

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-539804

(P2022-539804A)

(43)公表日 令和4年9月13日(2022.9.13)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55	4 C 0 7 2
A 6 1 K	31/519(2006.01)	A 6 1 K	31/519	4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/437(2006.01)	A 6 1 K	31/437	4 C 0 8 6
C 0 7 D	519/00 (2006.01)	C 0 7 D	519/00	3 1 1
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
		審査請求	未請求	予備審査請求
				未請求 (全124頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-500582(P2022-500582)	(71)出願人	598063203 パーデュー・リサーチ・ファウンデーション PURDUE RESEARCH FOUNDATION アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, スイート 2500, ファウンドリー ドライブ 101
(86)(22)出願日	令和2年7月8日(2020.7.8)	(74)代理人	110000659弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
(85)翻訳文提出日	令和4年3月4日(2022.3.4)	(72)発明者	ロウ, フィリップ, スチュワート アメリカ合衆国 インディアナ州 47906, ウェスト ラファイエット, ファーム リッジ ロード 5850
(86)国際出願番号	PCT/US2020/041120		
(87)国際公開番号	WO2021/007277		
(87)国際公開日	令和3年1月14日(2021.1.14)		
(31)優先権主張番号	62/872,146		
(32)優先日	令和1年7月9日(2019.7.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/871,686		
(32)優先日	令和1年7月8日(2019.7.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		

(54)【発明の名称】 線維性疾患状態およびがんの治療および予防のための化合物ならびに方法

(57)【要約】

M2様マクロファージをM1様マクロファージへ再プログラム化し、線維性疾患および特定のがんの経過中に観察される抗線維化から線維化促進へのシフトを逆転させるための化合物、医薬組成物、ならびに方法が提供される。化合物は、細胞のパターン認識受容体を標的とする免疫調節物質を含み、標的化部分(例えば、葉酸またはその機能的断片もしくは類似体)の組み込みを通して対象となる細胞に特異的である。放出可能および/または放出不能リンカーは、免疫調節物質の最適な送達を促進するために含まれ操作されることができる。化合物および組成物は、線維性疾患および/またはがんに対する1つ以上の治療方法に採用することができる。

【選択図】図1 - 1

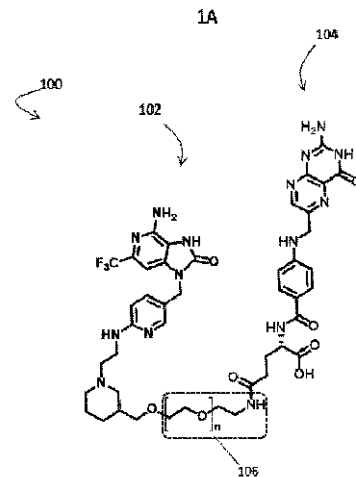


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式によって表される化合物であって、



式中、

Q は、葉酸受容体結合リガンドのラジカルであり、

L は、リンカーであり、

T は、toll様受容体 (TLR) アゴニストまたはその薬学的に許容可能な塩のラジカルである、化合物。

【請求項 2】

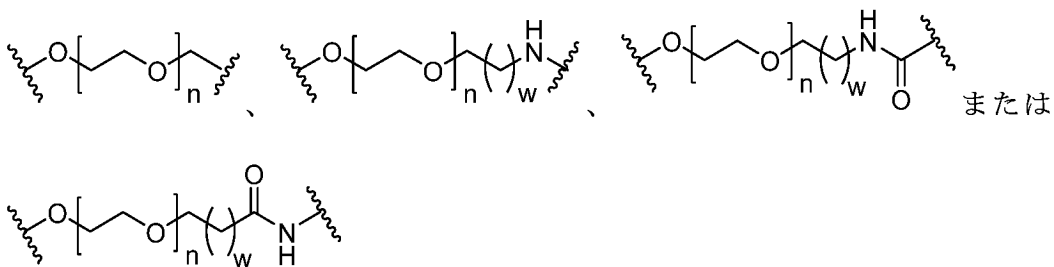
前記リンカーが、放出不能リンカーである、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 3】

前記放出不能リンカーが、下式、

【化 1】



20

によって表され、

式中、

n は、1 ~ 30 であり、

w は、0 ~ 5 である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

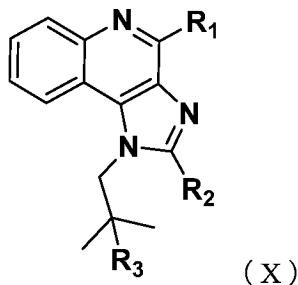
前記 TLR アゴニストが、toll様受容体 7 (TLR7) アゴニストである、先行請求項のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 5】

前記 TLR アゴニストの前記ラジカルが、式 X によって表される構造を有し；

【化 2】



(X)

40

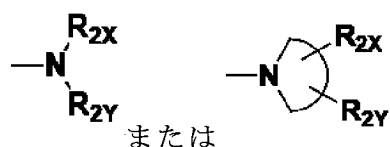
式中、

R₁ は -NH₂ または -NH-R_{1x} であり、

R₂ は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、ヘテロアリール、-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

50

【化3】

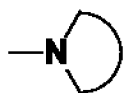


であり、

R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

10

【化4】



は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

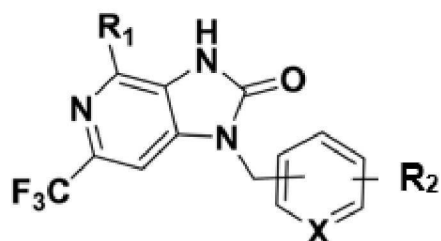
R_3 は、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、または $-NH-R_{1X}$ である、先行請求項のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項6】

前記TLRアゴニストの前記ラジカルが、式XXによって表される構造を有し、

【化5】



(XX)

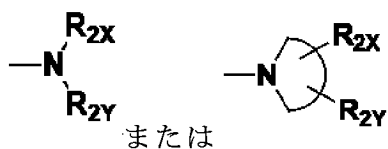
30

式中、

R_1 は、 $-NH_2$ または $-NH-R_{1X}$ であり、

R_2 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、 $-NH-R_{2X}$ 、 $-O-R_{2X}$ 、 $-S-R_{2X}$ 、

【化6】

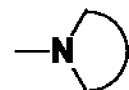


40

であり、

R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

【化7】



50

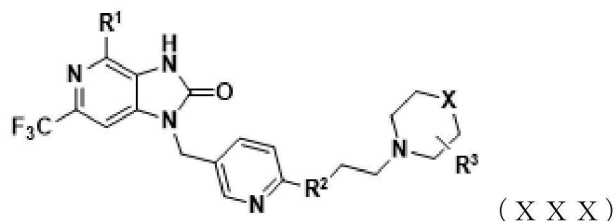
は、3 ~ 10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

Xは、CH、CR₂、またはNである、請求項1 ~ 4のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項7】

前記TLRの前記ラジカルが、式XXXによって表される構造を有するTLR7アゴニストである、請求項6に記載の化合物。

【化8】



10

【請求項8】

標的化部分および免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩の間にリンカーL_nをさらに含み、前記リンカーL_nが、TLR7アゴニストの遊離形態の放出を回避するように構成され、nが50以下の整数である、先行請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項9】

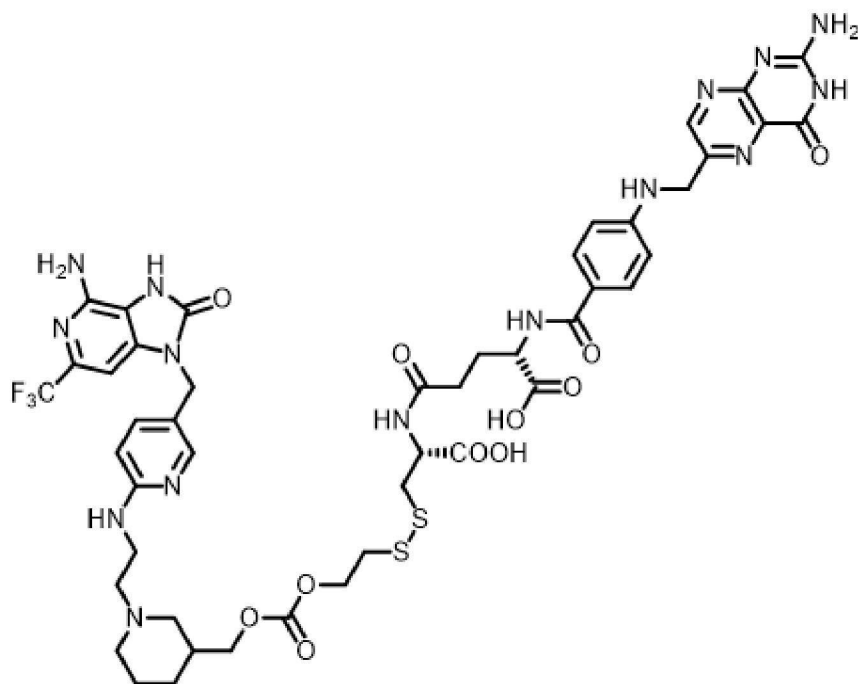
リンカーL_nを含み、前記リンカーL_nが、ポリエチレングリコール(PEG)またはPEG誘導体を含み、nが、1 ~ 32の範囲から選択される整数であり、前記葉酸受容体結合リガンドのラジカルが、葉酸受容体結合リガンドである、先行請求項のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項10】

前記化合物が、下記で表される構造を有する、請求項1に記載の化合物。

【化9】



30

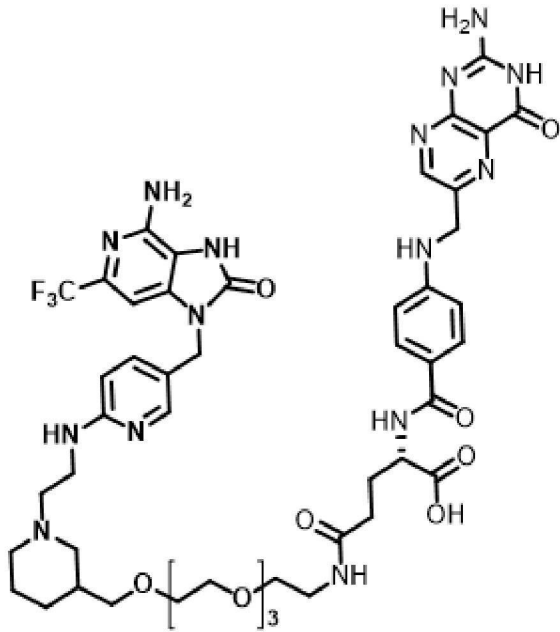
40

【請求項11】

前記化合物が、下記で表される構造を有する、請求項1に記載の化合物。

50

【化 1 0】



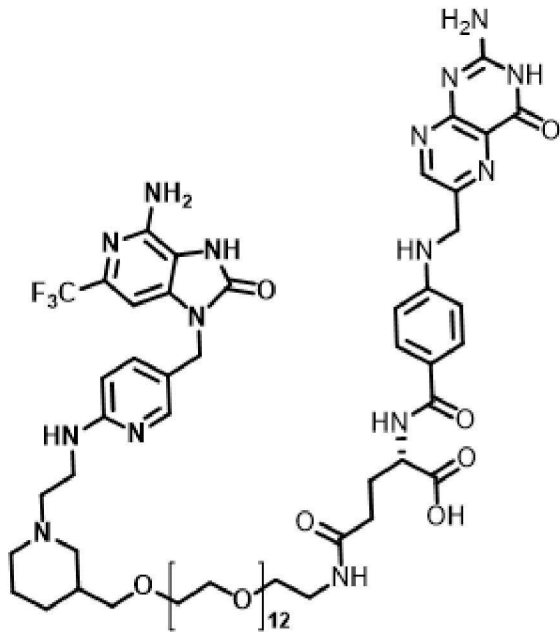
10

【請求項 1 2】

前記化合物が、下記で表される構造を有する、請求項 1 に記載の化合物。

20

【化 1 1】



30

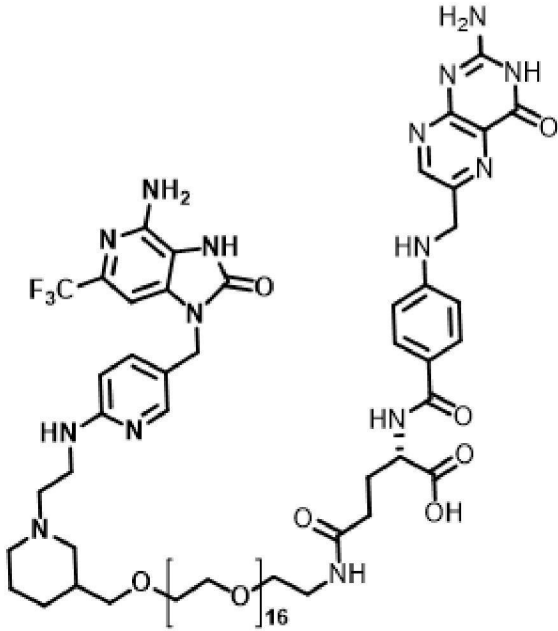
40

【請求項 1 3】

前記化合物が、下記で表される構造を有する、請求項 1 に記載の化合物。

50

【化 1 2】



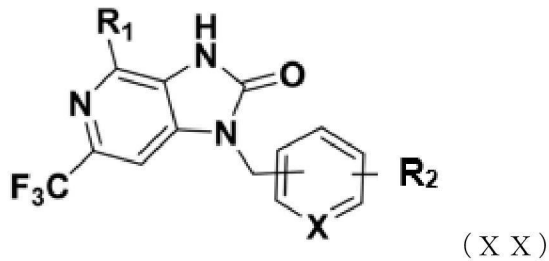
10

20

【請求項 1 4】

前記 T L R 7 アゴニストが、式 X X によって表される構造を有し、

【化 1 3】



30

式中、

R_1 は $-NH_2$ または $-NH-R_{1X}$ であり、

R_2 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、 $-NH-R_{2X}$ 、 $-O-R_{2X}$ 、 $-S-R_{2X}$ 、

【化 1 4】



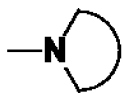
40

であり、

R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

50

【化 1 5】



は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

Xは、CH、CR₂、またはNである、請求項4に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項15】

10

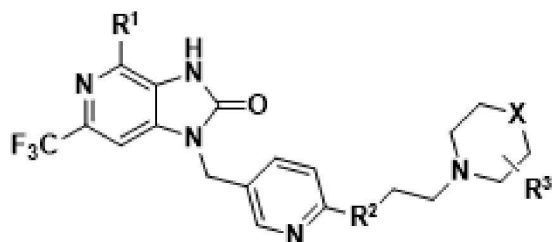
線維性疾患状態またはがん罹患している対象を治療する方法であって、前記方法が、前記対象の細胞を、請求項1～13のいずれか一項に記載の化合物、または請求項14に記載の医薬組成物を含む少なくとも1つの化合物と接触させることを含み、前記TLRアゴニストまたはその薬学的に許容可能な塩のラジカルが、TLR7、8、または9のアゴニストを含む、方法。

【請求項16】

リンカーを介して toll 様受容体 (TLR) アゴニストに付着された葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む化合物であって、前記TLRアゴニストが以下の式またはその薬学的に許容可能な塩を有し、

【化 1 6】

20



式中、

R¹は、アミン基であり、

R²は、単結合-NH-であり、

R³は、H、アルキル、ヒドロキシ基、またはその任意の他の置換基であり、

Xは、CH₂、NH、O、またはSであり、

前記リンカーが、R¹、R²、またはR³で付着される、化合物。

30

【請求項17】

前記リンカーが、ポリエチレングリコール (PEG) リンカーまたはPEG誘導体リンカーを含み、R³で付着された放出不能リンカーであるか、R¹、R²またはR³で付着された放出可能リンカーであるか、のいずれかである、請求項1～13のいずれか一項に記載の化合物または請求項16に記載の組成物を含む、医薬組成物。

40

【請求項18】

前記薬学的に許容可能な塩が、臭化水素酸塩、クエン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アスコルビン酸、塩酸塩、酒石酸塩、トリフラート、マレイン酸塩、メシル酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、またはフマル酸塩から選択される、請求項1～13もしくは請求項16のいずれか一項に記載の化合物、または請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項19】

線維性疾患状態を予防または治療する方法であって、

細胞を、リンカーを介して、葉酸リガンドもしくは機能的断片もしくはその類似体に付着された免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩を含む少なくとも1つの化合物と接触させることであって、前記免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩が、パター

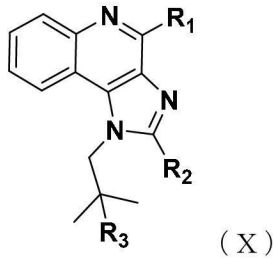
50

ン認識受容体を標的とする、接触させることと、を含む、方法。

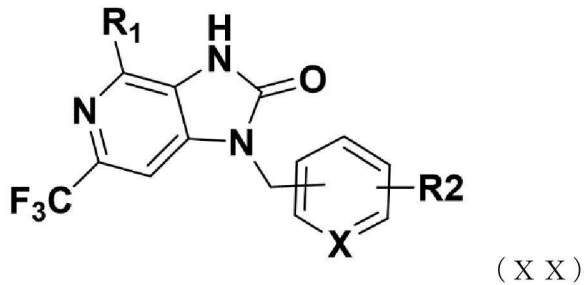
【請求項 20】

免疫調節物質が、式 X もしくは X X の toll 様受容体 (TLR) アゴニストを含むか、または式 X もしくは X X の薬学的に許容可能な塩であり、

【化 17】



10



20

式 X および X X において、

R₁ は、-NH₂ または -NH-R_{1x} であり、

R₂ は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

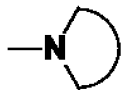
【化 18】



30

であり、

【化 19】



40

は、3 ~ 10 員の N 含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

式 X において、R₃ は、-OH、-SH、-NH₂ または -NH-R_{1x} であり、

式 X X において、X は、CH または N であり、

R_{1x}、R_{2x}、および R_{2y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞が、線維性疾患状態を経験している、または経験するリスクがある対象の細胞を含み、前記細胞を少なくとも 1 つの化合物と接触させることが、治療有効量の前記少なくとも 1 つの化合物を前記対象に投与または適用することをさらに含む、請求項 19 に記

50

載の方法。

【請求項 2 2】

前記対象が、特発性肺線維症を経験している患者であり、前記少なくとも 1 つの化合物が、前記対象に静脈内、筋肉内、腹腔内、局所的投与され、または吸入によって投与される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記線維性疾患状態が、特発性肺線維症、または肝臓、皮膚、膀胱、心臓、膵臓、前立腺、もしくは腎臓の線維症疾患を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記対象から試料を取得すること、または試料を取得したことと、

前記試料中の 1 つ以上のバイオマーカーの発現レベルを定量化することであって、前記 1 つ以上のバイオマーカーの各々は、ケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 1 8 (C C L 1 8)、アルギナーゼ 1 (A r g 1)、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (M M P 9)、メタロプロテイナーゼ 3 (T I M P 3)、インターロイキン 1 ベータ (I L - 1)、ヒドロキシプロリン、コラーゲン、血小板由来成長因子 (P D G F)、形質転換成長因子 - ベータ (T G F)、葉酸受容体ベータ (F R)、腫瘍壊死因子アルファ (T N F)、インターフェロンガンマ (I F N -)、マンノース受容体 (C D 2 0 6)、分化抗原群 1 6 3 (C D 1 6 3)、分化抗原群 8 6 (C D 8 6)、インターロイキン 6 (I L - 6)、ケモカイン 1 0 (C X C L 1 0)、および免疫インターフェロン (I F N) からなる群から選択される、定量化することと、

前記試料中の前記 1 つ以上のバイオマーカーの各々の前記発現レベルを、対照中のそのようなバイオマーカーの発現レベルと比較することと、

C C L 1 8、A r g 1、M M P 9、T I M P 3、I L - 1、P D G F、T G F、C D 2 0 6、C D 1 6 3、F R、ヒドロキシプロリン、もしくはコラーゲンが、前記対照の前記発現レベルと比較してアップレギュレーションしているか、または T N F、I F N -、I L - 6、C X C L 1 0、I F N および C D 8 6 のうちの 1 つ以上が、前記対照の前記発現レベルと比較してダウンレギュレーションしているもしくは発現していない場合に、治療有効量のコンジュゲートしていないアゴニストもしくは阻害剤を、前記対象に投与すること、または投与したことと、をさらに含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体が、葉酸受容体 に特異的であり、前記細胞上の葉酸受容体 に結合する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

細胞のパターン認識受容体を標的とする免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩に付着された標的化部分を含む化合物であって、前記標的化部分が葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む、化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権

本出願は、a) 2 0 1 9 年 7 月 8 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 8 7 1 , 6 8 6 号、および b) 2 0 1 9 年 7 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 8 7 2 , 1 4 6 号に関連し、それら優先権の利益を主張する。前述の出願の内容は、参照によりその全体が本開示に本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本開示は、標的化部分を含み、M 2 型マクロファージを M 1 型マクロファージに再プログラム化する 1 つ以上の化合物を使用して、線維性疾患状態および/またはがんを治療および予防するための化合物、医薬組成物、ならびに方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

特発性肺線維症（IPF）などの多くの線維性疾患の重篤性にもかかわらず、治療を成功させるための選択肢はほとんどなく、従来利用可能なほぼすべてのものは、基礎疾患を治癒するのではなく、症状を軽減して進行を遅らせるように設計されている。例えば、IPFでは、酸素療法は快適さおよびライフスタイルを改善することができるが、疾患進行に対してはほとんど効果がない。同様に、2つのFDA承認薬剤であるピルフェニドンおよびニンテダニブは、疾患の進行を遅らせる可能性があるが、既存の線維性疾患を回復することも、さらなる線維性疾患の産生を停止することもできない。IPFなどの多くの線維性疾患に関連する死亡の可能性が高いことを考えると、疾患の進行を遅らせ、おそらくは進行を停止させるための新しい戦略を特定する大きな必要性がある。

【0004】

10

さらに、がんは、マイトマイシン、パクリタキセル、およびカンプトセシンなどの非常に強力な薬剤を使用した化学療法で治療される。多くの場合、これらの化学療法剤は用量反応的効果を示し、腫瘍阻害は薬剤投与量に比例する。したがって、新生物を治療するために積極的な投与レジメンが使用されるが、高用量化学療法は、がん細胞に対する選択性の低さおよび正常細胞に対する毒性により妨げられる。腫瘍特異性の欠如は、従来化学療法によって克服する必要がある多くのハードルの1つである。

【0005】

線維性疾患およびがんの両方の予防および治療に対する明確な必要性にもかかわらず、これらの状態は、状態を治療することができる有効な治療選択肢が現時点で存在しないため、世界中で死亡および/または苦痛の著しい原因のままである。さらに、薬剤または他の療法が利用可能である場合、そのような治療は、対象となる線維性および/またはがん細胞に対して選択性が乏しいため、通常は根底にある対象において全身毒性のリスクを伴う、非常に強力な薬剤を採用する。必要とされるのは、活性化されたM2型（代替的に活性化された）マクロファージによって開始される線維化促進および/または増殖促進因子サイクルを破壊するだけでなく、問題となる細胞（がん細胞であるか、または線維性疾患を経験している他の細胞であるかに関わらず）に対して非常に高い特異性でそれを行うこともできる治療である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

30

一部の例では、活性化M2表現型マクロファージは、例えば、線維芽細胞を活性化してコラーゲンおよび他の細胞外基質タンパク質を合成する線維化促進サイトカインを分泌することによって、線維性疾患において役割を果たす。特定の例では、これらのマクロファージは同様に、がんを経験する対象において問題となる成長因子の放出を引き起こす。例えば、このような成長因子は、がん性腫瘍の成長を促進し得る。さらに、一部の例では、マクロファージは、免疫抑制サイトカインを（例えば、同時発生的に）放出する。したがって、マクロファージは、線維性疾患および/またはがんの確立および成長を促進する上で重要な役割を果たし得る。

【0007】

特発性肺線維症（IPF）は、そのような線維性疾患の1つであり、例えば、コラーゲンの過剰な沈着から生じる間質性肺疾患である。場合により、このタイプの線維症は、肺の進行性の剛直化をもたらし、場合によっては、ガス交換を媒介する肺の能力の喪失をもたらす。肺活量のこの進行性の低下により、IPFの診断後の生存期間中央値はわずか2.5～5年と推定される。場合により、重篤な関連する病的状態（例えば、慢性低酸素症、疲労、体重減少、筋肉および関節の痛み、持続性咳、ならびに可動性の喪失など）は、病理の後期中、継続的に増加する。米国では、年間約40,000件の新たなIPFが診断され、そのほとんどが死に至る。

40

【0008】

いくつかの例では、組織内に存在するマクロファージまたは末梢血単球に由来する活性化マクロファージは、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド18（CCL18）、形質

50

転換成長因子 - 1 (T G F - 1) および / または血小板由来成長因子 (P D G F) の分泌を介して線維芽細胞の活性化を誘導する。この活性化は、一部の例では、線維芽細胞によるコラーゲンの分泌を促進し、これは線維性疾患およびそれに関連するがんを進行させ得る。多くの線維性疾患の後期では、活性化マクロファージおよび筋線維芽細胞は互いに交差刺激することができ、肺または身体の他の関連する部分全体にわたって線維化の伝播を確実にする悪循環をもたらす。

【 0 0 0 9 】

同様の病態は、他の線維性疾患でも観察される。がんはまた、がん性腫瘍の成長を促進する (例えば、活性化マクロファージによって分泌される成長因子によって)、および / またはがん性腫瘍におけるコラーゲン形成を促進する (例えば、下流の線維性コラーゲン産生を介して、それはその薬剤浸透性を遮断することによって治療がより困難であるがん性腫瘍をもたらすことができる) ような、同様の免疫応答を伴い得る。

10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

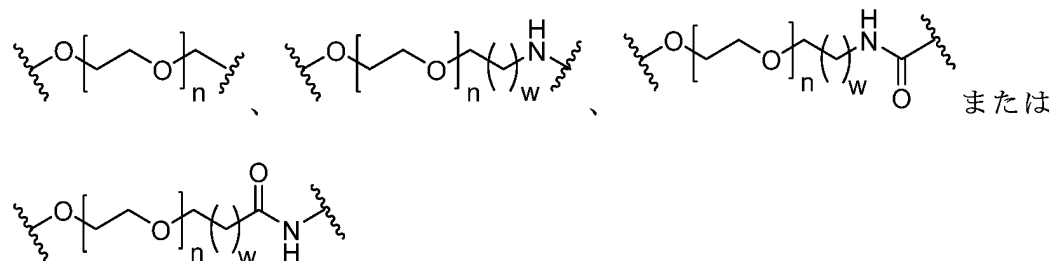
いくつかの実施形態では、式 Q - L - T によって表される化合物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、Qは、葉酸受容体結合リガンドのラジカルである。いくつかの実施形態では、Lは、リンカーである。いくつかの実施形態では、Tは、t o l l 様受容体 (T L R) アゴニストのラジカルである。いくつかの実施形態では、Q - L - T は、その薬学的に許容可能な塩である。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、リンカーは、放出不能リンカーである。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーは、式、

20

【 化 1 】



30

で表される。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、nは、1 ~ 30である。いくつかの実施形態では、nは、1 ~ 24である。いくつかの実施形態では、nは、1 ~ 12である。いくつかの実施形態では、nは、1 ~ 3である。いくつかの実施形態では、nは、12である。いくつかの実施形態では、nは、3である。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、wは、0 ~ 5である。いくつかの実施形態では、wは、0 ~ 2である。いくつかの実施形態では、wは、1である。

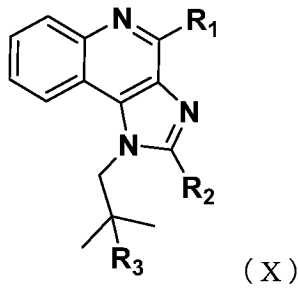
40

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、T L R アゴニストは、t o l l 様受容体 7 (T L R 7) アゴニストである。いくつかの実施形態では、T L R アゴニストのラジカルは、下式 X によって表される構造を有する。

50

【化2】

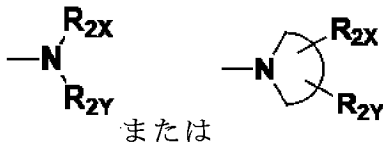


10

【0015】

いくつかの実施形態では、R₁は、-NH₂または-NH-R_{1x}である。いくつかの実施形態では、R₂は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式 (alicyclic)、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

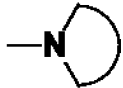
【化3】



20

である。いくつかの実施形態では、R_{1x}、R_{2x}、およびR_{2y}の各々は独立して、水素 (H)、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、

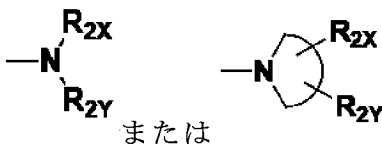
【化4】



30

は、3~10員の窒素 (N) 含有非芳香族単環式または二環式複素環である。いくつかの実施形態では、R₃は、-OH、-SH、-NH₂、または-NH-R_{1x}である。いくつかの実施形態では、R₁は、-NH₂または-NH-R_{1x}であり、R₂は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

【化5】

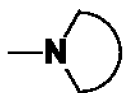


40

であり、R_{1x}、R_{2x}、およびR_{2y}の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

50

【化6】

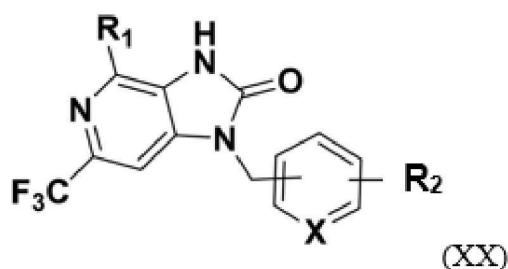


は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、 R_3 は、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、または $-NH-R_{1X}$ である。

【0016】

いくつかの実施形態では、TLRアゴニストのラジカルは、式XXによって表される構造を有する。

【化7】

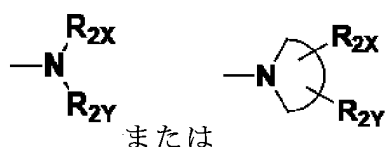


20

【0017】

いくつかの実施形態では、 R_1 は、 $-NH_2$ または $-NH-R_{1X}$ である。いくつかの実施形態では、 R_2 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、 $-NH-R_{2X}$ 、 $-O-R_{2X}$ 、 $-S-R_{2X}$ 、

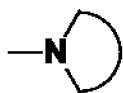
【化8】



30

である。いくつかの実施形態では、 R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、

【化9】

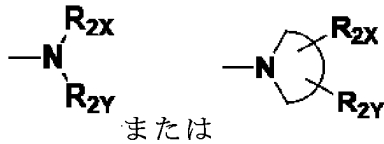


40

は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環である。いくつかの実施形態では、 X は、 CH 、 CR_2 、または N である。いくつかの実施形態では、 R_1 は、 $-NH_2$ または $-NH-R_{1X}$ であり、 R_2 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、 $-NH-R_{2X}$ 、 $-O-R_{2X}$ 、 $-S-R_{2X}$ 、

50

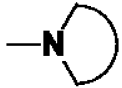
【化10】



であり、 R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

10

【化11】



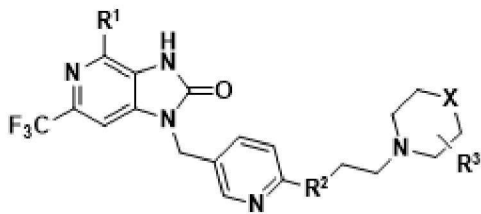
は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、Xは、CH、 CR_2 、またはNである。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、TLR7アゴニストのラジカルは、式XXXによって表される構造を有する。

【化12】



30

【0019】

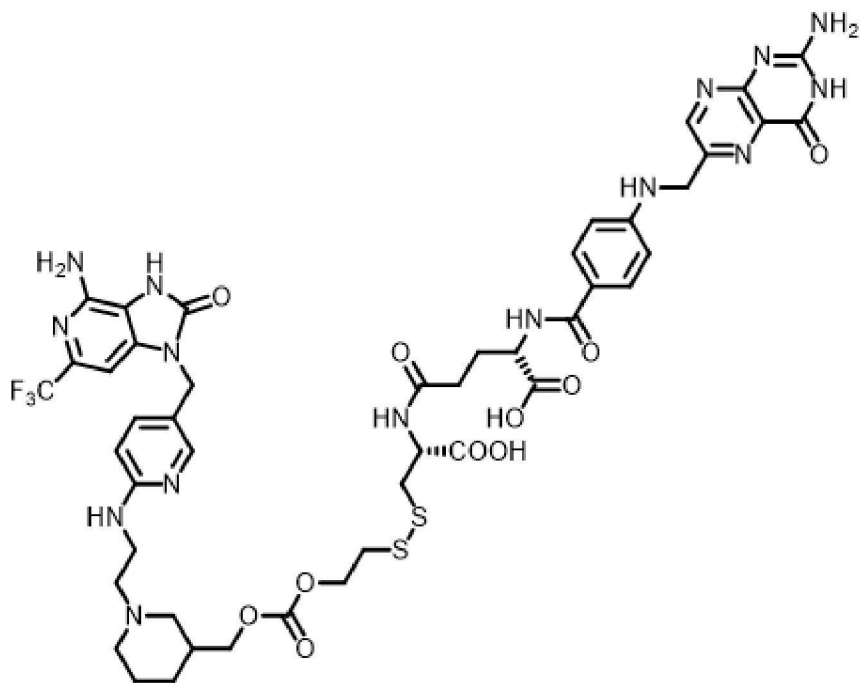
いくつかの実施形態では、化合物は、標的化部分および免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩の間にリンカー L_n をさらに含み、リンカー L_n は、TLR7アゴニストの遊離形態の放出を回避するように構成され、 n は、50以下の整数である。いくつかの実施形態では、リンカー L_n は、ポリエチレングリコール(PEG)またはPEG誘導体を含み、 n は、1～32の範囲から選択される整数であり、葉酸受容体結合リガンドのラジカルは、葉酸受容体(FB)結合リガンドである。

【0020】

いくつかの実施形態では、化合物は、下記で表される構造を有する。

40

【化 1 3】



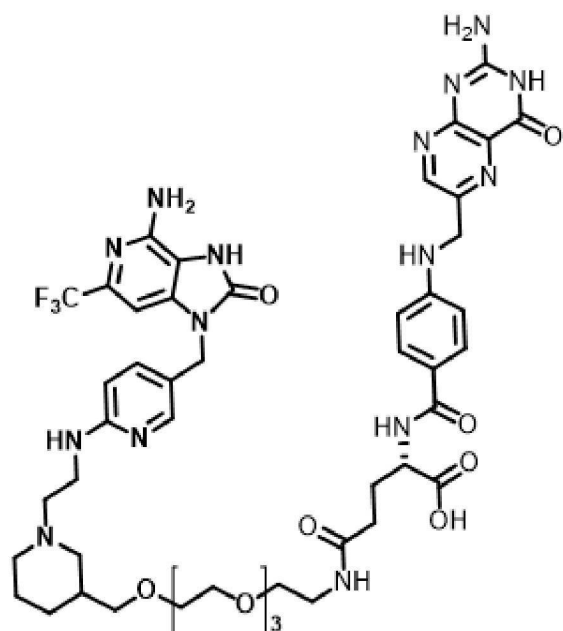
10

20

【 0 0 2 1】

いくつかの実施形態では、化合物は、下記で表される構造を有する。

【化 1 4】



30

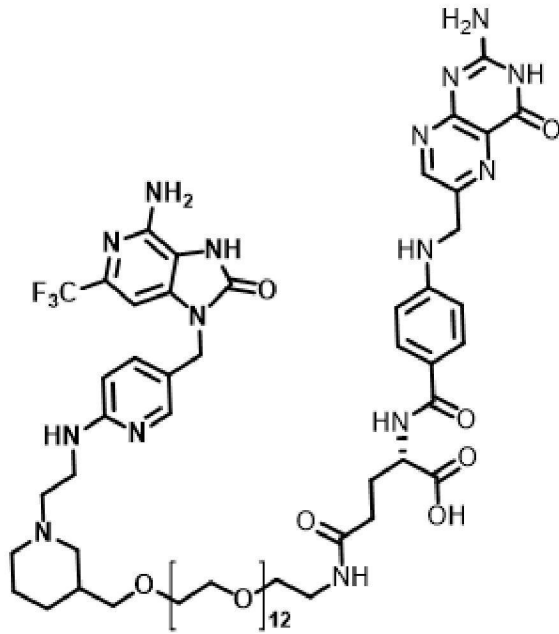
40

【 0 0 2 2】

いくつかの実施形態では、化合物は、下記で表される構造を有する。

50

【化 1 5】



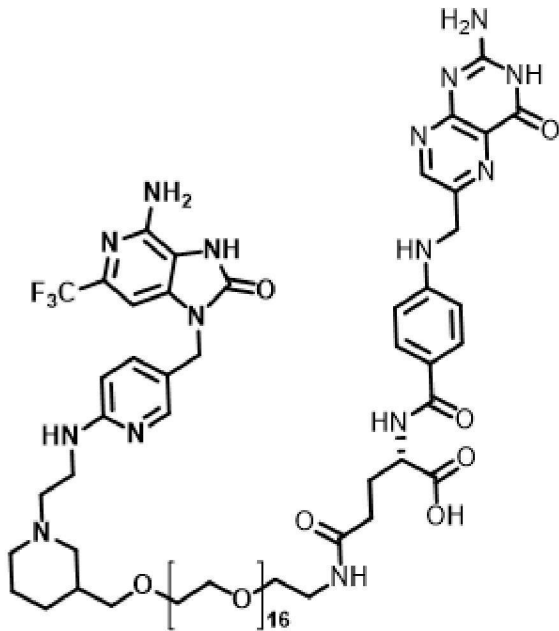
10

20

【 0 0 2 3】

いくつかの実施形態では、化合物は、下記で表される構造を有する。

【化 1 6】



30

40

【 0 0 2 4】

いくつかの実施形態では、本開示の化合物のうちの1つ以上を含む医薬組成物が本明細書に提供されており、TLR7アゴニストは、式XXによって表される構造を有する。

【 0 0 2 5】

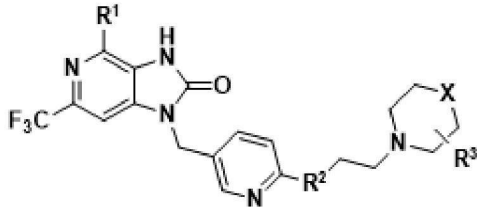
ある特定の例では、線維性疾患状態またはがん罹患する対象を治療する方法が本明細書において提供され、この方法は対象の細胞を、免疫調節物質がTLR7、8、または9のアゴニストを含む、本明細書に記載される化合物を含む少なくとも1つの化合物と接触させることを含む。

50

【0026】

いくつかの実施形態では、リンカーを介してTLRアゴニストに付着された葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む化合物であって、以下の式を有するTLRアゴニストまたはその薬学的に許容可能な塩が本明細書に提供される。

【化17】



10

【0027】

いくつかの実施形態では、R¹は、アミン基であり、R²は、単結合-NH-であり、R³は、H、アルキル、ヒドロキシ基、またはその任意の他の置換基であり、Xは、CH₂、NH、酸素(O)、または硫黄(S)であり、リンカーはR¹、R²、またはR³において付着される。

【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される式のいずれか1つの化合物を含む医薬組成物が提供され、上述のリンカーは、PEGリンカーまたはPEG誘導体リンカーを含み、R³において付着された放出不能リンカーであるか、またはR¹、R²、もしくはR³において付着された放出可能リンカーである。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な塩は、臭化水素酸塩、クエン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アスコルビン酸、塩酸塩、酒石酸塩、トリフラート、マレイン酸塩、メシル酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、またはフマル酸塩から選択される。

【0030】

本明細書のいくつかの実施形態では、細胞を、リンカーを介して、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体に付着した免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩を含む少なくとも1つの化合物(例えば、本明細書に提供される式によって提供される任意の化合物)と接触させることを含む、線維性疾患状態を予防または治療する方法が提供され、上記免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩は、パターン認識受容体を標的とする。いくつかの実施形態では、細胞は、線維性疾患状態を経験している、または経験するリスクがある対象の細胞を含み、細胞を少なくとも1つの化合物と接触させることが、治療有効量の少なくとも1つの化合物を対象に投与または適用することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象は、IPFを経験している患者であり、少なくとも1つの化合物は、対象に静脈内、筋肉内、腹腔内、局所的投与され、または吸入によって投与される。いくつかの実施形態では、線維性疾患状態は、IPFまたは肝臓、皮膚、膀胱、心臓、膵臓、前立腺、もしくは腎臓の線維性疾患を含む。

30

40

【0031】

いくつかの実施形態では、方法は、対象から試料を取得すること、または試料を取得したことで、試料中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを定量化することであって、1つ以上のバイオマーカーの各々が、CCL18、アルギナーゼ1(Arg1)、マトリックスメタロペプチダーゼ9(MMP9)、マトロプロテイナーゼ3(TIMP3)、インターロイキン1(IL-1)、ヒドロキシプロリン、コラーゲン、PDGF、TGF、葉酸受容体(FR)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロンガンマ(IFN-γ)、マンノース受容体(CD206)、分化抗原群(cluster of differentiation)163(CD163)、分化抗原群86(CD86)、インターロイキン6(IL-6)、ケモカイン10(CXCL10)、および免疫イン

50

ターフェロン (IFN) からなる群から選択される、定量化することと、試料中の1つ以上のバイオマーカーの各々の発現レベルを、対照中のそのようなバイオマーカーの発現レベルと比較することと、CCL18、Arg1、MMP9、TIMP3、IL-1、PDGF、TGF、FR、CD206、CD163、ヒドロキシプロリン、もしくはコラーゲンが、対照の発現レベルと比較してアップレギュレーションしているか、またはTNF、IFN-、IL-6、CXCL10、IFNもしくはCD86が、対照の発現レベルと比較してダウンレギュレーションしているもしくは発現していない場合に、治療有効量のコンジュゲートしていないアゴニストもしくは阻害剤を、対象に投与すること、または投与したことと、をさらに含む。

【0032】

10

いくつかの実施形態では、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体は、FRに特異的であり、細胞上のFRに結合する。

【0033】

本明細書のいくつかの実施形態では、細胞のパターン認識受容体を標的とする免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩に付着した標的化部分を含む化合物が提供され、当該標的化部分は、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む。

【図面の簡単な説明】

【0034】

本明細書に開示される実施形態および他の特徴、利点、および態様、ならびにそれらを達成する事項は、本開示の様々な例示的な実施形態の以下の詳細な説明に照らして、明らかになるであろう。このような詳細な説明は、添付図面と併せて考えると、より良く理解される：

20

【図1A】放出不能リンカー（例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 骨格部分を含む）を介して免疫調節物質 (Toll様受容体7 (TLR7) アゴニストラジカル) に付着された標的化部分 (葉酸受容体リガンド) を有する例示的化合物の化学構造を示す。

【図1B】放出可能リンカー（例えば、その骨格にジスルフィド部分を含む）を介して免疫調節物質 (TLR7 アゴニストラジカル) に付着された標的化部分 (葉酸受容体リガンド) を有する例示的化合物の化学構造、ならびに例示的な薬剤放出機構を示す。

【図2】線維性疾患またはがんを経験する、または経験するリスクがある対象を治療する方法の代表的なフローチャートを示す。

30

【図3A - 3F】各化合物について様々な濃度で、例示的遊離 (非標的化) TLR7アゴニストまたは例示的標的化 (例えば、葉酸受容体結合リガンドを有する) TLR7アゴニストと接触させた場合に、ヒトM2-型マクロファージから測定された様々なマーカーレベルのグラフデータを示す。図3A ~ 3Cに示されるデータは、非標的化TLR7アゴニストまたは標的化TLR7アゴニストのいずれかの投与が、M2型マクロファージをM1型マクロファージに首尾良く再プログラム化したこと (すなわち、M2型線維化促進マクロファージをダウンレギュレーションした) を裏付け、図3D ~ 3Fに示されるデータは、試験された化合物の投与がM1型マクロファージをアップレギュレーションしたことを裏付け、各値は、各群に対する平均 ± S.D. を表す、# P < 0.05、## P < 0.01、### P < 0.005、#### P < 0.0001、ダネットの多重比較検定による処置群対M2未処置群。

40

【図4A - 4E】様々な濃度の例示的遊離または標的化TLR7アゴニストと共に2時間 (図4A ~ 4E)、または46時間 (図5A ~ 5D) インキュベートされたM2マクロファージから測定された様々なマーカーレベルの代表的なグラフデータを示す。図4A ~ 4Eおよび図5A ~ 5Dは、M2型線維化促進表現型が、遊離および標的化TLR7アゴニストの投与後にダウンレギュレーションされたことを裏付ける。各値は、各群に対する平均 ± S.D. を表す、# P < 0.05、## P < 0.01、### P < 0.005、#### P < 0.0001、ダネットの多重比較検定による図4A - 5Dの化合物1Aおよび化合物1B処置群対M2未処置群。

【図5A - 5D】様々な濃度の例示的遊離または標的化TLR7アゴニストと共に2時間

50

(図4A~4E)、または46時間(図5A~5D)インキュベートされたM2マクロファージから測定された様々なマーカーレベルの代表的なグラフデータを示す。図4A~4Eおよび図5A~5Dは、M2型線維化促進表現型が、遊離および標的化TLR7アゴニストの投与後にダウンレギュレーションされたことを裏付ける。各値は、各群に対する平均±S.D.を表す、#P<0.05、##P<0.01、###P<0.005、####P<0.0001、ダネットの多重比較検定による図4A-5Dの化合物1Aおよび化合物1B処置群対M2未処置群。

【図6A-6D】様々な濃度の例示的な遊離および標的化TLR7アゴニストで、(i)48時間(図6Aおよび6B)、または(ii)2時間、次いで新鮮な培地と交換し、残りの46時間培養した(図6Cおよび6D)、処置されたM2マクロファージから測定された様々なマーカーレベルを表すグラフデータを示す。各値は、各群に対する平均±S.D.を表す、#P<0.05、##P<0.01、###P<0.005、####P<0.0001、ダネットの多重比較検定による化合物1Aおよび化合物1B処置群対M2未処置群。

【図6E】THP-1(急性単球性白血病患者に由来するヒト単球性細胞株)誘導マクロファージが、葉酸受容体ベータ(FR)陽性(FR+)であったことを支持するフローサイトメトリーデータを示す。

【図6F】例示的な標的化TLR7アゴニストが安定していることを示す。

【図7A】ブレオマイシン(BM)誘発実験線維症を有するマウスから採取され、抗マウスFR抗体を使用して染色された肺の染色画像を示し、ヘマトキシリン-エオシン(H&E)染色は、BM誘発肺損傷後7、14、および21日目に実行された。

【図7B】図7AのパネルにおけるFR染色の定量化を示す。

【図7C-7D】ヒト特発性肺線維症(IPF)肺組織(図7C)および健康なヒト肺組織(図7D)のFR免疫組織化学(IHC)染色を示す。

【図7E】BMを有するか、またはBM誘発実験線維症を有しない(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)対照)マウスから採取され、葉酸受容体標的化蛍光色素で画像化されたマウスの組織/器官の画像を示す。

【図7F】BM誘発実験線維症を有するマウスの蛍光活性化細胞選別機(FACS)分析を示す。

【図8A】BMモデルにおける遊離および標的化TLR7アゴニストの処置計画を示す。

【図8B-8G】図8AのBMモデルで処置されたマウスから測定された線維化促進マーカーレベル(図8B~8D)および抗線維化マーカーレベル(図8E~8G)を示す。

【図8H】図8AのBMモデルで処置されたマウスからの気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞の数を示す。

【図9A-9B】非標的化および標的化TLR7薬剤で処置した肺線維症マウスの生存曲線(図9A)および体重変化(図9B)を示す。

【図10A】線維化の尺度としての肺組織のヒドロキシプロリン含量($\mu\text{g}/\text{肺}$)を示す。

【図10B-10C】H&E染色(図10B)およびマッソントリクローム(コラーゲン)染色(図10C)使用する図9Aの肺組織を示す。

【図11A-11B】例示的な標的化TLR7アゴニストで処置した肺線維症を有するマウスの、生存曲線(図11A)および体重変化(図11B)を示し、各値は各群の平均±S.D.を表す。

【図12】BM誘発マウスにおける線維症の抑制に対する、本開示の例示的な標的化TLR7アゴニストの用量依存的効果を示す。

【図12A】BM誘導マウスの経時的な体重に関連するグラフデータを示す。

【図12B】本明細書に提供される様々な用量の例示的なコンジュゲート(例えば、化合物1B)で処置された肺組織のヒドロキシプロリン含量の測定を示す。

【図12C】様々な染色を用いた肺組織の組織学的分析のための画像を示す。各値は、各群に対する平均±S.D.を表し、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0001。

10

20

30

40

50

0005、スチューデントのt検定による、生理食塩水対ビヒクル群、処置群対ビヒクル群。

【図13A - 13D】本開示の方法に従って様々な濃度の例示的な標的化TLR7アゴニストで48時間にわたって再プログラム化されたM2様マクロファージから測定された様々なマーカーレベルを示し、および各値は各群に対する平均±S.D.を表す。

【図14A - 14C】様々な濃度の例示的な遊離および標的化TLR7アゴニストを用いて、本開示の方法に従って再プログラム化されたM2型マクロファージから測定された様々なマーカーレベルを示す。図14A ~ 14Cに示される各値は、各群に対する平均±S.D.を表し；#P<0.05、##P<0.005、###P<0.0005；####P<0.0001；ダネットの多重比較検定による、化合物3A、化合物3B処置、および化合物3C処置群対M2未処置群。

【図15】例示的な遊離TLR7アゴニストを用いた処置後の14A - 14Cの細胞の各群における分泌されたケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド18(CCL18)タンパク質レベルを示す。

【図16】BMマウスモデルの方法論を示す。

【図17A - 17B】本明細書に提供される例示的な標的化TLR7アゴニストの純度を示す。

【図18A - 18F】図16のインビボ研究方法論からのデータを示し、生存曲線(図18A)、体重変化(図18Bおよび18D)、BALFによる細胞の濃度(図18C)、生存マウス(図18E)およびすべてのマウス(すなわち、生存マウスおよび21日目以前に死亡したマウスの両方を含む)(図18F)におけるヒドロキシプロリン濃度($\mu\text{g HP/葉}$)を含む。

【図19】標的化TLR7アゴニストおよび非標的化TLR7アゴニストの両方が、ヒト単球由来の線維化促進マクロファージを抗線維化表現型に再プログラム化することを示す(図19A - 19F)。平均±S.D.群間の統計的有意性は、対応のない両側t検定を使用して決定された(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001)。

【図20】化合物1Aおよび化合物1Bによる処置後の健康なマウスの血漿サイトカインレベルの比較を示す(図20A - 20F)。図20Gは、本明細書に提供される例示的化合物を用いたマウス処置後の体重の変化を示し、隔日投与中の全身毒性の尺度としての体重の変化を示す(n=2)、平均±S.D.群間の統計的有意性は、対のない両側t検定を使用して比較された(*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

【図21】4',6-ジアミド-2-フェニルインドール(DAPI)(核、青色)、抗F4/80(マクロファージ、赤色)、および抗マンノース受容体(CD206)で染色された図6に記載の健康なおよび線維性肺を示す。

【0035】

本開示は、様々な修正および代替形態の影響を受けやすいが、その例示的な実施形態は、図面に例として示され、本明細書に詳細に説明される。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本開示の原理の理解を促進する目的で、ここで、図面に示されている実施形態を参照し、特定の言語を使用してそれを説明する。それにもかかわらず、これらの実施形態の説明によって範囲の制限が意図されていないことが理解されるであろう。それどころか、本開示は、添付の特許請求の範囲によって定義される本出願の精神および範囲内に含まれ得る代替物、改変物、および均等物を網羅することを意図している。前述のように、この技術は、1つ以上の好ましい実施形態で図示および説明され得るが、本明細書の組成物、化合物、および方法は、多くの異なる構成、形態、材料、および付属品を含んでもよい。

【0037】

以下の説明では、本開示の完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が記載されている。特定の実施例は、これらの特定の詳細の一部またはすべてなしで実施されても

10

20

30

40

50

よく、本開示は、特定の生物学的システム、特定の線維性疾患もしくはがん、または特定の器官もしくは組織に限定されず、当然のことながら変化し得るが、本明細書に提供されるデータに照らして引き続き適用可能であることを理解されたい。

【0038】

本開示の様々な技術および機構は、二つの構成要素の間の接続または連結を記述する場合がある。付着した、連結した、結合した、接続した、およびそれらの語尾変化の形態素を伴う類似の用語などの用語は、違いが注記されるか、または文脈から別途明らかでない限り、互換的に使用される。これらの単語および表現は、必ずしも直接接続を意味するものではなく、中間構成要素を介した接続を含む。2つの構成要素間の接続は、様々な他の構成要素が注目する2つの構成要素の間に存在し得るため、必ずしも直接的で障害のない接続を意味するとは限らないことに注意すべきである。したがって、特に明記されない限り、接続は必ずしも直接的で障害のない接続を意味するものではない。

10

【0039】

さらに、実行可能で都合の良い場合はいつでも、図および説明で、同一または類似の部品または工程を指すため同様の参照符号が使用される。図面は、正確な縮尺ではなく、簡略化された形態である。当然のことながら、本開示は、単に説明目的のためにこのように提示され、本明細書に記載される原理および実施形態は、本明細書に具体的に記述されるもの以外の構成を有する化合物および/または組成物成分に適用され得ることが理解される。実際に、本開示の組成物および化合物の成分は、その所望の適用を促進するように調整され得ることが明示的に企図される。

20

【0040】

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、化学および生物学の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料を、本出願の対象の実践または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料が本明細書に記載されている。さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、化合物/組成物が「an」アルキルまたはアリールで置換される場合、化合物/組成物が、少なくとも1つのアルキルおよび/または少なくとも1つのアリールで任意に置換される。さらに、別段の記載がない限り、用語「約」は、パーセンテージについては、値のプラスまたはマイナス10%の範囲を、単位値については、プラスまたはマイナス1.0単位を指し、例えば、「約1.0」は、0.9~1.1の値の範囲を指す。

30

【0041】

特定の実施形態では、本開示の化合物、組成物、および方法は、線維性疾患の予防および/または治療に有用である。特定の実施形態では、提供される化合物および/または組成物は、がんの予防および/または治療にも有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物、組成物、および方法は、(例えば、選択的に)自然免疫系を標的とする戦略を活用し、M2からM1へのマクロファージの極性化(polarization)を再プログラム化し、例えば、その抗線維化特性を利用する。

40

【0042】

概して、およびいかなる意図される限定も伴わず、本開示の新規化合物、組成物、および方法は、対象の自然免疫系を標的とし、M1型表現型の抗線維化特性に有利になるようにM2型からM1型へのマクロファージの極性化を再プログラム化する。例えば、少なくとも1つの例示的な実施形態では、こうした化合物および組成物は、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩と結合した、葉酸受容体結合リガンドまたはそのラジカルなどの、葉酸受容体(FR)を標的とする標的化部分を含む。以下で詳細に説明するように、こうした実施形態は、FRの限定的な発現を利用して、全身的に投与される化合物を直接FRの発現細胞(例えば、線維性および/またはがん性組織の細胞)に局在化させ、その結果、免疫調節因子成分が、活性化骨髄細胞(例えば、M2様マクロファージ)

50

を、抗線維化 M 1 極性化に変換することができようにする。この標的化設計は、免疫系の全身の活性化を有利に防止し、したがって毒性を回避する。

【 0 0 4 3 】

さらなる例示的な実施形態は、標的化部分と免疫調節物質との間に配置されるリンカーを含み得る。こうしたリンカーは、放出可能であっても、放出不能であってもよい。本明細書に記載されるように、放出可能リンカーを含む本開示の化合物 / 組成物は、投与された場合、免疫調節物質が活性になる時間またはその前後に、標的化部分および免疫調節物質が互いに放出される結果となる。追加的または代替的に、本開示の化合物 / 組成物が放出不能リンカーを含む実施形態では、標的化部分および免疫調節物質が投与された場合、生理学的条件下ではすぐには放出されない。このようにして、標的細胞による取り込みおよび / または免疫調節物質の活性化の後、成分は一緒に留まる。

10

【 0 0 4 4 】

本開示の様々な実施形態、ならびにそれを裏付ける実施例に関するデータをこれから説明する。主に、脊椎動物に見られる 2 つの主要な免疫戦略、自然免疫系および適応免疫系がある。自然免疫応答または非特異的免疫応答は、非自己病原体に対する防御の第一線であり、物理的、化学的および細胞的防御から構成される。一方、適応免疫系は、一次自然免疫防御を回避または克服する病原体に対して作用するように呼び出される。

【 0 0 4 5 】

炎症反応は、免疫において重要な役割を果たしている。組織が損傷されたとき、または病原体が検出されたとき、例えば、炎症反応が開始され、免疫系が起動される。自然免疫系の免疫細胞（すなわち、好中球および好酸球）は、血管およびリンパ系を介して組織損傷または損傷または病原体の位置の部位に最初に動員され、続いてマクロファージが動員される。

20

【 0 0 4 6 】

自然免疫系の細胞は、微生物病原体または他の非自己分子に存在する特定のタンパク質配列を感知して結合する、特別なパターン認識受容体を発現することができる。本明細書で使用される場合、「パターン認識受容体」は、白血球 - 例えば少なくともマクロファージ - の膜上に発現される、任意の免疫受容体を意味しかつそれらを含み、受容体を活性化し、最終的に自然免疫応答（および特定の場合、最終的に抗原特異的獲得免疫の発達）をもたらす特異的リガンドを結合することができる。

30

【 0 0 4 7 】

パターン認識受容体に結合することができる 2 種類の分子のクラスの例としては、微生物病原体に関連する病原体関連分子パターン、および細胞損傷または死の間に放出される宿主細胞の成分に関連する損傷関連分子パターンが含まれる。パターン認識受容体によるこれらのタンパク質配列の認識は、産物が自然免疫応答を制御する特定の遺伝子の発現を誘発するシグナル伝達経路を開始することができる（例えば、場合により、抗原特異的獲得免疫の発達を指示する）。したがって、パターン認識受容体は、これらのシグナル伝達経路を媒介し、特定の事例では、自然免疫応答、さらには適応免疫応答を正または負に制御するために使用することができる。

【 0 0 4 8 】

マクロファージは、食作用を介して病原体を排除することが知られている白血球の多様なグループであり、局所組織環境に応答してどのような特異的分化が起こるかに応じて、大きく M 1 または M 2 表現型を有するかのいずれかとして分類される。場合により、マクロファージは、インターフェロンガンマ（IFN - ）、リポ多糖類（LPS）、および / または顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）への曝露によって、M 1 表現型に向かって極性化される。ある特定の例では、M 1 表現型は、高レベルの炎症誘発性サイトカインの産生（例えば、インターロイキン 1（IL - 1）、腫瘍壊死因子（TNF）、インターロイキン 12（IL - 12）、インターロイキン 18（IL - 18）、および / またはインターロイキン 23（IL - 23）など）、病原体に対する耐性を媒介する能力、強力な殺菌特性、反応性窒素および酸素中間体の高産生、および / また

40

50

はTヘルパー1型(T_h1)応答の促進を特徴とする。場合により、M1極性化は、自然免疫応答の「攻撃および殺傷」段階と関連付けられる。ある特定の例では、M1極性化は、感染の初期確立を阻害または防止し、および/または損傷した組織を除去するように機能する。

【0049】

ある特定の例では、自然免疫系がこの「攻撃および殺傷」段階を実行した後、マクロファージは、それ自体を再プログラム化して治癒系(すなわち、M2型)となり得、例えば、治癒を促進するために成長因子を放出し得る。このような成長因子は、インターロイキン4(IL-4)、インターロイキン10(IL-10)、血小板由来成長因子(PDGF)、トランスフォーミング成長因子-1(TGF-β)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド18(CCL18)、および/またはインターロイキン13(IL-13)などの特定のサイトカインを含み得るが、これらに限定されない。ある特定の例では、このようなサイトカイン/成長因子への曝露は、代替的にM2マクロファージ表現型を活性化する。

10

【0050】

M1とは対照的に、M2マクロファージは、創傷治癒および組織修復と関連し得る。場合により、M2マクロファージは、組織リモデリング、免疫調節/抑制、および/または腫瘍促進への関与を特徴とする。特定の例では、M2マクロファージは、細胞増殖を誘発するポリアミンおよび/またはコラーゲン産生を誘発するプロリンを産生する。この治癒応答は、健康な対象に有益であるが、M2マクロファージの存在は、線維性疾患またはがん罹患する対象に対する免疫抑制および/または腫瘍成長および線維症の促進を通して、著しく有害な影響を与え得る。

20

【0051】

例えば、線維性病態は、未知の外傷または上皮への損傷から始まる可能性がある。結果として生じる組織損傷に応答して、ケモカインおよび他の因子を放出して、損傷した組織への免疫細胞の浸潤を促進でき(例えば、自然免疫反応)、これには、例えば、M2様表現型が想定される、例えば、線維化促進サイトカインを放出する単球およびマクロファージが含まれる。次いで、これらのサイトカインの慢性的な分泌は、組織内在性および浸潤性線維芽細胞/線維細胞を活性化して筋線維芽細胞になり、次にコラーゲンおよび他の細胞外基質タンパク質を分泌して周囲の組織を硬化させ得る。場合により、これらのM2マクロファージは、線維症を促進することによって疾患を悪化させる。例えば、特発性肺線維症(IPF)の対象では、例えば、M2マクロファージが肺に浸潤し、その中の線維症を促進し得、それら機能をさらに低下させる。場合により、M2表現型によって産生される成長因子および他のサイトカインは、同様の経路を通してがん性腫瘍の成長を推進する。

30

【0052】

M2様マクロファージのM1様マクロファージへの再プログラム化

特定のがんおよび線維性疾患では、マクロファージは、抗炎症性(M2様)表現型に対して不釣り合いに偏っている可能性がある。ある特定の例では、免疫調節物質は、例えば、活性化骨髄細胞(例えば、M2様マクロファージ)を抗線維化M1極性化(例えば、それらが成長因子および/または関連サイトカインをほとんどまたは全く産生せず、例えば、疾患状態の進行を遅くするかまたは排除する)に変換する-例えば再プログラム化することができる。ある特定の例では、本明細書に提供される組成物および方法は、線維性疾患(例えば、IPFおよび特定のがん)の発症の経過中に観察される抗線維化から線維化促進へのシフトを逆転させる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法は、個体または対象から採取された試料中の線維性バイオマーカー(例えば、線維化促進活性に関連するもの(例えば、CCL18、ヒドロキシプロリン、およびコラーゲン)の量/発現を減少させる。本明細書で使用される場合、「個体」、「対象」または「患者」は、哺乳動物であり、好ましくはヒトであるが、動物であってもよい。

40

【0053】

50

用語が本明細書で使用されるような「マーカー」または「バイオマーカー」は、活性な疾患状態を経験している対象における発現のレベルが、健康な対象または疾患状態を経験していない対象または試料の発現レベルとは著しく異なる場合に、差次的に発現されているとして記述され得る。差次的に発現されたマーカーは、正常試料もしくは対照試料、または対象のベースラインの発現レベルと比較して、過剰発現または過小発現（*under express*）されてもよい（直前の段落で述べた実施形態では、バイオマーカーは減少または過小発現される）。生物学的試料中のマーカーの増加または減少、または定量は、遺伝子産物または転写物の存在および/または相対的存在量を測定するための当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって決定され得る。マーカーのレベルは、絶対値として、またはベースライン値と比較して決定されてもよく、またカットオフ指標（*cutoff index*）と比較した対象のマーカーのレベルとして決定されてもよい。あるいは、1つまたは複数のマーカーの相対的存在量は、臨床的に正常な対象であり得る対照と比較して決定されてもよい。さらに、本明細書で使用される場合、用語「遺伝子過剰発現」および「過剰発現」（遺伝子に関連して使用される場合）およびそれらの形成物は、変異表現型を引き起こし得る、および/または豊富な標的タンパク質発現をもたらし得る野生型遺伝子産物の過剰発現または誤発現を含む（限定されるものではない）、関連分野の当業者による、それに起因する意味を有する。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法は、抗線維化バイオマーカー（例えば、TNF および IFN - ）を増加させる。いくつかの実施形態では、M2様表現型シフトを逆転させる（例えば、線維性疾患、障害、またはその状態に対して効果的な治療を提供する）組成物が提供される。

20

【0055】

少なくとも1つの実施形態では、免疫調節物質を含む薬剤を使用して、本明細書に記載される方法で使用される化合物が作製される。本明細書で使用される場合、「免疫調節物質」は、免疫系の1つ以上の構成要素の活性化または活性の増加を誘導することによって、対象の免疫系を刺激するか、またはそうでなければ影響を与える、任意の薬剤、弾頭（*warhead*）、またはその他の組成物もしくは化合物を意味する。例えば、限定されるものではないが、免疫調節物質は、免疫細胞におけるシグナル伝達経路を標的とすることに加えて、またはこれの代わりに、1つ以上のパターン認識受容体を標的とする化合物または組成物を含むことができる。

30

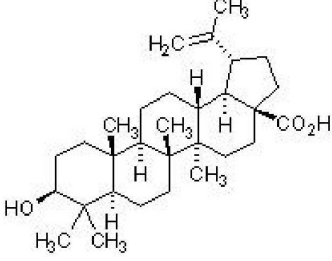
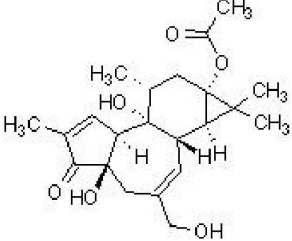
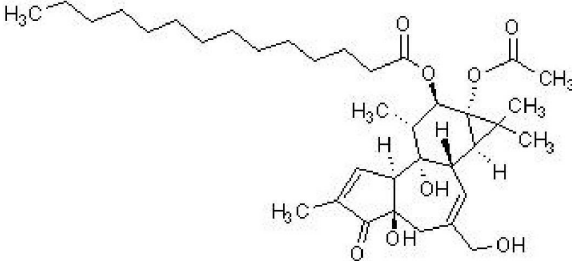
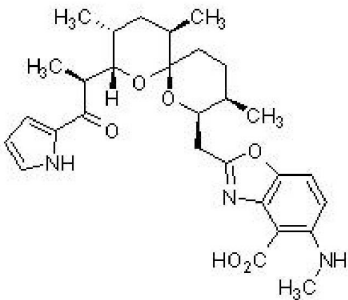
【0056】

本開示の免疫調節物質の例には、限定されるものではないが、*toll*様受容体（TLR）のアゴニスト、インターフェロン遺伝子の刺激物質（*STING*）、ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン（*NOD*）様受容体（*NLR*）、レチノイン酸誘導性遺伝子I（*RIG-I*）様受容体（*RLR*）、アブセントインメラノーマ（*absent in melanoma*）2（*AIM2*）様受容体（*ALR*）、糖化最終産物（*advanced glycation end product*）の受容体（*RAGE*）、または細胞のエンドソームまたは細胞質内に位置する、任意の他のパターン認識受容体を含む。本開示の免疫調節物質は、追加的または代替的に、経路のさらに下流で機能する、活性化細胞の核内因子カッパ-軽鎖エンハンサー（*NF*）活性化因子またはIキナーゼ阻害剤を含んでもよい。表1は、本開示の免疫調節物質として採用され得る、このようなNF活性化因子またはIキナーゼ阻害剤の例を提供する。

40

【表 1】

表 1 NF κ B 活性化因子／誘導因子

化合物	構造
AA	
BB	
CC	
DD	

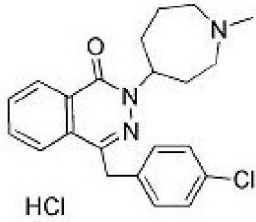
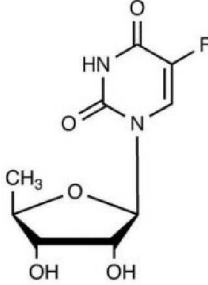
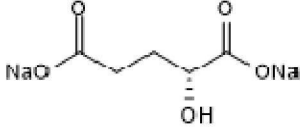
10

20

30

40

50

EE	
FF	
GG	

10

20

30

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される場合、「TLR」は、自然免疫系で役割を果たすタンパク質のクラスであり、パターン認識受容体の一例である。TLRは、微生物に由来する構造的に保存された分子を認識する単一の膜貫通型受容体であり得る。TLRは、例えば、樹状細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、適応免疫細胞（例えば、Tリンパ球およびBリンパ球）および非免疫細胞（上皮細胞および内皮細胞および線維芽細胞）を含む、白血球の膜上に発現され得る。TLRの非限定的な例としては、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12、およびTLR13が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるTLRアゴニストは、1つ以上のTLRに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるTLRアゴニストは、TLR7、TLR8、またはTLR9に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるTLRアゴニストは、TLR7に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるTLRアゴニストは、TLR7およびTLR8に結合する。いくつかの実施形態では、アゴニストは、受容体に結合し、受容体を活性化するリガンドである。

40

【 0 0 5 8 】

活性化マクロファージ（M2様表現型）をM1様表現型に再プログラム化することに適した任意の治療薬（例えば、薬剤）を使用してもよく、薬剤（または弾頭）は、細胞のエンドソームおよび/または細胞質で（例えば、その構造に応じて）動作してもよい。少なくとも1つの実施形態では、治療剤は、免疫調節物質（例えば、パターン認識受容体およ

50

び/またはその下流シグナル伝達経路を正に制御するもの(それぞれの場合、自然免疫系の一部)、例えば、TLR、NLR、RLR、ALR、RAGE、および/もしくはSTINGアゴニスト、ならびに/またはPelletier/インターロイキン-1受容体関連キナーゼ(IRAK)ファミリー、例えばIRAK-M阻害剤など)を含む。他の実施形態では、本明細書に提供される化合物は、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PIK)キナーゼ阻害剤、または適応免疫系を負に制御する他の阻害剤を含む(例えば、単独でまたはパターン認識受容体を標的とする免疫調節物質と併用され得る)。いくつかの実施形態では、特にIPFまたは他の線維性状態の治療に使用されるとき、組成物または化合物(例えば、薬剤)は、(a)パターン認識受容体を標的とする免疫調節物質、および/またはその自然免疫系の下流シグナル伝達経路のアゴニストである免疫調節物質、ならびに(b) 10
例えばラパマイシンまたはCZ415などの、哺乳動物ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)阻害剤(ATP競合的またはその他)の組み合わせ、を含む。

【0059】

特定の実施形態では、本明細書では、細胞のパターン認識受容体を標的とする免疫調節物質(またはそのラジカル)に付着した標的化部分(またはそのラジカル)を含む化合物が提供され、当該標的化部分は、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む。「葉酸」とは、葉酸および葉酸の類似体および誘導体、例えば、葉酸、プテロイルポリグルタミン酸、プテロイル-D-グルタミン酸、および葉酸受容体結合プテルジン、例えばテトラヒドロプτεリン、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、およびそれらのデアザおよびジデアザ類似体を含むがこれらに限定されない。 20

【0060】

用語「デアザ」および「ジデアザ」類似体は、天然の葉酸構造中の1つまたは2つの窒素原子の代わりに炭素原子を有する、当技術分野に認識される類似体、またはその類似体もしくは誘導体を指す。例えば、デアザ類似体は、葉酸、フォルリン酸、プテロポリグルタミン酸、およびテトラヒドロプτεリン、ジヒドロ葉酸、およびテトラヒドロ葉酸などの葉酸受容体結合プτεリジンの1-デアザ、3-デアザ、5-デアザ、8-デアザ、および10-デアザ類似体を含み得る。ジデアザ類似体としては、例えば、葉酸の1,5-ジデアザ、5,10-ジデアザ、8,10-ジデアザ、および5,8-ジデアザ類似体が挙げられる。本開示の文脈において、複合形成リガンドとして有用な他の葉酸は、葉酸受容体結合類似体ペメトレキセド、プログアニル、ピリメタミン、トリメトプリム、プララトレキサート、ラルチトレキセド、アミノプτεリン、アメトプτεリン(メトトレキサートとしても知られる)、N¹⁰-メチル葉酸、2-デアミノダイドロキシ葉酸、デアザ類似体、例えば1-デアザメトプτεリンまたは3-デアザメトプτεリン、および3',5'-ジクロロ-4-アミノ-4-デオキシ-N¹⁰-メチルプテロイルグルタミン酸(ジクロロメトトレキサート)などである。 30

【0061】

葉酸(folic acid)、ならびに前述の類似体および/または誘導体も、葉酸受容体に結合する能力を反映するように、「葉酸(folate)」、「当該葉酸」、または「複数の葉酸(folates)」と呼ばれる。本明細書に記載されるように、こうした分子は、外因性分子とコンジュゲートされた場合、葉酸媒介性エンドサイトーシスを介してなど、膜貫通輸送を強化するのに効果的である。前述の文献は、本明細書に記載される葉酸受容体結合リガンドにおいて使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「リガンド」は、化合物の中央原子またはイオン(例えば、薬剤)に付着される分子、イオン、または原子である。 40

【0062】

本開示の新規化合物の特定の実施形態がここに提供される。当業者であれば、本開示の化合物が多形を呈し得ることを理解するであろう。実際、本開示の化合物は、有用な特性を示す、本明細書に記載される化合物の任意のラセミ体、光学的活性体、多形体、もしくは立体異性体、またはそれらの混合物を含み得、光学的活性体の調製方法(例えば、再結晶技術によるラセミ体の分割によって、光活性出発物質からの合成によって、キラル合成 50

によって、またはキラル固定相を使用したクロマトグラフィー分離によって)、および本明細書に記載される標準試験を使用して、または当技術分野で周知の他の類似の試験を使用して抗腫瘍活性を決定する方法は、当技術分野でよく知られている。さらに、別段の明示的な記載がない限り、本明細書に描写される構造はまた、構造のすべての立体化学的形態、すなわち、各非対称中心の構成の右手(R)および左手(S)構成を含むことを意味する。したがって、本組成物の単一立体化学異性体ならびにエナンチオマーおよびジアストロメア混合物は、本開示の範囲内である。

【0063】

ラジカル、置換基、および範囲について本明細書に列挙された特定の値は、別段の指定がない限り、例示目的のみを目的としており、このような実施例は、ラジカルおよび置換基について、他の定義された値、または定義された範囲内の他の値を除外しない。例えば、(C₁-C₆)アルキルは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、ペンチル、3-ペンチル、もしくはヘキシルとすることができ、(C₁-C₃)アルキルは、ヨードメチル、プロモメチル、クロロメチル、フルオロメチル、トリフルオロメチル、2-クロロエチル、2-フルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、もしくはペンタフルオロエチルとすることができ、(C₁-C₃)アルコキシは、メトキシ、エトキシ、もしくはプロポキシとすることができ、(C₂-C₆)アルカノイルオキシは、アセトキシ、プロパノイルオキシ、ブタノイルオキシ、イソブタノイルオキシ、ペンタノイルオキシ、またはヘキサノイルオキシとすることができる。

【0064】

さらに、ある部分がR置換基または置換基で置換される場合、その基は「R置換される」と呼んでもよい。部分がR置換されるか、またそうでなければ一般に置換基を含むものとして記載される場合、部分は少なくとも1つのR置換基で置換され、各置換基は任意選択的には異なる。置換基(またはR置換基)は、任意の分子または組み合わせ分子を含んでもよいが、その含有が、化合物の全体的な構造および形状に実質的に影響せず、またその意図された目的を達成する(例えば、標的パターン認識受容体への結合)基礎となる化合物に必須である任意の水素結合を変化させない場合、任意の分子または組み合わせ分子を含んでもよいことが理解されるであろう。

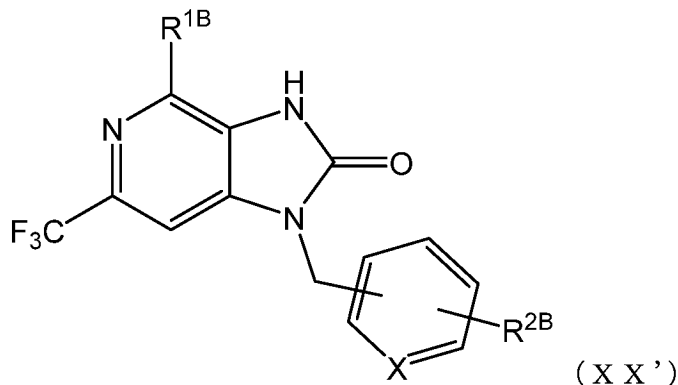
【0065】

置換基が、左から右に書かれた従来の化学式によって指定される場合、それらは、例えば、-CH₂O-が-OCH₂-と同等であるなど、構造を右から左に記述することから生じる化学的に同一の置換基を同様に包含する。

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物の免疫調節物質(例えば、TLR7アゴニスト)基は、式XXの構造、より具体的には、式XX'の構造を有するラジカルであり；

【化18】



式中、

10

20

30

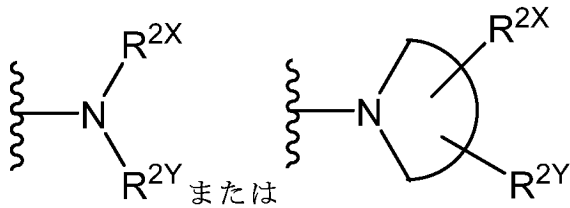
40

50

R^{1B} は、 $-NH_2$ または $-NH-R^{1X}$ であり、

R^{2B} は、水素 (H)、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、ヘテロアリール、 $-NH-R^{2X}$ 、 $-O-R^{2X}$ 、 $-S-R^{2X}$ 、

【化19】

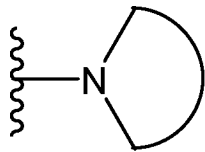


10

であり、

R^{1X} 、 R^{2X} 、および R^{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

【化20】



20

は、3 ~ 10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

Xは、CHまたは窒素(N)である。

【0067】

本明細書で使用される場合、アルキル、アルコキシなどは、直線(すなわち、非分岐)もしくは分岐鎖、またはそれらの組み合わせを示し、それらは、完全に飽和、一価または多価不飽和であってもよく、二価および多価ラジカルを含んでもよく、指定される炭素原子の数を有する(すなわち、 $C_1 - C_{10}$ は、1 ~ 10個の炭素を意味する)。飽和炭化水素ラジカル例としては、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、(シクロヘキシル)メチル、例えば、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなどの相同体および異性体の基が挙げられる。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するアルキル基である。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル-2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペナジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにより高い相同体および異性体が挙げられるが、これらに限定されない。アルコキシは、酸素リンカー(-O-)を介して分子の残りの部分に付着されるアルキルである。いくつかの実施形態では、アルコキシは、式-O-アルキルの酸素原子を介して結合されるラジカルを指す。

30

40

【0068】

概して、用語「アシル」または「アシル置換基」は、無機酸を含むオキソ酸から1つ以上のヒドロキシル基を除去することによって誘導されるものを指し、二重結合酸素原子およびアルキル基を含有する。さらに、「プロピル」などの個々のラジカルへの言及は、直鎖ラジカルのみを包含し、特に参照される「イソプロピル」などの分岐鎖異性体が具体的に言及されている。

【0069】

いくつかの実施形態では、TLR7アゴニストは、式Xを有し、TLR7アゴニストは

50

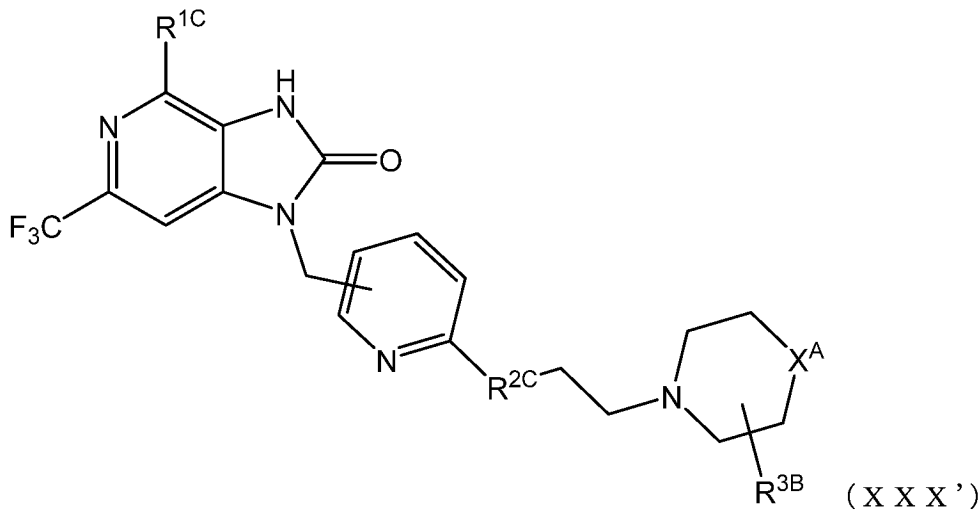
リンカーを介して R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^{3A} 、または R^{3B} のうちのいずれか 1 つにおいて標的化部分にコンジュゲートされ、TLR7 アゴニストは式 XX' を有する場合、TLR7 アゴニストはリンカーを介して R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^{3A} 、または R^{3B} のうちの 1 つにおいて標的化部分にコンジュゲートされる。

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、A、B、または S との化学結合を形成するように生体機能的に適合され、分子の 2 つ以上の機能的部分を接続して本開示の化合物を形成する、原子の鎖を含む。例示的には、原子の鎖は、炭素 (C)、N、酸素 (O)、硫黄 (S)、ケイ素 (Si)、およびリン (P)、または C、N、O、S、および P、C、N、O、および S から選択され得る。原子の鎖は、葉酸および薬剤などの化合物の異なる機能的能力を共有結合し得る。リンカーは、連続する骨格中の約 2 ~ 約 100 原子の範囲など、多種多様な連結を含んでもよく、放出可能または放出不能リンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物の免疫調節物質 (例えば、TLR7 アゴニスト) 基は、式 XXX の構造、より具体的には、式 XXX' の構造を有するラジカルであり、

10

【化 2 1】



20

30

式中、

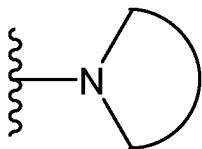
R^{1C} は、 $-NH_2$ または $-NH-R^{1X}$ であり、

R^{2C} は、結合、 NH 、 $-NR^{1X}$ 、または CH_2

であり、

該当する場合、

【化 2 2】



40

は、3 ~ 10 員の N 含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

X^A は、 CH_2 、 NH_2 、または $-NH-R^{1X}$ であり、

各 R^{1X} は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され、

TLR7 アゴニストは、リンカーを介して R^{1C} 、 R^{2C} 、または R^{3B} のうちの 1 つにおいて標的化部分にコンジュゲートしている。

50

【0071】

いくつかの実施形態では、化合物は、標的化部分と免疫調節物質との間のリンカー、またはそうでなければ、接続するリンカー（「L」または「L_n」）をさらに含む。いくつかの実施形態では、リンカーL_nは、免疫調節物質の放出を回避するように構成され、nは50以下の整数である。いくつかの実施形態では、リンカーL_nは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカーまたはPEG誘導体リンカーを含み、nは、1～32の範囲から選択される整数であり、標的化部分は、葉酸受容体に特異的である。いくつかの実施形態では、nは、1～50、1～10、2～8、または2～4である。

【0072】

いくつかの実施形態では、Lは、加水分解可能リンカーである。いくつかの実施形態では、Lは、加水分解不能リンカーである。いくつかの実施形態では、Lは、任意選択的に置換されたヘテロアルキルである。 10

【0073】

用語「アルキレン」は、単独で、または別の置換基の一部として、別段の記載がない限り、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ で例示されるが、これに限定されないアルキルに由来する2価ラジカルを意味する。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24個の炭素原子を有する。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、短鎖アルキルまたはアルキレン基であり、概して8個以下の炭素原子を有する。

【0074】

用語「ヘテロアルキル」は、単独でまたは別の用語と組み合わせて、別段の記載がない限り、少なくとも1つの炭素原子、およびO、N、P、Si、およびSからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子から構成される、安定な直鎖もしくは分岐鎖、またはその組み合わせを意味し、窒素および硫黄原子は任意で酸化されてもよく、窒素ヘテロ原子は任意選択で四分化（quarternized）されてもよい。ヘテロ原子O、N、P、S、およびSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置、またはアルキル基が分子の残りの部分に付着される位置に配置されてもよい。例としては、限定されるものではないが、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH_2=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 、 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-O-CH_3$ 、 $-O-CH_2-CH_3$ 、および $-CN$ が挙げられる。最大2個のヘテロ原子が、例えば、 $-CH_2-NH-OCH_3$ のように、連続してもよい。 20 30

【0075】

同様に、用語「ヘテロアルキレン」は、それ自体、または別の置換基の一部として（別段の記載がない限り）、例えば、 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2$ および $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2$ によって例示されるが、これに限定されないヘテロアルキルに由来する2価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基については、ヘテロ原子はまた、鎖末端（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）のいずれかまたは両方を占有してもよい。さらにまた、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基については、連結基の式が記述される方向によって、連結基の配向は暗示されない。例えば、式 $-C(O)_2R'$ は、 $-C(O)_2R'$ および $-R'C(O)_2$ の両方を表す。上述のように、ヘテロアルキル基は、本明細書で使用される場合、例えば $-C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$ 、および/または $-SO_2R'$ などのヘテロ原子を介して分子の残りの部分に付着される基を含む。「ヘテロアルキル」が列挙され、その後 $-NR'R''$ などの特定のヘテロアルキル基の列挙が続く場合、ヘテロアルキルおよび $-NR'R''$ という用語は、重複または相互に排他的ではないことが理解されよう。むしろ、明確さを加えるために特定のヘテロアルキル基が列挙される。したがって、用語「ヘテロアルキル」は、本明細書では、 $-NR'R''$ などの特定のヘテロアルキル基を除外するものと解釈されるべきではない。 40

【0076】

いくつかの実施形態では、Lは、アルキル、ヒドロキシル、オキシ、PEG、カルボキシレート、およびハロからなる群から選択される少なくとも1つの置換基を含む置換ヘテロアルキルである。「ハロ」または「ハロゲン」は、それ自体でまたは別の置換基の一部としての別段の記載がない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。

【0077】

いくつかの実施形態では、Lは、スペーサー（例えば、本明細書の別の箇所に記載されるように）を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ペプチドグリカンまたは糖を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、Lは、その骨格中に少なくとも1つのジスルフィド結合を有する置換ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、Lは、その骨格中に少なくとも1つのジスルフィド結合を有するペプチドである。

【0079】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマー、ポリペプチド、またはポリペプチド、ペプチド、もしくは融合ポリペプチドの断片を指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然由来のアミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然由来のアミノ酸ポリマーおよび非天然由来のアミノ酸ポリマーに適用される。

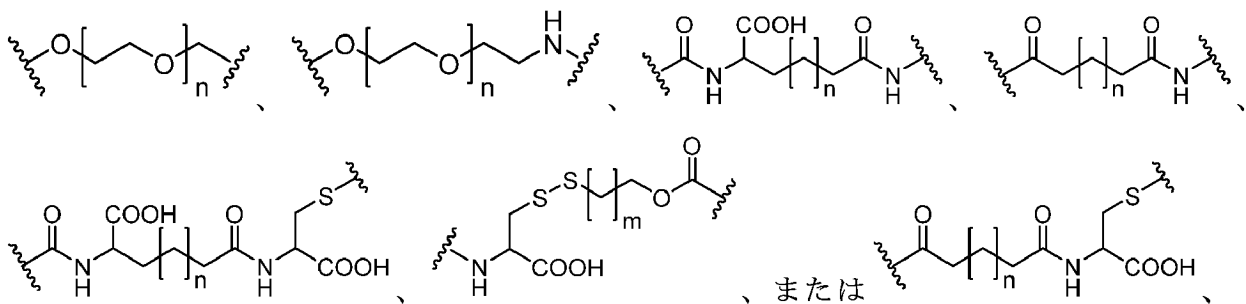
【0080】

いくつかの実施形態では、Lは、 $-CONH-CH(COOH)-CH_2-S-S-CH_2-CR_aR_b-O-CO-$ 、 $-CONH-CH(COOH)CR_aR_b-O-CO-$ 、 $C(O)NHCH(COOH)(CH_2)_2-CONH-CH(COOH)CR_aR_b-O-CO-$ または $-C(O)NHCH(COOH)(CH_2)_2-CONH-CH(COOH)-CH_2-S-S-CH_2-CR_aR_b-O-CO-$ を含み、式中、 R_a および R_b は独立して、H、アルキル、またはヘテロアルキルである（例えば、PEG）。

【0081】

いくつかの実施形態では、Lは、以下の構造を含み、

【化23】



式中、 n および m は、それぞれ独立して $0 \sim 10$ である。

【0082】

いくつかの実施形態では、Lは、以下の構造を含み、

10

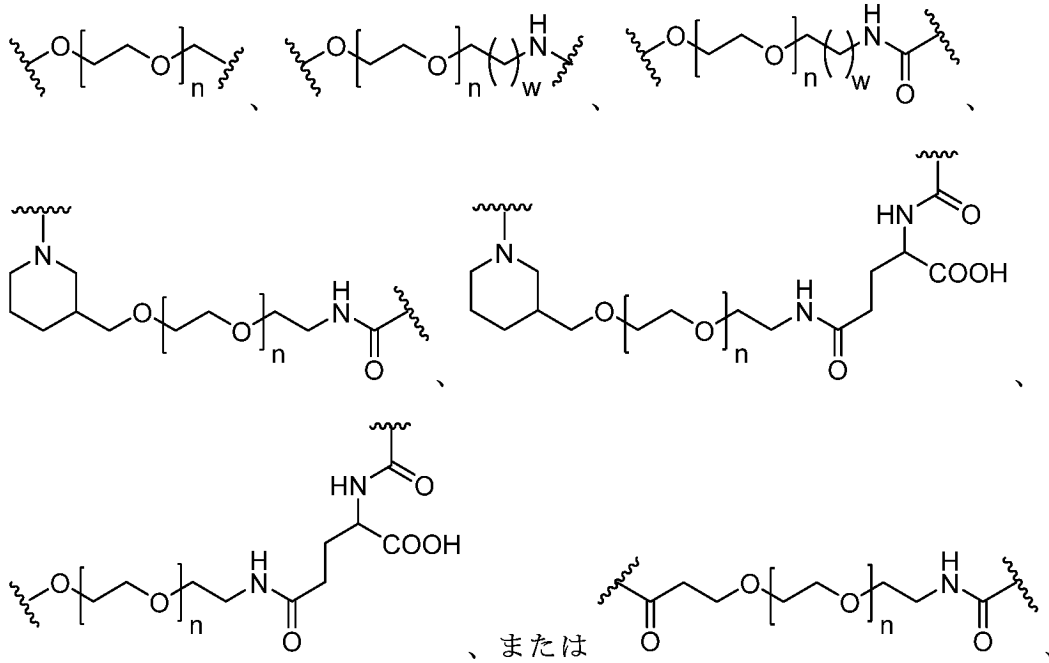
20

30

40

50

【化 2 4】



10

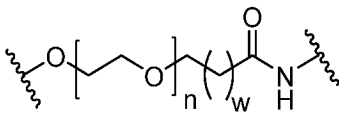
20

式中、 n は、1～32である。少なくとも1つの例示的な実施形態では、 n は1～30であり、 w は0～5である。

【0083】

いくつかの実施形態では、 L は、以下の構造を含み

【化 2 5】



30

式中、 n は1～30であり、 w は0～5である。

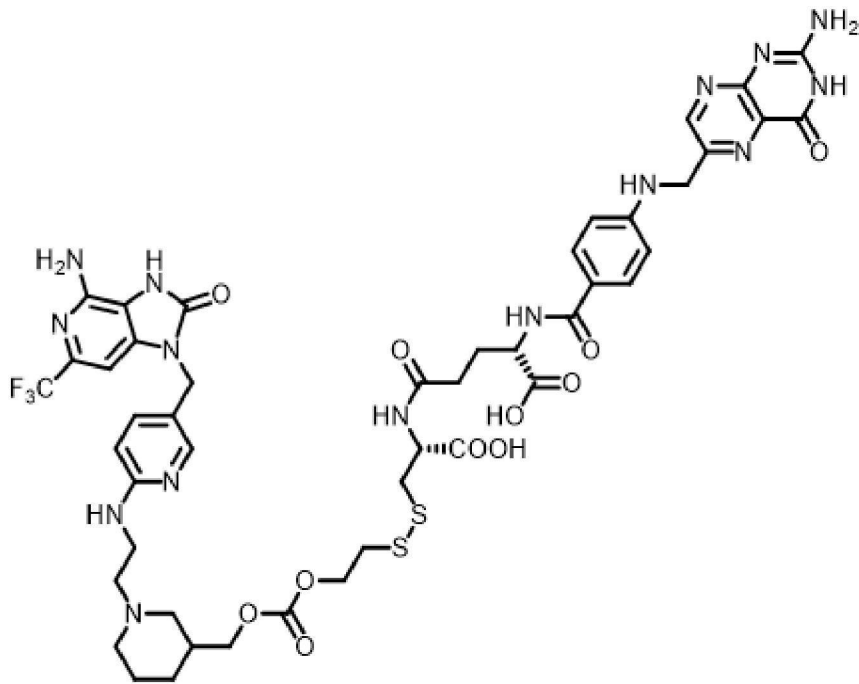
【0084】

いくつかの実施形態では、化合物は、下式で表される構造を有する。

40

50

【化 2 6】



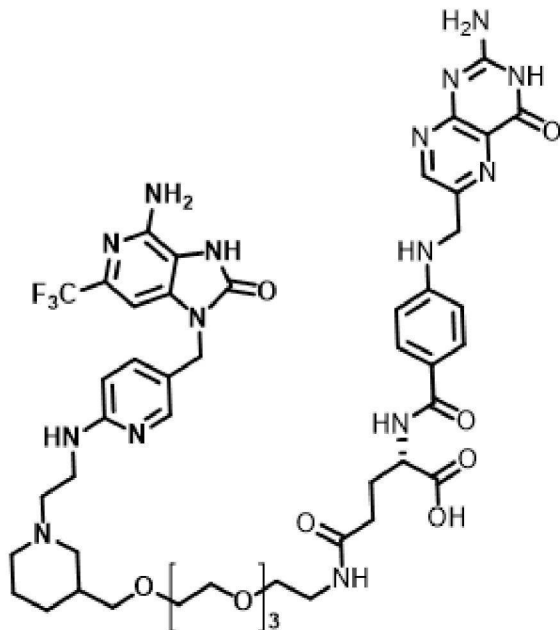
10

20

【 0 0 8 5】

いくつかの実施形態では、化合物は、下式で表される構造を有する。

【化 2 7】



30

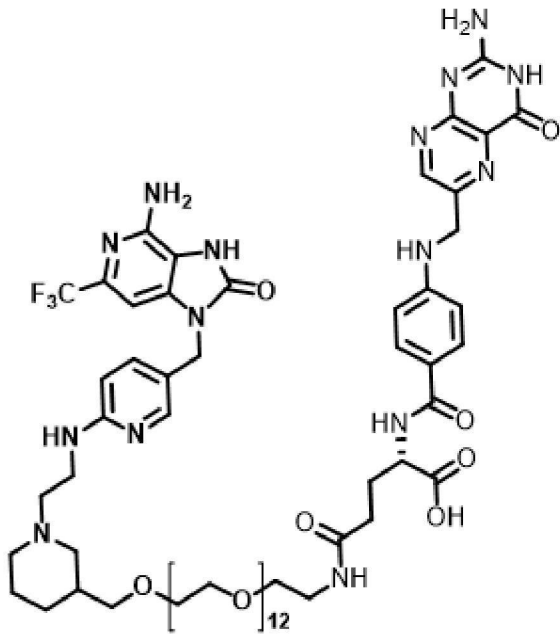
40

【 0 0 8 6】

いくつかの実施形態では、化合物は、下式で表される構造を有する。

50

【化 2 8】



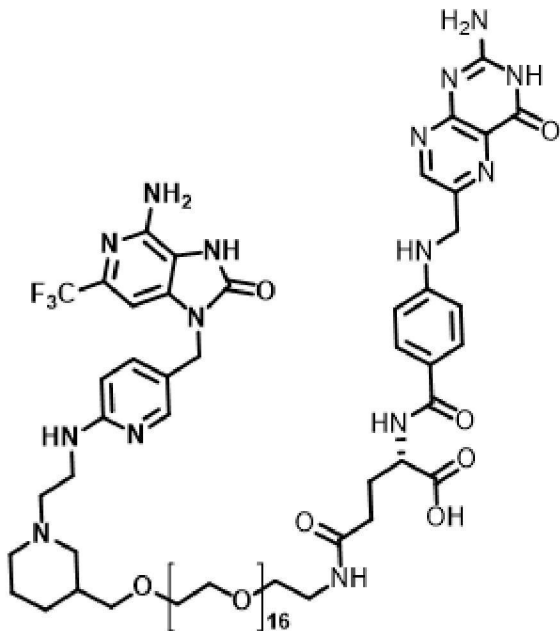
10

20

【 0 0 8 7】

いくつかの実施形態では、化合物は、下式で表される構造を有する。

【化 2 9】



30

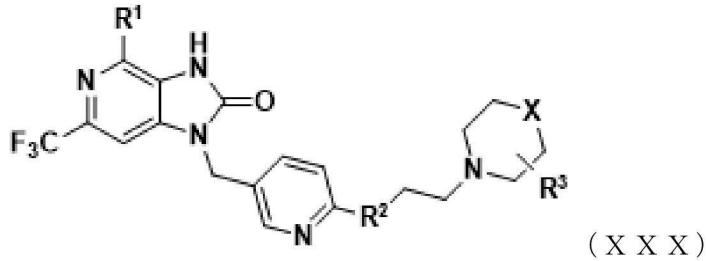
40

【 0 0 8 8】

特定の実施形態では、本明細書に提供されるのは、リンカーを介してTLRアゴニストを含む免疫調節物質に付着された葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体を含む標的化部分を含む化合物であり、TLRアゴニストは、式XXXによって表される以下の構造を有し、

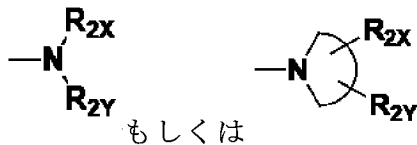
50

【化30】



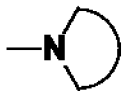
式中、 R^1 はアミン基であり、 R^2 は、単結合 - NH - であり、 R^3 はH、アルキル、ヒドロキシ基、またはその任意の他の置換基であり、Xは、CH₂、NH、O、またはSであり、リンカーは、 R^1 、 R^2 、または R^3 において付着される。追加的または代替的に、 R_1 は、-NH₂もしくは- NH - R_{1X} であってもよく、 R_2 は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、- NH - R_{2X} 、- O - R_{2X} 、- S - R_{2X} 、

【化31】



であり得、 R_{1X} 、 R_{2X} 、および R_{2Y} の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択され得、

【化32】



は、3 ~ 10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり得、ならびに / またはCH、CR₂、もしくはNであり得る。

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、本明細書で提供される任意の式または化合物を含む医薬組成物であり、リンカーは、PEGまたはPEG誘導体を含み、場合によっては、 R^3 において付着された放出不能リンカーであるか、または R^1 、 R^2 、もしくは R^3 において付着された放出可能リンカーである。

【0090】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な塩は、臭化水素酸塩、クエン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アスコルビン酸、塩酸塩、酒石酸塩、トリフラート、マレイン酸塩、メシル酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、またはフマル酸塩から選択される。

【0091】

いくつかの実施形態では、化合物は、TLRアゴニスト（例えば、そのラジカル）、例えば、限定されるものではないが、TLR3アゴニスト、TLR7アゴニスト、TLR7 / 8アゴニスト、TLR8アゴニスト、またはTLR9アゴニスト（例えば、それらすべてが細胞のエンドソーム内に存在する toll 様受容体と結合する）を含む。例えば、限定されるものではないが、少なくとも1つの例示的な実施形態では、薬剤 / 化合物の免疫調節物質は、以下の表2に列挙される化合物から選択されてもよい。

10

20

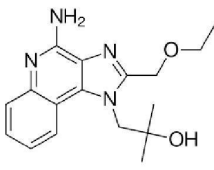
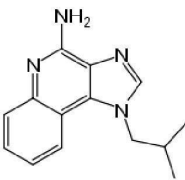
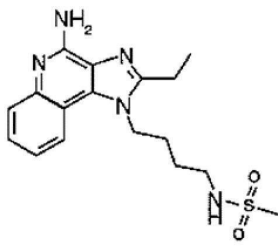
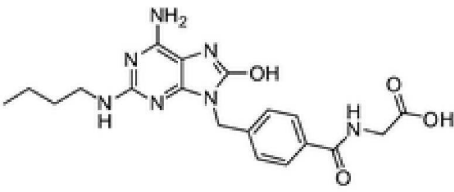
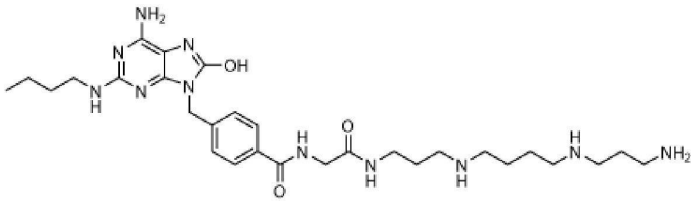
30

40

50

【表 2】

表 2. TLR アゴニスト

化合物	構造/説明	タイプ
A		TLR7 アゴニスト
B		TLR7 アゴニスト
C		TLR7 アゴニスト
D		TLR7 アゴニスト
E		TLR7 アゴニスト

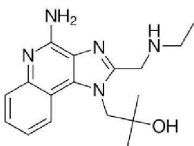
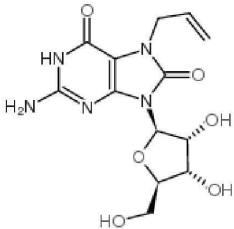
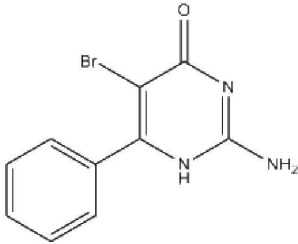
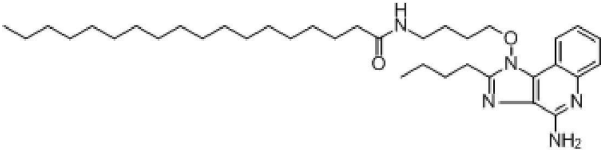
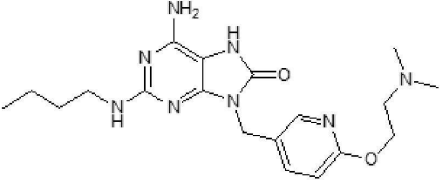
10

20

30

40

50

F		TLR7 アゴニスト
G		TLR7 アゴニスト
H		TLR7 アゴニスト
I		TLR7 アゴニスト
J		TLR7 アゴニスト

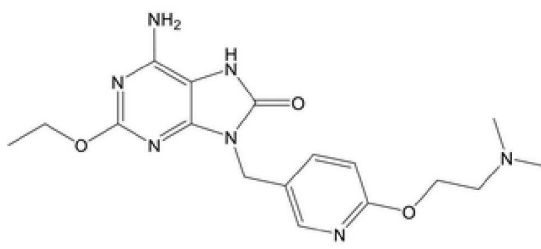
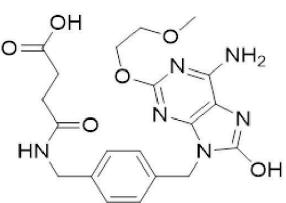
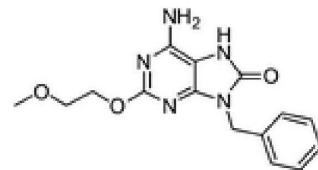
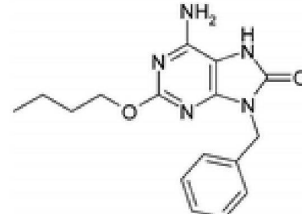
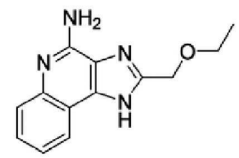
10

20

30

40

50

K		TLR7 アゴニスト
L		TLR7 アゴニスト
M		TLR7 アゴニスト
N		TLR7 アゴニスト
O		TLR7/8 アゴニスト

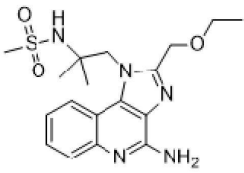
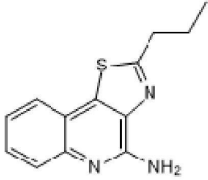
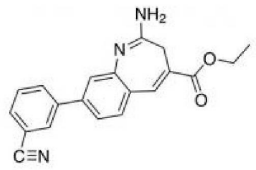
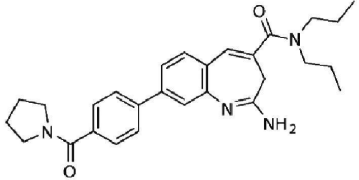
10

20

30

40

50

P		TLR7/8 アゴニスト
Q	例えば、Lipman et al., "The structure of poly(dA) : poly(dT) in a condensed state and in solution" Nucleic Acids Research 15 (14) : 5833-5844(1987)を参照されたい。	TLR7/8 アゴニスト
R		TLR8 アゴニスト
S		TLR8 アゴニスト
T		TLR8 アゴニスト
U	特定の配列状況において、非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含有する短い合成一本鎖 DNA 分子(CpG モチーフ)(CpG ODN)	TLR9 アゴニスト
V	潜在的な免疫増強活性を有する非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含有する合成オリゴヌクレオチド(IMO 2005)	TLR9 アゴニスト
W	免疫刺激活性を有する短い合成非メチル化 CpG オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)(1018-ISS)	TLR9 アゴニスト
X	シチジンの鎖にアニーリングされたイノシンポリ(I)ホモポリマーの鎖で構成されるもの(ポリ(I:C))	TLR3 アゴニスト
Y	ポリ(C)ホモポリマー	TLR3 アゴニスト

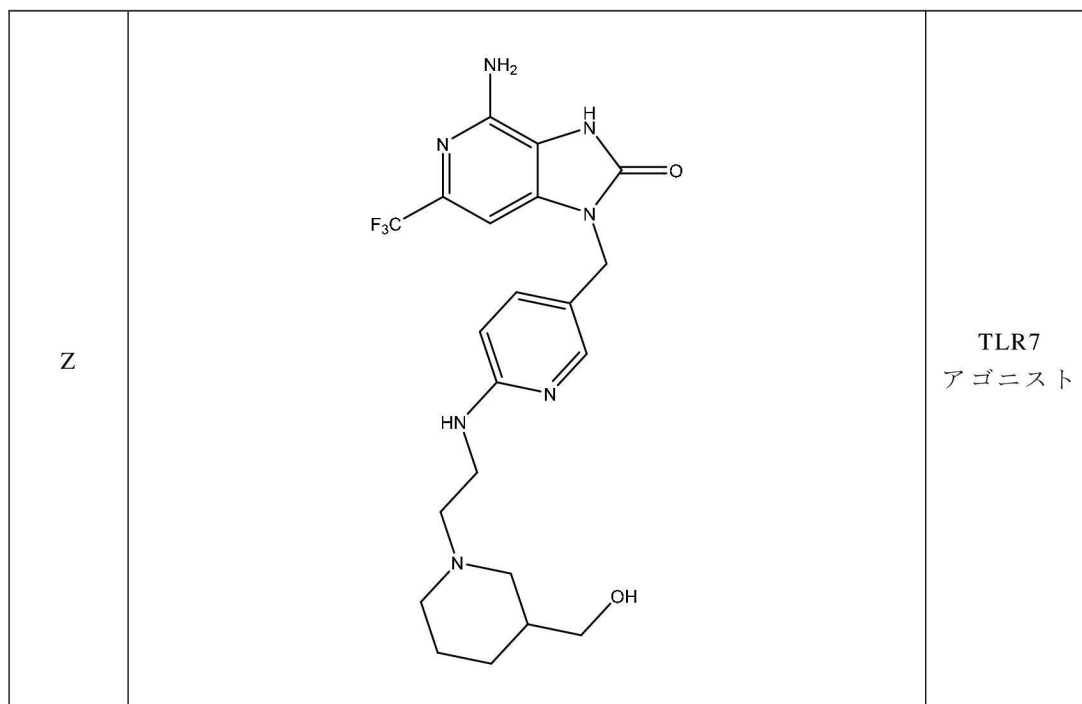
10

20

30

40

50



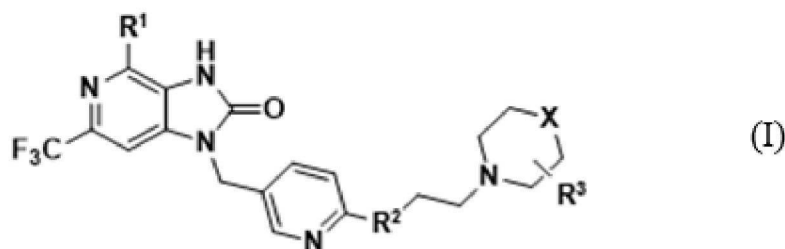
10

20

【0092】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式 I の化合物（またはラジカル）（例えば、TLR7アゴニスト）、

【化33】



(I)

30

またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。いくつかの実施形態では、 R^1 はアミンである。いくつかの実施形態では、 R^2 は、（例えば、単一）結合、またはアミン（例えば、 $-NH-$ ）である。特定の実施形態では、 R^3 は、H、アルキル、ヒドロキシ基、または任意の他の適切な置換基（例えば、本明細書に記載されるもの）である。いくつかの実施形態では、 X は、 CH_2 、 NH 、 O 、または S である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式 I のラジカルを含み、標的化部分は、任意の適切な位置で、例えば R^1 、 R^2 、および/または R^3 で、またはこれらを介して（例えば、リンカーを介しておよび/または直接的に）、コンジュゲートまたは連結される。

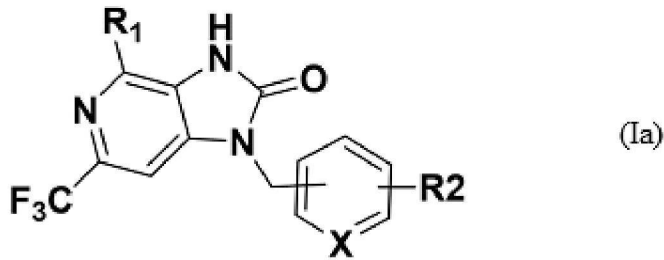
40

【0093】

少なくとも1つの例示的な実施形態では、本明細書に記載の化合物は、式 I a の化合物（またはラジカル）（例えば、TLR7アゴニスト）

50

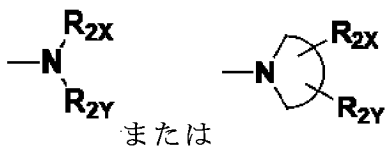
【化 3 4】



10

またはその薬学的に許容される塩であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、Xは、CHまたはNである。いくつかの実施形態では、R₁は-NH₂または-NH-R_{1x}である。いくつかの実施形態では、R₂は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、ヘテロアリール、-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

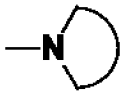
【化 3 5】



20

である。特定の実施形態では、R_{1x}、R_{2x}、およびR_{2y}の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ビアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、

【化 3 6】



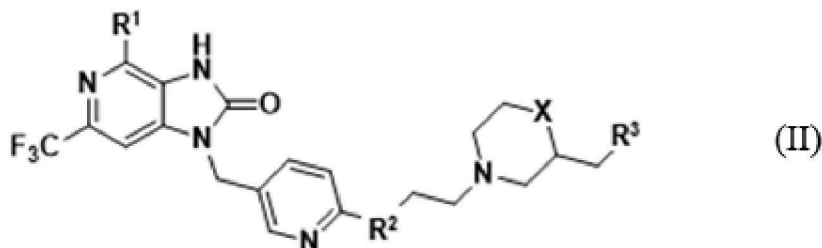
30

は、3 ~ 10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式Iaのラジカルを含み、標的化部分は、任意の適切な位置で、例えばR¹、R²、および/またはR³で、またはこれらを介して（例えば、リンカーを介して、および/または直接的に）、コンジュゲートまたは連結される、

【0094】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式IIの化合物（またはラジカル）（例えば、TLR7アゴニスト）、

【化 3 7】



40

またはその薬学的に許容される塩であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、R¹はアミンである。いくつかの実施形態では、R²は、（例えば、単一）結合または

50

- NH - である。特定の実施形態では、 R^3 は、H、アルキル、ヒドロキシ基、または任意の他の適切な置換基、例えば、本明細書に記載されるものである。いくつかの実施形態では、X は、 CH_2 、NH、O、またはSである。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式 I I のラジカルを含み、標的化部分は、任意の適切な位置で、例えば R^1 、 R^2 、および/または R^3 で、またはこれらを介して（例えば、リンカーを介しておよび/または直接的に）、コンジュゲートまたは結合される。

【0095】

他の実施形態では、本開示の化合物は、式 I I I の T L R アゴニスト（例えば、またはそのラジカル）またはその薬学的に許容可能な塩を含む薬剤を含み得、

【化38】

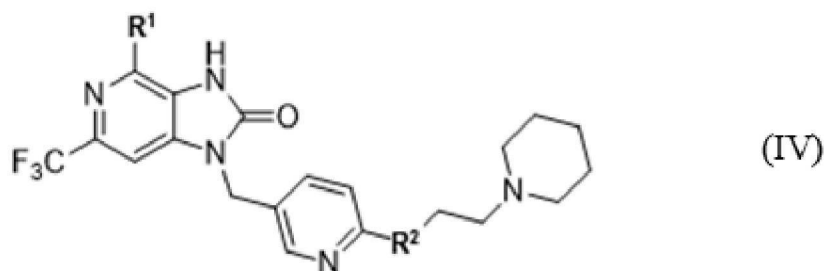


式中、 R^1 はアミン基であり、 R^3 はヒドロキシ基である。さらに、所望される場合、標的化部分（例えば、またはそのラジカル）または他のリガンドは、 R^1 または R^3 において（リンカーを介して、または直接的に）、式 I I I のアゴニストにコンジュゲートされてもよい。式 I I I の T L R アゴニスト（例えば、またはそのラジカル）は、T L R 7 アゴニストであり、従来利用可能な T L R 7 アゴニストの少なくとも 10 倍（10x）強力である。

【0096】

本明細書のいくつかの実施形態では、式 I V の T L R 7 アゴニスト（例えば、またはそのラジカル）またはその薬学的に許容可能な塩が提供され、

【化39】



式中、 R^1 はアミン基であり、 R^2 は単結合 - NH - である。

【0097】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物（例えば、個体への）の投与は、線維性組織のマクロファージを M 2 様表現型から M 1 様表現型に変換する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物の投与後に、コラーゲン合成を刺激するサイトカイン（すなわち、 $CCl18$ 、 $PDGF$ 、および $IL-1$ ）の減少が起こり、ならびにコラーゲン産生を阻害するサイトカイン（例えば、 $IFN-$ ）の増加が同時に発生する。特に、少なくとも 1 つの実施形態では、本明細書に提供される化合物の投与後、サイトカインプロファイルは、M 2 様表現型の M 1 様表現型への再プログラム化と一致する。本明細書で使用される場合、「プロファイル」または「アッセイ」は、1 つ以上のマーカーのセットであり、それらの存在、不在、および/または（1 つ以上の対照に対する）相対的なレベルまたは存在量である。例えば、サイトカインプロファイルは、試料内に存

10

20

30

40

50

在するサイトカインの存在、不在、相対レベル、または存在量のデータセットである。ゲノムまたは核酸プロファイルは、発現核酸（例えば、転写物、mRNAなど）の存在、不在、相対レベルまたは存在量のデータセットである。あるいは、プロファイルは、発現プロファイルと呼ばれることもある。

【0098】

いくつかの実施形態では、再プログラム化の正味の結果は、肺胞気嚢（alveolar air sac）の増加、細胞外基質沈着の減少、およびヒドロキシプロリン/コラーゲン生合成の減少であり、疾患の有効な回復（例えば、実施例4を参照）である。

【0099】

特定の薬剤および処方が本明細書に記載されているが、活性化骨髄細胞を抗線維化M1様表現型に再プログラムするのに有用な任意の化合物（例えば、薬剤）を、本明細書の新しい化合物および方法（例えば、パターン認識受容体と結合し、その下流の自然免疫系応答の少なくとも一部を阻害することができる任意の化合物（例えば、薬剤））に使用され得ることが理解されるべきである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物の類似体および/または誘導体は、本明細書に提供される標的化合物に使用されうる。

【0100】

さらに、2つ以上の化合物を投与することができ、場合によっては、化合物は異なる薬剤を含むことができる。例えば、異なる薬剤は、TLR7アゴニストおよびTLR9アゴニストから選択することができる。さらに別の実施形態では、1つ以上の化合物は、1つ以上のコンジュゲートされた薬剤および/または非コンジュゲート化された薬剤（例えば、以下に記載されるコンジュゲートされた実施形態）と共に組成物で投与され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される化合物および薬剤のいずれかを、本明細書に記載される方法に従って使用することができ、場合によっては、所望の用途に応じて、骨髄由来抑制細胞（例えば、がんの治療に関連して）を枯渇させもしくは阻害し、成長因子（例えば、IPFの治療に関連するピルフェニドン）の産生をダウンレギュレーションし、哺乳動物ラパマイシン標的タンパク質複合体1（mTORC1）シグナル伝達（例えば、IPFまたは他の線維性病態の治療に関連するCZ415）を阻害することにより線維芽細胞を直接改変する他の薬剤、および/またはその他の任意の抗線維化および/または抗がん剤および療法と組み合わせることができる。本明細書で使用される場合、「ダウンレギュレーション」およびその形成物（例えば、「ダウンレギュレーションされた」など）は、互換的に使用されてもよく、遺伝子、核酸、代謝物、転写物、タンパク質、またはポリペプチドなどのマーカーのレベルの減少を指す。本明細書で使用される場合、「アップレギュレーション」およびその形成物（例えば、「pレギュレーション」または「アップレギュレーションされた」など）は、互換的に使用されてもよく、遺伝子、核酸、代謝物、転写物、タンパク質、またはポリペプチドなどのマーカーのレベルの増加を指す。また、シグナル伝達または代謝経路などの経路も、アップまたはダウンレギュレーションされ得る。

【0101】

標的化部分

場合によっては、本明細書に特定される少なくとも従来の薬剤の全身投与に関連する毒性は、線維性疾患、がん、または任意の他の疾患状態の治療に関するそれらの実用的な適用を妨げた。例えば、TLRアゴニストは、個体によって耐性がない可能性があり、場合によっては、対象の死をもたらす得る（例えば、従来の様式を介して全身的に投与された場合）。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物、例えば、式Iおよび/またはIIを有する化合物は、本開示の化合物と併用することができる従来の薬剤よりも著しく強力であり、場合によっては、全身毒性を回避する機構が望ましい。

【0102】

特定の実施形態では、標的化部分とコンジュゲートされた治療剤（例えば、（前述したような）薬剤）が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、個体の特定の領域または組織を標的化する（例えば、高い特異性を有する）リガンドま

10

20

30

40

50

たは他の原子または分子を含み、特定の例では、例えば、ホルモン、抗体、および/またはビタミンを含んでもよい。以下でさらに詳細に説明するように、少なくとも1つの実施形態では、標的化部分は、FR に対する（例えば、高い）親和性を有する分子を含む。場合によっては、標的化部分は、必要に応じて、線維性疾患またはがんの細胞または組織に特有の任意の受容体に対する特異的親和性を有する。

【0103】

場合によっては、FR は、例えば、活性化骨髄細胞（例えば、主に活性化された単球およびM2様マクロファージ）において著しくアップレギュレーションされ、これまでのすべての記録データは、FR が、抗炎症性または炎症促進性刺激への曝露後に骨髄性起源の細胞においてのみ誘導されることを裏付けている。葉酸受容体は、非粘液性卵巣がんの（例えば、90%超）でアップレギュレーションされ得る。ある特定の例では、葉酸受容体は、腎臓、脳、肺、および乳がんが存在する。例えば、それ自体が所望の特異性を提供するに十分な数で葉酸受容体を発現しない多数のがんがあるが、がん性腫瘍は、例えば、FR を発現する骨髄由来サプレッサー細胞（MDS-C）を発現し、例えば、本明細書に提供される標的化部分によって標的化することができる。いくつかの実施形態では、葉酸受容体は、健康な（非骨髄性）組織（例えば、肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、筋肉、腸、膵臓、膀胱など）には実質的に存在しない（例えば、非常に低いレベルでのみ存在する）。場合によっては、全身に豊富に存在する静止組織内マクロファージでさえ、主にFR - 陰性である。場合によっては、葉酸標的化造影剤の取り込みは、例えば、炎症組織、悪性病変、および腎臓にある。特定の例では、がんのない対象は、腎臓および炎症部位に葉酸標的化薬剤のみを保持する。場合によっては、葉酸受容体発現の不一致は、線維性がん細胞を選択的に標的化するための機構を提供する。

10

20

【0104】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物および方法は、FR の限定的な発現を利用して、全身投与された強力な化合物（例えば、コンジュゲートまたは薬剤）を線維性および/またはがん組織に標的化/局在化させる。場合によっては、本明細書に提供される化合物は、例えば、免疫系の全身的活性化を有利に防止するFR 発現細胞に直接送達され、例えば、本明細書に記載される非標的化合物（例えば、薬剤）の全身使用をこれまでに妨げてきた毒性（例えば、少なくとも一部）を回避することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、例えば、がんが葉酸受容体を発現するかどうかに関わらず、線維性疾患および/またはがんを治療するために使用される。いくつかの実施形態では、葉酸および例えば葉酸などの他の葉酸受容体結合リガンド（またはそのラジカル）は、例えば、FR に対する親和性を有するため、標的化部分として使用される。

30

【0105】

葉酸は、ビタミンのBファミリーのメンバーであり、例えば、核酸およびアミノ酸の合成に参加することによって、細胞生存において重要な役割を果たすことができる。葉酸は、活性化骨髄細胞を標的化することによってコンジュゲートされた免疫調節薬の特異性を増強し、葉酸受容体陽性がん細胞を標的化することによってコンジュゲートされた抗がん剤を増強することができる。場合によっては、標的化部分および免疫調節物質（例えば、TLR7、TLR8、TLR7/8、TLR9、またはTLR3アゴニスト）として、葉酸リガンド（またはそのラジカル）、またはその機能的断片もしくは類似体を含む化合物が本明細書に提供される。場合によっては、TLR7、TLR8、TLR7/8、TLR9、およびTLR3がエンドソーム中に存在する。いくつかの実施形態では、化合物、またはそのラジカルは、TLRに結合する。いくつかの実施形態では、TLRは、TLR7である。

40

【0106】

代わりに、ピリド[2,3-d]ピリミジン類似体リガンド（例えば、またはそのラジカル）、その機能的断片もしくは類似体、またはFR の親和性（例えば、限定されないが、高い特異性）を有する任意の他の分子、断片もしくは原子を、標的化部分（またはそ

50

のラジカル)として使用してもよい。例えば、このような葉酸類似体分子は、約 20 / 25 / 30 / 生理学的な温度で葉酸と比較して、約 0.01 以上の FR を結合するための相対的親和性を有し得る。同様に、Galactin-3 リガンド、トランスロケータタンパク質 (TSPO) リガンド、および線維性および / またはがん性細胞または組織に対して高度に特異的な親和性を有する任意の他のリガンドまたは標的化部分が採用されてもよい。

【0107】

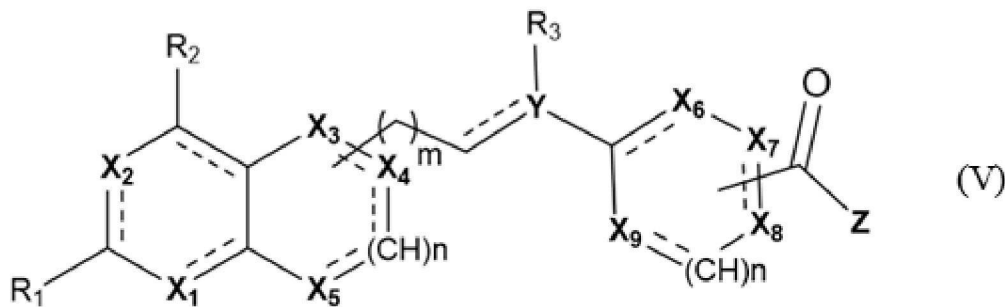
好適な標的化部分 (またはそのラジカル) の具体的な例がここで提供されるが、本開示の標的化部分 (またはそのラジカル) は、FR を標的とするのに有用な任意のリガンド (またはそのラジカル) を含んでもよく、本明細書に指定される構造に限定されないことが理解されよう。リガンド (またはそのラジカル) は、FR に結合し得る。

10

【0108】

少なくとも 1 つの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、式 V の構造またはその機能的断片もしくは類似体を有する、標的化部分 (またはそのラジカル) を含み、

【化 40】



20

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立して、N、NH、CH、 CH_2 、O、または S であり、

Y は、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、または S であり、

30

Z は、グルタミン酸、バリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、または H であり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

m および n はそれぞれ独立して、0、1、または 0 ~ 1 の間であり、

【化 41】

は、単結合 C - C または二重結合 C = C のいずれかを表す。

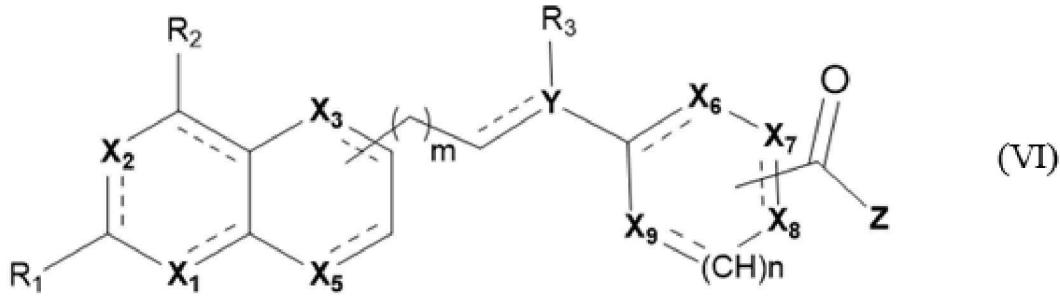
40

【0109】

さらなる態様では、非限定的な例として、式 V の標的化部分 (またはそのラジカル) は、VI (またはその機能的断片もしくは類似体) の構造を有し、

50

【化 4 2】



10

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立してN、NH、CH、 CH_2 、O、またはSであり、

Yは、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、またはSであり、

Zは、グルタミン酸、パリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、またはHであり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

mおよびnはそれぞれ独立して、0、1、または0～1の間であり、

【化 4 3】

20

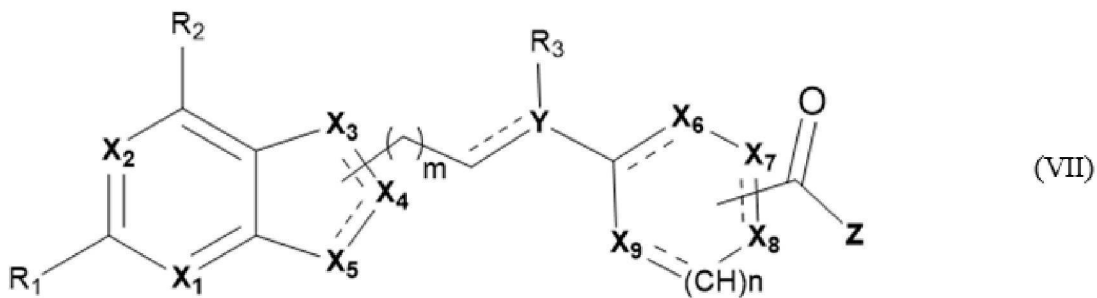
は、単結合C - Cまたは二重結合C - Cのいずれかを表す。

【0 1 1 0】

式V（またはその機能的断片もしくは類似体）の別の特異的な標的化部分（またはそのラジカル）は、式VIIの構造を有し、

【化 4 4】

30



40

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立して、N、NH、CH、 CH_2 、O、またはSであり、

Yは、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、またはSであり、

Zは、グルタミン酸、パリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、またはHであり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

mおよびnはそれぞれ独立して、0、1、または0～1の間であり、

50

【化 4 5】

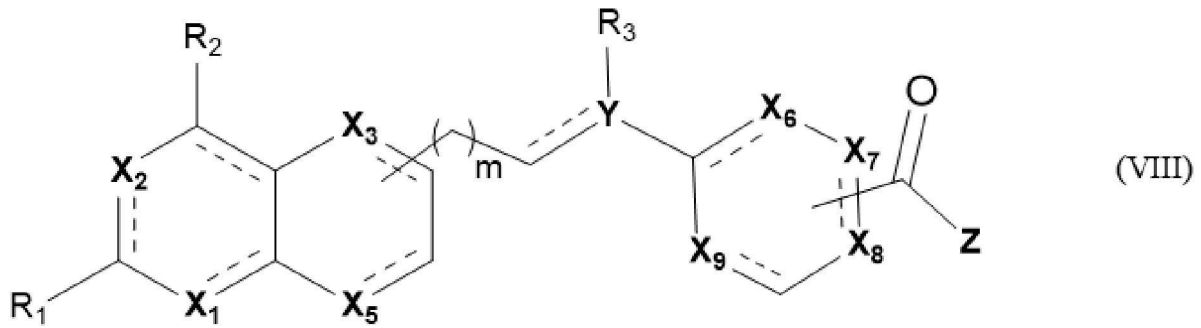
は、単結合または二重結合 C - C のいずれかが表す。

【 0 1 1 1】

いくつかの実施形態では、式 V I の標的化部分（またはそのラジカル）は、式 V I I I の構造を有し、

【化 4 6】

10



(VIII)

20

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立して N、NH、C、H、 CH_2 、O、または S であり、

Y は、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、または S であり、

Z は、グルタミン酸、パリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、または H であり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

m は、0、1、または 0 ~ 1 の間であり、

【化 4 7】

30

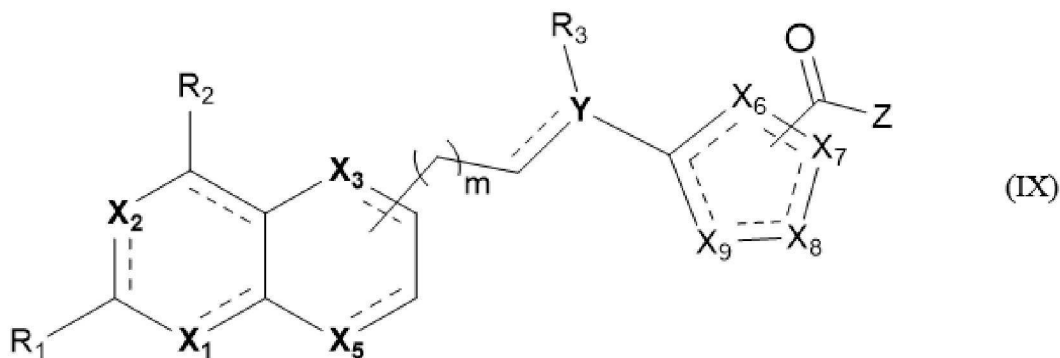
は、単結合または二重結合 C - C のいずれかを表す。

【 0 1 1 2】

いくつかの実施形態では、式 V I の標的化部分（またはそのラジカル）は、式 I X の構造を有し、

【化 4 8】

40



(IX)

50

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立してN、NH、CH、 CH_2 、O、またはSであり、

Yは、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、またはSであり、

Zは、グルタミン酸、バリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、またはHであり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

mは、0、1、または0～1の間であり、

【化49】

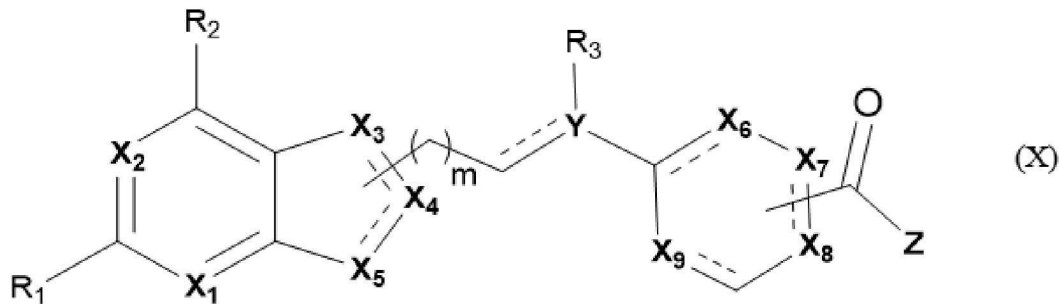
10

は、単結合または二重結合C - Cのいずれかを表す。

【0113】

いくつかの実施形態では、式VIIの標的化部分（またはそのラジカル）は、式XまたはXIの構造を有し、

【化50】



20

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立して、N、NH、CH、 CH_2 、O、またはSであり、

Yは、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、またはSであり、

Zは、グルタミン酸、バリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、またはHであり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

mは、0、1、または0～1の間であり、

【化51】

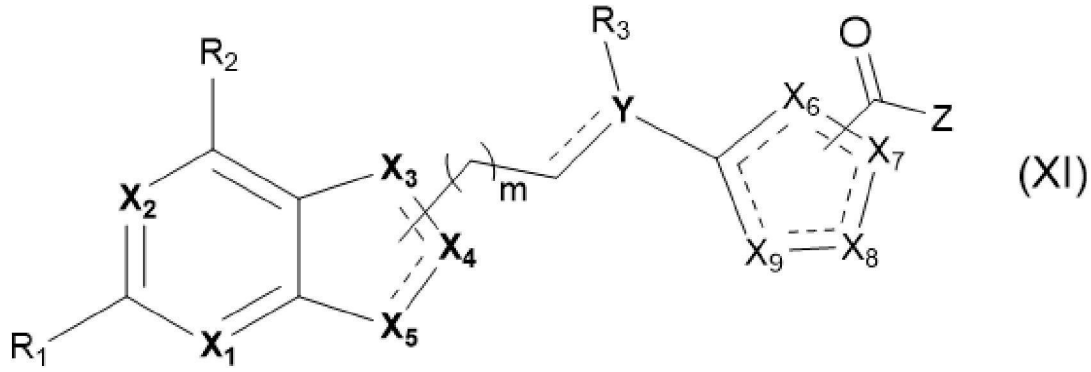
30

は、単結合または二重結合C - Cのいずれかを表す、または

40

50

【化 5 2】



10

式中、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、および X_9 はそれぞれ独立して、N、NH、CH、 CH_2 、O、またはSであり、

Yは、C、CH、 CH_2 、N、NH、O、またはSであり、

Zは、グルタミン酸、パリン、または基質であり、

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 NH_2 、OH、SH、 CH_3 、またはHであり、

R_3 は、時間またはアルキルであり、

mは、0、1、または0～1の間であり、

【化 5 3】

20

は、単結合または二重結合C - Cのいずれかを表す。

【0 1 1 4】

本開示の標的化部分（例えば、またはそのラジカル）のいくつかの追加的实施形態の化学構造および分光データを、以下の表3、表4、表5、および表6に提供する。

30

【0 1 1 5】

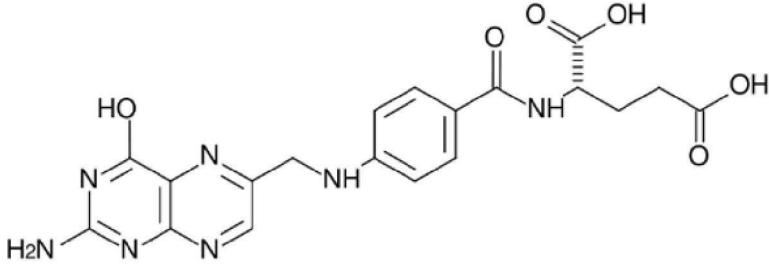
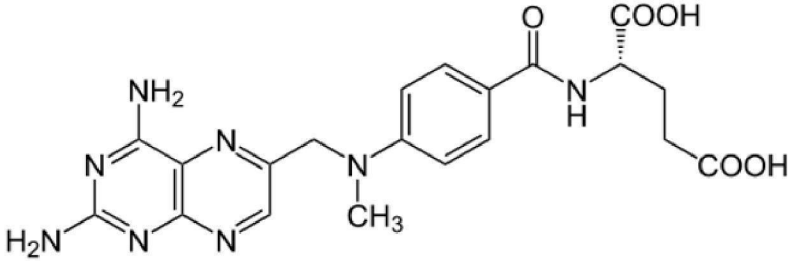
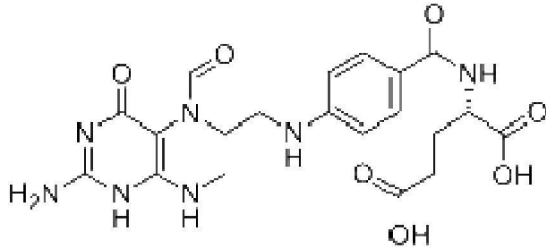
表3は、式VIIの構造を有する標的化部分（例えば、またはそのラジカル）の追加的实施形態の非限定的な例を提供する。

40

50

【表 3】

表 3. 式VIII

リガンド	構造
a	
b	
c	

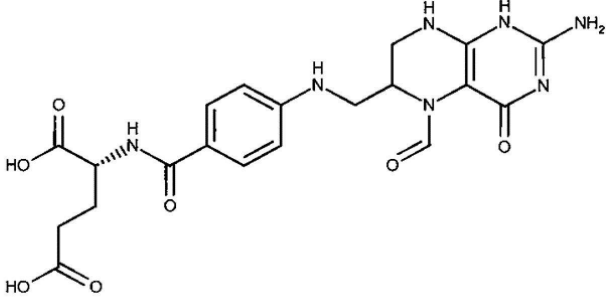
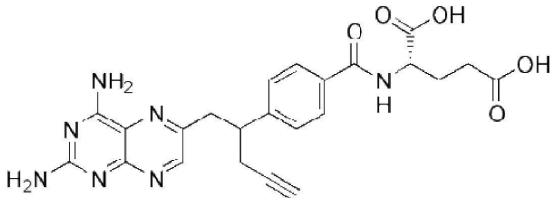
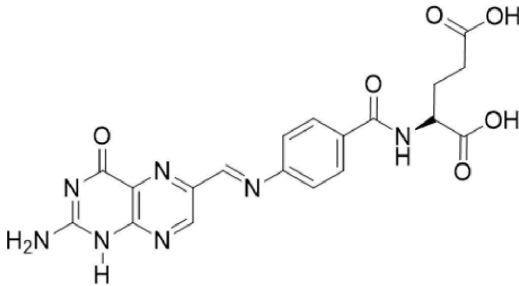
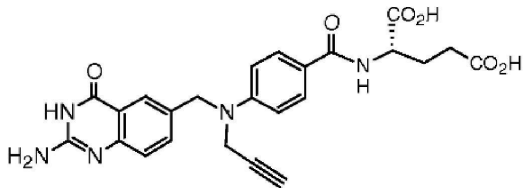
10

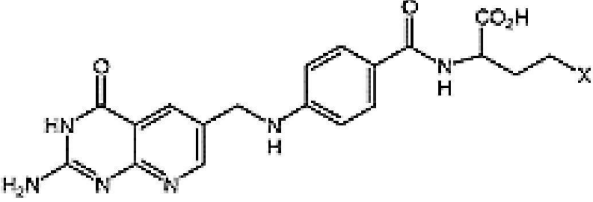
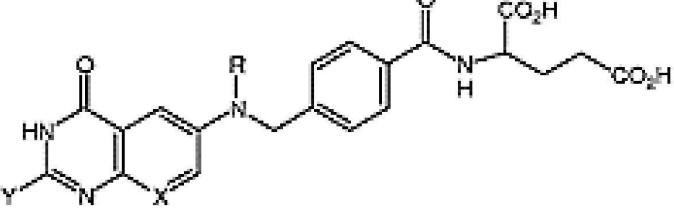
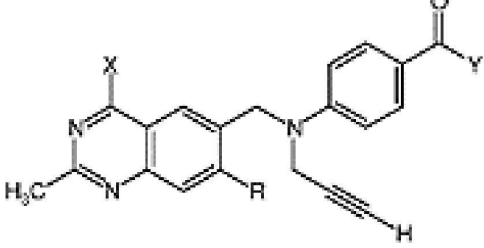
20

30

40

50

d		10
e		20
f		30
g		40

h	 <p>式中、X は、$\text{PO}(\text{OH})_2$、CH_2NH_2、または SO_2OH である。</p>	10
i	 <p>式中、 X は、N または CH であり、 Y は、NH_2、H、または CH_3 であり、 R は、H、CH_3、または CHO である。</p>	20
j	 <p>式中、 X は、OH または OCH_3 であり、 R は、時間または CH_3 であり、 Y はグルタミン酸、バリン、または基質である。</p>	30

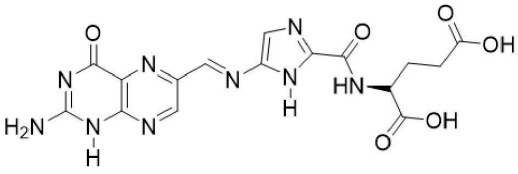
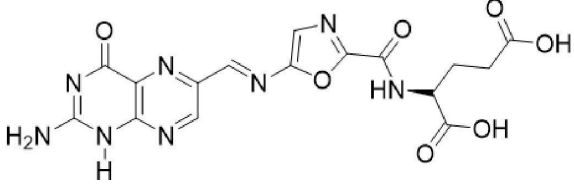
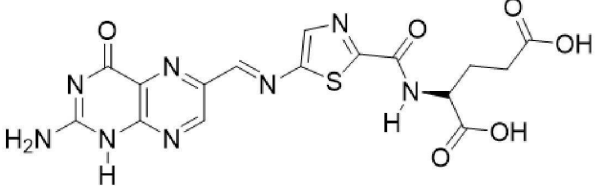
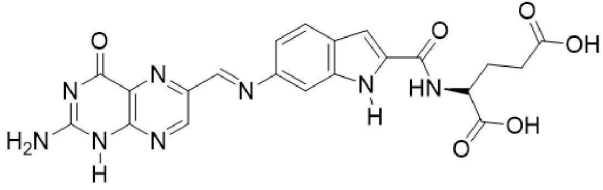
40

【 0 1 1 6 】

表 4 は、式 I X の構造を有する標的化部分（例えば、またはそのラジカル）の追加的な実施形態の非限定的な例を提供する。

【表 4】

表 4. 式 I X

リガンド	構造
aa	
bb	
cc	
dd	

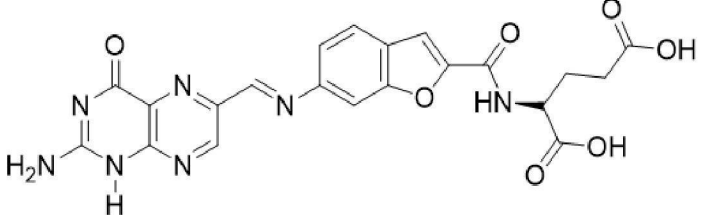

10

20

30

40

50

ee		10
ff		20

【 0 1 1 7 】

表 5 は、式 X の構造を有する標的化部分の追加的な実施形態の非限定的な例を提供する。

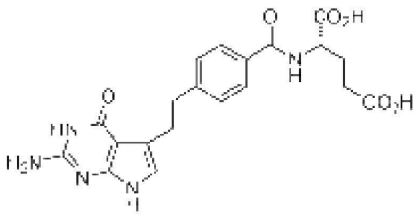
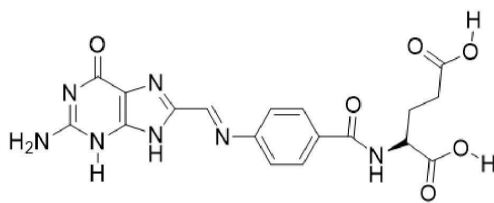
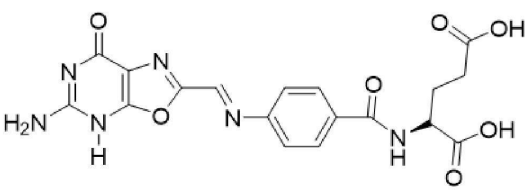
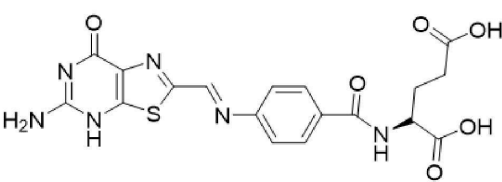
30

40

50

【表 5】

表 5. 式 X

リガンド	構造
aaa	
bbb	
ccc	
ddd	

10

20

30

40

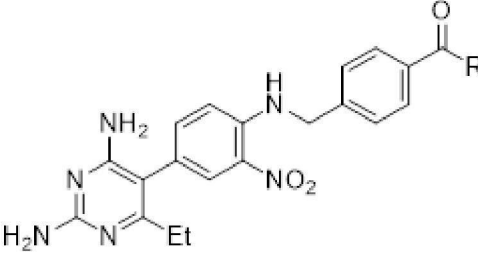

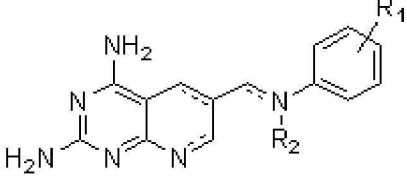

【0118】

前述のように、葉酸の代わりに、標的化部分（例えば、そのラジカル）は、例えば、ピリド[2,3-d]ピリミジンまたは以下の表 6 に記載される式（例えば、式のラジカル）を有する類似の類似体（またはそのラジカル）などの 1 つ以上の非古典的な葉酸代謝拮抗剤類似体（またはその類似体もしくは機能的断片）であってもよい。

50

【表 6】

表 6. 非古典的な葉酸代謝拮抗剤類似体

リガンド	式
aaaa	<div style="text-align: center;">  </div> <p>式中、 R は NH₂ または NHMe または NHCH(CO₂Et)(CH₂)₂CO₂Et または NHCH(CO₂Et)(CH₂)₂CO₂H または  である</p>
bbbb	<div style="text-align: center;">  </div> <p>式中、 R₁ は、3,4,5-(OCH₃)₃ または 3,4-(OCH₃)₂ または 4-OCH₃ であり、 R₂ は、時間またはアルキル鎖または CHO であり、  は、単結合または二重結合 C-C のいずれかを表す。</p>

10

20

30

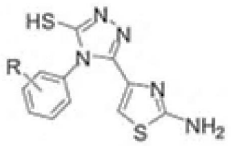
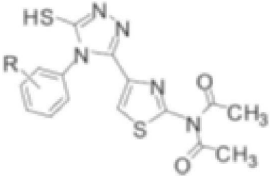
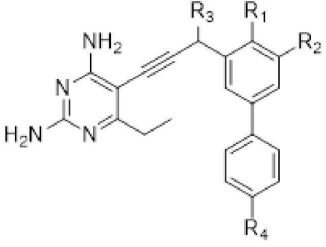
40

50

eeee	<div data-bbox="619 248 1007 450" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>式中、</p> <p>R は、H、4-Cl、2-CH₃O、4-CH₃O、2,4-(CH₃O)₂、4-CH₃、または 4-C₆H₅O である。</p>	10
ffff	<div data-bbox="628 748 1002 958" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>式中、</p> <p>R は、H、4-Cl、2-CH₃O、4-CH₃O、2,4-(CH₃O)₂、4-CH₃、または 4-C₆H₅O である。</p>	20
gggg	<div data-bbox="603 1196 1027 1435" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>式中、</p> <p>R は、H、4-Cl、2-CH₃O、4-CH₃O、2,4-(CH₃O)₂、4-CH₃、または 4-C₆H₅O である。</p>	30

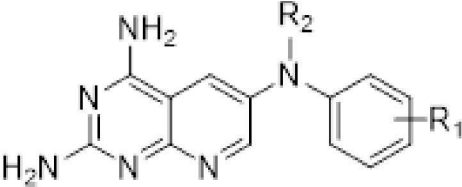
40

50

<p>hhhh</p>	 <p>式中、 R は、H、4-Cl、2-CH₃O、4-CH₃O、2,4-(CH₃O)₂、4-CH₃、または 4-C₆H₅O である。</p>	<p>10</p>
<p>iiii</p>	 <p>式中、 R は、H、4-Cl、2-CH₃O、4-CH₃O、2,4-(CH₃O)₂、4-CH₃、または 4-C₆H₅O である。</p>	<p>20</p>
<p>jjjj</p>	 <p>式中、 R₁ および R₂ はそれぞれ独立して、時間または OMe であり、 R₃ は、時間またはアルキルであり、 R₄ は、o-COOH または m-COOH または p-COOH である。</p>	<p>30</p>

40

50

kkkk	<div style="text-align: center;">  </div> <p>式中、</p> <p>R₁は、時間または2'-OMeもしくは4'-OMeもしくは2',5'-ジOMeもしくは3',4',5'-トリ OMeもしくは4'-Meもしくは4'-i-Prもしくは3',4'-(C₄H₄)もしくは2',3'-(C₄H₄)もしくは4'-NO₂もしくは2',5'-ジFもしくは3',4',5'-トリ Fであり、</p> <p>R₂は、時間またはアルキルである。</p>
------	---

10

【0119】

20

場合によっては、本明細書に提供される化合物は、標的化部分（例えば、そのラジカル）とコンジュゲートされた薬剤（例えば、そのラジカル）（例えば、免疫調節物質）を含む。免疫調節物質（例えば、そのラジカル）は、標的化部分（例えば、そのラジカル）と直接的に、またはリンカー（例えば、任意選択的にスペーサーを含む）を介してコンジュゲートされてもよい。図1Aは、化合物100の少なくとも1つの実施形態を示す。ここで、化合物100は、例えば式Iを有する免疫調節物質（またはその薬剤もしくはラジカル）102を含み、式中、R³はヒドロキシ基である。免疫調節物質（例えば、そのラジカル）102は、リンカー106を介して標的化部分（例えば、そのラジカル）104にコンジュゲートされる。ここで、標的化部分（例えば、そのラジカル）106は、葉酸であり、（例えば、放出不能）リンカー106は、n回繰り返されるPEGリンカーであり、nは、1～32の間である。

30

【0120】

少なくとも1つの実施形態では、そして限定されるものではないが、化合物100は、以下の式によって表され得、Q-L-T、式中、Qは、葉酸受容体結合リガンド/標的化部分104のラジカルであり、Lは、リンカー106であり、Tは、TLRアゴニスト/免疫調節物質102のラジカルである。リンカーLは、本明細書に提示されるリンカーの式のいずれかを含んでもよい。

【0121】

同様に、図1Bは、化合物150の少なくとも1つの実施形態を示す。化合物150は、例えば、（例えば、放出可能な）リンカー156を介して標的化部分（例えば、そのラジカル）154にコンジュゲートされた、例えば、式IIIを有するTLR7アゴニスト（例えば、そのラジカル）である免疫調節物質/薬剤（例えば、そのラジカル）152を有する。

40

【0122】

リンカー（LまたはL_n）は、放出可能であっても、または放出不能であってもよい。場合によっては、放出不能リンカーを含む化合物の標的は、例えば、エンドソーム（例えば、対象となる細胞の）であり、一方で、放出可能リンカーの標的は、場合によっては、エンドソーム、細胞質、または両方（例えば、対象となる細胞の）である。

【0123】

少なくとも1つの例示的な実施形態では、リンカーL_nは、標的化部分（例えば、その

50

ラジカル) および免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩との間に配置され、リンカー L_n または L_n は、TLR7アゴニストの遊離形態の放出を回避するように構成され、 n は、50以下の整数である。追加的または代替的に、化合物は、PEGまたはPEG誘導体を含むリンカー L_n を含んでもよく、 n は、1~32の範囲から選択される整数であってもよく、標的化部分(例えば、そのラジカル)は、FR結合リガンドを含む葉酸受容体結合リガンドのラジカルを含んでもよい。

【0124】

リンカーに関連する「放出可能」という用語は、例えば、還元剤不安定性、pH不安定性、酸不安定性、塩基不安定性、酸化不安定性、代謝不安定性、生化学的不安定性、酵素不安定性、またはp-アミノベンジルベースの多価放出可能結合(p-aminobenzyl based multivalent releasable bond) 10
 によるような、生理学的条件下で壊れ得る(例えば、化学的または酵素的に加水分解される)少なくとも1つの結合を含むリンカーを意味する。結合の破壊をもたらす生理学的条件は、必ずしも生物学的または代謝的プロセスを含むものではなく、代わりに、例えば、生理的pHで、または細胞質pHよりも低いpHを有するエンドソームなどの細胞小器官への区画化の結果としての加水分解反応などの標準的な化学反応を含みうる。理解される。切断可能な結合は、例えば、放出可能リンカーのいずれかまたは両端で、本明細書に記載されるように、放出可能リンカー内の2つの隣接する原子を接続し、および/または他のリンカー部分もしくは標的化部分および/または薬剤を接続することができる。場 20
 合によっては、放出可能リンカーは、二つ以上の断片に分割される。場合によっては、放出可能リンカーは、標的化部分から分離される。いくつかの実施形態では、標的化部分および免疫調節物質は、互いに放出され、免疫調節物質は活性化される。

【0125】

対照的に、リンカーに関連する「放出不能」という用語は、生理学的条件下では容易または迅速には壊れない少なくとも1つの結合を含むリンカーを意味する。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーは、生理学的条件下で安定である骨格を含む(例えば、骨格は加水分解(例えば、水性加水分解または酵素加水分解)の影響を受けにくい)。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーを含む本明細書に提供される組成物は、組成物のい 30
 ずれかの成分(例えば、標的化リガンド(例えば、完全非結晶性(FA)-リガンド)または免疫調節物質(例えば、TLR7アゴニスト))を放出しない。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーは、ジスルフィド結合(例えば、S-S)または骨格中のエステルを欠く。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物の循環の全期間にわたって(例えば、標的細胞エンドソームへのエンドサイトーシスの間)、実質的に安定している骨格によって接続される標的化部分および免疫調節物質を含む。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーを含む組成物は、免疫調節物質が細胞のエンドソーム内に存在するTLR、NOD様受容体、および/または他のパターン認識受容体を標的とする場合に特に有益である。放出不能リンカーは、アミド、エステル、エーテル、アミン、および/またはチオエーテル(例えば、チオ-マレイミド)を含み得る。具体的な例が本明細書に提供されるが、生理学的条件下で容易に、または迅速には壊れない少なくとも1つの結合が形成されることを条件として、任意の分子を放出不能リンカーで使用できることが理解されよう。 40

【0126】

おそらくより具体的には、放出不能リンカーは、例えば、中性pHで、例えば、10パーセント未満(10%) (例えば、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満、または0.001%)が、水溶液(例えば、緩衝された(例えば、リン酸緩衝液)溶液)で一定の期間内(例えば24時間)に加水分解するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、放出不能リンカーが採用される場合、(例えば、標的細胞/組織による取り込み前の体循環において)投与されるコンジュゲート化合物の約10パーセント未満(10%)が、好ましくは5パーセント未満(5%)が、または全くなく、遊離薬剤を放出する。いくつかの実施形態では、投与の1時間以内では、化合物が体循環にある間、遊離薬剤の5パーセント未満(5%)がコンジュゲートから放出さ 50

れる。

【0127】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、化合物がインビボで治療的に有効であるように、薬剤/免疫調節物質から切断されない。いくつかの実施形態では、これは、例えば、(例えあったとしても)薬剤(例えば、免疫調節物質、例えばTLR7アゴニスト)のわずかな量のみが、化合物の標的送達の前に放出される(例えば、全身的に)ため、強力な薬剤(例えば、TLR7アゴニスト)を含む標的化組成物の使用を可能にするため、有利である。いくつかの実施形態では、活性成分の放出特性を調整することは、有効な医薬組成物の調製の困難な態様である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される放出不能リンカーを含む組成物は、有効な医薬組成物の調製の困難さを回避する(例えば、放出のタイミングの必要性を除去することによって)。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物の免疫調節物質または弾頭は、結合された時(例えば、標的化コンジュゲートにコンジュゲートされた時)に活性になる。いくつかの実施形態では、核頭/免疫調節物質が活性である間、放出不能リンカーおよび標的化部分は、(例えば、対象の体によって)免疫系を活性化する毒性サイトカイン(例えば、インターロイキン6(IL-6)など)の放出を防止する(例えば、(例えば、葉酸またはその類似体を使用して)化合物が特異的に標的化されているため)。特定の例では、例えば、化合物の弾頭/免疫調節物質が放出不能リンカーに接続したときに活性であっても、免疫調節物質は、化合物が標的受容体(例えば、葉酸受容体)に結合するまで、細胞のエンドソーム内の適切な(例えば、標的の)受容体にアクセスすることができない。

10

20

【0128】

非限定的な例として、図1Aのリンカー106は、放出不能なPEGリンカーであるが、図1Bのリンカー156は、自壊性の(self-immolative)放出可能リンカーである(例えば、ジスルフィド結合(例えば、S-S)を含む)。例えば、図1Bは、標的化部分154からの切断時の、化合物150の自壊性カスケードを示す。

【0129】

いくつかの実施形態では、リンカー156は、投与後に化合物が対象の体循環内で循環するのに十分な時間が経過した後(例えば、非標的組織から消え去り、標的細胞および/または受容体によって捕捉および内部移行される)にのみ、薬剤が標的化部分154から切断されるように形成される。いくつかの実施形態では、放出の期間は多様である(例えば、対象ごとに(例えば、様々な要因に基づいて))。いくつかの実施形態では、放出可能リンカーは、投与の少なくとも24時間後まで、または一週間にわたってさえも切断/放出されないように操作されてもよい。いくつかの実施形態では、化合物は、対象の系を安全に通過することができ、標的細胞(例えば、FRを発現するもの)によって捕捉されない任意の量は、放出/活性化の前に排出され得るため、毒性を防ぐことができる(例えば、放出可能リンカーに結合されたとき、免疫調節物質は活性ではないため)。

30

【0130】

放出可能および放出不能リンカーの両方は、(例えば、化合物の)体内分布、生物学的利用能、およびPK/PDを最適化し、および/またはPEGレーション(PEGylation)などを介して当技術分野で一般に知られている、または今後開発される方法論に従って、(例えば、化合物の)標的組織への取り込みを増加させるように操作することができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞(例えば、対象となる細胞(例えば、治療される線維性またはがん組織中のマクロファージ))による捕捉の前に、循環中の薬剤の薬学的活性量の著しい放出を回避するように構成される。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、本開示の放出可能リンカーを含む化合物は、エンドソームの膜を横切って、例えば、標的細胞の細胞質内に拡散するように設計され得る。いくつかの実施形態では、放出可能リンカーは、化合物が細胞質に到達するまで免疫調節物質が放出されないように設計され得る。

【0132】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるコンジュゲートは、放出可能リンカー（例えば、細胞質内の免疫調節物質の放出を促進するために、例えば、その場合、免疫調節物質が P I 3 K キナーゼ、I R A K、または 1 - カッパ - (I) キナーゼの活性化因子（例えば、プロストラチンなどを使用して）または活性化細胞の核内因子カッパ - 軽鎖エンハンサー（ N F - ）（例えば、表 1 を参照されたい）、または骨髄分化一次応答 8 8 (M y D 8 8) アゴニストを含む）を含む。いくつかの実施形態では、放出可能リンカーは、例えば、標的化部分が適切な標的（例えば、マクロファージ葉酸受容体）を結合し、標的細胞のエンドソーム内に内部移行され、および / または細胞質内（例えば、所望のパターン認識受容体が位置する場所）に拡散する後まで、免疫調節物質の放出を防止する。いくつかの実施形態では、放出可能リンカーは、エンドソーム内に免疫調節物質を放出する。

10

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるリンカーは、1つ以上のスペーサー（例えば、特定の放出時間を促進するため、標的組織への取り込みの増加を促進するため、および / または本明細書に提供される化合物の体内分布、生物学的利用能、および / または P K / P D を最適化するため）を含み得る。スペーサーは、アルキル鎖、P E G、ペプチド、糖、ペプチドグリカン、クリック可能なリンカー（例えば、トリアゾール）、ポリプロリンおよびポリピペリジンなどの硬質リンカー、およびこれに類するもののうちの 1 つ以上を含み得る。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、P E G _{1 2} を含むリンカーは、本明細書に提供される化合物の非特異的取り込み（例えば、非標的化器官（例えば、投与後の対象の肝臓および / または腎臓内）への）を、完全に回避しない場合には、著しく減少する。いくつかの実施形態では、化合物は、肝臓および腎臓への送達を回避する。いくつかの実施形態では、標的化部分（その遊離形態、そのラジカル、またはそのコンジュゲート）は、非標的化細胞上の取り込み受容体と結合しない（例えば、器官が標的部位ではない場合、したがって、それらの器官における免疫複合体の刺激は回避することができ、これは臨床的状況において非常に有益である）。

20

【 0 1 3 5 】

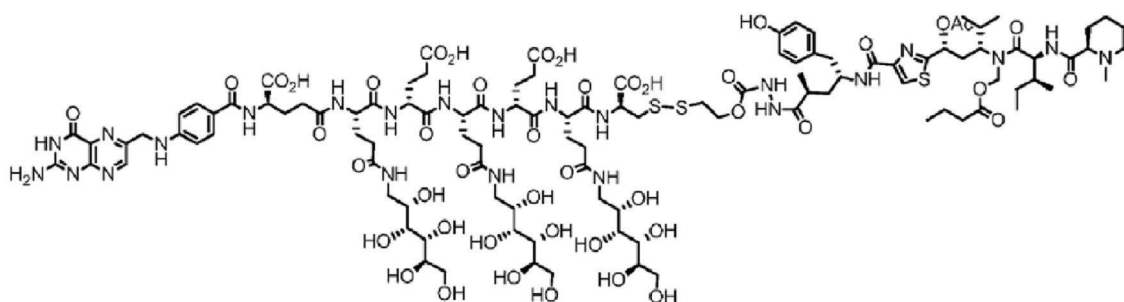
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される放出不能リンカーを含むコンジュゲートは、その遊離形態（例えば、本明細書に提供される化合物および / またはリガンドの遊離形態）でコンジュゲートから放出される成分の毒性を低減または排除する。

30

【 0 1 3 6 】

少なくとも 1 つの実施形態では、リンカーは親水性スペーサーを含む。いくつかの実施形態では、化合物は、式 X I I の構造（例えば、第 1 の親水性スペーサーを含有する放出可能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I I の T L R 7 アゴニストのサブ構造）を有する。

【 化 5 4 】



(XII)

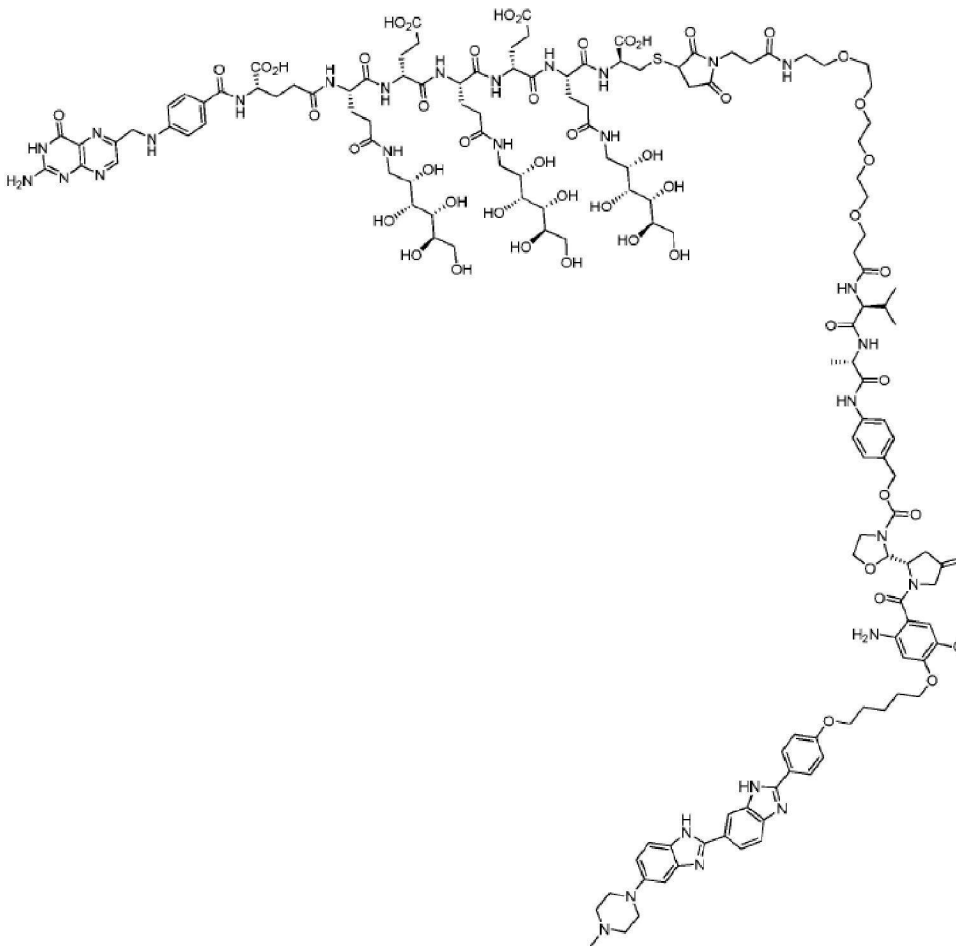
40

【 0 1 3 7 】

50

いくつかの実施形態では、化合物は、式 X I I I の構造（例えば、第 2 の親水性スパーサーを含む放出不能リンカー（共有結合）を介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I I の T L R 7 アゴニストのサブ構造）を有する。

【化 5 5】



10

(XIII)

20

30

【 0 1 3 8 】

例示的なコンジュゲート化合物の具体的な例が本明細書に提供される。

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、免疫調節物質（またはそのラジカル）またはその薬学的に許容可能な塩がコンジュゲートされた時に医薬的に活性なままである、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩のラジカルとコンジュゲートされた標的化部分のラジカルを含む。標的化部分は、本明細書に記載される任意の標的化部分を含んでもよく、少なくとも 1 つの実施形態では、葉酸リガンド、任意の他の葉酸受容体結合分子（例えば、または、前述したもののいずれかの機能的断片もしくは類似体）またはピリド [2 , 3 - d] ピリミジン類似体を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分（またはそのコンジュゲートもしくはラジカル）は、F R に特異的である。

40

【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物は、1 つ以上のリンカーを含み、標的化部分のラジカルは、1 つ以上のリンカーを介して免疫調節物質のラジカルとコンジュゲートされる。例えば、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩が式 I または I I を有する場合、免疫調節物質のラジカルは、リンカーを介して、または直接的に、R¹、R²、または R³ のうちの 1 つにおいて、標的化部分のラジカルにコンジュゲートされてもよい。同様に、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩が式 I I I を有する場合、免疫調節物質のラジカルは、リンカーを介して、または直接的に、R¹ または R³

50

のうちの1つにおいて、標的化部分のラジカルにコンジュゲートされてもよい。あるいは、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩が式IVを有する場合、免疫調節物質のラジカルは、リンカーを介して、または直接的に、 R^1 または R^2 のうちの1つにおいて、標的化部分のラジカルにコンジュゲートされてもよい。本明細書に記載されるように、リンカーは、放出可能であっても放出不能であってもよい。

【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される化合物の1つ以上のリンカーは、PEG、PEG誘導体、または本明細書に明記される目的を達成できる当該技術分野で公知のまたは今後開発される任意の他のリンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、 n 回繰り返されてもよく、 n は、正の整数である。例えば、 n は、限定されないが、1~16、1~32、1~64、または1~96の範囲から選択される任意の整数であってもよい。リンカー中の反復の数（すなわち、 n ）は、化合物の所望の機能性、サイズ、および/または効力を達成するために、および/または所望の適用を考慮して選択されてもよい。いくつかの実施形態では、リンカーのうちの1つ以上は、1つ以上のスペーサー（例えば、これは化合物の特性を特異的に設計するためにも使用され得る）を含む。

10

【0142】

いくつかの実施形態では、リンカーは、加水分解性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、非加水分解性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択的に置換されたヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、リンカーは、アルキル、ヒドロキシル、オキソ、PEG、カルボキシレート、および八口からなる群から選択される少なくとも1つの置換基を含む置換ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサー（例えば、本明細書の別の箇所に記載されるもの）を含む。

20

【0143】

いくつかの実施形態では、リンカーは、その骨格中に少なくとも1つのジスルフィド結合を有する置換ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、リンカーは、その骨格中に少なくとも1つのジスルフィド結合を有するペプチドである。

【0144】

いくつかの実施形態では、リンカーは、 $-CONH-CH(COOH)-CH_2-S-S-CH_2-CR_aR_b-O-CO-$ 、 $-CONH-CH(COOH)CR_aR_b-O-CO-$ 、 $C(O)NHCH(COOH)(CH_2)_2-CONH-CH(COOH)CR_aR_b-O-CO-$ または $-C(O)NHCH(COOH)(CH_2)_2-CONH-CH(COOH)-CH_2-S-S-CH_2-CR_aR_b-O-CO-$ を含み、式中、 R_a および R_b は独立して、H、アルキル、またはヘテロアルキルである（例えば、PEG）。

30

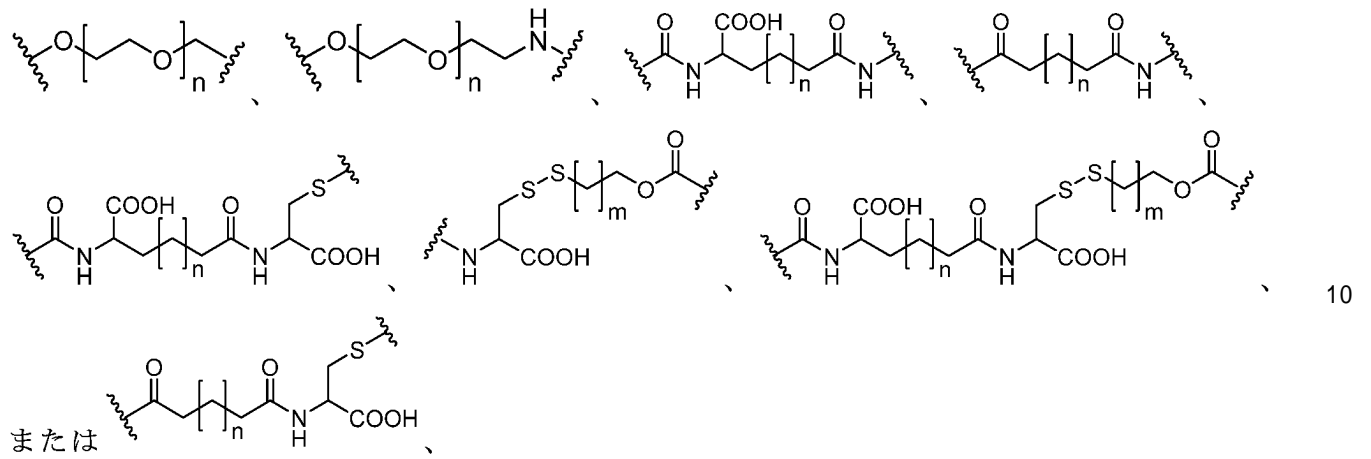
【0145】

いくつかの実施形態では、リンカーは、以下の構造を含み、

40

50

【化56】

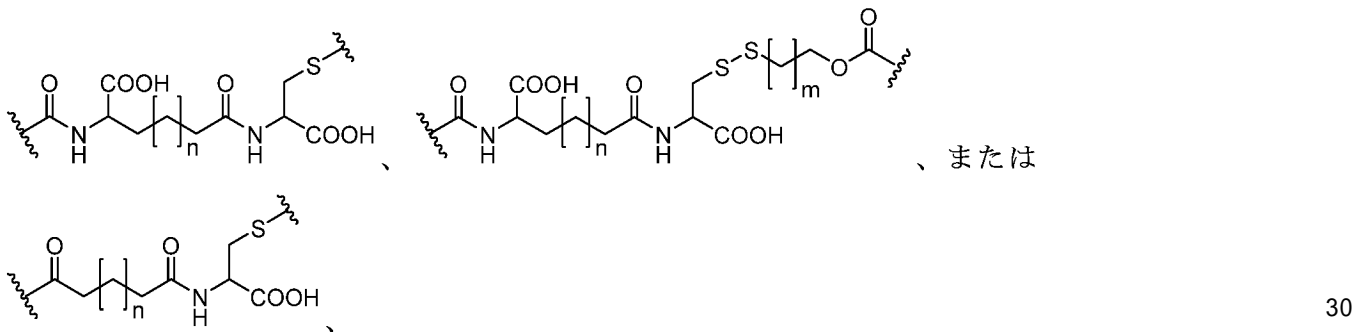


式中、 n および m は、それぞれ独立して0～10である。

【0146】

いくつかの実施形態では、リンカーは、以下の構造を含み、

【化57】

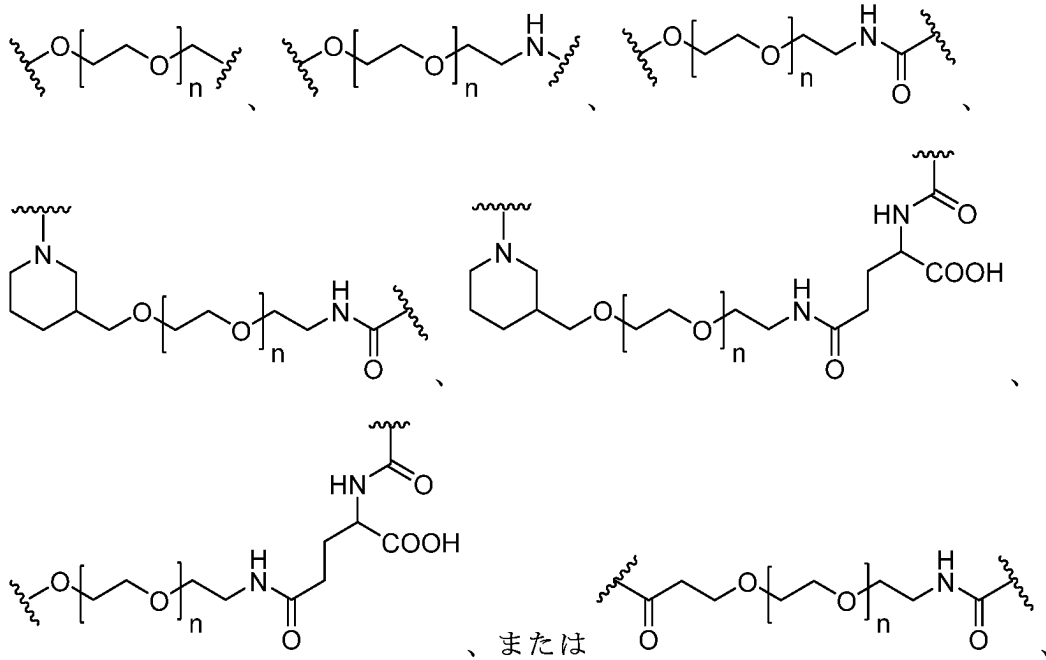


式中、 n および m は、それぞれ独立して0～10である。

【0147】

いくつかの実施形態では、リンカーは、以下の構造を含み、

【化 5 8】



10

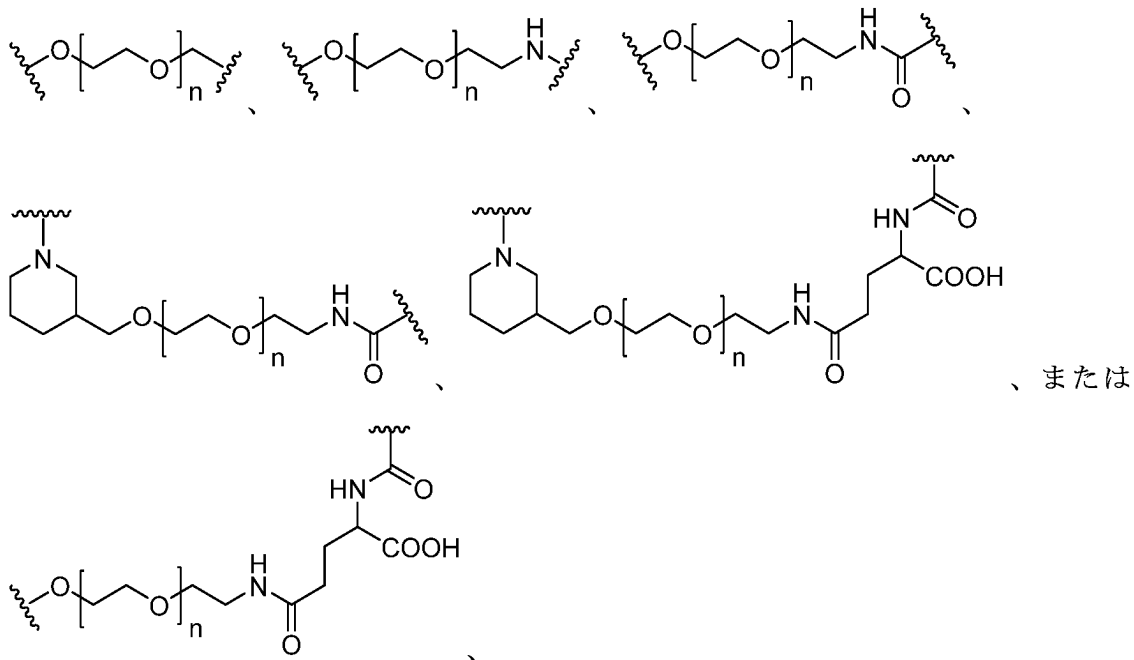
20

式中、 n は、1～32である。

【0148】

いくつかの実施形態では、リンカーは、以下の構造を含み、

【化 5 9】



30

40

式中、 n は、1～16である。

【0149】

化合物のラジカル（例えば、表1または表2のうちのいずれか1つにおける化合物のラジカル）、リンカー（例えば、本明細書に提供されるもの）、およびリガンドのラジカル（例えば、表3～6のうちのいずれか1つにおけるリガンドのラジカル）の任意の組み合わせを組み合わせ、本明細書に提供されるコンジュゲートを形成することができることが理解される。いくつかの実施形態では、化合物のラジカルまたはリガンドのラジカルは

50

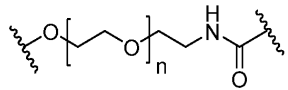
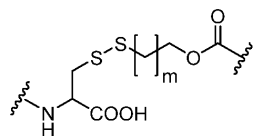
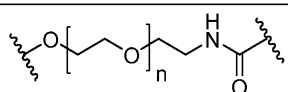
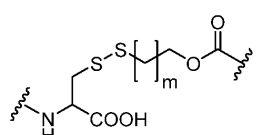
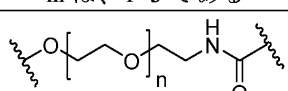
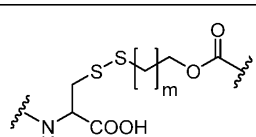
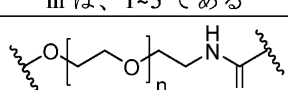
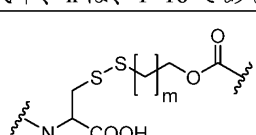
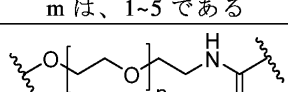
、炭素原子またはヘテロ原子（例えば、O、S、Nなど）である。いくつかの実施形態では、化合物のラジカルは、CまたはOである。いくつかの実施形態では、リガンドのラジカルは、CまたはOである。いくつかの実施形態では、化合物およびリガンドの付着点（例えば、リンカーを介して）は、ラジカル配置によって決定される。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサー（例えば、本明細書の別の箇所に記載されるもの）を含む。本明細書に提供される任意のコンジュゲートは、実施例に提供される方法に提供されるのと同様のプロセスで合成され得ることも理解される。

【0150】

本明細書に提供されるコンジュゲートの非限定的な例が、表7に提供される。

【表7】

表7. コンジュゲートの例

化合物	リンカー	リガンド
A•	 式中、nは、1~16である	a•
A•	 mは、1~5である	a•
Z•	 式中、nは、1~16である	a•
Z•	 mは、1~5である	a•
F•	 式中、nは、1~16である	a•
F•	 mは、1~5である	a•
L•	 式中、nは、1~16である	a•
L•	 mは、1~5である	a•
D•	 式中、nは、1~16である	a•

10

20

30

40

50

D•	<p>m は、1~5 である</p>	a•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	b•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	f•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	h•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	aa•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	bb•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	cc•
A•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	aaa•
Z•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	b•
Z•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	f•
Z•	<p>式中、n は、1~16 である</p>	h•

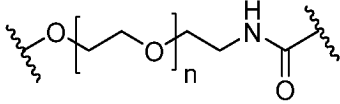
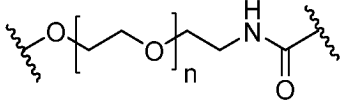
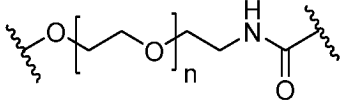
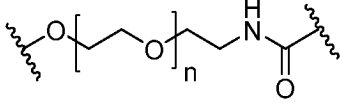
10

20

30

40

50

Z·	 <p>式中、nは、1~16である</p>	aa·
Z·	 <p>式中、nは、1~16である</p>	bb·
Z·	 <p>式中、nは、1~16である</p>	cc·
Z·	 <p>式中、nは、1~16である</p>	aaa·

10

20

30

40

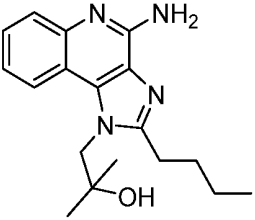
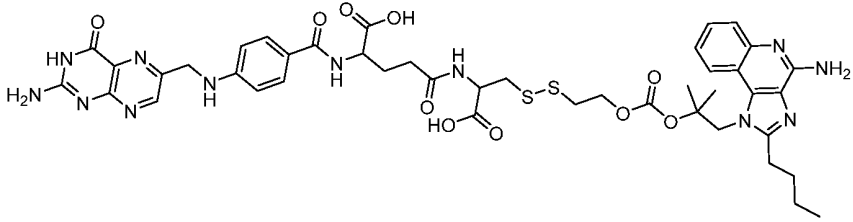
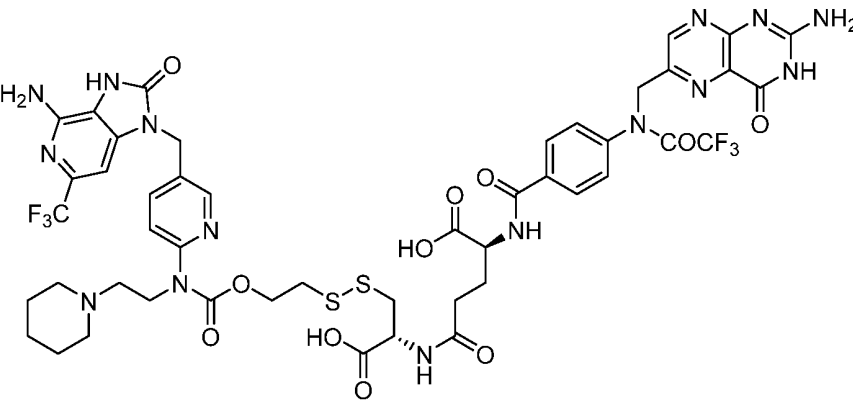
50

【 0 1 5 1 】

本明細書に提供されるコンジュゲートの非限定的な例が、表 8 に提供される。

【表 8】

表 8. 追加のコンジュゲートの例

化合物	構造
1A	
1B	
2A	

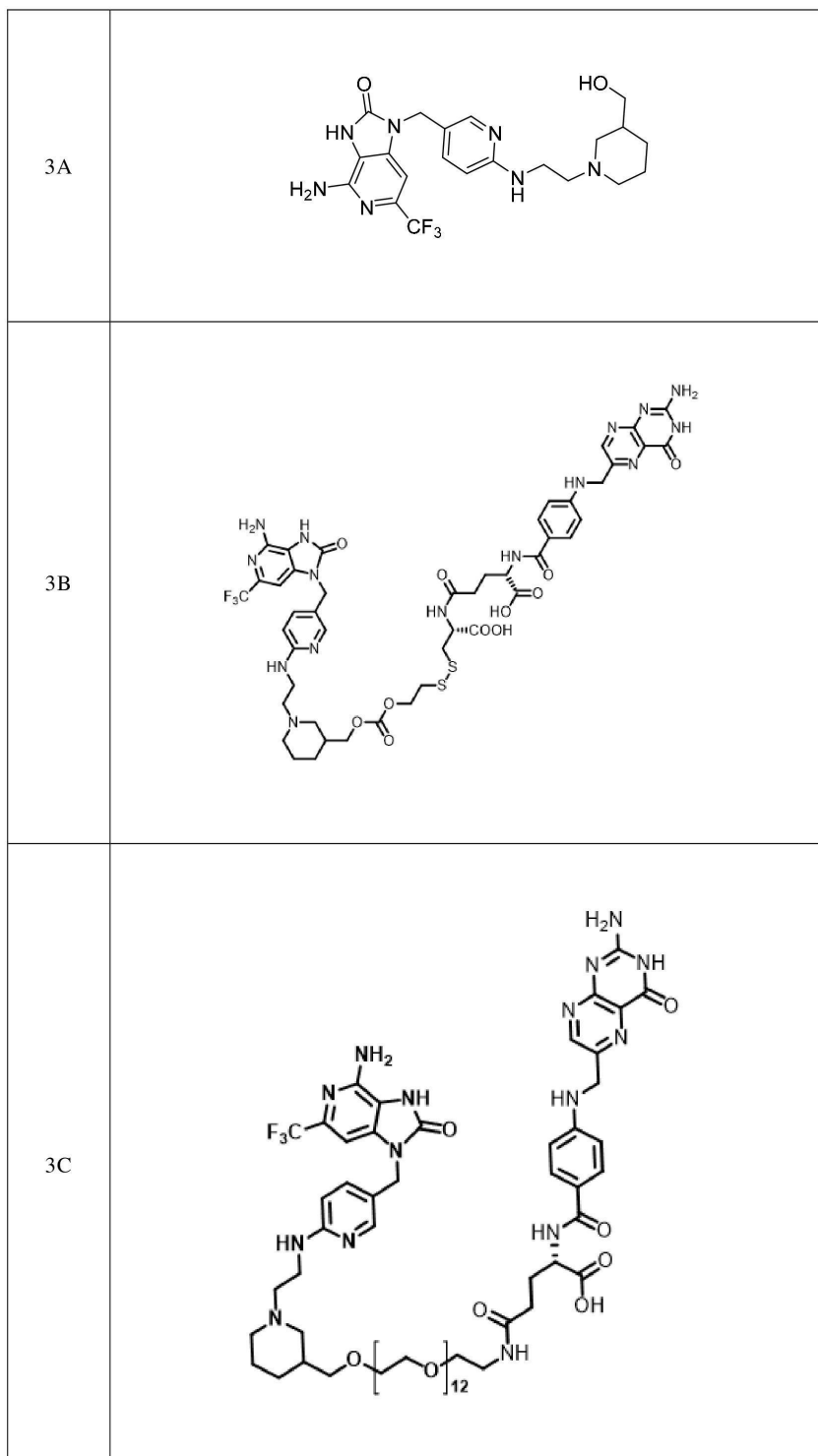
10

20

30

40

50



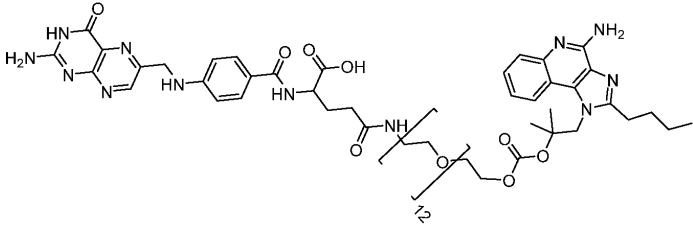
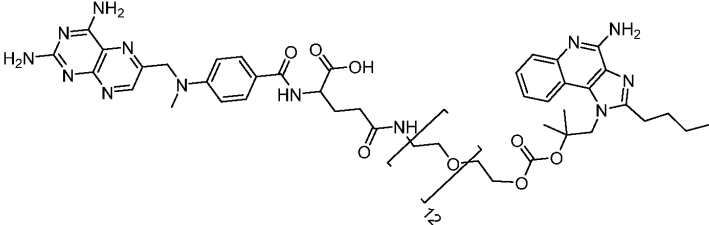
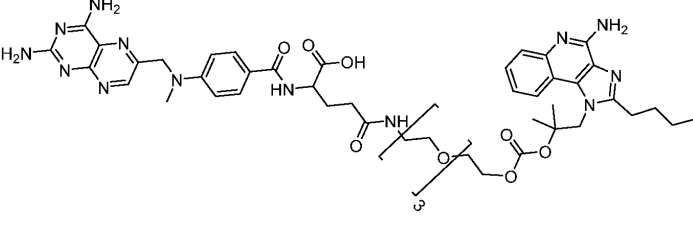
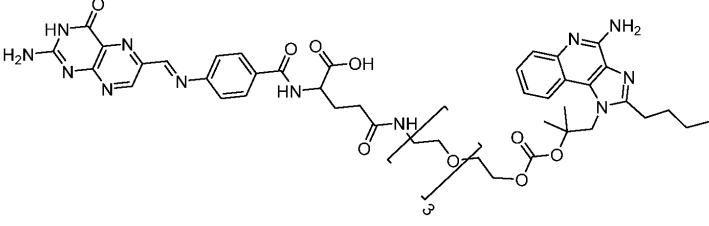
10

20

30

40

50

6A		10
7A		20
8A		30
9A		40

10A		10
11A		20
12A		30

10

20

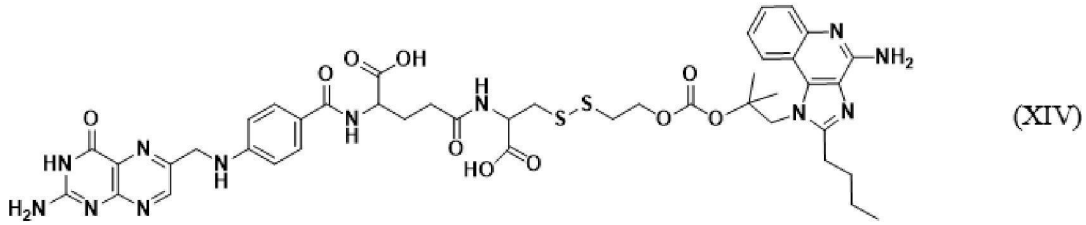
30

40

【 0 1 5 2 】

場合によっては、本明細書に提供されるコンジュゲート化合物は、式XIVの構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、放出可能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式IIIのTLR7アゴニストを含む）を有する：

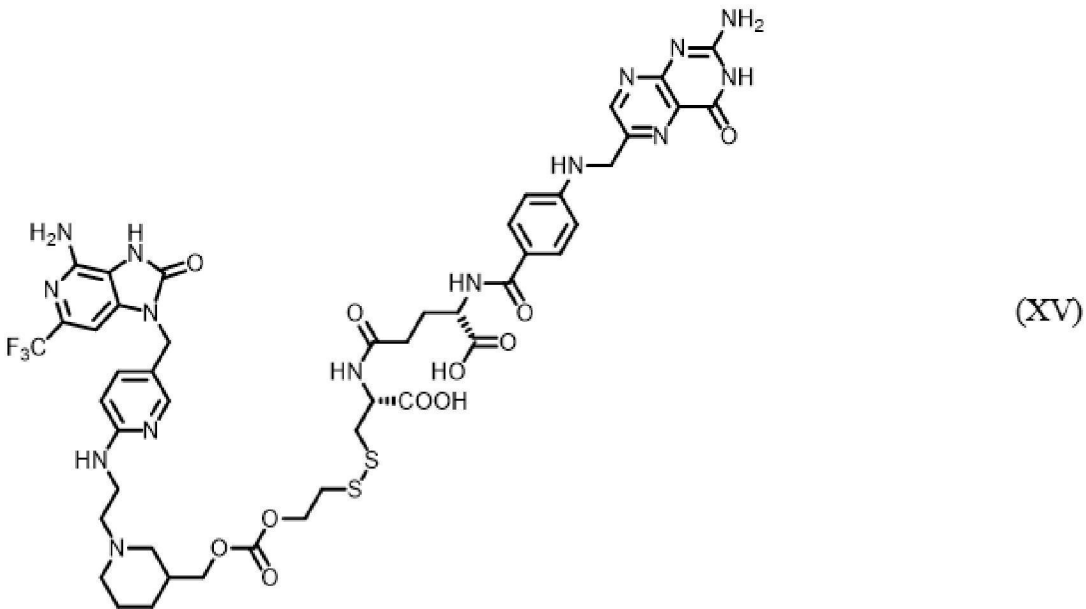
【化 6 0】



【 0 1 5 3】

別の実施形態では、本明細書に提供されるコンジュゲート化合物は、式 X V の構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、放出可能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I の T L R 7 アゴニストを含む（例えば、化合物 3 B））を有する：

【化 6 1】



【 0 1 5 4】

さらに別の実施形態では、本明細書に提供されるコンジュゲート化合物は、式 X V I の構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、3つの P E G を含む放出不能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I の T L R 7 アゴニストを含む（例えば、化合物 3 D））を有する：

10

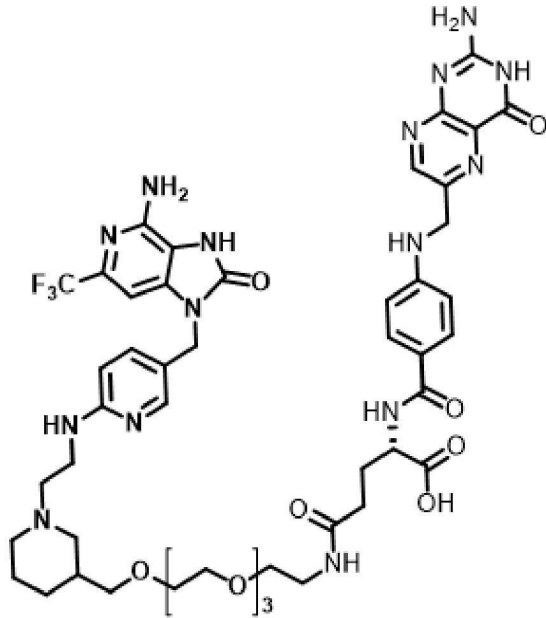
20

30

40

50

【化 6 2】



(XVI)

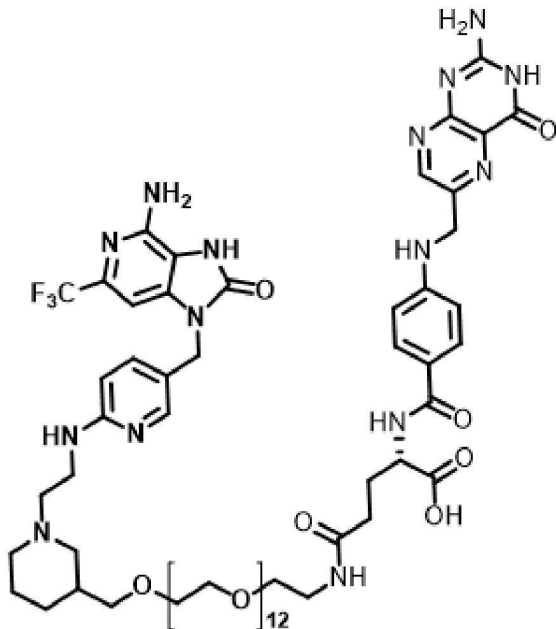
10

【 0 1 5 5】

さらに別の実施形態では、本明細書に提供されるコンジュゲート化合物は、式 X V I I の構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、12個の P E G を含む放出不能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I の T L R 7 アゴニストを含む（例えば、化合物 3 C））を有する：

20

【化 6 3】



(XVII)

30

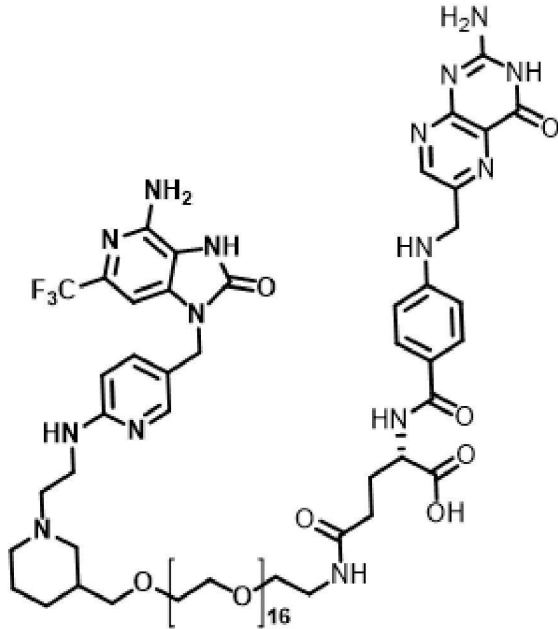
40

【 0 1 5 6】

本明細書に提供されるコンジュゲート化合物のさらなる実施形態は、式 X V I I I の構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、16個の P E G を含む放出不能リンカーを介して葉酸とコンジュゲートされた式 I I の T L R 7 アゴニストを含む（例えば、化合物 3 D'））を有する：

50

【化 6 4】



(XVIII)

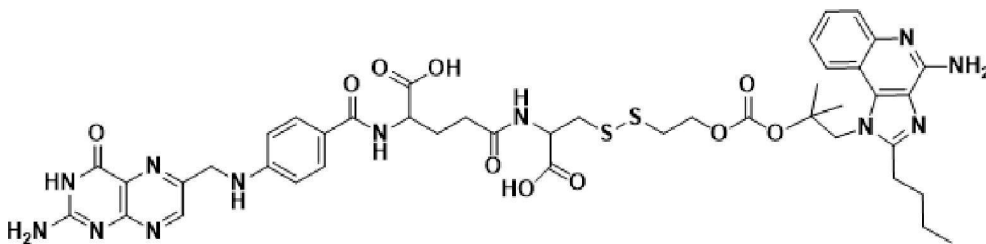
10

【0 1 5 7】

20

本明細書に提供されるコンジュゲート化合物のさらなる実施形態は、式 X I X の構造（例えば、またはその機能的断片もしくは類似体で、葉酸とコンジュゲートされた式 I I I の T L R 7 アゴニストを含む（化合物 1 B））を有する：

【化 6 5】



(XIX)

30

【0 1 5 8】

本明細書に記載される化合物は、当業者によって実施される有機合成の従来的な方法によって調製され得る。以下に概説する一般的な反応順序は、本開示の化合物を調製するのに有用な一般的な方法を表し、範囲または有用性を限定することを意味するものではない。

【0 1 5 9】

40

本発明の化合物の説明は、当業者に公知の化学結合の原則によって限定される。したがって、基が、いくつかの置換基のうちの一つ以上によって置換され得る場合、こうした置換は、化学結合の原則に準拠し、本質的に不安定ではない化合物、および/または水性、中性、およびいくつかの既知の生理学的条件などの周囲条件下で不安定である可能性が高いと当分野の当業者に知られている化合物を与えるように選択される。例えば、ヘテロシクロアルキルまたはヘテロアリアルは、当業者に公知の化学結合の原則に従い、環ヘテロ原子を介して分子の残りの部分に付着し、それによって本質的に不安定な化合物を回避する。

【0 1 6 0】

2つ以上のポリペプチド配列に関連する「同一」または「同一性」という用語は、当該技術分野で公知の配列比較アルゴリズムを使用してまたは手動アライメントおよび目視検

50

査によって測定した場合、同一であるか、または同一のペプチドの特定のパーセンテージ（すなわち、比較ウィンドウまたは標的化末端、葉酸末端、リンカー、または弾頭などの指定された領域にわたって最大の対応のために比較されおよび整列された場合に、指定された領域にわたって約60%の同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより高い同一性）を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。その場合、そのような配列は、「実質的に同一」とであると言われる。言い換えれば、分子の一般的な形状および構造、ならびに適切な場合、水素結合が、標的結合部位に実質的に適合し、それに対するアゴニストとして機能するように維持される限り、配列全体の1つ以上の領域の上に同一性が存在する。

10

【0161】

本明細書に記載される化合物は、1つ以上の薬学的に許容される担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤、および/またはビヒクル、ならびにそれらの組み合わせを含む単位剤形および/または組成物で投与することができる。本明細書で使用される場合、用語「投与」およびその形成物は、経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、吸入、口腔、眼、舌下、膈、直腸、および類似の投与経路を含むがこれに限定されない、本明細書に記載される化合物を宿主対象に導入する任意のすべての手段を一般的に指す。

【0162】

塩としての本開示の化合物の投与は適切であり得る。許容可能な塩の例には、限定されないが、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、またはリチウム）またはアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩が含まれ、しかしながら、治療される対象に投与された時に一般に非毒性で有効などな塩でも許容される。同様に、「薬学的に許容可能な塩」は、医薬品に使用され得る対イオンを有する塩を指す。このような塩は、限定されないが以下を含むことができる、(1) 酸付加塩、これは親化合物の遊離塩基と無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸などとの反応によって、または有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、(D)もしくは(L)リンゴ酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸またはマロン酸などとの反応によって得ることができ、あるいは(2) 親化合物に存在する酸性プロトンが、金属イオン例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、もしくはアルミニウムイオンで置換されるか、または有機塩基、例えばエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トリメタミン、N-メチルグルカミンなどで配位されるかのいずれかの場合に形成される塩。薬学的に許容可能な塩は、当業者に周知であり、任意のこのような薬学的に許容可能な塩は、本明細書に記載される実施形態に関連して意図されてもよい。

20

30

【0163】

許容可能な塩は、十分に酸性の化合物を適切な塩基と反応させて生理学的に許容可能なアニオンを与えることを含む（これに限定されない）、当技術分野で公知の標準的な手順を使用して取得され得る。適切な酸付加塩は、非毒性塩を形成する酸から形成される。例示的で非限定的な例としては、酢酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、重炭酸塩/炭酸塩、重硫酸塩/硫酸塩、ホウ酸塩、カムシレート、クエン酸塩、エジシル酸塩、エシレート、ギ酸塩、フマル酸塩、グルセプテート、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヒベンズ酸塩、塩酸塩/塩化物、臭化水素酸塩/臭化物、ヨウ化水素酸塩/ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メシル酸塩、メチル硫酸塩、ナフチル酸塩(naphthylate)、2-ナフシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オロチン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩/リン酸水素塩/リン酸二水素塩、糖酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、トシレートおよびトリフルオロ酢酸塩を含む。本明細書に記載される化合物の適切な塩基塩は、非毒性塩を形成する塩基から形成される。例示的で非限定的な例としては、アルギニン、ベンザチン、カルシウム、コリン、ジエチルアミン、ジオラミン、グリシン、リジン、マグネシウム、メグルミン、オラミン、カリウム、ナトリウム、トロメタ

40

50

ミン、および亜鉛塩が挙げられるが、これらに限定されない。酸および塩基のヘミ塩 (hemisalt)、例えばヘミ硫酸塩およびヘミカルシウム塩も形成され得る。

【0164】

本明細書で使用される場合、用語「組成物」は、本明細書に記載される化合物を含む、2つ以上の成分を含む任意の生成物を一般的に指す。本明細書に記載される組成物は、本明細書に記載される単離された化合物から、または本明細書に記載される化合物の塩、溶液、水和物、溶媒和物、および他の形態から調製されることが理解されるべきである。ヒドロキシ、アミノ、および類似の基などの特定の官能基は、化合物の様々な物理的形態で、水および/または様々な溶媒と複合体を形成し得ることが理解される。組成物は、本明細書に記載される化合物の様々な非晶質性、非晶質でない、部分的に結晶性、結晶性、および/または他の形態型から調製されてもよく、組成物は、本明細書に記載される化合物の様々な水和物および/または溶媒和物から調製され得ることも理解されるべきである。したがって、本明細書に記載される化合物を列挙する医薬組成物には、本明細書に記載される化合物の様々な形態型および/または溶媒和形態もしくは水和物形態のそれぞれ、またはそれらの任意の組み合わせ、または個々の形態が含まれる。

10

【0165】

本開示の化合物は、医薬組成物として製剤化され、選択された投与経路に適合した様々な形態でヒト患者などの哺乳動物宿主に投与され得る。例えば、医薬組成物は、経口または非経口、静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、硬膜外、脳室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、腫瘍内、筋肉内、局所的、吸入および/または皮下経路のために製剤化され、かつそれらを介して投与され得る。実際に、少なくとも1つの実施形態では、本明細書に記載の化合物および/または組成物は、血流内、筋肉内、または内臓内に直接投与されてもよい。

20

【0166】

例えば、少なくとも1つの実施形態では、本化合物は、不活性希釈剤または同化可能食用担体などの薬学的に許容可能なビヒクルと組み合わせて、全身投与(例えば、経口的に)されてもよい。経口治療投与については、活性化合物は、1つ以上の賦形剤と組み合わせられ、摂取可能な錠剤、パッカレット、ドロッチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハなどの形態で使用され得る。組成物および調製物のパーセンテージは、変化してもよく、約1~約99重量%で、有効成分と、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、および/または甘味剤(当該技術分野で既知である)との間であり得る。このような治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、有効な投与量レベルが得られるような量である。

30

【0167】

例えば、凍結乾燥による滅菌条件下での非経口化合物/組成物の調製は、当業者に周知の標準的な医薬技術を使用して容易に達成され得る。少なくとも1つの実施形態では、非経口組成物の調製に使用される化合物の溶解性は、溶解性増強剤(solubility-enhancing agent)の組み込みなどの適切な製剤化技術の使用によって増大させることができる。

【0168】

前述したように、本開示の化合物/組成物はまた、注入または注射を介して(例えば、針(マイクロニードルを含む)注射器および/または無針注射器を使用して)投与されてもよい。活性組成物の溶液は、水性であってもよく、任意選択的に非毒性界面活性剤と混合されてもよく、および/または塩、炭水化物、および緩衝剤などの担体もしくは賦形剤(好ましくは、3~9のpHで)を含有してもよいが、いくつかの用途については、それらは、滅菌非水性溶液として、または滅菌のピロジェンフリー水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの適切なビヒクルと共に使用される乾燥形態としてより適切に製剤化されてもよい。例えば、分散液は、グリセロール、液体PEG、トリアセチン、およびそれら混合物、ならびに油中で調製することができる。通常の保管および使用の条件下で、これらの調製物はさらに、微生物の増殖を防止するための防腐剤を含有してもよい。

40

【0169】

50

注射または注入に好適な医薬剤形は、任意にリポソームで封入された、滅菌注射可能または注入可能溶液または分散剤の即時調製に適合された活性成分を含む、滅菌水溶液または分散剤または滅菌粉末を含み得る。すべての場合において、最終的な剤形は、製造および保管の条件下で滅菌され、流動的で、安定的であるべきである。液体担体または液体ビヒクルは、例えば限定されないが、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体PEGなど）、植物油、無毒性グリセリルエステル、および/またはそれらの好適な混合物を含む、溶媒または液体分散媒体であり得る。少なくとも1つの実施形態では、適切な流動性は、リポソームの形成によって、分散液の場合に必要な粒子サイズの維持によって、または界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル

10

【0170】

滅菌注射可能溶液は、活性化化合物および/または組成物を、必要に応じて、上記に明記される他の成分のうちの1つ以上と、適切な溶媒の必要量に組み込み、続いてフィルター滅菌することによって調製され得る。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これは、有効成分の粉末に、以前に滅菌濾過された溶液中に存在する任意の追加の所望の成分を加えたものをもたす

20

【0171】

局所投与の場合、本化合物を、固体または液体でありうる皮膚科学的に許容可能な担体と組み合わせた組成物または製剤として皮膚に投与することが望ましい場合がある。例えば、特定の実施形態では、固体担体は、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどの微細に分割された固体を含み得る。同様に、有用な液体担体は、水、アルコールまたはグリコール、または水-アルコール/グリコールのブレンドを含んでもよく、本発明の化合物は、任意選択的に非毒性界面活性剤の助けを借りて、有効レベルで溶解または分散することができる。追加的または代替的に、芳香剤および抗微生物剤などのアジュバントを加えて、所与の使用に対する特性を最適化することができる。得られた液体組成物は、吸収性パッドから塗布するか、包帯剤および/または他の包帯剤を含浸するために使用するか、ポンプ式もしくはエアロゾル噴霧器を使用して標的領域上に噴霧するか、または単に対象の所望の領域に直接塗布することができる。

30

【0172】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪酸アルコール、修飾セルロース、または修飾鉱物質などの増粘剤を、液体担体と共に採用して、対象の皮膚に直接適用するために、塗り広げられるペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成することもできる。

【0173】

本明細書で使用される場合、「治療的に有効な」、「治療有効用量」、「治療有効量」、「予防有効量」または「予防有効用量」という用語は、（特に明記されていない限り）1回または治療サイクルの過程のいずれかで投与された場合、対象の健康、ウェルビーイングまたは死亡率に影響を与える化合物の量を意味する（例えば、限定されるものではないが、適用できる場合は、線維性疾患または状態および/またはがんに関連する1つ以上の症状の発症を遅らせ、および/または重症度を低減する）。本開示の化合物の有用な用量は、動物モデルにおけるそれらのインビトロ活性、およびインビボ活性を比較することによって決定することができる。マウスおよび他の動物における有効投与量のヒト対象への外挿の方法は、当技術分野で公知である。実際に、化合物の用量は、宿主対象の状態、治療されるがんまたは線維性疾患、病状がどの程度進行しているか、化合物の投与経路および組織分布、ならびに他の治療的治療（放射線療法または併用療法における追加の薬剤など）の併用の可能性に応じて、著しく変化し得る。治療（例えば、治療または予防有効

40

50

量または用量)における使用に必要とされる組成物の量は、特定の用途だけでなく、選択された塩(該当する場合)および対象の特徴(例えば、年齢、状態、性別、対象の体表面積および/または質量、薬剤に対する耐性など)によっても異なり、最終的には、担当医師、臨床医、またはその他の者の裁量に委ねられる。治療有効または予防有効量または用量は、例えば、約0.05 mg/kg患者体重~約30.0 mg/kg患者体重、または約0.01 mg/kg患者体重~約5.0 mg/kg患者体重の範囲であり得、限定されるものではないが、0.01 mg/kg、0.02 mg/kg、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg、および5.0 mg/kg(すべて患者の体重のkg)が含まれる。化合物の治療有効または予防有効総量は、単回または分割用量で投与されてもよく、開業医の裁量で、本明細書に与えられる典型的な範囲外であってもよい。

10

【0174】

別の実施形態では、化合物は、約0.5 g/m²~約500 mg/m²、約0.5 g/m²~約300 mg/m²、または約100 g/m²~約200 mg/m²の治療または予防有効量で投与され得る。他の実施形態では、量は、約0.5 mg/m²~約500 mg/m²、約0.5 mg/m²~約300 mg/m²、約0.5 mg/m²~約200 mg/m²、約0.5 mg/m²~約100 mg/m²、約0.5 mg/m²~約50 mg/m²、約0.5 mg/m²~約600 mg/m²、約0.5 mg/m²~約6.0 mg/m²、約0.5 mg/m²~約4.0 mg/m²、または約0.5 mg/m²~約2.0 mg/m²であり得る。総量は、単回または分割用量で投与されてもよく、医師の裁量で、本明細書に与えられる典型的な範囲外であってもよい。これらの量は、体表面積のmに基づく。

20

【0175】

いくつかの実施形態では、対象からのサンプル中の特定のバイオマーカーの発現の測定および/またはサイトカインレベルの分析に関連して、本開示の意義は、マーカーまたはマーカーのセットを検出するために使用される特定の方法ではなく、マーカーを検出するために使用されるものである。1つ以上のバイオマーカーの発現、定量、またはプロファイルを検出するために使用され得る多くの方法がある。検出または定量化されるマーカーまたはマーカーのセットが特定されると、適切な試薬の提供と共に、いくつかの技術(現在既知であるか、または今後開発される)のいずれかを使用してよい。当業者であれば、特定される1つ以上のバイオマーカーが提供される場合、本明細書に開示される方法を実施するための適切なアッセイ(例えば、核酸マーカーのためのPCRベースまたはマイクロアッセイベースのアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、タンパク質もしくは抗体マイクロアレイまたは類似の免疫学的アッセイなど)を選択することができる。

30

【0176】

化学的な例

実施例A：化合物1Aの合成：

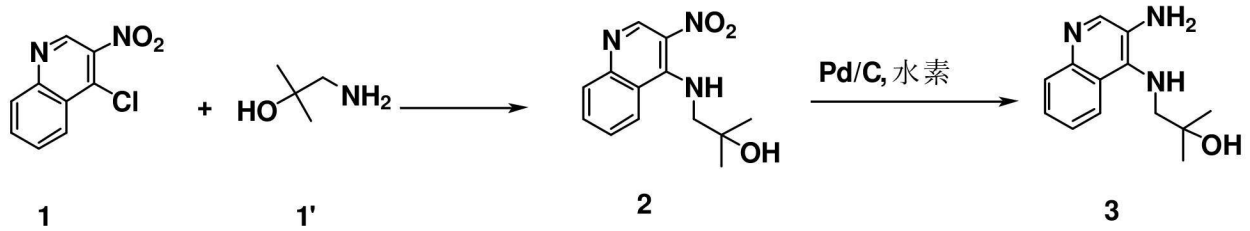
化合物1Aを、以下のスキーム1に従って、Nikunj M. Shukla, Cole A. Mutz, Subbalakshmi S. Malladi, Hemamli J. Warshakoon, Rajalakshmi Balakrishna, and Sunil A. David, "Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline; Structure-Activity Relationships in Human Toll-Like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues," J Med Chem. 2012 Feb 9; 55(3): 1106-1116によって報告されたように合成した。

40

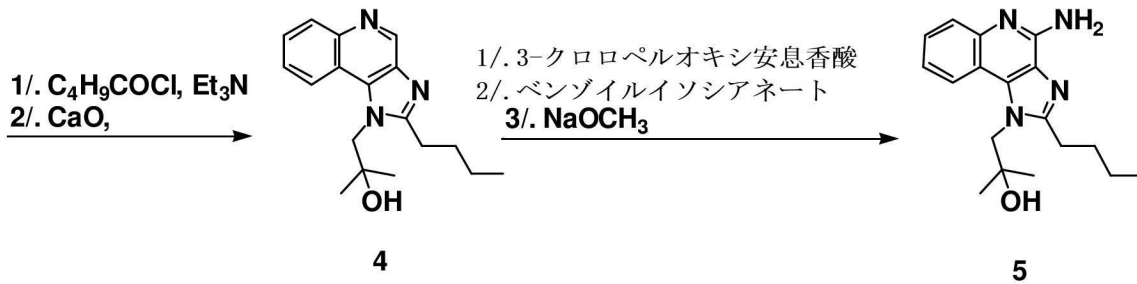
50

【化66】

スキーム1



10



20

【0177】

ステップ1：1-アミノ-2-メチルプロパン-2-オール（化合物）の合成

2, 2-ジメチルオキシラン（0.1 g、1.388 mmol）を、20 mLの氷冷した水酸化アンモニウムの溶液に滴下で加えた。反応混合物を、室温で12時間攪拌した。溶媒を真空下で除去し、残渣をメタノールに溶解した。二炭酸ジ-tert-ブチル（0.75 g、3.47 mmol）を反応混合物に加え、4時間攪拌した。混合物を、カラムクロマトグラフィー（24%酢酸エチル（EtOAc）/ヘキサン）を使用して精製して、tert-ブチル2-ヒドロキシ-2-メチルプロピルカルバメートを得た。純粋なtert-ブチル2-ヒドロキシ-2-メチルプロピルカルバメートを、5 mLのトリフルオロ酢酸に溶解し、35分間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、トリフルオロ酢酸塩1'として1-アミノ-2-メチルプロパン-2-オールを得た。 $^1\text{H NMR}$ 500 MHz（500 MHz、 CDCl_3 、（ppm））：8.62（s, 2H）, 3.02（d, 2H）, 2.06 - 2.04（m, 2H）, 1.37 - 1.34（s, 6H）。

30

【0178】

ステップ2：2-メチル-1-(3-ニトロキノリン-4-イルアミノ)プロパン-2-オール（化合物2）の合成

1-アミノ-2-メチルプロパン-2-オール（化合物）（450 mg、2.4 mmol）のトリフルオロ酢酸塩を、トルエンおよび2-プロパノールの4：1の混合物中の4-クロロ-3-ニトロキノリン（化合物1）（250 mg、1.2 mmol）および Et_3N （0.5 mL、3 mmol）の溶液に加えた。固体が沈殿を始めるまで、混合物を30分間、70 に加熱した。次いで、反応混合物を冷却し、濾過し、トルエン/2-プロパノール（7：3）、エーテルおよび冷水で洗浄した。残渣を80 で乾燥させて、2-メチル-1-(3-ニトロキノリン-4-イルアミノ)プロパン-2-オール（化合物2）を得た。液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）分析：[M+H]⁺ m/z = 261。

40

【0179】

ステップ3：1-(3-アミノキノリン-4-イルアミノ)-2-メチルプロパン-2-

50

オール（化合物 3）の合成

2 - メチル - 1 - (3 - ニトロキノリン - 4 - イルアミノ) プロパン - 2 - オール（化合物 2）（450 mg、1.72 mmol）をメタノールに溶解し、触媒として Pd / C 上で水素バルーンを用いて 4 時間水素化した。次いで、溶液を、セライトを使用して濾過し、その後、減圧下で溶媒を蒸発させて、1 - (3 - アミノキノリン - 4 - イルアミノ) - 2 - エチルプロパン - 2 - オール（化合物 3）を得た。LCMS : [M + H] ⁺ m / z = 231 . NMR 500 MHz (CDC 13 , (ppm)) : 8 . 12 (s , 1 H) , 7 . 61 - 7 . 58 (m , 1 H) , 7 . 48 - 7 . 40 (m , 2 H) , 4 . 90 (s , 2 H) , 3 . 47 (2 H) , 1 . 35 - 1 . 21 (s , 6 H) .

【 0 1 8 0 】

10

ステップ 4 : 1 - (4 - アミノ - 2 - ブチル - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 1 - イル) - 2 - メチルプロパン - 2 - オール（化合物 5、TLR 7 A）の合成

無水 THF 中の化合物 3（100 mg、0.43 mmol）の溶液に、トリエチルアミン（66 mg、0.65 mmol）および塩化バレリル（62 mg、0.52 mmol）を添加した。次いで、反応混合物を 6 ~ 8 時間攪拌し、続いて真空下で溶媒を除去した。残渣を EtOAc に溶解し、水およびブラインで洗浄し、次いで Na₂SO₄ で乾燥させて、中間体アミド化合物を得た。これをメタノール（MeOH）中に溶解し、続いて酸化カルシウムを添加し、マイクロ波で 110 で 1 時間加熱した。次いで、溶媒を除去し、残渣を、カラムクロマトグラフィー（9% MeOH / ジクロロメタン）を使用して精製して、化合物 4（58 mg）を得た。MeOH : ジクロロメタン : クロロホルム（0.1 : 1 : 1）の溶媒混合物中の化合物 4 の溶液に、3 - クロロペルオキシ安息香酸（84 mg、0.49 mmol）を加え、溶液を 45 ~ 50 で 40 分間還流した。次いで溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィー（20% MeOH / ジクロロメタン）を使用して精製して、酸化物誘導体（55 mg）を得た。次いでこれを無水ジクロロメタンに溶解し、続いてベンゾイルイソシアネート（39 mg、0.26 mmol）を添加し、45 で 15 分間加熱した。次いで、溶媒を真空下で除去し、残渣を無水 MeOH 中に溶解し、続いて過剰のナトリウムメトキシドを添加した。次いで、反応混合物を、80 で 1 時間加熱した。溶媒を真空下で除去し、残渣をカラムクロマトグラフィー（11% MeOH / ジクロロメタン）を使用して精製して、化合物 5 を得た。LCMS : [M + H] ⁺ m / z = 312 . H NMR 500 MHz (CDC 13 , (ppm)) : 8 . 16 - 8 . 15 (d , 1 H) , 7 . 77 - 7 . 46 (d , 1 H) , 7 . 46 - 7 . 43 (m , 1 H) , 7 . 33 - 7 . 26 (m , 1 H) , 3 . 00 - 2 . 97 (m , 2 H) , 1 . 84 - 1 . 78 (m , 2 H) , 1 . 47 - 1 . 41 (m , 2 H) , 1 . 36 (s , 6 H) , 0 . 98 - 0 . 95 (m , 3 H) .

20

30

【 0 1 8 1 】

実施例 B : 化合物 1 B の合成 :

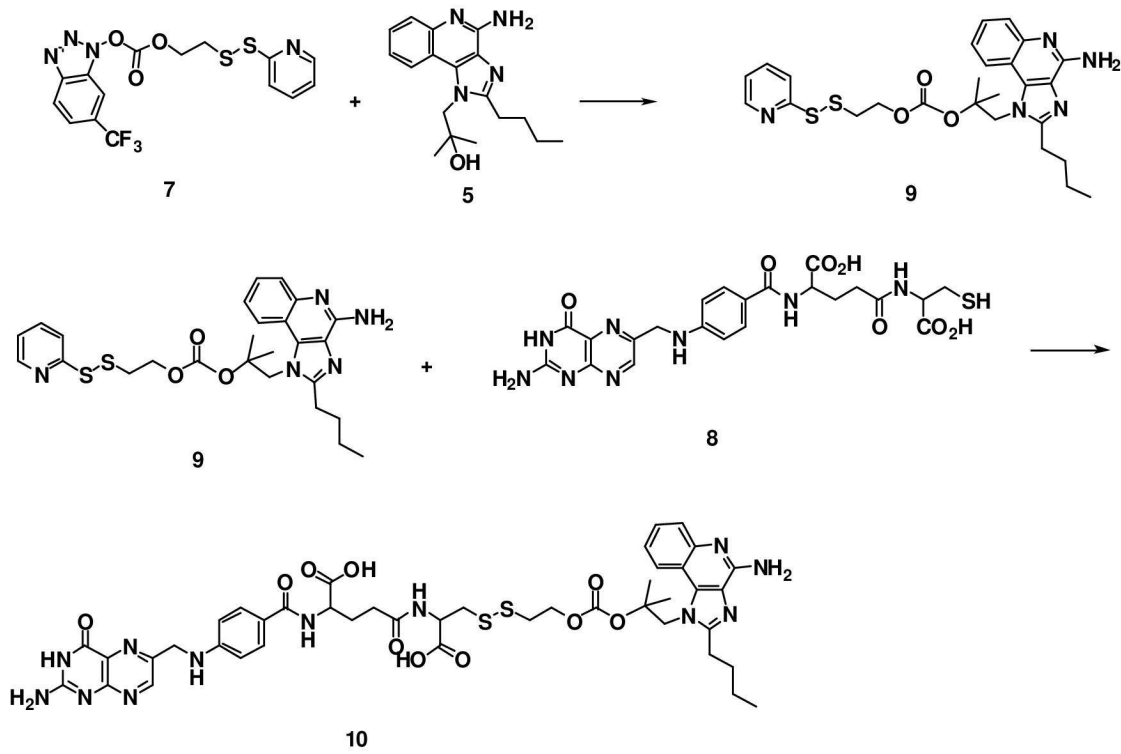
その後、化合物 1 A を使用して、以下のスキーム 2 に従って化合物 1 B を合成することができる。

40

50

【化 6 7】

スキーム 2



10

20

40

50

【 0 1 8 2】

化合物 1 A、葉酸、およびリンカーは市販されているか、または当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【 0 1 8 3】

ヘテロ二官能性リンカー 7 (88 mg、0.213 mmol) を、窒素雰囲気下で室温で 4 mL の塩化メチレン中の化合物 5 (33 mg、0.106 mmol) およびジメチルアミノピリジン (39 mg、0.319 mmol) の溶液に加え、混合物を還流温度で 7 時間攪拌し、このとき、混合物の薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析は > 80% の変換を示した。混合物を濃縮し、塩化メチレン中の 10% アセトニトリルを溶離液として使用したカラムクロマトグラフィーにより精製した。純生成物化合物 9 を、淡黄色の固体として得た。ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の化合物 8 (1 当量) の溶液を、ジメチルアミノピリジン (1 当量) を含む DMSO 中の薬剤リンカー中間体化合物 9 (1.0 当量 ~ 1.5 当量) の溶液に、20 分間隔で 3 回に分けて添加した。アルゴン下、室温で 1 ~ 2 時間攪拌した後、混合物の LCMS 分析は、主要生成物として所望の葉酸 - 薬剤コンジュゲート (化合物 10) の形成を示した。混合物を、分取高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。LCMS: $[M+H]^+$ $m/z = 959$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 8.58 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.83 - 7.74 (m, 1H), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.48 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.27 (s, 1H), 4.43 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.28 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.00 (d, $J = 25.7$ Hz, 3H), 3.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.97 (dd, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.09 (s, 2H), 1.81 (s, 7H), 1.40 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.22 (s, 2H), 1.

1.3 (s, 2H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

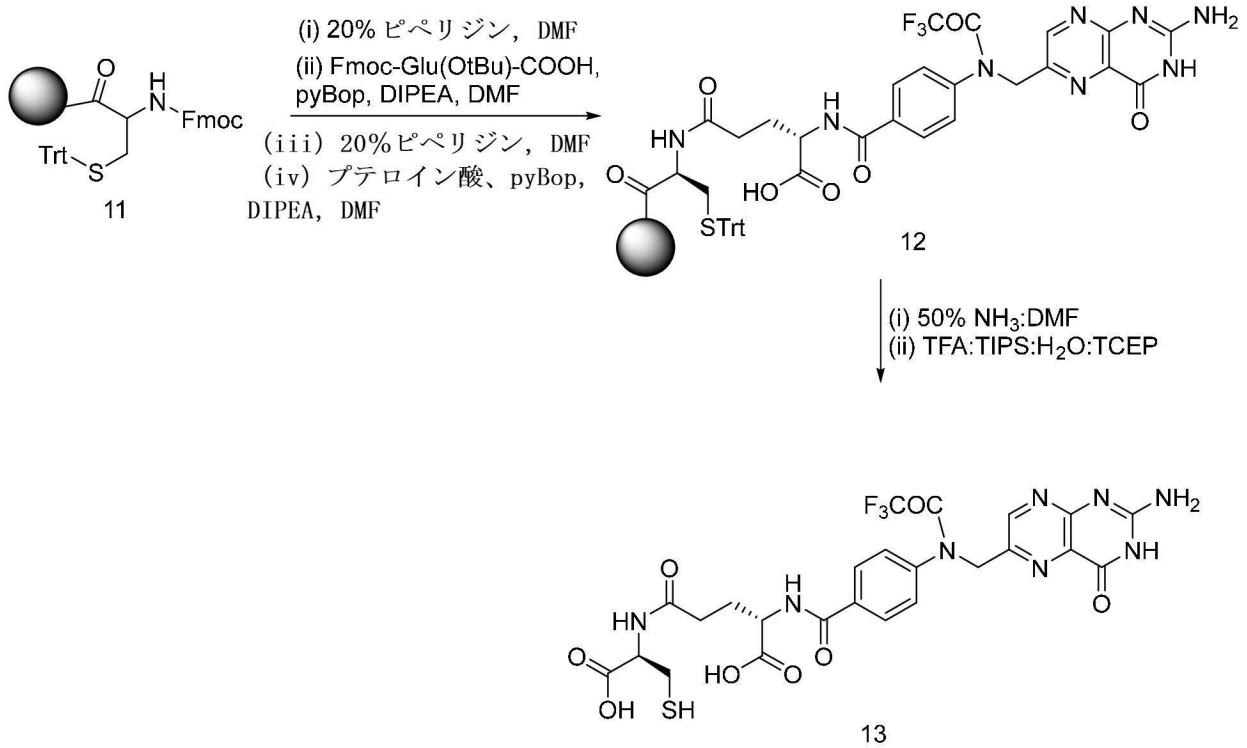
【0184】

実施例 C：化合物 2 A の合成：

化合物 2 A は、スキーム 3 およびスキーム 4 に従って合成することができる。

【化 6 8】

スキーム 3

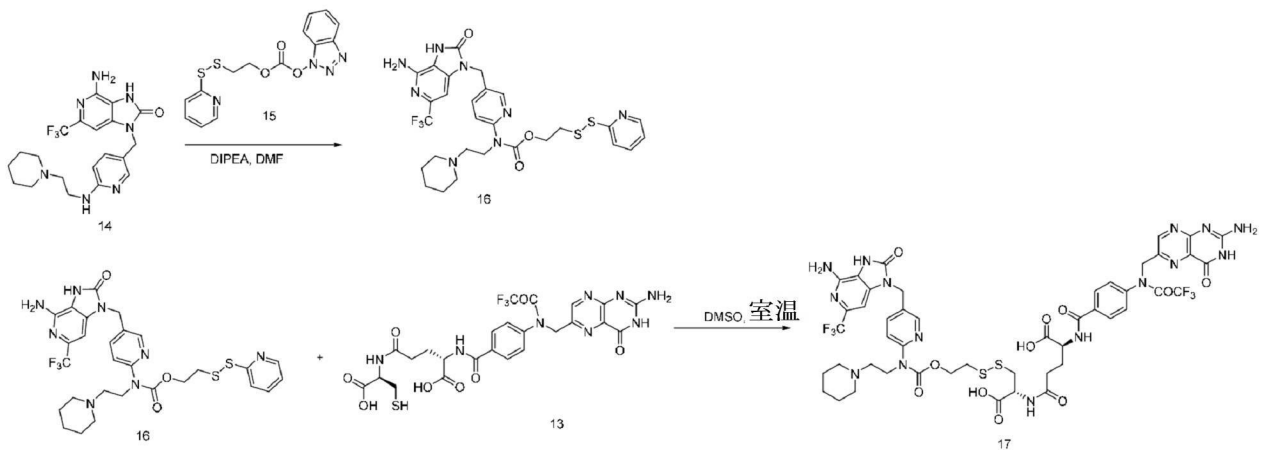


10

20

【化 6 9】

スキーム 4



30

40

【0185】

システインを装填した Wang 樹脂 (11) は、ジメチルホルムアミド (DMF) 中の 20% ピペリジンを使用して最初に脱保護された。遊離アミンを、ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBop

50

)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)およびDMFの存在下で、Fmoc-Glu(OtBu)-COOHで処置した。結合した生成物を、DMF中の20%ピペリジンを使用して脱保護し、PyBop、DIPEAおよびDMFの存在下で、プテロイン酸で処置し、化合物12を生成した。トリフルオロアセチル基を50%アンモニア-DMF溶液で脱保護した。最後に、樹脂を、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：水：トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンカクテル溶液を使用して切断し、HPLCを使用して精製して、葉酸-システイン(13)を黄色固体として得た。

【0186】

化合物14を、最初にヘテロ二官能性リンカー試薬(15)で処置して、葉酸-システインジスルフィド中間体(16)を得た。次いでこれを、DMSO中の葉酸-システイン(13)と反応させ、HPLCを使用して精製して化合物17(例えば、化合物2A)を生成した。すべての化合物の特性評価は、緩衝系として重炭酸アンモニウムおよびアセトニトリルを使用したLCMSを用いた。化合物2AのLCMSから観察された質量は、[M+H]⁺=1082.2であった。

10

【0187】

特に上記に明記されるスキーム1、2、および3を考慮して、関連技術の現在の状態と併せて、本開示は、当業者が本明細書に明記される概念を利用して本開示の他のすべての化合物を合成することができるように、十分な詳細を提供する。

【0188】

治療方法

本明細書に記載される化合物に加えて、線維性疾患またはがんの治療および/または予防のための方法も提供される。

20

【0189】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、線維性疾患状態またはがんに罹患している対象を治療する方法であって、方法は、対象の細胞を、本明細書に提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または本明細書で提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む(例えば、医薬的)組成物と接触させることを含む、方法であり、例えば化合物は、式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII、式IX、式X、式XI、式XII、式XIII、式XIV、式XV、式XVI、式XVII、式XVIII、式XIX、または式XXXのうちの任意の1つの構造を有する。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、TLR7、8、または9のアゴニストを含む。

30

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、治療を必要とする個体の腫瘍性、炎症性、自己免疫性、または線維性疾患または障害を治療する方法であって、本明細書に提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または本明細書で提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む(例えば、医薬的)組成物を、その個体に投与することを含む、方法であり、例えば化合物は、式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII、式IX、式X、式XI、式XII、式XIII、式XIV、式XV、式XVI、式XVII、式XVIII、式XIX、または式XXXのうちの任意の1つの構造を有する。

40

【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、治療を必要とする個体の腫瘍性疾患または障害を治療する方法であって、本明細書に提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または本明細書で提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む(例えば、医薬的)組成物を、その個体に投与することを含む、方法であり、例えば化合物は、式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII、式IX、式X、式XI、式XII、式XIII、式XIV、式XV、式XVI、式XVII、式XVIII、式XIX、または式XXXのうちの任意の1つの構造を有する。いくつかの実施形態では、腫瘍性疾患または障害は、がんである。いくつか

50

の実施形態では、がんは、膀胱がん、脳がん、肝がん、腎がん、皮膚がん、胸腺がん、消化管間質腫瘍（GIST）、食道がん、膵がん、および乳がんから選択される。

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、治療を必要とする個体の線維性疾患または障害を治療する方法であって、本明細書に提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または本明細書で提供される任意の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む（例えば、医薬的）組成物を、その個体に投与することを含む、方法であり、例えば化合物は、式 I、式 II、式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII、式 VIII、式 IX、式 X、式 XI、式 XII、式 XIII、式 XIV、式 XV、式 XVI、式 XVII、式 XVIII、式 XX、または式 XXX のうちの任意の 1 つの構造を有する。いくつかの実施形態では、線維性疾患または障害は線維症である。いくつかの実施形態では、線維症は、IPF、脂肪肝疾患、肝硬変、大腸炎、慢性肝疾患、心臓線維症、および強皮症から選択される。

10

【0193】

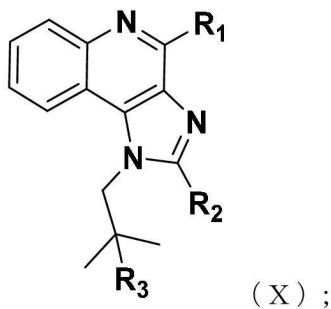
特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、細胞を、リンカーを介して、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体に付着した免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩を含む少なくとも 1 つの化合物と、接触させることを含む線維性疾患状態を予防または治療する方法であり、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩は、パターン認識受容体を標的とする。

【0194】

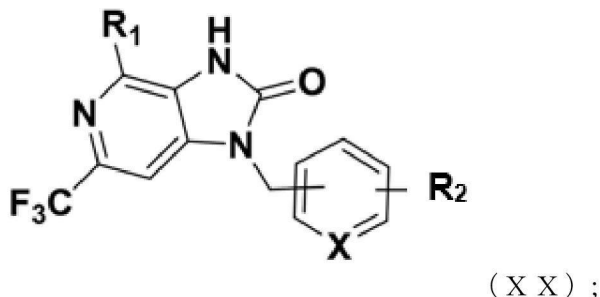
本明細書に提供される化合物、組成物、および/または方法のいくつかの実施形態では、免疫調節物質は、TLRアゴニストを含み、それは以下の式 X もしくは XX によって表される構造であるか、または式 X もしくは XX の薬学的に許容可能な塩であり、

20

【化70】



30



40

式中、式 X および XX において、

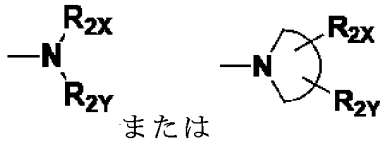
R₁ は、-NH₂ または -NH-R_{1x} であり、

R₂ は、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、ヘテロアリール、

-NH-R_{2x}、-O-R_{2x}、-S-R_{2x}、

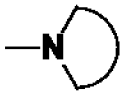
50

【化 7 1】



であり、

【化 7 2】



は、3～10員のN含有非芳香族単環式または二環式複素環であり、

式Xにおいて、R₃は、-OH、-SH、-NH₂、または-NH-R_{1X}であり、

式XXにおいて、Xは、CH、CR₂、またはNであり、

R_{1X}、R_{2X}、およびR_{2Y}の各々は独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂環式、アリール、ピアリール、およびヘテロアリールからなる群から選択される。

【0195】

いくつかの実施形態では、細胞は、線維性疾患状態を経験している、または経験するリスクがある対象の細胞を含み、細胞を少なくとも1つの化合物と接触させることが、治療有効量の少なくとも1つの化合物を対象に投与または適用することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象は、IPFを経験している患者であり、少なくとも1つの化合物は、対象に静脈内、筋肉内、腹腔内、局所的、または吸入によって投与される。いくつかの実施形態では、線維性疾患状態は、IPFまたは肝臓、皮膚、膀胱、心臓、膵臓、前立腺、もしくは腎臓の線維性疾患を含む。

【0196】

いくつかの実施形態では、方法は、対象から試料を取得すること、または試料を取得したことから、試料中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを定量化することによって、1つ以上のバイオマーカーの各々が、CCL18、アルギナーゼ1 (Arg1)、マトリックスメタロペプチダーゼ9 (MMP9)、メタロプロテイナーゼ3 (TIMP3)、IL-1、ヒドロキシプロリン、コラーゲン、PDGF、TGF、FR、TNF、IFN-、抗マンノース受容体 (CD206)、分化抗原群86 (CD86)、分化抗原群163 (CD163)、IL-6、ケモカイン10 (CXCL10)、免疫インターフェロン (IFN) からなる群から選択される、定量化することと、試料中の1つ以上のバイオマーカーの各々の発現レベルを、対照中のそのようなバイオマーカーの発現レベルと比較することと、CCL18、Arg1、MMP9、TIMP3、IL-1、PDGF、TGF、FR、CD206、CD163、ヒドロキシプロリン、もしくはコラーゲンが、対照の発現レベルと比較してアップレギュレーションしているか、またはTNF、IFN-、IL-6、CXCL10、IFNもしくはCD86が、対照の発現レベルと比較してダウンレギュレーションしているもしくは発現していない場合に、治療有効量のコンジュゲートしていないアゴニストもしくは阻害剤を、対象に投与すること、または投与したことを、をさらに含む。いくつかの実施形態では、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体は、FRに特異的であり、細胞上のFRに結合する。

【0197】

少なくとも1つの実施形態では、線維性疾患（例えば、IPFなど）を治療および/または予防するための方法が提供される。方法は、線維性組織または器官中のM2様マクロファージをM1様表現型に再プログラム化するために、（リンカーまたはその他の方法で）薬剤に付着した標的化部分（葉酸受容体結合リガンドなど）を含む1つ以上の化合物の

10

20

30

40

50

治療有効量を、対象に投与することを含む。例えば、薬剤は、 t o l l 様受容体アゴニスト（例えば、式 I、I I I、または I V を有する）、またはマクロファージを葉酸にコンジュゲートされて M 2 表現型から M 1 表現型に再プログラム化するのに有効な任意の他の分子または化合物であってもよい。少なくとも 1 つの実施形態では、薬剤は、T L R 3 アゴニスト、T L R 7 アゴニスト、T L R 7 / 8 アゴニスト、T L R 8 アゴニスト、および T L R 9 アゴニストから選択されてもよい。いくつかの実施形態では、薬剤は、M 2 様マクロファージを M 1 表現型に再プログラム化でき、それによって、線維化促進サイトカインおよび成長因子の産生を低減することができる。

【0198】

少なくとも 1 つの実施形態では、疾患状態に罹患している、または経験するリスクがある対象を治療するための方法が提供され、ここで、疾患状態は、線維性疾患状態またはがんを含み、方法は、対象の細胞を少なくとも 1 つの化合物と接触させることを含む。少なくとも 1 つの化合物は、本開示の化合物のいずれかを含んでもよく、少なくとも 1 つの例示的な実施形態では、F R に特異的な標的化部分を含む。場合によっては、細胞を接触させることは、少なくとも 1 つの化合物を対象に静脈内、筋肉内、腹腔内、局所的、経口で、または吸入、または本明細書に記載される他の投与様式のいずれかを介して投与することによって達成され得る。追加的または代替的に、少なくとも 1 つの化合物は、1 つ以上の薬学的に許容可能な担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤、および/またはビヒクル、またはそれらの組み合わせを含有する組成物を含み得る。投与される少なくとも 1 つの化合物の投与量は、臨床医によって適宜変更されてもよいが、少なくとも 1 つの化合物は、治療有効または予防有効な量で投与され、少なくとも一実施形態では、投与量は、 $1 \text{ n m o l } / \text{ k g}$ 対象の体重 $\sim 50 \text{ n m o l } / \text{ k g}$ 対象の体重の範囲内である。

【0199】

ここで図 2 を参照すると、本開示の化合物のうちの 1 つ以上を使用して、線維性疾患状態またはがんを予防または治療するための方法 1900 の代表的なフローチャートが示されている。少なくとも 1 つの例では、方法 1900 は、対象の細胞を、リンカーを介して、葉酸リガンドまたはその機能的断片もしくは類似体に付着された免疫調節物質（またはその薬学的に許容可能な塩）を含む少なくとも 1 つの化合物と接触させるステップを含む（ステップ 1902）。少なくとも 1 つの例示的な実施形態では、免疫調節物質またはその薬学的に許容可能な塩は、パターン認識受容体を標的とする。細胞は、例えば、線維性疾患状態を経験している、または経験するリスクがある対象の細胞を含んでもよく、少なくとも 1 つの化合物は、本明細書に提供される化合物のいずれかを含んでもよい。

【0200】

少なくとも 1 つの実施形態では、細胞を少なくとも 1 つの化合物と接触させるステップ 1902 は、治療有効量の少なくとも 1 つの化合物を対象に投与または適用することをさらに含む。追加的または代替的に、少なくとも 1 つの化合物は、1 つ以上の薬学的に許容可能な担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤、および/またはビヒクル、またはそれらの組み合わせを含有する組成物を含み得る。

【0201】

少なくとも 1 つの実施形態では、疾患状態は、肝臓、皮膚、心臓、または腎臓の I P F または線維性疾患を含む。さらに、対象は、マウス、ヒト、または任意の他の哺乳動物を含んでもよい。

【0202】

方法 1900 は、ステップ 1902 に加えて、ステップ 1904 \sim 1910 を任意に含んでもよい。ステップ 1904 で、生体試料を対象から取得し、ステップ 1906 で、試料中の 1 つ以上のバイオマーカーの発現レベルを定量化する。例えば、試料は、対象から採取されたある量の末梢血から取得されてもよい。

【0203】

定量ステップ 1906 は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して実行されてもよく、例えば、q P C R、質量分析、E L I S A、および/またはバイオマーカー発現

10

20

30

40

50

を測定/定量することができる任意の他のモダリティを含んでもよい。少なくとも1つの例示的な実施形態では、1つ以上のバイオマーカーは、CCL18、Arg1、MMP9、TIMP3、IL-1、PDGF、TGF、FR、ヒドロキシプロリン、コラーゲン、TNF、IFN-、CD206、CD163、IL-6、CXCL10、IFNおよびCD86からなる群から選択される。

【0204】

ステップ1908で、試料中の1つ以上のバイオマーカーの各々の発現レベルが、対照中のそのようなバイオマーカーの発現レベルと比較される。対照は、健康な個体、または単に問題となっている疾患状態を経験していない個体であり得る。少なくとも1つの実施形態では、試料中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルと、対照中の関連バイオマーカーの発現レベルとの間の臨床的差異は、対象が問題となっている疾患状態に罹患していることを示すことができる。例えば、限定されるものではないが、比較ステップ1908が、バイオマーカーCCL18、Arg1、CD163、MMP9、TIMP3、IL-1、PDGF、TGF、FR、ヒドロキシプロリン、コラーゲン、および/またはCD206（すなわち、「線維化促進バイオマーカー」）のうちの1つ以上の発現が、対照と比較してアップレギュレーションされていることを示している場合、これは、対象がM2様マクロファージ表現型に関連する線維化促進免疫応答を経験していることを示している。したがって、少なくとも1つの実施形態では、こうした結果は、そのようなM2様マクロファージをM1表現型に再プログラム化するために、本開示の1つ以上の化合物を投与する必要性を示す。

10

20

【0205】

対照的に、比較ステップ1908が、前述のバイオマーカーの発現が、対照と比較してダウンレギュレーションされていることを示している場合、または、1つ以上のTNF、IFN-、および/またはCD86（「抗線維化バイオマーカー」）の発現が、対照と比較してアップレギュレーションされている場合、これは特定の実施形態において、対象が、以前に投与された化合物（該当する場合）に対して陽性応答を示すか、および/または対象がM1表現型に関連する抗線維化免疫反応を経験していることのいずれかを示す。

【0206】

任意選択で、ステップ1910で、試料中の1つ以上の線維化促進バイオマーカーの発現が、対照中のそれぞれの発現レベルと比較してアップレギュレーションしている場合、または1つ以上の抗線維化バイオマーカーの発現が、対照中のそれぞれの発現レベルと比較して、試料中でダウンレギュレーションしている場合、代替療法を施用することができる。少なくとも1つの実施形態では、代替療法は、ステップ1902で以前に投与された少なくとも1つの化合物の誘導体の治療有効量を投与することを含むことができ、誘導体は、異なる標的化部分、異なるリンカーサイズ、および/または異なる免疫調節物質のいずれかを採用して、少なくとも1つの化合物の有効性をよりよく最適化することに関して改変された、以前に投与された少なくとも1つの化合物を含む。追加的または代替的に、問題となっている線維性疾患の治療のために従来的に知られているものを含む、他の治療が採用されてもよい。ステップ1904~1910は、必要に応じて、または所望に応じて繰り返すことができる。

30

40

【0207】

追加的な実施形態は、がん（葉酸受容体陽性または葉酸受容体陰性かを問わない）を治療および/または予防するための方法を提供し得る。例えば、特定の例では、このような方法は、がん性および/または腫瘍細胞中のM2様マクロファージをM1様表現型に再プログラム化するために薬剤に（リンカーまたはその他の方法で）付着した標的化部分を含む1つ以上の化合物の治療有効量および/または予防有効量を、宿主対象に投与することを含む。がんが葉酸受容体陰性である場合、そのような投与は、そのような組織/腫瘍中に存在するMDS Cを枯渇または阻害するためにさらに作用し得る。例えば、限定されないが、薬剤は、PI3k阻害剤、シグナル伝達および転写活性化因子6（STAT6）阻

50

害剤、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 阻害剤、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 阻害剤、ならびに抗炎症薬 (例えば、メトトレキサート) から選択され得る。少なくとも1つの実施形態では、薬剤は、MDS Cを不活化することができる。

【0208】

代表的な実施形態を説明する際に、本開示は、特定の一連のステップとして方法および/またはプロセスを提示する可能性がある。方法またはプロセスが本明細書に明記されるステップの特定の順序に依存しない限り、方法またはプロセスは、記載されるステップの特定の順序に限定されるべきではない。当業者であれば理解するように、ステップのその他の順序が可能であり得る。したがって、本明細書に開示されるステップの特定の順序は、特許請求の範囲の制限として解釈されるべきではない。さらに、方法および/またはプロセスに向けられた特許請求の範囲は、記載される順序でのそれらのステップの実行に限定されるべきではなく、当業者であれば、順序が変化してもよく、依然として本開示の精神および範囲内であることを容易に理解することができる。

10

【実施例】

【0209】

ヒト単球性THP-1細胞を、American Type Culture Collectionから入手し、10%の熱不活化ウシ胎児血清と1%のペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含有する葉酸欠乏RPMI 1640培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で培養した。THP-1細胞は、このヒト単球細胞株がM2様表現型を獲得し、IL-4、IL-6プラスIL-13で刺激すると著しい量の線維化促進サイトカインを産生することが知られているため、最初にモデル系として選択された。

20

【0210】

IFN- γ 、IL-4、インターロイキン-6 (IL-6)、およびインターロイキン-13 (IL-13) は、Biolegendから入手した。ホルボール12-ミリスタート13-アセタート (PMA)、リポ多糖 (LPS)、その他すべての試薬および溶媒は、Sigmaから購入した。

【0211】

実施例1：インビトロでのTHP1細胞のM2-様マクロファージへの分化および極性化

THP-1細胞を、60,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。細胞を、200nMのPMAと48時間インキュベーションし、続いて新鮮なRPMI培地で24時間インキュベーションすることによって、非極性マクロファージに分化させた。得られたマクロファージを、20ng/mlのIL-4、20ng/mlのIL-13、および5ng/mlのIL-6と3日間インキュベーションすることによってM2様表現型に極性化させ、次いで異なる濃度の化合物1Aおよび化合物1Bで48時間再プログラム化し、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) による遺伝子分析のために採取した。培養物を、加湿された5%CO₂インキュベーター中で37°Cで維持した。

30

【0212】

強力なTLR7アゴニスト (例えば、式IIIの、例えば、化合物1A) が、線維化促進マクロファージをより低い線維性表現型に再プログラム化することができるかどうかを評価するために、IL-4、IL-6プラスIL-13刺激で刺激されたTHP-1細胞を、異なる濃度の非標的化合物1Aとインキュベートし、いくつかの線維化促進マーカー、すなわち、CCL18、CD206、IL-1 β 、ならびにPDGF α およびTNF α のmRNAレベルを調べた。

40

【0213】

図3A~3Cに示すように、化合物1Aとの48時間インキュベーションは、CCL18、CD206およびIL-1 β 発現の減少を誘導し、TLR7アゴニストが、これらの線維化促進に極性化されたTHP-1細胞の、より低い線維性表現型へのシフトを実際に促進できることを示唆する。さらに、抗線維化表現型のマーカーであるTNF α の発現を調べたところ、その発現の増加が観察され (図3D)、THP-1が線維化促進特性から

50

線維化促進特性へシフトしたことが確認された。

【0214】

実施例2：マクロファージの再プログラム化の評価

葉酸にコンジュゲートしたTLR7アゴニストが、実施例1に見られるのと同じTHP-1再プログラム化を引き起こすことができることを確認するために、化合物1Bを調製し、細胞内エンドソームの還元環境への化合物1Bの内在化に続く化合物1Aの放出を可能にするため葉酸を化合物1Aに接続する放出可能リンカーを、ジスルフィド、自壊性結合で構築した。

【0215】

異なる濃度の化合物1Aまたは化合物1Bのいずれかを、上記の極性化THP-1マクロファージと指定時間インキュベートし、その後、分泌サイトカインの分析およびqPCR分析のための細胞の収集のために培養培地を採取した。

【0216】

製造業者が推奨するプロトコルに従い、Quick-RNA(商標)MicroPrepキット(Zymo Research, Irvine, CA)を使用して、 1×10^5 ~ 2×10^5 個のマクロファージから全RNAを単離した。次いで、RNA試料を、大容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA, #4368814)を使用してcDNAに逆転写した。qPCR分析を、iTaq(商標)Universal SYBR Green SuperMix(Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, #1725121)、iCyclerサーモサイクラー、およびiCycler iQ 3.0ソフトウェア(Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA)を使用して実行し、マクロファージ極性化状態に特徴的なマーカーの発現を追跡した。M1表現型のマーカーとしてIL-6、CXCL10、IFN、IFN、およびCD86を使用し、M2表現型のマーカーとしてCCL18、CD206、CD163、およびArg1を採用した。IL-1、PDGF、MMP9、およびTIMP3を、線維化促進表現型の指標として測定した。IRAK-4をTLR7刺激の指標として使用した。増幅産物の特異性を制御するために、融解曲線分析を実行した。いずれの反応においても、非特異的産物の増幅は観察されなかった。各試料は、各マーカーに対して3通りずつ独立して分析された。

【0217】

上述の研究を繰り返すと(図3A~3F、灰色のバーを参照されたい)、同じ定性的変化が観察され、化合物1Bの影響の大きさのみが多少低下していた。非標的化TLR7アゴニストが培養細胞に直ちに進入するのに対し、その葉酸標的化された対応物は、葉酸受容体結合および受容体介在性エンドサイトーシスの後にのみ細胞進入するように設計されているため、この効力の低下が予想された。

【0218】

図4A~4Eおよび図5A~5Dは、M2マクロファージへ誘導されたTHP-1細胞から測定された様々なマーカーレベルを表すグラフデータを示し、それらは続いて、異なる濃度の化合物1Bまたは化合物1Aと2時間インキュベートし、PBSで洗浄し、図5A~5Dに示されるデータについては、再び46時間インキュベートした(図4A~4Eに示されるデータについては、細胞は、最初の2時間のインキュベーションの直後に採取された)。両方のデータセットにおいて、qPCRによる遺伝子分析のために細胞を採取した。図4A~4Cは、CCL18 mRNAレベル(図4Aおよび図5A)、CD206 mRNAレベル(図4Bおよび図5B)、IL-1 mRNAレベル(図4Cおよび図5C)、およびPDGF mRNAレベル(図4E)を示す。データは、M2様線維化促進表現型が、試験された化合物の投与後にダウンレギュレーションされたことを裏付けている。特に、化合物1Bは、マクロファージの線維化促進/M2型マーカーを、化合物1Aよりも大きくダウンレギュレーションした。さらに、図4Dは、CD86 mRNAレベルを示し、図5Dは、TNF レベルを示し、これらのデータは、M1様表現型

が、試験された化合物の投与後にアップレギュレーションしたことを裏付けている。収集されている間、治療後の有意差は観察されなかったため、PDGF に関するデータは示されていない。

【0219】

化合物1Aおよび化合物1Bのような低分子量の水溶性薬剤は、多くの場合、注射の2時間以内に体内から排泄されるため、インビボでの薬剤曝露の、より生理学的に適切なインビトロモデルは、薬剤による細胞のインキュベーションを2時間のみ制限し、薬剤の不在下でさらに46時間のインキュベーション後に薬剤の有効性を検討する。図4A~4Eで示すように、THP-1細胞をTLR7アゴニストと2時間インキュベートした後、薬剤含有培地を薬剤を含まない培地で置換すると、化合物1Bは、化合物1Aと比較して優れた効力を有することが観察され、特に、TNF 誘導の場合に葉酸標的化コンジュゲートが劇的に改善された。これは、葉酸標的化TLR7アゴニストが葉酸受容体陽性細胞によって捕捉されたのに対し、化合物1Aは同じ細胞によって保持されなかったためであると思われる。

【0220】

これらのデータは、化合物1Bが、インビボで線維化促進マクロファージの再プログラム化においてより効果的であるべきであることを裏付け、葉酸コンジュゲートされた薬剤（例えば、化合物1B）は、FR 発現マクロファージに集中しており、全身で優勢な葉酸受容体陰性細胞（例えば、化合物1Bは、葉酸受容体陰性細胞に対して不浸透性であるように設計されている）に入ることができないため、より全身毒性をも引き起こさないというさらなる利点を有することを裏付けている。

【0221】

図6A~6Dは、異なる濃度の薬剤で48時間（図6Aおよび6B）または2時間処置した後、新鮮な培地で置き換えて、残りの46時間培養された（図6Cおよび6D）M2誘導THP-1マクロファージから測定した様々なマーカーレベルを表すグラフデータを示す。どちらの場合も、細胞上清を収集し、分泌されたCCL18タンパク質およびIL-1をELISAにより検出した。データは、TLR7化合物または葉酸を標的化したTLR7化合物の投与が、低濃度範囲（0.1~10nM）でCCL18およびIL-1の分泌をダウンレギュレーションすることを裏付けている。

【0222】

さらに、上記のmRNA分析が、IL-4、IL-6プラスIL-13によって産生された線維化促進サイトカインのレベルを正確に反映するように、THP-1細胞を刺激するため、THP-1上清中のCCL18およびIL-1ポリペプチドの濃度を、ELISAアッセイにより定量した。図6Aおよび6Bに示されるように、化合物1Aおよび化合物1Bの両方が、アゴニストと48時間連続的にインキュベートされたときにCCL18およびIL-1の低下を誘発したが、薬剤曝露が2時間のみ制限された場合に化合物1Bは、再び優れていることが見出された（図6Cおよび6Dを参照されたい）。

【0223】

実施例3：フローサイトメトリーによるFR 発現の特性評価

THP-1由来マクロファージでのFR の発現を測定するために、蛍光活性化細胞選別機（FACS）分析を実施した。細胞を、Accutase（登録商標）細胞剥離溶液（Biolegend、San Diego, CA、#423201）を使用して剥離し、細胞スクレーパーで穏やかに持ち上げた。細胞をPBSで洗浄し、Fc受容体ブロッキング溶液（Biolegend、San Diego, CA、#422301）を用いて室温で10分間インキュベーションすることによって非特異的結合をブロックした。次いで、ビオチン化抗ヒトFR モノクローナル抗体（m909）を添加し、細胞を氷上でさらに30分間インキュベートした後、染色緩衝液（2%のFBSを補充したPBS）中で洗浄した。次いで、細胞をフルオレセイン標識ストレプトアビジン（BD Biosciences、Franklin Lakes, NJ、#554060）中で20分間氷上でインキュベートし、PBSで2回洗浄し、7AAD（生存率染色）で15分間染色し、

10

20

30

40

50

BD Accuri C6ソフトウェア (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を使用してフローサイトメトリーにより分析した。図 6 E は、フローサイトメトリーデータを示し、THP-1 マクロファージが FR⁺ であり、それゆえ、化合物 1 B のインビトコ研究および本明細書に記載される他の研究に適していることを裏付けている。

【0224】

図 6 F は、培養培地中で 37 °C であったインキュベーション期間中、化合物 1 B が安定なままであったことを確認する。実際、化合物 1 B は、48 時間のインキュベーション後に元の構造を保持していた。

【0225】

実施例 4：プレオマイシン誘発肺線維症および線維化促進マクロファージのインビボでの再プログラム化

肺線維性肺のマクロファージが、インビボで葉酸連結薬剤で特異的に標的化され得るかどうかを判定するための試験も行われた。マウスにおける肺線維症の誘発について複数のプロトコルを試験した後、0.75 mg/kg のプレオマイシン (BM) を、気管の切開を介して C57BL/6 マウスの肺に注入し、治療開始前に線維症の炎症段階および線維化段階の両方を経てマウスに進行させるプロトコルを選択した。(BM モデルは、インビボの状況で線維形成に関連する機構的調査を可能にするという点で、広く役立つとみなされている。)

【0226】

図 7 A ~ 7 D に示されるように、このプロトコルを使用して処置されたマウスは、通常、BM 処置後 7 日目までに線維症を呈示し、この新生線維症は、14 日目までに重度の線維症に発展する。その後、病状の進行は、2 ~ 5 日間続き、21 日目までに自然に消退し始める。

【0227】

より具体的には、Charles River からの 8 週齢の C57BL/6 雄マウス (平均体重 22 g ~ 25 g) を、病原体のない条件下、室温 (22 °C) で 12 時間の明暗サイクル下で飼育した。マウスは、BM または PBS 注入前に 1 週間、葉酸欠乏飼料 (Envigo Teklad Global Rat Food Pellets) にした。新鮮な水および葉酸欠乏食は自由に摂取できた。すべての動物手順は、国立衛生研究所のガイドラインに従って、Purdue Animal Care and Use Committee によって承認された。

【0228】

その後、マウスをケタミン/キシラジンで麻酔し、マウスの頸部を脱毛ローションを使用して剃り、次いで 70% アルコールで滅菌した。気管を可視化するため頸部に小さな切開を行った。マウスを 75 度の角度で位置付け、26 G 針付き 1 cc 注射器を使用して、100 μ L の滅菌 PBS または PBS 中に溶解された BM (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, #13877) (0.75 mg/kg) を気管内に注射した。実験全体を通して、体重を隔日で監視した。

【0229】

これらのマウスにおける線維化促進肺マクロファージが、葉酸連結薬剤で特異的に標的化され得るかを評価するために、注入の 10 日後、10 nmol (インビボ撮像用) または 100 nmol (インビボ標識用) の 200 倍過剰の FA-グルコサミン (OTL38 の競合物) を含むまたは含まない葉酸連結近赤外蛍光色素 (OTL38) を、BM 処置されたマウスの尾静脈に注射し、主要臓器への色素の取り込みを評価した。

【0230】

2 時間後、CO₂ 窒息を用いてマウスを犠牲にし、腹部から首までの皮膚を直ちに切開して肺および気管を露出させた。次いで、22 ゲージの鈍い針を挿入するために気管上部に小さな切り込みを入れ、ナイロンストリングを気管の周りに結んで針の周りの気管を密閉した。次いで、気管 (挿入針を含む)、肺、および心臓を肺の下の結合組織を慎重に切

10

20

30

40

50

断することによってひとまとめにすることによって除去し、左肺の気管支をディーフェンバッハ血管クリップでクリップした。右肺にPBSを注射し、1mlの注射器を使用して3回吸引し、回収された洗浄液を氷上で保存した。

【0231】

次いで、気管支肺胞洗浄液(BALF)を分析して、標的化TLR7アゴニストがどのように作用するかを決定した。BALF試料を、4で1500rpmで5分間遠心分離し、上清をアリコートし、サイトカイン/ケモカイン分析のために-80で保存した。細胞ペレットを再懸濁し、予め加温されたRPMI1640培地中で2時間培養し、次いでqPCRアッセイのための採取前に予め加温されたPBSで3回洗浄した。次いで、右肺をナイロンストリングで結束し、ヒドロキシプロリン含量のその後の分析に使用した。左肺を、挿入された注射器を使用して1mlのPBSで膨張させ、その後の組織学的分析のために10%ホルマリン溶液に移した。

10

【0232】

上で収集された右肺の葉を計量し、耐圧バイアル(Supelco Inc., Bellefonte, PA, #27003)に入れ、砂浴中で120で3.5時間、6NHCl(10ml/g, v/w)で加水分解した。加水分解した溶液を、4で15分間冷却し、1.5mlのエピンドルフチューブに移した後に、4で12,000rcfで15分間遠心分離した。上清を注意深く収集し、分取し、ヒドロキシプロリン(HYP)分析に使用した。

【0233】

その後のHYP分析では、10μlの試料を96ウェルプレートに移し、10μlの5.3M水酸化ナトリウム溶液で中和した。次いで、イソプロパノール(40μl)を各ウェルに添加し、次いで20μlの酸化緩衝液を添加し、混合物を室温で5分間、振とう器上でインキュベートした。分析試薬(260μl)を加え、プレートを、室温で30秒間、振とう器上でインキュベートし、直ちに60で25分間インキュベートした。吸光度を、15分以内に560nm(A560)で測定した。すべての試薬を、以前に報告されたプロトコルに従って調製した。

20

【0234】

肺切片の組織学的分析については、固定された肺(上記を参照)をパラフィンに包埋し、切片化し、ヘマトキシリン-エオシン(H&E)、マッソントリクロームまたはF3(抗マウスFR-抗体)で染色した。組織切片を、認可された病理学者によって盲検法で調べた。Aperio-Image Scope(Leica Biosystems, Wetzlar, DE)を使用して、切片ごとに90×10⁶個を超える細胞を定量化した。

30

【0235】

ヒトDuoSet ELISA開発システム(R&D Systems Europe, Abingdon, UK, #DY394-05)およびIL-1ベータヒトELISAキット(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; #BMS224-2)を、製造業者によって説明されているように使用して、誘導されたTHP-1細胞上清中のCCL18およびIL-1を定量化した。BALF試料を、ELISA MAX(商標)Deluxe(Biolegend, San Diego, CA; #430804)を使用してマウスIFN-について分析した。

40

【0236】

最後に、インビボ葉酸撮像研究については、主要臓器(心臓、肺、脾臓、肝臓、小腸、大腸、および腎臓)を切除し、AMIライブイメージャー(Spectral Instruments Imaging, Tucson, AZ)を使用して撮像した。インビボ葉酸受容体標識試験については、マウスの肺を安楽死の直後に採取し、マニュアルで説明されているようにgentleMACS Octo Dissociator with Heathers(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE, #130-096-427)の説明に従って、肺解離キット(Milten

50

y i B i o t e c、B e r g i s c h G l a d b a c h、D E、# 1 3 0 - 0 9 8 - 4 2 7) を用いて消化し、70 μ mセルストレーナー (M i l t e n y i B i o t e c、B e r g i s c h G l a d b a c h、D E、# 1 3 0 - 0 9 8 - 4 6 2) で濾過した。濾液中に収集された細胞は、硫酸アンモニウム溶解により赤血球を枯渇させ、冷PBS中で2x洗浄し、所望のマクロファージマーカーに対する抗体を用いて氷上で30分間標識した (F I T C - C D 1 1 b、B i o l e g e n d、S a n D i e g o、C A、# 1 0 1 2 0 5; F E - F 4 / 8 0、B i o l e g e n d、S a n D i e g o、C A、# 1 2 3 1 0 9)。次いで、標識されたマクロファージをPBS中で2回洗浄し、7 A A D (生存率染色) で15分間染色し、B D A c c u r i C 6 ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s、S a n J o s e、C A) を使用してフローサイトメトリーで分析した。 10

【0237】

図7A (上部パネル) に示されるように、未処置肺 (PBS対照欄) および7日目のBM処置肺は、最小限の細胞外基質によって相互接続された類似の高密度の肺胞を示す。対照的に、BM注入後14日目には、気嚢のサイズおよび頻度は著しく減少し、細胞外基質の密度は明らかに増加し、処置されたマウスにおける目立った線維症の発生を示唆した。21日目までに、このモデルの病状はすでに自然に消退し始めており、多くのマウスが最終的に35日目までにBM誘発性外傷から回復した。

【0238】

7日目までの炎症発現の証拠は、FR発現マクロファージの浸潤から見出され (図7Aの下部パネルおよび図7Bの定量化を参照)、それは健康な肺にはほとんど完全に存在しないが、BMに曝露された肺では14日目まで蓄積し続ける。さらに、F3を用いた染色は、以前に文献で報告されたように、IPF肺 (主に間質腔) におけるFRの著しい発現を示した (図7A)。FRの発現は、炎症を起こした肺に限定された (IPF患者またはBM誘発性PFのいずれかであるが、健康な肺では発現しなかった)。さらに、FR発現マクロファージは、BM投与後7日目にマウス肺で観察され、14日目に最大の発現であった (図7B)。これらの結果は、以前に報告されている炎症を起こした肺の活性化マクロファージでのFR発現を確認するものであった。 20

【0239】

次に、これらのFR発現マクロファージが、葉酸連結分子で標的化され得ることを、BM処置されたが尾静脈注射後健康でないマウスの肺における、葉酸標的化蛍光色素であるOTL38の蓄積によって実証した。図7Bに示されるように、OTL38蛍光は、健康なマウスの腎臓 (すなわち、その主要な排泄部位) でのみ観察され、他の組織での取り込みはほとんどまたは全くなかった。 30

【0240】

図7Cおよび7Dは、ヒトIPF肺組織 (図7C) および健康なヒト肺組織 (図7D) のFR IHC染色を示す。8週齢のC57BL/6オスのマウスを、BMまたはPBSの注入前の1週間、葉酸欠乏飼料にし、注入の10日後、マウスに、10 nmol (インビボ撮像用) または100 nmol (インビボ標識用) の200倍過剰のFA-グルコサミンを含むか、または含まないOTL38を尾静脈を介して注射した。2時間後、マウスを、分析前に犠牲にした。インビボ葉酸撮像研究については、主要臓器 (心臓、肺、脾臓、肝臓、小腸、大腸、および腎臓) を切除し、AMIライブイメージャー (S p e c t r a l I n s t r u m e n t s I m a g i n g、T u c s o n、A Z) を使用して撮像した。インビボ葉酸受容体標識試験については、安楽死の直後にマウスの肺を採取し、消化し、次いで所望のマクロファージマーカー (F I T C - C D 1 1 b、P E - F 4 / 8 0) および7 A A D (生/死染色) に対する抗体で標識し、フローサイトメトリーにより分析した。 40

【0241】

図7Eは、BM誘導実験線維症を有する (BM) または有さない (PBS対照) マウスから採取され、葉酸受容体標的化蛍光色素、OTL38で撮像された様々なマウス組織 / 50

器官の画像を示し、健康なマウス（a欄）またはBM処置したマウス（bおよびc欄）の尾静脈に線維症の誘発後10日目に10nmolのOTL38で200倍過剰の葉酸標的グルコサミン（OTL38の結合をブロックするFRの競合試薬）の非存在（b）または存在（c）のものを注射され、2時間後に組織切除と蛍光イメージングのために安楽死させている。これは本開示の発明のFA標的化コンジュゲートが、他の健康な組織で取り込みすることなくFR特異的結合を示すことを支持する。

【0242】

BM処置マウスへのOTL38の尾静脈注射は、腎臓における前述の蛍光だけでなく、線維性肺における顕著な蓄積ももたらした（図7Eを参照）。この肺への取り込みは、主に葉酸受容体によって媒介されることが、BM処置マウスに200倍過剰の葉酸-グルコサミン（すなわち、FR結合の競合阻害剤（図7Eを参照））を同時に注射した場合の肺蓄積のほぼ定量的な遮断によって実証できる。これらのデータは、葉酸標的分子が、身体他の組織において著しい程度に蓄積することなく、線維性組織において葉酸受容体発現細胞に選択的に結合することを示す。言い換えれば、FR発現マクロファージは、実際には、葉酸結合分子で標的化することができ、臨床応用では、ほぼ線維性組織にのみ局在する。したがって、本開示の化合物において標的部分を使用する場合、標的の線維性（またはがん性）組織によって捕捉されない任意のTLR7アゴニストは最小限である。

【0243】

次に、どの細胞タイプがBM処置マウスの肺中の葉酸-色素コンジュゲートを捕捉しているかを決定するために、上記動物の肺をコラゲナーゼで消化し、フローサイトメトリーにより細胞特異的色素取り込みについて調べた。図7Fは、BM誘発性実験的線維症を経験するマウスのインビボ標識から得られたFACS分析からのデータを示しており、これは、PBS（列1）または100nmol OTL38を、200倍過剰の葉酸標的化[グルコサミン]の非存在下（列2）または存在下（列3）で、尾静脈に注射されたものである。図7Fに示すように、OTL38を注射されていないBM処置マウスから単離された場合、マクロファージ様細胞は蛍光を呈示しなかった（列1を参照）。対照的に、OTL38注射した線維性マウス由来のマクロファージ様細胞の約22%は、著しい葉酸標的化色素保持を示し（列2）、これは、OTL38が炎症を起こした肺のFR陽性マクロファージを標的とすることを裏付けている。実際に、200倍過剰の葉酸-グルコサミンの同時尾静脈注射が、本質的にすべての葉酸-色素保持を遮断したという観察によって実証されるように、色素の取り込みは特に葉酸受容体媒介性であり、色素の蓄積には、占有されていない葉酸受容体を必要であることを実証している。重要なことに、この結論は、FR発現が未処置の肺において本質的に検出できないが（図7Aを参照）、BM処置された肺における線維症の発症中に劇的に増加する（図7A~7Dを参照）ことを示すデータによってさらに裏付けられる。FRの発現はまた、ヒトIPF患者の肺でも顕著に発現している。

【0244】

実施例5

次いで、確立されたFR発現線維性マクロファージに付着した薬剤を標的とする能力を用いて、葉酸標的化TLR7アゴニストが、BM処置マウスにおける線維化の徴候および症状を抑制することができるかどうかを調査された。このために、BM処置マウスに、ビヒクル（PBS中3%のDMSO）または化合物1Bのいずれかで10日目から隔日で静脈内注射した（図8Aを参照）。TLR7-54アゴニストは、急速な体重減少とその後の死亡を引き起こしたため（図9Aおよび9Bを参照）、化合物1Aはインビボで同様に評価できなかった。マウスにおけるBM誘発性実験肺線維症では、炎症は、BM導入後約9~10日間持続することが知られている。このため、炎症から線維化への切り替えは、このモデルでおよそ9日目~14日目に起こり、線維化促進マーカーは、約10日目に現れ始め、投薬は10日目に開始された（図8A）。

【0245】

21日目まで隔日で2回投与した。TLRアゴニストに対するいかなる「耐性」も防ぐ

10

20

30

40

50

ため、1日の個々の用量は6時間ごとに分けられる。次に、21日目にマウスを犠牲にし、直ちに気管支肺胞洗浄に供し、続いて免疫組織化学ならびにコラーゲンおよびヒドロキシプロリンの定量のために肺を切除した。

【0246】

図8B～8Gは、図8AのBMモデルで処置されたマウスから測定された様々なマーカーレベルを表すグラフデータを示し、これはBALFを21日目に収集し、4で遠心分離し、得られたペレットを培地に再懸濁し、96ウェルプレートに播種し、2時間培養し、予め加温されたPBSで3回洗浄し、qPCRのために細胞を採取して行い、このデータは、Arg1(図8B)、MMP9(図8C)、TIMP3(図8D)(例えば、線維化促進マーカー)がすべてダウンレギュレーションされことを示す。CD86(図8E)およびIFN- γ (図8F)(例えば、抗線維化マーカー)は両方ともアップレギュレーションされた。さらに、存在するBALF細胞の数と同様に(図8H)、TLR7シグナル伝達IRAK-4の負の調節因子がアップレギュレーションされた(図8G)。実際に、マウスBALF細胞の総数は、化合物1Bの異なる用量を用いた処置後、用量依存的に減少した。図8B～8Gに示されている各値は、各群に対する平均 \pm S.D.を表し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$;生理食塩水対ビヒクル群、化合物1Aおよび化合物1B処置群対ビヒクル群については、スチューデントのt検定によって計算され、ただし、化合物1Bを処置群およびビヒクル群がダネットの多重比較検定によって計算されたBALF細胞数およびタンパク質濃度測定値を除く。ビヒクル = PBS中の3% DMSO。

10

20

【0247】

図8B～8Dに示されるように、気管支肺胞洗浄細胞のマクロファージ亜群における線維化促進マーカーのqPCR分析により、対照マウスと比較して、BM誘発マウスにおいて、Arg1、MMP9、およびTIMP3の組織阻害剤がすべて上昇していることが明らかになった。より重要なことに、並行研究では、BM誘発マウスを化合物1Bで処置したときに同じ線維化促進マーカーがすべて抑制され、健康なマウスに見られるものと同様の線維化促進マーカーのレベルがもたらされることが実証された。これらのデータと一致して、線維化促進マーカーの定量は、CD86の転写物(qPCR)およびIFN- γ の濃度(洗浄液のELISA)の両方が、化合物1Bを用いた処置後に上昇することを明らかにした(図7Eおよび7Fを参照されたい)。観察されたIRAK-4(すなわち、TLR活性化のマーカー、結果は図7Gに示される)のアップレギュレーション、および存在するBALF細胞の総数が異なる用量の化合物1Bを用いた処置後に用量依存的に減少している(図7H)ことを合わせて、これらのデータは、葉酸標的化TLR7アゴニストの投与が、マクロファージを、インピボで、BM処置マウスの肺における線維化促進M2様表現型から、線維化促進性M1様表現型に再プログラム化することができることを示す。

30

【0248】

実施例6

上述の線維性肺マクロファージの再プログラム化が、線維性マウスにおける線維性状態の実際の改善をもたらしたかどうかを決定するために、追加の研究が実施された。上述のマウスからの肺組織をパラフィンに包埋し、切片にしてH&Eおよびマッソントリクロームで染色し、それぞれ組織密度および細胞外コラーゲン沈着を評価した。

40

【0249】

図9Aおよび9Bは、非標的化および標的化TLR7アゴニストで処置した実験的肺線維症を有するマウスの生存曲線(図9A)および体重変化(図9B)を示す。データは、本開示の化合物(ここでは、例えば、化合物1B)の投与が、著しい体重減少を引き起こすことなく、BM処置マウスの生存を増加させることを裏付けている。各値は、各群の平均 \pm S.D.を表す。

【0250】

図10Aは、線維化の尺度としてコラーゲン沈着を利用する肺組織のヒドロキシプロリ

50

ン含量 ($\mu\text{g}/\text{肺}$) を示す。以下のそれぞれの 21 日目の組織が示される：健康対照（生理食塩水）（ ）、疾患対照（ビヒクル）（ ）、遊離薬剤 TLR7 アゴニスト（化合物 1 A）（ ）による処置、葉酸標的化 TLR7 アゴニスト（化合物 1 B）による処置（ ）。 10nmol の化合物 1 B（ ）および化合物 1 A（ ）のいずれかで処置された BM 誘発マウスは、ビヒクル対照（ ）と比較して、肺当たりの総ヒドロキシプロリン含量の著しい減少を示した。図 9 A に示される各値は、各群に対する平均 \pm S. D. を表し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、スチューデントの t 検定による、生理食塩水対ビヒクル群、化合物 1 A および化合物 1 B 処置群対ビヒクル群。

【0251】

図 10 B および 10 C は、図 H & E 染色（図 10 B）およびマッソントリクローム（コラーゲン）染色（図 10 C）を使用する図 10 A に表された肺組織の染色画像を示す。 10

【0252】

図 10 B のパネルの H & E 染色に示されているように、健康な肺は、薄い網状膜に囲まれた気嚢を豊富に含む。対照的に、BM 誘発性肺は、かつて気嚢が存在していた細胞外基質の顕著な沈着を伴うはるかに少ない肺胞を示す。最も重要なことに、化合物 1 B で 10 日目から処置された BM 注入マウスは、健康なマウスの肺構造に類似する肺構造を示し（図 10 B）は、肺線維症の主要で顕著な特徴を抑制するのに、線維性肺マクロファージへの化合物 1 A の標的化が有効であることを示唆している。この線維症の予防は、実際にコラーゲン沈着の遮断を伴うことは、並行するランチ（Lunch）切片的マッソントリクローム染色によって記録され（図 10 C）、コラーゲン染色は、化合物 1 B を尾静脈に注射されたマウスにおいて強く抑制される（図 10 B）。したがって、データは、少なくとも化合物 1 B（ ）で処置された IPF マウスが、IPF 病状（例えば、線維症）の抑制を示すことを裏付けている。 20

【0253】

最後に、化合物 1 B がインビボでのコラーゲンの産生に実際に影響を与えたことを確認するために、影響を受けた肺の総加水分解物中のヒドロキシプロリン（コラーゲンの主要成分）を定量した。より具体的には、上記マウスからの肺組織を PBS で灌流し、酸で加水分解し、ヒドロキシプロリン含量について分析した。図 10 A では、線維症の誘発はヒドロキシプロリン含量の大幅な増加を誘発し、この増加は化合物 1 B を用いた処置で抑制された。したがって、本データは、本開示の標的化 TLR7 アゴニスト化合物を用いた治療が、インビボでのコラーゲンの沈着、したがって線維化を低減させる（さらにはそれに対抗する）ことを支持する。 30

【0254】

要約すると、最適化された BM 用量（ $0.75\text{mg}/\text{kg}$ ）を注射したマウスの全生存率は、化合物 1 B での治療によって有意に改善されたが、化合物 1 A では、著しい体重減少を示す（ $> 25\%$ 、図 7）ことを除いて生存率の利益はなかった。遊離薬剤はヒドロキシプロリン含量の減少において良好に機能したが、観察された乏しい生存率は、全体的な毒性に起因する可能性がある（すなわち、体重減少、図 7 B を参照されたい）。TLR7 アゴニストの全身投与が毒性を引き起こすことが知られているため、これは驚くべきことではなかった。 40

【0255】

実施例 7

IPF（または他の線維性疾患）を治療するための非標的化 TLR7 アゴニストの使用が、免疫系の全身的活性化および結果として生じる毒性によって防止されているため、マウスにおける化合物 1 B の全身投与を伴う可能性のある明白な毒性があるかどうかを評価した。この目的のために、BM 誘発マウスを、10 日目から隔日で、0、1、3、または 10nmol の化合物 1 B で処置し、体重、肺ヒドロキシプロリン含量、組織学的分析を 21 日目に行った。従来の全身投与とは異なり、標的薬剤は生存率を改善するだけでなく、標的化アプローチの意義を強調する体重減少も低減した（図 11 A および 11 B）。

【0256】

図12は、線維症の尺度としてコラーゲン沈着を使用した、BM誘発マウスにおける線維症の抑制に対する葉酸標的化TLR7アゴニストの用量依存的効果に関するデータを示す。データは、以下によって表される：健康な対照（PBS、）、ビヒクル（）、1nmol化合物1B（）、3nmol化合物1B（）、または10nmol化合物1B（）での処置を有するBM誘発マウス、サブパートAは、経時的なBM誘導マウスの体重に関するグラフデータを示し、サブパートBは、異なる用量（化合物1Bの10nmol、3nmol、または1nmol）で処置された肺組織のヒドロキシプロリン含量の測定を示し、サブパートCは、H&E染色およびトリクローム染色を用いた右肺組織の組織学的分析のための画像を示している。

【0257】

10

図11Bおよび図12サブパートAは、0、1、3、または10nmolの化合物1Bで処置されたマウス間で体重減少に差異は観察されず、このことは、化合物の反復投与によって重大な毒性が引き起こされなかったことを示唆している。これらの処置が依然として肺線維化に対して予期される効果を有することは、それでも、様々な肺加水分解物のヒドロキシプロリン含量の比較から見ることであり、有効性の順序は、10nmol/マウス > 3nmol/マウス > 1nmol/マウス > 0nmol/マウスであった（図12のサブパートBおよびCを参照されたい）。より重要なことに、肺組織像の詳細な分析は、化合物1Bの用量が増加するにつれて肺組織像が改善されたことを示し、これは、TLR7アゴニストが最も強く濃縮された組織は、実際に顕微鏡形態が最も正常であった組織であることを示唆している。まとめると、これらのデータは、線維性組織におけるTLR7アゴニストFR + マクロファージの標的化が、ヒトにおけるTLR7アゴニストの使用を制限する免疫系の全身的活性化を伴わずに、線維症を効果的に予防し得ることを裏付けている。

20

【0258】

最後に、この抗線維化効果を低用量で達成できるかどうかを判定するために、2つの低用量（3nmol/kgおよび1nmol/kg）を用いた治療研究を実施した（図9および図10）。興味深いことに、低用量はヒドロキシプロリン含量およびコラーゲン沈着レベルの著しい低下を示したが、10nmol用量は最良の生存率をもたらした。

【0259】

実施例8

30

化合物1Aおよび化合物1B以外の本開示の化合物の実施形態が適用で同様に機能することを支持するために、本明細書の化合物の他の代表的な実施形態をインビトロ研究で調べた。

【0260】

図13A~13Dは、20ng/mLのIL-4、20ng/mLのIL-13、5ng/mLのIL-6でM2マクロファージに誘導されたヒトTHP-1細胞から測定された様々なマーカーレベルのグラフデータを示す。次いで、細胞を、式IVを有するTLR7アゴニスト（例えば、化合物2A）の異なるnM濃度で48時間再プログラム化し、qPCRによる遺伝子分析のために採取した。M2様マクロファージ対照の発現に対する以下のマーカーのmRNAレベル：CCL18 mRNAレベル（図12A）、IL-1 mRNAレベル（図13B）、およびTNF レベル（図13C）、および図13Dは、細胞上清を収集した後のタンパク質分析結果を示す。分泌されたCCL18タンパク質をELISAにより検出した。

40

【0261】

図13A~13Dでは、式IVを有する本開示のアゴニスト化合物（例えば、化合物2A）を、M2様マクロファージをM1様マクロファージに再プログラム化するその能力に関して評価した。

【0262】

主に、ヒト単球性（THP-1）細胞を、前述の方法および材料を使用してM2様表現型に誘導した。具体的には、THP-1細胞を、60,000細胞/ウェルの密度で96

50

ウェルプレートに播種した。細胞を、200 nMのPMAと48時間インキュベーションし、続いて新鮮なRPMI培地で24時間インキュベーションすることによって、非極性マクロファージに分化させた。得られたマクロファージを、20 ng/mlのIL-4、20 ng/mlのIL-13、および5 ng/mlのIL-6と48時間インキュベーションすることによって、M2様表現型に極性化した。培養物を、加湿された5% CO₂インキュベーター中で37℃で維持した。

【0263】

化合物2Aが、線維化促進マクロファージを、より低い線維性表現型に再プログラム化することができるかどうかを評価するために、IL-4、IL-6プラスIL-13で刺激されたTHP-1細胞を、異なる濃度の化合物2Aとインキュベートし、いくつかの線維化促進マーカー、すなわちCCL18、IL-1、およびTNFのmRNAレベルを、qPCRおよびELISAを使用して調べた。

10

【0264】

図13Aおよび13Bに示すように、化合物2A（遊離薬剤）との48時間インキュベーションは、CCL18およびIL-1の発現の減少を誘導し、TLR7アゴニストが、これらの線維化促進性に極性化されたTHP-1細胞の、より低い線維性表現型へのシフトを実際に促進できることを示唆する。（注 図13Bは、低濃度で阻害性応答を有し、高濃度で刺激性応答を有する化合物2Aを示すベル型の曲線を示し、これは特定の薬剤に共通の応答曲線である。）さらに、TNF（抗線維化表現型マーカー）の発現を調べたところ、その発現の増加が観察され（図13C）、THP-1が線維化促進特性から抗線維化特性へシフトしたことを確認した。

20

【0265】

非コンジュゲートTLR7アゴニスト性に加えて、本開示のコンジュゲート化合物も同様に評価された。ヒトTHP-1細胞は、本明細書に記載の方法に従ってM2-様表現型を有するマクロファージに誘導され（例えば、20 ng/mlのIL-4、20 ng/mlのIL-13、5 ng/mlのIL-6を使用して）、次いで、以下の本開示の様々な化合物の異なるnM濃度で2時間再プログラム化された、すなわち、式Iおよび/またはIIを有する非コンジュゲート（遊離薬剤）TLR7アゴニスト化合物（データは化合物3Aとして集会的に示される）、式XVを有する葉酸コンジュゲートTLR7アゴニスト化合物（放出可能リンカーを有する）（例えば、化合物3B）、式XVIIを有する葉酸コンジュゲートTLR7アゴニスト化合物（放出不能リンカーを有する）（例えば、化合物3C）、および式XVIを有する葉酸コンジュゲートTLR7アゴニスト化合物（放出不能リンカーを有する）（例えば、化合物3D）。次いで、細胞を、qPCRによる遺伝子分析のために採取し、CCL18（図14A）、CD206（図14B）、およびIL-1（図14C）の相対的発現を分析した。

30

【0266】

様々な線維化促進（M2表現型）マーカーであるCCL18、IL-1、およびCD206マーカーの発現を定量した。図14A～14Cで示すように、これらの線維化促進マーカーのそれぞれの発現は、化合物3B、化合物3D、および化合物3Cのそれぞれの投与後に低減し、化合物3Dおよび化合物3C化合物（両方とも放出不能リンカーを有する）が他の化合物と比較して最も効果的であった。

40

【0267】

図15は、化合物3A、化合物3B、化合物3C、または化合物3Dで処置した後の、図14A～14CのTHP-1細胞の各群における分泌されたCCL18タンパク質レベルを示す。化合物3Aおよび葉酸標的化TLR7化合物（例えば、化合物3B、化合物3C、および化合物3D）は、低濃度範囲（0.1～10 nM）でCCL18の分泌をダウンレギュレーションする。

【0268】

さらに、細胞上清を収集し、分泌されたCCL18タンパク質をELISAにより検出した。図15では、化合物3A（遊離薬剤）および葉酸標的化化合物（化合物3B、化合

50

物 3 C、および化合物 3 D) がすべて、低濃度範囲 (0 . 1 ~ 1 0 n M) で C C L 1 8 の分泌をダウンレギュレーションしたことを確認し、さらに、化合物 1 A および化合物 1 B に関連して記載した実施例と同様に、これらの化合物が、同様の機構を介して M 2 様線維化促進マクロファージを M 1 様抗線維化マクロファージに同様に再プログラム化することができることを支持する。

【 0 2 6 9 】

実施例 9

上述の研究を繰り返すと (図 3 A ~ 3 F)、同じ定性的変化が観察され、化合物 1 B の影響の大きさのみが多少低下していた。非標的化 T L R 7 アゴニストが培養細胞に直ちに進入するのに対し、その葉酸標的化された対応物は、葉酸受容体結合および受容体介在性エンドサイトーシスの後にのみ細胞進入するように設計されているため、この効力の低下が予想された。化合物 1 A および化合物 1 B のような低分子量の水溶性薬剤は、多くの場合、注射の 2 時間以内に体内から排泄されるため、インビボでの薬剤曝露の、より生理学的に適切なインビトロモデルは、薬剤による細胞のインキュベーションを 2 時間のみ制限し、薬剤の不在下でさらに 4 6 時間のインキュベーション後に薬剤の有効性を検討する。図 4 A ~ 4 E で示すように、T H P - 1 細胞を T L R 7 アゴニストと 2 時間インキュベートした後、薬剤含有培地を薬剤を含まない培地で置換すると、化合物 1 B は、化合物 1 A と比較して優れた効力を有することが観察され、特に、T N F 誘導の場合に葉酸標的化コンジュゲートが劇的に改善された。これは、葉酸標的化 T L R 7 アゴニストが葉酸受容体陽性細胞によって捕捉されたのに対し、化合物 1 A は同じ細胞によって保持されなかったためであると思われる。

【 0 2 7 0 】

これらのデータは、化合物 1 B が、インビボで線維化促進マクロファージの再プログラム化においてより効果的であるべきであることを裏付け、葉酸コンジュゲートされた薬剤 (例えば、化合物 1 B) は、F R 発現マクロファージに集中しており、全身で優勢な葉酸受容体陰性細胞 (例えば、化合物 1 B は、葉酸受容体陰性細胞に対して不浸透性であるように設計されている) に入ることができないため、より全身毒性をも引き起こさないというさらなる利点を有することを裏付けている。

【 0 2 7 1 】

さらに、上記の m R N A 分析が、I L - 4、I L - 6 プラス I L - 1 3 によって産生された線維化促進サイトカインのレベルを正確に反映するように、T H P - 1 細胞を刺激するため、T H P - 1 上清中の C C L 1 8 および I L - 1 ポリペプチドの濃度を、E L I S A アッセイにより定量した。図 6 A および 6 B に示されるように、化合物 1 A および化合物 1 B の両方が、アゴニストと 4 8 時間連続的にインキュベートされたときに C C L 1 8 および I L - 1 の低下を誘発したが、薬剤曝露が 2 時間のみ制限された場合に化合物 1 B は、再び優れていることが見出された (図 6 C および 6 D を参照されたい) 。

【 0 2 7 2 】

実施例 1 0

図 1 6 は、B M マウスモデルにおける本開示の化合物の少なくとも 1 つの実施形態のインビボ研究方法論を示しており、化合物は、式 X V I I を有するもの (例えば、化合物 3 C) である。図 1 7 A および 1 7 B は、化合物 3 C の L C - M S スペクトルであり、コンジュゲートの高純度を支持し、遊離薬剤は検出されなかった。

【 0 2 7 3 】

図 1 8 A - 1 8 F は、図 1 6 のインビボ研究方法論の対象マウスからの結果を示し、生存曲線 (図 1 8 A)、体重変化 (図 1 8 B および 1 8 D)、B A L F による細胞の濃度 (図 1 7 C)、生存マウス (図 1 8 E) およびすべてのマウス (例えば、生存マウスおよび 2 1 日目以前に死亡したマウスの両方を含む) (図 1 8 F) におけるヒドロキシプロリン濃度 ($\mu\text{g H P} / \text{葉}$) を含む。式 X V I I (例えば、化合物 3 C) を有する化合物の 1 0 n m o l 濃度投与量は、対象マウスの生存率を増加させ、同時に H P および B A L F 細胞の数を減少させた。また、3 n m o l 濃度投与量は、対象マウスに測定可能な利益を示さ

なかった。

【0274】

実施例 1 1

M2 誘導ヒト単球由来マクロファージを、100 nM の化合物 1 A または化合物 1 B で、48 時間連続で処置するか、または最初に FA - グルコサミン (競合体) の存在下もしくは非存在下で 2 時間、続いて薬剤の非存在下で 46 時間処置するか (2 + 46 時間) のいずれかを行った。図 19 に示されるように、線維化促進マーカー、Arg 1 (図 19 A)、CD 206 (図 19 B) および CD 163 (図 19 C) の mRNA レベル、ならびに分泌された線維化促進 CCL 18 (図 19 D) および抗線維化サイトカイン、CXCL 10 (図 19 E) および IL - 6 (図 19 F) (n = 3、技術的複製) のタンパク質レベルを次に決定した。サイトカインの両方のセットの変化は、過剰な FA - グルコサミン (2 + 46 時間、競合) を有する、占有されていない葉酸受容体の遮断によって阻害された。このデータは、バイオマーカーのダウンレギュレーションが過剰な FA - グルコサミン (競合体) で遮断されたため、化合物 1 B が葉酸受容体に結合することを裏付けている。

10

【0275】

実施例 1 2

健康なマウスに、10 nmol の化合物 1 A (丸) または化合物 1 B (正方形) を尾静脈注射し、薬剤注射後の指定された時点で末梢血を採取した。(図 20 A ~ C) 血漿 IL - 6 (図 20 A)、IFN (図 20 B) および TNF (図 20 C) の測定 (n = 3)。(図 20 D - F)。IL - 6 (図 20 D)、IFN (図 20 E)、および TNF (図 20 F) の血漿レベルに対する薬剤濃度の効果を、それぞれ治療後 1.5 時間、1 時間、または 1 時間で決定した (n = 2) (図 20 G)。化合物 1 A は、健康なマウスにおいて全身サイトカイン放出を刺激するが、化合物 1 B は刺激しない。さらに、化合物 1 B は、化合物 1 A の用量の半分よりも低い炎症性サイトカイン放出を刺激する。これらのデータは、TLR7 アゴニストが、葉酸受容体標的化リガンドを用いて肺マクロファージを標的とする場合、線維化肺マクロファージを、線維化促進状態に再プログラム化するために安全に採用できることを示唆している。

20

【0276】

実施例 1 3

図 6 に記載されているのと同じ健康および線維性肺の切片を、DAPI (核、青色)、抗 F 4 / 8 0 (マクロファージ、赤色)、および抗 CD 206 (M2 マクロファージマーカー、緑色) で染色し、方法に記載されたように Leica Versa 8 ホールスライドスキャナで画像を取得した (n = 2)。スケールバー、100 μm。処置群間の違いは、化合物 1 B が、インビボで強力な線維化促進応答を引き起こすことを示している。

30

【0277】

化合物、組成物、および方法の様々な実施形態が本明細書にかなり詳細に説明されているが、実施形態は、単に非限定的な例として提供されるに過ぎない。本明細書に記載された実施形態の多くの変形および修正は、本開示に照らして当業者には明らかであろう。したがって、本開示の範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされてもよく、均等物をその要素に置き換えることができることが当業者によって理解されるであろう。実際に、本開示は、網羅的または限定的すぎることを意図するものではない。本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によって、およびそれらの均等物によって定義される。

40

【0278】

さらに、本明細書に提供される実施例の多くは、マウスモデルを使用するが、マウスモデルにおける遺伝子発現パターンは、ヒト状態の遺伝子発現パターンと非常に著しい相関を示し、多くの経路は、ヒトおよびマウスの複数の条件によって一般に制御されていることは、当業者によって理解されるであろう。したがって、マウスモデルにおける遺伝子発現パターンおよび疾患進行は、特に炎症性疾患およびがんに関して、ヒト病態におけるものを厳密に再現し、したがって、本明細書に記載される実施例が、ヒトデータ、特定の病態、および適用と相関することを支持する。

50

【 0 2 7 9 】

したがって、本説明および添付の特許請求の範囲には、本開示に基づいて当業者に明らかであるすべての修正および変更が包含されることが意図される。

【 図 面 】

【 図 1 A 】

【 図 1 B 】

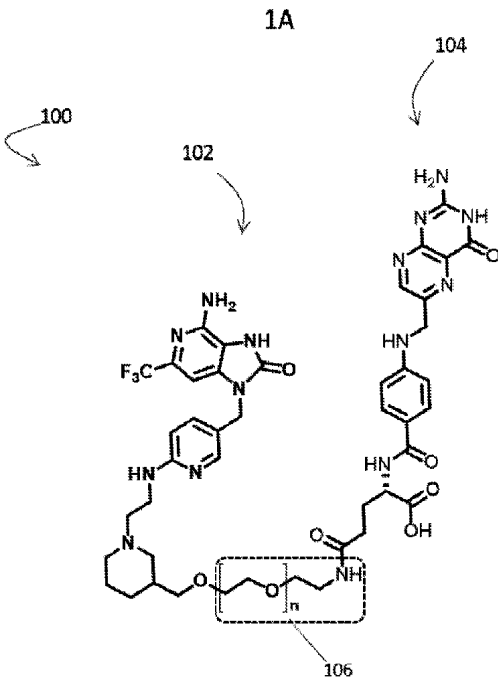


FIG. 1

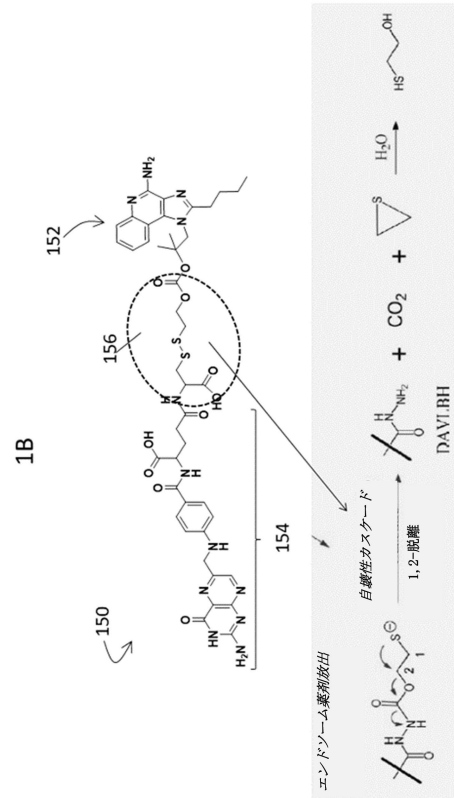


図1続き

10

20

30

40

50

【 图 2 】

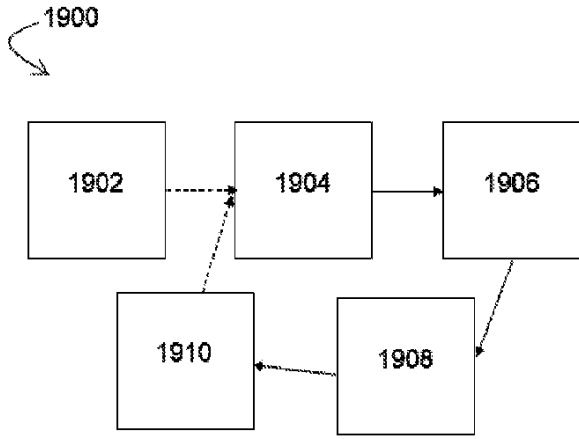


FIG. 2

【 图 3 A - B 】

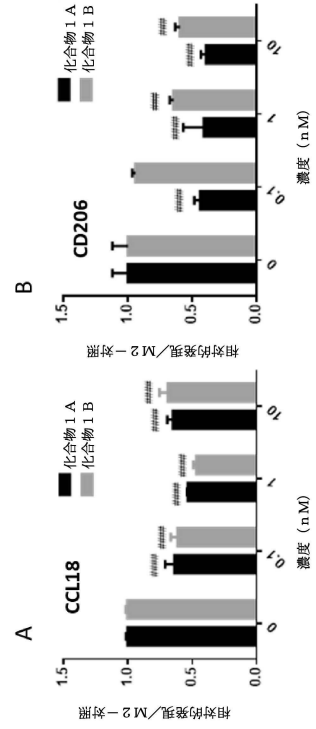


图 3

10

20

【 图 3 C - D 】

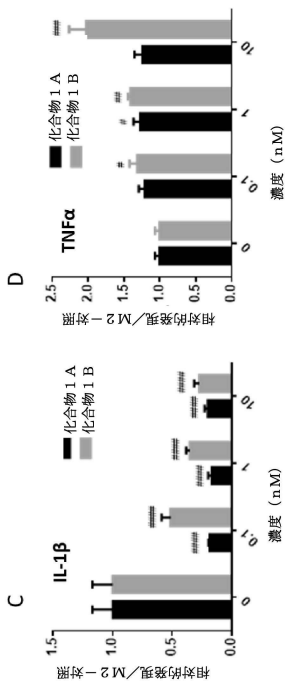


图 3 続き

30

【 图 3 E - F 】

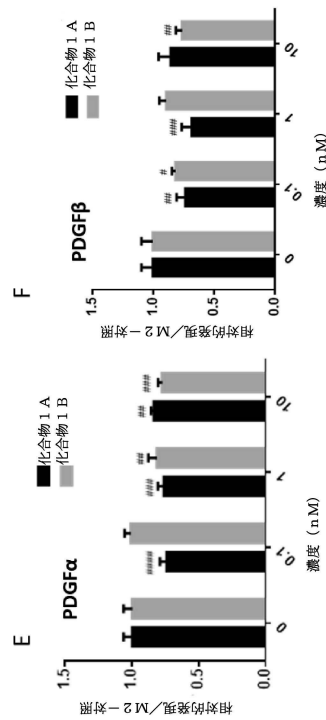


图 3 続き

40

50

【 図 4 A - B 】

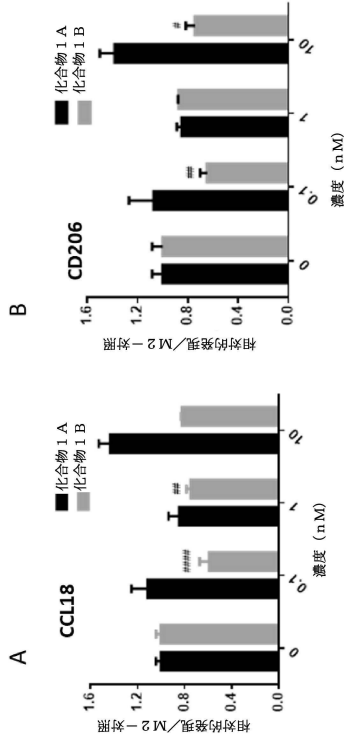


图 4

【 图 4 C - D 】

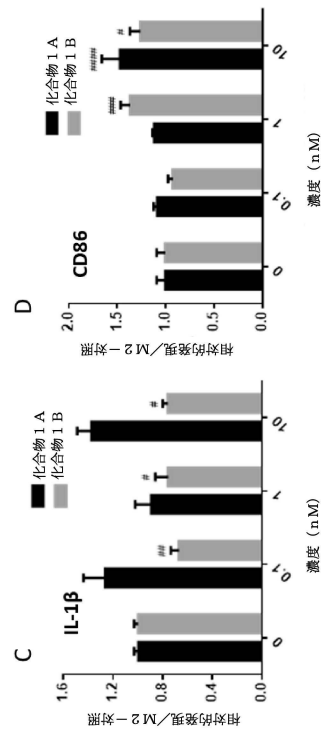


图 4 続き

10

20

【 图 4 E 】

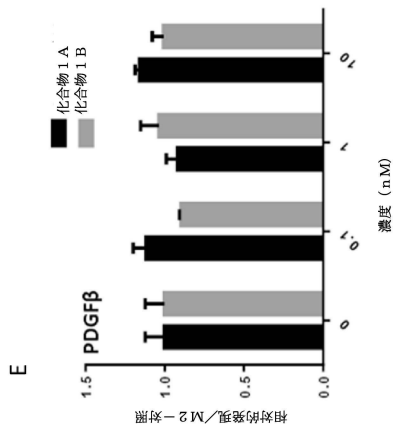


图 4 続き

【 图 5 A - B 】

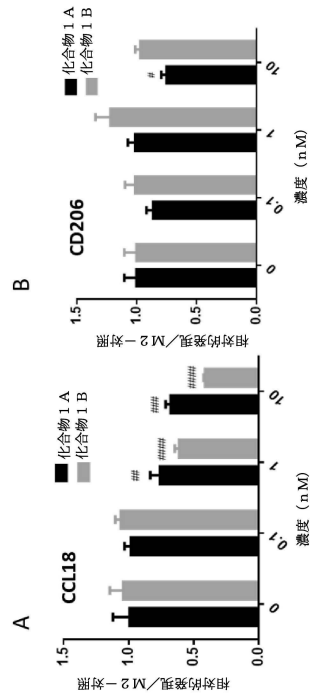


图 5

30

40

50

【 図 5 C - D 】

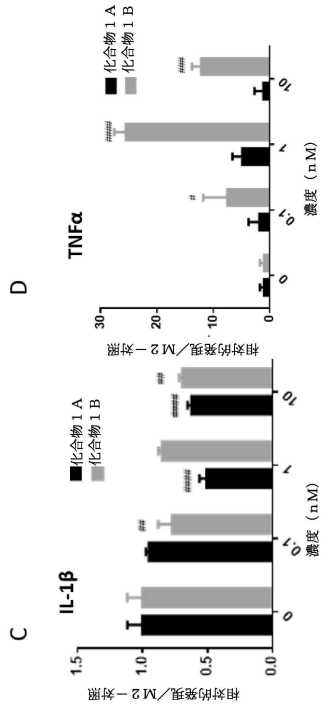


図 5 続き

【 図 6 A - B 】

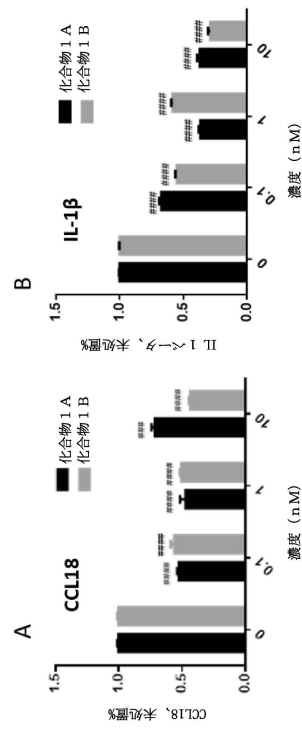


図 6

10

20

【 図 6 C - D 】

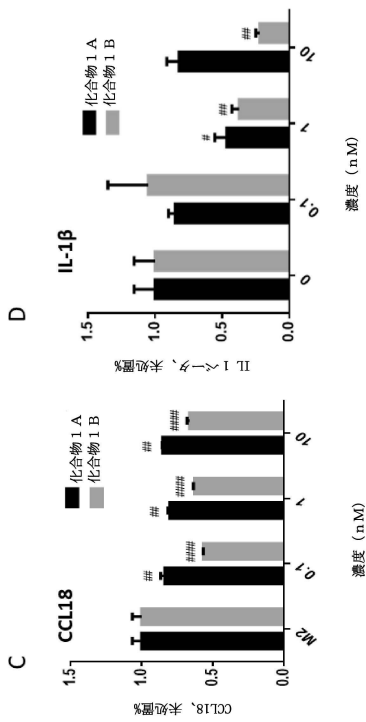


図 6 続き

【 図 6 E 】

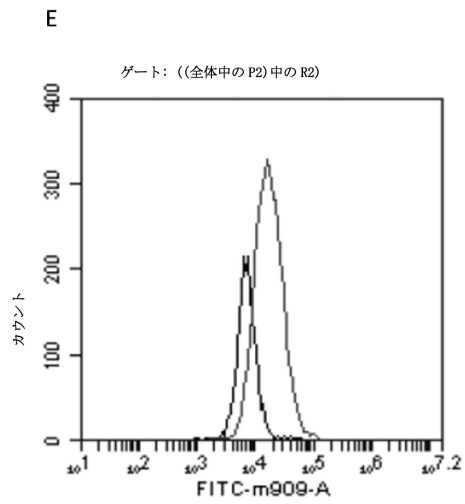


図 6 続き

30

40

50

【 図 6 F 】

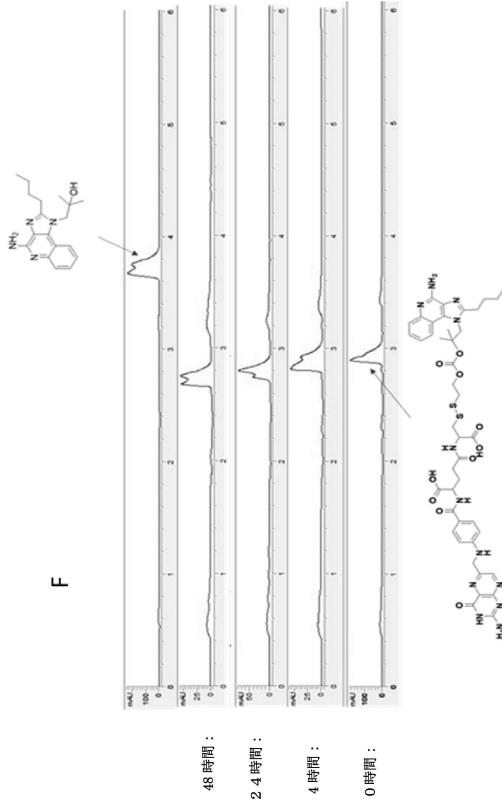


図 6 続き

【 図 7 A 】

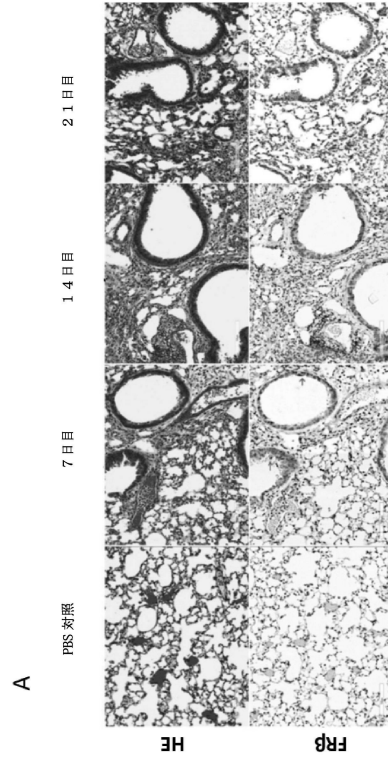


図 7

【 図 7 B 】

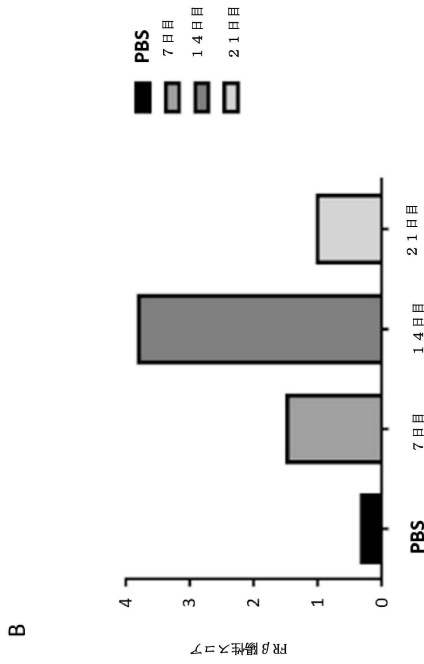


図 7 続き

【 図 7 C - D 】

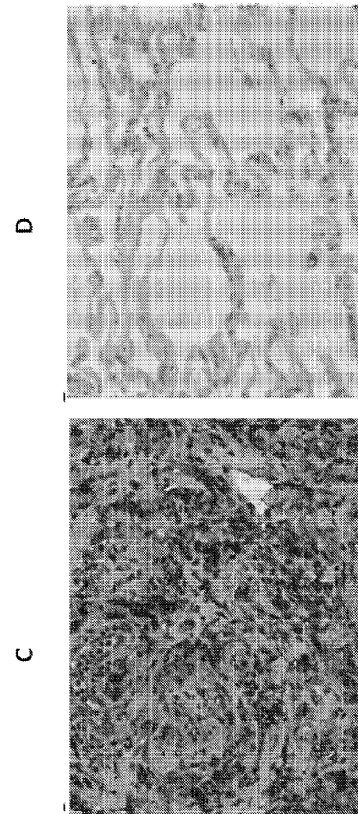


FIG. 7 con't

10

20

30

40

50

【 図 7 E 】

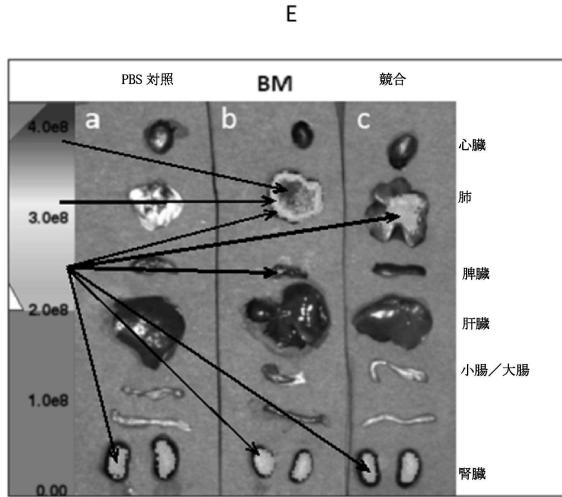


図 7 続き

【 図 7 F - 1 】

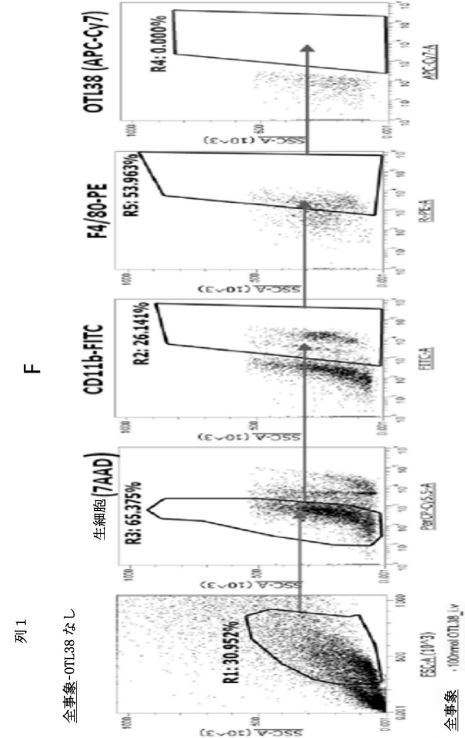


図 7 続き

10

20

【 図 7 F - 2 】

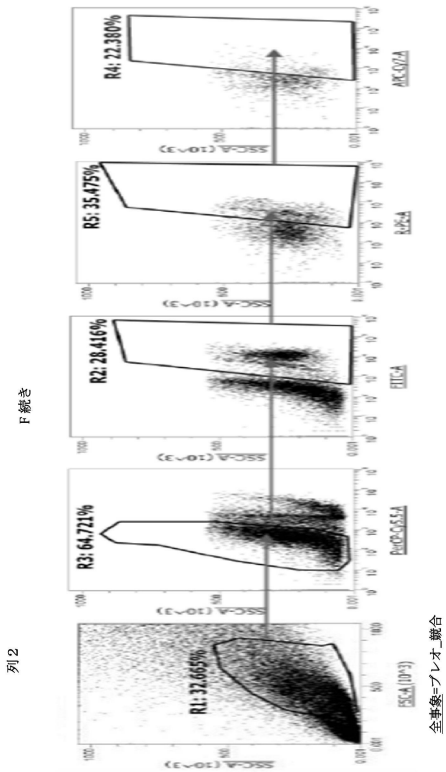


図 7 続き

【 図 7 F - 3 】

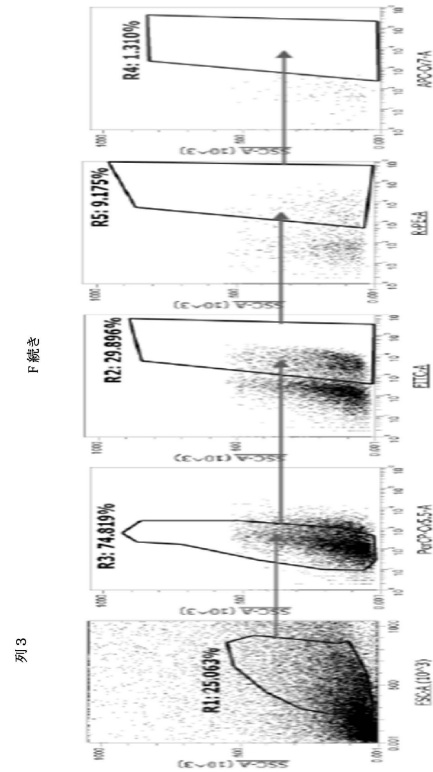


図 7 続き

30

40

50

【 図 8 A 】

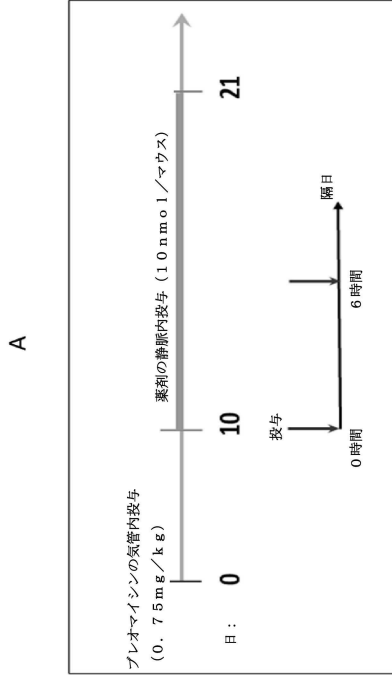


図 8

【 図 8 B - C 】

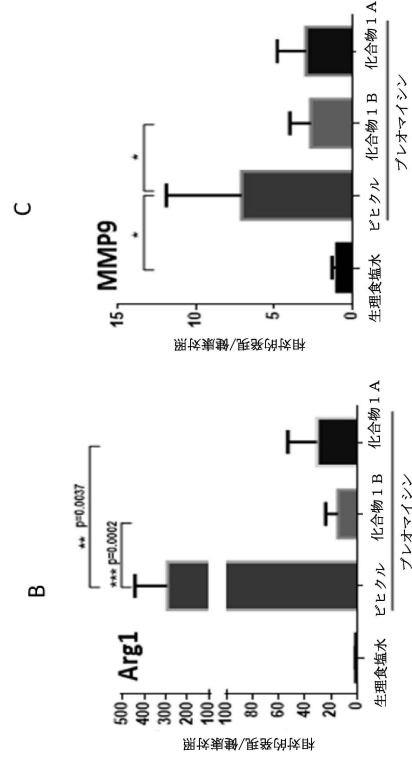


図 8 続き

10

20

【 図 8 D - E 】

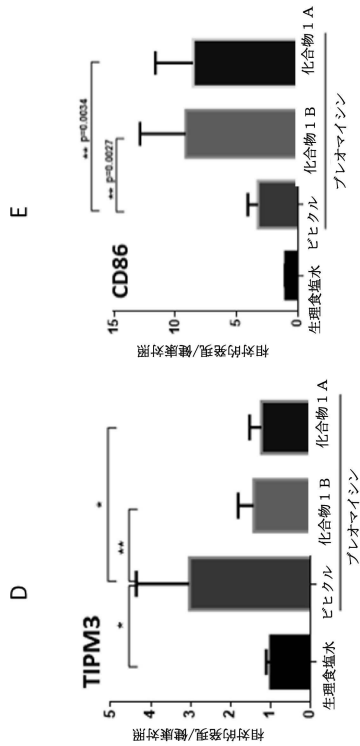


図 8 続き

【 図 8 F - G 】

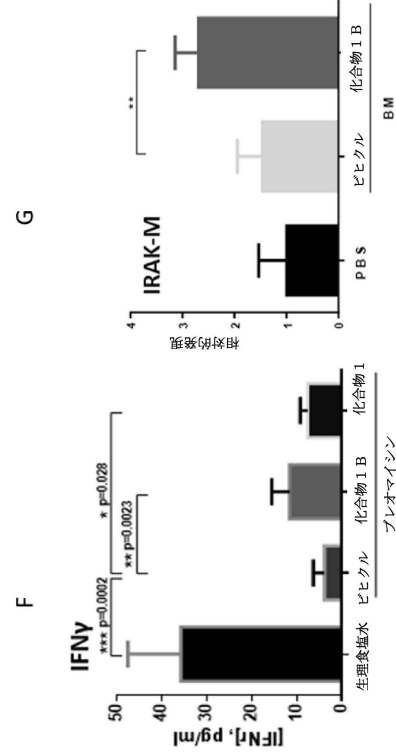


図 8 続き

30

40

50

【 図 8 H 】

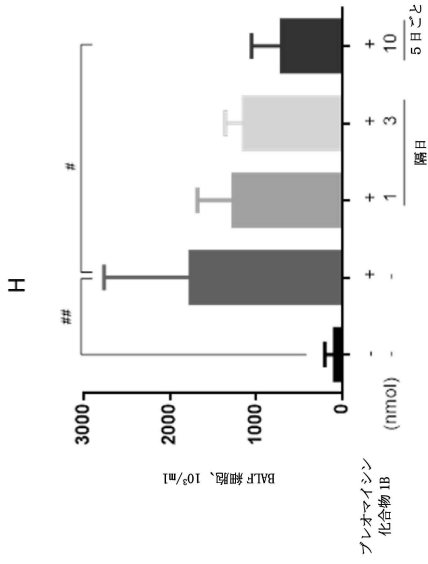


図8続き

【 図 9 A 】

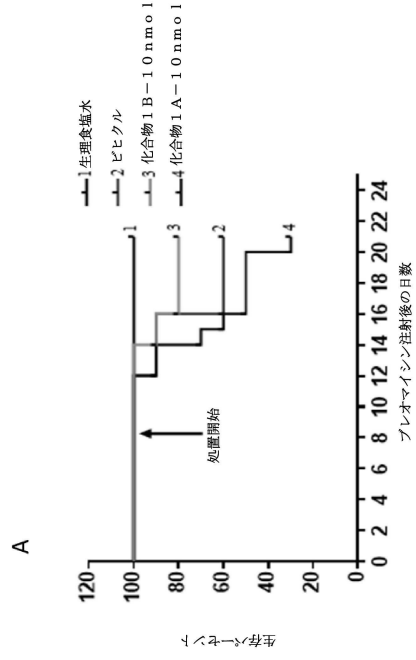


図9

10

20

【 図 9 B 】

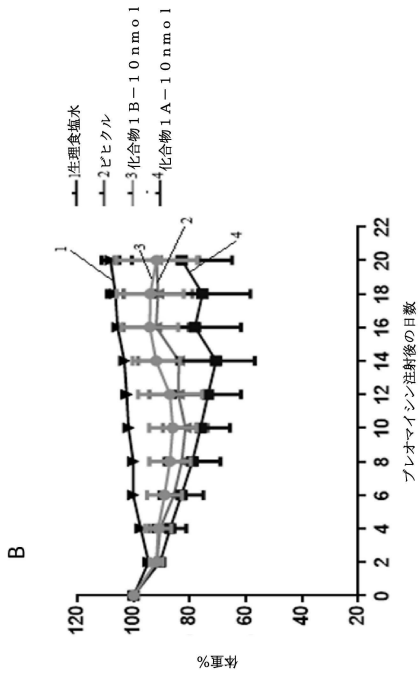


図9続き

【 図 10 A 】

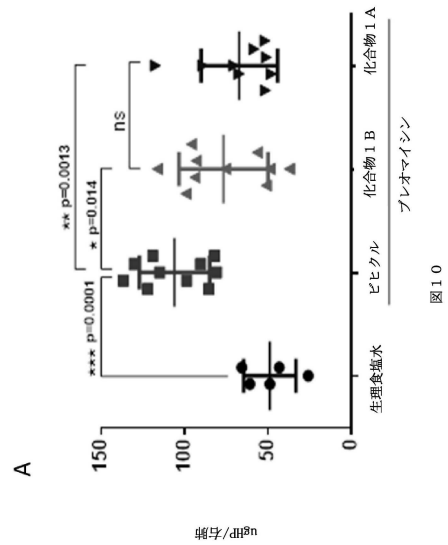


図10

30

40

50

【 図 1 0 B 】

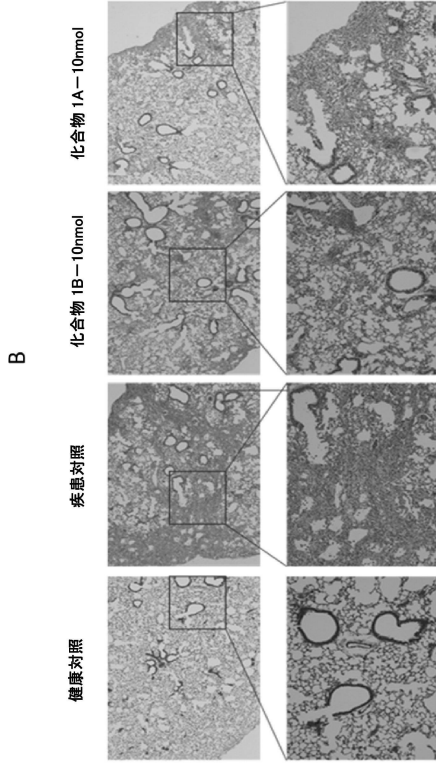


図 1 0 続き

【 図 1 0 C 】

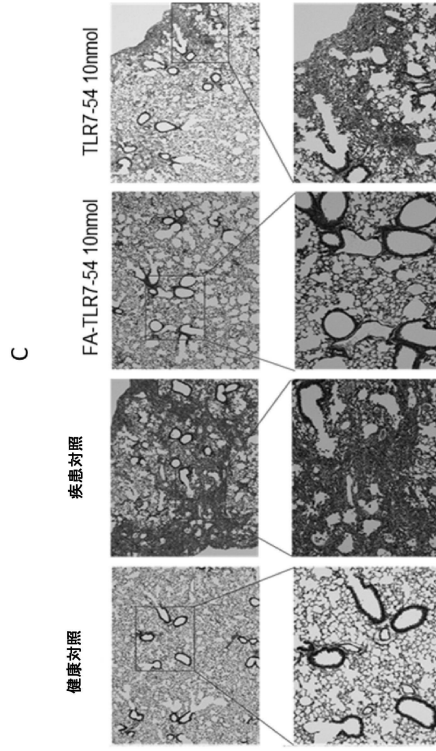


図 1 0 続き

10

20

【 図 1 1 A 】

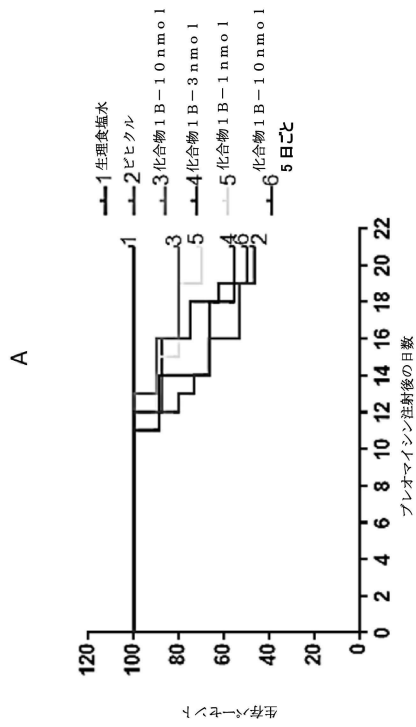


図 1 1

【 図 1 1 B 】

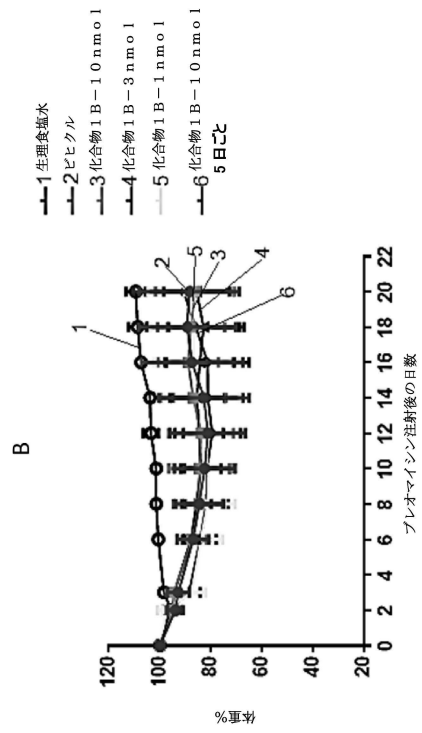


図 1 1 続き

30

40

50

【 図 1 2 A 】

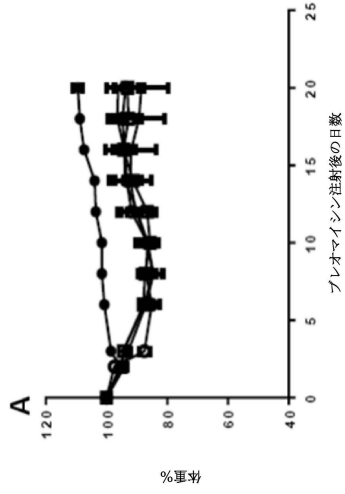


図 1 2

【 図 1 2 B 】

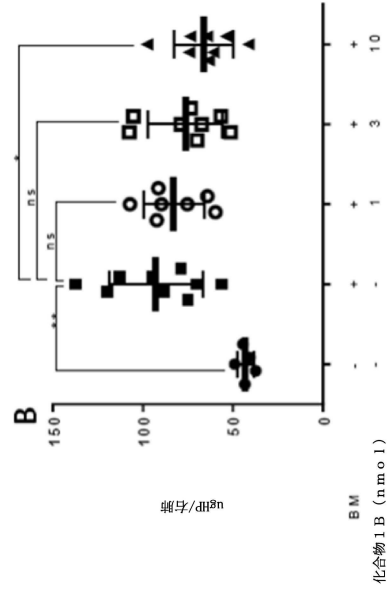


図 1 2 続き

10

20

【 図 1 2 C 】

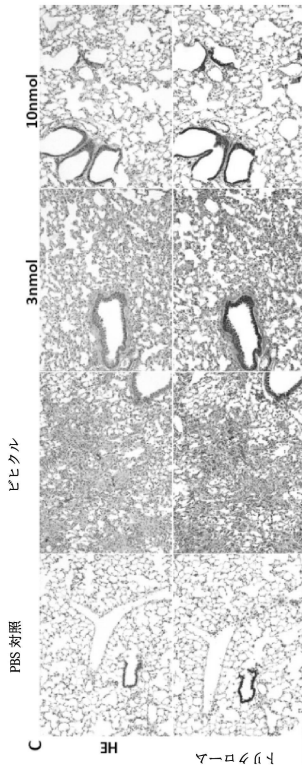


図 1 2 続き

【 図 1 3 A - B 】

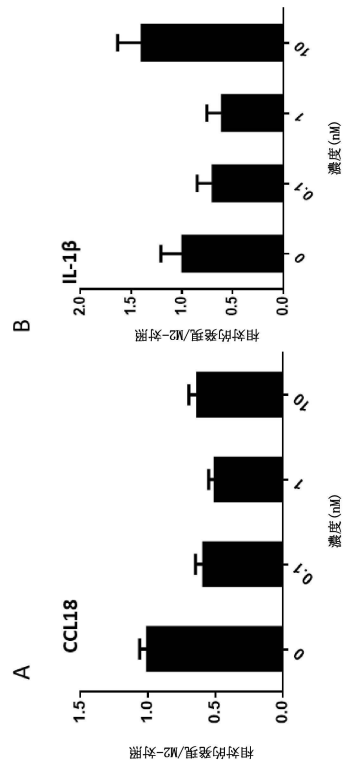


図 1 3

30

40

50

【 13 C - D 】

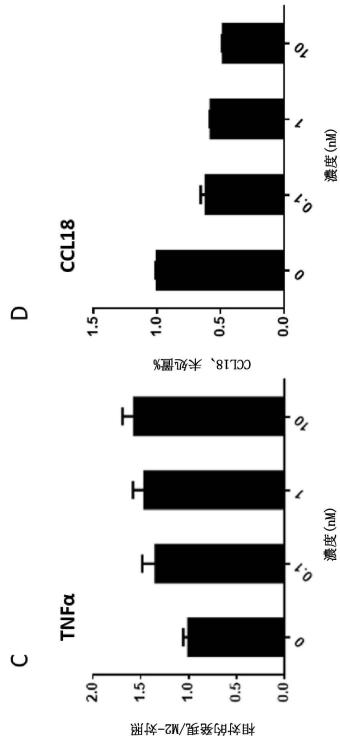


図 13 続き

【 14 A 】

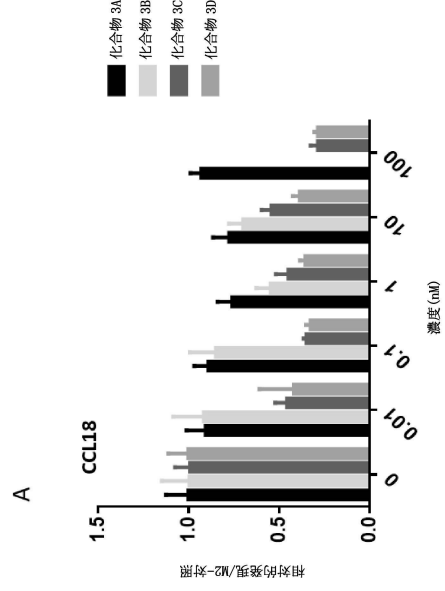


図 14

10

20

【 14 B 】

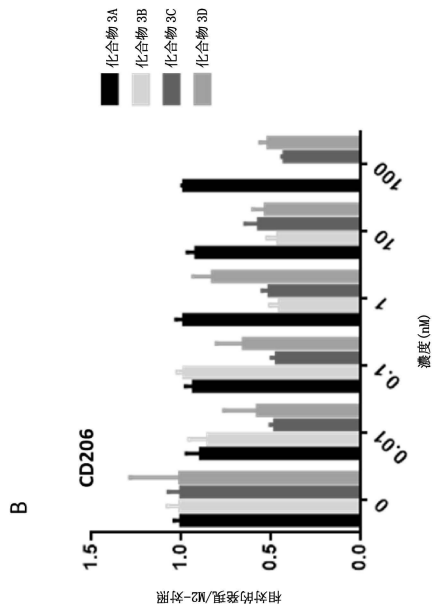


図 14 続き

【 14 C 】

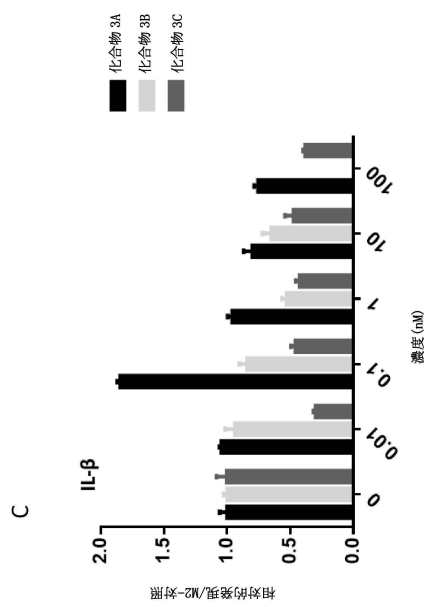


図 14 続き

30

40

50

【 図 1 5 】

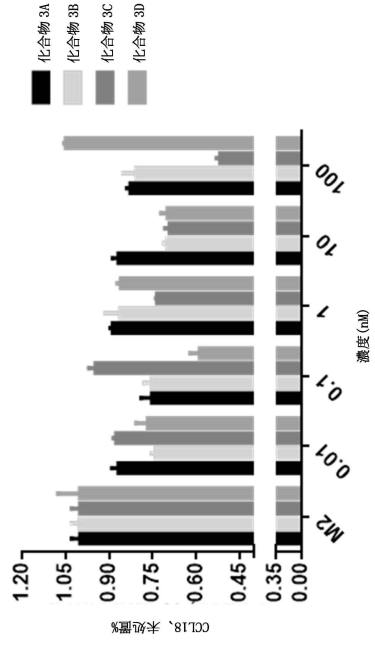


図 1 5

【 図 1 6 】

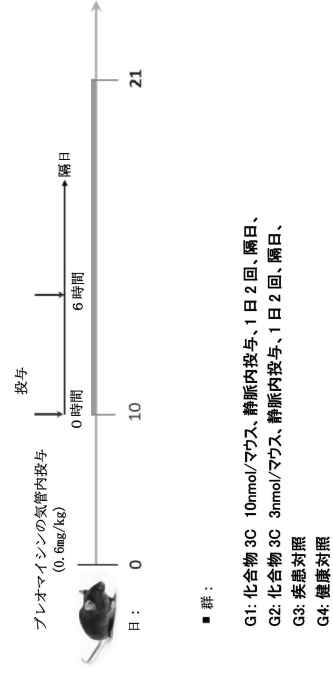


図 1 6

10

20

【 図 1 7 - 1 】

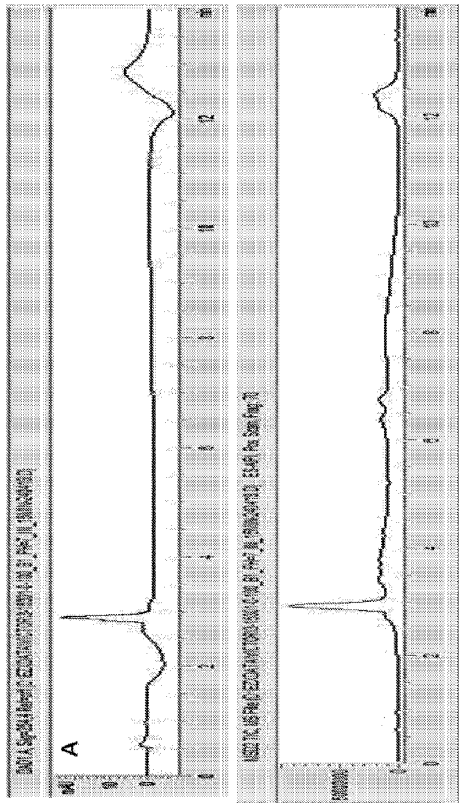


FIG. 17

【 図 1 7 - 2 】

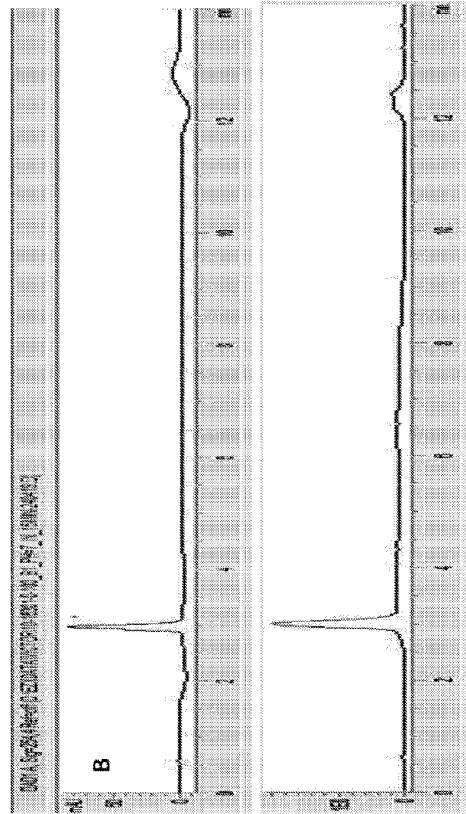


FIG. 17 con't

30

40

50

【 図 1 8 A 】

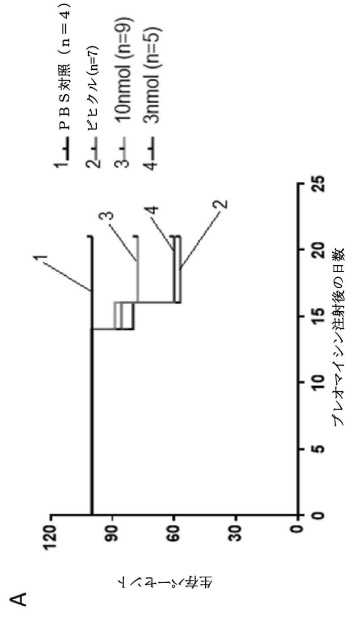


図 1 8

【 図 1 8 B - C 】

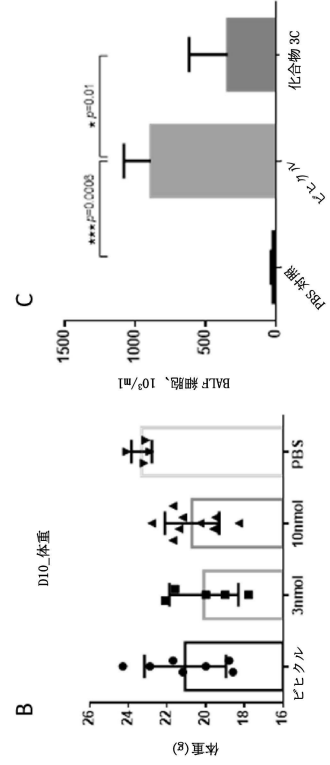


図 1 8 続き

【 図 1 8 D 】

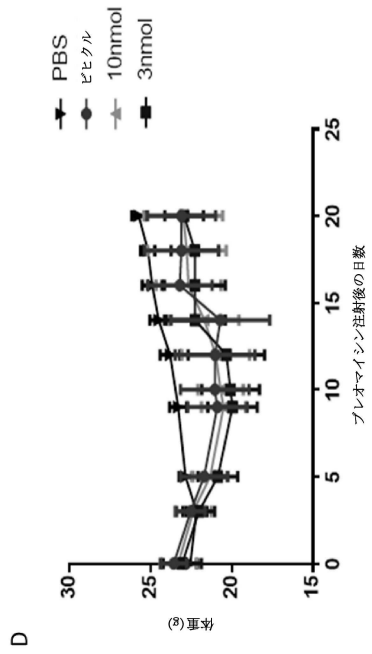


図 1 8 続き

【 図 1 8 E - F 】

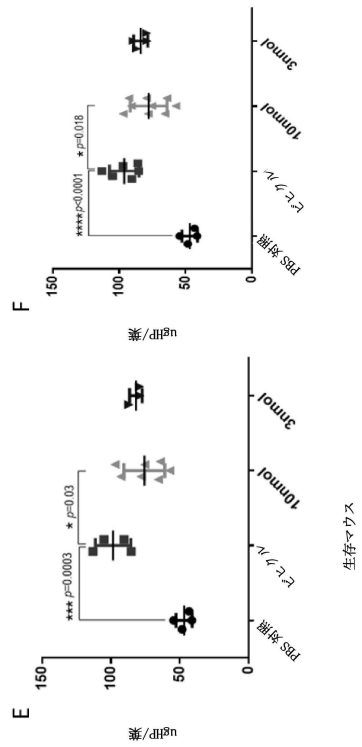


図 1 8 続き

10

20

30

40

50

【 図 1 9 A - B 】

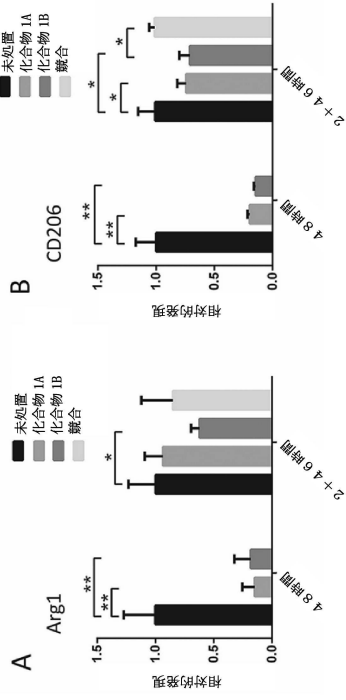


図 1 9

【 図 1 9 C - D 】

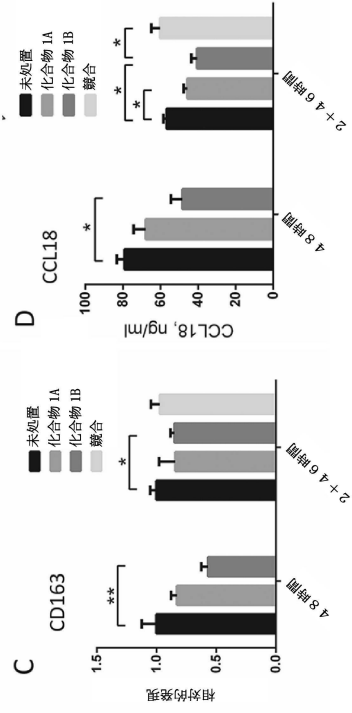


図 1 9 続き

10

20

【 図 1 9 E - F 】

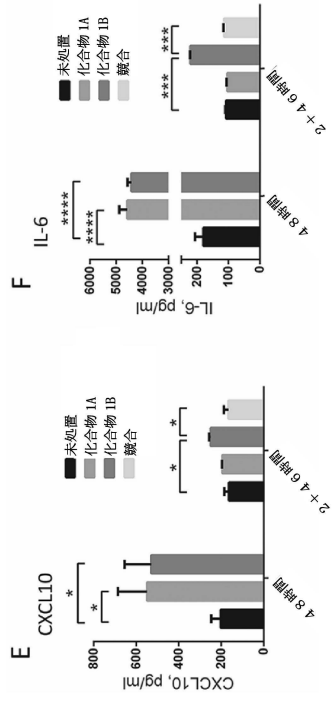


図 1 9 続き

【 図 2 0 A - C 】

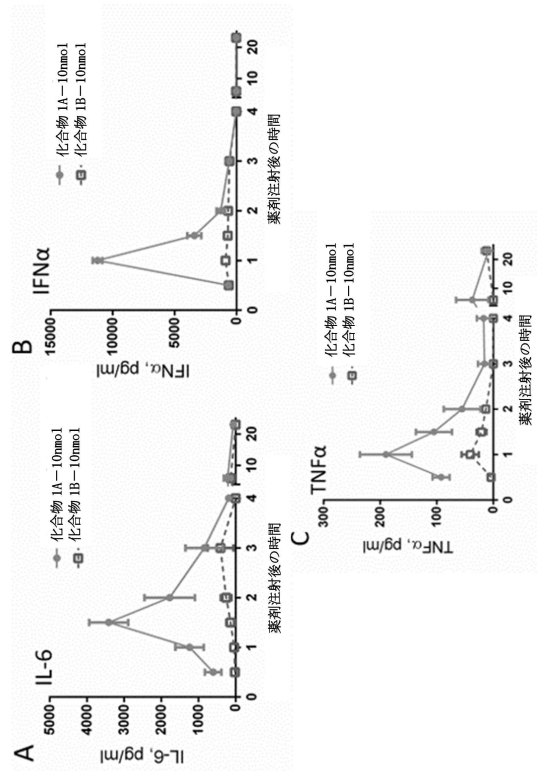


図 2 0

30

40

50

【 図 2 0 D - F 】

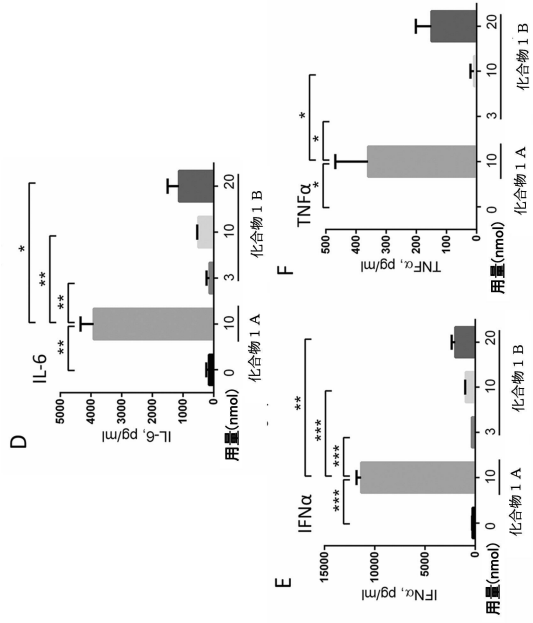


図 2 0 続き

【 図 2 0 G 】

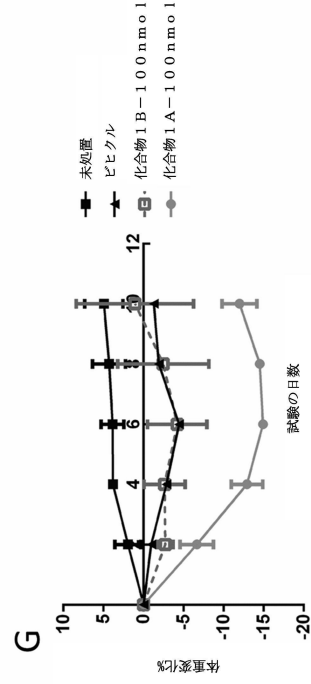


図 2 0 続き

【 図 2 1 】

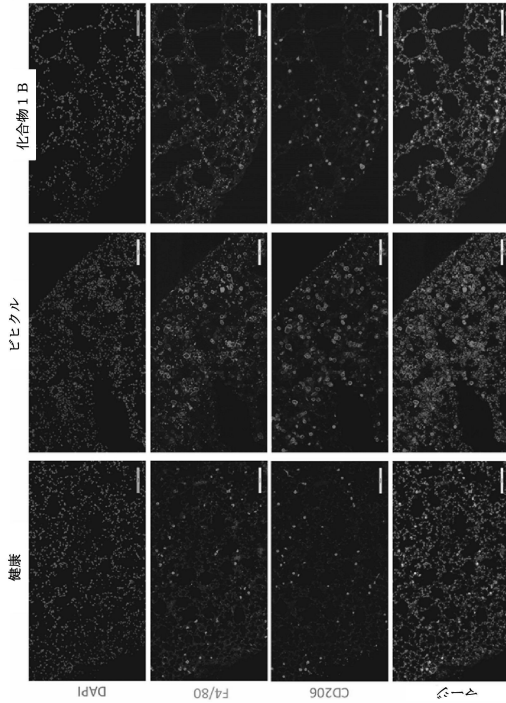


図 2 1

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/41120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - A61K 31/519; A61K 31/437; A61K 47/55; A61P 11/00; A61P 35/00 (2020.01)
 CPC - A61K 31/519; A61K 31/437; A61K 47/551; A61P 1/16; A61P 1/18; A61P 11/00; A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/205661 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 30 November 2017 (30.11.2017) pg 24, ln 5-8; pg 49, ln 22 to pg 50, ln 3	1, 4/1, 26
A		10, 14/1, 16
A	US 2015/0174268 A1 (SHANGHAI BIRDIE BIOTECH, INC.) 25 June 2015 (25.06.2015) para [0012], [0016], [0024]	10
A	US 2006/0142202 A1 (ALKAN et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0077], [0164], Fig 1	10
A	US 2010/0093998 A1 (ISOBE et al.) 15 April 2010 (15.04.2010) para [0406], [0561]	14/1, 16
A	PUBCHEM-CID: 56675929 Create Date: 06 March 2012 (06.03.2012) pages 1-9; pg 2, pg 7	14/1, 16
A	WO 2007/093901 A1 (PFIZER LIMITED) 23 August 2007 (23.08.2007) pg 57, ln 10-12, Ex 18; pg 139, ln 10 to pg 140, ln 20	14/1, 16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
9 September 2020

Date of mailing of the international search report
02 DEC 2020

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 20/41120

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 5-9, 15 and 17-18
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please see attached sheet-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 4/1, 10, 14/1, 16 and 26

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/41120

Attachment to Box.No.III:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-14, 10-14, 16 and 26, directed to a compound comprising a folate ligand or a functional fragment or analog thereof attached to a toll-like receptor (TLR) agonist via a linker, wherein said compound is selected from those specified in claims 10-13, and to a pharmaceutical composition comprising said compound.

10

The compound and composition will be searched to the extent that the compound encompasses the structure specified in claim 10. It is believed that claims 1, 4/1, 10, 14/1, 16 and 26 read on this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the structure specified in claim 10.

Applicant is invited to elect additional compound(s) wherein each additional compound elected will require one additional invention fee. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected compound. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the '+' group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Additionally, an exemplary election wherein different actual variables are selected is suggested. An exemplary election would be a compound represented by the structure specified in claim 11; and a pharmaceutical composition comprising said compound (i.e., claims 1-4, 11, 14, 16 and 26).

Group II: Claims 19-25, directed to a method of preventing or treating a fibrotic disease state comprising: contacting a cell with at least one compound comprising an immune modulator or pharmaceutically acceptable salt thereof attached, via a linker, to a folate ligand or functional fragment or analog thereof, wherein the immune modulator or pharmaceutically acceptable salt thereof targets a pattern recognition receptor.

The group of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

20

Group I+ includes the technical feature of a unique compound, which is not required by any other invention of Group I+.

Group II includes the technical feature of a method of preventing or treating a fibrotic disease state, not required by Group I+.

Common technical features:

The inventions of Group I+ share the technical feature of a compound represented by the formula: Q-L-T, wherein,

Q is a radical of a folate receptor binding ligand;

L is a linker; and

T is a radical of a toll-like receptor (TLR) agonist or a pharmaceutically acceptable salt thereof; and a pharmaceutical composition comprising said compound.

Groups I+ and II also share the technical feature of a compound comprising an immune modulator or pharmaceutically acceptable salt thereof attached, via a linker, to a folate ligand or functional fragment or analog thereof.

This shared technical feature, however, does not provide a contribution over the prior art, as being anticipated by WO 2017/205661 A1 to Purdue Research Foundation (hereinafter Purdue), which discloses a compound represented by the formula: Q-L-T, wherein, Q is a radical of a folate receptor binding ligand;

L is a linker; and

T is a radical of a toll-like receptor (TLR) agonist (pg 24, ln 5-8; pg 49, ln 22 to pg 50, ln 3, compound 10). Purdue further teaches a pharmaceutical composition comprising said compound (pg 26, ln 23-29).

30

As said compound and composition were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features, that would otherwise unify the inventions of Group I+ or those of Groups I+-II.

The inventions of Groups I+-II, thus lack unity under PCT Rule 13.

Note reg. item 4: Claims 5-9, 15 and 17-18 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). These claims are, therefore, not included in the above analysis.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

(72)発明者 チャン, フェンファ
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 9 0 6 , ウェスト ラファイエット, インディアン トレイル
ドライブ 2 2 3 7

(72)発明者 ナポレオン, ジョン, ヴィクトル
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 9 0 6 , ウェスト ラファイエット, アpartment 0 2
- 1 0 , イェーガー ロード 2 5 5 0

F ターム (参考) 4C072 MM02 UU01
4C076 AA95 EE59
4C086 AA01 AA02 AA03 CB05 CB09 MA01 MA04 MA66 NA05 NA13
ZB07 ZB11 ZB26 ZC75