

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7703050号

(P7703050)

(45)発行日 令和7年7月4日(2025.7.4)

(24)登録日 令和7年6月26日(2025.6.26)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K

16/28

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

L

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 K

31/519

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P

11/00

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P

37/02

請求項の数 27 (全87頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-570204(P2023-570204)

(86)(22)出願日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(65)公表番号 特表2024-517341(P2024-517341
A)

(43)公表日 令和6年4月19日(2024.4.19)

(86)国際出願番号 PCT/CN2022/092556

(87)国際公開番号 WO2022/237884

(87)国際公開日 令和4年11月17日(2022.11.17)

審査請求日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(31)優先権主張番号 202110525504.5

(32)優先日 令和3年5月13日(2021.5.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 513322718

清華大学

TSINGHUA UNIVERSITY

中華人民共和国北京市海淀区清華▲園▼

1号 100084

1 Qinghuayuan, Haid

ian District, Beij

ing 100084, China

(73)特許権者 523247175

北京森妙生物科技有限公司

中華人民共和国北京市海淀区中関村大街

甲38号1号楼B座7層017号

(74)代理人 110002077

園田・小林弁理士法人

(72)発明者 廖学斌

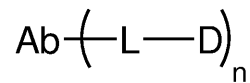
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体薬物コンジュゲート、その製造方法及び使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造を有する抗体薬物コンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、
立体異性体であって、



(I)

ここで、

A b は、抗体又はその抗原結合断片であり、

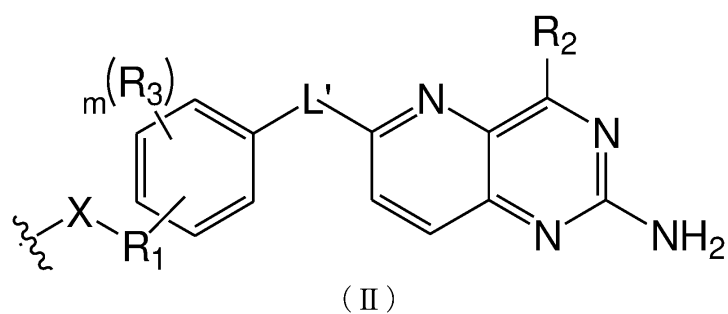
D は、小分子薬物であり、

L は、A b と D を連結する連結単位であり、

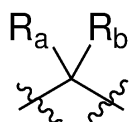
一般式 I における D 部分が下記構造を有し、

10

20



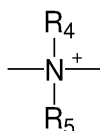
ここで、
L'は、下記構造



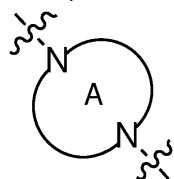
を有し、ここで、 R_a 及び R_b は、独立に、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキルから選択され、又は、 R_a 及び R_b は、それらに連結される炭素原子とともに $C_3 \sim C_6$ シクロアルキレンを形成し、

R_1 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンであり、又は、 R_1 は、単結合であり、又は、 R_1 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンオキシであり、

Xは、

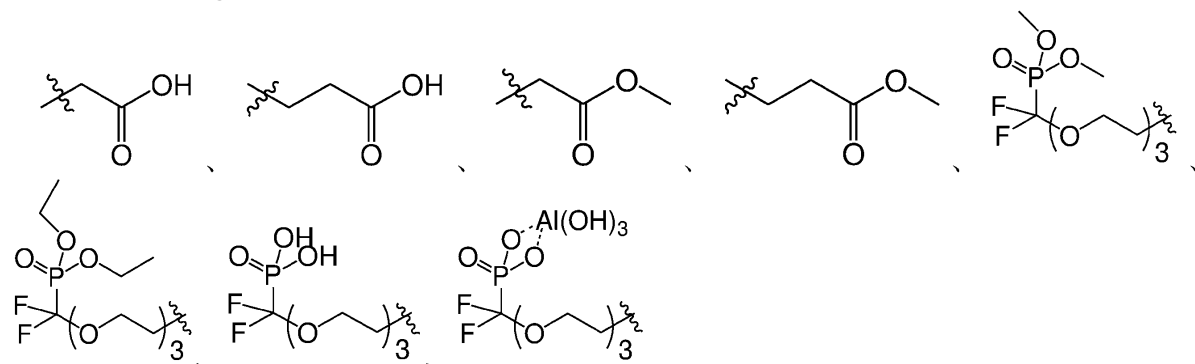


、
-NR₄-、-NR₄-($C_1 \sim C_6$ アルキレン)-NR₅-、



(A環は、4～10員窒素含有複素環である)

から選択され、ここで、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、アミノ酸残基、オリゴペプチド残基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、



10

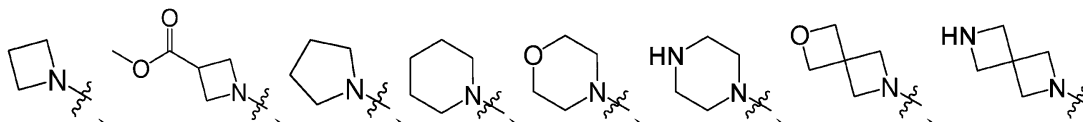
20

30

40

50

から選択され、又は R_4 及び R_5 は、それらの両方に連結される窒素原子とともに置換又は無置換のヘテロシクリルを形成し、前記置換又は無置換のヘテロシクリルは、



から選択され、

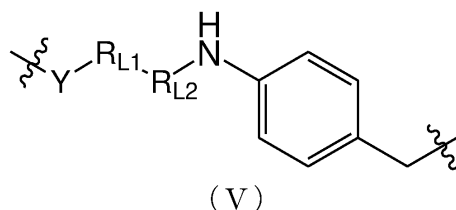
R_2 は、 $-NHR_6$ 、 $-OR_6$ 、 $-SR_6$ から選択され、ここで、 R_6 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又は $C_1 \sim C_6$ アルコキシアルキルであり、

10

R_3 は、ベンゼン環上の 1 つ又は複数の独立した置換基であり、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシアルキルから選択され、

m は、 $0 \sim 4$ の整数であり、

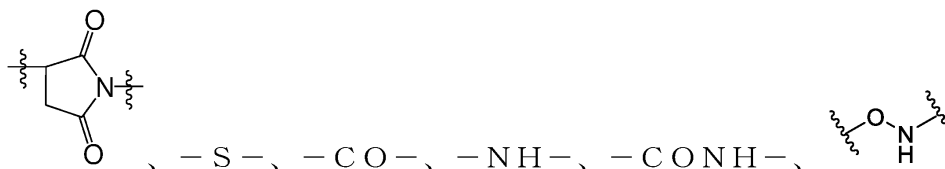
L 部分が、下記構造



20

を有し、

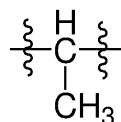
Y は、単結合、



から選択され、

30

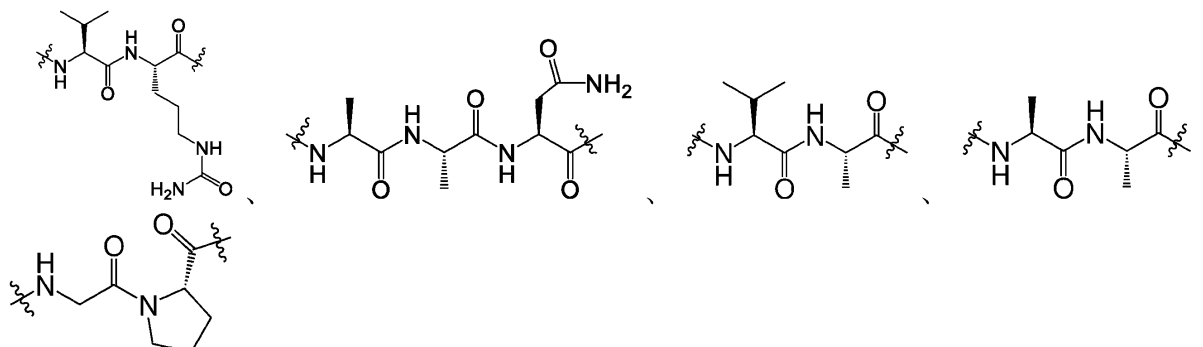
R_{L1} は、



であり、又は、 R_{L1} は $-(CH_2)_jCO-$ であり、 j は $0 \sim 6$ の整数であり、

R_{L2} は $-(CH_2)_iOCO-$ であり、 i は $0 \sim 6$ の整数であり、又は、 R_{L2} は、オリゴペプチド残基であり、オリゴペプチド残基は、

40



50

から選択され、

前記抗体は抗 P D - L 1 抗体であり、S E Q I D N O : 4 に示される重鎖配列と、S E Q I D N O : 9 に示される軽鎖配列と、を有し、

n は、1 ~ 10 の整数である、

抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2】

n は、1 ~ 6 の整数である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3】

n = 2 又は 4 である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

【請求項 4】

L への前記抗体の連結部位が、S E Q I D N O : 9 に示されるアミノ酸配列の 226 位のシステイン残基での遊離メルカプトである、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 5】

L' は、



から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

20

【請求項 6】

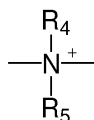
R₃ は、ベンゼン環上の 1 つ又は複数の独立した置換基であり、独立に、H、メチル、メトキシから選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 7】

m は 0 又は 1 である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

X は



30

であり、R₄ 及び R₅ は、独立に、C₁ ~ C₆ アルキルから選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

R₄ 及び R₅ はいずれもメチルである、ことを特徴とする請求項 8 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

X は -NR₄- であり、R₄ は、H、C₁ ~ C₆ アルキルから選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

40

【請求項 11】

R₄ は、H 又はメチルである、ことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

X は -NR₄-(C₁ ~ C₆ アルキレン)-NR₅- であり、R₄ 及び R₅ は、独立に、C₁ ~ C₆ アルキルから選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

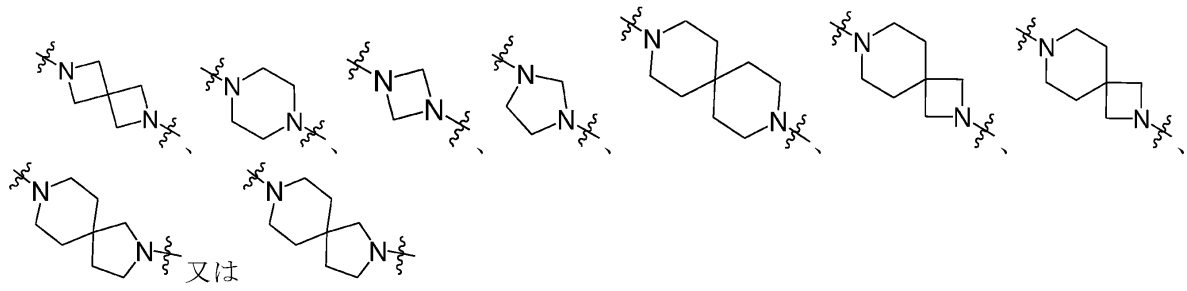
【請求項 13】

R₄ 及び R₅ はいずれもメチルである、ことを特徴とする請求項 12 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

50

【請求項 1 4】

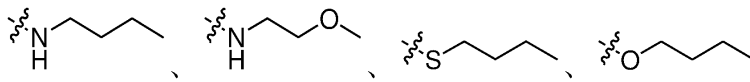
X は、



から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 1 5】

R₂ は、



から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 1 6】

一般式 I における D 部分が、下記構造から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

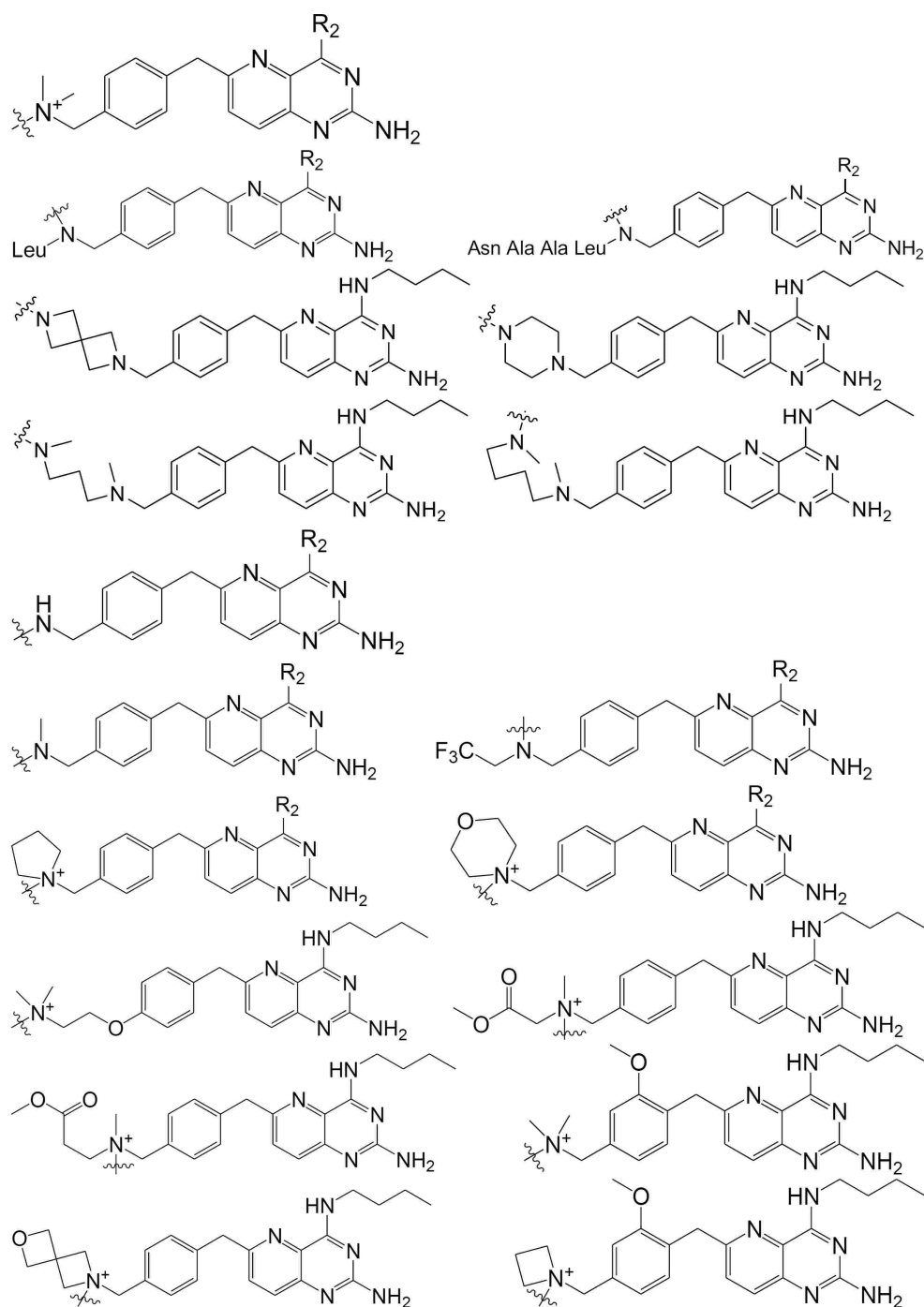
10

20

30

40

50



10

20

30

40

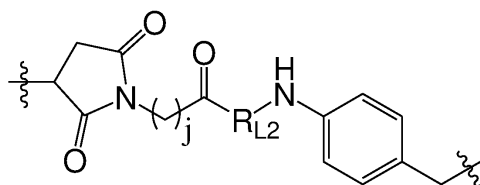
50



一般式 I における D 部分が、下記構造を有する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

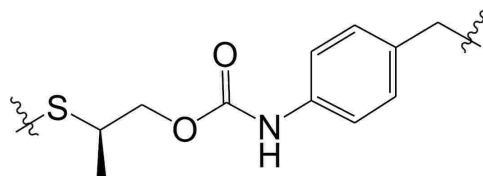


前記 L 部分が、下記構造を有する、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

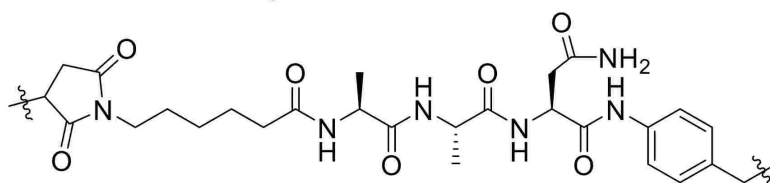


【請求項 19】

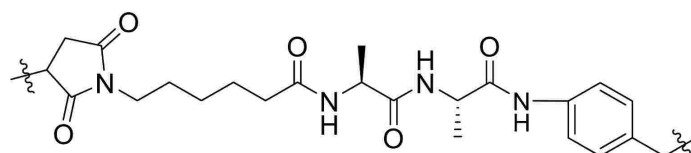
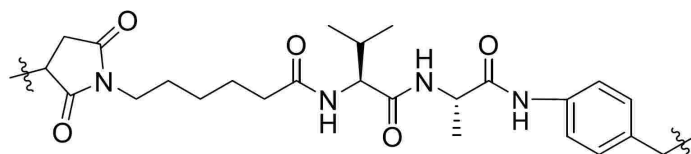
前記 L 部分が、下記構造から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。



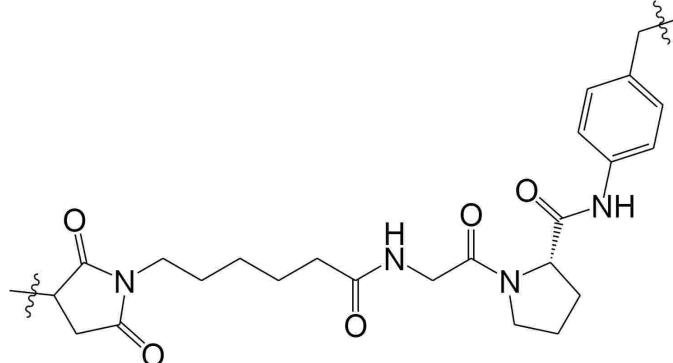
10



20



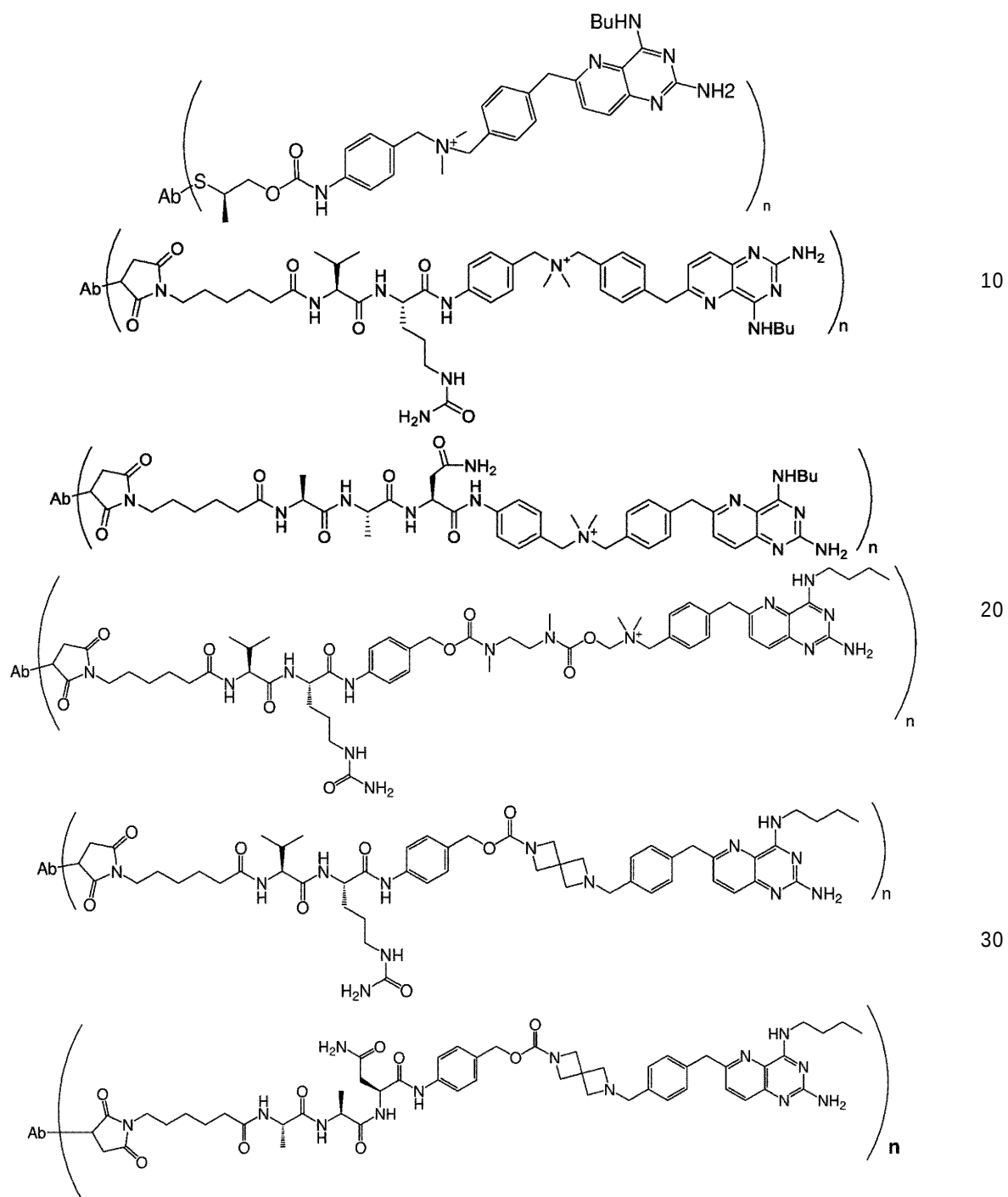
30



【請求項 20】

下記構造から選択される抗体薬物コンジュゲートであって、

40



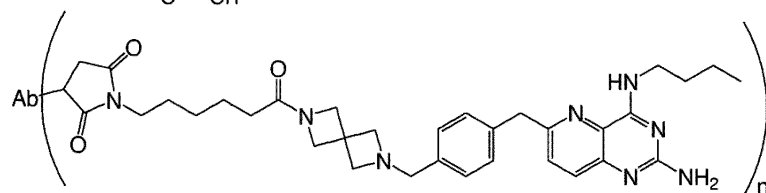
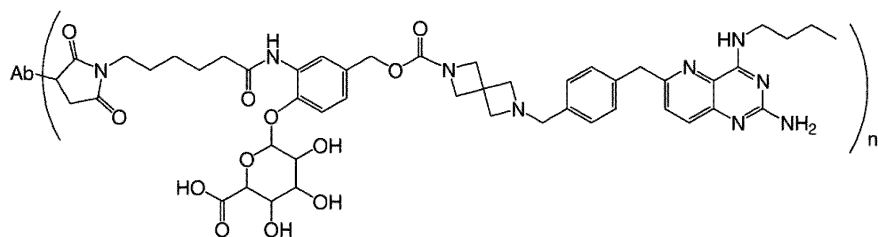
10

20

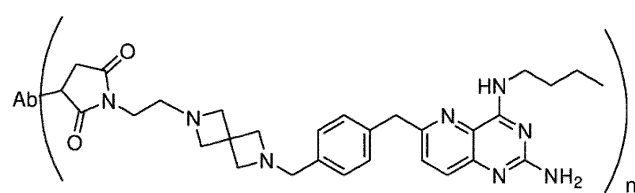
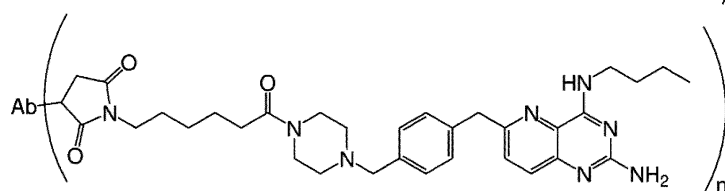
30

40

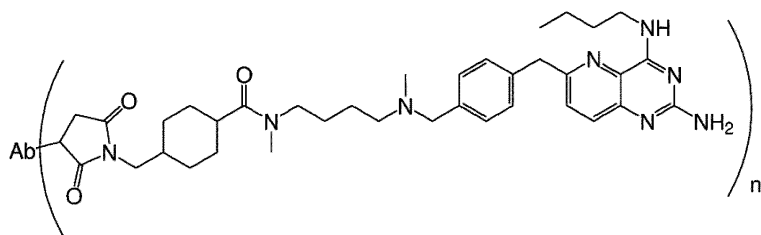
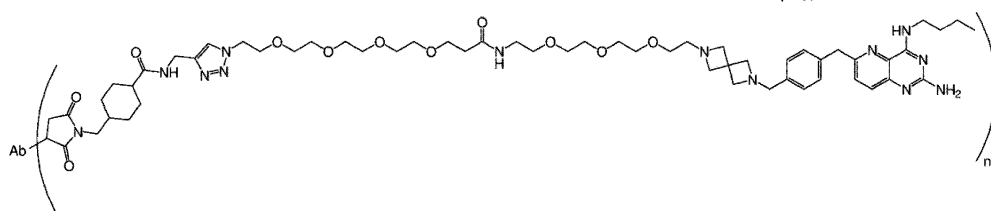
50



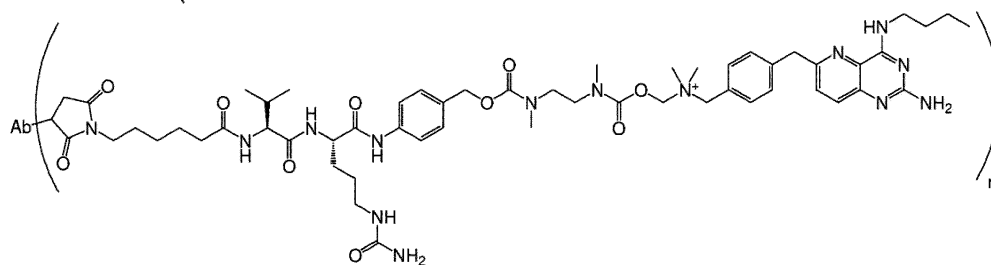
10



20

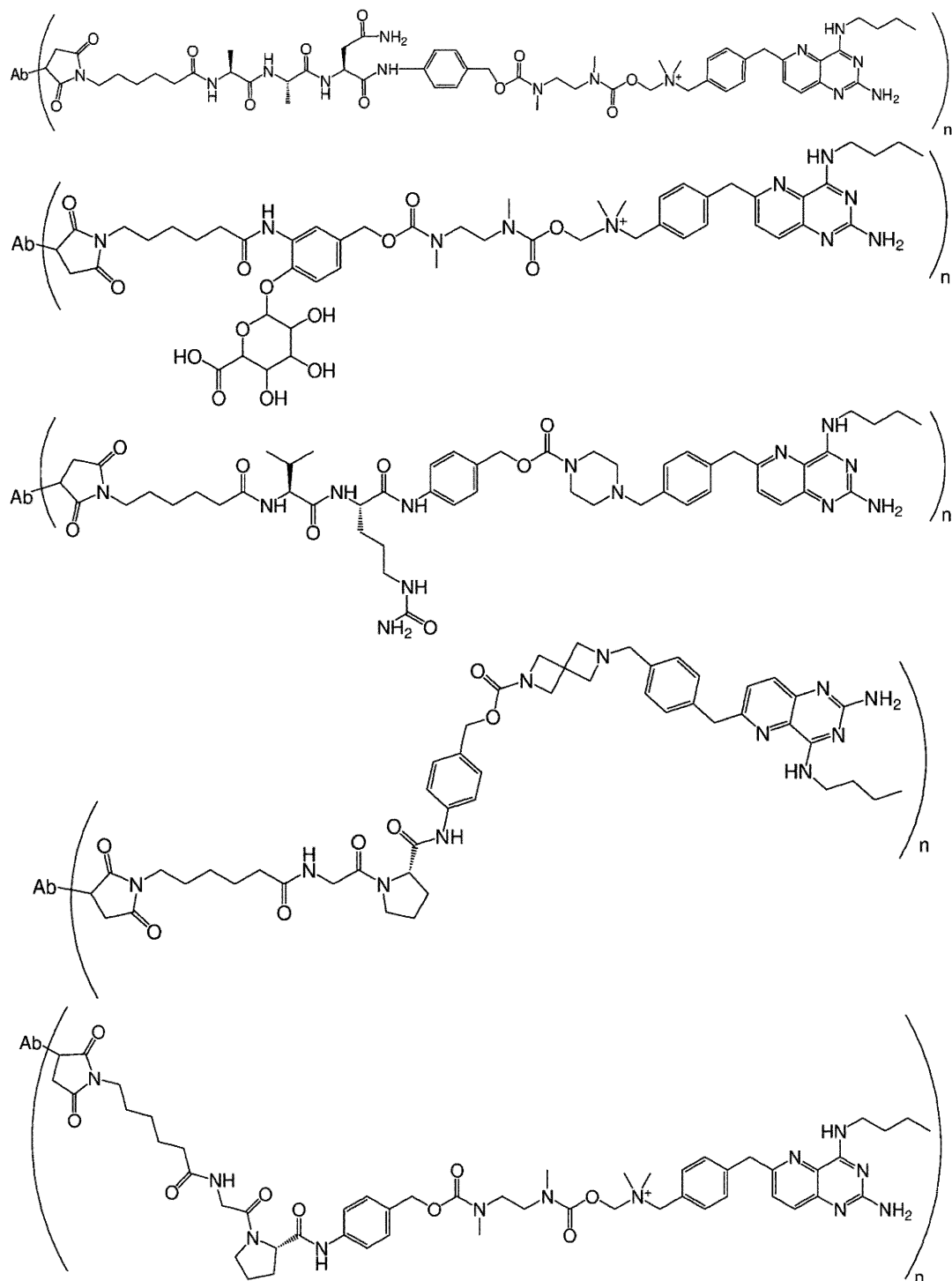


30



40

50



ここで、

Ab は、抗体又はその抗原結合断片であり、前記抗体は、SEQ ID NO : 4 に示される重鎖配列と、SEQ ID NO : 9 に示される軽鎖配列と、を有するか、又はSEQ ID NO : 4 に示される重鎖配列と、SEQ ID NO : 3 に示される軽鎖配列と、を有し、

n は、1 ~ 10 の整数である、

ことを特徴とする抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される補助材料と、を含む医薬組成物。

【請求項 2 2】

疾患を予防及び／又は治療するための医薬であって、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含み、

前記疾患は、呼吸器疾患、免疫疾患、ウイルス性疾患、腫瘍から選択される、医薬。

【請求項 2 3】

前記呼吸器疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患、成人型呼吸窮迫症候群から選択される、ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の医薬。

【請求項 2 4】

前記免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節リウマチ、炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、多発性筋炎、血管炎、ウェグナー肉芽腫症、サルコイドーシス、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節炎、ベーチェット症候群から選択される自己免疫疾患である、ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の医薬。

10

【請求項 2 5】

前記ウイルス性疾患は、インフルエンザ、SARS、COVID-19、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、AIDS、狂犬病、デング熱、エボラ出血熱から選択される、ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の医薬。

【請求項 2 6】

前記腫瘍は、リンパ腫、芽腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫、脂肪肉腫、滑膜細胞肉腫、神経内分泌腫瘍、カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ、膵島細胞癌、中皮腫、神経鞘腫、聴神経腫、髄膜腫、腺癌、黒色腫、白血病又はリンパ性悪性腫瘍、扁平上皮癌、上皮扁平上皮癌、肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肛門癌、陰茎癌、メルケル細胞癌、食道癌、胆道腫瘍、頭頸部癌、及び血液悪性腫瘍から選択される、ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の医薬。

20

【請求項 2 7】

前記肺癌は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌から選択される、ことを特徴とする請求項 2 6 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

本発明は、生化学医薬の技術分野に関し、具体的には、抗体薬物コンジュゲート(ADC)、特に免疫療法用の抗体と免疫調節剤とのコンジュゲート、例えば抗PD-L1抗体とTLR7及び／又はTLR8アゴニストとのコンジュゲート、その医薬組成物、製造方法及び使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

Toll様受容体は進化中に保守的な受容体ファミリーであり、少なくとも13個のメンバーを含み、ヒトで10種類(TLR1~10)を発見し、TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR10は細胞表面に発現し、細菌代謝の産物を迅速に認識し、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9は細胞内に発現し、主にウイルス核酸に対する監視及び認識を行い、TLR3は二本鎖RNAを認識し、TLR7とTLR8は一本鎖RNAを認識し、TLR9はメチル化されていないCG補酵素Iを認識し、細菌DNAとあるウイルスの反応を調節する。

40

【0003】

TLRは病原関連分子パターン(PAMP)を特異的に認識し、自然免疫と獲得免疫の両方において重要な役割を果たしており、自然免疫と獲得免疫をつなぐ架け橋となっている。そのうち、TLR7はウイルスに結合する一本鎖RNA又は人工的に合成された小分子プリン類化合物を認識した後、特異なリンカータンパク質を募集し、一連のシグナルカスケード反応を活性化し、ハイレベルの全身性適応免疫応答を開始し、ウイルスに感染した細胞を殺傷することで、ウイルスを完全に除去する。臨床では、TLR7アゴニストを

50

利用して慢性ウイルス性感染症、例えばＢ型肝炎、Ｃ型肝炎などの治療を開始した。さらに、ＴＬＲ７アゴニストはインフルエンザワクチンのアジュバントとして、より迅速かつ効果的な免疫保護を誘導することができる。抗腫瘍においては、ＴＬＲ７アゴニストは直接ｐＤＣを刺激してＩＦＮ-αを分泌させるだけでなく、ｐＤＣの共刺激と抗原提示能力を増強し、活性化したｐＤＣはＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を促進し、更にＣＤ８＋Ｔ細胞を活性化し、腫瘍細胞を殺傷するため、ＴＬＲ７アゴニストは免疫アジュバントとして生体認識と殺傷の過程における作用も次第に重視されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

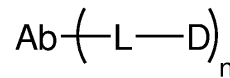
【０００４】

本発明者らは、これまでの研究開発の成果に基づいて、研究を続けた結果、より優れた治療効果を有し、毒性や副作用を著しく低減し、免疫調節剤（例えば、ＴＬＲ７及び／又はＴＬＲ８アゴニスト）の治療窓を拡大させる抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）（特に、抗ＰＤ-Ｌ１抗体とＴＬＲ７及び／又はＴＬＲ８アゴニストとのコンジュゲートのような免疫療法用抗体と免疫調節剤とのコンジュゲートを開発した。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

具体的には、上記の抗体薬物コンジュゲートは、下記構造を有する。



(I)

（ただし、

Ａｂは、抗体又はその抗原結合断片であり、

Ｄは、小分子薬物であり、

Ｌは、ＡｂとＤを連結する連結単位であり、

ｎは、１～１００の整数である。）

【０００６】

具体的には、上記の抗体はモノクローナル抗体である。

【０００７】

具体的には、上記の抗体は、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体などの形態であってもよい。

【０００８】

具体的には、上記の抗原結合断片は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ'）₂断片、Ｆ_d断片、Ｆ_v断片、ｄＡｂ断片、一本鎖Ｆ_v（ｓｃＦ_v）、ジスルフィド結合が連結するＦ_v（ｓｄＦ_v）、ＣＤＲを含有する断片又は単離ＣＤＲなどを含む。

【０００９】

具体的には、上記の抗体は、腫瘍、感染性微生物又は自己免疫疾患などの関連抗原又はそのエピトープに対して反応性であり、具体的には、上記の抗体が標的となる抗原は、例えば、Ｃｌａｕｄｉｎ １８．２、ＧＰＣ３、ＨＥＲ-２／ｎｅｕ、炭酸脱水酵素Ⅹ、Ｂ７、ＣＣＣＬ１９、ＣＣＣＬ２１、ＣＳＡｐ、ＢｒＥ３、ＣＤ１、ＣＤ１_a、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ１１Ａ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２９、ＣＤ３０、ＣＤ３２_b、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４０_L、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ５２、ＣＤ５４、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ６４、ＣＤ６７、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ７９_a、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ９５、ＣＤ１２６、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ１４７、ＣＤ１５４、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ-６、α-フェトプロテイン（ＡＦＰ）、ＶＥＧＦ、ＥＤ-Ｂフィブロネクチン、ＥＧＰ-１、ＥＧＰ-２、ＥＧＦ受容体（ＥｒｂＢ１）、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、因子Ｈ、ＦＨＬ-１、Ｆ１

10

20

30

40

50

t - 3、葉酸受容体、Ga 733、GROB、HMGB - 1、低酸素誘導因子 (HIF)、HM1.24、インスリン様成長因子 (ILGF)、IFN - γ 、IFN - α 、IFN - β 、IL - 2R、IL - 4R、IL - 6R、IL - 13R、IL - 15R、IL - 17R、IL - 18R、IL - 2、IL - 6、IL - 8、IL - 12、IL - 15、IL - 17、IL - 18、IL - 25、IP - 10、IGF - 1R、Ia、HM1.24、ガングリオシド、HCG、HLA - DR、CD66a - d、MAGE、mCRP、MCP - 1、MIP - 1A、MIP - 1B、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、PD - 1、PD - L1、胎盤成長因子 (PIGF)、PSA、PSMA、PSMA二量体、PAM4抗原、NCA - 95、NCA - 90、A3、A33、Ep - CAM、KS - 1、Le(y)、メソテリン、S100、テナシン、TAC、Tn抗原、Thomas - Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、TNF - α 、TRAIL受容体 (R1とR2)、VEGFR、RANTES、T101、癌幹細胞抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、及び癌遺伝子産物などである。

10

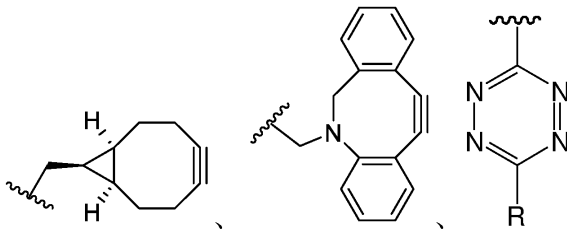
【0010】

本発明の一実施形態では、上記の抗体は抗PD - L1抗体である。

【0011】

具体的には、上記の抗体は、反応性基（例えば、メルカプト、アミノ、カルボキシ、アミド、ハロゲン、エステル、アシルハライド、無水物、エポキシ、マレイミド、アミノオキシ、アジド、アルキニル、

20



を含み、ここで、Rは、H、置換又は無置換のアルキル、置換又は無置換のアリール、置換又は無置換のアラルキル、置換又は無置換のシクロアルキル、置換又は無置換のシクロアルキルアルキル、置換又は無置換のヘテロシクリル、置換又は無置換のヘテロシクリルアルキル）から選択されてもよく、上記の抗体は、自体がそれらの反応性基を持ってもよいし、突然変異（例えば部位特異的突然変異）により、従来の抗体の1つ又は複数のアミノ酸残基を同じ又は異なる所望の反応性基を含有するアミノ酸（天然アミノ酸や非天然アミノ酸などを含む）に突然変異することによって取得されてもよい。本発明の一実施形態では、上記の抗体は、突然変異（例えば、Thiomab技術）により、抗体のアミノ酸配列の特定の位置にシステイン残基が挿入されている / システイン残基に置換されている。

30

【0012】

本発明の一実施例では、上記の抗体は、遺伝子工学手法によって、従来の抗PD - L1抗体（例えば、アテゾリズマブ (Atezolizumab)、デュルバルマブ (Durvalumab)、アベルマブ (Avelumab)、センプリマブ (Cemiplimab)、KN035、CS1001、BGB - A333、KL - A167、SHR - 1316、及びSTI - A1014など）の1つ又は複数のアミノ酸残基をそれぞれシステインに突然変異することによって得られる改変抗PD - L1抗体である。

40

【0013】

具体的には、上記の抗体は、重鎖と軽鎖を含み、

重鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 4に示され、又はSEQ ID NO : 4と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列であり、及び / 又は、

軽鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 9に示され、又はSEQ ID NO : 9

50

と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列である。

【0014】

より具体的には、上記の抗体は、SEQ ID NO: 9に示される軽鎖配列を有する。

【0015】

本発明の一実施例では、上記の抗体は、SEQ ID NO: 4に示される重鎖配列と、SEQ ID NO: 9に示される軽鎖配列と、を有する。

【0016】

具体的には、上記の n (すなわち、薬物/抗体比 (DAR)) は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、例えば、1~50、1~40、1~20、1~10、1~6、1~4であってもよく、本発明のいくつかの実施例では、 $n = 2$ 又は 4 である。

10

【0017】

本発明の一実施形態では、上記の抗体薬物コンジュゲートにおいて、L への抗体の連結部位は抗体のアミノ酸配列におけるシステイン残基での遊離メルカプトである。

【0018】

本発明の一実施例では、上記の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体は、SEQ ID NO: 4に示される重鎖配列と、SEQ ID NO: 9に示される軽鎖配列と、を有し、L への抗体の連結部位は、SEQ ID NO: 9に示されるアミノ酸配列の 226 位のシステイン残基での遊離メルカプトであり、好ましくは、 $n = 2$ である。

20

【0019】

本発明の別の実施例では、上記の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体は、SEQ ID NO: 4に示される重鎖配列と、SEQ ID NO: 3に示される軽鎖配列と、を有し、 n は、1~10、特に 1~6 である。

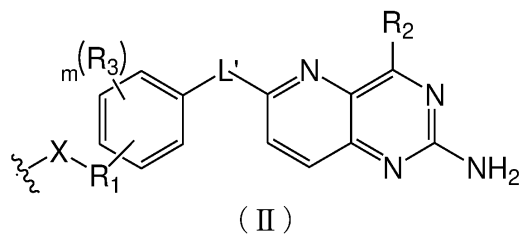
【0020】

具体的には、上記の小分子薬物は、免疫調節剤、例えば、Toll様受容体アゴニスト (Toll-like receptors、TLR)、具体的には、TLR7 及び/又は TLR8 アゴニスト、例えば、特許出願公開番号 WO 2019/095455 A1 に記載のピリドピリミジン誘導体及びその塩であってもよい。

30

【0021】

本発明の一実施形態では、一般式 I における D 部分が、下記構造を有する。



(ただし、

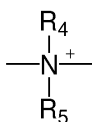
40

L' は、単結合又は C₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、C₃~C₆シクロアルキレンから選択される連結基であり、ここで、前記基はすべて、C₁~C₄アルキルによって任意に置換されてもよく、

R₁ は、単結合、C₁~C₆アルキレン、C₁~C₆アルケニレン、C₁~C₆アルキレンオキシから選択され、ここで、前記基はすべて、C₁~C₄アルキルによって任意に置換されてもよく、

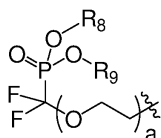
X は、

50

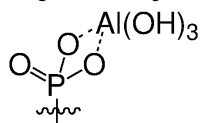


、 $-\text{NR}_4-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、単結合、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{NR}_4-$ ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキレン) $-\text{NR}_5-$ 、ヘテロシクリレン (特に窒素含有ヘテロシクリレン) から選択され、ここで、 R_4 及び R_5 は、独立に、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルコキシ、アミノ酸残基、オリゴペプチド残基、ハロアルキル、カルボキシ置換アルキル、エステル置換アルキル、

10



から選択され、ここで、 a は $1 \sim 10$ の整数 (例えば $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$) であり、 R_8 及び R_9 は、独立に、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、又は R_8 及び R_9 は、それらの中間にある原子とともに



20

を形成し、又は R_4 及び R_5 は、それらの両方に連結される窒素原子とともにヘテロシクリルを形成し、

R_2 は、 $-\text{NR}_6\text{R}_7$ 、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{SR}_6$ から選択され、ここで、 R_6 及び R_7 は、独立に、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルコキシ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルコキシアルキルから選択され、又は R_6 及び R_7 は、それらの両方に連結される窒素原子とともにヘテロシクリルを形成し、又は R_6 は、それに連結される酸素原子とともにヘテロシクリルを形成し、又は R_6 は、それに連結される硫黄原子とともにヘテロシクリルを形成し、

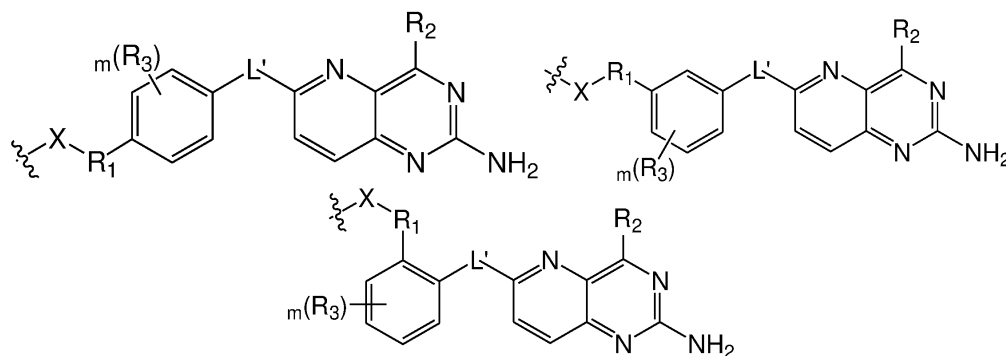
30

R_3 は、ベンゼン環上の 1 つ又は複数の独立した置換基であり、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルコキシ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルコキシアルキルから選択され、

m は、 $0 \sim 4$ の整数 (例えば $0, 1, 2, 3, 4$) である。)

【0022】

具体的には、式IIは、下記構造を有する。



40

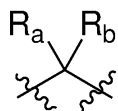
【0023】

本発明の一実施形態では、上記の L' は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキレン、例えば $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキレンである。

【0024】

50

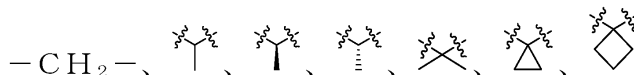
本発明の一実施形態では、上記の L' は、下記構造



を有し、ここで、 R_a 及び R_b は、独立に、 H 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル（例えばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル）から選択され、又は、 R_a 及び R_b は、それらに連結される炭素原子とともに $C_3 \sim C_6$ シクロアルキレン（例えばシクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン）を形成する。

【0025】

具体的には、 L' は、



から選択されてもよい。

【0026】

本発明の一実施形態では、上記の R_1 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、例えば $C_1 \sim C_3$ アルキレン、例えば $-CH_2-$ である。

【0027】

本発明の別の実施形態では、上記の R_1 は単結合である。

【0028】

本発明の一実施形態では、上記の R_1 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキレンオキシ、例えば $C_1 \sim C_3$ アルキレンオキシ、例えば $-CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2O-$ である。

【0029】

具体的には、 R_3 は、ベンゼン環上の1つ又は複数の独立した置換基であり、 H 、メチル、メトキシから選択される。

【0030】

本発明の実施例では、 m は0又は1である。

【0031】

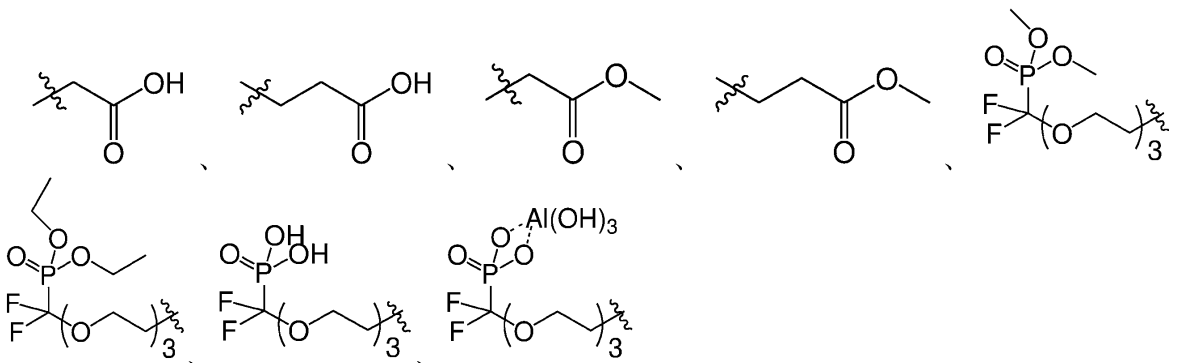
具体的には、 a は、1～5の整数、例えば1、2、3、4、5である。

【0032】

具体的には、 R_8 及び R_9 は、独立に、 H 、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルから選択される。

【0033】

具体的には、上記の R_4 及び R_5 は、独立に、 H 、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、 t -ブチル、アミノ酸残基、オリゴペプチド残基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、



から選択され、又は R_4 及び R_5 は、それらの両方に連結される窒素原子とともに置換

10

20

30

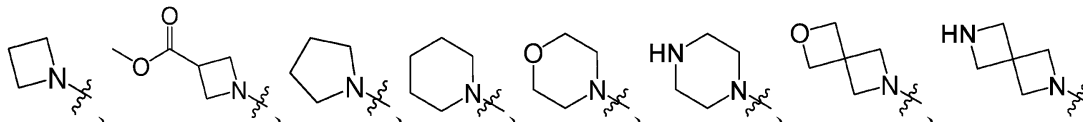
40

50

又は無置換のヘテロシクリルを形成する。

【 0 0 3 4 】

具体的には、上記の置換又は無置換のヘテロシクリルは、



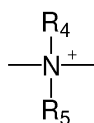
から選択されてもよい。

【 0 0 3 5 】

具体的には、上記のアミノ酸残基及びオリゴペプチドにおけるアミノ酸残基は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン残基から選択される1種又は複数種である。本発明の一実施例では、上記のアミノ酸残基はロイシン残基である。本発明の一実施例では、上記のオリゴペプチド残基は、-アスパラギン-アラニン-アラニン-ロイシン-である。

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施例では、Xは



であり、R₄及びR₅は、独立に、C₁～C₆アルキルから選択され、例えば、R₄及びR₅はいずれもメチルである。

【 0 0 3 7 】

本発明の別のいくつかの実施例では、Xは、-NR₄-であり、R₄は、H、C₁～C₆アルキルから選択され、例えばR₄は、H又はメチルである。

【 0 0 3 8 】

本発明の別のいくつかの実施例では、Xは、-NR₄-(C₁～C₆アルキレン)-NR₅-であり、R₄及びR₅は、独立に、C₁～C₆アルキルから選択され、例えば、R₄及びR₅はいずれもメチルである。

【 0 0 3 9 】

本発明の別のいくつかの実施例では、Xは、ヘテロシクリレン、特に窒素含有ヘテロシクリレンであり、例えば



であり、A環は、4～10員窒素含有複素環であり、A環は、単環、二環又は三環（縮合環、スピロ環、架橋環を含む）であってもよく、具体的には、Xは、

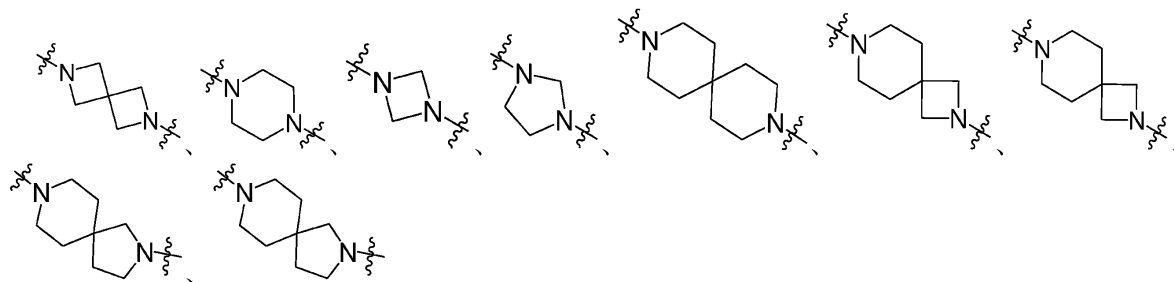
10

20

30

40

50

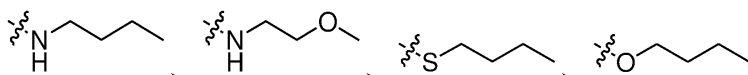


であってもよい。

10

【0040】

本発明の一実施形態では、 R_2 は、 $-NHR_6$ 、 $-OR_6$ 、 $-SR_6$ から選択され、ここで、 R_6 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又は $C_1 \sim C_6$ アルコキシアルキル、例えば $C_1 \sim C_4$ アルキル、例えばブチル、特に n -ブチル、例えば $C_1 \sim C_4$ アルコキシアルキル、例えばメトキシエチルである。本発明のいくつかの実施例では、 R_2 は、

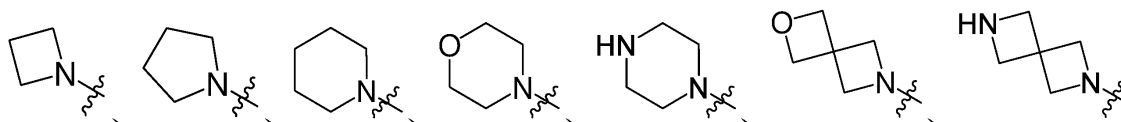


から選択される。

【0041】

20

本発明の別の実施形態では、 R_2 は、 $-NR_6R_7$ から選択され、ここで、 R_6 及び R_7 は、それらの両方に連結される窒素原子とともにヘテロシクリルを形成し、例えば、



である。

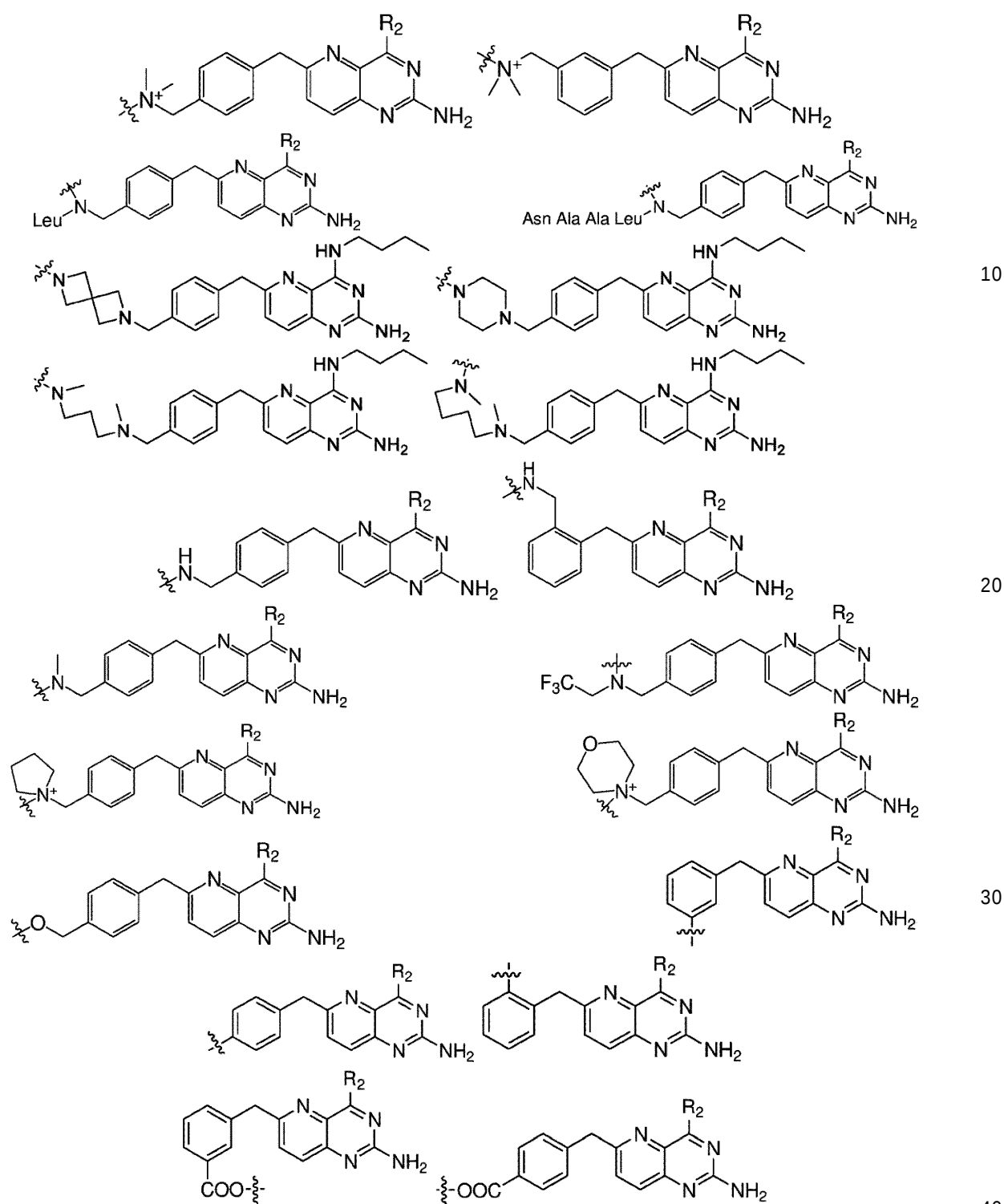
【0042】

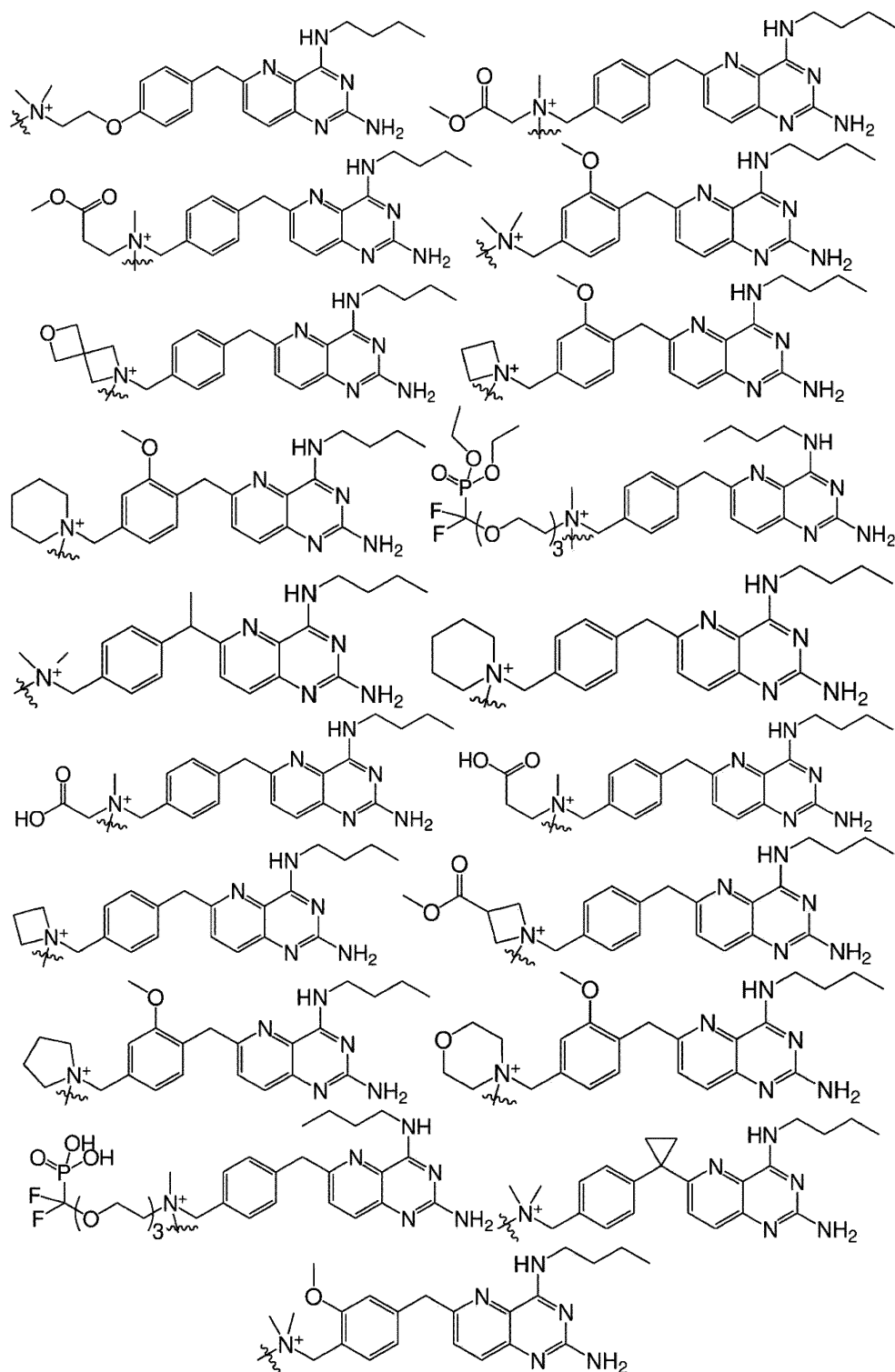
具体的には、一般式 I における D 部分が、下記構造から選択される。

30

40

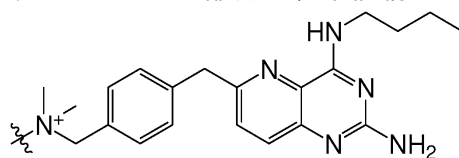
50





【 0 0 4 3 】

本発明の一実施例では、一般式 I における D 部分が、下記構造を有する。



【 0 0 4 4 】

本発明の一実施形態では、上記のコンジュゲートは、下記構造を有する。

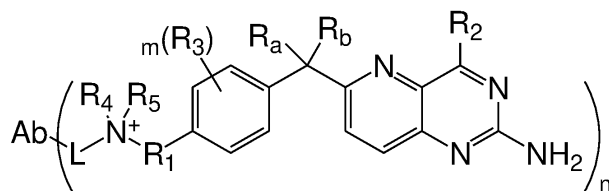
10

20

30

40

50



(III)

(ただし、Ab、n、m、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R_a、R_bは、本発明で上記定義を有する。)

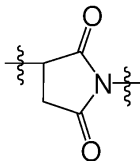
【0045】

10

具体的には、上記のコンジュゲートにおける連結単位は、化学的に安定ではない連結単位(例えば、ヒドラゾン、ジスルフィド)、酵素触媒連結単位(例えば、ペプチド残基、エステラーゼに対して安定ではない炭酸塩残基)などの形態であってもよい。

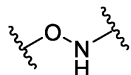
【0046】

具体的には、AbとDを連結する連結単位Lは、Abの反応性基(例えば、メルカプト、アミノ、カルボキシ等、特にメルカプト)と連結する基Y、例えば単結合、

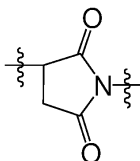


20

、-S-、-CO-、-NH-、-CONH-、



(アミノオキシ)を含み、本発明のいくつかの実施例では、Yは、-S-又は



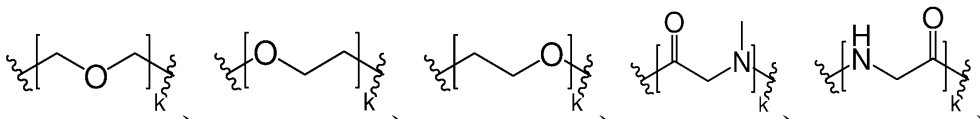
30

である。

【0047】

さらに、Lは、飽和又は不飽和の2価の直鎖又は分岐C₁~50炭化水素鎖である基Qをさらに含み、ここで、0~6個のメチレン単位は、独立に、-Cy-、-O-、-NR₁₀-、-S-、-OC(O)-、-C(O)O-、-C(O)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-NR₁₀S(O)₂-、-S(O)₂-NR₁₀-、-NR₁₀-C(O)-、-C(O)NR₁₀-、-OC(O)NR₁₀-、-NR₁₀-C(O)O-、

40



アミノ酸残基、オリゴペプチド残基によって置換され、ここで、kは、1~10の整数(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)から選択され、-Cy-は、それぞれ独立に、アリーレン、シクロアルキレン、ヘテロシクリレンの任意に置換された2価環から選択され、R₁₀は、H、-OH、C₁~C₆アルキル、C₃~C₆シクロアルキル、ヘテロシクロアルキルから選択される。

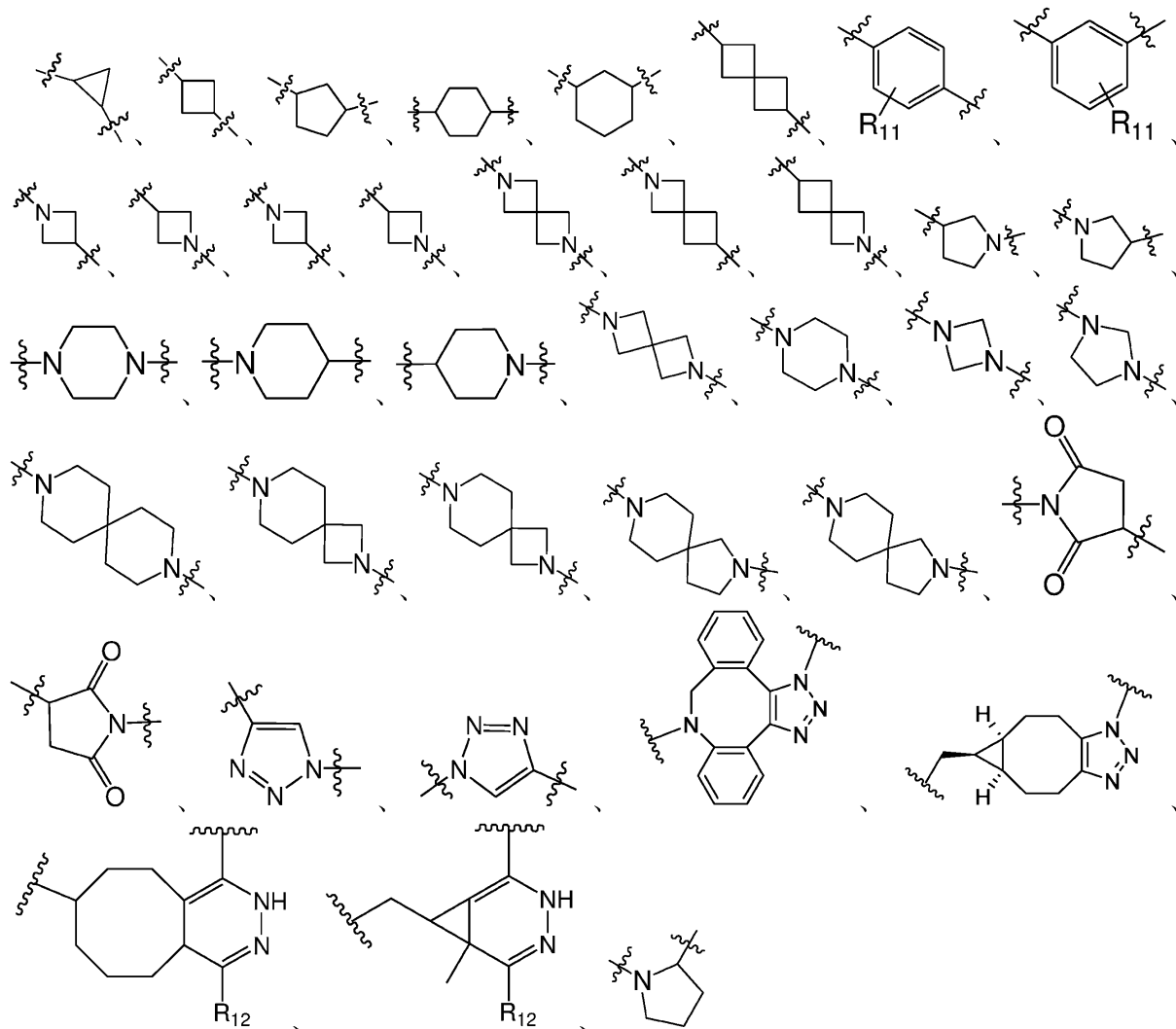
50

【 0 0 4 8 】

具体的には、- Cy - は、それぞれ独立に、フェニレン、二環式アリーレン、単環式シクロアルキレン、二環式シクロアルキレン、単環式ヘテロアリーレン、二環式ヘテロアリーレン、単環式ヘテロシクロアルキレン、二環式ヘテロシクロアルキレン、特に、フェニレン、単環式シクロアルキレン、単環式ヘテロアリーレン、単環式ヘテロシクロアルキレンの任意に置換された 2 価環から選択される。

【 0 0 4 9 】

より具体的には、- Cy - は、それぞれ独立に、



から選択され、ここで、R₁₁は、環上の 1 つ又は複数の独立した置換基であり、H、ハロゲン、- CN、- NO₂、- CF₃、- OCF₃、- NH₂、- OH、C₁ ~ C₆ アルキル、- O (C₁ ~ C₆ アルキル)、- NH (C₁ ~ C₆ アルキル)、- N (C₁ ~ C₆ アルキル) (C₁ ~ C₆ アルキル)、単糖又はその誘導体の残基から選択され、R₁₂は、H、置換又は無置換のアルキル、置換又は無置換のアリール、置換又は無置換のアラルキル、置換又は無置換のシクロアルキル、置換又は無置換のシクロアルキルアルキル、置換又は無置換のヘテロシクリル、置換又は無置換のヘテロシクリルアルキルから選択される。

【 0 0 5 0 】

具体的には、単糖又はその誘導体は、アラビノース、キシロース、リボース、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、グルクロン酸、ガラクツロン酸から選択されてもよい。本発明のいくつかの実施例では、単糖又はその誘導体の残基は、ガラクツロン酸残基、例えば

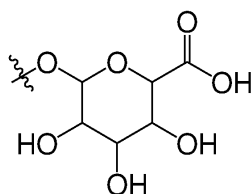
10

20

30

40

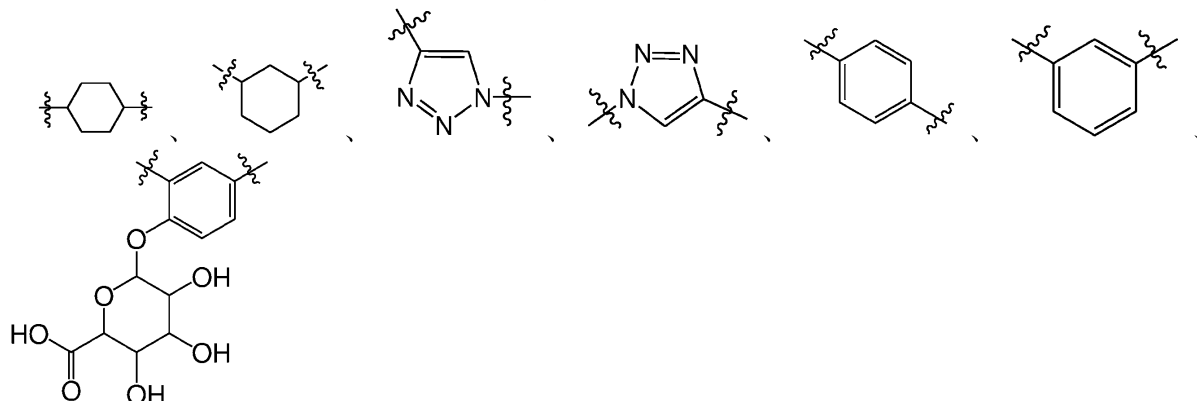
50



である。

【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施例では、 $-C_y-$ は、それぞれ独立に、



10

20

から選択される。

【 0 0 5 2 】

具体的には、 R_{10} は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択されてもよく、本発明のいくつかの実施例では、 R_{10} は、 H 又はメチルである。

【 0 0 5 3 】

具体的には、上記の Q の定義では、アミノ酸残基及びオリゴペプチド残基におけるアミノ酸残基は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、シトルリン、オルニチン残基から選択される 1 種又は複数種であり、特に、バリン、シトルリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、グリシン残基から選択される 1 種又は複数種であり、特に、アミノ酸残基及びオリゴペプチド残基におけるアミノ酸残基は、 L 型アミノ酸の残基である。

30

【 0 0 5 4 】

具体的には、上記の Q の定義では、オリゴペプチド残基は、2 ~ 10 個のアミノ酸残基からなり、特に 2 ~ 6 個のアミノ酸残基、例えば 2、3、4 又は 5 個のアミノ酸残基からなる。

【 0 0 5 5 】

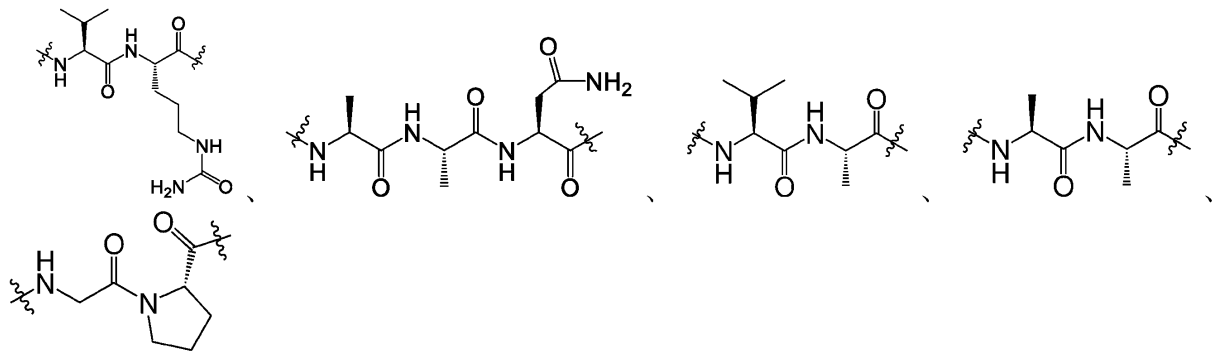
具体的には、上記の Q の定義では、オリゴペプチド残基は、バリン - シトルリン残基、アラニン - アラニン - アスパラギン残基、アスパラギン酸 - バリン残基、グルタミン酸 - バリン残基、グリシン - プロリン残基などから選択される。

40

【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施例では、オリゴペプチド残基は、

50

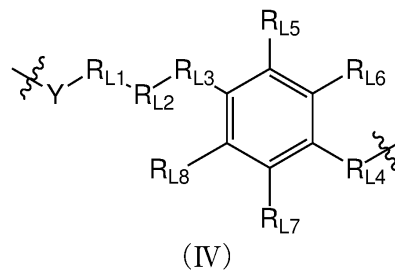


10

である。

【 0 0 5 7 】

本発明の一実施形態では、一般式 I における L 部分が、下記構造を有する。

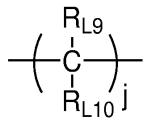


20

(ただし、

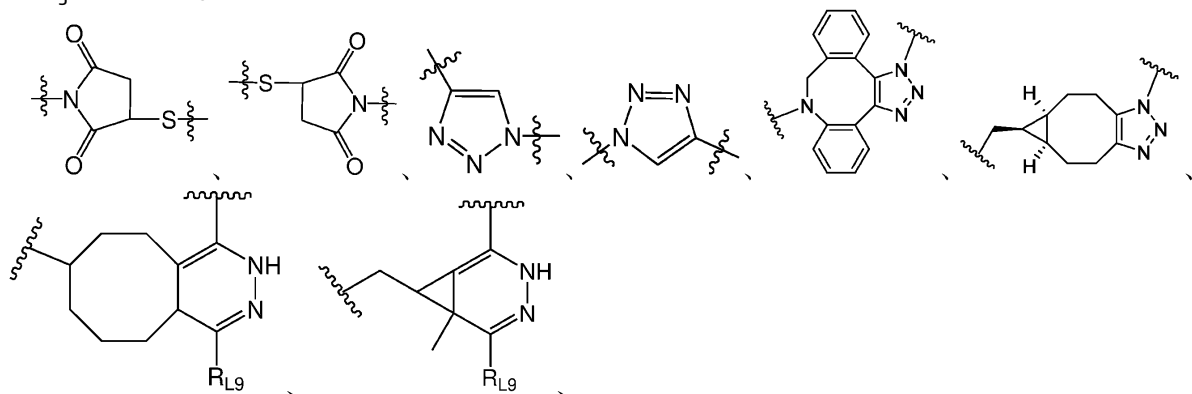
Y は、A b の反応性基 (例えば、メルカプト、アミノ、カルボキシなど、特にメルカプト) と連結する基であり、

R_{L1} 、 R_{L3} 及び R_{L4} は、独立に、



30

、 $-(CH_2)_jO-$ 、 $-(CH_2)_jN(R_{L9})-$ 、 $-(CH_2)_jCO-$ 、 $-(CH_2)_jOCO-$ 、 $-(CH_2)_jOCON(R_{L9})-$ 、 $-(CH_2)_jN(R_{L9})CON(R_{L10})-$ 、 $-(CH_2)_jN(R_{L9})CO-$ 、 $-O(CH_2)_jCOO-$ 、 $-(CH_2)_jCOO-$ 、 $-(CH_2)_jCON(R_{L9})-$ 、 $-(CH_2)_jS-S-$ 、 $-(CH_2)_jN(R_{L9})-NH=$ 、



40

シクロアルキレン、及びアリーレンのうちの 1 種又は複数種の組み合わせから選択され、 j は、0 ~ 10 の整数であり、

R_{L2} は、単結合、 $-(CH_2)_iOCO-$ 、 $-(CH_2)_iOCO O-$ 、 $-(CH_2)_i$

50

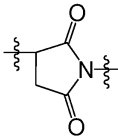
i NH - COO - 、アミノ酸残基、オリゴペプチド残基から選択され、ここで、 i は、0 ~ 10 の整数であり、

R_{L5} 、 R_{L6} 、 R_{L7} 及び R_{L8} は、独立に、H、置換又は無置換のアルキル、ハロゲン、ニトロ、シアノ、 $-OR_{L9}$ 、 $-NR_{L9}R_{L10}$ 、 $-S(O)_tR_{L9}$ 、 $-C(O)OR_{L9}$ 、 $-C(O)R_{L9}$ 、及び $-C(O)NR_{L9}R_{L10}$ から選択され、ここで、 t は、0、1 又は 2 であり、

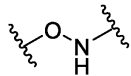
各 R_{L9} 及び R_{L10} は、独立に、H、置換又は無置換のアルキル、置換又は無置換のアリール、置換又は無置換のアラルキル、置換又は無置換のシクロアルキル、置換又は無置換のシクロアルキルアルキル、置換又は無置換のヘテロシクリル、置換又は無置換のヘテロシクリルアルキルから選択される。) 10

【0058】

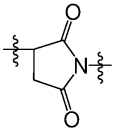
具体的には、 Y は、単結合、



、 $-S-$ 、 $-CO-$ 、 $-NH-$ 、 $-CONH-$ 、



(アミノオキシ) から選択される。本発明のいくつかの実施例では、 Y は、 $-S-$ 又は



である。

【0059】

具体的には、上記の R_{L2} の定義では、アミノ酸残基及びオリゴペプチド残基におけるアミノ酸残基は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、シトルリン、オルニチン残基から選択される1種又は複数種である。特に、アミノ酸残基及びオリゴペプチド残基におけるアミノ酸残基は、L型アミノ酸の残基である。 30

具体的には、上記の R_{L2} の定義では、オリゴペプチド残基は、2 ~ 10 個のアミノ酸残基からなり、特に2 ~ 6 個のアミノ酸残基、例えば2、3、4 又は5 個のアミノ酸残基からなる。

【0060】

具体的には、上記の R_{L2} の定義では、オリゴペプチド残基は、バリン - シトルリン残基、アラニン - アラニン - アスパラギン残基、アスパラギン酸 - バリン残基、グルタミン酸 - バリン残基、グリシン - プロリン残基などから選択されてもよい。 40

【0061】

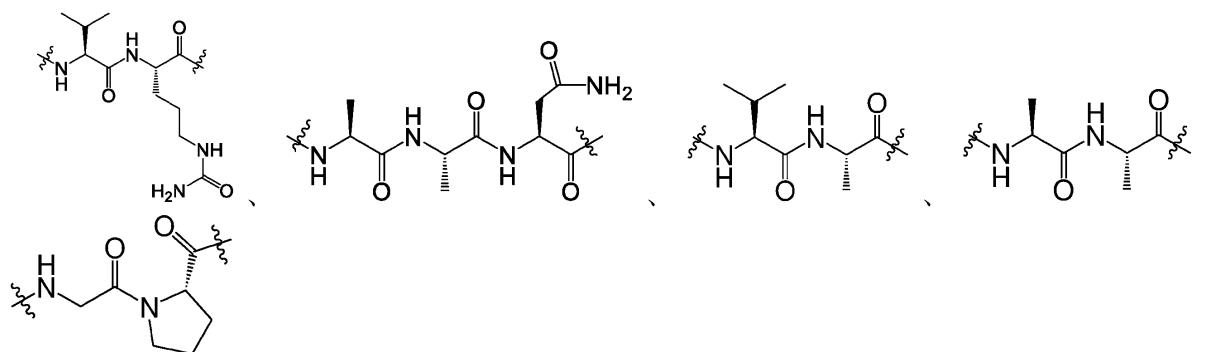
本発明の一実施例では、 R_{L2} は、 $-(CH_2)_iOCCO-$ であり、 i は0 ~ 6 の整数、特に1 である。

【0062】

本発明の一実施例では、 R_{L2} は、 $-(CH_2)_i$ であり、 i は1 ~ 10 の整数、特に2 である。

【0063】

本発明の別の実施例では、 R_{L2} は、バリン - シトルリン残基、アラニン - アラニン - アスパラギン残基、アスパラギン酸 - バリン残基、グルタミン酸 - バリン残基などから選択されるオリゴペプチド残基であり、特に



10

である。

【0064】

具体的には、 R_{L1} 、 R_{L3} 及び R_{L4} は、独立に、 $-(CH_2)_j-$ 、 $-(CH_2)_jO-$ 、 $-(CH_2)_jNH-$ 、 $-(CH_2)_jCO-$ 、 $-(CH_2)_jOCO-$ 、 $-(CH_2)_jOCONH-$ 、 $-(CH_2)_jNHCONH-$ 、 $-(CH_2)_jNHCO-$ 、 $-O(CH_2)_jCOO-$ 、 $-(CH_2)_jCOO-$ 、及び $-(CH_2)_jCONH-$ から選択される1種又は複数種の組み合わせであり、 j は、0～10の整数である。

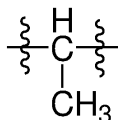
20

【0065】

具体的には、上記の各 j は、独立に、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10であってもよい。

【0066】

本発明の一実施例では、 R_{L1} は、



30

である。

【0067】

本発明の別の実施例では、 R_{L1} は、 $-(CH_2)_jCO-$ であり、 j は0～6の整数、特に5である。

【0068】

本発明の一実施例では、 R_{L3} は、 $-(CH_2)_jNH-$ であり、 j は0～6の整数、特に0である。

【0069】

本発明の一実施例では、 R_{L4} は、 $-(CH_2)_j-$ であり、 j は0～5の整数、特に1である。

40

【0070】

具体的には、 R_{L5} 、 R_{L6} 、 R_{L7} 及び R_{L8} は、独立に、H、C1-6アルキル、C1-6ハロアルキル、ハロゲン、ニトロ、シアノ、 $-OR_{L9}$ から選択され、 R_{L8} は、H、C1-6アルキルから選択され、より具体的には、 R_{L5} 、 R_{L6} 、 R_{L7} 及び R_{L8} は、独立に、H、ハロゲンから選択される。

【0071】

本発明の一実施例では、 R_{L5} はHである。

【0072】

本発明の一実施例では、 R_{L6} はHである。

50

【 0 0 7 3 】

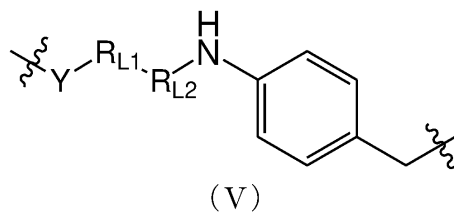
本発明の一実施例では、 R_{L7} はHである。

【 0 0 7 4 】

本発明の一実施例では、 R_{L8} はHである。

【 0 0 7 5 】

本発明の一実施形態では、上記のL部分が、下記構造を有する。

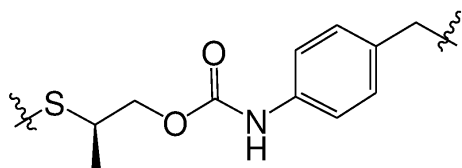


10

(ただし、Y、 R_{L1} 、 R_{L2} は、それぞれ、本発明で上記定義を有する。)

【 0 0 7 6 】

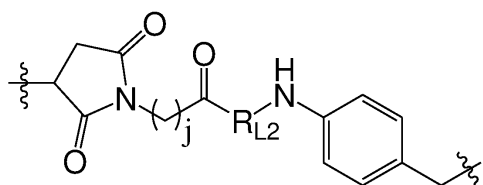
本発明の一実施例では、上記のL部分が、下記構造を有してもよい。



20

【 0 0 7 7 】

本発明の別の実施例では、上記のL部分が、下記構造をさらに有してもいい。



30

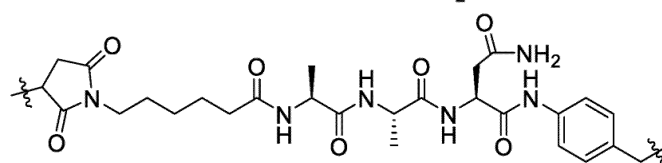
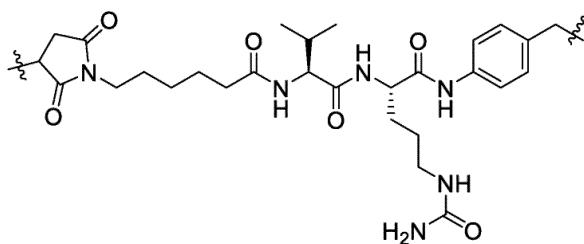
(ただし、 R_{L2} は、オリゴペプチド残基であって、本発明で上記定義を有する。)

【 0 0 7 8 】

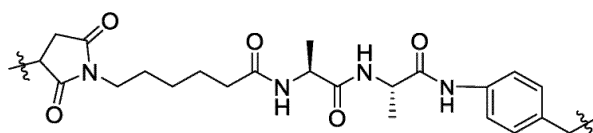
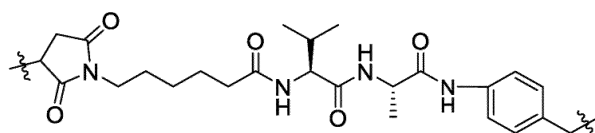
具体的には、上記のL部分が、下記構造を有する。

40

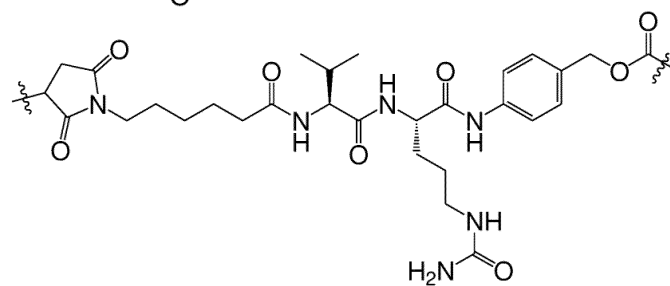
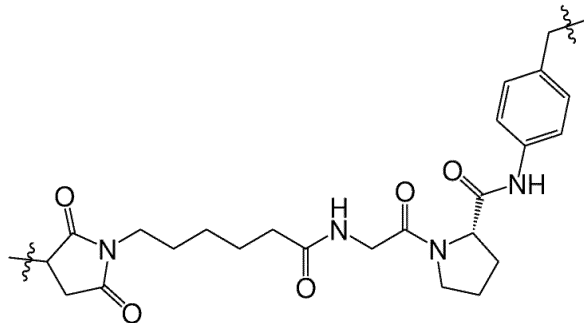
50



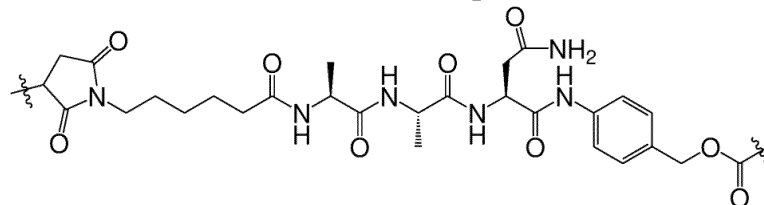
10



20

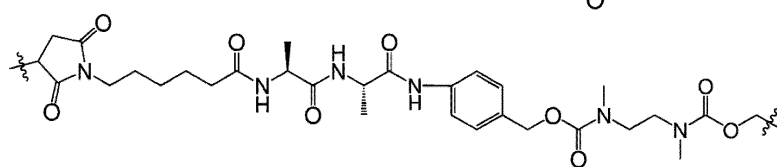
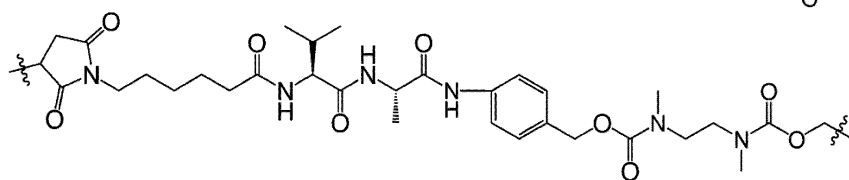
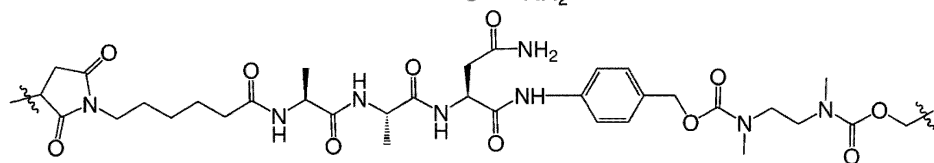
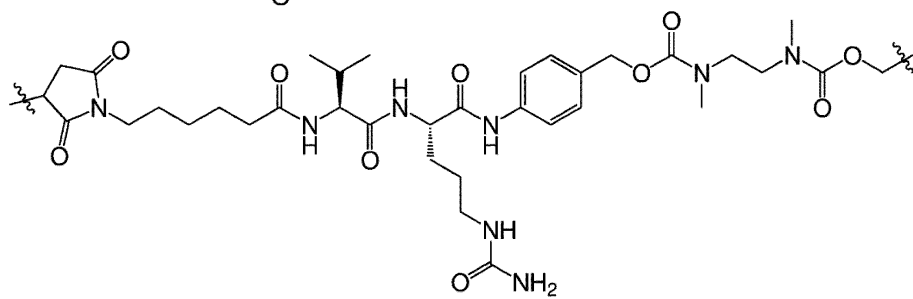
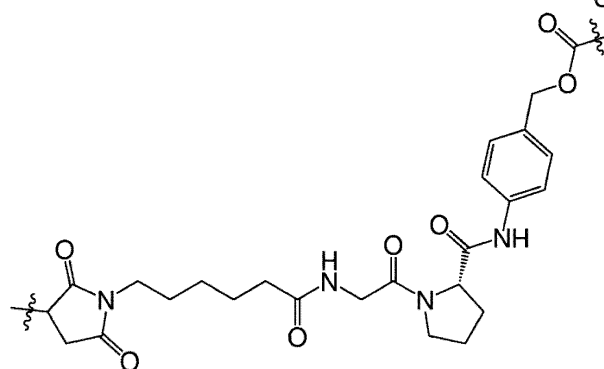
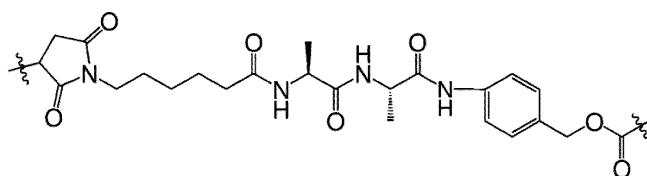
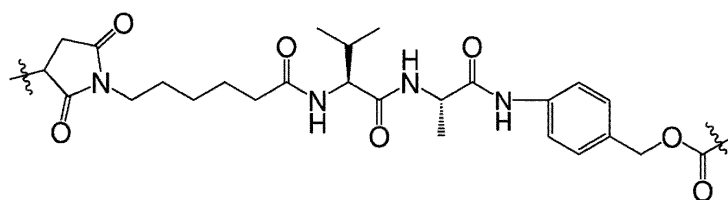


30



40

50



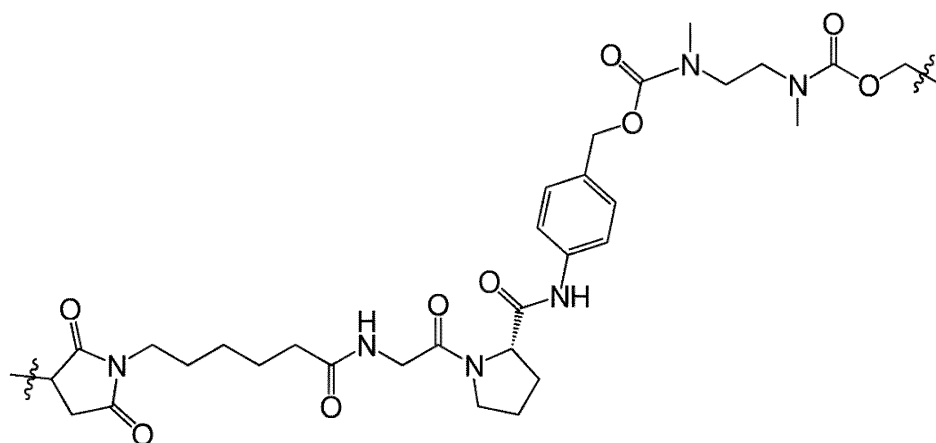
10

20

30

40

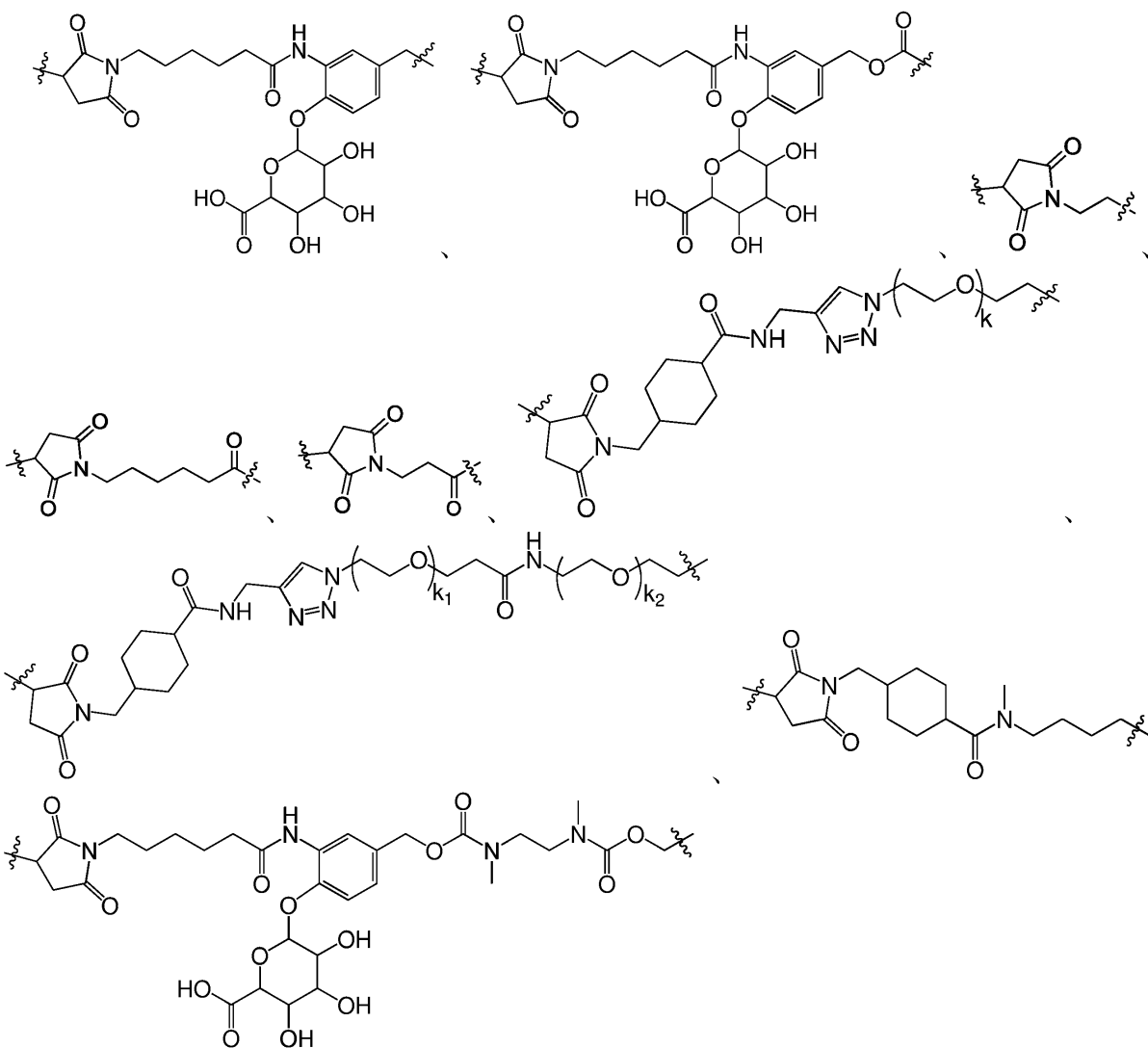
50



10

【 0 0 7 9 】

本発明の別のいくつかの実施例では、L部分が、下記構造を有する。



20

30

40

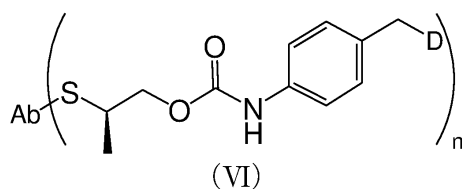
【 0 0 8 0 】

k_1 及び k_2 は、独立に、1 ~ 10 の整数から選択される。

【 0 0 8 1 】

本発明の一実施形態では、上記のコンジュゲートは、下記構造を有する。

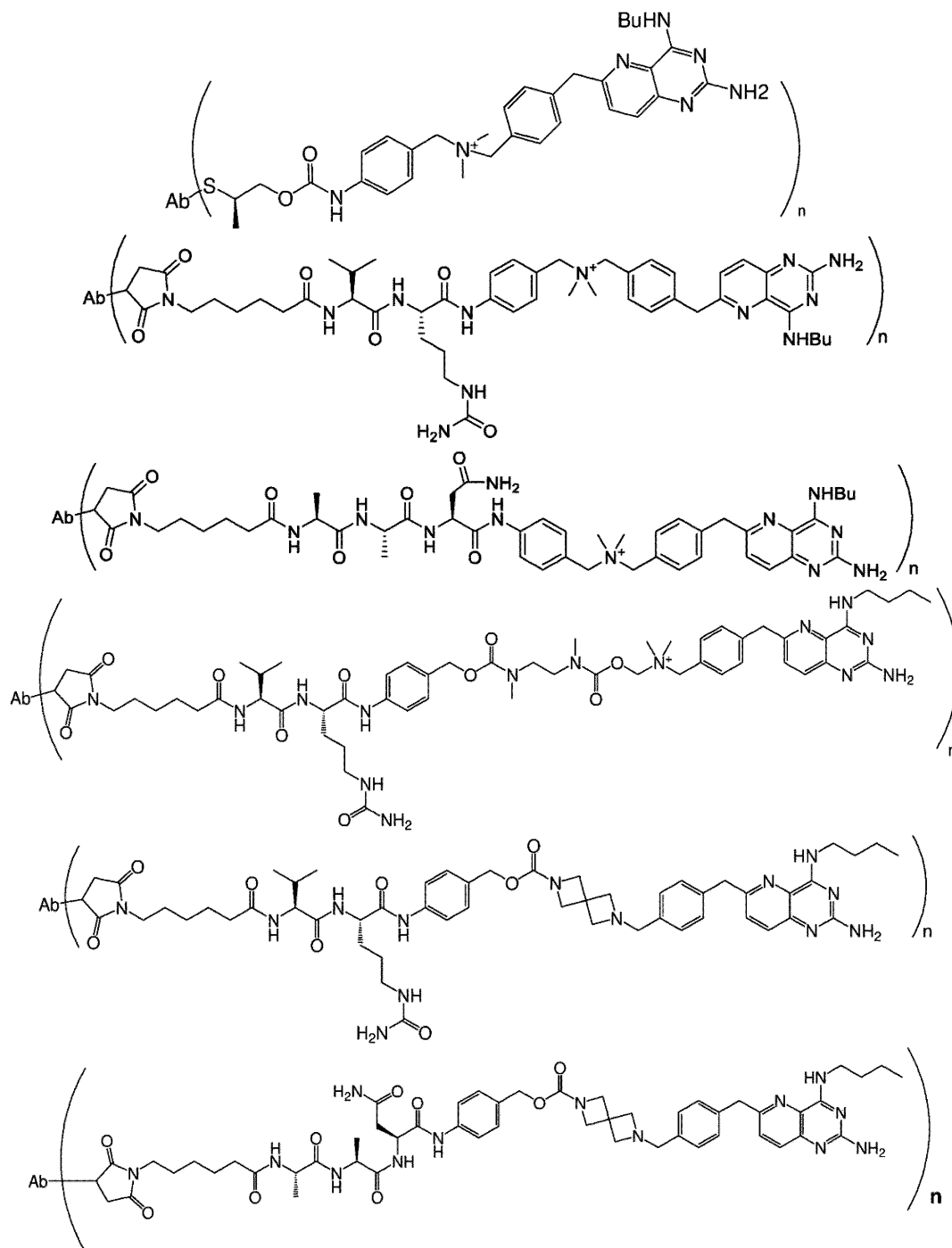
50

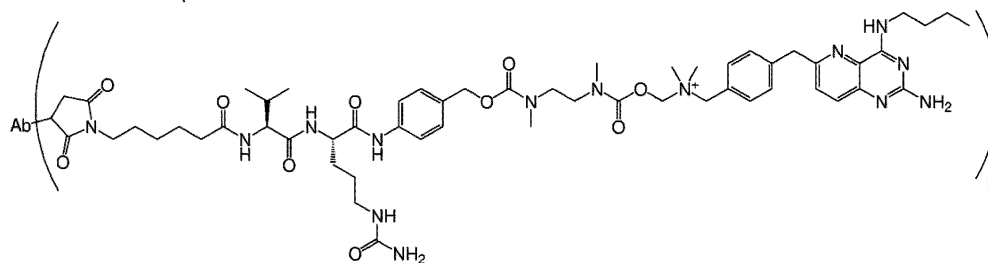
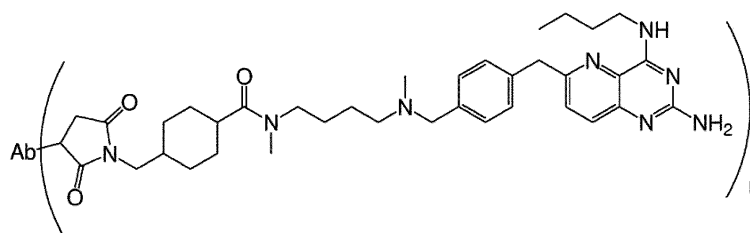
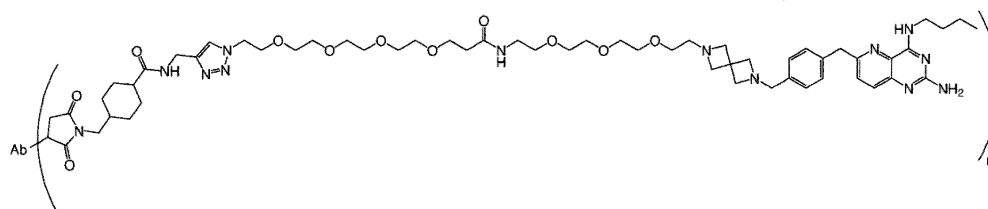
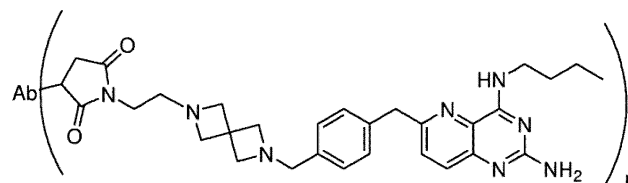
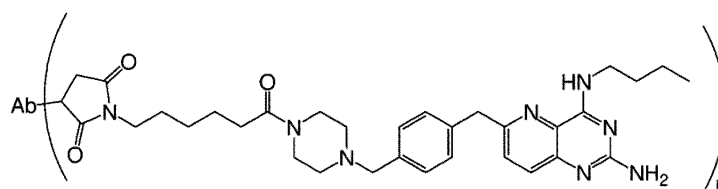
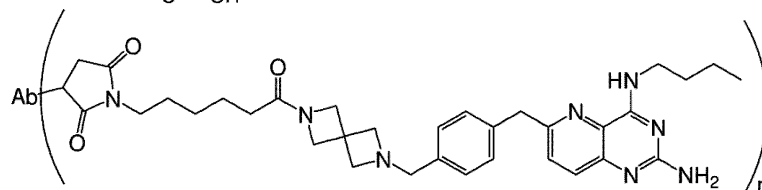
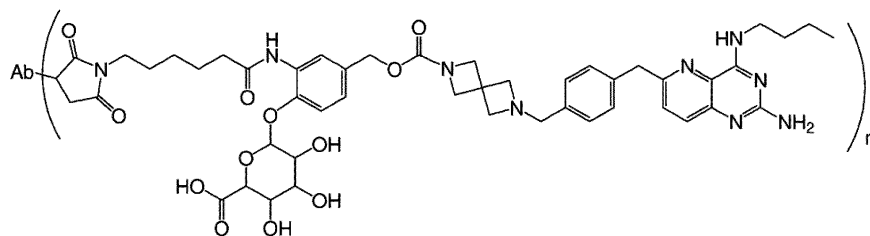


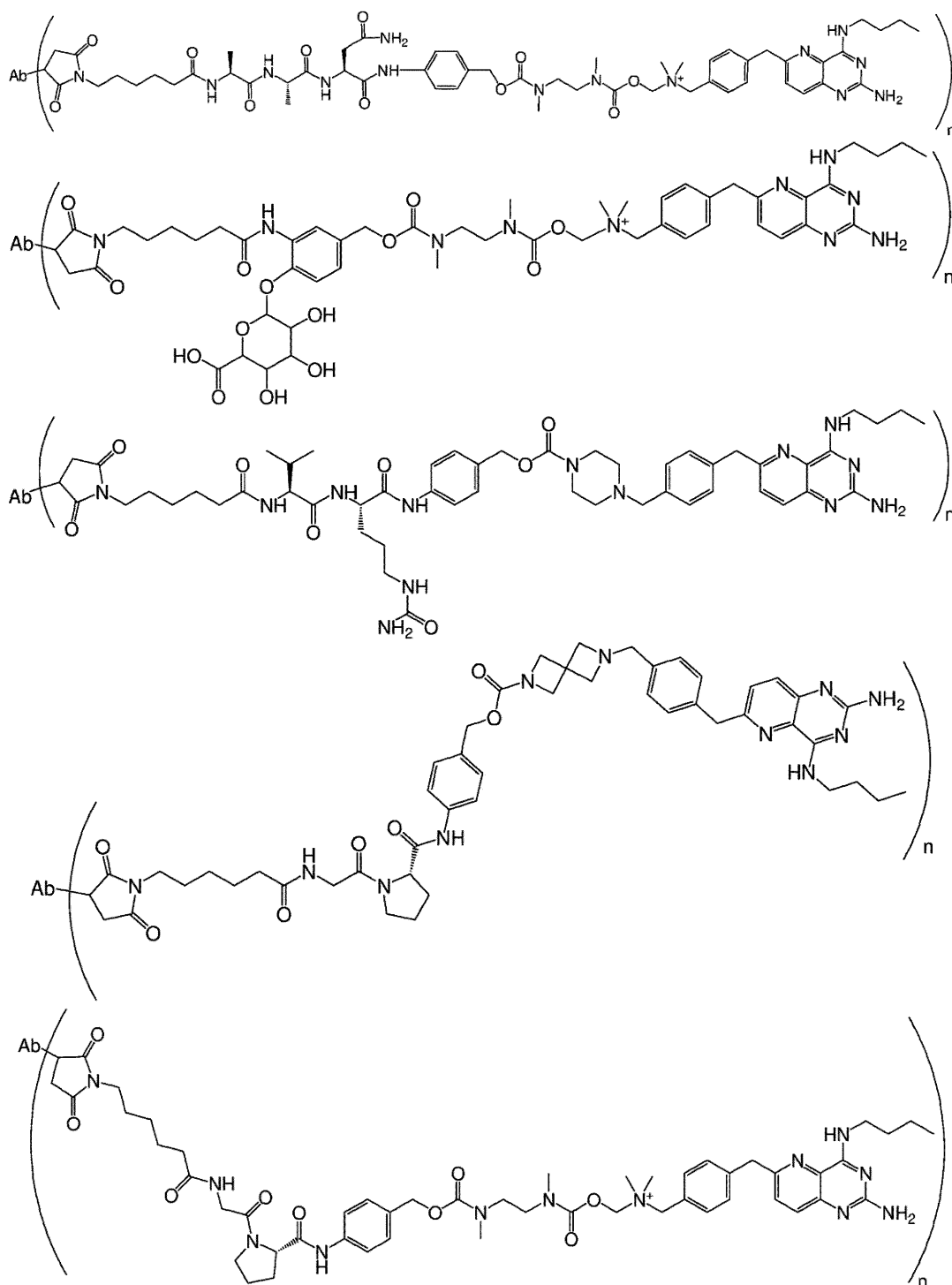
(ただし、A b、n、及びDは、それぞれ本発明で上記定義を有する。)

【 0 0 8 2 】

本発明のいくつかの実施例では、上記のコンジュゲートは、下記構造を有する。







(ただし、Ab、及びn、それぞれ本発明で上記定義を有する。)

【0083】

本発明は、さらに、上記のコンジュゲートの立体異性体（上記に示される）又はその混合物を提供する。

【0084】

本発明は、さらに、上記のコンジュゲートの薬学的に許容される塩、溶媒和物、及びプロドラッグを提供する。

【0085】

具体的には、上記の薬学的に許容される塩は、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、パントテン酸塩、コハク酸

塩、クエン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、アルギニン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、パントテン酸塩、及びアスコルビン酸塩のうちの 1 種又は複数種の有機塩又は無機塩を含んでもよい。

【 0 0 8 6 】

本発明は、さらに、小分子薬物と連結単位との結合物 (L - D) と抗体を結合させるステップを含む上記のコンジュゲートの製造方法を提供する。

【 0 0 8 7 】

具体的には、結合ステップの前に、上記の製造方法は、さらに、抗体のジスルフィド結合を還元し酸化するステップを含む。

10

【 0 0 8 8 】

具体的には、上記の製造方法は、下記ステップを含む。

(1) 抗体をジスルフィド結合還元剤とともにインキュベートする。

(2) ステップ (1) で得られた抗体を酸化剤とインキュベートする。

(3) ステップ (2) で得られた抗体を上記の結合物 L - D とともにインキュベートする。

【 0 0 8 9 】

具体的には、ステップ (1) は、(例えば、限外濾過によって) 過剰なジスルフィド結合還元剤を除去することをさらに含んでもよい。

【 0 0 9 0 】

20

具体的には、ステップ (1) では、前記ジスルフィド結合還元剤は、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 、ジチオスレイトール (D T T) 、 β - メルカプトエタノールなどであってもよい。

【 0 0 9 1 】

具体的には、ステップ (1) では、抗体とジスルフィド結合還元剤との当量比は、1 : 8 ~ 1 5 (具体的には、例えば 1 : 8 、 1 : 9 、 1 : 1 0 、 1 : 1 1 、 1 : 1 2) である。

【 0 0 9 2 】

具体的には、ステップ (1) におけるインキュベートの温度は、3 5 ~ 4 0 (具体的には、例えば 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0) であり、本発明の一実施例では、そのインキュベートの温度は 3 7 である。

30

【 0 0 9 3 】

具体的には、ステップ (1) におけるインキュベートの時間は、0 . 5 ~ 6 時間 (具体的には、例えば 0 . 5 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 時間) であり、本発明の一実施例では、そのインキュベート時間は 3 時間である。

【 0 0 9 4 】

具体的には、ステップ (2) は、(例えば、限外濾過によって) 余剰な酸化剤を除去することをさらに含んでもよい。

【 0 0 9 5 】

具体的には、ステップ (2) における酸化剤は、デヒドロアスコルビン酸 (D H A A) 、 $Cu(II)$ などであってもよい。

40

【 0 0 9 6 】

具体的には、ステップ (2) では、抗体と酸化剤との当量比は、1 : 4 0 ~ 6 0 (具体的には、例えば 1 : 4 0 、 1 : 4 5 、 1 : 5 0 、 1 : 5 5 、 1 : 6 0) である。

【 0 0 9 7 】

具体的には、ステップ (2) におけるインキュベートの温度は、2 0 ~ 3 0 (具体的には、例えば 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 8 、 3 0) であり、本発明の一実施例では、そのインキュベートの温度は室温である。

【 0 0 9 8 】

具体的には、ステップ (2) におけるインキュベートの時間は、1 ~ 6 時間 (具体的には、例えば 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 時間) であり、本発明の一実施例では、そのインキュ

50

ベートの時間は3時間である。

【0099】

具体的には、ステップ(3)では、抗体と小分子L-Dとの当量比は、1:10~20(具体的には、例えば1:10、1:12、1:14、1:15、1:16、1:18、1:20)である。

【0100】

具体的には、ステップ(3)におけるインキュベートの温度は、20~30(具体的には、例えば20、22、24、25、26、28、30)であり、本発明の一実施例では、そのインキュベートの温度は室温である。

【0101】

具体的には、ステップ(3)におけるインキュベートの時間は、6~48時間(具体的には、例えば6、12、18、20、22、24、26、28、30、36、42、48時間)であり、本発明の一実施例では、そのインキュベートの時間は24時間である。

【0102】

本発明の一実施形態では、上記の製造方法は、小分子薬物と連結単位との結合物(L-D)を製造するステップをさらに含む。

【0103】

本発明は、さらに、遺伝子工学手法(例えばThiomab技術)によって、従来の抗PD-L1抗体(例えば、アテゾリズマブ(Atezolizumab)、デュルバルマブ(Durvalumab)、アベルマブ(Avelumab)、センプリマブ(Cemiplimab)、KN035、CS1001、BGB-A333、KL-A167、SHR-1316、及びSTI-A1014など)の1つ又は複数のアミノ酸残基をそれぞれシステインに突然変異し、例えば、アベルマブ(Avelumab)の重鎖及び/又は軽鎖におけるアミノ酸をシステインに突然変異することによって得られる改変抗PD-L1抗体を提供する。

【0104】

具体的には、上記の抗体は、重鎖と軽鎖を含み、

重鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:4に示され、又はSEQ ID NO:4と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列であり、及び/又は、

軽鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:9に示され、又はSEQ ID NO:9と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列である。

【0105】

具体的には、上記の抗体は、SEQ ID NO:9に示される軽鎖配列を有する。

【0106】

本発明の一実施例では、上記の抗体は、SEQ ID NO:4に示される重鎖配列と、SEQ ID NO:9に示される軽鎖配列と、を有する。

【0107】

本発明は、さらに、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の製造における上記の改変抗PD-L1抗体の使用を提供する。

【0108】

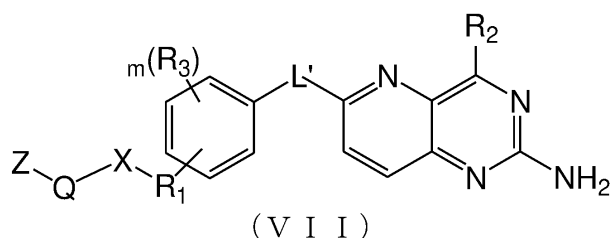
本発明は、さらに、下記構造を有する小分子化合物、及びその薬学的に許容される塩、立体異性体、溶媒和物、プロドラッグを提供する。

10

20

30

40

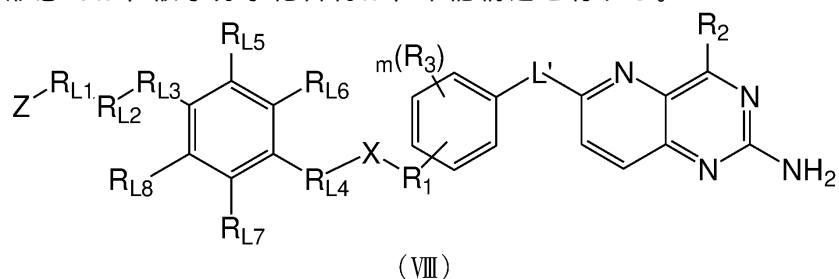


(ただし、 m 、 X 、 L' 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 Q は、それぞれ、本発明で上記定義を有し、 Z は反応性基である。)

10

【0109】

本発明の一実施形態では、該小分子化合物は、下記構造を有する。



20

(ただし、 m 、 X 、 L' 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{L1} 、 R_{L2} 、 R_{L3} 、 R_{L4} 、 R_{L5} 、 R_{L6} 、 R_{L7} 、 R_{L8} は、それぞれ、本発明で上記定義であり、 Z は反応性基である。)

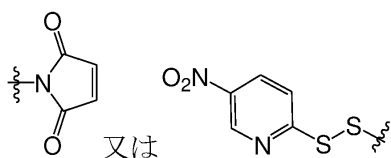
【0110】

具体的には、 Z は、アミノ酸の反応性基（例えば、メルカプト、アミノ、カルボキシなど、特にメルカプト）との反応連結基であり、具体的には、例えば、メルカプト反応性基は、マレイミド、カルボキシ、アミド、ハロゲン、ジスルフィドなどであってもよく、アミノ反応性基は、エステル、アシルハライド、無水物、カルボキシ、エポキシなどであってもよく、カルボキシアミノ反応性基は、ヒドロキシ、アミノ、ハロゲン、アシルハライドなどであってもよい。

30

【0111】

本発明のいくつかの実施例では、 Z は、

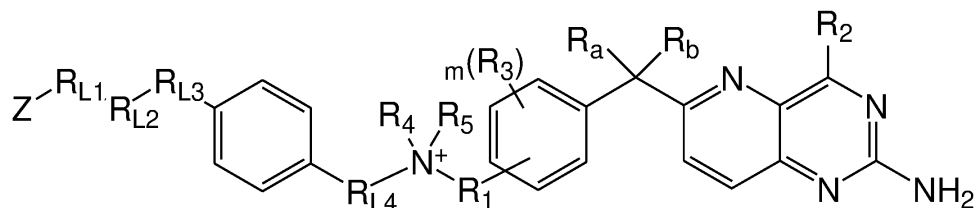


である。

【0112】

具体的には、式VIIに示される化合物は、下記構造を有する。

40

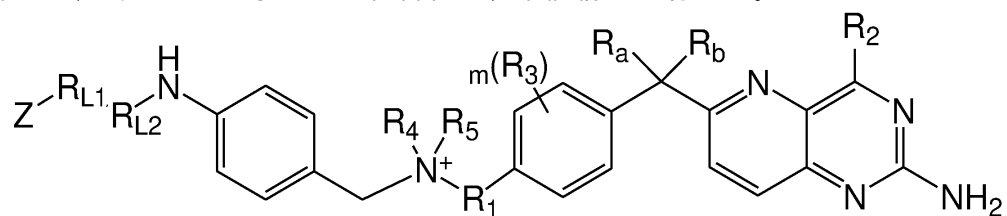


(ただし、 Z 、 R_{L1} 、 R_{L2} 、 R_{L3} 、 R_{L4} 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_a 、 R_b 、 m は、それぞれ、本発明で上記定義を有する。)

【0113】

50

より具体的には、式ⅤⅠⅠに示される化合物は、下記構造を有する。

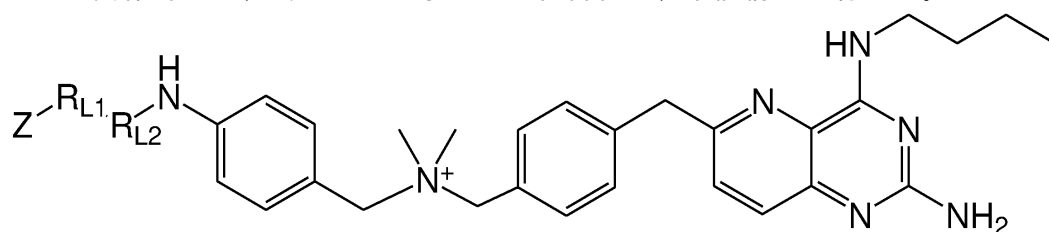


(ただし、Z、R_{L1}、R_{L2}、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R_a、R_b、mは、本発明で上記定義を有する。)

10

【0114】

さらに具体的には、式ⅤⅠⅠに示される化合物は、下記構造を有する。



(ただし、Z、R_{L1}、R_{L2}は、本発明で上記定義を有する。)

20

【0115】

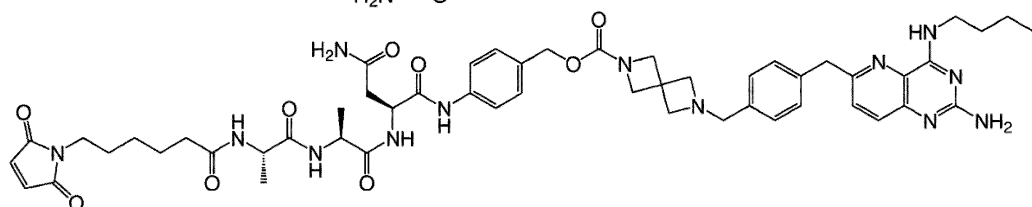
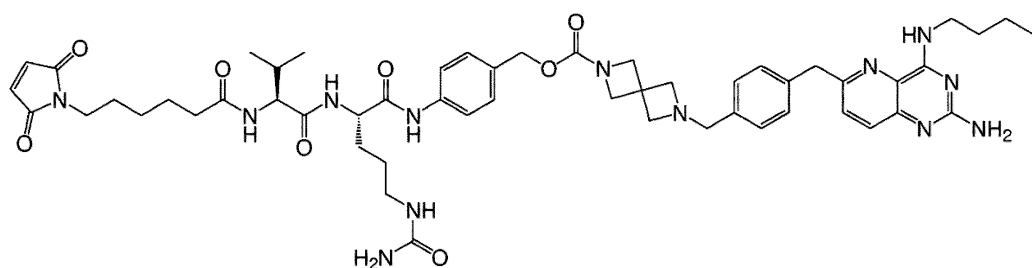
本発明のいくつかの実施例では、式ⅤⅠⅠに示される化合物は、下記構造を有する。

30

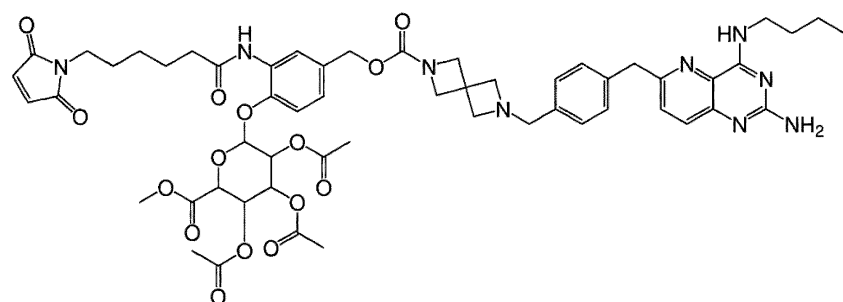
40

50

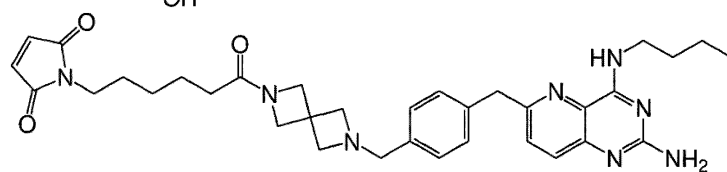
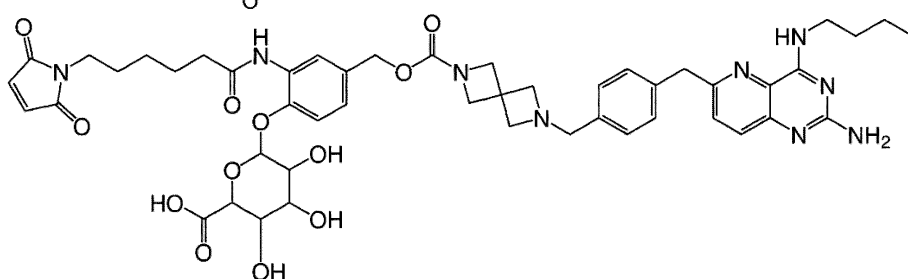




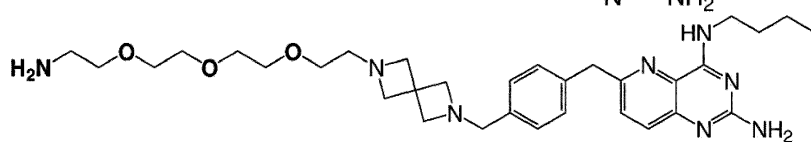
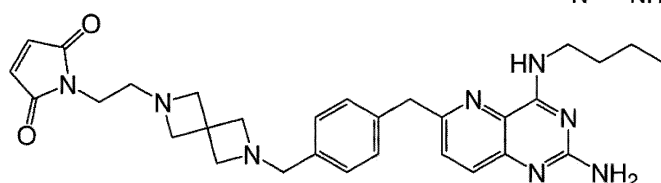
10



20

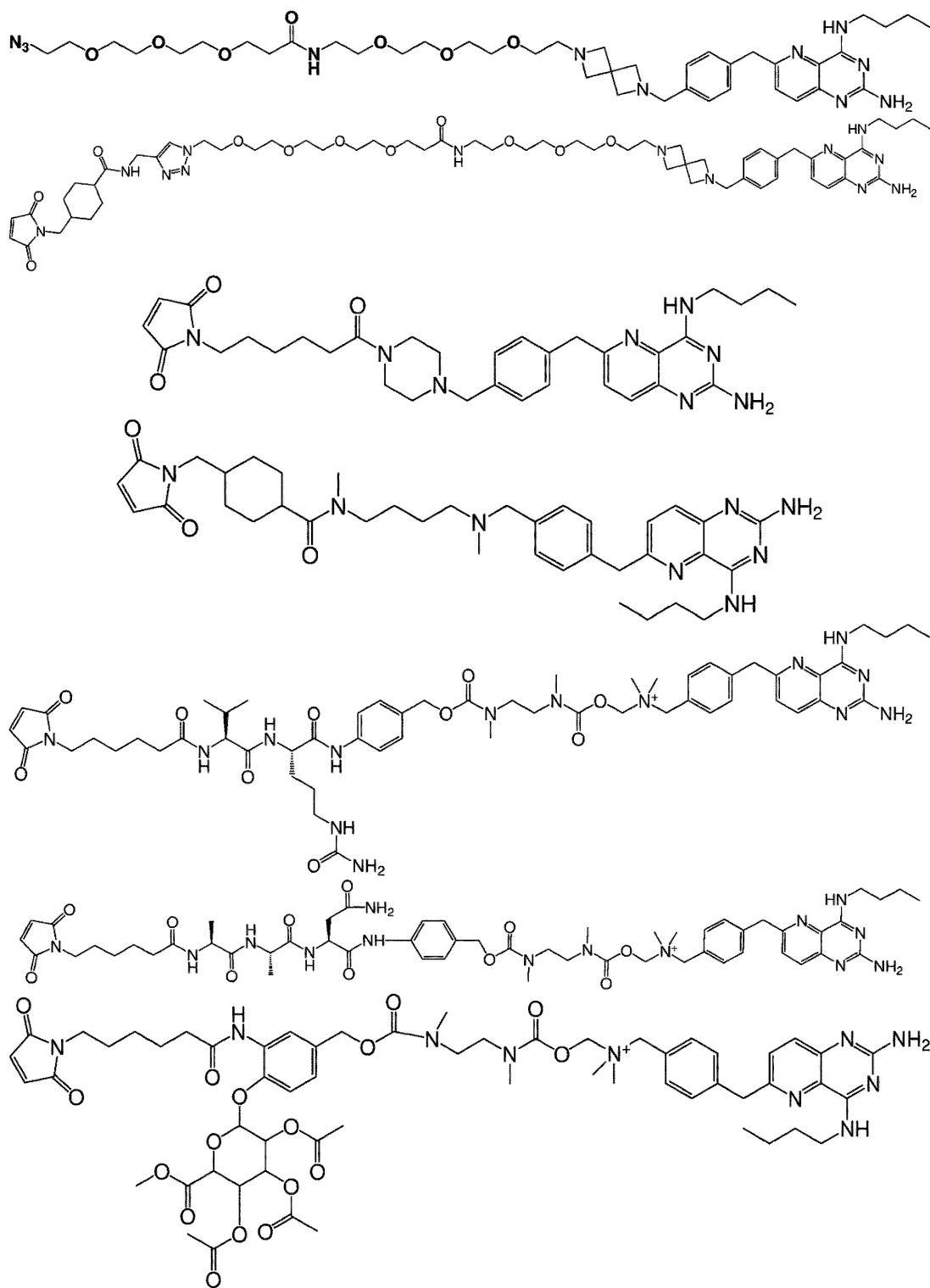


30



40

50



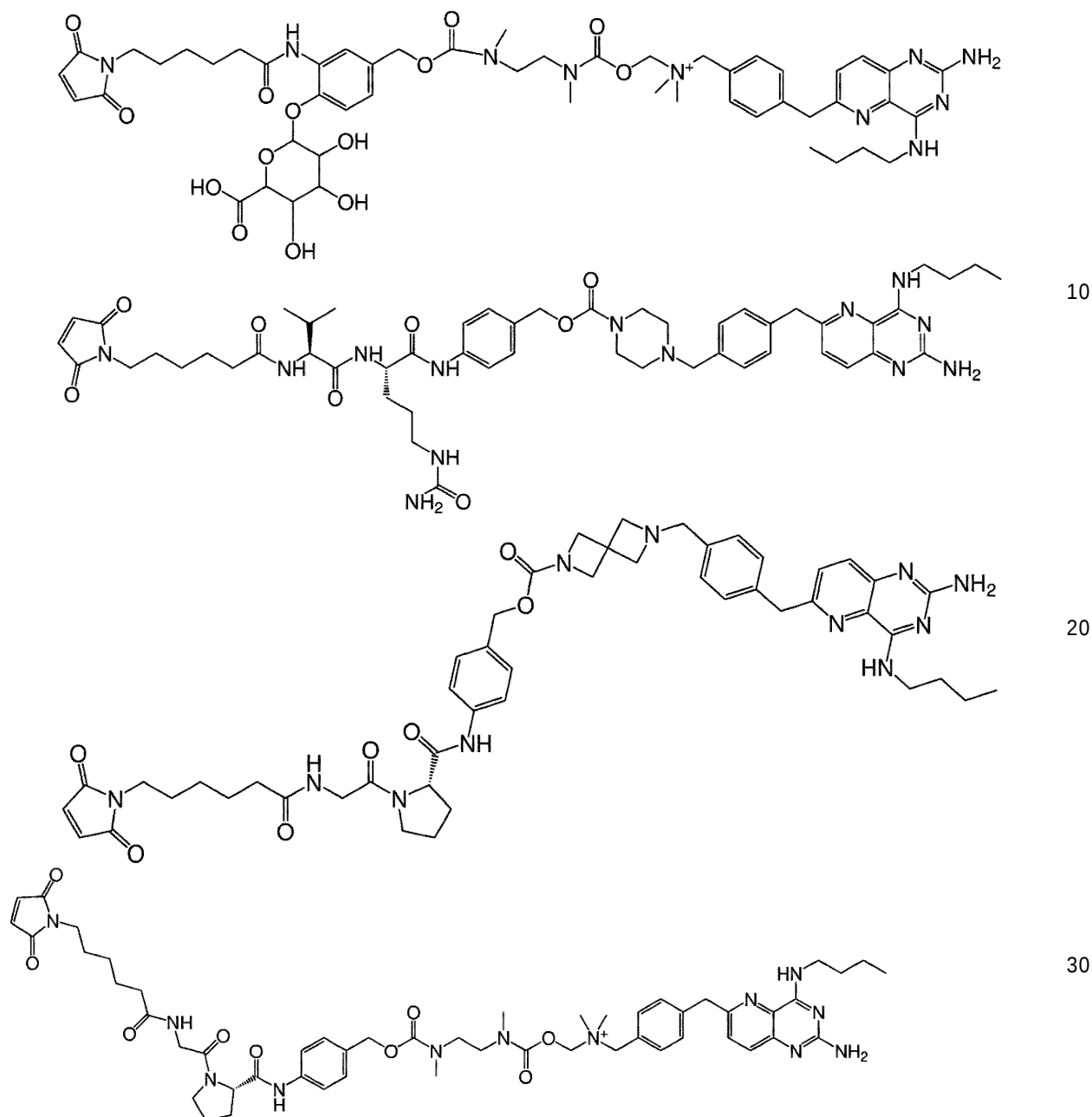
10

20

30

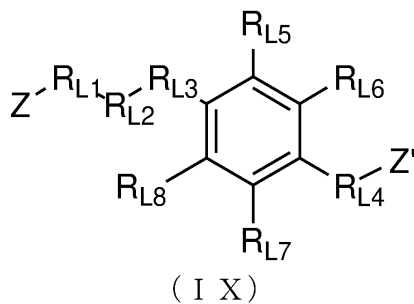
40

50



【 0 1 1 6 】

本発明は、さらに、抗体薬物コンジュゲートの連結単位部分として有用で、下記構造を有する化合物、及びその薬学的に許容される塩、立体異性体を提供する。



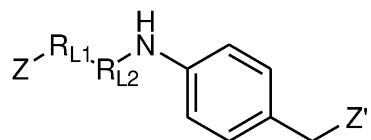
(ただし、Z、R_{L1}、R_{L2}、R_{L3}、R_{L4}、R_{L5}、R_{L6}、R_{L7}、R_{L8}は、本発明で上記定義を有し、Z'は反応性基である。)

【 0 1 1 7 】

具体的には、Z'は、ハロゲン（例えば塩素）、カルボキシ、エステル、ヒドロキシ、エポキシ、アミン基などであってもいい。

【 0 1 1 8 】

具体的には、式 I X に示される化合物は、下記構造を有する。



（ただし、Z、RL1、RL2、Z'は、本発明で上記定義を有する。）

10

【 0 1 1 9 】

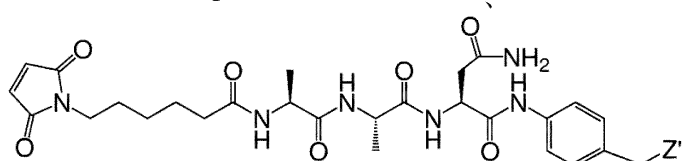
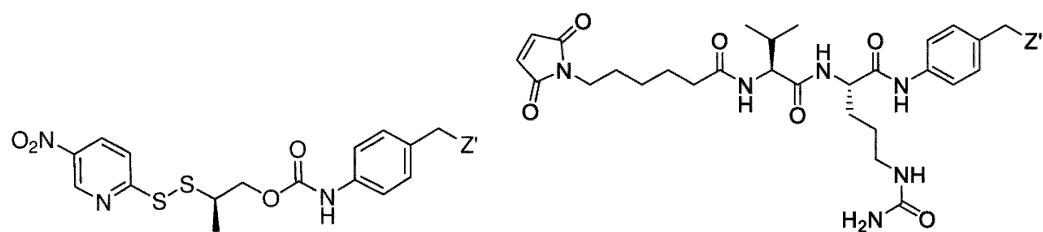
本発明のいくつかの実施例では、式 I X に示される化合物は、下記構造を有する。

20

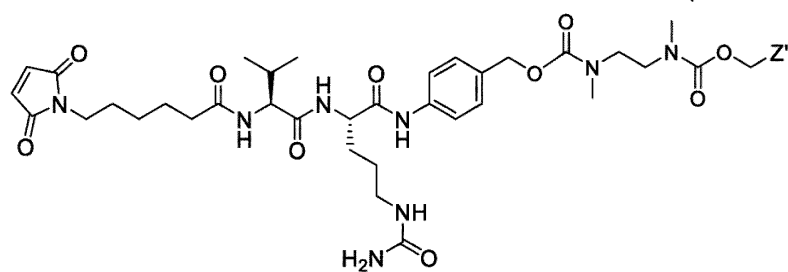
30

40

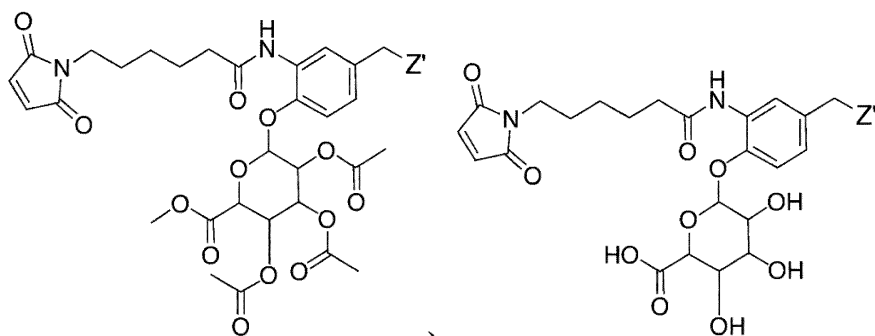
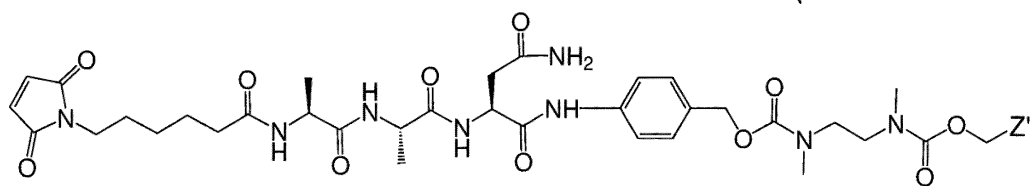
50



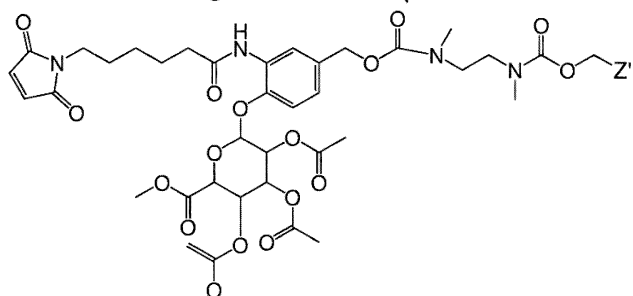
10



20

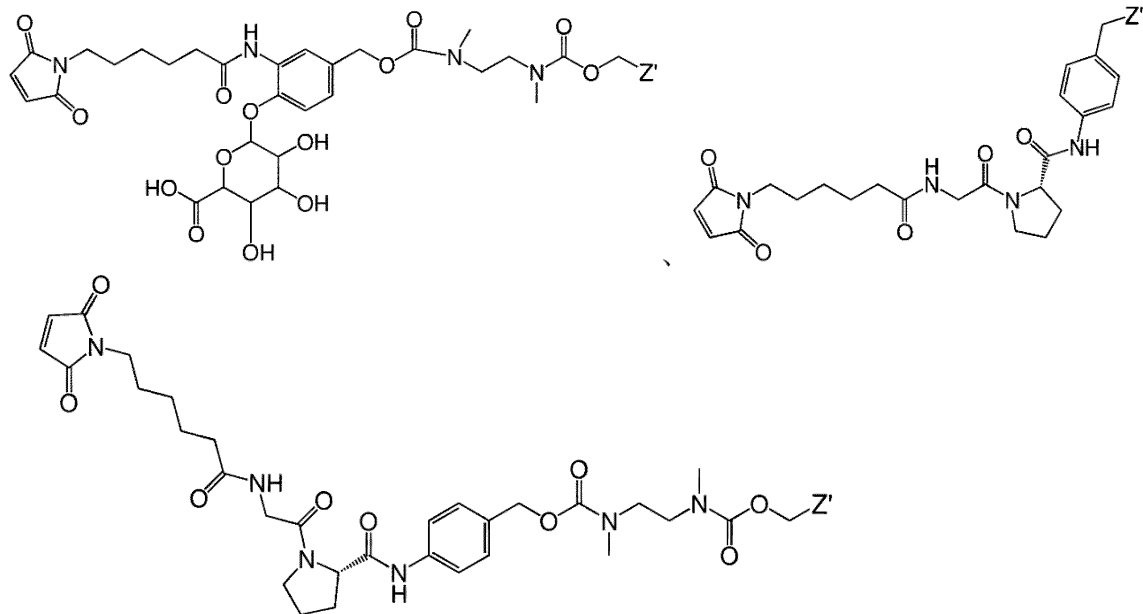


30



40

50



10

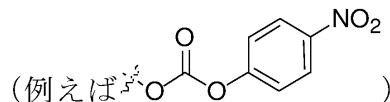
【 0 1 2 0 】

本発明のいくつかの実施例では、上記の Z' は、ハロゲン（例えば塩素）である。

20

【 0 1 2 1 】

本発明の別のいくつかの実施例では、上記の Z' は、炭酸エステル



である。

【 0 1 2 2 】

本発明は、さらに、抗体薬物コンジュゲート（ADC）の製造における上記の式 I X に示される化合物の使用を提供する。

30

【 0 1 2 3 】

本発明は、さらに、上記のコンジュゲートと薬学的に許容される補助材料とを含む医薬組成物を提供する。

【 0 1 2 4 】

具体的には、上記の薬学的に許容される補助材料は、例えば、水などの希釈剤、賦形剤；澱粉、ショ糖などの充填剤；セルロース誘導体、アルギン酸塩、ゼラチンやポリビニルピロリドンなどの接着剤；グリセリンなどの湿潤剤；例えば寒天、炭酸カルシウムや炭酸水素ナトリウムなどの崩壊剤；第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；セタノールなどの界面活性剤；カオリンや石炭粘土などの吸着担体；タルク、ステアリン酸カルシウム、マグネシウム、ポリエチレングリコール等の潤滑剤など、薬学分野の通常の薬学補助材料である。また、香味剤、甘味剤、安定化剤等の他の補助材料を医薬組成物に添加することもできる。

40

【 0 1 2 5 】

具体的には、所望の投与方法に応じて、上記の医薬組成物は、約 1 ～ 約 99 重量％（具体的には、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％など）の本発明の上記コンジュゲートを含み、残りは適切な補助材料である。

【 0 1 2 6 】

具体的には、上記の医薬組成物は、任意の投与経路での投与に有用であり、経口投与、又は経肺、鼻、直腸及び／又は静脈内投与のような非経口投与であってもよい。したがっ

50

て、本発明に係る製剤は、局所的又は全身的に、特に皮膚、皮下、筋肉、関節内、腹膜内、肺、口腔、舌下、鼻、経皮的穿刺、腔、経口的又は腸管外に投与するのに適している。直腸投与の形態は座薬であることが好ましい。

【0127】

経口投与に適した剤形は、錠剤、丸薬、チュアリングガム剤、カプセル剤、顆粒剤、点滴剤やシロップ剤などである。腸管外投与に適した剤形は、溶液、懸濁液、再水化可能な乾燥剤又はスプレー剤などである。

【0128】

本発明の組成物は、経皮投与のための溶解形態の堆積物又は貼付剤に製造してもよい。皮膚用途としては、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、ローション剤、懸濁液や乳液などが挙げられる。

10

【0129】

本発明の医薬組成物の種々の剤形は、例えば、活性成分を1種又は複数種の補助材料と混合して所望の剤形にするなど、医薬分野における従来の製造方法に従って製造され得る。

【0130】

具体的には、上記の医薬組成物において、本発明の上記コンジュゲートは、唯一の活性成分として、又は同じ適応症のための1種又は複数種の他の活性成分と併用することができ、ここで、本発明の上記コンジュゲートは、上記他の活性成分とともに、同時、単独、又は逐次投与 (simultaneous, separate or sequential administration) のために製造することができる。

20

【0131】

本発明は、さらに、本発明に記載の抗体と小分子薬物を活性成分として含む組成物を提供する。

【0132】

具体的には、上記の組成物において、抗体は、例えば、アテゾリズマブ (Atezolizumab)、デュルバルマブ (Durvalumab)、アベルマブ (Avelumab)、センプリマブ (Cemiplimab)、KN035、CS1001、BGB-A333、KL-A167、SHR-1316、及びSTI-A1014などの抗PD-L1抗体であり、及び遺伝子工学手法によって、従来の抗PD-L1抗体 (前記) の1つ又は複数のアミノ酸残基をそれぞれシステインに突然変異することによって得られる改変抗PD-L1抗体、例えば遺伝子工学的手法によりアテゾリズマブ (Avelumab) の重鎖及び/又は軽鎖におけるアミノ酸をシステインに変異させたものである。

30

【0133】

具体的には、上記の抗体は、重鎖と軽鎖を含み、

重鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 4 に示され、又はSEQ ID NO : 4 と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列であり、及び/又は、

軽鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 9 に示され、又はSEQ ID NO : 9 と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するアミノ酸配列である。

40

【0134】

具体的には、上記の抗体は、SEQ ID NO : 9 に示される軽鎖配列を有する。

【0135】

本発明の一実施例では、上記の抗体は、SEQ ID NO : 4 に示される重鎖配列と、SEQ ID NO : 9 に示される軽鎖配列と、を含む。

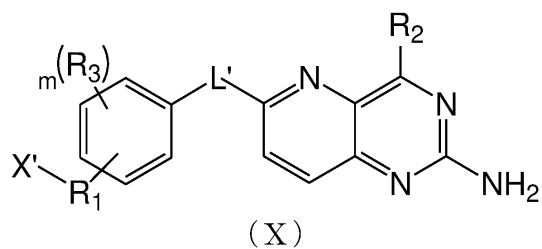
【0136】

具体的には、上記の組成物において、小分子薬物は、免疫調節剤、例えば、Toll様受容体アゴニスト (Toll-like receptors、TLR)、具体的には、例えば、TLR7及び/又はTLR8アゴニスト、例えば特許出願公開番号WO2019/095455A1に記載のピリドピリミジン誘導体及びその塩であってもよい。

50

【 0 1 3 7 】

具体的には、上記の組成物における小分子薬物は、下記構造を有する。



10

(ただし、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 m 、 L' は、本発明で上記定義を有し、

X' は、H、ハロゲン、 $-NR_4R_5$ 、 $-N^+R_4R_5$ 、 $-OR_4$ 、 $-SR_4$ 、アジド、ホスホン酸基、ジエチルホスホネート基、ハロアルキル、カルボキシ、エステル、 $-CN$ から選択され、ここで、 R_4 及び R_5 は、独立に、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アミノ酸残基、オリゴペプチド残基、ハロアルキルから選択され、又は R_4 及び R_5 は、それらの両方に連結される窒素原子とともにヘテロシクリルを形成する。)

【 0 1 3 8 】

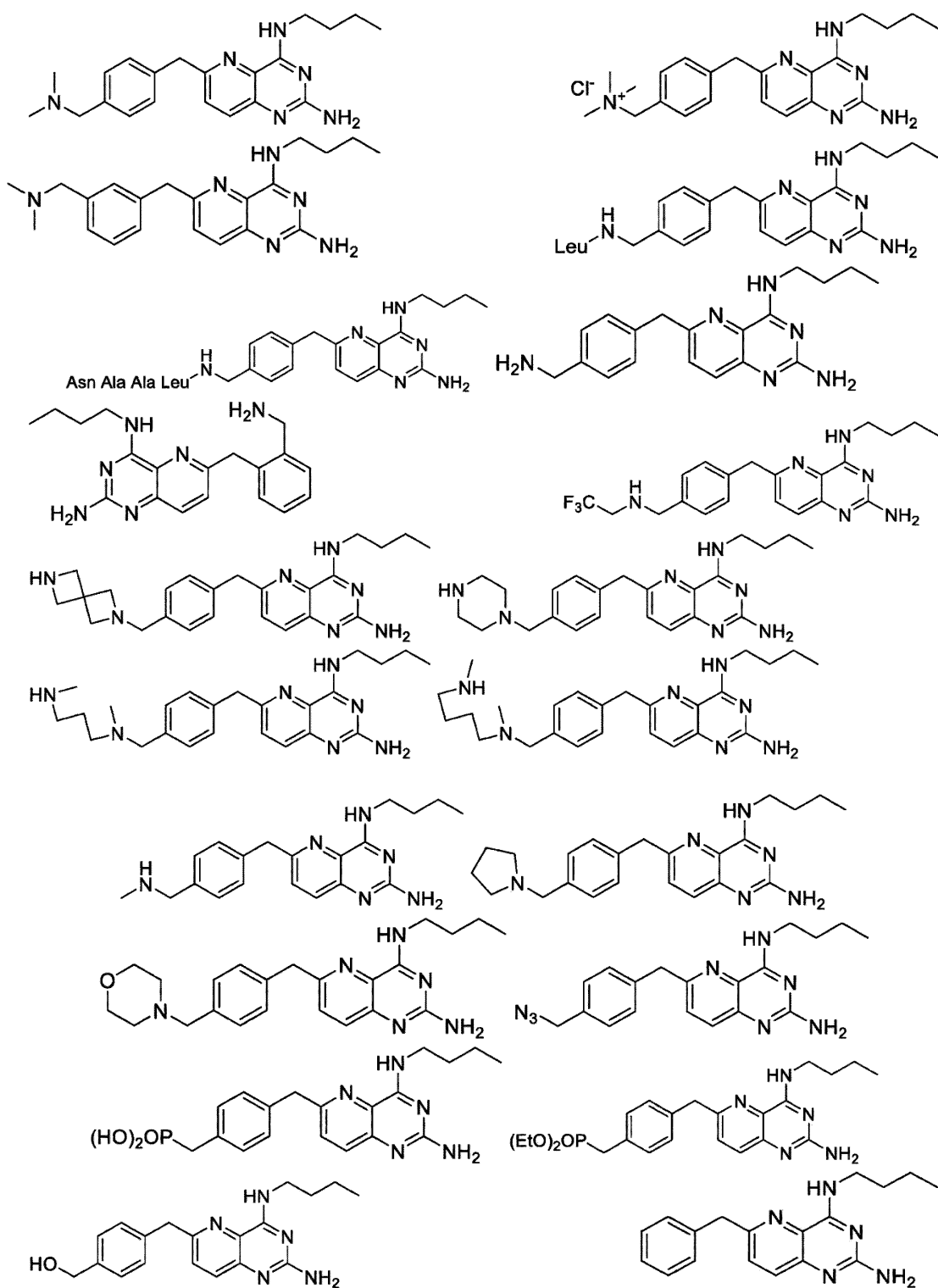
より具体的には、上記の組成物における小分子薬物は、下記構造から選択されてもよい。

20

30

40

50



10

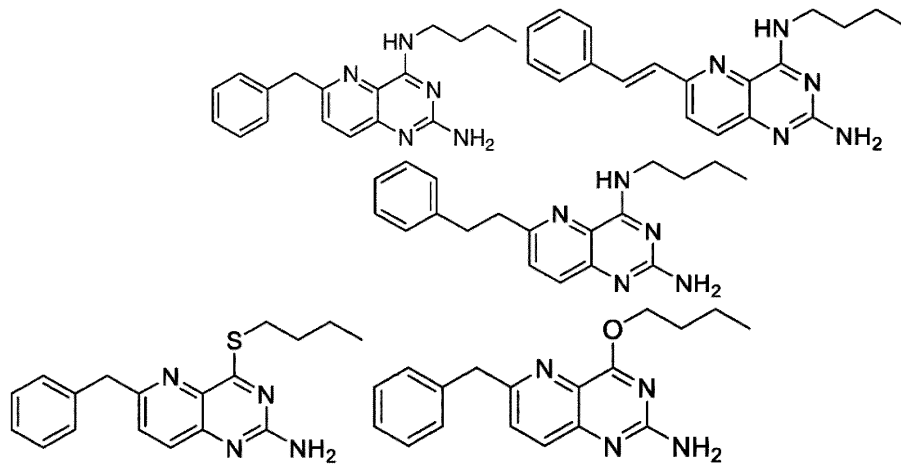
20

30

40

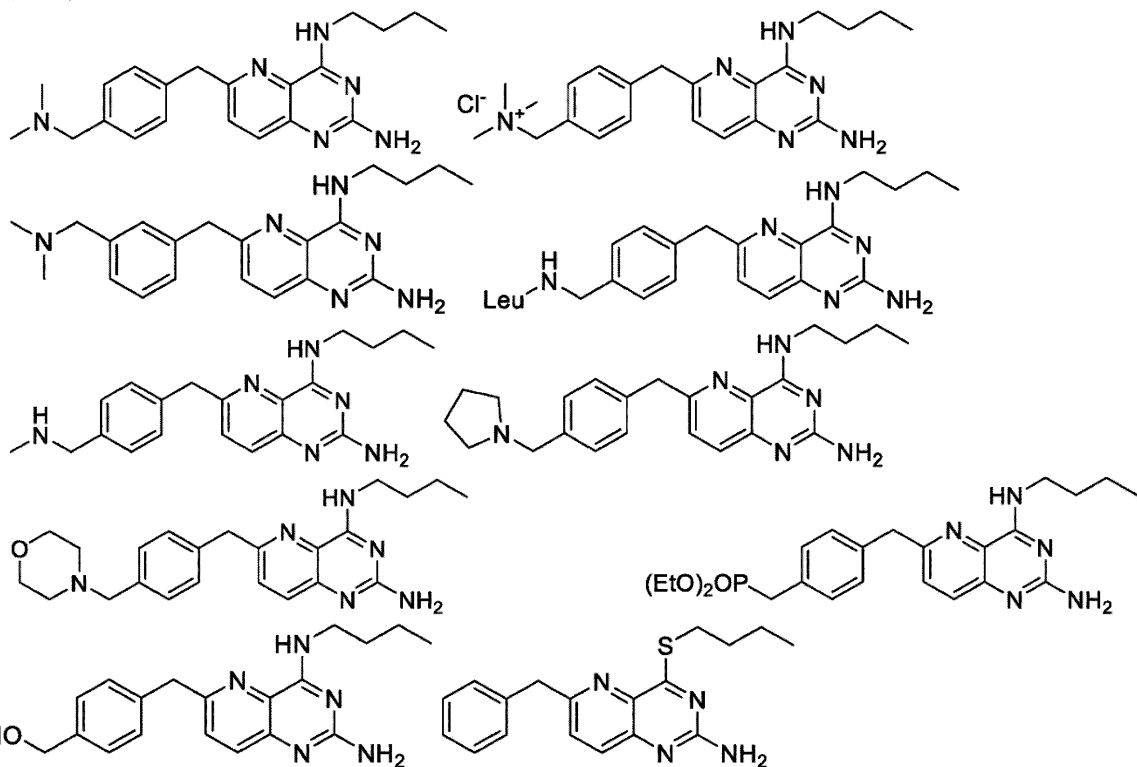
50





10

特に、

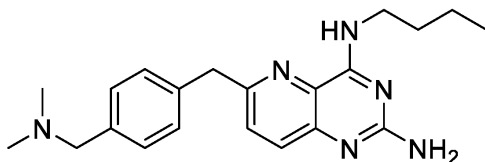


20

30

【 0 1 3 9 】

本発明の一実施例では、上記の組成物において、抗体はアベルマブ (Avelumab) であり、小分子薬物は、



40

の構造を有する。

【 0 1 4 0 】

本発明は、さらに、疾患を予防及び/又は治療する薬物の製造における、上記のコンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、プロドラッグ、立体異性体、本発明の上記の抗体、式VIIに示される化合物、組成物の使用を提供する。

【 0 1 4 1 】

50

具体的には、上記の疾患は、P D - L 1 発現に関連する疾患であってもよいし、T L R 7 及び / 又は T L R 8 活性に関連する疾患であってもよい。

【 0 1 4 2 】

具体的には、上記の疾患は、呼吸器疾患、免疫疾患、ウイルス性疾患、腫瘍のうちの 1 種又は複数種であってもよい。

【 0 1 4 3 】

具体的には、上記の呼吸器疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患、成人型呼吸窮迫症候群を含むが、それらに限定されない。

【 0 1 4 4 】

具体的には、上記の免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節リウマチ、炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、多発性筋炎、血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節炎、ベーチェット症候群を含むが、それらに限定されない、自己免疫疾患である。

【 0 1 4 5 】

具体的には、上記のウイルス性疾患の病原体は、アデノウイルス科（アデノウイルスなど）、ヘルペスウイルス科（H S V 1（口腔ヘルペス）、H S V 2（性器ヘルペス）、V Z V（水痘）、E B V（エプスタイン・バーウイルス）、C M V（サイトメガロウイルス）など）、ポックスウイルス科（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルスなど）、パピロウイルス科（パピローマウイルスなど）、パルボウイルス科（B 1 9 ウイルスなど）、ヘパドナウイルス科（B 型肝炎ウイルスなど）、ポリオーマウイルス科（ポリオーマウイルスなど）、レオウイルス科（レオウイルス、ロタウイルスなど）、ピコルナウイルス科（エンテロウイルス、口蹄疫ウイルスなど）、カリシウイルス科（ノロウイルス、E 型肝炎ウイルスなど）、トガウイルス科（風疹ウイルスなど）、アレナウイルス科（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスなど）、レトロウイルス科（H I V - 1、H I V - 2、H T L V - 1）、フラビウイルス科（デングウイルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニヤウイルス、黄熱ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ウエストナイルウイルスなど）、オルトミクソウイルス科（インフルエンザウイルスなど（A 型インフルエンザウイルス、B 型インフルエンザウイルス、C 型インフルエンザウイルスなど）、パラミクソウイルス科（ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型（H P V）、2 型 H P V、3 型 H P V、4 型 H P V、センダイウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、R S ウイルス、ニューカッスル病ウイルスなど）、ブニヤウイルス科（カリフォルニア脳炎ウイルス、ハンタウイルスなど）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルスなど）、フィロウイルス科（エボラウイルス、マールブルグウイルスなど）、コロナウイルス科（H C o V - 2 2 9 E、H C o V - O C 4 3、H C o V - N L 6 3、H C o V - H K U 1、S A R S - C o V、M E R S - C o V、S A R S - C o V - 2 など）、アストロウイルス科（アストロウイルスなど）、ボルナウイルス科（ボルナウイルスなど）を含むが、それらに限定されない。より具体的には、上記のウイルス疾患は、インフルエンザ、S A R S、C O V I D - 1 9、ウイルス性肝炎（A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎など）、A I D S、狂犬病、デング熱、エボラウイルスなどであってもよい。

【 0 1 4 6 】

具体的には、上記の腫瘍は、悪性腫瘍であり、悪性腫瘍には、リンパ腫、芽腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫、脂肪肉腫、滑膜細胞肉腫、神経内分泌腫瘍、カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ、膵島細胞癌、中皮腫、神経鞘腫、聴神経腫、髄膜腫、腺癌、黒色腫、白血病又はリンパ性悪性腫瘍、扁平上皮癌、上皮扁平上皮癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌）、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、乳癌、転移性乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肛門癌、陰茎癌、メルケル細胞癌、食道癌、胆道腫瘍、頭頸部癌、及び血液悪性腫瘍が含まれるが、それらに限定されない。特に、結腸癌、膀胱癌、黒色腫、髄膜腫、肺癌、膵臓癌である。

【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

本発明は、さらに、それを必要とするシステム又は個体に本発明の上記のコンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、プロドラッグ、立体異性体、本発明の上記の抗体、式ⅤⅠⅠに示される化合物、組成物の治療有効量を投与するステップを含む疾患の予防及び／又は治療方法を提供する。

【0148】

具体的には、上記の方法において、前記疾患は、本発明で上記定義を有する。

【0149】

本発明は、さらに、それを必要とするシステム又は個体に本発明の上記のコンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、プロドラッグ、立体異性体、本発明の上記の抗体、式ⅤⅠⅠに示される化合物、組成物の治療有効量を投与するステップを含む、
生体のポジティブな免疫反応を向上させる方法を提供する。

10

【0150】

本発明は、さらに、それを必要とするシステム又は個体に本発明の上記のコンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、プロドラッグ、立体異性体、本発明の上記の抗体、式ⅤⅠⅠに示される化合物、組成物の治療有効量を投与するステップを含む、化学療法効果を強化する方法を提供する。

【0151】

本発明は、さらに、それを必要とするシステム又は個体に本発明の上記のコンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、プロドラッグ、立体異性体、本発明の上記の抗体、式ⅤⅠⅠに示される化合物、組成物の治療有効量を投与するステップを含む、
免疫療法の効果を高める方法を提供する。

20

【0152】

具体的には、上記の治療有効量は、投与経路、患者の年齢、体重、性別、治療される疾患の種類及び重症度などの要因に応じて変更することができ、本発明はこれを特に限定しない。

【0153】

本発明は、遺伝子編集によって、原抗体の構造を実質的に維持し、ADCの構築に有用な、2つの突然変異システインを有する改変抗PD-L1抗体を得る。実験により、この改変抗体及び得られたADCは、元の抗PD-L1抗体の抗原認識親和性を維持し、細胞表面PD-L1と結合することによって細胞内に良好な選択性で内在化することが確認された。抗腫瘍実験により、得られたADCは、高い抗腫瘍活性を有し、担癌動物の生存率を有意に高めることができ、しかも、その中の小分子薬物を個別に使用する場合や抗体と併用する場合よりも毒性が顕著に低減し、実験動物の体に対する負担が小さい。本発明に記載のADCは、その中の小分子薬物を個別に使用する場合の最低有効用量を大幅に低下させ、その治療窓を拡大させ、複数の疾患（例えば腫瘍、B型肝炎などのウイルス性疾患）の治療薬の開発用として有望であり、応用の将来性及び価値が期待できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0154】

【図1】プラスミドαPD-L1 TH10MAB LC-V205Cのシーケンシング結果を示し、A. αPD-L1 TH10MAB LC-V205Cシーケンシング配列（上）とテンプレート軽鎖159-pFuse-αPD-L1-LCプラスミド（下）との配列のアライメントであり、テンプレートプラスミドのGTG部位がTGCに突然変異され、B. αPD-L1 TH10MAB LC-V205C突然変異部位でコードを行うアミノ酸がシステイン（Cys）であり、C. テンプレートプラスミド突然変異部位でコードを行うアミノ酸がバリン（Val）である。

40

【図2】還元性及び非還元性SDS PAGE分析による抗PD-L1抗体発現の同定結果を示す。

【図3】還元性及び非還元性SDS PAGE分析による抗PD-L1 TH10MAB発現の同定結果を示す。

【図4】THIO-S2の質量分析結果を示す。

50

【図5】ADC HE-S2の結合スキームを示す。

【図6】ADC HE-S2の質量分析検出結果を示す。

【図7】ADC VCの結合スキームを示す。

【図8】ADC Legumainの結合スキームを示す。

【図9】ADC VC及びADC Legumainの質量分析検出結果を示す。

【図10】ADC HE-S2及び抗PD-L1 TH10MA B抗体の抗原親和能を特徴付けた結果を示す。MC38細胞を抗PD-L1抗体、抗PD-L1 TH10MA B、及びADC HE-S2で処理した後、FITC標識ヤギ抗ヒト二次抗体で染色し、FACS技術によってMC38表面のFITCシグナル強度を検出して分析する。A. 各色のヒストグラムは、上から下へ、それぞれ陰性対照(NC)、二次抗体(secondary antibody)、抗PD-L1抗体、抗PD-L1 TH10MA B、及びADC HE-S2の群について測定された蛍光シグナルを表す。B. MC38上の各抗体類薬物で処理した後に測定された平均蛍光強度(MFI)である。NC群: アイスotype抗体のみを加え、二次抗体で染色しない陰性対照。二次抗体群: アイスotype抗体を加えて、蛍光二次抗体で染色した対照群。Student's t testにより、各群の有意差を決定して比較し、****で $p < 0.0001$ を表す。

10

【図11】抗PD-L1 TH10MA Bを癌細胞に内在化した実験の結果を示す。MC38及びB16細胞をpHrodoTM赤色染料標識抗PD-L1 TH10MA Bで24h処理後、A. IncuCyte (登録商標) 生細胞システムによって収集された細胞の高解像度位相画像、赤色蛍光画像、及び結合画像である。B. IncuCyte (登録商標) ソフトウェアによって分析されたトータルレッドオブジェクト統合強度(total red object integrated intensity)ヒストグラムであり、縦座標のデータは10の対数を取る。Student's t testにより各群の有意差を比較し、****は $p < 0.0001$ を表す。

20

【図12】FACS検出によるCd274ノックアウト型及び野生型DC 2.4細胞の表面のPD-L1レベルの結果を示す。KO: Cd274ノックアウト型DC 2.4細胞、WT: 野生型DC 2.4細胞。Student's t testにより各群の有意差を比較し、**は $P < 0.01$ を表す。

【図13】抗PD-L1 TH10MA BをDC細胞に内在化した予備実験の結果を示す。10% FBS培地中でPD-L1陽性野生型DC 2.4細胞及びPD-L1陰性Cd274ノックアウトDC 2.4細胞を培養し、細胞の状態が安定になると、pHrodoTM赤色染料標識抗PD-L1 TH10MA Bを加え、一晚インキュベートする。次に、FACSにより細胞内の赤色蛍光強度を分析し、その強度でTH10MA Bの内在化レベルを表す。

30

【図14】DC細胞におけるPD-L1/抗PD-L1抗体複合物の内在化能力の実験結果を示す。pHrodoTM赤色染料標識抗PD-L1 TH10MA Bの、野生型DC 2.4細胞系及びCd274ノックアウトDC 2.4細胞系内のトータルレッドオブジェクト統合強度-時間変化曲線である。4で細胞を30分間インキュベートして細胞の障害を一時的に停止し、受容体の内在化プロセスを明らかにする。標識抗PD-L1抗体を加えた後、4で30分間培養し、抗原と抗体とを完全に結合させる。その後、IncuCyte (登録商標) 生細胞システムによって抗体の内在化を分析する。A. 細胞を10% FBS含有培地中で培養する。B. 細胞を10% マウス血清含有培地中で培養する。C. 6時間後、IncuCyte (登録商標) 生細胞システムによりDC 2.4細胞の高解像度位相画像、赤色蛍光画像、及び結合画像を収集する。Student's t testにより各群の有意差を比較し、****は $P < 0.0001$ を表す。

40

【図15】マウス腫瘍モデルにより検証されたADC HE-S2の抗腫瘍活性の実験結果を示す。A. ADC HE-S2治療、抗PD-L1抗体単独投与、D18単独投与、抗PD-L1 TH10MA B単独投与、及び抗PD-L1抗体/D18併用治療によるマウスMC38腫瘍成長への障害活性。B. 動物の全体的な生存の研究。曲線の縦座標は、各日数後に生存している担癌マウスの百分率、横座標は、実験日数を表す。C. ADC

50

HE-S2治療、抗PD-L1抗体単独投与、D18単独投与、抗PD-L1 THIO MAB単独投与、及び抗PD-L1抗体/D18併用治療による、マウスMC38腫瘍成長への阻害活性。各群のマウスの投与用量及び投与時間を表1に示す。Student's t testにより各群の有意差を比較し、***は $P < 0.001$ を表す。

【図16】勾配用量のD18+抗PD-L1抗体に備える様々な腫瘍阻害能力の実験結果を示す。D18を週に1回投与し、抗PD-L1抗体又はIgGを週に2回投与する。抗体類薬物を投与する場合、群ごとに1匹あたり150 µg投与する。併用群では、群別に、anti-PD-L1+D18(25 µg)群では、マウス1匹あたり1回にD18 25 µgを注射し、anti-PD-L1+D18(2.5 µg)群では、マウス1匹あたり1回にD18 2.5 µgを注射し、anti-PD-L1+D18(0.25 µg)群では、マウス1匹あたり1回にD18 0.25 µgを注射する。Student's t testにより各群の有意差を比較し、****は $P < 0.0001$ を表す。

10

【図17】ADC HE-S2がマウスの体重に与える影響の結果を示す。ADC HE-S2、抗PD-L1抗体+D18併用、抗PD-L1抗体単独投与、D18単独投与、及びアイソタイプIgGによりマウスを処置し、その体重の変化を記録する。各薬物の投与時間は矢印に示される。Student's t testにより各群の有意差を比較し、*は、 $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、nsは、有意差なしを表す。

【図18】ADC10のマウス抗腫瘍実験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0155】

20

別段の定義がない限り、本発明において使用されるすべての科学用語及び技術用語は、本発明の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。

【0156】

本発明の内容において、以下の用語は、以下に詳述される意味を有する。

【0157】

「アルキル」とは、不飽和結合を含まない直鎖又は分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルであって、該炭化水素鎖ラジカルが単結合で分子の他の部分に連結する炭化水素鎖ラジカルを指す。代表的なアルキル基は、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-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、t-ペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシルなどの1~12個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）の炭素原子を含むものである。アルキルがシクロアルキルで置換されている場合、対応して、シクロプロピルメチル、シクロプロピルエチル、シクロブチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルメチルなどの「シクロアルキルアルキル」ラジカルとなる。アルキルがアリールで置換されている場合、対応して、ベンジル、ジフェニルメチルやフェネチルなどの「アラルキル」ラジカルとなる。アルキルがヘテロシクリルで置換されている場合、対応して、「ヘテロシクリルアルキル」ラジカルとなる。

30

【0158】

「アルケニル」とは、少なくとも2つの炭素原子と少なくとも1つの不飽和結合とを含む直鎖又は分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルであって、該炭化水素鎖ラジカルが単結合で分子の他の部分に連結する炭化水素鎖ラジカルを指す。代表的なアルケニルは、ビニル、1-メチル-ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル又はブテニルなど、1~12個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）の炭素原子を含む。

40

【0159】

「アルコキシ」とは、ヒドロキシにおける水素がアルキルで置換された置換基であり、代表的なアルコキシは、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシなど、炭素原子を1~12個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）含むものである。

【0160】

「アリール」とは、単環又は多環ラジカルを意味し、モノアリール基及び/又は縮合ア

50

リール基を含む多環ラジカルを含む。代表的なアリールは、フェニル、ナフチル、ピフェニル、インデニル、フェナントレニル又はアントラセニルなど、1～3個の単環又は縮合環及び6～約18個の炭素環原子、好ましくは6～約14個の炭素環原子を含むものである。

【0161】

「ヘテロシクリル」は、1～3個の単環及び/又は縮合環と、3～約18個の環原子とを含むヘテロ芳香族基及びヘテロ脂環基を含む。好ましいヘテロ芳香族基及びヘテロ脂環式基は、5～約10個の環原子を含む。本発明の化合物における好適なヘテロアリールは、1、2、又は3種類のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、N、O又はS原子から選択され、前記ヘテロアリールは、例えば、クマリン(8-クマリンを含む)、キノリル(8-キノリル、イソキノリルを含む)、ピリジル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリミジニル、フリル、ピロリル、チエニル、チアゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、シンノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾフラニル、ベンゼンチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、クイナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びフロピリジルなどを含む。本発明の化合物における好適なヘテロ脂環式基は、1、2、又は3種類のヘテロ原子を含み、前記ヘテロ原子は、N、O又はS原子から選択され、前記ヘテロ脂環式基は、例えば、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラン、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、オキサチアニル、ピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキシラニル、チラニル、アゼピニル、オキサゼパニル、ジアゼピニル、トリアゼピニル、1,2,3,6-テトラヒドロピリジル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、インドリル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキシル、3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプチル、3H-インドリル及びキノリニルなどを含む。

【0162】

「ハロゲン」又は「ハロ」とは、ブロモ、クロロ、ヨード又はフルオロを指す。

【0163】

別段の記載がない限り、本発明の化合物は、同位体標識の形態をさらに含み、すなわち、同位体に富む原子の1つ又は複数の化合物の存在のみが相違点である。例えば、少なくとも1つの水素原子のみを重水素又はトリチウムで置換するか、少なくとも1つの炭素を ^{13}C 又は ^{14}C に富む炭素で置換するか、又は少なくとも1つの窒素を ^{15}N に富む窒素で置換する既存の構造を有する化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0164】

用語「PD-L1」は、ヒトPD-L1のような哺乳類の同種型、ヒトPD-L1の種ホモログ、及びPD-L1と共通の少なくとも1つのエピトープを含むアナログを含む。PD-L1のアミノ酸配列、例えばヒトPD-L1は、当該分野に知られている。本発明において、「抗PD-L1抗体」とは、PD-L1に特異的に結合し得る抗体を指す。

【0165】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖、すなわち、ジスルフィド結合を介して相互連結された2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖(すなわち、「全抗体分子」)を含む免疫グロブリン分子、及びその多量体(例えば、IgM)又はその抗原結合断片を指す。各重鎖は、重鎖可変領域(「HCV R」又は「VH」)と重鎖定常領域(領域CH1、CH2、CH3を含む)とを含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(「LCV R」又は「VL」)と軽鎖定常領域(CL)とを含む。VH及びVL領域は、さらに相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域に細分化され、その間には、フレーム領域(FR)と呼ばれ

る比較的保守的な領域が散在している。各 V H と V L は 3 個の C D R と 4 個の F R からなり、アミノ末端からカルボキシル末端に F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 の順に配列される。

【 0 1 6 6 】

本明細書で使用されるように、抗体の「抗原結合部分」、「抗体断片」等の用語は、抗原に特異的に結合して複合体を形成する天然に存在する任意なポリペプチド又は糖タンパク質であって、酵素的方法で得られ、合成され、又は遺伝子工学的に改変され得るポリペプチド又は糖タンパク質を含む。本明細書で使用されるように、P D - L 1 抗体の「抗原結合部分」又は「抗体断片」という用語は、P D - L 1 に特異的に結合する能力を維持する抗体の 1 つ又は複数の断片を指す。抗体断片は、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F v 断片、d A b 断片、C D R を含む断片、又は単離された C D R を含んでもよい。抗原結合断片の非制限的な例は、(i) F a b 断片、(i i) F (a b ')₂ 断片、(i i i) F d 断片、(i v) F v 断片、(v) 一本鎖 F v (s c F v) 分子、(v i) d A b 断片、(v i i) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、単離された相補性決定領域（C D R））を含む。本明細書で使用される表現のように、「抗原結合断片」には、二機能性抗体、三機能性抗体、四機能性抗体及びマイクロ抗体など、他の工学的に改変された分子も含まれる。抗体の抗原結合断片には、代表的には、少なくとも 1 つの可変ドメインが含まれる。

10

【 0 1 6 7 】

用語「治療有効量」は、本発明に記載された疾患又は状態を治療、予防、軽減、及び／又は寛減することを被験体において達成することができる用量を指す。

20

【 0 1 6 8 】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書で交換して使用することができ、インビトロであるかインサイチュであるかを問わず、本明細書に記載された方法に従う任意の動物又はその細胞を指し、一部の非限定的な実施形態では、ヒト、サル、イヌ、ウサギ、マウスなどの哺乳類である。

【 0 1 6 9 】

「治療」という用語は、疾患及び／又は状態の発症後に、この疾患及び／又は状態を根絶、除去、逆転、寛解、変化、又は制御することを含む。

【 0 1 7 0 】

「予防」という用語は、疾患及び／又は状態の発症前に、この疾患及び／又は状態を治療により発症又は進行から回避、最小化、又は困難にする能力を指す。

30

【 0 1 7 1 】

「疾患」という用語は、本発明に記載の疾患に関連する被験体の身体状態を指す。

【 0 1 7 2 】

本明細書に引用される各種出版物、特許、及び開示される特許明細書の開示内容は、全体として引用により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 7 3 】

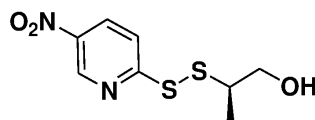
以下、本発明の実施例を参照して、本発明の技術的解決手段を明確かつ完全に説明するが、説明される実施例は本発明の一部の実施例にすぎず、全ての実施例ではないことは明らかである。本発明の実施例に基づいて、当業者が創造的な労働を行わずに取得した他のすべての実施例は、本発明の保護範囲に属する。

40

【 0 1 7 4 】

実施例 1：小分子薬物の製造

1、(R) - 2 - ((5 - 5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジチオシクロヘキシル) プロプ - 1 - オール (化合物 2 4) の製造



24

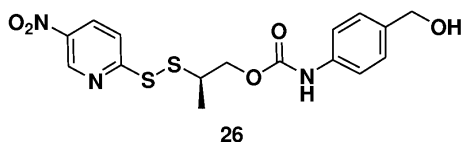
50

0、窒素保護で、5-ニトロピリジン-2-チオール(560mg、3.59mmol)の無水DCM(8mL)溶液にSOCl₂(316μL、3.94mmol)を滴下した。得られた混合物を室温で2h攪拌し、反応完了後、反応混合物を減圧濃縮して、黄色粉末としての中間体24を提供した。中間体4の乾燥DCM(10mL)の溶液にメチル(R)-2-メルカプトプロパ-1-オール(WO2013055987に記載の手順に従って製造、360mg、3.88mmol)の乾燥DCM溶液(5mL)を1滴ずつ滴下した。反応混合物を窒素保護下で、室温で一晩攪拌した。反応完了後、反応混合物を濾過して濾液を減圧濃縮し、黄色固体を得た。残留物を水中に懸濁させ、炭酸水素ナトリウム溶液でアルカリ化し、その後、DCM(3×100mL)で抽出した。有機相を無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過して減圧濃縮した。残留物をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー(PE:EA=10:3)により精製し、化合物24を得た。収率:76%。
¹H NMR(400MHz,クロロホルム-d)δ9.23(dd,J=2.7,0.8Hz,1H),8.33(dd,J=8.9,2.6Hz,1H),7.71(dd,J=8.8,0.7Hz,1H),4.48(t,J=6.7Hz,1H),3.62(dddd,J=11.8,7.1,4.3Hz,1H),3.38(dddd,J=11.9,7.3,4.4Hz,1H),3.11(pd,J=7.0,4.4Hz,1H),1.28(d,J=6.9Hz,3H)。¹³C NMR(101MHz,クロロホルム-d)δ167.95,145.12,142.45,131.48,120.85,64.00,49.68,16.73。C₈H₁₁N₂O₃S₂ MS(ESI)m/z [M+H]⁺。計算値247.0、実測値247.2。

10

2、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジチオシクロヘキシル)プロピル(4-(ヒドロキシメチル)フェニル)カルバメート(化合物26)の製造

20



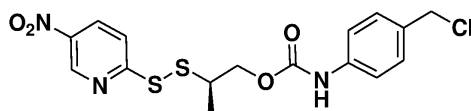
化合物24(246mg、1mmol)及びピリジン(79mg、1mmol)を乾燥DCM(5mL)に溶解し、0で攪拌した。窒素保護下で、0の混合物にトリホスゲン(145mg、0.5mmol)の無水DCM(5mL)溶液を1滴ずつ滴下し、攪拌を1h持続した。反応終了後、得られた反応液を減圧下で回転蒸発させ、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジチオアルキル)プロピル炭素塩化物(化合物25)を得て、更なる精製を必要とせずそのまま使用した。次に、化合物25(308mg、1.0mmol)を乾燥DCM(5mL)に溶解し、(4-アミノフェニル)メタノール(148mg、1.2mmol)及びピリジン(79mg、1.0mmol)のDCM混合溶液(5mL)をゆっくりと滴下した。反応混合物を窒素保護下、室温で2h攪拌した。反応完了後、得られた溶液を飽和塩化アンモニウム溶液に移し、DCM(3×50mL)で抽出した。有機層を水及び食塩水で洗浄し、その後、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過して減圧回転蒸発させ、粗製物を得た。粗製物をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー(PE:EA=2:1)により精製し、白色固体として化合物26を得た。収率:70%。
¹H NMR(400MHz,Chloroform-d)δ9.23(d,J=2.6Hz,1H),8.33(dd,J=8.8,2.6Hz,1H),7.91(d,J=8.8Hz,1H),7.34(m,4H),6.82(s,1H),4.67(s,2H),4.31-4.23(m,2H),3.37(h,J=6.8Hz,1H),1.43(d,J=7.0Hz,3H)。¹³C NMR(101MHz,Chloroform-d)δ168.63,152.87,145.03,142.06,136.88,136.37,131.61,128.04,119.47,118.73,67.26,64.86,45.57,17.10。Mass(ESI):C₁₆H₁₈N₃O₅S₂ m/z [M+H]⁺。計算値396.1、実測値396.2。

30

40

3、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジチオシクロヘキシル)プロピル(4-(ベンジルクロライド)フェニル)カルバメート(化合物19)の製造

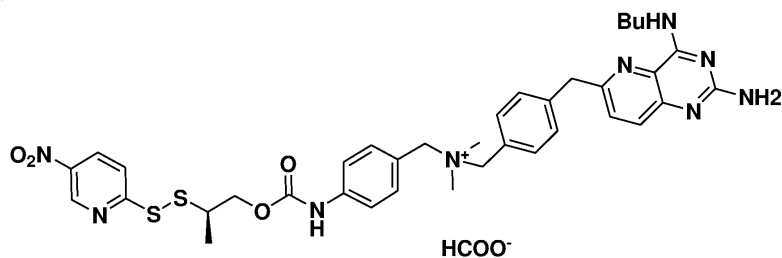
50



19

0 で、化合物 26 (100 mg、0.253 mmol) の無水 DCM (5 mL) 溶液に塩化チオニル (22 μ L、0.304 mmol) を滴下した。反応混合物を 0 で取り出して、室温で 30 分間撹拌した。反応終了後、減圧回転蒸発により過剰な塩化チオニルを除去し、白色固体として目的生成物である化合物 19 を得た。収率：96%。 ^1H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 9.24 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.35 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.35 (m, 4H), 6.75 (s, 1H), 4.56 (s, 2H), 4.27 (qd, J = 11.5, 6.1 Hz, 2H), 3.35 (h, J = 6.7 Hz, 1H), 1.41 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, クロロホルム-d) δ 168.59, 152.71, 145.06, 142.11, 137.56, 132.88, 131.60, 129.59, 119.47, 118.71, 67.34, 45.90, 45.51, 17.07。C₁₆H₁₇ClN₃O₄S₂ MS (ESI) : m/z [M + H]⁺。計算値 414.0、実測値 414.2。

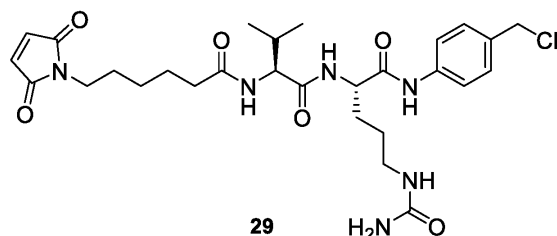
4、化合物 20 の製造



20

化合物 N⁴-ブチル-6-(4-(ジメチルアミノ)メチル)ベンジル)ピリジン [3,2-d] ピリミジン-2,4-ジアミン (40 mg、0.11 mmol) の DMF (0.5 mL) 溶液に化合物 19 (50 mg、0.12 mmol)、TBAB (8 mg、0.022 mmol)、及び DIEA (18 μ L、0.11 mmol) を加えた。反応混合物を室温で撹拌し、LC-MS により監視した。反応完了後、DMF を減圧回転蒸発により除去した。残留物を 10% メタノール溶液に再溶解し、室温で 2 h 撹拌した。得られた溶液を回転蒸発させて濃縮した後、相分取高速液体クロマトグラフィー (RPHPLC) により精製し、ギ酸塩である化合物 20 を得た。収率：68.0%。 ^1H NMR (400 MHz, メタノール-d₄) δ 9.09 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.31 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.62 - 7.44 (m, 8H), 4.69 (s, 2H), 4.57 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.26 - 4.16 (m, 2H), 3.70 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.44 (pd, J = 6.9, 4.8 Hz, 1H), 2.97 (s, 6H), 1.73 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.50 - 1.40 (m, 5H), 1.00 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, メタノール-d₄) δ 168.46, 165.88, 160.00, 157.48, 155.18, 153.27, 144.32, 142.10, 141.94, 141.18, 133.68, 133.63, 133.31, 131.74, 129.62, 129.31, 126.30, 125.85, 125.76, 121.22, 120.11, 118.01, 68.23, 67.23, 67.20, 43.08, 40.56, 30.66, 19.77, 15.98, 12.78。C₃₇H₄₄N₉O₄S₂ MS (ESI) : m/z [M]⁺。計算値 742.3、実測値 742.3。HRMS (ESI) [M]⁺ : 計算値 742.2958、実測値 742.2968。

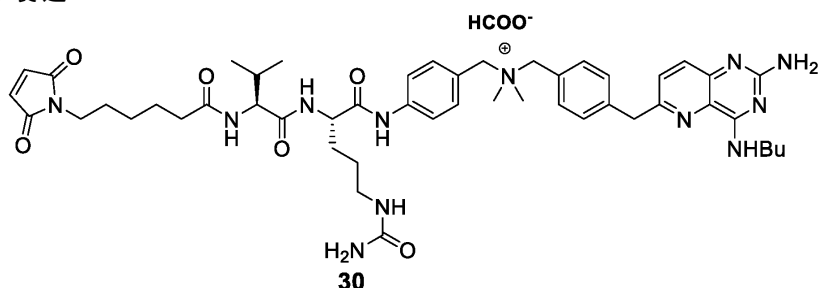
5、MC-Val-Cit-PAB-Cl (化合物29) の製造



0 で、MC-Val-Cit-PAB-OH (57 mg、0.1 mmol) の無水DM (5 mL) 溶液に塩化チオニル (8.7 μ L、0.304 mmol) を滴下した。反応混合物を0 で取り出し、室温で12時間撹拌した。反応終了後、過剰な塩化チオニルを減圧回転蒸発により除去し、所望の生成物を棕色固体29として得て、生成物を精製せずに、そのまま使用した。

10

6、化合物30の製造



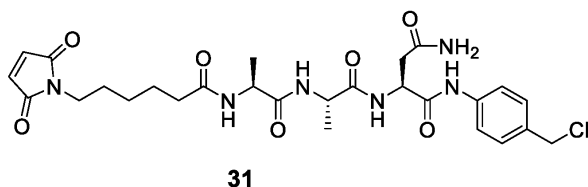
20

化合物N⁴-ブチル-6-(4-(ジメチルアミノ)メチル)ベンジル)ピリジン[3,2-d]ピリミジン-2,4-ジアミン(40 mg、0.11 mmol)のDMF(1 mL)溶液に化合物29(71 mg、0.12 mmol)、TBAB(8 mg、0.022 mmol)、及びDIEA(18 μ L、0.11 mmol)を加えた。反応混合物を室温で撹拌し、LC-MSにより監視した。反応完了後、DMFを減圧回転蒸発により除去した。残留物を10%メタノール溶液に再溶解し、室温で2h撹拌した。得られた溶液を回転蒸発させて濃縮した後、相分取高速液体クロマトグラフィー(RPHPLC)により精製し、ギ酸塩である化合物30を得た。収率: 55.0%。¹H NMR (400 MHz, Chloroform) δ 10.34 (bs, 1H), 9.40 (bs, 1H), 8.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.82 - 7.68 (m, 4H), 7.61 - 7.39 (m, 4H), 7.25 - 6.96 (m, 3H), 4.51 - 4.14 (m, 5H), 4.25 (s, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.46 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.27 (s, 6H), 2.95 (m, 2H), 2.73 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.10 - 1.85 (m, 6H), 1.74 - 1.53 (m, 4H), 1.60 - 1.38 (m, 2H), 1.41 - 1.19 (m, 6H), 1.14 - 0.80 (m, 9H). MS (ESI) [M]⁺: 計算値920.15、実測値920.30。

30

40

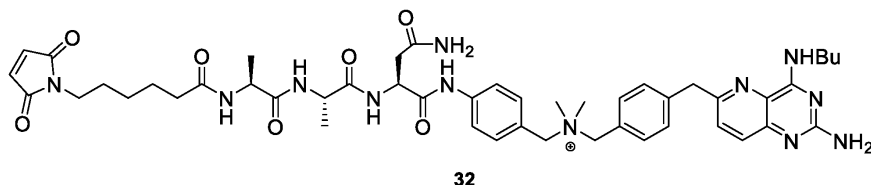
7、(S)-N¹-(4-(クロロメチル)フェニル)-2-((R)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサミド)プロピオンアミド)プロピオンアミド)コハク酸アミド(化合物31)の製造



50

0 で、(S) - 2 - ((R) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル)ヘキサミド)プロピオンアミド)プロピオンアミド) - N¹ - (4 - (ヒドロキシメチル)フェニル)コハク酸アミド(100 mg、0.174 mmol)の無水DCM(5 mL)溶液に塩化チオニル(15 μ L、0.210 mmol)を滴下した。反応混合物を0 で取り出し、室温で30分間撹拌した。反応終了後、過剰な塩化チオニルを減圧回転蒸発により除去し、棕色固体として所望の生成物を得た。生成物を精製せずに、そのまま使用した。

8、化合物32の製造

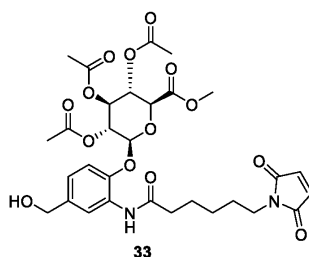


10

化合物N⁴ - ブチル - 6 - (4 - ((ジメチルアミノ)メチル)ベンジル)ピリジン[3,2-d]ピリミジン - 2,4 - ジアミン(40 mg、0.11 mmol)のDMF(1 mL)溶液に化合物31(71 mg、0.12 mmol)、TBAB(8 mg、0.022 mmol)、及びDIEA(18 μ L、0.11 mmol)を加えた。反応混合物を室温で撹拌し、LC - MSにより監視した。反応完了後、DMFを減圧回転蒸発により除去した。残留物を10%メタノール溶液に再溶解し、室温で2 h撹拌した。得られた溶液を回転蒸発させて濃縮した後、相分取高速液体クロマトグラフィー(RPHPLC)により精製し、化合物ギ酸塩32を得た。収率：48.0%。LC - MS(ESI) [M]⁺：. 計算値920.10、実測値920.25。

20

9、化合物33の製造

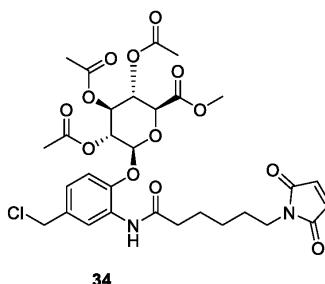


30

市販品として入手可能な化合物(2S,3R,4S,5S,6S) - 2 - (2 - アミノ - 4 - (ヒドロキシメチル)フェノキシ) - 6 - (メトキシカルボニル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 3,4,5 - トリオールトリアセテート(455 mg、1 mmol)をDMF(5 mL)に溶解し、6 - マレイミドヘキササン酸N - スクシンイミジル(340 mg、1.1 mmol)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール(135 mg、1 mmol)、及びN,N - ジイソプロピルエチルアミン(210 μ L、1.2 mmol)を順次加え、室温で2時間撹拌した。反応液をEA/H₂Oで抽出し、有機相を濃縮して粗製物を得た。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(DCM : MeOH = 10 : 1)により精製し、目的生成物278 mgを得た。LC - MS(ESI) [M]⁺：649.3。

40

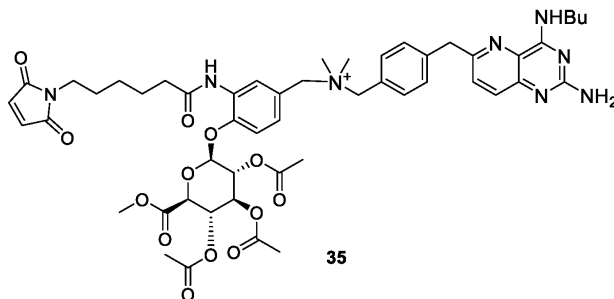
10、化合物34の製造



50

0 で、(2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサミド)-4-(ヒドロキシメチル)フェノキシ)-6-(メトキシカルボニル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3,4,5-トリアシルトリアセテート(化合物33)(65mg、0.1mmol)の無水DCM(2mL)溶液に塩化チオニル(8μL、0.12mmol)を滴下した。反応混合物を0で30分間攪拌した。反応終了後、有機溶媒を減圧回転蒸発により除去して、目的生成物を得た。生成物を精製せずに、そのまま使用した。

11、化合物35の製造

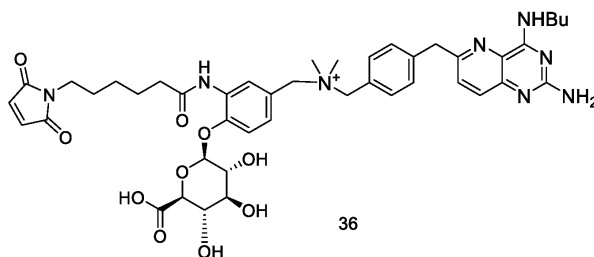


10

化合物(2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(クロロメチル)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサミド)フェノキシ)-6-(メトキシカルボニル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3,4,5-トリアシルトリ
アセテート(67mg、0.1mmol)(化合物34)のDMF(1mL)溶液にN⁴-ブチル-6-(4-(ジメチルアミノ)メチル)ベンジル)ピリジン[3,2-d]ピリミジン-2,4-ジアミン(40mg、0.11mmol)、TBAB(8mg、0.022mmol)、及びDIEA(18μL、0.11mmol)を加えた。反応混合物を室温で攪拌し、LC-MSにより監視した。反応完了後、反応液を濾過した後、相分取高速液体クロマトグラフィー(RP HPLC)により精製し、目的生成物30mgを得て、収率は28%であった。LC-MS(ESI) [M]⁺: 995.4。

20

12、化合物36の製造

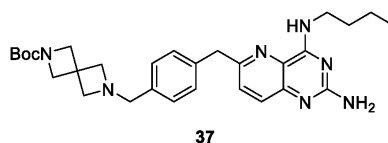


30

化合物35(30mg、0.03mmol)を混合溶媒(THF:H₂O=2:1)に溶解し、水酸化リチウム水和物(15mg、0.3mmol)を加え、室温で30min攪拌した後、酢酸を加えてpHを7に調整した。減圧濃縮して有機溶媒を除去し、メタノールを加えて溶解させ、逆相クロマトグラフィーにより目的生成物12mgを製造し、収率は46%であった。LC-MS(ESI) [M]⁺: 855.4。

40

13、化合物37の製造



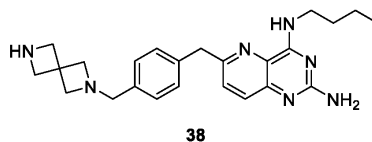
37

N⁴-ブチル-6-(4-(クロロメチル)ベンジル)ピリジン[3,2-d]ピリミジン-2,4-ジアミン(356mg、1mmol、合成方法は中国特許CN 108069963 B実施例における化合物10の製造方法を参照)をDMFに溶解し、2-Boc

50

- 2,6 - ジアザスピロ [3 . 3] ヘプタンヘミオキサレート (9 8 0 m g 、 0 . 2 m m o l) 、 及び炭酸カリウム (4 2 0 m g 、 0 . 3 m m o l) を加え、 3 5 °C 一晩撹拌した。反応終了後、反応液を酢酸エチル及び飽和食塩水で抽出し、水で 3 回洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を回転蒸発により除去して、粗製物を得た。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (D C M - M e O H 系) により精製し、目的生成物 3 4 0 m g を得て、収率は 6 5 % であった。LC - MS (E S I) [M + H] ⁺ : 5 1 8 . 3 。

1 4 、化合物 3 8 の製造

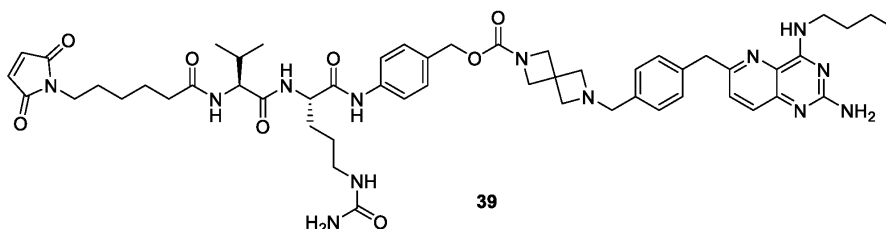


38

10

6 - (4 - ((2 - アミノ - 4 - (ブチルアミノ) ピリジン [3 , 2 - d] ピリミジン - 6 - イル) メチル) ベンジル) - 2,6 - ジアザスピロ [3 . 3] ヘプタン - 2 - t - ブチルカルボキシレート (化合物 3 7) (2 6 0 m g 、 0 . 5 m m o l) を混合溶媒 (D C M : T F A = 1 0 : 1) に溶解した。反応液を 0 °C で 1 時間撹拌した。有機溶媒を減圧濃縮して除去し、粗製物を得た。粗製物にエチルエーテルを加えて超音波処理し、濾過して目的生成物を得た。LC - MS (E S I) [M + H] ⁺ : 4 1 8 . 3 。

1 5 、化合物 3 9 の製造



39

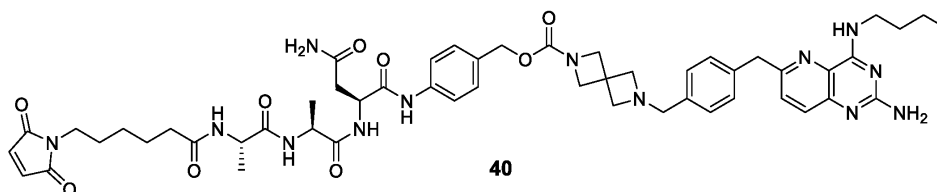
20

4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサミド) - 3 - メチルブタナミド) - 5 - ウリジンバレラミド) ベンジル (4 - ニトロベンゼン) カーボネート (8 1 . 0 m g 、 0 . 1 1 m m o l) を D M F (0 . 5 m L) に溶解し、6 - (4 - ((2,6 - ジアザスピロ [3 . 3] ヘプタン - 2 - イル) メチル) ベンジル) - N⁴ - ブチルピリジン [3 , 2 - d] ピリミジン - 2,4 - ジアミン (化合物 3 8) (4 2 . 0 m g 、 0 . 1 0 m m o l) 及び N,N - ジイソプロピルエチルアミン (2 1 μ L 、 0 . 1 2 m m o l) を加え、室温で撹拌し、LCMS により反応を検出した。反応終了後、RP - HPLC により直接製造して、目的生成物 2 0 m g を得て、収率は 2 0 % であった。LC - MS (E S I) [M + H] ⁺ : 1 0 1 6 . 4 。
¹ H NMR (4 0 0 M H z , D M S O - d 6) δ 7 . 7 8 (d , J = 8 . 5 H z , 1 H) , 7 . 6 0 - 7 . 5 5 (m , 4 H) , 7 . 2 9 - 7 . 1 7 (m , 5 H) , 4 . 0 0 (s , 2 H) , 3 . 6 6 (s , 2 H) , 3 . 4 6 (t , J = 1 3 . 2 H z , 2 H) , 3 . 0 7 (s , 2 H) , 2 . 9 5 (t , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 2 . 7 6 - 2 . 6 7 (m , 1 H) , 2 . 0 8 - 2 . 0 1 (m , 2 H) , 1 . 7 5 - 1 . 5 9 (m , 6 H) , 1 . 5 0 - 1 . 4 3 (m , 3 H) , 1 . 3 8 - 1 . 2 7 (m , 6 H) , 1 . 0 1 - 0 . 8 7 (m , 9 H) 。

30

40

1 6 、化合物 4 0 の製造



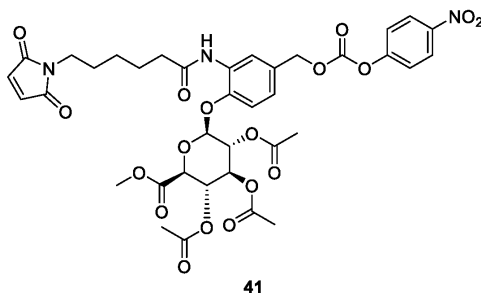
40

50

市販品として入手可能な 4 - ((S) - 4 - アミノ - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサミド) プロピオンアミド) - 4 - オキシブチルアミド) ベンジル (4 - ニトロベンゼン) カーボネート (81.0 mg、0.11 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解し、6 - (4 - ((2, 6 - ジアザスピロ [3. 3] ヘプタン - 2 - イル) メチル) ベンジル) - N⁴ - ブチルピリジン [3, 2 - d] ピリミジン - 2, 4 - ジアミン (化合物 38) (42.0 mg、0.10 mmol)、及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (21 μ L、0.12 mmol) を加え、室温で攪拌し、LCMS により反応を検出した。反応終了後、RP - HPLC により直接製造して、目的生成物 15 mg を得て、収率は 16 % であった。LC - MS (ESI) [M + H]⁺: 1016.4。

10

17、化合物 41 の製造



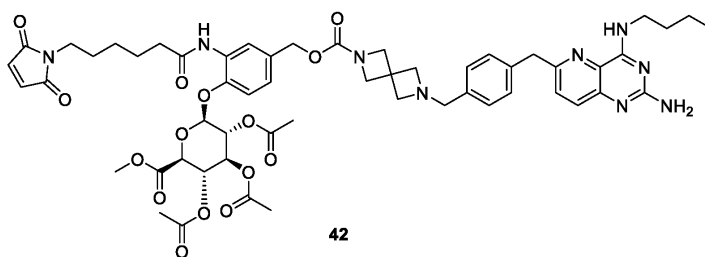
41

20

(2 S, 3 R, 4 S, 5 S, 6 S) - 2 - (2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサミド) - 4 - ((ヒドロキシメチル) フェノキシ) - 6 - (メトキシカルボニル) テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3, 4, 5 - トリアシルトリアセテート (260 mg、0.4 mmol) を DMF (2 mL) に溶解し、ジ (p - ニトロベンゼン) カーボネート (182 mg、0.6 mmol)、及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (105 μ L、0.6 mmol) を順次加え、6 時間反応させた。反応液を E A / H₂O で 3 回抽出し、有機相を併せて、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して粗製物を得た。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM : MeOH = 15 : 1) により精製し、目的生成物 250 mg (収率 78 %) を得た。LC - MS (ESI) [M + H]⁺: 814.4。

30

18、化合物 42 の製造



42

(2 S, 3 R, 4 S, 5 S, 6 S) - 2 - (2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサミド) - 4 - ((((4 - ニトロフェノキシ) カルボニル) メチル) フェノキシ) - 6 - (メトキシカルボニル) テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3, 4, 5 - トリアシルトリアセテート (化合物 41) (82 mg、0.1 mmol) を DMF (1 mL) に溶解し、6 - (4 - ((2, 6 - ジアザスピロ [3. 3] ヘプタン - 2 - イル) メチル) ベンジル) - N⁴ - ブチルピリジン [3, 2 - d] ピリミジン - 2, 4 - ジアミン (化合物 38) (42.0 mg、0.10 mmol)、及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (21 μ L、0.12 mmol) を加え、室温で攪拌し、LCMS により反応を検出した。反応終了後、RP - HPLC により直接製造して、目的生成物 30 mg を得て、収率は 27 % であった。LC - MS (ESI) [M + H]⁺: 1092.4。

40

19、化合物 43 の製造

50



20

20



30

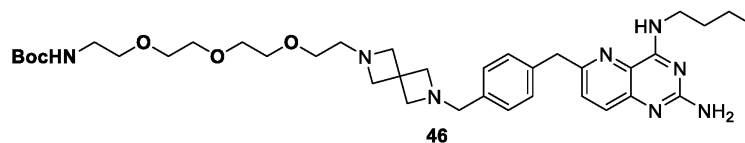
40



50

4.5 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.43 - 7.32 (m, 4H), 4.24 (s, 2H), 4.70 (s, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.53 (td, $J = 13.2, 5.9$ Hz, 2H), 3.46 - 3.33 (s, 4H), 3.33 (s, 4H), 2.50 (t, 3H), 1.70 - 1.65 (m, 2H), 1.53 - 1.44 (m, 2H), 1.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

22、化合物46の製造

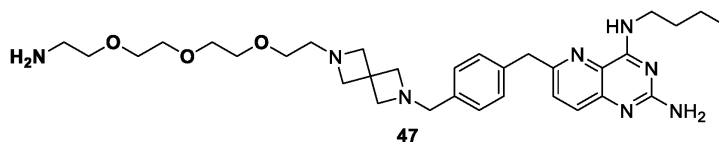


10

化合物38 (210 mg、0.5 mmol) をアセトニトリル (5 mL) に溶解し、(2 - ((2 - ((2 - ヨードエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル) t - ブチルカルバメート (305 mg、0.75 mmol)、及び炭酸カリウム (216 mg、1.5 mmol) を順次加え、反応液を65 に昇温させて5時間反応させた。反応終了後、濾過して、濾過滓をアセトニトリルで洗浄した。濾液を収集して、減圧濃縮して粗製物を得た。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM : MeOH = 4 : 1) により精製し、目的生成物218 mgを得て、収率は62%であった。LC - MS (ESI) $[M + H]^+$: 693.5。

23、化合物47の製造

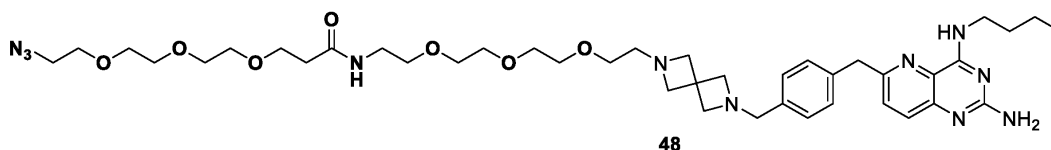
20



化合物46 (218 mg) を混合溶媒 (DCM : TFA = 20 : 1、10 mL) に溶解し、反応液を0 で1時間反応させた。反応終了後、有機溶媒を減圧濃縮して除去し、目的生成物を得た。生成物を精製せずに、そのまま使用した。

24、化合物48の製造

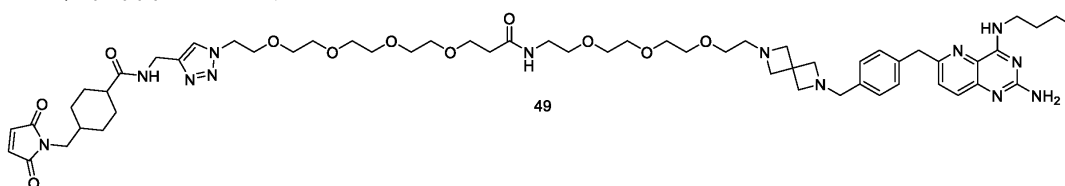
30



化合物47 (184 mg、0.3 mmol) をDMF (1 mL) に溶解し、2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル3 - ((2 - ((2 - アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)プロピオネート (106 mg、0.3 mmol)、及びトリエチルアミン (135 μ L、0.9 mmol) を順次加えた。反応液を室温で3時間反応させた。反応終了後、ジクロロメタン及び水を加えて抽出し、有機相を飽和塩化アンモニウム水溶液及び水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して粗製物を得た。得られた粗製物を精製せずに、そのまま使用した。LC - MS (ESI) $[M + H]^+$: 822.3。

40

25、化合物49の製造

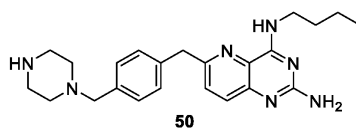


化合物48 (100 mg、0.12 mmol) を混合溶媒 (DMSO : H₂O = 1 : 1, 1 mL) に溶解し、4 - ((2,5 - ジオキソ - 2,5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 -

50

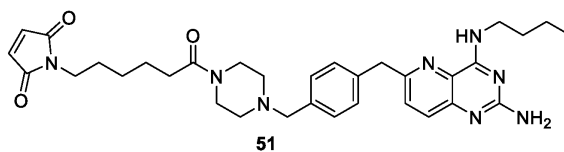
イル)メチル)-N-(プロブ-2-イン-1-イル)シクロヘキサン-1-ホルムアミド(66mg、0.24mmol)、及び臭化第一銅(51mg、0.36mmol)。反応液を室温で1時間反応させた。反応終了後、濾過して、濾液を逆相クロマトグラフィーにより直接製造して、目的化合物22mgを得て、収率は16%であった。LC-MS(ESI) $[M+H]^+$: 1140.4。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.43 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.21 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.91 (t, 1H), 7.82 (bs, 2H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 4.48 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.26 (m, 4H), 3.82 - 3.76 (m, 4H), 3.67 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.62 - 3.55 (m, 6H), 3.55 - 3.43 (m, 22H), 3.39 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 3.33 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.20 (m, 7H), 2.31 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 2.06 (t, J = 11.3 Hz, 2H), 1.67 (m, 8H), 1.34 (m, 6H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

26、化合物50の製造



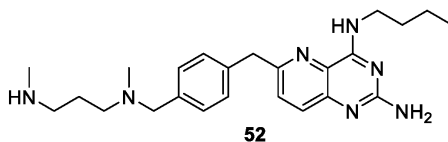
化合物50は化合物38の合成方法を参照して製造した。

27、化合物51の製造



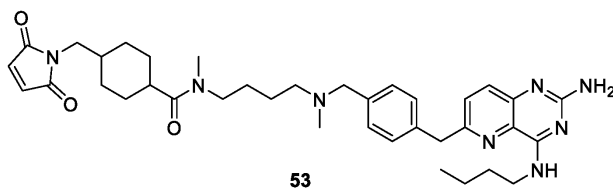
化合物51は、化合物45の合成方法を参照して製造し、収率は56%であった。LC-MS(ESI) $[M+H]^+$: 599.4。

28、化合物52の製造



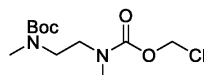
化合物52は化合物38の合成方法を参照して製造した。

29、化合物53の製造



化合物53は、化合物45の合成方法を参照し、6-マレイミドヘキサン酸N-スクシニミジルをN-スクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートに変更して製造し、収率は42%であった。LC-MS(ESI) $[M+H]^+$: 655.3。

30、化合物54の製造

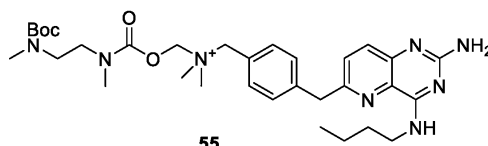


54

メチル(2-(メチルアミノ)エチル)t-ブチルカルバメート(1g、5.3mmol)をジクロロメタン(10mL)に溶解し、0℃で反応液にクロロギ酸クロロメチル(0.95mL)及びピリジン(0.86mL)を順次加え、0℃で反応を2時間持続した。反応終了後、ジクロロメタン及び水を加えて分離し、有機相を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、次に、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、有機層を併せて濃縮し、粗製物を得た。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(PE:EA=5:1)により精製し、無色油状物として目的生成物を得た。LC-MS(ESI) $[M+H]^+$: 281.3。

10

3.1、化合物55の製造

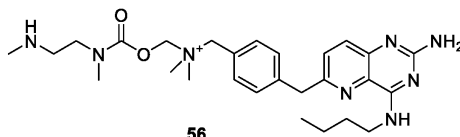


55

N⁴-ブチル-6-(4-((ジメチルアミノ)メチル)ベンジル)ピリジン[3,2-d]ピリミジン-2,4-ジアミン(400mg、1.1mmol)のクロロホルム(10mL)に、化合物54(1080mg、3.9mmol)及びTBAI(1420mg、3.9mmol)を加え、反応液を60℃に昇温させて、6時間反応させた。反応終了後、反応液を濃縮した後、カラムクロマトグラフィー(DCM:MeOH=4:1)により直接精製し、目的化合物480mgを得て、収率は72%であった。LC-MS(ESI) $[M]^+$: 609.3。

20

3.2、化合物56の製造

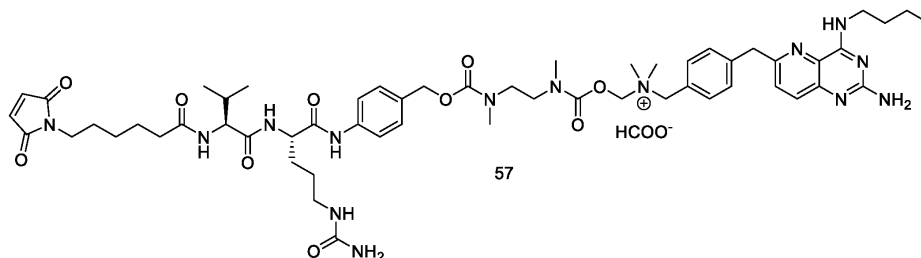


56

30

化合物55(480mg)を混合溶媒(DCM:TFA=10:1)に溶解し、反応液を0℃で1時間反応させ、反応終了後、有機溶媒を減圧濃縮して除去し、目的生成物のトリフルオロ酢酸塩を得た。黄色油状物にエチルエーテルを加えて超音波処理し、固体を析出させて、濾過した。濾過滓は目的生成物のトリフルオロ酢酸塩であった。LC-MS(ESI) $[M]^+$: 509.3。

3.3、化合物57の製造



57

40

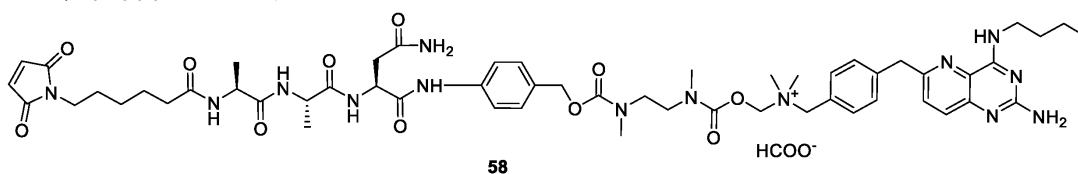
4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサミド)-3-メチルプタナミド)-5-ウリジンバレラミド)ベンジル(4-ニトロベンゼン)カーボネート(MC-VC-PAB-NPC)(81.0mg、0.11mmol)をDMF(0.5mL)に溶解し、化合物56(51mg、0.10mmol)、HOBt(13.5mg、0.10mmol)、及びN,N-ジ

50

イソプロピルエチルアミン (53 μ L、0.3 mmol) を加え、室温で攪拌し、LCMS により反応を検出した。反応終了後、RP-HPLC により直接製造し、目的生成物 30 mg を得て、収率は 24 % であった。LC-MS (ESI) $[M]^+$: 1107.4。
 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.16 (s, 1H), 8.38 (bs, 2H), 8.24 (bs, 1H), 7.90 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.66 - 7.37 (m, 7H), 7.26 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.24 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 5.26 - 5.06 (m, 2H), 5.04 - 4.87 (m, 2H), 4.61 - 4.12 (m, 8H), 3.60 - 3.27 (m, 8H), 2.89 (m, 12H), 2.25 - 2.05 (m, 2H), 1.97 (m, 1H), 1.79 - 1.09 (m, 13H), 1.00 - 0.71 (m, 8H).

10

34、化合物 58 の製造

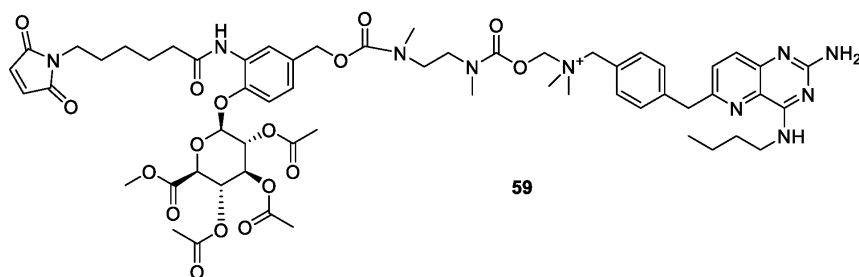


化合物 58 は、化合物 57 の合成方法を参照し、MC-VC-PAB-NPC を MC-AAN-PAB-NPC に変更して製造された。LC-MS (ESI) $[M]^+$: 1107.4。
 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.75 (s, 1H), 8.33 (bs, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.76 (t, 1H), 7.63 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.55 - 7.38 (m, 7H), 7.27 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.14 (m, 2H), 4.96 (m, 2H), 4.65 - 4.42 (m, 3H), 4.32 - 4.14 (m, 5H), 3.50 - 3.35 (m, 10H), 3.04 - 2.77 (m, 12H), 2.58 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.09 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.67 - 1.55 (m, 2H), 1.53 - 1.27 (m, 6H), 1.24 - 1.18 (m, 10H), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

20

30

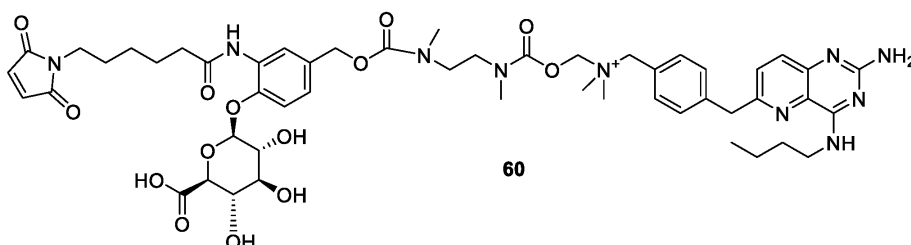
35、化合物 59 の製造



40

化合物 59 は、化合物 57 の合成方法を参照し、MC-VC-PAB-NPC を化合物 41 に変更して製造された。LC-MS (ESI) $[M]^+$: 1183.5。

36、化合物 60 の製造



50

化合物 59 (35 mg, 0.03 mmol) を混合溶媒 (THF : H₂O = 2 : 1) に溶解し、水酸化リチウム水和物 (16 mg, 0.3 mmol) を加え、室温で 30 min 撪拌した後、酢酸を加えて pH を 7 に調整した。有機溶媒を減圧濃縮して除去し、メタノールを加えて溶解させ、逆相クロマトグラフィーにより目的生成物 5 mg を製造し、収率は 15 % であった。LC-MS (ESI) [M+H]⁺ : 1043.4。

実施例 2 : 抗 PD-L1 TH10MA B の製造

【0175】

1. 抗 PD-L1 TH10MA B の遺伝子編集

Avelumab (MSB0010718C、商品名 Bavencio) はメルクセロノ社 (Merck KGaA) とファイザー社 (Pfizer) が開発した完全ヒト化 IgG1 型モノクローナル抗 PD-L1 抗体薬で、2017 年にメルケル細胞癌 (Merkel-cell carcinoma) の治療薬として FDA に承認されており (Apolo et al., 2017; Shirley, 2018)、その軽鎖及び重鎖をコードするヌクレオチド配列はそれぞれ SEQ ID NO : 1 及び 2 に示され、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列はそれぞれ SEQ ID NO : 3 及び 4 に示される。Avelumab はヒト PD-L1 と結合するほか、マウス由来の PD-L1 と交差反応を起こすことができる (Deng et al., 2016)。したがって、Avelumab を原料として抗 PD-L1 の ADC 薬の開発を行うことは、抗体自体が十分に優れた生物活性と創薬性を有することを保証するとともに、得られた ADC 薬を前段階のマウスモデル試験や、その後の開発時のヒト臨床試験に適用可能にする。Avelumab の発現プラスミドは、軽鎖 159 - pFuse - αPDL1 - LC プラスミドと重鎖 162 - pFuse - αPDL1 - hIgG - Fc2 プラスミドの 2 つの部分からなり、そのヌクレオチド配列は SEQ ID NO : 5 及び 6 に示される。この 2 種類のプラスミドを細胞内に共トランスフェクションして発現させ、プロテイン A 樹脂により精製して、抗 PD-L1 抗体 Avelumab を得た。

本発明者らは、PCR 部位特異的突然変異方法により、TH10MA B 発現プラスミドを構築した。突然変異部位を含む完全に相補的で逆方向のプライマー対を設計し、突然変異すべき完全プラスミドをテンプレートとして、高忠実度 PCR 酵素を用いて、突然変異部位を有するプラスミド配列全体を複製増幅した。その後、メチル化したテンプレートプラスミドを DpnI 有意エンドヌクレアーゼで除去し、メチル化されていない PCR 産物を維持した。さらにプラスミドの形質転換と培養により、突然変異部位を持つ完全プラスミドを増幅した。

部位特異的突然変異実験が終了した後、得られたプラスミドを抽出してシーケンシングし、突然変異が成功したか否かを同定した。軽鎖 159 - pFuse - αPDL1 - LC プラスミドを部位特異的に突然変異させて得られたプラスミドは、αPD-L1 TH10MA B LC-V205C と命名され、そのヌクレオチド配列は SEQ ID NO : 7 に示される。シーケンシング比較の結果を図 1 に示す。テンプレートプラスミドとアライメントしたところ、所定の突然変異部位での配列が GTG から TGC に突然変異したが、他の塩基は変化しなかったため、翻訳後の軽鎖の 205 位のアミノ酸はバリンからシステインに突然変異した。この 2 つの人工的に導入されたシステインは、後の ADC 薬の結合反応に使用される。突然変異により得られた抗体である抗 PD-L1 TH10MA B では、軽鎖をコードするヌクレオチド配列は SEQ ID NO : 8 に示され、軽鎖のアミノ酸配列は SEQ ID NO : 9 に示される。

2. 抗 PD-L1 抗体及び TH10MA B の発現

精製された抗 PD-L1 抗体を発現させ、還元性及び非還元性 SDS PAGE 分析により同定する。図 2 に示すように、この抗体は、還元性 SDS PAGE では軽鎖 (~25 KD) と重鎖 (~50 KD) に還元され、非還元性 SDS PAGE では完全な抗体 (~150 KD) のままであった。

発現し精製した後、抗 PD-L1 TH10MA B が得られ、還元性及び非還元性 SDS PAGE 分析により同定された。図 3 に示すように、抗 PD-L1 TH10MA B の SDS 染色結果 (図 3 に示す) は、抗 PD-L1 抗体 (図 2 に示す) とほぼ一致し、すなわ

ち、抗体は、還元性 SDS PAGE では軽鎖 (~ 2 5 K D) と重鎖 (~ 5 0 K D) に還元され、非還元性 SDS PAGE では完全な抗体 (~ 1 5 0 K D) のままであった。実験により、遺伝子編集により得られた抗 PD - L 1 TH I O M A B は、基本的に抗体の元の構造を維持し、TH I O M A M の発現過程と自己組織化過程が人工突然変異の影響を受けていないことを示唆した。また、同じ条件下では、抗体と TH I O M A B の発現量にも差がなく、細胞内抗体発現や組織化過程に有意な影響がないことも示唆された。

得られた TH I O M A B を更に同定するために、本発明者らは、完全な TH I O M A B を「T C E P 還元 - 精製 - D H A A 再酸化 - 精製」の流れで処理し、遊離メルカプトを有する TH I O M A B (TH I O M A B - S 2) を得た。その分子量の変化を E x a c t i v e P l u s E M R O r b i t r a p L C - M S で検出した。結果を図 4 に示す。完全な抗 PD - L 1 TH I O M A B の分子量は約 1 4 3 7 9 1 . 7 5 であるが、遊離メルカプトを有する TH I O M A B - S 2 の分子量は約 1 4 3 5 4 4 . 3 1 であり、分子量の差は 2 4 7 . 4 4 である。理論上、完全な抗 PD - L 1 TH I O M A B のメルカプトには一般的に 1 つの遊離システインが改変されるため、TH I O M A B - S 2 に比べて分子量は 2 つのシステインとメルカプトが縮合された残基の分子量だけより多く、約 2 3 8 である。この誤差は抗体高分子に対して許容可能である。したがって、得られた TH I O M A B の分子量変化は、実験的な期待通りであると判断された。この結果から、本発明者らが遺伝子編集により、均質で 2 つの突然変異システインを持つ抗 PD - L 1 TH I O M A B の発現に成功し、その後の均質 ADC 薬の構築に利用できることが示唆された。後の実験において、本発明者らはさらに、そのインビトロとインビトロ実験の結果を天然の抗 PD - L 1 抗体と比較することにより、この人工的な突然変異が抗体の抗原結合能力及びその他の活性に影響を及ぼすか否かを検討する必要がある。

図 4 に示すように、システインで被覆された元の抗 PD - L 1 TH I O M A B と比較して、還元透析後の TH I O M A B は 2 つのシステインを失い、2 つの自由メルカプトを露出した。これにより、このときの TH I O M A B の期待分子量は 2 3 8 減少して 1 4 3 5 5 3 . 7 5 となるが、実際に検出された TH I O M A B の分子量は 1 4 3 5 4 4 . 3 1 で、2 4 7 . 4 4 減少した。

実施例 3 : TH I O M A B に基づく ADC の合成経路及び同定

【 0 1 7 6 】

1 . A D C H E - S 2 の合成及び同定

A D C H E - S 2 の合成概略図は図 5 に示される。本発明者らは、抗 PD - L 1 TH I O M A B と化合物 2 0 (実施例 1) を原料として、A D C H E - S 2 と命名された、ジスルフィド結合リンカーを有する抗 PD - L 1 抗体と N ⁴ - プチル - 6 - (4 - ((ジメチルアミノ) メチル) ベンジル) ピリジン [3 , 2 - d] ピリミジン - 2 , 4 - ジアミン (以下、化合物 D 1 8 と略す) とのコンジュゲートを合成した。ここで、抗体上の連結部位は、S E Q I D N O : 9 に示すアミノ酸配列 (軽鎖配列) の 2 2 6 位のシステインである。

反応により得られた A D C H E - S 2 について、N o n a d r o p により濃度と純度を測定した後、収率 (約 3 0 % ~ 5 0 %) を推定した。サンプルの一部を国立タンパク質センターに送り、高分子 M S で抗体分子量の変化を測定した結果は図 6 に示される。理論上、A D C H E - S 2 におけるメルカプトが S 2 - D 1 8 で改変されると、D A R が 2 の A D C 全体の分子量の変化量は TH I O M A B に対して ~ 9 3 4 増加する。M S 検出で得られた A D C の分子量は 1 4 4 7 2 1 . 0 8 であったが、TH I O M A B の分子量は 1 4 3 7 9 1 . 7 5 であり、分子量の差は 9 2 9 . 3 3 であった。この誤差は ~ 1 4 7 K のプロテオスペクトラム解析では許容できる。したがって、均一で D A R が 2 の A D C 薬、A D C H E - S 2 (A D C 1) の製造に成功したと判断され、以下に示す。

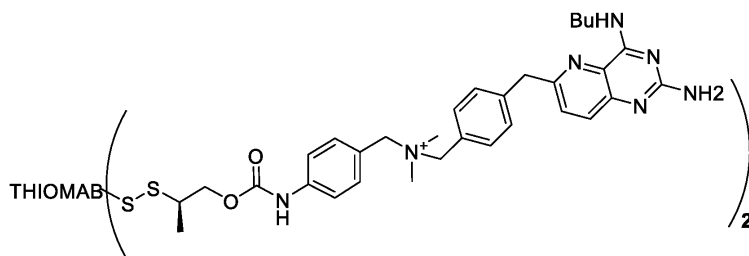
10

20

30

40

50



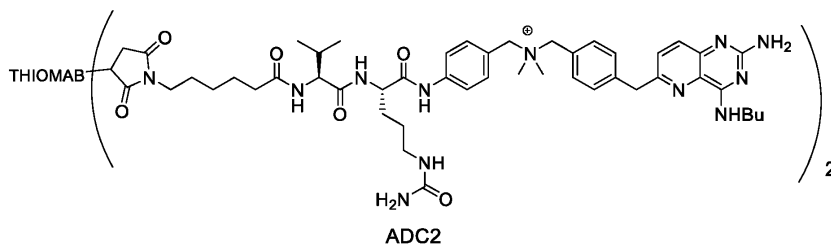
ADC HES2 (ADC1)

ADC HES2の質量分析結果は図6に示されるが、MSで得られたADCの分子量は144721.08、THIOMABの分子量は143791.75であった。

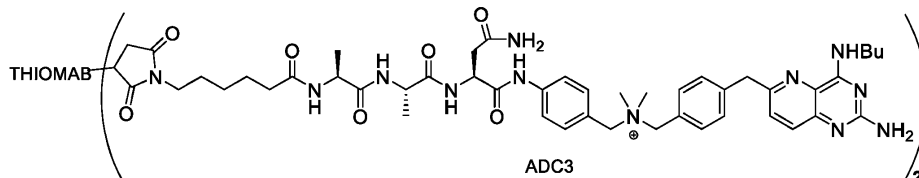
10

2. 他のADC薬の合成及び同定

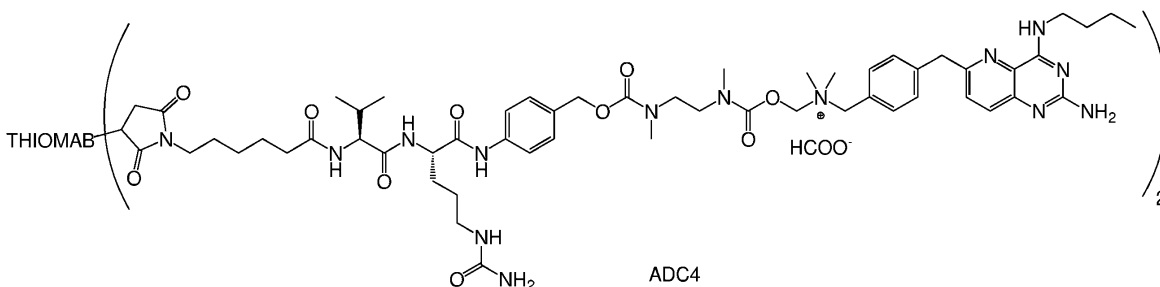
ADC HES2を合成する実験案が成熟した後、本発明者らは、この結合戦略（抗PD-L1 THIOMABと化合物30、化合物32、化合物57（実施例1で製造）を原料とする）を利用して、異なるリンカーを有する2種類のADC：ADC VC（ADC2）とADC Legumain（ADC3）、ADC4を合成した。合成の流れはそれぞれ7及び8に示される。



20



30



MS同定（図9に示す）により、ADC VCの理論上の分子量はTHIOMABより約1600大きいことが、従来の計算分析法により計算、検証された。MSの結果、両者の差は145399.23 - 143791.75 = 1607.48となり、理論値に非常に近いことが分かった。同様に、ADC Legumainの理論上の分子量はTHIOMABより約1600増加すべきであることも検証された。MSの結果、両者の差は145391.09 - 143791.75 = 1599.34となり、同様に理論計算の結果に非常に近いことが分かった。したがって、均一でDARが2の2種類のADC、ADC VC、及びADC Legumainが得られたと結論できる。

40

実施例4：野生型PD-L1抗体に基づくADCの合成経路及び同定

【0177】

1. ADC結合ステップ及び方法

a. 反応原料及び試薬の調製：抗体を濃度5～10mg/mLのPBS溶液（実施例2

50

に記載のAvelumab)に調製した。濃度10mMのTCEP水溶液に調製した。結合小分子(化合物39、40、43、44、51、45、49、53、57、58、60、実施例1で製造)を濃度10mMのDMSO溶液に調製した。濃度20mMのシステインPBS溶液に調製した。

b. 抗体還元: 10又は20当量のTCEP(10mM)を加え、37℃、回転数220rpm/minで2~3h振盪させた。

c. 結合反応: 抗体還元後、10~20当量の小分子を加え、室温、回転数220rpm/minで2~4h時間振盪させた。

d. クエンチ反応: 小分子と等量のシステイン溶液を加え、4又は10℃で30minインキュベートして反応を停止した。

e. 脱塩: 反応終了後、Cytivaの5mlプレパッケージ脱塩カラムを用いて脱塩した。

2. ADC DAR値の測定

超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)を用いたタンデム質量分析(MS)によるDAR値の算出方法

a. 機器: Waters Acquity-Class超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)タンデムWaters Synapt G2-Si Q-TOF高分解能質量分析システムを採用し、高純度窒素ガスを霧化ガスとし、高純度アルゴンガスを衝突ガスとした。

b. 液体クロマトグラフィー条件: カラムはACQUITY UPLC Protein BEH SECカラム(200℃、2.1mm×150mm、1.7µm)、カラム温度は25℃、試料注入量は15µLとした。等度溶出: 移動相50mM酢酸アンモニウム、流速0.065mL/min、採集時間10min、紫外検出波長280nm。

質量分析条件: 毛細管電圧を3.0kVに設定してESIソース正イオン化モードスキャンを行った。コーン電圧は120Vで、ソース温度と脱溶温度はそれぞれ120℃と500℃に設定した。コーンガスの流量を20L/H、脱溶媒ガスの流量を600L/Hとし、一次質量分析範囲をm/z 400~m/z 8000とした。

c. データ分析: Waters Masslynxソフトウェアでデータを分析し、MaxEnt 1プラグインを使用して質量分析データをデコンボリューション処理した。マスペクトルデコンボリューションマップを解析することによりADC DAR値を測定した。まず、ピークを積分してピーク面積率を算出し、ピーク面積率の和を100とする。式: $DAR = \sum \text{加重ピーク面積} / 100$ によりADCの加重平均薬物結合比を算出した。

3. 具体的なADC生成物の構造情報

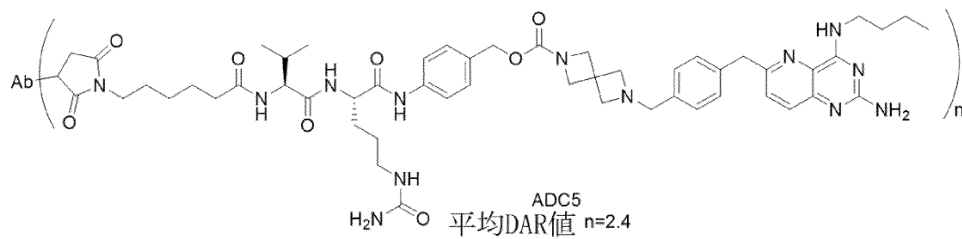
10

20

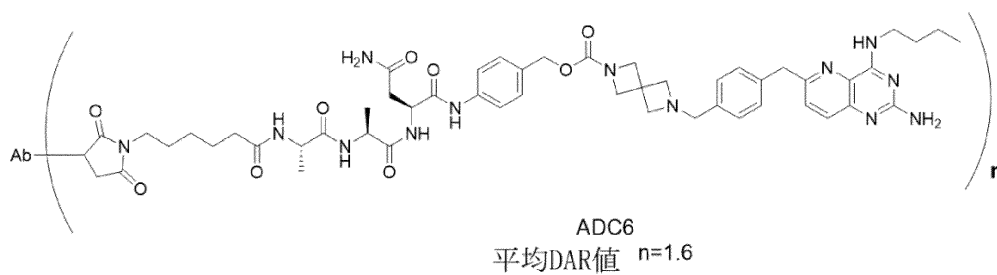
30

40

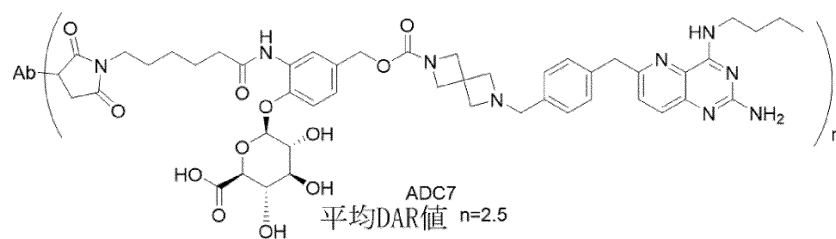
50



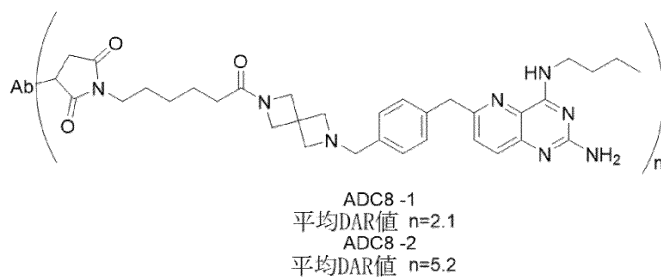
10



20

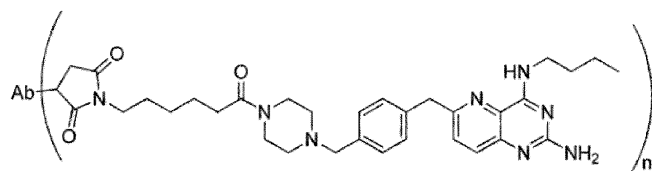


30

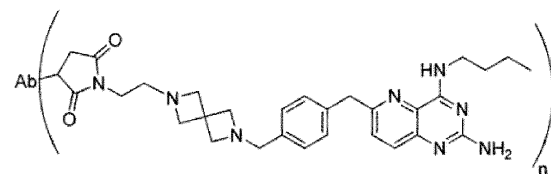


40

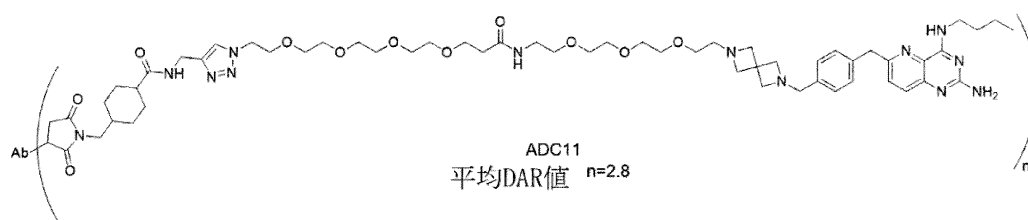
50



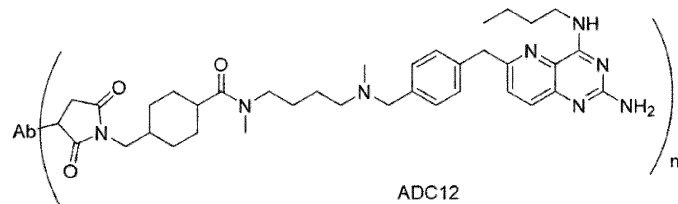
ADC9
平均DAR值 $n=2.0$



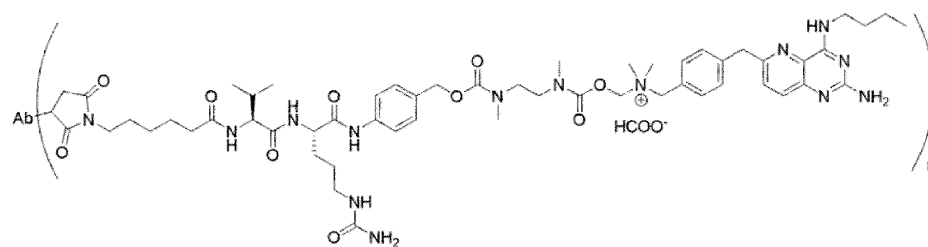
ADC10
平均DAR值 $n=2.1$



ADC11
平均DAR值 $n=2.8$



ADC12
平均DAR值 $n=2.0$



ADC13
平均DAR值 $n=4.7$

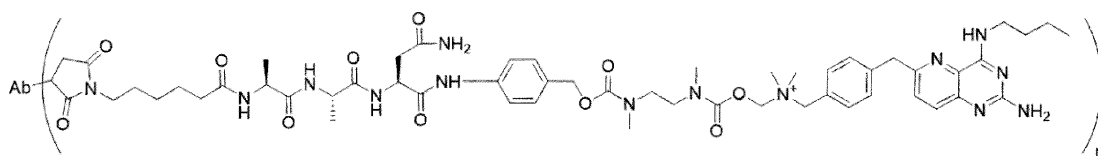
10

20

30

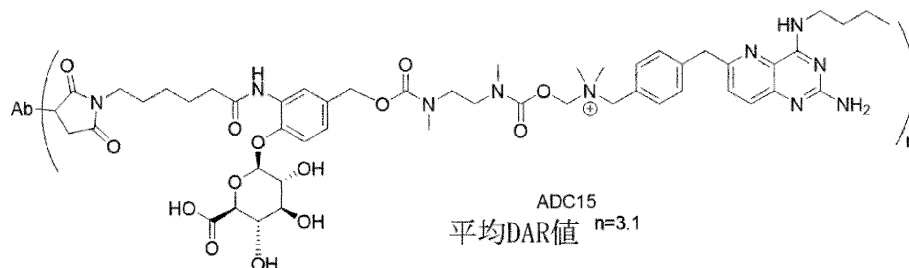
40

50



ADC14
平均DAR値 $n=5.7$

10



ADC15
平均DAR値 $n=3.1$

実施例 5：生物活性に関する研究

【 0 1 7 8 】

20

1. ADC HE-S2 (ADC1) の抗原結合能力の検出

十分な特異的抗原親和能は抗体生物活性の基礎であり、抗体類薬物の活性と治療効果にとって極めて重要である。ADC薬の製造過程に抗体の改変、化学処理及び小分子結合に関わるため、これらはすべて抗体の元の抗原親和能と安定性を破壊又は影響し、抗体抗原結合能力を損なう可能性がある。したがって、抗体を処理するプロセスでは、使用条件はできるだけ温和である必要がある。改変及び結合部位を選択する際にも、抗体の抗原結合能力を損なわないように、原抗体の抗原決定基を避けるべきである。さらに、得られたADC薬の抗原親和能を検証し、ADC薬が十分な標的性と特異性を維持することを確保すべきである。

本発明で設計及び製造されたADC HE-S2の抗体抗原親和能は、その抗腫瘍活性を達成するための重要な基礎である。ADC HE-S2は、腫瘍で高発現するPD-L1に抗体が特異的に結合することにより、免疫調節剤D18の標的輸送を達成する必要がある。また、ADC HE-S2は、細胞表面のPD-L1結合を介して、腫瘍PD-1/PD-L1免疫阻害シグナル経路を遮断し、T細胞の抗腫瘍反応を誘導することができる。したがって、ADC HE-S2の製造に成功した後、本発明者らは、まず、そのPD-L1抗原を認識し、結合する能力をインビトロで検証した。

30

本発明者らは、PD-L1陽性MC38をプラットフォームとして、蛍光活性化細胞選別技術(FACS)によりADC HE-S2と遺伝子改変後の抗PD-L1 TH10MA Bが元の抗体抗原結合能力を維持しているか否かを検証した。実験では、ADC HE-S2、抗PD-L1抗体(すなわち、実施例2のAvelumab)、及び抗PD-L1 TH10MA B(すなわち、実施例2で製造された突然変異抗体)を一次抗体としてMC38細胞とインキュベートし、抗体が細胞表面のPD-L1に十分接触して結合するようにした。PBS洗浄後、FITC標識ヤギ抗ヒト二次抗体で細胞を処理し、光を避けて30分間インキュベートし、二次抗体と一次抗体を十分に結合させた。また、2群の陰性対照を行い、その一方を陰性対照(NC)とし、アイソタイプ対照IgGのみを加えて細胞を処理し、染色せず、細胞自体の蛍光背景を示す。他方は二次抗体(secondary antibody)とし、アイソタイプ対照IgGを加えた後、他の実験群と一緒にFITC標識二次抗体で染色し、二次抗体と細胞の非特異性結合による偽陽性蛍光シグナルを特徴づけた。染色したMC38細胞をBD FACS Aria(登録商標)IIIFローサイトメータで分析し、異なる抗体類薬物で処理したMC38細胞上のFITC蛍光

40

50

シグナルの強弱を検出し、比較することにより、ADC、THIOMBA、及び抗体のPD-L1に対する親和能を特徴付けた。すべての結果をFlowJoソフトウェア(TreeStar Inc.)で処理した結果は図10に示される。

FACSの結果は図10に示される。IgGアイソタイプ抗体を用いた空白対照群(NC)をもとに、蛍光二次抗体染色を用いた対照群の偽陽性シグナルオフセット率は1.7%しか発生しなかった。平均蛍光強度(MFI)を計算した結果、NC群のMFIは142.00であるのに対し、二次染色後のMC38の平均蛍光強度は166.75であり、有意差があったが($p < 0.0001$)、差は小さかった。このような顕著で微弱な差は実験に用いたFITC二次抗体がMC38細胞と非特異的に結合して産生した偽陽性シグナルである。実験により、この偽陽性結合の現象は弱く、結果に影響を与えないことが証明された。したがって、NC対照群を基準として抗PD-L1抗体類薬物の抗体抗原結合能力を評価した。

10

抗PD-L1抗体、抗PD-L1 THIOMAB、及びADC HE-S2で処理したMC38細胞において、本発明者らは、類似のFITC陽性シグナルと観測した。NC群に対する蛍光シグナルオフセット率は、それぞれ、35.7%、36.6%、及び34.2%であり、蛍光二次抗体の非特異性結合による偽陽性シグナル(1.7%)よりはるかに高かった。MFI計算により、抗PD-L1抗体、抗PD-L1 THIOMAB、及びADC HE-S2の評価蛍光強度は、それぞれ445.3、449.0、及び392.5であり、同様に、2つの対照群よりも顕著に高かった($p < 0.0001$)ことが示される。3種類の抗体は、いずれもPD-L1に特異的に結合できることが示された。また、Student's t法の分析により、遺伝子編集を経験した抗PD-L1 THIOMAB及び更に化学改変したADC HE-S2は、天然の抗PD-L1抗体と比べて、検出されたMFIに顕著な差がないことが証明された。このことから、本発明者らの遺伝子編集及び化学改変が抗体本来の抗原認識親和能を損なうことも、抗体の非特異的な標的解除現象の出現を引き起こすこともなかった。

20

そのため、本発明者らは、ADC HE-S2が元の抗PD-L1抗体の抗原認識親和能を維持していることを確認でき、さらにその後の実験と研究開発に応用できる。

2. ADC HE-S2 (ADC1) の内在化能力

ADCの薬物放出は、対応する抗体の内在化能力に依存すると広く考えられている。ADCが細胞表面の抗原タンパク質に結合して形成される抗体-抗原複合体は、抗原タンパク質の内在化プロセスに伴って標的細胞に入り、細胞内酵素又は他の細胞内生理学的環境の作用下で、結合された薬物を放出する。従って、選択された抗原がADCに結合して形成される複合体の内在化能力は、ADC薬の機能の達成に不可欠である。本発明者らが設計したADC HE-S2は理論的にはがん細胞内とDC細胞内の両方で作用するべきであるため、本発明者らは、インビトロ実験により、抗PD-L1抗体類薬物が腫瘍細胞とDC細胞に内在化する能力を検証した。

30

pHrodoTM赤色染料はpH感受性蛍光染料であることが知られており、周囲の環境が酸になるとこの分子蛍光強度が急速に高まる(Lehrman et al., 2018)。この染料が抗原抗体複合体とともに細胞内に内在すると、染料の周囲のpHはすぐに酸性になり、それによって観察可能な蛍光シグナルが生成される。この性質は、pHrodoTM赤色染料を用いて抗体への内在化プロセスを監視することを可能にする。Incucyte(登録商標)生細胞分析システムを介して、本発明者らは、pHrodoTM赤色染料で標識した抗PD-L1抗体の内在化プロセスに対して画像に基づく監視と定量分析を行うことができる。0.1M炭酸ナトリウム(pH8.3)緩衝液中で、1mg/mLの抗PD-L1 THIOMABと3~5当量のpHrodoTM赤色染料を共同で約1hインキュベートし、透析により残留小分子を除去し、蛍光染料標識抗PD-L1 THIOMABを得た。標識後の抗体は光を避けて4℃に貯蔵しておくべきであり、長期保存の場合は、光を避けて-20℃の環境で保存し、繰り返し凍結融解を避けるべきである。PD-L1/抗PD-L1抗体複合体の内在化プロセスを特徴付けるために、本発明者らは、抗PD-L1 THIOMABを標識するためにpHrodoTM赤色染料を使用した。上述したよ

40

50

うに、本発明者らは、抗PD-L1 TH1OMABがADC HE-S2と同じ抗原認識能力を有することを検証したので、抗PD-L1 TH1OMABの内在化能力は、ADC HE-S2の内在化能力も反映し得る。

(1) 癌細胞における抗PD-L1 TH1OMABの内在化実験

MC38とB16の2種類のPD-L1陽性の腫瘍細胞を材料として、PD-L1/抗PD-L1抗体複合体の内在化を特徴付けることを検証した。蛍光標識抗PD-L1 TH1OMABを細胞内に添加した後、光を避けて24hインキュベートし、その後、Incucyte（登録商標）生細胞分析システムで細胞内の赤色蛍光シグナルの分布を撮影し、結果は図11Aに示される。

標識TH1OMABを添加すると、細胞内に赤シグナルが有意に発生することが明らかに認められたが、抗体を添加しない対照群では、赤色蛍光はほとんど認められなかった。合成された画像からは、細胞外で赤色蛍光がほとんど発生していないことがわかり、蛍光シグナルと抗体の内在化の関連性が証明された。したがって、本発明者らは、図11Bに示すように、Incucyte（登録商標）ソフトウェアを用いて、得られたトータルレッドオブジェクト総合強度を分析することにより、蛍光標識TH1OMABの内在化レベルを評価することができた。標識TH1OMABを加えた後、MC38内のトータルレッドオブジェクト総合強度は13701.63で、対照群の84.88よりも顕著に高かった。B16内のシグナル強度は更に283613.60に達し、同様に対照群の98.53よりも顕著に高かった。B16細胞内の蛍光シグナルはMC38細胞よりも強く、これは細胞によってPD-L1内在化速度や細胞内pH値の違いなどが原因である可能性がある。

(2) 抗PD-L1 TH1OMABのDC細胞への内在化及び選択性の実験

抗PD-L1 TH1OMABのDC細胞への内在化を検証するために、本発明者らは、清華大学薬学部の唐海東先生からCd274ノックアウト型DC2.4細胞と野生型DC2.4細胞の2種類のDC細胞を得た。Cd274遺伝子はPD-L1コード遺伝子であり、ノックアウト後のDC2.4はPD-L1タンパク質を発現できないため、PD-L1陰性DC細胞であった。一方、野生型DC2.4はPD-L1を発現し、PD-L1陽性DC細胞であった（図12に示す）。仮説によれば、抗PD-L1 TH1OMABはPD-L1陽性DC細胞には内在化するが、PD-L1陰性Cd274ノックアウト型DC2.4細胞には内在化しないことを発明者は観察できるべきである。したがって、この2種類の細胞の抗PD-L1 TH1OMAB内在化実験により、本発明者らは、抗PD-L1 TH1OMABのDC細胞への内在化能力及び抗体の選択性を同時に検証することができる。

予備実験において、本発明者らは、通常の操作に従って、DC2.4細胞の培地に10%の熱不活化ウシ胎児血清（FBS）をブロック剤として加え、8hインキュベートした後、FACSを用いて細胞内の赤色蛍光シグナルを検出し、その結果は図13に示される。意外なことに、FACS検出の結果、PD-L1陽性野生型DC2.4細胞においてもPD-L1陰性Cd274ノックアウトDC2.4細胞においても、それぞれ53.6%と52.9%と同じ割合の赤色蛍光陽性細胞と観測した。蛍光標識抗PD-L1 TH1OMABを加えていない陰性対照群では、赤色蛍光陽性細胞（1.57%と0.92%）はほとんど観測されなかった。繰り返し使用しても同様の結果が得られ、これは、蛍光色素で標識された抗PD-L1 TH1OMABがPD-L1陽性DC2.4細胞だけでなく、PD-L1陰性Cd274ノックアウト型DC2.4細胞にも円滑に内在化することを示唆している。この予想外の結果は本発明者らの仮説に反する。

本発明者らは、文献調査により、ヒトIgGのFcセグメントがマウスのFcγ受容体に結合する能力と、ヒト直系相同Fcγ受容体に結合する能力が非常に類似していることを発見した（Dekkers et al., 2017）。したがって、本発明者らは、DC2.4細胞表面の高発現、高活性のマウス由来Fcγ受容体が同様にヒト化抗PD-L1抗体と結合し、内在化することにより、両細胞とも抗PD-L1抗体を内在化できると推測した。

この推測を検証するために、本発明者らは、ブロック剤として10%のマウス血清と10%のFBSを群ごとに細胞培地に添加した。FBSに対して、マウス血清内に豊富に含

10

20

30

40

50

まれるマウス由来 I g G は D C 2 . 4 表面の F c γ 受容体をより効果的にブロックでき、それによって、D C 細胞の F c γ 受容体が媒介する抗体の内在化プロセスを阻害できる。T H I O M A B を添加する前に、D C 細胞は、まず、4 で 3 0 分間インキュベーションし、細胞表面受容体の内在化プロセスを一時停止すると同時に、マウス血清における I g G と D C 細胞表面の F c γ 受容体を十分に結合させる。その後、蛍光標識抗 P D - L 1 T H I O M B A を各群の細胞に加えた。次に、4 で 3 0 m i n の避光培養を行い、抗体と抗原を細胞内在化が停止した条件下で十分接触させ結合させた。

抗 P D - L 1 T H I O M A B の内在化実験により得られたトータルレットオブジェクト総合強度 - 時間変化曲線は図 1 4 A 及び B に示される。図 1 4 A の結果からわかるように、1 0 % F B S を加えてブロックすると、P D - L 1 陽性野生型 D C 2 . 4 細胞と P D - L 1 陰性 C d 2 7 4 ノックアウト D C 2 . 4 細胞において、よく似た蛍光強度変化曲線が観測され得るが、蛍光標識抗 P D - L 1 T H I O M A B を加えていない陰性対照群では、いずれも蛍光シグナルの変化は認められなかった。

図 1 4 B に示すように、1 0 % マウス血清を加えた実験群では、P D - L 1 陽性野生型 D C 細胞において、P D - L 1 陰性 C d 2 7 4 ノックアウト型 D C 細胞よりもトータルレットオブジェクト総合強度の増強が顕著に進んだ。特に、検出開始段階 (0 ~ 6 0 m i n) では、P D - L 1 陰性細胞では、蛍光シグナルの発生がほとんどなく、陰性対照と類似した変化曲線を示し、その後、P D - L 1 陰性 D C 細胞内では、抗体による蛍光シグナルが出現し始めたが、シグナル増強の速度 (傾き) は野生型 D C 2 . 4 細胞よりも遅れており、最終的に t 検定では有意差が認められた ($p < 0 . 0001$)。6 時間培養後、I n c u C y t e (登録商標) 生細胞を用いてマウス血清遮断の実験群を撮影し、各群の細胞内の赤色蛍光シグナルの分布を観察した。その結果、図 1 4 A に示すように、野生型 D C 2 . 4 細胞内の赤色蛍光シグナルは C d 2 7 4 ノックアウト型 D C 細胞より有意に強かった。このことは、検出 3 0 分前の 4 インキュベーションでは、細胞の受容体の内在化プロセスはほとんど停止し、抗原 - 抗体の結合は影響を受けないため、D C 細胞表面の P D - L 1 は抗 P D - L 1 抗体に十分に結合し、F c γ 受容体もマウス血清における相同 I g G に十分にブロックされていると解釈される。検出が開始すると、培養温度が 3 7 に回復するにつれて、細胞表面の受容体の内在化プロセスも回復し、それまで野生型 D C 細胞表面の P D - L 1 に十分に結合していた抗 P D - L 1 T H I O M A B も急速に内在化した。P D - L 1 陰性細胞は内在化しなかった。一方、インキュベーション時間が長くなると、P D - L 1 陰性 D C 細胞は、再循環した F c γ 受容体を介して抗 P D - L 1 T H I O M A B を内在化し、蛍光シグナルを生成する。しかし、培地内のマウス相同 I g G の作用で、このような内在化プロセスは競争的に阻害された。したがって、C d 2 7 4 ノックアウト型 D C 細胞では、P D - L 1 と結合することで T H I O M A B を内在化できる野生型 D C 2 . 4 細胞よりも T H I O M A B の内在化速度が遅れていた。

この結果は、本発明者らの推測を検証するものであり、抗 P D - L 1 抗体が細胞表面 P D - L 1 に結合することにより細胞内に内在化する能力を証明した。また、抗 P D - L 1 T H I O M A B の C d 2 7 4 ノックアウト型と野生型 D C 2 . 4 細胞での内在化速度の発現にマウス血清でのブロック後の差も、抗 P D - L 1 抗体が良好な選択性を有することを証明した。

実施例 6 : 抗腫瘍活性に関する研究

【 0 1 7 9 】

1 . A D C H E - S 2 (A D C 1) の抗腫瘍活性に関する研究

A D C H E - S 2 の抗癌活性を検証するために、本発明者らは、まず、M C 3 8 を用いてマウスモデルを作製した。担癌後、約 1 週間程度でマウスの体表に腫瘍が観察された。マウスの平均腫瘍組織体積が 100 mm^3 に達した後、最終投与種類によってマウスを、順に、I g G 同種型対照抗体群 (I g G と略称)、抗 P D - L 1 抗体群 (a n t i - P D - L 1)、抗 P D - L 1 T H I O M A B 群 (T h i o m a b)、D 1 8 群 (D 1 8)、D 1 8 と抗 P D - L 1 抗体併用治療群 (a n t i - P D - L 1 & D 1 8)、及び A D C H E - S 2 群 (A D C H E - S 2) にランダムに群分けし、各群は 7 ~ 8 匹のマウスと

した。I g Gアイソタイプ対照抗体群、抗PD-L1抗体（すなわち、実施例2のA v e l u m a b）群、抗PD-L1 TH10MAB（すなわち、実施例2で製造された突然変異抗体）群では、150 μ g ずつ週に2回腹腔内注射投与した。D18群では、25 μ g ずつ週に2回腹腔内注射投与した。D18 / 抗PD-L1抗体併用治療群では、抗PD-L1抗体を150 μ g ずつ週に2回投与し、D18を25 μ g ずつ1回投与し、ADC HE-S2群では、ADC HE-S2を週に1回、150 μ g ずつ腹腔内注射投与し、抗PD-L1抗体は、ADCと時間をずらして、150 μ g ずつ腹腔内に週に1回注射投与した。

実験結果は図15Aに示される。MC38腫瘍に対して、抗PD-L1抗体、抗PD-L1 TH10MAB、及びD18の3種類の薬物単独治療の効果はすべて非常に類似している。互いに腫瘍成長に対する阻害活性は有意差がないが、いずれも陰性対照としてのI g Gアイソタイプ抗体の治療効果よりやや優れていた。この結果は、D18と抗PD-L1抗体はいずれも一定の抗癌活性を持ち、抗PD-L1 TH10MABは同様に元の抗体の生物機能を維持していることを示している。一方、D18と抗PD-L1抗体の併用治療は、非常に良好な腫瘍増殖阻害活性を示し、その効果は単独投薬のどの群の治療よりもはるかに優れていた。この結果は、D18とPD-1 / PD-L1遮断抗体治療との相乗効果を再検証した。ADC HE-S2は、非常に驚くべき抗癌活性を示し、腫瘍増殖阻害活性は併用治療群より明らかに優れていた（ $P < 0.001$ ）。実験を24日目まで行った時、併用治療群のマウスの腫瘍体積は、比較的明らかな上昇を始めた一方、ADC治療群では、マウスの腫瘍サイズは低いレベルで維持されていた。

マウスの長期投与後の生存率をさらに研究するため、本発明者らは、マウスの生存実験を行った。実験は最終的に70日目まで行われた（図15B参照）。ADC HE-S2群のマウスの生存率は6 / 8であり、なお、最後に生存した6匹のマウスの腫瘍がほとんど検出されなくなった。D18とPD-L1併用投与群のマウスの生存率は4 / 8であった。D18群のマウスの生存率は1 / 8であった。一方、他の2種類の単独投与群と陰性対照群のマウスはすべて死亡した。この結果もADC HE-S2の強力な抗癌活性を証明している。

さらに、本発明者らは、ADC HE-S2の治療効果をさらに確認するために、B16黒色腫マウスモデルを使用した（図15C参照）。投与量と時間も表1に示されるものと同様であった。B16黒色腫はPD-L1レベルが低く、PD-1 / PD-L1遮断療法にある程度の耐性のある腫瘍とされている。その結果、本発明者が予想した通り、MC38腫瘍に比べて、各種薬物のB16黒色腫に対する阻害効果はいずれも低下した。抗PD-L1抗体、抗PD-L1 TH10MAB、及びD18の3種類の薬物の単独投与群の治療効果は、I g Gアイソタイプ抗体の効果とほぼ同等であった。抗PD-L1抗体 + D18の併用治療とADC HE-S2のみは、一定の腫瘍阻害効果を示した。ADC HE-S2治療後のマウスは、併用治療と比べ、その体のB16腫瘍の成長速度が明らかに遅く（ $P < 0.05$ ）、この結果は、B16腫瘍モデルにおいて、ADC HE-S2の抗腫瘍活性は同様に抗PD-L1抗体とD18の2種類の薬物の併用治療より強いことを証明した。

表1 マウス治療の薬物投与スケジュール

Group	10 th day	13 th day	17 th day	21 th day	24 th day*
Control	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
α PD-L1	α PD-L1	α PD-L1	α PD-L1	α PD-L1	α PD-L1
TH10MAB	TH10MAB.	TH10MAB	TH10MAB	TH10MAB	TH10MAB
D18	D18	—	D18	—	D18
α PD-L1/D18	α PD-L1/D18	α PD-L1	α PD-L1/D18	α PD-L1	α PD-L1/D18
ADC HE-S2	ADC HE-S2	α PD-L1	ADC HE-S2	α PD-L1	ADC HE-S2

10

20

30

40

50

投与量：抗体類薬物は、マウス1匹あたり150 μ g投与する。D18は、マウス1匹あたり25 μ g投与する。-は、その日に投与しないことを示す。は、MC38腫瘍モデルのマウスのみ24日目まで進行し、B16腫瘍モデルのマウスは、21日目以降は投与されないことを示す。

2. ADC結合戦略によるD18治療窓の拡大

なお、ADC HE-S2のDARが2であり、分子量が約150 Kであり、ADCにおけるD18含有量は1回投与あたり150 μ g / 150000 $\times$ 2 $\times$ 364 = 0.748 μ gであり、併用投与時の投与量（1回当たりのマウス1匹あたりの投与量は25 μ g）よりもはるかに少ないと簡単に見積もることができる。したがって、D18用量の変化が、D18と抗PD-L1抗体との間の相乗的な抗がん作用に及ぼす影響を研究したいと考えている。

したがって、本発明者らは、MC38腫瘍を治療するために、異なる用量のD18（0.25 μ g、2.5 μ g、及び25 μ g）と150 μ gの抗PD-L1抗体を併用した（図16参照）。マウスを投与タイプ別にIgGアイソタイプ抗体対照群（IgGと略称）、抗PD-L1抗体群（anti-PD-L1）、抗PD-L1抗体+D18（25 μ g）群（anti-PD-L1+D18（25 μ g））、抗PD-L1抗体+D18（2.5 μ g）群（anti-PD-L1+D18（2.5 μ g））、及び抗PD-L1抗体+D18（0.25 μ g）群（anti-PD-L1+D18（0.25 μ g））に群分けした。投与は、1群当たりの腫瘍の平均体積が100 mm³に達した後に開始した。IgGアイソタイプ抗体と抗PD-L1抗体は、週に2回、150 μ g / 匹ずつ腹腔内注射投与した。D18は、週に1回投与し、毎回の投与は、群別にそれぞれ25 μ g / 匹、2.5 μ g / 匹、及び0.25 μ g / 匹に腹腔内注射した。IgGアイソタイプ抗体群のマウスには、対照としてD18投与時と同じ量のDMSOを毎週腹腔内注射した。

抗PD-L1抗体を併用したD18のグラジエント投与による抗腫瘍結果は図16に示される。実験の結果から、D18は抗PD-L1抗体の抗腫瘍活性を増強する機能を示し、用量依存型の特徴を示した。抗PD-L1抗体との併用治療は、D18の1回当たりの投与量が25 μ gの場合に有意な腫瘍阻害活性を示した。D18用量の減少に伴い、D18と抗PD-L1抗体併用治療の抗腫瘍作用も弱まった。実際には、用量がマウス1匹あたり2.5 μ gあるいは0.25 μ gに低下したときに、その腫瘍阻害効果は抗PD-L1抗体単独投与と有意差がなくなっていた。

なお、ADC HE-S2の1回投与当たりのD18装填量（ $\sim$ 0.75 μ g）が2.5 μ gよりもはるかに小さい。したがって、ADC標的投与により、併用では活性を発揮するには不十分なD18用量（ $\sim$ 0.75 μ g）で、25 μ gのD18と抗PD-L1抗体を併用した場合よりも顕著な腫瘍阻害効果が得られたと判断された。

その後、マウスモデルで各群の薬物による治療がマウスの体重に与える影響を調べ、使用した薬物の毒性や副作用を判断した結果は図17に示される。健康なマウスを投与に応じてADC群、抗PD-L1抗体+D18群、抗PD-L1抗体群、D18群、及びIgG群に5匹ずつ分けた。各群のマウスの投与方式と用量はマウス腫瘍モデル試験と同じである。ADC群は、ADC HE-S2を週に1回投与し、また、抗PD-L1抗体を1回注射し、毎回150 μ gである。D18は、週に1回、毎回25 μ gを投与した。抗PD-L1抗体とIgGアイソタイプ抗体は、週に2回150 μ g投与した。

抗PD-L1抗体群におけるマウスの体重変化は、空白対照のIgG群とほぼ一致し、抗PD-L1抗体自体のマウスに対する毒性や副作用は大きくないことが証明された。抗PD-L1抗体+D18群とD18群では、D18の投与が終わるたびに、マウスの体重はある程度の減少を示した。D18単独投与に比べて、抗PD-L1抗体+D18群マウスの体重減少程度は特に顕著であり（ $p < 0.05$ ）、この結果は、免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-L1抗体が、TLR7 / 8アゴニストD18の毒性や副作用を増大させるという本発明者の以前の仮説を証明した。ADC群は、ADC HE-S2を注射するたびに、ある程度の体重の減少をもたらしたが、その幅はD18群（ $p < 0.05$ ）と併用投与群（ $p < 0.01$ ）よりも顕著に小さかった。投与後、マウスの体重も急速

に正常に戻り、最終的にADC群のマウスの体重変化は対照群と有意差がなかった。これらの結果から、ADC HE-S2も同様に一定の毒性を示したが、その毒性はD18単独投与や併用投与に比べて有意に低く、マウスへの負担が少ないことが明らかになった。ADCに実際に負荷されたD18が少ないことはD18の毒性低下の主な原因であると考えられる。

最終的に、ADC HE-S2は、実際のD18使用量をより少なくすることにより、併用時よりも優れた腫瘍阻害活性を示すと同時に、併用治療の毒性や副作用を著しく低減することができる結論した。本発明者らが提案したADC戦略により、D18使用時の最低有効用量を大幅に低減し、D18の治療窓を拡大させた。

2. 野生型PD-L1抗体による抗体結合薬物ADC10のマウス抗腫瘍実験

10

マウスの右側腹部皮下にMC38細胞(1×10^6 cells/匹)を接種した。マウスの平均腫瘍組織体積が 100 mm^3 に達した後、最終投与種類によってマウスを、順に、PBS対照群とADC10群に5~6匹ずつランダムに群分けした。週に2回、 10 mg/kg ずつ腹腔内注射投与した。マウスの体重変化を毎日計量し(図18A)、マウスの腫瘍体積を3日ごとに測定した(図18B)。図18Bに示すように、ADCの腫瘍阻害率は70%であった。

【0180】

上記は、本発明の好ましい実施例に過ぎず、本発明を限定するものではなく、本発明の精神及び原理の範囲内において、行われたあらゆる修正、同等の置換等は、本発明の保護の範囲内に含まれるものとする。

20

【0181】

本発明に記載された前述の実施例及び方法は、当業者の能力、経験及び嗜好に基づいて異なることがある。

【0182】

本発明では、方法のステップはある順序で列挙されたが、方法のステップの順序に対するいかなる制限ではない。

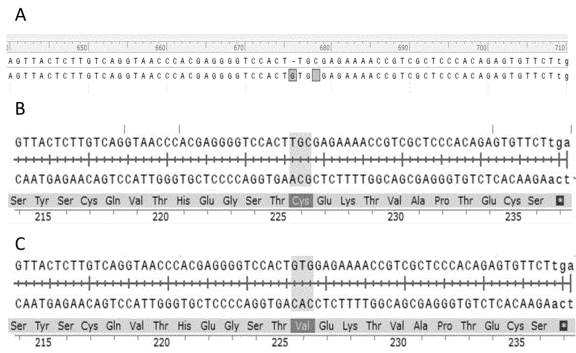
30

40

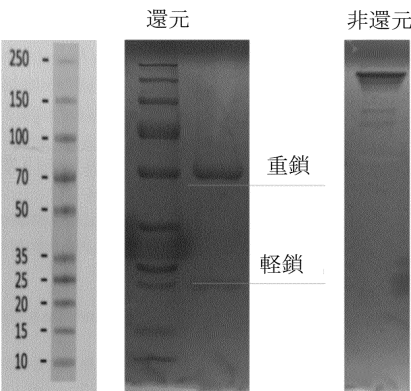
50

【図面】

【図 1】

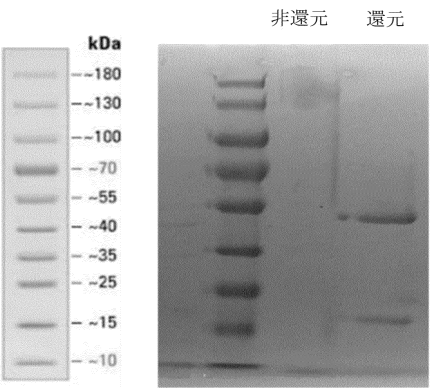


【図 2】

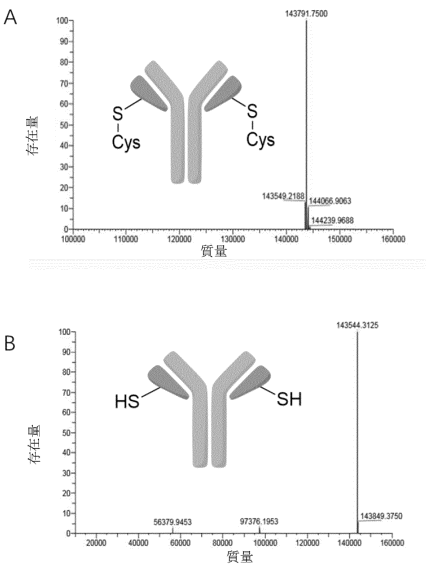


10

【図 3】



【図 4】



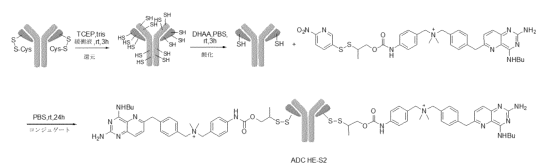
20

30

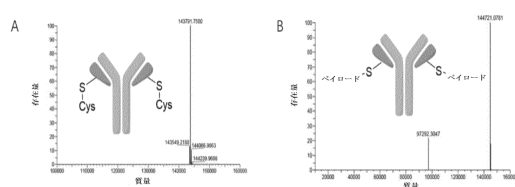
40

50

【圖 5】

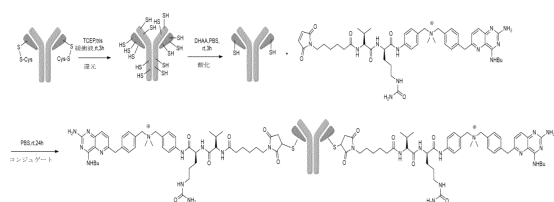


【 図 6 】

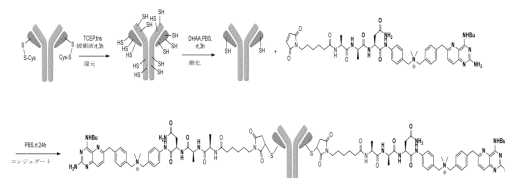


10

【圖 7】

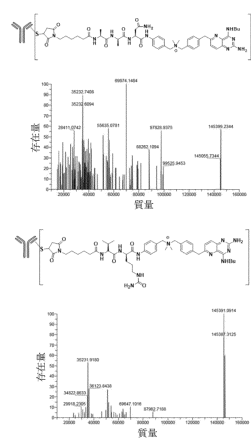


【图 8】

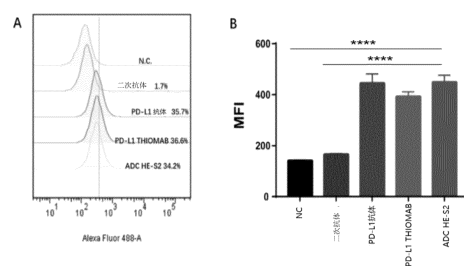


20

【图 9】



【 図 1 0 】

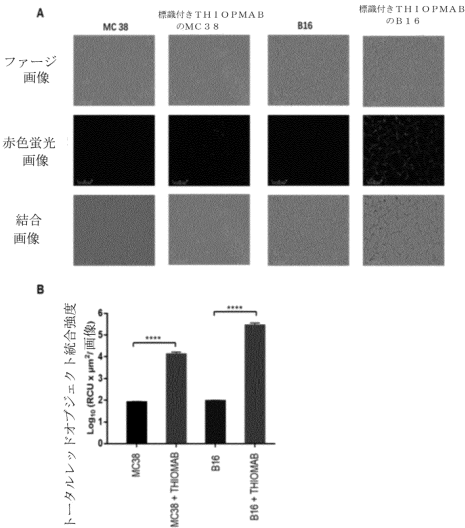


30

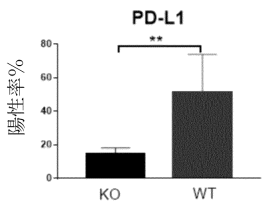
40

50

【図 1 1】

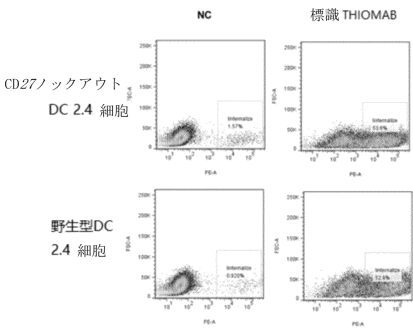


【図 1 2】

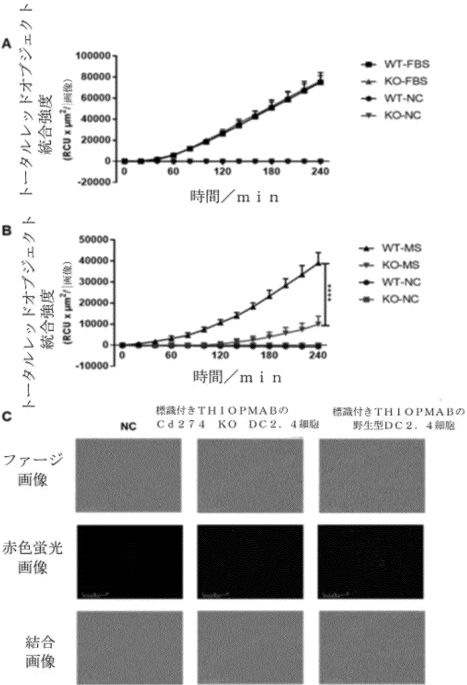


10

【図 1 3】



【図 1 4】

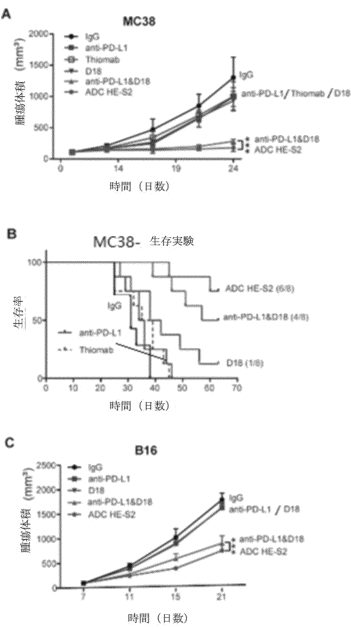


30

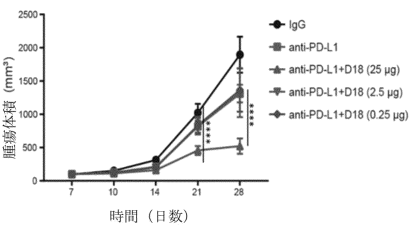
40

50

【 図 1 5 】



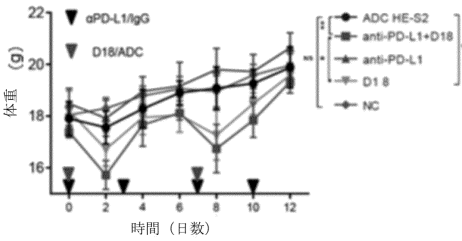
【 図 1 6 】



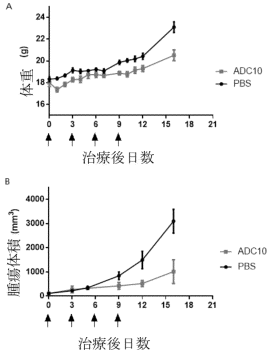
10

20

【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



30

40

50

【配列表】
0007703050000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

中華人民共和国北京市海淀区清華園 1 号

(72)発明者 王志松

中華人民共和国北京市海淀区清華園 1 号

(72)発明者 賀磊

中華人民共和国北京市海淀区清華園 1 号

(72)発明者 張岩

中華人民共和国北京市海淀区清華園 1 号

審査官 團野 克也

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 9 / 2 2 2 6 7 6 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 2 3 6 5 6 7 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 9 5 4 5 5 (W O , A 1)

特表 2 0 1 8 - 5 3 7 4 1 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 6 8 0 1 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 0 / 0 5 6 1 9 2 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 1 / 0 6 7 7 7 6 (W O , A 2)

Christopher R BEHRENS et al. , “ Methods for site-specific drug conjugation to antibodies ” ,
mAbs , 2013年09月27日 , Vol. 6, No. 1 , p.46-53 , DOI: 10.4161/mabs.26632

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

I P C C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

D B 名 J S T P l u s / J M E D P l u s

/ J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I) ,

B I O S I S / M E D L I N E / C A p l u s

/ E M B A S E (S T N)