(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0006000
(43) 공개일자 2015년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) *A61K 103/30* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7032847
(22) 출원일자(국제) 2013년04월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/038742
(87) 국제공개번호 WO 2013/165940
국제공개일자 2013년11월07일
(30) 우선권주장
61/641,074 2012년05월01일 미국(US)
61/678,911 2012년08월02일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
첸, 유준
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
말레, 윌리엄
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

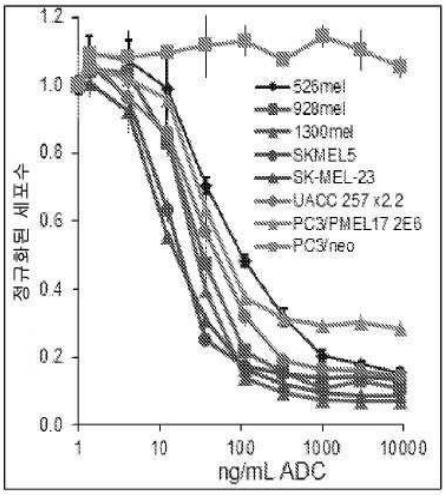
전체 청구항 수 : 총 78 항

(54) 발명의 명칭 **항-PMEL17 항체 및 면역접합체**

(57) 요 약

본 발명은 항-PMEL17 항체 및 면역접합체 및 이들의 사용 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

폴라키스, 폴

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

탄, 크리스틴

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

아순디, 지요티

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

클락, 수잔나

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

특허청구의 범위

청구항 1

PMEL17에 결합하는, 단리된 항체로f서, 상기 항체는 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하거나 서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합하는, 단리된 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 모노클로날 항체인, 단리된 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 인간, 인간화된, 또는 키메라 항체인, 단리된 항체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, PMEL17에 결합하는 항체 단편인, 단리된 항체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 PMEL17은 인간 PMEL17인, 단리된 항체.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 인간 PMEL17은 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 서열을 갖는, 단리된 항체.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) (i) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는

b) (i) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는

c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H3, HVR-L3, 및 HVR-H2.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는

b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는

c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) (i) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

b) (i) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) 서열번호: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는

b) 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열; 또는

d) 서열번호: 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는

e) 서열번호: 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

f) (d)에서와 같은 VH 서열 및 (e)에서와 같은 VL 서열; 또는

g) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는

h) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

i) (g)에서의 같은 VH 서열 및 (h)에서와 같은 VL 서열.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 하기를 포함하는, 단리된 항체: 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열, 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열, 또는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 하기를 포함하는, 단리된 항체: 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열, 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열, 또는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열.

청구항 14

하기를 포함하는, 단리된 항체: (a) 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (b) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열 및 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서

열.

청구항 15

PMEL17에 결합하는, 단리된 항체로서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 단리된 항체:

a) (i) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는

b) (i) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는

c) (i) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

d) (i) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는

e) 서열번호: 11의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는

f) 서열번호: 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

g) (e)에서와 같은 VH 서열 및 (f)에서와 같은 VL 서열; 또는

h) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열; 또는

i) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는

j) (h)에서와 같은 VH 서열 및 (i)에서와 같은 VL 서열.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, IgG1, IgG2a 또는 IgG2b 항체인, 단리된 항체.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항체를 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 18

청구항 17의 핵산을 포함하는 숙주세포.

청구항 19

청구항 18의 숙주세포를 배양하고 이로써 항체가 생산되는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항체 및 세포독성 약물을 포함하는 면역 접합체.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 식 Ab-(L-D)p으로 표시되는 면역접합체:

여기서,

(a) Ab는 청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항체이고;

(b) L은 링커이고;

(c) D는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 약물이고;

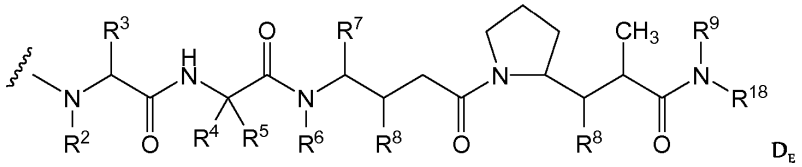
(d) p는 1-8의 범위이다.

청구항 22

청구항 21에 있어서, D는 아우리스타틴인 면역접합체.

청구항 23

청구항 22에 있어서, D는 식 D_E로 표시되는 면역접합체:



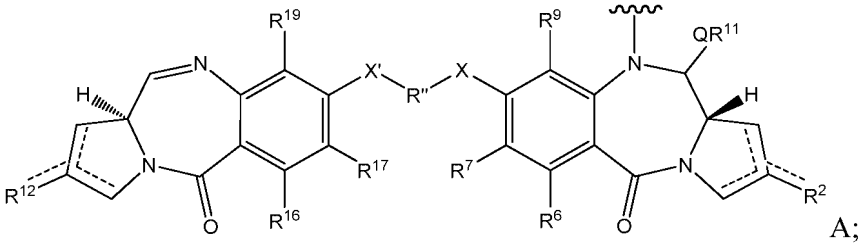
여기서 R^2 및 R^6 각각은 메틸이고, R^3 및 R^4 각각은 이소프로필이고, R^5은 H이고, R^7은 sec-부틸이고, 각각의 R^8은 로부터 독립적으로 선택되고 CH_3, O-CH_3, OH, 및 H; R^9은 H이고; R^{18}은 -C(R^8)$_2$-C(R^8)$_2$-아릴이다.

청구항 24

청구항 21에 있어서, 상기 약물은 MMAE인 면역접합체.

청구항 25

청구항 22에 있어서, D는 식 A의 피롤로벤조디아제핀인 면역접합체:



A;

상기 점선은 C1과 C2 또는 C2와 C3 사이의 임의 존재의 이중 결합을 나타내고;

R^2은 H, OH, =O, =CH_2, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)$_2$, O-SO_2-R, CO_2R 및 COR 로부터 독립적으로 선택되고, 할로 또는 디할로로부터 임의로 추가로 선택되고, 여기서

R^D은 R, CO_2R, COR, CHO, CO_2H, 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

R^6 및 R^9은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

R^7은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

Q는 O, S 및 NH로부터 독립적으로 선택되고;

R^{11}은 H, 또는 R이거나, 여기서 Q는 O, SO_3M (여기서 M은 금속 양이온임)이고;

R 및 R' 각각은 임의로 치환된 C_{1-8} 알킬, C_{3-8} 헤테로시클릴 및 C_{5-20} 아릴 그룹 로부터 독립적으로 선택되고, 임의로 그룹 NRR'과 관련하여, R 및 R' 이들이 부착된 질소 원자와 함께 임의로 치환된 4-, 5-, 6- 또는 7-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

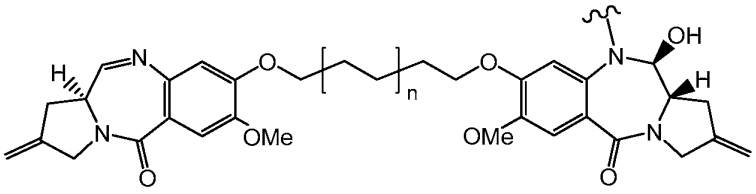
R^{12}, R^{16}, R^{19} 및 R^{17}은 R^2, R^6, R^9 및 R^7 각각에 대해 규정된 바와 같고;

R"는 C_{3-12} 알킬렌 그룹이고, 이 사슬은 임의로 치환된 하나 이상의 헤테로원자 및/또는 방향족 고리에 의해 방해될 수 있고;

X 및 X'는 O, S 및 N(H)로부터 독립적으로 선택된다.

청구항 26

청구항 25에 있어서, D는 하기 구조를 갖는 면역적합체:

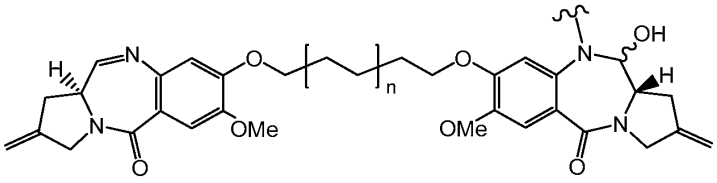


A(II);

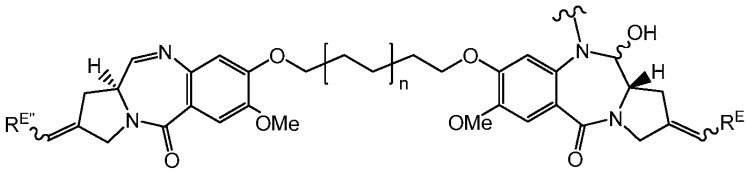
여기서 n은 0 또는 1이다.

청구항 27

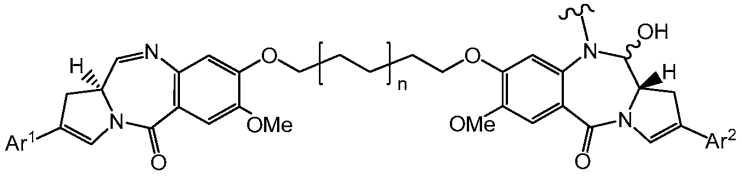
청구항 25에 있어서, D는 하기로부터 선택된 구조를 갖는 면역접합체:



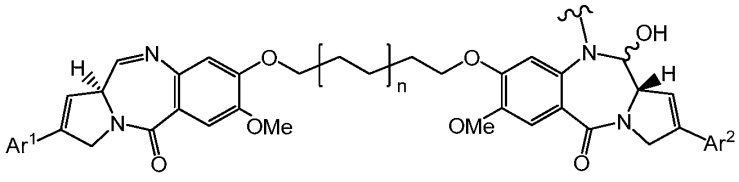
A(I);



A(III);



A(IV); 및



A(V);

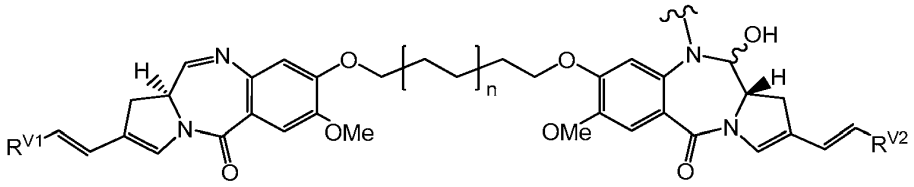
여기서 R^E 및 $R^{E"}$ 각각은 H 또는 R^D 로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^D은 R, CO_2R, COR, CHO, CO_2H, 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

여기서 Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 C_{5-20} 아릴이고;

여기서 n은 0 또는 1이다.

청구항 28

청구항 21에 있어서, D는 식 B의 피롤로벤조디아제핀인 면역접합체:



상기 수평 물결선은 링커에 대한 공유 부착 부위를 나타내고;

R^{V1} 및 R^{V2}은 H, 메틸, 에틸, 페닐, 플루오로-치환된 페닐, 및 C_{5-6} 헤테로시클릴 로부터 독립적으로 선택되고;

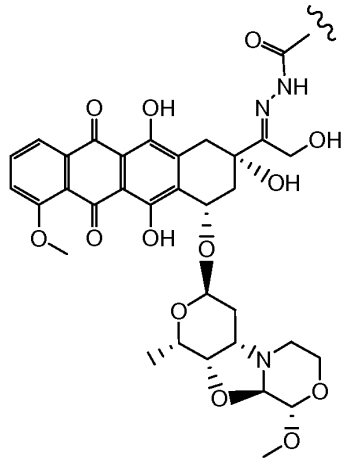
n은 0 또는 1이다.

청구항 29

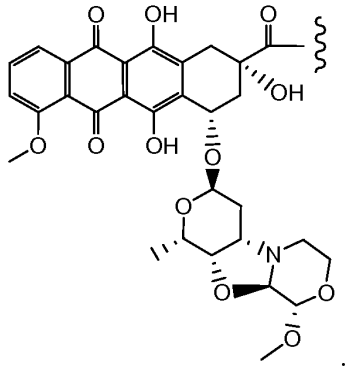
청구항 21에 있어서, D는 네모루비신 유도체인 면역접합체.

청구항 30

청구항 29에 있어서, D는 하기로부터 선택된 구조를 갖는 면역접합체:



; 및



.

청구항 31

청구항 21 내지 30 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 링커는 프로테아제에 의해 절단가능한 면역접합체.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 링커는 val-cit 디펩타이드 또는 Phe-Lys 디펩타이드를 포함하는 면역접합체.

청구항 33

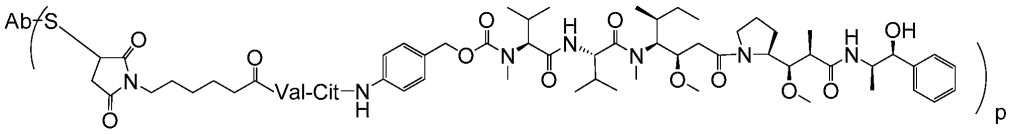
청구항 21 내지 30 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 링커는 산-불안정한 면역접합체.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 링커는 하이드라존을 포함하는 면역접합체.

청구항 35

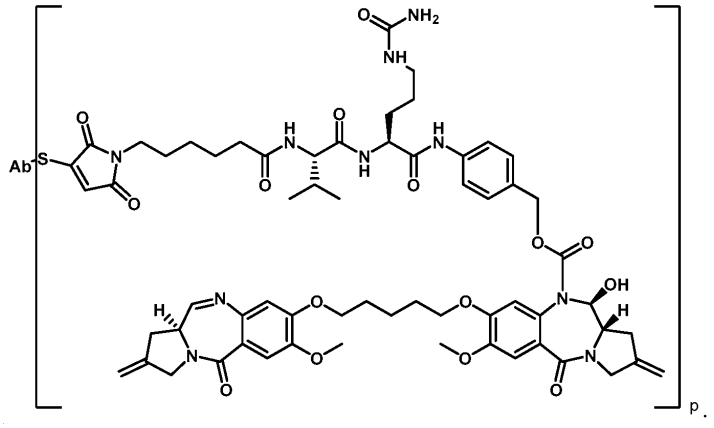
청구항 23에 있어서, 하기 식을 갖는 면역접합체:



여기서 S는 황 원자이다.

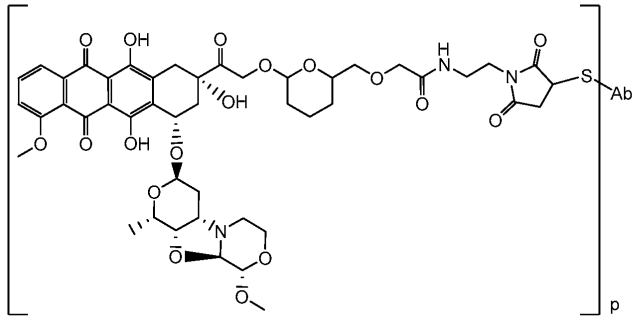
청구항 36

청구항 26에 있어서, 하기 식을 갖는 면역접합체:

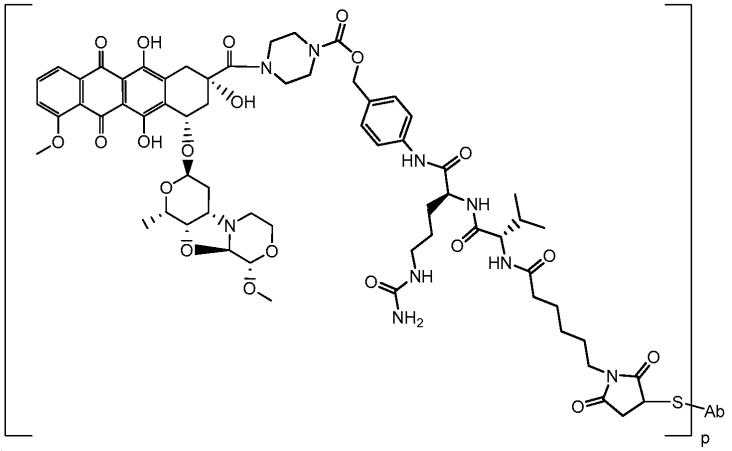


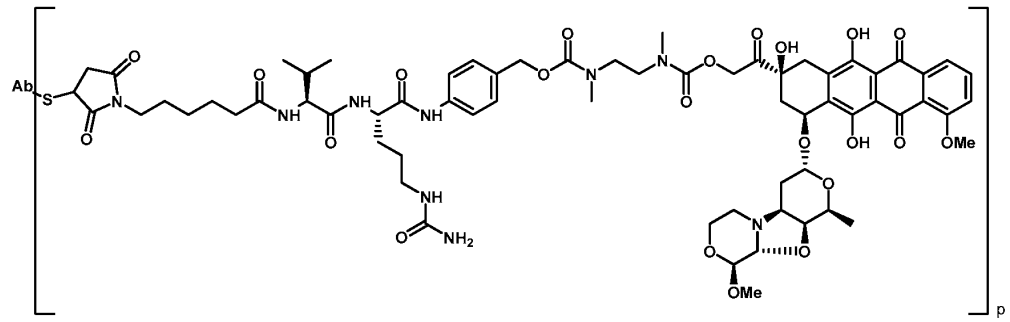
청구항 37

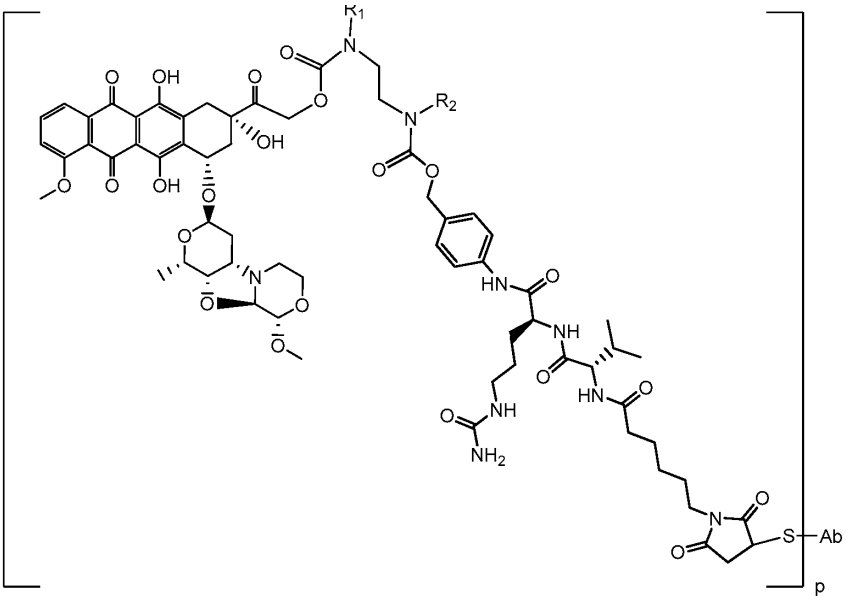
청구항 30에 있어서, 하기로부터 선택된 식을 갖는 면역접합체:



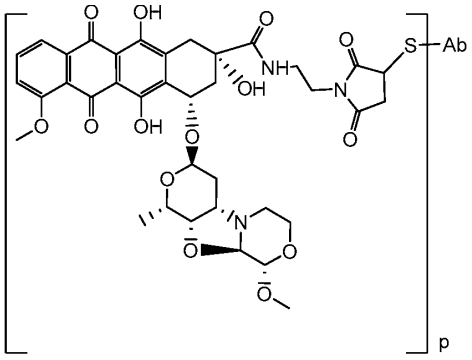
;







; 및



.

청구항 38

청구항 21 내지 37 중 어느 하나의 항에 있어서, p는 2-5의 범위인 면역접합체.

청구항 39

청구항 21 내지 38 중 어느 하나의 항에 있어서, 청구항 9의 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 40

청구항 21 내지 38 중 어느 하나의 항에 있어서, 청구항 14의 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 41

청구항 21 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 제형.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 약제학적 제형.

청구항 43

PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 PMEL17-양성 암은 흑색종인 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 추가의 치료제를 개체에 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

PMEL17-양성 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 상기 방법은 면역접합체의 세포 표면 상의 PMEL17에의 결합을 위해 허용된 조건 하에서 상기 세포를 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체에 노출시키고, 그렇게 함으로써 세포의 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 세포는 흑색종 세포인 방법.

청구항 48

청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항에 있어서, 표지에 접합된 항체.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 표지는 양전자 에미터인 항체.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 양전자 에미터는 ^{89}Zr인 항체.

청구항 51

하기를 포함하는, 생물학적 샘플 중 인간 PMEL17을 검출하는 방법: 항-PMEL17 항체의 자연 발생 인간 PMEL17에의 결합을 위해 허용된 조건 하에서 생물학적 샘플을 청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항-PMEL17 항체와 접촉시키는 단계, 및 복합물이 항-PMEL17 항체 및 생물학적 샘플 중 자연 발생 인간 PMEL17 사이에서 형성되는지를 검출하는 단계.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 항-PMEL17 항체는 청구항 9 또는 청구항 15에서와 같은 항체인 방법.

청구항 53

청구항 51에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 흑색종 샘플인 방법.

청구항 54

하기를 포함하는 PMEL17-양성 암을 검출하는 방법: (i) 표지된 항-PMEL17 항체를 PMEL17-양성 암을 가지고 있거나 그것이 의심되는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체는 청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항-PMEL17 항체를 포함하는 단계, 및 (ii) 상기 대상체에서 상기 표지된 항-PMEL17 항체를 검출하는 단계로서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체의 검출은 상기 대상체에서 PMEL17-양성 암을 나타내는 단계.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체는 표지된 청구항 9 또는 청구항 15에서와 같은 항체인 방법.

청구항 56

청구항 54 또는 청구항 55에 있어서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체는 양전자 에미터에 접합된 항-PMEL17 항체를 포함하는 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 양전자 에미터는 ^{89}Zr인 방법.

청구항 58

PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 PMEL17-양성 암은 제 1 치료에 대해 내성이 있고, 상기 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 PMEL17-양성 암은 흑색종인 방법.

청구항 60

청구항 58 또는 청구항 59에 있어서, 상기 제 1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제 1 항체를 포함하는 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 제 1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제 1 항체 및 제 1 세포독성 약물을 포함하는 제 1 면역접합체인 방법.

청구항 62

청구항 60 또는 청구항 61에 있어서, 상기 제 1 항체는 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), 티로시나제-관련된 단백질 1 (TYRP1), 세포독성 T 림프구 항원 4 (CTLA-4), 및 당단백질 NMB (GPNMB)로부터 선택된 항원에 결합하는 방법.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 상기 제 1 항체는 ETBR에 결합하는 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 제 1 항체는 hu5E9.v1인 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 상기 제 1 면역접합체는 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE인 방법.

청구항 66

청구항 61 내지 65 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제 1 세포독성 약물 및 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체의 세포독성 약물은 상이한 것인 방법.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 상기 제 1 세포독성 약물은 MMAE 및 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체의 세포독성 약물은 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택되는 방법.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 상기 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체의 세포독성 약물은 피롤로벤조디아제핀 및 네모루비신 유도체로부터 선택되는 방법.

청구항 69

PMEL17-양성 암을 가지고 있는 개체를 치료하는 방법으로서, 상기 개체에게 효과적인 양의, 제 1 청구항 20 내지 40 중 어느 하나의 항의 면역접합체를 ETBR에 결합하는 항체를 포함하는 제2 면역접합체와 함께 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 ETBR에 결합하는 항체는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 33의 서열을 포함하는 HVR H1, 서열번호: 34의 서열을 포함하는 HVR H2, 서열번호: 35의 서열을 포함하는 HVR H3, 서열번호: 36의 서열을 포함하는 HVR L1, 서열번호: 37의 서열을 포함하는 HVR L2, 및 서열번호: 38의 서열을 포함하는 HVR L3.

청구항 71

청구항 69에 있어서, 상기 ETBR에 결합하는 항체는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 40의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 39의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 72

청구항 69 내지 71 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제 1 면역접합체는 아우리스타틴, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함하고, 상기 제 2 면역접합체는 아우리스타틴, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함하는 방법.

청구항 73

청구항 69 내지 72 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제 1 면역접합체는 피롤로벤조디아제핀 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함하고, 상기 제 2 면역접합체는 아우리스타틴을 포함하는 방법.

청구항 74

청구항 73에 있어서, 상기 제 2 면역접합체는 MMAE를 포함하는 방법.

청구항 75

청구항 69 내지 74 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제 2 면역접합체는 MC-val-cit-PAB-MMAE를 포함하는 링커-약물부를 포함하는 방법.

청구항 76

청구항 69 내지 75 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 제 2 면역접합체는 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE인 방법.

청구항 77

청구항 69 내지 76 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 PMEL17-양성 암은 흑색종인 방법.

청구항 78

청구항 69 내지 77 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 PMEL17-양성 암은 또한 ETBR-양성인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-PMEL17 항체 및 면역접합체 및 이들의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 멜라노사이트 단백질 PMEL17은 소포체로부터 골지체로 이동하는 내재성 단백질로서, 골지체에서 당화되어 결국 멜라로솜으로 수송된다. 성숙한 PMEL17이 멜라로솜으로 이동하는 특정 경로가 논쟁거리가 되어 왔으나, 상기 단백질의 일부 부분이 단계 I 멜라로솜으로 들어가기 전에 세포 표면에 일시적으로 제시된다는 것은 확실하다. 멜라로솜은 PMEL17 단백질로부터 유래된 단백분해 단편으로 구성된 피브릴 상에 침착되는 멜라닌 색소를 생산하는 특수한 리소좀 관련 소기관이다. 멜라닌 색소의 합성은 주로 눈의 멜라노사이트 및 유사분열후 색소 상피에 국한된다. 멜라노사이트는 독특하게도 색소 형성에 필요한 특수한 유전자들을 발현하며, 이들 중 일부는 이들의

흑색종으로의 변형 후 유지된다.

[0003] 인간 PMEL17은 아미노산 596 및 616에 위치한 막통과 영역을 갖는, 661개 아미노산 단백질(아미노-말단 신호 서열 포함)이다. PMEL17은 복잡한 가공을 겪지만, 상기 단백질의 생활 주기 중 적어도 일부는 세포 표면에서 보낸다.

[0004] 암과 같이 PMEL17과 연관된 병태들의 진단 및 치료를 위해 PMEL17을 표적화하는 제제가 본 기술분야에서 요구된다. 본 발명은 상기 요구를 충족시키고 다른 이점을 제공한다.

[0005] **요약**

[0006] 본 발명은 항-PMEL17 항체 및 면역접합체 및 이들의 사용 방법을 제공한다.

[0007] 일부 구현예에서, PMEL17 에 결합하는, 단리된 항체가 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 항체는 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 항체는 서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 인간, 인간화된, 또는 키메라 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 PMEL17에 결합하는 항체 단편이다. 일부 구현예에서, PMEL17은 인간 PMEL17이다. 일부 구현예에서, 인간 PMEL17은 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 항체는 IgG1, IgG2a 또는 IgG2b 항체이다.

[0008] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는 b) (i) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H3, HVR-L3, 및 HVR-H2.

[0009] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는 b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3.

[0010] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3.

[0011] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 b) (i) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3.

[0012] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는 b) 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열; 또는 d) 서열번호: 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열 또는 49; 또는 e) 서열번호: 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 f) (d)에서와 같은 VH 서열 및 (e)에서와 같은 VL 서열; 또는 g) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; 또는 h) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 i) (g)에서의 같은 VH 서열 및 (h)에서와 같은 VL 서열.

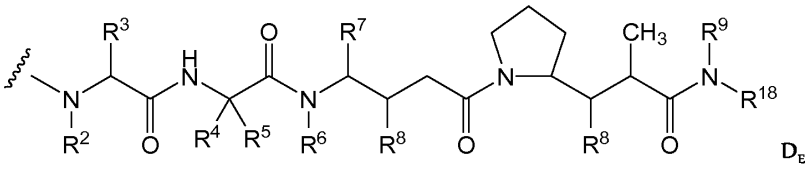
[0013] 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열, 서열번호: 9 또는 49의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열, 또는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호:2의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열, 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열, 또는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (b) 서열번호: 9 또는 49의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열 및 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열.

[0014] 일부 구현예에서, PMEL17 에 결합하는, 단리된 항체가 제공되고, 상기 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (ii) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (iii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 또는 b) (i) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 또는 c) (i) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (iii) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 d) (i) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 e) 서열번호: 11의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열 또는 51; 또는 f) 서열번호: 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 g) (e)에서와 같은 VH 서열 및 (f)에서와 같은 VL 서열; 또는 h) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 또는 51; 또는 i) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 j) (h)에서와 같은 VH 서열 및 (i)에서와 같은 VL 서열. 일부 구현예에서, 항체는 IgG1, IgG2a 또는 IgG2b 항체이다.

[0015] 일부 구현예에서, 임의의 전술한 항체를 인코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 일부 구현예에서, 핵산을 포함하는 숙주세가 제공된다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 숙주세포를 배양하는 것을 포함하고, 이로써 항체는 생산된다.

[0016] 일부 구현예에서, 면역접합체가 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 면역접합체는 임의의 전술한 항체 및 세포독성 약물을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역접합체는 식 Ab-(L-D)p를 가지며, 여기서: (a) Ab는 청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항의 항체이고; (b) L은 링커이고; (c) D는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 약물이고; (d) p는 1-8의 범위이다.

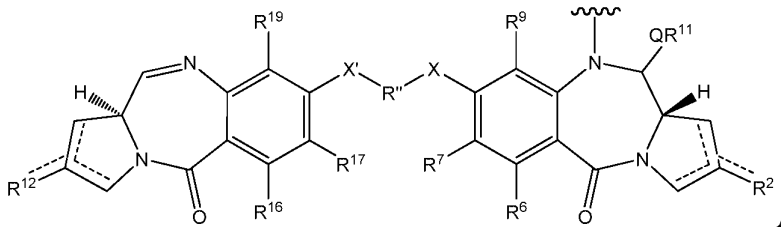
[0017] 일부 구현예에서, D는 아우리스타틴이다. 일부 그와 같은 구현예에서, D는 식 D_E을 갖는다:

[0018] 

[0019] 여기서 R^2 및 R^6 각각은 메틸이고, R^3 및 R^4 각각은 이소프로필이고, R^5은 H이고, R^7은 sec-부틸이고 각각의 R^8은 CH_3, O-CH_3, OH, 및 H로부터 독립적으로 선택되고; R^9은 H이고; R^{18}은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$아릴이다.

[0020] 일부 구현예에서, 약물 (D)는 MMAE이다.

[0021] 일부 구현예에서, D는 식 A의 피롤로벤조디아제핀이다:

[0022]  A;

[0023] 상기 점선은 C1과 C2 또는 C2와 C3 사이의 임의 존재의 이중 결합을 나타내고;

[0024] R^2은 H, OH, =O, $=CH_2$, CN, R, OR, $=CH-R^D$, $=C(R^D)_2$, $O-SO_2-R$, CO_2R 및 COR로부터 독립적으로 선택되고, 및 할로 또는 디할로로부터 임의로 추가로 선택되고, 여기서 R^D은 R, CO_2R, COR, CHO, CO_2H, 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

[0025] R^6 및 R^9은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

[0026] R^7은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

[0027] Q는 O, S 및 NH로부터 독립적으로 선택되고;

[0028] R^{11}은 H, 또는 R이거나, 여기서 Q는 O, SO_3M (여기서 M은 금속 양이온임)이고;

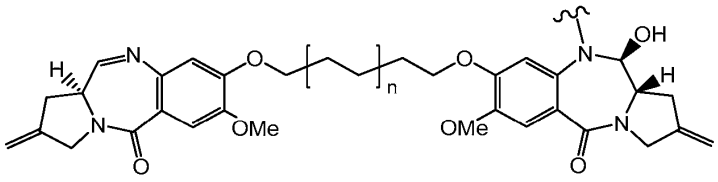
[0029] R 및 R' 각각은 임의로 치환된 C_{1-8} 알킬, C_{3-8} 헤테로시클릴 및 C_{5-20} 아릴 그룹으로부터 독립적으로 선택되고, 및 임의로 그룹 NRR'과 관련하여, R 및 R'은 이들이 부착된 질소 원자와 함께 임의로 치환된 4-, 5-, 6- 또는 7-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

[0030] R^{12}, R^{16}, R^{19} 및 R^{17}은 R^2, R^6, R^9 및 R^7 각각 에 대해 규정된 바와 같고;

[0031] R"는 C_{3-12} 알킬렌 그룹이고, 이 사슬은 임의로 치환된 하나 이상의 헤테로원자 및/또는 방향족 고리에 의해 방해될 수 있고;

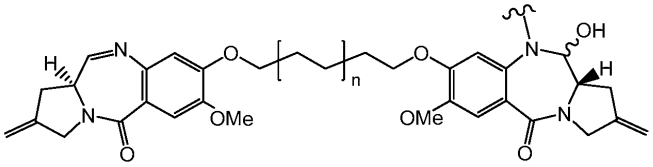
[0032] X 및 X'는 O, S 및 N(H)로부터 독립적으로 선택된다.

[0033] 일부 그와 같은 구현예에서, D는 하기 구조를 갖는다:

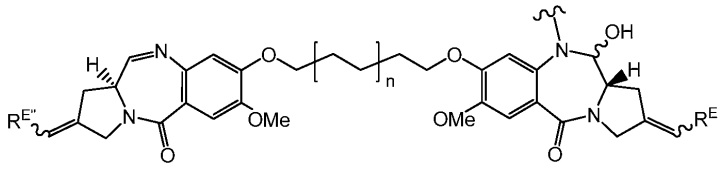
[0034]  A(II);

[0035] 여기서 n은 0 또는 1이다.

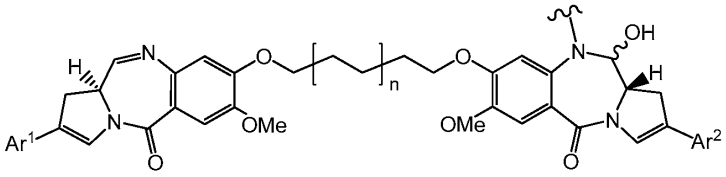
[0036] 일부 구현예에서, D는 하기로부터 선택된 구조를 갖는다:



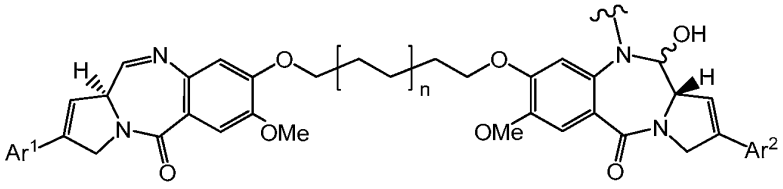
A(I);

[0037] 

A(III);

[0038] 

A(IV); 및

[0039] 

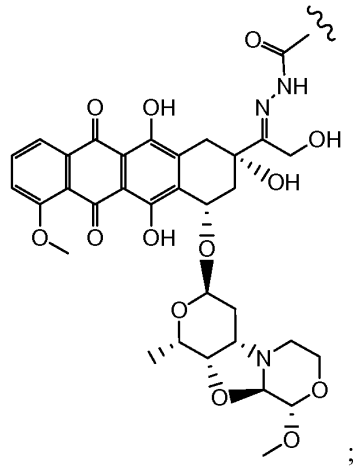
A(V);

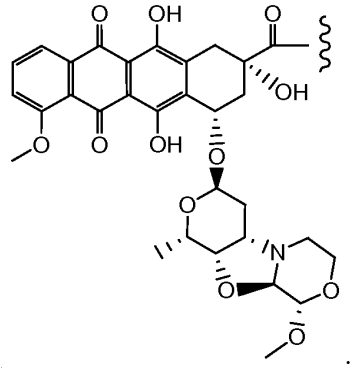
[0040] 여기서 R^E 및 $R^{E''}$ 각각은 H 또는 R^D로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^D은 R, CO_2R, COR, CHO, CO_2H, 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

[0041] 여기서 Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 C_{5-20} 아릴이고;

[0042] 여기서 n은 0 또는 1이다.

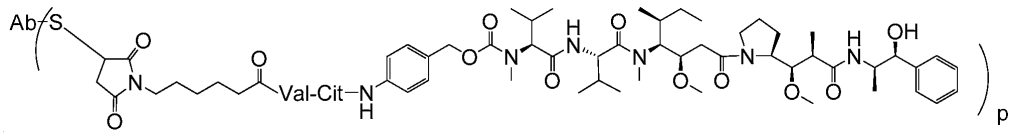
[0043] 일부 구현예에서, D는 네모루비신 유도체이다. 일부 그와 같은 구현예에서, D는 하기로부터 선택된 구조를 갖는다:

[0044]  ; 및

[0045]  .

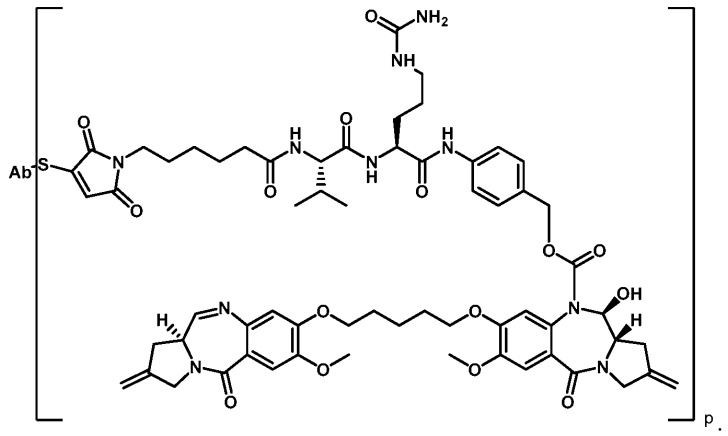
[0046] 일부 구현예에서, 링커는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 일부 그와 같은 구현예에서, 링커는 val-cit 디펩타이드 또는 Phe-Lys 디펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 산-불안정하다. 일부 그와 같은 구현예에서, 링커는 하이드라존을 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 면역접합체는 하기 식을 갖는다:

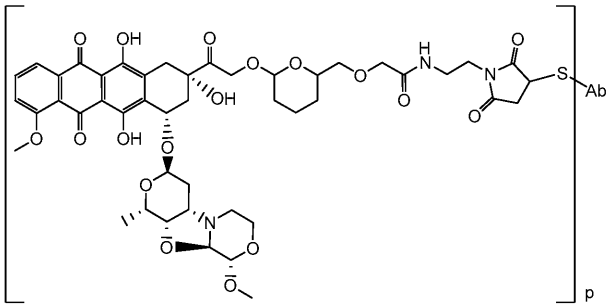
[0048] 

[0049] 여기서 S는 황 원자.

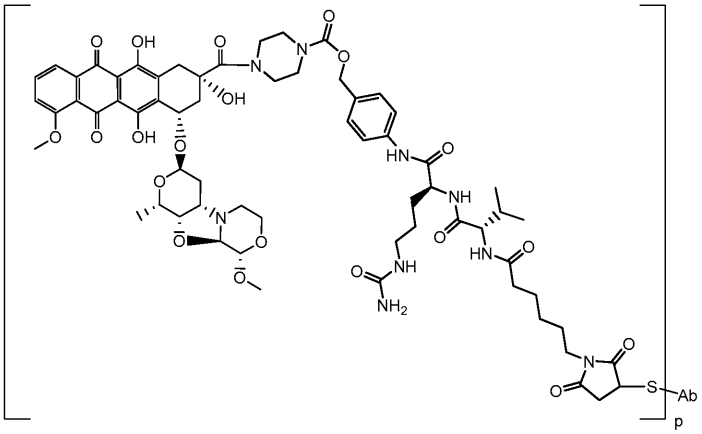
[0050] 일부 구현예에서, 면역접합체는 하기 식을 갖는다:

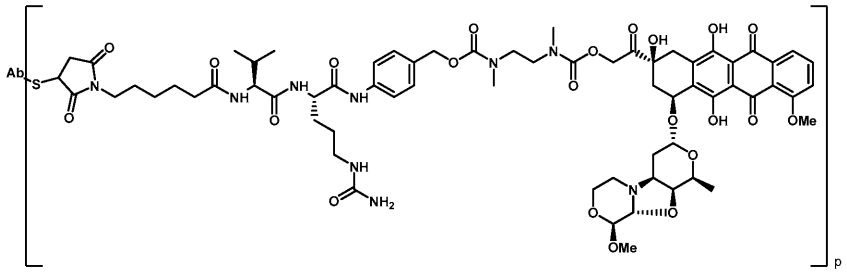
[0051]  .

[0052] 일부 구현예에서, 면역접합체는 하기로부터 선택된 식을 갖는다:

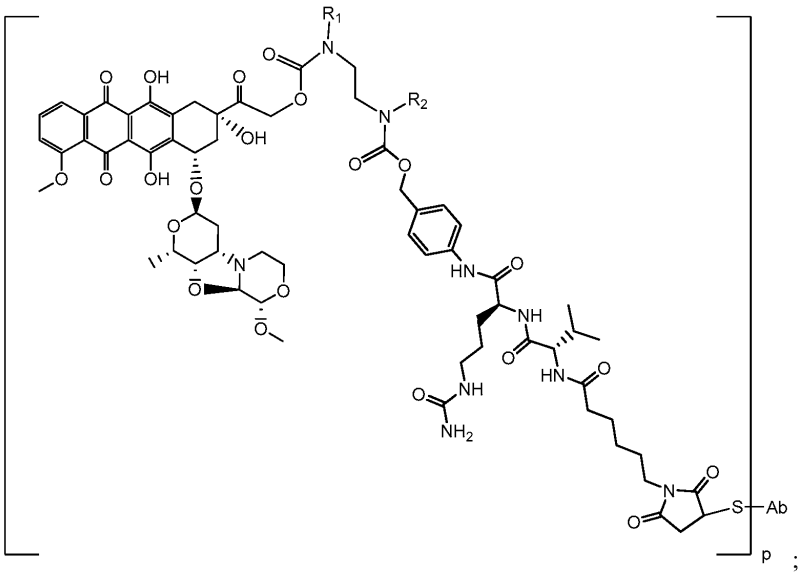


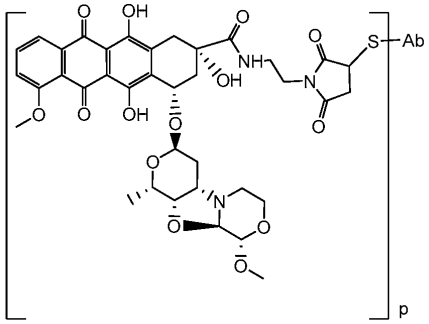
;





[0053]

[0054]  ; 및

[0055]  .

[0056] 전술된 면역접합체의 일부 구현예에서, p는 2-5의 범위이다.

[0057] 일부 구현예에서, 면역접합체가 제공되고, 상기 면역접합체는 하기를 포함하는 항체를 포함한다: a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3.

[0058] 일부 구현예에서, 면역접합체가 제공되고, 상기 면역접합체는 하기를 포함하는 항체를 포함한다: (a) 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호:2의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (b) 서열번호: 9 또는 49의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열; 또는 (c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열 및 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열.

[0059] 일부 구현예에서, 약제학적 제형이 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 약제학적 제형은 본원에서 기재된 항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 제형은 추가로, 추가의 치료제를 포함한다.

[0060] 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, PMEL17의 세포외 도메인에 결합하는 항체

를 포함하는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, 본원에서 기재된 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 흑색종이다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법은 추가로, 추가의 치료제를 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0061] 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법이 제공되고, 상기 PMEL17-양성 암은 제 1 치료제에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 흑색종이다. 일부 구현예에서, 제 1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제 1 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제 1 항체 및 제 1 세포독성 약물을 포함하는 제 1 면역접합체이다. 일부 구현예에서, 제 1 항체는 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), 티로시나제-관련된 단백질 1 (TYRP1), 세포독성 T 림프구 항원 4 (CTLA-4), 및 당단백질 NMB (GPNMB)로부터 선택된 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제 1 항체는 ETBR에 결합한다. 일부 구현예에서, 제 1 항체는 hu5E9.v1이다. 일부 구현예에서, 제 1 면역접합체는 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE이다. 일부 구현예에서, 제 1 세포독성 약물 및 PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성 약물은 상이하다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제 1 세포독성 약물은 MMAE 및 PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성 약물은 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성 약물은 피롤로벤조디아제핀 및 네모루비신 유도체로부터 선택된다.

[0062] 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 상기 개체에게 효과적인 양의, 본원에서 기재된 제 1 면역접합체를 ETBR에 결합하는 항체를 포함하는 제 2 면역접합체와 함께 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ETBR에 결합하는 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 33의 서열을 포함하는 HVR H1, 서열번호: 34의 서열을 포함하는 HVR H2, 서열번호: 35의 서열을 포함하는 HVR H3, 서열번호: 36의 서열을 포함하는 HVR L1, 서열번호: 37의 서열을 포함하는 HVR L2, 및 서열번호: 38의 서열을 포함하는 HVR L3. 일부 구현예에서, ETBR에 결합하는 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 40의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 39의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. 일부 구현예에서, 제 1 면역접합체는 아우리스타틴, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함하고, 상기 제 2 면역접합체는 아우리스타틴, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 면역접합체는 피롤로벤조디아제핀 및 네모루비신 유도체로부터 선택된 세포독성 약물을 포함하고, 상기 제 2 면역접합체는 아우리스타틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 제 2 면역접합체는 MMAE를 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제 2 면역접합체는 MC-val-cit-PAB-MMAE를 포함하는 링커-약물부를 포함한다. 일부 구현예에서, 제 2 면역접합체는 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE이다. 임의의 전술한 것의 구현예에서, PMEL17-양성 암은 흑색종일 수 있다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 또한 ETBR-양성이다.

[0063] 일부 구현예에서, PMEL17-양성 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 면역접합체의 세포 표면 상의 PMEL17에의 결합을 위해 허용된 조건 하에서 상기 세포를 본원에서 기재된 면역접합체에 노출하고, 그렇게 함으로써 세포의 증식을 억제하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 흑색종 세포이다.

[0064] 일부 구현예에서, 표지에 접합된 PMEL17에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 구현예에서, 표지는 양전자 에미터이다. 일부 그와 같은 구현예에서, 양전자 에미터는 ^{89}Zr이다.

[0065] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플 중 인간 PMEL17를 검출하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 항-PMEL17 항체의 자연 발생 인간 PMEL17에의 결합을 위해 허용된 조건 하에서 생물학적 샘플을 본원에서 기재된 항-PMEL17 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 추가로, 복합물이 항-PMEL17 항체 및 생물학적 샘플 중 자연 발생 인간 PMEL17 사이에서 형성되는 지를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: a) (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, (iii) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 b) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (iv) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (v) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는

HVR-L2, (vi) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 또는 c) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 흑색종 샘플이다.

[0066] 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암을 검출하는 방법이 제공된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 하기를 포함한다: (i) 표지된 항-PMEL17 항체를 PMEL17-양성 암을 가지고 있거나 그것이 의심되는 대상체에게 투여하는 단계로서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체는 본원에서 기재된 항-PMEL17 항체를 포함하는 단계, 및 (ii) 상기 대상체에서 상기 표지된 항-PMEL17 항체를 검출하는 단계로서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체의 검출은 상기 대상체에서 PMEL17-양성 암을 나타내는 단계. 일부 그와 같은 구현예에서, 표지된 항-PMEL17 항체는 양전자 에미터에 접합된 항-PMEL17 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 양전자 에미터는 ^{89}Zr이다.

도면의 간단한 설명

[0067] **도 1**은 실시예 A에 기재된 바와 같이, (A) 다양한 조직에서의 인간 PMEL17 유전자 발현 수준의 그래프 표시, 및 (B) 다양한 인간 세포주에서의 인간 PMEL17 수준의 그래프 표시를 보여준다.

도 2a 및 2b는 항체 8G3, 17A9, 및 15F2에 대한 (A) 경쇄 및 (B) 중쇄 가변 영역 서열들의 정렬을 보여준다.

도 3A 내지 3D는 실시예 D에 기재된 바와 같이, 77E6(A 및 B), 17A9(C 및 D), 및 31D1(D)의 에피토프 맵핑을 보여준다.

도 4는 실시예 G에 기재된 바와 같이, 흑색종 세포에서 17A9의 내재화를 보여준다.

도 5는 실시예 I에 기재된 바와 같이, 17A9 ADC의 농도 증가에 의한 다양한 PMEL17+ 흑색종 세포주의 사멸을 보여준다.

도 6은 실시예 J에 기재된 바와 같이, (A) 정상 피부에서의 31D1 염색의 분포, (B) FACS에 의한 정상 멜라노사이트 및 흑색종 세포주 SK-MEL-5의 17A9 염색, 및 (C) 정상 멜라노사이트 상에서의 17A9의 IC50이 흑색종 세포주 상에서의 17A9의 IC50보다 거의 100배 더 높다는 것을 보여준다.

도 7은 실시예 K에 기재된 바와 같이, (A) PMEL17 염색의 각 수준에 대한 예시적인 염색 및 (B) 인간 흑색종 샘플 집단에 대한 IHC 스코어를 보여준다.

도 8은 실시예 L에 기재된 바와 같이, SK-MEL-23 세포주 이종이식에서 17A9 ADC의 효능을 보여준다.

도 9a 및 9d는 실시예 F에 기재된 바와 같이, 인간, 마우스, 랫트, 및 사이노몰구스 원숭이 PMEL17의 정렬을 보여준다.

도 10은 실시예 M에 기재된 바와 같이, (A) UACC-257X2.2 흑색종 세포를 접종하고 다양한 용량의 항-ETBR-vc-MMAE("5E9v1-vcE")를 투여한 마우스에서 시간에 따른 종양 부피, 및 (B) 증가하는 농도의 항-ETBR-vc-MMAE ADC의 존재 하에 시험관내에서 성장한 모(parental) 및 내성 UACC-257X2.2 세포를 보여준다.

도 11은 실시예 M에 기재된 바와 같이, 생체내에서(A 및 C) 그리고 시험관내에서(B 및 D) 유래된 모 및 내성 UACC-257X2.2 세포에서의 ETBR(A 및 B; 또한 "EDNRB"으로도 지칭됨) 및 PMEL17(C 및 D)의 발현을 보여준다.

도 12는 실시예 M에 기재된 바와 같이, 증가하는 농도의 항-ETBR-vc-MMAE, 항-PMEL17-vc-MMAE, 및 항-gD-vc-MMAE에 대한 (A) 모 UACC-257X2.2 세포, (B) 생체내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포, 및 (C) 시험관내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포의 민감도를 보여준다.

도 13은 실시예 M에 기재된 바와 같이, 증가하는 농도의 항-ETBR-PNU, 항-PMEL17-PNU, 및 항-gD-PNU에 대한 (A) 모 UACC-257X2.2 세포, (B) 생체내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포, 및 (C) 시험관내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포의 민감도를 보여준다.

도 14는 실시예 M에 기재된 바와 같이, 증가하는 농도의 항-ETBR-vc-PNU, 항-PMEL17-vc-PNU, 및 항-gD-vc-PNU에 대한 (A) 모 UACC-257X2.2 세포, (B) 생체내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포, 및 (C) 시험관내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포의 민감도를 보여준다.

도 15는 (A) Ab-MC-val-cit-PAB-MMAE; (B) Ab-MC-아세탈-PNU-159682; (C) Ab-MC-val-cit-PAB-PNU-159682; (D) Ab-MC-val-cit-PAB-PBD; 및 (E) Ab-PNU-159682를 포함하는, 다양한 항체-약물 접합체의 구조를 보여준다.

발명의 어떤 구현예의 상세한 설명

I. 정의

본원의 목적을 위한 "수용체 인간 뼈대"는 이하에서 규정된 바와 같이 인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대로부터 유도된 경쇄 가변 도메인 (VL) 뼈대 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 뼈대의 아미노산 서열을 포함하는 뼈대이다. "인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대"로부터 유도된 수용체 인간 뼈대는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하이다. 일부 구현예에서, VL 수용체 인간 뼈대는 VL 인간 면역글로불린 뼈대 서열 또는 인간 공통 뼈대 서열에 대해 그 서열이 동일하다.

"친화도"는 분자의 단일 결합 부위 (예를 들면, 항체)와 그의 결합 파트너 (예를 들면, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총계의 강도를 의미한다. 달리 지시되지 않으면, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 멤버 (예를 들면, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 그것의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 나타낼 수 있다. 친화도는 공통의 당해분야에서 공지된 방법에 의해 측정될 수 있고, 그 방법은 본원에서 기재된 것들을 포함한다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 예시적인 및 예시적인 구현예는 하기에서 기재되어 있다.

"친화도 성숙된" 항체는 그와 같은 변경을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여, 하나 이상의 초가변 영역 (HVR)에서 하나 이상의 변경을 같는 항체를 의미하고, 그와 같은 변경으로 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된다.

용어들 "항-PMEL17 항체" 및 "PMEL17에 결합하는 항체"는 충분한 친화도를 갖는 PMEL17에 결합할 수 있고 이로써 항체는 표적 PMEL17에서 진단 및/또는 치료제로서 유용한 항체를 의미한다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체를 관련없는, 비-PMEL17 단백질에 결합하는 정도는 예를 들면, 방사선면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 항체의 PMEL17에의 결합의 10% 미만이다. 어떤 구현예에서, PMEL17에 결합하는 항체는 ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 5 Nm, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM (*예를 들면*, 10^{-8} M 이하, *예를 들면* 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, *예를 들면*, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 어떤 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 상이한 종으로부터 PMEL17 중에서 보존된 PMEL17의 에피토프에 결합한다.

용어 "항체"는 넓은 의미로 본원에서 사용되고 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 항체 단편을 비제한적으로 포함하는 다양한 항체 구조를 포함한다, 단, 원하는 항원-결합 활성을 나태내어야 한다.

"항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 포함하고 온전한 항체에 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체 이외의 분자를 의미한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자 (예를 들면 scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체.

참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 50% 또는 그 초과까기 경쟁 검정에서 참조 항테의 그것의 항원에의 결합을 차단하는 항체를 의미하고, 반대로, 참조 항체는 50% 또는 그 초과까지 경쟁 검정에서 항체의 그것의 항원에의 결합을 차단한다. 예시적인 경쟁 검정기 본원에서 제공된다.

용어들 "암" 및 "암성"은 조절되지 않은 세포 성장/증식을 전형적으로 특징으로 하는 포유동물에서 생리적 조건을 의미한다. 암의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 흑색종, 암종, 림프종 (예를 들면, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종, 및 백혈병. 그와 같은 암의 더 구체적인 예는 하기를 포함한다: 편평상피 세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평상피 암종, 복막의 암, 간세포 암, 위장관 암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암.

용어 "키메라" 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유도되고, 한편 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유도되는 항체를 의미한다.

항체의 "클래스"는 중쇄에 의해 보유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 의미한다. 항체의 5 개의 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM가 있고, 몇 개의 이들은 서브클래스 (아이소타입), 예를 들면, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 추가로 분할될 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메

인을 α, δ, ε, γ, 및 μ 각각이라 한다.

용어 "세포독성 약물"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 세포성 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포사 또는 파괴를 야기하는 물질을 의미한다. 세포독성 약물은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 방사성 동위원소 (예를 들면, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학치료제 또는 약물 (예를 들면, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 빈카 알카로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로르암부실, 다우노루비신 또는 다른 개재 약물); 성장 억제; 효소 및 그의 단편 예컨대 핵산분해 효소; 항생제; 독소 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적으로 활성 독소 (단편 및/또는 그의 변이체 포함); 및 하기에 기재된 다양한 항종양 또는 항암제.

"화학치료제"는 암의 치료에 유용한 화합물이다. 화학치료제의 예는 하기를 포함한다: 알킬화제 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파마이드 (CYTOXAN®); 알킬 설포네이트 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아마이드, 트리에틸렌티오포스포르아마이드 및 트리메틸롤로멜라민 포함); 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (HYCAMTIN®), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그것의 아도젤레신, 카르젤레신 및 바이젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포사이드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로르암부실, 클로르나파진, 콜로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 우라신 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님무스틴; 항생제 예컨대 엔디인 항생제 (예를 들면, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 감마1I 및 칼리키아마이신 오메가I1 (참고, 예를 들면, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); 다이네마이신 (다이네마이신 A 포함); 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백질 엔디인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모폴리노-독소루비신, 시아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 아이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피머, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신 예컨대 아미노글루테티마이드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노레벌린산; 에닐루라실; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드 예컨대 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소크산트론; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK® 다당류 복합물 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 라이족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아진산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코세텐 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE®, FILDESIN®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라바이노사이드 ("아라-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들면, 파클리탁셀 (TAXOL®; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremophor-free, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), 및 도세탁셀 (TAXOTERE®; Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 젬시타빈 (GEMZAR®); 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토

트렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®); 백금; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파마이드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONCOVIN®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (XELODA®); 상기의 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기의 2 이상의 조합 예컨대, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 조합된 요법의 약어인 CHOP; 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 조합된 요법의 약어인 CVP; 및, 5-FU 및 류코보린와 조합된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)에 의한 치료 계획의 약어인 FOLFOX.

"효과기 기능"은 항체 아이소타입과 함께 변하는 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 의미한다. 항체 효과기 기능의 예는 하기를 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들면 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화.

제제, 예를 들면, 약제학적 제형의 "효과적인 양"은, 필요한 기간에서 그리고 기간 동안, 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 양을 의미한다.

용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 분자 상의 특정한 부위를 의미한다.

본원의 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하도록 사용된다. 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230으로부터, 중쇄의 카복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 본원에서 달리 구체화되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역 중 아미노산 잔기의 넘버링은 하기에서 기재된 바와 같이 소위 EU 지수인 EU 넘버링 시스템에 따른다: Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. 공중 보건 서비스, 미국 국립 보건원, Bethesda, MD, 1991.

"뼈대" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 의미한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4 개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 구성된다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL) 중 하기의 서열에서 보인다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

용어들 "전체 길이 항체", "온전한 항체", 및 "전체의 항체"는 원상태 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에서 규정된 바와 같이 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 의미하도록 상호교환적으로 본원에서 사용된다.

용어 "당화된 형태의 PMEL17"은 탄수화물 잔기의 부가에 의해 번역후로 변형된 자연 발생 형태의 PMEL17를 의미한다.

용어들 "숙주세포", "숙주세포주", 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고 그와 같은 세포의 자손을 포함하는, 도입된, 외인성 핵산이 도입된 세포를 의미한다. 숙주세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하고, 이것은 일차 형질전환된 세포 및 계대의 수에 무관하게 그것으로부터 유도된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포의 핵산 함량에서 완저히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에서 포함된다.

"인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 이용하는 비-인간 공급원으로부터 유도된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특이적으로 비-인간 항원-결합 잔기을 포함하는 인간화된 항체를 제외한다.

"인간 공통 뼈대"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 뼈대 서열의 선택에서 가장 통상적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 뼈대이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위그룹으로부터이다. 일반적으로, 서열의 하위그룹은 하기에서와 같은 하위그룹이다: Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제5 Edition, NIH 공보 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. 일 구현예에서, VL에 대해, 하위그룹은 하기에서와 같은 하위그룹 카파 I이다: Kabat 등, *supra*. 일 구현예에서, VH에 대해, 하위그룹은 하기에서와 같은 하위그룹 III이다: Kabat 등, *supra*.

"인간화된" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 의미한다. 어떤 구현예에서, 인간화된 항체는 적어도 1, 및 전형적으로 2 개의, 가변 도메인의 모두를 실질적으로 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들면, CDR)은 비-인간 항체의 그것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 그것에 상응한다. 인간화된 항체는 임의로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 임의로 포함할 수 있다. "인간화된 형태"의 항체, 예를 들면, 비-인간 항체는, 인간화를 경험한 항체를 의미한다.

용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 서열에서 초가변이고/거나 구조적으로 규정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 갑견 도메인의 각각의 영역을 의미한다. 일반적으로, 원상태 4-사슬 항체는 6 HVR; 3 VH 중 3 개 (H1, H2, H3), 및 VL 중 3 개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터 아미노산 잔기를 포함하고, 후자는 최고 서열 가변성이고/거나 항원 인식과 연루된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 일어난다. (Chothia 및 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)는 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의89-97, H1의31-35B, H2의50-65, 및 H3의95-102에서 일어난다. (Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. 공중 보건 서비스, 미국 국립 보건원, Bethesda, MD (1991).) VH 중 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원을 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기", 또는 "SDR"를 포함한다. SDR은 단축된-CDR, 또는 a-CDR로 불리는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58, 및 H3의 95-102에서 일어난다. (참고 Almagro 및 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) 달리 지적되지 않으면, 가변 도메인 중 HVR 잔기 및 다른 잔기 (예를 들면, FR 잔기)은 하기에 따라 넘버링된다: Kabat 등, *supra*.

"면역접합체"는 세포독성 약물을 비제한적으로 포함하는, 하나 이상의 이종기원 분자(들)에 접합된 항체이다.

"개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 사육된 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비-인간 영장류 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예를 들면, 마우스 및 랫트). 어떤 구현예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

"단리된 항체"는 그것의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 구현예에서, 항체는 하기의 예에 의해 결정된 바와 같이 95% 또는 99% 순도 초과로 정제된다: 전기영동 (예를 들면, SDS-PAGE, 등전점 전기영동 (IEF), 모세혈관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들면, 이온 교환 또는 역상 HPLC). 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들면 하기를 참고한다: Flatman 등, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

"단리된 핵산"은 그것의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 의미한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 대개 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체외에서 또는 그것의 천연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에서 존재한다.

"항-PMEL17 항체를 인코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 의미하고, 이 분자는 단일 벡터 또는 별개의 벡터 중 그와 같은 핵산 분자(들), 및 숙주세포 중 하나 이상의 위치에서 존재하는 그와 같은 핵산 분자(들)을 포함한다.

용어 "PMEL17"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 임의의 원상태 PMEL17을 의미한다. 용어는 임의의 척추동물 공급원으로부터 PMEL17을 포함하고, 이 공급원은, 달리 지적되지 않으면 포유동물 예컨대 영장류 (예를 들면 인간 및 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류 (예를 들면, 마우스 및 랫트)을 포함한다. 용어는 "전체길이", 미가공된 PMEL17, 뿐만 아니라 세포의 가공으로부터 생긴 임의 형태의 PMEL17을 포함한다. 용어는 또한 PMEL17의 자연 발생 변이체, 예를 들면, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 신호 서열 (아미노산 1-24)을 갖는 예시적인 인간 PMEL17 프레프리단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 26에서 보여진다. 예시적인 인간 PMEL17 프로단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 27에서 보여진다. (신호 서열 없는)예시적인 사이노몰구스 원숭이 PMEL17의 예상된 서열은 서열번호: 28에서 보여진다. 신호 서열 (아미노산 1-25)을 갖고 신호 서열이 없는 예시적인 랫트 PMEL17에 대한 아미노산 서열은 서열번호: 29 및 30 각각에서 보여진다. 신호 서열 (아미노산 1-25)을 갖고 신호 서열이 없는 예시적인 마우스 PMEL17에 대한 아미노산 서열은 서열번호: 31 및 32 각각에서 보여진다.

용어 "PMEL17-양성 암"은 그의 표면 상에서 PMEL17을 발현 (일시적 발현 포함) 시키는 세포를 포함하는 암을 의

미한다.

용어 "PMEL17-양성 세포"는 그것의 표면 상에서 PMEL17을 발현시키는 세포를 의미한다.

용어 "모노클로날 항체"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 실질적으로 균질한 항체의 모집단으로부터 수득된 항체를 의미하고, 즉, 모집단을 포함하는 개별적인 항체는 예를 들면, 자연 발생 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안에서 생기는 가능한 변이체 항체를 제외하고 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합하고, 그와 같은 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 결정요인 (에피토프)에 대항하여 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정요인에 대항하여 지향된다. 따라서, 조절물질 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 모집단으로부터 수득된 바와 같은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의해 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 다양한 기술에 의해 만들어 질 수 있고, 이 기술은, 비제한적으로 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자위치의 모두 또는 일부를 함유하는 이식유전자 동물을 이용하는 방법, 본원에서 기재된 모노클로날 항체를 제조하는 그와 같은 방법 및 다른 예시적인 방법을 포함한다.

"기존의 항체"는 이종기원 모이어티 (예를 들면, 세포독성 모이어티) 또는 방사선표지에 접합되지 않는 항체를 의미한다. 기존의 항체는 약제학적 제형에서 존재할 수 있다.

"원상태 항체"는 가변 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자를 의미한다. 예를 들면, 원상태 IgG 항체는 디설파이드-결합된 2 개의 동일한 경쇄 및 2 개의 동일한 중쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 헤테로사량체 당단백질이다. N- 내지 C-말단의 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH), 또한 소위 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인, 그 다음 3 불변 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N- 내지 C-말단의 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL), 또한 소위 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인, 그 다음 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그것의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 한, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2 개의 유형 중의 하나로 할당될 수 있다.

용어 "포장내 삽입물"은 그와 같은 치료 제품의 사용에 관한 징후, 용법, 복용량, 투여, 병용 요법, 사용금지사유 및/또는 경고에 관한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업적 패킷비에 관례상 포함된 설명을 의미하도록 사용된다.

참조 폴리펩타이드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은, 필요하면, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입하고, 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않는 후, 참조 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 백분율로서 규정된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 하기 예를 사용하여 당해분야의 기술 내의 다양한 방식으로 달성될 수 있다: 공공연하게 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어. 당해분야의 숙련가는 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본원의 목적을 위해, 그러나, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 산출된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램의 저자는 Genentech, Inc.이었고, 소스 코드는 미국 Copyright Office, Washington D.C., 20559에서 사용자 서류에 의해 제출되었고, 여기서 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에서 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 공공연하게 Genentech, Inc., South San Francisco, California로부터 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D을 포함하는 UNIX 운영 시스템 상에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 세팅되고 변하지 않는다.

ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 이용된 상황에서, (주어진 아미노산 서열 A가 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그것을 갖거나 그것에 대항하는 어떤 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 그것을 포함하는 것으로 대안적으로 표현된)주어진 아미노산 서열 B에 대한, 그것을 갖거나 그것에 대항하는 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성은 하기와 같이 계산된다:

100 곱하기 분획 X/Y

여기서 X는 A 및 B의 프로그램의 정렬 중 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로서 점수 매긴 아미노산 잔기의 수이고, 여기서 Y는 B 중 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, A 대 B의 % 아미노산 서열 동일성은 B 대 A의 % 아미노산 서열 동일성과 같지 않는 것

으로 인정될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하는 직전의 단락에서 기재된 바와 같이 수득된다.

용어 "약제학적 제형"은 그것에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 허용하는 그와 같은 형태 내에 있고, 제형이 투여되는 대상체에 대한 허용되지 않는 독성이 있는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다.

"약제학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에 비독성인, 활성 성분 이외의, 약제학적 제형 중 성분을 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는, 비제한적으로, 완충제, 부형제, 안정제, 또는 보존제.

본원에서 사용된 바와 같이, "치료" (및 그의 문법적 변화 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료될 개체의 자연스로운 과정을 변경하려는 시도에서 임상적 개입을 의미하고 예방을 위해 또는 임상적 병리의 과정 동안에 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 질환의 발생 또는 재발의 방지, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적 병리적 결과의 약화, 전이 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 처방, 및 차도 또는 개선된 예측. 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는 질환의 발달을 지연시키거나 진환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다.

용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 것에 연루된 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 의미한다. 원상태 항체의 중쇄 및 경쇄 (VH 및 VL 각각)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며 각각의 도메인은 4 보존된 뼈대 영역 (FR) 및 3 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (참고, 예를 들면, Kindt 등 *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman 및 Co., 페이지 91 (2007).) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하는데 충분할 수 있다. 더욱이, 특정한 항원에 결합할 수 있는 항체는 상보적 VL 또는 VH 도메인 각각의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 참고, 예를 들면, Portolano 등, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 등, *Nature* 352:624-628 (1991).

용어 "벡터"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 연결된 또 하나의 핵산을 전파할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 벡터 뿐만 아니라 도입된 숙주세포의 게룸에 편입된 벡터를 포함한다. 어떤 벡터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 이끌 수 있다. 그와 같은 벡터는 "발현 벡터"로서 본원에서 칭한다.

"알킬"은 노르말, 2차, 3차 또는 사이클릭 탄소 원자를 함유하는 C_1-C_{18} 탄화수소이다. 그 예는 하기이다: 메틸 (Me, $-CH_3$), 에틸 (Et, $-CH_2CH_3$), 1-프로필 (n-Pr, n-프로필, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-프로필 (i-Pr, i-프로필, $-CH(CH_3)_2$), 1-부틸 (n-Bu, n-부틸, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-메틸-1-프로필 (i-Bu, i-부틸, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-부틸 (s-Bu, s-부틸, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-메틸-2-프로필 (t-Bu, t-부틸, $-C(CH_3)_3$), 1-펜틸 (n-펜틸, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-펜틸 ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-펜틸 ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-메틸-2-부틸 ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-메틸-2-부틸 ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-메틸-1-부틸 ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-메틸-1-부틸 ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-헥실 ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-헥실 ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-헥실 ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-메틸-2-펜틸 ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-메틸-2-펜틸 ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-메틸-2-펜틸 ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-메틸-3-펜틸 ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-메틸-3-펜틸 ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-디메틸-2-부틸 ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-디메틸-2-부틸 ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$.

용어 "C_1-C_8 알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 내지 8 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지된, 포화된 또는 불포화된 탄화수소를 의미한다. 대표적인 "C_1-C_8 알킬" 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, -n-헥실, -n-헵틸, -n-옥틸, -n-노닐 및 -n-데실; 한편 분지된 C_1-C_8 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -이소프로필, -*sec*-부틸, -이소부틸, -*tert*-*부틸*, -이소펜틸, 2-메틸부틸, 불포화된 C_1-C_8 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸에닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, -2,3-디메틸-2-부테닐, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실,-아세틸에닐, -프로피닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐, -3-메틸-1 부티닐. C_1-C_8 알킬 그룹은 비치환되거나 하기를 포함하는 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다: 비제한적으로, $-C_1$-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$ $-NHC(O)R'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$,

-S(O)R', -OH, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R'), $-N(R')_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, $-C_1$-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

용어 "C_1-C_{12} 알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지된, 포화된 또는 불포화된 탄화수소를 의미한다. C_1-C_{12} 알킬 그룹은 비치환되거나 하기를 포함하는 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다: 비제한적으로, $-C_1$-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$ -NHC(O)R', $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, -S(O)R', -OH, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R'), $-N(R')_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, $-C_1$-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

용어 "C_1-C_6 알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지된, 포화된 또는 불포화된 탄화수소를 의미한다. 대표적인 "C_1-C_6 알킬" 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, - 및 n-헥실; 한편 분지된 C_1-C_6 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -이소프로필, -*sec*-부틸, -이소부틸, -*tert*-*부틸*, -이소펜틸, 및 2-메틸부틸; 불포화된 C_1-C_6 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, 및 -이소부틸에닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, -2,3-디메틸-2-부테닐, 1-헥실, 2-헥실, 및 3-헥실. C_1-C_6 알킬 그룹은 C_1-C_8 알킬 그룹 에 대해 상기에서 기재된 바와 같이 비치환되거나 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다.

용어 "C_1-C_4 알킬"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지된, 포화된 또는 불포화된 탄화수소를 의미한다. 대표적인 "C_1-C_4 알킬" 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸; 한편 분지된 C_1-C_4 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -이소프로필, -*sec*-부틸, -이소부틸, -*tert*-*부틸*; 불포화된 C_1-C_4 알킬은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, 및 -이소부틸에닐. C_1-C_4 알킬 그룹은 C_1-C_8 알킬 그룹 에 대해 상기에서 기재된 바와 같이 비치환되거나 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다.

"알콕시"는 산소에 단독으로 결합된 알킬 그룹이다. 예시적인 알콕시 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 메톡시 ($-OCH_3$) 및 에톡시 ($-OCH_2CH_3$). "C_1-C_5 알콕시"는 1 내지 5 개의 탄소 원자를 갖는 알콕시 그룹이다. 알콕시 그룹은 알킬 그룹에 대해 상기에서 기재된 바와 같이 비치환되거나 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다.

"알케닐"은 불포화, 즉 탄소-탄소, sp^2 이중 결합의 적어도 하나의 부위를 갖는 노르말, 2차, 3차 또는 사이클릭 탄소 원자를 함유하는 C_2-C_{18} 탄화수소이다. 예들은 비제한적으로 하기를 포함한다: 에틸렌 또는 비닐 ($-CH=CH_2$), 알릴 ($-CH_2CH=CH_2$), 사이클로펜테닐 ($-C_5H_7$), 및 5-헥세닐 ($-CH_2$ $CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$). "C_2-C_8 알케닐"은 불포화, 즉 탄소-탄소, sp^2 이중 결합의 적어도 하나의 부위를 갖는 2 내지 8 개의 노르말, 2차, 3차 또는 사이클릭 탄소 원자를 함유하는 탄화수소이다.

"알키닐"은 불포화, 즉 탄소-탄소, *sp* 삼중결합의 적어도 하나의 부위를 갖는 노르말, 2차, 3차 또는 사이클릭 탄소 원자를 함유하는 C_2-C_{18} 탄화수소이다. 예들은 비제한적으로 하기를 포함한다: 아세틸렌성 ($-C\equiv CH$) 및 프로파르길 ($-CH_2C\equiv CH$). "C_2-C_8 알키닐"은 불포화, 즉 탄소-탄소, *sp* 삼중결합의 적어도 하나의 부위를 갖는 2 내지 8 노르말, 2차, 3차 또는 사이클릭 탄소 원자를 함유하는 탄화수소이다.

"알킬렌"은 모 알칸의 동일한 또는 2 개의 상이한 탄소 원자로부터 2 개의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 2 개의 1가 라디칼 중심을 갖는, 1 내지 18 개의 탄소 원자의 포화된, 분지된 또는 직쇄 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼을 의미한다. 전형적인 알킬렌 라디칼은 비제한적으로 하기를 포함한다: 메틸렌 ($-CH_2-$) 1,2-에틸 ($-CH_2CH_2-$), 1,3-프로필 ($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-부틸 ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), 등.

"C_1-C_{10} 알킬렌"은 식 $-(CH_2)_{1-10}-$의 직쇄, 포화된 탄화수소 그룹이다. C_1-C_{10} 알킬렌의 예는 하기를 포함한다: 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌, 헵틸렌, 옥시틸렌, 노닐렌 및 데칼렌.

"알케닐렌"은 모 알켄의 동일한 또는 2 개의 상이한 탄소 원자로 부터 2 개의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 2 개의 1가 라디칼 중심을 갖는, 2 내지 18 개의 탄소 원자의 불포화된, 분지된 또는 직쇄 또는 사이클릭 탄화

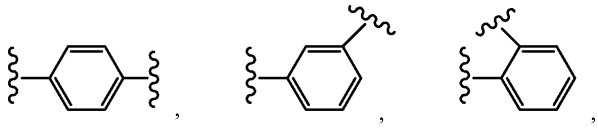
수소 라디칼을 의미한다. 전형적인 알케닐렌 라디칼은 비제한적으로 하기를 포함한다: 1,2-에틸렌 (-CH=CH-).

"알키닐렌"은 모 알킨의 동일한 또는 2 개의 상이한 탄소 원자로부터 2 개의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 2 개의 1가 라디칼 중심을 갖는, 2 내지 18 개의 탄소 원자의 불포화된, 분지된 또는 직쇄 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼을 의미한다. 전형적인 알키닐렌 라디칼은 비제한적으로 하기를 포함한다: 아세틸렌 (-C≡C-), 프로파르길 ($-CH_2C\equiv C-$), 및 4-펜티닐 ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv C-$).

"아릴"은 카보사이클릭 방향족 그룹을 의미한다. 아릴 그룹의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페닐, 나프틸 및 안트라세닐. 카보사이클릭 방향족 그룹 또는 헤테로사이클릭 방향족 그룹은 비치환되거나 하기를 포함하는 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다: 비제한적으로, $-C_1-C_8$ 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$ -NHC(O)R', $-S(O)_2R'$, -S(O)R', -OH, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R'), $-N(R')_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"C_5-C_{20} 아릴"은 카보사이클릭 방향족 고리 중 5 내지 20 개의 탄소 원자를 갖는 아릴 그룹이다. C_5-C_{20} 아릴 그룹의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페닐, 나프틸 및 안트라세닐. C_5-C_{20} 아릴 그룹은 치환되거나 아릴 그룹 에 대해 상기에서 기재된 바와 같이 비치환될 수 있다. "C_5-C_{14} 아릴"은 카보사이클릭 방향족 고리 중 5 내지 14 개의 탄소 원자를 갖는 아릴 그룹이다. C_5-C_{14} 아릴 그룹의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 페닐, 나프틸 및 안트라세닐. C_5-C_{14} 아릴 그룹은 치환되거나 아릴 그룹 에 대해 상기에서 기재된 바와 같이 비치환될 수 있다.

"아릴렌"은 2 개의 공유 결합을 가지며 하기의 구조에서 보여진 바와 같이 오르포, 메타, 또는 파라 배치로 있을 수 있는 아릴 그룹이다:



여기서 페닐 그룹은 비치환되거나 하기를 포함하는 최대 4 개의 그룹으로 치환될 수 있다: 비제한적으로, $-C_1-C_8$ 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', $-C(O)NH_2$, -C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$ -NHC(O)R', $-S(O)_2R'$, -S(O)R', -OH, -할로겐, $-N_3$, $-NH_2$, -NH(R'), $-N(R')_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, $-C_1-C_8$ 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"아릴알킬"은 비환식 알킬 라디칼을 의미하고, 여기서 탄소 원자, 전형적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자에 결합된 수소 원자 중의 하나는 아릴 라디칼로 치환된다. 전형적인 아릴알킬 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 벤질, 2-페닐에탄-1-일, 2-페닐에텐-1-일, 나프틸메틸, 2-나프틸에탄-1-일, 2-나프틸에텐-1-일, 나프토벤질, 2-나프토페닐에탄-1-일 등. 아릴알킬 그룹은 6 내지 20 개의 탄소 원자를 포함하고, 예를 들면 아릴알킬 그룹의, 알카닐, 알케닐 또는 알키닐 그룹을 포함하는 알킬 모이어티는 1 내지 6 개의 탄소 원자이고 아릴 모이어티는 5 내지 14 개의 탄소 원자이다.

"헤테로아릴알킬"은 비환식 알킬 라디칼을 의미하고, 여기서 탄소 원자, 전형적으로 말단 또는 sp^3 탄소 원자에 결합된 수소 원자 중의 하나는 헤테로아릴 라디칼로 치환된다. 전형적인 헤테로아릴알킬 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 2-벤즈이미다졸릴메틸, 2-퓨릴에틸, 등. 헤테로아릴알킬 그룹은 6 내지 20 개의 탄소 원자를 포함하고, 예를 들면 헤테로아릴알킬 그룹의,알카닐, 알케닐 또는 알키닐 그룹을 포함하는 알킬 모이어티는 1 내지 6 개의 탄소 원자이고 헤테로아릴 모이어티는 5 내지 14 개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자이다. 헤테로아릴알킬 그룹의헤테로아릴 모이어티는 3 내지 7 개의 고리 멤버 (2 내지 6 개의 탄소 원자)를 갖는 모노사이클 또는 7 내지 10 개의 고리 멤버 (4 내지 9 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자)를 갖는 바이사이클, 예를 들면: 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

"치환된 알킬", "치환된 아릴", 및 "치환된 아릴알킬"은 알킬, 아릴, 및 아릴알킬 각각을 의미하고, 여기서 하나 이상의 수소 원자 각각은 독립적으로 치환체로 치환된다. 전형적인 치환체는, 비제한적으로, 하기를 포함한

다: -X, -R, $-O^-$, -OR, -SR, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, =NR, $-CX_3$, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, NC(=O)R, -C(=O)R, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, -S(=O)R, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO^-_3$, $-PO_3H_2$, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$, $-C(=NR)NR_2$, 여기서 각각의 X는 독립적으로 할로겐: F, Cl, Br, 또는 I이고; 각각의 R은 독립적으로 -H, C_2-C_{18} 알킬, C_6-C_{20} 아릴, C_3-C_{14} 헤테로사이클, 보호 그룹 또는 전구약물 모이어티이다. 알킬렌, 알케닐렌, 및 알키닐렌 그룹은, 상기에서 기재된 바와 같이, 또한 유사하게 치환될 수 있다.

"헤테로아릴" 및 "헤테로사이클"은 고리계를 의미하고 여기서 하나 이상의 고리 원자는 헤테로원자, 예를 들면 질소, 산소, 및 황이다. 헤테로사이클 라디칼은 3 내지 20 개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자를 포함한다. 헤테로사이클은 3 내지 7 개의 고리 멤버를 갖는 모노사이클 (2 내지 6 개의 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자) 또는 7 내지 10 개의 고리 멤버를 갖는 바이사이클 (4 내지 9 탄소 원자 및 N, O, P, 및 S로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자), 예를 들면: 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 또는 [6,6] 시스템일 수 있다.

예시적인 헤테로사이클은 예를 들면 하기에서 기재되어 있다: Paquette, Leo A., " Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 Chapters 1, 3, 4, 6, 7, 및 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 내지 현재), 특히 Volumes 13, 14, 16, 19, 및 28; 및 *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

헤테로사이클의 예는 예로써 및 비제한적으로 하기를 포함한다: 피리딜, 디하이드록시피리딜, 테트라하이드로피리딜 (피페리딜), 티아졸릴, 테트라하이드로티오페닐, 황 산화된 테트라하이드로티오페닐, 피리미디닐, 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 테트라졸릴, 벤조푸라닐, 티아나프탈레닐, 인돌릴, 인돌레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 2-피롤리도닐, 피롤리닐, 테트라하이드로푸라닐, 비스-테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 비스-테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로퀴놀리닐, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 데카하이드로퀴놀리닐, 옥타하이드로이소퀴놀리닐, 아조시닐, 트리아지닐, 6H-1,2,5-티아디아지닐, 2H,6H-1,5,2-디티아지닐, 티에닐, 티안트레닐, 피라닐, 이소벤조푸라닐, 크로메닐, 크산테닐, 페녹사티닐, 2H-피롤릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 피라지닐, 피리다지닐, 인돌리지닐, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 1H-인다졸릴, 퓨리닐, 4H-퀴놀리지닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프테리디닐, 4aH-카바졸릴, 카바졸릴, β-카볼리닐, 펜안트리디닐, 아크리디닐, 피리미디닐, 펜안트롤리닐, 펜아지닐, 페노티아지닐, 푸라자닐, 펜옥사지닐, 이소크로마닐, 크로마닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피페라지닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 퀴누클리디닐, 모폴리닐, 옥사졸리디닐, 벤조트리아졸릴, 벤즈이속사졸릴, 옥신돌릴, 벤족사졸리닐, 및 이사티노일.

예로써 및 비제한적으로, 탄소 결합된 헤테로사이클은 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5, 또는 6, 피리다진의 위치 3, 4, 5, 또는 6, 피리미딘의 위치 2, 4, 5, 또는 6, 피라진의 위치 2, 3, 5, 또는 6, 푸란, 테트라하이드로푸란, 티오푸란, 티오펜, 피롤 또는 테트라하이드로피롤의 위치 2, 3, 4, 또는 5, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4, 또는 5, 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 위치 3, 4, 또는 5, 아지리딘의 위치 2 또는 3, 아제티딘의 위치 2, 3, 또는 4, 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8에서 결합된다. 더욱 더 전형적으로, 탄소 결합된 헤테로사이클은 하기를 포함한다: 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 5-피리딜, 6-피리딜, 3-피리다지닐, 4-피리다지닐, 5-피리다지닐, 6-피리다지닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-피리미디닐, 6-피리미디닐, 2-피라지닐, 3-피라지닐, 5-피라지닐, 6-피라지닐, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 또는 5-티아졸릴.

예로써 및 비제한적으로, 질소 결합된 헤테로사이클은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 위치 1, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 위치 2, 모폴린의 위치 4, 및 카바졸, 또는 β-카볼린의 위치 9에서 결합된다. 더욱 더 전형적으로, 질소 결합된 헤테로사이클은 하기를 포함한다: 1-아지리딜, 1-아제테딜, 1-피롤릴, 1-이미다졸릴, 1-피라졸릴, 및 1-피페리디닐.

"C_3-C_8 헤테로사이클"은 방향족 또는 비-방향족 C_3-C_8 카보사이클을 의미하고, 여기서 고리 탄소 원자의 1 내지 4 개는 독립적으로 O, S 및 N로 이루어진 그룹으로부터 선택된 헤테로원자로 치환된다. C_3-C_8 헤테로사이클의 대

표적인 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 쿠마리닐, 이소퀴놀리닐, 피롤릴, 티오페닐, 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 퀴놀리닐, 피리미디닐, 피리디닐, 피리도닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴 및 테트라졸릴. C_3-C_8 헤테로사이클은 비치환되거나 하기를 비제한적으로 포함하는 최대 7 개의 그룹으로 치환될 수 있다: -C_1-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, -C_1-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"C_3-C_8 헤테로사이클로"은 상기에서 규정된 C_3-C_8 헤테로사이클 그룹을 의미하고, 여기서 헤테로사이클 그룹의 수소 원자의 하나는 결합으로 대체된다. C_3-C_8 헤테로사이클로는 비치환되거나 하기를 비제한적으로 포함하는 최대 6 개의 그룹으로 치환될 수 있다: -C_1-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, -C_1-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"C_3-C_{20} 헤테로사이클"은 방향족 또는 비-방향족 C_3-C_8 카보사이클을 의미하고, 여기서 고리 탄소 원자의 1 내지 4 개는 독립적으로 O, S 및 N로 이루어진 그룹으로부터 선택된 헤테로원자로 치환된다. C_3-C_{20} 헤테로사이클은 비치환되거나 하기를 비제한적으로 포함하는 최대 7 개의 그룹으로 치환될 수 있다: -C_1-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, -C_1-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"C_3-C_{20} 헤테로사이클로"은 상기에서 규정된 C_3-C_{20} 헤테로사이클 그룹을 의미하고, 여기서 헤테로사이클 그룹의 수소 원자의 하나는 결합으로 대체된다.

"카보사이클"은 모노사이클로서 3 내지 7 개의 탄소 원자 또는 바이사이클로서 7 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는 포화된 또는 불포화된 고리를 의미한다. 모노사이클릭 카보사이클은 3 내지 6 개의 고리 원자, 더욱 더 전형적으로 5 또는 6 개의 고리 원자를 갖는다. 바이사이클릭 카보사이클은, 예를 들면 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서 배열된 7 내지 12 개의 고리 원자, 또는 바이사이클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서 배열된 9 또는 10 개의 고리 원자를 갖는다. 모노사이클릭 카보사이클의 예는 하기를 포함한다: 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 1-사이클로펜트-1-에닐, 1-사이클로펜트-2-에닐, 1-사이클로펜트-3-에닐, 사이클로헥실, 1-사이클로헥스-1-에닐, 1-사이클로헥스-2-에닐, 1-사이클로헥스-3-에닐, 사이클로헵틸, 및 사이클로옥틸.

"C_3-C_8 카보사이클"은 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-원 포화된 또는 불포화된 비-방향족 카보사이클릭 고리이다. 대표적인 C_3-C_8 카보사이클은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: -사이클로프로필, -사이클로부틸, -사이클로펜틸, -사이클로펜타디에닐, -사이클로헥실, -사이클로헥세닐, -1,3-사이클로헥사디에닐, -1,4-사이클로헥사디에닐, -사이클로헵틸, -1,3-사이클로헵타디에닐, -1,3,5-사이클로헵타트리에닐, -사이클로옥틸, 및 -사이클로옥타디에닐. C_3-C_8 카보사이클 그룹은 비치환되거나 하기를 포함하는 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다: 비제한적으로, -C_1-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -아릴, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -할로겐, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ 및 -CN; 여기서 각각의 R'는 H, -C_1-C_8 알킬 및 아릴로부터 독립적으로 선택된다.

"C_3-C_8 카보사이클로"는 상기에서 규정된 C_3-C_8 카보사이클 그룹을 의미하고, 여기서 카보사이클 그룹의 수소 원자의 하나는 결합으로 대체된다.

"링커"은 항체를 약물 모이어티에 공유 부착하는 원자의 공유 결합 또는 사슬을 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다. 다양한 구현예에서, 링커는 하기를 포함한다: 2가 라디칼 예컨대 알킬디일, 아릴디일, 헤테로아릴디일, 모이어티 예컨대: -$(CR_2)_nO(CR_2)_n$-, 알킬옥시 (예를 들면 폴리에틸렌옥시, PEG, 폴리메틸렌옥시) 및 알킬아미노

(예를 들면 폴리에틸렌아미노, Jeffamine™)의 반복 단위; 및 석시네이트, 석신아미드, 디글리콜레이트, 말로네이트, 및 카프로아마이드를 포함하는 이산 에스테르 및 아마이드. 다양한 구현예에서, 링커는 하나 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 발린, 페닐알라닌, 라이신, 및 호모라이신을 포함할 수 있다.

용어 "키랄"은 거울상 파트너의 비-포개짐의 특성을 갖는 분자를 의미하고, 한편 용어 "비키랄"은 그의 거울상 파트너 상에서 포갤 수 있는 분자를 의미한다.

용어 "입체이성질체"는 동일한 화학적 구성을 갖지만, 공간에서 원자 또는 그룹의 배열에 관해서 상이한 화합물을 의미한다.

"부분입체이성질체"는 키랄성의 2 이상의 중심을 가지며 그 분자가 서로 거울 이미지가 아닌 입체이성질체이다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 특성, 예를 들면 용융점, 비점, 스펙트럼 특성, 및 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 고-해상도 분석적 절차 예컨대 전기영동 및 크로마토그래피 하에서 분리될 수 있다.

"거울상이성질체"는 서로 포갤 수 없는 거울 이미지인 화합물의 2 개의 입체이성질체를 의미한다.

본원에서 사용된 입체화학적 정의 및 규약은 일반적으로 하기를 따른다: S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 및 Eliel, E. 및 Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. 많은 유기 화합물은 광학 활성 형태로 존재하고, 즉, 평면-편광의 면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물을 기재할 때, 접두어 D 및 L, 또는 *R* 및 *S*는 그것의 키랄 중심(들) 주위의 분자의 절대 배열을 나타내도록 사용된다. 접두어 d 및 l 또는 (+) 및 (-)은 화합물에 의해 평면-편광의 회전의 표시를 나타내도록 이용되고, (-) 또는 l은, 화합물이 좌측회전성이라는 것을 의미한다. 접두어 (+) 또는 d인 화합물은 우측회전성이다. 주어진 화학 구조에 대해, 이들 입체이성질체는 동일하고, 단, 서로 거울 이미지이다. 특이적 입체이성질체는 또한 거울상이성질체로 칭할 수 있고, 및 그와 같은 이성질체의 혼합물은 종종 소위 거울상이성질체 혼합물이다. 거울상이성질체의50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 칭하고, 이것은, 화학적 반응 또는 과정에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없었던 경우에 생길 수 있다. 용어들 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학적 활성이 없는 2 개의 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 의미한다.

"이탈 그룹"은 또 하나의 관능 그룹에 의해 치환될 수 있는 관능 그룹을 의미한다. 어떤 이탈 그룹은 당해기술에 잘 알려져 있고, 예들은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 할라이드 (*예를 들면*, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 메탄설포닐 (메실), p-톨루엔설포닐 (토실), 트리플루오로메틸설포닐 (트리플레이트), 및 트리플루오로메틸설포네이트.

용어 "보호 그룹"은 화합물 상의 다른 관능 그룹을 반응하면서 특정한 관능기를 차단 또는 보호하도록 통상적으로 이용된 치환체를 의미한다. 예를 들면, "아미노-보호 그룹"는 화합물에서 아미노 관능기를 차단 또는 보호하는 아미노 그룹에 부착된 치환체이다. 적당한 아미노-보호 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아세틸, 트리플루오로아세틸, t-부톡시카보닐 (BOC), 벤질옥시카보닐 (CBZ) 및 9-플루오레닐메틸렌옥시카보닐 (Fmoc). 보호 그룹 및 그의 용도의 일반적인 설명에 대해, 하기를 참조한다: T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991, 또는 구판.

II. 조성물 및 방법

일 측면에서, 본 발명은, 부분적으로, PMEL17에 결합하는 항체 및 그와 같은 항체를 포함하는 면역접합체를 기반으로 한다. 본 발명의 항체 및 면역접합체는, 예를 들면, PMEL17-양성 암의 진단 또는 치료에 유용하다.

A. 예시적인 항-PMEL17 항체

일부 구현예에서, 본 발명은 PMEL17에 결합하는, 단리된 항체를 제공한다. PMEL17은 멜라닌세포의 세포 표면에서 일시적으로 제공된 내재성 막 단백질이다. 본원에서 실증된 바와 같이, PMEL17은 시험된 대다수의 인간 흑색종 시료에서 발현된다.

신호 서열 (아미노산 1-24)을 갖는 예시적인 자연 발생 인간 PMEL17 프레프리단백질 서열은 서열번호: 26에서 제공되고, 상응하는 PMEL17 프로단백질 서열은 (서열번호: 26의 아미노산 25-661에 상응하는) 서열번호: 27에서 보여진다.

어떤 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하거나 서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합한다. 비제한 예시적인 그와 같은 항체는 17A9, 8G3, 및

31D1을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간, 사이노몰구스 원숭이, 마우스, 및 랫트 PMEL17로부터 선택된 PMEL에 결합한다.

일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 ≤ 5 nM, 또는 ≤ 4 nM, 또는 ≤ 3 nM, 또는 ≤ 2 nM, 또는 ≤ 1 nM, 및 임의로 ≥ 0.0001 nM, 또는 ≥ 0.001 nM, 또는 ≥ 0.01 nM의 친화도를 갖는 PMEL17에 결합한다. 비제한 예시적인 그와 같은 항체는 본원에서 기재된 17A9 및 8G3을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하는 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17에 결합한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하는 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17 및/또는 사이노몰구스 원숭이 PMEL17에 결합한다.

일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 ≤ 5 nM, 또는 ≤ 4 nM, 또는 ≤ 3 nM, 또는 ≤ 2 nM, 또는 ≤ 1 nM, 및 임의로 ≥ 0.0001 nM, 또는 ≥ 0.001 nM, 또는 ≥ 0.01 nM의 친화도를 갖는 PMEL17에 결합한다. 비제한 예시적인 그와 같은 항체는 본원에서 기재된 31D1이다. 일부 구현예에서, 서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합하는 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17에 결합한다. 일부 구현예에서, 서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하는 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17 및/또는 사이노몰구스 원숭이 PMEL17에 결합한다.

PMEL17에 결합하는 추가 항체가 제공된다. 비제한 예시적인 항-PMEL17 항체는 본원에서 기재된 15F2이다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 ≤ 5 nM, 또는 ≤ 4 nM, 또는 ≤ 3 nM, 또는 ≤ 2 nM, 또는 ≤ 1 nM, 및 임의로 ≥ 0.0001 nM, 또는 ≥ 0.001 nM, 또는 ≥ 0.01 nM의 친화도를 갖는 PMEL17에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간 PMEL17 및/또는 사이노몰구스 원숭이 PMEL17에 결합한다.

검정

항-PMEL17 항체가 "서열번호: 26의 아미노산 105 내지 125 내의 에피토프에 결합하거나" "서열번호: 26의 아미노산 25 내지 45 내의 에피토프에 결합하는 지를" 결정하기 위해, N- 및 C-말단 결실을 갖는 PMEL17 폴리펩타이드는 293 세포에서 발현되고 항체의 끝이 잘린 폴리펩타이드에의 결합은 실시예 D에서 기재된 바와 같이 FACS에 의해 시험되고, 여기서 293 세포에서 발현된 전체길이 PMEL17에의 결합에 대한 항체의 끝이 잘린 폴리펩타이드에의 결합의 실질적인 감소 (≥ 70% 감소) 또는 제거는, 항체가 상기 끝이 잘린 폴리펩타이드에 결합하지 않는다는 것을 나타낸다.

항-PMEL17 항체가 "≤ 5 nM, 또는 ≤ 4 nM, 또는 ≤ 3 nM, 또는 ≤ 2 nM, 또는 ≤ 1 nM의 친화도"와 함께 결합하는 지는, BIAcore® 검정에 따라 결정된다. 예를 들면, Kd는 BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. BIAcore™ 연구 등급 CM5 칩은 공급자의 설명에 따라 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이마이드 (EDC) 및 N-하이드록시석신이마이드 (NHS) 시약으로 활성화된다. 염소 항-인간 Fc IgG는 각 유동 전지에서 대략 10,000 반응 단위 (RU)를 달성하기 위해 칩에 커플링된다. 미반응된 커플링 그룹은 1M 에탄올아민으로 차단된다. 동력학 측정에 대해, 항-PMEL17 항체는 대략 300 RU를 달성하기 위해 포획된다. 2-배 연속 희석의 인간 PMEL17 ECD (예를 들면, 배큘로바이러스 시스템에서 발현된 C-말단 Fc에 융합된 아미노산 25 내지 291, 또는 Fc에 융합된 아미노산 22-558; 125 nM 내지 0.49 nM)는 30 μl/분의 유속으로 25℃에서 HBS-P 완충제 (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005% 계면활성제 P20)에서 주입된다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 1:1 Langmuir 결합 모델 (BIAcore™ 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산된다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on}의 비로서 계산된다. 결합 속도가 상기의 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 10^6 M^{-1} s^{-1}를 초과하지 않으면, 이때 결합 속도는 분광기, 예컨대 교반된 큐벳을 갖는 정지-유동 구비된 분광측정기 (Aviv Instruments) 또는 8000-시리즈 SLM-Aminco® 분광측정기 (ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 항원의 증가 농도의 존재에서, pH 7.2, PBS 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서 형광 방출 세기 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역통과)의 증가 또는 감소는 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

<u>항체 17A9 및 다른 구현예</u>

일부 구현예에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 또 하나의 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a)로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인 (i) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 5로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (b)로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인 (i) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일부 구현예에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a)로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3

개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인 (i) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 5로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (b)로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인 (i) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg, Lys, Gln, Asn, Gly, 및 Ala로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg, Lys, Gly, 및 Ala로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg 및 Gly로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr, Trp, Phe, Thr, Ser, Ile, Leu, Val, Met, Ala, 및 노르류신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr, Phe, Ile, Leu, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr 및 Ile로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_3은 Ser, Thr, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_3은 Ser 및 Thr로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_4은 Ser, Thr, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_4은 Ser 및 Thr로부터 선택된다.

임의의 상기 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 임의의 상기 구현예에서와 같이 HVR를 포함하고, 인간 수용체 뼈대, 예를 들면 인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 인간 수용체 뼈대는 인간 VL 카파 1 (VL_{KI}) 뼈대 및/또는 VH 뼈대 VH_1이다. 일부 구현예에서, 인간화된 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 구현예에서, 인간화된 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 1 또는 50의 아미노산 서열에 대한 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대한 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 1 또는 50에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 1 또는 50에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 1 또는 50의 VH 서열. 특정 구현예에서, VH는 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 일부 구현예에서, VH는 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대한 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결

실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 2에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 2에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 2의 VL 서열. 특정 구현예에서, VL은 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 구현예에서, VL은 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VH, 및 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VL을 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 1 및 서열번호: 2 중 VH 및 VL 서열 각각. 일부 구현예에서, 항체는 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 50 및 서열번호: 2 각각에서 VH 및 VL 서열을 포함한다.

추가 측면에서, 본 발명은 본원에서 제공된 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 서열번호: 1 또는 50의 VH 서열 및 서열번호: 2의 VL 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 어떤 구현예에서, 아미노산 105 내지 125로부터, 그것 내에 또는 그것과 중첩한 서열번호: 26의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 실질적으로 전체 길이 항체, 예를 들면, 본원에서 규정된 바와 같은 IgG1 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 아이소타입이다.

추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 이하의 섹션 1-7에서 기재된 바와 같이 임의의 특징을, 단독으로 또는 함께 편입할 수 있다.

항체 8G3 및 다른 구현예

일부 구현예에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 또 하나의 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a) (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하

는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일부 구현예에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a) (i) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 15로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg, Lys, Gln, Asn, Gly, 및 Ala로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg, Lys, Gly, 및 Ala로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 17 중 X_1은 Arg 및 Gly로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr, Trp, Phe, Thr, Ser, Ile, Leu, Val, Met, Ala, 및 노르류신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr, Phe, Ile, Leu, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 18 중 X_2은 Tyr 및 Ile로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_3은 Ser, Thr, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_3은 Ser 및 Thr로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_4은 Ser, Thr, 및 Val로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 서열번호: 19 중 X_4은 Ser 및 Thr로부터 선택된다.

임의의 상기 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 임의의 상기 구현예에서와 같이 HVR를 포함하고, 인간 수용체 뼈대, 예를 들면 인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화된 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산

서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 구현예에서, 인간화된 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 9 또는 49의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 9 또는 49의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대한 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 9 또는 49에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 9 또는 49에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 9 또는 49의 VH 서열. 특정 구현예에서, VH는 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 일부 구현예에서, VH는 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 서열번호: 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대한 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 10에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 10에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 10의 VL 서열. 특정 구현예에서, VL은 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 구현예에서, VL은 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VH, 및 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VL을 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 9 및 서열번호: 10 중 VH 및 VL 서열 각각. 일부 구현예에서, 항체는 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 49 및 서열번호: 10 각각에서 VH 및 VL 서열을 포함한다.

추가 측면에서, 본 발명은 본원에서 제공된 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 서열번호: 9 또는 49의 VH 서열 및 서열번호: 10의 VL 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 어떤 구현예에서, 아미노산 105 내지 125로부터, 그것 내에 따는 그것과 중합하여 서열번호: 26의 에피토프 에 결합하는 항체가 제공된다.

본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 F(ab')2 단편이다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 실질적으로 전체 길이 항체, 예를 들면, 본원에서 규정된 바와 같은 IgG1 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 아이소타입이다.

추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 하기의 섹션 1-7에서 기재된 바와 같이 임의의 특징을, 단독으로 또는 함께 편입할 수 있다.

항체 15F2 및 다른 구현예

일부 구현예에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

일 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3. 또 하나의 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2. 추가 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a) (i) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호: 22로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3로부터 선택된 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체를 제공한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

임의의 상기 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 임의의 상기 구현예에서와 같이 HVR를 포함하고, 인간 수용체 뼈대, 예를 들면 인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화된 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체는 서열번호: 11 또는 51의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 11 또는 51의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대한 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 11 또는 51에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 11 또는 51에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 11 또는 51의 VH 서열. 특정 구현예에서, VH는 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3.

일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 서열번호: 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함

한다. 어떤 구현예에서, 서열번호: 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 서열번호: 12에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 5 개의 아미노산은 서열번호: 12에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 하기를 포함한다: 서열번호: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 12의 VL 서열. 특정 구현예에서, VL은 하기로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다: (a) 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VH, 및 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VL을 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 11 및 서열번호: 12 중 VH 및 VL 서열 각각. 일부 구현예에서, 항체는 하기를 포함한다: 그 서열의 번역후 변형을 포함하는 서열번호: 51 및 서열번호: 12 중 VH 및 VL 서열 각각.

추가 측면에서, 본 발명은 본원에서 제공된 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 서열번호: 11 또는 51의 VH 서열 및 서열번호: 12의 VL 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 F(ab')2 단편이다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 실질적으로 전체 길이 항체, 예를 들면, 본원에서 규정된 바와 같은 IgG1 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 아이소타입이다.

추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 하기의 섹션 1-7에서 기재된 바와 같이 임의의 특징을, 단독으로 또는 함께 편입할 수 있다.

항체 31D1 및 다른 구현예

일 측면에서, 본 발명은 하이브리도마 지정된 "7509(31D1.6.7)"에 의해 생산되고 ATCC (2012년 4월 24일)에 기탁되고 ATCC 수납 번호 PTA-12862을 갖는 항체의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 개의 HVR를 포함하는 항-PMEL17 항체를 제공한다. 이 섹션을 위해, HVR는 CDR, 즉, 경쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 24-34, 50-56, 및 89-97, 및 중쇄 가변 영역의 아미노산 잔기 31-35B, 50-65, 및 95-102 (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3 각각)에서 생기는 CDR에 상응하는 아미노산 범위에 의해 기술된다. 하기를 참조한다: Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. 공중 보건 서비스, 미국 국립 보건원, Bethesda, MD (1991).

일 측면에서, 본 발명은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H3을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H3 및 HVR-L3을 포함한다. 추가 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H3, HVR-L3, 및 HVR-H2를 포함한다. 추가 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3를 포함한다.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함한다.

또 하나의 측면에서, 본 발명의 항체는 하기를 포함한다: (a) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 적어도 1, 적어도 2, 또는 모두 3 개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인.

또 하나의 측면에서, 본 발명은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된

항체의 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

임의의 상기 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 인간화된다. 하나의 그와 같은 구현예에서, 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 인간화된 형태이다. 추가 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 임의의 상기 구현예에서와 같이 HVR를 포함하고, 수용체 인간 뼈대, 예를 들면 인간 면역글로불린 뼈대 또는 인간 공통 뼈대를 추가로 포함한다.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 그 서열의 번역후 변형을 포함하는, ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, VH는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들면, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-PMEL17 항체는 PMEL17에 결합하기 위한 능력을 보유한다. 어떤 구현예에서, 총 1 내지 10 개의 아미노산은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR의 외부의 (즉, FR에 있는) 영역에서 일어난다. 임의로, 항-PMEL17 항체는 그 서열의 번역후 변형을 포함하는, ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VL 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, VL은 ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3로부터 선택된 1, 2 또는 3 개의 HVR을 포함한다.

또 하나의 측면에서, 항-PMEL17 항체가 제공되고, 상기 항체는 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VH, 및 상기에서 제공된 임의의 구현예에서와 같은 VL을 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 그 서열의 번역후 변형을 포함하는, ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체의 VH 및 VL 서열 각각을 포함한다.

추가 측면에서, 본 발명은 본원에서 제공된 항-PMEL17 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, ATCC 수납 번호 PTA-12862를 갖는 하이브리도마 7509(31D1.6.7)에 의해 생산된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 키메라, 인간화된 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 F(ab')2 단편이다. 또 하나의 구현예에서, 항체는 본원에서 규정된 바와 같이 실질적으로 전체 길이 항체, 예를 들면, IgG2b 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 아이소타입이다.

추가 측면에서, 임의의 상기 구현예에 따른 항-PMEL17 항체는 하기의 섹션 1-7에서 기재된 바와 같이 임의의 특징을, 단독으로 또는 함께 편입할 수 있다.

1. 항체 친화도

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM의 해리 상수(Kd)를 가지며, 임의로 ≥ 10^{-13} M(예를 들면 10^{-8} M 이하, 예를 들면 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들면, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)이다.

일 구현예에서, Kd는 하기 분석에 의해 기술된 바와 같이 관심 항체의 Fab 형태 및 그의 항원을 이용하여 수행되는 방사선표지된 항원 결합 분석(RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 표지되지 않은 항원의 적정(titration) 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화한 다음, 항-

Fab 항체-코팅된 플레이트를 이용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정된다(예를 들면, Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999) 참조). 분석을 위한 조건을 확립하기 위해, MICROTITER® 다중-웰 플레이트(Thermo Scientific)를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μg/ml의 포획용 항-Fab 항체(Cappel Labs)로 밤새 코팅하고, 이어서 실온(대략 23℃)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2%(w/v) 소 혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착성 플레이트(Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 연속 희석된 관심 Fab(예를 들면, 문헌[Presta 등, Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]에서 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함)와 혼합한다. 그리고 나서, 상기 관심 Fab를 밤새 배양하지만, 평형에 도달하도록 더 긴 기간(예를 들면, 약 65시간) 동안 배양을 계속할 수 있다. 그 후, 상기 혼합물을 실온에서(예를 들면, 1시간 동안) 배양하기 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 그리고 나서, 용액을 제거하고 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20®)로 8회 세척한다. 플레이트가 건조되면, 150 μl/웰의 섬광물질(MICROSCINT-20™; Packard)을 첨가하고, 플레이트를 TOPCOUNT™ 감마 계수기(Packard) 상에서 10분간 계수한다. 최대 결합의 20% 미만을 제공하는 각 Fab의 농도를 경쟁적 결합 분석에서 사용하기 위해 선택한다.

또 하나의 구현예에 따르면, Kd는 ~10 반응 단위(RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 갖는 25℃에서의 BIACORE®-2000 또는 BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용한 표면 플라즈몬 공명 분석을 이용하여 측정된다. 요약하면, 카복시메틸화된 덱스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)을 공급자의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이마이드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이마이드(NHS)를 이용하여 활성화한다. 항원을 10 mM나트륨 아세테이트, pH 4.8을 이용하여 5 μg/ml(~0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위(RU)를 달성하기 위해 5 μl/분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 반응하지 않은 그룹을 차단한다. 동력학 측정을 위해, 2배 연속 희석된 Fab(0.78 nM 내지 500 nM)를 대략 25 μl/분의 유속으로 25℃에서 0.05% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20™) 계면활성제(PBST)를 갖는 PBS 중에 주입한다. 회합 및 해리 센서그램을 동시에 핏팅(fitting)함으로써 단순 일대일 랑뮈어 결합 모델(BIACORE® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})를 계산한다. 평형 해리 상수(Kd)는 비 k_{off}/k_{on}으로서 계산한다. 예를 들면, 문헌[Chen 등, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 만약 회합 속도(on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 10^6 M^{-1} s^{-1}을 초과하면, 상기 회합 속도는 분광기, 예컨대 정지-유동(stop-flow)이 구비된 분광광도계(Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광측정기(ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 증가하는 농도의 항원의 존재하에, PBS, pH 7.2 중의 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도(여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정될 수 있다.

2. 항체 단편

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은, 비제한적으로, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, 및 scFv 단편, 및 하기에 기재된 다른 단편을 포함한다. 어떤 항체 단편의 검토를 위해, 문헌[Hudson 등 Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들면, 문헌[Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994))]을 참조하며, 또한 WO 제93/16185호; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호를 참조한다. 회수(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편의 검토를 위해, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다.

디아바디는 2가이거나 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들면, EP 제404,097호; WO 제1993/01161호; Hudson 등, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)를 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌[Hudson 등, Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기술되어 있다.

단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 어떤 구현예에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들면, 미국 특허 제6,248,516호 B1을 참조한다).

항체 단편은, 본원에 기재된 바와 같이, 비제한적으로 온전한 항체의 단백분해 절단 뿐만 아니라 재조합 숙주세

포(예를 들면 대장균 또는 파아지)에 의한 생산을 포함하는, 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

3. 키메라 항체 및 인간화 항체

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 키메라 항체이다. 어떤 키메라 항체는, 예를 들면, 미국 특허 제 4,816,567호; 및 문헌[Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 일 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역(예를 들면, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가 예에서, 키메라 항체는 모 항체로부터 클래스 또는 서브클래스가 바뀐 "클래스 전환된(class switched)" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

어떤 구현예에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서, 인간에 대한 면역원성을 줄이기 위해 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들면, CDR(또는 이의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR(또는 이의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된, 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의로 또한 인간 불변 영역 중 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기는, 예를 들면 항체 특이성 또는 친화도를 회복하거나 개선하기 위해, 비-인간 항체(예를 들면, HVR 잔기가 유래된 항체) 유래의 상응하는 잔기로 치환된다.

인간화 항체 및 이들을 제조하는 방법은, 예를 들면, 문헌[Almagro 및 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되며, 예를 들면, 문헌[Riechmann 등, Nature 332:323-329 (1988); Queen 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 미국 특허 제5, 821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호, 및 제 7,087,409호; Kashmiri 등, Methods 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 이식을 기술하고 있음); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) ("재포장(resurfacing)"을 기술하고 있음; Dall'Acqua 등, Methods 36:43-60 (2005)("FR 셔플링"을 기술하고 있음; 및 Osbourn 등, Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka 등, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)(FR 셔플링에 대한 "안내된 선택"을 기술하고 있음)]에 더 기술되어 있다.

인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 비제한적으로 "최적화(best-fit)" 방법을 이용하여 선택된 프레임워크(예를 들면, Sims 등 J. Immunol. 151:2296 (1993) 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위그룹의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크(예를 들면, Carter 등 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta 등 J. Immunol., 151:2623 (1993) 참조); 인간의 성숙한(체세포적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역(예를 들면, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) 참조); 및 스크리닝 FR 라이브러리로부터 유래된 프레임워크 영역(예를 들면, Baca 등, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok 등, J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) 참조)을 포함한다.

4. 인간 항체

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 본 기술분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌[van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기술되어 있다.

인간 항체는 항원 도전에 대한 반응으로 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 인간 항체를 생산하도록 변형된 형질전환 동물에게 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 그와 같은 동물은 전형적으로 인간 면역글로불린 좌위의 전부 또는 일부를 함유하며, 이는 내인성 면역글로불린 좌위를 대체하거나, 또는 이는 염색체밖에 존재하거나 또는 동물의 염색체 내로 무작위로 통합된다. 그러한 형질전환 마우스에서, 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 불활성화되어 왔다. 형질전환 동물로부터 인간 항체를 얻는 방법의 검토를 위해, 문헌[Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들면, XENOMOUSE™ 기술을 기재하고 있는 미국 특허 제6,075,181호 및 제 6,150,584호; HUMAB® 기술을 기재하고 있는 미국 특허 제 5,770,429호; K-M MOUSE® 기술을 기재하고 있는 미국 특허 제7,041,870호, 및 VELOCIMOUSE® 기술을 기재하고 있는 미국 특허 출원 공보 US 제2007/0061900호를 참조한다. 그러한 동물에 의해 생성된 온전한 항체로부터 유래된 인간 가변 영역은, 예를 들면, 상이한 인간 불변 영역과 조합함으로써 추가 변형될 수 있다.

인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수 세포주가 기술되어 왔다(예를 들면, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner 등, J. Immunol., 147: 86 (1991). 참조). 인간 B-세포 하이브리

도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌[Li 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기술되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들면, 미국 특허 제7,189,826호(하이브리도마 세포주로부터 모노클로날 인간 IgM 항체의 생산을 기술하고 있음) 및 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 기술하고 있음)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술(트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌[Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기술되어 있다.

인간 항체는 또한 인간 유래의 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 분리함으로써 생성될 수 있다. 그리고 나서, 그와 같은 가변 영역 서열은 원하는 인간 불변 영역과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기술은 하기에 기재되어 있다.

5. 라이브러리-유래된 항체

본 발명의 항체는 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대한 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리될 수 있다. 예를 들면, 파아지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 상기 라이브러리를 대상으로 원하는 결합 특성을 갖는 항체를 스크리닝하는 다양한 방법들이 본 기술분야에 공지되어 있다. 그와 같은 방법은, 예를 들면, 문헌[Hoogenboom 등 in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien 등, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에서 검토되며, 예를 들면, 문헌[McCafferty 등, Nature 348:552-554; Clackson 등, Nature 352: 624-628 (1991); Marks 등, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 등, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee 등, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee 등, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에서 추가로 기재되어 있다.

어떤 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리들은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되어 파아지 라이브러리에 무작위로 재조합되며, 이후 이는 문헌[Winter 등, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파아지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 단일-사슬 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서, 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 원상태 레퍼토리는 문헌[Griffiths 등, EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기술된 바와 같이 임의의 면역화 없이 광범위한 비-자기 또는 자기 항원에 대해 항체의 단일 공급원을 제공하기 위해 클로닝(예를 들면, 인간으로부터)될 수 있다. 마지막으로, 원상태 라이브러리는 또한 문헌[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 분절을 클로닝함으로써, 그리고 고 가변 CDR3 영역을 인코딩하며, 시험관내에서 재배열을 달성하는 랜덤 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 이용하여 합성적으로 제조될 수 있다. 인간 항체 파아지 라이브러리를 기술하는 특허 공보는 예를 들면 US 특허 제5,750,373, 및 US 특허 공보 제2005/0079574호, 제2005/0119455호, 제2005/0266000호, 제2007/0117126호, 제2007/0160598호, 제2007/0237764호, 제2007/0292936호, 및 제2009/0002360호를 포함한다.

인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편인 것으로 고려된다.

6. 다중특이적 항체

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 어떤 구현예에서, 결합 특이성 중 하나는 PMEL17에 대한 것이며 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 어떤 구현예에서, 결합 특이성 중 하나는 PMEL17에 대한 것이며 다른 하나는 CD3에 대한 것이다. 예를 들면, 미국 특허 제5,821,337호를 참조한다. 어떤 구현예에서, 이중특이적 항체는 PMEL17의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 PMEL17을 발현하는 세포에 내재화하는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술들은, 비제한적으로, 상이한 특이성을 갖는 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현(Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, 및 Traunecker 등, EMBO J. 10: 3655 (1991)), 및 "놉-인-홀(knob-in-hole)" 조작을 포함한다(예를 들면, 미국 특허 제5,731,168호 참조). 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이형이량체 분자를 제조하기 위해 정전기 스티어링 효과(electrostatic

steering effect)를 조작함으로써(WO 제2009/089004호A1); 둘 이상의 항체 또는 단편들을 가교시킴으로써(예를 들면, US 특허 제4,676,980호, 및 Brennan 등, Science, 229: 81 (1985) 참조); 이중특이적 항체를 생산하는 류신 지퍼를 이용함으로써(예를 들면, Kostelny 등, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위해 "디아바디" 기술을 이용함으로써(예를 들면, Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); 및 단일-사슬 Fv(sFv) 이량체를 이용함으로써(예를 들면 Gruber 등, J. Immunol., 152:5368 (1994)); 및 문헌[Tutt 등 J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조함으로써 제조될 수 있다.

"Octopus 항체"를 포함하는 3개 이상의 관능성 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체들이 또한 본원에 포함된다(예를 들면 US 제2006/0025576A1호 참조).

본원에서 항체 또는 단편은 또한 PMEL17 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다(US 제 2008/0069820호 참조).

7. 항체 변이체

어떤 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체들이 고려된다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 내로 적절한 변형을 도입함으로써, 또는 펩타이드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열로부터의 결실, 및/또는 이들 내로의 삽입 및/또는 이들 내에서의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구조체가 원하는 특성, 예를 들면, 항원-결합을 가지면, 최종 구조체에 도달하기 위해 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이뤄질 수 있다.

a) 치환, 삽입, 및 결실 변이체

어떤 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체들이 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위들은 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환이 "바람직한 치환"의 제목 하에 표 1에 나타나 있다. 보다 실질적인 변화가 "예시적인 치환"의 제목 하에 표 1에서 제공되며 아미노산 측쇄 클래스를 참조하여 하기에 더 기재되어 있다. 아미노산 치환이 관심 항체 내로 도입될 수 있고 생성물은 원하는 활성, 예를 들면, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝된다.

표 1

최초 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

아미노산은 공통의 측쇄 특성에 따라그룹화될 수 있다:

(1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) 산성: Asp, Glu;

(4) 염기성: His, Lys, Arg;

(5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

비-보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 멤버를 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체(예를 들면 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 수득한 변이체(들)은 모 항체와 비교하여 어떤 생물학적 특성(예를 들면, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에서 변형(예를 들면, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 실질적으로 유지된 어떤 생물학적 특성을 가질 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들면, 본원에서 기재된 것과 같은 파아지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 간편하게 생성될 수 있는, 친화도 성숙된 항체이다. 요약하면, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고 변이체 항체가 파아지 상에 디스플레이되며 특정한 생물학적 활성(예를 들면 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

예를 들면, 항체 친화도를 개선하기 위해, HVR에서 변경(예를 들면, 치환)이 이뤄질 수 있다. 그와 같은 변경은 HVR "핫스팟," 즉, 체세포 성숙 공정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩된 잔기(참고, 예를 들면, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), 및/또는 SDR(a-CDR)에서 이뤄질 수 있고, 수득한 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선별에 의한 친화도 숙성

은, 예를 들면, 문헌[Hoogenboom 등 in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien 등, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)]에 기술되어 왔다. 친화도 성숙의 일부 구현예에서, 임의의 다양한 방법(예를 들면, 오류유발 PCR, 사슬 셔플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지향된 돌연변이유발)에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 다양성이 도입된다. 그리고 나서, 2차 라이브러리가 생성된다. 그리고 나서, 상기 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지향된 접근법을 포함하며, 여기서 몇 개의 HVR 잔기(예를 들면, 한번에 4-6 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기들은, 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 확인될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

어떤 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 그러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들면, 본원에서 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이뤄질 수 있다. 그와 같은 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부에서 이뤄질 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 어떤 구현예에서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 단지 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환을 함유한다.

돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 표적 잔기들의 잔기 또는 그룹(예를 들면, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같이 전하를 띠는 잔기들)이 확인되고 항원과 항체의 상호작용이 영향을 맞는지 여부를 결정하기 위해 중성 또는 음전하를 띠는 아미노산(예를 들면, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체된다. 추가 치환이 초기 치환에 대한 기능적 민감도를 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조가 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하는데 사용된다. 그와 같은 접촉 잔기들과 이웃하는 잔기들이 표적화되고 치환을 위한 후보로서 제거될 수 있다. 원하는 특성을 갖는지 여부를 결정하기 위해 변이체들이 스크리닝될 수 있다.

아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기부터 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩타이드의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소(예를 들면 ADEPT의 경우) 또는 폴리펩타이드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단의 융합을 포함한다.

b) 당화 변이체

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 항체가 당화되는 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 변경된다. 항체에 대한 당화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 당화 부위가 생성되고 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 간편하게 달성될 수 있다.

항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 원상태 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 영역의 Asn297에 N-연결을 통해 일반적으로 부착된 분지의 바이안테너리 올리고당을 포함한다. 예를 들면, 문헌[Wright 등 TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들면, 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토오스, 및 시알산, 뿐만 아니라 푸코스 바이안테너리 올리고당 구조의 "줄기(stem)" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 어떤 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본 발명의 항체에서 올리고당의 변형이 이뤄질 수 있다.

일 구현예에서, Fc 영역에 부착된(직접적으로 또는 간접적으로) 푸코스가 부족한 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체들이 제공된다. 예를 들면, 상기 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들면 WO 제2008/077546호에 기재된 MALDI-TOF 질량 분광분석법에 의해 측정된 바와 같이, Asn 297에 부착된 모든 당구조의 합(예를 들면 복잡한, 하이브리드 및 고 만노스 구조) 대비 Asn297에 있는 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역(Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링) 내의 약 위치 297에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만, Asn297은 또한 위치 297의 약 ±3 아미노산 상류 또는 하류, 즉, 항체에서의 가벼운 서열 변화로 인해 위치 294 및 300 사이에 위치할 수 있다. 그와 같은 푸코실화 변이체들은 ADCC 기능을 개선할 수 있다. 예를 들면, US 특허 공보 US 제2003/0157108호 (Presta, L.); US 제2004/0093621호(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)를 참조한다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스-결핍된" 항체 변이체들과 관련된 문헌의 예는 US 제2003/0157108호; WO 제2000/61739호; WO 제2001/29246호; US 제2003/0115614호; US 제2002/0164328호; US 제2004/0093621호; US 제2004/0132140호; US 제2004/0110704호; US 제2004/0110282호; US 제2004/0109865호; WO 제2003/085119호; WO 제2003/084570호; WO 제2005/035586호; WO 제2005/035778호; WO 제2005/053742호; WO 제2002/031140호; Okazaki 등 J. Mol. Biol. 336:1239-1249

(2004); Yamane-Ohnuki 등 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)를 포함한다. 탈푸코실화된 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포(Ripka 등 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 특허출원 US 제2003/0157108호 A1, Presta, L; 및 WO 제2004/056312호 A1, Adams 등, 특히 실시예 11), 및 넉아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실전이효소 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포를 포함한다(예를 들면, Yamane-Ohnuki 등 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. 등, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 및 WO제2003/085107호 참조).

예를 들면, 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테너리 올리고당이 GlcNAc에 의해 이등분된, 이등분된 올리고당을 갖는 항체 변이체들이 추가 제공된다. 그와 같은 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 그와 같은 항체 변이체의 예는, 예를 들면, WO 제2003/011878호(Jean-Mairet 등); US 특허 제6,602,684호(Umana 등); 및 US 제2005/0123546호(Umana 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당 내의 적어도 하나의 갈락토오스 잔기를 갖는 항체 변이체들이 또한 제공된다. 그와 같은 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 그와 같은 항체 변이체는 기재된, 예를 들면, WO 제1997/30087호(Patel 등); WO 제1998/58964호(Raju, S.); 및 WO 제1999/22764호(Raju, S.)에 기술되어 있다.

c) Fc 영역 변이체

어떤 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입됨으로써, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들면 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들면, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

어떤 구현예에서, 본 발명은 일부를 갖지만 모든 효과기 기능을 갖지는 않는 항체 변이체를 고려하며, 이는 적용을 위한 바람직한 후보이며, 여기서 시험관내 항체의 반감기는 중요하지만 어떤 효과기 기능(예컨대 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 유해하다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/결실을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석이 수행될 수 있다. 예를 들면, 항체가 FcγR 결합이 부족하지만(따라서 ADCC 활성이 부족할 것 같음), FcRn 결합 능력은 보유한다는 것을 보증하기 위해, Fc 수용체(FcR) 결합 분석이 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 Fc(RIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc(RI, Fc(RII 및 Fc(RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌[Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하는 시험관내 분석의 비제한적인 예가 미국 특허 제5,500,362호(예를 들면 Hellstrom, I. 등 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 참조) 및 Hellstrom, I 등, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 제5,821,337호(Bruggemann, M. 등, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 이용될 수 있다(예를 들면, 유세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사성 세포독성 분석(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비-방사성 세포독성 분석(Promega, Madison, WI). 상기 분석을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 모노단핵구 세포(PBMC) 및 천연 사멸(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들면, 문헌[Clynes 등 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 분석은 항체가 C1q에 결합할 수 없어서 CDC 활성이 부족하다는 것을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들면, WO 제2006/029879호 및 WO 제2005/100402호 내의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참고한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석이 수행될 수 있다(예를 들면, Gazzano-Santoro 등, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. 등, Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) 참조). FcRn 결합 및 생체내 소거능/반감기 결정은 당해분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다(예를 들면, Petkova, S.B. 등, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006) 참조).

감소된 효과기 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 항체를 포함한다(미국 특허 제6,737,056호). 그와 같은 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 둘 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다(US 특허 제7,332,581호).

FcR에 대해 개선된 또는 줄어든 결합을 갖는 어떤 항체 변이체들이 기술되고 있다(예를 들면, 미국 특허 제6,737,056호; WO 제2004/056312호, 및 Shields 등, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) 참조).

어떤 구현예에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들면, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334(잔기들의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

일부 구현예에서, 예를 들면, US 특허 제6,194,551호, WO 제 99/51642호, 및 Idusogie 등 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)에 기재된 바와 같이, 변경된(즉, 개선되거나 줄어든) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 야기하는 Fc 영역에서 변경이 이뤄진다.

증가된 반감기를 가지며, 어머니의 IgG를 태아에 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대해 개선된 결합을 갖는 항체(Guyer 등, J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim 등, J. Immunol. 24:249 (1994))가 US 제2005/0014934호A1(Hinton 등)에 기재되어 있다. 상기 항체는 내부에 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 그와 같은 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들면, Fc 영역 잔기 434의 치환(US 특허 제7,371,826호)을 갖는 것을 포함한다.

또한 Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해 문헌[Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 WO 제94/29351호]을 참조한다.

d) 시스테인 조작된 항체 변이체

어떤 구현예에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작된 항체, 예를 들면, "thioMAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특별한 구현예에서, 상기 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에 존재한다. 상기 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 이에 의해 반응성 티올 그룹이 항체의 접근가능한 부위에 위치하고, 본원에 더 기재된 바와 같이 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합하여 면역접합체를 생성하는데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 하기의 잔기 중 어느 하나 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카밧 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들면, 미국 특허 제7,521,541호에 기재된 대로 생성될 수 있다.

e) 항체 유도체

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 당해기술에 공지되어 있고 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 더 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 비제한적으로 수용성 폴리머를 포함한다. 수용성 폴리머의 비제한적인 예는, 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로오스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 프롤리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 코-폴리머, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예를 들면, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 그의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 그 안정성으로 인해 제조시 이점을 가질 수 있다. 상기 폴리머는 임의의 분자량일 수 있고, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 폴리머의 수는 달라질 수 있으며, 만약 1개가 넘는 폴리머가 부착되면, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 폴리머의 수 및/또는 유형은 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지 여부에 관계없이, 비제한적으로, 개선될 항체의 특정한 특성 또는 기능 등을 포함하는 고려에 기초하여 결정될 수 있다.

또 하나의 구현예에서, 방사선에의 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티 및 항체의 접합체가 제공된다. 일 구현예에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다(Kam 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). 방사선은 임의의 파장일 수 있으며, 비제한적으로, 보통 세포에 해를 끼치지 않지만, 항체-비단백질성 모이어티에 주변의 세포가 사멸되는 온도까지 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함한다.

B. 재조합 방법 및 조성물

항체는, 예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같이, 재조합 방법 및 조성물을 이용하여 생산될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에서 기재된 항-PMEL17 항체를 인코딩하는 분리된 핵산이 제공된다. 그와 같은 핵산은 항체의 VL를 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들면, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 인코딩할 수 있다. 추가 구현예에서, 그와 같은 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들면, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 구현예에서, 그와 같은 핵산을 포함하는 숙주세포가 제공된다. 하나의 그와 같은 구현예에서, 숙주세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다(예를 들면,

상기 벡터로 형질전환되었음). 일 구현예에서, 숙주세포는 진핵, 예를 들면 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프 세포(예를 들면, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체를 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주세포를 상기 제공된 바와 같이, 항체의 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 것, 및 임의로 숙주세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 것을 포함한다.

항-PMEL17 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들면, 상기에서 기재된 바와 같이, 항체를 인코딩하는 핵산이 분리되고 숙주세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위한 하나 이상의 벡터 내로 삽입된다. 그와 같은 핵산은 쉽게 분리되고 종래의 절차(예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써)를 이용하여 시퀀싱될 수 있다.

항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주세포는 본원에서 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들면, 항체는, 특히 당화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않을 때, 박테리아에서 생산될 수 있다. 박테리아에서의 항체의 발현 단편 및 폴리펩타이드를 위해, 예를 들면, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호, 및 제5,840,523호를 참조한다. (또한 대장균에서의 항체 단편의 발현을 기술하고 있는, Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254를 참조한다). 발현 후, 항체는 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고 추가 정제될 수 있다.

원핵생물 외에도, 사상균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 항체-인코딩 벡터를 위한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 이는 당화 경로가 "인간화된" 진균 및 호모 균주를 포함하여 부분적으로 또는 완전히 인간 당화 패턴을 갖는 항체의 생산을 야기한다. 문헌[Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li 등, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

당화된 항체의 발현을 위한 적합한 숙주세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포도프테라 프루지페르다(Spodoptera frugiperda) 세포의 형질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 수많은 배큘로바이러스 균주가 확인되어 왔다.

식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들면, US 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호, 및 제6,417,429호(형질전환 식물에서 항체를 생산하는 PLANTIBODIES™ 기술을 기술하고 있음)를 참조한다.

척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하도록 개조된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(예를 들면, Graham 등, J. Gen Virol. 36:59 (1977)에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 어린 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예를 들면, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA); 갯과 신장 세포(MDCK; 버팔로 랫트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); 예를 들면, Mather 등, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주세포주는 DHFR^{-} CHO 세포를 포함하는, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(Urlaub 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 어떤 포유동물 숙주세포주의 검토를 위해, 예를 들면, 문헌[Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

C. 검정

본원에서 제공된 항-PMEL17 항체는 본 기술분야에 공지된 다양한 분석에 의해 그의 물리적 /화학적 특성 및/또는 생물학적 활성이 확인되거나, 스크리닝되거나 규명될 수 있다.

일 측면에서, 본 발명의 항체는, 예를 들면, ELISA, BIACore®, FACS, 또는 웨스턴 블랏과 같은 공지된 방법에 의해 그의 항원 결합 활성이 시험된다.

또 하나의 측면에서, 경쟁 분석이 PMEL17에 결합하는 것에 대하여 본원에 기재된 임의의 항체와 경쟁하는 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 그러한 경쟁하는 항체는 본원에 기재된 항체가 결합하는 동일한 에피토프(예를 들면, 선형 또는 형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하기 위한

상세한 예시적인 방법은 문헌[Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ]에 제시되어 있다.

예시적인 경쟁 분석에서, 고정된 PMEL17은 PMEL17에 결합하는 제1 표지된 항체(예를 들면, 본원에서 기재된 항체 중 어느 것) 및 PMEL17에의 결합에 대해 제1항체와 경쟁하는 그 능력이 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액에서 배양된다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액 내에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 PMEL17은 제1 표지된 항체를 포함하지만 제2 비표지된 항체를 포함하지 않는 용액에서 배양된다. 제1 항체를 PMEL17에 결합하는 것을 허용하는 조건 하에서 배양 후, 과량의 미결합된 항체는 제거되고, 고정된 PMEL17과 회합된 표지의 양이 측정된다. 만약 고정된 PMEL17과 회합된 표지의 양이 대조군 샘플과 비교하여 시험 샘플에서 실질적으로 감소되면, 이는 제2 항체가 PMEL17에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하고 있다는 것을 가리킨다. 문헌[Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.

D. 면역접합체

본 발명은 또한, 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학치료제 또는 약물, 성장 억제, 독소(예를 들면, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소(즉, 방사선접합체)에 접합된 본원에서의 항-PMEL17 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

면역접합체는 종양으로의 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 일부 구현예에서 그 안에서의 세포내 축적을 가능하게 하며, 여기서 비접합된 약물의 전신 투여는 정상 세포에게 허용가능하지 않은 수준의 독성을 야기할 수 있다(Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387).

항체-약물 접합체(ADC)는 항원-발현 종양 세포에 강력한 세포독성 약물을 표적화함으로써 항체 및 세포독성 약물 둘의 특성을 조합하고(Teicher, B.A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004), 이로써 효능을 최대화하고 부정확한 독성을 최소화함으로써 치료 지수를 향상시키는, 표적화된 화학치료 분자이다(Carter, P.J. and Senter P.D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107.

본 발명의 ADC 화합물은 항암 활성을 갖는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ADC 화합물은 약물 모이어티에 접합된, 즉 공유결합된 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 링커를 통해 약물 모이어티에 공유결합된다. 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)는 유효량의 약물을 종양 조직에 선택적으로 전달하며 그에 의하여 치료 지수("치료 윈도우")를 증가시키면서 더 큰 선택성, 즉 더 낮은 유효한 용량이 달성될 수 있다.

항체-약물 접합체(ADC)의 약물 모이어티(D)는 세포독성 또는 세포정지성 효과를 갖는 임의의 화합물, 모이어티 또는 그룹을 포함할 수 있다. 약물 모이어티는 비제한적으로 튜불린 결합, DNA 결합 또는 삽입, 및 RNA 중합효소의 억제, 단백질 합성, 및/또는 토포이소머라제를 포함하는 기전에 의해 그의 세포독성 및 세포정지성 효과를 부여할 수 있다. 예시적인 약물 모이어티는, 비제한적으로, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀(PBD), 네모루비신 및 그의 유도체, PNU-159682, 안트라사이클린, 듀오카르마이신, 빈카 알카로이드, 탁산, 트리코세텐, CC1065, 캄프토테신, 엘리나파이드, 및 입체이성질체, 등배체, 유사체, 및 세포독성 활성을 갖는 그의 유도체를 포함한다. 그와 같은 면역접합체의 비제한적인 예는 하기에서 추가로 상세히 논의된다.

1. 예시적인 항체-약물 콘주게이트

항체-약물 콘주게이트 (ADC) 화합물의 예시적인 구현예는 종양 세포, 약물 모이어티 (D), 및 Ab를 D에 부착시키는 링커 모이어티 (L)을 표적으로 하는 항체 (Ab)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 라이신 및/또는 시스테인을 통해 링커 모이어티 (L)에 부착된다.

예시적인 ADC는 하기 식 I을 갖는다:

$$Ab-(L-D)_p \qquad \mathbf{I}$$

여기서 p는 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, 항체에 접합될 수 있는 약물 모이어티의 수는 유리 시스테인 잔기의 수에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, 유리 시스테인 잔기는 본원에서 기재된 방법에 의해 항체 아미노산 서열에 도입된다. 예시적인 식 I의 ADC는 1, 2, 3, 또는 4 개의 조작된 시스테인 아미노산을 갖는 항체를 비제한적으로 포함한다 (Lyon, R. 등 (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). 일부 구현예에서, 하나 이상의 유리 시스테인 잔기는 조작의 사용 없이 항체에 이미 존재하고, 이 경우에 현존하는 유리 시스테인 잔기는 항체를

약물에 콘주게이트시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 하나 이상의 유리 시스테인 잔기를 생성하기 위해 항체의 콘주게이션 전에 환원 조건에 노출된다.

a) 예시적인 링커

"링커" (L)은 하나 이상의 약물 모이어티 (D)를 항체 (Ab)에 연결하여 식 I의 항체-약물 콘주게이트 (ADC)를 형성하도록 사용될 수 있는 이관능성 또는 다관능성 모이어티이다. 일부 구현예에서, 항체-약물 콘주게이트 (ADC)는 약물 및 항체에 공유결합하기 위한 반응성 관능기를 갖는 링커를 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 항체 (Ab)의 시스테인 티올은 ADC를 만들기 위해 링커 또는 약물-링커 중간체의 반응성 관능 그룹을 갖는 결합을 형성할 수 있다.

일 측면에서, 링커는 공유 결합을 형성하기 위해서 항체 상에 존재하는 유리 시스테인과 반응할 수 있는 관능기를 갖는다. 비제한 예시적인 그와 같은 반응성 관능기는 말레이마이드, 할로아세트아미드, α-할로아세틸, 활성화된 에스테르 예컨대 석신이마이드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 클로라이드, 설포닐 클로라이드, 이소시아네이트, 및 이소티오시아네이트를 포함한다. 참고, 예를 들면, Klussman, 등 (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773의 페이지 766의 콘주게이션 방법, 및 본원의 실시예를 참고한다.

일부 구현예에서, 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 그룹과 반응할 수 있는 관능기를 갖는다. 예시적인 그와 같은 친전자성 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 알데하이드 및 케톤 카보닐 그룹. 일부 구현예에서, 링커의 반응성 관능기의 헤테로원자는 항체 상의 친전자성 그룹과 반응할 수 있고 항체 단위에 대한 공유 결합을 형성할 수 있다. 비제한 예시적인 그와 같은 반응성 관능기는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 하이드라자이드, 옥심, 아미노, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진 카복실레이트, 및 아릴하이드라자이드.

링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분은 하기를 포함한다: 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카보닐 ("PAB"), N-석신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), 및 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1 카복실레이트 ("MCC"). 다양한 링커 성분은 당해기술에 공지되어 있고, 이것의 일부는 이하에 기재되어 있다.

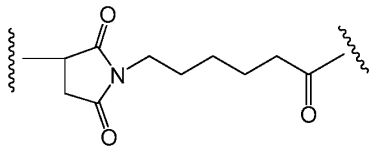
링커는 약물의 방출을 촉진하는 "절단가능 링커"일 수 있다. 비제한 예시적인 절단가능 링커는 산-불안정한 링커 (예를 들면, 하이드라존 포함), 프로테아제-민감성 (예를 들면, 펩티다아제-민감성) 링커, 광불안정한 링커, 또는 디설파이드-함유 링커를 포함한다 (Chari 등, Cancer Research 52:127-131 (1992); US 5208020).

어떤 구현예에서, 링커는 하기의 식 II를 갖는다:

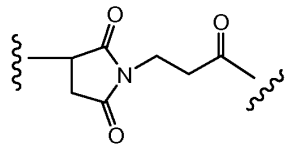
$$—A_a—W_w—Y_y— \qquad \text{II}$$

여기서 A는 "확대기 단위"이고, 정수 0 내지 1이고; W는 "아미노산 단위"이고, w는 정수 0 내지 12이고; Y는 "스페이서 단위"이고, y는 0, 1, 또는 2이고; Ab, D, 및 p는 식 I에 대해 상기와 같이 규정된다. 그와 같은 링커의 예시적인 구현예는 미국 특허 번호 7,498,298에서 기재되어 있고, 이것은 명확히 본원에 참조로 편입되어 있다.

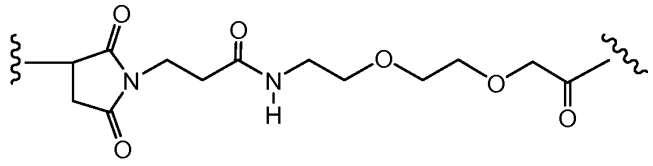
일부 구현예에서, 링커 성분은 항체를 또 하나의 링커 성분 또는 약물 모이어티에 연결하는 "확대기 단위"를 포함한다. 비제한 예시적인 확대기 단위는 하기에서 보여진다 (상기 물결선은 항체, 약물, 또는 추가의 링커 성분에 대한 공유결합의 부위를 나타낸다):



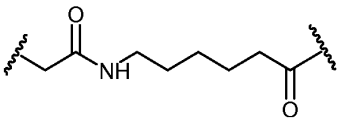
MC



MP



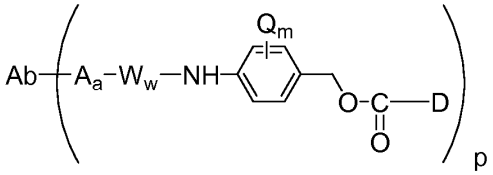
mPEG



일부 구현예에서, 링커 성분은 "아미노산 단위"를 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 아미노산 단위은 프로테아제에 의한 링커의 절단을 허용하고, 그렇게 함으로써 세포내 프로테아제, 예컨대 용해소체 효소에의 노출시 면역접합체로부터 약물의 방출을 용이하게 한다 (Doronina 등 (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784). 예시적인 아미노산 단위는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드, 및 펜타펩타이드. 예시적인 디펩타이드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-라이신 (fk 또는 phe-lys); 페닐알라닌-호모라이신 (phe-homolys); 및 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit). 예시적인 트리펩타이드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly). 아미노산 단위는 천연적으로 및/또는 작은 아미노산 및/또는 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 생기게하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 아미노산 단위는 특정한 효소, 예를 들면, 종양-연관된 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의해 효소 절단을 위해 설계 및 최적화될 수 있다.

일부 구현예에서, 링커 성분은 직접적으로 또는 확대기 단위 및/또는 아미노산 단위를 통해 항체를 약물 모이어티에 연결하는 "스페이서" 단위를 포함한다. 스페이서 단위는 "자기-희생" 또는 "비-자기-희생"일 수 있다. "비-자기-희생" 스페이서 단위는, 일부 또는 모든 스페이서 단위가 ADC의 절단 시 약물 모이어티에 결합된 채로 있는 것이다. 비-자기-희생 스페이서 단위의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위. 일부 구현예에서, 종양-세포 연관된 프로테아제에 의한, 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 ADC의 효소 절단으로 ADC의 나머지로부터 글리신-글리신-약물 모이어티를 방출한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 글리신-글리신-약물 모이어티에 대해 종양 세포에서 가수분해 단계가 수행되고, 따라서 글리신-글리신 스페이서 단위를 약물 모이어티로부터 절단한다.

"자기-희생" 스페이서 단위는 약물 모이어티의 방출을 허용한다. 어떤 구현예에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, p-아미노벤질 알코올은 아마이드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되고, 카바메이트, 메틸카바메이트, 또는 카보네이트는 벤질 알코올 및 약물 사이에서 만들어진다 (Hamann 등 (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103). 일부 구현예에서, 스이서 단위는 p-아미노벤질옥시카보닐 (PAB)이다. 일부 구현예에서, 자기-희생 링커를 포함하는 ADC는 하기 구조를 갖는다:

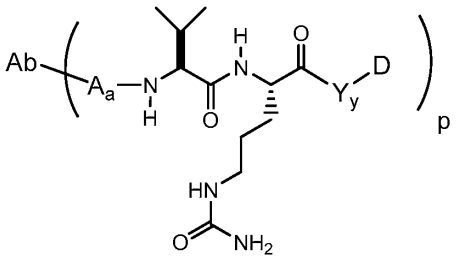


여기서 Q는 -C_1-C_8 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -할로겐, -니트로, 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4 범위의 정수이고; p 범위 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, p 범위 1 내지 10, 1 내지 7, 1 내지 5, 또는 1 내지 4이다.

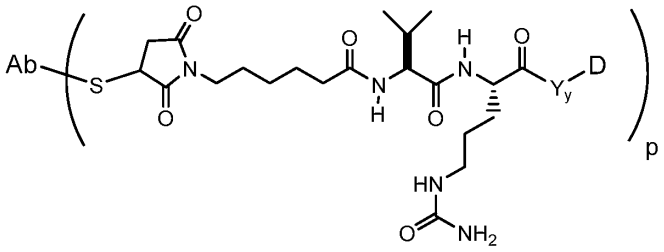
자기-희생 스페이서의 다른 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: PAB 그룹과 전자적으로 유사한 방향족 화합물, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (미국 특허 번호 7,375,078; Hay 등 (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 9:2237) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈. 일부 구현예에서, 아마이드 결합 가수분해시 고리화를 경험하는 스페이서, 예컨대 치환된 및 비치환된 4-아미노부티르산 아마이드 (Rodrigues 등 (1995) *Chemistry Biology* 2:223), 적절하게 치환된 바이사이클로[2.2.1] 및 바이사이클로[2.2.2] 고리계 (Storm 등 (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 (Amsberry, 등 (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867)가 사용될 수 있다. 약물의 글리신 잔기의 α-탄소에의 연결은 ADC에서 유용할 수 있는 자기-희생 스페이서의 또 하나의 예이다 (Kingsbury 등 (1984) *J. Med. Chem*. 27:1447).

일부 구현예에서, 링커 L은 분지화, 다관능성 링커 모이어티를 통해 항체에 대한 하나 초과의 약물 모이어티의 공유 결합을 위한 수지상 유형 링커일 수 있다 (Sun 등 (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun 등 (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). 수지상 링커는 ADC의 효능과 관련된 약물 대 항체의 몰비를 증가시킬 수 있다. 따라서, 항체가 단 하나의 반응성 시스테인 티올 그룹을 보유하는 경우에, 다수의 약물 모이어티는 수지상 링커를 통해 부착될 수 있다.

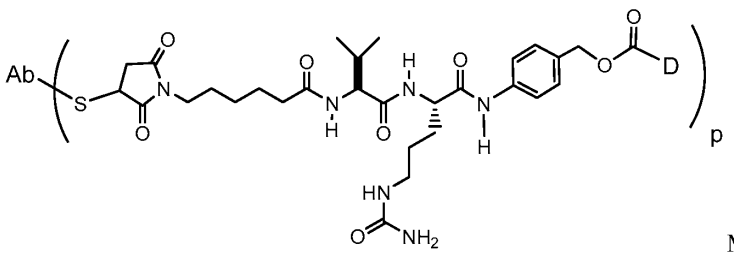
비제한 예시적인 링커는 식 I의 ADC의 문맥에서 이하에서 보여진다:



val-cit

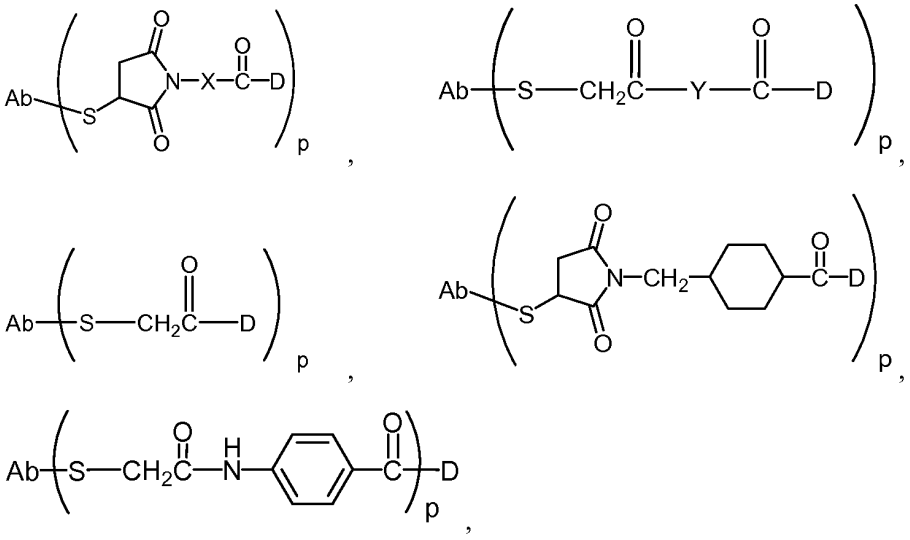


MC-val-cit

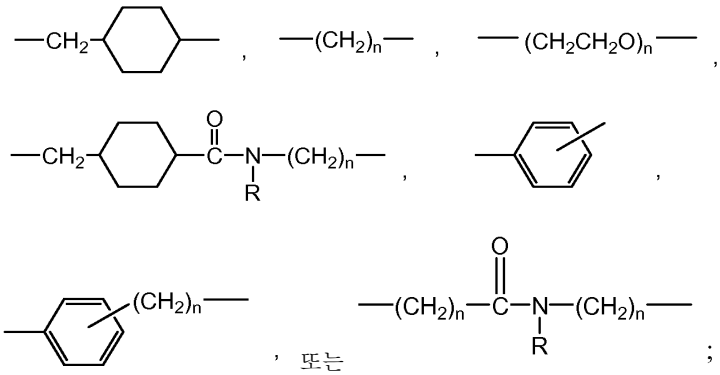


MC-val-cit-PAB

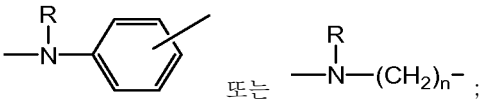
추가 비제한 예시적인 ADC는 하기 구조를 포함한다:



여기서 X는 하기이고:



Y는 하기이다:



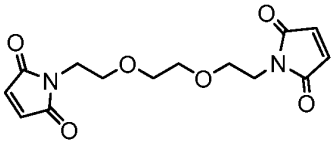
각각의 R은 독립적으로 H 또는 C_1-C_6 알킬이고; n은 1 내지 12이다.

전형적으로, 펩타이드-유형 링커는 2 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편 사이의 펩타이드 결합을 형성하여 제조될 수 있다. 그와 같은 펩타이드 결합은, 예를 들면, 액체상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다 (예를 들면, E. Schröder 및 K. Lübke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press).

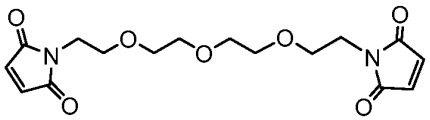
일부 구현예에서, 링커는 용해도 및/또는 반응성을 조절하는 그룹으로 치환된다. 비제한적인 예로서, 충전된 치환체 예컨대 설포네이트 ($-SO_3^-$) 또는 암모늄은 ADC를 제조하기 위해 이용된 합성 경로에 따라 링커 시약의 수용해도를 증가시키고 링커 시약과 항체 및/또는 약물 모이어티와의 커플링 반응을 용이하게 하거나, Ab-L (항체-링커 중간체)와, Ab를 갖는 D, 또는 D-L (약물-링커 중간체)와의 커플링 반응을 용이하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커의 부분은 항체에 커플링되고 링커의 부분은 약물에 커플링되고, 그 다음 Ab-(링커부)^{a}는 약물-(링커부)^b 에 커플링되어 식 I의 ADC를 형성한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 항체는 하나 초과의 (링커부)^a 치환체를 포함하고, 이로써 하나 초과의 약물은 식 I의 ADC에서 항체에 커플링된다.

본 발명의 화합물은 명확히 하기로 ADC를 비제한적으로 포함한다: 링커 시약: 비스-말레이미도-트리옥시에틸렌

글리콜 (BMPEO), N-(β-말레이미도프로필옥시)-N-하이드록시 석신이마이드 에스테르 (BMPS), N-(ε-말레이미도카프로일옥시) 석신이마이드 에스테르 (EMCS), N-[γ-말레이미도부티릴옥시]석신이마이드 에스테르 (GMBS), 1,6-헥산-비스-비닐설폰 (HBVS), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복시-(6-아미도카프로에이트) (LC-SMCC), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이마이드 에스테르 (MBS), 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 하이드라자이드 (MPBH), 석신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP), 석신이미딜 아이오도아세테이트 (SIA), 석신이미딜 (4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트 (SIAB), N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), N-석신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP), 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (SMPB), 석신이미딜 6-[(베타-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트] (SMPH), 이미노티올란 (IT), 설포-EMCS, 설포-GMBS, 설포-KMUS, 설포-MBS, 설포-SIAB, 설포-SMCC, 및 설포-SMPB, 및 석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트 (SVSB), 및 비스-말레이마이드 시약: 디티오비스말레이미도에탄 (DTME), 1,4-비스말레이미도부탄 (BMB), 1,4 비스말레이미딜-2,3-디하이드록시부탄 (BMDB), 비스말레이미도헥산 (BMH), 비스말레이미도에탄 (BMOE), $BM(PEG)_2$ (이하에서 보여짐), 및 $BM(PEG)_3$ (이하에서 보여짐); 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디석신이미딜 우베레이트), 알데하이드 (예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디나이트로벤젠). 일부 구현예에서, 비스-말레이마이드 시약은 항체 중 시스테인의 티올 그룹의 티올-함유 약물 모이어티, 링커, 또는 링커-약물 중간체에의 부착을 허용한다. 티올 그룹과 반응하는 다른 관능 그룹은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아이오도아세트아마이드, 브로모아세트아마이드, 비닐 피리딘, 디설파이드, 피리딜 디설파이드, 이소시아네이트, 및 이소티오시아네이트.



$BM(PEG)_2$



$BM(PEG)_3$

어떤 유용한 링커 시약은 하기의 예와 같은 다양한 상업적 공급원: Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)으로부터 수득될 수 있거나, 하기의 예와 같이 당해기술에서 기재된 절차에 따라 합성될 수 있다: Toki 등 (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; Dubowchik, 등 (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355; Frisch 등 (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 및 WO 04/032828.

탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)는 방사선뉴클레오타이드의 항체에의 콘주게이션에 대한 예시적인 킬레이트제이다. 참고, 예를 들면, WO94/11026.

b) 예시적인 약물 모이어티

(1) 마이탄신 및 메이탄시노이드

일부 구현예에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 항체를 포함한다. 메이탄시노이드는 마이탄신의 유도체이고, 튜불린 중합을 억제하여 작용하는 유사분열 억제제이다. 마이탄신은 동아프리카 관목 메이테너스 세라타로부터 먼저 단리되었다 (미국 특허 번호 3896111). 차후에, 어떤 미생물은 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시노이드는, 예를 들면, 하기에서 개시되어 있다: 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533.

메이탄시노이드 약물 모이어티가 항체-약물 콘주게이트 중 매력적인 약물 모이어티인 것은, 하기이기 때문이다: (i) 발효 생성물의 발효 또는 화학적 변형 또는 유도체화에 대해 비교적으로 접근가능하고, (ii) 항체에의 비-디설파이드 링커를 통한 콘주게이션에 적당한 관능 그룹에 의한 유도체화를 잘 받아들이고, (iii) 혈장에서 안

정하고, 및 (iv) 다양한 종양 세포주에 대항하여 효과적이다.

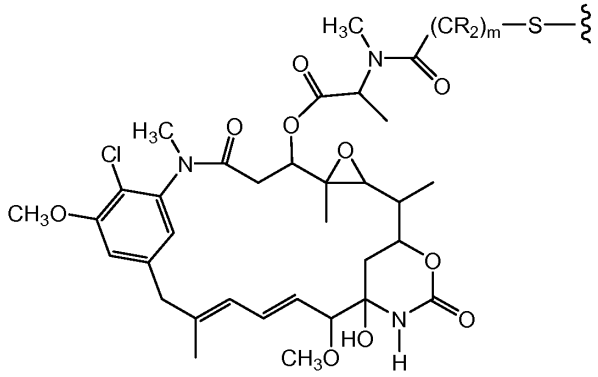
메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기에 적당한 어떤 메이탄시노이드는 당해기술에 공지되어 있고 공지된 방법에 따라 천연 공급원으로부터 단리되거나 유전공학 기술을 사용하여 생산될 수 있다 (참고, 예를 들면, Yu 등 (2002) PNAS 99:7968-7973). 메이탄시노이드는 또한 공지된 방법에 따라 합성으로 제조될 수 있다.

예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 변형된 방향족 고리를 갖는 것들, 예컨대: C-19-데클로로 (미국 특허 번호 4256746) (예를 들면, 안사미토신 P2의 리튬 알루미늄 하이드라이드 환원에 의해 제조됨); C-20-하이드록시 (또는 C-20-데메틸) +/-C-19-데클로로 (미국 특허 번호 4361650 및 4307016) (예를 들면, *스트렙토마이세스* 또는 *악티노마이세스*를 사용하는 데메틸화 또는 LAH를 사용하는 탈염소화에 의해 제조됨); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/-데클로로 (미국 특허 번호 4,294,757) (예를 들면, 아실 클로라이드를 사용하는 아실화에 의해 제조됨), 및 방향족 고리의 다른 위치에서의 변형을 갖는 것들.

예시적인 메이탄시노이드 약물 모이어티는 또한 하기를 포함한다: 변형을 갖는 것들 예컨대: C-9-SH (미국 특허 번호 4424219) (예를 들면, 메이탄시놀과 H_2S 또는 P_2S_5와의 반응에 의해 제조됨); C-14-알콕시메틸(데메톡시/CH_2 OR)(US 4331598); C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (미국 특허 번호 4450254) (예를 들면, 노카르디아로부터 제조됨); C-15-하이드록시/아실옥시 (US 4364866) (예를 들면, 스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조됨); C-15-메톡시 (미국 특허 번호 4313946 및 4315929) (예를 들면, 트레위아 루디플로라로부터 단리됨); C-18-N-데메틸 (미국 특허 번호 4362663 및 4322348) (예를 들면, 스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 데메틸화에 의해 제조됨); 및 4,5-데옥시 (US 4371533) (예를 들면, 메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조됨).

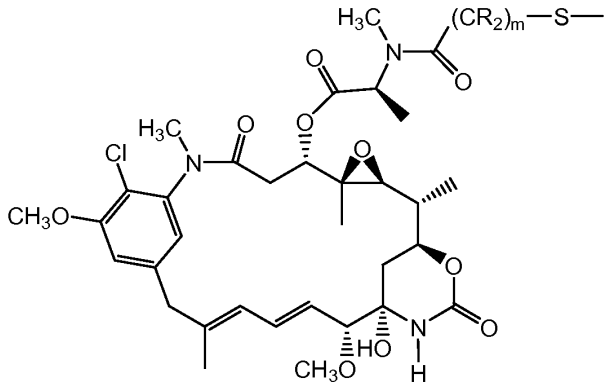
메이탄시노이드 화합물 상의 많은 위치는 연결 위치로서 유용하다. 예를 들면, 에스테르 연결은 종래의 커플링 기술을 사용하여 하이드록실과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 반응은 하이드록실 그룹을 갖는 C-3 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 하이드록실 그룹으로 변형된 C-15 위치, 및 하이드록실 그룹을 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 일부 구현예에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

메이탄시노이드 약물 모이어티는 하기 구조를 갖는 것을 포함한다:

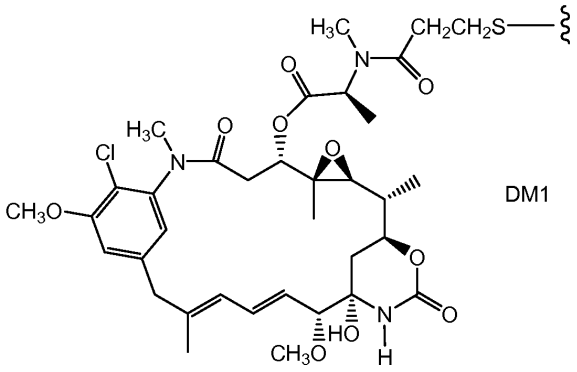


여기서 물결선은 메이탄시노이드 약물 모이어티의 황 원자의 ADC의 링커에의 공유 결합을 나타낸다. 각각의 R은 독립적으로 H 또는 C_1-C_6 알킬일 수 있다. 아마이드 그룹을 황 원자에 부착하는 알킬렌 사슬은 메타닐, 에타닐, 또는 프로필일 수 있고, 즉, m은 1, 2, 또는 3이다 (US 633410; US 5208020; Chari 등 (1992)는 can*cer Res.* 52:127-131; Liu 등 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623).

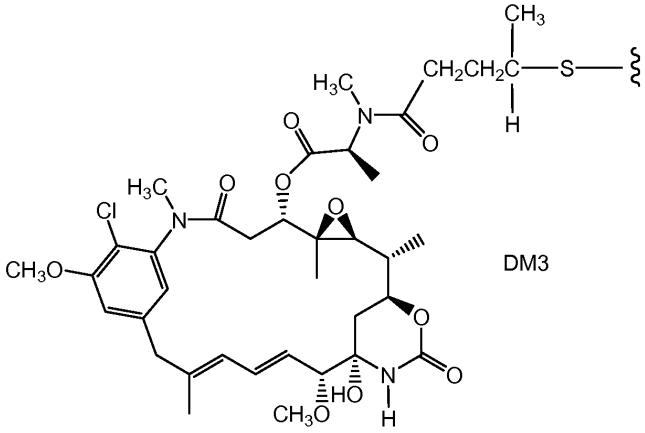
메이탄시노이드 약물 모이어티의 모든 입체이성질체는 본 발명의 ADC, 즉 키랄 탄소에서의 *R* 및 *S* 배치의 임의의 조합에 대해 고려된다 (US 7276497; US 6913748; US 6441163; US 633410 (RE39151); US 5208020; Widdison 등 (2006) J. Med. Chem. 49:4392-4408, 이것은 그 전체가 참조로 편입되어 있음). 일부 구현예에서, 메이탄시노이드 약물 모이어티는 하기의 입체화학을 갖는다:



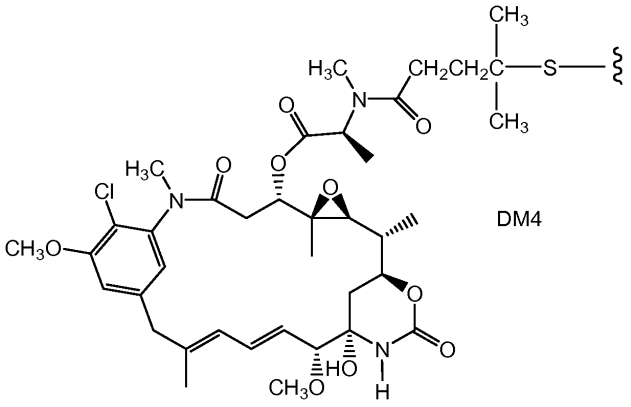
메이탄시노이드 약물 모이어티의 예시적인 구현예는 하기 구조를 갖는 DM1; DM3; 및 DM4를 비제한적으로 포함한다:



DM1



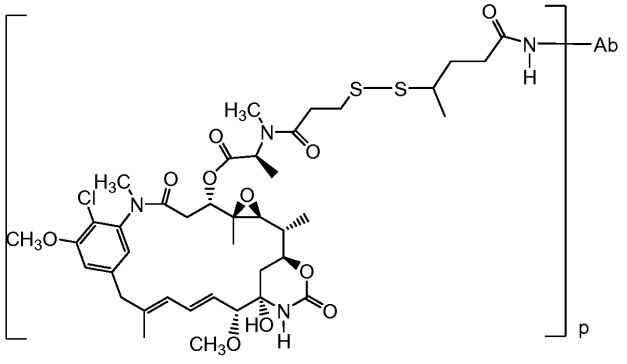
DM3



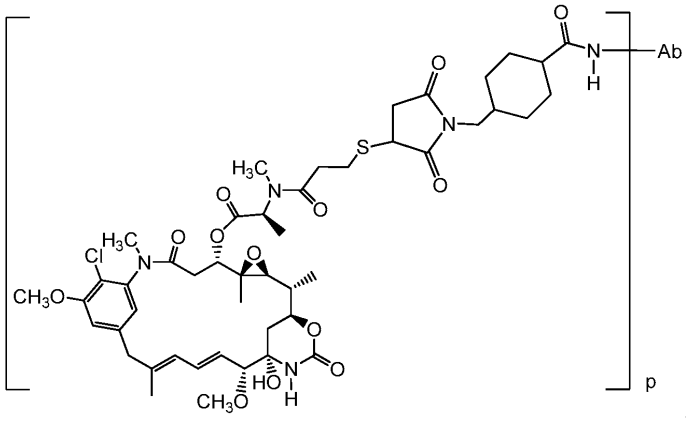
DM4

상기 물결선은 약물의 황 원자의 항체-약물 콘주게이트의 링커 (L)에의 공유 결합을 나타낸다.

다른 예시적인 메이탄시노이드 항체-약물 콘주게이트는 하기의 구조 및 약어를 갖는다 (여기서 Ab는 항체 및 p는 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, p는 1 내지 10, p는 1 내지 7, p는 1 내지 5, 또는 p는 1 내지 4임):

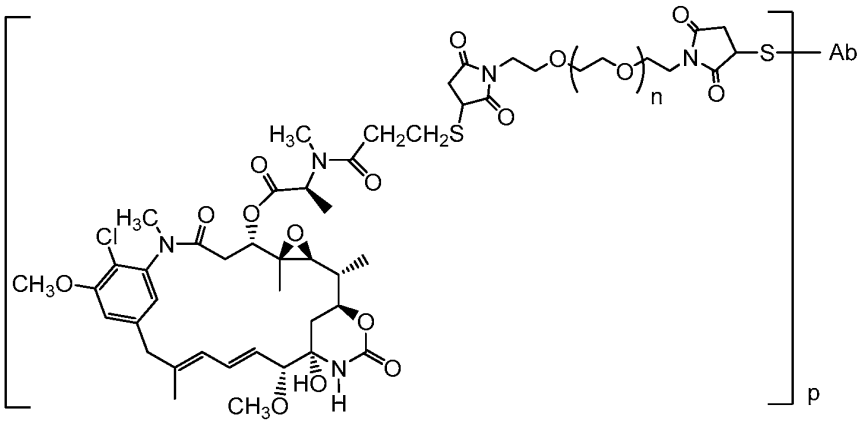


Ab -SPP-DM1



Ab-SMCC-DM1

DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티올 그룹에 연결된 예시적인 항체-약물 콘주게이트는 구조 및 약어를 갖는다:



여기서 Ab는 항체이고; n은 0, 1, 또는 2이고; p는 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, p는 1 내지 10, p는 1 내지 7, p는 1 내지 5, 또는 p는 1 내지 4이다.

메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 이 면역접합체를 제조하는 방법, 및 그의 치료 용도는, 예를 들면, 하기에서 개시되어 있다: 미국 특허 번호 5,208,020 및 5,416,064; US 2005/0276812 A1; 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1, 그의 개시내용은 명확히 참조로 본원에 편입되어 있다. 또한 하기를 참조한다: Liu 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996); 및 Chari 등 *Cancer Research* 52:127-131 (1992).

일부 구현예에서, 항체-메이탄시노이드 콘주게이트는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의미하게 줄이지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결하여 제조될 수 있다. 참고, 예를 들면,

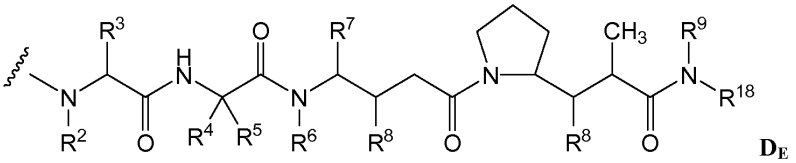
미국 특허 번호 5,208,020 (그의 개시내용은 명확히 참조로 편입되어 있음). 일부 구현예에서, 항체 분자 당 접합된 3-4 개의 메이탄시노이드 분자의 평균을 갖는 ADC는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적으로 영향을 주지 않으면서 표적 세포의 세포독성을 향상시키는 효능을 가졌다. 일부 예에서, 독소/항체의 하나의 분자조차도 기존의 항체의 사용 동안에 세포독성을 향상시키는 것으로 기대된다.

항체-메이탄시노이드 콘주게이트을 제조하는 예시적인 연결 그룹은, 예를 들면, 본원에서 기재된 것들 및 하기에서 개시된 것을 포함한다: 미국 특허 번호 5208020; EP 특허 0 425 235 B1; Chari 등 Cancer Research 52:127-131 (1992); US 2005/0276812 A1; 및 US 2005/016993 A1, 그의 개시내용은 명확히 참조로 본원에 편입되어 있다.

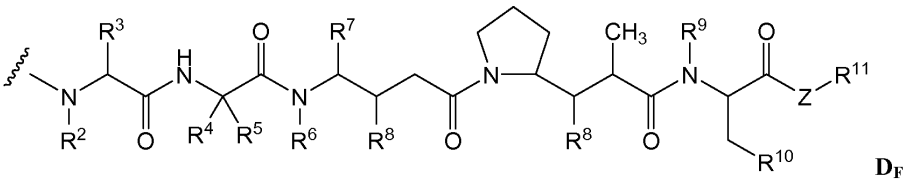
(2) 아우리스타틴 및 돌라스타틴

약물 모이어티는 돌라스타틴, 아우리스타틴, 및 유사체 및 그의 유도체를 포함한다 (US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431). 아우리스타틴은 해양 연체동물화합물 돌라스타틴-10의 유도체이다. 임의의 특정한 이론에 의해 구속되는 것으로 의도되지 않으면서, 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세소관 동력학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포성 분할 (Woyke 등 (2001) *Antimicrob. Agents 및 Chemother.* 45(12):3580-3584)에 개입하고 항암 (US 5663149) 및 항진균 활성 (Pettit 등 (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)을 갖는 것으로 보여졌다. 돌라스타틴/아우리스타틴 약물 모이어티는 펩타이드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172; Doronina 등 (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco 등 (2003) *Blood* 102(4):1458-1465).

예시적인 아우리스타틴 구현예는 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F를 포함하고, 이것은 US 7498298 및 US 7659241에서 개시되어 있고, 그의 개시내용은 그 전체가 참조로 명확히 편입되어 있다:



D_E



D_F

여기서 D_E 및 D_F의 상기 물결선은 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유 결합 부위를 나타내고, 독립적으로 각 위치에서:

R^2은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;

R^3은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;

R^4은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;

R^5은 H 및 메틸로부터 선택되고;

또는 R^4 및 R^5는 공동으로 카보사이클릭 고리를 형성하고 식 $-(CR^aR^b)_n-$를 가지며, 여기서 R^a 및 R^b은 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카보사이클로부터 독립적으로 선택되고 n은 2, 3, 4, 5 및 6로부터 선택되고;

R^6은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;

R^7은 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;

각각의 R^8은 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클 및 O-(C_1-C_8 알킬)로부터 독립적으로 선택되고;

R^9은 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;

R^{10}은 아릴 또는 C_3-C_8 헤테로사이클로부터 선택되고;

Z는 O, S, NH, 또는 NR^{12}이고, 여기서 R^{12}는 C_1-C_8 알킬이고;

R^{11}은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$로부터 선택되고;

m은 1-1000 범위의 정수이고;

R^{13}는 C_2-C_8 알킬이고;

R^{14}는 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;

각 경우의 R^{15}은 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;

각 경우의 R^{16}은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, 또는 $-(CH_2)_n-COOH$이고;

R^{18}은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$아릴, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$(C_3-C_8 헤테로사이클), 및 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$(C_3-C_8 카보사이클)로부터 선택되고;

n은 0 내지 6 범위의 정수이다.

일 구현예에서, R^3, R^4 및 R^7는 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고 R^5는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 구현예에서, R^3 및 R^4 각각은 이소프로필이고, R^5는 -H이고, R^7은 sec-부틸이다.

또 하나의 구현예에서, R^2 및 R^6 각각은 메틸이고, R^9는 -H이다.

또 하나의 구현예에서, 각 경우의 R^8은 $-OCH_3$이다.

예시적인 구현예에서, R^3 및 R^4 각각은 이소프로필이고, R^2 및 R^6 각각은 메틸이고, R^5는 -H이고, R^7은 sec-부틸, 각 경우의 R^8은 $-OCH_3$, 및 R^9는 -H이다.

일 구현예에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.

일 구현예에서, R^{10}은 아릴이다.

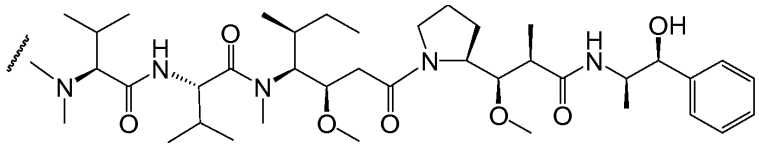
예시적인 구현예에서, R^{10}은 -페닐이다.

예시적인 구현예에서, Z가 -O-일 때, R^{11}은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.

일 구현예에서, Z가 -NH일 때, R^{11}은 $-CH(R^{15})_2$이고, 여기서 R^{15}는 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$이고, R^{16}은 $-C_1$-C_8 알킬 또는 $-(CH_2)_n-COOH$이다.

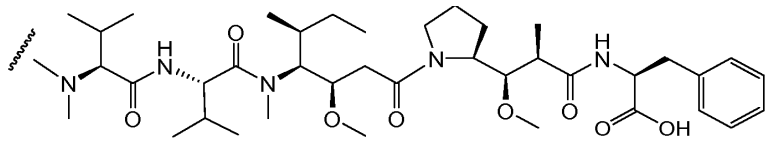
또 하나의 구현예에서, Z가 -NH일 때, R^{11}은 $-CH(R^{15})_2$이고, 여기서 R^{15}는 $-(CH_2)_n-SO_3H$이다.

식 D_E의 예시적인 아우리스타틴 구현예는 MMAE이고, 상기 물결선은 항체-약물 콘주게이트의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다:



MMAE

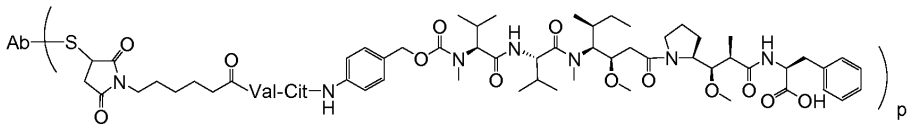
식 D_F의 예시적인 아우리스타틴 구현예는 MMAF이고, 상기 물결선은 항체-약물 콘주게이트의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다:



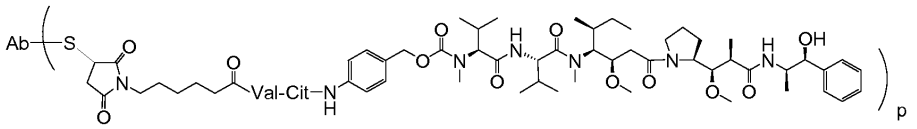
MMAF

다른 예시적인 구현예는 펜타펩타이드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에서 페닐알라닌 카복시 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물 (WO 2007/008848) 및 펜타펩타이드 아우리스타틴 약물 모이어티의 C-말단에서 페닐알라닌 측쇄 변형을 갖는 모노메틸발린 화합물 (WO 2007/008603)을 포함한다.

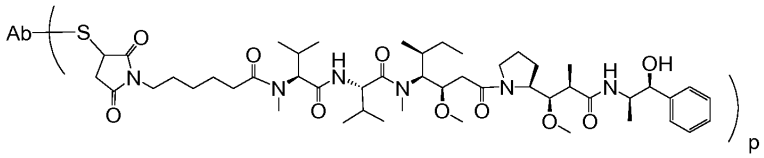
MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 식 I의 ADC의 비제한 예시적인 구현예는 하기의 구조 및 약어를 갖는다 (여기서 "Ab"는 항체이고; p는 1 내지 약 8이고, "Val-Cit"는 발린-시트룰린 디펩타이드이고; "S"는 황 원자임):



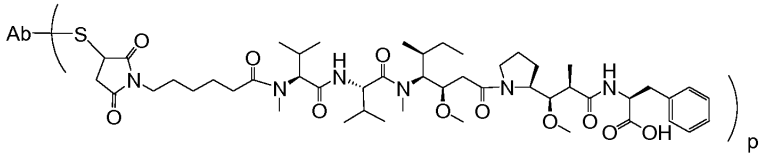
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

MMAF및 다양한 링커 성분을 포함하는 식 I의 ADC의 비제한 예시적인 구현예는 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-

MMAF를 추가로 포함한다. 단백분해로 절단가능하지 않은 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는 단백분해로 절단가능 링커에 의해 항체 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체이 비교할만한 활성을 갖는 것으로 보여졌다 (Doronina 등 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124). 일부 그와 같은 구현예에서, 약물 방출은 세포에서 항체 분해에 의해 영향을 받는 것으로 믿어진다.

전형적으로, 펩타이드-기반 약물 모이어티는 2 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편 사이의 펩타이드 결합을 형성하여 제조될 수 있다. 그와 같은 펩타이드 결합은, 예를 들면, 액체상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다 (참고, 예를 들면, E. Schröder 및 K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press). 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는, 일부 구현예에서, 하기의 방법에 따라 제조될 수 있다: US 7498298; US 5635483; US 5780588; Pettit 등 (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit 등 (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., 등 *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit 등 (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5:859-863; 및 Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

일부 구현예에서, 식 D_E의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티 예컨대 MMAE, 및 D_F, 예컨대 MMAF, 및 약물-링커 중간체 및 그의 유도체, 예컨대 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는 하기에서 기재된 방법: US 7498298; Doronina 등 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; 및 Doronina 등 (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784을 사용하여 제조되고 그 다음 관심 항체에 접합될 수 있다.

(3)칼리키아마이신

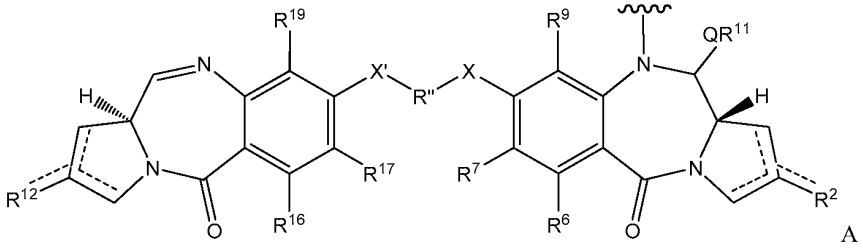
일부 구현예에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리키아마이신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 항생제의 칼리키아마이신 패밀리, 및 그의 유사체는 아-피코몰 농도에서 이중-가닥 DNA 절단을 생산할 수 있다 (Hinman 등, (1993)는 cancer *Research* 53:3336-3342; Lode 등, (1998)는 cancer *Research* 58:2925-2928). 칼리키아마이신은 작용의 세포내 부위를 갖지만, 어떤 예에서, 원형질막을 쉽게 교차하지 못한다. 따라서, 항체-매개된 내면화를 통한 이들 제제들의 세포성 흡수는, 일부 구현예에서, 그의 세포독성 효과를 크게 향상시킨다. 항체-약물 콘주게이트를 칼리키아마이신 약물 모이어티로 제조하는 비제한 예시적인 방법은 예를 들면 하기에서 기재되어 있다: US 5712374; US 5714586; US 5739116; 및 US 5767285.

(4) 피롤로벤조디아제핀

일부 구현예에서, ADC는 피롤로벤조디아제핀 (PBD)을 포함한다. 일부 구현예에서, PDB 이량체는 특이적 DNA 서열을 인식하고 그것에 결합한다. 천연 생성물 안트라마이신인, PBD는 먼저 1965년에 보고되었다 (Leimgruber, 등, (1965) *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5793-5795; Leimgruber, 등, (1965) *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5791-5793). 그때 이래로, 자연 발생 및 유사체 모두인 수많은 PBD가 보고되었다 (Thurston, 등, (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465, 트리사이클릭 PBD 스캐폴드의 이량체를 포함함 (US 6884799; US 7049311; US 7067511; US 7265105; US 7511032; US 7528126; US 7557099). 임의의 특정한 이론에 의해 구속되지 않으면서, 이량체 구조는 B-형 DNA의 작은 홈을 갖는 이소헬리시티에 대해 적절한 3차원 형상을 부여하고, 이로써, 결합 부위에서 꼭끼워 맞추게 된 것으로 믿는다 (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley 및 Needham-VanDevanter, (1986) *Acc. Chem. Res.*, 19:230-237). C2 아릴 치환체를 보유하는 이량체 PBD 화합물은 세포독성 약물로서 유용한 것으로 보여졌다 (Hartley 등 (2010)는 *cancer Res.* 70(17):6849-6858; Antonow (2010) *J. Med. Chem.* 53(7):2927-2941; Howard 등 (2009) *Bioorganic and Med. Chem. Letters* 19(22):6463-6466).

PBD 이량체는 항-암 특성을 갖는 것으로 보여진 항체 및 수득한 ADC에 접합되었다. PBD 이량체 상의 비제한 예시적인 연결 부위는 5-원 피롤로 고리, PBD 단위 사이의 테더(tether), 및 N10-C11 이민 그룹을 포함한다 (WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598).

ADC의 비제한 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A 및 그의 염 및 용매화물이다:



A

여기서:

물결선은 링커에 대한 공유 결합 부위를 나타내고;

점선은 C1과 C2 또는 C2와 C3 사이의 임의 존재의 이중 결합을 나타내고;

R^2은 H, OH, =O, $=CH_2$, CN, R, OR, $=CH-R^D$, $=C(R^D)_2$, $O-SO_2-R$, CO_2R 및 COR로부터 독립적으로 선택되고, 할로 또는 디할로로부터 임의로 추가로 선택되고, 여기서 R^D은 R, CO_2R, COR, CHO, CO_2H, 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

R^6 및 R^9은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

R^7은 H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', NO_2, Me_3Sn 및 할로로부터 독립적으로 선택되고;

Q는 O, S 및 NH로부터 독립적으로 선택되고;

R^{11}은 H, 또는 R이거나, 여기서 Q는 O, SO_3M (여기서 M은 금속 양이온임)이고;

R 및 R' 각각은 임의로 치환된 C_{1-8} 알킬, C_{1-12} 알킬, C_{3-8} 헤테로시클릴, C_{3-20} 헤테로사이클, 및 C_{5-20} 아릴 그룹로부터 독립적으로 선택되고, 및 임의로 그룹 NRR'과 관련하여, R 및 R'은 이들이 부착된 질소 원자와 함께 임의로 치환된 4-, 5-, 6- 또는 7-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

R^{12}, R^{16}, R^{19} 및 R^{17}은 R^2, R^6, R^9 및 R^7 각각 에 대해 규정된 바와 같고;

R"는, 그 사슬이 하나 이상의 헤테로원자, 예를 들면 O, S, N(H), NMe에 의해 방해될 수 있는 C_{3-12} 알킬렌 그룹 및/또는 방향족 고리, 예를 들면 그 고리가 임의로 치환되는 벤젠 또는 피리딘이고;

X 및 X'는 O, S 및 N(H)로부터 독립적으로 선택된다.

일부 구현예에서, R^9 및 R^{19}은 H이다.

일부 구현예에서, R^6 및 R^{16}은 H이다.

일부 구현예에서, R^7 및 R^{17} 둘 모두는 OR^{7A}이고, 여기서 R^{7A}는 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 구현예에서, R^{7A}는 Me이다. 일부 구현예에서, R^{7A}는 Ch_2Ph이고, 여기서 Ph는 페닐 그룹이다.

일부 구현예에서, X는 O이다.

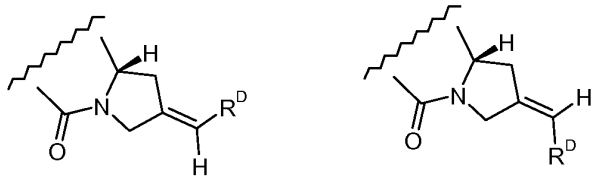
일부 구현예에서, R^{11}은 H이다.

일부 구현예에서, 각각의 모노단위체 단위에서 C2와 C3 사이에 이중결합이 있다.

일부 구현예에서, R^2 및 R^{12}은 H 및 R로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12}는 독립적으로 R이다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12}는 독립적으로 임의로 치환된 C_{5-20} 아릴 또는 C_{5-7} 아릴 또는 C_{8-10} 아릴이다. 일부

구현예에서, R^2 및 R^{12}는 독립적으로 임의로 치환된 페닐, 티에닐, 나프틸, 피리딜, 퀴놀리닐, 또는 이소퀴놀리닐이다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12}은 =O, $=CH_2$, $=CH-R^D$, 및 $=C(R^D)_2$로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12} 각각은 $=CH_2$이다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12} 각각은 H이다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12} 각각은 =O이다. 일부 구현예에서, R^2 및 R^{12} 각각은 $=CF_2$이다. 일부 구현예에서, R^2 및/또는 R^{12}는 독립적으로 $=C(R^D)_2$이다. 일부 구현예에서, R^2 및/또는 R^{12}는 독립적으로 $=CH-R^D$이다.

일부 구현예에서, R^2 및/또는 R^{12}가 $=CH-R^D$일 때, 각 그룹은 독립적으로 하기에서 보여진 배치 중 하나를 가질 수 있다:

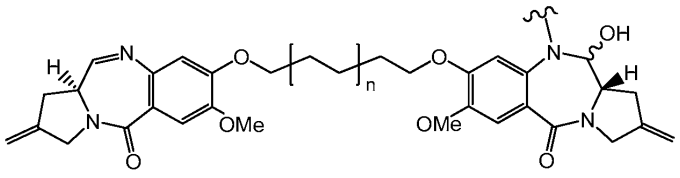


(I) (II)

일부 구현예에서, $=CH-R^D$는 배치 (I)에 있다.

일부 구현예에서, R"는 C_3 알킬렌 그룹 또는 C_5 알킬렌 그룹이다.

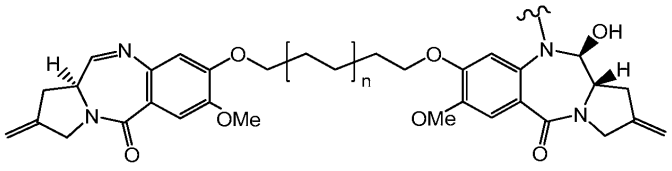
일부 구현예에서, ADC의 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A(I)의 구조를 갖는다:



A(I);

여기서 n은 0 또는 1이다.

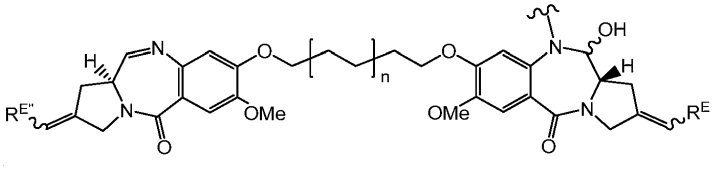
일부 구현예에서, ADC의 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A(II)의 구조를 갖는다:



A(II);

여기서 n은 0 또는 1이다.

일부 구현예에서, ADC의 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A(III)의 구조를 갖는다:



A(III);

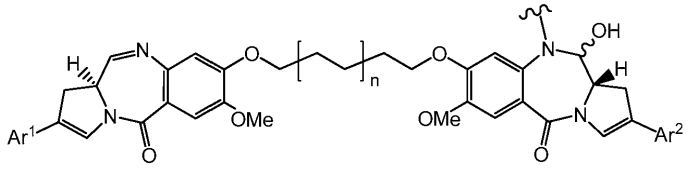
여기서 R^E 및 $R^{E"}$ 각각은 H 또는 R^D로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R^D는 상기와 같이 규정되고;

여기서 n은 0 또는 1이다.

일부 구현예에서, n은 0이다. 일부 구현예에서, n은 1이다. 일부 구현예에서, R^E 및/또는 $R^{E"}$은 H이다. 일부 구

현예에서, R^E 및 $R^{E"}$은 H이다. 일부 구현예에서, R^E 및/또는 $R^{E"}$는 R^D이고, 여기서 R^D는 임의로 치환된 C_{1-12} 알킬이다. 일부 구현예에서, R^E 및/또는 $R^{E"}$는 R^D이고, 여기서 R^D는 메틸이다.

일부 구현예에서, ADC의 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A(IV)의 구조를 갖는다:

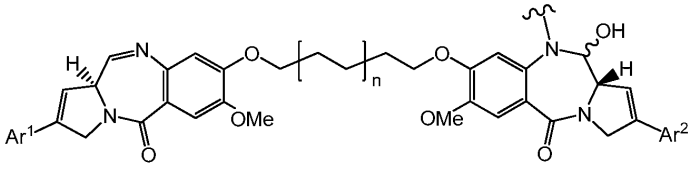


A(IV);

여기서 Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 C_{5-20} 아릴이고; 여기서 Ar^1 및 Ar^2는 동일 또는 상이할 수 있고;

여기서 n은 0 또는 1이다.

일부 구현예에서, ADC의 예시적인 PBD 이량체 성분은 식 A(V)의 구조를 갖는다:



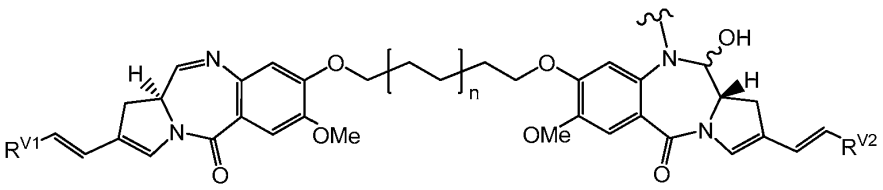
A(V);

여기서 Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 C_{5-20} 아릴이고; 여기서 Ar^1 및 Ar^2는 동일 또는 상이할 수 있고;

여기서 n은 0 또는 1이다.

일부 구현예에서, Ar^1 및 Ar^2 각각은 임의로 치환된 페닐, 푸라닐, 티오페닐 및 피리딜로부터 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 페닐이다. 일부 구현예에서, Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 티엔-2-일 또는 티엔-3-일이다. 일부 구현예에서, Ar^1 및 Ar^2 각각은 독립적으로 임의로 치환된 퀴놀리닐 또는 이소퀴놀리닐이다. 퀴놀리닐 또는 이소퀴놀리닐 그룹은 임의의 이용가능한 고리 위치를 통해 PBD 코어에 결합될 수 있다. 예를 들면, 퀴놀리닐은 퀴놀린-2-일, 퀴놀린-3-일, 퀴놀린-4일, 퀴놀린-5-일, 퀴놀린-6-일, 퀴놀린-7-일 및 퀴놀린-8-일일 수 있다. 일부 구현예에서, 퀴놀리닐은 퀴놀린-3-일 및 퀴놀린-6-일로부터 선택된다. 이소퀴놀리닐은 이소퀴놀린-1-일, 이소퀴놀린-3-일, 이소퀴놀린-4일, 이소퀴놀린-5-일, 이소퀴놀린-6-일, 이소퀴놀린-7-일 및 이소퀴놀린-8-일일 수 있다. 일부 구현예에서, 이소퀴놀리닐은 이소퀴놀린-3-일 및 이소퀴놀린-6-일로부터 선택된다.

추가 ADC의 비제한 예시적인 PBD 이량체 성분 및 그의 염 및 용매화물은 하기의 식 B로 나타낸다:



B

여기서:

물결선은 링커에 대한 공유 결합 부위를 나타내고;

OH에 연결된 물결선은 S 또는 R 배치를 나타내고;

R^{V1} 및 R^{V2}은 H, 메틸, 에틸 및 페닐 (그 페닐은 특히 4 위치에서 플루오로로 임의의 치환될 수 있음) 및 C_{5-6} 헤

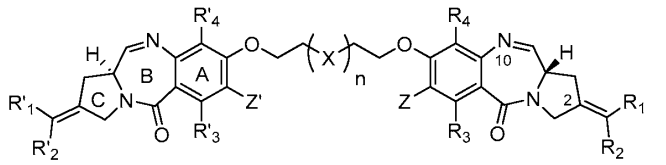
테로시클릴로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 R^{V1} 및 R^{V2}는 동일 또는 상이할 수 있고;

n은 0 또는 1이다.

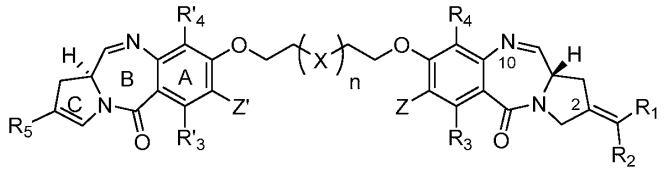
일부 구현예에서, R^{V1} 및 R^{V2}은 H, 페닐, 및 4-플루오로페닐로부터 독립적으로 선택된다.

일부 구현예에서, 링커는 다양한 부위의 PBD 이량체 약물 모이어티의 하나에서 부착될 수 있고, 상기 모이어티는 B 고리의 N10 이민, C 고리의 C-2 엔도/엑소 위치, 또는 A 고리를 연결하는 연결 단위를 포함한다 (이하의 구조 C(I) 및 C(II) 참고).

ADC의 비제한 예시적인 PBD 이량체 성분은 C(I) 및 C(II)을 포함한다:

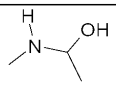
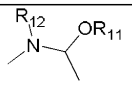


C(I)



C(II)

식 C(I) 및 C(II)는 그의 N10-C11 이민 형태에서 보여진다. 예시적인 PBD 약물 모이어티는 또한 이하의 표에서 보여진 바와 같이 카비놀아민 및 보호된 카비놀아민 형태를 포함한다:

		
이민	카비놀아민	보호된 카보놀아민

여기서:

X는 CH_2 (n = 1 내지 5), N, 또는 O이고;

Z 및 Z'는 OR 및 NR_2로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R은 1 내지 5 개의 탄소 원자를 함유하는 일차, 2차 또는 3차 알킬 사슬이고;

R_1, R'_1, R_2 및 R'_2 각각은 H, C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 알키닐, C_{5-20} 아릴 (치환된 아릴을 포함함), C_{5-20} 헤테로아릴 그룹, $-NH_2$, -NHMe, -OH, 및 -SH로부터 독립적으로 선택되고, 여기서, 일부 구현예에서, 알킬, 알케닐 및 알키닐 사슬은 최대 5 개의 탄소 원자를 포함하고;

R_3 및 R'_3은 H, OR, NHR, 및 NR_2로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R은 1 내지 5 개의 탄소 원자 를 함유하는 일차, 2차 또는 3차 알킬 사슬이고;

R_4 및 R'_4은 H, Me, 및 OMe로부터 독립적으로 선택되고;

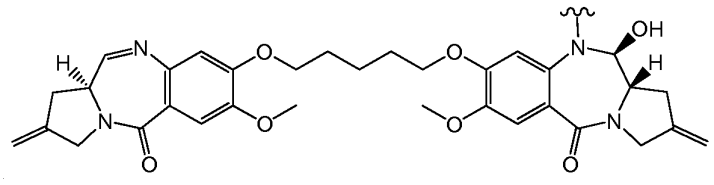
R_5은 C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 알키닐, C_{5-20} 아릴 (할로, 니트로, 시아노, 알콕시, 알킬, 헤테로시클릴에 의해 치환된 아릴을 포함함) 및 C_{5-20} 헤테로아릴 그룹로부터 선택되고, 여기서, 일부 구현예에서, 알킬, 알케닐 및 알키닐 사슬은 최대 5 개의 탄소 원자를 포함하고;

R_{11}은 H, C_1-C_8 알킬, 또는 보호 그룹 (예컨대 아세틸, 트리플루오로아세틸, t-부톡시카보닐 (BOC), 벤질옥시카보닐 (CBZ), 9-플루오레닐메틸렌옥시카보닐 (Fmoc), 또는 자기-희생 단위 예컨대 발린-시트룰린-PAB)을 포함하는 모이어티이고;

R_{12}는 H, C_1-C_8 알킬, 또는 보호 그룹이고;

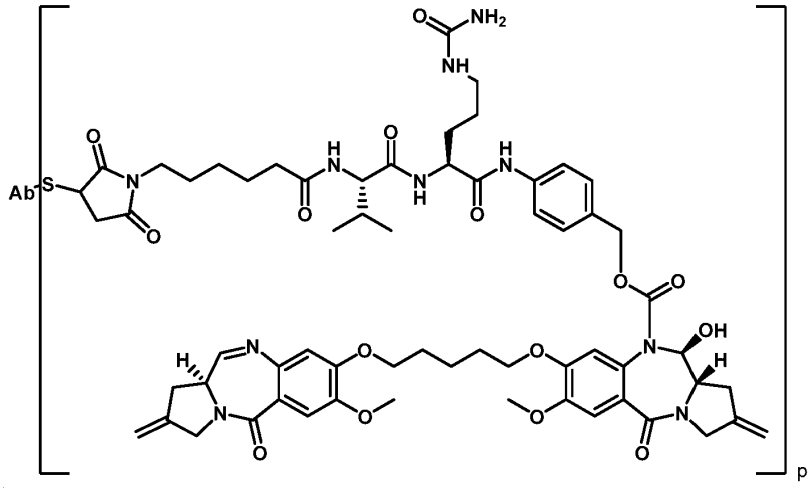
여기서 A 고리 사이의 R_1, R'_1, R_2, R'_2, R_5, 또는 R_{12} 중의 하나의 수소 또는 $-OCH_2CH_2(X)_nCH_2CH_2O-$ 스페이서의 수소는 ADC의 링커에 연결된 결합으로 치환된다.

ADC의 예시적인 PDB 이량체부는, 비제한적으로 하기를 포함한다 (물결선은 링커에 대한 공유 결합의 부위를 나타냄):

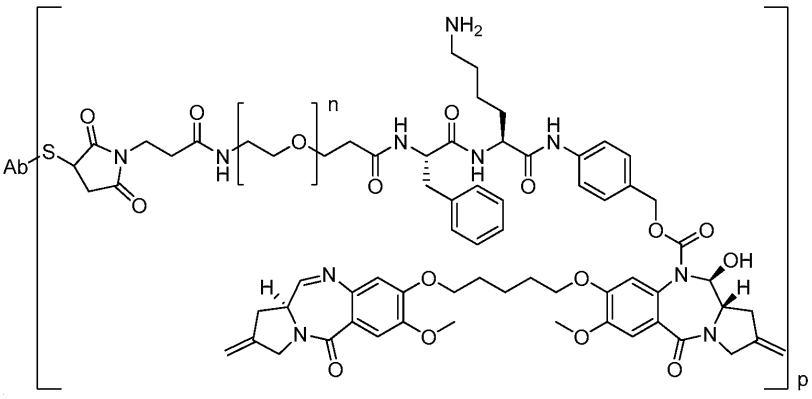


PBD 이량체;

PBD 이량체를 포함하는 ADC의 비제한 예시적인 구현예는 하기의 구조를 갖는다:



PBD 이량체-val-cit-PAB-Ab;



PBD 이량체-Phe-Lys-PAB-Ab,

여기서:

n은 0 내지 12이다. 일부 구현예에서, n은 2 내지 10이다. 일부 구현예에서, n은 4 내지 8이다. 일부 구현예에서, n은 4, 5, 6, 7, 및 8로부터 선택된다.

PBD 이량체-val-cit-PAB-Ab 및 PBD 이량체-Phe-Lys-PAB-Ab의 링커는 프로테아제 절단가능이고, 한편 PBD 이량체-말레이마이드-아세탈의 링커는 산-불안정하다.

PBD 이량체 및 PBD 이량체를 포함하는 ADC는 당해분야에서 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 참고, 예를 들

면, WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598.

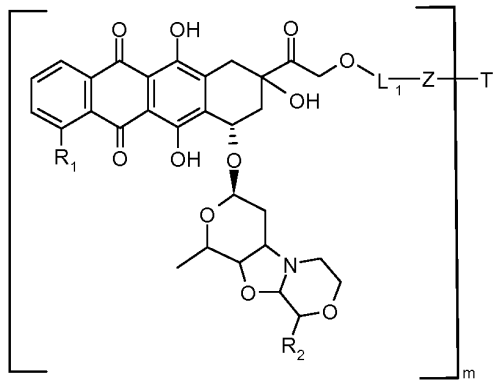
(5) 안트라사이클린

일부 구현예에서, 안트라사이클린. 안트라사이클린을 포함하는 ADC는 세포독성 활성을 나타내는 항생제 화합물이다. 임의의 특정한 이론에 의해 구속되는 것으로 의도되지 않으면서, 연구는, 하기를 포함하는 수많은 상이한 기전에 의해 세포를 사멸하도록 작용할 수 있다는 것을 명시했다: 1) 약물 분자를 세포의 DNA에 삽입하고 그렇게 함으로써 DNA-의존적 핵산 합성을 억제함; 2) 세포에 대한 손상을 야기하도록 세포성 거대분자와 반응하는 유리 라디칼의 약물에 의해 생산, 및/또는 3) 약물 분자와 세포막과의 상호작용 (참고, 예를 들면, C. Peterson 등, "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. pp.97-102에서). 그의 세포독성 포텐셜 때문에 안트라사이클린은 수많은 암 예컨대 백혈병, 유방 암종, 폐 암종, 난소 선암종 및 육종의 치료에 사용되었다 (참고 예를 들면, P.H- Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11).

비제한 예시적인 안트라사이클린은 독소루비신, 에피루비신, 아이다루비신, 다우노마이신, 네모루비신, 및 그의 유도체를 포함한다. 다우노루비신 및 독소루비신의 면역접합체 및 전구약물은 제조되었고 연구되었다 (Kratz 등 (2006) *Current Med. Chem.* 13:477-523; Jeffrey 등 (2006) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362; Torgov 등 (2005) *Bioconj. Chem.* 16:717-721; Nagy 등 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834; Dubowchik 등 (2002) *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532; King 등 (2002) *J. Med. Chem.* 45:4336-4343; EP 0328147; US 6630579). 항체-약물 콘주게이트 BR96-독소루비신은 종양-연관된 항원 Lewis-Y와 특이적으로 반응하고 I 및 II 상 연구에서 평가되었다 (Saleh 등 (2000) *J. Clin. Oncology* 18:2282-2292; Ajani 등 (2000)는 cancer *Jour.* 6:78-81; Tolcher 등 (1999) *J. Clin. Oncology* 17:478-484).

PNU-159682은 네모루비신의 강력한 대사물 (또는 유도체)이다 (Quintieri, 등 (2005) *Clinical Cancer Research* 11(4):1608-1617). 네모루비신은 독소루비신의 글리코사이드 아미노 상의 2-메톡시모폴리노 그룹을 갖는 독소루비신의 반합성 유사체이고 임상적 평가 (Grandi 등 (1990)는 cancer *Treat. Rev.* 17:133; Ripamonti 등 (1992) *Brit. J. Cancer* 65:703;) 하에 있었고, 상기 평가는 간세포 암종에 대한 II/III상 시험을 포함한다 (Sun 등 (2003) *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22, Abs1448; Quintieri (2003) *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 44:1st Ed, Abs 4649; Pacciarini 등 (2006) *Jour. Clin. Oncology* 24:14116).

네모루비신 또는 네모루비신 유도체를 포함하는 비제한 예시적인 ADC, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 식 Ia에서 보여진다:



(Ia)

여기서 R_1은 수소 원자, 하이드록시 또는 메톡시 그룹이고 R_2는 C_1-C_5 알콕시 그룹이고;

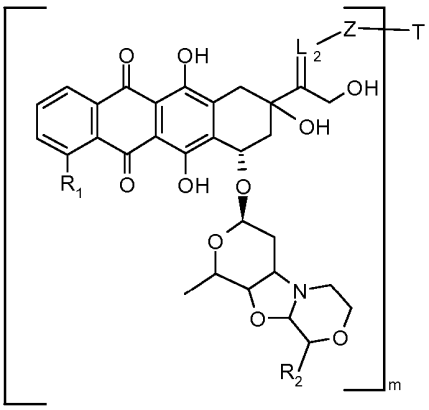
L_1 및 Z는 함께 본원에 기재된 바와 같은 링커 (L)이고;

T는 본원에 기재된 바와 같은 항체 (Ab)이고;

m은 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, m은 1 내지 10, 1 내지 7, 1 내지 5, 또는 1 내지 4이다.

일부 구현예에서, R_1 및 R_2 둘 모두는 메톡시 (-OMe)이다.

네모루비신 또는 네모루비신 유도체를 포함하는 추가 비제한 예시적인 ADC, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 식 Ib에서 보여진다:



(Ib)

여기서 R_1은 수소 원자, 하이드록시 또는 메톡시 그룹이고 R_2는 C_1-C_5 알콕시 그룹이고;

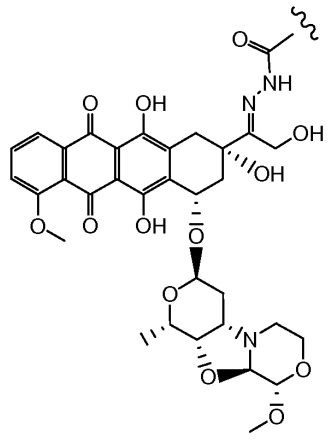
L_2 및 Z는 함께 본원에 기재된 바와 같은 링커 (L)이고;

T는 본원에 기재된 바와 같은 항체 (Ab)이고;

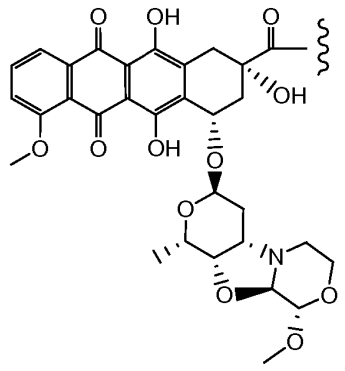
m은 1 내지 약 20이다. 일부 구현예에서, m은 1 내지 10, 1 내지 7, 1 내지 5, 또는 1 내지 4이다.

일부 구현예에서, R_1 및 R_2 둘 모두는 메톡시 (-OMe)이다.

일부 구현예에서, 네모루비신-함유 ADC의네모루비신 성분은 PNU-159682이다. 일부 그와 같은 구현예에서, ADC의 약물부는 하기의 구조 중의 하나를 가질 수 있다:



; 또는

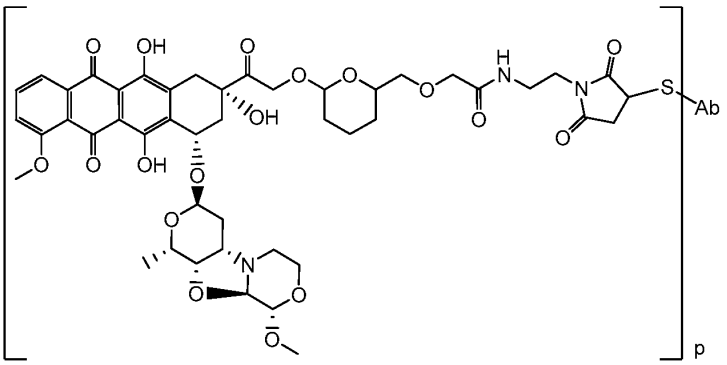


;

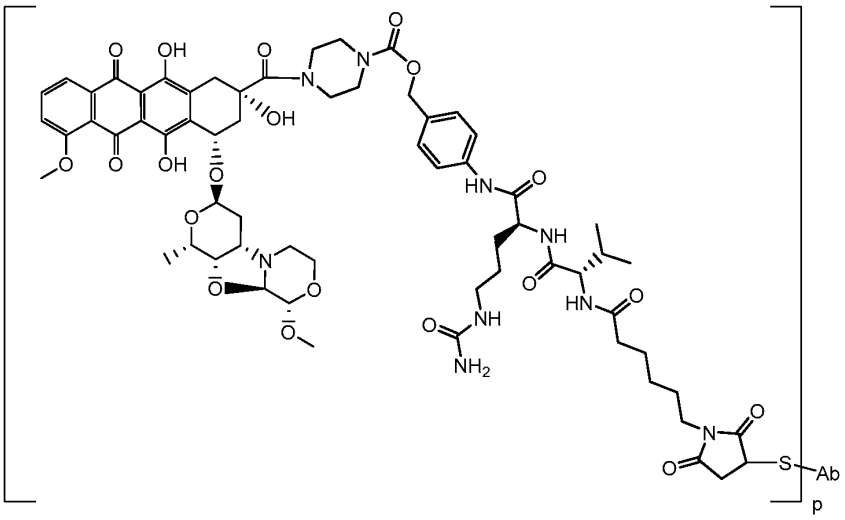
상기 물결선은 링커 (L)에 대한 부착을 나타낸다.

PNU-159682 를 포함하는 안트라사이클린은, 몇 개의 연결 부위 및 본원에서 기재된 링커를 포함하는 다양한 링커를 통해 항체에 접합될 수 있다 (US 2011/0076287; WO2009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124).

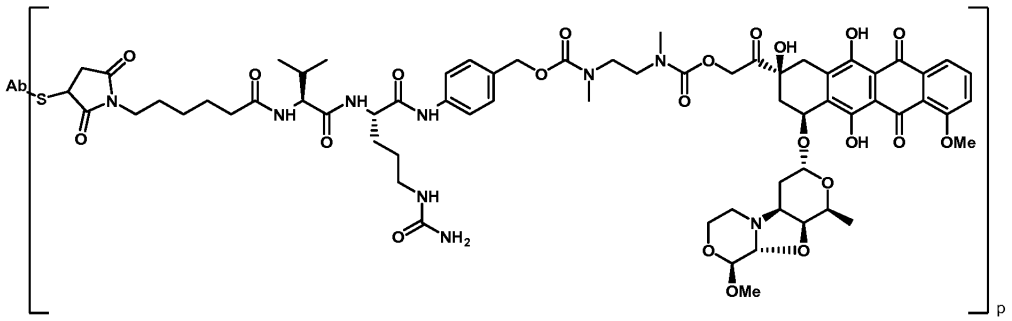
네모루비신 및 링커를 포함하는 예시적인 ADC는 비제한적으로 하기를 포함한다:



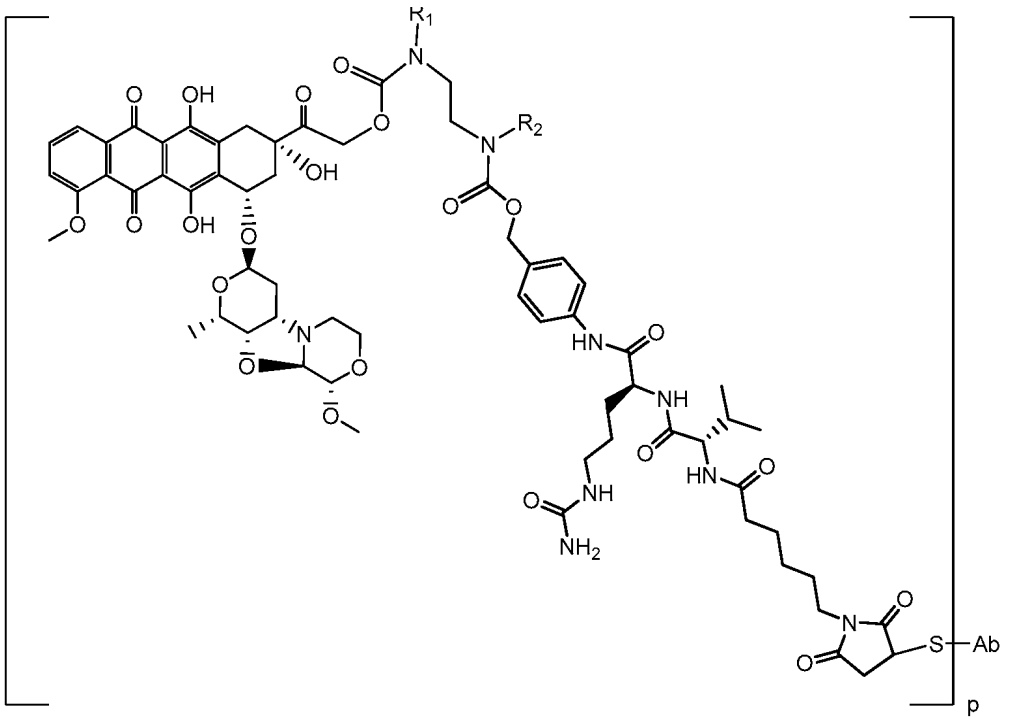
PNU-159682 말레이마이드 아세탈-Ab;



PNU-159682-val-cit-PAB-Ab;



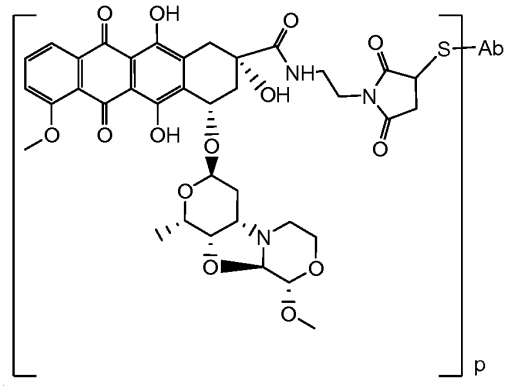
PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서-Ab;



PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서(R^1R^2)-Ab,

여기서:

R_1 및 R_2은 H 및 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택되고;



PNU-159682-말레이마이드-Ab.

PNU-159682 말레이마이드 아세탈-Ab의 링커는 산-불안정하고, 한편 PNU-159682-val-cit-PAB-Ab, PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서-Ab, 및 PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서(R^1R^2)-Ab의 링커는 프로테아제 절단가능하다.

(6) 다른 약물 모이어티

약물 모이어티는 또한 젤다나마이신(Mandler et al (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791); 및 비제한적으로, 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(슈도모나스 에어루기노사 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모덱신 A 사슬, 알파-사르신, 알류라이테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 마이토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이

신 및 트리코테센을 포함하는, 효소적으로 활성 독소 및 그의 단편을 포함한다. 예를 들면, WO 제93/21232호를 참조한다.

약물 모이어티는 또한 핵산분해 활성을 갖는 화합물(예를 들면, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제)을 포함한다.

어떤 구현예에서, 면역접합체는 고 방사선 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소들이 방사선접합된 항체의 생산에 이용가능하다. 예들은 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역접합체가 검출에 사용될 때, 그것은 섬광계수법 연구용 방사선 원자, 예를 들면 Tc^{99} 또는 I^{123}, 또는 핵자기 공명(NMR) 이미지화(자기 공명 영상, MRI로도 공지됨)를 위한 스핀 표지, 예컨대 지르코늄-89, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다. 지르코늄-89는 다양한 금속 킬레이트제에 복합될 수 있고 예를 들면, PET 이미지화(WO 제2011/056983호)를 위해 항체에 접합될 수 있다.

방사선표지 또는 다른 표지들은 공지된 방법으로 면역접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드는, 예를 들면, 하나 이상의 수소 대신에 하나 이상의 불소-19 원자를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 이용하여 생합성되거나 화학적으로 합성될 수 있다. 일부 구현예에서, Tc^{99}, I^{123}, Re^{186}, Re^{188} 및 In^{111}과 같은 표지가 항체에서 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 이트륨-90이 항체의 라이신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, IODOGEN 방법(Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)이 요오드-123을 혼입하는데 사용될 수 있다. 문헌["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]이 어떤 다른 방법을 기술하고 있다.

어떤 구현예에서, 면역접합체는 전구약물-활성화 효소에 접합된 항체를 포함할 수 있다. 일부 그와 같은 구현예에서, 전구약물-활성화 효소는 전구약물(예를 들면, 펩티딜 화학치료제, WO 제81/01145호 참조)을 활성 약물, 예컨대 항암 약물로 전환한다. 그와 같은 면역접합체는, 일부 구현예에서 항체-의존적 효소-매개된 전구약물 요법("ADEPT")에서 유용하다. 항체에 접합될 수 있는 효소는, 비제한적으로, 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 설페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 아릴설파타제; 비-독성 5-플루오로시토신을 항암 약물, 5-플루오로우라실로 전환하는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩타이드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한, 프로테아제, 예컨대 세라티아 프로테아제, 서몰리신, 서브틸리신, 카복시펩티다아제 및 카텝신(예컨대 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환하는데 유용한 D-알라닐카복시펩티다아제; 당화된 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한, 탄수화물-절단 효소, 예컨대 β-갈락토시다아제 및 뉴라미니다제; β-락탐을 이용하여 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 β-락타마제; 및 그의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 그룹을 이용하여 유도체화된 유리 약물로 전환하는데 유용한 페니실린 아미다아제, 예컨대 페니실린 V 아미다아제 및 페니실린 G 아미다아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 효소가 본 기술분야에 널리 알려진 재조합 DNA 기법에 의해 항체에 공유결합될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Neuberger 등, *Nature* 312:604-608 (1984)]을 참조한다.

c) 약물 부하

약물 부하는 식 I의 분자에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수인 p로 표시된다. 약물 부하는 항체 당 1 내지 20개의 약물 모이어티(D)의 범위일 수 있다. 식 I의 ADC는 1 내지 20개의 다양한 약물 모이어티와 접합된 항체의 수집물을 포함한다. 접합 반응으로부터의 ADC의 제조에서 항체 당 약물 모이어티의 평균 수는 종래의 수단, 예컨대 질량 분광계, ELISA 분석, 및 HPLC에 의해 규명될 수 있다. p에 관해서 ADC의 정량적 분포가 또한 결정될 수 있다. 일부 예에서, p가 다른 약물 부하를 갖는 ADC로부터의 어떤 값인 경우, 균질한 ADC의 분리, 정제, 및 특성규명은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

일부 항체-약물 접합체의 경우, p는 항체 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들면, 상기 어떤 예시적인 구현예에서와 같이, 부착이 시스테인 티올인 경우, 항체는 단지 하나 또는 몇 개의 시스테인 티올 그룹을 가질 수 있거나, 또는 단지 하나 또는 몇 개의 충분히 반응성인 티올 그룹을 가질 수 있고, 이를 통해 링커가 부착될 수 있다. 어떤 구현예에서, 더 높은 약물 부하, 예를 들면 $p > 5$는 응집, 불용성, 독성, 또는 어떤 항체-약물 접합체의 세포 투과성의 손실을 야기할 수 있다. 어떤 구현예에서, ADC의 평균 약물 부하는 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 또는 약 3 내지 약 5 범위이다. 사실상, 어떤 ADC의 경우, 항체 당 약물 모이어티의 최적 비율은 8 미만일 수 있고, 약 2 내지 약 5일 수 있는 것으로 나타났다(US 7498298).

어떤 구현예에서, 이론적 최대치 미만의 약물 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는, 예를 들면, 이하에서 논의된 바와 같이, 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 라이신 잔기를 함유할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 많은 유리 및 반응성 시스테인 티올 그룹을 함유하지 않으며; 사실상 항체 내의 대부분의 시스테인 티올 잔기들은 이황화 다리로서 존재한다. 어떤 구현예에서, 항체는 부분적인 또는 총 환원 조건 하에서, 디티오트레이톨(DTT) 또는 트리카보닐에틸포스핀(TCEP)과 같은 환원제를 이용하여 환원되어, 반응성 시스테인 티올 그룹을 생성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 항체는 변성 조건에 놓여져 라이신 또는 시스테인과 같은 반응성 친핵성 그룹을 드러낸다.

ADC의 부하(약물/항체 비율)는 예를 들면, (i) 항체 대비 몰 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약을 제한함으로써, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한함으로써, 및 (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 부분적인 또는 제한적인 환원 조건에 의해, 상이한 방식으로 조절될 수 있다.

하나를 초과하는 친핵성 그룹이 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하는 경우, 수득한 생성물은 항체에 부착된 하나 이상의 약물 모이어티의 분포를 갖는 ADC 화합물들의 혼합물임이 이해될 것이다. 항체 당 약물의 평균 수는, 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 분석에 의해 상기 혼합물로부터 계산될 수 있다. 개별적인 ADC 분자들은 질량 분광계에 의해 혼합물 내에서 확인될 수 있고, HPLC, 예를 들면 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다(예를 들면, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., 등 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., 등 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004 참조). 어떤 구현예에서, 단일 부하값을 갖는 균질한 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리될 수 있다.

d) 면역접합체를 제조하는 어떤 방법

식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 그룹을 2가 링커 시약과 반응시켜 공유 결합을 통해 Ab-L을 형성한 후, 약물 모이어티 D와 반응시키는 것; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 그룹을 2가 링커 시약과 반응시켜 공유 결합을 통해 D-L을 형성한 후, 항체의 친핵성 그룹과 반응시키는 것을 포함하는, 당해분야의 숙련가에 공지된 유기 화학 반응, 조건, 및 시약을 이용한 몇 가지 경로에 의해 제조될 수 있다. 후자 경로를 통해 식 I의 ADC를 제조하는 예시적인 방법이 본원에 참조로 명시적으로 통합되어 있는 US 제7498298호에 기술되어 있다.

항체 상의 친핵성 그룹은 비제한적으로 (i) N-말단 아민 그룹, (ii) 측쇄 아민 그룹, 예를 들면 라이신, (iii) 측쇄 티올 그룹, 예를 들면 시스테인, 및 (iv) 당 하이드록실 또는 아미노 그룹을 포함하고, 상기 항체는 당화된다. 아민, 티올, 및 하이드록실 그룹은 친핵성이고 (i) NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할로겐화물과 같은 활성 에스테르; (ii) 할로아세트아미드와 같은 알킬 및 벤질 할라이드 ; 및 (iii) 알데하이드, 케톤, 카복실, 및 말레이마이드 그룹을 포함하는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 그룹과 공유 결합을 형성하도록 반응할 수 있다. 어떤 항체는 환원될 수 있는 사슬간 이황화, 즉 시스테인 다리를 갖는다. 항체는 완전히 또는 부분적으로 환원되는 것과 같이 DTT(디티오트레이톨) 또는 트리카보닐에틸포스핀(TCEP)과 같은 환원제로 처리함으로써 링커 시약과 접합하기 위한 반응성이 될 수 있다. 따라서 각 시스테인 다리가 이론적으로, 2개의 반응성 티올 친핵체들을 형성할 것이다. 추가의 친핵성 그룹은, 예를 들면, 라이신 잔기를 2-이미노티올란(Traut 시약)과 반응시킴으로써, 라이신 잔기의 변형을 통해 항체 내로 도입되어, 아민의 티올로의 전환을 야기할 수 있다. 반응성 티올 그룹은 1, 2, 3, 4 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써(예를 들면, 하나 이상의 비-원상태 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체 내로 도입될 수 있다.

본 발명의 항체-약물 접합체는 또한 알데하이드 또는 케톤 카보닐 그룹과 같은 항체 상의 친전자성 그룹과 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 그룹과의 반응에 의해 생산될 수 있다. 링커 시약 상의 유용한 친핵성 그룹은, 비제한적으로, 하이드라자이드, 옥심, 아미노, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진 카복실레이트, 및 아릴하이드라자이드를 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환체와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하도록 변형된다. 또 하나의 구현예에서, 당화된 항체의 당류는, 예를 들면 퍼아이오데이트 산화제를 이용하여 산화되어, 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민 그룹과 반응할 수 있는 알데하이드 또는 케톤 그룹을 형성할 수 있다. 수득한 이민 쉬프 염기 그룹은 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 또는 예를

들면 보로하이드라이드 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 당화된 항체의 탄수화물 부분과 갈락토오스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼아이오데이트 중 하나와의 반응은 약물 상의 적절한 그룹과 반응할 수 있는 항체 내의 카보닐(알데하이드 및 케톤) 그룹을 생성할 수 있다(Hermanson, Bioconjugate Techniques). 또 하나의 구현예에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체는 나트륨 메타-퍼아이오데이트와 반응하여, 제1 아미노산 대신에 알데하이드의 생산할 수 있다(Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852)). 그와 같은 알데하이드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

약물 모이어티 상의 예시적인 친핵성 그룹은 (i) NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할로겐화물과 같은 활성 에스테르; (ii) 할로아세트아미드와 같은 알킬 및 벤질 할로겐화물; (iii) 알데하이드, 케톤, 카복실, 및 말레이마이드 그룹을 포함하는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 그룹과 공유 결합을 형성하도록 반응할 수 있는, 비제한적으로 아민, 티올, 하이드록실, 하이드라자이드, 옥심, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진 카복실레이트, 및 아릴하이드라자이드 그룹을 포함한다.

ADC를 제조하는데 사용될 수 있는 비제한적인 예시적인 가교제 시약은 "예시적인 링커"라는 제목의 섹션 내에 본원에 기술되어 있다. 단백질성 모이어티 및 화학적 모이어티를 포함하는, 2개의 모이어티를 연결하는 상기 가교제를 이용하는 방법은 당해기술에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들면, 재조합 기술 또는 펩타이드 합성에 의해 제조될 수 있다. 재조합 DNA 분자는 서로 인접하거나 또는 접합체의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩타이드를 인코딩하는 영역에 의해 분리된 접합체의 항체 및 세포독성 부분을 인코딩하는 영역을 포함할 수 있다.

또 하나의 구현예에서, 항체는 종양 전-표적화에서의 이용을 위해 "수용체"(예컨대 스트렙타비딘)에 접합된 후(상기 항체-수용체 접합체는 환자에게 투여됨), 소거제를 이용하여 순환으로부터 결합하지 않은 접합체를 제거한 다음, 세포독성제(예를 들면, 약물 또는 방사선뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드"(예를 들면, 아비딘)을 투여할 수 있다.

E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 임의의 항-PMEL17 항체는 생물학적 샘플에서 PMEL17의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "검출하는 것"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. "생물학적 샘플"은, 예를 들면, 세포 또는 조직(예를 들면, 가능한 또는 확인된 흑색종을 포함하는, 암성 또는 잠재적으로 암성 피부 조직을 포함하는 생검 물질; 림프종, 예컨대 피부 T-세포 림프종 유래의 생검 물질; 및 신장 종양 유래의 생검 물질)을 포함한다.

일 구현예에서, 진단 또는 검출 방법에서 사용하기 위한 항-PMEL17 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플 내에서 PMEL17의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 생물학적 샘플을 항-PMEL17 항체의 PMEL17에의 결합을 허용하는 조건 하에서 본원에 기재된 바와 같은 항-PMEL17과 접촉시키는 것, 및 생물학적 샘플에서 항-PMEL17 항체 및 PMEL17 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다. 그와 같은 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 일 구현예에서, 항-PMEL17 항체는, 예를 들면 PMEL17이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우, 항-PMEL17 항체를 이용한 요법에 적격인 대상을 선택하는데 사용된다. 추가 구현예에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직(가능한 또는 확인된 흑색종을 포함하는, 암성 또는 잠재적으로 암성 피부 조직; 림프종, 예컨대 피부 T-세포 림프종 유래의 생검 물질; 및 신장 종양 유래의 생검 물질)이다.

추가 구현예에서, 항-PMEL17 항체는, 예를 들면, 암을 진단하거나, 예측하거나, 단계화하거나, 요법의 적절한 코스를 결정하거나, 요법에 대한 암의 반응을 관찰하기 위해, 예를 들면 대상에서 PMEL17-양성 암을 생체내 영상화함으로써, 검출하기 위해 생체내에서 사용된다. 생체내 검출을 위한 본 기술분야에 공지된 하나의 방법은, 예를 들면, 문헌[van Dongen 등, *The Oncologist* 12:1379-1389 (2007) 및 Verel 등, *J. Nucl. Med.* 44:1271-1281 (2003)]에 기재된 바와 같이, 면역-양전자 방출 단층촬영(immuno-PET)이다. 그와 같은 구현예에서, 대상에서 PMEL17-양성 암을 검출하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 표지된 항-PMEL17 항체를 PMEL17-양성 암을 가지고 있거나 그것이 의심되는 대상에게 투여하는 것, 및 상기 대상에서 상기 표지된 항-PMEL17 항체를 검출하는 것을 포함하고, 상기 표지된 항-PMEL17 항체의 검출은 상기 대상에서 PMEL17-양성 암을 가리킨다. 어떤 그와 같은 구현예에서, 상기 표지된 항-PMEL17 항체는 ^{68}Ga, ^{18}F, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{76}Br, ^{89}Zr, 및 ^{124}I와 같은, 양전자 에미터에 접합된 항-PMEL17 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 양전자 에미터는 ^{89}Zr이다.

추가 구현예에서, 진단 또는 검출 방법은 기판에 고정된 1차 항-PMEL17 항체를 생물학적 샘플과 접촉시켜 PMEL17의 존재를 시험하는 단계, 상기 기판을 2차 항-PMEL17 항체에 노출시키는 단계, 및 2차-PMEL17이 생물학적 샘플 내의 1차 항-PMEL17 항체 및 PMEL17 간의 복합체에 결합되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 기판은 임의의 지지 매질, 예를 들면, 유리, 금속, 세라믹, 폴리머 비드, 슬라이드, 칩, 및 다른 기판일 수 있다. 어떤 구현예에서, 생물학적 샘플은 가능한 또는 확인된 흑색종을 포함하는, 세포 또는 조직(암성 또는 잠재적으로 암성 피부 조직; 림프종, 예컨대 피부 T-세포 림프종 유래의 생검 물질; 및 신장 종양 유래의 생검 물질)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 1차 또는 2차 항-PMEL17 항체는 본원에서 기재된 항체 중 어느 것이다.

상기 구현예 중 어느 하나에 따라 진단되거나 검출될 수 있는 예시적인 장애는 PMEL17-양성 암, 예컨대 PMEL17-양성 피부암(예컨대 흑색종); PMEL17-양성 림프종(예컨대 피부 T-세포 림프종); 및 PMEL17-양성 신장 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 실시예 K에서 본원에서 기재된 조건 하에서, 종양 세포의 >90%에서 염색이 매우 약하거나 없는 것에 해당하는, "0"보다 더 큰 항-PMEL17 면역조직화학(IHC) 스코어를 받는 암이다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 31D1 항체(31D1-발현 하이브리도마는 2012년 4월 24일에 7509(31D1.6.7)로서 ATCC에 기탁됨)를 이용하여, 실시예 K에서 본원에서 기재된 조건 하에서 규정된 바와 같이, 1+, 2+ 또는 3+ 수준으로 PMEL17을 발현한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 원위치 혼성화(ISH) 분석에 따라 PMEL17을 발현하는 암이다. 일부 그러한 구현예에서, IHC에 대해 사용된 것과 유사한 평점 체계가 사용된다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 PMEL17 mRNA를 검출하는 역-전사효소 PCR(RT-PCR) 분석에 따라 PMEL17을 발현하는 암이다. 일부 구현예에서, RT-PCR은 정량적 RT-PCR이다.

어떤 구현예에서, 표지된 항-PMEL17 항체가 제공된다. 표지는, 비제한적으로, 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티(예컨대 형광, 발색단, 전자 치밀, 화학발광, 및 방사성 표지), 뿐만 아니라, 예를 들면, 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 효소 또는 리간드와 같은 모이어티를 포함한다. 예시적인 표지는, 비제한적으로, HRP, 락토페록시다아제, 또는 마이크로페록시다아제, 바이오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파아지 표지, 안정한 유리 라디칼 등과 같이 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 이용하는 효소와 결합된, 방사선동위원소 ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, 및 ^{131}I, 형광단 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레신 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 엄벨리페론, 루세리페라제, 예를 들면, 개똥벌레 루시퍼라아제 및 박테리아 루시퍼라아제(미국 특허 제4,737,456호), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들면, 글루코오스 옥시다제, 갈락토오스 옥시다제, 및 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소, 헤테로사이클릭 옥시다제 예컨대 우리카제(uricase) 및 잔틴 옥시다제를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 표지는 양전자 에미터이다. 양전자 에미터는 비제한적으로 ^{68}Ga, ^{18}F, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{76}Br, ^{89}Zr, 및 ^{124}I를 포함한다. 특정 구현예에서, 양전자 에미터는 ^{89}Zr이다.

F. 약제학적 제형

본원에 기재된 바와 같은 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체의 약제학적 제형은, 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로, 원하는 정도의 순도를 갖는 상기 항체 또는 면역접합체를 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 제조된다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 이용된 복용량 및 농도에서 수령자에게 무독성이며, 비제한적으로 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신과 같은 아미노산; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코오스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제. 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용가능한 담체는 추가로 침입형 약물 분산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20(HYLENEX® Baxter International, Inc.)을 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 어떤 예시적인 sHASEGPs 및 사용 방법은 US 특허 공보 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 일 측면에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된

다.

예시적인 동결건조된 항체 또는 면역접합체 제형은 US 특허 제6,267,958호에 기재되어 있다. 수성 항체 또는 면역접합체 제형은 US 특허 제6,171,586호 및 WO제2006/044908호에 기재되어 있는 것을 포함하고, 후자 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

본원에서의 제형은 치료될 특정한 징후에 필요한 하나를 초과하는 활성 성분, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다.

활성 성분은, 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포좀, 알부민 마이크로구형체, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼에, 각각 예를 들면, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐에 포획될 수 있다. 그와 같은 기술은 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 실시예는 항체 또는 면역접합체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 형상화된 물품, 예를 들면 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

생체내 투여를 위해 사용될 제형은 일반적으로 멸균이다. 멸균은, 예를 들면, 멸균한 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성될 수 있다.

G. 치료 방법 및 조성물

본원에서 제공된 임의의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체는 방법, 예를 들면, 치료 방법에서 사용될 수 있다.

일 측면에서, 본원에서 제공된 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체는 PMEL17-양성 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용되며, 상기 방법은 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체가 세포의 표면상의 PMEL17에 결합하는 것을 허용하는 조건 하에서 세포를 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체에 노출시킴으로써 세포의 증식을 억제하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 흑색종 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 림프종 세포, 예컨대 피부 T 세포 림프종 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 신장 종양 세포이다.

시험관내에서 세포 증식의 억제는 프로메가사(Madison, WI)로부터 상업적으로 이용가능한 CellTiter-Glo™ 발광 세포 생존력 분석을 이용하여 분석될 수 있다. 상기 분석은 존재하는 ATP의 정량화에 기초하여 배양 내에 생존가능한 세포의 수를 결정하며 이는 대사적으로 활성인 세포를 표시한다. 문헌[Crouch 등 (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, 미국 특허 제6602677호]을 참조한다. 상기 분석은 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있고, 이는 그것이 자동화된 고-처리량 스크리닝(HTS)을 처리할 수 있게 한다. 문헌[Cree 등 (1995) *AntiCancer Drug* 6:398-404]를 참조한다. 상기 분석 절차는 배양된 세포에 직접 단일 시약(CellTiter-Glo® 시약)을 첨가하는 것을 포함한다. 이것은 세포 용해 및 루시퍼라아제 반응에 의해 생산된 발광 신호의 발생을 야기한다. 상기 발광 신호는 존재하는 ATP의 양에 비례하며, 이는 배양 내에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 직접적으로 비례한다. 데이타는 발광분석기 또는 CCD 카메라 이미지화 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 출력은 상대 광 단위(RLU)로서 표현된다.

또 하나의 측면에서, 약제로서 사용하기 위한 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체가 제공된다. 추가 측면에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체가 제공된다. 어떤 구현예에서, PMEL17-양성 암을 치료하는데 사용하기 위한 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체가 제공된다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 PMEL17-양성 암이 있는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체를 제공하며, 상기 방법은 상기 개체에게 유효량의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 하나의 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 추가로, 상기 개체에게, 예를 들면 하기 기재된 바와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 투여하는 것을 포함한다.

추가 측면에서, 본 발명은 약제의 제조 또는 준비에서의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 약제는 PMEL17-양성 암의 치료를 위한 것이다. 추가 구현예에서, 약제는 PMEL17-양성 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이며, 상기 방법은 PMEL17-양성 암이 있는 개체에게 유효량의 약제를 투여하는 것을 포함한다. 하나의 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 추가로 상기 개체에게 예를 들면, 아래에서 기재된 바와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 투여하는 것을 포함한다.

추가 측면에서, 본 발명은 PMEL17-양성 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 그와 같은 PMEL17-양성 암이 있는 개체에게 유효량의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 하나의 그와 같은 구현예에서, 본 방법은 추가로, 상기 개체에게 아래에서 기재된 바와 같은 유효량의 적어도 하나의 추가 치료제를 투여하는 것을 포함한다.

임의의 상기 구현예에 따른 PMEL17 -양성 암은, 예를 들면, PMEL17-양성 피부암(흑색종 포함); PMEL17-양성 림프종(예컨대 피부 T-세포 림프종); 및 PMEL17-양성 신장 종양일 수 있다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 실시예 K에 기재된 본원에서의 조건 하에, 종양 세포의 >90%에서 매우 약한 염색 또는 염색이 없는 것에 해당하는 "0"보다 더 큰 항-PMEL17 면역조직화학(IHC) 또는 원위치 혼성화(ISH) 스코어를 받는 암이다. 또 하나의 구현예에서, PMEL17-양성 암은 31D1 항체(31D1-발현 하이브리도마는 2012년 4월 24일에 7509(31D1.6.7)로서 ATCC에 기탁되었음)를 이용하여, 실시예 K에서 기재된 본원에서의 조건 하에서 규정된 바와 같이, 1+, 2+ 또는 3+ 수준으로 PMEL17을 발현한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 PMEL17 mRNA를 검출하는 역-전사효소 PCR(RT-PCR) 분석에 따라 PMEL17을 발현하는 암이다. 일부 구현예에서, RT-PCR은 정량적 RT-PCR이다.

일부 구현예에서, PMEL17-양성 암을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공되고, 상기 PMEL17-양성 암은 제1 치료제에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 상기 개체에게 PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 유효량의 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, PMEL17-양성 암은 흑색종이다. 일부 구현예에서, 제1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제1 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 치료제는 PMEL17 이외의 항원에 결합하는 제1 항체 및 제1 세포독성제를 포함하는 제1 면역접합체이다. 일부 구현예에서, 제1 항체는 엔도텔린 B 수용체(ETBR), 티로시나제-관련된 단백질 1(TYRP1), 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA-4), 및 당단백질 NMB(GPNMB)로부터 선택된 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 항체는 ETBR에 결합한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제1 면역접합체는 항-ETBR 항체 hu5E9.v1, 예컨대 면역접합체 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE를 포함한다. 미국 공보 제US 2011/0206702호를 참조한다. Hu5E9.v1의 초가변 영역(HVR)이 본원에, 예를 들면, 서열번호: 33 내지 38에 나타나 있다. Hu5E9.v1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 본원에, 예를 들면, 각각 서열번호: 40 및 39에 나타나 있다. 일부 구현예에서, 제1 세포독성제 및 PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성제는 상이하다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제1 세포독성제는 MMAE(예컨대, 예를 들면, 제1 면역접합체가 hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE인 경우)이고 PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성제는 칼리키아마이신, 피롤로벤조디아제핀, 및 네모루비신 유도체로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PMEL17에 결합하는 항체를 포함하는 면역접합체의 세포독성제는 피롤로벤조디아제핀 및 네모루비신 유도체로부터 선택된다.

일부 구현예에서, 암을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공되고, 상기 암은 제1 치료제에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 제1 치료제는 제1 링커를 통해 제1 세포독성제에 연결된 제1 항체를 포함하는 제1 면역접합체이다. 일부 구현예에서, 제1 치료제(예컨대, 제1 면역접합체)에 내성인 암을 갖는 개체를 치료하는 방법은 제2 링커를 통해 제2 세포독성제에 연결된 제2 항체를 포함하는 제2 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 항체 및 제2 항체는 상이한 항원에 결합하고 제1 세포독성제 및 제2 세포독성제는 동일 또는 상이하다. 일부 구현예에서, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 세포의 적어도 일부 상에 존재하는 상이한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 항체 및 제2 항체는 상이한 항원에 결합하고 제1 세포독성제 및 제2 세포독성제는 상이하다. 일부 구현예에서, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 항원에 결합하고, 제1 세포독성제 및 제2 세포독성제는 상이하다. 임의의 전술한 것의 구현예에서, 제1 링커 및 제2 링커는 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 항체 및 제2 항체는 상이한 항원에 결합하고, 제1 및 제2 링커는 상이하며, 제1 및 제2 세포독성제는 상이하다.

상기 구현예 중 어느 하나에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

추가 측면에서, 본 발명은 예를 들면, 상기 치료 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한, 본원에서 제공된 임의의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 일 구현예에서, 약제학적 제형은 본원에서 제공된 임의의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 약제학적 제형은 예를 들면, 아래에서 기재된 바와 같이, 본원에서 제공된 임의의 항-PMEL17 항체 또는 면역접합체 및 적어도 하나의 추가 치료제를 포함한다.

본 발명의 항체 또는 면역접합체는 요법에서 단독으로 또는 다른 제제와 병용으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 적어도 하나의 추가 치료제와 함께 공동 투여될 수 있다.

일부 구현예에서, 암을 치료하는 방법은 엔도텔린 B 수용체(ETBR), 티로시나제-관련된 단백질 1(TYRP1), 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA-4), 및 당단백질 NMB (GPNMB)로부터 선택된 항원에 결합하는 항체를 포함하는 제2 면

역접합체와 병용하여 본원에서 기재된 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제2 면역접합체의 세포독성제는 MMAE, 칼리키아마이신, 네모루비신 유도체, 및 피롤로벤조디아제핀으로부터 선택된다. 본원에서 기재된 면역접합체의 세포독성 약물 및 제2 면역접합체의 세포독성제는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 상이하다. 일부 구현예에서, 각각의 세포독성제는 MMAE, 네모루비신 유도체, 및 피롤로벤조디아제핀로부터 선택되다.

일부 구현예에서, 암을 치료하는 방법은 ETBR에 결합하는 항체를 포함하는 제2 면역접합체와 병용하여 본원에서 기재된 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 상기 암은 PMEL17-양성 암 및 또한 ETBR-양성 암이다. 암이 또한 ETBR-양성인지 여부의 결정은, 비제한적으로, 암이 PMEL17-양성인지 여부를 결정하기 위해 본원에 기술된 방법, 및 미국 공보 제US 2011/0206702호에 기술된 방법을 포함하는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, ETBR에 결합하는 항체는 hu5E9.v1이며, 이는, 예를 들면, 미국 공보 US 제2011/0206702호에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, ETBR에 결합하는 항체는 서열번호: 33의 서열을 포함하는 HVR H1, 서열번호: 34의 서열을 포함하는 HVR H2, 서열번호: 35의 서열을 포함하는 HVR H3, 서열번호: 36의 서열을 포함하는 HVR L1, 서열번호: 37의 서열을 포함하는 HVR L2, 및 서열번호: 38의 서열을 포함하는 HVR L3을 포함한다. 일부 구현예에서, ETBR에 결합하는 항체는 서열번호: 40의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 39의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

일부 구현예에서, 암을 치료하는 방법은, 본원에 기술된 것과 같은, 항-PMEL17 항체를 포함하는 면역접합체와 병용하여, hu5E9.v1-MC-val-cit-PAB-MMAE(참고, 예를 들면, 미국 공보 US 제2011/0206702호)와 같은 항-ETBR-MC-val-cit-PAB-MMAE 면역접합체를 투여하는 것을 포함한다. 항-PMEL17 항체를 포함하는 면역접합체는 항-ETBR 항체를 포함하는 면역접합체와 동일하거나 상이한 세포독성제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 항체를 포함하는 면역접합체는, 예를 들면, 항-ETBR 면역접합체가 MMAE를 포함할 때, 네모루비신 유도체 또는 피롤로벤조디아제핀과 같은 상이한 세포독성제를 포함한다.

"병용된" 투여는 조합된 투여(2 이상의 치료제가 동일하거나 별도의 제형 내에 포함되는 경우), 및 별도의 투여를 포함하며, 이 경우에, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 투여는 추가의 치료제(예컨대 항-ETBR 면역접합체) 및/또는 보조제의 투여 전에, 동시에, 및/또는 후에 일어날 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PMEL17 면역접합체의 투여 및 항-ETBR 면역접합체의 투여는 서로의 약 1개월 내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일 내에 일어난다. 본 발명의 항체 또는 면역접합체는 또한 방사선 요법과 병용하여 사용될 수 있다.

본 발명의 항체 또는 면역접합체(및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내, 및 비강내, 및, 원한다면 국소 치료, 병소내 투여를 포함하는, 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 복용은 투여가 짧은지 또는 만성인지 여부에 일부 좌우되어, 임의의 적당한 경로, 예를 들면 주사로, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의할 수 있다. 비제한적으로 다양한 시점에 걸쳐 단일 또는 다중 투여, 볼러스 투여, 및 펄스 주입를 포함하는 다양한 복용 계획이 본원에서 고려된다.

본 발명의 항체 또는 면역접합체는 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고, 복용되고 투여될 것이다. 이 문맥에서 고려될 인자들은 치료될 특정한 장애, 치료될 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상적 조건, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여의 일정 관리, 및 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체 또는 면역접합체는 그럴 필요는 없지만, 문제가 되고 있는 장애를 예방하거나 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 제제를 이용하여 임의로 제형화된다. 그와 같은 다른 제제의 유효량은 제형 내에 존재하는 항체 또는 면역접합체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자들에 좌우된다. 이들은 동일한 복용량으로 그리고 본원에 기재된 바와 같은 투여 경로를 이용하여, 또는 본원에서 기재된 복용량의 약 1 내지 99%, 또는 임의의 복용량으로 그리고 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 경로에 의해 일반적으로 사용된다.

질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체 또는 면역접합체의 적절한 복용량(단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 병용으로 사용될 때)은 치료될 질환의 유형, 항체 또는 면역접합체의 유형, 질환의 중증도 및 전개, 항체 또는 면역접합체가 예방적 또는 치료적 목적을 위해 투여되는지 여부, 종래 요법, 환자의 임상적 이력 및 항체 또는 면역접합체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 좌우될 것이다. 항체 또는 면역접합체는 환자에게 한번에 또는 일련의 처리에 걸쳐 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg(예를 들면 0.1mg/kg-10mg/kg)의 항체 또는 면역접합체가, 예를 들면, 하나 이상의 별도의 투여에 의해서인지, 또는 연속적 주입에 의해서인지 여부에 관계없이, 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 복용량일 수

있다. 하나의 전형적인 1일 복용량은 상기 언급된 인자에 의해 좌우되어, 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 병태에 따라 며칠 또는 그 이상에 걸친 반복된 투여의 경우, 치료는 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 일반적으로 유지될 것이다. 항체 또는 면역접합체의 하나의 예시적인 복용량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg(또는 이들의 임의의 조합)의 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 그와 같은 용량은 간헐적으로, 예를 들면 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다(예를 들면 환자가 약 2 내지 약 20, 또는 예를 들면 약 6 용량의 항체를 받도록). 초기의 더 높은 부하 용량 이후 하나 이상의 더 낮은 용량이 투여될 수 있다. 그러나, 다른 복용 계획이 유용할 수 있다. 이 용법의 진행은 종래의 기술 및 분석에 의해 쉽게 모니터링된다.

임의의 상기 제형 또는 치료 방법은 본 발명의 면역접합체 및 항-PMEL17 항체 모두를 이용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

H. 제조 물품

본 발명의 또 하나의 측면에서, 상기에서 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 용기 및 용기 위에 또는 이와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 그 자체의 조성물을 보유하거나 또는 장애를 치료하고, 예방하고/거나 진단하는데 효과적인 또 하나의 조성물과 조합된 조성물을 보유하며 멸균한 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 스토퍼(stopper)를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물에서 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항체 또는 면역접합체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 본 조성물이 선택된 병태를 치료하는데 사용된다는 것을 표시한다. 게다가, 제조 물품은 (a) 내부에 함유된 조성물을 갖는 제1 용기(여기서, 상기 조성물은 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 포함함); 및 (b) 내부에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기(여기서, 상기 조성물은 추가 세포독성제 또는 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 구현예에서 제조 물품은 조성물이 특정한 병태를 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 상기 제조 물품은 약제학적으로-허용가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 인산-완충된 염수, 링거액 또는 덱스트로오스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 그것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함한다.

I. 생물학적 물질의 기탁

하기의 생물학적 물질은 미국 종균 협회, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)에 기탁되었다:

하이브리도마 명칭　　ATCC 번호　수탁 일자

7509(31D1.6.7)　PTA-12862　2012년 4월 24일

상기 언급된 기탁된 하이브리도마는 본원에 언급된 31D1 항체를 생산한다.

이 기탁은 특허 절차 및 규제(부다페스트 조약)를 위한 미생물의 기탁의 국제 인식에 대한 부다페스트 조약의 조항 하에 이루어졌다. 이것은 기탁일로부터 30년간 그리고 기탁의 샘플을 제공해달라는 가장 최근의 요청 후 적어도 5년 동안 기탁의 생존가능한 배양을 유지하는 것을 보장한다. 기탁은 부다페스트 조약의 조건 하에 ATCC에 의해 이용가능하게 될 것이고, 제넥테크사와 ATCC 사이에 동의가 있고, 이는 기탁된 물질의 공공에 대한 이용가능성에 대해 기탁자에 의해 부과된 모든 제한들이 적절한 미국 특허의 허여시 최종적으로 제거될 것이라는 것과 적절한 미국 특허의 발행시 또는 어느 것이 우선적이든 간에 임의의 미국 또는 외국 특허 출원의 공개시 공공에게 기탁의 배양의 자손의 영원하고 제한되지 않은 이용가능성을 보장한다는 것과, 35 U.S.C.§122 및 특허청장의 규칙(886 OG 638을 특히 참조한 37 C.F.R. §1.14를 포함함)에 따라 자격이 주어질 미국 특허청장에 의해 결정된 하나에 대한 자손의 이용가능성을 보장하는 것을 보장한다.

III. 실시예

하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 하기 제공된 일반적인 설명을 고려해볼 때, 다양한 다른 구현예가 실시될 수 있는 것으로 이해된다.

A. 인간 PMEL17 유전자 발현

다수의 인간 종양 및 정상 생검 샘플에서의 PMEL17 mRNA 발현을 Gene Logic사(Gaithersburg, MD)로부터 얻은 Affymetrix 데이터를 이용하여 분석하였다. 나타난 분석은 3879개의 정상 인간 조직 샘플, 1605개의 인간 암 조직 샘플(1291개 원발성 및 314개 전이성), 및 3872개 인간 비-암 질환 조직 샘플에 대해 HGU133 Plus v2 GeneChip을 이용하여 수행된, 프로브 set ID 209848_s_at에 대한 것이다. 마이크로어레이 데이타를 Affymetrix MAS(Microarray Analysis Suite) 버전 5.0 소프트웨어를 이용하여 정규화하였고, 샘플 발현 값을 500의 절사 평균으로 맞추었다. 배양된 세포주의 분석을 유사한 방식으로 수행하였다.

결과가 도 1A 및 B에 나타나 있다. Y축 눈금은 혼성화 신호 강도에 기초한 유전자 발현 수준을 가리킨다. 도 1A에서, 각 열거된 조직의 이름으로부터 연장되는 선 위와 아래 모두에 점이 나타나 있다. 선 위에 있는 점들은 정상 조직에서의 유전자 발현에 해당하고, 선 아래에 있는 점들은 종양 및 병든 조직에서의 유전자 발현에 해당한다. 도 1A에 나타난 바와 같이, PMEL17 mRNA의 높은 수준의 발현은 피부로부터 유래된 신생물에 크게 제한되었고, 이들 모두는 흑색종으로서 분류되었다. 또한 양성이었던 적은 수의 양성 신장 종양은 유상피 혈관근육지방종으로서 분류되었고, 소수의 양성 림프종은 피부 T-세포 림프종으로서 확인되었다. 도 1B는 PMEL17이 많은 흑색종 세포주에서 과발현되는 반면, 다른 인간 암으로부터 유래된 세포주에서는 거의 또는 전혀 발현되지 않았음을 보여준다. BC, 유방암; CRC, 결장직장암; GB, 교모세포종; NSCLC, 비-소세포 폐암; SC, 소세포 폐암; NHL, 비-호지킨 림프종; MEL, 흑색종; MM, 다발성 골수종; OVCA, 난소암; PANC, 췌장암; PROS, 전립선암. 분석된 487개의 상이한 세포주 중 단지 5%만이 상기 도면에서 확인된다.

B. 마우스 모노클로날 항체 생성

인간 PMEL17에 대한 모노클로날 항체를 하기의 절차를 이용하여 생산하였다. Balb/C 마우스(Charles River Laboratories, Hollister, CA)의 2개의 별개의 그룹을 Ribi 보조제 중의 정제된 인간 PMEL17 ECD(CHO 세포에서 발현된 C-말단 Fc를 갖는 아미노산 25 내지 591)로 고면역화하거나(그룹 1) 또는 종래 기술된 프로토콜의 변형된 형태를 이용하여 유체역학적 꼬리 정맥(HTV) 주사를 통해 전장 PMEL17을 인코딩하는 플라스미드 DNA로 고면역화하였다(그룹 2) (예를 들면, Herweijer, H., 및 Wolff, J. A. (2003) *Gene Ther* 10(6), 453-458; Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999) *Gene Ther* 6(7), 1258-1266; and Zhang, 등 (1999) *Hum Gene Ther* 10(10), 1735-1737 참조). 융합 3일 전에, 단백질(그룹 1) 또는 PC3 세포 과발현 PMEL17(그룹 2)로 최종 부스트 후, 두 그룹으로부터 FACS에 의해 PC3 세포에 강한 특이적 결합을 나타내는 마우스로부터의 B 세포를 X63-Ag8.653 마우스 골수 세포(미국 종균 협회, Rockwille, MD)와 1:1 비율로 전기-융합하고(BTX ECM 2001, Harvard 장치), 1x 아자세린 및 하이포잔틴(HA, 시그마-알드리치, St. Louis, MO)을 함유하는 배양 배지에 100,000 세포/웰로 도말하고 37℃, 7% CO2에서 배양하였다.

10-14일 후, 상청액을 수확하고 ELISA 및 FACS에 의해 스크리닝하였다. FACS 분석을 위해, 흑색종 세포주 SK-MEL-23(종양 면역학 섹션, 암연구 센터, 폴 로빈에 의해 제공됨), 1300mel(종양 면역학 섹션, 암연구 센터, 폴 로빈에 의해 제공됨), SKMEL5(ATCC HTB-70), 및 UACC257(국립 암 협회), 정상 멜라노사이트(Invitrogen, Carlsbad, CA), 및 인간 PMEL17을 안정적으로 발현하는 전립선암 세포주 PC3을 항체와 접촉시켰다. 17A9로 지정된 PMEL17-면역화된 마우스로부터의 하나의 항체가 형광 활성화된 세포 분류(FACS)에 의해 살아있는 흑색종 세포, 정상 인간 멜라노사이트 및 PMEL17 cDNA를 안정적으로 발현하는 PC3 세포주와 강하게 반응하였지만, 모 PC3 세포주와는 반응하지 않았다. DNA-면역화된 마우스로부터 얻은 또 하나의 항체 77E6은 77E6이 17A9보다 다소 비일관되게 그리고 더 약하게 PMEL17을 발현하는 살아있는 세포주와 반응하였음에도 불구하고, 역시 FACS에 의해 양성이었다.

그리고 나서, FACS에 의해 강한 PMEL17 특이적 결합을 나타내는 양성 클론을 확장시키고 제한 희석에 의해 서브클로닝하였다. 2회의 서브클로닝 및 스크리닝 후, 최종 클론을 생물반응기(Integra Biosciences, Chur, Switzerland)에서 배양하고 상청액을 종래 기술된 대로 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다(Hongo, 등 (2000) *Hybridoma* 19(4), 303-315). 3개의 항체 클론, 8G3, 15F2, 17A9, 및 PMEL17 ECD-면역화된 마우스로부터의 31D1, 및 DNA-면역화된 마우스로부터의 하나의 항체 클론 77E6을 추가 분석을 위해 선택하였다.

C. 마우스 모노클로날 항체 클로닝

표준 방법을 이용하여 쥣과 8G3, 15F2, 및 17A9를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH) 도메인을 상기 중쇄 및 경쇄에 대한 축퇴 프라이머를 이용한 RT-PCR을 이용하여 증폭시켰다. 정방향 프라이머는 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 대해 특이적이었다. 각각, LC 및 HC 역전사 프라이머들을 종에 걸쳐 고도로 보존된 불변 경쇄(CL) 및 불변 중쇄 도메인 1(CH1) 내의 영역에 어닐링

하도록 설계하였다. 삽입물의 폴리뉴클레오타이드 서열은 통상적인 서열분석 방법을 이용하여 결정하였다. 17A9 VH 및 VL 아미노산 서열은 각각 서열번호: 50 및 2에 나타나 있다. 중쇄 초가변 영역(HVR) H1, H2, 및 H3은 각각 서열번호: 3, 4, 및 5에 나타나 있다. 경쇄 초가변 영역(HVR) L1, L2, 및 L3 각각 서열번호: 6, 7, 및 8에 나타나 있다. 8G3 VH 및 VL 아미노산 서열은 각각 서열번호: 49 및 10에 나타나 있다. 중쇄 초가변 영역(HVR) H1, H2, 및 H3은 각각 서열번호: 13, 14, 및 15에 나타나 있다. 경쇄 초가변 영역(HVR) L1, L2, 및 L3은 각각 서열번호: 16, 7, 및 8에 나타나 있다. 15F2 VH 및 VL 아미노산 서열은 각각 서열번호: 51 및 12에 나타나 있다. 중쇄 초가변 영역(HVR) H1, H2, 및 H3은 각각 서열번호: 20, 21, 및 22에 나타나 있다. 경쇄 초가변 영역(HVR) L1, L2, 및 L3은 각각 서열번호: 23, 24, 및 25에 나타나 있다.

항체 8G3, 17A9, 및 15F2의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 정렬이 각각 도 2a 및 2b에 나타나 있다.

D. 모노클로날 항체 에피토프 맵핑

에피토프 맵핑을 위한 모든 구조체들을 각 단편의 PCR 증폭 및 N-말단 gD 태그를 갖는 pRKtkneo 벡터, 또는 N-말단 gD 태그 및 C-말단 GPI 앵커를 갖는 pRKtkneo 벡터 내로 서브클로닝하여 제조하였다. FuGene 6(Roche Applied Science)을 이용하여 형질감염을 수행하였고, 공 벡터를 대조군으로서 사용하였다. 전장 인간 PMEL17을 N-말단 gD 태그를 갖는 pRKtkneo 벡터 내로 서브클로닝하였다.

신호 서열 및 gD 에피토프 태그를 일련의 결실 돌연변이의 N-말단 서열에 융합한 다음, 이를 포유동물 세포에서 발현시키고 용해물을 대상으로 면역블롯팅에 의해 17A9 또는 77E6과의 반응성을 분석하였다. 시험된 N-말단 결실은 △100, △255, △292, △315, △444, △515, 및 △567을 포함하였다.

또한, N-말단 gD 태그 및 C-말단 GPI 앵커를 갖는 C-말단 결실을 293 세포 내로 일시적으로 형질감염시키고 FACS에 의해 항체 결합을 분석하였다. 시험된 C-말단 결실은 $PMEL17_{25-125}$, $PMEL17_{25-105}$, $PMEL17_{25-85}$, $PMEL17_{25-65}$, 및 $PMEL17_{25-45}$를 포함하였다. 마지막으로, 아미노산 515부터 막통과 도메인까지의 영역을 포함하지만 세포질 영역이 부족한 PMEL17 단편("△515-C") 및 N-말단 gD 태그 및 C-말단 GPI 앵커를 갖는 세포질 도메인만을 포함하는 PMEL17 단편을 대상으로 면역블롯팅에 의해 77E6과의 반응성을 분석하였다.

상기 실험의 결과들이 도 3에 나타나 있다. 도 3A는 N-말단 PMEL17 결실 돌연변이의 도면, 및 항-gD 항체 및 77E6과의 반응성을 보여주는 면역블롯을 보여준다. 77E6은 시험된 모든 N-말단 결실과 반응하였다. 도 3B는 △515-C 단편 및 세포플라스미드 도메인 단편의 도면, 및 항-gD 항체 및 77E6과의 반응성을 보여주는 면역블롯을 보여준다. 77E6은 세포질 도메인을 함유한 모든 결실 돌연변이에는 결합하였지만 세포질 도메인이 결핍된 △515-C 돌연변이에는 결합하지 않았다. 이들 결과는 77E6이 PMEL17의 세포질 도메인 내의 에피토프에 결합한다는 것을 입증한다.

도 3C는 항-gD 항체 및 17A6과의 반응성을 보여주는 면역블롯을 보여준다. 17A6은 단지 전장 PMEL17에만 결합하였고 △225 또는 △100 돌연변이에는 결합하지 않았다. 도 3D는 C-말단 PMEL17 결실 돌연변이의 도면, 및 상기 돌연변이에 결합하는 항-gD, 17A9, 및 31D1 항체의 FACS 분석을 보여준다. 17A9는 단지 $PMEL17_{25-125}$에만 결합하였고 $PMEL17_{25-105}$를 포함하는 임의의 다른 돌연변이에는 결합하지 않았는데, 이는 17A9가 PMEL17의 아미노산 105 내지 125의 영역 내의 에피토프에 결합한다는 것을 제시한다. 31D1은 $PMEL17_{25-45}$를 포함하는 시험된 모든 단편에 결합하였느는데, 이는 31D1이 PMEL17의 아미노산 25 내지 45의 영역 내의 에피토프에 결합한다는 것을 제시한다.

E. PMEL17 에피토프의 하위세포 국재화

PMEL17은 그의 멜라로솜으로의 여정 동안 상당히 복잡한 가공을 거치는 것으로 알려져 있고, 이들 중 일부는 궁극적으로 제한된 RPT 도메인-함유 단편이 성숙한 소기관 내의 미소섬유 구조로 침착되는 것을 야기하는 단백분해 절단을 포함한다. 이 가공은 전구단백질 전환효소에 의한 Arg-469에서의 절단을 포함하며, 이는 이황화 결합에 의해 계속 연결되어 있는 N-말단 Mα 및 C-말단 Mβ 단편을 야기한다. Mβ 단편은 Gln-583에서 메탈로프로테이나제에 의해 그리고 막통과 영역에서 γ-세크레타제에 의해 더 절단된다. 따라서, 세포질 및 N-말단 에피토프를 함유하는 PMEL17의 영역은 이 가공 동안 해리된다.

PMEL17은 이 복잡한 가공을 겪기 때문에, 고정된 투과된 928mel 세포(종양 면역학 섹션의 암 연구 센터의 폴 로빈에 의해 제공됨)에서의 PMEL17 항체 에피토프의 하위세포 분포를 Cy3 형광체로 표지된 77E6 및 Alexa 488로 표지된 14C10을 이용하여 결정하였다. 항체 14C10은 17A9와 동일한 결실 단편에 결합한다. 세포질(77E6에 의해

검출됨) 및 N-말단 에피토프(14C10에 의해 검출됨) 모두를 함유하는 PMEL17의 거대한 집단은 핵주변 구조, 아마도 소포체에 존재하였다. 그러나 세포 주변 쪽으로 연장시, 77E6에 의한 하향 구배의 염색 강도가 눈에 띠며, 이후 14C10 염색의 상향 구배가 눈에 띠는데, 이는 세포막에서의 반응성을 포함한다. 이들 결과는 77E6에 의해 인식된 세포질 에피토프가 PMEL17의 원형질막으로의 이동하는 동안 제거되는 반면, 상기 N-말단 에피토프는 세포 표면으로 진행한다는 것을 제시한다.

분비성 가공 동안 세포질 구조의 방출과 일치하게도, 조절된 배지로부터 회수된 PMEL17은 또한 77E6과 반응하지 못하였다. 비-환원성 SDS-겔로부터 절개될 때, 이 분비된 PMEL17은 질량 분광분석법에 의해 결정된 바와 같이, Mα 및 Mβ로부터 유래되었지만 세포질 영역으로부터는 유래되지 않은 펩타이드 서열을 생성하였다. 2-머캅토에탄올을 이용한 환원시, 분비된 PMEL17은 SDS-겔 상에서 증대된 이동도를 나타내었고 Mβ가 아닌 Mα 서열이 이 절개된 밴드로부터 생성되었다. 이들 결과는 분비된 PMEL17이 이황화에 의해 연결된 Mα 및 Mβ 영역을 함유하지만, 세포질 서열이 결핍되어 있다는 것을 제시한다.

세포질 에피토프와 비교하여 세포 표면에서의 N-말단 에피토프의 우세는 77E6보다 17A9를 이용하여 관찰된 더 강한 FACS 신호와 일치한다. 그럼에도 불구하고, 세포질 영역의 일부 부분은 77E6을 이용하여 관찰된 FACS 신호를 설명하는 세포 표면에 존재한다. 이를 다루기 위해, 살아있는 세포를 각각 Alexa Fluors 555 및 488로 직접 표지된 77E6 및 17A9 항체와 반응시켰다. 항체가 서로 살아있는 세포에 결합하는데 경쟁하지 않았다는 것을 입증하기 위해, 928mel 세포를 표지된 항체 단독 또는 두 가지 모두와 함께 배양하였고, FACS 분석을 수행하였고, 개별적인 형광체에 게이트하였다. 개별적인 항체의 결합은 다른 항체의 존재에 의해 영향을 받지 않았다. 살아있는 표지된 세포의 가시화는 17A9를 이용시 균일한 세포 표면 염색을 밝혀내었고, 이는 원형질막에서 접근가능한 충분한 N-말단 에피토프와 일치하였다. 반대로, 77E6 염색은 더 격리되었고 드물게 있었으며, 17A9 반응성과 주로 비중첩이었다. 게다가, 17A9가 모든 세포를 균일하게 그리고 일관되게 염색하였음에도 불구하고, 77E6 염색은 세포마다 달랐고 염색의 전체 정도는 제제마다 달랐다. 이후 실험은 세포의 현탁액이 세포 표면에서 77E6 염색의 존재를 크게 향상시켰음을 입증하였고, 이는 배양 조건이 이 가변성을 설명할 수 있다는 것을 제시한다. 종합하면, 흑색종 세포 상에서의 17A9의 균일하고 강렬한 반응성이 이 항체를 약물 접합을 위한 우수한 후보로 만든다.

F. 종 교차-반응성

항체 17A9가 인간 이외의 종 유래의 PMEL17과 교차 반응하는지 여부를 결정하기 위해 항체 17A9를 시험하였다. 도 9는 인간(서열번호: 26), 사이노몰구스 원숭이(서열번호: 28), 랫트(서열번호: 29) 및 마우스(서열번호: 31) PMEL17 사이의 정렬을 보여준다. 모든 서열들은 사이노몰구스 원숭이 PMEL17을 제외하고 신호 서열을 포함한다. 모든 4개의 종 사이에 동일한 잔기들은 별표(*)로 표시되어 있다. 랫트 서열이 결실을 갖는 영역에서, 남아있는 3종 사이에 동일한 잔기들은 (+)로 표시되어 있다. PMEL17의 각 종에 대한 결합은 N-말단 gD 태그된 PMEL17(인간, 사이노몰구스 원숭이, 랫트, 또는 마우스 PMEL17)로 안정적으로 형질감염된 293S 세포를 이용하여 FACS 분석하고; 10 μg/ml 17A9 항체로 염색하고; R-파이코에리트린 접합된 염소 항-마우스 항체로 검출함으로써 결정하였다. 형질감염되지 않은 293 세포는 정상적으로는 PMEL17을 발현하지 않는다. 17A9는 시험된 PMEL17의 모든 4개의 종(인간, 사이노몰구스 원숭이, 랫트, 및 마우스)에 결합하는 것으로 확인되었다.

G. 항-PMEL17 항체의 내재화

ADC 표적의 한 가지 바람직한 속성은 세포 내의 분해 구획 내로 항체를 내재화하는 능력이다. 1300mel 흑색종 세포를 Lab-Tek II 세포 배양물이 처리된 4-웰 챔버 슬라이드(Nalge Nunc International)에 시딩하고, 5% CO_2를 갖는 37℃ 배양기에서 2시간 또는 20시간 동안 각각 50 nM 및 5 nM의 리소좀 프로테아제 억제제 류펩틴 및 펩스타틴 A(시그마-알드리치)의 존재하에 2 μg/ml의 PMEL17 mAb와 함께 배양하였다. 그리고 나서, 세포를 PBS로 세정하고, 실온에서 5분간 4% 파라 포름알데하이드(Polysciences, Inc.)에서 고정하고, 37℃에서 5분간 0.5% BSA를 갖는 PBS 중의 0.05% 사포닌(시그마-알드리치)으로 투과시키고 나서, 세포를 리소좀 마커에 대한 항체인 2 μg/ml 토끼 폴리클로날 항-LAMP1(시그마-알드리치)로 1시간 동안 배양한 다음, Cy3 표지된 항-마우스 IgG(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) 및 Alexa-488 표지된 항-토끼 IgG(Invitrogen Life Technology)로 1시간 배양하였다. PMEL17 항체를 또한 Alexa Fluro 555 또는 Alexa Fluro 488(Invitrogen Life Technology) 중 하나로 직접 표지하고, 이들을 상기와 같이 고정시키고 투과시켰다. 영상화를 위해 Leica SP5 초점공유 현미경(Leica Micro시스템)을 사용하였다.

도 4에 나타난 바와 같이, 17A9 및 LAMP1 염색의 상당한 중첩이 세포 내에서 명확하였다. 526mel, SK-MEL-5, 및 UACC257을 포함하는, 추가의 PMEL17+ 흑색종 세포주로의 17A9의 신속한 흡수가 일관되게 관찰되었다. 이들 결과

는 17A9 ADC가 효과적으로 내재화되고, 분해를 겪으며, 약물을 방출시켜 흑색종 세포를 사멸시킨다는 것을 예측한다.

H. 항-PMEL17 항체 약물 접합체의 생산

대규모 항체 생산을 위해, 항체를 CHO 세포에서 생산하였다. VL 및 VH를 코딩하는 벡터를 CHO 세포 내로 형질감염시키고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양 배지로부터 IgG를 정제하였다.

17A9 또는 ch17A9(예를 들면, 서열번호: 47 및 48 참고)를 본원에 묘사된 약물-링커 모이어티 MC-vc-PAB-MMAE에 접합함으로써 프로테아제-절단가능 val-cit 링커 및 약물 MMAE를 포함하는 항-PMEL17 항체-약물 접합체(ADC)를 생산하였다. ch5E9(예를 들면, 서열번호: 43 및 44 참고) 또는 hu5E9.v1(예를 들면, 서열번호: 45 및 46 참고)을 약물-링커 모이어티 MC-vc-PAB-MMAE에 접합함으로써 프로테아제-절단가능 val-cit 링커 및 약물 MMAE를 포함하는 항-ETBR ADC를 생산하였다. 편의상, 약물-링커 모이어티 MC-vc-PAB-MMAE는 이들 실시예 및 도면에서 종종 "vcMMAE" 또는 "VCE"로서 언급된다.

접합에 앞서, WO 제2004/010957호 A2에 기재된 방법론에 따른 표준 방법을 이용하여 항체를 TCEP를 이용하여 부분적으로 환원시켰다. 상기 부분적으로 환원된 항체를, 예를 들면, 문헌[Doronina 등 (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 및 US 제2005/0238649호 A1]에 기재된 방법론에 따른 표준 방법을 이용하여 약물-링커 모이어티에 접합시켰다. 요약하면, 부분적으로 환원된 항체를 약물-링커 모이어티와 조합하여 약물-링커 모이어티가 항체의 환원된 시스테인 잔기에 접합되게 하였다. 임의의 유리 링커-약물 모이어티와 반응하는 과량의 N-아세틸-시스테인을 첨가하여 상기 접합 반응을 켄칭시키고, ADC를 정제하였다. ADC에 대한 약물 부하(항체 당 약물 모이어티의 평균 수)는 2.78로 결정되었다. val-cit-MMAE 링커-약물(MC-val-cit-PAB-MMAE로도 지칭됨)을 포함하는 ADC의 구조가 도 15a에 나타나 있다.

ch17A9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-vc-PAB-PNU-159682에 접합함으로써 프로테아제-절단가능 val-cit 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-PMEL17 항체-약물 접합체(ADC)를 생산하였다. ch5E9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-vc-PAB-PNU-159682에 접합함으로써 프로테아제-절단가능 val-cit 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-ETBR ADC를 생산하였다. MC-val-cit-PAB-PNU-159682를 포함하는 ADC의 구조가 도 15c에 나타나 있다.

ch17A9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-아세탈-PNU-159682에 접합함으로써 산-불안정한 아세탈 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-PMEL17 항체-약물 접합체(ADC)를 생산하였다. ch5E9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-아세탈-PNU-159682에 접합함으로써 산-불안정한 아세탈 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-ETBR ADC를 생산하였다. MC-아세탈-PNU-159682를 포함하는 ADC의 구조가 도 15b에 나타나 있다.

ch17A9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-PNU-159682에 접합함으로써 비-절단가능 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-PMEL17 항체-약물 접합체(ADC)를 생산하였다. ch5E9를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-PNU-159682에 접합함으로써 비-절단가능 링커 및 약물 PNU-159682를 포함하는 항-ETBR ADC를 생산하였다. PNU-159682를 포함하는 ADC의 구조가 도 15e에 나타나 있다.

항체를 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같은 약물-링커 모이어티 MC-val-cit-PAB-PBD에 접합함으로써 프로테아제-절단가능 val-cit 링커 및 PBD 이량체 약물을 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC)를 생산하였다. 항체-MC-val-cit-PAB-PBD의 구조가 도 15d에 나타나 있다.

I. 항-PMEL17 항체 약물 접합체에 의한 시험관내 세포 증식의 억제

17A9 ADC의 존재시의 증식을 96-웰 투명바닥 플레이트(PerkinElmer)에서 50 μL의 정상 성장 배지에서 웰당 2,000으로 도말된 PMEL17+ 흑색종 세포 및 PMEL17을 안정적으로 발현하는 PC3 세포를 이용하여 평가하였다. 24시간 후, 연속 희석된 17A9 ADC를 갖는 추가의 50 μL의 배양 배지를 삼반복 웰에 첨가하였다. 3일 또는 5일 후, CellTiter-GloII(Promega Corp.) 및 Envision 2101 Mutilabel Reader(PerkinElmer)를 이용하여 세포수를 결정하였다.

도 5에 나타난 바와 같이, 17A9 ADC를 갖는 PMEL17+ 흑색종 세포의 패널의 적정은 10 내지 100 ng/ml ADC의 범위의 IC50으로 효과적인 세포 사멸을 야기하였다. PMEL17을 안정적으로 발현하는 전립선암 세포주 PC3은 효과적으로 사멸되었지만, 벡터 대조군 PC3 모 세포주의 사멸은 10 μg/ml의 ADC까지 드러나지 않았다.

임의의 특정한 이론에 의해 구속되고자 하는 것은 아니지만, 흑색종 세포주에 대한 ADC IC50 값의 변화는, 아마

도 추가의 인자가 원인일 수 있음에도 불구하고, ADC에 접근할 수 있는 PMEL17의 수준 변화를 반영할 수 있다. 예를 들면, 1300mel 세포주는 SK-MEL-5 세포주보다 현저히 더 많은 세포 표면 PMEL17을 발현하지만, ADC IC50은 1300mel보다 약간 더 높다. 또한, 유리 MMAE 약물 생성물에 대한 세포주의 반응 변화가 또 하나의 기여 요인일 수 있다. 8개의 흑색종 세포주에 대한 유리 MMAE의 IC50 값은 대략 0.1 내지 0.5 nM의 범위였다. 유리 약물 및 17A9 ADC에 대한 반응 사이에는 엄격한 상관관계가 존재하진 않았지만, 유리 약물 민감도에서의 몇 배의 차이는, 일부 경우 ADC에 대한 민감도 변화의 이유일 수 있다. 사실상, SK-MEL-5는 1300mel보다 유리 MMAE에 대해 더 민감한데, 이는 1300mel보다 더 낮은 수준의 세포 표면 PMEL17을 갖는 것을 보상할 수 있다. 항체 내재화의 상대적인 속도를 포함하는, 다른 인자 역시 ADC에 대한 반응에 영향을 미칠 수도 있다. 따라서, 시간 경과에 따라 항체를 축적하고 내재화하는 4개의 상이한 흑색종 세포주의 능력을 비교하였다. 예상대로, 더 높은 수준의 세포 표면 PMEL17을 갖는 세포들이 더 많은 항체를 축적하였지만, 내재화된 양의 백분율은 비슷한 것으로 나타났는데, 이는 흡수의 상대적 효율에 차이가 거의 없다는 것을 가리킨다.

J. 정상 멜라노사이트에서 항-PMEL17 ADC의 독성

정상 멜라노사이트 상에서 PMEL17을 표적화하는 잠재적 능력을 평가하기 위해, 정상 인간 피부에서의 이 표적의 발현 수준을 면역조직화학에 의해 평가하였다. 유리 슬라이드에 올린 4 μm 두께의 포르말린-고정된 파라핀 포매된 조직 섹션 상에서 면역조직화학(IHC)을 수행하였다. 모든 IHC 단계를 Ventana Discovery XT(Ventana Medical Systems; Tucson, AZ) 자동염색기 상에서 수행하였다. 전처리는 세포 컨디셔너 1, 표준 시간으로 수행하였다. 일차 항체인 PMEL17 클론 31D1을 10 μg/ml의 농도로 사용하였고 37℃에서 1시간 동안 슬라이드 상에서 배양하였다. Ventana Mouse OmniMap(Ventana Medical Systems; AZ)을 검출 시스템으로서 사용하였다. Ventana DAB 및 헤마톡실린 II를 발색 검출 및 대조염색을 위해 사용하였다.

상기 실험 결과들이 도 6A에 나타나 있다. PMEL17 항체 31D1을 이용한 염색은 진피의 기저층 따라 간헐적인 반응성을 나타내었고, 이는 피부에서 멜라노사이트의 분포와 일치하였다.

정상 인간 멜라노사이트 및 SK-MEL-5 흑색종 세포를 키메라 17A9와 반응시키거나, 또는 일차 항체와 반응시키지 않은 다음, Alexa 488-표지된 항-인간 IgG와 반응시키고 유세포측정에 의해 분석하였다. 도 6B에 나타난 바와 같이, 배양된 정상 인간 멜라노사이트는 또한 항체 17A9를 갖는 FACS+였고 강도는 흑색종 세포주 SK-MEL-5를 이용하여 관찰된 것과 대등하였다.

마지막으로, SK-MEL-5 및 SK-MEL-23 흑색종 세포, 또는 정상 인간 멜라노사이트를 17A9 ADC의 연속 희석물과 함께 배양하고 5일 후, CellTiter-GloII를 이용하여 세포수를 결정하였다. 도 6C에 나타난 바와 같이, 17A9 ADC를 이용한 정상 멜라노사이트의 적정은 흑색종 세포주를 이용하여 관찰된 것보다 거의 100배 높은 IC50을 갖는 세포 사멸을 야기하였다. 이들 결과는 항유사분열 약물 MMAE의 작용 기전 및 흑색종 세포 대비 정상 멜라노사이트의 감소된 증식 능력과 일치하였다.

K. 인간 흑색종 조직 시료 상에서의 PMEL17의 발현

PMEL17의 발현을, 17A9 및 31D1 모두를 이용하여, 실질적으로 상기에서 기재된 바와 같이, 면역조직화학에 의해 인간 흑색종 조직 샘플에 대해 평가하였다. 염색을 0(없을 경우)부터 3+(가장 강한 경우) 범위의 임의의 등급으로 점수를 매겼다:

0 (음성): 흑색종 세포의 >90%에서 염색이 매우 약하거나 없음

1+ (약함): 두드러진 염색 패턴이 약함

2+ (중간): 두드러진 염색 패턴이 흑색종 세포의 다수(> 50%)에서 중간 정도로 강함

3+ (강함): 두드러진 염색 패턴이 흑색종 세포의 다수(>50%)에서 강함

각각의 등급 수준에 대한 예시적인 염색이 도 7A, 좌측 패널에 나타나 있다.

30개의 원발성 흑색종 및 28개의 전이성 흑색종으로부터 58개의 시료를 얻었다. 도 7B에서 표에 나타난 바와 같이, 염색의 전체 스펙트럼이 58개의 인간 흑색종 시료에 걸쳐 관찰되었고, 대부분은 항체를 이용하여 양성 스코어를 나타내었다. 31D1로 검출될 때, 인간 흑색종 시료의 83%(48/58)는 PMEL17+였고, 17A9로 검출될 때 64%(37/58)는 PMEL17+였다. 17A9와 비교하여, 31D1을 이용한 염색은 등급의 상단부 쪽으로 크게 편중되었다. 또한, 흑색종 세포주의 고정된 파라핀-포매 펠렛을 절단하고 실제 흑색종 대비 그들의 염색 강도를 판단하기 위해 조직 시료와 동시에 이들을 염색하였다. 도 7A, 우측 패널을 참조한다.

L. SK-MEL-23 흑색종 세포주 이종이식에서 항-PMEL17 항체 약물 접합체의 효능

모든 연구는 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침(Ref- Institute of Laboratory Animal Resources, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", (NIH Publication #85-23). Washington (DC): National Academy Press; 1996)에 따라 수행하였다.

항-PMEL17 ADC의 효능을 SK-MEL-23 흑색종 세포주 이종이식 모델을 이용하여 조사하였다. 찰스 리버 실험실로부터 얻은 암컷 CRL Nu/Nu 마우스에게 매트리겔과 함께 HBSS 중의 5백만 SK-MEL-23 세포로 배 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하였다. SK-MEL-23 세포는 2+ 내지 3+의 염색 강도를 나타낸다. 종양 부피가 ~200 mm^3(0 일째)에 도달할 때, 동물을 무작위로 10마리씩 그룹으로 나누고, 2 또는 6 mg/kg 17A9 ADC의 단일 IV 주사를 투여하였다. 항-GP120 항체에 접합된 MMAE를 대조군으로서 사용하였다. 종양 부피를 연구 종료까지 주당 2회 측정하였다. 종양 부피를 식(L×W×W)/2를 이용하여 디지털 캘리퍼스(Fred V. Fowler Company, Inc.)를 이용하여 결정하였다. 종양 성장 억제(%TGI)를, %TGI = 100×[1-($AUC_{처리}$/일)/($AUC_{비히클}$/일)]과 같이, 비히클과 비교하여 1일당 각 용량 그룹에 대해 핏팅된 곡선하면적(AUC)의 백분율로서 계산하였다. R 패키지 nlme, 버전 3.1-96 in R v2.10.1을 이용하여 선형 혼합 효과 모델을 이용하여 로그$_2$ 변환된 개별적인 종양 부피 데이터에 곡선 핏팅을 적용하였다.

도 8에 나타난 바와 같이, 6 mg/kg 용량의 17A9 ADC는 몇 주간 종양 성장을 지연시킨 반면, 대조군 ADC의 어떤 용량도 종양 성장에 주목할 만한 효과를 나타내지 못했다. 이들 결과는 인간 흑색종 종양 이종이식 상에서 PMEL17을 표적화하는 ADC를 이용시 강력하고 특이적인 효능을 입증한다.

M. 항-ETBR-vc-MMAE에 대해 내성인 UACC-257X2.2 흑색종 세포에서의 항-PMEL17 항체 약물 접합체의 효능

또 다른 치료제에 대해 내성이 생긴 흑색종에서의 항-PMEL17 ADC의 효능을 결정하기 위해, val-cit 링커 및 MMAE 약물을 포함하는 항-엔도텔린 B 수용체(ETBR) 면역접합체(항-ETBR-vc-MMAE, 또한 항-EDNRB-vc-MMAE, 항-ETBR-MC-val-cit-PAB-MMAE 등으로 지칭됨; 예를 들면, 미국 공개 제2011/0206702호 참조)에 대해 내성인 UACC-257X2.2 흑색종 세포를 생체내 및 시험관내에서 개발하였다.

생체내에서 생긴 내성의 경우, NCr 누드 마우스(Taconic, Hudson, NY)에게 매트리겔과 함께 HBSS 중의 5백만 UACC-257X2.2 세포를 등 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하였다. UACC-257X2.2 세포는 UACC-257 세포(국립암협회)로부터 유래되고 하기와 같이 생체내 성장을 위해 최적화되어 있다. UACC-257 세포를 암컷 NCr 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하로 주사하여 종양 성장을 유도하였다. 하나의 종양을 수확하고 시험관내에서 성장시켰다(UACC-257X1.2 세포주로서 지칭됨). UACC-257X1.2 세포주를 다시 암컷 NCr 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하로 주사하여 생체내에서 세포주의 성장을 개선시켰다. 두 번째 주사로부터 종양을 수집하고 다시 시험관내 성장에 적응시켜 UACC-257X2.2를 생성하였다. 이 세포주로부터 유래된 UACC-257X2.2 세포주 및 종양은 모 세포주 UACC-257과 대등한 수준으로 ETBR을 발현한다.

UACC-257X2.2 세포로 접종된 10마리의 마우스에게 0일째 정맥내로 3 mg/kg hu5E9.v1-MC-vc-PAB-MMAE를 투여하였다(hu5E9.v1에 대한 중쇄 및 경쇄 서열이 각각 서열번호: 46 및 45에 나타나 있음). 마우스에게 다시 투여될 시기와 복용량을 결정하기 위해, 하기를 고려하였다: 초기 치료 후 종양이 재성장하였는지 여부(즉, 0일째의 초기 종양 부피 크기로 다시 성장한 종양), 및 재성장 속도. 투여된 용량의 빈도는 시간이 경과함에 따라 달라졌지만 2 용량/주를 초과하지 않았다. 정맥내 용량은 300 μL를 초과하지 않았다. 투여된 용량의 범위는 3 mg/kg, 6 mg/kg, 8 mg/kg, 및 10 mg/kg였다. 종양이 일련의 증가하는 용량에 대해 더 이상 반응하지 않으면(즉, 그것이 일련의 증가하는 용량에 대해 내성을 나타내면), 복용을 중단하였다.

도 10A에 나타난 바와 같이, UACC-257X2.2 종양 #359는 약 120일 후 항-ETBR-vc-MMAE에 대해 내성이 생긴 반면, 종양 #368은 더 느리게 내성이 생겼다. 종양 #359를 수확하고 시험관내 성장을 위해 세포를 해리시켰다(본원에서 생체내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포로서 지칭됨).

시험관내에서 생긴 내성의 경우, UACC-257X2.2 세포를 2개월의 과정에 걸쳐 배양 접시에서 항-ETBR-vc-MMAE의 증가하는 농도에 적응시켰다. 도 10B는 시험관내에서 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포주(본원에서 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포로서 지칭됨)를 보여주며, 이것은 적어도 10 μg/ml까지의 항-ETBR-vc-MMAE의 농도에 의해 상대적으로 영향을 받지 않았다. 도 10B는 또한 대조군 ADC, α-gD-vc-MMAE와 함께 배양된 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포, 및 α-ETBR-vc-MMAE와 함께 배양된 모 UACC-257X2.2 세포를 보여준다.

그리고 나서, 생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포 및 모 UACC-257X2.2 세포의 표면 상에서의 ETBR 및 PMEL17의 발현을 FACS에 의해 결정하였다. 세포를 항-ETBR 항체(hu5E9.v1 또는 ch5E9) 또는 항-PMEL17

항체(ch17A9)로 염색한 다음, 항-인간 Alexa 488 항체 접합체로 염색하였다. 도 11A 및 B에 나타난 바와 같이, 생체내-유래된 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포 모두는 모 세포주와 비교하여 세포의 표면상에서 감소된 ETBR의 발현을 가지고 있었다. PMEL17의 표면 발현은 모 세포와 비교하여 내성 세포에서 변하지 않았다. 도 11C 및 D를 참조한다. 각 도면에서 대조군 피크는 2차 항체만을 이용한 염색을 보여준다.

그리고 나서, 생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포를 대상으로 항-ETBR-vc-MMAE, 항-PMEL17-vc-MMAE, 및 대조군 ADC, 항-gD-vc-MMAE의 증가하는 농도에 대한 민감도를 분석하였다. 실시예 H 및 도 15a를 참조한다.

면역접합체의 존재시 세포주의 시험관내 세포 증식을 평가하였다. 세포를 96-웰 투명-바닥 플레이트에서 50 μL의 정상 성장 배지에서 1,500 세포/웰로 도말하였다. 24시간 후, 연속희석된 면역접합체를 갖는 추가의 50 μL의 배양 배지를 삼반복 웰에 첨가하였다. 5일 후, Envision 2101 Mutilabel Reader(Perkin-Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 CellTiter-Glo 발광 세포 생존율 시약(G7572, Promega Corporation, Madison, WI)을 이용하여 세포 생존을 결정하였다.

상기 실험의 결과가 도 12에 나타나 있다. 모 UACC-257X2.2 세포주는 각각 45 ng/mL 및 33 ng/mL의 EC50으로, 항-ETBR-vc-MMAE 및 항-PMEL17-vc-MMAE 모두에 대해 민감하였다. 도 12A를 참조한다. 또한 모 세포주는 0.28 nM의 EC50으로, 링커-약물(항체 없음; MC-vc-PAB-MMAE; 도 12에서 "유리 약물"로서 지칭됨)에 민감하였다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 항-PMEL17-vc-MMAE에 대해 다소 덜 민감하였고 항-ETBR-vc-MMAE에 대해 유의하게 덜 민감하였으며, EC50은 각각 119 ng/mL 및 235 ng/mL였다. 도 12B를 참조한다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포 역시 0.77 nM의 EC50으로, 링커-약물(항체 없음)에 대해 덜 민감하였다. 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 764 ng/mL의 EC50으로, 항-PMEL17-vc-MMAE에 유의하게 덜 민감하였고, 항-ETBR-vc-MMAE에게 민감하지 않았다. 도 12C를 참조한다. 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 3.5 nM의 EC50으로, 링커-약물(항체 없음)에 대해 덜 민감하였다. 이들 결과는 ADC의 항체 및 약물 부분 모두에 대해 내성이 생길 수 있음을 제시한다.

UACC-257X2.2 세포에서 ADC의 항체 부분이 내성에 대해 미치는 효과를 결정하기 위해, 생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포를 대상으로 내성 세포를 개발하기 위해 사용되었던 것 이외의 상이한 링커 및 상이한 약물을 갖는 ADC에 대한 민감도를 분석하였다. 이 실험에서 시험된 ADC는 비-절단가능 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 항-ETBR(항-ETBR-PNU) 및 비-절단가능 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 항-PMEL17(항-PMEL17-PNU)이었다. 실시예 H 및 도 15e를 참조한다. 비-절단가능 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 관련없는 항체, 항-gD(항-gD-PNU)를 대조군으로서 사용하였다.

상기 실험의 결과가 도 13에 나타나 있다. 모 UACC-257X2.2 세포주는 각각 4.2 ng/mL 및 5.5 ng/mL의 EC50으로, 항-ETBR-PNU 및 항-PMEL17-PNU 모두에 대해 민감하였다. 도 13A를 참조한다. 모 세포주 역시 이 실험에서 0.18 nM의 EC50으로, 링커-약물(항체 없음; MC-PNU-159682; 도 13에서 "유리 약물"로서 지칭됨)에 대해 민감하였다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는, 각각 4.7 ng/mL 및 14.3 ng/mL의 EC50으로, 모 세포주만큼 항-PMEL17-PNU에 대해 민감하였지만, 항-ETBR-PNU에 대해 다소 덜 민감하였다. 도 13B를 참조한다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포 역시, 0.133 nM의 EC50으로, 모 세포주만큼 링커-약물(항체 없음)에 민감하였다. 생체내 유도된 내성 UACC-257X2.2 세포와 유사하게, 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는, 각각 4.8 ng/mL 및 14.6 ng/mL의 EC50으로, 항-PMEL17-PNU에 대해 민감하였지만, 항-ETBR-PNU에 대해 다소 덜 민감하였다. 도 13C를 참조한다. 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포 역시, 0.15 nM의 EC50으로, 모 세포주만큼 링커-약물(항체 없음)에 민감하였다. 이들 결과는 MMAE ADC의 약물부에 대한 내성과는 대조적으로, 생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포에서의 내성의 정도가 ADC의 항체 부분에 기인한다(예를 들면, ETBR의 발현 감소로 인해)는 것을 입증한다. 항-ETBR 및 산 불안정한 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 항-PMEL17을 이용하여 유사한 결과가 얻어졌다.

생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포를 대상으로 MMAE 면역접합체에서 사용된 vc 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 항-ETBR(항-ETBR-vc-PNU) 및 vc 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 항-PMEL17(항-PMEL17-vc-PNU)에 대한 민감도를 분석하였다. 실시예 H 및 도 15c를 참조한다. vc 링커를 통해 PNU-159682에 연결된 관련없는 항체, 항-gD(항-gD-vc-PNU)를 대조군으로서 사용하였다.

상기 실험 결과가 도 14에 나타나 있다. 모 UACC-257X2.2 세포주는 각각 3 ng/mL 및 2.5 ng/mL의 EC50으로, 항-ETBR-vc-PNU 및 항-PMEL17-vc-PNU에 대해 민감하였다. 도 14A를 참조한다. 모 세포주는 이 실험에서 2 nM의 EC50으로, 링커-약물(항체 없음; MC-vc-PAB-PNU-159682)에 민감하였다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포

는, 각각 6.4 ng/mL 및 23 ng/mL의 EC50으로, 항-PMEL17-vc-PNU에 대해 모 세포주보다 약간 덜 민감하였고, 항-ETBR-vc-PNU에 대해 덜 민감하였다. 도 14B를 참조한다. 생체내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 또한 4.2 nM의 EC50으로, 모 세포주보다 링커-약물(항체 없음)에 대해 약간 덜 민감하였다. 유사하게, 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 각각 11.6 ng/mL 및 41 ng/mL의 EC50으로, 항-PMEL17-PNU 및 항-ETBR-PNU에 대해 덜 민감하였다. 도 14C를 참조한다. 시험관내 유래된 내성 UACC-257X2.2 세포는 6.6 nM의 EC50으로, 모 세포주보다 링커-약물(항체 없음)에 대해 약간 덜 민감하였다. 이들 결과는 ADC의 링커 성분이 생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포에서의 내성에 기여할 수 있음을 제시한다. 예를 들면, 내성 세포주를 개발하는데 사용된 ADC와 항체와 약물은 상이하지만 링커는 동일한 항-PMEL17-vc-PNU에 대한 모 세포주 및 시험관내-유도된 내성 세포주의 민감도(각각 EC50 2.5 ng/ml 및 11.6 ng/ml) 대 항체, 약물 및 링커가 상이한 항-PMEL17-PNU에 대한 모 세포주 및 시험관내-유도된 내성 세포주의 민감도(각각 EC50 5.5 ng/ml 및 4.8 ng/ml)를 비교한다.

생체내- 및 시험관내-유래된 내성 UACC-257X2.2 세포를 대상으로 MMAE 면역접합체에서 사용된 vc 링커를 통해 PBD 이량체에 연결된 항-ETBR(항-ETBR-vc-PBD)에 대한 민감도를 분석하였다. vc-PBD는 본원에서 "PBD 이량체-val-cit-PAB-Ab"로서 제시된 구조를 가지고 있었다. 또한 실시예 H 및 도 15d를 참조한다. 상기 실험에서, 항-ETBR-vc-PNU를 이용한 결과와 유사하게, 상기 내성 세포주들은, 이들이 완전히 내성은 아니였음에도 불구하고, 모 세포주보다 항-ETBR-vc-PBD에 대해 덜 민감하였는데, 이는 내성의 일부가 항체 및 링커 부분으로 인한 것임을 제시하지만, 일부 민감도는 면역접합체의 약물 부분을 변화시킴으로써 회복될 수 있다.

전술한 발명이 이해의 명확성을 위해 도식 및 예로써 상세하게 기술되었음에도 불구하고, 상기 설명과 예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그 전체가 참조로 분명히 포함된다.

서열의 표

서열번호	설명	서열
1	17A9 중쇄 가변 영역	EVQLQQSGPE LVKPGASMKI SCKSSGYSFT RYTMNWVKQS HGKNLEWIGV INPYNGGTVY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MELLSLTSED SAVYYCARTD YDGYAMDYWG QGTSVTVSSA KT
2	17A9 경쇄 가변 영역	DVQITQSPSY LAASPGETIT INCRATKSIS KYLAWYQEQP GKTNNLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAMYYCQQ HNEYPYTFGS GTKLEIK
3	17A9 HVR H1	GYSFTRYTMN
4	17A9 HVR H2	VINPYNGGTVYNQKFKG
5	17A9 HVR H3	TDYDGYAMDY
6	17A9 HVR L1	RATKSISKYLA
7	17A9 HVR L2; 8G3 HVR L2	SGSTLQS
8	17A9 HVR L3; 8G3 HVR L3	QQHNEYPYT
9	8G3 중쇄 가변 영역	EVQLQQSGPE LVKPGASMRI SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKNLEWIGV YNPYNGGTVY NQKFKGKATL TVDKSSSTTY MELLSLTSED SAVYYCARTD SGGYAMDCWG QGTSVTVSSA KT
10	8G3 경쇄 가변 영역	DVQITQSPSY LDASPGETIT INCRASKTIS KYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAMYYCQQ HNEYPYTFGS GTKLEIK
11	15F2 중쇄 가변 영역	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT KYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGNTNYN SALMSRLSIN KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AMYYCATFDV WGAGTTVTVS SAKT
12	15F2 경쇄 가변 영역	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL HSNGNTFLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLV SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGF YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE LK
13	8G3 HVR H1	GYSFTGYTMN
14	8G3 HVR H2	VYNPYNGGTVYNQKFKG
15	8G3 HVR H3	TDSGGYAMDC
16	8G3 HVR L1	RASKTISKYLA
17	8G3 / 17A9 HVR H1 공통	GYSFTX_1YTMN
18	8G3 / 17A9 HVR H2 공통	VX_2NPYNGGTVYNQKFKG
19	8G3 / 17A9 HVR L1 공통	RAX_3KX_4ISKYLA
20	15F2 HVR H1	GFSLTKYGVH
21	15F2 HVR H2	VIWAGGNTNYNSALMS
22	15F2 HVR H3	TFDV
23	15F2 HVR L1	RSSKSLLHSNGNTFLY
24	15F2 HVR L2	RMSNLVS
25	15F2 HVR L3	MQHLEYPYT
26	인간 PMEL17 프레프로단백질; NP_008859; 신호 서열 = 아미노산 1 내지 24	MDLVLKRCLL HLAVIGALLA VGATKVPRNQ DWLGVSRQLR TKAWNRQLYP EWTEAQRLDC WRGGQVSLKV SNDGPTLIGA NASFSIALNF PGSQKVLPDG QVIWVNNTII NGSQVWGGQP VYPQETDDAC IFPDGGPCPS GSWSQKRSFV YVWKTWGQYW QVLGGPVSGL SIGTGRAMLG THTMEVTVYH RRGSRSYVPL AHSSSAFTIT DQVPFSVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF ALQLHDPSGY LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS CGSSPVPGTT DGHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTTPGQA PTAEPSGTTS VQVPTTEVIS TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM TPAEVSIVVL SGTTAAQVTT TEWVETTARE LPIPEPEGPD

		ASSIMSTESI TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY GSFSVTLDIV QGIESAEILQ AVPSGEGDAF ELTVSCQGGL PKEACMEISS PGCQPPAQRL CQPVLPSPAC QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AGLGQVPLIV GILLVLMAVV LASLIYRRRL MKQDFSVPQL PHSSSHWLRL PRIFCSCPIG ENSPLLSGQQ V
27	인간 PMEL17 프로단백질, 신호 서열 없음; 아미노산 25 내지 661	KVPRNQ DWLGVSRQLR TKAWNRQLYP EWTEAQRLDC WRGGQVSLKV SNDGPTLIGA NASFSIALNF PGSQKVLPDG QVIWVNNTII NGSQVWGGQP VYPQETDDAC IFPDGGPCPS GSWSQKRSFV YVWKTWGQYW QVLGGPVSGL SIGTGRAMLG THTMEVTVYH RRGSRSYVPL AHSSSAFTIT DQVPFSVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF ALQLHDPSGY LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS CGSSPVPGTT DGHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTTPGQA PTAEPSGTTS VQVPTTEVIS TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM TPAEVSIVVL SGTTAAQVTT TEWVETTARE LPIPEPEGPD ASSIMSTESI TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY GSFSVTLDIV QGIESAEILQ AVPSGEGDAF ELTVSCQGGL PKEACMEISS PGCQPPAQRL CQPVLPSPAC QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AGLGQVPLIV GILLVLMAVV LASLIYRRRL MKQDFSVPQL PHSSSHWLRL PRIFCSCPIG ENSPLLSGQQ V
28	사이노몰구스 원숭이 PMEL17, 신호 서열 없음	KGPRNQDWLG VSRQLRTKAW NRQLYPEWTE AQRLDCWRGG QVSLKVSNDG PTLIGANASF SIALNFPGSQ KVLPDGQVIW VNNTIINGSQ VWGGQPVYPQ ETDDACIFPD GGPCPSGPWS QKRSFVYVWK TWGQYWQVLG GPVSGLSIGT GRAMLGTHTM EVTVYHRRGS RSYVPLAHSS SAFTITDQVP FSVSVSQLRA LDGGNKHFLR NQPLTFALQL HDPSGYLAEA DLSYTWDFGD SSGTLISRAL VVTHTYLEPG PVTAQVVLQA AIPLTSCGSS PVPGTTDGHR PTAEAPDTTA GRGPTTEVVG TTPGQVPTTQ PSGTTSVQVP TTEVISTTPV QMPTAESTGT TPEKVPVSEV MGTTLAEMST PEAIGMTPAE VSIVVPSGTT AAQVTTTEWV ETTAGELPTP EPEGPDTSSI MSTESITGSL GPLLDGTATL RLEKRQVPLD CVLYRYGSFS VTLDIVQGIE SAEILQVVPS SEGDAFELTV SCQGGLPTEA CMEISSPGCQ PPAQQLCQPV PPSPACQLVL YQILKGGLGT YCLNVSLADA NSLAVVSTQL IVPGQEAGLG QAPLFVGILL VLMAVVLASL IYRRRLMKQA FSIPQLPHGS SHWLRLPRIF RSCPIGENSP LLSGQEV
29	랫트 PMEL17 전구체; NP_068682; 신호 서열 = 아미노산 1 내지 25	MGVQRRCFLP VLVLGALLAL GSIEGSRNQN WHGVSRQLVT KVWNKQLYPE WTEVQGSNCW RGGQVSLKVR NDGPTLVGAN TSFSIALHFP GSQKVLPDGQ VIWVNNTIIN GSQVWGGQPV YPREPDDACI FPDGGPCPSG PKPPRRSFVY VWKTWGQYWQ VLGGPESKLS IPTGHARLGT HTMEVTVYHR RGSQSYVPLA HSSSTFTITG SVSRLLDDTD TIMLVKRQVP LDCVLYRYGS FSLTLDIVQG IESAEILQAV PSSEGDAFEL TVSCRGGLPK EACMDISSPG CQPPAQRLCQ PVPPSPDCQL VLHQILKGGL GTYCLNVSLA DANSLAVAST QLVVPGQEGS LGQAPLLVGV LLVLVAVVLA SLIYRHRLKK QDSVSQTPHG STHWLRLPPV FCARRLGESS PLLSGQQV
30	랫트 PMEL17, 신호 서열 없음, 아미노산 26 내지 418	SRNQN WHGVSRQLVT KVWNKQLYPE WTEVQGSNCW RGGQVSLKVR NDGPTLVGAN TSFSIALHFP GSQKVLPDGQ VIWVNNTIIN GSQVWGGQPV YPREPDDACI FPDGGPCPSG PKPPRRSFVY VWKTWGQYWQ VLGGPESKLS IPTGHARLGT HTMEVTVYHR RGSQSYVPLA HSSSTFTITG SVSRLLDDTD TIMLVKRQVP LDCVLYRYGS FSLTLDIVQG IESAEILQAV PSSEGDAFEL TVSCRGGLPK EACMDISSPG CQPPAQRLCQ PVPPSPDCQL VLHQILKGGL GTYCLNVSLA DANSLAVAST QLVVPGQEGS LGQAPLLVGV LLVLVAVVLA SLIYRHRLKK QDSVSQTPHG STHWLRLPPV FCARRLGESS PLLSGQQV

31	마우스 PMEL17 전구체; NP_068682; 신호 서열 = 아미노산 1 내지 25	MGVQRRSFLP VLVLSALLAV GALEGSRNQD WLGVPRQLVT KTWNRQLYPE WTEVQGSNCW RGGQVSLRVI NDGPTLVGAN ASFSIALHFP GSQKVLPDGQ VIWANNTIIN GSQVWGGQPV YPQEPDDACV FPDGGPCPSG PKPPKRSFVY VWKTWGKYWQ VLGGPVSRLS IATGHAKLGT HTMEVTVYHR RGSQSYVPLA HASSTFTITD QVPFSVSVSQ LQALDGETKH FLRNHPLIFA LQLHDPSGYL AEADLSYTWD FGDGTGTLIS RALDVTHTYL ESGSVTAQVV LQAAIPLVSC GSSPVPGTTD GYMPTAEAPG TTSRQGTTTK VVGTTPGQMP TTQPSGTTVV QMPTTEVTAT TSEQMLTSAV IDTTLAEVST TEGTGTTPTR PSGTTVAQAT TTEGPDASPL LPTQSSTGSI SPLLDDTDTI MLVKRQVPLD CVLYRYGSFS LALDIVQGIE SAEILQAVPF SEGDAFELTV SCQGGLPKEA CMDISSPGCQ PPAQRLCQSV PPSPDCQLVL HQVLKGGSGT YCLNVSLADA NSLAVASTQL VVPGQDGGLG QAPLLVGILL VLVAVVLASL IHRHRLKKQG SVSQMPHGST HWLRLPPVFR ARGLGENSPL LSGQQV
32	마우스 PMEL17, 신호 서열 없음, 아미노산 26 내지 626	SRNQD WLGVPRQLVT KTWNRQLYPE WTEVQGSNCW RGGQVSLRVI NDGPTLVGAN ASFSIALHFP GSQKVLPDGQ VIWANNTIIN GSQVWGGQPV YPQEPDDACV FPDGGPCPSG PKPPKRSFVY VWKTWGKYWQ VLGGPVSRLS IATGHAKLGT HTMEVTVYHR RGSQSYVPLA HASSTFTITD QVPFSVSVSQ LQALDGETKH FLRNHPLIFA LQLHDPSGYL AEADLSYTWD FGDGTGTLIS RALDVTHTYL ESGSVTAQVV LQAAIPLVSC GSSPVPGTTD GYMPTAEAPG TTSRQGTTTK VVGTTPGQMP TTQPSGTTVV QMPTTEVTAT TSEQMLTSAV IDTTLAEVST TEGTGTTPTR PSGTTVAQAT TTEGPDASPL LPTQSSTGSI SPLLDDTDTI MLVKRQVPLD CVLYRYGSFS LALDIVQGIE SAEILQAVPF SEGDAFELTV SCQGGLPKEA CMDISSPGCQ PPAQRLCQSV PPSPDCQLVL HQVLKGGSGT YCLNVSLADA NSLAVASTQL VVPGQDGGLG QAPLLVGILL VLVAVVLASL IHRHRLKKQG SVSQMPHGST HWLRLPPVFR ARGLGENSPL LSGQQV
33	5E9 HVR H1	GYTFTSYWMQ
34	5E9 HVR H2	TIYPGDGDTSYAQKFKG
35	5E9 HVR H3	WGYAYDIDN
36	5E9 HVR L1	KSSQSLLDSDGKTYLN
37	5E9 HVR L2	LVSKLDS
38	5E9 HVR L3	WQGTHFPYT
39	hu5E9.v1 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLL DSDGKTYLNW LQQKPGKAPK RLIYLVSKLD SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCWQGTHFP YTFGQGTKVE IK
40	hu5E9.v1 중쇄 가변 영역	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYWMQWVRQA PGKGLEWIGT IYPGDGDTSY AQKFKGRATL STDKSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARWG YAYDIDNWG
41	mu5E9 경쇄 가변 영역	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI TRVEAEDLGV YYCWQGTHFP YTFGGGTKLE IK
42	mu5E9 중쇄 가변 영역	QVQLLQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT IYPGDGDTSY AQKFKGKATL TTDKYSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARWG YAYDIDNWG
43	ch5E9 경쇄	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI TRVEAEDLGV YYCWQGTHFP YTFGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
44	ch5E9 중쇄	QVQLLQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT IYPGDGDTSY AQKFKGKATL TTDKYSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARWG YAYDIDNWGQ GTLVTVSSAS

		TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
45	hu5E9.v1 경쇄	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLL DSDGKTYLNW LQQKPGKAPK RLIYLVSKLD SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCWQGTHFP YTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
46	hu5E9.v1 중쇄	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYWMQWVRQA PGKGLEWIGT IYPGDGDTSY AQKFKGRATL STDKSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARWG YAYDIDNWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
47	ch17A9 경쇄	DVQITQSPSY LAASPGETIT INCRATKSIS KYLAWYQEQP GKTNNLLIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAMYYCQQ HNEYPYTFGS GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
48	ch17A9 중쇄	EVQLQQSGPE LVKPGASMKI SCKSSGYSFT RYTMNWVKQS HGKNLEWIGV INPYNGGTVY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MELLSLTSED SAVYYCARTD YDGYAMDYWG QGTSVTVSSA KTKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
49	8G3 중쇄 가변 영역	EVQLQQSGPE LVKPGASMRI SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKNLEWIGV YNPYNGGTVY NQKFKGKATL TVDKSSSTTY MELLSLTSED SAVYYCARTD SGGYAMDCWG QGTSVTVSS
50	17A9 중쇄 가변 영역	EVQLQQSGPE LVKPGASMKI SCKSSGYSFT RYTMNWVKQS HGKNLEWIGV INPYNGGTVY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MELLSLTSED SAVYYCARTD YDGYAMDYWG QGTSVTVSS
51	15F2 중쇄 가변 영역	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT KYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGNTNYN SALMSRLSIN KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AMYYCATFDV WGAGTTVTVS S

수탁번호

[0067]

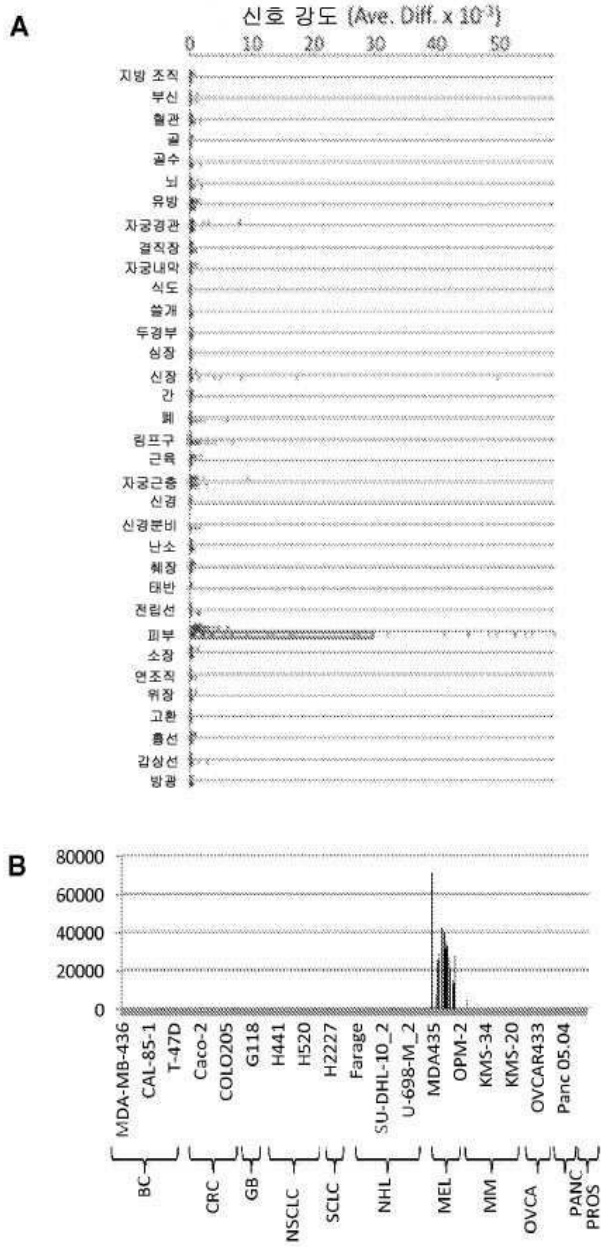
기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-12862

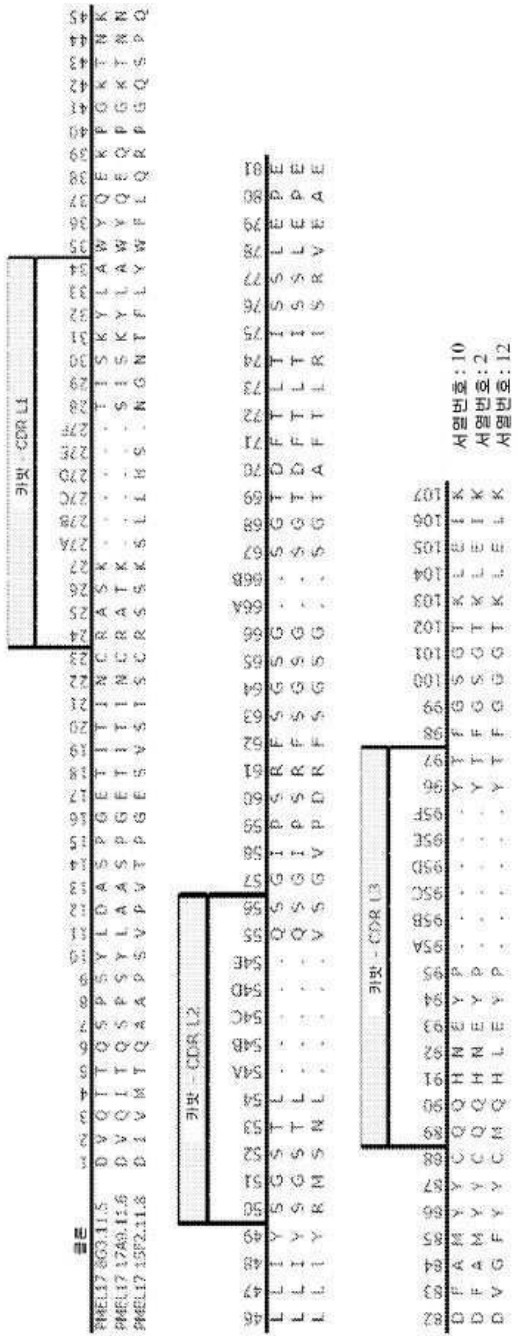
수탁일자 : 20120424

도면

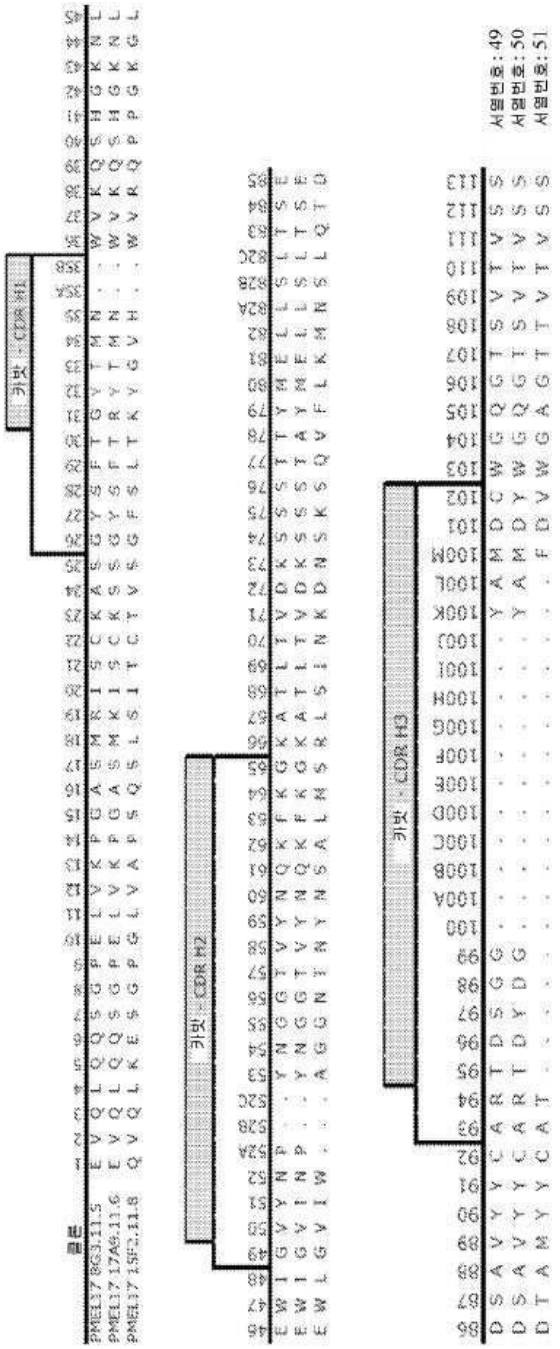
도면1


A
신호 강도 (Ave. Diff. x 10-3)
0
10
20
30
40
50
지방 조직
부신
혈관
골
골수
뇌
유방
자궁경관
결직장
자궁내막
식도
쓸개
두경부
심장
신장
간
폐
림프구
근육
자궁근층
신경
신경분비
난소
췌장
태반
전립선
피부
소장
연조직
위장
고환
흉선
갑상선
방광
B
80000
60000
40000
20000
0
MDA-MB-436
CAL-85-1
T-47D
Caco-2
COLO205
G118
H441
H520
H2227
Farage
SU-DHL-10_2
U-698-M_2
MDA435
OPM-2
KMS-34
KMS-20
OVCAR433
Panc 05.04
BC
CRC
GB
NSCLC
SCLC
NHL
MEL
MM
OVCA
PANC
PROS

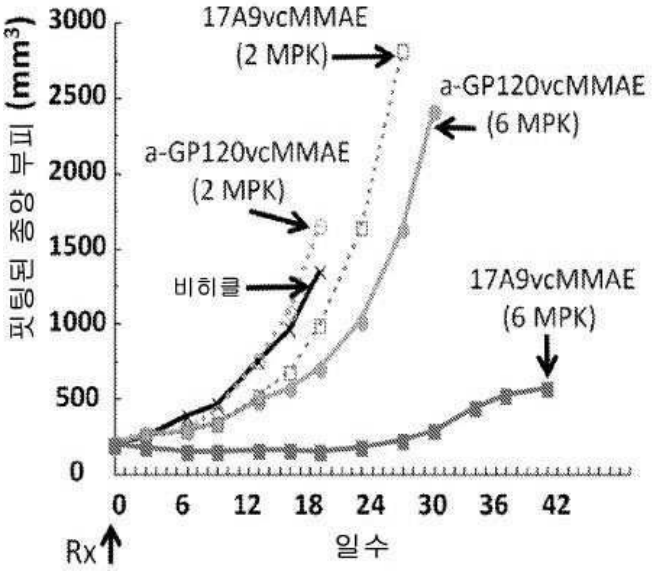
도면2a



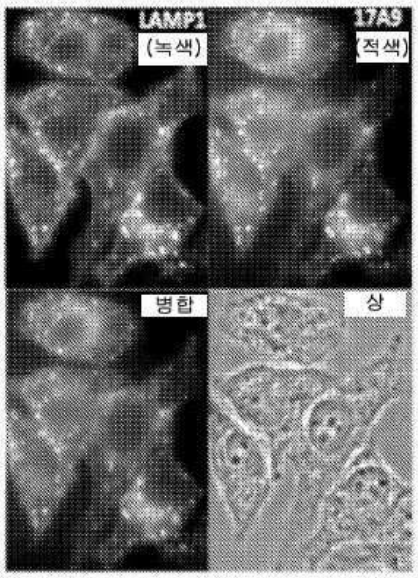
도면2b



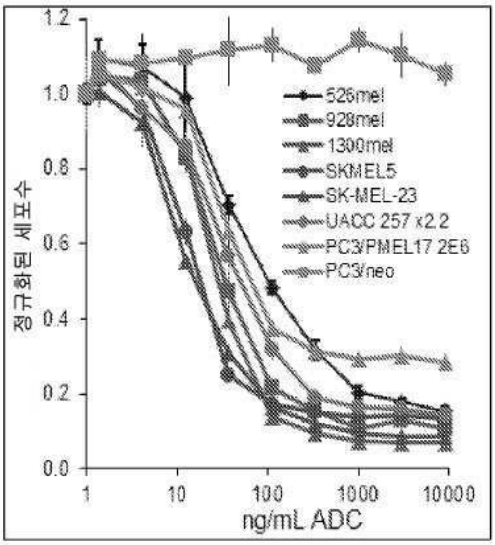
도면3


피팅된 종양 부피 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
17A9vcMMAE
(2 MPK)
a-GP120vcMMAE
(6 MPK)
a-GP120vcMMAE
(2 MPK)
비히클
17A9vcMMAE
(6 MPK)
0
6
12
18
24
30
36
42
Rx
일수

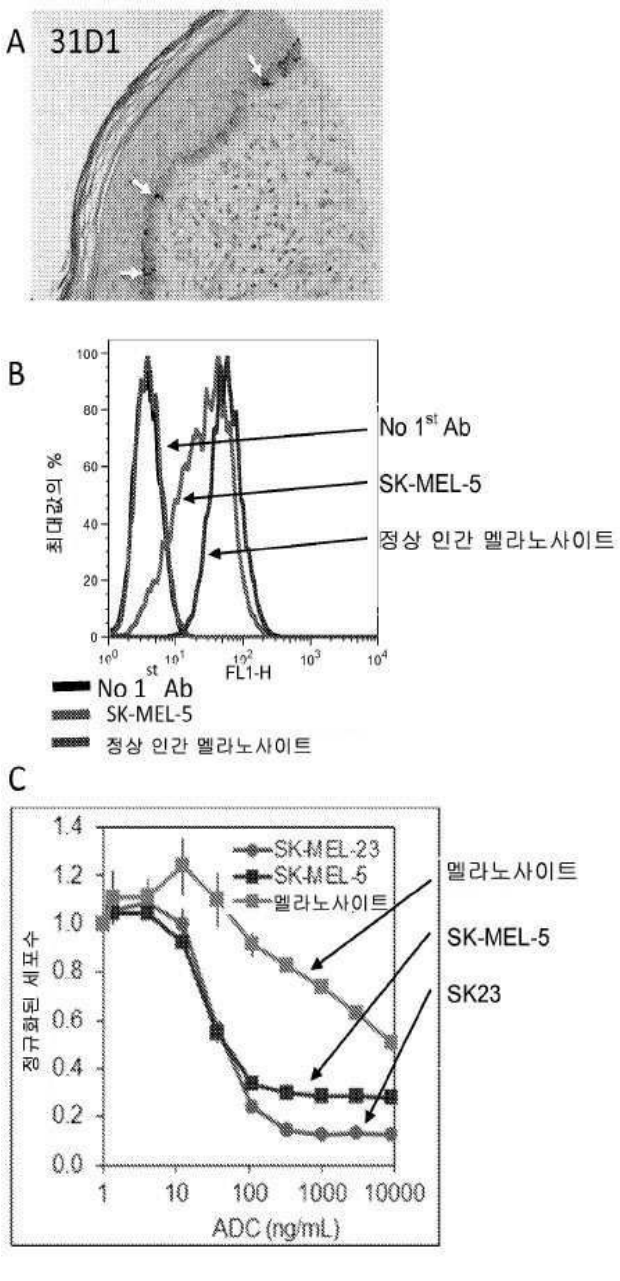
도면4


LAMP1
(녹색)
17A9
(적색)
병합
상

도면5

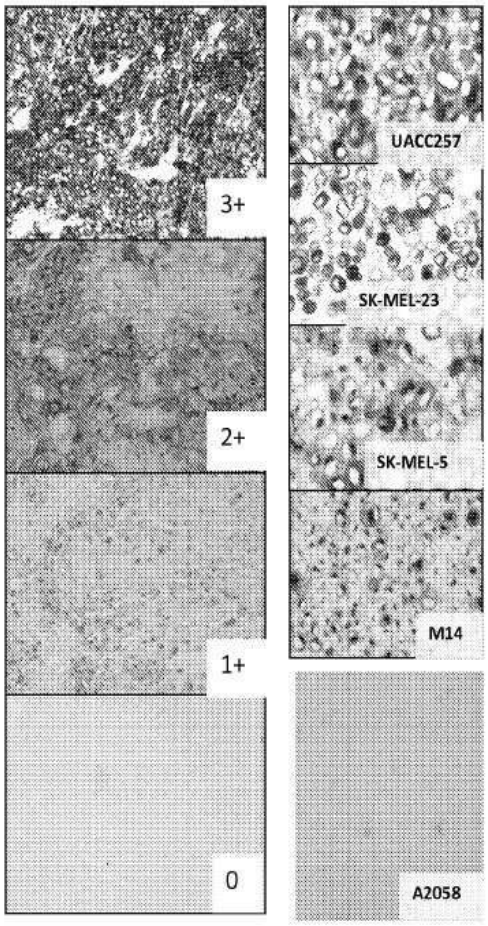

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
정규화된 세포수
1
10
100
1000
10000
ng/mL ADC
526mel
928mel
1300mel
SKMEL5
SK-MEL-23
UACC 257 x2.2
PC3/PMEL17 2E6
PC3/neo

도면6


A
31D1
B
최대값의 %
FL1-H
No 1st Ab
SK-MEL-5
정상 인간 멜라노사이트
C
정규화된 세포수
ADC (ng/mL)
SK-MEL-23
SK-MEL-5
멜라노사이트
멜라노사이트
SK-MEL-5
SK23

도면7

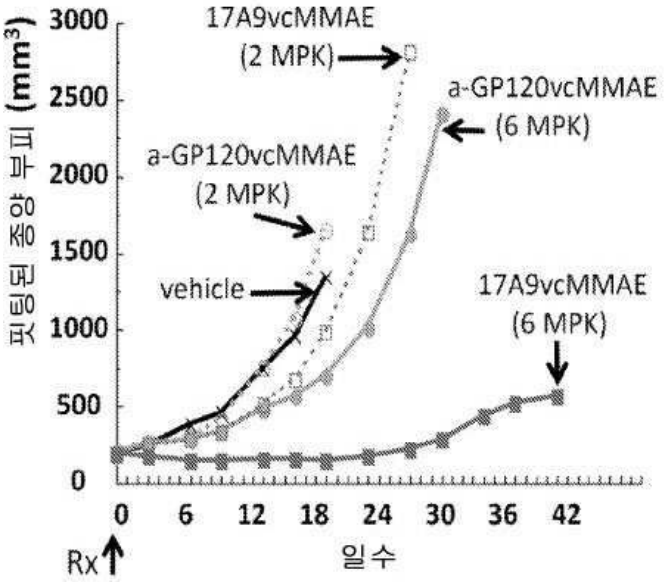
A



B 인간 흑색종에 대한 IHC 스코어 (n=58)

스코어	0	1	2	3
31D1	10	15	20	13
17A9	21	17	13	7

도면8



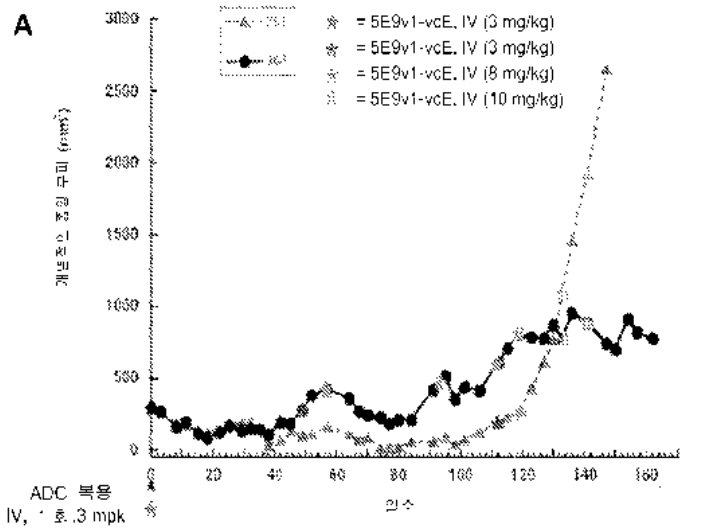
도면9a

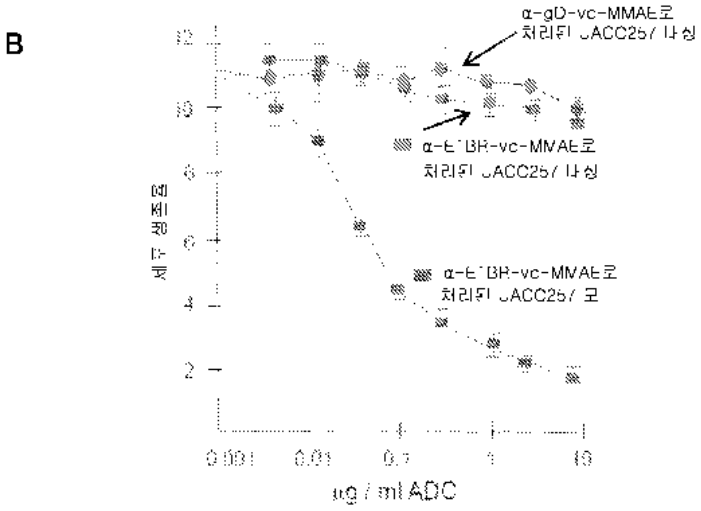
```
랫트  -MGVQRRCFLPVLVLGALLALGSIEGSRNQNHGVSRQLVTKYWNKQLYPEWTEVQGSNC  59
마우스 -MGVQRRSFLPVLVLSALLAVGALEGSRNQDWLGVPRQLVTKTWNRQLYPEWTEVQGSNC  59
인간  MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLDC  60
사이노 ----------------------KGPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLDC  36
                                : .***:* **.*** **.**:*********.* :*

랫트  WRGGQVSLKVRNDGPTLVGANTSFSIALHFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP 119
마우스 WRGGQVSLRVINDGPTLVGANASFSIALHFPGSQKVLPDGQVIWANNTIINGSQVWGGQP 119
인간  WRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP 120
사이노 WRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP 96
      ********:* *******:***:******:**********.*.**********.******

랫트  VYPREPDDACIFPDGGPCPSGPKPPRRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPESKLSIPTGHARLG 179
마우스 VYPQEPDDACVFPDGGPCPSGPKPPKRSFVYVWKTWGKYWQVLGGPVSRLSIATGHAKLG 179
인간  VYPQETDDACIFPDGGPCPSGWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLG 180
사이노 VYPQETDDACIFPDGGPCPSGPWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLG 156
      ***:*.*****:**********. . :*********:******** * *** **:* **

랫트  THTMEVTVYHRRGSQSYVPLAHSSSTFTIT---------------------------- 209
마우스 THTMEVTVYHRRGSQSYVPLAHASSTFTITDQVPFSVSVSQLQALDGETKHFLRNHPLIF 239
인간  THTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTF 240
사이노 THTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTF 216
      ********************:**:*********++++++++++ ++++  ++++++ ++ +

랫트  ---------------------------------------------------------- 
마우스 ALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDGTGILISRALDVTHTYLESGSVTAQVVLQAAIPLVS 299
인간  ALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTS 300
사이노 ALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGFVTAQVVLQAAIPLTS 276
      ++++++++++++++++++++++++++  ++++++++ ++++++++ + ++++++++++++++ +

랫트  ---------------------------------------------------------- 
마우스 CGSSPVPGTTDGYMPTAEAPGTTSRQGTTTKVVGTTPGQMPTTQPSGTTVVQMPTTEVTA 359
인간  CGSSPVPGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVIS 360
사이노 CGSSPVPGTTDGHRPTAEAPDTTAGRGPTTEVVGTTPGQVPTTQPSGTTSVQVPTTEVIS 336
      ++++++++++  ++++++ ++     ++ ++++++++ ++  +++++ ++ +++++

서열번호 : 29
서열번호 : 31
서열번호 : 26
서열번호 : 28
```

도면9b

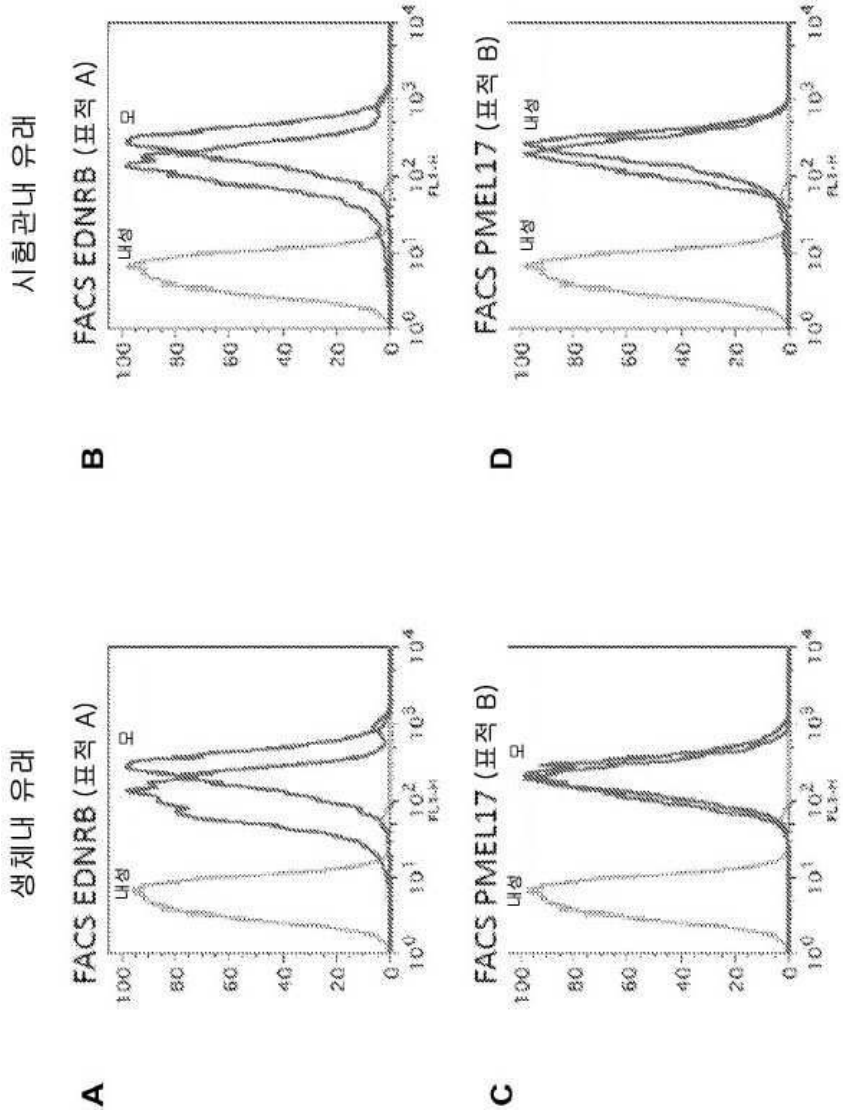
```
랫트    ------------------------------------------------------------
마우스  TTSEQMLTSA-------------VIDTTLAEVSTTEGTGTTPTRPSGTTVA--------- 397
인간    TAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTT 420
사이노  TTPVQMPTAESTGTTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEAIGMTPAEVSIVVPSGTTAAQVTT 396
        +   ++ +               +  +++++ ++ +  + ++   +

랫트    ------------------------------GSVSRLLDDTDTIMLVKRQVPLDCVLYRY 238
마우스  -----------QATTTEGPDASPLLPTQSSTGSISPLLDDTDTIMLVKRQVPLDCVLYRY 446
인간    TEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRY 480
사이노  TEWVETTAGELPTPEPEGPDTSSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLEKRQVPLDCVLYRY 456
                        ++++ +    + +  **:. ***.* *: * *************

랫트    GSFSLTLDIVQGIESAEILQAVPSSEGDAFELTVSCRGGLPKEACMDISSPGCQPPAQRL 298
마우스  GSFSLALDIVQGIESAEILQAVPFSEGDAFELTVSCQGGLPKEACMDISSPGCQPPAQRL 506
인간    GSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRL 540
사이노  GSFSVTLDIVQGIESAEILQVVPSSEGDAFELTVSCQGGLPTEACMEISSPGCQPPAQQL 516
        ****::**************.** .***********:****.****:***********:*

랫트    CQPVPPSPDCQLVLHQILKGGLGTYCLNVSLADANSLAVASTQLVVPGQEGSLGQAPLLV 358
마우스  CQSVPPSPDCQLVLHQVLKGGSGTYCLNVSLADANSLAVASTQLVVPGQDGGLGQAPLLV 566
인간    CQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIV 600
사이노  CQPVPPSPACQLVLYQILKGGLGTYCLNVSLADANSLAVVSTQLIVPGQEAGLGQAPLFV 576
        **.* *** *****:*:**** ***********:*****.****::***:..***.**:*

랫트    GVLLVLVAVVLASLIYRHRLKKQD-SVSQTPHGSTHWLRLPPVFCARRLGESSPLLSGQQ 417
마우스  GILLVLVAVVLASLIHRHRLKKQG-SVSQMPHGSTHWLRLPPVFRARGLGENSPLLSGQQ 625
인간    GILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQ 660
사이노  GILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQAFSIPQLPHGSSHWLRLPRIFRSCPIGENSPLLSGQE 636
        *:****:********:*:** **  *:.* **.*:****** :* :  :**.*******:

랫트    V 418      서열번호 : 29
마우스  V 626      서열번호 : 31
인간    V 661      서열번호 : 26
사이노  V 637      서열번호 : 28
        *
```

도면10

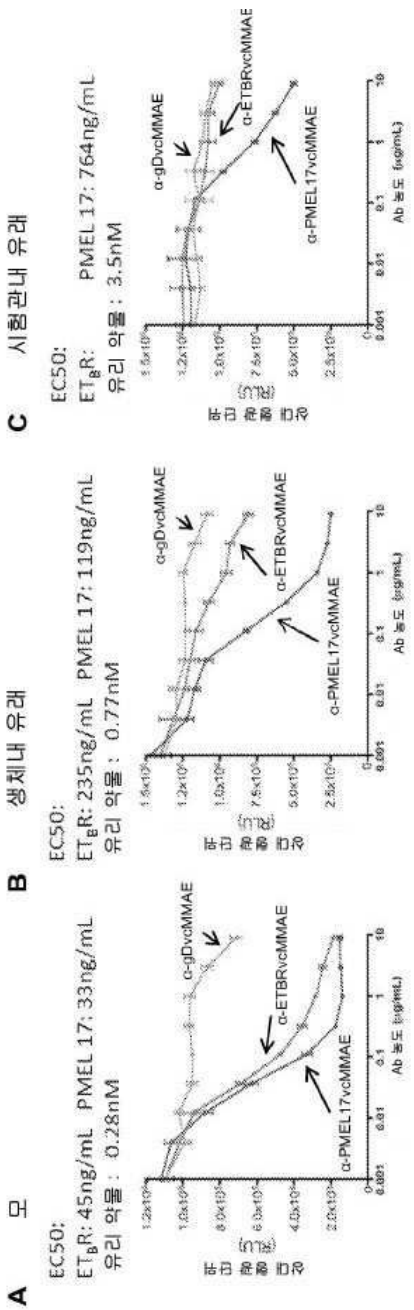

A
= 5E9v1-vcE, IV (3 mg/kg)
= 5E9v1-vcE, IV (3 mg/kg)
= 5E9v1-vcE, IV (8 mg/kg)
= 5E9v1-vcE, IV (10 mg/kg)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
ADC 복용
IV, 1 회 3 mpk


B
α-gD-vc-MMAE로
α-E BR-vc-MMAE로
α-E BR-vc-MMAE로
12
10
8
6
4
2
0.001
0.01
0.1
1
10
ug / ml ADC

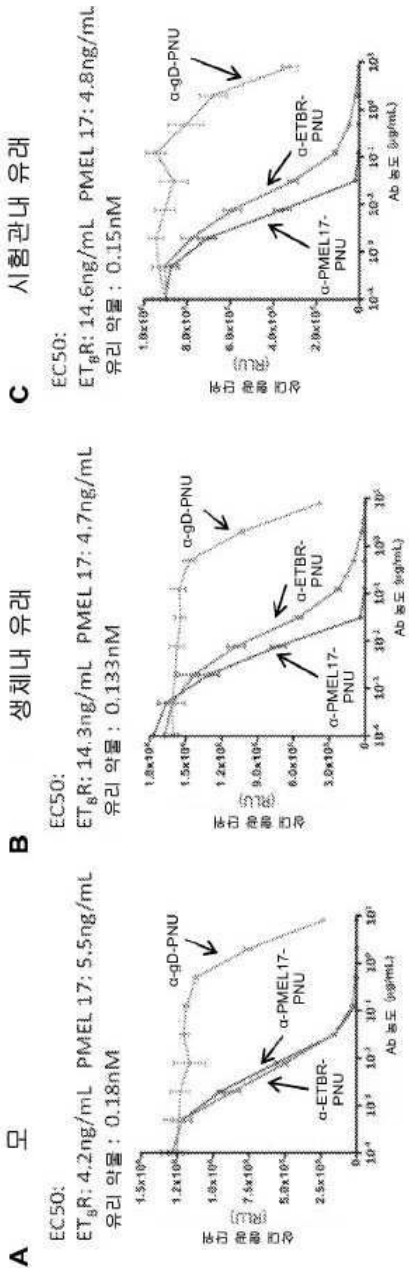
도면11


생체내 유래
시험관내 유래
A
FACS EDNRB (표적 A)
B
FACS EDNRB (표적 A)
C
FACS PMEL17 (표적 B)
D
FACS PMEL17 (표적 B)
내성
대

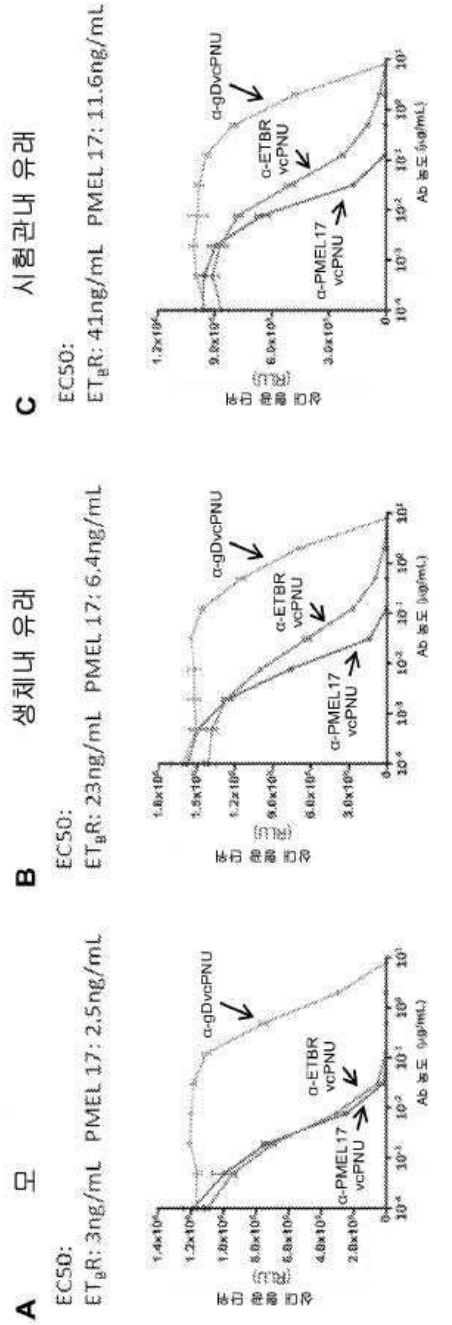
도면12


A
모
EC50:
ET$_B$R: 45ng/mL PMEL 17: 33ng/mL
유리 약물 : 0.28nM
B
생체내 유래
EC50:
ET$_B$R: 235ng/mL PMEL 17: 119ng/mL
유리 약물 : 0.77nM
C
시험관내 유래
EC50:
ET$_B$R: PMEL 17: 764ng/mL
유리 약물 : 3.5nM
α-gDvcMMAE
α-ETBRvcMMAE
α-PMEL17vcMMAE
Ab 농도 (μg/mL)

도면13

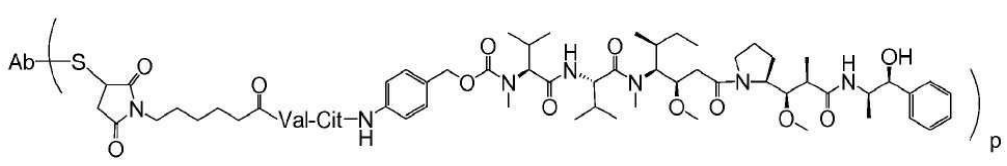

A
모
EC50:
ET$_B$R: 4.2ng/mL PMEL 17: 5.5ng/mL
유리 약물 : 0.18nM
B
생체내 유래
EC50:
ET$_B$R: 14.3ng/mL PMEL 17: 4.7ng/mL
유리 약물 : 0.133nM
C
시험관내 유래
EC50:
ET$_B$R: 14.6ng/mL PMEL 17: 4.8ng/mL
유리 약물 : 0.15nM
α-gD-PNU
α-ETBR-PNU
α-PMEL17-PNU
Ab 농도 (μg/mL)

도면14



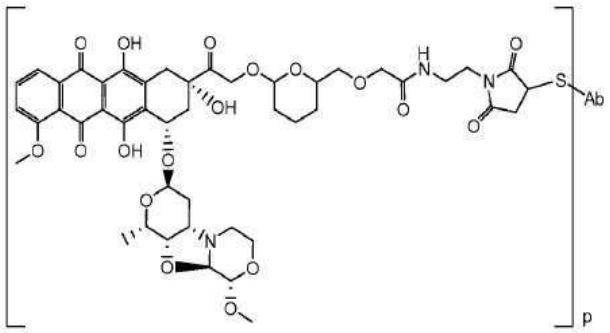
도면15a

Ab-MC-val-cit-PAB-MMAE



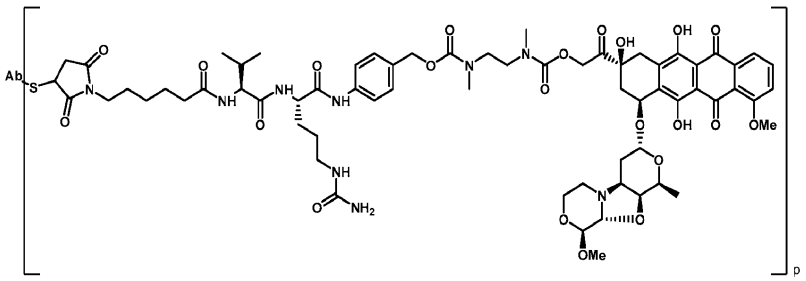
도면15b

Ab-MC-아세탈-PNU-159682



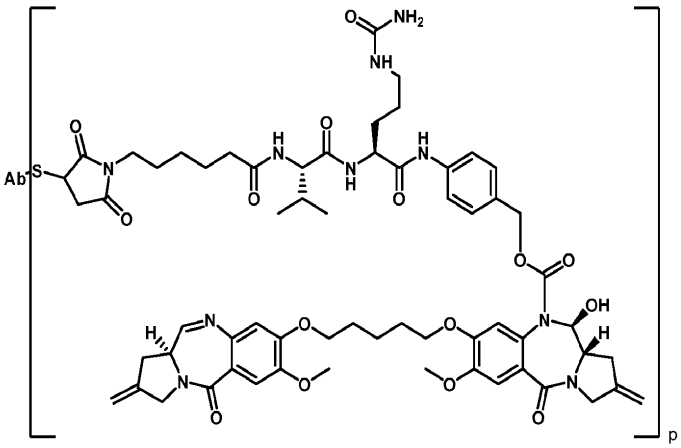
도면15c

Ab-MC-val-cit-PAB-PNU-159682



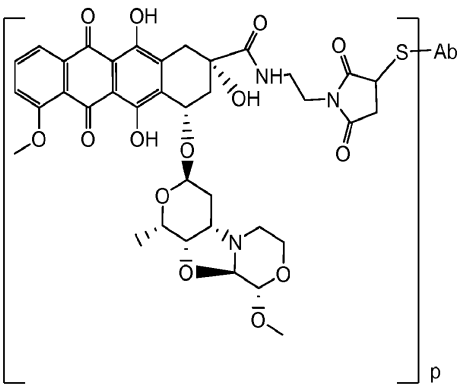
도면15d

Ab-MC-val-cit-PAB-PBD



도면15e

Ab-PNU-159682



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

<120> ANTI-PMEL17 ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

<130> GENE-32549/WO-1/ORD

<150> US 61/641,074

<151> 2012-05-01

<150> US 61/678,911

<151> 2012-08-02

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Asp Tyr Asp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Thr Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Gln Pro Gly Lys Thr Asn Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Thr Asp Tyr Asp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Arg Ala Thr Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Tyr Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ala Met Asp Cys Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr

115 120

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala

100 105 110

Lys Thr

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Val Tyr Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ala Met Asp Cys

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from Arg, Lys, Gly, and Ala

<400> 17

Gly Tyr Ser Phe Thr Xaa Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is selected from Tyr, Trp, Phe, Thr, Ser, Ile, Leu, Val, Met,
Ala, and Norleucine

<400> 18

Val Xaa Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is selected from Ser, Thr, and Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Ser, Thr, and Val

<400> 19

Arg Ala Xaa Lys Xaa Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr Gly Val His

1 5 10

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Thr Phe Asp Val

1

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile Gly
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp
20 25 30

Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu
35 40 45

Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly
50 55 60

Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala
65 70 75 80

Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val
85 90 95

Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly
100 105 110

Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp
115 120 125

Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser
130 135 140

Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp
145 150 155 160

Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg
165 170 175

Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg
180 185 190

Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr
195 200 205

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala
210 215 220

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

275 280 285
Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser
290 295 300
Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro
305 310 315 320
Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr
325 330 335
Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr Thr Ser Val Gln

340 345 350
Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr
355 360 365
Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
370 375 380
Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met
385 390 395 400
Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala

405 410 415
Gln Val Thr Thr Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
420 425 430
Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu
435 440 445
Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu
450 455 460
Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile

515 520 525

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

530 535 540

Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly

545 550 555 560

Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser

565 570 575

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

580 585 590

Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala

595 600 605

Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp

610 615 620

Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu

625 630 635 640

Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu

645 650 655

Ser Gly Gln Gln Val

660

<210

> 27

<211> 637

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg

1 5 10 15

Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln
20 25 30
Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn
35 40 45
Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu
50 55 60
Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp
65 70 75 80
Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro
85 90 95
Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly
100 105 110
Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val
115 120 125
Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser
130 135 140
Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met
145 150 155 160
Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu
165 170 175
Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser
180 185 190
Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe
195 200 205
Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser
210 215 220
Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp
225 230 235 240
Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr
245 250 255
Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile

260 265 270

Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly

275 280 285

His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro

290 295 300

Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr Pro

340 345 350

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

355 360 365

Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val

370 375 380

Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala Gln Val Thr Thr Thr Glu Trp Val

385 390 395 400

Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp

405 410 415

Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro

420 425 430

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro

435 440 445

Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu

485 490 495

Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro

500 505 510

Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu
515 520 525
Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn
530 535 540
Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu
545 550 555 560
Ile Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val

565 570 575
Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr
580 585 590
Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His
595 600 605
Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro
610 615 620
Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln Val

625 630 635

<210> 28
<211> 637
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 28
Lys Gly Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg
1 5 10 15
Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln
20 25 30
Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn
35 40 45

Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu
50 55 60
Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp
65 70 75 80
Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro

85 90 95

Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly

100 105 110

Pro Cys Pro Ser Gly Pro Trp Ser Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val

115 120 125

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

130 135 140

Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met

145 150 155 160

Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu

165 170 175

Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser

180 185 190

Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe

195 200 205

Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser

210 215 220

Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp

225 230 235 240

Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr

245 250 255

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

260 265 270

Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly

275 280 285

His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro Asp Thr Thr Ala Gly Arg Gly Pro

290 295 300

Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr Pro Gly Gln Val Pro Thr Thr Gln

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Thr Pro Val Gln Met Pro Thr Ala Glu Ser Thr Gly Thr Thr Pro
340 345 350

Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met
355 360 365

Ser Thr Pro Glu Ala Ile Gly Met Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val
370 375 380

Val Pro Ser Gly Thr Thr Ala Ala Gln Val Thr Thr Thr Glu Trp Val
385 390 395 400

Glu Thr Thr Ala Gly Glu Leu Pro Thr Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp
405 410 415

Thr Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro
420 425 430

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu Glu Lys Arg Gln Val Pro
435 440 445

Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp
450 455 460

Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala Glu Ile Leu Gln Val Val Pro Ser
465 470 475 480

Ser Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu
485 490 495

Pro Thr Glu Ala Cys Met Glu Ile Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro
500 505 510

Ala Gln Gln Leu Cys Gln Pro Val Pro Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu
515 520 525

Val Leu Tyr Gln Ile Leu Lys Gly Gly Leu Gly Thr Tyr Cys Leu Asn
530 535 540

Val Ser Leu Ala Asp Ala Asn Ser Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu
545 550 555 560

Ile Val Pro Gly Gln Glu Ala Gly Leu Gly Gln Ala Pro Leu Phe Val
565 570 575

Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr

580 585 590

Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Ala Phe Ser Ile Pro Gln Leu Pro His

595 600 605

Gly Ser Ser His Trp Leu Arg Leu Pro Arg Ile Phe Arg Ser Cys Pro

610 615 620

Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Glu Val

625 630 635

<210> 29

<211> 418

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 29

Met Gly Val Gln Arg Arg Cys Phe Leu Pro Val Leu Val Leu Gly Ala

1 5 10 15

Leu Leu Ala Leu Gly Ser Ile Glu Gly Ser Arg Asn Gln Asn Trp His

20 25 30

Gly Val Ser Arg Gln Leu Val Thr Lys Val Trp Asn Lys Gln Leu Tyr

35 40 45

Pro Glu Trp Thr Glu Val Gln Gly Ser Asn Cys Trp Arg Gly Gly Gln

50 55 60

Val Ser Leu Lys Val Arg Asn Asp Gly Pro Thr Leu Val Gly Ala Asn

65 70 75 80

Thr Ser Phe Ser Ile Ala Leu His Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu

85 90 95

Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser

100 105 110

Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr Pro Arg Glu Pro Asp Asp Ala

115 120 125

Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Pro Lys Pro Pro

130 135 140

Arg Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln

145 150 155 160

Val Leu Gly Gly Pro Glu Ser Lys Leu Ser Ile Pro Thr Gly His Ala

165 170 175

Arg Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg Gly

180 185 190

Ser Gln Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Thr Phe Thr Ile

195 200 205

Thr Gly Ser Val Ser Arg Leu Leu Asp Asp Thr Asp Thr Ile Met Leu

210 215 220

Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Cys Arg Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Asp Ile Ser Ser

275 280 285

Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val Pro Pro

290 295 300

Ser Pro Asp Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly Gly Leu

305 310 315 320

Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Ala Asn Ser Leu Ala

325 330 335

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

340 345 350

Gln Ala Pro Leu Leu Val Gly Val Leu Leu Val Leu Val Ala Val Val

355 360 365

Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg His Arg Leu Lys Lys Gln Asp Ser Val

370 375 380

Ser Gln Thr Pro His Gly Ser Thr His Trp Leu Arg Leu Pro Pro Val

385 390 395 400

Phe Cys Ala Arg Arg Leu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln

405 410 415

Gln Val

<210> 30

<211> 393

<212

> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 30

Ser Arg Asn Gln Asn Trp His Gly Val Ser Arg Gln Leu Val Thr Lys

1 5 10 15

Val Trp Asn Lys Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Val Gln Gly Ser

20 25 30

Asn Cys Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Arg Asn Asp Gly

35 40 45

Pro Thr Leu Val Gly Ala Asn Thr Ser Phe Ser Ile Ala Leu His Phe

50 55 60

Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn

65 70 75 80

Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr

85 90 95

Pro Arg Glu Pro Asp Asp Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys

100 105 110

Pro Ser Gly Pro Lys Pro Pro Arg Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys

115 120 125

Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Leu Gly Gly Pro Glu Ser Lys Leu

130 135 140

Ser Ile Pro Thr Gly His Ala Arg Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val

145 150 155 160

Thr Val Tyr His Arg Arg Gly Ser Gln Ser Tyr Val Pro Leu Ala His

165 170 175

Ser Ser Ser Thr Phe Thr Ile Thr Gly Ser Val Ser Arg Leu Leu Asp

180 185 190

Asp Thr Asp Thr Ile Met Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys
195 200 205

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Leu Thr Leu Asp Ile Val Gln
210 215 220

Gly Ile Glu Ser Ala Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Ser Glu Gly
225 230 235 240

Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys Arg Gly Gly Leu Pro Lys Glu
245 250 255

Ala Cys Met Asp Ile Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg
260 265 270

Leu Cys Gln Pro Val Pro Pro Ser Pro Asp Cys Gln Leu Val Leu His
275 280 285

Gln Ile Leu Lys Gly Gly Leu Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu
290 295 300

Ala Asp Ala Asn Ser Leu Ala Val Ala Ser Thr Gln Leu Val Val Pro
305 310 315 320

Gly Gln Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Gly Val Leu
325 330 335

Leu Val Leu Val Ala Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg His Arg
340 345 350

Leu Lys Lys Gln Asp Ser Val Ser Gln Thr Pro His Gly Ser Thr His
355 360 365

Trp Leu Arg Leu Pro Pro Val Phe Cys Ala Arg Arg Leu Gly Glu Ser
370 375 380

Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln Val
385 390

<210> 31

<211> 626

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Met Gly Val Gln Arg Arg Ser Phe Leu Pro Val Leu Val Leu Ser Ala
1 5 10 15
Leu Leu Ala Val Gly Ala Leu Glu Gly Ser Arg Asn Gln Asp Trp Leu
20 25 30
Gly Val Pro Arg Gln Leu Val Thr Lys Thr Trp Asn Arg Gln Leu Tyr
35 40 45

Pro Glu Trp Thr Glu Val Gln Gly Ser Asn Cys Trp Arg Gly Gly Gln
50 55 60
Val Ser Leu Arg Val Ile Asn Asp Gly Pro Thr Leu Val Gly Ala Asn
65 70 75 80
Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu His Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu
85 90 95
Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Ala Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser
100 105 110

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

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

Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp Leu Ser
245 250 255

Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Gly Thr Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala
260 265 270

Leu Asp Val Thr His Thr Tyr Leu Glu Ser Gly Ser Val Thr Ala Gln
275 280 285

Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Val Ser Cys Gly Ser Ser Pro
290 295 300

Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly Tyr Met Pro Thr Ala Glu Ala Pro Gly
305 310 315 320

Thr Thr Ser Arg Gln Gly Thr Thr Thr Lys Val Val Gly Thr Thr Pro
325 330 335

Gly Gln Met Pro Thr Thr Gln Pro Ser Gly Thr Thr Val Val Gln Met
340 345 350

Pro Thr Thr Glu Val Thr Ala Thr Thr Ser Glu Gln Met Leu Thr Ser
355 360 365

Ala Val Ile Asp Thr Thr Leu Ala Glu Val Ser Thr Thr Glu Gly Thr
370 375 380

Gly Thr Thr Pro Thr Arg Pro Ser Gly Thr Thr Val Ala Gln Ala Thr
385 390 395 400

Thr Thr Glu Gly Pro Asp Ala Ser Pro Leu Leu Pro Thr Gln Ser Ser
405 410 415

Thr Gly Ser Ile Ser Pro Leu Leu Asp Asp Thr Asp Thr Ile Met Leu
420 425 430

Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser
435 440 445

Phe Ser Leu Ala Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala Glu Ile
450 455 460

Leu Gln Ala Val Pro Phe Ser Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val
465 470 475 480

Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Asp Ile Ser Ser

485 490 495

Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Ser Val Pro Pro
500 505 510
Ser Pro Asp Cys Gln Leu Val Leu His Gln Val Leu Lys Gly Gly Ser
515 520 525
Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Ala Asn Ser Leu Ala
530 535 540
Val Ala Ser Thr Gln Leu Val Val Pro Gly Gln Asp Gly Gly Leu Gly
545 550 555 560

Gln Ala Pro Leu Leu Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Val Ala Val Val
565 570 575
Leu Ala Ser Leu Ile His Arg His Arg Leu Lys Lys Gln Gly Ser Val
580 585 590
Ser Gln Met Pro His Gly Ser Thr His Trp Leu Arg Leu Pro Pro Val
595 600 605
Phe Arg Ala Arg Gly Leu Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln
610 615 620

Gln Val
625

<210> 32
<211> 601
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32

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

50 55 60

Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Ala Asn

65 70 75 80

Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr

85 90 95

Pro Gln Glu Pro Asp Asp Ala Cys Val Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys

100 105 110

Pro Ser Gly Pro Lys Pro Pro Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys

115 120 125

Thr Trp Gly Lys Tyr Trp Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser Arg Leu

130 135 140

Ser Ile Ala Thr Gly His Ala Lys Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val

145 150 155 160

Thr Val Tyr His Arg Arg Gly Ser Gln Ser Tyr Val Pro Leu Ala His

165 170 175

Ala Ser Ser Thr Phe Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser

180 185 190

Val Ser Gln Leu Gln Ala Leu Asp Gly Glu Thr Lys His Phe Leu Arg

195 200 205

Asn His Pro Leu Ile Phe Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr

210 215 220

Leu Ala Glu Ala Asp Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Gly Thr

225 230 235 240

Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala Leu Asp Val Thr His Thr Tyr Leu Glu

245 250 255

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

260 265 270

Val Ser Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly Tyr Met

275 280 285

Pro Thr Ala Glu Ala Pro Gly Thr Thr Ser Arg Gln Gly Thr Thr Thr

290 295 300

Lys Val Val Gly Thr Thr Pro Gly Gln Met Pro Thr Thr Gln Pro Ser

305 310 315 320

Gly Thr Thr Val Val Gln Met Pro Thr Thr Glu Val Thr Ala Thr Thr

325 330 335

Ser Glu Gln Met Leu Thr Ser Ala Val Ile Asp Thr Thr Leu Ala Glu

340 345 350

Val Ser Thr Thr Glu Gly Thr Gly Thr Thr Pro Thr Arg Pro Ser Gly

355 360 365

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

370 375 380

Leu Leu Pro Thr Gln Ser Ser Thr Gly Ser Ile Ser Pro Leu Leu Asp

385 390 395 400

Asp Thr Asp Thr Ile Met Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys

405 410 415

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Leu Ala Leu Asp Ile Val Gln

420 425 430

Gly Ile Glu Ser Ala Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Phe Ser Glu Gly

435 440 445

Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu

450 455 460

Ala Cys Met Asp Ile Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg

465 470 475 480

Leu Cys Gln Ser Val Pro Pro Ser Pro Asp Cys Gln Leu Val Leu His

485 490 495

Gln Val Leu Lys Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu

500 505 510

Ala Asp Ala Asn Ser Leu Ala Val Ala Ser Thr Gln Leu Val Val Pro

515 520 525

Gly Gln Asp Gly Gly Leu Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Gly Ile Leu

530 535 540

Leu Val Leu Val Ala Val Val Leu Ala Ser Leu Ile His Arg His Arg

545 550 555 560

Leu Lys Lys Gln Gly Ser Val Ser Gln Met Pro His Gly Ser Thr His

565 570 575

Trp Leu Arg Leu Pro Pro Val Phe Arg Ala Arg Gly Leu Gly Glu Asn

580 585 590

Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln Val

595 600

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln

1 5 10

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

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

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn

1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 40

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Thr Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn Trp Gly

100 105

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

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

1 5 10 15

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 42
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 42
Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn Trp Gly
100 105
<210> 43

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 43

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 44

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

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

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

435 440 445

<210> 45

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 46

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Thr Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

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

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

290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

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

435 440 445

<210> 47

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Thr Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Gln Pro Gly Lys Thr Asn Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 48

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Asp Tyr Asp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

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

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

Lys

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 49
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Tyr Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ala Met Asp Cys Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 50

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

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Asp Tyr Asp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 51
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Thr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110