

명세서

발명의 명칭: 인간 DLK1에 대한 항체를 포함하는 항체 약물 접합체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 DLK1을 타겟팅하는 신규한 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC), 이들 ADC의 활성 대사물, 이들 ADC의 제조방법, 병의 치료 및/또는 예방을 위한 이들 ADC의 용도, 및 또한 병, 더 상세하게는 과증식 및/또는 혈관신생질환 예컨대, 암 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제를 생산하기 위한 이들 ADC의 용도에 관한 것이며, 보다 구체적으로, DLK1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 항체-약물 접합체 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 암(cancer)은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리로 인한 질환을 말하며, 다양한 조직에서 조절되지 않는 세포 성장의 결과이다. 초기 단계 종양은 수술 및 방사선치료 조치에 의해 제거될 수 있으며, 전이된 종양의 경우 일반적으로 화학요법에 의해 완화치료를 하게 된다.
- [4] 비경구로 투여되는 대다수 화학요법제는 전신 투여의 결과로서 원치 않는 부작용 및 심지어 독성이라는 심각한 효과를 유도할 수 있으며, 따라서 종양 세포 또는 바로 인접한 조직에서 이들 화학요법제의 개선되었으면서도 선택적인 적용을 통해 약효 증가 및 독성/부작용의 최소화를 동시에 이루기 위한 신규한 화학 요법제의 개발에 초점이 맞추어져 왔다.
- [5] 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)는 항원과 결합하는 항체에 독소 또는 약물을 결합시킨 후 세포 내부에서 독성물질을 방출하면서 암 세포 등을 사멸에 이르게 하는 표적지향성 신기술이다. 건강한 세포에는 최소한으로 영향을 주면서 약물을 타겟 암세포에 정확하게 전달하고, 특정한 조건하에서만 방출되도록 해주기 때문에 항체 치료제 자체보다 효능이 우수하고 기존의 항암제들에 비해 부작용의 위험성을 크게 낮출 수 있는 기술이다.
- [6] 이러한 항체-약물 접합체의 기본 구조는 "항체-링커-저분자 약물(독소)"로 구성되어 있다. 여기서 링커는 단순히 항체와 약물을 연결시켜 주는 기능적인 역할뿐 아니라, 체내 순환시 안정하게 타겟 세포까지 도달 후 항체-약물 접합체가 세포 내로 들어가 항체-약물간 해리현상(예, 효소에 의한 가수분해에 의한 결과)에 의해 약물이 잘 떨어지면서 타겟 암세포에 약효를 나타내도록 해야 한다. 즉 링커의 안정성에 따라 항체-약물 접합체의 효능 및 전신독성(systemic toxicity) 등의 안전성 면에서 링커는 매우 중요한 역할을 한다(Discovery Medicine 2010, 10(53): 329-39).

- [7] 본 발명의 발명자는 혈장 내에서 보다 안정하고 체내 순환시에도 안정적이며 약물이 암세포 내에서 쉽게 방출되어 약효를 나타낼 수 있는 효과적인 자가-희생기(self-immolative group)을 포함하는 링커를 개발하여 이에 대해 특허를 확보한바 있다(한국등록특허 제1,628,872호 등). 한편 암 치료를 위한 단일클론 항체의 사용은 상당한 성공을 거두고 있다. 단일클론 항체는 종양 조직 및 종양 세포의 표적-지향된 어드레싱(addressing)에 적당하다. 항체 약물 접합체들은 림프종과 고형암 치료를 위해 강력하고 새로운 치료의 옵션이 되었으며, 최근 들어 면역 조절 항체들도 임상에서 상당한 성공을 거두고 있다. 치료 항체들의 개발은 암 혈청학, 단백질 엔지니어링 기술과 그 작용, 저항성의 기작들 및 면역 시스템과 암세포들 간의 상호 작용에 대한 깊은 이해를 바탕으로 한다.
- [8] 인간 암의 세포 표면에서 발현되는 항원의 정의는 정상 조직에 비해 과다 발현되거나 돌연변이 및 선택적으로 발현되는 광범위한 목표물들을 의미한다. 핵심적인 문제는 항체를 기반으로 한 치료법들에 적절한 항원을 동정하는 것이다. 이러한 치료제들은 항원이나 수용체 기능 (즉 자극제로서나 길항제로서의 기능)의 변화를 매개하고 Fc 과 T 세포 활성화를 통해 면역 시스템을 조절하며 특정한 항원을 목표로 하는 항체에 결합되는 특정한 약물의 전달을 통해 그 효능을 발휘한다. 항체 약동학(pharmacokinetics), 작용 기능, 사이즈와 면역 자극성을 변화시킬 수 있는 분자 기술들은 새로운 항체를 기반으로 한 치료법들의 개발에서 핵심적인 요소로 등장하고 있다. 암 환자들을 대상으로 한 치료 항체들의 임상 시도에서 얻은 증거들은 목표 항원과 항체들의 친화성 및 결합성, 항체 구조의 선택, 치료적 접근법(신호전달 차단이나 면역 작용 기능)을 포함하는 최적화된 항체들의 선택을 위한 접근법들의 중요성을 강조하고 있다.
- [9] 이와 관련하여, DLK1을 항원으로 항체에 대한 연구가 진행되고 있다. 인간 유래 DLK1(delta-like 1 homolog (Drosophila))은 전장 383개의 아미노산으로 이루어진 1 회 막관통형의 막단백질로, 상기 단백질은 세포 외 영역에 6 개의 EGF-유사 반복(epidermal growth factor-like repeat) 도메인을 가지고 있다.
- [10] DLK1은 세포 분화 제어 인자인 노취(Notch) 리셉터의 리간드인 델타(Delta)와의 아미노산 배열의 상동성에 의해 DLK1이라는 유전자로 칭해지는 것이 일반적이고, 그 외에 Pref-1, pG2, SCP-1 및 ZOG로 불리기도 한다. DLK1은 막 단백질이기도 하지만, 종양괴사인자 알파 전환 효소(Tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE)에 의해 세포 외 영역이 세포막에서 떨어져 나와(shedding), 따로 기능을 가지기도 하는 단백질로 잘 알려져 있다.
- [11] DLK1은 미분화로 증식능이 높은 태아 세포에서 높은 발현을 나타낸다. 특히, 태아의 간, 신장, 골격근, 뇌 등에서 높은 발현을 나타내지만, 출생 후는 대부분의 조직에서 발현이 확인되지 않고, 지방 분화 전 세포(pre-adipocyte), 췌장 섬세포(pancreatic islet cell), 흉선 체세포(thymic stromal cell), 부신세포(adrenal gland cell) 등의 특정 세포에서만 발현이 된다.

- [12] DLK1의 기능 연구는 지방세포분화를 억제하는 인자 Pref-1(preadipocyte factor-1)으로 알려져 가장 많은 연구가 되어 있다. 지방세포 분화 억제능력을 제외하고도 DLK1은 혈액 생성 줄기 세포(hematopoietic stem cells)의 분화를 억제하고, 임파선 전구세포(lymphoid progenitor cell)의 분화를 조절하는 역할 및 상처치유(wound healing)에 관계된 것으로도 알려져 있다.
- [13] 또한, DLK1은 여러 가지 암이나 종양에서도 고빈도로 발현하고 있는 것이 보고되고 있다. 현재까지, 그 발현이 확인되고 있는 암의 종류로서는, 고형암에서는신경 내분비 종양, 신경아세포종, 신경교종, 1 형 신경 섬유종증, 소세포 폐암, 간암, 신장암, 난소암, 대장암, 유방암 및 췌장암이 알려져 있고, 혈액암에서는 골수이형성 증후군 및 급성 골수성 백혈병이 알려져 있다. DLK1과 암과의 관련성에 대한 연구로는 뇌암 세포(glioma)에서 DLK1의 발현이 과발현되어 있으며, DLK1의 cDNA를 뇌암 세포에 과발현시키면 뇌암 세포의 증식(proliferation)이 증가하여 전이(migration)가 증가한다는 보고가 있었으며, 간암에서 DLK1의 발현이 정상 간세포에 비해 올라가 있으며, siRNA 실험을 통하여 DLK1의 발현을 감소시켰을 때 종양의 크기가 감소한다는 보고가 있었다.
- [14] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명의 발명자는 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위하여 노력한 결과 DLK1에 우수한 결합력을 나타내는 항-DLK1 항체를 개발하였으며, 항체의 효과를 더욱 강화하기 위하여 혈장 내에서 보다 안정하고 체내 순환시에도 안정적이며 약물이 암세포 내에서 쉽게 방출되어 약효를 나타낼 수 있는 효과적인 자가-희생기(self-immolative group)을 포함하는 링커를 DLK1에 특이적으로 결합하는 항암 치료용 항체에 적용하여, 과증식 및/또는 전이암 질환의 치료 및/또는 예방에 효과적인 DLK1를 타겟팅하는 신규한 항체-약물 접합체(ADC)를 제공할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [15] **발명의 상세한 설명**
기술적 과제
- [16] 본 발명은 DLK1을 타겟팅하는 신규한 항체-링커 약물 접합체 또는 이의 염, 용매화물을 제공하고자 한다.
- [17] 본 발명은 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 및 이에 결합하는 약물을 포함하는 항체-약물 접합체 및 이를 포함하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- [18] 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 및 이에 결합하는 약물을 포함하는 항체-약물 접합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방 또는 치료방법을 제공하고자 한다.
- [19] 본 발명은 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로

사용하기 위한 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 및 이에 결합하는 약물을 포함하는 항체-약물 접합체의 용도를 제공하고자 한다.

- [20] 본 발명에서는 또한 혈장 내에서 보다 안정하고 체내 순환시에도 안정적이며, 약물이 암세포 내에서 쉽게 방출되어 약효를 극대화할 수 있는 자가-희생기를 포함하는 링커 기술을 접목시켜, 약물 및/또는 독신이 표적 세포에 안정적으로 도달하여 약효를 효과적으로 발휘하면서도 독성을 크게 낮출 수 있는, 항체-링커-약물(독신) 시스템을 제공하고자 한다.

[21]

과제 해결 수단

- [22] 본 발명의 일 양태에서, 하기 일반식 I의 구조를 갖는 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물이 제공된다:
- [23] [일반식 I] $Ab - (X)_y$
- [24] 여기에서,
- [25] Ab는 항-DLK1 항체 또는 이의 항원 결합단편이고,
- [26] 상기 X는 독립적으로 하나 이상의 활성화제 및 링커를 포함하는 화학적 잔기이며, 및
- [27] 상기 링커는 항체와 활성화제를 연결하고,
- [28] 상기 y는 1 내지 20의 정수이다.
- [29] 상기 항-DLK1 항체 또는 이의 항원 결합단편, 즉 DLK1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 2, 16, 30, 44, 58, 72 및 86으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR1, 서열번호 4, 18, 32, 46, 60, 74 및 88로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR2, 서열번호 6, 20, 34, 48, 62, 76 및 90으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및
- [30] 서열번호 9, 23, 37, 51, 65, 79, 93, 115 및 121로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR1, 서열번호 11, 25, 39, 53, 67, 81 및 95로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 13, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 116 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [31] 본 발명에 따른 항체는 예를 들어, 인간 DLK1의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [32] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 DLK1, 특히 인간 DLK1 단백질의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항-DLK1 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 DLK1에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합단편도 포함된다.
- [33] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고

- 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [34] 항체의 항원 결합단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개 특허출원 WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 및 WO88/09344에 개시 되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [35] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [36] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [37] 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [38] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연

발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 예를 들어, 본 발명에서 유용한 단일클론 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조할 수 있다(미국 특허 4,816,567 참조). 또한, 단일클론 항체는 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

- [39] 본 발명의 일 실시예에서는 파지 디스플레이 방법으로 천연 인간 scFv 라이브러리(native human single chain Fv library)를 패닝하여 DLK1에 특이적으로 결합하는 7종의 단일클론 인간 항체를 제조하였다.
- [40] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 대상으로 하여, 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.
- [41] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드(예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고 친화성으로 결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.
- [42] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 *E. coli*의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데에 있어 중요하다. 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리는 수많은 방식, 예를 들어 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법으로 제조하였다. 라이브러리를 대상으로 하여, 목적하는 특징을 수반한 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝할 수 있다.
- [43] 파지 디스플레이 기술은 목적하는 특징을 지닌 항체를 제조하기 위한 통상적인

하이브리도마 및 재조합 방법에 비해 몇 가지 이점을 지니고 있다. 이러한 기술은 동물을 사용하지 않고서도 짧은 시간에 다양한 서열을 지닌 큰 항체 라이브러리를 생성시킬 수 있도록 한다. 하이브리도마의 제조나 인간화 항체의 제조는 수개월의 제조기간을 필요로 할 수 있다. 또한, 면역이 전혀 요구되지 않기 때문에, 파지 항체 라이브러리는 독성이거나 항원성이 낮은 항원에 대해서도 항체를 생성시킬 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 또한 사용하여 신규한 치료적 항체를 생성 및 확인할 수 있다.

- [44] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리(repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [45] 파지 디스플레이 라이브러리로부터 고친화성 항체를 확인 및 분리할 수 있는 기술은 치료용 신규 항체 분리에 중요하다. 라이브러리로부터 고친화성 항체를 분리하는 것은 라이브러리의 크기, 세균성 세포 중에서의 생산 효율 및 라이브러리의 다양성에 좌우될 수 있다. 라이브러리의 크기는 항체 또는 항원 결합성 단백질의 부적절한 폴딩과 정지 코돈의 존재로 인한 비효율적 생산에 의해 감소된다. 세균성 세포에서의 발현은 항체 또는 항원 결합성 도메인이 적절하게 폴딩되지 않는 경우에는 억제될 수 있다. 발현은 가변/불변 계면의 표면이나 선별된 CDR 잔기에서의 잔기를 교대로 돌연변이시킴으로써 개선시킬 수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.
- [46] 고 친화성 항체 분리에서 항체 또는 항원 결합성 단백질의 다양한 라이브러리를 생성시키는 것이 중요하다. CDR3 영역은 이들이 종종 항원 결합에 참여하는 것으로 밝혀졌다. 중쇄 상의 CDR3 영역은 크기, 서열 및 구조적 입체 형태 면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [47] 또한, 각 위치에서 20개 아미노산 모두를 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄의 CDR영역을 무작위화함으로써 다양성을 발생시킬 수 있다. 20개의 모든 아미노산을 사용하면 다양성이 큰 변이체 항체 서열이 생성되고 신규한 항체를 확인할 기회가 증가할 수 있다.
- [48] "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위(determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [49] 상기 "인간화" 형태의 비-인간(예: 무린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는

수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다.

- [50] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [51] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [52] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역(CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [53] "상보성 결정 영역"(CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [54] 본 발명에 있어, 상기 DLK1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 구체적으로, 다음의 표 1에 기재된 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이 중, 2종(18A5, 27F7)과 또 다른 2종의 18A5 변이 항체(18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12)의 항-DLK1 항체는 DLK1이 과발현된 세포에 결합 가능하고, 암세포 표면에 발현하는 DLK1을 타겟으로 하여 암세포를 사멸시킬 수 있는 항-DLK1 항체-약물접합체로서 개발이 가능함을 대한민국 출원번호 제10-2018-0107639호에서 확인하였다.
- [55] [표 1]

[56]

클론	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
17B11- HC	QVQL VESG GTLV QPGG SLRLS CAAS	GFTF SSHA	MSWV RQTPG KGLE WVSS	ITKS GSGT	YSADSVK GRFTISR DNSKNTL YLQMNSL RAEDTAV YYC	TREG LGYY YGMD V	WGQ GTTV TVSS	99
서열 번호	1	2	3	4	5	6	7	
17B11- LC	QLVLT QPPSV SGAPG QRVII SCTGS	SSNI GAG YD	VHWY QQLPG TAPRL LIY	GST	NRPSGVP DRFSGSK SGTSASL AITGLQA EDEADYY C	QSYD NSLSA HYV	FGTG TKVT VL	100
서열 번호	8	9	10	11	12	13	14	
18A5- HC	QVQL VQSG GAVV QPGH SLRLS CEAS	GFK FKD YG	MHWV RQAPG KGLE WLAV	ISHD GRN K	NYADSVK GRLTISR DNSKNTL SFQMNSL RAEDTAV YYC	VRDW SYAFD I	WGQ GTLV TVSS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	
18A5- LC	DIQM TQSPS FLSAS VGDR VNITC RAS	QDIS RR	LAWY QQKP GKAP KLLIY	GAA	SLQSAVAS RFSGSGS GTEFTLTI SSLQPEDF ANYYC	QQIY TIPLT	FGGG TKVE IK	102
서열 번호	22	23	24	25	26	27	28	
20D3- HC	QMQL VQSG GGLV QPGRS LRLSC AAS	GFTF DDY A	MHWV RQAPG KGLE WVSG	ISWN SGSI	GYADSVK GRFTISR DNAKNSL YLQMNSL RAEDTAV YYC	TKGP GLAT GKVY FNS	WGQ GTQV TVSS	103
서열 번호	29	30	31	32	33	34	35	

[57]

20D3-LC	DIQM TQSPS SVSAS VGDR VTITC RAS	QRIS SW	LAWY QQKP GRAPK LLIH	SAS	TLHNGVP SRFSGSAS GTDFTLTI SSLQPEDF AIYYC	QQGH SFPYT	FGQG TKLD IK	104
서열 번호	36	37	38	39	40	41	42	
21D8-HC	QVQL VESG GGLV QPGG SLRLS CAAS	GFTF SSY W	MNWV RQAPG KGLV WVSR	ISPD GSST	TYADSVK GRFTISR DNAKNTL YLQMNSL RAEDTAV YYC	ARGY SPKYP TVGL DV	WGQ GTI TVSS	105
서열 번호	43	44	45	46	47	48	49	
21D8-LC	DIVMT QSPLS SPVTL GQPAS ISCRS S	ESLL HSN GNT Y	LTWL QQR GQPPR LLIH	KIS	NRFSGVP DRFSGSG AGTDFTL QITRVET EDVGVYY C	VQTT QWP WT	FGQG TKVE IK	106
서열 번호	50	51	52	53	54	55	56	
21F9-HC	QVQL VQSG AEVK KPGAS VRVSC KVS	GYSL SEFP	IHWVR QAPR MGLE WMGG	SYPE DGE T	LYAQKFQ GRVTMT EDTSTD AYMELSS LRSEDTA VYYC	ARLN YFEST DYWV DAFDI	WGQ GTM VTVS S	107
서열 번호	57	58	59	60	61	62	63	
21F9-LC	QLVLT QPYSV SESPG KTITIS CTRS	SGSI ASNF	VQWY QQR GSAPT PVIY	EDN	QRPSGVP DRFSGSID SSSNSASL TISGVM EDEADYY C	QSYD SGSS WV	FGGG TKLT VL	108
서열 번호	64	65	66	67	68	69	70	

[58]

27F7- HC	QMQL VESG GGLV KPGC SLTLS CDAT	GFNF GSY Y	MNVV RQAPG KGLE WLAH	ISST GRTI	YYADSVK GRFTISR DNAKSSL DLQMNSL RAEDTAV YYC	ARDQ GYPF GMDV	WGH GTTV TVSS	109
서열 번호	71	72	73	74	75	76	77	
27F7- LC	QLVLT QPSSV SGAPG QRTVI SCTGS	SSNI GAG YD	VDWY QQLPG IAPKL LIY	GNT	NRPSGVP DRFSGSK SGTSASL AITGLQA EDDSYY C	QSYD SSLSA WV	FGGG TKLT VL	110
서열 번호	78	79	80	81	82	83	84	
35E2- HC	QVQL VESG GGVV QPGRS LRLSC AAS	GFTF SSYA	MHWV RQAPG KGLE WVAV	IYSG GST	YYADSVK GRFTISR DNSKNTL YLQMNSL RAEDTAV YYC	AREG SYDV MTYT RIGG YFDY	WGQ GALV TVSS	111
서열 번호	85	86	87	88	89	90	91	
35E2- LC	DIQM TQSPS SVSAS VGDR VIHIC RAS	QGIS DW	VAWY QQKP GKAP KLLIY	AAS	SLQSGVP SRFSGSG SGTEFSLT ISNLOPE DFATYYC	QQAN SFPLT	FGPG TKVE IK	112
서열 번호	92	93	94	95	96	97	98	
18A5_ LS_1A 10 -HC	QVQL VQSG GAVV QPGH SLRLS CEAS	GFK FKD YG	MHWV RQAPG KGLE WLAV	ISHD GRN K	NYADSVK GRLTISR DNSKNTL SFQMNSL RAEDTAV YYC	VRDW SYAF DI	WGQ GTLV TVSS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	

[59]

18A5_1S_1A10-LC	DIQM TQSPS SLSAS LGDR VTITC RAS	QGIS SA	LAWY QQKP GKAP KLLIY	AAS	SLQSGVP SRFSGSG SGTDFTL TINSLQPE DFATYYC	QQSY TTPLT	FGGG TKVE IK	126
서열 번호	117	115	24	95	118	116	28	
18A5_1A12-HC	QVQL VQSG GGVV QPGG SLRLS CAAS	GFK FKD YG	MHWV RQAPG KGLE WLAV	ISHD GRN K	NYADSVK GRLTISR DNSKNTL SFQMNSL RAEDTAV YYC	VRDW SYAF DI	WGQ GTLV TVSS	127
서열 번호	119	16	17	18	19	20	21	
18A5_1A12-LC	DIQM TQSPS FLSAS VGDR VTITC RAS	HDIS SS	LAWY QQKS GKAP KLLIY	SAS	NLKSGVP SRFSGSG SGTDFSL TISSLQPE DFATYYC	QQSY TTVL T	FGGG TKLE IK	128
서열 번호	120	121	122	39	123	124	125	

[60]

[61] "골격 영역"(FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.

[62] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 및 119로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR1, 서열번호 3, 17, 31, 45, 59, 73 및 87로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR2, 서열번호 5, 19, 33, 47, 61, 75 및 89로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR3, 서열번호 7, 21, 35, 49, 63, 77 및 91로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR4, 서열번호 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 117 및 120로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR1, 서열번호 10, 24, 38, 52, 66, 80, 94 및 122로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR2, 서열번호 12, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 118 및 123으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR3, 또는 서열번호 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR4를 포함할 수 있다.

[63] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.

[64] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab

단편을 포함한다.

- [65] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명에 따른 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇠를 포함한다.
- [67] 기능적으로, 항체의 DLK1의 세포외 도메인에 대한 결합 친화도는 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내에 있다. 예를 들어, 결합 친화성은 10^{-6} M 내지 10^{-12} M, 10^{-7} M 내지 10^{-12} M, 10^{-8} M 내지 10^{-12} M, 10^{-9} M 내지 10^{-12} M, 10^{-5} M 내지 10^{-11} M, 10^{-6} M 내지 10^{-11} M, 10^{-7} M 내지 10^{-11} M, 10^{-8} M 내지 10^{-11} M, 10^{-9} M 내지 10^{-11} M, 10^{-10} M 내지 10^{-11} M, 10^{-5} M 내지 10^{-10} M, 10^{-6} M 내지 10^{-10} M, 10^{-7} M 내지 10^{-10} M, 10^{-8} M 내지 10^{-10} M, 10^{-9} M 내지 10^{-10} M, 10^{-5} M 내지 10^{-9} M, 10^{-6} M 내지 10^{-9} M, 10^{-7} M 내지 10^{-9} M, 10^{-8} M 내지 10^{-9} M, 10^{-5} M 내지 10^{-8} M, 10^{-6} M 내지 10^{-8} M, 10^{-7} M 내지 10^{-8} M, 10^{-5} M 내지 10^{-7} M, 10^{-6} M 내지 10^{-7} M 또는 10^{-5} M 내지 10^{-6} M이다.
- [68] 또한, 본 발명에 따른 항체는 항원에 대한 친화도(affinity)가 증가된 항체이다. 용어 "친화도"는 항원의 특정부위를 특이적으로 인식하고 결합하는 능력으로, 항체의 항원에 대한 특이성과 함께 고도의 친화도는 면역 반응에서 중요한 요소이다. 당업계에 공지된 임의의 다양한 분석, 예를 들어 방사면역분석법(RIA) 및 ELISA를 사용하여 친화도를 결정할 수고, 다양한 정량적 값으로 표현될 수 있다. 항체의 항원에 대한 친화도는 일반적으로 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수(dissociation constant, Kd)에 의해 나타낼 수 있다. Kd 값이 낮으면 낮을수록 항체의 항원에 대한 친화력이 높음을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 Kd 값은 18A5 항체가 0.52이며, 27F7 항체가 0.22이므로 인간 DLK1에 특이적으로 결합하는 고친화도 항체임을 알 수 있다.
- [69] 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 중쇄가변영역을 포함할 수 있다.
- [70] 또한, 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [71] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 DLK1의 세포외 도메인을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-DLK1 항체의 서열뿐만

아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

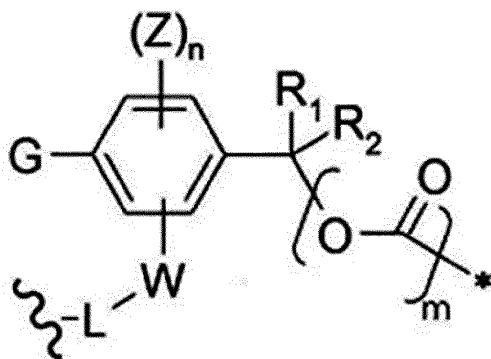
- [72] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [73] 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [74] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [75] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [76] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을

포함하는 벡터에 관한 것이다.

- [77] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [78] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [79] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [80] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [81] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL_λ 프로모터, pR_λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 물로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [82] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온

- S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [83] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [84] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [85] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스쉴린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [86] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [87] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [88] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [89] 상기 항체 또는 그의 항원 결합단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [90] 본 발명의 일 양태에서, 항체와 활성제 사이의 링커는 절단 가능한 것일 수 있다.
- [91] 본 발명의 일 양태에서, 상기 링커는 하기 화학식 IIa의 구조를 갖는다:
- [92] [화학식 IIa]

[93]



[94] 상기 식에서,

[95] G 는 당(sugar), 당산(sugar acid), 또는 당 유도체(sugar derivatives)이고,[96] W 는 $-C(O)-$, $-C(O)NR'$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'$, $-P(O)R''NR'$, $-S(O)NR'$, 또는 $-PO_2NR'$ 이고,[97] $C(O)$, S , 또는 P 가 페닐링(phenyl ring)과 바로 연결되는 경우, R' 및 R'' 은 각각 독립적으로 수소, (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_8) 사이클로알킬, (C_1-C_8) 알콕시, (C_1-C_8) 알킬티오, 모노- 또는 디- (C_1-C_8) 알킬아미노, (C_3-C_{20}) 헤테로아릴, 또는 (C_6-C_{20}) 아릴이며,[98] Z 는 각각 독립적으로 수소, (C_1-C_8) 알킬, 할로젠, 시아노 또는 니트로이고,[99] n 은 0 내지 3의 정수이며,[100] m 은 0 또는 1이고,[101] L 은 부존재하거나, 또는

[102] 최소 하나의 분지 유닛(branching unit, BR) 및 최소 하나의 연결 유닛(connection unit)을 함유하며,

[103] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소, (C_1-C_8) 알킬 또는 (C_3-C_8) 사이클로알킬이거나, 또는[104] R_1 및 R_2 는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 (C_3-C_8) 사이클로알킬 환을 형성하며,

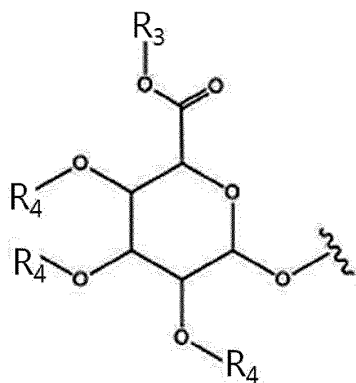
[105] 상기 식에서 물결표시는 항체와 연결되는 부위,

[106] * 표시는 약물 또는 독신과 연결되는 부위를 나타낸다. 본 발명의 일 양태에서, 상기 당 또는 당산은 모노사카라이드이다.

[107] 본 발명의 일 양태에서, 상기 G 는 글루쿠론산 모이어티(glucuronic acid moiety) 또는 하기 화학식 (IIIa) 구조의 화합물이다:

[108] [화학식 (IIIa)]

[109]



[110] 여기서,

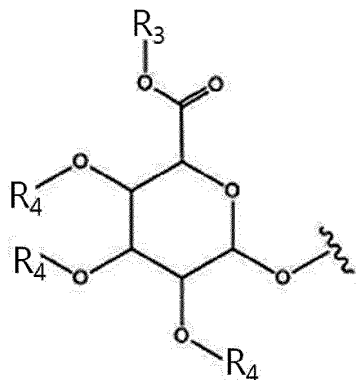
[111] R_3 는 수소 또는 카르복실 보호기이고,[112] 각 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 하이드록실 보호기이다.[113] 본 발명의 일 양태에서, 상기 R_3 는 수소이고, 각 R_4 는 수소이다.[114] 또한, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 수소이다.[115] 또한, 상기 Z는 각각 독립적으로 (C_1 - C_8)알킬, 할로젠, 시아노 또는 니트로이다.[116] 또한, 상기 W는 $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$ 또는 $??C(O)O-$ 이고, 보다 구체적으로 상기 W는 $-C(O)NR'-$ 이며, 여기에서 C(O)가 페닐링과 연결되고, NR' 은 L에 결합된다.

[117] 또한, 상기 n은 0, 1, 2 또는 3이고, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2이며, 보다 더 구체적으로 0이다.

[118] 보다 구체적으로, 상기 G는 하기 화학식 (IIIa) 구조의 화합물이고:

[119] [화학식 (IIIa)]

[120]



[121] 여기서,

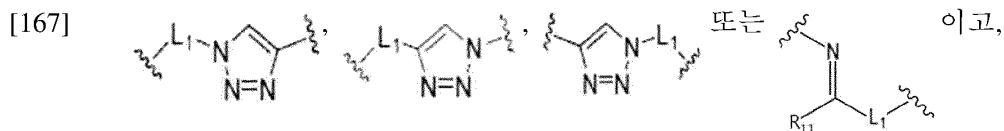
[122] R_3 는 수소 또는 카르복실 보호기이고,[123] 각 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 하이드록실 보호기이며,[124] W는 $-C(O)NR'-$ 이고, 여기에서 C(O)가 페닐링과 연결되며 NR' 은 L에 결합하며, 각 Z는 (C_1 - C_8)알킬, 할로젠, 시아노 또는 니트로이며, n은 0이고, m은 1이며, R_1 및 R_2 는 각각 수소이다.

- [125] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 분지 유닛은 1 내지 100개의 탄소 원자를 갖는 알킬렌이고, 여기에서 알킬렌의 탄소 원자는, N, O 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 헤테로원자로 치환될 수 있으며, 알킬렌은 1 내지 20개의 탄소원자를 갖는 하나 이상의 알킬로 더 치환될 수 있다.
- [126] 구체적으로, 최소 하나의 분지 유닛은 C_1-C_{50} 알킬렌 또는 1-50 원자 헤테로알킬렌이고, 하기 중 하나 이상을 만족할 수 있다:
- [127] (i) 하나 이상의 불포화 결합을 포함하고;
- [128] (ii) 분지 유닛 내의 2 개의 원자가 치환체와 같은 2가 치환체로 치환되고; 이는 헤테로아릴렌(heteroarylene)을 완성시키며
- [129] (iii) 분지 유닛은 1 내지 50 원자 헤테로알킬렌이고;
- [130] (iv) 상기 알킬렌은 하나 이상의 C_{1-20} 알킬로 치환된다.
- [131] 또한, 상기 최소 하나의 분지 유닛은 질소 함유 1-50 원자 헤테로알킬렌이고, 링커는 친수성 아미노산의 2 이상의 원자를 포함하며, 상기 질소는 친수성 아미노산의 카르보닐과 펩타이드 결합을 형성할 수 있다.
- [132] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 분지 유닛은 친수성 아미노산(hydrophilic amino acid)이다.
- [133] 본 발명의 일 양태에서, 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 히스티딘, 리신, 오르니틴, 프롤린, 세린, 또는 트레오닌일 수 있다.
- [134] 또한, 상기 친수성 아미노산은 링커의 옥심(oxime)을 링커의 폴리에틸렌 글리콜 유닛에 공유 결합시킬 수 있다.
- [135] 본 발명의 일 양태에서, 친수성 아미노산은 수용액에서 중성 pH에서 전하를 갖는 잔기를 갖는 측쇄를 포함하는 아미노산일 수 있다.
- [136] 본 발명의 일 양태에서, 친수성 아미노산은 아스파테이트 또는 글루타메이트이다.
- [137] 본 발명의 일 양태에서, 친수성 아미노산은 오르니틴 또는 리신이다.
- [138] 본 발명의 일 양태에서, 친수성 아미노산은 아르기닌이다.
- [139] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 분지 유닛은 $-C(O)-$, $-C(O)NR'$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'$, $-P(O)R''NR'$, $-S(O)NR'$, 또는 $-PO_2NR'$ 이고, R' 및 R'' 은 각각 독립적으로 수소, (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_8) 사이클로알킬, (C_1-C_8) 알콕시, (C_1-C_8) 알킬티오, 모노- 또는 디- (C_1-C_8) 알킬아미노, (C_3-C_{20}) 헤테로아릴, 또는 (C_6-C_{20}) 아릴이다.
- [140] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 분지 유닛은 $-C(O)NR'$ 이고, R' 은 수소이다.
- [141] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 연결 유닛은 일반식 VIII 또는 일반식 IX로 표시된다:
- [142] [일반식 VIII]
- [143] $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$

- [144] [일반식 IX]
- [145] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_w-$
- [146] 상기 V는 단일결합, -O-, -S-, $-\text{NR}^{21}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{22}-$, $-\text{NR}^{23}\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^{24}\text{SO}_2-$ 또는 $-\text{SO}_2\text{NR}^{25}-$ 이고;
- [147] X는 -O-, C_1 - C_8 알킬렌 또는 $-\text{NR}^{21}-$ 이고;
- [148] R^{21} 내지 R^{25} 는 각각 독립적으로 수소, C_1 - C_6 알킬, C_1 - C_6 알킬 C_6 - C_{20} 아릴 또는 C_1 - C_6 알킬 C_3 - C_{20} 헤테로아릴이고;
- [149] r은 0 내지 10의 정수이고;
- [150] p는 0 내지 10의 정수이고;
- [151] q는 1 내지 20의 정수이고; 및
- [152] w는 1 내지 20의 정수이다.
- [153] 본 발명의 일 양태에서, q는 4 내지 20일 수 있고, 보다 구체적으로 6 내지 20일 수 있다. 또한, q는 2 내지 12일 수 있고, 보다 구체적으로 2, 5, 또는 11일 수 있다. 또한, r은 2일 수 있다. 또한, p는 2일 수 있다. 또한, V는 -O-일 수 있다.
- [154] 보다 구체적으로, r은 2이고, p는 2이며, q는 2, 5 또는 11이고, V는 -O-일 수 있다.
- [155] 또한, 본 발명의 일 양태에서, X는 -O-일 수 있다. 또한, w는 6 내지 20의 정수일 수 있다.
- [156] 보다 구체적으로, X는 -O-이고, w는 6 내지 20일 수 있다.
- [157] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 연결 유닛은 최소 하나의 폴리에틸렌 글리콜 유닛이고, $\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_n$ 또는 $\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_n$ 의 구조를 갖으며, 여기서 n은 1 내지 12이다.
- [158] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 연결 유닛은 1 내지 12 - OCH_2CH_2 -유닛, 또는 3 내지 12 - OCH_2CH_2 -유닛, 또는 5 내지 12 - OCH_2CH_2 -유닛, 또는 6 내지 12 - OCH_2CH_2 -유닛, 또는 3 - OCH_2CH_2 -유닛이다.
- [159] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 연결 유닛은 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_w$ -이고,
- [160] 여기에서 X는 단일 결합, -O-, (C_1-C_8) 알킬렌, 또는 $-\text{NR}_{21}-$ 이고;
- [161] R_{21} 은 수소, (C_1-C_6) 알킬, (C_1-C_6) 알킬 $(\text{C}_6-\text{C}_{20})$ 아릴, 또는 (C_1-C_6) 알킬 $(\text{C}_3-\text{C}_{20})$ 헤테로아릴이며,
- [162] w는 1 내지 20의 정수이고, 구체적으로는 1, 3, 6, 또는 12이다.
- [163] 본 발명의 일 양태에서 X는 -O-이고, w는 6 내지 20의 정수이다.
- [164] 본 발명의 일 양태에서, 링커는 1,3-양극성고리 첨가반응(1,3-dipolar cycloaddition reactions), 헤테로-디엘스 반응(hetero-Diels-Alder reactions), 친핵성 치환(nucleophilic substitution) 반응, 비-알돌형 카르보닐 반응(non-aldol type carbonyl reactions), 탄소-탄소 다중 결합 첨가(addition to carbon-carbon multiple bond), 산화 반응(osidation reactions) 또는 클릭 반응(click reactions)에 의해 형성된 결합 유닛을 추가로 포함한다.

[165] 본 발명의 일 양태에서, 결합 유닛은 아세틸렌 및 아자이드 사이의 반응, 또는 알데하이드 또는 케톤기 및 하이드라진 또는 알콕시아민 사이의 반응에 의해 형성된다.

[166] 본 발명의 일 양태에서, 결합 유닛은,



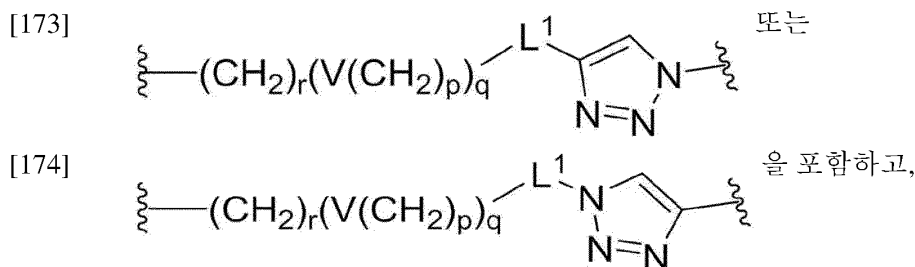
[168] 여기에서,

[169] L₁은 단일 결합 또는 1 내지 30개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이고,

[170] R₁₁은 수소 또는 1 내지 10개의 탄소원자를 갖는 알킬이며, 구체적으로 메틸이다.

[171] 본 발명의 일 양태에서, L₁은 단일 결합, 또는 11개의 탄소원자를 갖는 알킬렌, 또는 12개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이다.

[172] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 결합 유닛은



[175] 상기 V는 단일 결합, -O-, -S-, -NR²¹-, -C(O)NR²²-, -NR²³C(O)-, -NR²⁴SO₂-, or -SO₂NR²⁵-;

[176] R²¹ 내지 R²⁵는 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬 C₆₋₂₀ 아릴, 또는 C₁₋₆ 알킬 C₃₋₂₀ 헤테로아릴;

[177] r은 1 내지 10의 정수이고;

[178] p는 0 내지 10의 정수이며;

[179] q는 1 내지 20의 정수이고; 및

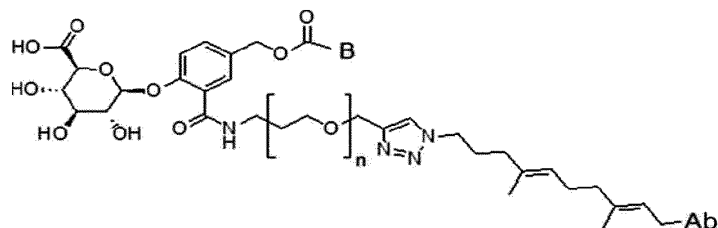
[180] L₁은 단일결합이다.

[181] 본 발명의 일 양태에서, 상기 r은 2 또는 3일 수 있다. 또한, p는 1 또는 2일 수 있다. 또한, q는 1 내지 6일 수 있다.

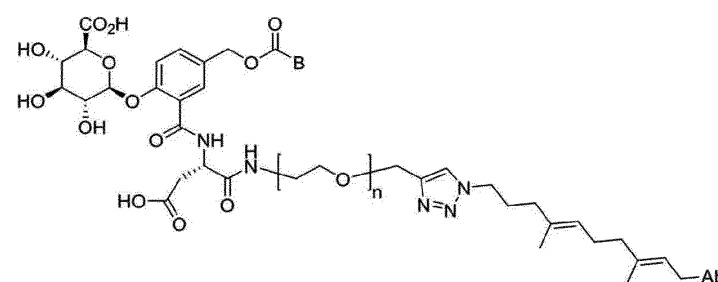
[182] 보다 구체적으로, 상기 결합 유닛에서 r은 2 또는 3; p는 1 또는 2; q는 1 내지 6일 수 있다.

[183] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 결합 유닛은

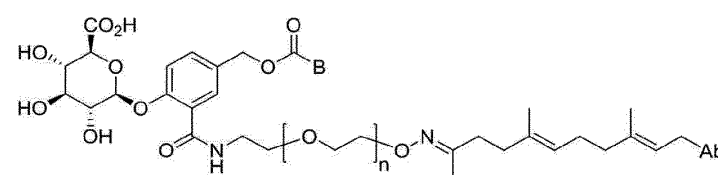
[184]



[185]

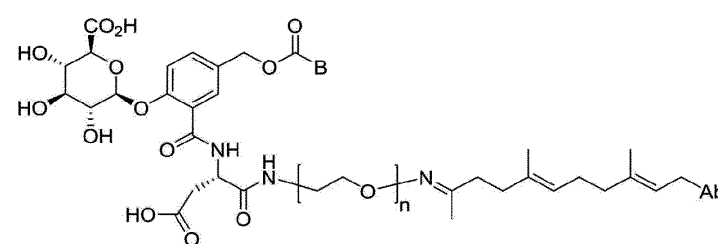


[186]



또는

[187]

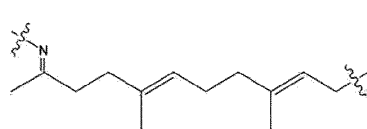


일 수 있고, 여기서

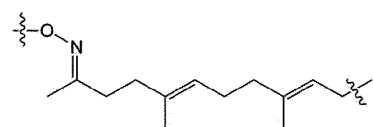
Ab는 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편이고, B는 활성제이며, n은 0 내지 20의 정수이다.

[188]

본 발명의 일 양태에서, 분지 유닛은



또는



이다.

[189]

본 발명의 일 양태에서, 링커는 옥심을 포함하는 3 내지 50 헤테로알킬렌을 포함할 수 있고,

[190]

상기 옥심의 산소 원자는 W와 연결된 L의 측면에 있고, 옥심의 탄소 원자는 Ab에 연결된 L의 측면에 있으며; 또는

[191]

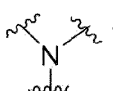
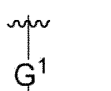
상기 옥심의 탄소 원자는 W에 연결된 L의 측면에 있고, 옥심의 산소 원자는 Ab에 연결된 L의 측면에 있는 것일 수 있다.

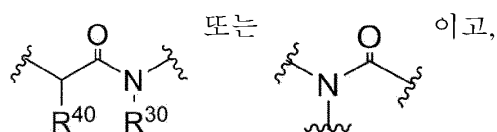
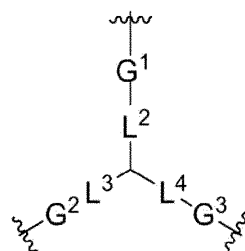
- [192] 본 발명의 일 양태에서, 링커는 $\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array} = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{CH}_2 \end{array} \right]_n$ 의 구조를 갖는 최소 하나

이상의 이소프레닐 유닛을 추가로 함유할 수 있으며, 여기에서 n 은 최소 2 이상이다.

- [193] 본 발명의 일 양태에서, 최소 하나의 이소프레닐 유닛은 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질 또는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 생성물이다.
- [194] 본 발명의 일 양태에서, 링커의 이소프레닐 유닛은 티오에테르 결합에 의해 항체와 공유결합하며, 티오에테르 결합은 항체의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [195] 또한, 이소프레닐 유닛은 링커에 포함된 옥심을 항체에 공유 결합시킬 수 있다.
- [196] 본 발명의 일 양태에서, 항체는 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의해 인식되는 아미노산 모티프를 포함하고, 티오에테르 결합은 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [197] 본 발명의 일 양태에서, DLK1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의해 인식되는 아미노산 모티프를 포함하고, 티오에테르 결합은 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [198] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CXX, CXC, XCXC, XXCC, 및 CYYX로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열이고, 여기에서 C는 시스테인을 나타내며; Y는 각 경우 독립적으로 지방족 아미노산을 나타내고; X는 각 경우 독립적으로 글루타민, 글루타메이트, 세린, 시스테인, 메티오닌, 알라닌, 또는 루신을 나타내고; 티오에테르 결합은 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [199] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CYYX 서열이고, Y는 각 경우 독립적으로 알라닌, 이소루신, 루신, 메티오닌 또는 발린이다.
- [200] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CVIM 또는 CVLL 서열이다.
- [201] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프에 선행하는 1 내지 10개의 아미노산 중 하나 이상이 글리신, 아르기닌, 아스파르트산 및 세린으로부터 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프에 선행하는 7개의 아미노산 중 적어도 하나는 글리신이다. 또는, 아미노산 모티프에 선행하는 7개의 아미노산 중 3개 이상이 글리신, 아르기닌, 아스파르트산 및 세린으로부터 각각 독립적으로 선택된다. 또는, 아미노산 모티프에 선행하는 1 내지 10개의 아미노산이 글리신, 구체적으로는 아미노산 모티프에 선행하는 최소 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산은 글리신이다.
- [202] 본 발명의 일 양태에서, 항체는 GGGGGGGCVIM의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

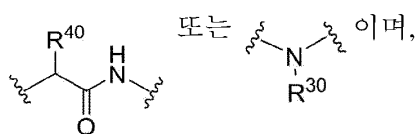
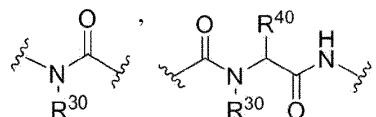
- [203] 본 발명의 일 양태에서, L은 Ab에 공유 결합된 하나 이상의 분지형 링커를 포함하고,
- [204] i) 각각의 분지형 링커는 주링커(PL)에 의해 Ab에 공유 결합된 분지 유닛(BR)을 포함하고;
- [205] ii) 각각의 분지형 링커는 제 1 활성제를 분지 유닛에 결합시키고, 제 2 링커 (SL) 및 절단기(CG)를 포함하는 제 1 분지(B1)를 포함하며; 및
- [206] iii) 각각의 분지형 링커는 a) 제 2 활성제가 제 2 링커 (SL) 및 절단기 (CG)에 의해 분지 유닛에 공유 결합된 제 2 분지 (B2); 또는 b) 폴리에틸렌 글리콜 모이어티가 분지 유닛에 공유 결합되어 있는 제 2 분지를 포함하고,
- [207] 상기 각각의 절단기는 항체 접합체부터 활성제를 방출하기 위해 가수분해되는 것일 수 있다.

- [208] 본 발명의 일 양태에서, 상기 분지형 링커는 , ,



- [209] 상기 L², L³, L⁴는 각각 독립적으로 직접 결합 또는 -C_nH_{2n}-이며, 상기 n은 1 내지 30의 정수이고,

- [210] 상기 G¹, G², G³은 독립적으로 직접 결합,

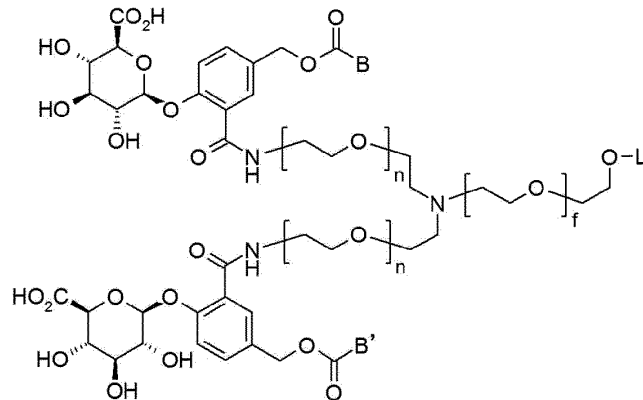


- [211] 상기 R³⁰은 수소 또는 C₁₋₃₀ 알킬이다.

- [212] 보다 구체적으로, 분지형 링커는

[213]

를 포함하고,



[214] 상기 B 및 B'는 동일하거나 상이할 수 있는 활성제를 나타내고;

[215] n은 각각 독립적으로 0 내지 30의 정수를 나타내며;

[216] f는 각각 독립적으로 0 내지 30의 정수를 나타내고; 및

[217] L은 Ab에 대한 결합을 나타낸다.

[218] 본 발명의 일 양태에서, 상기 n은 1 내지 20의 정수, 보다 구체적으로 1 내지 10의 정수, 또는 4 내지 20의 정수이다.

[219] 본 발명의 일 양태에서, L은 옥심을 포함하고, 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 유닛은 옥심을 활성제에 공유 결합시킨다.

[220] 본 발명의 일 양태에서, 상기 절단기는 표적 세포 내에서 절단될 수 있고, 하나 이상의 활성제를 방출시킬 수 있다.

[221] 본 발명의 일 양태에서, Ab에 공유 결합된 하나 이상의 분지형 링커를 포함하며; 및 분지형 링커에 공유 결합된 2개 이상의 활성제를 포함한다.

[222] 구체적으로, 1개 분지형 링커는 Ab와 결합되는 것을 수 있다.

[223] 또한, 2 이상의 분지형 링커가 Ab와 결합되고, 각각의 분지형 링커가 2개 이상의 활성제와 결합하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 3개 분지형 링커가 Ab와 결합되는 것일 수 있다. 또는 4개 분지형 링커가 Ab와 결합되는 것일 수 있다.

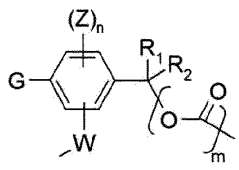
[224] 본 발명의 일 양태에서, 각각의 분지형 링커는 2개 이상의 동일 또는 상이한 활성제와 결합된다. 본 발명의 일 양태에서, 각각의 활성제는 절단 가능한 결합에 의해 분지형 링커에 결합된다.

[225] 본 발명의 일 양태에서, 각각의 분지형 링커는 분지형 유닛을 포함하고, 각각의 활성제는 2차 링커를 통해 분지형 유닛에 결합하고, 상기 분지형 유닛 1차 링커에 의해 항체에 결합된다.

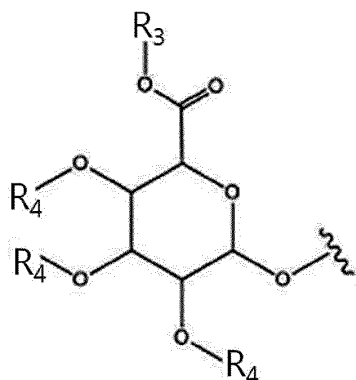
[226] 본 발명의 일 양태에서, 상기 분지형 유닛은 질소 원자일 수 있다. 또는, 상기 분지형 유닛은 아미드이고, 1차 링커 또는 2차 링커는 아미드의 카르보닐을 포함할 수 있다. 또는, 상기 분지형 유닛은 라이신 유닛일 수 있다.

[227]

[228] 본 발명의 또 다른 일 양태에서, 링커는,

- [229] (a) 하나 이상의 분지 유닛; (b) 하나 이상의 연결 유닛; (c) 하나 이상의 결합 유닛(binding unit, BU); 및 (d) 하나 이상의 트리거 유닛(trigger unit, TU)을 함유하는 것일 수 있다.
- [230] 여기에서 연결 유닛은 트리거 유닛과 결합 유닛, 트리거 유닛과 분지 유닛 또는 분지 유닛과 결합 유닛을 연결하고,
- [231] 여기에서 하나 이상의 트리거 유닛은 하나 이상의 약물 또는 독신을 방출할 수 있으며,
- [232] 여기에서 분지 유닛은 연결 유닛과 트리거 유닛, 또는 연결 유닛을 또 다른 연결 유닛과 연결하는 것이다.
- [233] 본 발명의 일 양태에서, 트리거 유닛은 다음 화학식 (IIb)의 구조를 갖는다:
- [234] [화학식 (IIb)]
- [235] 
- [236] 상기 식에서,
- [237] G는 당(sugar), 당산(sugar acid), 또는 당 유도체(sugar derivatives)이고,
- [238] W는 -C(O)-, -C(O)NR', -C(O)O-, -S(O)₂NR', -P(O)R''NR', -S(O)NR', 또는 -PO₂NR'이고,
- [239] C(O), S, 또는 P가 페닐환과 바로 연결되는 경우, R' 및 R''은 각각 독립적으로 수소, (C₁-C₈)알킬, (C₃-C₈)사이클로알킬, (C₁-C₈)알콕시, (C₁-C₈)알킬티오, 모노- 또는 디-(C₁-C₈)알킬아미노, (C₃-C₂₀)헤테로아릴, 또는 (C₆-C₂₀)아릴이며, W는 연결 유닛 또는 분지 유닛과 연결되고,
- [240] 각 Z는 각각 독립적으로 수소, (C₁-C₈)알킬, 할로젠, 시아노 또는 니트로이고,
- [241] n은 1 내지 3의 정수이며,
- [242] m은 0 또는 1이고,
- [243] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소, (C₁-C₈)알킬 또는 (C₃-C₈)사이클로알킬이거나, 또는
- [244] R₁ 및 R₂는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 (C₃-C₈)사이클로알킬링을 형성한다.
- [245] 본 발명의 일 양태에서, 상기 당 또는 당산은 모노사카라이드이다.
- [246] 본 발명의 일 양태에서, G는 하기 화학식 (IIIa) 구조의 화합물이다:
- [247] [화학식 (IIIa)]

[248]



[249] 여기서,

[250] R_3 는 수소 또는 카르복실 보호기이고,[251] 각 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 하이드록실 보호기이다.[252] 본 발명의 일 양태에서, R_3 는 수소이고, 각 R_4 는 수소이다.

[253]

[254] 본 발명의 일 양태에서, W는 $-C(O)NR'$ -이고, 여기에서 C(O)가 페닐환과 연결되며, NR' 은 연결 유닛과 연결된다.

[255] 본 발명의 일 양태에서, Z는 수소이다.

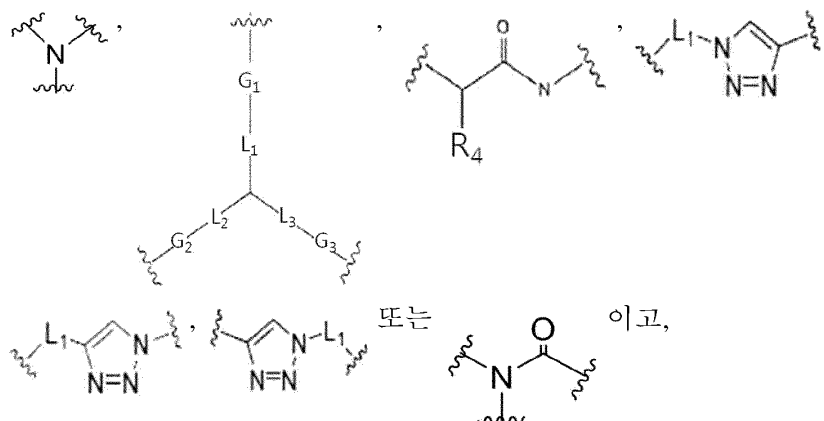
[256] 본 발명의 일 양태에서, R_1 및 R_2 는 각각 수소이다.[257] 본 발명의 일 양태에서, 연결 유닛은 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$, $-((CH_2)_pV)_q-$, $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qY-$, $-((CH_2)_pV)_q(CH_2)_r-$, $-Y((CH_2)_pV)_q-$ 또는 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qYCH_2-$ 로 나타내지며,

[258] 여기서,

[259] r 은 0 내지 10의 정수이고;[260] p 는 1 내지 10의 정수이며;[261] q 는 1 내지 20의 정수이고,[262] V 및 Y는 각각 독립적으로 단일결합, $-O-$, $-S-$, $-NR_{21}-$, $-C(O)NR_{22}-$, $-NR_{23}C(O)-$, $-NR_{24}SO_2-$, 또는 $-SO_2NR_{25}-$ 이고,[263] R_{21} 내지 R_{25} 는 각각 독립적으로 수소, (C_1-C_6) 알킬, (C_1-C_6) 알킬 (C_6-C_{20}) 아릴 또는 (C_1-C_6) 알킬 (C_3-C_{20}) 헤테로아릴이다.[264] 본 발명의 일 양태에서, r 은 2이다.[265] 본 발명의 일 양태에서, p 는 2이다.[266] 본 발명의 일 양태에서, q 는 6 내지 20의 정수이다.[267] 본 발명의 일 양태에서, q 는 2, 5, 또는 11이다.[268] 본 발명의 일 양태에서, V 및 Y는 각각 독립적으로 $-O-$ 이다.

[269]

[270]



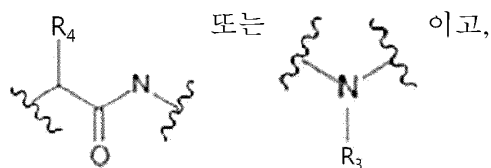
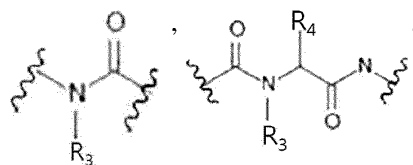
[271] 여기서,

[272] L_1 , L_2 , 및 L_3 는 각각 독립적으로 직접 결합(direct bond) 또는 $-C_nH_{2n}-$ 이고,

[273] 여기서 n 은 1 내지 30의 정수이며,

[274] 여기서,

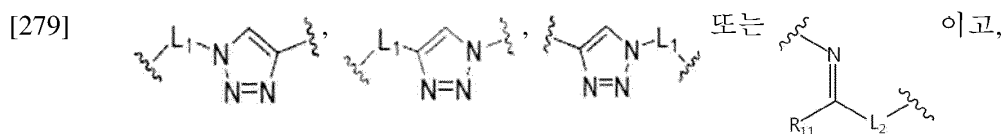
[275] G_1 , G_2 , G_3 는 각각 독립적으로 직접 결합,



[276] 여기서 R_3 는 수소 또는 C_1-C_{30} 알킬이며,

[277] 여기서 R_4 는 수소 또는 $-L_4-COOR_5$ 이고, 여기서 L_4 는 직접 결합 또는 $-C_nH_{2n}-$ 이고 여기서 n 은 1 내지 10의 정수이며, R_5 는 수소 또는 C_1-C_{30} 알킬이다.

[278] 본 발명의 일 양태에서, 분지 유닛은



[280] 여기서 L_1 은 직접 결합 또는 1 내지 30개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이고,

[281] R_{11} 은 수소 또는 1 내지 10개의 탄소원자를 갖는 알킬이며, 구체적으로 메틸이고,

[282] L_2 는 1 내지 30개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이고,

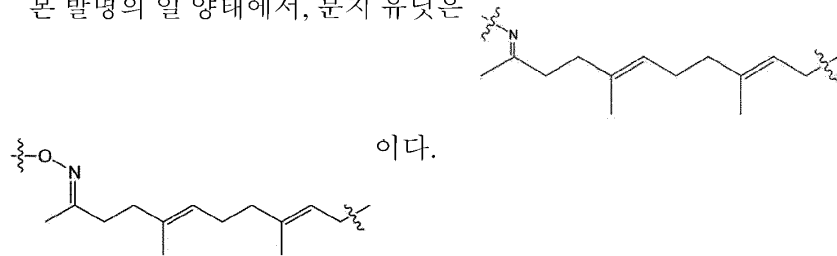
[283] 여기서 분지 유닛은 연결 유닛과 항체를 연결한다.

[284] 본 발명의 일 양태에서, L_1 은 12개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이다.

[285] 본 발명의 일 양태에서, R_{11} 은 메틸이다.

[286] 본 발명의 일 양태에서, L_2 는 11개의 탄소원자를 갖는 알킬렌이다.

[287] 본 발명의 일 양태에서, 분지 유닛은 또는



- [288] 본 발명의 일 양태에서, 결합 유닛은 티오에테르 결합에 의해 항체와 공유결합하며, 티오에테르 결합은 항체의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [289] 본 발명의 일 양태에서, 항체는 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의해 인식되는 아미노산 모티프를 포함하고, 티오에테르 결합은 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [290] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CXX, CXC, XCXC, XXCC, 및 CYYX로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열이고, 여기에서 C는 시스테인을 나타내며; Y는 각 경우 독립적으로 지방족 아미노산을 나타내고; X는 각 경우 독립적으로 글루타민, 글루타메이트, 세린, 시스테인, 메티오닌, 알라닌, 또는 루신을 나타내고; 티오에테르 결합은 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함한다.
- [291] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CYYX 서열이고, Y는 각 경우 독립적으로 알라닌, 이소루신, 루신, 메티오닌 또는 발린이다.
- [292] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프는 CVIM 또는 CVLL 서열이다.
- [293] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프에 선행하는 7개의 아미노산 중 적어도 하나는 글리신이다.
- [294] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프에 선행하는 7개의 아미노산 중 3개 이상이 글리신, 아르기닌, 아스파르트산 및 세린으로부터 각각 독립적으로 선택될 수 있다.
- [295] 본 발명의 일 양태에서, 아미노산 모티프에 선행하는 1 내지 10개의 아미노산이 글리신, 구체적으로는 아미노산 모티프에 선행하는 최소 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산은 글리신이다.
- [296] 본 발명의 일 양태에서, 항체는 GGGGGGGCVIM의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [297]
- [298] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 활성제는 화학요법제 또는 독신일 수 있다.
- [299] 또한, 활성제는 면역 조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항균제, 항진균제, 항기생충제 또는 이들의 조합일 수 있고, 하기 나열된 활성제 중 선택적으로 사용할 수 있다:
- [300] (a) 엘로티닙(erlotinib), 보르테조미(bortezomib), 풀베스트란트(fulvestrant), 수텐트(sutent), 레트로졸(letrozole), 이마티닙 메실레이트(imatinib mesylate),

PTK787/ZK 222584, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil),
 루코보린(leucovorin), 라파마이신(rapamycin), 라파티닙(lapatinib),
 로나파르닙(lonafarnib), 소라페닙(sorafenib), 제피티닙(gefitinib), AG1478,
 AG1571, 티오테파(thiotepa), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide),
 부숴판(busulfan), 임프로숴판(improsulfan), 피포숴판(piposulfan),
 벤조도파(benzodopa), 카르보콘(carboquone), 메츄도파(meturedopa),
 유레도파(uredopa), 에틸렌이민(ethylenimine), 알트레타민(altretamine),
 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine),
 트리에틸렌포스포라미드(triethylenephosphoramidate),
 트리에틸렌티오포스포라미드(triethylenethiophosphoramidate),
 트리메틸롤로멜라민(trimethylolomelamine), 불라타신(bullatacin),
 불라타시논(bullatacinone), 캄토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan),
 브리오스타틴(bryostatin), 칼리스타틴(callystatin), CC-1065,
 아도젤레신(adozelesin), 카르젤레신(carzelesin), 비젤레신(bizelesin), 크립토피신
 1(cryptophycin 1), 크립토피신 8(cryptophycin 8), 돌라스타틴(dolastatin),
 듀오카마이신(duocarmycin), KW-2189, CB1-TM1, 엘루테로빈(eleutherobin),
 판크라티스타틴(pancratistatin), 사르코딕틴(sarcodictyin),
 스폰지스타틴(spongistatin), 클로람부실(chlorambucil),
 클로르나파진(chlornaphazine), 클로로포스파미드(chlorophosphamide),
 에스트라무스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide),
 메클로르에타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 노벰비킨(novembichin),
 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine),
 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard),
 카르무스틴(carmustine), 클로로코토신(chlorozotocin), 포테쿠스틴(fotemustine),
 로무스틴(lomustine), 니무스틴(nimustine), 라니무스틴(ranimustine),
 칼리키아미신(calicheamicin), 칼리키아미신 감마 1(calicheamicin gamma 1),
 칼리키아미신 오메가 1(calicheamicin omega 1), 디네미신(dynemicin), 디네미신
 A(dynemicin A), 클로드로네이트(clodronate), 에스페르아미신(esperamicin),
 네오키르지노스타틴 크로모포어(neocarzinostatin chromophore),
 아클라시노마이신(aclacinomysins), 악티노마이신(actinomycin),
 안트르마이신(antrmycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins),
 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabycin), 카르니노마이신(carninomycin),
 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이신(chromomycins),
 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin),
 데토루부신(detorubicin),
 6-디아조-5-옥소-L-노르루신(6-diazo-5-oxo-L-norleucine),
 독소루비신(doxorubicin), 모르폴리노-독소루비신(morpholino-doxorubicin),
 시아노모르폴리노-독소루비신(cyanomorpholino-doxorubicin),

2-피롤리노-독소루비신(2-pyrrolino-doxorubicin), 리포소말 독소루비신(liposomal doxorubicin), 테옥시독소루비신(deoxydoxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신 C(mitomycin C), 미코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 페플로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 쿠엘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토미그린(streptomigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 데노프테린(denopterin), 메토트렉세이트(methotrexate), 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 티아미프린(thiamiprine), 티구아닌(thiguanine), 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자유리딘(6-azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 디데옥시유리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록수리딘(floxuridine), 칼루스테론(calusterone), 드로모스타놀론(dromostanolone), 프로피오네이트(propionate), 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스테인(mepitiostane), 테스토락톤(testolactone), 아미노글루테티미드(aminogluthethimide), 미토테인(mitotane), 트릴로스테인(trilostane), 폴린산(folinic acid), 아세글라톤(aceglatone), 알도포스파미드 글리코사이드(aldophosphamide glycoside), 아미노레불린산(aminolevulinic acid), 에닐우라실(eniluracil), 암사크린(amsacrine), 베스트라부실(bestrabucil), 비산트렌(bisantrene), 에다트락세이트(edatraxate), 데포파민(defofamine), 데메콜신(demecolcine), 디아지콘(diaziquone), 엘포르니틴(elformithine), 엘립티니움 아세테이트(elliptinium acetate), 에토글루시드(etoglucid), 갈리움 나이트레이트(gallium nitrate), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 렌티난(lentinan), 로니다이닌(lonidainine), 메이탄신(maytansine), 안사미토신(ansamitocins), 미토구아존(mitoguazone), 미토잔트론(mitoxantrone), 모피단몰(mopidanmol), 니트라에린(nitraerine), 펜토스타틴(pentostatin), 페나메트(phenamet), 피라루비신(pirarubicin), 로소잔트론(losoxantrone), 2-에틸하이드라지드(2-ethylhydrazide), 프로카르바진(procarbazine), 폴리사카라이드-k(polysaccharide-k), 라족세인(razoxane), 리조신(rhizoxin), 시조피란(sizofiran), 스피로게르마늄(spirogermanium), 테누아존산(tenuazonic acid), 트리아지콘(triaziquone), 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민(2,2',2"-trichlorotriethylamine), T-2 독신, 베라큐린 A(verracurin A), 로리딘 A(roridin A), 안구이딘(anguidine),

- 우레탄(urethane), 빈데신(vindesine), 다카르바진(dacarbazine),
만노무스틴(mannomustine), 미토브로니톨(mitobronitol), 미토락톨(mitolactol),
피포브로만(pipobroman), 가시토신(gacytosine), 아라비노사이드(arabinoside),
사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 티오테파(thiotepa),
파클리탁셀(paclitaxel), 파클리탁셀, 파클리탁셀의 알부민-엔지니어드
나노파티클(albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel), 도세탁셀,
클로람부실, 켄시타빈, 6-티오구아닌, 머캅토프린, 시스플라틴,
카보플라틴(carboplatin), 빈블라스틴(vinblastine), 플래티늄(platinum),
에토포사이드(etoposide), 이포스파미드(ifosfamide), 미톡산트론(mitoxantrone),
빈크리스틴, 비노렐빈(vinorelbine), 노반트론(novantrone),
테니포사이드(teniposide), 에다트렉세이트(edatrexate),
다우노마이신(daunomycin), 아미노프테린(aminopterin), 젤로다(xeloda),
이반드로네이트(ibandronate), CPT-11, 토포이소머라아제 저해제 RFS 2000,
디플루오로메틸오르니틴(difluoromethylornithine), 레티노산(retinoic acid),
카페시타빈(capecitabine), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 산;
- [301] (b) 모노카인(monokine), 림포카인(lympokine), 폴리펩타이드 호르몬(traditional polypeptide hormone), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 티록신(thyroxine), 릴렉신(relaxin), 프로릴렉신(prorelaxin), 당단백 호르몬(glycoprotein hormone), 여포자극호르몬(follicle stimulating hormone), 갑상샘자극호르몬(thyroid stimulating hormone), 황체형성호르몬(luteinizing hormone), 간 성장인자 섬유모세포성장인자(hepatic growth factor fibroblast growth factor), 프로락틴(prolactin), 태반성 락토젠(placental lactogen), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α), 종양괴사인자- β , 뮐러관 억제물질(mullerian-inhibiting substance), 마우스 고나도트로핀-연관 펩타이드(mouse gonadotropin-associated peptide), 인히빈(inhibin), 액티빈(activin), 혈관내피증식인자(vascular endothelial growth factor), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 골유도 인자(osteoinductive factor), 인터페론, 인터페론- α , 인터페론- β , 인터페론- γ , 콜로니자극인자(colony stimulating factor, CSF), 마크로파지-CSF, 과립구-마크로파지-CSF(granulocyte-macrophage-CSF), 과립구-CSF, 인터루킨(IL), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, 종양괴사인자(tumor necrosis factor), TNF- α , TNF- β , 폴리펩타이드 인자, LIF, 키트 리간드(kit ligand), 또는 이들의 배합물;
- [302] (c) 디프테리아 독신, 보툴리눔 독신, 테타누스 독신, 디센터리 독신, 콜레라 독신, 아마니틴, α -아마니틴, 피롤로벤조디아제핀, 피롤로벤조디아제핀 유도체, 테트로도독신, 브레베독신(brevetoxin), 시구아독신(ciguatoxin), 리신(ricin), AM 독신, 오리스타틴(auristatin), 튜블리신(tubulysin), 겔다나마이신(geldanamycin), 메이탄시노이드(maytansinoid), 칼리케아마이신(calicheamycin), 다우노마이신(daunomycin), 독소루비신(doxorubicin),

- 메토트렉세이트(methotrexate), 빈데신(vindesine), SG2285, 돌라스타틴(dolastatin), 돌라스타틴 유사체(dolastatin analog), 오리스타틴(auristatin), 크립토피신(cryptophycin), 캄토테신(camptothecin), 리족신(rhizoxin), 리족신 유도체(rhizoxin derivatives), CC-1065, 유사체 또는 유도체, 듀오카마이신(duocarmycin), 에네다인 항생제(enediynes antibiotic), 에스페라마이신(esperamicin), 에포틸론(epothilone), 독소이드(toxoid), 또는 이들의 배합물;
- [303] (d) 친화성 리간드(affinity ligand), 여기에서 친화성 리간드는 기질, 저해제, 활성화제, 신경전달물질, 방사성 동위원소, 또는 이들의 배합물;
- [304] (e) 방사능표지(radioactive label), ³²P, ³⁵S, 형광다이, 전자밀도 반응제(electron dense reagent), 효소, 비오틴, 스트렙타비딘(streptavidin), 디옥시제닌(dioxigenin), 햅텐(hapten), 면역성 단백질(immunogenic protein), 타겟에 컴플리멘터리한 서열을 갖는 핵산 분자(nucleic acid molecule with a sequence complementary to a target) 또는 이들의 배합물;
- [305] (f) 면역조절 화합물(immunomodulatory compound), 항-암제(anti-cancer agent), 항-바이러스제(anti-viral agent), 항-박테리아제(anti-bacterial agent), 항-곰팡이제(anti-fungal agent), 및 항-기생충제(anti-parasitic agent), 또는 이들의 배합물;
- [306] (g) 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 드롤록시펜(droloxifene), 4-하이드록시타목시펜(4-hydroxytamoxifen), 트리옥시펜(trioxifene), 케옥시펜(keoxifene), LY117018, 오나프리스톤(onapristone) 또는 토레미펜(toremifene);
- [307] (h) 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 메제스톨 아세테이트(megestrol acetate), 엑스메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole)Ehmsms 아나스트로졸(anastrozole)
- [308] (i) 플루타미드(flutamide), nil루타미드(nilutamide), 비칼루타미드(bicalutamide), 리우프롤라이드(leuprolide), 고세렐린(goserelin), 또는 트록사시타빈(troxacitabine);
- [309] (j) 아로마타아제 저해제;
- [310] (k) 단백질 키나아제 저해제;
- [311] (l) 리피드 키나아제 저해제;
- [312] (m) 안티센스 올리고뉴클레오티드;
- [313] (n) 리보자임;
- [314] (o) 백신; 및
- [315] (p) 항-맥관형성제(anti-angiogenic agent)
- [316]
- [317] 본 발명의 또 다른 일 양태에서, 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로

허용되는 염 또는 용매화물의 용도가 제공된다.

[318]

[319] 본 발명의 또 다른 일 양태에서, 항체-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 유효성분으로 함유하는, 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 과증식, 암 또는 혈관신생질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공되며, 이 때 하나 이상의 항-과증식, 세포정지성 또는 세포독성물질을 배합하여 투여하는 방법이 또한 제공된다.

[320]

[321]

[322] 본 발명의 또 다른 일 양태에서, 다음 일반식 Ia의 항체-약물 접합체가 제공된다:

[323] [일반식 Ia]

[324] $Ab-(Linker-D)_n$

[325] 상기 식에서,

[326] Ab는 항-DLK1 항체이고,

[327] Linker는 링커이며,

[328] D는 활성제로 피롤로벤조디아제핀 이량체이고,

[329] 상기 피롤로벤조디아제핀 이량체의 N10 또는 N10' 위치를 통해 링커와 항체가 연결된다.

[330] 피롤로벤조디아제핀 이량체의 N10 및 N'10 위치에 각각 독립적으로 $-C(O)O^*$, $-S(O)O^*$, $-C(O)^*$, $-C(O)NR^*$, $-S(O)_2NR^*$, $-P(O)R'NR^*$, $-S(O)NR^*$, 및 $-PO_2NR^*$ 기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나가 부착되며,

[331] 여기에서 *은 링커가 부착되는 부분이고,

[332] 여기에서, R, 및 R'은 각각 독립적으로 H, OH, N_3 , CN, NO_2 , SH, NH_2 , ONH_2 , NNH_2 , 할로, 치환되거나 비치환된 C_{1-8} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{3-8} 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_{1-8} 알콕시, 치환되거나 비치환된 C_{1-8} 알킬티오, 치환되거나 비치환된 C_{3-20} 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 C_{5-20} 아릴 또는 모노- 또는 다이- C_{1-8} 알킬아미노이고,

[333] 여기에서 C_{1-8} 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, C_{1-8} 알콕시, C_{1-8} 알킬티오, C_{3-20} 헤테로아릴, C_{5-20} 아릴이 치환되는 경우, H, OH, N_3 , CN, NO_2 , SH, NH_2 , ONH_2 , NNH_2 , 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시 및 C_{6-12} 아릴로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 치환기로 치환되는,

[334] 피롤로벤조디아제핀 이량체 전구체(pyrrolobenzodiazepine dimer prodrug), 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 활성제로 사용할 수 있다.

[335] 본 발명의 일 양태에서, 피롤로벤조디아제핀 이량체 전구체가 제공된다. 본 발명에 따른 전구체 형태로 투여하는 경우, 혈중 노출 시 추가적인 반응에 의해 유효한 약물로 전환되어야 할 필요가 있기 때문에 예상치 못한 링커의 분해 시에

생길 수 있는 부작용의 발생가능성을 미연에 방지할 수 있고, 정상세포에 대한 독성이 감소하며, 약물이 보다 안정적이라는 점에서 기존 PBD 약물에 비해 유리한 점이 있다.

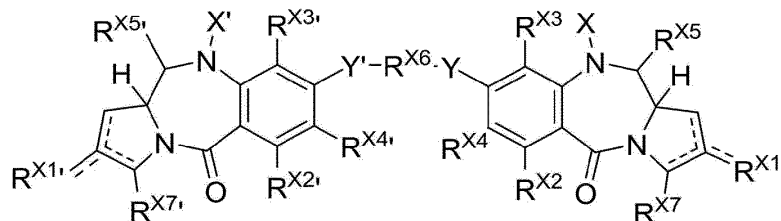
[336] 또한 항체-약물 접합체 제조 시, 기존 방법으로 제조한 항체-약물 접합체의 경우 불순물의 함량이 높고 노출된 이민 그룹이 뉴클레오�필(nucleophile)의 공격을 받아 원치 않는 구조의 약물이 생성될 우려가 있는 반면, 본 발명에 따른 방법으로 제조된 항체-약물 접합체는 순도가 높아 분리가 용이하다는 장점이 있고, 기존 PBD 또는 PBD 이량체에 비하여 물성이 보다 향상되는 것으로 나타났다.

[337] 본 발명의 일 양태에서, 피롤로벤조디아제핀 이량체 전구체는 하기 일반식 X 또는 일반식 XI 구조를 갖는 것을 특징으로 하는,

[338] 피롤로벤조디아제핀 이량체 전구체, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물이다:

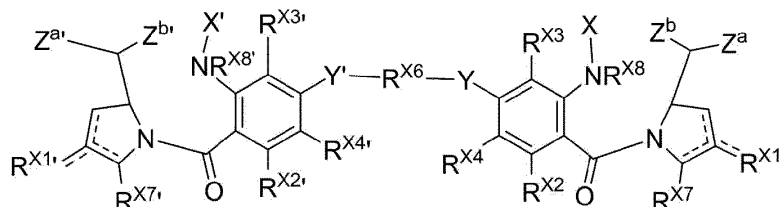
[339] [일반식 X]

[340]



[341] [일반식 XI]

[342]



[343] 상기 식에서,

[344] 상기 점선은 C1과 C2 사이, C2와 C3 사이, C'1과 C'2 사이, 또는 C'2과 C'3 사이의 이중 결합의 선택적 존재를 나타내며;

[345] R^{X1} 및 $R^{X1'}$ 는 독립적으로 H, OH, =O, =CH₂, CN, R^m, OR^m, =CH-R^{m'}=C(R^{m'})₂, O-SO₂-R^m, CO₂R^m, COR^m, 할로 및 디할로로부터 선택되고;

[346] R^{m'}는 R^m, CO₂R^m, COR^m, CHO, CO₂H, 및 할로로부터 선택되며,

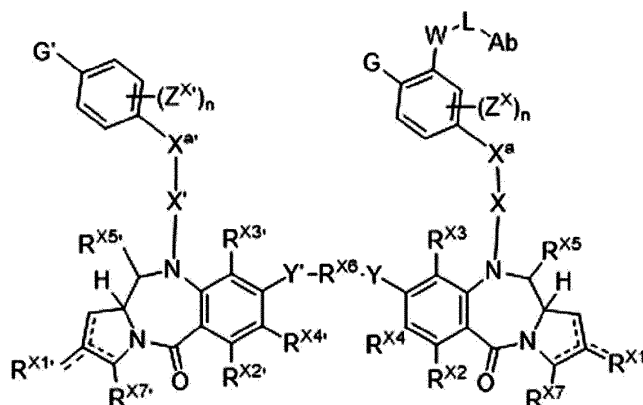
[347] 각각의 R^m는 독립적으로 C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, C₅₋₂₀ 아릴, C₅₋₂₀ 헤테로아릴, C₃₋₆ 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[348] R^{X2} , $R^{X2'}$, R^{X3} , $R^{X3'}$, R^{X5} , 및 $R^{X5'}$ 는 독립적으로 H, R^m, OH, OR^m, SH, SR^m, NH₂, NHR

- ^m, NR^m₂, NO₂, Me₃Sn 및 할로로부터 선택되며;
- [349] R^{X4} 및 R^{X4'}는 독립적으로 H, R^m, OH, OR^m, SH, SR^m, NH₂, NHR^m, NR^m₂, NO₂, Me₃Sn, 할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₅₋₁₂ 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -CN, -NCO, -ORⁿ, -OC(O)Rⁿ, -OC(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)Rⁿ, -OS(O)₂Rⁿ, -SRⁿ, -S(O)Rⁿ, -S(O)₂Rⁿ, -S(O)NRⁿR^{n'}, -S(O)₂NRⁿR^{n'}, -OS(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)₂NRⁿR^{n'}, -NRⁿR^{n'}, -NRⁿC(O)R^o, -NRⁿC(O)OR^o, -NRⁿC(O)NR^oR^{o'}, -NRⁿS(O)R^o, -NRⁿS(O)₂R^o, -NRⁿS(O)NR^oR^{o'}, -NRⁿS(O)₂NR^oR^{o'}, -C(O)Rⁿ, -C(O)ORⁿ 및 -C(O)NRⁿR^{n'}로부터 선택되고;
- [350] R^X 및 R^{X'}는 독립적으로 H, OH, N₃, CN, NO₂, SH, NH₂, ONH₂, NHNH₂, 할로, C₁₋₈ 알킬, C₃₋₈ 시클로알킬, C₁₋₈ 알콕시, C₁₋₈ 알킬티오, C₃₋₂₀ 헤테로아릴, C₅₋₂₀ 아릴 또는 모노- 또는 디(di)-C₁₋₈ 알킬아미노로부터 선택되며;
- [351] Y 및 Y'는 독립적으로 O, S, 및 N(H)으로부터 선택되고;
- [352] R^{X6}는 독립적으로 C₃₋₁₂ 알킬렌, C₃₋₁₂ 알케닐렌, 또는 C₃₋₁₂ 헤테로알킬렌으로부터 선택되며;
- [353] R^{X7} 및 R^{X7'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -OR^r, -OC(O)R^r, -OC(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)R^r, -OS(O)₂R^r, -SR^r, -S(O)R^r, -S(O)₂R^r, -S(O)NR^rR^{r'}, -S(O)₂NR^rR^{r'}, -OS(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)₂NR^rR^{r'}, -NR^rR^{r'}, -NR^rC(O)R^s, -NR^rC(O)OR^s, -NR^rC(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)R^s, -NR^rS(O)₂R^s, -NR^rS(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)₂NR^sR^{s'}, -C(O)R^r, -C(O)OR^s 또는 -C(O)NR^rR^{r'}으로부터 선택되고;
- [354] 각각의 R^r, R^{r'}, R^s, 및 R^{s'}은 독립적으로 H, C₁₋₇ 알킬, C₂₋₇ 알케닐, C₂₋₇ 알키닐, C₃₋₁₃ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택되며;
- [355] 각 R^{X8} 및 R^{X8'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆ 헤테로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -S(O)R^m, -S(O)₂R^m, -S(O)NR^mR^{m'}, -S(O)₂NR^mR^{m'}, -NR^mR^{m'}, -NR^mC(O)R^m, -NR^mC(O)ORⁿ, -NR^mC(O)NRⁿR^{n'}, -NR^mS(O)Rⁿ, -NR^mS(O)₂Rⁿ, -NR^mS(O)NRⁿR^{n'}, -NR^mS(O)₂NRⁿR^{n'}, -C(O)R^m, -C(O)OR^m 및 -C(O)NR^mR^{m'}로부터 선택되고;
- [356] Z^a는 OR^{X12a}, NR^{X12a}R^{X12a}, 또는 SR^{X12a}로부터 선택되며;
- [357] Z^b는 OR^{X13a}, NR^{X13a}R^{X13a}, 또는 SR^{X13a}로부터 선택되고;
- [358] Z^{a'}는 OR^{X12a}, NR^{X12a}R^{X12a}, 또는 SR^{X12a}로부터 선택되며;
- [359] Z^{b'}는 OR^{X13a'}, NR^{X13a'}R^{X13a'}, 또는 SR^{X13a'}로부터 선택되고;
- [360] 각 R^{X12a}, R^{X12a'}, R^{X13a'} 및 R^{X13a'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -C(O)R^{X15a}, -C(O)OR^{X15a} 및 -C(O)NR^{X15a}R^{X15a'}로부터 선택되고; 및
- [361] 각각의 R^{X15a} 및 R^{X15a'}는 독립적으로 C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, C₅₋₂₀ 아릴, C₅₋₂₀ 헤테로아릴, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택되며;

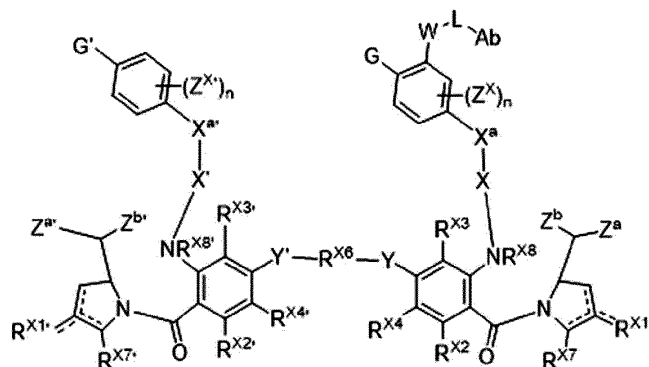
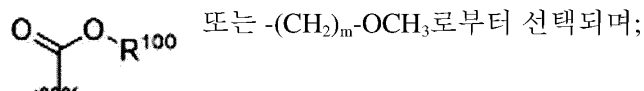
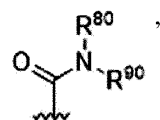
- [362] 상기 R^{X13a} 및 R^{X14a} 는 이들이 부착된 원자와 함께 임의적으로 결합하여 3 내지 7-원 헤테로 사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로 사이클로 알킬, 또는 3 내지 7-원 헤테로아릴을 형성하고, 및 $R^{X13a'}$ 및 $R^{X14a'}$ 이들이 부착된 원자와 함께 임의적으로 결합하여 3 내지 7-원 헤테로 사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 또는 3 내지 7-원 헤테로아릴을 형성하며; 및
- [363] 상기 각각의 R^n , R^n , R^o , R^o , R^p , 및 R^p 는 독립적으로 H, C_{1-7} 알킬, C_{2-7} 알케닐, C_{2-7} 알키닐, C_{3-13} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, C_{5-10} 아릴, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택됨.
- [364] 또한, 상기 R^m 는 독립적으로 C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, C_{5-20} 아릴, C_{5-20} 헤테로아릴, C_{3-6} 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [365] 상기 R^m 는 추가적으로 C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, C_{5-20} 아릴, C_{5-20} 헤테로아릴, C_{3-6} 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 또는 5 내지 7-원 헤테로아릴로 치환된다.
- [366] 또한, 상기 R^{X4} 및 $R^{X4'}$ 는 독립적으로 H, R^m , OH, OR^m , SH, SR^m , NH_2 , NHR^m , NR^m , R^m , NO_2 , Me_3Sn , 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-12} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -CN, -NCO, -ORⁿ, -OC(O)Rⁿ, -OC(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)Rⁿ, -OS(O)₂Rⁿ, -SRⁿ, -S(O)Rⁿ, -S(O)₂Rⁿ, -S(O)NRⁿR^{n'}, -S(O)₂NRⁿR^{n'}, -OS(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)₂NRⁿR^{n'}, -NRⁿR^{n'}, -NRⁿC(O)R^o, -NRⁿC(O)OR^o, -NRⁿC(O)NR^oR^{o'}, -NRⁿS(O)R^o, -NRⁿS(O)₂R^o, -NRⁿS(O)NR^oR^{o'}, -NRⁿS(O)₂NR^oR^{o'}, -C(O)Rⁿ, -C(O)ORⁿ 및 -C(O)NRⁿR^{n'}로부터 선택되고,
- [367] 상기 R^{X4} 또는 $R^{X4'}$ 는 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-12} 아릴 또는 5 내지 7-원 헤테로아릴이고, 추가적으로 하나 이상의 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -OR^p, -OC(O)R^p, -OC(O)NR^pR^{p'}, -OS(O)R^p, -OS(O)₂R^p, -SR^p, -S(O)R^p, -S(O)₂R^p, -S(O)NR^pR^{p'}, -S(O)₂NR^pR^{p'}, -OS(O)NR^pR^{p'}, -OS(O)₂NR^pR^{p'}, -NR^pR^{p'}, -NR^pC(O)R^q, -NR^pC(O)OR^q, -NR^pC(O)NR^qR^{q'}, -NR^pS(O)R^q, -NR^pS(O)₂R^q, -NR^pS(O)NR^qR^{q'}, -NR^pS(O)₂NR^qR^{q'}, -C(O)R^p, -C(O)OR^p 또는 -C(O)NR^pR^{p'}로 치환된다.
- [368] 또한, 상기 R^{X7} 및 $R^{X7'}$ 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -OR^r, -OC(O)R^r, -OC(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)R^r, -OS(O)₂R^r, -SR^r, -S(O)R^r, -S(O)₂R^r, -S(O)NR^rR^{r'}, -S(O)₂NR^rR^{r'}, -OS(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)₂NR^rR^{r'}, -NR^rR^{r'}, -NR^rC(O)R^s, -NR^rC(O)OR^s, -NR^rC(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)R^s, -NR^rS(O)₂R^s, -NR^rS(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)₂NR^sR^{s'}, -C(O)R^r, -C(O)OR^s 또는 -C(O)NR^rR^{r'}으로부터 선택되고,
- [369] 상기 R^{X7} 또는 $R^{X7'}$ 는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴이고, 추가적으로 C_{1-6}

- 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, $-OR^t$, $-OC(O)R^t$, $-OC(O)NR^tR^t$, $-OS(O)R^t$, $-OS(O)_2R^t$, $-SR^t$, $-S(O)R^t$, $-S(O)_2R^t$, $-S(O)NR^tR^t$, $-S(O)_2NR^tR^t$, $-OS(O)NR^tR^t$, $-OS(O)_2NR^tR^t$, $-NR^tR^t$, $-NR^tC(O)R^u$, $-NR^tC(O)OR^u$, $-NR^tC(O)NR^uR^u$, $-NR^tS(O)R^u$, $-NR^tS(O)_2R^u$, $-NR^tS(O)NR^uR^u$, $-NR^tS(O)_2NR^uR^u$, $-C(O)R^t$, $-C(O)OR^t$ 또는 $-C(O)NR^tR^t$ 로 치환되며,
- [370] 상기 R^t , R^r , R^s , R^t , R^t , R^u 및 R^u 는 독립적으로 H, C_{1-7} 알킬, C_{2-7} 알케닐, C_{2-7} 알키닐, C_{3-13} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-10} 아릴, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택된다.
- [371] 또한, 상기 R^{x1} 및 $R^{x1'}$ 는 독립적으로 R^m 으로부터 선택되고; 및
- [372] R^m 은 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{5-7} 아릴 및 C_{3-6} 헤테로아릴로부터 선택된다.
- [373] 또한, 상기 R^{x2} , $R^{x2'}$, R^{x3} , $R^{x3'}$, R^{x5} , 및 $R^{x5'}$ 은 독립적으로 H 또는 OH로부터 선택된다.
- [374] 또한, R^{x4} 및 $R^{x4'}$ 는 독립적으로 R^m 으로부터 선택되고; 및
- [375] R^m 은 C_{1-6} 알콕시이다.
- [376] 또한, 상기 R^{x4} 및 $R^{x4'}$ 는 독립적으로 메톡시, 에톡시 및 부톡시로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.
- [377] 또한, 상기 Y 및 Y'는 O이다.
- [378] 또한, 상기 R^{x6} 는 C_{3-12} 알킬렌, C_{3-12} 알케닐렌 또는 C_{3-12} 헤테로알킬렌이고, 상기 R^{x6} 은 $-NH_2$, $-NHR^m$, $-NHC(O)R^m$, $-NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R^{xx}$, 또는 $-[CH_2CH_2O]_n-R^{xx}$ 치환되고;
- [379] 상기 R^{xx} 는 H, OH, N_3 , CN, NO_2 , SH, NH_2 , ONH_2 , $NHNH_2$, 할로, C_{1-8} 알킬, C_{3-8} 시클로알킬, C_{1-8} 알콕시, C_{1-8} 알킬 티오, C_{3-20} 헤테로아릴, C_{5-20} 아릴 또는 모노- 또는 디- C_{1-8} 알킬아미노; 및
- [380] n은 1 내지 6의 정수이다.
- [381]
- [382] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 활성제는 일반식 XII 또는 일반식 XIII로 기재되는 피롤로벤조디아제핀 다이머이다:
- [383] [일반식 XII]
- [384]

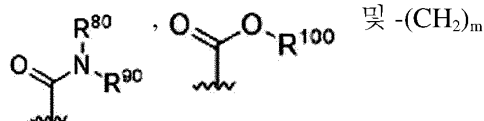


[385] [일반식 XIII]

[386]

[387] 상기 X^a 및 X^b는 독립적으로 결합 또는 C₁₋₆ 알킬렌으로부터 선택되고;[388] Z^x 및 Z^x는 독립적으로 수소, C₁₋₈ 알킬, 할로젠, 시아노, 니트로,또는 -(CH₂)_m-OCH₃로부터 선택되며;[389] 각각의 R⁸⁰, R⁹⁰ 및 R¹⁰⁰는 수소, C₁₋₈ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, 및 C₁₋₆ 알콕시로부터 선택되고; 및

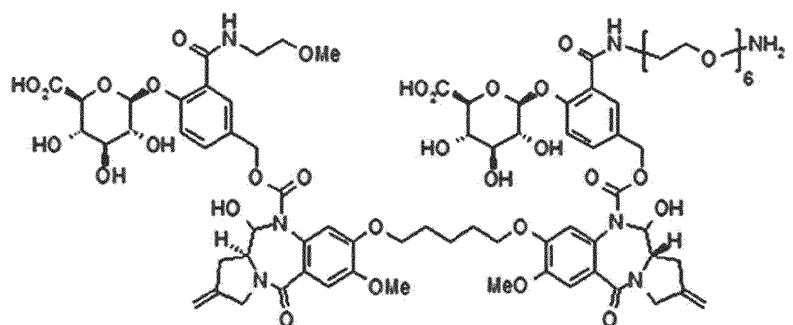
[390] m은 0 내지 12의 정수임.

[391] 상기 Z^x 및 Z^x는 독립적으로 수소,및 -(CH₂)_m-OCH₃로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고,[392] 상기 각각의 R⁸⁰, R⁹⁰ 및 R¹⁰⁰는 수소, C₁₋₃ 알킬 및 C₁₋₃ 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이며,

[393] m은 1 내지 6의 정수이고,

[394] 상기 활성제는

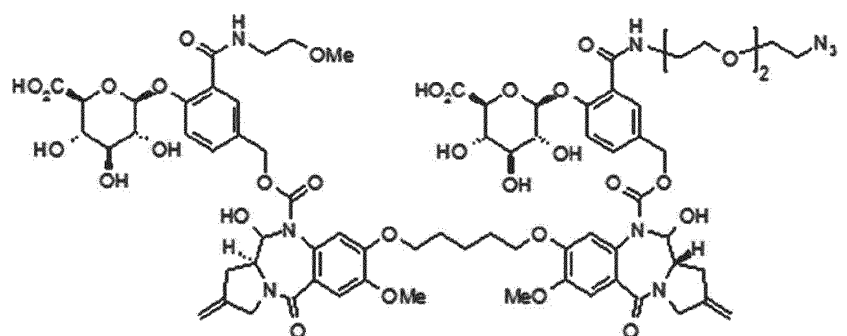
[395]



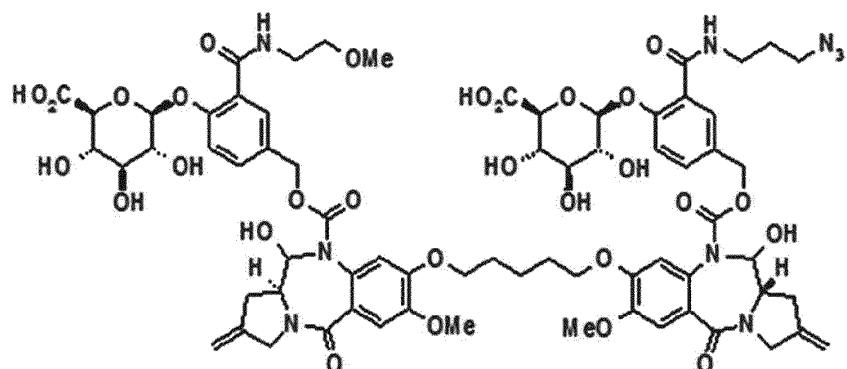
[illegible][illegible]

[illegible]

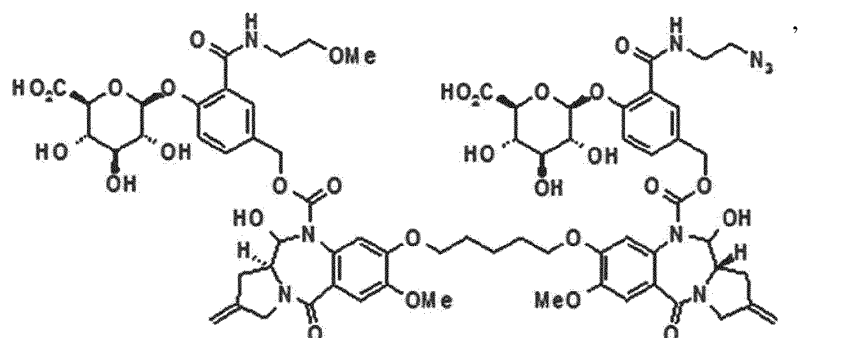
[404]



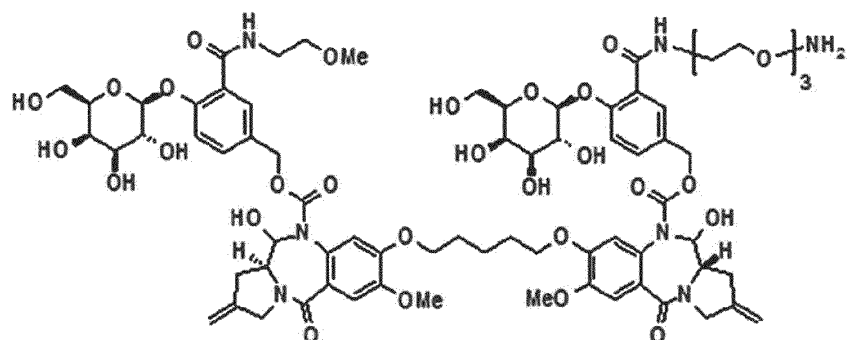
[405]



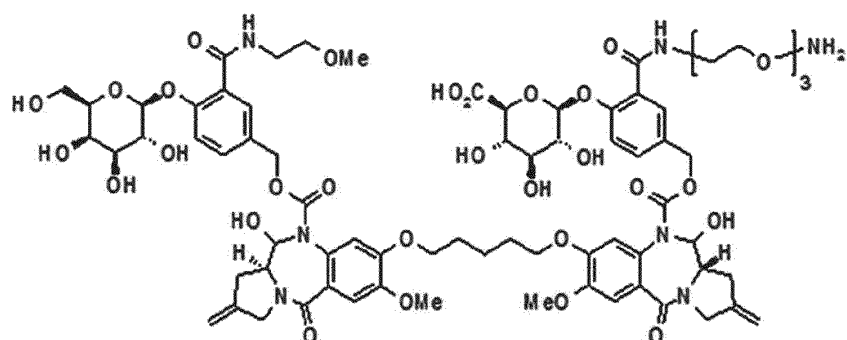
[406]



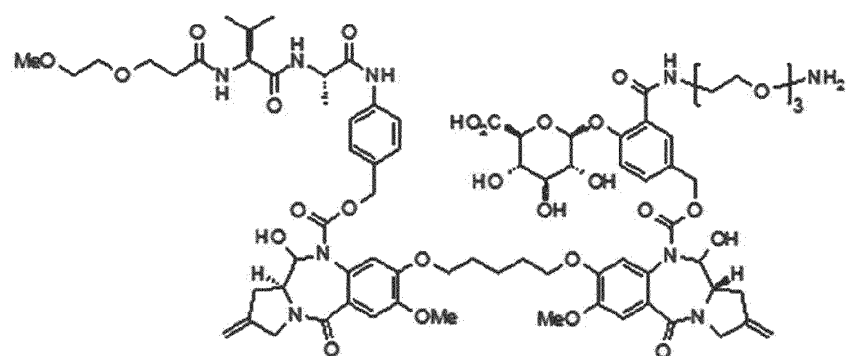
[407]



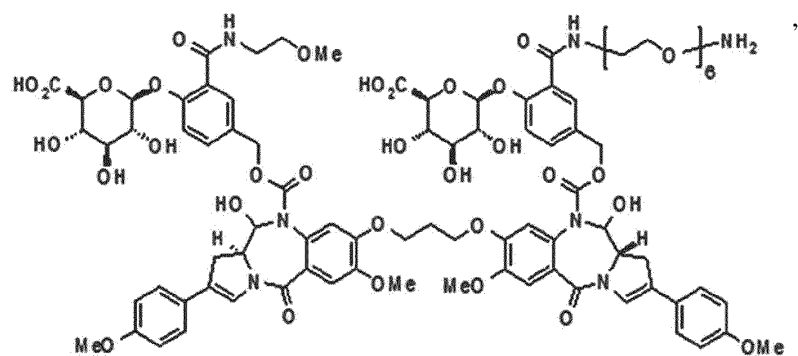
[408]



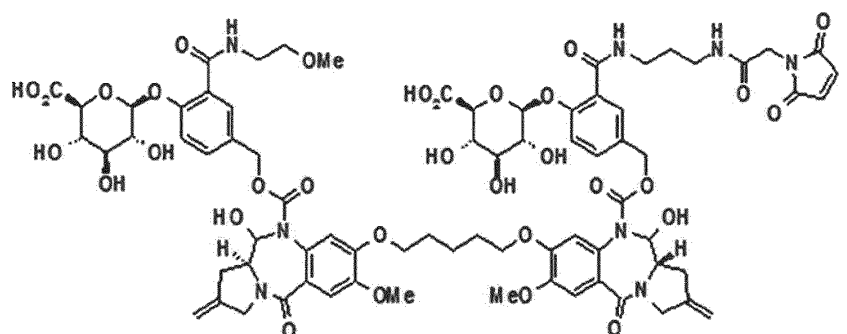
[409]



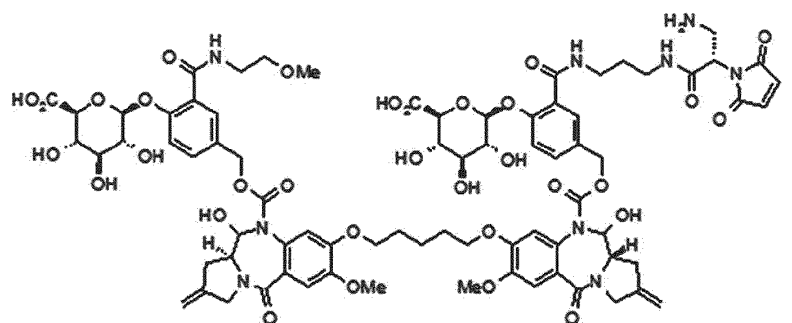
[410]



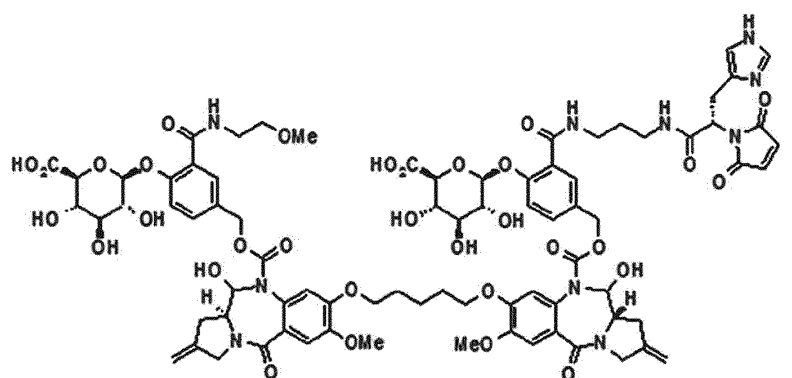
[411]



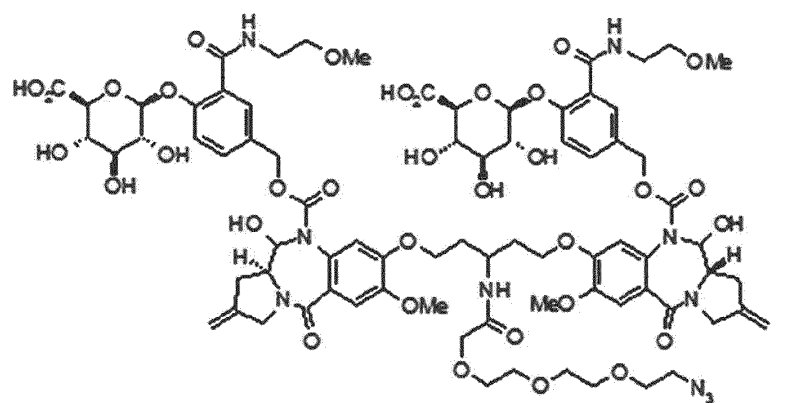
[412]



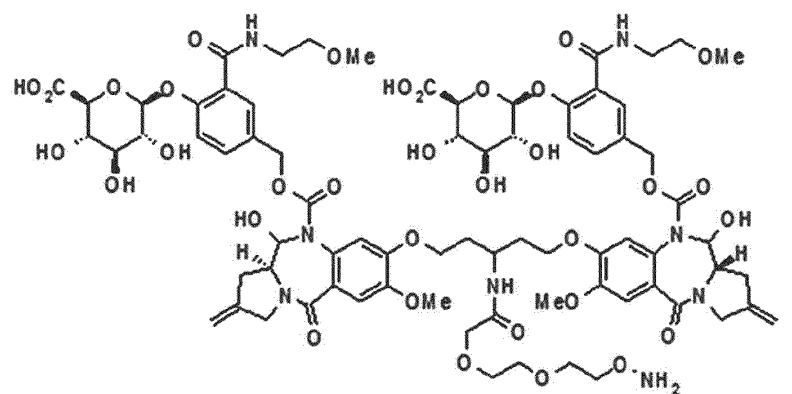
[413]



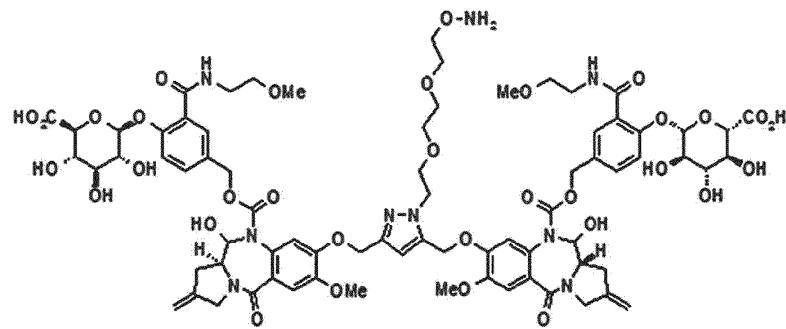
[414]



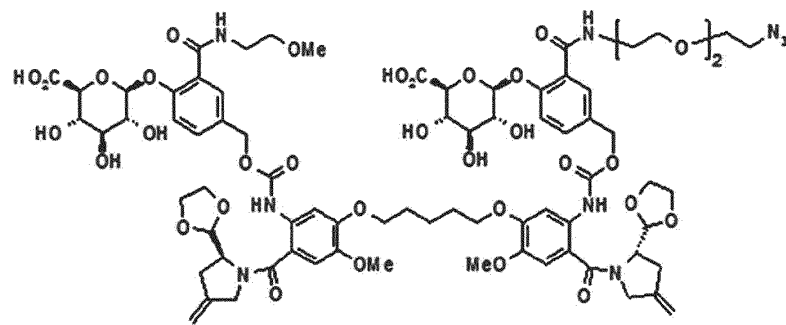
[415]



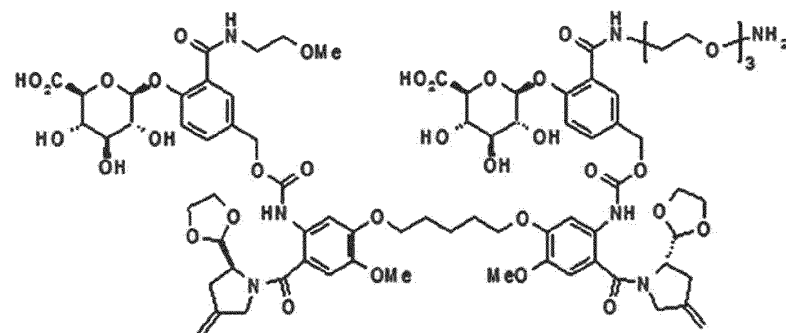
[416]



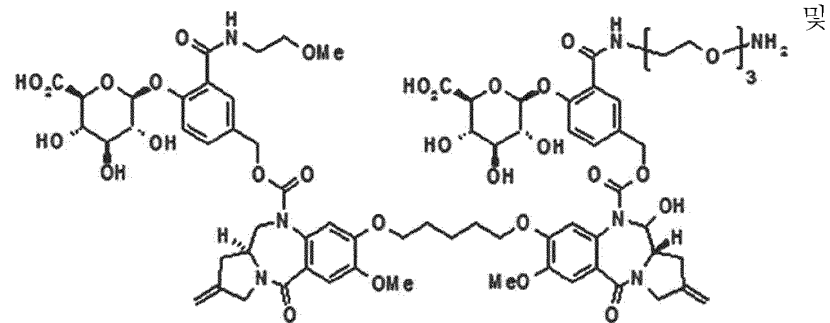
[417]



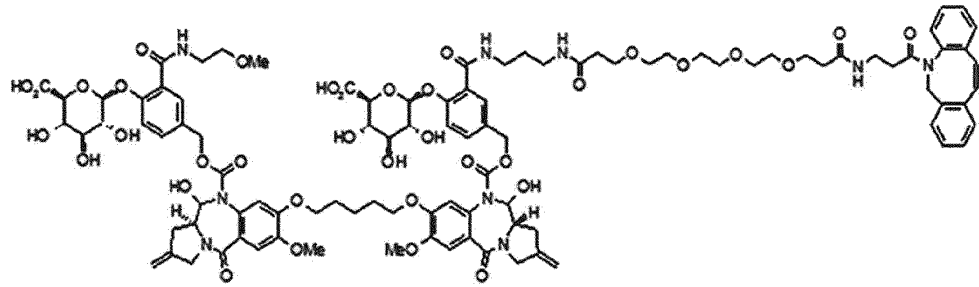
[418]



[419]



[420]



으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[421]

[422] 본 명세서에서 "접합체(conjugates)"는 세포독성 화합물의 하나 이상의 분자에 공유결합되는 세포 결합제를 말한다. 여기서, "세포 결합제"는 생물학적 타겟에 대한 친화도를 갖는 분자로서, 예를 들어 리간드, 단백질, 항체, 구체적으로 모노클로날 항체, 단백질 또는 항체 단편, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 올리고사카라이드일 수 있으며, 결합제는 생물학적 활성 화합물을 생물학적 타겟으로 유도하는 기능을 한다. 본 발명의 일 양태에서, 접합체는 세포 표면 항원을 통해 종양 세포를 표적화하도록 설계될 수 있다. 항원은 비정상적인 세포 타입에서 과다 발현되거나 또는 발현되는 세포 표면 항원일 수 있다. 구체적으로, 표적 항원은 증식성 세포(예컨대 종양 세포) 상에서만 발현되는 것일 수 있다. 표적 항원은 통상 증식성 조직 및 정상 조직 사이의 상이한 발현에 기초하여 선택될 수 있다. 본 발명에서 리간드는 링커에 결합된다.

[423] 본 명세서에서 "항체"는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치하는 적어도 1개의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 무손상 폴리클로날 또는 모노클로날 항체뿐만 아니라, 소정의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 무손상 항체의 임의의 항원 결합 부분(예를 들어, "항원-결합단편") 또는 그의 단일쇄, 항체를 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 배열, 예를 들어 비제한적으로, Fab; Fab'; F(ab')₂ Fd 단편; Fv 단편; 단일 도메인 항체(dAb) 단편; 단리된 상보성 결정 영역(CDR); 단일쇄(scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어, 상어 및 낙타류 항체), 맥시바디, 미니바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv를 포괄한다(예를 들어, 문헌 [Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136] 참조).

[424] 항체는 임의의 부류의 항체, 예컨대 IgG, IgA 또는 IgM (또는 그의 하위부류)을 포함하며, 항체가 임의의 특정한 부류일 필요는 없다. 항체의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들

중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄(HC) 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 불린다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배위는 널리 공지되어 있다. 본 발명의 항체는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술, 예컨대 제조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술 또는 상기 기술들의 조합 또는 관련 기술분야에 용이하게 공지되어 있는 다른 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

- [425] 본 명세서에서 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체를 실질적으로 함유하지 않는 항체를 지칭하며, 다른 세포 물질 및/또는 화학물질을 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.
- [426] 본 명세서에서 "생물학적 타깃"은 종양, 암세포, 세포간질(extracellular matrix) 표면에 위치하는 항원을 말한다.
- [427] 본 명세서에서 "링커"는 세포독성 화합물을 리간드에 공유결합시키는 화합물을 말한다. 본 발명의 일 양태에서, 링커로는 PCT/US2016/063564호 및 PCT/US2016/063595호에 개시된 링커를 사용할 수 있다.
- [428] 본 명세서에서 "치료제"는 증식성 질환, 예를 들어 암 세포 또는 활성화된 면역 세포에 세포독성, 세포증식억제 및/또는 면역조절 효과를 행사하는 작용제이다. 치료제의 예는 세포독성제, 화학요법제, 세포증식억제제 및 면역조절제를 포함한다.
- [429] 본 명세서에서 "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다.
- [430] 본 명세서에서 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물, 특히 포유동물을 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예로는 인간 대상체를 들 수 있으며, 예컨대 본 명세서에 기재된 장애, 보다 구체적으로는 암을 갖는 인간 환자 또는 정상 대상체를 포함하는 개념이다. "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 비-포유동물(예를 들어, 닭, 양서류, 파충류) 및 포유동물, 예를 들어, 비-인간 영장류, 가축 및/또는 농업에 유용한 동물(예를 들어, 양, 개, 고양이, 소, 돼지 등) 및 설치류(예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 기니피그 등)를 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간 환자이다.
- [431] 본 명세서에서 "치료" 또는 "치료한다"는 치료적 처치 및 예방학적 또는 예방적 조치 둘 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 질병을 갖는 대상체, 및 질병을 갖기 쉬운 대상체 또는 질병이 예방되어야 할 대상체를 포함한다. 따라서, 질병 또는 치료를 필요로 하는 대상체에 관하여 사용되는 경우, 상기 용어는 미처리 대상체에 비하여, 질병 진행의 저지 또는 둔화, 증상의 예방, 질병 및/또는 증상 중증도의 감소 또는 질병 기간의 감소를 포함하나 이로 한정되지 않는다.
- [432] 본 명세서에서, "투여" 또는 "투여하는"은 요망되는 효과를 달성하기 위하여 임의의 적절한 경로에 의해 화합물 또는 화합물들을 제공하고/거나 접촉시키고/거나 전달하는 것을 지칭한다. 투여는 경구, 설하, 비경구(예를 들어,

정맥내, 피하, 피내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활막내, 흉골내, 척수강내, 병변내 또는 두개내 주사), 경피, 국소, 협측, 직장, 질, 비강, 안과적, 흡입 및 이식물을 통한 투여를 포함할 수 있지만, 이로 한정되지 않는다.

- [433] 본 명세서에서 "비치환되거나 치환된"은 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있는 모기(parent group)를, "치환된"은 1 이상의 치환기를 갖는 모기(parent group)를, 치환기는 모기(parent group)에 공유결합되거나 모기(parent group)에 융합된 화학적 부분을 의미한다.
- [434] 본 명세서에서 "할로"는 플루오린, 클로라인, 브로마인, 요오드 등을 말한다.
- [435] 본 명세서에서 "알킬"은 지방족 또는 지환족, 포화 또는 불포화(불포화, 완전 불포화) 탄화수소 화합물의 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여 얻어진 1가 부분으로서, 포화 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸 등을, 포화 직쇄형 알킬의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, n-펜틸(아밀), n-헥실, n-헵틸 등, 포화 분지쇄형 알킬의 예로는 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 이소펜틸, 네오펜틸 등을 들 수 있다.
- [436] 본 명세서에서 "알콕시"는 -OR[여기서, R은 알킬기]을 의미하며, 예로는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, sec-부톡시, 이소부톡시, tert-부톡시 등을 들 수 있다.
- [437] 본 명세서에서 "아릴"은 고리 원자를 갖는 방향족 화합물의 방향족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거하여 얻어진 1가 부분을 의미한다.
- [438] 본 명세서에서 "알케닐"은 1 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 알킬로서, 불포화 알케닐기의 예로는 에테닐(비닐, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1-프로페닐($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-프로페닐, 이소프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐 등을 들 수 있다.
- [439] 본 명세서에서 "알키닐"은 1 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 알킬기로서, 불포화 알키닐기의 예는 에티닐 및 2-프로피닐 등을 들 수 있다.
- [440] 본 명세서에서 "카르복시"는 $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 를 말한다.
- [441] 본 명세서에서 "포르밀"은 $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 를 말한다.
- [442] 본 명세서에서 "아릴"은 방향족 화합물의 방향족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거하여 얻어진 1가 모이어티에 관한 것이다. 예를 들어 " C_{5-7} 아릴"은 모이어티가 5 내지 7 개의 고리 원자를 갖는 것으로서, 방향족 화합물의 방향족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거함으로써 획득되는 1가 모이어티를 의미하고, " C_{5-10} 아릴"은 모이어티가 5 내지 10 개의 고리 원자를 갖는 것으로서, 방향족 화합물의 방향족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거함으로써 획득되는 1가 모이어티를 의미한다. 여기에서 접두사(C_{5-7} , C_{5-10} 등)는 탄소 원자 또는 헤테로 원자인지 여부와 상관없이 고리원자의 수 또는 고리 원자의 수의 범위를 지칭한다. 예를 들어 " C_{5-6} 아릴"은 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는 아릴기에 관한 것이다. 여기에서, 고리 원자는 "카르보아릴기"에서와 같이 모두 탄소 원자일 수 있다. 카르보아릴기의 예는 벤젠, 나프탈렌, 아줄렌, 안트라센, 페난트렌, 나프타센 및 피렌으로부터 유도된 것들을 포함하나, 이로 제한되지 않는다.

적어도 하나가 방향족 고리인 융합 고리를 포함하는 아릴기의 예는 인단, 인텐, 이소인텐, 테트라린, 아세나프텐, 플루오렌, 페날렌, 아세페난트렌 및 아세안트렌으로부터 유도된 기를 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 또는, 고리 원자는 "헤테로아릴"에서와 같이 하나 이상의 헤테로 원자를 포함할 수 있다.

- [443] 본 명세서에서 "헤테로아릴"은 1 이상의 헤테로 원자를 포함하는 아릴로서, 예로는 피리딘, 피리미딘, 벤조티오펜, 푸릴, 디옥살라닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐 등, 보다 구체적으로 벤조푸란, 이소벤조푸란, 인돌, 이소인돌, 인돌리진, 인돌린, 이소인돌린, 푸린(아데닌 또는 구아닌), 벤즈이미다졸, 인다졸, 벤즈옥사졸, 벤즈이속사졸, 벤조디옥솔, 벤조푸란, 벤조트리아졸, 벤조티오펜, 벤조티아졸, 벤조티아디아졸로부터 유도된 2개의 융합고리를 갖는 C_9 , 크로멘, 이소크로멘, 크로만, 이소크로만, 벤조디옥산, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 퀴놀리진, 벤조사진, 벤조디아진, 피리도피리딘, 퀴놀살린, 퀴나졸린, 신놀린, 프탈라진, 나프티리딘, 프테리딘으로부터 유도된 2개의 융합고리를 갖는 C_{10} , 벤조디아제핀으로부터 유도된 2개의 융합고리를 갖는 C_{11} , 카르바졸, 디벤조푸란, 디벤조티오펜, 카르볼린, 페리미딘, 피리도인돌로부터 유도된 3개의 융합고리를 갖는 C_{13} , 아크리딘, 크산텐, 티오크산텐, 옥산트렌, 페녹사티인, 페나진, 페녹사진, 페노티아진, 티안트렌, 페난트리딘, 페난트롤린, 페나진으로부터 유도된 3개의 융합고리를 갖는 C_{14} 를 들 수 있다.

- [444] 본 명세서에서, "사이클로알킬"은 시클릴기인 알킬기이고, 고리(cyclic) 탄화수소 화합물의 지환족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거하여 얻어진 1가 부분에 관한 것이다. 사이클로알킬기의 예는 하기로부터 유도된 것들을 포함하나, 이로 제한되지 않는다:

- [445] 포화 단일고리 탄화수소 화합물: 사이클로프로판, 사이클로부탄, 사이클로펜탄, 사이클로헥산, 사이클로헵탄, 메틸사이클로프로판, 디메틸사이클로프로판, 메틸사이클로부탄, 디메틸사이클로부탄, 메틸사이클로펜탄, 디메틸사이클로펜탄 및 메틸사이클로헥산;

- [446] 불포화 단일고리 탄화수소 화합물: 사이클로프로펜, 사이클로부텐, 사이클로펜텐, 사이클로헥센, 메틸사이클로프로펜, 디메틸사이클로프로펜, 메틸사이클로부텐, 디메틸사이클로부텐, 메틸사이클로펜텐, 디메틸사이클로펜텐 및 메틸사이클로헥센; 및

- [447] 포화 헤테로사이클릭 탄화수소 화합물: 노르카란, 노르피난, 노르보르난.

- [448] 본 명세서에서, "헤테로사이클릴"은 헤테로사이클릭 화합물의 고리원자로부터 수소 원자를 제거하여 얻어진 1가 부분에 관한 것이다.

- [449] 본 명세서에서 접두사(예를 들어 C_{1-12} , C_{3-8} 등)는 탄소 원자 또는 헤테로 원자인지 여부와 상관없이 고리 원자의 수 또는 고리 원자의 수의 범위를 지칭한다. 예를 들어 본 명세서에서 사용된 용어 " C_{3-6} 헤테로사이클릴"은 3 내지 6개의 고리 원자를 갖는 헤테로사이클릴기에 관한 것이다.

- [450] 단일고리 헤테로사이클릴기의 예는 하기로부터 유도된 것들을 포함하지만,

이로 제한되지 않는다:

- [451] N_1 : 아지리딘, 아제티딘, 피롤리딘, 피롤린, 2H- 또는 3H-피롤, 피페리딘, 디하이드로피리딘, 테트라하이드로피리딘, 아제핀;
- [452] N_2 : 이미다졸리딘, 피라졸리딘, 이미다졸린, 피라졸린, 피페라진;
- [453] O_1 : 옥시란, 옥세탄, 옥솔란, 옥솔, 옥산, 디하이드로피란, 피란, 옥세핀;
- [454] O_2 : 디옥솔란, 디옥산 및 디옥세판;
- [455] O_3 : 트리옥산;
- [456] N_1O_1 : 테트라하이드로옥사졸, 디하이드로옥사졸, 테트라하이드로이속사졸, 디하이드로이속사졸, 모르폴린, 테트라하이드로옥사진, 디하이드로옥사진, 옥사진
- [457] S_1 : 티이란, 티에탄, 티올란, 티안, 티에판;
- [458] N_1S_1 : 티아졸린, 티아졸리딘, 티오모르폴린;
- [459] N_2O_1 : 옥사디아진;
- [460] O_1S_1 : 옥사티올, 옥사티안; 및
- [461] $N_1O_1S_1$: 옥사티아진.
- [462]
- [463] 본 명세서에서 "전구체(prodrug)"는 생체내 생리학적 조건 하(예를 들어 효소 산화(enzymatic oxidation), 환원(reduction) 및/또는 가수분해 등)에서 효소, 위산의 작용에 의해 피롤로벤조다이아제핀 약물로 직접적으로 또는 간접적으로 변환할 수 있는 화합물을 말한다.
- [464] 본 명세서에서 "약학적으로 허용되는 염"으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염을 사용할 수 있고, 상기 유리산으로는 유기산 또는 무기산을 사용할 수 있다.
- [465] 상기 유기산은 이로 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이로 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [466] 예컨대, 화합물이 음이온이거나 또는 음이온일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예컨대 $-COOH$ 는 $-COO^-$ 일 수 있음), 적절한 양이온으로 염을 형성할 수 있다. 적절한 무기 양이온의 예는 알칼리 금속 이온, 예컨대 Na^+ 및 K^+ , 알칼리 토금속 양이온, 예컨대 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 및 다른 양이온, 예컨대 Al^{3+} 을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 유기 양이온의 예는 암모늄 이온(즉, NH_4^+) 및 치환된 암모늄 이온(예컨대 NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [467] 일부 적절한 치환된 암모늄 이온의 예는 하기로부터 유도된 것들이다:
에틸아민, 디에틸아민, 디사이클로헥실아민, 트리에틸아민, 부틸아민, 에틸헨디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진, 벤질아민, 페닐벤질아민,

콜린, 메글루민 및 트로메타민 뿐 아니라, 아미노산, 예컨대 리신 및 아르기닌, 통상적인 4급 암모늄 이온의 예는 $N(CH_3)_4^+$ 이다.

- [468] 화합물이 양이온이거나 또는 양이온일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예컨대 $-NH_2$ 는 $-NH_3^+$ 일 수 있음), 적절한 음이온으로 염을 형성할 수 있다. 적절한 무기 음이온의 예는 하기 무기 산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 아황산, 질산, 아질산, 인산 및 아인산 등을 예로 들 수 있다.
- [469] 적절한 유기 음이온의 예는 하기 유기산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이로 한정되지 않는다: 2-아세트옥시벤조산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤조산, 캄퍼설폰산, 신남산, 시트르산, 에데트산, 에탄디설폰산, 에탄설폰산, 푸마르산, 글루타민산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 히드록시말레산, 히드록시나프탈렌 카르복실산, 이세티온산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 메탄설폰산, 점액산, 올레산, 옥살산, 팔미트산, 팜산, 판토텐산, 페닐아세트산, 페닐설폰산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 설파닐산, 타르타르산, 툴루엔설폰산 및 발레르산 등을 예로 들 수 있다. 적절한 중합체 유기 음이온의 예는 하기 중합체 산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 타닌산, 카르복시메틸 셀룰로오스 등을 예로 들 수 있다.
- [470] 본 명세서에서 "용매화물(solvate)"은 본 발명에 따른 화합물과 용매 분자(solvent molecules) 사이의 분자 복합체(molecular complex)를 말하며, 용매화물의 예는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide), 에틸 아세테이트, 아세트산, 에탄올아민 또는 이의 혼합용매와 결합한 본 발명에 따른 화합물을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [471] 활성 화합물의 상당하는 용매화물을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 또는 바람직할 수 있다. 용어 "용매화물"은 본 명세서에서 용질(예컨대 활성 화합물, 활성 화합물의 염) 및 용매의 착체를 지칭하기 위해 통상적인 의미로 사용된다. 용매가 물인 경우, 용매화물을 편리하게 수화물, 예컨대 일수화물, 이수화물, 삼수화물 등으로 지칭할 수 있다.
- [472] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 통상적으로 서서히 대사되는 거대분자, 예를 들어 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등을 포함할 수 있으며, 이러한 약학적으로 허용 가능한 담체는 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다.
- [473] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [474] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [475] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [476] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [477] 상기 약학적 조성물은 주사제, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [478] 정맥내, 피부 또는 피하 주사 등을 위해, 활성 성분은 무발열성(pyrogen-free)이고 적절한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구 투여용의, 허용가능한 수용액의 형태일 수 있다. 당업자는 예를 들어 염화나트륨 수용액, 링거액, 락테이트 링거액 등과 같은 등장성 비히클을 사용하여 적절한 용액을 제조할 수 있으며, 보존제, 안정화제, 완충제, 산화 방지제 또는 기타 다른 첨가제로 필요한 경우 포함될 수 있다. 주사에 적합한 고체 형태는 또한 에멀전으로서 또는 리포솜에 캡슐화된 폴리펩티드의 형태로 제조될 수 있다.
- [479] 본 명세서에 사용된 어구 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적 치료 결과를 달성하는데 (투여량 및 투여 기간 및 수단에 대해) 필요한 양을 지칭한다. 유효량은 적어도 대상체에게 치료 이익을 부여하는데 필요한 활성제의 최소량이며, 독성량 미만이다. 예를 들어 투여량은 환자 당 약 100 ng 내지 약 100 mg/kg 범위로, 보다 전형적으로 약 1 µg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위로 투여할 수 있다. 활성 화합물이 염, 에스테르, 아미드, 전구체약물(prodrug) 등인 경우에 투여량은 모 화합물을 기준으로 계산되므로, 사용되는 실제 중량은 비례하여 증가된다. 본 발명에 따른 피롤로벤조디아제핀 화합물은 단위 제형(dosage form)당 활성 성분 0.1 mg 내지 3000 mg, 1 mg 내지 2000 mg, 10 mg 내지 1000 mg을 포함하도록 제형화될 수 있으나 이로 한정되지 않는다. 활성 성분은 약 0.05 µM 내지 100 µM, 1 µM 내지 50 µM, 5 µM 내지 30 µM의 활성 화합물의 피크 플라즈마 농도를 얻도록 투여될 수 있다. 예를 들어 임의로 식염수내에서 활성 성분 0.1 w/v% 내지 5 w/v% 용액의 정맥 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [480] 약학 조성물에서 활성 화합물의 농도는 약물의 흡수, 불활성화 및 배출 및 당

기술분야의 숙련자에게 알려진 다른 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 증상/질환의 심각도에 따라 달라질 수 있다. 또한 어떤 특정 환자에 대한 투여량 및 투여요법은 환자의 증상/질환의 정도, 필요성, 나이, 약물에 대한 반응성 등을 종합적으로 고려하여 투여 감독자의 직업적 판단에 따라 조정될 수 있으며, 본 발명에서 제시된 농도 범위는 단지 일예이며 청구된 조성물의 실시양태를 이로 한정하는 것을 의도하지 않는다. 또한 활성 성분은 1회 투여될 수 있거나, 보다 적은 투여량을 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

- [481] 본 발명에 따른 전구체 화합물, 또는 전구체-링커 화합물, 전구체-링커-리간드 접합체 화합물은 증식성 질환, 특히 암 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 용어 "증식성 질환"은 시험관내 또는 생체 내에서 신생 또는 과다형성 성장과 같은 바람직하지 않은 과도하거나 비정상적인 세포의 원치 않거나 조절되지 않는 세포 증식을 말한다. 증식성 질환은 예를 들어 신생물, 종양, 암, 백혈병, 건선, 뼈 질환, 섬유증증식 장애, 죽상동맥경화증 등을 포함하며, 양성, 전악성 또는 악성 세포 증식을 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않는다. 상기 암은 폐암, 소세포성 폐암, 위장관암, 대장암, 장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 고환암, 간암, 신장암, 방광암, 췌장암, 뇌암, 육종, 골육종, 카포시 육종 또는 흑색종일 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[482]

발명의 효과

- [483] 본 발명에 따른 항체-약물 접합체는 DLK1 발현 세포에 특이적으로 결합하여 세포 내로 내재화되는 항-DLK1 항체를 포함함으로써, 약물을 효과적이면서도 특이적 및 선택적으로 전달할 수 있으며, 항체에 약물이 안정적으로 결합되어 생체내 안정성을 유지하면서 목적하는 세포독성을 나타낼 수 있도록 하며, 특히 혈장 내에서 보다 안정하고 체내 순환시에도 안정적이며, 약물이 암세포 내에서 쉽게 방출되어 약효를 극대화할 수 있는 자가-희생기를 포함하는 링커 기술을 접목시킴으로써, 약물 및/또는 독신이 표적 세포에 안정적으로 도달하여 약효를 효과적으로 발휘하면서도 독성을 크게 낮출 수 있는, 약물-링커-리간드 시스템을 제공하는 효과를 나타낸다.

[484]

도면의 간단한 설명

- [485] 도 1은 환자 유래 종양 동물 모델에서 본 발명에 따른 ADC의 효능을 확인한 도이다.

[486]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[487]

- [488] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 보다 상세히 설명한다.

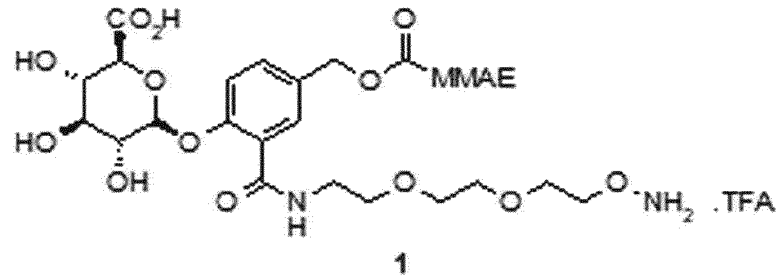
- [489] 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것이고, 본 발명의

권리범위를 이로 한정하려는 의도를 갖는 것은 아니다.

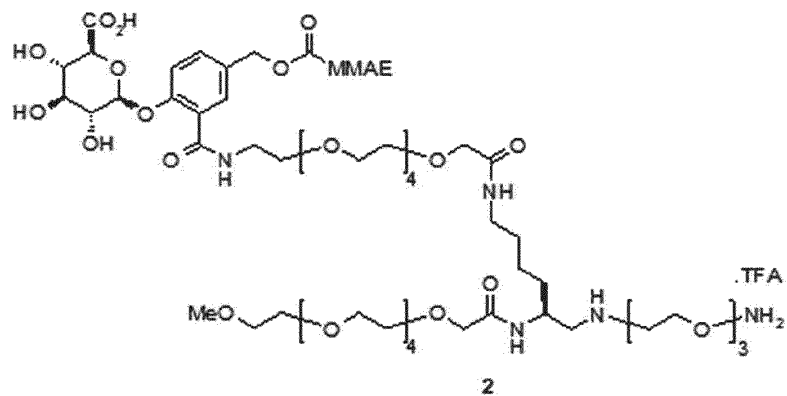
[490]

[491] <실시예 1> 화합물 1, 2, 3 및 4의 제조

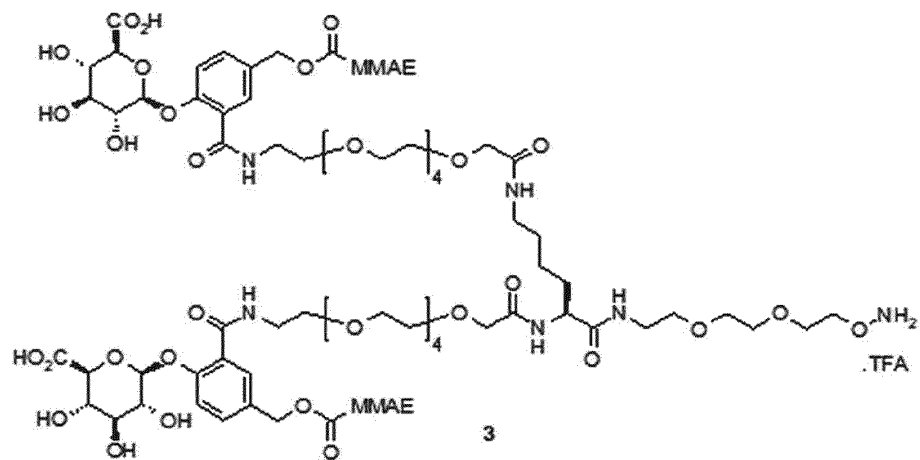
[492]



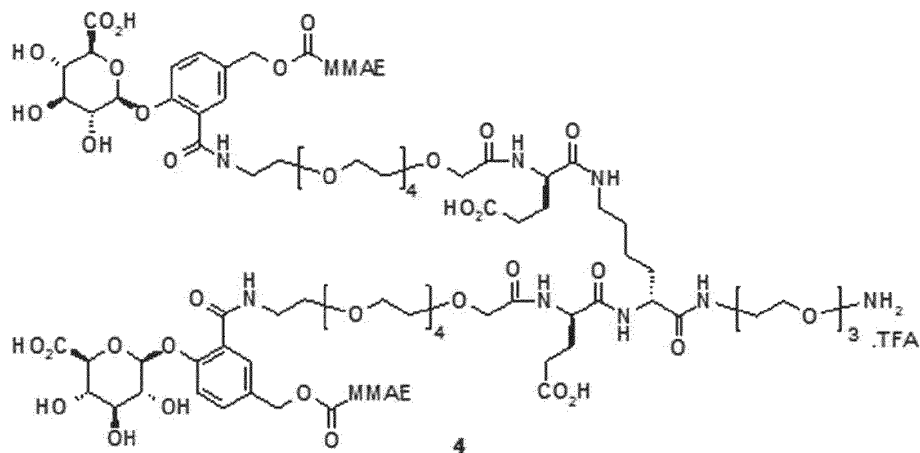
[493]



[494]



[495]



[496]

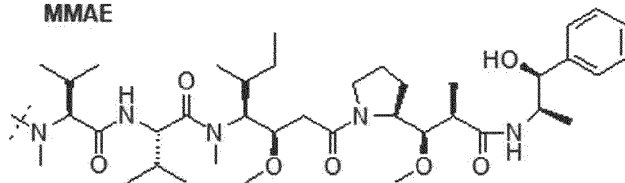
[497] 상기 화합물 1, 2, 3 및 4는 국제 공개특허 WO2017-089895에 기재된 방법으로 제조하였다.

[498]

[499] 상기 화합물 1, 2, 3 및 4에서 MMAE의 구조는 다음과 같다.

[500]

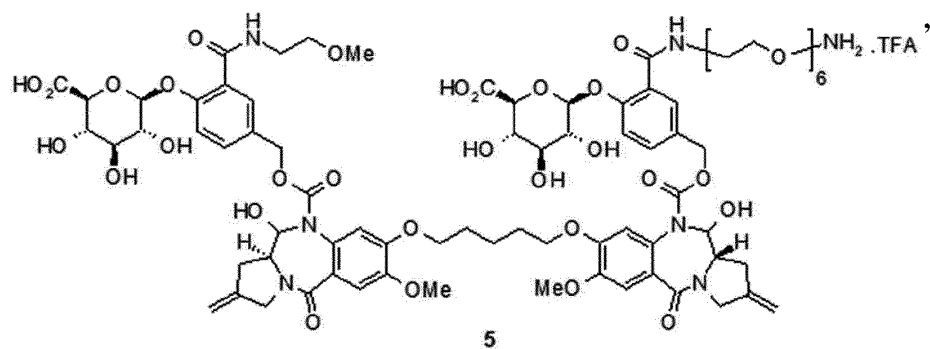
MMAE



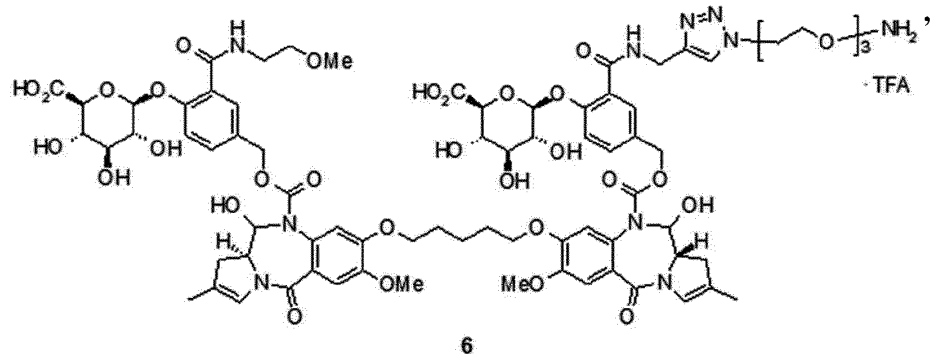
[501]

[502] <실시예 2> 화합물 5, 6, 7 및 8의 제조

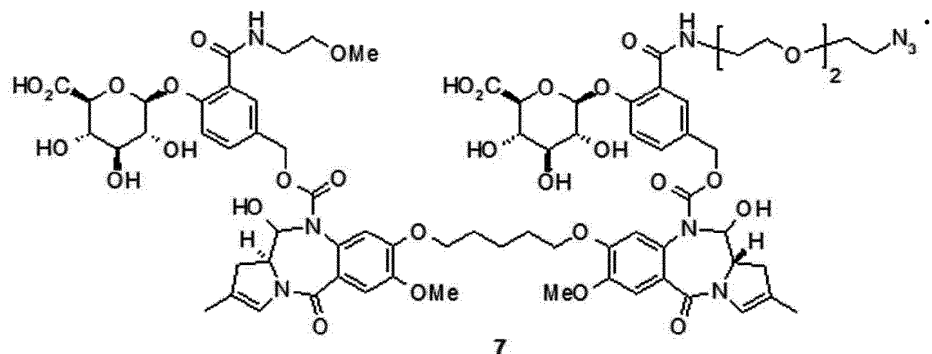
[503]



[504]



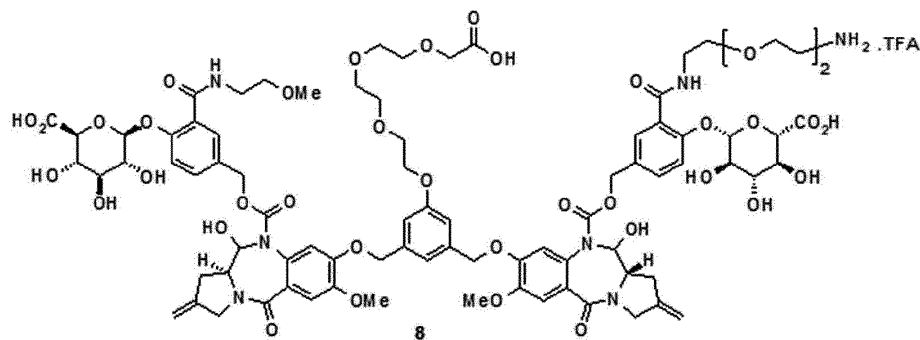
[505]



[506]

[507] 상기 화합물 5, 6 및 7은 대한민국 공개특허 제10-2018-0110645호에 기재된 방법으로 제조하였다.

[508]



[509]

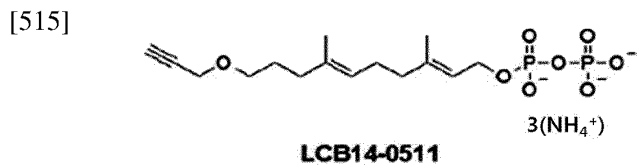
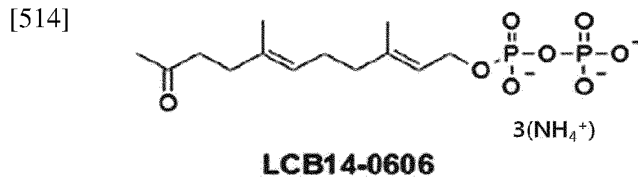
[510] 상기 화합물 8은 대한민국 출원번호 제10-2019-0000514호에 기재된 방법으로 제조하였다.

[511]

[512] <실시예 3> ADC의 제조

[513] ADC의 제조는 다음의 두 단계를 거쳐 제조되었으며, 공통적으로 사용한 LCB14-0511 및 LCB14-0606은 대한민국 공개특허 제10-2014-0035393호에 기재된 방법으로 제조하였다. LCB14-0511 및 LCB14-0606 구조식은 다음과

같다:



[516]

[517] **1단계 : 프레닐화 항체(prenylated antibody)의 제조**

[518] 대한민국 출원번호 제10-2018-0107639호에 기재된 방법으로 제조한 항체(18A5)의 프레닐레이션 반응 혼합물을 제조하여 30°C에서 16시간 반응하였다. 반응혼합물은 24 μ M 항체(18A5), 200 nM FTase(Calbiochem #344145)와 0.144 mM LCB14-0511 또는 LCB14-0606을 포함하는 완충용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 10 μ M ZnCl₂, 0.144 mM DTT)으로 구성하였다. 반응 종료 후 프레닐레이션된 항체는 PBS 완충용액으로 평형화된 G25 Sepharose 컬럼(AKTA purifier, GE healthcare)으로 제염시켰다.

[519]

[520] **2단계 : drug-conjugation 방법**

[521] <옥심 결합 반응(conjugation by oxime bond formation)>

[522] 프레닐레이션된 항체와 링커-약물간의 옥심 결합 생성반응 혼합물은 100 mM Na-아세테이트 완충용액 pH 5.2, 10% DMSO, 20 μ M 항체와 200 μ M 링커-약물(in house, 실시예 1, 2의 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 7 및 8번)을 섞어 제조하였으며 30°C에서 약하게 교반하였다. 6시간 또는 24시간 반응 후에 FPLC(AKTA purifier, GE healthcare) 과정을 거쳐 사용된 과량의 저분자 화합물들을 제거하였으며 단백질을 분획은 수집하여 농축하였다.

[523] <클릭 결합 반응에 의한 컨쥬게이션(conjugation by click reaction)>

[524] 프레닐레이션된 항체와 링커-약물간의 옥심 결합 생성반응 혼합물은 10% DMSO, 20 μ M 항체와 200 μ M 링커-약물(in house, 실시예 2의 화합물 6번), 1 mM 카퍼(II) 설페이트 펜타하이드레이트, 2 mM (BimC₄A)₃(Sigma-Aldrich 696854), 10 mM 소듐 아스코르베이트(sodium ascorbate) 및 10 mM 아미노구아니딘 염산염을 섞어 제조하였으며 25 °C에서 3 시간 반응 후에 2.0 mM EDTA를 처리하여 30 분 동안 반응하였다. 반응 종료 후, FPLC(AKTA purifier, GE healthcare) 과정을 거쳐 사용된 과량의 저분자 화합물들을 제거하였으며 단백질 분획은 수집하여 농축하였다.

[525] [표 2] ADC 제조목록

[526]

ADCs	Antibody	linker-toxin
ADC1	18A5	화합물1
ADC2		화합물2
ADC3		화합물3
ADC4		화합물4
ADC5		화합물5
ADC6		화합물6
ADC7		화합물7
ADC8		화합물8

[527]

[528] < 실험예 1 > *In vitro* 세포 독성 평가

[529] 하기 표 3에 기재된 약물 및 상기 <실시예 3>에서 제조한 ADC의 암세포주에 대한 세포증식억제 활성을 측정하였다. 암세포주로 시판 중인 사람 췌장암 세포주 MIA-PaCa2(DLK1 음성 내지 정상) 및 MIA-PaCa2-DLK1 과발현 세포주를 사용하였다. 약물로써, MMAF-OMe를 ADC로써, 표 2의 ADC를 사용하였다. 96-웰 플레이트에 각 암세포주를 72시간 처리군은 웰(well)당 4,000~5,000개씩, 96시간 처리군은 웰당 2,000~3,000개씩, 168시간 처리군은 웰당 800~1,000개씩 접종(seeding)하여 24시간 동안 배양한 뒤에 약물과 ADC를 0.0015~10.0 nM(3배 연속 희석) 농도로 처리하였다. 72/96/168시간 뒤에 살아있는 세포수를 SRB(Sulforhodamine B)염료를 사용하여 정량하였다.

[530]

[표 3]

[531]

Test samples	IC50 (nM)					
	MIA-PaCa2-DLK1 negative			MIA-PaCa2-DLK1 positive		
	72hr	96h	168hr	72hr	96h	168hr
MMAF-OMe	0.41	0.12	0.12	0.30	0.13	0.06
ADC1	>10	N.T	>10	0.54	N.T	0.09
ADC2	>10	>10	>10	0.57	0.26	0.09
ADC3	>10	>10	>10	0.19	0.11	0.03
ADC4	N.T	>10	N.T	N.T	0.05	N.T
ADC5	>10	N.T	>10	0.22	0.01	0.003
ADC6	N.T	N.T	>10	N.T	N.T	0.21
ADC7	>10	N.T	>10	0.008	N.T	0.004
ADC8	N.T	>10	N.T	N.T	0.008	N.T

[532] *NT : not tested.

[533]

[534] DLK1이 과발현된 췌장암 세포주에서 대부분의 항체-약물 복합체는 DLK1이 발현되지 않는 췌장암 세포주에서보다 세포 독성이 매우 뛰어남을 확인하였다. DLK1이 과발현된 췌장암 세포주에서의 동일 시간 반응한 세포독성 시험에서 오리스타틴 계열의 항체-약물 복합체(ADC1, 2, 3, 4) 보다 피롤로벤조디아제핀 계열의 항체-약물복합체(ADC5, 7, 8)가 더 강한 세포독성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 피롤로벤조디아제핀 계열의 항체-약물 복합체는 오리스타틴 계열의 항체-약물 복합체에 비해 반응시간이 길어질수록 세포독성이 강하게 나타나는 것을 확인하였다.

[535]

[536] < 실험예 2 > *In vivo* 효능 평가

[537] 환자 유래 종양 동물모델에서 상기 < 실시예 3 >에서 제조한 ADC의 효능을 평가하였다. 구체적으로 환자유래 소세포폐암 마우스 모델(PDX 모델)은 Champions Oncology社로부터 제공받았다. 상기 PDX 모델 꼬리에 대조군으로서 PBS를, 실험군으로서 ADC4를 각 6 mpk/Q4D*4, 6 mpk/QW*4, 9 mpk/QW*4 3가지 조건으로 정맥 투여한 후 종양 크기를 측정하였다.

[538] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 6 mpk/Q4D*4 그룹과 9 mpk/QW*4 그룹에서는 실험동물 8개체 모두 종양이 사라졌고(CR, complete remission), 6 mpk/QW*4 그룹에서는 실험동물 8개체 중 6개체에서 종양이 사라진 것을 확인하였다.

[539]

산업상 이용가능성

[540] 본 발명의 DKL1을 타겟팅하는 신규한 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC) 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 ADC는 과증식 및/또는 혈관신생질환 예컨대, 암 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 약제의 생산에 이용될 수 있다.

[541]

[542]

[543]

[544]

청구범위

- [청구항 1] 일반식 I의 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:
 [일반식 I]
 $Ab - (X)_y$
 상기 식에서,
 Ab는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 DLK1 (delta-like 1 homolog (Drosophila))에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편이고,
 상기 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 2, 16, 30, 44, 58, 72 및 86으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR1,
 서열번호 4, 18, 32, 46, 60, 74 및 88로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR2,
 서열번호 6, 20, 34, 48, 62, 76 및 90으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및
 서열번호 9, 23, 37, 51, 65, 79, 93, 115 및 121로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR1,
 서열번호 11, 25, 39, 53, 67, 81 및 95로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR2, 및
 서열번호 13, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 116 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고,
 상기 X는 독립적으로 하나 이상의 활성제 및 링커를 포함하는 화학적 잔기이며, 및
 상기 링커는 항체와 활성제를 연결하고,
 상기 y는 1 내지 20의 정수이다.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은
 서열번호 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 및 119로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR1,
 서열번호 3, 17, 31, 45, 59, 73 및 87로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR2,
 서열번호 5, 19, 33, 47, 61, 75 및 89로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR3,
 서열번호 7, 21, 35, 49, 63, 77 및 91로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR4,
 서열번호 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 117 및 120로 구성된 군에서 선택된 하나

이상의 경쇄 FR1,

서열번호 10, 24, 38, 52, 66, 80, 94 및 122로 구성된 군에서 선택된 하나

이상의 경쇄 FR2,

서열번호 12, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 118 및 123으로 구성된 군에서 선택된

하나 이상의 경쇄 FR3, 또는

서열번호 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나

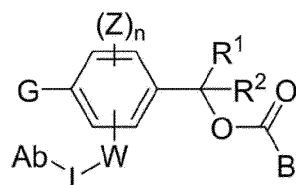
이상의 경쇄 FR4를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

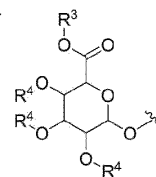
[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 링커는 일반식 II의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:

[일반식 II]



상기 식에서,

G는 글루쿠론산 모이어티(glucuronic acid moiety) 또는



이고;

상기 R³은 수소 또는 카복실 보호기이고, 상기 각각의 R⁴는 독립적으로 수소 또는 하이드록실 보호기이며;

Ab는 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편이고;

B는 활성제이며;

R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₈ 알킬 또는 C₃-C₈

사이클로알킬이고;

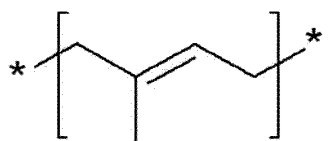
W는 $-C(O)-$, $-C(O)NR'$, $-C(O)O-$, $-SO_2NR'$, $-P(O)R''NR'$, $-SONR'$ 또는 $-PO_2NR'$ 이고, 상기 C, S 또는 P는 직접적으로 페닐링(phenyl ring)에 결합하며, 상기 NR' 은 L에 결합하고, 상기 R' 및 R'' 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 사이클로알킬, C_1-C_8 알콕시, C_1-C_8 알킬티오, 모노- 또는 다이- C_1-C_8 알킬아미노, C_3-C_{20} 헤테로아릴 또는 C_6-C_{20} 아릴이며; Z는 독립적으로 C_1-C_8 알킬, 할로젠, 시아노 또는 나이트로이고; n은 0 내지 3의 정수이며;

L은, 하기 중 어느 하나이다:

A) C_1-C_{50} 알킬렌 또는 1-50 원자 헤테로알킬렌이며, 하기 중 하나 이상을 만족한다:

- (i) L은 하나 이상의 불포화 결합을 포함하고;
 - (ii) L 내의 2 개의 원자가 치환체와 같은 2가 치환체로 치환되고; 이는 헤테로아릴렌(heteroarylene)을 완성시키며;
 - (iii) L은 1 내지 50 원자 헤테로알킬렌이고;
 - (iv) 상기 알킬렌은 하나 이상의 C_{1-20} 알킬로 치환된다;
- B) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 하기 일반식 III의 이소프레닐 유도체 유닛을 하나 이상 포함한다;

[일반식 III]



[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 L은 질소 함유 1-50 원자 헤테로 알킬렌이고, 상기 링커는 친수성 아미노산의 2 이상의 원자를 포함하고, 상기 질소는 아르기닌, 아스파테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 오르니틴, 프롤린, 세린 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산의 카르보닐과 펩타이드 결합을 형성하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

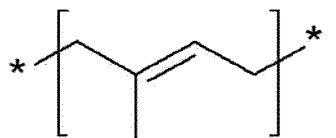
[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 W는 $-C(O)NR'$ 이고, 상기 W의 질소는 아르기닌, 아스파테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 오르니틴, 프롤린, 세린 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산의 질소 원자인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 8] 제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 아미노산은 링커의 옥심(oxime)을 링커의 폴리에틸렌 글리콜 유닛에 공유 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

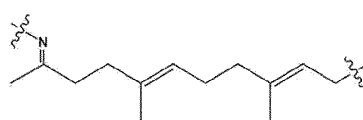
- [청구항 9] 제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 친수성 아미노산은 수용액에서 중성 pH에서 전하를 나타내는 모이어티(moiety)를 갖는 측쇄를 포함하는 아스파테이트, 글루타메이트, 오르니틴, 라이신 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 10] 제5항에 있어서, 상기 링커는 펩타이드를 포함하고, 상기 펩타이드는 2 내지 20개의 아미노산을 포함하며, 알라닌, 아스파테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 글리신, 라이신, 오르니틴, 프롤린, 세린 및 트레오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산을 하나 이상 포함하고, 수용액에서 중성 pH에서 전하를 나타내는 모이어티(moiety)를 갖는 측쇄를 포함하는 아스파테이트, 글루타메이트, 오르니틴, 라이신 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산을 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, W는 $-C(O)NR'$ 이고, 상기 W의 질소는 상기 펩타이드의 N-말단 아미노산의 질소 원자인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 펩타이드는 링커의 옥심(oxime)을 링커의 폴리에틸렌 글리콜 유닛에 공유 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 13] 제5항에 있어서, 상기 L은 티오에테르 결합에 의해 항체와 공유결합하고, 상기 티오에테르 결합은 항체의 시스테인의 황원자를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 항체는 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 항체의 C-말단에 아미노산 모티프를 포함하고, 상기 티오에테르 결합은 상기 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 아미노산 모티프는 CYXX 서열이고, C가 시스테인이고, Y가 알라닌, 이소류이신, 류신, 메티오닌 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 지방족 아미노산이고, X가 글루타민, 글루타메이트, 세린, 시스테인, 메티오닌, 알라닌 및 류신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이며; 및 상기 티오에테르 결합은 상기 아미노산 모티프의 시스테인의 황원자를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 아미노산 모티프는 CVIM 또는 CVLL 서열인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 17] 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 모티프에 선행하는 1 내지 10 개의 아미노산 중 하나 이상이 글리신, 프롤린, 아스파르트산, 아르기닌 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 아미노산 모티프에 선행하는 1 내지 10 개의 아미노산은 각각 글리신인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 19] 제5항에 있어서, 상기 L은 C-말단에 아미노산 서열 GGGGGGGCVIM을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 20] 제5항에 있어서, 상기 L은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 하기 일반식 III의 이소프레닐 유도체 유닛을 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:

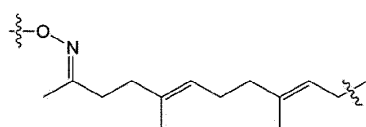
[일반식 III]



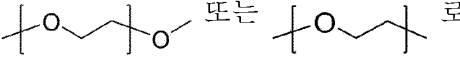
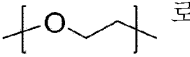
- [청구항 21] 제5항에 있어서, 상기 L은 옥심을 포함하는 3 내지 50 헥테로알킬렌이고, 상기 옥심의 산소 원자는 W와 연결된 L의 측면에 있고, 옥심의 탄소 원자는 Ab에 연결된 L의 측면에 있으며; 또는
상기 옥심의 탄소 원자는 W에 연결된 L의 측면에 있고, 옥심의 산소 원자는 Ab에 연결된 L의 측면에 있는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 22] 제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 L은 옥심을 포함하고, 하나 이상의 이소 프레닐 유닛은 옥심을 Ab에 공유 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 23] 제5항에 있어서, 상기 L은



또는



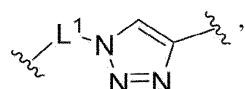
을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체

- 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 24] 제5항에 있어서,
 상기 L은 일반식 VIII 또는 일반식 IX로 표시되는 연결 유닛을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:
 [일반식 VIII]
 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$
 [일반식 IX]
 $-(CH_2CH_2X)_w-$
 상기 V는 단일결합, -O-, -S-, -NR²¹-, -C(O)NR²²-, -NR²³C(O)-, -NR²⁴SO₂- 또는 -SO₂NR²⁵-이고;
 X는 -O-, C₁-C₈ 알킬렌 또는 -NR²¹-이고;
 R²¹ 내지 R²⁵는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알킬 C₆-C₂₀ 아릴 또는 C₁-C₆ 알킬 C₃-C₂₀ 헤테로아릴이고;
 r은 0 내지 10의 정수이고;
 p는 0 내지 10의 정수이고;
 q는 1 내지 20의 정수이고; 및
 w는 1 내지 20의 정수이다.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 L은  또는  로 표시되는 1 내지 20의 폴리에틸렌 글리콜 유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 L은 1 내지 12 -OCH₂CH₂- 유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 27] 제25항에 있어서, L은 옥심을 포함하고, 1 내지 20의 폴리에틸렌 글리콜 유닛은 옥심을 활성제에 공유 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 28] 제5항에 있어서, 상기 L은 1,3-양극성고리 첨가반응(1,3-dipolar cycloaddition reactions), 헤테로-디엘스 반응(hetero-diels reactions), 친핵성 치환 반응(nucleophilic substitution reactions), 논-알돌 형 카보닐 반응(non-aldol type carbonyl reactions), 탄소-탄소 다중 결합에 대한 첨가(additions to carbon-carbon multiple bonds), 산화 반응(oxidation reactions) 또는 클릭 반응(click reaction)에 의하여 형성된 결합 유닛을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 29] 제28항에 있어서, 상기 결합 유닛은 아세틸렌과 아지드와의 반응, 또는 알데히드 또는 케톤 그룹과 하이드라진 또는 하이드록실아민과의

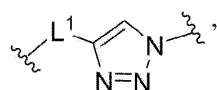
반응으로 형성되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 30] 제5항에 있어서, 상기 L은 하기 일반식 IV, V, VI 또는 VII로 표시되는 결합 유닛을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:

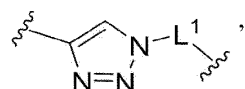
[일반식 IV]



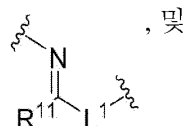
[일반식 V]



[일반식 VI]



[일반식 VII]



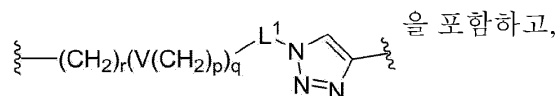
상기 식에서,

상기 L¹은 단일결합 또는 C₁-C₃₀의 알킬렌이고;

R¹¹은 수소 또는 C₁-C₁₀의 알킬이다.

[청구항 31] 제30항에 있어서, 상기 L¹은 단일결합, 또는 C₁₁ 또는 C₁₂의 알킬렌인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 32] 제30항에 있어서, 상기 L은 $\xi-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-L^1$ 또는 $\xi-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-L^1$ 을 포함하고,



상기 V는 단일 결합, -O-, -S-, -NR²¹-, -C(O)NR²²-, -NR²³C(O)-, -NR²⁴SO₂-, or -SO₂NR²⁵-;

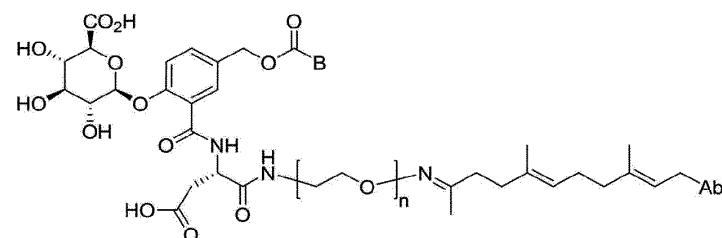
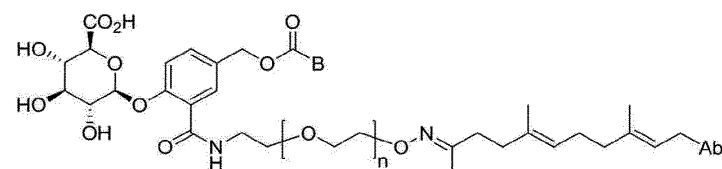
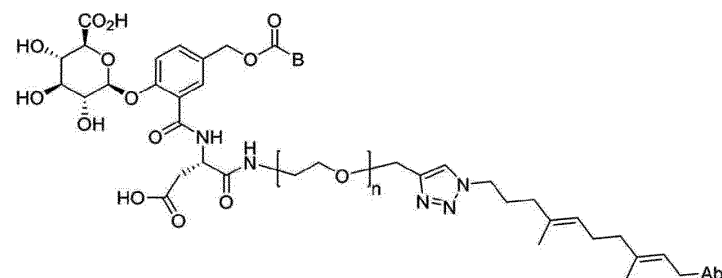
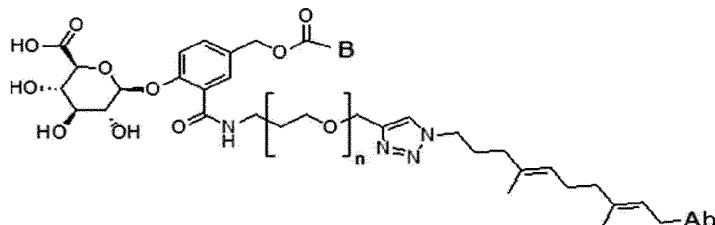
R²¹ 내지 R²⁵는 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬 C₆₋₂₀ 아릴, 또는 C₁₋₆ 알킬 C₃₋₂₀ 헤테로아릴;

r은 1 내지 10의 정수이고;

p는 0 내지 10의 정수이며;

q는 1 내지 20의 정수이고; 및

[청구항 33] 제32항에 있어서, 상기 L은



밋

으로 이루어진

상기 Ab는 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편이고; B는 활성제이며, n은 0 내지 20의 정수인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

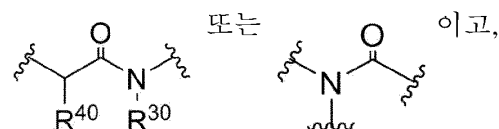
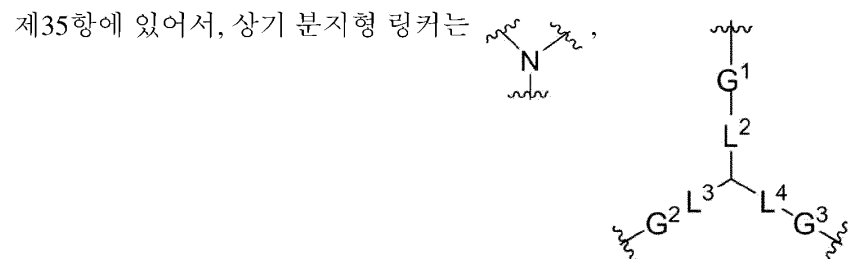
[청구항 34] 제5항에 있어서, 이소프레노이드 트랜스퍼라제는 파네실 단백질 트랜스퍼라아제(FTase) 또는 게라닐게라닐 트랜스퍼라제(GGTase)인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 35] 제5항에 있어서, L은 Ab에 공유 결합된 하나 이상의 분지형 링커를 포함하고,

i) 각각의 분지형 링커는 주링커(PL)에 의해 Ab에 공유 결합된 분지 유닛(BR)을 포함하고;

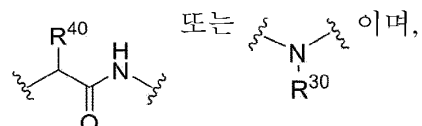
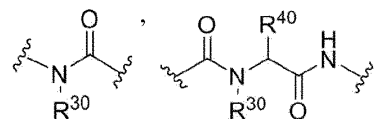
- ii) 각각의 분지형 링커는 제 1 활성제를 분지 유닛에 결합시키고, 제 2 링커 (SL) 및 절단기(CG)를 포함하는 제 1 분지(B1)를 포함하며; 및
- iii) 각각의 분지형 링커는 a) 제 2 활성제가 제 2 링커 (SL) 및 절단기 (CG)에 의해 분지 유닛에 공유 결합된 제 2 분지 (B2); 또는 b) 폴리에틸렌 글리콜 moiety가 분지 유닛에 공유 결합되어 있는 제 2 분지를 포함하고, 상기 각각의 절단기는 항체 접합체부터 활성제를 방출하기 위해 가수분해되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 36]



상기 L², L³, L⁴는 각각 독립적으로 직접 결합 또는 -C_nH_{2n}-이며, 상기 n은 1 내지 30의 정수이고,

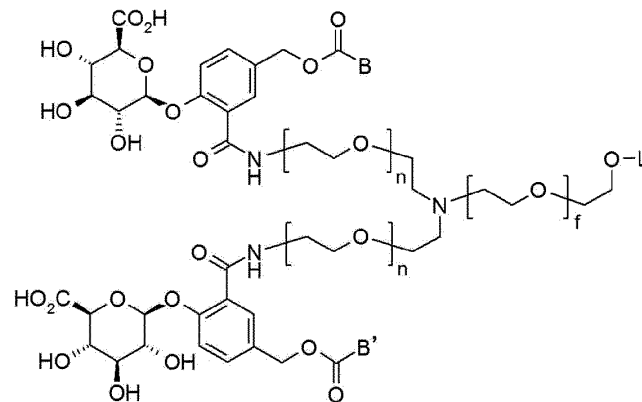
상기 G¹, G², G³은 독립적으로 직접 결합,



상기 R³⁰은 수소 또는 C₁₋₃₀ 알킬인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 37]

제36항에 있어서,



를 포함하고,

상기 B 및 B'는 동일하거나 상이할 수 있는 활성제를 나타내고;

n은 각각 독립적으로 0 내지 30의 정수를 나타내며;

f는 각각 독립적으로 0 내지 30의 정수를 나타내고; 및

L은 Ab에 대한 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 38] 제37항에 있어서, L은 옥심을 포함하고, 1 내지 20의 폴리에틸렌 글리콜 유닛은 옥심을 활성제에 공유 결합시키는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 39] 제35항에 있어서, 절단기는 표적 세포 내에서 절단될 수 있는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 40] 제5항에 있어서, L은 Ab에 공유 결합된 1 내지 6개의 분지형 링커를 포함하고; 및 상기 분지형 링커에 공유 결합된 2 내지 6개의 동일 또는 상이한 활성제를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 41] 제40항에 있어서, 각각의 활성제는 절단 가능한 결합에 의해 분지형 링커에 결합되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 42] 제40항에 있어서, 각각의 분지형 링커는 분지형 유닛을 포함하고, 각각의 활성제는 2차 링커를 통해 분지형 유닛에 결합하고, 상기 분지형 유닛 1차 링커에 의해 Ab에 결합되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 43] 제42항에 있어서, 상기 분지형 유닛은 질소 원자 또는 라이신 유닛인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 44] 제42항에 있어서, 상기 분지형 유닛은 아미드이고, 1차 링커 또는 2차 링커는 아미드의 카르보닐을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

- [청구항 45] 제5항에 있어서, 활성제는 화학요법제 또는 독신인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 46] 제5항에 있어서, 활성제는 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항균제, 항진균제, 항기생충제 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.
- [청구항 47] 제5항에 있어서, 활성제는 하기로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:
- (a) 엘로티닙(erlotinib), 보르테조미브(bortezomib), 풀베스트란트(fulvestrant), 수텐트(sutent), 레트로졸(letrozole), 이마티닙 메실레이트(imatinib mesylate), PTK787/ZK 222584, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 루코보린(leucovorin), 라파마이신(rapamycin), 라파티닙(lapatinib), 로나파르닙(lonafarnib), 소라페닙(sorafenib), 제피티닙(gefitinib), AG1478, AG1571, 티오테파(thiotepa), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 부숴판(busulfan), 임프로숴판(improsulfan), 피포숴판(piposulfan), 벤조도파(benzodopa), 카르보콘(carboquone), 메츄도파(meturedopa), 유레도파(uredopa), 에틸렌이민(ethylenimine), 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트리에틸렌포스포라미드(triethylenephosphoramidate), 트리에틸렌티오포스포라미드(triethylenethiophosphoramidate), 트리메틸롤로멜라민(trimethylolomelamine), 불라타신(bullatacin), 불라타시논(bullatacinone), 캄토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 브리오스타틴(bryostatin), 칼리스타틴(callystatin), CC-1065, 아도젤레신(adozelesin), 카르젤레신(carzelesin), 비젤레신(bizelesin), 크립토피신 1(cryptophycin 1), 크립토피신 8(cryptophycin 8), 돌라스타틴(dolastatin), 듀오카마이신(duocarmycin), KW-2189, CB1-TM1, 엘루테로빈(eleutherobin), 판크라티스타틴(pancratistatin), 사르코딕티인(sarcodictyin), 스폰지스타틴(spongistatin), 클로람부실(chlorambucil), 클로르나파진(chlornaphazine), 클로로포스파미드(chlorophosphamide), 에스트라무스틴(estrामustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 노베헬킨(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard), 카르무스틴(carmustine), 클로로코토신(chlorozotocin), 포테쿠스틴(fotemustine), 로무스틴(lomustine), 니무스틴(nimustine), 라니무스틴(ranimustine), 칼리키아미신(calicheamicin), 칼리키아미신 감마 1(calicheamicin gamma

1), 칼리키아미신 오메가 1(calicheamicin omega 1), 디네미신(dynemicin),
 디네미신 A(dynemicin A), 클로드로네이트(clodronate),
 에스페르아미신(esperamicin), 네오키르지노스타틴
 크로모포어(neocarzinostatin chromophore),
 아클라시노마이신(aclacinomysins), 악티노마이신(actinomycin),
 안트르마이신(antrmycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins),
 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabycin),
 카르니노마이신(carninomycin), 카르지노필린(carzinophilin),
 크로모마이신(chromomycins), 닥티노마이신(dactinomycin),
 다우노루비신(daunorubicin), 데토루부신(detorubucin),
 6-디아조-5-옥소-L-노르루신(6-diazo-5-oxo-L-norleucine),
 독소루비신(doxorubicin),
 모르폴리노-독소루비신(morpholino-doxorubicin),
 시아노모르폴리노-독소루비신(cyanomorpholino-doxorubicin),
 2-피롤리노-독소루비신(2-pyrrolino-doxorubucin), 리포소말
 독소루비신(liposomal doxorubicin), 데옥시독소루비신(deoxydoxorubicin),
 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin),
 마르셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신 C(mitomycin C),
 미코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin),
 올리보마이신(olivomycins), 펄로로마이신(peplomycin),
 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin),
 쿠엘라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin),
 스트렙토미그린(streptomigrin), 스트렙토조신(streptozocin),
 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin),
 조루비신(zorubicin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil),
 데노프테린(denopterin), 메토트렉세이트(methotrexate),
 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate),
 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine),
 티아미프린(thiamiprine), 티구아닌(thiguanine), 안시타빈(ancitabine),
 아자시티딘(azacitidine), 6-아자유리딘(6-azauridine),
 카르모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine),
 디데옥시유리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine),
 에노시타빈(enocitabine), 플록수리딘(floxuridine), 칼루스테론(calusterone),
 드로모스타놀론(dromostanolone), 프로피오네이트(propionate),
 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스테인(mepitiostane),
 테스트락톤(testolactone), 아미노글루테티미드(aminogluthetamide),
 미토테인(mitotane), 트릴로스테인(trilostane), 폴린산(folinic acid),
 아세글라톤(aceglatone), 알도포스파미드 글리코사이드(aldophosphamide)

glycoside), 아미노레불린산(aminolevulinic acid), 에닐우라실(eniluracil), 암사크린(amsacrine), 베스트라부실(bestrabucil), 비산트렌(bisantrene), 에다트랙세이트(edatraxate), 데포파민(defofamine), 데메콜신(demecolcine), 디아지콘(diaziqune), 엘포르니틴(elfornithine), 엘립티니움 아세테이트(elliptinium acetate), 에토글루시드(etoglucid), 갈리움 나이트레이트(gallium nitrate), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 렌티난(lentinan), 로니다이닌(lonidainine), 메이탄신(maytansine), 안사미토신(ansamitocins), 미토구아존(mitoguazone), 미토잔트론(mitoxantrone), 모피단몰(mopidanmol), 니트라에린(nitraerine), 펜토스타틴(pentostatin), 페나메트(phenamet), 피라루비신(pirarubicin), 로소잔트론(losoxantrone), 2-에틸하이드라지드(2-ethylhydrazide), 프로카르바진(procarbazine), 폴리사카라이드-k(polysaccharide-k), 라족세인(razoxane), 리조신(rhizoxin), 시조피란(sizofiran), 스피로게르마늄(spirogermanium), 테누아존산(tenuazonic acid), 트리아지콘(triaziqune), 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민(2,2',2"-trichlorotriethylamine), T-2 독신, 베라큐린 A(verracurin A), 로리딘 A(roridin A), 안구이딘(anguidine), 우레탄(urethane), 빈데신(vindesine), 다카르바진(dacarbazine), 만노무스틴(mannomustine), 미토브로니톨(mitobronitol), 미토락톨(mitolactol), 피포브로만(pipobroman), 가시토신(gacytosine), 아라비노사이드(arabinoside), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 티오테파(thiotepa), 파클리탁셀(paclitaxel), 파클리탁셀, 파클리탁셀의 알부민-엔지니어드 나노파티클(albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel), 도세탁셀, 클로람부실, 켄시타빈, 6-티오구아닌, 머캅토피린, 시스플라틴, 카보플라틴(carboplatin), 빈블라스틴(vinblastine), 플래티늄(platinum), 에토포사이드(etoposide), 이포스파미드(ifosfamide), 미톡산트론(mitoxantrone), 빈크리스틴, 비노렐빈(vinorelbine), 노반트론(novantrone), 테니포사이드(teniposide), 에다트렉세이트(edatrexate), 다우노마이신(daunomycin), 아미노프테린(aminopterin), 젤로다(xeloda), 이반드로네이트(ibandronate), CPT-11, 토포이소머라아제 저해제 RFS 2000, 디플루오로메틸오르니틴(difluoromethylornithine), 레티노산(retinoic acid), 카페시타빈(capecitabine), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 용매화물 또는 산;

(b) 모노카인(monokine), 림포카인(lympokine), 폴리펩타이드 호르몬(traditional polypeptide hormone), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 티록신(thyroxine), 릴렉신(relaxin), 프로릴렉신(prorelaxin), 당단백 호르몬(glycoprotein hormone), 여포자극호르몬(follicle stimulating

hormone), 갑상샘자극호르몬(thyroid stimulating hormone), 황체형성호르몬(luteinizing hormone), 간 성장인자 섬유모세포성장인자(hepatic growth factor fibroblast growth factor), 프롤락틴(prolactin), 태반성 락토젠(placental lactogen), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α), 종양괴사인자- β , 뮐러관 억제물질(mullerian-inhibiting substance), 마우스 고나도트로핀-연관 펩타이드(mouse gonadotropin-associated peptide), 인히빈(inhibin), 액티빈(activin), 혈관내피증식인자(vascular endothelial growth factor), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 골유도 인자(osteoinductive factor), 인터페론, 인터페론- α , 인터페론- β , 인터페론- γ , 콜로니자극인자(colony stimulating factor, CSF), 마크로파지-CSF, 과립구-마크로파지-CSF(granulocyte-macrophage-CSF), 과립구-CSF, 인터루킨(IL), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, 종양괴사인자(tumor necrosis factor), TNF- α , TNF- β , 폴리펩타이드 인자, LIF, 키트 리간드(kit ligand), 또는 이들의 배합물;

(c) 디프테리아 독신, 보툴리눔 독신, 테타누스 독신, 디센터리 독신, 콜레라 독신, 아마니틴, α -아마니틴, 피롤로벤조디아제핀, 피롤로벤조디아제핀 유도체, 테트로도톡신, 브레베톡신(brevetoxin), 시구아톡신(ciguatoxin), 리신(ricin), AM 독신, 오리스타틴(auristatin), 투블리신(tubulysin), 겔다나마이신(geldanamycin), 메이탄시노이드(maytansinoid), 칼리케아마이신(calicheamycin), 다우노마이신(daunomycin), 독소루비신(doxorubicin), 메토트렉세이트(methotrexate), 빈데신(vindesine), SG2285, 돌라스타틴(dolastatin), 돌라스타틴 유사체(dolastatin analog), 오리스타틴(auristatin), 크립토피신(cryptophycin), 캄토테신(camptothecin), 리족신(rhizoxin), 리족신 유도체(rhizoxin derivatives), CC-1065, CC-1065, 유사체 또는 유도체, 듀오카마이신(duocarmycin), 에네다인 항생제(enediyn antibiotic), 에스페라마이신(esperamicin), 에포틸론(epothilone), 독소이드(toxoid), 또는 이들의 배합물;

(d) 친화성 리간드(affinity ligand), 여기에서 친화성 리간드는 기질, 저해제, 활성화제, 신경전달물질, 방사성 동위원소, 또는 이들의 배합물;

(e) 방사능표지(radioactive label), ^{32}P , ^{35}S , 형광다이, 전자밀도 반응제(electron dense reagent), 효소, 비오틴, 스트렙타비딘(streptavidin), 디옥시제닌(dioxigenin), 햅텐(hapten), 면역성 단백질(immunogenic protein), 타겟에 컴플러멘터리한 서열을 갖는 핵산 분자(nucleic acid molecule with a sequence complementary to a target) 또는 이들의 배합물;

(f) 면역조절 화합물(immunomodulatory compound), 항-암제(anti-cancer

agent), 항-바이러스제(anti-viral agent), 항-박테리아제(anti-bacterial agent), 항-곰팡이제(anti-fungal agent), 및 항-기생충제(anti-parasitic agent), 또는 이들의 배합물;

(g) 타목시펜(tamoxifen), 칼록시펜(raloxifene), 드롤록시펜(droloxifene), 4-하이드록시타목시펜(4-hydroxytamoxifen), 트리옥시펜(trioxifene), 케옥시펜(keoxifene), LY117018, 오나프리스톤(onapristone) 또는 토레미펜(toremifene);

(h) 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 메제스톨 아세테이트(megestrol acetate), 엑스메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole)Ehms 아나스트로졸(anastrozole)

(i) 플루타미드(flutamide), nil루타미드(nilutamide), 비칼루타미드(bicalutamide), 리우프롤라이드(leuprolide), 고세렐린(goserelin), 또는 트록사시타빈(troxacitabine);

(j) 아로마타아제 저해제;

(k) 단백질 키나아제 저해제;

(l) 리피드 키나아제 저해제;

(m) 안티센스 올리고뉴클레오티드;

(n) 리보자임;

(o) 백신; 및

(p) 항-맥관형성제(anti-angiogenic agent).

[청구항 48]

제1항에 있어서,

상기 활성제는 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepine) 다이머; 상기 링커는 Ab를 피롤로벤조디아제핀 다이머의 N10 또는 N'10 위치에 연결하는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 49]

제48항에 있어서,

상기 활성제는 피롤로벤조디아제핀 다이머;

상기 피롤로벤조디아제핀 다이머는 N10 위치에서 X 또는 N'10 위치에서 X'로 치환되고, 여기서 X 또는 X'는 피롤로벤조디아제핀 다이머를 링커에 연결;

X 및 X'는 각각 독립적으로 -C(O)O^{*}-, -S(O)O^{*}-, -C(O)-^{*}-, -C(O)NR^X-^{*}-, -S(O)₂NR^X-^{*}-, -(P(O)R')NR^X-^{*}-, -S(O)NR^X-^{*}-, 또는 PO₂NR^X-^{*};

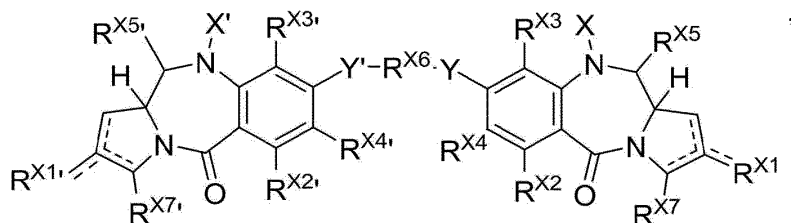
R^X는 H, C₁₋₈ 알킬, C₃₋₈ 사이클로알킬, C₃₋₂₀ 헤테로아릴, 또는 C₅₋₂₀ 아릴;

R^{X'}는 OH, N₃, CN, SH, C₁₋₈ 알킬, C₃₋₈ 사이클로알킬, C₁₋₈ 알콕시, C₁₋₈ 알킬 티오, C₃₋₂₀ 헤테로아릴, C₅₋₂₀ 아릴, 또는 아미노; 및

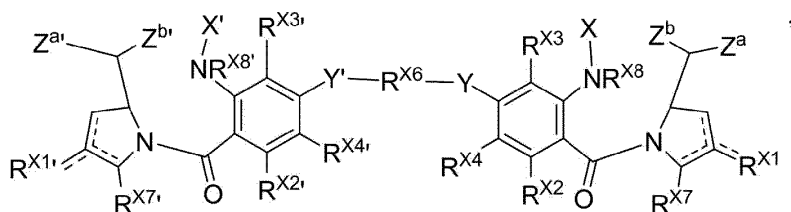
*는 피롤로벤조디아제핀 다이머와 링커 사이의 결합 지점인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 50] 제49항에 있어서, 상기 피롤로벤조디아제핀 다이머 하기 일반식 X 또는 일반식 XI로 기재되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:

[일반식 X]



[일반식 XI]



상기 식에서,

상기 점선은 C1과 C2 사이, C2와 C3 사이, C'1과 C'2 사이, 또는 C'2과 C'3 사이의 이중 결합의 선택적 존재를 나타내며;

R^{X1} 및 $R^{X1'}$ 는 독립적으로 H, OH, =O, =CH₂, CN, R^m, OR^m, =CH-R^{m'}=C(R^m)₂, O-SO₂-R^m, CO₂R^m, COR^m, 할로 및 디할로로부터 선택되고;

R^m는 R^m, CO₂R^m, COR^m, CHO, CO₂H, 및 할로로부터 선택되며,

각각의 R^m는 독립적으로 C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, C₅₋₂₀ 아릴, C₅₋₂₀ 헤테로아릴, C₃₋₆ 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{X2} , $R^{X2'}$, R^{X3} , $R^{X3'}$, R^{X5} , 및 $R^{X5'}$ 는 독립적으로 H, R^m, OH, OR^m, SH, SR^m, NH₂, NHR^m, NR^m, NO₂, Me₃Sn 및 할로로부터 선택되며;

R^{X4} 및 $R^{X4'}$ 는 독립적으로 H, R^m, OH, OR^m, SH, SR^m, NH₂, NHR^m, NR^m, NO₂, Me₃Sn, 할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆ 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, C₅₋₁₂ 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -CN, -NCO, -ORⁿ, -OC(O)Rⁿ, -OC(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)Rⁿ, -OS(O)₂Rⁿ, -SRⁿ, -S(O)Rⁿ, -S(O)₂Rⁿ, -S(O)NRⁿR^{n'}, -S(O)₂NRⁿR^{n'}, -OS(O)NRⁿR^{n'}, -OS(O)₂NRⁿR^{n'}, -NRⁿR^{n'}, -NRⁿC(O)R^{n'}, -NRⁿC(O)OR^{n'}, -NRⁿC(O)NR^{n'}R^{n'}, -NRⁿS(O)R^{n'}, -NRⁿS(O)₂R^{n'}, -NRⁿS(O)NR^{n'}R^{n'}, -NRⁿS(O)₂NR^{n'}R^{n'}, -C(O)Rⁿ, -C(O)ORⁿ 및 -C(O)NRⁿR^{n'}로부터 선택되고;

R^x 및 R^{x'}는 독립적으로 H, OH, N₃, CN, NO₂, SH, NH₂, ONH₂, NHNH₂,

할로, C₁₋₈ 알킬, C₃₋₈ 시클로알킬, C₁₋₈ 알콕시, C₁₋₈ 알킬티오, C₃₋₂₀

헤테로아릴, C₅₋₂₀ 아릴 또는 모노- 또는 디(di)-C₁₋₈ 알킬아미노로부터
선택되며;

Y 및 Y'는 독립적으로 O, S, 및 N(H)으로부터 선택되고;

R^{X6}는 독립적으로 C₃₋₁₂ 알킬렌, C₃₋₁₂ 알케닐렌, 또는 C₃₋₁₂

헤테로알킬렌으로부터 선택되며;

R^{X7} 및 R^{X7'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆

시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 7-원

헤테로아릴, -OR^r, -OC(O)R^r, -OC(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)R^r, -OS(O)₂R^r, -SR^r,

-S(O)R^r, -S(O)₂R^r, -S(O)NR^rR^{r'}, -S(O)₂NR^rR^{r'}, -OS(O)NR^rR^{r'}, -OS(O)₂NR^rR^{r'},

-NR^rR^{r'}, -NR^rC(O)R^s, -NR^rC(O)OR^s, -NR^rC(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)R^s, -NR^rS(O)₂

R^s, -NR^rS(O)NR^sR^{s'}, -NR^rS(O)₂NR^sR^{s'}, -C(O)R^r, -C(O)OR^s 또는 -C(O)NR^rR^{r'}

으로부터 선택되고;

각각의 R^r, R^{r'}, R^s, 및 R^{s'}은 독립적으로 H, C₁₋₇ 알킬, C₂₋₇ 알케닐, C₂₋₇ 알키닐,

C₃₋₁₃ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 및 5 내지 7-원

헤테로아릴로부터 선택되며;

각 R^{X8} 및 R^{X8'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₆

헤테로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 5 내지 7-원

헤테로아릴, -S(O)R^m, -S(O)₂R^m, -S(O)NR^mR^{m'}, -S(O)₂NR^mR^{m'}, -NR^mR^{m'}, -NR^m

C(O)R^m, -NR^mC(O)ORⁿ, -NR^mC(O)NRⁿR^{n'}, -NR^mS(O)Rⁿ, -NR^mS(O)₂Rⁿ, -NR^m

S(O)NRⁿR^{n'}, -NR^mS(O)₂NRⁿR^{n'}, -C(O)R^m, -C(O)OR^m 및 -C(O)NR^mR^{m'}로부터

선택되고;

Z^a는 OR^{X12a}, NR^{X12a}R^{X12a}, 또는 SR^{X12a}로부터 선택되며;

Z^b는 OR^{X13a}, NR^{X13a}R^{X13a}, 또는 SR^{X13a}로부터 선택되고;

Z^{a'}는 OR^{X12a}, NR^{X12a}R^{X12a}, 또는 SR^{X12a}로부터 선택되며;

Z^{b'}는 OR^{X13a}, NR^{X13a}R^{X13a} 또는 SR^{X13a}로부터 선택되고;

각 R^{X12a}, R^{X12a'}, R^{X13a} 및 R^{X13a'}는 독립적으로 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆

알키닐, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 to 7-원 헤테로시클로알킬, C₅₋₁₀ 아릴, 5 내지

7-원 헤테아릴, -C(O)R^{X15a}, -C(O)OR^{X15a} 및 -C(O)NR^{X15a}R^{X15a'}로부터

선택되고; 및

각각의 R^{X15a} 및 R^{X15a'}는 독립적으로 C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₂ 알케닐, C₂₋₁₂ 알키닐, C₅₋₂₀

아릴, C₅₋₂₀ 헤테로아릴, C₃₋₆ 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3

내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터

선택되며;

상기 R^{X13a} 및 R^{X14a}는 이들이 부착된 원자와 함께 임의적으로 결합하여 3

내지 7-원 헤테로 사이클 릴, 3 내지 7-원 헤테로 사이클로 알킬, 또는 3

내지 7-원 헤테로아릴을 형성하고, 및 R^{X13a'} 및 R^{X14a'}이들이 부착된 원자와

함께 임의적으로 결합하여 3 내지 7-원 헤테로 사이클릴, 3 내지 7-원

헤테로사이클로알킬, 또는 3 내지 7-원 헤테로아릴을 형성하며; 및
 상기 각각의 R^n , $R^{n'}$, R^o , $R^{o'}$, R^p , 및 $R^{p'}$ 는 독립적으로 H, C_{1-7} 알킬, C_{2-7} 알케닐, C_{2-7} 알키닐, C_{3-13} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, C_{5-10} 아릴, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택됨.

[청구항 51] 제50항에 있어서, 상기 R^m 는 독립적으로 C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, C_{5-20} 아릴, C_{5-20} 헤테로아릴, C_{3-6} 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고,
 상기 R^m 는 추가적으로 C_{1-12} 알킬, C_{2-12} 알케닐, C_{2-12} 알키닐, C_{5-20} 아릴, C_{5-20} 헤테로아릴, C_{3-6} 사이클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로사이클릴, 3 내지 7-원 헤테로사이클로알킬, 또는 5 내지 7-원 헤테로아릴로 치환되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 52] 제50항에 있어서, 상기 R^{x4} 및 $R^{x4'}$ 는 독립적으로 H, R^m , OH, OR^m , SH, SR^m , NH_2 , NHR^m , $NR^mR^{m'}$, NO_2 , Me_3Sn , 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-12} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, -CN, -NCO, - OR^n , - $OC(O)R^n$, - $OC(O)NR^nR^{n'}$, - $OS(O)R^n$, - $OS(O)_2R^n$, - SR^n , - $S(O)R^n$, - $S(O)_2R^n$, - $S(O)NR^nR^{n'}$, - $S(O)_2NR^nR^{n'}$, - $OS(O)NR^nR^{n'}$, - $OS(O)_2NR^nR^{n'}$, - $NR^nR^{n'}$, - $NR^nC(O)R^o$, - $NR^nC(O)OR^o$, - $NR^nC(O)NR^oR^{o'}$, - $NR^nS(O)R^o$, - $NR^nS(O)_2R^o$, - $NR^nS(O)NR^oR^{o'}$, - $NR^nS(O)_2NR^oR^{o'}$, - $C(O)R^n$, - $C(O)OR^n$ 및 - $C(O)NR^nR^{n'}$ 로부터 선택되고,
 상기 R^{x4} 또는 $R^{x4'}$ 는 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-12} 아릴 또는 5 내지 7-원 헤테로아릴이고, 추가적으로 하나 이상의 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, - OR^p , - $OC(O)R^p$, - $OC(O)NR^pR^{p'}$, - $OS(O)R^p$, - $OS(O)_2R^p$, - SR^p , - $S(O)R^p$, - $S(O)_2R^p$, - $S(O)NR^pR^{p'}$, - $S(O)_2NR^pR^{p'}$, - $OS(O)NR^pR^{p'}$, - $OS(O)_2NR^pR^{p'}$, - $NR^pR^{p'}$, - $NR^pC(O)R^q$, - $NR^pC(O)OR^q$, - $NR^pC(O)NR^qR^{q'}$, - $NR^pS(O)R^q$, - $NR^pS(O)_2R^q$, - $NR^pS(O)NR^qR^{q'}$, - $NR^pS(O)_2NR^qR^{q'}$, - $C(O)R^p$, - $C(O)OR^p$ 또는 - $C(O)NR^pR^{p'}$ 로 치환되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

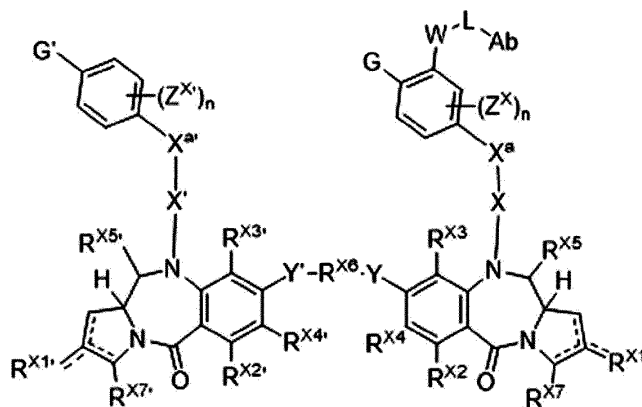
[청구항 53] 제50항에 있어서, 상기 R^{x7} 및 $R^{x7'}$ 는 독립적으로 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, - OR^r , - $OC(O)R^r$, - $OC(O)NR^rR^{r'}$, - $OS(O)R^r$, - $OS(O)_2R^r$, - SR^r , - $S(O)R^r$, - $S(O)_2R^r$, - $S(O)NR^rR^{r'}$, - $S(O)_2NR^rR^{r'}$, - $OS(O)NR^rR^{r'}$, - $OS(O)_2NR^rR^{r'}$, - $NR^rR^{r'}$, - $NR^rC(O)R^s$, - $NR^rC(O)OR^s$, - $NR^rC(O)NR^sR^{s'}$, - $NR^rS(O)R^s$, - $NR^rS(O)_2R^s$, - $NR^rS(O)NR^sR^{s'}$, - $NR^rS(O)_2NR^sR^{s'}$, - $C(O)R^r$, - $C(O)OR^r$ 또는 - $C(O)NR^rR^{r'}$ 로부터 선택되고,

상기 R^{X7} 또는 $R^{X7'}$ 는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴이고, 추가적으로 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{6-10} 아릴, 5 내지 7-원 헤테로아릴, $-OR^t$, $-OC(O)R^t$, $-OC(O)NR^tR^t$, $-OS(O)R^t$, $-OS(O)_2R^t$, $-SR^t$, $-S(O)R^t$, $-S(O)_2R^t$, $-S(O)NR^tR^t$, $-S(O)_2NR^tR^t$, $-OS(O)NR^tR^t$, $-OS(O)_2NR^tR^t$, $-NR^tR^t$, $-NR^tC(O)R^u$, $-NR^tC(O)OR^u$, $-NR^tC(O)NR^uR^u$, $-NR^tS(O)R^u$, $-NR^tS(O)_2R^u$, $-NR^tS(O)NR^uR^u$, $-NR^tS(O)_2NR^uR^u$, $-C(O)R^t$, $-C(O)OR^t$ 또는 $-C(O)NR^tR^t$ 로 치환되며, 상기 R^t , R^t , R^s , R^s , R^t , R^t , R^u 및 R^u 는 독립적으로 H, C_{1-7} 알킬, C_{2-7} 알케닐, C_{2-7} 알키닐, C_{3-13} 시클로알킬, 3 내지 7-원 헤테로시클로알킬, C_{5-10} 아릴, 및 5 내지 7-원 헤테로아릴로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

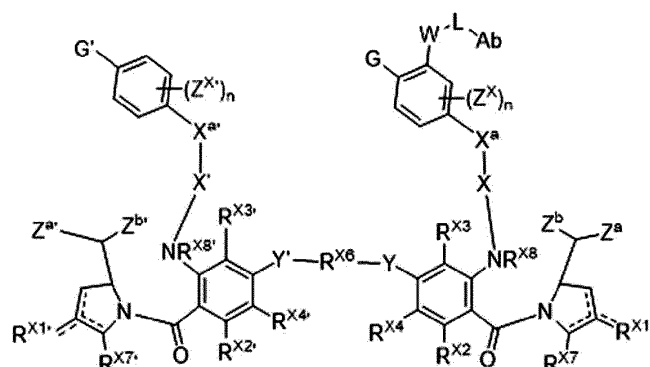
[청구항 54] 제50항에 있어서, R^{X6} 는 C_{3-12} 알킬렌, C_{3-12} 알케닐렌 또는 C_{3-12} 헤테로알킬렌이고, 상기 R^{X6} 은 $-NH_2$, $-NHR^m$, $-NHC(O)R^m$, $-NHC(O)CH_2$, $-[OCH_2CH_2]_n-R^{XX}$, 또는 $-[CH_2CH_2O]_n-R^{XX}$ 치환되고; 상기 R^{XX} 는 H, OH, N_3 , CN, NO_2 , SH, NH_2 , ONH_2 , $NHNH_2$, 할로, C_{1-8} 알킬, C_{3-8} 시클로알킬, C_{1-8} 알콕시, C_{1-8} 알킬 티오, C_{3-20} 헤테로아릴, C_{5-20} 아릴 또는 모노- 또는 디- C_{1-8} 알킬아미노; 및 n은 1 내지 6의 정수인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 55] 제50항에 있어서, 상기 활성제는 일반식 XII 또는 일반식 XIII로 기재되는 피롤로벤조디아제핀 다이머인 것을 특징으로 하는 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물:

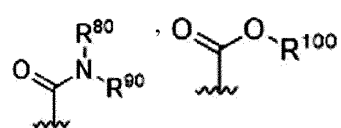
[일반식 XII]



[일반식 XIII]



상기 X^a 및 X^a 는 독립적으로 결합 또는 C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되고;
 Z^a 및 Z^b 는 독립적으로 수소, C_{1-8} 알킬, 할로젠, 시아노, 니트로,
 또는 $-(CH_2)_m-OCH_3$ 로부터 선택되며;

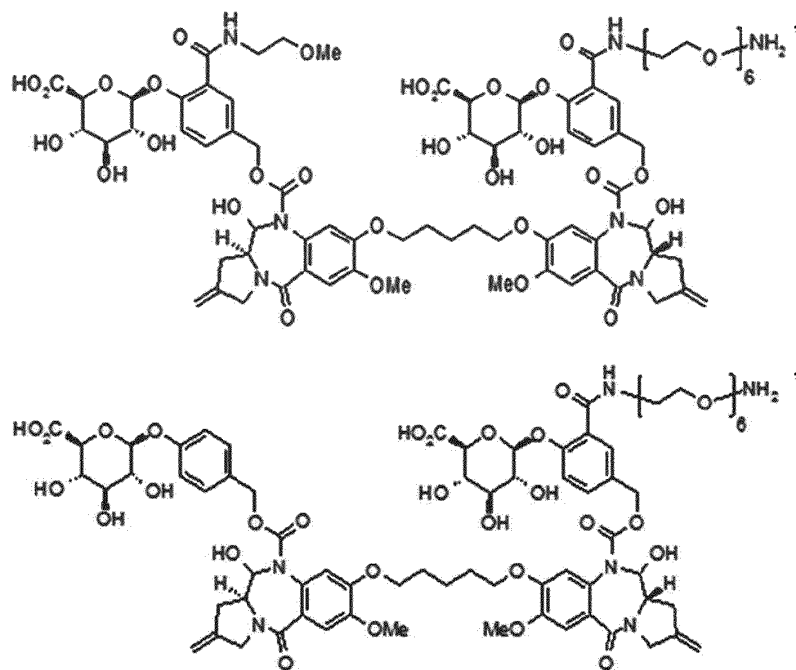


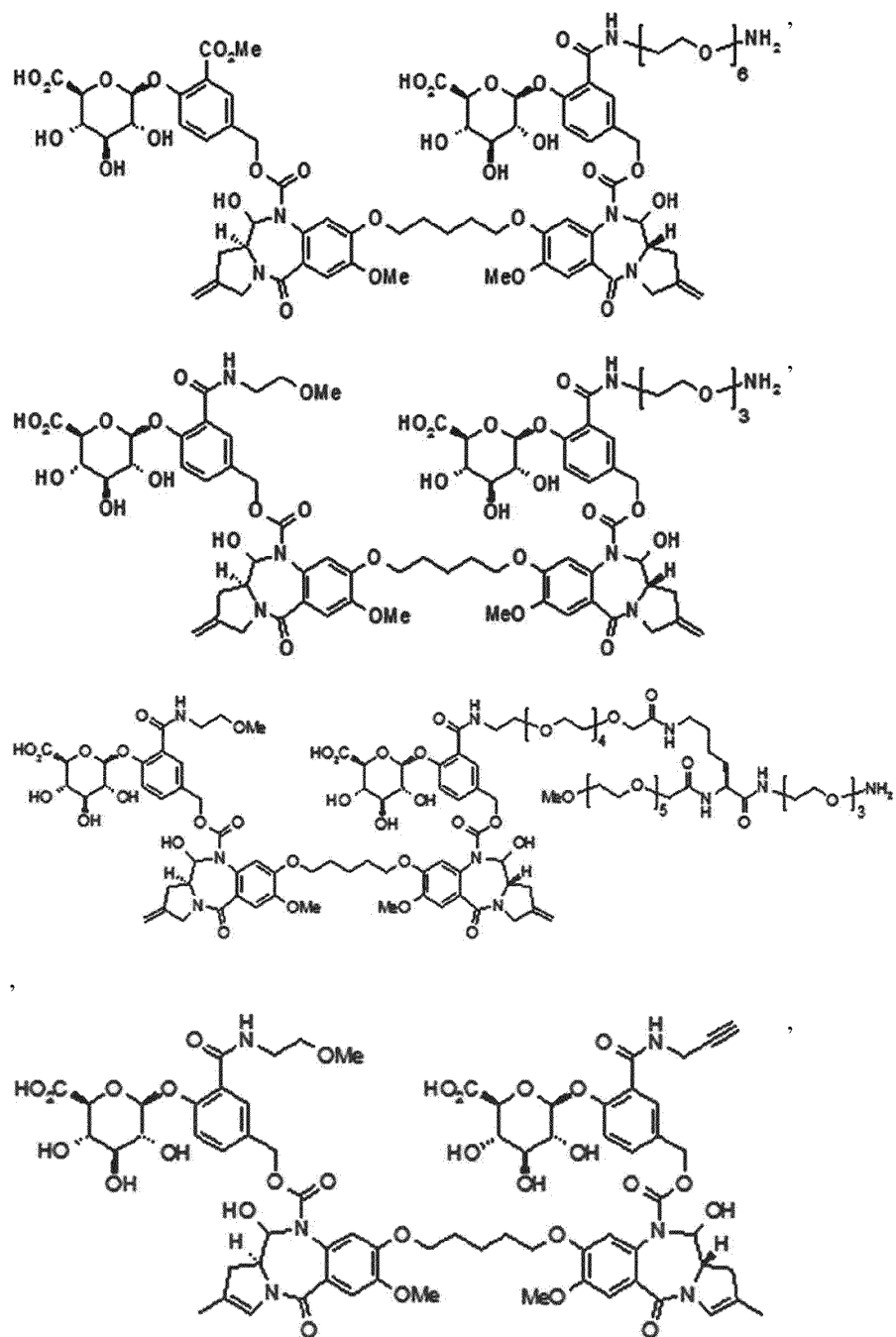
각각의 R^{80} , R^{90} 및 R^{100} 는 수소, C_{1-8} 알킬, C_{2-6} 알케닐, 및 C_{1-6} 알콕시로부터
 선택되고; 및

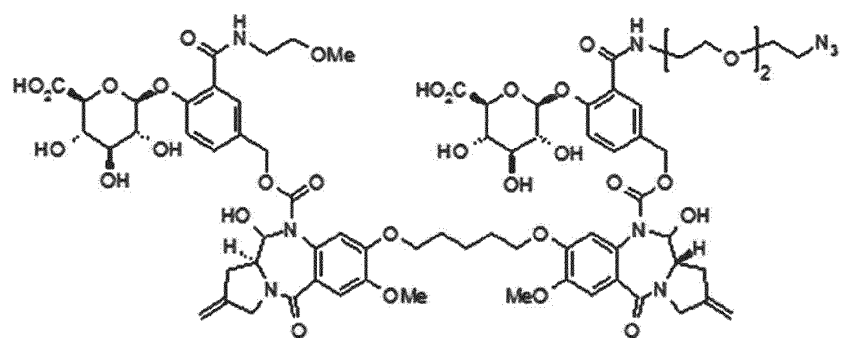
m 은 0 내지 12의 정수이다.

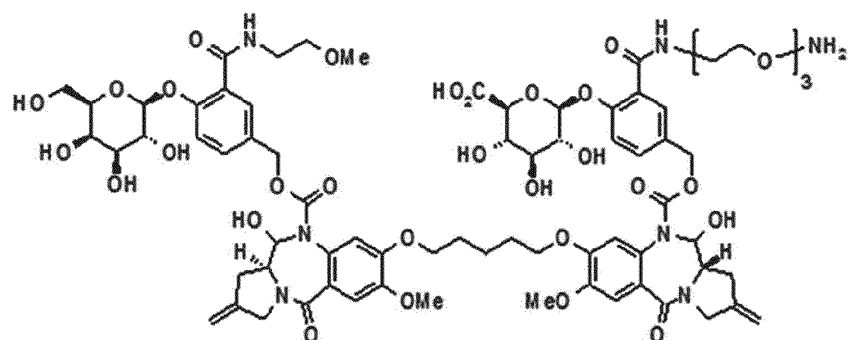
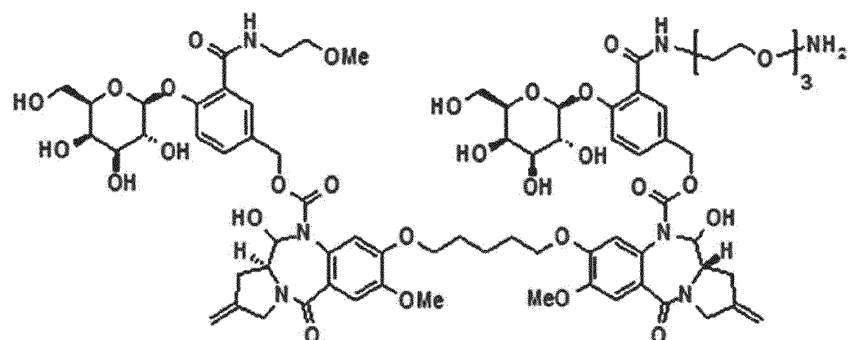
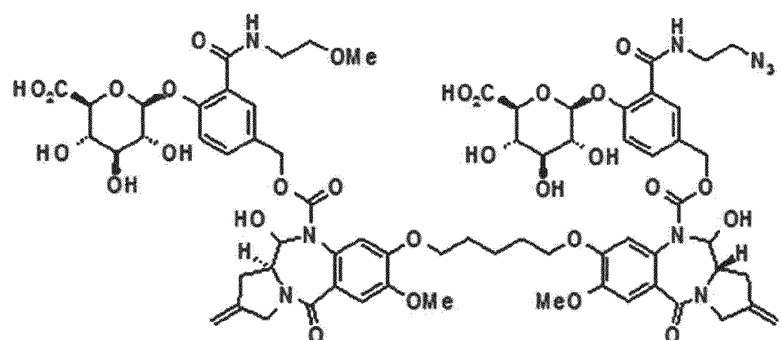
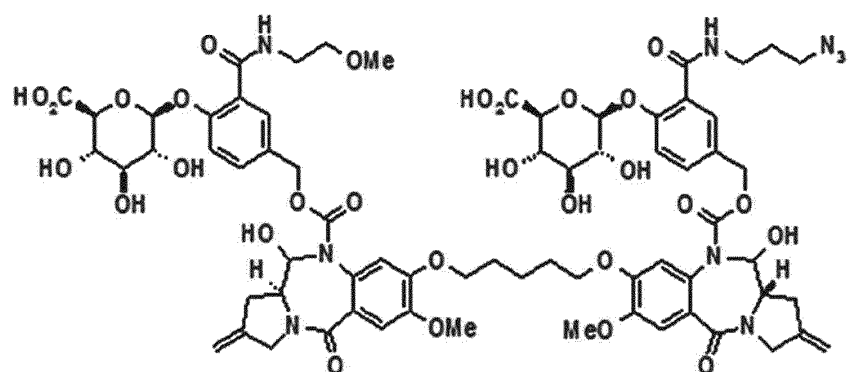
[청구항 56]

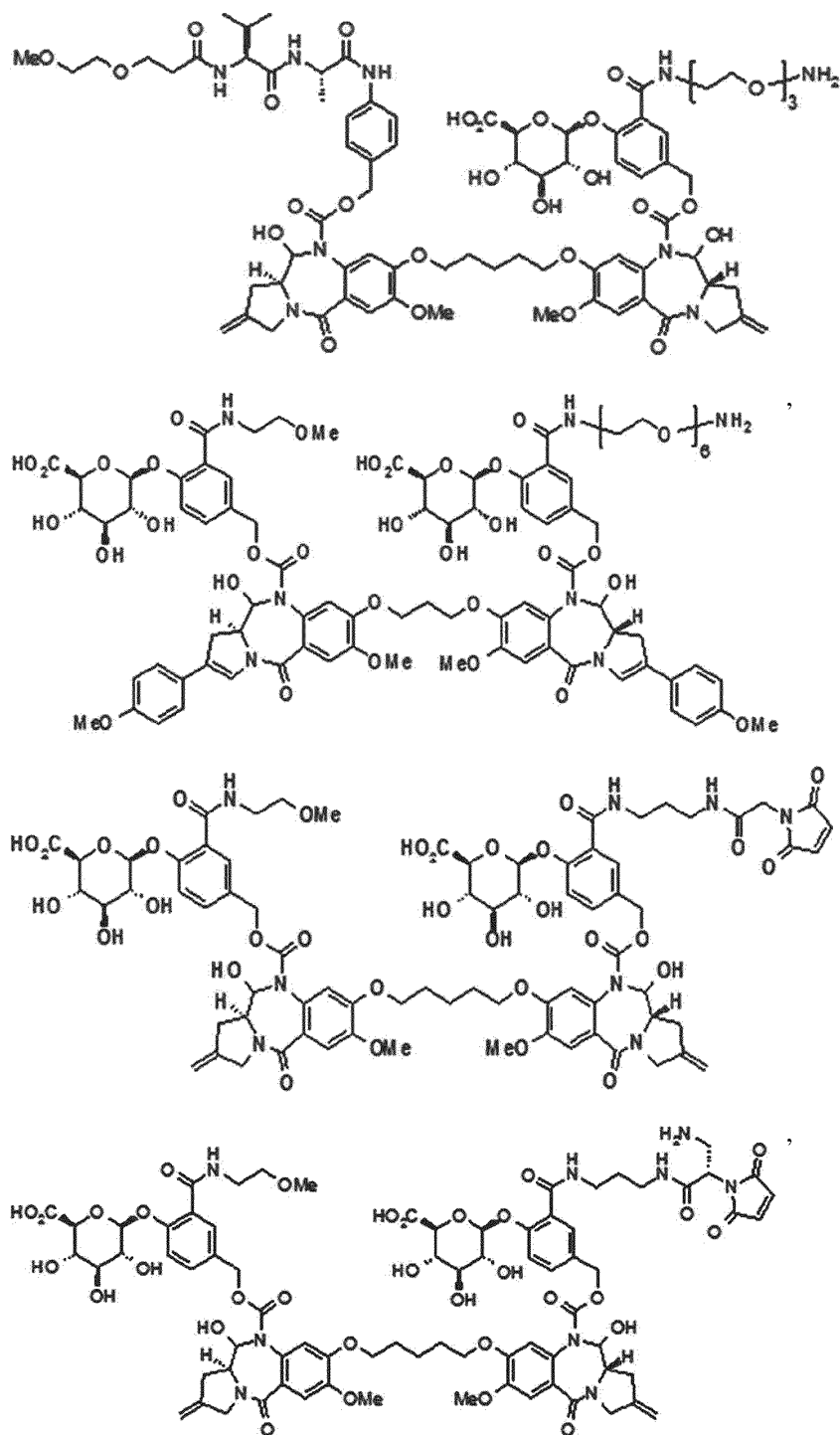
제1항에 있어서, 상기 활성제는

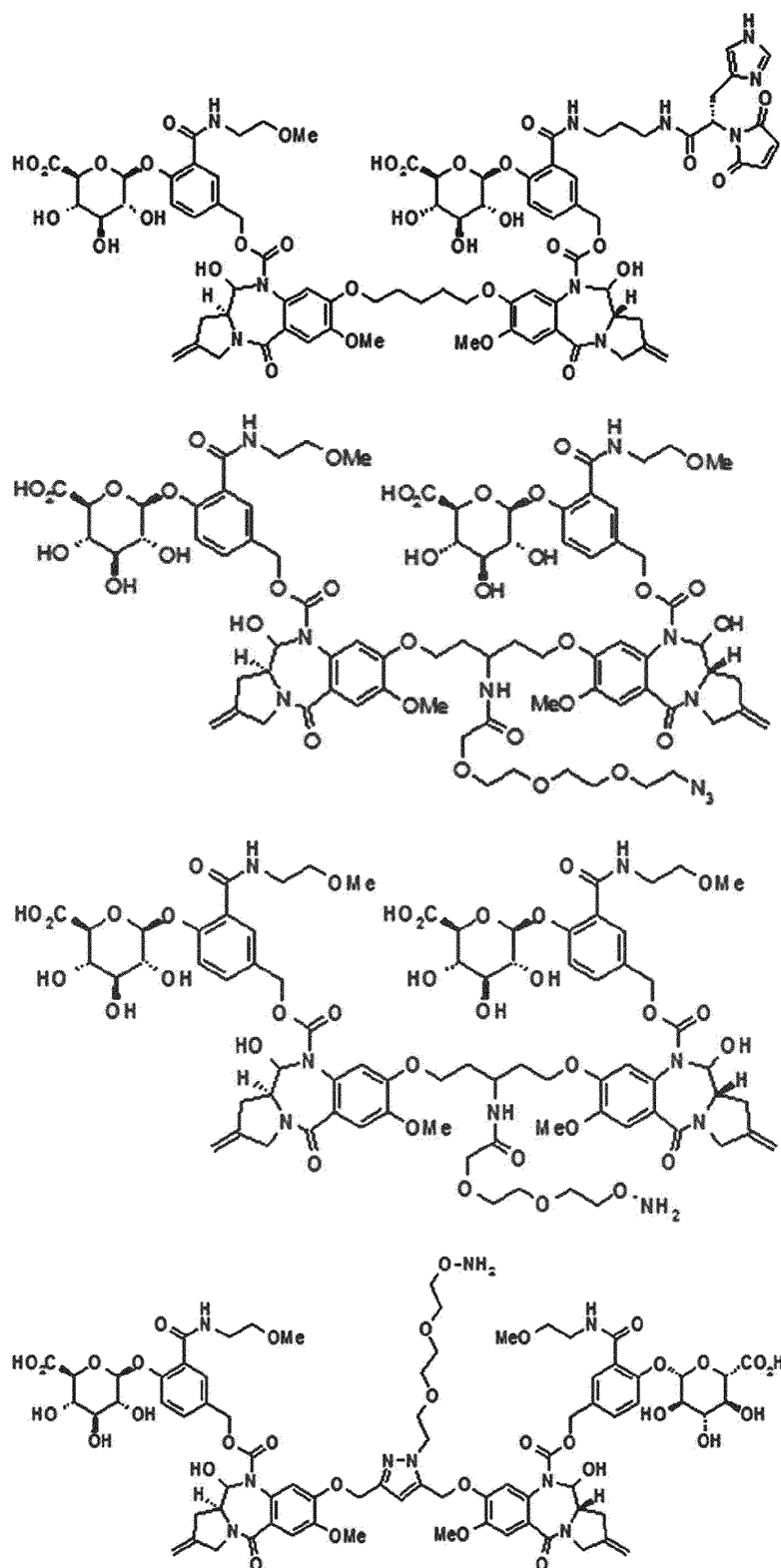


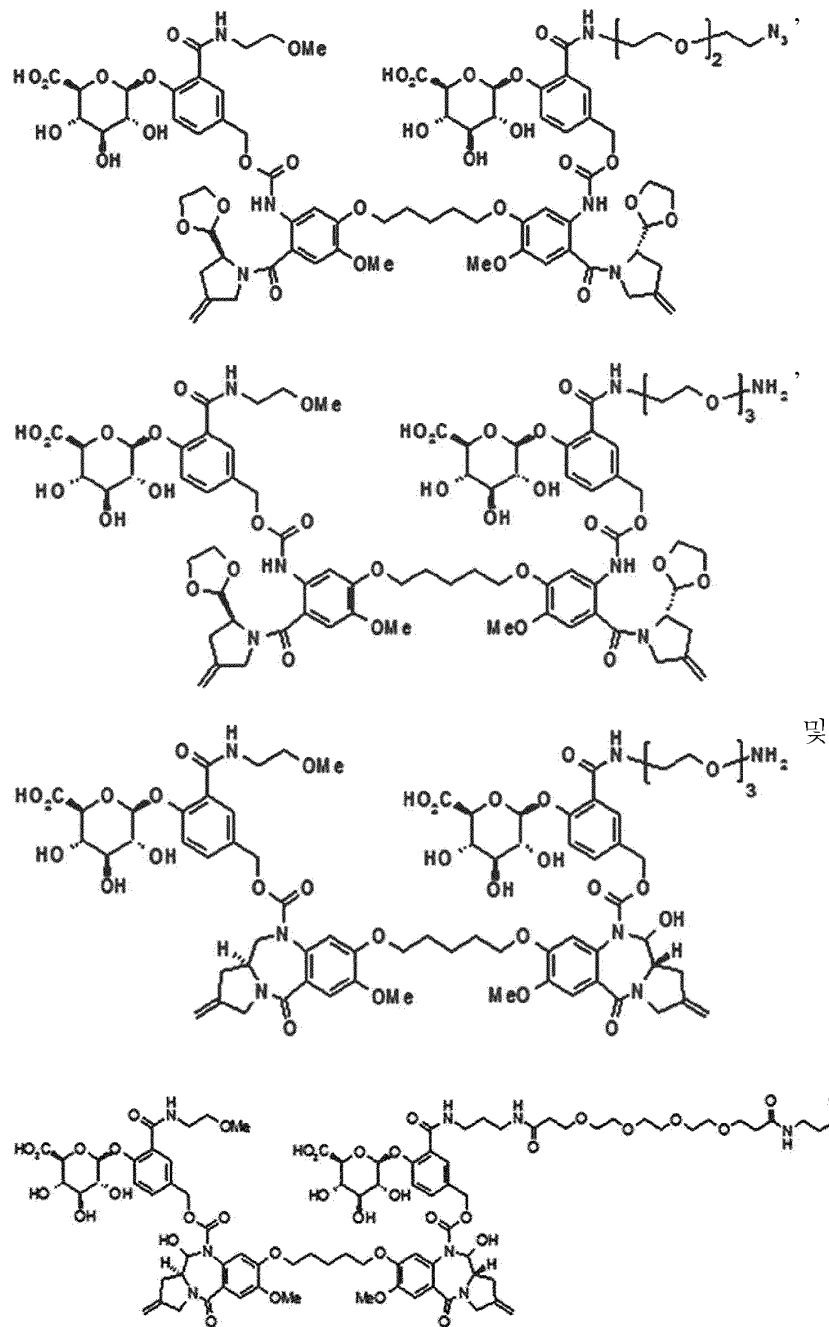












으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는
 항체 접합체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물.

[청구항 57] 제1항의 항체 접합체를 포함하는 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방
 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 58] 제57항에 있어서, 추가적으로 약학적으로 유효한 양의 화학
 치료제(chemotherapeutic agent)를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적

조성물.

- [청구항 59] 제57항에 있어서, 상기 암은 폐암, 소세포성 폐암, 위장관암, 대장암, 장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 고환암, 간암, 신장암, 방광암, 췌장암, 뇌암, 육종, 골육종, 카포시 육종 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 60] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 접합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방방법.
- [청구항 61] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 접합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 치료방법.
- [청구항 62] 과증식, 암 또는 혈관신생질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 제1항의 접합체의 용도