



공개특허 10-2020-0014276



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0014276
(43) 공개일자 2020년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2869 (2013.01)
A61K 47/68 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2019-7033359
(22) 출원일자(국제) 2018년04월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년11월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/059548
(87) 국제공개번호 WO 2018/189379
국제공개일자 2018년10월18일
(30) 우선권주장
17305445.3 2017년04월14일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
가마맵스 파마
프랑스 31106 툴루즈 상뜨르 피에르 포띠에 1 뿔
라스 피에르 포띠에 옹코뿔 양드레 비
엥스띠뛰 퀴리
프랑스 애프-75248 파리 세텍 05 뤼 월드 26
(72) 발명자
바레 장-마르끄
프랑스 81100 카스뜨르 뤼 뒤 트레조르 5
프로스뜨 장-프랑수아
프랑스 78000 베르사유 아브뉴 빌뇌브 레팡 21
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 11 항

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

(57) 요약

본 발명은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종 및 백혈병을 포함하는 암의 군으로부터 선택되는 암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합체에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/72 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

라마르 메흐디

프랑스 78220 비로플레 뤼 데 프레 조 부아 154

드고브 스테판

프랑스 93500 광땡 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

명세서

청구범위

청구항 1

비-부인과암의 예방 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 비-부인과암은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 인간 AMHRII-결합체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 모노클로날 항체 및 그의 AMHRII-결합 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 AMHRII-결합체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 인간 AMHRII-결합체:

- a) SEQ ID NO: 2 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 4 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23 VL 및 VH 서열);
- b) SEQ ID NO: 6 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 8 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23K VL 및 VH 서열);
- c) SEQ ID NO: 10 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 12 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23 경쇄 및 중쇄);
- d) SEQ ID NO: 14 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 16 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23K 경쇄 및 중쇄).

청구항 5

제 1 항에 있어서, 하기 서열을 포함하는 CDR 을 포함하는 모노클로날 항체인 인간 AMHRII-결합체:

- CDRL-1: RASX1X2VX3X4X5A (SEQ ID NO. 65), 여기에서 X1 및 X2 는, 독립적으로, S 또는 P 이고, X3 은 R 또는 W 또는 G 이고, X4 는 T 또는 D 이고, X5 는 I 또는 T 임;
- CDRL-2: PTSSLX6S (SEQ ID NO. 66), 여기에서 X6 은 K 또는 E 임; 및
- CDRL-3: LQWSSYPWT (SEQ ID NO. 67);
- CDRH-1: KASGYX7FTX8X9HIH (SEQ ID NO. 68), 여기에서 X7 은 S 또는 T 이고, X8 은 S 또는 G 이고, X9 는 Y 또는 N 임;
- CDRH-2: WIYPX10DDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO. 69), 여기에서 X10 은 G 또는 E 임; 및
- CDRH-3: GDRFAY (SEQ ID NO. 70).

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합체는 항체 약물 컨주케이트 (Antibody Drug Conjugate) (ADC)로 이루어지는 인간 AMHRII-결합체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, AMHRII-결합 조작된 수용체인 인간 AMHRII-결합체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, AMHRII-결합 조작된 수용체를 발현하는 세포인 인간 AMHRII-결합체.

청구항 9

제 8 항에 있어서, AMHRII-결합 조작된 수용체를 발현하는 CAR T-세포 또는 NK T-세포인 인간 AMHRII-결합체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 또다른 항-암 치료와 조합된 인간 AMHRII-결합체.

청구항 11

개체가 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인지 여부를 확인하는 방법으로서, 상기 개체로부터 이전에 수득된 종양 조직 샘플이 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 암 치료 분야와 관련된다.

배경 기술

[0002]

세계 인구의 사망의 주요 원인 중 하나는 암 또는 악성 종양이며, 사망률을 순위는 폐암, 위암, 간암, 직장결장암, 유방암 및 자궁경부암이다. 미국에서만 모든 개체의 삼분의 일이 암에 걸릴 것이다. 조기 진단 및 치료법의 진전의 결과로 5년 생존률이 50 퍼센트 가까이 극적으로 증가했지만, 암은 여전히 미국에서 심장 질환 다음으로 높은 사망의 원인이다. 미국인의 20 퍼센트가 암으로 사망하며, 그 절반은 폐암, 유방암, 및 결장직장암으로 인한 것이다. 더욱이, 피부암은 여전히 건강 위협이다.

[0003]

암 환자를 위한 효과적 치료의 디자인은 중대한 도전이 되어 왔다. 외과적 절제술, 외부 빔 방사선 요법, 및/또는 전신 화학요법의 현재의 양생법 (regimen)은 악성종양의 일부 종류에서는 부분적으로 성공적이었으나, 다른 종류에서는 만족스러운 결과를 낳지 않았다. 게다가, 이들 접근법은 종종 허용할 수 없는 독성을 갖는다.

[0004]

방사선치료 및 수술은 동일한 이론적 문제점을 겪는다. 단일 클론원성 악성 세포가 숙주를 살해할 충분한 자손을 생기게 할 수 있다는 것을 고려하면, 신생 세포의 전체 집단이 박멸되어야 한다는 것이 인정되었다. 일반적으로는, Goodman and Gilman *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Pergamon Press, 8th Edition) (pp. 1202-1204)를 참고한다. 이러한 "전체 세포 살해"의 개념은, 치유를 달성하고자 하는 경우에, 외과적 접근법에서 종양의 전체 절제가 필수적이고, 방사선치료 접근법에서 모든 암 세포의 완전한 파괴가 필요하다는 것을 시사한다. 실제로 이것은 좀처럼 가능하지 않으며; 사실, 전이가 있는 경우에, 그것은 불가능하다.

[0005]

더욱이, 전통적 화학요법 암 치료는 또한 종양의 완전한 차도를 드물게 초래하고, 심지어 중간 정도 반응을 일으키는데 요구되는 유의한 투여량 수준은 종종 허용할 수 없는 독성을 동반한다. 항암제는 전형적으로는 음성 혈액학적 효과 (예를 들어, 유사분열의 중지 및 골수 및 림프 조직에서 형성되는 요소의 붕괴), 및 면역억제 작용 (예를 들어, 하락한 세포 수), 뿐만 아니라 상피 조직 (예를 들어, 장 점막), 생식 조직 (예를 들어, 정자 발생의 장애), 및 신경계에 대한 심각한 영향을 갖는다. P. Calabresi and B. A. Chabner, In: Goodman and Gilman *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Pergamon Press, 8th Edition) (pp. 1209-1216). 높은 투여량 수준, 및 결과적인 독성은, 대부분 항암제 자체의 표적 특이성의 결여에 의해 필요하게 된다. 약물은 암에 걸린 숙주 세포와 암에 걸리지 않은 숙주 세포를 구별할 필요가 있다. 방대한 양의 항암 약물은 이 수준에서 무차별적이고, 현저한 내재하는 독성을 갖는다. 항암 의료품은 최근에 체크포인트 저해제로 알려진 면역요법으로 강화되어 왔다. 이들 제품 (항-PD1, 항-PDL1, 항-CTLA4)은 암 세포가 면역 감시 및 세포 살해를 모면하는 메카니즘에 대항함으로써 면역계를 잠금해제 (unlock) 할 수 있다. 이들 제품이 여러 암 (예컨대 흑색종 및 폐암)에서 주목할 만한 장기간 결과를 초래했다는 사실에도 불구하고, 반응자의 백분율은 저에서 중이고, 그들의 징후의 범위는 여전히 상대적으로 제한된다 (DM. Pardoll, *Nature Review* 2012)

[0006] 종래의 의과적 요법, 방사선 요법 및 화학요법에 대한 대안적 또는 보완적 항암 요법에 대한 필요가 여전히 존재한다. 그러한 유망한 대안적 또는 보완적 요법 중 하나는 치료제에 의한 종양 세포에 의해 발현되는 항원의 인지를 통해 암 세포를 특이적으로 표적화하는 것으로 이루어진다. 2017년도에, 그러한 종양 세포-특이적 치료 전략은 면역 세포 예컨대 NK 및 마크로파지 (예컨대 당-조작된 항체) 또는 예컨대 살해 T-림프구 (예컨대 CD3 이중특이적 포맷) 참여를 증가시키도록 조작될 수 있는 이중특이적 항체-기반 요법 및 CAR-T 세포-기반 요법에 의해 주로 나타난다. 항체는 또한 항체 약물 컨주케이트 (Antibody Drug Conjugate) (ADC) 의 포맷 하에 다양한 세포독성제에 의해 무장될 수 있다. 마지막으로, T-세포 자체가 종양 세포를 직접 인지하고 TCR 신호전달 (CAR-T 세포) 을 활성화하도록 유전자 조작될 수 있다. 대부분의 상기 제제는 종양 선별적 표적에 대한 수요가 증가하므로 강력하다.

[0007] 암에 대한 항체-기반 요법은 지난 15년에 걸쳐 확립되어 왔고, 이제 혈액학적 악성종양 및 고형 종양에 걸린 환자를 치료하기 위한 가장 성공적인 중요한 전략 중 하나이다. 주요 과제는 항체-기반 치료법에 적합한 항원을 동정하는 것이었다. 그러한 치료법은 항원 또는 수용체 기능의 변화를 매개하는 것 (예컨대 아고니스 트 또는 안타고니스트 기능), 면역계를 조정하는 것 (예를 들어, Fc 기능의 변화 및 T 세포 활성화) 또는 특이적 항원을 표적화하는 항체에 컨주케이트되어 있는 특이적 약물을 전달하는 것을 통해 가능할 수 있다 (Van den Eynde, B. J. & Scott, A. M. *Encyclopedia of Immunology* (eds Roitt, D. P. J. & Roitt, I. M.) 2424-2431 (Academic Press, London, 1998)., Scott, A. M. et al. A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 4071-4076 (2007)., Hughes, B. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nature Rev. Drug Discov.* **9**, 665-667 (2010)., Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Rev. Immunol.* **10**, 317-327 (2010).). 항체 약물 동력학, 효과기 기능, 크기 및 면역원성을 변경할 수 있는 분자 기술은 새로운 항체-기반 요법의 개발에서 핵심 요소로 나타났다. 암 환자에서의 항체의 임상 시험으로부터의 증거는 항원 표적 및 항체의 친화도 및 결합 활성을 포함하는 최적 항체의 선별, 항체 구축물, 치료적 접근법 (예컨대 신호전달 폐지 또는 면역 효과기 기능)의 선택을 위한 반복적 접근법의 중요성 및 항체의 약물동력학적 및 약물역학적 특성을 초기 임상 시험에서 비판적으로 검토할 필요를 밝혔다. 이 리뷰는 모노클로날 항체 (mAb) 를 인간 용도의 시약으로 전환시키는데 필요한 단계, 암 환자의 치료에서 항체의 성공, 표적 및 구축물 선별에서의 도전, 및 항체 요법에서 면역 계의 결정적 역할을 요약한다. 1986년도에 치료적 모노클로날 항체의 최초 상업화 이후로, 이 부류의 생물 약제 제품은 크게 성장했으며, 2014년도 말에, 47 가지 모노클로날 항체가 미국에서 또는 유럽에서, 특히 암 치료에 관해, 승인되었다. 약 70 가지 모노클로날 항체가 2020년까지 시장에 나올 것으로 예상된다.

[0008] CAR-T 세포 요법은 키메라 항원 T 세포 수용체 (chimeric antigen T-cell receptor) (CAR) 의 제조에 기반한다. 키메라 항원 수용체는 새로운 특이성을 면역 효과기 세포에 이식하는 유전자 조작된 수용체이다. 이것은 전형적으로는 모노클로날 항체의 특이성을 T 세포에 이식하는데 사용된다. CAR-T 세포는 암을 위한 요법으로서 연구 중이다. 전형적으로는, CAR-T 요법은 키메라 항원 수용체를 그것의 세포 막에서 발현하는 조작된 T 세포의 주입을 수반한다. 이 수용체는 특이적 종양 항원을 인지하도록 디자인된 외부 표적-결합 도메인 및 CAR-T 가 항원 표적에 결합할 때 T 세포 활성화를 책임지는 내부 활성화 도메인을 포함한다. 암 치료에 관한 CAR-T 임상 시험은 종종 형태의 암에서 94% 까지의 큰 차도율을 보였으며, 이는 대부분의 시험이 그들의 형태의 암에 이용 가능한 모든 다른 치료에 반응하지 않은 환자를 동원하는 것을 고려할 때 특히 인상적이다. 2017년도까지, 약 300 회의 CAR-T 임상 시험이 수행되었다.

[0009] 특정 종류의 암을 치료하기 위한 현존하는 요법에 대안적 또는 보완적일 수 있는, 암 요법을 위한 추가의 도구에 대한 필요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 비-부인과암의 예방 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합제에 관한 것이다.

[0011] 특히, 본 발명은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 암의 군으로부터 선택되는 비-부인과암의 예방 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합제에 관한 것이다. 결장암은 직장결장암종을 포함한다. 신장암은 신세포 암종을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 상기 인간 AMHRII-결합제는 항-AMHRII 모노클로날 항체로 이루어진다.

- [0013] 일부 구현예에서, 상기 인간 AMHRII-결합체는 항체 약물 컨주케이트 (ADC)로 이루어진다.
- [0014] 일부 구현예에서, 상기 인간 AMHRII-결합체는 AMHRII-결합 조작된 수용체로 이루어진다.
- [0015] 일부 구현예에서, 상기 인간 AMHRII-결합체는 AMHRII-결합 조작된 수용체를 발현하는 세포, 예컨대 AMHRII-결합 조작된 수용체를 발현하는 CAR T-세포 또는 NK T-세포로 이루어진다.
- [0016] 본 발명은 또한 개체가 위에서 정의된 바와 같은 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료를 받을 수 있는지 여부, 즉, 개체가 위에서 정의된 바와 같은 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인지 여부를 확인하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 개체로부터 이전에 수득된 종양 조직 샘플이 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 또한 개체가 위에서 정의된 바와 같은 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인지 여부를 확인하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 개체로부터 이전에 수득된 종양 조직 샘플이 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 3C23 모노클로날 항체의 복수의 변이체의 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열을 도시한다. 도 1A는 각각의 항체 변이체의 VH 도메인을 도시한다. 도 1B는 각각의 항체 변이체의 VL 도메인을 도시한다.
- 도 2는 다양한 암 세포주에 의한 AMHRII 발현을 도시한다.
- 도 2A는 암 세포주에 의한 AMHRII mRNA 발현을 도시한다. 가로 좌표: 도 2A의 왼쪽에서 오른쪽으로: HCT116 (결장 직장결장암종), COV434-WT (인간 난소 과립막 종양), K562 (인간 골수성 백혈병) 및 OV90 (인간 악성 유두상 장액성 선암종). 세로 좌표: RT-qPCR에 의해 어세이되는 AMHRII mRNA 발현 수준, 임의 단위 (Arbitrary Units) (RQ)로 표현됨.
- 도 2B 내지 2F: 도 2A에서 동일한 암 세포주에 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: 형광 신호 강도 (FL2-A 염료), 임의 단위로 표현됨. 세로 좌표: 세포 계수.
- 도 3은 다양한 인간 종양 일차 조직 샘플에서의 AMHRII 표면 발현을 도시한다. 가로 좌표: 암의 유형; 도 3의 왼쪽에서 오른쪽으로: 결장암, 간암, 고환암, 갑상선암, 위암, 방광암, 췌장암, 두경부암. 세로 좌표: AMHRII 양성도 지수는 AMHRII 전체 점수 ≥ 1.5 에 의해 정의되었다. 이 전체 조직학적 점수는 세포질 + 막 점수의 평균에 의해 확립되었다. 이를 각각은 빈도 x 강도 점수 (0 내지 3)의 평균을 사용하여 점수를 매긴다. 빈도는 AMHRII를 발현하는 세포의 백분율로서 정의되었고, 강도는 하기 점수부여 시스템을 통해 종양 세포 막 또는 세포질의 분명한 갈색 라벨링으로서 분류되었다: 라벨링의 강도는 음성의 경우 0, 약의 경우 1, 중의 경우 2, 및 COV434 양성 대조군에서 보여지는 바와 같이 강의 경우 3으로서 정의되었다; 각각의 막대 위에 위치하는 숫자: 시험된 인간 집단에서 해당 암에 관한 AMHRII 발현의 빈도.
- 도 4는 다양한 인간 종양 이종이식편에 의한 AMHRII 표면 발현을 도시한다. 가로 좌표, 도 4의 왼쪽에서 오른쪽으로: 백혈병, 골육종, 위장암, 뇌암, 육종, 흑색종, 흉막증피종, 지방육종, 고환암, 결장암, 신장암. 세로 좌표: AMHRII 전체 점수, 임의 단위로 표현됨.
- 도 5는 PDX 모델 인간 간암종 (HCC)에 대항하는 3C23K 항체의 생체내 항-종양 활성을 도시한다. 가로 좌표: 처리의 시작 후의 시간, 일로 표현됨. 세로 좌표: 종양 부피, mm^3 로 표현됨. ●: 비히클; ▲: 3C23K 항체, 용량 20 mg/kg; ■: 3C23K 항체, 용량 50 mg/kg; ▼: 소라페닙, 용량 50 mg/kg을 사용하는 비교 처리. 세로 좌표: 종양 부피 mm^3 로 표현됨. 가로 좌표: ● 비히클; ▲: 3C23K 항체, 용량 20 mg/kg; ■: 3C23K 항체, 용량 50 mg/kg; ▼: 소라페닙, 용량 50 mg/kg.
- 도 6은 PDX 모델 인간 간암종 (HCC)에 대항하는 PCT 출원 n° WO 2017/025458에 개시된 바와 같은 3C23K 항체 세포독성 컨주케이트 (GM103으로 명명됨)로 이루어지는 항체 약물 컨주케이트 (ADC)의 생체내 항-종양 활성을 도시한다. 가로 좌표: 처리의 시작 후의 시간, 일로 표현됨. 세로 좌표: 종양 부피, mm^3 로 표현됨. ●: 비히클; ▼: GM103 ADC, 용량 1 mg/kg; ▲: GM103 ADC, 용량 5 mg/kg; ■: GM103 ADC, 용량 10 mg/kg;
- 도 7은 유세포측정법 (flow cytometry) (FACS)에 의해 측정되는, 직장결장암에 걸린 네 명의 환자로부터의 종

양 샘플에서 유래하는 종양 세포에 의한 AMHRII 막 발현을 도시한다 (도 7A, 7B, 7C, 7D). 가로 좌표: 형광 신호 강도 (FL2-A 염료), 임의 단위로 표현됨. 세로 좌표: 세포 계수. 도 7A, 7B, 7C, 7D 에서: (i) 왼쪽 피크: 관련 없는 동형 항체와 함께 인큐베이션된 세포; (ii) 오른쪽 피크: 3C23K 항-AMHRII 항체와 함께 인큐베이션된 세포.

도 8 은 유세포측정법 (FACS)에 의해 측정되는, 마우스에서의 네 개의 구별되는 직장결장암 인간 이종이식편에 의한 AMHRII 막 발현을 도시한다 (도 8A, 8B, 8C, 8D). 가로 좌표: 형광 신호 강도 (FL2-A 염료), 임의 단위로 표현됨. 세로 좌표: 세포 계수. 도 8A, 8B, 8C, 8D 에서: (i) 왼쪽 피크: 관련 없는 동형 항체와 함께 인큐베이션된 세포; (ii) 오른쪽 피크: 3C23K 항-AMHRII 항체와 함께 인큐베이션된 세포.

도 9 는 유세포측정법 (FACS)에 의해 측정되는, 신세포 암종에 걸린 두 명의 환자로부터의 종양 샘플에서 유래하는 종양 세포에 의한 AMHRII 막 발현을 도시한다 (도 9A; 9B). 가로 좌표: 형광 신호 강도 (FL2-A 염료), 임의 단위로 표현됨. 세로 좌표: 세포 계수. 도 9A, 9B 에서: (i) 왼쪽 피크: 관련 없는 동형 항체와 함께 인큐베이션된 세포; (ii) 오른쪽 피크: 3C23K 항-AMHRII 항체와 함께 인큐베이션된 세포.

도 10 은 인간 직장결장암종 (CRC)의 PDX 모델에 대항하는 항-AMHRII 항체 GM102 의 생체내 항-종양 활성을 도시한다. 가로 좌표: 처리의 시작 후의 시간, 일로 표현됨. 세로 좌표: 종양 부피, mm^3 로 표현됨. ●: 비히클; ■: GM102, 용량 20 mg/kg; ▲: 이리노테칸, 용량 100 mg/kg.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

발명의 상세한 설명

[0020]

본 발명자들은 예상 외로 AMHRII, AMH 수용체가 복수의 다양한 비-부인과암 조직의 세포 막에서 발현된다는 것을 밝혔다.

[0021]

용어 "AMHR-II" 는 인간 항-뮐러 호르몬 유형 II 수용체 (human Anti-Muellerian Hormone type II Receptor)를 지칭한다. 인간 AMHR-II 의 서열은 본원에서 SEQ ID NO. 18 (신호 펩티드 MLGSLGLWALLPTAVEA (SEQ ID NO: 17) 를 결여함) 로서 기재된다.

[0022]

본원에서 사용되는, "비-부인과 (non-gynecologic)" 암은 용어 "부인과" 암에 의해 포함되지 않는 임의의 암을 포함한다.

[0023]

본원에서 사용되는, "부인과 (gynecologic)" 암은 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 임신영양막병 암 (융모암종), 자궁 육종, 질암, 외음부암 및 나팔관암으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0024]

이 때, 본원에서 사용되는, "비-부인과" 암은 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 임신영양막병 암, 자궁 육종, 질암, 외음부암 및 나팔관암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 암으로 이루어지지 않는 암으로 이루어진다.

[0025]

본원에서 사용되는, 용어 "PDX" 는 표현 "환자 유래 이종이식편 (Patient-Derived Xenograft)" 의 두문자어이다. 환자 유래 이종이식편은, 환자의 종양으로부터의 조직 또는 세포가 면역 결핍 비인간 포유류, 예컨대 면역 결핍 마우스에 이식, 즉 "그래프트" 되는 생체내 암 모델, 특히 생체내 인간 암 모델에서 자주 사용된다.

[0026]

본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, 본 발명자들은, 고려되는 비-부인과암 유형에 따라 가변적인 빈도로 AMHRII 가 비-부인과암 조직의 세포막에서 발현됨을 발견했다. 예시적으로 본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, AMHRII 는 두경부암에 걸린 환자 기원의 종양 조직에서 유래하는 암세포에 의해서보다 부신피질암에 걸린 환자 기원의 종양 조직에서 유래하는 암세포에 의해서 더욱 빈번하게 발현된다. 이는, 이들 두 가지 유형의 암이 AMHRII 를 표적화하는 항암 치료를 받기에 적격이지만, 그러한 항암 치료는 두경부암에 걸린 환자를 치료하는 데에는 덜 빈번하게 적절할 것임을 의미한다.

[0027]

본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, 임의의 비-부인과암, 예를 들어 간암, 직장결장암 또는 신장암은 AMHRII-결합제에 의해 치료될 수 있으며, 다만, 상기 비-부인과 종양으로부터의 종양 세포가 그들의 막에서 AMHRII 를 발현하는 경우에, 따라서 다만, 종양 세포 막에서의 AMHRII 단백질의 존재가 임의의 방법에 따라 검출 또는 확인될 수 있는 경우에 그러하다.

[0028]

따라서, 본원에서 실시예에서 제공되는 실험 데이터는 동일한 AMHRII-결합제, 여기에서 항-AMHRII 모노클로날 항체가 복수의 구별되는 종류의 암을 치료하는데 효과적이라는 것을 보여주며, 다만, AMHRII 표적 단백질이 종양 세포 막에서 발현되는 경우에 그러하다.

- [0029] 부수적으로, 표적-결합 분자, 예를 들어 표적-결합 항체로 이루어지는 항암 활성 성분의 분야에서, 동일한 활성 성분이 복수의 구별되는 암을 치료하는데 효과적인 상황은 전례가 없다. 예시적으로, 펨브롤리주맙으로 명명된 항-PD1 항체는 다양한 구별되는 종류의 암의 치료에서 유용한 활성 성분으로서 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 허가받았으며, 다만 상기 암이 동일한 생리학적 특색을 공유하는 경우에 그러하다.
- [0030] 따라서, 비-부인과암에 걸린 개체는 상기 개체로부터 이전에 수집된 종양 세포에 의한 AMHRII 막 발현이 검출되거나 또는 아니면 적당한 방법에 의해 확인될 때 본원에서 기재되는 바와 같은 AMHRII-결합체를 사용하여 상기 암에 대해 치료될 수 있다.
- [0031] 일부 구현예에서, 암 세포의 세포 막에서의 AMHRII의 발현은 상기 암 세포가 AMHRII를 주어진 정량화할 수 있는 수준에서 또는 상기 정량화할 수 있는 수준보다 더 높은 수준에서 발현하는 것을 포함한다.
- [0032] 따라서, 일부 구현예에 따르면, AMHRII-결합 분자를 사용하는 처리에 대한 비-부인과암에 걸린 개체의 반응성은 상기 개체로부터 이전에 수집된 샘플로부터의 비-부인과암 세포가 AMHRII를 그들의 막에서 발현하는지 여부를 확인함으로써 평가될 수 있다.
- [0033] 일부 구현예에 따르면, AMHRII-결합 분자를 사용하는 처리에 대한 비-부인과암에 걸린 개체의 반응성은 상기 개체로부터 이전에 수집된 샘플로부터의 비-부인과암 세포가 AMHRII를 그들의 막에서 확인된 역치 값 초과로 발현하는지 여부를 확인함으로써 평가될 수 있다.
- [0034] AMHRII-결합체, 예를 들어 항-AMHRII 항체를 사용하는 처리에 대한 비-부인과암에 걸린 환자의 반응성을 확인하기 위해 일부 구현예에서 사용될 수 있는 AMHRII 막 발현 수준은 (i) AMHRII를 그들의 막에서 발현하는 종양 샘플에 함유되는 종양 세포의 백분율, (ii) 종양 세포 막에서의 AMHRII 단백질의 평균 수 및 (iii) 시험된 종양 세포 샘플에 함유되는 종양 세포의 FACS AMHRII 신호 프로파일을 포함하는 다양한 기술로 평가될 수 있다.
- [0035] 일부 구현예에 따르면, 비-부인과암에 걸린 개체로부터 이전에 수집된 종양 샘플에 포함되는 암 세포는 막 AMHRII 가 상기 종양 샘플에 포함되는 종양 세포의 5% 이상에서 검출될 때 막 AMHRII를 발현하는 것으로 평가될 수 있다.
- [0036] 따라서, 일부 구현예에서, 비-부인과암에 걸린 개체는 상기 개체로부터 이전에 수집된 종양 샘플에 포함되는 종양 세포의 5% 이상이 AMHRII를 그들의 막에서 발현할 때 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 확인된다.
- [0037] 막 AMHRII 단백질을 발현하는 종양 세포의 빈도 (예를 들어 백분율)를 확인하는 방법은 본원의 실시예를 포함하는 본 명세서의 다른 곳에서 개시된다.
- [0038] 일부 구현예에 따르면, AMHRII-결합체, 예를 들어 항-AMHRII 항체를 사용하는 암 치료에 대한 비-부인과암에 걸린 환자의 반응성은 상기 환자로부터 이전에 수집된 종양 샘플에 함유되는 종양 세포의 막에 존재하는 AMHRII 단백질의 평균 수를 확인함으로써 평가될 수 있다.
- [0039] 일부 구현예에서, 비-부인과암에 걸린 환자는 상기 환자로부터 이전에 수집된 종양 샘플에 함유되는 종양 세포에 의해 발현되는 막 AMHRII 단백질의 평균 수가 10000 AMHRII 단백질 이상일 때 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 반응성, 예를 들어 항-AMHRII 항체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 분류될 수 있다.
- [0040] 종양 세포 막에서 발현되는 AMHRII 단백질의 수의 평가는 (a) 환자로부터 이전에 수집된 종양 조직 샘플로부터의 세포를 함유하는 샘플을 AMHRII 단백질에 특이적으로 결합하는 검출가능한 화합물, 예컨대 형광 라벨링된 항-AMHRII 항체와 인큐베이션하는 단계, 및 추가로 (b) 상기 샘플로부터의 각각의 시험된 세포에 결합된 상기 검출가능한 화합물의 수, 예를 들어 형광 라벨링된 항-AMHRII 항체의 수를 확인하는 단계를 포함하는 종래의 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 종양 세포 막에서 발현되는 AMHRII 단백질의 수의 평가는, 예를 들어, 본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같은, 잘 알려진 형광 활성화되는 세포 분류 (FACS) 기술을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0041] 기타 구현예에서, 비-부인과암에 걸린 환자는 상기 환자로부터 이전에 수집된 종양 샘플에 함유되는 종양 세포의 AMHRII FACS 프로파일의 분석에 의해 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 분류될 수 있으며, 예를 들어 항-AMHRII 항체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 분류될 수 있다.
- [0042] 이들 기타 구현예에 따르면, 비-부인과암에 걸린 환자는, 형광 활성화되는 세포 분류 (FACS) 방법에서, (i) 항-AMHRII 형광 라벨링된 항체와 함께 인큐베이션된 종양 세포의 평균 형광 강도와 (ii) 동형 형광 라벨링된 항체

와 함께 인큐베이션된 종양 세포로부터의 평균 형광 강도 (mean fluorescence intensity) (MFI) 값의 비가 1.5 이상일 때 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 분류될 수 있으며, 예를 들어 항-AMHRII 항체를 사용하는 처리에 반응성인 것으로 분류될 수 있다.

- [0043] 상기 평균 형광 강도 비를 확인하기 위해서, 동형 항체 및 항-AMHRII 항체 둘 모두는 동일한 형광체, 예컨대 본 원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, Company ThermoFisher Scientific에 의해 판매되는 Alexa Fluor 488 염료로 라벨링된다.
- [0044] 일부 추가의 구현예에서, AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 대한 비-부인과암 개체의 반응성은 (i) AMHRII-결합체로 치료될 수 있는 암에서 유래하는 막 AMHRII-발현 암 세포와 (ii) AMHRII-결합체로 치료될 수 없는 암에서 유래하는 막 AMHRII-발현 암 세포 사이를 구별하는 것을 허용하는 AMHRII 발현 점수를 계산함으로써 확인될 수 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명자들은 본원에서 기재되는 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 특히 적격인, 즉, 본원에서 기재되는 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 특히 반응성인, 본원에서 기재되는 비-부인과암에 걸린 환자는 암 종양 AMHRII 를 세포 막에서 파괴될 관련 세포 표적에 존재하기에 충분히 높은 수준으로 발현하는 환자를 포함한다는 것을 확인했다.
- [0046] 그 때, 이들 추가의 구현예에 따르면, 본 발명자들은 비-부인과암 환자로부터의 암 세포 샘플에서 측정되는 최소 AMHRII 발현 수준이 상기 환자는 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 반응성이라는 것 및 상기 환자는 따라서 본원에서 기재되는 AMHRII-결합체에 의해 치료될 수 있단는 것을 확인해줄 수 있다는 것을 확인했다.
- [0047] 비-부인과암에 걸린 개체의 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 대한 반응성은 따라서 또한 상기 개체로부터 이전에 수집된 샘플에 포함되는 암 세포에 의한 AMHRII 발현 수준이 (i) 막 AMHRII 를 발현하는 종양 세포의 빈도, 예를 들어 AMHRII 를 그들의 막에서 발현하는 종양 세포의 백분율 및 (ii) 상기 종양 세포에 의한 AMHRII 막 발현의 수준, 예를 들어 세포 당 막 AMHRII 단백질의 평균 수 둘 모두 확인함으로써 평가될 때 확인될 수 있다.
- [0048] 따라서, 이들 추가의 구현예 중 일부에서, 상기 환자로부터 이전에 수집된 종양 세포의 샘플에서 인간 AMHRII-결합체에 대한, 예를 들어 항-인간 AMHRII 항체에 대한 비-부인과암에 걸린 환자의 반응성은 (i) 상기 샘플에 함유되는 종양 세포가 최소 평균 수의 인간 AMHRII 단백질을 그들의 막에서 발현한다는 것 및 (ii) 인간 AMHRII 를 그들의 막에서 발현하는 세포의 빈도, 예를 들어 인간 AMHRII 를 그들의 막에서 발현하는 세포의 백분율이 적어도 역치 값인지 여부를 확인함으로써 평가될 수 있다.
- [0049] 따라서, 또한 본원에서 기재되는 것은 또한 (i) AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격이 아닌 비-부인과암 환자, 즉, AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성이 아닌 비-부인과암 환자 및 (ii) AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격인 비-부인과암 환자, 즉, AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인 비-부인과암 환자 사이를 구별하는 것을 허용하는 특정 AMHRII 발현 점수 값을 확인하는데 사용될 수 있는 추가의 방법이다.
- [0050] 더욱 정확히, 상기 방법의 구현예에 따르면, 본 명세서에서 기재되는 AMHRII-결합체를 사용하여 암에 대항하여 치료될 수 있는 본원에서 기재되는 비-부인과암에 걸린 환자는 바람직하게는 AMHRII 발현 점수가 1.5 이상임이 확인된 환자를 포함하는 AMHRII 발현 점수가 1.0 이상임이 확인된 환자일 수 있다.
- [0051] 막 AMHRII 발현 점수는 시험되는 암 세포에 의한 AMHRII 발현의 면역조직화학 평가에 기반할 수 있고, 주어진 암 세포 샘플에 관한 개별 막 AMHRII 점수는 (i) AMHRII 발현이 검출가능하지 않은 경우에 0 으로 부여되고, (ii) 유의한 AMHRII 발현이 검출되는 경우에 1 로 부여되고, (iii) 높은 AMHRII 발현이 검출되는 경우에 2 로 부여되고, (iv) AMHRII 의 과발현이 검출되는 경우에 3 으로 부여된다.
- [0052] 실제로, (i) 위에서 기재된 면역조직화학 평가를 통해 막 AMHRII 발현 수준에 부여되는 점수 및 (ii) 암 세포 당 발현되는 AMHRII 단백질의 평균 수 사이에 상관관계가 존재한다. 본원에서 실시예에서 개별 막 AMHRII 점수를 부여하는 것을 허용하는, 막 AMHRII 발현 수준은 또한 비-부인과암에 걸린 환자로부터 이전에 수집된 종양 세포의 샘플에서 시작하여, 세포 당 막 AMHRII 단백질의 평균 수를 확인함으로써 평가될 수 있다는 것이 보여진다.
- [0053] 비-부인과암에 걸린 개체의 AMHRII-결합체를 사용하는 처리에 대한, 즉, 항-AMHRII 항체를 사용하는 처리에 대한 반응성을 확인하는 상기 구현예에 따르면, 막 AMHRII 발현 점수는 주어진 암 세포 샘플에 관해 (i) 상기 암 세포 샘플에서의 AMHRII-발현 세포의 빈도 및 (ii) 상기 AMHRII-발현 세포에 의한 AMHRII 발현의 수준 둘 모두를 고려함으로써 확인된다. 전형적으로는, 주어진 암 세포 샘플의 AMHRII 발현 점수는 하기 식 (I)에 의해

확인된다:

- [0054] E-SCORE=FREQ x AMHRII_수준, 식에서
- [0055] - E-SCORE 는 주어진 암 세포 샘플에 관한 AMHRII 발현 점수 값을 의미하고,
- [0056] - FREQ 는 막 AMHRII 발현이 검출되는 상기 암 세포 샘플에 함유되는 세포의 빈도를 의미하고,
- [0057] - AMHRII_수준은 상기 주어진 암 세포 샘플에 함유되는 AMHRII-발현 세포에 의한 AMHRII 발현의 수준을 의미한다.
- [0058] 예시적으로, E-SCORE 1.0 은 (i) 세포의 50% 가 AMHRII (FREQ 값 0.5) 를 발현하고 (ii) AMHRII 발현 수준 (AMHRII_수준) 이 2 인 주어진 암 세포 샘플에 관해 확인된다.
- [0059] 바람직한 구현예에서, AMHRII 발현 점수 (또는 E-SCORE) 는 본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이 면역조직 학적 방법에 의해 확인된다. 이들 바람직한 구현예에 따르면, AMHRII 막 발현은 AMHRII 에 특이적인 검출 가능한 항체를 사용함으로써 그리고 (i) 상기 항-AMHRII 항체가 결합된 세포의 빈도를 확인하고 (ii) 막-발현되는 AMHRII 에 대한 결합 후에 상기 검출가능한 항-AMHRII 항체에 의해 생성되는 신호의 강도를 확인함으로써 평가된다.
- [0060] 그러나, 본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, AMHRII 발현 점수가 1.5 이상인 AMHRII-발현 암 세포는 다양한 암에서, 비록 구별되는 빈도로이긴 하지만, 확인되었다. 예시적으로, 본 발명자들은 본원에서 결장 종양에서 유래하는 암 세포가 AMHRII 양성 (즉, AMHRII 점수가 1.5 이상임) 으로 분류되며, 두경부암에서 유래하는 암 세포보다 더 높은 빈도를 갖는다는 것을 보였다.
- [0061] AMHRII 막 발현의 수준을 확인하기 위해서, 세포 막에서 AMHRII 의 검출은 가장 바람직하게는 AMHRII 에 대해 높은 친화도 및 높은 특이성을 갖는 항-AMHRII 모노클로날 항체를 사용하여 수행될 것이며, 이는 실시예에서 3C23K 항-AMHRII 모노클로날 항체에 의해 예시된다.
- [0062] 추가로, AMHRII 점수를 확인하려는 목적의 면역조직화학 방법에 의한 AMHRII 발현의 확인은 가장 바람직하게는 조직 샘플을 적당한 검출 시약 (예를 들어 AMHRII 에 대한 결합에 관한 Kd 값이 55.3 pM 인 높은 친화도 항-AMHRII 모노클로날 항체 예컨대 모노클로날 3C23K 항체) 과 접촉시키기 전에 조직 샘플의 조심스러운 전처리를 수반한다. 샘플 전처리는 세포 표면에서 발현되는 AMHRII 분자의 검출 시약에 대한 이용가능성을 증가시키는 것을 허용할 것이다. 예시적으로, 본원에서 실시예에서 보여지는 바와 같이, 염색 방법은 특정 단계 예컨대 (i) 마이크로파원에의 노출에 의한 고온 탈립 및 (ii) AMHRII-결합 시약, 예컨대 후속적으로 스트렙타비딘-컨주게이티드 검출가능한 시약과 복합체화될 수 있는 비오티닐화된 항-AMHRII 항체의 결합에 의해 생성되는 신호를 증폭시키기 위한 시스템의 적당한 조합을 포함한다. 전처리 탈립 단계는 사전 조직 고정 단계로 인한 검출 신호 소멸 효과를 역전시키는데 중요한 것으로 보였다. 본 발명자들은 AMHRII 검출가능성이 조직 고정 단계에 사용되는 포르말린의 작용에 특별히 민감하다는 것을 보였다.
- [0063] 본 발명의 맥락에서, 이는 AMHRII-결합체, 예컨대 항-AMHRII 항체는 두경부암에 걸린 환자를 치료하는 경우보다 결장암에 걸린 환자를 치료하는 경우에 더 높은 빈도로 유용한 치료제일 것이라는 것을 의미한다. 이는 또한 AMHRII-결합체는 두경부암에 걸린 환자를 치료하는데 적절한 치료제일 수 있지만, 특정 환자가 본원에서 기재되는 바와 같은 AMHRII 결합체를 투여받을 것인지를 결정하기 위해서 종양-유래 암 세포의 AMHRII 발현에 관해 사전에 시험하는 것이 바람직할 것이라는 것을 의미한다.
- [0064] 추가로, 본 발명자들은 항-AMHRII 항체가 유리하게는 비-부인과암을 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 보였다.
- [0065] 따라서, 본 발명자들은 본원에서 AMHRII 를 표적화하는 약제가 비-부인과암의 예방 또는 치료를 위한 신규한 치료적 도구로서 유용하다는 것을 보였다.
- [0066] 본 발명에 따르면, 표현 "~를 포함하는", 예컨대 "~ 단계들을 포함하는" 은 또한 "~로 이루어진", 예컨대 "~ 단계들로 이루어진" 으로 이해된다.
- [0067] AMH 수용체 (AMHR 또는 AMHR2 또는 AMHRII) 는 TGF-베타 관련 단백질들에 대한 유형 II 수용체의 패밀리에 속하는 단일 경막 도메인을 갖는 세린/트레오닌 키나아제이다. 유형 II 수용체는 스스로 리간드와 결합하지만, 신호 전달을 위해서는 유형 I 수용체의 존재를 요구한다. Imbeaud 외 다수는 인간 AMH 유형 II 수용체 유전자를 클로닝했다 (1995, Nature Genet, Vol. 11: 382-388). 인간 AMH 수용체 단백질은 573 개의 아미노산으로 이루어진다; 573 개의 아미노산 중 17, 127, 26 및 403 개는 각각 신호 서열, 세포외 도메인 (ECD), 경막

도메인, 그리고 세린/트레오닌 키나아제 도메인을 함유하는 세포내 도메인을 형성한다.

[0068] 본원에 사용되는 용어 "AMHRII" 는 SEQ ID NO. 17 의 아미노산 서열을 갖는 인간 항 월러 호르몬 유형 II 수용체를 지칭한다.

[0069] 항 월러 호르몬 수용체 (AMHRII) 의 발현은 이미 당 분야에 부인과암, 즉 주로 면역 골수 세포에 의해 침윤되는 종양과 관련하여 기술되었다. AMHRII 는 부인과암을 치료하기 위한 표적 분자인 것으로 동정되었다. AMHRII 에 대해 생성된 항체는 이러한 암을 치료하기 위한 치료 도구로서 제조되었다. 특히 난소암을 치료하기 위한 것으로 PCT 출원 n° WO 2008/053330 및 n° WO 2011/141653 에 기술된 12G4 항-AMHRII 항체와 이의 변이체 뿐만 아니라 동 PCT 출원에 기술된 3C23K 항-AMHRII 항체가 예시될 수 있다. 이는 항-AMHRII 항체-약물 컨주게이트를 사용하는, 난소암에 대한 특정의 치료 전략을 개시한 PCT 출원 n° WO 2017/025458 이 또한 언급될 수 있다.

[0070] 본 발명자들은 이제 예상 외로 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는, 다양한 인간암 세포의 표면에서 AMHRII 이 발현되었다는 것을 발견했다. 본 발명자들은 또한 (i) 암 세포에 의한 AMHRII 유전자 발현과 (ii) 동일한 암 세포에 의한 세포 막 AMHRII 단백질 발현 사이에 관계가 없다는 것을 발견했다.

[0071] 인간암 세포에 의한 AMHRII 표면 발현에 관한 본 발명자들의 발견은 특히 암 환자로부터 이전에 수득된 인간 고형 종양 조직 샘플을 사용하여 수행된 항-AMHRII 항체를 사용하는 면역조직화학 어세이에서 비롯된다. 인간암 세포에 의한 AMHRII 표면 발현에 관한 본 발명자들의 발견은 또한 마우스에서 인간 일차 암 세포 이종이식편에서 기원하는 종양 조직 샘플에 대해 수행된 항-AMHRII 항체를 사용하는 면역조직화학 어세이로부터 얻어졌다.

[0072] 본 발명자들은 또한 항-AMHRII 항체는 AMHRII 를 종양 세포 표면에서 발현하는 비-부인과 인간암, 특히 본 명세서에서 개시되는 AMHRII-발현 암을 치료하는데 유용하다는 것을 보였다. 특히, 양호한 항-암 활성은 세포독성 분자에 컨주게이트된 항-AMHRII 항체를 포함하는 면역컨주게이트에 의해 보여졌다.

[0073] 본 발명자들은 당해 기술분야에서 AMHRII-발현 부인과암에 대항하는 항-종양 효능이 증명된 항-AMHRII 항체는 또한 비-부인과 AMHRII-발현 암, 특히 본 명세서에서 개시되는 AMHRII-발현 암을 예방 또는 치료하는데 유용하다는 것을 보였다.

[0074] 더욱 정확히, 본원에서 실시예에서 3C23K 로 명명되는 항-AMHRII 항체는 인간 간암에 대항하여 생체내에서 항-종양 활성을 발휘한다는 것이 보여진다. 중요하게도, 인간 간암에 대항하는 항-AMHRII 3C23K 항체의 생체내 항-종양 활성은 간암, 특히 간세포 암종을 치료하기 위한 잘 알려진 항암제인 소라페닙과 동일한 자릿수를 갖는다.

[0075] 추가로, 본원에서 실시예는 또한 항-AMHRII 3C23K 항체는 검출가능한 독성 이벤트를 생체내에서 유도하지 않지만, 동일한 생체내 조건에서 소라페닙을 사용하는 처리는 유의미한 체중 손실을 야기했다는 것을 보였다.

[0076] 추가로, 본원에서 개시되는 바와 같이, 항-AMHRII 3C23K 항체의 독성면역컨주게이트 유도체 (ADC: 항체 약물 컨주게이트 (Antibody Drug Conjugate)) 는 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는 암에 대항하여 양호한 항-암 활성을 발휘한다.

[0077] 따라서, 본 발명은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 암의 군으로부터 선택되는 암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 인간 AMHRII-결합체에 관한 것이다.

[0078] 본 발명은 또한 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 암의 군으로부터 선택되는 암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 명세서에서 개시되는 AMHRII-결합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0079] 본 발명은 또한 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 암의 군으로부터 선택되는 암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 명세서에서 개시되는 AMHRII-결합체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0080] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 AMHRII-결합체는 MIS 천연 리간드 활성의 모방을 요구하지 않는다. 따라서,

본 발명에 따라 사용될 수 있는 AMHRII-결합체는 AMHRII 에 대한 결합 후에 임의의 세포 신호전달 경로를 활성화시킬 필요가 없다. 그 대신에, 단지 상기 결합체가 AMHRII 에 결합하는 능력만이 요구되며, 그 이유는 상기 결합체가 세포독성-유도 활성, 예컨대, 항-AMHRII 세포독성 면역-くん주게이트, ADCC-유도 또는 ADC-유도 항-AMHRII 항체 또는 AMHRII-결합 조작된 수용체를 발현하는 CAR T-세포를 포함하는, 세포독성-유도 독립체(entity)를 표적화하는데 배타적으로 사용되기 때문이다.

[0081] AMHRII 결합체

본원에서 사용되는, AMHRII-결합체는 AMHRII 에 특이적으로 결합하고, 적당한 방식으로 제시될 때, 상기 결합체가 세포 막-발현되는 AMHRII 에 결합된 후에 표적 AMHRII 를 그들의 표면에서 발현하는 세포의 사망을 야기할 것인 임의의 결합체를 포함한다.

[0083] 본원에서 기재되는 바와 같은 암을 치료하는데 사용되는 AMHRII-결합체는 또한 본원에서 "치료적 AMHRII-결합체"로 명명될 수 있다.

[0084] 일반적으로는, AMHRII-결합체는 AMHRII 에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 핵산을 포함한다.

[0085] AMHRII-결합 단백질은 주로 항-AMHRII 항체 또는 항-AMHRII 항체의 AMHRII-결합 단편으로부터 기원하는 하나 이상의 상보성 결정 영역 (Complementary Determining Region) (CDR) 을 포함하는 단백질을 포함하며, 상기 AMHRII-결합 단백질은 조작된 세포 예컨대 CAR-T-세포, CAR NK T-세포 또는 CAR 마크로파지에 의해 키메라 항원 수용체 (CAR) 로서 발현될 수 있음이 이해된다.

[0086] AMHRII-결합 핵산은 주로 AMHRII 에 대한 그들의 특이적 결합 특성에 관해 특히 선별된 핵산 앱타머를 포함한다.

[0087] 일부 바람직한 구현예에서, AMHRII-결합체는 항-AMHRII 항체 또는 그의 AMHRII-결합 단편이다.

[0088] 가장 바람직한 구현예에서, AMHRII-결합체는 항-AMHRII 모노클로날 항체 또는 그의 AMHRII-결합 단편이다.

[0089] 이들 바람직한 구현예에 따르면, 항-AMHRII 모노클로날 항체는 키메라 항-AMHRII 항체, 인간화된 항-AMHRII 항체 및 인간 AMHRII 항체, 뿐만 아니라 그의 AMHRII-결합 단편 및 AMHRII-결합 유도체를 포함한다.

[0090] 다양한 AMHRII 항체가 당해 기술 분야에서 알려져 있고, 본 발명에 따라 AMHRII-결합체로서 사용될 수 있다.

본 발명을 수행하는 목적을 위해, 당업자는, 예시를 위해, Creative Biolabs 에 의해 레퍼런스 n° MHH-57 하에 시판되는 재조합 인간 항-AMHRII 를 사용할 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 사용될 수 있는 항-AMHRII 항체는 PCT 출원 n° WO 2008/053330 에서 개시된 인간화된 12G4 항체이다.

[0092] 일부 기타 구현예에서, 상기 항-AMHRII 항체는 PCT 출원 n° WO 2011/141653 에 기재된 인간화된 항체이며, 상기 인간화된 항체는 3C23 항체 뿐만 아니라 그의 변이체를 포함하며, 상기 그의 변이체는 3C23K 인간화된 항체를 포함한다.

[0093] 추가의 구현예에서, 상기 항-AMHRII 항체는 PCT 출원 n° WO 2017/025458 에 기재된 항체이다. 이들 추가의 구현예에 따르면, PCT 출원 n° WO 2017/025458 은 상기 항-AMHRII 항체가 세포독성체에 연결되어 있는 항체 약물 컨주게이트 (ADC) 의 형태로 AMHRII-결합체를 개시했다.

[0094] 뛸러 호르몬 유형 II 수용체에 대항하는 모노클로날 항체 (및 그의 인간화된 유도체) 는 당해 기술분야에서 난소암의 치료를 위해 개발되었다 (참고, EP 2097453B1 및 미국 특허 No. 8,278,423, 이는 본원에서 그 전문이 참조로 포함됨).

[0095] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 AMHRII-결합체 중에서, 당업자는 약물 또는 검출가능한 라벨로 유도체화되어 ADC 를 형성하는 항체를 포함하는 모노클로날 항체 12G4 (mAb 12G4), 또는 그의 키메라 또는 인간화된 변이체를 사용할 수 있다. mAb12G4 를 생산하는 하이브리도마는 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France) 에, 부다페스트 조약에 따라, 2006 년 9 월 26 일자에 기탁되었고, CNCM 수탁 번호 1-3673 을 갖는다. mAb 12G4 의 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인은 서열분석되었으며, mAb 12G4 의 상보성 결정 영역 (CDR) 을 갖는 것으로 확인되었다 (참고, EP 2097453B1 및 미국 특허 No. 8,278,423, 이는 본원에서 그 전문이 참조로 포함됨). mAb 12G4 및 그것의 키메라 또는 인간화된 변이체는 본원에서 개시되는 ADC 의 생산에 사용될 수 있다.

- [0096] PCT 출원 n° PCT/FR2011/050745 (국제 공보 n° WO/2011/141653) 및 미국 특허 No. 9,012,607 (이)를 각각은 본원에서 그 전문이 참조로 포함됨) 은 뮤린 12G4 항체에서 유래하는 신규한 인간화된 항체를 개시하고 있다. 이들 인간화된 항체는 본 발명의 목적을 위해 AMHRII-결합제로서 사용될 수 있다. PCT 출원 n° WO/2011/141653에서 개시되는 특정 구현예에서, 항체는 3C23 및 C23K로서 동정된 것이다. 이들 항체의 핵산 서열 및 폴리펩티드 서열은 본원에서 SEQ ID NO: 1-16로서 제공된다. 본 발명의 일부 양태에서, 관심의 항-AMHRII 항체는 "SEQ ID NO: 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 을 포함하는 중쇄를 포함하는" 것으로 언급될 수 있다. 따라서, 다양한 구현예에서, ADC의 생성을 위한 것을 포함하는, 특히 바람직한 항체는 하기로 포함한다:
- [0097] a) SEQ ID NO: 2 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 4 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23 VL 및 VH 서열);
- [0098] b) SEQ ID NO: 6 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 8 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23K VL 및 VH 서열);
- [0099] c) SEQ ID NO: 10 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 12 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23 경쇄 및 중쇄);
- [0100] d) SEQ ID NO: 14 을 포함하는 경쇄 및 SEQ ID NO: 16 을 포함하는 중쇄 (리더가 없는 3C23K 경쇄 및 중쇄).
- [0101] 도 1A 및 1B에서 제공되는 중쇄 및 경쇄 서열에 기반하는 다른 항체 (예를 들어, 인간화된 또는 키메라 항체) (예를 들어, 도면에 개시된 CDR 서열을 함유하는 항체, 예컨대 인간화된 또는 키메라 항체)는 ADC의 형성을 위한 것을 포함하는 관심의 항-AMHRII-결합제로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 하기 서열을 포함하는 (또는 하기 서열로 이루어지는) CDR을 포함하는/함유하는 항-AMHRII 항체의 용도에 관한 것이다:
- [0102] - CDRL-1: RASX1X2VX3X4X5A (SEQ ID NO. 65), 여기에서 X1 및 X2 는, 독립적으로, S 또는 P이고, X3 은 R 또는 W 또는 G이고, X4 는 T 또는 D이고, X5 는 I 또는 T임;
- [0103] - CDRL-2: PTSSLX6S (SEQ ID NO. 66), 여기에서 X6 은 K 또는 E임; 및
- [0104] - CDRL-3: LQWSSYPWT (SEQ ID NO. 67);
- [0105] - CDRH-1: KASGYX7FTX8X9HIH (SEQ ID NO. 68), 여기에서 X7 은 S 또는 T이고, X8 은 S 또는 G이고, X9 은 Y 또는 N임;
- [0106] - CDRH-2: WIYPX10DDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO. 69), 여기에서 X10 은 G 또는 E임;
- [0107] - CDRH-3: GDRFAY (SEQ ID NO. 70).
- [0108] 본 발명은 또한 본원에서 명시되는 비-부인과암을 치료하기 위한 그러한 항-AMHRII 항체를 사용하여 생성되는 ADC의 용도에 관한 것이다.
- [0109] 본 출원의 범위 내에서 항체 (예를 들어, 키메라 또는 인간화된)는 하기 표에 개시된 것을 포함한다: 대안적으로, AMHRII에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체가 ADC의 제조에 사용될 수 있다. 3C23K 항체는 하기로 의해 정의된다:
- [0110] - VH 아미노산 서열에 관해 SEQ ID NO: 19
- [0111] - VL 아미노산 서열에 관해 SEQ ID NO: 36
- [0112] 아래 표 1은 본 발명에 따라 사용될 수 있는 항-AMHRII 인간화된 항체를 열거한다.
- [0113] 표 1: 항-AMHRII 항체

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID	VL 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID
3C23K		19		36
3C23		19	L-K55E	37
3C23KR	H-R3Q	20		36

- [0114]

황체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID	VL 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID
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
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

[0115]

항체	돌연변이			
	VH 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID	VL 돌연변이	서열 목록의 SEQ ID
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
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

[0116]

항-AMHRII 항체, AMHRII-결합 단편 또는 항-AMHRII 항체의 AMHRII-결합 유도체

[0117]

용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체(전장 또는 완전한 모노클로날 항체를 포함함), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물 활성을 나타내는 한 항체 단편(이하 참조)을 포함한다.

[0118]

그러므로 본원에 사용되는 용어 "항체"는 임의의 척추동물에서, 예를 들어, 포유동물 예컨대 인간, 염소, 토끼 및 마우스, 뿐만 아니라 비-포유류 종에서 면역 반응 동안 생산되는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 그의 조합, 및 유사한 문자를 예를 들어 제한 없이 포함하는 면역글로불린 또는 면역글로불린 유사 문자, 예컨대 상어 면역글로불린을 총칭한다.

구체적으로 다르게 명시되지 않으면, 용어 "항체"는 다른 문자(즉, AMHRII 와 관련 없는 문자)에 대한 결합을 실질적으로 배제하는 AMHRII에 특이적으로 결합하는 완전한 면역글로불린 및 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"을 포함한다.

용어 "항체"는 또한 유전자 조작된 형태 예컨대 키메라 항체(예를 들어, 인간화된 뮤린 항체), 이종컨주케이트 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함한다.

또한, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, 111.); Kuby, J., Immunology, 7th Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 2013 을 참조한다.

[0119]

본원에 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 언급하며,

즉 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원에 대항하여 유도된다. 게다가, 전형적으로는 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되면 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용되는 모노클로날 항체는 Kohler et al, *Nature* 256:495 (1975)에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어, Clackson et al, *Nature* 352:624-628 (1991) 또는 Marks et al, *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991)에 기재된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

- [0121] 용어 "항체 단편"은 완전한 항체의 일부분을 언급하고, 완전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 언급한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편들로부터 형성되는 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0122] 본원에 사용되는 "항체 중쇄"는 모든 항체 분자의 자연 발생적 입체구조에 존재하는 폴리펩티드 사슬 2 가지 유형 중 더 큰 사슬을 언급한다.
- [0123] 본원에 사용되는 "항체 경쇄"는 모든 항체 분자의 자연 발생적 입체구조에 존재하는 폴리펩티드 사슬 2 가지 유형 중 더 작은 사슬을 언급하며, κ 및 λ 경쇄는 주요 항체 경쇄 동형 (isotype) 2 가지를 언급한다.
- [0124] 본원에 사용되는 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 특정 항원을 인지하고 이에 결합하는 항체의 2 개의 가변 사슬 (중쇄 및 경쇄)의 일부를 언급한다. CDR은 가변 사슬 중 가장 가변적인 부분이고, 항체에 특이성을 제공한다. 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 각각에 3 개의 CDR이 존재하므로, 항체 분자 당 총 6 개의 CDR이 존재한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합을 책임진다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로는 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 넘버링하여 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 언급되고, 또한 전형적으로는 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 식별된다. 따라서, VHCDR3은 그것이 발견되는 항체 중쇄의 가변 도메인에 위치하지만, VLCDR1은 그것이 발견되는 항체 경쇄의 가변 도메인에서 유래하는 CDR1이다. LHR에 결합하는 항체는 특이적 VH 영역 및 VL 영역 서열, 및 따라서 특이적 CDR 서열을 가질 것이다. 상이한 특이성 (즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 자리)을 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다. 항체마다 다른 것은 CDR이지만, CDR 내의 오직 제한된 수의 아미노산 위치가 항원 결합에 직접 관여한다. CDR 내의 이들 위치는 특이성 결정 잔기 (SDR)로 호칭된다.
- [0125] "골격 영역" (이후 FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로는 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 식별되는 4 개의 FR를 갖는다. CDR이 Kabat에 따라 정의되는 경우에, 경쇄 FR 잔기는 대략 잔기 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), 및 98-107 (LCFR4)에 위치하고, 중쇄 FR 잔기는 중쇄 잔기에서 대략 잔기 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3), 및 103-113 (HCFR4)에 위치한다.
- [0126] "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로 Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합에 요망되는 구조를 형성하는 것을 가능하게 해준다. scFv에 관한 리뷰에 관해, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, VoI 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)을 참조한다.
- [0127] 용어 "다이아바디"는 2 개의 항원 결합 자리를 갖는 작은 항체 단편을 언급하며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (VH 및 VL)에 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일 사슬 상의 2 개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적 도메인과의 쌍형성이 강제되고, 2 개의 항원-결합 자리를 생성한다. 다이아바디는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에 더욱 상세히 기재되어 있다.
- [0128] 다이아바디 또는 이중특이적 항체는 대략 2 개의 범주로 분류된다: 면역글로불린 G (IgG)-유사 분자 및 비-IgG-유사 분자. IgG-유사 bsAb는 Fc-매개되는 효과기 기능 예컨대 항체-의존적 세포-매개되는 세포독성 (ADCC), 보체-의존적 세포독성 (CDC), 및 항체-의존적 세포성 식세포작용 (ADCP)을 보유한다 (Spiess et al.,

2015, Mol Immunol., Vol. 67(2): 95-106.). bsAb 의 Fc 영역은 정제를 용이하게 하고, 가용성 및 안정성을 개선한다. IgG-유사 포맷의 이중특이적 항체는 통상적으로는 그들의 더 큰 크기 및 FcRn-매개되는 재순환 때문에 더 긴 혈청 반감기를 갖는다 (Kontermann et al., 2015, Bispecific antibodies. Drug Discov Today Vol. 20(7): 838-47). 비-IgG-유사 bsAb 는 크기가 더 작아서, 향상된 조직 침투성을 초래한다 (Kontermann et al., 2015, Bispecific antibodies. Drug Discov Today Vol. 20(7): 838-47).

[0129] 일부 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 (i) AMHRII 에 결합하는 제 1 항원 결합 자리 및 (ii) AMHRII 와 구별되는 표적 항원, 특히 종양 미세환경의 암 세포 또는 면역 세포 예컨대 T-세포, NK 또는 마크로파지에 의해 발현될 수 있는 표적 항원에 결합하는 제 2 항원 결합 자리를 포함한다. 일부 구현 예에서, 그러한 이중특이적 항체에서, 상기 제 2 항원 결합 자리는 CD3 인 표적 항원에 결합하고 T-세포의 참여를 허용한다. 이 표적 항원은 또한 be T-세포를 잠금해제하는 PDL1 또는 NK 또는 마크로파지를 활성화시키는 CD16 일 수 있다.

[0130] 본원에서 명시되는 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종에서 유래하는 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내 대응 서열과 동일한 또는 상동성이며, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종에서 유래하는 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내 대응 서열과 동일한 또는 상동성인 "키메라" 항-AMHRII 항체 (면역글로불린), 뿐만 아니라, 원하는 생물 활성을 나타내는 한 그러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 No. 4,816,567; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0131] 본원에서 명시되는 모노클로날 항체는 또한 인간화된 항-AMHRII 항체를 포함한다. 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린에서 유래하는 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수용자의 과가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체) 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 과가변 영역으로부터의 잔기로 대체되어 있는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역 (FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 대체되어 있다. 게다가, 인간화된 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 만들어진다.

일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 1 개의, 전형적으로는 2 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이며, 과가변 루프의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 과가변 루프에 대응하고, FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 FR 영역이다. 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 관해, 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.

[0132] 본원에서 명시되는 모노클로날 항-AMHRII 항체는 항-AMHRII 인간 항체를 추가로 포함한다. "인간 항체" 는 인간에 의해 생산되는 항체의 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하고/보유하거나 본원에서 개시되는 인간 항체를 제조하는 임의의 기술을 사용하여 제조된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 배제한다. 인간 항체는 당해 기술분야에서 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 하나의 구현예에서, 인간 항체는 인간 항체를 발현하는 파지 라이브러리로부터 선별된다 (Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 좌위를 트랜스제닉 동물, 예를 들어, 내생적 면역글로불린 유전자가 일부 또는 전부 불활성화된 마우스에 도입함으로써 제조될 수 있다. 챠린지 후에, 인간 항체 생산이 관찰되며, 이는 유전자 재배열, 조립, 및 항체 레퍼토리를 포함하는 모든 측면에서 인간에서 보이는 것과 매우 비슷하다. 이 접근법은, 예를 들어, 미국 특허 No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 및 하기 과학 문헌에 기재되어 있다: 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). 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대항하여 유도되는 항체를 생산하는 인간 B 림프구의 불멸화를 통해 제조될 수 있다 (그러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나 또는 시험관 내에서 면역화될 수 있다). 예를 들어, 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 No. 5,750,373 을 참조한다.

[0133]

본원에 사용되는 "항체 돌연변이체" 또는 "항체 변이체"는 종-의존적 항체의 아미노산 잔기 중 하나 이상이 변형된 종-의존적 항체의 아미노산 서열 변이체를 언급한다. 그러한 돌연변이체는 필연적으로 종-의존적 항체와 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 하나의 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%, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다. 이 서열에 관한 동일성 또는 유사성은 본원에서, 필요에 따라, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위한 서열 정렬 및 캡 도입 후에, 종-의존적 항체 잔기와 동일한 (즉, 동일한 잔기) 또는 유사한 (즉, 공통 측쇄 특성에 기반하는 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기, 이하 참조) 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. N-말단, C-말단, 또는 내부 연장, 결실, 또는 가변 도메인 외부의 항체 서열로의 삽입 중 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되면 안된다.

[0134]

인간화된 항체는 당해 기술분야에 알려진 기술에 따라 CDR 도메인을 인코딩하는 핵산 서열을 수득하고 인간화된 항체를 구축함으로써 생산될 수 있다. 종래의 재조합 DNA 및 유전자 트랜스펙션 기술에 기반하여 인간화된 항체를 생산하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M S. et al. 1985 참조). 항체는, 예를 들어, CDR-그래프팅 (EP 239,400; PCT 공보 WO 91/09967; 미국 특허 No. 5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 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)), 및 사슬 셔플링 (미국 특허 No. 5,565,332)을 포함하는 당해 기술분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다.

그러한 항체를 제조하기 위한 일반적 재조합 DNA 기술이 또한 알려져 있다 (유럽 특허 출원 EP 125023 및 국제 특허 출원 WO 96/02576 참조).

[0135]

본원에서 명시되는 항-AMHRII 항체를 효과기 기능에 관하여 변형하여, 예를 들어 항체의 항원-의존적 세포-매개되는 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성 (CDC)을 향상시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)이 Fc 영역에 도입될 수 있으며, 그에 의해 이 영역에서 사슬간 이황화물 결합 형성을 허용한다. 그에 따라 생성되는 동종이합체성 항체는 개선된 내부화 능력 및/또는 증가된 보체-매개되는 세포 살해 및 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. Caron et al, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)을 참조한다. 향상된 항-종양 활성을 갖는 동종 이합체성 항체는 또한 Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)에 기재된 바와 같은 혜테로이작용 성 가교 링커를 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖도록 조작될 수 있고, 그에 의해 향상된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)을 참조한다. WO00/42072 (Presta, L.)는 인간 효과기 세포의 존재 하에 개선된 ADCC 기능을 갖는 항체를 기재하며, 상기 항체는 그의 Fc 영역에 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 개선된 ADCC을 갖는 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 네모버링)에서 치환을 포함한다. 바람직하게는 변경된 Fc 영역은 이들 위치 중 하나, 둘 또는 셋에서 치환을 포함하거나 그것으로 이루어지는 인간 IgG1 Fc 영역이다. 그러한 치환은 임의로 CIq 결합 및/또는 CDC를 증가시키는 치환(들)과 조합된다.

[0136]

변경된 CIq 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 갖는 항체는 WO99/51642, 미국 특허 No. 6,194,551B1, 미국 특허 No. 6,242,195B1, 미국 특허 No. 6,528,624B1 및 미국 특허 No. 6,538,124 (Idusogie et al)에 기재되어 있다. 항체는 그의 Fc 영역의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 포함한다 (잔기의 Eu 네모버링).

[0137]

일부 구현예에서, AMHRII-결합체는 당-조작된 항-AMHRII 항체를 포함한다.

[0138]

본원에 사용되는, 용어 "당조작 (glycoengineering)"은 결합 단백질 조성물의 당형 (glycoform) 프로파일을 변경하기 위한 임의의 당해 기술분야에서 알려진 방법을 언급한다. 그러한 방법은 이종 글리코실트랜스페라제 또는 글리코시다아제를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포 (예를 들어, CHO 세포)에서 결합 단백질 조성물을 발현시키는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 당조작 방법은 특정 당형 프로파일을 편향시키는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0139]

본원에 사용되는 "당-조작된 항체"는, (i) 고-갈락토실화된 Fc 단편을 포함하는 항체, (ii) 비-만노실화된 Fc 단편을 포함하는 저-만노실화된 Fc 단편을 포함하는 항체, 및 (iii) 비-푸코실화된 Fc 단편을 포함하는 저-푸코실화된 Fc 단편을 포함하는 항체를 포함한다. 본원에 사용되는, 당-조작된 단편은 하기 변경된 당화 중 하

나 이상을 포함하는 군에서 선택되는 변경된 당화를 갖는 Fc 단편을 포함한다: (i) 고-갈락토실화, (ii) 저-만노실화 및 (iii) 저-푸코실화. 결과적으로, 본 발명에 따라 사용되는 항-AMHRII 항체로부터의 당-조작된 Fc 단편은 고-갈락토실화된, 저-만노실화된 및 저-푸코실화된 Fc 단편의 예시적 예들을 포함한다.

[0140] 당업자는 비-변형된 Fc 단편보다 더 높은 친화도로 Fc 수용체에 결합하는 것으로 알려진 고-갈락토실화된 Fc 단편, 저-만노실화된 Fc 단편 및 저-푸코실화된 Fc 단편을 포함하는 항-AMHRII 항체를 수득하기 위한 잘 알려진 기술을 참조할 수 있다.

[0141] 당-조작된 항-AMHRII 항체는 또한 "저 푸코스" Fc 단편으로 명명될 수 있는 저-푸코실화된 Fc 단편을 포함하는 항-AMHRII 항체를 포함한다.

[0142] 면역컨주게이트, 특히 항체 약물 컨주게이트 (ADC)

[0143] 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있는 AMHRII-결합체는 세포독성제 예컨대 화학요법제, 독소 (예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 컨주게이트) 컨주게이트되는 본원에서 명시되는 항체를 포함한다. 그러한 항체 컨주게이트는 PCT 출원 n° WO 2017/025458 에 기재된 것을 포함한다. PCT 출원 n° WO 2017/025458 은 특히 항-AMHRII 3C23K 항체, 뿐만 아니라 비-부인과 인간암에 대항하는 생체내 항-암 활성이 본원에서 보여지는 3C23K ADC 컨주게이트를 개시했다.

[0144] 세포독성제는 효소 활성 독소를 포함한다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬 (*Pseudomonas aeruginosa* 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모디카 카란티아 (*momordica charantia*) 저해제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*sapaonaria officinalis*) 저해제, 젤로닌, 미토겔린, 리스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다.

[0145] 다양한 방사성핵종이 방사성컨주게이트 항체의 생산에 사용가능하다.

[0146] 항체 및 세포독성제의 컨주게이트는 다양한 이작용성 단백질 커플링제 예컨대 PCT 출원 n° WO 2017/025458 에 개시된 것을 사용하여 제조된다.

[0147] 항-AMHRII ADC 항체 컨주게이트의 바람직한 면역컨주게이트는 PCT 출원 n° WO 2017/025458 에 기재된 것이다.

[0148] CAR T-세포, CAR NK 세포 및 CAR 마크로파지를 포함하는, CAR 세포

[0149] 일부 구현예에서, 인간-AMHRII-결합체는 AMHRII-결합 수용체 또는 AMHRII-결합 수용체-발현 세포, 특히 AMHRII-결합 수용체-발현 CAR T-세포, AMHRII-결합 수용체 CAR NK 세포 또는 AMHRII-결합 수용체-발현 CAR 마크로파지이다.

[0150] 따라서, 일부 구현예에서, 인간 AMHRII-결합체는 AMHRII-결합 조작된 수용체, 가장 바람직하게는 그의 AMHRII-결합 영역이 본 명세서에서 개시되는 모노클로날 항-AMHRII 항체에서 유래하는 AMHRII-결합 조작된 수용체이다.

[0151] 전형적으로는, AMHRII-결합 조작된 수용체는 (i) 세포외 도메인, (ii) 경막 도메인 및 (iii) 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)로 이루어지고, 세포외 도메인은 본 명세서에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체에서 유래하는 AMHRII-결합 모이어티이다. 일부 구현예에서, 상기 AMHRII-결합 조작된 수용체의 세포외 도메인은 (i) 본원에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체에서 유래하는 CDR 을 포함하는 항체 VH 사슬 및 (ii) 본원에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체에서 유래하는 CDR 을 포함하는 항체 VL 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 AMHRII-결합 조작된 수용체의 세포외 도메인은 본원에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체의 VH 사슬 및 VL 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 AMHRII-결합 조작된 수용체의 세포외 도메인은, 각각, 본 명세서에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체로부터의 VH 사슬 및 CH 사슬에서 유래하는 CDR 을 포함하는 ScFv 이다. 일부 구현예에서, 상기 AMHRII-결합 조작된 수용체의 세포외 도메인은, 각각, 본 명세서에서 개시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체로부터의 VH 사슬 및 CH 사슬을 포함하는 ScFv 이다.

[0152] 또한 본원에서 포함되는 것은 그러한 AMHRII-결합 수용체를 발현하는 세포, 특히 AMHRII-결합 수용체를 발현하는 CAR T-세포, CAR NK 세포 또는 CAR 마크로파지로 이루어지는 AMHRII-결합체이다.

[0153] 본원에 사용되는 용어 "키메라 항원 수용체" (CAR) 는 항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인, 이 세포외 도메인

이 유래되는 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드에서 유래하는 경막 도메인, 및 적어도 하나의 세포내 도메인을 포함하는 융합 단백질을 언급한다. "키메라 항원 수용체 (CAR)"는 때때로 "키메라 수용체", "T-바디" 또는 "키메라 면역 수용체 (chimeric immune receptor) (CIR)"로 호칭된다. "AMHRII에 결합할 수 있는 세포외 도메인"은 AMHRII에 결합할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. "세포내 도메인"은 신호를 전달하여 세포에서 생물학적 과정의 활성화 또는 저해를 야기하는 도메인으로서 기능하는 것으로 알려진 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. "경막 도메인"은 세포 막을 가로지르는 것으로 알려져 있고 세포외 도메인과 신호전달 도메인을 연결시키는 기능을 할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 키메라 항원 수용체는 임의로 세포외 도메인과 경막 도메인 사이에서 링커로서의 역할을 하는 "힌지 도메인"을 포함할 수 있다.

[0154] CAR T-세포는 단일 사슬 항체 단편 (scFv) 또는 리간드가 T-세포 활성화를 촉진할 수 있는 T-세포 신호전달 도메인에 부착되어 있는 유전자 조작된 자가 T-세포이다 (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).

[0155] "세포내 신호전달 도메인"은 T 세포 내부에서 발견되거나 또는 T 세포 내부에서 발견되도록 조작되는 CAR의 부분을 의미한다. "세포내 신호전달 도메인"은 T 세포의 원형질막에 CAR을 고정시키는 "경막 도메인"을 함유할 수 있거나 또는 또한 함유할 수 없다. 하나의 구현예에서, "경막 도메인" 및 "세포내 신호전달 도메인"은 다른 구현예에서와 동일한 단백질 (예를 들어, CD3ζ)에서 유래한다; 세포내 신호전달 도메인 및 경막 도메인은 상이한 단백질 (예를 들어, CD3ζ의 경막 도메인과 CD28 분자의 세포내 신호전달 도메인, 또는 그 반대)에서 유래한다.

[0156] "보조자극 엔도도메인"은 T 세포 보조자극 분자에서 유래하는 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 단편을 의미한다. T 세포 보조자극 분자의 비제한적 목록은 CD3, CD28, OX-40, 4-1BB, CD27, CD270, CD30 및 ICOS를 포함한다. 보조자극 엔도도메인은 동일 또는 상이한 보조자극 엔도도메인으로부터의 경막 도메인을 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있다.

[0157] "세포외 항원 결합 도메인"은 AMHRII를 특이적으로 인지하고 그에 결합하는 CAR의 부분을 의미한다.

[0158] 바람직한 구현예에서, "세포외 결합 도메인"은 항-AMHRII 모노클로날 항체에서 유래한다. 예를 들어, "세포외 결합 도메인"은 모노클로날 항체로부터의 Fab 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, "세포외 결합 도메인"은 특정 항-AMHRII 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, "세포외 결합 도메인"은 본원에서 명시되는 항-AMHRII 모노클로날 항체로부터 수득되는 단일-사슬 가변 단편 (scFv)이다.

[0159] 바람직한 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 본 명세서에서 기재되는 항-AMHRII 모노클로날 항체 중 임의의 하나에서, 특히 3C23K 항-AMHRII 모노클로날 항체에서 유래한다.

I. 세포외 항원 결합 도메인

[0161] 하나의 구현예에서, 본 발명의 CAR은 본원에서 기재되는 항-AMHRII 모노클로날 항체 중 하나로부터의 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0162] 하나의 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 하기 CDR 서열을 포함한다:

[0163] - CDRL-1: RASX1X2VX3X4X5A (SEQ ID NO. 65), 여기에서 X1 및 X2는, 독립적으로, S 또는 P이고, X3은 R 또는 W 또는 G이고, X4는 T 또는 D이고, X5는 I 또는 T임;

[0164] - CDRL-2: PTSSLX6S (SEQ ID NO. 66), 여기에서 X6은 K 또는 E임; 및

[0165] - CDRL-3: LQWSSYPWT (SEQ ID NO. 67);

[0166] - CDRH-1: KASGYX7FTX8X9HIH (SEQ ID NO. 68), 여기에서 X7은 S 또는 T이고, X8은 S 또는 G이고, X9은 Y 또는 N임;

[0167] - CDRH-2: WIYPX10DDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO. 69), 여기에서 X10은 G 또는 E임;

[0168] - CDRH-3: GDRFAY (SEQ ID NO. 70)

II. KappaMab scFv의 VL 및 VH 도메인 사이의 링커

- [0170] 추가의 구현예에서, 항-AMHRII VL 는 항-AMHRII VH 에 가요성 링커를 통해 연결된다. 구체적으로, 가요성 링커는 약 10-30 개 아미노산 (예를 들어 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 또는 5 개 아미노산) 의 글라이신/세린 링커이고 구조 (Gly4Ser)³ 을 포함한다.
- [0171] *III. 세포외 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인 사이의 스페이서*
- [0172] 세포외 항원 결합 도메인은 세포내 신호전달 도메인에 "스페이서" 를 사용하여 연결된다. 스페이서는 항원 인지 및 결합을 촉진하는 방식으로 항원 결합 도메인의 배향을 허용하기에 충분히 가요성이도록 디자인된다. 스페이서는 항-AMHRII 면역글로불린 자체에서 유래할 수 있고, IgG1 헌지 영역 또는 IgG 의 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함할 수 있다.
- [0173] *IV. 세포내 신호전달 도메인*
- [0174] 세포내 신호전달 도메인은 CD3 사슬의 전부 또는 일부를 포함한다. CD 은, 또한 CD247 로서 알려져 있으며, CD4 또는 CD8 T 세포 보조수용체와 함께 세포외 항원 인지를 세포내 신호전달 캐스케이드에 커플링시키는 것을 책임진다.
- [0175] CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함시키는 것에 더하여, 보조자극 분자의 포함은 뮤린 모델 및 임상 시험에서 CAR T-세포 활성을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. CD28, 4-IBB, ICOS, CD27, CD270, CD30 및 OX-40 을 포함하여 여러 개가 연구되어 왔다.
- [0176] 특정 구현예에서, 하기 단계를 포함하거나, 또는 대안적으로 하기 단계로 본질적으로 이루어지는 CAR 발현 세포의 생산 방법이 개시된다: (i) 단리된 세포의 집단을 CAR 을 인코딩하는 핵산 서열로 형질도입시키는 단계 및 (ii) 단계 (i) 의 상기 핵산 서열로 성공적으로 형질도입된 세포의 하위집단을 선별하는 단계. 일부 구현예에서, 단리된 세포는 T-세포, 동물 T-세포, 포유류 T-세포, 고양이 T-세포, 개 T-세포 또는 인간 T-세포이며, 그에 의해 CAR T-세포를 생산한다. 특정 구현예에서, 단리된 세포는 NK-세포, 예를 들어, 동물 NK-세포, 포유류 NK-세포, 고양이 NK-세포, 개 NK-세포 또는 인간 NK-세포이며, 그에 의해 CAR NK-세포를 생산한다.
- [0177] *CAR T-세포, CAR NK 세포 및 CAR 마크로파지의 치료적 응용*
- [0178] 본원에서 기재되는 CAR T-세포, CAR NK 세포 및 CAR 마크로파지를 포함하는, CAR 세포는 비-부인과 AMHRII-발현 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 CAR 세포는 바람직하게는 본원에서 기재되는 하나의 암에 걸린 환자에서 AMHRII-발현 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 CAR 세포는 바람직하게는 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 암을 치료하는데 사용된다.
- [0179] 본 발명의 CAR 세포는 단독으로 또는 희석제, 알려진 항-암 치료제, 및/또는 기타 성분 예컨대 사이토카인 또는 면역자극성인 기타 세포 집단과의 조합으로 투여될 수 있다.
- [0180] 본 공개의 방법 양태는 종양 성장의 저해를 필요로 하는 대상체에서 종양 성장의 저해 방법 및/또는 암 치료를 필요로 하는 암 환자의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 종양은 고형 종양이다. 일부 구현예에서, 종양/암은 갑상선, 유방, 난소 또는 전립선 종양/암이다.
- [0181] 본원에서 개시되는 CAR 세포는 단독으로 또는 희석제, 알려진 항-암 치료제, 및/또는 기타 성분 예컨대 사이토카인 또는 면역자극성인 기타 세포 집단과의 조합으로 투여될 수 있다. 그들은 일차, 이차, 삼차, 사차, 또는 그 이상의 요법일 수 있다. 그들은 기타 요법과 조합될 수 있다. 기의 비제한적 예는 화학요법제 또는 생물의약품 (biologic) 을 포함한다. 치료 의사 또는 수의사에 의해 적절한 치료 양생법이 결정될 것이다.
- [0182] 본 발명의 CAR 을 포함하는 약학 조성물이 치료 또는 예방될 질환에 적당한 방식으로 투여될 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 환자의 상태, 및 환자의 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적당한 투여량은 임상 실험에 의해 결정될 수 있다.
- [0183] 치료적 응용
- [0184] 본 명세서에서 다른 곳에서 이미 개시하는 바와 같이, (i) 본원에서 개시되는 항-AMHRII 항체, (ii) 본원에서 개시되는 항체 약물 컨주케이트 및 (iii) 본원에서 개시되는 CAR 세포 (CAR T-세포, CAR NK 세포 및 CAR 마크로

파지를 포함함)를 포함하는 본원에서 개시되는 AMHRII-결합체는 비-부인과 AMHRII-발현 암, 특히 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 활성 성분으로 이루어진다.

[0185] 항-종양 항원 항체 또는 항-종양 항원 CAR 세포를 사용하는 암 치료 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0186] 일부 구현예에서, AMHRII-결합체, 예컨대 항-AMHRII 항체, 항-AMHRII ADC, 항-AMHRII CAR T-세포, 항-AMHRII CAR NL 세포 또는 항-AMHRII CAR 마크로파지를 사용하는 처리를 수행하기 전에, 암 환자는 그들의 종양 세포가 AMHRII를 그들의 표면에서 발현하는지 여부를 확인하기 위해 시험된다.

[0187] AMHRII의 막 발현을 검출하기 위한 그러한 예비 시험은 AMHRII를 낮은 빈도로 발현하는 암의 치료에 바람직하다. 반대로, AMHRII의 막 발현을 검출하기 위한 그러한 예비 시험은 AMHRII를 높은 빈도로 발현하는 암의 치료를 위해 수행될 수 있다.

[0188] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 AMHRII-양성 암에 걸린 개체의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 본원에서 명시되는 AMHRII-결합체에 관한 것이다.

[0189] 본 발명은 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 AMHRII-양성 암에 걸린 개체의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 AMHRII-결합체의 용도에 관한 것이다.

[0190] 본 발명은 또한 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 AMHRII-양성 암에 걸린 개체의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 개체에게 항-AMHRII 결합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0191] 개체는 상기 개체로부터 이전에 수득된 암 조직 샘플에 대해 세포 표면 AMHRII 단백질 발현을 검출하는 방법을 수행함으로써 AMHRII-양성 암에 걸린 개체로서 지정될 수 있다. 세포 표면 AMHRII 단백질 발현의 검출은 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법에 따라 수행될 수 있다. 세포 표면 AMHRII 단백질 발현 검출 방법은 특히 본원에서 실시예에서 예시되는 면역조직화학 방법 뿐만 아니라 형광 활성화되는 세포 분류 방법을 포함한다.

[0192] 본 발명은 또한 개체가 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격 (즉, 반응성) 인지 여부를 확인하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 개체로부터 이전에 수득된 종양 조직 샘플이 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

[0193] 따라서, 본 발명은 또한 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 암에 걸린 개체가 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격인지, 즉, AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인지 여부를 확인하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0194] a) 상기 환자로부터의 암 세포가 AMHRII를 그들의 막에서 발현하는지 여부를 확인하는 단계, 및

[0195] b) 상기 암 세포에 의한 AMHRII의 막 발현이 단계 a)에서 확인된 경우에, 상기 환자가 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격, 즉, AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성이라는 결론을 내리는 단계.

[0196] 상기 방법의 바람직한 구현예에서, (i) AMHRII 발현 점수 값이 단계 a)에서 확인될 때 및 (ii) 상기 AMHRII 발현 점수 값이 역치 점수 값 이상일 때 단계 b)에서 상기 환자가 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격 (즉, 반응성) 이라는 결론이 내려진다. AMHRII 점수 값은 가장 바람직하게는 본 명세서에서 다른 곳에서 기재된 식 (I)을 사용함으로써 계산된다.

[0197] 따라서, 바람직한 구현예에 따르면, 방법의 단계 a)는 면역조직화학 방법, 예컨대 본원에서 실시예에서 보여지는 방법에 의해 수행된다.

[0198] 단계 a)에서 사용되는 암 세포는 일반적으로는 상기 암 환자로부터 이전에 수집된 생검 조직 샘플에서 기원한다.

- [0199] 바람직하게는, 단계 a) 는 본 명세서에서 구체적으로 기재되는 것 중에서 선택되는 항-AMHRII 항체, 특히 3C23K 항체를 사용하여 수행되며, 이의 AMHRII 결합은 잘 알려진 항체 검출 기술, 예컨대 본원에서 실시예에서 개시된 기술에 따라 이차 라벨링된 항체를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0200] 바람직하게는, 하기 식 (I)에 따라 E-SCORE 값의 확인을 허용하는 점수 확인 방법을 수행할 때 상기 암 환자에서 기원하는 암 세포 샘플에서 AMHRII 발현 점수 값 1.0 이상, 가장 바람직하게는 AMHRII 발현 점수 값 1.5 이상이 확인될 때, 상기 열거된 암의 군에 포함되는 암에 걸린 환자는 AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 적격인 것으로 확인되며, 즉, AMHRII-결합체를 사용하는 암 치료에 반응성인 것으로 확인된다:
- [0201] $E\text{-SCORE} = \text{FREQ} \times \text{AMHRII_수준}$, 식에서
- [0202] - E-SCORE 는 주어진 암 세포 샘플에 관관 AMHRII 발현 점수 값을 의미하고,
- [0203] - FREQ 는 막 AMHRII 발현이 검출되는 상기 암 세포 샘플에 함유되는 세포의 빈도를 의미하고,
- [0204] - AMHRII_수준은 상기 주어진 암 세포 샘플에 함유되는 AMHRII-발현 세포에 의한 AMHRII 의 발현의 수준을 의미한다.
- [0205] 본 발명은 또한 결장암, 간암, 간세포 암종, 고환암, 갑상선암, 위암, 위장암, 방광암, 췌장암, 두경부암, 신장암, 지방육종, 섬유육종, 흉막중피종, 흑색종, 육종, 뇌암, 골암종, 유방암, 전립선암 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택되는 암에 걸린 환자의 치료 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0206] a) 상기 개체로부터 이전에 수득된 종양 조직 샘플이 세포 표면에서 AMHRII 단백질을 발현하는지 여부를 확인하는 단계, 및
- [0207] b) AMHRII 의 세포 표면 발현이 단계 a)에서 확인된 경우에 상기 개체를 AMHRII-결합체로 치료하는 단계.
- [0208] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 종양 샘플이 위에 기재된 식 (I)에 따라 계산되는 AMHRII 발현 점수 값 "E-SCORE" 1.0 이상 (이는 E-SCORE 값 1.5 이상을 포함한다) 을 가질 때 단계 a)에서 AMHRII 발현이 확인된다.
- [0209] 상기 방법의 가장 바람직한 구현예에서, 상기 AMHRII-결합체는 본원에서 명시되는 항-AMHRII 항체 또는 그의 단편, 또는 본원에서 명시되는 CAR 세포 (예를 들어 CAR T-세포 또는 CAR NK-세포)로 이루어진다.
- [0210] 일부 구현예에서, 상기 AMHRII-결합체는 유일한 항-암 활성 성분으로서 사용된다.
- [0211] 일부 기타 구현예에서, 상기 AMHRII-결합체를 사용하는 항-암 치료는 또한 상기 개체를 방사선요법 치료 및 화학요법 치료를 포함하는 하나 이상의 추가의 항-암 치료에 적용하는 것을 포함한다.
- [0212] 따라서, 그러한 기타 구현예에 따르면, 상기 AMHRII-결합체를 사용하는 항-암 치료는 또한 상기 개체에게 하나 이상의 추가의 항-암 활성 성분을 투여하는 것을 포함한다.
- [0213] 따라서, 본원에서 기재되는 바와 같은 용도를 위한 AMHRII-결합체의 일부 구현예에 따르면, 상기 AMHRII-결합체는 또다른 항-암 치료와 조합되며, 예컨대 하나 이상 기타 항-암 활성제(들)과 조합된다.
- [0214] "항암제" 는 거대분자 (DNA, RNA, 단백질 등) 의 생합성을 간섭하거나, 세포 증식을 저해하거나, 또는 예를 들어 세포자멸사 또는 세포독성에 의해 세포 사망을 초래할 수 있는 임의의 분자로서 정의된다. 항암제 중에서, 알킬화제, 토포아이소미라아제 저해제 및 삽입제, 항대사물질, 절단제, 튜불린 간섭제, 모노클로날 항체가 언급될 수 있다.
- [0215] 특정 양상에 따르면, 본 발명은, 약학적으로 허용가능한 비히클파의 조합으로, 활성 성분으로서, 항암제 및 AMHRII-에 결합하는 항체, 특히 본원에서 기재되는 항-AMHRII 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0216] "약학적으로 허용가능한 비히클" 은 생물학적 시스템 예컨대 세포, 세포 배양물, 조직 또는 유기체와 화합가능한 비-독성 물질을 언급한다.
- [0217] 일부 구현예에서, 본 발명은, 약학적으로 허용가능한 비히클파의 조합으로, 활성 성분으로서, 항암제, 및 AMHRII-에 결합하는 항체, 특히 본원에서 기재되는 항-AMHRII 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0218] 일부 구현예에서, 본 발명은, 약학적으로 허용가능한 비히클파의 조합으로, 활성 성분으로서, 항암제, 및 AMHRII-에 결합하는 항체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이며, 항암제는 도세탁셀, 시스플라틴, 켐시타빈 및 시스플라틴과 켐시타빈의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.

- [0219] 항-AMHRII 항체와의 조합으로 사용될 수 있는 기타 항암제는 파클리탁셀 또는 백금 염 예컨대 옥살리플라틴, 시스플라틴 및 카르보플라틴을 포함한다.
- [0220] 항암제는 또한 백금 염 이외의 화학요법제, 소분자, 모노클로날 항체 또는 기타 항-혈관신생 펩티바디 (peptibody)로부터 선택될 수 있다.
- [0221] 백금 염 이외의 화학요법제는 삽입제 (DNA 복제 및 전사의 차단), 예컨대 안트라사이클린 (독소루비신, 페길화된 리포솜 독소루비신), 토포아이소미라아제 저해제 (캄프토테신 및 유도체: 카레니테신, 토포테칸, 이리노테칸) 또는 기타 SJG-136, 히스톤 데아세틸라아제의 저해제 (보리노스타트, 벨리노스타트, 밸프로산), 알킬화제 (벤다무스틴, 글루포스파미드, 테모졸로미드), 항-유사분열 식물 알칼로이드, 예컨대 탁산 (도세탁셀, 파클리탁셀), 빈카 알칼로이드 (비노렐빈), 에포ти론 (ZK-에포티론, 익사베필론), 항-대사물질 (겐시타빈, 엘라시타라빈, 카페시타빈), 키네신 스판들 단백질 (KSP) 저해제 (이스피네십), 트라벡테딘, 또는 기타 옴브라불린 (콤브레타스타틴 A-4 유도체)을 포함한다.
- [0222] 소분자 중에서 폴리(ADP-리보오스)폴리머라아제 (PARP) 저해제: 올라파립, 이니파립, 벨리파립, 루카파립, CEP-9722, MK-4827, BMN-673, 키나아제 저해제, 예컨대 티로신 키나아제 저해제 (TKI)가 있으며, 이들 중에서 항-VEGFR 분자 (소라페닙, 수니티닙, 세디라닙, 반데타닙, 파조파닙, BIBF 1120, 세막사닙, 카보잔티닙, 모테사닙), 항-HER2/EGFR 분자 (에를로티닙, 계피티닙, 라파티닙), 항-PDGFR 분자 (이마티닙, BIBF 1120), 항-FGFR 분자 (BIBF 1120), 오로라 키나아제/티로신 키나아제 저해제 (ENMD-2076), Src/Ab1 키나아제 저해제 (사라카티닙), 또는 또한 페리포신, 템시클리무스 (mTOR 저해제), 알보시닙 (사이클린-의존적 키나아제 저해제), 블라세르팁 (PLK1 (풀로-유사 카나아제 1) 단백질의 저해제), LY2606368 (체크포인트 키나아제 1 (chk 1)의 저해제), GDC-0449 (헤지호그 (Hedgehog) 경로 저해제), 지보텐탄 (ETA-수용체의 안타고니스트), 보르테조닙, 카르필조닙 (프로테아솜 저해제), 사이토카인 예컨대 IL-12, IL-18, IL-21, INF-알파, INF-감마가 언급될 수 있다.
- [0223] 항체 중에서, 언급될 수 있는 것은, 항-VEGF: 베바시주맙, 항-VEGFR: 라무시루맙, 항-HER2/EGFR: 트라스투주맙, 페르투주맙, 세툭시맙, 과니투무맙, MGAH22, 마투주맙, 항-PDGFR 알파: IMC-3G3, 항-폴레이트 수용체: 파클레투주맙, 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: 아마톡시맙, BAY 94-9343 (면역독소), 카투막소맙 (EpCAM/CD3 이중특이적 항체), 항-IL2R: 다클리주맙, 항-IGF-1R: 가니투맙, 항-CTLA-4: 이필리무맙, 항-PD1: 니볼루맙 및 펜브롤리주맙, 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: KHK2866 이다. 항-혈관신생 펩티바디는 AMG 386 및 CVX-241로부터 선택된다.
- [0224] 더욱 특히, 본원에서 기재되는 것은, 약학적으로 허용가능한 비히클과의 조합으로, 활성 성분으로서, 항암제, 및 AMHRII에 결합하는 항체를 포함하는 약학 조성물이며, 항암제는 도세탁셀, 시스플라틴, 켐시타빈 및 시스플라틴과 켐시타빈의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0225] 더욱더 특히, 본원에서 기재되는 것은, 약학적으로 허용가능한 비히클과의 조합으로, 활성 성분으로서, 항암제, 및 AMHRII에 결합하는 항체, 특히 본원에서 3C23K로 명명되는 돌연변이된 인간화된 모노클로날 항체를 포함하는 약학 조성물이며, 항암제는 도세탁셀, 시스플라틴, 켐시타빈 및 시스플라틴과 켐시타빈의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0226] 본원에서 개시되는 AMHRII-결합체, 특히 본원에서 개시되는 항-AMHRII 항체는 경구 투여, 피하 투여, 및 정맥내 투여를 포함하는 다양한 방식으로 투여될 수 있다.
- [0227] "치료적 유효량"은 포유동물의 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 약물의 양을 언급한다. 암의 경우에, 약물의 치료적 유효량은 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 감소시킬 수 있고; 주변 장기 내로의 암 세포 침윤을 저해 (즉, 어느 정도 둔화, 바람직하게는 중지) 할 수 있고; 종양 전이를 저해 (즉, 어느 정도 둔화, 바람직하게는 중지) 할 수 있고; 종양 성장을 어느 정도 저해할 수 있고; 및/또는 장애와 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화할 수 있다. 약물이 기준 암 세포를 성장 방지 및/또는 살해할 수 있는 정도까지, 약물은 세포증식저해성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법에서, 생체내 효능은, 예를 들어, 생존의 지속기간, 무진행 생존의 지속기간 (PFS), 반응률 (RR), 반응의 지속기간, 및/또는 삶의 질을 평가함으로써 측정될 수 있다.
- [0228] 본 발명에 따라 사용되는 제제 (예를 들어, 항체)의 치료적 제형은 저장을 위해 원하는 정도의 순도를 갖는 항

체를 임의적인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에 비독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 항산화제 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로파일 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 기타 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 반대이온 예컨대 소듐; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 을 포함한다.

[0229] 활성 성분은 또한, 예를 들어, 코아세르베이트화 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐, 각각에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀전에 포함될 수 있다. 그러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 개시되어 있다.

[0230] 생체내 투여에 사용될 제형은 멸균될 수 있다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0231] 또다른 특정 양태에서, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 이 조성물은 정맥내 또는 복강내 경로에 의한 투여를 위해 의도되는 제형을 갖는다.

[0232] 또다른 특정 양태에서, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 모노클로날 항체 및 항암제는 별도, 동시 또는 순차 투여를 위해 의도된다.

[0233] 항체 및 항암제는 하나의 동일한 약학 조성을 내에 조합될 수 있거나, 또는 별도의 약학 조성물의 형태로 사용될 수 있으며, 별도의 약학 조성물은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 특히, 제품은 별도로, 즉 수반하여, 또는 독립적으로, 예를 들어 시간차를 두고 투여될 수 있다.

[0234] 더욱 특히, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 항체 및 항암제는 동일한 약학 조성을 내에 조합된다.

[0235] 또다른 특정 양태에 따르면, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 환자에게 투여되는 항-AMHRII 항체의 치료적 유효량은 약 0.07 mg 내지 약 35 000 mg, 바람직하게는 약 0.7 mg 내지 약 7000 mg, 바람직하게는 약 0.7 mg 내지 약 1400 mg, 바람직하게는 약 0.7 mg 내지 약 700 mg, 더욱 바람직하게는 약 0.7 mg 내지 약 70 mg 범위이다.

[0236] 또다른 특정 양태에 따르면, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 환자에게 투여되는 항암제의 치료적 유효량은 약 10 mg 내지 약 700 mg 범위, 바람직하게는 약 20 mg 내지 약 350 mg, 바람직하게는 약 110 mg 범위이다.

[0237] 또다른 특정 양태에 따르면, 본 발명은 항암제 및 AMHR-II에 결합하는 항체를 포함하는, 본원에서 기재되는 비-부인과암의 예방 또는 치료에서 약제품으로서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 환자에게 투여되는 항체의 치료적 유효량은 약 70 mg 이고, 환자에게 투여되는 항암제의 용량은 약 110 mg 이다.

[0238] 본 발명은 이하 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 어떤 식으로든 실시예에 한정되지 않는다.

실시예

실시예 1: 차등 AMHRII 유전자 발현 및 AMHRII 단백질 발현

[0241] A. 재료 및 방법

[0242] A.1. 세포주 및 배양물

COV434 WT 세포주 (ECACC N° 07071909) 를 10% FBS, 페니실린 100 U/ml 및 스트렙토마이신 100 μ g/ml 이 보충된 DMEM/GlutaMax (Gibco) 에서 유지했다. 계네티신 (Gibco) 400 μ g/ml 을 COV434 MISRII 트랜스펙션된 세포주를 위해 첨가했다. 적백혈병 K562 세포주 (ATCC® CCL-243™) 를 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 IMDM 배지 (Sigma-Aldrich) 에서 혼탁액으로 배양하고, T75 플라스크에서 밀도 1×10^5 내지 1×10^6 세포/ml 로 유지했다. OV90 세포주 (ATCC® CRL-11732™, 난소 장액성 선암종) 를 최종 농도 1.5g/1 소듐바이카르보네이트를 함유하는 MCDB 105 배지 (Sigma-Aldrich) 및 15% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 최종 농도 2.2 g/l 소듐 바이카르보네이트를 함유하는 배지 199 (Sigma-Aldrich) 의 1:1 혼합물에서 배양했다.

NCI-H295R 세포주 (부신피질암종, ATCC® CRL-2128™) 를 iTS⁺ Premix (Corning), 2.5% Nu-혈청 (Falcon) 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM:F12 배지 (Sigma-Aldrich) 에서 유지했다. 세포를 37°C 에서 8% CO₂ 를 함유하는 가습 분위기에서 성장시키고, 배지를 세포주에 따라 1 주 1 회 또는 2 회 교체했다.

[0244] A.2. RT-qPCR 에 의한 AMHR2 mRNA 의 상대 정량화

RNA 의 추출. $1-5 \times 10^6$ 세포 웰렛으로부터의 총 RNA 를 Trizol® Plus RNA 정제 키트 (Ambion) 를 제조사의 지침에 따라 사용하여 제조했다. 간략히, 페놀/클로로포름 추출 후에, 용해된 세포의 RNA 를 실리카 매트릭스상에 흡착시키고, DNase 처리하고, 그 후 30 μ l 의 RNase 비함유 물로 세정 및 용리했다. RNA 농도 및 품질을 분광 광도계 (NanoDrop, ThermoFisher Scientific) 를 사용하여 평가했다.

cDNA 합성. Maxima H Minus First Strand cDNA 합성 키트 (Ambion) 및 올리고-dT 프라이머를 사용하여 프라이밍을 위해 25°C 에서 10 min 및 역전사를 위해 50°C 에서 15 min 그에 뒤이어 역전사효소 불활성화를 위해 85°C 에서 5 min 인큐베이션에 의해 RNA (1 μ g) 를 역전사시켰다.

정량적 PCR. Light Cycler 480 (Roche) 에서 96-웰 마이크로플레이트에서 Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Ambion) 를 최종 부피 20 μ l 로 사용하여 정량적 PCR 을 수행했다. 하기 프라이머를 사용했다: AMHR2 의 경우에, 정방향 5'-TCTGGATGGCACTGGTGCTG-3' (SEQ ID NO. 71) 및 역방향 5'-AGCAGGGCCAAGATGATGCT-3' (SEQ ID NO. 72), TBP 의 경우에, 정방향 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' (SEQ ID NO. 73) 및 역방향 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3' (SEQ ID NO. 74). cDNA 주형 (100 ng 당량 RNA) 및 하기 프로토콜을 사용하여 증폭을 수행했다: 50°C 에서 2 min UDG 전처리, 95°C 에서 10 min 변성, 그에 뒤이어 95°C 에서 15 s/60°C 에서 30 s/70°C 에서 30 s 의 40 사이클. 계놈 DNA 및 이합체 프라이머의 부재를 제어하기 위해서 각각의 실험의 마지막에 용융 곡선 분석을 수행했다. 각각의 cDNA 샘플 및 대조군 ("주형 샘플 없음" 및 "역전사를 RNA 없음") 을 듀플리케이트로 시험했다. 사이클 역치 (Cycle Threshold) (Ct) 의 평균 값을 계산하고, AMHR2 상대 정량화 (RQ) 를 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (여기에서 $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{샘플}} - \Delta Ct_{\text{칼리브레이터}}$ 이고, $\Delta Ct = Ct_{\text{AMHR2}} - Ct_{\text{TBP}}$ 임) 로 표현했다. HCT116 샘플을 칼리브레이터로서 사용하고, TBP 를 정규화를 위한 하우스키핑 (housekeeping) 유전자로서 사용했다.

[0248] 아래의 표 2 는 위에서 기재된 Q-PCR 방법을 사용하여 시험된 세포주에서의 AMHRII 발현 수준을 나타낸다.

[0249] 표 2

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

[0250]

[0251] A.3. 유세포측정법 분석에 의한 막 AMHR2 발현의 평가.

[0252] 형광-활성화되는 세포 분류 (FACS) 분석을 위해, 4×10^5 세포를 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 3C23K 와 함께 30 min 동안 4°C에서 인큐베이션했다. PBS-BSA2%로 세정 후에, 일차 항체를 형광단에 친주게이트된 항-종 이차 항체에 의해 검출했다. 3C23K 를 파코에리트린 (1:1000, Beckman-Coulter, IM0550) 에 친주게이트된 항-인간 F(ab')₂에 의해 검출했다. PBS로 세정 후에, 재현탁된 세포의 FACS 분석을 BD Accur i™ C6 유세포분석기 (BD Bioscience) 의 FL2 채널에서 실시했다.

B. 결과

[0254] 결과가 도 2에 나타나 있다. 결과는 재조합 세포주 COV434-WT 가 인간 AMHRII 단백질의 유의한 막 발현 수준을 갖는다는 것을 보여줬다 (세포주 NCI-H295R에 판매 측정된 AMHRII 유전자 발현 수준의 약 3%).

[0255] 이들 결과는 AMHRII 유전자 발현과 막 AMHRII 단백질 발현 사이에 상관관계가 염격히 없다는 것을 보여줬다.

실시예 2: 비-부인과암 (인간 종양 샘플)에서의 AMHRII 발현

A. 재료 및 방법

A.1. 목적

[0259] 비오티닐화된 3C23K 모노클로날 항체를 사용하여 항-필러 호르몬 수용체 유형 2 (AMHR2) 발현을 검출하기 위한 마우스 (PDXs)에서의 인간암 세포 이종이식편의 면역조직화학 연구.

A.2. 프로토콜 및 방법

[0261] - 세포주: 셀블록의 구성으로 포름알데히드 아세트산 알코올 (AFA)에 고정

[0262] - 인간 종양: 외부 샘플의 경우에는 포르말린에 고정하고, Curie Institute로부터의 슬라이드의 경우에는 AFA에 고정

[0263] - 면역조직화학 (IHC) 기술은 샘플을 틸립하고 pH 9에서 언마스킹 (unmasking) (90°C에서 15' 마이크로파 EZ Retriever, 그에 뒤이어 20' 동안 냉각) 한 후에 가능했다.

[0264] - 면역페록시다아제 기술 및 DAB 발색 기질 레벨레이션 (revelation)에 의한 항-필러 호르몬 수용체 유형 II 검출.

[0265] - 내생적 페록시다아제 활성을 차단한 후에, 슬라이드를 희석된 비오티닐화된 일차 항체 (1/800, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 90 분 동안 실온에서 인큐베이션했다. 조직 절편을 그 후 PBS로 세정하고, 아비딘/비오틴 ABC [벡터] 복합체와 함께 30 분 동안 인큐베이션했다. 면역반응성 신호를 DAB 기질 용액 (DAB+ 기질 완충제 / 액체 DAB+ 색소원, 10 분 인큐베이션)을 사용하여 검출했다. 마지막으로, 절편을 Mayer 헤마톡실린 (Lillie's Modification)으로 대조염색했다.

[0266] - 면역조직화학 염색 절차에서 일차 항체를 동형 대조군 면역글로불린 (R565)으로 또는 항체 희석제 단독 (음성 완충제 대조군)으로 치환하여 음성 대조군을 수득했다.

[0267] - 양성 대조군을 AMHR2-트랜스펙션된 COV434 세포 및 인간 과립막 종양 샘플을 사용하여 수득했다.

[0268] - 가공 후에, 절편을 Philips IMS 를 통한 디지털화에 의해 관찰했다. 모든 표본은 2 명의 병리학자에 의해 독립적으로 점수가 매겨졌다.

[0269] - 라벨링의 국소화를 상세히 기술했다: 세포질 및/또는 막.

[0270] - 하기 점수부여 시스템을 통해 종양 세포 막 및/또는 세포질의 분명한 갈색 라벨링으로서 강도를 분류했다: 라벨링의 강도는 음성의 경우에 0, 약의 경우에 1, 중의 경우에 2, 및 강의 경우에 3으로서 정의되었으며, 이는 COV434 양성 대조군에서 보여지는 바와 같다.

[0271] - 빈도는 AMHRII 를 발현하는 세포의 백분율로서 정의되었다. 괴사 영역은 분석에서 배제했다. 전체 조직학적 점수는 빈도 \times 강도 점수 (0 내지 3)의 평균을 사용하여 막 및 세포질 발현을 누적하여 확립했다.

[0272] - 모든 슬라이드를 적절한 절차에 따라 저장했다.

[0273] **B. 결과**

[0274] 다양한 일차 인간암 세포에 의한 AMHRII 막 발현의 결과는 또한 도 3에 나타나 있으며, AMHRII 발현 점수는 구별되는 암 세포 유형의 패널에 대해 표시되어 있다.

[0275] 결과가 도 3에 나타나 있다. 결과는 결장암, 간암, 고환암, 갑상선암, 위암, 방광암, 췌장암, 뿐만 아니라 두경부암을 포함하는 복수의 다양한 비-부인과 인간암에서 AMHRII 이 세포 표면에서 발현된다는 것을 보여줬다.

[0276] 실시예 3: 비-부인과암 (인간 종양 이종이식편) 에서의 AMHRII 발현

[0277] **A. 재료 및 방법**

[0278] **A.1. 목적**

[0279] 비오티닐화된 3C23K 모노클로날 항체를 사용하여 항-릴리 호르몬 수용체 유형 2 (AMHR2) 발현을 검출하기 위한 마우스 (PDXs)에서의 인간암 세포 이종이식편의 면역조직화학 연구.

[0280] **A.2. 프로토콜 및 방법**

- 세포주: 셀블록의 구성으로 포름알데히드 아세트산 알코올 (AFA)에 고정

- 인간 종양: 외부 샘플의 경우에는 포르말린에 고정하고, Curie Institute로부터의 슬라이드의 경우에는 AFA에 고정

- 면역조직화학 (IHC) 기술은 샘플을 탈립하고 pH 9에서 언마스킹 (90°C에서 15' 마이크로파 EZ Retriever, 그에 뒤이어 20' 동안 냉각) 한 후에 가능했다.

- 면역페록시다아제 기술 및 DAB 발색 기질 레벨레이션에 의한 항-릴리 호르몬 수용체 유형 II 검출.

- 내생적 폐록시다아제 활성을 차단한 후에, 슬라이드를 희석된 비오티닐화된 일차 항체 (1/800, 8 μ g/ml)와 함께 90분 동안 실온에서 인큐베이션했다. 조직 절편을 그 후 PBS로 세정하고, 아비딘/비오틴 ABC [벡터] 복합체와 함께 30분 동안 인큐베이션했다. 면역반응성 신호를 DAB 기질 용액 (DAB+ 기질 완충제 / 액체 DAB+ 색소원, 10분 인큐베이션)을 사용하여 검출했다. 마지막으로, 절편을 Mayer 헤마톡실린 (Lillie's Modification)으로 대조염색했다.

- 면역조직화학 염색 절차에서 일차 항체를 동형 대조군 면역글로불린 (R565)으로 또는 항체 희석제 단독 (음성 완충제 대조군)으로 치환하여 음성 대조군을 수득했다.

- AMHR2-트렌스펙션된 COV434 세포 및 인간 과립막 종양 샘플을 사용하여 양성 대조군을 수득했다.

- 가공 후에, 절편을 Philips IMS를 통한 디지털화에 의해 관찰했다. 모든 표본은 2명의 병리학자에 의해 독립적으로 점수가 매겨졌다.

- 라벨링의 국소화를 상세히 기술했다: 세포질 및/또는 막.

- 하기 점수부여 시스템을 통해 종양 세포 막 및/또는 세포질의 분명한 갈색 라벨링으로서 강도를 분류했다: 라벨링의 강도는 음성의 경우에 0, 약의 경우에 1, 중의 경우에 2, 및 강의 경우에 3으로서 정의되었으며, 이는 COV434 양성 대조군에서 보여지는 바와 같다.

- 빈도는 AMHRII를 발현하는 세포의 백분율로서 정의되었다. 괴사 영역은 분석에서 배제했다. 전체 조직학적 점수는 빈도 \times 강도 점수 (0 내지 3)의 평균을 사용하여 막 및 세포질 발현을 누적하여 확립했다.

- 모든 슬라이드를 적절한 절차에 따라 저장했다.

[0293] **B. 결과**

[0294] a) 대조군

- 음성 대조군 및 동형 대조군은 종양 세포에 대해 반응성이 없었다.

- 양성 대조군 샘플 (COV434 AMHRII 증폭됨)은 세포의 광범위 면역염색 (강도 점수: 3)을 보여줬다. 라벨링은 균일했으며 (빈도 점수: 100%) 세포질 및 막 국소화가 있었다.

- 양성 과립막 대조군 샘플은 종양 세포의 강한 면역염색을 보여줬다 (강도 점수 3). 라벨링은 균일했으며

(빈도 점수: 100%) 세포질 및 막 국소화가 있었다.

[0298] b) 환자-유래 이종이식편 (PDX) 샘플의 스크리닝.

[0299] 샘플을 AFA에서 가공하는 경우와 비교하여 샘플을 포르말린에 고정하는 경우에 AMHR2의 막 발현은 과소평가되는 것으로 보인다는 점에 주목하는 것이 중요하다.

[0300] 마우스에 이종이식된 다양한 인간 종양에 의한 AMHRII 막 발현의 결과는 도 4에 나타나 있으며, AMHRII 발현 점수는 구별되는 암 세포 유형의 패널에 대해 표시되어 있다.

[0301] 인간 종양 이종이식편에 의한 AMHRII 발현의 결과의 일부가 아래의 표 3에 요약되어 있다.

표 3: 인간 종양 이종이식편에서의 AMHRII 발현

종양 유형	종양에서의 양성도 (양성 PDX의 퍼센트)	시험된 PDX의 수
결장	35%	6
간	44%	3
신장	84%	13

[0303]

[0304] c) 결론

[0305] AMHR2 전사에 대해 양성인 PDX 모델 6개 중 4개에서 AMHR2 단백질 발현이 확인되었다. 이들 PDX는 신경 교종 (ODA14-RAV), 및 결장 (TC306-BAU) 암으로부터 적응시켰다. 발현 수준은 중간이었으나 유의했으며, 전체 점수 1 내지 1.5를 특징으로 했다. 이들 데이터는 비-부인과 암이 AMHR2를 발현할 수 있다는 것을 시사한다.

[0306] 이들 모델은 장래에 항-AMHR2 요법을 특성분석하는데 사용될 수 있을 것이다.

실시예 4: AMHRII-발현 비-부인과암에 대항하는 항-AMHRII 항체의 생체내 효능

[0308] A. 재료 및 방법

[0309] A.1. 약어

[0310] 이 프로토콜에서 공통으로 사용되는 약어는 표 4 및 표 5 둘 모두에서 보여진다.

[0311]

표 4. 투여 관련 약어

투여 일정	
Bid	매일 2 회
Qd	매일
Q2d	하루 걸러 (또한 Qod)
Q3d	3 일마다 (1 일 투여 및 2 일 비투여)
Q4d	4 일마다 (1 일 투여 및 3 일 비투여)
BIW	매주 2 회
QW	매주
Q3W	3 주마다
투여 경로 (ROA)	
i.p.	복강내 (ly)
i.v.	정맥내(ly)
p.o.	경구(ly)
s.c.	피하(ly)

[0312]

[0313]

표 5. 이 실시예에서 사용되는 다른 공통 약어

약어	전문 & 설명
ANOVA	분산 분석
BW	체중
BWL	체중 손실
GLP	우수 실험실 관리기준
MTD	최대 허용 용량
MTV	평균 종양 부피
TV	종양 부피
TGI	종양 성장 저해, $\%TGI = (1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)) * 100$; Ti 는 측정일에서의 처리군의 평균 종양 부피이고; $T0$ 는 D1에서의 처리군의 평균 종양 부피이고; Vi 는 측정일에서의 대조군의 평균 종양 부피이고; $V0$ 은 D1에서의 대조군의 종양 부피이다.
T-C	$T-C$ 는 T 를 처리군의 평균 종양 크기가 예정된 크기 (예를 들어, 1000 mm^3)에 도달하는데 요구되는 시간 (단위: 일)으로 하고, C 를 대조군의 평균 종양 크기가 동일한 크기에 도달하는데 요구되는 시간 (단위: 일)으로 하여 계산된다.
T/C	T/C 값 (%)은 치료에 대한 종양 반응의 지표이고, 흔히 사용되는 항-종양 활성 종점 중 하나이다; T 및 C 는 정해진 날에서의 처리군 및 대조군, 각각의 평균 종양 부피이다.
REG	$REG(\%)$ 값은 하기 식을 사용하여 계산된다: $\%REG = [(VTr_{day0} - VTr_{dayx}) / VTr_{day0}] \times 100\%$.
SOC	임상 상황에서 특정 질환에 관해 사용되는 관리 표준
FFPE	포르말린 고정 파라핀 포매

[0314]

[0315]

A.2. 연구 목적

[0316]

Balb/C 누드 마우스에서 Huprime® HCC 이종이식편 모델 LI1097의 치료에서, GM102로 명명되는, GamaMabss' 항-AMHR2 모노클로날 항체의 생체내 효능을 전임상 평가하기 위한 것이다. RNAseq (전사체 시퀀싱)를 사용하여 CrownBio에 의해 제공되는 AMHR2 전사를 위한 스크리닝 후에 모델 LI1097을 선택했다. 추가로, 이 모델의 AMHR2 막 단백질 발현을 Institut Curie, France에 의해 IHC을 사용하여 확인되었다.

[0317]

A.3. 실험 디자인

[0318]

표 6. 효능 연구의 연구 디자인

군	N	처리	용량 수준 (mg/kg)	용량 경로	투여 빈도
1	8	비히클 (용매 대조군)	-	i.v.	BIW x 4 주
2	8	GamaMabs's Ab	20mg/kg	i.v.	BIW x 4 주
3	8	GamaMabs's Ab	50mg/kg	i.v.	BIW x 4 주
4	8	소라페닙	50mg/kg	p.o.	QD x 4 주

주: N: 군 당 동물 수;

[0319]

A.4. 동물

- 계통: BALB/c 누드

- 연령: 7-8 주 (처리 시작)

- 성별: 암컷

- 총 #: 32 마리 마우스 + 예비 (spare)

A.5. 동물 수용

마우스는 개별 통풍 케이지 (케이지 당 4 마리)에 하기 조건에서 수용될 것이다:

» 온도: 20~26°C

» 습도 30-70%

» 광주기: 12 시간 명 및 12 시간 암

» 크기 325 mm × 210 mm × 180 mm 의 폴리술폰 케이지

» 깔개는 옥수수대이고 매주 바꾸었다

» 식이: 동물은 전체 연구 기간 동안 방사선조사 멸균된 건조 과립 음식에 자유롭게 접근할 것이다.

» 물: 동물은 멸균 음료수에 자유롭게 접근할 것이다

» 케이지 식별 라벨: 동물의 번호, 성별, 계통, 수령일, 처리, 연구 번호, 군 번호, 및 치료의 시작일

» 동물 식별: 동물을 귀 태그로 표시했다

A.6. HuPrime® 모델 프로파일

이 효능 연구를 위해 남성 HCC 환자에서 유래하는 HuPrime® 간암 모델 LI1097 을 선택했다. 이 모델은 접종 후 20-25 일에 1000 mm³ 에 도달했다.

A.7. 시험 및 양성 대조물

제품 식별번호: GamaMabs's Ab (3C23K)

제조사: GamaMabs Pharma

로트 번호: R18H2-LP01

뱃치: 04GAM140513API

필요한 양: 25 g 의 동물 BW 에 기초하여 255 mg 및 50% 예비

패키지 및 저장 조건: [30 mL/튜브], 30 mL, [2-8°C]

[0345] 농도: 10.1 g/L

[0346] 제품 식별부호: 소라페닙

[0347] 제조사: Melonepharma

[0348] 로트 번호: D1111A

[0349] 필요한 양: 25 g 의 동물 BW 에 기초하여 300 mg 및 50% 예비

[0350] 패키지 및 저장 조건: 400 mg, [RT]

A.8. 실험 방법 및 절차

A.8.1. 종양 접종 및 군 분배

[0353] 선별된 일차 인간암 조직으로 접종된 스톡 (stock) 마우스로부터의 종양 단편을 수확하고, BALB/c 누드 마우스 내로의 접종에 사용했다. 2015년 6월 9일에 각각의 마우스를 종양 발달을 위해 일차 인간 HCC 모델 LI1097 단편 (R12P4, 2-4 mm 직경) 으로 오른쪽 옆구리에 피하 접종했다. 부모 마우스 번호는 #80150, #80151 및 #80153 이었다. 2015년 6월 24일에 평균 종양 크기가 약 145 mm³ 에 도달했을 때 마우스를 분류했다. 마우스를 그들의 종양 크기에 따라 4 개의 실험 군으로 무작위로 할당했다. 각각의 군은 8 마리의 마우스로 이루어졌으며, 케이지 당 마우스는 4 마리였다. 날짜를 제 0 일로 표시했다. 제 0 일 (2015년 6월 24일)로부터 제 27일 (2015년 6월 21일) 까지 섹션 1.1 실험 디자인에 제시된 예정된 양 생법에 따라 종양-보유 마우스에게 시험물을 투여했다.

A.8.2. 투여 양생법 중단

[0355] 개별 마우스의 체중 손실이 ≥ 20% 일 때, 마우스의 체중이 기준선으로 회복할 때까지 마우스에게 투여 휴가(들)을 주었다. 이 연구에서, 투여는 중단되지 않았다.

A.8.3. 관찰

[0357] 이 연구에서 동물 취급, 관리, 및 치료와 관련되는 모든 절차는 실험동물인증협회 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) (AAALAC) 의 지도에 따라 CrownBio 의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC) 에 의해 승인된 가이드라인에 따라 수행했다. 일상적 모니터링시에, 동물을 정상 거동 예컨대 이동성, 음식 및 물 소비 (오직 보는 것에 의해서), 체중 증가/손실, 눈/털 매팅 (matting) 및 임의의 기타 비정상 효과에 대한 종양 성장의 임의의 효과에 관해 체크했다. 사망 및 관찰된 임상 징후를 각각의 서브세트 (subset) 내의 동물의 수에 기초하여 기록했다.

A.8.4. 종양 측정 및 종점

[0359] 종양 크기를 캘리퍼를 사용하여 매주 2 회 이차원으로 측정하고, 부피를 하기 식을 사용하여 mm³ 단위로 표현한다: $TV = 0.5 a \times b^2$ (식에서 a 및 b 는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다). 종양 크기를 그 후 표 2 의 약어 설명에 따라 TGI, T/C, 및 T-C 값의 계산에 사용한다.

A.8.5. 종료

[0361] 28 일 치료 후에 연구를 종료했고, 마우스를 희생시켰다.

[0362] 하기 조건 하에, 개별 동물 또는 전체 군의 생전 (in-life) 실험을, 인도적 안락사에 의해, 사망 전에, 또는 혼수 상태에 도달하기 전에 종료할 것이다.

[0363] ✓ 극심한 고통 및/또는 통증의 극심한 임상 징후, 충분한 음식 또는 물에 접근할 수 없는 계속적인 악화되는 상태;

[0364] ✓ 유의미한 체질량 손실 (수척해짐) (> 20%);

[0365] ✓ 개별 마우스의 종양 크기 3000 mm³ 초과 또는 MTV > 2000 mm³.

A.8.6. 통계적 분석

[0367] 평균 및 평균의 표준 오차 (SEM) 를 포함하는, 요약 통계가 각각의 시점에 각각의 군의 종양 부피에 관해 제공된다. 군 사이에서의 종양 부피의 차이의 통계적 분석을 일원 ANOVA 를 사용하여 평가했고, 그에 뒤이어

Games-Howell 을 사용하여 다중 비교했다. 모든 데이터를 SPSS 16.0 을 사용하여 분석했다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

[0368] **B. 결과**

[0369] **B.1. 체중**

[0370] 종양 보유 마우스에서 체중 및 체중 변화의 결과를 측정했다. 모든 마우스는 투여 휴가 없이 그들의 치료를 완료했다. GamaMabs's Ab 처리된 마우스에서 동물 사망 또는 유의미한 체중 손실이 관찰되지 않았으나, 소라페닙 처리된 마우스에서 7% 체중 손실이 관찰되었다.

[0371] **B.2. 종양 부피**

[0372] 상이한 시점에서의 상이한 군의 종양 크기가 표 7 에서 보여진다.

[0373] 표 7 상이한 처리군에서의 종양 크기

일	종양 부피 (mm^3)			
	비하클, BIW x 2 주	GamaMabs's Ab, 20 mg/kg, BIW x 4 주	GamaMabs's Ab, 50 mg/kg, BIW x 4 주	소라페닙, 50 mg/kg, QD x 4 주
0	145.08±17.70	145.15±16.79	145.24±16.38	145.18±16.97
2	439.23±54.14	358.57±51.86	297.78±46.32	321.35±45.66
6	937.83±99.91	665.09±85.00	532.71±104.17	493.84±65.13
9	1556.55±248.13	952.12±171.45	751.81±176.15	695.20±66.81
13	2269.46±356.55	1179.90±232.26	1117.12±302.85	891.50±103.33
16		1479.51±292.49	1476.74±407.93	1135.40±133.62
20		1973.13±372.07	1602.61±481.85	1478.84±189.62
23		1814.59±231.17	1148.22±381.49	1627.4±202.91
27		2081.67±213.28	1454.47±479.27	1829.66±256.4

[0374] 주: 데이터는 평균 \pm SEM 로 표현됨.

[0375] **B.2. 종양 성장 저해**

[0376] 종양 성장 저해가 표 8 에 요약되어 있다.

[0377] 표 8 HuPrime® 간 이종이식편 모델 LI1097에서 시험 화합물 GamaMabs's Ab 및 소라페닙 처리의 항종양 활성

처리	종양 크기 (mm^3) ^a		TGI (%)	T/C (%)	1000 mm^3 에서의 T-C (일)	P 값 ^b
	제 0 일	제 13 일				
G1 비하클	145.08±17.70	2269.46±356.55	-	-	-	-
G2 GamaMabs's Ab, 20 mg/kg	145.15±16.79	1179.90±232.26	51.3%	48.7%	3	0.100
G3 GamaMabs's Ab, 50 mg/kg	145.24±16.38	1117.12±302.85	54.3%	45.7%	5	0.111
G4 소라페닙, 50 mg/kg	145.18±16.97	891.50±103.33	64.9%	35.1%	8	0.024*

[0378] 주: a. 평균 \pm SEM

b. Games-Howell 을 사용하는 다중 비교에 의해 비하클과 비교됨.

* $P < 0.05$, G1 비하클과 비교됨.

[0379] **B.3. 종양 성장 곡선**

[0380] 상이한 군의 종양 성장 곡선이 도 5에서 보여진다.

[0381] 도 5는 HuPrime® 간 이종이식편 모델 LI1097에서 시험 화합물 GamaMabs's Ab 및 소라페닙 처리 동안 상이한 군에서의 마우스의 종양 부피를 나타낸다

B.4. 결과 요약 및 논의

[0383] 이 연구에서, 시험 화합물 GamaMabs's Ab 및 양성 대조군 약물 소라페닙의 효능을 암컷 BALB/c 누드 마우스에서 HuPrime® HCC 이종이식편 모델 LI1097의 처리에서 평가했다.

[0384] 군 1(비히클, BIW x 2주, i.v.), 군 2(GamaMabs's Ab 20 mg/kg, BIW x 4주, i.v.), 군 3(GamaMabs's Ab 50 mg/kg, BIW x 4주, i.v.) 및 군 4(소라페닙, 50 mg/kg, QD x 4주, p.o.)에서, 연구 종료시 체중 변화는 각각 0.67%, 2.68%, -0.38% 및 -7.63%였다. 시험 화합물 GamaMabs's Ab 20 mg/kg 및 50 mg/kg은 LI1097 종양-보유 마우스에서 잘 용인되었다. 소라페닙 50 mg/kg 처리된 군에서 마우스는 처리의 제 27일에 평균 최대 체중 손실 7.63%를 나타냈다.

[0385] 비히클 처리된 마우스의 평균 종양 크기는 제 13일에 2269.46 mm³에 도달했다. 군 2(GamaMabs's Ab, 20 mg/kg) 및 군 3(GamaMabs's Ab, 50 mg/kg)은 50% 항-종양 반응을 보였으며, 이에 비해 비히클 처리의 경우에 TGI는 각각 51.3% 및 54.3% (P = 0.100 및 0.111)였다. 군 4(소라페닙, 50 mg/kg)는 유의한 항-종양 활성을 보였으며 처리의 제 13일에 TGI는 64.9% (P = 0.024)였다. 표 8 및 도 5에 제시된 처리 후 상이한 시점에서 상이한 군에서 종양 크기의 결과는 군 2 및 3(GamaMab's AB, 20 및 50 mg/kg 각각)에서 처리에 대한 반응이, 소라페닙의 경우와 같이, 적어도 27일 동안 동안 유지된다는 것을 보여준다. 그러나, 군 2 및 3에서의 종양 반응은 아마도 더 나은 통계적 유의도를 얻기에는 너무 불균일하다.

[0386] 요약하면, 이 연구에서, 시험 화합물 GamaMabs's Ab는 소라페닙, 이 병태에 관한 관리 표준에 의해 유도되는 것과 가깝게 일차 HuPrime® HCC 이종이식편 모델 LI1097에 대항하여 항-종양 활성을 초래했다. 더욱이, GM102의 항-종양 활성을 어떠한 독성 이벤트도 동반하지 않았지만, 소라페닙 처리는 ~7%의 평균 체중 손실을 유도했다.

실시예 5: AMHRII-발현 비-부인과암에 대항하는 항-AMHRII 면역전주개이트의 생체내 효능

A. 재료 및 방법

A.1. 약어

[0390] 이 실시예에서 공통으로 사용되는 약어는 실시예 4의 표 3 및 표 4의 약어와 동일하다.

A.2. 목적

[0392] 암컷 BALB/c 누드 마우스에서 PDX 모델 LI1097의 치료에서 GamaMabs's 화합물 GM103의 생체내 효능을 전임상 평가하기 위한 것이다.

A.3. 실험 디자인

[0394] 표 9. 효능 연구의 연구 디자인

군	N	처리	용량 수준 (mg/kg)	투여 부피 (ml/kg)	경로	일정
1	8	비히클	-	10	IV	일회 용량
2	8	GM103	1	10	IV	일회 용량
3	8	GM103	5	10	IV	일회 용량
4	8	GM103	10	10	IV	일회 용량

[0395] 주: N: 군 당 동물 수

A.4. 재료

A.4.1. 동물

[0398] - 계통: BALB/c 누드

[0399] - 연령: 6-8 주

[0400] - 성별: 암컷

[0401] - 총 #: 32 마우스 + 예비

A.4.2. 동물 수용

[0403] 마우스는 개별 통풍 케이지 (케이지 당 4-5 마리 마우스)에 하기 조건에서 수용될 것이다:

[0404] - 온도: 20~26°C

[0405] - 습도 30-70%

[0406] - 광주기: 12 시간 명 및 12 시간 암

[0407] - 크기 325 mm × 210 mm × 180 mm 의 폴리술폰 케이지

[0408] - 깔개는 옥수수갈대이고 매주 바꾸었다

[0409] - 식이: 동물은 전체 연구 기간 동안 방사선조사 멸균된 건조 과립 음식에 자유롭게 접근할 것이다.

[0410] - 물: 동물은 멸균 음료수에 자유롭게 접근할 것이다

[0411] - 케이지 식별 라벨: 동물의 수, 성별, 계통, 수령일, 처리, - 프로젝트 ID, 군 번호, 동물 ID 및 치료의 시작 일

[0412] - 동물 식별: 동물을 귀 태그로 표시했다

A.4.3. 모델 정보

[0414] 이 효능 연구를 위해 HuPrime® 간암 이종이식편 모델 LI1097 을 선택했다.

A.4.4. 시험 및 대조물

[0416] 제품 식별부호: GM103

[0417] 제조사: GamaMabs Pharma

[0418] 물리적 설명: 용액

[0419] 뱃치 번호: GAM100-NC005-4

[0420] 필요한 양: 25 g 의 동물 BW 에 기초하여 4.48 mg 및 40% 예비

[0421] 패키지 및 저장 조건: 4.3 mg/1.3 ml/바이알, 4°C 에서 저장.

A.5. 실험 방법

A.5.1. 종양 접종

[0424] 각각의 마우스를 종양 발달을 위해 일차 인간 간암 이종이식편 모델 LI1097 단편 (2-3 mm 직경) 으로 오른쪽 옆 구리에 피하 접종할 것이다.

A.5.2. 군 배정

[0426] 평균 종양 크기가 대략 200 mm³ 에 도달했을 때, 마우스를 표 3에서 보여지는 바와 같이 4 개의 군으로 무작위로 할당할 것이다. 각각의 군은 8 마리의 마우스를 포함한다.

A.5.3. 시험물 투여 용액 제조

[0428] 부피 유형: 투여 부피를 체중에 맞춰 조정한다 (투여 부피 = 10 μ l/g)

[0429] 표 10. 제형 및 저장에 관한 상세한 설명

화합물	용량 (mg/ kg)	제조	농도 (mg/ml)	저장
GM103 (1)	1	0.073 ml GM103 모액 (3.308 mg/ml) 을 2.327 ml 염분 또는 PBS?로 희석.	0.1	신선하게 제조
GM103 (2)	5	0.363 ml GM103 모액 (3.308 mg/ml) 을 2.037 ml 염분 또는 PBS?로 희석.	0.5	신선하게 제조
GM103 (3)	10	0.726 ml GM103 모액 (3.308 mg/ml) 을 1.674 ml 염분 또는 PBS?로 희석.	1	신선하게 제조

[0430] **A.5.4. 관찰**

[0431] [0432] 종양 접종 후에, 동물을 이환률 및 사망률에 관해 매일 체크할 것이다. 일상적 모니터링시에, 동물을 정상 거동 예컨대 이동성, 음식 및 물 소비, 체중 증가/손실, 눈/털 매팅 및 임의의 기타 비정상 효과에 대한 종양 성장 및 치료의 임의의 효과에 관해 체크했다. 사망 및 관찰된 임상 징후를 각각의 서브세트 내의 동물의 수에 기초하여 기록했다.

[0433] [0434] 종양 크기를 캘리퍼를 사용하여 매주 2 회 이차원으로 측정할 것이다. 종양 부피를 하기 식을 사용하여 mm^3 단위로 표현할 것이다: $TV = 0.5 a \times b^2$ (식에서 a 및 b 는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다).

[0435] [0436] 체중을 매주 2 회 측정할 것이다.

A.5.5. 종점

[0437] [0438] 하기 조건 하에, 개별 동물 또는 전체 군의 생전 실험을, 인도적 안락사에 의해, 사망 전에, 또는 혼수 상태에 도달하기 전에 종료할 것이다.

[0439] » 극심한 고통 및/또는 통증의 극심한 임상 징후, 충분한 음식 또는 물에 접근할 수 없는 계속적인 악화되는 상태;

[0440] » 유의미한 체질량 손실 (수척해짐) (> 20%);

[0441] » 개별 마우스의 종양 크기 3000 mm^3 초과 또는 마우스의 전체 군 MTV > 2000 mm^3 .

A.5.7. 통계 분석

[0442] [0443] 3 개 이상의 군 사이에서의 비교를 위해, 일원 ANOVA 를 수행할 것이고, 그에 뒤이어 다중 비교 절차를 수행한다. 모든 데이터를 SPSS 16.0 을 사용하여 분석할 것이다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 여겨진다.

A.6. 순응도

[0444] [0445] 이 연구에서 동물의 관리 및 사용을 수반하는 프로토콜 및 임의의 개정(들) 또는 절차는 수행 전에 동물실험윤리위원회 (IACUC) 에 의해 검토 및 승인될 것이다. 연구 동안, 동물의 관리 및 사용은 실험동물인증협회 (AAALAC) 의 규제에 따라 수행할 것이다.

B. 결과

[0446] [0447] 도 6 의 결과는 5 mg/kg 이상의 용량에서 GM103 ADC 면역컨주게이트의 생체내 항-암 활성을 보여줬다.

실시예 6 : 추가의 비-부인과암에서의 AMHRII 발현**A. 재료 및 방법**

[0450] A.1. 유세포측정법에 의한 AMHRII 막 발현 분석

[0451] 분석을 위한 세포의 제조

[0452] - 조직을 1 h 의 수술 내에 해부하고, 1-mm² 단편으로 다지고, 페니실린 (10%), 스트렙토마이신 (10%) 및 겐타마이신 (0.1 mg/ml; Sigma-Aldrich) 을 함유하는 RPMI 에서 세정했다.

[0453] - 조직 단편을 2-4 h 동안 콜라제나아제 및 DNase (2 mg/ml; Sigma-Aldrich) 로 소화시키면서 37°C 에서 신속하게 세이킹했다.

[0454] - 점액 및 큰 잔해물을 40-1m 세포 스트레이너를 통한 여과에 의해 제거했다.

[0455] - Ficoll 구배 원심분리에 의해 생균을 수득했다.

[0456] 재현탁된 종양 세포 상의 AMHRII 결합 자리의 정량화를 The Quantum™ Simply Cellular (Bangs Laboratory) 를 제조사의 지침에 따라 사용하여 수행했다:

[0457] - 간략히, 인간 IgG 항체의 Fc 부분에 대해 특이적인 마우스 항-인간 IgG 의 상이한 보정된 양으로 라벨링된 4 개의 마이크로비드 집단을 AlexaFluor488-컨주케이티드 항-AMHRII 3C23K 로 염색했다. FACS 투브에서, 키트 내의 각각의 바이알의 한 방울을 50 µl 의 PBS 1X 에 첨가했다:

[0458] 1- 비드 B (블랭크)

[0459] 2- 비드 1 + 3C23K-AF 10 µg/ml

[0460] 3- 비드 2 + 3C23K-AF 10 µg/ml

[0461] 4- 비드 3 + 3C23K-AF 10 µg/ml

[0462] 5- 비드 4 + 3C23K-AF 10 µg/ml (필요한 경우에 농도를 25 µg/ml 로 증가시킬 수 있었다)

[0463] - 각각의 비드 집단은 다양한 양의 AlexaFluor488-컨주케이트된 항-AMHRII 3C23K 에 결합하여, 상응하는 강도의 형광을 발생시키며, 이를 FACS Canto II 사이토미터 (BD) 에서 분석한다.

[0464] - 각각의 비드 집단의 평균 형광 강도를 그것의 배정된 항체 경합 능력 (Antibody Binding Capacity) (ABC) 에 대해 도표를 그려서 보정 곡선을 생성했다.

[0465] 세포를 통상적으로는 에펜도르프 투브 1.5 ml 에서 염색했다.

[0466] - 모든 원심분리 단계를 4°C 에서 수행했다.

[0467] - 모든 인큐베이션 단계를 4°C 에서 수행하여 항체 내부화를 회피했다.

[0468] - 3.5 백만 개의 세포 (트립신화된 COV434-MISRII 또는 신선하게 해리된 종양 세포) 를 200-300 g 에서 5 min 동안 원심분리하고, PBS (투브 당 500 µl) 로 1 회 세정했다.

[0469] - 빙랭 PBS/2% FBS (200-300g 3 min 동안) 로 세정하고, 700 µl 의 PBS 1X 에 재현탁시키고, 아래 표 11 에 기재된 조건에 관해 FACS 투브마다 100 µl 를 분배했다:

[0470]

표 11

COV434-MISRII	신선한 종양 세포
항체 없음	
R565-AF (동형 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 (및 필요에 따라 ~25 µg/mL)	

[0471]

- [0472] - 항체 3C23K-AF488 와 함께 PBS/1% FBS 에서 30 min 동안 4°C 에서 인큐베이션
- [0473] - PBS/2%BSA 에서 2 회 세정 (3 min 동안 200-300g)
- [0474] - PBS 에서 2 회 세정 (3 min 동안 200-300g)
- [0475] - 300-400 µl PBS 첨가 및 가능한 빨리 FACS 에서 분석
- [0476] 이 프로토콜은 막의 온전함을 유지하기 위해 세포외 염색을 위한 임의의 고정 단계를 포함하지 않는다. 그 결과, 오직 막 AMHRII 이 검출된다.
- [0477] A.2. 면역형광에 의한 AMHRII 막 발현
- [0478] 그러므로 Alexa Fluor® 488 에 친수계이트된 항-AMHRII 3C23K 항체를 사용하는 간접 면역형광 방법을 개발했다. 그 후 Alexa Fluor® 647 에 친수계이트된 토끼 항-AF488 항체 및 염소 항-토끼 항체를 사용하여 2 단계로 신호 증폭을 수행했다.
- [0479] 동결된 조직 절편을 크리오스타트 Leica CMD1950 으로 제조하고, -20°C 에서 유지한다. 동결된 조직을 OCT 화합물과 함께 금속 디스크 상에 얹고, 그것이 고체화되면 디스크 홀더 위에 얹는다. 7 µm 의 절편을 만들고, Superfrost Plus 슬라이드 (Menzel Glaeser) 위에 놓고, -20°C 에서 즉시 저장했다.
- [0480] 동결된 절편 슬라이드를 PBS 1X 로 다시 수화시키고, 그 후 그것을 300 µl 의 차카운 아세테이트 (VWR Prolabo) 로 커버함으로써 -20°C 에서 10 min 동안 고정하고, 파라필름으로 회복시켜 용액에 의해 모든 조직이 전부 회복되는 것을 보장했다. PBS 로 헹군 후에, 슬라이드를 RT 에서 가습 박스에서 1 시간 동안 300 µl 의 차단 완충제 (PBS1X-BSA2%-염소 혈청 10%-Triton X100 0.1%) 로 처리하여 항체와 조직 성분 사이의 비특이적 상호작용을 차단했다. 차단 완충제에 10 µg/ml 로 희석된 3C23K-AF488 또는 동형 대조군 R565-AF488 을 RT 에서 가습 박스에서 30 min 동안 적용했다. PBS1X-Triton X100 0.1% 로 3 회 세정 (3x10 min) 후에, 차단 완충제에 1/500 로 희석된 항체 항-AF488 (Invitrogen) (300 µl) 을 RT 에서 30 min 인큐베이션 동안 첨가했다. PBS1X-Triton X100 0.1% 로 3 회 세정 (3x10 min) 후에, 차단 완충제에 1/500 로 희석된 항-토끼 항체 AF647 친수계이트드 (Invitrogen) (300 µl) 를 RT 에서 30 min 인큐베이션 동안 첨가했다. PBS1X-Triton X100 0.1% 로 3 회 세정 (3x10 min) 을 수행하고, 그 후 0.5 µg/ml 에서 DAPI (Sigma-Aldrich) 를 10 min 동안 적용했다. PBS 및 H₂O 로 헹군 후에 슬라이드 절편을 커버슬립 (24x50 mm, Knittel Glass) 아래에 한 방울 (50 µl) 의 DAKO 형광 봉입제와 함께 얹어서 기포를 회피하고, 이미지화될 때까지 어둠 속에서 4°C 에서 저장했다.
- [0481] Metavue 소프트웨어 (Molecular Devices) 에 의해 제어되는 CoolSnap EZ CCD 카메라가 구비된 형광 현미경 Leica DM5000B 을 사용하여 이미지 획득을 수행했다. ImageJ 무료 소프트웨어 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) 를 사용하여 이미지 사후 처리를 수행했다.
- [0482] B. 결과

- [0483] B.1. 신선한 인간 직장결장 샘플에서의 AMHRII 발현
- [0484] 직장결장암종에 걸린 4 명의 구별되는 개체로부터 이전에 수집된 종양 샘플로부터의 AMHRII 막 발현의 FACS 분석이 도 7A, 7B, 7C 및 7D 에 나타나 있다. 결과는 종양 샘플에 함유된 종양 세포 (CD3-Epcam+) 가 AMHRII 를 그들의 막에서 발현한다는 것을 보여준다.
- [0485] 직장결장암종에 걸린 20 명의 구별되는 개체로부터 이전에 수집된 종양 샘플로부터의 결과가 표 12 에 제시되어 있다.
- [0486] 표 12 에서, 각각의 종양 샘플에서, (i) 종양 세포 막에 존재하는 AMHRII 단백질의 평균 수를 확인함으로써 그리고 (ii) 종양 샘플에서 막 AMHRII 양성 세포의 백분율을 확인함으로써 AMHRII 발현이 평가되어 있다. 해당 종양 샘플이 "양성" 또는 "음성" 으로 설정되는지 여부의 표시는 표 12 의 왼쪽 칼럼에 제시되어 있다. "양성" 표시는 AMHRII 가 종양 세포 막에서 유의하게 발현된다는 것을 의미한다. "음성" 표시는 세포 막에서 AMHRII 발현이 유의하게 검출되지 않는다는 것을 의미한다.
- [0487] 표 12 의 결과는 종양 샘플 20 개 중 15 개가, 비록 다양한 발현 수준에서일지라도, 막 AMHRII 발현했음을 보여준다.
- [0488] 종양 샘플에 따라, 종양 세포 당 막 AMHRII 단백질의 평균 수 (표 12 에서 "세포 (종양) 당 수용체의 수" 로 명명됨) 는 540 내지 155 000 초과로 다양했다.
- [0489] 종양 샘플에 따라, 막 AMHRII 단백질 발현 세포의 빈도 (표 12 에서 "AMHRII 양성 세포 (Epcam+) 의 백분율"로 명명됨) 는 20% 내지 100% 로 다양했다.
- [0490] 표 12 의 결과는 종양 세포 당 막 AMHRII 의 평균 수와 막 AMHRII 를 발현하는 종양 세포의 빈도 사이에 상관관계를 보여주지 않았다.
- [0491] B.2. 인간 직장결장 종양 이종이식편 (환자 유래 이종이식편) 에서의 AMHRII 발현
- [0492] 인간 종양 이종이식편 샘플을 실시예 3 에 개시되는 바와 같이 수득하고, 종양 세포에 의한 AMHRII 발현을 재료 및 방법 섹션에 개시되는 바와 같은 방법을 사용하여 평가했다.
- [0493] 직장결장암종에 걸린 4 명의 구별되는 개체로부터 이전에 수집된 후 마우스에 이종이식된 종양 샘플로부터의 AMHRII 막 발현의 FACS 분석이 도 8A, 8B, 8C 및 8D 에 나타나 있다. 결과는 이종이식된 종양 샘플에 함유된 종양 세포 (CD3-Epcam+) 가 AMHRII 를 그들의 막에서 발현한다는 것을 보여준다.
- [0494]로부터 이전에 수집된 종양 샘플로부터의 결과
- [0495] 직장결장암종에 걸린 12 명의 구별되는 개체로부터 이전에 수집된 후 마우스에 이종이식된 종양 샘플로부터의 결과가 표 13 에 제시되어 있다.
- [0496] 표 13 에서, 각각의 이종이식편 종양 샘플에서,, (i) 종양 세포 막에 존재하는 AMHRII 단백질의 평균 수를 확인함으로써 그리고 (ii) 이종이식편 종양 샘플에서 막 AMHRII 양성 세포의 백분율을 확인함으로써 AMHRII 발현이 평가되어 있다.
- [0497] 표 13 의 결과는 이종이식편 종양 샘플 12 개 중 6 개가, 비록 다양한 발현 수준에서일지라도, 막 AMHRII 발현했음을 보여준다.
- [0498] 이종이식편 종양 샘플에 따라, 세포 당 막 AMHRII 단백질의 평균 수 (표 13 에서 "세포 당 수용체의 수 (Epcam+)"로 명명됨) 는 16 000 초과 내지 약 100 000 로 다양했다.
- [0499] 종양 샘플에 따라, 막 AMHRII 단백질 발현 세포의 빈도 (표 13 에서 "AMHRII 양성 세포 (Epcam+) 의 백분율"로 명명됨) 는 0.5% 내지 87% 로 다양했다.
- [0500] 표 13 의 결과는 종양 세포 당 막 AMHRII 의 평균 수와 막 AMHRII 를 발현하는 종양 세포의 빈도 사이에 분명한 상관관계를 보여주지 않았다.
- [0501] 해당 종양 샘플이 "양성" 또는 "음성" 으로 설정되는지 여부의 표시는 표 13 의 왼쪽 칼럼에 제시되어 있다. "양성" 표시는 AMHRII 가 종양 세포의 막에서 유의하게 발현되지 않는다는 것을 의미한다. "음성" 표시는 종양 세포에 의한 막 AMHRII 발현이 유의하게 검출되지 않는다는 것을 의미한다.

[0502] B.3. 신선한 신세포 암종 샘플에서의 AMHRII 막 발현

[0503] 인간 신세포 암종 종양 샘플을 재료 및 방법 색션에 개시되는 바와 같은 방법을 사용하여 수득하고, 종양 세포에 의한 막 AMHRII 발현 (EpCam⁺) 을 FACS 분석에 의해 평가했다.

[0504] 결과가 도 9A 및 9B에 나타나 있다.

[0505] 신세포 암종에 걸린 2명의 구별되는 개체로부터 이전에 수집된 종양 샘플로부터의 AMHRII 막 발현의 FACS 분석이 도 9A 및 9B에 나타나 있다. 결과는 신세포 암종 종양 샘플에 함유된 종양 세포 (CD3-Epcam⁺) 가 AMHRII 를 그들의 막에서 발현한다는 것을 보여준다.

[0506] 실시예 7: AMHRII-발현 비-부인과암에 대항하는 항-AMHRII 항체의 생체내 효능

[0507] **A. 재료 및 방법**

[0508] 스톡 마우스 (Envigo로부터의 무흉선 누드-*Foxn1^{nu}*)에게 Champions TumorGraft® 모델 CTG-0401로부터의 종양 단편을 이식했다. 종양이 1000-1500 mm³에 도달한 후에, 종양을 수확하고, 종양 단편을 암컷 연구 마우스의 왼쪽 옆구리에 SC 이식했다. 각각의 동물에게 특정 계대 로트를 이식했다: CTG-0401의 경우에 계대 6. 종양 성장을 디지털 캘리퍼를 사용하여 1주 2회 모니터링하고, 종양 부피 (TV) 를 쟁 (0.52 × [길이 × 너비²]) 을 사용하여 계산했다. 종양 부피가 175 ± 7 mm³에 도달한 후에, 마우스를 그들의 종양 크기에 기초하여 선별하고, 4개의 군 (군 당 동물 12마리)으로 무작위로 할당했다 (제 0일). 제 0일에 투여의 개시 후에, 동물을 매주 2회 디지털 저울을 사용하여 칭량하고, TV 를 매주 2회 및 또한 연구의 최종일에 측정했다. 비히클 대조군에서의 평균 종양 부피가 1500 mm³에 도달했을 때 또는 제 60일에 (어느 쪽이든 먼저 발생한 것) 연구를 종료했다. 연구 디자인이 아래 표 13에 요약되어 있다.

[0509] 표 13: 인간 직장결장암의 모델 CTG-0401에서 효능 연구의 디자인

군	n	제제	용량 (mg/kg)	용량 부피 (mL/kg)	경로	투여 일정	투여의 총 #
1	12	비히클 GM102	0	10	IP	BIWx4	8
		비히클 이리노테칸	0	10	IP	Q7Dx3	3
2	12	GM102	20	10	IP	BIWx4	8
3	12	이리노테칸	100	10	IP	Q7Dx3	3

[0510]

[0511] GM102 또는 GM102 비히클을 이리노테칸 또는 이리노테칸 비히클 전에 투여했다.

[0512] **B. 결과**

[0513] 이 실험의 결과가 도 10에 나타나 있다.

[0514] 도 10의 결과는 항-AMHRII 항체 GM102는 AMHRII-발현 인간 직장결장 종양에 대항하는 효율적 생체내 항-종양 효과를 보유한다는 것을 보여준다.

[0515] 현저히, 항-AMHRII 항체 GM102는 주로 사용되는 항-결장암 분자 이리노테칸 (CAS 번호: 100286-90-6)의 항-종양 효과와 구별할 수 없는 항-종양 효과를 발휘한다.

[0516]

표 12 : 신선한 인간 직장결장 종양 샘플에서의 AMHRII 발현

샘플	Id	조직학적 유형	세포 (종양) 당 수용체의 수	AMHRII 양성 세포 (Epcam+) 의 백분율	양성/음성
# 1	C1	AdenoK	15,600	100%	+
# 2	I1	AdenoK	155,954	20%	+
# 3	E1	AdenoK	23,548	100%	+
# 4	A2	AdenoK	12,680	26%	+
# 5	N1	AdenoK (좌 결장)	116,704	50%	+
# 6	N2	AdenoK (좌 결장)	7,578	-	-
# 7	N3	AdenoK (우 결장)	34,677	100%	+
# 8	N4	AdenoK (좌 결장) MSI	1,605	-	-
# 9	A1	MucinousAdenoK(7번)	540	-	-
# 10	E2	AdenoK	57,209	100%	+
# 11	I2	AdenoK	155,473	27%	+
# 12	I3	AdenoK	102,275	68%	+
# 13	N6	AdenoK (좌 결장)	47,464	100%	+

[0517]

샘플	Id	조작한 유전체	세포(종양) 당 수용체의 수	AMHR1 양성 세포 (Epcam+)의 백분율	양성/음성
# 14	N7	AdenoK (좌절장)	61,870	100%	+
# 15	E3	AdenoK	4,090		-
# 16	E4	AdenoK	32,153	75%	+
# 17	A3	AdenoK (7월)	6,400		-
# 18	E5	AdenoK	13,152	37%	+
# 19	E6	AdenoK	21,962	25%	+
# 20	A4	AdenoK	42,596	56%	+

[0518]

[0519]

표 13 : 이종이식된 인간 종양으로부터의 종양 세포에서의 AMHRII

체포린스	번호	조직학적 유형	세포(Epcam+) 및 수용체의 Nb	AMHRII 양성 세포 (Epcam+)의 백분율	양성/음성
CO14452B	#1	Muc adenoK	63.181	16%	+
CO14744C	#2	AdenoK	25.269	1,5%	-
CO13196D	#3	AdenoK	21.313	4%	-
CO11291	#4	AdenoK	20.629	0,5%	-
CO10619	#5	AdenoK	16.327	0,5%	-
CO11690	#6	AdenoK	17.802	1%	-
CO10069	#7	AdenoK	44.511	2%	-
CO14592	#8	AdenoK	83.762	87%	+
CO10708	#9	AdenoK	43.109	7%	+

[0520]

레퍼런스	번호	조직학적 유형	세포 (Epcam+) 당 수용체의 Nb	AMHRII 양성 세포 (Epcam+)의 백분율	양성/음성
CO7935	#10	AdenoK	99.959	73%	+
CO11101	#11	AdenoK	28.951	44%	+
CO10748	#12	AdenoK	29.821	56%	+

도면

도면 1a

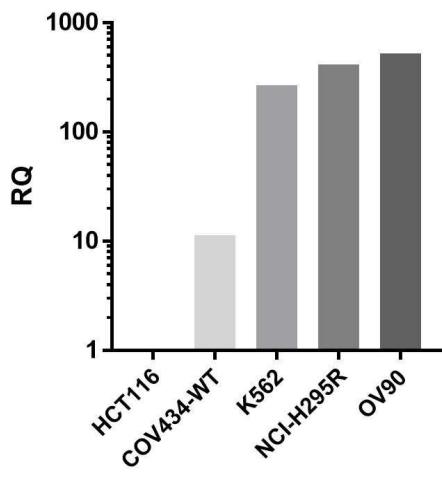
VH 도메인	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4				
								10	20	30	40
SEQ ID								10	20	30	40
19 3C23R	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
20 3C23RK	QVQLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
21 5B42	QVQLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
22 K4D24	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
23 K4D20	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
24 K4A12	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
25 K5D05	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
26 K5D14	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
27 K4D123	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
28 K4D127	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
29 5C14	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
30 5C26	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
31 5C27	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
32 5C60	QVRLVQSSAK1REGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
33 6C13	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
34 6C18	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...
35 6C54	QVRLVQSGAEVKKEGASVKVSC	KASGYTFTSYLH	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	WVROQAFQRL	...1...	...1...	...1...	...1...

E 1A

도면1b

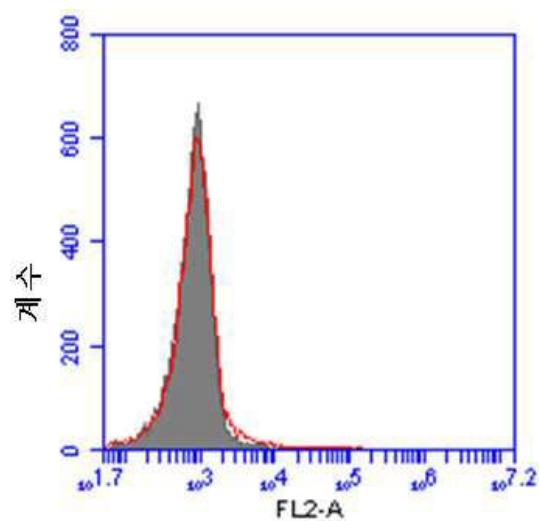
11

도면2a



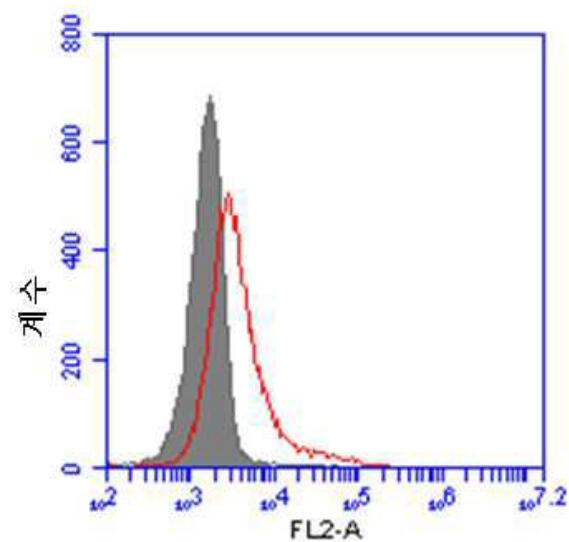
도 2A

도면2b



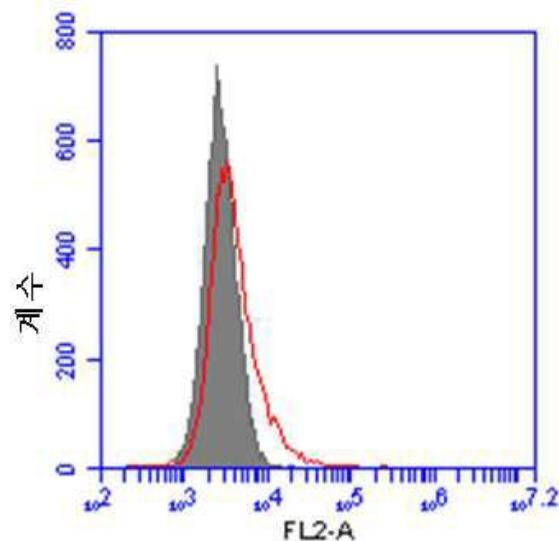
도 2B

도면2c



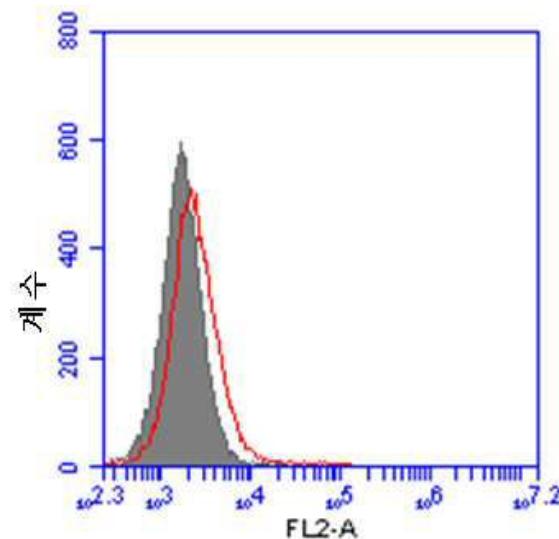
도 2C

도면2d



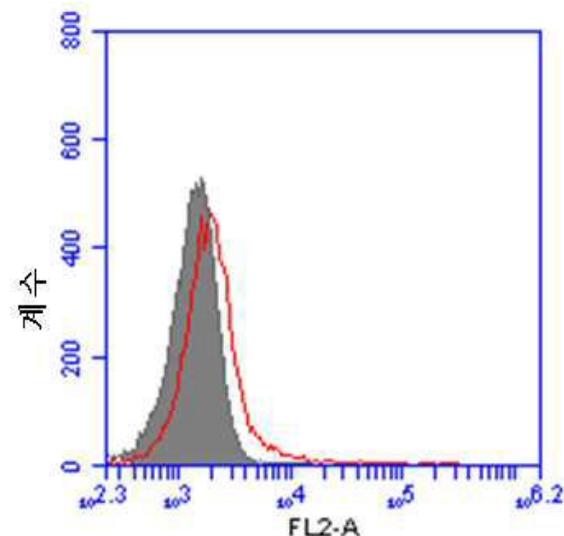
도 2D

도면2e



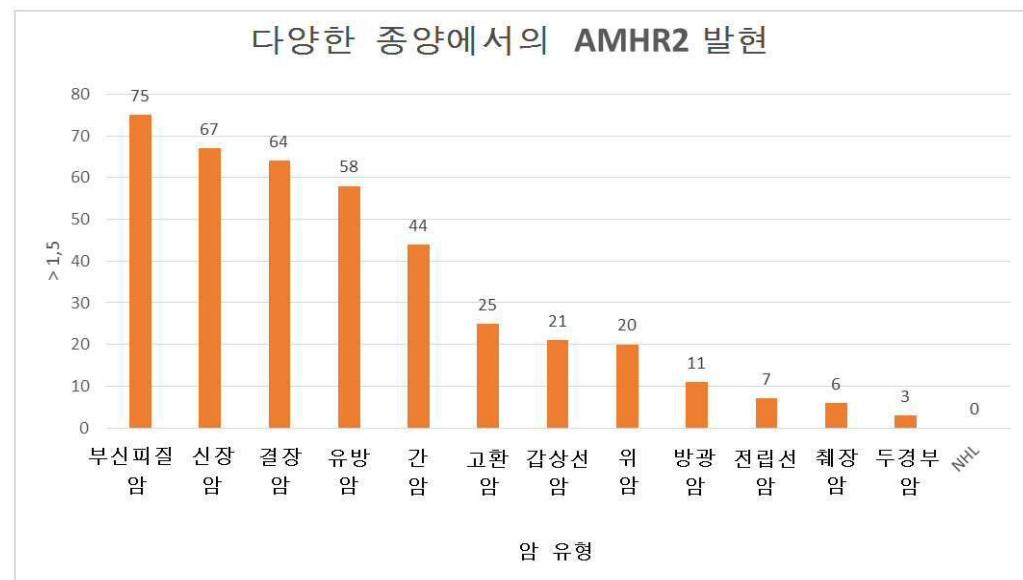
도 2E

도면2f

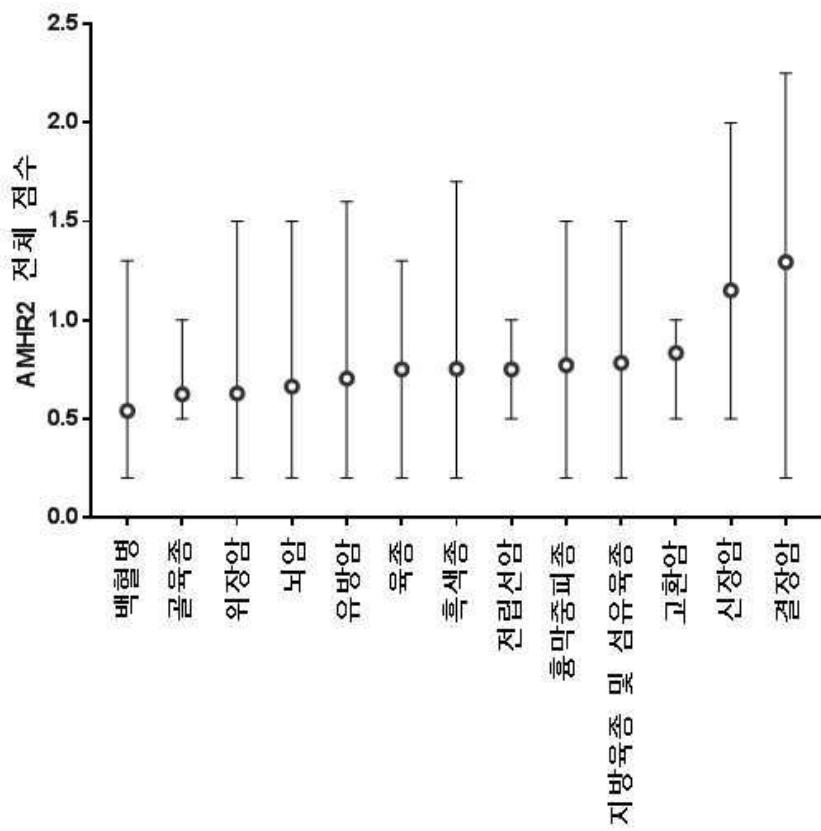


도 2F

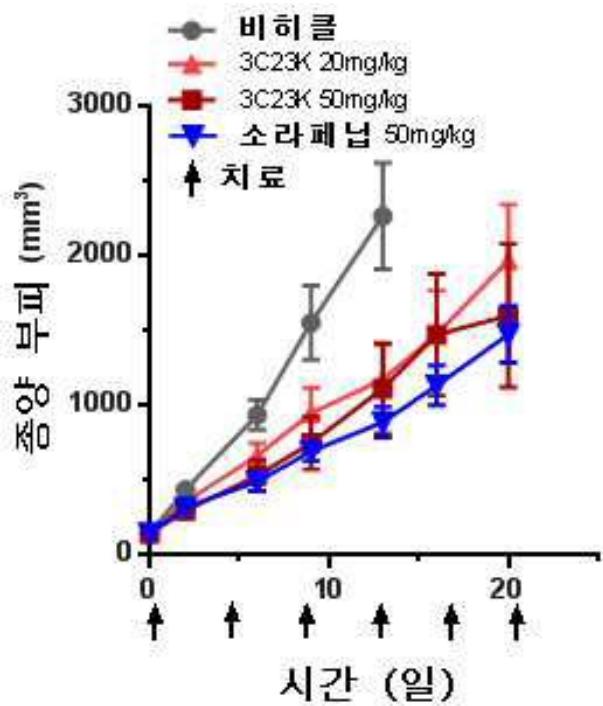
도면3



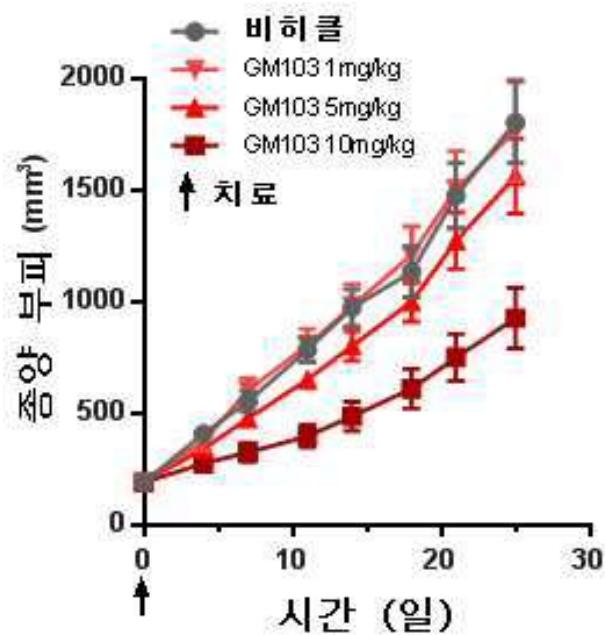
도면4



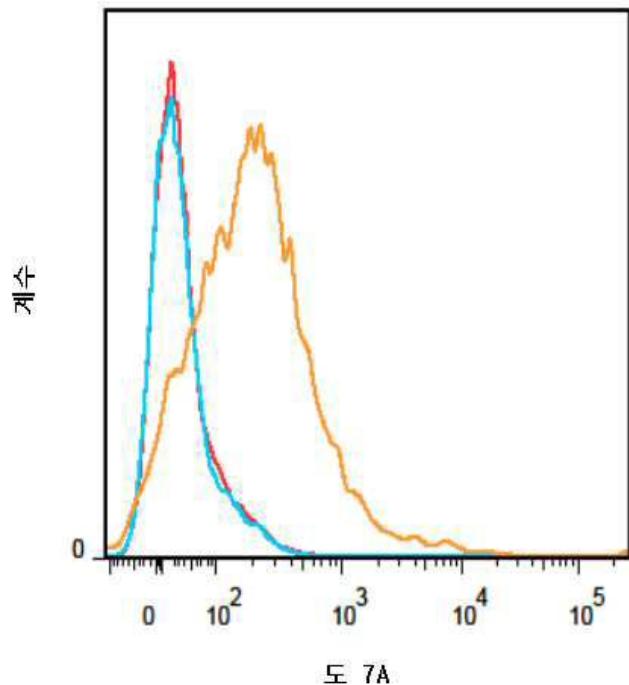
도면5



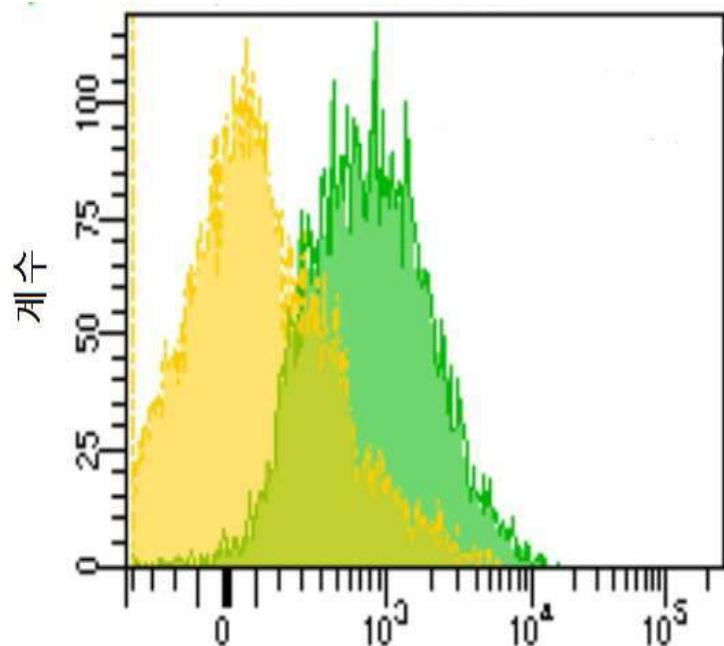
도면6



도면7a

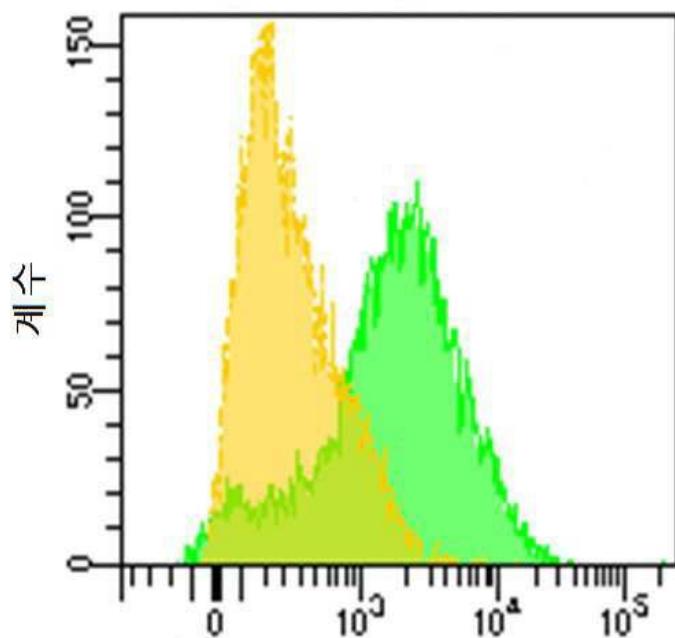


도면7b



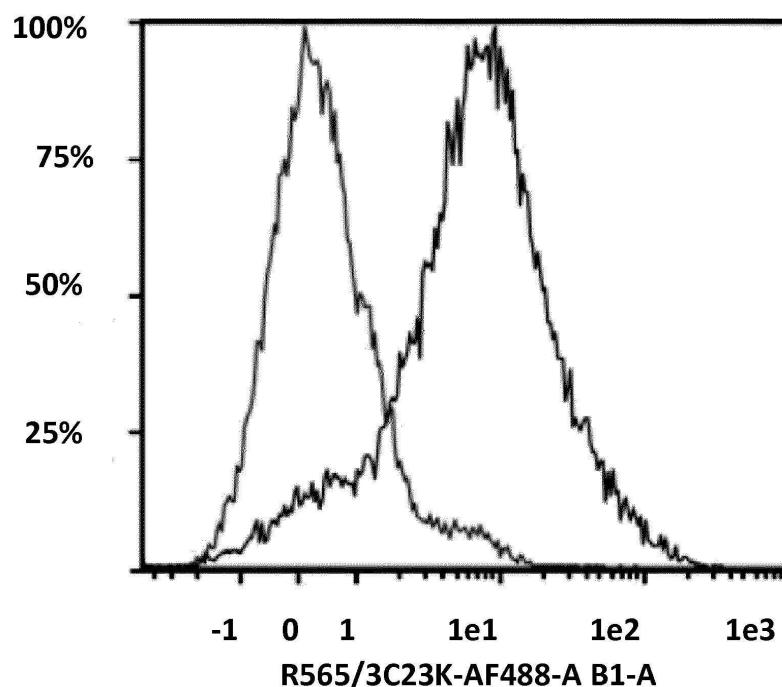
도 7B

도면7c

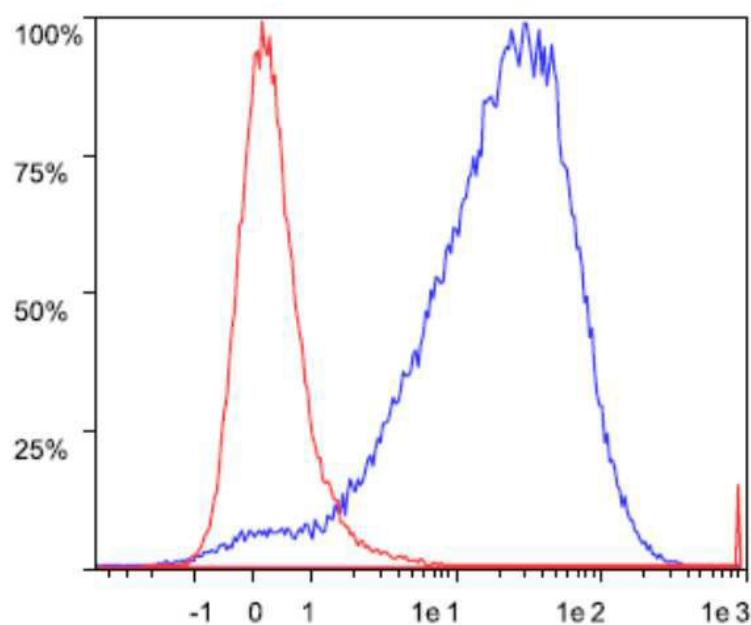


도 7C

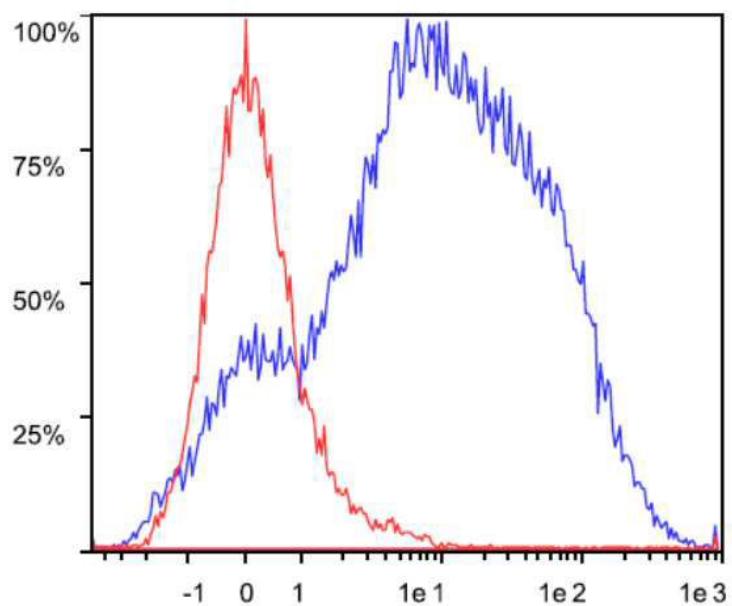
도면7d



도면8a

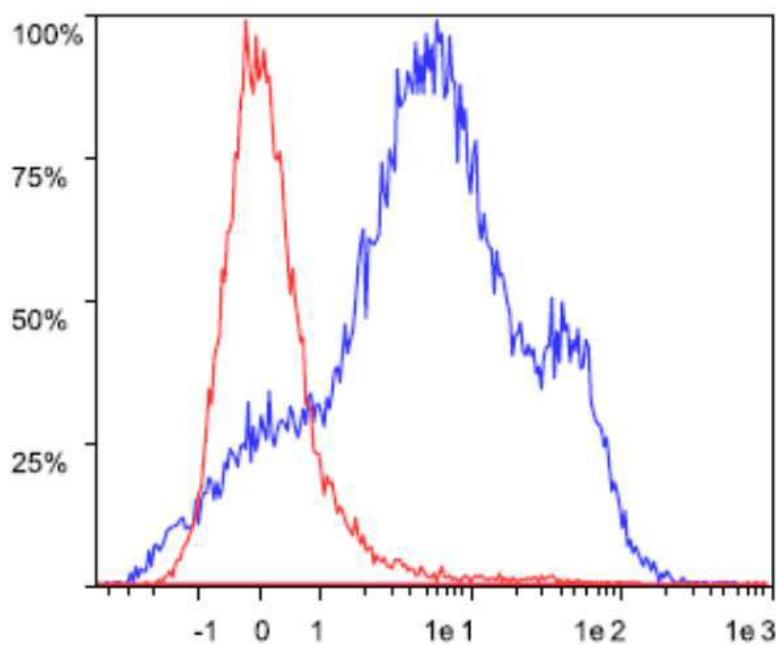


도면8b



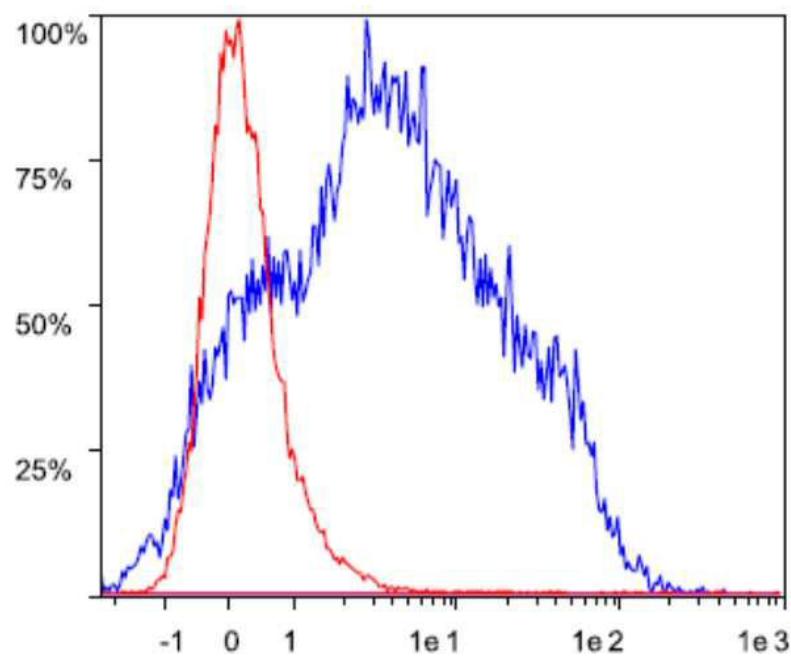
도 8B

도면8c



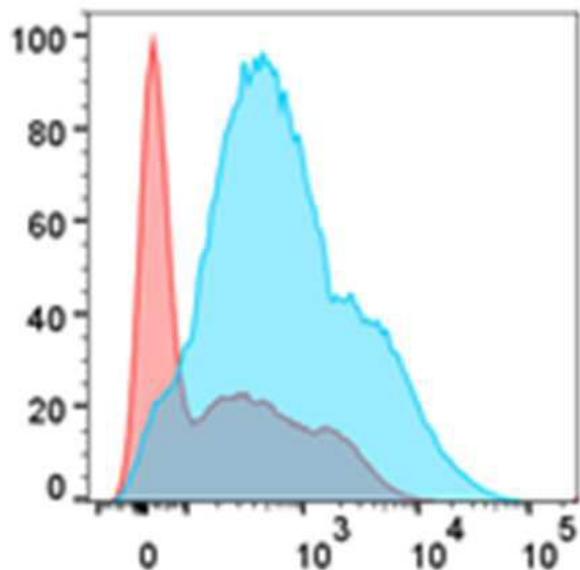
도 8C

도면8d



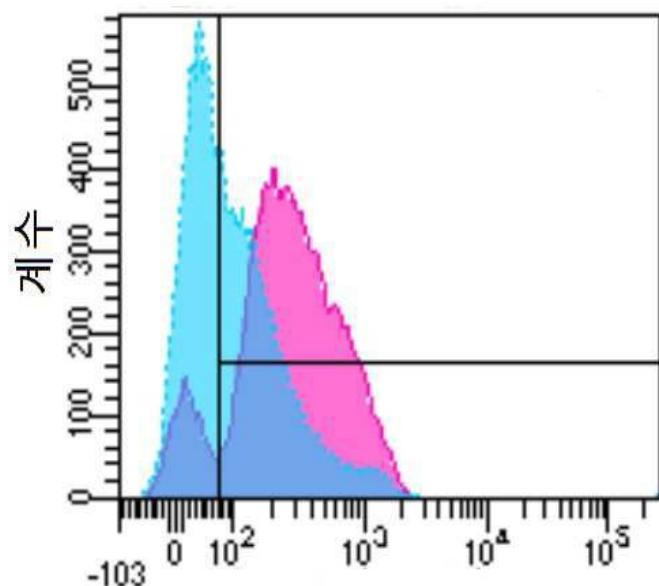
도 8D

도면9a



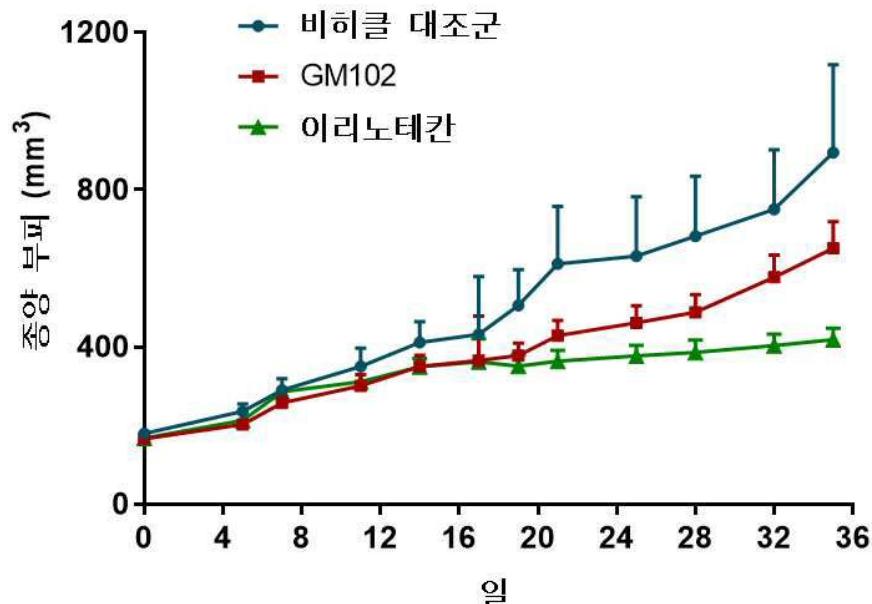
도 9A

도면9b



도 9B

도면10



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GAMAMABS PHARMA

INSTITUT CURIE

<120> AMHRII-binding compounds for preventing or treating cancers

<130> PR77465

<140> EP17305445.3

<141> 2017-04-14

<150> EP17305445

<151> 2017-04-14

<160> 74

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3C_23 VL without leader" <223> "3C_23 VL without leader

<220>

<223> 3C_23 VL without leader

<220>

<223> 3C_23 VL without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..318

<400> 1

gac atc cag atg aca cag tcc cca tct acc ctg tct gct tcc gtg gga	48
gat cgg gtg act atc acc tgc aga gca agc tcc tcc gtg agg tac atc	96
gct tgg tac cag cag aag cca gga aag gcc cca aag ctg ctg acc tac	144
cca acc tcc tcc ctg gaa tcc ggg gtg ccc agc aga ttc tca ggc agt	192
ggc tcc ggc acc gaa ttc acc ctg acc atc agc tca ctg cag cct gac	240
gac ttc gca acc tac tac tgt ctg cag tgg agt agc tac cct tgg aca	288
ttc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag	318

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..318 from SEQ ID NO 1

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3C_23 VH without leader" <223> "3C_23 VH without leader

<220>

<223> 3C_23 VH without leader

<220>

<223> 3C_23 VH without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..345

<400> 3

cag gtg cgg ctg gtg cag agc ggg gcc gag gtg aag aag cct gga gcc	48
tca gtg aag gtg agt tgc aag gcc tcc ggt tac acc ttc acc agc tac	96
cac atc cac tgg gtc aga cag gct ccc ggc cag aga ctg gag tgg atg	144

ggc tgg atc tac cct gga gat gac tcc acc aag tac tcc cag aag ttc	192
cag ggt cgc gtg acc att acc agg gac acc agc gcc tcc act gcc tac	240
atg gag ctg tct tcc ctg aga tct gag gat acc gca gtc tac tac tgt	288
aca cgg ggg gac cgc ttt gct tac tgg ggg cag ggc act ctg gtg acc	336
gtc tcg agc	345

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..345 from SEQ ID NO 3

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

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

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ty

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" <223> "3C_23K VL without leader

<220>

<223> 3C_23K VL without leader

<220>

<223> 3C_23K VL without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..318

<400> 5

gac atc cag atg aca cag tcc cca tct acc ctg tct gct tcc gtg gga	48
gat cgg gtg act atc acc tgc aga gca agc tcc tcc gtg agg tac atc	96
gct tgg tac cag cag aag cca gga aag gcc cca aag ctg ctg acc tac	144
cca acc tcc tcc ctg aaa tcc ggg gtg ccc agc aga ttc tca ggc agt	192

ggc tcc ggc acc gaa ttc acc ctg acc atc agc tca ctg cag cct gac	240
gac ttc gca acc tac tac tgt ctg cag tgg agt agc tac cct tgg aca	288
ttc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag	318

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..318 from SEQ ID NO 5

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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" <223> "3C_23K VH without leader

<220>

<223> 3C_23K VH without leader

<220>

<223> 3C_23K VH without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..345

<400> 7

gtc tcg agc 345

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..345 from SEQ ID NO 7

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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

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" <223> "3C_23 light chain
without leader

<220>

<223> 3C_23 light chain without leader

<220>

<223> 3C_23 light chain without leader

<220>

<221> CDS

<222

> 1..639

<400> 9

gac atc cag atg aca cag tcc cca tct acc ctg tct gct tcc gtg gga	48
gat cgg gtg act atc acc tgc aga gca agc tcc tcc gtg agg tac atc	96
gct tgg tac cag cag aag cca gga aag gcc cca aag ctg ctg acc tac	144
cca acc tcc tcc ctg gaa tcc ggg gtg ccc agc aga ttc tca ggc agt	192
ggc tcc ggc acc gaa ttc acc ctg acc atc agc tca ctg cag cct gac	240
gac ttc gca acc tac tac tgt ctg cag tgg agt agc tac cct tgg aca	288
ttc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc gtc gcc gca cca	336

agt gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act	384
gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa	432
gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag	480
agt gtc aca gag cag gac agc aag gac acc tac agc ctc agc agc	528
acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc	576
tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc	624
aac agg gga gag tgt	639

<210>

> 10

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..639 from SEQ ID NO 9

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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" <223> "3C_23 heavy chain

without leader

<220>

<223> 3C_23 heavy chain without leader

<220>

<223> 3C_23 heavy chain without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..1335

<400> 11

cag gtg cggtt ctg gtg cag agc ggg gcc gag gtg aag aag cct gga gcc	48
tca gtg aag gtg agt tgc aag gcc tcc ggt tac acc ttc acc agc tac	96
cac atc cac tgg gtc aga cag gct ccc ggc cag aga ctg gag tgg atg	144
ggc tgg atc tac cct gga gat gac tcc acc aag tac tcc cag aag ttc	192
cag ggt cgc gtg acc att acc agg gac acc agc gcc tcc act gcc tac	240

atg gag ctg tct tcc ctg aga tct gag gat acc gca gtc tac tac tgt	288
aca cgg ggg gac cgc ttt gct tac tgg ggg cag ggc act ctg gtg acc	336
gtc tcg agc gcc agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc	384
tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc	432

aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc	480
ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga	528
ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc	576

acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag	624
gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc	672
cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc	720
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	768
gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	816
ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	864
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	912

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	960
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	1008
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	1056
cggtt gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	1104
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	1152
ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	1200
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	1248

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	1296
cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1335

<210> 12

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..1335 from SEQ ID NO 11

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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 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" <223> "3C_23K light chain

without leader

<220>

<223> 3C_23K light chain without leader

<220>

<223> 3C_23K light chain without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..639

<400> 13

gac atc cag atg aca cag tcc cca tct acc ctg tct gct tcc gtg gga	48
gat cgg gtg act atc acc tgc aga gca agc tcc tcc gtg agg tac atc	96
gct tgg tac cag cag aag cca gga aag gcc cca aag ctg ctg acc tac	144
cca acc tcc tcc ctg aaa tcc ggg gtg ccc agc aga ttc tca ggc agt	192
ggc tcc ggc acc gaa ttc acc ctg acc atc agc tca ctg cag cct gac	240

gac ttc gca acc tac tac tgt ctg cag tgg agt agc tac cct tgg aca	288
ttc ggc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc gtc gcc gca cca	336
agt gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act	384
gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa	432
gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag	480
agt gtc aca gag cag gac agc aag gac acc tac agc ctc agc agc	528
acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc	576
tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc	624

aac agg gga gag tgt	639
---------------------	-----

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..639 from SEQ ID NO 13

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223> Synthetic Construct

<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" <223> "3C_23K heavy chain
without leader

<220>

<223> 3C_23K heavy chain without leader

<220>

<223> 3C_23K heavy chain without leader

<220>

<221> CDS

<222> 1..1335

<400> 15

cag gtg cgg ctg gtg cag agc ggg gcc gag gtg aag aag cct gga gcc	48
tca gtg aag gtg agt tgc aag gcc tcc ggt tac acc ttc acc agc tac	96
cac atc cac tgg gtc aga cag gct ccc ggc cag aga ctg gag tgg atg	144

ggc tgg atc tac cct gga gat gac tcc acc aag tac tcc cag aag ttc	192
cag ggt cgc gtg acc att acc agg gac acc agc gcc tcc act gcc tac	240
atg gag ctg tct tcc ctg aga tct gag gat acc gca gtc tac tac tgt	288
aca cgg ggg gac cgc ttt gct tac tgg ggg cag ggc act ctg gtg acc	336
gtc tcg agc gcc agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc	384
tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc	432
aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc	480

ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga	528
ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc	576
acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag	624
gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc	672
cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc	720
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag	768
gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gtc aag	816

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	864
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	912

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	960
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	1008
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	1056
cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	1104
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	1152

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	1200
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	1248
cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	1296
cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1335

<210> 16

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct <223> Synthetic Construct

[CDS]:1..1335 from SEQ ID NO 15

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<223>

Synthetic Construct

<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
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 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
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
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 " <223> signal peptide

<220>

<223> signal peptide

<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" <223>

Human AMHR-II lacking the

<220>

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

<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

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 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		
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 <223> 3C23K/3C23

<220>

<223> 3C23K/3C23

<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 <223> 3C23KR/6B78

<220>

<223> 3C23KR/6B78

<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 <223> 5B42

<220>

<223> 5B42

<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 <223> K4D-24/6C59

<220>

<223> K4D-24/6C59

<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 <223> K4D-20

<220>

<223> K4D-20

<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 <223> K4A-12

<220>

<223> K4A-12

<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 <223> K5D05

<220>

<223> K5D05

<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 <223> K5D-14

<220>

<223> K5D-14

<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

<223> K4D-123

<220>
 <223> K4D-123
 <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 <223> K4D-127/6C07

<220>

<223> K4D-127/6C07

<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 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 <223> 5C14

<220>

<223> 5C14

<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 <223> 5C26

<220>

<223> 5C26

<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 <223> 5C27

<220>

<223> 5C27

<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 <223> 5C60

<220>

<223> 5C60

<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 <223> 6C13

<220>

<223> 6C13

<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 <223> 6C18

<220>

<223> 6C18

<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 <223> 6C54

<220>

<223> 6C54

<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 <223> 3C23K

<220>

<223> 3C23K

<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 <223> L-K55E

<220>

<223> L-K55E

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 38			
<211> 106			
<212> PRT			

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<220>

<223> L-T48I, L-P50S

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
-----	-----

<210> 39

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LT48I, L-K55E <223> LT48I, L-K55E

<220>

<223> LT48I, L-K55E

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LS27P, L-S28P <223> LS27P, L-S28P

<220>

<223> LS27P, L-S28P

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 41

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<220>

<223> L-M4L, L-T20A

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-S27P <223> L-S27P

<220>

<223> L-S27P

<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 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 <223> L-M4L, L-S9P, L-R31W

<220>

<223> L-M4L, L-S9P, L-R31W

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-M4L <223> L-M4L

<220>

<223> L-M4L

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-I33T <223> L-I33T

<220>

<223> L-I33T

<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 <223> L-M4L, L-K39E

<220>

<223> L-M4L, L-K39E

<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 <223> L-T22P

<220>

<223> L-T22P

<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 <223> L-Y32D

<220>

<223> L-Y32D

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-Q37H <223> L-Q37H

<220>

<223> L-Q37H

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-G97S <223> L-G97S

<220>

<223> L-G97S

<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 <223> L-S12P

<220>

<223> L-S12P

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-19A <223> L-19A

<220>

<223> L-19A

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-T72A <223> L-T72A

<220>

<223> L-T72A

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-R31W <223> L-R31W

<220>

<223> L-R31W

<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 <223> L-M4L, L-M39K

<220>

<223> L-M4L, L-M39K

<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 <223> L-I2N

<220>

<223> L-I2N

<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 <223> L-G63C, L-W91C

<220>

<223> L-G63C, L-W91C

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-R31G <223> L-R31G

<220>

<223> L-R31G

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-I75F <223> L-I75F

<220>

<223> L-I75F

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 60
 <211> 106
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L-I2T <223> L-I2T
 <220>
 <223> L-I2T
 <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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<220>

<223> L-I2T, L-K42R

<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-Y49H <223> L-Y49H

<220>

<223> L-Y49H

<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 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 <223> L-M4L, L-T20S, L-K39E

<220>

<223> L-M4L, L-T20S, L-K39E

<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 <223> L-T69P
 <220>
 <223> L-T69P
 <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 antibody

<220>

<223> CDRL-1 of anti-AMHRII antibody

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa in position 4 can be S or P

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa in position 5 can be S or P

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa in position 7 can be R or W or G

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa in position 8 can be T or D

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Waa in position 9 can be 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 antibody

<220>

<223> CDRL-2 of anti-AMHRII antibody

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa in position 6 can be 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 antibody

<220>

<223> CDRL-3 of anti-AMHRII antibody

<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 antibody

<220>

<223> CDRH-1 of anti-AMHRII antibody

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa in position 6 can be S or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa in position 9 can be S or G

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa in position 10 can be 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 antibody

<220>

<223> CDRH-2 of anti-AMHRII antibody

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa in position 5 can be 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 antibody

<220>

<223> CDRH-3 of anti-AMHRII antibody

<400> 70

Gly Asp Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for AMHR2

<220>

<223> forward primer for AMHR2

<400> 71

tctggatggc actggtgctg 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for AMHR2

<220>

<223> reverse primer for AMHR2

<400> 72

agcaggccca agatgatgct 20

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for TBP

<220>

<223> forward primer for TBP

<400> 73

tgcacaggag ccaagagtga a

21

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for TBP

<220>

<223> reverse primer for TBP

<400> 74

cacatcacag ctccccacca

20