

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7695885号

(P7695885)

(45)発行日 令和7年6月19日(2025.6.19)

(24)登録日 令和7年6月11日(2025.6.11)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K

19/00

Z N A

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K

16/46

A 6 1 K 31/522 (2006.01)

A 6 1 K

31/522

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K

47/68

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

N

請求項の数 34 (全252頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-547124(P2021-547124)

(86)(22)出願日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(65)公表番号 特表2022-520792(P2022-520792
A)

(43)公表日 令和4年4月1日(2022.4.1)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/018015

(87)国際公開番号 WO2020/168017

(87)国際公開日 令和2年8月20日(2020.8.20)

審査請求日 令和5年2月13日(2023.2.13)

(31)優先権主張番号 62/804,742

(32)優先日 平成31年2月12日(2019.2.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 508048481

アンブルックス、インコーポレイテッド
Ambr x, Inc.アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0
, ノース トーレイ パインズ ロード 1
0 9 7 51 0 9 7 5 North Torrey
Pines Road, Suite 1 0
0, La Jolla, Califor
nia 9 2 0 3 7, United St
ates of America

(74)代理人 110000338

弁理士法人 HARAKENZO WOR
LD PATENT & TRADEMA
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体-TLRアゴニストコンジュゲートを含有する組成物、その方法、及び使用

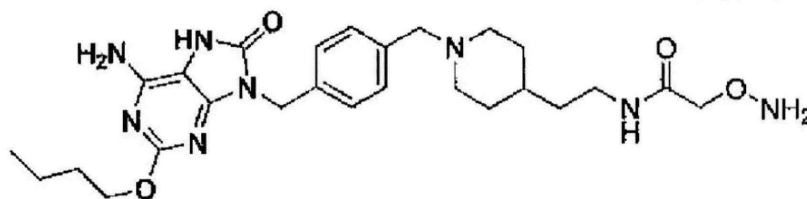
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組み込まれた1つ以上の非天然アミノ酸を有する、1つ以上の標的化ポリペプチドを含む、組成物であって、前記ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、前記標的化ポリペプチドの前記非天然アミノ酸に共有結合されるリンカーを介して、TLRアゴニスト分子に連結されており、前記リンカーは結合であり、

前記TLRアゴニストは、以下の構造を含むTLRアゴニスト、または、その塩である、組成物。

【化1】



【請求項2】

(i) 前記1つ以上の標的化ポリペプチドが、同じ標的化ポリペプチドである、または、

(ii) 前記1つ以上の標的化ポリペプチドが、細胞表面標的または腫瘍細胞標的に結合する、または、

(iii) 前記1つ以上の標的化ポリペプチドが、単一特異性標的化ポリペプチドであ

る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、二重特異性、または多特異性標的化ポリペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記単一特異性、二重特異性、または多特異性標的化ポリペプチドが、薬物コンジュゲートまたはチェックポイント阻害剤を含む、請求項 2 又は 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、抗体または抗体断片を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、細胞の抗原に結合する抗体または抗体断片である、または、

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、HER2、HER3、PD-1、PDL-1、EGFR、TROP2、PSMA、VEGFR、CTLA-4、EpCAM、MUC1、MUC16、c-met、GPC3、ENPP3、TIM-1、FOLR1、STEAP1、メソセリン、5T4、CEA、CA9、カドヘリン6、ROR1、SLC34A2、SLC39A6、SLC44A4、LY6E、DLL3、ePhA2、GPNMB、SLITRK6、CD3、CD19、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD117、CD123、CD179、CD223、及びCD276からなる群から選択される標的に結合する抗体または抗体断片である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、HER2 に結合する抗体または抗体断片を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、トラスツズマブである、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

(i) 前記抗体または抗体断片が、配列番号 1 ～ 13 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含み；

(ii) 前記抗体または抗体断片が、配列番号 1 ～ 13 の少なくとも 2 つのアミノ酸配列を含み；

(iii) 前記抗体または抗体断片が、a) 配列番号 1 または 2、並びに b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 のうちのいずれか 1 つ、を含み；又は

(iv) 前記抗体または抗体断片が、a) 配列番号 2、および b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 のうちのいずれか 1 つを含む；請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗体または抗体断片が、配列番号 2 及び配列番号 3 を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記抗体または抗体断片が、IgG、Fab、(Fab')₂、Fv、もしくは一本鎖 Fv (scFv)、1 つ以上の Fab、(Fab')₂、Fv、もしくは一本鎖 Fv (scFv) 変異、1 つ以上の Fc 変異、または、1 ～ 6 つの Fc 変異、を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体または抗体断片が、重鎖及び／又は軽鎖を含み、前記 1 つ以上の非天然アミノ

10

20

30

40

50

酸は、前記重鎖、軽鎖、または前記重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれている、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、パラアセチルフェニルアラニン、p-ニトロフェニルアラニン、p-スルホチロシン、p-カルボキシフェニルアラニン、o-ニトロフェニルアラニン、m-ニトロフェニルアラニン、p-ボロニルフェニルアラニン、o-ボロニルフェニルアラニン、m-ボロニルフェニルアラニン、p-アミノフェニルアラニン、o-アミノフェニルアラニン、m-アミノフェニルアラニン、o-アシルフェニルアラニン、m-アシルフェニルアラニン、p-OMe フェニルアラニン、o-OMe フェニルアラニン、m-OMe フェニルアラニン、p-スルホフェニルアラニン、o-スルホフェニルアラニン、m-スルホフェニルアラニン、5-ニトロHis、3-ニトロTyr、2-ニトロTyr、ニトロ置換Leu、ニトロ置換His、ニトロ置換De、ニトロ置換Trp、2-ニトロTrp、4-ニトロTrp、5-ニトロTrp、6-ニトロTrp、7-ニトロTrp、3-アミノチロシン、2-アミノチロシン、O-スルホチロシン、2-スルホオキシフェニルアラニン、3-スルホオキシフェニルアラニン、o-カルボキシフェニルアラニン、m-カルボキシフェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、L-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホチロシン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-ブromoフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラアジドエトキシフェニルアラニン、及びパラアジドメチル-L-フェニルアラニンの群から選択される 1 つ以上の非天然アミノ酸を含み、

任意で、前記非天然アミノ酸が、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、パラアセチル-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラアジドエトキシフェニルアラニン、またはパラアジドメチル-L-フェニルアラニンからなる群から選択され、および／または、

任意で、前記非天然アミノ酸が、前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドに部位特異的に組み込まれる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記非天然アミノ酸が、パラアセチルフェニルアラニンである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、1 つ以上のポリマー、または生物学的活性分子にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

(i) 前記 1 つ以上のポリマーが、直鎖状である、

(ii) 前記 1 つ以上のポリマーが、二官能性もしくは多官能性ポリマーである、または、

(iii) 前記 1 つ以上のポリマーが、水溶性ポリマーである、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記 1 つ以上のポリマーが水溶性ポリマーであり、前記水溶性ポリマーがポリエチレングリコール(PEG)であり、

任意で、前記PEGが、0.1 kDa~100 kDaの分子量、又は、0.1 kDa~50 kDaの分子量である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記少なくとも１つのポリマー、または生物学的活性分子が、少なくとも１つの非天然アミノ酸に連結されている、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記非天然アミノ酸が、前記ポリペプチド内の 20 個の一般的なアミノ酸のいずれかに対してさもなければ非反応性である、ポリマー、または生物学的活性分子に対して反応性であり、

任意で、前記非天然アミノ酸が、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含み、

任意で、前記非天然アミノ酸が、カルボニル基を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

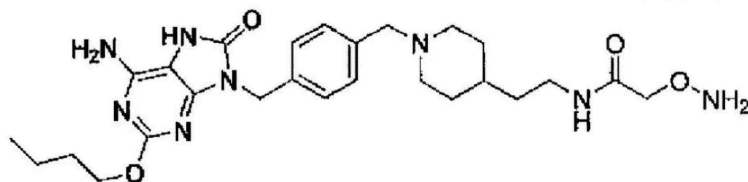
前記 1 つ以上の標的化ポリペプチドが、細胞傷害性剤または免疫刺激剤に連結されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 21】

T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む、T L R アゴニストコンジュゲート (T C) であって、前記 T L R アゴニストが、前記抗 H E R 2 抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して、前記抗 H E R 2 抗体または抗体断片にコンジュゲートされており、前記リンカーは結合であり、

前記 T L R アゴニストは、以下の構造を含む T L R アゴニスト、または、その塩である、T C。

【化 2】



【請求項 22】

前記抗 H E R 2 抗体または抗体断片が、重鎖及び／又は軽鎖を含み、前記 1 つ以上の非天然アミノ酸は、前記重鎖、軽鎖、または前記重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれており、

任意で、前記抗 H E R 2 抗体または抗体断片が、F c 領域を含み、前記抗 H E R 2 抗体または抗体断片が前記 F c 領域に 1 つ以上の変異をさらに含む、請求項 21 に記載の T C。

【請求項 23】

前記 1 つ以上の非天然アミノ酸が、パラアセチルフェニルアラニン、p-ニトロフェニルアラニン、p-スルホチロシン、p-カルボキシフェニルアラニン、o-ニトロフェニルアラニン、m-ニトロフェニルアラニン、p-ボロニルフェニルアラニン、o-ボロニルフェニルアラニン、m-ボロニルフェニルアラニン、p-アミノフェニルアラニン、o-アミノフェニルアラニン、m-アミノフェニルアラニン、o-アシルフェニルアラニン、m-アシルフェニルアラニン、p-OMeフェニルアラニン、o-OMeフェニルアラニン、m-OMeフェニルアラニン、p-スルホフェニルアラニン、o-スルホフェニルアラニン、m-スルホフェニルアラニン、5-ニトロHis、3-ニトロTyr、2-ニトロTyr、ニトロ置換Leu、ニトロ置換His、ニトロ置換De、ニトロ置換Trp、2-ニトロTrp、4-ニトロTrp、5-ニトロTrp、6-ニトロTrp、7-ニトロTrp、3-アミノチロシン、2-アミノチロシン、O-スルホチロシン、2-スルホオキシフェニルアラニン、3-スルホオキシフェニルアラニン、o-カルボキシフェニルアラニン、m-カルボキシフェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAcβ-セリン、L-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェ

エニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドエトキシフェニルアラニン、及びパラ-アジドメチル-フェニルアラニンの群から選択される、請求項21に記載のTC。

【請求項24】

前記非天然アミノ酸が、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、パラ-アセチル-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドメチル-フェニルアラニン、またはパラ-アジドエトキシフェニルアラニンである、請求項23に記載のTC。

10

【請求項25】

前記非天然アミノ酸が、パラ-アセチル-フェニルアラニンである、請求項24に記載のTC。

【請求項26】

(i) 前記抗HER2抗体または抗体断片が、配列番号1～13のうちの少なくとも1つのアミノ酸配列を含み、

(ii) 前記抗HER2抗体または抗体断片が、配列番号1～13のうちの少なくとも2つのアミノ酸配列を含み、

(iii) 前記抗HER2抗体または抗体断片が、a) 配列番号1または2、ならびにb) 配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び13のうちのいずれか1つを含み、

20

(iv) 前記抗HER2抗体または抗体断片が、a) 配列番号2、ならびにb) 配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び13のうちのいずれか1つを含み、又は

(v) 前記抗HER2抗体または抗体断片が、配列番号2、ならびに配列番号3を含む、請求項21～25のいずれかに記載のTC。

【請求項27】

化学療法剤または免疫療法剤をさらに含む、請求項21に記載のTC。

【請求項28】

前記抗HER2抗体または抗体断片が、配列番号2及び配列番号3を含み、並びに前記非天然アミノ酸が、パラ-アセチル-フェニルアラニンである、請求項21～27のいずれか1項に記載のTC。

30

【請求項29】

治療有効量の、請求項1～20のいずれか1項に記載の組成物または請求項21～28のいずれか一項に記載のTCと、医薬的に許容される担体または賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項30】

薬剤の製造における、請求項1～20または29のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項31】

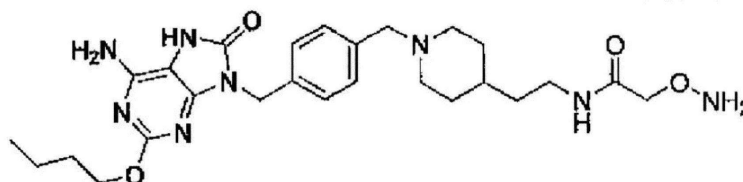
請求項21～28のいずれか一項に記載のTLRアゴニストコンジュゲート(TC)を含む免疫刺激抗体コンジュゲート(ISAC)。

40

【請求項32】

以下の構造を有する化合物またはその塩。

【化3】



50

【請求項 33】

請求項 32 に記載の化合物またはその塩を含む医薬組成物であって、任意で、医薬的に許容される賦形剤をさらに含む、医薬組成物。

【請求項 34】

薬剤の製造における、請求項 32 に記載の化合物又はその塩の使用、または請求項 33 に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔技術分野〕

関連出願の参照

本出願は、2019年2月12日に提出された、それぞれ「Compositions Containing, Methods And Uses Of Antibody-TLR Agonist Conjugates」と題される米国仮特許出願第62/804,742号の利益を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2020年2月7日に作成されたASCIIコピーは、AMBX__0230__PCT__SL.txtという名前で、30,527

【0003】

本発明の開示は、TLRアゴニスト化合物及びTLRアゴニストコンジュゲート(TC)、ならびにそれらの使用に関する。本発明はさらに、治療的または予防的として(TC)を含有する医薬組成物に関する。

【0004】

〔背景技術〕

抗体及びその断片などの標的化分子またはポリペプチド、ならびにTLRアゴニスト化合物は、部位特異的コンジュゲーションによって非天然コード化アミノ酸を使用して一緒にコンジュゲートさせて、新規のTLRアゴニストコンジュゲート(TC)を産生することができる。新規のTCは、全身治療中に循環TCがTLRアゴニストを腫瘍部位に標的化し、局所的に有益な免疫応答を刺激し、それによって全身サイトカイン放出症候群を最小限に抑えることができるような方法で構築することができる。

【0005】

〔発明の概要〕

本発明は、TLR7及び／またはTLR8を含むがこれらに限定されない、TLRのアゴニスト化合物にコンジュゲートされた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を有するポリペプチドを標的化することに関する。そのようなコンジュゲートは、本明細書では、TLRアゴニストコンジュゲート(TC)と称される。本発明のTCは、新規の生物学的TLRアゴニストコンジュゲート(BTC)を産生するために、部位特異的コンジュゲートによって非天然コード化アミノ酸を使用して一緒にコンジュゲートされた生物学的分子またはポリペプチド及びTLRアゴニスト化合物を標的化することを含む。標的化生物学的分子またはポリペプチドは、腫瘍標的化生物学的分子またはポリペプチドであり得る。

【0006】

さらなる実施形態において、本発明はさらに、安定した二量体または多量体を形成する水溶性ポリマーにさらにコンジュゲートされたTCに関する。

【0007】

本発明は、腫瘍に近接して患者の免疫系を刺激するために、腫瘍を有効量の本発明のTCと接触させることを含む、腫瘍またはがんの成長を阻害または低減する方法を提供する。本発明は、腫瘍を有効量の本発明のPEG化TC、またはTCの安定した二量体もしくは

10

20

30

40

50

は多量体と接触させることを含む、腫瘍またはがんの成長を阻害または低減する方法を提供する。一実施形態において、TCは、非ペグ化またはモノペグ化される。一実施形態において、TCは、ジペグ化される。一実施形態において、TCは、それに結合された2つ以上の及び／または異なるTLRアゴニスト分子を有する。一実施形態において、TCは、それに結合された2つ以上の及び／または同じTLRアゴニスト分子を有する。本発明の別の実施形態は、腫瘍細胞に対する免疫応答を調節するために、本発明のTCを使用する方法を提供する。ある特定の実施形態において、TCは、少なくとも1つの化学療法剤及び／または少なくとも1つの免疫療法剤と同時投与される。化学療法剤は、テモゾロミド、ゲムシタビン、ドキシソルビシン、シクロホスファミド、パクリタキセル、シスプラチン、フルオロピリミジン、タキサン、アントラサイクリン、ラパチニブ、カベシタビン、レトロゾール、ペルツズマブ、ドセタキセル、IFN- α からなる群から選択され得る。本発明の別の実施形態において、TCは、少なくとも1つの化学療法剤及び／または少なくとも1つの免疫療法剤と同時投与される。

【0008】

いくつかの実施形態において、TCは、1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む抗原結合ポリペプチド(ABP)を含むがこれに限定されない、標的化ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、完全な抗体重鎖を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、完全な抗体軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、抗体軽鎖の可変領域を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、抗体重鎖の可変領域を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、抗体軽鎖の少なくとも1つのCDRを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、抗体重鎖の少なくとも1つのCDRを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、軽鎖の少なくとも1つのCDR及び重鎖の少なくとも1つのCDRを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、Fabを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、2つ以上のFabを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、(Fab')₂を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、2つ以上の(Fab')₂を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、scFvを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、2つ以上のscFvを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、ミニボディを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、2つ以上のミニボディを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、ダイアボディを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、2つ以上のダイアボディを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、完全な軽鎖及び完全な重鎖を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、1つ以上のFcドメインまたはその一部を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、上記の実施形態のいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、ABPは、上記の実施形態のいずれかのホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体、またはヘテロ多量体を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、結合パートナーに結合するポリペプチドを含み、結合パートナーは、抗原、ポリペプチド、核酸分子、ポリマー、または他の分子もしくは物質を含む。いくつかの実施形態において、ABPは、非抗体足場分子または物質と会合する。いくつかの実施形態において、抗原は、腫瘍抗原である。

【0009】

Toll様受容体(TLR)は、広範囲の保存された病原体関連分子パターン(PAMP)を検出する。これらは、侵入病原体を感知し、続いて自然免疫応答を開始する重要な役割を果たす。ヒトにおけるTLRファミリーの10のメンバーが既知であり、これは、細胞外ロイシンリッチドメイン及び保存されたToll/インターロイキン(IL)-1受容体(TIR)ドメインを含有する細胞質尾部を特徴とするI型膜貫通タンパク質である。このファミリー内で、TLR3、TLR7、TLR8、及びTLR9は、エンドソーム内に位置する。TLR7及びTLR8は、特定の小分子リガンド(すなわち、TLR7アゴニストまたはTLR8アゴニスト)またはその天然リガンド(すなわち、一本鎖RNA、ssRNA)に結合することによって活性化され得る。アゴニストがTLR7または

10

20

30

40

50

T L R 8に結合した後、その二量体化形態の受容体は、骨髄分化一次応答遺伝子 8 8 (M y D 8 8)を含むその細胞質ドメインにおけるアダプタータンパク質のその後の動員につながる構造変化を受けると考えられる。M y D 8 8経路を介した受容体シグナル伝達カスケードの開始後、インターフェロン調節因子 7 (I R F - 7) 及び核因子カッパ B (N F - κ B) などの細胞質転写因子が活性化される。次いで、これらの転写因子は、核に転座し、種々の遺伝子、例えば、I F N - アルファ及び他の抗ウイルスサイトカイン遺伝子の転写を開始する。T L R 7は、主に形質細胞様細胞上、及びB細胞上に発現する。免疫細胞の応答性の変化は、がん患者における自然免疫応答の低減に寄与し得る。したがって、抗体またはその断片などの標的化部分にコンジュゲートされたT L R 7及び／またはT L R 8のアゴニスト誘導性活性化は、がんの治療のための新規アプローチを表し得る。T L R 7またはT L R 8アゴニストを含むT Cによる治療は、より優れた忍容性を有するより高い有効性を提供する有望な解決策を表す。T Cを作製するために本発明で使用する好適なT L R 7及び／またはT L R 8アゴニストは、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる以下の米国特許に見出される：米国特許第6, 825, 350号、米国特許第6, 656, 389号、米国特許第6, 656, 398号、米国特許第6, 683, 088号、米国特許第6, 756, 382号、米国特許第6, 825, 350号、米国特許第6, 667, 312号、米国特許第6, 677, 347号、米国特許第7, 598, 382号、米国特許第8, 673, 932号。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、T Cは、置換、付加、または欠失を伴わない対応する野生型T Cの適合性と比較した場合、T Cポリペプチドの薬学的保存剤（例えば、m-クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール）との適合性を増加させるアミノ酸置換、付加、または欠失をさらに含む標的化ポリペプチドを含む。この適合性の増加は、貯蔵中のタンパク質の生理化学的特性及び生物学的活性を維持する保存された医薬製剤の調製を可能にするであろう。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、1つ以上の操作された結合は、1つ以上の非天然アミノ酸で作製される。分子内結合は、好適な条件下でのタンパク質中の2つのアミノ酸間の反応（1つまたは両方のアミノ酸が非天然アミノ酸であり得る）、2つのアミノ酸との反応（それらのそれぞれが好適な条件下でのリンカー、ポリマー、または他の分子で天然にコード化されるか、または非天然にコード化され得る）などを含むが、これらに限定されない多くの方法で作製され得る。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、T Cポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸置換は、1つ以上の天然に存在するまたは非天然に存在するアミノ酸によるものであり得る。いくつかの実施形態において、T Cにおけるアミノ酸置換は、天然に存在するまたは非天然に存在するアミノ酸によるものであり得るが、但し、少なくとも1つの置換が非天然コード化アミノ酸によるものであることを条件とする。いくつかの実施形態において、T Cポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸置換は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸によるものであり得、加えて、少なくとも1つの置換は、非天然コード化アミノ酸によるものである。いくつかの実施形態において、T Cポリペプチドは、抗体または抗体断片であり得る。いくつかの実施形態において、T Cポリペプチドは、腫瘍標的化ポリペプチドであり得る。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、カルボニル基、アセチル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。

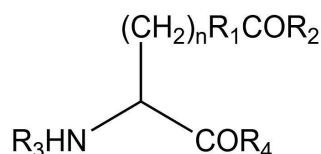
【0014】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、カルボニル基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、構造：

【0015】

50

【化 1】



【0016】

を有し、式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり、 R_2 は、H、アルキル、アリール、置換アルキル、及び置換アリールであり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_4 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

10

【0017】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、アミノオキシ基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、ヒドラジド基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、ヒドラジン基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸残基は、セミカルバジド基を含む。

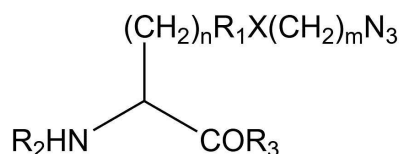
【0018】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸残基は、アジド基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、構造：

【0019】

20

【化 2】



【0020】

を有し、式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、または存在せず、 X は、O、N、Sであるか、または存在せず、 m は、0～10であり、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

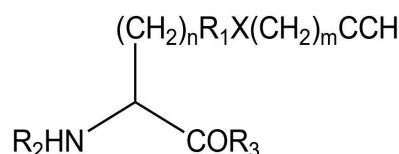
30

【0021】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、アルキン基を含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、構造：

【0022】

【化 3】



40

【0023】

を有し、式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり、 X は、O、N、Sであるか、または存在せず、 m は、0～10であり、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

【0024】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、水溶性ポリマーに連結された非天然コード化アミノ酸を含むTCである。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む。いくつかの実施形態において、TCは、非天然コ

50

ード化アミノ酸、及び1つ以上の翻訳後修飾、リンカー、ポリマー、または生物学的活性分子を含む。

【0025】

本発明はまた、TCの標的化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸を提供し、本発明は、ストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む単離された核酸を提供する。本発明はまた、標的化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸を提供し、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのセクターコドンを含む。当業者には、いくつかの異なるポリヌクレオチドが本発明の任意のポリペプチドをコードすることができることは容易に明らかである。

10

【0026】

いくつかの実施形態において、セクターコドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドン、5塩基コドン、及び4塩基コドンからなる群から選択される。

【0027】

本発明はまた、水溶性ポリマーに連結される、または1つ以上のTCポリペプチドに連結されるTCポリペプチドを作製して、ホモ二量体またはホモ多量体を形成する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、非天然コード化アミノ酸を含む単離されたTCポリペプチドを、非天然コード化アミノ酸と反応する部分を含む水溶性ポリマーまたはリンカーと接触させることを含む。いくつかの実施形態において、TCポリペプチドに組み込まれる非天然コード化アミノ酸は、20個の一般的なアミノ酸のいずれかに対してさもなくば非反応性である水溶性ポリマーまたはリンカーに対して反応性である。いくつかの実施形態において、TCポリペプチドに組み込まれる非天然コード化アミノ酸は、20個の一般的なアミノ酸のいずれかに対してさもなくば非反応性であるリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子に対して反応性である。

20

【0028】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーまたはリンカーに連結されるTCポリペプチドは、カルボニル含有アミノ酸を含むTCポリペプチドを、ポリ（エチレングリコール）分子、またはアミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、もしくはセミカルバジド基を含むリンカーと反応させることによって作製される。いくつかの実施形態において、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジド基は、アミド連結を介してポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーに連結されている。いくつかの実施形態において、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジド基は、カルバメート連結を介してポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーに連結されている。

30

【0029】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーに連結されるTCポリペプチドは、カルボニル基を含むポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーを、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジド基を含む非天然コード化アミノ酸を含むポリペプチドと反応させることによって作製される。

【0030】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーまたはリンカーに連結されるTCポリペプチドは、アルキン含有アミノ酸を含むTCを、アジド部分を含むポリ（エチレングリコール）分子と反応させることによって作製される。いくつかの実施形態において、アジドまたはアルキン基は、アミド連結を介してポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーに連結されている。

40

【0031】

いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーまたはリンカーに連結されるTCポリペプチドは、アジド含有アミノ酸を含むTCポリペプチドを、アルキン部分を含むポリ（エチレングリコール）分子と反応させることによって作製される。いくつかの実施形態において、アジドまたはアルキン基は、アミド連結を介してポリ（エチレングリコール）分子

50

またはリンカーに連結されている。

【0032】

いくつかの実施形態において、ポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーは、約 0.1 kDa ～ 約 100 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態において、ポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーは、0.1 kDa ～ 50 kDa の分子量を有する。いくつかの実施形態において、ポリ（エチレングリコール）分子またはリンカーは、分枝状ポリマーまたはリンカーである。いくつかの実施形態において、ポリ（エチレングリコール）分枝状ポリマーまたはリンカーの各分枝は、1 kDa ～ 100 kDa、または 1 kDa ～ 50 kDa の分子量を有する。

【0033】

いくつかの実施形態において、TC ポリペプチドに連結される水溶性ポリマーは、ポリアルキレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、TC に組み込まれる非天然コード化アミノ酸残基は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。いくつかの実施形態において、TC ポリペプチドに組み込まれる非天然コード化アミノ酸残基は、カルボニル部分を含み、水溶性ポリマーは、アミノオキシ、ヒドラジド、ヒドラジン、またはセミカルバジド部分を含む。いくつかの実施形態において、TC ポリペプチドに組み込まれる非天然コード化アミノ酸残基は、アルキン部分を含み、水溶性ポリマーは、アジド部分を含む。いくつかの実施形態において、TC ポリペプチドに組み込まれる非天然コード化アミノ酸残基は、アジド部分を含み、水溶性ポリマーは、アルキン部分を含む。本発明はまた、非天然コード化アミノ酸及び医薬的に許容される担体を含む TC ポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。

【0034】

本発明はまた、セクターコドンを含む TC の標的化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、TC の標的化ポリペプチドに非天然コード化アミノ酸を置換するための直交 RNA 合成酵素及び／または直交 tRNA を含む。

【0035】

本発明はまた、非天然コード化アミノ酸を含む TC の標的化ポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、TC の標的化ポリペプチド、直交 RNA 合成酵素、及び／または直交 tRNA をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含む細胞を、TC の標的化ポリペプチドまたはそのバリエーションの発現を可能にする条件下で培養することと、TC ポリペプチドを細胞及び／または培養培地から精製することを含む。

【0036】

本発明は、TC の治療上の半減期、血清半減期、または循環時間を増加させる方法も提供する。本発明はまた、TC の免疫原性を調節する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、TC の天然に存在する標的化ポリペプチド中の任意の 1 つ以上のアミノ酸の代わりに非天然コード化アミノ酸を用いること、及び／または標的化ポリペプチドを、リンカー、ポリマー、水溶性ポリマー、または生物学的活性分子に連結することを含む。

【0037】

本発明はまた、そのような治療を必要とする患者を有効量の本発明の TC 分子で治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、治療有効量の、非天然コード化アミノ酸を含む TC と、医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物を患者に投与することを含む。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、水溶性ポリマーに連結されている。いくつかの実施形態において、TC は、グリコシル化される。いくつかの実施形態において、TC は、グリコシル化されない。

【0038】

本発明はまた、単一アミノ酸におけるＴＣへの共有結合によって連結される水溶性ポリマーまたはリンカーを含むＴＣを提供する。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）部分を含む。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマーまたはリンカーに共有結合されるアミノ酸は、ＴＣの標的化ポリペプチドに存在する非天然コード化アミノ酸である。

【００３９】

本発明は、少なくとも１つのリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子を含むＴＣポリペプチドを提供し、該リンカー、ポリマー、または生物学的活性分子は、ＴＣの標的化ポリペプチドにリボソームにより組み込まれる非天然コード化アミノ酸の官能基を介して、ポリペプチドに結合される。ＴＣコンジュゲートにおいて、ＰＥＧまたは他の水溶性ポリマー、別のＴＣ、ポリペプチド、または生物学的活性分子は、リンカーを介してＴＣに直接コンジュゲートされ得る。一実施形態において、リンカーは、可動性を可能にし、二量体形成を可能にするのに十分な長さである。一実施形態において、リンカーは、二量体形成を可能にするように、長さが少なくとも３個のアミノ酸、または１８個の原子である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、多量体の形成を可能にするようにリンカーに連結される。いくつかの実施形態において、リンカーは、二官能性リンカーである。いくつかの実施形態において、本発明の組成物及び／またはＴＣは、複数のリンカーを含み得る。他の実施形態において、各リンカーは、結合された１つ以上の化合物を含み得る。リンカーはまた、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ポリエーテル、ポリエステル、ポリアミド基（複数可）、ならびにポリアミノ酸、ポリペプチド、切断可能なペプチド、またはアミノベンジルカルバメートも含み得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、同じまたは異なるリンカーであってもよい。好適なリンカーとしては、例えば、切断可能な及び切断不可能なリンカーが挙げられる。好適な切断可能なリンカーとしては、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーが挙げられる。切断可能なリンカーは、バリンーシトルリンリンカーまたはバリンーアラニンペプチドを含み得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、バリンーシトルリンまたはフェニルアラニンーリジンリンカーなどのジペプチドリンカーであり得る。バリンーシトルリンまたはバリンーアラニン含有リンカーは、マレイミドまたはスクシンイミド基を含有し得る。バリンーシトルリンまたはバリンーアラニン含有リンカーは、パラアミノベンジルアルコール（ＰＡＢＡ）基またはパラアミノベンジルカルバメート（ＰＡＢＣ）を含有し得る。他の好適なリンカーとしては、ｐＨ５．５未満で加水分解可能なリンカー、例えば、ヒドラゾンリンカーが挙げられる。さらなる好適な切断可能なリンカーとしては、ジスルフィドリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態において、切断可能なリンカーは、腫瘍微小環境で切断されたリンカー、例えば、腫瘍浸潤性Ｔ細胞を含み得る。いくつかの実施形態において、切断不可能なリンカーには、マレイミドカプロイルリンカーが含まれるが、これに限定されない。マレイミドカプロイルリンカーは、Ｎ-マレイミドメチルシクロヘキサンー１-カルボキシレート、スクシンイミド基、ペンタフルオロフェニル基、及び／または１つ以上のＰＥＧ分子を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の組成物、化合物、またはその塩のうちのいずれか１つは、リンカーによりポリペプチドに連結され得る。いくつかの実施形態において、表３、４、５、６、及び７の、本明細書に開示される化合物またはその塩のうちのいずれか１つは、リンカーによりポリペプチドに連結され得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、標的化ポリペプチドまたは生物学的標的化ポリペプチドまたは腫瘍標的化ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、抗体または抗体断片である。

【００４０】

いくつかの実施形態において、ＴＣポリペプチドは、モノＰＥＧ化される。本発明はまた、１つ以上の非天然コード化アミノ酸に結合されるリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子を含むＴＣを提供し、該非天然コード化アミノ酸は、予め選択された部位でポリペプチドにリボソームにより組み込まれる。

【0041】

いくつかの実施形態において、本発明は、組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を有する、1つ以上の標的化ポリペプチドを含む組成物を提供し、ポリペプチドのうちの少なくとも1つは、ポリペプチドの非天然アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して、TLRアゴニスト分子に連結されている。

【0042】

別の実施形態において、本発明は、1つ以上の標的化ポリペプチドが同じまたは異なる標的化ポリペプチドである組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、1つ以上の標的化ポリペプチドが、細胞表面標的または腫瘍細胞標的またはがん細胞標的に結合する組成物を提供する。別の実施形態において、1つ以上の標的化ポリペプチドは、単一特異性、二重特異性、または多特異性標的化ポリペプチドである。

10

【0043】

他の実施形態において、単一特異性、二重特異性、または多特異性標的化ポリペプチドは、薬物コンジュゲートまたはチェックポイント阻害剤を含む。任意の好適な免疫チェックポイント阻害剤は、本発明の組成物またはTCと共に使用することが企図される。いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質の発現または活性を低減する。別の実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質とそれらのリガンドとの間の相互作用を低減する。免疫チェックポイント分子の発現及び／または活性を減少させる阻害性核酸も、本発明において使用することができる。いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA4、TIGIT、グルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）、誘導性T細胞共刺激性（ICOS）、CD96、ポリオウイルス受容体関連2（PVR2）、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、B7-H4、キラー免疫グロブリン受容体（KIR）、OX40、OX40-Lインドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ1（IDO-1）、インドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ2（IDO-2）、CEACAM1、CD272、TEVI3、アデノシンA2A受容体、及びVISTAタンパク質である。いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA4、PD-1、またはPD-L1の阻害剤である。

20

【0044】

別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、抗体または抗体断片を含む。他の実施形態において、標的化ポリペプチドは、細胞の抗原に結合する抗体または抗体断片である。別の実施形態において、標的ポリペプチドは、HER2、HER3、PD-1、PDL-1、EGFR、TROP2、PSMA、VEGFR、CTLA-4、EpCAM、MUC1、MUC16、c-met、GPC3、ENPP3、TIM-1、FOLR1、STEAP1、メソセリン、5T4、CEA、CA9、カドヘリン6、ROR1、SLC34A2、SLC39A6、SLC44A4、LY6E、DLL3、ePhA2、GPNMB、SLITRK6、CD3、CD19、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD117、CD123、CD179、CD223、及びCD276からなる群から選択される標的に結合する抗体または抗体断片である。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、HER2に結合する抗体または抗体断片を含む。別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、トラスツズマブである。

30

40

【0045】

別の実施形態において、抗体または抗体断片は、IgG、Fab、(Fab')₂、Fv、または一本鎖Fv（scFv）を含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗体断片は、1つ以上のFab、(Fab')₂、Fv、または一本鎖Fv（scFv）変異を含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗体断片は、1つ以上のFc変異を含む。他の実施形態において、抗体または抗体断片は、1～6つのFc変異を含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗体断片は、2つ以上のFc変異を含む。他の実施形態において、抗体または抗体断片は、3つ以上のFc変異を含む。いくつかの実施形態にお

50

いて、抗体または抗体断片は、4つ以上のFc変異を含む。他の実施形態において、抗体または抗体断片は、5つ以上のFc変異を含む。他の実施形態において、抗体または抗体断片は、6つのFc変異を含む。

【0046】

別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、1つ以上のFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、1つ以上のFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、少なくとも2つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、少なくとも2つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、少なくとも3つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、少なくとも3つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、少なくとも4つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、少なくとも4つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、少なくとも5つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、少なくとも5つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、少なくとも6つのFc変異をさらに含む。別の実施形態において、抗体または抗体断片は、重鎖及び軽鎖のそれぞれに組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含み、抗体または抗体断片は、少なくとも6つのFc変異をさらに含む。

【0047】

別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、パラアセチルフェニルアラニン、p-ニトロフェニルアラニン、p-スルホチロシン、p-カルボキシフェニルアラニン、o-ニトロフェニルアラニン、m-ニトロフェニルアラニン、p-ボロニルフェニルアラニン、o-ボロニルフェニルアラニン、m-ボロニルフェニルアラニン、p-アミノフェニルアラニン、o-アミノフェニルアラニン、m-アミノフェニルアラニン、o-アシルフェニルアラニン、m-アシルフェニルアラニン、p-OMeフェニルアラニン、o-OMeフェニルアラニン、m-OMeフェニルアラニン、p-スルホフェニルアラニン、o-スルホフェニルアラニン、m-スルホフェニルアラニン、5-ニトロHis、3-ニトロTyr、2-ニトロTyr、ニトロ置換Leu、ニトロ置換His、ニトロ置換De、ニトロ置換Trp、2-ニトロTrp、4-ニトロTrp、5-ニトロTrp、6-ニトロTrp、7-ニトロTrp、3-アミノチロシン、2-アミノチロシン、O-スルホチロシン、2-スルホオキシフェニルアラニン、3-スルホオキシフェニルアラニン、o-カルボキシフェニルアラニン、m-カルボキシフェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-プロパルギル-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-

チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-β-セリン、L-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドエトキシフェニルアラニン、及びパラ-アジドメチル-フェニルアラニンの群から選択される1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。別の実施形態において、非天然アミノ酸は、パラ-アセチル-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドエトキシフェニルアラニン、またはパラ-アジドメチル-フェニルアラニンからなる群から選択される。他の実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、1つ以上の標的化ポリペプチドに部位特異的に組み込まれる。

10

【0048】

別の実施形態において、TLRアゴニストは、TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、またはTLR7／TLR8デュアルアゴニストである。他の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造1、2、3、4、または5のうちのいずれか1つに記載の分子構造を含むTLRアゴニストである。別の実施形態において、TLRアゴニストは、本発明の表3、4、5、6、7に記載の構造の群から選択されるTLRアゴニストのうちのいずれか1つである。

【0049】

他の実施形態において、標的化ポリペプチドは、1つ以上のリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、1つ以上のリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子に直接または間接的にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、1つ以上のリンカーは、切断可能または切断不可能なリンカーである。

20

【0050】

いくつかの実施形態において、1つ以上のリンカーは、0.1kDa～50kDaである。他の実施形態において、1つ以上のリンカーは、0.1kDa～10kDaである。他の実施形態では、1つ以上のリンカーまたはポリマーは、直鎖状、分枝状、多量体、またはデンドリマーである。別の実施形態において、1つ以上のリンカーまたはポリマーは、二官能性もしくは多官能性リンカーまたは二官能性もしくは多官能性ポリマーである。

30

【0051】

他の実施形態において、1つ以上のポリマーは、水溶性ポリマーである。他の実施形態において、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)である。いくつかの実施形態において、PEGは、0.1kDa～100kDaの分子量を有する。他の実施形態において、PEGは、0.1kDa～50kDaの分子量を有する。他の実施形態において、PEGは、0.1kDa～40kDaの分子量を有する。他の実施形態において、PEGは、0.1kDa～30kDaの分子量を有する。他の実施形態において、PEGは、0.1kDa～20kDaの分子量を有する。他の実施形態において、PEGは、0.1kDa～10kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール)分子は、約0.1kDa～約100kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール)分子は、0.1kDa～50kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール)は、1kDa～25kDa、または2～22kDa、または5kDa～20kDaの分子量を有する。例えば、ポリ(エチレングリコール)ポリマーの分子量は、約5kDa、または約10kDa、または約20kDa、または約30kDaであり得る。例えば、ポリ(エチレングリコール)ポリマーの分子量は、5kDa、または10kDa、または20kDa、または30kDaであり得る。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール)分子は、分枝状PEGである。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール)分子は、分枝状の5KのPEGである。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレング

40

50

リコール) 分子は、分枝状の 10 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、分枝状の 20 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、直鎖状 PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、直鎖状の 5 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、直鎖状の 10 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、直鎖状の 20 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) 分子は、直鎖状の 30 K の PEG である。いくつかの実施形態において、ポリ(エチレングリコール) ポリマーの分子量は、平均分子量である。ある特定の実施形態において、平均分子量は、数平均分子量(M_n) である。平均分子量は、GPC または SEC、SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、質量分析、またはキャピラリー電気泳動を使用して決定または測定され得る。

【0052】

別の実施形態において、少なくとも 1 つのリンカー、ポリマー、または生物学的活性分子は、少なくとも 1 つの非天然コード化アミノ酸に連結されている。いくつかの実施形態において、リンカーは、PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 40 kDa の分子量を有する PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 30 kDa の分子量を有する PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 20 kDa の分子量を有する PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 10 kDa の分子量を有する PEG である。他の実施形態において、リンカーは、0.1 kDa ~ 5 kDa の分子量を有する PEG である。

【0053】

別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、組成物の安定性または溶解性を増加させる 1 つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、ADCP または ADC 活性を増強/低減する 1 つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、組成物の薬物動態を増加させる 1 つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。他の実施形態において、組成物は、組換え宿主細胞における、またはインビトロで合成された標的化ポリペプチドの発現を増加させる、1 つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む。

【0054】

別の実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、ポリペプチド内の 20 個の一般的なアミノ酸のいずれかに対してさもなければ非反応性である、リンカー、ポリマー、または生物学的活性分子に対して反応性である。別の実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む。他の実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、カルボニル基を含む。

【0055】

別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、細胞傷害性剤または免疫刺激剤に連結されている。別の実施形態において、本発明の TC または BTC は、細胞傷害性剤または免疫刺激剤に連結される。別の実施形態において、標的化ポリペプチドは、細胞傷害性剤または免疫刺激剤を含む。別の実施形態において、本発明の TC または BTC は、細胞傷害性剤または免疫刺激剤を含む。

【0056】

別の実施形態において、本発明は、図 1 のいずれかの構造に記載の構造を含む TLR アゴニストにコンジュゲートされた抗 HER2 抗体または抗体断片を含む TLR アゴニストコンジュゲート(TC)を提供し、TLR アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされる。別の実施形態において、TLR アゴニストは、TLR 7 アゴニスト、TLR 8 アゴニスト、または TLR 7 / TLR 8 デュアルアゴニストである

。別の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造1に記載の構造を含む。別の実施形態において、構造1に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-621、AXC-622、AXC-625、AXC-626、AXC-627、AXC-638、AXC-639、AXC-640、AXC-642、AXC-662、AXC-665、AXC-666、AXC-667、AXC-668、AXC-669、AXC-670、AXC-671、AXC-672、AXC-675、AXC-678、AXC-679、AXC-681、AXC-687、AXC-688、AXC-689、AXC-690、AXC-691、AXC-696、AXC-697、AXC-698、AXC-699、AXC-700、AXC-701、AXC-702、AXC-709、AXC-710、AXC-711、AXC-712、AXC-713、AXC-714、AXC-715、AXC-716、AXC-717、AXC-718、AXC-719、AXC-722、AXC-723、AXC-724、AXC-725、AXC-726、AXC-727、AXC-729、AXC-731、AXC-732、AXC-733、AXC-734、AXC-735、AXC-736、AXC-737、AXC-738、AXC-739、AXC-740、AXC-741、AXC-743、AXC-742、AXC-747、AXC-748、AXC-749、AXC-750、AXC-751、AXC-752、AXC-754、AXC-755、AXC-756、AXC-757、AXC-758、AXC-759、AXC-760、AXC-761、AXC-762、AXC-764、AXC-771、AXC-772、AXC-773、AXC-777、AXC-778、AXC-779、AXC-789、AXC-793、AXC-799、AXC-800、AXC-801、AXC-802、AXC-803、AXC-804、AXC-805、AXC-806、AXC-807、AXC-808、AXC-809、AXC-810、AXC-831、及びAXC-910化合物の群から選択される。別の実施形態において、本発明は、リンカーをさらに含む、AXC-621、AXC-622、AXC-625、AXC-626、AXC-627、AXC-638、AXC-639、AXC-640、AXC-642、AXC-662、AXC-665、AXC-666、AXC-667、AXC-668、AXC-669、AXC-670、AXC-671、AXC-672、AXC-675、AXC-678、AXC-679、AXC-681、AXC-687、AXC-688、AXC-689、AXC-690、AXC-691、AXC-696、AXC-697、AXC-698、AXC-699、AXC-700、AXC-701、AXC-702、AXC-709、AXC-710、AXC-711、AXC-712、AXC-713、AXC-714、AXC-715、AXC-716、AXC-717、AXC-718、AXC-719、AXC-722、AXC-723、AXC-724、AXC-725、AXC-726、AXC-727、AXC-729、AXC-731、AXC-732、AXC-733、AXC-734、AXC-735、AXC-736、AXC-737、AXC-738、AXC-739、AXC-740、AXC-741、AXC-743、AXC-742、AXC-747、AXC-748、AXC-749、AXC-750、AXC-751、AXC-752、AXC-754、AXC-755、AXC-756、AXC-757、AXC-758、AXC-759、AXC-760、AXC-761、AXC-762、AXC-764、AXC-771、AXC-772、AXC-773、AXC-777、AXC-778、AXC-779、AXC-789、AXC-793、AXC-799、AXC-800、AXC-801、AXC-802、AXC-803、AXC-804、AXC-805、AXC-806、AXC-807、AXC-808、AXC-809、AXC-810、AXC-831、またはAXC-910化合物のうちのいずれか1つのTLRアゴニストを提供する。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、構造1に記載の構造を含む。

【0057】

他の実施形態において、構造1に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-625、AXC-626、AXC-638、AXC-639、AXC-640、AXC-642、AXC-662、AXC-667、AXC-668、AXC-669、AXC-67

10

20

30

40

50

0、AXC-671、AXC-672、AXC-675、AXC-681、AXC-687、AXC-688、AXC-689、AXC-690、AXC-691、AXC-697、AXC-699、AXC-700、AXC-701、AXC-702、AXC-709、AXC-710、AXC-711、AXC-713、AXC-714、AXC-717、AXC-719、AXC-722、AXC-723、AXC-724、AXC-725、AXC-726、AXC-727、AXC-731、AXC-732、AXC-733、AXC-734、AXC-735、AXC-736、AXC-737、AXC-738、AXC-739、AXC-740、AXC-741、AXC-743、AXC-742、AXC-747、AXC-748、AXC-750、AXC-751、AXC-752、AXC-754、AXC-755、AXC-756、AXC-757、AXC-758、AXC-759、AXC-760、AXC-761、AXC-762、AXC-764、AXC-771、AXC-772、AXC-773、AXC-777、AXC-778、AXC-779、AXC-789、AXC-793、AXC-800、AXC-801、AXC-802、AXC-803、AXC-804、AXC-805、AXC-806、AXC-807、AXC-808、AXC-809、AXC-810、AXC-831、及びAXC-910化合物の群から選択される。他の実施形態において、構造1に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-801、AXC-802、AXC-831、及びAXC-910化合物の群から選択される。他の実施形態において、AXC-801、AXC-802、AXC-831、及びAXC-910化合物の群から選択される構造1に記載の構造を含むTLRアゴニストは、リンカーをさらに含む。

【0058】

別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、重鎖、軽鎖、または重鎖及び軽鎖の両方に組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。別の実施形態において、1つ以上の非天然コード化アミノ酸は、パラアセチルフェニルアラニン、p-ニトロフェニルアラニン、p-スルホチロシン、p-カルボキシフェニルアラニン、o-ニトロフェニルアラニン、m-ニトロフェニルアラニン、p-ボロニルフェニルアラニン、o-ボロニルフェニルアラニン、m-ボロニルフェニルアラニン、p-アミノフェニルアラニン、o-アミノフェニルアラニン、m-アミノフェニルアラニン、o-アシルフェニルアラニン、m-アシルフェニルアラニン、p-OMeフェニルアラニン、o-OMeフェニルアラニン、m-OMeフェニルアラニン、p-スルホフェニルアラニン、o-スルホフェニルアラニン、m-スルホフェニルアラニン、5-ニトロHis、3-ニトロTyr、2-ニトロTyr、ニトロ置換Leu、ニトロ置換His、ニトロ置換De、ニトロ置換Trp、2-ニトロTrp、4-ニトロTrp、5-ニトロTrp、6-ニトロTrp、7-ニトロTrp、3-アミノチロシン、2-アミノチロシン、O-スルホチロシン、2-スルホオキシフェニルアラニン、3-スルホオキシフェニルアラニン、o-カルボキシフェニルアラニン、m-カルボキシフェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAcβ-セリン、L-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホチロシン、ホスホチロシン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラアジドエトキシフェニルアラニン、及びパラアジドメチル-L-フェニルアラニンの群から選択される。他の実施形態において、非天然アミノ酸は、パラアセチル-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラアジドメチル-L-フェニルアラニン、またはパラアジドエトキシフェニルアラニンである。

【0059】

別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に1つ以上の変異

をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に2つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に3つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に4つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に5つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に6つ以上の変異をさらに含む。別の実施形態において、抗HER2抗体または抗体断片は、Fc領域に6つの変異をさらに含む。

【0060】

別の実施形態において、1つ以上のリンカーは、切断可能または切断不可能なリンカーである。他の実施形態において、1つ以上のリンカーは、二官能性または多官能性リンカーである。

10

【0061】

別の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造2に記載の構造を含む。別の実施形態において、構造2に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-745、AXC-746、及びAXC-753化合物の群から選択される。別の実施形態において、AXC-745、AXC-746、及びAXC-753化合物のうちのいずれか1つに記載の構造を含むTLRアゴニストは、リンカーをさらに含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、構造2に記載の構造を含む。

【0062】

別の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造3に記載の構造を含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、AXC-837またはAXC-847化合物である構造3に記載の構造を含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、AXC-837またはAXC-847化合物に記載の構造を含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、AXC-847化合物に記載の構造を含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、構造3に記載の構造を含む。

20

【0063】

別の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造4に記載の構造を含む。別の実施形態において、構造4に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-844、AXC-842、AXC-843、AXC-845、AXC-846、AXC-836、またはAXC-841化合物の群から選択される。別の実施形態において、AXC-844、AXC-842、AXC-843、AXC-845、AXC-846、AXC-836、またはAXC-841化合物のうちのいずれか1つの構造4に記載の構造を含むTLRアゴニストは、リンカーをさらに含む。別の実施形態において、TLRアゴニストは、リンカーをさらに含む、構造4に記載の構造を含む。

30

【0064】

別の実施形態において、TLRアゴニストは、図1の構造5に記載の構造を含む。別の実施形態において、構造5に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-862、AXC-863、AXC-867、AXC-868、AXC-869、AXC-872、AXC-873、AXC-876、AXC-877、AXC-878、AXC-879、AXC-880、AXC-881、AXC-882、AXC-883、AXC-884、AXC-885、AXC-886、AXC-887、AXC-888、AXC-889、AXC-890、AXC-891、AXC-892、AXC-893、AXC-895、AXC-896、AXC-897、AXC-898、AXC-901、AXC-903、AXC-904、AXC-905、AXC-906、AXC-907、AXC-908、AXC-909、AXC-911、AXC-912、AXC-913、AXC-914、AXC-915、またはAXC-916化合物の群から選択される。他の実施形態において、構造5に記載の構造を含むTLRアゴニストは、AXC-862、AXC-863、AXC-867、AXC-868、AXC-869、AXC-873、AXC-876、AXC-879、AXC-880、AXC-882、AXC-889、AXC-893、A

40

50

X C - 8 9 6、A X C - 8 9 7、A X C - 9 0 1、A X C - 9 0 7、A X C - 9 0 9、A X C - 9 1 3、及び A X C - 9 1 4 化合物の群から選択される。別の実施形態において、A X C - 8 6 2、A X C - 8 6 3、A X C - 8 6 7、A X C - 8 6 8、A X C - 8 6 9、A X C - 8 7 2、A X C - 8 7 3、A X C - 8 7 6、A X C - 8 7 7、A X C - 8 7 8、A X C - 8 7 9、A X C - 8 8 0、A X C - 8 8 1、A X C - 8 8 2、A X C - 8 8 3、A X C - 8 8 4、A X C - 8 8 5、A X C - 8 8 6、A X C - 8 8 7、A X C - 8 8 8、A X C - 8 8 9、A X C - 8 9 0、A X C - 8 9 1、A X C - 8 9 2、A X C - 8 9 3、A X C - 8 9 5、A X C - 8 9 6、A X C - 8 9 7、A X C - 8 9 8、A X C - 9 0 1、A X C - 9 0 3、A X C - 9 0 4、A X C - 9 0 5、A X C - 9 0 6、A X C - 9 0 7、A X C - 9 0 8、A X C - 9 0 9、A X C - 9 1 1、A X C - 9 1 2、A X C - 9 1 3、A X C - 9 1 4、A X C - 9 1 5、または A X C - 9 1 6 化合物のいずれか 1 つに記載の構造を含む T L R アゴニストは、リンカーをさらに含む。別の実施形態において、T L R アゴニストは、リンカーをさらに含む、構造 5 に記載の構造を含む。

【0065】

別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 1 ~ 1 3 のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 1 ~ 1 3 のうちの少なくとも 2 つのアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、a) 配列番号 1 または 2、ならびに b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 のうちのいずれか 1 つを含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、a) 配列番号 1 または 2 の重鎖、ならびに b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 のうちのいずれか 1 つの軽鎖を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、a) 配列番号 1、ならびに b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 のうちのいずれか 1 つを含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、a) 配列番号 2、ならびに b) 配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及び 13 のうちのいずれか 1 つを含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 3 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 4 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 5 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 6 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 7 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 8 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 9 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 10 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 11 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 12 を含む。別の実施形態において、抗 H E R 2 抗体または抗体断片は、配列番号 2 及び配列番号 13 を含む。別の実施形態において、本発明は、抗 H E R 2 抗体または抗体断片を提供し、非天然コード化アミノ酸は、K a b a t 番号付けによる 1 1 4 位に特異的に組み込まれる。

【0066】

別の実施形態において、本発明は、図 1 のいずれかの構造に記載の構造を含む T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされ、T C は、化学療法剤または免疫療法剤をさらに含む。別の実施形態において、本発明は、表 3 ~ 7 の化合物のうちのいずれか 1 つから選択される T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体ま

たは抗体断片にコンジュゲートされる。別の実施形態において、本発明は、表 3～7 の化合物のうちのいずれか 1 つから選択される T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされ、T C は、化学療法剤または免疫療法剤をさらに含む。

【0067】

別の実施形態において、本発明は、図 1 のいずれかの構造に記載の構造を含む T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされ、T C は、薬物コンジュゲートをさらに含む。他の実施形態において、薬物コンジュゲートは、抗体薬物コンジュゲートである。別の実施形態において、本発明は、表 3～7 の化合物のうちのいずれか 1 つから選択される T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされる。別の実施形態において、本発明は、表 3～7 の化合物のうちのいずれか 1 つから選択される T L R アゴニストにコンジュゲートされた抗 H E R 2 抗体または抗体断片を含む T L R アゴニストコンジュゲート (T C) を提供し、T L R アゴニストは、抗体または抗体断片に組み込まれた 1 つ以上の非天然コード化アミノ酸に共有結合されたリンカーを介して抗体または抗体断片にコンジュゲートされ、T C は、薬物コンジュゲートをさらに含む。他の実施形態において、薬物コンジュゲートは、抗体薬物コンジュゲートである。他の実施形態において、T C は、サイトカインまたはサイトトキシンをさらに含む。

【0068】

別の実施形態において、本発明は、対象または患者に、治療有効量の本発明の組成物または T C を投与することを含む、がんまたは疾患または状態または適応症または障害を有する対象または患者を治療する方法を提供する。ある特定の実施形態において、腫瘍またはがんは、H E R 2 陽性腫瘍またはがんである。ある特定の実施形態において、腫瘍、がん、適応症、疾患、障害、または状態は、H E R 2 陽性腫瘍、がん、適応症、疾患、障害、または状態である。ある特定の実施形態において、腫瘍またはがんは、結腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、膠芽腫、前立腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、膵臓癌、腎臓癌、食道癌、膣癌、胃癌、及び白血病からなる群から選択される。

【0069】

別の実施形態において、本発明は、対象または患者に、治療有効量の、化学療法剤または免疫療法剤をさらに含む、本発明の組成物または T C を投与することを含む、がんまたは疾患または状態を有する対象または患者を治療する方法を提供する。ある特定の実施形態において、T C は、少なくとも 1 つの化学療法剤と同時投与される。化学療法剤は、テモゾロミド、ゲムシタピン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、パクリタキセル、シスプラチン、フルオロピリミジン、タキサン、アントラサイクリン、ラパチニブ、カペシタピン、レトロゾール、ペルツズマブ、ドセタキセル、I F N - α からなる群から選択され得る。本発明の別の実施形態において、T C は、少なくとも 1 つの化学療法剤と同時投与される。

【0070】

別の実施形態において、本発明は、対象または患者に、治療有効量の、抗体薬物コンジュゲート、細胞傷害性剤、またはチェックポイント阻害剤をさらに含む、本発明の組成物または T C を投与することを含む、がんまたは疾患または状態を有する対象または患者を治療する方法を提供する。

【0071】

別の実施形態において、本発明は、細胞を、本発明のＴＣと接触させることを含む、細胞を死滅させる方法を提供する。他の実施形態において、本細胞は、腫瘍またはがん細胞である。ある特定の実施形態において、腫瘍またはがん細胞は、結腸、卵巣、乳房、黒色腫、肺、膵芽腫、前立腺、膀胱、子宮頸部、脾臓、腎臓、食道、膣、胃、または白血病がん細胞である。ある特定の実施形態において、腫瘍またはがんは、ＨＥＲ２陽性腫瘍またはがんである。ある特定の実施形態において、治療される腫瘍、がん、適応症、疾患、障害、または状態は、ＨＥＲ２陽性腫瘍、がん、適応症、疾患、障害、または状態である。

【００７２】

本発明は、腫瘍に近接して患者の免疫系を刺激するために、腫瘍を、有効量の本発明のＴＣと接触させることを含む、腫瘍またはがんの成長を阻害または低減する方法を提供する。本発明は、腫瘍を、有効量の本発明のＰＥＧ化ＴＣ、またはＴＣの安定した二量体もしくは多量体と接触させることを含む、腫瘍またはがんの成長を阻害または低減する方法を提供する。一実施形態において、ＴＣは、非ペグ化またはモノペグ化される。一実施形態において、ＴＣは、ジペグ化される。一実施形態において、ＴＣは、それに結合された２つ以上の及び／または異なるＴＬＲアゴニスト分子を有する。本発明の別の実施形態は、腫瘍細胞に対する免疫応答を調節するために、本発明のＴＣを使用する方法を提供する。

【００７３】

いくつかの実施形態において、本発明は、がんを治療するためにＴＣを使用する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明のＴＣは、がん、例えば、血管新生及び異形成などの前がん状態に直接または間接的に関連する状態を含む、がん関連疾患、障害、及び状態の治療または予防に使用することができる。いくつかの実施形態において、腫瘍は、液性または固形腫瘍である。いくつかの実施形態において、治療される状態は、がんである。がんは、乳癌、脳癌、脾臓癌、皮膚癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、結腸癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、骨癌、及び血液癌（白血病性癌）、またはこれらのがんのいずれかに関連するがんまたは疾患または状態であり得るが、これらに限定されない。癌腫は、上皮細胞から始まるがんであり、上皮細胞は、身体の表面を覆い、ホルモンを産生し、腺を構成する細胞である。非限定的な例として、癌腫には、乳癌、脾臓癌、肺癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、胃癌、前立腺癌、肝臓癌、卵巣癌、脳癌、膣癌、外陰部癌、子宮癌、口腔癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、皮膚癌、卵管の癌、頭頸部癌、消化管間質癌、腺癌、皮膚または眼内黒色腫、肛門領域の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、尿道の癌、腎盂腎癌、尿管の癌、子宮内膜の癌、子宮頸部の癌、下垂体の癌、中枢神経系（ＣＮＳ）の腫瘍、原発性ＣＮＳリンパ腫、脳幹神経膠腫、及び脊髄軸腫瘍が含まれる。いくつかの症例では、がんは、基底細胞癌、扁平上皮癌、黒色腫、非黒色腫、または日光（太陽）角化症などの皮膚癌である。いくつかの実施形態において、本発明はまた、哺乳動物における急性白血病を治療するための方法に関し、これには、治療有効量の本発明のＴＣを、該哺乳動物に投与することが含まれる。本発明はまた、急性白血病芽細胞の増殖を阻害するための方法を提供し、これには、治療有効量の本発明のＴＣを、急性白血病を患う哺乳動物に投与することが含まれる。

【００７４】

別の実施形態において、本明細書に開示されるＴＣは、免疫応答を調節するために使用され得る。免疫応答の調節は、免疫応答の刺激、活性化、増加、増強、または上方調節を含み得る。免疫応答の調節は、免疫応答を抑制、阻害、予防、低減、または下方調節することを含み得る。

【００７５】

別の実施形態において、本発明は、治療有効量の本発明の組成物またはＴＣと、医薬的に許容される担体または賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【００７６】

別の実施形態において、本発明は、製剤の製造における本発明の組成物の使用を提供する。

【００７７】

別の実施形態において、本発明は、図1の構造のうちのいずれか1つに記載のTLRアゴニストを含む、免疫刺激抗体コンジュゲート（ISAC）を提供する。別の実施形態において、本発明は、表3、4、5、6、7の化合物のうちのいずれか1つに記載のTLRアゴニストを含む、免疫刺激抗体コンジュゲート（ISAC）を提供する。別の実施形態において、本発明は、TLRアゴニストが、AXC-862、AXC-863、AXC-867、AXC-868、AXC-869、AXC-874、AXC-875、AXC-876、AXC-879、AXC-880、AXC-882、AXC-893、AXC-896、AXC-897、AXC-901、AXC-907、及びAXC-910化合物の群から選択される化合物を含むISACを提供する。

【0078】

別の実施形態において、本発明は、図1に記載の構造を有する化合物のうちのいずれか1つの塩を提供する。別の実施形態において、本発明は、表3、4、5、6、7の化合物のうちのいずれか1つの塩を提供する。別の実施形態において、本発明は、本開示の組成物、化合物、及びTCによる医薬組成物またはその塩を提供する。他の実施形態において、医薬組成物または塩は、医薬的に許容される賦形剤をさらに含む。

【0079】

〔図面の簡単な説明〕

〔図1〕本発明での使用に好適なTLRアゴニストの一般構造を示す。

【0080】

〔図2〕種々のTCコンジュゲートの構造を示す。

【0081】

〔図3〕さらなるTCコンジュゲートの構造を示す。

【0082】

〔図4〕細胞増殖アッセイにおける選択されたTCコンジュゲートの生物学的活性を示す。

【0083】

〔図5〕A及びBは、種々のTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【0084】

〔図6〕リンカーに結合された種々のTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【0085】

〔図7〕さらなるTLR7アゴニスト及びリンカーに結合されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【0086】

〔図8〕さらなるTLR7アゴニスト及びリンカーに結合されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【0087】

〔図9〕非天然アミノ酸であるpAF（DL-pAF）と比較した、リンカーに結合された異なるTLR7アゴニスト（薬物リンカーまたはDL）のTLR7活性を示す。

【0088】

〔図10〕アミノ酸位置HA114に非天然アミノ酸を有する非コンジュゲート抗HER2抗体（A）、ならびにTLRアゴニストAXC-875（B）及びAXC-880（C）を有するアミノ酸位置HA114にコンジュゲートされた抗HER2抗体のHPLCクロマトグラムを示す。

【0089】

〔図11〕SKOV3 HER2高発現腫瘍細胞株（A）、JIMT-1 HER2中／低発現腫瘍細胞株（B）、及びA431 HER2低発現腫瘍細胞株（C）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされた種々のペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【0090】

〔図12〕SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株（A）及びHCC1806 HER2

10

20

30

40

50

超低発現腫瘍細胞株（Ｂ）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【0091】

〔図13〕SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株（Ａ）及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株（Ｂ）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【0092】

〔図14〕SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株（Ａ）及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株（Ｂ）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【0093】

〔図15〕SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株（Ａ）及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株（Ｂ）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされた3つの（3）ペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較し、HER2-AXC-879が最良のISAC活性を有することを示す。

【0094】

〔発明を実施するための形態〕

抗体などの標的化部分及び1つ以上のTLRアゴニストを含むTCが本明細書に開示される。TLRアゴニストは、1つ以上のリンカー（複数可）をさらに含み得る。本発明のTCは、標的化部分の非天然アミノ酸に連結されたTLRアゴニストを含み得る。また、標的化部分ポリペプチドに組み込まれた非天然アミノ酸を含むそのようなTCを作製するための方法も含まれる。

【0095】

ある特定の実施形態において、記載される化合物のいずれかと、医薬的に許容される担体、賦形剤、または結合剤とを含む、医薬組成物が提供される。

【0096】

さらなるまたは代替的な実施形態は、患者におけるポリペプチドの存在を検出するための方法であり、該方法は、少なくとも1つの複素環含有非天然アミノ酸を含むポリペプチドを投与することを含み、得られる複素環含有非天然アミノ酸ポリペプチドは、相同的な天然に存在するアミノ酸ポリペプチドに対してポリペプチドの免疫原性を調節する。

【0097】

本明細書に記載の方法及び組成物は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコル、細胞株、構築物、及び試薬に限定されず、したがって変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される、本明細書に記載の方法及び組成物の範囲を限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0098】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明確に他のことを指示しない限り、複数の参照を含む。

【0099】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本明細書に記載の発明が属する当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法、デバイス、及び材料を、本明細書に記載の本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法、デバイス、及び材料をここで説明する。

【0100】

本明細書で言及されるすべての刊行物及び特許は、例えば、刊行物に記載されている構築物及び方法論を説明及び開示する目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれており、これは現在記載されている発明と関連して使用され得る。本明細書において論じられる刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示についてのみ提供される。本

10

20

30

40

50

明細書におけるいかなるものも、本明細書に記載の発明者が、先行発明またはいかなる他の理由によってもそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【0101】

「アルドールベースの連結」または「混合アルドールベースの連結」という用語は、 β -ヒドロキシカルボニル化合物-アルドールを生成するための、あるカルボニル化合物と、同じであってもなくてもよい別のカルボニル化合物のエノレート／エノールとの酸または塩基触媒縮合を指す。

【0102】

本明細書で使用される場合、「親和性標識」という用語は、それを修飾するか、それを破壊するか、またはそれと化合物を形成するかのいずれかのために、別の分子に可逆的または不可逆的に結合する標識を指す。例として、親和性標識は、酵素及びそれらの基質、または抗体及びそれらの抗原を含む。

【0103】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、及び「アルキルチオ」（またはチオアルコキシ）という用語は、それらの従来の意味で使用され、それぞれ、酸素原子、アミノ基、または硫黄原子を介して分子に連結されたそれらのアルキル基を指す。

【0104】

「アルキル」という用語は、それ自体または別の分子の一部として、別段の記載がない限り、直鎖もしくは分枝鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはそれらの組み合わせを意味し、これは、完全飽和、一価または多価不飽和であり得、指定された炭素原子の数を有する（すなわち、 $C_1 \sim C_{10}$ は、1～10個の炭素を意味する）二価及び多価ラジカルを含み得る。飽和炭化水素ラジカルの例としては、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、イソブチル、 sec -ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えば、 n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチルなどの相同体及び異性体などの基が挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2，4-ペンタジエニル、3-（1，4-ペンタジエニル）、エチニル、1-及び3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにより高い相同体及び異性体が挙げられるが、これらに限定されない。「アルキル」という用語は、別段の記載がない限り、「ヘテロアルキル」、「ハロアルキル」、及び「ホモアルキル」などの、本明細書により詳細に定義されるアルキルのそれらの誘導体を含むことも意味する。

【0105】

「アルキレン」という用語は、それ自体または別の分子の一部として、 $(-CH_2-)_n$ によって例示されるように、アルカンに由来する二価のラジカルを意味し、式中、 n は、1～約24であり得る。単なる例として、そのような基には、構造 $-CH_2CH_2-$ 及び $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ などの10個以下の炭素原子を有する基が含まれるが、これらに限定されない。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、一般に8個以下の炭素原子を有する、より短い鎖のアルキルまたはアルキレン基である。「アルキレン」という用語は、別段の記載がない限り、「ヘテロアルキレン」として本明細書に記載されるそれらの基を含むことも意味する。

【0106】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在する及び非天然のアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を指す。天然にコードされるアミノ酸は、20個の一般的なアミノ酸（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、及びバリン）、ならびにピロリジン、及びセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸、ほんの一例と

して、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合される α 炭素と同じ基本的な化学構造を有する化合物を指す。そのような類似体は、修飾されたR基（例として、ノルロイシン）を有し得るか、または天然に存在するアミノ酸と同じ基本的な化学構造を依然として保持しながら修飾されたペプチド骨格を有し得る。アミノ酸類似体の非限定的な例としては、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムが挙げられる。

【0107】

アミノ酸は、本明細書において、それらの名称、それらの一般的に知られている3文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名委員会（IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission）によって推奨される1文字記号のいずれかによって参照され得る。加えて、ヌクレオチドは、それらの一般に受け入れられている1文字コードによって参照されてもよい。

【0108】

「アミノ末端修飾基」とは、末端アミン基に結合することができる任意の分子を指す。例として、そのような末端アミン基は、ポリマー分子の末端にあってもよく、そのようなポリマー分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び多糖類を含むが、これらに限定されない。末端修飾基には、種々の水溶性ポリマー、ペプチド、またはタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。ほんの一例として、末端修飾基には、ポリエチレングリコールまたは血清アルブミンが含まれる。末端修飾基は、ペプチドの血清半減期を増加させることを含むが、これに限定されないポリマー分子の治療特徴を修飾するために使用され得る。

【0109】

本明細書における「抗体」とは、抗体遺伝子のすべてまたは一部によって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ（IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4）、デルタ、イプシロン、及びミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における抗体は、完全長抗体及び抗体断片を含み、任意の生物内に自然に存在するか、または操作される抗体（例えば、バリエーション）を含むことを意味する。

【0110】

「抗体断片」とは、全長形態以外の抗体の任意の形態を意味する。本明細書における抗体断片としては、全長抗体内に存在するより小さい構成要素である抗体、及び操作されている抗体が挙げられる。抗体断片には、限定されないが、Fv、Fc、Fab、及び（Fab'）₂、一本鎖Fv（scFv）、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二機能性ハイブリッド抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDRの組み合わせ、可変領域、フレームワーク領域、定常領域、重鎖、軽鎖、及び可変領域、ならびに代替の足場非抗体分子、二重特異性抗体などが含まれる（Maynard & Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76, Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395-402）。別の機能的部分構造は、ペプチドリンカーによって共有結合される、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の可変領域からなる一本鎖Fv（scFv）である（S-z Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061）。これらの小さな（Mr 25,000）タンパク質は、一般に、単一ポリペプチド中の抗原に対する特異性及び親和性を保持し、より大きな抗原特異的分子のための便利な構築ブロックを提供することができる。特に記述のない限り、「抗体（複数可）」という用語を使用する明細書及び特許請求の範囲には、「抗体断片（複数可）」が具体的に含まれる。

【0111】

本明細書で使用される場合、「抗体-薬物コンジュゲート」または「ADC」とは、1つ以上の生物学的活性分子（複数可）に共有結合される抗体分子またはその断片を指す。生物学的活性分子は、リンカー、ポリマー、または他の共有結合を介して抗体にコンジュ

10

20

30

40

50

ゲートされ得る。

【0112】

本明細書で使用される場合、「芳香族」または「アリール」という用語は、コンジュゲートされた π 電子系を有する少なくとも1つの環を有し、炭素環式アリール及び複素環式アリール（または「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香族」）基の両方を含む閉環構造を指す。炭素環式または複素環式芳香族基は、5～20個の環原子を含有し得る。この用語は、共有結合的に連結された単環式環または縮合環多環式（すなわち、隣接する炭素原子の対を共有する環）基を含む。芳香族基は、非置換であるか、または置換されていてもよい。「芳香族」または「アリール」基の非限定的な例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、アントラセニル、及びフェナントラセニルが挙げられる。上述のアリール及びヘテロアリール環系のそれぞれに対する置換基は、本明細書に記載の許容される置換基の群から選択される。

10

【0113】

簡潔に述べると、「芳香族」または「アリール」という用語は、他の用語と組み合わせて使用される場合（アリールオキシ、アリールチオキシ、アラルキルを含むが、これらに限定されない）、上で定義したアリール環及びヘテロアリール環の両方を含む。したがって、「アラルキル」または「アルカリル」という用語は、炭素原子（メチレン基を含むがこれに限定されない）がヘテロ原子、ほんの一例として、酸素原子に置き換えられているそれらのアルキル基を含む、アリール基がアルキル基（ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなどを含むがこれらに限定されない）に結合されるそれらのラジカルを含むことを意味する。そのようなアリール基の例としては、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-（1-ナフチルオキシ）プロピルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0114】

本明細書で使用される場合、「アリレン」という用語は、二価のアリールラジカルを指す。「アリレン」の非限定的な例としては、フェニレン、ピリジニレン、ピリミジニレン、及びチオフェニレンが挙げられる。アリレン基の置換基は、本明細書に記載の許容される置換基の群から選択される。

【0115】

「二官能性ポリマー」は、「二官能性リンカー」とも称され、共有結合または非共有結合を形成するために他の部分と特異的に反応することが可能な2つの官能基を含むポリマーを指す。そのような部分には、天然もしくは非天然アミノ酸、またはそのような天然もしくは非天然アミノ酸を含有するペプチド上の側基が含まれ得るが、これらに限定されない。二官能性リンカーまたは二官能性ポリマーに連結され得る他の部分は、同じであっても異なってもよい。ほんの一例として、二官能性リンカーは、第1のペプチド上の基と反応性の官能基、及び第2のペプチド上の基と反応性の別の官能基を有し得、それにより、第1のペプチド、二官能性リンカー、及び第2のペプチドを含むコンジュゲートを形成する。種々の化合物をペプチドに結合させるための多くの手順及びリンカー分子が既知である。例えば、欧州特許出願第188,256号、米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号、同第4,680,338号、及び同第4,569,789号を参照されたい（これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。「多官能性ポリマー」は、「多官能性リンカー」とも称され、他の部分と反応することが可能な2つ以上の官能基を含むポリマーを指す。そのような部分には、天然もしくは非天然アミノ酸、またはそのような天然もしくは非天然アミノ酸を含有するペプチド上の側基が含まれ得るが、これらに限定されない。共有結合または非共有結合を形成するための（アミノ酸側基を含むがこれらに限定されない）。二官能性ポリマーまたは多官能性ポリマーは、任意の所望の長さまたは分子量であってもよく、化合物に連結された1つ以上の分子と、それが結合する分子または化合物との間に特定の所望の間隔または立体配座を提供するように選択され得る。

30

40

【0116】

50

本明細書で使用される場合、「バイオアベイラビリティ」という用語は、物質またはその活性部分が医薬剤形から送達され、作用部位または一般的な循環において利用可能になる速度及び程度を指す。バイオアベイラビリティの増加は、物質またはその活性部分が医薬剤形から送達され、作用部位または一般的な循環において利用可能になる速度及び程度の増加を指す。例として、バイオアベイラビリティの増加は、他の物質または活性部分と比較したときに、血液中の物質またはその活性部分の濃度の増加として示され得る。バイオアベイラビリティの増加を評価するための方法は当該技術分野で既知であり、任意のポリペプチドのバイオアベイラビリティを評価するために使用され得る。

【0117】

本明細書で使用される場合、「生物学的活性分子」、「生物学的活性部分」、または「生物学的活性剤」という用語は、ウイルス、細菌、バクテリオファージ、トランスポゾン、プリオン、昆虫、真菌、植物、動物、及びヒトを含むがこれらに限定されない、生物に関する生物学系、経路、分子、または相互作用の任意の物理的または生化学的特性に影響を及ぼし得る任意の物質を意味する。特に、本明細書で使用される場合、生物学的活性分子には、ヒトもしくは他の動物における疾患の診断、治療、緩和、治療、もしくは予防を目的とした、またはさもなければヒトもしくは動物の身体的もしくは精神的健康を増強することを目的とした任意の物質が含まれるが、これに限定されない。生物学的活性分子の例としては、ペプチド、タンパク質、酵素、小分子薬物、ハードドラッグ、ソフトドラッグ、プロドラッグ、炭水化物、無機原子または分子、染料、脂質、ヌクレオシド、放射性核種、オリゴヌクレオチド、毒素、細胞、ウイルス、リボソーム、微粒子、及びミセルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法及び組成物との使用に好適な生物学的活性剤のクラスには、薬物、プロドラッグ、放射性核種、撮像剤、ポリマー、抗生物質、殺菌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗腫瘍剤、心血管治療薬、抗不安剤、ホルモン、成長因子、ステロイド剤、微生物由来毒素などが含まれるが、これらに限定されない。

【0118】

「生物学的活性の調節」とは、ポリペプチドの反応性を増加または減少させ、ポリペプチドの選択性を変化させ、ポリペプチドの基質選択性を増強または減少させることを意味する。修飾された生物学的活性の分析は、非天然ポリペプチドの生物学的活性を天然ポリペプチドの生物学的活性と比較することによって実施することができる。

【0119】

本明細書で使用される場合、「生体材料」という用語は、バイオリアクター及び／または組換え方法及び技法から得られる材料を含むが、これらに限定されない、生物学的由来の材料を指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、「生物物理学的プローブ」という用語は、分子の構造変化を検出または監視することができるプローブを指す。そのような分子には、タンパク質が含まれるが、これに限定されず、「生物物理学的プローブ」は、他の巨大分子とのタンパク質の相互作用を検出または監視するために使用され得る。生物物理学的プローブの例としては、スピン標識、フルオロフォア、及び光活性化基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

本明細書で使用される場合、「生合成的に」という用語は、次の構成要素：ポリヌクレオチド、コドン、tRNA、及びリボソームのうちの少なくとも1つの使用を含む、翻訳系（細胞または非細胞）を利用する任意の方法を指す。例として、非天然アミノ酸は、WO 2002/085923（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載の方法及び技法を使用して、非天然アミノ酸ポリペプチドに「生合成的に組み込まれ」得る。加えて、非天然アミノ酸ポリペプチドに「生合成的に組み込まれ」得る有用な非天然アミノ酸の選択方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO 2002/085923に記載される。

10

20

30

40

50

【0122】

本明細書で使用される場合、「ビオチン類似体」または「ビオチン模倣物」とも称される用語は、アビジン及び／またはストレプトアビジンに高い親和性で結合するビオチン以外の任意の分子である。

【0123】

本明細書で使用される場合、「カルボニル」という用語は、少なくとも1つのケトン基、及び／または少なくとも1つのアルデヒド基、及び／または少なくとも1つのエステル基、及び／または少なくとも1つのカルボン酸基、及び／または少なくとも1つのチオエステル基を含有する基を含むがこれらに限定されない、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、及び $-C(S)-$ からなる群から選択される部分を含有する基を指す。そのようなカルボニル基には、ケトン、アルデヒド、カルボン酸、エステル、及びチオエステルが含まれる。加えて、そのような基は、直鎖状、分枝状、または環状分子の一部であり得る。

10

【0124】

「カルボキシ末端修飾基」という用語は、末端カルボキシ基に結合することができる任意の分子を指す。例として、そのような末端カルボキシ基は、ポリマー分子の末端であってもよく、そのようなポリマー分子は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び多糖類を含むが、これらに限定されない。末端修飾基には、種々の水溶性ポリマー、ペプチド、またはタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。ほんの一例として、末端修飾基には、ポリエチレングリコールまたは血清アルブミンが含まれる。末端修飾基は、ペプチドの血清半減期を増加させることを含むがこれに限定されないポリマー分子の治療特徴を修飾するために使用され得る。

20

【0125】

本明細書で使用される場合、「化学的に切断可能な基」という用語は、「化学的に不安定な」とも称され、酸、塩基、酸化剤、還元剤、化学反応開始剤、またはラジカル反応開始剤に暴露されると分解または切断される基を指す。

【0126】

本明細書で使用される場合、「コフォールディング」は、互いに相互作用し、折り畳まれていないまたは不適切に折り畳まれた分子の、適切な折り畳まれた分子への変換をもたらす少なくとも2つの分子を用いる再折り畳みプロセス、反応、または方法を指す。ほんの一例として、「コフォールディング」は、互いに相互作用し、折り畳まれていないまたは不適切に折り畳まれたポリペプチドの、天然の適切に折り畳まれたポリペプチドへの変換をもたらす少なくとも2つのポリペプチドを用いる。そのようなポリペプチドは、天然アミノ酸及び／または少なくとも1つの非天然アミノ酸を含有し得る。

30

【0127】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」は、本明細書に記載の化合物または化合物-リンカー、例えば、図1に記載の構造のうちのいずれか1つの化合物もしくは塩、または表3～7の構造のうちのいずれか1つに直接的にまたはリンカーを介してのいずれかで、連結される、例えば、共有結合されるポリペプチドを指す。「標的化部分」は、他の非標的分子と比較して標的分子に対して選択的親和性を有する構造を指す。本発明の標的化部分は、標的分子に結合する。標的化部分は、例えば、抗体、ペプチド、リガンド、受容体、またはそれらの結合部分を含み得る。標的生物学的分子は、生物学的受容体または腫瘍抗原などの細胞の他の構造であり得る。本明細書で使用される場合、「本発明のコンジュゲート」、「標的化部分コンジュゲート」、「標的化コンジュゲート」、「標的化部分活性分子コンジュゲート」、または「TC」という用語は、TLR7及び／またはTLR8アゴニストを含むがこれらに限定されない、生物学的活性分子、その一部、またはその類似体にコンジュゲートされた細胞またはそのサブユニット上に存在する標的に結合する標的化ポリペプチド、またはその一部、類似体、もしくは誘導体を指す。本明細書で使用される場合、「腫瘍標的化部分コンジュゲート」、「腫瘍標的化部分-生物学的活性分子コンジュゲート」または「BTC」という用語は、TLR7及び／またはTLR8ア

40

50

ゴニストを含むがこれらに限定されない、生物学的活性分子、その一部、またはその類似体にコンジュゲートされた腫瘍細胞またはそのサブユニット上に存在する標的に結合する腫瘍標的化ポリペプチド、またはその一部、類似体、もしくは誘導体を指す。別段の指示がない限り、「本発明の化合物」及び「本発明の組成物」という用語は、「本発明のコンジュゲート」という用語の代替として使用される。

【0128】

「保存的に修飾されたバリエーション」という用語は、天然及び非天然アミノ酸、ならびに天然及び非天然核酸配列の両方、ならびにそれらの組み合わせに適用される。特定の核酸配列に関して、「保存的に修飾されたバリエーション」は、同一または本質的に同一の天然及び非天然アミノ酸配列をコードするか、または天然及び非天然アミノ酸が本質的に同一の配列に対して天然及び非天然アミノ酸配列をコードしないそれらの天然及び非天然核酸を指す。例として、遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、及び G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特定されるすべての位置で、コドンは、コードされたポリペプチドを改変することなく、記載の対応するコドンのいずれかに改変され得る。そのような核酸の変化は、保存的に修飾された変化の1つの種である「サイレント変化」である。したがって、例として、天然または非天然のポリペプチドをコードする本明細書のすべての天然または非天然核酸配列は、天然または非天然の核酸のすべての可能なサイレント変化も記載する。当業者であれば、天然または非天然核酸中の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンである A U G、及び通常、トリプトファンの唯一のコドンである T G G を除く）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを認識するであろう。したがって、天然及び非天然ポリペプチドをコードする天然及び非天然核酸の各サイレント変化は、記載の各配列において暗示的である。

【0129】

アミノ酸配列に関して、単一の天然及び非天然アミノ酸、またはコード配列中の少量の天然及び非天然アミノ酸を改変、付加、もしくは欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、もしくは付加は、改変がアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または天然及び非天然アミノ酸の化学的に類似したアミノ酸による置換をもたらす「保存的に修飾されたバリエーション」である。機能的に類似した天然アミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野において周知である。そのような保存的に修飾されたバリエーションは、本明細書に記載の方法及び組成物の多型バリエーション、種間相同体、及び対立遺伝子に加えられ、かつそれらを除外しない。

【0130】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に既知である。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、スレオニン (T)；及び8) システイン (C)、メチオニン (M)。(例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)) を参照されたい。)

「シクロアルキル」及び「ヘテロシクロアルキル」という用語は、それ自体または他の用語と組み合わせて、別段の記載がない限り、それぞれ、「アルキル」及び「ヘテロアルキル」の環状型を表す。したがって、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルは、飽和、部分的に不飽和、及び完全に不飽和の環連結を含む。加えて、ヘテロシクロアルキルの場合、ヘテロ原子は、複素環が分子の残部に結合される位置を占めることができる。ヘテロ原子は、酸素、窒素、または硫黄を含み得るが、これらに限定されない。シクロアルキルの例には、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘ

10

20

30

40

50

キセニル、シクロヘプチルなどが含まれるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例としては、1-(1, 2, 5, 6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、この用語は、二環式及び三環式環構造を含むがこれらに限定されない多環式構造を包含する。同様に、「ヘテロシクロアルキレン」という用語は、それ自体または別の分子の一部として、ヘテロシクロアルキルに由来する二価のラジカルを意味し、「シクロアルキレン」という用語は、それ自体または別の分子の一部として、シクロアルキルに由来する二価のラジカルを意味する。

10

【0131】

本明細書で使用される場合、「シクロデキストリン」という用語は、環形成における少なくとも6~8つのグルコース分子からなる環状炭水化物を指す。環の外側部分は水溶性基を含有し、環の中心には小分子を収容することができる比較的非極性の空洞である。

【0132】

本明細書で使用される場合、「細胞傷害性」という用語は、細胞を害する化合物を指す。

【0133】

本明細書で使用される場合、「変性剤 (Denaturing agent)」または「変性剤 (denaturant)」は、ポリマーの可逆的なアンフォールディングを引き起こす任意の化合物または材料を指す。ほんの一例として、「変性剤 (denaturing agent)」または「変性剤 (denaturant)」は、タンパク質の可逆的なアンフォールディングを引き起こし得る。変性剤 (denaturing agent) または変性剤 (denaturant) の強度は、特定の変性剤 (denaturing agent) または変性剤 (denaturant) の特性及び濃度の両方によって決定される。例として、変性剤 (denaturing agent) または変性剤 (denaturant) には、カオトロップ、洗剤、有機水混和性溶媒、リン脂質、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。カオトロップの非限定的な例としては、尿素、グアニジン、及びチオシアン酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。洗剤の非限定的な例には、強力な洗剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、もしくはポリオキシエチレンエーテル (例えば、Tween または Triton 洗剤)、サルコシル、低刺激非イオン性洗剤 (例えば、ジギトニン)、低刺激カチオン性洗剤、例えば、N-2, 3-(ジオレイオキシ)-プロピル-N, N, N-トリメチルアンモニウム、低刺激イオン性洗剤 (例えば、コール酸ナトリウムまたはデオキシコール酸ナトリウム)、または双性イオン洗剤 (スルホベタイン (Zwittergent)、3-(3-クロロアミドプロピル) ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルフェート (CHAPS)、ならびに3-(3-クロロアミドプロピル) ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート (CHAPSO) が含まれ得るが、これらに限定されない) を含み得るが、これらに限定されない。変性剤として使用され得る有機水混和性溶媒の非限定的な例としては、アセトニトリル、低級アルカノール (特に、エタノールまたはイソプロパノールなどのC2~C4アルカノール)、または低級アルカンジオール (エチレングリコールなどのC2~C4アルカンジオール) が挙げられるが、これらに限定されない。リン脂質の非限定的な例としては、天然に存在するリン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルイノシトール、または合成リン脂質誘導体もしくはバリエーション、例えば、ジヘキサノイルホスファチジルコリンまたはジヘプタノイルホスファチジルコリンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0134】

本明細書で使用される場合、「ジアミン」という用語は、ヒドラジン基、アミジン基、イミン基、1, 1-ジアミン基、1, 2-ジアミン基、1, 3-ジアミン基、及び1, 4-ジアミン基を含むがこれらに限定されない、少なくとも2つのアミン官能基を含む基／

50

分子を指す。加えて、そのような基は、直鎖状、分枝状、または環状分子の一部であり得る。

【0135】

本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」という用語は、蛍光、化学発光、電子スピン共鳴、紫外線／可視吸光分光法、質量分析、核磁気共鳴、磁気共鳴、及び電気化学方法を含むが、これらに限定されない分析技法を使用して観察可能であり得る標識を指す。

【0136】

本明細書で使用される場合、「ジカルボニル」という用語は、1, 2-ジカルボニル基、1, 3-ジカルボニル基、及び1, 4-ジカルボニル基、ならびに少なくとも1つのケトン基、及び／または少なくとも1つのアルデヒド基、及び／または少なくとも1つのエステル基、及び／または少なくとも1つのカルボン酸基、及び／または少なくとも1つのチオエステル基を含有する基が含まれるが、これらに限定されない、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、及び $-C(S)-$ からなる群から選択される少なくとも2つの部分を含有する基を指す。そのようなジカルボニル基には、ジケトン、ケトアルデヒド、ケト酸、ケトエステル、及びケトチオエステルが含まれる。加えて、そのような基は、直鎖状、分枝状、または環状分子の一部であり得る。ジカルボニル基中の2つの部分は、同じであっても異なってもよく、2つの部分のいずれかで、ほんの一例として、エステル、ケトン、アルデヒド、チオエステル、またはアミドを産生する置換基を含んでもよい。

【0137】

本明細書で使用される場合、「薬物」という用語は、疾患または状態の予防、診断、軽減、治療、または治癒において使用される任意の物質を指す。

【0138】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、治療される疾患または状態の症状のうちの1つ以上をある程度緩和する、投与される薬剤または化合物の十分な量を指す。結果は、疾患の徴候、症状、もしくは原因の低減及び／または軽減、または生物学系の任意の他の所望の変更であり得る。例として、投与される薬剤または化合物としては、天然アミノ酸ポリペプチド、非天然アミノ酸ポリペプチド、修飾された天然アミノ酸ポリペプチド、または修飾された非アミノ酸ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。そのような天然アミノ酸ポリペプチド、非天然アミノ酸ポリペプチド、修飾された天然アミノ酸ポリペプチド、または修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドを含有する組成物は、予防的、増強的、及び／または治療的処置のために投与され得る。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、用量漸増研究などの技法を使用して決定され得る。

【0139】

「増強する」または「増強」という用語は、効力または所望の効果の持続時間のいずれかが増加または延長することを意味する。例として、治療剤の効果を「増強する」とは、疾患、障害、または状態の治療中に、効力または持続時間のいずれかにおいて、治療剤の効果を増加または延長する能力を指す。本明細書で使用される場合、「増強有効量」は、疾患、障害、または状態の治療における治療剤の効果を増強するのに十分な量を指す。患者で使用される場合、この使用に有効な量は、疾患、障害、または状態の重症度及び経過、以前の療法、患者の健康状態及び薬物への応答、ならびに治療を行う医師の判断に依存する。

【0140】

本明細書で使用される場合、「真核生物」という用語は、動物（哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥類などを含むがこれらに限定されない）、絨毛虫、植物（単子葉類、双子葉類、及び藻類を含むがこれらに限定されない）、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、及び原生生物を含むがこれらに限定されない、系統学的ドメインの真核生物に属する生物を指す。

【0141】

本明細書で使用される場合、「脂肪酸」という用語は、約C6またはより長い炭化水素

側鎖を有するカルボン酸を指す。

【0142】

本明細書で使用される場合、「フルオロフォア」という用語は、励起されると光子を放出し、それによって蛍光性である分子を指す。

【0143】

本明細書で使用される場合、「官能基」、「活性部分」、「活性基」、「脱離基」、「反応性部位」、「化学反応性基」、及び「化学反応性部分」という用語は、化学反応が生じる分子の部分または単位を指す。これらの用語は、化学分野においてある程度同義であり、何らかの機能または活性を実施し、他の分子と反応性である分子の部分を示すために本明細書で使用される。

【0144】

「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、ヨウ素、及び臭素を含む。

【0145】

本明細書で使用される場合、「ハロアシル」という用語は、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ などを含むが、これらに限定されないハロゲン部分を含有するアシル基を指す。

【0146】

本明細書で使用される場合、「ハロアルキル」という用語は、 $-CF_3$ 及び $-CH_2CF_3$ などを含むハロゲン部分を含有するアルキル基を指す。

【0147】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアルキル」という用語は、アルキル基、ならびにO、N、Si、及びSからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子からなる直鎖もしくは分枝鎖、または環状炭化水素ラジカル、あるいはそれらの組み合わせを指し、窒素及び硫黄原子は任意に酸化され得、窒素ヘテロ原子は任意に四級化され得る。ヘテロ原子（複数可）のO、N、及びS及びSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置に、またはアルキル基が分子の残部に結合される位置に配置され得る。例としては、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 、及び $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、最大2個のヘテロ原子が、連続していてもよく、例えば、例として、 $-CH_2-NH-OCH_3$ 及び $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ が挙げられる。

【0148】

「複素環式ベースの連結」または「複素環連結」という用語は、ジカルボニル基とジアミン基との反応から形成される部分を指す。得られる反応生成物は、ヘテロアリアル基またはヘテロシクロアルキル基を含む複素環である。得られる複素環基は、非天然アミノ酸または非天然アミノ酸ポリペプチドと別の官能基との間の化学連結として機能する。一実施形態において、複素環連結は、ほんの例として、ピラゾール連結、ピロール連結、インドール連結、ベンゾジアゼピン連結、及びピラザロン連結を含む、窒素含有複素環連結を含む。

【0149】

同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 及び $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ によって例示されるが、これらに限定されない、ヘテロアルキルに由来する二価のラジカルを指す。ヘテロアルキレン基に関して、同じまたは異なるヘテロ原子はまた、鎖末端の一方または両方を占有することができる（アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノ、アミノオキシアルキレンなどを含むが、これらに限定されない）。またさらに、アルキレン及びヘテロアルキレン連結基に関して、連結基の配向は、連結基の式が書かれる方向によって暗示されない。例として、式 $-C(O)_2R'-$ は、 $-C(O)_2R'-$ 及び $-R'C$

10

20

30

40

50

(O) 2-の両方を表す。

【0150】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリアル」または「ヘテロ芳香族」という用語は、N、O、及びSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含有するアリアル基を指し、窒素及び硫黄原子は任意に酸化され得、窒素原子（複数可）は任意に四級化され得る。ヘテロアリアル基は、置換されるか、または非置換であり得る。ヘテロアリアル基は、ヘテロ原子を介して分子の残部に結合され得る。ヘテロアリアル基の非限定的な例としては、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、及び6-キノリルが挙げられる。

【0151】

本明細書で使用される場合、「ホモアルキル」という用語は、炭化水素基であるアルキル基を指す。

【0152】

本明細書で使用される場合、「同一」という用語は、同じである2つ以上の配列または部分配列を指す。加えて、本明細書で使用される場合、「実質的に同一」という用語は、比較ウィンドウ、または比較アルゴリズムを使用して、もしくは手動アライメント及び目視検査によって測定される指定領域にわたって最大一致について比較及び整列させたときに同じである配列単位のパーセンテージを有する2つ以上の配列を指す。ほんの一例として、配列単位が、指定の領域にわたって約60%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、または約95%同一である場合、2つ以上の配列は、「実質的に同一」であり得る。そのようなパーセンテージは、2つ以上の配列の「同一性パーセント」を説明する。配列の同一性は、長さが少なくとも約75~100の配列単位である領域にわたって、長さが約50の配列単位である領域にわたって、または指定されていない場合は、配列全体にわたって存在することができる。この定義はまた、試験配列の相補性を指す。ほんの一例として、2つ以上のポリペプチド配列は、アミノ酸残基が同じであるときに同一である一方で、2つ以上のポリペプチド配列は、アミノ酸残基が指定の領域にわたって約60%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、または約95%同一である場合、「実質的に同一」である。同一性は、長さが少なくとも約75~約100のアミノ酸である領域にわたって、長さが約50のアミノ酸である領域にわたって、または指定されていない場合、ポリペプチド配列の配列全体にわたって存在することができる。加えて、ほんの一例として、2つ以上のポリヌクレオチド配列は、核酸残基が同じであるときに同一である一方で、2つ以上のポリヌクレオチド配列は、核酸残基が指定の領域にわたって約60%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、または約95%同一である場合、「実質的に同一」である。同一性は、長さが少なくとも約75~約100の核酸である領域にわたって、長さが約50の核酸である領域にわたって、または指定されていない場合、ポリヌクレオチド配列の配列全体にわたって存在することができる。

【0153】

配列比較に関して、典型的には、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて、部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメータが指定される。デフォルトのプログラムパラメータが使用され得るか、または代替のパラメータが指定され得る。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに

基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

【0154】

本明細書で使用される場合、「免疫原性」という用語は、治療薬の投与に対する抗体応答を指す。治療用の非天然アミノ酸ポリペプチドに対する免疫原性は、生物学的流体中の抗非天然アミノ酸ポリペプチド抗体の検出のための定量及び定性アッセイを使用して得ることができる。そのようなアッセイには、限定されないが、放射免疫測定法（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、発光免疫測定法（LIA）、及び蛍光免疫測定法（FIA）が含まれる。治療用の非天然アミノ酸ポリペプチドに対する免疫原性の分析は、治療用の非天然アミノ酸ポリペプチドの投与時の抗体応答を、治療用の天然アミノ酸ポリペプチドの投与時の抗体応答と比較することを伴う。

10

【0155】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、関心の構成要素を、関心の構成要素から分離及び除去することを指す。単離された物質は、乾燥もしくは半乾燥状態、または水溶液を含むがこれらに限定されない溶液のいずれかであり得る。単離された構成要素は、均一な状態であるか、または単離された構成要素は、追加の医薬的に許容される担体及び／または賦形剤を含む医薬組成物の一部であってもよい。純度及び均一性は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない分析化学技法を使用して決定され得る。さらに、関心の構成要素が単離され、調製物中に存在する主要種である場合、構成要素は、本明細書において実質的に精製されたものとして記載される。本明細書で使用される場合、「精製された」という用語は、少なくとも85%純粋、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも99%以上純粋である関心の構成要素を指し得る。ほんの一例として、核酸またはタンパク質は、そのような核酸もしくはタンパク質が、それが自然状態で会合している細胞構成要素の少なくともいくつかを含まないとき、または核酸もしくはタンパク質が、そのインビボもしくはインビトロ産生の濃度よりも高いレベルに濃縮されているときに、「単離される」。また、例として、遺伝子は、遺伝子に隣接し、関心の遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離されるときに単離される。

20

【0156】

本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、化合物に組み込まれ、容易に検出され、それにより、その物理的分布が検出及び／または監視され得る物質を指す。

30

【0157】

本明細書で使用される場合、「連結」または「リンカー」という用語は、リンカーの官能基と別の分子との間の化学反応から形成される結合または化学部分を指す。そのような結合には、共有結合及び非共有結合が含まれ得るが、これらに限定されない。一方、そのような化学部分には、エステル、カーボネート、イミンリン酸エステル、ヒドラゾン、アセタール、オルトエステル、ペプチド連結、及びオリゴヌクレオチド連結が含まれ得るが、これらに限定されない。加水分解的に安定した連結は、連結が水中で実質的に安定であり、長期間、おそらく永久にでも、生理学的条件下を含むが、これに限定されない有用なpH値で水と反応しないことを意味する。加水分解的に不安定なまたは分解可能な連結とは、連結が、例えば、血液を含む水または水溶液中で分解可能であることを意味する。酵素的に不安定なまたは分解可能な連結は、連結が1つ以上の酵素によって分解され得ることを意味する。ほんの一例として、PEG及び関連ポリマーは、ポリマー骨格内、またはポリマー骨格とポリマー分子の末端官能基のうちの1つ以上との間のリンカー基内に分解可能な連結を含んでもよい。そのような分解可能な連結には、PEGカルボン酸または活性化PEGカルボン酸と生物学的活性剤上のアルコール基との反応によって形成されるエステル連結が含まれるが、これに限定されず、そのようなエステル基は一般に、生理的条件下で加水分解して生物学的活性剤を放出する。他の加水分解可能な連結としては、カーボネート連結、アミンとアルデヒドとの反応によって生じるイミン連結、アルコールとホスフェート基との反応によって形成されるリン酸エステル連結、ヒドラジドとアルデヒドとの反応生成物であるヒドラゾン連結、アルデヒドとアルコールとの反応生成物であるア

40

50

セタール連結、ホルメートとアルコールとの反応生成物であるオルトエステル連結、PEGなどのポリマーの末端を含むが、これに限定されないアミン基及びペプチドのカルボキシル基によって形成されるペプチド連結、ならびにポリマーの末端を含むが、これに限定されないホスホロアミダイト基及びオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基によって形成されるオリゴヌクレオチド連結が挙げられるが、これらに限定されない。リンカーには、限定されないが、ポリマーなどの短い直鎖状、分枝状、多アーム型、またはデンドリマー分子が含まれる。本発明のいくつかの実施形態において、リンカーは分枝していてもよい。他の実施形態において、リンカーは、二官能性リンカーであり得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、三官能性リンカーであり得る。当業者には、いくつかの異なる切断可能なリンカーが知られている。米国特許第4,618,492号、同第4,542,225号、及び同第4,625,014号を参照されたい。これらのリンカー基から薬剤を放出するための機構としては、例えば、光不安定結合の照射及び酸触媒加水分解が挙げられる。例えば、米国特許第4,671,958号は、患者の補体系のタンパク質分解酵素によってインビボの標的部位で切断されるリンカーを含むイムノコンジュゲートの説明を含む。リンカーの長さは、ポリペプチドとそれに連結された分子との間の所望の空間関係に応じて、予め決定されるか、または選択され得る。様々な放射線診断化合物、放射線治療化合物、薬物、毒素、及び他の薬剤を抗体に結合させるための多数の方法が報告されていることを鑑みて、当業者は、所与の薬剤または分子をポリペプチドに結合させるための好適な方法を決定することができるであろう。

【0158】

本明細書で使用される場合、「修飾された」という用語は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、または非天然アミノ酸ポリペプチドに対する変化の存在を指す。そのような変化または修飾は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、もしくは非天然アミノ酸ポリペプチドの合成後修飾によって、または同時翻訳によって、または天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、もしくは非天然アミノ酸ポリペプチドの翻訳後修飾によって得ることができる。「修飾されたまたは非修飾の」という形態は、論じられている天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、または非天然アミノ酸ポリペプチドが、任意に修飾されていること、すなわち、論じられている天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、または非天然アミノ酸ポリペプチドが、修飾されているか、または未修飾であり得ることを意味する。

【0159】

本明細書で使用される場合、「調節された血清半減期」という用語は、修飾された生物学的活性分子の、その非修飾形態に対する循環半減期の正または負の変化を指す。例として、修飾された生物学的活性分子には、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、または非天然アミノ酸ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例として、血清半減期は、生物学的活性分子または修飾された生物学的活性分子の投与後の種々の時点で血液試料を採取し、各試料中のその分子の濃度を決定することによって測定される。血清濃度と時間の相関により、血清半減期の計算が可能になる。例として、調節された血清半減期は、改善された投与レジメンを可能にし得るか、または毒性効果を回避し得る、血清半減期の増加であり得る。血清のそのような増加は、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍であり得る。任意のポリペプチドの血清半減期の増加を評価する方法は、当業者に周知である。

【0160】

本明細書で使用される場合、「調節された治療半減期」という用語は、治療有効量の修飾された生物学的活性分子の、その非修飾形態に対する半減期における正または負の変化を指す。例として、修飾された生物学的活性分子には、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、天然アミノ酸ポリペプチド、または非天然アミノ酸ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例として、治療半減期は、投与後の種々の時点での分子の薬物動態及び／または薬力学的特性を測定することによって測定される。治療半減期の増加は、特定の有

益な投与レジメン、特定の有益な総用量を可能にするか、または望ましくない効果を回避し得る。例として、治療半減期の増加は、効力の増加、修飾された分子のその標的への結合の増加もしくは減少、非修飾分子の別のパラメータもしくは作用機序の増加または減少、またはほんの一例として、プロテアーゼなどの酵素による分子の分解の増加もしくは減少から生じ得る。任意のポリペプチドの治療半減期の増加を評価する方法は、当業者に周知である。

【0161】

「非天然アミノ酸」は、20個の一般的なアミノ酸、またはピロリジンもしくはセレノシステインのうちの1つではないアミノ酸を指す。「非天然アミノ酸」という用語と同義に使用され得る他の用語は、「非天然コード化アミノ酸」、「非天然アミノ酸」、「非天然に存在するアミノ酸」、ならびにその種々のハイフンでつながれた及びハイフンでつながれていない形である。「非天然アミノ酸」という用語には、限定されないが、天然コード化アミノ酸の修飾によって天然に生じるアミノ酸（20個の一般的なアミノ酸またはピロリジン及びセレノシステインを含むが、これらに限定されない）が含まれるが、それ自体は翻訳複合体によって成長するポリペプチド鎖に組み込まれない。そのようなアミノ酸の例としては、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-スレオニン、及びO-ホスホチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、「非天然アミノ酸」という用語には、天然には生じず、合成的に得ることができるか、または非天然アミノ酸の修飾によって得ることができるアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、リジン類似体、例えば、N6-アジドエトキシ-L-リジン（AzK）、N6-プロパルギルエトキシ-L-リジン（PraK）、BCN-L-リジン、ノルボルネンリジン、TCO-リジン、メチルテトラジンリジン、またはアリルオキシカルボニルリジンを含む。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は糖部分を含む。そのようなアミノ酸の例としては、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-ガラクトサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-スレオニン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-アスパラギン、及びO-マンノサミニル-L-セリンが挙げられる。そのようなアミノ酸の例には、アミノ酸と糖との間の天然に存在するN-またはO連結が、アルケン、オキシム、チオエーテル、アミドなどを含むがこれらに限定されない、天然には一般に見られない共有結合に置き換えられる例も含まれる。そのようなアミノ酸の例としては、2-デオキシ-グルコース、2-デオキシガラクトースなどの天然に存在するタンパク質に一般的に見られない糖類も挙げられる。非天然アミノ酸の具体的な例としては、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-（2-ナフチル）アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-β-セリン、L-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、p-プロパルギルオキシ-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドエトキシフェニルアラニン、及びパラ-アジドメチル-フェニルアラニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、パラ-アセチル-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、パラ-アジドエトキシフェニルアラニン、またはパラ-アジドメチル-フェニルアラニンからなる群から選択される。

【0162】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態でのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはリボヌクレオチド、ならびにそれらのポリマーを指す。ほんの一例として、そのような核酸及び核酸ポリマーとしては、（i）参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在

10

20

30

40

50

するヌクレオチドと同様の様式で代謝される天然ヌクレオチドの類似体、(i i) P N A (ペプチド核酸) を含むがこれに限定されないオリゴヌクレオチド類似体、アンチセンス技術で使用するDNAの類似体(ホスホロチオエート、ホスホロアミデートなど)、(i i i) それらの保存的に修飾されたバリエーション(縮重コドン置換を含むが、これに限定されない)、ならびに相補配列及び明示的に示される配列を含むが、これらに限定されない。例として、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(またはすべての)コドンの第3の位置が混合塩基及び／またはデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成され得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)、Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)、及びRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

10

【0163】

本明細書で使用される場合、「酸化剤」という用語は、酸化される化合物から電子を除去することが可能な化合物または材料を指す。例として、酸化剤には、酸化グルタチオン、シスチン、シスタミン、酸化ジチオスレイトール、酸化エリスレイトール、及び酸素が含まれるが、これらに限定されない。多種多様な酸化剤が本明細書に記載の方法及び組成物における使用に好適である。

【0164】

本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される」という用語は、化合物の生物学的活性または特性を抑止せず、比較的無毒である塩、担体、または希釈剤を含むが、これらに限定されない材料を指し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こさないか、またはそれを含有する組成物の構成要素のいずれかと有害な様式で相互作用することなく、個体に投与することができる。

20

【0165】

本明細書で使用される場合、「ポリアルキレングリコール」または「ポリ(アルケングリコール)」という用語は、直鎖状または分枝状の高分子ポリエーテルポリオールを指す。そのようなポリアルキレングリコールには、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール、及びそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。他の例示的な実施形態は、例えば、Shearwater Corporation's catalog "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001) などの商業的供給元のカタログに列挙される。ほんの一例として、そのような高分子ポリエーテルポリオールは、約0.1 kDa~約100 kDaの平均分子量を有する。例として、そのような高分子ポリエーテルポリオールには、約100 Da~約100,000 Da以上が含まれるが、これらに限定されない。ポリマーの分子量は、約100,000 Da、約95,000 Da、約90,000 Da、約85,000 Da、約80,000 Da、約75,000 Da、約70,000 Da、約65,000 Da、約60,000 Da、約55,000 Da、約50,000 Da、約45,000 Da、約40,000 Da、約35,000 Da、約30,000 Da、約25,000 Da、約20,000 Da、約15,000 Da、約10,000 Da、約9,000 Da、約8,000 Da、約7,000 Da、約6,000 Da、約5,000 Da、約4,000 Da、約3,000 Da、約2,000 Da、約1,000 Da、約900 Da、約800 Da、約700 Da、約600 Da、約500 Da、400 Da、約300 Da、約200 Da、及び約100 Daを含むが、これらに限定されない約100 Da~約100,000 Daであり得る。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約100 Da~約50,000 Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約100 Da~約40,000 Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約1,000 Da~約40,000 Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約2,000~約50,000 Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約5,000 Da~約40,000 Daである。いくつかの実施形態にお

30

40

50

いて、ポリマーの分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリ（エチレングリコール）分子は、分枝状ポリマーである。分枝鎖PEGの分子量は、約100,000Da、約95,000Da、約90,000Da、約85,000Da、約80,000Da、約75,000Da、約70,000Da、約65,000Da、約60,000Da、約55,000Da、約50,000Da、約45,000Da、約40,000Da、約35,000Da、約30,000Da、約25,000Da、約20,000Da、約15,000Da、約10,000Da、約9,000Da、約8,000Da、約7,000Da、約6,000Da、約5,000Da、約4,000Da、約3,000Da、約2,000Da、及び約1,000Daを含むが、これらに限定されない約1,000Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの分子量は、約1,000Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの分子量は、約5,000Da～約20,000Daである。他の実施形態において、分枝鎖PEGの分子量は、約2,000～約50,000Daである。

10

【0166】

本明細書で使用される場合、「ポリマー」という用語は、反復サブユニットから構成される分子を指す。そのような分子としては、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または多糖類もしくはポリアルキレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0167】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書で交換可能に使用される。すなわち、ポリペプチドに関する説明は、ペプチドの説明及びタンパク質の説明に同等に適用され、逆もまた同様である。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー、ならびに1つ以上のアミノ酸残基が非天然アミノ酸であるアミノ酸ポリマーに適用される。加えて、そのような「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を含み、アミノ酸残基は、共有結合ペプチド結合によって連結される。

【0168】

「翻訳後修飾」という用語は、そのようなアミノ酸がポリペプチド鎖に翻訳により組み込まれた後に生じる、天然または非天然アミノ酸の任意の修飾を指す。そのような修飾としては、同時翻訳インビボ修飾、同時翻訳インビトロ修飾（無細胞翻訳系においてなど）、翻訳後インビボ修飾、及び翻訳後インビトロ修飾が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0169】

本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」または「医薬的に許容されるプロドラッグ」という用語は、薬物の生物学的活性または特性を抑止せず、比較的無毒である、インビボまたはインビトロで親薬物に変換される薬剤を指し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こさないか、またはそれを含有する組成物の構成要素のいずれかと有害な様式で相互作用することなく、個体に投与することができる。プロドラッグは一般に、対象への投与及びその後の吸収の後、代謝経路による変換などの何らかのプロセスを介して活性な種、またはより活性な種に変換される薬物前駆体である。いくつかのプロドラッグは、プロドラッグ上に存在する化学基を有し、これは、プロドラッグの活性を低下させる、及び／または薬物に溶解性または何らかの他の特性を付与する。化学基がプロドラッグから切断及び／または修飾されると、活性薬物が生成される。プロドラッグは、酵素反応または非酵素反応を通じて体内で活性薬物に変換される。プロドラッグは、改善された生理化学的特性、例えば、より良い溶解性、増強された送達特徴、例えば、特定の細胞、組織、臓器、もしくはリガンドを特異的に標的とすること、及び薬物の改善された治療価値を提供し得る。そのようなプロドラッグの利点としては、（i）親薬物と比較した投与の容易さ、（ii）プロドラッグは経口投与により生体利用可能であるが、親薬物

40

50

はそうではない、(i i i) プロドラッグはまた、親薬物と比較して、医薬組成物において改善された溶解性を有し得ることが挙げられるが、これらに限定されない。プロドラッグには、薬理学的に不活性な、または低減した活性の、活性薬物の誘導体が含まれる。プロドラッグは、薬物の特性、例えば、生理化学的、生物薬剤学的、または薬物動態学的特性の操作を通じて所望の作用部位に到達する薬物または生物学的活性分子の量を調節するように設計され得る。プロドラッグの例としては、限定されないが、水溶性が移動性に有害であるが、後に、水溶性が有益である細胞内に入ると活性物質であるカルボン酸に代謝的に加水分解される、細胞膜を横断する伝達を促進するために、エステルとして投与される非天然アミノ酸ポリペプチド（「プロドラッグ」）が挙げられる。プロドラッグは、部位特異的組織への薬物輸送を増強するための修飾剤として使用するための、可逆的薬物誘導体として設計され得る。

10

【0170】

本明細書で使用される場合、「予防有効量」という用語は、治療される疾患、状態、または障害の症状のうちの1つ以上をある程度緩和する、患者に予防的に適用される少なくとも1つの非天然アミノ酸ポリペプチドまたは少なくとも1つの修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドを含有する組成物の量を指す。そのような予防的適用において、そのような量は、患者の健康状態、体重などに依存し得る。用量漸増臨床試験を含むがこれに限定されない、日常的な実験によってそのような予防有効量を決定することは、十分に当業者の範囲内であると考えられる。

【0171】

本明細書で使用される場合、「保護された」という用語は、ある特定の反応条件下で化学反応性官能基の反応を防止する「保護基」または部分の存在を指す。保護基は、保護される化学反応性基の種類に応じて異なる。ほんの一例として、(i) 化学反応性基がアミンまたはヒドラジドである場合、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル (t-Boc) 及び9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) から選択され得る、(i i) 化学反応性基がチオールである場合、保護基は、オルトピリジルジスルフィドであり得る、及び(i i i) 化学反応性基が、ブタン酸もしくはプロピオン酸などのカルボン酸、またはヒドロキシル基である場合、保護基は、ベンジル、またはメチル、エチル、もしくはtert-ブチルなどのアルキル基であり得る。

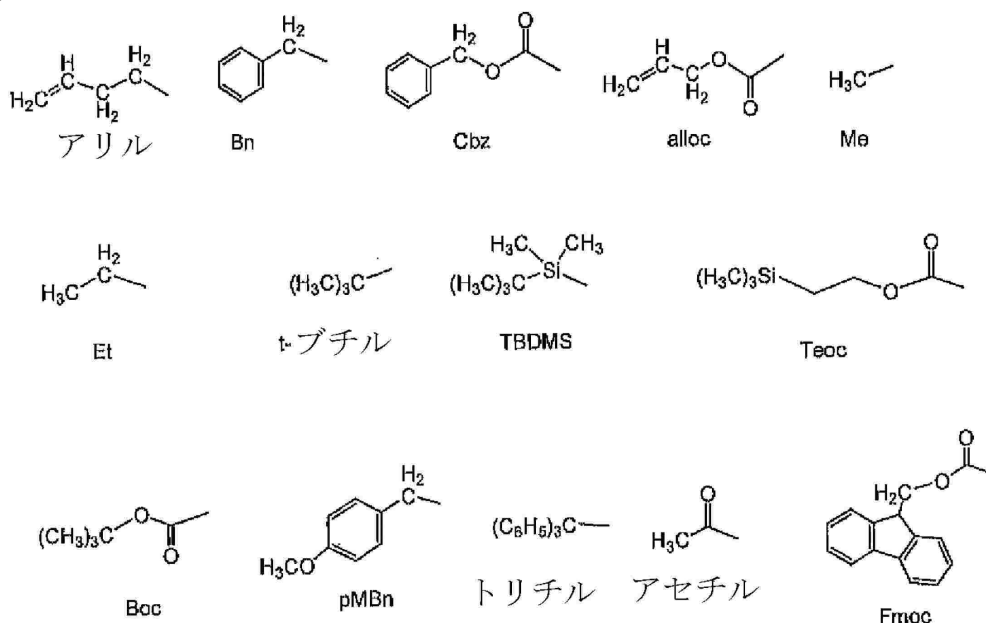
20

【0172】

ほんの一例として、ブロッキング／保護基は、次から選択される。

【0173】

【化4】



30

40

50

【0174】

さらに、保護基には、Nvoc及びMeNvocなどの光不安定基、ならびに当該技術分野で既知の他の保護基が含まれるが、これらに限定されない。他の保護基は、Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載される。

【0175】

「組換え宿主細胞」という用語は、「宿主細胞」とも称され、外因性ポリヌクレオチドを含む細胞を指し、外因性ポリヌクレオチドを細胞に挿入するために使用される方法には、直接取り込み、形質導入、f交配、または組換え宿主細胞を作製するための当該技術分野で既知の他の方法が含まれるが、これらに限定されない。ほんの一例として、そのような外因性ポリヌクレオチドは、プラスミドを含むがこれに限定されない非組み込みベクターであり得るか、または宿主ゲノムに組み込まれ得る。

【0176】

本明細書で使用される場合、「酸化還元活性剤」という用語は、別の分子を酸化または還元し、それによって酸化還元活性剤が還元または酸化される分子を指す。酸化還元活性剤の例としては、フェロセン、キノン、 $Ru^{2+}/^{3+}$ 複合体、 $Co^{2+}/^{3+}$ 複合体、及び $Os^{2+}/^{3+}$ 複合体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

本明細書で使用される場合、「還元剤」という用語は、還元される化合物に電子を付加することが可能な化合物または材料を指す。例として、還元剤としては、ジチオスレイトール(DTT)、2-メルカプトエタノール、ジチオエリスリトール、システイン、システアミン(2-アミノエタンチオール)、及び還元型グルタチオンが挙げられるが、これらに限定されない。そのような還元剤は、ほんの一例として、還元状態でスルフヒドリル基を維持し、分子内または分子間ジスルフィド結合を還元するために使用され得る。

【0178】

本明細書で使用される場合、「リフォールディング」は、不適切に折り畳まれたまたは折り畳まれていない状態を天然または適切に折り畳まれた立体配座に変換する任意のプロセス、反応、または方法を説明する。ほんの一例として、リフォールディングは、不適切に折り畳まれたまたは折り畳まれていない状態から、ジスルフィド結合に関して天然のまたは適切に折り畳まれた立体配座に、ジスルフィド結合含有ポリペプチドを形質転換する。そのようなジスルフィド結合含有ポリペプチドは、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドであり得る。

【0179】

本明細書で使用される場合、「安全性」または「安全性プロファイル」という用語は、薬物が投与された回数に対して薬物の投与に関連し得る副作用を指す。例として、何度も投与され、副作用が軽度または全くない薬物は、優れた安全性プロファイルを有すると言われる。任意のポリペプチドの安全性プロファイルを評価するために使用される方法は、当該技術分野で既知である。

【0180】

本明細書で使用される場合、「～に選択的にハイブリダイズする」または「～に特異的にハイブリダイズする」という語句は、その配列が、限定されないが、全細胞またはライブラリDNAもしくはRNAを含む、複合体混合物中に存在する場合、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下での特定のヌクレオチド配列への分子の結合、二本鎖形成、またはハイブリダイゼーションを指す。

【0181】

「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」という語句は、低イオン強度及び高温の条件下でのDNA、RNA、PNA、もしくは他の核酸模倣物、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションを指す。例として、ストリンジентな条件下では、プローブは、核酸の複合体混合物(全細胞またはライブラリDNAもしくはRNA

10

20

30

40

50

を含むがこれらに限定されない) 中でその標的配列にハイブリダイズするが、複合体混合物中の他の配列にハイブリダイズしない。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる条件では異なる。例として、より長い配列は、高温で特異的にハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、(i) 定義されたイオン強度及び pH での特定の配列の熱融点 (T_m) よりも約 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 低いこと、(ii) 塩濃度が、約 pH $7.0 \sim 8.3$ で約 $0.01\text{M} \sim 1.0\text{M}$ であり、温度が、短いプローブ (約 $10 \sim 50$ ヌクレオチドを含むが、これらに限定されない) については少なくとも約 30°C であり、長いプローブ (50 ヌクレオチド超を含むが、これに限定されない) については少なくとも約 60°C であること、(iii) ホルムアミドを含むが、これに限定されない不安定化剤の添加、(iv) 50% ホルムアミド、 $5\times$ SSC、及び 1% SDS、 42°C でのインキュベート、または $5\times$ SSC、約 1% SDS、 65°C でのインキュベート、 $0.2\times$ SSC で洗浄、及び約 0.1% SDS、約 $5\text{分} \sim 120\text{分}$ 間、 65°C でのインキュベートが含まれる。ほんの一例として、選択的または特異的ハイブリダイゼーションの検出は、少なくとも 2 倍のバックグラウンドの正のシグナルを含むが、これに限定されない。核酸のハイブリダイゼーションの広範なガイドは、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993) に見出される。

【0182】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、治療、観察、または実験の対象である動物を指す。ほんの一例として、対象は、限定されないが、ヒトを含む哺乳動物であり得るが、これに限定されない。

【0183】

本明細書で使用される場合、「実質的に精製された」という用語は、精製前の関心の構成要素に通常付随するかまたはそれと相互作用する他の構成要素を実質的にまたは本質的に含み得ない関心の構成要素を指す。ほんの一例として、関心の構成要素の調製物が、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、または約 1% 未満 (乾燥重量) の汚染構成要素を含有する場合、関心の構成要素が「実質的に精製され」得る。したがって、関心の「実質的に精製された」構成要素は、約 70% 、約 75% 、約 80% 、約 85% 、約 90% 、約 95% 、約 96% 、約 97% 、約 98% 、約 99% 以上の純度レベルを有し得る。ほんの一例として、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドは、天然細胞、または組換えにより産生された天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドの場合、宿主細胞から精製され得る。例として、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドの調製物は、調製物が、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、または約 1% 未満 (乾燥重量) の汚染材料を含有する場合、「実質的に精製」され得る。例として、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドが宿主細胞によって組換えにより産生される場合、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドは、細胞の乾燥重量の約 30% 、約 25% 、約 20% 、約 15% 、約 10% 、約 5% 、約 4% 、約 3% 、約 2% 、または約 1% 以下で存在し得る。例として、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドが宿主細胞によって組換えにより生産される場合、天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドは、細胞の乾燥重量の約 5g/L 、約 4g/L 、約 3g/L 、約 2g/L 、約 1g/L 、約 750mg/L 、約 500mg/L 、約 250mg/L 、約 100mg/L 、約 50mg/L 、約 10mg/L 、または約 1mg/L 以下で培養培地中に存在し得る。例として、「実質的に精製された」天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然アミノ酸ポリペプチドは、SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、SEC、及びキャピラリー電気泳動を含むが、こ

れらに限定されない適切な方法で決定されるとき、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%以上の純度レベルを有し得る。

【0184】

「置換基」という用語は、「非干渉置換基」とも称され、分子上の別の基を置き換えるために使用され得る基を指す。そのような基としては、ハロ、 C_1-C_{10} アルキル、 C_2-C_{10} アルケニル、 C_2-C_{10} アルキニル、 C_1-C_{10} アルコキシ、 C_5-C_{12} アラルキル、 C_3-C_{12} シクロアルキル、 C_4-C_{12} シクロアルケニル、フェニル、置換フェニル、トルオリル、キシレニル、ビフェニル、 C_2-C_{12} アルコキシアルキル、 C_5-C_{12} アルコキシアリール、 C_5-C_{12} アリールオキシアルキル、 C_7-C_{12} オキシアリール、 C_1-C_6 アルキルスルフィニル、 C_1-C_{10} アルキルスルホニル、 $-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}アルキル)$ (式中、 m は、1~8である)、アリール、置換アリール、置換アルコキシ、フルオロアルキル、複素環式ラジカル、置換複素環式ラジカル、ニトロアルキル、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-NRC(O)-(C_1-C_{10}アルキル)$ 、 $-C(O)-(C_1-C_{10}アルキル)$ 、 C_2-C_{10} アルキチオアルキル、 $-C(O)O-(C_1-C_{10}アルキル)$ 、 $-OH$ 、 $-SO_2$ 、 $=S$ 、 $-COOH$ 、 $-NR_2$ 、カルボニル、 $-C(O)-(C_1-C_{10}アルキル)-CF_3$ 、 $-C(O)-CF_3$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-(C_1-C_{10}アリール)-S-(C_6-C_{10}アリール)$ 、 $-C(O)-(C_6-C_{10}アリール)$ 、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}アルキル)$ (各 m は、1~8である)、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(S)NR_2$ 、 $-SO_2NR_2$ 、 $-NRC(O)NR_2$ 、 $-NRC(S)NR_2$ 、それらの塩などが挙げられるが、これらに限定されない。前述のリストの各R基としては、H、アルキルもしくは置換アルキル、アリールもしくは置換アリール、またはアルカリルが挙げられるが、これらに限定されない。置換基が、左から右に書かれたそれらの従来の化学式によって特定される場合、それらは、右から左に構造を書くことから生じるであろう化学的に同一の置換基を等しく包含し、例えば、 $-CH_2O-$ は、 $-OCH_2-$ に等しい。

【0185】

ほんの一例として、アルキル及びヘテロアルキルラジカルの置換基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニルと称されるそれらの基を含む）には、以下が含まれるが、これらに限定されない： $-OR$ 、 $=O$ 、 $=NR$ 、 $=N-OR$ 、 $-NR_2$ 、 $-SR$ 、ハロゲン、 $-SiR_3$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR_2$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-NRC(O)R$ 、 $-NRC(O)NR_2$ 、 $-NR(O)_2R$ 、 $-NR-C(NR_2)=NR$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-NRSO_2R$ 、 $-CN$ 、及び $-NO_2$ 。前述のリストの各R基は、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール（1~3個のハロゲンで置換されたアリールを含むがこれに限定されない）、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシ、もしくはチオアルコキシ基、またはアラルキル基が含まれるがこれらに限定されない。2つのR基が同じ窒素原子に結合されるとき、それらは、窒素原子と組み合わせられて、5、6、または7員環を形成することができる。例えば、 $-NR_2$ は、限定されないが、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことを意図する。

【0186】

例として、アリール及びヘテロアリール基の置換基は、ゼロ~芳香族系上の開放原子価の総数の範囲の数で、限定されないが、 $-OR$ 、 $=O$ 、 $=NR$ 、 $=N-OR$ 、 $-NR_2$ 、 $-SR$ 、ハロゲン、 $-SiR_3$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR_2$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-NRC(O)R$ 、 $-NRC(O)NR_2$ 、 $-NR(O)_2R$ 、 $-NR-C(NR_2)=NR$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-NRSO_2R$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-R$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ(C_1-C_4)アルコキシ、及びフルオロ(C_1-C_4)アルキルを含み、前述のリストの各R基は、限定されないが、水素、アルキル、ヘテロアルキル、アリール、及びヘテロアリールを

含む。

【0187】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、治療される疾患、障害、または状態の症状のうちの1つ以上を治癒するか、または少なくとも部分的に阻止するか、またはある程度緩和するのに十分な、疾患、状態、または障害を既に患っている患者に投与される、少なくとも1つの非天然アミノ酸ポリペプチド及び／または少なくとも1つの修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドを含有する組成物の量を指す。そのような組成物の有効性は、疾患、障害、または状態の重症度及び経過、以前の療法、患者の健康状態及び薬物への応答、ならびに治療を行う医師の判断を含むが、これらに限定されない状態に依存する。ほんの一例として、治療有効量は、用量漸増臨床試験を含むが、これに限定されない、日常的な実験によって決定され得る。

10

【0188】

本明細書で使用される場合、「チオアルコキシ」という用語は、酸素原子を介して分子に連結された硫黄含有アルキル基を指す。

【0189】

本明細書で使用される場合、「毒性部分」または「毒性基」という用語は、害、障害、または死亡を引き起こし得る化合物を指す。毒性部分には、アウリスタチン、DNA小溝結合剤、DNA小溝アルキル化剤、エンジン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、TLRアゴニスト、メイタンシノイド、ピンカルアルカロイド、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、アウリスタチンE、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノードキソルビシン、リゾキシ、シアノモルホリノードキソルビシン、TLR-アゴニスト-10、エキノマイシン、コンプレタスタチン、カリキアマイシン、メイタンシン、DM-1、ネトロブシン、ポドフィロトキシ（例えば、エトポシド、テニポシドなど）、バッカチン及びその誘導体、抗チューブリン剤、クリプトフィジン、コンプレタスタチン、アウリスタチンE、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン、VP-16、カンプトテシン、エポチロンA、エポチロンB、ノコダゾール、コルヒチン、コルシミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、メイタンシン、エリユテロビン、メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、クロロゾトシン、ウラシルマスタード、クロルメチン、イフォスファミド、クロランブシル、ピボプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、ダカルバジン、及びテモゾロミド、イタラビン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、フロクスウリジン、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、ペントスタチン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、10-プロパルギル-5, 8-ジデアザフォレート、5, 8-ジデアザテトラヒドロ葉酸、ロイコボリン、リン酸フルダラビン、ペントスタチン、ゲムシタビン、Ara-C、パクリタキセル、ドセタキセル、デオキシコホルマイシン、マイトマイシン-C、L-アスパラギナーゼ、アザチオプリン、ブレキナール、抗生物質（例えば、アントラサイクリン、ゲンタマイシン、セファロチン、バンコマイシン、テラバンシン、ダブトマイシン、アジスロマイシン、エリスロマイシン、ロシスロマイシン、フラゾリドン、アモキシシリン、アンピシリン、カルベニシリン、フルクロキサシリン、メチシリン、ペニシリン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシン、オフロキサシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、リファブチン、エタンブトール、リファキシミンなど）、抗ウイルス剤（例えば、アバカビル、アシクロビル、アンプリゲン、シドフォビル、デラビルジン、ジダノシン、エファビレンツ、エンテカビル、ホスフォネット、ガンシクロビル、イバシタビン、イムノビル、イドクスウリジン、イノシン、ロピナビル、メチサゾン、ネキサビル、ネビラピン、オセルタミビル、ペンシクロビル、スタブジン、トリフルリジン、トルバダ、バラシクロビル、ザナミビルなど）、ダウノルビシン塩酸塩、ダウノマイシン、ルビドマイシン、セルビジン、イダルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、及びモルホリノ誘導体、フェノキシゾンビスシクロペ

20

30

40

50

チド（例えば、ダクチノマイシン）、塩基性糖ペプチド（例えば、ブレオマイシン）、アントラキノングリコシド（例えば、プリカマイシン、ミトラマイシン）、アントラセンジオン（例えば、ミトキサントロン）、アジリノピロロインドレジオン（例えば、マイトマイシン）、大環状免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、FK-506、タクロリムス、プロGRAF、ラパマイシンなど）、ナベルペン、CPT-11、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、シクロホスファミド、イフォサミド、ドロロキサフィン、アロコルヒチン、ハリコンドリンB、コルヒチン、コルヒチン誘導体、メイタンシン、リゾキシ、パクリタキセル、パクリタキセル誘導体、ドセタキセル、チオコルヒチン、トリチルシステリン、ビンブラスチン硫酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、シスプラチン、カルボプラチン、ヒドロキシ尿素、N-メチルヒドラジン、エピドフィロトキシ

ン、プロカルバジン、ミトキサントロン、ロイコボリン、ならびにテガフルが含まれるが、これらに限定されない。「タキサン」は、パクリタキセル、ならびに任意の活性タキサン誘導体またはプロドラッグを含む。

10

【0190】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、または「治療」という用語は、疾患もしくは状態の症状を軽減、減少、もしくは改善すること、追加の症状を予防すること、症状の根本的な代謝原因を改善もしくは予防すること、疾患もしくは状態を阻害すること、例えば、疾患もしくは状態の発症を阻止すること、疾患もしくは状態を緩和すること、疾患もしくは状態の退行を引き起こすこと、疾患もしくは状態によって引き起こされる状態を緩和すること、または疾患もしくは状態の症状を停止させることを含む。「治療する」、「治療すること」、または「治療」という用語には、予防的及び／または治療的処置が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0191】

本明細書で使用される場合、「水溶性ポリマー」という用語は、水性溶媒に可溶性である任意のポリマーを指す。そのような水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、モノC₁-C₁₀アルコキシまたはそのアリールオキシ誘導体（本明細書に参照により組み込まれる米国特許第5,252,714号に記載される）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸、ジビニルエーテルマレイン酸無水物、N-(2-ヒドロキシプロピル)-メタクリルアミド、デキストラン、デキストラン硫酸塩を含むデキストラン誘導体、ポリプロピレングリコール、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリン断片、多糖類、オリゴ糖、グリカン、セルロース及びセルロース誘導体（限定されないが、メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含む）、血清アルブミン、デンプン及びデンプン誘導体、ポリペプチド、ポリアルキレングリコール及びその誘導体、ポリアルキレングリコール及びその誘導体のコポリマー、ポリビニルエチルエーテル、及びアルファ-ベーターポリ〔(2-ヒドロキシエチル)-DL-アスパルトアミドなど、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ほんの一例として、そのような水溶性ポリマーの天然アミノ酸ポリペプチドまたは非天然ポリペプチドへの結合は、非修飾形態と比較して、水溶性の増加、血清半減期の増加または調節、治療半減期の増加または調節、バイオアベイラビリティの増加、生物学的活性の調節、循環時間の延長、免疫原性の調節、限定されないが、凝集及び多量体形成、受容体結合、活性調節因子、または他の標的化ポリペプチド結合の変更、1つ以上の結合パートナーへの結合の変更、及び標的化ポリペプチド受容体の二量体化または多量体化の変更を含むが、これらに限定されない物理的会合特徴の調節を含むがこれらに限定されない変化をもたらし得る。加えて、そのような水溶性ポリマーは、独自の生物学的活性を有しても有していなくてもよく、1つ以上の標的化ポリペプチド、または1つ以上の生物学的活性分子を含むがこれらに限定されない、標的化ポリペプチドを他の物質に結合させるためのリンカーとして利用されてもよい。

30

40

【0192】

別段の指示がない限り、当業者の技能の範囲内の、質量分析、NMR、HPLC、タン

50

パク質化学、生化学、組換えDNA技法、及び薬理学の従来の方法が用いられる。

【0193】

本明細書に提示される化合物（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、及び前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、本明細書に提示される種々の式及び構造に列記されるものと同じであるが、1つ以上の原子が、通常、天然に見出される原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子に置き換えられるという事実に関して、同位体標識化合物を含む。本化合物に組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、フッ素、及び塩素の同位体、例えば、それぞれ ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl が挙げられる。本明細書に記載のある特定の同位体標識化合物、例えば、 ^3H 及び ^{14}C などの放射性同位体が組み込まれる化合物は、薬物及び／または基質組織分布アッセイにおいて有用である。さらに、重水素、すなわち、 ^2H などの同位体での置換は、より大きな代謝安定性、例えば、インビボでの半減期の増加または必要な投薬量の低減に起因するある特定の治療上の利点をもたらすことができる。

【0194】

本明細書の化合物のいくつか（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、不斉炭素原子を有し、したがって鏡像異性体またはジアステレオマーとして存在することができる。ジアステレオマー混合物は、例えば、クロマトグラフィー及び／または分別晶析によって知られる方法によって、それらの物理化学的相違に基づいて、それらの個々のジアステレオマーに分離することができる。エナンチオマーは、適切な光学活性化合物（例えば、アルコール）との反応によってエナンチオマー混合物をジアステレオマー混合物に変換し、ジアステレオマーを分離し、個々のジアステレオマーを対応する純粋なエナンチオマーに変換する（例えば、加水分解する）ことによって分離することができる。ジアステレオマー、エナンチオマー、及びそれらの混合物を含む、すべてのそのような異性体は、本明細書に記載の組成物の一部とみなされる。

【0195】

追加またはさらなる実施形態において、本明細書に記載の化合物（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、プロドラッグの形態で使用される。追加またはさらなる実施形態において、本明細書に記載の化合物（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、代謝産物を産生する必要がある生物への投与時に代謝され、その後、所望の治療効果を含む所望の効果をもたらすために使用される。さらなるまたは追加の実施形態において、非天然アミノ酸及び「修飾されたまたは非修飾」非天然アミノ酸ポリペプチドの活性代謝産物である。

【0196】

本明細書に記載の方法及び製剤は、N-オキシド、結晶形（多形としても知られる）、または非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドの医薬的に許容される塩の使用を含む。ある特定の実施形態において、非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドは、互変異性体として存在し得る。すべての互変異性体は、本明細書に提示される非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドの範囲内に含まれる。加えて、本明細書に記載の非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドは、非溶媒和、ならびに水、エタノールなどの医薬的に許容される溶媒との溶媒和形態で存在することができる。本明細書に提示される非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチドの溶媒和形態も、本明細書に開示されるとみなされる。

【0197】

本明細書の化合物のいくつか（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、いくつかの互変異性形態で存在し得る。すべてのそのような互変異性形態は、本明細書に記載の組成物の一部とみなされる。また、例えば、本明細書の任意の化合物のすべてのエノールーケト形態（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、本明細書に記載の組成物の一部とみなされる。

【0198】

本明細書の化合物のいくつか（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物のいずれかを産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、酸性であり、医薬的に許容されるカチオンと塩を形成し得る。本発明の化合物のいくつか（非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、及び修飾された非天然アミノ酸ポリペプチド、ならびに前述の化合物を産生するための試薬を含むが、これらに限定されない）は、塩基性であり得、したがって、医薬的に許容されるアニオンと塩を形成し得る。二塩を含むすべてのそのような塩は、本明細書に記載の組成物の範囲内であり、それらは、従来の方法によって調製することができる。例えば、塩は、水性、非水性、または部分的な水性媒体のいずれかで、酸性及び塩基性の物質を接触させることによって調製することができる。塩は、次の技法：濾過、非溶媒での沈殿、続いて濾過、溶媒の蒸発、または水溶液の場合、凍結乾燥、のうちの少なくとも1つを使用することによって回収される。

【0199】

本明細書に開示される非天然アミノ酸ポリペプチドの医薬的に許容される塩は、親非天然アミノ酸ポリペプチド中に存在する酸性プロトンが、例として、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、もしくはアルミニウムイオンの金属イオンに置き換えられるか、または有機塩基と配位結合するときのいずれかの場合に形成され得る。加えて、開示される非天然アミノ酸ポリペプチドの塩形態は、出発材料または中間体の塩を使用して調製することができる。本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドは、本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドの遊離塩基形態を医薬的に許容される無機または有機酸と反応させることによって、医薬的に許容される酸付加塩（医薬的に許容される塩の一種である）として調製することができる。あるいは、本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドは、本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドの遊離酸形態を医薬的に許容される無機または有機酸と反応させることによって、医薬的に許容される塩基付加塩（医薬的に許容される塩の一種である）として調製することができる。

【0200】

医薬的に許容される塩の種類には、以下が含まれるが、これらに限定されない：（1）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などと形成された、または有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、ヘキサ酸、シクロペンタプロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3-（4-ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、4-メチルビシクロ[2.2.2]オクト-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプトン酸、4,4'-メチレンビス-（3-ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸）、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、三級ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸などで形成された酸付加塩、あるいは（2）親化合物中に存在する酸性プロトンが、金属イオン、例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、もしくはアルミニウムイオンに置き換えられるか、または有機塩基と配位結合するときのいずれかの場合に形成された塩。許容される有機塩基には、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N

ーメチルグルカミンなどが含まれる。許容される無機塩基には、水酸化アルミニウム、水酸化カルシウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウムなどが含まれる。

【0201】

非天然アミノ酸ポリペプチドの医薬的に許容される塩の対応する対イオンは、イオン交換クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、誘導結合プラズマ、原子吸光分析、質量分析、またはそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない種々の方法を使用して分析及び特定され得る。加えて、そのような非天然アミノ酸ポリペプチドの医薬的に許容される塩の治療活性は、実施例に記載の技法及び方法を使用して試験され得る。

【0202】

塩への言及は、溶媒付加形態またはその結晶形態、特に溶媒和物または多形を含むことが理解されるべきである。溶媒和物は、化学量論的量または非化学量論的量のいずれかの溶媒を含有し、多くの場合、水、エタノールなどの医薬的に許容される溶媒との結晶化プロセス中に形成される。水和物は溶媒が水である場合に形成されるか、またはアルコールは溶媒がアルコールである場合に形成される。多形は、化合物の同じ元素組成の異なる結晶充填配置を含む。多形は、通常、異なるX線回折パターン、赤外線スペクトル、融点、密度、硬度、結晶形状、光学及び電気特性、安定性、ならびに溶解性を有する。再結晶化溶媒、結晶化速度、及び貯蔵温度などの種々の要因は、単結晶形態を支配する可能性がある。

【0203】

非天然アミノ酸ポリペプチドの医薬的に許容される塩の多形及び／または溶媒和物のスクリーニング及び特徴付けは、熱分析、X線回折、分光法、蒸気吸着、及び顕微鏡法を含むがこれらに限定されない様々な技法を使用して達成され得る。熱分析方法は、多形遷移を含むがこれに限定されない熱化学分解または熱物理プロセスに対処し、そのような方法は、多形体間の関係を分析するため、重量損失を決定するため、ガラス遷移温度を見つけるため、または賦形剤適合性研究のために使用される。そのような方法には、示差走査熱量測定(DSC)、変調示差走査熱量測定(MDSC)、熱重量分析(TGA)、ならびに熱重量測定及び赤外線分析(TG/IR)が含まれるが、これらに限定されない。X線回折法には、単結晶及び粉末回折計ならびにシンクロトロン源が含まれるが、これらに限定されない。使用される種々の分光技法には、ラマン、FTIR、UVIS、及びNMR(液体及び固体状態)が含まれるが、これらに限定されない。種々の顕微鏡法の技法には、偏光顕微鏡法、エネルギー分散型X線分析(EDX)を用いた走査型電子顕微鏡法(SEM)、EDXを用いた環境走査型電子顕微鏡法(ガスまたは水蒸気雰囲気中)、IR顕微鏡法、及びラマン顕微鏡法が含まれるが、これらに限定されない。

【0204】

本発明の好ましい実施形態を本明細書で示し説明してきたが、そのような実施形態が例として提供されていることは当業者には明らかであろう。本発明から逸脱することなく、多くの変形、変更、及び置換が当業者に生じるであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する種々の代替案が、本発明を実施する際に用いられ得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲の範囲内の方法及び構造、ならびにそれらの等価物がそれによって網羅されることが意図される。

【0205】

TLR-アゴニストリンカー誘導体

あるレベルで、カルボニル、ジカルボニル、オキシム、またはヒドロキシルアミン基を有する少なくとも1つの非天然アミノ酸または修飾された非天然アミノ酸を含むTCまたは類似体の標的化ポリペプチドを作製し使用するためのツール(方法、組成物、技法)が本明細書に記載される。非天然アミノ酸を含むTCのそのような標的化ポリペプチドは、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体断片、及びそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されないさらなる官能基を含有し得る。種々の前述の

10

20

30

40

50

官能基は、ある官能基のメンバーが別の官能基のメンバーとして分類することができないことを意味するものではないことに留意されたい。実際、特定の状況に応じて重複する。ほんの一例として、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコールの誘導体と範囲が重複するが、重複は完全ではなく、したがって両方の官能基が上記に引用される。

【0206】

一態様では、本明細書に記載の方法、組成物、及び技法を使用して修飾されるTLR-アゴニストリンカー誘導体、及び標的化ポリペプチドを選択及び設計する方法である。ほんの一例を含む、新規のTLR-アゴニストリンカー誘導体及び標的化ポリペプチドが、ハイスループットスクリーニングプロセス（その場合、多数のポリペプチドが設計、合成、特徴付け、及び／または試験され得る）の一部として、または研究者の関心に基づいて新規に設計され得る。新規のTLR-アゴニストリンカー誘導体及び標的化ポリペプチドは、既知のまたは部分的に特徴付けられたポリペプチドの構造に基づいて設計することもできる。ほんの一例として、TLR-アゴニストは科学界による集中的な研究の対象であり、新規化合物はTLR-アゴニストの構造に基づいて設計され得る。どのアミノ酸（複数可）を置換及び／または修飾するかを選択するための原理は、本明細書において別個に記載される。どの修飾を用いるかの選択も本明細書に記載されており、実験者または最終使用者のニーズを満たすために使用することができる。そのようなニーズには、ポリペプチドの治療有効性を操作すること、ポリペプチドの安全性プロファイルを改善すること、ポリペプチドの薬物動態、薬理学、及び／または薬力学を調整すること、例えば、ほんの一例として、水溶性、バイオアベイラビリティの増加、血清半減期の増加、治療半減期の増加、免疫原性の調節、生物学的活性の調節、または循環時間の延長が含まれるが、これらに限定されない。加えて、そのような修飾には、ほんの一例として、ポリペプチドに追加の官能基を提供すること、抗体を組み込むこと、及び前述の修飾の任意の組み合わせが含まれる。

【0207】

オキシム、カルボニル、ジカルボニル、またはヒドロキシルアミン基を有するか、または含有するように修飾され得る、TLR-アゴニストリンカー誘導体及び標的化ポリペプチドも本明細書に記載される。この態様には、そのようなTLR-アゴニストリンカー誘導体及び標的化ポリペプチドを産生、精製、特徴付け、及び使用するための方法が含まれる。

【0208】

TLR-アゴニストリンカー誘導体または標的化ポリペプチドは、カルボニルもしくはジカルボニル基、オキシム基、ヒドロキシルアミン基、またはそれらの保護形態のうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10以上を含有し得る。TLR-アゴニストリンカー誘導体または標的化ポリペプチドは、同一であっても異なってもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の異なる反応性基を含む誘導体に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の異なる部位が存在し得る。

【0209】

本明細書に記載されるように、本開示は、式「標的化ポリペプチド-L-M」を有する別の分子に結合した標的化ポリペプチドを提供し、式中、Lは、連結基または化学結合であり、Mは、別の標的化ポリペプチドを含むが、これらに限定されない任意の他の分子である。いくつかの実施形態において、Lは、インビボで安定である。いくつかの実施形態において、Lは、インビボで加水分解可能である。いくつかの実施形態において、Lは、インビボで準安定である。

【0210】

標的化ポリペプチド及びMは、当業者に既知の標準的な連結剤及び手順を使用して、Lにより一緒に連結され得る。いくつかの態様において、標的化ポリペプチド及びMは直接

縮合され、Lは結合である。他の態様において、標的化ポリペプチド及びMは、連結基Lを介して縮合される。例えば、いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチド及びMは、ペプチド結合を介して、任意に、ペプチドまたはアミノ酸スペーサーを通じて一緒に連結される。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチド及びMは、化学コンジュゲーションを通じて、任意に、連結基（L）を通じて一緒に連結される。いくつかの実施形態において、Lは、標的化ポリペプチド及びMのそれぞれに直接コンジュゲートされる。

【0211】

化学コンジュゲーションは、ある化合物の求核反応性基を別の化合物の求電子反応性基に反応させることによって生じ得る。いくつかの実施形態において、Lが結合であるとき、標的化ポリペプチドは、標的化ポリペプチド上の求核反応性部分と、Y上の求電子反応性部分とを反応させるか、または標的化ポリペプチド上の求電子反応性部分と、M上の求核反応性部分とを反応させるかのいずれかによって、Mにコンジュゲートされる。Lが標的化ポリペプチド及びMと一緒に連結する基である実施形態において、標的化ポリペプチド及び／またはMは、標的化ポリペプチド及び／またはM上の求核反応性部分と、L上の求電子反応性部分とを反応させるか、または標的化ポリペプチド及び／またはM上の求電子反応性部分と、L上の求核反応性部分とを反応させるかのいずれかによって、Lにコンジュゲートされ得る。求核反応性基の非限定的な例としては、アミノ、チオール、及びヒドロキシルが挙げられる。求電子反応性基の非限定的な例としては、カルボキシル、塩化アシル、無水物、エステル、スクシンイミドエステル、ハロゲン化アルキル、スルホネートエステル、マレイミド、ハロアセチル、及びイソシアネートが挙げられる。標的化ポリペプチド及びMを、カルボン酸とアミンとを反応させることによって一緒にコンジュゲートする実施形態において、活性化剤を使用して、カルボン酸の活性化エステルを形成することができる。

【0212】

カルボン酸の活性化エステルは、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、トシレート（Tos）、メシレート、トリフレート、カルボジイミド、またはヘキサフルオロホスフェートであり得る。いくつかの実施形態において、カルボジイミドは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1,1'-カルボニルジイミダゾール（CDI）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）、または1,3-ジイソプロピルカルボジイミド（DICD）である。いくつかの実施形態において、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェートベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）、及びo-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）からなる群から選択される。

【0213】

いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、MまたはL上の求電子反応性基にコンジュゲートすることが可能な求核反応性基（例えば、リジン、システインまたはセリンの側鎖のアミノ基、チオール基、またはヒドロキシル基）を含む。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、MまたはL上の求核反応性基にコンジュゲートすることが可能な求電子反応性基（例えば、AspまたはGluの側鎖のカルボキシレート基）を含む。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、MまたはLに直接コンジュゲートすることが可能な反応性基を含むように化学修飾される。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドは、求核側鎖を有する天然または非天然アミノ酸を含むように、N末端またはC末端で修飾される。例示的な実施形態において、標的化ポリペプチドのN末端またはC末端アミノ酸は、リジン、オルニチン、セリン、システイン、及びホモシステインからなる群から選択される。例えば、標的化ポリペプチドのN末端またはC末端アミノ酸は、リジン残基を含むように修飾され得る。いくつかの実施形態において、

標的化ポリペプチドは、例えば、A s p及びG l uなどの求電子側鎖を有する天然または非天然アミノ酸を含むように、N末端またはC末端アミノ酸で修飾される。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドの内部アミノ酸は、本明細書に先に記載されるように、求核側鎖を有する天然または非天然アミノ酸で置換される。例示的な実施形態において、置換される標的化ポリペプチドの内部アミノ酸は、リジン、オルニチン、セリン、システイン、及びホモシステインからなる群から選択される。例えば、標的化ポリペプチドの内部アミノ酸は、リジン残基で置換され得る。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドの内部アミノ酸は、例えば、A s p及びG l uなどの求電子側鎖を有する天然または非天然アミノ酸で置換される。

【0214】

いくつかの実施形態において、Mは、標的化ポリペプチドまたはLに直接コンジュゲートすることが可能な反応性基を含む。いくつかの実施形態において、Mは、標的化ポリペプチドまたはL上の求電子反応性基にコンジュゲートすることが可能な求核反応性基（例えば、アミン、チオール、ヒドロキシル）を含む。いくつかの実施形態において、Mは、標的化ポリペプチドまたはL上の求核反応性基にコンジュゲートすることが可能な求電子反応性基（例えば、カルボキシル基、カルボキシル基の活性化形態、脱離基を有する化合物）を含む。いくつかの実施形態において、Mは、標的化ポリペプチドまたはL上の求電子反応性基にコンジュゲートすることが可能な求核反応性基のいずれかを含むように化学修飾される。いくつかの実施形態において、Mは、標的化ポリペプチドまたはL上の求核反応性基にコンジュゲートすることが可能な求電子反応性基を含むように化学修飾される。

【0215】

いくつかの実施形態において、コンジュゲーションは、オルガノシラン、例えば、グルタルアルデヒドで処理されたアミノシラン、シラノール基のカルボニルジイミダゾール（CDI）活性化、またはデンドリマーの利用を通じて行われ得る。様々なデンドリマーが当該技術分野で既知であり、アンモニアまたはエチレンジアミン開始剤コア試薬から始まる分岐法によって合成されるポリ（アミドアミン）（PAMAM）デンドリマー、トリスーアミノエチレンーイミンコアに基づくPAMAMデンドリマーのサブクラス、親水性、求核性ポリアミドアミン（PAMAM）内部及び疎水性有機ケイ素（OS）外部からなる逆単分子ミセルである放射状層ポリ（アミドアミンー有機ケイ素）デンドリマー（PAMAMOS）、一般に、末端基として一級アミンを有するポリーアルキルアミンであるが、デンドリマー内部は多数の三級トリスープロピレンアミンからなるポリ（プロピレンイミン）（PPI）デンドリマー、ポリ（プロピレンアミン）（POPAM）デンドリマー、ジアミノブタン（DAB）デンドリマー、両親媒性デンドリマー、水溶性超分枝状ポリフェニレンの単分子ミセルであるミセルデンドリマー、ポリリジンデンドリマー、ならびにポリーベンジルエーテル超分枝状骨格に基づくデンドリマーを含む。

【0216】

いくつかの実施形態において、コンジュゲーションは、オレフィンメタセシスを通じて行われ得る。いくつかの実施形態において、M及び標的化ポリペプチド、M及びL、または標的化ポリペプチド及びLは両方とも、メタセシスを受けることが可能なアルケンまたはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態において、好適な触媒（例えば、銅、ルテニウム）を使用して、メタセシス反応を加速させる。オレフィンメタセシス反応を実施する好適な方法は、当該技術分野において記載されている。例えば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000)、Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004)、及びBlackwell et al., Angew, Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998)を参照されたい。

【0217】

いくつかの実施形態において、コンジュゲーションは、クリック化学を使用して行われ得る。「クリック反応」は、範囲が広く、実施が容易であり、容易に入手可能な試薬のみを使用し、酸素及び水に対して非感受性である。いくつかの実施形態において、クリック

反応は、トリアゾリル基を形成するためのアルキニル基とアジド基との間の環状付加反応である。いくつかの実施形態において、クリック反応は、銅またはルテニウム触媒を使用する。クリック反応を実施するための好適な方法は、当該技術分野において記載されている。例えば、Kolb et al., Drug Discovery Today 8: 1128 (2003)、Kolb et al., Angew. Chem. Int. Ed. 40: 2004 (2001)、Rostovtsev et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596 (2002)、Tornøe et al., J. Org. Chem. 67: 3057 (2002)、Manetsch et al., J. Am. Chem. Soc. 126: 12809 (2004)、Lewis et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41: 1053 (2002)、Speers, J. Am. Chem. Soc. 125: 4686 (2003)、Chan et al. Org. Lett. 6: 2853 (2004)、Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 127: 15998 (2005)、及びWaser et al., J. Am. Chem. Soc. 127: 8294 (2005)を参照されたい。

【0218】

高親和性特異的結合パートナー、例えば、ストレプトアビジン／ビオチンまたはアビジン／ビオチンまたはレクチン／炭水化物を介した間接的なコンジュゲーションも企図される。

【0219】

いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチド及び／またはMは、有機誘導体化剤を有する求核反応性基または求電子反応性基を含むように官能化される。この誘導体化剤は、標的化ポリペプチド上の標的とされるアミノ酸の選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基、及びM上の官能基と反応することが可能である。標的化ポリペプチド及び／またはM上の反応性基には、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミド、またはヒドラジノ基が含まれる。誘導体化剤としては、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を通じたコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を通じて）、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、または当該技術分野で既知の他の薬剤が挙げられる。あるいは、標的化ポリペプチド及び／またはMは、多糖またはポリペプチド担体などの中間担体を通じて間接的に互いに連結され得る。多糖担体の例としては、アミノデキストランが挙げられる。得られるロードした担体に望ましい溶解性を付与するための好適なポリペプチド担体の例としては、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、そのコポリマー、及びこれらのアミノ酸及び他のアミノ酸、例えばセリンの混合ポリマーが挙げられる。

【0220】

システニル残基を、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどの α -ハロアセテート（及び対応するアミン）と反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、アルファ-ブロモ- β -（5-イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサー1, 3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

【0221】

ヒスチジル残基は、この薬剤がヒスチジル側鎖に比較的特異的であるため、pH 5.5～7.0でジエチルピロカーボネートとの反応によって誘導体化される。パラ-ブロモフェナシルプロミドも有用であり、反応は、好ましくは、pH 6.0の0.1Mのカコジル酸ナトリウム中で実施される。

【0222】

リシニル及びアミノ末端残基をコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。こ

これらの薬剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。アルファ-アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬としては、ピコリンイミド酸メチル、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロ水素化ホウ素 (chloroborohydride)、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2, 4-ペンタンジオン、及びグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応などのイミドエステルが挙げられる。

【0223】

アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来の試薬、その中でもフェニルグリオキサル、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサジオン、及びニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の pK_a が高いため、アルカリ性条件下で反応を実施する必要がある。さらに、これらの試薬は、リジンの基ならびにアルギニンイプシロン-アミノ基と反応し得る。

【0224】

チロシル残基の特異的修飾は、特に、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって、スペクトル標識をチロシル残基に導入することに関心を持って行われ得る。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンを使用して、それぞれ、O-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体を形成する。

【0225】

カルボキシル側基 (アスパルチルまたはグルタミル) は、カルボジイミド ($R-N=C=N-R'$) との反応により選択的に修飾され、式中、 R 及び R' は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル) カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル) カルボジイミドなどの異なるアルキル基である。さらに、アンモニウムイオンとの反応により、アスパルチル及びグルタミル残基をアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換する。

【0226】

他の修飾としては、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリルもしくはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のアルファ-アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、アスパラギンもしくはグルタミンの脱アミド化、N末端アミンのアセチル化、及び／またはC末端カルボン酸基のアミド化もしくはエステル化が挙げられる。

【0227】

共有結合修飾の別の種類は、グリコシドをペプチドに化学的または酵素的に結合することを伴う。糖 (複数可) が、(a) アルギニン及びヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) 遊離スルフヒドリル基、例えば、システインのもの、(d) 遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、スレオニン、もしくはヒドロキシプロリンのもの、(e) 芳香族残基、例えば、チロシンもしくはトリプトファンのも、または (f) グルタミンのアミド基に結合され得る。これらの方法は、WO1987/05330号、及びApplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981) に記載される。

【0228】

いくつかの実施形態において、 L は、結合である。これらの実施形態において、標的化ポリペプチド及び M は、標的化ポリペプチド上の求核反応性部分と、 M 上の求電子反応性部分とを反応させることによって、一緒にコンジュゲートされる。代替的な実施形態において、標的化ポリペプチド及び M は、標的化ポリペプチド上の求電子反応性部分と、 M 上の求核部分とを反応させることによって、一緒にコンジュゲートされる。例示的な実施形態において、 L は、標的化ポリペプチド上のアミン (例えば、リジン残基の ϵ -アミン) と、 M 上のカルボキシル基との反応時に形成されるアミド結合である。代替的な実施形態において、標的化ポリペプチド及び／または M は、コンジュゲーション前に誘導体化剤で

10

20

30

40

50

誘導体化される。

【0229】

いくつかの実施形態において、Lは、連結基である。いくつかの実施形態において、Lは、二官能性リンカーであり、標的化ポリペプチド及びMへのコンジュゲーション前に2つの反応性基のみを含む。標的化ポリペプチド及びMの両方が求電子反応性基を有する実施形態において、Lは、標的化ポリペプチド及びMへのコンジュゲーション前に、同じ求核基を2つまたは2つの異なる求核基（例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール）を含む。標的化ポリペプチド及びMの両方が求核反応性基を有する実施形態において、Lは、標的化ポリペプチド及びMへのコンジュゲーション前に、同じ求電子基を2つまたは2つの異なる求電子基（例えば、カルボキシル基、カルボキシル基の活性化形態、脱離基を有する化合物）を含む。標的化ポリペプチドまたはMの一方が求核反応性基を有し、標的化ポリペプチドまたはMの他方が求電子反応性基を有する実施形態において、Lは、標的化ポリペプチド及びMへのコンジュゲーション前に、1つの求核反応性基及び1つの求電子基を含む。

10

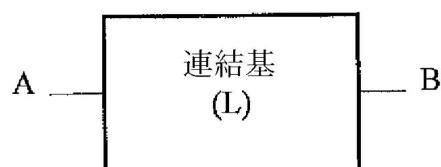
【0230】

Lは、（標的化ポリペプチド及びMへのコンジュゲーション前に）標的化ポリペプチド及びMのそれぞれと反応可能な少なくとも2つの反応性基を有する任意の分子であり得る。いくつかの実施形態において、Lは、2つの反応性基のみを有し、二官能性である。L（ペプチドへのコンジュゲーション前）は、式VI：

【0231】

20

【化5】



【0232】

で表すことができ、式中、A及びBは、独立して、求核または求電子反応性基である。いくつかの実施形態において、A及びBは、両方とも求核基または両方とも求電子基のいずれかである。いくつかの実施形態において、AまたはBのうちの一方が求核基であり、AまたはBの他方が求電子基である。A及びBの非限定的な組み合わせを以下の表1に示す。

30

【0233】

40

50

【表 1】

表 1：求核基及び求電子基の非限定的な組み合わせ

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
アミノ	アミノ	カルボキシシル	カルボキシシル	アミノ	カルボキシシル
アミノ	チオール	カルボキシシル	塩化アシル	アミノ	塩化アシル
アミノ	ヒドロキシシル	カルボキシシル	無水物	アミノ	無水物
チオール	アミノ	カルボキシシル	エステル	アミノ	エステル
チオール	チオール	カルボキシシル	NHS	アミノ	NHS
チオール	ヒドロキシシル	カルボキシシル	ハロゲン	アミノ	ハロゲン
ヒドロキシシル	アミノ	カルボキシシル	スルホン酸エステル	アミノ	スルホン酸エステル
ヒドロキシシル	チオール	カルボキシシル	マレイミド	アミノ	マレイミド
ヒドロキシシル	ヒドロキシシル	カルボキシシル	ハロアセチル	アミノ	ハロアセチル
		カルボキシシル	イソシアネート	アミノ	イソシアネート
		塩化アシル	カルボキシシル	チオール	カルボキシシル
		塩化アシル	塩化アシル	チオール	塩化アシル
		塩化アシル	無水物	チオール	無水物
		塩化アシル	エステル	チオール	エステル
		塩化アシル	NHS	チオール	NHS
		塩化アシル	ハロゲン	チオール	ハロゲン
		塩化アシル	スルホン酸エステル	チオール	スルホン酸エステル
		塩化アシル	マレイミド	チオール	マレイミド
		塩化アシル	ハロアセチル	チオール	ハロアセチル
		塩化アシル	イソシアネート	チオール	イソシアネート
		無水物	カルボキシシル	ヒドロキシシル	カルボキシシル

10

20

30

40

50

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
		無水物	塩化アシル	ヒドロキシ シル	塩化アシル
		無水物	無水物	ヒドロキシ シル	無水物
		無水物	エステル	ヒドロキシ シル	エステル
		無水物	NHS	ヒドロキシ シル	NHS
		無水物	ハロゲン	ヒドロキシ シル	ハロゲン
		無水物	スルホン酸エス テル	ヒドロキシ シル	スルホン酸エス テル
		無水物	マレイミド	ヒドロキシ シル	マレイミド
		無水物	ハロアセチル	ヒドロキシ シル	ハロアセチル
		無水物	イソシアネート	ヒドロキシ シル	イソシアネート
		エステル	カルボキシ シル		
		エステル	塩化アシル		
		エステル	無水物		
		エステル	エステル		
		エステル	NHS		
		エステル	ハロゲン		
		エステル	スルホン酸エス テル		
		エステル	マレイミド		

10

20

30

40

50

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
		エステル	ハロアセチル		
		エステル	イソシアネート		
		NHS	カルボキシル		
		NHS	塩化アシル		
		NHS	無水物		
		NHS	エステル		
		NHS	NHS		
		NHS	ハロゲン		
		NHS	スルホン酸エステル		
		NHS	マレイミド		
		NHS	ハロアセチル		
		NHS	イソシアネート		
		ハロゲン	カルボキシル		
		ハロゲン	塩化アシル		
		ハロゲン	無水物		
		ハロゲン	エステル		
		ハロゲン	NHS		
		ハロゲン	ハロゲン		
		ハロゲン	スルホン酸エステル		
		ハロゲン	マレイミド		
		ハロゲン	ハロアセチル		
		ハロゲン	イソシアネート		

10

20

30

40

50

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
		スルホン酸エステル	カルボキシル		
		スルホン酸エステル	塩化アシル		
		スルホン酸エステル	無水物		
		スルホン酸エステル	エステル		
		スルホン酸エステル	NHS		
		スルホン酸エステル	ハロゲン		
		スルホン酸エステル	スルホン酸エステル		
		スルホン酸エステル	マレイミド		
		スルホン酸エステル	ハロアセチル		
		スルホン酸エステル	イソシアネート		
		マレイミド	カルボキシル		
		マレイミド	塩化アシル		
		マレイミド	無水物		
		マレイミド	エステル		
		マレイミド	NHS		
		マレイミド	ハロゲン		

10

20

30

40

50

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
		マレイミド	スルホン酸エステル		
		マレイミド	マレイミド		
		マレイミド	ハロアセチル		
		マレイミド	イソシアネート		
		ハロアセチル	カルボキシル		
		ハロアセチル	塩化アシル		
		ハロアセチル	無水物		
		ハロアセチル	エステル		
		ハロアセチル	NHS		
		ハロアセチル	ハロゲン		
		ハロアセチル	スルホン酸エステル		
		ハロアセチル	マレイミド		
		ハロアセチル	ハロアセチル		
		ハロアセチル	イソシアネート		
		イソシアネート	カルボキシル		
		イソシアネート	塩化アシル		
		イソシアネート	無水物		
		イソシアネート	エステル		
		イソシアネート	NHS		

10

20

30

40

50

両方とも求核性		両方とも求電子性		求核性／求電子性	
A	B	A	B	A	B
		イソシアネート	ハロゲン		
		イソシアネート	スルホン酸エステル		
		イソシアネート	マレイミド		
		イソシアネート	ハロアセチル		
		イソシアネート	イソシアネート		

10

【0234】

いくつかの実施形態において、A及びBは、オレフィンメタセシス反応に好適なアルケン及び／またはアルキン官能基を含み得る。いくつかの実施形態において、A及びBは、クリック化学に好適な部分（例えば、アルケン、アルキン、ニトリル、アジド）を含む。反応性基（A及びB）の他の非限定的な例としては、ピリジルジチオール、アリアルアジド、ジアジリン、カルボジイミド、及びヒドラジドが挙げられる。

20

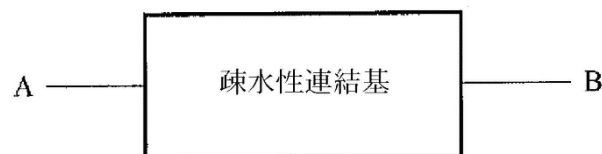
【0235】

いくつかの実施形態において、Lは、疎水性である。疎水性リンカーは当該技術分野で既知である。例えば、参照によりその全体が組み込まれる *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996) を参照されたい。当該技術分野で既知の好適な疎水性連結基として、例えば、8-ヒドロキシオクタン酸及び8-メルカプトオクタン酸が挙げられる。組成物のペプチドへのコンジュゲートの前に、疎水性連結基は、本明細書に記載され、以下に示す、少なくとも2つの反応性基（A及びB）を含む：

30

【0236】

【化6】



【0237】

いくつかの実施形態において、疎水性連結基は、反応性基として、マレイミドまたはヨードアセチル基のいずれか、及びカルボン酸または活性化カルボン酸（例えば、NHSエステル）のいずれかを含む。これらの実施形態において、マレイミドまたはヨードアセチル基は、標的化ポリペプチドまたはM上のチオール部分に結合することができ、カルボン酸または活性化カルボン酸は、結合試薬の使用の有無にかかわらず、標的化ポリペプチドまたはM上のアミンに結合することができる。当業者に既知の任意の結合剤を使用して、カルボン酸を、例えば、本明細書に記載のDCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU、及び他の活性化剤などの遊離アミンと結合することができる。特定の実施形態において、親水性結合基は、2～100のメチレン基の脂肪族鎖を含み、A及びBは、カルボキシル基またはその誘導体（例えば、コハク酸）である。他の特定の実施形態において、L

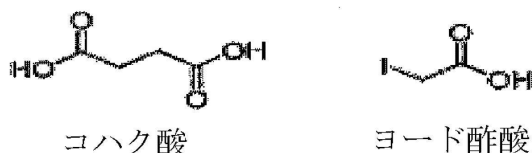
40

50

は、ヨード酢酸である。

【0238】

【化7】

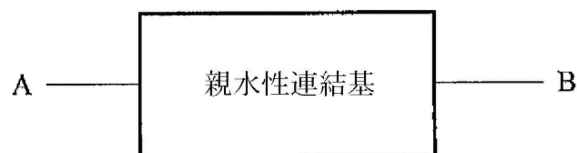


【0239】

いくつかの実施形態において、連結基は、例えば、ポリアルキレングリコールなどの親水性である。組成物のペプチドへのコンジュゲーションの前に、親水性連結基は、本明細書に記載され、以下に示す、少なくとも2つの反応性基（A及びB）を含む：

【0240】

【化8】



【0241】

特定の実施形態において、連結基は、ポリエチレングリコール（PEG）である。ある特定の実施形態におけるPEGは、約100ダルトン～約10,000ダルトン、例えば、約500ダルトン～約5000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態におけるPEGは、約10,000ダルトン～約40,000ダルトンの分子量を有する。

【0242】

いくつかの実施形態において、親水性連結基は、反応性基として、マレイミドまたはヨードアセチル基のいずれか、及びカルボン酸または活性化カルボン酸（例えば、NHSエステル）のいずれかを含む。これらの実施形態において、マレイミドまたはヨードアセチル基は、標的化ポリペプチドまたはM上のチオール部分に結合することができ、カルボン酸または活性化カルボン酸は、結合試薬の使用の有無にかかわらず、標的化ポリペプチドまたはM上のアミンに結合することができる。当業者に既知の任意の適切な結合剤を使用して、カルボン酸を、例えば、本明細書に記載のDCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU、及び他の活性化剤などのアミンと結合することができる。いくつかの実施形態において、連結基は、マレイミド-ポリマー（20～40kDa）-COOH、ヨードアセチル-ポリマー（20～40kDa）-COOH、マレイミド-ポリマー（20～40kDa）-NHS、またはヨードアセチル-ポリマー（20～40kDa）-NHSである。

【0243】

いくつかの実施形態において、連結基は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、またはポリペプチドからなり、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、またはポリペプチドは、本明細書に記載される少なくとも2つの活性化基を含む。いくつかの実施形態において、連結基（L）は、アミノ、エーテル、チオエーテル、マレイミド、ジスルフィド、アミド、エステル、チオエステル、アルケン、シクロアルケン、アルキン、トリゾイル、カルバメート、カーボネート、カテプシンB切断可能、及びヒドラゾンからなる群から選択される部分を含む。

【0244】

いくつかの実施形態において、Lは、1～約60個、または1～30個以上の原子、2～5個の原子、2～10個の原子、5～10個の原子、または10～20個の長さの原子の鎖を含む。いくつかの実施形態において、鎖原子はすべて、炭素原子である。いくつかの実施形態において、リンカーの骨格中の鎖原子は、C、O、N、及びSからなる群から

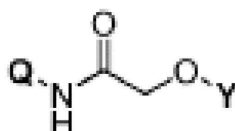
選択される。鎖原子及びリンカーは、より可溶性のコンジュゲートを提供するために、それらの予想される溶解性（親水性）によって選択され得る。いくつかの実施形態において、Lは、標的組織または器官または細胞に見出される酵素または他の触媒または加水分解条件による切断の対象となる官能基を提供する。いくつかの実施形態において、Lの長さは、立体障害の可能性を低減するのに十分に長い。

【0245】

いくつかの実施形態において、Lは、血液または血液画分などの生物学的流体中で安定である。いくつかの実施形態において、Lは、血清中で少なくとも5分間安定であり、例えば、25%、20%、15%、10%、または5%未満のコンジュゲートが、血清中で5分間インキュベートされたときに切断される。他の実施形態において、Lは、少なくとも10、もしくは20、もしくは25、もしくは30、もしくは60、もしくは90、もしくは120分間、または3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、もしくは24時間、血清中で安定である。これらの実施形態において、Lは、インビボで加水分解を受けることが可能な官能基を含まない。いくつかの例示的な実施形態において、Lは、血清中で少なくとも約72時間安定である。インビボで顕著な加水分解を受けることができない官能基の非限定的な例としては、アミド、エーテル、及びチオエーテルが挙げられる。例えば、以下の化合物は、インビボで顕著な加水分解を受けない：

【0246】

【化9】

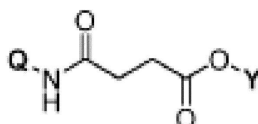


【0247】

いくつかの実施形態において、Lは、インビボで加水分解可能である。これらの実施形態において、Lは、インビボで加水分解を受けることが可能な官能基を含む。インビボで加水分解を受けることが可能な官能基の非限定的な例としては、エステル、無水物、及びチオエステルが挙げられる。例えば、以下の化合物は、エステル基を含むため、インビボで加水分解を受けることが可能である。

【0248】

【化10】



【0249】

いくつかの例示的な実施形態において、Lは不安定であり、37℃の血漿中で3時間以内に実質的な加水分解を受け、6時間以内に加水分解が完了する。いくつかの例示的な実施形態において、Lは、不安定ではない。

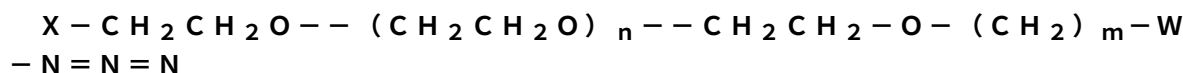
【0250】

いくつかの実施形態において、Lは、インビボで準安定である。これらの実施形態において、Lは、任意に、ある期間にわたってインビボで化学的または酵素的に切断されることが可能な官能基（例えば、酸不安定性、還元不安定性、または酵素不安定性官能基）を含む。これらの実施形態において、Lは、例えば、ヒドラゾン部分、ジスルフィド部分、またはカテプシン切断可能部分を含むことができる。Lが準安定であり、いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、標的化ポリペプチド-L-Mコンジュゲートは、細胞外環境、例えば、上述の期間にわたって血清中で安定であるが、細胞内環境または細胞内環境を模倣する条件において不安定であり、その結果、細胞内に入ると切断される。いくつかの実施形態において、Lが準安定である場合、Lは、少なくとも約24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、4

2、もしくは48時間、例えば、少なくとも約48、54、60、66、もしくは72時間、または約24～48、48～72、24～60、36～48、36～72、もしくは48～72時間、血清中で安定である。

【0251】

別の実施形態において、本発明のポリマー誘導体は、構造：



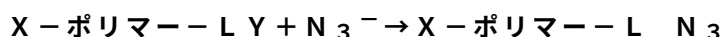
を有するポリマー骨格を含み、式中、Wは、1～10個の炭素原子を含む脂肪族または芳香族リンカー部分であり、

nは、1～約4000であり、Xは、上述の官能基であり、mは、1～10である。

10

【0252】

本発明のアジド含有ポリマー誘導体は、当該技術分野で既知の及び／または本明細書に開示される様々な方法によって調製することができる。以下に示す1つの方法では、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格であり、第1の官能基に結合した第1の末端及び好適な脱離基に結合した第2の末端を有するポリマー骨格を、アジドアニオン（ナトリウム、カリウム、tert-ブチルアンモニウムなどを含むいくつかの好適な対イオンのいずれかと対合されてもよい）と反応させる。脱離基が求核置換を受け、アジド部分に置き換えられ、所望のアジド含有ポリマーを得る：



例示されるように、本発明で使用するのに好適なポリマー骨格は、式X-ポリマー-LYを有し、式中、ポリマーはポリ（エチレングリコール）であり、Xはアジド基と反応しない官能基であり、Yは好適な脱離基である。好適な官能基の例としては、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アセタール、アルケニル、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボン酸、保護されたカルボン酸、マレイミド、ジチオピリジン、及びビニルピリジン、ならびにケトンが挙げられるが、これらに限定されない。好適な脱離基の例としては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシレート、トレシレート、及びトシレートが挙げられるが、これらに限定されない。

20

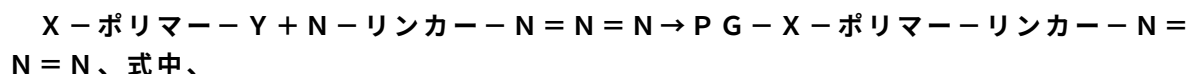
【0253】

本発明のアジド含有ポリマー誘導体の調製のための別の方法において、アジド官能基を有する連結剤は、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格と接触させられ、連結剤は、ポリマー上の化学官能基と選択的に反応してアジド含有ポリマー誘導体生成物を形成する化学官能基を有し、アジドは、連結基によってポリマー骨格から分離される。

30

【0254】

例示的な反応スキームを以下に示す：



式中、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）であり、Xは、アルコキシまたは上述の官能基などのキャッピング基であり、Yは、アジド官能基と反応性ではないが、N官能基と効率的かつ選択的に反応する官能基である。

40

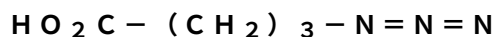
【0255】

好適な官能基の例としては、限定されないが、Nがアミンである場合、Yは、カルボン酸、カーボネート、または活性エステルであり、Nがヒドラジドまたはアミノオキシ部分である場合、Yはケトンであり、Nが求核剤である場合、Yは脱離基であることが挙げられる。粗生成物の精製は、必要に応じて、生成物の沈殿、続いてクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない既知の方法によって達成することができる。

【0256】

より具体的な例は、以下に示され、ポリマージアミンの場合、アミンのうちの1つをtert-ブチル-Bocなどの保護基部分によって保護し、得られる単保護ポリマージアミンを、アジド官能基を有する連結部分と反応させる。BocHN-ポリマー-NH₂+

50



この場合、アミン基を、塩化チオニルまたはカルボジイミド試薬、ならびにN-ヒドロキシスクシンイミドまたはN-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどの様々な活性化剤を使用してカルボン酸基に結合させて、モノアミンポリマー誘導体とアジド担持リンカー部分との間にアミド結合を作製することができる。アミド結合の形成に成功した後、得られるN-tert-ブチル-Boc保護アジド含有誘導体を直接使用して、生理活性分子を修飾することができるか、またはそれをさらに緻密化して、他の有用な官能基を設置することができる。例えば、N-tert-Boc基は、強酸で処理することによって加水分解されて、オメガアミノポリマーアジドを生成することができる。得られるアミンは、有益なヘテロ二官能性試薬を作製するために、マレイミド基、活性化ジスルフィド、活性化エステルなどの他の有用な官能基を設置するための合成ハンドルとして使用することができる。

10

【0257】

ヘテロ二官能性誘導体は、ポリマーの各末端に異なる分子を結合させることが所望される場合、特に有用である。例えば、オメガ-N-アミノ-N-アジドポリマーは、アルデヒド、ケトン、活性化エステル、活性化カーボネートなどの活性化求電子基を有する分子を、ポリマーの一方の末端に、そしてアセチレン基を有する分子を、ポリマーの他方の末端に結合させることを可能にするであろう。

【0258】

本発明の別の実施形態において、Aは、1~10個の炭素原子の脂肪族リンカー、または6~14個の炭素原子の置換アリール環である。Xはアジド基と反応しない官能基であり、Yは好適な脱離基である。

20

【0259】

複数の標的化ポリペプチドは、リンカーポリペプチドによって接合されてもよく、リンカーポリペプチドは、任意に、長さが6~14、7~13、8~12、7~11、9~11、または9アミノ酸である。他のリンカーとしては、限定されないが、PEGなどの小さなポリマーが挙げられ、これは、複数の標的化ポリペプチド分子と一緒に連結されることを可能にする多アーム型であり得る。複数の標的化ポリペプチド及び修飾された標的化ポリペプチドは、そのようなリンカーの使用を通じて、または各ポリペプチドのそれぞれのN末端間の直接的な化学結合により、頭-頭配置でそれらのN末端を介して互いに連結され得る。例えば、2つの標的化ポリペプチドを連結して、それらのN末端アミノ基または修飾されたN末端アミノ基間の化学結合によって二量体を形成してもよい。また、各標的化ポリペプチドのN末端と結合するための複数の化学官能基を含むように設計される連結分子を使用して、それらのそれぞれのN末端で複数の標的化ポリペプチドをそれぞれ接合してもよい。加えて、複数の標的化ポリペプチドは、N末端アミノ酸またはC末端アミノ酸以外のアミノ酸間の結合を通じて連結され得る。本明細書に記載される標的化ポリペプチドの二量体及び多量体を形成するために利用され得る共有結合の例としては、ジスルフィドまたはスルフヒドリルまたはチオール結合が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、ある特定の酵素、例えば、ソルターゼを使用して、標的化ポリペプチドのN末端を含む位置で、標的化ポリペプチドとリンカーとの間に共有結合を形成してもよい。

30

【0260】

リンカーは、広範囲の分子量または分子長を有し得る。標的化ポリペプチドと連結された実体との間、または連結された実体とその結合パートナーとの間（もしあれば）に所望の空間的関係または立体配座を提供するために、より大きいまたはより小さい分子量のリンカーが使用され得る。また、標的化ポリペプチドと連結された実体との間、または連結された実体とその結合パートナーとの間に所望の空間または柔軟性を提供するために、より長いまたはより短い分子長を有するリンカーが使用され得る。

40

【0261】

いくつかの実施形態において、本発明は、a) ポリマー骨格の少なくとも第1の末端上にアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはカルボニル含有部分、及びb) ポリマー骨格の第2の末端上に少なくとも第2の官能基を含む、ダン

50

ベル構造を有する水溶性二官能性リンカーを提供する。第2の官能基は、第1の官能基と同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態において、第2の官能基は、第1の官能基と反応性ではない。本発明は、いくつかの実施形態において、分枝状分子構造の少なくとも1つのアームを含む水溶性化合物を提供する。例えば、分枝状分子構造は、樹状であり得る。

【0262】

例示的な実施形態において、ポリマーは、リンカーを通じて標的化ポリペプチドまたは修飾された標的化ポリペプチドに連結される。例えば、リンカーは、一方の末端でポリマー（例えば、アルブミン結合部分など）に結合し、他方の末端でポリペプチド骨格上の任意の利用可能な位置に結合する1つまたは2つのアミノ酸を含み得る。追加の例示的なリンカーとしては、少なくとも5個の非水素原子を含む化学部分などの親水性リンカーが挙げられ、これらのうちの30～50%は、NまたはOのいずれかである。ポリマーを標的化ポリペプチドまたは修飾された標的化ポリペプチドに連結し得る追加の例示的なリンカーは、U.S. 2012/0295847及びWO/2012/168430に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0263】

任意に、複数の標的化ポリペプチドまたは修飾された標的化ポリペプチド分子は、リンカーポリペプチドによって接合されてもよく、該リンカーポリペプチドは、任意に、長さが1、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12アミノ酸、及び長さがそれ以上であり、任意に、1つの標的化ポリペプチドのN末端が、リンカーポリペプチドのC末端に縮合され、リンカーポリペプチドのN末端が、別の標的化ポリペプチドのN末端に縮合される。利用され得るさらなる例示的なリンカーポリペプチドは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO/2013/004607に開示される。

【0264】

本明細書で使用される場合、「求電子基」、「求電子剤」などの用語は、共有結合を形成するために電子対を受け入れることができる原子または原子の基を指す。本明細書で使用される「求電子基」は、ハロゲン化物、カルボニル、及びエポキシド含有化合物を含むが、これらに限定されない。一般的な求電子剤は、チオホスゲン、グリセリンジクロロヒドリン、フタロイルクロリド、スクシニルクロリド、クロロアセチルクロリド、クロロスクシリルクロリドなどのハロゲン化物、クロロアクトン、ブromoアセトンなどのケトン、グリオキサールなどのアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、トリレンジイソシアネート、メタキシリレンジイソシアネート、シクロヘキシルメタン-4、4-ジイソシアネートなどのイソシアネート、及びそれらの化合物の誘導体であり得る。

【0265】

本明細書で使用される場合、「求核基」、「求核剤」などの用語は、共有結合を形成することができる電子対を有する原子または原子の基を指す。この種類の基は、アニオン性基として反応するイオン化基であり得る。本明細書で使用される「求核基」は、ヒドロキシル、一級アミン、二級アミン、三級アミン、及びチオールを含むが、これらに限定されない。

【0266】

表2は、所望の官能基を作製するために組み合わせられ得る種々の出発求電子剤及び求核剤を提供する。提供される情報は、例示的なものであり、本明細書に記載の合成技法に限定されるものではない。

【0267】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：共有結合及びその前駆体の例

共有結合生成物	求電子剤	求核剤
カルボキサミド	活性化エステル	アミン／アニリン
カルボキサミド	アシルアジド	アミン／アニリン
カルボキサミド	ハロゲン化アシル	アミン／アニリン
エステル	ハロゲン化アシル	アルコール／フェノール
エステル	アシルニトリル	アルコール／フェノール
カルボキサミド	アシルニトリル	アミン／アニリン
イミン	アルデヒド	アミン／アニリン
ヒドラゾン	アルデヒドまたはケトン	ヒドラジン
オキシム	アルデヒドまたはケトン	ヒドロキシルアミン
アルキルアミン	ハロゲン化アルキル	アミン／アニリン
エステル	ハロゲン化アルキル	カルボン酸
チオエーテル	ハロゲン化アルキル	チオール
エーテル	ハロゲン化アルキル	アルコール／フェノール
チオエーテル	アルキルスルホネート	チオール
エステル	アルキルスルホネート	カルボン酸
エーテル	アルキルスルホネート	アルコール／フェノール
エステル	無水物	アルコール／フェノール
カルボキサミド	無水物	アミン／アニリン
チオフェノール	ハロゲン化アリール	チオール
アリールアミン	ハロゲン化アリール	アミン
チオエーテル	アジンジン	チオール
ボロン酸エステル	ボロネート	グリコール
カルボキサミド	カルボン酸	アミン／アニリン
エステル	カルボン酸	アルコール
ヒドラジン	ヒドラジド	カルボン酸

10

20

30

40

50

共有結合生成物	求電子剤	求核剤
N－アシル尿素または無水物	カルボジイミド	カルボン酸
エステル	ジアゾアルカン	カルボン酸
チオエーテル	エポキシド	チオール
チオエーテル	ハロアセトアミド	チオール
アンモトリアジン	ハロトリアジン	アミン／アニリン
トリアジニルエーテル	ハロトリアジン	アルコール／フェノール
アミジン	イミドエステル	アミン／アニリン
尿素	イソシアネート	アミン／アニリン
ウレタン	イソシアネート	アルコール／フェノール
チオ尿素	イソチオシアネート	アミン／アニリン
チオエーテル	マレイミド	チオール
亜リン酸エステル	ホスホロアミダイト	アルコール
シリルエーテル	ハロゲン化シリル	アルコール
アルキルアミン	スルホン酸エステル	アミン／アニリン
チオエーテル	スルホン酸エステル	チオール
エステル	スルホン酸エステル	カルボン酸
エーテル	スルホン酸エステル	アルコール
スルホンアミド	ハロゲン化スルホニル	アミン／アニリン
スルホン酸エステル	ハロゲン化スルホニル	フェノール／アルコール

【 0 2 6 8 】

一般に、炭素求電子剤は、炭素求核剤を含む相補的な求核剤によって攻撃されやすく、攻撃的な求核剤は、求核剤と炭素求電子剤との間に新しい結合を形成するために、電子対を炭素求電子剤にもたらす。

【 0 2 6 9 】

炭素求核剤の非限定的な例としては、アルキル、アルケニル、アリール、及びアルキニルグリニャール、有機リチウム、有機亜鉛、アルキル、アルケニル、アリール、及びアルキニルスズ試薬（有機スタナン）、アルキル、アルケニル、アリール、及びアルキニルボラン試薬（有機ボラン及び有機ボロネート）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの炭素求核剤は、水または極性有機溶媒中で動態学的に安定であるという利点を有する。炭素求核剤の他の非限定的な例としては、リンイリド、エノール、及びエノラート試薬が挙げられる。これらの炭素求核剤は、合成有機化学の当業者に周知の前駆体から生成することが比較的容易であるという利点がある。炭素求核剤は、炭素求電子剤と併せて使用される場合、炭素求核剤と炭素求電子剤との間に新しい炭素－炭素結合を生じさせる。

【 0 2 7 0 】

炭素求電子剤への結合に好適な非炭素求核剤の非限定的な例としては、一級及び二級アミン、チオール、チオレート、ならびにチオエーテル、アルコール、アルコキシド、アジ

ド、セミカルバジドなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの非炭素求核剤は、炭素求電子剤と併せて使用される場合、典型的にはヘテロ原子連結（C-X-C）を生成し、Xは、酸素、硫黄、または窒素を含むが、これらに限定されないヘテロ原子である。

【0271】

場合によっては、本発明で使用されるポリマーは、一端で、ヒドロキシまたはメトキシで終結する、すなわち、Xは、HまたはCH₃（「メトキシPEG」）である。あるいは、ポリマーは反応性基で終結し、それにより二官能性ポリマーを形成することができる。典型的な反応性基としては、20個の一般的なアミノ酸に見られる官能基（マレイミド基、活性化カーボネート（p-ニトロフェニルエステルを含むがこれに限定されない）、活性化エステル（N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェニルエステルを含むがこれらに限定されない）、及びアルデヒドを含むがこれらに限定されない）と反応するために一般的に使用されるそれらの反応性基、ならびに20個の一般的なアミノ酸に対して不活性であるが、相補的な官能基（アジド基、アルキン基を含むがこれらに限定されない）と特異的に反応する官能基が挙げられる。Yによって上記の式に示されるポリマーの他方の端は、天然に存在するまたは非天然コード化アミノ酸を介して標的化ポリペプチドに直接または間接的のいずれかで結合することに留意されたい。例えば、Yは、ポリペプチドのアミン基（リジンのイプシロンアミンまたはN末端を含むがこれらに限定されない）へのアミド、カルバメート、または尿素連結であり得る。あるいは、Yは、チオール基（システインのチオール基を含むがこれに限定されない）へのマレイミド連結であり得る。あるいは、Yは、20の一般的なアミノ酸を介して一般的にアクセス可能ではない残基への連結であり得る。例えば、ポリマー上のアジド基を標的化ポリペプチド上のアルキン基と反応させて、ヒュスゲン[3+2]環化付加生成物を形成することができる。あるいは、ポリマー上のアルキン基を標的化ポリペプチド中に存在するアジド基と反応させて、類似の生成物を形成することができる。いくつかの実施形態において、適用できる場合、強力な求核剤（ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、セミカルバジドを含むがこれらに限定されない）を、標的化ポリペプチド中に存在するアルデヒドまたはケトン基と反応させて、ヒドラゾン、オキシム、またはセミカルバゾン形成することができ、場合によっては、適切な還元剤での処理によってさらに還元することができる。あるいは、強力な求核剤は、非天然コード化アミノ酸を介して標的化ポリペプチドに組み込むことができ、水溶性ポリマー中に存在するケトンまたはアルデヒド基と優先的に反応させるために使用することができる。

【0272】

ポリマーの任意の分子量は、所望されるように、約100ダルトン(Da)~100,000Da以上を含むがこれらに限定されない、実質的に所望されるように使用することができる（場合によっては0.1~50kDaまたは10~40kDaを含むがこれらに限定されない）。ポリマーの分子量は、約100Da~約100,000Da以上を含むがこれらに限定されない広範囲のものであり得る。ポリマーは、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da~約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、ポリマーは、約100Da~約50,000Daである。各鎖が、1~100kDa（1~50kDaまたは5~20kDaを含むがこれらに限定されない）の範囲の分子量を有するポリマー分子を含むが、これに限定されない分枝鎖ポリマーも使用することができる。分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、限定さ

れないが、約1,000Da～約100,000Da以上を含むものであり得る。分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、及び1,000Daを含むがこれらに限定されない、約1,000Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、約1,000Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖ポリマーの各鎖の分子量は、約5,000Da～約20,000Daである。広範囲のポリマー分子が、限定されないが、Shearwater Polymers, Inc. のカタログ、Nektar Therapeuticsのカタログ（参照により本明細書に組み込まれる）を含むものに記載される。

【0273】

いくつかの実施形態において、本発明は、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格を含む、アジド及びアセチレン含有ポリマー誘導体を提供する。水溶性ポリマーのポリマー骨格は、ポリ（エチレングリコール）であり得る。しかしながら、ポリ（エチレン）グリコールを含むがこれに限定されない多種多様の水溶性ポリマー、ならびにポリ（デキストラン）及びポリ（プロピレングリコール）を含む他の関連ポリマーもまた、本発明の実施において使用するのに好適であり、用語PEGまたはポリ（エチレングリコール）の使用は、すべてのそのような分子を包含し、含むことが意図されていることを理解されたい。PEGという用語には、二官能性PEG、多アーム型PEG、誘導体化PEG、フォーク型PEG、分枝型PEG、ペンダント型PEG（すなわち、ポリマー骨格に対してペンダント状である1つ以上の官能基を有するPEGまたは関連ポリマー）、またはそれらの中に分解可能な連結を有するPEGを含む、その形態のいずれかのポリ（エチレングリコール）が含まれるが、これに限定されない。

【0274】

これらの形態のポリマーに加えて、ポリマーは、骨格内の弱いまたは分解可能な連結で調製することもできる。例えば、ポリマーは、加水分解を受けるポリマー骨格内のエステル連結で調製することができる。以下に示すように、この加水分解は、ポリマーを低分子量の断片に切断する。 $\text{—ポリマー—CO}_2\text{—ポリマー—} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ポリマー—CO}_2\text{H} + \text{HO—ポリマー—}$

多くのポリマーはまた、本発明での使用に好適である。いくつかの実施形態において、2～約300の末端を有する水溶性のポリマー骨格は、本発明において特に有用である。好適なポリマーの例としては、ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）などの他のポリ（アルキレングリコール）、それらのコポリマー（エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマーを含むが、これに限定されない）、それらのターポリマー、それらの混合物などが挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各鎖の分子量は変化し得るが、典型的には、約800Da～約100,000Da、多くの場合約6,000Da～約80,000Daの範囲である。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da

a、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0275】

本発明のこの実施形態の1つの特徴において、インタクトなポリマーコンジュゲートは、加水分解の前に、切断可能な結合の加水分解が活性標的化ポリペプチドの血流への遅い放出速度を制御するのに有効であるように、投与時に最小限に分解され、これは、標的化ポリペプチドの体循環へのその放出前の酵素分解とは対照的である。

【0276】

適切な生理学的に切断可能な連結には、エステル、炭酸エステル、カルバメート、スルフェート、ホスフェート、アシルオキシアルキルエーテル、アセタール、及びケタールが含まれるが、これらに限定されない。そのようなコンジュゲートは、貯蔵時及び投与時に安定である生理学的に切断可能な結合を有するべきである。例えば、ポリマーに連結された標的化ポリペプチドまたは修飾された標的化ポリペプチドは、最終的な医薬組成物の製造時、用いられる場合、適切な送達ビヒクルにおける溶解時、及び経路にかかわらず投与時にその完全性を維持するべきである。

【0277】

本発明はまた、参照により本明細書に組み込まれるUS2017/0182181に開示される薬物コンジュゲートの細胞内送達のための調節可能な安定性を有するホスフェートベースのリンカーを含む。ホスフェートベースのリンカーは、遠位方向から近位方向に、調節要素、任意にスペーサー要素、及び反応性官能基を含む、リンカーアームの遠位端に共有結合したモノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、またはテトラホスフェート基（ホスフェート基）を含む。ホスフェートベースのリンカーのホスフェート基は、ペイロードにコンジュゲートすることが可能であり、反応性官能基は、抗体などの細胞特異的標的化リガンドにコンジュゲートすることが可能である。ホスフェートベースのリンカーの一般的な構造は、ホスフェート基-調節要素-任意のスペーサー要素-官能性反応性基である。ペイロードにコンジュゲートされたホスフェートベースのリンカーは、一般的な構造：ペイロード-ホスフェート基-調節要素-任意のスペーサー要素-官能性反応性基を有し、標的化リガンドにコンジュゲートされた場合、一般構造：ペイロード-ホスフェート基-調節要素-任意のスペーサー要素-標的化リガンドを有する。これらのホスフェートベースのリンカーは、細胞内環境（例えば、リソソームコンパートメント）と比較して、血液中で区別され、調節可能な安定性を有する。ホスフェート基が細胞内環境で切断されて、その天然または活性形態でペイロードを放出する速度は、ホスフェート基の置換によって媒介されるさらなる効果を有する調節要素の構造によって、ならびにホスフェート基がモノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、またはテトラホスフェートであるかどうかによって影響され得る。さらに、これらのホスフェートベースのリンカーは、本明細書に開示されるホスフェートベースのリンカーではないリンカーを使用して、同じペイロードが抗体または標的化リガンドにコンジュゲートされるコンジュゲートと比較して、コンジュゲートが凝集体を形成する傾向が低減される抗体-薬物コンジュゲートなどのコンジュゲートを構築する能力を提供する。

【0278】

TLR-アゴニストリンカー誘導体の構造及び合成：求電子及び求核基

ヒドロキシルアミン（アミノオキシとも呼ばれる）基を含有するリンカーを有するTLRアゴニスト誘導体は、様々な求電子基と反応して、コンジュゲート（PEGまたは他の

10

20

30

40

50

水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されない)を形成することができる。ヒドラジン、ヒドラジド、及びセミカルバジドと同様に、アミノオキシ基の求核性が増強することにより、ケトン、アルデヒド、または同様の化学反応性を有する他の官能基を含むがこれらに限定されない、カルボニルまたはジカルボニル基を含有する様々な分子と効率的かつ選択的に反応することが可能となる。例えば、Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)、H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34 (9): 727-736 (2001)を参照されたい。ヒドラジン基との反応の結果は、対応するヒドラゾンであるが、オキシムは、一般に、アミノオキシ基と、例として、ケトン、アルデヒド、または同様の化学反応性を有する他の官能基などのカルボニルまたはジカルボニル含有基との反応から生じる。いくつかの実施形態において、アジド、アルキン、またはシクロアルキンを含むリンカーを有するTLR-アゴニスト誘導体は、環化付加化反応(例えば、1,3-二極環化付加、アジド-アルキンヒュスゲン環化付加など)を介した分子の連結を可能にする。(反応に対する程度において、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,807,619号に記載される)。

【0279】

したがって、ある特定の実施形態において、ヒドロキシルアミン、アルデヒド、保護されたアルデヒド、ケトン、保護されたケトン、チオエステル、エステル、ジカルボニル、ヒドラジン、アミジン、イミン、ジアミン、ケト-アミン、ケト-アルキン、及びエン-ジオンヒドロキシルアミン基、ヒドロキシルアミン様基(ヒドロキシルアミン基に類似する反応性を有し、ヒドロキシルアミン基に構造的に類似する)、マスクされたヒドロキシルアミン基(ヒドロキシルアミン基に容易に変換され得る)、または保護されたヒドロキシルアミン基(脱保護時にヒドロキシルアミン基に類似する反応性を有する)を含むリンカーを有するTLR-アゴニスト誘導体が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、リンカーを有するTLRアゴニスト誘導体は、アジド、アルキン、またはシクロアルキンを含む。

【0280】

そのようなTLR-アゴニストリンカー誘導体または標的化ポリペプチドは、塩の形態であり得るか、または非天然アミノ酸ポリペプチド、ポリマー、多糖、もしくはポリヌクレオチドに組み込まれ、任意に翻訳後修飾され得る。

【0281】

ある特定の実施形態において、式(I)~(VII)の化合物は、弱酸性条件下で、少なくとも1ヶ月間水溶液中で安定である。ある特定の実施形態において、式(I)~(VII)の化合物は、弱酸性条件下で、少なくとも2週間安定である。ある特定の実施形態において、式(I)~(VII)の化合物は、弱酸性条件下で、少なくとも5日間安定である。ある特定の実施形態において、そのような酸性条件は、pH2~8である。

【0282】

本明細書に提供及び記載される方法及び組成物は、少なくとも1つのカルボニルもしくはジカルボニル基、オキシム基、ヒドロキシルアミン基、またはそれらの保護もしくはマスクされた形態を有する非天然アミノ酸を含むポリペプチドを含む。少なくとも1つの反応性基の、TLR-アゴニストリンカー誘導体または標的化ポリペプチドへの導入は、一般的に存在するアミノ酸と反応しない一方で、1つ以上の標的化ポリペプチド(複数可)を含むが、これに限定されないものとの特定の化学反応を伴うコンジュゲーション化学の適用を可能にすることができる。一旦組み込まれると、TC側鎖の標的化ポリペプチドはまた、本明細書に記載される化学方法論を利用することによって修飾されるか、またはTLR-アゴニストリンカー誘導体もしくは標的化ポリペプチドに存在する特定の官能基もしくは置換基に好適であり得る。

【0283】

本明細書に記載のTLR-アゴニストリンカー誘導体及び標的化ポリペプチド、方法、ならびに組成物は、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコール誘導体、第2の

タンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体または抗体断片、及びそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない他の物質を伴う多種多様の官能基、置換基、または部分を有する物質のコンジュゲートを提供する。

【0284】

ある特定の実施形態において、式(I)～(VII)の化合物を含む、本明細書に記載のTLR-アゴニストリンカー誘導体、標的化ポリペプチド、TC、リンカー、及び試薬は、弱酸性条件下(pH2～8を含むが、これらに限定されない)で、水溶液中で安定である。他の実施形態において、そのような化合物は、弱酸性条件下で少なくとも1ヶ月間安定である。他の実施形態において、そのような化合物は、弱酸性条件下で少なくとも2週間安定である。他の実施形態において、そのような化合物は、弱酸性条件下で少なくとも5日間安定である。

10

【0285】

組成物、方法、技法、及び戦略の別の態様において、前述の「修飾されたまたは非修飾」非天然アミノ酸標的化ポリペプチドのうちのいずれかを研究または使用するための方法が本明細書に記載される。この態様には、ほんの一例として、「修飾されたもしくは非修飾」非天然アミノ酸ポリペプチドまたはタンパク質を含む標的化ポリペプチドから利益を受けるであろう、治療的、診断的、アッセイベースの、工業的、美容的、植物生物学的、環境的、エネルギー産生的、消費者製品、及び／または軍事的使用が含まれる。

【0286】

少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むTC分子が本発明で提供される。本発明のある特定の実施形態では、少なくとも1つの非天然アミノ酸を有するTCは、少なくとも1つの翻訳後修飾を含む。一実施形態において、少なくとも1つの翻訳後修飾は、標識、染料、リンカー、別のTCポリペプチド、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、放射性核種、細胞傷害性化合物、薬物、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体断片、金属キレート剤、補因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、糖、シクロデキストリン、阻害性リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的もしくは非共有結合的に相互作用する基、光ケージ化(photo-caged)部分、アクチン放射線励起部分、光異性化可能部分、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込んだ部分、化学的に切断可能な基、光切断可能な基、細長い側鎖、炭素連結された糖、酸化還元活性剤、アミノチオ酸、毒性部分、同位体標識された部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、電子密集基、磁性基、挿入基、発色団、エネルギー移動剤、生物学的活性剤、検出可能な標識、小分子、量子ドット、ナノ伝達物質、放射性ヌクレオチド、放射性伝達物質、中性子捕捉剤、または上記の任意の組み合わせ、あるいは任意の他の望ましい化合物もしくは物質(特定の反応性基に好適であることが当業者に知られている化学方法論を利用する第1の反応性基を含む、少なくとも1つの非天然アミノ酸に対する第2の反応性基を含む)を含むが、これらに限定されない分子の結合を含む。例えば、第1の反応性基はアルキニル部分(非天然アミノ酸p-プロパルギルオキシフェニルアラニン内を含むがこれに限定されない、ここで、プロパルギル基は、アセチレン部分とも称されることがある)であり、第2の反応性基はアジド部分であり、[3+2]環化付加化学方法論が利用される。別の実施例において、第1の反応性基は、アジド部分(本明細書内で時折参照される非天然アミノ酸p-アジド-L-フェニルアラニンまたはpAZ内を含むが、これらに限定されない)であり、第2の反応性基は、アルキニル部分である。本発明の修飾されたTCのある特定の実施形態において、少なくとも1つの翻訳後修飾を含む少なくとも1つの非天然アミノ酸(ケト官能基を含有する非天然アミノ酸を含むが、これに限定されない)が使用され、ここで、少なくとも1つの翻訳後修飾は糖部分を含む。ある特定の実施形態において、翻訳後修飾は、真核生物細胞または非真核生物細胞においてインビボで行われる。リンカー、ポリマー、水溶性ポリマー、または他の分子は、分子をポリペプチドに結合し得

20

30

40

50

る。さらなる実施形態において、TCに結合されたリンカーは、二量体の形成を可能にするのに十分な長さである。分子はまた、ポリペプチドに直接連結され得る。

【0287】

ある特定の実施形態において、TCタンパク質は、1つの宿主細胞によってインビボで行われる少なくとも1つの翻訳後修飾を含み、ここで、翻訳後修飾は通常、別の宿主細胞型によって行われない。ある特定の実施形態において、タンパク質は、真核細胞によってインビボで行われる少なくとも1つの翻訳後修飾を含み、ここで、翻訳後修飾は通常、非真核細胞によって行われない。翻訳後修飾の例には、グリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミテート付加、リン酸化、糖脂質連結修飾などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0288】

いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミテート付加、リン酸化、または糖脂質連結修飾のための1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化のための1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミテート付加、リン酸化、または糖脂質連結修飾のための1つ以上の天然コード化アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化のための1つ以上の天然コード化アミノ酸を含む。

【0289】

いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチドのグリコシル化を増強する1つ以上の欠失を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の異なるアミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の異なるアミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の欠失を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の非天然コード化アミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の天然コード化アミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の異なるアミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の天然コード化アミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。いくつかの実施形態において、TCは、ポリペプチド中の非天然コード化アミノ酸においてグリコシル化を増強する1つ以上の非天然コード化アミノ酸付加及び／または置換を含む。

20

30

【0290】

一実施形態において、翻訳後修飾は、GlcNAc-アスパラギン連結によるオリゴ糖のアスパラギンへの結合（オリゴ糖が（GlcNAc-Man）₂-Man-GlcNAc-GlcNAcなどを含む場合を含むが、これに限定されない）を含む。別の実施形態において、翻訳後修飾は、GalNAc-セリン、GalNAc-スレオニン、GlcNAc-セリン、またはGlcNAc-スレオニン連結によるオリゴ糖（Gal-GalNAc、Gal-GlcNAcなどを含むが、これらに限定されない）のセリンまたはスレオニンへの結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、分泌または局在化配列、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジンタグ、GST融合物及び／または同等物を含むことができる。分泌シグナル配列の例としては、原核生物分泌シグナル配列、真核生物分泌シグナル配列、細菌発現のために5'最適化された真核生物分泌シグナル配列、新規分泌シグナル配列、ペクテトリアーゼ分泌シグナル配列、Omp A分泌シグナル配列、及びファージ分泌シグナル配列が挙げられるが、

40

50

これらに限定されない。分泌シグナル配列の例としては、S T I I（原核生物）、F d G I I I及びM 1 3（ファージ）、B g l 2（酵母）、ならびにトランスポゾンに由来するシグナル配列b l aが挙げられるが、これらに限定されない。任意のそのような配列は、1つのシグナル配列を異なるシグナル配列で置換すること、リーダー配列を異なるリーダー配列で置換することなどを含むがこれらに限定されない、ポリペプチドでの所望の結果を提供するように修飾され得る。

【0291】

関心のタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10以上の非天然アミノ酸を含有することができる。非天然アミノ酸は、同じであっても異なってもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の異なる部位が存在し得る。ある特定の実施形態において、天然に存在するタンパク質型に存在する特定のアミノ酸の少なくとも1つであるが、すべてより少ないアミノ酸が、非天然アミノ酸で置換される。

【0292】

本発明は、少なくとも1つの非天然コード化アミノ酸を含むT Cに基づく方法及び組成物を提供する。T Cへの少なくとも1つの非天然コード化アミノ酸の導入は、一般的に存在する20個のアミノ酸と反応しない一方で、1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含むが、これに限定されないものとの特定の化学反応を伴うコンジュゲート化学の適用を可能にすることができる。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸を含むT Cは、非天然コード化アミノ酸の側鎖を介して、ポリエチレングリコール（P E G）などの水溶性ポリマー、またはリンカーに連結される。本発明は、P E G誘導体またはT L Rーリンカー誘導体を有するタンパク質の選択的修飾のための非常に効率的な方法を提供し、これは、ケトン、アジド、またはアセチレン部分を含むがこれらに限定されない20個の天然に組み込まれたアミノ酸に見られない官能基または置換基を含有するそれらのアミノ酸を含むがこれに限定されない非遺伝子コード化アミノ酸を、セクターコドンに応答してタンパク質に選択的に組み込むことと、その後それらのアミノ酸を好適な反応性P E G誘導体で修飾することとを伴う。組み込まれると、アミノ酸側鎖は次いで、非天然コード化アミノ酸に存在する特定の官能基または置換基に好適なように、当業者に知られている化学方法論を利用することによって修飾され得る。多種多様の既知の化学方法論は、水溶性ポリマーをタンパク質に組み込むために本発明での使用に好適である。そのような方法論には、それぞれ、アセチレンまたはアジド誘導体を含むが、これらに限定されないものとのヒュスゲン[3+2]環化付加反応（例えば、Padwa, A. in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109及びHuisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176を参照されたい）が含まれるが、これに限定されない。

【0293】

ヒュスゲン[3+2]環化付加方法は、求核置換反応ではなく環化付加を伴うため、タンパク質は極めて高い選択性で修飾され得る。反応は、反応混合物に触媒量のCu(I)塩を添加することによって、優れた位置選択性(1, 4>1, 5)を有する水性条件で室温で行われ得る。例えば、Tornoe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064及びRostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599、ならびにW003/101972を参照されたい。[3+2]環状付加を通じて本発明のタンパク質に付加され得る分子は、アジドまたはアセチレン誘導体を含むがこれらに限定されない好適な官能基または置換基を有する実質的に任意の分子を含む。これらの分子は、それぞれ、p-プロパルギルオキシフェニルアラニンを含むがこれに限定されないアセチレン基、または

p-アジド-フェニルアラニンを含むがこれに限定されないアジド基を有する非天然アミノ酸に付加することができる。

【0294】

ヒュスゲン〔3+2〕環化付加から生じる5員環は、還元環境では一般的に可逆的ではなく、水性環境での長期間の加水分解に対して安定である。したがって、多種多様な物質の物理的及び化学的特徴は、本発明の活性PEG誘導体またはTLR-リンカー誘導体を用いた厳しい水性条件下で修飾することができる。さらに重要なことに、アジド及びアセチレン部分は互いに特異的である（及び例えば、20個の一般的な遺伝子コード化アミノ酸のいずれとも反応しない）ため、タンパク質は、極めて高い選択性で1つ以上の特異的部位で修飾され得る。

10

【0295】

また、本発明は、PEG誘導体またはTLRリンカー誘導体の水溶性及び加水分解的に安定な誘導体、ならびに1つ以上のアセチレンまたはアジド部分を有する関連する親水性ポリマーを提供する。アセチレン部分を含有するPEGポリマー誘導体は、セクターコードンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアジド部分との結合に対して選択性が高い。同様に、アジド部分を含有するPEGポリマー誘導体は、セクターコードンに応答してタンパク質に選択的に導入されたアセチレン部分との結合に対して選択性が高い。より具体的には、アジド部分は、アルキルアジド、アリールアジド、及びこれらのアジドの誘導体を含むが、これらに限定されない。アルキル及びアリールアジドの誘導体は、アセチレン特異的反応性が維持される限り、他の置換基を含むことができる。アセチレン部分は、アルキル及びアリールアセチレン、ならびにそれぞれの誘導体を含む。アルキル及びアリールアセチレンの誘導体は、アジド特異的反応性が維持される限り、他の置換基を含むことができる。

20

【0296】

本発明は、標識、染料、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、放射性核種、細胞傷害性化合物、薬物、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体断片、金属キレート剤、補因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、糖、水溶性デンドリマー、シクロデキストリン、阻害性リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的もしくは非共有結合的に相互作用する基、光ケージ化部分、アクチン放射線励起部分、光異性化可能部分、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込んだ部分、化学的に切断可能な基、光切断可能な基、細長い側鎖、炭素連結された糖、酸化還元活性剤、アミノチオ酸、毒性部分、同位体標識された部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、電子密集基、磁性基、挿入基、発色団、エネルギー移動剤、生物学的活性剤、検出可能な標識、小分子、量子ドット、ナノ伝達物質、放射性ヌクレオチド、放射性伝達物質、中性子捕捉剤、または上記の任意の組み合わせ、あるいは任意の他の望ましい化合物または物質を含むが、これらに限定されない他の物質との、多種多様な官能基、置換基、または部分を有する物質のコンジュゲートを提供する。本発明は、対応するアセチレンまたはアジド部分を有するPEGポリマー誘導体を有するアジドまたはアセチレン部分を有する物質のコンジュゲートも含む。例えば、アジド部分を含有するPEGポリマーは、アセチレン官能基を有する非遺伝子コード化アミノ酸を含有するタンパク質内の位置で、生物学的活性分子に結合され得る。PEG及び生物学的活性分子が結合している連結には、限定されないが、ヒュスゲン〔3+2〕環化付加生成物が含まれる。

30

40

【0297】

PEGを使用して生体材料の表面を修飾することができることは当該技術分野で十分に確立されている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,610,281号、Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1):125-136(2000)）を参照されたい。本発明はまた、1つ以上の反応性アジドまた

50

はアセチレン部位を有する表面と、ヒュスゲン〔3+2〕環化付加連結を介して表面に結合された本発明のアジドまたはアセチレン含有ポリマーのうちの1つ以上とを含む生体材料を含む。生体材料及び他の物質はまた、アジドまたはアセチレン連結以外の連結、例えば、カルボン酸、アミン、アルコール、またはチオール部分を含む連結を通じて、アジドまたはアセチレン活性化ポリマー誘導体に結合されて、アジドまたはアセチレン部分をその後の反応のために利用可能にすることができる。

【0298】

本発明は、本発明のアジド及びアセチレン含有ポリマーを合成する方法を含む。アジド含有PEG誘導体の場合、アジドは、ポリマーの炭素原子に直接結合することができる。あるいは、アジド含有PEG誘導体は、得られるポリマーがその末端にアジド部分を有するように、一方の末端にアジド部分を有する連結剤を従来の活性化ポリマーに結合させることによって調製することができる。アセチレン含有PEG誘導体の場合、アセチレンは、ポリマーの炭素原子に直接結合することができる。あるいは、アセチレン含有PEG誘導体は、得られるポリマーがその末端にアセチレン部分を有するように、一方の末端にアセチレン部分を有する連結剤を従来の活性化ポリマーに結合させることによって調製することができる。

【0299】

より具体的には、アジド含有PEG誘導体の場合、少なくとも1つの活性ヒドロキシル部分を有する水溶性ポリマーは、その上にメシレート、トレシレート、トシレート、またはハロゲン脱離基などのより反応性の部分を有する置換ポリマーを産生するための反応を受ける。スルホニル酸ハロゲン化物、ハロゲン原子、及び他の脱離基を含有するPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体の調製及び使用は、当業者に既知である。次いで、得られた置換ポリマーは、ポリマーの末端のアジド部分の代わりにより反応性の部分を使用するための反応を受ける。あるいは、少なくとも1つの活性求核または求電子部分を有する水溶性ポリマーは、PEGポリマーと連結剤との間に共有結合が形成され、アジド部分がポリマーの末端に配置されるように、1つの末端にアジドを有する連結剤との反応を受ける。アミン、チオール、ヒドラジド、ヒドラジン、アルコール、カルボキシレート、アルデヒド、ケトン、チオエステルなどを含む求核及び求電子部分は、当業者に既知である。

【0300】

より具体的には、アセチレン含有PEG誘導体の場合、少なくとも1つの活性ヒドロキシル部分を有する水溶性ポリマーは、アセチレン部分を含有する前駆体からハロゲンまたは他の活性化された脱離基を置換する反応を受ける。あるいは、少なくとも1つの活性求核または求電子部分を有する水溶性ポリマーは、PEGポリマーと連結剤との間に共有結合が形成され、アセチレン部分がポリマーの末端に配置されるように、1つの末端にアセチレンを有する連結剤との反応を受ける。有機合成及びPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体の調製及び使用の文脈におけるハロゲン部分、活性化された脱離基、求核及び求電子部分の使用は、当業者に十分に確立されている。

【0301】

本発明はまた、アジドまたはアセチレン部分を含有する、PEG及びPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体、リンカー、または別のTCポリペプチドなどの水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されない、他の物質を修飾されたタンパク質に付加するためのタンパク質の選択的修飾のための方法を提供する。アジド及びアセチレン含有PEG誘導体またはTLRリンカー誘導体は、生体適合性、安定性、溶解性、及び免疫原性の欠如が重要である表面及び分子の特性を修飾するために使用できると同時に、当該技術分野で以前に知られていたよりもタンパク質にPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体を結合させるより選択的な手段を提供する。

【0302】

本発明で使用するための一般的な組換え核酸方法

本発明の多数の実施形態において、関心のTCの標的化ポリペプチドをコードする核酸は、組換え方法を使用して単離、クローニング、及びしばしば改変される。そのような実

10

20

30

40

50

施形態は、タンパク質発現のために、またはバリエーション、誘導体、発現カセット、もしくはTCの標的化ポリペプチドに由来する他の配列の生成中に使用されることを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドをコードする配列は、異種プロモーターに作動可能に連結される。

【0303】

非天然コード化アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、親ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成され、次いで、関連するアミノ酸残基（複数可）の導入（すなわち、組み込みまたは置換）または除去（すなわち、欠失または置換）をもたらすようにヌクレオチド配列を変更することができる。ヌクレオチド配列は、従来の方法により、部位特異的変異誘発によって便利に修飾され得る。あるいは、オリゴヌクレオチド合成装置の使用を含むがこれに限定されない化学合成によってヌクレオチド配列を調製してもよく、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを設計し、好ましくは、組換えポリペプチドが産生される宿主細胞において好ましいそれらのコドンを選択する。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドは、PCR、ライゲーション、またはライゲーション連鎖反応によって合成及び組み立てられ得る。例えば、Barany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:189-193 (1991)、米国特許第6,521,427号（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0304】

本発明は、組換え遺伝学の分野における通例の技法を利用する。本発明における一般的な使用方法を開示する基本的なテキストとしては、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001)、Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990) 及び Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994) が挙げられる。

【0305】

本発明はまた、直交tRNA／RS対を介した非天然アミノ酸のインビボ組み込みのための、真核宿主細胞、非真核宿主細胞、及び生物に関する。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチド、または例えば、クローニングベクターもしくは発現ベクターであり得る本発明のベクターを含むがこれに限定されない、本発明のポリヌクレオチドを含む構築物で遺伝子操作される（形質転換、形質導入、もしくはトランスフェクトを含むがこれらに限定されない）。

【0306】

標的核酸を細胞に導入するいくつかの周知の方法が利用可能であり、これらのうちのいずれかが本発明で使用され得る。これらには、DNAを含有する細菌プロトプラストとのレシピエント細胞の融合、エレクトロポレーション、入射粒子衝撃法、及びウイルスベクターによる感染（以下でさらに論じられる）などが含まれる。細菌細胞を使用して、本発明のDNA構築物を含有するプラスミドの数を増幅することができる。細菌を対数期まで成長させ、細菌内のプラスミドを当該技術分野で既知の様々な方法によって単離することができる（例えば、Sambrookを参照されたい）。加えて、細菌からのプラスミドの精製のためにキットが市販されている（例えば、EasyPrep（商標）、FlexiPrep（商標）（両方ともPharmacia Biotech）、StrataClean（商標）（Stratagene）、及びQIAprep（商標）（Qiagen）を参照されたい）。次いで、単離及び精製されたプラスミドをさらに操作して、他のプラスミドを産生し、細胞をトランスフェクトするために使用するか、または関連するベクターに組み込んで、生物に感染させる。典型的なベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、転写及び翻訳開始配列、ならびに特定の標的核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。ベクターは、任意に、少なくとも1つの独立したターミネーター配列、真核生物もしくは原核生物、またはその両方におけるカセットの複製を可能にする配列（シ

10

20

30

40

50

ャトルベクターを含むが、これに限定されない)を含有する一般的な発現力セット、及び原核生物及び真核生物系の両方の選択マーカーを含む。ベクターは、原核生物、真核生物、またはその両方における複製及び組み込みに好適である。Gillam & Smith, Gene 8:81 (1979)、Roberts, et al., Nature, 328:731 (1987)、Schneider, E., et al., Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995)、Ausubel, Sambrook, Berger (全て上記)を参照されたい。クローニングに有用な細菌及びバクテリオファージのカatalogは、例えば、ATCC、例えば、The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds) によって提供される。分子生物学のシーケンシング、クローニング、及び他の態様、ならびに基礎となる理論考察のための追加の基本的な手順は、Watson et al. (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NYにも見出される。加えて、本質的に、任意の核酸(及び標準的であるか非標準的であるかに関わらず、実質的に任意の標識された核酸)は、Midland Certified Reagent Company (Midland, TX、World Wide Web at mcrc.comで入手可能)、The Great American Gene Company (Ramona, CA、World Wide Web at genco.comで入手可能)、ExpressGen Inc. (Chicago, IL、World Wide Web at expressgen.comで入手可能)、Operon Technologies Inc. (Alameda, CA)、及び多くのその他の様々な商業的供給源のいずれかから特別注文または標準注文することができる。

10

20

【0307】

セクターコドン

本発明のセクターコドンは、タンパク質生合成機構の遺伝子コドンフレームワークを拡張する。例えば、セクターコドンには、固有の3塩基コドン、終止コドンなどのナンセンスコドン(アンバーコドン(UAG)、オーカーコドン、またはオパールコドン(UGA)、非天然コドン、4塩基以上のコドン、レアコドンなどを含むこれらに限定されない)が含まれるが、これらに限定されない。当業者であれば、所望の遺伝子またはポリヌクレオチドに導入することができるセクターコドンの数には、TCの少なくとも一部をコードする単一のポリヌクレオチド中に、1つ以上、2つ以上、3つ以上、4、5、6、7、8、9、10以上を含むが、これらに限定されない幅広い範囲があることは、容易に明らかである。

30

【0308】

一実施形態において、方法は、インビボで1つ以上の非天然アミノ酸を組み込むための終止コドンであるセクターコドンの使用を伴う。例えば、UAGを含むがこれに限定されない終止コドンを認識するO-tRNAが産生され、所望の非天然アミノ酸を有するO-RSによってアミノアシル化される。このO-tRNAは、天然に存在する宿主のアミノアシル-tRNA合成酵素によって認識されない。従来の部位特異的変異誘発を使用し、TAGを含むがこれに限定されない終止コドンを、関心のポリペプチド内の関心の部位に導入することができる。例えば、Sayers, J. R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 16:791-802を参照されたい。O-RS、O-tRNA、及び関心のポリペプチドをコードする核酸をインビボで組み合わせると、非天然アミノ酸がUAGコドンに応答して組み込まれ、非天然アミノ酸を特定の位置に含有するポリペプチドが得られる。

40

【0309】

インビボでの非天然アミノ酸の組み込みは、真核宿主細胞の著しい攪乱なしに行うことができる。例えば、UAGコドンの抑制効率は、アンバーサプレッサー-tRNAを含むが

50

これに限定されないO-tRNAと、真核生物放出因子(eRFを含むがこれに限定されない)(終止コドンに結合し、リボソームからの成長ペプチドの放出を開始する)との間の競合に依存するため、抑制効率は、O-tRNAの発現レベル及び/またはサプレッサー-tRNAを増加させることを含むがこれに限定されないことによって調節され得る。

【0310】

非天然アミノ酸はまた、レアコドンでコードすることができる。例えば、インビトロタンパク質合成反応におけるアルギニン濃度が低下した場合、レアアルギニンコドンであるAGGは、アラニンでアシル化された合成tRNAによるAlaの挿入に効率的であることが証明されている。例えば、Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993)を参照されたい。この場合、合成tRNAは、Escherichia coliにおいて少数の種として存在する天然に存在するtRNA Argと競合する。一部の生物は、すべてのトリプレットコドンを使用しない。インビトロ転写/翻訳抽出物におけるアミノ酸の挿入には、Micrococcus luteusにおける割り当てられていないコドンAGAが利用されている。例えば、Kowal and Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997)を参照されたい。本発明の構成要素は、これらのレアコドンインビボで使用するために生成され得る。

【0311】

セクターコドンはまた、限定されないが、4つ以上の塩基コドン、例えば、4、5、6つ以上の塩基コドンを含む、伸長コドンを含む。4つの塩基コドンの例としては、AGGA、CUAG、UAGA、CCCUなどが挙げられるが、これらに限定されない。5つの塩基コドンの例としては、AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGCなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の特徴は、フレームシフト抑制に基づく伸長コドンを使用することを含む。限定されないが、1つまたは複数の非天然アミノ酸を含むが、これに限定されない4つ以上の塩基コドンを、同じタンパク質に挿入することができる。例えば、アンチコドンループを有する、例えば、少なくとも8~10ntのアンチコドンループを有する特殊なフレームシフトサプレッサー-tRNAを含むが、これに限定されない変異O-tRNAの存在下で、4つ以上の塩基コドンを単一のアミノ酸として読み取る。他の実施形態において、少なくとも4塩基コドン、少なくとも5塩基コドン、または少なくとも6塩基コドン以上を含むが、これらに限定されないアンチコドンループは、デコードすることができる。可能な4塩基コドンが256あるため、複数の非天然アミノ酸を、4つ以上の塩基コドンを使用して同じ細胞にコードすることができる。Anderson et al., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244、Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307:755-769を参照されたい。

【0312】

例えば、4塩基コドンは、インビトロ生合成方法を使用して、非天然アミノ酸をタンパク質に組み込むために使用されている。例えば、Ma et al., (1993) Biochemistry, 32:7939、及びHohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34を参照されたい。CGGG及びAGGUを使用して、2つの化学的にアシル化されたフレームシフトサプレッサー-tRNAを用いて、2-ナフチルアラニン及びリジンのNBD誘導体をインビトロでストレプトアビジンに同時に組み込んだ。例えば、Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194を参照されたい。インビボ研究において、Mooreらは、NCUAアンチコドンを持つtRNA Leu誘導体が、UAGNコドン(Nは、U、A、G、またはCであり得る)を抑制する能力を調べ、四重UAGAが、0または

10

20

30

40

50

ー1フレームにおけるデコードがほとんどなく、13～26%の効率で、UCUAアンチコドンを含むtRNA^{Leu}によってデコードされ得ることを見出した。Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195を参照されたい。一実施形態において、レアコドンまたはナンセンスコドンに基づく伸長コドンを用いることができ、これは他の望ましくない部位におけるミスセンスリードスルー及びフレームシフト抑制を低減することができる。

【0313】

所与の系について、セクターコドンはまた、天然の3つの塩基コドンのうちの1つを含むことができ、内因性系は、天然の塩基コドンを使用しない（またはほとんど使用しない）。例えば、これには、天然の3塩基コドンを認識するtRNAを欠いている系、及び／または3塩基コドンがレアコドンである系が含まれる。

【0314】

セクターコドンは、任意に、非天然塩基対を含む。これらの非天然塩基対は、既存の遺伝的アルファベットをさらに拡張する。1つの余分な塩基対は、トリプレットコドンの数を64から125に増加させる。第3の塩基対の特性としては、安定した選択的塩基対形成、ポリメラーゼによる高忠実度でのDNAへの効率的な酵素による組み込み、及び新生非天然塩基対の合成後の効率的な継続的プライマー伸長が挙げられる。方法及び組成物に適合させることができる非天然塩基対の説明には、例えば、Hirao, et al., (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182が含まれる。Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630も参照されたい。他の関連する出版物を以下に列挙する。

【0315】

インビボでの使用に関して、非天然ヌクレオシドは膜透過性であり、リン酸化されて対応するトリホスフェートが形成される。加えて、増加した遺伝情報は安定しており、細胞酵素によって破壊されない。Bennerらの以前の試みは、正準ワトソン-クリック対のものとは異なる水素結合パターンを利用しており、その最も注目すべき例は、イソ-C:イソ-G対である。例えば、Switzer et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322及びPiccirilli et al., (1990) Nature, 343:33、Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602を参照されたい。これらの塩基は一般に、天然塩基とある程度誤って対形成し、酵素により複製することはできない。Kool及び同僚は、塩基間の疎水性パッキング相互作用が、水素結合を置き換えて塩基対の形成を駆動することができることを示した。Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602及びGuckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825を参照されたい。上記のすべての要件を満たす非天然塩基対を開発する目的で、Schultz, Romesberg、及び同僚は、一連の非天然疎水性塩基を体系的に合成し、研究した。PICS:PICS自己対は、天然塩基対よりも安定であることが見出され、Escherichia coli DNAポリメラーゼI (KF) のクレノウ断片によってDNAに効率的に組み込まれ得る。例えば、McMinn et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6及びOgawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274を参照されたい。3MN:3MNの自己対は、KFによって、生物学的機能に十分な効率性及び選択性で合成され得る。例えば、Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803を参照されたい。しかしながら、両方の塩基は、さらなる複製のための鎖ターミネーターとして作用する。PICS自己対を複製するために使用することができる変異体DNAポリメラーゼが最近考案された。加えて、7AI自己対を複製することができる。例えば、Tae et al., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439を参照されたい。Cu(II

10

20

30

40

50

）に結合すると安定した対を形成する、新規のメタロ塩基対である $Dipic:Py$ も開発された。Meggers et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714 を参照されたい。伸長コドン及び非天然コドンは、天然コドンに本質的に直交するため、本発明の方法は、この特性を利用して、それらのための直交 tRNA を生成することができる。

【0316】

翻訳バイパス系を使用して、所望のポリペプチドに非天然アミノ酸を組み込むこともできる。翻訳バイパス系では、大きな配列は遺伝子に組み込まれるが、タンパク質には翻訳されない。この配列は、リボソームが配列を飛ばし、挿入の下流で翻訳を再開するように誘導するための手がかりとして機能する構造を含有する。

【0317】

TC の標的化ポリペプチドなどの関心のタンパク質をコードする核酸分子は、ポリペプチドの任意の所望の位置にシステインを導入するために容易に変異され得る。システインは、反応性分子、水溶性ポリマー、タンパク質、または多種多様な他の分子を関心のタンパク質上に導入するために広く使用される。システインをポリペプチドの所望の位置に組み込むのに好適な方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6,608,183 号に記載されるもの、及び標準的な変異誘発技法など、当業者に既知である。

【0318】

III. 非天然コード化アミノ酸

非常に多種多様な非天然コード化アミノ酸が、本発明での使用に好適である。任意の数の非天然コード化アミノ酸を TC に導入することができる。一般的に、導入された非天然コード化アミノ酸は、20 個の一般的な遺伝子コード化アミノ酸（すなわち、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、及びバリン）に対して実質的に化学的に不活性である。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は、20 個の一般的なアミノ酸には見られない官能基（アジド、ケトン、アルデヒド、及びアミノオキシ基を含むがこれらに限定されない）と効率的かつ選択的に反応して、安定したコンジュゲートを形成する側鎖官能基を含む。例えば、アジド官能基を含有する非天然コード化アミノ酸を含む TC の標的化ポリペプチドを、ポリマー（ポリ（エチレングリコール））、または代替的に、アルキン部分を含有する第 2 のポリペプチドもしくはリンカーを含むが、これらに限定されない）と反応させて、アジド及びアルキン官能基の選択的反応から生じる安定したコンジュゲートを形成し、ヒュスゲン [3+2] 環化付加生成物を形成することができる。

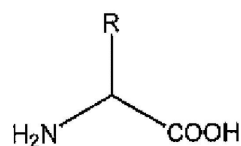
【0319】

アルファアミノ酸の一般構造は、以下（式 I）のように示される：

【0320】

【化 11】

I



【0321】

非天然コード化アミノ酸は、典型的には、上に列記される式を有する任意の構造であり、R 基は、20 個の天然アミノ酸で使用される置換基以外の任意の置換基であり、本発明での使用に好適であり得る。本発明の非天然コード化アミノ酸は、典型的には、側鎖の構造のみにおいて天然アミノ酸と異なるため、非天然コード化アミノ酸は、天然または非天然コード化を含むがこれらに限定されない他のアミノ酸と、天然に存在するポリペプチド

内で形成されるのと同じ様式でアミド結合を形成する。しかしながら、非天然コード化アミノ酸は、それらを天然アミノ酸と区別する側鎖基を有する。例えば、Rは、任意に、アルキル、アリール、アシル、ケト、アジド、ヒドロキシル、ヒドラジン、シアノ、ハロ、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、セレノ、スルホニル、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ基など、またはそれらの任意の組み合わせを含む。本発明での使用に好適であり得る他の関心の非天然に存在するアミノ酸としては、光活性化架橋剤を含むアミノ酸、スピン標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規官能基を有するアミノ酸、他の分子と共有結合的もしくは非共有結合的に相互作用するアミノ酸、光ケージ化及び／または光異性化可能なアミノ酸、ビオチンもしくはビオチン類似体を含むアミノ酸、糖置換セリンなどのグリコシル化アミノ酸、他の炭水化物修飾されたアミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポリエチレングリコールもしくはポリエーテルを含むアミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学的に切断可能な及び／または光切断可能なアミノ酸、天然アミノ酸と比較して細長い側鎖を有するアミノ酸（約5超または約10超の炭素を含むがこれらに限定されない、ポリエーテルもしくは長鎖炭化水素を含むがこれらに限定されない）、炭素連結された糖含有アミノ酸、酸素還元活性アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、ならびに1つ以上の毒素部分を含むアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0322】

本発明での使用に好適であり得、水溶性ポリマーとの反応に有用である例示的な非天然コード化アミノ酸には、カルボニル、アミノオキシ、ヒドラジン、ヒドラジド、セミカルバジド、アジド、及びアルキン反応性基を有するものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸は糖部分を含む。そのようなアミノ酸の例としては、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-ガラクトサミニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-スレオニン、N-アセチル-L-グルコサミニル-L-アスパラギン、及びO-マンノサミニル-L-セリンが挙げられる。そのようなアミノ酸の例には、アミノ酸と糖との間の天然に存在するN-またはO連結が、アルケン、オキシム、チオエーテル、アミドなどを含むがこれらに限定されない、天然には一般に見られない共有結合に置き換えられる例も含まれる。そのようなアミノ酸の例としては、2-デオキシグルコース、2-デオキシガラクトースなどの天然に存在するタンパク質に一般的に見られない糖類も挙げられる。

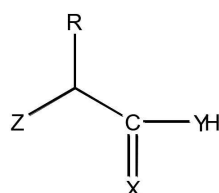
【0323】

本明細書で提供される非天然コード化アミノ酸の多くは、例えば、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Novabiochem (a division of EMD Biosciences, Darmstadt, Germany)、またはPeptech (Burlington, MA, USA)から市販されている。市販されていないものは、本明細書に提供されるように、または当業者に既知の標準的な方法を使用して任意に合成される。有機合成技法については、例えば、Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.)、Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)、及びAdvanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)を参照されたい。米国特許第7,045,337号及び同第7,083,970号（参照により本明細書に組み込まれる）も参照されたい。新規の側鎖を含有する非天然アミノ酸に加えて、本発明での使用に好適であり得る非天然アミノ酸は、任意に、式II及びIIIの構造：

【0324】

【化 1 2】

II

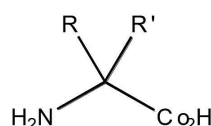


【 0 3 2 5】

【化 1 3】

10

III



【 0 3 2 6】

（式中、Zは、典型的には、OH、NH₂、SH、NH-R'、またはS-R'を含み、X及びYは、同じであっても異なってもよく、典型的には、SまたはOを含み、R及びR'は、任意に、同じであっても異なってもよく、典型的には、式I及び水素を有する非天然アミノ酸について上述したR基の成分と同じリストから選択される）によって示されるように、これらを含むがこれらに限定されない、修飾された骨格構造も含む。例えば、本発明の非天然アミノ酸は、任意に、式II及びIIIによって示されるように、アミノまたはカルボキシル基に置換を含む。この種類の非天然アミノ酸には、一般的な20個の天然アミノ酸または非天然側鎖に対応する側鎖を含むが、これらに限定されないものを有する、α-ヒドロキシ酸、α-チオ酸、α-アミノチオカルボキシレートが含まれるが、これらに限定されない。加えて、α炭素での置換には、任意に、L、D、またはD-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-α-チロシン、アミノ酪酸などのα-α-二置換アミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。他の構造代替物としては、プロリン類似体などの環状アミノ酸、ならびに3、4、6、7、8、及び9員環プロリン類似体、置換β-アラニン及びγ-アミノ酪酸などのβ及びγアミノ酸が挙げられる。

20

30

【 0 3 2 7】

多くの非天然アミノ酸は、チロシン、グルタミン、フェニルアラニンなどの天然アミノ酸に基づいており、本発明での使用に好適である。チロシン類似体としては、限定されないが、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、及びメタ置換チロシンが挙げられ、ここで、置換チロシンは、ケト基（アセチル基を含むがこれに限定されない）、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C₆-C₂₀直鎖または分枝状炭化水素、飽和または不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基、アルキニル基などを含むが、これらに限定されない。加えて、複数の置換アリール環も企図される。本発明での使用に好適であり得るグルタミン類似体には、α-ヒドロキシ誘導体、γ-置換誘導体、環状誘導体、及びアミド置換グルタミン誘導体が含まれるが、これらに限定されない。本発明での使用に好適であり得る例示的なフェニルアラニン類似体としては、限定されないが、パラ置換フェニルアラニン、オルト置換フェニルアラニン、及びメタ置換フェニルアラニンが挙げられ、ここで、置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド、アジド、ヨード、ブロモ、ケト基（アセチル基を含むがこれに限定されない）、ベンゾイル、アルキニル基などを含むが、これらに限定されない。本発明での使用に好適であり得る非天然アミノ酸の具体例としては、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-ア

40

50

リル-Ｌ-チロシン、４-プロピル-Ｌ-チロシン、トリ-Ｏ-アセチル-ＧｌｃＮＡｃ
β-セリン、Ｌ-ドパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-Ｌ-フェニルアラニ
ン、p-アジド-Ｌ-フェニルアラニン、p-アシル-Ｌ-フェニルアラニン、p-ベン
ゾイル-Ｌ-フェニルアラニン、Ｌ-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン
、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン p-アミノ-Ｌ-フェニ
ルアラニン、イソプロピル-Ｌ-フェニルアラニン、及び p-プロパルギルオキシ-フェ
ニルアラニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明での使用に好適であり
得る様々な非天然アミノ酸の構造の例は、例えば、「In vivo incorporation of unnatural amino acids」と題されるWO2002
／085923に提供される。追加のメチオニン類似体については、参照により本明細書
に組み込まれる、Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for ch
emoselective modification by the Stauding
er ligation, PNAS 99:19-24も参照されたい。参照により本明細
書に組み込まれる「Compositions Containing, Methods
Involving, and Uses of Non-natural Amino A
cids and Polypeptides」と題される国際出願第PCT／US06／
47822号は、限定されないが、p-アミノ-フェニルアラニン及び還元的アミノ化を
含む芳香族アミン部分の還元的アルキル化を記載する。

【0328】

本発明の別の実施形態において、1つ以上の非天然コード化アミノ酸を有するTCポリ
ペプチドは、共有結合により修飾される。生物学的系の多様な官能基に直交する選択的化
学反応は、化学生物学における重要なツールとして認識されている。合成化学のレパート
リーの比較的新規なものとして、これらの生体直交反応は、化合物ライブラリ合成、タン
パク質工学、機能的プロテオミクス、及び細胞表面の化学的リモデリングのための新しい
戦略を刺激してきた。アジドは、生体コンジュゲートのための固有の化学ハンドルとして
重要な役割を確保している。シュタウディングライゲーションは、細胞糖コンジュゲート
に代謝により導入されたアジド糖にタグを付けるために、ホスフィンと共に使用されてき
た。シュタウディングライゲーションは、生きている動物において、生理学的な害なしに
実施することができる。それにもかかわらず、シュタウディング反応は、不利なことがな
いわけではない。必要なホスフィンが空気酸化されやすく、改善された水溶性及び増加さ
れた反応速度のそれらの最適化は、合成的に困難であることが判明している。

【0329】

アジド基は、Huisgenによって記載されるアルキンとの[3+2]環化付加とい
う、生体直交反応性の代替モードを有する。その古典的な形態では、この反応は、合理的
な反応速度のための高温（または圧力）の要件により、生物学的系への適用性が限定され
ている。Sharpless及び同僚は、生理学的温度及び十分に機能化された生物学的
環境で容易に進行する「クリック化学」と呼ばれる銅(I)触媒バージョンの開発により
、この障害を克服した。この発見は、複合体組織溶解物からのウイルス粒子、核酸、及び
タンパク質の選択的修飾を可能にした。残念ながら、必須の銅触媒は、細菌細胞及び哺乳
類細胞の両方に対して毒性であり、したがって、細胞が生存していなければならない用途
を排除する。電子求引性置換基によって活性化されたアルキンの触媒不含ヒュスゲン環化
付加は、周囲温度で生じることが報告されている。しかし、これらの化合物は、生物学的
求核剤によりマイケル反応を受ける。

【0330】

一実施形態において、非天然アミノ酸（p-（プロパルギルオキシ）-フェニルアラ
ニンなど）を含むTCの標的化ポリペプチドの組成物が提供される。タンパク質及び／また
は細胞を含むがこれらに限定されない、p-（プロパルギルオキシ）-フェニルアラニン
を含む種々の組成物も提供される。一態様において、p-（プロパルギルオキシ）-フェ
ニルアラニン非天然アミノ酸を含む組成物は、直交tRNAをさらに含む。非天然アミノ

酸は、アミノアシル結合を通じた直交 tRNA への共有結合、直交 tRNA の末端リボース糖の 3' OH または 2' OH への共有結合などを含むがこれらに限定されない、直交 tRNA に結合され得る（限定されないが共有結合を含む）。

【0331】

タンパク質に組み込むことができる非天然アミノ酸を介した化学部分は、タンパク質の様々な利点及び操作を提供する。例えば、ケト官能基の固有の反応性は、インビトロ及びインビボで、いくつかのヒドラジンまたはヒドロキシルアミン含有試薬のいずれかを用いたタンパク質の選択的修飾を可能にする。重原子非天然アミノ酸は、例えば、X 線構造データの相化に有用であり得る。非天然アミノ酸を使用した重原子の部位特異的導入は、重原子の位置を選択する際の選択性及び柔軟性も提供する。光反応性非天然アミノ酸（ベンゾフェノン及びアリアルアジド（フェニルアジドを含むがこれに限定されない）側鎖を有するアミノ酸を含むがこれに限定されない）は、例えば、タンパク質のインビボ及びインビトロでの効率的な光架橋を可能にする。光反応性非天然アミノ酸の例としては、p-アジド-フェニルアラニン及び p-ベンゾイル-フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。次いで、光反応性非天然アミノ酸を有するタンパク質を、光反応性基の励起によって任意に架橋し、時間的制御を提供することができる。一実施例において、非天然アミノのメチル基は、核磁気共鳴及び振動分光法の使用を含むがこれらに限定されないものの使用により、局所構造及び動態のプロープとして、限定されないが、メチル基を含む同位体標識されたもので置換され得る。例えば、アルキニルまたはアジド官能基は、

【0332】

アミノ末端のポリペプチドに組み込まれる非天然アミノ酸は、20 個の天然アミノ酸に使用される置換基以外の任意の置換基である R 基、及びアルファアミノ酸に通常存在する NH₂ 基とは異なる第 2 の反応性基から構成されてもよい。同様の非天然アミノ酸は、アルファアミノ酸に通常存在する COOH 基とは異なる第 2 の反応性基を有する C 末端に組み込むことができる。

【0333】

本発明の非天然アミノ酸は、20 個の天然アミノ酸では利用できない追加の特徴を提供するように選択または設計され得る。例えば、非天然アミノ酸は、例えば、それらが組み込まれるタンパク質の生物学的特性を修飾するように任意に設計または選択され得る。例えば、以下の特性は、非天然アミノ酸をタンパク質に含めることによって任意に修飾され得る：毒性、生体分布、溶解度、安定性、例えば、熱、加水分解、酸化、酵素分解に対する耐性など、精製及び処理の容易さ、構造特性、分光学的特性、化学及び／または光化学特性、触媒活性、酸化還元電位、半減期、他の分子と反応する能力、例えば、共有結合的または非共有結合的など。

【0334】

いくつかの実施形態において、本発明は、オキシム結合によって水溶性ポリマー、例えば PEG に連結された TC を提供する。多くの種類の非天然コード化アミノ酸は、オキシム結合の形成に好適である。これらには、カルボニル、ジカルボニル、またはヒドロキシルアミン基を含有する非天然コード化アミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。そのようなアミノ酸は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許公開第 2006/0194256 号、同第 2006/0217532 号、及び同第 2006/0217289 号、ならびに「Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides」と題される WO2006/069246 に記載されている。非天然コード化アミノ酸は、米国特許第 7,083,970 号及び米国特許第 7,045,337 号にも記載されており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0335】

本発明のいくつかの実施形態は、パラアセチルフェニルアラニンアミノ酸で、1 つ以

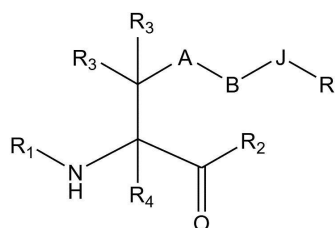
上の位置で置換されているTCポリペプチドを利用する。p-アセチル- (+/-) -フェニルアラニン及びm-アセチル- (+/-) -フェニルアラニンの合成は、Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) (参照により組み込まれる) に記載されている。他のカルボニルまたはジカルボニル含有アミノ酸は、当業者によって同様に調製され得る。さらに、本明細書に含まれる非天然アミノ酸の非限定的な例示的な合成は、米国特許第7, 083, 970号 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に提示される。

【0336】

求電子反応性基を有するアミノ酸は、とりわけ求核付加反応を介して分子を連結するための様々な反応を可能にする。そのような求電子性反応性基としては、カルボニル基 (ケト基及びジカルボニル基を含む)、カルボニル様基 (カルボニル基 (ケト基及びジカルボニル基を含む) に類似の反応性を有し、かつカルボニル基に構造的に類似している)、マスクされたカルボニル基 (カルボニル基 (ケト基及びジカルボニル基を含む) に容易に変換することができる)、または保護されたカルボニル基 (脱保護時にカルボニル基 (ケト基及びジカルボニル基を含む) に類似の反応性を有する) が挙げられる。そのようなアミノ酸には、式 (IV) の構造を有するアミノ酸が含まれる:

【0337】

【化14】



(IV)

【0338】

式中、

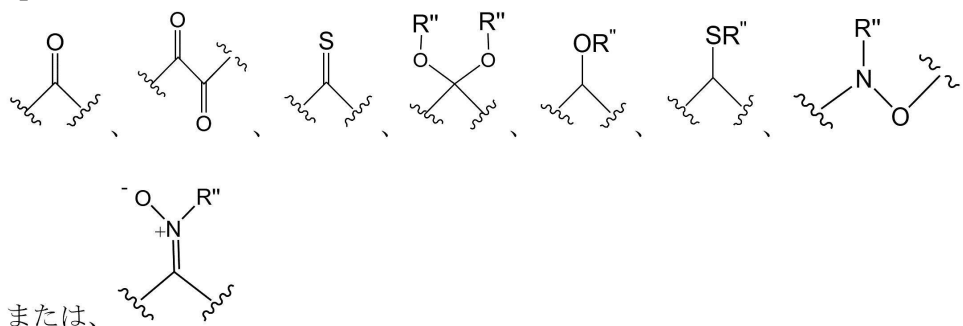
Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、-O-、-O- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-S-、-S- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-S(O)_k- (kは、1、2、または3である)、-S(O)_k (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)-、-C(O)- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(S)-、-C(S)- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')-、-NR'- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-CSN(R')-、-CSN(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')CO- (アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、及び-C(R')₂-N(R')-N(R')- (各R'は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり、

Jは、

【0339】

【化 1 5】



10

【0 3 4 0】

であり、

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

各 R'' は、独立して、H、アルキル、置換アルキル、または保護基であるか、または 2 つ以上の R'' 基が存在する場合、2 つの R'' は、任意に、ヘテロシクロアルキルを形成し、

R₁ は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂ は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

20

R₃ 及び R₄ のそれぞれは、独立して、H、ハロゲン、低級アルキル、もしくは置換低級アルキルであるか、あるいは R₃ 及び R₄、または 2 つの R₃ 基は、任意に、シクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキルを形成するか、

あるいは -A-B-J-R 基は一緒に、ジカルボニル基を含む少なくとも 1 つのカルボニル基、保護されたジカルボニル基を含む保護されたカルボニル基、またはマスクされたジカルボニル基を含むマスクされたカルボニル基を含む、二環式もしくは三環式シクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキルを形成するか、

あるいは -J-R 基は一緒に、ジカルボニル基を含む少なくとも 1 つのカルボニル基、保護されたジカルボニル基を含む保護されたカルボニル基、またはマスクされたジカルボニル基を含むマスクされたカルボニル基を含む、単環式もしくは二環式シクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキルを形成するが、

30

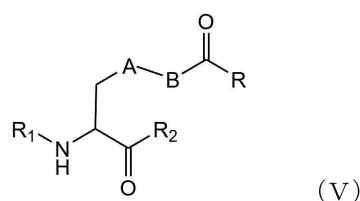
但し、A がフェニレンであり、かつ各 R₃ が H である場合、B が存在し、A が -(CH₂)₄-であり、かつ各 R₃ が H である場合、B は -NH-C(=O)-(CH₂CH₂)-ではなく、A 及び B が不在であり、かつ各 R₃ が H である場合、R はメチルではないことを条件とする。

【0 3 4 1】

加えて、式 (V) の構造を有するものが含まれる：

【0 3 4 2】

【化 1 6】



40

【0 3 4 3】

式中、

A は任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン

50

、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであるが、

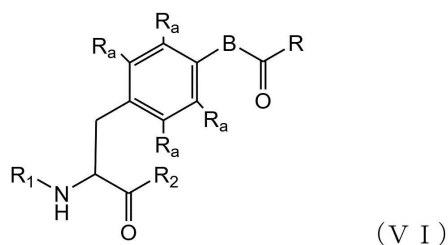
但し、Aがフェニレンである場合、Bが存在し、Aが $-(CH_2)_4-$ である場合、Bは $-NHCO(CH_2CH_2)-$ ではなく、A及びBが不在の場合、Rはメチルではないことを条件とする。

【0344】

加えて、式(VI)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0345】

【化17】



【0346】

式中、

Bは、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

$R' - , -N(R')C(S)N(R') - , -N(R')S(R')(R') - , -N(R' - N = , -C(R') = N - , -C(R') = N - N(R') - , -C(R') = N - N = , -C(R')_2 - N = N - ,$ 及び $-C(R')_2 - N(R') - N(R') -$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり、

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

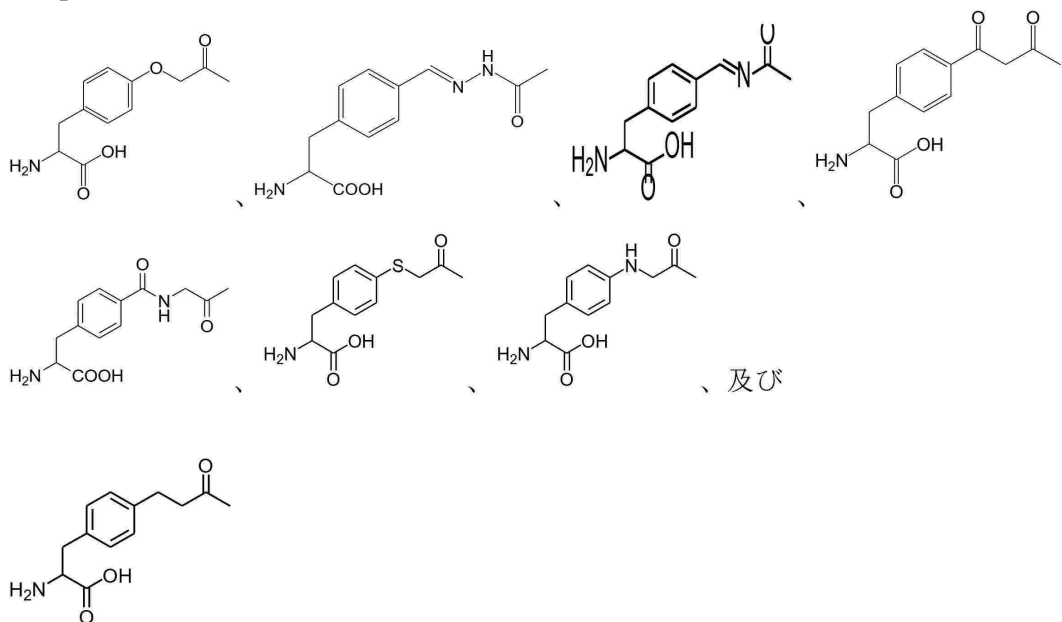
各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は、1、2、または3である)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_k R'$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択される。

【 0 3 4 7 】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

【 0 3 4 8 】

【化 1 8】



【 0 3 4 9 】

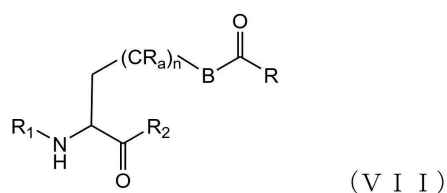
(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護基、カルボキシル保護されている、またはその塩である)。加えて、以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

【 0 3 5 0 】

加えて、式 (VII) の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【 0 3 5 1 】

【化 19】



【0352】

式中、

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_kR'$ （ k は、1、2、または3である）、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_kR'$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択され、 n は、0～8であるが、

但し、Aが $-(CH_2)_4-$ である場合、Bは $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ ではないことを条件とする。

【0353】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

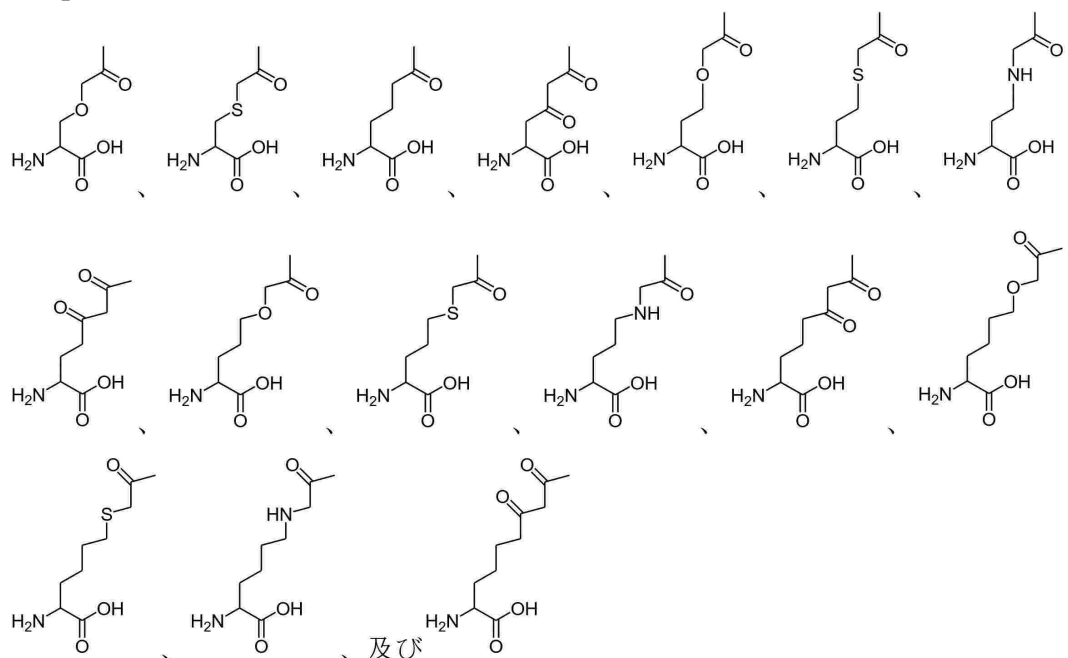
【0354】

30

40

50

【化 20】



10

【0355】

(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護されるか、任意に、カルボキシル保護されるか、任意に、アミノ保護され、かつカルボキシル保護されるか、またはその塩である)。加えて、これらの非天然アミノ酸及び以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

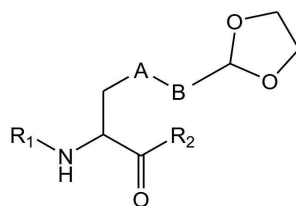
20

【0356】

加えて、式(VIII)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0357】

【化 21】



(VIII)

30

【0358】

式中、Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

40

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、-O-、-O- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-S-、-S- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-S(O)_k- (kは、1、2、または3である)、-S(O)_k (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)-、-C(O)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(S)-、-C(S)- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')-、-NR'- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-C(O)N(R')-、-CON(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-CSN(R')-、-CSN(R')- (アルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')CO- (ア

50

ルキレンまたは置換アルキレン) -、-N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、及び-C(R')₂-N(R')-N(R')- (各R'は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

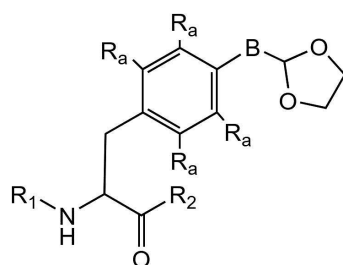
10

【0359】

加えて、式(I X)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0360】

【化22】



(I X)

20

【0361】

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、-O-、-O-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-S-、-S-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-S(O)_k- (kは、1、2、または3である)、-S(O)_k(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)-、-C(O)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(S)-、-C(S)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')-、-NR'-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')CO-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)_kN(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)_kN(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')₂-N=N-、及び-C(R')₂-N(R')-N(R')- (各R'は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり、

30

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

40

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

各R_aは、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、-N(R')₂、-C(O)_kR' (kは、1、2、または3である)、-C(O)N(R')₂、-OR'、及び-S(O)_kR' (各R'は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択される。

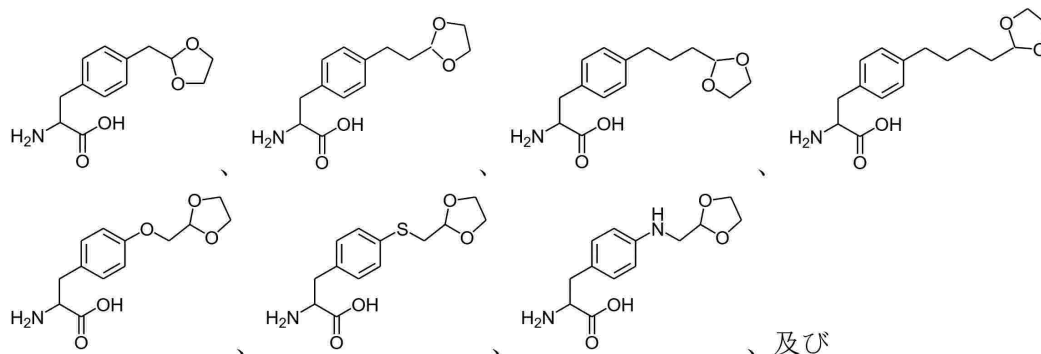
【0362】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

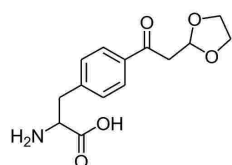
50

【 0 3 6 3 】

【化 2 3】



10



【 0 3 6 4 】

(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護されるか、任意に、カルボキシル保護されるか、任意に、アミノ保護され、かつカルボキシル保護されるか、またはその塩である)。加えて、これらの非天然アミノ酸及び以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

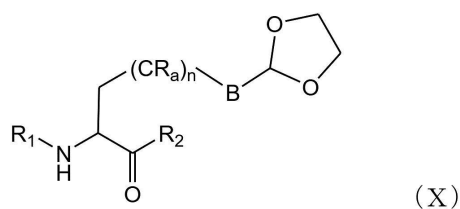
20

【 0 3 6 5 】

加えて、式 (X) の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【 0 3 6 6 】

【化 2 4】



30

【 0 3 6 7 】

式中、Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N$ （ R' ） $-$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R'_2)-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N$ （ R' ） $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

40

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであ

50

り、

R_1 は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

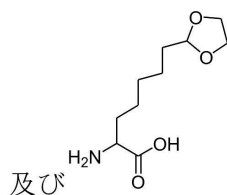
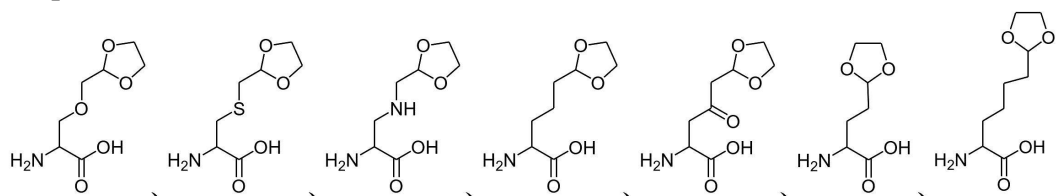
各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は、1、2、または3である)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_k R'$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択され、 n は、0～8である。

【0368】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

【0369】

【化25】



及び

【0370】

(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護されるか、任意に、カルボキシル保護されるか、任意に、アミノ保護され、かつカルボキシル保護されるか、またはその塩である)。加えて、これらの非天然アミノ酸及び以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

【0371】

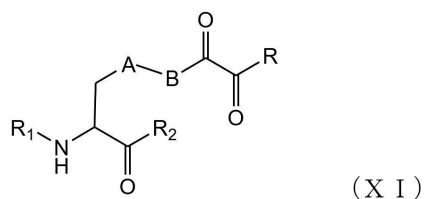
モノカルボニル構造に加えて、本明細書に記載の非天然アミノ酸は、ジカルボニル、ジカルボニル様、マスクされたジカルボニル、及び保護されたジカルボニル基などの基を含み得る。

【0372】

例えば、式(XI)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0373】

【化26】



【0374】

式中、 A は任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラ

ルキレンであり、

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

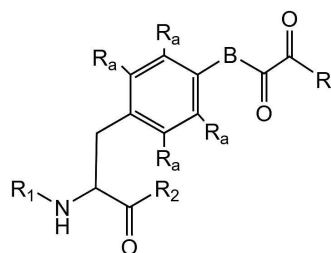
R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

【0375】

加えて、式(XII)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0376】

【化27】



(XII)

【0377】

Bは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-S(O)_k-$ （ k は、1、2、または3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')$ 、 $-NR'-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')CO-$ （アルキレンまたは置換アルキレン） $-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、及び $-C(R')_2-N(R')$ 、 $-N(R')$ （各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである）からなる群から選択されるリンカーであり、

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁ は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂ は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は、1、2、または3である)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_k R'$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択される。

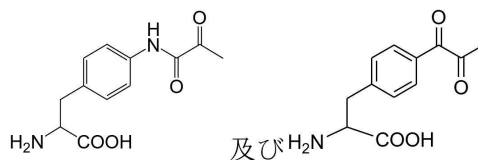
10

【0378】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

【0379】

【化28】



【0380】

(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護されるか、任意に、カルボキシル保護されるか、任意に、アミノ保護され、かつカルボキシル保護されるか、またはその塩である)。加えて、これらの非天然アミノ酸及び以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

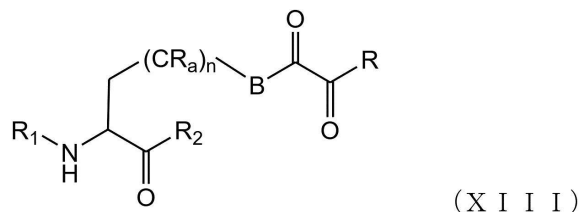
20

【0381】

加えて、式 (XII) の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0382】

【化29】



30

【0383】

式中、B は任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S-$ 、 $-S-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S(O)_k-$ (k は、1、2、または3である)、 $-S(O)_k$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')-$ 、 $-NR'-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')CO-$ (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_k N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_k N(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N$ (R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり、

40

50

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁ は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂ は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は、1、2、または3である)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_k R'$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択され、n は、0～8 である。

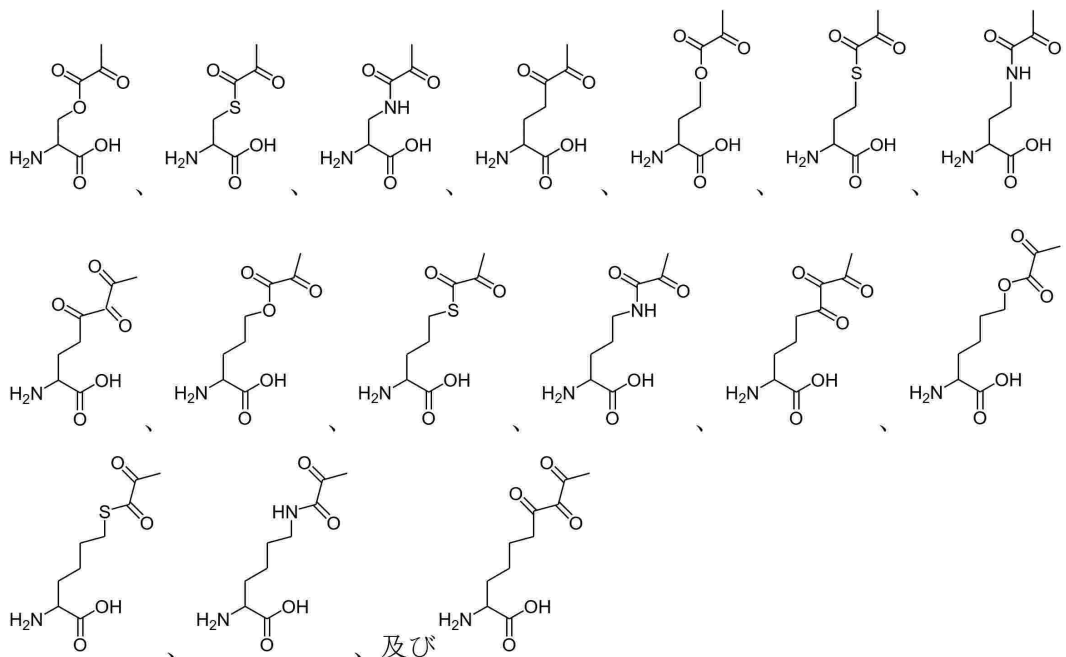
10

【0384】

加えて、以下のアミノ酸が含まれる：

【0385】

【化30】



20

30

【0386】

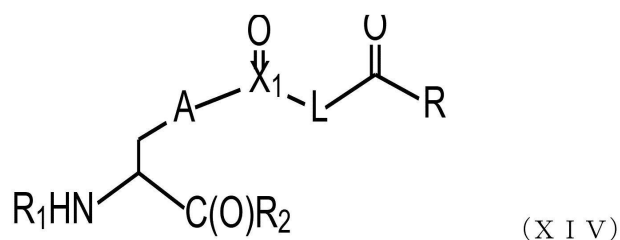
(式中、そのような化合物は、任意に、アミノ保護されるか、任意に、カルボキシル保護されるか、任意に、アミノ保護され、かつカルボキシル保護されるか、またはその塩である)。加えて、これらの非天然アミノ酸及び以下の非天然アミノ酸のいずれかを、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込むことができる。

【0387】

加えて、式 (XIV) の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0388】

【化31】



40

【0389】

式中、

50

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

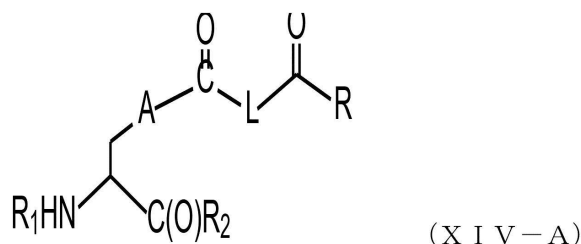
X₁は、C、S、またはS(O)であり、Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0390】

加えて、式(XIV-A)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0391】

【化32】



【0392】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

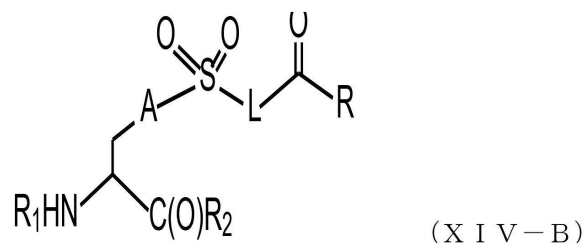
Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0393】

加えて、式(XIV-B)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0394】

【化 3 3】



【0395】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

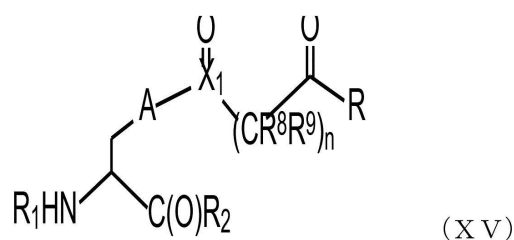
Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0396】

加えて、式(XV)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0397】

【化 3 4】



【0398】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

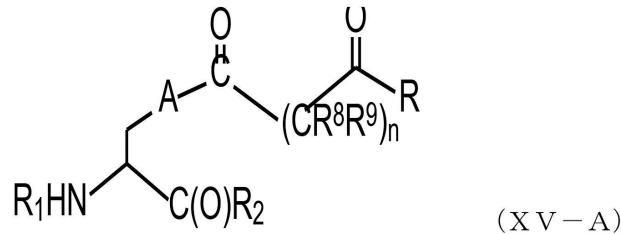
X_1 は、C、S、またはS(O)であり、 n は、0、1、2、3、4、または5であり、各 CR^8R^9 基上の各 R^8 及び R^9 は、独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アリールからなる群から選択されるか、または任意の R^8 及び R^9 と一緒に、=Oもしくはシクロアルキルを形成することができるか、または隣接するいずれかの R^8 基と一緒に、シクロアルキルを形成することができる。

【0399】

加えて、式(XV-A)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0400】

【化35】



10

【0401】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

20

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

30

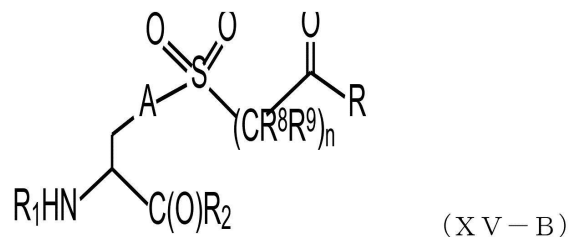
n は、0、1、2、3、4、または5であり、各 CR^8R^9 基上の各 R^8 及び R^9 は、独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アリールからなる群から選択されるか、または任意の R^8 及び R^9 が共に、=Oもしくはシクロアルキルを形成することができるか、または隣接するいずれかの R^8 基が共に、シクロアルキルを形成することができる。

【0402】

加えて、式(XV-B)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0403】

【化36】



40

【0404】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アル

50

キニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

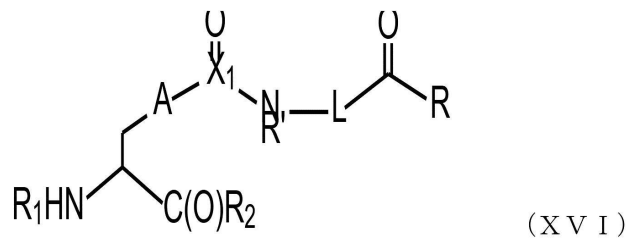
nは、0、1、2、3、4、または5であり、各C R⁸ R⁹基上の各R⁸及びR⁹は、独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アリールからなる群から選択されるか、または任意のR⁸及びR⁹が共に、=Oもしくはシクロアルキルを形成することができるか、または隣接するいずれかのR⁸基が共に、シクロアルキルを形成することができる。

【0405】

加えて、式(XVI)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0406】

【化37】



【0407】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

X₁は、C、S、またはS(O)であり、Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0408】

加えて、式(XVII-A)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0409】

10

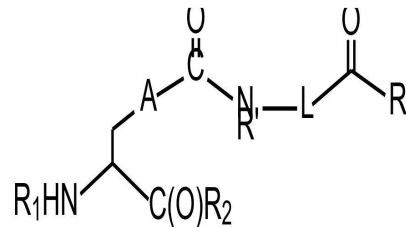
20

30

40

50

【化 3 8】



(XVI-A)

【0410】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

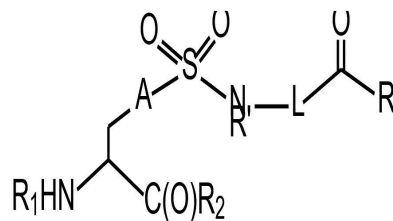
Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0411】

加えて、式(XVI-B)の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0412】

【化 3 9】



(XVI-B)

【0413】

式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R₁は任意であり、存在する場合、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

R₂は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

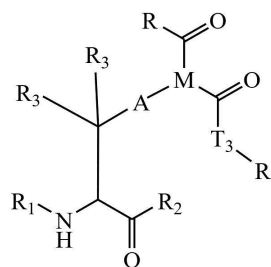
Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン)であり、ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0414】

加えて、式(XVII)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0415】

【化40】



(XVII)

【0416】

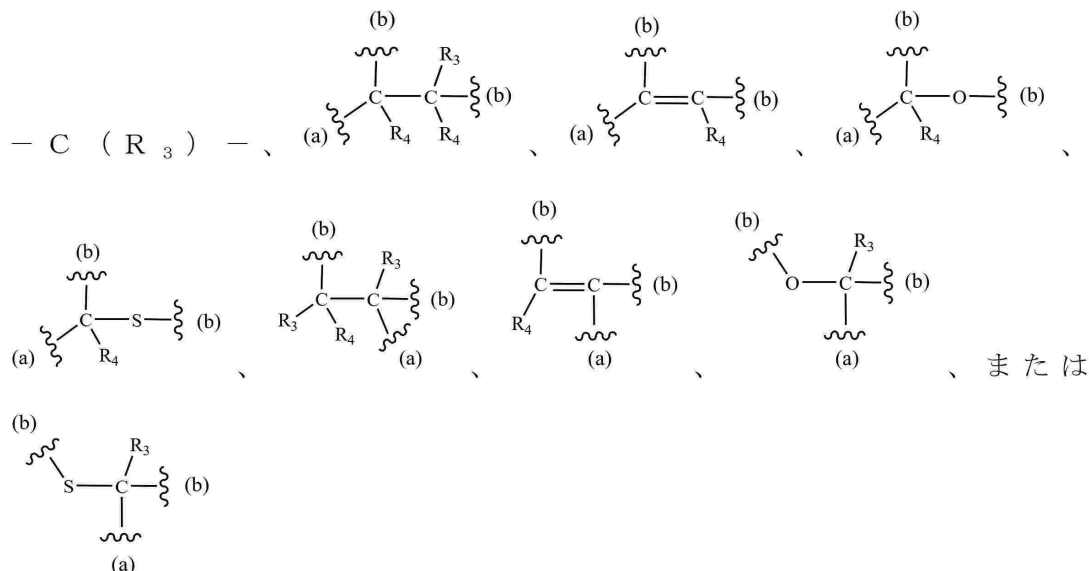
式中、

Aは任意であり、存在する場合、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリレン、置換アリレン、ヘテロアリレン、置換ヘテロアリレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり、

Mは、

【0417】

【化41】



【0418】

であり、(a)は、A基への結合を示し、(b)は、それぞれのカルボニル基への結合を示し、R3及びR4は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキルから選択されるか、あるいはR3及びR4または2つのR3基もしくは2つのR4基は、任意に、シクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキルを形成し、

Rは、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

T_3 は、結合、 $C(R)(R)$ 、 O 、または S であり、 R は、 H 、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、 H 、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

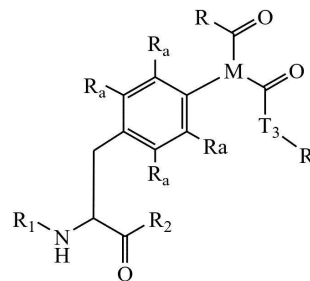
R_2 は任意であり、存在する場合、 OH 、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである。

【0419】

加えて、式 (XVII) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0420】

【化42】



(XVII)

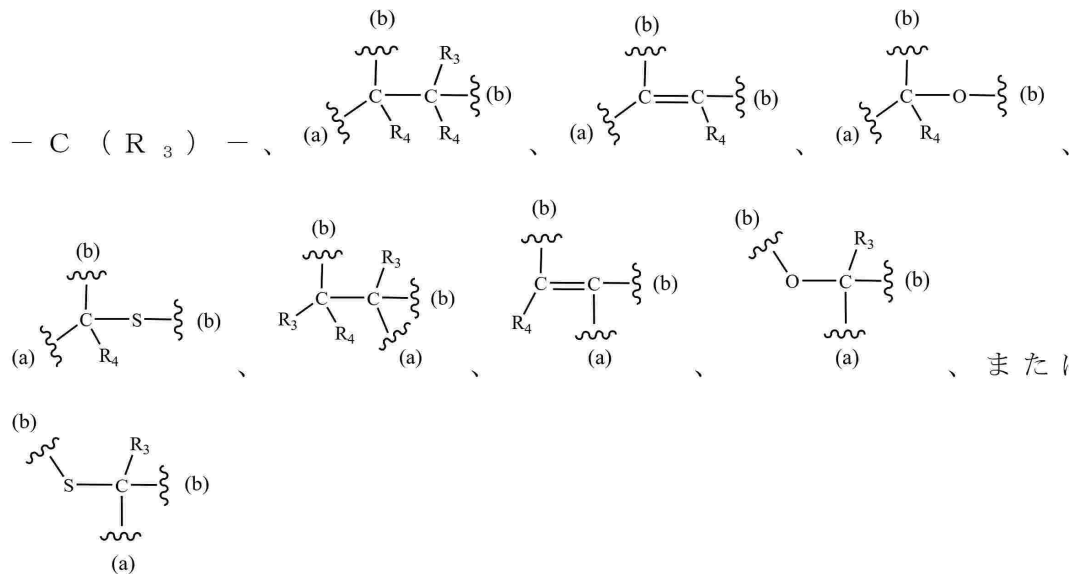
【0421】

式中、

M は、

【0422】

【化43】



【0423】

であり、(a) は、 A 基への結合を示し、(b) は、それぞれのカルボニル基への結合を示し、 R_3 及び R_4 は、独立して、 H 、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキルから選択されるか、あるいは R_3 及び R_4 または 2 つの R_3 基もしくは 2 つの R_4 基は、任意に、シクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキルを形成し、

R は、 H 、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

T_3 は、結合、 $C(R)(R)$ 、 O 、または S であり、 R は、 H 、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

R_1 は任意であり、存在する場合、 H 、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド

、またはポリヌクレオチドであり、

R_2 は任意であり、存在する場合、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり、

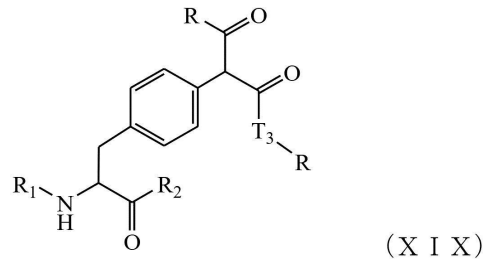
各 R_a は、独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')_2$ 、 $-C(O)_k R'$ (k は、1、2、または3である)、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、及び $-S(O)_k R'$ (各 R' は、独立して、H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択される。

【0424】

加えて、式 (XIX) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0425】

【化44】



【0426】

式中、

R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり、

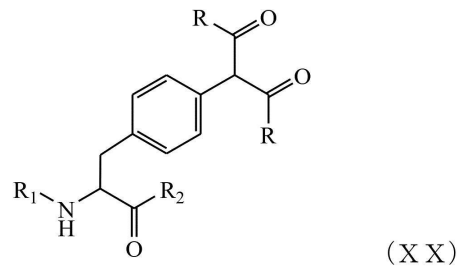
T_3 は、OまたはSである。

【0427】

加えて、式 (XX) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0428】

【化45】



【0429】

式中、

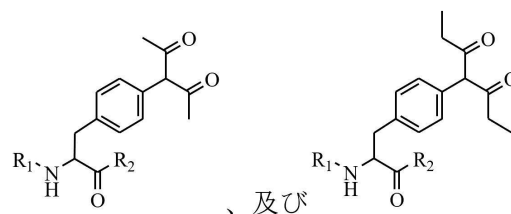
R は、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである。

【0430】

加えて、式 (XXI) の構造を有する以下のアミノ酸が含まれる：

【0431】

【化46】



10

20

30

40

50

【0432】

いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸を含むポリペプチドは、反応性カルボニルまたはジカルボニル官能基を生成するように化学修飾される。例えば、コンジュゲーション反応に有用なアルデヒド官能基は、隣接するアミノ及びヒドロキシル基を有する官能基から生成することができる。生物学的活性分子が例えばポリペプチドである場合、N末端セリンまたはスレオニン（通常存在し得るか、または化学的または酵素的消化を介して曝露され得る）を使用して、過ヨウ素酸を使用して穏やかな酸化切断条件下でアルデヒド官能基を生成することができる。例えば、Gaertner, et al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992)、Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992)、Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994)を参照されたい。しかしながら、当該技術分野で既知の方法は、ペプチドまたはタンパク質のN末端のアミノ酸に限定される。

10

【0433】

本発明では、隣接するヒドロキシル及びアミノ基を担持する非天然アミノ酸を、「マスクされた」アルデヒド官能基としてポリペプチドに組み込むことができる。例えば、5-ヒドロキシリジンは、イプシロンアミンに隣接するヒドロキシル基を担持する。アルデヒドを生成するための反応条件は、典型的には、ポリペプチド内の他の部位における酸化を回避するために、穏やかな条件下でモル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加することを伴う。酸化反応のpHは、典型的には、約7.0である。典型的な反応は、ポリペプチドの緩衝溶液に約1.5モル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、続いて暗所で約10分間インキュベートすることを伴う。例えば、米国特許第6,423,685号を参照されたい。

20

【0434】

カルボニルまたはジカルボニル官能基を、水溶液中で、穏やかな条件下でヒドロキシルアミン含有試薬と選択的に反応させて、生理学的条件下で安定である対応するオキシム連結を形成することができる。例えば、Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)、Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)を参照されたい。さらに、カルボニルまたはジカルボニル基の固有の反応性は、他のアミノ酸側鎖の存在下での選択的修飾を可能にする。例えば、Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996)、Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992)、Mahal, L. K., et al., Science 276: 1125-1128 (1997)を参照されたい。

30

【0435】

A. カルボニル反応性基

カルボニル反応性基を有するアミノ酸は、とりわけ求核付加またはアルドール縮合反応を介して分子（PEGまたは他の水溶性分子を含むがこれらに限定されない）を連結するための様々な反応を可能にする。

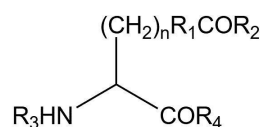
40

【0436】

例示的なカルボニル含有アミノ酸は、以下のように表すことができ、

【0437】

【化47】



【0438】

式中、nは、0～10であり、R₁は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置

50

換アリールであり、 R_2 は、H、アルキル、アリール、置換アルキル、及び置換アリールであり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_4 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 R_2 は、単純なアルキル（すなわち、メチル、エチル、またはプロピル）であり、ケトン部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に配置される。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 R_2 は、単純なアルキル（すなわち、メチル、エチル、またはプロピル）であり、ケトン部分は、アルキル側鎖に対してメタ位に配置される。

【0439】

p-アセチル- (+/-) -フェニルアラニン及びm-アセチル- (+/-) -フェニルアラニンの合成は、Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) (参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。他のカルボニル含有アミノ酸も、当業者によって同様に調製され得る。

【0440】

いくつかの実施形態において、非天然コード化アミノ酸を含むポリペプチドは、反応性カルボニル官能基を生成するように化学修飾される。例えば、コンジュゲーション反応に有用なアルデヒド官能基は、隣接するアミノ及びヒドロキシル基を有する官能基から生成することができる。生物学的活性分子が例えばポリペプチドである場合、N末端セリンまたはスレオニン（通常存在し得るか、または化学的または酵素的消化を介して曝露され得る）を使用して、過ヨウ素酸塩を使用して穏やかな酸化切断条件下でアルデヒド官能基を生成することができる。例えば、Gaertner, et al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992)、Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992)、Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994)を参照されたい。しかしながら、当該技術分野で既知の方法は、ペプチドまたはタンパク質のN末端のアミノ酸に限定される。

【0441】

本発明では、隣接するヒドロキシル及びアミノ基を有する非天然コード化アミノ酸を、「マスクされた」アルデヒド官能基としてポリペプチドに組み込むことができる。例えば、5-ヒドロキシリジン、イプシロンアミンに隣接するヒドロキシル基を有する。アルデヒドを生成するための反応条件は、典型的には、ポリペプチド内の他の部位における酸化を回避するために、穏やかな条件下でモル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加することを伴う。酸化反応のpHは、典型的には、約7.0である。典型的な反応は、ポリペプチドの緩衝溶液に約1.5モル過剰のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、続いて暗所で約10分間インキュベートすることを伴う。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,423,685号を参照されたい。

【0442】

カルボニル官能基を、水溶液中で、穏やかな条件下で、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはセミカルバジド含有試薬と選択的に反応させて、それぞれ、生理学的条件下で安定である対応するヒドラゾン、オキシム、またはセミカルバゾン連結を形成することができる。例えば、Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)、Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)を参照されたい。さらに、カルボニル基の固有の反応性は、他のアミノ酸側鎖の存在下での選択的修飾を可能にする。例えば、Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996)、Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992)、Mahal, L. K., et al., Science 276: 1125-1128 (1997)を参照されたい。

【0443】

B. ヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジド反応基

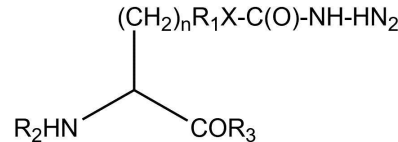
ヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジドなどの求核基を含有する非天然コード化アミノ酸は、様々な求電子基と反応して、（PEGまたは他の水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されないものと）コンジュゲートを形成することを可能にする。

【0444】

例示的なヒドラジン、ヒドラジド、またはセミカルバジド含有アミノ酸は、以下のよう

【0445】

【化48】



10

【0446】

式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、もしくは置換アリールであるか、または存在せず、 X は、O、N、もしくはSであるか、または存在せず、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。

【0447】

いくつかの実施形態において、 n は4であり、 R_1 は存在せず、 X はNである。いくつかの実施形態において、 n は2であり、 R_1 は存在せず、 X は存在しない。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 X はOであり、酸素原子は、アリール環上のアルファ基に対してパラに配置される。

20

【0448】

ヒドラジド、ヒドラジン、及びセミカルバジド含有アミノ酸は、商業的供給源から入手可能である。例えば、L-グルタメート- γ -ヒドラジドは、Sigma Chemical (St. Louis, MO) から入手可能である。市販されていない他のアミノ酸は、当業者によって調製され得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,281,211号を参照されたい。

30

【0449】

ヒドラジド、ヒドラジン、またはセミカルバジド官能基を担持する非天然コード化アミノ酸を含有するポリペプチドは、アルデヒドまたは同様の化学反応性を有する他の官能基を含有する様々な分子と効率的かつ選択的に反応することができる。例えば、Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995) を参照されたい。ヒドラジド、ヒドラジン、及びセミカルバジド官能基の固有の反応性により、20個の一般的なアミノ酸（セリンもしくはスレオニンのヒドロキシル基、またはリジン及びN末端のアミノ基を含むがこれらに限定されない）上に存在する求核基と比較して、これらを、アルデヒド、ケトン、及び他の求電子基に対して顕著により反応性にする。

40

【0450】

C. アミノオキシ含有アミノ酸

アミノオキシ（ヒドロキシルアミンとも呼ばれる）基を含有する非天然コード化アミノ酸は、様々な求電子基と反応して、（PEGまたは他の水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されないものと）コンジュゲートを形成することを可能にする。ヒドラジン、ヒドラジド、及びセミカルバジドと同様に、アミノオキシ基の求核性が増強することにより、アルデヒド、または同様の化学反応性を有する他の官能基を含有する様々な分子と効率的かつ選択的に反応することが可能となる。例えば、Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893-3899 (1995)、H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2

50

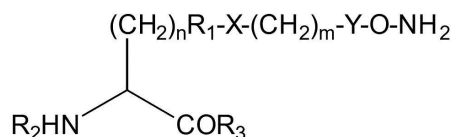
001)を参照されたい。ヒドラジン基との反応の結果は、対応するヒドラゾンであるが、オキシムは、一般に、アミノオキシ基と、ケトンなどのカルボニル含有基との反応から生じる。

【0451】

アミノオキシ基を含有する例示的なアミノ酸は、以下のように表すことができ、

【0452】

【化49】



10

【0453】

式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、もしくは置換アリールであるか、または存在せず、 X は、O、N、Sであるか、または存在せず、 m は、0～10であり、 $\text{Y}=\text{C}(\text{O})$ であるか、または存在せず、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 X はOであり、 m は1であり、 Y は、存在する。いくつかの実施形態において、 n は2であり、 R_1 及び X は存在せず、 m は0であり、 Y は存在しない。

【0454】

20

アミノオキシ含有アミノ酸は、容易に入手可能なアミノ酸前駆体（ホモセリン、セリン、及びスレオニン）から調製され得る。例えば、M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853–8858 (2003)を参照されたい。L-2-アミノ-4-(アミノオキシ)酪酸などのある特定のアミノオキシ含有アミノ酸は、天然源から単離されてきた(Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635–1641 (1997))。他のアミノオキシ含有アミノ酸は、当業者によって調製され得る。

【0455】

D. アジド及びアルキン反応性基

アジド及びアルキン官能基の固有の反応性は、それらを、ポリペプチド及び他の生物学的分子の選択的修飾に非常に有用なものにする。有機アジ化物、特にアルファアジド、及びアルキンは、一般的な反応性の化学条件に対して一般的に安定である。特に、アジド及びアルキン官能基の両方は、天然に存在するポリペプチドに見られる20個の一般的なアミノ酸の側鎖（すなわち、 R 基）に対して不活性である。しかしながら、近接させると、アジド及びアルキン基の「バネ式(spring-loaded)」性質が明らかになり、それらはヒュスゲン[3+2]環化付加反応を介して選択的かつ効率的に反応して、対応するトリアゾールを生成する。例えば、Chin J., et al., Science 301: 964–7 (2003)、Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192–3193 (2003)、Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124: 9026–9027 (2002)を参照されたい。

30

40

【0456】

ヒュスゲン環化付加反応は、求核置換よりも選択的環化付加反応を伴うため（例えば、Padwa, A., in COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069–1109、Huisgen, R. in 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1–176を参照されたい）、アジド及びアルキン含有側鎖を担持する非天然コード化アミノ酸の組み込みにより、非天然コード化アミノ酸の位置で、得られるポリペプチドを選択的に修飾することが可能となる。アジドまたはアルキン含有TCを伴う環化付加反応は、触媒量で、インサ

50

イツで、Cu (II) を Cu (I) に還元するための還元剤の存在下で、Cu (II) (触媒量の CuSO₄ の形態を含むがこれに限定されない) を添加することによって、水性条件下で、室温で行うことができる。例えば、Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)、Tornøe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002)、Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002) を参照されたい。例示的な還元剤としては、アスコルベート、金属銅、キニーネ、ヒドロキノン、ビタミンK、グルタチオン、システイン、Fe²⁺、Co²⁺、及び適用電位が挙げられるが、これらに限定されない。

【0457】

場合によっては、アジドとアルキンとの間のヒュズゲン [3+2] 環状付加反応が所望される場合、TCは、アルキン部分を含む非天然コード化アミノ酸を含み、アミノ酸に結合される水溶性ポリマーは、アジド部分を含む。あるいは、逆反応（すなわち、アミノ酸上にアジド部分を有し、アルキン部分が水溶性ポリマー上に存在する）を実施することもできる。

【0458】

アジド官能基を、アリアルエステルを含有する水溶性ポリマーと選択的に反応させ、アリアルホスフィン部分で適切に官能化して、アミド連結を生成することもできる。アリアルホスフィン基は、アジドをインサイツで還元し、次いで、得られるアミンが近位エステル連結と効率的に反応して、対応するアミドを生成する。例えば、E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000) を参照されたい。アジド含有アミノ酸は、アルキルアジド (2-アミノ-6-アジド-1-ヘキサン酸を含むがこれに限定されない) またはアリアルアジド (p-アジド-フェニアラニン) のいずれかであり得る。

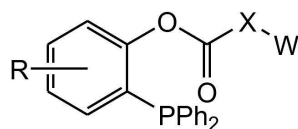
【0459】

アリアルエステル及びホスフィン部分を含有する例示的な水溶性ポリマーは、以下のよう

に表すことができ、

【0460】

【化50】



【0461】

式中、Xは、O、N、Sであるか、または存在しなくもよく、Phはフェニルであり、Wは水溶性ポリマーであり、Rは、H、アルキル、アリアル、置換アルキル、及び置換アリアル基であり得る。例示的なR基としては、-CH₂、-C(CH₃)₃、-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-C(O)R'、-CONR'R''、-S(R'O)-S(O)₂NR'R''、-CN、及び-N₂が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R''', 及びR''''は、それぞれ独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリアル (1~3個のハロゲンで置換されたアリアルを含むがこれに限定されない)、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシ、もしくはチオアルコキシ基、またはアリアルアルキル基を指す。本発明の化合物が例えば2つ以上のR基を含む場合、R基の各々は、これらの基のうちの2つ以上が存在する場合、それぞれのR'、R''、R''', 及びR''''基と同様に独立して選択される。R'及びR''が同じ窒素原子に結合されるとき、それらは、窒素原子と組み合わせられて、5、6、または7員環を形成することができる。例えば、-NR'R''は、限定されないが、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことを意図する。置換基の上記の考察から、当業者は、「アルキル」という用語が、水素基以外の基、例えば、ハロアルキル (-CF₃及び-CH₂CF₃を含むがこれらに限定されない) 及びアシル (-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OC

10

20

30

50

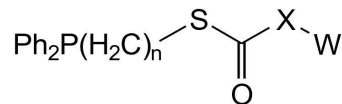
H₃などを含むが、これらに限定されない)に結合した炭素原子を含む基を含むことを意味することを理解するであろう。

【0462】

アジド官能基を、チオエステルを含有する水溶性ポリマーと選択的に反応させ、アリアルホスフィン部分で適切に官能化して、アミド連結を生成することもできる。アリアルホスフィン基は、アジドをインサイツで還元し、次いで、得られるアミンがチオエステル連結と効率的に反応して、対応するアミドを生成する。チオエステル及びホスフィン部分を含有する例示的な水溶性ポリマーは、以下のように表すことができ、

【0463】

【化51】



10

【0464】

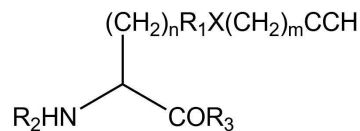
式中、nは、1～10であり、Xは、O、N、Sであるか、または存在しなくてもよく、Phはフェニルであり、Wは、水溶性ポリマーである。

【0465】

例示的なアルキン含有アミノ酸は、以下のように表すことができ、

【0466】

【化52】



20

【0467】

式中、nは、0～10であり、R₁は、アルキル、アリアル、置換アルキル、または置換アリアルであるか、または存在せず、Xは、O、N、Sであるか、または存在せず、mは、0～10であり、R₂は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、R₃は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。いくつかの実施形態において、nは1であり、R₁はフェニルであり、Xは存在せず、mは0であり、アセチレン部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に配置される。いくつかの実施形態において、nは1であり、R₁はフェニルであり、XはOであり、mは1であり、プロパルギルオキシ基は、アルキル側鎖に対してパラ位（すなわち、O-プロパルギルチロシン）に配置される。いくつかの実施形態において、nは1であり、R₁及びXは存在せず、mは0である（すなわち、プロパリルグリシン）。

30

【0468】

アルキン含有アミノ酸は市販されている。例えば、プロパルギルグリシンは、Peptech (Burlington, MA) から市販されている。あるいは、アルキン含有アミノ酸は、標準的な方法により調製することができる。例えば、p-プロパルギルオキシフェニルアラニンは、例えば、Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003) に記載されるように合成され得、4-アルキニル-L-フェニルアラニンは、Kayser, B., et al., Tetrahedron 53 (7): 2475-2484 (1997) に記載されるように合成され得る。他のアルキン含有アミノ酸は、当業者によって調製され得る。

40

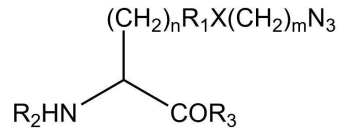
【0469】

例示的なアジド含有アミノ酸は、以下のように表すことができ、

【0470】

50

【化 5 3】



【0 4 7 1】

式中、 n は、0～10であり、 R_1 は、アルキル、アリール、置換アルキル、置換アリールであるか、または存在せず、 X は、O、N、Sであるか、または存在せず、 m は、0～10であり、 R_2 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、 R_3 は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 X は存在せず、 m は0であり、アジド部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に配置される。いくつかの実施形態において、 n は、0～4であり、 R_1 及び X は存在せず、 $m=0$ である。いくつかの実施形態において、 n は1であり、 R_1 はフェニルであり、 X はOであり、 m は2であり、－アジドエトキシ部分は、アルキル側鎖に対してパラ位に配置される。

【0 4 7 2】

アジド含有アミノ酸は、商業的供給源から入手可能である。例えば、4－アジドフェニルアラニンは、Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL) から得ることができる。市販されていないこれらのアジド含有アミノ酸に関して、アジド基は、限定されないが、好適な脱離基（ハロゲン化物、メシレート、トシレートを含むがこれらに限定されない）の置換を介して、または好適に保護されたラクTONの開口を介して、当業者に既知の標準的な方法を使用して比較的容易に調製することができる。例えば、Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) を参照されたい。

【0 4 7 3】

E. アミノチオール反応性基

ベータ置換アミノチオール官能基の固有の反応性により、それらを、チアゾリジンの形成を介してアルデヒド基を含有するポリペプチド及び他の生物学的分子の選択的修飾に非常に有用なものにする。例えば、J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893–3899を参照されたい。いくつかの実施形態において、ベータ置換アミノチオールアミノ酸は、TCポリペプチドに組み込まれ、次いで、アルデヒド官能基を含む水溶性ポリマーと反応させることができる。いくつかの実施形態において、水溶性ポリマー、薬物コンジュゲート、または他のペイロードは、チアゾリジンの形成を介して、ベータ置換アミノチオールアミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドに結合され得る。

【0 4 7 4】

F. 追加の反応性基

本発明のTCポリペプチドに組み込むことができる、パラ－アミノ－フェニルアラニンを含むがこれに限定されない追加の反応性基及び非天然コード化アミノ酸は、参照によりそれらのすべてが本明細書に組み込まれる以下の特許出願に記載されている：米国特許公開第2006/0194256号、米国特許公開第2006/0217532号、米国特許公開第2006/0217289号、米国仮特許第60/755,338号、米国仮特許第60/755,711号、米国仮特許第60/755,018号、国際特許出願第PCT/US06/49397号、WO2006/069246、米国仮特許第60/743,041号、米国仮特許第60/743,040号、国際特許出願第PCT/US06/47822号、米国仮特許第60/882,819号、米国仮特許第60/882,500号、及び米国仮特許第60/870,594。これらの出願はまた、コンジュゲーションのための、ヒドロキシルアミン（アミノオキシ）基を含むがこれに限定されないPEGまたは他のポリマー上に存在し得る反応性基について考察する。

【0475】

TCポリペプチド内の非天然アミノ酸の位置

本明細書に記載の方法及び組成物は、本発明のTCを作製するために、1つ以上の非天然アミノ酸を標的化ポリペプチドに組み込むことを含む。1つ以上の非天然アミノ酸は、標的化ポリペプチドの活性を妨害しない1つ以上の特定の位置に組み込まれ得る。これは、疎水性アミノ酸を非天然もしくは天然の疎水性アミノ酸で、かさ高のアミノ酸を非天然もしくは天然のかさ高のアミノ酸で、親水性アミノ酸を非天然もしくは天然の親水性アミノ酸で置換すること、及び／または非天然アミノ酸を活性に必要とされない位置に挿入することを含むが、これらに限定されない「保存的」置換を行うことによって達成することができる。

10

【0476】

様々な生化学的及び構造的アプローチを用いて、TCの標的化ポリペプチド内の非天然アミノ酸での置換のための所望の部位を選択することができる。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、TLR-アゴニスト誘導体のC末端で連結されている。他の実施形態において、非天然アミノ酸は、TLR-アゴニスト誘導体のN末端で連結されている。TCの標的化ポリペプチドの任意の位置は、非天然アミノ酸を組み込むための選択に好適であり、選択は、合理的設計に基づくか、または任意のもしくは特定の所望の目的のためのランダム選択によるものであってもよい。所望の部位の選択は、限定されないが、受容体結合調節因子、受容体活性調節因子、結合剤パートナーへの結合の調節因子、結合パートナー活性調節因子、結合パートナー立体配座調節因子、二量体または多量体形成、天然分子と比較して活性または特性に対する変化なし、または可溶性、凝集、もしくは安定性などのポリペプチドの任意の物理もしくは化学特性の操作を含む、任意の所望の特性または活性を有する非天然アミノ酸ポリペプチド（さらに修飾されるか、または未修飾のままであり得る）の産生に基づき得る。あるいは、生物学的活性にとって重要であると特定された部位はまた、やはりポリペプチドに求められる所望の活性に応じて、非天然アミノ酸での置換のための好適な候補であり得る。別の代替案は、単に、非天然アミノ酸を用いてポリペプチド鎖上の各位置に連続置換を行い、ポリペプチドの活性に対する効果を観察することであろう。非天然アミノ酸での任意のポリペプチドへの置換のための位置を選択するための任意の手段、技法、または方法は、本明細書に記載の方法、技法、及び組成物において使用するのに好適である。

20

30

【0477】

欠失を含有するポリペプチドの天然に存在する変異体の構造及び活性を調べて、非天然アミノ酸での置換に耐性である可能性が高いタンパク質の領域を決定することもできる。非天然アミノ酸での置換に不耐性である可能性が高い残基が排除されると、関連するポリペプチドの三次元構造、及び任意の関連するリガンドまたは結合タンパク質を含むがこれらに限定されない方法を使用して、残りの各位置での提案された置換の影響を調べることができる。多くのポリペプチドのX線結晶学的及びNMR構造は、タンパク質及び核酸の巨大分子の三次元構造データを含む集中データベースであるタンパク質構造データバンク（Protein Data Bank）（PDB、www.rcsb.org）において入手可能であり、非天然アミノ酸で置換され得るアミノ酸位置を特定するために使用することができる。加えて、三次元構造データが利用できない場合、ポリペプチドの二次及び三次構造を調査するモデルを作製してもよい。したがって、非天然アミノ酸で置換され得るアミノ酸位置の同一性を容易に得ることができる。

40

【0478】

非天然アミノ酸の組み込みの例示的な部位としては、潜在的な受容体結合領域、または結合タンパク質もしくはリガンドへの結合のための領域から除外されるもの、完全にまたは部分的に溶媒曝露され得るもの、近くの残基との水素結合相互作用が最小限であるか、または全くないもの、近くの反応性残基に最小限に曝露され得るもの、及び／または関連する受容体、リガンド、もしくは結合タンパク質を有する特定のポリペプチドの三次元結晶構造によって予測されるように非常に柔軟な領域にあり得るものが挙げられるが、これ

50

らに限定されない。

【0479】

多種多様な非天然アミノ酸を、ポリペプチド内の所与の位置に置換するか、またはその中に組み込むことができる。例として、特定の非天然アミノ酸は、その関連するリガンド、受容体、及び／または結合タンパク質を有するポリペプチドの三次元結晶構造の検査に基づいた組み込みのために選択されてもよく、保存的置換が好ましい。

【0480】

一実施形態において、本明細書に記載の方法は、非天然アミノ酸をTCの標的化ポリペプチドに組み込むことであって、TCの標的化ポリペプチドが第1の反応性基を含む、組み込むことと、TCの標的化ポリペプチドを、第2の反応性基を含む分子（第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体断片、及びそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない）と接触させることと、を含む。ある特定の実施形態において、第1の反応性基はヒドロキシルアミン部分であり、第2の反応性基はカルボニルまたはジカルボニル部分であり、それによりオキシム連結が形成される。ある特定の実施形態において、第1の反応性基はカルボニルまたはジカルボニル部分であり、第2の反応性基はヒドロキシルアミン部分であり、それによりオキシム連結が形成される。ある特定の実施形態において、第1の反応性基はカルボニルまたはジカルボニル部分であり、第2の反応性基はオキシム部分であり、それによりオキシム交換反応が生じる。ある特定の実施形態において、第1の反応性基はオキシム部分であり、第2の反応性基はカルボニルまたはジカルボニル部分であり、それによりオキシム交換反応が生じる。

【0481】

場合によっては、非天然アミノ酸のTC組み込み（複数可）の標的化ポリペプチドを、ポリペプチド内の他の付加、置換、または欠失と組み合わせ、他の化学的、物理的、薬理的、及び／または生物学的形質に影響を与える。場合によっては、他の付加、置換、または欠失は、ポリペプチドの安定性（タンパク質分解に対する耐性を含むがこれに限定されない）を増加させるか、またはポリペプチドの、その適切な受容体、リガンド、及び／または結合タンパク質に対する親和性を増加させ得る。場合によっては、他の付加、置換、または欠失は、ポリペプチドの溶解性（E. coli または他の宿主細胞で発現された場合を含むがこれらに限定されない）を増加させ得る。いくつかの実施形態において、部位は、E. coli または他の組換え宿主細胞における発現後のポリペプチド溶解性を増加させる目的で、非天然アミノ酸の組み込みのための別の部位に加えて、天然コード化または非天然アミノ酸での置換のために選択される。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、関連するリガンド、結合タンパク質、及び／または受容体に対する親和性を調節する、受容体二量体化を調節する（限定するものではないが、増加または減少を含む）、受容体二量体を安定化する、循環半減期を調節する、放出もしくはバイオアベイラビリティを調節する、精製を促進する、または特定の投与経路を改善もしくは変更する別の付加、置換、または欠失を含む。同様に、非天然アミノ酸ポリペプチドは、検出（GFPを含むがこれに限定されない）、精製、組織もしくは細胞膜を通した輸送、プロドラッグ放出もしくは活性化、サイズ低減、またはポリペプチドの他の形質を改善する、化学もしくは酵素切断配列、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合ドメイン（FLAGまたはポリ-Hisを含むがこれらに限定されない）、または他の親和性ベースの配列（FLAG、ポリ-His、GSTなどを含むがこれらに限定されない）、または連結された分子（ビオチンを含むがこれに限定されない）を含むことができる。

【0482】

標的化部分の例としての抗HER2抗体

本明細書に記載の方法、組成物、戦略、及び技法は、特定の種類、クラス、またはファミリーの標的化部分ポリペプチドまたはタンパク質に限定されない。実際、実質的に任意の標的化部分ポリペプチドは、本明細書に記載のTCの標的化ポリペプチドを含有する少なくとも1つの「修飾されたまたは未修飾」の非天然アミノ酸を含むように設計または修

飾され得る。ほんの一例として、標的化部分ポリペプチドは、アルファ-1抗トリプシン、アンギオスタチン、抗溶血因子、抗体、抗体断片、モノクローナル抗体（例えば、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ、オマリズマブ、ウステキヌマブ、エタネルセプト、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ニモツズマブ、パリビズマブ、及びアブシキシマブ）、アポリポタンパク質、アポタンパク質、心房性ナトリウム利尿因子、心房性ナトリウム利尿ポリペプチド、心房性ペプチド、C-X-Cケモカイン、T39765、NAP-2、ENA-78、gro-a、gro-b、gro-c、IP-10、GCP-2、NAP-4、SDF-1、PF4、MIG、カルシトニン、c-ki tリガンド、CCケモカイン、単球化学誘引物質タンパク質-1、単球化学誘引物質タンパク質-2、単球化学誘引物質タンパク質-3、単球炎症性タンパク質-1アルファ、単球炎症性タンパク質-i ベータ、RANTES、1309、R83915、R91733、HCC1、T58847、D31065、T64262、CD40、CD40リガンド、c-k i tリガンド、コラーゲン、結腸刺激因子(CSF)、補体因子5a、補体阻害剤、補体受容体1、サイトカイン、上皮好中球活性化ペプチド-78、MIP-16、MCP-1、表皮成長因子(EGF)、上皮好中球活性化ペプチド、エリスロポエチン(EPO)、剥離毒素、第IX因子、第VII因子、第VII因子、第X因子、線維芽細胞成長因子(FGF)、フィブリノーゲン、フィブロンекチン、4ヘリカルバンドルタンパク質、G-CSF、glp-1、GM-CSF、グルコセレブロシダーゼ、ゴナドトロピン、成長因子、成長因子受容体、成長ホルモン放出因子、ヘッジホッグタンパク質、ヘモグロビン、肝細胞成長因子(hGF)、ヒルジン、ヒト成長ホルモン(hGH)、ヒト血清アルブミン、ICAM-1、ICAM-1受容体、LFA-1 LFA-1受容体、インスリン、インスリン様成長因子(IGF)、IGF-I、IGF-II、インターフェロン(IFN)、IFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、インターロイキン(IL)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、ケラチノサイト成長因子(KGF)、ラクトフェリン、白血病抑制因子、ルシフェラーゼ、ニュールツリン、好中球抑制因子(NIF)、オンコスタチンM、骨形成タンパク質、がん遺伝子産物、パラシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH)、PD-ECGF、PDGF、ペプチドホルモン、プレイオトロピン、プロテインA、プロテインG、発熱性外毒素A、発熱性外毒素B、発熱性外毒素C、ペプチドYY(PYY)、リラキシン、レニン、SCF、小さな生合成タンパク質、可溶性補体受容体I、可溶性I-CAM 1、可溶性インターロイキン受容体、可溶性TNF受容体、ソマトメジン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、ストレプトキナーゼ、超抗原、staphylococcalエンテロトキシン、SEA、SEB、SEC1、SEC2、SEC3、SED、SEE、ステロイドホルモン受容体、スーパーオキシドジスムターゼ、毒素性ショック症候群毒素、サイモシナルファ1、組織プラスミノーゲン活性化因子、腫瘍成長因子(TGF)、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子アルファ、腫瘍壊死因子ベータ、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、VLA-4タンパク質、VCAM-1タンパク質、血管内皮成長因子(VEGF)、ウロキナーゼ、mos、ras、raf、met、p53、tat、fos、myc、jun、myb、rel、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、テストステロン受容体、アルドステロン受容体、LDL受容体、及びコルチコステロンからなる群から選択される治療用タンパク質と同種であり得る。

【0483】

一実施形態においては、乳癌、小細胞肺癌、卵巣癌、子宮内膜癌、膀胱癌、頭頸部癌、前立腺癌、胃癌、子宮頸癌、子宮癌、食道癌、及び結腸癌からなる群から選択されるHER-2を過剰発現する固形腫瘍を治療するための方法である。別の実施形態において、固形腫瘍は、乳癌である。さらなる実施形態において、固形腫瘍は、卵巣癌である。

【0484】

したがって、トラスツズマブの以下の説明は、例示の目的のため、及びほんの一例として提供され、本明細書に記載の方法、組成物、戦略、及び技法の範囲を限定するものでは

ない。さらに、本出願におけるトラスツズマブへの言及は、任意の抗体の例として一般用語を使用することを意図する。したがって、トラスツズマブに関して本明細書に記載される修飾及び化学は、本明細書に具体的に列記されるものを含む、任意の抗体またはモノクローナル抗体に等しく適用され得ることを理解されたい。

【0485】

トラスツズマブは、HER2/neu受容体の細胞外セグメントのドメインIVに結合するヒト化モノクローナル抗体である。HER2遺伝子(HER2/neu及びErbB2遺伝子としても知られる)は、早期乳癌の20~30%で増幅され、それを過剰発現させる。また、がんにおいて、HER2は、マイトジェンが到達せずにシグナルを送り、任意の受容体に結合し、それを過剰に活性化し得る。

10

【0486】

HER2は細胞膜を通して伸長し、細胞の外部から内部へシグナルを伝達する。健康な人では、マイトジェンと呼ばれるシグナル伝達化合物が細胞膜に到達し、受容体のHERファミリーの他のメンバーの外部に結合する。次いで、これらの結合した受容体は、HER2と連結(二量体化)し、それを活性化する。次いで、HER2は細胞の内部にシグナルを送る。シグナルは異なる生化学的経路を通過する。これには、PI3K/Akt経路及びMAPK経路が含まれる。これらのシグナルは、細胞の侵入、生存、及び血管の成長(血管新生)を促進する。

【0487】

トラスツズマブで処理された細胞は、細胞周期のG1期中に阻止するため、増殖が低減する。トラスツズマブは、HER2/neuの下方調節によってその効果の一部を誘導し、下流のPI3Kカスケードを通じて受容体の二量体化及びシグナル伝達の破壊をもたらすことが示唆されている。次いで、p27kip1は、リン酸化されず、核に入り、cdk2活性を阻害することができ、細胞周期を阻止させる。また、トラスツズマブは、抗血管新生因子の誘導及び血管新生促進因子の抑制の両方によって血管新生を抑制する。がんにおいて観察される無制御な成長への寄与は、細胞外ドメインの放出をもたらすHER2/neuのタンパク質分解切断による可能性があると考えられる。トラスツズマブは、乳癌細胞におけるHER2/neu外部ドメイン切断を阻害することが示されている。

20

【0488】

非真核生物及び真核生物における発現

30

クローニングされたTCポリヌクレオチドの高レベルの発現を得るために、典型的には、本発明のTCポリペプチドの標的化ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、転写を指向する強力なプロモーター、転写/翻訳ターミネーター、及びタンパク質をコードする核酸の場合は翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含有する発現ベクターにサブクローニングする。好適な細菌プロモーターは、当業者に既知であり、例えば、Sambrook et al. 及び Ausubel et al. に記載されている。

【0489】

本発明のTCポリペプチドを発現するための細菌発現系は、限定されないが、E. coli、Bacillus sp、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas aeruginosa、Pseudomonas putida、及びSalmonella含むこれらにおいて利用可能である(Palva et al., Gene 22:229-235(1983)、Mosbach et al., Nature 302:543-545(1983))。そのような発現系のためのキットは市販されている。哺乳類細胞、酵母、及び昆虫細胞の真核生物発現系は、当業者に既知であり、また、市販されている。直交tRNA及びアミノアシルtRNA合成酵素(上述)を使用して、本発明のTCポリペプチドを発現する場合、発現のための宿主細胞は、直交構成要素を使用するそれらの能力に基づいて選択される。例示的な宿主細胞としては、グラム陽性細菌(B. brevis、B. subtilis、またはStreptomycesを含むがこれらに限定されない)、ならびにグラム陰性細菌(E. coli、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas aeruginosa、

40

50

Pseudomonas putida)、ならびに酵母及び他の真核細胞が挙げられる。O-tRNA/O-RS対を含む細胞は、本明細書に記載されるように使用され得る。

【0490】

本発明の真核宿主細胞または非真核宿主細胞は、非天然アミノ酸を有益に大量に含むタンパク質を合成する能力を提供する。一態様において、組成物は、任意に、少なくとも10マイクログラム、少なくとも50マイクログラム、少なくとも75マイクログラム、少なくとも100マイクログラム、少なくとも200マイクログラム、少なくとも250マイクログラム、少なくとも500マイクログラム、少なくとも1ミリグラム、少なくとも10ミリグラム、少なくとも100ミリグラム、少なくとも1グラム以上の、非天然アミノ酸を含むタンパク質、またはインビボでのタンパク質産生方法で達成可能な量を含むが、これらに限定されない（組み換えタンパク質の産生及び精製の詳細は、本明細書に提供される）。別の態様において、タンパク質は、任意に、細胞溶解物、緩衝液、医薬緩衝液、または他の液体懸濁液（約1nL～約100L以上の間の体積を含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されないものにおいて、1リットル当たり少なくとも10マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも50マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも75マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも100マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも200マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも250マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり少なくとも500マイクログラムのタンパク質、1リットル当たり1ミリグラムのタンパク質、または1リットル当たり少なくとも10ミリグラムのタンパク質以上を含むがこれらに限定されない濃度で、組成物中に存在する。本発明の特徴は、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む真核細胞におけるタンパク質の大量産生（インビトロ翻訳を含むがこれに限定されない他の方法で典型的に可能な量を超えることを含むがこれに限定されない）である。

【0491】

TCポリペプチドの標的化ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列には、シグナルペプチドをコードする配列が含まれていても、含まれていなくてもよい。シグナルペプチドは、ポリペプチドが発現する細胞から分泌される場合に存在する。そのようなシグナルペプチドは、任意の配列であり得る。シグナルペプチドは、原核生物であっても真核生物であってもよい。Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152: 89-104) は、哺乳類細胞において使用するためのシグナルペプチド（マウスIgG軽鎖シグナルペプチド）を記載している。他のシグナルペプチドには、S. Cervisiaeからのアルファ因子シグナルペプチド（米国特許第4,870,008号、参照により本明細書に組み込まれる）、マウス唾液アミラーゼのシグナルペプチド（O. Hagenbuchle et al. Nature, 289, 1981, pp. 643-646）、修飾されたカルボキシペプチダーゼシグナルペプチド（L. A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897）、酵母BAR1シグナルペプチド（WO87/02670、参照により本明細書に組み込まれる）、及び酵母アスパラギン酸プロテアーゼ3（YAP3）シグナルペプチド（M. Egel-Mitani et al. Yeast, 6, 1990, pp. 127-137を参照）が含まれるが、これらに限定されない。

【0492】

適切な哺乳類宿主細胞の例は、当業者に既知である。そのような宿主細胞は、組織培養における、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、CHO-K1; ATCC CCL-61）、ミドリザル細胞（COS）（例えば、COS1（ATCC CRL-1650）、COS7（ATCC CRL-1651））、マウス細胞（例えば、NS/O）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞株（例えば、ATCC CRL-1632またはATCC CCL-10）、及びヒト細胞（例えば、HEK293（ATCC CRL-1573））、ならびに植物細胞であり得る。これらの細胞株及び他の細胞株は、American Type Culture Collection, Rockville,

10

20

30

40

50

Md.などの公共保管所から入手可能である。TCポリペプチドの改善されたグリコシル化を提供するために、哺乳類宿主細胞は、例えば、米国特許第5,047,335号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように、シアリルトランスフェラーゼ、例えば、1,6-シアリルトランスフェラーゼを発現するように修飾され得る。

【0493】

外因性DNAを哺乳類宿主細胞に導入するための方法は、これらに限定されないが、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リボソーム媒介性トランスフェクション、ウイルスベクター、ならびにLipofectamin 2000を使用した、Life Technologies Ltd, Paisley, UKにより記載されるトランスフェクション方法、及びFuGENE 6を使用したRoche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USAにより記載されるトランスフェクション方法を含むが、これらに限定されない。これらの方法は、当該技術分野において周知であり、Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USAによって記載される。哺乳類細胞の培養は、確立された方法、例えば、(Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N. J., USA及びHarrison Mass. and Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997)に開示される確立された方法により実施され得る。

【0494】

E. coli、Pseudomonas種、及び他の原核生物 細菌発現技法が当業者に既知である。多種多様なベクターが、細菌宿主における使用に利用可能である。ベクターは、単一のコピーまたは低もしくは高マルチコピーベクターであり得る。ベクターは、クローニング及び／または発現のために機能し得る。ベクターに関する豊富な文献、多くのベクターの商業的利用可能性、さらにはベクター及びその制限マップ及び特徴を説明するマニュアルを考慮すると、ここでは広範な考察を必要としない。周知のように、ベクターは通常、選択を可能にするマーカーを伴い、このマーカーは、細胞傷害性剤耐性、原栄養性、または免疫を提供し得る。多くの場合、異なる特徴を提供する複数のマーカーが存在する。

【0495】

細菌プロモーターは、細菌RNAポリメラーゼを結合し、コード配列(例えば構造遺伝子)のmRNAへの下流(3')転写を開始することができる任意のDNA配列である。プロモーターは、コード配列の5'末端の近位に通常配置される転写開始領域を有する。この転写開始領域は、典型的には、RNAポリメラーゼ結合部位及び転写開始部位を含む。細菌プロモーターはまた、RNA合成が始まる隣接するRNAポリメラーゼ結合部位と重複し得るオペレーターと呼ばれる第2のドメインも有し得る。遺伝子リプレッサータンパク質は、オペレーターに結合し、それにより特定の遺伝子の転写を阻害し得るため、オペレーターは、負に調節された(誘導可能な)転写を可能にする。構成的発現は、オペレーターなどの負の調節要素の不在で生じ得る。加えて、正の調節は、存在する場合、通常、RNAポリメラーゼ結合配列に近位(5')である遺伝子活性化タンパク質結合配列によって達成され得る。遺伝子活性化タンパク質の例は、Escherichia coli (E. coli)におけるlacオペロンの転写を開始するのに役立つカタボライト活性化因子タンパク質(CAP)である(Raibaud et al., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173を参照されたい)。したがって、調節された発現は、正または負のいずれかであり得、それにより、転写を増強または低減する。

【0496】

「細菌宿主」または「細菌宿主細胞」という用語は、組換えベクターまたは他のトラン

10

20

30

40

50

スファアDNAのレシピエントとして使用され得るか、または使用されてきた細菌を指す。この用語は、トランスフェクトされた元の細菌宿主細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、偶発的または意図的な変異により、必ずしも、形態、または元の親に対して相補的なゲノムもしくは全DNAが完全に同一ではない場合があることを理解されたい。TCポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在など、関連する特性によって特徴付けられる親と十分に類似している親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれる。

【0497】

TCポリペプチドの発現に好適な宿主細菌の選択は、当業者に既知である。発現のための細菌宿主の選択において、好適な宿主は、とりわけ、良好な封入体形成能、低タンパク質分解活性、及び全体的な堅牢性を有することが示されるものを含み得る。細菌宿主は、一般に、Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) 及び the American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA) を含むがこれらに限定されない様々な供給源から入手可能である。工業／医薬発酵は、一般に、K株（例えばW3110）に由来する細菌、またはB株（例えばBL21）に由来する細菌を使用する。これらの株は、それらの成長パラメータが非常に周知で堅牢であるため、特に有用である。加えて、これらの株は非病原性であり、安全性及び環境的な理由から商業的に重要である。好適なE. coli 宿主の他の例としては、BL21、DH10B、またはそれらの誘導体の株が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法の別の実施形態において、E. coli 宿主は、OMP-及びLON-を含むがこれらに限定されないプロテアーゼマイナス株である。宿主細胞株は、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas aeruginosa、及びPseudomonas putidaを含むがこれらに限定されないPseudomonas種であり得る。Pseudomonas fluorescens biovar 1、指定株MB101は、組換え産生に有用であり、治療用タンパク質産生プロセスに利用可能であることが知られている。Pseudomonas 発現系の例は、宿主株としてThe Dow Chemical Companyから入手可能な系 (Midland, MI、the worldwide web at dow.comで入手可能) を含む。

【0498】

組換え宿主細胞株が確立されると（すなわち、発現構築物が宿主細胞に導入され、適切な発現構築物を有する宿主細胞が単離される）、組換え宿主細胞株を、TCポリペプチドの産生に適切な条件下で培養する。当業者には明らかであるように、組換え宿主細胞株の培養方法は、利用される発現構築物の性質及び宿主細胞の同一性に依存する。組換え宿主株は、通常、当業者に既知の方法を使用して培養される。組換え宿主細胞は、典型的には、炭素、窒素、及び無機塩の同化可能な源を含有し、任意に、ビタミン、アミノ酸、成長因子、及び当業者に既知の他のタンパク質性培養サプリメントを含有する液体培地中で培養される。宿主細胞の培養のための液体培地は、任意に、望ましくない微生物の成長を防止するための抗生物質もしくは抗真菌剤、及び／または発現ベクターを含有する宿主細胞を選択するための抗生物質を含むがこれに限定されない化合物を含有し得る。

【0499】

組換え宿主細胞は、バッチまたは連続的な形式のいずれかで、細胞採取（TCポリペプチドが細胞内で蓄積する場合）または培養上清の採取のいずれかを伴って、バッチまたは連続的な形式で培養され得る。原核宿主細胞における産生のために、バッチ培養及び細胞採取が好ましい。

【0500】

本発明のTCポリペプチドは、通常、組換え系において発現後に精製される。TCポリペプチドは、当該技術分野において既知の様々な方法によって宿主細胞または培養培地か

10

20

30

40

50

ら精製され得る。細菌宿主細胞で産生されるTCポリペプチドは、難溶性であっても不溶性であってもよい（封入体の形態で）。本発明の一実施形態において、アミノ酸置換は、本明細書に開示される方法及び当該技術分野で既知の方法を利用して、組換え産生されたタンパク質の溶解性を増加させる目的で選択されるTCポリペプチドにおいて容易に行うことができる。不溶性タンパク質の場合、タンパク質は遠心分離によって宿主細胞溶解物から収集され得、さらに細胞の均質化が続き得る。難溶性タンパク質の場合、ポリエチレンイミン（PEI）を含むがこれに限定されない化合物を添加して、部分的に可溶性のタンパク質の沈殿を誘導することができる。次いで、沈殿したタンパク質は、遠心分離によって便利に収集され得る。組換え宿主細胞は、当業者に既知の様々な方法を使用して、細胞内から封入体を放出するように破壊または均質化され得る。宿主細胞の破壊または均質化は、酵素細胞破壊、超音波処理、ダウンス均質化、または高圧放出破壊を含むが、これらに限定されない周知の技法を使用して実施され得る。本発明の方法の一実施形態において、高圧放出技法を使用して、*E. coli* 宿主細胞を破壊し、TCポリペプチドの封入体を放出する。TCポリペプチドの封入体を取り扱う場合、可溶化、機械的剪断、またはタンパク質分解などの要因による損失なしに封入体の収率を最大にするために、反復における均質化時間を最小限にすることが有利であり得る。

【0501】

次いで、不溶性または沈殿したTCポリペプチドを、当該技術分野で既知のいくつかの好適な可溶化剤のうちのいずれかを使用して可溶化してもよい。TCポリペプチドは、尿素またはグアニジン塩酸塩で可溶化され得る。可溶化TCポリペプチドの体積は、便利に管理可能なバッチサイズを使用して大きなバッチを産生することができるよう最小限にする必要がある。この要因は、組換え宿主が数千リットルの体積のバッチで成長し得る大規模な商業的環境において顕著であり得る。加えて、TCポリペプチドを、特にヒトの医薬用途のために、大規模な商業的環境で製造する場合、機械及び容器、またはタンパク質製品自体を損傷する可能性のある刺激の強い化学物質の回避は、可能であれば、避けるべきである。本発明の方法において、より刺激の強い変性剤グアニジン塩酸塩の代わりに、より刺激の少ない変性剤尿素を使用して、TCポリペプチド封入体を可溶化することが示されている。尿素の使用は、TCポリペプチド封入体を効率的に可溶化しながら、TCポリペプチドの製造及び精製プロセスで利用されるステンレス鋼装置への損傷のリスクを大幅に低減する。

【0502】

TCタンパク質の可溶性標的化ポリペプチドの場合、TCの標的化ポリペプチドは、細胞質周辺腔または培養培地中に分泌され得る。加えて、可溶性TCは、宿主細胞の細胞質に存在してもよい。精製ステップを実施する前に、可溶性TCを濃縮することが望ましい場合がある。当業者に既知の標準的な技法を使用して、例えば、細胞溶解物または培養培地から可溶性標的化ポリペプチドを濃縮することができる。加えて、当業者に知られている標準的な技法を使用して、宿主細胞を破壊し、宿主細胞の細胞質または細胞質周辺腔から可溶性TCを放出してもよい。

【0503】

一般に、発現されたポリペプチドを変性及び還元して、次いでポリペプチドを好ましい立体配座にリフォールディングすることが時折望ましい。例えば、グアニジン、尿素、DTT、DTE、及び／またはシャペロニンを、関心の翻訳産物に添加することができる。タンパク質を還元、変性、及び再生する方法は、当業者に既知である（上記の参考文献、ならびにDebinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268:14065-14070、Kreitman and Pastan (1993) Bioconj. Chem., 4:581-585、及びBuchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205:263-270を参照されたい）。Debinskiらは、例えば、グアニジン-DTEにおける封入体タンパク質の変性及び還元について記載している。タンパク質は、酸化されたグルタチオン及びL-アルギニンを含むがこれらに限定されない酸化還元緩衝液中でリフォールディングされ得る。リ

フォールディング試薬は、1つ以上のポリペプチドまたは他の発現産物と接触するように流されるか、さもなければ移動させることができ、逆もまた同様である。

【0504】

TCポリペプチドの原核生物産生の場合、このようにして産生されたTCポリペプチドは、ミスフォールディングされ得、したがって、生物学的活性を欠くか、またはそれが低減され得る。タンパク質の生物活性は、「リフォールディング」によって回復させることができる。一般に、ミスフォールディングされたTCポリペプチドは、例えば、1つ以上のカオトロピック剤（例えば、尿素及び／またはグアニジン）及びジスルフィド結合を還元することができる還元剤（例えば、ジチオスレイトール、DTT、または2-メルカプトエタノール、2-ME）を使用して、ポリペプチド鎖を可溶化（TCポリペプチドも不溶性である）、アンフォールディング、及び還元することによってリフォールディングされる。中濃度のカオトロブでは、次いで酸化剤（例えば、酸素、シスチン、またはシスタミン）が添加され、これによりジスルフィド結合の再形成が可能になる。TCポリペプチドは、米国特許第4,511,502号、同第4,511,503号、及び同第4,512,922号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの、当該技術分野で既知の標準的な方法を使用してリフォールディングされ得る。TCポリペプチドは、他のタンパク質とコフォールディングされて、ヘテロ二量体またはヘテロ多量体を形成してもよい。

10

【0505】

リフォールディング後、TCの標的化ポリペプチドをさらに精製してもよい。TCの精製は、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなど、またはそれらの任意の組み合わせを含む、当業者に既知の様々な技法を使用して達成され得る。さらなる精製には、精製したタンパク質を乾燥または沈殿させるステップも含まれ得る。

20

【0506】

精製後、TCの標的化ポリペプチドは、限定されないが、透析濾過及び透析を含む、当該技術分野で既知の様々な方法のうちのいずれかによって、異なる緩衝液に交換され、及び／または濃縮され得る。単一の精製タンパク質として提供されるTCは、凝集及び沈殿に供されてよい。

30

【0507】

TCの精製された標的化ポリペプチドは、少なくとも90%純粋（逆相高速液体クロマトグラフィー、RP-HPLC、またはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS-PAGEにより測定される）、または少なくとも95%純粋、または少なくとも96%純粋、または少なくとも97%純粋、または少なくとも98%純粋、または少なくとも99%以上純粋であり得る。TCの標的化ポリペプチドの純度の正確な数値にかかわらず、TCの標的化ポリペプチドは、医薬製品として使用するため、またはPEGなどの水溶性ポリマーとのコンジュゲーションなどのさらなる処理のために十分に純粋である。

【0508】

ある特定のTC分子は、他の活性成分もしくはタンパク質（賦形剤、担体、及び安定剤、血清アルブミン以外）の不在下で治療剤として使用され得るか、またはそれらは、別のタンパク質もしくはポリマーと複合体化され得る。

40

【0509】

以前に、非天然アミノ酸は、所望のアンバーナセンス変異を含有する遺伝子でプログラムされたタンパク質合成反応に化学的にアミノアシル化されたサブレッサー7RNAを添加することによって、インビトロでタンパク質に部位特異的に組み込むことができることが示された。これらのアプローチを使用して、特定のアミノ酸に栄養要求性の株を使用して、一般的な20個のアミノ酸のいくつかを、密接な構造相同体で置換することができ、例えば、フェニルアラニンの代わりにフルオロフェニルアラニンを使用することができ

50

る。例えば、Noren, C. J., Anthony-Cahill, Griffith, M. C., Schultz, P. G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244:182-188 (1989)、M. W. Nowak, et al., *Science* 268:439-442 (1995)、Bain, J. D., Glabe, C. G., Dix, T. A., Chamberlin, A. R., Diala, E. S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989)、N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51 (1999)、Ellman, J. A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C. J., Schultz, P. G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992)、及び Mendel, D., Cornish, V. W. & Schultz, P. G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995) を参照されたい。

【0510】

例えば、終止コドンUAGを認識し、非天然アミノ酸で化学的にアミノアシル化したサプレッサートRNAを調製した。従来の部位特異的変異誘発を使用して、タンパク質遺伝子内の関心の部位に終止コドンTAGを導入した。例えば、Sayers, J. R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3):791-802 (1988) を参照されたい。アシル化サプレッサートRNA及び変異遺伝子をインビトロ転写／翻訳系で組み合わせた場合、非天然アミノ酸は、指定位置にそのアミノ酸を含有するタンパク質をもたらすUAGコドンに应答して組み込まれた。 [³H]-Pheを使用した実験及びα-ヒドロキシ酸を用いた実験は、所望のアミノ酸のみがUAGコドンによって指定された位置に組み込まれ、このアミノ酸がタンパク質中の任意の他の部位に組み込まれないことを示した。例えば、Noren, et al., 上記、Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432及びEllman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 255(5041):197-200 (1992) を参照されたい。

【0511】

tRNAは、化学的または酵素的アミノアシル化を含むがこれらに限定されない任意の方法または技法によって所望のアミノ酸でアミノアシル化され得る。

【0512】

アミノアシル化は、アミノアシルtRNA合成酵素によって、またはリボザイムを含むがこれに限定されない他の酵素分子によって達成され得る。「リボザイム」という用語は、「触媒RNA」と交換可能である。Cech及び同僚(Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539、McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226)は、触媒(リボザイム)として作用することができる天然に存在するRNAの存在を示した。しかしながら、これらの天然RNA触媒は、切断及びスプライシングのためのリボ核酸基質に作用することのみが示されているが、最近のリボザイムの人工進化の開発は、触媒作用のレパートリーを種々の

化学反応に拡大している。研究により、アミノアシル-RNA結合を自ら(2')3'末端で触媒することができるRNA分子(Illangakere et al., 1995 Science 267:643-647)、及びアミノ酸を1つのRNA分子から別のRNA分子に移行することができるRNA分子(Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444)が特定されている。

【0513】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2003/0228593号は、リボザイムを構築する方法、及び天然コード化アミノ酸及び非天然コード化アミノ酸によるtRNAのアミノアシル化におけるそれらの使用を記載する。リボザイムを含むがこれに限定されない、tRNAをアミノアシル化することができる酵素分子の基質固定化形態は、アミノアシル化産物の効率的な親和性精製を可能にし得る。好適な基質の例としては、アガロース、セファロース、及び磁気ビーズが挙げられる。アミノアシル化のためのリボザイムの基質固定化形態の産生及び使用は、Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084及び米国特許出願公開第2003/0228593号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0514】

化学的アミノアシル化方法としては、Hecht及び同僚(Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roeser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517)、及びSchultz、Chamberlin、Doughertyら(Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al. Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34)により導入されたものが挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法または他の化学的アミノアシル化方法を使用して、tRNA分子をアミノアシル化してもよい。

【0515】

触媒RNAを生成する方法は、ランダム化リボザイム配列の別個のプールを生成すること、プール上で指向性進化を実施すること、望ましいアミノアシル化活性についてプールをスクリーニングすること、及び所望のアミノアシル化活性を示すそれらのリボザイムの配列を選択することを伴い得る。

【0516】

再構成された翻訳系も使用され得る。精製された翻訳因子の混合物は、mRNAを、タンパク質、ならびに溶解物または開始因子-1(IF-1)、IF-2、IF-3(α または β)、伸長因子T(EF-Tu)、もしくは終結因子などの精製された翻訳因子で補充された溶解物の組み合わせに翻訳するためにも良好に使用されている。細胞を含まない系も、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. editors, Wiley Intersci

ence, 1993) (参照により本明細書に具体的に組み込まれる)に記載されるように、DNAが系に導入され、mRNAに転写され、mRNAが翻訳される、結合転写／翻訳系であり得る。真核生物転写系で転写されるRNAは、ヘテロ核RNA(hnRNA)または5'末端キャップ(7-メチルグアノシン)、及び3'末端ポリA尾部成熟mRNAの形態であってよく、これはある特定の翻訳系において利点であり得る。例えば、キャップされたmRNAは、網状赤血球溶解物系において高効率で翻訳される。

【0517】

TCポリペプチドに結合された巨大分子ポリマー

本明細書に記載の非天然アミノ酸ポリペプチドに対する様々な修飾は、本明細書に記載の組成物、方法、技法、及び戦略を使用して行われ得る。これらの修飾には、標識、染料、ポリマー、水溶性ポリマー、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、放射性核種、細胞傷害性化合物、薬物、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質またはポリペプチドもしくはポリペプチド類似体、抗体もしくは抗体断片、金属キレート剤、補因子、脂肪酸、炭水化物、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、糖、水溶性デンドリマー、シクロデキストリン、阻害性リボ核酸、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、フルオロフォア、金属含有部分、放射性部分、新規官能基、他の分子と共有結合的もしくは非共有結合的に相互作用する基、光ケージ化部分、アクチン放射線励起部分、光異性化可能部分、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、重原子を組み込んだ部分、化学的に切断可能な基、光切断可能な基、細長い側鎖、炭素連結された糖、酸化還元活性剤、アミノチオ酸、毒性部分、同位体標識された部分、生物物理学的プローブ、リン光基、化学発光基、電子密集基、磁性基、挿入基、発色団、エネルギー移動剤、生物学的活性剤、検出可能な標識、小分子、量子ドット、ナノ伝達物質、放射性ヌクレオチド、放射性伝達物質、中性子捕捉剤、または上記の任意の組み合わせ、あるいは任意の他の望ましい化合物または物質を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドの非天然アミノ酸構成要素上へのさらなる官能性の組み込みが含まれる。本明細書に記載の組成物、方法、技法、及び戦略の例示的な非限定的な例として、以下の説明は、本明細書に記載の組成物、方法、技法、及び戦略もまた、上記に列記されるものを含むが、これらに限定されない他の官能性を追加することに適用可能である(必要に応じて適切な修飾により、そして本明細書の開示により当業者が作製することができる)と理解した上で、巨大分子ポリマーを非天然アミノ酸ポリペプチドに付加することに焦点を当てる。

【0518】

多種多様な巨大分子ポリマー及び他の分子を本発明のTCポリペプチドに連結して、TCポリペプチドの生物学的特性を調節し、及び／またはTC分子に新しい生物学的特性を提供することができる。これらの巨大分子ポリマーは、天然コード化アミノ酸を介して、非天然コード化アミノ酸を介して、または天然もしくは非天然アミノ酸の任意の官能性置換基、または天然もしくは非天然アミノ酸に付加された任意の置換基もしくは官能基を介して、TCポリペプチドに連結され得る。ポリマーの分子量は、約100Da～約100,000Da以上を含むがこれらに限定されない、広範囲のものであり得る。ポリマーの分子量は、約100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約100Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態

において、ポリマーの分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマーの分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0519】

本発明は、ポリマー：タンパク質コンジュゲートの実質的に均質な調製物を提供する。本明細書で使用される場合、「実質的に均質な」とは、ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子が総タンパク質の半分以上を占めることが観察されることを意味する。ポリマー：タンパク質コンジュゲートは、生物学的活性を有し、本明細書に提供される本「実質的に均質な」PEG化TCポリペプチド調製物は、均質な調製物の利点、例えば、ロット間薬物動態の予測可能性における臨床応用の容易さを示すのに十分に均質なものである。

10

【0520】

ポリマー：タンパク質コンジュゲート分子の混合物を調製することを選択することでもでき、本明細書で提供される利点は、混合物に含めるモノポリマー：タンパク質コンジュゲートの割合を選択することができることである。したがって、所望する場合、結合された種々の数のポリマー部分（すなわち、ジ、トリ、テトラなど）を有する種々のタンパク質の混合物を調製し、本発明の方法を使用して調製されたモノポリマー：タンパク質コンジュゲートと該コンジュゲートを組み合わせ、所定の割合のモノポリマー：タンパク質コンジュゲートを有する混合物を有することができる。

【0521】

選択されたポリマーは、それが結合しているタンパク質が生理学的環境などの水性環境で沈殿しないように水溶性であり得る。ポリマーは、分枝状または非分枝状であり得る。最終製品の調製物の治療用途のために、ポリマーは、医薬的に許容される。

20

【0522】

ポリマーの例としては、ポリアルキルエーテル及びそのアルコシキップされた類似体（例えば、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシエチレン／プロピレングリコール、及びメトキシまたはそのエトキシキップされた類似体、特に、ポリオキシエチレングリコール、後者はポリエチレングリコールまたはPEGとしても知られる）、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルキルエーテル、ポリオキサゾリン、ポリアルキルオキサゾリン及びポリヒドロキシアリールオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリアルキルアクリルアミド、及びポリヒドロキシアリールアクリルアミド（例えば、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド及びその誘導体）、ポリヒドロキシアリールアクリレート、ポリシアル酸及びその類似体、親水性ペプチド配列、多糖類及びそれらの誘導体（デキストラン及びデキストラン誘導体、例えば、カルボキシメチルデキストラン、デキストラン硫酸、アミノデキストランを含む）、セルロース及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシアリールセルロース、キチン及びその誘導体、例えば、キトサン、スクシニルキトサン、カルボキシメチルキチン、カルボキシメチルキトサン、ヒアルロン酸及びその誘導体、デンプン、アルギネート、コンドロイチン硫酸、アルブミン、プルラン及びカルボキシメチルプルラン、ポリアミノ酸及びその誘導体、例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジン、ポリアスパラギン酸、ポリアスパルタミド、無水マレイン酸コポリマー、例えば、スチレン無水マレイン酸コポリマー、ジビニルエチルエーテル無水マレイン酸コポリマー、ポリビニルアルコール、それらのコポリマー、それらのターポリマー、それらの混合物、ならびに前述の誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0523】

ポリエチレングリコール分子とタンパク質分子との比率は、反応混合物中のそれらの濃度と同様に変化する。概して、最適な比率（過剰な未反応タンパク質またはポリマーが最小であるという点での反応効率の観点から）は、選択されたポリエチレングリコールの分子量及び利用可能な反応性基の数によって決定され得る。分子量に関連するように、典型的には、ポリマーの分子量が高いほど、タンパク質に結合され得るポリマー分子の数が少ない。同様に、ポリマーの分枝は、これらのパラメータを最適化する際に考慮されるべき

50

である。一般に、分子量が高い（または分枝が多い）ほど、ポリマー：タンパク質比が高い。

【0524】

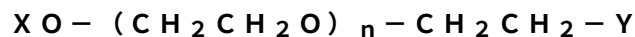
本明細書で使用される場合、及びPEG：TCポリペプチドコンジュゲートを企図する場合、「治療有効量」という用語は、患者に所望の利益を与える量を指す。量は個人によって異なり、患者の全体的な身体状態及び治療される状態の根本的な原因を含むいくつかの要因に依存する。療法に使用されるTCポリペプチドの量は、許容される変化率を与え、所望の応答を有益なレベルで維持する。本組成物の治療有効量は、公的に入手可能な材料及び手順を使用して、当業者によって容易に確認され得る。

【0525】

水溶性ポリマーは、直鎖状、フォーク状、または分枝状を含むが、これらに限定されない任意の構造形態であり得る。典型的には、水溶性ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）などのポリ（アルキレングリコール）であるが、他の水溶性ポリマーを用いることもできる。例として、PEGは、本発明のある特定の実施形態を説明するために使用される。

【0526】

PEGは、市販されているか、または当業者に既知の方法によりエチレングリコールの開環重合によって調製することができる周知の水溶性ポリマーである（Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161）。「PEG」という用語は、サイズまたはPEGの末端での修飾に関係なく、任意のポリエチレングリコール分子を包含するように広く使用され、式：



（式中、 n は2～10、000であり、 X は、 H または末端修飾であり、 C_{1-4} アルキル、保護基、または末端官能基を含むが、これらに限定されない）によってTCポリペプチドに連結されるように表され得る。

【0527】

場合によっては、本発明で使用されるPEGは、一端で、ヒドロキシまたはメトキシで終結する、すなわち、 X は、 H または CH_3 （「メトキシPEG」）である。あるいは、PEGは反応性基で終結し、それにより二官能性ポリマーを形成することができる。典型的な反応性基としては、20個の一般的なアミノ酸に見られる官能基（マレイミド基、活性化カーボネート（ p -ニトロフェニルエステルを含むがこれに限定されない）、活性化エステル（ N -ヒドロキシスクシンイミド、 p -ニトロフェニルエステルを含むがこれらに限定されない）、及びアルデヒドを含むがこれらに限定されない）と反応するために一般的に使用されるそれらの反応性基、ならびに20個の一般的なアミノ酸に対して不活性であるが、非天然コード化アミノ酸に存在する相補的な官能基（アジド基、アルキン基を含むがこれらに限定されない）と特異的に反応する官能基が挙げられる。 Y によって上記の式に示されるPEGの他方の端は、天然に存在するまたは非天然コード化アミノ酸を介してTCポリペプチドに直接または間接的のいずれかで結合することに留意されたい。例えば、 Y は、ポリペプチドのアミン基（リジンのイプシロンアミンまたは N 末端を含むがこれらに限定されない）へのアミド、カルバメート、または尿素連結であり得る。あるいは、 Y は、チオール基（システインのチオール基を含むがこれに限定されない）へのマレイミド連結であり得る。あるいは、 Y は、20の一般的なアミノ酸を介して一般的にアクセス可能ではない残基への連結であり得る。例えば、PEG上のアジド基をTCポリペプチド上のアルキン基と反応させて、ヒュスゲン[3+2]環化付加生成物を形成することができる。あるいは、PEG上のアルキン基を、非天然コード化アミノ酸に存在するアジド基と反応させて、類似の生成物を形成することができる。いくつかの実施形態において、適用できる場合、強力な求核剤（ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、セミカルバジドを含むがこれらに限定されない）を、非天然コード化アミノ酸に存在するアルデヒドまたはケトン基と反応させて、ヒドラゾン、オキシム、またはセミカルバゾンを形

10

20

30

40

50

成することができ、場合によっては、適切な還元剤での処理によってさらに還元することができる。あるいは、強力な求核剤は、非天然コード化アミノ酸を介してTCポリペプチドに組み込むことができ、水溶性ポリマー中に存在するケトンまたはアルデヒド基と優先的に反応させるために使用することができる。

【0528】

PEGの任意の分子量は、所望されるように、約100ダルトン(Da)～100,000Da以上を含むがこれらに限定されない、実質的に所望されるように使用することができる(場合によっては0.1～50kDaまたは10～40kDaを含むがこれらに限定されない)。PEGの分子量は、約100Da～約100,000Da以上を含むがこれらに限定されない、広範囲のものであり得る。PEGは、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、PEGは、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGは、約100Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGは、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGは、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGは、約10,000Da～約40,000Daである。各鎖が、1～100kDa(1～50kDaまたは5～20kDaを含むがこれらに限定されない)の範囲の分子量を有するPEG分子を含むが、これに限定されない分枝鎖PEGも使用することができる。分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、限定されないが、約1,000Da～約100,000Da以上を含むものであり得る。分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、及び1,000Daを含むがこれらに限定されない、約1,000Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、約1,000Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、分枝鎖PEGの各鎖の分子量は、約5,000Da～約20,000Daである。広範なPEG分子が、参照により本明細書に組み込まれるShearwater Polymers, Inc.のカatalog、Nektar Therapeuticsのカatalogを含むが、これらに限定されないものに記載される。

【0529】

一般に、PEG分子の少なくとも1つの末端は、非天然コード化アミノ酸との反応に利用可能である。例えば、アミノ酸側鎖との反応のためのアルキン及びアジド部分を担持するPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体を使用して、本明細書に記載の非天然コード化アミノ酸にPEGを結合させることができる。非天然コード化アミノ酸がアジドを含む場合、PEGは、典型的には、[3+2]環化付加生成物の形成をもたらすアルキン部分、またはアミド連結の形成をもたらすホスフィン基を含有する活性化PEG種(すなわち、エステル、カーボネート)のいずれかを含有する。あるいは、非天然コード化アミノ

10

20

30

40

50

酸がアルキンを含む場合、PEGは、典型的には、[3+2]ヒュスゲン環化付加生成物の形成をもたらすアジド部分を含有する。非天然コード化アミノ酸がカルボニル基を含む場合、PEGは、典型的には、それぞれ、対応するヒドラゾン、オキシム、及びセミカルバゾン連結の形成をもたらすために、強力な求核剤（ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、またはセミカルバジド官能基を含むがこれらに限定されない）を含む。他の代替案では、上述の反応性基の配向の逆を使用することができ、すなわち、非天然コード化アミノ酸中のアジド部分を、アルキンを含むPEG誘導体と反応させることができる。

【0530】

いくつかの実施形態において、PEG誘導体を有するTCポリペプチドは、非天然コード化アミノ酸の側鎖上に存在する化学官能基と反応性である化学官能基を含有する。

10

【0531】

いくつかの実施形態において、本発明は、約800Da～約100,000Daの平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格を含む、アジド及びアセチレン含有ポリマー誘導体を提供する。水溶性ポリマーのポリマー骨格は、ポリ（エチレングリコール）であり得る。しかしながら、ポリ（エチレン）グリコールを含むがこれに限定されない多種多様の水溶性ポリマー、ならびにポリ（デキストラン）及びポリ（プロピレングリコール）を含む他の関連ポリマーもまた、本発明の実施において使用するのに好適であり、用語PEGまたはポリ（エチレングリコール）の使用は、すべてのそのような分子を包含し、含むことが意図されていることを理解されたい。PEGという用語には、二官能性PEG、多アーム型PEG、誘導体化PEG、フォーク型PEG、分枝型PEG、ペンダント型PEG（すなわち、ポリマー骨格に対してペンダント状である1つ以上の官能基を有するPEGまたは関連ポリマー）、またはそれらの中に分解可能な連結を有するPEGを含む、その形態のいずれかにおけるポリ（エチレングリコール）が含まれるが、これに限定されない。

20

【0532】

PEGは、典型的には、透明、無色、無臭であり、水に可溶性であり、熱に安定であり、多くの化学剤に対して不活性であり、加水分解または劣化せず、一般に無毒である。ポリ（エチレングリコール）は生体適合性であると考えられており、つまり、PEGは、害を及ぼすことなく生体組織または生物と共存することができる。より具体的には、PEGは、実質的に、非免疫原性であり、つまり、PEGは、体内で免疫応答をもたらさない傾向がある。生物学的活性剤など、体内である望ましい機能を有する分子に結合された場合、PEGは、薬剤をマスクする傾向があり、生物が薬剤の存在を忍容できるように、任意の免疫応答を低減または排除することができる。PEGコンジュゲートは、実質的な免疫応答をもたらさないか、または凝固もしくは他の望ましくない効果を引き起こさない傾向がある。式 $\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{O---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{---CH}_2\text{CH}_2\text{---}$ （式中、 n は、約3～約4000、典型的には約20～約2000である）を有するPEGは、本発明での使用に好適である。本発明のいくつかの実施形態において、約800Da～約100,000Daの分子量を有するPEGは、ポリマー骨格として特に有用である。PEGの分子量は、約100Da～約100,000Da以上を含むがこれらに限定されない、広範囲のものであり得る。PEGの分子量は、約100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、PEGの分子量は、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGの分子量は、約100Da～約40,000D

30

40

50

aである。いくつかの実施形態において、PEGの分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGの分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、PEGの分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0533】

ポリマー骨格は、直鎖状または分枝状であり得る。分枝状ポリマー骨格は、一般に当該技術分野で既知である。典型的には、分枝状ポリマーは、中央分枝コア部分及び中央分枝コアに連結された複数の直鎖状ポリマー鎖を有する。PEGは、グリセロール、グリセロールオリゴマー、ペンタエリスリトール、及びソルビトールなどの種々のポリオールにエチレンオキシドを添加することによって調製することができる分枝形態で一般的に使用される。中央分枝部分はまた、リジンなどのいくつかのアミノ酸に由来し得る。分枝状ポリ(エチレングリコール)は、一般的な形態では、 $R(-PEG-OH)_m$ として表すことができ、Rは、グリセロール、グリセロールオリゴマー、またはペンタエリスリトールなどのコア部分に由来し、mは、アームの数を表す。米国特許第5,932,462号、同第5,643,575号、同第5,229,490号、同第4,289,872号、米国特許出願第2003/0143596号、WO96/21469号、及びWO93/21259号(それらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているものなどの多アーム型PEG分子もまた、ポリマー骨格として使用することができる。

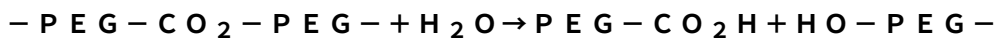
【0534】

分枝状PEGはまた、 $PEG(-YCHZ_2)_n$ で表されるフォーク型PEGの形態であってもよく、ここで、Yは連結基であり、Zは、定義された長さの原子鎖によってCHに連結された活性化末端基である。さらに別の分枝状形態であるペンダント型PEGは、PEG鎖の末端ではなく、PEG骨格に沿ってカルボキシルなどの反応性基を有する。

【0535】

これらの形態のPEGに加えて、ポリマーは、骨格内の弱いまたは分解可能な連結で調製することもできる。例えば、PEGは、加水分解を受けるポリマー骨格内のエステル連結で調製することができる。以下に示すように、この加水分解は、ポリマーを低分子量の断片に切断する。

【0536】



当業者であれば、ポリ(エチレングリコール)またはPEGという用語は、本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知のすべての形態を表すか、またはそれらを含むことを理解されたい。

【0537】

多くの他のポリマーはまた、本発明での使用に好適である。いくつかの実施形態において、2～約300の末端を有する水溶性のポリマー骨格は、本発明において特に有用である。好適なポリマーの例としては、ポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)などの他のポリ(アルキレングリコール)、それらのコポリマー(エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマーを含むが、これに限定されない)、それらのターポリマー、それらの混合物などが挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各鎖の分子量は変化し得るが、典型的には、約800Da～約100,000Da、多くの場合約6,000Da～約80,000Daの範囲である。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、

300Da、200Da、及び100Daを含むがこれらに限定されない、約100Da～約100,000Daであり得る。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約1,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約5,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態において、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0538】

当業者であれば、実質的に水溶性の骨格に関する前述のリストは、決して網羅的なものではなく、単なる例示であり、上述の質を有するすべてのポリマー材料が、本発明での使用に好適であると企図されることを認識するであろう。

【0539】

本発明のいくつかの実施形態において、ポリマー誘導体は、「多官能性」であり、ポリマー骨格が、官能基で官能化または活性化された少なくとも2つの末端、及び場合によっては約300ほどの末端を有することを意味する。多官能性ポリマー誘導体としては、限定されないが、2つの末端を有する直鎖状ポリマーが挙げられ、各末端は、同じであっても異なってもよい官能基に結合されている。

【0540】

「保護された」という用語は、ある特定の反応条件下で化学反応性官能基の反応を防止する保護基または部分の存在を指す。保護基は、保護される化学反応性基の種類に応じて異なる。例えば、化学反応性基がアミンまたはヒドラジドである場合、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル (t-Boc) 及び9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) の基から選択され得る。化学反応性基がチオールである場合、保護基は、オルトピリジルジスルフィドであり得る。化学反応性基が、ブタン酸もしくはプロピオン酸などのカルボン酸、またはヒドロキシル基である場合、保護基は、ベンジル、またはメチル、エチル、もしくはtert-ブチルなどのアルキル基であり得る。当該技術分野で既知の他の保護基もまた、本発明で使用され得る。

【0541】

文献における末端官能基の具体的な例としては、N-スクシンイミジルカーボネート (例えば、米国特許第5,281,698号、同第5,468,478号を参照されたい)、アミン (例えば、Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981)、Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983) を参照されたい)、ヒドラジド (例えば、Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978) を参照されたい)、プロピオン酸スクシンイミジル及びブタン酸スクシンイミジル (例えば、Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997 を参照されたい、また米国特許第5,672,662号も参照されたい)、コハク酸スクシンイミジル (例えば、Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) 及びJoppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979) を参照されたい)、スクシンイミジエステル (例えば、米国特許第4,670,417号を参照されたい)、炭酸ベンゾトリアゾール (例えば、米国特許第5,650,234号を参照されたい)、グリシジルエーテル (例えば、Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991) を参照されたい)、オキシカルボニルイミダゾール (例えば、Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Toncelli et al. J. Controlled Release 1:251 (19

10

20

30

40

50

85)を参照されたい)、p-ニトロフェニルカーボネート(例えば、Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985)及びSartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)を参照されたい)、アルデヒド(例えば、Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)、米国特許第5,824,784号、米国特許第5,252,714号を参照されたい)、マレイミド(例えば、Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990)、Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)、及びKogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)を参照されたい)、オルトピリジルジスルフィド(例えば、Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314 (1993)を参照されたい)、アクリロール(例えば、Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)を参照されたい)、ビニルスルホン(例えば、米国特許第5,900,461号を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。上記の参照文献及び特許のすべては、参照により本明細書に組み込まれる。

【0542】

P-アジド-L-フェニルアラニンなどの非天然コード化アミノ酸を含有するTCポリペプチドのPEG化(すなわち、任意の水溶性ポリマーの付加)は、任意の便利な方法によって行われる。例えば、TCポリペプチドは、アルキン末端処理されたmPEG誘導体でPEG化される。簡単に述べると、過剰の固体mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CHを、攪拌しながら、p-アジド-L-Phe含有TCポリペプチドの水溶液に室温で添加する。典型的には、水溶液は、反応が行われるpH付近のpK_aを有する緩衝液(一般に、約pH4~10)で緩衝される。例えば、pH7.5でのPEG化に好適な緩衝液の例としては、限定されないが、HEPES、ホスフェート、ボレート、TRIS-HCl、EPPS、及びTESが挙げられる。pHは、連続的に監視され、必要に応じて調整される。反応は、典型的には、約1~48時間継続させる。

【0543】

その後、反応生成物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供して、PEG化TCポリペプチドを遊離mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH及びpeg化TCポリペプチドの任意の高分子量複合体(非ブロック化PEGが分子の両端で活性化されるときに形成され得る)から分離し、それにより、TCポリペプチド分子を架橋することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィー中の条件は、遊離mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CHがカラムを通して流れる一方で、任意の架橋されたPEG化TCポリペプチド複合体が、1つ以上のPEG基にコンジュゲートされた1つのTCポリペプチド分子を含有する所望の形態の後に溶出される。好適な条件は、架橋された複合体と所望のコンジュゲートとの相対サイズに応じて異なり、当業者によって容易に決定される。所望のコンジュゲートを含有する溶出液を、限外濾過により濃縮し、透析濾過により脱塩する。

【0544】

実質的に精製されたPEG-TCは、產生されたPEG-TCが、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC、及びキャピラリー電気泳動などの適切な方法によって決定される場合、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度レベル、具体的には少なくとも約75%、80%、85%の純度レベル、より具体的には少なくとも約90%の純度レベル、少なくとも約95%の純度レベル、少なくとも約99%以上の純度レベルを有する、上述の溶出方法を使用して製造され得る。必要に応じて、疎水性クロマトグラフィーから得られたPEG化TCポリペプチドは、親和性クロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー(DEAE SEPHAROSEの使用を含むがこれに限定されない)、シリカでのクロマトグラフィー、逆相HPLC、ゲル濾過(SEPHADEX G-75の使

10

20

30

40

50

用を含むがこれに限定されない)、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー、限外濾過／透析濾過、エタノール沈殿、硫酸アンモニウム沈殿、クロマトフォーカシング、置換クロマトグラフィー、電気泳動手順(分取等電点電気泳動を含むがこれに限定されない)、差溶解性(硫酸アンモニウム沈殿を含むがこれに限定されない)、または抽出を含むがこれらに限定されない、当業者に既知の1つ以上の手順によってさらに精製され得る。見かけの分子量は、球状タンパク質標準品(Preneta, AZ in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306)と比較することによって、GPCにより推定され得る。TC-PEGコンジュゲートの純度は、タンパク質分解(トリプシン切断を含むがこれに限定されない)、続いて質量分析により評価され得る。Peppinsky RB., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297 (3): 1059-66 (2001)。

【0545】

本発明のTCポリペプチドの標的化ポリペプチドのアミノ酸に連結された水溶性ポリマーは、さらに誘導体化または置換することができるが、これらに限定されない。

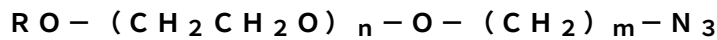
【0546】

アジド含有PEG誘導体またはTLR-リンカー誘導体

本発明の別の実施形態において、TCの標的化ポリペプチドは、非天然コード化アミノ酸の側鎖上に存在するアルキン部分と反応するアジド部分を含有するPEG誘導体で修飾される。一般に、PEG誘導体またはTLR-リンカー誘導体は、1~100 kDa、いくつかの実施形態においては10~40 kDaの範囲の平均分子量を有する。

【0547】

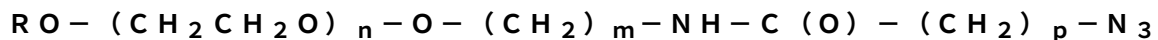
いくつかの実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、以下の構造：



を有し、式中、Rは、単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは100~1,000である(すなわち、平均分子量は5~40 kDaである)。

【0548】

別の実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、構造：



を有し、式中、Rは、単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、pは2~10であり、nは100~1,000である(すなわち、平均分子量は5~40 kDaである)。

【0549】

本発明の別の実施形態において、アルキン含有アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドは、末端アジド部分を含有する分枝状PEG誘導体で修飾され、分枝状PEGの各鎖は、10~40 kDaの範囲の分子量を有し、5~20 kDaであり得る。例えば、いくつかの実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、以下の構造：



を有し、式中、Rは、単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、pは2~10であり、nは100~1,000であり、Xは、任意に、O、N、S、またはカルボニル基(C=O)であり、各場合において、存在するか、または不在であり得る。

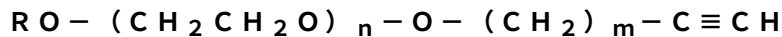
【0550】

アルキン含有PEG誘導体またはTLR-リンカー誘導体

本発明の別の実施形態において、TCの標的化ポリペプチドは、非天然コード化アミノ酸の側鎖上に存在するアジド部分と反応するアルキン部分を含有するPEG誘導体で修飾される。

【0551】

いくつかの実施形態において、アルキン末端PEG誘導体は、以下の構造：



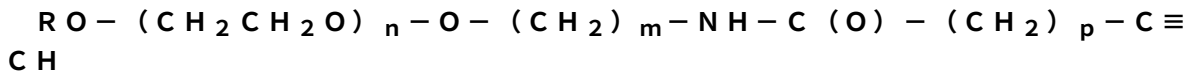
を有し、式中、Rは、単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、nは100～1,000である（すなわち、平均分子量は5～40kDaである）。

【0552】

本発明の別の実施形態において、アルキン含有非天然コード化アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドは、アミド連結によってPEG骨格に連結される末端アジドまたは末端アルキン部分を含有するPEG誘導体で修飾される。

【0553】

いくつかの実施形態において、アルキン末端PEG誘導体は、以下の構造：



を有し、式中、Rは、単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、pは2～10であり、nは100～1,000である。

【0554】

本発明の別の実施形態において、アジド含有アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドは、末端アルキン部分を含有する分枝状PEG誘導体で修飾され、分枝状PEGの各鎖は、10～40kDaの範囲の分子量を有し、5～20kDaであり得る。例えば、いくつかの実施形態において、アルキン末端PEG誘導体は、以下の構造：



を有し、式中、Rは、単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、pは2～10であり、nは100～1,000であり、Xは、任意に、O、N、S、もしくはカルボニル基（C=O）であるか、または存在しない。

【0555】

ホスフィン含有PEG誘導体またはTLRリンカー誘導体

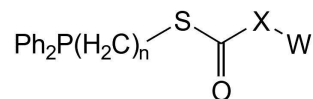
本発明の別の実施形態において、TCの標的化ポリペプチドは、非天然コード化アミノ酸の側鎖上に存在するアジド部分と反応するアリアルホスフィン基をさらに含む活性化官能基（エステル、カーボネートを含むがこれらに限定されない）を含有するPEG誘導体で修飾される。一般に、PEG誘導体またはTLRリンカー誘導体は、1～100kDa、いくつかの実施形態においては10～40kDaの範囲の平均分子量を有する。

【0556】

いくつかの実施形態において、PEG誘導体は、構造：

【0557】

【化54】



【0558】

を有し、式中、nは、1～10であり、Xは、O、N、Sであるか、または存在しなくてもよく、Phはフェニルであり、Wは、水溶性ポリマーである。

【0559】

いくつかの実施形態において、PEG誘導体は、構造：

【0560】

10

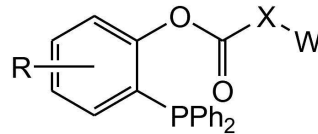
20

30

40

50

【化 5 5】



【0 5 6 1】

を有し、式中、Xは、O、N、Sであるか、または存在しなくもよく、Phはフェニルであり、Wは水溶性ポリマーであり、Rは、H、アルキル、アリール、置換アルキル、及び置換アリール基であり得る。例示的なR基としては、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}(\text{O})$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ 、及び $-\text{N}(\text{O})$ が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、及びR'''はそれぞれ独立して、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール（1～3個のハロゲンで置換されたアリールを含むがこれに限定されない）、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシ、もしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が例えば2つ以上のR基を含む場合、R基の各々は、これらの基のうちの2つ以上が存在する場合、それぞれのR'、R''、R'''、及びR''''基と同様に独立して選択される。R'及びR''が同じ窒素原子に結合されるとき、それらは、窒素原子と組み合わせられて、5、6、または7員環を形成することができる。例えば、 $-\text{NR}'\text{R}''$ は、限定されないが、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことを意図する。置換基の上記の考察から、当業者は、「アルキル」という用語が、水素基以外の基、例えば、ハロアルキル（ $-\text{CF}_3$ 及び $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ を含むがこれらに限定されない）及びアシル（ $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ などを含むが、これらに限定されない）に結合した炭素原子を含む基を含むことを意味することを理解するであろう。

【0 5 6 2】

他のPEG誘導体またはTLR-リンカー誘導体及び一般的なコンジュゲーション技法TCポリペプチドに連結され得る他の例示的なPEG分子、ならびにPEG化方法には、例えば、米国特許公開第2004/0001838号、同第2002/0052009号、同第2003/0162949号、同第2004/0013637号、同第2003/0228274号、同第2003/0220447号、同第2003/0158333号、同第2003/0143596号、同第2003/0114647号、同第2003/0105275号、同第2003/0105224号、同第2003/0023023号、同第2002/0156047号、同第2002/0099133号、同第2002/0086939号、同第2002/0082345号、同第2002/0072573号、同第2002/0052430号、同第2002/0040076号、同第2002/0037949号、同第2002/0002250号、同第2001/0056171号、同第2001/0044526号、同第2001/0021763号、米国特許第6,646,110号、同第5,824,778号、同第5,476,653号、同第5,219,564号、同第5,629,384号、同第5,736,625号、同第4,902,502号、同第5,281,698号、同第5,122,614号、同第5,473,034号、同第5,516,673号、同第5,382,657号、同第6,552,167号、同第6,610,281号、同第6,515,100号、同第6,461,603号、同第6,436,386号、同第6,214,966号、同第5,990,237号、同第5,900,461号、同第5,739,208号、同第5,672,662号、同第5,446,090号、同第5,808,096号、同第5,612,460号、同第5,324,844号、同第5,252,714号、同第6,420,339号、同第6,201,072号、同第6,451,346号、同第6,306,821号、同第5,559,213号、同第5,747,646号、同第5,834,594号、同第5,849,860号、同第5,980,948号、同第6,004,573号、同第6,129,912号、WO97/32607、EP229,108、EP402,37

8、WO92/16555、WO94/04193、WO94/14758、WO94/17039、WO94/18247、WO94/28024、WO95/00162、WO95/11924、WO95/13090、WO95/33490、WO96/00080、WO97/18832、WO98/41562、WO98/48837、WO99/32134、WO99/32139、WO99/32140、WO96/40791、WO98/32466、WO95/06058、EP439 508、WO97/03106、WO96/21469、WO95/13312、EP921 131、WO98/05363、EP809 996、WO96/41813、WO96/07670、EP605 963、EP510 356、EP400 472、EP183 503、及びEP154 316（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載のPEG分子のいずれかは、単鎖、分枝鎖、多アーム鎖、単一官能性、二官能性、多官能性、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない任意の形態で使用され得る。

【0563】

ヒドロキシルアミン（アミノオキシ）PEG誘導体またはTLRリンカー誘導体を含むがこれらに限定されない、追加のポリマー及びPEG誘導体またはTLRリンカー誘導体は、参照によりその全体が本明細書にすべて組み込まれる以下の特許出願に記載される：米国特許公開第2006/0194256号、米国特許公開第2006/0217532号、米国特許公開第2006/0217289号、米国仮特許第60/755,338号、米国仮特許第60/755,711号、米国仮特許第60/755,018号、国際特許出願第PCT/US06/49397号、WO2006/069246、米国仮特許第60/743,041号、米国仮特許第60/743,040号、国際特許出願第PCT/US06/47822号、米国仮特許第60/882,819号、米国仮特許第60/882,500号、及び米国仮特許第60/870,594。

【0564】

TCポリペプチドのグリコシル化

グリコシル化は、TCポリペプチドなどのポリペプチドの物理的特性（例えば、溶解性）に劇的に影響を与えることができ、タンパク質の安定性、分泌、及び細胞内局在化においても重要であり得る。グリコシル化ポリペプチドはまた、増強された安定性を示すことができるか、または半減期などの1つ以上の薬物動態学的特性を改善することができる。加えて、溶解性の改善は、例えば、非グリコシル化ポリペプチドを含む製剤よりも医薬投与に好適な製剤の生成を可能にすることができる。

【0565】

本発明は、糖残基を担持する1つ以上の非天然コード化アミノ酸を組み込んだTCポリペプチドを含む。糖残基は、天然（N-アセチルグルコサミンを含むがこれに限定されない）または非天然（3-フルオロガラクトースを含むがこれに限定されない）のいずれかであり得る。糖類は、N-またはO連結グリコシド連結（N-アセチルガラクトース-ル-セリンを含むがこれに限定されない）または非天然連結（オキシムまたは対応するC-もしくはS連結グリコシドを含むがこれらに限定されない）のいずれかによって非天然コード化アミノ酸に連結され得る。

【0566】

糖（グリコシルを含むがこれに限定されない）部分は、インビボまたはインビトロのいずれかでTCポリペプチドに付加され得る。本発明のいくつかの実施形態において、カルボニル含有非天然コード化アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドを、アミノオキシ基で誘導体化された糖で修飾して、オキシム連結を介して連結された対応するグリコシル化ポリペプチドを生成する。非天然にコード化アミノ酸に結合すると、糖は、グリコシルトランスフェラーゼ及び他の酵素で処理することによってさらに緻密化されて、TCポリペプチドに結合したオリゴ糖を生成することができる。例えば、H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)を参照されたい。

【0567】

本発明のいくつかの実施形態において、カルボニル含有非天然コード化アミノ酸を含むTCポリペプチドは、アミオキシ誘導体として調製される定義された構造を有するグリカンで直接修飾される。当業者であれば、アジド、アルキン、ヒドラジド、ヒドラジン、及びセミカルバジドを含む他の官能基を使用して、糖を非天然コード化アミノ酸に連結することができることを認識するであろう。

【0568】

本発明のいくつかの実施形態において、アジドまたはアルキニル含有非天然コード化アミノ酸を含むTCの標的化ポリペプチドは、次いで、それぞれアルキニルまたはアジド誘導体を含むがこれらに限定されないものとのヒュスゲン〔3+2〕環状付加反応を含むが、これに限定されないものによって修飾され得る。この方法は、タンパク質を極めて高い選択性で修飾することを可能にする。

【0569】

TC二量体及び多量体

本発明はまた、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体、またはヘテロ多量体（すなわち、三量体、四量体など）などのTC及びTC類似体の組み合わせを提供し、ここで、1つ以上の非天然コード化アミノ酸を含有するTCは、ポリペプチド骨格に直接またはリンカーを介してのいずれかで、別のTCまたはTCではない任意の他のポリペプチドに結合される。モノマーと比較して分子量が増加しているため、TC二量体または多量体コンジュゲートは、モノマーTCと比較して異なる薬理学的、薬物動態学的、薬力学的、調節された治療半減期、または調節された血漿半減期を含むが、これらに限定されない新しいまたは望ましい特性を示し得る。いくつかの実施形態において、本発明のTC二量体は、TC受容体のシグナル伝達を調節する。他の実施形態において、本発明のTC二量体または多量体は、TC受容体アンタゴニスト、アゴニスト、または調節因子として作用する。

【0570】

いくつかの実施形態において、TC含有二量体または多量体に存在するTC分子のうちの1つ以上は、水溶性ポリマーに連結された非天然コード化アミノ酸を含む。

【0571】

いくつかの実施形態において、TCポリペプチドは、Asn-Lysアミド連結またはCys-Cysジスルフィド連結を含むが、これらに限定されないものを介して直接連結される。いくつかの実施形態において、TCポリペプチド及び／または連結された非TC分子は、第1のTCポリペプチドの1つの非天然コード化アミノ酸中のアルキン、及び第2の分子の第2の非天然コード化アミノ酸中のアジドが、ヒュスゲン〔3+2〕環化付加を介してコンジュゲートされることを含むがこれに限定されない、二量体化を容易にするための、異なる非天然コード化アミノ酸を含む。あるいは、ケトン含有非天然コード化アミノ酸を含むTC及び／または連結された非TC分子を、ヒドロキシルアミン含有非天然コード化アミノ酸を含む第2のポリペプチドにコンジュゲートすることができ、ポリペプチドを、対応するオキシムの形成を介して反応させる。

【0572】

あるいは、2つのTCポリペプチド及び／または連結された非ペプチドTC分子は、リンカーを介して連結される。任意のヘテロまたはホモ二官能性リンカーを使用して、同じまたは異なる一次配列を有することができる2つの分子及び／または連結された非ペプチドTC分子を連結することができる。場合によっては、TCをつなぐために使用されるリンカー及び／または連結された非ペプチドTC分子は一緒に、二官能性PEG試薬であってもよい。リンカーは、広範囲の分子量または分子長を有し得る。TCと連結された実体との間、またはTCとその受容体、または連結された実体とその結合パートナー（もしあれば）との間の所望の空間的關係または立体配座を提供するために、より大きいまたはより小さい分子量のリンカーが使用され得る。また、TCと連結された実体との間、または連結された実体とその結合パートナー（もしあれば）との間に所望の空間または柔軟性を提供するために、より長いまたはより短い分子長を有するリンカーが使用され得る。

【0573】

いくつかの実施形態において、本発明は、a) ポリマー骨格の少なくとも第1の末端上にアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはカルボニル含有部分、及びb) ポリマー骨格の第2の末端上に少なくとも第2の官能基を含む、ダンベル構造を有する水溶性二官能性リンカーを提供する。第2の官能基は、第1の官能基と同じであっても異なってもよい。いくつかの実施形態において、第2の官能基は、第1の官能基と反応性ではない。本発明は、いくつかの実施形態において、分枝状分子構造の少なくとも1つのアームを含む水溶性化合物を提供する。例えば、分枝状分子構造は、樹状であり得る。

【0574】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下の構造：

$R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$ (式中、 n は約5～3,000であり、 m は2～10であり、 X は、アジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、アミノオキシ基、ヒドロキシルアミン、アセチル、またはカルボニル含有部分であり得、 R は、キャッピング基、官能基、または X と同じであっても異なってもよい脱離基であり得る) を有する水溶性の活性化ポリマーとの反応により形成される、1つ以上のTCポリペプチドを含む多量体を提供する。 R は、例えば、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アルコキシル、 N -ヒドロキシスクシンイミジルエステル、1-ベンゾトリアゾリルエステル、 N -ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、1-ベンゾトリアゾリルカーボネート、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性スルホン、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、ヒドラジド、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボン酸、保護されたカルボン酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセタミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレート、及びトレシレート、アルケン、ならびにケトンからなる群から選択される官能基であり得る。

【0575】

HER2標的に対するTCポリペプチド活性及びTCポリペプチドの親和性の測定

TCポリペプチド活性は、標準的なまたは既知のインビトロまたはインビボアッセイを使用して決定することができる。TCは、当該技術分野で既知の好適な方法によって生物学的活性について分析され得る。そのようなアッセイには、TC応答性遺伝子の活性化、受容体結合アッセイ、抗ウイルス活性アッセイ、細胞障害効果阻害アッセイ、抗増殖アッセイ、免疫調節アッセイ、及びMHC分子の誘導を監視するアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【0576】

TCポリペプチドは、TC感受性シグナル伝達経路を活性化する能力について分析され得る。一例は、インターフェロン刺激応答要素(ISRE)アッセイである。TC受容体を構成的に発現する細胞を、ISRE-ルシフェラーゼベクター(pISRE-luc、Clontech)で一過性にトランスフェクトする。トランスフェクション後、細胞をTCの標的化ポリペプチドで処理する。例えば、0.0001～10ng/mLのいくつかのタンパク質濃度を試験し、用量応答曲線を生成する。TCポリペプチドがTC受容体に結合してそれを活性化する場合、得られるシグナル伝達カスケードは、ルシフェラーゼ発現を誘導する。発光は、例えば、TopCount(商標)またはFusion(商標)マイクロプレートリーダー及びSteady-Glo(登録商標)Luciferase Assay System(Promega)を使用することによって、いくつかの方法で測定することができる。

【0577】

TCポリペプチドは、TC受容体に結合するそれらの能力について分析され得る。非天然アミノ酸を含む非PEG化またはPEG化TCポリペプチドに関して、TCのその受容体に対する親和性は、BIAcore(商標)バイオセンサー(Pharmacia)を使用することによって測定することができる。好適な結合アッセイとしては、限定されな

いが、B I A c o r e アッセイ (P e a r c e e t a l . , B i o c h e m i s t r y 3 8 : 8 1 - 8 9 (1 9 9 9)) 及び A l p h a S c r e e n (商 標) アッセイ (P e r k i n E l m e r) が挙げられる。

【 0 5 7 8 】

どの方法を使用して T C ポリペプチドを作製するかにかかわらず、T C ポリペプチドは、生物学的活性についてのアッセイに供される。一般に、生物学的活性の試験は、生物学的活性の増加もしくは減少（修飾された T C と比較したとき）、異なる生物学的活性（修飾された T C と比較したとき）、受容体もしくは結合パートナー親和性分析、T C 自体もしくはその受容体の立体配座もしくは構造変化（修飾された T C と比較したとき）、または血清半減期分析などの所望の結果に対する分析を提供するべきである。

10

【 0 5 7 9 】

効力、機能的インビボ半減期、及び薬物動態パラメータの測定

本発明の重要な態様は、水溶性ポリマー部分へのポリペプチドのコンジュゲーションの有無にかかわらず、T C の構築によって得られる生物学的半減期の延長である。投与後の T C 血清濃度の減少率により、コンジュゲートされた及びコンジュゲートされていない T C ポリペプチドならびにそのバリエーションによる治療に対する生物学的応答を評価することが重要となり得る。本発明のコンジュゲートされた及びコンジュゲートされていない T C ポリペプチドならびにそのバリエーションは、例えば、皮下または i . v . 投与による投与後にも血清半減期が延長し得、それにより、例えば、E L I S A 方法または一次スクリーニングアッセイにより測定が可能となる。I n v i t r o g e n (C a r l s b a d , C A) などの商業的供給源からの E L I S A または R I A キットを使用してもよい。インビボの生物学的半減期の測定は、本明細書に記載されるように行われる。

20

【 0 5 8 0 】

非天然コード化アミノ酸を含む T C の標的化ポリペプチドの効力及び機能的インビボ半減期は、当業者に既知のプロトコルにより決定され得る。

【 0 5 8 1 】

非天然コード化アミノ酸を含む T C ポリペプチドの薬物動態パラメータは、正常なスプラグドローラットの雄（治療群当たり N = 5 匹の動物）において評価することができる。動物は、2 5 u g / ラット i v または 5 0 u g / ラット s c のいずれかの単回用量を受け、約 5 ~ 7 の血液試料が、所定の時間経過に従って採取され、一般に、水溶性ポリマーにコンジュゲートされていない非天然コード化アミノ酸を含む T C ポリペプチドでは約 6 時間、そして非天然コード化アミノ酸を含み、水溶性ポリマーにコンジュゲートされた T C ポリペプチドでは約 4 日かかる。非天然コード化アミノ酸を含まない T C の薬物動態データは、非天然コード化アミノ酸を含む T C ポリペプチドについて得られたデータと直接比較することができる。

30

【 0 5 8 2 】

投与及び医薬組成物

本発明のポリペプチドまたはタンパク質（T C、合成酵素、1 つ以上の非天然アミノ酸を含むタンパク質などを含むがこれらに限定されない）は、任意に、限定されないが、好適な医薬担体と組み合わせることを含む治療用途に用いられる。そのような組成物は、例えば、治療有効量の化合物、及び医薬的に許容される担体または賦形剤を含む。そのような担体または賦形剤としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及び／またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。製剤は、投与様式に合うように作製される。一般に、タンパク質を投与する方法は当業者に既知であり、本発明のポリペプチドの投与に適用することができる。組成物は、酸及び塩基付加塩の両方を含むことを意図する、医薬的に許容される塩として存在するなど、水溶性形態であってもよい。

40

【 0 5 8 3 】

本発明の 1 つ以上のポリペプチドを含む治療用組成物は、任意に、当業者に既知の方法により、有効性、組織代謝を確認し、投薬量を推定するために、疾患の 1 つ以上の適切な

50

インビトロ及び／またはインビボ動物モデルにおいて試験される。特に、投薬量は、天然アミノ酸相同体に対する本明細書における非天然アミノ酸の活性、安定性、または他の好適な尺度（1つ以上の非天然アミノ酸を含むように修飾されたTCの標的化ポリペプチドと天然アミノ酸TCポリペプチドとの比較、及び1つ以上の非天然アミノ酸を含むように修飾されたTCの標的化ポリペプチドと現在利用可能なTC治療との比較を含むが、これらに限定されない）によって、すなわち、関連するアッセイにおいて、最初に決定することができる。

【0584】

投与は、血液または組織細胞との最終接触へと分子を導入するために通常使用される経路のいずれかによる。本発明の非天然アミノ酸ポリペプチドは、任意に、1つ以上の医薬的に許容される担体と共に、任意の好適な方法で投与される。本発明の文脈におけるそのようなポリペプチドを患者に投与する好適な方法が利用可能であり、2つ以上の経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、特定の経路は別の経路よりもより即時的かつより有効な作用または反応を提供し得る場合が多い。

【0585】

医薬的に許容される担体は、部分的には、投与される特定の組成物、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の医薬組成物の好適な製剤は多種多様である。

【0586】

本発明のTCポリペプチドは、非経口、例えば、皮下もしくは静脈内、または任意の他の形態の注射もしくは注入を含むがこれらに限定されない、注射を含むがこれに限定されない、タンパク質またはペプチドに好適な任意の従来の経路によって投与され得る。ポリペプチド組成物は、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、経皮、皮下、局所、舌下、または直腸手段が挙げられるがこれらに限定されない、いくつかの経路によって投与することができる。修飾または未修飾の非天然アミノ酸ポリペプチドを含む組成物は、リボソームを介して投与することもできる。そのような投与経路及び適切な製剤は、一般に、当業者に既知である。TCポリペプチドは、単独で、または薬学的担体などの他の好適な構成要素と組み合わせて使用され得る。TCポリペプチドは、他の薬剤または治療薬と組み合わせて使用され得る。

【0587】

単独でまたは他の好適な構成要素と組み合わせて、非天然アミノ酸を含むTCポリペプチドを、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にすることもできる（すなわち、それらを「噴霧する」ことができる）。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容される推進剤中に配置することができる。

【0588】

例えば、関節内（関節内（joints））、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、及び皮下経路などによる非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び保存剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。TCの製剤は、単位用量または複数回用量の密封容器、例えば、アンプル及びバイアルで提示することができる。

【0589】

非経口投与及び静脈内投与が好ましい投与方法である。特に、天然アミノ酸相同体治療薬（EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFN、例えば、TC、インターロイキン、抗体、FGF、及び／または任意の他の医薬的に送達されるタンパク質に典型的に使用されるものを含むがこれらに限定されない）に既に使用されている投与経路は、現在使用中の製剤と共に、本発明のポリペプチドのための好ましい投与経路及び製剤を提供する。

【0590】

本発明の文脈において、患者に投与される用量は、適用に応じて、経時的に患者における有益な治療応答、または他の適切な活性を有するのに十分である。用量は、特定のペク

10

20

30

40

50

ター、または製剤の有効性、及び用いられる非天然アミノ酸ポリペプチドの活性、安定性、または血清半減期、及び患者の状態、ならびに治療される患者の体重または表面積によって決定される。用量のサイズは、特定の患者における特定のベクター、製剤などの投与に伴う任意の有害な副作用の存在、性質、及び程度によっても決定される。

【0591】

疾患（好中球減少症、再生不良性貧血、周期性好中球減少症、特発性好中球減少症、Chd i a k-H i g a s h i 症候群、全身性エリテマトーデス（S L E）、白血病、骨髓異形成症候群、及び骨髓線維症などを含むがこれらに限定されない）の治療または予防に投与されるベクターまたは製剤の有効量を決定する際に、医師は循環血漿レベル、製剤毒性、及び疾患進行を評価する。

10

【0592】

例えば、70キログラムの患者に投与される用量は、典型的には、関連する組成物の変更された活性または血清半減期について調整された、現在使用されている治療用タンパク質の投薬量に相当する範囲内である。本発明のベクターまたは医薬製剤は、抗体投与、ワクチン投与、細胞傷害性薬剤、天然アミノ酸ポリペプチド、核酸、ヌクレオチド類似体、生物学的応答修飾剤などの投与を含む、任意の既知の従来の療法によって治療条件を補完することができる。

【0593】

投与に関して、本発明の製剤は、患者の体重及び全体的な健康に適用される場合を含むが、これらに限定されない、関連する製剤のLD-50またはED-50により、及び／または様々な濃度での非天然アミノ酸ポリペプチドの任意の副作用の観察により決定される速度で投与さる。投与は、単回用量または分割用量によって達成され得る。

20

【0594】

製剤の注入を受ける患者が、発熱、悪寒、または筋肉痛を発症する場合、患者は、適切な用量のアスピリン、イブプロフェン、アセトアミノフェン、または他の疼痛／熱制御薬を受ける。発熱、筋肉痛、及び悪寒などの、注入に対する反応を経験する患者は、後の注入の30分前に、アスピリン、アセトアミノフェン、またはジフェンヒドラミンを含むがこれらに限定されないもののいずれかを前投薬される。メペリジンは、解熱剤及び抗ヒスタミン剤にすぐに応答しないより重度の悪寒及び筋肉痛に使用される。細胞注入は、反応の重症度に応じて遅くされるか、または中止される。

30

【0595】

本発明のTCの標的化ポリペプチドのヒト形態は、哺乳類対象に直接投与することができる。投与は、TCポリペプチドを対象に導入するために通常使用される経路のいずれかによる。本発明の実施形態によるTCポリペプチド組成物は、経口、直腸、局所、吸入（エアロゾルを介することを含むが、これに限定されない）、頬（舌下を含むが、これに限定されない）、膣、非経口（皮下、筋肉内、皮内、関節内、胸膜内、腹腔内、脳内、動脈内、または静脈内を含むが、これらに限定されない）、局所（すなわち、気道表面を含む皮膚及び粘膜表面の両方）、肺、眼内、鼻腔内、及び経皮投与に好適なものを含むが、いずれの場合においても、最も好適な経路は、治療される状態の性質及び重症度に依存する。投与は、局所または全身のいずれかであり得る。化合物の製剤は、単位用量または複数回用量の密封容器、例えば、アンプル及びバイアルにおいて提示することができる。本発明のTCポリペプチドは、医薬的に許容される担体と共に、単位投薬量の注射可能な形態（溶液、懸濁液、またはエマルジョンを含むがこれらに限定されない）で混合物中で調製することができる。本発明のTCポリペプチドはまた、連続注入（浸透圧ポンプなどのミニポンプを使用することを含むが、これに限定されない）、単回ボールス、または徐放性デポー製剤により投与することもできる。

40

【0596】

投与に好適な製剤としては、水性及び非水性溶液、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を等張にする溶質を含有することができる等張滅菌液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び保存剤を含むことができる水性及び非水性滅菌懸濁液が挙げられる。

50

溶液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製され得る。

【0597】

凍結乾燥は、関心のタンパク質調製物から水を除去する役割を果たすタンパク質を提示するために一般的に用いられる技法である。凍結乾燥 (Freeze-drying)、または凍結乾燥 (lyophilization) は、乾燥される材料が最初に凍結され、次いで真空環境での昇華によって氷または凍結溶媒が除去されるプロセスである。賦形剤は、凍結乾燥プロセス中の安定性を増強させる、及び／または保管時の凍結乾燥生成物の安定性を改善するために、凍結乾燥前の製剤に含まれ得る。Pikal, M. Biopharm. 3 (9) 26-30 (1990) 及び Arakawa et al. Pharm. Res. 8 (3): 285-291 (1991)。

10

【0598】

医薬品の噴霧乾燥も、当業者に既知である。例えば、Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11&12), 1169-1206 (1992) を参照されたい。小分子医薬品に加えて、様々な生物学的材料が噴霧乾燥されており、これらには、酵素、血清、血漿、微生物、及び酵母が含まれる。噴霧乾燥は、一段階プロセスで液体医薬調製物を微細、無塵、または凝集粉末に変換することができるため、有用な技法である。基本的な技法は、以下の4つのステップを含む：a) 供給溶液の噴霧への微粒化、b) 噴霧-空気接触、c) 噴霧乾燥、及び d) 乾燥空気からの乾燥生成物の分離。米国特許第6,235,710号及び同第6,001,800号（参照により本明細書に組み込まれる）は、噴霧乾燥による組換えエリスロポエチンの調製を記載している。

20

【0599】

本発明の医薬組成物及び製剤は、医薬的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤を含み得る。医薬的に許容される担体は、部分的には、投与される特定の組成物、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の医薬組成物（任意の医薬的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む）の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985）を参照されたい）。

【0600】

好適な担体としては、コハク酸、リン酸、ホウ酸、HEPES、クエン酸、ヒスチジン、イミダゾール、酢酸、重炭酸、及び他の有機酸を含有する緩衝剤；アスコルビン酸を含むが、これに限定されない抗酸化剤；約10残基未満のものを含むが、これらに限定されない低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンを含むが、これらに限定されないタンパク質；ポリビニルピロリドンを含むが、これに限定されない親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、ヒスチジンもしくはヒスチジン誘導体、メチオニン、グルタメート、またはリシンを含むが、これらに限定されないアミノ酸；トレハロース、スクロース、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含むが、これらに限定されない、単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA及びエデト酸二ナトリウムを含むがこれらに限定されないキレート剤；亜鉛、コバルト、もしくは銅を含むがこれらに限定されない二価の金属イオン；マンニトールもしくはソルビトールを含むがこれらに限定されない糖アルコール；ナトリウム及び塩化ナトリウムを含むがこれらに限定されない塩形成対イオン；微結晶セルロース、ラクトース、トウモロコシ、及び他のデンプンなどの充填剤；結合剤；甘味料及び他の香味剤；着色剤；及び／またはTween（商標）（Tween 80（ポリソルベート80）及びTween 20（ポリソルベート20）を含むが、これらに限定されない）、Pluronic（商標）及び他のプルロニック酸（プルロニック酸F68（ポロキサマー188））を含むが、これに限定されない）非イオン性界面活性剤、またはPEGが挙げられるが、これらに限定されない。好適な界面活性剤としては、例えば、ポリ（エチレンオキシド）-ポリ（プロピレンオキシド）-ポリ（エチレンオキシド）、すなわち、（PEO-PPO-

30

40

50

PEO)、またはポリ(プロピレンオキシド)ーポリ(エチレンオキシド)ーポリ(プロピレンオキシド)、すなわち、(PPO-PEO-PPO)、またはそれらの組み合わせに基づくポリエーテルが挙げられるが、これらに限定されない。PEO-PPO-PEO及びPPO-PEO-PPOは、Pluronic(商標)、R-Pluronic(商標)、Tetronics(商標)、及びR-Tetronics(商標)(BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.)の商品名で市販されており、米国特許第4,820,352号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)にさらに記載されている。他のエチレン/ポリプロピレンブロックポリマーは、好適な界面活性剤であり得る。界面活性剤または界面活性剤の組み合わせを使用して、限定されないが、攪拌から生じる応力を含む1つ以上の応力に対してPEG化TCを安定化することができる。上記のうちのいくつかは、「増量剤」と称され得る。いくつかは、「等張修飾剤」とも称され得る。抗菌保存剤は、製品の安定性及び抗菌効果のために適用されてもよく、好適な保存剤としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、メタクレゾール、メチル/プロピルパラベン、クレゾール、及びフェノール、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第7,144,574号(参照により本明細書に組み込まれる)は、本発明の医薬組成物及び製剤、ならびに他の送達調製物に好適であり得る追加の材料を記載している。

【0601】

PEGなどの水溶性ポリマーに連結されたものを含む本発明のTCポリペプチドは、徐放系によって、またはその一部として投与することもできる。持続放出組成物としては、フィルムまたはマイクロカプセルを含むが、これらに限定されない成形品の形態の半透過性ポリマーマトリックスを含むが、これに限定されないものが挙げられる。持続放出マトリックスとしては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:267-277(1981)、Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))、エチレン酢酸ビニル(Langerら、上記)、またはポリ-D-(-)ー3-ヒドロキシ酪酸(EP133,988)、ポリラクチド(ポリ乳酸)(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、ポリグリコリド(グリコール酸のポリマー)、ポリラクチドコグリコリド(乳酸とグリコール酸とのコポリマー)ポリ無水物、L-グルタミン酸とガンマーエチル-L-グルタメートとのコポリマー(Sidman et al., Biopolymers, 22, 547-556(1983))、ポリ(オルト)エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸塩、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖類、核酸、ポリアミノ酸、アミノ酸、例えば、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドン、及びシリコーンなどの生体適合性材料からのものが挙げられる。持続放出組成物には、リポソーム捕捉された化合物も含まれる。化合物を含有するリポソームは、それ自体が知られている方法によって調製される:DE3,218,121、Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:3688-3692(1985)、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77:4030-4034(1980)、EP52,322、EP36,676、米国特許第4,619,794号、EP143,949、米国特許第5,021,234号、日本特許出願第83-118008号、米国特許第4,485,045号及び同第4,544,545号、ならびにEP102,324。引用されるすべての参考文献及び特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0602】

リポソーム捕捉されたTCポリペプチドは、例えば、DE3,218,121、Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:3688-3692(1985)、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77:4030-4034(1980)、EP52,322、EP36,676、米国特許第4,619,794号、EP143,949、米国

10

20

30

40

50

特許第5,021,234号、日本特許出願第83-118008号、米国特許第4,485,045号及び同第4,544,545号、ならびにEP102,324に記載される方法によって調製され得る。リポソームの組成物及びサイズは、周知であるか、または当業者が経験的に容易に決定することが可能である。リポソームのいくつかの例は、例えば、Park JW, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331 (1995)、Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998)、Drummond DC, et al., Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002)、Park JW, et al., Clin. Cancer Res. 8:1172-1181 (2002)、Nielsen UB, et al., Biochim. Biophys. Acta 1591 (1-3):109-118 (2002)、Mamot C, et al., Cancer Res. 63:3154-3161 (2003)に記載される通りである。引用されるすべての参考文献及び特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0603】

本発明の文脈において、患者に投与される用量は、経時的に対象において有益な応答を引き起こすのに十分でなければならない。一般に、用量当たり非経口投与される本発明のTCポリペプチドの医薬有効量の合計は、患者の体重の約 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、または約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $1\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であるが、これは治療的裁量に依存する。本実施形態の特定の態様において、コンジュゲートは、1日当たり $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 超～1日当たり約 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲の用量で投与され得る。また他の態様において、コンジュゲートは、1日当たり $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 超～1日当たり約 $9\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲の用量で投与され得る。さらに他の態様において、コンジュゲートは、1日当たり約 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ ～1日当たり約 $12.5\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲の用量で投与され得る。特定の態様において、コンジュゲートは、過度の毒性を伴わずに忍容される最大用量である用量以下で投与され得る。さらに、コンジュゲートは、週に少なくとも2回投与され得るか、またはコンジュゲートは、週に少なくとも3回、週に少なくとも4回、週に少なくとも5回、週に少なくとも6回、または週に7回投与され得る。特定の態様において、コンジュゲートを2回以上投与する場合、コンジュゲートは、毎回1日当たり $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 超の用量で投与され得る。特に、コンジュゲートは、2週間以上の期間にわたって投与され得る。ある特定の態様において、インターロイキン-10受容体発現細胞の成長は、参照試料、すなわち、本発明のコンジュゲートと接触していない細胞の試料と比較して、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%阻害され得る。本実施形態の特定の態様において、コンジュゲートは、1日当たり約 $5.3\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、または1日当たり約 $7.1\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、または1日当たり約 $9.4\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、または1日当たり約 $12.5\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与され得る。投与頻度も治療的裁量に依存し、ヒトでの使用が承認されている市販のTCポリペプチド製品よりも頻度が高い、または頻度が低い場合がある。一般に、本発明のTC、PEG化TCポリペプチド、コンジュゲートされたTCポリペプチド、またはPEG化されたコンジュゲートされたTCポリペプチドの標的化ポリペプチドは、上述の投与経路のいずれかによって投与することができる。

【0604】

本発明のTCの治療用途

本発明のTCは、広範囲の障害の治療に有用である。本発明はまた、TC、CD8+T細胞刺激、及び／またはTC製剤に応答するがんのリスクがあるか、それを有するか、及び／またはそれを有している哺乳動物を治療する方法を含む。TCの投与は、短期的な効果、すなわち、観察されたいくつかの臨床パラメータに対する即時の有益な効果をもたら

し得、これは、投与から12時間または24時間であり得る一方で、長期的な効果、腫瘍成長の進行の有益な遅延、腫瘍サイズの低減、及び／または循環CD8+T細胞レベルの増加ももたらし得、本発明のTCは、当業者に既知の任意の手段によって投与され得、所望の薬理学的効果を得るのに十分な投薬量で、注入を介して、例えば、動脈、腹腔内もしくは静脈内注射、及び／または注入により有益に投与され得る。

【0605】

TC投薬量は、1回の治療につき、kg体重当たり10～200mg、または40～80mgのTCポリペプチドの範囲であり得る。例えば、投与されるTCの投薬量は、ボラス注射として、及び／または臨床的に必要な期間、例えば、数分～数時間、例えば、最大24時間の範囲の期間にわたって注入として与えられるkg体重当たり約20～100mgのTCポリペプチドであり得る。必要に応じて、TC投与は、1回または数回繰り返され得る。TCの投与は、化学療法剤などの他の医薬品の投与と組み合わせられ得る。さらに、本発明は、がんの予防及び／または治療のための方法であって、それを必要とする対象に有効量のTCを投与することを含む方法に関する。

【0606】

TCの平均量は異なり、特に資格のある医師の推奨及び処方に基づいている必要がある。TCの正確な量は、治療される状態の正確な種類、治療される患者の状態、ならびに組成物中の他の成分などの要因に依存する優先事項の問題である。本発明はまた、治療有効量の別の活性剤の投与も提供する。与えられる量は、TCによる療法に基づいて、当業者によって容易に決定され得る。

【0607】

〔実施例〕

以下の実施例は、特許請求される発明を例示するが、限定するものではない。

【0608】

実施例1：TLRアゴニストの合成のための一般的な方法論

本実施例は、本発明のTLRアゴニストの合成において使用される一般的な方法論を提供する。

【0609】

すべての市販の無水溶媒はさらに精製することなく使用し、窒素雰囲気下で保管した。UV光及び／または可視化のためのKMnO₄水溶液による染色を使用して、Merckシリカゲル60 F254プレート上でTLCを実施した。実験手順で詳述した条件を使用して、Teledyne ISCOからのCombi Flash Rfでクロマトグラフィー精製を実施した。Phenomenex Gemini-NX C18 5µm 50×4.6mmカラムを使用して、Shimadzuシステムで分析HPLCを実施し、カラムは、0.05% TFAを含有する水中のアセトニトリルの線形勾配で1ml/分で溶出した。（移動相A：水中0.05%トリフルオロ酢酸；移動相B：90%アセトニトリル（ACN）水溶液中0.05%トリフルオロ酢酸）またはWaters BEH 1.7µm v2.1×50mmカラム。分析方法1：1分で0%B、11分で0～50%B、0.5分で50～100%B、1.5分間100%B、1分で100～0%B、2分間0%B；方法2：1分で10～20%B、11分で20～70%B、0.5分で70～100%B、1.5分間100%B、1分で100～10%B、2分間10%B；方法3：方法2：1分で0～40%B、11分で40～90%B、0.5分で90～100%B、1.5分間100%B、1分で100～10%B、2分間10%B；方法4：0.3分で5%B、0.3～1.5分間5～100%B、1.5分～1.8分間100%B、0分～1.8分間0.8ml/分～1.1ml/分の流量。

【0610】

スケールに応じて、Gemini-NX C18 5µm 100×30mm、150×30mm、または250×50mmのカラムを使用して、Shimadzuシステムで分取HPLCを実施した。質量スペクトル（MS）を、Shimadzu LCMS-2020システムで記録し、データを、Shimadzu LabSolutionsソフト

ウェアを使用して処理した。6230 Accurate-Mass TOFMSシステムと結合したAgilent 1260 Infinity Binary LCを、HR-ESI-TOF分析に使用した。NMRスペクトルデータを、500MHz Bruker NMR分光計で収集した。化学シフト(δ)をppmで報告し、重水素溶媒シグナルから参照した。結合定数(J)をヘルツ(Hz)で報告する。スピン多重度は、以下のように記載される：s(一重線)、br(広い)、d(二重線)、dd(二重二重線)、t(三重線)、q(四重線)、またはm(多重線)。単量体抗体をプールし、0.22 μ M濾過し、さらに使用するまで65°C以下で保管した。

【0611】

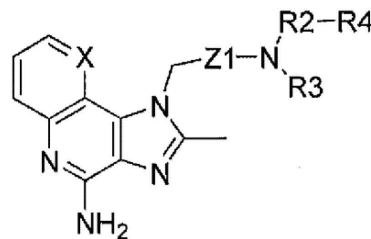
実施例2：以下の構造-コア1(図1)を含むTLRアゴニストの合成：

10

【0612】

【化56】

コア1



20

【0613】

いくつかの実施形態において、Xは、CHまたはNHであり、

R₂及びR₃はそれぞれ、C₄~C₈シクロアルキル、または独立して-H、C₁~C₁₂アルキル、ニトロ含有アルキル、芳香族環、または-C(NH)NH₂を形成するように結合され、

R₄は、C₁~C₁₂アルキル、C₁~C₁₂置換アルキル、C₄~C₈シクロアルキル、C₄~C₈置換シクロアルキル、芳香族環、置換芳香族環、芳香族ヘテロ環、置換芳香族ヘテロ環、-ONH₂末端C₁~C₁₂アルキル、または不在である。いくつかの実施形態において、Z₁=C₁~C₆アルキル、C₃~C₈シクロアルキル、またはC₃~C₈ニトロ含有複素環である。

30

【0614】

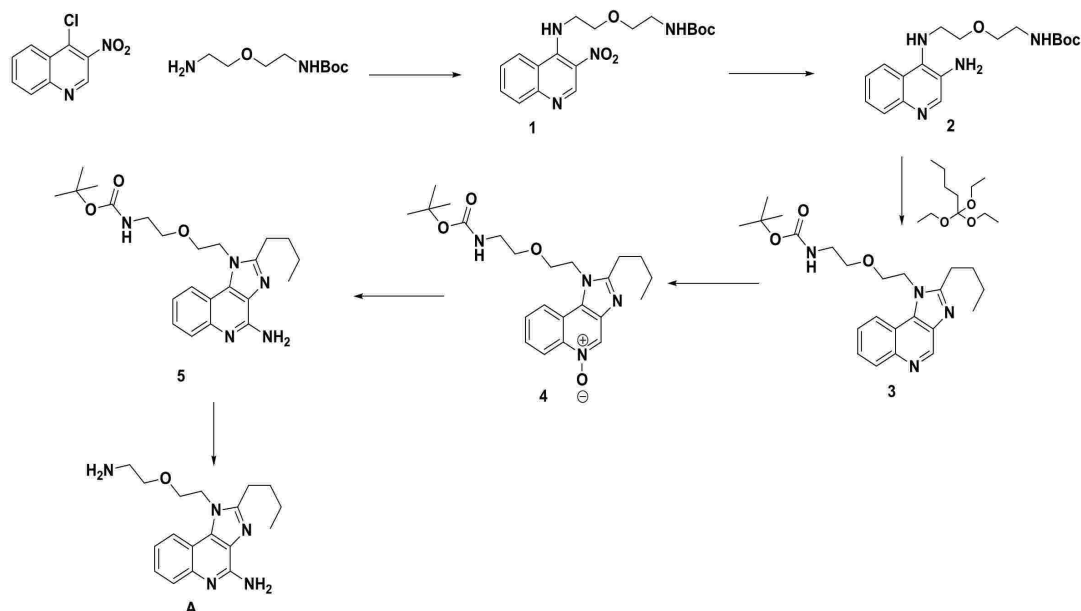
コア1構造を有するTLR-アゴニストは、以下のスキームに開示されるように合成された。

【0615】

40

50

【化 57】



10

【0616】

tert-ブチル 2-(2-(3-ニトロキノリン-4-イルアミノ)エトキシ)エチルカルバメート (1) : 4-クロロ-3-ニトロキノリン (1750 mg、8.39 mmol) を、DCM (30 mL) に溶解し、遊離アミン (1800 mg、8.55 mmol)、続いて TEA (2.29 mL、17.3 mmol) で処理した。反応物を室温で 18 時間保持し、次いで H₂O (20 mL)、ブライン (10 mL) で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥させ、真空中で濃縮した。標的化合物 (1) を、黄色の固体 (3130 mg、99%) として得た、MS m/z 399 (M+Na)⁺。

20

【0617】

tert-ブチル 2-(2-(3-アミノキノリン-4-イルアミノ)エトキシ)エチルカルバメート (2) : ニトロ化合物 (1) (3.12 g、8.29 mmol) を、THF (100 mL) 及び水 (80 mL) に溶解した。亜鉛 (13.55 g、207.2 mmol) を、一度に添加し、続いて NH₄Cl (13.3 g、248.6 mmol) を添加した。懸濁液を室温で 1 時間激しく攪拌した (HPLC)。濾過後、ケーキを THF (20 mL × 2) で洗浄した。水相が飽和されるまで濾液に NaCl を添加した。液相を収集し、THF 層を分離した。水層を THF/EA (50 mL/50 mL) で抽出した。有機層を組み合わせ、MgSO₄ 上で乾燥させ、濃縮して、次のステップのための残留物 (2) (3.1 g、>100%) を得た。MS m/z 347 (M+H)⁺。

30

【0618】

tert-ブチル 2-(2-(2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチルカルバメート (3) : アミン化合物 (2) (3.1 g、粗製、<8.95 mmol) 及びトリエチルオルトバレレート (3.1 mL、13.5 mmol) を、トルエン (200 mL) に懸濁し、110℃ に加熱した。次いで、ピリジン HCl (55 mg、0.48 mmol) を添加した。反応物を 4 時間加熱した。混合物を室温で 48 時間保持した。液体をデカントし、残りの固体/残留物を、トルエン (20 mL × 2) で攪拌し、液体と合わせ、濃縮した。残留物を、DCM に溶解し、カラムクロマトグラフィー (DCM 中のメタノール、0~10~20%、80 g カラム) によって精製して、標的化合物 (3) (1.05 g、30%、ニトロ化合物 1 から 2 段階) を得た。MS m/z 413 (M+H)⁺。

40

【0619】

1-(2-(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エトキシ)エチル)-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン5-オキシド (4) : 化合物 3 (1.0

50

5 g、2.54 mmol) を、DCM (20 mL) に溶解し、mCPBA (750 mg、2.83 mmol) で処理した。反応物を室温で4時間保持した。混合物を、NaHCO₃ 飽和溶液 (15 mL × 3) で洗浄し、乾燥させ、濃縮して、次のステップ (4) のための粗製シロップ (900 mg、83%) を得た。MS m/z 429 (M+H)⁺。

【0620】

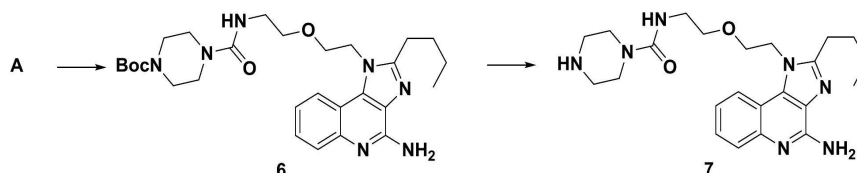
tert-ブチル 2- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エトキシ) エチルカルバメート (5) : 圧力チューブ内で、化合物 4 (900 mg、2.18 mmol) を、ジクロロエタン (25 mL) に溶解し、濃縮水酸化アンモニウム (28%、1 mL) で処理し、温度を80℃にした。この混合物に、冷却後5分間にわたって塩化トシル (470 mg、2.46 mmol) をゆっくりと添加した。濃縮水酸化アンモニウム (0.5 mL) を添加し、チューブを密封した。チューブを80℃で4時間加熱した。冷却後、混合物を、DCM (60 mL) で希釈し、水 (40 mL) で洗浄し、乾燥させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、標的化合物 (5) (750 mg、80%) を得た。MS m/z 428 (M+H)⁺。

【0621】

1- (2- (2-アミノエトキシ) エチル) -2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-4-アミン (A) : 化合物 5 (750 mg、1.75 mmol) を、室温で17時間、EtOH (20 mL) 中1.25 MのHClで処理した。次に、反応物を真空中で乾燥させ、残留物をEtOH/Et₂O (1/10; 20 mL) に再懸濁し、濾過した。固体を収集して、標的化合物 (A) (600 mg、85%) を得た。HPLC (方法1) : 5.8分、MS m/z 328 (M+H)⁺。

【0622】

【化58】



【0623】

tert-ブチル 4- (2- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エトキシ) エチルカルバモイル) ピペラジン-1-カルボキシレート (6) : 化合物 A、HCl 塩 (100 mg、0.25 mmol) を、DCM (10 mL) に溶解し、TEA (68 μ L、0.511 mmol) で処理した。懸濁液に、tert-ブチル 4- (クロロカルボニル) ピペラジン-1-カルボキシレート (75 mg、0.286 mmol) を添加した。反応物を室温で17時間保持し、DCM/MeOH (4 mL/1 mL) で希釈し、次いで溶液をブラインで洗浄した。有機相をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、純粋な生成物 6 (130 mg、0.24 mmol、96%) を得た。MS m/z 540 (M+H)⁺。

【0624】

N- (2- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エトキシ) エチル) ピペラジン-1-カルボキサミド (7) : 化合物 (6) (10 mg、0.018 mmol) を、EtOH中のHCl (約1.5 M、1 mL) で、室温で1時間、次いで60℃で1時間処理し、真空中で乾燥させた。残留物を、ジエチルエーテルで洗浄し、乾燥させて、標的化合物 (7) (9 mg、0.018 mmol、定量的) を得た。MS m/z 440 (M+H)⁺。

【0625】

10

20

30

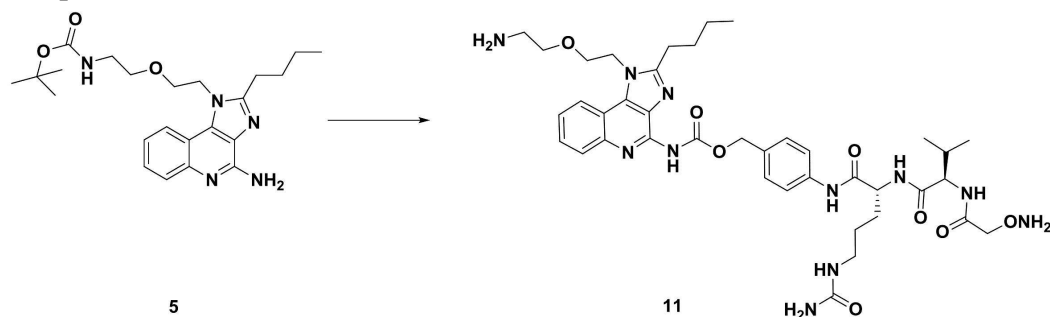
40

50

0 u L、0.97 mmol) で30分間室温で処理した。反応混合物を分取LCにより精製し、中間体Val-Cit-PAB-OCO- (化合物6) を得た。この中間体 (11 mg、0.01 mmol) を、DCM (1 mL) に溶解し、DIPEA (3.5 u L、0.02 mmol)、続いて2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2- (tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ) アセテート (3.3 mg、0.011 mmol) で処理した。反応物を室温で17時間保持した。TFA (0.3 mL) を添加し、混合物を15分間攪拌した。真空中で乾燥させた後、残留物を分取HPLCにより精製して、化合物10 (化合物6から15 mg、16%) を得た。MS m/z 918 (M+H)⁺。

【0631】

【化62】

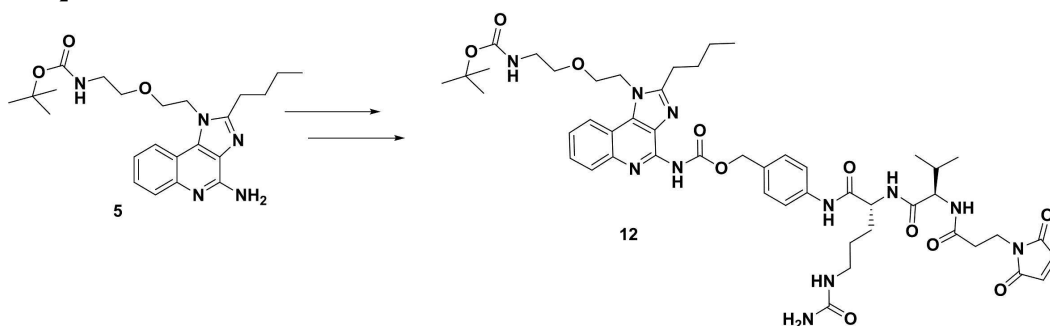


【0632】

4- ((R)-2- ((R)-2- (2- (アミノオキシ) アセトアミド) -3-メチルブタンアミド) -5-ウレイドペンタンアミド) ベンジル1- (2- (2-アミノエトキシ) エチル) -2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-4-イルカルバメート (11) : 10について記載されるのと同様の手順を用いて、5を出発材料として使用して化合物11を調製して、標的化合物11 (5から22 mg、21%) を得た。MS m/z 806 (M+H)⁺。

【0633】

【化63】



【0634】

4- ((R)-2- ((R)-2- ((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) プロパンアミド) -3-メチルブタンアミド) -5-ウレイドペンタンアミド) ベンジル2-ブチル-1- (2- (2- (ピペラジーン-1-カルボキサミド) エトキシ) エチル) -1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-4-イルカルバメート (12) : 10について記載されるのと同様の手順を用いて、5, 2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル3- (2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) プロパノエートを出発材料として使用して、化合物12を調製して、標的化合物12 (TFA処理なし) (5から15 mg、17%) を得た。MS m/z 984 (M+H)⁺。

【0635】

10

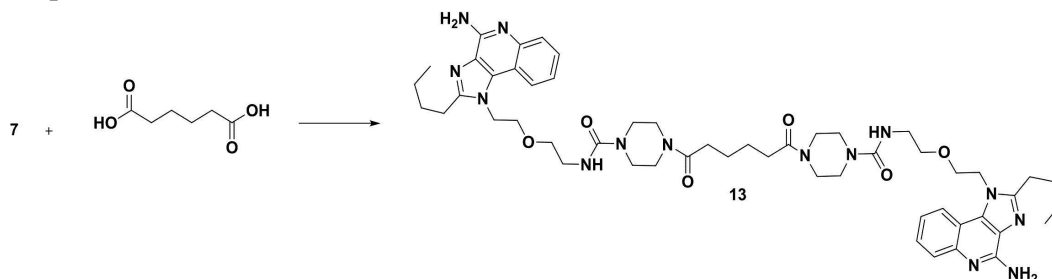
20

30

40

50

【化 6 4】



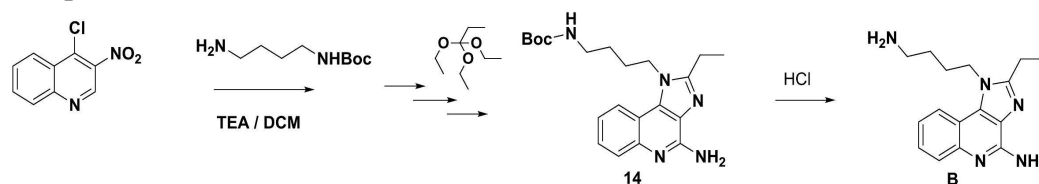
【0 6 3 6】

10

アジピン酸-ビス- (N- (2- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エトキシ) エチル) ピペラジン-1-カルボキサミド (13) : DMF (1 mL) 中の化合物 7 (8 mg、0.018 mmol) 及びアジピン酸 (2 mg、0.07 mmol) の溶液に、EDC (3 mg、0.016 mmol)、HOBt (1 mg、0.018 mmol)、及び DIEA (4 μ L、0.23 mmol) を 23°C で添加した。24 時間後、混合物を分取 LC により精製し、乾燥させて、化合物 13 (5 mg、0.004 mmol、23%) を得た。MS m/z 1217 (M+H)⁺。

【0 6 3 7】

【化 6 5】



20

【0 6 3 8】

tert-ブチル 4- (4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチルカルバメート (14) : Boc-1, 4-ブタンジアミン及びトリエチルオルトプロピオネートを出発材料として使用し、5 について記載されるのと同様の手順を使用して、化合物 14 を調製して、標的化合物 14 (出発材料から 420 mg、1.095 mmol、14.5%) を得た。MS m/z 384 (M+H)⁺。

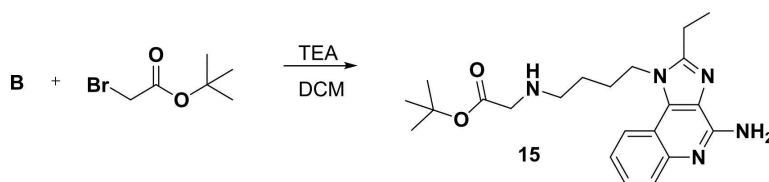
30

【0 6 3 9】

1- (4-アミノブチル) -2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-4-アミン、2 HCl (B) : 化合物 14 (400 mg、1.043 mmol) を、ジオキサン (10 mL、40 mmol) 中の DCM (0.5 mL) 及び 4 M の HCl に 23°C で添加した。1 時間後、LCMS は、反応が完了したことを示した。溶媒を真空中で除去し、高真空ポンプで 6 時間乾燥させて、化合物 B (400 mg、1.129 mmol、99%) を淡黄色の固体として得た。MS m/z 284 (M+H)⁺。

【0 6 4 0】

【化 6 6】



40

【0 6 4 1】

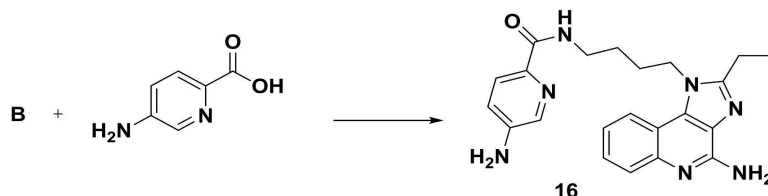
tert-ブチル 2- (4- (4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチルアミノ) アセテート (15) : DCM (5 mL) 中の化合物 B (31 mg、0.109 mmol) の溶液に、tert-ブチルプロモアセテート (

50

15 μ L、0.102 mmol) を添加し、続いて TEA (88 μ L、0.681 mmol) を 23°C で添加した。24 時間後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 15 (4 mg、0.006 mmol、6%) を黄色の固体として得た。MS m/z 398 ($M+H$)⁺。

【0642】

【化67】



10

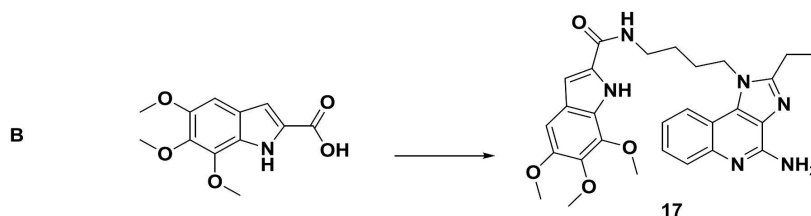
【0643】

5-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ピコリンアミド (16) : DMF (1 mL) 中の化合物 B (25 mg、0.071 mmol) 及び 5-アミノピリジン-2-カルボン酸 (10 mg、0.072 mmol) の溶液に、HATU (20 mg、0.083 mmol) 及び DIEA (50 μ L、0.287 mmol) を 23°C で添加した。1 時間後、混合物を分取 LC により精製し、乾燥させて、化合物 16 (21 mg、0.033 mmol、46%) を白色の固体として得た。MS m/z 404 ($M+H$)⁺。

20

【0644】

【化68】



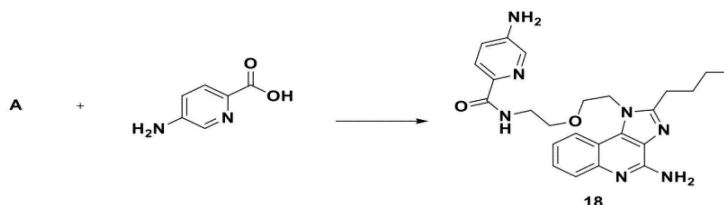
【0645】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-5,6,7-トリメトキシ-1H-インドール-2-カルボキサミド (17) a : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 B 及び 5,6,7-トリメトキシ-1H-インドール-2-カルボン酸を出発材料として使用して、化合物 17 を調製して、標的化合物 17 (13 mg、0.017 mmol、44%) を得た。MS m/z 517 ($M+H$)⁺。

30

【0646】

【化69】



40

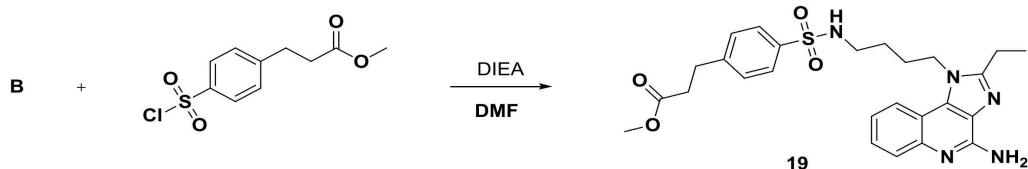
【0647】

5-アミノ-N-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチル)ピコリンアミド (18) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 A 及び 5-アミノピリジン-2-カルボン酸を出発材料として使用して、化合物 18 を調製して、標的化合物 18 (24 mg、0.036 mmol、82%) を得た。MS m/z 448 ($M+H$)⁺。

【0648】

50

【化 7 0】

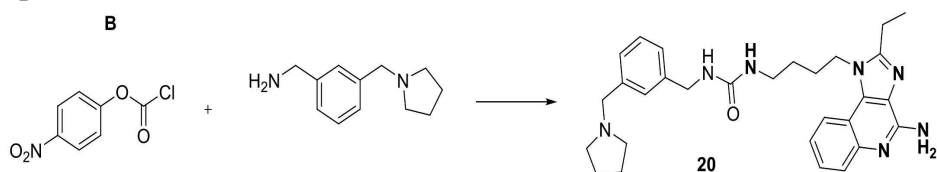


【0 6 4 9】

メチル 3- (4- (N- (4- (4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル) スルファモイル) フェニル) プロパノエート (19) : DMF (1 mL) 中の化合物 B (14 mg、0.035 mmol) 及び 5-アミノピリジン-2-カルボン酸 (6 mg、0.043 mmol) の溶液に、DIEA (40 μ L、0.230 mmol) を 23°C で添加した。30 分後、混合物を分取 LC により精製し、乾燥させて、化合物 19 (15 mg、0.020 mmol、58%) を淡黄色の固体として得た。MS m/z 510 (M+H)⁺。

【0 6 5 0】

【化 7 1】

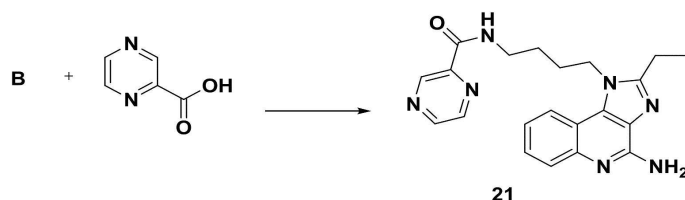


【0 6 5 1】

1- (4- (4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル) -3- (3- (ピロリジン-1-イルメチル) ベンジル) 尿素 (20) : DMF (1 mL) 中の (3- (ピロリジン-1-イルメチル) フェニル) メタンアミン (19 mg、0.100 mmol) 及び ニトロフェニルクロロホルメート (21 mg、0.104 mmol) の溶液に、DIEA (34 μ L、0.195 mmol) を 23°C で添加した。10 分後、LCMS は、ニトロフェノールの活性化が完了したことを示した。この混合物に化合物 B を添加した。2 時間後、混合物を分取 LC により精製し、乾燥させて、化合物 20 (3 mg、0.006 mmol、6%) を白色の固体として得た。

【0 6 5 2】

【化 7 2】



【0 6 5 3】

N- (4- (4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル) ピラジン-2-カルボキサミド (21) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 B 及びピラジンカルボン酸を出発材料として使用して、化合物 28 を調製して、標的化合物 21 (11 mg、0.013 mmol、23%) を得た。MS m/z 390 (M+H)⁺。

【0 6 5 4】

10

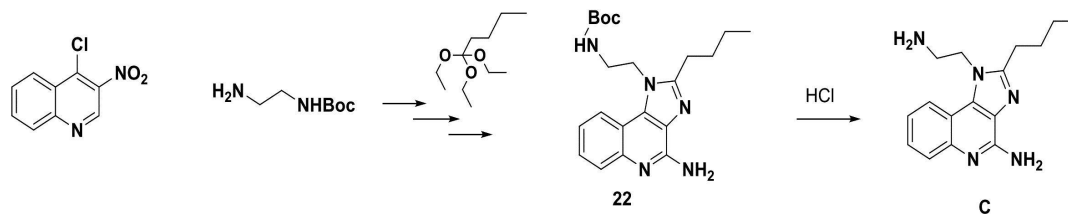
20

30

40

50

【化 7 3】



【0 6 5 5】

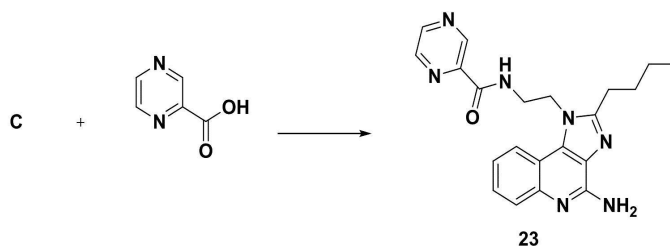
tert-ブチル 2-((4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)カルバメート (22) : 化合物 5 について記載されるのと同様の手順を用いて、4-クロロ-3-ニトロキノリン、tert-ブチル 2-アミノエチルカルバメート、及びトリエチルオルトバレレートを出発材料として使用して、化合物 22 を調製して、標的化合物 22 (140 mg、0.365 mmol、33%) を得た。MS m/z 384 (M+H)⁺。

【0 6 5 6】

1-((4-アミノブチル)-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン、3HCl (C) : A について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 22 を出発材料として使用して化合物 C を調製して、標的化合物 C (60 mg、0.169 mmol、定量的) を得た。MS m/z 284 (M+H)⁺。

【0 6 5 7】

【化 7 4】

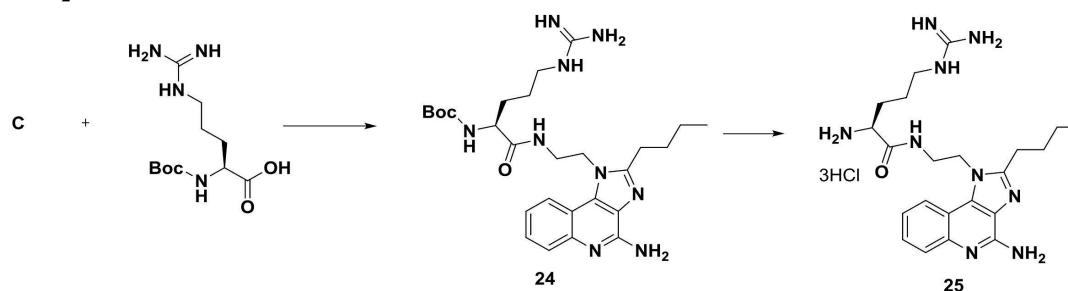


【0 6 5 8】

N-((2-((4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)ピラジン-2-カルボキサミド (23) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 C 及びピラジンカルボン酸を出発材料として使用して、化合物 23 を調製して、標的化合物 23 (8 mg、0.09 mmol、29%) を得た。MS m/z 390 (M+H)⁺。

【0 6 5 9】

【化 7 5】



【0 6 6 0】

(S)-tert-ブチル 1-((2-((4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチルアミノ)-5-グアニジノ-1-オキソペンタン-2-イル)カルバメート (24) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 C 及び Boc-Arg-OH を出発材料として使用して、化合物 24 を調製して、標的化合物 24 (75 mg、0.098 mmol、79%) を得た。MS m/z 540 (

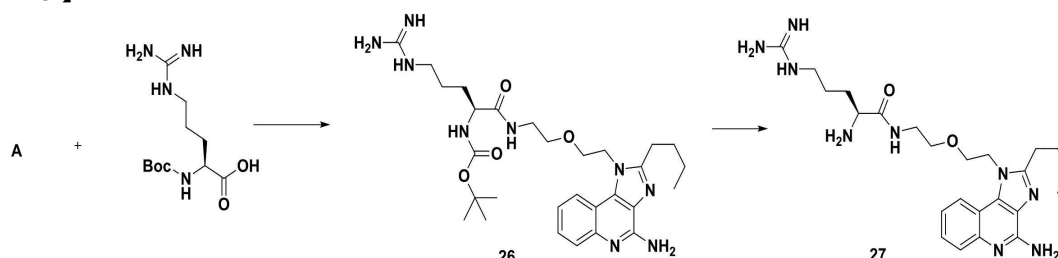
$M + H)^+$ 。

【0661】

(S)-2-アミノ-N-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)-5-グアニジノペンタンアミド、3HCl(25)：化合物24(60mg、0.111mmol)に、ジオキサン中4MのHCl(1mL、4mmol)を23℃で添加した。2時間後、反応物を真空中で乾燥させた。残留物を高真空ポンプ下で乾燥させて、化合物25(64mg、0.110mmol、定量的)を白色の固体として得た。

【0662】

【化76】



【0663】

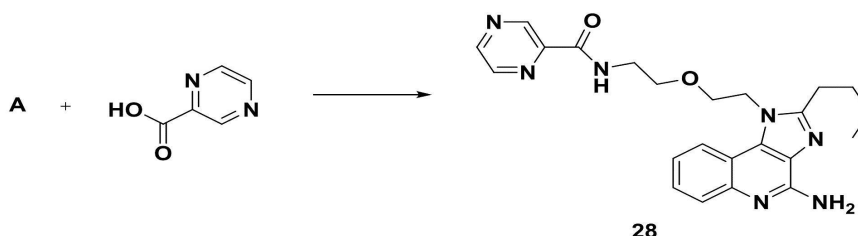
(S)-tert-ブチル1-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチルアミノ)-5-グアニジノ-1-オキソペンタン-2-イルカルバメート(26)：16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物A及びBoc-Arg-OHを出発材料として使用して、化合物26を調製して、標的化合物26(20mg、0.019mmol、59%)を得た。MS m/z 584 ($M + H)^+$ 。

【0664】

(S)-2-アミノ-N-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)-5-グアニジノペンタンアミド(27)：25について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物26を出発材料として使用して、化合物27を調製して、標的化合物27(14mg、0.016mmol、定量的)を得た。MS m/z 484 ($M + H)^+$ 。

【0665】

【化77】



【0666】

N-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチル)ピラジン-2-カルボキサミド(28)：16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物A及びピラジンカルボン酸を出発材料として使用して、化合物28を調製して、標的化合物28(1.3mg、0.001mmol、4%)を得た。MS m/z 434 ($M + H)^+$ 。

【0667】

10

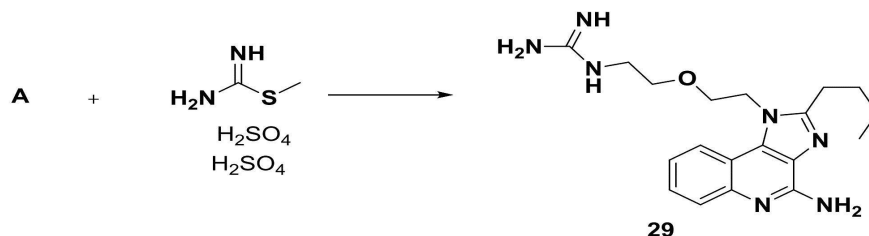
20

30

40

50

【化 7 8】

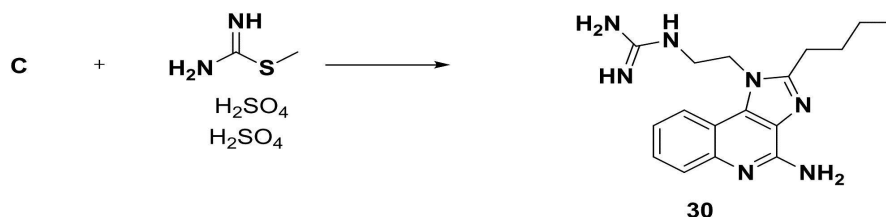


【0668】

1-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチル)グアニジン(29): DMF(1mL)及び水(1mL)中の化合物A(15mg、0.038mmol)及びメチルカルバムイミドチオエートビス(スルフェート)(25mg、0.090mmol)の溶液に、TEA(50μL、0.358mmol)を80℃で添加した。18時間後、混合物を分取LCにより精製して、化合物29(12mg、0.017mmol、45%)を得た。MS m/z 370 (M+H)⁺。

【0669】

【化 7 9】

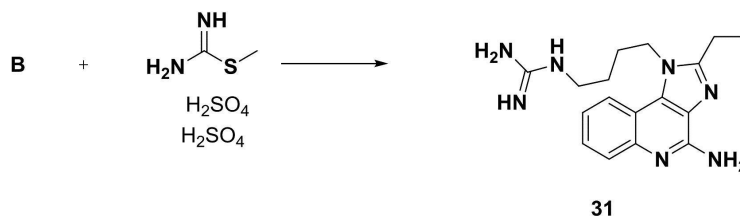


【0670】

1-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)グアニジン(30): 29について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物Cを出発材料として使用して、化合物30を調製して、標的化合物30(10mg、0.013mmol、29%)を得た。MS m/z 434 (M+H)⁺。

【0671】

【化 8 0】



【0672】

1-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)グアニジン(31): 29について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物Bを出発材料として使用して、化合物31を調製して、標的化合物31(8mg、0.010mmol、29%)を得た。MS m/z 326 (M+H)⁺。

【0673】

10

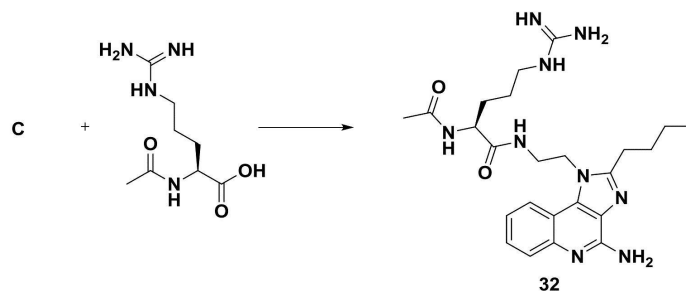
20

30

40

50

【化 8 1】

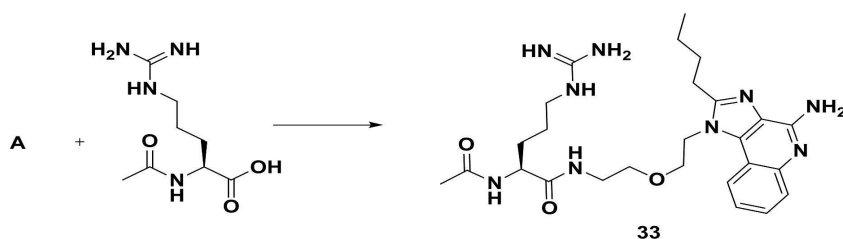


【0 6 7 4】

(S)-2-アセトアミド-N-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチル)-5-グアニジノペンタンアミド(32): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物C及びアセチル-アルギンを出発材料として使用して、化合物32を調製して、標的化合物32(18mg、0.025mmol、69%)を得た。MS m/z 482 (M+H)⁺。

【0 6 7 5】

【化 8 2】

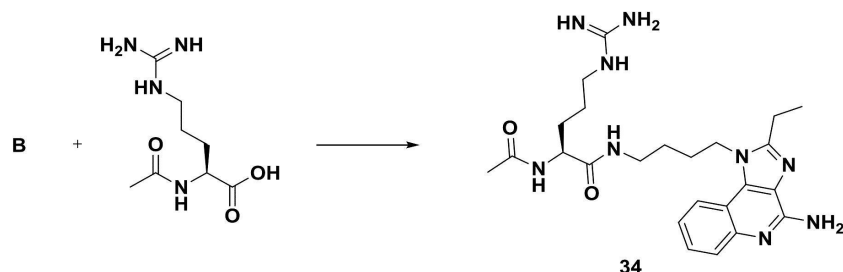


【0 6 7 6】

(S)-2-アセトアミド-N-(2-(2-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エトキシ)エチル)エチル)-5-グアニジノペンタンアミド(33): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物A及びアセチル-アルギンを出発材料として使用して、化合物33を調製して、標的化合物33(4mg、0.019mmol、67%)を得た。MS m/z 526 (M+H)⁺。

【0 6 7 7】

【化 8 3】



【0 6 7 8】

(S)-2-アセトアミド-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-5-グアニジノペンタンアミド(34): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及びアセチル-アルギンを出発材料として使用して、化合物34を調製して、標的化合物34(5mg、0.007mmol、30%)を得た。MS m/z 482 (M+H)⁺。

【0 6 7 9】

10

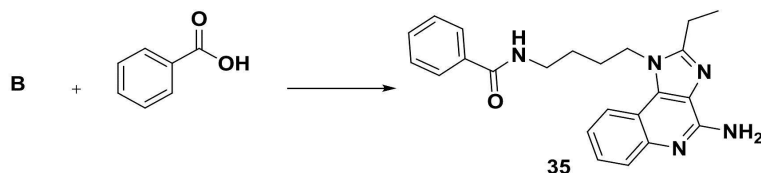
20

30

40

50

【化 8 4】



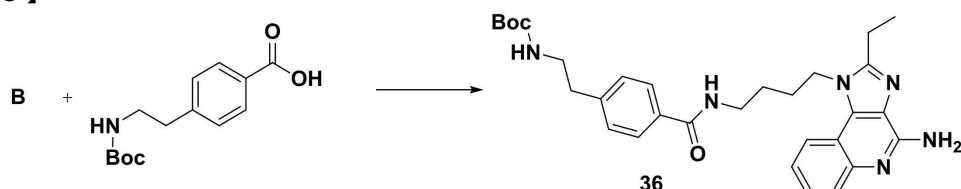
【0 6 8 0】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(35): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び安息香酸を出発材料として使用して、化合物35を調製して、標的化合物35(8mg、0.013mmol、53%)を得た。MS m/z 388 (M+H)⁺。

10

【0 6 8 1】

【化 8 5】



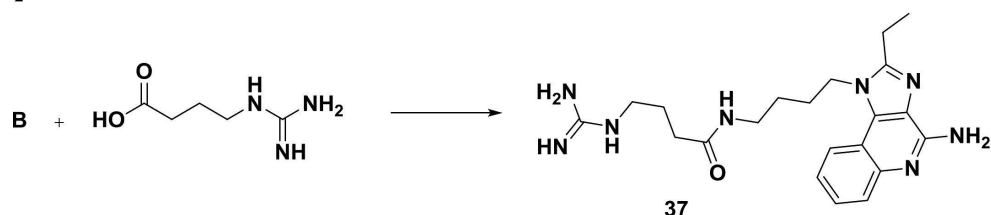
【0 6 8 2】

tert-ブチル4-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチルカルバモイル)フェネチルカルバメート(36): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-((2-boc-アミノ)エチル)安息香酸を出発材料として使用して、化合物36を調製して、標的化合物36(25mg、0.033mmol、38%)を得た。MS m/z 531 (M+H)⁺。

20

【0 6 8 3】

【化 8 6】



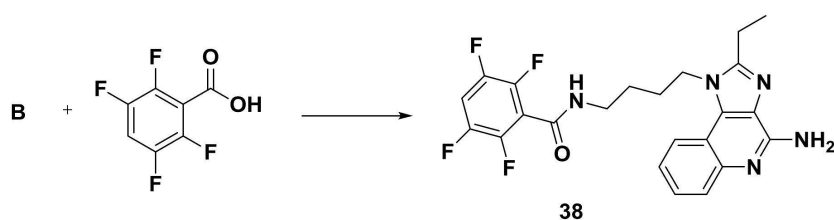
30

【0 6 8 4】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-グアニジノブタンアミド(37): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-グアニド酪酸を出発材料として使用して、化合物37を調製して、標的化合物37(10mg、0.016mmol、45%)を得た。MS m/z 411 (M+H)⁺。

【0 6 8 5】

【化 8 7】



【0 6 8 6】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-2,3,5,6-テトラフルオロベンズアミド(38): 16について

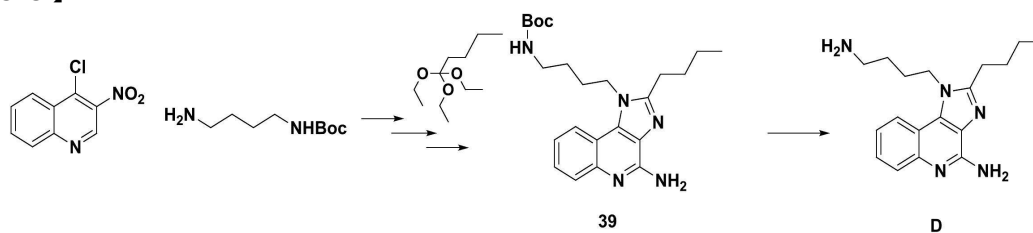
40

50

記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び2, 3, 5, 6-テトラフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物38を調製して、標的化合物38 (7 mg、0.010 mmol、36%)を得た。MS m/z 460 (M+H)⁺。

【0687】

【化88】



10

【0688】

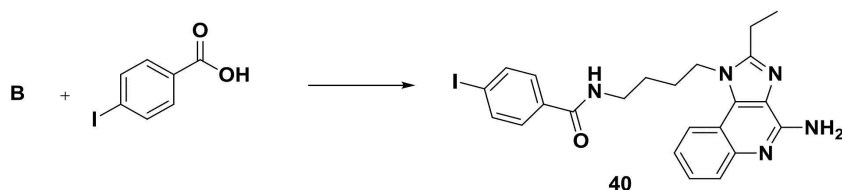
tert-ブチル4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチルカルバメート(39): 化合物5について記載されるのと同様の手順を用いて、4-クロロ-3-ニトロキノリン、tert-ブチル4-アミノブチルカルバメート、及びトリエチルオルトバレレートを出発材料として使用して、化合物39を調製して、標的化合物39(出発材料から177 mg、0.430 mmol、20%)を得た。MS m/z 412 (M+H)⁺。

【0689】

1-(4-アミノブチル)-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン、3HCl(D): Aについて記載されるのと同様の手順を用いて、化合物39を出発材料として使用して、化合物Dを調製して、標的化合物D(180 mg、0.431 mmol、定量的)を得た。MS m/z 312 (M+H)⁺。

【0690】

【化89】



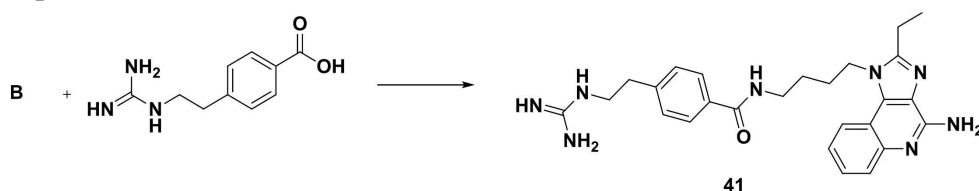
30

【0691】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-ヨードベンズアミド(40): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-ヨード安息香酸を出発材料として使用して、化合物40を調製して、標的化合物40(15 mg、0.020 mmol、72%)を得た。MS m/z 514 (M+H)⁺。

【0692】

【化90】



40

【0693】

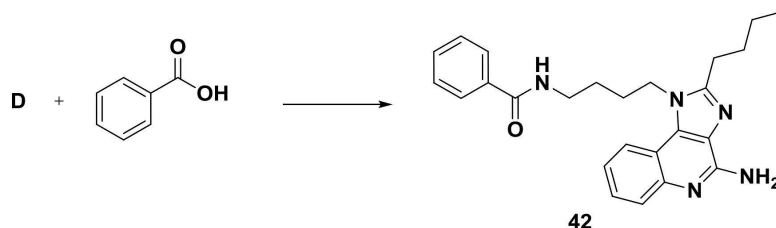
N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(2-グアニジノエチル)ベンズアミド(41): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(2-グアニジノエチル)安息香酸

50

を出発材料として使用して、化合物 4 1 を調製して、標的化合物 4 1 (7 mg、0.009 mmol、29%) を得た。MS m/z 473 (M+H)⁺。

【0694】

【化91】



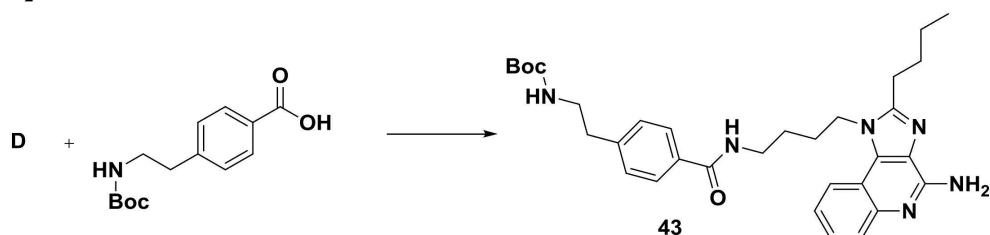
10

【0695】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(42): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 D 及び安息香酸を出発材料として使用して、化合物 4 2 を調製して、標的化合物 4 2 (6 mg、0.012 mmol、38%) を得た。MS m/z 416 (M+H)⁺。

【0696】

【化92】



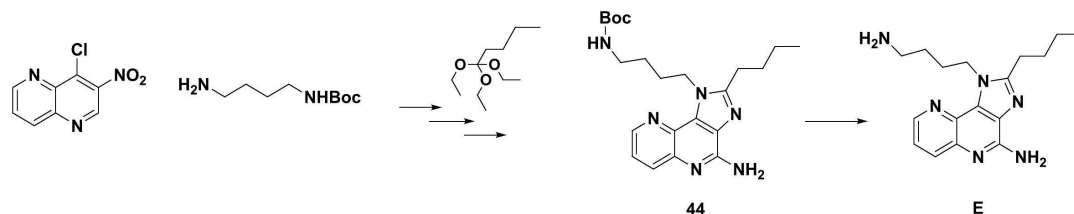
20

【0697】

tert-ブチル 4-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチルカルバモイル)フェネチルカルバメート(43): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 D 及び 4-(2-boc-アミノ)エチル安息香酸を出発材料として使用して、化合物 4 3 を調製して、標的化合物 4 3 (9 mg、0.010 mmol、38%) を得た。MS m/z 559 (M+H)⁺。

【0698】

【化93】



30

【0699】

tert-ブチル 4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチルカルバメート(44): 5について記載されるのと同様の手順を用いて、4-クロロ-3-ニトロ-1,5-ナフチリジン、tert-ブチル 4-アミノエチルカルバメート、及びトリエチルオルトバレレートを出発材料として使用して、化合物 4 4 を調製して、標的化合物 4 4 (出発材料から120 mg、0.159 mmol、5.3%) を得た。MS m/z 413 (M+H)⁺。

【0700】

1-(4-アミノブチル)-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-4-アミン、4HCl(E): Aについて記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 4 4 を出発材料として使用して、化合物 E を調製して、標的化合物 E (145

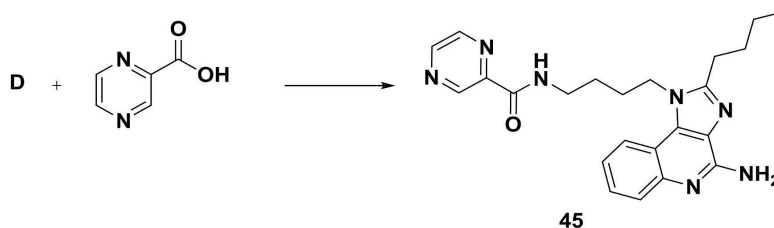
40

50

mg、0.296 mmol、定量的)を得た。MS m/z 313 ($M+H$)⁺。

【0701】

【化94】



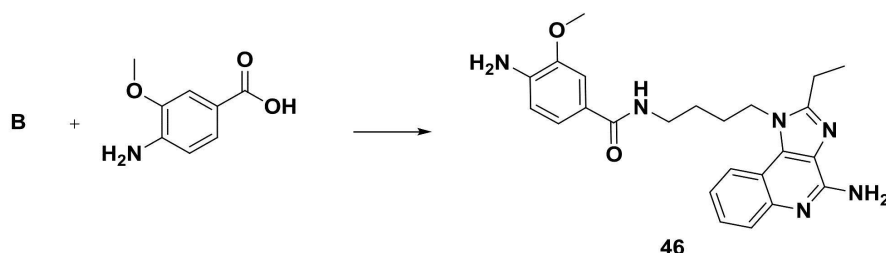
10

【0702】

N-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)pyridine-2-carboxamide (45): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及びピラジンカルボン酸を出発材料として使用して、化合物45を調製して、標的化合物45 (4 mg、0.004 mmol、14%)を得た。MS m/z 418 ($M+H$)⁺。

【0703】

【化95】



20

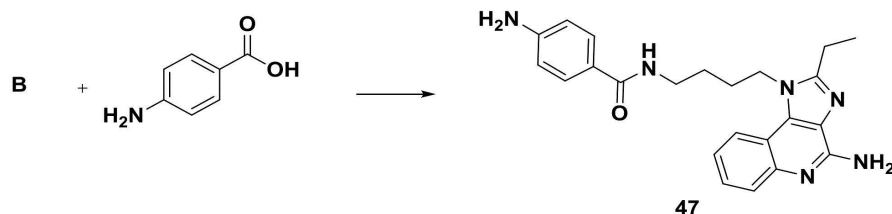
【0704】

4-amino-N-(4-(4-amino-2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-3-methoxybenzamide (46): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-amino-3-methoxybenzoic acidを出発材料として使用して、化合物46を調製して、標的化合物46 (12.1 mg、0.014 mmol、58%)を得た。MS m/z 433 ($M+H$)⁺。

30

【0705】

【化96】



40

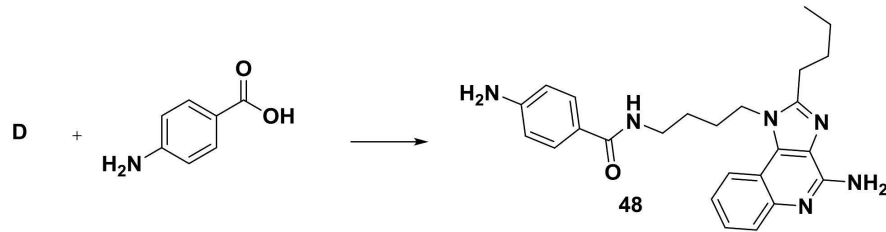
【0706】

4-amino-N-(4-(4-amino-2-ethyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)benzamide (47): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-amino-3-methoxybenzoic acidを出発材料として使用して、化合物47を調製して、標的化合物47 (6 mg、0.007 mmol、30%)を得た。MS m/z 403 ($M+H$)⁺。

【0707】

50

【化 9 7】

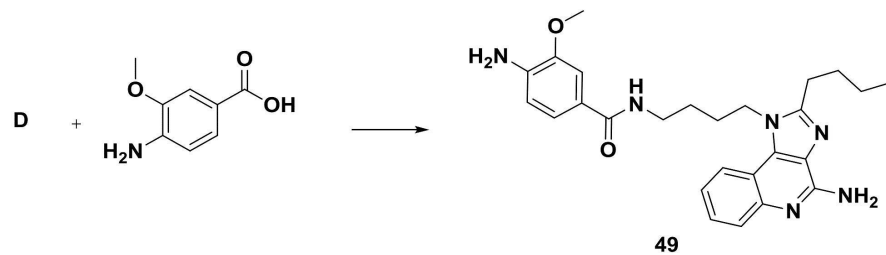


【0 7 0 8】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(48): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物48を調製して、標的化合物48(0.4mg、0.0005mmol、2%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

【0 7 0 9】

【化 9 8】

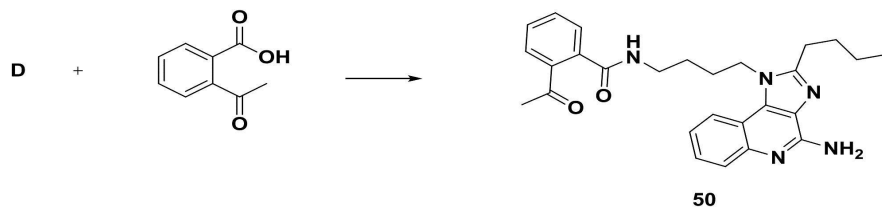


【0 7 1 0】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-メトキシベンズアミド(49): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-アミノ-3-メトキシ安息香酸を出発材料として使用して、化合物49を調製して、標的化合物49(4.2mg、0.005mmol、21%)を得た。MS m/z 461 (M+H)⁺。

【0 7 1 1】

【化 9 9】

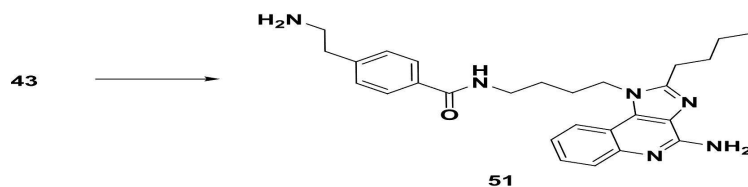


【0 7 1 2】

2-アセチル-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(50): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び2-アセチル安息香酸を出発材料として使用して、化合物50を調製して、標的化合物50(7.6mg、0.01mmol、43%)を得た。MS m/z 458 (M+H)⁺。

【0 7 1 3】

【化 1 0 0】



10

20

30

40

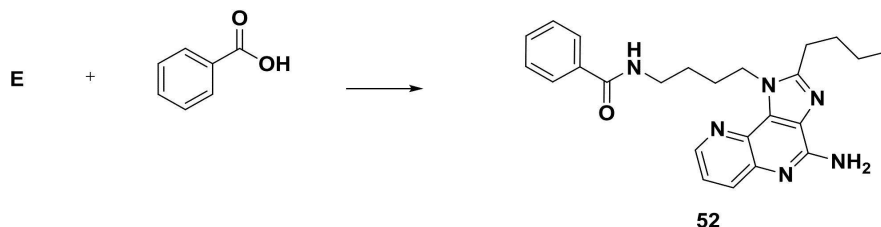
50

【0714】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(2-アミノエチル)ベンズアミド、4Hc l (51) : Aについて記載されるのと同様の手順を用いて、化合物43を出発材料として使用して、化合物51を調製して、標的化合物51 (10 mg、0.017 mmol、定量的)を得た。MS m/z 459 (M+H)⁺

【0715】

【化101】



10

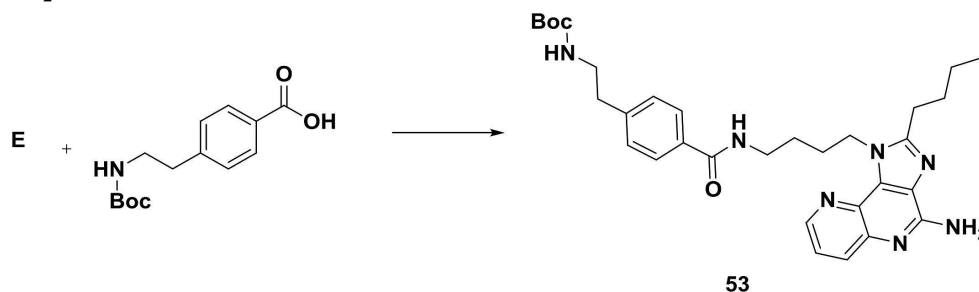
【0716】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチル)ベンズアミドベンズアミド (52) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び安息香酸を出発材料として使用して、化合物52を調製して、標的化合物52 (1.5 mg、0.002 mmol、8%)を得た。MS m/z 417 (M+H)⁺。

20

【0717】

【化102】



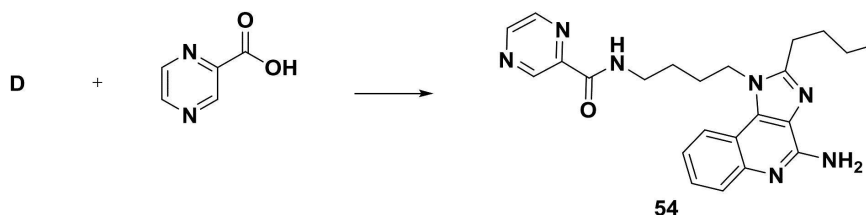
30

【0718】

tert-ブチル 4-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチルカルバモイル)フェネチルカルバメート (53) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び4-(2-((tert-boc-アミノ)エチル)安息香酸を出発材料として使用して、化合物53を調製して、標的化合物53 (3.8 mg、0.004 mmol、16%)を得た。MS m/z 560 (M+H)⁺。

【0719】

【化103】



40

【0720】

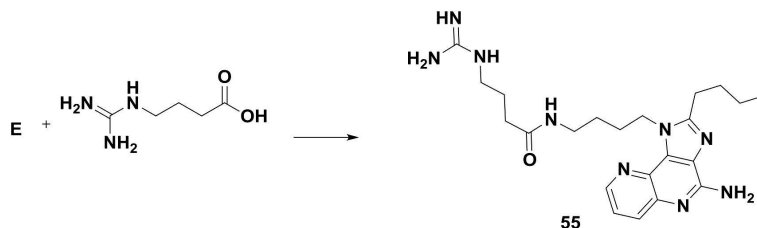
N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチル)ピラジン-2-カルボキサミド (54) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及びピラジンカルボン酸を出発材料として使

50

用して、化合物 54 を調製して、標的化合物 54 (3 mg、0.004 mmol、20%) を得た。MS m/z 419 ($M+H$)⁺。

【0721】

【化104】



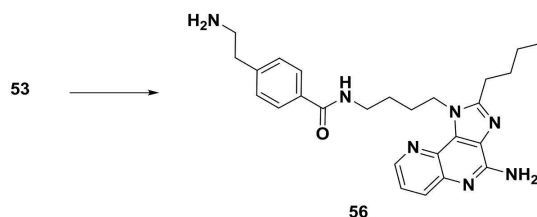
10

【0722】

N-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naphthyridin-1-yl)butyl)-4-aminobutanamide (55): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 E 及び 4-グアニジノブタンアミド (55): 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 E 及び 4-グアニドカルボン酸を出発材料として使用して、化合物 55 を調製して、標的化合物 55 (2 mg、0.003 mmol、12%) を得た。MS m/z 440 ($M+H$)⁺。

【0723】

【化105】



20

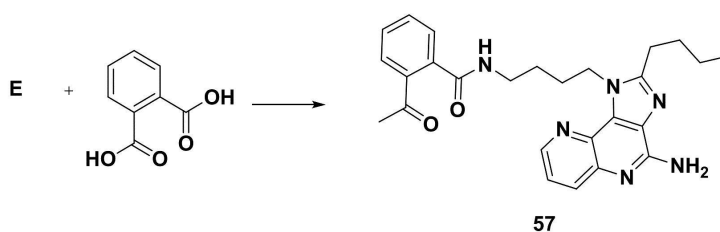
【0724】

N-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naphthyridin-1-yl)butyl)-4-(2-aminoethyl)benzamide, 4 TFA (56): 化合物 53 (3.6 mg、0.006 mmol) に、DCM (0.5 mL) 及び TFA (1 mL) を 23°C で添加した。20 分後、反応物を真空中で乾燥させ、次いで高真空ポンプで一晩乾燥させて、標的化合物 56 (7 mg、0.008 mmol、定量的) を得た。MS m/z 460 ($M+H$)⁺。

30

【0725】

【化106】



40

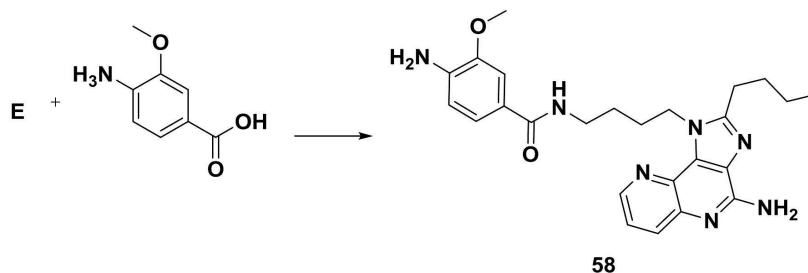
【0726】

2-acetyl-N-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naphthyridin-1-yl)butyl)benzamide (57): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 E 及び 2-acetyl-4-aminobenzoic acid を出発材料として使用して、化合物 57 を調製して、標的化合物 57 (5.2 mg、0.006 mmol、27%) を得た。MS m/z 459 ($M+H$)⁺。

【0727】

50

【化107】



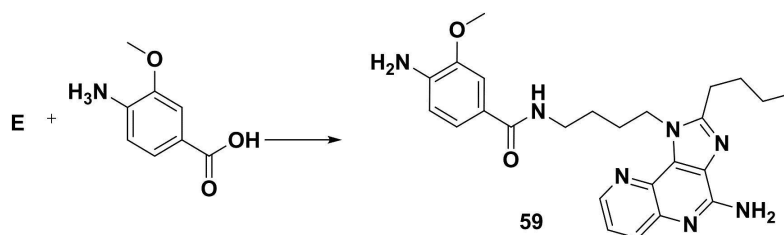
【0728】

10

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチル)-3-メトキシベンズアミド(58):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び4-アミノ-3-メトキシ安息香酸を出発材料として使用して、化合物58を調製して、標的化合物58(4.3mg、0.04mmol、20%)を得た。MS m/z 462 (M+H)⁺。

【0729】

【化108】



20

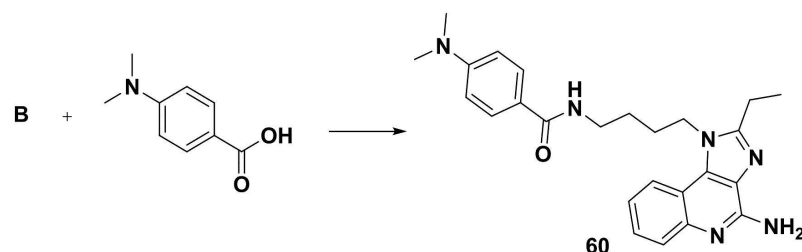
【0730】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(59):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び4-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物59を調製して、標的化合物59(1.6mg、0.002mmol、8%)を得た。MS m/z 432 (M+H)⁺。

30

【0731】

【化109】



【0732】

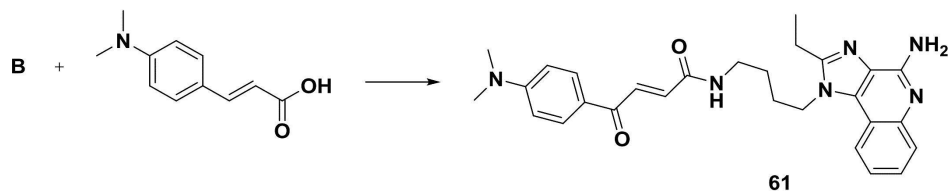
40

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(2-ジメチルアミノ)ベンズアミド(60):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-ジメチルアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物60を調製して、標的化合物60(1mg、0.001mmol、6%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

【0733】

50

【化 1 1 0】



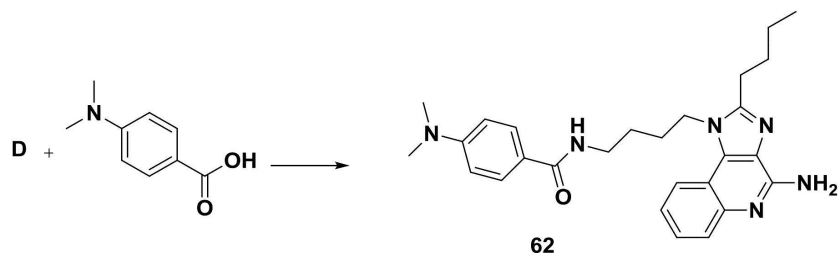
【0 7 3 4】

(E)-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)アクリルアミド(61): 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 B 及び 4-ジメチルアミノケイ皮酸を出発材料として使用して、化合物 61 を調製して、標的化合物 61 (2 mg、0.003 mmol、11%) を得た。MS m/z 457 (M+H)⁺。

10

【0 7 3 5】

【化 1 1 1】



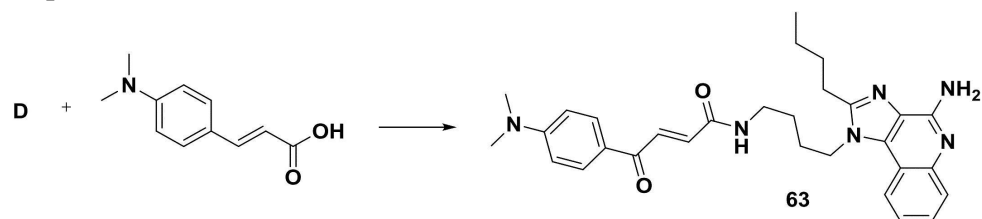
20

【0 7 3 6】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)ベンズアミド(62): 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 D 及び 4-ジメチルアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物 62 を調製して、標的化合物 62 (3.5 mg、0.004 mmol、20%) を得た。MS m/z 459 (M+H)⁺。

【0 7 3 7】

【化 1 1 2】



30

【0 7 3 8】

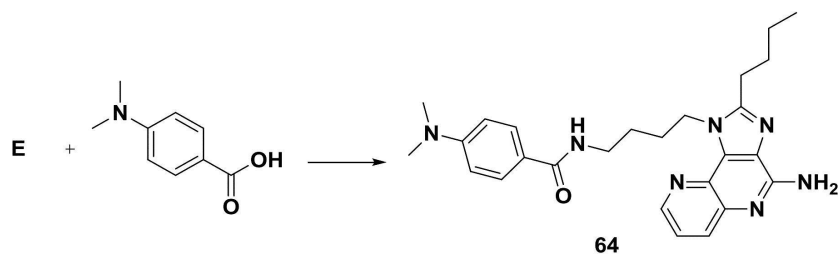
(E)-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)アクリルアミド(63): 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 D 及び 4-ジメチルアミノケイ皮酸を出発材料として使用して、化合物 63 を調製して、標的化合物 63 (4.5 mg、0.005 mmol、25%) を得た。MS m/z 485 (M+H)⁺。

40

【0 7 3 9】

50

【化 1 1 3】

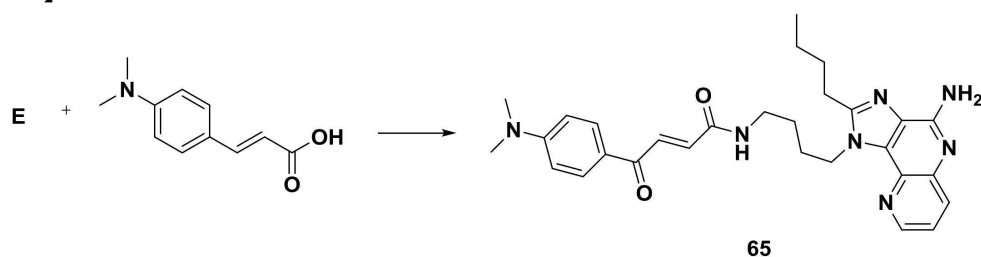


【0 7 4 0】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)ベンズアミド(64): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び4-ジメチルアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物64を調製して、標的化合物64(0.5mg、0.001mmol、7%)を得た。MS m/z 460 (M+H)⁺。

【0 7 4 1】

【化 1 1 4】

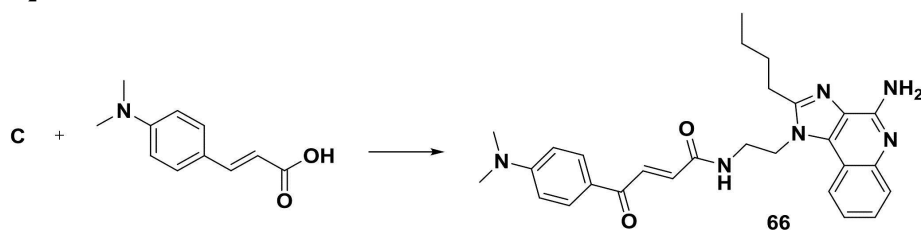


【0 7 4 2】

(E)-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c][1,5]ナフチリジン-1-イル)ブチル)-3-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)アクリルアミド(65): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物E及び4-ジメチルアミノケイ皮酸を出発材料として使用して、化合物65を調製して、標的化合物65(0.5mg、0.001mmol、7%)を得た。MS m/z 486 (M+H)⁺。

【0 7 4 3】

【化 1 1 5】



【0 7 4 4】

(E)-N-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)-3-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)アクリルアミド(66): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物C及び4-ジメチルアミノケイ皮酸を出発材料として使用して、化合物66を調製して、標的化合物66(3mg、0.004mmol、16%)を得た。MS m/z 457 (M+H)⁺。

【0 7 4 5】

10

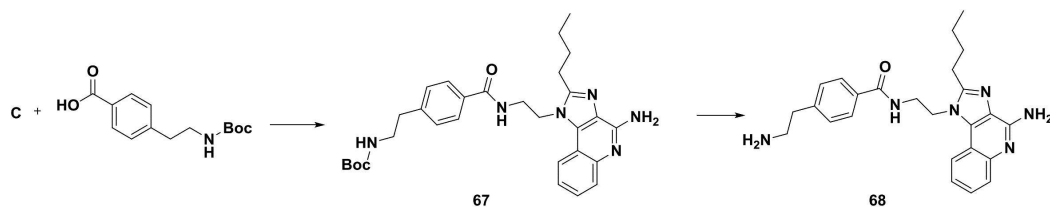
20

30

40

50

【化 1 1 6】



【0 7 4 6】

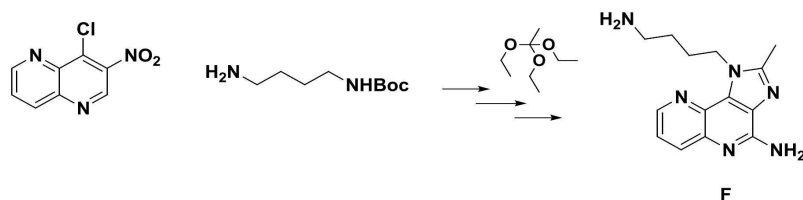
tert-ブチル 4- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エチルカルバモイル) フェネチルカルバメート (67) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 C 及び 4- (2- (tert-ブトキシカルボニルアミノ) エチル) 安息香酸を出発材料として使用して、化合物 67 を調製して、標的化合物 67 (1.5 mg、0.002 mmol、11%) を得た。MS m/z 457 (M+H)⁺。

【0 7 4 7】

N- (2- (4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) エチル) -4- (2-アミノエチル) ベンズアミド (68) : 56 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 67 を出発材料として使用して、化合物 68 を調製して、標的化合物 68 (2.9 mg、0.003 mmol、定量) を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

【0 7 4 8】

【化 1 1 7】

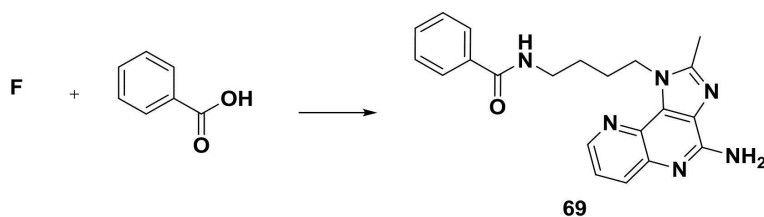


【0 7 4 9】

1- (4-アミノブチル) -2-エチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-4-アミン (F) : A について記載されるのと同様の手順を用いて、4-クロロ-3-ニトロ-1, 5-ナフチリジン、tert-ブチル 4-アミノブチルカルバメート及びトリエチルオルトアセテートを出発材料として使用して、化合物 F を調製して、標的化合物 F (出発材料から 130 mg、0.316 mmol、9%) を得た。MS m/z 270 (M+H)⁺。

【0 7 5 0】

【化 1 1 8】



【0 7 5 1】

N- (4- (4-アミノ-2-メチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル) ベンズアミド (69) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 F 及び安息香酸を出発材料として使用して、化合物 69 を調製して、標的化合物 69 (6.5 mg、0.008 mmol、42%) を得た。MS m/z 374 (M+H)⁺。

【0 7 5 2】

10

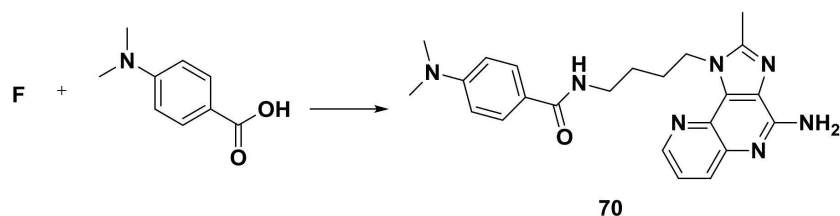
20

30

40

50

【化 1 1 9】

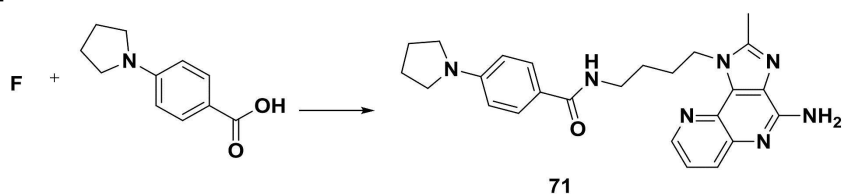


【0 7 5 3】

N-(4-(4-(4-amino-2-methyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(ジメチルアミノ)ベンズアミド(70): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物F及び4-ジメチルアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物70を調製して、標的化合物70(6.5mg、0.009mmol、39%)を得た。MS m/z 417 (M+H)⁺。

【0 7 5 4】

【化 1 2 0】

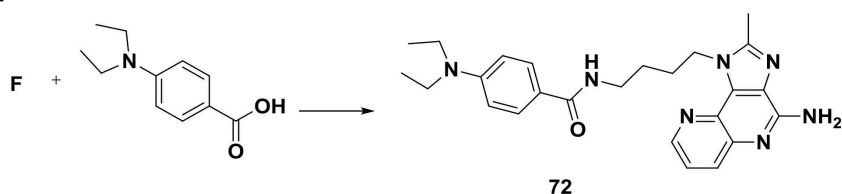


【0 7 5 5】

N-(4-(4-(4-amino-2-methyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(ピロリジン-1-イル)ベンズアミド(71): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物F及び4-(1-ピロリジニル安息香酸を出発材料として使用して、化合物71を調製して、標的化合物71(3.1mg、0.004mmol、18%)を得た。MS m/z 443 (M+H)⁺。

【0 7 5 6】

【化 1 2 1】

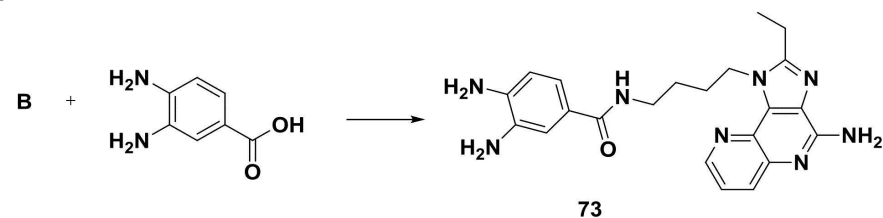


【0 7 5 7】

N-(4-(4-(4-amino-2-methyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(ジエチルアミノ)ベンズアミド(72): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物F及び4-(ジエチルアミノ)安息香酸を出発材料として使用して、化合物72を調製して、標的化合物72(6.4mg、0.008mmol、41%)を得た。MS m/z 445 (M+H)⁺。

【0 7 5 8】

【化 1 2 2】

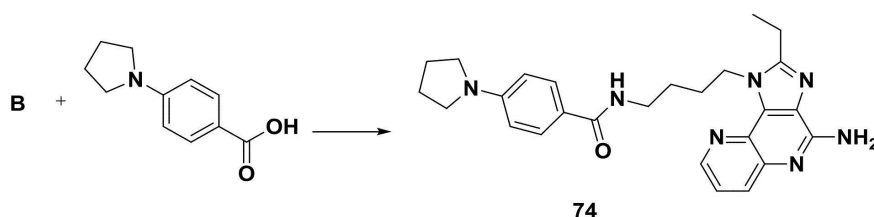


【0 7 5 9】

3, 4-ジアミノ-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(73): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び3, 4-ジアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物73を調製して、標的化合物73(1.1mg、0.001mmol、4%)を得た。MS m/z 418 (M+H)⁺。

【0760】

【化123】



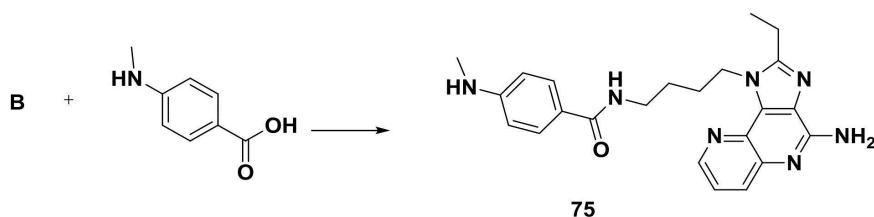
10

【0761】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ピロリジン-1-イル)ベンズアミド(74): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(ピロリジン-1-イル)安息香酸を出発材料として使用して、化合物74を調製して、標的化合物74(4.5mg、0.005mmol、19%)を得た。MS m/z 457 (M+H)⁺。

【0762】

【化124】



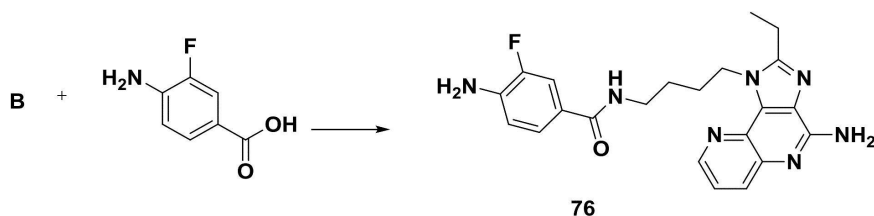
20

【0763】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(メチルアミノ)ベンズアミド(75): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-メチルアミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物75を調製して、標的化合物75(7.6mg、0.009mmol、33%)を得た。MS m/z 417 (M+H)⁺。

【0764】

【化125】



30

40

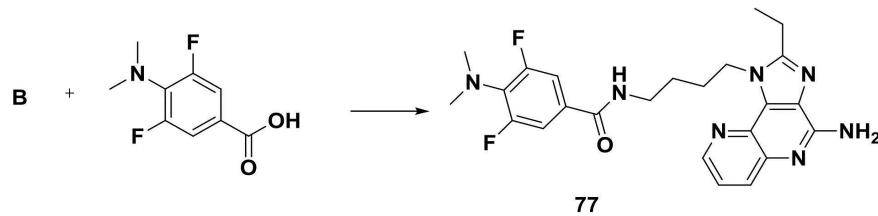
【0765】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-フルオロベンズアミド(76): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び3-フルオロ-4-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物76を調製して、標的化合物76(7mg、0.008mmol、31%)を得た。MS m/z 421 (M+H)⁺。

【0766】

50

【化126】



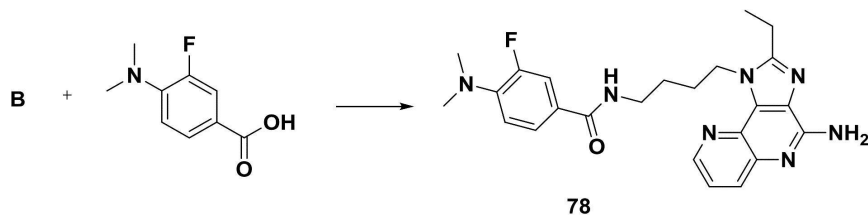
【0767】

N-(4-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)-3,5-ジフルオロベンズアミド(77): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(ジメチルアミノ)-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物77を調製して、標的化合物77(9.5mg、0.010mmol、41%)を得た。MS m/z 467 ($M+H$)⁺。

10

【0768】

【化127】



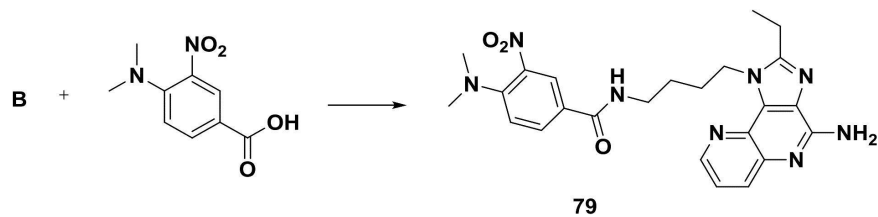
20

【0769】

N-(4-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)-3-フルオロベンズアミド(78): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(ジメチルアミノ)-3-フルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物78を調製して、標的化合物78(12mg、0.013mmol、49%)を得た。MS m/z 449 ($M+H$)⁺。

【0770】

【化128】



30

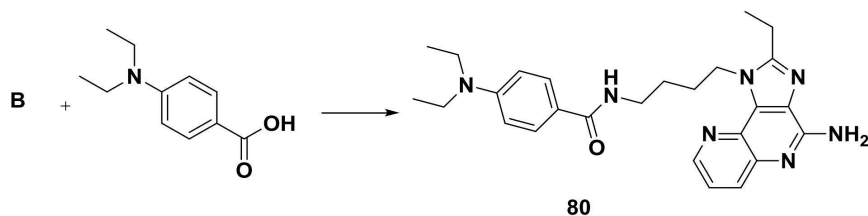
【0771】

N-(4-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)-3-ニトロベンズアミド(79): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(ジメチルアミノ)-3-ニトロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物79を調製して、標的化合物79(11mg、0.012mmol、50%)を得た。MS m/z 476 ($M+H$)⁺。

40

【0772】

【化129】



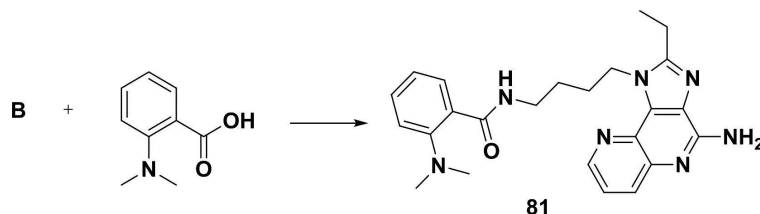
50

【0773】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジエチルアミノ)ベンズアミド(80):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-(ジエチルアミノ)安息香酸を出発材料として使用して、化合物80を調製して、標的化合物80(10mg、0.011mmol、42%)を得た。MS m/z 459 (M+H)⁺。

【0774】

【化130】



10

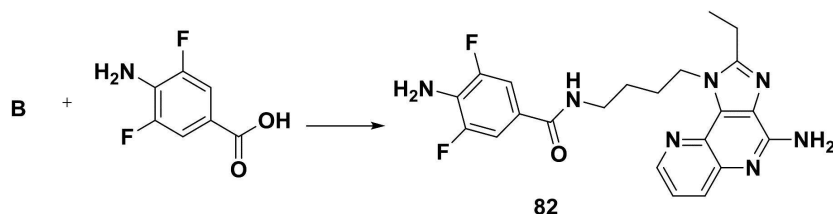
【0775】

N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-2-(ジメチルアミノ)ベンズアミド(81):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び2-(ジエチルアミノ)安息香酸を出発材料として使用して、化合物81を調製して、標的化合物81(12.2mg、0.014mmol、57%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

20

【0776】

【化131】



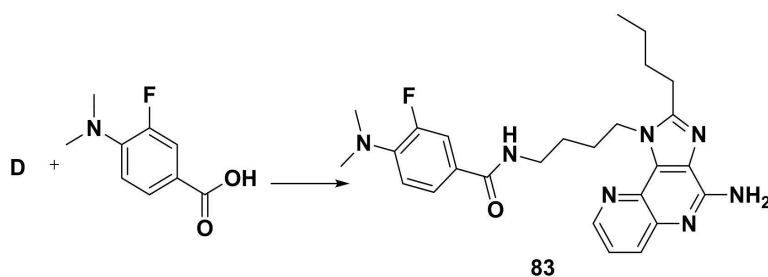
【0777】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(82):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物82を調製して、標的化合物82(10.2mg、0.011mmol、49%)を得た。MS m/z 439 (M+H)⁺。

30

【0778】

【化132】



40

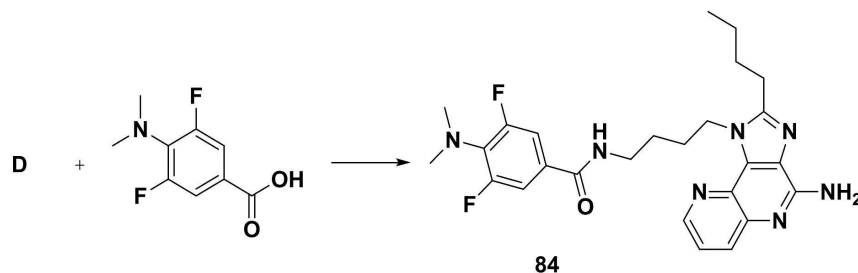
【0779】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)-3-フルオロベンズアミド(83):16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-(ジメチルアミノ)-3-フルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物83を調製して、標的化合物83(9mg、0.011mmol、50%)を得た。MS m/z 477 (M+H)⁺。

50

【0780】

【化133】



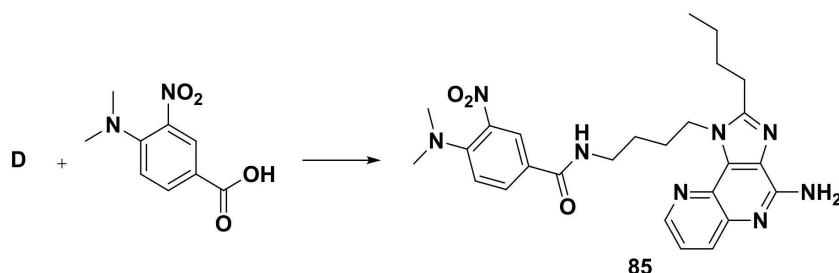
10

【0781】

N-(4-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(dimethylamino)-3,5-difluorobenzamido)butylamine (84) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-(dimethylamino)-3,5-difluorobenzoic acidを出発材料として使用して、化合物84を調製して、標的化合物84 (7 mg、0.008 mmol、38%)を得た。MS m/z 495 (M+H)⁺。

【0782】

【化134】



20

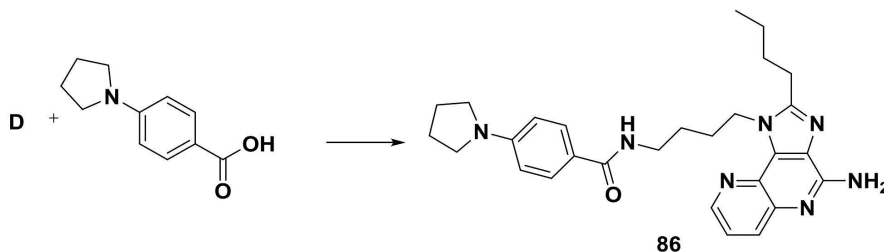
【0783】

N-(4-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(dimethylamino)-3-nitrobenzamido)butylamine (85) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-(dimethylamino)-3-nitrobenzoic acidを出発材料として使用して、化合物85を調製して、標的化合物85 (10 mg、0.012 mmol、54%)を得た。MS m/z 504 (M+H)⁺。

30

【0784】

【化135】



40

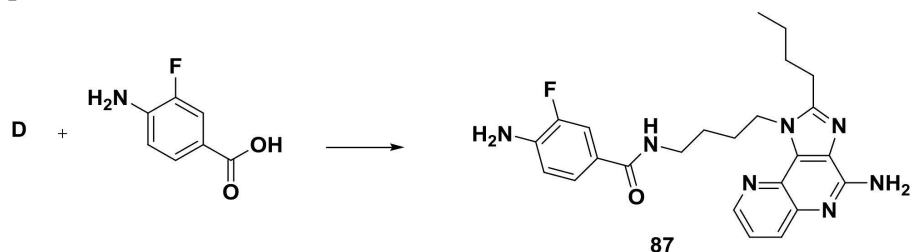
【0785】

N-(4-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)butyl)-4-(pyrrolidin-1-yl)benzamido)butylamine (86) : 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-(1-pyrrolidinyl)benzoic acidを出発材料として使用して、化合物86を調製して、標的化合物86 (2 mg、0.002 mmol、11%)を得た。MS m/z 485 (M+H)⁺。

【0786】

50

【化 1 3 6】



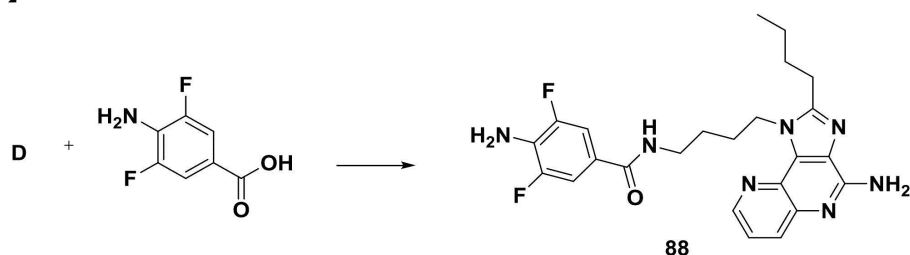
【0 7 8 7】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-フルオロベンズアミド(87): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-アミノ-3-フルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物87を調製して、標的化合物87(6mg、0.008mmol、20%)を得た。MS m/z 449 (M+H)⁺。

10

【0 7 8 8】

【化 1 3 7】



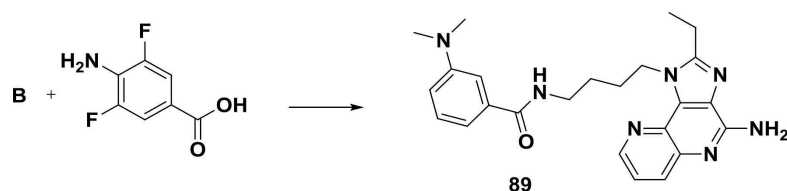
20

【0 7 8 9】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(88): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物88を調製して、標的化合物88(6mg、0.007mmol、34%)を得た。MS m/z 467 (M+H)⁺。

【0 7 9 0】

【化 1 3 8】



30

【0 7 9 1】

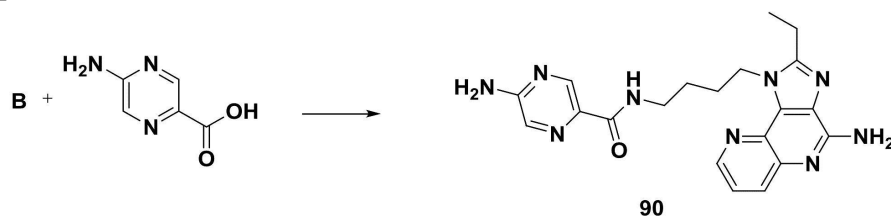
N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-(ジメチルアミノ)ベンズアミド(89): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物89を調製して、標的化合物89(10mg、0.011mmol、27%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

40

【0 7 9 2】

50

【化 1 3 9】

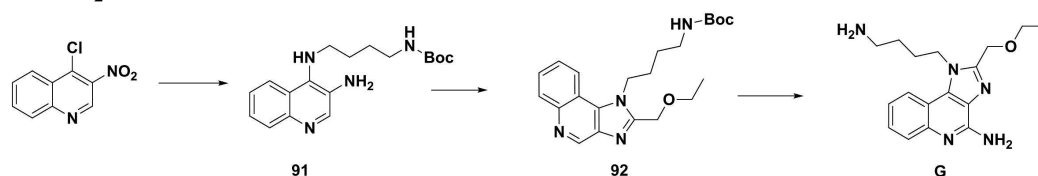


【0 7 9 3】

5-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ピラジン-2-カルボキサミド(90): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物B及び5-アミノピリジン-2-カルボン酸を出発材料として使用して、化合物90を調製して、標的化合物90(8mg、0.009mmol、37%)を得た。MS m/z 405 (M+H)⁺。

【0 7 9 4】

【化 1 4 0】



【0 7 9 5】

tert-ブチル4-(3-アミノキノリン-4-イルアミノ)ブチルカルバメート(91): 2について記載されるのと同様の手順を用いて、4-クロロ-3-ニトロキノリン及びtert-ブチル4-アミノブチルカルバメートを使用して、化合物91を調製して、標的化合物91(出発材料から5050mg、15.284mmol、97%)を得た。MS m/z 331 (M+H)⁺。

【0 7 9 6】

tert-ブチル4-(2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチルカルバメートブチルカルバメート(92): 無水THF(12mL)中のtert-ブチル4-(3-アミノキノリン-4-イルアミノ)ブチルカルバメート(1070mg、3.238mmol)の溶液に、トリエチルアミン(885μL、8.746mmol)及び2-エトキシアセチルクロリド(500mg、4.078mmol)を23℃で添加した。20時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM(50mL)に溶解し、飽和重炭酸ナトリウム(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、中間体(tert-ブチル4-(3-(2-エトキシアセトアミド)キノリン-4-イルアミノ)ブチルカルバメート)を粗製物として得た。この粗製物をMeOH(5mL)中に溶解し、続いて酸化カルシウム(0.5g)を密封チューブに添加した。この反応混合物を、120℃で2.5時間加熱した。CaOを濾過により除去した後、溶媒を真空下で除去し、残留物を分取LCにより精製して、化合物92(346mg、0.868mmol、27%)を得た。MS m/z 399 (M+H)⁺。

【0 7 9 7】

1-(4-アミノブチル)-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン、3HCl(G): Aについて記載されるのと同様の手順を用いて、化合物92を使用して、化合物Gを調製して、標的化合物G(出発材料から5270mg、0.595mmol、4%)を得た。MS m/z 312 (M+H)⁺。

【0 7 9 8】

10

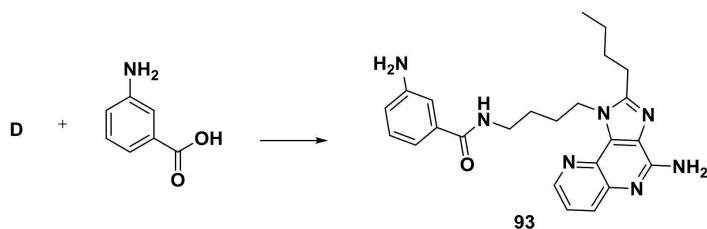
20

30

40

50

【化 1 4 1】

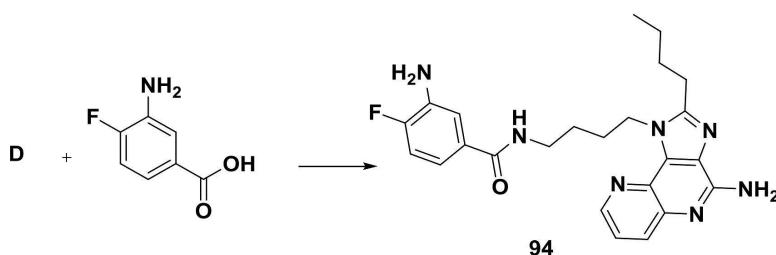


【0 7 9 9】

3-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(93): 16について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物D及び3-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物93を調製して、標的化合物93(5mg、0.006mmol、19%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

【0 8 0 0】

【化 1 4 2】

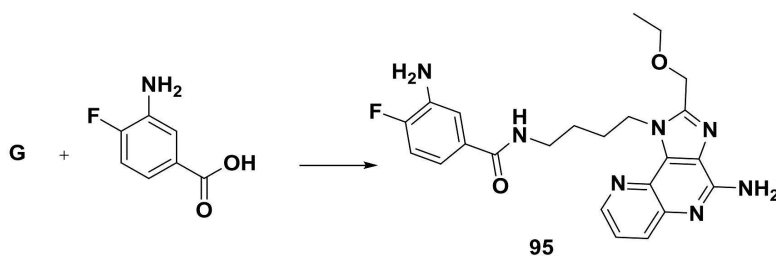


【0 8 0 1】

3-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-フルオロベンズアミド(94): DMF(1mL)中のD(10mg、0.024mmol)及び3-アミノ-4-フルオロ安息香酸(4mg、0.026mmol)の溶液に、DMTMMT(7mg、0.029mmol)、及びDIEA(30μL、0.172mmol)を23℃で添加した。10分後、混合物を分取LCにより精製して、標的化合物94(5mg、0.006mmol、21%)を得た。MS m/z 449 (M+H)⁺。

【0 8 0 2】

【化 1 4 3】



【0 8 0 3】

3-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-フルオロベンズアミド(95): 94について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物G及び3-アミノ-4-フルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物95を調製して、標的化合物95(6mg、0.007mmol、26%)を得た。MS m/z 451 (M+H)⁺。

【0 8 0 4】

10

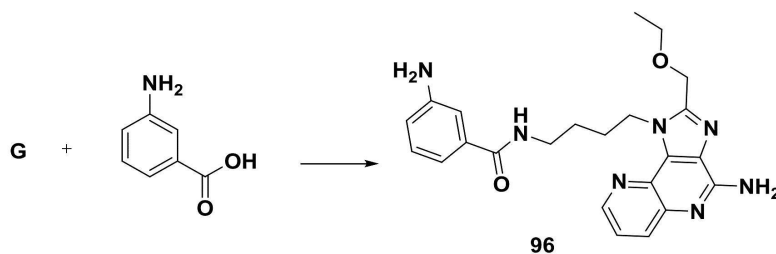
20

30

40

50

【化 1 4 4】

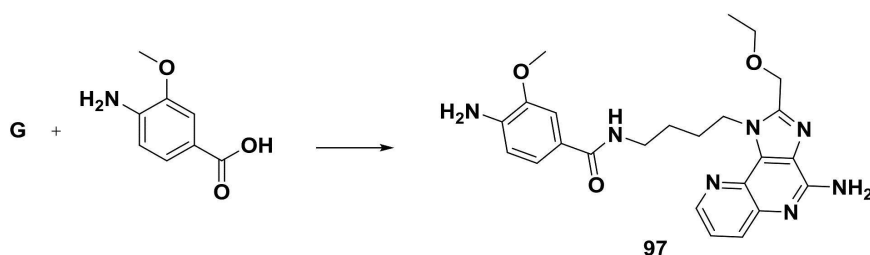


【0 8 0 5】

3-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-フルオロベンズアミド(96) : 94 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物G及び3-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物96を調製して、標的化合物96(5mg、0.006mmol、19%)を得た。MS m/z 433 (M+H)⁺。

【0 8 0 6】

【化 1 4 5】

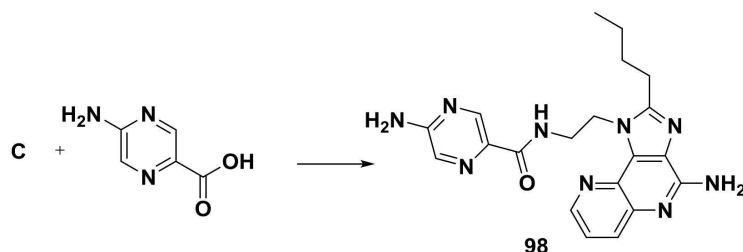


【0 8 0 7】

3-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)ベンズアミド(97) : 94 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物G及び4-アミノ-3-メトキシ安息香酸を出発材料として使用して、化合物97を調製して、標的化合物97(5mg、0.005mmol、23%)を得た。MS m/z 463 (M+H)⁺。

【0 8 0 8】

【化 1 4 6】



【0 8 0 9】

5-アミノ-N-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチ)ピラジン-2-カルボキサミド(98) : 16 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物C及び5-アミノピラジン-2-カルボン酸を出発材料として使用して、化合物98を調製して、標的化合物98(2.13mg、0.002mmol、11%)を得た。MS m/z 405 (M+H)⁺。

【0 8 1 0】

10

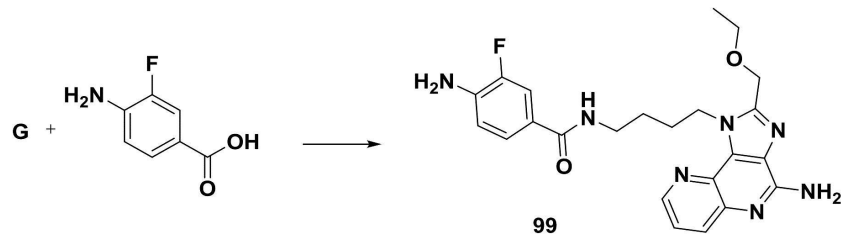
20

30

40

50

【化 1 4 7】

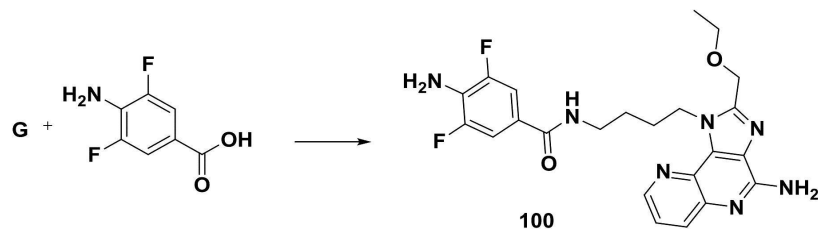


【0 8 1 1】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3-フルオロベンズアミド(99): 94について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物G及び3-フルオロ-4-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物99を調製して、標的化合物99(7.37mg、0.008mmol、37%)を得た。MS m/z 451(M+H)⁺。

【0 8 1 2】

【化 1 4 8】

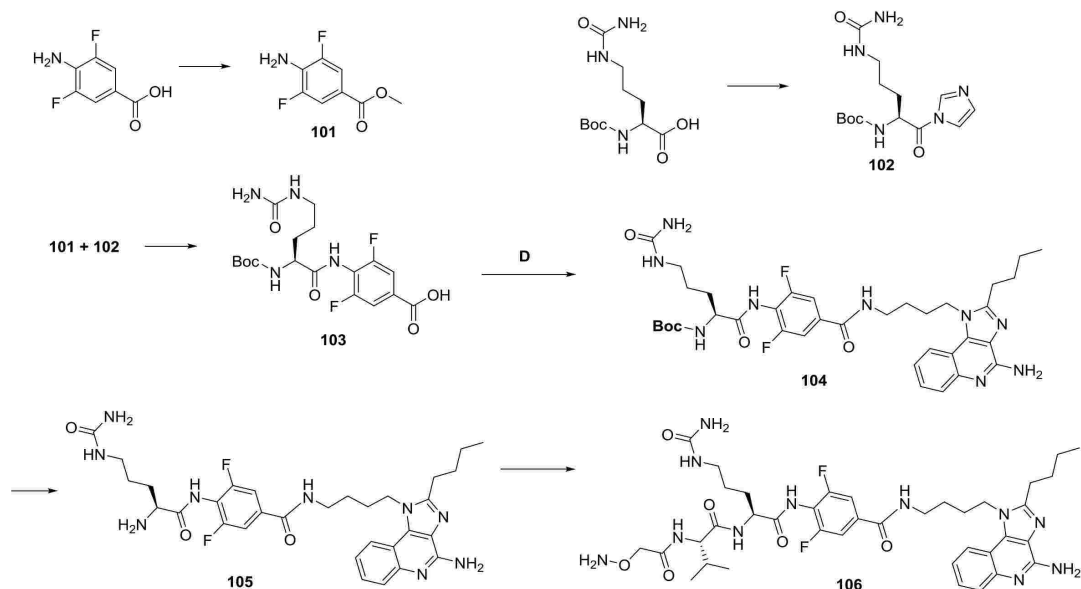


【0 8 1 3】

4-アミノ-N-(4-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(100): 94について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物G及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物100を調製して、標的化合物100(9.7mg、0.011mmol、51%)を得た。MS m/z 469(M+H)⁺。

【0 8 1 4】

【化 1 4 9】



【0 8 1 5】

メチル-4-アミノ-3,5-ジフルオロベンゾエート(101): アセトニトリル(

10

20

30

40

50

15 mL) 中の 4-アミノ-3, 5-ジフルオロ安息香酸 (2087 mg、12.055 mmol) の溶液に、塩化チオニル (12 mL) を添加し、次いで 80℃ に加熱した。1 時間後、溶媒を真空中で除去した。トルエン (10 mL) を混合物に添加し、続いて真空中で蒸発させた。残留物を無水 MeOH (5 mL) に溶解した。0.5 時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物を DCM (20 mL) に溶解し、飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄した後、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去して、化合物 101 (1730 mg、9.244 mmol、77%) を得た。MS m/z 188 (M+H)⁺。

【0816】

(S)-tert-ブチル 1-(1H-イミダゾール-1-イル)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバメート (102): DMF (5 mL) 中の Boc-Cit-OH (1150 mg、4.177 mmol) の溶液に、CDI (880 mg、5.427 mmol) を室温で添加し、次いで 60℃ に加熱した。2 時間後、この混合物に CDI (220 mg、1.357 mmol) を添加した。反応物を 60℃ で 1 時間攪拌した。3 時間後、反応物を真空中で乾燥させた。残留物を EtOAc (50 mL) で希釈し、水 (50 mL)、飽和重炭酸ナトリウム (20 mL) 及びブライン (20 mL) で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥させ、続いて濾過し、溶媒を真空中で除去して、化合物 102 (1465 mg、4.503 mmol、粗製物) を得た。MS m/z 326 (M+H)⁺。

【0817】

(S)-4-(2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-5-ウレイドペンタンアミド)-3, 5-ジフルオロ安息香酸 (103): THF (2 mL) 中の化合物 103 (188 mg、0.578 mmol) 及び化合物 102 (108 mg、0.577 mmol) の溶液に、NaH60% (70 mg、1.826 mmol) を 23℃ で添加した。20 時間後、1 mL の水を添加し、混合物を 10 分間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物を分取 LC により精製して、化合物 103 (17 mg、0.049 mmol、9%) を得た。MS m/z 345 (M+H)⁺。

【0818】

(S)-tert-ブチル 1-(4-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチルカルバモイル)-2, 6-ジフルオロフェニルアミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イルカルバメート (104): DMF (1 mL) 中の化合物 D (20 mg、0.044 mmol) 及び化合物 103 (17 mg、0.040 mmol) の溶液に、HATU (16 mg、0.042 mmol) 及び DIEA (60 µL、0.344 mmol) を 23℃ で添加した。20 分後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 104 (23 mg、0.022 mmol、55%) を得た。MS m/z 724 (M+H)⁺。

【0819】

(S)-N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル)-4-(2-アミノ-5-ウレイドペンタンアミド)-3, 5-ジフルオロベンズアミド (105): DCM (1 mL) 中の化合物 104 (23 mg、0.022 mmol) の溶液に、TFA (1 mL) を 23℃ で添加した。15 分後、溶媒を真空中で除去した。残留物に 10 mL のトルエンを添加し、再蒸発させた。残留物を高真空ポンプで乾燥させて、化合物 105 (24 mg、0.022 mmol、定量) を得た。MS m/z 624 (M+H)⁺。

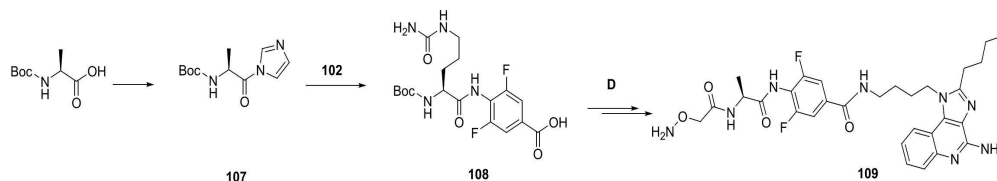
【0820】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ [4, 5-c] キノリン-1-イル) ブチル)-4-((S)-2-((S)-2-(2-(アミノオキシ) アセトアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)-3, 5-ジフルオロベンズアミド (106): DMF (1 mL) 中の Fmoc-Aoa-Val-OH (11 mg、0.027 mmol) 及び化合物 105 (24 mg、0.022 mmol) の溶液

に、HATU (9 mg、0.037 mmol) 及び DIEA (40 μ L、0.023 mmol) を 23℃ で添加した。10 分後、この混合物にピペリジン (50 μ L、5%) を添加した。5 分後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 106 (9 mg、0.007 mmol、27%) を得た。MS m/z 796 ($M+H$)⁺。

【0821】

【化150】



10

【0822】

(S)-tert-butyl 1-(1H-imidazol-1-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbamate (107) : 102 について記載されるのと同様の手順を用いて、Boc-アラニンを使用して、化合物 107 を調製して、標的化合物 107 (730 mg、3.051 mmol、75% 粗製物) を得た。MS m/z 326 ($M+H$)⁺。

【0823】

(S)-4-(2-(tert-butoxycarbonylamino)-5-ureidopentanamide)-3,5-difluorobenzoic acid (108) : 103 について記載されるのと同様の手順を用いて、107 を使用して、化合物 108 を調製して、標的化合物 108 (17 mg、0.049 mmol、9%) を得た。MS m/z 431 ($M+H$)⁺。

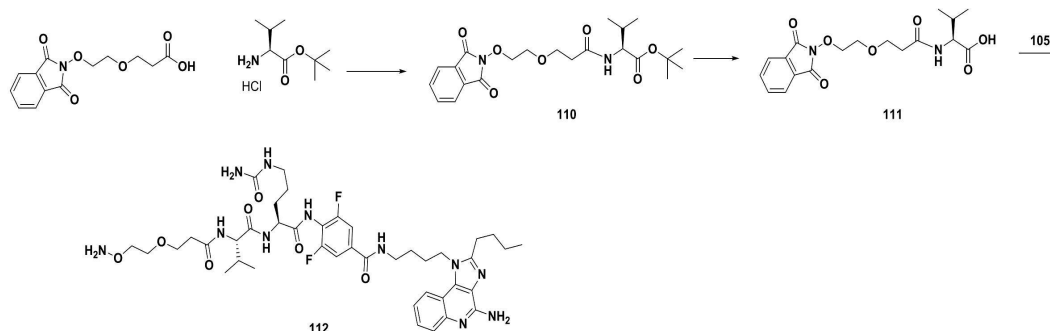
20

【0824】

(S)-N-(4-(4-amino-2-butyl-1H-imidazo[4,5-c]キノリン-1-yl)butyl)-4-(2-(2-(aminooxy)acetamido)propanamide)-3,5-difluorobenzamide (109) : 106 について記載されるのと同様の手順を用いて、108 及び化合物 D を使用して、化合物 109 を調製して、標的化合物 109 (108 から 9 mg、0.007 mmol、31%) を得た。MS m/z 796 ($M+H$)⁺。

【0825】

【化151】



40

【0826】

(S)-tert-butyl 2-(3-(2-(1,3-dioxoisobindolin-2-yl oxy) ethoxy) propanamide)-3-methylbutanoate (110) : DCM (5 mL) 中の 3-(2-(1,3-dioxoisobindolin-2-yl oxy) ethoxy) propanoic acid (295 mg、1.056 mmol) 及び Val-OtBu、HCl (225 mg、1.078 mmol) の溶液に、DMTMMT (304 mg、1.260 mmol) 及び DIEA (460 μ L、2.641 mmol) を 23℃ で添加した。1.5 時間後、溶液を EtOAc (100 mL) で希釈し、1N の HCl (100 mL)、飽和重碳酸ナトリウム (100 mL)、及び ブライン (50 mL) で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフ

50

ィーにより精製して、化合物 110 (379mg、0.872mmol、83%) を得た。
MS m/z 435 (M+H)⁺。

【0827】

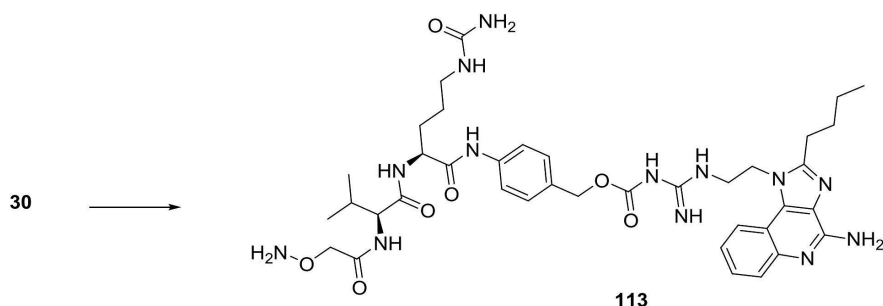
(S)-2-(3-(2-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イルオキシ)エトキシ)プロパンアミド)-3-メチルブタン酸(111): 化合物 110 (379mg、0.872mmol) の溶液に、ジオキサン中の 4M の HCl (5mL、20mmol) を 23℃ で添加した。20 時間後、溶媒を真空中で除去し、高真空ポンプを使用して乾燥させて、化合物 111 (320mg、0.846mmol、97%) を得た。MS m/z 379 (M+H)⁺。

【0828】

N-(4-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(アミノオキシ)エトキシ)プロパンアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド)-3,5-ジフルオロベンズアミド(112): DMF (1mL) 中の化合物 111 (3mg、0.007mmol) 及び化合物 105 (5mg、0.005mmol) の溶液に、DMTMMT (3mg、0.012mmol) 及び DIEA (20μL、0.115mmol) を 23℃ で添加した。1.5 時間後、この混合物にヒドラジン、H₂O (2μL、0.506mmol) を添加した。5 分後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 112 (2mg、0.002mmol、21%) を得た。MS m/z 855 (M+H)⁺。

【0829】

【化152】



【0830】

(S)-N-(4-((N-(2-(4-アミノ-2-ブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)エチル)カルバミドイルカルバモイルオキシ)メチル)フェニル)-2-((S)-2-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタンアミド(113): 106 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 30 を出発材料として使用して、化合物 113 を調製して、標的化合物 113 (化合物 30 から 2mg、0.001mmol、2%) を得た。MS m/z 805 (M+H)⁺。

【0831】

10

20

30

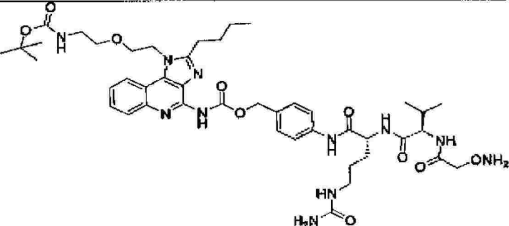
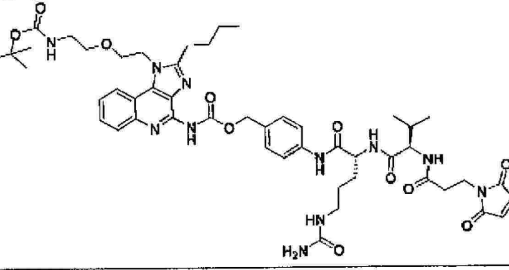
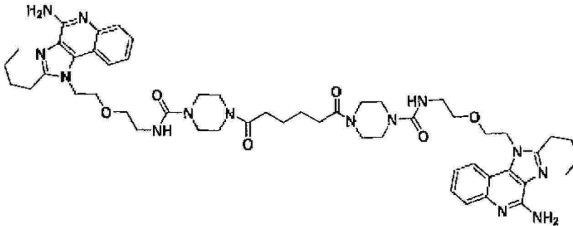
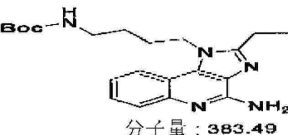
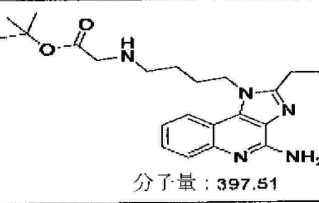
40

50

【表 3】

表 3 - TLR アゴニスト - コア 1 化合物

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
5	AXC-621	
A	AXC-622	
6	AXC-625	
7	AXC-626	
8	AXC-627	
9	AXC-638	
10	AXC-639	

化合物番号	化合物名	構造・コア1化合物
11	AXC-640	
12	AXC-642	
13	AXC-662	
14	AXC-665	 分子量：383.49
B	AXC-666	 分子量：283.37
15	AXC-667	 分子量：397.51

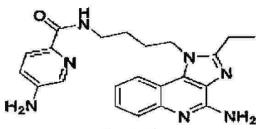
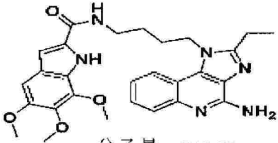
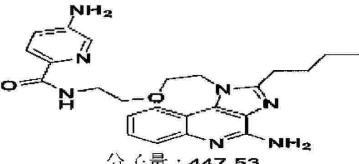
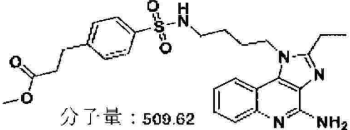
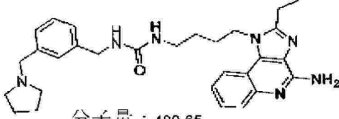
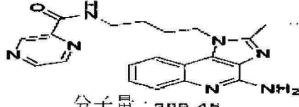
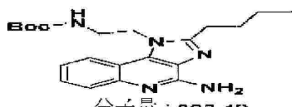
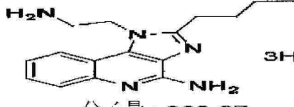
10

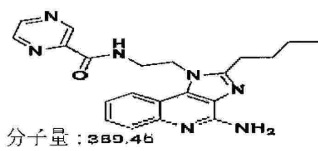
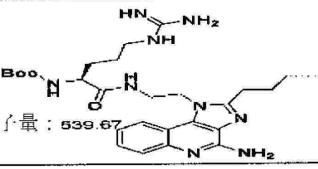
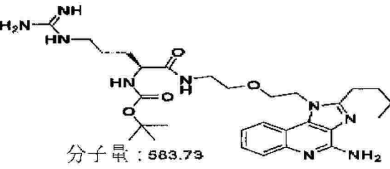
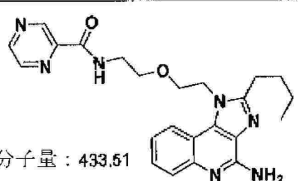
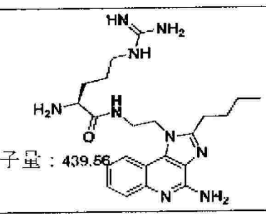
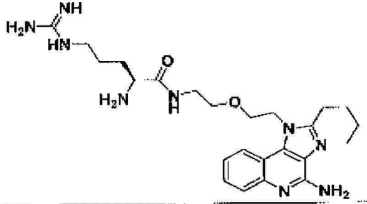
20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コアI化合物
16	AXC-668	 分子量 : 403.48
17	AXC-669	 分子量 : 516.59
18	AXC-670	 分子量 : 447.53
19	AXC-671	 分子量 : 509.62
20	AXC-672	 分子量 : 489.65
21	AXC-675	 分子量 : 389.45
22	AXC-678	 分子量 : 383.49
C	AXC-679	 分子量 : 283.37 3HCl

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
23	AXC-681	 分子量 : 389.45
24	AXC-687	 分子量 : 539.67
26	AXC-688	 分子量 : 583.73
28	AXC-689	 分子量 : 433.51
25	AXC-690	 分子量 : 439.56
27	AXC-691	 分子量 : 439.56

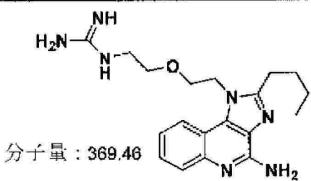
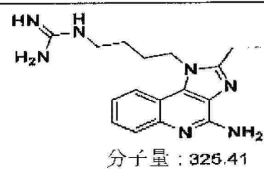
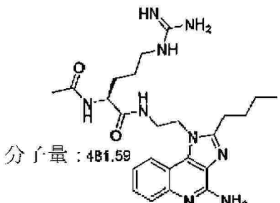
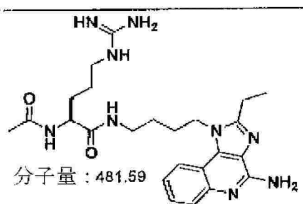
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造・コア1化合物
29	AXC-696	 分子量 : 369.46
30	AXC-697	 分子量 : 325.41
31	AXC-698	 分子量 : 325.41
32	AXC-699	 分子量 : 481.59
33	AXC-700	 分子量 : 625.65
34	AXC-701	 分子量 : 481.59

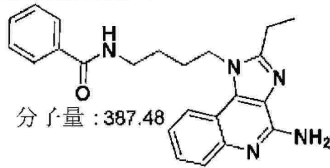
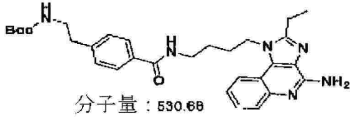
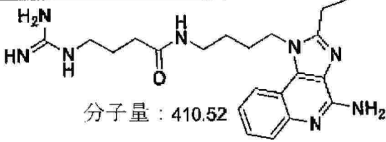
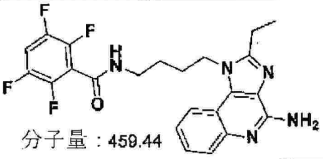
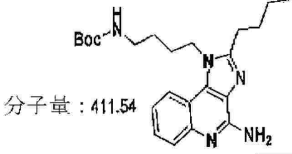
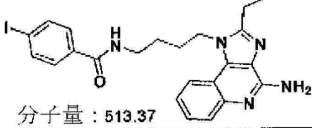
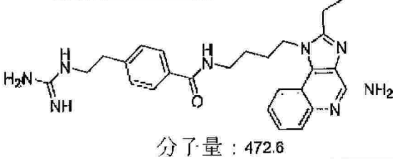
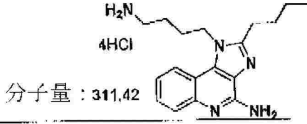
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
35	AXC-702	 分子量 : 387.48
36	AXC-709	 分子量 : 530.68
37	AXC-710	 分子量 : 410.52
38	AXC-711	 分子量 : 459.44
39	AXC-712	 分子量 : 411.54
40	AXC-713	 分子量 : 513.37
41	AXC-714	 分子量 : 472.6
D	AXC-715	 分子量 : 311.42

10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
42	AXC-716	 分子量 : 415.53
43	AXC-717	 分子量 : 558.71
44	AXC-718	 分子量 : 412.53
45	AXC-719	 分子量 : 417.51
46	AXC-722	 分子量 : 432.53
47	AXC-723	 分子量 : 402.50
48	AXC-724	 分子量 : 430.56

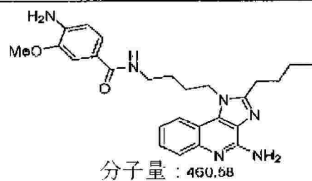
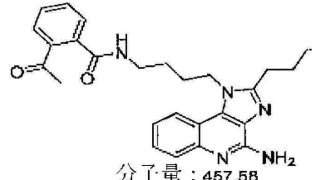
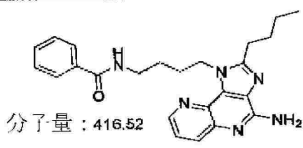
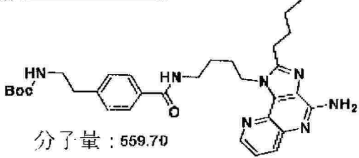
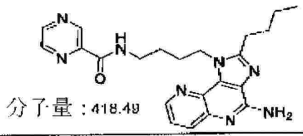
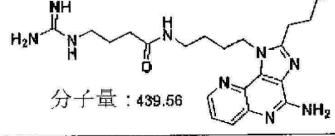
10

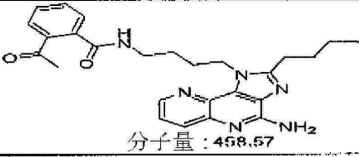
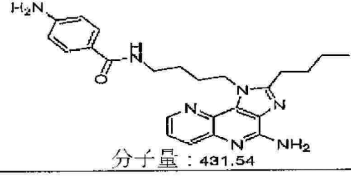
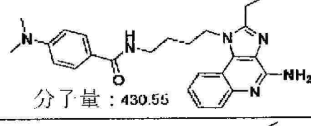
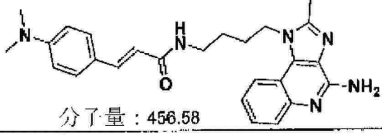
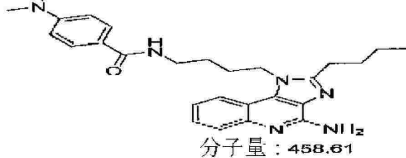
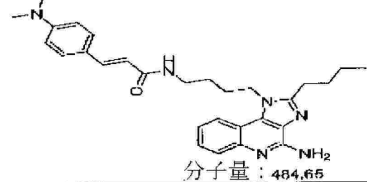
20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造・コア1化合物
49	AXC-725	 分子量 : 460.58
50	AXC-726	 分子量 : 457.58
51	AXC-727	 分子量 : 458.60
52	AXC-729	 分子量 : 416.52
53	AXC-731	 分子量 : 559.70
54	AXC-732	 分子量 : 418.48
55	AXC-733	 分子量 : 439.58
56	AXC-734	 分子量 : 459.59

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
57	AXC-735	 分子量 : 458.57
58	AXC-736	 分子量 : 461.57
59	AXC-737	 分子量 : 431.54
60	AXC-738	 分子量 : 430.55
61	AXC-739	 分子量 : 456.58
62	AXC-740	 分子量 : 458.61
63	AXC-741	 分子量 : 484.65

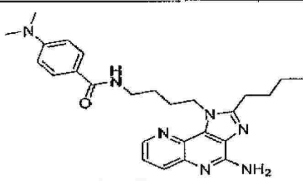
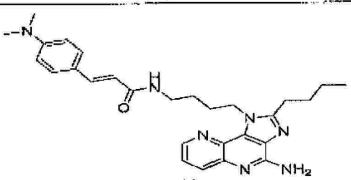
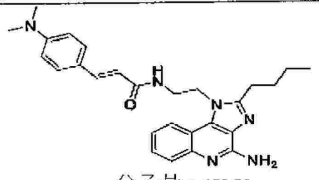
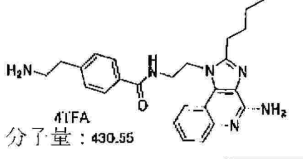
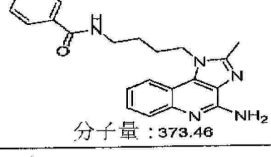
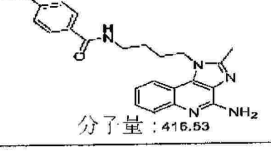
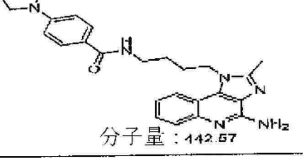
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
64	AXC-743	 分子量 : 459.60
65	AXC-742	 分子量 : 455.64
66	AXC-747	 分子量 : 456.58
68	AXC-748	 41FA 分子量 : 430.55
69	AXC-749	 分子量 : 373.46
70	AXC-750	 分子量 : 416.53
71	AXC-751	 分子量 : 442.57

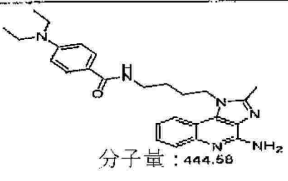
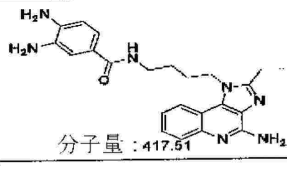
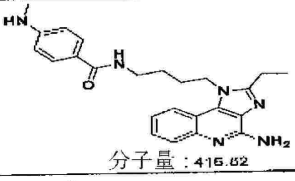
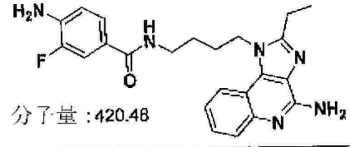
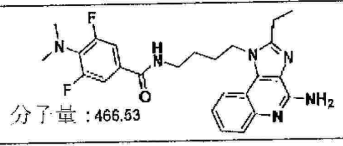
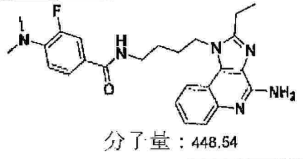
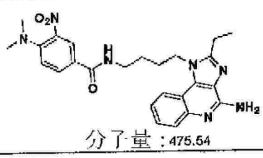
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア I 化合物
72	AXC-752	 分子量 : 444.58
73	AXC-754	 分子量 : 417.51
74	AXC-755	 分子量 : 456.58
75	AXC-756	 分子量 : 415.52
76	AXC-757	 分子量 : 420.48
77	AXC-758	 分子量 : 466.53
78	AXC-759	 分子量 : 448.54
79	AXC-760	 分子量 : 475.54

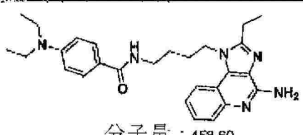
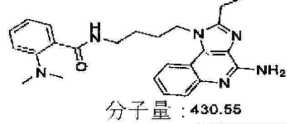
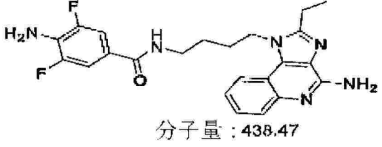
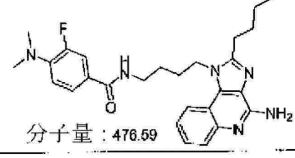
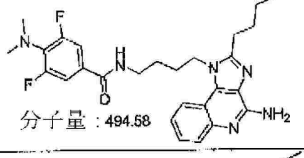
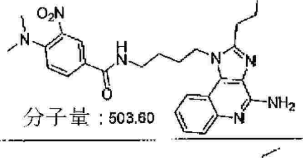
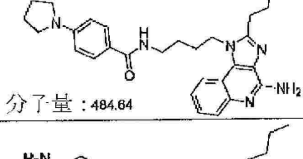
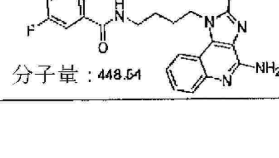
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
80	AXC-761	 分子量 : 468.60
81	AXC-762	 分子量 : 430.55
82	AXC-764	 分子量 : 438.47
83	AXC-771	 分子量 : 476.59
84	AXC-772	 分子量 : 494.58
85	AXC-773	 分子量 : 503.60
86	AXC-777	 分子量 : 484.64
87	AXC-778	 分子量 : 448.54

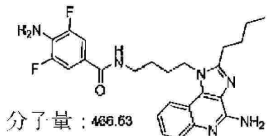
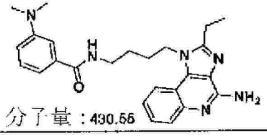
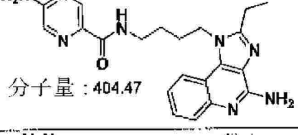
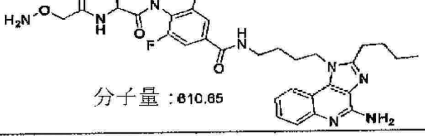
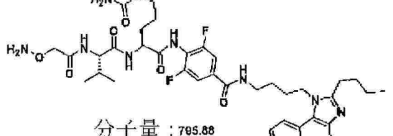
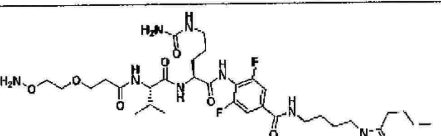
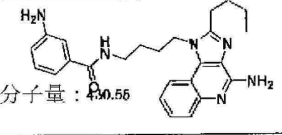
10

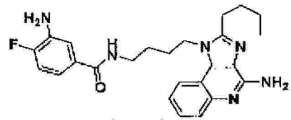
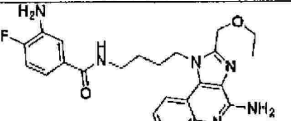
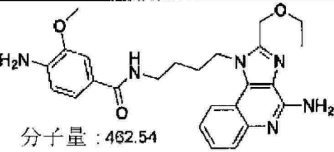
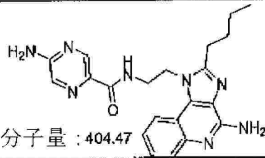
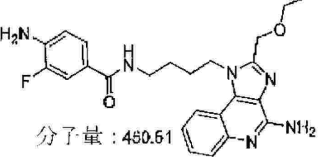
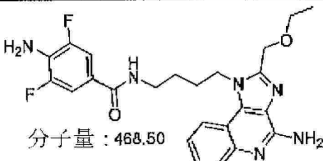
20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
88	AXC-779	 分子量 : 466.63
89	AXC-789	 分子量 : 430.56
90	AXC-793	 分子量 : 404.47
G	AXC-799	 分子量 : 313.40
109	AXC-800	 分子量 : 610.65
106	AXC-801	 分子量 : 765.88
112	AXC-802	 分子量 : 853.96
93	AXC-803	 分子量 : 430.56

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
94	AXC-804	 分子量 : 448.54
95	AXC-805	 分子量 : 450.61
96	AXC-806	 分子量 : 432.52
97	AXC-807	 分子量 : 462.54
98	AXC-808	 分子量 : 404.47
99	AXC-809	 分子量 : 450.61
100	AXC-810	 分子量 : 468.50

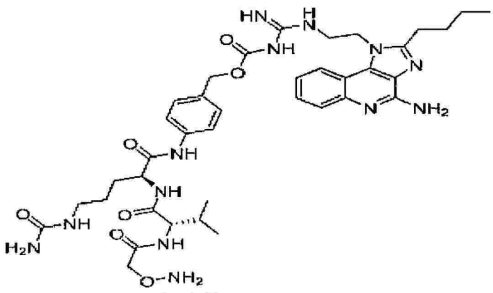
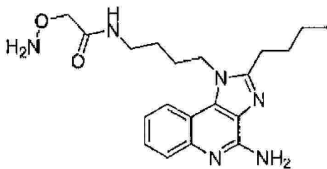
10

20

30

40

50

化合物番号	化合物名	構造 - コア1化合物
113	AXC-831	 分子量 : 803.93
192	AXC-910	 分子量 : 384.5

10

【0832】

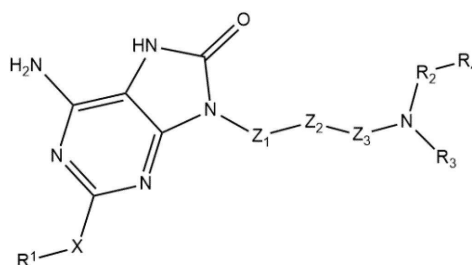
20

実施例3：以下の代表的な構造 - コア5（図1）を含むTLRアゴニストの合成：

【0833】

【化153】

コア5



30

【0834】

いくつかの実施形態において、Xは、O、S、NH、またはHであり、

R1は、C1～C12アルキル、置換C1～C12アルキル、酸素含有C1～C12アルキル、複素環、置換複素環、シクロアルキル、置換シクロアルキル、-N3、末端C1～C12アルキル、末端置換C1～C12アルキル、または不在であり、

R2またはR3は、それぞれ、C4～C8シクロアルキル、または独立して、-H、C1～C12アルキル、ニトロ含有アルキル、酸素含有アルキル、芳香族環を形成するように結合され、

40

R4は、-ONH2、末端C1～C12アルキル、C1～C12アルキル、C1～C12置換アルキル、C4～C8シクロアルキル、芳香族環、置換芳香族環、芳香族複素環、置換芳香族複素環、または不在であり、

Z1は、C1～C6アルキル、C3～C10シクロアルキル、C3～C10ニトロ含有複素環であり、

Z2は、芳香族環、芳香族複素環、C2～C8シクロアルキル、または不在であり、

Z3は、C1～C12アルキル、置換C1～C12アルキル、C3～C8シクロアルキル、置換C3～C8シクロアルキル、置換C3～C8ニトロ含有複素環、C3～C8ニトロ含有複素環、または不在である。

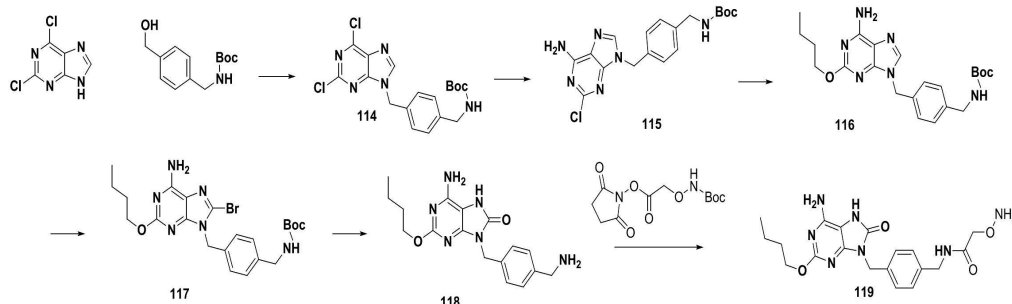
【0835】

50

コア5構造を有するTLRアゴニストは、以下のスキームに開示されるように合成された。

【0836】

【化154】



10

【0837】

tert-ブチル4-((2,6-ジクロロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジルカルバメート、*tert*-ブチル4-((2,6-ジクロロ-7H-プリン-7-イル)メチル)ベンジルカルバメート(114): THF(10mL)中の*tert*-ブチル4-(ヒドロキシメチル)ベンジルカルバメート(1280mg、5.394mmol)及び2,6-ジクロロプリン(1050mg、5.556mmol)の溶液に、PPh₃(1560mg、5.948mmol)を23℃で添加した。30分後、DIAD(1600μL、8.126mmol)を0℃で5分間にわたって添加した。混合物を50℃で攪拌した。2時間後、溶媒を真空中で除去した。残留混合物を、EtOAc(100mL)により希釈し、半飽和重炭酸ナトリウム(100mL)及びブライン(20mL)を使用して洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物114(2268mg、<5.555mmol、PPh₃との粗製混合物)を得た。MS m/z 409 (M+H)⁺。

20

【0838】

tert-ブチル4-((6-アミノ-2-クロロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジルカルバメート(115): 化合物114(PPh₃の粗製混合物、2268mg、<5.555mmol)を、攪拌棒を備えた耐圧ガラス容器に入れた。この容器に、MeOH中の7NのNH₃(12mL、84mmol)を添加した。チューブを密封し、120℃で加熱した。1時間後、溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM(100mL)に溶解した。沈殿物を濾過により除去した。液体をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物115(2,6-ジクロロプリンから1043mg、2.682mmol、50%)を得た。MS m/z 400 (M+H)⁺。

30

【0839】

tert-ブチル4-((6-アミノ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジルカルバメート(116): 化合物115(1043mg、2.682mmol)を20%ナトリウム*n*-ブトキシド(5mL、10.4mmol)に、乾燥窒素ガス下で、23℃で溶解し、温度を110℃に上げた。1.5時間後、1mLの水を混合物に添加し、続いてBoc無水物(170mg、0.779mmol)を添加した。5分後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM(30mL)に溶解し、半飽和重炭酸ナトリウム(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物116(560mg、1.313mmol、49%)を得た。MS m/z 427 (M+H)⁺。

40

【0840】

tert-ブチル4-((6-アミノ-8-プロモ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジルカルバメート(117): DCM(10mL)中の化合物11

50

6 (560 mg、1.313 mmol) の溶液に、臭素 (135 μ L、0.507 mmol) を 23 °C で添加した。10 分後、反応物を真空中で乾燥させた。残留物を DCM (50 mL) に溶解し、半飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、化合物 117 (440 mg、0.871 mmol、66%) を HBr 塩として得た。MS m/z 506 (M+H)⁺。

【0841】

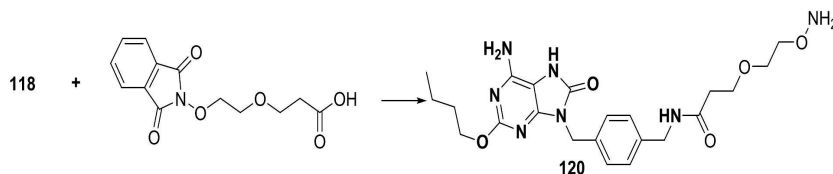
6-アミノ-9-(4-(アミノメチル)ベンジル)-2-ブトキシ-7H-プリン-8(9H)-オン (118) : 化合物 117 (240 mg、0.410 mmol) を、濃縮 HCl 溶液、37% (10 mL) に溶解し、還流した。4.5 時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物に水 (10 mL) 及び MeOH (4 mL) を添加し、これを NH₃、28% 溶液 (9 mL) を添加することによって中和した。溶媒を真空中で除去した。残留物を分取 LC により精製して、化合物 118 (11 mg、0.019 mmol、5%) を得た。MS m/z 343 (M+H)⁺。

【0842】

N-(4-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド (119) : DMF (1 mL) 中の化合物 118 (5 mg、0.007 mmol) 及び 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテート (3 mg、0.010 mmol) の溶液に、DIEA (5 μ L、0.057 mmol) を 23 °C で添加した。10 分後、溶媒を真空中で除去した。残留物に、DCM (1 mL) 及び TFA (1 mL) を 23 °C で添加した。10 分後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 119 (3.6 mg、0.005 mmol、65%) を得た。MS m/z 416 (M+H)⁺。

【0843】

【化155】



【0844】

N-(4-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)-3-(2-(アミノオキシ)エトキシ)プロパンアミド (120) : DMF (1 mL) 中の 118 (5 mg、0.007 mmol) 及び 3-(2-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イルオキシ)エトキシ)プロパン酸 (3 mg、0.011 mmol) の溶液に、DMTMMT (3 mg、0.012 mmol) 及び DIEA (8 μ L、0.046 mmol) を 23 °C で添加した。15 分後、混合物にヒドラジン、H₂O (3 μ L、0.06 mmol) を添加した。20 分後、混合物を分取 LC により精製して、化合物 120 (3.5 mg、0.004 mmol、59%) を得た。MS m/z 474 (M+H)⁺。

【0845】

10

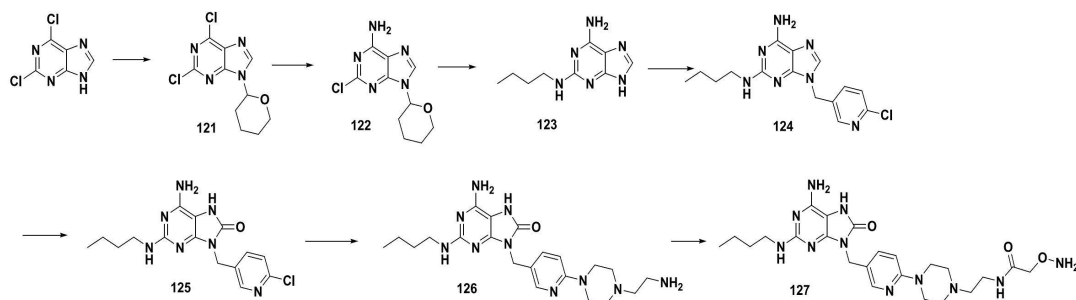
20

30

40

50

【化 1 5 6】



10

【0 8 4 6】

2, 6-ジクロロ-9-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)-9H-プリン (121) : 酢酸エチル (100 mL) 中の 2, 6-ジクロロプリン (2950 mg、15.608 mmol) の磁気攪拌溶液に、ベンゼンスルホン酸 (30 mg、0.19 mmol) を添加し、乾燥窒素下で 50℃ に加熱した。攪拌混合物に、3, 4-ジヒドロ-2H-ピラン (2200 μ L、26.153 mmol) を、50℃ で 1 時間にわたって添加した。温度を 23℃ に下げた。1 時間後、混合物を半飽和 NaHCO₃ (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去し、残留物を高真空ポンプで乾燥させて、化合物 121 (4170 mg、15.269 mmol、98%) を得た。MS m/z 274 (M+H)⁺。

20

【0 8 4 7】

2-クロロ-9-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)-9H-プリン-6-アミン (122) : 化合物 121 (4170 mg、15.269 mmol) を、攪拌棒を備えた耐圧ガラス容器に入れた。この容器に、MeOH 中の 7N の NH₃ (12.84 mmol) を添加した。チューブを密封し、110℃ で加熱した。3.5 時間後、混合物を室温に冷却し、一晩放置した。沈殿物を濾過し、MeOH (5 mL) で洗浄した。固体を高真空ポンプで乾燥させて、化合物 122 (3450 mg、13.6 mmol、89%) を得た。MS m/z 254 (M+H)⁺。

【0 8 4 8】

2-クロロ-9-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)-9H-プリン-6-アミン (123) : 化合物 122 (1746 mg、6.882 mmol) を、攪拌棒を備えた耐圧ガラス容器に入れた。この容器に、n-ブチルアミン (7 mL、70.86 mmol) 及び DIEA (2.3 mL、13.25 mmol) を添加した。チューブを密封し、150℃ で加熱した。5 時間後、混合物を室温に冷却し、溶媒を真空中で除去した。残留物を DCM (100 mL) 中に溶解し、水 (30 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去した。残留物 (中間体) を MeOH (10 mL) 及び TFA (2 mL) に溶解し、23℃ で一晩攪拌した。18 時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物に EtOAc (10 mL) 及びヘキサン (50 mL) を添加して沈殿させた。沈殿物を、濾過し、真空ポンプで乾燥させることにより収集して、化合物 123 (1640 mg、3.777 mmol、55%) を 2 TFA 塩として得た。MS m/z 207 (M+H)⁺。

30

40

【0 8 4 9】

N2-ブチル-9-(6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-9H-プリン-2, 6-ジアミン (124) : DMF (5 mL) 中の化合物 123 (1640 mg、3.777 mmol) 及び 2-クロロ-5-(クロロメチル)ピリジン (900 mg、5.556 mmol) の溶液に、K₂CO₃ (2600 mg、18.813 mmol) を添加し、混合物を、窒素ガス下で、50℃ で攪拌した。24 時間後、氷水 (100 mL) を混合物に添加し、沈殿物を分離した。沈殿物を DCM (100 mL) に溶解させ、ブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去した。残留物を、1%~10%の MeOH/DCM 勾配でフラッシュクロマトグラフィー (シリカ

50

ゲル)により精製して、化合物124 (1020mg、3.074mmol、81%)を得た。MS m/z 332 (M+H)⁺。

【0850】

6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-9-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-7H-プリン-8(9H)-オン(125): DCM(10mL)中の化合物124 (1020mg、3.074mmol)の溶液に、臭素(250 μ L、0.939mmol)を23℃で添加した。1.5時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物を高真空ポンプで乾燥した。8-ブロモ-N2-ブチル-9-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-9H-プリン-2,6-ジアミン、HBr(1500mg、<3.074mmol)の粗製中間体を、濃縮HCl溶液、37%(15mL)に溶解し、溶液を還流した。8時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物に水(10mL)及びMeOH(4mL)を添加し、次いでNH₃、28%溶液(5mL)を添加することによって中和した。沈殿した固体を遠心分離(5分、4000rpm)により分離し、MeOH(2mL)及び水(10mL)で洗浄した。沈殿物を乾燥させて、化合物125(1100mg、2.421mmol、79%)を得た。MS m/z 348 (M+H)⁺。

【0851】

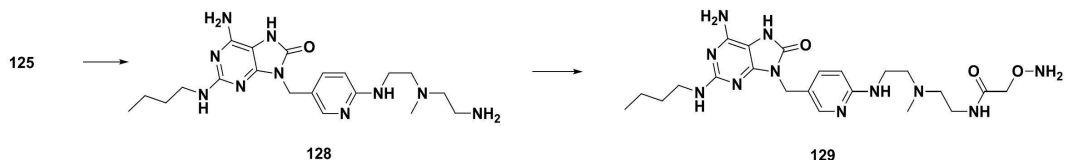
6-アミノ-9-((6-(4-(2-アミノエチル)ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-イル)メチル)-2-(ブチルアミノ)-7H-プリン-8(9H)-オン(126): 化合物125(30mg、0.086mmol)及びtert-ブチル2-(ピペラジン-1-イル)エチルカルバメート(26mg、0.113mmol)の混合物を、140℃で加熱した。20時間後、混合物を23℃に冷却した。残留物に、DCM(0.5mL)及びTFA(0.5mL)を添加した。30分後、溶媒を真空中で除去し、残留物を分取LCにより精製して、化合物126(9mg、0.010mmol、12%)をTFA塩として得た。MS m/z 441 (M+H)⁺。

【0852】

N-(2-(4-(5-((6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ピリジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)エチル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド(127): DMF(1mL)中の化合物126(9mg、0.010mmol)及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテート(2.5mg、0.011mmol)の溶液に、DIEA(10 μ L、0.060mmol)を23℃で添加した。15分後、溶媒を真空中で除去した。残留物にDCM(1mL)及びTFA(1mL)を添加した。5分後、溶媒を真空中で除去した。残留物を分取LCにより精製して、化合物127(8mg、0.008mmol、82%)をTFA塩として得た。MS m/z 514 (M+H)⁺。

【0853】

【化157】



【0854】

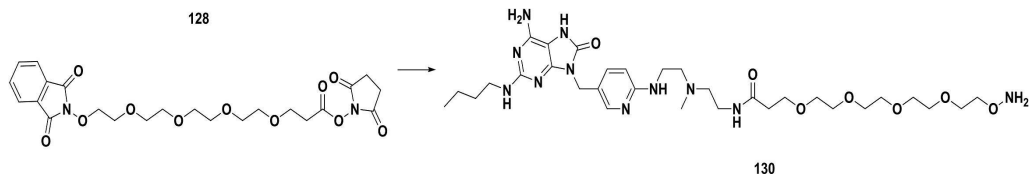
6-アミノ-9-((6-(2-((2-アミノエチル)(メチル)アミノ)エチルアミノ)ピリジン-3-イル)メチル)-2-(ブチルアミノ)-7H-プリン-8(9H)-オン(128): 化合物125(30mg、0.086mmol)及び2,2'-ジアミノ-N-メチルジエチルアミン(100 μ L、0.853mmol)の混合物を、130℃で加熱した。20時間後、混合物を23℃に冷却し、分取LCにより精製して、化合物128(40mg、0.045mmol、52%)を得た。MS m/z 423 (M+H)⁺。

【0855】

N-(2-((2-(5-((6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ピリジン-2-イルアミノ)エチル)(メチル)アミノ)エチル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド(129): 127について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物128を出発材料として使用して、化合物129を調製して、標的化合物129(13mg、0.012mmol、54%)を得た。MS m/z 502 (M+H)⁺。

【0856】

【化158】

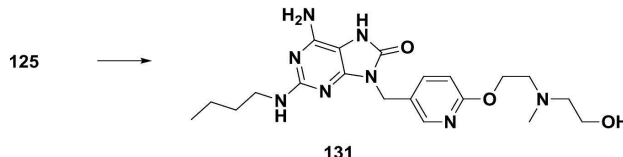


【0857】

NH₂O-PEG3-Pr-(6-アミノ-9-((6-(2-((2-アミノエチル)(メチル)アミノ)エチルアミノ)ピリジン-3-イル)メチル)-2-(ブチルアミノ)-7H-プリン-8(9H)-オン)アセトアミド(130): DMF(1mL)中の化合物128(20mg、0.023mmol)及びPhth-PEG4-OSu(10mg、0.022mmol)の溶液に、DIEA(50μL、0.287mmol)を23℃で添加した。5分後、23℃でヒドラジン、H₂O(10μL)を混合物に添加した。5分後、混合物を分取LCにより精製して、化合物130(20mg、0.016mmol、70%)を得た。MS m/z 692 (M+H)⁺。

【0858】

【化159】

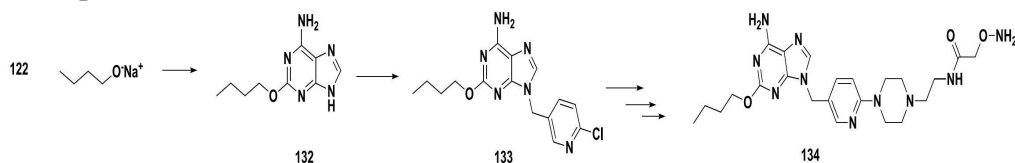


【0859】

6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-9-((6-(2-((2-ヒドロキシエチル)(メチル)アミノ)エトキシ)ピリジン-3-イル)メチル)-7H-プリン-8(9H)-オン(131): DMF(4mL)中の化合物125(124mg、0.215mmol)の溶液に、N-メチルジエタノールアミン(200μL、1.007mmol)及びNaH、60%(350mg、8.750mmol)を23℃で添加した。混合物を乾燥窒素下で、60℃で攪拌した。3時間後、1NのHCl(4mL)を混合物に添加し、分取LCにより精製して、化合物131(75mg、0.085mmol、39%)を得た。MS m/z 431 (M+H)⁺。

【0860】

【化160】



【0861】

2-ブトキシ-9H-プリン-6-アミン(132): 化合物122(690mg、2.720mmol)を、乾燥窒素ガス下で、23℃で20%ナトリウムn-ブトキシド(8mL、16.71mmol)に溶解した。添加後、温度を100℃に上げた。20時間

後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM (30 mL) に溶解し、半飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去した。MeOH (5 mL) 及びTFA (1 mL) を残留物に添加し、23℃で攪拌した。18時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM (30 mL) に溶解し、重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去し、2-ブトキシ-9H-プリン-6-アミン (1300 mg、2.987、定量的) を粗製物として得た。MS m/z 208 (M+H)⁺。

【0862】

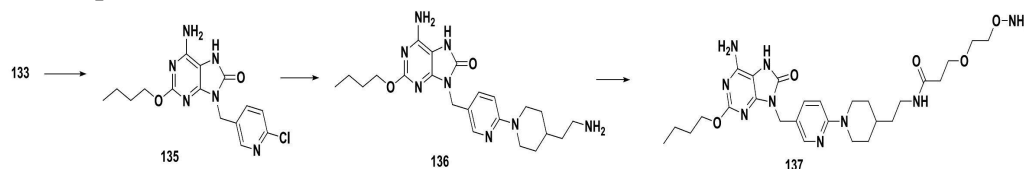
N2-ブチル-9-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-9H-プリン-2,6-ジアミン (133) : 124 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物132を出発材料として使用して、化合物133を調製して、標的化合物133 (468 mg、1.406 mmol、47%) を得た。MS m/z 333 (M+H)⁺。

【0863】

N-(2-(4-(5-((6-アミノ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)メチル)ピリジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)エチル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド (134) : 127 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物133を出発材料として使用して、化合物134を調製して、標的化合物134 (化合物133から12 mg、0.012 mmol、10%) を得た。MS m/z 514 (M+H)⁺。

【0864】

【化161】



【0865】

6-アミノ-2-ブトキシ-9-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-7H-プリン-8(9H)-オン (135) : DCM (10 mL) 中の化合物133 (124 mg、0.373 mmol) の溶液に、臭素 (30 µL、0.113 mmol) を23℃で添加した。2時間後、反応物を真空中で乾燥させた。8-ブロモ-2-ブトキシ-9-((6-クロロピリジン-3-イル)メチル)-9H-プリン-6-アミン、HBr (150 mg、<0.373 mmol、粗製物) の粗製残留物を、3NのHCl溶液 (15 mL) に溶解し、還流した。20時間後、溶媒を真空中で除去した。混合物を分取LCにより精製して、化合物135 (47 mg、0.110 mmol、29%) を得た。MS m/z 349 (M+H)⁺。

【0866】

6-アミノ-9-((6-(4-(2-アミノエチル)ピペリジン-1-イル)ピリジン-3-イル)メチル)-2-ブトキシ-7H-プリン-8(9H)-オン (136) : 化合物135 (46 mg、0.132 mmol) 及び4-(2-boc-アミノエチル)-ピペリジン (120 mg、0.526 mmol) を混合し、混合物を140℃で攪拌した。25時間後、23℃に冷却した後、混合物にDCM (1 mL) 及びTFA (1 mL) を添加した。10分後、有機溶媒を真空中で除去した。混合物を分取LCにより精製して、化合物136 (11 mg、0.014 mmol、11%) を得た。MS m/z 441 (M+H)⁺。

【0867】

N-(2-(1-(5-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ピリジン-2-イル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3-(2-(アミノオキシ)エトキシ)プロパンアミド (137) : 130 について記載さ

10

20

30

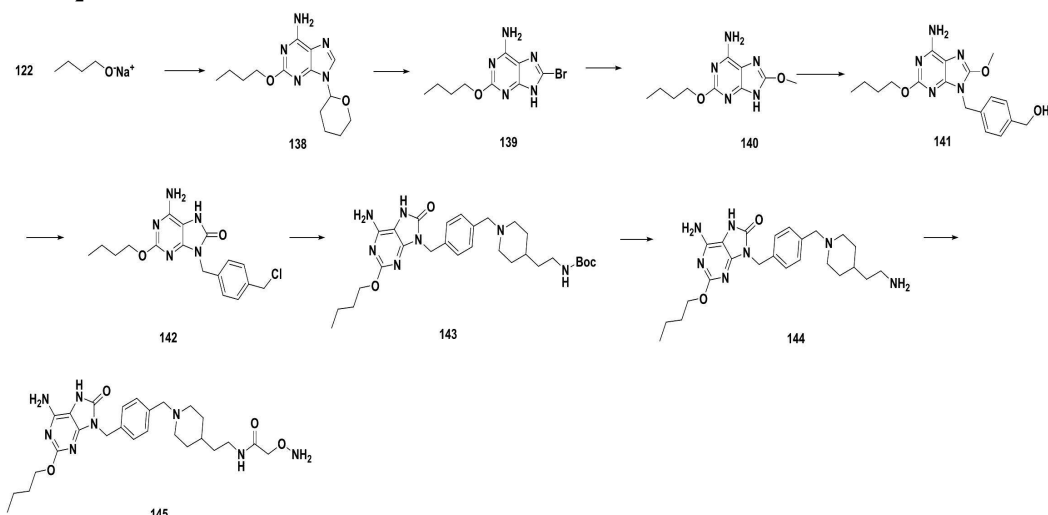
40

50

れるのと同様の手順を用いて、化合物 136 及び 3-(2-(1,3-ジオキソイソイン
ドリン-2-イルオキシ)エトキシ)プロパン酸を出発材料として使用して、化合物 13
7 を調製して、標的化合物 137 (9 mg、0.010 mmol、70%) を得た。MS m/z 572 (M+H)⁺。

【0868】

【化162】



10

20

【0869】

9-(4-(2-アミノエチル)ベンジル)-2-ブトキシ-9H-プリン-6-アミ
ン (138) : 化合物 122 (3330 mg、13.126 mmol) を 20% ナトリウ
ム n-ブトキシド (25 mL) に、乾燥窒素ガス下で、23℃で溶解し、温度を 100℃
に上げた。1.5 時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物を DCM (30 mL) に溶解
し、半飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄
で乾燥させ、濾過した。有機溶媒を真空中で除去した。残留物を 1%~4% の MeOH
/ DCM 勾配でフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物 138 (2687
mg、9.224 mmol、70%) を得た。MS m/z 292 (M+H)⁺。

【0870】

8-ブromo-2-ブトキシ-9-(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)-9H-
プリン-6-アミン (139) : DCM (50 mL) 中の化合物 138 (2687 mg、
9.224 mmol) の溶液に、N-ブromosuccinimide (2000 mg、11.069 mmol)
を 23℃で添加した。1 時間後、飽和チオ硫酸ナトリウム (20 mL) を混合物
に添加した。材料を DCM (20 mL) で抽出した。有機層を飽和重炭酸ナトリウム (5
0 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機溶
媒を真空中で除去した。残留物を 20%~70% の EtOAc / ヘキサン勾配でフラッ
シュクロマトグラフィーにより精製して、化合物 139 (2517 mg、6.799 mmol、
74%) を得た。MS m/z 371 (M+H)⁺。

【0871】

2-ブトキシ-8-メトキシ-9H-プリン-6-アミン (140) : 化合物 139 (2517 mg、6.799 mmol) を、乾燥窒素ガス下で、23℃で 25% ナトリウム
メトキシド (20 mL、42 mmol) に溶解した。添加後、温度を 70℃に上げた。2.
5 時間後、混合物を真空中で濃縮し、EtOAc (100 mL) に溶解し、水 (100
mL) 及びブライン (100 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。有機層
を収集し、真空中で蒸発させた。残留物に MeOH (10 mL) 及び TFA (3 mL) を
添加した。TFA 添加の 48 時間後、溶媒を真空中で除去した。混合物を分取 LC により
精製して、化合物 140 (708 mg、2.984、44%) を得た。MS m/z 238 (M+H)⁺。

【0872】

30

40

50

(4-((6-アミノ-2-(ブチルアミノ)-8-メトキシ-9H-プリン-9-イル)メチル)フェニル)メタノール(141):化合物140の溶液に、DMF(2mL)中のTFA塩(25mg、0.054mmol)、炭酸カリウム(20mg、0.524mmol)、及び(4-ヒドロキシメチル)ベンジルクロリド(11mg、0.070mmol)を添加し、50℃で攪拌した。2時間後、溶媒を濃縮した。残留物に水を添加し、次いで、混合物をDCM(50mL)で抽出した。有機層を水(10mL)及びブライン(20mL)で洗浄し、続いてMgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。混合物を分取LCにより精製して、化合物141(29mg、0.042mmol、77%)をTFA塩として得た。MS m/z 357 (M+H)⁺。

【0873】

6-アミノ-2-ブトキシ-9-(4-(クロロメチル)ベンジル)-7H-プリン-8(9H)-オン(142):化合物141(607mg、1.037mmol)に、ジクロロメタン(10mL)を添加した。得られる懸濁液に塩化チオニル(1000uL)を添加し、混合物を5℃で3時間攪拌した。トルエン(30mL)を混合物に添加し、溶媒を蒸発させた。残留物にトルエン(100mL)を再び添加し、溶媒を蒸発させ、減圧下で乾燥させて、化合物142(402mg、1.111mmol、定量的)を得た。MS m/z 362 (M+H)⁺。

【0874】

tert-ブチル2-(1-(4-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチルカルバメート(143):DMF(2mL)中の化合物142(166mg、0.384mmol)及び4-(2-boc-アミノエチル)-ピペリジン(180mg、0.788mmol)の溶液に、DIEA(1000uL、5.741mmol)を添加し、温度を80℃に上げた。3.5h後、溶媒を真空中で除去した。混合物を分取LCにより精製して、化合物143(205mg、0.229mmol、29%)を得た。MS m/z 554 (M+H)⁺。

【0875】

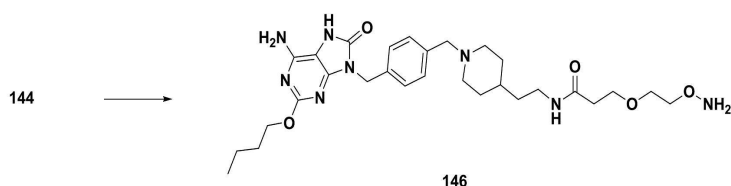
6-アミノ-9-(4-((4-(2-アミノエチル)ピペリジン-1-イル)メチル)ベンジル)-2-ブトキシ-7H-プリン-8(9H)-オン(144):化合物143(41mg、0.052mmol)をDCM(2mL)及びTFA(1mL)に溶解した。5分後、溶媒を真空中で除去した。トルエン(5mL)を残留物に添加し、真空中で蒸発させた。残留物を高真空ポンプで乾燥させて、化合物144(41mg、0.052mmol、定量的)をTFA塩として得た。MS m/z 454 (M+H)⁺。

【0876】

N-(2-(1-(4-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド(145):127について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144を出発材料として使用して、化合物145を調製して、標的化合物145(15mg、0.015mmol、87%)を得た。MS m/z 527 (M+H)⁺。

【0877】

【化163】



【0878】

N-(2-(1-(4-((6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3-(2-(

【化 1 6 4】



20

30

【化 1 6 5】



50

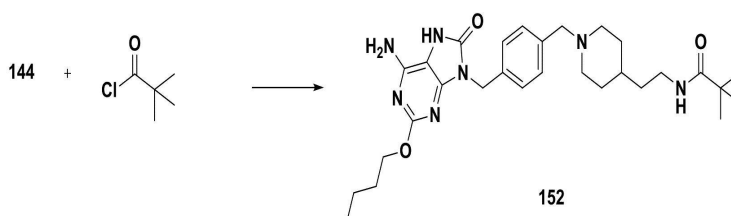
）及びDIEA（20 uL、0.115 mmol）を23℃で添加した。30分後、混合物を分取LCにより精製し、化合物150（7 mg、0.007 mmol、37%）を得た。MS m/z 653 (M+H)⁺。

【0885】

N-（2-（1-（4-（（6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9（8H）-イル）メチル）ベンジル）ピペリジン-4-イル）エチル）-2-メチル-2-（メチルアミノ）プロパンアミド（151）：144について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物150を出発材料として使用して、化合物151を調製して、標的化合物151（5.5 mg、0.005 mmol、定量的）を得た。MS m/z 553 (M+H)⁺。

【0886】

【化166】

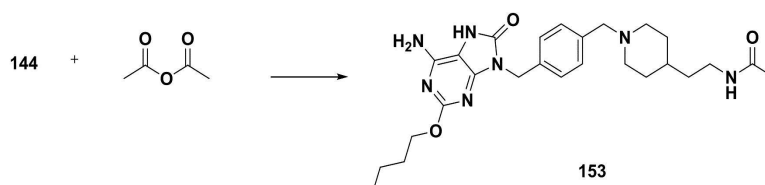


【0887】

N-（2-（1-（4-（（6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9（8H）-イル）メチル）ベンジル）ピペリジン-4-イル）エチル）ピバルアミド（152）：DMF（1 mL）中の化合物144（14 mg、0.018 mmol）及びトリメチルアセチルクロリド（2.8 uL、0.022 mmol）の溶液に、DIEA（20 uL、0.115 mmol）を23℃で添加した。1時間後、混合物を分取LCにより精製し、化合物152（7 mg、0.008 mmol、36%）を得た。MS m/z 538 (M+H)⁺。

【0888】

【化167】

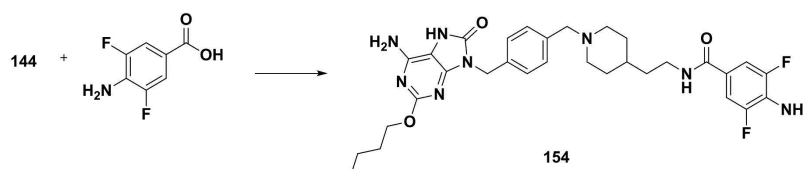


【0889】

N-（2-（1-（4-（（6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9（8H）-イル）メチル）ベンジル）ピペリジン-4-イル）エチル）アセトアミド（153）：DMF（1 mL）中の化合物144（20 mg、0.022 mmol）及び無水酢酸（2.1 uL、0.021 mmol）の溶液に、DIEA（20 uL、0.115 mmol）を23℃で添加した。1時間後、混合物を分取LCにより精製し、化合物153（8 mg、0.010 mmol、43%）を得た。MS m/z 496 (M+H)⁺。

【0890】

【化168】

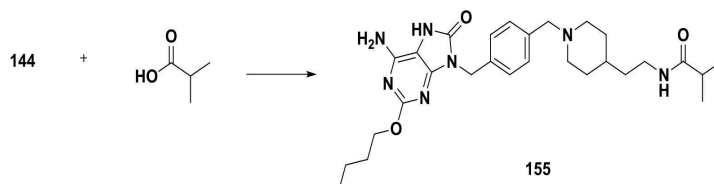


【0891】

4-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(154):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物154を調製して、標的化合物154(8mg、0.008mmol、38%)を得た。MS m/z 609 (M+H)⁺。

【0892】

【化169】



10

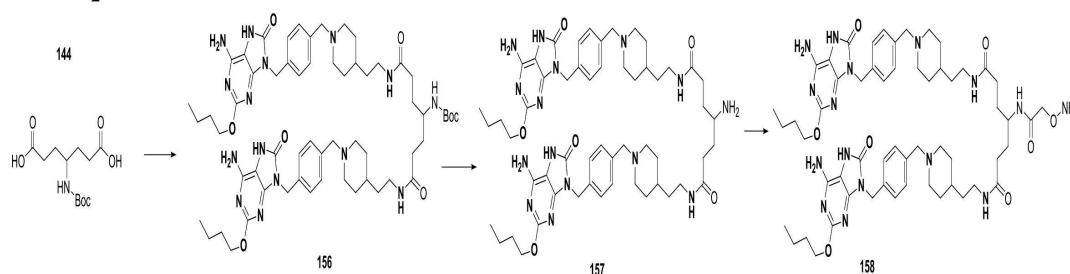
【0893】

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)イソブチルアミド(155):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及びイソ酪酸を出発材料として使用して、化合物155を調製して、化合物155(6mg、0.007mmol、32%)を得た。MS m/z 524 (M+H)⁺。

20

【0894】

【化170】



30

【0895】

tert-ブチル1,7-ビス(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチルアミノ)-1,7-ジオキソヘプタン-4-イルカルバメート(156):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-(N-Boc-アミノ)-1,6-ヘプタン二酸を出発材料として使用して、化合物156を調製して、標的化合物156(15mg、0.009mmol、34%)を得た。MS m/z 1147 (M+H)⁺。

【0896】

4-アミノ-N1,N7-ビス(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)ヘプタンジアミド(157):144について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物156を出発材料として使用して、化合物157を調製して、標的化合物157(15mg、0.01mmol、定量的)を得た。MS m/z 1047 (M+H)⁺。

40

【0897】

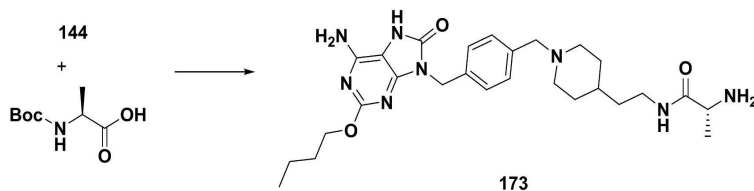
N1,N7-ビス(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-4-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)ヘプタンジアミド(158):145について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物157及び2,5-ジオキソピロリジン-

50

1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテートを出発材料として使用して、化合物158を調製して、標的化合物158(5mg、0.003mmol、34%)を得た。MS m/z 1120 (M+H)⁺。

【0898】

【化171】



10

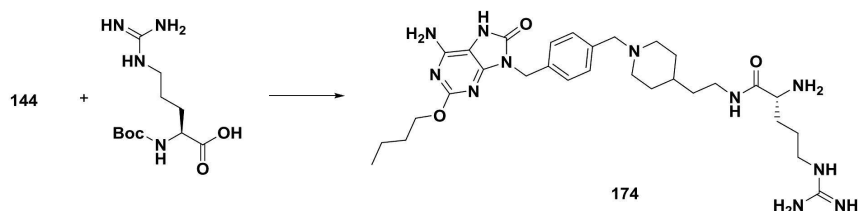
【0899】

(S)-2-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)プロパンアミド(173): DMF(1mL)中の化合物144(20mg、0.022mmol)及びN-Boc-アラニン(5mg、0.026mmol)の溶液に、DMTMMT(6mg、0.025mmol)及びDIEA(20μL、0.115mmol)を23℃で添加した。10分後、溶媒を真空中で除去した。残留物にDCM(1mL)及びTFA(1mL)を添加した。10分後、溶媒を真空中で除去し、残留物を分取LCにより精製して、化合物173(8mg、0.009mmol、42%)を得た。MS m/z 525 (M+H)⁺。

20

【0900】

【化172】



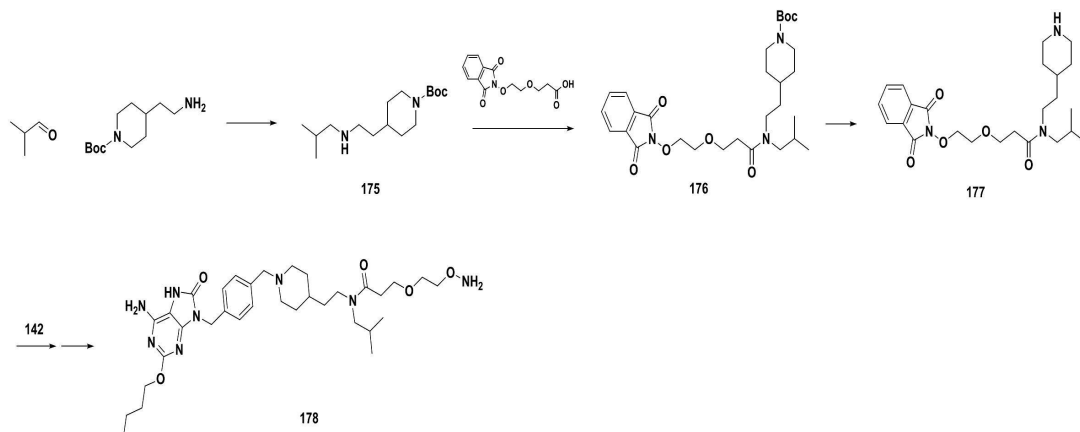
【0901】

(S)-2-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-5-グアニジノペンタンアミド(174): 173について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及びN-Boc-アルギニンを出発材料として使用して、化合物174を調製して、標的化合物174(10mg、0.011mmol、48%)を得た。MS m/z 610 (M+H)⁺。

30

【0902】

【化173】



40

50

【0903】

tert-ブチル 4-(2-(イソブチルアミノ)エチル)ピペリジン-1-カルボキシレート (175) : 4-(2-アミノエチル)-1-Boc-ピペリジン (520 mg、2.278 mmol) 及びイソブチルアルデヒド (230 μ L、3.190 mmol) を、23℃でメタノール (10 mL) に溶解した。2時間後、水素化ホウ素ナトリウム (142 mg、3.754 mmol) をこの混合物に添加した。10分後、溶媒を真空中で除去した。残留物を DCM (100 mL) に溶解し、飽和 NaHCO₃ (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物を分取 LC により精製して、化合物 175 (499 mg、1.755 mmol、55%) をガラス質の無色の固体として得た。MS m/z 285 (M+H)⁺。

10

【0904】

tert-ブチル 4-(2-(3-(2-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イルオキシ)エトキシ)-N-イソブチルプロパンアミド)エチル)ピペリジン-1-カルボキシレート (176) : EtOAc (10 mL) 中の化合物 175 (80 mg、0.201 mmol) 及び Phth-PEG1-COOH (56 mg、0.201 mmol) の溶液に、CMP1 (62 mg、0.243 mmol) 及び DIEA (70 μ L、0.402 mmol) を 23℃で添加した。3時間後、沈殿物を濾過によって除去し、濾液をフラッシュクロマトグラフィーで精製して、化合物 176 (65 mg、0.119 mmol、59%) を白色の固体として得た。MS m/z 546 (M+H)⁺。

20

【0905】

3-(2-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イルオキシ)エトキシ)-N-イソブチル-N-(2-(ピペリジン-4-イル)エチル)プロパンアミド (177) : 144 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 176 を出発材料として使用して、化合物 177 を調製して、標的化合物 177 (66 mg、0.118 mmol、定量的) を得た。MS m/z 446 (M+H)⁺。

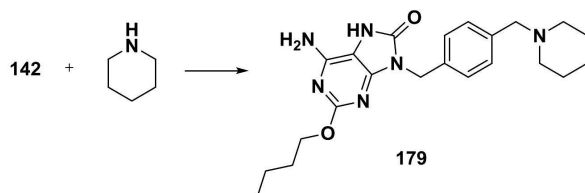
【0906】

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3-(2-(アミノオキシ)エトキシ)-N-イソブチルプロパンアミド (178) : 143 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 177 及び化合物 142 を出発物質として使用して、化合物 178 を調製し、続いて、130 について記載されるように、ヒドラジン、H₂O (10 μ L) で処理して、化合物 178 (19 mg、0.019 mmol、7%) を得た。MS m/z 641 (M+H)⁺。

30

【0907】

【化174】



40

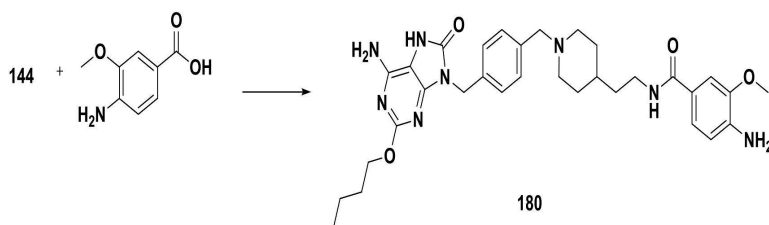
【0908】

6-アミノ-2-ブトキシ-9-(4-(ピペリジン-1-イルメチル)ベンジル)-7H-プリン-8(9H)-オン (179) : 143 について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物 142 及びピペリジンを出発材料として使用して、化合物 179 を調製して、化合物 179 (31 mg、0.041 mmol、54%) を得た。MS m/z 411 (M+H)⁺。

【0909】

50

【化 175】

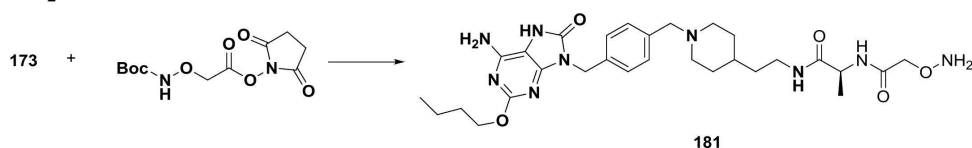


【0910】

4-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3-メトキシベンズアミド(180): 150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-アミノ-3-メトキシ安息香酸を出発材料として使用して、化合物180を調製して、標的化合物180(8mg、0.008mmol、39%)を得た。MS m/z 603 (M+H)⁺。

【0911】

【化 176】

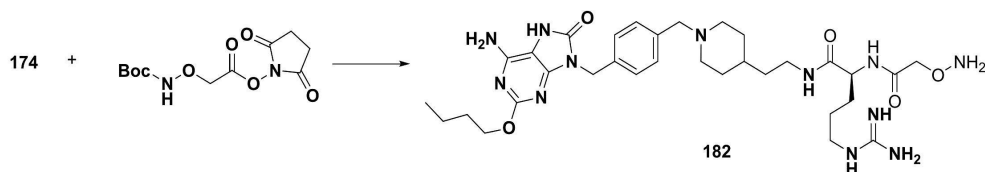


【0912】

(S)-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-2-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)プロパンアミド(181): 127について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物173及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテートを出発材料として使用して、化合物181を調製して、標的化合物181(5mg、0.005mmol、58%)を得た。MS m/z 598 (M+H)⁺。

【0913】

【化 177】



【0914】

(S)-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-2-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)-5-グアニジノペンタンアミド(182): 127について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物174及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテートを出発材料として使用して、化合物182を調製して、標的化合物182(5mg、0.004mmol、42%)を得た。MS m/z 683 (M+H)⁺。

【0915】

10

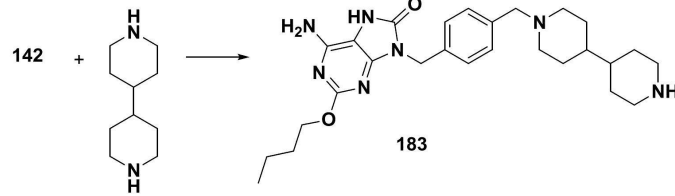
20

30

40

50

【化178】

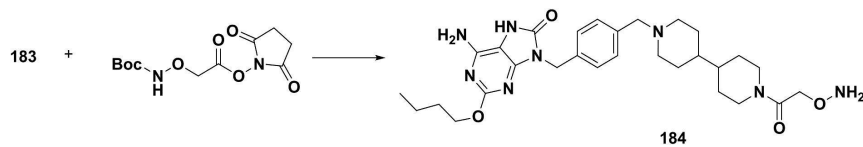


【0916】

9-(4-(4,4'-bipiperidin-1-ylmethyl)benzyl)-6-amino-2-butyl-7H-purin-8-one (183): 143について記載されると同様の手順を用いて、化合物142及び4,4'-bipiperidineを出発材料として使用して、化合物183を調製して、化合物183 (13 mg、0.016 mmol、7%)を得た。MS m/z 494 (M+H)⁺。

【0917】

【化179】

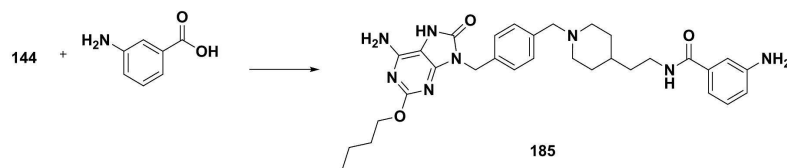


【0918】

6-amino-9-(4-(1'-(2-(aminooxy)acetyl)-4,4'-bipiperidin-1-yl)methyl)benzyl)-2-butyl-7H-purin-8-one (184): 127について記載されると同様の手順を用いて、化合物183及び2,5-dioxypiperidin-1-yl 2-(tert-butyl carbonylaminooxy)acetateを出発材料として使用して、化合物184を調製して、標的化合物184 (5 mg、0.005 mmol、18%)を得た。MS m/z 567 (M+H)⁺。

【0919】

【化180】

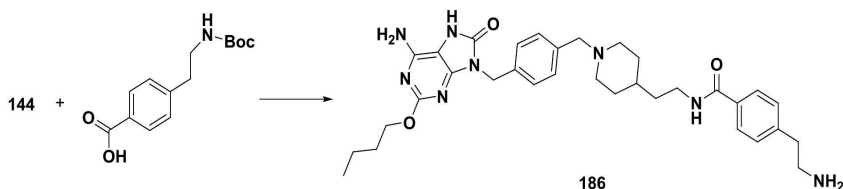


【0920】

3-amino-N-(2-(1-(4-(6-amino-2-butyl-8-oxo-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)methyl)benzyl)piperidin-4-yl)ethyl)benzamide (185): 150について記載されると同様の手順を用いて、化合物144及び3-aminoanilineを出発材料として使用して、化合物185を調製して、標的化合物185 (8 mg、0.009 mmol、53%)を得た。MS m/z 572 (M+H)⁺。

【0921】

【化181】



【0922】

10

20

30

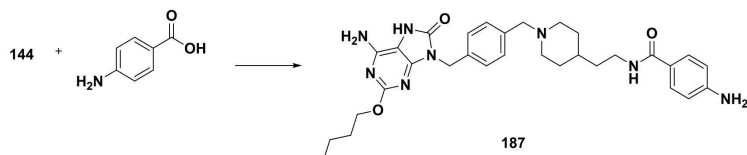
40

50

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-4-(2-アミノエチル)ベンズアミド(186): 173について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-(2-Boc-アミノ)エチル安息香酸を出発材料として使用して、化合物186を調製して、標的化合物186(9mg、0.010mmol、58%)を得た。MS m/z 600 (M+H)⁺。

【0923】

【化182】



10

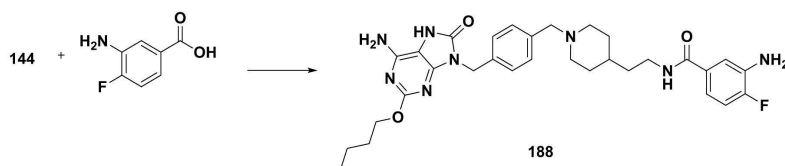
【0924】

4-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)ベンズアミドベンズアミド(187): 150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物187を調製して、標的化合物187(8mg、0.009mmol、53%)を得た。MS m/z 572 (M+H)⁺。

20

【0925】

【化183】



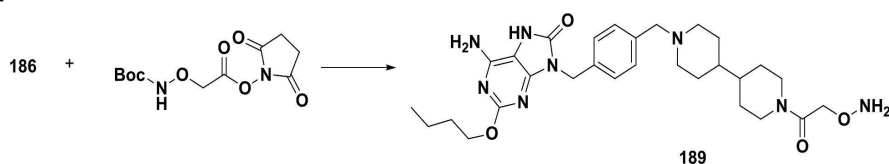
【0926】

3-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-4-フルオロベンズアミド(188): 150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び3-アミノ-4-フルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物188を調製して、標的化合物188(11mg、0.011mmol、64%)を得た。MS m/z 590 (M+H)⁺。

30

【0927】

【化184】



40

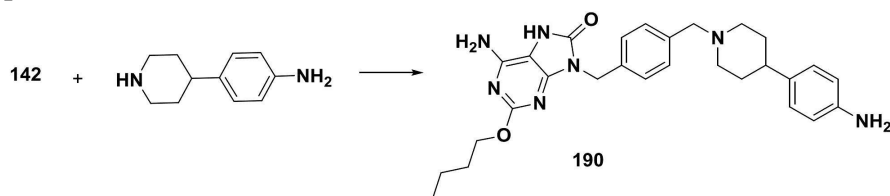
【0928】

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-4-(2-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)エチル)ベンズアミド(189): 127について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物186及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテートを出発材料として使用して、化合物189を調製して、標的化合物189(11mg、0.010mmol、94%)を得た。MS m/z 673 (M+H)⁺。

【0929】

50

【化185】

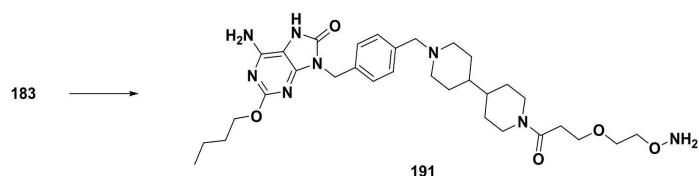


【0930】

6-アミノ-9-(4-(4-(4-アミノフェニル)ピペリジン-1-イル)メチル)ベンジル)-2-ブトキシ-7H-プリン-8(9H)-オン(190):143について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物142及び4-(4-アミノフェニル)-ピペリジンを出発材料として使用して、化合物190を調製して、化合物190(3 mg、0.004 mmol、5%)を得た。MS m/z 502 (M+H)⁺。

【0931】

【化186】

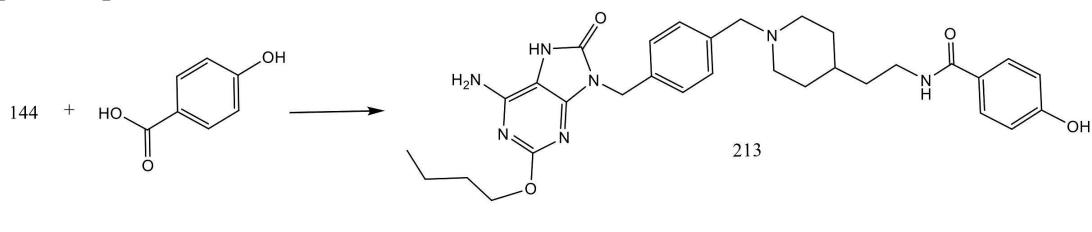


【0932】

6-アミノ-9-(4-(1'-(3-(2-(アミノオキシ)エトキシ)プロパノイル)-4,4'-ビピペリジン-1-イル)メチル)ベンジル)-2-ブトキシ-7H-プリン-8(9H)-オン(191):137について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物183を出発材料として使用して、化合物191を調製して、標的化合物191(13 mg、0.012 mmol、48%)を得た。MS m/z 625 (M+H)⁺。

【0933】

【化187】

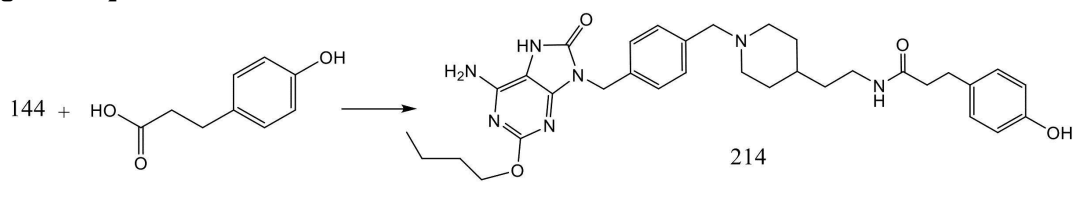


【0934】

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-4-ヒドロキシベンズアミド(213):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び4-ヒドロキシ安息香酸を出発材料として使用して、化合物213を調製して、標的化合物213(10 mg、0.011 mmol、66%)を得た。MS m/z 573 (M+H)⁺。

【0935】

【化188】



10

20

30

40

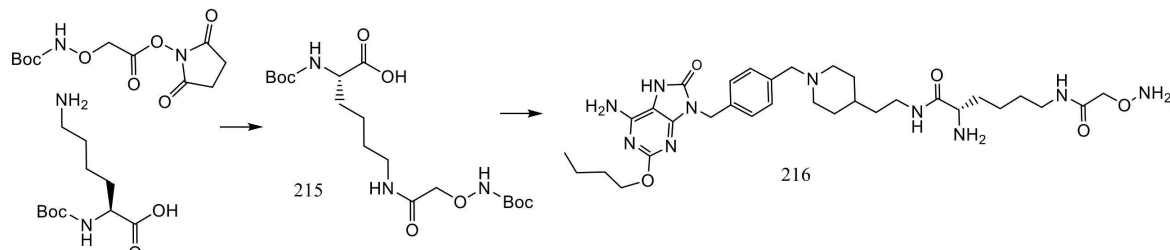
50

【0936】

N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパンアミド(214):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸を出発材料として使用して、化合物214を調製して、標的化合物214(9mg、0.010mmol、58%)を得た。MS m/z 601 (M+H)⁺。

【0937】

【化189】



10

【0938】

Boc-Lys(Boc-アミノオキシアセチル)-OH(215):DMF(5mL)中の2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-(tert-ブトキシカルボニルアミノオキシ)アセテート(399mg、1.384mmol)及びBoc-Lys-OH(335mg、1.360mmol)に、DIEA(750μL、4.306mmol)を23℃で添加した。2時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をEtOAc(50mL)に溶解し、1NのHCl(50mL)及びブライン(20mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過し、溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物215(480mg、1.144mmol、83%)を白色の固体として得た。MS m/z 420 (M+H)⁺。

20

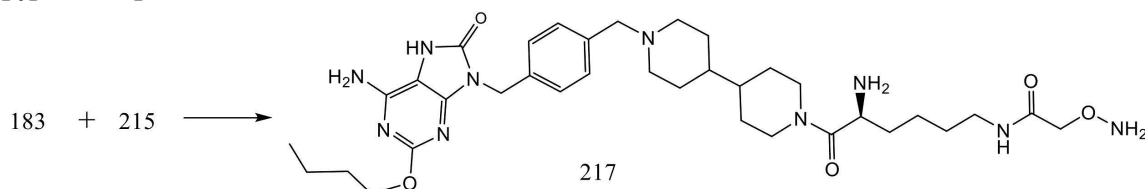
【0939】

(S)-2-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)-6-(2-(アミノオキシ)アセトアミド)ヘキサンアミド(216):173について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び化合物215を出発材料として使用して、化合物216を調製して、標的化合物216(6mg、0.006mmol、37%)を得た。MS m/z 654 (M+H)⁺。

30

【0940】

【化190】



40

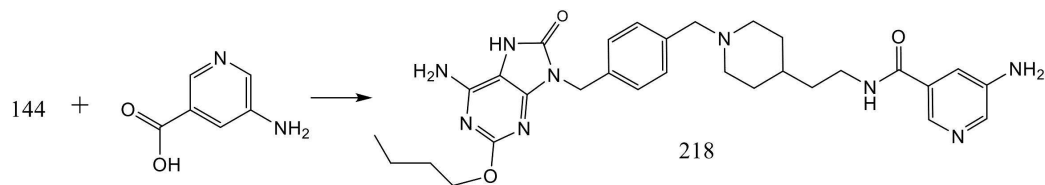
【0941】

(S)-N-(5-アミノ-6-(1'-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)-4,4'-ビペリジン-1-イル)-6-オキソヘキシル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド(217):173について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物183及び化合物215を出発材料として使用して、化合物217を調製して、標的化合物217(6mg、0.006mmol、37%)を得た。MS m/z 654 (M+H)⁺。

50

【0942】

【化191】



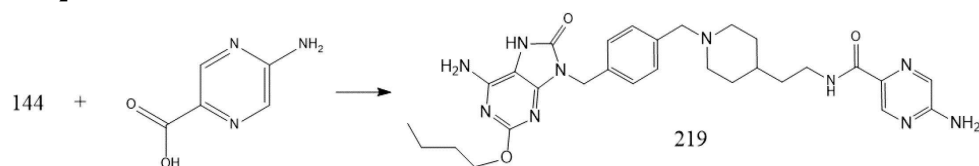
【0943】

10

5-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)ニコチンアミド(218):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び5-アミノニコチン酸を出発材料として使用して、化合物218を調製して、標的化合物218(1mg、0.001mmol、7%)を得た。MS m/z 573 (M+H)⁺。

【0944】

【化192】



20

【0945】

5-アミノ-N-(2-(1-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7,8-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)メチル)ベンジル)ピペリジン-4-イル)エチル)ピラジン-2-カルボキサミド(219):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物144及び5-アミノピラジン-カルボン酸を出発材料として使用して、化合物219を調製して、標的化合物219(10mg、0.11mmol、66%)を得た。MS m/z 574 (M+H)⁺。

30

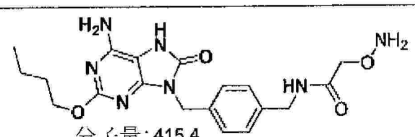
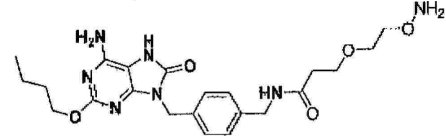
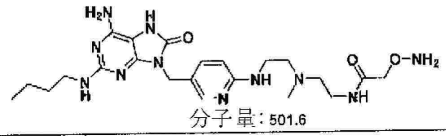
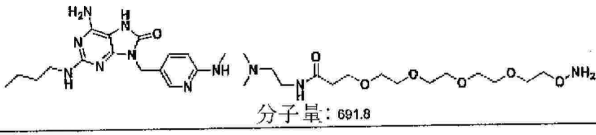
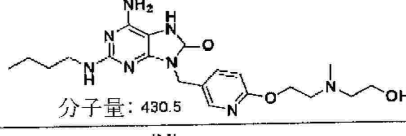
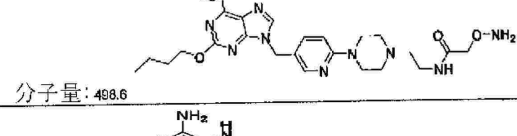
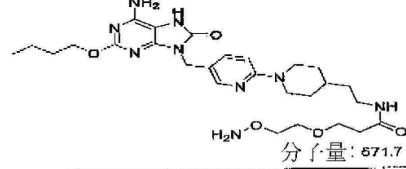
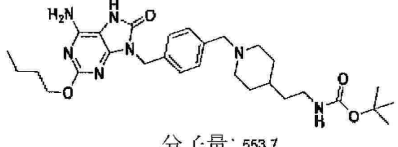
【0946】

40

50

【表 4】

表 4 - T L R アゴニスト - コア 5 化合物

化合物番号	化合物名	構造 - コア 5 化合物
119	AXC-862	 分子量: 415.4
120	AXC-863	 分子量: 473.5
127	AXC-867	 分子量: 513.6
129	AXC-868	 分子量: 501.6
130	AXC-869	 分子量: 691.8
131	AXC-872	 分子量: 430.5
134	AXC-873	 分子量: 498.6
137	AXC-876	 分子量: 671.7
143	AXC-877	 分子量: 553.7

10

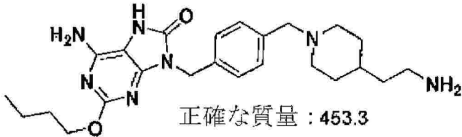
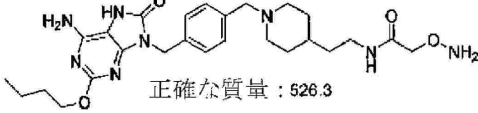
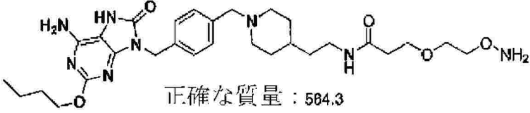
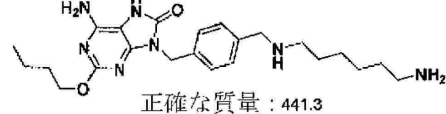
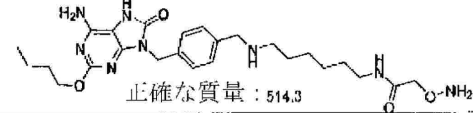
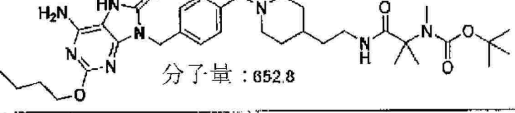
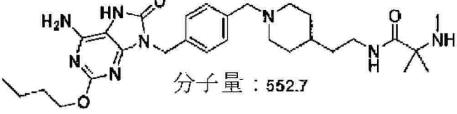
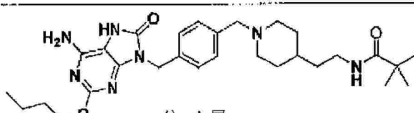
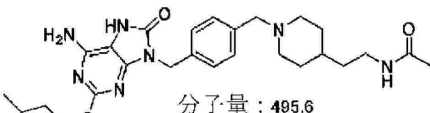
20

30

40

50

(表 4 の続き - 1)

化合物番号	化合物名	構造-コア5化合物
144	AXC-878	 正確な質量 : 453.3
145	AXC-879	 正確な質量 : 526.3
146	AXC-880	 正確な質量 : 584.3
148	AXC-881	 正確な質量 : 441.3
149	AXC-882	 正確な質量 : 514.3
150	AXC-883	 分子量 : 652.8
151	AXC-884	 分子量 : 552.7
152	AXC-885	 分子量 : 537.7
153	AXC-886	 分子量 : 495.6

(表4の続き-2)

化合物番号	化合物名	構造-コア5化合物
154	AXC-887	分子量：608.7
157	AXC-888	分子量：1046.3
158	AXC-889	分子量：1119.4
155	AXC-890	分子量：523.7
173	AXC-891	分子量：524.7
174	AXC-892	分子量：609.8
178	AXC-893	分子量：640.8

10

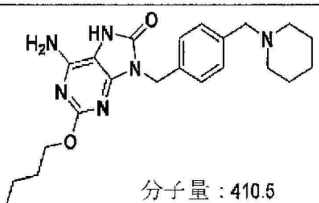
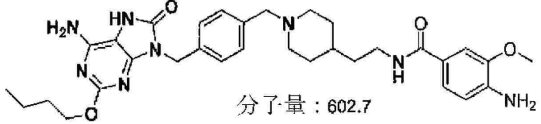
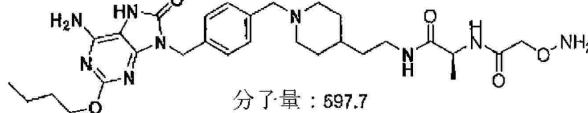
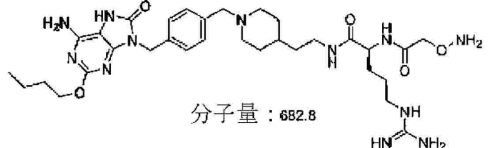
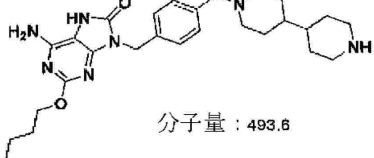
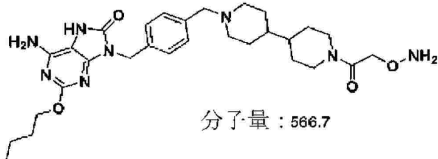
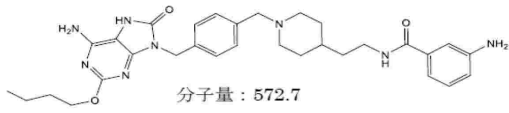
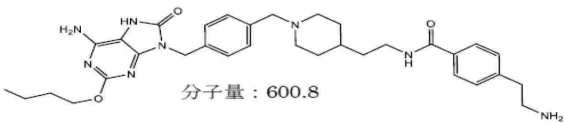
20

30

40

50

(表4の続き-3)

化合物番号	化合物名	構造-コア5化合物
179	AXC-894	 分子量：410.5
180	AXC-895	 分子量：602.7
181	AXC-896	 分子量：697.7
182	AXC-897	 分子量：682.8
183	AXC-898	 分子量：493.6
184	AXC-901	 分子量：566.7
185	AXC-903	 分子量：572.7
186	AXC-904	 分子量：600.8

10

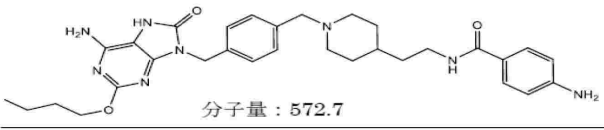
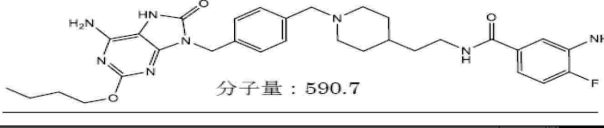
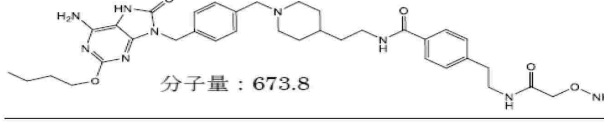
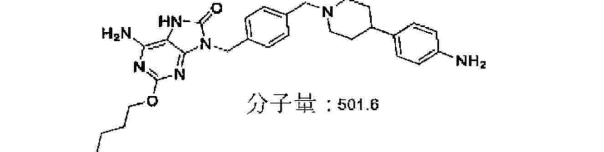
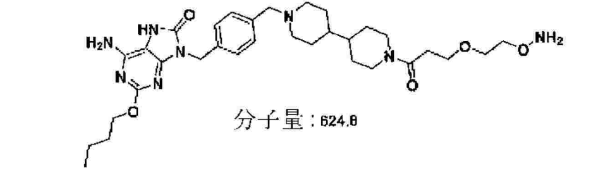
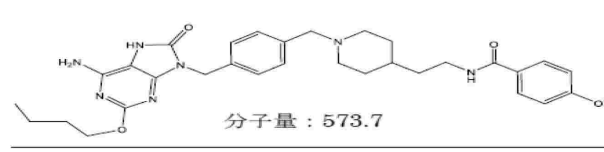
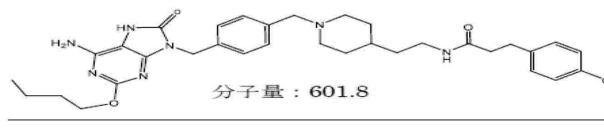
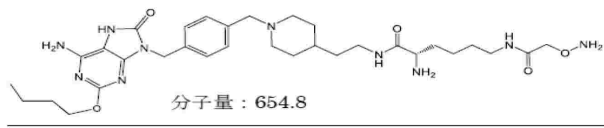
20

30

40

50

(表4の続き - 4)

化合物番号	化合物名	構造-コア5化合物
187	AXC-905	 分子量：572.7
188	AXC-906	 分子量：590.7
189	AXC-907	 分子量：673.8
190	AXC-908	 分子量：501.6
191	AXC-909	 分子量：624.8
213	AXC-911	 分子量：573.7
214	AXC-912	 分子量：601.8
216	AXC-913	 分子量：654.8

10

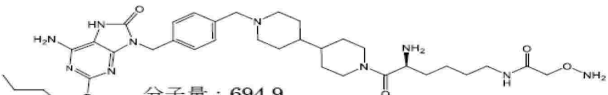
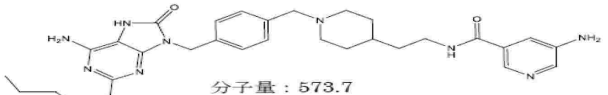
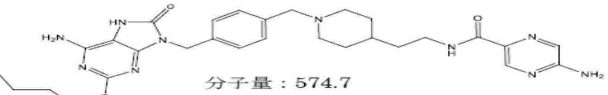
20

30

40

50

(表4の続き-5)

化合物番号	化合物名	構造-コア5化合物
217	AXC-914	 分子量：694.9
218	AXC-915	 分子量：573.7
219	AXC-916	 分子量：574.7

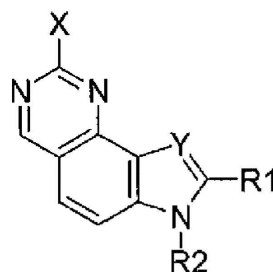
【 0 9 4 7 】

実施例 4：以下の構造－コア 3（図 1）を含む TLR アゴニストの合成：

【 0 9 4 8 】

【化 1 9 3】

コア 3



【 0 9 4 9 】

いくつかの実施形態において、Xは、NまたはHであり、Yは、CまたはNであり、

R₁は、C₁～C₁₂アルキル、置換C₁～C₁₂アルキル、酸素含有C₁～C₁₂アルキル、複素環、置換複素環、またはHであり、

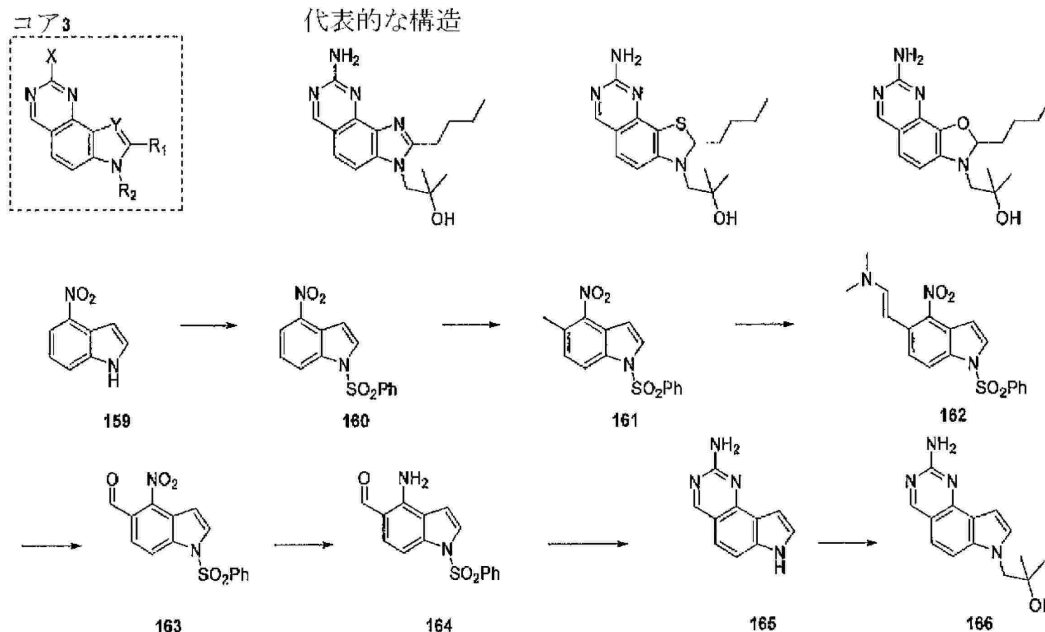
R₂は、C₁～C₁₂アルキル、C₁～C₁₂置換アルキル、C₄～C₈シクロアルキル、芳香族環、置換芳香族環、芳香族ヘテロ環、置換芳香族ヘテロ環、-ONH₂、末端C₁～C₁₂アルキル、またはHである。

【 0 9 5 0 】

コア3構造を有するTLRアゴニストは、以下のスキームに開示されるように合成された。

【 0 9 5 1 】

【化 194】



10

【0952】

4-ニトロ-1-トシル-1H-インドール (160) : 化合物159 (4-ニトロ-1H-インドール) (2.43 g、15.0 mmol) を THF (15 mL) に溶解した。THF (30 mL) 中の水素化ナトリウム (900 mg、22.5 mmol) を、0℃で懸濁液に滴加した。溶液を室温に温め、さらに1時間攪拌した。次に、THF (15 mL) 中の塩化トシル (3.0 g、15.75 mmol) をゆっくり添加し、反応物を一晩攪拌し、溶液を、NaHCO₃ と Et₂O との間で分配した。水層を抽出し (3×75 mL)、合わせた有機層をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、真空中で濃縮した。得られる固体を AcCN に取り込み、超音波処理し、濾過した。固体 (出発材料) は使用しなかった。液体を回転蒸発させ、残留物 (160) を次のステップで使用した (3.12 g)。MS m/z NO₂ は観察されなかった。

20

【0953】

5-メチル-4-ニトロ-1-(フェニルスルホニル)-1H-インドール (161) : 化合物160 (3.11 g、9.83 mmol) を、-15℃で THF (98.3 mL) に溶解した。塩化メチルマグネシウム (4.9 mL、14.75 mmol) を添加し、溶液を1時間45分間攪拌した。次に、-10℃を下回る温度に維持しながら、DDQ (3.79 g、16.71 mmol) を添加した。反応物を室温に温め、一晩攪拌した。次に、反応物を DCM で希釈して反応をクエンチし、続いて回転蒸発させた。粗製物を、SiO₂ のプラグに通し、DCM で溶出した。溶出液を乾燥させ、カラムクロマトグラフィー (DCM 中のヘキサン、0~40%、40 g のカラム) により精製して、標的化合物161 (2工程にわたって2.06 g、63%) を得た。MS m/z NO₂ は観察されなかった。

30

40

【0954】

(E) N, N-ジメチル-2-(4-ニトロ-1-(フェニルスルホニル)-1H-インドール-5-イル) エテン-1-アミン (162) : 5-メチル-4-ニトロ-1-(フェニルスルホニル)-1H-インドール (161) (0.83 g、2.63 mmol) を、DMF (26.3 mL) に溶解した。N, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (3.54 mL、26.3 mmol) を添加し、反応物を115℃で加熱した。反応物をロータリーエバポレーターで蒸発させた。残留物 (化合物162) を次の反応に使用した (0.98 g)。MS m/z NO₂ は観察されなかった。

【0955】

4-ニトロ-1-(フェニルスルホニル)-1H-インドール-5-カルバルデヒド (

50

163) : THF (13.2 mL) 及び水 (13.2 mL) 中の化合物 162 (0.98 g、2.6 mmol) の溶液に、メタ過ヨウ素酸ナトリウム (1.7 g、7.9 mmol) を添加し、攪拌した。反応物を濾過し、EtOAc (50 mL) で洗浄した。有機層を NaHCO₃ で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥させ、濾過し、ロータリーエバポレーターで蒸発させた。残留物 (化合物 163、0.56 g) を真空ポンプで乾燥させ、次の反応に使用した。MS m/z NO₂ は観察されなかった。

【0956】

4-アミノ-1-(フェニルスルホニル)-1H-インドール-5-カルバルデヒド (164) : MeOH (47 mL) 中の化合物 163 (0.56 g、1.7 mmol) の溶液に、Pd/C (0.03 g) を添加した。反応物を水素雰囲気下で攪拌した (二重バルーン/1気圧)。反応物をセライトで濾過し、MeOH で洗浄した。溶媒を真空中で乾燥させ、残留物をカラムクロマトグラフィー (EtOAc 中のヘキサン、0~50%、12 g カラム) により精製して、標的化合物 164 (3工程で93 mg、12%) を得た。MS m/z 301 (M+H)⁺。

【0957】

7H-ピロロ[2,3-h]キナゾリン-2-アミン (165) : DMA (3.1 mL) 中の化合物 164 (0.092 g、0.31 mmol) の溶液に、炭酸グアニジン (279 mg、3.09 mmol) を添加し、150℃で攪拌した。LCMS は、反応が完了したことを示し、混合物を分取 LC によって精製して、標的化合物 165 (6 mg、11%) を得た。MS m/z 257 (M+H)⁺。

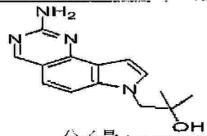
【0958】

1-(2-アミノ-7H-ピロロ[2,3-h]キナゾリン-7-イル)-2-メチルプロパン-2-オール (166) : 水素化ナトリウム (鉱油中の60%分散液、2.2 mg、0.054 mmol) の溶液に、0℃で5 mL のヘキサンを添加し、溶液を攪拌した。ヘキサンを除去して、鉱油を洗い流した。次に、DMF (1.1 mL) 中の化合物 165 (2 mg、0.011 mmol) を溶液に滴加し、1時間攪拌した。次に、イソブチレンオキシド (1 µL、0.011 mmol) を滴加し、反応物を攪拌した。反応物を濾過し、混合物を分取 LC で精製して、標的化合物 166 (1.5 mg、23%) を得た。MS m/z 185 (M+H)⁺。

【0959】

【表5】

表5-TLRアゴニストコア3化合物

化合物番号	化合物名	構造-コア3化合物
165	AXC-837	 分子量: 184.20
166	AXC-847	 分子量: 256.31

【0960】

実施例5: 以下の代表的な構造-コア2 (図1) を含むTLRアゴニストの合成:

【0961】

10

20

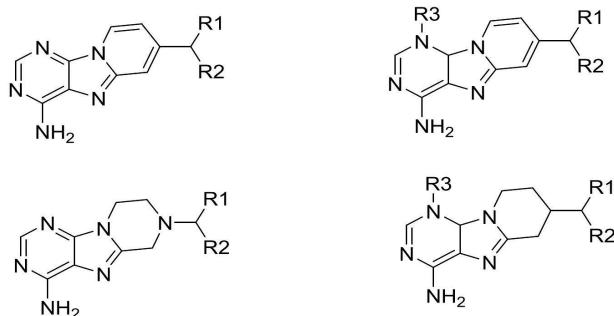
30

40

50

【化195】

コア2



10

【0962】

いくつかの実施形態において、 R_1 または R_2 はそれぞれ、 $C_4 \sim C_8$ シクロアルキル、または独立して、 $-H$ 、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、ニトロ含有アルキル、芳香族環、または $-C(NH)NH_2$ を形成するように結合され、

R_3 は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、酸素含有 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、複素環、置換複素環、または H である。

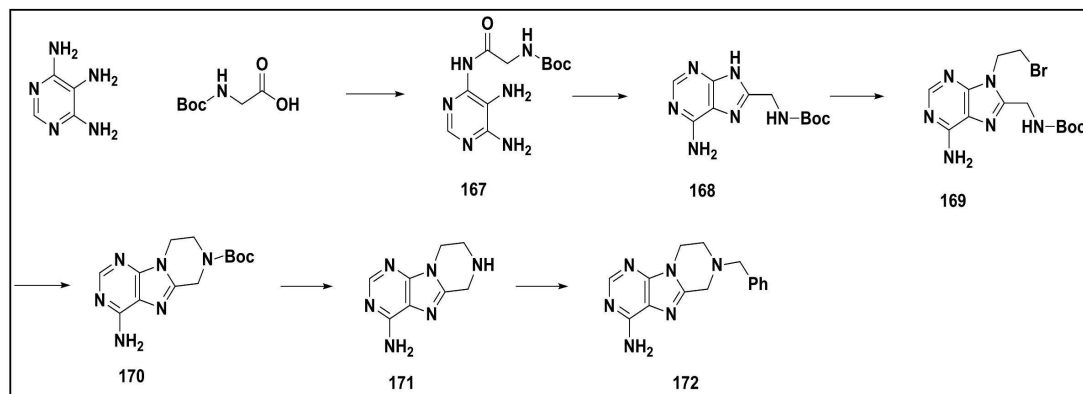
【0963】

コア2構造を有するTLRアゴニストは、以下のスキームに開示されるように合成された。

20

【0964】

【化196】



30

【0965】

tert-ブチル 2-(5,6-ジアミノピリミジン-4-イルアミノ)-2-オキソエチルカルバメート (167) : DCM (50 mL) 中のピリミジン-4,5,6-トリアミン (2050 mg、16.383 mmol) 及び Boc-Gly-OH (2880、16.440 mmol) の溶液に、DCC (3800 mg、18.417 mmol) 及び DMAP (80 mg、0.655 mmol) を 23 °C で添加した。3 時間後、沈殿物を濾過により除去した。混合物を分取 LC により精製して、標的化合物 167 (2458 mg、8.707 mmol、53%) を得た。MS m/z 283 ($M+H$)⁺。

40

【0966】

tert-ブチル (6-アミノ-9H-プリン-8-イル) メチルカルバメート (168) : *n*-BuOH (20 mL) 中の化合物 167 (620 mg、2.196 mmol) の溶液に、MeOH (2500 μ L、11.570 mmol) 中の NaOMe 25% を 23 °C で添加した。温度を 70 °C に上げた。1 時間後、6 N の HCl (1.83 mL、11 mmol) を氷浴中で混合物に添加し、混合物を EtOAc (50 mL) で希釈した。混合物を飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。混合物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、標

50

的化合物 168 (250 mg、0.946 mmol、43%) を得た。MS m/z 265 (M+H)⁺。

【0967】

tert-ブチル (6-アミノ-9-(2-ブロモエチル)-9H-プリン-8-イル) メチルカルバメート (169) : DMF (5 mL) 中の化合物 168 (250 mg、0.946 mmol) の溶液に、ジブロモエタン (2100 mg、2.795 mmol) 及び CsCO₃ (2400 mg、1.842 mmol) を 23℃ で添加した。2.5 時間後、混合物を 20 mL の DCM で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム (50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥させ、濾過した。混合物を分取 LC により精製して、化合物 169 (144 mg、0.545 mmol、58%) を得た。MS m/z 372 (M+H)⁺。

【0968】

tert-ブチル 4-アミノ-8,9-ジヒドロピラジノ [1,2-e] プリン-7 (6H) -カルボキシレート (170) : 水素化ナトリウム (鉱油中 60% 分散液、51.4 mg、1.286 mmol) の溶液に、5 mL のヘキサンを添加した。溶液を攪拌し、続いてヘキサンを除去して鉱油を洗い流した。DMF (2.9 mL) 中の化合物 169 (159.2 mg、0.429 mmol) を、23℃ で攪拌しながら溶液に滴加した。1 時間後、LCMS は、反応が完了したことを示した。混合物を、Gemini NX、150×30 C18 カラムを使用して、20 分間、5%~60% の水/90% ACN 0.05% TFA 勾配で、分取 LC により精製した。生成物を含有する画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで蒸発させた。残留物を高真空ポンプで乾燥させて、標的化合物 170 (36.7 mg、0.05 mmol、11%) を得た。MS m/z 291 (M+H)⁺。

【0969】

6,7,8,9-テトラヒドロピラジノ [1,2-e] プリン-4-アミン (171) : 170 (35.7 mg、0.123 mmol) の溶液に、1.2 mL の DCM を添加した。トリフルオロ酢酸 (45.7 μ L、0.615 mmol) を 23℃ で攪拌しながら滴加した。1 時間後、LCMS は反応が完了したことを示した。混合物を、PhMe を使用したさらなる共沸によってロータリーエバポレーターで蒸発させ、化合物 171 (38.5 mg、0.05 mmol、41%) を得た。MS m/z 191 (M+H)⁺。

【0970】

7-ベンジル-6,7,8,9-テトラヒドロピラジノ [1,2-e] プリン-4-アミン (172) : DMF (1.1 mL) 中の 171 (10 mg、0.053 mmol) の溶液に、ベンズアルデヒド (6.7 μ L、0.066 mmol) を添加した。DIEA (18.3 μ L、0.105 mmol) を添加し、反応物を 15 分間攪拌した。次に、ボロン-ピリジン複合体 (6.7 μ L、0.067 mmol) を添加し、反応物を 23℃ で一晩攪拌した。混合物を、Gemini NX、150×30 C18 カラムを使用して、20 分間、5%~60% の水/90% ACN 0.05% TFA 勾配で、分取 LC により精製した。生成物を含有する画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで蒸発させた。残留物を高真空ポンプで乾燥させて、化合物 172 (1.3 mg、0.002 mmol、3%) を得た。MS m/z 281 (M+H)⁺。

【0971】

10

20

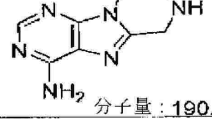
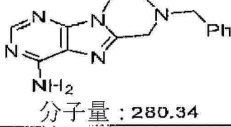
30

40

50

【表 6】

表 6-TLR アゴニスト-コア 2 化合物

化合物番号	化合物名	構造-コア2化合物
170	AXC-745	 分子量: 290.33
171	AXC-746	 分子量: 190.21
172	AXC-753	 分子量: 280.34

10

【0972】

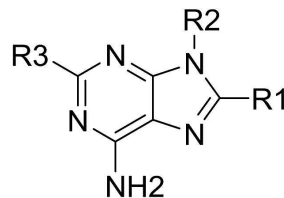
実施例 6：以下の代表的な構造-コア 4（図 1）を含む TLR アゴニストの合成：

コア 4

【0973】

20

【化 197】



【0974】

いくつかの実施形態において、 R_1 は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、酸素含有 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、複素環、置換複素環、ハロゲン、またはHであり、

30

R_2 は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{12}$ 置換アルキル、 $C_4 \sim C_8$ シクロアルキル、芳香族環、置換芳香族環、芳香族複素環、置換芳香族複素環、 $-ONH_2$ 末端 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、またはHであり、

R_3 は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、酸素／窒素／硫黄含有 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、複素環、置換複素環、シクロアルキル、置換シクロアルキル、 $-N_3$ 、末端 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、末端置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、または不在である。

【0975】

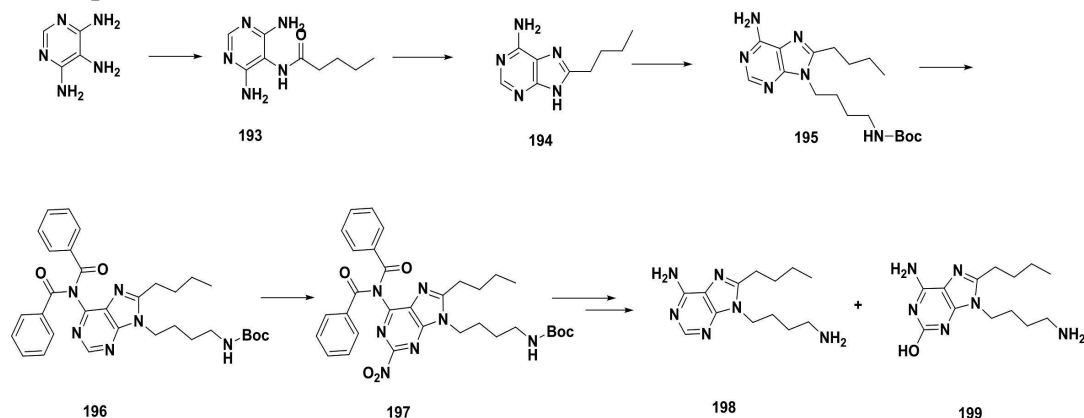
コア 4 構造を有する TLR アゴニストは、以下のスキームに開示されるように合成された。

40

【0976】

50

【化 198】



10

【0977】

N-(4,6-ジアミノピリミジン-5-イル)ペンタンアミド(193):ピリミジン-4,5,6-トリアミン(1015mg、8.112mmol)を、70℃でN-メチル-2-ピロリドン(10mL)に溶解した。溶液が透明になった後、23℃に冷却した。混合物に塩化バレリル(980μl、8.127mmol)を添加し、温度を50℃に上げた。20時間後、温度を23℃に下げ、EtOAc(50mL、沈殿物)を混合物に添加し、沈殿物を濾過により分離した。固体をEtOAc(10mL)及びアセトン(10mL)で洗浄し、乾燥させて、化合物193(1780mg、7.237mmol、90%)を淡褐色の固体として得た。生成物をさらに精製することなく次のステップに使用した。MS m/z 210 (M+H)⁺。

20

【0978】

8-ブチル-9H-プリン-6-アミン(194):n-BuOH(30mL)中の粗製化合物193(1780mg、7.273mmol)の溶液に、23℃でナトリウムメトキシド(1570mg、29.063mmol)を添加し、還流まで加熱した。1時間後、溶液を室温に冷却し、6MのHCl(3.2mL)で中和し、ブライン(20mL)を添加して、二相混合物を得た。有機層を分離し、MgSO₄で乾燥させ、続いて真空中で濃縮して、標的化合物194(1148mg、6.003mmol、83%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 192 (M+H)⁺。

30

【0979】

tert-ブチル4-(6-アミノ-8-ブチル-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(195):THF(20mL)中のN-Boc-アミノ-ブタノール(1520mg、8.032mmol)及び化合物194(1420mg、7.426mmol)の溶液に、PPh₃(2080mg、7.930mmol)を0℃で添加した。30分後、この混合物にDIAD(2200μl、11.174mmol)を0℃で5分間にわたって添加した。3時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM(100mL)で希釈し、半飽和重炭酸ナトリウム(100mL)及びブライン(20mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物195(1064mg、2.935mmol、37%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 363 (M+H)⁺。

40

【0980】

tert-ブチル4-(6-(N-ベンゾイルベンズアミド)-8-ブチル-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(196):DCM(10mL)中の化合物195(1064mg、2.935mmol)の溶液に、0℃で塩化ベンゾイル(700μl、4.980mmol)及びTEA(900μl、17.788mmol)を添加し、温度を20℃に上げた。2.5時間後、混合物を飽和重炭酸ナトリウム(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄し、MgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去し、残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物196(1650mg

50

、2.891mmol、98%)を淡褐色の油状物として得た。MS m/z 571 ($M+H$)⁺。

【0981】

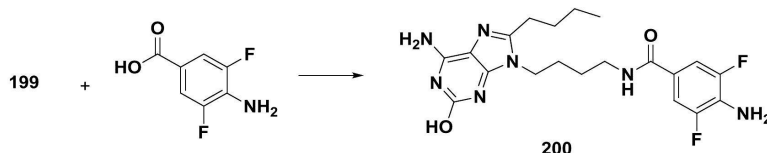
tert-ブチル4-(6-(N-ベンゾイルベンズアミド)-8-ブチル-2-ニトロ-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(197):DCM(10mL)中のテトラメチル硝酸アンモニウム(780mg、5.729mmol)の溶液に、トリフルオロ酢酸無水物(1200 μ L、17.118mmol)を23℃で添加した。1時間後、混合物を0℃に冷却し、DCM(20mL)中の化合物196(1650mg、2.891mmol)の溶液を添加した。温度を23℃に上げた。2時間後、混合物をDCM(20mL)で希釈し、半飽和重炭酸ナトリウム(20mL)及びブライン(20mL)で洗淨し、MgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去し、残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物197(1067mg、1.733mmol、60%)をガラス質の淡黄色の固体として得た。MS m/z 616 ($M+H$)⁺。

【0982】

9-(4-アミノブチル)-8-ブチル-9H-プリン-6-アミン(198)及び6-アミノ-9-(4-アミノブチル)-8-ブチル-9H-プリン-2-オール(199):EtOH(20mL)中の化合物197(220mg、0.357mmol)の溶液に、Pd/C(10%、0.1g)を23℃で添加し、水素ガスを通気した。18時間後、LCMSは、脱ニトロ化された化合物が作製されたことを示した。NaOMe(30mg、0.6mmol)を添加し、混合物を4時間攪拌した。次に、TFA(3mL)を添加した。20分後、溶媒を真空中で除去し、混合物を分取LCにより精製して、化合物198(94mg、0.156mmol、44%)を淡褐色の固体として得(MS m/z 263 ($M+H$)⁺)、化合物199(0.024mmol、7%)を淡褐色の固体として得た(MS m/z 279 ($M+H$)⁺)。

【0983】

【化199】

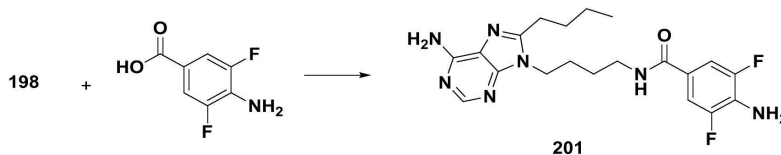


【0984】

4-アミノ-N-(4-(6-アミノ-8-ブチル-2-ヒドロキシ-9H-プリン-9-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(200):150について記載したのと同様の手順を用いて、化合物199及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物200を調製して、標的化合物200(14mg、0.018mmol、61%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 434 ($M+H$)⁺。

【0985】

【化200】



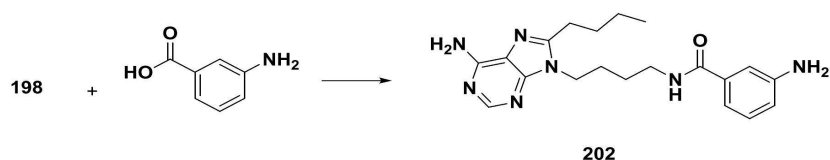
【0986】

4-アミノ-N-(4-(6-アミノ-8-ブチル-9H-プリン-9-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(201):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物198及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物201を調製して、標的化合物201(13mg、0.017m

mol、93%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 418 ($M+H$)⁺。

【0987】

【化201】

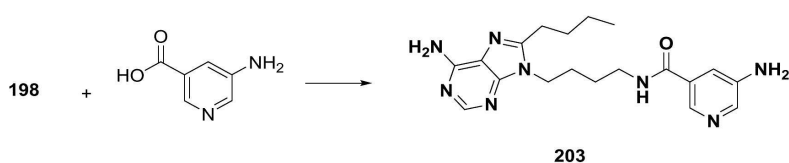


【0988】

3-アミノ-N-(4-(6-アミノ-8-ブチル-9H-プリン-9-イル)ブチル)ベンズアミド(202):150について記載したと同様の手順を用いて、化合物198及び3-アミノ安息香酸を出発材料として使用して、化合物202を調製して、標的化合物202(10mg、0.014mmol、88%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 382 ($M+H$)⁺。

【0989】

【化202】

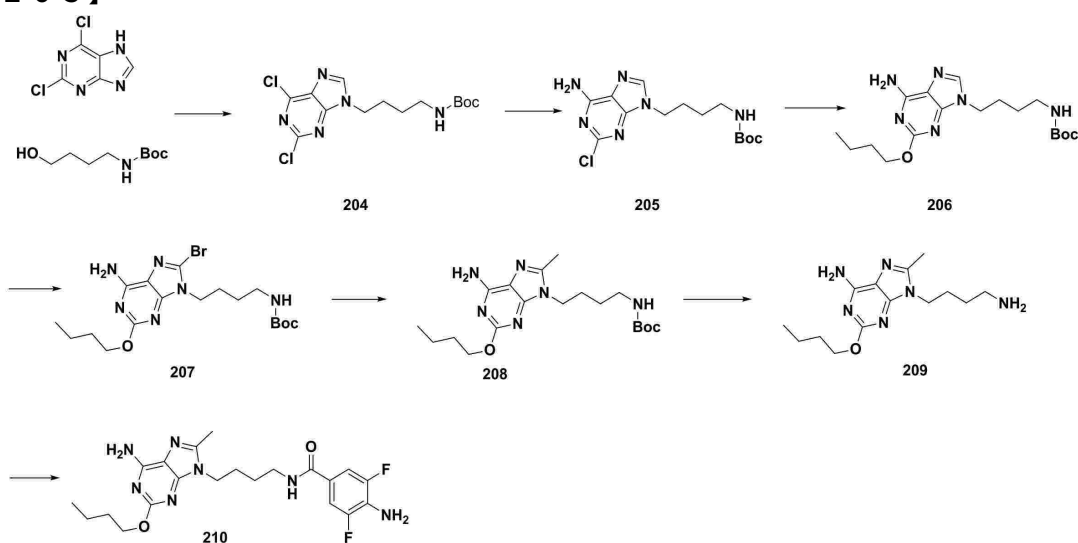


【0990】

5-アミノ-N-(4-(6-アミノ-8-ブチル-9H-プリン-9-イル)ブチル)ニコチンアミド(203):150について記載されると同様の手順を用いて、化合物198及び5-アミノニコチン酸を出発材料として使用して、化合物203を調製して、標的化合物203(14mg、0.019mmol、定量的)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 383 ($M+H$)⁺。

【0991】

【化203】



【0992】

tert-ブチル4-(2,6-ジクロロ-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(204):THF(10mL)中のN-Boc-アミノブタノール(1620mg、8.560mmol)及び2,6-ジクロロプリン(1495mg、7.910mmol)の溶液に、0℃でPPh₃(2280mg、8.693mmol)を添加した。30分後、DIAD(2300μL、11.681mmol)を0℃で5分間にわたって添

10

20

30

40

50

加した。混合物を50℃で攪拌した。6時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をEtOAc(100mL)で希釈し、半飽和重炭酸ナトリウム(100mL)及びブライン(20mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物204(4500mg、<12.492mmol、<100%)を黄色の油状物として得た。(約20%の不純物がPPh₃である)。MS m/z 361 (M+H)⁺。

【0993】

tert-ブチル4-(6-アミノ-2-クロロ-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(205): 化合物204(PPh₃の粗製混合物、4500mg、<12.492mmol)を、攪拌棒を備えた耐圧ガラス容器に入れた。この容器に、MeOH中の7NのNH₃(12mL、84mmol)を添加した。チューブを密封し、次いで、120℃で加熱した。30分後、溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM(100mL)に溶解した。溶液を飽和重炭酸ナトリウム(100mL)及びブライン(30mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物205(1310mg、3.844mmol、37%)を淡黄色の固体として得た。MS m/z 341 (M+H)⁺。

【0994】

tert-ブチル4-(6-アミノ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(206): n-ブタノール(5mL)中の化合物205(257mg、0.754mmol)の溶液に、乾燥窒素ガス下で、ナトリウム金属(90mg、2.455mmol)を23℃で添加した。温度を100℃に上げた。18時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物をDCM(50mL)に溶解し、半飽和重炭酸ナトリウム(50mL)及びブライン(50mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。化合物206(310mg、<0.819mmol、定量的)を淡褐色の粗製固体として得た。MS m/z 379 (M+H)⁺。

【0995】

tert-ブチル4-(6-アミノ-8-ブロモ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(207): DCM(10mL)中の化合物206(310mg、0.819mmol、粗製)の溶液に、臭素(150uL、0.563mmol)を23℃で添加した。1時間後、溶媒を真空中で除去した。混合物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物207(250mg、0.547mmol、67%)をガラス質の淡黄色の固体として得た。MS m/z 458 (M+H)⁺。

【0996】

tert-ブチル4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-メチル-9H-プリン-9-イル)ブチルカルバメート(208): 乾燥THF(5mL)中の化合物207(82mg、0.179mmol)の溶液に、THF中のトリメチルアルミニウム、1M(360uL、0.36mmol)及びPdCl₂(PPh₃)₂(44mg、0.063mmol)を23℃で添加した。混合物を還流した。20時間後、混合物を20mLのDCMで希釈し、半飽和重炭酸ナトリウム(20mL)及びブライン(20mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過した。溶媒を真空中で除去した。残留物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物208(12mg、0.031mmol、17%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 393 (M+H)⁺。

【0997】

9-(4-アミノブチル)-2-ブトキシ-8-メチル-9H-プリン-6-アミン(209): DCM(0.5mL)中の化合物208(12mg、0.031mmol)の溶液に、トリフルオロ酢酸(0.5mL)を23℃で添加した。1時間後、溶媒を真空中で除去した。残留物を高真空ポンプで一晩乾燥させて、化合物209(15mg、0.02mmol、定量的)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 293 (M+H)⁺。

【0998】

4-アミノ-N-(4-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-メチル-9H-プリン-9

10

20

30

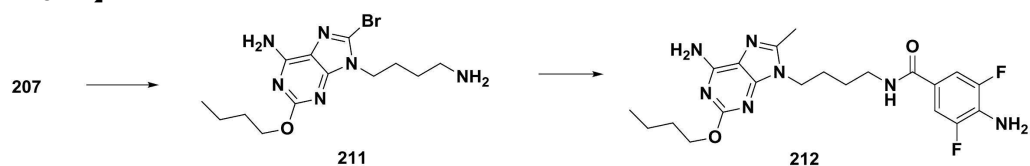
40

50

－イル)ブチル)－3,5-ジフルオロベンズアミド(210):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物209及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物210を調製して、標的化合物210(3.5mg、0.004mmol、22%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 469 ($M+H$)⁺。

【0999】

【化204】



10

【1000】

9-(4-アミノブチル)-8-ブロモ-2-ブトキシ-9H-プリン-6-アミン(211):209について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物207を使用して、化合物211を調製して、標的化合物211(8mg、0.011mmol、定量的)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 358 ($M+H$)⁺。

【1001】

4-アミノ-N-(4-(6-アミノ-8-ブロモ-2-ブトキシ-9H-プリン-9-イル)ブチル)-3,5-ジフルオロベンズアミド(212):150について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物211及び4-アミノ-3,5-ジフルオロ安息香酸を出発材料として使用して、化合物212を調製して、標的化合物212(8mg、0.009mmol、82%)を淡褐色の固体として得た。MS m/z 513 ($M+H$)⁺。

20

【1002】

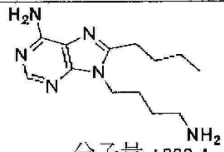
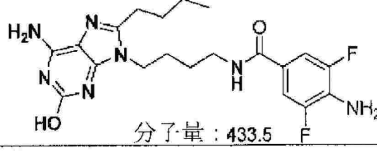
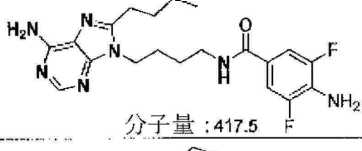
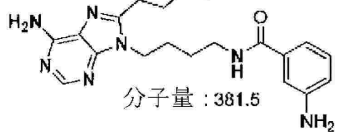
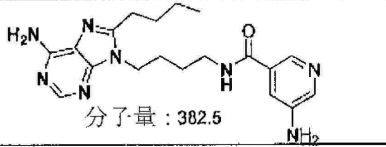
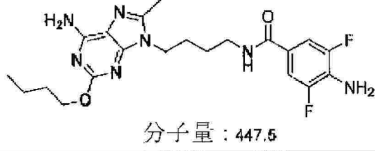
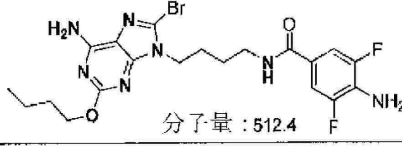
30

40

50

【表 7】

表 7－T L R アゴニスト－コア 4 化合物

化合物番号	化合物名	構造－コア 4 化合物
198	AXC-844	 分子量：262.4
200	AXC-842	 分子量：433.5
201	AXC-843	 分子量：417.5
202	AXC-845	 分子量：381.5
203	AXC-846	 分子量：382.5
210	AXC-836	 分子量：447.5
212	AXC-841	 分子量：512.4

【1003】

実施例 7：本実施例は、本発明で使用される種々の方法論及び技法を開示する。

【1004】

分子クローニング－CHO 細胞コドン最適化抗体重鎖及び軽鎖 cDNA 配列は、商業的 DNA 合成サービス (IDT, San Diego, CA) から得た。合成された DNA 断片を、Hind III 及び EcoR I (いずれも New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA から) で消化し、PCR 精製キット (Qiagen, Valencia, CA) により精製した。消化された抗体遺伝子断片をクイックライゲーションキット (NEB) を介して発現ベクターにライゲーションして、野生型抗体重鎖及び軽鎖の発現のための構築物を得た。得られるプラスミドを E. coli で増殖させ、DNA シーケンシングサービス (Eton) により検証した。

【1005】

アンバーコドン含有変異体の生成－抗 HER2 Fab の結晶構造に基づいて、非天然アミノ酸 (例えば、パラアセチルフェニルアラニン (pAF)、またはパラアジドフェニルアラニン) を遺伝子組み込みするために、軽鎖定常領域に位置する 10 の異なる表面アクセス可能部位を選択した。これらの部位は、抗原－抗体結合に重要ではない。その後、選択した部位の各遺伝子コドンを、部位特異的変異誘発を介してアンバーコドン

(TAG)に変異させて、その抗体変異体の発現プラスミドを生成した。プライマーは、IDTから購入した。すべての部位特異的変異誘発実験は、取扱説明書(NEB)に従ってQ5部位特異的変異誘発キットを使用し行った。変異体の発現プラスミドをE. coliで増殖させ、DNAシーケンシングサービス(Eton)により検証した。表8は、抗HER2 Fabの重鎖または軽鎖定常領域における、それらのKabatt番号付けによるアンバー変異部位、及び対応するアミノ酸配列(配列番号2及び4~11)のリストを提供する。配列番号1及び3は、それぞれ、抗HER2 Fabの野生型重鎖及び軽鎖を示す。抗HER2 Fabとしては、配列番号2及び配列番号4、配列番号2及び配列番号5、配列番号2及び配列番号6、配列番号2及び配列番号7、配列番号2及び配列番号8、配列番号2及び配列番号9、配列番号2及び配列番号10、配列番号2及び配列番号11、配列番号2及び配列番号12、配列番号2及び配列番号13の重鎖及び軽鎖配列が挙げられる。

【1006】

【表8】

表8. 非天然アミノ酸組み込みのためのアンバー部位を有する抗HER2 Fab重鎖(HC)及び軽鎖(LC)アミノ酸配列。pAFが任意の他の非天然アミノ酸に置き換えられる、以下の表の配列のすべてもまた開示される。

配列番号	説明	配列
1	重鎖野生型	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
2	重鎖A114変異	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSXSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

3	輕鎖野生型	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
4	輕鎖V 1 1 0 變異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTXAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
5	輕鎖A 1 1 2 變異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAXPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
6	輕鎖S 1 1 4 變異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPXVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
7	輕鎖S 1 2 1 變異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPXDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

10

20

30

40

50

8	軽鎖 S 1 2 7 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKXGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
9	軽鎖 K 1 4 9 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWXXVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
10	軽鎖 S 1 5 6 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQXGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
11	軽鎖 S 1 6 8 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDXKDSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

10

20

30

12	軽鎖 S 2 0 2 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLXSPVTKSFN RGEC
13	軽鎖 V 2 0 5 変異	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPXTKSFN RGEC

40

【1007】

Xは非天然アミノ酸（nnAA）を示し、下線付きは表7のFc変異を示す。

【1008】

50

114位の重鎖におけるアンバー変異に加えて、Fc変異もまた、抗HER2抗体または抗体断片の種々の位置で生成され、薬物動態を改善し、及び／または抗体依存性細胞食作用（ADCP）及び／または抗体依存性細胞毒性ADCC活性を増強した（表9）。

【1009】

【表9】

表9－抗HER2 Fc変異

Fc変異	標的化Fc受容体	目的
野生型	該当なし	対照
E233P/L234V/L235A	FcγRIII	ADCCヌル
N434A	FcRn	改善されたPK
M252Y/S254T/T256E	FcRn	改善されたPK
M252Y/S254T/T256E G236A/S239D/I332E	FcRn/FcγRII/FcγRIII	PK及びADCP増強
G236A/S239D/I332E	FcγRII/RIII	ADCP/ADCC増強
G236A	FcγRII	ADCP増強
D270E	FcγRII	ADCP増強
Y300L	FcγRII	ADCP増強

【1010】

一過性発現－プラットフォーム細胞株301～14を、3mMのL－グルタミン（Gibco）及び3mMのGlutaMAX（Gibco）を補充したEX－Cell 302（Sigma）中で維持した。細胞を3～4日ごとに継代し、40万個の細胞/mLの密度で播種した。トランスフェクションの1日前に、細胞を1mL当たり60万個の細胞で播種した。0日目に、取扱説明書に従って、MaxCyteエレクトロポレーションプラットフォームを使用して、軽鎖及び重鎖をコードする抗体発現プラスミドで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を空の125mL振盪フラスコに静置し、37℃の静的インキュベーターで30分間インキュベートした。次いで、トランスフェクトした細胞を、振盪フラスコ中に 3×10^6 /mLの密度で、基本発現培地（50μMのMSXを補充した50%DynamiS－50%EX－Cell 302）に接種した。トランスフェクトした細胞を、140rpmに設定したオービタルシェーカー上で、37℃、5%CO₂でインキュベートした。1mMのpAFを、7g/LのCell Boost 5（GE healthcare）、120μg/LのLong R3 IGF－1（sigma）、及び2mMのGlutaMAXと一緒に、1日目に培養物に添加した。インキュベーター内の温度を37℃から32℃に変えた。さらに7g/LのCell Boost 5及び2mMのGlutaMAXを3日目に添加し、5日目に上清を収集した。グルコースレベルをグルコースメーターを使用して監視し、培養培地中のグルコースレベルが2g/Lを下回った場合、追加のグルコースを培養物に添加した。生存細胞数及び生存率をVi－Cell機器によって測定した。生産性は、プロテインGセンサーを使用して、Octetにより測定した。

【1011】

安定したバルクプール生成－発現プラスミドを、6時間のPvu I（NEB）消化を使用して線形化した。線形化後、フェノール抽出を使用してDNAを精製し、2.5μg/μLの濃度でエンドトキシン不含水に溶解した。プラットフォーム細胞株BB－117を、3mMのL－グルタミン及び3mMのGlutaMAXを補充したEX－Cell 302中で維持した。細胞を3～4日ごとに継代し、 0.4×10^6 /mLの密度で播種した。トランスフェクションの1日前、細胞を 0.6×10^6 /mLで播種した。0日目に、取扱説明書に従って、MaxCyteエレクトロポレーションプラットフォームを使

用して、細胞を線形化抗体発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を空の125 mL振盪フラスコに静置し、37℃の静的インキュベーターで30分間インキュベートした。次いで、30 mLの回収培地（3 mMのグルタミン及び3 mMのGlutaMAXを補充した50%Ex-302～50%CD-CHO）をフラスコに添加し、一晚振盪した。1日目に、トランスフェクトした細胞を計数し、沈降させ、洗浄し、安定したバルクプール生成のために選択培地（50～100 µMのMSXを含む50%Ex-302～50%CD-CHO）に再懸濁した。生存細胞数及び生存率を監視し、安定したバルクプールの生存率が90%に戻るまで、3～4日ごとに培地を交換した。選択が終了したら、凍結細胞ストックを作製し、得られる安定したバルクプールを使用して、供給回分発現のための材料を生成した。

10

【1012】

供給回分発現-0日目に、振盪フラスコ中に 0.5×10^6 / mLの密度で、以前に生成された抗体の安定したバルクプールを基本発現培地（50 µMのMSXを補充した50%Dynamis-50%ExCell 302）に接種した。トランスフェクトした細胞を、140 rpmに設定したオービタルシェーカー上で、37℃、5%CO₂でインキュベートした。0.5 mMのpAFを、10 g/LのCell Boost 4 (GE healthcare) 及び0.52 g/LのCell Boost 7b (GE healthcare) と一緒に、3日目に培養物に添加した。5日目に、120 µg/LのLong R3 IGF-1を培養物に添加した。グルコースレベルをグルコースメーターを使用して監視し、培養培地中のグルコースレベルが2 g/Lを下回った場合、追加のグルコースを培養物に添加した。生存細胞数及び生存率をVi-Cell機器によって測定した。7日目に、精製のために上清を収集した。生産性は、プロテインGセンサーを使用して、Octetにより測定した。

20

【1013】

EuCODE発現系からnnAAを含有する抗体の精製-nnAAを含有する標的抗体を含有する清澄化した細胞培養培地を、20 mMのリン酸ナトリウム、100 mMの塩化ナトリウム（pH 7.5）において平衡化したプロテインA ProSep Ultraカラム（EMD Millipore）上にロードした。ロード後、カラムを、緩衝液A（20 mMのリン酸ナトリウム、100 mMの塩化ナトリウム、pH 7.5）、続いて洗浄緩衝液B（5 mMのコハク酸、pH 5.8）で洗浄して、宿主細胞汚染物質を除去した。標的抗体を溶出緩衝液C（50 mMのグリシン、10 mMのコハク酸、pH 3.2）でカラムから溶出した。標的抗体をプールし、2.0 Mのトリス塩基でpH 5.0に調整した。標的抗体を、30 mMの酢酸ナトリウム（pH 5.0）において平衡化したCaptos SP Impresカラム（GE Healthcare）上に条件付けされたプロテインAプールをロードすることによってさらに精製した。標的抗体を、100%緩衝液B（30 mMの酢酸ナトリウム、0.5 Mの塩化ナトリウム、pH 5.0）への線形勾配でカラムから溶出し、モノマー抗体を含有する画分をプールし、0.22 µM濾過し、さらなる使用まで65℃以下で保管した。

30

【1014】

TLRアゴニストリンカーペイロードの部位特異的コンジュゲーション-nnAA、例えばパラアセチルフェニルアラニン含有する抗体をコンジュゲーション緩衝液（30 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.0）に緩衝液交換し、10～20 mg/mLに濃縮した。最終的な100 mMの酢酸ヒドラジドを抗体に添加し、続いて10モル当量のヒドロキシルアミン官能化TLRアゴニスト薬物-リンカーを添加した。コンジュゲーション反応を25～30℃で18～20時間インキュベートし、続いてCaptos SP Impresカラム（GE Healthcare）上で精製して、過剰な試薬を除去した。精製したADCを製剤緩衝液（50 mMのヒスチジン、100 mMのNaCl、5%トレハロース、pH 6.0）に緩衝液交換し、さらなる使用まで65℃以下で保管した。図2及び3は、本発明のTCの部位特異的コンジュゲーションを図示する。種々のTLRアゴニストとのTLRアゴニスト薬物-リンカー抗体コンジュゲーションが図示される。図3に示

40

50

すように、A Aは切断可能なアミノ酸リンカーを示し、Lは切断不能なリンカーを示す。

【1015】

実施例8：小分子TLRアゴニストのインビトロ機能アッセイ

HEK-Blue（商標）hTLR7細胞を、HEK-Blue（商標）検出培地中でインキュベートし、増加濃度のTLR7もしくはTLR8またはTLR7／8アゴニストで刺激した。24時間のインキュベーション後、NF-κB誘導性SEAPのレベルを、Quanti-Blue検出試薬（Invivogen, San Diego, CA）により決定し、読み取り値を655nmのODで得た。EC₅₀を、Prismソフトウェアを使用して用量応答曲線から決定した。以下の表及び図は、本明細書の実施例1～6に記載の本発明の例示的なTLRアゴニストの活性を示す。500nM未満のEC₅₀値は、50nM～1μM、または1μM～3μMを超えるEC₅₀値を有する化合物よりも高い効力を有する化合物を示唆する。

10

【1016】

図4は、2.08μMのEC₅₀を有する市販のTLR7レシキモド（R848）、0.435μMのEC₅₀を有する化合物1、及び0.153μMのEC₅₀を有する化合物2を使用した、HEK-Blue hTLR7レポーター細胞株におけるTLR7アゴニスト刺激を示す。

【1017】

上記の実施例1～6に開示される例示的なTLRアゴニストの活性をアッセイした。図5A、表10は、市販の対照DSR-6434、レシキモド、及びモトリモドと比較したEC₅₀値を示す。

20

【1018】

【表10】

表10—例示的なTLRアゴニストの活性

化合物番号	化合物	TLR7 EC ₅₀ (nM)
なし	対照-DSR-6434	9.203
なし	R848-レシキモド	519.7
88	AXC-779	242.1
60	AXC-738	11.08
49	AXC-725	249.4
54	AXC-732	255.5
58	AXC-736	213.4
62	AXC-740	115.6
86	AXC-777	910.4
87	AXC-778	83.34
89	AXC-789	71.34
109	AXC-800	>5000
106	AXC-801	>5000
112	AXC-802	>5000
93	AXC-803	331.5
94	AXC-804	260.3
97	AXC-807	412.6
61	AXC-739	28.17
59	AXC-737	18.7
64	AXC-743	56.11

30

40

50

【1019】

図5B及び表11は、選択されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。AXC-887及びAXC-877は、10 nMを下回るEC₅₀値を示し、これらの化合物が非常に強力なTLR7アゴニストであることを示唆している。TLR8レポーターアッセイにおいて、AXC-887は、1427 nMのEC₅₀を有する市販の化合物モトリモドと比較して、3733 nMのEC₅₀を有する測定可能な活性を示した。これは、AXC-887がTLR7／8デュアルアゴニストであることを示唆した。

【1020】

【表11】

表11－例示的なTLRアゴニストの活性

化合物	EC ₅₀ (nM)
DSR-6434	15.8
AXC-886	16.7
AXC-887	4.6
AXC-890	15.3
AXC-885	11.3
AXC-888	467.9
AXC-878	50.4
AXC-877	5.5
AXC-881	87.3
AXC-883	19.3
AXC-884	71.3

【1021】

図6及び表12は、リンカーに結合された選択されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。AXC-879は、異なるTLR-アゴニスト（ペイロード）リンカーの中で最も高い効力を示した。

【1022】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 2－例示的な T L R アゴニスト及びリンカーの活性

化合物	T L R アゴニストのペイロード+リンカー
	E C ₅₀ (nM)
DSR-6434	14.8
AXC-876	362.4
AXC-879	151.2
AXC-880	409.5
AXC-882	550.8
AXC-874	>10,000
AXC-875	>10,000
AXC-862	400.1
AXC-863	864.2
AXC-867	829.0
AXC-868	>5,000
AXC-869	>10,000
AXC-889	696.5

10

20

【1023】

図 7 及び表 1 3 は、追加の T L R 7 アゴニスト及びリンカーに結合された T L R 7 アゴニストの T L R 7 活性を示した。AXC-895 は、試験した異なるペイロードの中で最も高い効力を示し、AXC-901 は、異なるペイロードリンカーの中で最も高い効力を示した。(DL) は、薬物リンカーまたはリンカーに結合された T L R アゴニストまたはリンカーに結合された T L R アゴニスト (ペイロード) を示す。

【1024】

【表 1 3】

表 1 3－例示的な T L R アゴニスト及びリンカーの活性

化合物	E C ₅₀ (nM)
DSR-6434	9
AXC-901 (DL)	48
AXC-900 (DL)	615
AXC-899	1302
AXC-895	11
AXC-891	47
AXC-896 (DL)	325
AXC-897 (DL)	330
AXC-898	50
AXC-892	73
AXC-893 (DL)	3120
AXC-894	1672

30

40

【1025】

図 8 及び表 1 4 は、追加の T L R 7 アゴニスト及びリンカーに結合された T L R 7 アゴニストの T L R 7 活性を示す。すべての試験化合物は、T L R 7 アゴニスト活性を有する

50

。AXC-894、AXC-903、AXC-904、AXC905、及びAXC-906は、10 nMを下回るEC₅₀値で試験した異なるペイロードの中で最も高い効力を示した。

【1026】

【表14】

表14ー例示的なTLRアゴニスト及びリンカーの活性

化合物	TLR7 EC ₅₀ (nM)
DSR-6434	10.5
AXC-903	4.3
AXC-907 (DL)	51.8
AXC-894	2.1
AXC-909 (DL)	71.9
AXC-904	8.1
AXC-905	2.6
AXC-906	5.4
AXC-908	11.5
AXC-860	119.5
AXC-910	2591.1

10

20

【1027】

図9及び表15は、リンカー（薬物リンカーまたはDL）、及び最終代謝産物を含有する非天然アミノ酸、例えばpAF（DL-pAF）に結合された異なるTLR7アゴニストのTLR7活性を比較した。すべての場合において、最終代謝産物を含有するpAFは、薬物リンカーを有するそれぞれのペイロードよりも高い効力を示した。AXC-879は、異なるTLRペイロードリンカーの中で最も高い効力を示した。

【1028】

【表15】

表15ー非天然アミノ酸（nnAA）の存在下または不在下における例示的なTLRアゴニスト+リンカーの活性

化合物	TLRアゴニスト+リンカー (DL)-EC ₅₀ (nM)	TLRアゴニスト+リンカー+nnAA (DL-pAF)-EC ₅₀ (nM)
AXC-879	151.2	90
AXC-880	409.5	167
AXC-882	550.8	343
AXC-876	362.4	245
AXC-863	864.2	287
AXC-862	400.1	121
AXC-867	829	283
DSR 6434	15	11

40

DL＝薬物リンカー、DL-pAF＝最終代謝産物を含有するpAF

【1029】

実施例9：TCの部位特異的コンジュゲーション

TCの部位特異的コンジュゲーションは、分析逆相HPLCを使用して、実施例7に記

50

載されるように行われた。図10Aは、還元条件下で、非天然アミノ酸、例えば、pAFを有するコンジュゲートされていない抗HER2抗体の、アミノ酸位置HA114における分析逆相HPLCクロマトグラムを示す。図10B及び10Cは、それぞれ、TLRアゴニストAXC-875及びAXC-880とアミノ酸位置HA114でコンジュゲートした抗HER2抗体を示す。表16は、上述の標準的なコンジュゲーション条件からのTLRコンジュゲートの薬物-抗体比(DAR)を示す。様々なDARレベル(0.3~2.0)がTLRコンジュゲート間で見ることができるが、これは、主に、関連するTLRリンカー-ペイロードの異なる特性に起因する。

【1030】

【表16】

表16. RP-HPLCにより決定されるTLRコンジュゲートの薬物-抗体比(DAR)。

コンジュゲート	薬物抗体比(DAR)
HER2-HA114-AXC638	1.7
HER2-HA114-AXC800	1.7
HER2-HA114-AXC801	1.9
HER2-HA114-AXC802	1.5
HER2-HA114-AXC874	2.0
HER2-HA114-AXC875	1.9
HER2-HA114-AXC862	0.8
HER2-HA114-AXC863	1.8
HER2-HA114-AXC867	1.5
HER2-HA114-AXC868	1.2
HER2-HA114-AXC869	0.3

【1031】

実施例10：種々の腫瘍細胞とのインビトロ共培養アッセイ

RAW-Blue(商標)細胞(Invivogen, San Diego, CA)を、異なるレベルのHER2発現レベルを有するヒト腫瘍細胞と、96ウェルプレートのウェル当たりの総細胞数100万個で、1:1のE:T比で共培養した。異なる濃度の小分子TLR7アゴニスト及びコンジュゲートされたISAC(免疫刺激抗体コンジュゲート)を共培養細胞培地に添加した。24時間のインキュベーション後、RAW-Blue(商標)細胞からのNF-κB誘導性SEAPのレベルを、OD_{655nm}で読み取って、Quanti-Blue検出試薬(Invivogen, San Diego, CA)により決定した。Prismソフトウェアを使用して、用量応答曲線を生成した。

【1032】

図11A~11Cは、抗HER2抗体にコンジュゲートされたときの、選択されたペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。SKOV3は、HER2高発現腫瘍細胞株(図11A)であり、JIMT-1は、HER2中/低発現腫瘍細胞株(図11B)であり、A431は、HER2低発現腫瘍細胞株(図11C)である。小分子TLR7アゴニストは、すべての腫瘍細胞株の存在下で強力なTLR7活性を示す。すべてのTLR7 ISACSは、HER2低または中発現腫瘍細胞株の存在下で活性を示さない。ペイロード薬物リンカーAXC-863を有するISACは、HER2高発現腫瘍細胞株の存在下でのみ強力な用量依存活性を示す。

【1033】

図12A及び12Bは、抗HER2抗体にコンジュゲートされたときの、追加のペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。SKBR3は、HER2高発現腫瘍

細胞株であり（図12A）、HCC1806は、HER2超低発現腫瘍細胞株である（図12B）。小分子TLR7アゴニストは、すべての腫瘍細胞株の存在下で強力なTLR7活性を示す。すべてのTLR7 ISACS及びコンジュゲートされていない抗HER2抗体は、HER2超低発現腫瘍細胞株の存在下で活性を示さない。ペイロード薬物リンカーAXC-863を有するISACは、HER2高発現腫瘍細胞株の存在下でのみ強力な用量依存活性を示す。

【1034】

図13A及び13Bは、抗HER2抗体にコンジュゲートされたときの、追加のペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。SKBR3は、HER2高発現腫瘍細胞株であり（図13A）、HCC1806は、HER2超低発現腫瘍細胞株である（図13B）。小分子TLR7アゴニストは、すべての腫瘍細胞株の存在下で強力なTLR7活性を示す。すべてのTLR7 ISACS及びコンジュゲートされていない抗HER2抗体は、HER2超低発現腫瘍細胞株の存在下で活性を示さない。すべてのISACは、HER2高発現腫瘍細胞株の存在下でのみ強力な用量依存活性を示す（図13A）。ペイロード薬物リンカーAXC-879を有するISACSは、最も高いHER2依存性TLR7活性を示した。

【1035】

図14A及び14Bは、抗HER2抗体にコンジュゲートされたときの、追加のペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。SKBR3は、HER2高発現腫瘍細胞株であり（図14A）、HCC1806は、HER2超低発現腫瘍細胞株である（図14B）。小分子TLR7アゴニストは、すべての腫瘍細胞株の存在下で強力なTLR7活性を示す。TLR7 ISACS及びコンジュゲートされていない抗HER2抗体は、HER2超低発現腫瘍細胞株の存在下で活性を示さなかった。すべてのISACは、HER2高腫瘍細胞株の存在下でのみ強力な用量依存活性を示す。ペイロード薬物リンカーAXC-901を有するISACは、最も高いHER2依存性TLR7活性を示した。

【1036】

図15A及び15Bは、SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株（図15A）及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株（図15B）における、抗HER2抗体にコンジュゲートされた3つの（3）ペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較し、HER2-AXC-879が、既知のISACの代表であるHER2-AXC-860及びHER2-AXC-910と比較して、最良のISAC活性を有することを示す。表17は、比較したHER2-AXC ISACの生成に使用されたTLR-アゴニストリンカー構造を示す。

【1037】

10

20

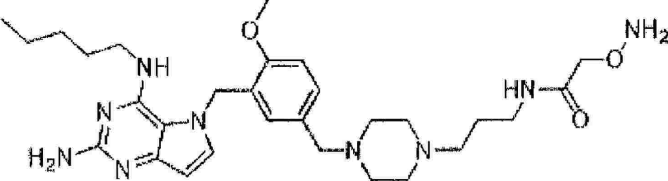
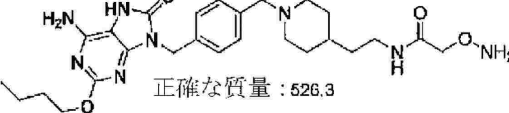
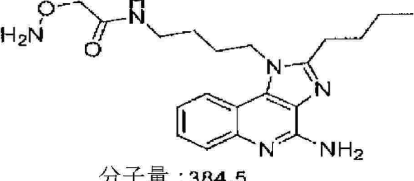
30

40

50

【表 17】

表 17－図 15 A～15 Bに関連する TLR－アゴニスト構造

化合物名	構造
AXC-860	
AXC-879	 正確な質量 : 526.3
AXC-910	 分子量 : 384.5

【1038】

実施例 11：乳癌の治療

乳癌療法のためのトラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体の安全性及び／または有効性のヒト臨床試験

目的：トラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体を含む、投与された組成物の安全性及び薬物動態を比較するため。

【1039】

研究設計：この研究は、乳癌患者における第Ⅰ相、単一施設、非盲検、無作為化用量漸増試験、続く第Ⅱ相試験とする。患者は、研究のエントリー前に、トラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体に曝露されてはならない。患者は、試験開始の 2 週間以内にがんの治療を受けてはならない。治療には、化学療法、造血成長因子、及びモノクローナル抗体などの生物学的療法の使用が含まれる。患者は、以前の治療に関連するすべての毒性（グレード 0 または 1）から回復していなければならない。すべての対象を安全性について評価し、薬物動態分析のためのすべての採血を予定通りに収集する。すべての研究は、施設の倫理委員会の承認及び患者の同意を得て実施される。

【1040】

第Ⅰ相：患者は、各 28 日サイクルの 1、8、及び 15 日目に、i.v. でトラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体を受ける。トラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体の用量を、以下に概説される評価に基づいて、毒性に関して保持または修飾してもよい。治療は、許容できない毒性の不在で 28 日ごとに繰り返される。3～6 人の患者のコホートは、トラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体の最大耐用量（MTD）が決定されるまで、トラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体の漸増用量を受ける。MTD は、3 人のうちの 2 人または 6 人のうちの 2 人が用量制限毒性を経験した用量の前の用量として定義される。用量制限毒性は、National Cancer Institute (NCI) Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Version 3.0 (2006 年 8 月 9 日) によって設定された定義及び基準に従って決定される。

【1041】

第Ⅱ相：患者は、第Ⅰ相で決定された MTD において第Ⅰ相と同様にトラスツズマブ連結 TLR アゴニスト誘導体を受ける。治療は、疾患の進行または許容できない毒性の不在で 4 週間ごとに 2～6 コース繰り返される。2 コースの研究療法を完了した後、完全

または部分的な応答を達成した患者は、さらに4コースを受けることができる。6コースの研究治療を完了した後2ヶ月以上安定した疾患を維持する患者は、元の適格性基準を満たしていれば、疾患進行時にさらに6コースを受けることができる。

【1042】

連続採血の血液は、トラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体の投与の前後に、直接静脈穿刺によって採取される。血清濃度を決定するための静脈血試料(5mL)を、投与の約10分前、及び投与後およそ以下の時間:1、8、及び15日目に得る。各血清試料は、2つのアリコートに分割される。すべての血清試料は、-20℃で保存される。血清試料は、ドライアイスで輸送される。

【1043】

薬物動態:患者は、治療を開始する前、及び1、8、及び15日目に、薬物動態評価のための血漿/血清試料収集を受ける。薬物動態パラメータは、最新バージョンのBIOAVLソフトウェアを使用して、Digital Equipment Corporation VAX 8600コンピュータシステム上でモデルに依存しない方法によって計算される。以下の薬物動態パラメータを決定する:ピーク血清濃度(C_{max})、ピーク血清濃度までの時間(t_{max})、線形台形則を使用して計算された時間ゼロから最後の血液サンプリング時間までの濃度-時間曲線下面積(AUC)(AUC_{0-72})、及び消失速度定数から計算された末端消失半減期($t_{1/2}$)。消失速度定数は、対数線形濃度-時間プロットの末端線形領域における連続データ点の線形回帰により推定される。薬物動態パラメータの平均、標準偏差(SD)、及び変動係数(CV)は、各処理について計算される。パラメータ手段(保存製剤/非保存製剤)の比率を計算する。

【1044】

併用療法に対する患者の応答:患者の応答は、X線、CTスキャン、及びMRIによる画像診断を介して評価され、画像診断は、研究の開始前及び最初のサイクルの終了時に実施され、追加の画像診断は4週間ごとにまたはその後のサイクルの終了時に実施される。画像診断様式は、がんの種類及び実現可能性/可用性に基づいて選択され、同じ画像診断様式は、類似のがんの種類ならびに各患者の研究コースを通して利用される。応答率は、RECIST基準を使用して決定される。(Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 2000 Feb 2;92(3):205-16、<http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>)。患者はまた、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、及びIHCによる前駆がん細胞表現型及びクローン性成長の変化を評価し、FISHによる細胞遺伝学の変化を評価するために、がん/腫瘍生検を受ける。研究治療の完了後、患者を4週間にわたって定期的に追跡する。

【1045】

実施例12:乳癌の治療

乳癌療法のためのトラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体の安全性及び有効性のヒト臨床試験

目的:HER2過剰発現の転移性乳癌を有する女性における、トラスツズマブ連結TLR-アゴニスト誘導体単独、疾患進行時に、続いてトラスツズマブとパクリタキセルとの組み合わせ対第1選択薬のトラスツズマブとパクリタキセルとの組み合わせの有効性及び毒性を比較する。

【1046】

研究設計:この研究は、無作為化された多施設研究である。患者は、HER2/neu過剰発現の程度(2+対3+)、以前のアントラサイクリン含有アジュバント治療(左胸壁への放射線療法なしの前治療なし対前治療と、左胸壁への放射線療法による前治療)、エストロゲン受容体状態(陽性対陰性対不明)、前療法(第1選択薬対第2/第3選択薬)、及び中央施設に応じて層別化される。患者は、2つの治療群のうちの1つに無作為に分けられる。群I:患者は、毎週30~90分にわたって、IVでトラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体を受ける。疾患の進行時に、患者は、群IIと同様に、トラスツズ

10

20

30

40

50

マブ連結 T L R - アゴニスト誘導体 I V 及びパクリタキセル I V の組み合わせを受ける。
群 I I : 患者は、毎週 30 ~ 90 分にわたって、I V でトラスツズマブ連結 T L R アゴニスト誘導体を受ける。パクリタキセルは、毎週 1 時間にわたって 3 週間 I V 投与され、その後 1 週間休薬する。

【1047】

治療は、疾患の進行または許容できない毒性の不在下で、両群で継続する。生活の質は、ベースラインならびにコース 2、3、4、5、6、8、10、及び 12 の 1 日目に評価される。患者は、1、3、及び 6 ヶ月で追跡され、その後 6 ヶ月ごとに追跡される。

【1048】

実施例 13 : 膀胱癌の治療

目的 : 膀胱の筋肉侵襲性移行細胞癌のために経尿道膀胱切除術を以前に受けた患者における、本明細書に記載の T L R アゴニスト誘導体の有無にかかわらず、パクリタキセル及び放射線療法の急性毒性を決定するため。

【1049】

疾患の特徴 : 膀胱原発性の移行細胞癌 (TCC) が組織学的または細胞学的に確認されている ; 筋固有浸潤の組織学的証拠 ; 以下のステージ基準のうちの 1 つを満たしている : ステージ T2 - 4a ; NX、N0、または N1 ; ならびに M0 疾患または臨床ステージ T1、グレード 3 / 3 の疾患であり、かつ確定的な局所療法が必要である ; 次の基準を満たしている場合には、前立腺尿道の腫瘍病変が認められている : 腫瘍が目に見えて完全に切除されている ; 前立腺の間質浸潤の証拠がなく、胸部 X 線または CT スキャンならびに腹部 / 骨盤 CT スキャンによる遠隔転移の証拠がない ; 腫瘍マッピングによる双合診を含む過去 3 ~ 8 週間以内に経尿道膀胱切除術を受けた (可能な限り安全に判断された) ; 十分な腫瘍組織が HER2 / neu 分析のために利用可能 ; 根治的膀胱切除術の候補者ではない。

【1050】

研究設計 : この研究は、無作為化されていない多施設研究である。患者は、HER2 / neu 状態 (HER2 / neu 2+ または 3+ 染色 [群 1] 対 HER2 / neu 0 または 1+ 染色 [群 2]) に従って、2 つの治療群のうちの 1 つに割り当てられる。

【1051】

群 1 : 患者は、1、8、15、22、29、36、及び 43 日目に 1 時間にわたって I V でパクリタキセルを受け、1 日目に 90 分にわたって、次いで 8、15、22、29、36、及び 43 日目に 30 分にわたって I V を介して、本明細書に記載のトラスツズマブ連結 T L R アゴニスト誘導体を受ける。また、患者は、1 ~ 5、8 ~ 12、15 ~ 19、22 ~ 26、29 ~ 33、36 ~ 40、43 ~ 47、及び 50 日目に 1 日 1 回放射線療法を受ける。治療は、疾患の進行または許容できない毒性の不在下で継続する。

【1052】

群 2 : 患者はパクリタキセルを受け、群 1 と同様に放射線療法を受ける。研究治療終了後、患者は 4 ~ 5 週間、1 年間は 3 ヶ月ごと、1 年間は 4 ヶ月ごと、3 年間は 6 ヶ月ごと、その後は毎年追跡される。

【1053】

実施例 14 : 卵巣癌の治療

卵巣癌療法のための本明細書に記載のトラスツズマブ連結 T L R アゴニスト誘導体の安全性及び有効性のヒト臨床試験

目的 : HER2 過剰発現卵巣癌を有する女性において、本明細書に記載のトラスツズマブ連結 T L R アゴニスト誘導体を含む組成物の、1 週間に 1 回、4 週間の I V 投薬量の安全性及び有効性を評価する。

【1054】

研究設計 : この研究は、無作為化、非盲検、11 週間、多施設研究である。この試験は、1 週間に 1 回、4 回の I V 投薬量の安全性プロファイル、MTD、PK、及びトラスツズマブ連結 T L R アゴニスト誘導体の免疫原性を評価する。患者は 1 つの群に割り当てら

10

20

30

40

50

れる。患者は、1週間に1回、4週間、1用量のトラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体を受ける。トラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体は、研究の1、8、15、及び22日目にIV注入により投与される。1及び22日目に尿試料を採取する。

【1055】

連続採血の血液は、トラスツズマブ連結TLRアゴニスト誘導体の投与の前後に、直接静脈穿刺によって採取される。血清濃度を決定するための静脈血試料（5mL）を、投与の約10分前、及び投与後およそ以下の時間：1、2、4、5、8、15、22、36、43、及び50日目に得る。各血清試料は、2つのアリコートに分割される。すべての血清試料は、-20℃で保存される。血清試料は、ドライアイスで輸送される。

【1056】

治療は、疾患の進行または許容できない毒性の不在下で継続する。生活の質は、ベースラインならびにコース2、3、4、5、6、8、10、及び12の1日目に評価される。29、36、43、及び50日目に患者を追跡する。有害事象について患者に尋ねる。患者は、腫瘍サイズ及び心機能を評価するための画像診断スキャン及びECGを受ける（43日目）。研究の終了時に、患者は身体検査を受ける（50日目）。疾患退行の証拠を有する患者は、疾患の進行の証拠が文書化されるまで継続的な療法を受けることができる。

【1057】

本発明は、以下の番号付けされた実施形態によってさらに説明される。

【1058】

1. 組み込まれた1つ以上の非天然コード化アミノ酸を有する、1つ以上の腫瘍標的化ポリペプチドを含む、組成物であって、前記ポリペプチドが、前記腫瘍標的化ポリペプチドの非天然アミノ酸に共有結合されるリンカーを介して、TLRアゴニスト分子に連結されている、前記組成物。

【1059】

2. 前記腫瘍標的ポリペプチドが、HER2に結合する抗体である、実施形態1に記載の組成物。

【1060】

3. 前記腫瘍標的ポリペプチドが、トラスツズマブである、実施形態1に記載の組成物。

【1061】

4. 前記TLRアゴニストが、TLR7またはTLR8アゴニストである、実施形態1、2、または3に記載の組成物。

【1062】

5. 前記TLRアゴニストが、図4のTLR7またはTLR8アゴニストである、実施形態1、2、または3に記載の組成物。

【1063】

6. 前記腫瘍標的化ポリペプチドが、1つ以上の水溶性ポリマーにコンジュゲートされる、実施形態1に記載の組成物。

【1064】

7. 前記水溶性ポリマーのうちの少なくとも1つが、前記非天然コード化アミノ酸のうちの少なくとも1つに連結されている、実施形態6に記載の組成物。

【1065】

8. 前記水溶性ポリマーがPEGである、実施形態7に記載の組成物。

【1066】

9. 前記リンカーが、10～50の分子量を有するPEGである、実施形態1に記載の組成物。

【1067】

10. 前記組成物が、前記組成物の安定性または溶解性を増加させる1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む、実施形態1に記載の組成物。

【1068】

13. 前記組成物が、組換え宿主細胞またはインビトロで合成された前記腫瘍標的化ポ

10

20

30

40

50

リペプチドの発現を増加させる、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を含む、実施形態1に記載の組成物。

【1069】

14. 前記非天然コード化アミノ酸が、前記ポリペプチド内の20個の一般的なアミノ酸のいずれかに対してさもなければ非反応性である、リンカー、ポリマー、または生物学的活性分子に対して反応性である、実施形態1に記載の組成物。

【1070】

15. 前記非天然コード化アミノ酸が、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基、またはアルキン基を含む、実施形態14に記載の組成物。

【1071】

16. 前記非天然コード化アミノ酸が、カルボニル基を含む、実施形態14に記載の組成物。

【1072】

17. 前記腫瘍標的化ポリペプチドが、生物学的活性分子、細胞傷害性剤、水溶性ポリマー、または免疫刺激剤に連結されている、実施形態1に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【1073】

【図1】本発明での使用に好適なTLRアゴニストの一般構造を示す。

【図2】種々のTCコンジュゲートの構造を示す。

【図3】さらなるTCコンジュゲートの構造を示す。

【図4】細胞増殖アッセイにおける選択されたTCコンジュゲートの生物学的活性を示す。

【図5】A及びBは、種々のTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【図6】リンカーに結合された種々のTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【図7】さらなるTLR7アゴニスト及びリンカーに結合されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【図8】さらなるTLR7アゴニスト及びリンカーに結合されたTLR7アゴニストのTLR7活性を示す。

【図9】非天然アミノ酸であるpAF(DL-pAF)と比較した、リンカーに結合された異なるTLR7アゴニスト(薬物リンカーまたはDL)のTLR7活性を示す。

【図10】アミノ酸位置HA114に非天然アミノ酸を有する非コンジュゲート抗HER2抗体(A)、ならびにTLRアゴニストAXC-875(B)及びAXC-880(C)を有するアミノ酸位置HA114にコンジュゲートされた抗HER2抗体のHPLCクロマトグラムを示す。

【図11】SKOV3 HER2高発現腫瘍細胞株(A)、JIMT-1 HER2中/低発現腫瘍細胞株(B)、及びA431 HER2低発現腫瘍細胞株(C)における、抗HER2抗体にコンジュゲートされた種々のペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【図12】SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株(A)及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株(B)における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【図13】SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株(A)及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株(B)における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【図14】SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株(A)及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株(B)における、抗HER2抗体にコンジュゲートされたさらなるペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較する。

【図15】SKBR3 HER2高発現腫瘍細胞株(A)及びHCC1806 HER2超低発現腫瘍細胞株(B)における、抗HER2抗体にコンジュゲートされた3つの(3)ペイロードリンカーの腫瘍依存性ISAC活性を比較し、HER2-AXC-879が最

10

20

30

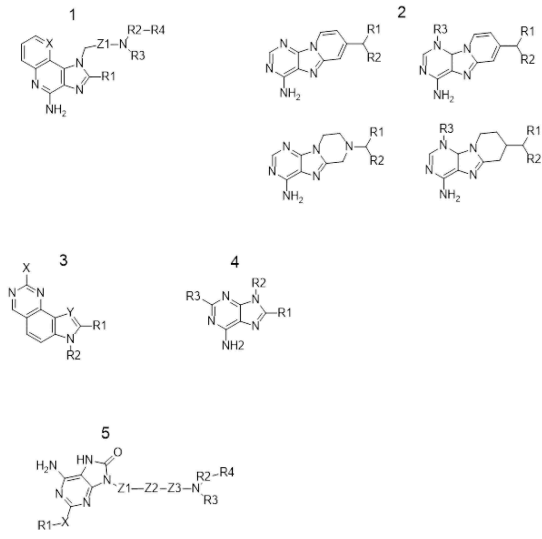
40

50

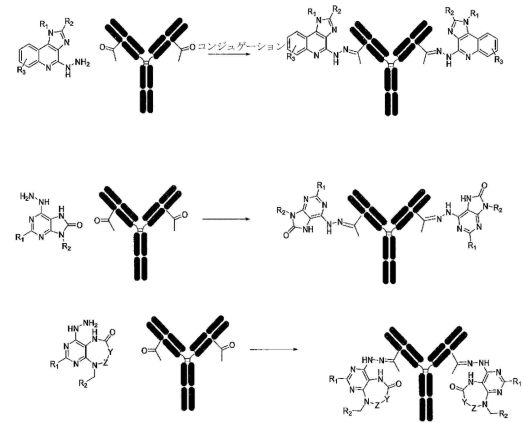
良の I S A C 活性を有することを示す。

【図面】

【図 1】

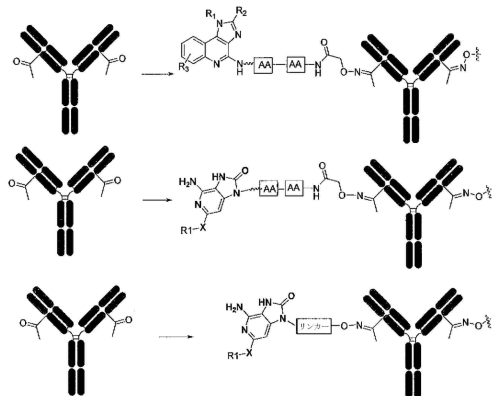


【図 2】

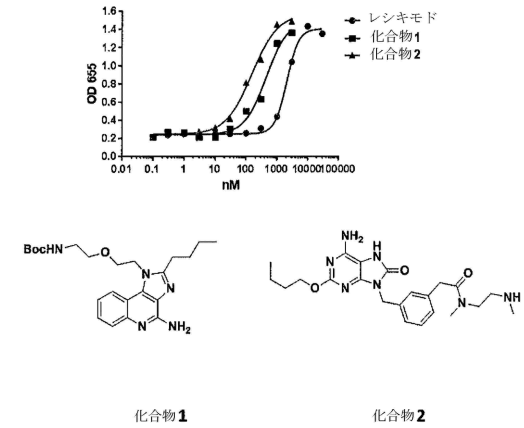


10

【図 3】



【図 4】



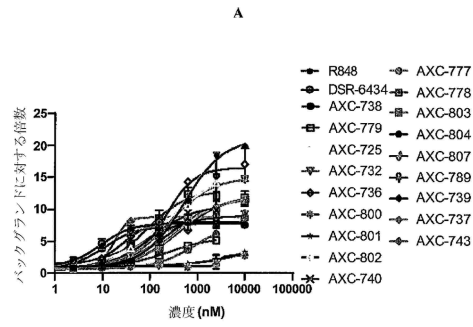
20

30

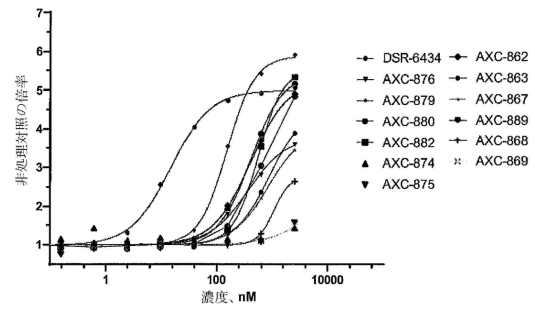
40

50

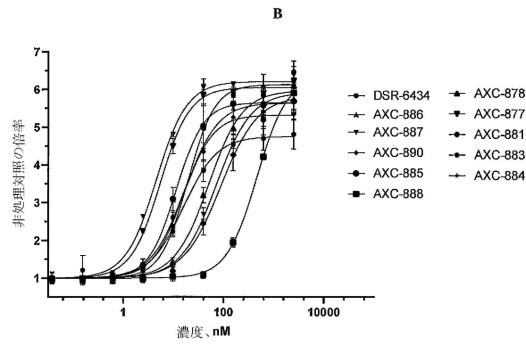
【図 5】



【図 6】

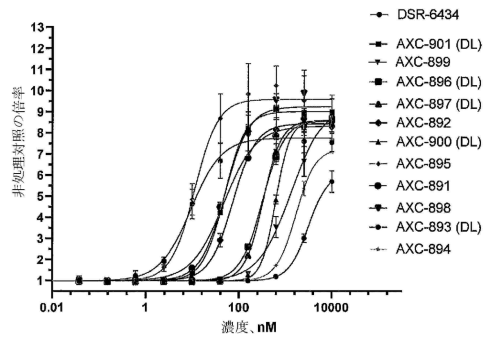


10

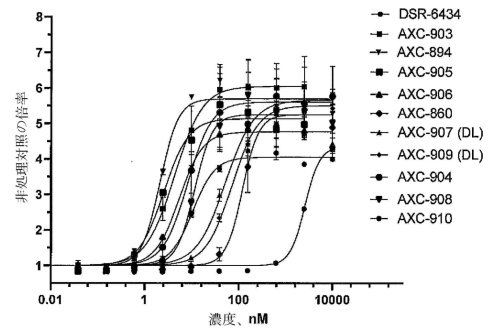


20

【図 7】



【図 8】

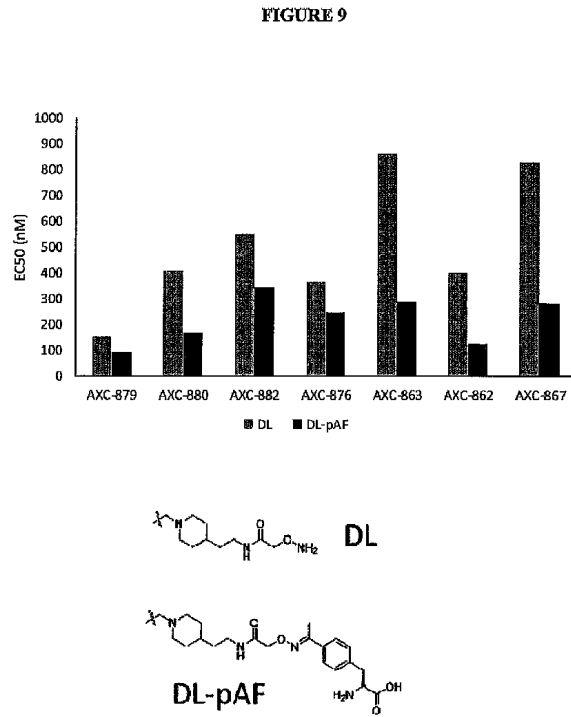


30

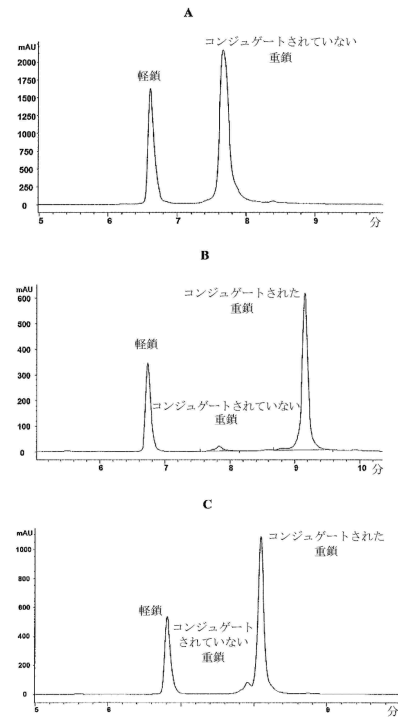
40

50

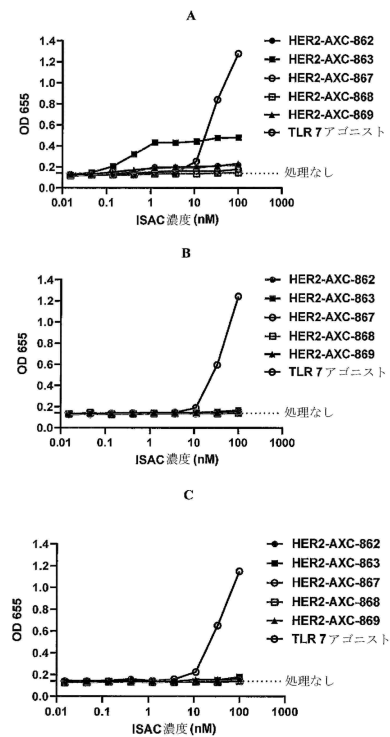
【図 9】



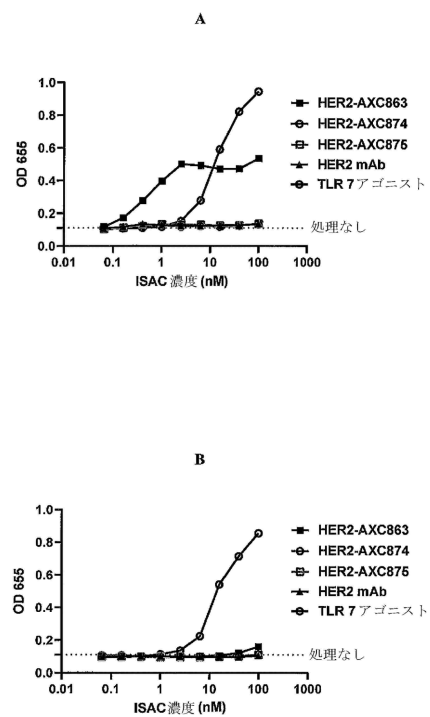
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

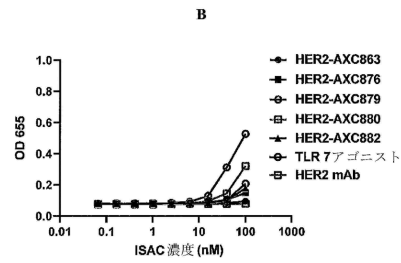
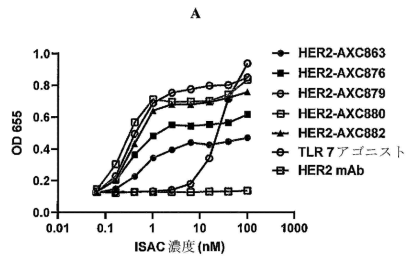
20

30

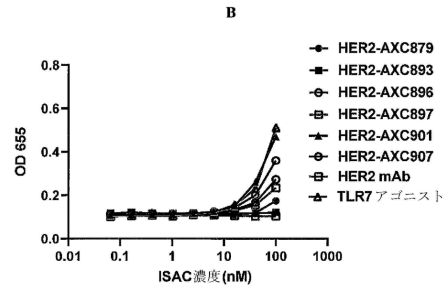
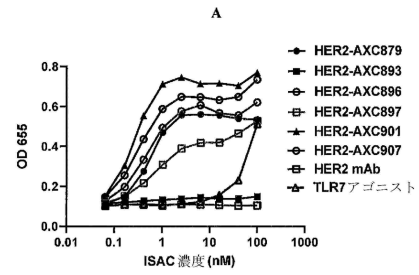
40

50

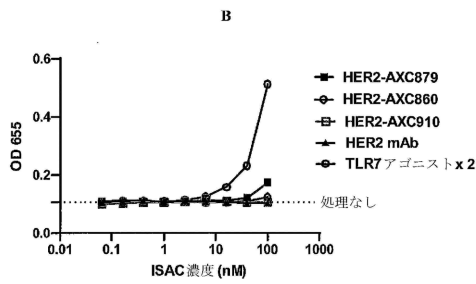
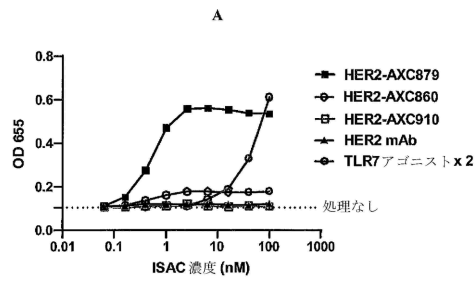
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



【配列表】

0007695885000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 0 7 D 473/04 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 N 5/09 (2010.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395 U
 A 6 1 K 45/00
 C 1 2 N 15/13
 C 0 7 D 473/04
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 5/09
 C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 16/30

R K

(72)発明者 ムーン, スノーチュ

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 レオン, ブライアン

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 カン, ミンカオ

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 クヌーセン, ニコラス

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 ワン, チャンイン

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 サカムリ, スクマール

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 ティアン, フェン

アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホーヤ, スイート 1 0 0, ノース トーレイ
 パインス ロード 1 0 9 7 5, シー／オー アンブルックス, インコーポレイテッド

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 4 8 1 7 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 3 0 7 4 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 0 9 9 1 6 (WO, A 1)

特表 2 0 1 8 - 5 3 4 2 9 7 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

C 0 7 D 4 7 3 / 0 0 - 4 7 5 / 1 4

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
 N)