

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第6993056号  
(P6993056)

(45)発行日 令和4年2月15日(2022.2.15)

(24)登録日 令和3年12月13日(2021.12.13)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E Z N A
A 6 1 K	31/4375(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/4375	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	

請求項の数 14 (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-500500(P2019-500500)	(73)特許権者	514164650 ペイジーン リミテッド 英国領ケイマン諸島 グランド ケイマン カマナ ベイ ソラリス アベニュー 94 ムーラント オザネス コーポレート サ ービスズ (ケイマン) リミテッド内
(86)(22)出願日	平成29年6月14日(2017.6.14)	(74)代理人	100144048 弁理士 坂本 智弘
(65)公表番号	特表2019-524714(P2019-524714 A)	(72)発明者	ソン、ジン 中華人民共和国 ベイジン 102206 、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30
(43)公表日	令和1年9月5日(2019.9.5)	(72)発明者	ワン、ライ 中華人民共和国 ベイジン 102206 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/IB2017/053521		
(87)国際公開番号	WO2018/007885		
(87)国際公開日	平成30年1月11日(2018.1.11)		
審査請求日	令和2年6月8日(2020.6.8)		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2016/088591		
(32)優先日	平成28年7月5日(2016.7.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

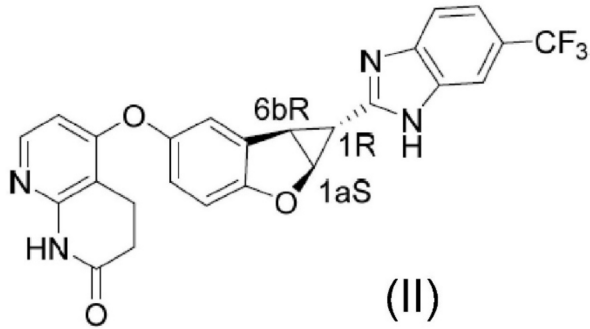
(54)【発明の名称】 癌治療のためのPD - 1アンタゴニスト及びRAF阻害剤の組合せ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌又は腫瘍の予防、進行の遅延又は治療に使用するための、PD - 1アンタゴニスト及びRAF阻害剤を含む組合せ医薬であって、  
前記PD - 1アンタゴニストが、以下に列記される補体決定基領域(CDR)を含む重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)を含む、ヒトPD - 1に特異的に結合する抗体又はそれに結合する抗原結合断片であり、  
CDR - H1、CDR - H2及びCDR - H3(それぞれ配列番号31、32、33)、  
並びに  
CDR - L1、CDR - L2及びCDR - L3(それぞれ配列番号34、35、36)、  
前記RAF阻害剤が、式(II)の化合物、又はその薬学上許容される塩であり、  
前記癌又は腫瘍が、副腎癌、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌(小細胞肺癌、又は非小細胞肺癌を含む)、リンパ腫、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、皮膚癌、又は甲状腺腫瘍、及びこれらの合併症からなる群から選択される、組合せ医薬。

## 【化 1】



10

## 【請求項 2】

前記 P D - 1 アンタゴニストが、配列番号 2 4 及び 2 6 をそれぞれ含む重鎖可変領域 ( V h ) 及び軽鎖可変領域 ( V k ) を含む抗体である、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

## 【請求項 3】

前記 P D - 1 アンタゴニストが、重鎖可変領域 ( V h ) 、軽鎖可変領域 ( V k ) 、及び配列番号 8 8 を含む I g G 4 重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体であって、重鎖可変領域 ( V h ) 及び軽鎖可変領域 ( V k ) がそれぞれ配列番号 2 4 及び配列番号 2 6 を含む、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

## 【請求項 4】

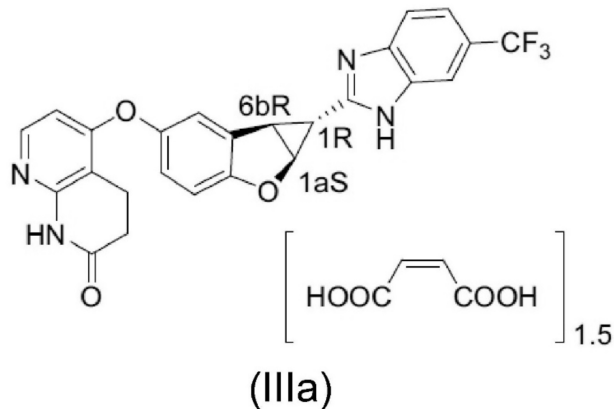
前記 R A F 阻害剤が式 ( I I ) の化合物のマレイン酸塩である、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

20

## 【請求項 5】

前記 R A F 阻害剤が、式 ( I I I a ) の化合物である、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

## 【化 2】



30

## 【請求項 6】

前記癌が固形腫瘍である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組合せ医薬。

## 【請求項 7】

前記癌又は腫瘍が、 B - R a f 変異、 K - R a s / N - R a s 変異及び / 又は N F 1 変異と関連している、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

40

## 【請求項 8】

前記癌又は腫瘍が、各々 K - R a s 変異と関連している、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、又は子宮内膜癌である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組合せ医薬。

## 【請求項 9】

前記 P D - 1 アンタゴニストと前記 R A F 阻害剤とが、同時に、連続して又は別々に投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組合せ医薬。

## 【請求項 10】

前記 R A F 阻害剤が、 5 ~ 8 0 m g Q D の用量で経口投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれ

50

かに記載の組合せ医薬。

【請求項 1 1】

前記 P D - 1 アンタゴニストが、0.5 ~ 10 mg / kg の Q W、又は Q 2 W、又は Q 3 W 又は Q 4 W の用量で非経口的に投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の組合せ医薬。

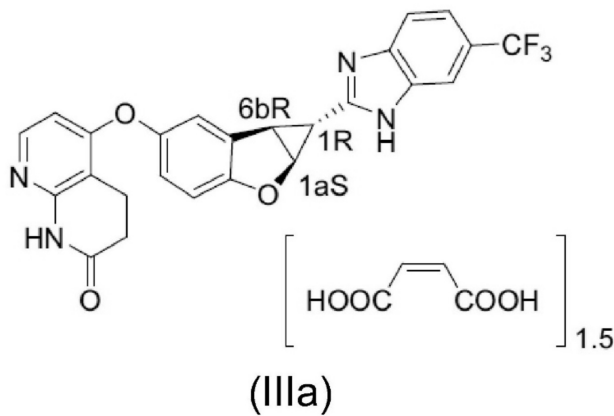
【請求項 1 2】

前記 P D - 1 アンタゴニストが、重鎖可変領域 ( V h )、軽鎖可変領域 ( V k )、及び配列番号 8 8 を含む I g G 4 重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体であり、前記重鎖可変領域 ( V h ) 及び前記軽鎖可変領域 ( V k ) がそれぞれ配列番号 2 4 及び配列番号 2 6 を含み、

10

前記 R A F 阻害剤が、式 ( I I I a )

【化 3】



20

の化合物である、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

【請求項 1 3】

前記 P D - 1 アンタゴニストが 0.5 ~ 10 mg / kg の Q W、Q 2 W 又は Q 3 W の用量で投与され、前記 R A F 阻害剤としての式 ( I I I a ) の化合物が 5 ~ 80 mg Q D の用量で投与される、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

【請求項 1 4】

30

前記 P D - 1 アンタゴニストが 0.5 ~ 10 mg / kg I V の Q W、Q 2 W 又は Q 3 W の用量で投与され、前記 R A F 阻害剤としての式 ( I I I a ) の化合物が 10 ~ 30 mg Q D の用量で投与される、請求項 1 に記載の組合せ医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、国際出願 P C T / C N 2 0 1 6 / 0 8 8 5 9 1 の優先権の利益を主張し、同国際出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

本明細書には、癌の予防、進行の遅延又は治療に使用するための、相乗的な効力を示す薬学的組合せが開示されている。本薬学的組合せは、P D - 1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体及び R A F 阻害剤を含む。また、本明細書には、治療有効量の P D - 1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体及び治療有効量の R A F 阻害剤を対象に投与することを含む、対象における癌の予防、進行の遅延又は治療に使用のための方法が開示されている。

40

【背景技術】

【0002】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ ( M A P K ) シグナル伝達経路は、R A S - R A F - M E K - E R K キナーゼカスケードからなり、細胞生存、成長、分化及び増殖等の多様な細胞活動の調節における重要なシグナル伝達経路の 1 つである。M A P K 経路の構成的活性化をもたらす遺伝的異常は、一般的にヒトの癌で観察される。様々なヒト悪性腫瘍

50

で、少なくとも90%を占めるV600E変異を有する発癌性B-Raf変異が検出されている。ベムラフェニブ及びダブラフェニブ等の変異したB-Rafを選択的に標的とする阻害剤は高い応答率を達成し、B-Raf V600Eを有するメラノーマ患者の治療においてFDAに承認されている。以前の研究は、B-Raf標的化治療が、抗原発現を増加させ、腫瘍微小環境における免疫抑制因子を減少させ、そしてTエフェクター細胞の腫瘍への自動追尾を改善し得ることを示唆した。従って、選択的なB-Raf阻害剤は免疫感作特性を有することが示唆されており、免疫治療と組み合わせて使用することができ、癌治療においてより持続性のある疾患制御/応答が達成される。

#### 【0003】

プログラム死-1タンパク質(PD-1、Pdcd-1、又はCD279)は、CD28/CTLA4共刺激/阻害性受容体ファミリーに関連する55KD受容体タンパク質である(Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314)。全長PD-1は、288個のアミノ酸残基(NCBI受託番号:NP\_005009)を含む。その細胞外ドメインは、アミノ酸残基1~167で構成され、そして、細胞質C-末端テールは、残基191~288を含み、二つの仮定の疫調節性モチーフ、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ(ITIM; Vivier et al., 1997 Immunol Today 18:286-291)、及び免疫受容体チロシンスイッチモチーフ(ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173:945-954)を有する。

#### 【0004】

今まで、二つの配列関連リガンド(sequence-related ligand)、PD-L1(B7-H1)及びPD-L2(B7-DC)は、PD-1と特異的に相互作用して、CD3及びCD28媒介性T細胞活性化を阻害する細胞内シグナル伝達を誘導し(Riley, 2009 Immunol Rev 229:114-125)、それにより、例えば、細胞増殖の減少、IL-2及びIFN- $\gamma$ の分泌、他の成長因子及びサイトカイン分泌といったT細胞活性を弱化させることが確認されていた。

#### 【0005】

PD-1の発現は、しばしば、T細胞、B細胞、単球及びナチュラルキラー(NK)細胞等の免疫細胞においてみられた。それは、ヒトの他の組織、例えば、筋肉、上皮、神経組織等においては稀にしか発現されなかった。また、PD-1の高水準発現は、多くの場合、免疫細胞の活性化と関連している。例えば、ヒトT細胞株、ジャーカット(Jurkat)はフィトヘマグルチニン(PHA)又はホルボールエステル(12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート、又はTPA)によって活性化されたときに、PD-1の発現はウエスタンブロットにおいて上方制御されることが確認された(Vibharka et al., 1997 Exp Cell Res 232:25-28)。同様の現象は、抗CD3抗体による刺激の際に、刺激されたマウスT-、及びB-リンパ球、及び、初代(primary)ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞において観察された(Agata et al., 1996 Int Immunol 8:765-772、及びBennett et al., 2003 J Immunol 170:711-718)。Tエフェクター細胞の刺激後のPD-1発現の増加は、枯渇(exhaustion)及び免疫活性減少のほうに活性化Tエフェクター細胞を向け直す。従って、PD-1媒介性阻害シグナルは、免疫寛容(immune tolerance)に重要な役割をしている(Bour-Jordan et al., 2011 Immunol Rev 241:180-205)。

#### 【0006】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるPD-1発現増加及び腫瘍細胞におけるPD-1リガンド発現増加は、肺(Konishi et al., 2004 Clin Cancer Res 10:5094-5100)、肝臓(Shi et al., 2008 Int J Cancer 128:887-896、及びGao et al., 2009 Clin Cancer Res 15:971-979)、胃(Wu et al., 2

10

20

30

40

50

006 Acta Histochem 108:19-24)、腎臓(Thompson et al., 2004 Proc Natl Acad Sci 101:17174-17179、及びThompson et al., 2007 Clin Cancer Res 13:1757-1761)、乳房(Ghebeh et al., 2006 Neoplasia 8:190-198)、卵巣(Hamanishi et al., 2007 Proc Natl Acad Sci 104:3360-3365)、膵臓(Nomi et al., 2007 Clin Cancer Res 13:2151-2157)、メラノサイト(Hino et al., 2010 Cancer 116:1757-1766)、及び食道(Ohigashi et al., 2005 Clin Cancer Res 11:2947-2953)等の異なるタイプの臓器及び組織に關与する様々な癌において報告されている。これらの癌におけるPD-1とPD-L1の発現増加は、より頻繁に患者の生存転帰の予後不良と關連している。異種移植片癌細胞の増殖を阻害するPD-1遺伝子ノックアウトを有するトランスジェニックマウスは、癌の根絶又は寛容のための免疫系の調節におけるPD-1シグナル伝達の重要性を明らかにした(Zhang et al., 2009 Blood 114:1545-1552)。

10

## 【0007】

WO2013/097224は第二世代のB-RAF阻害剤を開示し、セリン/スレオニンキナーゼのRAFファミリーに対して強力な阻害活性を示した。

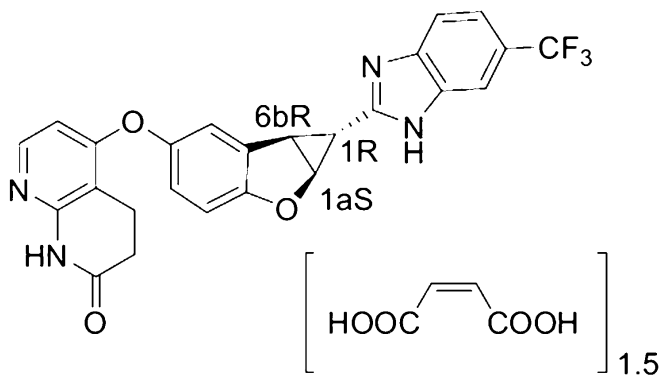
## 【0008】

国際出願PCT/CN2016/079251には、B-Raf変異、K-Ras/N-Ras変異及びNF1変異を含む、RAF-MEK-ERK MAPK経路に異常がある癌の治療のための、WO2013/097224に記載された第2世代B-RAF阻害剤の薬学上許容される塩、特に5-(((1R,1aS,6bR)-1-(6-(トリフルオロメチル)-1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2-イル)-1a,6b-ジヒドロ-1H-シクロプロパ[b]ベンゾフラン-5-イル)オキシ)-3,4-ジヒドロ-1,8-ナフチリジン-2(1H)-オン セスキマレイン酸塩(以下、化合物1と呼ぶ)が開示されている。これら化合物は、A-Raf、B-Raf、C-Raf及びB-Raf V600Eを含む、RAFファミリーキナーゼ-対する強力で可逆的な阻害活性を有する。

20

## 【0009】

## 【化1】



40

化合物1

## 【0010】

WO2015/035606には、(それぞれ、配列番号24及び配列番号26を含む)重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)、並びに(配列番号88を含む)IgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含むモノクローナル抗体であって、PD-1、特にK45及びI93、又はI93、L95及びP97を含むPD-1残基に特異的に結合

50

し、PD-1 媒介性の細胞内シグナル伝達及び免疫細胞における活性を阻害し、そのリガンド結合に必要なアミノ酸残基のセットに結合するモノクローナル抗体（以下、Mab1 と呼ぶ）が開示されている。

【0011】

本出願の発明者らは、上記の抗PD-1 抗体（すなわち、Mab1）及びその抗体断片と選択的B-Raf 阻害剤（すなわち、化合物1）との組合せが、IFN- $\gamma$  産生増強によって、K-Ras 変異に関連する癌に罹患している対象において、驚くべきことにそして予想外にT細胞の応答を増強することを見出した。特に、本出願の発明者らは、意外にも、特定の抗PD-1 抗体（すなわち、Mab1）と特定の選択的B-Raf 阻害剤（すなわち、化合物1）との組合せが、抗PD-1 抗体の単独治療又はB-Raf 阻害剤単独と比較して、K-Ras 変異に関連する癌において、腫瘍増殖の相乗的な阻害をもたらすことを見出した。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

第1の側面において、本明細書に、PD-1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体及びRAF 阻害剤を含む、癌の予防、進行の遅延又は治療に使用するための薬学的組合せが開示される。薬学的組合せは、癌における腫瘍増殖を阻害することにおいて相乗効果を生成する。

【0013】

第2の側面において、本明細書に、治療有効量のPD-1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体及び治療有効量のRAF 阻害剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における癌の予防、進行の遅延又は治療のための方法が開示される。

20

【0014】

第3の側面において、本明細書に、RAF 阻害剤と組み合わせて癌の予防、進行の遅延又は治療に使用するための、PD-1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体が開示されている。この側面の1つの態様において、本明細書に、PD-1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体と組み合わせて、癌の予防、進行の遅延又は治療において使用するための、RAF 阻害剤が開示される。

【0015】

第4の側面において、本明細書に、癌の予防、進行の遅延又は治療に使用するための医薬の製造における、PD-1 に対するヒト化アンタゴニストモノクローナル抗体及びRAF 阻害剤を含む薬学的組合せの使用が開示される。

30

【0016】

第5の側面において、本明細書に、第1の容器、第2の容器及び添付文書を含む製品又は「キット」であって、第1の容器はPD-1 アンタゴニストを含む薬剤の少なくとも1用量を含み、第2の容器はRAF 阻害剤を含む薬剤の少なくとも1用量を含み、添付文書はこれら薬剤を用いて対象における癌を治療するための説明書を含む、製品又は「キット」が開示される。

【図面の簡単な説明】

40

【0017】

【図1】RAF 阻害剤単独又はRAF 阻害剤と抗PD-1 mAbとの組合せで処理した後の、腫瘍スフェロイド/PBMC 共培養系における活性化されたPBMC から生産されたIFN- $\gamma$  のレベルを示す。

【図2】ヒトPBMC の存在下でのCalu-6 異種移植片モデルにおける腫瘍増殖に対するRAF 阻害剤及び抗PD-1 mAbの組合せ効果を示す。

【図3】ヒトPBMC の存在下でのヒト原発性結腸癌BCCO-028 異種移植片モデルにおける腫瘍増殖に対するRAF 阻害剤及び抗PD-1 mAbの組合せ効果を示す。

【図4】化合物1の結晶形（イソプロパノール/水から結晶化）のX線回折パターンを示す。

50

【図5】化合物1の結晶形の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。

【図6】化合物1の結晶形の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

#### 略語

本明細書に記載される詳細な説明及び実施例を通して、以下の略語が使用される。

C D R	相補性決定領域	
D P B S	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	
D M E M	ダルベッコ最小必須培地	
I g G	免疫グロブリンG	10
i . p .	腹腔内	
i . v .	静脈内	
I F N -	インターフェロン -	
m A b	モノクローナル抗体	
M A P K	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ	
N K	ナチュラルキラー	
P D - 1	プログラム死 - 1タンパク質、P d c d - 1、又はC D 2 7 9	
P B M C	末梢血単核球	
P D X	患者由来異種移植片	
P H A	フィトヘماغルチニン	20
p . o .	経口	
Q D	1日1回	
Q W	週1回	
Q 2 W	2週間に1回	
Q 3 W	3週間に1回	
Q 4 W	4週間に1回	
T I L	腫瘍浸潤リンパ球	
V h	重鎖可変領域	
V k	軽鎖可変領域	

【0019】

30

#### 定義

本明細書の他の箇所にて特に定義されていない限り、本明細書で使用される他のすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【0020】

添付の特許請求の範囲を含む本明細書で使用される「a」、「an」及び「the」等の単数形の単語は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、それらの対応する複数の言及を含む。

【0021】

定量的測定の前文で使用される用語「約」は、指示量 $\pm 20\%$ 、又は指示量 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 若しくは $\pm 1\%$ を意味する。例えば、化合物1に関して、約1のモル比（遊離塩基/マレイン酸，n）は、0.8~1.2の間で変動し得る。

【0022】

本明細書における用語「アルキル」は、1~18個、例えば1~12個、さらには1~6個の炭素原子を含む単価の分岐又は直鎖の飽和炭化水素鎖を意味する。アルキルには、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ヘキシル、n-デシル、テトラデシル等が含まれるが、これらに限定されない。

【0023】

本明細書における用語「アルケニル」は、少なくとも1個のC=C二重結合、及び2~18個、例えば2~8個、さらには2~6個の炭素原子を含む単価の分岐又は直鎖の不飽和

50

炭化水素基を意味する。アルケニルには、エテニル（又はビニル、すなわち  $-CH=CH_2$ ）、1-プロピレン（又はアリル、すなわち  $-CH_2CH=CH_2$ ）、イソプロピレン（ $-C(CH_3)=CH_2$ ）等が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0024】

本明細書における用語「アルキニル」は、少なくとも1個のC-C三重結合、及び2～18個、例えば2～8個、さらには2～6個の炭素原子を含む単価の分岐又は直鎖の不飽和炭化水素基を意味する。アルキニルには、エチニル（ $-C\equiv CH$ ）、プロパルギル（又はプロピニル、すなわち  $-C\equiv CCH_3$ ）等が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0025】

本明細書における用語「シクロアルキル」は、単環式環又は複数の縮合環を有する、3～20個の炭素原子、又は3～10個の炭素原子、又は3～8個の炭素原子又は3～6個の炭素原子を含むシクロアルキルを意味する。シクロアルキルは飽和でも部分的に不飽和でもよい。単環式の飽和シクロアルキルの例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルからなる群から選択されるC<sub>3</sub>～8シクロアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。単環式の部分的に不飽和のシクロアルキルの例としては、シクロペント-1-エニル、1-シクロペント-2-エニル、1-シクロペント-3-エニル、1-シクロヘキス-1-エニル、1-シクロヘキス-2-エニル、1-シクロヘキス-3-エニル、及びシクロヘキサジエニルが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0026】

本明細書における用語「アリール」は、親芳香環系の1個の炭素原子から1個の水素原子を除去することによって誘導される、6～20個の炭素原子、例えば6～10個の炭素原子を含む一価芳香族炭化水素基を意味する。アリールには、飽和環、部分的に不飽和の環、芳香族炭素環又は複素環に縮合した芳香環を含む二環式基が含まれる。アリールの例としては、ベンゼン（フェニル）、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ピフェニル、インデニル、インダニル、1,2-ジヒドロナフタレン、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル等から誘導される基が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0027】

本明細書における用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、F、Cl、Br又はIを意味する。

## 【0028】

本明細書における用語「ヘテロアリール」は、以下の基から選択される基を意味する。N、O及びSから選択される、少なくとも1個のヘテロ原子、例えば1～4個、又はいくつかの実施態様では1～3個のヘテロ原子を含み、残りの炭素の環原子を含む、5～7員芳香族単環式環；

N、O及びSから選択される、少なくとも1個のヘテロ原子、例えば1～4個、又はいくつかの実施態様では1～3個のヘテロ原子、又は他の実施態様では1又は2個のヘテロ原子を含み、残りの炭素の環原子を含み、そして少なくとも1つの環は芳香族であり、少なくとも1つのヘテロ原子は芳香環中に存在する、8～12員二環式環；及び

N、O及びSから選択される、少なくとも1個のヘテロ原子、例えば1～4個、又はいくつかの実施態様では1～3個のヘテロ原子、又は他の実施態様では1又は2個のヘテロ原子を含み、残りの炭素の環原子を含み、そして少なくとも1つの環は芳香族であり、少なくとも1つのヘテロ原子は芳香環中に存在する、11～14員三環式環。

## 【0029】

例えば、ヘテロアリールには、5～7員シクロアルキル環に縮合した5～7員複素環式芳香環が含まれる。環の1つのみが少なくとも1つのヘテロ原子を含むこのような縮合二環式ヘテロアリール環系については、結合点はヘテロ芳香族環又はシクロアルキル環にあってもよい。

## 【0030】

ヘテロアリール中のS及びO原子の総数が1を超える場合、これらのヘテロ原子は互いに隣接しない。いくつかの実施態様では、ヘテロアリール基中のS及びO原子の総数は2以

10

20

30

40

50



下である。いくつかの実施態様において、芳香族複素環中のS及びO原子の総数は1以下である。

【0031】

ヘテロアリアルル例としては、(1位に割り当てられた結合位置から数えて)ピリジル(例えば、2-ピリジル、3-ピリジル、又は4-ピリジル)、シンノリニル、ピラジニル、2,4-ピリミジニル、3,5-ピリミジニル、2,4-イミダゾリル、イミダゾピリジニル、イソキサゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、チエニル、トリアジニル、ベンゾチエニル、フリル、ベンゾフリル、ベンゾイミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インドリニル、フタラジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピロリル、トリアゾリル、キノリニル、イソキノリニル、ピラゾリル、ピロロピリジニル(例えば、1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-イル)、ピラゾロピリジニル(例えば、1H-ピラゾロ[3,4-b]ピリジン-5-イル)、ベンゾオキサゾリル(例えば、ベンゾ[d]オキサゾール-6-イル)、プテリジニル、プリニル、1-オキサ-2,3-ジアゾリル、1-オキサ-2,4-ジアゾリル、1-オキサ-2,5-ジアゾリル、1-オキサ-3,4-ジアゾリル、1-チア-2,3-ジアゾリル、1-チア-2,4-ジアゾリル、1-チア-2,5-ジアゾリル、1-チア-3,4-ジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、フロピリジニル、ベンゾチアゾリル(例えば、ベンゾ[d]チアゾール-6-イル)、インダゾリル(例えば、1H-インダゾール-5-イル)及び5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリンが含まれるが、これらに限定されない。

【0032】

本明細書における用語「複素環式」、「複素環」又は「ヘテロシクリル」は、O、S及びNから選択される、少なくとも1個のヘテロ原子、例えば1~4個のヘテロ原子、さらに1~3個のヘテロ原子、又は1又は2個のヘテロ原子に加えて、少なくとも1個の炭素原子を含む4~12員単環式、二環式及び三環式の飽和及び部分的に不飽和な環から選択される環を意味する。本明細書における「複素環」はまた、5、6及び/又は7員のシクロアルキル、炭素環式芳香族環又は複素環式芳香族環と縮合した、N、O及びSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含む、5~7員複素環を意味する。ただし、複素環式環が炭素環式芳香族環又は複素環式芳香環と縮合している場合、結合点は複素環式環にあり、複素環式環がシクロアルキルと縮合している場合、結合点はシクロアルキル又は複素環式環にあることができる。本明細書における「複素環」はまた、結合点が複素環にあるという条件で、N、O及びSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含む脂肪族スピロ環を意味する。環は飽和していてもよく、又は少なくとも1つの二重結合を有していてもよい(すなわち、部分的に不飽和)。複素環はオキソで置換されていてもよい。結合点は、複素環内の炭素又はヘテロ原子であり得る。複素環は、本明細書に定義のヘテロアリアルルではない。

【0033】

複素環の例としては、(1位に割り当てられた結合位置から数えて)1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、2,4-イミダゾリジニル、2,3-ピラゾリジニル、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル、2,5-ピペラジニル、ピラニル、2-モルホリニル、3-モルホリニル、オキシラニル、アジリジニル、チイラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、1,2-ジチエタニル、1,3-ジチエタニル、ジヒドロピリジニル、テトラヒドロピリジニル、チオモルホリニル、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ホモピペリジニル、アゼパニル、オキセパニル、チエパニル、1,4-オキサチアニル、1,4-ジオキセパニル、1,4-オキサチエパニル、1,4-オキサアゼパニル、1,4-ジチエパニル、1,4-チアゼパニル、1,4-ジアゼパン、1,4-ジチアニル、1,4-アザチアニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチ

10

20

30

40

50

オピラニル、1 - ピロリニル、2 - ピロリニル、3 - ピロリニル、インドリニル、2 H - ピラニル、4 H - ピラニル、1, 4 - ジオキサニル、1, 3 - ジオキサニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、ジチアニル、ジチオラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、ピリミジノニル、1, 1 - ジオキソ - チオモルホリニル、3 - アザピシクロ [ 3 . 1 . 0 ] ヘキサニル、3 - アザピシクロ [ 4 . 1 . 0 ] ヘプタニル、アザピシクロ [ 2 . 2 . 2 ] ヘキサニルが含まれるが、これらに限定されない。置換された複素環には、ペペリジニル - N - オキシド、モルホリニル - N - オキシド、1 - オキソ - 1 - チオモルホリニル及び1, 1 - ジオキソ - 1 - チオモルホリニル等の1以上のオキソ基で置換された環系も含まれる。

#### 【 0 0 3 4 】

本明細書における用語「縮合環」は、多環式環系、例えば2つの環が2つの環原子のみと1つの結合を共有している二環式又は三環式環系を意味する。縮合環の例としては、上記のような [ 4 , 4 ]、[ 4 , 5 ]、[ 5 , 5 ]、[ 5 , 6 ] 及び [ 6 , 6 ] の環系から選択される二環式環として配置された7 ~ 12個の環原子を有するもの等の縮合二環式シクロアルキル環；上記のような7 ~ 12員二環式アリアル環系等の縮合二環式アリアル環；上記の10 ~ 15員三環式アリアル環系等の縮合三環式アリアル環；上記のような8 ~ 12員二環式ヘテロアリアル環等の縮合二環式ヘテロアリアル環；上記のような11 ~ 14員三環式ヘテロアリアル環等の縮合三環式ヘテロアリアル環；及び、上記のような縮合二環式又は三環式ヘテロシクリル環が含まれ得る。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書における用語「投与」、「投与する」、「治療する」及び「治療」は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官又は生体液に適用される場合、動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官又は生体液への、外因性の医薬、治療薬、診断薬又は組成物の接触を意味する。細胞の治療には、細胞への試薬の接触、及び流体が細胞と接触している場合、流体への試薬の接触が含まれる。用語「投与」及び「治療」はまた、試薬、診断薬、結合化合物による、又は他の細胞による、例えば細胞のインビトロ及びエクソビボの治療を意味する。本明細書における用語「対象」には、任意の生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、最も好ましくはヒトが含まれる。

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書における用語「薬学上許容される塩」には、例えば、塩素酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、臭素酸塩、硫酸塩、スルフィン酸塩、及び硝酸塩から選択される無機酸との塩、並びに、例えば、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、2 - ヒドロキシエチルスルホン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、酢酸塩等のアルカン酸塩、及び  $\text{HOOC} - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ （式中、nは0 ~ 4から選択される）との塩から選択される有機酸との塩が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、薬学上許容されるカチオンの例としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウム、及びアンモニウムが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 3 7 】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、それらがPD - 1を認識する限り、（全長モノクローナル抗体を含む）抗体及び抗体断片を本質的に包含する。抗体分子は、通常、単一特異的であるが、特定の抗原に特異的、異種特異的、又は多特異的としても記載され得る。抗体分子は、特異的結合部位によって特異的抗原決定基又は抗原上のエピトープに結合する。「抗体断片」は、全長抗体の一部、一般にその抗原結合領域又はその可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれる。

#### 【 0 0 3 8 】

本明細書における用語「モノクローナル抗体」、「mAb」又は「MAb」は、実質的に

10

20

30

40

50

均質な抗体の集団を意味する。すなわち、集団に含まれる抗体分子は、少量で存在し得る天然の突然変異を除いてアミノ酸配列において同一である。対照的に、通常の（ポリクローナル）抗体調製物は、典型的には、可変ドメイン、特にCDRに異なるアミノ酸配列を有する多数の異なる抗体を含み、それらはしばしば異なるエピートープに特異的である。修飾句「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体の性質を示し、特定の方法によって抗体を生産することを必要とすると解釈されるべきではない。モノクローナル抗体（mAb）は、当業者に知られる方法によって得ることができる。参照、例えば、Kohler et al. (1975); US 4376110; Ausubel et al. (1987~1999); Harlow et al. (1988); 及び、Colligan et al. (1993)。本明細書に開示されるmAbは、IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、及びそれらの任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであり得る。mAbを生産するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養することができる。個々のハイブリドーマ由来の細胞を、マウス、例えばプリスティン（pristine）で抗原刺激されたBalb/cマウスに腹腔内注射し、高濃度の所望のmAbを含有する腹水を生産するインビボ生産で、高力価のmAbを得ることができる。アイソタイプIgM又はIgGのmAbを、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を使用して、腹水、又は培養上清から精製することができる。

#### 【0039】

一般に、基本抗体構造単位は四量体を含む。各四量体は、2つの同一の対のポリペプチド鎖を含み、各々の対は1つの「軽鎖」（約25kDa）及び1つの「重鎖」（約50~70kDa）を有する。各々の鎖のアミノ末端部分には、主に抗原認識に關与する約100~110又はそれ以上のアミノ酸の可変領域が含まれる。重鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に關与する定常領域を規定し得る。典型的には、ヒト軽鎖は及び軽鎖として分類される。さらに、ヒト重鎖は典型的には、 $\mu$ 又は $\mu$ として分類され、それぞれIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMとして抗体のアイソタイプが定義される。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域で結合され、重鎖はまた約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む。

#### 【0040】

各々の軽鎖/重鎖（Vk/Vh）対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。従って、一般に、未変化の抗体は2つの結合部位を有する。二官能性又は二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は一般に同じである。

#### 【0041】

典型的には、重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインは、3つの「相補性決定領域（CDR）」とも呼ばれる超可変領域を含み、これらは比較的保存されたフレームワーク領域（FR）内に位置する。CDRは、通常、フレームワーク領域によって整列され、特定のエピートープへの結合を可能にする。一般に、N末端からC末端へ、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメインは、FR-1、CDR-1、FR-2、CDR-2、FR-3、CDR-3及びFR-4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、一般に、Kabata et al., 「免疫学的に重要なタンパク質の配列」, 第5版, NIH Publ. No. 91-3242 (1991), 国立衛生研究所, メリーランド州ベセスダ; Kabata, (1978) Adv. Prot. Chem. 32: 1-75; Kabata, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252: 6609-6616; Chothia, et al., (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917, 又はChothia, et al. (1989) Nature, 342: 878-883の定義に従う。

#### 【0042】

用語「超可変領域」は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」（すなわち、軽鎖可変ドメイン中のCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3、並びに重鎖可変ドメイン中のCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3）由来のアミノ酸残基を含む。参照、Kabata et al., (1991) 「免疫学的に重要なタンパク質の配列」, 第5版, 国立衛生研究所, 公衆衛生局,

10

20

30

40

50

メリーランド州ベセスダ（配列によって抗体のCDR領域を定義する）。参照、Chothia及びLesk（1987）J. Mol. Biol. 196: 901-917（構造によって抗体のCDR領域を定義する）。用語「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書においてCDR残基として定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【0043】

特に断らない限り、「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、抗体の抗原結合断片、すなわち全長抗体によって結合された抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片、例えば、1つ以上のCDR領域を保持する断片を意味する。抗体結合断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子、例えばsc-Fv；ナノボディ、及び抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0044】

特定の標的タンパク質に「特異的に結合する」抗体は、他のタンパク質と比較してその標的に優先的に結合する抗体であるが、この特異性は絶対的な結合特異性を必要としない。その結合が試料中の標的タンパク質の存在を決定する場合、すなわち、誤検知などの望ましくない結果が生じることがない場合、抗体はその意図された標的に対して「特異的」と見なされる。本発明において有用な抗体又はその結合断片は、非標的タンパク質との親和性と比較して、少なくとも2倍、好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも20倍、最も好ましくは少なくとも100倍高い親和性で標的タンパク質に結合するであろう。本明細書中の抗体は、所与のアミノ酸配列を含むポリペプチド、例えば、成熟ヒトPD-1分子のアミノ酸配列に結合するが、その配列を欠くタンパク質には結合しない場合、その配列を含むポリペプチドに特異的に結合すると言われる。

20

【0045】

本明細書における用語「ヒト抗体」は、ヒトの免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。ヒト抗体は、マウス中で、マウス細胞中で、又はマウス細胞に由来するハイブリドーマ中で生産される場合、マウスの炭水化物鎖を含み得る。同様に、「マウス抗体」又は「ラット抗体」は、それぞれマウス又はラットの免疫グロブリン配列のみを含む抗体を意味する。

【0046】

用語「ヒト化抗体」は、非ヒト（例えば、マウス）抗体及びヒト抗体に由来する配列を含む抗体の形態を意味する。そのような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全部又は実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものである可変ドメインの少なくとも1つ、典型的には2つの実質的に全部を含み、FR領域の全部又は実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部を含む。ヒト化抗体を親のげっ歯類抗体と区別するのに必要な場合、接頭語「hum」、「hu」又は「h」が抗体クローンの指定に加えられる。ヒト化型のげっ歯類抗体は一般に、親のげっ歯類抗体の同じCDR配列を含むが、親和性を高め、ヒト化抗体の安定性を高め、又は他の理由のために特定のアミノ酸置換が含まれてもよい。

30

40

【0047】

本明細書における用語「癌」又は「腫瘍」は、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を意味又は説明する。癌の例としては、副腎癌、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（小細胞肺癌、又は非小細胞肺癌を含む）、リンパ腫、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、皮膚癌、又は甲状腺腫瘍、及びこれらの合併症が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に開示される組合せによって治療され得る特に好ましい癌又は腫瘍は、B-Raf変異、K-Ras/N-Ras変異、及び/又はNF1変異によって特徴付けられるものを含む。本明細書中に開示される組合せによって治療され得る最も好ましい癌又は腫瘍

50

は、各々 K - R a s 変異に関連している、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、及び子宮内膜癌を含む。

【 0 0 4 8 】

用語「 C D R 」は、特記しない限り、 K a b a t 番号付けシステムを用いて定義された、免疫グロブリン可変領域中の相補性決定領域を意味する。

【 0 0 4 9 】

「 P D - 1 アンタゴニスト」は、癌細胞上に発現された P D - L 1 の免疫細胞（ T 細胞、 B 細胞又は N K T 細胞）上に発現された P D - 1 への結合を遮断し、より好ましくは、癌細胞上に発現された P D - L 2 の免疫細胞上に発現された P D - 1 への結合も遮断する、任意の化学化合物又は生体分子を意味する。 P D - 1 及びそのリガンドの代替名称又は同義語には、 P D - 1 について P D C D 1、 P D 1、 C D 2 7 9 及び S L E B 2； P D - L 1 について P D C D 1 L 1、 P D L - 1、 B 7 H 1、 B 7 - 4、 C D 2 7 4 及び B 7 - H； P D - L 2 について P D C D 1 L 2、 P D L 2、 B 7 - D C、 B t d c 及び C D 2 7 3 が含まれる。

【 0 0 5 0 】

P D - 1 アンタゴニスト

上記の 5 つの側面のそれぞれに記載されるように、 P D - 1 アンタゴニストは、ヒト P D - 1 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片である。

【 0 0 5 1 】

上記の 5 つの側面のそれぞれに記載されるように、 P D - 1 アンタゴニストは、以下に列記される補体決定基領域（ C D R ）を含む重鎖可変領域（ V h ）及び軽鎖可変領域（ V k ）を含む抗体である。

- a ) m u 3 1 7 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 1、 1 2、 1 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 1 4、 1 5、 1 6）；
- b ) m u 3 2 6 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 7、 1 8、 1 9）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 2 0、 2 1、 2 2）；
- c ) 3 1 7 - 4 B 6 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 3 1、 3 2、 3 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 3 4、 3 5、 3 6）；
- d ) 3 2 6 - 4 A 3 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 3 7、 3 8、 3 9）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 4 0、 4 1、 4 2）；
- e ) 3 1 7 - 1 H C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 1、 5 9、 1 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 1 4、 1 5、 1 6）；
- f ) 3 1 7 - 4 B 2 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 1、 6 0、 1 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 6 1、 1 5、 1 6）；
- g ) 3 1 7 - 4 B 5 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 1、 6 0、 1 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 6 1、 1 5、 1 6）；
- h ) 3 1 7 - 4 B 6 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 1、 3 2、 1 3）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 6 1、 1 5、 1 6）；
- i ) 3 2 6 - 1 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号 1 7、 6 2、 1 9）、並びに  
C D R - L 1、 C D R - L 2 及び C D R - L 3（それぞれ配列番号 2 0、 2 1、 2 2）；
- j ) 3 2 6 - 3 B 1 C D R - H 1、 C D R - H 2 及び C D R - H 3（それぞれ配列番号

10

20

30

40

50

17、62、19)、並びに

CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3(それぞれ配列番号20、21、22);

又は

k)326-3G1 CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3(それぞれ配列番号17、62、19)、並びに

CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3(それぞれ配列番号20、21、22)。

【0052】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、以下に列記されるCDRの任意の組合せを含む重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)を含む抗体である。

(a)CDR-H1(配列番号31)、CDR-H2(配列番号12、32、59又は60)及びCDR-H3(配列番号33)、

CDR-L1(配列番号14、34又は61)、CDR-L2(配列番号35)及びCDR-L3(配列番号36)、又は

(b)CDR-H1(配列番号37)、CDR-H2(配列番号18、38又は62)及びCDR-H3(配列番号39)、

CDR-L1(配列番号40)、CDR-L2(配列番号41)及びCDR-L3(配列番号42)。

【0053】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、以下に列記される重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)を含む抗体である。

a)mu317(それぞれ配列番号4及び6)

b)mu326(それぞれ配列番号8及び10)

c)317-4B6(それぞれ配列番号24及び26)

d)326-4A3(それぞれ配列番号28及び30)

e)317-4B2(それぞれ配列番号43及び44)

f)317-4B5(それぞれ配列番号45及び46)

g)317-1(それぞれ配列番号48及び50)

h)326-3B1(それぞれ配列番号51及び52)

i)326-3G1(それぞれ配列番号53及び54)

j)326-1(それぞれ配列番号56及び58)

k)317-3A1(それぞれ配列番号64及び26)

l)317-3C1(それぞれ配列番号65及び26)

m)317-3E1(それぞれ配列番号66及び26)

n)317-3F1(それぞれ配列番号67及び26)

o)317-3G1(それぞれ配列番号68及び26)

p)317-3H1(それぞれ配列番号69及び26)

q)317-3I1(それぞれ配列番号70及び26)

r)317-4B1(それぞれ配列番号71及び26)

s)317-4B3(それぞれ配列番号72及び26)

t)317-4B4(それぞれ配列番号73及び26)

u)317-4A2(それぞれ配列番号74及び26)

v)326-3A1(それぞれ配列番号75及び30)

w)326-3C1(それぞれ配列番号76及び30)

x)326-3D1(それぞれ配列番号77及び30)

y)326-3E1(それぞれ配列番号78及び30)

z)326-3F1(それぞれ配列番号79及び30)

aa)326-3B N55D(それぞれ配列番号80及び30)

ab)326-4A1(それぞれ配列番号28及び81)、又は

ac)326-4A2(それぞれ配列番号28及び82)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 4 】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、配列番号83～88のいずれかを含むIgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体である。

## 【 0 0 5 5 】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、上記のドメインを含むF(ab)又はF(ab)<sub>2</sub>を含み、重鎖可変領域(Vh)、軽鎖可変領域(Vk)、及びIgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体である。

## 【 0 0 5 6 】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、重鎖可変領域(Vh)、軽鎖可変領域(Vk)、及び配列番号87又は88を含むIgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体であって、重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)が、以下に列記される重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)を含む抗体である。

- a) mu317 (それぞれ配列番号4及び6)
- b) mu326 (それぞれ配列番号8及び10)
- c) 317-4B6 (それぞれ配列番号24及び26)
- d) 326-4A3 (それぞれ配列番号28及び30)
- e) 317-4B2 (それぞれ配列番号43及び44)
- f) 317-4B5 (それぞれ配列番号45及び46)
- g) 317-1 (それぞれ配列番号48及び50)
- h) 326-3B1 (それぞれ配列番号51及び52)
- i) 326-3G1 (それぞれ配列番号53及び54)
- j) 326-1 (それぞれ配列番号56及び58)
- k) 317-3A1 (それぞれ配列番号64及び26)
- l) 317-3C1 (それぞれ配列番号65及び26)
- m) 317-3E1 (それぞれ配列番号66及び26)
- n) 317-3F1 (それぞれ配列番号67及び26)
- o) 317-3G1 (それぞれ配列番号68及び26)
- p) 317-3H1 (それぞれ配列番号69及び26)
- q) 317-3I1 (それぞれ配列番号70及び26)
- r) 317-4B1 (それぞれ配列番号71及び26)
- s) 317-4B3 (それぞれ配列番号72及び26)
- t) 317-4B4 (それぞれ配列番号73及び26)
- u) 317-4A2 (それぞれ配列番号74及び26)
- v) 326-3A1 (それぞれ配列番号75及び30)
- w) 326-3C1 (それぞれ配列番号76及び30)
- x) 326-3D1 (それぞれ配列番号77及び30)
- y) 326-3E1 (それぞれ配列番号78及び30)
- z) 326-3F1 (それぞれ配列番号79及び30)
- aa) 326-3B N55D (それぞれ配列番号80及び30)
- ab) 326-4A1 (それぞれ配列番号28及び81)、又は
- ac) 326-4A2 (それぞれ配列番号28及び82)。

## 【 0 0 5 7 】

上記の5つの側面のそれぞれに記載されるように、PD-1アンタゴニストは、重鎖可変領域(Vh)、軽鎖可変領域(Vk)、及び配列番号88を含むIgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体であって、重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)がそれぞれ配列番号24及び配列番号26を含む抗体である。

## 【 0 0 5 8 】

本明細書に記載される抗PD-1抗体及びその抗体断片は、WO2015/035606

10

20

30

40

50

の開示に従って調製され得る。また、その全体の開示が参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0059】

RAF阻害剤

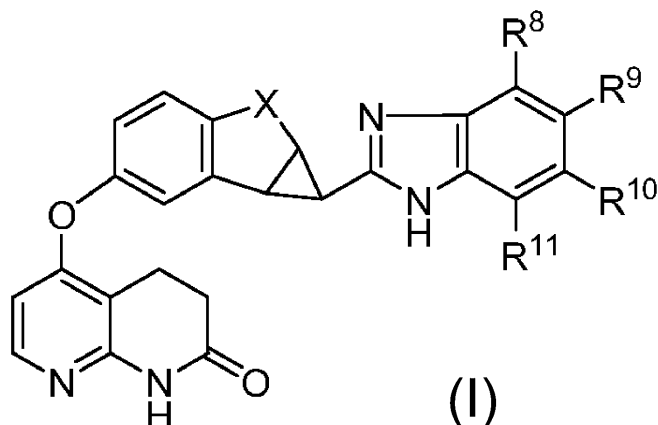
「RAF阻害剤」は、式(I)の化合物、若しくはその立体異性体、又はそれらの薬学上許容される塩を意味する。

【0060】

上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は式(I)の化合物、若しくはその立体異性体、又はそれらの薬学上許容される塩である。

【0061】

【化2】



【0062】

〔式中、Xは、CH<sub>2</sub>及びOから選択される。〕

R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>及びR<sup>11</sup>は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキニル、-NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>、-OR<sup>13</sup>、-COR<sup>13</sup>、-CO<sub>2</sub>R<sup>13</sup>、-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>、-C(=NR<sup>13</sup>)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>、-NR<sup>13</sup>COR<sup>14</sup>、-NR<sup>13</sup>CONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>、-NR<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>14</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>13</sup>、-SO<sub>2</sub>アリール、-NR<sup>13</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>、及び-NR<sup>13</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>14</sup>から選択され、これらのアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロアリール、アリール、及びヘテロシクリルは、それぞれ必要に応じて、少なくとも1つの置換基R<sup>16</sup>で置換されているか、又は(R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>)及び/若しくは(R<sup>9</sup>及びR<sup>10</sup>)及び/若しくは(R<sup>10</sup>及びR<sup>11</sup>)は、それらが結合している環と一緒に、必要に応じて少なくとも1つの置換基R<sup>16</sup>で置換されたヘテロシクリル環及びヘテロアリール環から選択される縮合環を形成する。

R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素、ハロアルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、及びヘテロアリールから選択されるか、又は(R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>)及び/若しくは(R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>)は、それらが結合している原子と一緒に、それぞれ必要に応じて少なくとも1つの置換基R<sup>16</sup>で置換されたヘテロシクリル環及びヘテロアリール環から選択される環を形成する。

R<sup>16</sup>は、ハロゲン、ハロアルキル、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキニル、オキソ、-CN、-OR'、-NR'R''、-COR'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-C(=NR')NR''R'、-NR'COR''、-NR'CONR'R''、-NR'2CRO''、-SO<sub>2</sub>R'、-SO<sub>2</sub>アリール、-NR'SO<sub>2</sub>NR''R'、-NR'2RO''、-NR'SO<sub>2</sub>アリールから選択され、R、R''、及びR'は、独立して水素、ハロアルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、

10

20

30

40

50



ヘテロシクリル、アリール、及びヘテロアリールから選択されるか、又は( R ' 及び R " ) 及び/若しくは( R " 及び R ' " ) は、それらが結合している原子と一緒に、ヘテロシクリル環及びヘテロアリール環から選択される環を形成する。]

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施態様では、式( I )の化合物は光学的に純粋である。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施態様では、式( I )における X は O である。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施態様では、式( I )における X は C H <sub>2</sub> である。

【 0 0 6 6 】

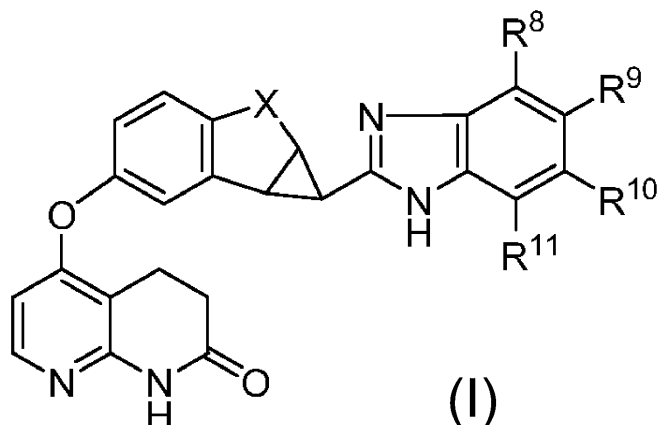
いくつかの実施態様では、式( I )における R <sup>8</sup>、R <sup>9</sup>、R <sup>10</sup>、及び R <sup>11</sup> は、同一又は異なってもよく、それぞれ独立してアルキル(例えば、メチル、tert-ブチル)、水素、ハロアルキル(例えば、-CF<sub>3</sub>)、ハロゲン、ヒドロキシ、-CN、-Oアルキル(例えば、メトキシ)、-Oハロアルキル(例えば、OCF<sub>3</sub>)、及びアリール(例えば、フェニル)から選択される。

【 0 0 6 7 】

上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は式( I )の化合物、若しくはその立体異性体、又はその薬学上許容される塩である。

【 0 0 6 8 】

【化3】



【 0 0 6 9 】

[式中、Xは、CH<sub>2</sub>及びOから選択される。

R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>及びR<sup>11</sup>は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素、ハロゲン、アルキル、-CN、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、-OR<sup>13</sup>、及び-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>から選択され、これらのアルキル、及びアリールは、それぞれ必要に応じて、少なくとも1つの置換基R<sup>16</sup>で置換されているか、又は(R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>)及び/若しくは(R<sup>9</sup>及びR<sup>10</sup>)及び/若しくは(R<sup>10</sup>及びR<sup>11</sup>)は、それらが結合している環と一緒に、ヘテロシクリル環から選択される縮合環を形成する。

R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素、アルキル、及びハロアルキルから選択される。

R<sup>16</sup>は、ハロゲン、ハロアルキル、及びアルキルから選択される。]

【 0 0 7 0 】

上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は式( I )の化合物、若しくはその立体異性体、又はそれらの薬学上許容される塩である。

【 0 0 7 1 】

10

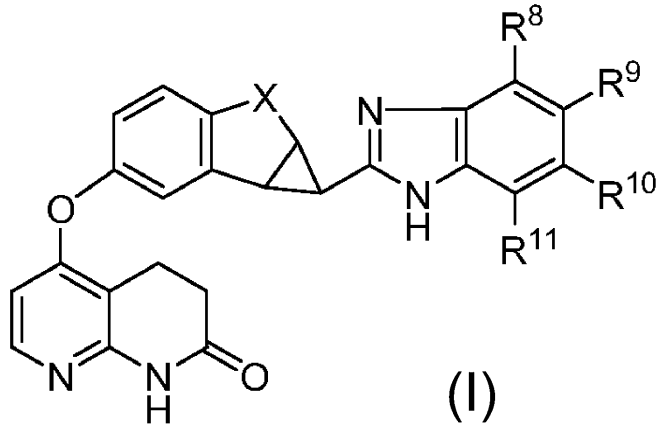
20

30

40

50

【化4】



10

【0072】

〔式中、Xは、CH<sub>2</sub>及びOから選択される。〕R<sup>8</sup>は、水素、F、Cl及びBrから選択される。R<sup>9</sup>は、水素、F、Cl、Br及びC<sub>1</sub>-6アルキルから選択される。

R<sup>10</sup>は、水素、F、Cl、Br、OH、-CN、C<sub>1</sub>-6アルキル、CF<sub>3</sub>、フェニル、OC<sub>1</sub>-6アルキル、OC<sub>1</sub>-6ハロアルキル及び-CONR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>から選択され、R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>は、同一又は異なってもよく、それぞれ水素及びC<sub>1</sub>-6アルキルから選択される。

20

R<sup>11</sup>は、水素、F、Cl、Br及びCF<sub>3</sub>から選択される。

又は、(R<sup>9</sup>及びR<sup>10</sup>)は、それらが結合している環と一緒に、C<sub>5</sub>-6シクロアルキルから選択される縮合環を形成する。〕

【0073】

上記5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は以下の化合物から選択される化合物、若しくはその立体異性体、又はそれらの薬学上許容される塩である。

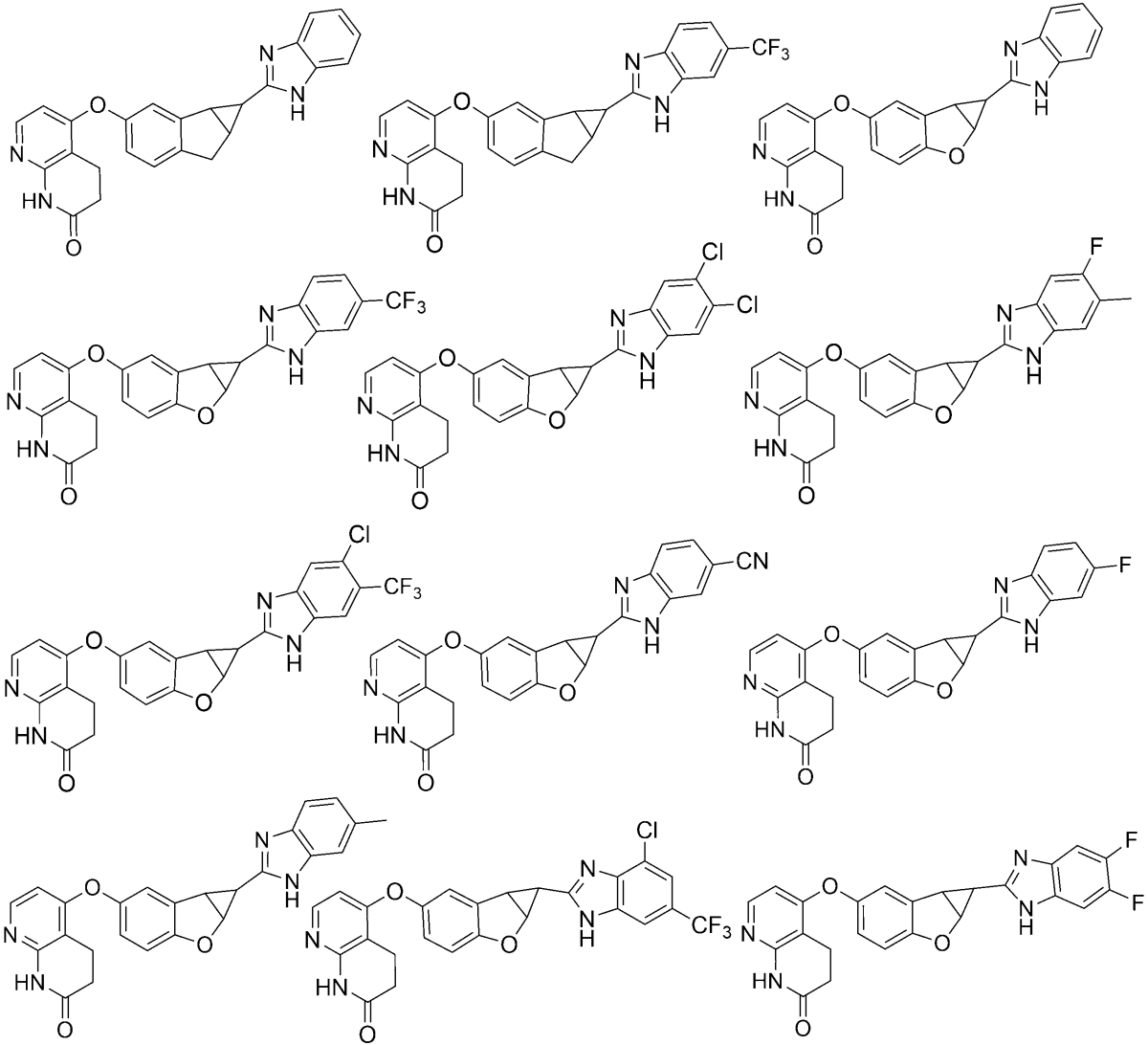
【0074】

30

40

50

【化 5】



10

20

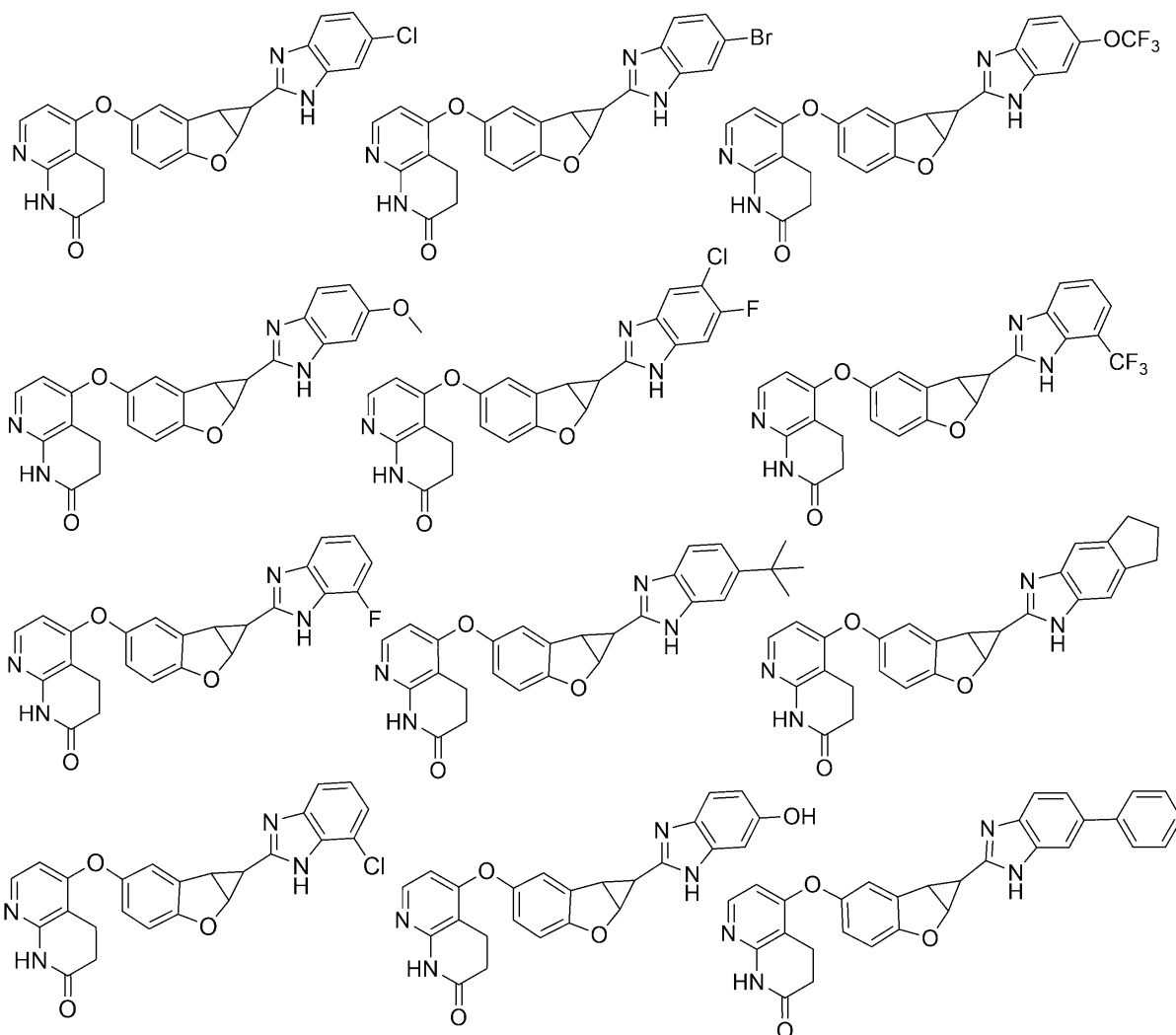
30

【 0 0 7 5 】

40

50

## 【化6】



10

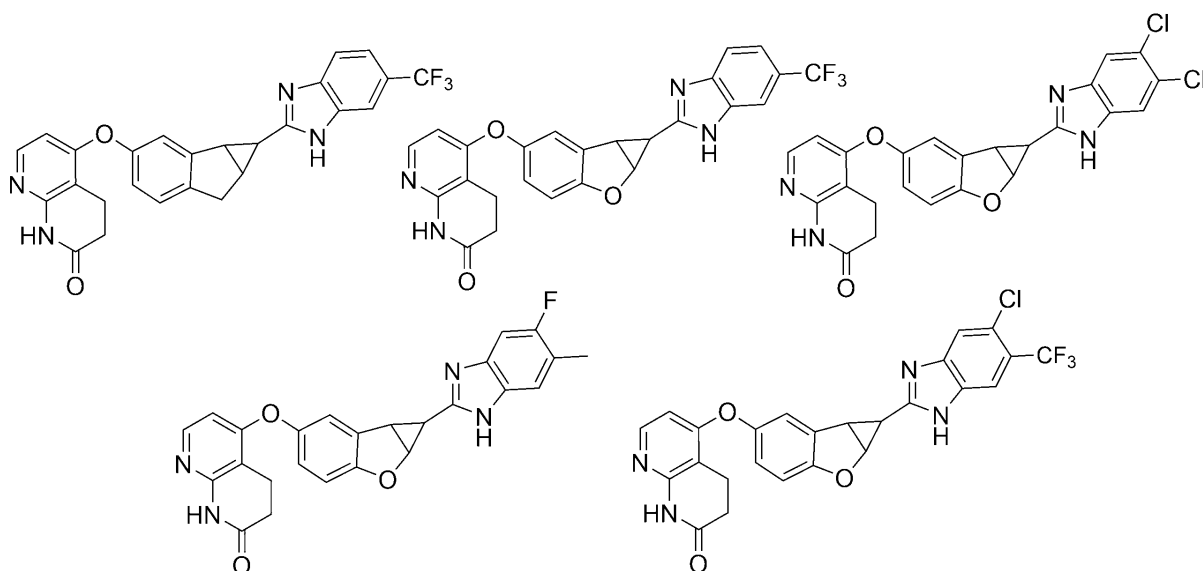
20

## 【0076】

上記5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は以下の化合物から選択される化合物、若しくはその立体異性体、又はそれらの薬学上許容される塩である。

## 【0077】

## 【化7】



40

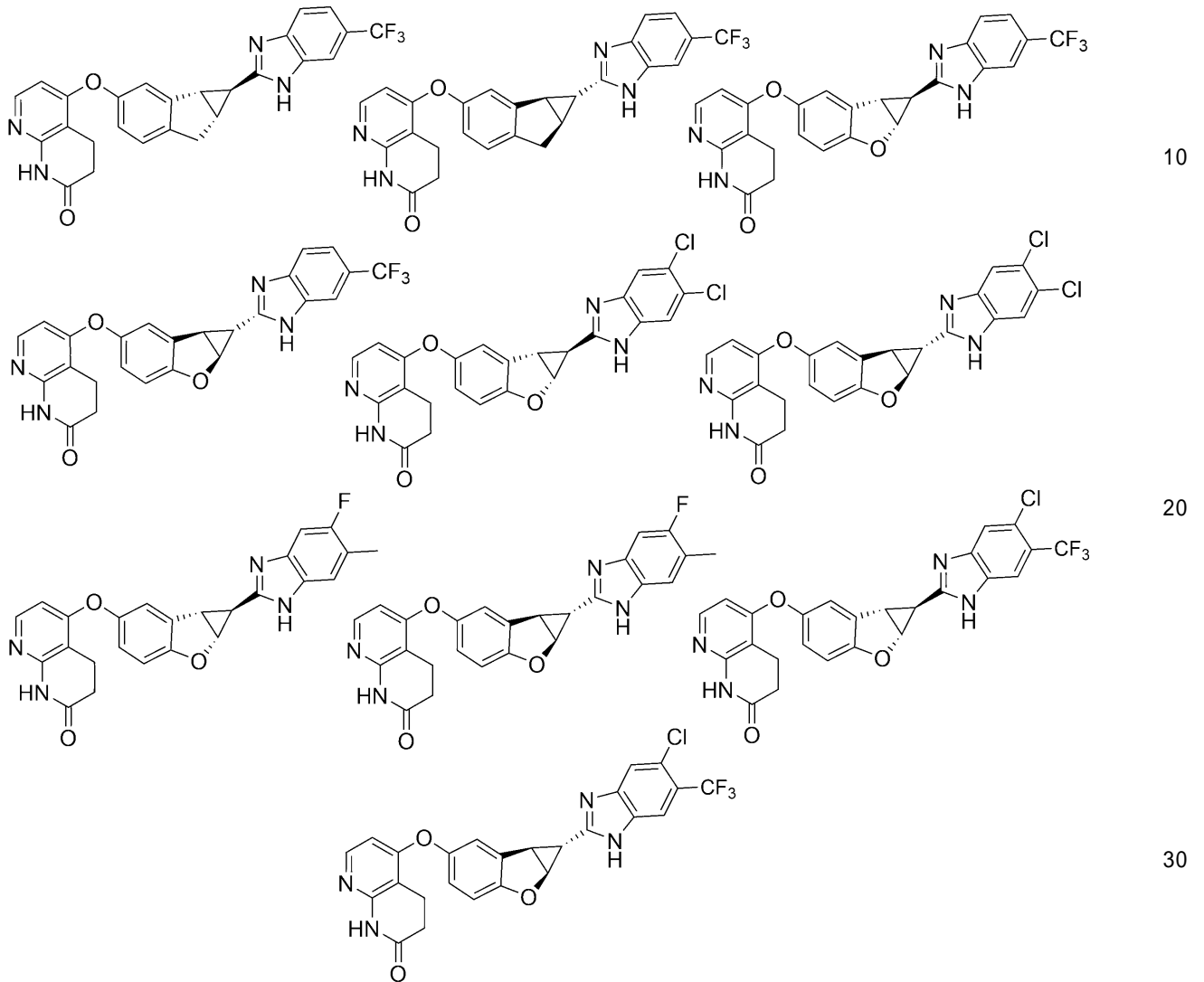
50

【 0 0 7 8 】

上記5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は以下の化合物から選択される化合物、又はその薬学上許容される塩である。

【 0 0 7 9 】

【化8】

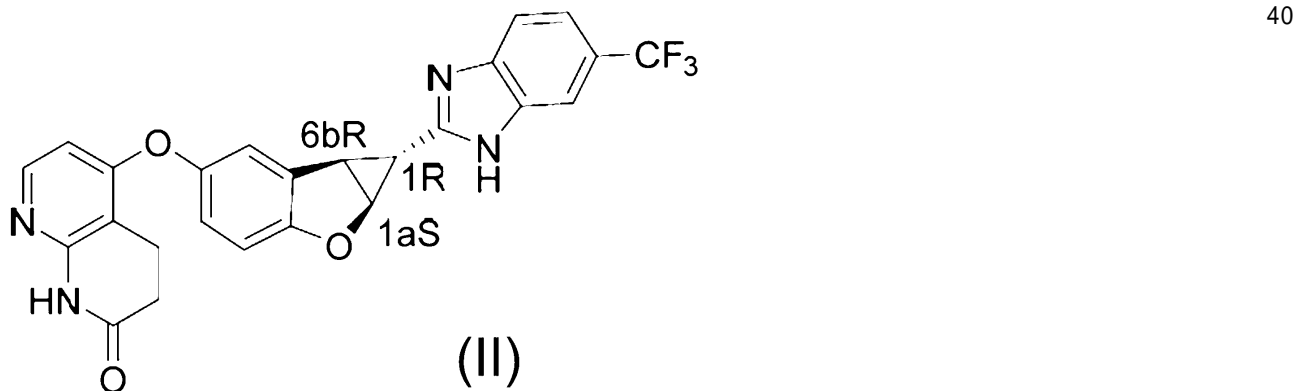


【 0 0 8 0 】

上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、RAF阻害剤は式(II)の化合物、又はその薬学上許容される塩である。

【 0 0 8 1 】

【化9】



【 0 0 8 2 】

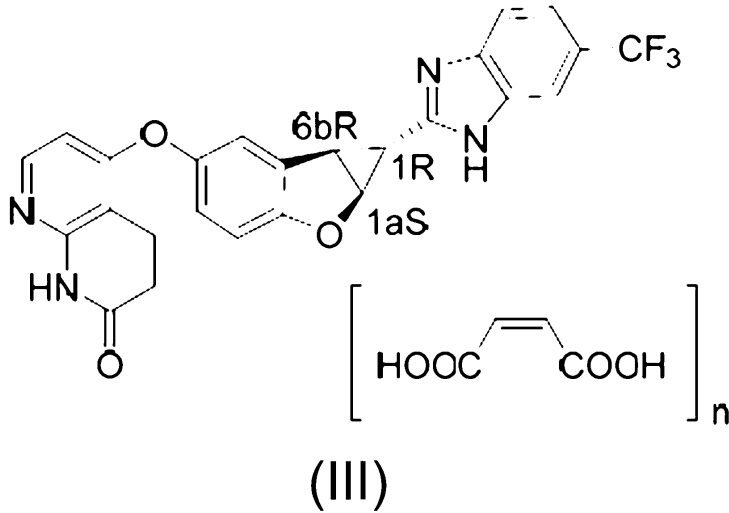
上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、R A F 阻害剤は式 ( I I ) の化合物のマレイン酸塩である。

【 0 0 8 3 】

上記の5つの側面のそれぞれに開示されているように、R A F 阻害剤は式 ( I I I ) の化合物である。

【 0 0 8 4 】

【 化 1 0 】



10

20

【 0 0 8 5 】

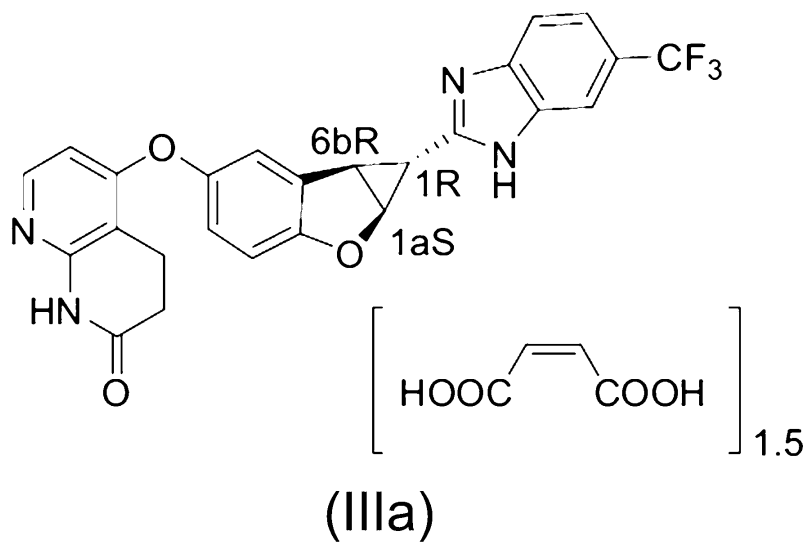
[ 式中、n は約 0 . 5 から約 1 . 5 の数である。 ]

【 0 0 8 6 】

上記5つの側面のそれぞれに開示されているように、R A F 阻害剤は式 ( I I I a ) の化合物、すなわち化合物 1 である。

【 0 0 8 7 】

【 化 1 1 】



30

40

【 0 0 8 8 】

式 ( I ) の化合物等の本明細書に開示されている R A F 阻害剤は、W O 2 0 1 3 / 0 9 7 2 2 4 に開示された合成経路によって合成することができる。この公報の全開示は参照により本明細書に明確に組み込まれる。本明細書に開示される R A F 阻害剤、すなわち化合

50

物1は、PCT/CN2016/079251の手順に従って調製することができる。この出願の全開示は参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0089】

組合せ治療

組合せ治療は、同時の、別々の又は連続的な方式で投与することができる。連続的に投与する場合、組合せは2回以上の投与で投与することができる。組合せ投与には、別々の製剤を用いた同時投与、及び好ましくは両方の（又は全ての）活性薬剤が同時にそれらの生物学的活性を発揮する期間を有する、いずれかの順序での連続的な投与が含まれる。

【0090】

上記5つの側面のそれぞれの1つの態様において、RAF阻害剤又はその薬学上許容される塩は、PD-1アンタゴニストの投与後、約1～10日間の期間、投与することができる。上記5つの側面のそれぞれの別の実施態様では、RAF阻害剤又はその薬学上許容される塩は、組合せの投与の開始前に約1～10日間の期間、投与することができる。上記5つの側面のそれぞれの別の実施態様では、RAF阻害剤又はその薬学上許容される塩の投与と、PD-1アンタゴニストの投与が、同じ日に始まる。

10

【0091】

上記の共に投与される薬剤のそれぞれの適切な投与量は、現在使用されている投与量であり、RAF阻害剤及びPD-1アンタゴニストの組合せの作用（相乗作用）のために、例えば、治療指数を増加させるために、又は毒性若しくは他の副作用若しくは影響を軽減するために、減少させることができる。

20

【0092】

抗癌治療の特定の実施態様において、RAF阻害剤及びPD-1アンタゴニストはさらに外科治療及び放射線治療と組み合わせることができる。

【0093】

上記5つの側面のそれぞれの実施態様において、本明細書に開示されるRAF阻害剤及びPD-1アンタゴニストの量、並びに相対的な投与時期は、治療される患者の個々の必要性、投与経路、疾患又は病気の重症度、投与スケジュール、及び指定された医師の評価と判断によって、決定される。

【0094】

例えば、RAF阻害剤の投与量は（親化合物として）1～100mg/日であり、投与頻度は1日1～3回である。好ましくは、RAF阻害剤の投与量は（親化合物として）5～80mg/日であり、投与頻度は1日1～3回である。より好ましくは、RAF阻害剤の投与量は（親化合物として）10～40mg/日であり、投与頻度は1日1回である。しかし、活性化化合物に基づいて、本明細書に記載されたRAF阻害剤の有効投与量の好ましい範囲は、単回用量又は別々の用量で、体重1kg当たり約0.01～10mg/日、より好ましくは、体重1kg当たり0.1～1mg/日であり得る。場合によっては、上記の投与量範囲の下限を適用することがより適切であり、他の場合には、有害な副作用を引き起こすことなくより高い投与量を使用することができる。上記5つの側面のそれぞれのいくつかの好ましい態様において、RAF阻害剤は1日1回5～80mgの用量で投与される。

30

40

【0095】

PD-1アンタゴニストは、0.5～30mg/kg、例えば0.5～20mg/kg、さらに例えば0.5～10mg/kg等の用量で、週1回、2週間ごと、3週間ごと、又は4週間ごとに、投与される。

【0096】

本明細書に記載されたRAF阻害剤及びPD-1アンタゴニストは、経口的に、局所的に、直腸的に、非経口的に、吸入スプレーで、又は埋め込み型リザーバーを介してなど、様々な既知の方法で投与することができる。ただし、任意の所与の事例における最適な経路は、特定の宿主、及び活性成分が投与される症状の性質と重症度に依存する。本明細書で使用される用語「非経口」は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液内、

50

胸骨内、髄腔内、病巣内及び頭蓋内注射又は注入技術を含む。

【0097】

上記5つの側面のそれぞれの1つの実施態様において、本明細書に記載されたRAF阻害剤及びPD-1アンタゴニストは、異なる経路で投与することができる。好ましい態様において、RAF阻害剤は経口投与され、PD-1アンタゴニストは、皮下、皮内、静脈内又は腹腔内のような非経口で投与される。

【0098】

上記5つの側面のそれぞれの実施態様において、PD-1アンタゴニストは、重鎖可変領域(Vh)、軽鎖可変領域(Vk)、及び配列番号88を含むIgG4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む抗体であって、前記重鎖可変領域(Vh)及び前記軽鎖可変領域(Vk)がそれぞれ配列番号24及び配列番号26を含む抗体であり、RAF阻害剤は、本明細書中に記載された式(IIIa)の化合物である。

10

【0099】

上記5つの側面のそれぞれの実施態様において、PD-1アンタゴニストのMab1は、0.5~10mg/kgのQW、Q2W又はQ3Wの用量で静脈内又は腹腔内に投与され、RAF阻害剤の化合物1は、5~80mgQDの用量で対象に投与される。いくつかの好ましい態様において、PD-1アンタゴニストのMab1は、0.5~10mg/kgのQW、Q2W又はQ3Wの用量で静脈内又は腹腔内に投与され、RAF阻害剤の化合物1は、10~30mgQDの用量で対象に投与される。さらにより好ましい態様において、PD-1アンタゴニストのMab1は、皮下、皮内、静脈内又は皮下等の非経口的に投与される。

20

【0100】

治療方法

薬学的組合せは、副腎癌、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌(小細胞肺癌、又は非小細胞肺癌を含む)、リンパ腫、メラノーマ、卵巣癌、膵臓癌、皮膚癌、又は甲状腺腫瘍、及びこれらの合併症等の癌において腫瘍の増殖を阻害する相乗効果を生じる。特に、薬学的組合せは、B-Raf変異、K-Ras/N-Ras変異、及び/又はNF1変異に関連している上記の癌に有効である。本明細書に記載された薬学的組合せで治療し得る、最も好ましい癌又は腫瘍は、各々K-Ras変異に関連している、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、及び子宮内膜癌を含む。薬学的組合せは、癌の予防、進行の遅延又は治療のための方法で有用である。

30

【実施例】

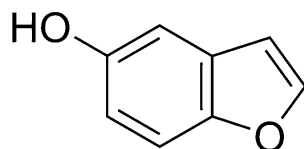
【0101】

実施例A：化合物1(すなわちセスキマレイン酸塩)の調製

ステップ1：中間体1の合成

【0102】

【化12】



中間体1

40

【0103】

窒素保護下、DMF(989kg)中のEtONa(154kg)の攪拌された溶液に、内温35以下でEtSH(68.6kg)を加えた。混合物を内温35以下で60~90分間攪拌した。DMF(55.0kg)中の5-メトキシベンゾフラン(58.75kg)を加えた。混合物を110~130に加熱し、45時間攪拌し、次いで真空下、90未満で濃縮した。混合物を10~20に冷却した後、2NHCl(1326k

50



g)を滴下し、続いて内温35以下でEtOAc(531kg)及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(129kg)を加えた。混合物を30~60分間攪拌した。有機層を分離した後、水層をEtOAcで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で2回洗浄し、溶媒を蒸留して乾固させた。MeOH及び水(185kg)中のNaOH(44.5kg)の溶液を40未満で残渣に滴下した。混合物を30~40で5~7時間攪拌した。水(77kg)で湿らせた活性炭(74kg)を加えた。混合物を30~40で4~6時間攪拌し、濾過した。フィルターケーキをMeOH及び水で洗浄した。DCMを濾液に入れ、40未満で35% HCl水溶液を用いてpHを1に調整した。水層をDCMで抽出し、有機層を25% NaClで洗浄し、そして40未満で濃縮した。残渣を次の工程で直接使用した。

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 9.14(s, 1H)、7.86(d, J=2.0Hz, 1H)、7.36(d, J=8.8Hz, 1H)、6.94(d, J=2.4Hz, 1H)、6.79(dd, J=2.0, 0.9Hz, 1H)、6.74(dd, J=8.8, 2.4Hz, 1H) ppm

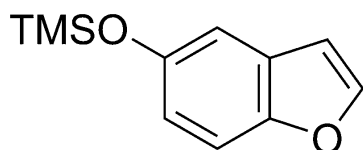
MS: M/e 135(M+1)<sup>+</sup>

【0104】

ステップ2: 中間体2の合成

【0105】

【化13】



中間体2

【0106】

-5~0で、DCM(155kg)中のベンゾフラン-5-オール(中間体1, 33.1kg)及びEt<sub>3</sub>N(50.8kg)の攪拌された溶液に、DCM(50kg)中のTMSCl(30.4kg)の溶液を滴下した。混合物を0~10に温め、その温度で2時間攪拌した(IPCでチェックしたINT-1/INT-2=37.4%)。混合物を-5~0に冷却し、DCM(8kg)中のTMSCl(10.6kg)の溶液を滴下し、次いで混合物を0~10に温め、その温度で1時間、攪拌した。混合物を40未満で濃縮し、混合物にn-ヘプタンを加えた。混合物を20~30分間攪拌し、濾過し、ケーキをn-ヘプタンで洗浄した。ろ液から溶媒を留去し、粗中間体2(INT-2%: 62.7%, KF: 0.01%)を得た。-5~0で、DCM(149kg)中の上記粗中間体2及びEt<sub>3</sub>N(8.6kg)の攪拌された溶液に、DCM(10kg)中のTMSCl(9.0kg)の溶液を滴下した。混合物を0~10に温め、その温度で1時間攪拌した(TLCは反応が完了したことを示した)。反応混合物を40未満で濃縮し、混合物にn-ヘプタンを加えた。混合物を20~30分間攪拌し、次いで濾過し、ケーキをn-ヘプタンで洗浄した。ろ液から溶媒を留去し、無色油状の中間体2(41.5kg, INT-2%: 98.1%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 7.69(d, J=2.0Hz, 1H)、7.21(d, J=8.8Hz, 1H)、6.84(d, J=2.5Hz, 1H)、6.61(d, J=2.0Hz, 1H)、6.56(dd, J=8.8, 2.5Hz, 1H)、0.00(s, 9H) ppm

【0107】

ステップ3: 中間体3の合成

【0108】

10

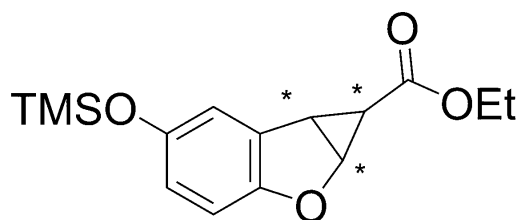
20

30

40

50

## 【化14】



中間体3

10

## 【0109】

窒素雰囲気下、DCM (160 kg) 中、銅(I)トリプレート(トルエンとの2:1錯体, 0.41 kg)、及び(S,S)-エバンス配位子(Evans Ligand, 0.552 kg)を周囲温度で1~2時間撹拌した。中間体2(37.0 kg)を添加し、続いて20~30 °CでDCM(450 kg)中のジアゾエタン酸エチル(58 kg)をゆっくり添加した。20~30 °Cで反応物を0.5~1時間撹拌した(IPC:INT-2/INT-3 0.2%, 残留N<sub>2</sub>CHCO<sub>2</sub>Et:0.05% 1.0%)。20~30 °Cで、反応混合物にEDTA二ナトリウム溶液(0.05 mol/L, 150 kg)を3回、40~50分間で添加した。20~30 °Cで有機層を25% NaCl水溶液で2回洗浄し、30 °C未満に濃縮した。残渣を減圧下で蒸留し、粗中間体3(36.26 kg, 84.5%)を120~144 °Cで集めた。粗化合物は、次の工程で除去することができるエンドエナンチオマーを含んでいた。

20

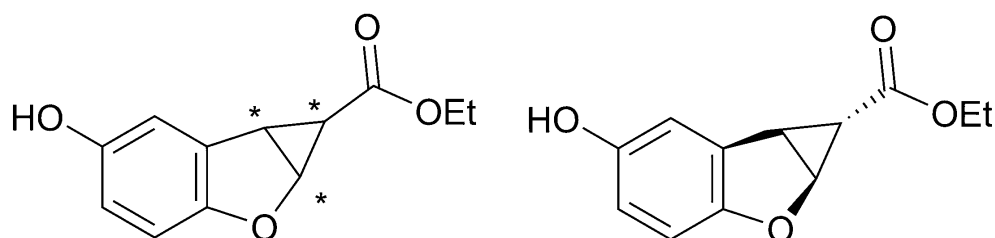
<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 6.79(d, J=2.4 Hz, 1H)、6.59(d, J=8.4 Hz, 1H)、6.42(dd, J=8.4, 2.4 Hz, 1H)、4.95(dd, J=5.4, 1.0 Hz, 1H)、3.08(dd, J=5.4, 3.2 Hz, 1H)、1.02(dd, J=3.1, 1.2 Hz, 1H)、0.00(s, 9H) ppm

## 【0110】

ステップ4及び5: 中間体5及び中間体6の合成

## 【0111】

## 【化15】



中間体5

中間体6

40

## 【0112】

20~30 °Cで、MeOH(108 kg)中の中間体4(36.3 kg)の溶液に、HCl/MeOH(5M, 0.11 kg)を加え、混合物を2~3時間撹拌した(IPC:L/M:0.5%, キラル純度:90.0%)。20~30 °CでEt<sub>3</sub>N(0.22 kg)を滴下した。混合物を濃縮し、残渣をn-ヘプタン/EtOAc(4:1)で希釈し、濃縮した。温度を10~20 °Cに調整し、10~20 °Cで2~4時間撹拌した後、混合物を濾過して、湿った生成物を得た(中間体5:94.0%, キラル純度:90.5%)。

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 9.05(s, 1H)、6.89(d, J=2.4 Hz, 1H)、6.72(d, J=8.4 Hz, 1H)、6.55(dd, J=8.4, 2.4 Hz, 1H)、5.11(dd, J=5.4, 1.0 Hz, 1H)、

50

3.27 (dd,  $J = 5.4, 3.0$  Hz, 1H)、1.19 - 1.17 (m, 1H) ppm

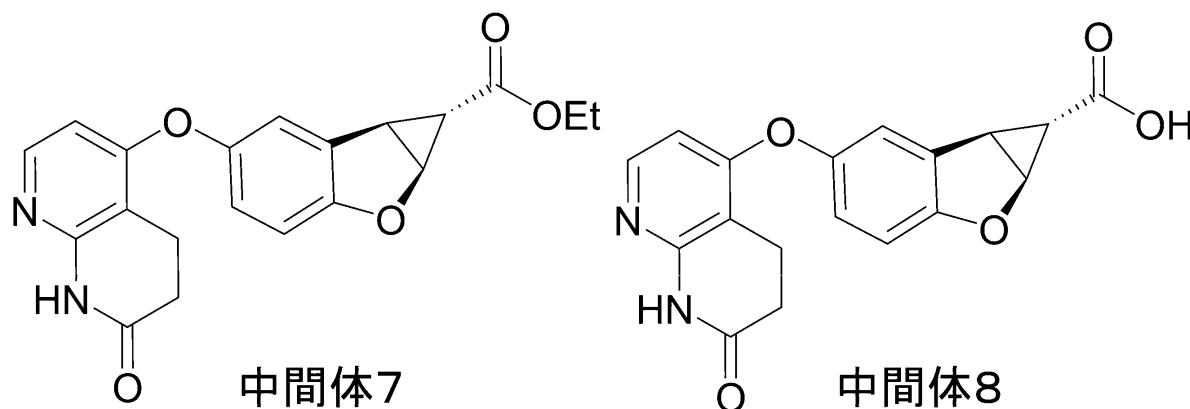
粗生成物を *n*-ヘプタン/EtOAc (20:1) で3回スラリー化して、淡黄色固体を得た。これを 40 ~ 50 °C で12 ~ 16時間乾燥して16.55 kgの生成物 (中間体6: 98.6%, キラル純度: 99.3%) を得た。

【0113】

ステップ6及び7: 中間体7及び中間体8の合成

【0114】

【化16】



【0115】

40 ~ 60 °C で、DMF (66 kg) 中の中間体6 (14 kg) 及び5-フルオロ-3,4-ジヒドロ-1,8-ナフチリジン-2(1H)-オン (SM2, 11.2 kg) の溶液に、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (26 kg) を添加した。混合物を110 ~ 120 °C に温め、110 ~ 120 °C で3時間撹拌した。25 ~ 35 °C で酢酸 (12.0 kg) を用いて反応pHを6に調整した。水 (520 kg) を添加し、混合物を1 ~ 2時間撹拌した。濾過後、固体をEA (78 kg) でスラリー化して、湿った生成物 (純度: (中間体7 + 中間体8) % : 98%) を得た。水酸化ナトリウム水溶液 (125 kg, 2M) を、THF (240 kg) 中の湿った生成物の撹拌された溶液に添加し、20 ~ 30 °C で2 ~ 3時間撹拌した (IPC: INT-7 / INT-8: 0.9%)。混合物を20 ~ 30 °C で4N HCl (37 kg) を用いてpH 4 ~ 5に調整し、次いで0.5 ~ 1時間撹拌した。混合物を50 °C 未満で濃縮して、溶液から固体が沈殿した。濾過後、35 ~ 45 °C で湿った生成物をTHF中で1 ~ 2時間再スラリー化し、濾過した。得られた湿った生成物を45 ~ 65 °C で40時間乾燥して、標記化合物の中間体8 (18.95 kg: 化学純度99%、キラル純度100%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 12.59 (s, 1H)、10.43 (s, 1H)、7.92 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H)、7.29 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H)、6.97 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H)、6.93 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H)、6.21 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H)、5.21 (dd,  $J = 5.4, 1.0$  Hz, 1H)、3.27 - 3.25 (m, 1H)、2.89 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H)、2.51 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H)、1.19 (dd,  $J = 3.0, 1.0$  Hz, 1H) ppm

MS: M/e 339 (M+1) +

【0116】

ステップ8: 中間体9の合成

【0117】

10

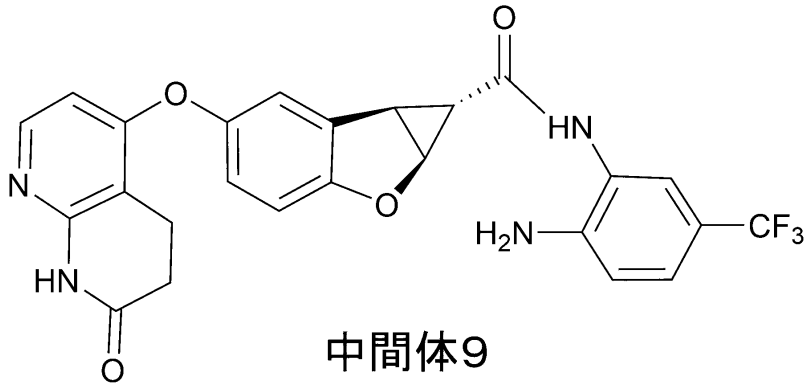
20

30

40

50

## 【化17】



10

## 【0118】

0 ~ 15 で、DMF (167 kg) 中の中間体8 (13.3 kg)、DIPEA (16 kg) 及び HATU (18.1 kg) の溶液を、DMF (74 kg) 中の4-(トリフルオロメチル)ベンゼン-1,2-ジアミン (SM3, 7.6 kg) の混合物に滴下した。20 ~ 25 で混合物を4 ~ 6時間攪拌した (IPC: INT-8 / INT-9: 不検出)。DMF (7.5 kg) 中の活性炭 (5.3 kg) を反応混合物に加え、40 ~ 45 で2 ~ 4時間攪拌し、濾過した。15 ~ 30 で水 (846 kg) を濾液に滴下し、1 ~ 2時間攪拌したときに固体が溶液から析出した。沈殿物を充填し、20 ~ 30 で EtOH 中、2 ~ 4時間スラリー化した。濾過後、45 ~ 60 で湿った生成物を37時間乾燥して、標題化合物の中間体9 (17.60 kg: 95.5%) を得た。

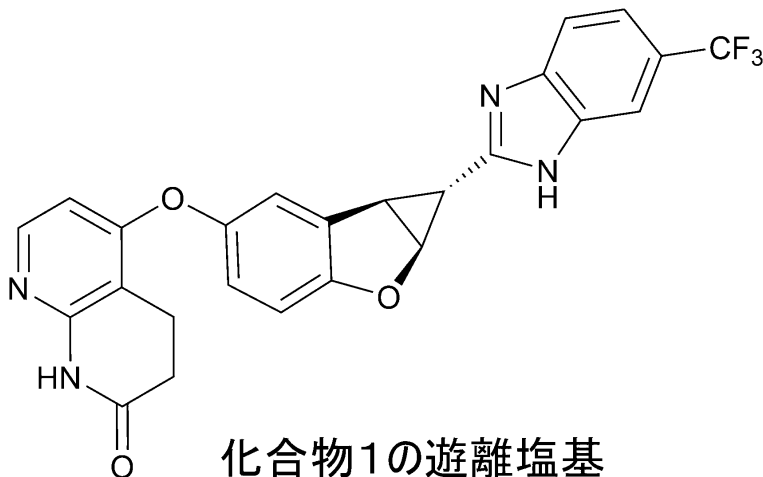
20

## 【0119】

ステップ9: 化合物1の遊離塩基の合成

## 【0120】

## 【化18】



30

## 【0121】

65 ~ 70 で、AcOH (360 kg) 中の中間体9 (17 kg) 及び水 (1.5 kg) の溶液を20時間攪拌した (IPC: R/S 1.0%)。混合物を55 未満で濃縮乾固し、MeOH (32 kg) を含む活性炭 (17 kg) を残渣に添加した。約50 で混合物を1時間攪拌した。濾過後、45 未満で濾過物を濃縮して溶媒を除去した。EA (160 kg) 及び水 (330 kg) を残渣に加え、20 ~ 30 で pH が8 ~ 9 になるまで NaOH 水溶液 (2 mol/L) を加えた。有機層を分離し、水層を EA で抽出した。合わせた有機層を水で2回洗浄し、濃縮乾固させて、遊離塩基の形態の化合物1を得た。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 12.84 (s, 1H)、10.47 (s, 1H)、7.98 (d, J = 5.8 Hz, 1H)、7.86 (d, J = 1.2 Hz

40

50

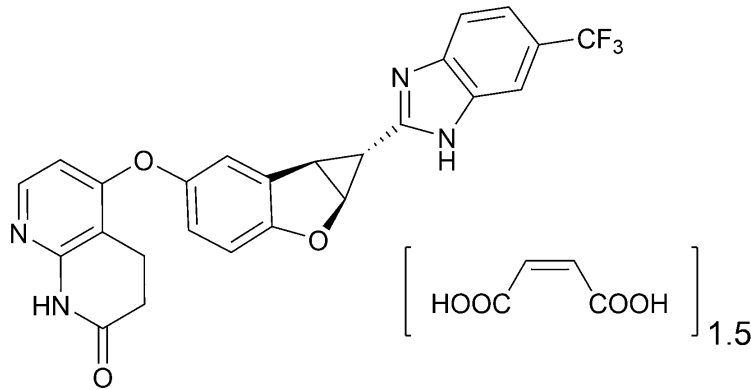
, 1 H)、7.69 (m, 1 H)、7.48 (t, J = 6.2 Hz, 1 H)、7.38 (d, J = 2.6 Hz, 1 H)、7.08 (d, J = 8.7 Hz, 1 H)、7.02 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1 H)、6.29 (d, J = 5.8 Hz, 1 H)、5.43 (dd, J = 5.4, 1.2 Hz, 1 H)、3.55 (dd, J = 5.3, 3.3 Hz, 1 H)、2.95 (t, J = 7.7 Hz, 2 H)、2.55 (t, J = 7.7 Hz, 2 H)、1.97 (d, J = 1.3 Hz, 1 H) ppm

【0122】

ステップ10：化合物1の合成

【0123】

【化19】



化合物1

【0124】

I P A ( 8 3 k g ) をステップ9の残渣に添加した。水 ( 2 9 k g ) 中のマレイン酸 ( 5 k g ) を混合物に添加し、約50 で4時間攪拌し、35 に冷却し、その温度で12時間攪拌した。得られた固形物を濾過し、40 ~ 60 で乾燥し、マイクロナイザー中で微粉化して、 $D_{90} = 4.1 \mu\text{m}$ ,  $D_{10} = 1.5 \mu\text{m}$ ,  $D_{50} = 2.4 \mu\text{m}$ の白色粉末 ( 化合物1のセスキマレイン酸塩, 8.36 kg ) を得た。化合物1は、粉末X線回折パターン法で図4に示すように結晶形として同定された。化合物1の結晶形の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを図5に示す。化合物1の結晶形の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図6に示す。

【0125】

実施例1

T細胞機能インビトロ3Dスフェロイド/PBMC共培養モデルにおけるRAF阻害剤及び抗PD-1 mAbの組合せの効果

【0126】

方法

腫瘍スフェロイドの生成のために、氷冷培地中で、HEK-293-OS8-PD-L1細胞とSk-Mel-28細胞 ( B - R a f V 6 0 0 E ) を1:1の比率で $5 \times 10^4$ 細胞/mLの密度で混合した。三次元構造の形成を助けるために、マトリゲル ( 登録商標 ) マトリックス ( C o r n i n g ) を2%の最終濃度で、細胞懸濁液に添加した。細胞を、U L A 9 6 ウェル丸底プレート ( C o r n i n g ) に播種し、3日間増殖させて腫瘍スフェロイドを生成させた。健康なドナーからの血液サンプルをヘパリン添加チューブに集め、製造者の指示に従ってF i o 1 1 - P a q u e P L U S 試薬 ( G E H e a l t h c a r e ) を用いて、PBMCを単離した。腫瘍スフェロイドとの共培養の前に、PBMCを $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CD3抗体で2日間活性化させた。M a b 1 ( 配列番号24に示される重鎖可変領域 ( V h )、配列番号26に示される軽鎖可変領域 ( V k )、及び配列番号88を含むI g G 4重鎖エフェクター又は定常ドメインを含む ) と組み合わせて、化合物1 ( 5 - ( ( ( 1 R , 1 a S , 6 b R ) - 1 - ( 6 - ( トリフルオロメチル ) - 1 H - ベンゾ [ d ] イミダゾール - 2 - イル ) - 1 a , 6 b - ジヒドロ - 1 H - シクロプロパ [ b ] ベンゾフラン - 5 - イル ) オキシ ) - 3 , 4 - ジヒドロ - 1 , 8 - ナフチリジン - 2 ( 1 H

10

20

30

40

50

) - オン セスキマレイン酸塩) の系列希釈の存在下、1つの腫瘍スフェロイド及び10<sup>4</sup> P B M C / ウェルを含むU L A 96ウェル丸底プレート中で、共培養を行った。e B i o s c i e n c e の E L I S A キットを用いて、培養上清中のI F N - 生産レベルを決定した。

【0127】

#### 結果

化合物1単独では、10nM~100nMの濃度で共培養系においてP B M CからのI F N - 放出が促進され、高濃度(3μM)でI F N - 放出が抑制された。中間レベルの化合物1及びM a b 1の組合せでは、著しく増強されたP B M CのI F N - 産生が示され、これはより良好なインビトロT細胞活性を示す(図1)。

10

【0128】

#### 実施例2

ヒトP B M Cの存在下でのK - R a s 変異肺癌モデル及びB - R a f V 6 0 0 E 変異結腸癌モデルにおける抗P D - 1 m A b及びR A F 阻害剤の組合せの効果

【0129】

#### 方法

移植の日に、健康なボランティアから提供された120mLの血液から、ヒト末梢血単核細胞(P B M C)を単離した。簡潔には、末梢血を、ヘパリンナトリウムを含む真空採血管に集めた。H i s t o p a q u e - 1 0 7 7を用いて密度勾配遠心分離によってP B M Cを分離し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(D P B S)で1回洗浄した。細胞ペレットを1×10<sup>8</sup>細胞/mlの最終濃度になるように適切な容量でD P B Sで懸濁し、接種前に氷上に置いた。N O D / S C I Dマウスを、シクロホスファミド(生理食塩水中で調製, 150mg/kg, 腹腔内)及びジスルフィラム(生理食塩水中の0.8% T w e e n - 8 0で調製, 125mg/kg, 経口, シクロホスファミドの各々の投与1時間後)で1日1回2日間、前処理した。次いで、シクロホスファミドの2回目の投与の24時間後に、動物に腫瘍細胞又は腫瘍断片及びP B M C混合物を注射した。

20

【0130】

C a l u - 6 K - R a s 変異肺癌モデルについては、10%(v/v)ウシ胎児血清、及び100μg/mlのペニシリン及びストレプトマイシンを添加したダルベッコ最小必須培地(D M E M)中で、細胞を培養した。移植の日に、培地を新鮮な培地と交換した。5時間後、培地を除去し、細胞を冷(4℃)D P B Sに再懸濁させて5×10<sup>7</sup>細胞/mlの最終濃度にし、接種前に氷上に置くこと以外は上記のように細胞を収集した。C a l u - 6細胞、P B M C及びマトリゲル(B D, カタログ番号356237)を1:1:2の比率で混合した。細胞接種の前に、各マウスの右腋窩領域を70%エタノールで洗浄した。5×10<sup>6</sup>個のC a l u - 6細胞及び2.5×10<sup>6</sup>個のP B M C(50%マトリゲル中の200μlの細胞混合物)を、26ゲージの針を介して各動物の右前方の脇腹に皮下注射した。

30

【0131】

B - R a f V 6 0 0 E 変異結腸癌患者由来異種移植片(P D X)モデルについては、B C C O - 0 2 8は結腸癌を有する患者から外科的に摘出された腫瘍組織に由来する。患者の手術後2~4時間以内に、腫瘍サンプルを、麻酔をかけたN O D / S C I Dマウスの肩甲骨部に皮下移植した。腫瘍が約300~1000mm<sup>3</sup>に成長した後、腫瘍を外科的に除去し、断片を引き続く移植によってN O D / S C I Dマウス中で継代した。次いで、シクロホスファミドの2回目の投与の24時間後に、動物にB C C O - 0 2 8腫瘍断片及びP B M Cを移植した。腫瘍断片の接種前に、各N O D / S C I Dマウスの右腋窩領域を70%エタノールで洗浄した。B C C O - 0 2 8結腸癌(継代5)の断片(約3×3×3mm<sup>3</sup>)を、14ゲージトロカール針を介して各動物の右側腹部に皮下移植し、続いて50%マトリゲル200μl中の5×10<sup>6</sup>個のP B M Cを、26ゲージ針を介して腫瘍断片の端部付近に皮下注射した。

40

【0132】

50

細胞又は断片の接種後0日目から始めて、動物を無作為に1群当たり8～11匹のマウスを有する4群に割り当てた。群は、対照群（薬物治療なし）、5mg/kgの化合物1（遊離塩基重量に基づく）、10mg/kgのMab1、及び化合物1とMab1の組合せからなった。治療は、投与直前に評価して10ml/kg体重の量で投与し、投与量はそれに応じて調整した。化合物1を1日1回（QD）経口強制経口投与（p.o.）によって投与し、Mab1を週1回（QW）腹腔内（i.p.）注射によって投与した。移植後、カリパスを用いて原発腫瘍体積を二次元で測定した。

【0133】

試験期間中、個々の体重を週に2回記録し、毒性の臨床的徴候について毎日マウスをモニターした。腫瘍体積が2,500mm<sup>3</sup>に達するか、腫瘍が潰瘍化したか、又は体重減少が20%を超えたときに、二酸化炭素を用いてマウスを安楽死させた。

10

【0134】

腫瘍体積は、式： $V = 0.5 \times (a \times b^2)$ 〔式中、a及びbはそれぞれ腫瘍の長径及び短径である。〕を用いて計算した。腫瘍増殖阻害（TGI）は、以下の式を用いて計算した。

$$\%TGI = 100 \times [1 - (\text{治療済}_t / \text{プラセボ}_t)]$$

治療済<sub>t</sub> = 時間tにおける治療済の腫瘍体積

プラセボ<sub>t</sub> = 時間tにおけるプラセボの腫瘍体積

【0135】

結果

化合物1及びMab1のインビボ効果を、ヒトPBMCの存在下でNOD/SCIDマウスの皮下に増殖させたBCCO-028 PDX細胞及びCalu-6細胞で試験した。化合物1は、ヌードマウスにおけるPDX BCCO-028結腸直腸癌腫（B-Raf V600E変異）及びヒトCalu-6肺腺癌（K-Ras変異）腫瘍異種移植片に対して顕著な抗腫瘍活性を有する。さらに、以下の図に示すように、化合物1とMab1の相乗効果は、これらのモデルの腫瘍増殖曲線によって明確に証明される。組合せ治療群の腫瘍は、いずれの単独治療よりも著しく小さい（図2, 図3）。

20

【0136】

前述の実施例及び特定の実施態様の説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明を限定するものとしてではなく、例示として解釈されるべきである。容易に理解されるように、特許請求の範囲に記載された本発明から逸脱することなく、上記に記載された特徴の多数の変形及び組合せが利用され得る。全てのそのような変形は本発明の範囲内に含まれることが意図される。引用された全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0137】

本明細書で先行技術の刊行物が参照されている場合、そのような参照は、その刊行物があらゆる国の当技術分野における一般常識の一部を形成するという承認を構成するものではないことが理解されるべきである。

【0138】

以下の特許請求の範囲及びこれまでの本発明の説明では、文言が明示的な表現又は必要な含意のために別段の要求をしている場合を除いて、単語「含む」又は「含んでいる」等の変形は、包括的な意味で、すなわち本発明の様々な実施態様における更なる特徴の存在又は追加を排除するためではなく、述べられた特徴の存在を特定するために使用される。

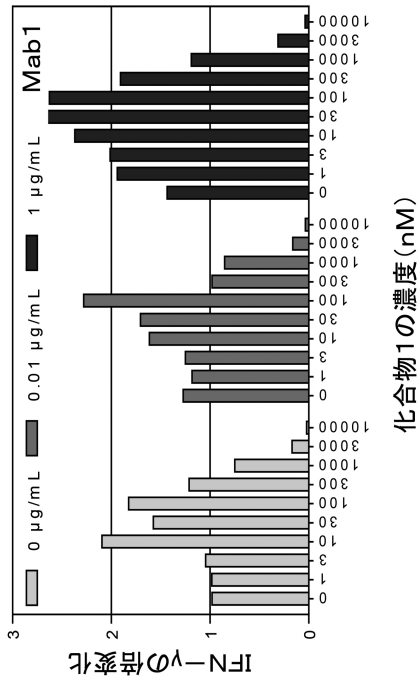
40

【0139】

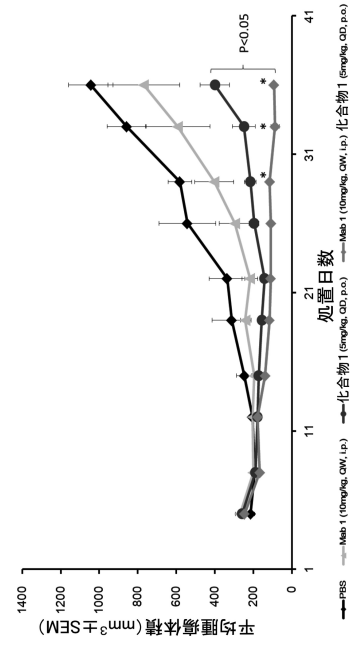
本明細書中に言及された全ての刊行物、特許、特許出願及び公開特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

50

【図面】  
【図 1】



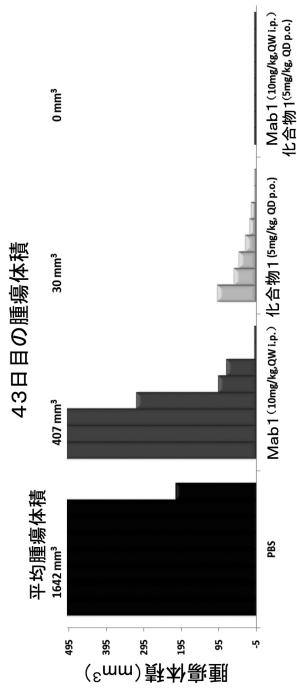
【図 2】



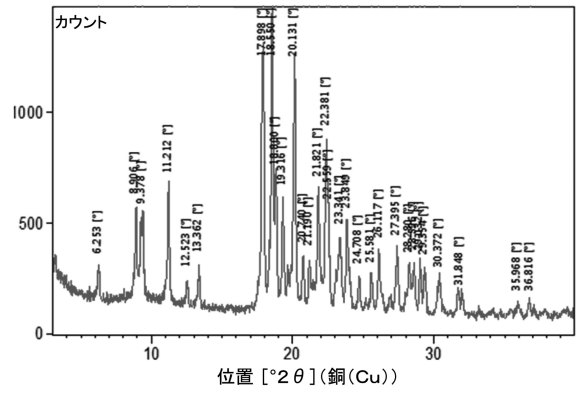
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50





## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
		C 1 2 N	15/13	

、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

リー、カン

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

チャン、トン

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

ロ、ルソン

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

ウェイ、ミン

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

タン、ジユ

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

チャン、グオリヤン

中華人民共和国 ベイジン 102206、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 30

## (72)発明者

チョウ、チャンヨウ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08540、プリンストン、カッセルベリー ウェイ 4

## 審査官

深草 亜子

## (56)参考文献

米国特許第08735553 (US, B1)

特表2015-506353 (JP, A)

International Immunology, 2014年, Vol.27, No.1, pp.39-46

Annals of Oncology, 2015年, Vol.26, No.5, p.894-901

Oncogene, 2002年, Vol.21, p.3792-3795

Med Electron Microsc, 2004年, Vol.37, p.188-192

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/00 - 31/80

A 6 1 K 39/00 - 39/44

A 6 1 P 35/00 - 35/04

A 6 1 P 37/00 - 37/08

A 6 1 P 43/00

C 0 7 K 16/00 - 16/46

C 1 2 N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST

N)