

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7608360号
(P7608360)

(45)発行日 令和7年1月6日(2025.1.6)

(24)登録日 令和6年12月20日(2024.12.20)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	47/56 (2017.01)	A 6 1 K	47/56
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10

請求項の数 46 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-563306(P2021-563306)	(73)特許権者	510340997 プロリンクス エルエルシー アメリカ合衆国 9 4 1 5 8 カリフォル ニア、サン フランシスコ、ミッショ ン ベイ ブルヴァード サウス 4 5 5、ス イト 1 4 5
(86)(22)出願日	令和2年4月24日(2020.4.24)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(65)公表番号	特表2022-530462(P2022-530462 A)	(74)代理人	100150500 弁理士 森本 靖
(43)公表日	令和4年6月29日(2022.6.29)	(74)代理人	100176474 弁理士 秋山 信彦
(86)国際出願番号	PCT/US2020/029911	(72)発明者	ハンガスキー、ジョン エイ、ザ サード アメリカ合衆国 9 4 1 1 2 カリフォルニ ア州サンフランシスコ、トランブル・ス 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2020/219943		
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		
審査請求日	令和5年4月21日(2023.4.21)		
(31)優先権主張番号	62/839,112		
(32)優先日	平成31年4月26日(2019.4.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

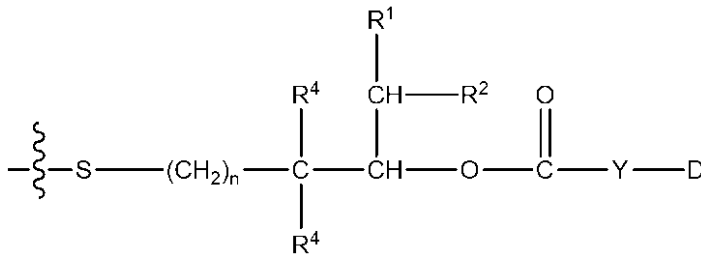
(54)【発明の名称】 徐放性サイトカインコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：

【化1】



[式中、

n は、0 ~ 6 の整数であり；

R^1 は、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{COR}^5$ 、 $-\text{SOR}^5$ 、または $-\text{SO}_2\text{R}^5$ であり、ここで

R^5 は、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^6_2 であり、こ
こで、各 R^6 は、独立して、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^2 は、Hまたはアルキルであり；

各 R^4 は、独立して、Hもしくは $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキルであるか、または2つの R^4 は、それ
らが結合する炭素原子と一緒に3 ~ 6員環を形成し；

Sは、存在しないか、または $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{CONH}$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；

Yは、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 1000$ であり；

Dは、IL-15またはIL-15・IL-15R Su融合タンパク質であり；かつ

【化2】

〜
〜
〜

は、リンカー-薬物ユニットと高分子担体との結合点を示す]

10

で示されるリンカー-薬物ユニットを含む、ヒドロゲル。

【請求項2】

リンカー-薬物ユニットが、カルボキサミド、アミド、オキシム、トリアゾール、チオエーテル、チオスクシニミド、またはエーテル部分を通じて高分子担体と結合している、請求項1に記載のヒドロゲル。

【請求項3】

リンカー-薬物ユニットが、トリアゾール部分を通じて高分子担体と結合している、請求項2に記載のヒドロゲル。

【請求項4】

R^1 が $-\text{CN}$ または $-\text{SO}_2\text{R}^5$ であり、ここで、 R^5 が C_1-C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^6_2 であり、ここで、各 R^6 が、独立して、 C_1-C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、かつ、 R^2 が H であり、ここで、 R^5 および R^6 のそれぞれが、独立して、任意に置換されていてもよい、請求項1に記載のヒドロゲル。

20

【請求項5】

R^1 が $-\text{CN}$ 、 $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{Ph}$ 、 $-\text{SO}_2\text{PhCl}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、または $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ である、請求項4に記載のヒドロゲル。

【請求項6】

R^2 が H である、請求項1に記載のヒドロゲル。

30

【請求項7】

n が4であり、各 R^4 が H であり、 R^1 が $-\text{SO}_2\text{R}^5$ であり、ここで、 R^5 がメチルであり、 R^2 が H であり、Sが $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{CONH}$ であり、ここで、 $g = 2$ 、および、 $h = 4$ であり、かつ、Yが $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_m$ であり、ここで、 $m = 3$ 、および、 $p = 0$ である、請求項1に記載のヒドロゲル。

【請求項8】

Mがマルチアーム鎖を有するポリマーを含む、請求項1に記載のヒドロゲル。

【請求項9】

Mが r -アームポリマーを含み、ここで、 r が2~8の整数である、請求項8に記載のヒドロゲル。

40

【請求項10】

r が4である、請求項9に記載のヒドロゲル。

【請求項11】

r -アームポリマーがペグ化ポリマーである、請求項9に記載のヒドロゲル。

【請求項12】

r が4である、請求項11に記載のヒドロゲル。

【請求項13】

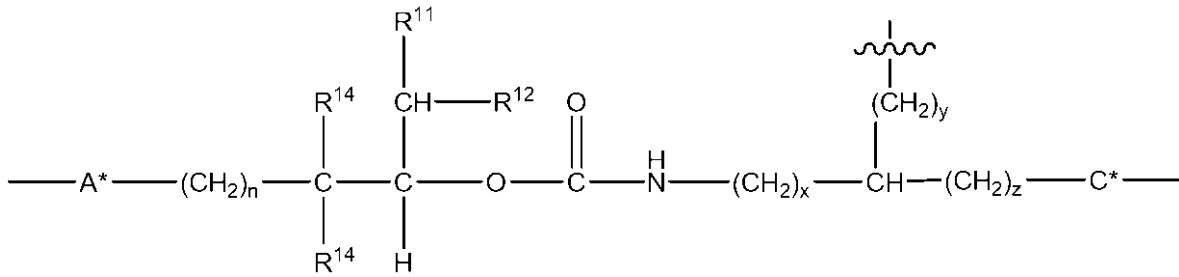
r -アームポリマーが切断可能なリンカーを通じて結合している、請求項8~12のいずれか1項に記載のヒドロゲル。

50

【請求項 14】

切断可能なリンカーが、式：

【化 3】



10

[式中、

A^{*}およびC^{*}は、独立して、切断可能なリンカーとr-アームポリマーを接続する接続基であり；

nは、0～6の整数であり；

x、y、およびzは、独立して、0～6の整数であり；

R¹¹は、-CN、-NO₂、-COR⁵、-SOR⁵、または-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵は、C₁-C₆アルキル、アリール、ヘテロアリール、またはNR⁶₂であり、ここで、各R⁶は、独立して、C₁-C₆アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

20

R¹²は、Hまたはアルキルであり；

各R¹⁴は、独立して、C₁-C₃アルキルであるか、または2つのR¹⁴は、それらが結合する炭素原子と一緒に3～6員環を形成し；かつ

【化 4】



は請求項1に記載のリンカー-薬物ユニットとの結合点を示す]

で示されるものである、請求項13に記載のヒドロゲル。

【請求項 15】

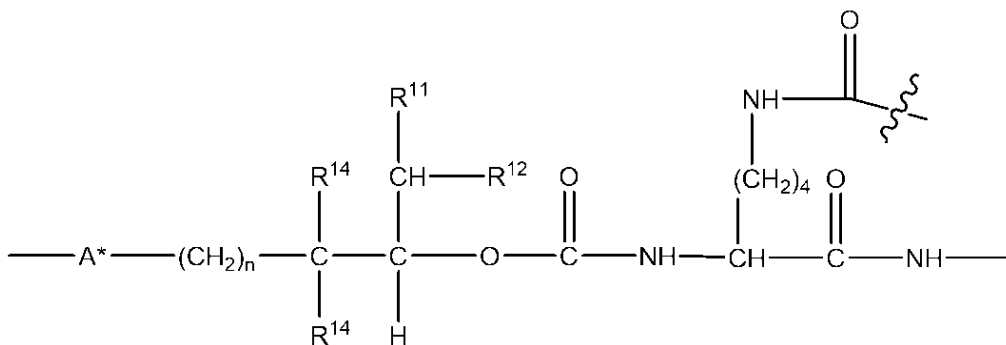
リンカー-薬物ユニットが、カルボキサミド、オキシム、チオエーテル、またはトリアゾール部分を通じて切断可能なリンカーと結合している、請求項14に記載のヒドロゲル。

30

【請求項 16】

切断可能なリンカーが、式：

【化 5】



40

で示されるものである、請求項14に記載のヒドロゲル。

【請求項 17】

リンカー-薬物ユニットが、切断可能なリンカー上のシクロオクチン基と、請求項1に記載のリンカー-薬物ユニットと結合したアジド基との間の反応を通じて切断可能なリンカーと結合している、請求項16に記載のヒドロゲル。

【請求項 18】

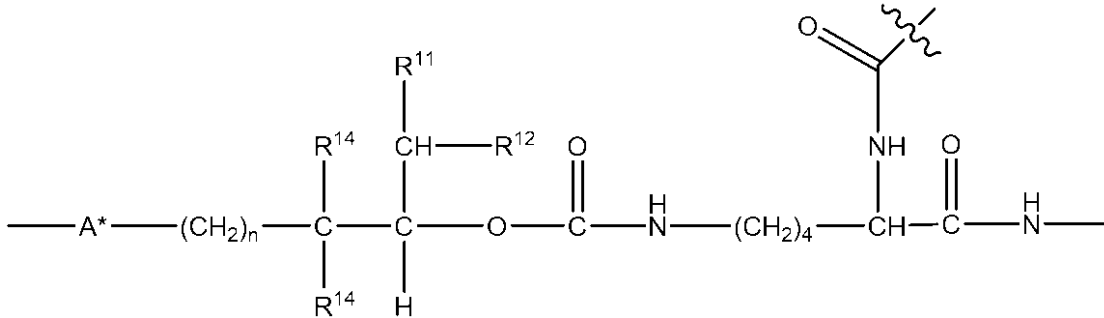
50

リンカー - 薬物ユニットが、4 - シクロオクチニルオキシカルボニルまたは (1 R , 8 S , 9 s) - ビシクロ [6 , 1 , 0] ノナ - 4 - イン - 9 - イルメトキシカルボニルと、請求項 1 に記載のリンカー - 薬物ユニットと結合したアジド基との間の反応を通じて切断可能なリンカーと結合している、請求項 1 6 に記載のヒドロゲル。

【請求項 1 9】

切断可能なリンカー - r - アームポリマーが、式：

【化 6】



10

で示されるものである、請求項 1 5 に記載のヒドロゲル。

【請求項 2 0】

リンカー - 薬物ユニットが、切断可能なリンカー上のシクロオクチン基と、請求項 1 に記載のリンカー - 薬物ユニットと結合したアジド基との間の反応を通じて切断可能なリンカーと結合している、請求項 1 9 に記載のヒドロゲル。

20

【請求項 2 1】

リンカー - 薬物ユニットが、4 - シクロオクチニルオキシカルボニルまたは (1 R , 8 S , 9 s) - ビシクロ [6 , 1 , 0] ノナ - 4 - イン - 9 - イルメトキシカルボニルと、請求項 1 に記載のリンカー - 薬物ユニットと結合したアジド基との間の反応を通じて切断可能なリンカーと結合している、請求項 1 9 に記載のヒドロゲル。

【請求項 2 2】

D が配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、または配列番号 1 5 の I L - 1 5 である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のヒドロゲル。

30

【請求項 2 3】

D が配列番号 1 6 または配列番号 1 7 の I L - 1 5 ・ I L - 1 5 R S u 融合タンパク質である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のヒドロゲル。

【請求項 2 4】

各 R⁴ が H である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のヒドロゲル。

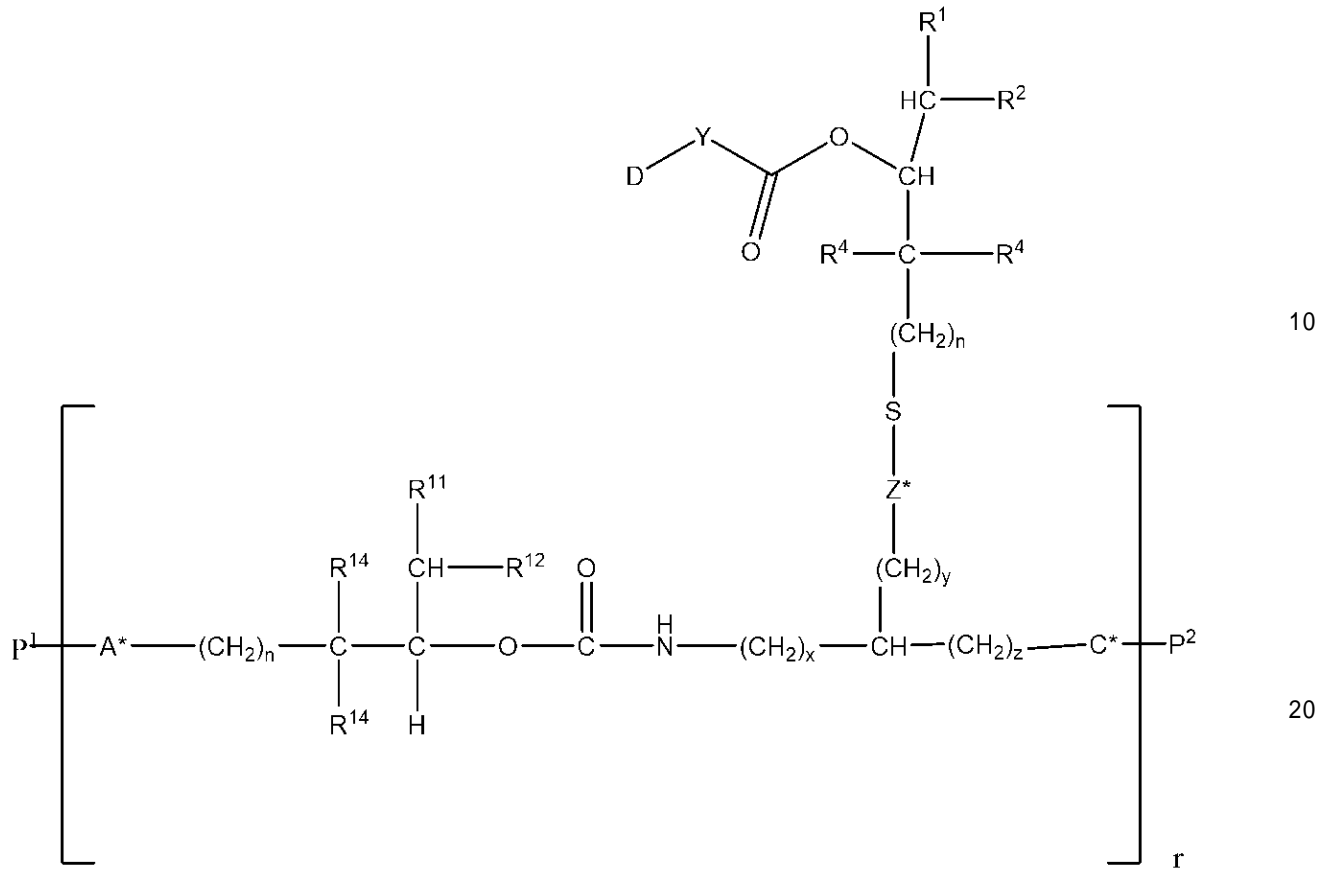
【請求項 2 5】

式：

40

50

【化7】



[式中、

P^1 および P^2 は、独立して、 r -アームポリマーであり、ここで r は、2～8の整数であり；

A^* は、接続基であり；

C^* は、接続基であり；

各 n は、独立して、0～6の整数であり；

x 、 y 、および z は、独立して、0～6の整数であり；

R^{11} は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-COR^5$ 、 $-SOR^5$ 、または $-SO_2R^5$ であり、ここで、 R^5 は、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^6_2 であり、ここで、各 R^6 は、独立して、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^{12} は、 H またはアルキルであり；

各 R^{14} は、独立して、 C_1 - C_3 アルキルであるか、または2つの R^{14} は、それらが結合する炭素原子と一緒にになって3～6員環を形成し；

Z^* は、接続基であり；

S は、存在しないか、または $(CH_2CH_2O)_h(CH_2)_gCONH$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；

Y は、 $NH(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 100$ であり；

R^1 は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-COR^5$ 、 $-SOR^5$ 、または $-SO_2R^5$ であり、ここで、 R^5 は、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^6_2 であり、ここで、各 R^6 は、独立して、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^2 は、 H またはアルキルであり；

各 R^4 は、独立して、 H または C_1 - C_3 アルキルであるか、または2つの R^4 は、それらが結合する炭素原子と一緒にになって3～6員環を形成し；かつ

10

20

30

40

50

Dは、IL-15またはIL-15・IL-15R Su融合タンパク質である]
で示される反復単位を含む、ヒドロゲル。

【請求項26】

P¹およびP²がバグ化ポリマーである、請求項25に記載のヒドロゲル。

【請求項27】

rが4である、請求項25または26に記載のヒドロゲル。

【請求項28】

A^{*}およびC^{*}が、独立して、カルボキサミド、オキシム、エーテル、チオエーテル、またはトリアゾールである、請求項25に記載のヒドロゲル。

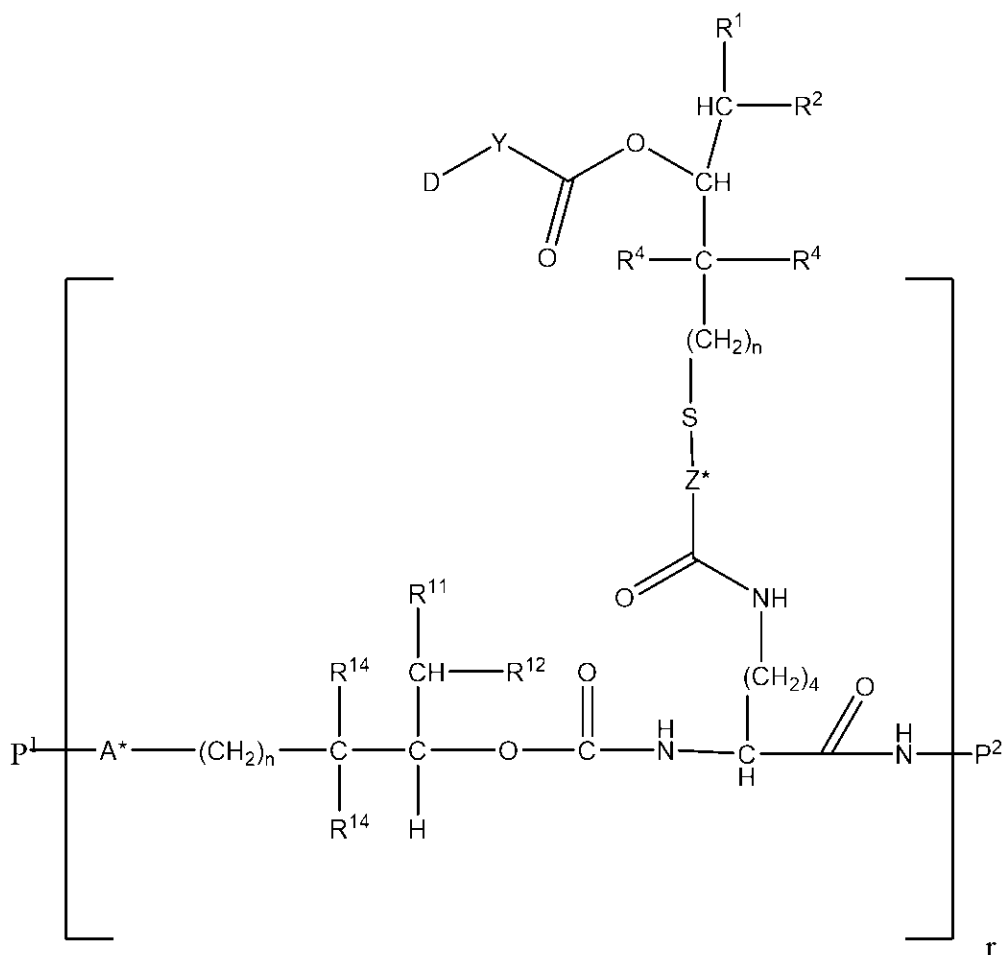
【請求項29】

R¹⁻⁴基がいずれもメチルである、請求項25に記載のヒドロゲル。

【請求項30】

式：

【化8】



[式中、

P¹およびP²は、独立して、r-アームポリマーであり、ここで、rは、2～8の整数であり；

A^{*}は、接続基であり；

各nは、独立して、0～6の整数であり；

R¹⁻¹は、-CN、-NO₂、-COR⁵、-SOR⁵、または-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵は、C₁-C₆アルキル、アリール、ヘテロアリール、またはNR⁶₂であり、ここで、各R⁶は、独立して、C₁-C₆アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R¹⁻²は、Hまたはアルキルであり；

10

20

30

40

50

各 R^{1-4} は、独立して、 $C_1 - C_3$ アルキルであるか、または2つの R^{1-4} は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって3～6員環を形成し；

Z^* は、接続基であり；

S は、存在しないか、または $(CH_2CH_2O)_h(CH_2)_gCONH$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；

Y は、 $NH(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 100$ であり；

R^1 は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-COR^5$ 、 $-SOR^5$ 、または $-SO_2R^5$ であり、ここで、 R^5 は、 $C_1 - C_6$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^6_2 であり、ここで、各 R^6 は、独立して、 $C_1 - C_6$ アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^2 は、 H またはアルキルであり；

各 R^4 は、独立して、 H または $C_1 - C_3$ アルキルであるか、または2つの R^4 は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって3～6員環を形成し；かつ

D は、 $IL - 15$ または $IL - 15 \cdot IL - 15R$ Su 融合タンパク質である]
で示される反復単位を含む、ヒドロゲル。

【請求項 3 1】

P^1 および P^2 がバグ化ポリマーである、請求項 3 0 に記載のヒドロゲル。

【請求項 3 2】

r が 4 である、請求項 3 0 または 3 1 に記載のヒドロゲル。

【請求項 3 3】

A^* がカルボキサミド、オキシム、エーテル、チオエーテル、またはトリアゾールである、請求項 3 0 に記載のヒドロゲル。

【請求項 3 4】

R^{1-4} 基がいずれもメチルである、請求項 3 0 に記載のヒドロゲル。

【請求項 3 5】

式：

10

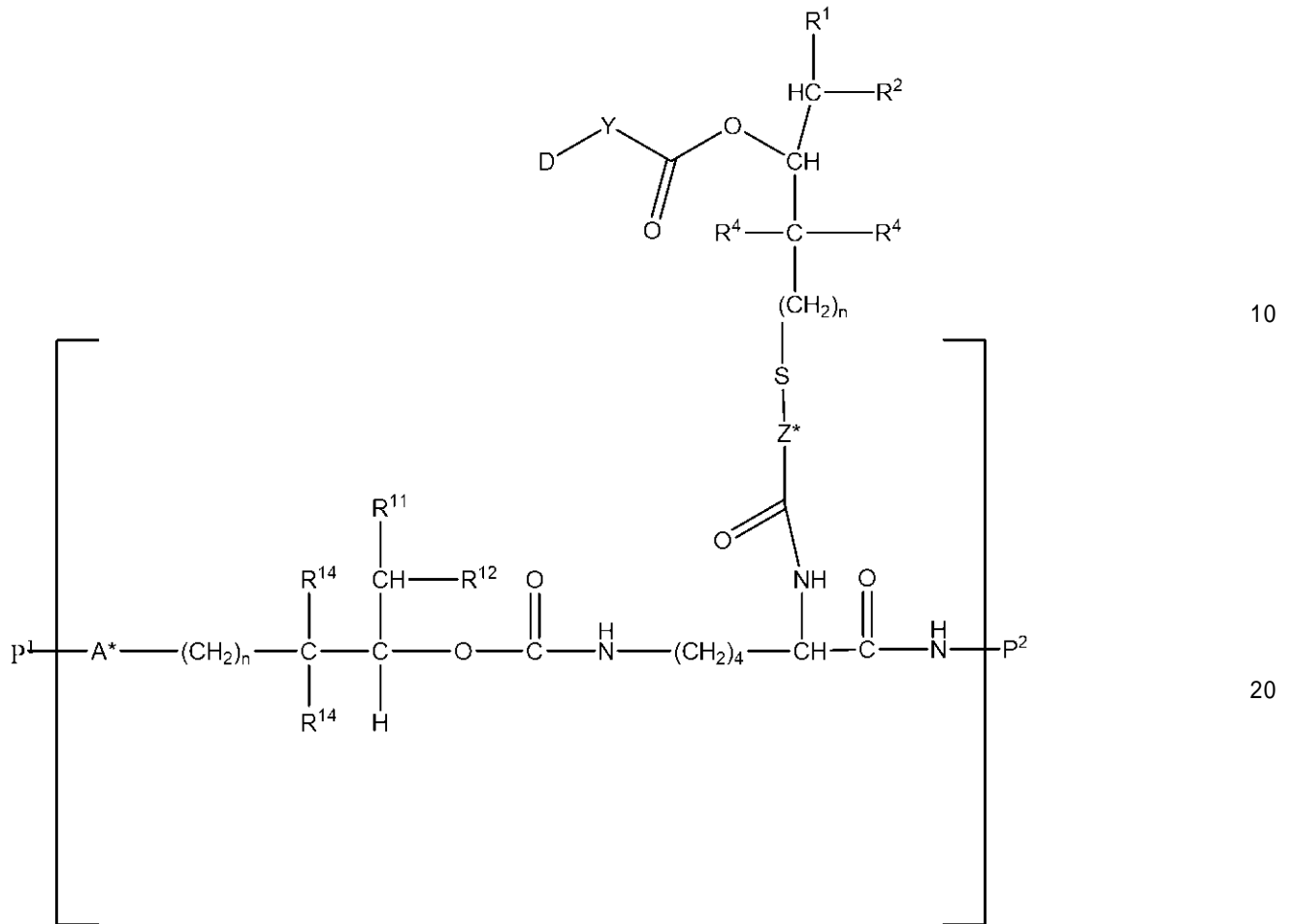
20

30

40

50

【化9】



[式中、

P^1 および P^2 は、独立して、 r -アームポリマーであり、ここで、 r は、2～8の整数であり；

A^* は、接続基であり；

各 n は、独立して、0～6の整数であり；

R^{11} は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-COR^5$ 、 $-SOR^5$ 、または $-SO_2R^5$ であり、ここで、 R^5 は、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^{62} であり、ここで、各 R^6 は、独立して、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^{12} は、Hまたはアルキルであり；

各 R^{14} は、独立して、 C_1 - C_3 アルキルであるか、または2つの R^{14} は、それらが結合する炭素原子と一緒になって3～6員環を形成し；

Z^* は、接続基であり；

S は、存在しないか、または $(CH_2CH_2O)_h(CH_2)_gCONH$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；

Y は、 $NH(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 100$ であり；

R^1 は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-COR^5$ 、 $-SOR^5$ 、または $-SO_2R^5$ であり、ここで、 R^5 は、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または NR^{62} であり、ここで、各 R^6 は、独立して、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R^2 は、Hまたはアルキルであり；

各 R^4 は、独立して、Hまたは C_1 - C_3 アルキルであるか、または2つの R^4 は、それらが結合する炭素原子と一緒になって3～6員環を形成し；かつ

10

20

30

40

50

Dは、IL - 15またはIL - 15・IL - 15 R Su融合タンパク質である]
 で示される反復単位を含む、ヒドロゲル。

【請求項36】

P¹およびP²がバグ化ポリマーである、請求項35に記載のヒドロゲル。

【請求項37】

rが4である、請求項35または36に記載のヒドロゲル。

【請求項38】

A^{*}がカルボキサミド、オキシム、エーテル、チオエーテル、またはトリアゾールである、請求項35に記載のヒドロゲル。

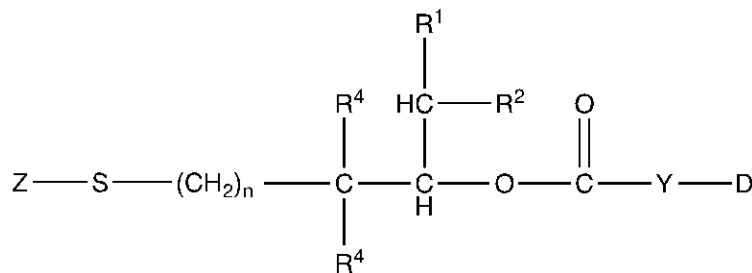
【請求項39】

R^{1,4}基がいずれもメチルである、請求項35に記載のヒドロゲル。

【請求項40】

式(Ia)

【化10】



(Ia)

[式中、

nは、0～6の整数であり；

R¹は、-CN、-NO₂、-COR⁵、-SOR⁵、または-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵は、C₁-C₆アルキル、アリール、ヘテロアリール、またはNR⁶₂であり、ここで、各R⁶は、独立して、C₁-C₆アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり；

R²は、Hまたはアルキルであり；

各R⁴は、独立して、HまたはC₁-C₃アルキルであるか、または2つのR⁴は、それらが結合する炭素原子と一緒に3～6員環を形成し；

Zは、リンカーと高分子担体とを接続する基であり；

Sは、存在しないか、または、(CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gCONHであり、ここで、gは、1～6の整数、および、hは、0～1000の整数であり；

Yは、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_mであり、ここで、mは、2～6の整数、および、pは、0～1000の整数であり；かつ

Dは、IL - 15またはIL - 15・IL - 15 R Su融合タンパク質である]
 で示されるリンカー - 薬物。

【請求項41】

R¹が-CNまたは-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵がC₁-C₆アルキル、アリール、ヘテロアリール、またはNR⁶₂であり、ここで、各R⁶が、独立して、C₁-C₆アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、かつ、R²がHであり、ここで、R⁵およびR⁶のそれぞれが、独立して、任意に置換されていてもよい、請求項40に記載のリンカー - 薬物。

【請求項42】

YがNH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_mであり、ここで、m=3、および、p=0である、請求項40に記載のリンカー - 薬物。

【請求項43】

nが4であり、各R⁴がHであり、R¹が-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵がメチルであり、R²がHであり、Sが(CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gCONHであり、ここで、g

= 2、および、h = 4であり、かつ、YがNH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_mであり、ここで、m = 3、および、p = 0である、請求項40に記載のリンカー - 薬物。

【請求項44】

Dが配列番号12、配列番号13、配列番号14、または配列番号15のIL-15である、請求項40～43のいずれか1項に記載のリンカー - 薬物。

【請求項45】

Dが配列番号16または配列番号17のIL-15・IL-15R_{Su}融合タンパク質である、請求項40～43のいずれか1項に記載のリンカー - 薬物。

【請求項46】

対象においてT_{reg}細胞を選択的に増殖させるための、請求項1～39のいずれか1項に記載のヒドロゲル。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年4月26日に出願された米国仮出願第62/839,112号の優先権を主張し、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】

配列表の参照による組み込み

本出願は、電子フォーマットの配列表を伴って提出されている。その配列表は、2020年4月24日作成、サイズ26,622バイトの、670572002240SeqList.txtという名称のファイルとして提供されている。配列表の電子フォーマットの情報は、参照によりその全体が組み込まれる。

20

【0003】

技術分野

本開示は、一般に、放出可能なサイトカインコンジュゲート、およびそれを用いた方法に関する。

【背景技術】

【0004】

サイトカインは、細胞シグナル伝達に関与する小さな(最大~20kDa)タンパク質であり、インターロイキン(IL)、インターフェロン(IF)、腫瘍壊死因子(TNF)、ケモカイン、およびリンホカインの幅広いカテゴリーを含む。これらは、広範囲の細胞によって産生され、免疫系において特に重要であり、体液性免疫応答と細胞性免疫応答の間のバランスを調節する。インターロイキンは、免疫において特に重要な役割を果たすサイトカインの1つのグループを構成する。インターロイキンの大部分は、ヘルパーCD4 Tリンパ球で発現し、Tリンパ球とBリンパ球および造血細胞の、発達と分化を促進する。

30

【0005】

インターロイキン-2(IL-2)(配列番号1)は、微生物感染に対する天然の応答、および天然細胞と外来細胞との間の識別、において重要な、~16kDaのサイトカインである。IL-2は、主にT細胞への直接的な影響を介して、免疫系、寛容性、免疫の重要な機能に、不可欠な役割を果たしている。T細胞が成熟する胸腺では、特定の未成熟T細胞から制御性T細胞(T_{reg})への分化を促進することにより、自己免疫疾患を防いでおり、この制御性T細胞は、体内の正常で健康な細胞を攻撃するように準備されている、他のT細胞を抑制する。IL-2は、活性化誘導細胞死(AICD)を増強する。IL-2はまた、初期のT細胞がまた抗原によって刺激されると、T細胞から、エフェクターT細胞(T_{eff})およびメモリーT細胞(T_{mem})への分化を促進し、それにより、身体が感染症と戦うのを助ける。IL-2は、他の極性化サイトカインとともに、ナイーブCD4⁺T細胞のTh1およびTh2リンパ球への分化を刺激し、一方、Th17および濾胞性Thリンパ球への分化を阻害する。

40

50

【0006】

IL-2受容体(IL-2R)のサブユニット(CD25)は、低い親和性($K_d \sim 10^{-8} M$)でIL-2に結合する。IL-2とCD25の相互作用は、細胞内鎖が短い
ため、単独でシグナル伝達をもたらさないが、(およびサブユニットに結合した場合)
IL-2R親和性を1000倍に増加させる能力がある。IL-2Rのおよびサブ
ユニットのヘテロ二量体化は、T細胞のシグナル伝達に不可欠である。IL-2は、中程
度の親和性の二量体CD122/CD132 IL-2R 受容体($K_d \sim 10^{-9} M$)
、または高親和性の三量体CD25/CD122/CD132 IL-2R 受容体
($K_d \sim 10^{-11} M$)のいずれかを介して、シグナル伝達をすることができる。二量体
IL-2R は、CD8⁺Tmem細胞およびNK細胞によって発現されるが、Treg
および活性化T細胞は、高レベルの三量体IL-2R を発現する。サブユニット(
CD132)は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、
およびIL-21の受容体間で共有されている。

10

【0007】

制御性T細胞(Treg)は、自己寛容の維持に重要なTリンパ球のサブセットである。
IL-2は、制御性T細胞とエフェクター(Teff)細胞の両方の活性化に関与している
が、Teff細胞よりもTreg細胞の高親和性受容体の発現が高いということは、低用量
のIL-2が、Treg細胞の維持を優先的にサポートすることを意味する。1型糖尿病、
多発性硬化症、クローン病、および全身性エリテマトーデスなどの疾患における自己免疫
反応は、Tregの欠損と相関している。したがって、高親和性受容体を介したTreg細
胞の選択的で長期的な刺激は、自己免疫疾患の治療に有望である。

20

【0008】

アルデスロイキン(組換えIL-2)を用いた高用量IL-2療法は、転移性黒色腫お
よび腎細胞癌の治療に承認されている。しかしながら、客観的奏効率が低く、高用量療法
では、末端臓器毒性の発生率が高くなる。IL-2のほとんどの抗腫瘍活性は、高親和性
IL-2R 受容体を介したT細胞の刺激からもたらされ、毒性のほとんどは、低親
和性IL-2R 受容体を介したナチュラルキラー細胞による炎症性タンパク質の放出
に起因すると考えられている。88位にアスパラギンを置き換えてアルギニンを有する
IL-2変異体(mut ein)(配列番号2; IL2-N88R、BAY50-4798
)は、高親和性IL-2R 受容体に選択的に結合し、Teff細胞およびNK細胞よ
りも、Treg細胞の活性化に対する選択性を3,000倍、増加させる。この考えと一致
して、げっ歯類モデルにより、BAY50-4798とアルデスロイキンの同等な有効性
が示されたが、変異体では毒性が低かった。BAY50-4798のヒト第1相試験では
、Teff細胞およびNK細胞よりも、Treg細胞の、予想される異なる活性化が確認さ
れたが、抗腫瘍反応は制限され、変異体(mut ein)の開発はストップした。

30

【0009】

IL-2および類似体のインピボ半減期を延長し、それによってそれらの効力を向上す
る試みが、報告されている。IL-2と抗体および抗体フラグメントとのさまざまな融合
(WO2014/023752A1)が開示されている。何人かの研究者は、Fcまたは
IgGと、IL-2{Bell, 2015#2}またはTreg特異的変異体との融合、例
えば、Fc-IL-2N88R(Greve, J. US2017/0204154A1)
、またはIgG-IL-2N88D{Peterson, 2018#1}など、を開示し
ている。IgG-IL-2N88Dの半減期は、カニクイザルにおいて、IV注射した場
合は~8時間で、SC注射した場合は14時間でしかなく、IgGにおいて期待される1
4日よりもはるかに短く、 $t_{1/2}$ が短いことは、受容体媒介のエンドサイトーシス(RME)
)に起因していた。それにもかかわらず、IgG-IL-2N88NDの1回のSC注
射は、低用量IL-2の毎日の注射に匹敵する、制御性T細胞の長期的な増加をもたらし
た。すなわち、1回の注射後、Tregは、最大で~4日まで増殖し、~14日間続いた。
CD4⁺およびCD8⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Tregは、10~14倍に増加し
たが、CD4⁺またはCD8⁺メモリーエフェクターT細胞には、影響しなかった。しか

40

50

しながら、そのような融合タンパク質は、効力の喪失、および天然タンパク質に対する免疫原性の増加などの、いくつかの欠陥を被る。IL-2と水溶性ポリマーとの特定の永続的かつ放出可能なコンジュゲートが開示されている（米国特許第9,861,705号）。受容体とその水溶性コンジュゲートとの間の選択性を変化させるために、非天然アミノ酸を含むIL-2異性体が開示されている（WO2019/028425; WO2019/028419）。

【0010】

インターロイキン-15は、独特の受容体鎖を介して作用するが、IL-2と同様のおよび受容体鎖を介して作用する、関連サイトカインである。IL-15は、獲得免疫および自然免疫の両方にとって重要な多面発現性のサイトカインである。IL-15は、ナチュラルキラー（NK）およびCD8⁺エフェクターT_{mem}細胞の活性化と維持を促進し、癌および免疫不全の治療のための免疫療法剤として興味をもたれている。外因性IL-15は、インビボおよびインビトロの両方で、CD8⁺T_{mem}細胞の増殖を刺激することが示されている。IL-15による低用量療法は、腫瘍特異的CD8⁺T_{mem}細胞の維持と機能を促進し、養子免疫療法の失敗における腫瘍の再発を遅延または防止すると仮定されている（Roychowdhury et al., *Cancer Research* 64: 8062-7 (2004)）。10日間わたるサルへの継続注入による低用量療法は、末梢血中のCD8⁺エフェクターT_{mem}細胞の100倍の増大をもたらし、これは毎日のボラス投与レジメンよりも効果的であった（Sneller et al., *Blood* 118: 6845-8 (2011)）。IL-15の安定化変異体が報告されている（Nellis et al., *Pharm. Res.* 29: 722-38 (2012)）。IL-15と水溶性ポリマーとの特定の永続的かつ放出可能なコンジュゲートが開示されている（PCT公開WO2015/153753A2）。改良された受容体アゴニズムを示すIL-15の変異体が開示されている（Zhu et al., *J. Immunology* 2009, 183(6): 3598）。IL-15 [N72D]は、細胞増殖アッセイにおいて、ネイティブのIL-15の4~5倍の生物活性の増加を示した。IL-15、およびIL-15Rのスシ(sushi)ドメイン(IL-15R_{Su})を含む、IL-15受容体アゴニストはまた、複合体としても、および融合タンパク質としても、報告されている（Han et al., *Cytokine* 2011, 56(3):804-10; Mortier et al., *J. Biological Chem.* 2006, 281: 1612-9; 米国特許10,358,477号）。IgG1のFcドメインに融合したIL-15R_{Su}FcとIL-15 [N72D]との多量体複合体(ALT-803)が、現在、臨床試験中である。

【0011】

三量体受容体に対する親和性が低下したIL-2の変異体が開示されている（米国特許第9,206,243号）。これらの変異体は、CD4⁺Tヘルパー細胞、CD8⁺T細胞、およびナチュラルキラー（NK）細胞を刺激する能力を維持しながら、T_{reg}細胞を刺激する能力の低下を示す。このようなIL-2変異体は、T_{reg}細胞による免疫抑制が欠如しているため、抗腫瘍活性の増強を示し得ることが、提案されている。

【0012】

IL-7は、T細胞の発達、および成熟T細胞の生存および恒常性に必要なサイトカインである。胸腺におけるダブルネガティブ(DN)CD4⁻CD8⁻胸腺細胞前駆細胞の移行には、IL-7シグナル伝達が必要であるが、高用量のIL-7は、DNの進行をブロックする。末梢に入ると、ナイーブT細胞の生存は、IL-7に依存する。IL-7受容体には、IL-2、IL-15、IL-9、およびIL-21に使用される、共通の鎖(CD132)とともに、リンパ球にほぼ独占的に発現する特定の鎖(CD127)が含まれている。IL-7は、CD4⁺およびCD8⁺T細胞のレベルを上昇させるために、T細胞除去療法を受けた癌患者の免疫療法剤として、臨床試験が行われている。IL-7の投与により、ナイーブT細胞が優先的に増殖し、患者の年齢に関係なく、T細胞のレパートリーが広がり、ナイーブT細胞集団が少ない患者の免疫応答を増強するIL-7による治療の可能性が示唆された（Elkassar & Gress, *J. Immunotoxicol.* (2010) 7: 1-7.)。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

IL - 9 は、肥満細胞、NK細胞、TH2、TH17、Treg、ILC2、およびTh9細胞によって産生される、IL - 2およびIL - 15に構造的に関連する別の多面的なサイトカインであり、Th9細胞は、主要なCD4 + T細胞産生体とみなされる。IL - 9受容体は、共通の鎖(CD132)とともに、特定のアルファ鎖(CD129)を含んでいる。化学療法誘発性の血小板減少症を防ぎ、血小板の回復を促進するために、IL - 9を用いた低用量療法が、提案されている(Xiao et al., Blood 129: 3196-3209 (2017))。

【 0 0 1 4 】

IL - 10 (ヒトサイトカイン合成阻害因子)は、Th2細胞、B細胞、およびマクロファージによって産生される、抗炎症性の免疫抑制性サイトカインである。それは、ガンインターフェロン、IL - 2、および腫瘍壊死因子 - アルファ(TNF -)が含まれる、Th1細胞によって産生されるいくつかのサイトカインの合成を阻害し、そして、IL - 1、IL - 6、IL - 8、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、および、単球とマクロファージによるTNF - 、の産生を阻害する。IL - 10は、用量依存的にNK細胞の活性化と標的細胞の破壊を誘導することが見られる(Zheng et al. J. Exp.Med. 184:579-84 (1996))。それは、自己免疫疾患、敗血症性ショック、および細菌性敗血症の治療のために、調査中である。IL - 10のPEG化誘導体が、開示されている(PC T公開WO2010/077853)。PEG化IL10は、インターフェロンガンマおよびCD8 + T細胞依存性抗腫瘍免疫を誘導することが示されている(Emmerich et al., Cancer Res. 72: 3570-81 (2012); Mumm et al., Cancer Cell 20:781-96 (2011); Chan et al., J Interferon Cytokine Res. 35: 948-55 (2015))。PEG化IL10の調査は、ヒトの治療において、IL - 10が、主にCD8 + T細胞の活性化を介した免疫刺激性であることを示唆し、転移ステージ4の膵臓癌の治療に関する第3相試験は主要評価項目を達成できなかったが、非小細胞肺癌の第2相試験が進行中である。

10

20

【 0 0 1 5 】

IL - 21は、活性化したCD4 + T細胞で発現され、Th2およびTh17 Tヘルパー細胞、ならびにT濾胞細胞において、アップレギュレートされる。それは、NK細胞で発現され、その機能を調節する。IL - 21受容体(IL21R)は、T細胞、B細胞、およびNK細胞の表面に発現し、共通の鎖(CD132)と組み合わせさせて、機能する。アレルギー、ウイルス感染、および癌の治療におけるIL - 21の利用が、提案されており、転移性黒色腫および腎細胞癌の治療のための臨床試験が行われている。IL - 21は、HIVに感染した被験者における、HIV特異的細胞傷害性T細胞応答およびNK細胞機能を改善することが報告されており、HIVの治療における使用の可能性が示唆されている。

30

【 0 0 1 6 】

持続注入は、サイトカインによる持続的低用量療法の期待を示すが、しかしながら、ヒト治療において実際に実施することは困難である。したがって、サイトカインを用いた、癌および自己免疫障害を含む様々な疾患に対する、低用量で長期間の治療を可能にする、改良された薬剤が必要である。

40

【発明の概要】

【 0 0 1 7 】

一態様において、式(I)：



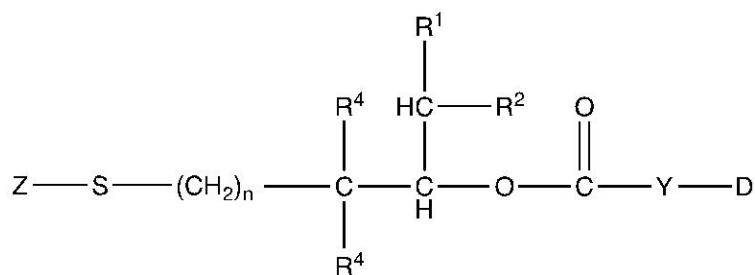
[式中、Z、L、Dは、本明細書に記載された通りである。]

で示される、リンカー - 薬物が提供される。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、リンカー - 薬物Z - L - Dは、式(Ia)：

【化1】



(I a)

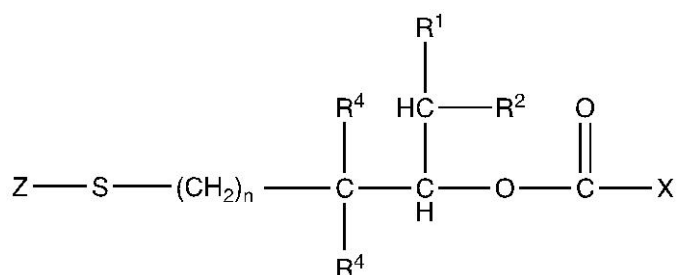
[式中、Z、S、n、R¹、R²、R⁴、Y、およびDは、本明細書に記載された通りである。]

で示される化合物である。

【0019】

別の態様において、式(II a)：

【化2】



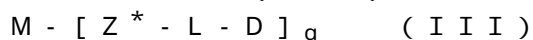
(II a)

[式中、n、Z、S、R¹、R²、R⁴、およびXは、本明細書に記載された通りである。]

で示されるリンカー、が提供される。

【0020】

別の態様において、式(III)：



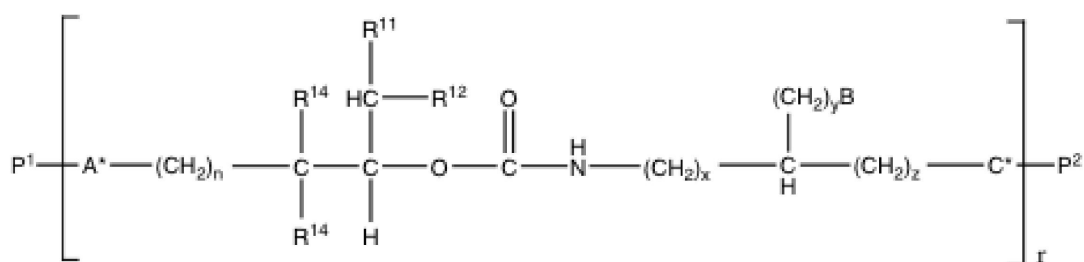
[式中、M、Z^{*}、L、D、およびqは、本明細書に記載された通りである。]

で示されるコンジュゲート、が提供される。

【0021】

別の態様において、式(IV)：

【化3】



(IV)

[式中、P¹、P²、r、A^{*}、B、C^{*}、n、R¹¹、R¹²、R¹⁴、x、y、およびzは、本明細書に記載された通りである。]

で示される分解性架橋ヒドロゲル、が提供される

【0022】

別の態様において、本明細書に開示された化合物を製造する方法、およびそれらを使用

10

20

30

40

50

する方法、が提供される。別の態様において、式 (I I I) のコンジュゲート、または式 (I V) のヒドロゲルを含む、医薬組成物、が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】図 1 は、リンカー - 薬物がヒドロゲルに結合しているコンジュゲートの一般的な構造を示している。

【 0 0 2 4 】

【図 2】図 2 は、 および 受容体を含む細胞に対する、 I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の結合を示している。

【 0 0 2 5 】

【図 3】図 3 は、 I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の還元的アルキル化からのリンカー - タンパク質生成物に対応するバンドを有する、 S D S - P A G E ゲルを示している。

【 0 0 2 6 】

【図 4】図 4 は、マイクロスフェア - I L 2 - N 8 8 R で処置した後のラットにおける血漿 I L 2 [N 8 8 R] の、 C 対 t プロットを示している。図 4 A は、 0 . 2 5 μ m o l / k g で投与されたランダムアシル化コンジュゲートからの I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5] の放出を示し、図 4 B は、 0 . 1 2 μ m o l / k g で投与された還元アルキル化コンジュゲートからの A P - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の放出を示している。

【 0 0 2 7 】

【図 5】図 5 は、脾臓における I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の薬力学を示している。左： C D 4 + エフェクター / メモリー T 細胞のパーセンテージ；右： C D 8 + エフェクター / メモリー T 細胞のパーセンテージ。

【 0 0 2 8 】

【図 6】図 6 は、豚島における I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の薬力学を示している。左上： F o x p 3 + C D 4 + T 細胞のパーセンテージ；右上： C D 4 + のパーセンテージ；左下： C D 8 + のパーセンテージ；右下：自然リンパ球。NODマウスに、 P B S ビヒクル、プロロイキン (Proleukin) (2 5 0 0 0 ユニット)、または I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] (2 5 0 0 0 ユニット) を、毎日注射し、 5 日目の最後の注射の 2 時間後、 殺した。

【 0 0 2 9 】

【図 7】図 7 は、マウスにおける、マイクロスフェア - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] (「 M S - I L - 2 変異体 」) から放出された、 [アミノプロピル] - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の薬物動態を示している。図 7 A : B A L B / c マウス (n = 6) の側腹部に、 2 8 n m o l (1 9 m g / k g) または 9 . 9 n m o l (6 . 5 m g / k g) のマイクロスフェア - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] を含む、 1 回の皮下注射投与を行った。 3 1 時間の t _{1/2} が測定された。図 7 B : N O D マウス (n = 6) の側腹部に、マイクロスフェア - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] (0 . 5 、 1 、 5 、 1 0 、 または 1 9 m g / k g) を投与した。 1 8 時間の t _{1/2} が測定された。図 7 C : N S G マウス (n = 6) または N O D マウス (n = 6) の側腹部に、マイクロスフェア - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] (5 m g / k g) を投与した。 N S G マウスにおいて、 [アミノプロピル] - I L 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] で、 1 5 2 時間の t _{1/2} が測定された。すべての場合において、血漿は、 T h e r m o f i s h e r E L I S A を使用して分析し、 I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] 濃度を定量した。

【 0 0 3 0 】

【図 8】図 8 は、 F o x p 3 + C D 4 + および C D 8 + 細胞の集団の増殖に対する、 I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] (「 I L - 2 変異体 」) の効果を示している。図 8 A は、脾臓および末梢血単核細胞 (P B M C) における、 F o x p 3 + C D 4 + T 細胞の増殖を示している。図 8 B は、脾臓および P B M C における、 C D 8 + T 細胞の増殖を示している。脾臓および P B M C に見られる C D 8 + 細胞のパーセンテージは、それぞれ、約 1 1 % および 1 9 % であった。マイクロスフェア - I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] で処理し

10

20

30

40

50

た場合、これらのパーセンテージは、それぞれ、約25%および60%に増加した。NODマウスに、IL2-変異体(QD×5、25,000ユニット)、単回注射の空(エンブティ)のマイクロスフェア、またはマイクロスフェア-IL-2[N88R,C125S](18mg/kg)を投与した。5日目の最後の投与の2時間後に、マウスを殺した。

【0031】

【図9】図9は、PBMCにおける用量依存的なFoxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖を示している。図9Aは、Foxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖に対する、マイクロスフェア-IL-2[N88R,C125S]の効果を示し、図9Bは、CD8⁺細胞の活性化に対する、その効果を示しており(右)、これらはNODマウス(n=3/用量群)におけるものである。マイクロスフェア-IL-2[N88R,C125S]は、NODマウス(n=3/用量群)において、Foxp3⁺CD4⁺T細胞を優先的に増殖させ、CD8⁺細胞の活性化を避ける。Foxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖は、すべての用量で4日目にピークに達し、14日目までにベースラインレベルに戻る。

10

【0032】

【図10】図10は、IL-15の還元的アルキル化からのリンカー-タンパク質生成物に対応するバンドを有する、SDS-PAGEゲルを示している。左から右に：分子量マーカー；IL-15；IL-15 + PEG_{5kDa}-DBCO；IL-15 + 1Eq(IIb) + PEG_{5kDa}-DBCO；IL-15 + 3Eq(IIb) + PEG_{5kDa}-DBCO；および、IL-15 + 5Eq(IIb) + PEG_{5kDa}-DBCO。

20

【0033】

【図11】図11は、C57BL/6Jマウスにおける、MS-IL-15から放出された[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、t=0時間およびt=240時間に、MS-IL-15(50μg)を投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。240時間を通して2つの異なるt_{1/2}が観測された。t_{1/2}>200時間が、120時間まで観測され、その後、120時間から240時間までで、27時間の2回目のt_{1/2}が観測された。MS-IL-15(50μg)の2回目の注射は、240時間の採血直後に投与した(青色のデータ)。23時間のt_{1/2}が、264時間から360時間までで、観測された。

30

【0034】

【図12】図12は、C57BL/6Jマウスにおける、マイクロスフェア-IL-15から放出された、[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態の用量依存性を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、MS-IL-15(12.5、25、または50μg)を投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。120時間までのデータフィットでは、115~207時間のt_{1/2}が観測された。

【0035】

【図13】図13は、皮下投与あるいは腹腔内投与したC57BL/6Jマウスにおける、マイクロスフェア-IL-15から放出された、[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態学を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、MS-IL-15(50μg)を、皮下(s.c.)注射(黒色、)または腹腔内(i.p.)注射(青色、)で、投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。120時間までで、皮下投与(115時間)および腹腔内投与(129時間)において、同様のt_{1/2}が観測された。

40

【0036】

【図14】図14は、NK細胞およびCD44^{hi}CD8⁺T細胞に対する、マイクロスフェア-IL15コンジュゲートの効果を示している。マイクロスフェア-IL15コンジュゲートは、CD44^{hi}CD8⁺T細胞およびNK細胞を増殖させる。図14A：CD

50

44hⁱCD8⁺T細胞の増殖。図14B：NK細胞の増殖。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、単回の皮下注射のマイクロスフェア~IL-15(2.5、12.5、25、または50μgのIL-15)、空(エンブティ)のマイクロスフェア(黒色)、または、単回の皮下注射のrhIL15(2.5μg)、を投与した。フローサイトメトリーを使用して、PBMCにおけるNK細胞およびCD44^{hⁱ}CD8⁺T細胞の増殖をモニタリングした。CD44^{hⁱ}CD8⁺T細胞の増殖は、マイクロスフェア-IL15の50μg単回注射の後、28日間続いた。

【0037】

【図15】図15は、PEG_{5kDa}-DBCOとのゲルシフト反応後に視覚化された、リンカー(I Ib)による受容体結合インターロイキン(RLI)の還元的アルキル化からのリンカー-タンパク質生成物に対応するバンドを有する、SDS-PAGEゲルを示している。左から右に：分子量マーカー；RLI；RLI + PEG_{5kDa}-DBCO；RLI + 1.5Eq(I Ib) + PEG_{5kDa}-DBCO；RLI + 2Eq(I Ib) + PEG_{5kDa}-DBCO；RLI + 3Eq(I Ib) + PEG_{5kDa}-DBCO；および、RLI + 5Eq(I Ib) + PEG_{5kDa}-DBCO。

10

【0038】

【図16】図16は、RLIのためのIL-2R 受容体結合細胞ベースのアッセイの結果を示している。U2OS細胞ベースのアッセイを使用して、pH7.4でコンジュゲートから放出した[アミノプロピル]-RLIの結合活性(EC₅₀=180pM)を測定し、天然のRLI(EC₅₀=160pM)と比較した。

20

【0039】

【図17】図17は、C57BL/6Jマウスにおける、マイクロスフェアコンジュゲートから放出された、[アミノプロピル]-RLIの薬物動態を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、マイクロスフェア-RLIコンジュゲート(1.5nmol)を投与した。血漿サンプルを、R&D systems DuoSet hIL15/IL15R complex ELISA(DY6924)を使用して、調製および分析した。

【0040】

【図18】図18は、マイクロスフェアコンジュゲートから放出された[アミノプロピル]-RLIの薬力学を示し、PBMCにおけるCD8⁺メモリーT細胞の増殖を測定している。図18A：PBMCにおけるCD8⁺メモリーT細胞の細胞の割合、および、図18B：CD8⁺T細胞の増殖。正常なオスのC57BL/6Jマウスの側腹部に、空(エンブティ)のMS、MS~RLI(34μg、1.5nmol)、または、天然のRLI(2.5μg、0.11nmol、QD×4)を、皮下注射で投与した。採血後にPBMCを調製し、フローサイトメトリー分析のために染色した。

30

【0041】

【図19】図19は、マイクロスフェア-RLIにより処置した、PBMCにおけるNK細胞の増殖を示している。図19A：PBMCにおけるNK細胞の細胞割合、および、図19B：NK細胞の増殖。正常なオスのC57BL/6Jマウスの側腹部に、空(エンブティ)のMS、MS~RLI(34μg、1.5nmol)、または、天然のRLI(2.5μg、0.11nmol、QD×4)を、皮下注射で投与した。採血後にPBMCを調製し、フローサイトメトリーによる分析のために染色した。

40

【発明を実施するための形態】

【0042】

本開示は、その変異体を含むサイトカインタンパク質の放出可能なコンジュゲートを提供する。コンジュゲートは、これらのタンパク質治療薬を、長期間にわたって低用量で用量持続的に送達するため、さまざまな疾患の治療に有用である。

【0043】

一態様において、本開示は、タンパク質の高分子担体へのコンジュゲーションに適した、結合した放出可能なリンカーを有する、サイトカインおよびその変異体を提供する。こ

50

これらのリンカーは、担体からのタンパク質の放出速度を制御し、したがって、体内のサイトカインまたは変異体の濃度および持続時間を決定する。

【0044】

別の態様において、本開示は、高分子担体からサイトカインおよびその変異体を放出するコンジュゲートを提供する。担体は、体内のタンパク質の持続時間を延長させる、可溶性または不溶性のデポ剤 (d e p o s) である。

【0045】

別の態様において、本開示は、本開示のリンカー - サイトカインおよびコンジュゲートのための、製造および使用の方法を提供する。

【0046】

定義

本明細書において、特に断りのない限り、「a」、「an」などの用語の使用は、1つまたは複数を意味する。

【0047】

本明細書において、特に断りのない限り、「約」または「おおよそ」との用語は、数値に関連して使用する場合、15%以内、10%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内、または0.5%以内の数値を企図する。

【0048】

「アルキル」との用語は、1~20、1~12、1~8、1~6、または1~4個の炭素原子の、直鎖、分岐、または環状の飽和炭化水素基を含む。いくつかの実施形態において、アルキルは、直鎖または分岐である。直鎖または分岐のアルキル基としては、これに限定されるものではないが、例えば、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、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシルなどが挙げられる。いくつかの実施形態において、アルキルは環状である。環状アルキル基としては、これに限定されるものではないが、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンタジエニル、シクロヘキシルなどが挙げられる。

【0049】

「アルコキシ」との用語は、酸素に結合したアルキル基を含み、メトキシ、エトキシ、イソプロポキシ、シクロプロポキシ、シクロブトキシなどが挙げられる。

【0050】

「アルケニル」との用語は、炭素 - 炭素二重結合を有し、および2~20、2~12、2~8、2~6、または2~4個の炭素原子を有する、非芳香族の不飽和炭化水素を含む。

【0051】

「アルキニル」との用語は、炭素 - 炭素三重結合を有し、および2~20、2~12、2~8、2~6、または2~4個の炭素原子を有する、非芳香族の不飽和炭化水素を含む。

【0052】

「アリール」との用語は、6~18個の炭素、好ましくは6~10個の炭素の芳香族炭化水素基を含み、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルなどの基が挙げられる。「ヘテロアリール」との用語は、少なくとも1つのN、OまたはS原子を含んで、3~15個の炭素を含む、好ましくは、少なくとも1つのN、OまたはS原子を含んで、3~7個の炭素を含む、芳香族環を含み、ピロリル、ピリジル、ピリミジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、キノリル、インドリル、インデニルなどの基が挙げられる。

【0053】

いくつかの例において、アルケニル、アルキニル、アリール、またはヘテロアリールの部分は、アルキル結合を介して分子の残りの部分に結合し得る。これらの状況下で、置換基は、アルケニルアルキル、アルキニルアルキル、アリールアルキル、またはヘテロアリールアルキルと称され、アルキレン部分が、アルケニル、アルキニル、アリール、またはヘテロアリールの部分と、該アルケニル、アルキニル、アリール、またはヘテロアリール

10

20

30

40

50

が結合している分子との間にあることを示す。

【0054】

「ハロゲン」または「ハロ」との用語は、プロモ、フルオロ、クロロ、およびヨードを含む。

【0055】

「ヘテロ環」または「ヘテロシクリル」との用語は、少なくとも1つのN、O、またはS原子を含む、3～15員の芳香族または非芳香族の環を意味する。これに限定されるものではないが、例えば、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロピラニル、ピロリジン、およびテトラヒドロフラニル、ならびに、上記の「ヘテロアリアル」の用語のために提供された例示の基が含まれる。いくつかの実施形態において、ヘテロ環またはヘテロシクリルは、非芳香族である。いくつかの実施形態において、ヘテロ環またはヘテロシクリルは、芳香族である。

10

【0056】

「高分子」との用語は、分子量が、5,000～1,000,000ダルトン、好ましくは10,000～500,000ダルトン、より好ましくは10,000～250,000ダルトンの、分子または分子の残基を意味する。高分子としては、これに限定されるものではないが、例えば、抗体、抗体フラグメント、および酵素を含む、タンパク質；ポリ(リジン)、およびポリ(バリン)などのポリ(アミノ酸)、および混合配列ポリペプチドを含む、ポリペプチド；ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(エチレンオキシド)(PEO)、ポリ(エチレンイミン)(PEI)、およびそれらのコポリマーを含む、合成ポリマー；および、デキストランなどの多糖類、が挙げられる。いくつかの実施形態において、高分子は、上記のような、アミン、カルボン酸、アルコール、チオール、アルキン、アジド、またはマレイミド基などの、天然または化学的変換後のいずれかで、コンジュゲーションに適した少なくとも1つの官能基を含む。本開示の特定の実施形態において、高分子は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、直鎖または分枝であって、一端がコンジュゲーションに適した官能基で終端となり、他端(または複数の他端)がキャッピング基(例えば、メチル)で終端となってもよく、あるいは、各アームが、コンジュゲーションに適した官能基で終端となった、複数のアームを含んでいてもよい。本開示の好ましい実施形態において、ポリエチレングリコールは、平均分子量が、20,000～200,000ダルトン、好ましくは20,000～100,000ダルトン、最も好ましくは約40,000ダルトン、である、直鎖、分岐、またはマルチアームのポリマーである。そのようなポリエチレングリコールの例は、当技術分野で知られており、例えば、日油株式会社(東京、日本)から市販されている。

20

30

【0057】

特に断りのない限り、「任意に置換されていてもよい」とは、基が、非置換であるか、または、同じかまたは異なってもよい置換基の1つまたは複数(例えば、1、2、3、4または5つ)によって、置換され得ることを意味する。置換基としては、これに限定されるものではないが、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、-CN、-OR^{aa}、-SR^{aa}、-NR^{aa}R^{bb}、-NO₂、-C=NH(OR^{aa})、-C(O)R^{aa}、-OC(O)R^{aa}、-C(O)OR^{aa}、-C(O)NR^{aa}R^{bb}、-OC(O)NR^{aa}R^{bb}、-NR^{aa}C(O)R^{bb}、-NR^{aa}C(O)OR^{bb}、-S(O)R^{aa}、-S(O)₂R^{aa}、-NR^{aa}S(O)R^{bb}、-C(O)NR^{aa}S(O)R^{bb}、-NR^{aa}S(O)₂R^{bb}、-C(O)NR^{aa}S(O)₂R^{bb}、-S(O)NR^{aa}R^{bb}、-S(O)₂NR^{aa}R^{bb}、-P(O)(OR^{aa})(OR^{bb})、ヘテロシクリル、ヘテロアリアル、またはアリアル、が挙げられ、ここで、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリアル、およびアリアルは、それぞれ独立して、任意に、R^{cc}によって置換されていてもよく、ここで、

40

R^{aa}およびR^{bb}は、それぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリアル、またはアリアルであるか、または、

R^{aa}およびR^{bb}は、それらが結合する窒素原子と一緒にあってヘテロシクリルを形成

50

し、これは、任意に、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、または - CN で置換されていてもよく、ここで、

各 R^c は、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アリール、- CN、または - NO₂ である。

【0058】

典型的には、薬物の活性形態が、本開示のコンジュゲートから直接放出されるが、いくつかの場合において、そのプロドラッグの形態で、活性な薬物を放出することが可能である。

【0059】

リンカー - 薬物

一態様において、式 (I) :



[式中、Z は、リンカー - 薬物の高分子担体への接続を可能にする官能基であり、L は、切断可能なリンカーであり、および、D は、サイトカインまたはサイトカイン変異体である。]

で示される、リンカー - 薬物が提供される。

いくつかの実施形態において、放出可能なリンカーは、タンパク質の高分子担体へのコンジュゲーションに適している。いくつかの実施形態において、リンカーは、担体からのサイトカインまたは変異体の放出速度を制御し、したがって、体内の活性タンパク質の濃度および持続時間を決定する。

一態様において、式 (I) :



[式中、Z は、リンカー - 薬物の高分子担体への接続を可能にする官能基であり、L は、切断可能なリンカーであり、および、D は、サイトカインまたはサイトカイン変異体である。]

で示される、リンカー - 薬物が提供される。

【0060】

式 (I) のリンカー - 薬物のいくつかの実施形態において、サイトカイン D は、IL - 2、IL - 4、IL - 7、IL - 9、IL - 10、IL - 15、IL - 21、またはそのサイトカイン変異体、である。D は、また、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_m などの、サイトカインに特定の化学修飾を有するサイトカインを包含し、ここで前記式において、m は、2 ~ 6 の整数であり、p は、0 ~ 1000 の整数であり、リンカー L を結合するための還元的アミノ化から生じるアミン基に結合される。特定の実施形態において、この修飾は、タンパク質配列の N 末端アルファ - アミノ基に結合される。

【0061】

「サイトカイン変異体」とは、天然 (native) のサイトカインに対して、少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% の配列同一性を有する、変更された配列のタンパク質 (「変異体」(ムテイン、mutein)) を意味する。いくつかの実施形態において、サイトカイン変異体は、天然のサイトカインに対して、少なくとも 90% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、サイトカイン変異体は、天然配列から 1 ~ 10 個の変更されたアミノ酸を含み、タンパク質の安定性および/または受容体結合親和性または選択性の向上に基づいて、選択される。組換えサイトカインを産生するために使用される発現系に応じて、配列は、開始メチオニン残基を含んでもよいし、あるいは含まなくてもよい。例えば、本開示において有用な IL - 2 変異体は、二量体 受容体よりも三量体 受容体に対しての結合親和性が増加したのから選択され得る。いくつかの実施形態において、IL - 2 変異体は、アスパラギン - 88 に変異を有し、例えば、N88R または N88D であり、これは、C125S などの他の変異と組み合わせて、さらなる安定性または選択性を与え得る。本開示における使用に適した他の IL - 2 変異体を開示すると、例えば、IL - 2 D20T などの、アスパラギン酸 - 20 において変更された変異体、または、米国特許第 9,206,

10

20

30

40

50

243号に開示される三量体受容体に対する親和性が低下した変異体、が挙げられる。IL-2および変異体の特定の実施形態は、配列番号1~11に示されるものである。

【0062】

配列番号1 天然のヒトIL-2

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQ
CLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIV
EFLNR WITFCQSIIS LT

【0063】

配列番号2 IL-2-N88R (BAY50-4798)

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT

10

【0064】

配列番号3 IL-2-N88R, C125S

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFSQSIISTLT

【0065】

配列番号4 IL-2-D20T

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT

20

【0066】

配列番号5 IL-2-D20T, C125S

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFSQSIISTLT

【0067】

配列番号6 IL-2-R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTKML TIKFNMPKKA TELKHLQ
CLE ELLKPLEVVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIV
EFLNR WITFCQSIIS TLT

30

【0068】

配列番号7 IL-2-R38K, F42Q, Y45E, E68V

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTKML TQKFEMPKKA TELKHL
QCLE EELKPLEVVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATI
VEFLNR WITFCQSIIS TLT

【0069】

配列番号8 IL-2-R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TIKFNMPKKA TELKHLQ
CLE ELLKPLEVVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIV
EFLNR WITFCQSIIS TLT

40

【0070】

配列番号9 IL-2-R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTKML TKKFRMPKKA TELKHL
QCLE ELLKPLEVVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATI
VEFLNR WITFCQSIIS TLT

【0071】

配列番号10 IL-2 R38K, F42I, Y45E, E68V

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTKML TIKFEMPKKA TELKHLQ

50

CLE EELKPLEVVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIV
EFLNR WITFCQSIIS TLT

【 0 0 7 2 】

配列番号 1 1 I L - 2 R 3 8 A , F 4 2 A , Y 4 5 A , E 6 2 A
APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TAKFAMPKKA TELKHL
QCLE EALKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATI
VEFLNR WITFCQSIIS TLT

【 0 0 7 3 】

同様に、天然の I L - 1 5 は、活性、受容体結合選択性、または安定性を向上させる変異体で置き換えることができる。例えば、天然の I L - 1 5 (配列番号 1 2) は、アスパラギン脱アミド化による分解に対する耐性が向上した変異体によって置換され得、例えば、I L - 1 5 - [N 7 7 A] (配列番号 1 3)、または I L - 1 5 - [N 7 1 S , N 7 2 A , N 7 7 A] (配列番号 1 4) が挙げられ、これらは生物学的活性を保持することが示され (Nellis et al., Pharm. Res. 29:722-38 (2012))、あるいは、I L - 1 5 [N 7 2 D] (配列番号 1 5) が挙げられ、これは増強された受容体アゴニズムを示す (Zhu et al., J. Immunology 2009, 183(6): 3598)。

10

【 0 0 7 4 】

配列番号 1 2 I L - 1 5
NWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDAS
IH DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

20

【 0 0 7 5 】

配列番号 1 3 I L - 1 5 [N 7 7 A]
NWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDAS
IH DTVENLIILA NNSLSSAGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

【 0 0 7 6 】

配列番号 1 4 I L - 1 5 [N 7 1 S , N 7 2 A , N 7 7 A]
NWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDAS
IH DTVENLIILA SASLSSAGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

【 0 0 7 7 】

配列番号 1 5 I L - 1 5 [N 7 2 D]
NWNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDAS
IH DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

30

【 0 0 7 8 】

I L - 1 5 と I L - 1 5 R S u との、複合体および融合タンパク質もまた、使用することができ、例えば、受容体結合インターロイキン R L I (配列番号 1 6) およびその変異体 (Mortier et al., J. Biological Chem. 2006, 281: 1612-9; 米国特許 1 0 , 3 5 8 , 4 7 7 号) が挙げられる。これらの融合タンパク質は、任意に、I L - 1 5 R S u シグナル配列、および、タンパク質の単離および精製を容易にするために当技術分野で知られた配列、例えば、H i s タグおよび F l a g タグ、を含んでもよいし、あるいは、これらの構成要素が存在しなくてもよい (配列番号 1 7)。

40

【 0 0 7 9 】

配列番号 1 6 R L I
MAPRRARGC RTLGLPALLL LLLLRPPATR GDYKDDDDKI EGRITCRRRM SVEHADIW
VK SYSLYSRERY ICNSGFKRKA GTSSLTECVL NKATNVAHWT TPLSKCIRDV ALVHQ
RPAPP SGGSGGGGSG GSGGGGSLQ NWNVISDLK KIQDLIQSMH IDATLYTESD VH
PSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

【 0 0 8 0 】

配列番号 1 7 R L I [N 7 7 A]
ITCPPPMSVE HADIWVKSY SLYSRERYIC NSGFKRKAGT SSLTECVLNK ATNVAHWT

50

TP SLKCIRDPAL VHQRPAAPPSS GGSGGGGGSGG GSGGGGSLQN WVNVISDLKK IEDLI
QSMHI DATLYTESDV HPSCKVAMK CFLLELQVIS LESGDASIHD TVENLIILAN NSL
SSAGNVT ESGCKECEEL EEKNIKEFLQ SFVHIVQMFI NTS

【 0 0 8 1 】

他のサイトカインとしては、I L - 7、I L - 9、I L - 1 0、およびI L - 2 1 (配
列番号1 8 ~ 2 1) が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

配列番号1 8 I L - 7

DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDISMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDAN KEGMFLFR
AA RKLQRFLKMN STGDFDLHLL KVSEGTTILL NCTGQVKGRK PAALGEAQPT KSLE
ENKSLK EQKKLNDLCF LKROLLQEIKT CWNKILMGTK EH

10

【 0 0 8 3 】

配列番号1 9 I L - 9

QGCPTLAGIL DINFLINKMQ EDPASKCHCS ANVTSCCLCG IPSDNCTRPC FSERLSQM
TN TTMQTRYPLI FSRVKKSVEV LKNNKCPYFS CEQPCNQTTA GNALTFLKSL LEIFQ
KEKMR GMRGKI

【 0 0 8 4 】

配列番号2 0 I L - 2 1

QGQDRHMIRM RQLIDIVDQL KNYVNDLVPE FLPAPEDVET NCEWSAFSCF QKAQLK
SANT GNNERIINVS IKKLRKPPS TNAGRRQKHR LTCPSCDSYE KKPPKEFLER FKSL
LQKMIH QHLSSRTHGS EDS

20

【 0 0 8 5 】

配列番号2 1 I L - 1 0

MSPGQGTQSE NSCTHFPGNL PNMLRDLRDA FSRVKTFQFM KDQLDNLLLK ESLLD
FKGY LGCQALSEMI QFYLEEVMPQ AENQDPDIKA HVNSLGENLK TLRLRLRRCH RF
LPCENKSK AVEQVKNAFN KLQEKGIYKA MSEFDIFINY IEAYMTMKIR N

【 0 0 8 6 】

特定の実施形態において、サイトカインは、化学的に修飾して、例えば、ポリエチレン
グリコールなどの水溶性ポリマーを1つまたは複数の位置に結合させることによって、コン
ジュゲートから放出された体内のタンパク質の持続時間を延長したり、および/または
、受容体の選択性を変更したりすることができる。

30

【 0 0 8 7 】

これらのタンパク質は、当技術分野で知られている方法を用いて製造することができる
。組換えにより製造する場合、それらは原核生物または真核生物のいずれかの系で発現さ
せることができる。

【 0 0 8 8 】

様々な切断可能なリンカーLを使用することができ、例えば、米国特許第8, 680,
315号; PCT公開WO2013/036857号; PCT公開WO2006/138
572号; PCT公開WO2005/099768号; PCT公開WO2006/136
586号; PCT公開WO2011/012722号; PCT公開WO2011/089
214号; PCT公開WO2011/089215号; PCT公開WO2011/089
216号; および、PCT公開WO2016/020373号、に開示されているものが
挙げられる。リンカーLは、適切な条件下で特定の速度で切断する共有結合を含む。この
ような切断は、触媒作用または非触媒作用による加水分解、タンパク質分解、または脱離
反応によるものであり得る。切断のための適切な条件は、生理学的環境で典型的に見られ
る条件であり、典型的には、pHが約6.5~7.5で、温度が30~45 であり、好
ましくは、pHが約7.4で、温度が約37、である。

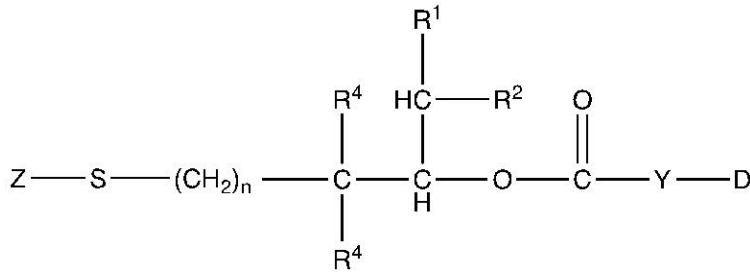
40

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、式(I)のリンカー-薬物は、式(Ia):

50

【化4】



(I a)

10

[式中、

n は、0 ~ 6 の整数であり；

R¹ および R² は、独立して、電子求引基、アルキル、または H であり、ここで、R¹ および R² のうちの少なくとも1つは、電子求引基であり；各 R⁴ は、独立して、C₁ - C₃ アルキルであるか、または、2つの R⁴ は、それらが結合する炭素原子と一緒にあって3 ~ 6員環を形成し；

Z は、リンカーを高分子担体に接続するための基であり；

S は、存在しないか、または、(CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gCONH であり、ここで、g は、1 ~ 6 の整数であり、h は、0 ~ 1000 の整数であり；Y は、存在しないか、または、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_m であり、ここで、m は、2 ~ 6 の整数であり、p は、0 ~ 1000 の整数であり；および、

20

D は、本明細書に開示されたサイトカインまたはサイトカイン変異体のアミン残基である。]

で示される、化合物である。

【0090】

式 (I a) のリンカー - 薬物のいくつかの実施形態において、n = 1 ~ 6、R¹ および R² は、独立して、電子求引基、アルキル、または H であり、ここで、R¹ および R² のうちの少なくとも1つは、電子求引基であり；各 R⁴ は、独立して、H、または C₁ - C₃ アルキルであるか、または一緒にあって3 ~ 6員環を形成してもよく；Z は、リンカーを高分子担体に接続するための基であり；S は、存在しないか、または、(CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gCONH であり、ここで、g = 1 ~ 6、および h = 0 ~ 1000 であり；Y は、存在しないか、または、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_m であり、ここで、m = 2 ~ 6、および、p = 0 ~ 1000 であり；そして、D は、IL - 2、IL - 2 変異体、IL - 15、または IL - 15 変異体のサイトカインのアミン残基である。

30

【0091】

R¹ および R² の電子求引基の説明は、米国特許第 8,680,315 号に見られ得るものであり、これは、参照により本明細書に組み込まれる。電子求引基は、ハメットのシグマ値が 0 より大きい基として定義される (例えば、Hansch et al. 1991 Chemical Reviews 91: 165-195 を参照)。電子求引基の典型的な例としては、これに限定されるものではないが、ニトリル、ニトロ、スルホン、スルホキシド、カルボニル、任意に置換されていてもよいアリール、および、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、が挙げられる。

40

【0092】

式 (I a) のリンカー - 薬物のいくつかの実施形態において、R¹ および R² の電子求引基は、

- CN；

- NO₂；

任意に置換されていてもよいアリール；

任意に置換されていてもよいヘテロアリール；

任意に置換されていてもよいアルケニル；

50

任意に置換されていてもよいアルキニル；

- COR⁵、-SOR⁵、または、-SO₂R⁵、

[ここで、R⁵は、H、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR⁶、または-NR⁶₂であり、ここで、各R⁶は、独立して、H、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、または任意に置換されていてもよいヘテロアリールであるか、または、2つのR⁶基は、それらが結合している窒素と一緒になってヘテロ環を形成する。]；または、

SR⁷

[ここで、R⁷は、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、または、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキルである。]

【0093】

式(Ia)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、-CNである。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、-NO₂である。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、6~10個の炭素を含む任意に置換されていてもよいアリールである。例えば、いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、任意に置換されていてもよい、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルである。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、3~7個の炭素を含み、N、O、またはS原子の少なくとも1つを含む、任意に置換されていてもよいヘテロアリールである。例えば、いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、ピロリル、ピリジル、ピリミジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、キノリル、インドリル、またはインデニルであり、これらのそれぞれは、任意に置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、2~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルケニルである。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、2~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキニルである。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、-COR⁵、-SOR⁵、または-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵は、H、1~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR⁶、または-NR⁶₂であり、ここで、各R⁶は、独立して、H、または1~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキルであるか、または、2つのR⁶基はそれらが結合している窒素と一緒になってヘテロ環を形成する。いくつかの実施形態において、R¹およびR²の電子求引基は、-SR⁷であり、ここで、R⁷は、1~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、または、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキルである。

【0094】

式(Ia)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、R¹およびR²のうちの少なくとも1つは、-CN、-SOR⁵、または-SO₂R⁵である。いくつかの実施形態において、R¹およびR²のうちの少なくとも1つは、-CN、または-SO₂R⁵である。いくつかの実施形態において、R¹およびR²のうちの少なくとも1つは、-CN、または-SO₂R⁵であり、ここで、R⁵は、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリールである。いくつかの実施形態において、R¹およびR²のうちの少なくとも1つは、-CN、-SO₂N(CH₃)₂、-SO₂CH₃、-SO₂Ph、-SO₂PhCl、-SO₂N(CH₂CH₂)₂O、-SO₂CH(CH₃)₂、-

10

20

30

40

50

$\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、または、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ 、である。

【0095】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、各 R^4 は、独立して、 C_1 - C_3 アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^4 の少なくとも1つは、メチルである。いくつかの実施形態において、 R^4 は両方、メチルである。

【0096】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、 n は、1~6の整数である。いくつかの実施形態において、 n は、1~3の整数である。いくつかの実施形態において、 n は、0~3の整数である。いくつかの実施形態において、 n は0である。いくつかの実施形態において、 n は1である。いくつかの実施形態において、 n は2である。いくつかの実施形態において、 n は3である。いくつかの実施形態において、 n は4である。いくつかの実施形態において、 n は5である。いくつかの実施形態において、 n は6である。

10

【0097】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、 R^1 は CN 、または $-\text{SO}_2\text{R}^5$ であり、ここで、 R^5 は、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または $-\text{NR}^6_2$ であり、ここで、 R^6 は、独立して、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、および、 $\text{R}^2 = \text{H}$ であり、ここで、 R^5 および R^6 のそれぞれは、独立して、任意に置換されていてもよい。

20

【0098】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、 Z は、コンジュゲートについて当技術分野で知られている任意の官能基を含むことができる。そのような官能基としては、これに限定されるものではないが、例えば、アミン、アミノオキシ、ケトン、アルデヒド、マレイミジル、チオール、アルコール、アジド、1, 2, 4, 5-テトラジニル、トランス-シクロオクテニル、ビスクロノニル(bicyclononyl)、シクロオクチニル、およびそれらの保護された変異体、が挙げられる。いくつかの実施形態において、 Z は、保護されたアミン、保護されたアミノオキシ、ケトンまたは保護されたケトン、アルデヒドまたは保護されたアルデヒド、マレイミジル、保護されたチオール、保護されたアルコール、アジド、1, 2, 4, 5-テトラジニル、トランス-シクロオクテニル、ビスクロノニル、またはシクロオクチニルを含む。いくつかの実施形態において、 Z は、アジド、ケトン、または保護されたケトンを含む。いくつかの実施形態において、 Z は、高分子担体上の関連する官能基 Z' と選択的に反応して、接続官能基 Z^* を形成することを可能にする官能基を含む。いくつかの実施形態において、接続官能基 Z^* は、 Z/Z' が、アミン/カルボキシレートまたは活性エステルである場合、カルボキサミドであり； Z/Z' が、 NH_2O /ケトンまたはアルデヒドである場合、オキシムであり； Z/Z' が、チオール/マレイミドまたはハロカルボニルである場合、チオエーテルであり；あるいは、 Z/Z' が、アジド/シクロオクチンである場合、トリアゾールである。

30

【0099】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、 S は存在しない。いくつかの実施形態において、 S は、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{CONH}$ である。

40

【0100】

式(I a)のリンカー-薬物のいくつかの実施形態において、 Y は存在しない。いくつかの実施形態において、 Y は、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_m$ である。

【0101】

本明細書の記載において、部分についての、すべての記載、変形例、実施形態、または態様は、記載のそれぞれのおよびすべての組み合わせが具体的にかつ個別的に記載されているのと同じように、他の部分についての、すべての記載、変形例、実施形態、または態様と組み合わせることができることが理解される。例えば、式(I)の R^1 に関して本明細書で提供される、すべての記載、変形例、実施形態、または態様は、それぞれのおよび

50

すべての組み合わせが具体的にかつ個別的に記載されているのと同じように、Z、S、n、R²、R⁴、Y、および/またはDの、すべての記載、変形例、実施形態、または態様と組み合わせることができる。また、式(I)、(Ia)、(IIa)、(IIIa)、(IV)、(V)、または(VI)などの式の、すべての記載、変形例、実施形態、または態様は、適用可能な場合、本明細書で述べられる他の式にも等しく適用され、そして、すべての記載、変形例、実施形態、または態様が、すべての式について別々に個別に記載されているのと同じように、等しく記載されるものと理解される。例えば、式(I)の、すべての記載、変形例、実施形態、または態様は、適用可能な場合、式(Ia)、(IIa)、(IIIa)、(IV)、(V)、または(VI)などの、本明細書で述べられる式の、いずれにも等しく適用され、そして、すべての記載、変形例、実施形態、または態様が、すべての式について別々に個別に記載されているのと同じように、等しく記載される。

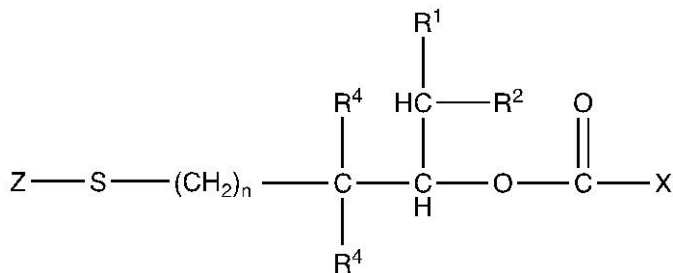
10

【0102】

リンカー

別の態様において、式(IIa)：

【化5】



20

(IIa)

[式中、n、Z、S、R¹、R²、およびR⁴は、式(Ia)について本明細書に開示された通りであり；および、Xは、ハロゲン、活性エステル(例えば、N-スクシンイミジルオキシ、ニトロフェノキシ、またはペンタハロフェノキシ)、または、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_(m-1)CHOであり、ここで、mは、2~6の整数であり、pは、0~1000の整数である。]

30

で示される、リンカーが提供される。

いくつかの実施形態において、Xはハロゲンである。いくつかの実施形態において、Xは、スクシンイミジルオキシなどの、活性エステルである。いくつかの実施形態において、Xは、ハライド、スクシンイミジルオキシ、またはニトロフェノキシである。いくつかの実施形態において、Xは、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_(m-1)CHOである。Xが、NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_(m-1)CHOであるリンカーは、還元的アルキル化によってサイトカインに結合することができ、この還元的アルキル化では、リンカーのアルデヒド基が、サイトカインのアミン基とイミンを形成し、そして、このイミンは、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤の存在下でアミンに還元される。この方法は、通常、リンカーを、サイトカインのN末端アルファ-アミン基に接続するのに、

選択的である。この実施形態において、リンカーの切断時にコンジュゲートから放出されるサイトカインは、NH₂(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_mの付加によって、N末端アルファ-アミンにおいて修飾される。これらのリンカーは、Schneider et al. (2016) Bioconjugate Chem 27: 2534-9 (参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように製造される。いくつかの実施形態において、pは、0であり、リンカーの切断時にコンジュゲートから放出されるサイトカインは、NH₂(CH₂)_mの付加によって、N末端アルファ-アミンにおいて修飾される。

40

【0103】

式(IIa)のリンカーのいくつかの実施形態において、n=1~6、R¹およびR²は、独立して、電子求引基、アルキル、またはHであり、ここで、R¹およびR²のうち

50

の少なくとも1つは、電子求引基であり；各R⁴は、独立して、H、またはC₁-C₃アルキルであるか、または、一緒になって3～6員環を形成してもよく；Zは、リンカーを高分子担体に接続するための基であり；Sは、存在しないか、または、(CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gCONHであり、ここで、g = 1～6、およびh = 0～1000であり；および、Xは、ハライド、スクシンイミジルオキシ、またはニトロフェノキシである。

【0104】

これらのリンカー試薬の製造は、米国特許第8,680,315号、およびPCT特許出願PCT/US2020/026726(2020年4月3日出願)に開示されており、これらはともに、参照により本明細書に組み込まれる。

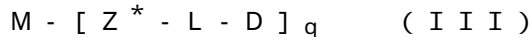
【0105】

これらのリンカーは、当技術分野で知られている方法によって、サイトカインまたはサイトカイン変異体に結合でき、例えば、pH6～9、好ましくはpH7～8で、タンパク質の緩衝液と反応させて、タンパク質上のアミン基をアシル化して、式(I)のリンカー-タンパク質を形成することによって行う。タンパク質上の複数のアミン基が反応に利用できる場合、複数のリンカーが各タンパク質に結合し得る。タンパク質に結合するリンカーの数の選択性は、タンパク質に対するリンカー試薬の化学量論を使用して、制御することができる。リンカーが1つだけ結合している場合、リンカーが切断してコンジュゲートから放出されるタンパク質は、追加の修飾を有さない。

【0106】

コンジュゲート

別の態様において、式(III)：



[式中、Mは、高分子担体であり、Z^{*}は、接続官能基であり、Lは、切断可能なリンカーであり、Dは、サイトカインまたはサイトカイン変異体タンパク質であり、qは、Mが可溶性高分子担体の場合、1～10の整数であり、または、qは、Mが不溶性高分子担体の場合、多数である。]

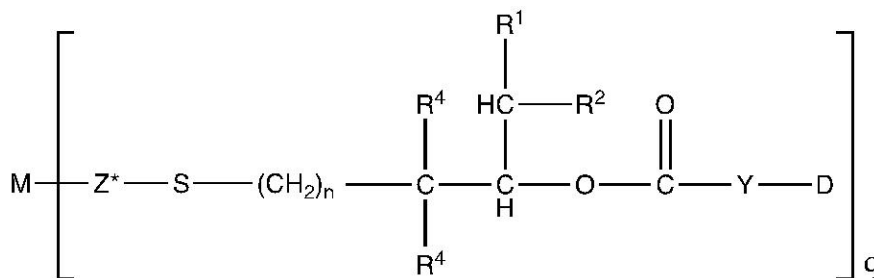
で示される、コンジュゲートが提供される。

Mが、不溶性のマトリックスまたは支持体などの不溶性高分子担体である場合、多数のリンカー-薬物が、Mに結合し得ることが理解される。例えば、いくつかの実施形態において、Mが、式(IV)のヒドロゲルであって、P¹およびP²が両方、4-アームのポリマーである場合、1、2、3、または4つのリンカー-薬物を、各P¹-P²ユニットに結合させることができる。したがって、リンカー-薬物を適切な比率でMと反応させることにより、所望の数の多数を得ることができる。このようにして、マトリックスの体積中の適切な薬物濃度を得ることができる。

【0107】

いくつかの実施形態において、式(III)のコンジュゲートは、式(IIIa)：

【化6】



(IIIa)

[式中、M、Z^{*}、S、n、R¹、R²およびR⁴、YおよびDは、式(I)、(Ia)、または(IIIa)について本明細書で説明された通りに定義される。]

で示されるものである。

【0108】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、Mは、ポリエチレングリコール、デキストラン、タンパク質、または抗体などの、可溶性高分子担体であり；Z^{*}は、接続基であり；q = 1 ~ 10である。それぞれの場合において、Mは、式(I)の化合物上の基Zと反応して、接続基Z^{*}を形成する、反応性基Z'を含む。接続基Z^{*}は、Z/Z'が、アミン/カルボキシレートまたは活性エステルの場合、カルボキサミドであり；Z/Z'が、アミノオキシ/ケトンまたはアルデヒドの場合、オキシムであり；Z/Z'が、チオール/マレイミドまたはハロカルボニルの場合、チオエーテルであり；または、Z/Z'が、アジド/シクロオクチンの場合、トリアゾールである。いくつかの実施形態において、Z^{*}は、アミド、カルボキサミド、オキシム、トリアゾール、チオエーテル、チオスクシンイミド、またはエーテルを含む。

10

【0109】

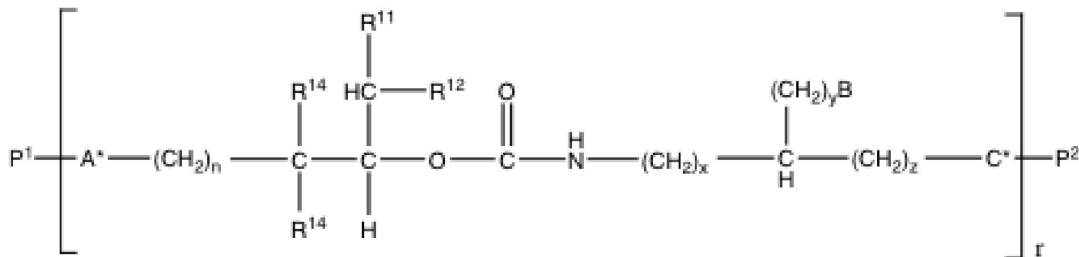
いくつかの実施形態において、Mは、平均分子量が1,000 ~ 100,000ダルトン、好ましくは10,000 ~ 60,000ダルトン、最も好ましくは20,000 ~ 40,000ダルトンの、ポリエチレングリコールである。Mは、単鎖、分岐鎖、または、マルチアームのものであり得る。Mは、リンカー - 薬物に接続するための1つまたは複数の官能基Z'を含む。Z'は、当技術分野で知られている方法を用いて、商業的に入手可能なポリマーMに結合させることができ；例えば、Mがアミン基を含む場合、これはさらに誘導化して、アシル化によって、(Boc - アミノオキシ)酢酸との反応とそれに続く脱保護により、Z' = アミノオキシを導入することができ；アシル化によって、シクロオクチンの活性エステルまたはカーボネート(例えば、4 - シクロオクチニルスクシンイミジルカーボネート、または、(1R, 8S, 9s) - ビシクロ[6.1.0]ノナ - 4 - イン - 9 - イルメトキシスクシンイミジルカーボネート(BCN - OSu)またはその(1R, 8S, 9r)ジアステレオマー)との反応により、Z' = シクロオクチンを導入することができ；または、アシル化によって、3 - マレイミドプロピオン酸との反応により、マレイミド基を導入することができる。

20

【0110】

いくつかの実施形態において、Mは、ヒドロゲルまたは外科装置などの、不溶性高分子担体である。そのような実施形態において、qは、不溶性支持体に付いた反応性基Z'の数によって決定される、多数である。いくつかの実施形態において、Mは、式(IV)：

【化7】



30

(IV)

[式中、

P¹およびP²は、独立して、r - アームポリマーであり、ここで、rは、2 ~ 8の整数であり；

nは、0 ~ 6の整数であり；

x、y、およびzは、それぞれ独立して、0 ~ 6の整数であり；

Bは、Z'を含む基であり；

A*およびC*は、それぞれ独立して、カルボキサミド、オキシム、エーテル、チオエーテル、またはトリアゾールなどの、接続基であり；

R¹¹およびR¹²は、それぞれ独立して、H、C₁ - C₄アルキル、または電子求引基であり、ここで、R¹¹またはR¹²のうちの少なくとも1つは、電子求引基であり；および、

40

50

各 R^{14} は、独立して、 $C_1 - C_3$ アルキルであるか、または、2つの R^{14} は、それらが結合する炭素原子と一緒にになって3～6員環を形成する。]

で示される、分解性架橋ヒドロゲルである。

【0111】

電子求引基 R^{11} および R^{12} の説明は、米国特許第8,680,315号に見られ得るものであり、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

式(IV)のヒドロゲルのいくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、

- CN ;

- NO₂ ;

任意に置換されていてもよいアリール ;

任意に置換されていてもよいヘテロアリール ;

任意に置換されていてもよいアルケニル ;

任意に置換されていてもよいアルキニル ;

- COR¹⁵、-SOR¹⁵、または、-SO₂R¹⁵、

[ここで、 R^{15} は、H、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR¹⁶、または -NR¹⁶₂であり、ここで、各 R^{16} は、独立して、H、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、または任意に置換されていてもよいヘテロアリールであるか、または、2つの R^{16} 基は、それらが結合する窒素と一緒にになってヘテロ環を形成する。] ; または、

S R¹⁷

[ここで、 R^{17} は、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、または任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキルである。] である。

【0112】

式(IV)のヒドロゲルのいくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、-CNである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、

-NO₂である。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、6～

10個の炭素を含む任意に置換されていてもよいアリールである。例えば、いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、任意に置換されていてもよい、フェニル、ナフチル、またはアントラセニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、3～7個の炭素を含み、少なくとも1つのN、O、またはS

原子を含む、任意に置換されていてもよいヘテロアリールである。例えば、いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、ピロリル、ピリジル、ピリミジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、キノリル、インドリル、またはインデニルであり、これらのそれぞれは、任意に置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルケニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、-COR¹⁵、-SOR¹⁵、または -SO₂R¹⁵であり、ここで、 R^{15} は、

H、1～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR¹⁶または -NR¹⁶₂であり、ここで、各 R^{16} は、独立して、H、または1～20

個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキルであるか、または、2つの R^{16} 基は、それらが結合している窒素と一緒にになってヘテロ環を形成する。いくつかの実施形

態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルケニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、-COR¹⁵、-SOR¹⁵、または -SO₂R¹⁵であり、ここで、 R^{15} は、

H、1～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR¹⁶または -NR¹⁶₂であり、ここで、各 R^{16} は、独立して、H、または1～20

個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキルであるか、または、2つの R^{16} 基は、それらが結合している窒素と一緒にになってヘテロ環を形成する。いくつかの実施形

態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルケニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、2～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキニルである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、-COR¹⁵、-SOR¹⁵、または -SO₂R¹⁵であり、ここで、 R^{15} は、

H、1～20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、-OR¹⁶または -NR¹⁶₂であり、ここで、各 R^{16} は、独立して、H、または1～20

個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキルであるか、または、2つの R^{16} 基は、それらが結合している窒素と一緒にになってヘテロ環を形成する。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態において、 R^{11} および R^{12} の電子求引基は、 $-SR^{17}$ であり、ここで、 R^{17} は、1~20個の炭素原子を含む任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいアリールアルキル、任意に置換されていてもよいヘテロアリール、または、任意に置換されていてもよいヘテロアリールアルキルである。

【0113】

式(IV)のヒドロゲルのいくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} のうち少なくとも1つは、 $-CN$ 、 $-SOR^{15}$ 、または $-SO_2R^{15}$ である。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} のうち少なくとも1つは、 $-CN$ 、または $-SO_2R^{15}$ である。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} のうち少なくとも1つは、 $-CN$ 、または $-SO_2R^{15}$ であり、ここで、 R^{15} は、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアリールである。いくつかの実施形態において、 R^{11} および R^{12} のうち少なくとも1つは、 $-CN$ 、 $-SO_2N(CH_3)_2$ 、 $-SO_2CH_3$ 、 $-SO_2Ph$ 、 $-SO_2PhCl$ 、 $-SO_2N(CH_2CH_2)_2O$ 、 $-SO_2CH(CH_3)_2$ 、 $-SO_2N(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、または、 $-SO_2N(CH_2CH_2OCH_3)_2$ 、である。

10

【0114】

式(IV)のヒドロゲルのいくつかの実施形態において、各 R^{14} は、独立して、 C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^{14} の少なくとも1つは、メチルである。いくつかの実施形態において、 R^{14} は両方、メチルである。

20

【0115】

式(IV)のヒドロゲルのいくつかの実施形態において、 R^{11} は、 CN 、または $-SO_2R^{15}$ であり、ここで、 R^{15} は、 C_1-C_6 アルキル、アリール、ヘテロアリール、または $-NR^{16}_2$ であり、ここで、各 R^{16} は、独立して、 C_1-C_6 アルキル、アリール、またはヘテロアリール、および、 $R^{12} = H$ であり、ここで、 R^{15} および R^{16} のそれぞれは、独立して、任意に置換されていてもよい。

【0116】

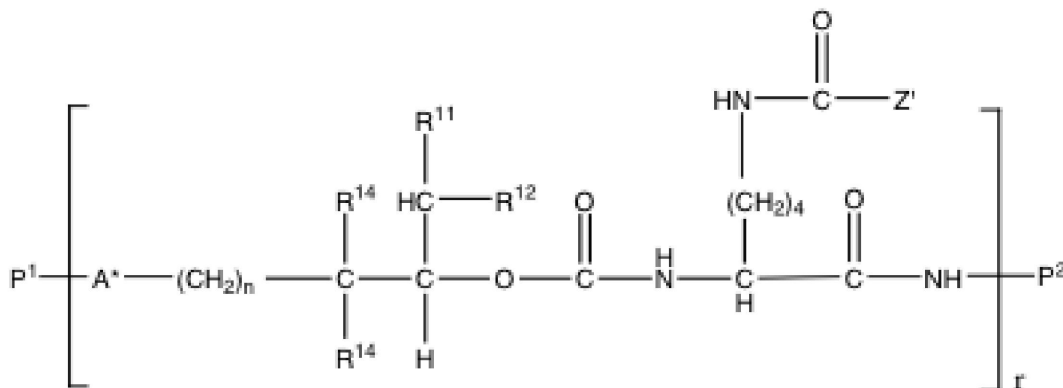
そのようなヒドロゲルに結合したリンカー-タンパク質の一般式を、図1に示す。

【0117】

特定の実施形態において、Mは、式(V)または式(VI)

30

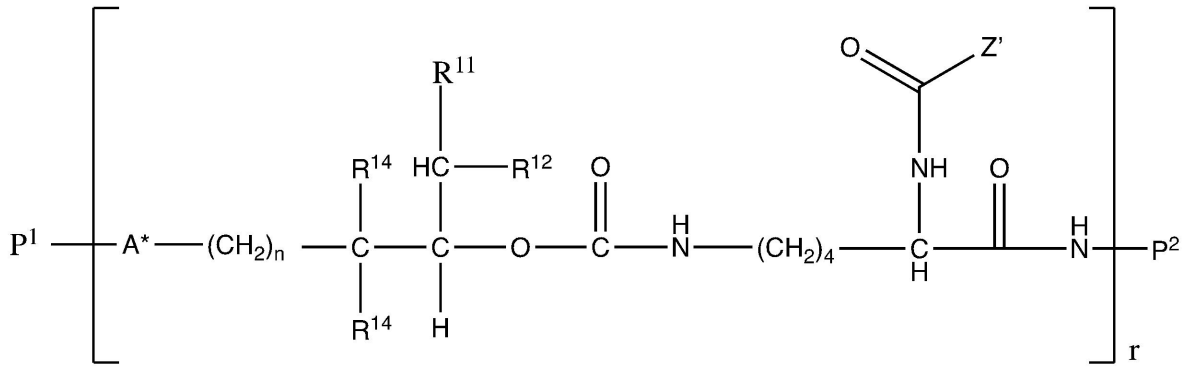
【化8】



40

(V)

【化 9】



10

(VI)

[式中、 P^1 、 P^2 、 r 、 R^{11} 、 R^{12} 、および R^{14} は、式(IV)について本明細書に記載した通りであり；および、

Z' はシクロオクチン基を含む。]

で示される、ヒドロゲルである。

特定の実施形態において、 Z' は、4-シクロオクチニルオキシカルボニル、または(1R, 8S, 9s)-ピシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメトキシカルボニル、である。

20

【0118】

これらの式のヒドロゲル支持体の製造は、米国特許第9,649,385号、およびPCT/US2020/026726(2020年4月3日出願)に開示されており、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0119】

上記のコンジュゲートは、そのレジメンで治療することができる疾患または病気を有する対象において、サイトカインの連続的低用量を供給するために、使用され得る。連続的低用量のサイトカイン療法で治療可能な特定の疾患および病気としては、寛容原性CD4⁺CD25⁺FOXp3⁺制御性T細胞の不適切な再構成に関連する、慢性移植片対宿主病(cGVHD)(Koreth et al., Blood 128: 130-7 (2016))；全身性エリテマトーデス；サルコイドーシス；C型肝炎誘発性血管炎；円形脱毛症；関節リウマチ；炎症性腸疾患；多発性硬化症；および、1型糖尿病(Koreth et al., Oncology & Hematology Review 10: 157-63 (2014))、が挙げられる。外因性サイトカインによる免疫増強は、癌や免疫不全の治療に有用であり得る。

30

【0120】

本開示のコンジュゲートは、当技術分野で知られている標準的な緩衝液および賦形剤を使用して、製剤化することができる。使用される緩衝液は、好ましくはpH3~pH7であり、より好ましくはpH4~pH6である。投与は、可溶性コンジュゲートの場合、静脈内、皮下、硝子体内、または筋肉内であり得、そして、不溶性コンジュゲートの場合、皮下、硝子体内、または筋肉内であり得る。腫瘍内注射も使用され得る。

40

【0121】

医薬組成物

別の態様において、薬学的に許容される緩衝液および/または賦形剤と一緒に、高分子担体-薬物コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩を含む、医薬組成物、が本明細書で提供される。緩衝液は、リンカーの安定性が保存中および必要に応じた再調製時に維持されるように、選択され、典型的には、pHが、2~7、好ましくは2~6、より好ましくは2~5である。許容される緩衝液としては、酢酸、クエン酸、リン酸、ヒスチジン、グルコン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、乳酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、 α -ケトグルタル酸などが挙げられる。賦形剤としては、塩化ナトリウムなどの、張性剤および浸透圧剤；クエン酸またはクエン酸塩、およびパラベンなどの、保存剤

50

; フェノールおよびクレゾールなどの、抗菌剤; プチル化ヒドロキシトルエン、ビタミン A、C、または E、システイン、メチオニンなどの、抗酸化剤; スクロース、ポリオール、ヒアルロン酸、およびカルボキシメチルセルロースなどの、密度調整剤、を挙げることができる。これらの製剤は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Science」A.R. Gennaro, ed., 17th edition, 1985, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA に記載されているように、当業者に知られている従来の方法によって、製造することができる。医薬組成物は、液体溶液または懸濁液で供給されてもよく、あるいは、例えば、液体組成物の凍結乾燥によって、固体として提供されてもよい。このような凍結乾燥物は、使用前に迅速かつ効率的な再調製を行うための増量剤をさらに含み得る。

【0122】

使用方法

別の態様において、本明細書に記載の高分子担体 - 薬物コンジュゲートおよびそれを含む医薬組成物を用いて、個体の疾患または病気を治療または予防することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の高分子担体 - 薬物コンジュゲート、または本明細書に記載の高分子担体 - 薬物コンジュゲートを含む医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む、疾患または病気を治療する方法、が提供される。「個体」は、ヒトであってよく、あるいは、ネコ、イヌ、ウシ、ラット、マウス、ウマ、ウサギ、または他の飼育動物などの、動物であってよい。

【0123】

また、疾患または病気の治療に使用するための、本明細書に記載の高分子担体 - 薬物コンジュゲートを含む組成物、が提供される。また、疾患または病気の治療のための医薬の製造における、本明細書に記載の高分子担体 - 薬物コンジュゲートの使用、が本明細書で提供される。

【0124】

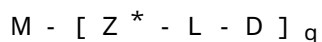
治療を必要とする適用可能な疾患または病気は、コンジュゲート薬物の性質から、当業者によって認識されるものである。

【0125】

特定の代表的な実施形態が以下に提供される。

実施形態 1

下記の式



[式中、

M は、高分子担体であり;

Z^{*} は、接続官能基であり;

L は、切断可能なリンカーであり; および、

D は、サイトカインまたはその変異体のアミン残基であり; および、

ここで、M が可溶性担体である場合、q = 1 ~ 10 であり、M が不溶性担体である場合、q は多数である。]

で示される、コンジュゲート。

実施形態 2

Z^{*} が、カルボキサミド、オキシム、チオエーテル、またはトリアゾールであり;

L が、下記の式

10

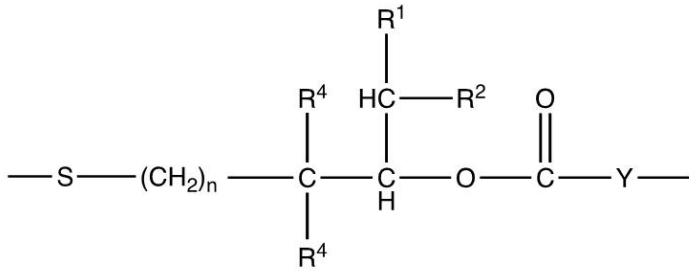
20

30

40

50

【化 1 0】



10

[式中、

$n = 0 \sim 6$ 、または $n = 1 \sim 6$ であり；

R^1 および R^2 は、独立して、電子求引基、アルキル、または H であり、ここで、 R^1 および R^2 のうちの少なくとも 1 つは、電子求引基であり；

各 R^4 は、独立して、H、または $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキルであるか、または、2 つの R^4 は、一緒になって 3 ~ 6 員環を形成し；

S は、存在しないか、または、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{CONH}$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；

Y は、存在しないか、または、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 1000$ である。]

20

で示されるものである、実施形態 1 に記載のコンジュゲート。

実施形態 3

R^1 が、CN、または R^5SO_2 であり、ここで、 R^5 は、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、アリール、ヘテロアリールであるか、または、 $(\text{R}^6)_2\text{N}$ であり、ここで、 R^6 は、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、および、 $\text{R}^2 = \text{H}$ であり、ここで、 $\text{R}^4 \sim \text{R}^6$ のそれぞれは、任意に置換されていてもよい、実施形態 2 に記載のコンジュゲート。

実施形態 4

M が、平均分子量 1,000 ~ 100,000 ダルトンの可溶性ポリエチレングリコールであり、および、 $q = 1 \sim 10$ である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載のコンジュゲート。

30

実施形態 5

M が、不溶性ヒドロゲル、または外科装置であり、q が、多数である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載のコンジュゲート。

実施形態 6

D が、IL-2、IL-7、IL-9、IL-10、IL-15、IL-21、またはそれらの変異体である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載のコンジュゲート。

実施形態 7

D が、二量体 受容体よりも三量体 受容体に対して選択的結合性を有する IL-2 変異体であるか、または、三量体 受容体よりも二量体 受容体に対して選択的結合性を有する IL-2 変異体である、実施形態 6 に記載のコンジュゲート。

40

実施形態 8

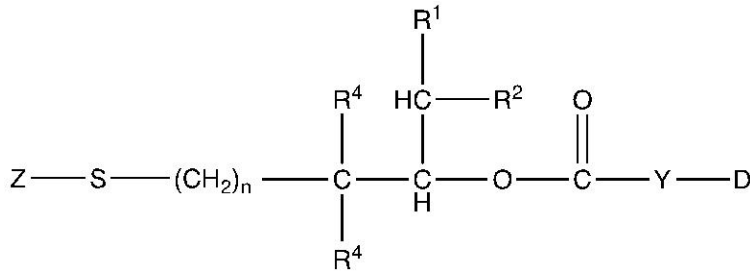
D が、脱アミド化に対して安定化された IL-15 変異体である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載のコンジュゲート。

実施形態 9

下記の式

50

【化 1 1】



[式中、 $n = 0 \sim 6$ 、または $n = 1 \sim 6$ であり、 R^1 および R^2 は、独立して、電子求引基、アルキル、または H であり、ここで、 R^1 および R^2 のうちの少なくとも 1 つは、電子求引基であり；各 R^4 は、独立して、H、または $C_1 - C_3$ アルキルであるか、または、一緒になって 3 ~ 6 員環を形成していてもよく；Z は、リンカーを高分子担体に接続するための官能基であり；S は、存在しないか、または、 $(CH_2CH_2O)_h(CH_2)_gCONH$ であり、ここで、 $g = 1 \sim 6$ 、および、 $h = 0 \sim 1000$ であり；Y は、存在しないか、または、 $NH(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_m$ であり、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 1000$ であり；そして、D は、サイトカインまたはその変異体のアミン残基である。]

で示されるリンカー - タンパク質。

実施形態 10

R^1 が、CN、または R^5SO_2 であり、ここで、 R^5 が、 $C_1 - C_6$ アルキル、アリアル、ヘテロアリアルであるか、または、 $(R^6)_2N$ であり、ここで、 R^6 は、 $C_1 - C_6$ アルキル、アリアル、またはヘテロアリアルであり、および、 $R^2 = H$ であり、ここで、 $R^4 \sim R^6$ のそれぞれは、任意に置換されていてもよい、実施形態 9 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 11

D が、IL - 2、IL - 7、IL - 9、IL - 10、IL - 15、IL - 21、またはそれらの変異体である、実施形態 9 または 10 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 12

D が、二量体 受容体よりも三量体 受容体に対して選択的結合性を有する IL - 2 変異体であるか、または、三量体 受容体よりも二量体 受容体に対して選択的結合性を有する IL - 2 変異体である、実施形態 11 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 13

D が、IL - 2、IL - 2 N88R、IL - 2 N88D、IL - 2 N88R、C125S、および、IL - 2 N88D、C125S、からなる群から選択される、実施形態 12 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 14

D が、IL - 15、IL - 15 N77A、および、IL - 15 - [N71S、N72A、N77A]、からなる群から選択される、実施形態 9 または 10 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 15

D が、IL - 2、IL - 7、IL - 9、IL - 10、IL - 15、IL - 21、またはそれらの変異体からなる群から選択され、ここで、その N - アルファアミン基は、 $NH_2(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_m$ の付加によって修飾され、ここで、 $m = 2 \sim 6$ 、および、 $p = 0 \sim 1000$ である、実施形態 9 または 10 に記載のリンカー - タンパク質。

実施形態 16

D が、IL - 2、または IL - 2 変異体である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載のコンジュゲートにより対象を処置することからなる、対象において、Treg 細胞を選択的に増殖させる方法。

実施形態 17

10

20

30

40

50

Dが、IL-15、またはIL-15変異体である、実施形態1~3のいずれかに記載のコンジュゲートにより対象を処置することからなる、対象において、CD8+エフェクターT細胞を選択的に増殖させる方法。

実施形態18

実施形態1~8のいずれかに記載のコンジュゲートを投与することを含む、そのような治療を必要とする対象における、疾患または病気を治療する方法。

実施形態19

疾患または病気が、自己免疫疾患、寛容原性CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺制御性T細胞の不適切な再構成に関連する慢性移植片対宿主病(cGVHD)；全身性エリテマトーデス；サルコイドーシス；C型肝炎誘発性血管炎；脱毛症；関節リウマチ；炎症性腸疾患；多発性硬化症；または、1型糖尿病である、実施形態18に記載の方法。

10

実施形態20

実施形態1~8のいずれかに記載のコンジュゲートを投与することからなる、そのような治療を受けている対象における、免疫療法を増強するための方法。

【実施例】

【0126】

以下の実施例は、説明に役立つためのものであり、本開示の範囲を限定するものではない。その中で引用されているすべての参考文献は、それらの開示の特定の態様として、特にそれらの態様および一般的なものとして、引用されているものを含め、参照により本明細書に組み込まれる。

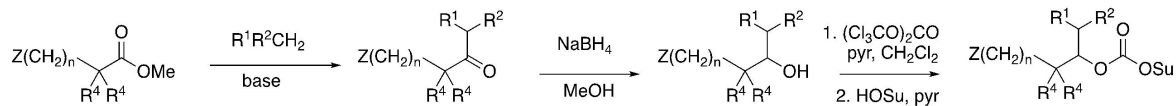
20

【0127】

製造A

Sが存在しない、式(IIa)のリンカー

【化12】



Sが存在しない式(IIa)のリンカーを、以下の一般的な手法に従って製造した。一方法において、基ZおよびR⁴を含むエステルを、塩基の、典型的にはカリウムtert-ブトキシドまたはカリウムtert-ペントキシドの存在下、R¹R²CH₂と縮合させて、中間体ケトンを形成し、これを、水素化ホウ素ナトリウムを用いて、アルコールに還元した。次いで、これを、トリホスゲンおよびピリジンとの反応によって活性化して、X=Clである式(IIa)のリンカーを得た。これは、クロロホルメートとN-ヒドロキシスクシンイミドとの反応により、X=スクシンイミジルオキシに、さらに変換することができた。別の方法において、最初の縮合は、まず、R¹R²CH₂を、ブチルリチウム、リチウムジイソプロピルアミド、または金属化ヘキサメチルジシラザンなどの強塩基と反応させ、次に、得られたR¹R²CH⁻カルバニオンをエステルで処理して、同様のケトン中間体を生成することによって、実施した。いくつかの具体的な例を以下に示す。

30

【0128】

(1) 4-アジド-1-シアノ-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式(I)において、n=1、R¹=CN、R²=H、R⁴=CH₃、Z=N₃、および、X=スクシンイミジルオキシ)

40

1Mのカリウムtert-ブトキシドのTHF溶液(3.5mL、3.5mmol)を、-30℃で、メチル3-アジド-2,2-ジメチルプロピオネート(Kim, Synthetic Communicationsに従って調製；300mg、1.9mmol)、およびアセトニトリル(0.365mL、7.0mmol)のTHF7mLの溶液に加えた。混合物を-30℃で30分間攪拌し、次いで、1時間で周囲温度まで昇温し、さらに30分間攪拌した。混合物を氷で冷却し、6NのHCl(0.62mL、3.7mmol)を加えてクエンチし、次に、EtOAcと水で分液した。水相をEtOAcで2回抽出し、合わせた有機物を

50

食塩水で洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥し、濾過し、そして、濃縮して、粗製のケトンを得た。

【0129】

水素化ホウ素ナトリウム (33 mg、0.88 mmol) を、粗製のケトン (300 mg、約 1.75 mmol) のメタノール 7 mL の溶液に加えた。次いで、混合物を 15 分間攪拌し、6 N の HCl (0.7 mL) を加えることによりクエンチし、EtOAc と水で分液した。水相を EtOAc で 2 回抽出し、合わせた有機物を食塩水で洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥し、濾過し、そして、濃縮して、粗製のアルコールを得た。 SiO_2 (20 ~ 40% の EtOAc / ヘキサン) で精製することにより、4 - アジド - 1 - シアノ - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ブタノール (142 mg、0.85 mmol) を得た。

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) d 3.83-3.92 (m, 1H), 3.43 (d, J=12.1 Hz, 1H), 3.21 (d, J=12.1 Hz, 1H), 2.41-2.62 (m, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H).

10

【0130】

ピリジン (136 μ L、1.7 mmol) を、氷冷した、4 - アジド - 1 - シアノ - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ブタノール (142 mg、0.85 mmol) 、およびトリホスゲン (425 mg、1.44 mmol) の THF 8 mL の溶液に、滴下して加えた。得られた懸濁液を周囲温度まで昇温し、15 分間攪拌し、次いで、濾過し、濃縮して、粗製のクロロホルメートを得た。これを 8 mL の THF に溶解し、氷冷し、N - ヒドロキシスクシンイミド (291 mg、2.5 mmol) 、およびピリジン (204 μ L、2.53 mmol) で処理した。得られた懸濁液を周囲温度まで昇温し、15 分間攪拌し、次いで、EtOAc と 5% $KHSO_4$ で分液した。水相を EtOAc で 2 回抽出し、合わせた有機物を食塩水で洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥し、濾過し、そして、濃縮して、粗製のスクシンイミジルカーボネートを得た。 SiO_2 (20 ~ 40% の EtOAc / ヘキサン) で精製することにより、4 - アジド - 1 - シアノ - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ブチル スクシンイミジルカーボネート (174 mg、0.56 mmol) を得た。

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) d 5.03 (dd, J=7.0, 5.1, 1H), 3.27-3.41 (m, 6H), 3.43 (d, J=12.1 Hz, 1H), 3.21 (d, J=12.1 Hz, 1H), 2.41-2.62 (m, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H).

20

【0131】

(2) 4 - アジド - 1 - ((N, N - ジメチルアミノ) スルホニル) - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ブチル スクシンイミジルカーボネート (式 (I) において、 $n = 1$ 、 $R^1 = SO_2N(CH_3)_2$ 、 $R^2 = H$ 、 $R^4 = CH_3$ 、 $Z = N_3$ 、および、 $X =$ スクシンイミジルオキシ)。

30

1.43 M の n - ブチルリチウムのヘキサン溶液 (70 mL、100 mmol) を、不活性雰囲気下、 $-50^\circ C$ に保った、N, N - ジメチルメタンスルホンアミド (12.33 g、100 mmol) の無水 THF 200 mL の攪拌溶液に加えた。混合物を 1 時間で $-20^\circ C$ に昇温し、次いで、 $-50^\circ C$ に再冷却した後、メチル 3 - アジド - 2 , 2 - ジメチルプロピオネート (Kim, Synthetic Communications に従って調製; 7.70 g、50 mmol) を加えた。混合物を 2 時間で $+10^\circ C$ に昇温し、次いで、20 mL の 6 N の HCl でクエンチした。混合物を、メチル t - ブチルエーテル (MTBE、200 mL) で希釈し、水 100 mL で 2 回、および食塩水 100 mL で 1 回、洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥し、濾過し、濃縮して、粗製のケトン生成物 14.05 g を得た。0、20、30、40、および 50% の EtOAc / ヘキサンの段階グラジエントを用いた SiO_2 (220 g) のクロマトグラフィーにより精製して、結晶固体として、4 - アジド - 1 - ((N, N - ジメチルアミノ) スルホニル) - 3 , 3 - ジメチル - 2 - ブタノン (10.65 g、86%) を得た。

40

【0132】

上記のケトンメタノール 200 mL に溶解し、氷冷し、水素化ホウ素ナトリウム (0.96 g、2.5 mmol) で 15 分間処理した後、4 mL の 6 N の HCl でクエンチし、濃縮した。得られたスラリーをメチル t - ブチルエーテル (MTBE、200 mL) で希釈し、水 100 mL で 1 回、食塩水 100 mL で 1 回、洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥し、濾

50

過し、濃縮して、10.0 gの結晶の4-アジド-1-((N,N-ジメチルアミノ)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブタノールを得た。

【0133】

ピリジン(10.6 mL、132 mmol)を、N-ヒドロキシスクシンイミド(6.90 g、60 mmol)、およびトリホスゲン(5.93 g、20 mmol)の、氷冷したジクロロメタン250 mLの攪拌混合物に、10分に加えた。混合物を氷冷で15分間攪拌し、次いで、30分で周囲温度まで昇温した。4-アジド-1-((N,N-ジメチルアミノ)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブタノール(10.0 g、40 mmol)のジクロロメタン20 mLの溶液を加え、混合物を周囲温度で1時間さらに攪拌した。氷冷した後、混合物を、水100 mLで処理し、相を分離した。有機相を、水で2回、5% KHSO₄で1回、および食塩水で1回、洗浄し、MgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。粗生成物を、100 mLの30% EtOAc/ヘキサンから結晶化して、白色の結晶固体として、4-アジド-1-((N,N-ジメチルアミノ)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(11.1 g、71%)を得た。(3) これらの手法に従って製造した、さらなる式(I)の化合物は、以下のものが挙げられる。

10

4-アジド-1-(メチルスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2CH_3$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

4-アジド-1-((4-メチルピペリジニル)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2N(CH_2CH_2)_2CHCH_3$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。LC/MSは[M+H]⁺=446.15を示す。

20

4-アジド-1-(フェニルスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2Ph$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

4-アジド-1-(4-クロロフェニルスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2PhCl$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

4-アジド-1-(4-ホルリノスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2N(CH_2CH_2)_2O$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

30

4-アジド-1-(イソプロピルスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2CH(CH_3)_2$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

4-アジド-1-((N-エチル-N-メチルアミノ)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2N(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

4-アジド-1-((N,N-ビス(2-メトキシエチル)アミノ)スルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2N(CH_2CH_2OCH_3)_2$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

40

4-アジド-1-(4-メチルフェニルスルホニル)-3,3-ジメチル-2-ブチルスクシンイミジルカーボネート(式Iにおいて、 $n=1$ 、 $R^1=SO_2PhCH_3$ 、 $R^2=H$ 、 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 、および、 $X=$ スクシンイミジルオキシ)。

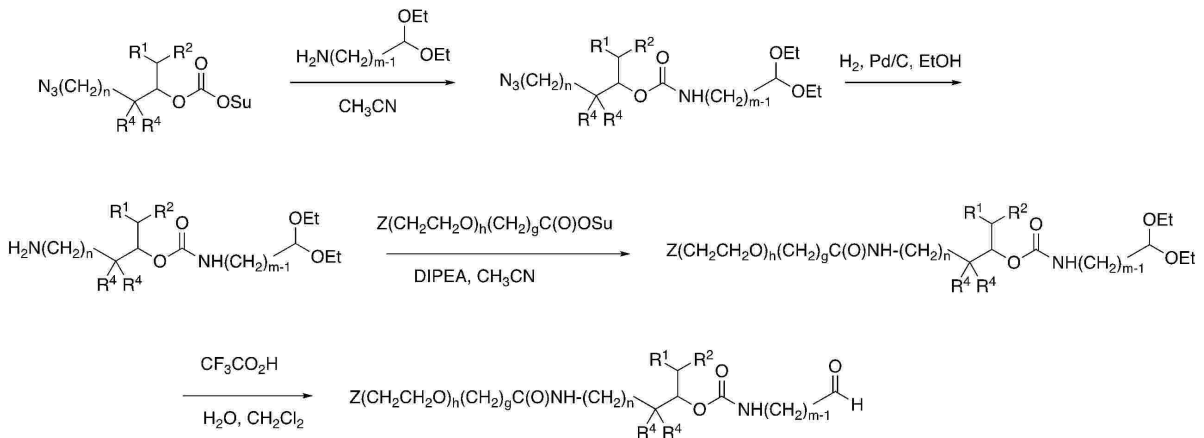
Sが存在せず、各R⁴がHである、式(I)の化合物を、Santi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109(16): 6211-6に従って、製造した。

【0134】

製造B

50

$S = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、および、 $X = \text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_{(m-1)}\text{CHO}$ である、式 (I I a) のリンカー
【化 1 3】



10

$S = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、および、 $X = \text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_{(m-1)}\text{CHO}$ である、式 (I I a) のリンカーを、以下のように製造した。一方法において、 Z がアジドであり、 S が存在せず、 $X = \text{スクシンイミジルオキシ}$ である式 (I I a) のリンカーを、 R がアルキルであるアミン - アセタール $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_{m-1}\text{CH}(\text{OR})_2$ と反応させ、アジドカルバメートアセタールを得た。パラジウム触媒での触媒的水素化、または、水の存在下でのトリメチルホスフィンによるシュタウディング還元いずれかにより、アジド基をアミンに還元し、続いて、スパーサー - スクシンイミジルエステル $Z - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{C}(\text{O})\text{OSu}$ を加えて、アセタール保護の形態のリンカーを得た。次いで、酸性条件下でのアセタールの加水分解により、 $S = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_h(\text{CH}_2)_g\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、および、 $X = \text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p(\text{CH}_2)_{(m-1)}\text{CHO}$ である、式 (I I a) のリンカーを得た。具体例は次のとおりである。

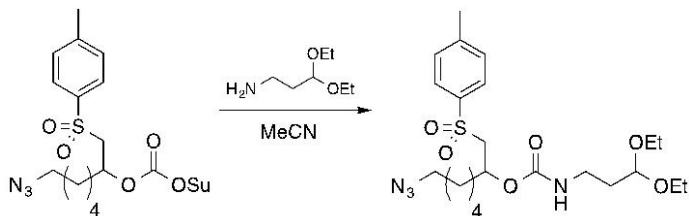
20

【 0 1 3 5】

7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサベンタデカンアミド) - 1 - (4 - フェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル $\text{N} - (3 - \text{オキシプロピル })$ カルバメート (式 I I a において、 $Z = \text{N}_3$ 、 $S = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $n = 5$ 、 $R^1 = (4 - \text{メチルフェニル }) \text{SO}_2$ 、 $R^2 = \text{H}$ 、各 $R^4 = \text{H}$ 、および、 $X = \text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$))

30

【化 1 4】



40

(1) 7 - アジド - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル $\text{N} - (3 , 3 - \text{ジエトキシプロピル })$ カルバメート

7 - アジド - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチルスクシンイミジルカーボネート (1 2 5 m g 、 2 7 7 μmol 、 最終濃度 5 0 m M) (Santi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109(16): 6211-6) を、5 . 5 m L の Me C N に溶解し、1 - アミノ - 3 , 3 - ジエトキシプロパン (5 4 μL 、 0 . 3 3 m m o l 、 最終濃度 6 0 m M) を加えた。反応混合物を周囲温度で攪拌した。1 5 分以内に、T L C の判断により、出発のカーボネートが完全に消費された。反応混合物を、1 0 0 m L の 1 : 1 の Et O A c : N a H C O 3 (飽和水溶液) で分液した。水層を 4 0 m L の Et O A c で抽出し

50

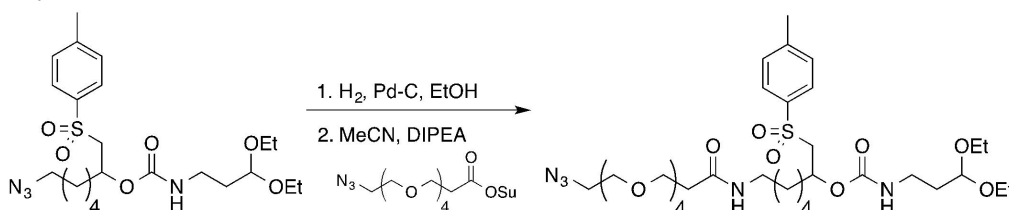
た。合わせた有機層を、水、 KHSO_4 (5%水溶液)、水および食塩水 (各 $1 \times 30 \text{ mL}$) で、順次に洗浄した。有機相を分離し、 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮して、 109 mg (粗 81%) の表題の化合物を、無色の油として得て、これをさらに精製することなく次の工程ですべて使用した。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.76 (d, $J=8.1 \text{ Hz}$, 2H), 7.33 (d, $J=8.1 \text{ Hz}$, 2H), 5.04 (quin, $J=6.8 \text{ Hz}$, 1H), 4.91 (t, $J=5.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.49 (t, $J=5.2 \text{ Hz}$, 1H), 3.62 (m, 2H), 3.37-3.53 (m, 3H), 3.10-3.25 (m, 5H), 2.42 (s, 3H), 1.74 (q, $J=5.8 \text{ Hz}$, 2H), 1.63 (br q, $J=5.7 \text{ Hz}$, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.30 (br m, 4H), 1.17 (td, $J=7.0$, 2.1 Hz, 6H).

LC-MS (m/z): calc, 529.2; obsd, 529.6 $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$.

【0136】

【化15】



(2) 7 - (15 - アジド - 4, 7, 10, 13 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3, 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート

7 - アジド - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3, 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート (109 mg 、 $225 \mu\text{mol}$ 、最終濃度 0.1 M) を、 2.3 mL の無水 EtOH に溶解した。パラジウム炭素 (10%、活性化、 109 mg) を加えた。反応フラスコをゴム製セプタムで密閉し、次いで、排気し、水素ガスを充填した (3x)。反応混合物を、 H_2 (バルーン) の雰囲気下、周囲温度で、激しく撹拌した。90分後、TLCの判断により、出発物質は完全に消費された。反応混合物を、セライトの短いピペットプラグを通して濾過し、パッドを 10 mL の EtOH で洗浄した。濾液を濃縮して乾燥して、 90 mg の中間体アミンを、無色の油として得て、これをさらに精製することなく次の工程ですべて使用した。

粗製の 7 - アミノ - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3, 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート (90 mg 、最大 0.20 mmol 、最終濃度 0.1 M) を、 2.0 mL の MeCN に溶解した。スクシンイミジル 15 - アジド - 4, 7, 10, 13 - テトラオキサペンタデカノエート (93 mg 、 0.24 mmol 、最終濃度 0.12 M)、および DIPEA ($42 \mu\text{L}$ 、 0.22 mmol) を加え、反応物を、周囲温度で撹拌し、TLCでモニタリングした。1時間後、反応混合物を、 60 mL の 1 : 1 の $\text{EtOAc} : \text{NaHCO}_3$ (飽和水溶液) で分液した。有機層を、水、クエン酸 (10%水溶液)、水および食塩水 (各 $1 \times 30 \text{ mL}$) で、順次に洗浄した。有機相を、分離し、 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮して乾燥した。粗生成物を、 CH_2Cl_2 中アセトンの段階的勾配: 0%、10%、20%、30%、40%および50% (各 30 mL) で溶出する、 4 g の Siliasep カラムで精製した。精製された生成物を含む画分を合わせて濃縮し、表題の化合物 (68 mg 、 $93 \mu\text{mol}$ 、2工程で 41%) を、無色の油として得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.76 (d, $J=8.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.32 (d, $J=8.1 \text{ Hz}$, 2H), 6.60 (br t, $J=5.8 \text{ Hz}$, 1H), 4.95-5.08 (m, 2H), 4.50 (br t, $J=4.9 \text{ Hz}$, 1H), 3.56-3.74 (m, 18H), 3.40-3.52 (m, 3H), 3.36 (t, $J=5.1 \text{ Hz}$, 2H), 3.10-3.26 (m, 5H), 2.44 (t, $J=5.8 \text{ Hz}$, 2H, obscured), 2.42 (s, 3H), 1.74 (q, $J=6.0 \text{ Hz}$, 2H), 1.62 (br s, 2H), 1.43 (br m, 2H), 1.26 (br s, 4H), 1.17 (td, $J=7.0$, 2.3 Hz, 6H).

LC-MS (m/z): calc, 776.4; obsd, 776.7 $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$.

10

20

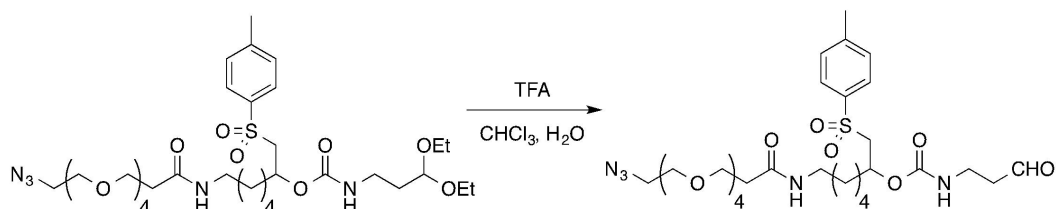
30

40

50

【 0 1 3 7 】

【 化 1 6 】



(3) 7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3 - オキシプロピル) カルバメート

10

7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3 , 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート (6 8 m g , 9 3 μ m o l , 最終濃度 0 . 1 M) を、 0 . 6 2 m L の C H C l ₃ に溶解した。水および T F A (各 0 . 1 6 m L) を、順次に加えた。反応混合物を周囲温度で激しく攪拌した。2 時間後、 T L C の判断により、出発物のアセタールは完全に消費された。反応混合物を濃縮して乾燥し、次いで、 C H ₂ C l ₂ 中アセトンの段階的勾配 : 0 % , 1 5 % , 3 0 % , 4 5 % , 6 0 % および 7 5 % (各 3 0 m L) で溶出する、 4 g の S i l i a S e p カラムで精製した。精製された生成物を含む画分を合わせて濃縮し、表題の化合物 (2 6 m g , 4 0 μ m o l , 4 3 %) を、無色の油として得た。

20

¹H NMR (3 0 0 M H z , C D C l ₃) 9 . 7 8 (s , 1 H) , 7 . 7 8 (d , J = 8 . 3 H z , 2 H) , 7 . 3 6 (d , J = 8 . 0 H z , 2 H) , 6 . 6 0 (b r s , 1 H) , 5 . 0 9 (m , 1 H) , 4 . 9 8 (t , J = 6 . 0 H z , 1 H) , 3 . 6 2 - 3 . 7 5 (m , 1 6 H) , 3 . 3 6 - 3 . 4 4 (m , 5 H) , 3 . 1 3 - 3 . 2 6 (m , 3 H) , 2 . 7 0 (t , J = 5 . 7 H z , 2 H) , 2 . 4 7 (t , J = 5 . 7 H z , 2 H , obscured) , 2 . 4 5 (s , 3 H) , 1 . 6 3 (b r s , 2 H) , 1 . 4 6 (b r t , J = 6 . 6 H z , 2 H) , 1 . 2 9 (m , 4 H) . L C - M S (m / z) : calc , 6 5 6 . 3 ; obsd , 6 5 6 . 6 [M - H] ⁻ ; calc , 7 0 2 . 3 ; obsd , 7 0 2 . 6 [M + H C O ₂] ⁻ ; calc , 7 3 4 . 3 ; obsd , 7 3 4 . 7 [M + C H ₃ O H + H C O ₂] ⁻ .

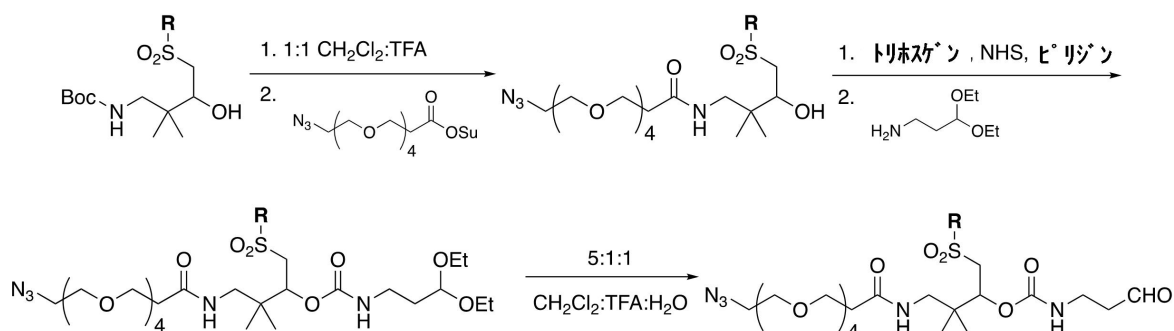
【 0 1 3 8 】

第 2 の方法において、 Z = B o c - アミノ、 S = 不存在、および、 X = O H である、式 (I I a) のリンカーを、同様の一連の工程を経て実施したが、ただし、 B o c 基は最初に酸性処理下で除去し、スパーサー - スクシンイミジルエステル Z - (C H ₂ C H ₂ O) _h (C H ₂) _g C (O) O S u が付加された。次いで、アルコールを、トリホスゲンおよびピリジンとの反応により活性化し、得られたクロロホルメートを、 R がアルキルであるアミン - アセタール H ₂ N - (C H ₂) _{m - 1} C H (O R) ₂ と反応させ、アセタール保護リンカーを得た。次に、酸性条件下でのアセタールの加水分解により、 S = (C H ₂ C H ₂ O) _h (C H ₂) _g C (O) N H 、および、 X = N H (C H ₂ C H ₂ O) _p (C H ₂) _(m - 1) C H O である、式 (I I a) のリンカーを得た。具体例は次のとおりである。

30

【 0 1 3 9 】

【 化 1 7 】



40

1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - フェニルスルホニル - 1 5 - オキシ - 3 , 6

50

, 9, 12 - テトラオキサ - 16 - アザイコサン - 19 - イル (3 - オキソプロピル) カルバメート (式 I I a において、 $Z = N_3$ 、 $S = (CH_2CH_2O)_4(CH_2)_2C(O)NH$ 、 $n = 1$ 、 $R^1 = \text{フェニルSO}_2$ 、 $R^2 = H$ 、各 $R^4 = \text{メチル}$ 、 $X = NH(CH_2)_2CHO$)

工程 1 および 2

1 - アジド - 18, 18 - ジメチル - 20 - フェニルスルホニル - 15 - オキソ - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサ - 16 - アザ - 19 - イコサノール

トリフルオロ酢酸 (1 mL) を、4 - [(tert - ブトキシカルボニル) アミノ] - 1 - フェニルスルホニル - 3, 3 - ジメチル - 2 - ブタノール (58% w/w 混合物の 124 mg; 72 mg, 0.20 mmol、最終濃度 0.1 M) の 1 mL の CH_2Cl_2 溶液に加えた。反応物を周囲温度で攪拌し、TLC (ヘキサン中 40% EtOAc、モリブデン酸セリウム染色) によってモニタリングした。10 分後、TLC によって、出発物質が単一のより極性の高いスポットに変換された。反応物を濃縮して乾燥し、残留揮発性物質を高真空下で除去して、中間体アミンを、白色のフィルムとして得た。中間体を、1.8 mL の MeCN に溶解し、DIPEA (0.17 mL, 1.0 mmol) を加えた。無溶媒のアジド - PEG₄ - OSu (78 mg, 0.2 mmol) を加えた。反応物を、周囲温度で攪拌し、C18 - HPLC (ELSD) によってモニタリングした。アジド - PEG₄ - OSu は、5 分以内に、単一のより速く移動する HPLC ピークに完全に変換された。次いで、反応物を濃縮して乾燥し、4 g の SiliaSep シリカゲルカラムに載せた。生成物を、 CH_2Cl_2 中アセトンの段階的勾配 (0%、10%、20%、30%、アセトン; 各段階 30 mL) で溶出した。C18 - HPLC により判断して、精製された生成物を含む画分を合わせ、濃縮して乾燥した。残留揮発性物質を高真空下で除去して、表題の化合物 (85 mg, 0.16 mmol、2 工程の収率 80%) を、無色の油として得た。C18 - HPLC、純度は ELSD によって決定した: 98.2% (RV = 9.12 mL)。

【0140】

工程 3

1 - アジド - 18, 18 - ジメチル - 20 - フェニルスルホニル - 15 - オキソ - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサ - 16 - アザイコサン - 19 - イル (3, 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート

N - ヒドロキシスクシンイミド (92 mg, 0.80 mmol) を、N₂ 下、トリホスゲン (0.24 g, 0.80 mmol) の 8.0 mL の無水 THF 溶液に加えた。ピリジン (77 μ L, 0.96 mmol) を滴下して加えると、すぐに白い沈殿物が形成された。懸濁液を、周囲温度で 15 分間攪拌し、次いで、綿栓を通して濾過した。濾液を濃縮して乾燥し、1.6 mL の無水 THF に再溶解した。1 - アジド - 18, 18 - ジメチル - 20 - フェニルスルホニル - 15 - オキソ - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサ - 16 - アザ - 19 - イコサノール (86 mg, 0.16 mmol, 0.1 M) の 1 mL の無水 THF 溶液を加えた。反応物を周囲温度で攪拌し、C18 - HPLC (ELSD) によってモニタリングした。1 時間後、出発物のアルコールが消費された。反応混合物を 50 mL の 1:1 の EtOAc : KHSO₄ (5% 水溶液) で分液した。層を分離し、有機相を、KHSO₄ (5% 水溶液)、水、NaHCO₃ (飽和水溶液) および食塩水 (各 25 mL) で、順次に洗浄した。洗浄した有機相を、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。粗製のスクシンイミジルカーボネートを、1.6 mL の無水 THF に溶解し、1 - アミノ - 3, 3 - ジエトキシプロパン (86 μ L, 0.53 mmol) を加えた。反応物を、周囲温度で攪拌し、C18 - HPLC (ELSD) によってモニタリングした。25 分後、スクシンイミジルカーボネートは、2 つのより遅く溶出する生成物のピークに変換された。反応混合物を、30 mL の 1:1 の EtOAc : 酢酸ナトリウム (0.2 M, pH 5.0) で分液した。層を分離し、有機相を、水および食塩水 (各 15 mL) で、順次に洗浄した。洗浄した有機相を、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。残留揮発性物質を高真空下で除去して、粗

10

20

30

40

50

製の表題の化合物 (1 0 5 m g、0 . 1 5 m m o l、2 工程の粗収率 9 4 %) を、黄色の油として得た。

【 0 1 4 1 】

工程 4

1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - フェニルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 - オキソプロピル) カルバメート

水 (0 . 2 1 m L) および T F A (0 . 2 1 m L) を、1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - フェニルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 , 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート (1 0 5 m g、0 . 1 5 m m o l、最終濃度 0 . 1 M) の、1 . 1 m L の C H ₂ C l ₂ 溶液に、順次に加えた。反応物を、周囲温度で攪拌し、C 1 8 - H P L C (E L S D) によってモニタリングした。1 0 分後、反応が完了したと判断された。混合物を濃縮して乾燥させた。濃縮物を、S i l i a S e p 4 g シリカゲルカラムに載せ、生成物を、C H ₂ C l ₂ 中アセトンの段階的勾配 (0 %、2 0 %、4 0 %、6 0 % アセトン、各段階 3 0 m L) で溶出した。画分は T L C (モリブデン酸セリウム染色) で分析した。精製された生成物を含む画分を合わせ、濃縮して乾燥した。残留揮発性物質を高真空下で除去して、表題の化合物 (3 4 m g、5 4 μ m o l、収率 3 6 %) を、無色の油として得た。生成物を、5 . 0 m L の G i b c o H ₂ O (0 . 0 1 M 質量) に溶解した。C 1 8 - H P L C、純度は E L S D によって決定した : 9 9 . 0 % (R V = 8 . 7 6 m L)。

【 0 1 4 2 】

1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - メチルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 - オキソプロピル) カルバメート (式 I I a において、Z = N ₃、S = (C H ₂ C H ₂ O) ₄ (C H ₂) ₂ C (O) N H、n = 1、R ¹ = M e S O ₂、R ² = H、各 R ⁴ = メチル、および、X = N H (C H ₂) ₂ C H O)

工程 3

1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - メチルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 , 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート

N - ヒドロキシスクシンイミド (9 8 m g、0 . 8 5 m m o l) を、N ₂ 下、トリホスゲン (0 . 2 5 g、0 . 8 5 m m o l) の 8 . 5 m L の無水 T H F 溶液に加えた。ピリジン (8 2 μ L、1 . 0 m m o l) を滴下して加えると、すぐに白い沈殿物が形成された。懸濁液を、周囲温度で 1 5 分間攪拌し、次いで、綿栓を通して濾過した。濾液を濃縮して乾燥し、2 m L の無水 T H F に再溶解した。1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - メチルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザ - 1 9 - イコサノール (8 0 m g、0 . 1 7 m m o l、0 . 0 6 M) の 1 m L の無水 T H F 溶液を加えた。反応物を周囲温度で攪拌し、C 1 8 - H P L C (E L S D) によってモニタリングした。2 時間後、出発物のアルコールが消費された。反応混合物を 5 0 m L の 1 : 1 の E t O A c : K H S O ₄ (5 % 水溶液) で分液した。層を分離し、洗浄した有機相を、K H S O ₄ (5 % 水溶液)、水、N a H C O ₃ (飽和水溶液) および食塩水 (各 2 5 m L) で、順次に洗浄した。有機相を、M g S O ₄ で乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。粗製のスクシンイミジルカーボネート (9 1 m g) を、2 m L の無水 T H F に溶解し、1 - アミノ - 3 , 3 - ジエトキシプロパン (6 1 μ L、0 . 3 7 m m o l) を加えた。反応物を、周囲温度で攪拌し、C 1 8 - H P L C (E L S D) によってモニタリングした。5 分後、スクシンイミジルカーボネートは、単一のより遅く溶出する生成物のピークに変換された。反応混合物を、3 0 m L の 1 : 1 の E t O A c : 酢酸ナトリウム (0 . 2 M、p H 5 . 0) で分液した。層を分離し、有機相を、水および食塩水 (各 1 5 m L) で、順次に洗浄した。洗浄した有機相を、M g S O ₄ で乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。残留揮発性物質を高真空下で除去して、粗

製の表題の化合物 (6 1 m g、9 5 μ m o l、2 工程の粗収率 5 6 %) を、黄色の油として得た。

【 0 1 4 3 】

工程 4

1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - メチルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 - オキシプロピル) カルバメート

水 (1 3 5 μ L) および T F A (1 3 5 μ L) を、1 - アジド - 1 8 , 1 8 - ジメチル - 2 0 - メチルスルホニル - 1 5 - オキソ - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサ - 1 6 - アザイコサン - 1 9 - イル (3 , 3 - ジエトキシプロピル) カルバメート (6 1 m g、9 5 μ m o l、最終濃度 0 . 1 M) の、0 . 6 8 m L の C H ₂ C l ₂ 溶液に、順次に加えた。反応物を、周囲温度で攪拌し、C 1 8 - H P L C (E L S D) によってモニタリングした。2 5 分後、反応が完了したと判断された。混合物を濃縮して乾燥させた。濃縮物を S i l i a S e p 4 g シリカゲルカラムに載せ、生成物を、C H ₂ C l ₂ 中アセトンの段階的勾配 (0 %、2 0 %、4 0 %、6 0 %、8 0 %、1 0 0 % アセトン、各段階 3 0 m L) で溶出した。画分は T L C (モリブデン酸セリウム染色) および C 1 8 - H P L C で分析した。精製された生成物を含む画分を合わせ、濃縮して乾燥した。残留揮発性物質を高真空下で除去して、表題の化合物 (1 2 m g、2 1 μ m o l、収率 2 2 %) を、無色の油として得た。特性評価の後、生成物を、2 . 0 m L の G i b c o H ₂ O (0 . 0 1 M 質量) に溶解した。C 1 8 - H P L C、純度は E L S D によって決定した：9 1 . 3 % (R V = 5 . 6 0 m L)

10

20

(4) これらの方法に従って製造した、さらなる式 (I) の化合物を、以下に挙げる。

7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (4 - フェニルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3 - オキシプロピル) カルバメート (式 I I a において、Z = N ₃、S = (C H ₂ C H ₂ O) ₄ (C H ₂) ₂ C (O) N H、n = 5、R ¹ = P h S O ₂、R ² = H、各 R ⁴ = H、および、X = N H (C H ₂) ₂ C H O)) 。

7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (メチルスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3 - オキシプロピル) カルバメート (式 I I a において、Z = N ₃、S = (C H ₂ C H ₂ O) ₄ (C H ₂) ₂ C (O) N H、n = 5、R ¹ = M e S O ₂、R ² = H、各 R ⁴ = H、および、X = N H (C H ₂) ₂ C H O)) 。

30

7 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 1 - (モルホリノスルホニル) - 2 - ヘプチル N - (3 - オキシプロピル) カルバメート (式 I I a において、Z = N ₃、S = (C H ₂ C H ₂ O) ₄ (C H ₂) ₂ C (O) N H、n = 5、R ¹ = O (C H ₂ C H ₂) ₂ N - S O ₂、R ² = H、各 R ⁴ = H、および、X = N H (C H ₂) ₂ C H O)) 。

5 - (1 5 - アジド - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラオキサペンタデカンアミド) - 3 , 3 - ジメチル - 1 - (チオモルホリノスルホニル) - 2 - ペンチル N - (3 - オキシプロピル) カルバメート (式 I I a において、Z = N ₃、S = (C H ₂ C H ₂ O) ₄ (C H ₂) ₂ C (O) N H、n = 1、R ¹ = S (C H ₂ C H ₂) ₂ N S O ₂、R ² = H、各 R ⁴ = メチル、および、X = N H (C H ₂) ₂ C H O)) 。

40

【 0 1 4 4 】

実施例 1

I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] の製造と活性

I L - 2 [N 8 8 R , C 1 2 5 S] は、H E K 細胞での発現によって製造した。細胞ベースの受容体結合アッセイを実施して、I L - 2 受容体の高親和性 三量体 (T r e g) および中親和性 二量体 (T e f f) の形態に対する、変異体 (mutein) の活性を評価した (表 1) 。変異体は、I L - 2 よりも I L - 2 R に 6 倍弱く結合するだけであるが、I L - 2 R には約 9 0 0 倍弱く結合する。重要なことに、変異体は、I L - 2 R 対 I L - 2 R について 3 , 0 0 0 倍以上選択的である。

50

【0145】

IL-2R 結合のためのU2OS細胞ベースのアッセイキットを、製造業者の指示に従って実施した(DiscerX、Part#93-1003E3CP0)。細胞を、96ウェルアッセイプレートに100 μ L(～10,000細胞/ウェル)で播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で、24時間増殖させた。次いで、細胞を、WT IL-2、IL-2 N88R、C125S、または、pH9.4でマイクロスフェアから放出されたIL-2 N88R、C125S、のいずれかの希釈系により、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で、6時間処理した。11個のWT IL-2濃度が、2pg/mL～100ng/mL(0.1pM～6nM)でアッセイされた。11個の、IL-2 N88R、C125S濃度、および、放出IL-2 N88R、C125S濃度が、200pg/mL～10 μ g/mL(10pM～600nM)でアッセイされた。処理した細胞を、化学発光基質とともに、暗所において周囲温度で、1時間インキュベートし、次いで、発光を、Spectramax i3プレートリーダーで、250msの積算時間で読み取った。

10

【0146】

IL-2R 結合のためのU2OS細胞ベースのアッセイキットを、製造業者の指示に従って実施した(DiscerX、Part#93-0998E3CP5)。細胞を、96ウェルアッセイプレートに50 μ L(～5,000細胞/ウェル)で播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で48時間増殖させた。次いで、細胞を、WT IL-2、IL-2 N88R、C125S、または、pH9.4でマイクロスフェアから放出されたIL-2 N88R、C125S、のいずれかの希釈系により、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で、6時間処理した。11個のWT IL-2濃度が、17pg/mL～1 μ g/mL(1pM～61nM)でアッセイされた。11個のIL-2 N88R、C125S濃度が、1.7ng/mL～100 μ g/mL(100pM～6 μ M)でアッセイされた。11個の放出残留IL-2 N88R、C125S濃度が、170pg/mL～10 μ g/mL(10pM～600nM)でアッセイされた。処理した細胞を、化学発光基質とともに、暗所において周囲温度で、1時間インキュベートし、次いで、発光を、Spectramax i3プレートリーダーで、250msの積算時間で読み取った。

20

【0147】

これらの測定の結果を、図2および表1に示す。

表1. 受容体および 受容体を含む細胞への、IL-2およびIL-2 N88R、C125Sの結合

30

【表1】

	$\alpha\beta\gamma$ EC50, nM	$\beta\gamma$ EC50, nM	倍一変化
WT IL-2	0.10	2.0	21
IL-2 N88R, C125S	0.55	1,849	3367
倍一変化	6	918	

40

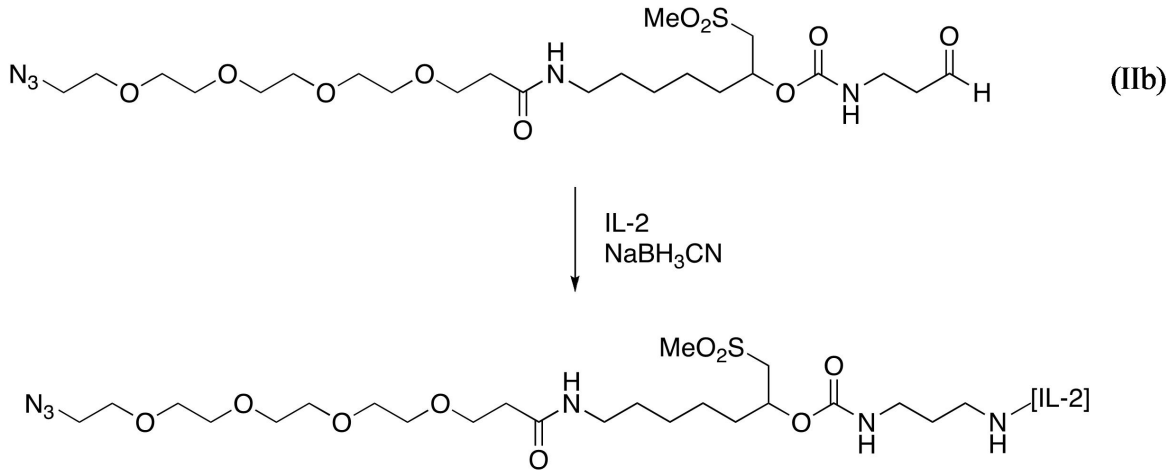
【0148】

実施例2

サイトカイン還元的アルキル化の最適化

50

【化18】



10

リンカーの結合は、IL-2のN末端アミノ基の還元的アルキル化によるものとした。200 μ MのIL-2 N88R, C125Sを、10 mMのNaCNBH₃の存在下、式(IIb)のリンカー試薬(すなわち、式(IIa))において、R¹ = MeSO₂、R² およびR⁴ = H、S = (CH₂CH₂O)_h(CH₂)_gC(O)NH、および、X = NH(CH₂CH₂O)_p(CH₂)_(m-1)CHO、ここで、h = 4、g = 2、p = 0、およびm = 3である、リンカー)の濃度系列で処理した。N₃基を、PEG-シクロオクチンDBCO-PEG₅kDaと反応させて、PEG結合によるゲルシフトを誘導した後、反応物を、SDS-PAGEで分析した。1.5 : 1のリンカー : タンパク質の比率が最適であることがわかり、58 : 34 : 5 : 3の未修飾タンパク質 : シングルリンカー - タンパク質 : ダブルリンカー - タンパク質 : トリプルリンカー - タンパク質の混合物が得られた(表2)。図3は、Image Jで定量化したゲルバンドの結果を示している。C125S(200 μ M)を、1、1.5、2、または3当量(Eq.)のリンカー-CHO(Mod = MeSO₂)、および10 mMのNaCNBH₃で、50 mMのMES、150 mMのNaCl中、pH 6.0、周囲温度で20時間、処理した。

20

表2. IL-2 N88R, C125Sの還元的アルキル化によるリンカー-タンパク質生成物の分布

30

【表2】

リンカー当量	未修飾	シングルリンカー	ダブルリンカー	トリプルリンカー
1	66	30	4	0
1.5	58	34	5	3
2	52	35	9	4
3	43	38	15	4

40

【0149】

実施例3

リンカー-サイトカインの製造

IL-2 [N88R, C125S]を、2つの方法のうちの1つによって、放出可能なリンカーに結合させた。

【0150】

50

(1) ランダムアシル化

サイトカイン (3.4 mL、4.81 mg/mL、1.00 μmol)、および、1.44 mLの100 mMのHEPES (pH 7.0)の混合物を、4 - アジド - 3, 3 - ジメチル - 1 - (イソプロピルスルホニル) - 2 - プチルスクシンイミジルカーボネート [式 (II) において、 $R^1 = \text{iPrSO}_2$ 、 $R^2 = \text{H}$ 、 $R^4 = \text{Me}$ 、 $Z = \text{N}_3$ 、 $n = 1$ ； $S =$ 不存在；および、 $X =$ スクシンイミジルオキシ] (156 μL 、アセトニトリル中10 mg/mL、4 μmol)と混合し、4 で20時間保持した。ヒドロキシルアミン (0.55 mL、1 M、pH 7.0)を加え、4 でさらに23時間保持した。混合物を、50 mMのMES、pH 6.0、0.05% Tween-20を使用して、PD-10カラムにアプライし、OD₂₈₀によって1 μmol の回収タンパク質を得た。SDS-PAGEによる分析により、57:31:6:6の、未修飾:1リンカー:2リンカー:3+リンカーの混合物の形成が示された。

【0151】

(2) 還元的アルキル化

還元的アルキル化は、Schneider et al., Bioconjugate Chem (2016) 27: 2534-9 (参照により本明細書に組み込まれる)に記載された方法を用いて、実施した。IL-2 N88R, C125S (最終濃度250 μM 、1.25 μmol 、20.5 mg)の、4.25 mLの50 mMのMES、150 mMのNaCl (pH 6.0) (反応バッファー)の0 の溶液に、O-7-[(15 - アジド - 13, 10, 7, 4 - テトラオキサペンタデカノイル) アミノ] - 1 - (メチルスルホニル) - 2 - ヘプチルN - 3 - オキサプロピルカルバメート [式 (II) において、 $R^1 = \text{MeSO}_2$ 、 $R^2 = \text{H}$ 、 $R^4 = \text{H}$ 、 $Z = \text{N}_3$ 、 $S = (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$]； $n = 4$ ；および、 $X = (\text{CH}_2)_2\text{CHO}$] (最終濃度375 μM 、1.9 μmol 、0.9 mg、0.27 mL)の、20 mMのNaOAc (pH 5.0)、および、NaCNBH₃ (最終濃度10 mM、1 μmol 、0.5 μL)の、反応バッファーの溶液を、加えた。反応を、暗所において周囲温度で、22時間行った。20 mMのMES、150 mMのNaCl、0.05% tween-20、pH 6.0、で平衡化したPD-10カラムを使用して、過剰の試薬を除去した。Amicon Ultra 10, 000 MWカットオフコンセンレーターで濃縮した後、1.85 mL、600 μM (A280による) - 1.1 μmol 、89% - 総ペプチドで、リンカー - N末端アミノプロピル - IL-2 [N88R, C125S]が、回収された。

【0152】

実施例 4

IL2 - および [アミノプロピル] - IL2 - 放出ヒドロゲルマイクロスフェアの製造
マイクロスフェア活性化

式 (IV) のPEGヒドロゲルマイクロスフェア (Henise et al., Engineering Reports (2020) <https://doi.org/10.1002/eng2.12091>に従って調製) (ここで、 P^1 および P^2 が、20 kDaの4 - アームPEGであり； Z^* が、 $Z = \text{N}_3$ および $Z' = 5$ - ヒドロキシシクロオクチンからのトリアゾールであり； $n = 4$ ； $R^{11} = \text{CN}$ ； $R^{12} = \text{H}$ ；各 $R^{14} = \text{H}$ ； $B = \text{NH}_2$ ； $x = 4$ ； $y = 0$ ； $z = 0$ ；および、 $r = 4$ である)を使用した。これらを、以下のようにして、 $B = \text{NH} - \text{CO} - \text{O} - (4 - \text{シクロオクチニル})$ である、式 (IV) に活性化した。15 mLコニカルチューブ内で、 $B = \text{NH}_2$ (4.2 μmol 、 NH_2)であるマイクロスフェアのスラリー1.3 gのMeCN懸濁液に、4 - シクロオクチニルスクシンイミジルカーボネート (5 μmol 、1.2 当量)の1 mLのMeCN溶液、および、N,N - ジイソプロピルエチルアミン (17 μmol 、4 当量)の1 mLのMeCN溶液、を加えた。反応物を、周囲温度で6時間、転倒回転して攪拌した。スラリーを、4 x 12 mLのMeCN、次いで、4 x 12 mLの20 mMのMES、150 mMのNaCl、0.05% tween-20、pH 6.0、で洗浄した。

【0153】

同じ方法を用い、4 - シクロオクチニルスクシンイミジルカーボネートの代わりに、B

10

20

30

40

50

CN-OSu((1R, 8S, 9s) - ビシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチルスクシンイミジルカーボネート)との反応により、 $B = NH_2$ である式(IV)のマイクロスフェアを、 $B = (1R, 8S, 9s) - \text{ビシクロ}[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメトキシ-CO-NH$ である式(IV)のものに、活性化した。

【0154】

リンカー-サイトカインを結合させるために、2gの活性化したマイクロスフェアのスラリーの、20mMのMES、150mMのNaCl、0.05% tween-20、pH6.0の懸濁液を、15mLコニカルチューブ内で、18.3mg(1.1nmol)のリンカー-AP-IL-2 N88R, C125S(ゲルシフトアッセイにより37%のリンカー-IL-2、実施例3)の、1.9mLの同じバッファーの溶液と、混合した。混合物を、250rpmのオービタルシェーカーによって、37で23時間、インキュベートした。スラリーを、上記のバッファー8×12mLで洗浄し、続いて、20mMのMES、250mMのNaCl、0.05% tween-20、pH6.0の4×6mLで、洗浄した。マイクロスフェアの総担持量は、9倍容量の50mMのNaOHにおいて溶解したスラリーの29~32mgアリコートから放出される、AP-IL-2の A_{280} ($\epsilon_{280} = 10,095 M^{-1} cm^{-1}$)により求められ、スラリーにおいて、102nmol IL-2 N88R, C125S $g m^{-1}$ であった。

10

【0155】

PEGヒドロゲルマイクロスフェアを、同じ方法でランダムアシル化(実施例3)によって製造したリンカー-IL-2で担持させ、配列番号3を有するタンパク質で0.11mMに担持された不溶性コンジュゲートを得た。

20

【0156】

実施例5

インピットロ放出速度論

脱離の速度を、実施例4の257mgのマイクロスフェア-IL-2変異体スラリーの、257 μ Lの250mMのNaBorate、0.05%(v/v) tween-20、pH9.4、の液を使用して、エッペンドルフチューブ内において37で、加速放出条件下で、測定した。時間の間隔において、サンプルを37ウォーターバスから取り出し、21,000×gで1分間遠心分離し、100 μ Lの上清の A_{280} を、キュベットベースのUV/Vis分光光度計で測定した。測定後、アッセイした上清を、マイクロスフェアを含むチューブに戻し、37でのインキュベーションを続けた。放出速度を、放出された A_{280} 対(v/s)時間をGraphpad Prismの1次反応速度式に適合させることによって、計算した。脱離が水酸化物イオンで一次であるとの認識より、速度は、pH7.4で、 $k_{pH7.4} = k_{pH} \times 10^{(pH-7.4)}$ として計算した。実施例2のランダムアシル化コンジュゲートからのIL-2[N88R, C125S]の放出プロファイルは、二相性であり、半減期は、pH9.4で、0.4および41時間であり、これは、pH7.4で、40および4100時間に対応する。実施例2の還元的アルキル化コンジュゲートからのAP-IL-2[N88R, C125S]の放出プロファイルは、単相性であり、半減期は、pH9.0で、11時間であり、これは、pH7.4で、440時間に相当する。

30

40

【0157】

実施例6

ラットにおける、ヒドロゲルマイクロスフェアから放出される、IL-2[N88R, C125S]の薬物動態

シリンジ(0.5mL、29ゲージ、固定針、BD)に、無菌条件下で、実施例4のマイクロスフェア-IL-2スラリーを、平均50mgまたは300mg(5nmolまたは30nmol IL-2[N88R, C125S])で、20mMのMES、250mMのNaCl、0.05%(w/v) tween-20、pH6.0からなる投与バッファーにおいて、充填した。各シリンジの内容物を、カニューレを挿入した4匹のオスの平均体重250gのSprague Dawleyラットの側腹部に、皮下投与した。血液

50

サンプル(200 μL)を、0、4、8、24、48、96、168、240、336、408、504、576、および672時間に、採取した。血漿を収集し、プロテアーゼ阻害剤を添加し、分析まで、サンプルを-80℃で凍結した。図4に示すように、実施例2のマイクロスフェアコンジュゲートを使用して、投与後96時間、血漿中に、IL-2(または、NH₂(CH₂)₃-IL-2、「AP-IL2」)が観測された。

【0158】

実施例7

マウスにおける、IL2およびIL2[N88R, C125S]の薬力学

遊離IL-2[N88R, C125S]の薬力学を、NOD(非肥満糖尿病)マウスにおける天然IL-2の薬力学と、比較した。3匹のNODマウスからなる3つの群に、それぞれ、PBSビヒクル、プロロイキン(25,000ユニット、63 μg)、または、IL-2[N88R, C125S](25,000ユニット、63 μg)のいずれかを、5日間連続して、毎日注射した。最後の注射の2時間後にマウスを殺し、脾臓および脾臓をフローサイトメトリー分析のために採取して、T細胞の総数の変化、および脾臓および脾臓におけるそれらの分化、を測定した。

【0159】

IL-2[N88R, C125S]は、脾臓のCD4⁺およびCD8⁺エフェクター/メモリーT細胞にほとんどまたは全く影響を及ぼさなかったが、T細胞集団の増加は両方、天然IL-2において増加した(図5)。

【0160】

NODマウスは、PBSビヒクル、プロロイキン(25,000ユニット)、またはIL-2[N88R, C125S](25,000ユニット)の毎日の注射が与えられ、そして、5日目の最後の注射の2時間後に殺された。脾臓におけるIL-2[N88R, C125S]の薬力学を、図5に示す。

【0161】

天然IL-2およびIL-2[N88R, C125S]はどちらも、PBSビヒクルと比較して、脾臓のT細胞にほとんどまたは全く影響を及ぼさなかった(図6)。マウスをIL-2[N88R, C125S]で処置すると、脾臓の総数が減少したことに注意すべきである。

【0162】

NODマウスは、PBSビヒクル、プロロイキン(25000ユニット)、またはIL-2[N88R, C125S](25000ユニット)の毎日の注射が与えられ、そして、5日目の最後の注射の2時間後に殺された。脾臓におけるIL-2[N88R, C125S]の薬力学を、図6に示す。

【0163】

実施例8

マウスにおける、マイクロスフェア-IL-2[N88R, C125S]から放出される、[アミノプロピル]-IL2[N88R, C125S]の薬物動態/薬力学

6匹のNODマウスの3つの群を用いて、マイクロスフェア-IL-2[N88R, C125S]コンジュゲートから放出された、[アミノプロピル]-IL-2[N88R, C125S]のPK/PDを測定した。第1番目の群には、遊離IL-2[N88R, C125S](25,000ユニット、63 μg)を、1日5回注射した。第2番目の群には、シクロオクチンがN₃(CH₂CH₂O)₇Hでキャップされた、空のマイクロスフェアを、皮下注射で投与した。第3番目の群には、実施例4のマイクロスフェア-IL-2[N88R, C125S](0.5、1、5、10または19 mgのタンパク質/kg)を、単回の皮下注射で投与した。血漿、末梢血単核細胞(PBMC)、および臓器組織を、図の説明の記載に従って、調製し、分析した。T細胞集団の変化をモニタリングするために、リンパ球のフローサイトメトリー分析を行った。脾臓およびリンパ節および脾臓を単離し、単一細胞懸濁液を調製した。フローサイトメトリー用の標準的な細胞表面免疫蛍光染色によって、表面染色を実施した。固定および細胞内染色は、e B i o s c i e n c

10

20

30

40

50

e Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific) のプロトコルに従った。使用した抗体は、CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD45、および FoxP3 に対するものであり；すべて商用販売業者からのものであった。染色した単一細胞懸濁液を、LSRIIFローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して、分析した。

【0164】

図7は、マウスにおける、マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] (「MS - IL - 2 変異体」) から放出された、[アミノプロピル] - IL - 2 [N88R, C125S] の薬物動態を示している。パネルA：BALB/cマウス (n = 6) の側腹部に、28 nmol (19 mg / kg) または 9.9 nmol (6.5 mg / kg) のマイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] を含む、1回の皮下注射投与を行った。31時間の $t_{1/2}$ が測定された。パネルB：NODマウス (n = 6) の側腹部に、マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] を投与した。どちらの場合も、血漿は、Thermofisher ELISA を使用して分析し、IL - 2 [N88R, C125S] の濃度を定量化した。

10

【0165】

マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] での処置は、脾臓およびPBMCの両方において、Foxp3⁺CD4⁺T細胞の大幅な増加をもたらした。脾臓およびPBMCにおいて、T細胞のそれぞれほぼ70%および55%が、Foxp3⁺CD4⁺T細胞であった (図8)。CD8⁺T細胞の割合も、対照と比較して増加した。CD8⁺細胞は、脾臓では11%から25%に、PBMCでは15%から60%に増加した。

20

【0166】

図8Aは、脾臓およびPBMCにおける、Foxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖を示している。図8Bは、脾臓およびPBMCにおける、CD8⁺T細胞の増殖を示している。脾臓およびPBMCに見られるCD8⁺細胞の割合は、それぞれ、約11%および19%であった。マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] で処置した場合、これらのパーセンテージは、それぞれ、約25%および約60%に増加した。NODマウスに、IL2 - 変異体 (QD × 5, 25, 000 ユニット)、単回注射の空のマイクロスフェア、またはマイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] (18 mg / kg) を投与した。5日目の最後の投与の2時間後にマウスを殺した。

30

【0167】

CD8⁺細胞を活性化せずにFoxp3⁺CD4⁺T細胞集団を増殖させる有効用量を決定するために、マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] の用量滴定試験を実施した。マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] の4つの濃度 (0.5 mg / kg, 1 mg / kg, 5 mg / kg, および 10 mg / kg) を試験し、薬力学を、PBMCによって、2週間にわたってモニタリングした。Foxp3⁺CD4⁺T細胞の用量依存的な増殖が、マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] の単回注射後、PBMCにおいて、観測された。Foxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖は、4日でピークに達し、すべての投与量で、14日目にベースラインレベルに戻った (図9A)。重要なことに、CD8⁺細胞の割合は、どの投与量でも増加しなかった (図9B)。

40

【0168】

図9Aは、NODマウス (n = 3 / 用量群) において、マイクロスフェア - IL - 2 [N88R, C125S] が、Foxp3⁺CD4⁺T細胞を優先的に増殖させることを示し、図9Bは、それらが、CD8⁺細胞 (右) の活性化を避けることを示している。示されるように、Foxp3⁺CD4⁺T細胞の増殖は、すべての用量で4日目にピークに達し、14日目までにベースラインレベルに戻った。

【0169】

実施例9

リンカー - IL - 15 の製造

50

実施例 2 のリンカーを、上記の IL - 2 について記載されたように、 NaCNBH_3 を用いた還元的アルキル化を介して、IL - 15 の N 末端にコンジュゲートさせた。反応混合物は、25 mM リン酸ナトリウム、250 mM の NaCl 、 $\text{pH} 7.4$ 中に、IL - 15 ($30 \mu\text{M}$)、 $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-リンカー}(\text{MeSO}_2)\text{-CHO}$ ($90 \mu\text{M}$)、および NaCNBH_3 (10mM) を含んでいた。反応は、暗所において周囲温度で、24 時間行った。20 mM クエン酸ナトリウム、500 mM の NaCl 、0.05% *tween*-20、 $\text{pH} 5.86$ 、で平衡化した PD - 10 カラムを使用して、過剰の試薬を除去した。脱塩した反応混合物を、Amicon Ultra 3, 500 MW カットオフコンセンレーターを用いて濃縮した。

【0170】

リンカー当量を変化させた小スケール (2.25nmol 、 $75 \mu\text{L}$) の還元的アルキル化反応を、IL - 15 で実施し、最適な反応条件を決定した。最初の反応は、1、1.5、および 2 当量の $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-L}(\text{MeSO}_2)\text{-CHO}$ リンカーを用いて実施し、1:1 の比率でタンパク質に 1 つのリンカーが結合したことが示された (データは示さない)。その後の反応は、1.5、3、および 5 当量のリンカーを用いて実施し、未修飾タンパク質の変換を増加させた (図 10A)。3 当量のリンカーを使用した場合、反応の結果、IL - 15 の約 52% がタンパク質に 1 つのリンカーのみが結合し、IL - 15 の約 5% が 2 つのリンカーと結合した (図 10B)。リンカー濃度を 5 当量に増やすと、シングルリンカー - タンパク質は少し増加したが、総タンパク質の約 27% が、2 つ以上のリンカーと結合した。

【0171】

反応の進行は、図 10 に示すように、SDS - PAGE DBCO - PEG_5k ゲルシフトアッセイによって、測定した。表 3 は、修飾された IL - 15 のパーセントを示す。バンドは、Image J ソフトウェアを使用して定量化した。IL - 15 ($30 \mu\text{M}$) を、25 mM リン酸ナトリウム、500 mM の NaCl 中、1.5、3、または 5 当量のリンカー - $\text{CHO}(\text{Mod} = \text{MeSO}_2)$ および NaCNBH_3 (10mM) で、暗所において周囲温度で 20 時間、処理した。

【表 3】

% IL-15 修飾

当量 リンカー	未修飾	1 リンカー	2 リンカー	3 リンカー
1.5	54	46	0	0
3	43	52	5	0
5	16	58	22	5

【0172】

3 当量のリンカーを用いた最適化された反応条件を、大スケール ($0.93 \mu\text{mol} \sim 1.08 \mu\text{mol}$) の反応で使用した。大スケールの反応を 2 回行った。

【0173】

実施例 10

マイクロスフェア - IL - 15 の製造

BCN 活性化マイクロスフェアのスラリー ($2.6 \mu\text{mol BCN}$ 、実施例 4) を、滅菌シリンジ内で、20 mM クエン酸ナトリウム、500 mM の NaCl 、0.05% *tween*-20、 $\text{pH} 5.86$ 、で 5 回 ($\sim 35 \text{mL}$)、洗浄した。リンカー - IL - 15 (実施例 9) (総タンパク質 $1 \mu\text{mol}$ 、約 50% のアルキル化 IL - 15 を含む) を、滅菌フィルターを通してシリンジに加えた ($0.22 \mu\text{M}$)。混合物を、周囲温度で 18

時間、転倒回転させて攪拌した。次いで、スラリー混合物を、20 mMクエン酸ナトリウム、500 mMのNaCl、0.05% tween-20、pH 5.86、で5回洗浄した。未反応のBCN活性化マイクロスフェアを、 $N_3(CH_2CH_2O)_7H$ でキャップし、その後、さらに6回洗浄した。マイクロスフェア(216~336 μM)に担持されたIL-15濃度は、4倍容量の50 mMのNaOHに溶解したスラリーの5 mgアリコートから放出されたIL-15からのA280 ($\epsilon_{280} = 7240 M^{-1} cm^{-1}$)によって、測定した。3つの別々の担持からのMS-IL-15濃度は、336 nmol/mL、216 nmol/mL、および232 nmol/mLであると決定された。

【0174】

実施例 11

マイクロスフェア-IL-15から放出される、IL-15の薬物動態

実施例10のマイクロスフェア-IL-15スラリー(275 nmol、タンパク質/mL)を、500 mMのNaCl、0.05% tween-20、および1.25% (w/v)ヒアルロン酸を含む、25 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.9、で希釈した。さまざまな用量のマイクロスフェア-IL15を要する試験のため、段階希釈を用いて、目的のマイクロスフェア-IL-15濃度を得た。すべての場合において、無菌条件を用いて、マイクロスフェアコンジュゲートを、取り扱いおよび調製した。固定針(27 G)を有するシリンジに、コンジュゲート(100 μL)を後ろから充填した。シリンジの内容物を、正常なオスのC57BL/6Jマウスに、皮下投与または腹腔内投与した。血液サンプルを、各3匹のマウスからなるそれぞれの群から、-24、4、8、24、48、96、168、および240時間に、採取した。HALTプロテアーゼ阻害剤カクテル(ThermoFisher Scientific)を、すべての血漿サンプルに添加し、その後、分析まで、-80 で凍結した。

【0175】

hIL-15のELISAを、製造業者の指示(R&D Systems、hIL-15 Quantikine、カタログ#D1500)に従って実施し、rhIL-15血漿を測定した。血漿サンプルは、氷上で解凍し、その後、製造業者が提供する標準希釈液で希釈した。4、8時間のサンプルは50倍に希釈し、24時間のサンプルは25倍に希釈し、プレリード、48、96、168、および240時間のサンプルは10倍に希釈した。GraphPad Prismソフトウェアを使用して、hIL-15濃度を、時間と適合度の関数としてプロットした。

【0176】

フローサイトメトリー分析のために、PMBCを調製し、表面染色を実施して、NK1.1、CD3、CD8、およびCD44の発現細胞を定量化した。市販のFITC-、PE-、またはアロフィコシアニン-コンジュゲート抗体を使用した。サンプルデータを、FACSscanフローサイトメーター(BD Biosciences)で収集し、FlowJoサイトメトリー分析ソフトウェア(TreeStar、Ashland、OR)を使用して、分析した。

【0177】

マイクロスフェアコンジュゲートから放出された[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態を、正常なC57BL/6Jマウスで測定した。マウスに、2.4 nmolのコンジュゲートタンパク質を投与した(200 μL の注射)。開始時の平均マウス体重(25.1 \pm 1.3 g)と、終了時の平均マウス体重(25.1 \pm 1.4 g)に、有意な変化はなかった。約120時間後、観測された濃度は急速に低下している(図11)。120時間までのデータの1相減衰モデルの適合は、少なくとも200時間の半減期をもたらしている。120時間から240時間までのデータポイントは、1相減衰モデルに適合し、27時間の $t_{1/2}$ であった。MS-IL-15(50 μg)の2回目の注射により、248時間で測定された血漿IL-15が、初期投与と同様の濃度が増加している。23時間の $t_{1/2}$ が、264時間から360時間までで、観測されている。

【0178】

10

20

30

40

50

図11は、C57BL/6Jマウスにおける、MS-IL-15から放出された[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、MS-IL-15(50 μ g)を、 $t=0$ 時間および $t=240$ 時間に、投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。240時間を通して2つの異なる $t_{1/2}$ が観測されており、少なくとも115時間の $t_{1/2}$ が、120時間までで観測され、続いて、120時間から240時間までで43時間の2回目の $t_{1/2}$ が、観測されている。MS-IL15(50 μ g)の2回目の注射は、240時間の採血直後に投与した(青色のデータ)。

【0179】

図12は、C57BL/6Jマウスにおける、マイクロスフェア-IL-15から放出された、[アミノ-プロピル]-IL-15の薬物動態の用量依存性を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、MS-IL-15(12.5、25、または50 μ g)を投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。

【0180】

投与経路(すなわち、皮下[s.c.]および腹腔内[i.p.])は、放出された[アミノプロピル]-IL15の $t_{1/2}$ を変化させなかった(図13)。しかしながら、 AUC_{sc} (14.9 nM^*h)と比較して、 AUC_{ip} (25.2 nM^*h)は、ほぼ2倍高くなった。これにより、腹腔内スペースからのIL-15の生物学的利用能の増加または吸収速度の増加が、示され得る。

【0181】

図13は、皮下投与あるいは腹腔内投与したC57BL/6Jマウスにおける、マイクロスフェア-IL-15から放出された、[アミノプロピル]-IL-15の薬物動態を示している。正常なオスのC57BL/6Jマウスに、MS-IL-15(50 μ g)を、皮下注射(黒色、)または腹腔内注射(青色、)で、投与した。血漿サンプルを、ヒトIL-15 Quantikine ELISA(R&D systems)を使用して、調製および分析した。120時間までで、皮下投与(115時間)および腹腔内投与(129時間)において、同様の $t_{1/2}$ が観測された。

【0182】

実施例12

マイクロスフェア-IL-15から放出される、[アミノプロピル]-IL-15の薬力学

実施例10のマイクロスフェア-IL-15から放出される、[アミノプロピル]-IL-15の薬力学を、正常なオスのC57BL/6Jマウス($n=3$ /群)で測定した(図14)。実施例10で製造したマイクロスフェア-IL-15(2.5、12.5、25、または50 μ g、コンジュゲートしたタンパク質)を、マウスに投与した。PMBCを調製し、NK1.1、CD3、CD8、およびCD44の発現細胞のフローサイトメトリー分析のために、表面染色した。市販のFITC-、PE-、またはアロフィコシアニン-コンジュゲート抗体を使用した。サンプルデータを、FACScanフローサイトメーター(BD Biosciences)で収集し、FlowJoサイトメトリー分析ソフトウェア(TreeStar, Ashland, OR)を使用して、分析した。臨床観察では、注射部位で反応がなく、また、開始時平均体重(25.1 \pm 1.3g)と、終了時平均体重(25.1 \pm 1.4g)に、有意な変化がなかった。

【0183】

MS-IL-15コンジュゲート(12.5 μ g、25 μ g、または50 μ g)の単回皮下注射は、PMBCにおいて、CD44^{hi}CD8⁺T細胞の用量依存的増加をもたらした。CD44^{hi}CD8⁺T細胞の2~4倍の増殖は、処置後5日でピークに達した。これらの細胞は、21日間、対照群よりも上昇したままであった(図14A)。最高用量のMS-IL-15(50 μ g)が投与されたマウスは、28日目に、依然として、CD44^{hi}CD8⁺T細胞のレベルが、対照群の2倍であった。実験期間中、天然rhIL-15

10

20

30

40

50

($2.5 \mu\text{g}$)の単回投与、またはMS~IL-15($2.5 \mu\text{g}$)の同等の用量から、CD44^{hi}CD8⁺T細胞の増加は観測されなかった。

【0184】

NK細胞の用量依存的増殖はまた、MS~IL-15コンジュゲートの単回皮下注射後、PBMCにおいて観測された(図14B)。MS~IL-15($12.5 \mu\text{g}$ 、 $25 \mu\text{g}$ 、または $50 \mu\text{g}$)を投与した場合、NK細胞の約2~3倍の増殖が、処置後5~7日でピークに達した。NK細胞は、14日から21日の間上昇したままであった。NK細胞の増殖は、天然rhIL-15の単回投与($2.5 \mu\text{g}$)、または同等の用量のMS~IL-15($2.5 \mu\text{g}$)では観測されなかった。

【0185】

実施例13

リンカー-RLIおよびマイクロスフェア-RLIコンジュゲートの製造

RLI(受容体結合インターロイキン)は、IL-15、および、IL-15受容体/複合体のスーパーアゴニストとして作用する受容体サブユニットのスシ(sushi)ドメインを含む、融合タンパク質である(Mortier et al., J. Biological Chem. 2006, 281: 1612-9; 米国特許第10,358,488号)。

【0186】

リンカー濃度を変化させて、RLI(10 nmol 、 $50 \mu\text{L}$)の小スケールの還元的アルキル化反応を実施して、化学量論的リンカー付加のための最適な反応条件を決定した。1.5、2、3、および5当量の実施例2のリンカー(IIb)を使用して、最初の反応を実施した。試験条件下で、1.5当量のリンカーを使用した場合、44%のRLIが1つのリンカーで修飾され、46%が未修飾のままであった。2当量のリンカーにおいて、RLIの約53%がリンカーの化学量論的付加をもたらし、33%のRLIが未修飾で、14%が複数のリンカーと共有結合することが確認された。リンカー量を3当量に増加させると、2つのリンカーの結合の割合(27%)が増加し、3つのリンカーを含むRLIの形成も増加した(6%)。これらのパーセンテージは、5当量のリンカーの存在下で、さらに増加した(図15)。

【表4】

	未修飾	+1 リンカー	+2 リンカー	+3 リンカー
1.5 当量	46%	44%	10%	—
2.0 当量	33%	53%	14%	—
3.0 当量	14%	53%	27%	6%
5.0 当量	5%	48%	28%	19%

【0187】

RLIの還元的アルキル化を、SDS-PAGE DBCO-PEG₅Kゲルシフトアッセイによって、測定した。図15は、ゲルシフトアッセイから測定された、修飾されたRLIの割合を示している。バンドは、ImageJソフトウェアを使用して定量化した。RLI(10 nmol)を、1.5、2、3、または5当量のリンカー-CHO(Mod = MeSO₂)、およびNaCNBH₃(10 mM)の、 25 mM のMES、 500 mM のNaClおよび0.05% tween-20の液で、暗所において室温で20時間、処理した。

【0188】

2当量のリンカーを使用して、大スケールの還元的アルキル化反応(800 nmol 、

4 mL) を実施した。次いで、還元的にアルキル化した R L I を、B C N 活性化マイクロスフェア (実施例 4) にコンジュゲートさせた。酸化プロセスを最小限に抑えるために、E D T A (1 m M) およびメチオニン (3 0 m M) を、反応に加えた。コンジュゲーション反応後、マイクロスフェアを、バッファー (2 5 m M のクエン酸ナトリウム、5 0 0 m M の N a C l 、 0 . 0 5 % t w e e n - 2 0 、 3 0 m M のメチオニン、p H 5 . 9) で、よく洗浄し、非共有結合で付いた R L I を除去した。洗浄したマイクロスフェアの少量アリコート (~ 2 5 m g) を、N a O H (5 0 m M) で処理し、マイクロスフェアに共有結合した R L I の濃度を測定した。マイクロスフェア上の R L I 濃度は、1 7 5 n m o l / m L であると決定した。

【 0 1 8 9 】

実施例 1 4

マイクロスフェアコンジュゲートから放出された R L I の生物活性

R L I がマイクロスフェアコンジュゲートから放出された後、アミノプロピル残基がコンジュゲーションの部位に残る。放出された [アミノプロピル] - R L I の生物活性を試験するために、細胞ベースのアッセイを使用して、[アミノプロピル] - R L I が、天然の R L I と比較して、受容体の二量体化を誘導する能力を測定した。天然の R L I と [アミノプロピル] - R L I の E C ₅₀ 曲線は、互いに重なり合っており、この生物活性アッセイで評価されるように、アミノプロピル残基が、I L - 1 5 活性に影響を与えないことを示している (図 1 6) 。

【 0 1 9 0 】

図 1 6 は、R L I のための I L - 2 R 受容体結合細胞ベースのアッセイの結果を示している。U 2 O S 細胞ベースのアッセイを使用して、p H 7 . 4 でコンジュゲートから放出したアミノプロピル - R L I の結合活性 (E C ₅₀ = 1 8 0 p M) を測定し、天然の R L I (E C ₅₀ = 1 6 0 p M) と比較した。

【 0 1 9 1 】

実施例 1 5

マイクロスフェアコンジュゲートから放出される、[アミノプロピル] - R L I の薬物動態

マイクロスフェアコンジュゲートから放出される、[アミノプロピル] - R L I の薬物動態を、正常な C 5 7 B L / 6 J マウスで測定した。マウスに、コンジュゲートを皮下注射した (1 . 5 n m o l タンパク質、1 0 0 μ L 注射) 。採血を、1 0 日間にわたって所定の時点で行い、血漿を調製した。血漿中の [アミノプロピル] - R L I の濃度を、R L I に特異的な E L I S A を使用して測定した (図 1 7) 。データのマニュアルの検査により、T m a x は 4 8 時間であると示唆され、データを単相減衰モデルに適合させると、半減期は 1 3 5 時間になった。マウスの体重に変化はなかった (開始時体重 : 2 1 . 5 ± 1 . 1 g ; 終了時体重 : 2 1 . 5 ± 1 . 1 g) 。

【 0 1 9 2 】

図 1 7 は、C 5 7 B L / 6 J マウスにおける、マイクロスフェアコンジュゲートから放出された、[アミノプロピル] - R L I の薬物動態を示している。正常なオスの C 5 7 B L / 6 J マウスに、マイクロスフェア - R L I コンジュゲート (1 . 5 n m o l) を投与した。血漿サンプルを、R & D s y s t e m s D u o S e t h I L 1 5 / I L 1 5 R c o m p l e x E L I S A (D Y 6 9 2 4) を使用して、調製および分析した。データは、単相減衰モデルに適合し、半減期は 1 3 5 時間になった。

【 0 1 9 3 】

実施例 1 6

マイクロスフェアコンジュゲートから放出される、[アミノプロピル] - R L I の薬力学

M S ~ R L I コンジュゲート (3 4 μ g 、 1 . 5 n m o l) の薬力学を、C 5 7 B l a c k マウス (n = 5 / 群) において、空の M S 、および遊離 R L I (2 . 5 μ g 、 Q D × 4) の薬力学と、比較した。採血を 1 3 日間にわたって行い、P B M C の表面を、一般的な実験手法を用いて染色した。固定および細胞内染色は、e B i o s c i e n c e F o x p 3 / T r a n s c r i p t i o n F a c t o r S t a i n i n g B u f f e r

10

20

30

40

50

Set (ThermoFisher Scientific) のプロトコルに従った。使用した市販の抗体は、NK1.1、CD3、CD8、CD19、CD44、およびKi-67の発現細胞に対するものであった。染色した単一の細胞懸濁液を、LSRIIFローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して分析し、FlowJo サイトメトリ分析ソフトウェア (TreeStar, Ashland, OR) を使用して、分析した。特に注目した細胞集団は、CD8⁺メモリーT細胞 (CD44^{hi}CD8⁺)、ナチュラルキラー細胞 (CD3⁻NK1.1⁺)、増殖するCD8⁺メモリーT細胞 (CD44^{hi}CD8⁺Ki-67⁺)、および、増殖するナチュラルキラー細胞 (CD3⁻NK1.1⁺Ki-67⁺)、であった。

【0194】

CD44^{hi}CD8⁺T細胞の増加は、MS~RLIおよび天然RLI群の処置の5日後に、顕著であった (図18A)。この細胞量は、天然RLIによって維持されず、その量は、7日目までにベースラインレベルに戻った。これは、半減期が短く ($t_{1/2} = 3$ 時間)、遊離RLIが急速にクリアランスされるためと予想された。MS~RLIコンジュゲートは、処置後13日間、CD44^{hi}CD8⁺T細胞レベルを維持した。MS~RLIコンジュゲートが投与された5匹のマウスはすべて、注射部位で病変を発症し、安楽死を要した。

【0195】

CD8⁺T細胞の増殖を、増殖マーカーKi-67によって測定した。注射の3日後、対照と比較して、CD8⁺T細胞の増加が観測された (図18B)。増殖しているCD8⁺T細胞の割合は、すべての群で、5日でピークに達し、その後、急速にベースラインに戻った。

【0196】

NK細胞の割合の増加はまた、対照および天然RLIと比較して、MS~RLIコンジュゲートが投与されたマウスで、観測された (図19A)。遊離RLI注射、およびMS~RLIコンジュゲートは、PBMCにおいて、NK細胞の割合を、それぞれ~4倍および~15倍増加させた。NK細胞レベルは、すべての群で、処置後10日までにベースラインに戻った。NK細胞の増殖は、処置後3日で有意に増加し、各群において、5日間維持された (図19B)。NK細胞の増殖は、処置後7日までにベースラインに戻った。

【0197】

実施例17

分解性PEGヒドロゲルの製造

10

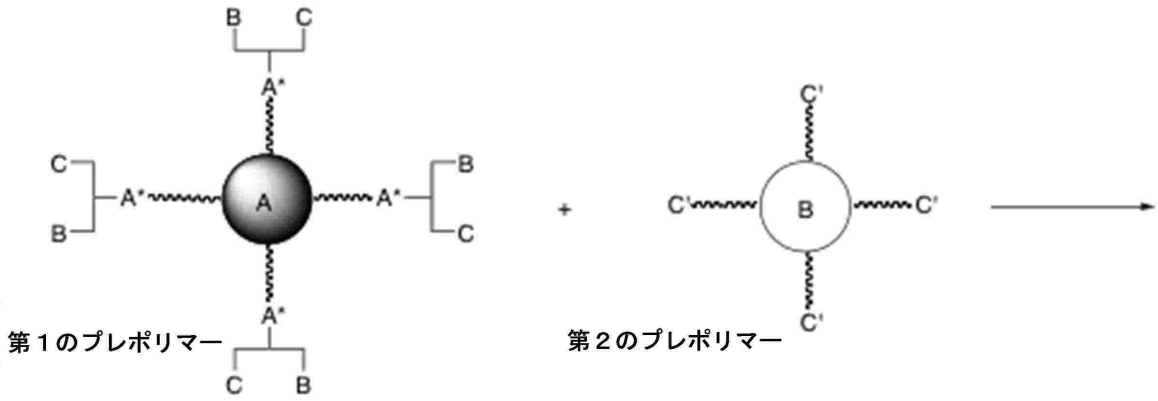
20

30

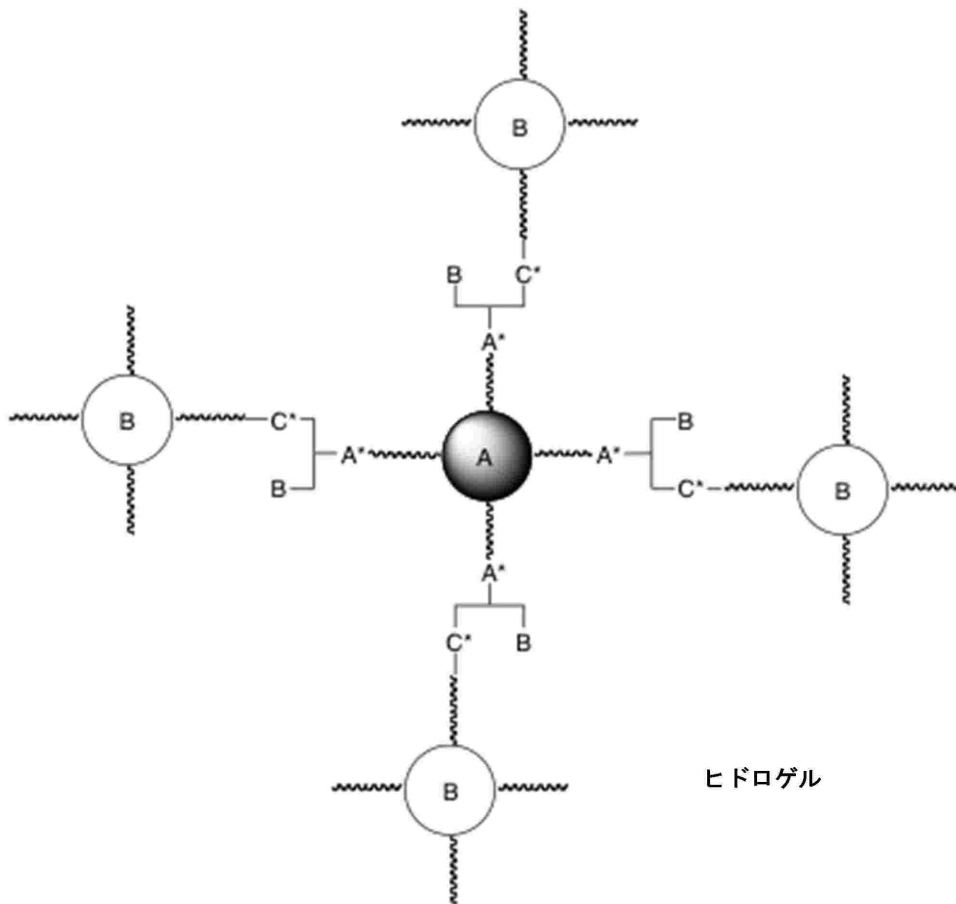
40

50

【化 1 9】



10



20

30

本発明のヒドロゲルは、反応して接続官能基 C^* を形成する基 C および基 C' を含む、2つのプレポリマーの重合によって製造される。 C または C' のうちの1つへのプレポリマー接続は、ヒドロゲルの各架橋に切断可能なリンカーを導入するために、本明細書に記載の式 (II a) のリンカーなどの切断可能なリンカーとの反応によって導入される、切断可能なリンカーをさらに含む。

40

【0198】

一実施形態において、第1のプレポリマーは、4 - アームの PEG を含み、これは、各アームが、2つの相互に非反応性 (「異種」) の官能基 B および C を有するアダプターユニットで末端となっている。 B および C は、最初、保護された形態で存在することができ、次の工程において選択的な化学反応を可能にする。特定の実施形態において、アダプターユニットは、アミノ酸、特に、リジン、システイン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸、の誘導体であり、これには、アルファアミン基がアジドに変換された誘導体、例え

50

ば、2-アジドグルタル酸のモノエステル、が含まれる。アダプターユニットは、各プレポリマーのアーム上の官能基Aと、アダプターユニット上の関連する官能基A'との縮合によって形成される接続官能基A*を介して、各第1のプレポリマーアームに接続される。第2のプレポリマーは、各アームが、第1のプレポリマーの基Cと相補的な反応性を有する官能基C'が終端となった、4-アームのPEGを含み、CとC'が反応して*Cを形成したときに、2つのプレポリマー間の架橋が起こる。

【0199】

例示的な例として、第1のプレポリマーを以下のように製造した。H-Lys(Boc)-OHを、Z=アジドである式(IIa)のリンカーでアシル化して、A=COOH、B=Boc保護NH₂、およびC=アジドである、アダプターユニットを得た。これを20kDaの4-アームPEG-テトラアミンとカップリングさせ、Boc基を除去することで、A*=アミド、B=NH₂、およびC=アジドである、第1のプレポリマーであって、式(IIa)の切断可能なリンカーが、各アームと第1のプレポリマーの基Cの間の結合に組み込まれた、第1のプレポリマーを得た。対応する第2のプレポリマーは、20kDaの4-アームのPEG-テトラアミンを5-シクロオクチニルスクシンイミジルカーボネートでアシル化することによって製造し、C'=シクロオクチンである第2のプレポリマーを得た。第1および第2のプレポリマーを混合すると、C=アジド基とC'=シクロオクチン基の反応により、対応するトリアゾール基が形成され、それにより、2つのプレポリマーが3次元ネットワークに架橋され、ここで、各架橋は、式(IIa)の化合物の組み込みにより得られる切断可能なリンカーを含み、ここで、第1のプレポリマーの組み込みにより得られる各節点(node)は、さらなるリンカー、薬物、フルオロフォア、金属キレート剤などの付加のために誘導化することが可能な、残留した官能基B=NH₂を含んでいる。

【0200】

本明細書で述べられた、特許、特許出願、および科学論文を含むすべての刊行物は、特許、特許出願、または科学論文を含む個々の刊行物が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたようなものと同程度に、あらゆる目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0201】

前記の発明は、理解を明確にする目的で、例示および実施例によって、いくらか詳細に説明されているが、特定の小さな変更および修正が、上記の教示に照らして実施されることは、当業者には明らかである。したがって、明細書および実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

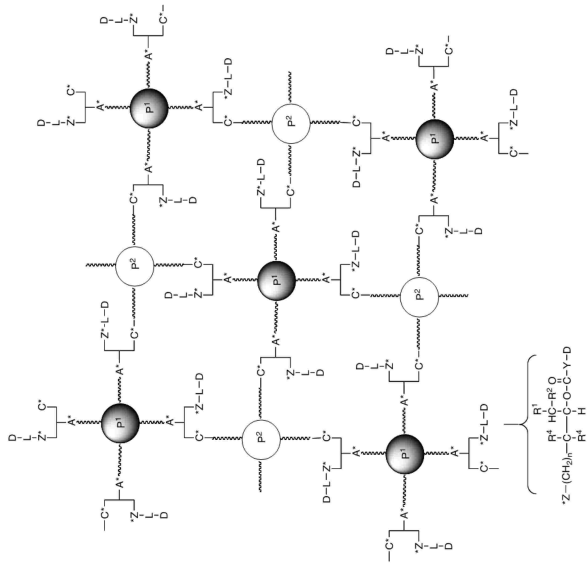
20

30

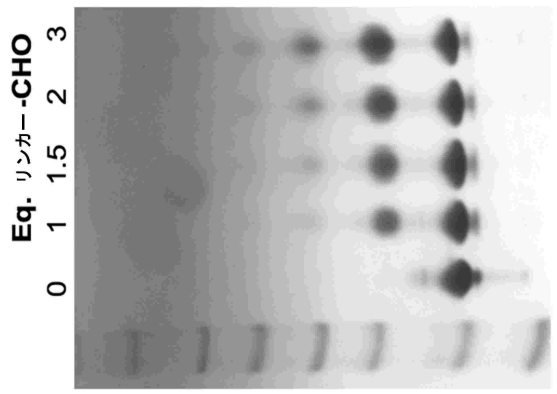
40

50

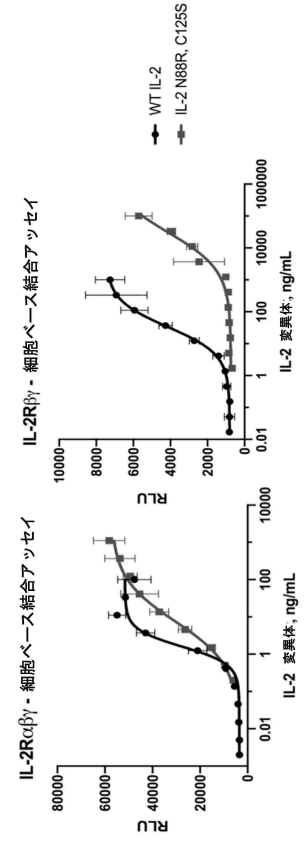
【図面】
【図 1】



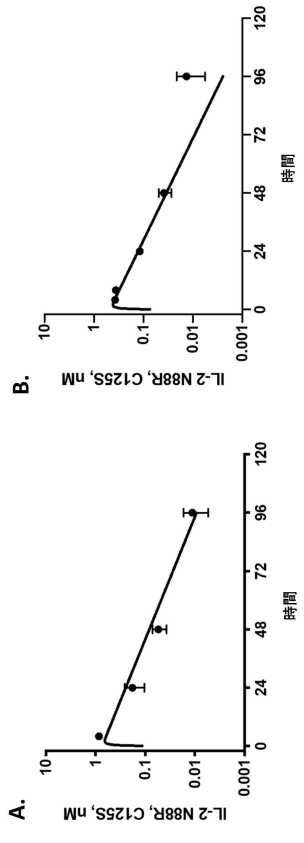
【図 3】



【図 2】



【図 4】



10

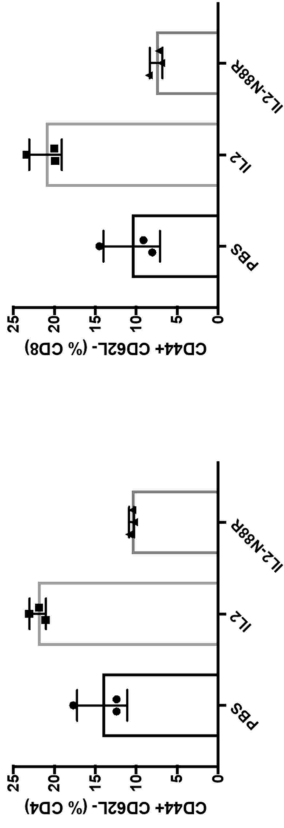
20

30

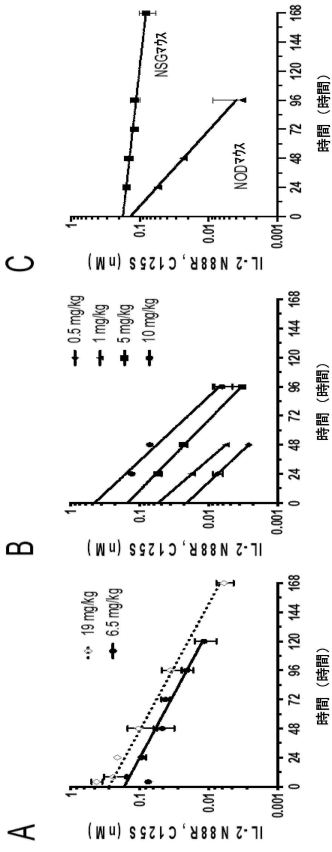
40

50

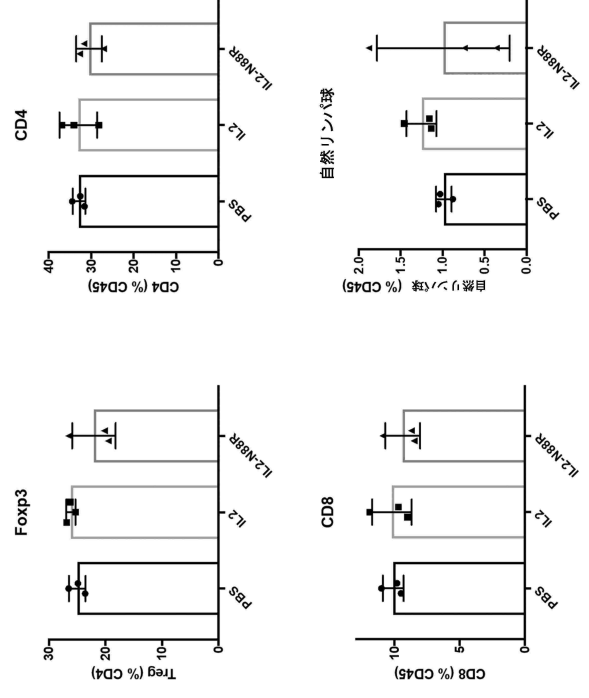
【 5 】



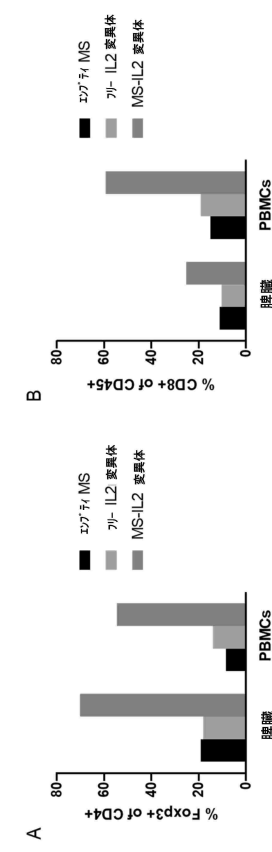
【 7 】



【 9 】



【 8 】



10

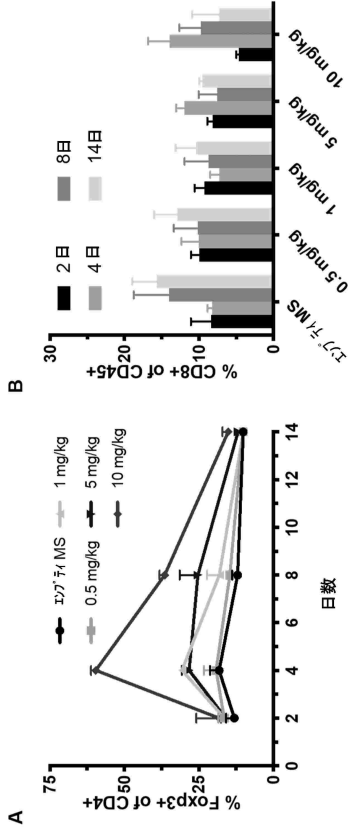
20

30

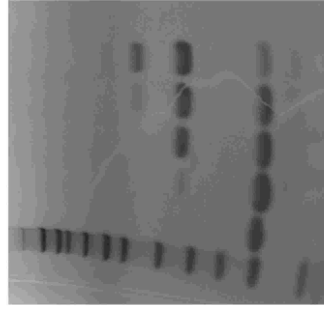
40

50

【 図 9 】



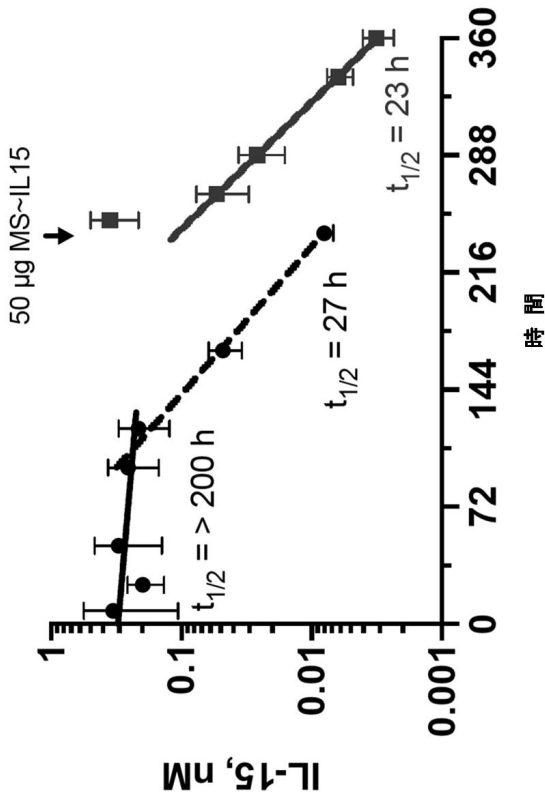
【 図 10 】



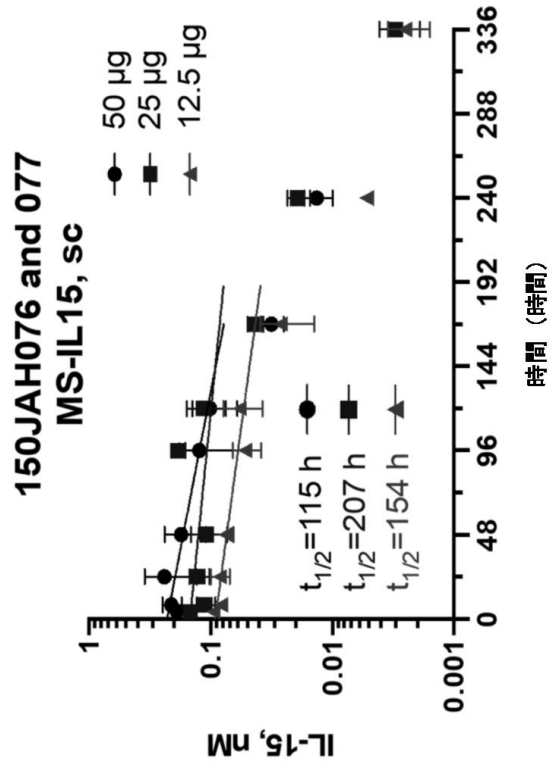
- レーン 1. Novex MW Ladder
- レーン 2. IL-15 のみ
- レーン 3. IL-15 及び PEG_{5K}
- レーン 4. Alk. IL-15, 1.0x PEG_{5K}
- レーン 5. Alk. IL-15, 3x PEG_{5K}
- レーン 6. Alk. IL-15, 5.0x PEG_{5K}

10

【 図 11 】



【 図 12 】



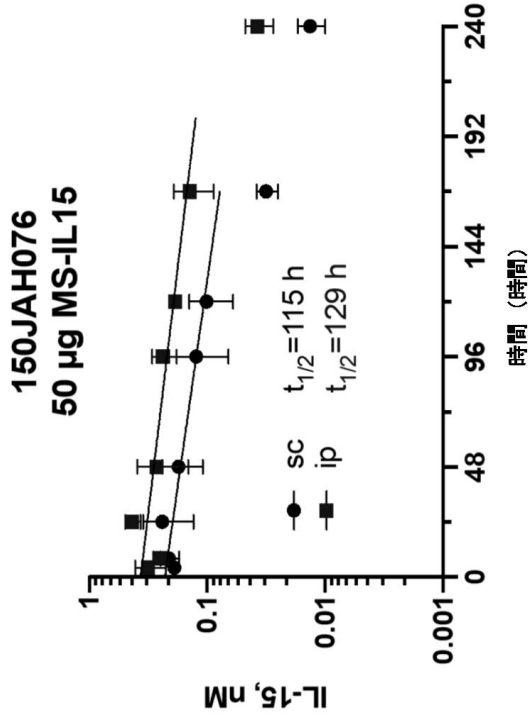
20

30

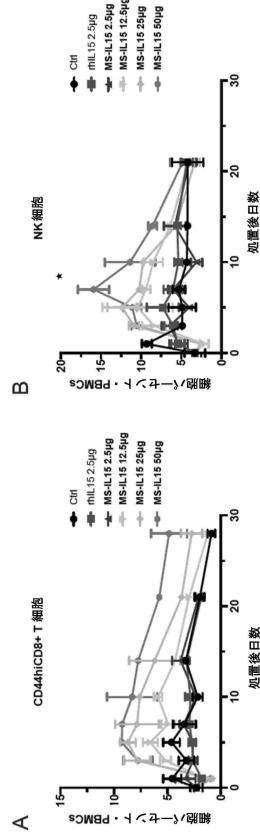
40

50

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

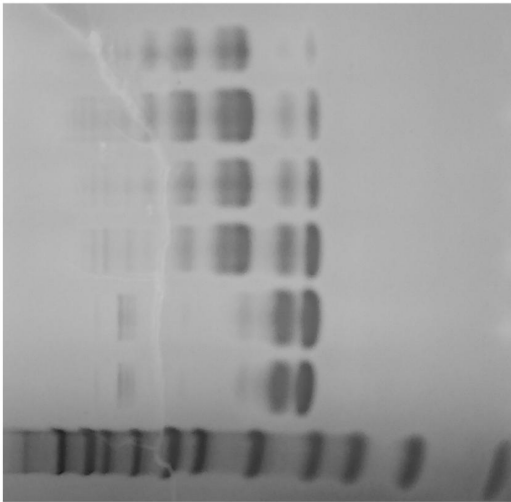
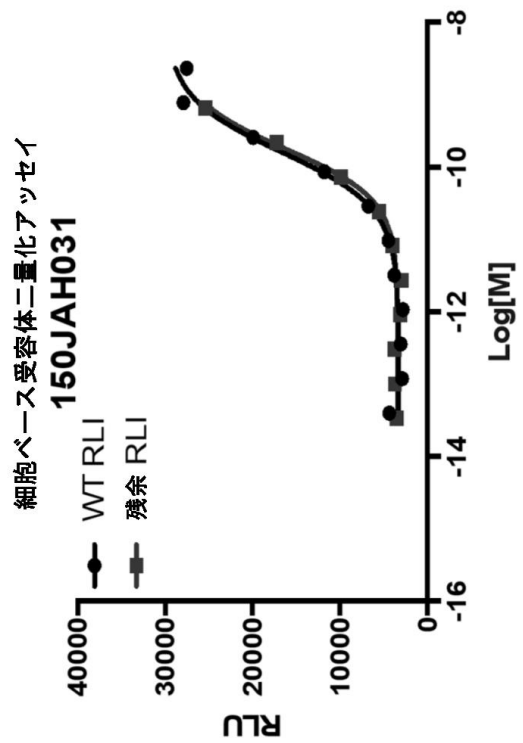
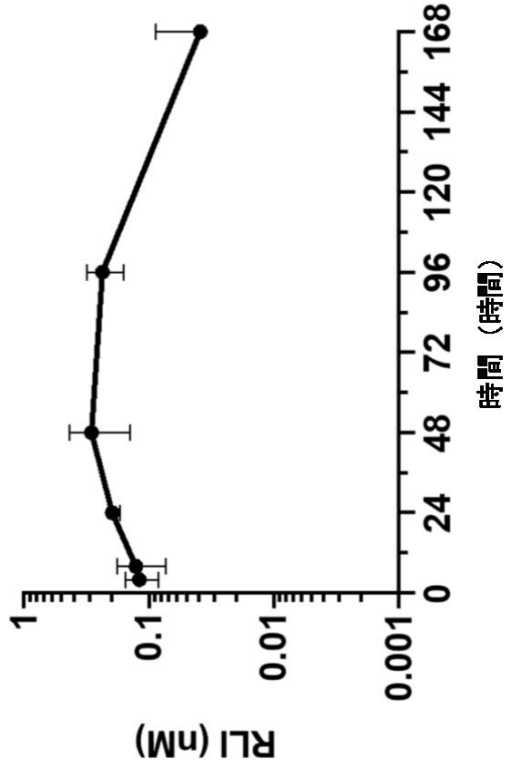


図 1 5

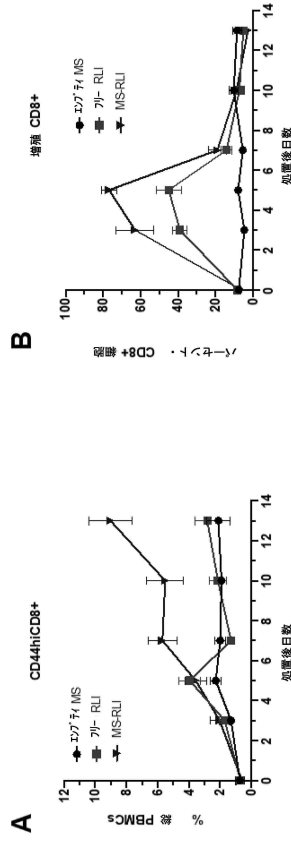
【 図 1 6 】



【 17 】



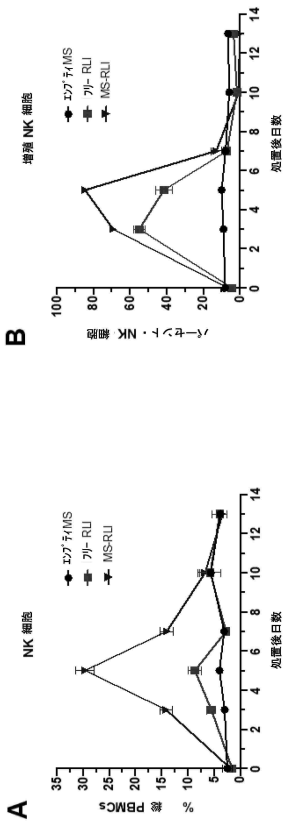
【 18 】



10

20

【 19 】



30

40

50

【配列表】

0007608360000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/14		
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14		
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		Z N A
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06		
		A 6 1 P	43/00	1 0 7	
		A 6 1 P	43/00	1 1 1	
		A 6 1 P	43/00	1 2 1	

トリート55、アパートメント2

(72)発明者

ファフ, サミュエル ジェイ

アメリカ合衆国94132カリフォルニア州サンフランシスコ、トゥウェンティフォース・アベニュー3090

(72)発明者

サンティ, ダニエル ブイ

アメリカ合衆国94117カリフォルニア州サンフランシスコ、ベルグレイブ・アベニュー211

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献

特表2017-511322(JP, A)

米国特許出願公開第2018/0250363(US, A1)

特表2017-528444(JP, A)

特表2016-518361(JP, A)

特表2013-525080(JP, A)

Bioconjugate Chemistry, 2016年, Vol. 27, pp. 2534-2539

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012年, Vol. 109, No. 16, pp. 6211-6216

Bioconjugate Chemistry, 2015年, Vol. 26, pp. 270-278

Translational Vision Science & Technology, 2018年, Vol. 7, No. 4, Article 21, pp. 1-8

ACS Chemical Biology, 2017年, Vol. 12, pp. 2107-2116

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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