

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7250679号

(P7250679)

(45)発行日 令和5年4月3日(2023.4.3)

(24)登録日 令和5年3月24日(2023.3.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/60 (2017.01)

A 6 1 K 47/60

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 31/4738(2006.01)

A 6 1 K 31/4738

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 61 (全132頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-537064(P2019-537064)

(86)(22)出願日 平成30年1月10日(2018.1.10)

(65)公表番号 特表2020-514300(P2020-514300
A)

(43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/013199

(87)国際公開番号 WO2018/132496

(87)国際公開日 平成30年7月19日(2018.7.19)

審査請求日 令和3年1月7日(2021.1.7)

(31)優先権主張番号 62/467,945

(32)優先日 平成29年3月7日(2017.3.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/444,735

(32)優先日 平成29年1月10日(2017.1.10)

最終頁に続く

(73)特許権者 597148884

ネクター セラピューティクス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4

1 5 8 サンフランシスコ ミッション

ベイ ブールバード サウス 4 5 5

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

最終頁に続く

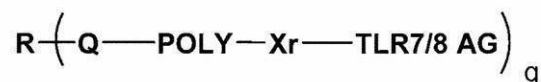
(54)【発明の名称】 T L R 作動薬化合物のマルチアームポリマーコンジュゲート及び関連の免疫療法治療の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式I:

【化1】



式I

又はその薬学的に許容可能な塩形態に係る、結合を含むスペーサ部分を介して、マルチアーム水溶性非ペプチド性ポリマーに共有結合しているトル様受容体 (T L R) 7 / 8 作動薬を含むコンジュゲートであって、

ここで:

Rは、 $C(-CH_2-)_4$ であり、そしてQは、 $-O-$ であり、ここで、Rが各Qと一緒に、ペンタエリスリトール部分であり;

各POLYは、独立して、ポリ(アルキレンオキシド)ポリマーであり;

各X_rは、独立して、結合を含むスペーサ部分であり;

qは、4であり; 且つ

各T L R 7 / 8 A Gは、T L R 7 / 8 作動薬であり、イミダゾキノリン化合物、4-

((6 - アミノ - 8 - ヒドロキシ - 2 - (2 - メトキシエトキシ) - 9 H - プリン - 9 - イル) メチル) - 安息香酸、又は 8 - (3 - (ピロリジン - 1 - イルメチル) ベンジル) - 4 - アミノ - 2 - ブトキシ - 7 , 8 - ジヒドロプテリジン - 6 (5 H) - オンから選択される、
コンジュゲート。

【請求項 2】

前記イミダゾキノリンがレシキモド、イミキモド、又は N - [4 - (4 - アミノ - 2 - エチル - 1 H - イミダゾ [4 , 5 c] キノリン - 1 - イル) ブチル] メタンスルホンアミドである、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

各 X_r が、独立して、安定な結合を含むスペーサ部分である、請求項 1 又は 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

各 X_r が、独立して、放出可能な結合を含むスペーサ部分である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記結合を含むスペーサ部分が、チオエーテル、カルバマート、エステル、カルボナート、又は尿素官能基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

前記結合を含むスペーサ部分が、酵素切断可能なペプチド性結合を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

X_r が式 I I :

$$\sim [X^1]_a - [L_r]_b - X^2 \sim$$

式 I I

(式中 :

a は、0 又は 1 であり ;

b は、0 又は 1 であり ;

X^1 は、存在する場合、スペーサであり ;

L_r は、存在する場合、結合であり ; 且つ

X^2 は、前記 T L R 7 / 8 作動薬に直接共有結合している官能基である)
に係る、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

X^1 が存在する、請求項 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

X^1 が、 $-CH_2C(O)-$ である、請求項 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

X^1 が存在しない、請求項 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

X^2 が、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、及び $-NH$ からなる群から選択される、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

L_r が存在する、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

L_r が、 $-(CR_xR_y)_z-$ 、及び $-NH(CR_xR_y)_z-$ からなる群から選択され、各 R_x 及び R_y が、独立して、水素、低級アルキル、ハロ、及びハロ置換低級アルキルから選択され、z が 1 ~ 6 の整数である、請求項 12 に記載のコンジュゲート。

【請求項 14】

L_r が、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$

10

20

30

40

50

CH_2- 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{CHCH}_3-$ 、 $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{NHCHCH}_3-$ 、 $-\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、及び $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2-$ から選択される、請求項13に記載のコンジュゲート。

【請求項15】

前記ポリ(アルキレンオキシド)がポリ(エチレンオキシド)である、請求項1～14のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項16】

「q」ポリマーアームの各々に含まれる前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約1～約30個の単量体サブユニットを含有する、請求項1～15のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項17】

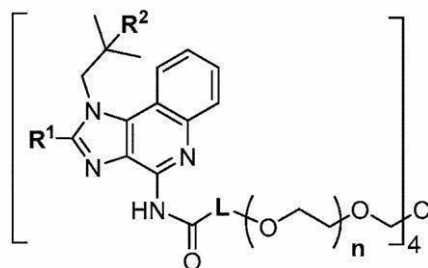
前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、約5,000ダルトン～約40,000ダルトンまたは約5,000ダルトン～約25,000ダルトンの分子量を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項18】

20

式III:

【化2】



(式III)

30

に係る式を有する、請求項1に記載のコンジュゲート

又はその薬学的に許容可能な塩若しくは立体異性体(式中:

Lは、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CHF}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、単結合、又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-$ であり、

40

各mは、独立して、1～5の整数(両端を含む)であり;

各nは、独立して、40～350の整数(両端を含む)であり;

R^1 は、水素又は $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ であり;且つ

R^2 は、水素又はヒドロキシルである)。

【請求項19】

Lが、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHF}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、単結合、又は $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

50

である、請求項 18 に記載のコンジュゲート。

【請求項 20】

各 n が、独立して、100～250の整数（両端を含む）である、請求項 18 又は請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 21】

R^1 が水素であり、且つ R^2 が水素である、請求項 18～20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

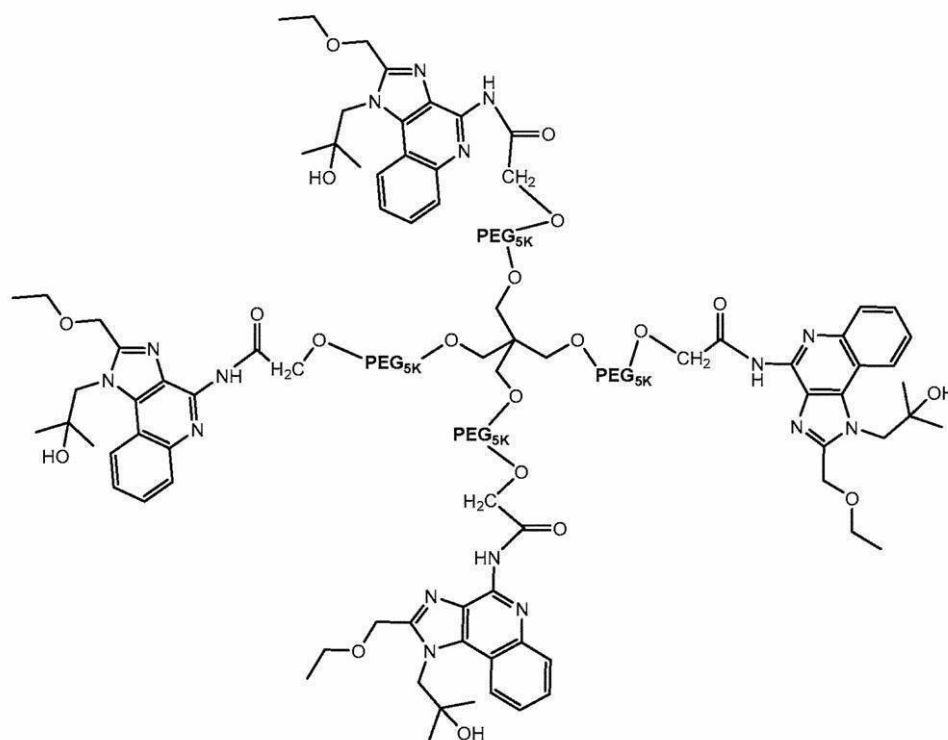
【請求項 22】

R^1 が $-CH_2-O-CH_2-CH_3$ であり、且つ R^2 がヒドロキシルである、請求項 18～20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

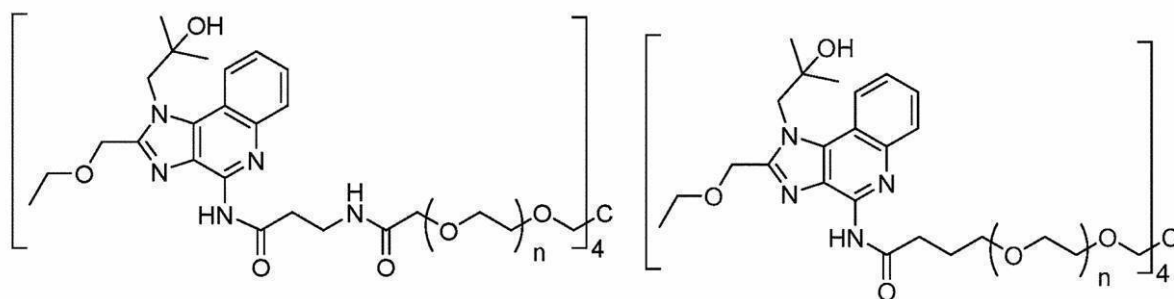
【請求項 23】

化合物 1～10 及び 12～16：

【化 3】



化合物 1



化合物 2

化合物 3

10

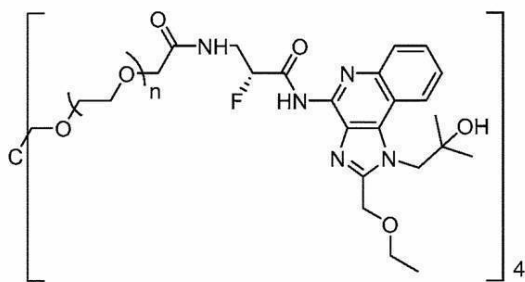
20

30

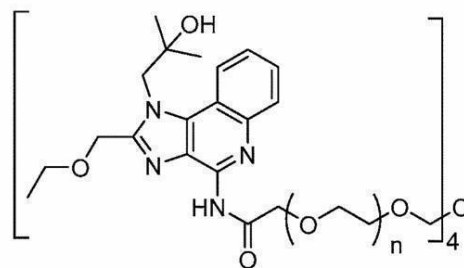
40

50

【化 4】

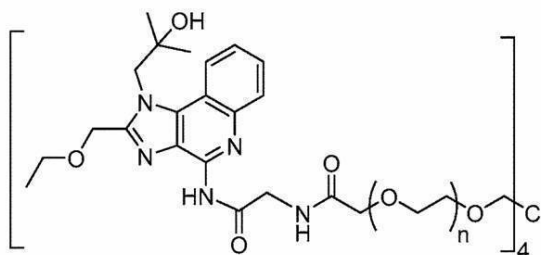


化合物 4

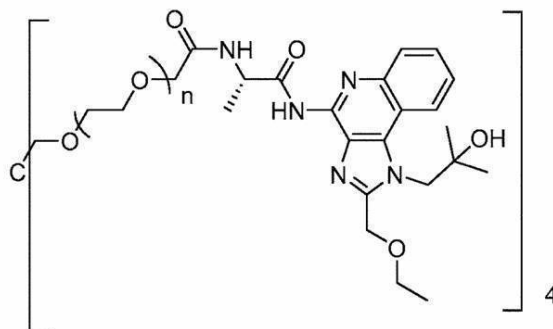


化合物 5

10

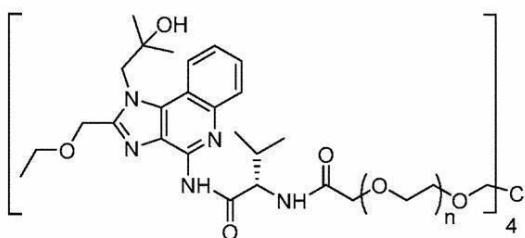


化合物 6

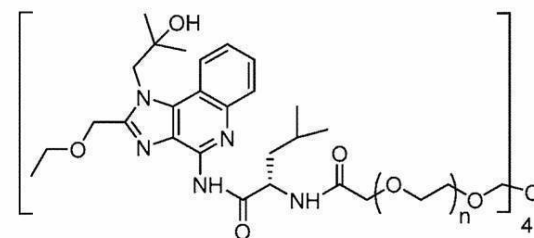


化合物 7

20

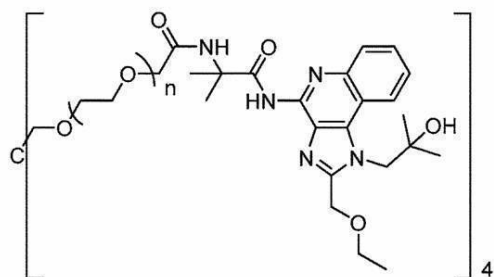


化合物 8

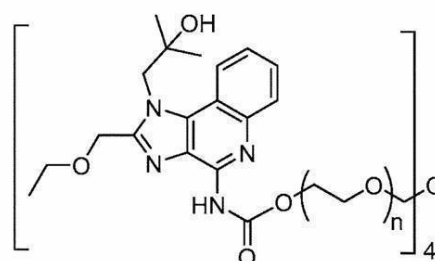


化合物 9

30



化合物 10

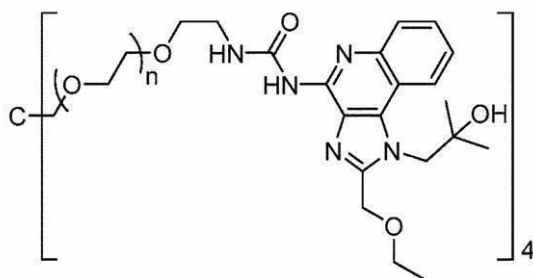


化合物 12

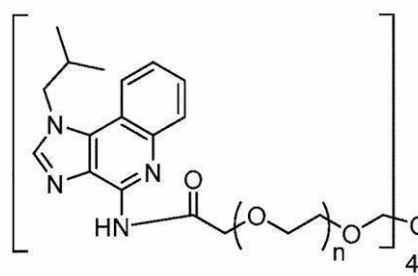
40

50

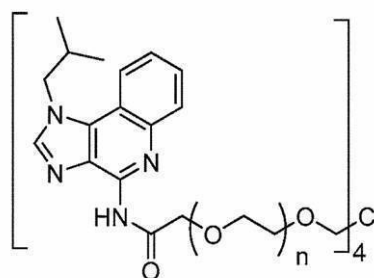
【化 5】



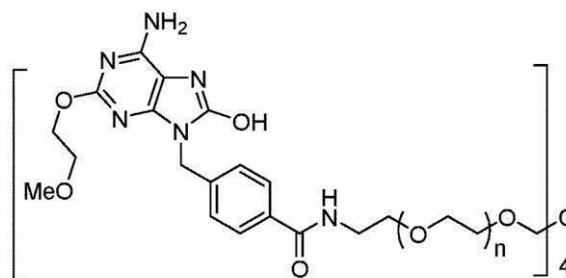
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

からなる群から選択されるコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩若しくは立体異性体（式中、各 n は、独立して、40～350の整数である）。

【請求項 24】

請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲート及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。

【請求項 25】

治療のための、請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物又は請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

癌の治療に使用するための、請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物。

【請求項 27】

癌の治療に有用な薬剤の調製に使用するための、請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物。

【請求項 28】

投与の方法において使用するための請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含む組成物であって、前記方法は、癌を有する対象に前記組成物を長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と組み合わせて投与することを含む、組成物。

【請求項 29】

前記組成物及び前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が、同時に又は連続的に、並びに任意の順序で、並びに同一及び／又は異なる投与経路により、それぞれ免疫調節量で投与されることを特徴とする、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記方法が、1回のサイクルの投与を含む、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記方法が、2回以上のサイクルの投与を含む、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記組成物が局所的に投与され、前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が非経

口投与されることを特徴とする、請求項 28～31 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記組成物が、癌性腫瘍の部位に直接（即ち、腫瘍内）投与されることを特徴とする、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記組成物が前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と別個に前記対象に投与されることを特徴とする、請求項 28～33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

前記組成物が、前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬の投与前に前記対象に投与されることを特徴とする、請求項 28～34 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 36】

前記組成物と前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬とが治療の 1 日目に両方投与されることを特徴とする、請求項 28～35 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 37】

前記組成物が治療の 1 日目に投与され、前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が治療の 1～4 日目のいずれか 1 日に投与されることを特徴とする、請求項 28～35 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

前記対象がヒト対象である、請求項 28～37 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記癌が固形癌である、請求項 28～38 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 40】

前記固形癌が、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結腸直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膵癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌からなる群から選択される、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬がポリエチレングリコールに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 28～40 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 42】

前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が 4 つから、5 つ及び 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 41 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が平均約 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 44】

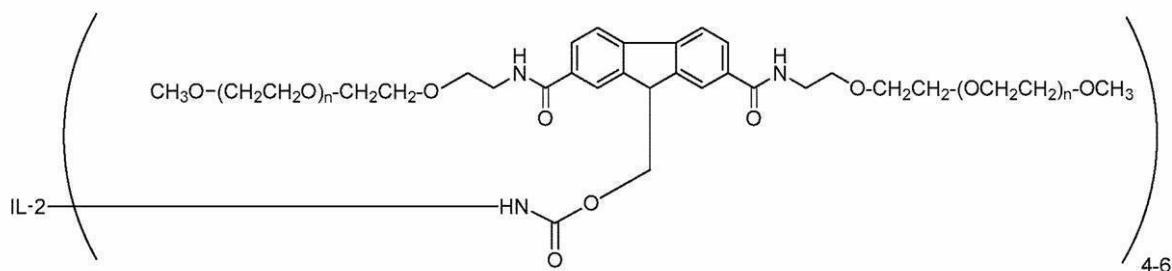
アルデスロイキンに放出可能に共有結合している前記ポリエチレングリコールポリマーが、分枝状である、請求項 43 に記載の組成物。

40

【請求項 45】

前記長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬が、以下の式：

【化 6】



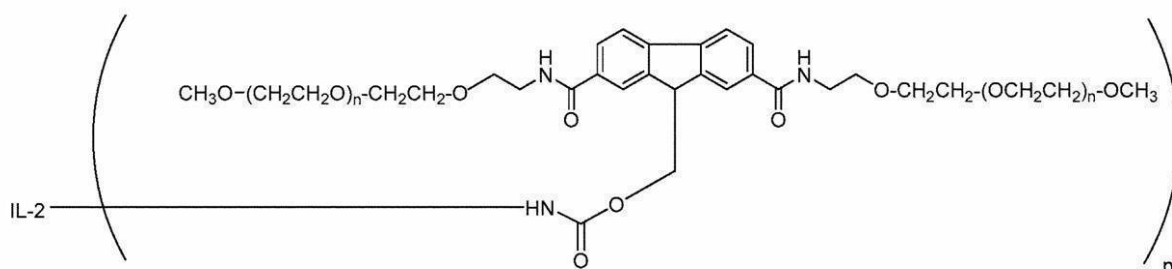
10

(式中、IL-2 はインターロイキン-2 であり、「n」は約 3 ～約 4 0 0 0 の整数である) に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬が、以下の式

【化 7】



20

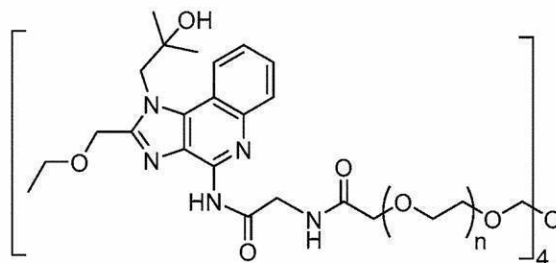
(式中、IL-2 はインターロイキン-2 であり、n' は 1、2、3、7 及び > 7 からなる群から選択される整数である) に包含される化合物、及びその薬学的に許容可能な塩を 1 0 % 以下 (モル量基準) 含む組成物中に含まれる、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

30

前記コンジュゲートが、以下の構造：

【化 8】



40

(式中、各 n は、独立して 4 0 ～ 3 5 0 の整数である) を有する、請求項 2 8 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記ポリマーアームの各々における n の値が、実質的に同じである、請求項 4 7 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記ポリマーアームの各々における n の値が、約 1 1 3 である、請求項 4 7 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

50

前記投与が、前記対象においてアブスコパル効果をもたらすのに有効である、請求項 28～49 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記投与が、マウス C T-26 結腸腫瘍モデルなどの好適な動物モデルにおいて評価される場合、ビヒクルのみの群における全ての対象が 0% の生存率に達した日の後である治療の開始後の日において、治療効果が同等の用量で対象に併用して投与される場合に前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬又は前記コンジュゲートのいずれかの単独投与について観察されるものを超える生存率パーセントを提供するのに有効である、請求項 28～50 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 52】

癌を有する対象の治療に使用するための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物が、I L-2 R β 活性化量の長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬と自然免疫活性化量の請求項 1～23 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含み、癌を有する対象の治療に使用するための説明書を伴う、組み合わせ物。

【請求項 53】

前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬が、ポリエチレングリコールに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 52 に記載の組み合わせ物。

【請求項 54】

前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬が 4 つから、5 つ及び 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 53 に記載の組み合わせ物。

【請求項 55】

前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬が平均約 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、請求項 54 に記載の組み合わせ物。

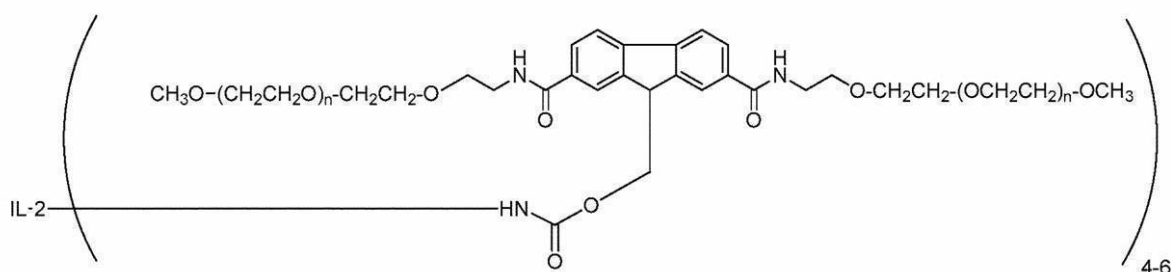
【請求項 56】

アルデスロイキンに放出可能に共有結合している前記ポリエチレングリコールポリマーが、分枝状である、請求項 53～55 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 57】

前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬が、以下の式：

【化 9】



(式中、I L-2 はインターロイキン-2 であり、「n」は約 3～約 4000 の整数である)

に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 52 に記載の組み合わせ物。

【請求項 58】

前記長時間作用型 I L-2 R β バイアス作動薬が、以下の式

10

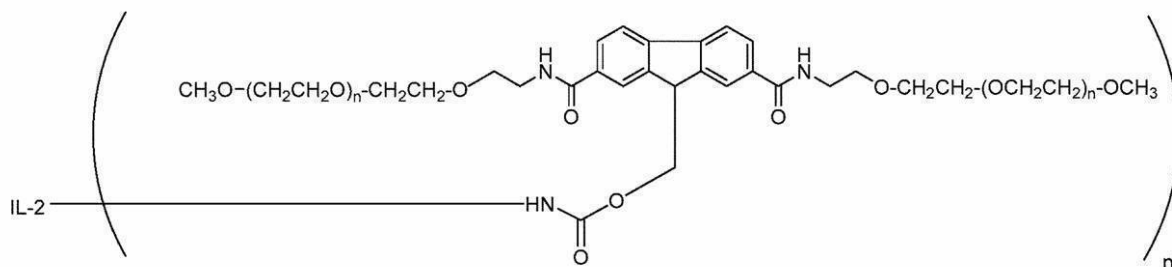
20

30

40

50

【化 10】



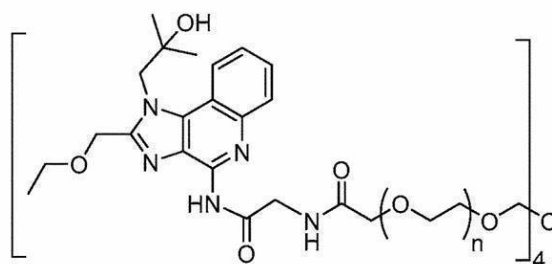
10

(式中、IL-2 はインターロイキン-2 であり、 n' は 1、2、3、7 及び >7 からなる群から選択される整数である) に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を 10% 以下 (モル量基準) 含む組成物中に含まれる、請求項 57 に記載の組み合わせ物。

【請求項 59】

前記コンジュゲートが、以下の式：

【化 11】



20

(式中、各 n は、独立して、40 ~ 350 の整数である) を有する、請求項 52 ~ 58 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項 60】

前記ポリマーアームの各々における n の値が、実質的に同じである、請求項 59 に記載の組み合わせ物。

30

【請求項 61】

前記ポリマーアームの各々における n の値が、約 113 である、請求項 59 に記載の組み合わせ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第 119 条 (e) のもと、2017 年 1 月 10 日に出願された米国仮特許出願第 62/444,735 号、2017 年 1 月 10 日に出願された米国仮特許出願第 62/444,756 号、2017 年 3 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 62/467,945 号、2017 年 4 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 62/488,251 号、2017 年 4 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 62/488,407 号、2017 年 5 月 23 日に出願された米国仮特許出願第 62/510,019 号、及び 2017 年 5 月 23 日に出願された米国仮特許出願第 62/510,024 号の優先権の利益を主張するものであり、これらの仮特許出願の内容は参照により全体として本明細書に援用される。

40

【0002】

本願は、(特に) トル様受容体 (「TLR」) 作動薬、詳細には、TLR7 及び/又は TLR8 のトル様受容体作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲート、並びにマルチアームポリマー TLR 作動薬コンジュゲートを含む組成物、並びにそのコンジュゲートを作

50

製し、且つ使用する方法に関する。本願はまた、癌免疫療法の分野に関し、且つ例えば、本明細書でより詳細に記載される、トル様受容体（TLR）作動薬、例えば、トル様受容体作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートと長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬とを併用して個体に投与することによる癌を有する個体の治療、並びに関連する組成物及び方法を含む。

【背景技術】

【0003】

トル様受容体（「TLR」）は、自然免疫系及び適応免疫系に属する複数の細胞型で発現される。今日までに、少なくとも13種の様々なTLRが哺乳動物において同定されている（Zhao, G., et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 2014, 2:12）。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、及びTLR10は細胞表面上で発現するが、TLR3、TLR7、TLR8、及びTLR9は、細胞内部のエンドソーム膜上に位置する（Kaczanowska, S., et al., J. Leukoc Biol. 2013 Jun; 93(6): 847-863）。TLRは、病原菌及び病原菌関連分子パターン（PAMP）と呼ばれる悪性細胞由来分子を検知するセンサーであり、それらがTLRに結合すると、樹状細胞（DC）及びマクロファージなどの他の抗原提示細胞において炎症性サイトカインの産生をもたらす（NF）-κB並びにI型インターフェロン経路を誘発する。TLRは、DC成熟の刺激、抗原取り込み及び抗原提示、並びにCD4⁺細胞の分化並びに制御性T（Treg）細胞の制御において極めて重要である。

【0004】

TLR作動薬はそれらの抗腫瘍特性について調査されてきたが、概して、大部分のTLR作動薬は癌治療法として期待した成果をあげていない。このような低迷は、免疫抑制性因子の誘導がTLR作動薬誘導性炎症を弱める機構によって説明され得ると仮定されてきた。（Lu, H. Frontiers in Immunology, March 2014, 5, 83）。例えば、TLR作動薬は、樹状細胞上のCD80、CD86、及びCD40などの共刺激分子、並びに免疫応答を方向づけするTNF-α及びIL-12などの炎症性サイトカインの誘導を介した免疫刺激効果を有する。しかしながら、TLR作動薬はまた、例えば、IL-10、制御性T細胞（Treg）、及びPD-1を含む、これら全ては抗腫瘍免疫を抑制することが可能ないくつかの免疫抑制性因子を誘導することによって、免疫抑制効果を有する（Lu, H., 2014、同個所）。

【0005】

TLR-7、TLR-8、及びTLR-9は、それらの核酸モチーフの認識及びエンドソーム区画内での発現において類似している（Zhao, G., 2014、同個所）。合成及び天然のヌクレオシドの両方であるいくつかのリガンドが、TLR7及び／又はTLR8リガンドとして特徴付けられてきた。TLR7受容体又はTLR8受容体によるこれらのヌクレオシドリガンドの認識により、炎症性サイトカイン、ケモカイン、及びI型インターフェロン（IFN）の誘導、並びに共刺激分子の上方制御が極点に達する細胞内経路が活性化される。TLRは、病原菌関連分子パターンの認識に関与するロイシンリッチリピートで構成される外部ドメイン、及び下流のシグナル伝達に必要であるトル／インターロイキン-1受容体（TIR）ドメインと呼ばれる細胞質ドメインによって特徴付けられるI型膜タンパク質である。TLR7及びTLR8は密接に関係しており、細胞内エンドソームでのそれらの所在及びリガンドを共有している。TLR7又はTLR8によるリガンドの認識に続いて、TLRドメイン含有アダプター分子であるミエロイド系分化初期応答遺伝子88（MyD88）の動員が起こる。TLR7／8及びMyD88の会合が、インターロイキン-1受容体関連キナーゼファミリーのメンバーの動員を刺激し、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）及びIκBキナーゼ（IKK）複合体の下流での活性化を引き起こす。TLR7及びTLR8のトル様受容体作動薬はマクロファージを活性化し、またいくつかの例では、腫瘍環境を腫瘍促進性環境から腫瘍抑制性（炎症性）環境へと変化させることができる。

DC、単球、マクロファージ、線維芽細胞、及びヒトケラチノサイトなどのいくつかの細胞型を活性化し、アポトーシスを誘導し、免疫原性の増大、並びに細胞傷害性T細胞リンパ球及び化学療法により媒介される殺傷に対する感作の増大を引き起こすことができるそれらの潜在的な能力を考慮すれば、TLRリガンドは、有効な抗腫瘍免疫応答を引き起こす潜在力を有する免疫応答調節剤の部類であると見なされる。さらに、TLR8リガンドは、CD8⁺Treg細胞の抑制性の機能を逆転させることが示されている(Kiniwa Y., et al., Clin Cancer Res 2007;13:6947-58)。さらに、TLR8リガンドの適用は、腫瘍環境を腫瘍促進性から腫瘍抑制性に変える腫瘍浸潤性Foxp3⁺Treg細胞の誘導をもたらした(Anz D. et al., Cancer Res. 2015;75:4483-93)。他方では、TLR活性化は、特定の例において、腫瘍細胞の増殖、侵襲性、及び／又は生存にとって有利であることが示されている(例えば、Bohnhorst J., et al., Leukemia 2006;20:1138-1144;及びJego G., et al., Leukemia 2006;20:1130-1137を参照されたい)。ある種のTLR7/8作動薬はまた、免疫抑制及び自己免疫疾患を誘発することが示されている(Chi H., et al. Frontiers in Pharmacology. 2017;8:304)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Zhao, G., et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 2014, 2:12

Kaczanowska, S., et al., J. Leukoc Biol. 2013 Jun;93(6):847-863

Lu, H. Frontiers in Immunology, March 2014, 5, 83

Kiniwa Y., et al., Clin Cancer Res 2007;13:6947-58

Anz D. et al., Cancer Res. 2015;75:4483-93

Bohnhorst J., et al., Leukemia 2006;20:1138-1144

Jego G., et al., Leukemia 2006;20:1130-1137

Chi H., et al. Frontiers in Pharmacology. 2017;8:304

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述の欠点の1つ以上を克服する新たなTLR作動薬及び改善されたTLR作動薬の開発における多大な試行が存在しているが、新たなより有効なTLR作動薬、並びに先行技術の化合物及び現存の治療方法の欠点を克服する一方で、炎症などの重大な不所望な副作用を誘発することなく有利な免疫応答も提供する関連治療レジメンを特定及び提供することが依然として必要とされている。本開示はこの及び他の必要性に対処しようとするものである。本明細書に記載されるTLR7/8作動薬は、独立した免疫療法(即ち、単剤での免疫療法)として使用することができるか、又は別の態様では、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬と併用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

第1の態様においては、本開示は、トル様受容体(「TLR」)作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートを対象としている。より詳しくは、そのコンジュゲートには、結合含有スペーサ部分(linkage-containing spacer moiety)

10

20

30

40

50

y) を介して、マルチアームで、水溶性の、非ペプチド性ポリマーに共有結合的に結合された、TLR7/8 作動薬化合物が含まれている。とりわけ、本明細書において提供されるコンジュゲートによって、例えば、腫瘍部位に対してコンジュゲートを局所投与することが可能となるが、その場合、そのコンジュゲートが、その腫瘍部位に滞留中に、局所的に抗腫瘍免疫を優先的に開始させるのに有効である。マルチアームコンジュゲートの構築が、特定の TLR7/8 作動薬、付着化学反応 (attachment chemistry)、及び投与モードとあいまって、コンジュゲートの、腫瘍の内部での滞留時間がより長くなり、そして腫瘍抗原提示及び T 細胞刺激を増大させるのに有効となる (即ち、CD8 T 細胞プライミングを向上させる結果となる)、即ち、先天免疫応答を誘発する結果を得るのに有効であり、しかも、活性が局所化されているために、有毒性副作用が最小限に抑えられる。

10

【0009】

マルチアームコンジュゲートのいくつかの実施態様においては、その TLR7/8 作動薬化合物が、小分子である。

【0010】

マルチアームポリマーコンジュゲートの、さらに1つ又は複数のさらなる実施態様においては、そのマルチアーム化された水溶性のポリマーには、3～約50本のポリマーアーム、又は3～約10本のポリマーアーム、又は3～6本のポリマーアームが含まれる。1つ又は複数の特定の実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートには、3、4、又は5本のポリマーアームが含まれる。1つ又は複数のさらなる実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートには、4本のポリマーアームが含まれる。

20

【0011】

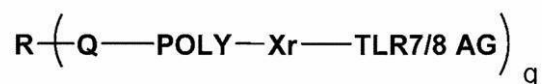
いくつかの実施態様においては、そのコンジュゲートには、マルチアームで、水溶性の非ペプチド性ポリマーのアームの1つ又は複数の末端に、共有結合的に結合された TLR7/8 作動薬が含まれる。1つ又は複数の実施態様においては、その TLR7/8 作動薬が、マルチアームで、水溶性の非ペプチド性ポリマーのアームのそれぞれの末端に、共有結合的に結合されている。さらに1つ又は複数の実施態様においては、マルチアームポリマーコンジュゲートのそれぞれのポリマーアームが同一である。

【0012】

いくつかの特定の実施態様においては、マルチアームポリマーコンジュゲートが、式 I で表される構造を有している：

30

【化1】



式I

[式中、Rは、それぞれのQと組み合わせさせて、3～約50個のヒドロキシル、チオール、又はアミノ基を担持するポリオール、ポリチオール、又はポリアミンの残基であり；それぞれのQは、酸素、硫黄、及び-NHから選択されるリンカー (例えば、それぞれポリオール、ポリチオール、又はポリアミンからの酸素、硫黄、又は窒素原子に相当する) であり；それぞれのPOLYは、独立して、水溶性の、非ペプチド性ポリマーであり；それぞれのX_rは、独立して、結合含有スペーサ部分であり；qは、3～約50の正の整数であり；そしてそれぞれのTLR7/8 AGは、トル様受容体7/8作動薬であるか、又はそれらの薬学的に許容される塩である。]

40

【0013】

さらに1つ又は複数のさらなる実施態様においては、その TLR7/8 作動薬が、(N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5c]キノリン-1-イル)

50

ブチル] メタンスルホンアミド、又は [8 - (3 - (ピロリジン-1-イルメチル) ベンジル) - 4 - アミノ - 2 - ブトキシ - 7, 8 - ジヒドロプテリジン - 6 (5H) - オン] である。

【0014】

いくつかの他の実施態様においては、その TLR 7 / 8 作動薬が、イミダゾキノリン化合物である。1つ又は複数の好ましい実施態様においては、その TLR 7 / 8 作動薬が、レシキモド (resiquimod) 若しくはイミキモド (imiquimod)、又はそれらの類似体、誘導体、若しくは異性体である。

【0015】

式 I に関連する、さらにいくつかのさらなる実施態様においては、R は、Q と組み合わさって、ポリオールに残基である。

10

【0016】

式 I に関連するいくつかの実施態様においては、それぞれの X_r が、独立して、安定な結合含有スペーサ部分である。さらにいくつかの代替の実施態様においては、それぞれの X_r が、独立して、放出可能な結合含有スペーサ部分である。

【0017】

式 I に関連するいくつかの追加の実施態様においては、q が、3 ~ 10 から選択される正の整数であるか、又は 3 ~ 6 から選択される正の整数であるか、又は 3、4、及び 5 から選択される正の整数であるか、又は 4 である。

【0018】

20

さらにいくつかのさらなる実施態様においては、その結合含有スペーサ部分には、チオエーテル、カルバメート、エステル、カーボネート、又は尿素官能基が含まれる。

【0019】

さらにいくつかの追加の実施態様においては、その結合含有スペーサ部分に、酵素で開裂させることが可能なペプチド結合が含まれる。

【0020】

式 I に関連する 1つ又は複数の特定の実施態様においては、 X_r が、式 II で表される：

$$\sim [X^1]_a - [Lr]_b - X^2 \sim$$

式 II

[式中、a は、ゼロ又は 1 であり (a がゼロなら、 X^1 は存在せず、そして a が 1 なら、 X^1 が存在していることを意味している) ; b は、ゼロ又は 1 であり (b がゼロなら、Lr は存在せず、そして b が 1 なら、Lr が存在していることを意味している) ; X^1 が存在しているのなら、それはスペーサであり ; Lr が存在しているのなら、それは結合基 (linkage) であり ; そして、 X^2 は、TLR 7 / 8 作動薬に共有結合的に直接結合された官能基である]。

30

【0021】

式 II に関連するいくつかの実施態様においては、「a」がゼロである。さらにいくつかの他の実施態様においては、「b」がゼロである。いくつかの追加の実施態様においては、「a」、「b」共にゼロである。さらにいくつかのさらなる実施態様においては、「a」が 1 である。さらにいくつかのさらなる実施態様においては、「b」が 1 である。さらにいくつかの追加の実施態様においては、「a」、「b」共に 1 である。

40

【0022】

式 II に関連するいくつかのさらなる実施態様においては、 X^1 が、 $-CH_2C(O)-$ である。

【0023】

式 II に関連するさらにいくつかの追加の実施態様においては、 X^2 が、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、及び $-NH$ からなる群より選択される。

【0024】

式 II に関連するさらにいくつかの追加の実施態様においては、Lr が、 $-(CR_xR_y$

50

） z －、及び $-\text{NH}(\text{CR}_x\text{R}_y)_z$ －からなる群より選択されるが、ここで、それぞれの R_x 及び R_y は、独立して、水素、低級アルキル、ハロ、及びハロ－置換された低級アルキルから選択され、そして z は、1～6の整数である。例えば、前述のもののいくつかの追加の特定の実施態様においては、 Lr が、以下のものから選択される： $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{CHCH}_3-$ 、 $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{NHCHCH}_3-$ 、 $-\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、及び $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2-$ 。

【0025】

コンジュゲートのマルチアームポリマー部分の1つ又は複数の実施態様においては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーが、ポリ（アルキレンオキシド）である。いくつかの特定の実施態様においては、そのポリ（アルキレンオキシド）が、ポリ（エチレンオキシド）である。

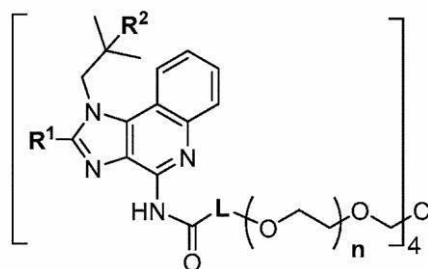
【0026】

いくつかの実施態様においては、「 q 個の」ポリマーアームのそれぞれの中に含まれている水溶性の、非ペプチド性ポリマーには、約1～約30個のモノマー性サブユニットが含まれる。さらにいくつかの他の実施態様においては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマー全体、即ちそのポリマーアームのそれぞれを含めたものが、約2,000ダルトン～約150,000ダルトンの分子量を有している。いくつかのある種の他の実施態様においては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマー全体で、約5,000ダルトン～約40,000ダルトンの分子量を有している。さらに追加の実施態様においては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマー全体で、約5,000ダルトン～約25,000ダルトンの分子量を有している。

【0027】

1つ又は複数の特定の実施態様においては、TLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートが、式IIIで表される式、又はそれらの薬学的に許容される塩若しくは立体異性体を有する：

【化2】



(式III)

〔式中、 L は、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CHF}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、単結合、又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-$ であり、それぞれの m は、独立して、1～5の整数（両端を含む）であり；それぞれの n は、独立して、40～350の整数（両端を含む）であり； R^1 は、水素

又は $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ であり；そして R^2 は、水素又はヒドロキシルである]。
式IIIに関連するさらにいくつかのさらなる実施態様においては、Lは、以下のものから選択される： $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHF}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、単結合、及び $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。

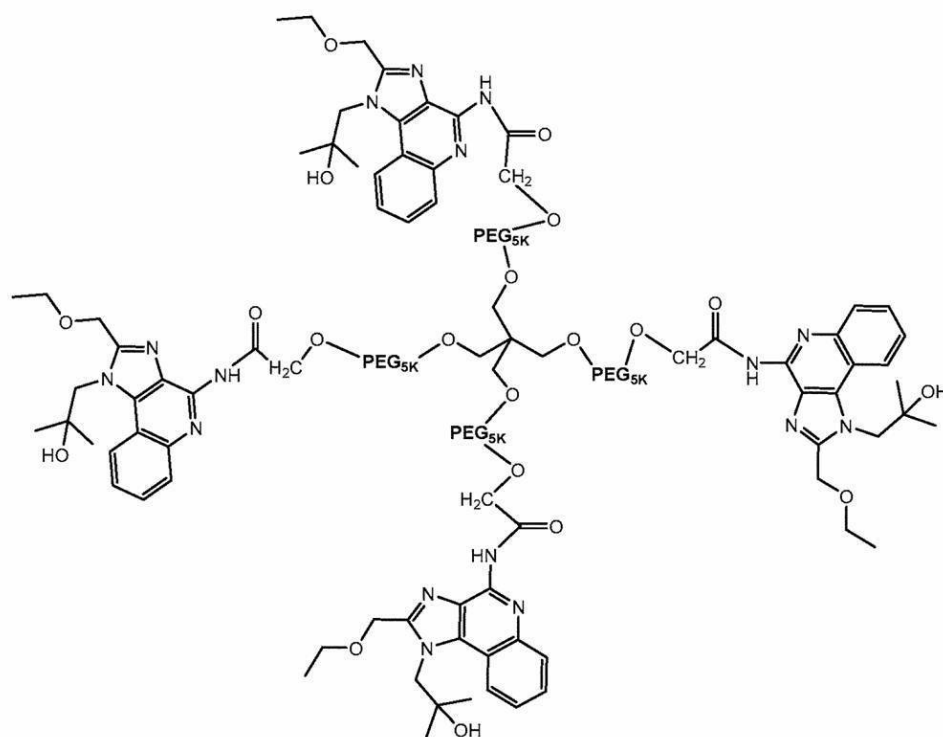
【0028】

式IIIのさらにいくつかのさらなる実施態様においては、それぞれのnが、独立して、100～250の整数（両端を含む）である。さらにいくつかの他の実施態様においては、 R^1 が水素であり、そして R^2 も水素である。さらにいくつかの追加の実施態様においては、 R^1 が、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ であり、そして R^2 がヒドロキシルである。

【0029】

1つ又は複数の特定の実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートが、以下の化合物1～10及び12～16、又はそれらの薬学的に許容される塩若しくは立体異性体から選択される：

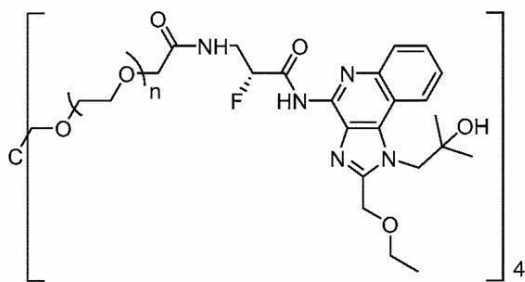
【化3】



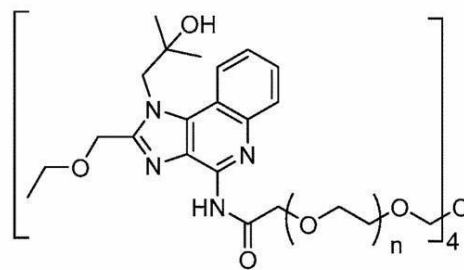
化合物1

ここで、それぞれのPEG5kは、式 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_y\text{CH}_2\text{CH}_2-$ （ここで、yは約113である）を有する直鎖状のポリエチレングリコールである；

【化 5】



化合物 4

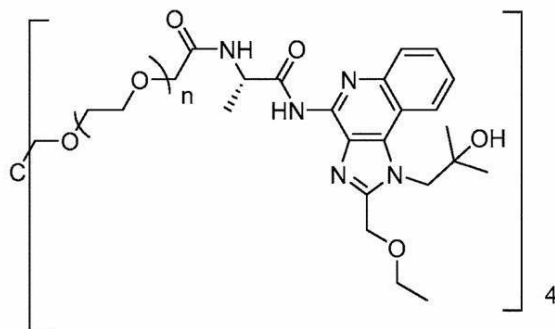


化合物 5

10

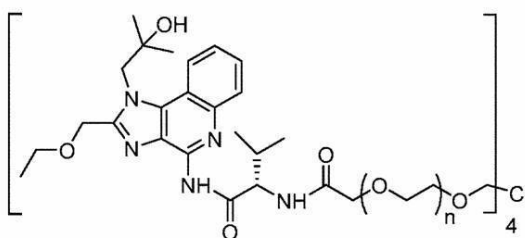


化合物 6

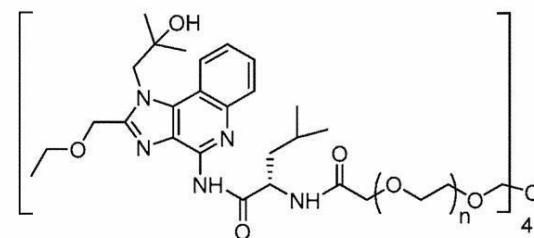


化合物 7

20

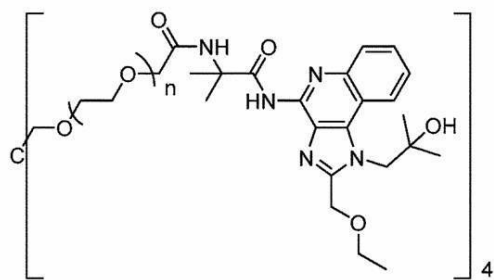


化合物 8

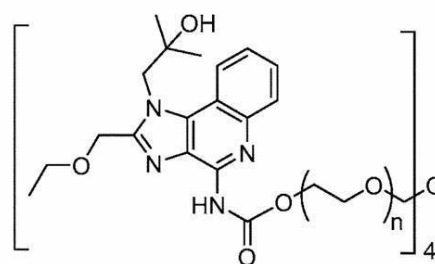


化合物 9

30



化合物 10

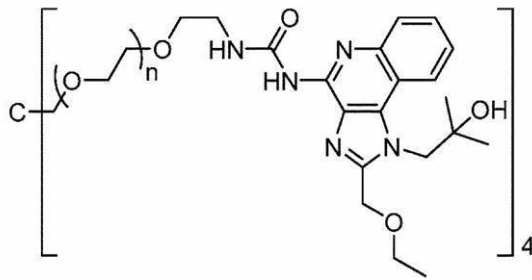


化合物 12

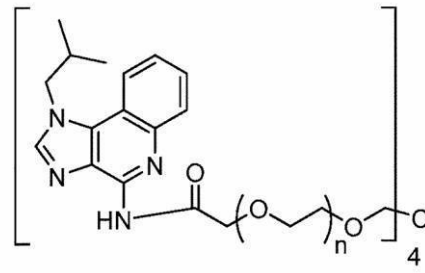
40

50

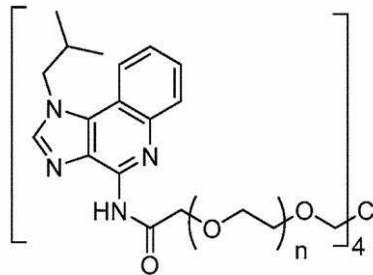
【化 6】



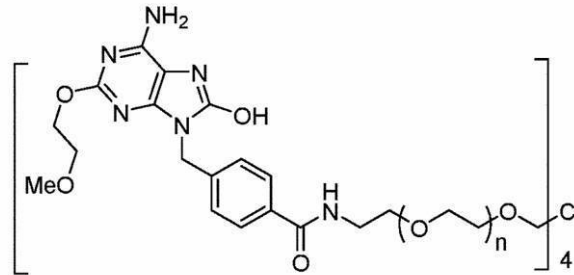
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

ここで、それぞれの n は、独立して、40～350の整数である。

【0030】

1つ又は複数の特定の実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートが化合物6である。

【0031】

さらに1つ又は複数の追加の実施態様に提供されているのは、本明細書に記載されたマルチアームポリマーコンジュゲート及び薬学的に許容される医薬品添加物 (excipient) を含む組成物である。

【0032】

さらにまた別の態様 (例えば、第2の態様) において開示されているのは、本明細書において提供されるマルチアームポリマーコンジュゲートを、それを必要としている患者に投与することを含む治療方法である。

【0033】

さらにまた別の、即ち第3の態様において開示されているのは、本明細書において提供される、TLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートの、癌の治療のための使用である。

【0034】

関連する、即ち第4の態様において開示されているのは、本明細書において提供されるTLR7/8作動薬のマルチアーム化ポリマーコンジュゲートの、癌の治療において有用な医薬品の製剤における使用である。

【0035】

さらに別な、即ち第5の態様において開示されているのは、安定、若しくは放出可能いずれかの結合含有スペーサ部分を介して、TLR7/8作動薬を、マルチアーム化された水溶性のポリマーに対して、共有結合を実施するのに好適な条件下で、共有結合的に結合させることによる、TLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートを調製するための方法である。

【0036】

さらに別の、即ち第6の態様において、両方ともに本明細書により詳細に記載される、

例えば、本明細書で開示される TLR7/8 のマルチアームポリマーコンジュゲートなどの TLR 作動薬と、IL-2R β 活性化量の長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬とを、癌を有する対象に投与することを含む方法が本明細書に提供される。ある実施形態において、その併用は、免疫系の活性化を促進する（例えば、CD8 T 細胞、CD11c + 及び CD8 + 樹状細胞、並びに好中球の促進を通して）のに有効であるが、一方でまた、免疫抑制を克服する（例えば、制御性 T 細胞、マクロファージ、及び単球の抑制にもかかわらず）。

【0037】

明確にしておくとして、投与順序に関して、TLR7/8 作動薬及び長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は、同時に又は連続的に、並びに任意の順序で、並びに同一及び又は異なる投与経路により、それぞれ免疫調節量で投与することができる。さらに、治療は、単一の治療サイクルを含み得、又は複数の治療サイクル（即ち、2 回以上）を含み得る。

10

【0038】

1 つ以上の実施形態において、TLR 作動薬は局所的に投与され、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は非経口的に投与される。1 つ以上の関連実施形態において、TLR 作動薬、例えば、TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートは、腫瘍部位に直接投与される。

【0039】

第 6 の態様に関連する 1 つ以上の実施形態において、TLR 作動薬、例えば、TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートは、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と別個に対象に投与する。

20

【0040】

さらに 1 つ以上の別の実施形態において、TLR 作動薬、例えば、TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートは、は、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬の投与前に対象に投与する。例えば 1 つ以上の実施形態において、TLR 作動薬と長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬とは治療の 1 日目に両方投与する。1 つ以上の代替実施形態において、TLR 作動薬を治療の 1 日目に投与し、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬を治療の 1 ~ 4 日目のいずれか 1 日に投与する。例えば長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は、1、2、3、又は 4 日目のいずれか 1 日に投与する。

【0041】

好ましい実施形態において、対象はヒト対象である。

30

【0042】

1 つ以上のさらなる実施形態において、癌は固形癌である。例えば癌は、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結腸直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌からなる群から選択される。

【0043】

一部の実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は、ポリエチレングリコールに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む。さらに一部のさらなる実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は、4、5 及び 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む。さらに一部の別の実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬は、平均約 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む。1 つ以上のさらなる実施形態において、アルデスロイキンに放出可能に共有結合しているポリエチレングリコールポリマーは、分枝状である。

40

【0044】

前述の態様又は実施形態のいずれか 1 つ以上に関するさらに一部の別の実施形態において、TLR 作動薬は、TLR7 作動薬又は TLR8 作動薬である。1 つ以上の実施形態において、TLR 作動薬は TLR7 作動薬である。さらに 1 つ以上の代替実施形態において、TLR 作動薬は TLR8 作動薬である。一部の実施形態において、TLR 作動薬は、長

50

時間作用型 T L R 7 作動薬又は長時間作用型 T L R 8 作動薬（例えば、マルチアームポリマーで修飾された T L R 7 作動薬又は T L R 8 作動薬）などの長時間作用型 T L R 作動薬である。

【0045】

さらに一部のさらなる実施形態において、長時間作用型 T L R 作動薬は、T L R 7 / 8 作動薬などの T L R 作動薬のマルチアーム水溶性ポリマーコンジュゲートである。さらに1つ以上の別の実施形態において、マルチアーム水溶性ポリマーは、T L R 作動薬、例えば、T L R 7 / 8 作動薬に安定的に共有結合している。1つ以上の代替実施形態において、マルチアーム水溶性ポリマーは、T L R 作動薬、例えば、T L R 7 / 8 作動薬に放出可能に共有結合している。

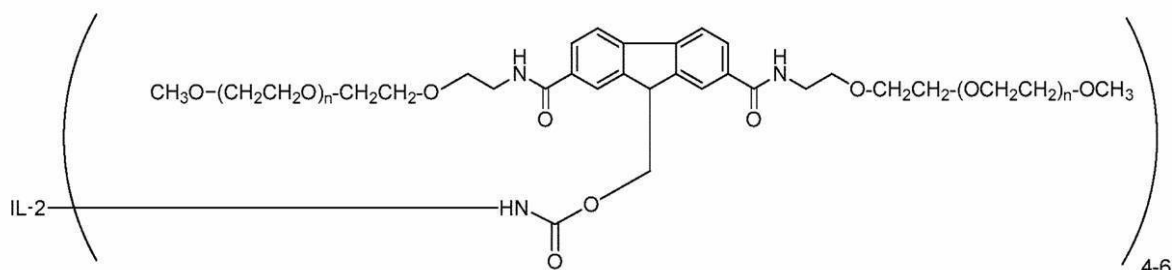
【0046】

さらに1つ以上の特定の実施形態において、長時間作用型 T L R 作動薬は、4つのポリマーアームのそれぞれの末端で安定的に又は放出可能に共有結合している T L R 作動薬分子を有する 4 - a r m - ペンタエリトリトリル系ポリエチレングリコールコンジュゲートである。

【0047】

一部の好ましい実施形態において、長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬は、以下の式：

【化7】

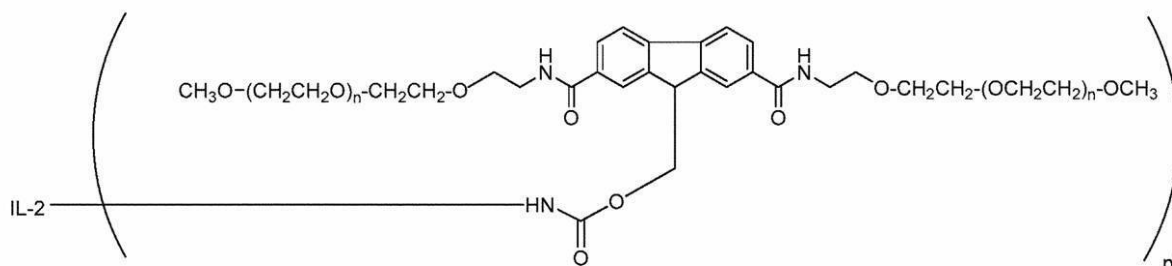


（式中、I L - 2 はインターロイキン - 2 であり、「n」は約 3 ～ 約 4 0 0 0 の整数である）に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を含む。

【0048】

一部の実施形態において、前の段落に記載される式を有する長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬は、以下の式：

【化8】



（式中、I L - 2 はインターロイキン - 2 であり、n' は 1、2、3、7 及び > 7 からなる群から選択される整数である）に包含される化合物、及びその薬学的に許容可能な塩を 1 0 % 以下（モル量基準）含む組成物中に含まれる。

【0049】

投与方法の一部の別の実施形態において、T L R 7 / 8 コンジュゲートは、以下の構造：

10

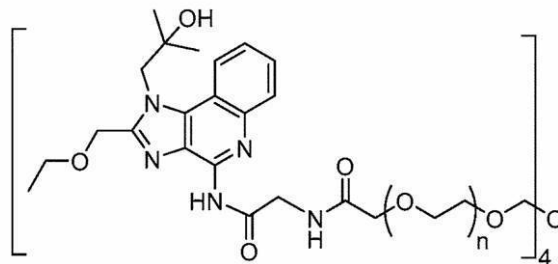
20

30

40

50

【化 9】



(式中、各 n は、独立して 40～350 の整数である) を有する。1 つ以上の関連実施形態において、ポリマーアームの各々における n の値は、実質的に同じである。一部の特定の実施形態において、4 つのポリマーアームの各々における n の値は、約 113 である。

【0050】

第 6 の態様の一部の実施形態において、本投与は、対象においてアブスコパル効果をもたらすのに有効である。

【0051】

上記に関連する一部の別の実施形態において、本投与は、マウス CT-26 結腸腫瘍モデルなどの好適な動物モデルにおいて評価される場合、ピヒクルのみの群における全ての対象が 0 % の生存率に達した日 (例えば、35 日～50 日) の後である治療の開始後の日において、単一の薬剤の各々 (即ち、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬及び TLR 作動薬) の単独投与について観察されるものを超える生存率パーセントを提供するのに有効である。

【0052】

さらに別の態様において、癌を有する対象の治療における使用に関する説明書が添付された、IL-2R β 活性化量の長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と自然免疫活性化量の TLR 作動薬、例えば、TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートを含むキットが提供される。

【0053】

キットの 1 つ以上の実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と TLR 作動薬とは対象への投与のための単一の組成物中に含まれ、単一の組成物は場合により、薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

【0054】

キットの一部の代替的实施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と TLR 作動薬とは別個の容器中に提供され、キットは TLR 作動薬と長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬とを別個に対象に投与するための説明書を含む。

【0055】

キットの一部の実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と TLR 作動薬との両方は固体形態である。1 つ以上の関連実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と長時間作用型 TLR 作動薬のそれぞれは、水性希釈剤中での再構成に好適な固体形態である。

【0056】

さらに 1 つ以上の別の実施形態において、長時間作用型 IL-2R β バイアス作動薬と TLR 作動薬との各々は薬学的に許容可能な賦形剤を各々含む別個の組成物内に含まれる。

【0057】

本コンジュゲート、組成物、方法などのさらなる実施形態は、以下の説明、実施例、及び特許請求の範囲から明らかであろう。上記及び下記の説明から理解することができるとおり、本明細書に記載されるあらゆる特徴、及びこのような特徴の 2 つ以上のあらゆる組み合わせが、本開示の範囲内に含まれるが、ただし、このような組み合わせに含まれる特徴が、相互に矛盾しないことを条件とする。加えて、任意の特徴又は特徴の組み合わせは

、任意の実施形態から具体的に除外され得る。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

結合を含むスペーサ部分を介して、マルチアーム水溶性非ペプチド性ポリマーに共有結合している T L R 7 / 8 作動薬を含むコンジュゲート。

(項目 2)

前記 T L R 7 / 8 作動薬が低分子である、項目 1 に記載のコンジュゲート。

(項目 3)

前記マルチアーム水溶性ポリマーが 3 ～ 約 5 0 のポリマーアームを含む、項目 1 又は項目 2 に記載のコンジュゲート。

(項目 4)

前記マルチアーム水溶性非ペプチド性ポリマーの前記アームの 1 つ以上の末端で共有結合している前記 T L R 7 / 8 作動薬を含む、項目 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

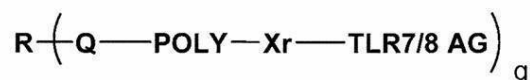
(項目 5)

前記マルチアーム水溶性非ペプチド性ポリマーの前記アームの各々の末端で共有結合している前記 T L R 7 / 8 作動薬を含む、項目 4 に記載のコンジュゲート。

(項目 6)

式 I :

【化 1】



式 I

(式中 :

R が Q と一緒になって、3 ～ 約 5 0 個のヒドロキシル、チオール、又はアミノ基を担持するポリオール、ポリチオール、又はポリアミンの残基であり ;

各 Q は、酸素、硫黄及び -NH から選択されるリンカーであり ;

各 P O L Y は、独立して、水溶性非ペプチド性ポリマーであり ;

各 X_r は、独立して、結合を含むスペーサ部分であり ;

q は、3 ～ 約 5 0 の正の整数であり ; 且つ

各 T L R 7 / 8 A G は、トル様受容体 7 / 8 作動薬である)

又はその薬学的に許容可能な塩形態に係る、項目 4 に記載のコンジュゲート。

(項目 7)

前記 T L R 7 / 8 作動薬が、(N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5 c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド又は[8-(3-(ピロリジン-1-イルメチル)ベンジル)-4-アミノ-2-ブトキシ-7, 8-ジヒドロプテリジン-6(5H)-オン]である、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 8)

前記 T L R 7 / 8 作動薬がイミダゾキノリン化合物である、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 9)

前記 T L R 7 / 8 作動薬がレシキモド又はイミキモドである、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 0)

R が Q と一緒になって、ポリオールの残基である、項目 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 1)

各 X_r が、独立して、安定な結合を含むスペーサ部分である、項目 6 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 2)

各 X_r が、独立して、放出可能な結合を含むスペーサ部分である、項目 6 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 3)

q が、3 ～ 1 0 の正の整数である、項目 6 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 4)

q が、3 ～ 6 の正の整数である、項目 6 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 5)

q が、3、4、及び 5 から選択される、項目 6 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 6)

q が 4 である、項目 6 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 7)

前記結合を含むスペーサ部分が、チオエーテル、カルバマート、エステル、カルボナート、又は尿素官能基を含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 8)

前記結合を含むスペーサ部分が、酵素切断可能なペプチド性結合を含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 8)

X_r が式 I I :

$$\sim [X^1]_a - [L_r]_b - X^2 \sim$$

式 I I

(式中：

a は、0 又は 1 であり；

b は、0 又は 1 であり；

X^1 は、存在する場合、スペーサであり；

L_r は、存在する場合、結合であり；且つ

X^2 は、前記 T L R 7 / 8 作動薬に直接共有結合している官能基である)
に係る、項目 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 1 9)

X^1 が存在する、項目 1 8 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 0)

X^1 が、 $-CH_2C(O)-$ である、項目 1 9 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 1)

X^1 が存在しない、項目 1 8 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 2)

X^2 が、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、及び $-NH$ からなる群から選択される、項目 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 2 3)

L_r が存在する、項目 1 8 ～ 2 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目 2 4)

L_r が、 $-(CR_xR_y)_z-$ 、及び $-NH(CR_xR_y)_z-$ からなる群から選択され、各 R_x 及び R_y が、独立して、水素、低級アルキル、ハロ、及びハロ置換低級アルキルから選択され、 z が 1 ～ 6 の整数である、項目 2 3 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 5)

10

20

30

40

50

L rが、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{CHCH}_3-$ 、 $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CHF}-$ 、 $-\text{NHCHCH}_3-$ 、 $-\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ 、及び $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2-$ から選択される、項目24に記載のコンジュゲート。

(項目26)

前記水溶性非ペプチド性ポリマーがポリ(アルキレンオキシド)である、項目1～25のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目27)

前記ポリ(アルキレンオキシド)がポリ(エチレンオキシド)である、項目26に記載のコンジュゲート。

(項目28)

「q」ポリマーアームの各々に含まれる前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約1～約30個の単量体サブユニットを含有する、項目1～27のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目29)

前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約2,000ダルトン～約150,000ダルトンの分子量を有する、項目1～28のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目30)

前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約5,000ダルトン～約40,000ダルトンの分子量を有する、項目1～29のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

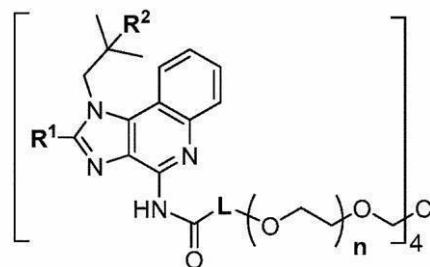
(項目31)

前記水溶性非ペプチド性ポリマーが、約5,000ダルトン～約25,000ダルトンの分子量を有する、項目1～30のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

(項目32)

式III:

【化2】



(式III)

に係る式を有する、項目1に記載のコンジュゲート

又はその薬学的に許容可能な塩若しくは立体異性体(式中:

Lは、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CHF}-$
 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-($
 $\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m$
 $m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m$
 $-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、単結合、又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2$
 $)_m-$ であり、

各mは、独立して、1～5の整数(両端を含む)であり;

各 n は、独立して、40～350の整数（両端を含む）であり；

R^1 は、水素又は $-CH_2-O-CH_2-CH_3$ であり；且つ

R^2 は、水素又はヒドロキシルである）。

（項目33）

L が、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CHF-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH(CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-C(CH_3)_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、単結合、又は $-NH-CH_2-CH_2-$ である、項目32に記載のコンジュゲート。

10

（項目34）

各 n が、独立して、100～250の整数（両端を含む）である、項目31又は項目32に記載のコンジュゲート。

（項目35）

R^1 が水素であり、且つ R^2 が水素である、項目32～34のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

（項目36）

R^1 が $-CH_2-O-CH_2-CH_3$ であり、且つ R^2 がヒドロキシルである、項目32～34のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

（項目37）

20

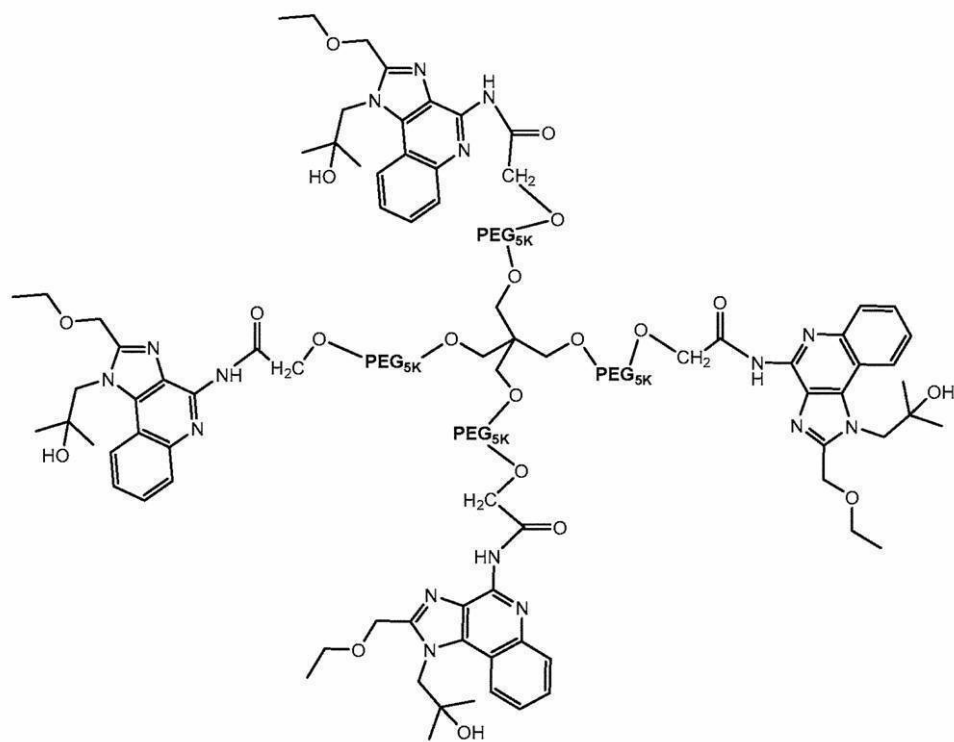
化合物1～10及び12～16：

30

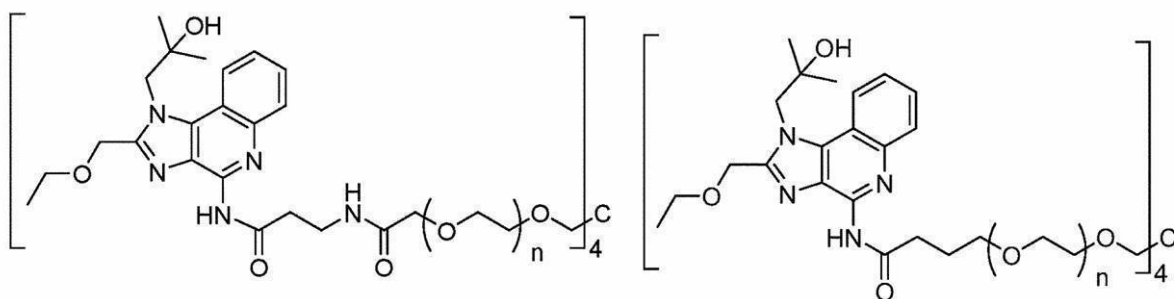
40

50

【化 3】



化合物 1



化合物 2

化合物 3

10

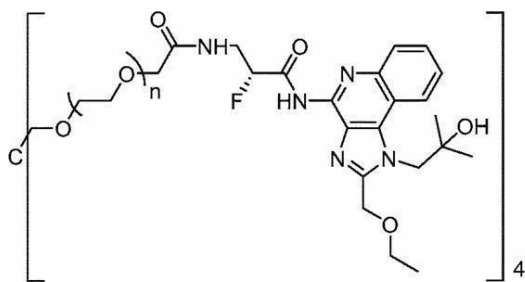
20

30

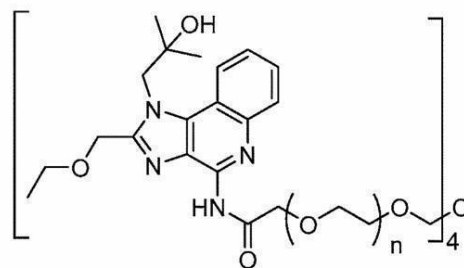
40

50

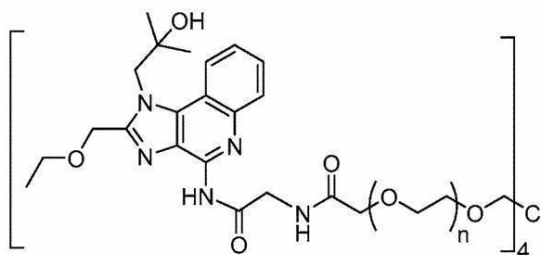
【化 4】



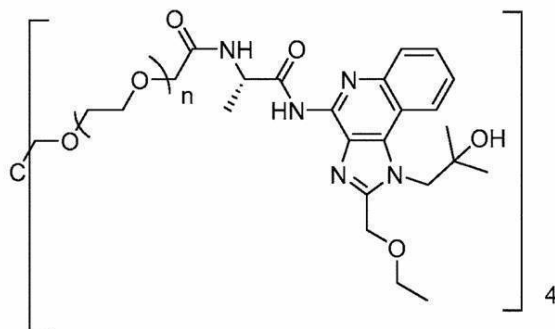
化合物 4



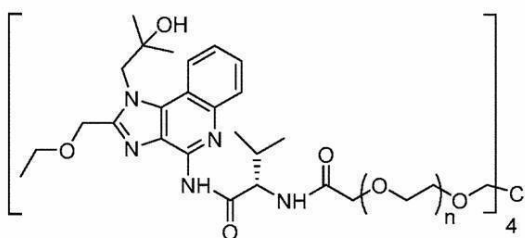
化合物 5



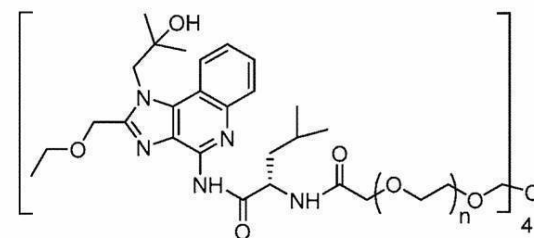
化合物 6



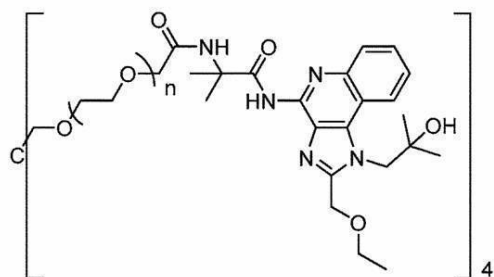
化合物 7



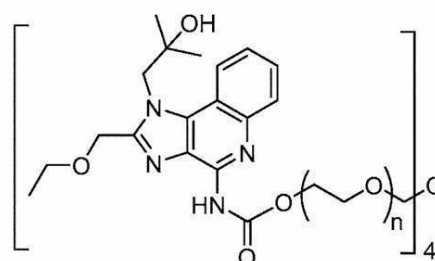
化合物 8



化合物 9



化合物 10



化合物 12

10

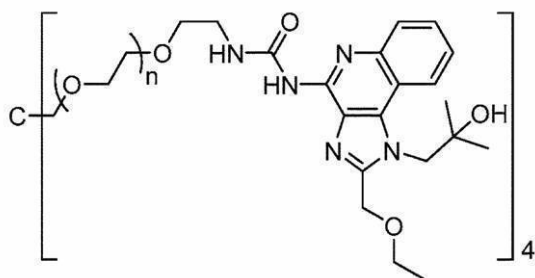
20

30

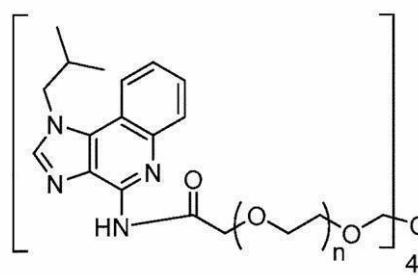
40

50

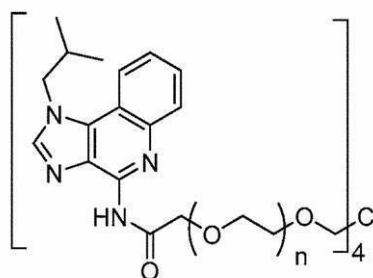
【化 5】



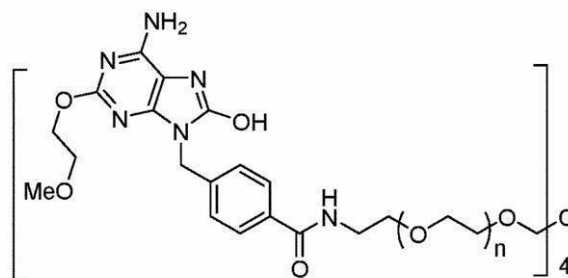
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

からなる群から選択されるコンジュゲート又はその薬学的に許容可能な塩若しくは立体異性体（式中、各 n は、独立して、40～350の整数である）。

（項目 38）

項目 1～37のいずれか一項に記載のコンジュゲート及び薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。

（項目 39）

項目 1～38のいずれか一項に記載のコンジュゲート又は組成物又は組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、治療の方法。

（項目 40）

癌の治療に使用するための、項目 1～37のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

（項目 41）

癌の治療に有用な薬剤の調製に使用するための、項目 1～37のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

（項目 42）

癌を有する対象に（i）結合を含むスペーサ部分を介してマルチアーム水溶性非ペプチド性ポリマーに共有結合している、TLR7／8受容体活性化量のTLR7／8作動薬を含む項目 1～37のいずれか一項に記載のコンジュゲート、及び（ii）IL-2R β 活性化量の長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬を投与することを含む、投与の方法。

（項目 43）

前記コンジュゲート及び前記長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬が、同時に又は連続的に、並びに任意の順序で、並びに同一及び／又は異なる投与経路により、それぞれ免疫調節量で投与される、項目 42に記載の方法。

（項目 44）

前記方法が、1回のサイクルの投与を含む、項目 43に記載の方法。

（項目 45）

前記方法が、2回以上のサイクルの投与を含む、項目 43に記載の方法。

（項目 46）

前記コンジュゲートを局所的に投与し、前記長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬

10

20

30

40

50

を非経口投与する、項目 4 2 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記コンジュゲートを、癌性腫瘍の部位に直接（即ち、腫瘍内）投与する、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記コンジュゲートを前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬と別個に前記対象に投与する、項目 4 2 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記コンジュゲートを前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬の投与前に前記対象に投与する、項目 4 2 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 5 0)

前記コンジュゲートと前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬とを治療の 1 日目に両方投与する、項目 4 2 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記コンジュゲートを治療の 1 日目に投与し、前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬を治療の 1 ～ 4 日目のいずれか 1 日に投与する、項目 4 2 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記対象がヒト対象である、項目 4 2 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記癌が固形癌である、項目 4 2 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 5 4)

前記固形癌が、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結腸直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌からなる群から選択される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬がポリエチレングリコールに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 4 2 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬が 4 つから、5 つ及び 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 5 5 に記載の方法。

30

(項目 5 7)

前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬が平均約 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

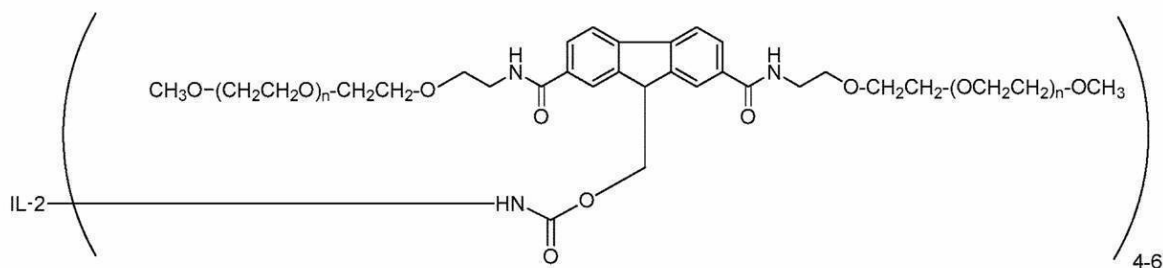
アルデスロイキンに放出可能に共有結合している前記ポリエチレングリコールポリマーが、分枝状である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記長時間作用型 IL-2 R β バイアス作動薬が、以下の式：

40

【化 6】



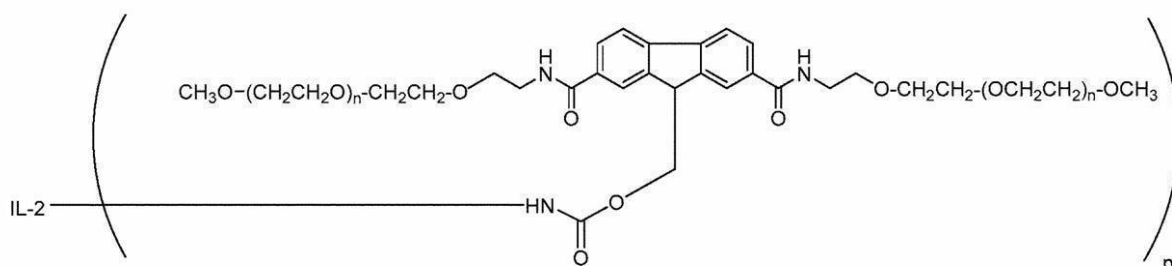
50

(式中、IL-2 はインターロイキン-2 であり、「n」は約3～約4000の整数である)に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を含む、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬が、以下の式

【化7】



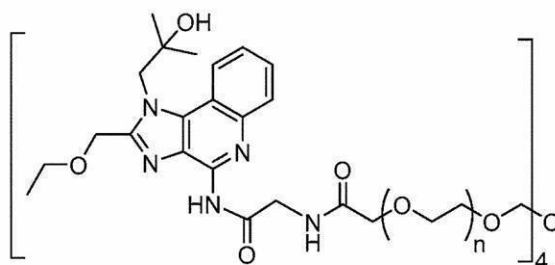
10

(式中、IL-2 はインターロイキン-2 であり、n' は1、2、3、7及び>7からなる群から選択される整数である)に包含される化合物、及びその薬学的に許容可能な塩を10%以下(モル量基準)含む組成物中に含まれる、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記コンジュゲートが、以下の構造：

【化8】



20

(式中、各nは、独立して40～350の整数である)を有する、項目42～60のいずれか一項に記載の方法。

(項目62)

前記ポリマーアームの各々におけるnの値が、実質的に同じである、項目61に記載の方法。

(項目63)

前記ポリマーアームの各々におけるnの値が、約113である、項目61に記載の方法。

(項目64)

前記投与が、前記対象においてアブスコパル効果をもたらすのに有効である、項目42～63のいずれか一項に記載の方法。

(項目65)

前記投与が、マウスCT-26結腸腫瘍モデルなどの好適な動物モデルにおいて評価される場合、ビヒクルのみの群における全ての対象が0%の生存率に達した日の後である治療の開始後の日において、治療効果が同等の用量で対象に併用して投与される場合に前記長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬又は前記コンジュゲートのいずれかの単独投与について観察されるものを超える生存率パーセントを提供するのに有効である、項目42～64のいずれか一項に記載の方法。

(項目66)

癌を有する対象の治療に使用するための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物が、IL-2Rβ活性化量の長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬と自然免疫活性化量の

30

40

50

項目 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを含み、癌を有する対象の治療に使用するための説明書を伴う、組み合わせ物。

(項目 6 7)

前記長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬が、ポリエチレングリコールに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 6 6 に記載の組み合わせ物。

(項目 6 8)

前記長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬が 4 つから、5 つ及び 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 6 7 に記載の組み合わせ物。

(項目 6 9)

前記長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬が平均約 6 つのポリエチレングリコールポリマーに放出可能に共有結合しているアルデスロイキンを含む、項目 6 8 に記載の組み合わせ物。

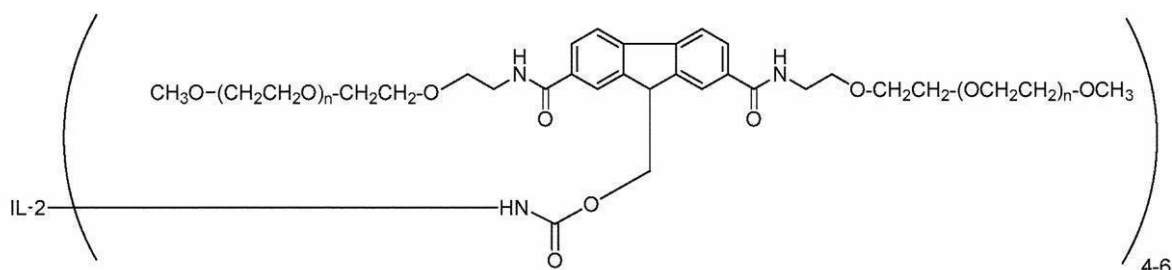
(項目 7 0)

アルデスロイキンに放出可能に共有結合している前記ポリエチレングリコールポリマーが、分枝状である、項目 6 7 ～ 6 9 のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 7 1)

前記長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬が、以下の式：

【化 9】



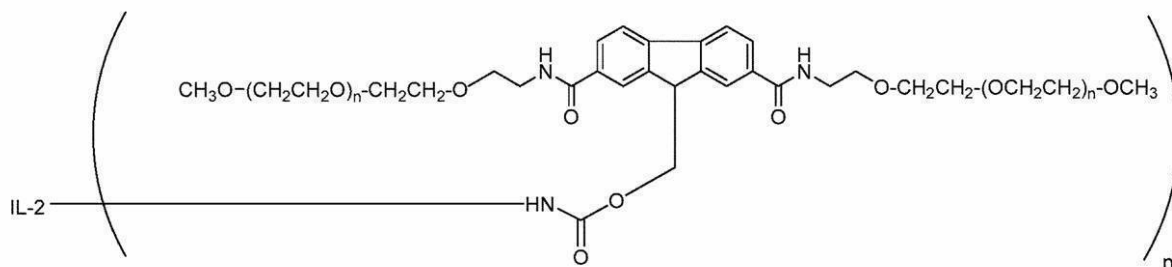
(式中、I L - 2 はインターロイキン - 2 であり、「n」は約 3 ～ 約 4 0 0 0 の整数である)

に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を含む、項目 6 6 に記載の組み合わせ物。

(項目 7 2)

前記長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬が、以下の式

【化 1 0】



(式中、I L - 2 はインターロイキン - 2 であり、n' は 1、2、3、7 及び > 7 からなる群から選択される整数である) に包含される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩を 1 0 % 以下 (モル量基準) 含む組成物に含まれる、項目 7 1 に記載の組み合わせ物。

(項目 7 3)

前記コンジュゲートが、以下の式：

10

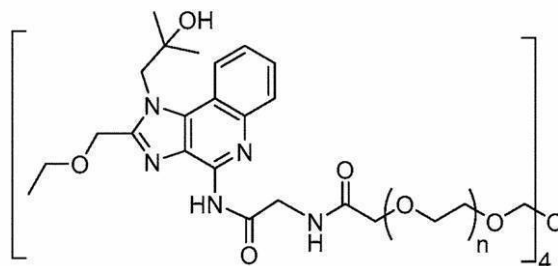
20

30

40

50

【化 1 1】



(式中、各 n は、独立して、40～350の整数である)を有する、項目66～72のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目74)

前記ポリマーアームの各々における n の値が、実質的に同じである、項目73に記載の組み合わせ物。

(項目75)

前記ポリマーアームの各々における n の値が、約113である、項目73に記載の組み合わせ物。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】実施例21に詳細に記載されるとおりの、第1の腫瘍(TLR作動薬注射部位)容積に対する、マウス結腸癌腫モデル(CT-26)において様々な介入(ビヒクル、例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2；例示的なTLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-N-R848；及びRSLAIL-2と4-arm-PEG20k-CM-N-R848の併用)で治療されたマウスの最初の投与後の日数を示すプロットである。

【図2】実施例21に詳細に記載されるとおりの、第2の腫瘍(遠隔性、非TLR作動薬注射部位)容積に対する、マウス結腸癌腫モデル(CT-26)において様々な介入で治療されたマウスの最初の投与後の日数を示すプロットである。

【図3】実施例21に詳細に記載されるとおりの、生存パーセントに対する、マウス結腸癌腫モデル(CT-26)において様々な介入(ビヒクル、例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2；例示的なTLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-N-R848；及びRSLAIL-2と4-arm-PEG20k-CM-N-R848の併用)で治療されたマウスの最初の投与後の日数を示すプロットである。

【図4ABCD】実施例23に詳細に記載されるとおり、RSLAIL-2とR848の併用治療が、治療開始後25日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中7頭、及び低投与量群において8頭の動物中ただ1頭の治療された腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらすことを示すプロットである。

【図4EFGH】実施例23に詳細に記載されるとおり、RSLAIL-2と化合物6の併用治療が、治療開始後32日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中9頭、及び(驚くべきことに)低投与量群において10頭の動物中10頭の治療された腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらすことを示すプロットである。

【図5ABCD】実施例23に詳細に記載されるとおり、RSLAIL-2とR848の併用治療が、治療開始後25日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中5頭、及び低投与量群において8頭の動物中ただ1頭の治療されていない腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらすことを示すプロットである。

【図5EFGH】実施例23に詳細に記載されるとおり、RSLAIL-2と化合物6の

併用治療が、治療開始後32日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中8頭、及び（驚くべきことに）低投与量群において10頭の動物中10頭の治療されていない腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらすことを示すプロットである。

【図6】実施例18に記載されるとおり、化合物6による治療後、それぞれ2時間及び6時間での腫瘍及び血漿のサイトカイン濃度の比較を提供するグラフである。全身的なサイトカインの濃度は、測定された各サイトカイン（IL-6、KC/GRO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-5、IFN- α 、IFN- γ 、IL-2及びIL-12p70）について腫瘍中の濃度より有意に低かった。

【発明を実施するための形態】

【0059】

定義

本明細書で使用する場合、単数形の冠詞「a」、「an」、及び「the」には、文脈的にそうではないとはっきり示されている場合以外は、複数の指示も含まれる。

【0060】

「水溶性の非ペプチド性ポリマー（water-soluble, non-peptidic polymer）」という用語は、室温で水の中に、少なくとも35%（重量）が可溶性である、好ましくは70%（重量）を超えて、そしてより好ましくは95%（重量）を超えて溶解するようなポリマーを指している。典型的には、未濾過の「水溶性の（water-soluble）」のポリマーの水性調製物が、濾過した後の同一の溶液で透過される光の量の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも95%の透過率を示す。しかしながら、その水溶性のポリマーが、水中へ少なくとも95%（重量）溶解するか、又は水に完全に溶解するのが、最も好ましい。「非ペプチド性（non-peptidic）」であるということに関しては、ポリマーが35%（重量）未満のアミノ酸残基しか有していない場合に、そのポリマーは非ペプチド性である。

【0061】

用語「単量体」、「単量体サブユニット」及び「単量体ユニット」は、本明細書では同義的に使用され、ポリマーの基本構造単位の1つを指す。ホモポリマーの場合、単一の繰り返し構造単位がポリマーを形成する。コポリマーの場合、2つ以上の構造単位があるパターンで又はランダムに繰り返すことでポリマーを形成する。好ましいポリマーはホモポリマーである。水溶性非ペプチドポリマーは、連続的に結合された1つ以上の単量体を含んで単量体の鎖を形成する。そのポリマーは、単一のモノマーから形成されるタイプ（即ち、ホモポリマーである）から、又は2種若しくは3種のモノマーのタイプ（即ち、コポリマーである）から形成させることができる。

【0062】

「ポリマー（polymer）」という用語は、本明細書で使用する時、約2個～約2000個以上、例えば約2個～約4000個のモノマーを含む分子である。特異的なポリマーとしては、例えば直鎖状、分岐状、又はフォーク状のような各種の形状を有するものが挙げられるが、それについては、以下においてさらに詳しく説明する。

【0063】

「PEG」又は「ポリエチレングリコール」は、本明細書で使用されるとき、任意の水溶性ポリ（エチレンオキシド）を包含することが意図される。特に指示されない限り、「PEGポリマー」又は任意のポリエチレングリコールは、実質的に全ての（好ましくは全ての）単量体サブユニットがエチレンオキシドサブユニットであるものであり、しかしながらポリマーは、例えばコンジュゲーション用に、個別のエンドキャッピング部分又は官能基を含有してもよい。PEGポリマーは、1つ以上の末端酸素が例えば合成変換中に置換されたか否かに応じて、以下の2つの構造のうち的一方を含み得る：「 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 」又は「 $-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$ 」。前述のとおり、PEGポリマーについては、変量（n）（即ち、繰り返し単位の数）は約2～2000、又は約2～4000の範囲であり、末端基及びPEG全体の構造は様々であり得る。PEGが、例

10

20

30

40

50

例えば、小分子の医薬品 (small molecule drug) に結合するための官能基をさらに含む場合には、その官能基は、PEGポリマーに共有結合的に結合されたときには、その結果として、酸素-酸素結合 (-O-O-)、ペルオキシド結合) を形成することはない。

【0064】

「エンドキャプト (end-capped)」又は「ターミナリーキャプト (terminally capped)」という用語は、本明細書においては、相互に交換可能に使用され、エンドキャッピング部分を有するポリマーの、ターミナル又はエンドポイントを指している。そのエンドキャッピング部分には、典型的には、ヒドロキシ基、又はC₁~20アルコキシ基、又はアルカアリアルオキシ基が含まれるが、それが必須という訳ではない。従って、エンドキャッピング部分の例としては、アルコキシ (例えば、メトキシ及びエトキシ)、ベンジルオキシ、さらにはアリール、ヘテロアリール、シクロ、ヘテロシクロなどが挙げられる。それに加えて、前述のものそれぞれの、飽和、不飽和、置換及び非置換の形態も考えられる。さらには、そのエンドキャッピング基が、シランであるということもまた可能である。そのエンドキャッピング基に、検出可能なラベルが含まれているのも、有利となりうる。そのポリマーが、検出可能なラベルを含むエンドキャッピング基を有している場合には、関心の対象となっているポリマー及び／又はそのポリマーが結合されている部分 (例えば、活性薬剤) の量や位置を、適切な検出器を使用することにより、調べることができる。そのようなラベルとしては、以下のものが挙げられる (それらに限定される訳ではない) : 蛍光剤、化学発光剤、酵素のラベリングに使用される部分、比色分析用部分 (例えば、色素)、金属イオン、放射性部分など。適切な検出器としては、光度計、フィルム、分光計などが挙げられる。それに加えて、エンドキャッピング基には、ターゲティング部分が含まれていてもよい。

【0065】

「ターゲティング部分 (targeting moiety)」という用語は、そのコンジュゲートをターゲティング領域に局在化させるのに役立つ、例えば細胞の中に入れたり、受容体と結合したりするのに役立つような分子構造を指している。ターゲティング部分としては、好ましくは以下のものが挙げられる: ビタミン、抗体、抗原、受容体、DNA、RNA、シアリルLewis X抗原、ヒアルロン酸、糖類、細胞特異性レクチン、ステロイド若しくはステロイド誘導体、RGDペプチド、細胞表面受容体のためのリガンド、血清成分、又は各種の細胞内若しくは細胞外受容体を対象としたコンビナトリアル分子。ターゲティング部分に、脂質又はリン脂質が含まれていてもよい。リン脂質の例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定される訳ではない: ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、及びホスファチジリエタノールアミン。これらの脂質は、ミセル又はリポソームなどの形態であってよい。ターゲティング部分には、検出可能なラベルをさらに含んでいてもよいし、或いはその代わりに、検出可能なラベルを、ターゲティング部分として役立ててもよい。ポリマーコンジュゲートが、検出可能なラベルを含むターゲティング基を有している場合、ポリマー、及び／又はそれに対してそのポリマーがコンジュゲートされた部分 (例えば、活性薬剤) の量及び／又は分布／位置を、適切な検出器を用いて測定することができる。そのようなラベルとしては、以下のものが挙げられる (それらに限定される訳ではない) : 蛍光剤、化学発光剤、酵素のラベリングに使用される部分、比色分析 (例えば、色素)、金属イオン、放射性部分、金の微粒子、量子ドットなど。

【0066】

水溶性ポリマー、例えばPEGに関する分子量は、数平均分子量又は重量平均分子量のいずれかとして表現することができる。特に示されない限り、本明細書の分子量への全ての言及は重量平均分子量を指す。分子量決定の両方、数平均及び重量平均は、ゲル浸透クロマトグラフィー又は他の液体クロマトグラフィー技術を使用して計測することができる。分子量値を計測する他の方法、例えば数平均分子量を決定するための末端基分析の使用若しくは束一性特性 (例えば凝固点降下、沸点上昇、又は浸透圧) の計測又は重量平均分

子量を決定するための光散乱技術、超遠心、若しくは粘度測定を使用することもできる。PEGポリマーは、典型的には、多分散性（即ちポリマーの数平均分子量及び重量平均分子量は等しくない）であり、好ましくは約1.2未満、より好ましくは約1.15未満、いっそうより好ましくは約1.10未満、さらによりいっそうより好ましくは約1.05未満、最も好ましくは約1.03未満の低多分散性値を有する。

【0067】

ポリマーの形状又は全体構造に関連して、「分岐状の(b r a n c h e d)」という用語は、分岐点から延びている2本以上のポリマーの「アーム(a r m)」を有するポリマーを指している。

【0068】

ポリマーの形状又は全体構造に関連して、「フォーク状の(f o r k e d)」という用語は、分岐点から（典型的には、1個又は2個以上の原子を介して）延びている2個以上の官能基を有するポリマーを指している。

【0069】

「分岐点(b r a n c h p o i n t)」という用語は、直鎖状の構造から、その点で、ポリマーが分岐状又はフォーク状となって1本又は複数の追加のアームとなる、1個又はそれ以上の原子を含む、分岐点(b i f u r c a t i o n p o i n t)を指している。

【0070】

「反応性(r e a c t i v e)」又は「活性化された(a c t i v a t e d)」という用語は、有機合成の通常の条件下で、容易に、或いは実用的な速度で反応する、官能基を指している。このものは、全く反応しないか、或いは、反応させるためには、強力な触媒や、非実用的な反応条件を必要とするような基（即ち「非反応性(n o n r e a c t i v e)」又は「不活性(i n e r t)」な基）とは対照的である。

【0071】

反応混合物中の分子の上に存在する官能基に関連して、「容易には反応しない(n o t r e a d i l y r e a c t i v e)」という用語は、その基が、その反応混合物の中で所望の反応を起こさせるのに有効な条件下でも、ほとんど反応せずに留まることを示している。

【0072】

「保護基(p r o t e c t i n g g r o u p)」は、ある種の条件下で、ある分子の中の特に化学反応性の高い官能系の反応を、防止又は遮断するような部分である。保護すべき化学的反応性の基、さらには採用される反応条件、並びに、その分子の中にそれ以外に存在している反応性の基又は保護基に応じて、その保護基を変えるのがよい。保護することが可能な官能基の例を挙げれば、カルボン酸基、アミノ基、ヒドロキシル基、チオール基、カルボニル基などである。代表的な保護基としては、以下のものが挙げられる：カルボン酸のためには、エステル（例えば、p-メトキシベンジルエステル）、アミド、及びヒドラジド；アミノ基のためには、カルバメート（例えば、tert-ブトキシルカルボニル）及びアミド；ヒドロキシル基のためには、エーテル及びエステル；チオール基のためには、チオエーテル及びチオエステル；カルボニル基のためには、アセタール及びケタール；など。そのような保護基は、当業者には公知であって、例えば次の文献に記載されている：T. W. Greene and G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Third Edition, Wiley, New York, 1999、及びその中で引用されている文献。

【0073】

「保護された形(p r o t e c t e d f o r m)」にある官能基とは、保護基を担持している官能基を指している。本明細書で使用する時、「官能基(f u n c t i o n a l g r o u p)」又はその各種の同義語には、それらの保護された形も包含される。

【0074】

「放出可能な結合(r e l e a s a b l e l i n k a g e)」という用語は、生理学的条件下でも解離する、比較的不安定な結合であって、その解離は、各種異なった機構の

10

20

30

40

50

いずれかによって起こさせることができる。放出可能な結合の例の1つのタイプは、例えば生理学的条件下で、加水分解可能な、即ち水との反応で解離する（即ち、加水分解される）結合であって、例えば芳香族アミド結合のようなアミド結合の加水分解である。結合が、水の中で加水分解される傾向は、2個の原子をつないでいる結合の一般的なタイプだけではなく、それらの原子に付着している置換基にも依存する。加水分解的に不安定、即ち弱い、適切な結合としては以下のものが挙げられるが、これらに限定される訳ではない：カルボン酸エステル、リン酸エステル、無水物、アセタール、ケタール、アシルオキシアルキルエーテル、イミン、オルトエステル、ペプチド、オリゴヌクレオチド、チオエステル、及びカーボネート。放出可能な結合としてはさらに、酵素的に放出可能な結合も挙げられるが、ここで「酵素的に放出可能な結合（enzymatically releasable linkage）」という用語は、1種又は複数の酵素によって解離される結合基を意味している。放出機構のさらなるタイプとしては、1,6-ベンジル脱離、β-脱離などが挙げられるが、これらに限定される訳ではない。ある種の結合が、安定であるか、或いは放出可能であるかを考える場合、そのような特性解析は、分子の全体構造、又は実体構造の範囲内で考えるべきである。ある種の場合においては、放出可能な結合を含むポリマーコンジュゲートは、プロドラッグとも呼ばれ、その場合、インビボで（即ち、生理学的条件下で）その放出可能な結合が解離して、その親薬物が放出される（又は活性薬剤に放出可能に付着されているポリマー部分の数に依存して、最終的には放出される）。共有結合的な「放出可能な（releasable）」結合は、例えば、有効成分例えばインターロイキン-2又はTLR作動薬例えばレシキモド（別名、R848）に共有結合的に結合されている、水溶性ポリマー例えばポリエチレングリコールの場合においては、生理学的条件下で解離し、それにより有効成分の部分から水溶性ポリマーを放出若しくは切り離すか、又は水溶性のポリマーから有効成分を切り離すようなものである。

【0075】

「安定な」結合（linkage）又は結合（bond）は、水中で（例えば、生理学的条件下）実質的に安定な化学結合、即ち、長期間にわたり生理学的条件下でいかなる認め得る程度の加水分解も受けない結合を指す。加水分解に安定な結合の例としては、限定はされないが、一般的に以下が挙げられ得る：炭素-炭素結合（例えば脂肪族鎖中の）、エーテル類、アミド類、ウレタン類、アミン類など。概して、安定な結合は、生理学的条件下で1日約1～2%未満の加水分解速度を呈するものである。代表的な化学結合の加水分解速度は、多くの標準的な化学テキストブックを参照することができる。

【0076】

「TLR7/8作動薬」（又は、「TLR作動薬」）は、トル様受容体7及び／又はトル様受容体8に対する作動薬である、各種の化合物である。

【0077】

「実質的に（substantially、又はessentially）」という用語は、ほぼ全部又は完全ということの意味を意味していて、例えば所定の量に対して、95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、なおより好ましくは99%以上、さらになおより好ましくは99.9%以上であり、最も好ましくは99.9%以上である。

【0078】

「アルキル（alkyl）」という用語は、長さ方向に約1～20個の原子が配列されている炭化水素鎖を指している。そのような炭化水素鎖は、（必ずという訳ではないが）好ましくは飽和していて、分岐鎖であっても、直鎖であってもよい。アルキル基の例としては、以下のものが挙げられる：メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、2-メチルブチル、イソプロピル、3-メチルペンチルなど。本明細書で使用する時、「アルキル」には、シクロアルキルも含まれるが、その場合3個以上の炭素原子が対象となっている。「アルケニル（alkenyl）」基は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含む、2～20個の炭素原子を有するアルキル基である。

【0079】

10

20

30

40

50

「置換された (substituted) アルキル」又は「置換された $C_q \sim r$ アルキル」(ここで、 q 及び r は、そのアルキル基の中に含まれる炭素原子の範囲を特定している整数である) という用語は、以下のものによって置換された、上記のアルキル基を表している：1 個、2 個、又は 3 個の、ハロ原子 (例えば、F、Cl、Br、I)、トリフルオロメチル、ヒドロキシ、 $C_1 \sim 7$ アルキル (例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、ブチル、 t -ブチルなど)、 $C_1 \sim 7$ アルコキシ、 $C_1 \sim 7$ アシルオキシ、 $C_3 \sim 7$ ヘテロシクリル、アミノ、フェノキシ、ニトロ、カルボキシ、アシル、シアノなど。置換されたアルキル基は、同一又は異なった置換基を用いて、1 回、2 回、又は 3 回置換されていてもよい。

【0080】

「低級 (lower) アルキル」という用語は、1～7 個の炭素原子を含むアルキル基を指しており、直鎖又は分岐鎖であってよく、例えば、メチル、エチル、 n -ブチル、 i -ブチル、 t -ブチルである。

【0081】

「低級 (lower) アルケニル」という用語は、少なくとも 1 個の炭素-炭素二重結合を有する 2～6 個の炭素原子の低級アルキル基を指している。

【0082】

「非干渉 (non-interfering) 置換基」とは、分子の中にあって、典型的には、その分子の中に含まれている他の官能基とは反応しない基である。

【0083】

「アルコキシ (alkoxy)」という用語は、 $-O-R$ 基を指しているが、ここで R は、アルキル又は置換されたアルキル、好ましくは $C_1 \sim C_{20}$ アルキル (例えば、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシなど)、好ましくは $C_1 \sim C_7$ アルキルである。

【0084】

「薬学的に許容可能な賦形剤」又は「薬学的に許容可能な担体」は、本明細書に記載される組成物中に含まれ得る成分であって、患者に重大な有害毒性効果を引き起こさない成分を指す。

【0085】

「アリール (aryl)」という用語は、14 個までの炭素原子を有する芳香族基を意味している。アリール基としては、フェニル、ナフチル、ビフェニル、フェナントレニル、ナフタレニルなどが挙げられる。「置換されたフェニル」及び「置換されたアリール」という用語は、それぞれ、ハロ (F、Cl、Br、I)、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アルキル (例えば、 $C_1 \sim 6$ アルキル)、アルコキシ (例えば、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ)、ベンジルオキシ、カルボキシ、アリールなどから選択された 1 個、2 個、3 個、4 個、又は 5 個で置換された (例えば、1-2、1-3、又は 1-4 置換基) のフェニル基及びアリール基を表している。

【0086】

例に挙げたコンジュゲート、有効成分、又は、本明細書に記載されたような、その他の好適に適合することが可能な化学部分には、適用可能である限りにおいて、それらの類似体、異性体、多形、溶媒和化合物、及び薬学的に許容される塩の形も包含されているものとする。

【0087】

「薬理学的有効量」、「生理学的有効量」、及び「治療有効量」という用語は、本明細書においては相互に交換可能に使用され、血流において、又は目標としている組織において、所望の応答が得られるような、活性薬剤及び／又はコンジュゲートの所望のレベルを与えるのに必要とされる、活性薬剤、典型的にはポリマーコンジュゲートの量を意味している。正確な量は、例えば、具体的な活性薬剤、その組成物の成分及び物理的特性、意図している患者の母集団、患者の事情など、多くの因子に依存する可能性があるが、当業熟練者であれば、本明細書において提供される情報及び、関連の文献から入手可能な情報に基づいて、容易に決めることができるであろう。

10

20

30

40

50

【0088】

本明細書に記載された塩基性反応剤又は酸性反応剤には、中性のもの、荷電したもの、及びそれらの各種の相当する塩の形が含まれる。

【0089】

用語「患者」、又は「対象」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に提供されたとおりの化合物又は組成物又は併用の投与により予防又は治療することのできる病態、例えば癌に罹患している又はそれに罹り易い生物を指し、ヒト及び動物の両方が含まれる。対象には、限定されるものではないが、哺乳動物（例えばマウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）が含まれ、好ましくはヒトである。

【0090】

「場合による (optional)」又は「場合によっては (optionally)」という用語は、その後に記述されている状況が、必ずしも起きる必要がないということを意味していて、そのため、その記述には、その状況が起きる場合と、それが起きない場合との両方が含まれている。

【0091】

「小分子 (small molecule)」という用語は、本明細書で使用するときに、典型的には、約1000未満の分子量の有機化合物を指している。

【0092】

概要

本明細書に記載されるマルチアーム水溶性ポリマーTLR7/8作動薬コンジュゲートは、新規の潜在的に安全であり且つ非常に有効な抗癌療法を統合する薬剤設計におけるいくつかの革新的な進歩及び治療の理論的根拠を取り入れている。それらは、自然免疫系を活性化することができ、且つTLR作動薬化合物に対する放出可能な結合で構成される場合、癌性腫瘍などの注射された組織において活性のTLR7/8作動薬を放出及び保持するのに有効である。このコンジュゲートは、腫瘍内に投与される場合、細胞障害性T細胞に対する局所性の腫瘍抗原提示を活性化し、腫瘍環境における免疫抑制性のシグナルを克服するのに有効である。マルチアーム水溶性ポリマー骨格は、注射された腫瘍部位で主に保持されている注射されたコンジュゲートに寄与し、それにより、TLR7/8作動薬に依存する免疫活性化が、全身性の活性を低減しながら治療部位で最高になる。従来の全身性の低分子TLR作動薬を超えるこのような薬剤設計の重要な利点は、治療される腫瘍での局所的な薬剤活性及び潜在的な毒性を低減する全身性の暴露の減少である。

【0093】

加えて、マルチアーム水溶性ポリマーTLR7/8作動薬コンジュゲートが長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬と併用投与される本明細書で提供されたとおりの併用治療は、局所TLR7/8作動薬ポリマーコンジュゲート誘導性抗腫瘍自然免疫活性化の固有の相乗作用及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬による細胞傷害性T細胞の全身性の腫瘍内増殖に由来する。本明細書に記載されたとおり、多発性同系腫瘍モデルの研究は、二重の療法薬併用の薬物動態特性及び薬力学特性の最適化が、天然の病原菌に誘導される免疫応答と同様に抗腫瘍の自然免疫活性化及び適応免疫活性化を首尾良く共役させる、非常に有効な併用療法をもたらすことを示す。両方の治療成分が、免疫系の補完的な部門を活性化して、全身的な腫瘍排除に必要な全体の免疫活性化カスケードに従事させる。本明細書に記載される併用療法は、単独で投与されるいずれかの薬剤よりも安全であり、且つより効果的な抗腫瘍免疫応答を相乗的に誘発するために設計される。これら及び他の特徴は、以下の節で明らかになり、詳細に記載される。

【0094】

TLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲート

先に述べたように、本明細書において提供されるのは、トル様受容体（「TLR」）作動薬化合物、即ちTLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートである。いくつかの特定の実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートが、式Iで表される構造を有している：

10

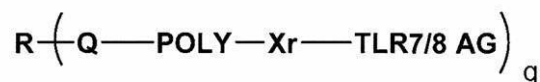
20

30

40

50

【化 10】



式I

〔式中、Rは、それぞれのQと組み合わせ、それぞれ3～約50個のヒドロキシル、チオール、又はアミノ基を担持するポリオール、ポリチオール、又はポリアミンの残基であり；それぞれのQは、独立して、酸素、硫黄、及び-NHから選択されるリンカー（例えば、それぞれポリオール、ポリチオール、又はポリアミンからの酸素、硫黄、又は窒素原子に相当する）であり；それぞれのPOLYは、独立して、水溶性の、非ペプチド性ポリマーであり；それぞれのX_rは、独立して、結合含有スペーサ部分であり；qは、3～約50の正の整数であり；そしてそれぞれのTLR7/8 AGは、トル様受容体7/8作動薬であり、ここで、式Iには、それらの薬学的に許容される塩も包含される〕。ここで、式Iのマルチアームポリマーコンジュゲートの各種の構成要素それぞれについて、考えてみることにしよう。

【0095】

式Iに関しては、1つ又は複数の実施態様においては、そのポリオール、ポリチオール又はポリアミンの残基である、「R」は、このマルチアームポリマーに関連して使用した場合、約3～約150個の炭素原子（例えば、約3～約50個の炭素原子）を有する、有機ラジカル含有部分である。いくつかの好ましい実施態様においては、Rは、Qと組み合わせ、即ち(R-Q)_qとして取り上げれば、これは、ポリオール、ポリアミン又はポリチオールのコア分子(core molecule)であって、3～約25個の炭素原子、又は3～約10個の炭素原子、例えば3、4、5、6、7、8、9、又は10個の炭素原子が含まれている。その残基には、Qで定義されたものに加えて、1個のさらなるヘテロ原子（例えば、O、S、又はN）が含まれていてもよい。ポリオール（又はポリアミン又はポリチオール）に関連して、「残基(residue)」という用語は、その親分子から、その末端の1個又は複数の水素原子を取り去って、POLYを付着させるのに適した有機ラジカルを与えたものを意味している。

【0096】

先にも説明したように、ポリオール、ポリチオール又はポリアミンの残基、(R-Q)_qは、本明細書において提供されるマルチアームコンジュゲートのための、枝分かれの基本を形成するものであって、相当するポリオール、ポリチオール又はポリアミンに由来している。1つ又は複数の実施態様においては、その相当するポリオール、ポリチオール、又はポリアミンは、それぞれ、ポリマーを付着させるのに利用することができる、少なくとも3個のヒドロキシル基、チオール基、又はアミノ基を担持している。「ポリオール(polyol)」は、3個以上のヒドロキシル基を含む分子である。「ポリチオール(polythiol)」は、3個以上のチオール基を含む分子である。「ポリアミン(polyamine)」は、3個以上のアミノ基を含む分子である。

【0097】

1つ又は複数の実施態様においては、そのポリオール、ポリアミン、又はポリチオールには、典型的には、それぞれ、3～約25個のヒドロキシル基、又はアミノ基、又はチオール基、例えばそれぞれ3～約10個（即ち、3、4、5、6、7、8、9、又は10個）のヒドロキシル基、アミノ基、又はチオール基、好ましくはそれぞれ、3～約8個（即ち、3、4、5、6、7、又は8個）のヒドロキシル基、アミノ基、又はチオール基が含まれる。1つ又は複数の実施態様においては、それぞれのヒドロキシル基、チオール基、又はアミノ基の間の原子の数は、変化するであろうが、それぞれのヒドロキシル基、チオール基、又はアミノ基の間に、約1～約20個（例えば、1～約5個）の、間に挟まる原子例えば炭素原子の長さが、一例として挙げられる。間に挟まるコア原子とその長さにつ

いて言えば、 $-CH_2-$ は、1個の介在原子の長さと考えられるし、 $-CH_2CH_2-$ は、2個の原子の長さと考えられる。

【0098】

ポリオール及びポリアミンの例では、それぞれ、(ラジカル) $-(OH)_q$ 及び (ラジカル) $-(NH_2)_q$ 構造を有しているが、ここで (ラジカル) は、有機含有ラジカルに相当し、 q は、3～約50の正の整数である。先に述べたように、式Iにおける変数「 Q 」は、 R と組み合わせ、典型的には、本明細書に記載されたようなコアの有機ラジカルの残基を表しているということに、注目されたい。即ち、ポリオール、ポリチオール、及びポリマーアミンと、特に名前で記述したときに、これらの分子は、マルチアームポリマー含有構造の中に取り込まれるより前のそれらの形で参照されている（即ち、それらの親分子として参照されている）。即ち、好ましい有機コア分子を、特に名前で記述したときに、そのコア分子は、例えば、1個又は複数のプロトンを除いた後のそれらのラジカルの形態というよりは、その前駆体の形態で記述されている。そのため、例えば、その有機コアラジカルがペンタエリスリトールから誘導されたとすると、その前駆体ポリオールは、構造 $C(CH_2OH)_4$ を有しているが、その有機コアラジカルは、 Q と組み合わせ、 $C(CH_2O-)_4$ に相当する（ここで、 Q は、 O である）。従って、例えば、式Iのコンジュゲートで、 Q と組み合わせ、 R が、ポリオールの、ペンタエリスリトール $C(CH_2OH)_4$ の残基であり、 Q と組み合わせ、 R が、「 $C(CH_2O-)_4$ 」に相当して、それにより、マルチアームポリマーコンジュゲートの中の「 q 個の」ポリマーアームのそれぞれが、ペンタエリスリトールコア即ち残基のそれぞれの酸素原子から伸びていることになるであろう。

【0099】

ポリオールの例としては、1～10個の炭素原子及び3～10個のヒドロキシル基を有する脂肪族ポリオール、例えば、トリヒドロキシアルカン、テトラヒドロキシアルカン、ポリヒドロキシアルキルエーテル、ポリヒドロキシアルキルポリエーテルなどが挙げられる。脂環式ポリオールとしては、以下のような、直鎖状又は閉環糖類、及び糖アルコールが挙げられる：マンニトール、ソルビトール、イノシトール、キシリトール、クエブラキトール、トレイトール、アラビトール、エリスリトール、アドニトール、ズルシトール、ファコース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、フルクトース、ソルボース、マンノース、ピラノース、アルトロース、タロース、タギトース、ピラノシド、スクロース、ラクトース、マルトースなど。脂肪族ポリオールの追加の例としては、グルコース、リボース、マンノース、ガラクトース、及び関連の立体異性体の誘導体が挙げられる。芳香族ポリオールを使用することも可能であり、例えば以下のものが挙げられる：1, 1, 1-トリス(4'-ヒドロキシフェニル)アルカン、例えば1, 1, 1-トリス(4-ヒドロキシフェニル)エタン、2, 6-ビス(ヒドロキシアルキル)クレゾールなど。使用することが可能なその他のコアポリオールとしては、以下のものが挙げられる：ポリヒドロキシクラウンエーテル、シクロデキストリン、デキストリン、及びその他の炭水化物（例えば、単糖類、オリゴサッカライド、及び多糖類、デンプン、並びにアミラーゼ）。

【0100】

ポリオールの例としては、以下のものが挙げられる：グリセロール、トリメチロールプロパン、ペンタエリスリトール、ジペンタエリスリトール、トリペンタエリスリトール、グリセロールのエトキシ化した形、トリメチロールプロパン、ペンタエリスリトール、ジペンタエリスリトール、トリペンタエリスリトール。さらに、好ましいのは、還元糖類例えば、ソルビトール及びグリセロール、オリゴマー例えば、ジグリセロール、トリグリセロール、ヘキサグリセロールなどである。21個の利用可能なヒドロキシル基を有している、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンを使用して、21本アームのポリマーを合成することができる。それらに加えて、平均して24個のヒドロキシル基を有するポリグリセロールもまた、ポリオールの例として挙げることができる。

【0101】

ポリアミンの例としては、以下のものが挙げられる：脂肪族ポリアミン例えば、ジエチレントリアミン、N，N'，N''-トリメチルジエチレントリアミン、ペンタメチルジエチレントリアミン、トリエチレンテトラアミン、テトラエチレンペンタアミン、ペンタエチレンヘキサアミン、ジプロピレントリアミン、トリプロピレンテトラアミン、ビスー（3-アミノプロピル）-アミン、ビスー（3-アミノプロピル）-メチルアミン、及びN，N-ジメチル-ジプロピレン-トリアミン。使用することが可能な天然由来のポリアミンとしては、プトレッシン、スペルミジン、及びスペルミンが挙げられる。使用するのに適した、多くの好適なペンタアミン、テトラアミン、オリゴアミン、及びペンタアミジン類似体が、Bacchi et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1) (2002) : 55～61に記載されている（参照することにより、本明細書に取り入れたものとする）。

10

【0102】

以下に示したのは、ポリオールの残基に相当する、説明のための構造である（それぞれの構造は、対応するヒドロキシル基から誘導された酸素原子（「O」）を用いて示されているが、それぞれポリチオール又はポリアミンの相当する残基を示すには、それぞれの「O」を、硫黄（「S」）又はNHと置きかえることが可能である）。ここで注意すべきは、以下で示す残基は、以下に示した酸素原子（又はその他の適切なヘテロ原子）の数に相当する数のアームを有するマルチアームポリマーコンジュゲートを得るための、Qと組み合わせたRに相当する、式Iのコンジュゲートの観点から理解するということである。

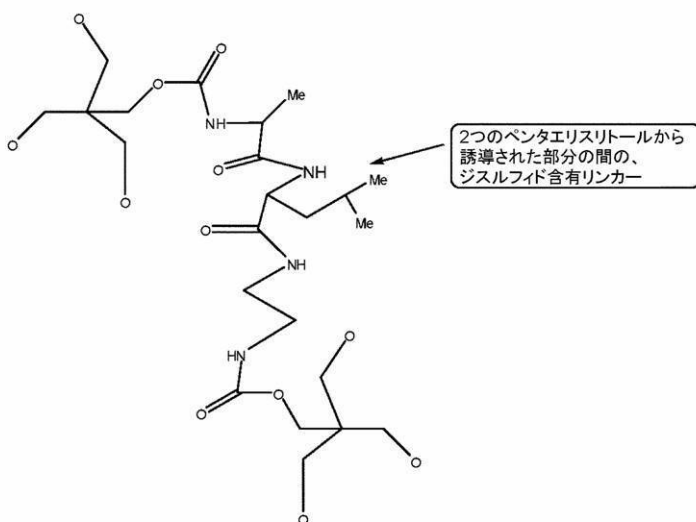
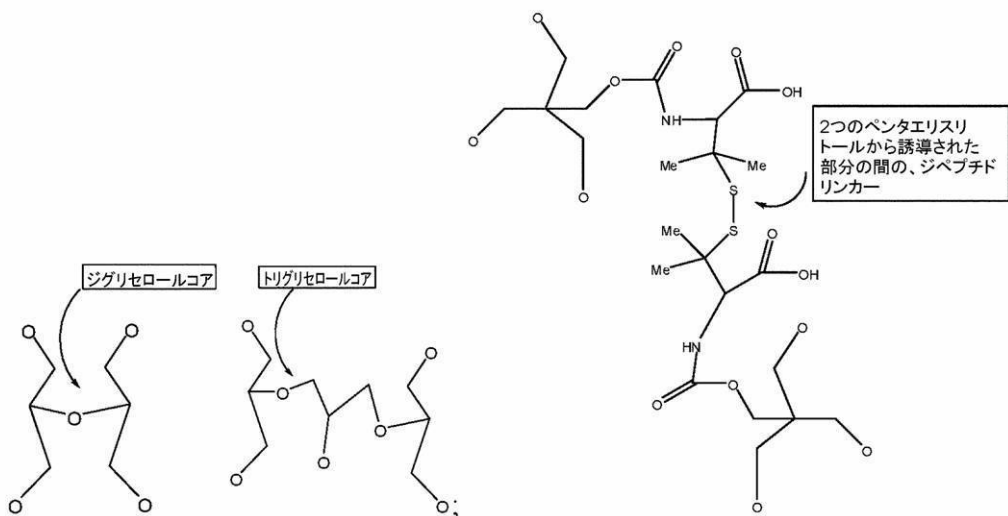
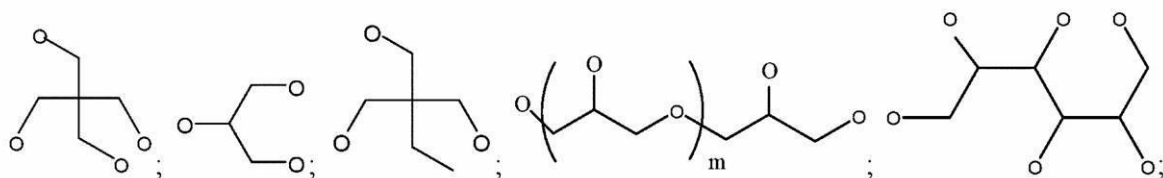
20

30

40

50

【化 1 1】



式中、 m は、0～40の正の整数〔例えば、0～10、例えば、0～5（即ち、0、1、2、3、4、5）〕である。

【0103】

水溶性の、非ペプチド性ポリマー、「POLY」

マルチアームポリマーコンジュゲートには、水溶性の、非ペプチド性ポリマーが含まれる。広く各種のポリマーを使用することが可能であり、本明細書において提供される構造は、水溶性のポリマーのタイプ（例えば、ポリエチレンオキシドか、ポリオキサゾリンか）又はサイズ（例えば、サイズが、2～4,000個のモノマー）に関する限定を受けるものではない。

【0104】

タイプに関しては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーは、モノマーの一連の繰り返しと理解するべきであるが、ここで、そのモノマーのタイプが、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーのタイプを規定している。モノマーの例としては、以下のものが挙げられるが、これらの限定される訳ではない：アルキレンオキシド、例えばエチレンオキシド又は

10

20

30

40

50

プロピレンオキシド；オレフィン系アルコール、例えばビニルアルコール、1-プロペノール又は2-プロペノール；ビニルピロリドン；ヒドロキシアルキルメタクリルアミド及びヒドロキシアルキルメタクリレート（ここで、それぞれの場合において、アルキルは、好ましくはメチルである）； α -ヒドロキシ酸、例えば乳酸又はグリコール酸；ホスファゼン、オキサゾリン、炭水化物、例えば単糖類、アルジトール例えば、マンニトール；並びにN-アクリロイルモルホリン。1つ又は複数の実施態様においては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーが、この群から選択される2種のモノマーからのコポリマーであるか、又はより好ましくは、この群から選択される1種のモノマーからのホモポリマーである。コポリマーに関して言えば、それにはブロックコポリマーも含まれるが、コポリマーの中の2種のモノマーのタイプが、同一のモノマータイプ、例えば、2種のアルキレンオキシド、例えば、エチレンオキシドとプロピレンオキシドであってもよい。

【0105】

サイズに関しては、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーは、比較的小さくてもよいし、或いは、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーが比較的大きくてもよい。

【0106】

POLY、即ちそれぞれのポリマーアームに関連して言えば、比較的小さな水溶性の、非ペプチド性ポリマーが存在しているような実施態様においては、分子量の例としては、次の値が挙げられる：約2000ダルトン未満；約1500ダルトン未満；約1450ダルトン未満；約1400ダルトン未満；約1350ダルトン未満；約1300ダルトン未満；約1250ダルトン未満；約1200ダルトン未満；約1150ダルトン未満；約1100ダルトン未満；約1050ダルトン未満；約1000ダルトン未満；約950ダルトン未満；約900ダルトン未満；約850ダルトン未満；約800ダルトン未満；約750ダルトン未満；約700ダルトン未満；約650ダルトン未満；約600ダルトン未満；約550ダルトン未満；約500ダルトン未満；約450ダルトン未満；約400ダルトン未満；約350ダルトン未満；約300ダルトン未満；約250ダルトン未満；約200ダルトン未満；そして約100ダルトン未満。比較的小さな水溶性の、非ペプチド性ポリマーでの範囲の例としては、次の範囲が挙げられる：約100～約1400ダルトン；約100～約1200ダルトン；約100～約800ダルトン；約100～約500ダルトン；約100～約400ダルトン；約200～約500ダルトン；約200～約400ダルトン；約75～1000ダルトン；及び約75～約750ダルトン。

【0107】

比較的小さな水溶性の、非ペプチド性ポリマー（「POLY」）では、モノマーの数は、典型的には、次の範囲の1つ又は複数の範囲に入る：1～約30（両端を含む）の間；約2～約25の間；約2～約20の間；約2～約15の間；約2～約12の間；約2～約10の間。ある種の例においては、そのポリマー（及びそれに相当するコンジュゲート）の中で、直列になっているモノマーの数は、1、2、3、4、5、6、7、又は8の内の1つである。追加の実施態様においては、そのポリマー（及びそれに相当するコンジュゲート）には、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のモノマーが含まれる。なおもさらなる実施態様においては、それぞれのポリマー「アーム」の中のポリマー部分（及びそれに相当するコンジュゲート）は、直列に、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30個のモノマーを有している。従って、例えば、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーアームが、 $-(OCH_2CH_2)_n-$ を含んでいる場合、「n」は整数であり、いくつかの実施態様においては、以下の数から選択される：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、及び30。そして、次の範囲の1つ又は複数の中に入ることができる：約1～約25の間；約1～約20の間；約1～約15の間；約1～約12の間；約1～約10の間。

【0108】

コンジュゲートの中の水溶性の、非ペプチド性ポリマー全体の分子量が、比較的大きい

場合（例えば、2,000ダルトンより大）、その全体の分子量は、2,000ダルトン～約150,000ダルトンの範囲に入ることができる。しかしながら、範囲の例としては、次の範囲の分子量が挙げられる：約3,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲；約5,000ダルトン～約110,000ダルトンの範囲；5,000ダルトンより大から～約100,000ダルトンの範囲内、約6,000ダルトン～約90,000ダルトンの範囲、約10,000ダルトン～約85,000ダルトンの範囲、10,000ダルトンより大から～約85,000ダルトンの範囲、約20,000ダルトン～約85,000ダルトンの範囲、約53,000ダルトン～約85,000ダルトンの範囲、約25,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲、約29,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲、約35,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲、そして約40,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲。

10

【0109】

式Iの中のポリマーアーム「POLY」のそれぞれに関連する比較的大きな水溶性の、非ペプチド性ポリマーの分子量の例としては、次のものが挙げられる：約500ダルトン、約750ダルトン、約1,000ダルトン、約1500ダルトン、約2,000ダルトン、約2,200ダルトン、約2,500ダルトン、約3,000ダルトン、約4,000ダルトン、約4,400ダルトン、約4,500ダルトン、約5,000ダルトン、約5,500ダルトン、約6,000ダルトン、約7,000ダルトン、約7,500ダルトン、約8,000ダルトン、約9,000ダルトン、約10,000ダルトン、約11,000ダルトン、約12,000ダルトン、約13,000ダルトン、約14,000ダルトン、約15,000ダルトン、及び約20,000ダルトン。

20

【0110】

マルチアームコンジュゲートのポリマー部分全体に関連する、比較的大きな水溶性の、非ペプチド性ポリマーの分子量の例としては、例えば、次のものが挙げられる：約20,000ダルトン、22,500ダルトン、約25,000ダルトン、約30,000ダルトン、約35,000ダルトン、約40,000ダルトン、約45,000ダルトン、約50,000ダルトン、約55,000ダルトン、約60,000ダルトン、約65,000ダルトン、約70,000ダルトン、及び約75,000ダルトン。上述のいずれかの合計分子量を有する水溶性の、非ペプチド性ポリマーの分岐状のタイプのものも、ポリマーアームのそれぞれにおいて使用することが可能で、多重分岐のコンジュゲートで得られる。

30

【0111】

従って、使用される水溶性の、非ペプチド性ポリマーが比較的に小さいか、或いは大きいには関係なく、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーがポリ（エチレンオキシド）の場合には、そのポリマーには、多くの数の（ OCH_2CH_2 ）モノマー〔或いは、（ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ）モノマー、PEGの定義の仕方に依存する〕が含まれるであろう。本明細書の記述を通して、繰り返し単位の数、 $\text{「(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{」}$ における、下付文字「n」によって認識される。従って、(n)の値は、典型的には、次の範囲の1つ又は複数の中に入る：2～約3400、約100～約2300、約100～約2270、約136～約2050、約225～約1930、約450～約1930、約1200～約1930、約568～約2727、約660～約2730、約795～約2730、約795～約2730、約909～約2730、及び約1,200～約1,900。分子量が公知であるようなポリマーなら、いかなるものであっても、そのポリマーの全重量平均分子量を、その繰り返しモノマーの分子量で割り算することによって、繰り返し単位の数（即ち、「n」）を求めることができる。

40

【0112】

マルチアームの水溶性の、非ペプチド性ポリマーに関しては、これらのポリマーは、典型的には、3本以上の、識別可能な水溶性の、非ペプチド性ポリマーアーム又はセグメントを含んでいる。他にも利点はあるものの、マルチアームの水溶性の、非ペプチド性ポリマーは、それぞれのアームが、TLR7/8作動薬に対して共有結合的な結合をする性能

50

を有しているので、例えば、それに付着した単一のTLR7／8作動薬を有する直鎖状のポリマーに比較して、より大きな薬物的特性を与える可能性を有している。

【0113】

結合含有スペーサ部分、「Xr」

式Iに関連して、一般的には、POLYをTLR7／8作動薬に共有結合的に結合している結合含有スペーサ部分(linkage-containing spacer moiety)が、生物学的に適切なpHで、加水分解的及び／又は酵素的に、安定であったり、或いは放出可能であったりすることができる。即ち、いくつかの実施態様においては、Xrが、加水分解的に安定な結合である。さらにいくつかの他の実施態様においては、Xrが、放出可能な結合を含んでいる。

10

【0114】

先に記述したように、安定な結合というのは、患者に投薬した後で、インビボでは、明らかな解離を起こさないものである。この点に関しては、安定な結合は当業者には公知である。それに加えて、ある結合が、本明細書において提供されるコンジュゲートに関連して、安定な結合として役立つかどうかは、実験を通して試験することができる(例えば、提案された安定な結合を有するコンジュゲートを患者に投与し、解離の指標を得るために一定時間おきに採血して、例えば、クロマトグラフィーその他適切な方法を用いて試験する)。

【0115】

マルチアームコンジュゲートのいくつかの実施態様においては、その結合含有スペーサ部分に、TLR7／8作動薬と水溶性の、非ペプチド性ポリマーとの間に挟み込ませた放出可能な結合が含まれる。従って、放出可能な結合とは、患者に投与した後、インビボで解離し、それにより、そのポリマーアームから、TLR7／8作動薬化合物(又は、例えば小さな分子標識を備えた、その少し変性された形)が放出されるような結合である。この点に関しては、放出可能な結合は当業者には公知である。それに加えて、ある結合が、本明細書において提供されるマルチアームコンジュゲートに関連して、本来的に放出可能であるかどうかは、実験を通して試験することができる(例えば、提案された放出可能な結合を有するコンジュゲートを患者に投与し、解離の指標を得るために一定時間おきに採血して、例えば、クロマトグラフィーその他適切な方法を用いて試験する)。いくつかの好ましい実施態様においては、TLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートには、放出可能な結合が含まれる、即ち、Xrに放出可能な結合が含まれる。

20

30

【0116】

例えば、TLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートの中に含まれている結合基の放出可能特性の評価は、インビトロで、各種のタイムポイントで採取したサンプルについて、人からのヘパリン化したプール血漿(pH、7.2～7.4)を用いて、コンジュゲートサンプルを37℃でインキュベーションしてから、決めることができるが、この場合、サンプルは直ちに凍結し、後に、例えば、各種適切な検出及び定量方法、例えばLC-MSを使用して、サンプルの分析及び定量を実施する。次いで、みかけの変換半減期($t_{1/2,app}$)を、コンジュゲートの、その最初の名目インキュベーション濃度からの変換が、TLR7／8作動薬の放出のみに起因するという仮定に基づいて計算するが、ここで、約300時間以下の $t_{1/2}$ であれば、放出可能な結合又は放出可能なコンジュゲートであることの指標であると考えることができる。

40

【0117】

本明細書において提供されるコンジュゲートに関連して使用される放出可能な結合の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定される訳ではない：アミド、チオエーテル、カルバメート、エステル、カーボネート、尿素、及び酵素で開裂させることが可能なペプチド結合(TLR7／8作動薬化合物の構造及びリンカー構造全体に依存する)。場合によっては、ある結合又は結合(bond or linkage)が、単独で考えると、一般的には、本来的に「放出可能(releasable)」又は「解離可能(leavable)」であるとは考えられないこともあるが、しかしながら、それが共有

50

結合的に結合されている分子の実体の構造と組み合わせると、例えば、イミダゾキノリン構造を有する TLR7/8 作動薬化合物のような場合、そのような結合は、例えばベータ-脱離、アミド加水分解などのような特殊な放出メカニズムのために、放出可能となり得る。例えば、チオエーテル、アミド、カルバメート、エステル、カーボネート、尿素などは、β-脱離反応又は加水分解を介して解離することができる（酵素の協調の存在下又は非存在下で、例えば、エステルは、そのエステルがエステラーゼにより解離されるかどうかには関係なく、放出可能な結合として機能することができる）。

【0118】

放出可能な結合を含む TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートは、放出の結果が、未変性の親分子の放出となるような場合には、多くの場合プロドラッグとして分類されるが、その理由は、それらが、投与された後で（即ち、生理学的条件下で）、共有結合的に結合された TLR7/8 作動薬化合物を放出するからである。一般的には、本明細書に記載された特定のマルチアームポリマーレシキモドコンジュゲートには、レシキモドへと放出可能な結合が含まれている。

【0119】

酵素で開裂させることが可能なペプチド結合に関しては、そのスペーサ部分には、意図された患者の母集団の中に存在している酵素のための基質として知られている、一連のアミノ酸の1個又は複数を含むことができる。この場合においては、患者に投与すると、そのコンジュゲートの中に含まれている、酵素で開裂させることが可能なペプチド結合の、酵素的に誘発された解離によって、TLR7/8 作動薬（又は、解離によって形成される、比較的小さな分子の破片即ち「タグ（tag）」を伴う TLR7/8 作動薬）が放出されるであろう。所定の患者の母集団の中で、酵素的解離の影響を受けやすいペプチド結合の例は、例えば、米国特許出願公開第2005/0079155号明細書に記載されており、実験的に求めることもまた可能である。

【0120】

Xrに関連しては、その結合含有スペーサ部分には、いくつかの例示的なアミノ酸、例えばベータ-アラニン、グリシン、L-アラニン、L-バリン、ロイシン、ジメチルグリシンなどのいずれかが含まれていてもよい。いくつかの実施態様においては、Xrには、前述のアミノ酸のいずれか1種又は複数に対して、そのアミノ基を介して共有結合的に結合されたカルボキシメチル基、 $-CH_2C(O)-$ が含まれるが、ここで、その末端のカルボキシ基が、その TLR7/8 作動薬のアミノ基に共有結合的に結合されて、アミド結合を与えており、それが、いくつかの実施態様においては、放出可能となっている。

【0121】

いくつかの実施態様においては、その結合含有スペーサ部分の「Xr」が、式IIで表される：

$$\sim [X^1]_a - [Lr]_b - X^2 \sim$$

（式II）

ここで、「a」は、ゼロ又は1であり（即ち、ゼロは、「X¹」が存在しないことを表し、そして1は、それが存在していることを示している）；「b」は、ゼロ又は1であり（即ち、ゼロは、「Lr」が存在しないことを表し、そして1は、それが存在していることを示している）；X¹が存在している場合には、それがスペーサであり；Lrが存在している場合には、それが結合基であり；そして、X²は、TLR7/8 作動薬に共有結合的に直接に結合された官能基である。

【0122】

a及びbがいずれもゼロであるような、式IIの場合においては、その結合含有スペーサがX²、マルチアームポリマーの残りの部分（例えば、ポリマーアーム、POLY）に対して TLR7/8 作動薬を共有結合的に結合している官能基で構成されているということは、理解されるであろう。そのような場合においては、その結合含有スペーサには、官能基X²のみが含まれており、TLR7/8 作動薬と水溶性の、非ペプチド性ポリマーとの間には、他の原子は一切含まれない。典型的には、X²には、それに対してマルチア-

ムポリマーが共有結合的に結合されている、未変性の T L R 7 / 8 作動薬の単一又は複数の原子が含まれている。例えば、T L R 7 / 8 作動薬のアミノ基のところで付着が起きているのなら、典型的には、そのアミノ基が、 X^2 の部分を構成している。

【0123】

a 及び b のいずれか、又は両方が 1 であるような、式 I I の場合においては、その結合含有スペーサには、 X^2 を構成しているものとは異なる、1 個又は複数の追加の原子が含まれるということは理解されるであろう。 X^1 及び L r の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる（右から左へと、左から右への、いずれも考えられる）： $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $C(O)-NH$ 、 $NH-C(O)-NH$ 、 $O-C(O)-NH$ 、 $-C(S)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、二価のシクロアルキル基、 $-N(R^6)-$ （ここで、 R^6 は、H 又は、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、アリール、及び置換されたアリール、並びに前述の 1 種又は複数の組み合わせからなる群より選択される有機ラジカルである）。さらなるスペーサ及び結合としては、以下のものが挙げられる：アシルアミノ、アシル、アリールオキシ、1～5（両端を含む）個の炭素原子を含むアルキレンブリッジ、アルキルアミノ、約 2～4（両端を含む）個の炭素原子を有するジアルキルアミノ、ピペリジノ、ピロリジノ、 $N-$ （低級アルキル）-2-ピペリジル、モルホリノ、1-ピペリジニル、4-（低級アルキル）-1-ピペリジニル、4-（ヒドロキシル-低級アルキル）-1-ピペリジニル、4-（メトキシ-低級アルキル）-1-ピペリジニル、フルオレニル、及びグアニジン。本明細書の記述の目的では、しかしながら、一群の原子が、ポリマーセグメントに直に隣接している場合には、それらはスペーサとはみなさず、それらの群の原子は、ポリマーにおけるモノマーと同じであって、そのためその群は、ポリマー鎖の単なる延長を表しているだけのことである。

【0124】

スペーサ及び／又は結合が存在している場合には、それらは、典型的には、とは言え必ずという訳ではないが、本来的に直鎖状である。それに加えて、スペーサ及び／又は結合は、典型的には、とは言え必ずという訳ではないが、加水分解的に安定であり、及び／又は、酵素的に安定である。1つ又は複数の実施態様においては、スペーサ又は結合が存在している場合、それらは、約12原子未満（例えば、約10原子未満、約8原子未満、及び約5原子未満）の鎖長を有している。特定のスペーサ又は結合の長さの判定に関しては、本明細書においては、長さは、単一の鎖の原子の数と定義される（置換基は数えない）。例えば、次のR-POLY-NH-(C=O)-NH-TLR7/8作動薬のような尿素結合は、3原子(-NH-C(O)-NH-)の鎖長を有していると考えられる。

【0125】

式IIに関連して、X¹を存在させる場合、その特定の例としては、-CH₂C(O)-（本明細書においては、カルボキシメチルと呼ばれる）が挙げられる。

【0126】

X²の例としては、以下のものが挙げられる：-C(O)-NH-（ここで、NHは、TLR7/8作動薬への付着点であって、共有結合的な結合をさせる前の未変性のTLR作動薬の一部を形成している）；-NH-C(O)-NH-（ここで、NHは、TLR7/8作動薬への付着点であって、共有結合的な結合をさせる前の未変性のTLR作動薬の一部を形成している）；-NH-C(O)-（ここで、そのカルボニル炭素は、TLR7/8作動薬への付着点を示し、共有結合的な結合をさせる前の未変性のTLR作動薬の一部を形成している）、並びに-NH（ここで、その窒素原子は、TLR7/8作動薬への付着点を示し、共有結合的な結合をさせる前の未変性のTLR作動薬の一部を形成している）。

【0127】

L_rの例としては、以下のものが挙げられる：-(C R_x R_y)_z-、及び-NH(C R_x R_y)_z-（ここでそれぞれのR_x及びR_yは、独立して、水素、低級アルキル、ハロ(X)、及びハロ-置換された低級アルキルから選択され、そしてzは、1～6の整数、例えば、1、2、3、4、5、及び6から選択される）。低級アルキルの例としては、以下のものが挙げられる：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、及びヘキシル。ハロ基の例は、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードである。L_r基を説明する例としては、例えば、以下のものが挙げられる：-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CHF-、-CHCH₃-、-CHCH(CH₃)₂-、-CHCH₂CH(CH₃)₂-、-C(CH₃)₂-、-NHCH₂-、-NHCH₂CH₂-、-NHCH₂CH₂CH₂-、-NHCH₂CH₂CH₂CH₂-、-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-、-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-、-NHCH₂CHF-、-NHCHCH₃-、-NHCHCH(CH₃)₂-、-NHCHCH₂CH(CH₃)₂-、及び-NHC(CH₃)₂-。さらなる構造も、本明細書において提供される。

【0128】

TLR7/8作動薬

ここで話題を、本明細書に記載されたマルチアームポリマーコンジュゲートの中に含まれるTLR7/8作動薬に転じると、TLR7/8作動薬は、トル様受容体7及び／又はトル様受容体8に対する作動薬である、各種の化合物である。TLR7/8作動薬が、小分子の作動薬であるのが好ましい。構造的な分類の例としては、グアノシン含有化合物及びイミダゾキノリンが挙げられる。

【0129】

TLR7/8作動薬化合物の例としては、例えば、以下のものが挙げられる：3M-052(MEDI-9797)、R848(S-28463)、R837(S-26308)、S-28690、3M-001(852A、PF-4878691、TMX-101)、GS-9620)、ANA-773、AZD8848、CLO97、CLO57(3

10

20

30

40

50

M-002)、3M-003、TMX-202、TMX-302、TMX-306、IV
136、IV209、3M-011、SM-276001、SM-324405、SM-
324405、SM-360320、PF-4171455、CpG、CpR、ssRNA、
BHMA、SM-324405、AZ12441970、及びAZ12443988。
【0130】

例えば、TLR7/8作動薬は、以下のものから選択することができる：4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)-メチル)-N-(20-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキササイコシル)ベンズアミド；3-(1-(1-(4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20-ヘキサオキサ-2-アザドコサン-22-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾル-4-イル)プロパン酸；4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)-メチル)-N-(20-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキササイコシル)ベンズアミド；4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)-N-(32-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサ-イル)メチル)-N-(32-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサドトリアコンチル)ベンズアミド；3-(1-(1-(4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-3-(1-(1-(4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32-デカオキサ-2-アザテトラトリアコンタン-34-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾル-4-イル)-プロパン酸；4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)-N-(32-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサドトリアコンチル)-ベンズアミド；4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)-N-(59-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57-ノナデカオキサノナペンタコンチル)ベンズアミド；{N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4, 5c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド}；[8-(3-(ピロリジン-1-イルメチル)ベンジル)-4-アミノ-2-ブトキシ-7, 8-ジヒドロプテリジン-6(5H)-オン]；[2-(4-((6-アミノ-2-(2-メトキシエトキシ)-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)ベンズアミド)エチル2, 3-ビス(ドデカノイルオキシ)プロピルホスフェート]；[1-(4-((6-アミノ-2-(2-メトキシエトキシ)-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)メチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20-ヘキサオキサ-2-アザトリコサン-23-オイック酸]；[9-ベンジル-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)アデニン；メチル2-(3-{[6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル]メチル}フェニル)アセテート、SM-324406：2-(3-{[6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル]メチル}フェニル)酢酸；メチル2-(3-((3-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)プロピル)(3-(ジメチルアミノ)プロピル)アミノ)フェニル)アセテート；及び2-(3-((3-(6-アミノ-2-ブトキシ-8-オキソ-7H-プリン-9(8H)-イル)プロピル)(3-(ジメチルアミノ)プロピル)アミノ)フェニル)。

【0131】

TLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートのいくつかの特定の実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、以下のものである：3M-052(MEDI-9797)、R848(S-28463)、R837(S-26308)、S-286

10

20

30

40

50

90、3M-001 (852A、PF-4878691)、TMX-101、GS-9620、ANA-773、AZD8848、CLO97、SM-324405、AZ12441970、GSK2245053、SZ-101、4-[6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)プリン-9-イルメチル]ベンズアルデヒド(UC-1V150)、9-ベンジル-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)アデニン(SM360320、1V136)、VTX-1463、及びVTX-2337。さらにいくつかの他の実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、(N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド、又は[8-(3-(ピロリジン-1-イルメチル)ベンジル)-4-アミノ-2-ブトキシ-7,8-ジヒドロプテリジン-6(5H)-オン]である。

10

【0132】

ある種の好ましい実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、イミダゾキノリン化合物である。イミダゾキノリンの例としては、例えば米国特許第5,389,640号明細書に記載されているような、例えば、1-置換、2-置換の1H-イミダゾ[4,5-c]-キノリン-4-アミン化合物が挙げられる。そのような化合物としては、以下のものが挙げられる：4-アミノ-7-クロロ-アルファ、アルファ-ジメチル-2-エトキシメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノール；4-アミノ-アルファ、アルファ-ジメチル-2-ヒドロキシメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノール；4-アミノ-アルファ，アルファ-ジメチル-2-メトキシメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノール；2-エトキシメチル-1-(3-メトキシプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン；及び1-(2-メトキシエチル)-2-メトキシメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン。

20

【0133】

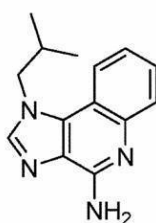
1つ又は複数の好ましい実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、レシキモド(R-848)又はイミキモド(1-イソブチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン)、又はそれらの誘導体である。

【0134】

1つ又は複数の特定の実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、イミキモドである。

30

【化12】



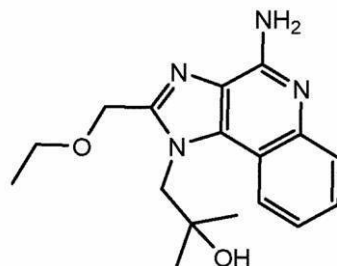
【0135】

さらにある種の他の特定の実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、レシキモドである。

40

50

【化 13】



R-848

10

【0136】

T L R 7 / 8 作動薬のマルチアームポリマーに対する共有結合的結合は、T L R 7 / 8 作動薬化合物の上に、各種適切な官能基又は原子を付着させることで実施することができる。マルチアームポリマーへの付着に適した官能基の例としては、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、及びチオールなどが挙げられる。ある種の好ましい実施態様においては、イミキモドに対する共有結合的な結合が、芳香族の $-NH_2$ 基で実施される。他の好ましい実施態様においては、レシキモドに対する共有結合的な結合が、芳香族の $-NH_2$ 基で実施される。構造の例については、以下において示す。

【0137】

20

コンジュゲートを合成するための方法

本明細書に記載されたコンジュゲートは、各種の方法で調製することが可能であるが、そのような合成例は、以下の実施例で示す。

【0138】

1つの例においては、そのコンジュゲートが、マルチアームで水溶性の、非ペプチド性の反応性ポリマーを、T L R 7 / 8 作動薬に共有結合的に結合させることを含む方法によって調製される。多くのT L R 7 / 8 作動薬は、市場で入手することもできるし、或いは、当業熟練者に公知の方法により合成することもできる。

【0139】

反応性のマルチアームで水溶性の、非ペプチド性ポリマーに関しては、そのようなポリマーは、1個又は複数個の反応性基を担持していて、それによって、T L R 7 / 8 作動薬に共有結合的な結合をさせるのに適した反応剤が得られるような形で、市場で入手することが可能であるし、或いは、国際公開第2011/063156号パンフレットに記載されているようにして、アルコキシ化を介して直接合成することもできる。この形態にある場合、その水溶性の、非ペプチド性ポリマーは、「ポリマー性反応剤」又は「活性化ポリマー」と呼ばれることも多い。

30

【0140】

一例として、多くの好適なポリオールコア物質のいくつかは、化学薬品供給業者例えばAldrich (St. Louis, MO) から購入することができる。最初に、ポリオールの末端ヒドロキシルを、例えば強塩基を使用して、それらのアニオンの形に転換させて、重合を開始させるのに適したサイトを作り、その後でそのコアの上に、モノマーサブユニット例えば、エチレンオキシドを直接重合させる。それぞれのアームの中で、所望の長さのポリマー鎖に達するまで、鎖の構築を続けさせ、その後で、反応、例えば停止反応によって、そして場合によっては、適切な反応性基を導入することによって反応を停止させる。

40

【0141】

それに代わるアプローチ方法では、活性化されたマルチアームポリマー前駆体を、最初に所望のポリオールコア物質を準備し、適切な条件下で、そのポリオールを所望の長さのヘテロ2官能性PEGメシレートと反応させることによって合成的に調製することが可能であって、この場合、場合によっては非メシレートPEG末端は保護して、ポリオールの

50

コアとの反応を防止する。そのようにして得られたマルチアームポリマー前駆体は、次いで、追加の転換反応やTLR7/8作動薬への直接的なカップリングに好適であって、その後で、必要があれば、脱保護する。

【0142】

そのようなポリマー性反応剤を市販している供給業者としては、例えば、以下のものが挙げられる：Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Creative PEGWorks (Winston Salem, NC, USA)、SunBio PEG-Shop (SunBio USA, Orinda, CA)、JenKem Technology USA (Allen, TX)、及びNOF America Corporation (White Plains, NY) (例えば、4本又は8本のポリマーアームを有するマルチアームポリマーのSUNBRIGHTシリーズ、又はポリオールコアから延びる3又は4本のポリマーアームを有する、分岐状のポリマーシリーズを参照されたい)。ルーチ的な実験を使用すれば、当業者ならば、主題のTLR7/8作動薬コンジュゲートを調製するための、サイズ、構造、及び反応性基などを有する、マルチアームポリマー性反応剤を識別することができる。

【0143】

例えば、そのシリーズの中のそれぞれのメンバーが、特徴(例えば、水溶性の、非ペプチド性ポリマーのサイズ、反応性基のタイプ、結合基の放出性能など)の点で異なっているような、コンジュゲートのシリーズを調製することが可能であって、次いで、そのシリーズの中の1つのメンバーを患者に投与し、その後で、(例えば、クロマトグラフィー法を使用して)、血液及び/又は尿のサンプルの検出及び定量を実施する。そのシリーズのそれぞれのメンバーは、未処置の(naive)患者に、同様の方法で、投与し、定量する。そのシリーズのそれぞれのメンバーの試験が済んだら、それらの結果を検討して、どの特徴によって、所望の効果を有するコンジュゲートが得られるかを求める。

【0144】

ポリマー性反応剤をTLR7/8作動薬に共有結合的に結合させることは、典型的には、コンジュゲーション条件下で実施するが、その条件には、マルチアームポリマー性反応剤の反応性基と、TLR7/8作動薬の上の反応性基との間での共有結合的な結合を可能とする、温度、pH、時間、及び溶媒の条件下で、TLR7/8作動薬をポリマー性反応剤と(多くの場合、TLR7/8作動薬に対して、マルチアームポリマー性反応剤を過剰モルで使用して)組み合わせることが含まれる。1つ又は複数の特定の実施態様においては、その反応性基が、反応性のアミノ基である。

【0145】

ポリマー性反応剤の例は、例えば、式Iのような構造を有するであろう。

【化14】



ここで、Yは、式IにおけるX_rを表すが、ただし、異なっているのは、Yが、TLR7/8作動薬の反応性基又は原子と反応するのに有効な官能基の末端を有していて、TLR7/8作動薬化合物に対する究極的な共有結合的な結合を与える。例えば、式IIに関連しては、Yは、~[X¹]_a-[L_r]_b-X²~に近いものではあるものの、ただし、X²を含むのではなく、TLR7/8作動薬に対して直接共有結合的な結合している点で異なっており、Yは、式II'の、~[X¹]_a-[L_r]_b-X^{Pre-2}~に従った構造を有しているが、ここで、それらの変数は、式IIについて先に述べたものであるが、ただし、X^{Pre-2}はそれとは異なっていて、TLR7/8作動薬の反応性の基又は原子と反応するのに適した反応性基(即ち、X²基前駆体)を表していて、TLR7/8作動薬とカップリングすることによって、共有結合的な結合、X²が生成する。

【0146】

いくつかの実施態様においては、マルチアームポリマー性反応剤は、(i) そのポリマー性反応剤の反応性基が、TLR7/8作動薬の反応性基のところでは共有結合的な結合を形成し、そして(ii) そのポリマー性反応剤が、(即ち、TLR7/8作動薬へ共有結合的に結合する前に) 放出可能な結合を含むか、又は、(例えば、TLR7/8作動薬に対してそのマルチアームポリマー反応剤が共有結合的に結合した後で) 放出可能な結合を形成できるように選択される。

【0147】

さらにいくつかの他の実施態様においては、そのマルチアームポリマー性反応剤が、(i) そのポリマー性反応剤の反応性基が、TLR7/8作動薬の反応性基のところでは共有結合的な結合を形成し、そして(ii) そのポリマー性反応剤が、(例えば、TLR7/8作動薬への共有結合的に結合する前に) 安定な結合を含んでいるか、又は(例えば、TLR7/8作動薬に対してそのマルチアームポリマー反応剤が共有結合的に結合した後で) 安定な結合が形成されるように、選択される。

【0148】

例えば、Xpre-2のような、TLR7/8作動薬のような小分子に対して共有結合的な結合を形成するための反応性基の例としては、以下のものが挙げられる：N-スクシイミジルカーボネート、アミン、ヒドラジド、スクシイミジルプロピオネート、スクシイミジルブタノエート、スクシイミジルスクシネート、スクシイミジルスルフェート、ベンゾトリアゾールカーボネート、グリシジルエーテル、オキシカルボニルイミダゾール、p-ニトロフェニルカーボネート、アルデヒド、マレイミド、オルトピリジールジスルフィド、アクリロール、ビニルスルホンなど。1つ又は複数の実施態様においては、Xpre-2がカルボキシルであるか、又は活性化エステルである。

【0149】

いくつかの例示的な実施態様においては、そのポリマーアームそれぞれの末端に活性化されたカルボキシメチル基(例えば、カルボキシメチル基のNHSEステル)を有するマルチアームポリマー反応剤が、アミノ酸、例えば、ベーターアラニン、グリシン、L-アラニン、L-バリン、ロイシン、ジメチルグリシンなどに共有結合的に結合されて、本明細書に記載されたようにしてTLR7/8作動薬に対してカップリングするのに適した、活性化されたマルチアームポリマー性反応剤が得られる。

【0150】

反応性基を担持する所定のポリマー性反応剤と、TLR7/8作動薬の上の反応性基との間のコンジュゲーション条件の例は、本明細書において提供される開示に基づき、そして関連する文献の文脈においては、当業者には公知であろう。例えば、Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Application, American Chemical Society (Washington, DC) (1997)を参照されたい。本主題のマルチアームポリマーコンジュゲートを調製するための詳細な説明例は、付属の裏付け用の実施例において提供される。例えば、実施例1~16を参照されたい。

【0151】

TLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートのいくつかの特徴が好ましく、以下において記述されるそれらの特徴のそれぞれが、個々に、且つ明確に組み合わせとして、考慮されるべきである。いくつかの好ましい実施態様においては、中央のコアから延びているポリマーアームのそれぞれが、同一である。即ち、例えば式Iに関連して言えば、Rから延びている、それぞれのQ、POLY、Xr、及びTLR7/8作動薬が、同じである。ある種の好ましい実施態様においては、qが4である。他の好ましい実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートに、ペンタエリスリトールのコアが含まれる。さらにいくつかのさらなる実施態様においては、そのTLR7/8作動薬が、レンチモドである。さらにいくつかの追加の実施態様においては、POLYがポリエチレングリコールであり、POLY-Xrには、-CH₂-C(O)-アミノ酸-が

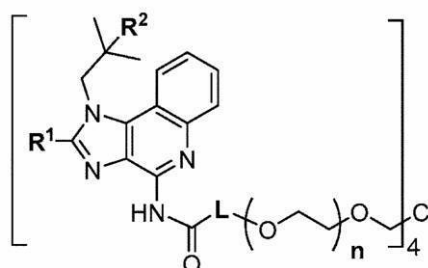
含まれるが、ここでそのアミノ酸は、ベータアラニン、グリシン、Lアラニン、Lバリン、ロイシン、 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CHF}\text{COOH}$ 、及びジメチルグリシンから選択され、そしてそれらのアミノ酸のアミノ基は、カルボニル基に直接結合されている。前述のさらにいくつかのさらなる実施態様においては、そのアミノ酸がグリシンである。さらにいくつかのさらなる実施態様においては、そのマルチアームポリマーコンジュゲートが化合物6である。

【0152】

コンジュゲートの例

先に述べたように特徴を有する代表的なコンジュゲートを、以下に示す。例えば、コンジュゲートが、式III、又はそれらの薬学的に許容される塩、又はそれらの立体異性体、で定義されるような構造を有してよい：

【化15】



(式III)

【式中、Lは、 $-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CHF}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-$ 、単結合、又は $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-$ であり；それぞれのmは、独立して、1～5の整数（両端を含む）であり；それぞれのnは、独立して、40～350の整数（両端を含む）であり； R^1 は、水素又は $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ であり；そして R^2 は、水素又はヒドロキシルである】

【0153】

式IIIの具体的なコンジュゲートにおいては、Lは、例えば、以下のものから選択される： $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHF}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、単結合、及び $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。

【0154】

式IIIのいくつかの特異的な実施態様を以下に示す。

【0155】

例えば、いくつかの実施態様においては、それぞれのnが、独立して、100～250の整数（両端を含む）である。

【0156】

式IIIのいくつかのコンジュゲートにおいては、 R^1 が水素であり、そして R^2 も水素である。

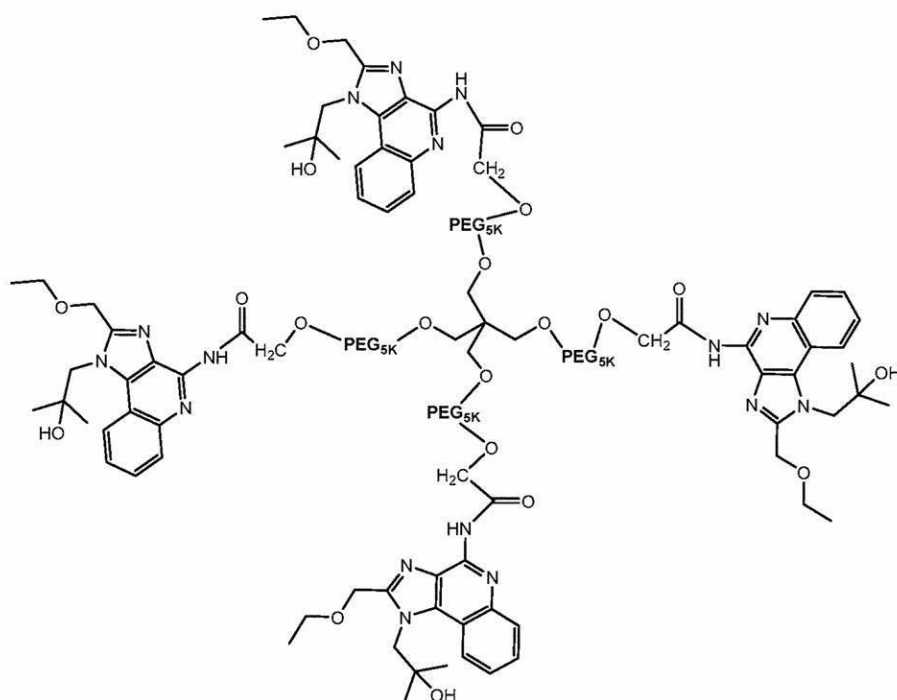
【0157】

さらに別な式IIIのコンジュゲートにおいては、 R^1 が $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ であり、そして R^2 がヒドロキシルである。

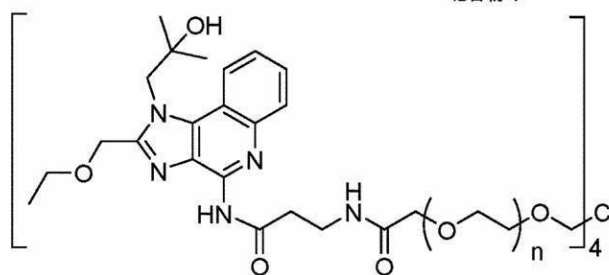
【 0 1 5 8 】

特定のマルチアームコンジュゲートは、以下のような構造を有している。即ち、いくつかの実施態様においては、マルチアームポリマーコンジュゲートが、化合物 1 ～ 1 0 又は 1 2 ～ 1 6、又はそれらの薬学的に許容される塩若しくは立体異性体のいずれか 1 つの構造を有している：

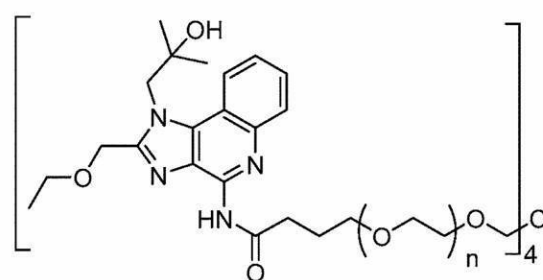
【化 1 6】



化合物 1



化合物 2



化合物 3

10

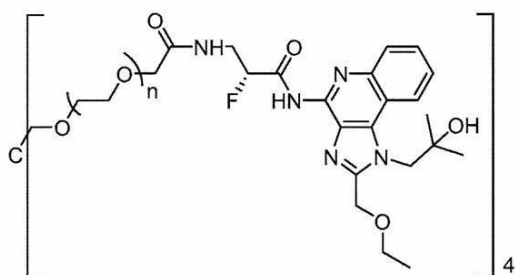
20

30

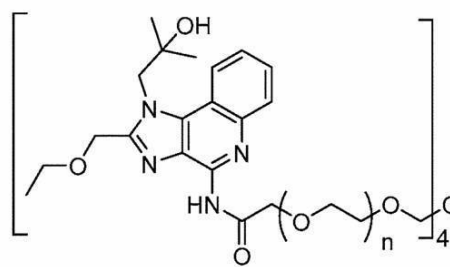
40

50

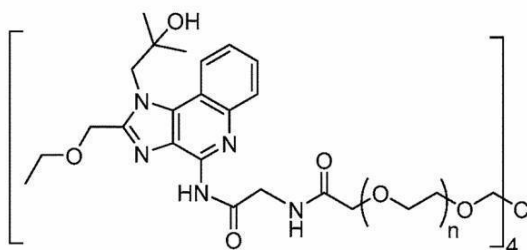
【化 17】



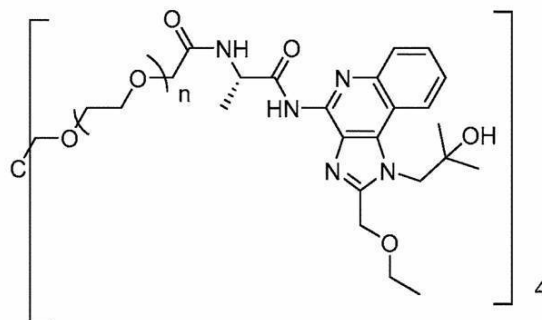
化合物 4



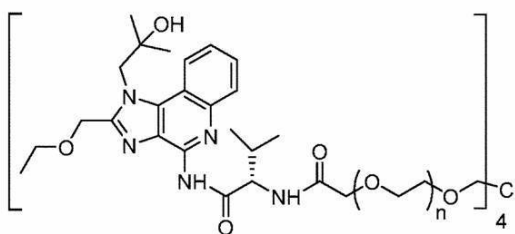
化合物 5



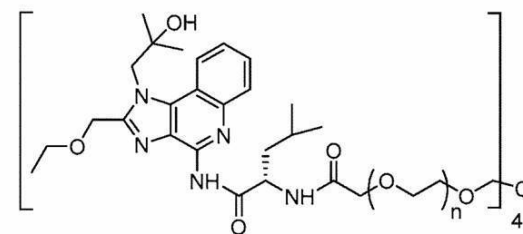
化合物 6



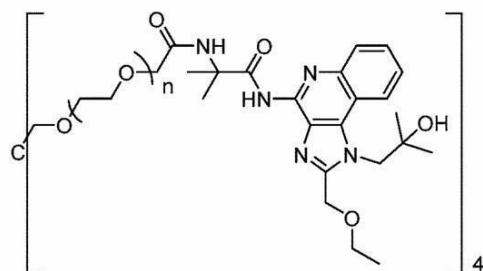
化合物 7



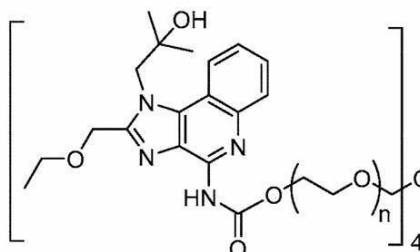
化合物 8



化合物 9



化合物 10



化合物 12

10

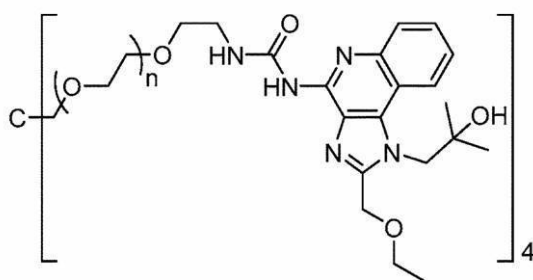
20

30

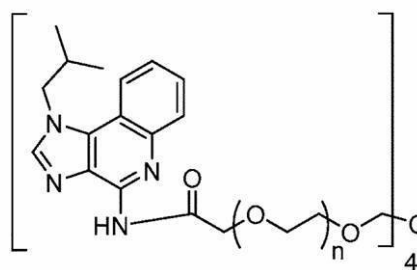
40

50

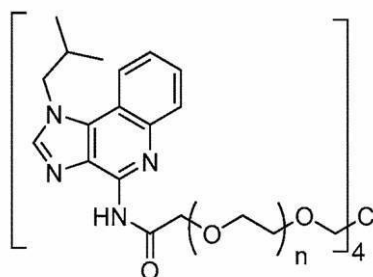
【化 18】



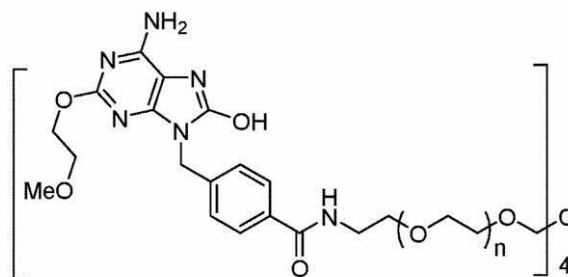
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

【0159】

いくつかの実施態様においては、化学的な変換（即ち、TLR7／8作動薬に対する共有結合的なカップリング）が不完全だったり、収率が100％未満になったり、及び／又は化学合成の際に日常的に遭遇するその他の避けがたい複雑化が起きたりするので、マルチアームポリマーコンジュゲートを含む例示組成物には、「q個」の数のポリマーアームのそれぞれに対して付着したTLR7／8作動薬化合物が、理想よりは少ない数しか含まれないことになるであろう。そのような数は、典型的には、ポリマー担持度（degree of polymer loading）と呼ばれていて、この場合、担持度100％とは、「q個」のポリマーアームのそれぞれの末端にTLR7／8作動薬化合物が共有結合的に結合されているような、完全な担持を表している。例えば、一例として、「4-arm-PEG」コンジュゲートは、4本アームのコンジュゲートを含む混合物として特徴付けることが可能であるが、ここで、その組成物の中の4本アームコンジュゲートの少なくとも50面積パーセント（a／a、HPLCによる測定）が、TLR7／8作動薬に対してコンジュゲートされた4本のアームのそれぞれを有している。「4-arm-PEG」コンジュゲートの例を含むさらなる組成物の例では、4本アームコンジュゲートを含む組成物を特徴とすることができるが、ここで、その組成物の4本アームコンジュゲートの、少なくとも65～90、70～85、又は70～75面積パーセント（a／a、HPLCによる測定）が、TLR7／8作動薬にコンジュゲートされた4本のアームのそれぞれを有している。

【0160】

組成物

それらのコンジュゲートは、それ自体で、又は薬学的に許容される塩の形態で投与することが可能であるが、本明細書の中で、いずれか1つ又は複数のマルチアームポリマーコンジュゲートを参照した場合には、薬学的に許容される塩が含まれることが意図されている。本明細書に記載されたようなコンジュゲートの塩を使用するならば、それは、薬理的及び薬学的、いずれでも許容されるものでなければならない。そのような薬理的及び薬学的に許容される塩は、文献に詳述されている標準的な方法を用いて、コンジュゲート

を、有機酸又は無機酸と反応させることによって調製することができる。有用な塩の例としては、以下の酸を用いて調製したものが挙げられるが、それらに限定される訳ではない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、及びベンゼンスルホン酸、トリフルオロ酢酸など。さらに、薬学的に許容される塩は、カルボン酸基のアルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩、例えば、ナトリウム、カリウム、又はカルシウム塩として調製することができる。

【0161】

コンジュゲート、特にコンジュゲートのTLR7/8作動薬の部分には、1個又は複数のキラル中心が含まれていてもよい。それらの中に含まれているそれぞれのキラル中心については、当該の(instant)化合物及び構造物には、それぞれの光学異性体、さらには光学活性な形態の各種の組み合わせ又は比率のもの、例えば、単一の光学活性な鏡像異性体、又は複数の鏡像異性体の各種組み合わせ又は比率のもの（例えば、スカレミック混合物及びラセミ混合物）が包含されることが意図されている。それに加えて、小分子の医薬品には、1つ又は複数の幾何異性体の形態が含まれていてもよく、それらそれぞれが、本明細書に包含されると考えるべきである。幾何異性体に関しては、コンジュゲートには、単一の幾何異性体、又は2つ以上の幾何異性体の混合物を含むことができるものの、特定のマルチアームポリマーコンジュゲート構造の中に入る単一の幾何異性体が好ましい。

【0162】

本明細書において提供されるのはさらに、薬学的添加物と組み合わせた、本明細書において提供されるようなTLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートを含む医薬製剤である。一般的には、コンジュゲートそのものは、固形の形態（例えば、沈殿物）にあるであろうが、それを、適切な薬学的添加物（固形の形態、液体の形態いずれであってもよい）と組み合わせることができる。

【0163】

医薬品添加物の例としては、以下のものからなる群より選択されるものが挙げられるが、これらに限定される訳ではない：炭水化物、無機塩、抗菌剤、抗酸化剤、界面活性剤、緩衝剤、酸、塩基、及びそれらの組み合わせ。

【0164】

炭水化物例えば、糖、変性糖例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化糖、及び／又は糖のポリマーを、医薬品添加物として存在させることができる。具体的な炭水化物系医薬品添加物としては、例えば以下のものが挙げられる：単糖類例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど；二糖類例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど；多糖類例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなど；並びにアルジトール例えば、マンニトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール、ミオイノシトールなど。

【0165】

医薬品添加物としてはさらに、以下のものも挙げられる：無機塩又は緩衝剤、例えば、クエン酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウム、硝酸カリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、及びそれらの組み合わせ。

【0166】

その製剤にはさらに、微生物の生育を防止又は阻止するための抗菌剤が含まれていてもよい。適切な抗菌剤の例を非限定的に挙げれば、以下のものである：塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、フェノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、チメロサル、及びそれらの組み合わせ。

【0167】

同様に、製剤の中に抗酸化剤を存在させることも可能である。抗酸化剤は、酸化を防止

10

20

30

40

50

するために使用され、それによって、その製剤の中のコンジュゲート又はその他の成分の劣化を防止する。好適な抗酸化剤としては、例えば、以下のものが挙げられる：パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、重亜硫酸ナトリウム、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、及びそれらの組み合わせ。

【0168】

医薬品添加物として、界面活性剤を存在させてもよい。界面活性剤の例としては、以下のものが挙げられる：ポリソルベート例えば、「Tween 20」及び「Tween 80」、並びにプルロニック例えば、F 68及びF 88（いずれも、BASF, Mount Olive, NJから入手可能）；ソルビタンエステル；脂質例えば、リン脂質例えばレシチン及びその他のホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノールアミン、脂肪酸及び脂肪族エステル；ステロイド例えば、コレステロール；並びにキレート化剤例えば、EDTA、亜鉛、及びその他のそのような適切なカチオン。

【0169】

その製剤の中には、医薬品添加物として、薬学的に許容される酸又は塩基が存在してもよい。使用することが可能な酸の非限定的な例としては、以下のものからなる群より選択されるものが挙げられる：塩酸、酢酸、リン酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、ギ酸、トリクロロ酢酸、硝酸、過塩素酸、リン酸、硫酸、フマル酸、及びそれらの組み合わせ。好適な塩基の例としては、次のものからなる群より選択される塩基が挙げられるが、これらに限定される訳ではない：水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、酢酸アンモニウム、酢酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、クエン酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、フマル酸カリウム、及びそれらの組み合わせ。

【0170】

その他の薬学的添加物及び／又は本開示に従った組成物、及び関連の製剤のための方法で使用するのに適した添加物は、例えば以下の文献に見出すことができる：“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 22nd Ed.; Remington: “The Essentials of Pharmaceuticals (2009)”；及び“Physician’s Desk Reference” (2017)；及び“Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 7th edition。

【0171】

組成物の中のコンジュゲートの量は、いくつかの因子に依存して変化するであろうが、その組成物を単位投与量容器の中に保存したときに、治療有効量となるようにするのが最善であろう。治療有効量は、臨床的に所望のエンドポイントに達するのに必要な量を求める目的で、コンジュゲートの量を増やしながら、繰り返し投与することによって、実験的に求めることができる。

【0172】

その組成物の中の、各種個々の医薬品添加物の量は、その医薬品添加物の活性、及びその組成物の具体的な必要性に応じて、変化するであろう。各種個々の医薬品添加物の最適量は、ルーチン的な実験によって決められる、即ち、医薬品添加物を（低から高までの範囲の）各種の量で含む組成物を調製し、その安定性及びその他のパラメータを確認し、次いで、顕著な有害効果がなく、最適な性能が達成される範囲を決定する。

【0173】

しかしながら、組成物の中には、医薬品添加物を、一般的には約1重量%～約99重量%、好ましくは約5重量%～98重量%、より好ましくは約15～95重量%の医薬品添加物の量で、最も好ましくは30重量%未満の濃度で存在させるであろう。

【0174】

医薬組成物は、任意の数の形態をとることができ、組成物はこれに関して限定されるものではない。例示的な製剤は、錠剤、カプレット、カプセル、ゲルキャップ、トローチ、

10

20

30

40

50

分散体、懸濁液、溶液、エリキシル剤、シロップ剤、舐剤、経皮貼付剤、噴霧剤、坐剤、及び散剤などの経口投与に好適な形態であり得る。好ましい実施形態において、組成物は腫瘍内投与に好適な形態である。

【0175】

経口投与形態としては、錠剤、カプレット、カプセル、ゲルキャップ、懸濁液、溶液、エリキシル剤、及びシロップ剤が挙げられ、また、任意選択的に被包される複数の顆粒剤、ビーズ、散剤又は粒剤を含んでもよい。このような投与形態は、製剤分野の当業者に知られる従来の方法を使用して作製され、関連文献に記載されている。

【0176】

例えば、錠剤及びカプレットは、標準的な錠剤加工手順及び装置を用いて製造することができる。本明細書で記載されるコンジュゲートを含有する錠剤又はカプレットを作製する際は、直接打錠法及び直接顆粒化法が好ましい。コンジュゲートに加えて、本錠剤及びカプレットは通常、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、充填剤、安定剤、界面活性剤、着色剤、流動化剤などの不活性の薬学的に許容可能な担体材料を含有することになる。結合剤を使用して、錠剤に凝集性の性質を付与し、従って、確実に錠剤がそのまま維持される。好適な結合剤材料としては、限定されるものではないが、澱粉（トウモロコシ澱粉及びアルファ化澱粉を含む）、ゼラチン、糖（スクロース、グルコース、デキストロース、及びラクトースを含む）、ポリエチレングリコール、ワックス、並びに天然ゴム及び合成ゴム、例えば、アカシアアルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系ポリマー（ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、微結晶セルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなど）、並びにビーガムが挙げられる。潤滑剤を使用して、錠剤製造を容易にして、粉末の流動を促進し、圧力が軽減される際の粒子キャッピング（即ち、粒子破砕）を防止する。有用な潤滑剤は、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、及びステアリン酸である。崩壊剤を使用して、錠剤の崩壊を容易にし、崩壊剤は通常、澱粉、粘土、セルロース、アルギン、ゴム、又は架橋ポリマーである。充填剤としては、例えば、二酸化ケイ素、二酸化チタン、アルミナ、タルク、カオリン、粉末セルロース、及び微結晶セルロースなどの材料、並びにマンニトール、尿素、スクロース、ラクトース、デキストロース、塩化ナトリウム、及びソルビトールなどの可溶性材料が挙げられる。当技術分野でよく知られるとおり、安定剤を使用して、一例として酸化反応を含む薬剤分解反応を阻害するか、又は遅らせる。

【0177】

カプセルはまた、好ましい経口投与形態であり、この場合、コンジュゲート含有組成物は、液体又はゲル（例えば、ゲルキャップの場合）又は固体（顆粒剤、ビーズ、散剤若しくは粒剤などの微粒子を含む）の形態で被包され得る。好適なカプセルとしては、硬質カプセル及び軟質カプセルが挙げられ、通常、ゼラチン、澱粉、又はセルロース系材料で作製される。二部分から成る硬質ゼラチンカプセルは、ゼラチンバンドなどで密閉されることが好ましい。

【0178】

実質的に乾燥形態（粉末又はケーキの形態であり得る凍結乾燥物又は沈殿物として）の非経口製剤、及び液体であり、且つ非経口製剤の乾燥形態を再構成する工程を要する注射用に作製された製剤が挙げられる。注射前に固体組成物を再構成するための好適な希釈剤の例としては、注射用静菌水、5%デキストロース水溶液、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液、生理食塩水、滅菌水、脱イオン水、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0179】

いくつかの場合において、非経口投与を目的とした組成物は、非水溶液、懸濁液、又はエマルジョンの形態をとることができ、通常、滅菌済みである。非水性溶媒又はビヒクルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油及びトウモロコシ油などの植物油、ゼラチン、並びにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。

【0180】

本明細書で記載される非経口製剤はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントを含有してもよい。製剤は、滅菌剤、細菌を保持するフィルターを通したる過、放射線照射、又は加熱を組み入れることによって滅菌される。

【0181】

コンジュゲートはまた、従来の経皮貼付剤又は他の経皮的な送達システムを用いて皮膚を通して投与することができ、ここで、コンジュゲートは、皮膚に貼られる薬物送達デバイスとして機能する積層構造内に含有される。このような構造において、コンジュゲートは、層、又は裏地の上部の下地となる「レザバー」に含有される。積層構造は、単一のレザバーを含有してもよいし、複数のレザバーを含有してもよい。

【0182】

コンジュゲートはまた、直腸投与用の坐剤に製剤化されてもよい。坐剤に関して、コンジュゲートを、ココバター（カカオ脂）、ポリエチレングリコール、グリセリンゼラチン、脂肪酸、及びこれらの組み合わせなどの（例えば、室温で固体を維持するが、体温で軟化するか、融解するか、又は溶解する賦形剤）である坐剤のベース材料と混合する。坐剤は、例えば、以下の工程（必ずしも提示される順序ではない）：坐剤のベース材料を融解して溶解物を形成する工程；コンジュゲートを組み込む工程（坐剤のベース材料の融解の前又は後のいずれか）；溶解物を鋳型に注ぐ工程；溶解物を冷却して（例えば、溶解物を含有する鋳型を室温環境に置く）、それにより坐剤を形成する工程；及び鋳型から坐剤を取り外す工程を実施することによって作製することができる。

【0183】

一部の好ましい実施形態において、コンジュゲート又はコンジュゲートを含む組成物は、腫瘍内に投与される（例えば、腫瘍に直接投与される（例えば、注射によって））。このような投与により、TLR7／8作動薬の体循環への、また、放出可能な結合を含むコンジュゲートの場合は腫瘍それ自体への遅延放出を伴い、腫瘍中においてTLR7／8作動薬の高い濃度が達成される。TLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートの腫瘍内投与のための例示的な製剤は、pH7.4のNa／Kリン酸塩緩衝液を含む。

【0184】

一部の実施形態において、コンジュゲートを含む組成物はさらに、好適な送達ビヒクルに組み込まれてもよい。このような送達ビヒクルは、コンジュゲートの制御放出及び／又は連続放出を実現し得、且つ標的化部分としても機能し得る。送達ビヒクルの非限定的な例としては、アジュバント、合成アジュバント、マイクロカプセル、微小粒子、リポソーム、及び酵母細胞壁粒子が挙げられる。酵母細胞壁は、様々に処理されてタンパク質成分、グルカン、又はマンナン層を除去される場合があり、全グルカン粒子（WGP）、酵母β-グルカンマンナン粒子（YGMP）、酵母グルカン粒子（YGP）、ロドトルラ（*Rhodotorula*）酵母細胞粒子（YCP）と称される。*S. cerevisiae*（*S. cerevisiae*）及びロドトルラ（*Rhodotorula*）種などの酵母細胞が好ましいが；任意の酵母細胞が使用されてもよい。これらの酵母細胞は、流体力学的体積に関して異なる特性を示し、それらの内容物を放出し得る標的器官も異なる。これらの粒子の製造及び特徴付けの方法は、米国特許第5,741,495号明細書、同第4,810,646号明細書、同第4,992,540号明細書、同第5,028,703号明細書、同第5,607,677号明細書並びに米国特許出願公開第2005／0281781号明細書及び同第2008／0044438号明細書に記載されている。

【0185】

本明細書に提供されるTLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートを、例えば癌を有する患者などの本コンジュゲートによる治療に応答する病態に罹患している患者に投与するための方法も提供される。本方法は、（好ましくは、医薬品の一部として提供される）治療有効量のコンジュゲートを投与する工程を含み、例示的な投与方法としては、経口投与に加えて、肺内、鼻内、頬側、直腸、舌下、経皮、及び非経口などの経路が挙げられる。本明細書で使用されるとき、用語「非経口」には、皮下、静脈内、動脈内、腹腔内、心臓内、くも膜下腔内、及び筋肉内注射、並びに点滴注射が含まれる。

【0186】

ある実施形態において、癌は固形癌である。例えば癌は、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結腸直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌からなる群から選択することができる。

【0187】

非経口投与が用いられる場合、例えば、約500～60,000ダルトンの範囲の分子量（例えば、約500、1000、2000、2500、3000、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30,000、40,000、50,000以上の分子量を有する）を有するいくらか大きいポリマーを用いることが有用である場合がある。

10

【0188】

一実施形態において、癌を治療する方法を対象とする方法が提供され、この方法は、患者に本明細書で記載されるコンジュゲートを含む医薬組成物を投与することを含む。

【0189】

一実施形態において、固形癌などの癌の治療に有用である医薬の調製における本明細書で記載されるコンジュゲートの使用が本明細書に提供される。

【0190】

投与すべき実際の用量は、対象の年齢、体重、及び全身状態並びに治療下の病態の重症度、医療専門家の判断、並びに投与されているコンジュゲートに応じて異なる。治療有効量は当業者に公知であり、且つ／又は関連の参考テキスト及び文献に記載されている。一般に、治療有効量は約0.001mg～1000mgの範囲であり、好ましくは0.01mg／日～750mg／日の用量、より好ましくは0.10mg／日～500mg／日の用量である。

20

【0191】

任意の所与のコンジュゲート（繰り返しになるが、好ましくは、医薬品の一部として提供される）の単位投与量を、臨床医の判断、患者の必要性などに応じて種々の投与スケジュールで投与することができる。特定の投与スケジュールは、当業者に公知であるか、又は通例の方法を用いて実験的に決定することができる。例示的な投与スケジュールとしては、限定されるものではないが、1日に5回、1日に4回、1日に3回、1日に2回、1日に1回、1週間に3回、1週間に2回、1週間に1回、1ヶ月に2回、1ヶ月に1回、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。一旦臨床エンドポイントが達成されたら、組成物の投与は中止される。

30

【0192】

トル様受容体（TLR）作動薬と長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の併用投与による癌を有する患者の治療

IL-2Rβ選択的作動薬の投与は、適応免疫系を標的化することによってある種の癌に罹患している患者に有益であると示唆された。このような投与は、CD8+記憶T細胞を増加させながら制御性T細胞の免疫抑制効果を低減して、それにより癌細胞を消失させる患者自身の免疫系を動員すると予想される。例えば、Charych et al., AACR 2013, Abstract #482を参照されたい。

40

【0193】

IL-2Rβ選択的作動薬の投与を介する癌の治療における癌患者の免疫系の動員（直接的に免疫を活性化することができる）を、場合によっては、例えば、追加の薬剤の投与によってさらに増強することができる。しかしながら、2種以上の免疫調節物質を投与することによって腫瘍に対する細胞傷害性免疫応答を活性化しようとする場合、多数の課題が生じる。例えば、場合によっては、第2の免疫調節薬の投与は、実際には、単剤として（即ち、単剤療法として）投与される場合には強力な抗腫瘍応答を促進する第1の免疫調節薬の細胞障害効果を増強する代わりに、細胞障害効果を減弱又は抑制する可能性がある。癌免疫療法において、有効な抗腫瘍応答を実現するための免疫刺激と免疫抑制との間の

50

好ましいバランスの達成は、特に複数の活性薬剤を投与する場合には重大な課題となる。

【0194】

TLR作動薬はそれらの抗腫瘍特性について調査されてきたが、概して、大部分のTLR作動薬は癌治療法として期待した成果をあげていない。このような低迷は、免疫抑制性因子の誘導がTLR作動薬誘導性炎症を弱める機構によって説明され得ると仮定されてきた。(Lu, H. *Frontiers in Immunology*, March 2014, 5, 83)。例えば、TLR作動薬は、樹状細胞上のCD80、CD86、及びCD40などの共刺激分子、並びに免疫応答を方向づけするTNF- α 及びIL-12などの炎症性サイトカインの誘導を介した免疫刺激効果を有する。しかしながら、TLR作動薬はまた、例えば、IL-10、制御性T細胞(Treg)、及びPD-1を含む、これら

10

全ては抗腫瘍免疫を抑制することが可能なくつかの免疫抑制性因子を誘導することによって、免疫抑制効果を有する(Lu, H., 2014、同個所)。従って、両方の成分が有利に相互作用して治療効果を増強する免疫療法的併用に達しようとするには、顕著な課題が存在している。

【0195】

上述のように、今日まで様々なプラットフォームを包含する有効な癌免疫療法の開発における多大な試行が存在しているが、例えば、癌を治療するための新たなより有効な免疫療法による治療レジメンを特定及び提供することが依然として必要とされている。本開示のこの及び他の態様は、この及び他の必要性に対処しようとするものである。

【0196】

20

概要

単一の免疫療法剤を含む現在の抗腫瘍戦略に関連する欠点、例えば、高い全身暴露並びに関連する毒性及び／又は最適以下の腫瘍溶解効果などの少なくとも一部に対処するための試行において、自然免疫活性化量のTLR作動薬及びIL-2R β 活性化量の長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬を、癌を有する対象に投与することを含む方法が本明細書に提供される。本開示は、少なくとも一部には、TLR作動薬、好ましくは本明細書で提供されるTLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲート及び長時間作用型IL-2R作動薬、より具体的にはIL-2R β バイアス作動薬を含む驚くほど有利な療法薬併用の発見に基づく。

【0197】

30

IL-2は、アルファ(IL2R α 、CD25)、ベータ(IL2R β 、CD122)及び共通のガンマ鎖受容体(γ_c ・CD132)を含有する受容体シグナリング複合体を通じて免疫細胞増殖及び活性化を刺激する。高用量において、IL2はヘテロ二量体IL2R β γ 受容体に結合し、腫瘍殺傷CD8+メモリーエフェクターT(CD8T)細胞の所望の拡大をもたらす。しかしながら、IL2はそのヘテロ三量体受容体IL2R $\alpha\beta\gamma$ にもより大きな親和性で結合し、それが免疫抑制CD4+、CD25+制御性T細胞(Treg)を拡大し、それが癌免疫療法についての不所望な効果をもたらし得る。従って、IL-2R $\alpha\beta$ バイアス作動薬、特に、長時間作用型IL-2R $\alpha\beta$ バイアス作動薬とTLR作動薬の投与を併用する治療モダリティが本明細書に提供される。理論により拘束されるものではないが、本出願人は、免疫抑制Tregの活性化を担うIL2R α サブユニットと相互作用する領域をマスクする(即ちその活性を抑制し、又は減衰させる)長時間作用型IL-2化合物、即ち長時間作用型IL-2R $\alpha\beta$ バイアス作動薬を利用することにより、抗原提示細胞の成熟及びT細胞プライミングの作用機序を有するTLR作動薬と選択的に併用する場合に、優れた治療有効性を達成することができることを発見し、それは本開示及び裏付けの実施例から明らかになる。実際に、代表的な実施例において、前述の併用により驚異的なアブスコパル効果がもたらされ、その結果、全ての腫瘍、つまりTLR作動薬が直接投与された腫瘍(第1の腫瘍)及びTLR作動薬が直接投与されなかった腫瘍(第2の腫瘍)の両方において、有効性が観察された。

40

【0198】

本明細書で提供される治療方法は、即ち、自然免疫応答を刺激するためのTLR作動薬

50

を投与することを含む。T L R 作動薬の投与は、例えば、自然免疫、骨髄系細胞応答を活性化し、且つ腫瘍抗原提示を増加させるために有効である。概して、T L R 作動薬は、局所感染を模倣することによって、腫瘍中において腫瘍抑制性微小環境を作出することができる。

【0199】

様々なT L R 作動薬を本明細書に記載される方法に従って投与することができ、本開示はこれに関して限定されるものではない。良好なアウトカムは、I L - 2 経路により（即ちT L R 作動薬と長時間作用型I L - 2 R α β バイアス作動薬の共投与により）達成してT L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R α β バイアス作動薬の補完性並びに作用機序に起因して所望のT細胞応答を刺激することができることが本出願人らの見地である。例示的なT L R 作動薬としては、限定されるものではないが、例えば、T L R 7又はT L R 8作動薬が挙げられる。特に好ましいT L R 作動薬は、上記のと通りのT L R 7 / 8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートである。

10

【0200】

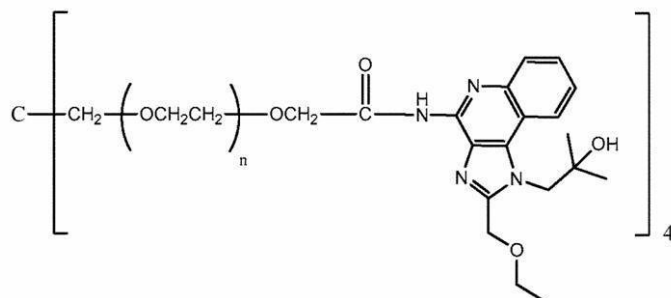
1つ以上の実施形態において、T L R 作動薬は、4つのポリマーアームのそれぞれの末端で安定的に又は放出可能に共有結合しているレシキモドなどのT L R 作動薬分子を有する、20,000ダルトンの4 - a r m - ペンタエリトリル系ポリエチレングリコールコンジュゲートである。

【0201】

ある実施形態において、長時間作用型T L R 作動薬は、4つのポリマーアームのそれぞれの末端で放出可能に共有結合しているR 8 4 8を有する4 - a r m - ペンタエリトリル系ポリエチレングリコールコンジュゲートであり、以下の構造を有する。

20

【化19】



30

【0202】

前述のT L R 作動薬マルチアームポリマーコンジュゲートは、本明細書で「4 - a r m - P E G - C M - N - R 8 4 8」と称され、N - は、T L R 作動薬分子R 8 4 8のアミノ基への結合を示し；その調製は実施例3において記載される。

【0203】

ある実施形態において、T L R 作動薬は、化合物1 ~ 10若しくは12 ~ 16のいずれか1つ、又はその薬学的に許容可能な塩形態である。

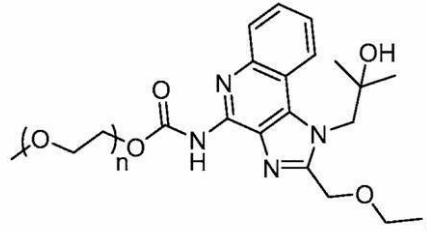
40

【0204】

ある実施形態において、T L R 作動薬は、下に示される構造を有する化合物11であり、nは、本明細書で記載される繰り返し単位の任意の好適な数である。

50

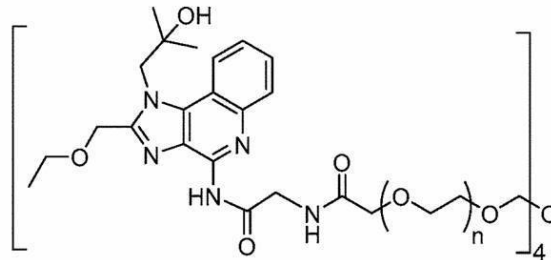
【化 20】



【0205】

さらに他の好ましい実施形態において、TLR作動薬化合物は、下に示される構造を有する化合物6であり、nは、本明細書で記載される繰り返し単位の任意の好適な数である。

【化 21】



【0206】

TLR作動薬は、任意の好適な投与経路、例えば皮内、静脈内、皮下、節内、リンパ管内、腫瘍内投与などにより投与することができる。本方法の1つ以上の特定の実施形態において、TLR作動薬は、例えば、対象における自然免疫を活性化するのに有効な量で注射により腫瘍に直接投与される。

【0207】

長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬

本明細書に記載される方法、製剤、キットなどは、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の投与を含む。これに関連して、本開示は、その作動薬が同じインビトロモデルにおけるIL-2Rαβへの結合親和性よりも少なくとも5倍高い（より好ましくは少なくとも10倍高い）IL-2Rβへのインビトロ結合親和性を呈し、IL-2よりも少なくとも10倍有効なインビボ半減期（IL-2のインビボ消失に基づく半減期）を有する限り、いかなる特定の長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬にも限定されない。例として、IL-2に対する親和性を基準として計測することが可能である。これに関連して、本明細書中の実施例1に言及されるRSLAIL-2は、IL-2と比べてIL-2Rαβへの親和性の約60倍の低下を呈するが、IL-2Rβへの親和性はIL-2と比べて約5倍の低下に過ぎない。

【0208】

長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の非限定的な例が国際公開第2012/065086号パンフレット及び国際公開第2015/125159号パンフレットに記載されている。例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬は本願の実施例19に言及されるRSLAIL-2であり、放出可能PEGは下記のとおり2, 7, 9置換フルオレンをベースとし、ポリ（エチレングリコール）鎖は、フルオレン環上の2及び7位からアミド結合（フルオレン-C(O)-NH-）、及びフルオレン環の9位にメチレン基（-CH₂-）により結合しているカルバメート窒素原子への結合によるIL-2への放出可能な共有結合により延在している。これに関連して、RSLAIL-2は、以下の式：

10

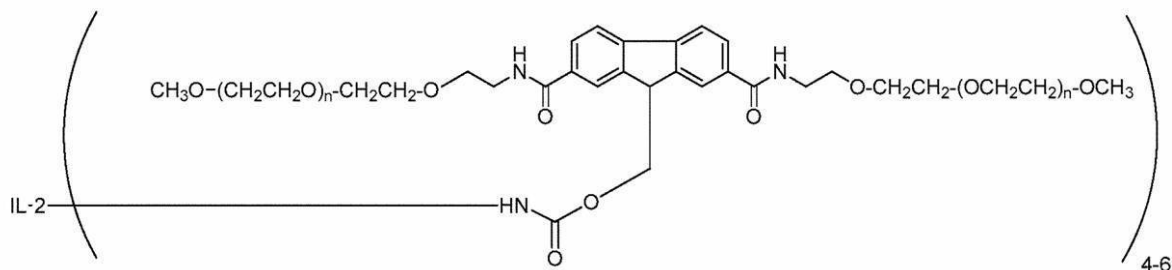
20

30

40

50

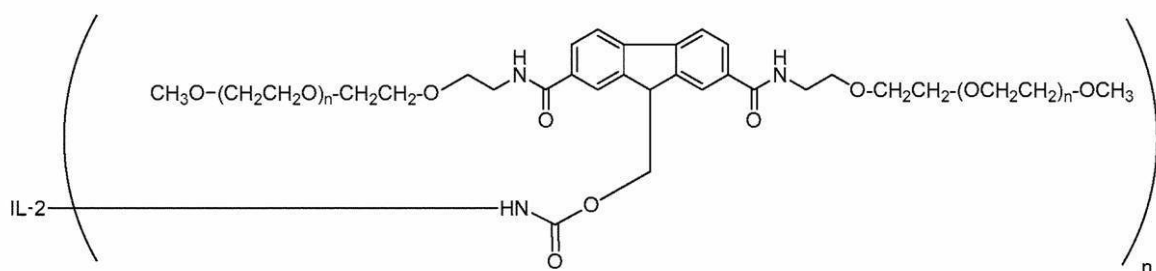
【化 2 2】



10

【式中、IL-2 は IL-2 の残基であり、及び「n」は約 3 ～ 約 4 0 0 0 の整数である】に包含される化合物、及びその薬学的に許容可能な塩を含む組成物である。1 つ以上の実施形態において、この組成物は、以下の式：

【化 2 3】



20

【式中、IL-2 は IL-2 の残基であり、(n) (IL-2 に結合しているポリエチレングリコール部分の数を指す) は 1、2、3、7 及び > 7 からなる群から選択される整数である】に包含される化合物、及びその薬学的に許容可能な塩を 10 % 以下（モル量基準）、好ましくは 5 % 以下（モル量基準）含有する。一部の実施形態において、RSLAIL-2 は IL-2 に結合している平均約 6 つのポリエチレングリコール部分を有する。一部の別の実施形態において、RSLAIL-2 は、一般に、不活性プロドラッグ、即ち投与時に不活性であると見なされ、インビボでのポリエチレングリコール部分の徐放により、腫瘍部位における持続濃度を達成するために有効なインターロイキン-2 の活性コンジュゲート形態を提供する。

30

【0 2 0 9】

RSLAIL-2 のさらなる例示的な組成物は、分子の全てのポリマー部分が約 2 5 0 ダルトン～約 9 0, 0 0 0 ダルトンの範囲の重量平均分子量を有する上記の式に係る化合物を含む。さらなる好適な範囲としては、約 1, 0 0 0 ダルトン～約 6 0, 0 0 0 ダルトンから選択される範囲、約 5, 0 0 0 ダルトン～約 6 0, 0 0 0 ダルトンの範囲、約 1 0, 0 0 0 ダルトン～約 5 5, 0 0 0 ダルトンの範囲、約 1 5, 0 0 0 ダルトン～約 5 0, 0 0 0 ダルトンの範囲、及び約 2 0, 0 0 0 ダルトン～約 5 0, 0 0 0 ダルトンの範囲の重量平均分子量が挙げられる。

40

【0 2 1 0】

ポリエチレングリコールポリマー部分のさらなる例示的な重量平均分子量としては、約 2 0 0 ダルトン、約 3 0 0 ダルトン、約 4 0 0 ダルトン、約 5 0 0 ダルトン、約 6 0 0 ダルトン、約 7 0 0 ダルトン、約 7 5 0 ダルトン、約 8 0 0 ダルトン、約 9 0 0 ダルトン、約 1, 0 0 0 ダルトン、約 1, 5 0 0 ダルトン、約 2, 0 0 0 ダルトン、約 2, 2 0 0 ダルトン、約 2, 5 0 0 ダルトン、約 3, 0 0 0 ダルトン、約 4, 0 0 0 ダルトン、約 4, 4 0 0 ダルトン、約 4, 5 0 0 ダルトン、約 5, 0 0 0 ダルトン、約 5, 5 0 0 ダルトン、約 6, 0 0 0 ダルトン、約 7, 0 0 0 ダルトン、約 7, 5 0 0 ダルトン、約 8, 0 0 0 ダルトン、約 9, 0 0 0 ダルトン、約 1 0, 0 0 0 ダルトン、約 1 1, 0 0 0 ダルトン、約 1 2, 0 0 0 ダルトン、約 1 3, 0 0 0 ダルトン、約 1 4, 0 0 0 ダルトン、約 1 5, 0

50

00ダルトン、約20,000ダルトン、約22,500ダルトン、約25,000ダルトン、約30,000ダルトン、約35,000ダルトン、約40,000ダルトン、約45,000ダルトン、約50,000ダルトン、約55,000ダルトン、約60,000ダルトン、約65,000ダルトン、約70,000ダルトン、及び約75,000ダルトンが挙げられる。一部の実施形態において、ポリエチレングリコールポリマーの重量平均分子量は約20,000ダルトンである。

【0211】

上記のとおり、長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬は、(TLR作動薬の場合のように)薬学的に許容可能な塩の形態であり得る。典型的には、かかる塩は薬学的に許容可能な酸又は酸等価物との反応によって形成される。これに関連して用語「薬学的に許容可能な塩」は、概して、比較的非毒性の無機酸及び有機酸付加塩を指し得る。これらの塩は、投与媒体又は剤形製造過程においてインサイチューで、又は別途本明細書に記載されるとおりの長時間作用型インターロイキン-2を好適な有機酸又は無機酸と反応させて、そのようにして形成された塩を単離することにより調製し得る。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩(naphthylate)、シュウ酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。(例えば、Berget al. (1977)「薬学的塩(Pharmaceutical Salts)」, J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。従って、記載されるとおりの塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機酸に由来してもよく;又は酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸(salicylic)、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸(isothionic)などの有機酸から調製されてもよい。

【0212】

前述のIL-2R β バイアス作動薬に関して、用語「IL-2」は、本明細書で使用されるとき、ヒトIL-2活性を有する部分を指す。用語、「残基」は、IL-2の残基の文脈では、上記の式に示されるとおり、IL-2分子のうち1つ以上の共有結合部位においてポリエチレングリコールなどのポリマー剤との共有結合後に残る部分を意味する。非修飾IL-2がポリエチレングリコールなどのポリマーに結合すると、その1つ以上のポリマーとの結合に付随する1つ以上の共有結合の存在によってIL-2は僅かに変化することが理解されるであろう。この僅かに変化した形態の、別の分子に結合したIL-2は、ある場合には、IL-2の「残基」と称され得る。

【0213】

例えば、国際公開第2012/065086号パンフレットに記載される配列番号1~4のいずれか1つに対応するアミノ酸配列を有するタンパク質が、それらと実質的に相同な任意のタンパク質又はポリペプチドと同様に、例示的IL-2タンパク質である。用語の実質的に相同とは、特定の対象配列、例えば突然変異配列が1つ以上の置換、欠失、又は付加だけ参照配列と異なるが、その正味の効果は参照配列と対象配列との間に有害な機能的相違をもたらさないものであることを意味する。本明細書の目的上、95パーセントより高い相同性、等価な生物学的活性(必須ではないが等価な生物学的活性強度)、及び等価な発現特性を有する配列が、実質的に相同と見なされる。相同性を決定する目的上、成熟配列のトランケーションは無視しなければならない。本明細書で使用されるとき、用語「IL-2」には、例えば部位特異的突然変異誘発によるとおり意図的に修飾されるか、又は突然変異を通じて偶発的に修飾されたタンパク質が含まれる。これらの用語にはまた、1~6つのさらなるグリコシル化部位を有する類似体、タンパク質のカルボキシ端側

10

20

30

40

50

末端に少なくとも1つのさらなるアミノ酸を有する類似体であって、そのさらなる1つ以上のアミノ酸が少なくとも1つのグリコシル化部位を含む類似体、及び少なくとも1つのグリコシル化部位を含むアミノ酸配列を有する類似体も含まれる。この用語には、天然の部分及び組換え生成された部分の両方が含まれる。加えて、IL-2は、ヒト供給源、動物供給源、及び植物供給源に由来し得る。1つの例示的IL-2は、アルデスロイキンと称される組換えIL-2である。

【0214】

化合物の放射標識、そのインビボ投与、及びそのクリアランスの決定に関わるものなどの従来手法を用いて、長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬であると提案される化合物が「長時間作用型」であるかどうかを決定することができる。本明細書における目的上、IL-2 R β バイアス作動薬の性質は、典型的には、マウスにおいて評価しようとする作動薬の投与後の様々な時点でフローサイトメトリーを用いてリンパ球のSTAT5リン酸化を計測することにより決定される。参考として、IL-2では約24時間までにシグナルが失われるが、長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬についてはそれより長い期間持続する。例示として、RSLAIL-2の組成物についてシグナルは数日間持続する。

【0215】

ここで本明細書に記載される長時間作用型作動薬のIL-2 R β バイアスを考慮して、実施例20は、RSLAIL-2の例示的組成物についての受容体バイアスに関連するインビトロ及びインビボデータの両方を提供する。実施例20に記載されるとおり、マウス黒色腫瘍モデルにおいて、IL-2と比較した場合のRSLAIL-2についてのCD8/制御性T細胞の比は、IL2受容体アルファと比べたIL-2受容体ベータの優先的な活性化を裏付ける。例示的な長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬、例えばRSLAIL-2は、例えばTregと比べてエフェクターCD8+T及びNK細胞を優先的に活性化させ、拡大するために有効である。

【0216】

さらに、代表的な長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬、例えばRSLAIL-2は、IL-2と比べて増加した腫瘍曝露、好ましくは有意に増強された腫瘍曝露、例えばIL-2の等価物について正規化した場合、少なくとも50倍増加した曝露、又は少なくとも100倍増加した曝露、又は少なくとも200倍増加した曝露、又は少なくとも300倍増加した曝露、又は少なくとも400倍増加した曝露、又は少なくとも500倍増加した曝露を提供する。

【0217】

上記に関連する方法、組成物、及びキット

本明細書に記載される長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬の特徴の少なくとも1つ以上に基づき、免疫抑制Tregの活性化を担うIL2 R α サブユニットと相互作用する領域をマスクする長時間作用型IL-2化合物を全身的に投与することによって、投与、例えば、最小の全身暴露を伴うTLR作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートの局所投与により腫瘍中のTLR活性を選択的に最適化して、それにより癌患者におけるT細胞応答を拡大して、それによりこの併用に対する優れた治療有効性を達成するために有効な方法が本明細書に提供される。

【0218】

本明細書に記載される方法、組成物、及びキットによれば、長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬はIL-2 R β 活性化量で提供される。当業者は、どのくらいの所与の長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬がIL-2 R β における臨床的に有意なアゴニスト活性をもたらすのに十分であるかを決定することができる。例えば、当業者は文献を参照してもよく、及び／又は一連の漸増量の長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬を投与して、どの1つ以上の量がIL-2 R β の臨床的に有意なアゴニスト活性をもたらすかを決定してもよい。或いは、長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬の活性化量を、上記に記載されるインビボSTAT5リン酸化アッセイを用いて決定する（投与後にインビボで決定する）ことができ、ここではピーク時点でNK細胞の10%を上回るSTA

T5リン酸化を誘導するのに十分な量が活性化量と見なされる。

【0219】

しかしながら、1つ以上の例において、IL-2Rβ活性化量は、タンパク質の量で表現される以下の範囲の1つ以上により包含される量である：約0.01~100mg/kg；約0.01mg/kg~約75mg/kg；約0.02mg/kg~約60mg/kg；約0.03mg/kg~約50mg/kg；約0.05mg/kg~約40mg/kg；約0.05mg/kg~約30mg/kg；約0.05mg/kg~約25mg/kg；約0.05mg/kg~約15mg/kg；約0.05mg/kg~約10mg/kg；約0.05mg/kg~約5mg/kg；約0.05mg/kg~約1mg/kg。一部の実施形態において、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬は、0.7mg/kg以下の用量において投与する。特定の例示的な投与量範囲には、例えば約0.1mg/kg~約10mg/kg、又は約0.2mg/kg~約7mg/kg又は約0.2mg/kg~約0.7mg/kg未満が含まれる。

10

【0220】

確認のために言えば、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬に関して、活性化の量及び程度は大きく異なり得、TLR作動薬の投与と合わせた場合になお有効であり得る。即ち、IL-2Rβでごく最小限の作動薬活性を十分に長期間にわたり呈する長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の量は、TLR作動薬と投与する場合、本明細書に記載される方法、組成物、及びキットが臨床的に意味のある応答を可能とする限り、なおも長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であり得る。一部の例において、（例えば）相乗的相互作用及び応答に起因して、TLR作動薬（例えば、長時間作用型TLR作動薬）の投与を伴う場合、IL-2Rβの作動薬活性は最小限だけ要求され得る。

20

【0221】

本明細書に記載される治療方法は、患者ケアを監督する臨床医がその治療方法を有効であると見なす限り継続され得る。治療方法が有効であることの指標となる非限定的パラメータには、以下のいずれか1つ以上が含まれる：腫瘍縮小（重量及び／又は容積の点で）；個別の腫瘍コロニーの数の減少；腫瘍消失；及び無進行生存。腫瘍サイズの変化は、任意の好適な方法、例えばイメージングにより決定することができる。様々な診断イメージングモダリティ、例えばコンピュータ断層撮影（CTスキャン）、二重エネルギーCDT、陽電子放出断層撮影及びMRIを用いることができる。

30

【0222】

TLR作動薬及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の実際の用量、並びに本明細書に記載される方法、組成物、及びキットに関連する投与レジメンは、対象の年齢、体重、及び全身状態並びに治療下の癌の種類及び進行、医療専門家の判断、並びに投与すべき特定のTLR作動薬及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬に応じて異なる。

【0223】

TLR作動薬及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の投与頻度及びスケジュールに関して、当業者は適切な頻度を決定することが可能であろう。例えば臨床医は、治療サイクルにおいて、TLR作動薬を例えば単一用量として又は例えば数日間若しくは数週間の過程にわたる一連の用量のいずれかで投与することを決定することができる。一部の治療レジメンにおいて、TLR作動薬は、治療の開始時に単一用量として投与する。長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬は、TLR作動薬と同時に、又はTLR作動薬の投与前、又はTLR作動薬の投与後のいずれかで投与する。好ましい治療モダリティにおいて、TLR作動薬は、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の前に投与する。例えば、TLR作動薬がTLR7/8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートである場合、TLR作動薬は腫瘍内に投与するが、IL-2Rβバイアス作動薬は、例えば注射によって全身的に投与する。例えば一部の治療モダリティにおいて、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬は、TLR作動薬投与の14日以内に（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14日目のいずれか1日に）投与し、0日目は治療の開始を示す。一部の治療レジメンにおいて、長時間作用型IL-2Rβバイア

40

50

ス作動薬は、T L R 作動薬の投与の7日以内、例えば、1、2、3、4、5、6又は7日目のいずれか1日に投与するか；T L R 作動薬の投与の4日以内に投与するか、又はT L R 作動薬の投与の2日以内に投与する。

【0224】

I L - 2 R β バイアス作動薬の長時間作用性質に基づき、このような化合物は、典型的には、比較的低頻度で（例えば3週間に1回、2週間に1回、8～10日に1回、週に1回など）投与する。

【0225】

治療過程に関連する例示的な時間の長さには、約1週間；約2週間；約3週間；約4週間；約5週間；約6週間；約7週間；約8週間；約9週間；約10週間；約11週間；約12週間；約13週間；約14週間；約15週間；約16週間；約17週間；約18週間；約19週間；約20週間；約21週間；約22週間；約23週間；約24週間；約7ヵ月；約8ヵ月；約9ヵ月；約10ヵ月；約11ヵ月；約12ヵ月；約13ヵ月；約14ヵ月；約15ヵ月；約16ヵ月；約17ヵ月；約18ヵ月；約19ヵ月；約20ヵ月；約21ヵ月；約22ヵ月；約23ヵ月；約24ヵ月；約30ヵ月；約3年；約4年；約5年が含まれる。

【0226】

本明細書に記載される治療方法は、典型的には、患者ケアを監督する臨床医がその治療方法を有効である、即ち患者が治療に応答していると見なす限り継続される。治療方法が有効であることの指標となる非限定的なパラメータには、以下の1つ以上が含まれ得る：腫瘍縮小（重量及び／又は容積及び／又は外観の点で）；個別の腫瘍コロニーの数の減少；腫瘍消失；無進行生存；好適な腫瘍マーカーによる適切な応答（該当する場合）、N K（ナチュラルキラー）細胞数の増加、T細胞数の増加、メモリーT細胞数の増加、セントラルメモリーT細胞数の増加、制御性T細胞、例えばC D 4 + T r e g、C D 2 5 + T r e g、及びF o x P 3 + T r e g の数の低下。

【0227】

本明細書に提供される方法は、（特に）癌を有する患者の治療に有用である。例えば、患者は、T L R 作動薬単独による治療、長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬単独による治療、並びにT L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬の併用に対して応答性であり得るが、その併用に対してより応答性である。別の例として、患者はT L R 作動薬又は長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬のいずれかに対して非応答性であり得るが、その併用に対して応答性である。さらに別の例として、患者は、単独で投与される場合にはT L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬の両方に対して非応答性であり得るが、その併用に対して応答性である。

【0228】

例えばT L R 作動薬及び／又は長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬の投与は、典型的には注射によるものである。肺内、鼻内、頬側、直腸、舌下及び経皮など、他の投与方法もまた企図される。本明細書で使用されるとき、用語「非経口」には、皮下、静脈内、動脈内、腫瘍内、リンパ管内、腹腔内、心臓内、くも膜下腔内、及び筋肉内注射、並びに点滴注射が含まれる。上記のとおり、T L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬は、別個に投与することができる。或いは、初回用量として、又は治療過程全体にわたり、又は投与レジメンの様々な段階においてT L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬の投与が同時であることが所望される場合（及びT L R 作動薬及び長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬が互いに及び所与の製剤中で適合する）、単一剤形／製剤の投与（例えば両方の免疫学的成分を含有する静脈内製剤の静脈内投与）により同時投与を実現することができる。当業者はルーチンの試験を通じて、2つのそのような成分が互いに及び所与の製剤中で適合するかどうかを決定することができる。

【0229】

本明細書に記載される療法薬併用、即ち長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬及びT L R 作動薬は、キットの形態で提供することができる。上記のとおり、成分は、単一の

組成物中に、場合により、1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤を伴って含めることができ、又は別個の容器中で提供することができ、キットは、典型的には、使用説明書を含む。キット成分、例えばTLR作動薬と長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬とを含む組成物は、液体又は固体形態のいずれかであり得る。ある実施形態において、TLR作動薬及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬の両方は、固体形態である。代表的な固体形態は、例えば約5重量パーセント未満の水、又は好ましくは2重量パーセント未満の水を含有する固体乾燥形態であるものである。固体形態は、一般に水性希釈剤中での再構成に好適である。

【0230】

ここに記載した方法、キット及び関連組成物は、本明細書に記載される方法により治療又は予防し得る任意の病態、例えば癌に罹患している患者の治療に使用することができる。例示的病態は、癌、例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膀胱癌、脳癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、脳癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、及び白血病である。一部の特定の実施形態において、治療すべき癌は、固形癌、例えば乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、骨癌、結腸直腸癌、胃癌、リンパ腫、悪性黒色腫、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、腎癌、胆管癌、脳癌、子宮頸癌、上顎洞癌、膀胱癌、食道癌、ホジキン病及び副腎皮質癌などである。

【0231】

本方法、キット及び組成物は、単剤としてのTLR作動薬又は長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬のいずれかの投与の治療効力の増強に有用である。増強された応答は、治療の間、単一の治療ラウンド後、2〜3つの治療サイクル後など任意の好適な時点において、及び多数の好適な方法のいずれか、例として、腫瘍の縮小（部分奏効）、即ち腫瘍サイズ又は容積の評価、腫瘍の消失、疾患進行の低下（癌は進行していない）、及び1つ以上の腫瘍試験マーカーの分析により適宜評価することができる。特に有効な治療は、50%の最大腫瘍成長において評価する場合）、少なくとも5日、又は少なくとも10日、又は少なくとも12日、又は少なくとも15日だけ、又は少なくとも20日だけ、又は少なくとも30日以上だけ生存期間を延長する。

【0232】

本明細書に提供される方法、キット、組成物などは、治療を受ける対象における腫瘍成長又はサイズ（又は容積）の低下にも有用である。例えば一部の実施形態において、1つ以上の治療サイクルは、腫瘍サイズを治療前の腫瘍サイズと比較する場合に約25%だけ、又は約30%だけ、又は約40%だけ、又は約50%だけ、又はさらには約60%だけ、又は約70%以上だけ、例えば、約90%以上だけ低下させるために有効である。

【0233】

裏付けの実施例について見ると、実施例23〜30に詳細に記載されるとおり、様々なマウス腫瘍モデルを、TLR7/8作動薬の例示的なマルチアームポリマーコンジュゲートであるレシキモド、4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848（化合物6）、及び例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2による併用治療の有効性について評価した。腫瘍モデルとしては、それぞれCT26結腸癌腫瘍モデル、WEHI-164線維肉腫腫瘍モデル、JC乳癌腫瘍モデル、4T1乳癌腫瘍モデル、MC38結腸癌腫瘍モデル、EMT6乳癌腫瘍モデル、RM-1前立腺癌腫瘍モデル、及びH22肝細胞癌腫瘍モデルが挙げられる。併用治療は、複数のモデルにおいて有意な腫瘍成長の抑制から最大100%の完全奏功の範囲にある有効性を有して、試験された全ての腫瘍モデルにおいて有効性を示した。

【0234】

CT26 結腸癌腫瘍モデルの結果は、RSLAIL-2 治療と併用した非常に少ない量の腫瘍内送達 TLR 作動薬が、治療部位及び非治療の遠隔腫瘍部位（即ち、TLR 作動薬化合物が直接投与されなかった部位）で腫瘍成長を有意に阻害することを示している。

【0235】

WEHI-164 線維肉腫腫瘍モデルにおいて、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による二重の薬剤治療は、投与の開始後52日目の試験終了までに当該動物のうち90%の生存をもたらした。際だったことに、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 治療群における全ての動物のうちの80%が完全奏功を有し、これは、ビヒクル群では生存している動物がいなかったこととは対照的に、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。全ての動物は、治療開始後17日目と31日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

10

【0236】

同様に、JC 乳腺癌腫瘍モデルにおいて、RSLAIL-2 と 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848（化合物6）による二重の薬剤治療（即ち、併用療法）は、43日目までに当該動物のうち90%の生存をもたらしたが、一方で、ビヒクル群においては、43日目までに生存している動物は残らなかった。RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 の併用治療は、投与開始後113日目の試験終了までに20%の動物の生存をもたらした。際だったことに、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 治療群における動物のうちの10%が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。対照的に、ビヒクル群は生存している動物がいなかった。実際に、全ての動物は、治療開始後26日目と36日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

20

【0237】

同様にして、4T1 乳癌腫瘍モデルにおいて、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による二重の免疫療法剤による治療は、投与の開始後25日目の試験終了までに当該動物のうち30%の生存をもたらした。RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による併用治療は、治療された動物において腫瘍成長を減速させることによって、ビヒクル治療と比較して有意な改善を示した。対照的に、ビヒクル群は、25日目の試験終了までに生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後16日目と18日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

30

【0238】

実施例27に提供されるとおり、MC38 結腸癌腫瘍モデルにおいて、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による二重の免疫療法剤による治療は、投与の開始後70日目の試験終了までに当該動物のうち50%の生存をもたらした。際だったことに、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 治療群における生存している全ての動物が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。著しく対照的に、ビヒクル群は生存している動物がいなかった。

40

【0239】

実施例28に記載されるとおりの皮下 EMT6 乳癌腫瘍モデルにおいて、RSLAIL-2 又は 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による単剤治療は、腫瘍成長の部分的な制御をもたらしたが、投与の開始後55日目の試験終了までに生存している動物はいなかった。著しく対照的に、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による二重の薬剤治療は、投与の開始後55日目の試験終了までに当該動物のうち100%の生存をもたらした。治療レジメンにおいて、腫瘍形成細胞を各側腹部において腫瘍とともに皮下に移植し、4-arm-PEG20k-CM

50

－G l y－N－R 8 4 8を、2つの腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）に腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接）投与したが、ここで、反対側の第2の腫瘍は、T L R作動薬、4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8で直接的に治療しなかった。R S L A I L－2を静脈内注射により全身的に投与した。生存群における全ての動物は、両方の腫瘍（第1及び第2）が消失して完全奏功を有した。即ち、予想に反して、R S L A I L－2＋4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8による併用治療は、等価用量のR S L A I L－2又は4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8による単剤での免疫療法治療モダリティと比較して有意な改善を提供するだけでなく、第1の腫瘍（T L R作動薬で注射される）及び第2の腫瘍（T L R作動薬の直接的な注射なし、第1の腫瘍部位から離れている）の両方の完全な根絶ももたらした。ビヒクル群は生存している動物がいなかった。

10

【0240】

実施例29に提供されるとおり、R M－1前立腺癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型I L－2 R βバイアス作動薬であるR S L A I L－2、及び例示的な長時間作用型T L R作動薬である4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。R S L A I L－2＋4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8による併用療法薬剤は、ビヒクル治療と比較して腫瘍成長の有意な低下をもたらした。R S L A I L－2＋4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8治療群において、治療開始後20日目までに当該動物の80%及び36日目の試験終了までに動物の10%の生存をもたらした。対照的に、ビヒクル群は、治療開始後20日目までに生存している動物がいなかった。

20

【0241】

実施例30に記載されるとおりのさらに別の例示的なインビボ試験において、H 2 2肝細胞癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型I L－2 R βバイアス作動薬であるR S L A I L－2、及び例示的な長時間作用型T L R作動薬である4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。R S L A I L－2＋4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8による二重の薬剤治療は、投与の開始後105日目の試験終了までに当該動物のうち50%の生存をもたらした。際だったことに、R S L A I L－2＋4－a r m－P E G 2 0 k－C M－G l y－N－R 8 4 8治療群における動物の40%が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。対照的に、ビヒクル群は生存している動物がいなかったが、これは、これらの例示的な実施例のそれぞれのとおり、本開示の併用療法により提供される例外的な結果を実証している。

30

【実施例】

【0242】

実施例に記載されている、全ての非P E G化学反応剤は、特に断らない限り、市場で入手可能である。水溶性のポリマー反応剤の製剤は、特に断らない限り、文献記載の当業者公知の方法を使用して調製することが可能であるか、或いは、市販している供給源から入手することが可能である。

40

【0243】

原料物質

4－a r m－P E G 2 0 k D－S C M（N H S－エステル）及び4－a r m－P E G 4 0 k D－S C M（N H S－エステル）は、国際公開第2010／019233A1号パンフレットの実施例3に従って、合成することができる。

【0244】

4－a r m－P E G 2 0 k D－B A（ブタン酸）は、国際公開第2010／019233A1号パンフレットの実施例1に従って、合成することができる。

【0245】

50

mPEG5kD-SCは、NOF America Corporation (Irvine, California, USA) から入手可能である。

【0246】

4-arm-PEG20kD-SCは、Biochempeg Scientific Inc., (Watertown, Massachusetts, USA) から入手可能である。

【0247】

4-arm-PEG20kD-NCOは、JenKem Technology (Plano, Texas, USA) から入手可能である。

【0248】

4-arm-PEG20kD-アミンは、Layson Bio, (Arab, Alabama, USA) から入手可能である。

【0249】

前述のものそれぞれの化学構造を、後に示す。

【0250】

アルデスロイキンのもとの同一のアミノ酸配列を有する組換えヒトIL-2をクローニングし、発現させ、使用して本明細書でRSLAIL-2と称される例示的な長時間作用型IL-2 R α β バイアス作動薬を調製した。

【0251】

RSLAIL-2は、国際公開第2015/125159号パンフレットの実施例1の手順に従うと得ることが可能な組成物を指し、概してマルチPEG化形態のIL-2を含む組成物であって、ここでマルチPEG化コンジュゲートに含まれるPEG部分への結合は投与後に遊離可能である。

【0252】

測定器

^1H NMR (核磁気共鳴) データは、500MHzのBruker NMR分光計で測定した。

【0253】

実施例1

4-arm-PEG20k-CM-N-R848 (化合物1) の合成

10

20

30

40

50

10



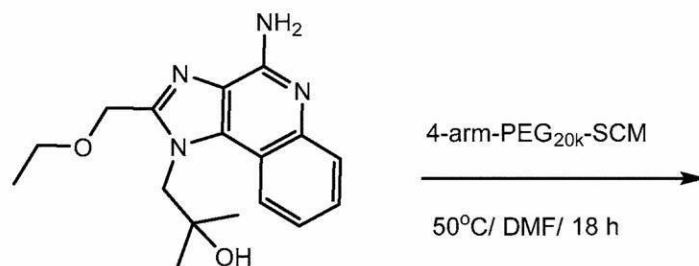
化合物 1

30

40

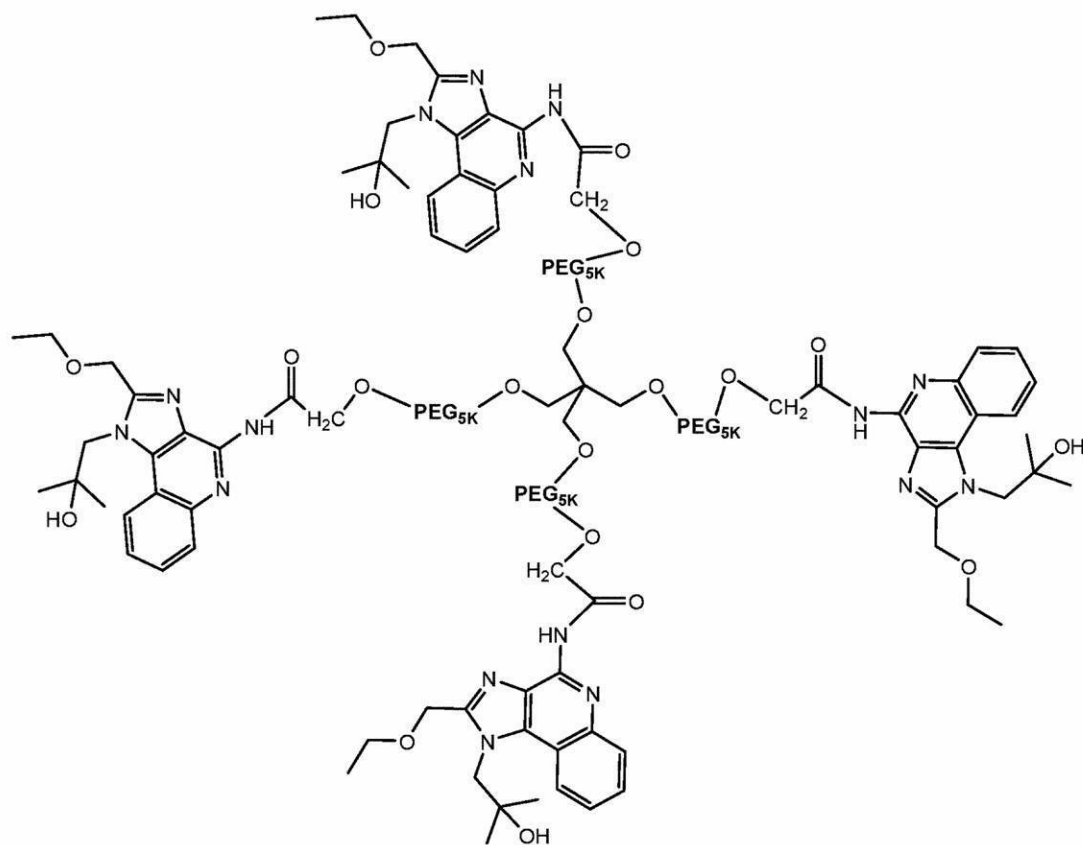
50

【化 2 5】



R-848

10



20

30

化合物 1

式中、4-arm-20k-PEG-SCMは、次の構造を有している：

40

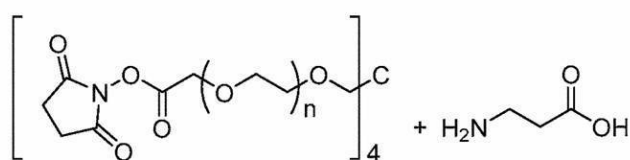
50

The chemical structure shows a central core consisting of a 1,3-bis(2-hydroxyethyl)urea derivative. This core is functionalized with four N-succinyl-L-glutamate (N-SG) units and three PEG_{5K} chains. The N-SG units are attached via their carboxylate groups to the terminal hydroxyl groups of the dendritic branches. The PEG_{5K} chains are attached via their hydroxyl groups to the terminal hydroxyl groups of the dendritic branches. The structure is symmetrical and represents a fourth-generation dendritic polymer.

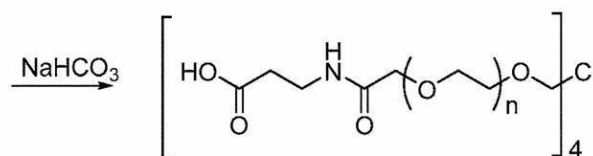
4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - β - アラニン - N - R 8 4 8 (化合物 2) の合成

CCOCc1nc2c(nc3c1cnc3c2c4ccccc4)nc(C(C)(C)O)cn1c2nc3c1cnc3c2c4ccccc4

10



20

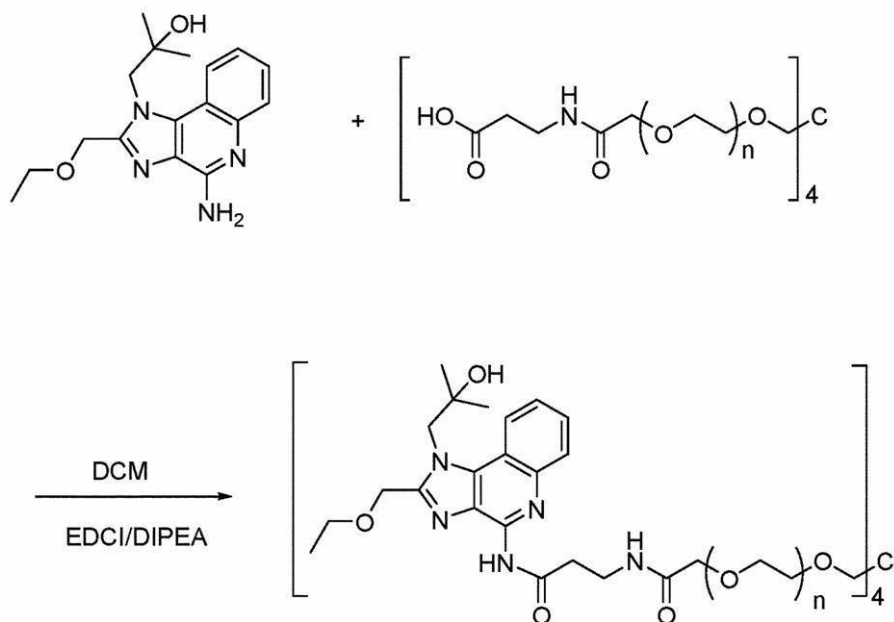


30

40

50

【化 29】



10

【0257】

4-arm-PEG20k-CM-β-アラニン-N-R848 :

20℃で、4-arm-PEG20k-CM-β-アラニン (4.012 g、0.8 mmol の-COOH)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (216 mg、1.6 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (307 mg、1.6 mmol)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (207 mg、1.6 mmol) を、ジクロロメタン (25 mL) の中に溶解させた。その混合物を、室温で30分間攪拌した。R848 (302 mg、0.96 mmol) を加え、その反応溶液を20℃で24時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に、攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、純粋なコンジュゲートが白色の固形物 (3.860 g、5.6% (w/w) のR848担持) として得られた。

30

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.82 (s, 3.56 H), 8.17 (d, $J=8.0$ Hz, 4.49 H), 8.07 (d, $J=8.0$ Hz, 4.02 H), 7.49 (t, $J=7.8$ Hz, 4.17 H), 7.49 (t, $J=7.8$ Hz, 7.55 H), 4.93 (s, 8.39 H), 4.79 (s, 9.0 H), 3.99 (s, 7.60 H), 3.80-3.44 (m, 1818 H), 1.33 (s) 及び 1.26 (t, $J=7.1$ Hz) (合計 34.18 H)。

40

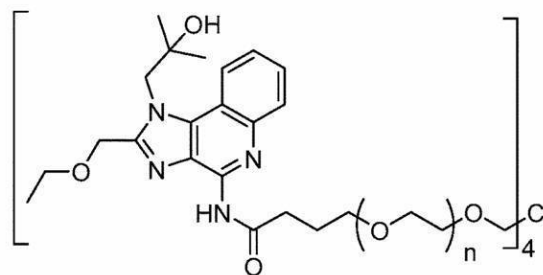
【0258】

実施例3

4-arm-PEG20k-BA-N-R848 (化合物3) の合成

50

【化 3 0】

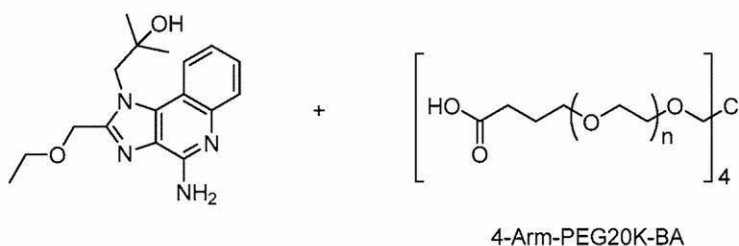


化合物 3

10

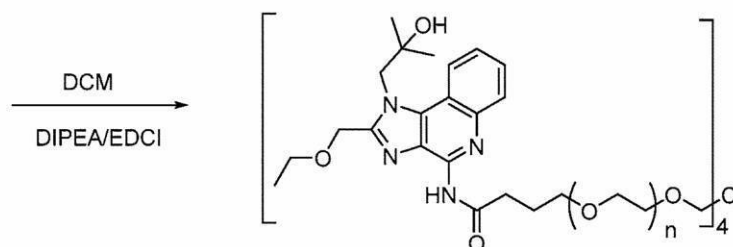
タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 3 1】



4-Arm-PEG20K-BA

20



30

【 0 2 5 9】

4-arm-PEG20k-BA-N-R848:

20℃で、4-arm-PEG20k-BA (4.020g、0.8mmolの-COOH)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (216mg、1.6mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (307mg、1.6mmol)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (207mg、1.6mmol)を、ジクロロメタン (15mL)の中に溶解させた。その混合物を、室温で30分間攪拌した。R848 (302mg、0.96mmol)を加え、その反応溶液を20℃で24時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に、攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50mL)を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300mL)の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50mL)を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、純粋なコンジュゲートが白色の固形物 (3.805g、5.2% (w/w) のR848担持)として得られた。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.16 (d, J=8.5Hz, 3.45H), 8.07 (d, J=8.5Hz, 3.43H), 7.59 (t, J=7.8Hz, 3.63H), 7.47 (t, J=7.8Hz, 3.71H), 4.91及び4.78 (

40

50

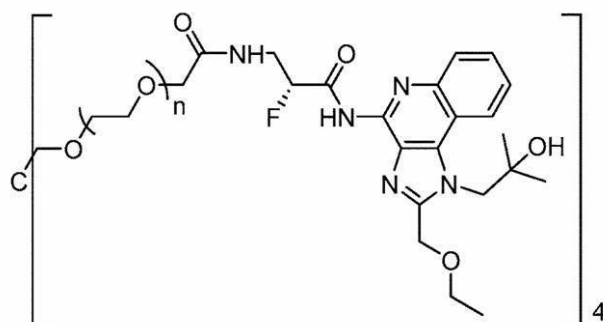
s, 15.86 H), 3.77–3.40 (m, 18.18 H), 2.10 (t, 7.30 H), 1.33 (s) 及び 1.26 (t, J = 7.1 Hz) (合計 31.34 H).

【0260】

実施例 4

4-arm-PEG20k-CM- α -(R)-フルオロプロパンアミド-N-R848 (化合物 4) の合成

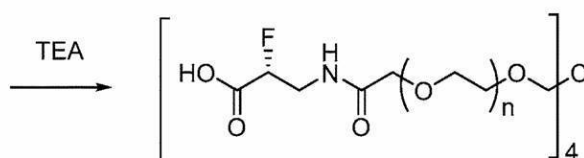
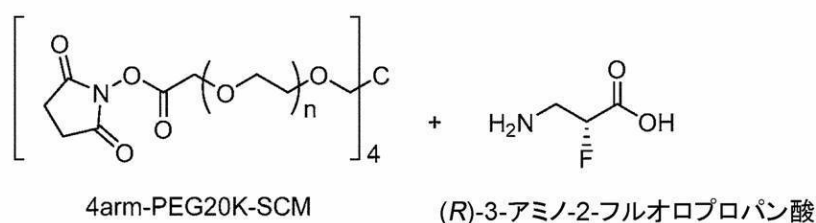
【化32】



化合物 4

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化33】



【0261】

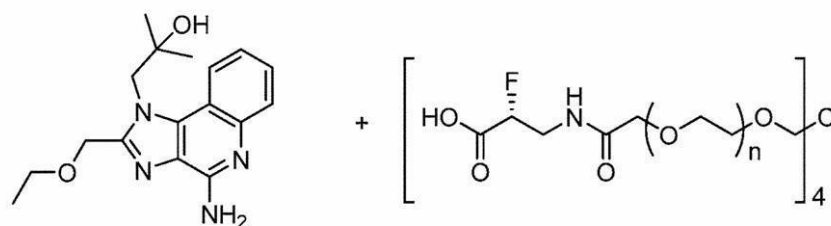
4-arm-PEG20k-CM- α -(R)-フルオロプロパン酸:

4-arm-PEG20k-SCM (5.140 g、1.03 mmol) を、ジクロロメタン (50 mL) の中に溶解させた。N,N-ジメチルホルムアミド (5 mL) の中に、(R)-3-アミノ-2-フルオロプロパン酸 (440 mg、4.11 mmol)、及びトリエチルアミン (416 mg、4.11 mmol) を加えて、懸濁液を生成させた。その懸濁液を、DCM 溶液中の 4-arm-PEG20k-SCM に加えた。その反応液を、20℃で10日間攪拌してから、水 (200 mL) で希釈した。ジクロロメタン (3×100 mL) を用いて、その水溶液を抽出した。有機相を合わせて、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥させ、濾過した。その濾液を濃縮して 50 mL とし、それをエチルエーテル (1 リットル) の中に加えて、沈殿物を生成させた。その沈殿物を濾過によって捕集し、それを高真空下で乾燥させると、4.638 g の白色の固形物である、4-arm-PEG20k-CM- α -(R)-フルオロプロパン酸が、70% の置換度で得られた。

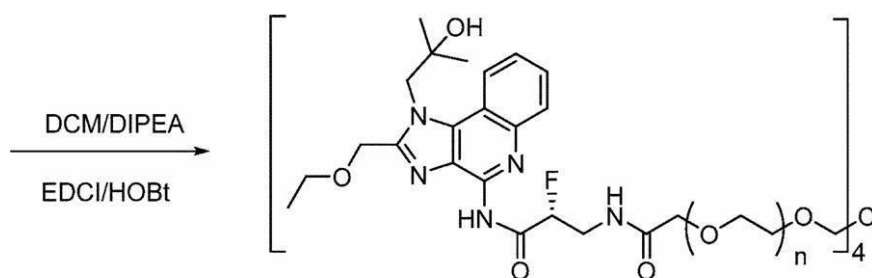
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (s, 2.77 H), 5.02 (

d, $J = 48.5 \text{ Hz}$, 2.77 H), 4.15 (s, 3.95 H), 3.65 (br, 1.818 H), 3.11 (q, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2.92 H), 1.35 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 3.95 H).

【化34】



10



20

【0262】

4-arm-PEG20k-CM- α -(R)-フルオロプロパンアミド-N-R848:

4-arm-PEG20k-CM- α -(R)-F-プロパン酸 (2.004 g、0.4 mmol の COOH)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (207 mg、1.6 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (153 mg、0.8 mmol)、及びヒドロキシベンゾトリアゾール (108 mg、0.9 mmol) を、脱水したジクロロメタン (15 mL) の中に溶解させた。30分かけて、R848 (113 mg、0.36 mmol) を加えた。その反応溶液を、20℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一晩かけて乾燥させると、白色の固形物として、純粋なコンジュゲート (1.602 g、4.1 (w/w) % の R848 担持) が得られた。

30

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (s, 5.53 H), 7.54 (d, $J = 57.7 \text{ Hz}$, 6.72 H), 4.92 (s, 4.74 H), 4.79 (s, 4.74 H), 3.62 (br, 1.818 H), 1.5-1.0 (br., 30.0 H).

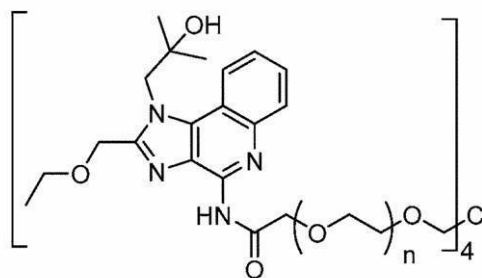
【0263】

実施例5

4-arm-PEG40k-CM-N-R848 (化合物5) の合成

40

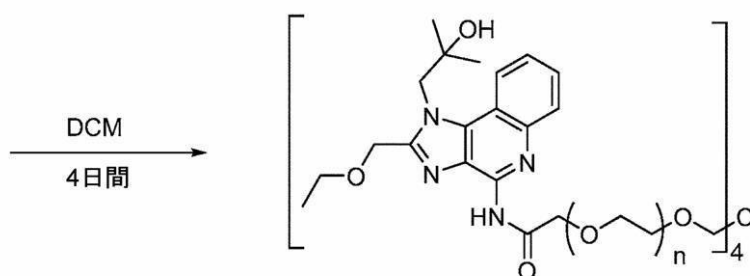
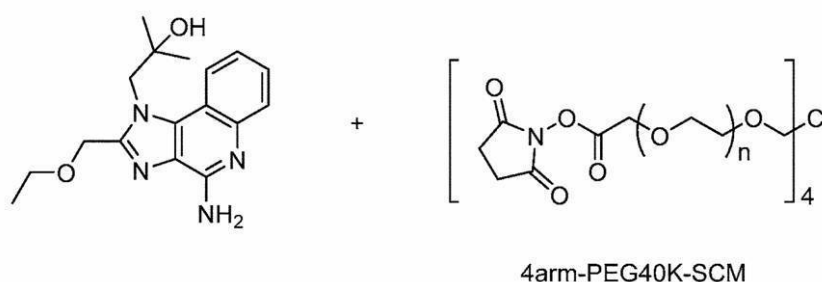
【化 3 5】



化合物 5

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 3 6】



【 0 2 6 4 】

4 - a r m - P E G 4 0 k - C M - N - R 8 4 8 :

4-arm-PEG40k-SCM (4.410 g、0.44 mmol の SCM) を、脱水したジクロロメタン (33 mL) の中に溶解させた。室温で、R848 (116 mg、0.53 mmol) を加えた。そのようにして得られた混合物の溶液を、室温で4日間攪拌した。その反応混合物を濃縮して、溶媒を除去した。上述と同じようにして、イソプロピルアルコール (300 mL) を用いて、その残分を2回、再結晶させると、4.262 g の反応生成物が白色の固形物として得られた。NMR 分析によると、その反応生成物には、2.0% (w/w) の R848 が含まれていた。

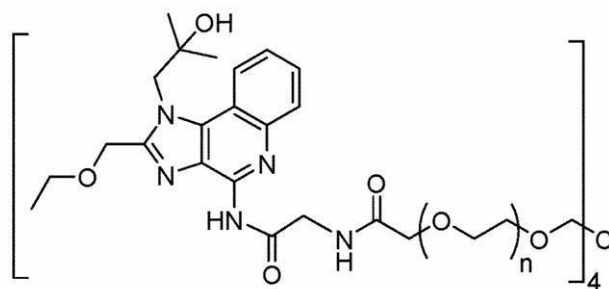
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (m, 5.4H), 7.58 (t, 2.8H), 7.47 (t, 2.8H), 4.92–4.70 (m, 10.6H), 4.07 (s, 1.5H), 3.88–3.45 (m, 36.36H), 1.23 (s) 及 1.21 (t) (合計 23.6H).

【 0 2 6 5 】

实施例 6

4-arm-PEG20k-CM-グリシン-N-R848（化合物6）の合成

【化 3 7】

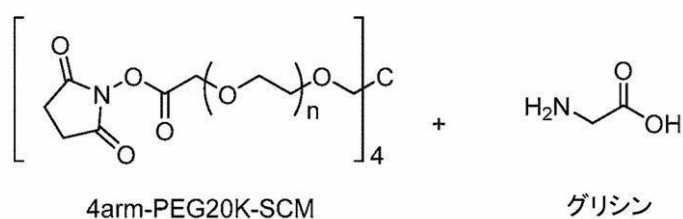


化合物 6

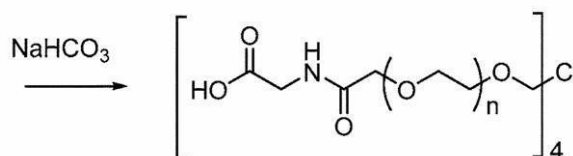
10

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 3 8】



20



【0 2 6 6】

30

4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - グリシン：

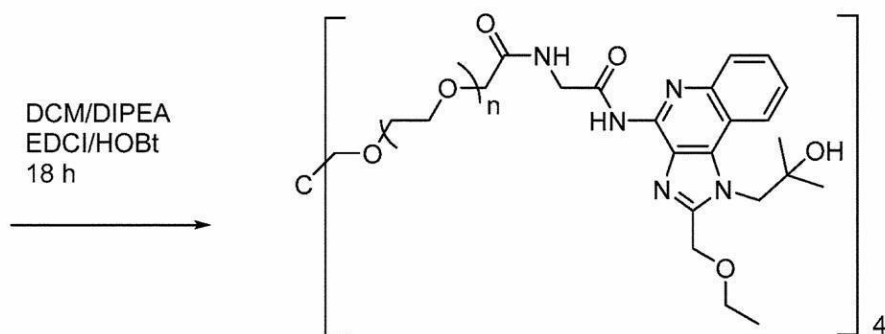
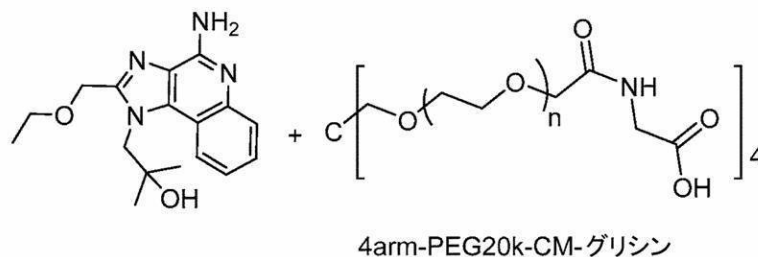
グリシン（6.003 g、10当量）及び重炭酸ナトリウム（6.720 g、10当量）を、脱イオン水（800 mL）の中に加え、その溶液を、透明になるまで攪拌した。その溶液の中に、4 - a r m - P E G 2 0 k - S C M（40.020 g、1当量）を加えた。その反応溶液を、室温で3時間攪拌した。その溶液の中に5 NのHCl溶液を加えて、pHを4.0に調節した。ジクロロメタン（2×150 mL）を用いて、その溶液を抽出した。有機相を合わせて、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。フリットを通過させることによって、固形物を除去した。その濾液を濃縮して50 mLとし、次いで、500 mLのエチルエーテルを加えて、沈殿物を得た。濾過により、反応生成物が、白色の固体の粉体（35.050 g）として得られ、高真空下、一夜かけて乾燥させた。

40

^1H NMR（500 MHz, CDCl_3 ） δ 4.01（d, 7.1 H）, 3.99（s, 7.1 H）, 3.74–3.48（m, 18.18 H）, 3.35（s, 7.1 H）。

50

【化 3 9】



【0267】

4-arm-PEG20k-CM-グリシン-N-R848:

20℃で、4-arm-PEG20k-CM-グリシン (2.520 g、0.5 mmol の COOH)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (135 mg、1 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (192 mg、1 mmol)、及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (258 mg、2 mmol) を、ジクロロメタン (15 mL) の中に溶解させた。その混合物を、20℃で30分間攪拌した。R848 (189 mg、0.6 mmol) を加えた。その反応溶液を、20℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に、攪拌しながら注いだ。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、純粋なコンジュゲートが白色の固形物 (1.823 g、5.1% (w/w) の R848 担持) として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.97 (s, 3.56 H), 8.18 (d, J=8.5 Hz, 3.52 H), 8.16-8.11 (m, 2.77 H), 7.81 (s, 2.92 H), 7.63 (t, J=7.8 Hz, 3.06 H), 7.51 (t, J=7.8 Hz, 3.48 H), 4.98 (d, J=39.6 Hz, 13.32 H), 4.81 (s, 6.64 H), 4.13 (s, 6.20 H), 3.65 (s, 18.18 H), 1.34 (s, 23.63 H), 1.27 (t, J=7.1 Hz, 10.59 H).

【0268】

t-ブチルエステル保護された4-arm-PEG20k-CM-グリシンの別な合成
次の反応スキームに従って、4-arm-PEG20k-CM-グリシンを合成した。

10

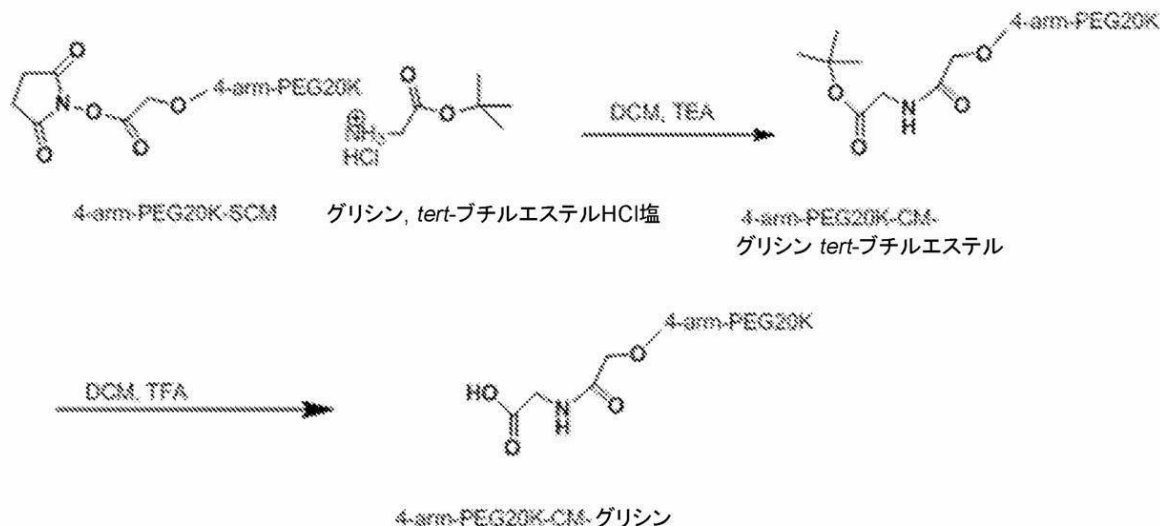
20

30

40

50

【化 40】



10

【0269】

4-arm-PEG20k-CM-グリシン *tert*-ブチルエステル:

グリシンの *tert*-ブチルエステルHCl塩 (2.1 g、12.6 mmol、1.05 当量) を、ジクロロメタン (300 mL) の中に加え、次いでトリエチルアミン (2.54 g、25 mmol、2.1 当量) 及び 4-arm-PEG20k-SCM (60 g、3 mmol、MW 約 20,000) を加えた。その反応溶液を、室温で 12 時間攪拌し、そして、攪拌下の TMBE (2.0 L) に加え、反応生成物を沈殿させた。濾過により、その反応生成物を単離し、30% MeOH / 70% TMBE (1 L) を用いて洗浄して、NHS を除去した。その反応生成物を、真空下で 12 時間かけて乾燥させると、4-arm-PEG20k-CM-グリシン *tert*-ブチルエステル (60.0 g) が得られた。

20

【0270】

4-arm-PEG20k-CM-グリシン

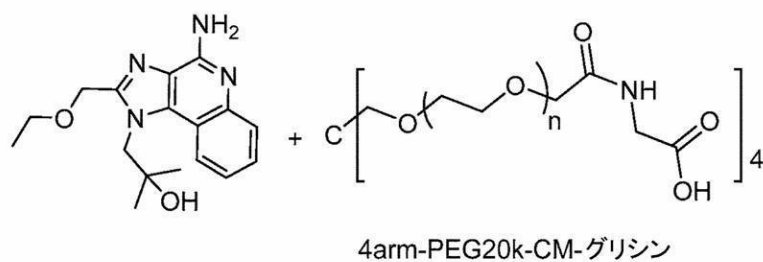
4-arm-PEG20k-CM-グリシン *tert*-ブチルエステル (55 g) と DCM (75 mL) との混合物に、TFA (225 mL) を加えた。そのようにして得られた反応溶液を、室温で 14 時間攪拌させておいた。その反応混合物を、攪拌下の TMBE (2.4 L) に徐々に加えて、反応生成物を沈殿させた。濾過により、その反応生成物を単離し、30% MeOH / 70% TMBE (1 L) を用いて洗浄した。真空下でその反応生成物を乾燥させると、4-arm-PEG20k-CM-グリシン (54.0 g) が得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (d, 7.1 H), 3.99 (s, 7.1 H), 3.74–3.48 (m, 18.18 H), 3.35 (s, 7.1 H)。

30

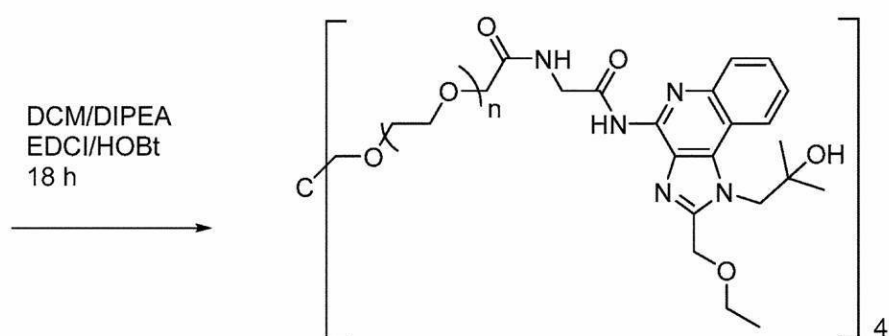
40

50

【化 4 1】



10



20

【 0 2 7 1】

4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - グリシン - N - R 8 4 8 :

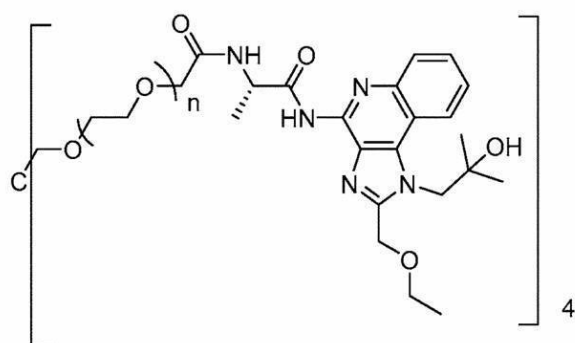
上述の反応スキームに従って、そのようにして得られた4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - グリシンを使用して、4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - グリシン - N - R 8 4 8 を得た。

【 0 2 7 2】

実施例 7

4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - (L) - アラニン - N - R 8 4 8 (化合物 7) の合成

【化 4 2】



化合物 7

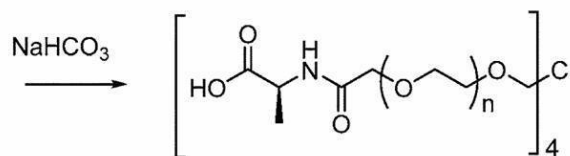
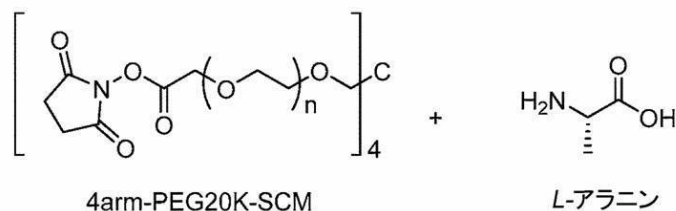
30

40

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

50

【化 4 3】



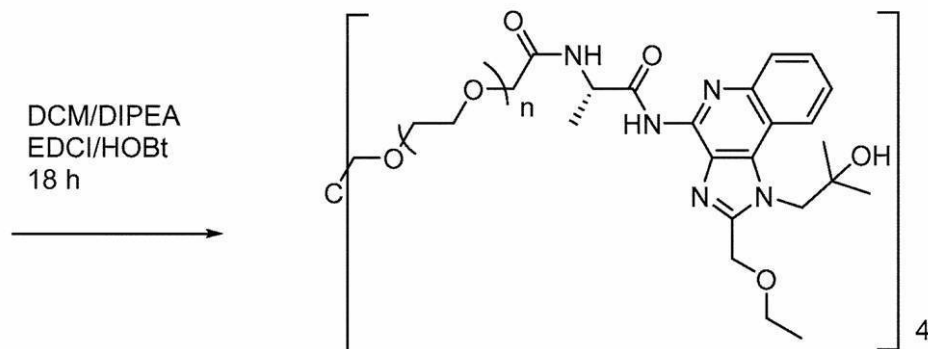
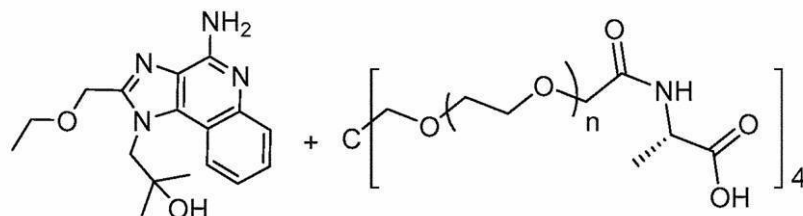
【0 2 7 3】

4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - L - アラニン：

L - アラニン (7 . 1 0 0 g 、 1 0 当量) 及び重炭酸ナトリウム (6 . 7 2 0 g 、 1 0 当量) を、脱イオン水 (8 0 0 m L) の中に加え、その溶液を、透明になるまで攪拌した。次いで、その溶液の中に、4 - a r m - P E G 2 0 k - S C M (4 0 . 0 3 0 g 、 1 当量) を加えた。その反応溶液を、2 0 ° C で 3 時間攪拌した。その溶液の中に 5 N の H C l 溶液を加えて、p H を 4 . 0 に調節した。ジクロロメタン (2 × 1 5 0 m L) を用いて、その溶液を抽出した。有機相を合わせて、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。フリットを通過させることによって、固形物を除去した。その濾液を濃縮して 5 0 m L とし、次いで、5 0 0 m L のエチルエーテルを加えて、沈殿物を得た。濾過により、反応生成物 (3 5 . 0 1 2 g 、 収率 8 7 %) が白色の固体粉体として得られ、高真空中、一夜かけて乾燥させた。

¹ H N M R (5 0 0 M H z , C D C l ₃) δ 4 . 4 2 (m , 3 . 5 6 H) , 3 . 8 5 (s , 7 . 1 1 H) , 3 . 5 8 - 3 . 3 3 (m , 1 8 1 8 H) , 3 . 2 7 (s , 7 . 9 0 H) , 1 . 3 0 (d , 1 0 . 2 8 H) .

【化 4 4】



【0274】

4-arm-PEG20k-CM-L-アラニン-N-R848:

20℃で、4-arm-PEG20k-CM-L-アラニン (2.500 g、0.5 mmol の COOH)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (258 mg、2.0 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (192 mg、1.0 mmol)、及びヒドロキシベンゾトリアゾール (135 mg、1 mmol) を、脱水したジクロロメタン (15 mL) の中に溶解させた。30分かけて、R848 (189 mg、0.6 mmol) を加えた。その反応溶液を、20℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら注いだ。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、白色の固形物として、純粋なコンジュゲート (1.702 g、4.2% (w/w) の R848 担持) が得られた。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J=8.4$ Hz, 5.14 H), 7.69–7.54 (m, 3.95 H), 7.48 (d, $J=8.0$ Hz, 2.37 H), 4.90 (s, 4.74 H), 4.78 (s, 4.74 H), 3.62 (br, 1818 H), 1.60 (d, $J=6.9$ Hz, 5.93 H), 1.39 (d, $J=7.3$ Hz, 5.93 H), 1.36–1.27 (m, 21.73 H), 1.24 (d, $J=6.7$ Hz, 15.80 H)。

【0275】

実施例 8

4-arm-PEG20k-CM-(L)-バリニン-N-R848 (化合物 8) の合成

10

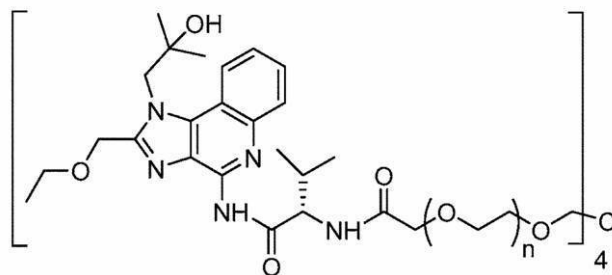
20

30

40

50

【化 4 5】

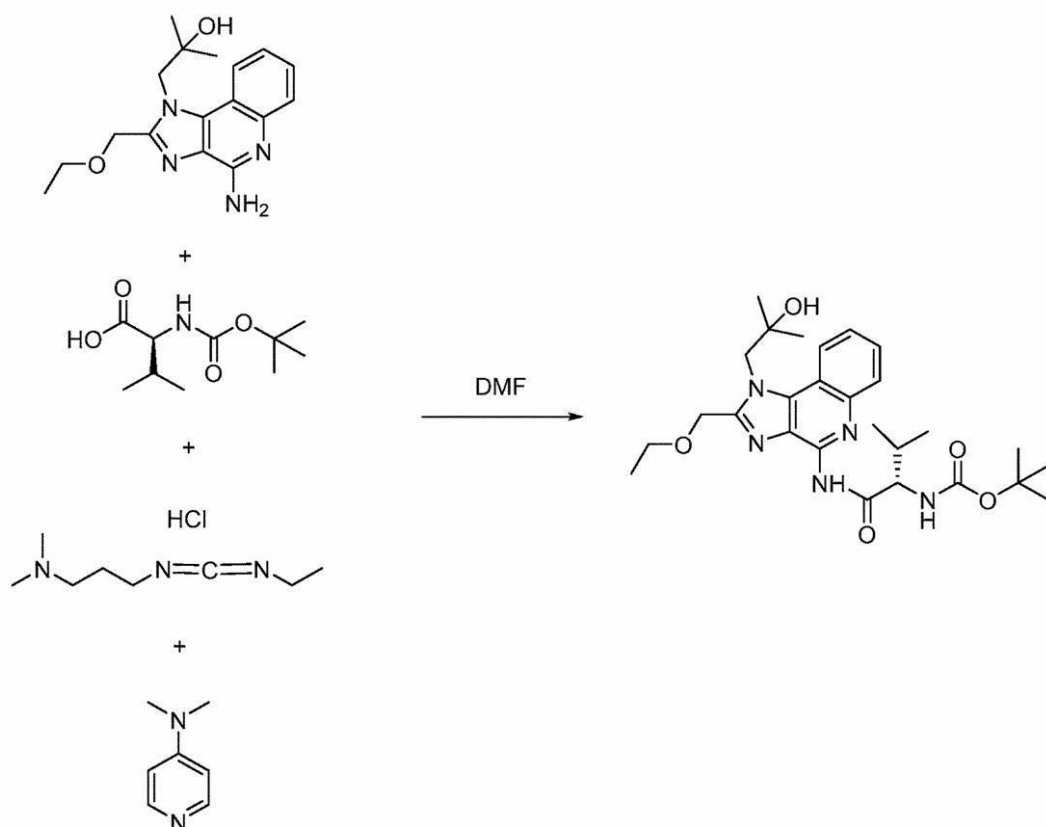


化合物 8

10

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 4 6】



20

30

【0 2 7 6】

B o c - バリン - R 8 4 8 :

40

1 - (4 - アミノ - 2 - (エトキシメチル) - 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 (R 8 4 8) (2 3 7 . 5 m g 、 0 . 7 5 5 m m o l) を、脱水した N , N - ジメチルホルムアミド (5 m L) の中に溶解させた。B o c - L - バリン (2 6 3 . 4 m g 、 1 . 2 m m o l) 及び 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (1 8 7 . 4 m g 、 1 . 5 3 4 m m o l) を加えた。N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (2 3 6 . 1 m g 、 1 . 2 3 2 m m o l) を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で 3 時間攪拌した。水を加えて、その反応を停止させた。塩水を加えた。酢酸エチル (2 × 5 0 m L) を用いて、その混合物を抽出した。それらの有機溶液を合わせて、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固させた。その残分を、シリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーを用い、1 ~ 1 0

50

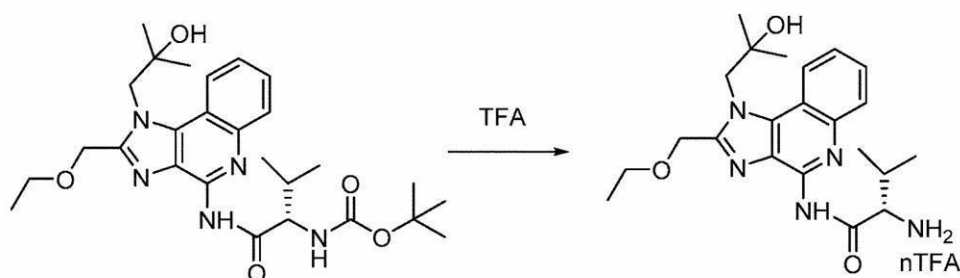
%のメタノール／ジクロロメタンを使用して精製すると、反応生成物（394.7mg）が白色の固形物として得られた。

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 8.99 (br., 1H), 8.15–8.11 (m, 2H), 7.58 (t, $J=7.5\text{ Hz}$, 1H), 7.47 (t, $J=7.5\text{ Hz}$, 1H), 5.42 (m, 1H), 4.89 (br, 2H), 4.77 (s, 2H), 3.63 (q, $J=7.0\text{ Hz}$, 2H), 3.27 (m, 1H), 2.45 (br, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (br, 6H), 1.22 (t, $J=7.0\text{ Hz}$, 3H), 1.14 (br, 3H), 0.93 (d, $J=6.0\text{ Hz}$, 3H). LC-MS: 514 (MH^+/z).

【0277】

バリニン-R848・nTFA塩：

【化47】



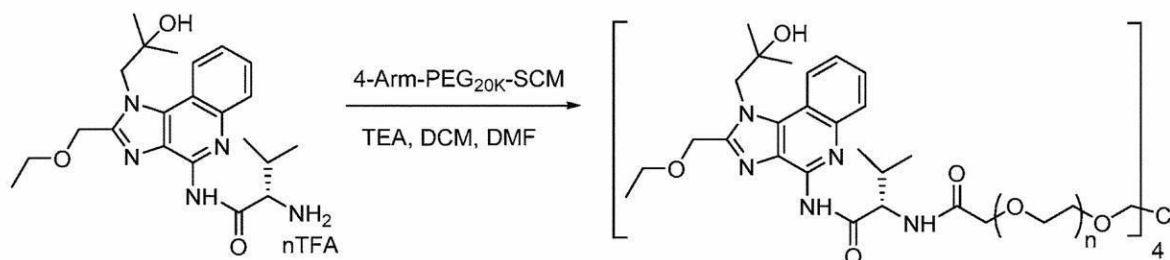
(S)-tert-ブチル(1-((2-(エトキシメチル)-1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバメート(Boc-バリニン-R848)(377.0mg, 0.73mmol)をジクロロメタン(30mL)の中に溶解させ、そしてトリフルオロ酢酸(3mL, 38.8mmol)を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で3.5時間攪拌した。その混合物を濃縮して、溶媒を除去した。その残分を、高真空中で乾燥させると、反応生成物(678.5mg)がTFA塩として得られた。

LC-MS: 414 (MH^+/z)。

【0278】

4-arm-PEG20k-バリニン-N-R848

【化48】



脱水したジクロロメタン(20mL)中の4-arm-PEG20k-SCM(4.170g, 0.74mmolのSCM)の溶液を、N,N-ジメチルホルムアミド(1.0mL)中のバリニン-R848・nTFA(約0.734mmol)とトリエチルアミン(0.3mL, 2.15mmol)との混合物に、室温に加えた。ジクロロメタン(約10mL)を使用して、バイアル中で、4-arm-PEG20k-SCMの残分を溶解させて、その反応混合物に加えた。トリエチルアミン(0.15mL, 1.076mmol)を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で23時間攪拌した。その反応混合物を濃縮して、溶媒を除去した。イソプロピルアルコール(275mL)を用いてその残分

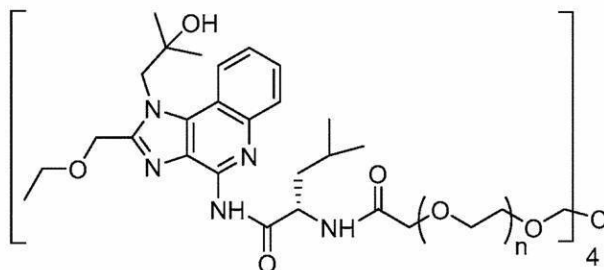
を再結晶させた。エチルエーテルを用いてその固形物を洗浄し、高真空下で一夜かけて乾燥させると、4.053 gの反応生成物が白色の固形物として得られた。薬物の担持率 (drug loading) は、4.3% (w/w) であった。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.99 (br), 8.10–8.09 (m, 6H), 7.54 (t, $J=7.5$ Hz, 3H), 7.47 (d, 3H), 7.42 (t, $J=7.5$ Hz, 3H), 4.840 (br, 6H), 4.712 (s, 6H), 4.07–3.95 (m, 6H), 3.72–3.42 (m, 18H), 3.39 (m, 3H), 2.41 (br, 6H), 1.36 (br, 18H), 1.16 (t, $J=6.5$ Hz, 9H), 1.12 (m, 9H), 0.92 (d, $J=6.0$ Hz, 9H).

【0279】

実施例 9

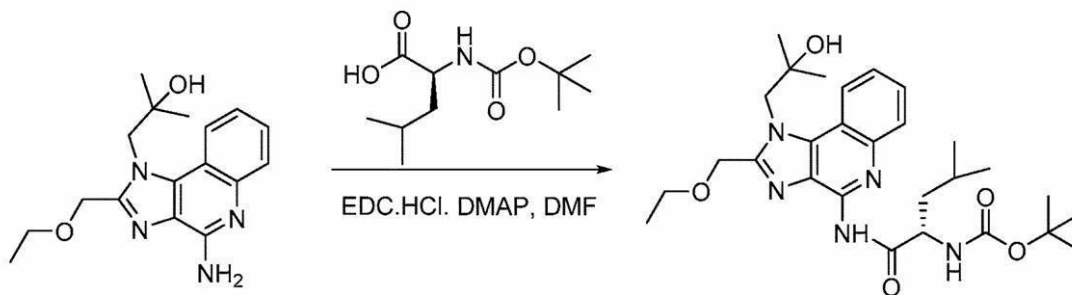
4-arm-PEG20k-CM-(L)-ロイシン-N-R848 (化合物9) の合成
【化49】



化合物9

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化50】



【0280】

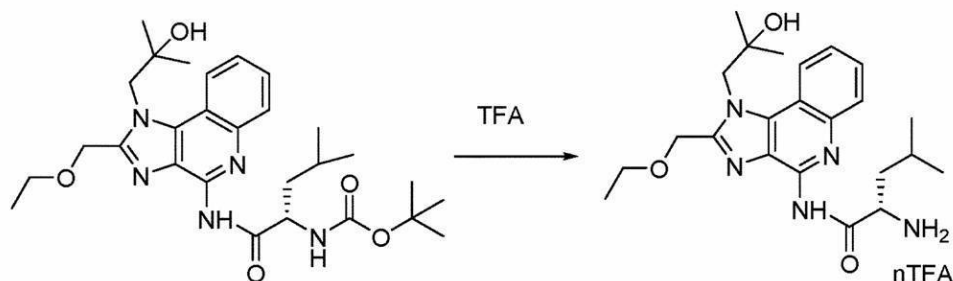
Boc-Leu-R848:

1-(4-アミノ-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)-2-メチルプロパン-2-オール (R848) (421.8 mg、1.34 mmol) を、N,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) の中に溶解させた。Boc-Leu-OH (501.4 mg、2.207 mmol) 及び 4-(ジメチルアミノ)ピリジン (344.6 mg、2.82 mmol) を加えた。N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (438.2 mg、2.286 mmol) を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で 18 時間攪拌した。水を加えて、その反応を停止させた。塩水を加えた。酢酸エチル (2 × 50 mL) を用いて、その混合物を抽出した。それらの有機溶液を合わせて、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、そして濃縮乾燥させた。その残分を、シリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーを用い、1~10%のメタノール/ジクロロメタンを使用して精製すると、494 mgの反応生成物が白色の固形物として、70%の収率で得られた。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 9.03 (br, 1H), 8.16 (d,

$J = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H), 8.17 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1 H), 7.57 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1 H), 7.46 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1 H), 5.26 (m, 1 H), 4.85 (br, 2 H), 4.77 (s, 2 H), 3.63 (q, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 H), 3.26 (m, 1 H), 1.89 (m, 2 H), 1.69 (s, 3 H), 1.56 (m, 1 H), 1.43 (s, 9 H), 1.31 (br, 3 H), 1.22 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H), 1.08 (br, 3 H), 0.94 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 3 H). LC-MS: 528 (MH^+ / z).

【化51】



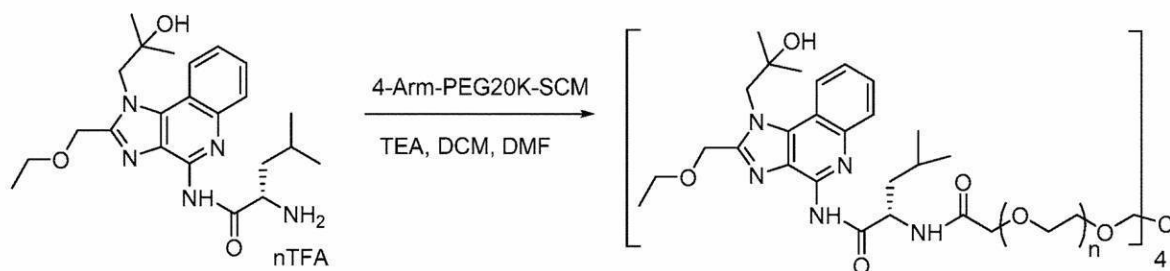
【0281】

Leu-R848・nTFA塩：

(S)-tert-ブチル(1-(2-(エトキシメチル)-1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-イル)アミノ)-4-メチル-1-オキソペンタン-2-イル)カルバメート(Boc-Leu-R848)(494 mg , 0.936 mmol)をジクロロメタン(20 mL)の中に溶解させ、そしてトリフルオロ酢酸(3 mL , 38.8 mmol)を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で4時間攪拌した。その混合物を濃縮して、溶媒を除去した。その残分を、高真空下で乾燥させると、反応生成物(895.7 mg)がTFA塩として得られた。

LC-MS: 428 (MH^+ / z)。

【化52】



【0282】

4-arm-PEG20k-CM-L-ロイシン-R848：

脱水したジクロロメタン(30 mL)中、4-arm-PEG20k-SCM(5.200 g , 0.96 mmol のSCM)の溶液を、N,N-ジメチルホルムアミド(1.0 mL)中、R848-Leu-NH₂・nTFA(約 0.936 mmol)の溶液に、室温で加えた。ジクロロメタン(約 10 mL)を使用して、バイアル中で、4-arm-PEG20k-SCMの残分を溶解させて、それを、その反応混合物に加えた。トリエチルアミン(0.35 mL , 2.51 mmol)を加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で35分間攪拌した。トリエチルアミン(0.25 mL , 1.79 mmol)を加えた。その混合物を、室温で19時間攪拌した。その反応混合物を濃縮して、溶媒を除去した。イソプロピルアルコール(275 mL)を用いてその残分を再結晶させた。エチル

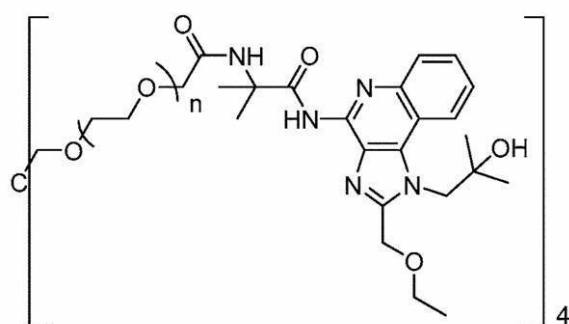
エーテルを用いてその固形物を洗浄し、高真空下で一夜かけて乾燥させると、5.12 g の白色の固形物が反応生成物として得られた。薬物の担持率は、4% (w/w) であった。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.09–8.08 (m, 5.5 H), 7.51 (t, J=7.5 Hz, 2.75 H), 7.40 (m, 5.5 H), 4.85 (br, 5.5 H), 4.70 (s, 5.5 H), 4.02–3.91 (m, 5.5 H), 3.70–3.32 (m, 18.18 H), 1.81 (m, 2.75 H), 1.72 (br, 2.75 H), 1.63 (m, 2.75 H), 1.22 (m, 16.5 H), 1.12 (t, J=6.0 Hz, 8.25 H), 0.95 (br, 8.25 H), 0.86 (d, J=6.0 Hz, 8.25 H)。

【0283】

実施例 10

4-arm-PEG20k-CM-α, α-ジメチルグリシン-N-R848 の合成 (化合物 10)

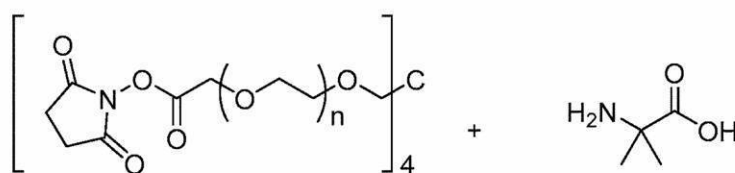
【化53】



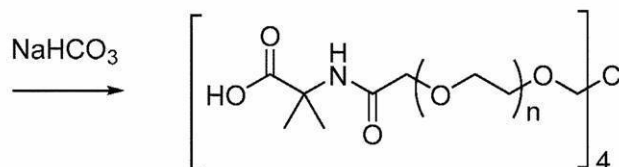
化合物 10

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化54】



4arm-PEG20K-SCM



【0284】

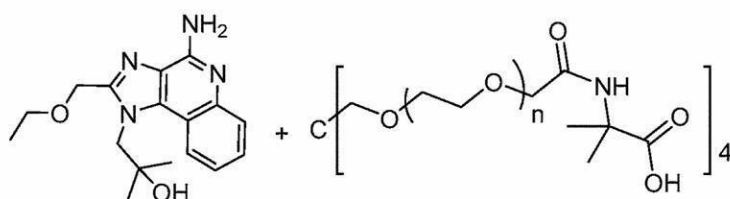
4-arm-PEG20k-CM-α, α-ジメチルグリシン:

2-アミノ-2-メチルプロパン酸 (2.890 g, 28 mmol) 及び重炭酸ナトリウム (2.352 g, 28 mmol) を水 (40 mL) の中に溶解させた。4-arm-PEG20k-SCM (7.0 g, 1.4 mmol の SCM) を数回に分けて加えた。その反応混合物を、20℃で18時間攪拌した。1 M の HCl 塩 (42 mL) を用いて、そ

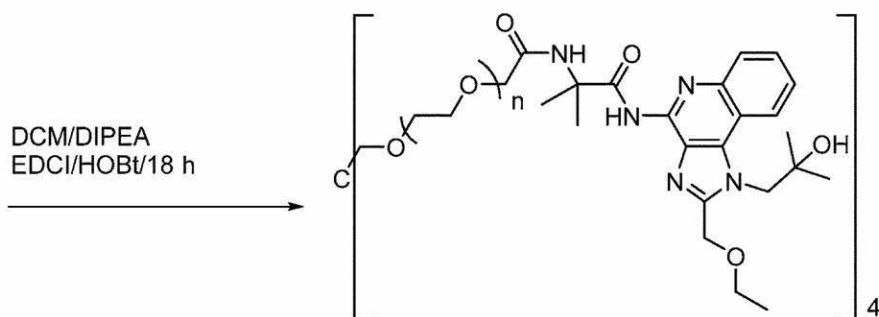
の反応液を中和してpH 4.7とした。塩化ナトリウムを用いてその反応混合物を飽和させ、ジクロロメタン (3×100 mL) を用いて抽出した。無水硫酸マグネシウム上で有機相を乾燥させ、濃縮した。イソプロピルアルコール (500 mL) を用いて残分を再結晶させると、4.710 g の、白色の固形物、4-arm-PEG20k-CM- α , α -ジメチル-グリシンが、80%の置換度で得られた。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (s, 3.56 H), 4.15 (s, 2.77 H), 3.97 (s, 2.77 H), 3.64 (br, 18.18 H), 3.41 (s, 7.90 H), 1.62 (s, 19.36 H).

【化55】



4arm-PEG20k-CM- α , α -ジメチル-グリシン



【0285】

4-arm-PEG20k-CM- α , α -ジメチル-グリシン-N-R848:

20℃で、4-arm-PEG20k-CM- α , α -ジメチル-グリシン (2.000 g、0.43 mmol の COOH)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (258 mg、2.0 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (153 mg、0.9 mmol)、及びヒドロキシベンゾトリアゾール (108 mg、0.9 mmol) を、脱水したジクロロメタン (15 mL) の中に溶解させた。30分かけて、R848 (138 mg、0.44 mmol) を加えた。その反応溶液を、20℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら注いだ。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、白色の固形物として、純粋なコンジュゲート (1.819 g、4.7% (w/w) R848 担持) が得られた。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.71 (s, 3.95 H), 8.29–8.03 (m, 3.95 H), 7.57 (s, 3.95 H), 7.45 (s, 3.95 H), 4.83 (d, $J=66.8$ Hz, 11.85 H), 3.61 (br, 18.18 H)

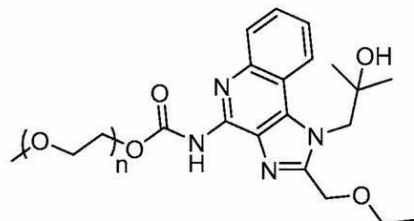
, 2.50 (s, 7.90 H), 1.76 (s, 11.85 H), 1.42 (s, 3.95 H), 1.26 (d, J = 34.3 Hz, 27.65 H).

【0286】

実施例 11

mPEG5k-カルバメート-N-R848 (化合物 11) の合成

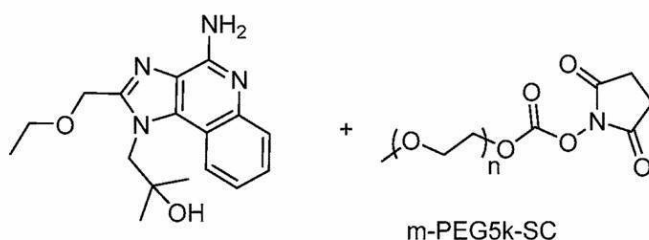
【化56】



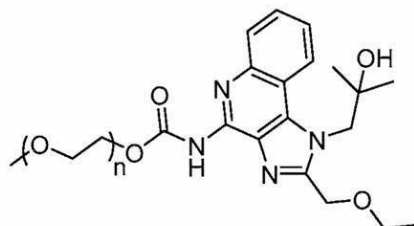
化合物11(比較例)

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化57】



DCE/DIPEA
50°C/18 h



【0287】

mPEG5k-カルバメート-N-R848 :

50°Cで、mPEG5k-SC (2.500 g、0.5 mmol)、R848 (236 mg、0.75 mmol)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (129 mg、1.0 mmol) を、脱水したN,N-ジメチルホルムアミド (20 mL) の中に溶解させた。その反応溶液を、50°Cで18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60°Cとすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一晩かけて乾燥させると、白色の固形物として、純粋なコンジュゲート (2.338 g、4.5% (w/w) のR848担持) が得られた。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (s, 0.77 H), 8.13 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 0.78 H), 7.59 (ddd, J = 8.4, 7.0, 1.3 Hz, 0.82 H), 7.49–7.44 (m, 0.82 H), 4.91 (s,

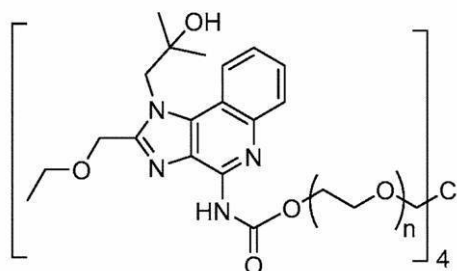
1.7 H), 4.78 (s, 1.7 H), 4.43 (d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 3.63 (br, 5.74 H), 3.37 (s, 3 H), 1.32 (s, 5 H), 1.25 (t, $J=7.0$ Hz, 2 H).

【0288】

実施例 12

4-arm-PEG20k-カルバメート-N-R848 (化合物12) の合成

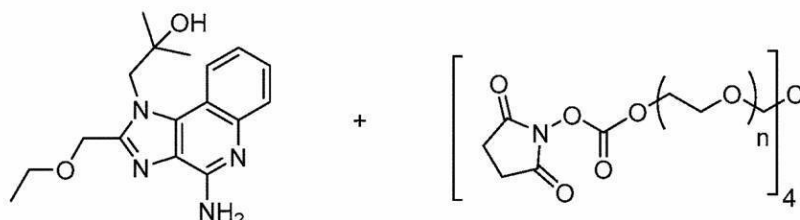
【化58】



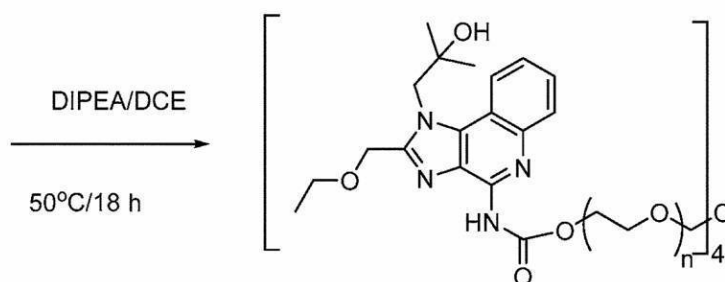
化合物12

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化59】



4arm-PEG20K-SC



【0289】

4-arm-PEG20k-カルバメート-N-R848 :

50°Cで、4-arm-PEG20k-SC (5.0 g、1.0 mmolのSCM) 及びR848 (377 mg、1.2 mmol) を、脱水した1,2-ジクロロエタン (25 mL) の中に溶解させた。その溶液の中に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (129 mg、2 mmol) を加えた。その反応溶液を、50°Cで18時間攪拌した。その反応溶液を、1リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール (300 mL) の中に加え、その懸濁液を加熱して60°Cとすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。沈殿物が生成したので、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返

し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、白色の固形物として、純粋なコンジュゲート（4.240 g、4.5%（w/w）のR848担持）が得られた。

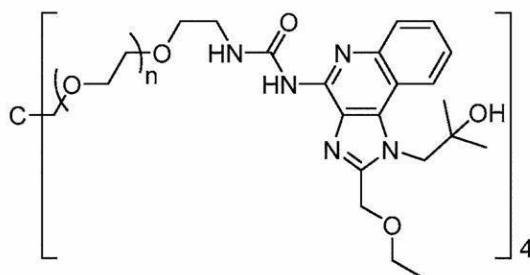
^1H NMR（500 MHz, CDCl_3 ） δ 8.16（t, $J=8.7\text{ Hz}$, 5.93 H）, 7.61（t, $J=7.7\text{ Hz}$, 3.16 H）, 7.48（t, $J=7.7\text{ Hz}$, 3.16 H）, 4.93（s, 2.96 H）, 4.80（s, 5.93 H）, 4.45（t, $J=4.8\text{ Hz}$, 2.96 H）, 3.82（t, $J=4.8\text{ Hz}$, 2.96 H）, 3.79（t, $J=5.0\text{ Hz}$, 5.93 H）, 3.65（br, 18.18 H）, 3.42（s, 3.16 H）, 1.33（s, 19.75 H）, 1.26（t, $J=7.0\text{ Hz}$, 7.90 H）.

【0290】

実施例 13

4-arm-PEG20k-尿素-N-R848（化合物13）の合成

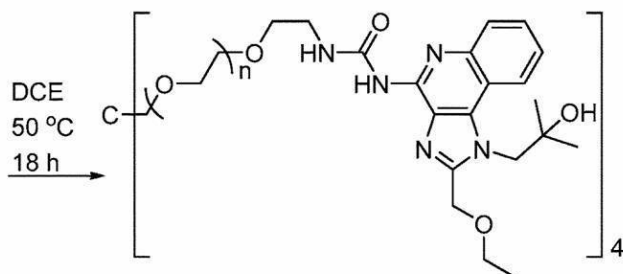
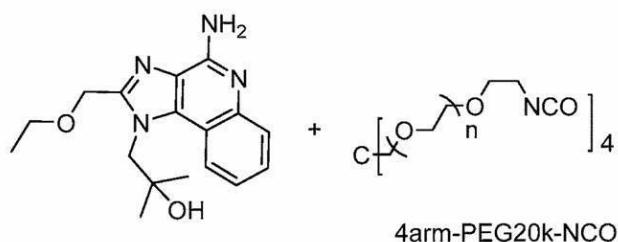
【化60】



化合物 13

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化61】



【0291】

4-arm-PEG20k-尿素-N-R848：

50℃で、4-arm-PEG20k-イソシアネート（1.0 g、0.2 mmolのNCO）及びR848（69.2 mg、0.22 mmol）を、脱水した1,2-ジクロロエタン（10 mL）の中に溶解させた。その反応溶液を、50℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、0.5リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら注いだ。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル（50 mL）を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、イソプロピルアルコール（250 mL）の中に加え、その懸

濁液を加熱して60℃とすると、透明な溶液が生成した。その溶液を、攪拌しながら冷却して、室温とした。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル（50 mL）を用いて洗浄した。イソプロピルアルコールの中へ沈殿させることによる精製をもう一度繰り返し、その後で、高真空中で一夜かけて乾燥させると、白色の固形物（938 mg、4.7%（w/w）のR848担持）として、純粋なコンジュゲートが得られた。

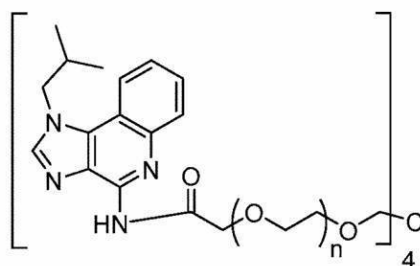
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 10.30 (d, $J=5.5$ Hz, 3.56 H), 8.17–8.09 (m, 7.11 H), 7.94 (d, $J=8.3$ Hz, 3.56 H), 7.57 (t, $J=7.8$ Hz, 3.56 H), 7.43 (t, $J=7.8$ Hz, 3.56 H), 4.92 (s, 7.51 H), 4.77 (s, 7.51 H), 3.63 (br, 1818 H), 1.32 (s, 23.70 H), 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 10.67 H).

【0292】

実施例14

4-arm-PEG20k-CM-イミキモド（化合物14）の合成

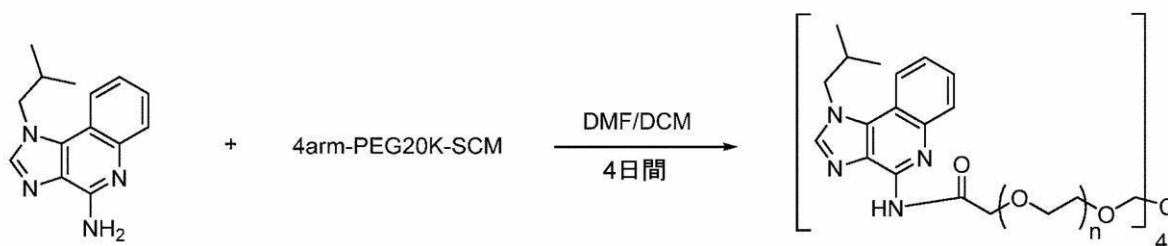
【化62】



化合物14

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化63】



【0293】

4-arm-PEG20k-CM-イミキモド：

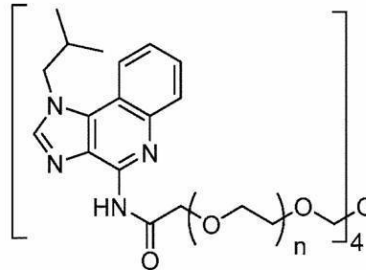
4-arm-PEG20k-SCM（6.789 g、1.2 mmolのSCM）を脱水したジクロロメタン（33 mL）の中に溶解させ、次いで、室温で、N,N-ジメチルホルムアミド（5.0 mL）中のイミキモド（359.7 mg、1.452 mmol）の懸濁液に加えた。ジクロロメタン（約10 mL）を使用して、4-arm-PEG20k-SCMの残分を溶解させて、その反応混合物に加えた。そのようにして得られた混合物を、室温で3日間攪拌した。ジクロロメタン（10 mL）を加えた。その混合物を、室温でもう1日攪拌した。その反応混合物を濃縮して、溶媒を除去した。その残分を、イソプロピルアルコールを用いて2回再結晶させると、4.8612 gの反応生成物が白色の固形物として得られた。薬物の担持率は、3.9%（w/w）であった。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 9.55 (br, 2.5 H), 8.026 (m, 3.2 H), 7.853 (d, $J=8.0$ Hz, 3.3 H), 7.720 (s, 3

. 3 H), 7.450 (t, J=8.0 Hz, 3.3 H), 7.371 (t, J=8.0 Hz, 3.3 H), 4.30–4.18 (m, 13.26 H), 3.471 (m, 18.18 H), 2.190 (m, 3.1 H), 0.877 及び 0.986 (2 s, 20.4 H).
【0294】

実施例 15

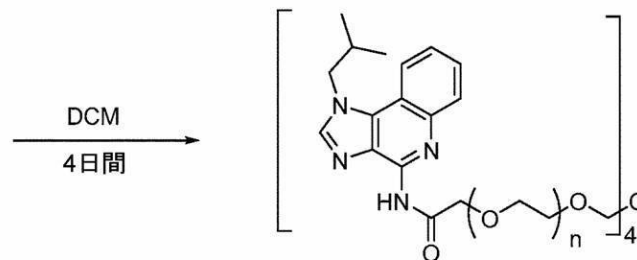
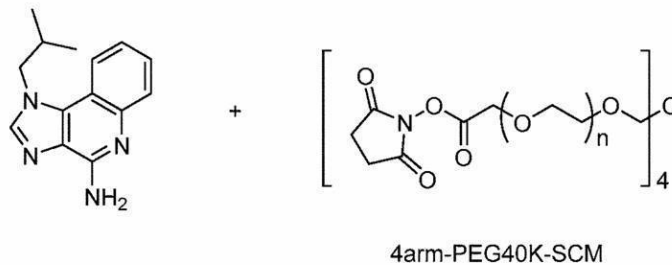
4-arm-PEG40k-CM-N-イミキモド (化合物 15) の合成
【化 6 4】



化合物 15

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 6 5】



【0295】

4-arm-PEG40k-CM-N-イミキモド：

4-arm-PEG40k-SCM (5.110 g、0.51 mmol の SCM) を脱水したジクロロメタン (33 mL) の中に溶解させ、室温で、イミキモド (148 mg、0.61 mmol) を加えた。そのようにして得られた懸濁液を、室温で 4 日間攪拌すると、透明な溶液が生成した。その反応混合物を濃縮して、溶媒を除去した。上述と同じようにして、イソプロピルアルコール (250 mL) を用いて、その残分を 2 回、再結晶させると、4.609 g の反応生成物が白色の固形物として得られた。NMR 分析では、その反応生成物には、1.8% (w/w) のイミキモドが含まれていた。

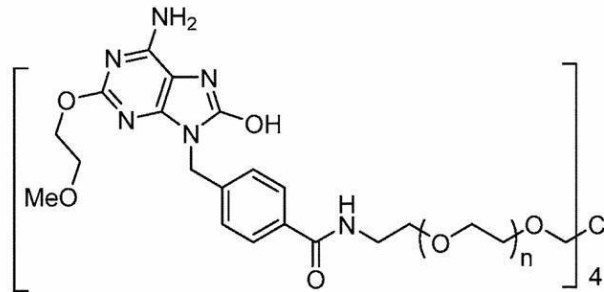
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, 3.06 H), 8.02 (d, 3.06 H), 7.85 (s, 3.15 H), 7.63 (t, 3.34 H), 7.5

3 (t, 3.17 H), 4.34 (d, 6.21 H), 3.89–3.43 (m, 36.36 H), 1.03 (s, 18.09 H).

【0296】

実施例 16

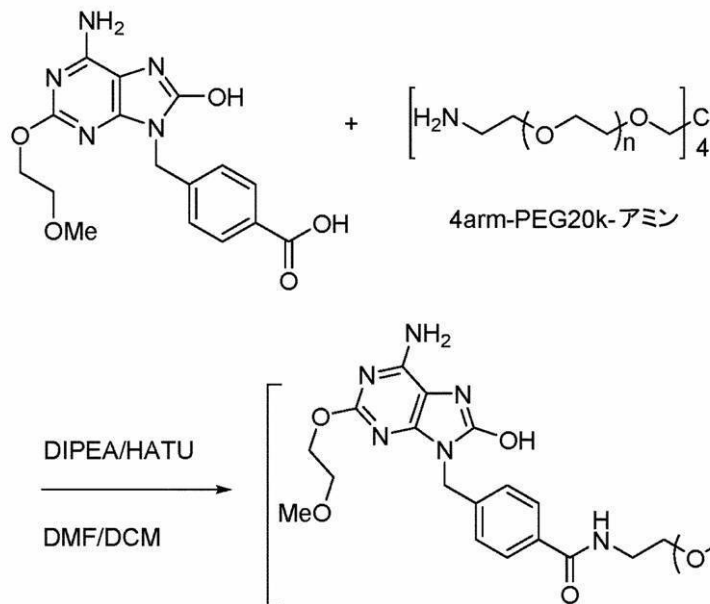
4-arm-PEG20k-4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)-ベンズアミド (化合物 16) の合成
【化 66】



化合物 16

タイトル化合物を、以下の反応スキームに従って合成した。

【化 67】



【0297】

20℃で、4-arm-PEG20k-アミン (1.500 g、0.3 mmol のアミン) をジクロロメタン (3 mL) の中に溶解させた。その溶液を、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (116 mg、0.9 mmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム-3-オキシドヘキサフルオロホスフェート (137 mg、0.36 mmol)、及び 4-((6-アミノ-8-ヒドロキシ-2-(2-メトキシエトキシ)-9H-プリン-9-イル)メチル)安息香酸 (108 mg、0.3 mmol) を含む、N,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) の溶液の中に加えた。その反応混合物を、20℃で18時間攪拌した。その反応溶液を、0.3 リットルのエチルエーテルの中に攪拌しながら加えた。生成した沈殿物を、濾過によって捕集し、エチルエーテル (50 mL) を用いて洗浄した。そのようにして得られた固形物を、フラッシュクロマトグラフィにより、ジクロロメタン中10～30%のメタノールを用いて精製した。その反応生成物を、20 mL のジクロロメタンの中に溶解

させ、濾過した。その濾液を濃縮し、もう一度エチルエーテルの中で沈殿させると、純粋なコンジュゲート300mgが、白色の固形物として得られた（薬物の担持率、6.0%（w/w））。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 9.26 (s, 3.95H), 7.78 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 7.90H), 7.52 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 7.90H), 5.67 (s, 7.90H), 5.04 (s, 7.90H), 4.42 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 7.90H), 3.66 (br, 1818H)。

【0298】

実施例17

インビボ試験：TLR7/8依存性サイトカイン産生の実証

10

化合物6又はR848によるTLR7/8アゴニズムの後のサイトカインの誘導を測定することによって、血漿におけるTLR7/8依存性サイトカイン産生を評価するための試験を実施した。

【0299】

方法

化合物6、R848、又はビヒクル（HBSS；ハanks平衡塩溶液）を、CT26腫瘍を担持するBalb/cマウスに腫瘍内投与した。用量は、10 μg の化合物6（R848等価物）又は10 μg のR848であった。（コンジュゲートの用量及び濃度は、TLR7/8作動薬（例えば、レシキモド又は他のTLR7/8作動薬）含量に基づいて表現され、TLR7/8作動薬の質量はPEG質量とは独立して表現される。）IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL5、IL-6、IL-1 β 、IL-10、IL-12p70、KC/GRO、TNF- α 、及びIFN- α のレベルの分析のために、血漿を所定の時点で回収した。

20

【0300】

IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL5、IL-6、IL-1 β 、IL-10、IL-12p70、KC/GRO、及びTNF α を評価するために、捕捉抗体で予めコーティングされたMeso Scale Discovery (MSD; Gaithersburg, MD, US) の96ウェルマルチスロットプレートを用いて、複製試料上で電気化学発光アッセイを実施した。MSD SULFO-TAG試薬で標識した検出抗体を各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートすることによって、特定のサイトカインレベルを定量化した。SECTOR Imager 2400を用いてプレートを速やかに読み取り、Discovery Workbenchソフトウェアバージョン4.0 (MSD; Gaithersburg, MD, US) を用いてデータを定量化した。

30

【0301】

マウスIFN α を、製造業者の説明書に従ってVerkineマウスインターフェロン- α ELISAキット (PBL, Piscataway, NJ, USA) で測定した。停止溶液の添加の後、BioTek μ Quantマイクロプレートリーダー (BioTek; Winooski, VT, USA) を用いて、450nmでの吸光度を決定した。BioTek Gen5ソフトウェア (BioTek; Winooski, VT, USA) を用いて、ELISAデータを定量化した。データは、複製物の倍数変化の平均として表される。

40

【0302】

結果

結果は、表1及び表2において3頭の動物の平均として提供される。

【0303】

【表 1】

表 1: 試験化合物の単剤による 10 μ g の腫瘍内投与後 2 時間でのサイトカイン産生

試験化合物	倍数変化(治療/ビヒクル)				
	IL6	IFNa	IL12	KC/GRO	TNFa
R848	++++	++	++	+	++
化合物 6	++	+	+	+	+

10

【0304】

倍数変化は以下のとおりに提供される：

NAは該当なしである。

—は試験されていない。

$+ < 50 \leq ++ < 200 \leq +++ < 800 \leq ++++$

【0305】

【表 2】

表 2: 試験化合物の単剤による 10 μ g の腫瘍内投与後 6 時間でのサイトカイン産生

試験化合物	倍数変化(治療/ビヒクル)	
	IFNg	IL10
R848	++++	++
化合物 6	+++	+

20

【0306】

倍数変化は以下のとおりに提供される：

NAは該当なしである。

—は試験されていない。

$+ < 5 \leq ++ < 10 \leq +++ < 20 \leq ++++$

【0307】

化合物 6 の腫瘍内投与は、血漿におけるサイトカインの誘導をもたらしたが、R848 親分子で観察された誘導よりも低いレベルであった。これらの結果は、R848 の PEG 化により血漿サイトカインの全身性の産生が低下し、毒性の可能性を低下させていることを実証する。

【0308】

実施例 18

インビボ試験：血漿及び腫瘍薬物動態並びにサイトカイン産生

血漿及び腫瘍組織における R848 並びに化合物 6 の単一用量の薬物動態を評価するための試験を実施した。

【0309】

R848 又は化合物 6 を、CT26 又は EMT6 腫瘍を担持する Balb/c マウスに腫瘍内投与した。R848 及び化合物 6 の両方の用量は、10 μ g であった（R848 等価物）。適格な LC-MS/MS 法を用いる R848 及び化合物 6 の分析のために、血漿及び腫瘍組織を所定の時点で回収した。

【0310】

結果を表 3A 及び 3B に提供する。提供される結果は、3 頭の動物の平均であり、R848 等価物として提供される。

30

40

50

【 0 3 1 1 】

【表 3】

表 3A: 試験化合物の CT26 腫瘍担持マウスへの単剤による腫瘍内投与後の血漿及び腫瘍濃度

試験化合物	投与後の 時間 (hr)	R848 血漿濃度 (ng/mL)	R848 腫瘍濃度 (ng/g)	化合物 6 血漿濃度 (ng/mL*)	化合物 6 腫瘍濃度 (ng/g*)
R848	0.25	++	++	NA	NA
	2.00	+	+	NA	NA
	6.00	+	+	NA	NA
	24.00	+	+	NA	NA
	48.00	BLQ	+	NA	NA
	72.00	BLQ	+	NA	NA
	96.00	BLQ	+	NA	NA
	120.00	BLQ	+	NA	NA
	144.00	BLQ	+	NA	NA
化合物 6	0.25	+	+	+++	+++
	2.00	+	+	+++	+++
	6.00	+	+	+++	++
	24.00	+	+	+++	++
	48.00	+	+	++	+
	72.00	+	+	BLQ	+
	96.00	BLQ	+	BLQ	+
	120.00	+	+	BLQ	+
	144.00	+	+	BLQ	+

*R848 等価物

【 0 3 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3B: 試験化合物の EMT6 腫瘍担持マウスへの単剤による腫瘍内投与後の血漿及び腫瘍濃度

試験化合物	投与後の時間 (hr)	R848 血漿濃度 (ng/mL)	R848 腫瘍濃度 (ng/g)	化合物 6 血漿濃度 (ng/mL*)	化合物 6 腫瘍濃度 (ng/g*)
R848	0.25	+++	++	NA	NA
	2.00	+	+	NA	NA
	6.00	+	+	NA	NA
	24.00	BLQ	+	NA	NA
	48.00	BLQ	+	NA	NA
	72.00	BLQ	+	NA	NA
	96.00	BLQ	+	NA	NA
	120.00	BLQ	+	NA	NA
	144.00	BLQ	+	NA	NA
化合物 6	0.25	+	+	++	+++
	2.00	+	+	+++	+++
	6.00	+	+	+++	++
	24.00	+	+	++	+
	48.00	+	+	++	+
	72.00	BLQ	+	BLQ	+
	96.00	BLQ	+	BLQ	+
	120.00	BLQ	+	BLQ	+
	144.00	BLQ	+	BLQ	BLQ

*R848 等価物

【0313】

血漿濃度は以下のとおりに提供される：

NA は該当なしである。

BLQ は定量下限値未満である。

— は試験されていない。

$+ < 10 \leq ++ < 100 \leq +++ < 1, 000 \leq +++++$

【0314】

腫瘍濃度は以下のとおりに提供される：

NA は該当なしである。

BLQ は定量下限値未満である。— は試験されていない。

$+ < 1, 000 \leq ++ < 10, 000 \leq +++ < 100, 000 \leq +++++$

【0315】

R848 の腫瘍内投与と比較する場合、化合物 6 の腫瘍内投与は、放出された R848 のピークの全身濃度を有意に低下させながら（観察される全身的なサイトカインのより低いピーク誘導と一致する）、治療された腫瘍において化合物 6（及び局所的に放出された R848）を保持するための有効な方法である。

【0316】

サイトカイン分析（CT26 腫瘍担持マウス）：腫瘍及び血漿試料を、サイトカイン分析のために投与後の複数の時点で得た。治療された腫瘍から RNA を単離して、I 型インターフェロン依存性遺伝子発現及び NF κ B 依存性遺伝子発現の誘導を評価した。一群の炎症性サイトカインを、複数のタンパク質測定アッセイにより腫瘍組織及び血漿から測定した。

【0317】

化合物6による全身的なサイトカインのより低いピーク誘導が、図6A及び6Bにおいて示される。図6A及び6Bは、それぞれ化合物6による治療の2時間後及び6時間後における、腫瘍及び血漿サイトカイン濃度の比較を提供するグラフである。全身的なサイトカインの濃度は、測定された各サイトカイン（IL-6、KC/GRO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-5、IFN- α 、IFN- γ 、IL-2及びIL-12p70）について腫瘍中の濃度より有意に低かった。

【0318】

これらのCT26モデル条件における化合物6の用量は、腫瘍内サイトカイン誘導を最大化する最適なサイトカイン誘導プロファイル及び血液中における最小の誘導を示した（図6A及び6B）。この観察は、過剰な全身性の免疫活性化のリスクを低減する、腫瘍内／腫瘍周囲に送達された化合物6（例示的なTLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲート）による腫瘍環境に偏った免疫細胞の関与を目的とすることを支持する。

【0319】

化合物6（TLR7／8作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲート）は、マウスの腫瘍におけるTLR7受容体活性の下流の血漿サイトカインを依存的に誘導した。コンジュゲートの腫瘍内／腫瘍周囲への送達は、末梢血と比較して治療された腫瘍においてより高いレベルのTLR7経路の活性化をもたらし、腫瘍内に偏った局所的な免疫活性化の発想を支持している。

【0320】

実施例19

MPEG2-C2-Fmoc-20KD-NHSによるrIL-2の反応

1. 44mg/mLの精製rIL-2（106.4mL）を第1の容器に入れ、続いて53.6mLの製剤化緩衝液（10mM酢酸ナトリウム、pH4.5、5%トレハロース）を加えた。pHを測ると4.62であり、温度を測ると21.2℃であった。PEG試薬のC2-PEG2-FMOC-NHS-20K（国際公開第2006/138572号パンフレットに記載されるとおり利用可能）（13.1g）を第2の容器に入れ、続いて73.3mLの2mM HClを加えた。得られた溶液を手動で25分間かき混ぜた。第1の容器にホウ酸ナトリウム（0.5M、pH9.8）を加えてpHを約9.1に上昇させ、次にPEG試薬が入った第2の容器の内容物を1～2分間かけて第1の容器に加えた。次に8.1mLの2mM HClを第2の容器に入れることによってリンスステップを行い、第1の容器に内容物を加えた。コンジュゲーション反応では、最終的なrIL-2濃度は0.6mg/mLであり、ホウ酸ナトリウム濃度は120mMであり、pHは9.1 $\pm$ 0.2であり、温度は20～22℃であった。試薬の活性（置換レベル）を調整した後のPEG試薬とrIL-2とのモル比は35：1であった。コンジュゲーション反応を30分間進行させ、75mLの2N酢酸の添加による酸性化反応（pHをほぼ4に降下させる）により停止させた。生成物を上記のとおりイオン交換クロマトグラフィーにより精製して主として4mer、5mer及び6mer（rIL-2に放出可能に共有結合しているPEG試薬の数を指す（8mer及びそれより高度なPEG化は、クロマトグラフィーに関連する洗浄ステップの間に取り除かれた）の組成物を提供した。この組成物は、本明細書で「RSLAIL-2」と称する。

【0321】

実施例20

RSLAIL-2の受容体バイアス及び関連免疫療法特性

IL-2受容体に対する結合親和性及び免疫刺激プロファイルに関連する受容体バイアス：RSLAIL-2のIL-2R α 及びIL-2R β への親和性を表面プラズモン共鳴（Biacore T-100）により直接計測し、臨床的に利用可能なIL-2（アルデスロイキン）と比較した。EDC/NHS化学を使用して抗ヒト抗体（Invitrogen）をCM-5センサーチップの表面に結合させた。次にヒトIL-2R α -Fc又はIL-2R β -Fc融合タンパク質のいずれかをこの表面にわたって捕捉リガンドとし

て使用した。酢酸塩緩衝液 pH 4.5 に、5 mM から始まる R S L A I L - 2 及びその活性 I L - 2 コンジュゲート代謝産物 (1 - P E G 及び 2 - P E G - I L - 2) の段階希釈物を作成した。これらの希釈物をリガンドに 5 分間結合させて、結合した反応単位 (R U) を濃度に対してプロットし、E C 5 0 値を決定した。各 I L - 2 受容体サブタイプに対する各アイソフォームの親和性を I L - 2 と比べた倍数変化として計算した。

【0322】

R S L A I L - 2 のインビトロ結合及び活性化プロファイルは、P E G 化がアルデスロイキンと比べて I L 2 と I L 2 R α との相互作用を妨害することを示唆し；これらの効果がインビボで免疫細胞サブタイプのプロファイルをバイアスするかどうかを決定するための調査を実施した。R S L A I L - 2 又は I L 2 のいずれかの投与後の腫瘍中の C D 8 T 及び T r e g 細胞の数は、I L 2 の多面的効果が I L 2 / I L 2 R α 界面におけるポリ (エチレングリコール) (R S L A I L - 2 中として) への I L 2 のコンジュゲーションに起因してシフトしたかどうかの重要な尺度である。この課題に対処するため、皮下 B 1 6 F 1 0 マウス黒色腫瘍を担持するマウスを単一用量の R S L A I L - 2 又は 5 回用量のアルデスロイキンにより治療し、腫瘍微小環境中の免疫細胞をフローサイトメトリーにより定量した。

【0323】

アルデスロイキン治療マウスの腫瘍中で総及びメモリー C D 8 細胞は腫瘍浸潤リンパ球の割合として増加し；しかしながら、これらの効果は一過的であり、ビヒクルと比べて 5 日目に有意性を達成した。対照的に、有意な (P < 0.05) 及び持続される総及びメモリー C D 8 T 細胞刺激は単一 R S L A I L - 2 投与後に達成され、メモリー C D 8 (7 日目) 及び総 C D 8 (7 及び 10 日目) の割合がアルデスロイキンと比べて優れていた。R S L A I L - 2 及びアルデスロイキン治療の両方は、治療開始 5 及び 7 日後に増加した活性化ナチュラルキラー (N K) 細胞をもたらしたが、この効果は 10 日目までに縮小した。腫瘍浸潤リンパ球の C D 4 細胞の割合は、5 日目にビヒクルと比べて R S L A I L - 2 治療後に縮小した。10 日目、R S L A I L - 2 は、ビヒクル及びアルデスロイキンと比較して少数の C D 4 細胞割合をもたらした。C D 4 細胞集団を、T r e g 集団を定義する F o x P 3 ⁺ サブセットについてさらに分析した。R S L A I L - 2 投与は全ての時点において T r e g の割合を低下させ、P E G 鎖から生じる I L 2 R α サブユニットへの接近の低下と一致した。対照的に、アルデスロイキンによる T r e g 低下は穏やかであり、5 日目に有意性を達成した。C D 8 T 細胞の増加及び T r e g の低下は、7 日目までに腫瘍中の C D 8 / T r e g 比の顕著な上昇をもたらした。R S L A I L - 2、アルデスロイキン、及びビヒクルについての C D 8 / T r e g の比はそれぞれ 449、18、及び 4 であり、R S L A I L - 2 についての I L 2 受容体アルファと比べた I L 2 受容体ベータの優先的な活性化を裏付けた。

【0324】

免疫組織化学染色を実施し、C D 8 T 細胞は数が増加しただけでなく、腫瘍細胞が散在したことを裏付けた。これらの結果は、R S L A I L - 2 が、腫瘍中の T r e g の等しい刺激なしで非修飾 I L - 2 (アルデスロイキン) について見られるものよりもロバストなインビボメモリーエフェクター C D 8 T 細胞応答を誘導するために有効であることを示し、インビトロ I L 2 R β 選択的結合プロファイルと一致する。即ち、R S L A I L - 2 は T r e g と比べてエフェクター C D 8 + T 及び N K 細胞を優先的に活性化させ、拡大するために有効である。

【0325】

実施例 21

インビボ試験：マウス C T - 2 6 結腸腫瘍モデルにおける R S L A I L - 2 及び 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - N - R 8 4 8 の投与

マウス C T - 2 6 結腸腫瘍モデルにおいて、R S L A I L - 2 及び 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - N - R 8 4 8 の単剤の各々による免疫療法と比較した場合の例示的な長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬である R S L A I L - 2、及び例示的な長時間作用

10

20

30

40

50

型TLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-N-R848の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0326】

インビボモデル：使用されたマウスは、各側腹部に移植された200万個のCT26腫瘍細胞を有する約10週齢の雌Balb/c系統であった。細胞を9日間腫瘍に成熟させて、100～150mm³の容積に達した。

【0327】

投与：4-arm-PEG20k-CM-N-R848を、2つの腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）の腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40μL量で投与した。第2の反対側の腫瘍は、TLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-N-R848により直接的に治療されなかった。RSLAIL-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0328】

標識された群：「RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが100～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に800μgの4-arm-20kPEG-CM-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回投与された）。

【0329】

標識された群「4-arm-PEG20k-CM-N-R848」：マウスは、100～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に800μgの4-arm-20kPEG-CM-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に1回投与された。

【0330】

標識された群「RSLAIL-2」：マウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgのRSLAIL-2を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0331】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、100～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μLのハンクス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクルを静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0332】

測定：腫瘍容積を、1週間に3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0333】

結果は表4において提供される。

【0334】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4. 生存割合のパーセント

治療 開始後の 日数	ビヒクル (腫瘍内)	1x800 μ g 4-arm-PEG20k- CM-N-R848(腫瘍内) + RSLAIL-2 (静脈内)“併用”	単剤 1x800 μ g 4-arm-PEG20k- CM-N-R848(腫瘍内)	単剤 RSLAIL-2
0	100	100	100	100
9	90			90
12	50		80	
14	20			
16	0		70	
19			40	
21			30	
26				70
40				60
43				40
47		100	30	30

【0335】

4-arm-PEG20k-CM-N-R848による単剤治療は、投与開始後47日目の実験終了までに当該動物のうち30%のみの生存をもたらした。当該動物のうち20%のみが完全奏功を有し、治療された側の腫瘍及び治療されていない側の腫瘍の両方が消失した；当該動物の10%が、2つの腫瘍のうちの1つが根絶される部分奏功を有した。

【0336】

RSLAIL-2による単剤治療は、投与の開始後47日目の試験終了までに当該動物のうち30%の生存をもたらした。生存群における全ての動物は、完全奏功を有し、両方の腫瘍が根絶された。

【0337】

最も特記されることとして、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-N-R848による併用治療は、治療された全ての動物における腫瘍の完全な消失及び100%の生存をもたらした。際だったことに、第1及び第2の腫瘍の両方が、治療の期間を通じて消失した。図1～3を参照されたい。即ち、予想に反して、併用治療は、少なくとも47日目までに100%の生存を有する併用免疫療法に対する単剤免疫療法治療モダリティ、例えば、4-arm-PEG20k-CM-N-R848（47日目で30%の生存）；RSLAIL-2（47日目で30%の生存）を超える有意な改善をもたらしただけでなく、第1の腫瘍（TLR作動薬を注射された）及び第2の腫瘍（TLR作動薬を直接注射されていない、第1の腫瘍の部位から離れた部位）の両方の完全な根絶ももたらした。

【0338】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後10日目と20日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0339】

結果は、単独で投与された免疫調節剤のそれぞれによる単剤療法と比較した場合に併用に関して著しいものであり、即ち、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-N-R848の併用投与は、注射によって4-arm-PEG20k-CM-N-R848を直接投与された第1のCT-26結腸腫瘍を根絶するのに有効であっただけでなく、第2のCT-26結腸腫瘍を根絶するのにも有効であった。47日の試験の期間を通じ

て、腫瘍の再生は観察されなかった。さらに、併用療法群に対する生存は100パーセントのままであったが、単剤療法群は両方ともに、47日目までに30%の生存へと減少した。

【0340】

結果を図1～3に示す。

【0341】

実施例22

免疫細胞型に対するインビボ治療の効果

本実施例は、長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬とTLR7/8作動薬の併用が、免疫系の活性化を促進することができる一方で、免疫抑制も克服することを示す。具体的には、免疫活性化は、CD8 T細胞、CD11c+及びCD8+樹状細胞、並びに好中球の促進を通して示されるが、一方で免疫抑制の克服は、制御性T細胞、マクロファージ、及び単球の抑制を通して示される。

【0342】

使用された雌Balb/cマウスは、各側腹部に移植された200万個のCT26腫瘍細胞を有する約10週齢のマウスであった。細胞を9日間成長させ、100～150mm³容積の腫瘍サイズに達した。

【0343】

R848を、腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）の腫瘍内又は腫瘍周囲に40μL量で投与した。他方（反対側）の腫瘍は、R848を投与しなかった。

【0344】

RSLAIL-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0345】

免疫細胞サブタイプをフローサイトメトリーにより測定した。腫瘍を単一細胞懸濁液へと分離し、細胞を、細胞型を同定する蛍光標識抗体の組み合わせで染色して、単剤及び併用としてのRSLAIL-2並びにR848治療に応答する単球、マクロファージ、制御性T細胞、CD8+T細胞、好中球、及び樹状細胞サブタイプを含む腫瘍内の免疫細胞型の比率の変化を評価した。

【0346】

結果は、ビヒクル対照群に対する細胞集団のパーセントとして表5に提供される。

【0347】

【表6】

表5. 免疫細胞型に対する単剤及び併用のインビボ効果(ビヒクルに対するパーセント)

	RSLAIL-2	R848	RSLAIL-2 & R848
CD8 T細胞	200%	95%	265%
CD11c+ CD8+ 樹状細胞	165%	135%	330%
好中球	225%	500%	525%
制御性 T細胞	125%	20%	30%
マクロファージ	85%	80%	50%
単球	20%	160%	50%

【0348】

表5のデータから見て分かるとおり、R848による単剤治療又はR848及びRSLAIL-2による併用治療は：(i)腫瘍中の制御性T細胞の存在量の減少；及び(ii)ビヒクル治療腫瘍に対して好中球存在量の増加をもたらす。

【0349】

RSLAIL-2による単剤治療は、腫瘍内単球の減少及びビヒクル治療腫瘍に対してCD8⁺T細胞の増加をもたらす。

【0350】

併用を考慮すると、RSLAIL-2とR848（例示的なTLR作動薬）による治療は、腫瘍内免疫細胞の存在量に対して上述の単剤の効果を組み合わせた増強効果をもたらす。加えて、併用は特に、ビヒクル治療と比較した場合、治療された腫瘍においてCD8⁺CD11c⁺樹状細胞を増加させ、且つマクロファージを減少させる。

【0351】

RSLAIL-2による併用治療における全ての細胞性の変化は、R848治療腫瘍だけでなく、R848により直接的に治療されていないが、R848治療腫瘍として同じ動物中に存在する遠位の腫瘍においても観察される（即ち、アブスコパル効果を実証している）。

【0352】

実施例23

インビボ試験：CT26腫瘍モデルにおけるRSLAIL-2及びTLR作動薬の投与

一定範囲のTLR作動薬投与量に対するCT-26腫瘍モデルにおいて、例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2、及び短時間作用型TLR作動薬（R848）又は例示的な長時間作用型TLR作動薬（化合物6）の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0353】

使用されたマウスは、各側腹部に移植された200万個のCT26腫瘍細胞を有する約10週齢の雌Balb/c系統であった。細胞を、RSLAIL-2と化合物6の併用による治療のために7日間、及びRSLAIL-2とR848の併用治療のために9日間腫瘍に成熟させて、各治療群について100～150mm³の容積に達した。各治療群は、10頭のマウスを含んだ。

【0354】

TLR作動薬（R848又は化合物6）を、2つの腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）の腫瘍内又は腫瘍周囲（即ち、直接的に）に、10マイクログラム（「高」）、1マイクログラム（「中」）、又は0.1マイクログラム（「低」）（R848等価物）の固定された用量において40μl量で投与した。反対側の腫瘍は、TLR作動薬により直接的に治療されなかった。RSLAIL-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0355】

腫瘍サイズが100～150mm³である最初の投与日（投与0日目）において、マウスは、10マイクログラム、1マイクログラム、又は0.1マイクログラム（R848等価物）の固定された用量のTLR作動薬を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、4日目、13日目及び22日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回投与された）。

【0356】

標識された群「ビヒクル」について：マウスは、100～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μlのハンス緩衝生理食塩水（TLR作動薬のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクルを静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0357】

10

20

30

40

50

腫瘍容積を、1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0358】

R S L A I L - 2 と R 8 4 8 による併用治療に関する結果を図4A～4Dに提供し、R S L A I L - 2 と化合物6による併用治療に関する結果を図4E～Hに提供する。R S L A I L - 2 と R 8 4 8 による併用治療に関する結果を図5A～5Dにも示し、R S L A I L - 2 と化合物6による併用治療に関する結果を図5E～5Hにも示す。図4A～4Dに提供されたとおり、R S L A I L - 2 と R 8 4 8 の併用治療は、治療開始後25日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中7頭、及び低投与量群において8頭の動物中ただ1頭の治療された腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらす。

10

【0359】

図4E～4Hに提供されたとおり、R S L A I L - 2 と化合物6の併用治療は、治療開始後32日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中9頭、及び驚くべきことに、低投与量群において10頭の動物中10頭の治療された腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらす。

【0360】

図5A～5Dに提供されたとおり、R S L A I L - 2 と R 8 4 8 の併用治療は、治療開始後25日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中5頭、及び低投与量群において8頭の動物中ただ1頭の治療されていない腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらす。

20

【0361】

図5E～5Hに提供されたとおり、R S L A I L - 2 と化合物6の併用治療は、治療開始後32日目までに、高投与量群において10頭の動物中9頭、中程度の投与量群において10頭の動物中8頭、及び驚くべきことに、低投与量群において10頭の動物中10頭の治療されていない腫瘍の腫瘍容積の縮小又は維持をもたらす。

【0362】

図4A～4H及び図5A～5Hに提供されたとおり、ビヒクル群は、治療開始後25日目までに生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後8日目と18日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

30

【0363】

このデータは、R S L A I L - 2 治療と併用した非常に少ないマイクログラム未満の腫瘍内送達 T L R 作動薬化合物6が、治療部位及び非治療の遠隔腫瘍部位（即ち、T L R 作動薬化合物が直接投与されなかった部位）で腫瘍成長を有意に阻害することを示している。

【0364】

実施例24

インビボ試験：W E H I - 1 6 4 腫瘍モデルにおける R S L A I L - 2 及び例示的 T L R 作動薬の投与

W E H I - 1 6 4 線維肉腫腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬である R S L A I L - 2、及び例示的な T L R 作動薬である 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8（化合物6）の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

40

【0365】

インビボモデル：使用されたマウスは、右側腹部皮下に移植された100万個の W E H I - 1 6 4 腫瘍細胞を有する約10週齢の雌 B a l b / c 系統であった。細胞を、治療開始前に 5 0 ～ 1 5 0 m m ³ 容積に達する腫瘍に成長させた。

【0366】

投与：4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 を、腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40 μ l 量で腫瘍に投与した。R S L A I L - 2 を 0 . 8 m g / k g で静脈内注射により全身的に投与した。

50

【0367】

標識された群：「RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが50～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20μgの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは9日おきに合計で3回投与された）。

【0368】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、50～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μlのハックス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクル緩衝液を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0369】

測定：腫瘍容積を、52日の間1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0370】

データは表6において提供される。

【0371】

【表7】

表6. 生存割合

治療開始後日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
3	++++	++++
7	++++	++++
10	++++	++++
15	++++	++++
22	+++	++++
27	+++	++++
29	++	++++
31	+	++++
34	なし	++++
41		++++
48		++++
52		++++

【0372】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0% ≤ + < 25%

25% ≤ ++ < 50%

50% ≤ +++ < 75%

75% ≤ ++++ < 100%

【0373】

RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による二重の薬剤治療は、投与の開始後52日目の試験終了までに当該動物のうち90%の生存をもたらした。際だったことに、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-G

Ly-N-R848 治療群における全ての動物のうちの80%が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。

【0374】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後17日目と31日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0375】

実施例25

インビボ試験：JC腫瘍モデルにおけるRSLAIL-2及びTLR作動薬の投与

JC乳腺癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2、及び例示的なTLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0376】

インビボモデル：使用されたマウスは、右側腹部皮下に移植された400万個のJC腫瘍細胞を有する約10週齢の雌Balb/c系統であった。細胞を、治療開始前に50～150mm³容積に達する腫瘍に成長させた。

【0377】

投与：4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848を、腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40μL量で腫瘍に投与した。RSLAIL-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0378】

標識された群：「RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが50～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20μgの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは9日おきに合計で3回投与された）。

【0379】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、50～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μLのハックス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクル緩衝液を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0380】

測定：腫瘍容積を、113日の間1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0381】

データは表7において提供される。

【0382】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 7. 生存割合

治療開始後日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
8	++++	++++
15	++++	++++
22	++++	++++
29	+++	++++
36	+	++++
43	なし	++++
46		+++
50		+++
57		++
60		++
64		+
71		+
78		+
85		+
95		+
102		+
113		+

【0383】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0% ≤ + < 25%

25% ≤ ++ < 50%

50% ≤ +++ < 75%

75% ≤ ++++ < 100%

【0384】

RSLAIL-2 と 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848（化合物 6）による二重の薬剤治療（即ち、併用療法）は、43日目までに当該動物のうち90%の生存をもたらしたが、一方で、ビヒクル群においては、43日目までに生存している動物は残らなかった。RSLAIL-2 + 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848の併用治療は、投与開始後113日目の試験終了までに20%の動物の生存をもたらした。際だったことに、RSLAIL-2 + 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848治療群における動物のうちの10%が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。

【0385】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後26日目と36日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0386】

実施例 26

インビボ試験：4T1腫瘍モデルにおけるRSLAIL-2及びTLR作動薬の投与

皮下4T1乳癌腫瘍モデルにおいて、単剤のRSLAIL-2及び単剤のTLR作動薬による免疫療法（比較の単剤両方）と比較した場合の例示的な長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬であるRSLAIL-2、及び例示的なTLR作動薬である4-arm

－PEG20k－CM－Gly－N－R848の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0387】

インビボモデル：使用されたマウスは、各側腹部に移植された200万個の4T1腫瘍細胞を有する約10週齢の雌Balb/c系統であった。細胞を7日間腫瘍に成熟させて、75～150mm³の容積に達した。

【0388】

投与：4-arm-PEG20k-Gly-CM-N-R848を、2つの腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）の腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40μl量で投与した。第2の反対側の腫瘍は、TLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848により直接的に治療されなかった。RSLAII-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0389】

標識された群：「RSLAII-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが75～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20μgの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAII-2を静脈内に投与された（即ち、それらは投与0日目から開始して9日おきに合計で3回投与された）。

【0390】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、75～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μlのハンクス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。

【0391】

測定：腫瘍容積を、1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0392】

結果：データは表8において提供される。結果は、ビヒクル治療と比較した場合、二重の併用について顕著であり、即ち、RSLAII-2と4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848の二重の併用投与は、4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848が注射により直接投与された第1の腫瘍における腫瘍成長を減速させるのに有効であるだけでなく、第2の腫瘍の成長を減速させるのにも有効であった。25日目の試験終了までにRSLAII-2と4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848の二重の併用療法群については30%が生存したままであったが、試験の18日目の後のビヒクル治療群においては生存している動物は残らなかった。

【0393】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 8. 生存割合

治療開始後 日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	+++++	+++++
3	+++++	+++++
7	+++++	+++++
9	+++++	+++++
11	+++++	+++++
14	+++++	+++++
16	+++	+++++
18	+++	+++++
21	なし	+++
23		+++
25		++

【0394】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0% ≤ + < 25%

25% ≤ ++ < 50%

50% ≤ +++ < 75%

75% ≤ ++++ < 100%

【0395】

RSLAIL-2 + 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による二重の免疫療法剤治療は、投与の開始後 25 日目の試験終了までに当該動物のうち 30% の生存をもたらした。RSLAIL-2 + 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 による併用治療は、治療された動物において腫瘍成長を減速させることによって、ビヒクル治療と比較して有意な改善を示した。

【0396】

ビヒクル群は、25 日目の試験終了までに生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後 16 日目と 18 日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0397】

実施例 27

インビボ試験：MC38 腫瘍モデルにおける RSLAIL-2 及び TLR 作動薬の投与

MC38 結腸癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型 IL-2 Rβ バイアス作動薬である RSLAIL-2、及び例示的な TLR7/8 作動薬のマルチアームポリマーコンジュゲートである 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0398】

インビボモデル：使用されたマウスは、右側腹部皮下に移植された 25 万個の MC38 腫瘍細胞を有する約 10 週齢の雌 Balb/c 系統であった。細胞を、治療開始前に 50 ~ 150 mm³ 容積に達する腫瘍に成長させた。

【0399】

投与：4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 を、腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40 μL 量で腫瘍に投与した。RSLAIL-2 を 0.8 mg/kg で静脈内注射により全身的に投与した。

【0400】

標識された群：「RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが50～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20μgの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは9日おきに合計で3回投与された）。

【0401】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、50～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40μlのハックス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクル緩衝液を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0402】

測定：腫瘍容積を、70日の間1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0403】

結果：データは表9において提供される。

【0404】

【表10】

表9. 生存割合

治療開始後日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
3	++++	++++
7	++++	++++
14	+++	++++
17	+++	++++
21	++	+++
28	++	+++
35	+	+++
39	+	+++
42	なし	+++
49		+++
56		+++
63		+++
70		+++

【0405】

生存割合は以下のとおり提供される：

0% ≤ + < 25%

25% ≤ ++ < 50%

50% ≤ +++ < 75%

75% ≤ ++++ < 100%

【0406】

RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による二重の薬剤治療は、投与の開始後70日目の試験終了までに当該動物のうち50%の生存を

もたらした。際だったことに、R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 治療群における生存している全ての動物が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。

【0407】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後7日目と39日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0408】

実施例28

インビボ試験：E M T 6 腫瘍モデルにおけるR S L A I L - 2 及びT L R 作動薬の投与

皮下E M T 6 乳癌腫瘍モデルにおいて、単剤のR S L A I L - 2 及び単剤のT L R 作動薬による免疫療法と比較した場合の例示的な長時間作用型I L - 2 R β バイアス作動薬であるR S L A I L - 2、及び例示的な長時間作用型T L R 作動薬である4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0409】

インビボモデル：使用されたマウスは、各側腹部に移植された200万個のE M T 6 腫瘍細胞を有する約10週齢の雌B a l b / c 系統であった。細胞を7日間腫瘍に成熟させて、75~150mm³の容積に達した。

【0410】

投与：4 - a r m - P E G 2 0 k - G l y - C M - N - R 8 4 8 を、2つの腫瘍のうちの1つ（第1の腫瘍）の腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40 μ l量で投与した。第2の反対側の腫瘍は、T L R 作動薬である4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 により直接的に治療されなかった。R S L A I L - 2 を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0411】

標識された群：「R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8」：マウスは、腫瘍サイズが75~150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20 μ gの4 a r m - 2 0 k P E G - C M - G l y - N - R 8 4 8 を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でR S L A I L - 2 を静脈内に投与された（即ち、それらは投与0日目から開始して9日おきに合計で3回投与された）。

【0412】

標識された群「R S L A I L - 2」：マウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でR S L A I L - 2 を腫瘍内に投与された（即ち、それらは投与0日目から開始して9日おきに合計で3回投与された）。

【0413】

標識された群「4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8」：マウスは、腫瘍サイズが75~150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20 μ gの4 a r m - 2 0 k P E G - C M - G l y - N - R 8 4 8 を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。

【0414】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、75~150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40 μ lのハックス緩衝生理食塩水（4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。

【0415】

測定：腫瘍容積を、1週間に2~3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0416】

結果：データは表10において提供される。結果は、効果の乏しいR S L A I L - 2 及び4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 の単剤治療と比較した場合、二重の併用について劇的であり、即ち、R S L A I L - 2 と4 - a r m - P E G 2 0 k -

10

20

30

40

50

CM-Gly-N-R848の二重の併用投与は、4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848が注射により直接投与された第1の腫瘍を根絶するのに有効であるだけでなく、第2の腫瘍を根絶するのににも有効であった。完全な腫瘍退縮後の21日の期間を通じて、腫瘍の再生は観察されなかった。さらに、二重の併用療法群については100%が生存したままであったが、単剤治療群においては、55日目の試験終了までに生存している動物は残らなかった。

【0417】

【表11】

表 10. 生存割合

治療開始後 日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k- CM-Gly-N- R848 + RSLAIL-2	4-arm-PEG20k- CM-Gly-N-R848	RSLAIL-2
0	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++
13	++++	++++	++++	++++
15	+	++++	++++	++++
20	なし	++++	+++	+++
27		++++	++	++
34		++++	+	+
42		++++	+	+
48		++++	+	なし
55		++++	なし	

【0418】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0% ≤ + < 25%

25% ≤ ++ < 50%

50% ≤ +++ < 75%

75% ≤ ++++ < 100%

【0419】

RSLAIL-2又は4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による単剤治療は、腫瘍成長の部分的な制御をもたらしたが、投与の開始後55日目の試験終了までに生存している動物はいなかった。

【0420】

対照的に、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による二重の薬剤治療は、投与の開始後55日目の試験終了までに当該動物のうち100%の生存をもたらした。生存群における全ての動物は、完全奏功を有し、両方の腫瘍が根絶された。即ち、予想に反して、RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による併用治療は、等価用量のRSLAIL-2又は4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848による免疫療法治療モダリティと比較して有意な改善であるだけでなく、第1の腫瘍（TLR作動薬で注射される）及び第2の腫瘍（TLR作動薬の直接的な注射なし、第1の腫瘍部位から離れている）の両方の完全な根絶ももたらした。

【0421】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後13日目と1

5日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0422】

実施例29

インビボ試験：RM-1腫瘍モデルにおけるRSLAIL-2及びTLR作動薬の投与

RM-1前立腺癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型IL-2R β バイアス作動薬であるRSLAIL-2、及び例示的な長時間作用型TLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0423】

インビボモデル：使用されたマウスは、右側腹部皮下に移植された200万個のRM-1腫瘍細胞を有する約10週齢の雌Balb/c系統であった。細胞を、治療開始前に50～150mm³容積に達する腫瘍に成長させた。

【0424】

投与：4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848を、腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）40 μ l量で腫瘍に投与した。RSLAIL-2を0.8mg/kgで静脈内注射により全身的に投与した。

【0425】

標識された群：「RSLAIL-2+4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848」：マウスは、腫瘍サイズが50～150mm³である最初の投与日（投与0日目）に20 μ gの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは9日おきに合計で3回投与された）。

【0426】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、50～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40 μ lのハックス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクル緩衝液を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0427】

測定：腫瘍容積を、36日の間1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0428】

結果：データは表11において提供される。

【0429】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 11. 生存割合

治療開始後日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
6	++++	++++
13	++++	++++
18	+	+++
20	なし	+++
25		+++
29		++
36		+

10

【0 4 3 0】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0 % $\leq$ + < 2 5 %

2 5 % $\leq$ ++ < 5 0 %

5 0 % $\leq$ +++ < 7 5 %

7 5 % $\leq$ ++++ < 1 0 0 %

20

【0 4 3 1】

R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 による二重の薬剤治療は、ビヒクル治療と比較して腫瘍成長の有意な低下をもたらし、R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 治療群において、治療開始後 2 0 日目までに当該動物の 8 0 % 及び 3 6 日目の試験終了までに動物の 1 0 % の生存をもたらした。

【0 4 3 2】

ビヒクル群は、治療開始後 2 0 日目までに生存している動物がいなかった。全ての動物は、治療開始後 1 3 日目と 1 8 日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

30

【0 4 3 3】

実施例 3 0

インビボ試験：H 2 2 腫瘍モデルにおける R S L A I L - 2 及び T L R 作動薬の投与

H 2 2 肝細胞癌腫瘍モデルにおいて、ビヒクル治療と比較した場合の例示的な長時間作用型 I L - 2 R β バイアス作動薬である R S L A I L - 2、及び例示的な長時間作用型 T L R 作動薬である 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - N - R 8 4 8 の併用の抗腫瘍応答を評価並びに比較するための試験を実施した。

【0 4 3 4】

インビボモデル：使用されたマウスは、右側腹部皮下に移植された 3 0 0 万個の H 2 2 腫瘍細胞を有する約 1 0 週齢の雌 B a l b / c 系統であった。細胞を、治療開始前に 5 0 ~ 1 5 0 mm³ 容積に達する腫瘍に成長させた。

40

【0 4 3 5】

投与：4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 を、腫瘍内又は腫瘍周囲に（即ち、直接的に）4 0 μ l 量で腫瘍に投与した。R S L A I L - 2 を 0 . 8 m g / k g で静脈内注射により全身的に投与した。

【0 4 3 6】

標識された群：「R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8」：マウスは、腫瘍サイズが 5 0 ~ 1 5 0 mm³ である最初の投与日（投与 0 日

50

目)に20 μ gの4-arm-20kPEG-CM-Gly-N-R848を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目に0.8mg/kgの用量でRSLAIL-2を静脈内に投与された（即ち、それらは9日おきに合計で3回投与された）。

【0437】

標識された群「ビヒクル」：マウスは、50～150mm³の範囲の腫瘍サイズである最初の投与日（投与0日目）に40 μ lのハンス緩衝生理食塩水（4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848のビヒクル）を腫瘍内／腫瘍周囲に投与された。同じマウスはまた、0日目、9日目及び18日目にRSLAIL-2のビヒクル緩衝液を静脈内に投与された（投与0日目から開始して9日ごとに、合計で3回の投与）。

【0438】

測定：腫瘍容積を、105日の間1週間に2～3回のキャリパー測定によって収集し、式： $L \times W^2 / 2$ （式中、Lは腫瘍の長さであり、Wは腫瘍の幅である）によって算出した。

【0439】

結果：データは表12において提供される。

【0440】

【表13】

表 12.生存割合

治療開始後日数	ビヒクル	4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
7	++++	++++
14	++++	++++
21	++++	++++
28	++++	++++
35	++++	++++
38	+++	++++
42	+++	++++
45	++	++++
49	++	++++
52	++	++++
56	+	++++
59	なし	+++
63		+++
70		+++
73		+++
77		+++
80		+++
84		+++
91		+++
94		+++
98		+++
105		+++

【0441】

生存割合は以下のとおりに提供される：

0 % ≤ + < 2 5 %

2 5 % ≤ + + < 5 0 %

5 0 % ≤ + + + < 7 5 %

7 5 % ≤ + + + + < 1 0 0 %

【0442】

R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 による二重の薬剤治療は、投与の開始後105日目の試験終了までに当該動物のうち50%の生存をもたらした。際だったことに、R S L A I L - 2 + 4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - R 8 4 8 治療群における動物の40%が完全奏功を有し、これは、試験終了までに測定可能な腫瘍が観察されなかったことを意味する。

10

【0443】

ビヒクル群は生存している動物がいなかった。全ての動物は、28日目と56日目の間で極限の腫瘍容積に達したため試験から取り除かれた。

【0444】

実施例31

インビトロ試験：4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - N - R 8 4 8 及び関連化合物によるTLRの活性化

用量反応実験において、ヒト(h)TLR7、hTLR8及びhTLR4の下流の転写応答の開始について、レシキモド及び例示的な長時間作用型TLR作動薬である4 - a r m - P E G 2 0 k - C M - G l y - N - N - R 8 4 8 (化合物6)を比較的に試験した。

20

【0445】

使用された試験系は、5つのNFκB及びAP-1結合部位(hTLR7及びhTLR8細胞系)に融合したミニマルIFNβプロモーター又は5つのNFκB及びAP-1結合部位(hTLR4細胞系)に融合したIL-12 p40ミニマルプロモーターの下流のヒトTLR受容体並びに分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター構築物で安定的に形質移入されたHEK293細胞におけるレポーター遺伝子細胞系であった。親細胞系(hTLR受容体発現を有しないがSEAPレポートで安定的に形質移入されたNull1及びNull1K)は、陰性対照として使用された。

【0446】

表13に示されるとおり、レシキモド及び化合物6は、hTLR7及びhTLR8発現細胞系におけるレポーター発現を活性化したが、hTLR4細胞系では活性化しなかった。既知のhTLR4リガンドであるLPSは、hTLR4細胞系のレポーター発現を特異的に活性化した。これらのデータは、レシキモドがhTLR7及びhTLR8のシグナリングを特異的に活性化したことを示す。化合物6もまた、hTLR7及びhTLR8の下流のレポーター発現を特異的に活性化したが、レシキモドと比較して20倍を超えて高い濃度であり、且つhTLR4に影響をもたなかった。

30

【0447】

レシキモドは既知のTLR7/8作動薬であるため、hTLR4ではなくhTLR7及びhTLR8を発現する細胞系における応答が予想された。これらの実験は、化合物6が不十分な活性であることを実証し、レシキモドの放出が有効な受容体アゴニズムに必要であることを示唆する。

40

【0448】

これらのデータは、化合物6がレシキモドのプロドラッグであり、且つ放出可能なリンカーを介するPEGへのコンジュゲーションがレシキモドの活性を著しく減弱することを実証する。この結果はさらに、PBMC培養物中の初代血中単球における化合物6及びレシキモドの活性比較によって裏付けられた。

【0449】

【表 1 4】

表 13. 化合物 6、レシキモド及び LPS による hTLR 活性化の概要

	試験化合物	R848	化合物 6	LPS
TLR 受容体 細胞系	実験番号	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (ng/mL)
hTLR7	実験 1	0.077	4.6	NT*
	実験 2	0.040	3.5	NT
	実験 3	0.092	4.8	NT
	平均	0.070	4.3	NT
	標準偏差	0.026	0.77	NT
hTLR8	実験 1	0.50	>30	NT
	実験 2	0.45	>30	NT
	実験 3	0.48	>30	NT
	平均	0.48	>30	NT
	標準偏差	0.027	-	NT
hTLR4	実験 1	NA	NA	0.095
Null1	実験 1	NA	NA	NT
Null1K	実験 1	NA	NA	NT

* NT = 試験なし, ** NA = TLR 経路の活性化が検出されない

【0 4 5 0】

実施例 3 2

BALB/c マウスのマウス結腸癌腫モデル CT26 における時間差 RSLAIL-2 投与と併用した化合物 6 又はレシキモド治療後の血漿サイトカイン誘導の分析

各側腹部に 1 つある 2 つの CT26 皮下腫瘍 (100~200 mm³) を担持する Balb/c マウス (n = 6 / 群) の解剖学上右側の腫瘍に、単一の固定された腫瘍内 / 腫瘍周囲用量のレシキモド (10 μg) 又は例示的な長時間作用型 TLR 作動薬である 4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848 (化合物 6) (1 μg 若しくは 10 μg) のいずれかを投与した。これらのマウスの半数 (n = 3 / 群) が、化合物 6 又はレシキモドの投与の 96 時間後に 0.8 mg / kg の例示的な長時間作用型 IL-2 Rβ バイアス作動薬である RSLAIL-2 の単回静注用量を受容して、単剤としてのレシキモドと化合物又は RSLAIL-2 との併用の比較を可能にした。炎症性サイトカイン IFNα、IFNγ、TNFα、IL-6 及び IL-12 の濃度は、投与後の指定の時点で多重のタンパク質測定アッセイにより血漿中において決定された。

【0 4 5 1】

化合物 6 の低い方の用量レベル (1 μg) は、血漿中において全てのサイトカインの極めて僅かな誘導を示した。しかしながら、レシキモド及び化合物 6 両方の 10 μg の腫瘍内 / 腫瘍周囲用量は、血中においてロバストな炎症性サイトカイン誘導を示した。両方の化合物が、IFNα、TNFα、IL-6 及び IL-12 に関して投与後 2 時間でピークレベルをもたらす急速な誘導、及び IFN-γ に関して投与後 6 時間での遅延したピークを有して、試験された全てのサイトカインについて同様の一過的誘導パターンを示した。サイトカインレベルは、24 時間までにバックグラウンドレベル近傍までおさまった。

【0 4 5 2】

しかしながら、レシキモドと化合物 6 との間の重要な差が、TNFα を除く測定された

全てのサイトカインについての誘導の大きさにおいて観察された。化合物6と比較したレシキモドによって誘導されるピークのサイトカインレベルにおける差は、8～10倍（IL-6、IFN α ）から3～4倍（IFN γ 、IL-12）の高さでばらつきがあった。化合物6又はレシキモドから4日後のRSLA IL-2の投与は、血漿中のIFN α 、TNF- α 及びIL-12の中程度の上昇を誘導した。しかしながら、IFN γ は、治療開始時における単剤のレシキモド又は化合物6よりも、RSLA IL-2によってより高いレベルに誘導された。血漿IFN γ レベルは、最後のサンプリング時間となった3日間高いまま（>100 pg/ml）であった。

【0453】

まとめると、同じレシキモド用量レベルでの並列の比較において、化合物6は、腫瘍内／腫瘍周囲送達後の非コンジュゲートレシキモドと比較して、血漿サイトカイン誘導の低下を示した。化合物6による治療にRSLA IL-2を加えることによって、測定されたサイトカインのうちただ1つ、IFN γ を有意に誘導したが、これは、2つの治療剤に関するサイトカイン誘導プロファイルが大部分重複していないことを示す。

【0454】

実施例33

CT26腫瘍モデルにおける腫瘍内／腫瘍周囲投与されたTLR作動薬及び静脈内RSLA IL-2により誘導される免疫細胞薬力学のフローサイトメトリー評価

各側腹部に1つある両側のCT26皮下腫瘍を担持するBalb/cマウス（n=3/群）の解剖学上右側の腫瘍において、単一腫瘍内／腫瘍周囲用量の例示的な長時間作用型TLR作動薬である4-arm-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848（化合物6）（10 μ g又は0.1 μ g）又はビヒクルを投与した。化合物6の投与の4日後、例示的な長時間作用型IL-2 R β バイアス作動薬であるRSLA IL-2（0.8 mg/kg）を静脈内に送達した。

【0455】

化合物6で治療された腫瘍における免疫細胞の局所的な変化並びに反対側の非治療腫瘍及び血中におけるアブスコパルな変化を誘導した治療を、フローサイトメトリー分析によって評価した。腫瘍及び血液を回収し、化合物6の投与の1日後及び7日後、抗体染色のために処理した。この治療及び分析スキームにより、T細胞への腫瘍抗原提示に必要な好中球及び樹状細胞を含む、主として自然免疫細胞型における急速な化合物6用量依存的な単一成分活性の特徴付けが可能になった。化合物6の後の7日目の第2のサンプリング時点（RSLA IL-2治療後3日目）は、化合物6治療が、血液及び腫瘍において後に発生するRSLA IL-2誘導性T細胞応答をどのように依存的に調節したかを示した。

【0456】

治療後1日目に観察された早期の免疫学的事象は、10 μ gの高い方の用量の化合物6で治療された腫瘍の腫瘍内好中球の増加を含み、これは、細胞死の増加と一致した。好中球の腫瘍浸潤はまた、治療された腫瘍及び遠隔腫瘍の両方における成熟並びにリンパ節ホーミングに関するマーカーの上方制御を示した樹状細胞の一過的な活性化とも一致した。併用治療開始後7日目（RSLA IL-2投与後3日目）に、治療された腫瘍において化合物6の用量依存的に好中球が増加した。RSLA IL-2誘導性の腫瘍細胞死に対する化合物6依存的な効果は、化合物6治療腫瘍及び非治療腫瘍の両方において観察されたが、これはおそらく、両腫瘍におけるRSLA IL-2の増強に依存的な細胞傷害性CD8+T細胞の増加によって誘導された。

【0457】

腫瘍関連単球は、治療後の腫瘍において、RSLA IL-2投与の3日後である7日目の時点で最も有意に低減された。生細胞の割合としてのマクロファージの総数が増大したが、これは、細胞死の増加が白血球ではなく腫瘍細胞において選択的に誘導されたことを示唆している。しかしながら、腫瘍中の総白血球の割合としてのマクロファージの相対数は、併用治療後に低減された。

【0458】

10

20

30

40

50

白血球における相対的なマクロファージの減少についての主要なドライバーは、示される腫瘍浸潤性T細胞の実質的な増加であった。CD8+T細胞は、RSLAIL-2による併用治療後の腫瘍における選択的な化合物6の用量依存的な増加を示した。制御性T細胞の相対的な割合は、劇的に減少して、高いCD8:Treg比をもたらした。腫瘍浸潤性CD8+細胞傷害性T細胞の割合の増加は、CD44の高い表面発現及びPD-1+CTLA-4+二重陽性の増加を呈し、これは、腫瘍環境における高い抗原特異的活性を示唆している。

【0459】

治療された腫瘍とは異なり、細胞生存率及び好中球数は、血液中において影響されなかった。最初は単球が化合物6の治療後に血液中において用量依存的に一過的に増加したが、ビヒクルと比較して、RSLAIL-2治療後には血液中において減少した。血中NK細胞は、高用量の化合物6に应答して僅かな増加を示した。しかしながら、RSLAIL-2治療後、有意に高いNK細胞の増加が明らかになった。腫瘍環境と比較して、血液中のT細胞は、最も著しい差としてRSLAIL-2治療後の制御性T細胞の有意な増加を有する治療に対して顕著に異なる応答を示した。RSLAIL-2投与後、化合物6の高用量の群における血液中のCD8+T細胞集団において僅かな増加が観察された。CD4+T細胞は、化合物6の投与後に僅かな用量依存的な一過的な増加を示したが、RSLAIL-2投与後には有意な応答は観察されなかった。重要なことに、両治療群が、腫瘍中で観察される劇的な用量依存的CD8:Tregの増加とは異なり、血液中においてCD8:Treg比の全体的な減少を示した。

【0460】

存在量の僅かな増加を呈する一方で、血液中の試験されたT細胞サブポピュレーションにおいて、活性化マーカー及び抑制性フィードバックチェックポイント受容体の明らかな上方制御が観察された。CD25の発現は、IL-2受容体の関与及び観察される存在量の増加と一致して、RSLAIL-2治療に应答して血液中の制御性T細胞上で上方制御された。CD4+T細胞は、高用量の化合物6及びRSLAIL-2投与後の両薬剤の治療群においてCD69活性化マーカーの発現を誘導した。CD8+T細胞は、RSLAIL-2投与に应答したCD25発現のロバストな増加及び高用量の化合物6に应答した一過的なCD69の上方制御を示した。CD8+T細胞のうちCD44を発現する割合は、RSLAIL-2投与後に化合物6の用量に依存的な増加を示した。抑制性のチェックポイント受容体PD-1及びCTLA-4は、CD8+T細胞上の活性化マーカーCD25、CD69及びCD44と同じ誘導パターンに従ったが、これは、腫瘍抗原依存的活性化を示唆している。

【0461】

これらのデータは、それぞれ化合物6及びRSLAIL-2などの、長時間作用型TLR作動薬及び長時間作用型IL-2Rβバイアス作動薬による例示的な併用療法が、細胞傷害性T細胞の腫瘍抗原特異的な腫瘍内蓄積及び活性を最適化する自然免疫細胞型並びに適応免疫細胞型の連続的な活性化をもたらすモデルを裏付ける。

【0462】

自然免疫は、好中球による腫瘍抗原の放出及び樹状細胞による主要なCD8+Tリンパ球への提示を誘導する化合物6の局所的な送達によって活性化され、続いてこれは、腫瘍抗原特異的活性CD8+T細胞集団の広く全身的な腫瘍内での増加をもたらす治療薬のRSLAIL-2成分によって大幅に増幅された。

【0463】

参照による援用

本明細書において参照される全ての論文、書籍、特許、特許公報及び他の刊行物は、全体として参照により援用される。本明細書の教示と参照によって援用される技術との間に不一致が生じた場合、本明細書におけるその教示の意味が優先するものとする。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

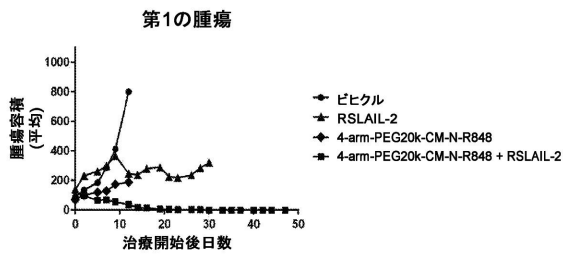


図 1

【図 2】

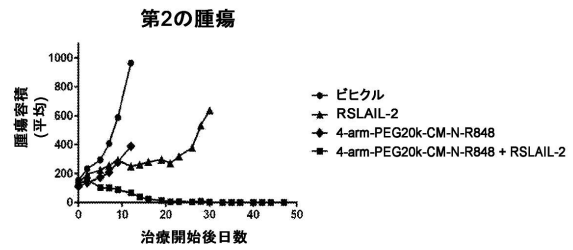


図 2

10

【図 3】

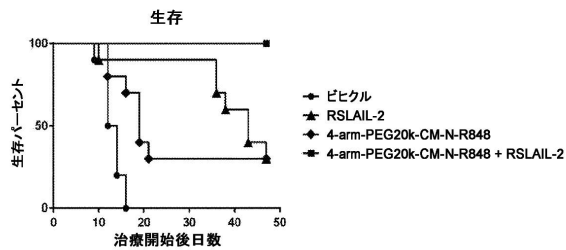


図 3

【図 4 A B C D】

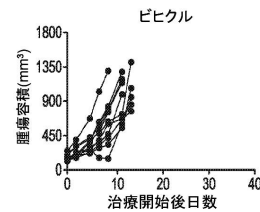


図 4A

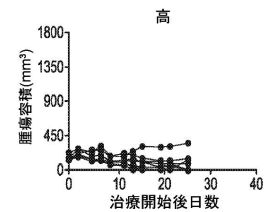


図 4B

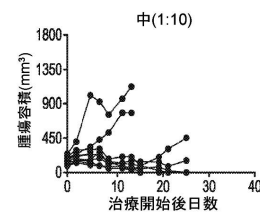


図 4C

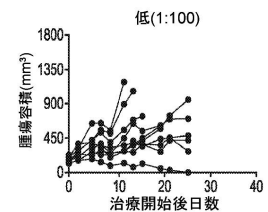


図 4D

20

30

40

50

【図 4 E F G H】

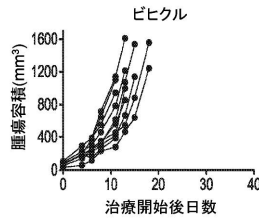


図 4E

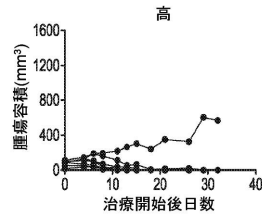


図 4F

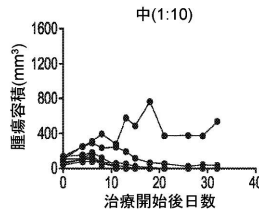


図 4G

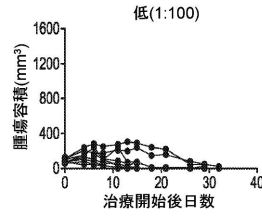


図 4H

【図 5 A B C D】

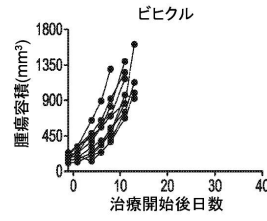


図 5A

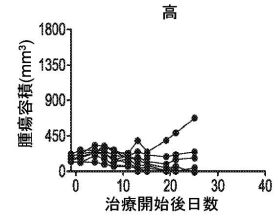


図 5B

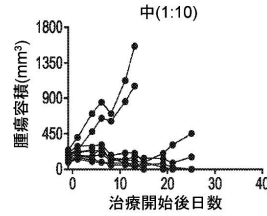


図 5C

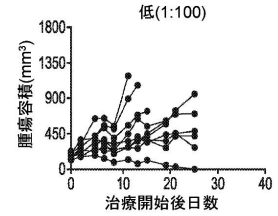


図 5D

【図 5 E F G H】

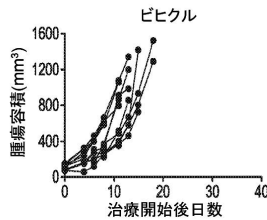


図 5E

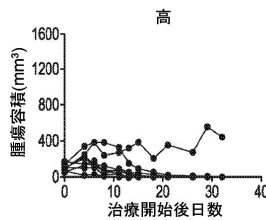


図 5F

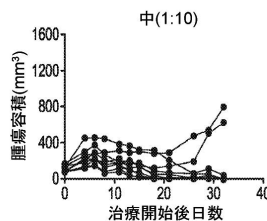


図 5G

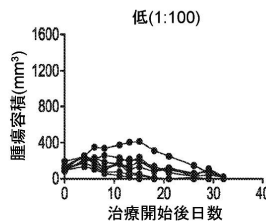


図 5H

【図 6】

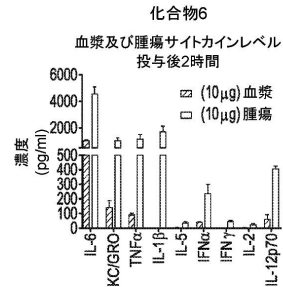


図 6A

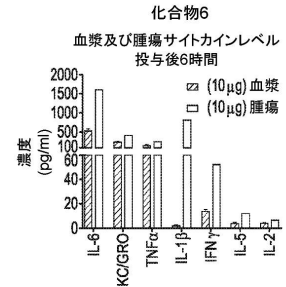


図 6B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 45/06 (2006.01)

A 6 1 K 45/06

A 6 1 K 38/20 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

C 0 8 G 65/329 (2006.01)

A 6 1 K 38/20

C 0 8 G 65/329

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/444,756

(32)優先日 平成29年1月10日(2017.1.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/488,407

(32)優先日 平成29年4月21日(2017.4.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/510,019

(32)優先日 平成29年5月23日(2017.5.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/488,251

(32)優先日 平成29年4月21日(2017.4.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/510,024

(32)優先日 平成29年5月23日(2017.5.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 レン, ゾンシュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, リボン ストリート 1 3 0 1

(72)発明者 アナンド, ニール ケー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, バーネソン アベニュー 5 4 2

(72)発明者 ツァイ, ハイイン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 1 4, クパチーノ, バーンハート プレイス 7 4 5 0

(72)発明者 デン, ボーリーヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 2, サン ラモン, パール クレスト コート 4 4 5

(72)発明者 ジョシ, バルチャンドラ ブイ.

アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 7 5 8, マディソン, グレン ビュー ドライブ 1 0 8

(72)発明者 ザレフスキー, ジョナサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 3, オリンダ, オーク リッジ レーン 3 4

(72)発明者 宮崎 宇広

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, キング ストリート 6 6 0, ナンバー 3 6 6

(72)発明者 キヴィメイ, サウル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2, サンフランシスコ, 4 6 ティーエイチ アベニュー 1 3 1 9

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 3 2 5 7 2 (J P, A)

特表 2 0 1 1 - 5 3 0 5 9 7 (J P, A)

特開 2 0 0 6 - 2 4 9 1 0 2 (J P, A)

特表2015-504881 (JP, A)
特表2014-506116 (JP, A)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 47/60
A61K 45/00
A61P 43/00
A61K 31/4738
A61P 35/00
A61K 45/06
A61K 38/20
C08G 65/329
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)