102(본원에서는 3C23K 항체라고도 칭하여짐)의 SC131에서의 항종양 효능을 분석하기 위해, 면역결핍 암컷 마우스를 이용하여 환자 유래 비소세포 폐 이종이식편 모델을 개발하였다.

[0372] 2. 방법

[0373] 평균 종양 부피 및 종양 부피 중앙값이 각각 130.76 mm^3 및 126.00 mm^3에 도달하였을 때, SC131 종양(P22.1.3/0)이 피하에서 성장하고 있는(62.5 mm^3 내지 220.5 mm^3) 마우스 54마리(54)를 대상으로 치료를 진행하였다.

[0374] 효능 연구 XTS-1526는 6개의 군(군당 마우스 9마리)을 대상으로 진행하였다.

[0375] - 제1군에는 비이클 5 ml/kg을 i.v. 투여하였고(2qwk x 3);

[0376] - 제2군에는 GM102 20 mg/kg을 i.v. 투여하였으며(2qwk x 3);

[0377] - 제3군에는 D0에 도세탁셀 20 mg/kg을 천천히 1회 i.v. 투여하였고;

[0378] - 제4군에는 D0에 도세탁셀 20 mg/kg을 천천히 1회 i.v. 투여함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 i.v. 투여하였으며(2qwk x 1 또는 2);

[0379] - 제5군에는 겜시타빈 100 mg/kg과 시스플라틴 5 mg/kg 두 약물 다 i.p. 투여하였다(qwk x 2 또는 3).

[0380] - 제6군에는 시스플라틴 5 mg/kg과 겜시타빈 100 mg/kg 두 약물 다 i.p. 투여(qwk x 2 또는 3))함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 i.v. 투여하였다(2qwk x 1 또는 2).

[0381] 여기에 포함되지 못한 효능 연구용 마우스 8마리씩을 포함하는 군 2개도 검정하였다:

[0382] - 제7군에는 시스플라틴 5 mg/kg을 i.p. 투여(qwk x 3)함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 i.v. 투여하였고(2qwk x 3);

[0383] - 제8군에는 겜시타빈 100 mg/kg을 i.p. 투여(qwk x 3)함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 i.v. 투여하였다(2qwk x 3).

[0384] 실험이 진행되는 기간 동안 1주일에 3회씩 마우스 무게와 종양의 크기를 측정하였다. 군당 3마리씩의 마우스로부터 새 종양 시료를 수집하되, 단 D28(2번 및 3번 마우스 포함) 또는 D31(1번 마우스 포함)에는 스냅 동결(snap freezing)한 조직과 포르말린 고정 시료에 대해서 추가의 투여를 진행하지 않았다. 스냅 동결 조직만을 대상으로 추후 분석을 진행하였다. 포르말린 고정 시료는 시료채취 후 폐기하였다.

[0385] 3. 연구의 목표

[0386] 본 보고서에 기술된 실험은 단독으로 사용되거나, 도세탁셀 또는 시스플라틴/겜시타빈 조합과 함께 사용될 때의 Gamamabs사 검정 화합물 하나(코드번호 GM102)의, 환자 유래 비소세포 폐 이종이식편 SC131 모델에서의 항종양 효능을 확정하는 것을 목표로 한다.

[0387] *검정 품목: GM102(본원에서는 3C23K라 칭하여지기도 함)*

[0388] 항 AMHR2 제품인 GM102는, 대안적으로 뮐러 억제 물질 수용체 II(MISRII)라고도 공지되어 있는, 항 뮐러 호르몬 수용체(AMHR2)에 대해 유도된 인간화 mAb이다. AMHR2는 여성 성기 내(뮐러관) 전구체 수준으로 자궁 내 주기 동안에 제시되는 호르몬으로서, 성년기 난소(과립막 세포)에 국한되어 생성되고, 고환(라이디히 세포)에도 국한되어 생성된다. AMHR2는 또한 부인과 암, 예컨대 난소암 및 자궁내막암의 약 65%에서 발현된다(Bakkum JN, Gynecol Oncol, 2007; Sahli I, Biochem, 2004; Anttonen M, Lab Invest, 2011; Song JY, Int J. Oncol, 2009).

[0389] GM102 항체는 AMHR2-형질감염 인간 종양 세포주를 사용하는 마우스 이종이식편 모델에서 항종양 효능을 나타내는 것으로 보였다. 이 효능은 항체가 종양 수준에서 최적화될 수 있음으로 말미암아 촉발되는 면역 효과기 세포의 포획에 달려있는 것으로 기록되었다. 더욱이 GM102 효능은, 난소암에 사용되는 주요 화학요법제인 카보플라틴 및 파클리탁셀과 함께 작용할 때 상승하는 것으로 보였다(Jacquet A., Cancer Res, 2012).

[0390] *인간 종양 이종이식편 모델*

[0391] 암센터에서 치료받는 환자들의 서면동의를 받아 이러한 환자들로부터 다양한 조직학적 기원을 가지는 인간 종양 시료를 수득하고, 이를 면역결핍 마우스에 이식가능한 이종이식편으로서 확립하였다. 조직이식된 시료는 치료 전 또는 치료 후에 원발성 종양 또는 전이로부터 얻은 잔여 재료이다. 이와 같은 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델을 선행 시험관 내 배양을 거치지 않고 확립하였으며, 조직학, 세포유전학, 유전학 및 기타 생물학적 마커에 대해서, 그리고 이 모델의 표준 치료제(Standard Of Care; SOC) 요법에 대한 반응에 대해서 연구를 수행

하였다.

[0392] EGFR(R451F) 및 Kras(G12V)가 돌연변이되었고, TP53 및 PTEN은 야생형인 비소세포 폐암의 피부 전이로부터 SC131 종양 모델을 구하였다.

[0393] SC131은 도세탁셀과, 시스플라틴/겜시타빈의 조합에 대한 저 반응개체이자, 검정된 다른 제제에 대한 무 반응개체이기도 하였다(스위스 누드 마우스에서 수득한 데이터).

[0394] SC131 종양 모델은, 종양의 최대 부피가 60 mm^3 내지 200 mm^3 범위에 이를 때까지는 이식일로부터 약 17일 소요되었고, 그 부피가 2000 mm^3에 이를 때까지는 이식일로부터 35일 내지 40일 소요되었다.

[0395] SC131은 악액질 특성을 보였다.

[0396] 4. 재료

[0397] *4.1 동물 및 유지 조건*

[0398] 무게가 18 그램 ~ 25 그램인 이계교배 무흉선(*nu/nu*) 암컷 마우스(<< HSD : 무흉선 누드-Foxn1^{nu} >>)(ENVIGO, Gannat, France)를 할당한 다음, 조작 전 적어도 6일 동안 먹이와 물이 자유급식으로 공급되는 동물 시설에 넣고 이 시설에 적응시켰다(표 7).

표 7

동물의 특징

[0399]

종	마우스 종	공급처	성별	무게	입수당시 나이
마우스 (무스 무스쿨루스)	무흉선 누드- Foxn1^{nu}	ENVIGO, France	암컷	18-25	5 주령

[0400] *4.2 동물 복지에 대한 진술*

[0401] 프랑스 페쉐에 소재하는 농업부의"수의학적 의료 서비스 지침(The Direction des Services Veterinaires)"에 따라 CERFE 시설에서의 동물 사용에 대한 인가를 얻었다(승인 번호B-91-228-107). 동물 관리 및 수용은 실험동물 보호 관련 프랑스 규제법에 따라서 이루어졌다.

[0402] 모든 실험은 실험동물 보호 관련 프랑스 규제법과, 현재 유효한 척추동물 실험에 관한 허가(프랑스 농림수산부에 의해 기욤 랑에게 2012년 4월 15일자로 부여됨, 허가번호: A-75-19; 유효기간: 5년)에 따라서 수행하였다.

[0403] *4.3. 동물 관리*

[0404] 마우스를, 적응 기간 동안에는 최대 동물수 7마리로 구성한 군에 수용하였고, 실험기간 동안에는 최대 동물수 6마리로 구성한 군에 수용하였다. 폴리설폰(PSU) 플라스틱으로 이루어져 있으며, 멸균 및 방진 베딩캅(bedding cob)이 장착된 개별 환기 케이지(IVC)(mm 213 W x 362 D x 185 H, Allentown, USA) 내부에 마우스를 넣었다. 먹이와 물은 멸균하였다. 동물을 명-암 주기(인공 광에 의한 14시간의 생물학적 주기) 하에 두어 수용하였고, 실내 온도와 습도를 제어하였다.

[0405] 요청에 따라, 환경 조건을 모니터링하였고, 데이터를 동물 수용 중앙 기록관(Central Animal House Archives)에 남겼다.

[0406] *4.4 먹이 및 물 공급*

[0407] 음용수를 자유급수 방식으로 제공하였다. 연구 기간 내내 각각의 마우스에게 펠릿형 완전 먹이(150-SP-25 타입, SAFE)를 매일 공급하였다. 동물 먹이와 물에 관한 분석 증명서를 CERFE 구내에 남겼다.

[0408] *4.5 동물의 식별*

[0409] 매 실험에 들어가기 전 모든 동물의 무게를 측정하여, 귀에 구멍을 뚫어 고유의 번호매김 체계 패턴에 따라 동물들을 식별하였다.

[0410] 각각의 케이지도 케이지 번호, 마우스 종 및 개체수, 종양 코드, 실험일이 적힌 종이 태그로 식별하였다.

[0411] *4.6. 검정 화합물 및 제형*

[0412] PBS 10X(Sigma PBS 10X, # P5493-1L, 회분번호: SLBJ2848)를 멸균 탈이온수에 1/10으로 희석시켜 PBS 1X 비이클을 제조하였다. 처리용 분액과 GM102 희석액을 4℃에 30일 동안 보관하여 두었다.

[0413] GM102(3C23K) 농축분액(회분번호: LP01[R18H2-LP01])을 2016년 7월 7일에 받아서(5 ml들이 바이알 4개, 10.1 mg/ml) 4℃에 보관하였다. 매 투여일마다 원액을 냉각 PBS 1X에 희석하여 2 mg/ml의 실험 용액을 만들었다. 이 용액을 얼음에 두거나 4℃로 유지시켜 처리시까지 차광하여 두었으며, 이후 주사가 이루어지는 동안에는 바이알을 실온에 놓아두었다. 처리 후 남은 실험 용액은 폐기하였다.

[0414] 매 투여 전에 10 mg/ml의 도세탁셀(탁소텔®, Sanofi, 회분번호: 6F255A - Exp: 03-2018) 원액을 0.9% NaCl로 1/5 희석하여 실험 농도가 2 mg/ml가 되도록 만들어야 했다. 이 원액은 4℃에서 재구성한 후에도 1개월 동안 안정적이었으며, 이를 차광하여 두었다.

[0415] 0.5 mg/ml의 시스플라틴(시스플라틴-테바, 회분번호: 15A30MF - Exp: 01-2017) 원액을 사용할 준비를 마쳤다. 이 용액을 실온에 놓아두고, 공급자가 정한 유효기간이 만료될 때까지 차광하여 두었다.

[0416] 매 투여 전에 40 mg/ml의 겜시타빈(겜자®, Lilly, 회분번호: C442937D, exp: 02-2018) 원액을 0.9% NaCl로 1/4 희석하여 실험 농도가 10 mg/ml가 되도록 만들어야 했다. 이 원액은 4℃에서 재구성한 후에도 1개월 동안 안정적이었으며, 이를 차광하여 두었다.

[0417] 5. 방법

[0418] *5.1. 종양이식편 모델 유도*

[0419] 동일하게 계대배양한 종양을 3 ~ 24마리의 마우스(공여개체 마우스, (n-1)회차 계대배양)에 피하 이식하였다. 이 종양의 부피가 700 mm^3 내지 2000 mm^3에 이르렀을 때, 공여개체 마우스를 골반 탈구시켜 죽인 다음, 종양을 무균 절개 및 해부하였다. 세포괴사 부위를 제거한 다음, 종양을 부피 약 20 mm^3의 단편으로 잘라, 배양 배지로 옮긴 다음, 조직이식하였다.

[0420] 89마리(89) 마우스를 100 mg/kg 케타민 하이드로클로라이드(회분번호: 5D92 - exp: 03-2017, Virbac) 및 10 mg/kg 자일라진(회분번호: KP0AX9X, Bayer)으로 마취시킨 다음, 피부를 클로르헥시딘 용액으로 살균하고 나서, 견갑골 사이 구간을 절개하여, 20 mm^3의 종양 단편을 피하 조직에 넣었다. 클립으로 피부를 닫았다.

[0421] 동일 실험 대상인 마우스 모두에 대해 같은 날에 이식을 수행하였다.

[0422] *5.2. 처리 단계*

[0423] XTS-1526 효능 부에서, 피하에 SC131 종양(P22.1.3/0)이 62.5 mm^3 내지 220.5 mm^3만큼 자란 마우스 54마리를 종양 부피에 따라 나누고, 각각의 처리 군에 있어서 종양 부피의 평균과 중앙값을 균일하게 만들었다. 처리는 5마리 이하의 마우스를 수용하는 박스에 무작위로 이루어졌으며, 종양 이식후 18일차에 개시하였다(시차를 두고 포함시키면서 60%의 포함률을 달성함). 본 연구는 처음에는 군당 5마리 마우스를 포함시키면서 시작하였고, 이로부터 2일 후에는 군당 4마리 마우스를 포함시켜 시차를 두면서 동물들을 포함시켰다. 본 연구는 처리 개시 31일 후에 종료하였다.

표 8

군	제제	평균(mm^3)	중앙값(mm^3)	SEM
1	비이클	129.28	126	17.80
2	GM102 20 mg/kg	129.83	126	13.13
3	도세탁셀 20 mg/kg	137.28	126	15.38
4	GM102 20 mg/kg 도세탁셀 20 mg/kg	130.33	126	12.15
5	시스플라틴 5 mg/kg 겜시타빈 100 mg/kg	132.67	126	17.50
6	GM102 20 mg/kg 시스플라틴 5 mg/kg 겜시타빈 100 mg/kg	125.17	126	16.53

[0424]

[0425] 추가 군인 제7군과 제8군의 경우, 종양 크기는 더 크고 더 불균일하였다. 이식후 32일차에 동물들을 포함시켰다.

표 9

군	제제	평균(mm^3)	중앙값(mm^3)	SEM
7	GM102 20 mg/kg 시스플라틴 5 mg/kg	310.63	288	57.03
8	GM102 20 mg/kg 겜시타빈 100 mg/kg	315.31	320	53.30

[0426]

[0427] *5.3. 종양 측정 및 동물 관찰*

[0428] 처리기간 중 1주일에 3회씩 캘리퍼로 종양의 지름을 측정하여 종양 부피를 평가하였다. 식 "$TV(mm^3) = [길이(mm) \times 폭(mm)^2]/2$"를 사용하였는데, 여기서 길이와 폭은 각각 종양의 최장 길이와 최단 지름이다.

[0429] 처리기간 중 1주일에 3회씩 모든 동물의 무게를 측정하였다. 상이한 처리마다의 부작용은 다음과 같이 확정하였다:

[0430] - 비체중(RBW)은 체중을 처리 개시시 체중으로 나누어 매 측정에 대해 산정하였다.

[0431] - 개별 체중 손실 퍼센트(BWL%) = "$100 - (BW_x / BW_0 \times 100)$" [식 중, BW_x는 처리 중 임의의 날의 BW이고, BW_0는 처리 1일차의 BW임] .

[0432] 마우스의 신체적 외관, 행동 및 임상 변화를 매일 관찰하였다.

[0433] 임의의 행동 변화나 처리에 대한 반응과 함께 질병의 모든 징후들을 각각의 동물에 대해 기록하였다.

[0434] *5.4. XTS-1526 연구 디자인*

[0435] 표 9에 요약한 바와 같이 총 8개의 군을 사용하였다. 제1군 ~ 제6군의 경우, 처음에는 각각의 군에 9마리 마우스를 포함시켰다. 제7군 및 제8군의 경우, 처음에는 각각의 군에 8마리 마우스를 포함시켰다.

[0436] 제1군에는 비이클 5 ml/kg을 정맥내 경로에 의해 1주일에 2회씩 총 3주 동안 투여하였다.

[0437] 제2군에는 GM102 20 mg/kg을 정맥내 경로에 의해 1주일에 2회씩 총 3주 동안 투여하였다.

[0438] 제3군에는 도세탁셀 20 mg/kg을 D0에 1회 정맥내 경로로 투여하였다.

[0439] 제4군에는 도세탁셀 20 mg/kg을 D0에 정맥내 경로로 1회 투여함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 정맥내 경로에 의해 1주일에 2회씩 총 1주 또는 2주 동안 투여하였다.

[0440] 제5군에는 겜시타빈 100 mg/kg과 함께 시스플라틴 5 mg/kg을 두 약물 다 정맥내 경로에 의해 1주일에 1회씩 총 2주 또는 3주 동안 투여하였다.

[0441] 제6군에는 시스플라틴 5 mg/kg 및 겜시타빈 100 mg/kg을 두 약물 다 복막내 경로로 1주일에 1회 총 1주 또는 2주 동안 투여함과 아울러, GM102 20 mg/kg을 정맥내 경로로 1주일에 2회 총 1주 또는 2주 동안 투여하였다.

[0442] 제7군에는 GM102 20 mg/kg을 정맥내 경로로 1주일에 2회 총 3주 동안, 그리고 시스플라틴 5 mg/kg을 복막내 경로로 1주일에 1회 총 3주 동안 투여하였다.

[0443] 제8군에는 GM102 20 mg/kg을 정맥내 경로로 1주일에 2회 총 3주 동안, 그리고 겜시타빈 100 mg/kg을 복막내 경로로 1주일에 1회 총 3주 동안 투여하였다.

[0444] 모든 처리 용량은 매회 주사시마다 체중에 따라 조정하였다.

표 10

XTS-1526 효능 연구에 있어 용량 및 투여 계획

[0445]

군	개체수	제1 검정 제제				제2 검정 제제				제3 검정 제제			
		제제	용량 mg/kg	경로	계획	제제	용량 mg/kg	경로	계획	제제	용량 mg/kg	경로	계획
1	9	비이클	-	IV	2qwk x 3	-	-	-	-	-	-	-	-
2	9	GM102	20	IV	2qwk x 3	-	-	-	-	-	-	-	-

군	개체수	제1 검정 제제				제2 검정 제제				제3 검정 제제			
3	9	-	-	-	-	도세탁셀	20	서서히 IV	D0	-	-	-	-
4	9	GM102	20	IV	2qwk x1-2	도세탁셀	20	서서히 IV	D0	-	-	-	-
5	9	-	-	-	-	시스플라틴	5	IP	D0, D7 및/또는 D14	겜시타빈	100	IP	D0, D7 및/또는 D14
6	9	GM102	20	IV	2qwk x1-2	시스플라틴	5	IP	D0 및 D7	겜시타빈	100	IP	D0 및 D7
7	8	GM102	20	IV	2qwk x 3	시스플라틴	5	IP	qwk x 3	-	-	-	-
8	8	GM102	20	IV	2qwk x 3	-	-	-	-	겜시타빈	100	IP	qwk x 3

[0446]

[0447] *5.5. 체중 손실 또는 부작용이 발생하였을 경우 수행한 조치들*

[0448] 종양 측정일 및 체중 모니터링일(1주일에 3회)에 만일 임의의 부작용이 관찰되거나, 또는 만일 체중 손실률이 포함일의 체중에 비해 15% 이상으로 관찰되면, 부작용/문제 회복에 최단기 지연이 일어났음을 후원자에게 고지하였다.

[0449] 그 다음, 하기 조치들을 실행하였다:

[0450] - 관련 동물에 대한 처리를 중지하였다가, 체중 손실률이 10% 미만이 되면 처리를 재개함.

[0451] - 체중 손실이 관찰되었던 전체 군에게 DietGel Recovery®를 공급하고, 체중 손실률이 10% 미만이 될 때까지 해당 동물의 무게를 매일 측정함; 만일 체중 손실률이 10% 미만이 되면 DietGel Recovery® 공급을 중지함.

[0452] *5.6 윤리적 살생에 대한 기준*

[0453] 하기 기준들을 기반으로 하여 동물을 죽였다:

[0454] - 처리 첫날의 체중에 비한, 48 연속시간 동안의 체중의 손실률(BWL)이 20% 이상(3회 측정).

[0455] - 행동 또는 임상 징후의 전반적 변화 발생.

[0456] - 종양 부피가 2000 mm^3 이상.

[0457] *5.7. 종료점/연구의 종료*

[0458] 윤리적 살생 기준에 부합하는 마우스만을 적당한 시점에 죽였다.

[0459] 모든 실험 군을 대상으로 한 실험은 실험 종료 기간의 막바지에 마쳤다.

[0460] 실험 종료점은 하기와 같았다:

[0461] - 4주간의 처리기간,

[0462] - 추적 조사 기간이 아닐 때.

[0463] 5.8 혈액, 종양 및 조직 시료채취

[0464] *5.8.1. 종양 시료채취*

[0465] 5.8.1.1. FFPE를 위한 종양 시료채취

[0466] - 종양의 1/2을 FFPE를 위해 처리하였다: 종양을 10% 포르말린에 24시간 동안 고정하고 나서, 70% 에탄올에 옮긴 후, 하기 주소의 Histalim으로 보내 파라핀 매립을 실시하였다(즉 [주 연구로부터 수득한] FFPE 종양 시료 17개).

[0467] 정확한 시료채취 시간과 포르말린 고정 지속기간을 각각의 종양 시료채취에 대해 명시하였다.

[0468] 수정 조항 제5조가 발효되는 동안 후원자는 FFPE 시료들을 폐기하기로 결정하였다.

[0469] 5.8.1.2. 스냅 동결을 위한 종양 시료채취

[0470] - 종양의 1/2을 스냅 동결을 위해 처리하였다: 종양을 크기 3x3x3 mm의 조각으로 절단한 다음, 액체 질소 중에서 스냅 동결한 후, 이를 -80℃로 옮겨 보관하였다(즉 [주 연구로부터 수득한] 스냅 동결 종양 시료 17개 + [관용성 제2군 연구로부터 수득한] 스냅 동결 종양 시료 6개).

[0471] 정확한 시료채취 시간을 각각의 종양 시료채취에 대해 명시하였다.

[0472] *5.9. 데이터 분석*

[0473] *5.9.1. 데이터 가공*

[0474] 미가공 데이터 모두를 번호가 매겨진 기록물로 정정하여 적당한 형태로 기록하고, 저장하여, 컴퓨터 시스템에 의해 가공하였다.

[0475] 제0일을 처리 첫날로 간주하였다. 이후 이 정의에 따라서 실험일에 번호를 매겼다.

[0476] 기록들을 평균 ± 평균의 표준 오차(m ± sem)로 표현하였다.

[0477] 평균 비체중을 각각의 실험군에서의 시간에 대해 플롯화하여 평균 RBW 곡선을 작성하였다. 통계 분석을 위해 델타 비체중(즉 대조군의 비체중에 비한, 처리군의 비체중)을 사용하였다.

[0478] 평균 체중 손실 퍼센트(BWL%) = "100 - (평균 BWx/평균 BW0x 100)" [단, 식 중 BWx는 처리 중 임의의 날의 평균 BW이고, BW0는 처리 1일차의 평균 BW임].

[0479] 평균 종양 부피(mm^3)를 각각의 실험군에서의 시간에 대해 플롯화하여 종양 성장 곡선을 작성하였다. 통계 분석을 위해 델타 종양 부피(즉 대조군의 상대적 종양 부피에 비한, 처리군의 상대적 종양 부피)를 사용하였다

[0480] 개별 종양 성장 지연(TGD)을, 개별 종양 부피가 처음 종양 부피의 3배 내지 5배에 이르는데 필요한 시간(일)으로서 산정하였다. 군당 성장 지연 중앙값을 산정하여 표에 보고하였다.

[0481] 종양 성장 지연 지수(Tumor Growth Delay Index; TGDI)를, 대조군에서의 성장 지연 중앙값으로 나눈, 치료군에서의 성장 지연 중앙값으로 산정하였다.

[0482] 처리군(T)의 평균 종양 부피와 대조군(C)의 평균 종양 부피 사이의 퍼센트 비(percentage ratio)를 산정하였다.

[0483] 만-휘트니 비모수 비교 검정에 의해 매 측정에 대한 통계 분석을 수행하였다. 각각의 처리군을 대조군과 비교하였다.

[0484] 종양 안정화(TS)는, 적어도 3회의 연속 측정 동안 일정한 종양 크기를 보이는 마우스의 수로서 정의된다.

[0485] 부분 종양 관해(PR)는, 적어도 3회의 연속 측정 동안 처음의 종양 크기보다 더 작은 종양 크기를 보이는 마우스의 수로서 정의된다.

[0486] 완전 종양 관해(CR)는, 적어도 3회의 연속 측정 동안 0 mm^3 내지 13.5 mm^3의 종양 크기를 보이는 마우스의 수로서 정의된다.

[0487] 무 종양 생존개체(Tumor Free Survivor; TFS)는, 군 대상 연구일 종료(Group Day End)시까지 기록된 완전 종양 관해 수로서 정의된다.

[0488] 6. 결과

[0489] *6.1. 관용성 데이터, 임상 관찰*

[0490] 처리기간 중 평균 체중 변화 퍼센트를 도 4에 표시하였다.

[0491] 본 연구에서는 실험기간 동안 마우스의 무게를 1주일에 3회 측정하였다.

[0492] 제1군에서는, 5 ml/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 3)한 비이클이 잘 관용되었지만, 16일차에 종양의 악액질 효과는 최대 평균 체중 손실률 8.3%를 초래하였고, 28일차에는 최대 개별 체중 손실률 17.6%를 초래하였다. 종양의 악액질 효과로 말미암아 다른 부작용은 관찰되지 않았으나, 18, 21, 25 및 26일에는 제2차 포함에 들어간 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였다.

[0493] 제2군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 3)한 GM102가 잘 관용되었고, 14일차에 최대 평균 체중 손실률 9.8%를, 그리고 16일차에는 최대 개별 체중 손실률 16.8%를 초래하였는데, 이는 제1 대조군에서 보이는 바와 같은 종양의 악액질 효과에 대응한다. 종양의 악액질 효과로 말미암아 다른 부작용은 관찰되지 않았고, 11, 16, 18일차와, 21일차로부터 27일차까지는 제2차 포함에 들어간 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였다. 27번 마우스는 그 어떠한 임상 징후도 보이지 않은채 27일차에 폐사한 채로 발견되었다.

[0494] 제3군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(D0에 1회)한 도세탁셀이 16일차에 제1 대조군에서와 비교하였을 때 통계학적으로 유의미한(4일차부터, $p<0.01$) 최대 평균 체중 손실률(17.0%)을, 그리고 19일차에는 최대 개별 체중 손실률(23.8%)을 보였다. 종양의 악액질 효과로 말미암아 다른 부작용은 관찰되지 않았으나, 7일차로부터 27일차까지(제1차 포함에 속한 동물들에 대해서는 31일차까지) 전체 군에 DietGel Recovery®를 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 연구 막바지에 이르기 전 4마리 마우스를 죽여야 했다.

[0495] 제4군에서는, D0에 1회 i.v. 투여한 도세탁셀 20 mg/kg과 함께, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 1 또는 2)한 GM102이 14일차에 제1 대조군에서와 비교하였을 때 통계학적으로 유의미한(4일차부터, $p<0.01$) 최대 평균 체중 손실률(18.1%)을, 그리고 23일차에는 최대 개별 체중 손실률(24.1%)을 보였다. 종양의 악액질 효과로 말미암아 다른 부작용은 관찰되지 않았으나, 4일차와 5일차, 그 다음에는 7일차로부터 27일차까지 전체 군에 DietGel Recovery®를 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 연구 막바지에 이르기 전 5마리 마우스를 죽여야 했다.

[0496] 제5군에서는, 100 mg/kg i.p. 투여(qwk x 2 또는 3)한 겜시타빈과 함께, 5 mg/kg i.p. 투여(qwk x 2 또는 3)한 시스플라틴은 11일차에 제1 대조군에서와 비교하였을 때 통계학적으로 유의미한(2일차부터, $p<0.01$) 최대 평균 체중 손실률(17.5%)을, 그리고 최대 개별 체중 손실률(30.1%)을 보였다. 화합물 조합의 합하여진 독성과, 종양 성장의 악액질 효과로 말미암아, 제2차 포함에 들어간 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였고(2일차 및 3일차), 이후 4일차 및 7일차와, 9일차로부터 27일차까지(제1차 포함에 들어간 동물들에 대해서는 31일차까지)에는 모든 군에게 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 연구 막바지에 이르기 전 4마리 마우스를 죽여야 했으며, 12일차에는 마우스 1마리가 폐사한 채 발견되었다.

[0497] 제6군에서는, 5 mg/kg의 시스플라틴 및 100 mg/kg의 겜시타빈(둘다 i.p. 투여(qwk x 1 또는 2))과 함께, 20 mg/kg i.v. 투여(2qwk x 1 또는 2)한 GM102는 11일차에 제1 대조군에서와 비교하였을 때 통계학적으로 유의미한(2일차부터, $p<0.001$) 최대 평균 체중 손실률(21.1%)을, 그리고 최대 개별 체중 손실률(27.5%)을 보였다. 화합물 조합의 합하여진 독성과, 종양 성장의 악액질 효과로 말미암아, 제2차 포함에 들어간 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였고(2일차 및 3일차), 이후 4일차로부터 27일차까지(제1차 포함에 들어간 동물들에 대해서는 31일차까지)에는 모든 군에게 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 연구 막바지에 이르기 전 7마리 마우스를 죽여야 했다.

[0498] 추가의 제7군에서는, 5 mg/kg i.p. 투여(qwk x 3)한 시스플라틴과 함께, 20 mg/kg, i.v. 투여(2qwk x 3)한 GM102가, 종양의 악액질 효과와 합하여져 18일차에 유의미한 최대 평균 체중 손실률(12.3%)을, 그리고 28일차에는 최대 개별 체중 손실률(28.9%)을 보였다. 화합물 조합의 합하여진 독성과, 종양 성장의 악액질 효과로 말미암아, 9일차와 11일차, 이후 13일차로부터 28일차까지 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 2마리 마우스를 죽여야 했으며, 연구 막바지에 이르기 전 1마리가 폐사한 채 발견되었다. 게다가 8일차로부터 연구 종료일까지에는 8마리 마우스 중 5마리는 표피탈락을 보였고/보였거나 건조한 피부를 보였다.

[0499] 추가의 제8군에서는, 100 mg/kg i.p. 투여(qwk x 3)한 겜시타빈과 함께, 20 mg/kg, i.v. 투여(2qwk x 3)한 GM102가, 종양의 악액질 효과와 합하여져 11일차에 유의미한 최대 평균 체중 손실률(13.4%)을, 그리고 28일차에는 최대 개별 체중 손실률(26.4%)을 보였다. 화합물 조합의 합하여진 독성과, 종양 성장의 악액질 효과로 말미암아, 2일차로부터 4일차까지, 7일차로부터 9일차까지, 11일차 및 12일차, 이후 14일차로부터 28일차까지 동물들에게 DietGel Recovery®를 공급하였다. DietGel을 공급하긴 했지만, 3마리 마우스를 죽여야 했으며, 연구 막바지에 이르기 전 1마리가 폐사한채 발견되었다. 게다가 4일차로부터 연구 종료일까지에는 8마리 마우스 중 6마리는 표피탈락을 보였고/보였거나 건조한 피부를 보였다.

[0500] *6.2. 항종양 효능 데이터*

[0501] 종양 성장 곡선(경시적 평균 종양 부피)을 도 4에 도시하였다. 각각의 처리군에 대한 T/C 퍼센트 값을 표 11에 제시하였고, 도 5와 도 6에 나타냈다. 통계학적 분석 결과를 표 12에 보였다.

[0502] 본 연구에서, 실험기간 동안 1주일에 3회씩 종양을 측정하였다.

[0503] 제2군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 3)한 GM102가 16일차에 그 어떠한 항종양 효능도 보이지 않았다[TGDI = 1.33 및 최고 T/C = 74.68%](대조군 종말).

[0504] 제3군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(D0에 1회)한 도세탁셀이 (제1 대조군에서와 비교하였을 때) 강력하고 통계학적으로 유의미한(D4, $p<0.01$ → D7로부터 D16까지 $p<0.001$, 만-휘트니 검정) 항종양 효능(TGDI>2.71)을, 그리고 16일차에는 최고 T/C(11.00%)를 보였다(대조군 종말). 게다가 처리기간 동안 9마리 중 7마리에서는 일시 종양 안정화가, 그리고 9마리 중 2마리에서는 일시 부분 종양 관해가 관찰되었다.

[0505] 제4군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 1 또는 2)한 GM102가 20 mg/kg으로 i.v. 투여(D0에 1회)한 도세탁셀과 함께 (제1 대조군에서와 비교하였을 때) 강력하고 통계학적으로 유의미한(D4, $p<0.01$ → D7로부터 D14까지 $p<0.001$, 만-휘트니 검정) 항종양 효능(TGDI>2.71)을, 그리고 16일차에는 최고 T/C(11.34%)를 보였다(제4군 종말, n = 6). 게다가 처리기간 동안 9마리 중 6마리에서는 일시 종양 안정화가, 그리고 9마리 중 3마리에서는 일시 부분 종양 관해가 관찰되었다.

[0506] 제5군에서는, 100 mg/kg으로 투여된 겜시타빈과 5 mg/kg으로 투여된 시스플라틴(둘다 i.p. 경로, qwk x 2 또는 3)이 (제1 대조군에서와 비교하였을 때) 통계학적으로 유의미한(D4, $p<0.01$ → D7로부터 D11까지 $p<0.001$, 만-휘트니 검정) 항종양 효능(TGDI=2.30)을, 그리고 16일차에는 최고 T/C(27.16%)를 보였다(제5군 종말, n = 6). 게다가 처리기간 동안 9마리 중 5마리에서는 일시 종양 안정화가 관찰되었다.

[0507] 제6군에서는, 20 mg/kg으로 i.v. 투여(2qwk x 1 또는 2)한 GM102가, 5 mg/kg 시스플라틴과 100 mg/kg 겜시타빈(둘 다 i.p. 경로 투여, qwk x 1 또는 2)과 함께 (제1 대조군에서와 비교하였을 때) 통계학적으로 유의미한(D2, $p<0.05$ → D4로부터 D11까지 $p<0.001$, 만-휘트니 검정) 항종양 효능(TGDI = 1.98)을, 그리고 11일차에는 최고 T/C(33.71%)를 보였다(제6군 종말, n=7). 게다가 처리기간 동안 9마리 중 6마리에서는 일시 종양 안정화가 관찰되었다.

[0508] 추가의 제7군과 제8군에서는, 평균 종양 부피가 등록된 것보다 더 컸기 때문에 제1 대조군과의 비교가 불가하였지만, 처리기간 동안 GM102/시스플라틴의 조합의 경우에는 8마리 중 5마리, 그리고 GM102/겜시타빈의 조합의 경우에는 8마리 중 6마리에서와 같이 몇몇 동물에서 일시적 종양 안정화가 관찰되었다.

[0509] 7. 결론

[0510] *결과 및 검토*

[0511] SC131 종양 모델의 악액질 효과는 예상한 바보다 더 컸고, 비이클 처리군과 GM102 처리군 둘 다에서 유사한 무게 손실을 초래하였다. 결국, 단독으로 사용한 GM102가 더 잘 관용되었다고 간주할 수 있다.

[0512] 다른 한편, 4개의 다른 군에서 관찰된 독성은 부분적으로 표준 치료제인 도세탁셀, 시스플라틴 및 겜시타빈에 기인한 것으로서, 이는 각 군의 마우스 거의 절반의 폐사를 초래하였다.

[0513] 단독 사용한 GM102 항체는 통계학적 유의성에 이르지는 못하는 25%의 종양 성장 억제 효과를 초래하였던 반면에, 표준 치료제 군은 종양 성장의 강력한 억제를 보였다. 이 모델은 자체의 막 AMHRII 발현(IHC 에 의해 1+로 스코어가 매겨짐)을 기반으로 처음으로 선택된 것이었기 때문에 이러한 결과는 놀라웠다. 그러나 막 AMHRII 발현이 이 연구와 병행하여 SC131 PDX 종양을 대상으로 평가되었을 때, 막 AMHRII 발현은 소수 회차

의 계대배양을 거친 후 감소하였음에 주목하였다(0.2+로 스코어가 매겨짐; 양성 세포 40%가 0.5%에서 스코어가 매겨짐). 이 데이터는, AMHRII 발현이 임의의 시험관 내 모델과 생체 내 모델에서는 불안정하고, 막 발현은 AMHRII 항종양 효능에 중요함을 확인시켜주었다.

[0514] GM102와 이들 표준 치료제들이 합하여졌을 때에는 동일한 이유로 항종양 활성의 상승효과가 관찰되지 않았다.

[0515] **실시예 5: AMHRII 발현 폐암에 대한 항 AMHRII 항체의 생체 내 효능**

[0516] **A. 재료 및 방법**

[0517] A.1. 면역조직화학에 의한 AMHRII 막 발현

[0518] 그러므로 Alexa Fluor® 488에 컨주게이트화된 항 AMHRII 3C23K 항체를 사용하는 간접적 면역형광법이 개발되었다. 그 다음 Alexa Fluor® 647에 컨주게이트화된 염소 항토끼 항체와 토끼 항 AF488 항체를 사용하여 2단계로 신호 증폭을 수행하였다.

[0519] -20℃로 유지시킨 저온유지장치 Leica CMD1950으로 동결 조직 절편을 제조하였다. 동결 조직을 OCT 화합물과 함께 금속재 원반 위에 올려놓은 다음, 이 조직이 고화되면 이 원반을 원반 홀더 위에 올려놓았다. 7 μm 절편을 만들고 나서, 이를 Superfrost Plus 슬라이드(Menzel Glaser) 위에 올려놓은 직후 -20℃에 보관하였다.

[0520] 동결 절편 슬라이드를 PBS 1X로 재수화한 다음, 이 슬라이드를 냉각 아세톤(VWR Prolabo) 300 μl로 덮어 10분 동안 -20℃에 고정시킨 후, 이를 파라필름으로 다시 덮어 모든 조직이 완전히 용액으로 다시 덮어지도록 보장하였다. 슬라이드를 PBS로 헹구고 나서, 가습 상자 안에서 차단 완충제(PBS1X-BSA2%-염소 혈청 10%-Triton X100 0.1%) 300 μl로 1시간 동안 RT에서 처리하여, 항체와 조직 구성성분 간의 비특이적 상호작용을 차단하였다. 3C23K-AF488 또는 이소타입 대조군인 R565-AF488(차단 완충제 중 10 μg/ml으로 희석)을 RT인 가습 상자 내에 30분 동안 방치하였다. PBS1X-Triton X100 0.1%로 3회 세척(3 x 10분)한 다음, 차단 완충제 중 1/500으로 희석한 항체인 항 AF488 (Invitrogen)(300 μl)을 30분 동안의 항온처리(RT)를 위해 첨가하였다. PBS1X-Triton X100 0.1%으로 3회 세척한 후(3 x 10분), 컨주게이트화된 항 토끼 항체 AF647(Invitrogen)(차단 완충제 중 1/500으로 희석)(300 μl)을 30분 동안의 항온처리(RT)를 위해 첨가하였다 PBS1X-Triton X100 0.1%로 3회 세척하고 나서(3 x 10분), 여기에 DAPI(Sigma-Aldrich) 0.5 μg/ml를 10분 동안 가하였다. 슬라이드 절편을 PBS와 H_2O로 헹군 다음, 이 위에 커버슬립(24 x 50mm, Knittel Glass)을 덮었는데, 이때 여기에 DAKO 형광 봉입제 한 방울(50 μl)을 떨어뜨려서 기포가 생기는 것을 막았으며, 영상화를 수행할 때까지 4℃ 암실에 보관하였다.

[0521] Metavue 소프트웨어(Molecular Devices)에 의해 제어되는 CoolSnap EZ CCD 카메라가 장착된 형광현미경 Leica DM5000B를 사용하여 영상 획득을 수행하였다. ImageJ 무료 소프트웨어(http://imagej.nih.gov/ij/)를 사용하여 영상 사후 처리를 수행하였다.

[0522] A.2. 인간 폐종양 이종이식편

[0523] 누드 마우스에서 연속 계대배양한 이종이식편으로부터 종양 단편을 수득하였다. 공여개체 마우스로부터 종양을 분리해낸 다음, 이를 단편(모서리 길이 3 mm ~ 4 mm으로 자른 다음, 10% 페니실린/스트렙토마이신 함유 PBS 중에 넣었다. 수용개체 동물에게 이소플루란을 흡입하게 하여 마취시키고, 옆구리에 일방향 또는 이방향으로 종양 이식물을 피하 주입하였다.

[0524] LXFE2226 편평 비소세포 폐암 모델 종양 이종이식편을 마우스(Charles River의 NMRI-*Foxn1*^{nu}) 1마리당 종양 1개씩 피하 이식하였다. 실험은, 마우스군 2개로 이루어졌는데, 15일차에는 이들 마우스 중 3마리를 안락사시켜 유세포분석법에 의해 막 AMHRII 발현이 일어났는지 검출하였다. 제1군은 비이클 대조군이었고, 제2군은 연구대상인 항체 GM102 투여군이었는데, 이때 항체 GM102는 20 mg/kg의 용량 수준으로 매주 2회씩 복막 내(i.p.) 투여하였다.

[0525] 최적의 효능이 달성된 날에 군의 상대적 종양 부피(RTV) 중앙값을 비교함으로써 최소 T/C 값으로 항종양 효능을 평가하였다. 2주간의 비투여 관찰 기간을 두고 나서 43일차에 실험을 종료하였다.

연구 디자인:

군 ID	요법	1 일 총 용량 [mg/kg/day]	계획 [투약일]	투여 경로	동물의 수
1	PBS (대조군 비이클)	10 ml/kg	BIW*4	i.p.	13#
2	GM102	20	BIW*4 (h:0)	i.p.	14#

[0526]

[0527] **B. 결과**

[0528] B. 폐암에 대한 GM102 항 AMHRII 항체의 생체 내 활성

[0529] 종양 성장 곡선(경시적 평균 종양 부피)을 도 7에 도시하였다. 실험기간 동안 매주 3회씩 종양을 측정하였다.

[0530] 도 7 및 도 8에 도시한 결과들은, 항 AMHRII 항체 GM102가 처리된 이종이식 동물 모두에서 강력한 항종양 활성이 보였음을 보여주는 것이다.

[0531] 28일차 종양 성장 측정치는, 항 AMHRII 항체 GM102가 종양 부피의 급진적 감소($p<0.001$)를 유발하였음을 보여주는데, 이는 항 AMHRII 항체가 (i) 종양 성장을 막았고, (ii) 처음에 종양 이종이식편에 함유되었던 종양 세포의 용해를 효율적으로 유도하였음을 의미한다.

[0532] 그러므로 실시예 5의 결과는 항 AMHRII 항체가, AMHRII 암호화 유전자의 발현 수준과는 관계없이, 자체의 막에 AMHRII 단백질을 실제로 발현하는 폐암세포에 대해 매우 효율적인 항종양 효과를 발휘함을 보여주었다.

표 11

GM102가 단독으로 투여되거나, 표준 치료제와 함께 투여되었을 때 SC131 이종이식편에서의 항종양 활성(효능 연구 XTS-1526)

군	약물 (1)	용량 (mg/kg)	경로	투약계획	약물 (2)	용량 (mg/kg)	경로	투약계획	약물 (3)	용량 (mg/kg)	경로	투약계획	D0에서의 평균 종양 부피 (mm3)	TGD 종양값 x 5 (일)	TGDI	16일차의 T/C %	최고 T/C %	연구 일차	TS	PR	CR	TFS	마우스 수
G1	비이클	-	IV	2qwkx3									129.3	10.32	/	/	/	/	0	0	0	0	9
G2	GM102	20	IV	2qwkx3									129.8	13.70	1.33	74.68%	74.68%	D 16	0	0	0	0	9
G3					도세탁셀	20	느린IV	D0					137.3	>28	>2.71	11.00%	11.00%	D 16	7	2	0	0	9
G4	GM102	20	IV	2qwkx1-2	도세탁셀	20	느린IV	D0					130.3	>28	>2.71	11.34%	11.34%	D 16	6	3	0	0	9
G5					시스플라틴	5	IP	qwkx2-3	겜시타빈	100	IP	qwkx2-3	132.7	23.74	2.30	27.19%	27.19%	D 16	5	0	0	0	9
G6	GM102	20	IV	2qwkx1-2	시스플라틴	5	IP	qwkx1-2	겜시타빈	100	IP	qwkx1-2	125.2	20.41	1.98	/	33.71%	D 11	4	0	0	0	9

XenTech T/C = 처리된 마우스의 평균 종양 부피/대조군 마우스의 평균 종양 부피 x100 (대조군에서 첫 번째 윤리적 살생 시에 산정) **TGD** (종양 성장 지연) = 종양 부피 중앙값이 D0 종양 부피에 이르는데 필요한 시간 x5 ; **TGDI** (종양 성장 지연 지수) = 처리 마우스의 TGD / 대조군 마우스의 TGD; **TS** (종양 안정화) = 적어도 3 연속 측정 동안 일정한 종양 크기를 보이는 마우스의 수 ; **PR** (부분 관해) = 적어도 3 연속 측정 동안 처음 종양 크기보다 더 작은 종양 크기를 보이는 마우스의 수 ; **CR** (완전 관해) = 적어도 3 연속 측정 동안 0 내지 13 mm^3의 종양 크기를 보이는 마우스의 수 ; **TFS** (무 종양 생존개체) = 이식 후 18일차에 처리를 시작하여 군 대상 연구일 종료시까지 기록된 완전 관해 수.

[0533]

표 12

SC131 종양 모델에 있어서 종양 부피에 대한 만-휘트니 분석 개요(효능 연구 XTS-1526)

만-휘트니 검정		투약일	0	2	4	7	9	11	14	16
비이클 - 2qwkx3	vs GM102 20 2qwkx3		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
비이클 - 2qwkx3	vs 도세탁셀 20 D0		ns	ns	**	***	***	***	***	***
비이클 - 2qwkx3	vs GM102 20 2qwkx1-2 도세탁셀 20 D0		ns	ns	**	***	***	***	***	
비이클 - 2qwkx3	vs 시스플라틴 5 qwkx2-3 겜시타빈 100 qwkx2-3		ns	ns	**	***	***	***		
비이클 - 2qwkx3	vs GM102 20 2qwkx1-2 시스플라틴 5 qwkx1-2 겜시타빈 100 qwkx1-2		ns	*	***	***	***	***		

군들의 비교는 처리군과 대조군 간 만-휘트니 비모수 검정을 이용하여 수행함.: **ns** = 유의미하지 않음, * = P < 0.05, ** = P < 0.01, 그리고 *** = P < 0.001. 초기 군 크기: 9마리 동물

[0534]

도면

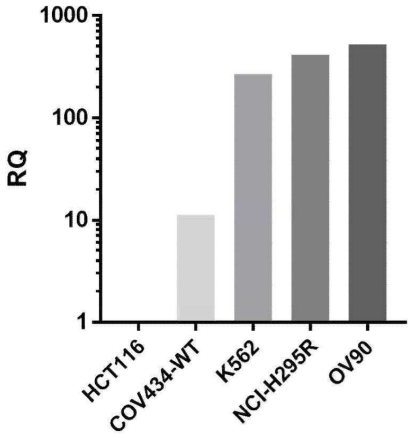
도면1a

VH 도메인 FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4
서열번호
19 3C23K QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
20 3C23KR QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
21 5B42 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
22 K4D24 RVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
23 K4D20 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSNHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
24 K4A12 QVRLVQSGAEVKKPGTSVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
25 K5D05 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
26 K5D14 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
27 K4D123 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQSLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
28 K4D127 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTTTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
29 5C14 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTFTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
30 5C26 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RMTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
31 5C27 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRPEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
32 5C60 QVRLVQSGAKVRKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPEDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
33 6C13 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
34 6C18 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GDRF--AY WGQGTLVTVSS
35 6C54 QVRLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYHIH WVRQAPGQRLEWMG WIYPGDDSTKYSQKFQG RVTITRDTSASTAYMELSSLRPEDTAVYYCTR GDRF--AY WGQGTLVTVSS

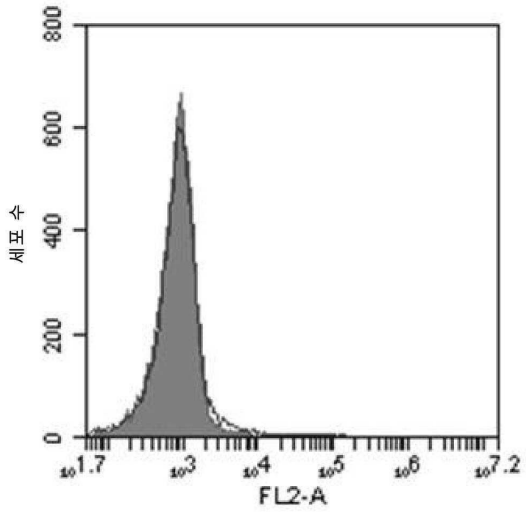
도면1b

VL 도메인 서열 번호		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
36	3C23K	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
37	3C23	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSL**E**S	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
38	6B78	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLL**I**Y	**S**TSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
39	5B42	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLL**I**Y	PTSSL**E**S	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
40	6C59	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RAS**PP**-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
41	6C07	DIQ**L**TQSPSTLSASVGDRV**A**ITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
42	5C10	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RAS**P**S-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
43	6C54	DIQ**L**TQSP**P**TLSASVGDRVTITC	RASSS-V**W**YIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
44	K4D25	DIQ**L**TQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
45	K4A03	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRY**T**A	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
46	K4A08	DIQ**L**TQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQ**E**PGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
47	K5D26	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTI**P**C	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
48	5C08	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VR**D**IA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
49	5C18	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WY**H**QKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
50	5C42	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	F**S**GGTKVEIK
51	5C44	DIQMTQSPSTL**P**ASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
52	5C52	DIQMTQSPSTLSASVGDR**A**TITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
53	5C56	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEF**A**LTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
54	6C03	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-V**W**YIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
55	6C05	DIQ**L**TQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQ**M**PGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
56	6C16	D**N**QMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
57	6C17	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFS**C**SGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQ**C**SSYPWT	FGGGTKVEIK
58	6C28	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-V**G**YIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
59	725C02	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLT**F**SSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
60	725C17	D**T**QMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
61	725C21	D**T**QMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPG**R**APKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
62	725C33	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLT**H**	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
63	725C42	DIQ**L**TQSPSTLSASVGDRV**S**ITC	RASSS-VRYIA	WYQQ**E**PGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK
64	725C57	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASSS-VRYIA	WYQQKPGKAPKLLTY	PTSSLKS	GVPSRFSGSGSG**P**EFTLTISSLQPDDFATYYC	LQWSSYPWT	FGGGTKVEIK

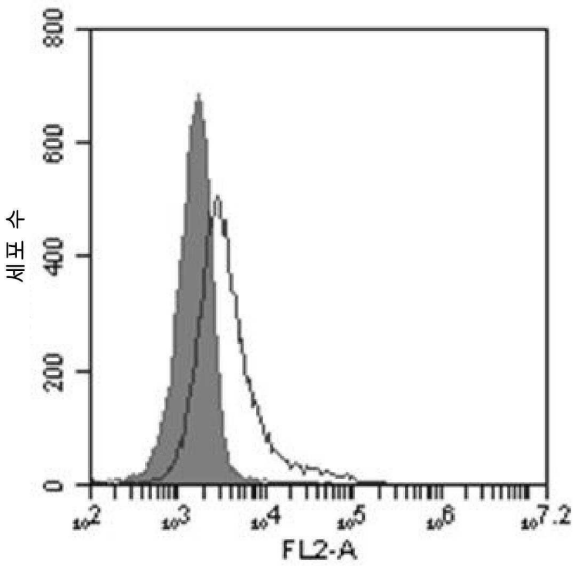
도면2a



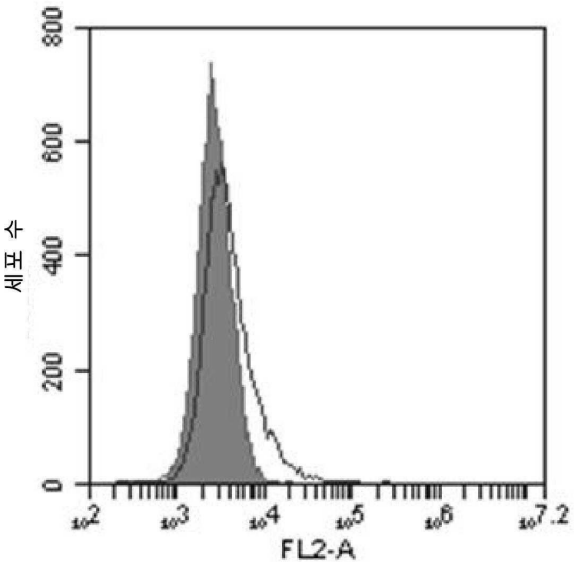
도면2b



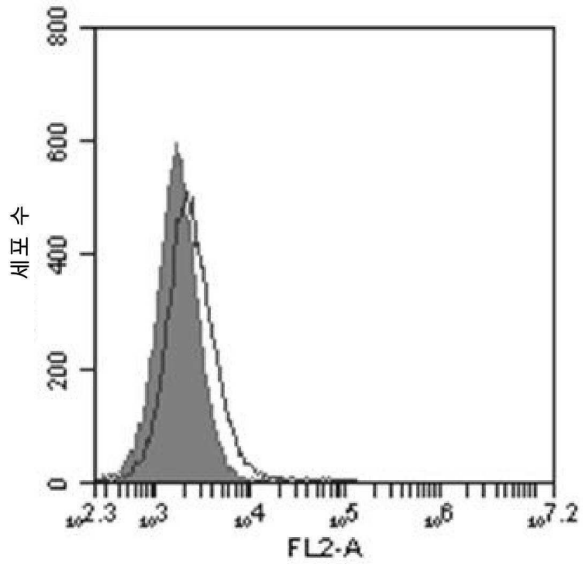
도면2c



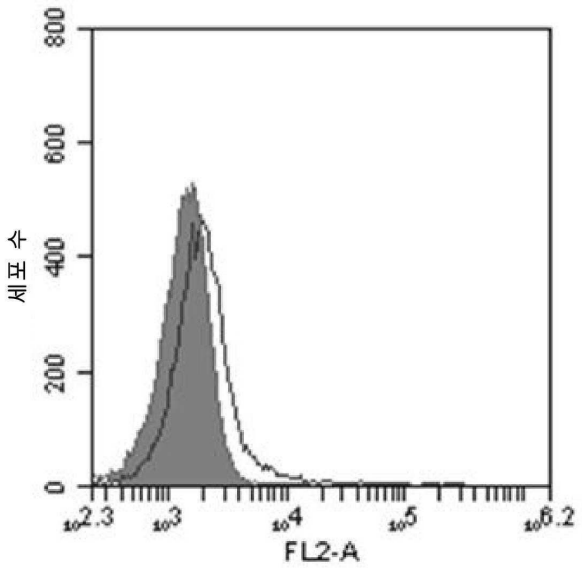
도면2d


800
600
400
200
0
세포 수
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7.2
FL2-A

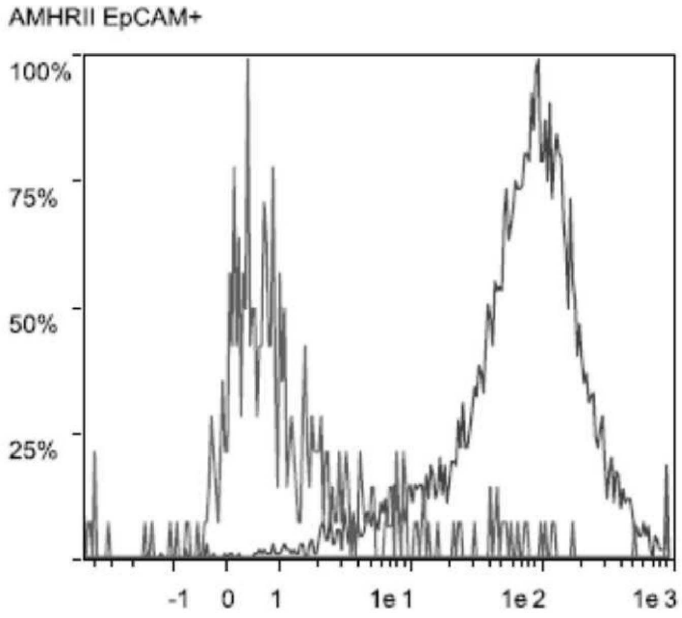
도면2e


800
600
400
200
0
세포 수
10^2.3
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7.2
FL2-A

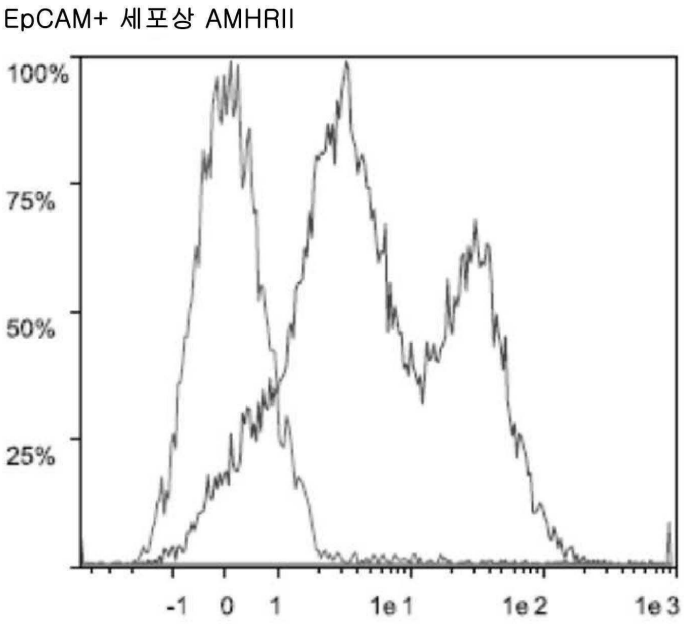
도면2f


800
600
400
200
0
세포 수
10^2.3
10^3
10^4
10^5
10^6.2
FL2-A

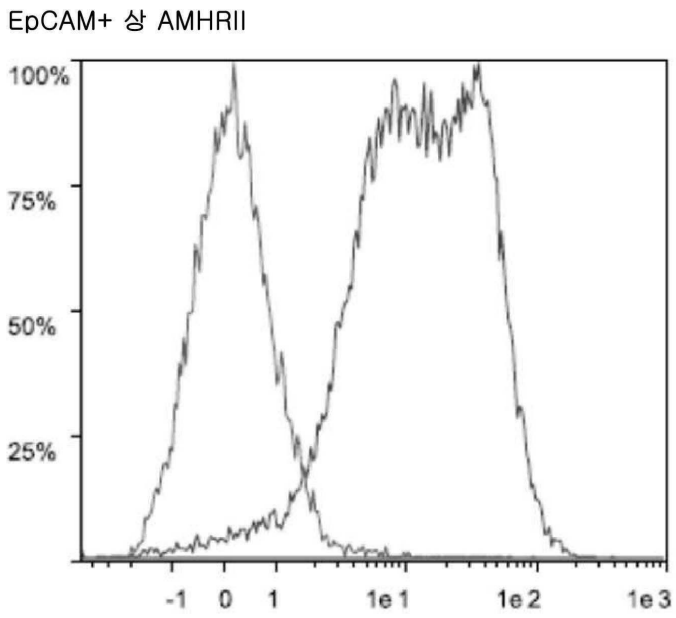
도면3a


AMHRII EpCAM+
100%
75%
50%
25%
-1
0
1
1e 1
1e 2
1e 3

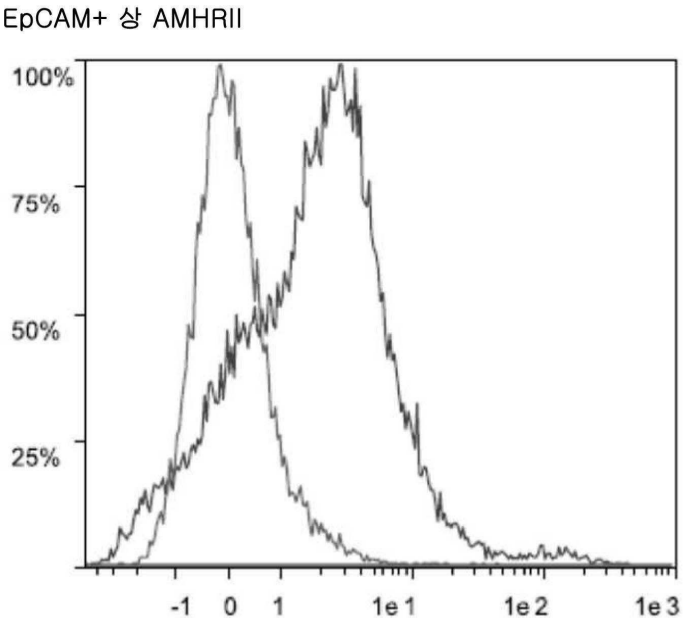
도면3b


EpCAM+ 세포상 AMHRII
100%
75%
50%
25%
-1
0
1
1e1
1e2
1e3

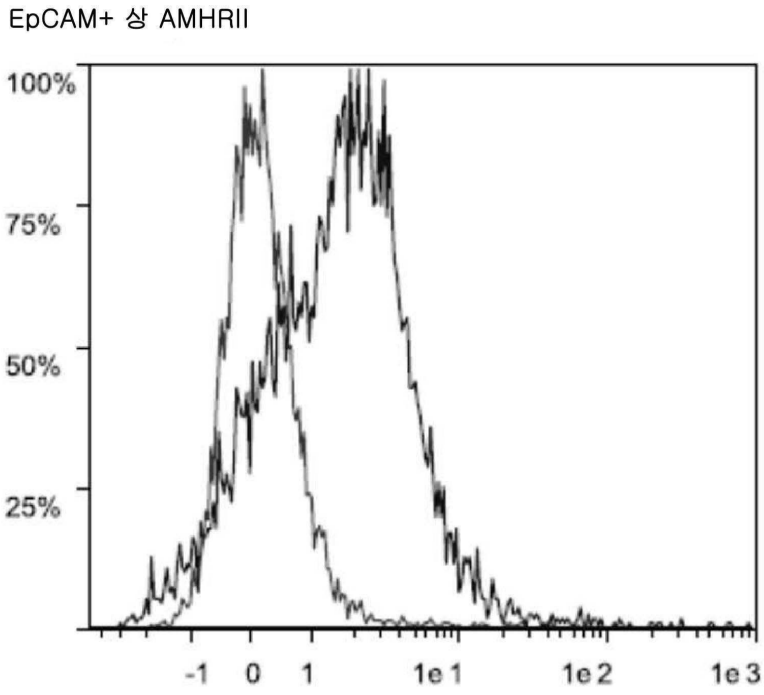
도면3c


EpCAM+ 상 AMHRII
100%
75%
50%
25%
-1
0
1
1e1
1e2
1e3

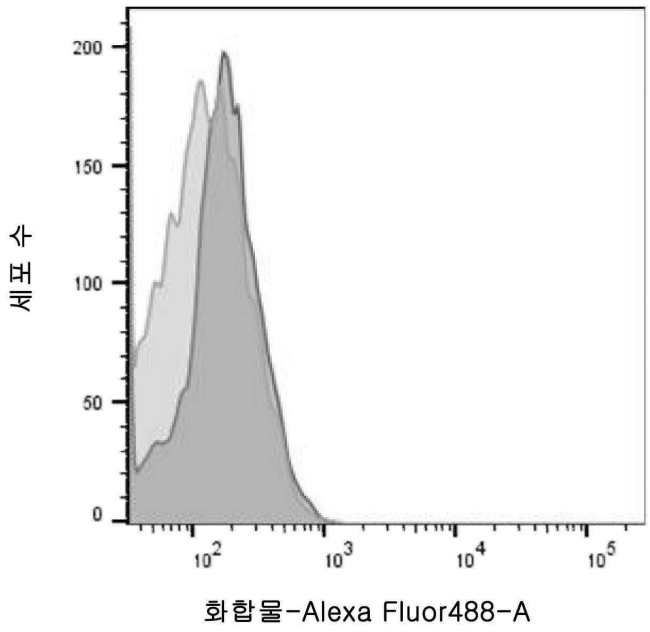
도면3d


EpCAM+ 상 AMHRII
100%
75%
50%
25%
-1
0
1
1e1
1e2
1e3

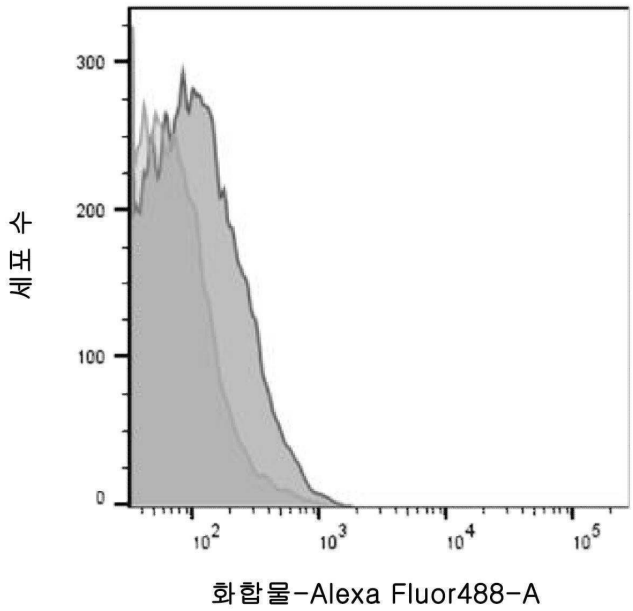
도면3e


EpCAM+ 상 AMHRII
100%
75%
50%
25%
-1
0
1
1e1
1e2
1e3

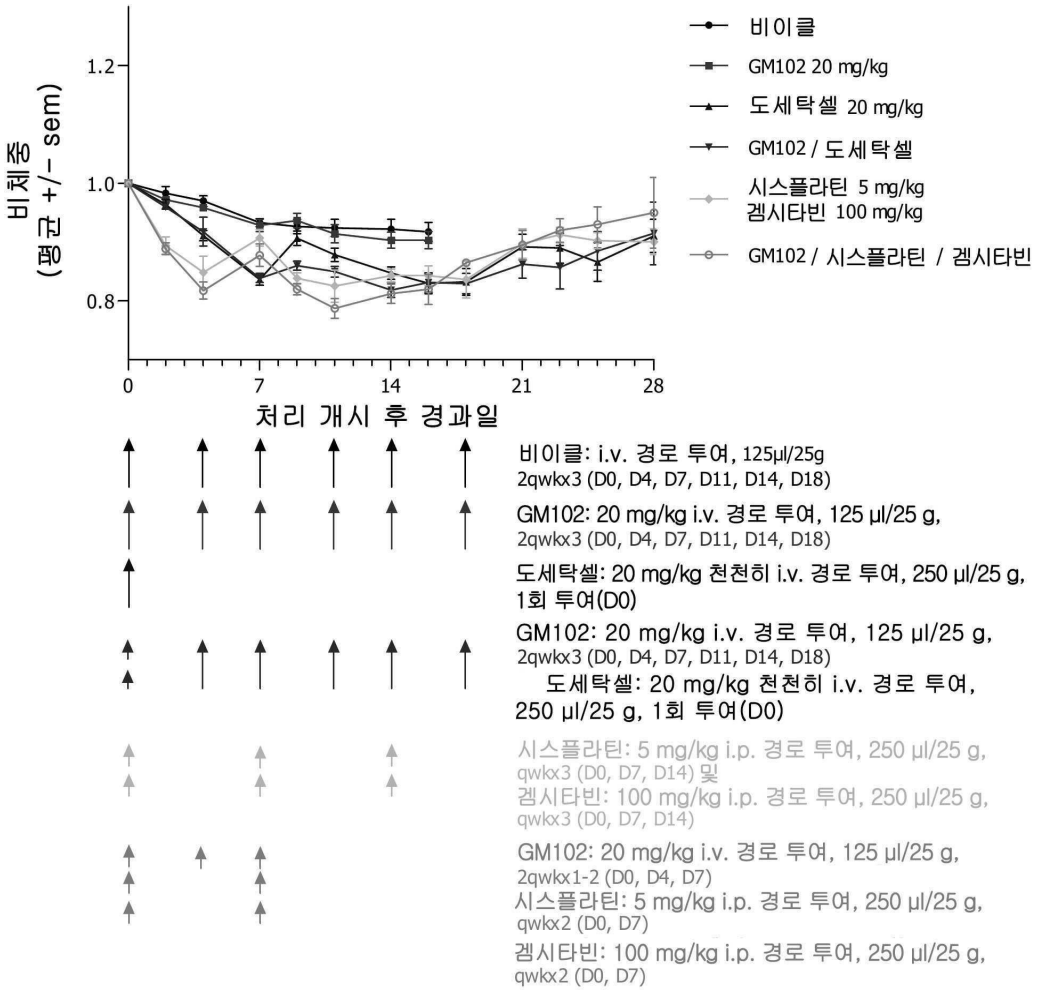
도면3f


200
150
100
50
0
세포 수
10^2
10^3
10^4
10^5
화합물-Alexa Fluor488-A

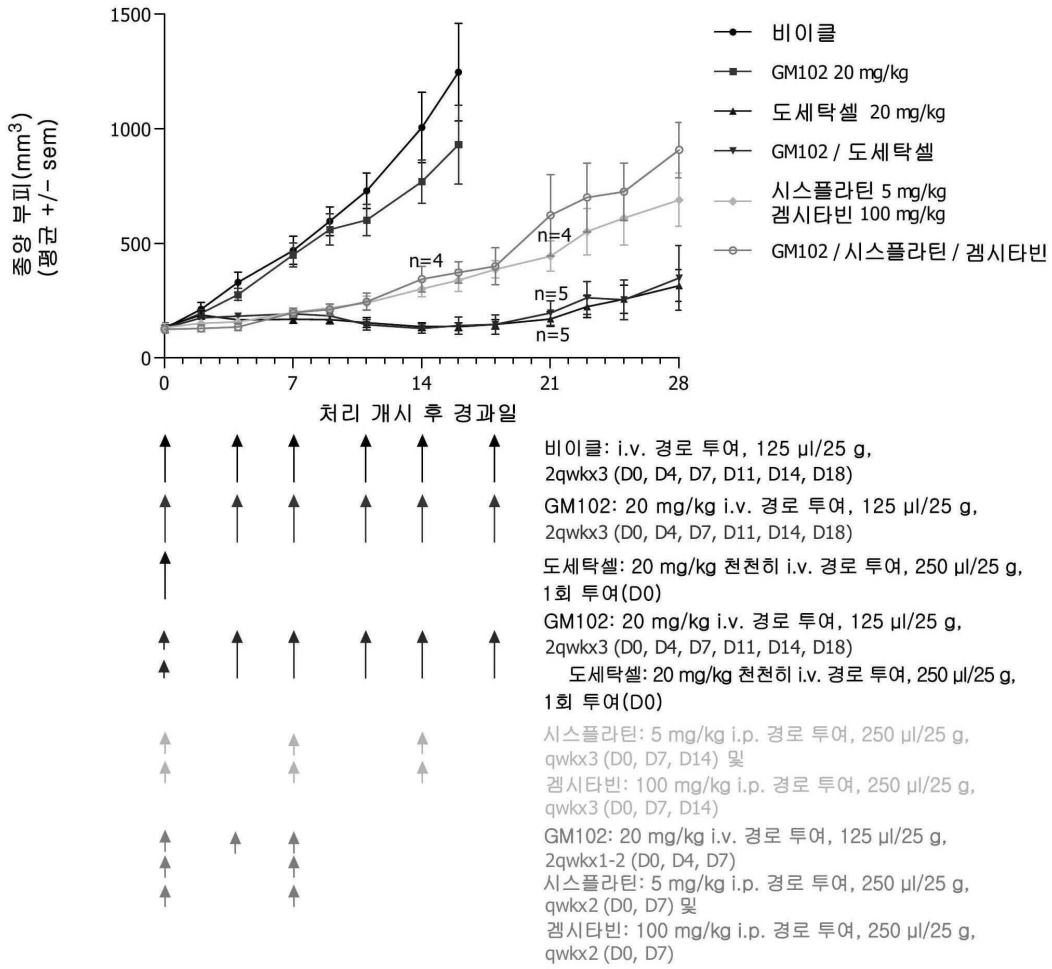
도면3g


300
200
100
0
세포 수
10^2
10^3
10^4
10^5
화합물-Alexa Fluor488-A

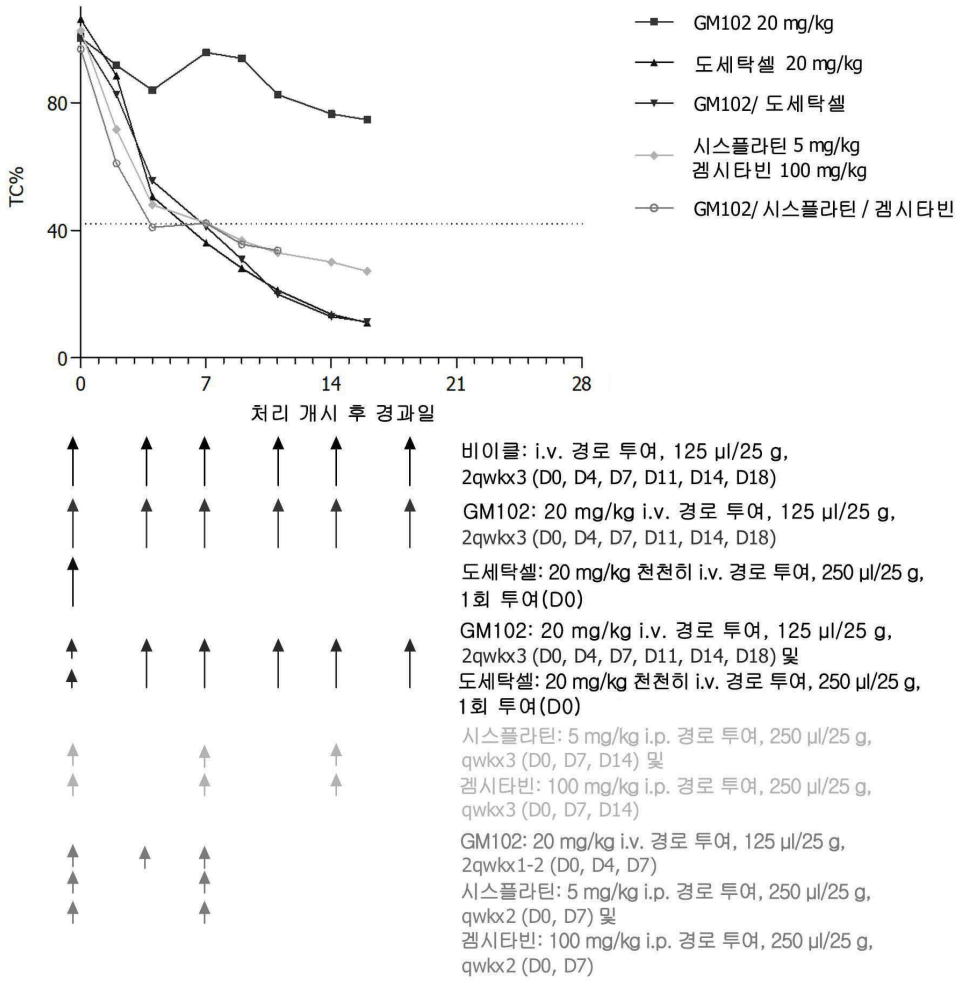
도면4


비이클
GM102 20 mg/kg
도세탁셀 20 mg/kg
GM102 / 도세탁셀
시스플라틴 5 mg/kg
겜시타빈 100 mg/kg
GM102 / 시스플라틴 / 겜시타빈
비체중
(평균 +/- sem)
1.2
1.0
0.8
0
7
14
21
28
처리 개시 후 경과일
비이클: i.v. 경로 투여, 125μl/25g
2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g,
2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여, 250 μl/25 g,
1회 투여(D0)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g,
2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여,
250 μl/25 g, 1회 투여(D0)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g,
qwkx3 (D0, D7, D14) 및
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g,
qwkx3 (D0, D7, D14)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g,
2qwkx1-2 (D0, D4, D7)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g,
qwkx2 (D0, D7)
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g,
qwkx2 (D0, D7)

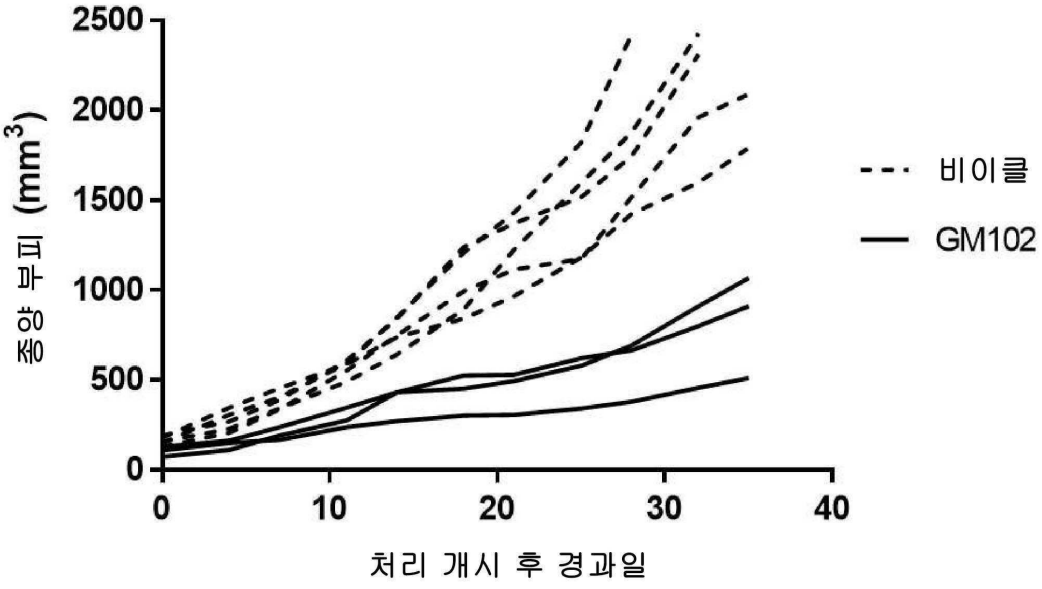
도면5


종양 부피(mm3) (평균 +/- sem)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
처리 개시 후 경과일
n=4
n=4
n=5
n=5
비이클
GM102 20 mg/kg
도세탁셀 20 mg/kg
GM102 / 도세탁셀
시스플라틴 5 mg/kg
겜시타빈 100 mg/kg
GM102 / 시스플라틴 / 겜시타빈
비이클: i.v. 경로 투여, 125 µl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 µl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여, 250 µl/25 g, 1회 투여(D0)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 µl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여, 250 µl/25 g, 1회 투여(D0)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 µl/25 g, qwkx3 (D0, D7, D14) 및
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 µl/25 g, qwkx3 (D0, D7, D14)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 µl/25 g, 2qwkx1-2 (D0, D4, D7)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 µl/25 g, qwkx2 (D0, D7) 및
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 µl/25 g, qwkx2 (D0, D7)

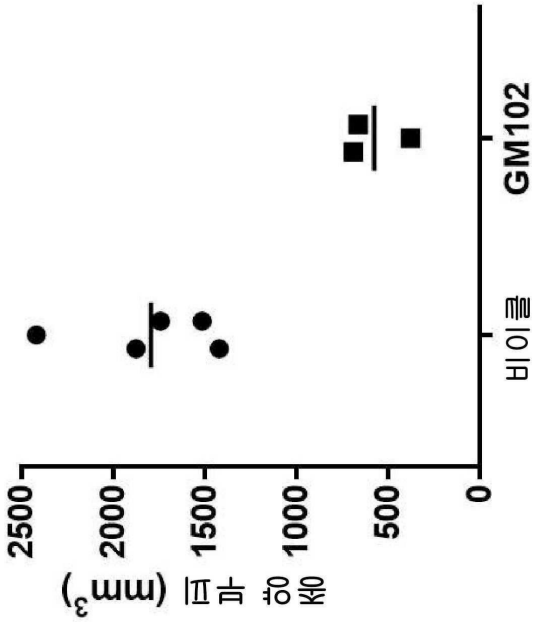
도면6


GM102 20 mg/kg
도세탁셀 20 mg/kg
GM102/ 도세탁셀
시스플라틴 5 mg/kg
겜시타빈 100 mg/kg
GM102/ 시스플라틴 / 겜시타빈
TC%
80
40
0
0
7
14
21
28
처리 개시 후 경과일
비이클: i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18)
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여, 250 μl/25 g, 1회 투여(D0)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g, 2qwkx3 (D0, D4, D7, D11, D14, D18) 및
도세탁셀: 20 mg/kg 천천히 i.v. 경로 투여, 250 μl/25 g, 1회 투여(D0)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g, qwkx3 (D0, D7, D14) 및
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g, qwkx3 (D0, D7, D14)
GM102: 20 mg/kg i.v. 경로 투여, 125 μl/25 g, 2qwkx1-2 (D0, D4, D7)
시스플라틴: 5 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g, qwkx2 (D0, D7) 및
겜시타빈: 100 mg/kg i.p. 경로 투여, 250 μl/25 g, qwkx2 (D0, D7)

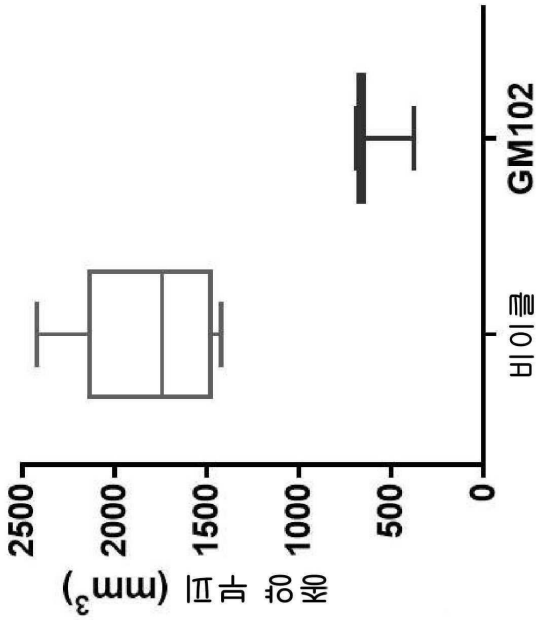
도면7


종양 부피 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
처리 개시 후 경과일
비이클
GM102

도면8a



도면8b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> EXELIXIS, INC.

INSTITUT CURIE

<120> AMHRII-BINDING COMPOUNDS FOR PREVENTING OR TREATING LUNG CANCERS

<130> 14529-018-187

<140> KR 10-2019-7033360

<141> 2019-11-11

<150> PCT/EP2018/059553

<151> 2018-04-13

<150> EP 17305446.1

<151> 2017-04-14

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23 VL without leader (CDS 1..318)

<400> 1

gacatccaga tgacacagtc cccatctacc ctgtctgctt ccgtgggaga tcgggtgact 60

atcacctgca gagcaagctc ctccgtgagg tacatcgctt ggtaccagca gaagccagga 120

aaggccccaa agctgctgac ctacccaacc tcctccctgg aatccggggt gcccagcaga 180

ttctcaggca gtggctccgg caccgaattc accctgacca tcagctcact gcagcctgac 240

gacttcgcaa cctactactg tctgcagtgg agtagctacc cttggacatt cggcggcggc 300

accaaggtgg agatcaag 318

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..318 from SEQ ID NO:1

<400> 2

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Glu 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3C_23 VH without leader (CDS 1..345)
<400> 3
caggtgcggc tggtgcagag cggggccgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtg 60

agttgcaagg cctccggtta caccttcacc agctaccaca tccactgggt cagacaggct 120
cccggccaga gactggagtg gatgggctgg atctaccctg gagatgactc caccaagtac 180
tcccagaagt tccagggtcg cgtgaccatt accagggaca ccagcgcctc cactgcctac 240
atggagctgt cttccctgag atctgaggat accgcagtct actactgtac acgggggggac 300
cgctttgctt actgggggca gggcactctg gtgaccgtct cgagc 345

<210> 4
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct CDS:1..345 from SEQ ID NO:3

<400> 4
Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

<210> 5
<211> 318
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3C_23K VL without leader (CDS 1..318)

<400> 5
gacatccaga tgacacagtc cccatctacc ctgtctgctt ccgtgggaga tcgggtgact 60
atcacctgca gagcaagctc ctccgtgagg tacatcgctt ggtaccagca gaagccagga 120
aaggccccaa agctgctgac ctacccaacc tcctccctga aatccggggt gcccagcaga 180
ttctcaggca gtggctccgg caccgaattc accctgacca tcagctcact gcagcctgac 240
gacttcgcaa cctactactg tctgcagtgg agtagctacc cttggacatt cggcggcggc 300
accaaggtgg agatcaag 318
<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213
> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct CDS:1..318 from SEQ ID NO:5
<400> 6
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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr

35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23K VH without leader (CDS 1..345)

<400> 7

caggtgcggc tggtgcagag cggggccgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtg 60

agttgcaagg cctccggtta caccttcacc agctaccaca tccactgggt cagacaggct 120

cccggccaga gactggagtg gatgggctgg atctaccctg gagatgactc caccaagtac 180

tcccagaagt tccagggtcg cgtgaccatt accagggaca ccagcgcctc cactgcctac 240

atggagctgt cttccctgag atctgaggat accgcagtct actactgtac acgggggggac 300

cgctttgctt actgggggca gggcactctg gtgaccgtct cgagc 345

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..345 from SEQ ID NO:7

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23 light chain without leader (CDS 1..639)

<400> 9

gacatccaga tgacacagtc cccatctacc ctgtctgctt ccgtgggaga tcgggtgact 60

atcacctgca gagcaagctc ctccgtgagg tacatcgctt ggtaccagca gaagccagga 120

aaggccccaa agctgctgac ctacccaacc tcctccctgg aatccggggt gcccagcaga 180

ttctcaggca gtggctccgg caccgaattc accctgacca tcagctcact gcagcctgac 240

gacttcgcaa cctactactg tctgcagtgg agtagctacc cttggacatt cggcggcggc 300

accaaggtgg agatcaagcg gaccgtcgcc gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

<210> 10

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..639 from SEQ ID NO:9

<400> 10

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Glu 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp 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> 11

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23 heavy chain without leader (CDS 1..1335)

<400> 11

caggtgcggc tggtgcagag cggggccgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtg 60

agttgcaagg cctccggtta caccttcacc agctaccaca tccactgggt cagacaggct 120

cccggccaga gactggagtg gatgggctgg atctaccctg gagatgactc caccaagtac 180

tcccagaagt tccagggtcg cgtgaccatt accagggaca ccagcgcctc cactgcctac 240

atggagctgt cttccctgag atctgaggat accgcagtct actactgtac acggggggac 300

cgctttgctt actgggggca gggcactctg gtgaccgtct cgagcgccag caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 12

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..1335 from SEQ ID NO:11

<400> 12

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

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

305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445
<210> 13
<211> 639
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23K light chain without leader (CDS 1..639)

<400> 13

gacatccaga tgacacagtc cccatctacc ctgtctgctt ccgtgggaga tcgggtgact 60

atcacctgca gagcaagctc ctccgtgagg tacatcgctt ggtaccagca gaagccagga 120

aaggccccaa agctgctgac ctacccaacc tcctccctga aatccggggt gcccagcaga 180

ttctcaggca gtggctccgg caccgaattc accctgacca tcagctcact gcagcctgac 240

gacttcgcaa cctactactg tctgcagtgg agtagctacc cttggacatt cggcggcggc 300

accaaggtgg agatcaagcg gaccgtcgcc gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..639 from SEQ ID NO:13

<400> 14

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp 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> 15

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C_23K heavy chain without leader (CDS 1..1335)

<400> 15

caggtgcggc tggtgcagag cggggccgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtg 60

agttgcaagg cctccggtta caccttcacc agctaccaca tccactgggt cagacaggct 120

cccggccaga gactggagtg gatgggctgg atctaccctg gagatgactc caccaagtac 180

tcccagaagt tccagggtcg cgtgaccatt accagggaca ccagcgcctc cactgcctac 240

atggagctgt cttccctgag atctgaggat accgcagtct actactgtac acgggggggac 300

cgctttgctt actgggggca gggcactctg gtgaccgtct cgagcgccag caccaagggc 360

ccatcggtct tcccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 16

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct CDS:1..1335 from SEQ ID NO:15

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Signal peptide

<400> 17

Met Leu Gly Ser Leu Gly Leu Trp Ala Leu Leu Pro Thr Ala Val Glu

1 5 10 15

Ala

<210> 18

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Human AMHR-II lacking the signal peptide SEQ ID NO:17

<400> 18

Pro Pro Asn Arg Arg Thr Cys Val Phe Phe Glu Ala Pro Gly Val Arg

1 5 10 15

Gly Ser Thr Lys Thr Leu Gly Glu Leu Leu Asp Thr Gly Thr Glu Leu

```
            20                  25                  30
Pro Arg Ala Ile Arg Cys Leu Tyr Ser Arg Cys Cys Phe Gly Ile Trp
        35                  40                  45
Asn Leu Thr Gln Asp Arg Ala Gln Val Glu Met Gln Gly Cys Arg Asp
    50                  55                  60
Ser Asp Glu Pro Gly Cys Glu Ser Leu His Cys Asp Pro Ser Pro Arg

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

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

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

            260                 265                 270
```

Tyr Leu Thr Gln Tyr Thr Ser Asp Trp Gly Ser Ser Leu Arg Met Ala
275 280 285
Leu Ser Leu Ala Gln Gly Leu Ala Phe Leu His Glu Glu Arg Trp Gln
290 295 300
Asn Gly Gln Tyr Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Ser Ser Gln
305 310 315 320
Asn Val Leu Ile Arg Glu Asp Gly Ser Cys Ala Ile Gly Asp Leu Gly

325 330 335
Leu Ala Leu Val Leu Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ala Trp Thr Pro
340 345 350
Thr Gln Pro Gln Gly Pro Ala Ala Ile Met Glu Ala Gly Thr Gln Arg
355 360 365
Tyr Met Ala Pro Glu Leu Leu Asp Lys Thr Leu Asp Leu Gln Asp Trp
370 375 380
Gly Met Ala Leu Arg Arg Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu

385 390 395 400
Trp Glu Ile Leu Ser Arg Cys Pro Asp Leu Arg Pro Asp Ser Ser Pro
405 410 415
Pro Pro Phe Gln Leu Ala Tyr Glu Ala Glu Leu Gly Asn Thr Pro Thr
420 425 430
Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu Ala Val Gln Glu Arg Arg Arg Pro Tyr
435 440 445
Ile Pro Ser Thr Trp Arg Cys Phe Ala Thr Asp Pro Asp Gly Leu Arg

450 455 460
Glu Leu Leu Glu Asp Cys Trp Asp Ala Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr
465 470 475 480
Ala Glu Cys Val Gln Gln Arg Leu Ala Ala Leu Ala His Pro Gln Glu
485 490 495
Ser His Pro Phe Pro Glu Ser Cys Pro Arg Gly Cys Pro Pro Leu Cys
500 505 510
Pro Glu Asp Cys Thr Ser Ile Pro Ala Pro Thr Ile Leu Pro Cys Arg

515 520 525

Pro Gln Arg Ser Ala Cys His Phe Ser Val Gln Gln Gly Pro Cys Ser

530 535 540

Arg Asn Pro Gln Pro Ala Cys Thr Leu Ser Pro Val

545 550 555

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C23K/3C23

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C23KR/6B78

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5B42
<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> K4D-24/6C59
<400> 22

Arg Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 115
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K4D-20

<400> 23

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K4A-12

<400> 24

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> K5D05
<400> 25

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K5D-14

<400> 26

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K4D-123

<400> 27

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K4D-127/6C07

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Thr Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5C14

<400> 29

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 30

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5C26

<400> 30

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Met Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5C27

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5C60

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6C13

<400> 33

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

1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 6C18
<400> 34

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 6C54
<400> 35

Gln Val Arg Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asp Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3C23K

<400> 36

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-K55E

<400> 37

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Glu 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 38

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-T48I, L-P50S

<400> 38

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 39

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LT48I, L-K55E

<400> 39

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Glu 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LS27P, L-S28P
<400> 40
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 Arg Ala Ser Pro Pro Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-M4L, L-T20A

<400> 41

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-S27P

<400> 42

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 Arg Ala Ser Pro Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-M4L, L-S9P, L-R31W
<400> 43
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Trp Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> L-M4L

<400> 44

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile

20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-I33T

<400> 45

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Thr
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-M4L, L-K39E

<400> 46

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-T22P

<400> 47

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 Pro Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-Y32D
<400> 48

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Asp Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-Q37H

<400> 49

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile

20 25 30

Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr

35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-G97S

<400> 50

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile

20 25 30

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

35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Ser Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-S12P

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-19A

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-T72A

<400> 53

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr

35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ala Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 54
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-R31W
<400> 54
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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Trp Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-M4L, L-M39K

<400> 55
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-I2N
<400> 56
Asp Asn 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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-G63C, L-W91C

<400> 57

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys 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 Leu Gln Cys Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-R31G

<400> 58

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Ile
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-I75F

<400> 59

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile

20 25 30

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

35 40 45

Pro Thr Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-I2T

<400> 60

Asp Thr 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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L-I2T, L-K42R

<400> 61

Asp Thr 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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 62
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-Y49H
<400> 62

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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr His
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 63
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-M4L, L-T20S, L-K39E
<400> 63
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys 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 Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L-T69P
<400> 64
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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Thr Tyr
35 40 45
Pro Thr Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Pro Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL-1 of anti-AMHRII antibodies

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa in position 4 is S or P

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa in position 5 is S or P

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Xaa in position 7 is R or W or G

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa in position 8 is Y or D

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa in position 9 is I or T

<400> 65

Arg Ala Ser Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Ala

1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL-2 of anti-AMHRII antibodies

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Xaa in position 6 is K or E

<400> 66

Pro Thr Ser Ser Leu Xaa Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL-3 of anti-AMHRII antibodies

<400> 67

Leu Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH-1 of anti-AMHRII antibodies

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Xaa in position 6 is S or T

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa in position 9 is S or G

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> Xaa in position 10 is Y or N

<400> 68

Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Xaa His Ile His

1 5 10

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH-2 of anti-AMHRII antibodies

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa in position 5 is G or E

<400> 69

Trp Ile Tyr Pro Xaa Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH-3 of anti-AMHRII antibodies

<400> 70

Gly Asp Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of AMHR2

<400> 71

tctggatggc actggtgctg 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of AMHR2

<400> 72

agcagggcca agatgatgct 20

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of TBP

<400> 73

tgcacaggag ccaagagtga a 21

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of TBP

<400> 74

cacatcacag ctccccacca 20

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary CDRL-1

<400> 75

Arg Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary CDRL-2

<400> 76

Pro Thr Ser Ser Leu Lys Ser

1 5

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary CDRH-1

<400> 77

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr His Ile His

1 5 10

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary CDRH-2

<400> 78

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary CDRL-2

<400> 79

Pro Thr Ser Ser Leu Glu Ser

1 5