

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7679355号
(P7679355)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

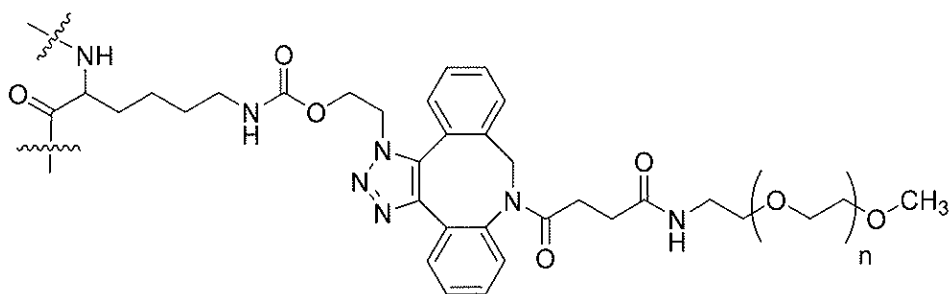
(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
請求項の数 21 (全303頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-508789(P2022-508789)	(73)特許権者	519050543
(86)(22)出願日	令和2年8月14日(2020.8.14)		シンソークス, インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-544280(P2022-544280 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0
(43)公表日	令和4年10月17日(2022.10.17)		3 7, ラ ホヤ, ノース トリー パイ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/046419		ンズ ロード 1 1 0 9 9, スイート 2
(87)国際公開番号	WO2021/030706	(74)代理人	100127926
(87)国際公開日	令和3年2月18日(2021.2.18)		弁理士 結田 純次
審査請求日	令和5年8月10日(2023.8.10)	(74)代理人	100140132
(31)優先権主張番号	62/887,400		弁理士 竹林 則幸
(32)優先日	令和1年8月15日(2019.8.15)	(72)発明者	ジェロド・ブタシン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9 2 0
(31)優先権主張番号	62/903,187		3 7. ラ・ホーヤ. ノース・トリー・
(32)優先日	令和1年9月20日(2019.9.20)		パインズ・ロード1 1 0 9 9. スイート
最終頁に続く			1 9 0
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 I L - 2 コンジュゲートを用いる免疫腫瘍学併用療

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

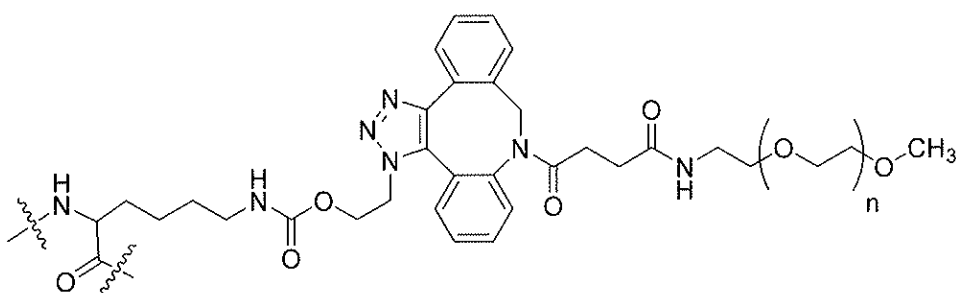
それを必要とする対象におけるがんを治療する方法に使用するための、治療有効量の I L - 2 コンジュゲートを含む医薬組成物であって、該方法は、1つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤を対象に投与する工程をさらに含み、
前記 I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] が配列番号 5 0 の位置を基準にして 6 4 位に存在しており、ここで、[A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] は、式 (X I I) もしくは式 (X I I I) の構造を有する：

【化 1】



10

(XII)



20

(XIII)

(式中：

n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ の構造を有する PEG 基が、 $30\text{ kDa} \pm 15\%$ の分子量を有するような整数であり；

30

波線は、配列番号 50 内の、 $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ に先行する最初のアミノ酸残基への共有結合および $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ に後続する最初のアミノ酸残基への共有結合をそれぞれ示す)

、前記医薬組成物。

【請求項 2】

前記 IL-2 コンジュゲートは、配列番号 50 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 配列が同一であるアミノ酸を含み、 $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ は配列番号 50 の位置を基準にして 64 位に存在する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記 IL-2 コンジュゲートは、 $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ が配列番号 50 の位置を基準にして 64 位に存在する配列番号 50 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 4】

前記 IL-2 コンジュゲートは混合物として提供され、該混合物は、(i) $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ が式 (XII) の構造を有する IL-2 コンジュゲートと、(ii) $[AzK\_L1\_PEG30kD]$ が式 (XIII) の構造を有する IL-2 コンジュゲートとを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記 IL-2 コンジュゲートおよび 1 つまたはそれ以上の PD-1 阻害剤は、単一の併用組成物として製剤化される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

50

【請求項 6】

前記 I L-2 コンジュゲートおよび 1 つまたはそれ以上の P D-1 阻害剤は、個々の組成物として製剤化される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

1 つまたはそれ以上の P D-1 阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはセミプリマブを含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

1 つまたはそれ以上の P D-1 阻害剤は、ペムブロリズマブを含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

1 つまたはそれ以上の P D-1 阻害剤は、ニボルマブを含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

1 つまたはそれ以上の P D-1 阻害剤は、セミプリマブを含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

がんは、腎細胞癌（RCC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）、縦隔原発大細胞型 B 細胞リンパ腫（PMBC L）、尿路上皮癌、マイクロサテライト不安定性がん、マイクロサテライト安定性がん、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん（CRC）、子宮頸がん、肝細胞癌（HCC）、メルケル細胞癌（MCC）、黒色腫、小細胞肺癌（SCLC）、食道、食道扁平上皮癌（ESCC）、膠芽腫、中皮腫、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、前立腺がん、去勢抵抗性前立腺がん、転移性去勢抵抗性前立腺がん、または DNA ダメージ応答（DDR）欠損を有する転移性去勢抵抗性前立腺がん、膀胱がん、卵巣がん、中度から軽度の変異性負荷の腫瘍、皮膚扁平上皮癌（CSCC）、扁平上皮皮膚がん（SCSC）、その原発性解剖学的起源部位を超えて肝臓および CNS に全身的に播種された腫瘍、ならびにびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫から選択される、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）、頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）、結腸がん、結腸直腸がん、および黒色腫から選択される、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記がんは結腸がんである、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記 I L-2 コンジュゲートは、対象に、毎週一回、2 週毎に一回、3 週毎に一回、4 週毎に一回、5 週毎に一回、6 週毎に一回、7 週毎に一回、または 8 週毎に一回投与される、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記 I L-2 コンジュゲートは、対象に、毎週一回投与される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記 I L-2 コンジュゲートは、対象に、2 週毎に一回投与される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記 I L-2 コンジュゲートは、対象に、3 週毎に一回投与される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記 I L-2 コンジュゲートは、対象に、静脈内投与によって投与される、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記 IL-2 コンジュゲートは、対象に、皮下投与によって投与される、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記 IL-2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記 IL-2 コンジュゲートは、対象の体重 1 kg あたり $10 \mu\text{g} \pm 15\%$ の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり $200 \mu\text{g} \pm 15\%$ の IL-2 コンジュゲートまでの用量で投与される、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年8月15日に出願された米国仮特許出願第 62/887,400 号、2019年9月20日に出願された米国仮特許出願第 62/903,187 号、および 2020年1月17日に出願された米国仮特許出願第 62/962,668 号に対する優先権を主張し、それらのそれぞれの開示は、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

20

配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。前記 ASCII コピーは、2020年8月12日に作成され、2020-08-12_01183-0073-00PCT_seq_listing.txt と名付けられ、サイズは 128,000 バイトである。

【背景技術】

【0003】

T 細胞の別々の集団が、免疫ホメオスタシスおよび免疫寛容を維持するために免疫系を調節する。例えば、制御性 T (Treg) 細胞は、病的自己反応性を防ぐことによって免疫系による不適切な応答を防ぎ、一方、細胞傷害性 T 細胞は、感染細胞および／または癌性細胞を標的とし、破壊する。一部の例では、T 細胞の異なる集団の調節は、疾患または症状の治療のための選択肢を提供する。一部の例では、これは、併用療法における追加の薬剤または方法の存在によって利益を受ける。

30

【0004】

よって、一態様では、対象におけるがんを治療する方法であって、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて IL-2 コンジュゲートを対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書において提供される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

40

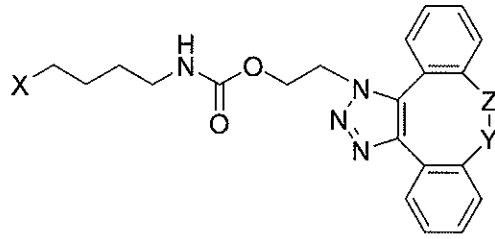
ある特定の実施形態では、がんを治療する方法が本明細書に記載される。以下の実施形態が包含される。

【0006】

実施形態 A1 は、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (I) の構造：

50

【化 1】



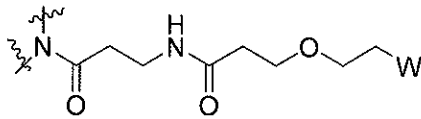
式(I);

10

(式中：

ZはCH₂であり、Yは

【化 2】

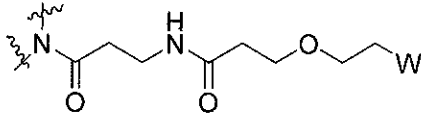


20

であり；

YはCH₂であり、Zは

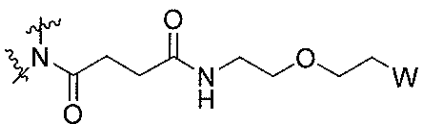
【化 3】



であり；

ZはCH₂であり、Yは

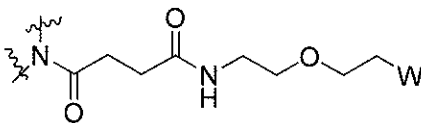
【化 4】



であり；または

YはCH₂であり、Zは

【化 5】



40

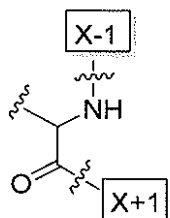
であり；

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

50

【化 6】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

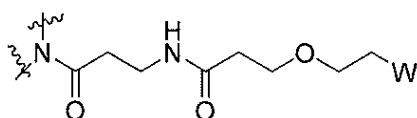
に置き換えられており；

配列番号 3 における式 (I) の構造の位置は、K 3 4、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、P 6 4、R 3 7、T 4 0、E 6 7、Y 4 4、V 6 8、および L 7 1 から選択される、前記方法である。

【0007】

実施形態 A 2 は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Z は C H ₂ であり、Y は

【化 7】

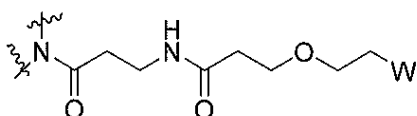


である、実施形態 A 1 に記載の方法である。

【0008】

実施形態 A 3 は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Y は C H ₂ であり、Z は

【化 8】

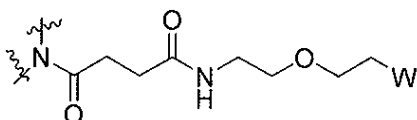


である、実施形態 A 1 に記載の方法である。

【0009】

実施形態 A 4 は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Z は C H ₂ であり、Y は

【化 9】



である、実施形態 A 1 に記載の方法である。

【0010】

実施形態 A 5 は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Y は C H ₂ であり、Z は

10

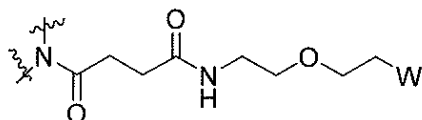
20

30

40

50

【化 10】



である、実施形態 A 1 に記載の方法である。

【0011】

実施形態 A 6 は、IL-2 コンジュゲートにおいて、PEG 基は、25 kDa、30 kDa、または 35 kDa の平均分子量を有する、実施形態 A 1 ~ A 5 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【0012】

実施形態 A 7 は、IL-2 コンジュゲートにおいて、PEG 基は、30 kDa の平均分子量を有する、実施形態 A 6 に記載の方法である。

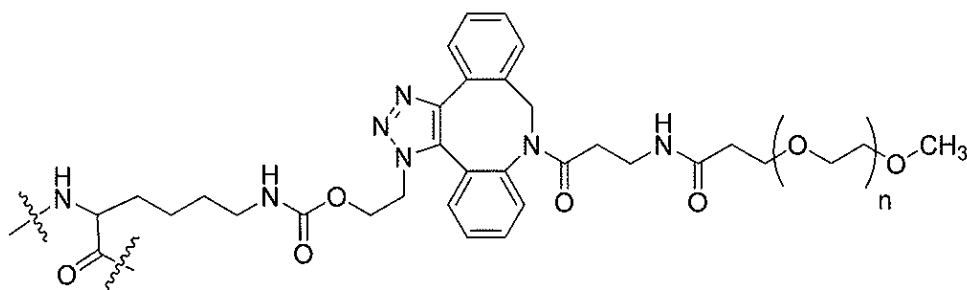
【0013】

実施形態 A 8 は、IL-2 コンジュゲートにおいて、配列番号 3 における式 (I) の構造の位置は、P 64 である、実施形態 A 1 ~ A 7 のいずれか 1 つに記載の方法である。

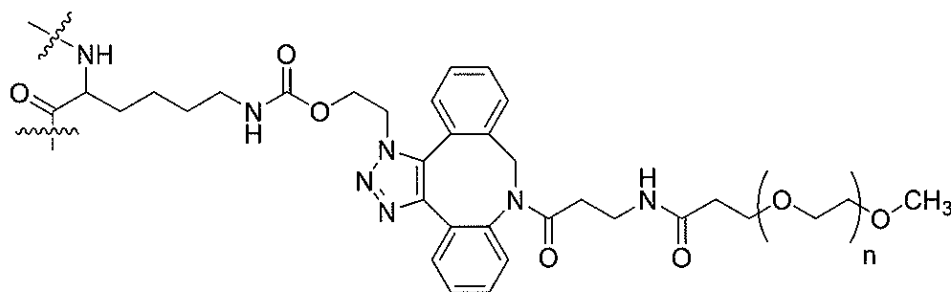
【0014】

実施形態 A 9 は、式 (I) の構造は、式 (X) もしくは式 (XI) の構造を有し、または式 (X) および式 (XI) の混合物：

【化 11】



式(X);



(XI);

(式中：

n は、約 2 ~ 約 5000 の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号 3 内のアミノ酸残基への共有結合を示す)

である、実施形態 A 1 に記載の方法である。

【0015】

実施形態 A 10 は、IL-2 コンジュゲートにおいて、配列番号 3 における式 (X) または式 (XI) の構造の位置は、P 64 である、実施形態 A 9 に記載の方法である。

【0016】

実施形態A11は、IL-2コンジュゲートにおいて、 n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ が、約25kDa、30kDa、または35kDaの分子量を有するような整数である、実施形態A9またはA10に記載の方法である。

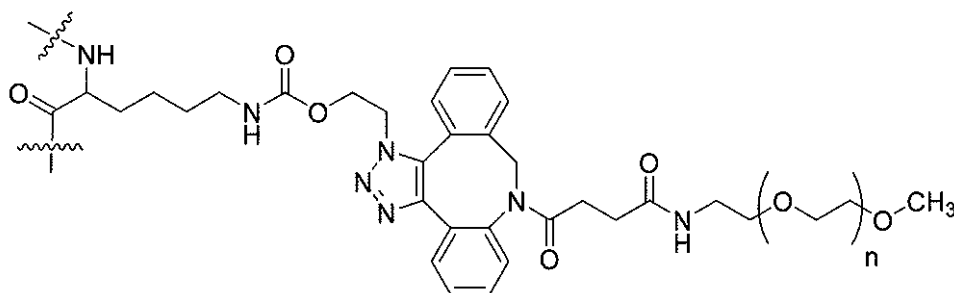
【0017】

実施形態A12は、IL-2コンジュゲートにおいて、 n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ が、約30kDaの分子量を有するような整数である、実施形態A11に記載の方法である。

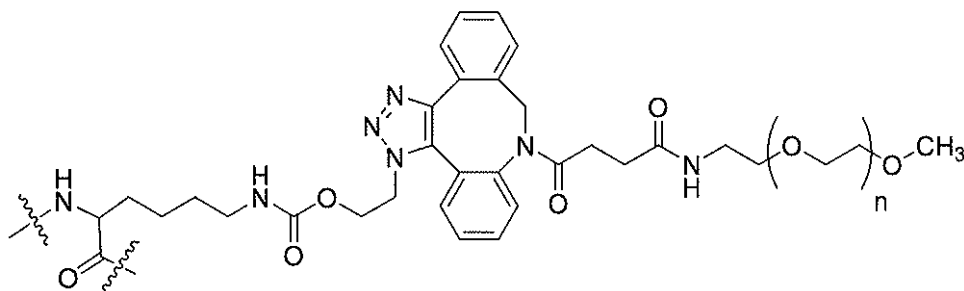
【0018】

実施形態A13は、式(I)の構造は、式(XII)もしくは式(XIII)の構造を有し、または式(XII)および式(XIII)の混合物：

【化12】



式(XII);



(XIII);

(式中：

n は、約2～約5000の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号3内のアミノ酸残基への共有結合を示す)

である、実施形態A1に記載の方法である。

【0019】

実施形態A14は、IL-2コンジュゲートにおいて、配列番号3における式(XII)または式(XIII)の構造の位置は、P64である、実施形態A13に記載の方法である。

【0020】

実施形態A15は、IL-2コンジュゲートにおいて、 n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ が、約25kDa、30kDa、または35kDaの分子量を有するような整数である、実施形態A13またはA14に記載の方法である。

【0021】

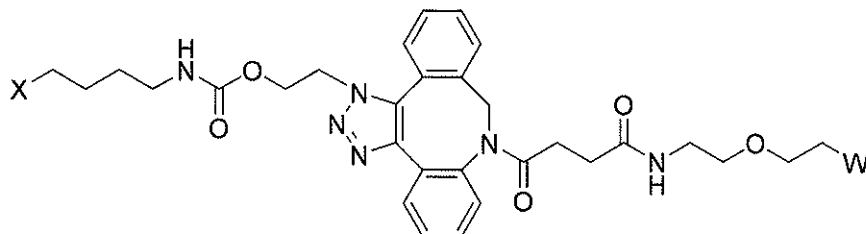
実施形態A16は、IL-2コンジュゲートにおいて、 n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ が、約30kDaの分子量を有するような整数である、実施形態A15に記載の

方法である。

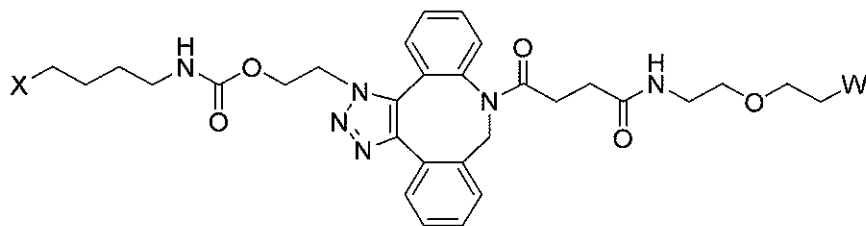
【0022】

実施形態A17は、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号50のアミノ酸配列を含み、[A₂K₁PEG30kD]は、式(IV)もしくは式(V)の構造を有し、または式(IV)および式(V)の構造の混合物：

【化13】



式(IV);



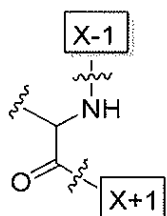
式(V);

(式中：

Wは、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、および60kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化14】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)

である、前記方法である。

【0023】

実施形態A18は、Wは、25kDa、30kDa、または35kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態A17に記載の方法である。

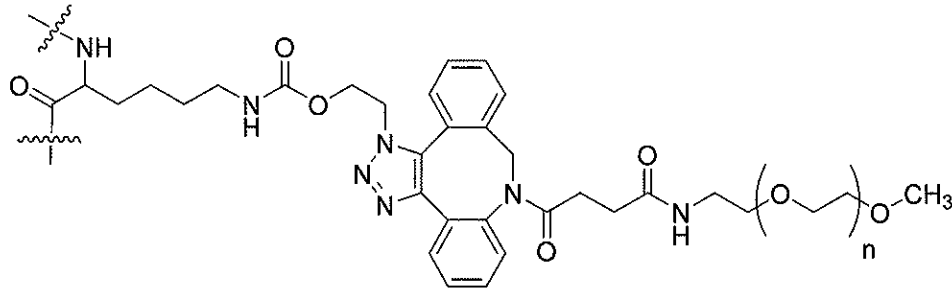
【0024】

実施形態A19は、Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態

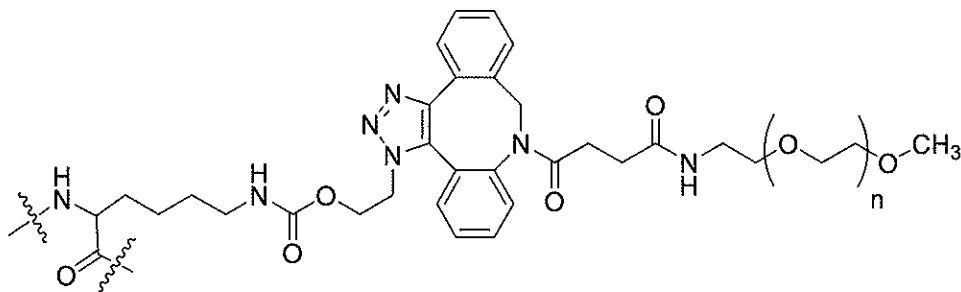
A 1 8 に記載の方法である。

【 0 0 2 5 】

実施形態 A 2 0 は、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] は、式 (X I I) もしくは式 (X I I I) の構造を有し、または式 (X I I) および式 (X I I I) の構造の混合物：
【化 1 5】



式(XII);



(XIII);

(式中：

n は、 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ が、約 3 0 k D a の分子量を有するような整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号 5 0 内のアミノ酸残基への共有結合を示す）である、前記方法である。

【 0 0 2 6 】

実施形態 A 2 1 は、1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤である、実施形態 A 1 ~ A 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【 0 0 2 7 】

実施形態 A 2 2 は、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、およびセミプリマブから選択される、実施形態 A 2 1 に記載の方法である。

【 0 0 2 8 】

実施形態 A 2 3 は、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態 A 2 2 に記載の方法である。

【 0 0 2 9 】

実施形態 A 2 4 は、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ニボルマブである、実施形態 A 2 2 に記載の方法である。

【 0 0 3 0 】

実施形態 A 2 5 は、がんは、腎細胞癌 (R C C)、非小細胞肺癌 (N S C L C)、頭頸部扁平上皮がん (H N S C C)、古典的ホジキンリンパ腫 (c H L)、縦隔原発大細胞型 B 細胞リンパ腫 (P M B C L)、尿路上皮癌、マイクロサテライト不安定性がん、マイクロサテライト安定性がん、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん (C R C)、子宮頸がん、肝細胞癌 (H C C)、メルケル細胞癌 (M C C)、黒色腫、小細胞肺癌 (S C L C)、食道がん、食道扁平上皮癌 (E S C C)、膠芽腫、中皮腫、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、前立腺がん、去勢抵抗性前立腺がん、転移性去勢抵抗性前立腺がん、または D N A ダメージ応答 (D D R) 欠損を有する転移性去勢抵抗性前立腺がん、膀胱がん、卵巣がん、中度から軽度の変異性負荷の腫瘍、皮膚扁平上皮癌 (C S C C)、扁平上皮皮膚がん (S C S C)、低発現から非発現の P D - L 1 の腫瘍、その原発性解剖学的起源部位を超えて肝臓および C N S に全身的に播種された腫瘍、ならびにびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫から選択される、実施形態 A 1 ~ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法である。

10

【0031】

実施形態 A 2 6 は、I L - 2 コンジュゲートは、対象に、1 週当たり一回、2 週毎に一回、3 週毎に一回、4 週毎に一回、5 週毎に一回、6 週毎に一回、7 週毎に一回、または 8 週毎に一回投与される、実施形態 A 1 ~ A 2 5 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【0032】

実施形態 A 2 7 は、I L - 2 コンジュゲートは、対象に、静脈内投与によって投与される、実施形態 A 1 ~ A 2 6 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【0033】

実施形態 A 2 8 は、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である、実施形態 A 1 ~ A 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法である。

20

【0034】

本発明の特徴性および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用されている例示的な実施形態を説明する下記の詳細な説明、および添付の図面を参照することにより得られるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】実施例 1 1 の試験 1 から得られた、Q W × 3 スケジュールに基づき I V により投与した化合物 A の抗腫瘍活性のグラフを示す。黒色の矢印は化合物 A を投与した日を示す。

30

【図 2】実施例 1 1 の試験 1 から得られた、Q W × 3 スケジュールに基づき I V により投与した化合物 A の腫瘍容積のグラフを示す。

【図 3】実施例 1 1 の試験 1 から得られた、化合物 A を用いて Q W × 3 投与により処置された各動物における処置後 1 5 日目の腫瘍容積を示す。黒色の矢印は化合物 A を投与した日を示す。

【図 4】実施例 1 1 の試験 1 から得られた、化合物 A を用いて Q 2 W × 2 投与された各動物における処置後 1 5 日目の腫瘍容積を示す。

【図 5】実施例 1 1 の試験 2 から得られた、ビヒクル、6 m g / k g の化合物 A (単一薬剤として)、抗 P D - 1 抗体 (単一薬剤として)、および 6 m g / k g の化合物 A と抗 P D - 1 抗体との組合せを用いたマウスの処置に由来する平均腫瘍増殖曲線を示す。黒色の矢印は化合物 A を投与した日を示す。

40

【図 6】実施例 1 1 の試験 2 から得られた、化合物 A と抗 P D - 1 抗体との組合せで処置された群における、処置後 1 5 日目の T G I % データのグラフを、ビヒクル、化合物 A 単独、または抗 P D - 1 抗体単独で処置された群と比較して示す。ビヒクル対照に対して * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および *** $p < 0.01$ 。⁺ 抗 P D - 1 抗体に対して $p < 0.05$ 。# 化合物 A に対して $p < 0.05$ 。データは平均腫瘍容積 ± S E M (マウス 1 4 匹 / 群) を表す。

【図 7】実施例 1 1 の試験 2 から得られた、処置群に関する K a p l a n - M e i e r 生存曲線のグラフを示す。* ビヒクル対照に対して $p < 0.05$ 。⁺ 抗 P D - 1 抗体に対して $p < 0.05$ 。# 化合物 A に対して $p < 0.05$ 。

50

【図8】実施例11の試験3において、化合物Aが、単一薬剤として、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、および9mg/kgで投与されたときの平均腫瘍増殖曲線を表す。データは平均腫瘍容積±SEMを表す（マウス14匹/群；ただしマウス12匹/群であった9mg/kgの化合物Aを除く）。黒色の矢印は化合物Aの投与日を示す。

【図9】実施例11の試験3から得られた、処置後15日目の個々の腫瘍容積を示す。データは個々の腫瘍容積を示す；平均値±SEMおよびビヒクル対照と比較したTGI%も表示する。ビヒクル対照に対して*** $p < 0.01$ 。

【図10】ビヒクル（対照）、抗PD-1抗体単独、化合物A単独、および化合物Aと抗PD-1抗体との組合せで処置された処置群に関するKaplan-Meier生存曲線のグラフを示す図である。*実施例11の試験3に由来するビヒクル対照に対して $p < 0.05$ 。[†]抗PD-1抗体に対して $p < 0.05$ 。[#]化合物Aに対して $p < 0.05$ 。

【図11A】実施例12の単ードナーについて、IL-2およびIL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD]-1単独、ならびにニボルマブ（Nivo）またはペンブロリズマブ（Pem）との組合せに関する代表的なサイトカインレベルのグラフを示す。図11Aは、IFNガンマ、IL-8、IL-6、TNFアルファ、IL-4、およびIL-5のレベルのグラフを示す。

【図11B】実施例12の単ードナーについて、IL-2およびIL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD]-1単独、ならびにニボルマブ（Nivo）またはペンブロリズマブ（Pem）との組合せに関する代表的なサイトカインレベルのグラフを示す。図11Bは、IL-6、TNFアルファ、およびIL-5のレベルのグラフを示す。

【図12】実施例13による、化合物B（IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD]-1）とペンブロリズマブとの組合せの、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおけるインターフェロンガンマの放出を示す。

【図13】実施例13による、化合物B（IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD]-1）とニボルマブとの組合せの、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおけるインターフェロンガンマの放出を示す。

【図14】実施例13による、化合物B（IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD]-1）とニボルマブとの組合せの、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおけるインターフェロンガンマの放出を示す。

【図15】実施例14から得られた、化合物Bの薬物動態特性を示す。

【図16A】実施例14による、化合物Bを投与した後の、末梢血液CD8+T細胞、CD8+メモリーT細胞、NK細胞、およびTreg細胞におけるpSTAT5+細胞の量をそれぞれ示す。

【図16B】実施例14による、化合物Bを投与した後の、末梢血液CD8+T細胞、CD8+メモリーT細胞、NK細胞、およびTreg細胞におけるpSTAT5+細胞の量をそれぞれ示す。

【図16C】実施例14による、化合物Bを投与した後の、末梢血液CD8+T細胞、CD8+メモリーT細胞、NK細胞、およびTreg細胞におけるpSTAT5+細胞の量をそれぞれ示す。

【図16D】実施例14による、化合物Bを投与した後の、末梢血液CD8+T細胞、CD8+メモリーT細胞、NK細胞、およびTreg細胞におけるpSTAT5+細胞の量をそれぞれ示す。

【図17-1】図17A~17Gは、実施例14による、化合物Bによる、CD8+T、NK、およびTreg細胞集団内のKi67の活性化を示す。

【図17-2】図17-1の続き。

【図17-3】図17-2の続き。

【図17-4】図17-3の続き。

【図18-1】図18A~18Dは、実施例14による、化合物Bによる処置後の、腫瘍サンプルの分析（CD8+T細胞、NK細胞、およびTreg細胞レベル、ならびにCD8+/Treg比）を示す。

10

20

30

40

50

【図18-2】図18-1の続き。

【図19】実施例15による、化合物Bおよびマウス抗PD-1抗体による処置後のTCR多様性を示す。

【図20】実施例15による、表示される処置（例えば、化合物Bおよび／またはマウス抗PD-1抗体）後の、T細胞分画に対するTILクローン性を示す。

【図21】実施例15による、化合物Bによる処置後のT細胞クローン性を、ビヒクル対照と比較して示す図。

【図22】実施例16による、対照（ビヒクル）、化合物B（6mg/kg）、マウス抗PD-1（10mg/kg）、または化合物Bとマウス抗PD-1との組合せによる処置後の、8日目CT26腫瘍サンプルに由来する発現ヒートマップを示す（1群あたりマウスN=10）。

10

【図23】図23A～23Cは、実施例16による、化合物Bによる処置後の腫瘍微小環境状態の重要な発現レポーター：活性化CD8+エフェクター、およびエフェクターメモリーT細胞、および細胞溶解性NK細胞の浸潤分析を示す。CTL=対照（ビヒクル）；Compound B=化合物B；aPD1=マウス抗PD-1抗体；Compound B aPD1=化合物Bとマウス抗PD-1抗体との組合せ。

【図24A】実施例16による治療に应答するインターフェロンγ遺伝子発現シグネチャレベルのプロファイル分析を示す。CTL=対照（ビヒクル）；Compound B=化合物B；aPD1=マウス抗PD-1抗体；Compound B aPD1=化合物Bとマウス抗PD-1抗体との組合せ。

20

【図24B】実施例16による治療に应答するインターフェロンγ遺伝子発現シグネチャレベルのプロファイル分析を示す。CTL=対照（ビヒクル）；Compound B=化合物B；aPD1=マウス抗PD-1抗体；Compound B aPD1=化合物Bとマウス抗PD-1抗体との組合せ。

【図25】実施例17による再チャレンジを受けた無腫瘍動物における生存および腫瘍増殖評価を示す。

【図26】実施例17による再チャレンジを受けた無腫瘍動物における生存および腫瘍増殖評価を示す。

【図27】図27Aおよび27Bは、実施例17による再チャレンジを受けたマウスにおいて、化合物BはメモリーCD8+T細胞を含む末梢血メモリーT細胞（CD3+）の全体的増加を促進することを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0036】

上記の一般的説明および下記の詳細な説明は例示的かつ説明的であるだけであり、また特許請求されるいかなる主題も制限しないことが理解されるべきである。参照によって本明細書に組み入れられている資料のいずれかが本開示の表現内容と矛盾する場合、その限度において、該表現内容がコントロールする。

【0037】

定義

そうでないと定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、特許請求される主題が属する技術の当業者により一般的に理解されるのと同じの意味を有する。本出願において、単数の使用は、具体的にそうでないと述べられない限り、複数を含む。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」には、文脈がそうでないと明らかに述べていない限り、複数の指示対照を含むことに留意しなければならない。本出願において、「または」の使用は、そうでないと述べられない限り「および／または」を意味する。さらに、用語「含むこと（including）」ならびに他の形態、例えば「含む（include）」、「含む（includes）」、および「含まれる（included）」の使用は限定でない。

40

【0038】

本明細書における、「一部の実施形態」、「実施形態」、「一実施形態」、または「他

50

の実施形態」への参照は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が、本発明の少なくとも一部の実施形態に含まれるが、必ずしも全ての実施形態に含まれるわけではないことを意味する。

【0039】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表すことができる。また、約は、正確な量も含む。それゆえに、「約5 μ L」は、「約5 μ L」を、また「5 μ L」をも意味する。通常、用語「約」は、実験誤差の範囲内、例えば、15%、10%、または5%以内であると予想されることとなる量を含む。

【0040】

本明細書で使用されるセクション見出しは、組織化のためだけのものであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきでない。

10

【0041】

用語「または」は、文脈がそうでないと明らかに述べていない限り、「および／または」と同等の包括的な意味合いで使用される。

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「個体」、「対象」、および「患者」は、あらゆる哺乳動物を意味する。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物はヒト以外である。いずれの用語も、ヘルスケアワーカー（例えば、医師、登録看護師、ナースプラクティショナー、医師のアシスタント、病棟勤務員またはホスピス職員）の（例えば定常的な、または断続的な）管理によって特徴付けられる状況を必要としないか、またそれに限定されしない。

20

【0043】

本明細書で使用される場合、結合親和性に関する用語「かなりの」または「かなり」は、標的受容体へのサイトカイン（例えば、IL-2 ポリペプチド）の結合に影響を与えるのに十分なサイトカイン（例えば、IL-2 ポリペプチド）の結合親和性の変化を意味する。一部の例では、当該用語は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれを上回る変化を指す。一部の例では、該用語は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍またはそれ以上の変化を意味する。

【0044】

一部の例では、サイトカインシグナル伝達複合体を介した1つまたはそれ以上の細胞集団の活性化に関する、用語「かなりの」または「かなり」は、場合、細胞集団を活性化するのに十分な変化を意味する。場合によっては、細胞集団を活性化する変化は、受容体シグナル伝達効力として測定される。そのような場合には、EC50値が提供される。その他の場合には、ED50値が提供される。追加の場合には、サイトカインの濃度または投薬量が提供される。

30

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「効力」は、標的効果をもたらすのに必要とされるサイトカイン（例えばIL-2 ポリペプチド）の量を指す。一部の例では、用語「効力」は、標的サイトカイン受容体（例えば、IL-2 受容体）を活性化するのに必要とされるサイトカイン（例えばIL-2 ポリペプチド）の量を指す。その他の場合には、用語「効力」とは、標的細胞集団を活性化するのに必要とされるサイトカイン（例えばIL-2 ポリペプチド）の量を指す。場合によっては、効力は、ED50（50%有効量）、または最大効果の50%を生成するのに必要とされる用量として測定される。その他のケースでは、効力は、EC50（50%有効濃度）、または集団の50%において標的効果をもたらすのに必要とされる用量として測定される。

40

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「非天然アミノ酸」は、20種類の天然アミノ酸以外のアミノ酸を指す。例示的な非天然アミノ酸は、Youngらの、「Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the ge

50

netic lexicon」、J. of Biological Chemistry 285 (15) : 11039~11044頁 (2010年) に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み入れられている。

【0047】

用語「抗体」は、本明細書では、最も広い意味合いで使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、および所望の抗原結合活性を示す限り抗体断片を含むが、これらに限定されない様々な抗体構造を包含する。

「抗体断片」は、無傷の抗体が結合する抗原に結合する、該無傷の抗体の一部を含む無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例として、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂ ; ダイアボディ ; 直鎖抗体 ; 単鎖抗体分子 (例えば、scFv) ; および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、抗原はEGFRである。

【0048】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち該集団を占める個々の抗体は同一であり、および／または同一のエピトープに結合する。ただし、例えば自然発生的な突然変異またはモノクローナル抗体調製物の製造期間中に生ずる突然変異を含有する考え得るバリエーション抗体、例えば微量で一般的に存在するようなバリエーション等は論外である。異なるデターミナント (エピトープ) を標的とする異なる抗体を一般的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のデターミナントを標的とする。したがって、修飾語の「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られるような抗体の特徴を表し、何らかの特別な方法により抗体を生成する必要があるとは解釈されない。例えば、本発明に基づき使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有する遺伝子導入動物を利用する方法を含む、これらに限定されない様々な技術により作成することができ、モノクローナル抗体を作成するためのそのような方法およびその他の例示的方法が本明細書に記載される。

【0049】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」は、ヌクレオシド部分とリン酸部分を含む化合物を指す。例示的な天然ヌクレオチドとしては、限定されないが、アデノシントリホスフェート (ATP)、ウリジントリホスフェート (UTP)、シチジントリホスフェート (CTP)、グアノシントリホスフェート (GTP)、アデノシンジホスフェート (ADP)、ウリジンジホスフェート (UDP)、シチジンジホスフェート (CDP)、グアノシンジホスフェート (GDP)、アデノシンモノホスフェート (AMP)、ウリジンモノホスフェート (UMP)、シチジンモノホスフェート (CMP)、およびグアノシンモノホスフェート (GMP)、デオキシアデノシントリホスフェート (dATP)、デオキシチミジントリホスフェート (dTTP)、デオキシシチジントリホスフェート (dCTP)、デオキシグアノシントリホスフェート (dGTP)、デオキシアデノシンジホスフェート (dADP)、チミジンジホスフェート (dTDP)、デオキシシチジンジホスフェート (dCDP)、デオキシグアノシンジホスフェート (dGDP)、デオキシアデノシンモノホスフェート (dAMP)、デオキシチミジンモノホスフェート (dTMP)、デオキシシチジンモノホスフェート (dCMP)、およびデオキシグアノシンモノホスフェート (dGMP) が挙げられる。糖部分としてデオキシリボースを含む例示的な天然デオキシリボヌクレオチドとしては、dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dADP、dTDP、dCDP、dGDP、dAMP、dTMP、dCMP、およびdGMPが挙げられる。糖部分としてリボースを含む例示的な天然リボヌクレオチドとしては、ATP、UTP、CTP、GTP、ADP、UDP、CDP、GDP、AMP、UMP、CMP、およびGMPが挙げられる。

【0050】

本明細書で使用される場合、「塩基」または「核酸塩基」は、少なくともヌクレオシド

10

20

30

40

50

またはヌクレオチド（リボまたはデオキシリボバリエントを含むヌクレオシドおよびヌクレオチド）の核酸塩基部分を指し、ある場合には、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの糖部分に対するさらなる改変を含有する。ある場合には、「塩基」は、ヌクレオシドまたはヌクレオチド全体を表すのにも使用される（例えば、「塩基」は、DNAポリメラーゼによりDNAに、またはRNAポリメラーゼによりRNAに組み込み可能である）。しかしながら、用語「塩基」は、文脈により必要とされる場合を除き、ヌクレオシドまたはヌクレオチド全体を必然的に表すものと解釈されるべきでない。塩基または核酸塩基の本明細書で提供される化学構造において、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの塩基のみが示され、明確にするために、糖部分、および場合により任意のホスフェート残基が省略される。塩基または核酸塩基の本明細書で提供される化学構造において使用される場合、波線は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの糖部分がさらに改変される可能性のあるヌクレオシドまたはヌクレオチドの結びつきを表す。一部の実施形態では、波線は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの糖部分、例えばペントース等に対する塩基または核酸塩基の連結を表す。一部の実施形態では、ペントースはリボースまたはデオキシリボースである。

【0051】

一部の実施形態では、核酸塩基は、一般的にヌクレオシドの複素環式塩基部分である。核酸塩基は、天然に存在し得るが、改変される場合もあり、天然塩基との類似性を一切担持しない場合もあり、および／または例えば有機合成により合成される場合もある。特定の実施形態では、核酸塩基は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドにおいて任意の原子または原子の群を含み、原子または原子の群は、別の核酸の塩基と水素結合を使用して、または使用しないで相互作用することができる。特定の実施形態では、非天然核酸塩基は、天然の核酸塩基に由来しない。非天然の核酸塩基は塩基性特性を必ずしも有さないが、しかしながらそれらは簡略化して核酸塩基と呼ばれることに留意すべきである。一部の実施形態では、核酸塩基と呼ぶとき、「(d)」は、核酸塩基はデオキシリボースまたはリボースに連結し得ることを表す一方、括弧の付かない「d」は、核酸塩基はデオキシリボースに連結していることを表す。

【0052】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」は、核酸塩基部分と糖部分を含む化合物である。ヌクレオシドとしては、天然に存在するヌクレオシド（DNAおよびRNAに見出されるような）、無塩基ヌクレオシド、改変型ヌクレオシド、および模倣的塩基および／または糖類を有するヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオシドには、任意の多様な置換基を含むヌクレオシドが含まれる。ヌクレオシドは、核酸塩基と糖の還元基の間のグリコシド結合を通じて形成されるグリコシド化合物であり得る。

【0053】

化学構造の「類似体」は、該用語が本明細書で使用される場合、親構造から合成により容易に誘導されない場合もあるが、親構造と実質的な類似性を維持する化学構造を指す。一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ヌクレオシド類似体は、非天然ヌクレオシドである。親化学構造から合成により容易に誘導される、関連する化学構造は、「誘導体」と呼ばれる。

【0054】

本発明の様々な特徴は、単一の実施形態の文脈において記載される場合もあるが、該特徴は、個別にまたは任意の適する組合せで提供される場合もある。反対に、本発明は、明確にするため、分離したいくつかの実施形態の文脈において本明細書に記載される場合もあるが、本発明は単一の実施形態においても実施可能である。

【0055】

IL-2 コンジュゲート

サイトカインには、細胞シグナル伝達タンパク質のファミリー、例えば、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、ならびに先天性および適応性免疫細胞ホメオスタシスに役割を果たしている他の増殖因子が含まれる。サイトカインは、免疫細胞、例えばマクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球、および肥満細

10

20

30

40

50

胞、内皮細胞、線維芽細胞等、ならびに異なる間質細胞によって生成される。一部の例では、サイトカインは、体液性免疫応答と細胞性免疫応答の間のバランスを調節する。

【0056】

インターロイキンは、TおよびBリンパ球、単球系統の細胞、好中球、好塩基球、好酸球、巨核球、ならびに造血細胞の発生および分化を調節する、シグナル伝達タンパク質である。インターロイキンは、ヘルパーCD4⁺TおよびBリンパ球、単球、マクロファージ、内皮細胞、およびその他の組織常在者により生成される。

【0057】

インターロイキン2 (IL-2) は、多面的なタイプ1サイトカインであり、その構造は、15.5 kDaの4個の α -ヘリックスバンドルを含む。IL-2の前駆体は、長さが153個のアミノ酸残基であり、最初の20個のアミノ酸がシグナルペプチドを形成し、残りの21~153個が成熟形態を形成する。IL-2は、抗原刺激後に主にCD4⁺T細胞によって、ならびにより少ない程度ではあるが、CD8⁺細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、およびナチュラルキラーT (NKT) 細胞、活性化樹状細胞 (DC)、および肥満細胞によって生成される。IL-2シグナル伝達は、IL-2受容体 (IL-2R) サブユニット、IL-2R α (CD25としても知られる)、IL-2R β (CD122としても知られる)、およびIL-2R γ (CD132としても知られる) の特定の組合せとの相互作用を介して起こる。IL-2とIL-2R α の相互作用は、約 10^{-8} Mの K_d で「低い親和性」IL-2受容体複合体を形成する。IL-2とIL-2R β およびIL-2R γ の相互作用は、約 10^{-9} Mの K_d で「中親和性」IL-2受容体複合体を形成する。IL-2と全ての3つのサブユニット、IL-2R α 、IL-2R β 、およびIL-2R γ の相互作用は、約 $>10^{-11}$ Mの K_d で「高親和性」IL-2受容体複合体を形成する。

【0058】

一部の例では、「高親和性」IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 複合体を介するIL-2シグナル伝達は、制御性T細胞の活性化および増殖を調節する。制御性T細胞、またはCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T (Treg) 細胞は、エフェクター細胞、例えばCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、B細胞、NK細胞、およびNKT細胞等を抑制によって免疫ホメオスタシスの維持を媒介する。一部の例では、Treg細胞は、胸腺 (tTreg細胞) から生じる、または末梢 (pTreg細胞) 中のナイーブT細胞から誘導される。場合によっては、Treg細胞は、末梢性の寛容のメディエーターとみなされる。実際、1つの研究では、CD25⁻枯渇化末梢CD4⁺T細胞の移植は、ヌードマウスにおいて種々の自己免疫疾患をが生じ、一方、CD4⁺CD25⁺T細胞の同時移植は、自己免疫の発生を抑制した (Sakaguchi, et al., 「Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25)」 J. Immunol. 155 (3): 1151~1164 (1995)、その開示は参照により本明細書に組み入れられている)。Treg細胞集団の増大は、エフェクターT細胞増殖を下方調節し、自己免疫およびT細胞抗腫瘍応答をが抑制する。

【0059】

「中親和性」IL-2R $\beta\gamma$ 複合体を介するIL-2シグナル伝達は、CD8⁺エフェクターT (Teff) 細胞、NK細胞、およびNKT細胞の活性化および増殖を調節する。CD8⁺Teff細胞 (細胞傷害性T細胞、Tc細胞、細胞傷害性Tリンパ球、CTL、Tキラー細胞、細胞溶解性T細胞、Tcon、またはキラーT細胞としても知られる) は、損傷を受けた細胞、癌性細胞、および病原体感染細胞を認識し死滅させるTリンパ球である。NKおよびNKT細胞は、CD8⁺Teff細胞と類似して、癌性細胞および病原体感染細胞を標的とするリンパ球のいくつかの種類である。

【0060】

一部の例では、IL-2シグナル伝達は、T細胞応答を調節し、続いてがんの治療に利用される。例えば、IL-2は、がんの治療のためのTeff細胞集団の拡大を誘導する

10

20

30

40

50

ために高用量で投与される。しかしながら、高用量 I L - 2 は、抗腫瘍免疫応答を鈍らせる T r e g 細胞の随伴する刺激をさらにもたす。高用量 I L - 2 はまた、タイプ 2 先天性免疫細胞 (I L C - 2)、好酸球、および内皮細胞を含む、脈管構造中の I L - 2 R アルファ鎖発現細胞の関与によって媒介される毒性有害事象を誘導する。これにより、好酸球増加症、毛細管漏出および脈管漏出症候群 (V L S) を引き起こす。

【 0 0 6 1 】

養子細胞療法は、医師が、疾患、例えば、増殖性疾患等（例えば、がん）ならびに感染性と闘う患者自身の免疫細胞を効果的に利用することを可能にする。一部の実施形態では、対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、前記 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤が、1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を含み得る方法が本明細書で開示される。

10

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態では、インターロイキン 2 (I L - 2) コンジュゲートについて本明細書に記載される。一部の実施形態では、表 1 に示す例示的なポリペプチドについて本明細書に記載される。一部の実施形態では、本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートが表 1 に例示される。

【 0 0 6 3 】

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1.

名称	配列	配列番号
IL-2 (ヒト(homo sapiens)) (成熟形態)	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (ヒト) (前駆体) NCBI 受託 番号: AAB46883.1	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLT	2
アルデス ロイキン	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	3
IL-2_C125S	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	4
IL-2_P65X	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELK ~~X~~ LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	5
IL-2_E62X	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELK ~~X~~ LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	6
IL-2_F42X	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT ~~X~~ KF YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	7
IL-2_K43X	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT ~~F~~ ~~X~~ F YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	8
IL-2_K35X	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP ~~X~~ LTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	9
IL- 2_P65[AzK]	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEELK[AzK]LEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIIST LT	10
IL- 2_E62[AzK]	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEE[AzK]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIIST LT	11
IL- 2_F42[AzK]	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK] JFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T	12
IL- 2_K43[AzK]	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K]FYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T	13
IL- 2_K35[AzK]	APTSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK]LTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD	14

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL- 2_P65[AzK- PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG]LEEVNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	15
IL- 2_E62[AzK- PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG]LKPLEEVNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	16
IL- 2_F42[AzK- PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	17
IL- 2_K43[AzK- PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K PEG]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	18
IL- 2_K35[AzK- PEG]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG]LT RMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	19
IL- 2_P65[AzK- PEG5kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG5kD]LEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	20
IL- 2_E62[AzK- PEG5kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG5kD]LKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	21
IL- 2_F42[AzK- PEG5kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG5kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	22
IL- 2_K43[AzK- PEG5kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K PEG5kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	23
IL- 2_K35[AzK- PEG5kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG5kD] LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	24
IL- 2_P65[AzK- PEG30kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG30kD]LEEVNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT	25
IL- 2_E62[AzK- PEG30kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG30kD]LKPLEEVNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT	26
IL- 2_F42[AzK- PEG30kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG30kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT	27
IL- 2_K43[AzK- PEG30kD]	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K PEG30kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLAQSKN	28

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

	FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_K35[AzK-PEG30kD]	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG30kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	29
IL-2_P65X-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKXLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	30
IL-2_E62X-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEXLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	31
IL-2_F42X-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTXKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	32
IL-2_K43X-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFXFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	33
IL-2_K35X-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPXLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	34
IL-2_P65[AzK]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELK[AzK]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	35
IL-2_E62[AzK]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEE[AzK]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	36
IL-2_F42[AzK]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK]KFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	37
IL-2_K43[AzK]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK]FYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	38
IL-2_K35[AzK]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	39
IL-2_P65[AzK-L1_PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELK[AzK L1 PEG]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	40
IL-2_E62[AzK-L1_PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEE[AzK L1 PEG]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	41
IL-2_F42[AzK-L1_PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG]KFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	42
IL-2_K43[AzK-L1_PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK L1 PEG]FYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	43
IL-2_K35[AzK-L1_PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	44

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

IL- 2_P65[AzK_ L1_PEG5kD] -1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG5kD]LEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	45
IL- 2_E62[AzK_ L1_PEG5kD] -1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG5kD]LKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	46
IL- 2_F42[AzK_ L1_PEG5kD] -1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG5kD]KFYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	47
IL- 2_K43[AzK_ L1_PEG5kD] -1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK L1 PEG5kD]FYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT	48
IL- 2_K35[AzK_ L1_PEG5kD] -1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG5k D]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT	49
IL- 2_P65[AzK_ L1_PEG30k D]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG30kD]LEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	50
IL- 2_E62[AzK_ L1_PEG30k D]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG30kD]LKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	51
IL- 2_F42[AzK_ L1_PEG30k D]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG30kD]KFYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	52
IL- 2_K43[AzK_ L1_PEG30k D]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK L1 PEG30kD]FYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	53
IL- 2_K35[AzK_ L1_PEG30k D]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG30 kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	54
IL- 2_P65[AzK_ L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG]LEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	55
IL- 2_E62[AzK_ L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEBELK[AzK L1 PEG]LKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	56
IL- 2_F42[AzK_ L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG]KFYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	57
IL- 2_K43[AzK_ L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K L1 PEG]FYMPKKATELKHLCLEEBELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	58

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

IL- 2_K35[AzK_ L1_PEG]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG] LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIISTLT	59
IL- 2_P65[AzK_ L1_PEG5kD] -2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELK[AzK L1 PEG5kD]LEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	60
IL- 2_E62[AzK_ L1_PEG5kD] -2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEL[AzK L1 PEG5kD]LKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	61
IL- 2_F42[AzK_ L1_PEG5kD] -2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG5kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	62
IL- 2_K43[AzK_ L1_PEG5kD] -2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K L1 PEG5kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	63
IL- 2_K35[AzK_ L1_PEG5kD] -2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG5 kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFSQSIISTLT	64
IL- 2_P65[AzK_ L1_PEG30k D]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELK[AzK L1 PEG30kD]LEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLT	65
IL- 2_E62[AzK_ L1_PEG30k D]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLCLEEL[AzK L1 PEG30kD]LKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLT	66
IL- 2_F42[AzK_ L1_PEG30k D]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG30kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	67
IL- 2_K43[AzK_ L1_PEG30k D]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[Az K L1 PEG30kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	68
IL- 2_K35[AzK_ L1_PEG30k D]-2	APTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK L1 PEG3 0kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT	69
IL- 2_P65[AzK_ PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG]LEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	70
IL- 2_E62[AzK_ PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG]LKPLEEVLNLAQSKNFHLR RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	71
IL- 2_F42[AzK_ PEG]-1	PTSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIISTLT	72

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

IL- 2_K43[AzK_ PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK PEG]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIH STLT	73
IL- 2_K35[AzK_ PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG]LTR MLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ SIHSTLT	74
IL- 2_P65[AzK_ PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG5kD]LEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIHSTLT	75
IL- 2_E62[AzK_ PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG5kD]LPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIHSTLT	76
IL- 2_F42[AzK_ PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG5kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIHSTLT	77
IL- 2_K43[AzK_ PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK PEG5kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIHSTLT	78
IL- 2_K35[AzK_ PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG5kD]L TRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIHSTLT	79
IL- 2_P65[AzK_ PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEELK[AzK PEG30kD]LEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIHSTLT	80
IL- 2_E62[AzK_ PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLCLEEL[AzK PEG30kD]LPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIHSTLT	81
IL- 2_F42[AzK_ PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG30kD]KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIHSTLT	82
IL- 2_K43[AzK_ PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK PEG30kD]FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIHSTLT	83
IL- 2_K35[AzK_ PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG30kD] LTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF SQSIHSTLT	84
IL-2_F44X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKX YMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT	85
IL-2_F44X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKXY MPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT	86
IL-2_R38X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTXMLTFKF YMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT	87

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

IL-2_R38X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT ~~X~~ MLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	88
IL-2_T41X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML ~~X~~ FKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	89
IL-2_T41X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML ~~X~~ FKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	90
IL-2_E68X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLE ~~X~~ VNLAQSKNFHLRPRDLISNI INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	91
IL-2_E68X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF MPKKATELKHLQCLEEELKPLE ~~X~~ VNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	92
IL-2_Y45X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF ~~X~~ MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	93
IL-2_Y45X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF ~~X~~ MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	94
IL-2_V69X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE ~~X~~ NLAQSKNFHLRPRDLISNI INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	95
IL-2_V69X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE ~~X~~ NLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	96
IL-2_L72X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN ~~X~~ AQSKNFHLRPRDLISNI INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	97
IL-2_L72X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN ~~X~~ AQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	98

X = 非天然アミノ酸を含む部位。

【0064】

【A z K】= N6 - ((2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジン (ケミカルアブストラクツ登録番号 1167421 - 25 - 1)。

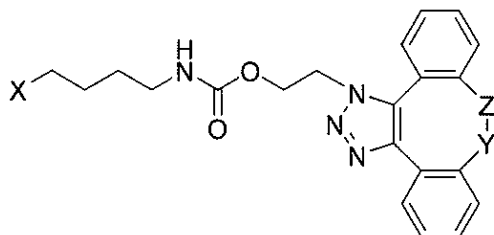
【A z K_PEG】= N6 - ((2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジンを、DBC O媒介クリックケミストリーを介してPEGに安定にコンジュゲートして、式 (I I) または式 (I I I) の構造を含む化合物を形成させる。例えば、PEG 5 k D は、5 キロダルトンの平均分子量を有し、メトキシ基でキャップされた、直鎖状ポリエチレングリコール鎖を示すと特定される。クリック反応から生成される位置異性体の比は、約 1 : 1 または 1 : 1 超である。用語「DBC O」は、ジベンゾシクロオクチン基を含む、例えば、実施例 2 のスキーム 1 に示される mPEG - DBC O 化合物を含む化学的部分を意味する。

【A z K_L1_PEG】= N6 - ((2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジンを、DBC O媒介クリックケミストリーを介してPEGに安定にコンジュゲートして、式 (I V) または式 (V) の構造を含む化合物を形成させる。例えば、PEG 5 k D は、5 キロダルトンの平均分子量を有し、メトキシ基でキャップされた、直鎖状ポリエチレングリコール鎖を示すと特定される。クリック反応から生成される位置異性体の比は、約 1 : 1 または 1 : 1 超である。用語「DBC O」は、ジベンゾシクロオクチン基を含む、例えば、実施例 2 のスキーム 1 に示される mPEG - DBC O 化合物を含む化学的部分を意味する。

【 0 0 6 5 】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（I）の構造：

【化16】



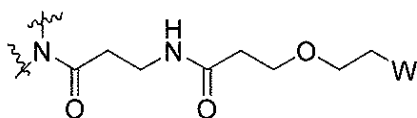
10

式(I);

（式中：

ZはCH₂であり、Yは

【化17】

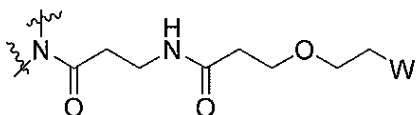


20

であり；

YはCH₂であり、Zは

【化18】

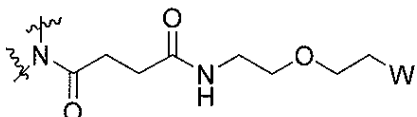


30

であり；

ZはCH₂であり、Yは

【化19】

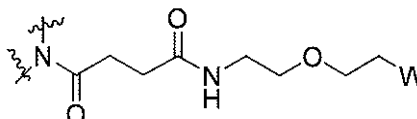


40

であり；または

YはCH₂であり、Zは

【化20】



であり；

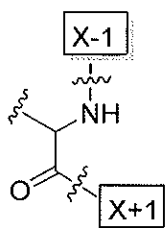
Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35

50

kDa、40kDa、45kDa、50kDa、および60kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化21】



10

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

【0066】

ここで、および全体を通して、用語「IL-2コンジュゲート」は、示される構造の薬学的に許容される塩、溶媒和物、および水和物を包含する。

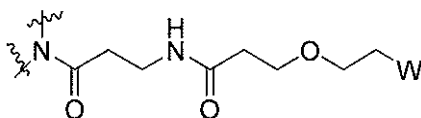
【0067】

ここで、および全体を通して、式(I)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。一部の実施形態では、式(I)の構造、またはその任意の実施形態もしくはバリエーションは、その薬学的に許容される塩として提供される。一部の実施形態では、式(I)の構造、またはその任意の実施形態もしくはバリエーションは、その溶媒和物として提供される。一部の実施形態では、式(I)の構造、またはその任意の実施形態もしくはバリエーションは、その水和物として提供される。一部の実施形態では、式(I)の構造、またはその任意の実施形態もしくはバリエーションは、遊離塩基として提供される。

【0068】

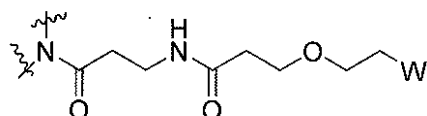
本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートにおいて、ZはCH₂であり、Yは

【化22】



である。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートにおいて、YはCH₂であり、Zは

【化23】

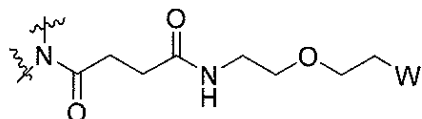


である。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、ZはCH₂であり、Yは

40

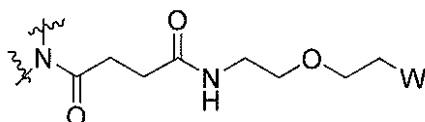
50

【化 2 4】



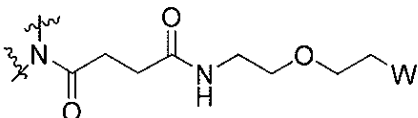
である。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Z は CH_2 であり、Y は

【化 2 5】



である。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、Y は CH_2 であり、Z は

【化 2 6】



である。ここで、および全体を通して、Z および Y の実施形態はまた、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。

【0 0 6 9】

本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、5 k D a、1 0 k D a、2 0 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、5 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、1 0 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、1 5 k D a の平均分子量を有する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基が 2 0 k D a の平均分子量を有する I L - 2 コンジュゲートを使用する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、2 5 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、3 0 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、3 5 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、4 0 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、4 5 k D a の平均分子量を有する。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基は、5 0 k D a の平均分子量を有する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおいて、P E G 基が 6 0 k D a の平均分子量を有する I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【0 0 7 0】

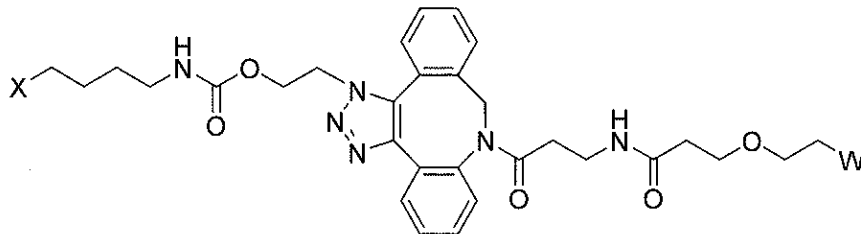
本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、K 3 4、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、P 6 4、R 3 7、T 4 0、E 6 7、Y 4 4、V 6 8、およ

び L 7 1 から選択され、I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、配列番号 3 の位置を基準にしている。本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおいて、I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、F 4 1、E 6 1、および P 6 4 から選択され、I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、配列番号 3 の位置を基準にしている。

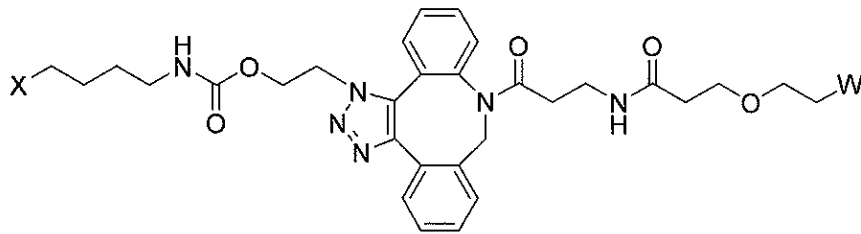
【0071】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 5 ~ 1 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G] は、式 (I I) もしくは式 (I I I)、または式 (I I) および式 (I I I) の混合物の構造：

【化 2 7】



式(II);



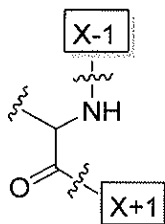
式(III);

(式中：

W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、3 0 k D a、3 5 k D a、4 0 k D a、4 5 k D a、5 0 k D a、および 6 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基であり；

X は構造：

【化 2 8】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)

を有する、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0072】

ここで、および全体を通して、式（II）の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式（III）の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。

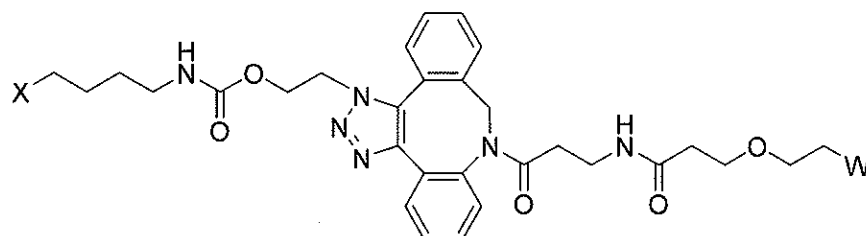
【0073】

一部の実施形態では、[AZK_PEG]は、式（II）および式（III）の混合物である。

【0074】

一部の実施形態では、[AZK_PEG]は、式（II）の構造：

【化29】



式(II)

を有する。

【0075】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号15のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である。

【0076】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号16のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、方法は、式（II）の構造におけるWが、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である。

【0077】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号17のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、方法は、式（II）の構造におけるWが、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式（II）の構造におけるWは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である。

【0078】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号18のアミノ酸配列を有す

る。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、式 (I I) の構造におけるWは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I) の構造におけるWは、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である。

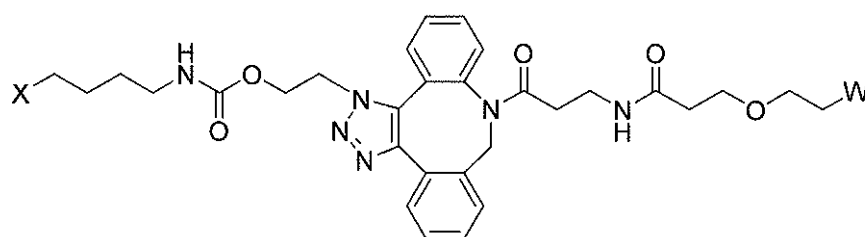
【0 0 7 9】

一部の実施形態では、I L-2 コンジュゲートは、配列番号1 9のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、式 (I I) の構造におけるWは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I) の構造におけるWは、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である。

【0 0 8 0】

一部の実施形態では、[A z K _ P E G] は、式 (I I I) の構造

【化3 0】



式(III)

を有する。

【0 0 8 1】

一部の実施形態では、I L-2 コンジュゲートは、配列番号1 5のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である。

【0 0 8 2】

一部の実施形態では、I L-2 コンジュゲートは、配列番号1 6のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である。一部の実施形態では、式 (I I I) の構造におけるWは、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である。

【0083】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号17のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式(III)の構造におけるWは、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、および30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDaおよび30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、式(III)の構造におけるWは、5kDaの平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、式(III)の構造におけるWは、30kDaの平均分子量を有するPEG基である。

【0084】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号18のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、式(III)の構造におけるWは、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、および30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDaおよび30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、30kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0085】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号19のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、および30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDaおよび30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、5kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(III)の構造におけるWが、30kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0086】

本明細書に開示される方法の一部の実施形態では、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、および60kDaから選択される平均分子量を有するPEG基を含有する、IL-2コンジュゲートが使用される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、5kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、10kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、15kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、20kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK_PEG]は、25kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15、16、17、18、および19のいずれか1

10

20

30

40

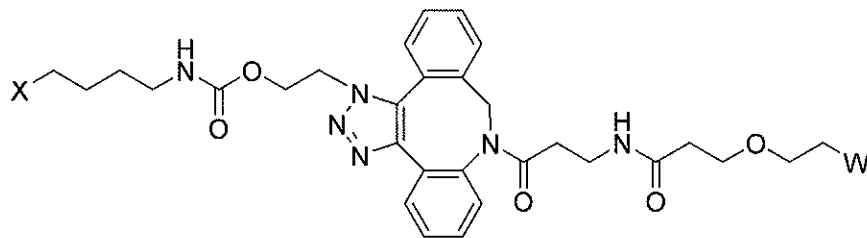
50

つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、30 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、35 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、40 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、45 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、50 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、60 k D a の平均分子量を有する P E G 基を含有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 15、16、17、18、および 19 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、[A z K _ P E G] は、5 k D a、10 k D a、15 k D a、20 k D a、25 k D a、30 k D a、35 k D a、40 k D a、45 k D a、50 k D a、および 60 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基を含有し、P E G 基は、メトキシ P E G 基、直鎖状メトキシ P E G 基、または分枝状メトキシ P E G 基である。

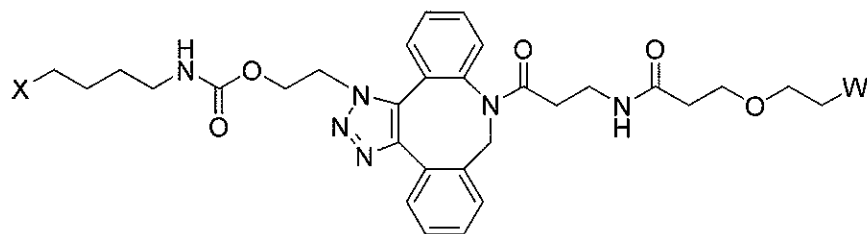
【0087】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 20 ~ 24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 5 k D] は、式 (I I) もしくは式 (I I I)、または式 (I I) および式 (I I I) の混合物の構造：

【化 31】



式(II);



式(III);

(式中：

Wは、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

10

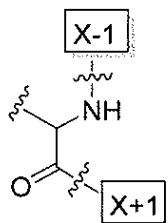
20

30

40

50

【化 3 2】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法が本明細書に記載される。

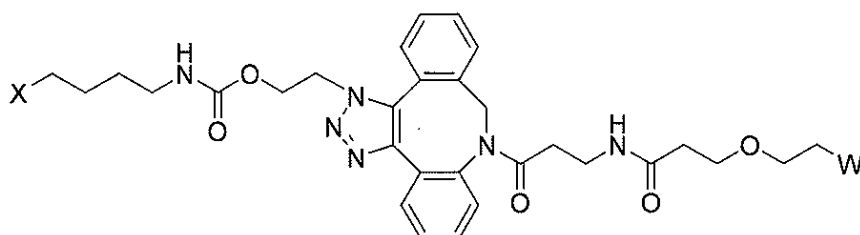
【 0 0 8 8 】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 8 9 】

一部の実施形態では、方法は、[A z K _ P E G 5 k D] が、式 (I I) の構造を有する I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【化 3 3】



式(II)

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 0 】

一部の実施形態では、方法は、[A z K _ P E G 5 k D] が、式 (I I I) の構造

10

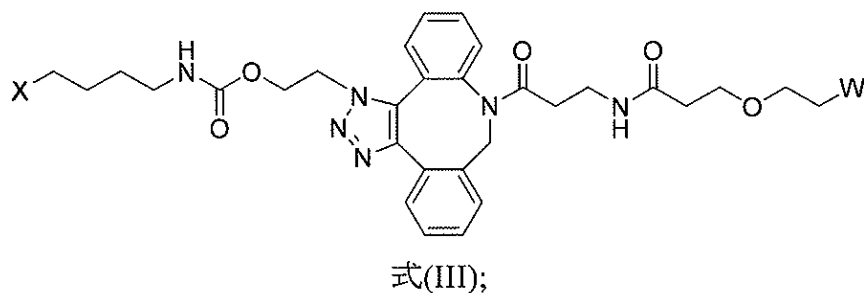
20

30

40

50

【化 3 4】



10

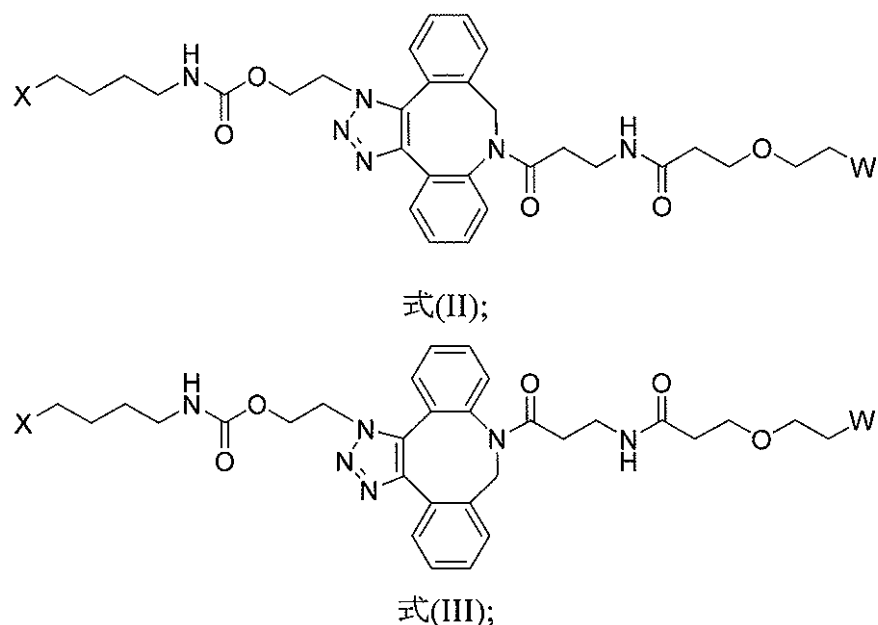
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 1】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 3 0 k D] は、式 (I I) もしくは式 (I I I) の構造を有し、または式 (I I) および式 (I I I) の構造の混合物：

20

【化 3 5】



30

40

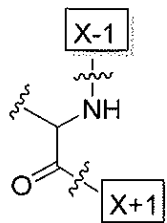
(式中：

Wは、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

X は構造：

50

【化 3 6】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

である、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

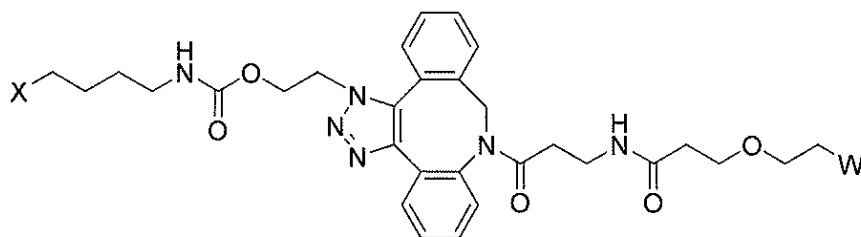
【0092】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する。

【0093】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、[A z K _ P E G 3 0 k D] が、式 (I I) の構造：

【化 3 7】



式(II);

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する。

【0094】

一部の実施形態では、方法は、[A z K _ P E G 3 0 k D] が、式 (I I I) の構造

10

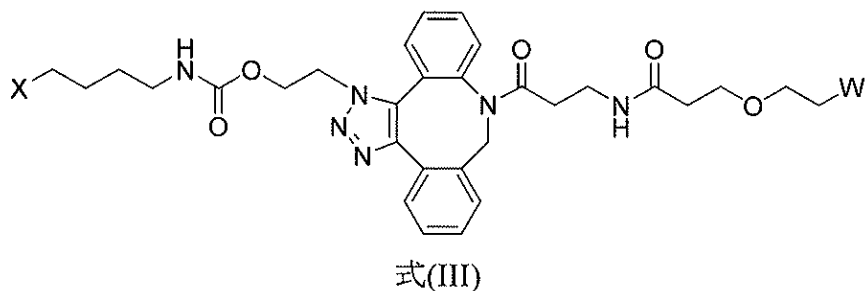
20

30

40

50

【化 3 8】



10

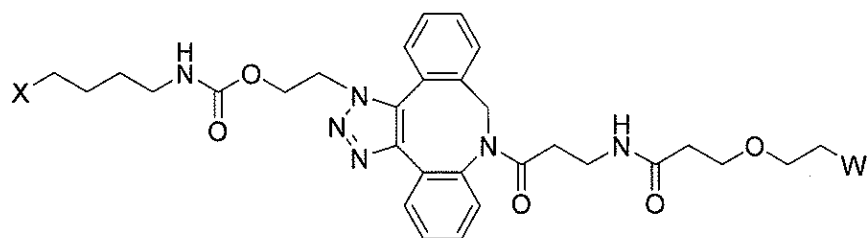
を有する、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する。

【0095】

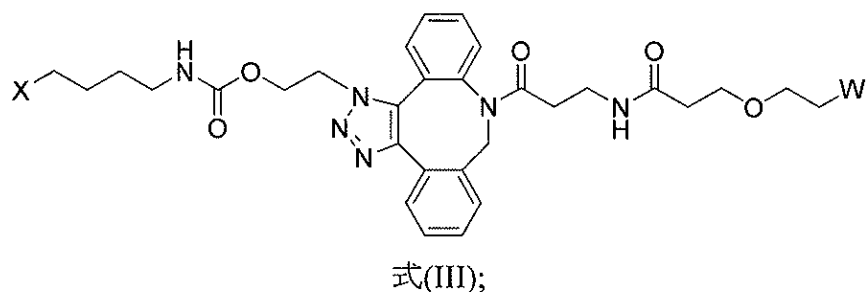
対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 15 ~ 19 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G] は、式 (I I) および式 (I I I) の構造の混合物：

20

【化 3 9】



30



40

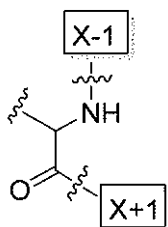
(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および 60 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基であり；

X は構造：

50

【化 40】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

である、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0096】

一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、約1:1である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、1:1より大きい、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、1:1より小さい、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、Wが、直鎖状または分枝状PEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、Wが、直鎖状PEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、Wが、分枝状PEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、Wが、メトキシPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、メトキシPEG基が、直鎖状または分枝状である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、メトキシPEG基が、直鎖状である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、メトキシPEG基が、分枝状である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0097】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号20~24のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AzK_PEG5kD]は、式(II)および式(III)の構造の混合物：

10

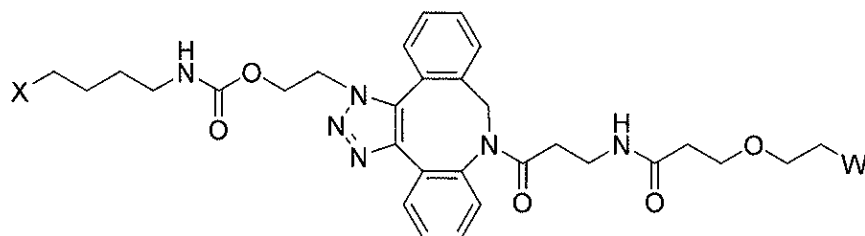
20

30

40

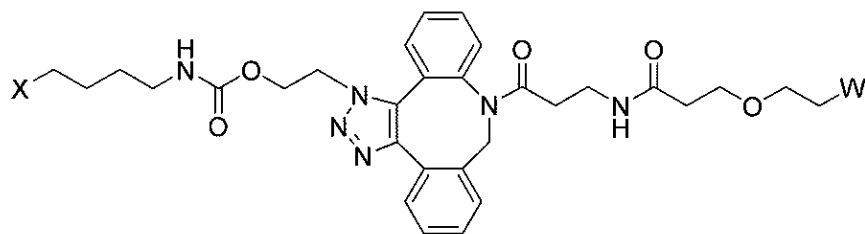
50

【化 4 1】



式(II);

10



式(III);

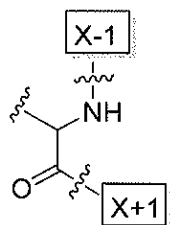
(式中：

20

Wは、5 k D aの平均分子量を有する P E G基であり；

Xは構造：

【化 4 2】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比が、約 1 : 1 である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比が、1 : 1 より大きい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比が、1 : 1 より小さい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

40

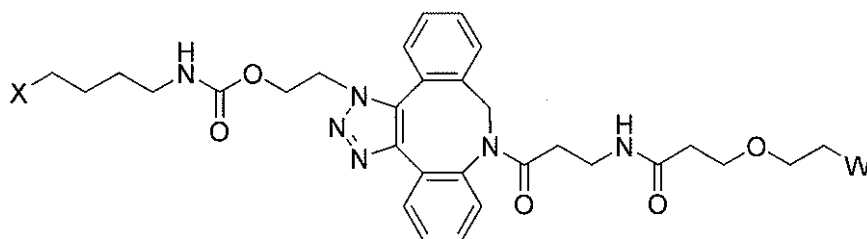
【 0 0 9 9 】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 3 0 k D] は、式 (I I) および式 (I I I) の構造の混

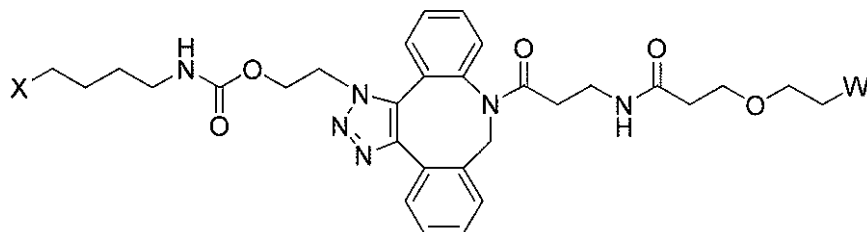
50

化合物：

【化 4 3】



式(II);



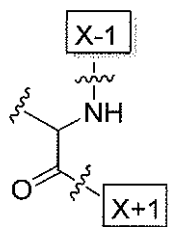
式(III);

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 4 4】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

【0100】

一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、約1:1である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、1:1より大きい、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK_PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比が、1:1より小さい、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0101】

一部の実施形態では、方法は、式(II)もしくは式(III)、または式(II)および式(III)の混合物の構造を含み、Wが、直鎖状または分枝状PEG基である、本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、

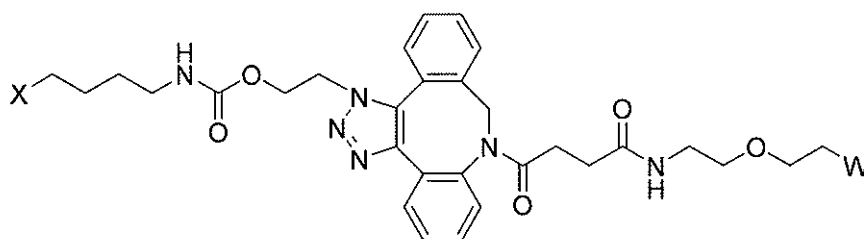
式 (I I) または式 (I I I) の構造における W が、直鎖状 P E G 基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) または式 (I I I) の構造における W が、分枝状 P E G 基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) または式 (I I I) の構造における W が、メトキシ P E G 基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) または式 (I I I) の構造における W が、直鎖状または分枝状のメトキシ P E G 基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) または式 (I I I) の構造におけるメトキシ P E G 基が直鎖状である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I I) または式 (I I I) の構造におけるメトキシ P E G 基が分枝状である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

10

【0102】

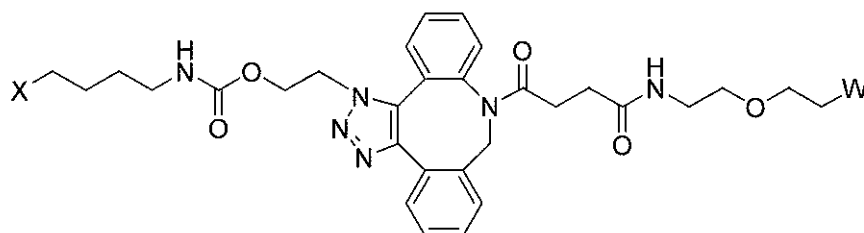
対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 40 ~ 44 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G] は、式 (I V) もしくは式 (V)、または式 (I V) および式 (V) の混合物の構造：

【化 45】



20

式(IV);



30

式(V);

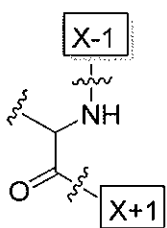
(式中：

W は、5 k D a、10 k D a、15 k D a、20 k D a、25 k D a、30 k D a、35 k D a、40 k D a、45 k D a、50 k D a、および 60 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基であり；

X は構造：

40

【化 46】



を有し；

50

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；
 X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；
 またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法が本明細書に記載される。

【0103】

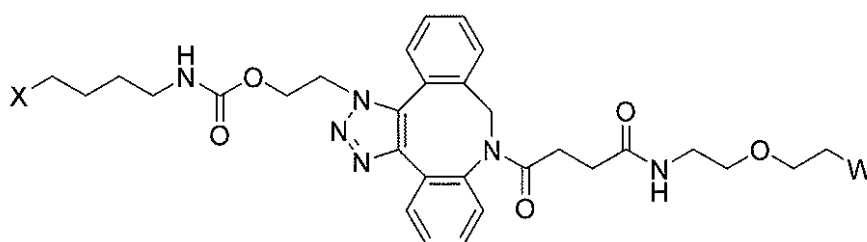
ここで、および全体を通して、式（IV）の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式（V）の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。

【0104】

一部の実施形態では、方法は、[AzK_L1_PEG]が、式（IV）および式（V）の混合物である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0105】

一部の実施形態では、方法は、[AzK_L1_PEG]が、式（IV）の構造：
 【化47】



式(IV)

を有する、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0106】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号40のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、および30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDaおよび30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、30kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0107】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号41のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、および30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDaおよび30kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、5kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（IV）の構造におけるWが、30kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0108】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号42のアミノ酸配列を有す

る。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、Wが、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【0109】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号43のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

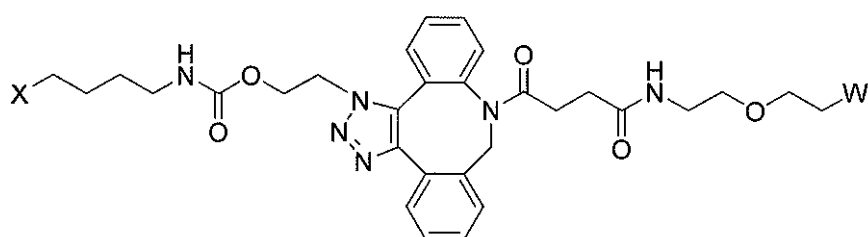
【0110】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号44のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（ⅠⅤ）の構造におけるWが、3 0 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【0111】

一部の実施形態では、方法は、[A z K _ L 1 _ P E G] が、式（Ⅴ）の構造

【化48】



式(V)

を有する、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【0112】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号40のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式（Ⅴ）の構造におけるWが、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および3 0 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式（Ⅴ）の構造におけるWが、5 k D aおよび3 0 k D aから選択される平均分子量

を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

【0113】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号41のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

10

【0114】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号42のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

20

【0115】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号43のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式(V)の構造におけるWが、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、IL-2コンジュゲートを使用する。

30

【0116】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号40、41、42、43、および44のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK__L1__PEG]は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号40、41、42、43、および44のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有し、[AzK__L1__PEG]は、5 kDaの平均分子量を有するPEG基を含有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号40、41、42、43、および44のいずれか1つ

40

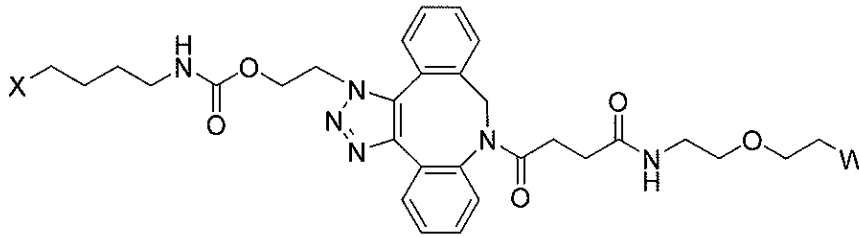
50

から選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 15 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 20 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 25 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 30 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 35 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 40 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 45 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 50 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 60 kDa の平均分子量を有する PEG 基を含有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40、41、42、43、および 44 のいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を有し、 $[A_zK\_L1\_PEG]$ は、 5 kDa 、 10 kDa 、 15 kDa 、 20 kDa 、 25 kDa 、 30 kDa 、 35 kDa 、 40 kDa 、 45 kDa 、 50 kDa 、および 60 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基を含有し、PEG 基は、メトキシ PEG 基、直鎖状メトキシ PEG 基、または分枝状メトキシ PEG 基である。

【0117】

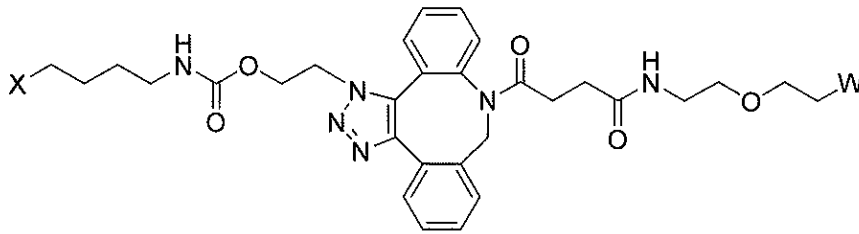
対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 45～49 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、 $[A_zK\_L1\_PEG5\text{ kD}]$ は、式 (IV) もしくは式 (V)、または式 (IV) および式 (V) の混合物の構造：

【化 4 9】



式(IV);

10



式(V);

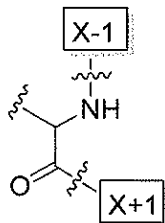
(式中：

20

Wは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基であり；

Xは構造：

【化 5 0】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)

を有する、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【 0 1 1 8】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を有する。

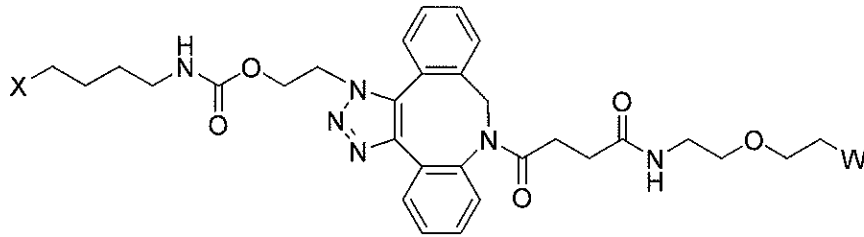
40

【 0 1 1 9】

一部の実施形態では、方法は、[A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] が、式 (I V) の構造

50

【化 5 1】



式(IV);

10

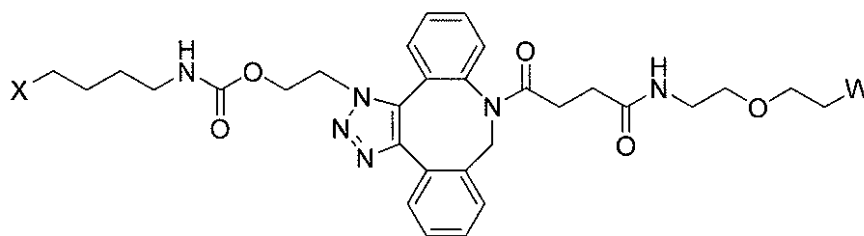
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 45 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 46 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 48 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する。

【0120】

一部の実施形態では、方法は、[AzK__L1__PEG5kD] が、式 (V) の構造

20

【化 5 2】



式(V)

30

を有する、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 45 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 46 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 48 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する。

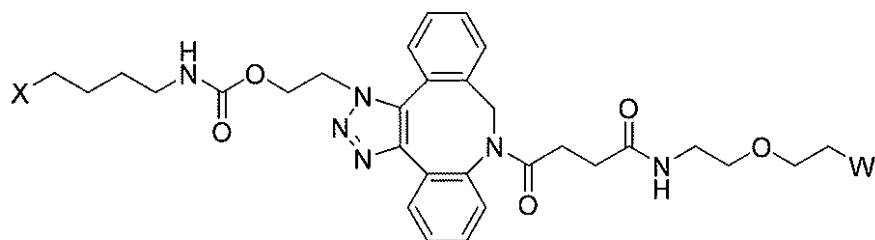
【0121】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 50～54 のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AzK__L1__PEG30kD] は、式 (IV) もしくは式 (V) の構造を有し、もしくは式 (IV) および式 (V) の構造の混合物：

40

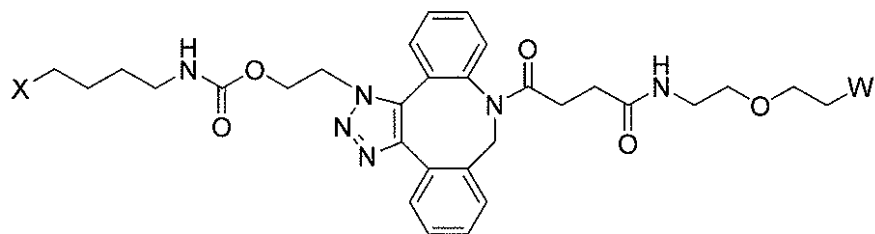
50

【化 5 3】



式(IV);

10



式(V);

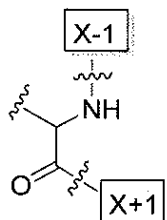
(式中：

20

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 5 4】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)

であり；またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

【0122】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号50のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号51のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号52のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号53のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号54のアミノ酸配列を有する。

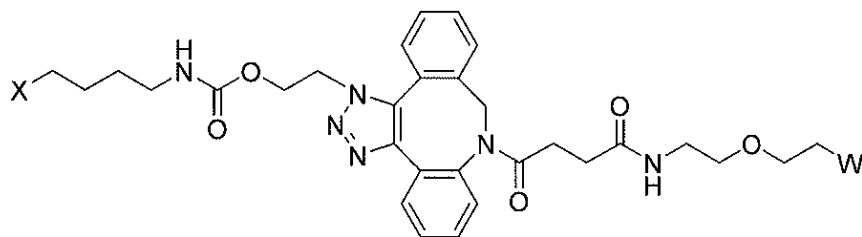
40

【0123】

一部の実施形態では、方法は、[AzK__L1__PEG30kD]が、式(IV)の構造：

50

【化 5 5】



式(IV);

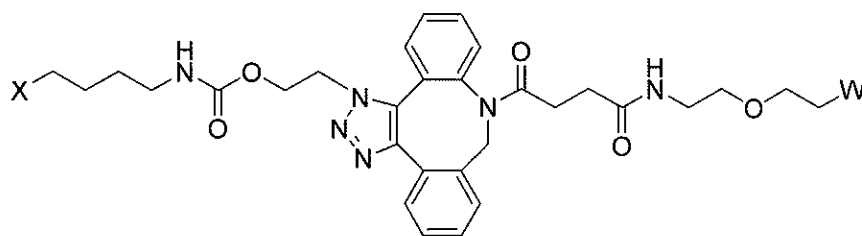
10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 50 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 52 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 53 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 54 のアミノ酸配列を有する。

【0124】

一部の実施形態では、方法は、[AzK__L1__PEG30kD] が、式 (V) の構造【化 5 6】

20



式(V)

30

を有する、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 50 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 52 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 53 のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 54 のアミノ酸配列を有する。

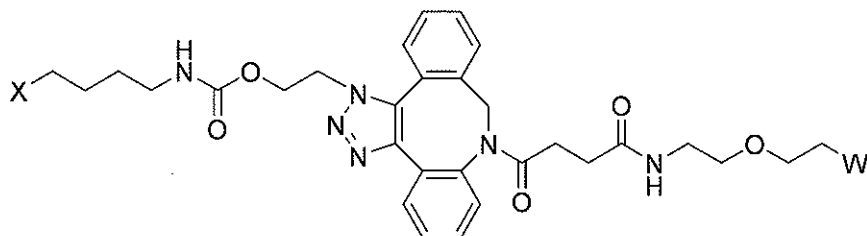
【0125】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40 ~ 44 のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AzK__L1__PEG] は、式 (IV) および式 (V) の構造の混合物：

40

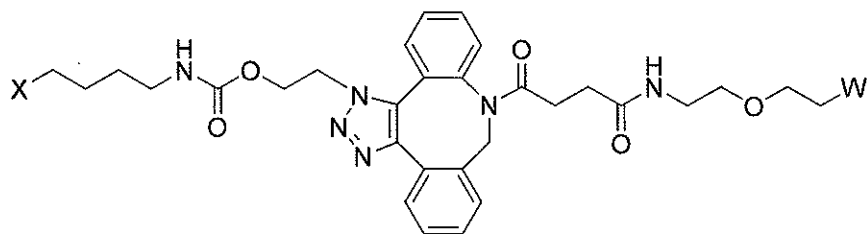
50

【化 5 7】



式(IV);

10



式(V);

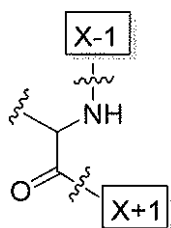
(式中：

20

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 5 8】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

【0126】

一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比が、約1:1である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比が、1:1より大きい、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比が、1:1より小さい、IL-2コンジュゲートを使用する。

40

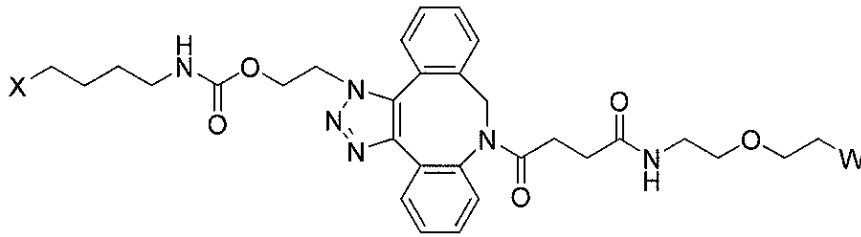
【0127】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する

50

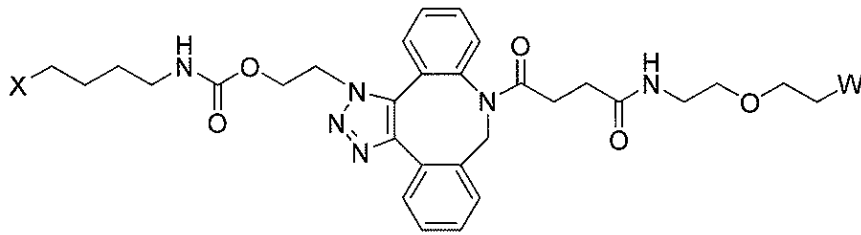
工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] は、式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

【化 5 9】



10

式(IV);



20

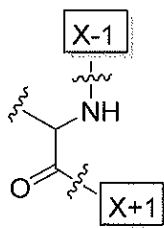
式(V);

(式中：

Wは、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

【化 6 0】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

【0 1 2 8】

40

一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、約 1 : 1 である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、1 : 1 より大きい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、1 : 1 より小さい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

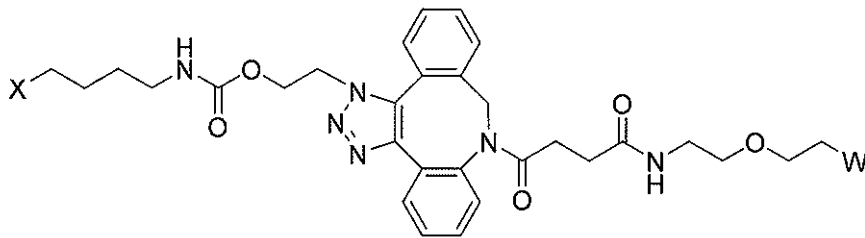
【0 1 2 9】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲー

50

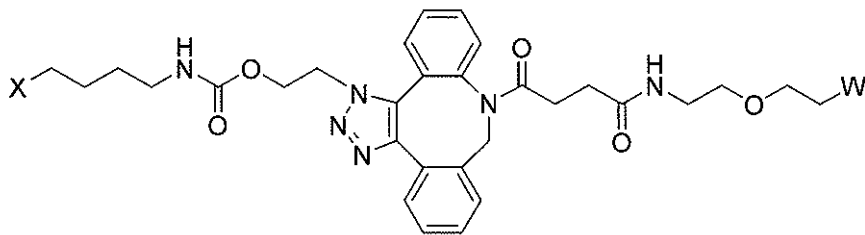
ト、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L-2 コンジュゲートは、配列番号 50～54 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 P E G 30 k D] は、式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

【化 6 1】



10

式(IV);



20

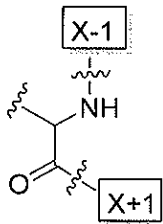
式(V);

(式中：

Wは、30 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

【化 6 2】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法が本明細書に記載される。

40

【0130】

一部の実施形態では、方法は、I L-2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 30 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、約 1：1である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L-2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 30 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、1：1より大きい、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L-2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 30 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比が、1：1より小さい、I L-2 コンジュゲートを使用する。

【0131】

50

一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、5 k D a、10 k D a、15 k D a、20 k D a、25 k D a、および30 k D aから選択される平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、5 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、30 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、10 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、15 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、20 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、25 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、30 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、35 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、40 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、45 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、50 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、55 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、60 k D aの平均分子量を有するP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。

【0132】

一部の実施形態では、方法は、式 (I V) もしくは式 (V)、または式 (I V) および式 (V) の混合物の構造を含み、Wが、直鎖状または分枝状P E G基である、本明細書に記載されるI L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、直鎖状P E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、分枝状P E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、メトキシP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるWが、直鎖状または分枝状であるメトキシP E G基である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるメトキシP E G基が、直鎖状である、I L-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、式 (I V) または式 (V) の構造におけるメトキシP E G基が、分枝状である、I L-2 コンジュゲートを使用する。

【0133】

本明細書に記載される方法において使用されるI L-2 コンジュゲートに関して、メトキシP E G基の例示的な構造は、実施例2のスキーム1におけるm P E G-D B C O構造において図示される。メトキシP E G基の例示的な構造は、以下のm P E G-D B C O構造：

10

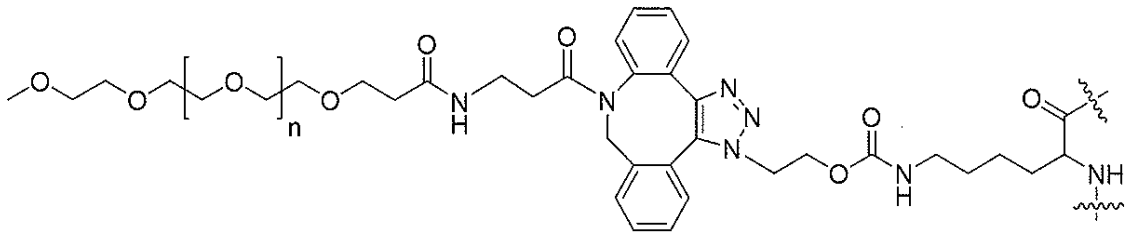
20

30

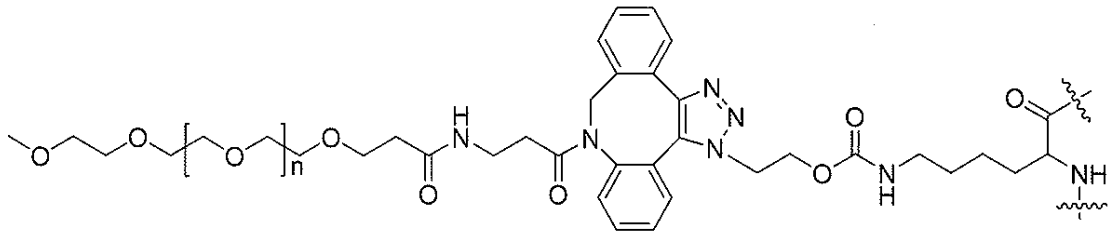
40

50

【化 6 3】



10



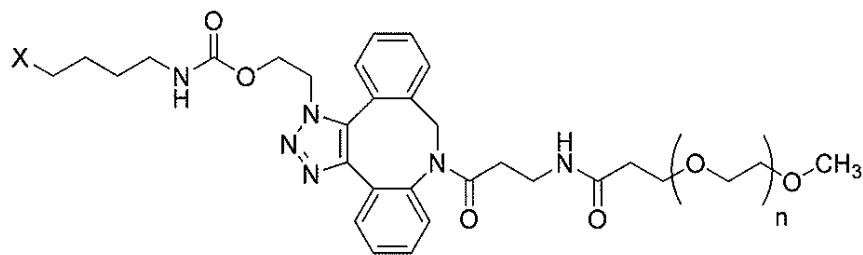
において図示される。

【 0 1 3 4】

20

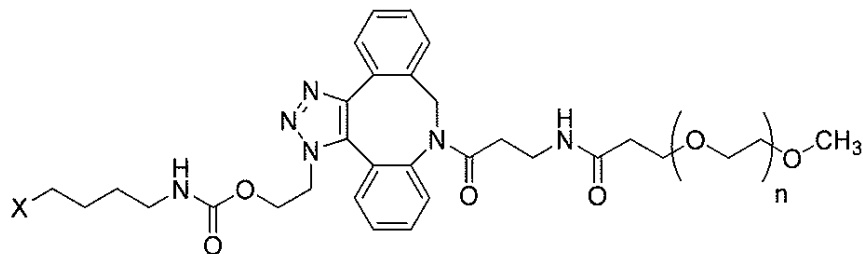
対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（VI）もしくは式（VII）、または式（VI）および式（VII）の混合物の構造：

【化 6 4】



30

式(VI)



40

式(VII)

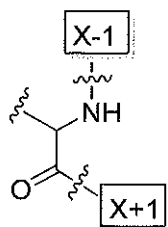
（式中：

nは、約2～約5000の範囲の整数であり；

Xは構造：

50

【化 6 5】



を有し、

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、I L-2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0135】

ここで、および全体を通して、式(VI)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式(VII)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。

【0136】

一部の実施形態では、式(VI)および式(VII)の化合物におけるnは、約5～約4600、または約10～約4000、または約20～約3000、または約100～約3000、または約100～約2900、または約150～約2900、または約125～約2900、または約100～約2500、または約100～約2000、または約100～約1900、または約100～約1850、または約100～約1750、または約100～約1650、または約100～約1500、または約100～約1400、または約100～約1300、または約100～約1250、または約100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲にある。一部の実施形態では、式(VI)および式(VII)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数

である。

【0137】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、配列番号3の位置を基準にしている。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、K34位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、F41位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、F43位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、K42位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、E61位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、P64位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、R37位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、T40位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、E67位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、Y44位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、V68位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造の位置は、L71位である。

【0138】

一部の実施形態では、方法は、IL-2 コンジュゲートの総量を含む、式(VI)の構造の量対式(VII)の構造の量の比が、約1:1である、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2 コンジュゲートの総量を含む、式(VI)の構造の量対式(VII)の構造の量の比が、1:1より大きい、IL-2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、IL-2 コンジュゲートの総量を含む、式(VI)の構造の量対式(VII)の構造の量の比が、1:1より小さい、IL-2 コンジュゲートを使用する。

【0139】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2 コンジュゲートを使用し、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VI)もしくは式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造に置き

換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、nは、100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の整数である。一部の実施形態では、式(VI)および式(VII)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。

【0140】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VI)もしくは式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(VI)および式(VII)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である。

【0141】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VI)もしくは式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(VI)および式(VII)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

【0142】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲート

10

20

30

40

50

、０００ダルトンの範囲にあるような整数である。

【０１４５】

一部の実施形態では、方法は、配列番号３のアミノ酸配列を含むＩＬ－２コンジュゲートを使用し、ＩＬ－２コンジュゲートにおける少なくとも１つのアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは式（ＶＩＩ）、または式（ＶＩ）および式（ＶＩＩ）の混合物の構造に置き換えられており、 n は、ＰＥＧ部分の分子量が、約５，０００ダルトン、約７，５００ダルトン、約１０，０００ダルトン、約１５，０００ダルトン、約２０，０００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６０，０００ダルトン、約７０，０００ダルトン、約８０，０００ダルトン、約９０，０００ダルトン、約１００，０００ダルトン、約１２５，０００ダルトン、約１５０，０００ダルトン、約１７５，０００ダルトンまたは約２００，０００ダルトンであるような整数である。

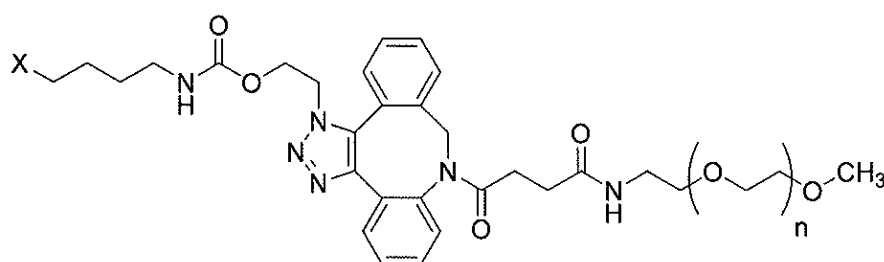
【０１４６】

一部の実施形態では、方法は、配列番号３のアミノ酸配列を含むＩＬ－２コンジュゲートを使用し、ＩＬ－２コンジュゲートにおける少なくとも１つのアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは式（ＶＩＩ）、または式（ＶＩ）および式（ＶＩＩ）の混合物の構造に置き換えられており、 n は、ＰＥＧ部分の分子量が、約５，０００ダルトン、約７，５００ダルトン、約１０，０００ダルトン、約１５，０００ダルトン、約２０，０００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、または約５０，０００ダルトンであるような整数である。

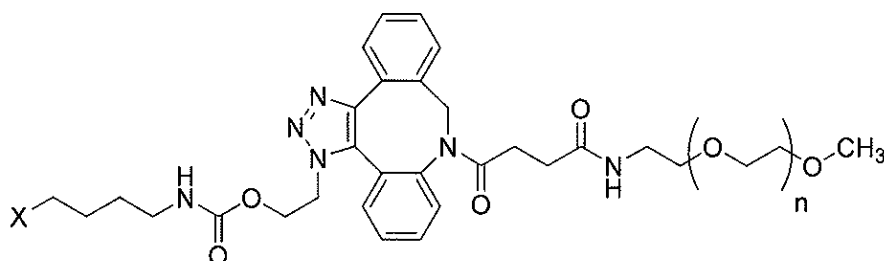
【０１４７】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（ａ）ＩＬ－２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬ－２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬ－２コンジュゲートにおける少なくとも１つのアミノ酸残基は、式（ＶＩＩＩ）もしくは式（ＩＸ）、または式（ＶＩＩＩ）および式（ＩＸ）の混合物の構造：

【化６６】



式(VIII)



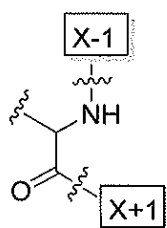
式(IX)

（式中：

n は、約２～約５０００の範囲の整数であり；

X は構造：

【化 6 7】



を有し、

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0148】

ここで、および全体を通して、式 (V I I I) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式 (I X) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。

【0149】

一部の実施形態では、式 (V I I I) および式 (I X) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0、または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 6 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 4 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 3 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 2 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 6 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 5 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 4 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 2 3 0、または約 1 5 0 ～ 約 4 7 5、または約 1 5 0 ～ 約 3 4 0、または約 1 1 3 ～ 約 3 4 0、または約 4 5 0 ～ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ～ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ～ 約 6 8 2、または約 3 4 0 ～ 約 7 9 5、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ～ 約 9 0 9、または約 2 2 7 ～ 約 1 5 0 0、または約 2 2 5 ～ 約 2 2 8 0、または約 4 6 0 ～ 約 2 1 6 0、または約 4 6 0 ～ 約 2 0 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 8 2 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 7 1 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 2 5 0、または約 2 2 5 ～ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 1 3 6、または約 3 4 1 ～ 約 1 0 2 3、または約 3 4 1 ～ 約 9 1 0、または約 3 4 1 ～ 約 7 9 6、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2、または約 3 4 1 ～ 約 5 6 8、または約 1 1 4 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 1 4 ～ 約 9 5 0、または約 1 1 4 ～ 約 9 1 0、または約 1 1 4 ～ 約 8 0 0、または約 1 1 4 ～ 約 6 9 0、または約 1 1 4 ～ 約 5 7 5 の範囲にある。一部の実施形態では、式 (V I I I) および式 (I X) の化合物における n は、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410

、 3 9 7 6、 3 9 7 7、 3 9 7 8、 4 5 4 4、 4 5 4 5、 および 4 5 4 6 から選択される整数である。

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、 I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 K 3 4、 F 4 1、 F 4 3、 K 4 2、 E 6 1、 P 6 4、 R 3 7、 T 4 0、 E 6 7、 Y 4 4、 V 6 8、および L 7 1 から選択され、 I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、配列番号 3 の位置を基準にしている。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 K 3 4、 F 4 1、 F 4 3、 K 4 2、 E 6 1、 P 6 4、 R 3 7、 T 4 0、 E 6 7、 Y 4 4、 V 6 8、および L 7 1 から選択される。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 K 3 4 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 F 4 1 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 F 4 3 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 K 4 2 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 E 6 1 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 P 6 4 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 R 3 7 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 T 4 0 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 E 6 7 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 Y 4 4 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 V 6 8 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (V I I I)、式 (I X)、または式 (V I I I) および式 (I X) の混合物の構造の位置は、 L 7 1 位である。

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、方法は、 I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (V I I I) の構造の量対式 (I X) の構造の量の比が、約 1 : 1 である、 I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、 I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (V I I I) の構造の量対式 (I X) の構造の量の比が、 1 : 1 より大きい、 I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、 I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (V I I I) の構造の量対式 (I X) の構造の量の比が、 1 : 1 より小さい、 I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【 0 1 5 2 】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートを使用し、 I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (V

ⅠⅠⅠ)もしくは式(ⅠⅩ)、または式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、nは、100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の整数である。一部の実施形態では、式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。

【0153】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むⅠⅡ-2コンジュゲートを使用し、ⅠⅡ-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(ⅤⅠⅠⅠ)もしくは式(ⅠⅩ)、または式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である。

【0154】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むⅠⅡ-2コンジュゲートを使用し、ⅠⅡ-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(ⅤⅠⅠⅠ)もしくは式(ⅠⅩ)、または式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(ⅤⅠⅠⅠ)および式(ⅠⅩ)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

【0155】

10

20

20

30

40

、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲であるような整数である、前記方法が本明細書に記載される。

【0158】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VIII)もしくは式(IX)、または式(VIII)および式(IX)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である。一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VIII)もしくは式(IX)、または式(VIII)および式(IX)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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、または約50,000ダルトンであるような整数である。

【0159】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造：

10

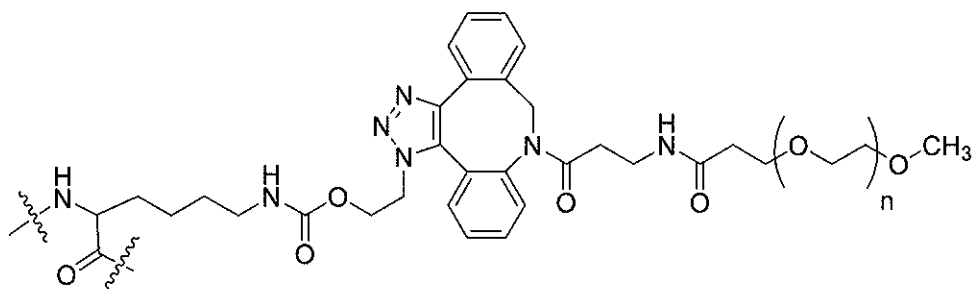
20

30

40

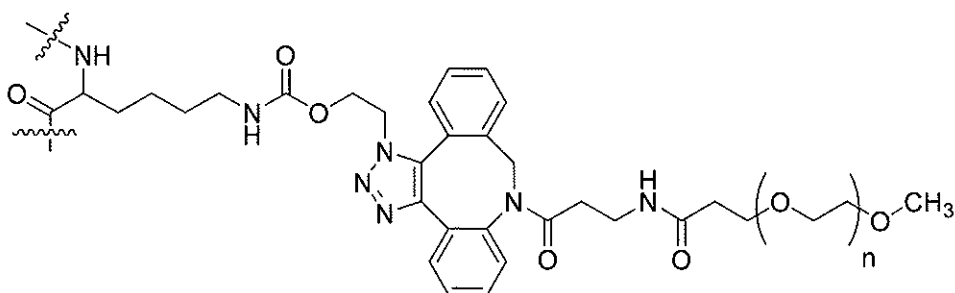
50

【化 6 8】



式(X);

10



式(XI);

20

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号 3 内のアミノ酸残基への共有結合を示す）
 に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

【0160】

ここで、および全体を通して、式 (X) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式 (XI) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。一部の実施形態では、I L-2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

30

【0161】

一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、ラセミであり、(R) に富み、(S) に富み、実質的に (R) であり、実質的に (S) であり、(R) でありまたは (S) である。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、ラセミである。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、(R) に富む。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、(S) に富む。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (R) である。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (S) である。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、(R) である。一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) 内のキラル中心の立体化学は、(S) である。

40

【0162】

一部の実施形態では、式 (X) および式 (XI) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0、または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0、または約 1

50

00～約1650、または約100～約1500、または約100～約1400、または約100～約1300、または約100～約1250、または約100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲にある。一部の実施形態では、式(X)および式(XI)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。
【0163】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置は、配列番号3の位置を基準にしている。一部の実施形態では、方法は、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置が、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置は、K34位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置は、F41位である。一部の実施形態では、方法は、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置が、F43位である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置が、K42位である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造の位置が、E61位である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)もしくは式(XI)、または式

(X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、P 6 4 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、R 3 7 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、T 4 0 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、E 6 7 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、Y 4 4 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、V 6 8 位である。一部の実施形態では、配列番号 3 の I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造の位置は、L 7 1 位である。

【0164】

一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (X) の構造の量対式 (X I) の構造の量の比が、約 1 : 1 である、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (X) の構造の量対式 (X I) の構造の量の比が、1 : 1 より大きい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、方法は、I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (X) の構造の量対式 (X I) の構造の量の比が、1 : 1 より小さい、I L - 2 コンジュゲートを使用する。

【0165】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートを使用し、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (X) もしくは式 (X I)、または式 (X) および式 (X I) の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、K 3 4、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、P 6 4、R 3 7、T 4 0、E 6 7、Y 4 4、V 6 8、および L 7 1 から選択され、n は、1 0 0 ~ 約 1 1 5 0、または約 1 0 0 ~ 約 1 1 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 9 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 7 5 0、または約 1 0 0 ~ 約 7 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 6 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 5 7 5、または約 1 0 0 ~ 約 5 0 0、または約 1 0 0 ~ 約 4 5 0、または約 1 0 0 ~ 約 3 5 0、または約 1 0 0 ~ 約 2 7 5、または約 1 0 0 ~ 約 2 3 0、または約 1 5 0 ~ 約 4 7 5、または約 1 5 0 ~ 約 3 4 0、または約 1 1 3 ~ 約 3 4 0、または約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 3 4 0 ~ 約 7 9 5、または約 3 4 1 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9、または約 2 2 7 ~ 約 1 5 0 0、または約 2 2 5 ~ 約 2 2 8 0、または約 4 6 0 ~ 約 2 1 6 0、または約 4 6 0 ~ 約 2 0 5 0、または約 3 4 1 ~ 約 1 8 2 0、または約 3 4 1 ~ 約 1 7 1 0、または約 3 4 1 ~ 約 1 2 5 0、または約 2 2 5 ~ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ~ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ~ 約 1 1 3 6、または約 3 4 1 ~ 約 1 0 2 3、または約 3 4 1 ~ 約 9 1 0、または約 3 4 1 ~ 約 7 9 6、または約 3 4 1 ~ 約 6 8 2、または約 3 4 1 ~ 約 5 6 8、または約 1 1 4 ~ 約 1 0 0 0、または約 1 1 4 ~ 約 9 5 0、または約 1 1 4 ~ 約 9 1 0、または約 1 1 4 ~ 約 8 0 0、または約 1 1 4 ~ 約 6 9 0、または約 1 1 4 ~ 約 5 7 5 の整数である。一部の実施形態では、式 (V I) および式 (V I I) の化合物における n は、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272

、 2 2 7 3、2 8 3 9、2 8 4 0、2 8 4 1、2 9 5 3、2 9 5 4、2 9 5 5、3 4 0 8、3 4 0 9、3 4 1 0、3 9 7 6、3 9 7 7、3 9 7 8、4 5 4 4、4 5 4 5、および 4 5 4 6 から選択される整数である。

【0166】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(X)および式(XI)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である。

10

【0167】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(X)および式(XI)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

20

【0168】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、方法は、式(X)および式(XI)の化合物におけるnが、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、IL-2コンジュゲートを使用する。一部の実施形態では、nは、約500～約1000である。一部の実施形態では、nは、約550～約800である。一部の実施形態では、nは、約681である。

30

【0169】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である。一部の実施形態では、式(X)および式(XI)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、nは、約500～約1000である。一部の実施形態では、nは、約550～約800である。一部の実施形態では、nは、約681である。

40

【0170】

一部の実施形態では、式(X)および式(XI)の構造におけるnは、PEG部分の分子量が、約1,000ダルトン～約200,000ダルトン、または約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、または約3,000ダルトン～約125,000ダルトン

50

ン、または約4,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約90,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約80,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約65,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約60,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲にあるような整数である。

【0171】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である。

【0172】

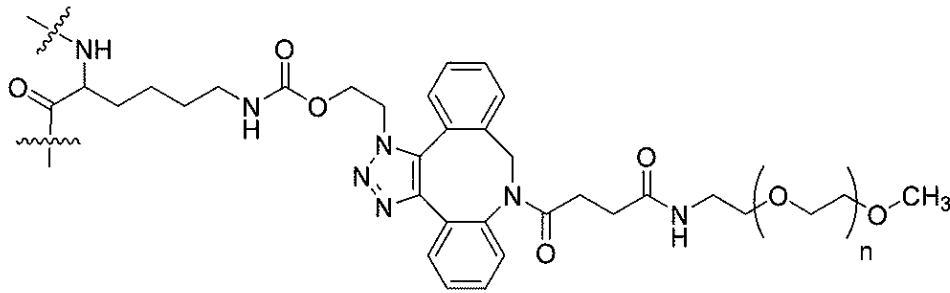
一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは式(XI)、または式(X)および式(XI)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000ダルトン、約25,000ダルトン、約30,000ダルトン、約35,000ダルトン、約40,000ダルトン、約45,000ダルトン、または約50,000ダルトンであるような整数である。

【0173】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コ

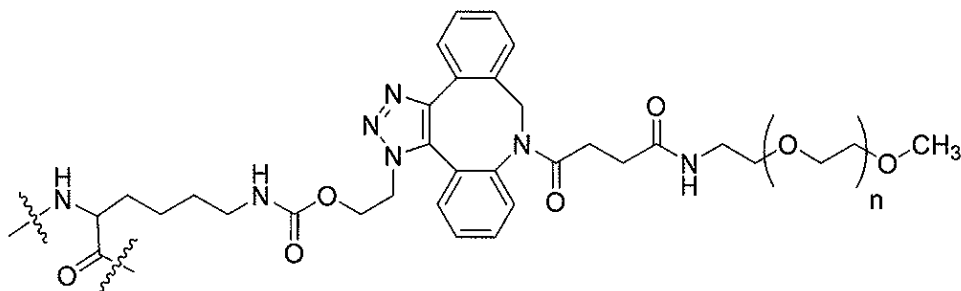
ンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造：

【化69】



10

式(XII);



20

式(XIII);

(式中：

nは、約2～約5000の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号3内のアミノ酸残基への共有結合を示す)

に置き換えられている、IL-2コンジュゲートである、前記方法が本明細書に記載される。

30

【0174】

ここで、および全体を通して、式(XII)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここで、および全体を通して、式(XIII)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0175】

一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、ラセミであり、(R)に富み、(S)に富み、実質的に(R)であり、実質的に(S)であり、(R)でありまたは(S)である。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、ラセミである。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、(R)に富む。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、(S)に富む。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、実質的に(R)である。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、実質的に(S)である。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、(R)である。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)内のキラル中心の立体化学は、(S)である。

40

【0176】

一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)の化合物におけるnは、約5～約4600、または約10～約4000、または約20～約3000、または約100

50

～約3000、または約100～約2900、または約150～約2900、または約125～約2900、または約100～約2500、または約100～約2000、または約100～約1900、または約100～約1850、または約100～約1750、または約100～約1650、または約100～約1500、または約100～約1400、または約100～約1300、または約100～約1250、または約100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲にある。一部の実施形態では、式(XII)および(XIII)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。

【0177】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)、式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、配列番号3の位置を基準にしている。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、K34位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、F41位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、F43位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、K42位である。一部の実施形態では、配

10

20

30

40

50

列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、E61位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、P64位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、R37位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、T40位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、E67位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、Y44位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、V68位である。一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造の位置は、L71位である。

【0178】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートの総量を含む、式(XII)の構造の量対式(XIII)の構造の量の比は、約1:1である。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートの総量を含む、式(XII)の構造の量対式(XIII)の構造の量の比は、1:1より大きい。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートの総量を含む、式(XII)の構造の量対式(XIII)の構造の量の比は、1:1より小さい。

【0179】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるのは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)および式(XIII)の混合物の構造に置き換えられ、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、nは、100~約1150、または約100~約1100、または約100~約1000、または約100~約900、または約100~約750、または約100~約700、または約100~約600、または約100~約575、または約100~約500、または約100~約450、または約100~約350、または約100~約275、または約100~約230、または約150~約475、または約150~約340、または約113~約340、または約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約340~約795、または約341~約682、または約568~約909、または約227~約1500、または約225~約2280、または約460~約2160、または約460~約2050、または約341~約1820、または約341~約1710、または約341~約1250、または約225~約1250、または約341~約1250、または約341~約1136、または約341~約1023、または約341~約910、または約341~約796、または約341~約682、または約341~約568、または約114~約1000、または約114~約950、または約114~約910、または約114~約800、または約114~約690、または約114~約575の整数である。一部の実施形態では、式(XII)および式(XIII)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、

1 2 5 0、1 2 5 1、1 3 6 2、1 3 6 3、1 3 6 4、1 4 7 6、1 4 7 7、1 4 7 8、
1 5 8 9、1 5 9 0、1 5 9 1、1 7 0 3、1 7 0 4、1 7 0 5、1 8 1 7、1 8 1 8、
1 8 1 9、1 9 3 0、1 9 3 1、1 9 3 2、2 0 4 4、2 0 4 5、2 0 4 6、2 1 5 8、
2 1 5 9、2 1 6 0、2 2 7 1、2 2 7 2、2 2 7 3、2 8 3 9、2 8 4 0、2 8 4 1、
2 9 5 3、2 9 5 4、2 9 5 5、3 4 0 8、3 4 0 9、3 4 1 0、3 9 7 6、3 9 7 7、
3 9 7 8、4 5 4 4、4 5 4 5、および 4 5 4 6 から選択される整数である。

【0180】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XII) もしくは式 (XIII)、または式 (XII) および式 (XIII) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、F 41、F 43、K 42、E 61、および P 64 から選択され、n は、約 450 ～ 約 800、または約 454 ～ 約 796、または約 454 ～ 約 682、または約 568 ～ 約 909 の整数である。一部の実施形態では、式 (XII) および式 (XIII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および 1249 から選択される整数である。

【0181】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XII) もしくは式 (XIII)、または式 (XII) および式 (XIII) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 および P 64 から選択され、n は、約 450 ～ 約 800、または約 454 ～ 約 796、または約 454 ～ 約 682、または約 568 ～ 約 909 の整数である。一部の実施形態では、式 (XII) および式 (XIII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である。

【0182】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XII) もしくは式 (XIII)、または式 (XII) および式 (XIII) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 であり、n は、約 450 ～ 約 800、または約 454 ～ 約 796、または約 454 ～ 約 682、または約 568 ～ 約 909 の整数である。一部の実施形態では、式 (XII) および式 (XIII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である。一部の実施形態では、n は、約 500 ～ 約 1000 である。一部の実施形態では、n は、約 550 ～ 約 800 である。一部の実施形態では、n は、約 681 である。

【0183】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XII) もしくは式 (XIII)、または式 (XII) および式 (XIII) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P 64 であり、n は、約 450 ～ 約 800、または約 454 ～ 約 796、または約 454 ～ 約 682、または約 568 ～ 約 909 の整数である。一部の実施形態では、式 (XII) および式 (XIII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である。一部の実施形態では、n は、約 500 ～ 約 1000 である。一部の実施形態では、n は、約 550 ～ 約 800 である。一部の実施形態では、n は、約 681 である。

【0184】

一部の実施形態では、式(X I I)もしくは式(X I I I)、または式(X I I)および式(X I I I)の混合物の構造におけるnは、PEG部分の分子量が、約1,000ダルトン～約200,000ダルトン、または約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、または約3,000ダルトン～約125,000ダルトン、または約4,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約90,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約80,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約65,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約60,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲であるような整数である。

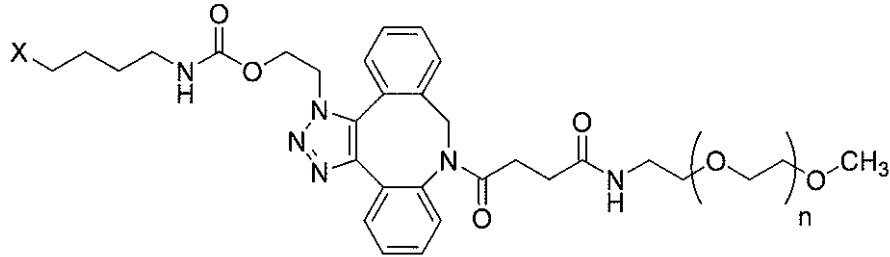
【0185】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X I I)もしくは式(X I I I)、または式(X I I)および式(X I I I)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である。配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X I I)もしくは式(X I I I)、または式(X I I)および式(X I I I)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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、または約50,000ダルトンであるような整数である、前記IL-2コンジュゲートが本明細書に記載される。

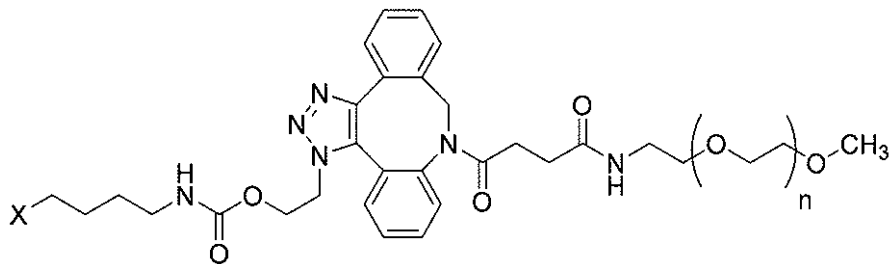
【0186】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）ＩＬ－２コンジュゲート、および（b）１つまたはそれ以上のＰＤ－１阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬ－２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬ－２コンジュゲートにおけるＥ６１またはＰ６４でのアミノ酸残基は、式（ＶＩＩＩ）もしくは式（ＩＸ）、または式（ＶＩＩＩ）および式（ＩＸ）の混合物の構造：

【化７０】



式(VIII);



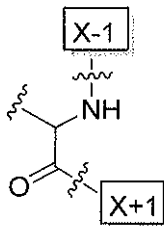
(IX);

（式中：

nは、PEG基の分子量が約１５，０００ダルトン～約６０，０００ダルトンであるような整数であり；

Xは構造：

【化７１】



を有し；

X－１は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X＋１は、後続のアミノ酸残基への結合点を示す）

に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

【０１８７】

一部の実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【０１８８】

一部の実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートにおけるＥ６１のアミノ酸残基は、式（ＶＩＩＩ）もしくは式（ＩＸ）、または式（ＶＩＩＩ）および式（ＩＸ）の混合物の構造に置き換えられ、nはPEG基の分子量が約２０，０００ダルトン～約４０，０００ダルトンであるような整数である。一部の実施形態では、nはPEG基の分子量が約３０，０

00ダルトンからであるような整数である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはセンプリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はペムブロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はニボルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はセンプリマブである。

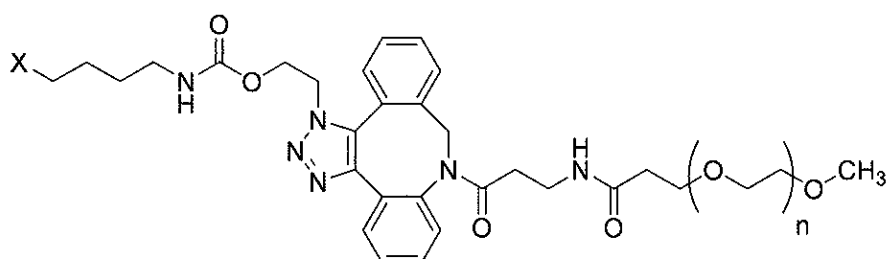
【0189】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートにおけるP64のアミノ酸残基は、式(VIII)もしくは式(IX)、または式(VIII)および式(IX)の混合物の構造に置き換えられ、nはPEG基の分子量が約20,000ダルトン〜約40,000ダルトンであるような整数である。一部の実施形態では、nはPEG基の分子量が約30,000ダルトンからであるような整数である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはセンプリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はペムブロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はニボルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤はセンプリマブである。

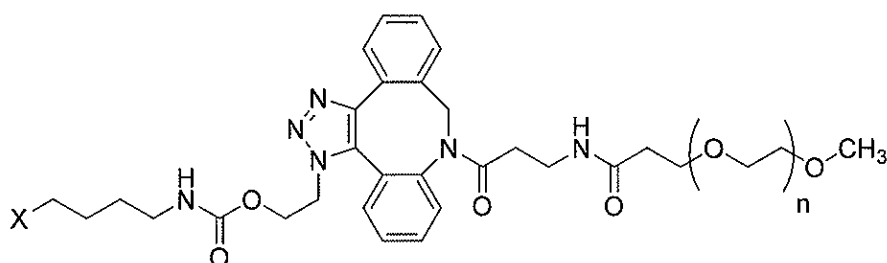
【0190】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおけるE61またはP64のアミノ酸残基は、式(VI)もしくは式(VII)、または式(VI)および式(VII)の混合物の構造：

【化72】



式(VI);



(VII);

(式中：

nは、PEG基の分子量が約15,000ダルトン〜約60,000ダルトンであるような整数であり；

Xは構造：

10

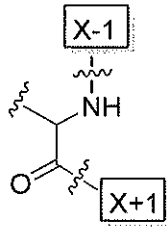
20

30

40

50

【化 7 3】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）

に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0191】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおける E 6 1 のアミノ酸残基は、式 (V I) もしくは式 (V I I)、または式 (V I) および式 (V I I) の混合物の構造に置き換えられており、n は P E G 基の分子量が約 2 0, 0 0 0 ダルトン～約 4 0, 0 0 0 ダルトンであるような整数である。一部の実施形態では、n は P E G 基の分子量が約 3 0, 0 0 0 ダルトンからであるような整数である。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はペムプロリズマブ、ニボルマブ、またはセミプリマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はペムプロリズマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はニボルマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はセミプリマブである。

【0192】

一部の実施形態では、I L - 2 コンジュゲートにおける P 6 4 のアミノ酸残基は、式 (V I) もしくは式 (V I I)、または式 (V I) および式 (V I I) の混合物の構造に置き換えられており、n は P E G 基の分子量が約 2 0, 0 0 0 ダルトン～約 4 0, 0 0 0 ダルトンであるような整数である。一部の実施形態では、n は P E G 基の分子量が約 3 0, 0 0 0 ダルトンからであるような整数である。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はペムプロリズマブ、ニボルマブ、またはセミプリマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はペムプロリズマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はニボルマブである。一部の実施形態では、1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤はセミプリマブである。

【0193】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートであり、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、P E G 基に共有結合しているシステインに置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、P E G 基は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、3 0 k D a、3 5 k D a、4 0 k D a、4 5 k D a、5 0 k D a および 6 0 k D a から選択される分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、5 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、1 0 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、1 5 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、2 0 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、2 5 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、3 0 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、3 5 k D a の分子量を有する。一部の実施形態では、P E G 基は、4 0 k D a の分子量を有する。一部の実施

形態では、PEG基は、45kDaの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG基は、50kDaの分子量を有する。一部の実施形態では、PEG基は、60kDaの分子量を有する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは配列番号3のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられているIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基はK34、T36、R37、T40、F41、K42、F43、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、L71、およびY106から選択される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは配列番号3のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられているIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基はK34、T40、F41、K42、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、およびL71から選択される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは配列番号4のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられるIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基はK35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、およびY107から選択される。

【0194】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであり、少なくとも1つの非リジン残基は、リンカーおよび水溶性ポリマーを含むリジンに置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、水溶性ポリマーはPEG基である。

【0195】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは放出できない結合を介して共有結合されたPEG基を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは放出できない、共有結合されたPEG基を含む。

【0196】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは配列番号3を有し、IL-2コンジュゲートにおける非リジンアミノ酸はリジン残基に置き換えられており、リジン残基は1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーおよび共有結合リンカーを含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、リジン残基は配列番号3の領域K34-Y106に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はK34に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はF41に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はF43に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はK42に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はE61に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はP64に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はR37に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はT40に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はE67に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はY44に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はV68に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はL71に位置する。

【0197】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは配列番号3を有し、IL-2コンジュゲートにおける非リジンアミノ酸はリジン残基に置き換えられており、リジン残基は1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーおよび共有結合リンカーを含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、リジン残基は配列番号3の領域K34-Y106に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はK34に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はF41に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はF43に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はK42に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はE61に位

置する。一部の実施形態では、リジン残基はP 6 4に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はR 3 7に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はT 4 0に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はE 6 7に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はY 4 4に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はV 6 8に位置する。一部の実施形態では、リジン残基はL 7 1に位置する。

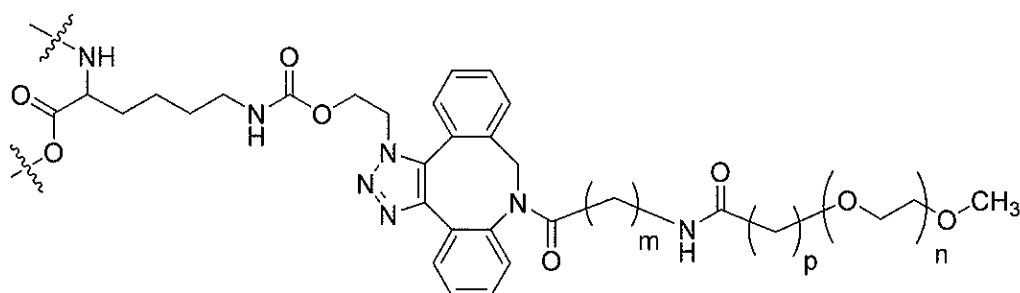
【0198】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、インターロイキン-2（IL-2）バリエーションであり、IL-2バリエーションのアミノ酸配列における非リジンアミノ酸は、（a）リジン；（b）共有結合リンカー；および（3）ならびに1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーを含むアミノ酸に置き換えられているインターロイキン-2（IL-2）バリエーションである、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーはPEG基を含む。

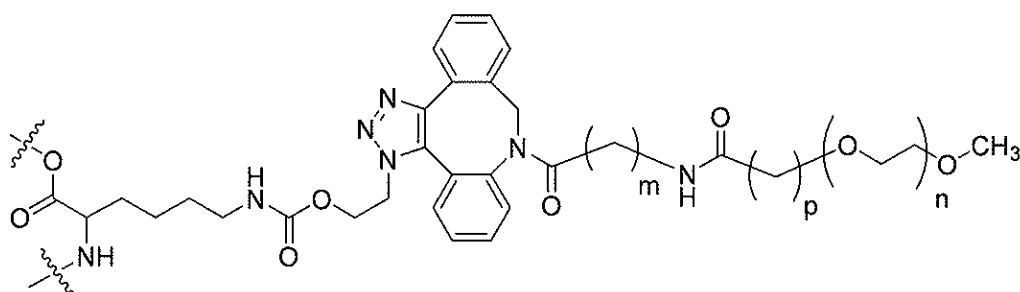
【0199】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであり、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（XIV）もしくは式（XV）、または式（XIV）および式（XV）の混合物の構造：

【化74】



式(XIV);



式(XV);

（式中：

mは、0～20の整数であり；

pは、0～20の整数であり；

nは、約2～約5000の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号3内のアミノ酸残基への共有結合を示す）に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

【0200】

ここでおよび全体で、式 (XIV) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここでおよび全体で、式 (XV) の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0201】

一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、ラセミであり、(R) に富み、(S) に富み、実質的に (R) であり、実質的に (S) であり、(R) でありまたは (S) である。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、ラセミである。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、(R) に富む。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、(S) に富む。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (R) である。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (S) である。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、(R) である。一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) 内のキラル中心の立体化学は、(S) である。

【0202】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、0 ~ 20、または 1 ~ 18、または 1 ~ 16、または 1 ~ 14、または 1 ~ 12、または 1 ~ 10、または 1 ~ 9、または 1 ~ 8、または 1 ~ 7、または 1 ~ 6、または 1 ~ 5、または 1 ~ 4、または 1 ~ 3、または 1 ~ 2 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、1 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、2 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、3 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、4 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、5 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、6 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、7 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、8 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、9 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、10 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、11 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、12 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、13 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、14 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、15 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、16 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、17 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、18 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲート

トの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、19 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、20 である。

【0203】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、1~20、または 1~18、または 1~16、または 1~14、または 1~12、または 1~10、または 1~9、または 1~8、または 1~7、または 1~6、または 1~5、または 1~4、または 1~3、または 1~2 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、1 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、2 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、3 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、4 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、5 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、6 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、7 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、8 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、9 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、10 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、11 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、12 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、13 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、14 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、15 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における m は、16 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、17 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、18 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、19 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における p は、20 である。

【0204】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートを使用し、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における n は、約 5~約 4600、または約 10~約 4000、または約 20~約 3000、または約 100~約 3000、または約 100~約 2900、または約 150~約 2900、または約 125~約 2900、または約 100~約 2500、または約 100~約 2000、または約 100~約 1900、または約 100~約 1850、または約 100~約 1750、または約 100~約 1650、または約 100~約 1500、または約 100~約 1400、または約 100~約 1300、または約 100~約 1250、または約 100~約 1150、または約 100~約 1100、または約 100~約 1000、または約 100~約 900、または

約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲にある。

【0205】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは1～6の整数であり、pは1～6の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは2～6の整数であり、pは2～6の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは2～4の整数であり、pは2～4の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは1であり、pは2であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは2であり、pは2であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは3であり、pは2であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは4であり、pは2であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に

10

20

30

40

50

記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 5 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 6 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 7 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 8 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 9 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 10 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 11 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 11 であり、p は 2 であり、n は、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X I V) および式 (X V) の化合物において、m は 2 であり、p は 2 であり、n は、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および 1 1 3 7 から選択される整数である。

【0206】

一部の実施形態では、方法は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートを使用し、式 (X I V) および式 (X V) の化合物における n は、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、15

89、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)もしくは式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、配列番号3の位置を基準にしている。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、K34位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、F41位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、F43位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、K42位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、E61位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、P64位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、R37位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、T40位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、E67位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、Y44位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、V68位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XIV)、式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造の位置は、L71位である。

【0207】

本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、IL-2コンジ

10

20

30

40

50

ュゲートの総量を含む、式 (XIV) の構造の量対式 (XV) の構造の量の比は、約 1 : 1 である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートの総量を含む、式 (XIV) の構造の量対式 (XV) の構造の量の比は、1 : 1 より大きい。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートの総量を含む、式 (XIV) の構造の量対式 (XV) の構造の量の比は、1 : 1 より小さい。

【0208】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートであり、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、および L71 から選択され、n は、100 ~ 約 1150、または約 100 ~ 約 1100、または約 100 ~ 約 1000、または約 100 ~ 約 900、または約 100 ~ 約 750、または約 100 ~ 約 700、または約 100 ~ 約 600、または約 100 ~ 約 575、または約 100 ~ 約 500、または約 100 ~ 約 450、または約 100 ~ 約 350、または約 100 ~ 約 275、または約 100 ~ 約 230、または約 150 ~ 約 475、または約 150 ~ 約 340、または約 113 ~ 約 340、または約 450 ~ 約 800、または約 454 ~ 約 796、または約 454 ~ 約 682、または約 340 ~ 約 795、または約 341 ~ 約 682、または約 568 ~ 約 909、または約 227 ~ 約 1500、または約 225 ~ 約 2280、または約 460 ~ 約 2160、または約 460 ~ 約 2050、または約 341 ~ 約 1820、または約 341 ~ 約 1710、または約 341 ~ 約 1250、または約 225 ~ 約 1250、または約 341 ~ 約 1250、または約 341 ~ 約 1136、または約 341 ~ 約 1023、または約 341 ~ 約 910、または約 341 ~ 約 796、または約 341 ~ 約 682、または約 341 ~ 約 568、または約 114 ~ 約 1000、または約 114 ~ 約 950、または約 114 ~ 約 910、または約 114 ~ 約 800、または約 114 ~ 約 690、または約 114 ~ 約 575 の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における n は、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および 4546 から選択される整数である。

【0209】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートであり、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、および P64 から選択され、n は、約 450 ~ 約 800、または約 454 ~ 約 796、または約 454 ~ 約 682、または約 568 ~ 約 909 の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部

の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である。

【0210】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、 n は、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

【0211】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2 コンジュゲートであり、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、 n は、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および式 (XV) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、 n は約500～約1000である。一部の実施形態では、 n は約550～約800である。一部の実施形態では、 n は約681である。

【0212】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、 n は、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XIV) および (XV) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、 n は約500～約1000である。一部の実施形態では、 n は約550～約800である。一部の実施形態では、 n は約681である。

【0213】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式 (XIV) もしくは式 (XV)、または式 (XIV) および式 (XV) の混合物の構造に置き換えられており、 n は、

PEG部分の分子量が、約1,000ダルトン～約200,000ダルトン、または約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、または約3,000ダルトン～約125,000ダルトン、または約4,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約90,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約80,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約65,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約60,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲にあるような整数である、前記方法が本明細書に記載される。

【0214】

配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XIV)もしくは式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である、前記IL-2コンジュゲートが本明細書に記載される。

【0215】

配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XIV)もしくは式(XV)、または式(XIV)および式(XV)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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、または約50,000ダルトンであるような整数である、前記IL-2コンジュゲートが本明細書に記載される。

【0216】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（XIV）もしくは（XV）、または（XIV）および（XV）の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、mは1～6の整数であり、pは1～6の整数であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式（XIV）および（XV）の化合物において、mは2であり、pは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である。

10

【0217】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（XIV）もしくは式（XV）、または式（XIV）および式（XV）の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、mは1～6の整数であり、pは1～6の整数であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式（XIV）および式（XV）の化合物において、mは2であり、pは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

20

【0218】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（XIV）もしくは式（XV）、または式（XIV）および式（XV）の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、mは1～6の整数であり、pは1～6の整数であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式（XIV）および式（XV）の化合物において、mは2であり、pは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、nは約500～約1000である。一部の実施形態では、nは約550～約800である。一部の実施形態では、nは約681である。

30

40

【0219】

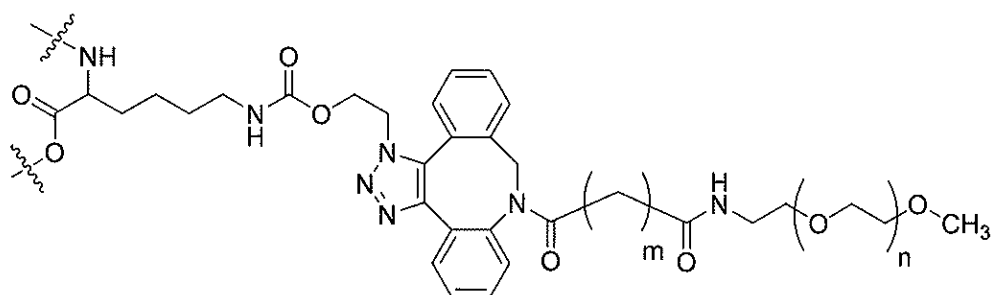
対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式（XIV）もしくは式（XV）、または式（XIV）および式（XV）の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、mは1～6の整数であり、pは1～6の整数であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約

50

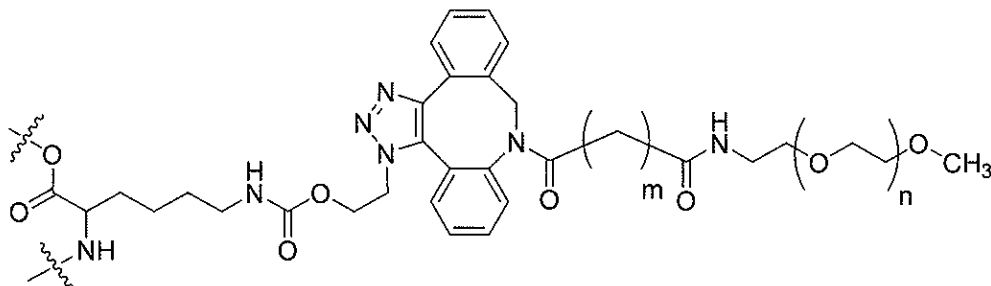
454～約682、または約568～約909の整数である、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XIV)および式(XV)の化合物において、mは2であり、pは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、nは約500～約1000である。一部の実施形態では、nは約550～約800である。一部の実施形態では、nは約681である。

【0220】

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造：



式(XVI);



式(XVII);

(式中：

mは、0～20の整数であり；

nは、約2～約5000の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号3内のアミノ酸残基への共有結合を示す)
に置き換えられている、前記方法が本明細書に記載される。

【0221】

ここおよび全体で、式(XVI)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。ここおよび全体で、式(XVII)の構造は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物を包含する。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である。

【0222】

一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)内のキラル中心の立体化学は、ラセミであり、(R)に富み、(S)に富み、実質的に(R)であり、実質的に(S)であり、(R)でありまたは(S)である。一部の実施形態では、式(XVI)および式

(X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、ラセミである。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、(R) に富む。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、(S) に富む。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (R) である。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、実質的に (S) である。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、(R) である。一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) 内のキラル中心の立体化学は、(S) である。

【0223】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、1~20、または1~18、または1~16、または1~14、または1~12、または1~10、または1~9、または1~8、または1~7、または1~6、または1~5、または1~4、または1~3、または1~2である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、1である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、2である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、3である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、4である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、5である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、6である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、7である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、8である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、9である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、10である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、11である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、12である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、13である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、14である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、15である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、16である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、17である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、18である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、19である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるmは、20である。

【0224】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物におけるnは、約5~約4600、または約10~約4000、または約20~約3000、または約100~約300

10

20

30

40

50

0、または約100～約2900、または約150～約2900、または約125～約2900、または約100～約2500、または約100～約2000、または約100～約1900、または約100～約1850、または約100～約1750、または約100～約1650、または約100～約1500、または約100～約1400、または約100～約1300、または約100～約1250、または約100～約1150、または約100～約1100、または約100～約1000、または約100～約900、または約100～約750、または約100～約700、または約100～約600、または約100～約575、または約100～約500、または約100～約450、または約100～約350、または約100～約275、または約100～約230、または約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲にある。

【0225】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートを使用し、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは1～6の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2～6の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2～4の整数であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは1であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは3であり、nは、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、および1137から選択される整数である。本明細

書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは4であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは5であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは6であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは7であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは8であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは9であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは10であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは11であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは12であり、nは、1 1 3、1 1 4、2 2 7、2 2 8、3 4 0、3 4 1、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。本明細書に記載されるⅠＬ－２コンジュゲートの一部の実施形態では、式（X V I）および式（X V I I）の化合物において、mは2であり、nは、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、および1 1 3 7から選択される整数である。

【0 2 2 6】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むⅠＬ－２コンジュゲートを使用し、式（X V I）および式（X V I I）の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455

、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択され、IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(I)の構造の位置は、配列番号3の位置を基準にしている。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、K34位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、F41位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、F43位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、K42位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、E61位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、P64位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、R37位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、T40位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、E67位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、Y44位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、配列番号3のIL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造の位置は、V68位である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲ

10

20

30

40

50

トの一部の実施形態では、配列番号3のI L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X V I)もしくは式(X V I I)、または式(X V I)および式(X V I I)の混合物の構造の位置は、L 7 1位である。

【0227】

本明細書に記載されるI L-2コンジュゲートの一部の実施形態では、I L-2コンジュゲートの総量を含む、式(X V I)の構造の量対式(X V I I)の構造の量の比は、約1:1である。本明細書に記載されるI L-2コンジュゲートの一部の実施形態では、I L-2コンジュゲートの総量を含む、式(X V I)の構造の量対式(X V I I)の構造の量の比は、1:1より大きい。本明細書に記載されるI L-2コンジュゲートの一部の実施形態では、I L-2コンジュゲートの総量を含む、式(X V I)の構造の量対式(X V I I)の構造の量の比は、1:1より小さい。

10

【0228】

一部の実施形態では、方法は、配列番号3のアミノ酸配列を含むI L-2コンジュゲートを使用し、I L-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X V I)もしくは式(X V I I)、または式(X V I)および式(X V I I)の混合物の構造に置き換えられており、K 3 4、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、P 6 4、R 3 7、T 4 0、E 6 7、Y 4 4、V 6 8、およびL 7 1から選択され、nは、100~約1150、または約100~約1100、または約100~約1000、または約100~約900、または約100~約750、または約100~約700、または約100~約600、または約100~約575、または約100~約500、または約100~約450、または約100~約350、または約100~約275、または約100~約230、または約150~約475、または約150~約340、または約113~約340、または約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約340~約795、または約341~約682、または約568~約909、または約227~約1500、または約225~約2280、または約460~約2160、または約460~約2050、または約341~約1820、または約341~約1710、または約341~約1250、または約225~約1250、または約341~約1250、または約341~約1136、または約341~約1023、または約341~約910、または約341~約796、または約341~約682、または約341~約568、または約114~約1000、または約114~約950、または約114~約910、または約114~約800、または約114~約690、または約114~約575の整数である。本明細書に記載されるI L-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(X V I)および式(X V I I)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である。

20

30

40

【0229】

一部の実施形態では、配列番号3のアミノ酸配列を含むI L-2コンジュゲートであって、I L-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X V I)もしくは式(X V I I)、または式(X V I)および式(X V I I)の混合物の構造に置き換えられており、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、およびP 6 4から選択され、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である、前記I L-2コンジュゲートが本明細書に記載される。本明細書に記載されるI L-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(X V I)およ

50

び式 (X V I I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、1 1 3 7、および 1 2 4 9 から選択される整数である。

【0 2 3 0】

一部の実施形態では、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートであって、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (X V I) もしくは式 (X V I I)、または式 (X V I) および式 (X V I I) の混合物の構造に置き換えられており、E 6 1 および P 6 4 から選択され、 n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、前記 I L - 2 コンジュゲートが本明細書に記載される。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および (X V I I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、および 9 1 0 から選択される整数である。

【0 2 3 1】

一部の実施形態では、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートであって、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (X V I) もしくは式 (X V I I)、または式 (X V I) および式 (X V I I) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられるのは、E 6 1 であり、 n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、前記 I L - 2 コンジュゲートが本明細書に記載される。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、および 9 1 0 から選択される整数である。一部の実施形態では、 n は約 5 0 0 ~ 約 1 0 0 0 である。一部の実施形態では、 n は約 5 5 0 ~ 約 8 0 0 である。一部の実施形態では、 n は約 6 8 1 である。

【0 2 3 2】

一部の実施形態では、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートであって、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (X V I) もしくは式 (X V I I)、または式 (X V I) および式 (X V I I) の混合物の構造に置き換えられており、置き換えられるのは、P 6 4 であり、 n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、前記 I L - 2 コンジュゲートが本明細書に記載される。本明細書に記載される I L - 2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (X V I) および式 (X V I I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、および 9 1 0 から選択される整数である。一部の実施形態では、 n は約 5 0 0 ~ 約 1 0 0 0 である。一部の実施形態では、 n は約 5 5 0 ~ 約 8 0 0 である。一部の実施形態では、 n は約 6 8 1 である。

【0 2 3 3】

一部の実施形態では、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む I L - 2 コンジュゲートであって、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (X V I) もしくは式 (X V I I)、または式 (X V I) および式 (X V I I) の混合物の構造に置き換えられており、 n は、P E G 部分の分子量が、約 1, 0 0 0 ダルトン ~ 約 2 0 0, 0 0 0 ダルトン、または約 2, 0 0 0 ダルトン ~ 約 1 5 0, 0 0 0 ダルトン、または約 3, 0 0 0 ダルトン ~ 約 1 2 5, 0 0 0 ダルトン、または約 4, 0 0 0 ダルトン ~ 約 1 0 0, 0 0 0 ダルトン、または約 5, 0 0 0 ダルトン ~ 約 1 0 0, 0 0 0 ダルトン、または約 6, 0 0 0 ダルトン ~ 約 9 0, 0 0 0 ダルトン、または約 7, 0 0 0 ダルトン ~ 約 8 0, 0 0 0 ダルトン、または約 8, 0 0 0 ダルトン ~ 約 7 0, 0 0 0 ダルトン、または約 5, 0 0 0 ダルトン ~ 約 7 0, 0 0 0 ダルトン、または約 5, 0 0 0 ダルトン ~ 約 6 5, 0 0 0 ダルトン、または約 5, 0 0 0 ダルトン ~ 約 6 0, 0 0 0 ダルトン、または約 5, 0 0 0 ダルトン ~ 約 5 0, 0 0 0 ダルトン、または約 6, 0 0 0 ダルトン ~ 約 5 0, 0 0 0 ダルトン

ン、または約 7,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 7,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 7,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 8,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 8,500 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 8,500 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 9,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 9,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 9,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 9,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 9,000 ダルトン～約 30,000 ダルトン、または約 9,500 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 9,500 ダルトン～約 30,000 ダルトン、または約 10,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 10,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 10,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 10,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 10,000 ダルトン～約 30,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 30,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 30,000 ダルトンの範囲にあるような整数である、前記 IL-2 コンジュゲートが本明細書に記載される。

【0234】

本明細書に記載されるのは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートであって、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XVI) もしくは式 (XVII)、または式 (XVI) および式 (XVII) の混合物の構造に置き換えられ、n は、PEG 部分の分子量が、約 5,000 ダルトン、約 7,500 ダルトン、約 10,000 ダルトン、約 15,000 ダルトン、約 20,000 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 60,000 ダルトン、約 70,000 ダルトン、約 80,000 ダルトン、約 90,000 ダルトン、約 100,000 ダルトン、約 125,000 ダルトン、約 150,000 ダルトン、約 175,000 ダルトンまたは約 200,000 ダルトンであるような整数である。本明細書に記載されるのは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートであって、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XVI) もしくは式 (XVII)、または式 (XVI) および式 (XVII) の混合物の構造に置き換えられ、n は、PEG 部分の分子量が、約 5,000 ダルトン、約 7,500 ダルトン、約 10,000 ダルトン、約 15,000 ダルトン、約 20,000 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、または約 50,000 ダルトンであるような整数である。

【0235】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるのは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む IL-2 コンジュゲートであって、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XVI) もしくは式 (XVII)、または式 (XVI) および式 (XVII) の混合物の構造に置き換えられ、F41、F43、K42、E61、および P64 から選択され、m は 1～6 の整数であり、n は、約 450～約 800、または約 454～約 796、または約 454～約 682、または約 568～約 909 の整数である。本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートの一部の実施形態では、式 (XVI) および式 (XVII) の化合物において、m は 2 であり、n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および 1249 から選択される

整数である。

【0236】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるのは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造に置き換えられる、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、mは1~6の整数であり、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。

10

【0237】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるのは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造に置き換えられる、置き換えられるIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、E61であり、mは1~6の整数であり、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、nは約500~約1000である。一部の実施形態では、nは約550~約800である。一部の実施形態では、nは約681である。

20

【0238】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるのは、配列番号3のアミノ酸配列を含むIL-2コンジュゲートであって、式(XVI)もしくは式(XVII)、または式(XVI)および式(XVII)の混合物の構造に置き換えられる、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、P64であり、mは1~6の整数であり、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である。本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートの一部の実施形態では、式(XVI)および式(XVII)の化合物において、mは2であり、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である。一部の実施形態では、nは約500~約1000である。一部の実施形態では、nは約550~約800である。一部の実施形態では、nは約681である。

30

【0239】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における増殖性疾患または状態を治療する方法であって、表1に記載される治療有効量の(a)サイトカインコンジュゲート(例えば、IL-2コンジュゲート)および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号1~98を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号1~84を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号15~29を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号40~54を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号55~69を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号70~84を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号85~98を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号1を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号2を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号3を含む。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートは、配列番号4を

40

50

50

30

40

50

【0241】

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 86、88、90、92、94、96、および 98 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、式 (I)、またはその任意のバリエーション、例えば式 (II) ~ 式 (XVII) もしくはその任意のバリエーションの構造が、非天然アミノ酸を含む部位に組み込まれる。

【0242】

一部の実施形態では、本明細書には、あるアミノ酸位置で修飾された IL-2 コンジュゲートが記載される。一部の例では、修飾は、天然アミノ酸への修飾である。一部の例では、修飾は非天然アミノ酸への修飾である。一部の例では、本明細書には、少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む、単離および修飾された IL-2 ポリペプチドが記載される。場合によっては、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 3 ~ 84 のいずれか 1 つと約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を含む。場合によっては、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 3 ~ 98 のいずれか 1 つと約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を含む。

【0243】

一部の例では、IL-2 コンジュゲートは、追加の突然変異をさらに含む。場合によっては、追加の突然変異は、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、および Y107 から選択されるアミノ酸位置にある。このような場合には、アミノ酸は、血清半減期の増加、安定性、またはそれらの組合せのための追加のコンジュゲート化部分にコンジュゲートされる。あるいは、アミノ酸は、天然アミノ酸、例えば、リジン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、もしくはチロシンに；または非天然アミノ酸に、追加のコンジュゲート化部分に結合する前に、最初に突然変異される。

【0244】

場合によっては、PEG 基は、特定の構造に限定されない。場合によっては、PEG は、直鎖状（例えば、末端がキャップされた、例えば、アルコキシ PEG または二官能性 PEG）、分枝状または多腕状（例えば、フォーク状 PEG、またはポリオールコアに結合した PEG）、樹枝状（または星状）構造であり、各々は、1 つまたはそれ以上の分解性連結を有するか否かを問わない。さらに、水溶性ポリマーの内部構造は、任意の数の異なる繰り返しパターンで組織化することができ、ホモポリマー、交互共重合体、ランダム共重合体、ブロック共重合体、交互トリポリマー、ランダムトリポリマー、およびブロックトリポリマーからなる群から選択することができる。

【0245】

PEG は、典型的には、多数の $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ モノマー [または $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ モノマー、PEG がどのように定義されるかに応じて] を含む。本明細書で使用される場合、繰り返し単位の数値は、「 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 」の下付き文字「n」によって同定される。したがって、(n) の値は、典型的には、以下の範囲：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、および約 1,200 ~ 約 1,900 の 1 つまたはそれ以上に含まれる。分子量が公知である任意の所与のポリマーについて、ポリマーの総重量 - 平均分子量を繰り返しモノマーの分子量で割ることによって、繰り返し単位の数（すなわち、「n」）を決定することが可能である。

【0246】

一部の例では、PEG は、末端キャップポリマー、すなわち、比較的不活性な基、例えば、低級 C_{1-6} アルコキシ基、またはヒドロキシル基でキャップされた少なくとも 1 つの

10

20

30

40

50

末端を有するポリマーである。ポリマーがPEGである場合、例えば、メトキシPEG（一般的には、mPEGと称される）を使用することができ、これは、ポリマーの一方の末端がメトキシ（ $-\text{OCH}_3$ ）基であるPEGの直鎖状形態であり、他方の末端は、ヒドロキシル、または場合により化学的に修飾され得る他の官能基である。

【0247】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、直鎖状または分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は直鎖状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基はメトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は直鎖状または分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約100ダルトン～約150,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状または分枝状PEG基である。例示的な範囲としては、例えば、5,000ダルトン超～約100,000ダルトンの範囲、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ダルトン超～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、および約40,000ダルトン～約120,000ダルトンの範囲の重量平均分子量が挙げられる。PEG基に関する例示的な重量平均分子量には、約100ダルトン、約200ダルトン、約300ダルトン、約400ダルトン、約500ダルトン、約600ダルトン、約700ダルトン、約750ダルトン、約800ダルトン、約900ダルトン、約1,000ダルトン、約1,500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、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、約75,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約95,000ダルトン、および約100,000ダルトンが含まれる。一部の実施形態では、PEG基は、上に開示される平均分子量を有する直鎖状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、上に開示される平均分子量を有する分枝状PEG基である。一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、定義される分子量 $\pm 10\%$ 、または 15% または 20% または 25% を有する直鎖状または分枝状PEG基である。例えば、 $30,000\text{ Da} \pm 3,000\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 4,500\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 6,000\text{ Da}$ の分子量を有するPEG基を含むIL-2コンジュゲートは、本開示の範囲内に含まれる。

【0248】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、約5,000ダルトン～約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状または分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、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、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、約75,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約95,000ダルトン、および約100,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状または分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状または分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状または分枝状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状PEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状PEG基である。

【0249】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、約5,000ダルトン～約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、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、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、約75,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約95,000ダルトン、および約100,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約10,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約20,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約30,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約50,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約60,000ダルトンの平均分子量を有する直鎖状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、定義される分子量 $\pm 10\%$ 、または 15% または 20% または 25% を有する直鎖状メトキシPEG基である。例えば、 $30,000\text{ Da} \pm 3,000\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 4,500\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 6,000\text{ Da}$ の分子量を有する直鎖状メトキシPEG基を含むIL-2コンジュゲートは、本開示の範囲内に含まれる。

10

20

30

40

50

【0250】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、約5,000ダルトン～約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、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、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、約75,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約95,000ダルトン、および約100,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトン、約10,000ダルトン、約20,000ダルトン、約30,000ダルトン、約50,000ダルトン、または約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約10,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約20,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約30,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約50,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、PEG基は、約60,000ダルトンの平均分子量を有する分枝状メトキシPEG基である。一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを含むPEG基は、定義される分子量 $\pm 10\%$ 、または 15% または 20% または 25% を有する分枝状メトキシPEG基である。例えば、 $30,000\text{ Da} \pm 3,000\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 4,500\text{ Da}$ 、または $30,000\text{ Da} \pm 6,000\text{ Da}$ の分子量を有する分枝状メトキシPEG基を含むIL-2コンジュゲートは、本開示の範囲内に含まれる。

【0251】

一部の実施形態では、例示的なPEG基としては、限定されないが、Quanta Biodesign, Ltd.からの直鎖状または分枝状の別個のPEG(dPEG)；Nektar Therapeuticsからの直鎖状、分枝状またはフォーク状のPEG；およびJenKem TechnologyからのY字のPEG誘導体が挙げられる。

【0252】

コンジュゲーション化学

コンジュゲーション化学

種々のコンジュゲーション反応を用いて、本明細書に記載されるサイトカインペプチドに組み込まれるリンカー、コンジュゲーション部分、および非天然アミノ酸をコンジュゲートする。このようなコンジュゲーション反応は、しばしば、「生体直交性」反応等の水性条件と適合する。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、リンカー、コンジュゲーション部分、または非天然アミノ酸上に見出される触媒、光、または反応性化学基

等の化学試薬によって媒介される。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、酵素によって媒介される。一部の実施形態では、本明細書で使用されるコンジュゲーション反応は、Gong, Y., Pan, L. Tett. Lett. 2015, 56, 2123に記載されている。一部の実施形態では、本明細書で使用されるコンジュゲーション反応は、Chen, X.; Wu, Y-W. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 5417に記載されている。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0253】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、1, 3-双極性環状付加反応を含む。一部の実施形態では、1, 3-双極性環状付加反応は、アジドとホスフィンとの反応（「クリック」反応）を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、銅によって触媒される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、トリアゾールを介して結合されたリンカーまたはコンジュゲーション部分を含むサイトカインペプチドをもたらす。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドと歪んだオレフィンとの反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドと歪んだアルキンとの反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドとシクロアルキン、例えば、DBCOとの反応を含む。

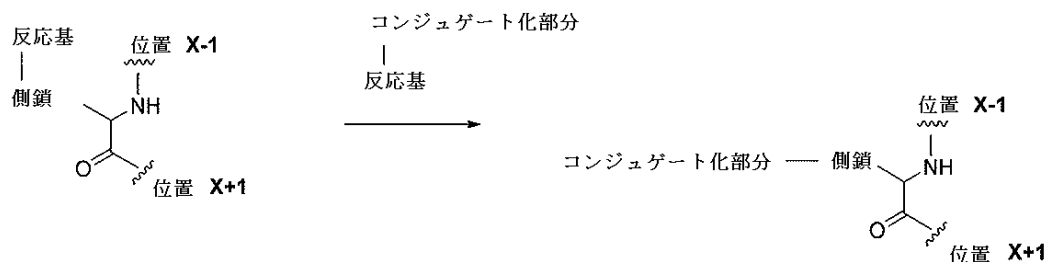
【0254】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、スキームS1に概説した反応を含み、式中のXは、例えば、配列番号5、6、7、8、9、30、31、32、33、および34のいずれか1つにおいて非天然アミノ酸を含むIL-2コンジュゲート中の位置である。

【0255】

【化76】

スキーム S1.



【0256】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマーを含む。一部の実施形態では、反応基はアルキンまたはアジドを含む。

【0257】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、スキームS2に概説した反応を含み、式中のXは、例えば、配列番号5、6、7、8、9、30、31、32、33、および34のいずれか1つにおいて非天然アミノ酸を含むIL-2コンジュゲート中の位置である。

【0258】

10

20

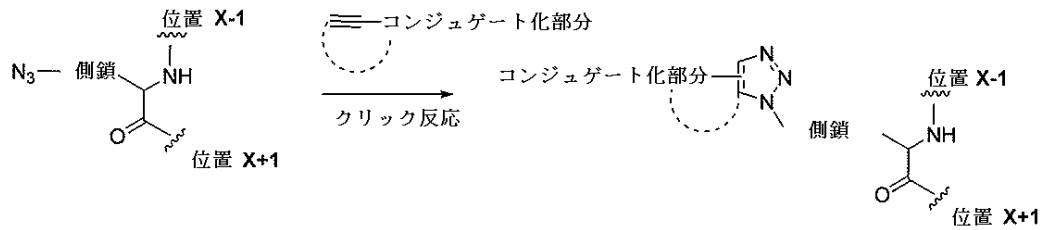
30

40

50

【化 7 7】

スキーム S2.



10

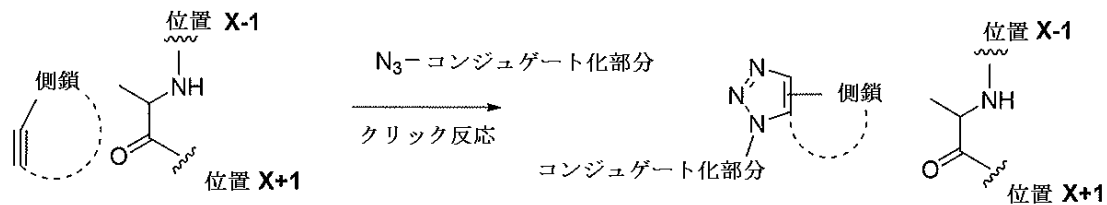
【0 2 5 9】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、スキーム S 3 に概説した反応を含み、式中の X は、例えば、配列番号 5、6、7、8、9、30、31、32、33、および 34 のいずれか 1 つにおいて非天然アミノ酸を含む IL-2 コンジュゲート中の位置である。

【0 2 6 0】

【化 7 8】

スキーム S3.



20

【0 2 6 1】

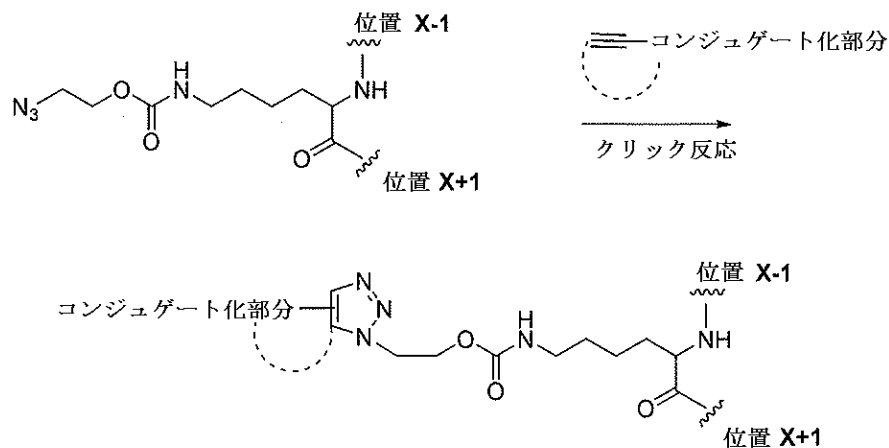
本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、スキーム S 4 に概説した反応を含み、式中の X は、例えば、配列番号 5、6、7、8、9、30、31、32、33、および 34 のいずれか 1 つにおいて非天然アミノ酸を含む IL-2 コンジュゲート中の位置である。

30

【0 2 6 2】

【化 7 9】

スキーム S4.



40

【0 2 6 3】

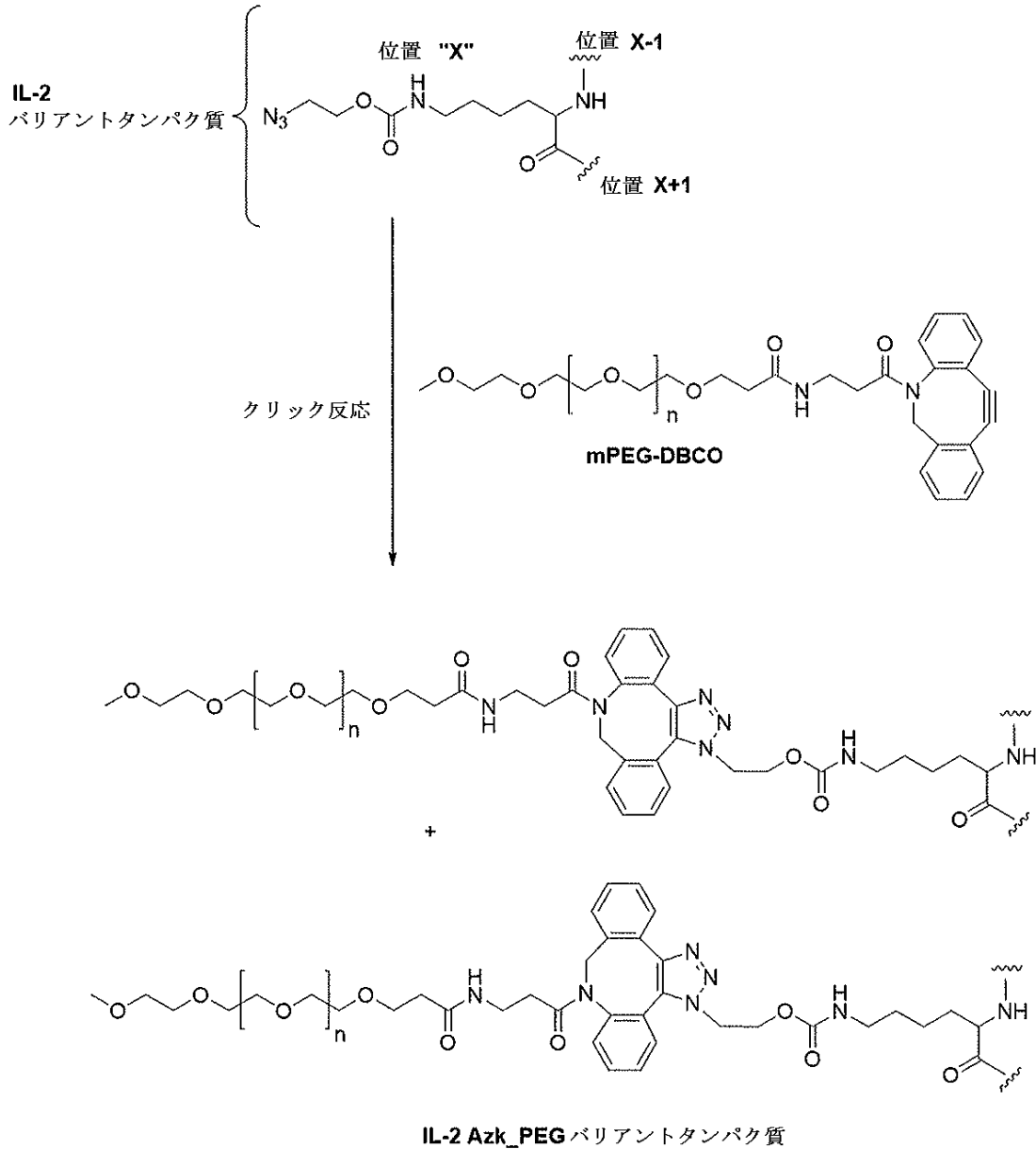
50

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジド部分、例えば、N 6 - ((2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジン (A z K) に由来するアミノ酸残基を含有するタンパク質中に含有されるものと、歪んだシクロアルキン、例えば、ジベンゾシクロオクチン基を含む化学的部分である D B C O に由来するものの間の付加環化反応を含む。D B C O 部分を含む P E G 基は、市販されているまたは当業者に公知の方法によって調製され得る。例示的な反応は、スキーム S 5 および S 6 に示される。

【 0 2 6 4 】

【 化 8 0 - 1 】

スキーム S5.



10

20

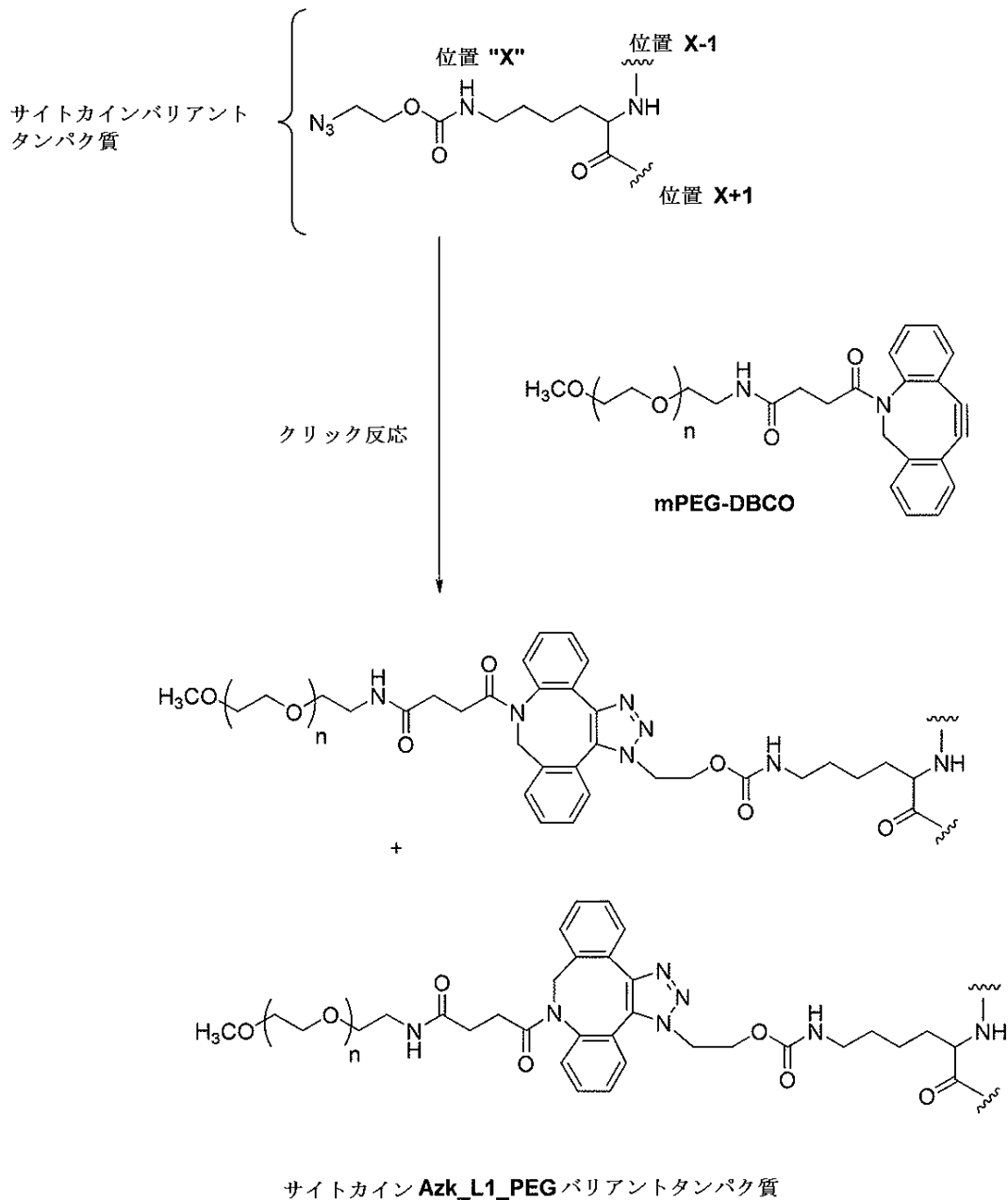
30

40

50

【化 80-2】

スキーム S6.



【0265】

コンジュゲーション反応、例えば、本明細書に記載されるクリック反応は、単一の位置異性体または位置異性体の混合物を生成し得る。一部の例では、位置異性体の比は、約 1 : 1 である。一部の例では、位置異性体の比は、約 2 : 1 である。一部の例では、位置異性体の比は、約 1.5 : 1 である。一部の例では、位置異性体の比は、約 1.2 : 1 である。一部の例では、位置異性体の比は、約 1.1 : 1 である。一部の例では、位置異性体の比は、1 : 1 超である。

【0266】

サイトカインポリペプチドの産生

一部の例では、本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートは、天然のアミノ酸突然変異または非天然のアミノ酸突然変異を含有し、組換えにより生成されるか、または化学的に合成される。一部の例では、本明細書に記載される IL-2 コンジュゲートは、例えば、宿主細胞系によって、または無細胞系において、組換えにより生成される。本明細書

に記載される実施形態またはバリエーションのいずれかでは、アミノ酸はL-アミノ酸またはD-アミノ酸であり得る。一部の実施形態では、アミノ酸はL-アミノ酸である。他の実施形態では、アミノ酸はD-アミノ酸である。

【0267】

一部の例では、IL-2コンジュゲートは、宿主細胞系を介して、組換えにより生成される。場合によっては、宿主細胞は、真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または植物細胞）または原核細胞（例えば、グラム陽性菌またはグラム陰性菌）である。場合によっては、真核宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。場合によっては、哺乳動物宿主細胞は、安定した細胞株、またはそれ自体のゲノム中に、目的の遺伝的材料を組み込んでおり、細胞分裂の多くの世代の後に、遺伝的材料の産物を発現する能力を有する細胞株である。その他の場合には、哺乳動物宿主細胞は、一過性の細胞株、またはそれ自体のゲノム中に、目的の遺伝的材料を組み込んでおらず、細胞分裂の多くの世代の後に、遺伝的材料の産物を発現する能力を有していない細胞株である。

10

【0268】

例示的な哺乳動物宿主細胞として、293T細胞株、293A細胞株、293FT細胞株、293F細胞、293H細胞、A549細胞、MDCK細胞、CHO DG44細胞、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、Exp i 293 F（商標）細胞、Flp-In（商標）T-Rex（商標）293細胞株、Flp-In（商標）-293細胞株、Flp-In（商標）-3T3細胞株、Flp-In（商標）-BHK細胞株、Flp-In（商標）-CHO細胞株、Flp-In（商標）-CV-1細胞株、Flp-In（商標）-Jurkat細胞株、FreeStyle（商標）293-F細胞、FreeStyle（商標）CHO-S細胞、GripTite（商標）293MSR細胞株、GS-CHO細胞株、HepaRG（商標）細胞、T-Rex（商標）Jurkat細胞株、Per.C6細胞、T-Rex（商標）-293細胞株、T-Rex（商標）-CHO細胞株、およびT-Rex（商標）-HeLa細胞株が挙げられる。

20

【0269】

一部の実施形態では、真核宿主細胞は、昆虫宿主細胞である。例示的な昆虫宿主細胞として、ショウジョウバエ（*Drosophila*）属S2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、High Five（商標）細胞、およびexpresSF+（登録商標）細胞が挙げられる。

30

【0270】

一部の実施形態では、真核宿主細胞は、酵母宿主細胞である。例示的な酵母宿主細胞として、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）（*K. phaffii*）酵母株、例えば、GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168HおよびX-33、ならびにサッカロミセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）酵母株、例えばINVSc1が挙げられる。

【0271】

一部の実施形態では、真核宿主細胞は、植物宿主細胞である。一部の例では、植物細胞は、藻類由来の細胞を含む。例示的な植物細胞株として、コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）137cまたはシアノバクテリア（*Synechococcus elongatus*）PPC 7942由来の株が挙げられる。

40

【0272】

一部の実施形態では、宿主細胞は、原核宿主細胞である。例示的な原核宿主細胞として、BL21、Mach1（商標）、DH10B（商標）、TOP10、DH5 α 、DH10Bac（商標）、OmniMax（商標）、MegaX（商標）、DH12S（商標）、INV110、TOP10F'、INV α F、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stbl2（商標）、Stbl3（商標）またはStbl4（商標）が挙げられる。

【0273】

一部の例では、本明細書に記載されるIL-2ポリペプチドの産生に適したポリ核酸分

50

子またはベクターとして、真核生物または原核生物の源に由来する適切なあらゆるベクターが挙げられる。例示的なポリ核酸分子またはベクターとして、細菌（例えば大腸菌（*E. coli*））、昆虫、酵母（例えばピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、*K. phaffii*）、藻類、または哺乳動物の源由来のベクターが挙げられる。細菌ベクターの例として、pACYC177、pASK75、pBADベクターシリーズ、pBADMベクターシリーズ、pETベクターシリーズ、pETMベクターシリーズ、pGEXベクターシリーズ、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQEベクターシリーズ、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2シリーズ、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTCまたはpTAC-MAT-2が挙げられる。

10

【0274】

昆虫ベクターの例として、pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac、M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、FLAGベクター、例えばpPolh-FLAG1もしくはpPolh-MAT 2またはMATベクター、例えばpPolh-MAT1もしくはpPolh-MAT2が挙げられる。

【0275】

20

酵母ベクターの例として、Gateway（登録商標）pDEST（商標）14ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（登録商標）15ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（登録商標）17ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（登録商標）24ベクター、Gateway（登録商標）pYES-DEST52ベクター、pBAD-DEST49 Gateway（登録商標）デスティネーションベクター、pAO815ピキア（*Pichia*）属ベクター、pFLD1ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）（*K. phaffii*）ベクター、pGAPZA, B, & Cピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）（*K. phaffii*）ベクター、pPIC3.5Kピキア（*Pichia*）属ベクター、pPIC6 A, B, & Cピキア（*Pichia*）属ベクター、pPIC9Kピキア（*Pichia*）属ベクター、pTEF1/Zeo、pYES2酵母ベクター、pYES2/CT酵母ベクター、pYES2/NT A, B, & C酵母ベクターまたはpYES3/CT酵母ベクターが挙げられる。

30

【0276】

藻類ベクターの例として、pChlamy-4ベクターまたはMCSベクターが挙げられる。

【0277】

哺乳動物ベクターの例として、一過性の発現ベクターまたは安定した発現ベクターが挙げられる。例示的な哺乳動物の一過性の発現ベクターとして、p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a, b, c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a, b, c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3またはpBICEP-CMV 4が挙げられる。例示的な哺乳動物の安定した発現ベクターとして、pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1またはpBICEP-CMV 2が挙げられる。

40

【0278】

50

一部の例では、無細胞系が、本明細書に記載されるサイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドの産生に用いられる。場合によっては、無細胞系は、細胞由来の細胞質および／または核構成要素の混合物を含み、インビトロ核酸合成に適している。一部の例では、無細胞系は、原核細胞構成要素を利用する。他の例では、無細胞系は、真核細胞構成要素を利用する。核酸合成は、例えば、ショウジョウバエ（*Drosophila*）属細胞、ツメガエル（*Xenopus*）属卵、古細菌、またはHeLa細胞に基づく無細胞系において達成される。例示的な無細胞系として、大腸菌（*E. coli*）S30 Extra c t系、大腸菌（*E. coli*）T7 S30系またはPURExpress（登録商標）、XpressCFおよびXpressCF+が挙げられる。

【0279】

無細胞翻訳系は、プラスミド、mRNA、DNA、tRNA、シンセターゼ、放出因子、リボソーム、シャペロンタンパク質、翻訳開始因子および伸長因子、天然のアミノ酸および／もしくは非天然アミノ酸等の構成要素、ならびに／またはタンパク質発現に用いられる他の構成要素を様々に含む。そのような構成要素は、場合により、収量を向上させるか、合成速度を高めるか、タンパク質生成物忠実性を増大させるか、または非天然アミノ酸を組み込むように修飾されている。一部の実施形態では、本明細書に記載されるサイトカインは、米国特許第8,778,631号；米国特許出願公開第2017/0283469号；米国特許出願公開第2018/0051065号；米国特許出願公開第2014/0315245号；または米国特許第8,778,631号に記載される無細胞翻訳系を用いて合成される。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、修飾放出因子を含み、または系からの1つもしくはそれ以上の放出因子の除去すら含む。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、プロテアーゼ濃度の引下げを含む。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、非天然アミノ酸をコードするのに用いられるコドンが再割当てされている修飾tRNAを含む。一部の実施形態では、非天然アミノ酸の組み込み用の、本明細書に記載されるシンセターゼが、無細胞翻訳系に用いられる。一部の実施形態では、tRNAが無細胞翻訳系に加えられる前に、酵素的または化学的方法を用いて、非天然アミノ酸がtRNAに予めロードされている。一部の実施形態では、無細胞翻訳系用の構成要素は、修飾された生物、例えば修飾された細菌、酵母、または他の生物から得られる。

【0280】

一部の実施形態では、サイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドは、発現宿主系を介して、または無細胞系を介して、環状に置換された形態として生成される。

【0281】

非天然アミノ酸を含むサイトカインポリペプチドの産生

直交性遺伝的コードまたは拡張遺伝的コードを本開示において用いることができ、その中では、サイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドの核酸配列内に存在する1つまたはそれ以上の特定のコドンが、非天然アミノ酸をコードするように割り当てられているので、これを、直交性tRNAシンセターゼ／tRNA対を用いることによってサイトカイン（例えばIL-2）中に遺伝的に組み込むことができる。直交性tRNAシンセターゼ／tRNA対は、非天然アミノ酸でtRNAを付加することができ、非天然アミノ酸をポリペプチド鎖中にコドンに応じて組み込むことができる。

【0282】

一部の例では、コドンは、コドンアンバー、オーカー、オパール、または四つ組コドンである。場合によっては、コドンは、非天然アミノ酸を有するように用いられることとなる直交性tRNAに対応する。場合によっては、コドンはアンバーである。その他の場合には、コドンは直交性コドンである。

【0283】

一部の例では、コドンは四つ組コドンであり、これは、直交性リボソームribo-Q1によってデコードされる。場合によっては、四つ組コドンは、Neumannら、「Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding riboso

10

20

30

40

50

me」、Nature、464巻(7287号)：第441～444頁(2010年)に示される通りであり、その開示は参照によって本明細書に組み入れられる。

【0284】

一部の例では、本開示において用いられるコドンは、リコードされるコドン、例えば、同義コドン、または代替コドンで置き換えられるレアコドンである。場合によっては、リコードされるコドンは、Napolitanoら、「Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in Escherichia coli」、PNAS、113巻(38号)：E5588～5597頁(2016年)に記載される通りである。場合によっては、リコードされるコドンは、Ostrovら、「Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome」、Science 353巻(6301号)：819～822頁(2016年)に記載される通りである。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0285】

一部の例では、非天然核酸が、サイトカイン(例えばIL-2)中への1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸の組み込みをもたらすように利用される。例示的な非天然核酸として、以下に限定されないが、ウラシル-5-イル、ヒポキサンチン-9-イル(I)、2-アミノアデニン-9-イル、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが挙げられる。特定の非天然核酸、例えば5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2置換プリン、N-6置換プリン、O-6置換プリン、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、5-メチルシトシン、二重鎖形成の安定性を増大させるもの、ユニバーサル核酸、疎水性核酸、プロミスキャス核酸、サイズ拡張核酸、フッ化核酸、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン(2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンが挙げられる)。5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチル、他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル、5-プロピニルシトシン、ピリミジン核酸の他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニン、三環ピリミジン、フェノキサジンシチジン([5, 4-b][1, 4]ベンズオキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5, 4-b][1, 4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプ、フェノキサジンシチジン(例えば

10

20

30

40

50

9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5, 4-b][1, 4]ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4, 5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3', 2':4, 5]ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-2-オン)、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、7-デアザアデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン、2-ピリドン、アザシトシン、5-プロモシトシン、プロモウラシル、5-クロロシトシン、塩素化シトシン、シクロシトシン、シトシンアラビノシド、5-フルオロシトシン、フルオロピリミジン、フルオロウラシル、5, 6-ジヒドロシトシン、5-ヨードシトシン、ヒドロキシウレア、ヨードウラシル、5-ニトロシトシン、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-フルオロウラシルおよび5-ヨードウラシル、2-アミノアデニン、6-チオグアニン、2-チオチミン、4-チオチミン、5-プロピニルウラシル、4-チオウラシル、N4-エチルシトシン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、5-ヒドロキシシトシン、2'-デオキシウリジン、2-アミノ-2'-デオキシアデノシン、ならびに米国特許第3, 687, 808号；米国特許第4, 845, 205号；米国特許第4, 910, 300号；米国特許第4, 948, 882号；米国特許第5, 093, 232号；米国特許第5, 130, 302号；米国特許第5, 134, 066号；米国特許第5, 175, 273号；米国特許第5, 367, 066号；米国特許第5, 432, 272号；米国特許第5, 457, 187号；米国特許第5, 459, 255号；米国特許第5, 484, 908号；米国特許第5, 502, 177号；米国特許第5, 525, 711号；米国特許第5, 552, 540号；米国特許第5, 587, 469号；米国特許第5, 594, 121号；米国特許第5, 596, 091号；米国特許第5, 614, 617号；米国特許第5, 645, 985号；米国特許第5, 681, 941号；米国特許第5, 750, 692号；米国特許第5, 763, 588号；米国特許第5, 830, 653号および米国特許第6, 005, 096号；国際公開第99/62923号；Kandimalra, (2001年) Bioorg. Med. Chem. 9巻：807~813頁；The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J. I編、John Wiley & Sons、1990年、858~859頁；Englischら、Angewandte Chemie、国際版、1991年、30巻、613頁；ならびにSanghvi、第15章、Antisense Research and Applications、CrookeおよびLebleu編、CRC Press、1993年、273~288頁に記載されるもの。さらなる塩基修飾を、例えば、米国特許第3, 687, 808号；Englischら、Angewandte Chemie、国際版、1991年、30巻、613頁；ならびにSanghvi、第15章、Antisense Research and Applications、289~302頁、CrookeおよびLebleu編、CRC Press、1993年において見出すことができる。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0286】

種々の複素環塩基および種々の糖部分（および糖類似体）を含む非天然核酸が、当技術分野において利用可能であり、核酸は、場合によっては、天然に存在する核酸の主な5つの塩基構成要素以外の1つまたはいくつかの複素環塩基を含む。例えば、複素環塩基として、場合によっては、ウラシル-5-イル、シトシン-5-イル、アデニン-7-イル、アデニン-8-イル、グアニン-7-イル、グアニン-8-イル、4-アミノピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル、2-アミノ-4-オキソピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル、2-アミノ-4-オキソピロロ[2, 3-d]ピリミジン-3-イル基が挙げられ、ここで、プリンは9-位置を介して、ピリミジンは1-位置を介して、ピロロピリミジンは7-位置を介して、ピラゾロピリミジンは1-位置を介して、核酸の糖部分に結合している。

【0287】

また、一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、ホスフェート部分にて修飾されている。修飾ホスフェート部分として、以下に限定されないが、2つのヌクレオチド間の結合にて修飾があるものが挙げられ、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート（3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートが挙げられる）、ホスフィネート、ホスホロアミデート（3'-アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートが挙げられる）、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにボラノホスフェートを含有する。2つのヌクレオチド間のこれらのホスフェート結合または修飾ホスフェート結合は、3'-5'結合または2'-5'結合を介していること、結合は、10 反転した極性、例えば3'-5'から5'-3'、または2'-5'から5'-2'を含有することが理解される。また、種々の塩、混合塩、および遊離酸形態が挙げられる。多数の米国特許が、修飾ホスフェートを含有するヌクレオチドを製造して用いる方法を教示しており、以下に限定されないが、米国特許第3,687,808号；米国特許第4,469,863号；米国特許第4,476,301号；米国特許第5,023,243号；米国特許第5,177,196号；米国特許第5,188,897号；米国特許第5,264,423号；米国特許第5,276,019号；米国特許第5,278,302号；米国特許第5,286,717号；米国特許第5,321,131号；米国特許第5,399,676号；米国特許第5,405,939号；米国特許第5,453,496号；米国特許第5,455,233号；米国特許第5,466,677号；米国特許第5,476,925号；米国特許第5,519,126号；米国特許第5,536,821号；米国特許第5,541,306号；米国特許第5,550,111号；米国特許第5,563,253号；米国特許第5,571,799号；米国特許第5,587,361号；および米国特許第5,625,050号が挙げられ、これらの特許のそれぞれの開示は、参照によっ

20

【0288】

一部の実施形態では、非天然核酸は、2',3'-ジデオキシ-2',3'-ジデヒドロヌクレオシド（国際出願PCT/US2002/006460号）、5'-置換DNAおよびRNA誘導体（国際出願PCT/US2011/033961号；Sahaら、J. Org Chem.、1995年、60巻、788~789頁；Wangら、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、1999年、9巻、885~890頁；Mikhailovら、Nucleosides & Nucleotides、1991年、10巻（1~3号）、339~343頁；Leonidら、1995年、14巻（3~5号）、901~905頁；およびEppacherら、Helvetica Chimica Acta、2004年、87巻、3004~3020頁；国際出願PCT/JP2000/004720号；国際出願PCT/JP2003/002342号；国際出願PCT/JP2004/013216号；国際出願PCT/JP2005/020435号；国際出願PCT/JP2006/315479号；国際出願PCT/JP2006/324484号；国際出願PCT/JP2009/056718号；国際出願PCT/JP2010/067560号）、または修飾塩基を有するモノホスフェートとして製造される5'-置換モノマー（Wangら、Nucleosides & Nucleotides & Nucleic Acids、2004年、23巻（1および2号）、317~337頁）を含む。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

30

40

【0289】

一部の実施形態では、非天然核酸は、糖環の5'-位置および2'-位置にて（国際出願PCT/US94/02993号）、5'-CH₂置換2'-O保護ヌクレオシド等の修飾を含む（Wuら、Helvetica Chimica Acta、2000年、83巻、1127~1143頁およびWuら、Bioconjugate Chem. 1999年、10巻、921~924頁）。場合によっては、非天然核酸は、オリゴヌクレオチド中へ

50

の組み込みのために調製されたアミド連結ヌクレオシドダイマーを含み、ダイマー内の3'連結ヌクレオシド(5'から3')は、2'-O ϕ および5'-(S)-CH₃を含む(Mesmaekerら、Synlett、1997年、1287~1290頁)。非天然核酸は、2'-置換5'-CH(またはO)修飾ヌクレオシドを含んでもよい(国際出願PCT/US92/01020号)。非天然核酸は、5'-メチレンホスホネートDNAおよびRNAモノマー、ならびにダイマーを含んでもよい(Bohringerら、Tet. Lett.、1993年、34巻、2723~2726頁; Collingwoodら、Synlett、1995年、7巻、703~705頁; およびHutterら、Helvetica Chimica Acta、2002年、85巻、2777~2806頁)。非天然核酸は、2'-置換を有する5'-ホスホネートモノマー(米国特許出願公開第2006/0074035号)および他の修飾5'-ホスホネートモノマー(国際公開第1997/35869号)を含んでもよい。非天然核酸は、5'-修飾メチレンホスホネートモノマー(EP614907号およびEP629633号)を含んでもよい。非天然核酸は、5'-位置および/または6'-位置にてヒドロキシル基を含む5'-または6'-ホスホネートリボヌクレオシドの類似体を含んでもよい(Chenら、Phosphorus, Sulfur and Silicon、2002年、777巻、1783~1786頁; Jungら、Bioorg. Med. Chem.、2000年、8巻、2501~2509頁; Gallierら、Eur. J. Org. Chem.、2007年、925~933頁; およびHamptonら、J. Med. Chem.、1976年、19巻(8号)、1029~1033頁)。非天然核酸は、5'-ホスフェート基を有する5'-ホスホネートデオキシリボヌクレオシドモノマーおよびダイマーを含んでもよい(Nawrotら、Oligonucleotides、2006年、16巻(1号)、68~82頁)。非天然核酸は、6'-ホスホネート基を有するヌクレオシドを含んでもよく、5'-位置および/または6'-位置は、置換されていないか、またはチオ-tert-ブチル基(SC(CH₃)₃)(およびその類似体);メチレンアミノ基(CH₂NH₂)(およびその類似体)もしくはシアノ基(CN)(およびその類似体)で置換されている(Fairhurstら、Synlett、2001年、4巻、467~472頁; Kapplerら、J. Med. Chem.、1986年、29巻、1030~1038頁; Kapplerら、J. Med. Chem.、1982年、25巻、1179~1184頁; Vrudhulaら、J. Med. Chem.、1987年、30巻、888-894頁; Hamptonら、J. Med. Chem.、1976年、19巻、1371~1377頁; Gezeら、J. Am. Chem. Soc.、1983年、105巻(26号)、7638~7640頁; およびHamptonら、J. Am. Chem. Soc.、1973年、95巻(13号)、4404~4414頁)。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0290】

また、一部の実施形態では、非天然核酸は、糖部分の修飾を含む。場合によっては、核酸は、1つまたはそれ以上のヌクレオシドを含有し、糖基は修飾されている。そのような糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の増強、結合親和性の増大、または他の一部の有益な生物学的性質を与え得る。特定の実施形態では、核酸は、化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例は、限定されないが、置換基の付加を含む(5'置換基および/または2'置換基;二環式核酸(BNA)を形成するような2つの環原子の架橋;S、N(R)、またはC(R₁)(R₂)(R=H、C₁~C₁₂アルキル、または保護基)によるリボシル環酸素原子の置き換え;およびそれらの組合せを含む)。化学修飾糖の例は、国際公開第2008/101157号、米国特許出願公開第2005/0130923号、および国際公開第2007/134181号において見出すことができ、これらの特許のそれぞれの開示が、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0291】

一部の例では、修飾核酸は、修飾糖または糖類似体を含む。ゆえに、リボースおよびデオキシリボースに加えて、糖部分は、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デ

オキシヘキソース、グルコース、アラビノース、キシロース、リキソース、または糖「類似体」シクロペンチル基であり得る。糖は、ピラノシル形態であってもフラノシル形態であってもよい。糖部分は、リボース、デオキシリボース、アラビノース、または2'-O-アルキルリボースのフラノシドであってもよく、糖は、各複素環塩基に、[アルファ]または[ベータ]アノマー配置で結合している。糖修飾は、以下に限定されないが、2'-アルコキシ-RNA類似体、2'-アミノ-RNA類似体、2'-フルオロ-DNA、および2'-アルコキシまたはアミノ-RNA/DNAキメラを含む。例えば、糖修飾は、2'-O-メチル-ウリジンを含んでも、2'-O-メチル-シチジンを含んでもよい。糖修飾は、2'-O-アルキル置換デオキシリボヌクレオシドおよび2'-O-エチレングリコール様リボヌクレオシドを含む。これらの糖または糖類似体、および各「ヌクレオシド」(そのような糖または類似体が、複素環塩基(核酸塩基)に結合している)の調製が知られている。また、糖修飾をして、他の修飾と組み合わせてもよい。

【0292】

糖部分への修飾として、リボースおよびデオキシリボースの天然の修飾、および非天然の修飾が挙げられる。糖修飾は、以下に限定されないが、2'位置にて以下の修飾：OH；F；O-、S-もしくはN-アルキル；O-、S-もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキルを含み、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換されているか、または置換されていないC₁~C₁₀、アルキルもしくはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルであってもよい。また、2'糖修飾は、以下に限定されないが、-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_nONH₂、および-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂(式中、nおよびmは、1~約10である)を含む。

【0293】

2'位置での他の修飾は、以下に限定されないが：C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、O-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、リポーター基、挿入剤、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を向上させる基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を向上させる基、および類似の性質を有する他の置換基を含む。また、類似の修飾が、3'末端ヌクレオチド上の、または2'-5'連結オリゴヌクレオチド内の糖上の他の位置、特に糖の3'位置、5'末端ヌクレオチドの5'位置にてなされる。また、修飾糖は、CH₂およびS等の架橋環酸素にて修飾を含有するものを含む。また、ヌクレオチド糖類似体は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分等の糖模擬物を有してもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示しており、かつ広範な塩基修飾を詳述かつ記載する多数の米国特許が存在し、例えば、米国特許第4,981,957号；米国特許第5,118,800号；米国特許第5,319,080号；米国特許第5,359,044号；米国特許第5,393,878号；米国特許第5,446,137号；米国特許第5,466,786号；米国特許第5,514,785号；米国特許第5,519,134号；米国特許第5,567,811号；米国特許第5,576,427号；米国特許第5,591,722号；米国特許第5,597,909号；米国特許第5,610,300号；米国特許第5,627,053号；米国特許第5,639,873号；米国特許第5,646,265号；米国特許第5,658,873号；米国特許第5,670,633号；米国特許第4,845,205号；米国特許第5,130,302号；米国特許第5,134,066号；米国特許第5,175,273号；米国特許第5,367,066号；米国特許第5,432,272号；米国特許第5,457,187号；米国特許第5,459,255号；米国特許第5,484,908号；米国特許第5,502,177号；米国特許第5,525,711号；米国特許第5,552,540号；米国特許第5,587,469号；米国特許第5,594,121号；米国特許第5,596,091号；米

10

20

30

40

50

国特許第5,614,617号;米国特許第5,681,941号;および米国特許第5,700,920号がある。これらの特許はそれぞれ、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0294】

修飾糖部分を有する核酸の例として、以下に限定されないが、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-O C_6H_5 および2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含む核酸が挙げられる。また、2'位置での置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-(C₁~C₁₀アルキル)、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)およびO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択することができ、式中、R_mおよびR_nは、それぞれ独立して、H、または置換されたかもしくは置換されていないC₁~C₁₀アルキルである。

10

【0295】

特定の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、1つまたはそれ以上の二環式核酸を含む。特定のそのような実施形態では、二環式核酸は、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子との間に架橋を含む。特定の実施形態では、本明細書で提供される核酸は、1つまたはそれ以上の二環式核酸を含み、その中で架橋は、4'から2'の二環式核酸を含む。そのような4'から2'の二環式核酸の例として、以下に限定されないが、式: 4'-(CH_2)-O-2'(LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-(CH_2)₂-O-2'(ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2'および4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'、ならびにそれらの類似体(米国特許第7,399,845号参照); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'およびその類似体(国際公開第2009/006478号、国際公開第2008/150729号、米国特許出願公開第2004/0171570号、米国特許第7,427,672号、Chattopadhyayaら、J. Org. Chem.、209巻、74号、118~134頁、および国際公開第2008/154401号参照)の1つが挙げられる。また、これらのそれぞれの開示が参照によって本明細書に組み入れられる、例えば: Singhら、Chem. Commun.、1998年、4巻、455~456頁; Koshkinら、Tetrahedron、1998年、54巻、3607~3630頁; Wahlestedtら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、2000年、97巻、5633~5638頁; Kumarら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1998年、8巻、2219~2222頁; Singhら、J. Org. Chem.、1998年、63巻、10035~10039頁; Srivastavaら、J. Am. Chem. Soc.、2007年、129巻(26号)8362~8379頁; Elayadilら、Curr. Opinion Inven. Drugs、2001年、2巻、558-561頁; Braaschら、Chem. Biol.、2001年、8巻、1~7頁; Oramら、Curr. Opinion Mol. Ther.、2001年、3巻、239~243頁; 米国特許第4,849,513号; 米国特許第5,015,733号; 米国特許第5,118,800号; 米国特許第5,118,802号; 米国特許第7,053,207号; 米国特許第6,268,490号; 米国特許第6,770,748号; 米国特許第6,794,499号; 米国特許第7,034,133号; 米国特許第6,525,191号; 米国特許第6,670,461号; および米国特許第7,399,845号; 国際公開第2004/106356号、国際公開第1994/14226号、国際公開第2005/021570号、国際公開第2007/090071号および国際公開第2007/134181号; 米国特許出願公開第2004/0171570号、米国特許出願公開第2007/0287831号および米国特許出願公開第2008/0039618号; 米国仮特許出願第60/989,574号、米国仮特許出願第61/026,995号、米国仮特許出願第61/026,998号、米国仮特許出願第61/056,564号、米国仮特許出願第61/086,231号、米国仮特許出願第61/097,787号および米国仮特許出願第61/099,844号; ならびに国際出願PCT/US2008/064591号、国際出願PCT/US2008/066154号、国際出願PCT/US2008/068922号および国際出

20

30

40

50

願PCT/DK98/00393号参照。

【0296】

特定の実施形態では、核酸は、連結核酸を含む。核酸は、あらゆる核酸間連結を用いて、一緒に連結することができる。核酸間連結基の2つの主要なクラスは、リン原子の有無によって定義される。代表的なリン含有核酸間連結として、以下に限定されないが、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホロアミデートおよびホスホロチオエート ($P=S$) が挙げられる。代表的な非リン含有核酸間連結基として、以下に限定されないが、メチレンメチルイミノ ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$)、チオジエステル ($-O-C(O)-S-$)、チオノカルバメート ($-O-C(O)(NH)-S-$)；シロキサン ($-O-Si(H)_2-O-$)；N, N'-ジメチルヒドラジン ($-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-$) が挙げられる。特定の実施形態では、キラル原子を有する核酸間連結は、ラセミ混合物として、別個の鏡像異性体、例えば、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートとして調製することができる。非天然核酸は、単一の修飾を含有してもよい。非天然核酸は、部分の1つの内部に、または異なる部分間に、複数の修飾を含有してもよい。

10

【0297】

核酸に対する骨格ホスフェート修飾は、以下に限定されないが、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート（架橋または非架橋）、ホスホトリエステル、ホスホロジチオエート、ホスホジチオエートおよびボラノホスフェートを含み、あらゆる組合せで用いることができる。また、他の非ホスフェート結合を用いてもよい。

20

【0298】

一部の実施形態では、骨格修飾（例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合）は、修飾核酸に免疫調節性活性を付与することができ、かつ／またはその安定性をインビボで増強することができる。

【0299】

一部の例では、リン誘導体（または修飾リン酸基）が、糖または糖類似体部分に結合しており、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート等であり得る。修飾ホスフェート結合または非ホスフェート結合を含有する例示的なポリヌクレオチドは、Peyrottesら、1996年、Nucleic Acids Res. 24巻：1841～1848頁；Chaturvediら、1996年、Nucleic Acids Res. 24巻：2318～2323頁；Schultzら（1996年）Nucleic Acids Res. 24巻：2966～2973頁；Matteucci、1997年、「Oligonucleotide Analogs: an Overview」(Oligonucleotides as Therapeutic Agents (ChadwickおよびCardew編) John Wiley and Sons, New York, NY)；Zon、1993年、「Oligonucleoside Phosphorothioates」(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Humana Press, 165～190頁)；Millerら、1971年、JACS 93巻：6657～6665頁；Jagerら、1988年、Biochem. 27巻：7247～7246頁；Nelsonら、1997年、JOC 62巻：7278～7287頁；米国特許第5,453,496号；ならびにMicklefield、2001年、Curr. Med. Chem. 8巻：1157～1179頁において見出すことができ、これらのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

30

40

【0300】

場合によっては、骨格修飾は、ホスホジエステル結合を、代わりの部分、例えばアニオン基、中性基、またはカチオン基で置き換えることを含む。そのような修飾の例として、以下が挙げられる：アニオンヌクレオシド間結合；N3'からP5'のホスホロアミデート

50

修飾；ボラノホスフェートDNA；プロオリゴヌクレオチド；中性ヌクレオシド間結合、例えばメチルホスホネート；アミド連結DNA；メチレン（メチルイミノ）結合；ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合；スルホニル基を含有する骨格；モルフォリノオリゴ；ペプチド核酸（PNA）；および正に帯電するデオキシリボ核グアニジン（DNG）オリゴ（Micklefield、2001年、Current Medicinal Chemistry 8巻：1157～1179頁、その開示は、参照によって本明細書に組み入れられる）。修飾核酸は、1つまたはそれ以上の修飾を含むキメラ骨格または混合骨格、例えば、ホスホジエステル結合およびホスホロチオネート結合の組合せ等のホスフェート結合の組合せを含んでもよい。

【0301】

ホスフェートの代わりの例として、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つもしくはそれ以上の短鎖ヘテロ原子間結合もしくは複素環ヌクレオシド間結合が挙げられる。これらとして、モルフォリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキンドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合N、O、SおよびCH₂構成要素部分を有するその他のものを有するものが挙げられる。多数の米国特許が、これらのタイプのホスフェート置き換えを形成して用いる方法を開示しており、以下に限定されないが、米国特許第5,034,506号；米国特許第5,166,315号；米国特許第5,185,444号；米国特許第5,214,134号；米国特許第5,216,141号；米国特許第5,235,033号；米国特許第5,264,562号；米国特許第5,264,564号；米国特許第5,405,938号；米国特許第5,434,257号；米国特許第5,466,677号；米国特許第5,470,967号；米国特許第5,489,677号；米国特許第5,541,307号；米国特許第5,561,225号；米国特許第5,596,086号；米国特許第5,602,240号；米国特許第5,610,289号；米国特許第5,602,240号；米国特許第5,608,046号；米国特許第5,610,289号；米国特許第5,618,704号；米国特許第5,623,070号；米国特許第5,663,312号；米国特許第5,633,360号；米国特許第5,677,437号；および米国特許第5,677,439号が挙げられ、これらの特許のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。また、ヌクレオチド置換において、ヌクレオチドの糖部分およびホスフェート部分の双方を、例えばアミド型結合（アミノエチルグリシン）（PNA）によって置き換えることができることが理解される。米国特許第5,539,082号；米国特許第5,714,331号；および米国特許第5,719,262号は、PNA分子を形成して用いる方法を教示しており、これらの特許はそれぞれ、参照によって本明細書に組み入れられる。また、Nielsenら、Science、1991年、254巻、1497～1500頁参照。また、他のタイプの分子（コンジュゲート）を、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に連結して、例えば細胞吸収を増強することも可能である。コンジュゲートは、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に化学的に連結することができる。そのようなコンジュゲートは、以下に限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1989年、86巻、6553～6556頁）、コール酸（Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1994年、4巻、1053～1060頁）、チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharanら、Ann. N.Y. Acad. Sci.、1992年、660巻、306～309；Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1993年、3巻、2765～2770頁）、チオコレステロール（Oberhauserら、Nucl. Acids Res.、1992年、20巻、533～538頁）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールもしくは

10

20

30

40

50

ウンデシル残基 (Saison-Behmoarasら、EMSOJ、1991年、10巻、1111～1118頁; Kabanovら、FEBS Lett.、1990年、259巻、327～330頁; Svinarchukら、Biochimie、1993年、75巻、49～54頁)、リン脂質、例えばジヘキサデシル-rac-グリセリンもしくはトリエチルアンモニウム1-ジヘキサデシル-rac-グリセロ-S-H-ホスホネート (Manoharanら、Tetrahedron Lett.、1995年、36巻、3651～3654頁; Sheaら、Nucl. Acids Res.、1990年、18巻、3777～3783頁)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides、1995年、14巻、969～973頁)、アダマンタン酢酸 (Manoharanら、Tetrahedron Lett.、1995年、36巻、3651～3654頁)、パルミチル部分 (Mishraら、Biochem. Biophys. Acta、1995年、1264巻、229～237頁)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノカルボニル-オキシコレステロール部分 (Crookeら、J. Pharmacol. Exp. Ther.、1996年、277巻、923～937頁)を含む。多数の米国特許が、そのようなコンジュゲートの調製を教示しており、以下に限定されないが、米国特許第4,828,979号; 米国特許第4,948,882号; 米国特許第5,218,105号; 米国特許第5,525,465号; 米国特許第5,541,313号; 米国特許第5,545,730号; 米国特許第5,552,538号; 米国特許第5,578,717号; 米国特許第5,580,731号; 米国特許第5,580,731号; 米国特許第5,591,584号; 米国特許第5,109,124号; 米国特許第5,118,802号; 米国特許第5,138,045号; 米国特許第5,414,077号; 米国特許第5,486,603号; 米国特許第5,512,439号; 米国特許第5,578,718号; 米国特許第5,608,046号; 米国特許第4,587,044号; 米国特許第4,605,735号; 米国特許第4,667,025号; 米国特許第4,762,779号; 米国特許第4,789,737号; 米国特許第4,824,941号; 米国特許第4,835,263号; 米国特許第4,876,335号; 米国特許第4,904,582号; 米国特許第4,958,013号; 米国特許第5,082,830号; 米国特許第5,112,963号; 米国特許第5,214,136号; 米国特許第5,082,830号; 米国特許第5,112,963号; 米国特許第5,214,136号; 米国特許第5,245,022号; 米国特許第5,254,469号; 米国特許第5,258,506号; 米国特許第5,262,536号; 米国特許第5,272,250号; 米国特許第5,292,873号; 米国特許第5,317,098号; 米国特許第5,371,241号; 米国特許第5,391,723号; 米国特許第5,416,203号; 米国特許第5,451,463号; 米国特許第5,510,475号; 米国特許第5,512,667号; 米国特許第5,514,785号; 米国特許第5,565,552号; 米国特許第5,567,810号; 米国特許第5,574,142号; 米国特許第5,585,481号; 米国特許第5,587,371号; 米国特許第5,595,726号; 米国特許第5,597,696号; 米国特許第5,599,923号; 米国特許第5,599,928号および米国特許第5,688,941号が挙げられる。これらの参照のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0302】

場合によっては、非天然核酸はさらに、非天然の塩基対を形成する。非天然DNAまたはRNA塩基対(UBP)をインビボ条件下で形成することができる例示的な非天然ヌクレオチドとして、以下に限定されないが、TAT1、dTAT1、5FM、d5FM、TPT3、dTPT3、5SICS、d5SICS、NaM、dNaM、CNMO、dCNMO、およびそれらの組合せが挙げられる。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドは：

10

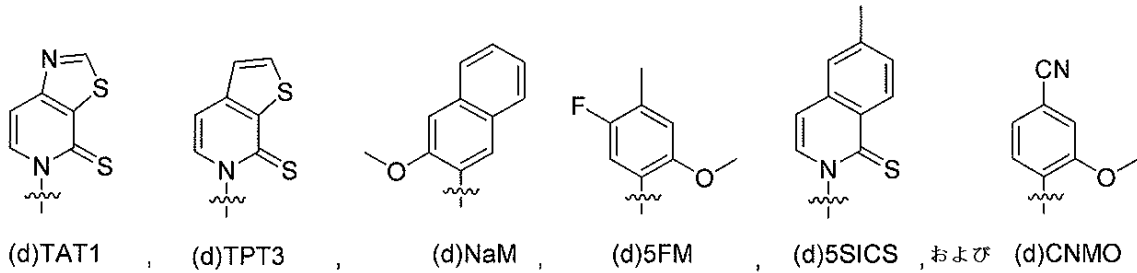
20

30

40

50

【化 8 1】



10

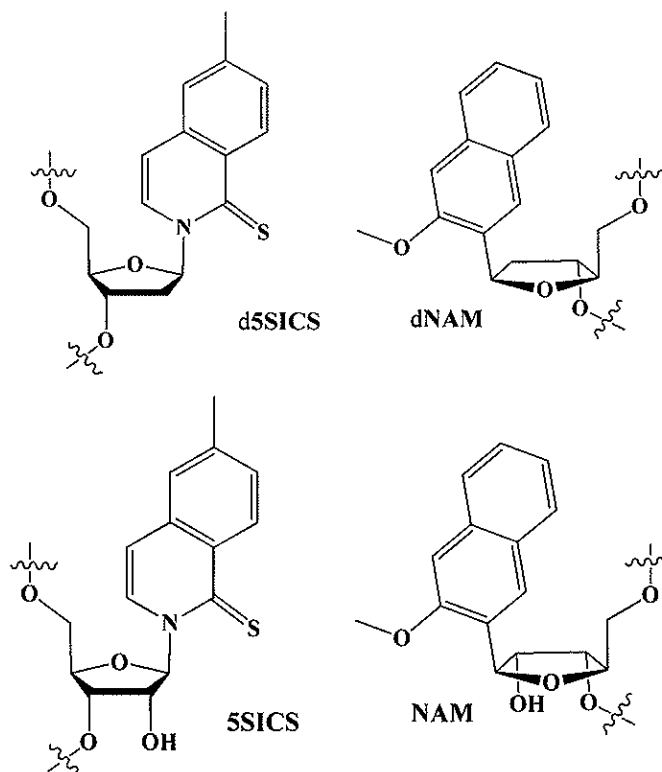
を含む。例示的な非天然塩基対としては、(d) T P T 3 – (d) N a M ; (d) 5 S I C S – (d) N a M ; (d) C N M O – (d) T A T 1 ; (d) N a M – (d) T A T 1 ; (d) C N M O – (d) T P T 3 ; および (d) 5 F M – (d) T A T 1 が挙げられる。

【0303】

本明細書に開示される I L – 2 コンジュゲートを調製するのに用いることができる非天然 U B P を形成することができる非天然ヌクレオチドの他の例を、D i e n ら、J A m C h e m S o c、2018年、140巻：16115～16123頁；F e l d m a n ら、J A m C h e m S o c、2017年、139巻：11427～11433頁；L e d b e t t e r ら、J A m C h e m S o c、2018年、140巻：758～765頁；D h a m i ら、N u c l e i c A c i d s R e s. 2014年、42巻：10235～10244頁；M a l y s h e v ら、N a t u r e、2014年、509巻：385～388頁；B e t z ら、J A m C h e m S o c、2013年、135巻：18637～18643頁；L a v e r g n e ら、J A m C h e m S o c. 2013年、135巻：5408～5419頁；および M a l y s h e v ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、2012年、109巻：12005～12010頁において見出すことができ、これらのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドとして、以下が挙げられる：

20

【化 8 2】



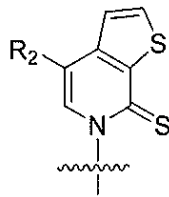
30

40

50

【0304】

一部の実施形態では、本明細書に開示される I L - 2 コンジュゲートを調製するのに用いることができる非天然ヌクレオチドは、式
【化83】



10

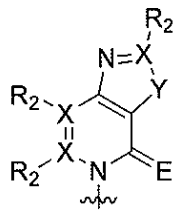
の化合物に由来し得、

式中、 R_2 は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、メトキシ、メタンチオール、メタンセレノール、ハロゲン、シアノ、およびアジドからなる群から選択され；

波線は、リボシルまたは 2' - デオキシリボシルへの結合を示し、リボシル部分または 2' - デオキシリボシル部分の 5' ヒドロキシ基は、遊離形態であり、場合により、モノホスフェート基、ジホスフェート基またはトリホスフェート基に結合されている、または RNA もしくは DNA に、または RNA 類似体もしくは DNA 類似体に含まれる。

【0305】

一部の実施形態では、本明細書に開示される I L - 2 コンジュゲートを調製するのに用いることができる非天然ヌクレオチドは、式
【化84】



の化合物に由来し得、

式中：

各 X は、独立して炭素または窒素であり；

R_2 は、X が窒素である場合に不在であり、X が炭素である場合に存在し、独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、メトキシ、メタンチオール、メタンセレノール、ハロゲン、シアノ、またはアジドであり、

Y は、硫黄、酸素、セレン、または二級アミンであり；

E は、酸素、硫黄、またはセレンであり；ならびに

波線は、リボシル部分、デオキシリボシル部分、もしくはジデオキシリボシル部分またはその類似体への結合点を示し、リボシル部分、デオキシリボシル部分、もしくはジデオキシリボシル部分またはその類似体は、遊離形態であり、モノホスフェート基、ジホスフェート基、トリホスフェート基、 α - チオトリホスフェート基、 β - チオトリホスフェート基、もしくは γ - チオトリホスフェート基に結合され、または RNA もしくは DNA に、または RNA 類似体もしくは DNA 類似体に含まれる。

【0306】

一部の実施形態では、各 X は炭素である。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの X は炭素である。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの X は炭素である。一部の実施形態では、2 つの X は炭素である。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの X は窒素である。一部の実施形態では、1 つの X は窒素である。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの X は窒素である。一部の実施形態では、2 つの X は窒素である。

30

40

50

【0307】

一部の実施形態では、Yは硫黄である。一部の実施形態では、Yは酸素である。一部の実施形態では、Yはセレンである。一部の実施形態では、Yは二級アミンである。

【0308】

一部の実施形態では、Eは硫黄である。一部の実施形態では、Eは酸素である。一部の実施形態では、Eはセレンである。

【0309】

一部の実施形態では、Xが炭素である場合、R₂は存在する。一部の実施形態では、Xが窒素である場合、R₂は不在である。一部の実施形態では、各R₂は、存在する場合、水素である。一部の実施形態では、R₂はアルキル、例えばメチル、エチル、またはプロピルである。一部の実施形態では、R₂はアルケニル、例えば-CH₂=CH₂である。一部の実施形態では、R₂はアルキニル、例えばエチニルである。一部の実施形態では、R₂はメトキシである。一部の実施形態では、R₂はメタンチオールである。一部の実施形態では、R₂はメタンセレンオールである。一部の実施形態では、R₂はハロゲン、例えばクロロ、ブromo、またはフルオロである。一部の実施形態では、R₂はシアノである。一部の実施形態では、R₂はアジドである。

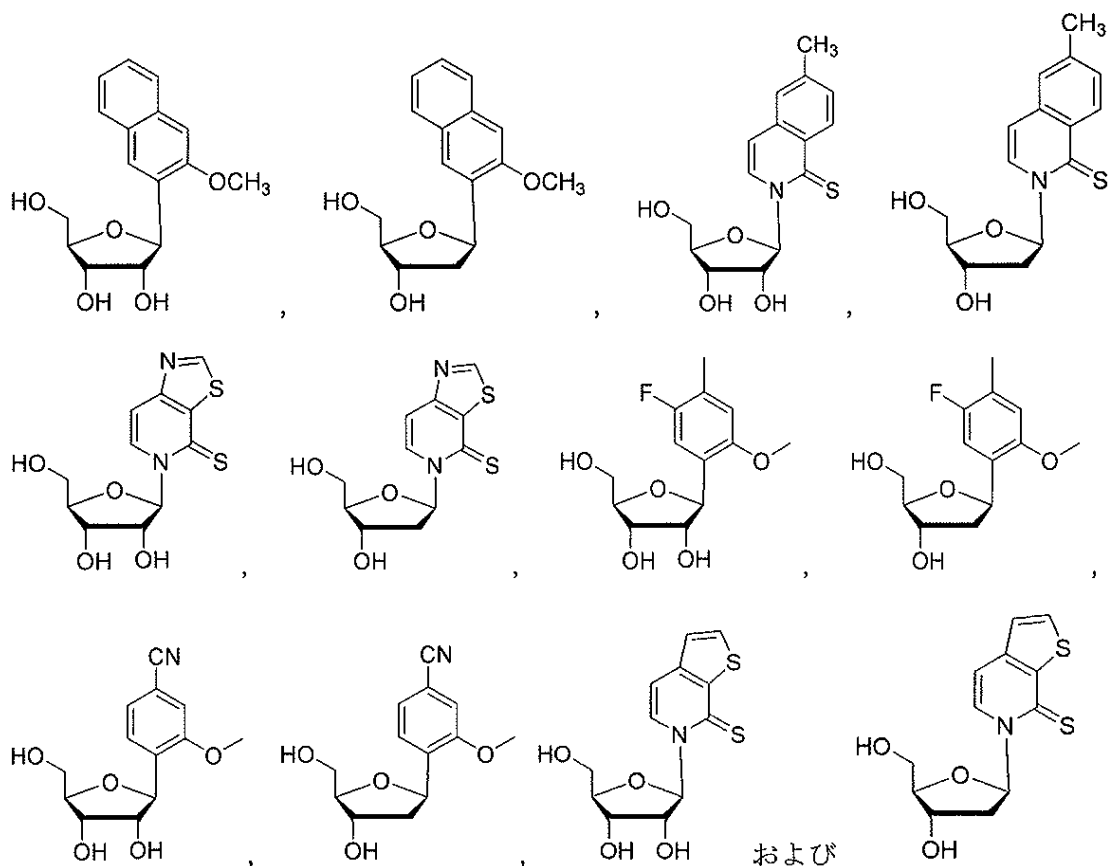
【0310】

一部の実施形態では、Eは硫黄であり、Yは硫黄であり、各Xは独立して炭素または窒素である。一部の実施形態では、Eは硫黄であり、Yは硫黄であり、各Xは炭素である。

【0311】

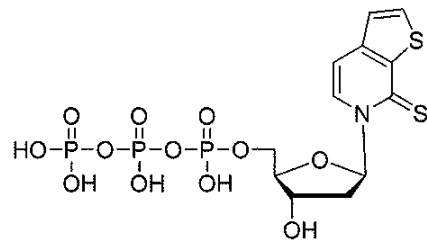
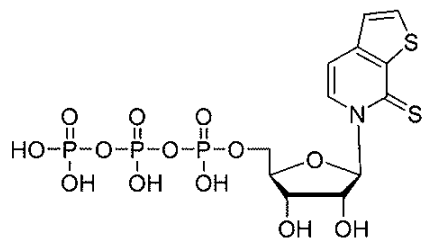
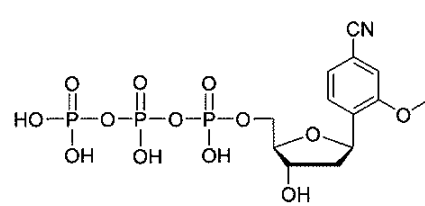
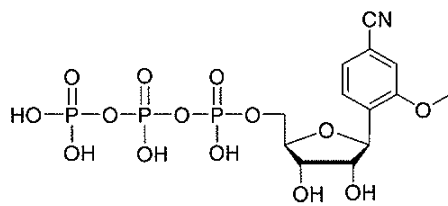
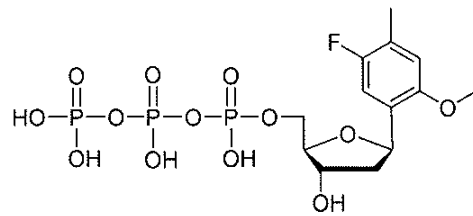
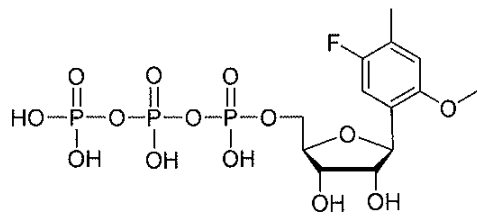
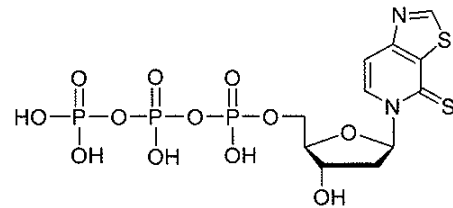
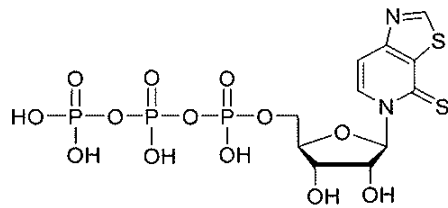
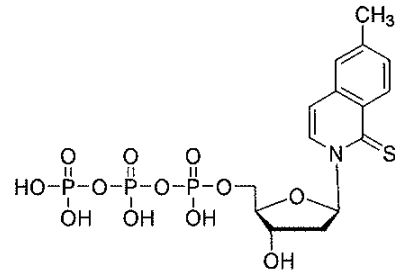
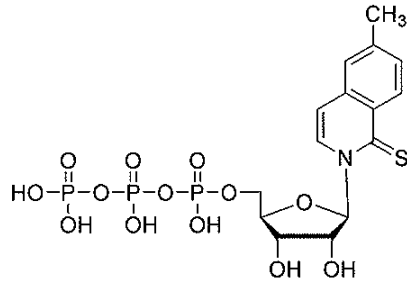
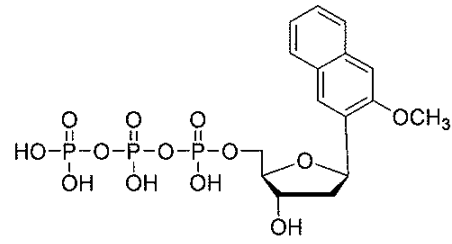
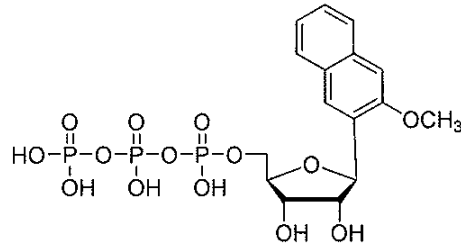
一部の実施形態では、本明細書に開示されるI L-2コンジュゲートを調製するのに用いることができる非天然ヌクレオチドは、

【化85】



に由来し得る。一部の実施形態では、本明細書に開示されるI L-2コンジュゲートを調製するのに用いることができる非天然ヌクレオチドは、

【化 8 6】



および

またはその塩を含む。

【0312】

一部の実施形態では、非天然の塩基対は、Dumasら、「Designing logical codon reassignment—Expanding the chemistry in biology」、Chemical Science、6巻：50～69頁（2015年）に記載される非天然アミノ酸を生成し、その開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0313】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、非天然核酸を含む合成コドンによってサイト

カイン（例えば、ILポリペプチド）に組み込まれる。一部の例では、非天然アミノ酸は、直交する修飾シンセターゼ／tRNA対によってサイトカインに組み込まれる。このような直交した対は、a) 他の内因性アミノ酸の非天然tRNA上への付加、およびb) 非天然アミノ酸の他の内因性tRNA上への付加を最小限にしながら、非天然tRNAに非天然アミノ酸を付加することができる非天然シンセターゼを含む。このような直交した対は、a) 内因性シンセターゼによって他の内因性アミノ酸を付加されることを避けながら、非天然シンセターゼによる付加を受けることが可能なtRNAを含む。一部の実施形態では、このような対は、細菌、酵母、古細菌、またはヒト供給源等の種々の生物から同定される。一部の実施形態では、直交性シンセターゼ／tRNA対は、単一の生物由来の成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンセターゼ／tRNA対は、2つの異なる生物由来の成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンセターゼ／tRNA対は、修飾前に2つの異なるアミノ酸の翻訳を促進する成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾アラニンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾アルギニンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾アスパラギンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾アスパラギン酸シンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾システインシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾グルタミンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾グルタミン酸シンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾アラニングリシンである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾ヒスチジンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾ロイシンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾イソロイシンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾リジンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾メチオニンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾フェニルアラニンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾プロリンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾セリンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾スレオニンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾トリプトファンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾チロシンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾バリンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性シンセターゼは、修飾ホスホセリンシンセターゼである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾アラニンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾アルギニンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾アスパラギンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾アスパラギン酸tRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾システインtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾グルタミンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾グルタミン酸tRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾アラニングリシンである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾ヒスチジンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾ロイシンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾イソロイシンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾リジンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾メチオニンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾フェニルアラニンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾プロリンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾セリンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾スレオニンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾トリプトファンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾チロシンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾バリンtRNAである。一部の実施形態では、直交性tRNAは、修飾ホスホセリンtRNAである。

10

20

30

40

50

【0314】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、アミノアシル (aaRS または RS) - tRNA シンセターゼ - tRNA 対によってサイトカイン (例えば、IL ポリペプチド) に組み込まれる。例示的な aaRS - tRNA 対としては、限定されないが、メタノカルドコックス・ヤナスキイ (*Methanococcus jannaschii*) (Mj-Tyr) aaRS / tRNA 対、大腸菌 TyrRS (Ec-Tyr) / バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) tRNA_{CUA} 対、大腸菌 LeuRS (Ec-Leu) / バチルス・ステアロサーモフィルス tRNA_{CUA} 対、およびピロリシル - tRNA 対が挙げられる。一部の例では、非天然アミノ酸は、Mj-TyrRS / tRNA 対によってサイトカイン (例えば、IL ポリペプチド) に組み込まれる。Mj-TyrRS / tRNA 対によって組み込むことができる例示的な UAA としては、限定されないが、パラ置換フェニルアラニン誘導体、例えば、p-アミノフェニルアラニンおよび p-メチルフェニルアラニン；メタ置換チロシン誘導体、例えば、3-アミノチロシン、3-ニトロチロシン、3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン、および 3-ヨードチロシン；フェニルセレノシステイン；p-ボロノフェニルアラニン；および o-ニトロベンジルチロシンが挙げられる。

10

【0315】

一部の例では、非天然アミノ酸は、Ec-Tyr / tRNA_{CUA} または Ec-Leu / tRNA_{CUA} 対によってサイトカイン (例えば、IL ポリペプチド) に組み込まれる。Ec-Tyr / tRNA_{CUA} または Ec-Leu / tRNA_{CUA} 対によって組み込まれ得る例示的な UAA としては、限定されないが、ベンゾフェノン、ケトン、ヨウ化物、またはアジド置換基を含むフェニルアラニン誘導体；O-プロパルギルチロシン；α-アミノカプリル酸、O-メチルチロシン、O-ニトロベンジルシステイン；および 3- (ナフタレン-2-イルアミノ) - 2-アミノ-プロパン酸が挙げられる。

20

【0316】

一部の例では、非天然アミノ酸は、ピロリシル - tRNA 対によってサイトカイン (例えば、IL ポリペプチド) に組み込まれる。場合によっては、PylRS は、古細菌、例えば、メタン生成古細菌から得られる。場合によっては、PylRS は、メタノサルキナ・バルケリ (*Methanosarcina barkeri*)、メタノサルキナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)、またはメタノサルキナ・アセチボランズ (*Methanosarcina acetivorans*) から得られる。ピロリシル tRNA 対によって組み込まれ得る例示的な UAA としては、限定されないが、アミドおよびカルバメート置換リジン、例えば、2-アミノ-6- ((R)-テトラヒドロフラン-2-カルボキサミド) ヘキサン酸、N-ε-D-プロリル-L-リジンおよび N-ε-シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン；N-ε-アクリロイル-L-リジン；N-ε-[(1-(6-ニトロベンゾ[d][1, 3] ジオキソール-5-イル) エトキシ) カルボニル] -L-リジン；および N-ε-(1-メチルシクロプロ-2-エンカルボキサミド) リジンが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示される IL-2 コンジュゲートは、メタノサルキナ・バルケリ ピロリシル - tRNA シンセターゼ (Mb PylRS) によって非天然アミノ酸、例えば、N6-((2-アジドエトキシ)-カルボニル)-L-リジン (AzK) を選択的に付加される、M. マゼイ tRNA の使用によって調製され得る。他の方法は、当業者に公知であり、例えば、Zhang ら、Nature 2017、551 (7682) : 644-647 に開示されるものであり、その開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

30

40

【0317】

一部の例では、米国特許第 9, 988, 619 号および米国特許第 9, 938, 516 号に開示されるシンセターゼによって、非天然アミノ酸は本明細書に記載されるサイトカイン (例えば、IL ポリペプチド) に組み込まれ、これらの特許のそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0318】

50

本明細書に開示される構築物またはベクターが導入されている宿主細胞は、目的の tRNA、tRNA シンセターゼおよびタンパク質が産生されるような適切な培地中で培養されるか、または維持される。また、培地は、非天然アミノ酸を、目的のタンパク質が非天然アミノ酸を組み込むように含む。また、一部の実施形態では、細菌、植物または藻類由来のヌクレオシド三リン酸トランスポーター (NTT) が、宿主細胞中に存在する。一部の実施形態では、本明細書に開示される IL-2 コンジュゲートは、NTT を発現する宿主細胞の使用によって調製される。一部の実施形態では、宿主細胞に用いられるヌクレオチドヌクレオシド三リン酸トランスポーターは、TpNTT1、TpNTT2、TpNTT3、TpNTT4、TpNTT5、TpNTT6、TpNTT7、TpNTT8 (T. シュードナナ (T. pseudonana))、PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5、PtNTT6 (P. トリコルナータム (P. tricornutum))、GsNTT (ガルジエリア・スルフラリア (Galdieria sulphuraria))、AtNTT1、AtNTT2 (シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana))、CtNTT1、CtNTT2 (クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis))、PamNTT1、PamNTT2 (プロトクラミジア・アモエボフィラ (Protochlamydia amoebophila))、CcNTT (ケディバクター・カリオフィルス (Caedibacter caryophilus))、RpNTT1 (発疹チフスリケッチア (Rickettsia prowazekii)) から選択することができる。一部の実施形態では、NTT は、PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5 および PtNTT6 から選択される。一部の実施形態では、NTT は PtNTT1 である。一部の実施形態では、NTT は PtNTT2 である。一部の実施形態では、NTT は PtNTT3 である。一部の実施形態では、NTT は PtNTT4 である。一部の実施形態では、NTT は PtNTT5 である。一部の実施形態では、NTT は PtNTT6 である。用いることができる他の NTT が、Zhang ら、Nature 2017 年、551 巻 (7682 号) : 644~647 頁; Malyshev ら、Nature 2014 年 (509 巻 (7500 号))、385~388 頁; および Zhang ら、Proc Natl Acad Sci USA、2017 年、114 巻 : 1317~1322 頁において開示されており、そのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0319】

直交性 tRNA シンセターゼ / tRNA 対は、tRNA に非天然アミノ酸を付加して、非天然アミノ酸をポリペプチド鎖中にコドンに応じて組み込む。例示的な aaRS-tRNA 対として、以下に限定されないが、メタノコッカス・ヤンナスキイ (Methanococcus jannaschii) (Mj-Tyr) aaRS / tRNA 対、大腸菌 (E. coli) TyrRS (Ec-Tyr) / B. ステアロサーモフィルス (B. stearoothermophilus) tRNA_{CUA} 対、大腸菌 (E. coli) LeuRS (Ec-Leu) / B. ステアロサーモフィルス (B. stearoothermophilus) tRNA_{CUA} 対およびピロリジル-tRNA 対が挙げられる。本開示に従って用いることができる他の aaRS-tRNA 対として、Feldman ら、J Am Chem Soc.、2018 年、140 巻 : 1447~1454 頁; および Zhang ら、Proc Natl Acad Sci USA、2017 年、114 巻 : 1317~1322 頁に記載される、M. マゼイ (M. mazei) に由来するものが挙げられ、そのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0320】

一部の実施形態では、提供されるのは、本明細書に開示される IL-2 コンジュゲートを、NTT および tRNA シンセターゼを発現する細胞系において調製する方法である。本明細書に記載される一部の実施形態では、NTT は、PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5 および PtNTT6 から選択され、tRNA シンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (Methanococcus jannaschii)、大腸菌 (E. coli) TyrRS (Ec-Tyr) / B. ステアロサ

ーモフィルス (*B. stearothermophilus*) および *M. マゼイ* (*M. mazei*) から選択される。一部の実施形態では、NTTはPtNTT1であり、tRNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT2であり、tRNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT3であり、tRNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) および *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT3であり、tRNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT4であり、RNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT5であり、tRNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。一部の実施形態では、NTTはPtNTT6であり、RNAシンセターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ (*Methanococcus jannaschii*)、大腸菌 (*E. coli*) TyrRS (*Ec-Tyr*) / *B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) または *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来する。

【0321】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートは、(a)ヌクレオチド三リン酸トランスポーターPtNTT2 (全長タンパク質の最初の65アミノ酸残基が欠失している切断されたバリエーションを含む)、(b)所望のアミノ酸配列を有するIL-2バリエーションをコードし、かつ、N6-((2-アジドエトキシ)-カルボニル)-L-リジン (AzK) 等の非天然アミノ酸が組み込まれることとなる所望の位置にてコドンを提供するように、第1の非天然ヌクレオチドおよび第2の非天然ヌクレオチドを含む非天然の塩基対を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを含むプラスミド、(c) *M. マゼイ* (*M. mazei*) に由来するtRNAをコードし、かつ、天然の配列の代わりに、認識されるアンチコドン (IL-2バリエーションのコドンに) 提供するように非天然ヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに (d) tRNAをコードする同じプラスミドであっても異なるプラスミドであってもよい、*M. バルケリ* (*M. barkeri*) 由来ピロリジン-tRNAシンセターゼ (*Mb PyLRS*) をコードするプラスミドを含む、大腸菌 (*E. coli*) 等の細胞内で調製することができる。一部の実施形態では、細胞はさらに、1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボ三リン酸が補充される。一部の実施形態では、細胞はさらに、1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むリボ三リン酸が補充される。一部の実施形態では、細胞はさらに、1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸、例えばN6-((2-アジドエトキシ)-カルボニル)-L-リジン (AzK) が補充される。一部の実施形態では、所望のIL-2バリエーションのアミノ酸配列をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドは、配列番号3を有するタンパク質をコードする配列の、例えば位

10

20

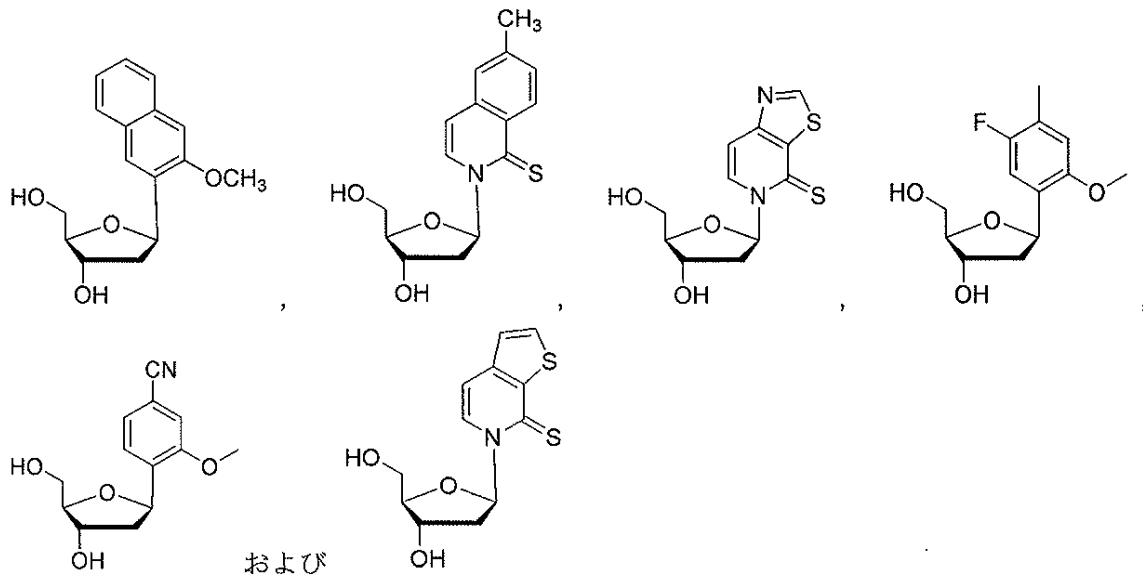
30

40

50

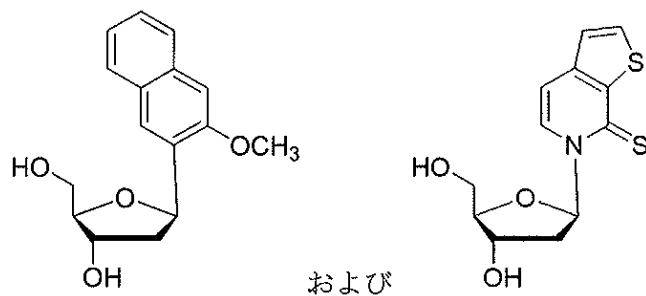
置 3 4、3 7、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、6 1、6 4、6 8、もしくは 7 1 にて、
 または配列番号 4 を有するタンパク質をコードする配列の位置 3 5、3 8、4 1、4 2、
 4 3、4 5、6 2、6 5、6 9 もしくは 7 2 にてコドン A X C を含有し、X は、非天然ヌ
 クレオチドである。一部の実施形態では、細胞はさらに、タンパク質発現プラスミドであ
 っても別のプラスミドであってもよいプラスミドを含み、これは、天然の配列の代わりに
 、A X C マッチングアンチコドン G Y T を含む M. マゼイ (M. m a z e i) 由来の直交
 性 t R N A 遺伝子をコードし、Y は、相補的である非天然ヌクレオチドであり、コドン内
 の非天然ヌクレオチドと同じであっても異なってもよい。一部の実施形態では、コドン内
 の非天然ヌクレオチドは、アンチコドン内の非天然ヌクレオチドと異なり、かつ相補的で
 ある。一部の実施形態では、コドン内の非天然ヌクレオチドは、アンチコドン内の非天然
 ヌクレオチドと同じである。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド内の非天然
 の塩基対を含む第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドは、

【化 8 7】



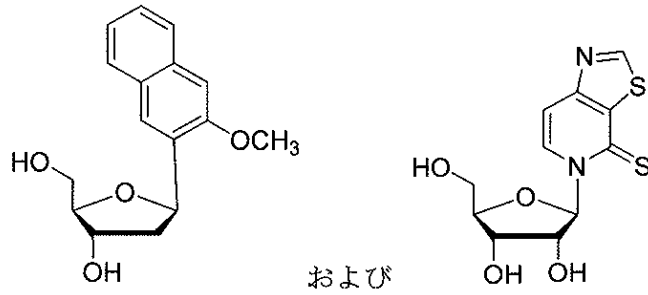
に由来し得る。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド内の非天然の塩基対を含
 む第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドは、

【化 8 8】



に由来し得る。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド内の非天然の塩基対を含
 む第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドは、

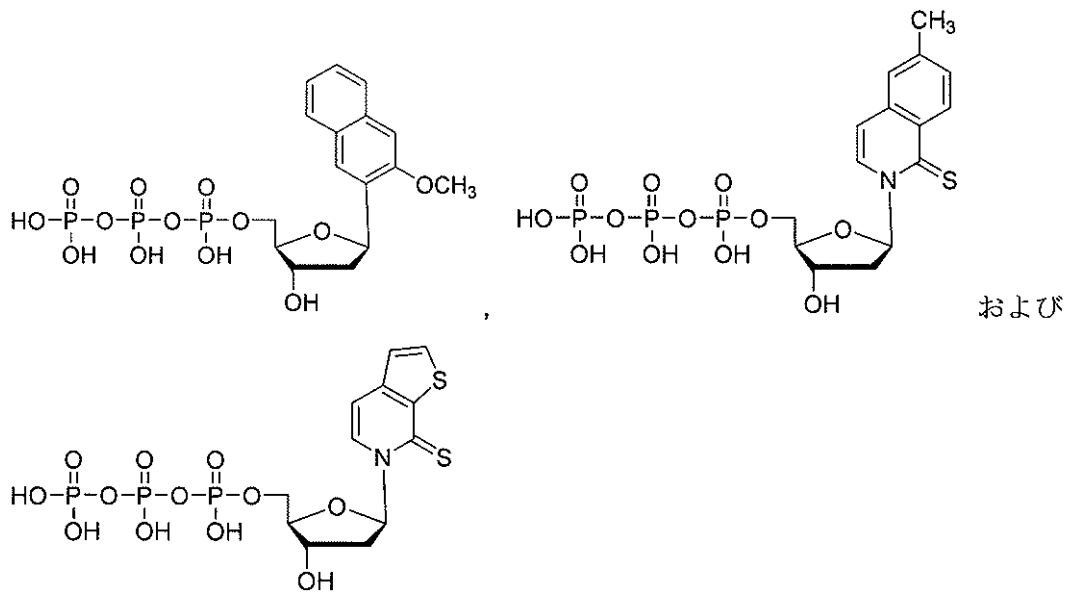
【化 8 9】



10

に由来し得る。一部の実施形態において、第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドのトリホスフェートは、

【化 9 0】

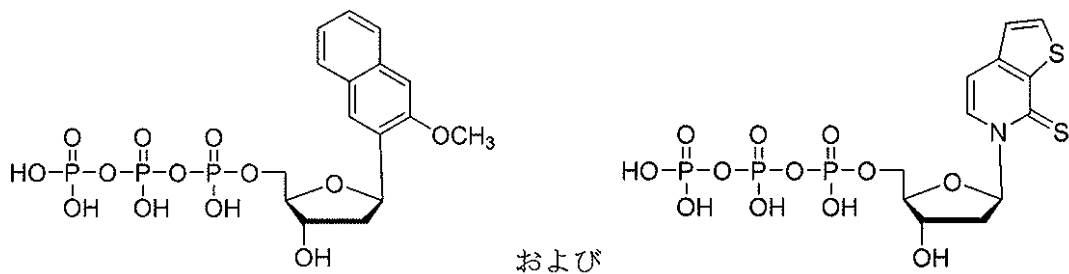


20

30

またはそれらの塩を含む。一部の実施形態において、第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドのトリホスフェートは、

【化 9 1】

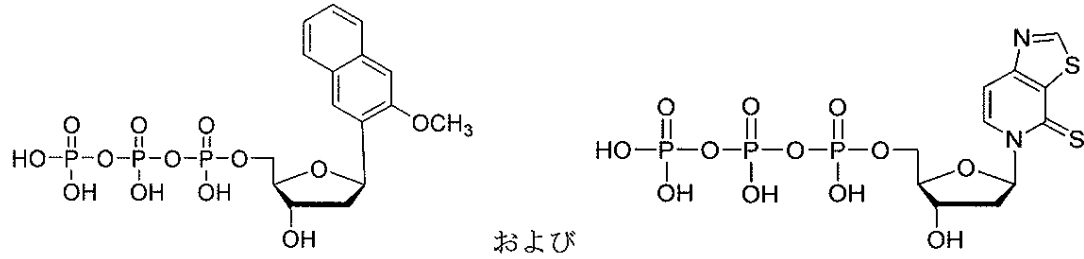


40

またはそれらの塩を含む。一部の実施形態において、第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドのトリホスフェートは、

50

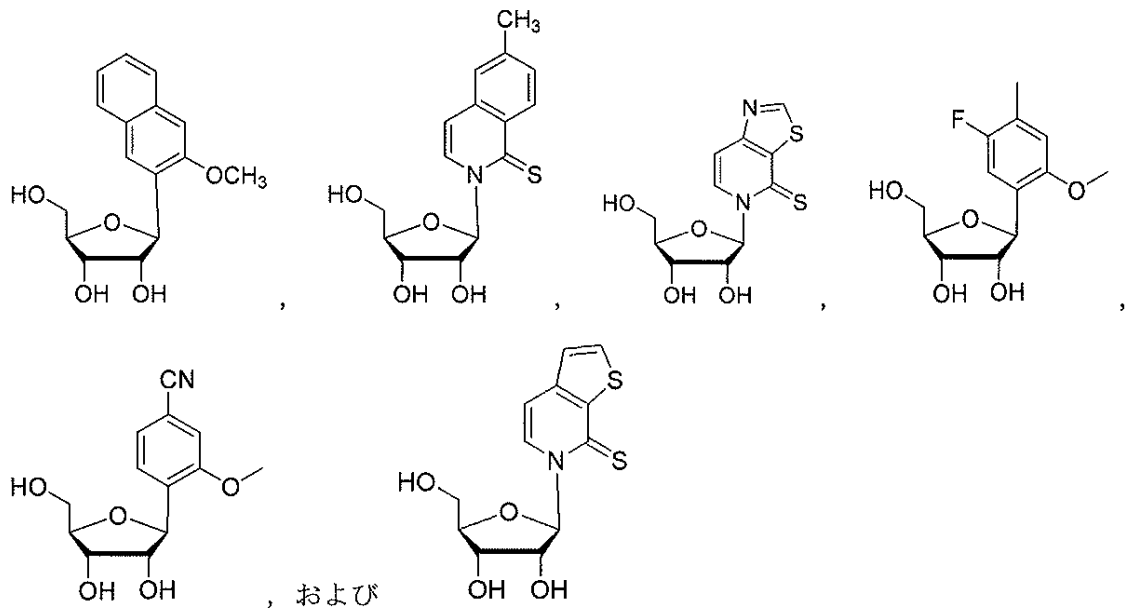
【化 9 2】



10

またはそれらの塩を含む。一部の実施形態では、第 1 の非天然ヌクレオチドおよび第 2 の非天然ヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチドに由来する mRNA は、

【化 9 3】



20

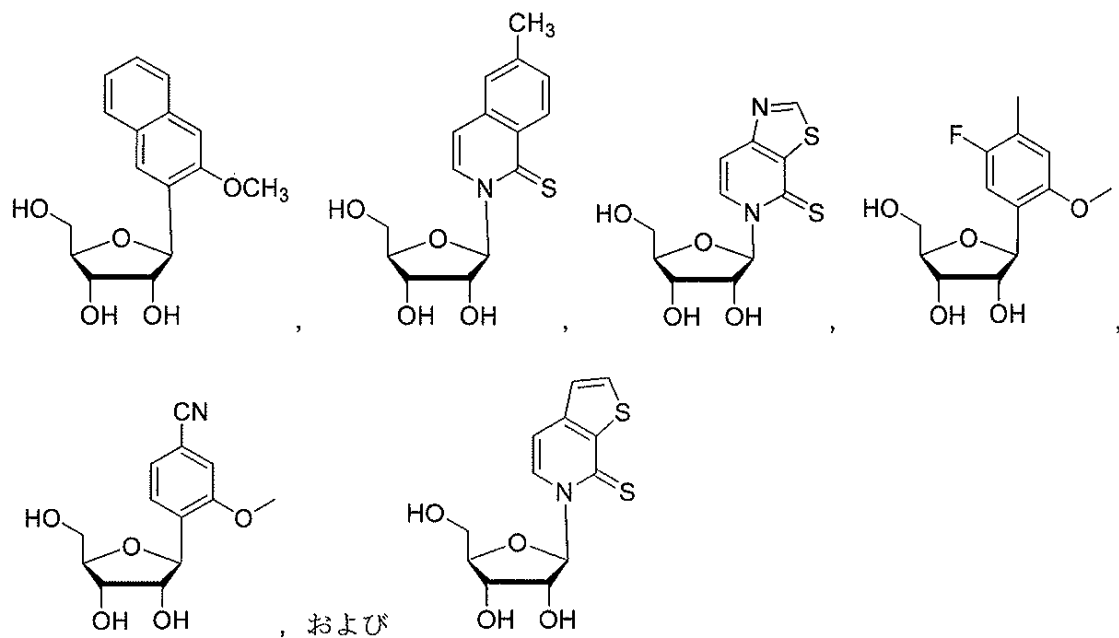
30

に由来する非天然ヌクレオチドを含むコドンを含み得る。一部の実施形態では、M. マゼイ (M. m a z e i) tRNA は、mRNA の非天然ヌクレオチドを含むコドンを認識する非天然ヌクレオチドを含むアンチコドンを含み得る。M. マゼイ (M. m a z e i) tRNA 内のアンチコдонは、

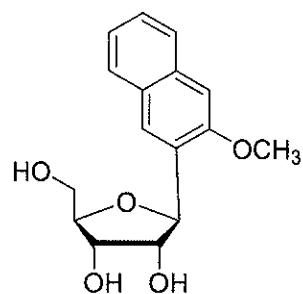
40

50

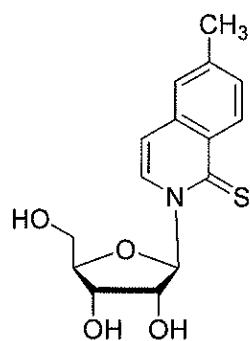
【化 9 4】



に由来する非天然ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 9 5】

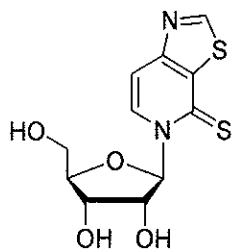


に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 9 6】



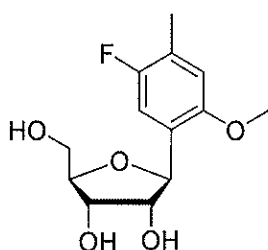
に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、

【化 9 7】



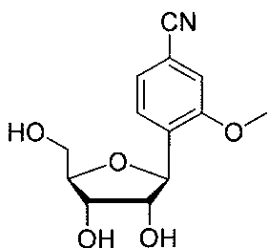
10

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 9 8】



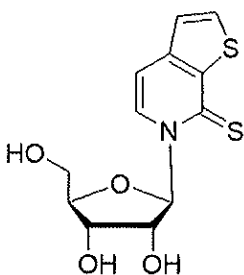
20

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 9 9】



30

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 1 0 0】

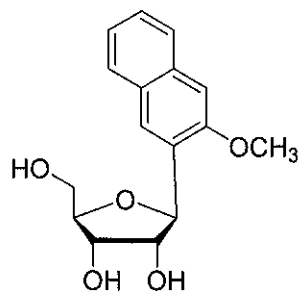


40

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、tRNAは、

50

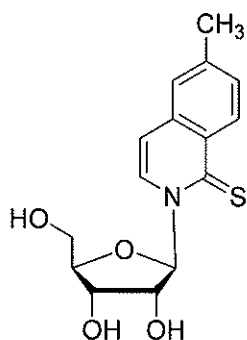
【化 1 0 1】



10

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $tRNA$ は、

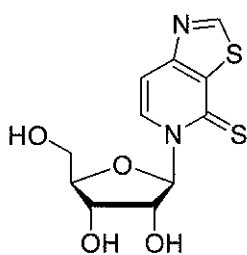
【化 1 0 2】



20

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $tRNA$ は、

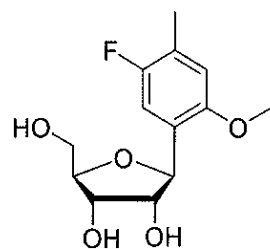
【化 1 0 3】



30

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $tRNA$ は、

【化 1 0 4】

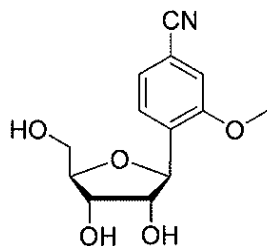


40

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $tRNA$ は、

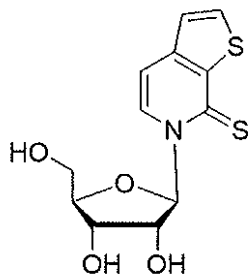
50

【化 1 0 5】



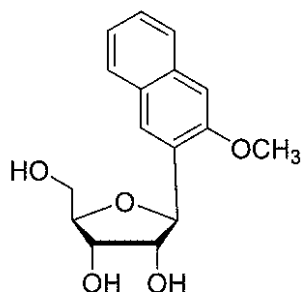
に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、tRNAは、
【化 1 0 6】

10



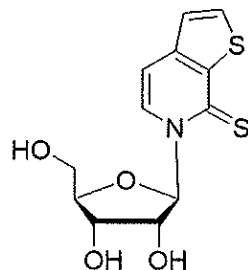
20

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 1 0 7】



30

に由来する非天然ヌクレオチドを含み、tRNAは、
【化 1 0 8】

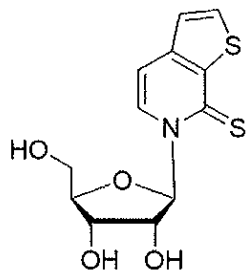


40

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、

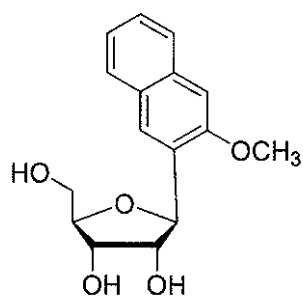
50

【化 1 0 9】



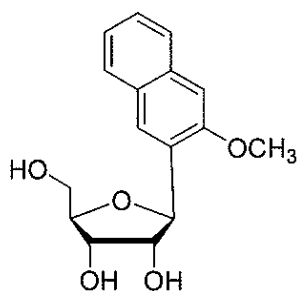
10

に由来する非天然ヌクレオチドを含み、tRNAは、
【化 1 1 0】



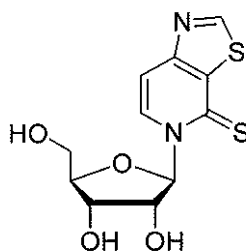
20

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、
【化 1 1 1】



30

に由来する非天然ヌクレオチドを含み、tRNAは、
【化 1 1 2】

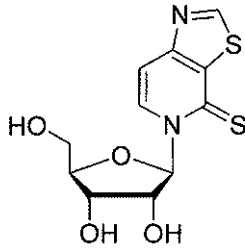


40

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、mRNAは、

50

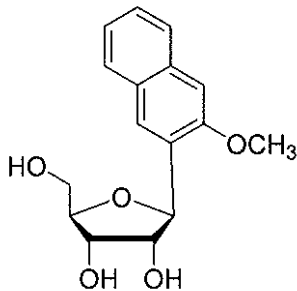
【化 1 1 3】



10

に由来する非天然ヌクレオチドを含み、tRNAは、

【化 1 1 4】



20

に由来する非天然ヌクレオチドを含む。宿主細胞は、適切な栄養素を含有する培地中で培養され、(a) コドンを含むサイトカイン遺伝子をコードするプラスミドの複製に必須である1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボヌクレオシドのトリホスフェート、(b) (i) サイトカインのコード配列に対応しており、かつ1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むコドンを含むmRNA、および(ii) 1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むアンチコドンを含むtRNAの転写に必須の1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むリボヌクレオシドのトリホスフェート、ならびに(c) 目的のサイトカインのポリペプチド配列中に組み込まれることとなる非天然アミノ酸が補充される。続いて、宿主細胞は、目的のタンパク質の発現を可能にする条件下で維持される。

30

【0 3 2 2】

発現される、結果として生じるA z K含有タンパク質は、当業者に知られている方法によって精製することができ、その後、当業者に知られている条件の下で、本明細書に開示される所望の平均分子量を有するPEG鎖を含むDBCO等のアルキンと反応させて、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを与えることができる。他の方法が当業者に知られており、例えば、Zhangら、Nature 2017年、551巻(7682号)：644～647頁；国際公開第2015157555号；国際公開第2015021432号；国際公開第2016115168号；国際公開第2017106767号；国際公開第2017223528号；国際公開第2019014262号；国際公開第2019014267号；国際公開第2019028419号；および国際公開第2019/028425号に開示されるものがあり、これらのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

40

【0 3 2 3】

発現される、1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸、例えばA z kを含む、結果として生じるタンパク質は、当業者に知られている方法によって精製することができ、その後、当業者に知られている条件の下で、本明細書に開示される所望の平均分子量を有するPEG鎖を含むDBCO等のアルキンと反応させて、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートを与えることができる。他の方法が当業者に知られており、例えば、Zhangら、Nature 2017年、551巻(7682号)：644～647頁；国際公開第

50

2015157555号；国際公開第2015021432号；国際公開第2016115168号；国際公開第2017106767号；国際公開第2017223528号；国際公開第2019014262号；国際公開第2019014267号；国際公開第2019028419号；および国際公開第2019/028425号に開示されるものがあり、これらのそれぞれの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0324】

これ以外にも、非天然アミノ酸を含むサイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドは、tRNAおよびアミノアシルtRNAシンセターゼを含み、1つまたはそれ以上のインフレイム直交性（終止）コドンを含む、目的の核酸配列を含む、本明細書に記載される核酸構築物を宿主細胞中に導入することによって調製される。宿主細胞は、適切な栄養素を含有する培地中で培養され、（a）新しいコドンおよびアンチコドンを含むサイトカイン遺伝子をコードするプラスミドの複製に必要とされる1つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボヌクレオシドのトリホスフェート、（b）（i）コドンを含むサイトカイン配列、および（ii）アンチコドンを含む直交性tRNAに対応するmRNAの転写に必要とされるリボヌクレオシドのトリホスフェート、ならびに（c）非天然アミノ酸が補充される。続いて、宿主細胞は、目的のタンパク質の発現を可能にする条件下で維持される。非天然アミノ酸は、ポリペプチド鎖中に非天然コドンに応じて組み込まれる。例えば、1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸は、サイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチド中に組み込まれる。これ以外にも、2つまたはそれ以上の非天然アミノ酸を、タンパク質内の2つまたはそれ以上の部位にてサイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチド中に組み込んでよい。

【0325】

非天然アミノ酸を組み込んでいるサイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドが宿主細胞内に産生されると、そこから、酵素的溶解、化学的溶解、および／または浸透圧溶解、ならびに物理的破壊が挙げられる、当技術分野において知られている種々の技術によって抽出することができる。サイトカイン（例えばIL-2）ポリペプチドは、当技術分野において知られている標準的な技術、例えば分取イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、または当業者に知られている他のあらゆる適切な技術によって精製することができる。

【0326】

適切な宿主細胞として、細菌細胞（例えば、大腸菌（*E. coli*）、BL21（DE3））が挙げられるが、最も適切には、宿主細胞は、真核細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、ドロソフィラ・メラノガスター（*Drosophila melanogaster*）等のショウジョウバエ（*Drosophila*）属）、酵母細胞、線虫（例えばC. エレガンス（*C. elegans*））、マウス（例えばハツカネズミ（*Mus musculus*））、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞、ヒト293T細胞、HeLa細胞、NIH 3T3細胞、およびマウス赤白血病（MEL）細胞）、ヒト細胞、または他の真核細胞である。他の適切な宿主細胞が、当業者に知られている。適切には、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞または昆虫細胞である。一部の実施形態では、適切な宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）を含む。

【0327】

本発明の実施形態において通常用いることができる他の適切な宿主細胞は、実施例のセクションに述べられているものである。ベクターDNAは、従来の形質転換技術または形質移入技術を介して、宿主細胞中に導入することができる。本明細書で使用される場合、用語「形質転換」および「形質移入」は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈降、DEAE-デキストラン媒介形質移入、リポフェクションまたはエレクトロポレーションが挙げられる、外来の核酸分子（例えばDNA）を宿主細胞中に導入する種々の十分に認識された技術に言及することが意図される。宿主細胞を形質転換するか、または形質移入するのに適した方法が、当技術分野において周知である。

【0328】

細胞株を生じさせる場合、通常、安定した細胞株が調製されることが好ましい。例えば哺乳動物細胞の安定した形質移入のために、用いられる発現ベクターおよび形質移入技術に応じて、僅かな細胞しか、そのゲノム中に外来DNAを組み込むことができないことが知られている。これらの組み込み体を識別して選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性について）をコードする遺伝子が、通常、目的の遺伝子と共に、宿主細胞中に導入される。好ましい選択マーカーとして、薬物、例えば、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートに対する耐性を付与するものが挙げられる。同じベクター上に選択マーカーをコードする核酸分子を宿主細胞中に導入することもできるし、別のベクター上に選択マーカーをコードする核酸分子を導入することもできる。導入された核酸分子が安定して形質移入された細胞は、薬物選択によって識別することができる（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残ることとなる一方、他の細胞は死亡する）。

10

【0329】

一実施形態では、本明細書に記載される構築物は、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。安定した組み込みの利点は、個々の細胞間または個々のクローン間で、均一性が達成されるというものである。別の利点は、最も良いプロデューサの選択を実行することができるというものである。したがって、安定した細胞株を生じさせることが所望される。別の実施形態では、本明細書に記載される構築物は、宿主細胞中に形質移入される。宿主細胞中に構築物を形質移入する利点は、タンパク質の収量を最大にすることができるというものである。一態様において、本明細書に記載される核酸構築物またはベクターを含む細胞が記載される。

20

【0330】

追加の薬剤

一部の実施形態では、それを必要とする対象において増殖性疾患または状態を治療する方法であって、本明細書に記載される治療有効量のサイトカインコンジュゲート（例えば、IL-2コンジュゲート）を対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、本明細書に記載される治療有効量のサイトカインコンジュゲート（例えば、IL-2コンジュゲート）を、1つまたはそれ以上の追加の薬剤と併用して対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、本明細書に記載される治療有効量のサイトカインコンジュゲート（例えば、IL-2コンジュゲート）を、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤と併用して対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。

30

【0331】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-1阻害剤から選択される1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤を含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ（GSK）、PDR001（Novartis）、MGA012（Macrogenics/Incyte）、GLS-010（Arcus/Wuxi）、AGEN2024（Agenus）、セトレリマブ（Janssen）、ABBV-181（Abbvie）、AMG-404（Amgen）、BI-754091（Boehringer Ingelheim）、CC-90006（Celgene）、JTX-4014（Jounce）、PF-06801591（Pfizer）、およびゲノリムズマブ（Apollomics/Genor BioPharma）から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペンブロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ニボルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、センプリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ランブ

40

50

ロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、AMP-224である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、シンチリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、トリパリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、カムレリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、チスレリズマブである。

【0332】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-L1阻害剤から選択される免疫チェックポイント阻害剤を含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブ、ASC22 (Alphamab/Asclethis)、CX-072 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、コシベリマブ (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte)、およびTG-1501 (TG Therapeutics) から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アベルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、デュルバルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリマブ、イピリムマブ、およびAGEN-1884 (Agenus) から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、イピリムマブである。

【0333】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、CTLA-4阻害剤から選択される免疫チェックポイント阻害剤を含む。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリマブおよびイピリムマブから選択される。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリマブである。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブである。

【0334】

治療の方法

それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、有効量の(a)本明細書に記載されるIL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の追加の薬剤を対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、それを必要とする対象においてがんを治療する方法であって、有効量の(a)本明細書に記載されるIL-2コンジュゲート、および(b)1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。

【0335】

がんの種類

対象におけるがんを治療する方法であって、本明細書に記載の有効量のIL-2コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する工程を含む、前記方法が本明細書に記載される。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象におけるがんは、腎細胞癌(RCC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)、古典的なホジキンリンパ腫(cHL)、原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫(PMBCL)、尿路上皮癌、マイクロサテライト不安定性がん、マイクロサテライト安定性がん、胃がん、子宮頸がん、肝細胞癌(HCC)、メルケル細胞癌(MCC)、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、食道がん、グリア芽細胞腫、中皮腫、乳がん、三種陰性乳がん、前立腺がん、去勢抵抗性前立腺がん、転移性去勢抵抗性前立腺がん、またはDNAダメージ応答(DDR)欠損を有する転移性去勢抵抗性前立腺がん、膀胱がん、卵巣がん、中程度から軽度の変異性の腫瘍負荷の腫瘍、皮膚扁平上皮細胞癌(CSCC)、扁平上皮細胞皮膚がん(SCSC)、低度PD-L1発現から非発現の腫瘍、その原発性解剖学

的起源部位を超えて肝臓およびCNSに全身的に播種された腫瘍、ならびにびまん性大細胞型B細胞リンパ腫から選択される。

【0336】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象におけるがんは、腎細胞癌(RCC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、尿路上皮癌、黒色腫、メルケル細胞癌(MCC)、および頭頸部の扁平上皮がん(HNSCC)から選択される。1つの実施形態では、がんは腎細胞癌(RCC)である。1つの実施形態では、がんは非小細胞肺癌(NSCLC)である。1つの実施形態では、がんは尿路上皮癌である。1つの実施形態では、がんは黒色腫である。1つの実施形態では、がんはメルケル細胞癌(MCC)である。1つの実施形態では、がんは頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)である。

10

【0337】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤が、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤を含む、本明細書に記載される方法が提供される。

【0338】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、PD-L2阻害剤、CTLA-4阻害剤、OX40作動薬、および4-1BB作動薬からなる群から選択される。

【0339】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(Macrogenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、セトレリマブ(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)、およびゲノリムズマブ(Apollomics/Genor Biopharma)から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペンブロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ニボルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、セミプリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ランブロリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、AMP-224である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、シンチリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、トリパリマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、カムレリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、チスレリズマブである。

20

30

【0340】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブ、ASC22(Alphamab/Ascletis)、CX-072(Cytomx)、CS1001(Cstone)、コシベリマブ(Checkpoint Therapeutics)、INCB86550(Incyte)、およびTG-1501(TG Therapeutics)から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アベルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、デュルバルマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリムマブ、イピリムマブ、およびAGEN-1884(Agenus)から選択さ

40

50

れる。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリムマブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、イピリムマブである。

【0341】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブおよびイピリムマブから選択される。一部の実施形態では、TLA-4阻害剤はトレメリムマブである。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤はイピリムマブである。

【0342】

一部の実施形態では、がんは固形腫瘍の形態にある。一部の実施形態では、がんは液体腫瘍の形態にある。

【0343】

一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートが対象に投与された後、1つまたはそれ以上の追加の薬剤が対象に投与される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤が対象に投与された後、IL-2コンジュゲートが対象に投与される。一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤が、対象に同時に投与される。

【0344】

一部の実施形態では、方法は、1つまたはそれ以上のチェックポイント阻害剤に付加して、治療有効量の1つまたはそれ以上の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)経路または哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)阻害剤を対象に投与する工程をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤が対象に投与される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤は、血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)、および抗VEGFモノクローナル抗体からなる群から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤は、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIから選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、カボザンチニブ、アキシチニブ、パゾパニブ、スニチニブ、またはソラフェニブからなる群から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、カボザンチニブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、アキシチニブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、パゾパニブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、スニチニブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、ソラフェニブである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤は、1つまたはそれ以上の抗VEGFモノクローナル抗体から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の抗VEGFモノクローナル抗体は、ベバシズマブである。

【0345】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤が、ラパマイシン、エベロリムス、テムシロリムス、リダホロリムス、およびデフォロリムスからなる群から選択される。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤は、ラパマイシンである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤は、エベロリムスである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤は、テムシロリムスである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤は、リダホロリムスである。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上のmTOR阻害剤は、デフォロリムスである。一部の実施形態では、対象におけるがんは、腎細胞癌(RCC)である。

【0346】

一部の実施形態では、方法は、1つまたはそれ以上のチェックポイント阻害剤に付加して、治療有効量の1つまたはそれ以上のポリ-ADPリボースポリメラーゼ(PARP)阻害剤を対象に投与する工程をさらに含む。一部の実施形態では、PARP阻害剤は、オラパリブ、ニラパリブ、ルカパリブ、タラゾパリブ、ベリパリブ、CEP-9722、お

10

20

30

40

50

よび E 7 0 1 6 からなる群より選択される。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、オラパリブである。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、ニラパリブである。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、ルカパリブである。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、タラゾパリブである。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、ベリパリブである。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、CEP-9722 である。一部の実施形態では、PARP 阻害剤は、E 7 0 1 6 である。

【0347】

一部の実施形態では、方法は、1つまたはそれ以上のチェックポイント阻害剤に付加して、治療有効量の非ステロイド系抗アンドロゲン物質化合物 (NSAA) を対象に投与する工程をさらに含む。一部の実施形態では、NSAA は、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、トピルタミド、アパルタミド、またはエンザルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はフルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はニルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はビカルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はトピルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はアパルタミドである。一部の実施形態では、NSAA はエンザルタミドである。

10

【0348】

一部の実施形態では、方法は、1つまたはそれ以上のチェックポイント阻害剤に付加して、治療有効量の1つまたはそれ以上のポリ-ADP リボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤および非ステロイド系抗アンドロゲン物質化合物 (NSAA) を対象に投与する工程をさらに含むが、ただし PARP 阻害剤および NSAA は、上記したものから独立に選択される場合もある。

20

【0349】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、1つまたはそれ以上のチェックポイント阻害剤に付加して、1つまたはそれ以上の化学療法剤をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の化学療法剤は、1つまたはそれ以上の白金に基づく化学療法剤を含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよびペメトレキセドを含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよびナノ粒子アルブミン結合パクリタキセルを含む。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよびドセタキセルを含む。一部の実施形態では、対象内におけるがんは非小細胞肺癌 (NSCLC) である。

30

【0350】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、1つまたはそれ以上の化学療法剤である。一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の化学療法剤は、1つまたはそれ以上の白金に基づく化学療法剤を含む。一部の実施形態では、対象は、IL-2 コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤を投与する前に、ヒトパピローマウイルス (HPV) について陽性であると検査で判定されている。一部の実施形態では、対象におけるがんは頭頸部の扁平上皮がん (HNSCC) である。一部の実施形態では、方法は、対象をヒトパピローマウイルスについて陽性 (HPV+) であると検査で判定する工程、その後に IL-2 コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤を投与する工程をさらに含む。

40

【0351】

投与

一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤を投与した後に、対象は、固形腫瘍における免疫関連の応答評価基準 (iRECIST) により測定されるような応答を経験する。

【0352】

一部の実施形態では、応答は、完全応答、部分応答、または安定疾患である。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、静脈内、皮下、筋肉内、脳内、鼻腔内、動脈内、関節内、皮内、硝子体内、骨髄内輸液、腹腔内、または髄腔内投与により、対象に投与される。一部の実施形態では、IL-2 コンジュゲートは、静脈内、皮下、または筋肉内

50

投与により対象に投与される。一部の実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートは、静脈内投与により対象に投与される。一部の実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートは、皮下投与により対象に投与される。一部の実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートは、筋肉内投与により対象に投与される。

【０３５３】

一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、５週間に１回、６週間に１回、７週間に１回、８週間に１回、９週間に１回、１０週間に１回、１１週間に１回、１２週間に１回、１３週間に１回、１４週間に１回、１５週間に１回、１６週間に１回、１７週間に１回、１８週間に１回、１９週間に１回、２０週間に１回、２１週間に１回、２２週間に１回、２３週間に１回、２４週間に１回、２５週間に１回、２６週間に１回、２７週間に１回、または２８週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要としている対象に、３週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、４週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、５週間１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、６週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、７週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、８週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、９週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１０週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１１週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１２週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１３週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１４週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１５週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１６週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１７週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１８週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、１９週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２０週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２１週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２２週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２３週間に１回投与される。一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートは、それを必要とする対象に、２４週間に１回投与される。

【０３５４】

一部の実施形態では、そのような量に対応する所与の薬剤の量は、因子、例えば具体的な化合物、疾患の重症度、処置を必要とする対象または宿主の同一性（例えば、重量）等に依存して変化するが、しかしそれにもかかわらず、事情を取り巻く具体的な状況（例えば、投与される特別な薬剤、投与経路、および処置される対象または宿主を含む）に基づき、当技術分野において公知の方式でルーチン的に決定される。一部の例では、所望の用量は、単回用量で、または同時に（もしくは短期間において）、もしくは適する間隔をお

【 0 3 5 5 】

50

g あたり約 200 μ g まで、または対象の体重 1 kg あたり約 150 μ g の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g まで、または対象の体重 1 kg あたり約 160 μ g の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g まで、または対象の体重 1 kg あたり約 170 μ g の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g まで、または対象の体重 1 kg あたり約 180 μ g の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g まで、または対象の体重 1 kg あたり約 190 μ g の IL-2 コンジュゲートから対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g までの範囲内の用量で、それを必要とする対象に IL-2 コンジュゲートを投与する工程を含む。個々の処置レジメンに関する変数の数は多く、またこれら推奨値からかなり逸脱することは珍しくないため、上記範囲は単なる示唆にすぎない。そのような投薬量は、使用される化合物の活性、処置される疾患または状態、投与様式、対象それぞれの要件、処置される疾患または状態の重症度、および医師の判断に限定されない、いくつかの変数に応じて変化する。一部の実施形態では、そのような治療レジメンの毒性および治療効能は、LD50（集団の 50% が死に至る用量）および ED50（集団の 50% において治療上有効な用量）の決定を含む、ただしこれらに限定されない、細胞培養物または実験動物を対象とする標準的な薬学的手順により決定される。有毒効果と治療効果の間の用量比が治療指数であり、また LD50 と ED50 の間の比として表される。高治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られるデータは、ヒトでの使用を目的として、ある範囲の投薬量を処方化の際に使用される。そのような化合物の投薬量は、好ましくは毒性が最低限度の ED50 を含む循環濃度範囲内に収まる。投薬量は、採用される投与剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化する。

【0356】

一部の実施形態では、方法は、対象の体重 1 kg あたり約 1 μ g の IL-2 コンジュゲート、または対象の体重 1 kg あたり約 2 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 4 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 6 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 8 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 10 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 12 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 14 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 16 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 18 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 20 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 22 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 24 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 26 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 28 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 30 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 32 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 34 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 36 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 38 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 40 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 42 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 44 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 46 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 48 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 50 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 55 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 60 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 65 μ g の IL-2 コンジュゲート、70 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 75 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 80 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 85 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 90 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 95 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 100 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 110 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 120 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 13

0 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 140 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 150 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 160 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 170 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 180 μ g の IL-2 コンジュゲート、対象の体重 1 kg あたり約 190 μ g の IL-2 コンジュゲート、または対象の体重 1 kg あたり約 200 μ g の IL-2 コンジュゲートの用量で、IL-2 コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する工程を含む。個々の処置レジメンに関する変数の数は多く、またこれら推奨値からかなり逸脱することは珍しくないで、上記範囲は単なる示唆にすぎない。そのような投薬量は、使用される化合物の活性、処置される疾患または状態、投与様式、対象それぞれの要件、処置される疾患または状態の重症度、および医師の判断に限定されない、いくつかの変数に応じて変化する。一部の実施形態では、そのような治療レジメンの毒性および治療効能は、LD50（集団の 50% が死に至る用量）および ED50（集団の 50% において治療上有効な用量）の決定を含む、ただしこれらに限定されない、細胞培養物または実験動物を対象とする標準的な薬学的手順により決定される。有毒効果と治療効果の間の用量比が治療指数であり、また LD50 と ED50 の間の比として表される。高治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られるデータは、ヒトでの使用を目的として、ある範囲の投薬量を処方化する際に使用される。そのような化合物の投薬量は、好ましくは毒性が最低限度の ED50 を含む循環濃度範囲内に収まる。投薬量は、採用される投与剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化する。

【0357】

一部の実施形態では、追加の薬剤は、ある用量で、および当該追加の薬剤にとって安全かつ有効であると確認された投与レジメンを使用して投与することも可能である。例えば、ペンブロリズマブは、本明細書に記載される方法に基づき、3 週間毎に約 200 mg の用量で、それを必要とする対象に投与される。別の例では、ニボルマブが、本明細書に記載される方法に基づき、2 週間毎に約 240 mg の用量で、または 4 週間毎に約 480 mg の用量で、それを必要とする対象に投与される。別の例では、センプリマブが、本明細書に記載される方法に基づき、3 週間毎に約 350 mg の用量で、30 分にわたる静脈内輸液として、それを必要とする対象に投与される。別の例では、アテゾリズマブが、本明細書に記載される方法に基づき、2 週間毎に 840 mg、3 週間毎に 1200 mg、または 4 週間毎に 1680 mg の用量で対象に投与される。別の例では、アベルマブが、本明細書に記載される方法に基づき、2 週間毎に 800 mg の用量で対象に投与される。別の例では、デュルバルマブが、本明細書に記載される方法に基づき、2 週間毎に、対象の体重 1 kg あたり 10 mg の用量で対象に投与される。別の例では、イピリムマブが、黒色腫を治療するために、本明細書に記載される方法に基づき、3 週間毎に、対象の体重 1 kg あたり約 3 mg、90 分間、合計 4 回投与、または対象の体重 1 kg あたり約 10 mg、90 分間、合計 4 回投与の用量で対象に投与され、その後に対象の体重 1 kg あたり 10 mg、最長 3 年間が後続し得る。進行した腎細胞癌の場合、イピリムマブが、本明細書に記載される方法に基づき、対象の体重 1 kg あたり 1 mg の用量で、30 分間投与される。

【0358】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象に対する有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、集中治療施設、または循環器もしくは集中治療医学における熟練した専門医の利用を必要としない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象に対する有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、集中治療施設、または循環器もしくは集中治療医学における熟練した専門医の利用を必要としない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象に対する有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、集中治療施設の利用を必要としない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象に対する有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、循環器または集中治療医学における熟練した専門医の利用を必

要としない。

【0359】

投与の効果

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に脈管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード２、グレード３、またはグレード４の脈管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード２の脈管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード３の脈管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量の

10

【0360】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に血管緊張の欠如を引き起こさない。

【0361】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に血漿タンパク質および液の血管外スペースへの溢出を引き起こさない。

20

【0362】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に低血圧および器官灌流の減少を引き起こさない。

【0363】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に好中球機能障害を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に走化性の減少を引き起こさない。

【0364】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象に播種性感染のリスク増加に関連しない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、播種性感染は、敗血症または細菌性心内膜炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、播種性感染は、敗血症である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、播種性感染は、細菌性心内膜炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象は、ＩＬ－２コンジュゲートの投与前に、任意の既存の細菌感染について治療される。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象は、ＩＬ－２コンジュゲートの投与前に、オキサシリン、ナフシリン、シプロフロキサシン、およびバンコマイシンから選択される抗菌剤で治療される。

30

40

【0365】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象における自己免疫疾患または炎症性障害の既存のまたは初期の提示を悪化させない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象における自己免疫疾患の既存のまたは初期の提示を悪化させない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象における炎症性障害の既存のまたは初期の提示を悪化させない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、クローン病、強皮症、甲状腺炎、炎症性関節炎、真性糖尿病、眼球重症筋無力症（o c u l o

50

-bulbar myasthenia gravis)、半月体IgA系球体腎炎、胆嚢炎、大脳血管炎、スチーブンスージョンソン症候群および類天疱瘡から選択される。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、クローン病である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、強皮症である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、甲状腺炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、炎症性関節炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、真性糖尿病である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、眼球重症筋無力症である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、半月体IgA系球体腎炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、胆嚢炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、大脳血管炎である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、スチーブンスージョンソン症候群である。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、類天疱瘡である。

10

20

【0366】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象に精神状態の変化、言語障害、皮質盲、肢または歩行の失調(limb or gait ataxia)、幻覚、攪拌、緩和、または昏睡を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象に発作を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、公知の発作障害を有する対象に禁忌でない。

【0367】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象に毛細管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード2、グレード3、またはグレード4の毛細管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード2の毛細管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード3の毛細管漏出症候群を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にグレード4の毛細管漏出症候群を引き起こさない。

30

40

【0368】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にIL-2コンジュゲートの投与後に対象に平均動脈圧の低下を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にIL-2コンジュゲートの投与後に対象に低血圧を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象にIL-2コンジュゲートの投与後に対象の収縮期圧のベースライン収縮期圧からの90 mmHgまたは20 mmHg未満の低下の体験の原因にならない。

【0369】

50

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象に浮腫を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象に腎臓または肝機能の障害を引き起こさない。

【０３７０】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象に好酸球増加症を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象の１μＬ当たり５００を超える末梢血中の好酸球数の原因にならない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象の１μＬ当たり５００から１５００を超える末梢血中の好酸球数の原因にならない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象の１μＬ当たり１５００から１μＬ当たり５０００を超える末梢血中の好酸球数の原因にならない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象の１μＬ当たり５０００を超える末梢血中の好酸球数の原因にならない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、向精神薬の現行のレジメンにおいて、対象に禁忌でない。

【０３７１】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、腎毒性、骨髄毒性、心毒性、または肝毒性薬の現行のレジメンにおいて、対象に禁忌でない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、アミノグリコシド、細胞傷害性化学療法、ドキソルビシン、メトトレキサート、またはアスパラギナーゼの現行のレジメンにおいて、対象に禁忌でない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、抗新生物剤を含有する組合せレジメンを受ける対象に禁忌でない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、抗新生物剤は、ダカルバジン、シスプラチナ、タモキシフェンおよびインターフェロン－アルファから選択される。

【０３７２】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に対象に１つまたはそれ以上のグレード４の有害事象を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、１つまたはそれ以上のグレード４の有害事象は、低体温；ショック；徐脈；心室性期外収縮；心筋虚血；失神；出血；心房性不整脈；静脈炎；第２度房室ブロック；心内膜炎；心嚢貯留液；末梢性壊疽；血栓症；冠動脈障害；口内炎；悪心および嘔吐；肝機能試験異常；胃腸出血；吐血；血性下痢；胃腸障害；腸穿孔；脾炎；貧血；白血球減少症；白血球増多症；低カルシウム血症；アルカリホスファターゼ増加；血中尿素窒素（ＢＵＮ）増加；高尿酸血症；非タンパク性窒素（ＮＰＮ）増加；呼吸性アシドーシス；傾眠；攪拌；神経障害；妄想反応；痙攣；大発作痙攣（*grand mal convulsion*）；譫妄；喘息、肺性水腫；過換気；低酸素症；咯血；換気低下；気胸；散瞳；瞳孔障害；腎機能異常；腎不全；および急性腎尿細管壊死から選択される。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のＩＬ－２コンジュゲートの対象の群への投与は、対象にＩＬ－２コンジュゲートの投与後に１％超の対象に１つまたはそれ以上のグレード４の有害事象を引き起こさない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、１つまたはそれ以上のグレード４の

有害事象は、低体温；ショック；徐脈；心室性期外収縮；心筋虚血；失神；出血；心房性不整脈；静脈炎；第2度房室ブロック；心内膜炎；心嚢貯留液；末梢性壊疽；血栓症；冠動脈障害；口内炎；悪心および嘔吐；肝機能試験異常；胃腸出血；吐血；血性下痢；胃腸障害；腸穿孔；脾炎；貧血；白血球減少症；白血球増多症；低カルシウム血症；アルカリホスファターゼ増加；血中尿素窒素（BUN）増加；高尿酸血症；非タンパク性窒素（NP N）増加；呼吸性アシドーシス；傾眠；攪拌；神経障害；妄想反応；痙攣；大発作痙攣；譫妄；喘息、肺性水腫；過換気；低酸素症；喀血；換気低下；気胸；散瞳；瞳孔障害；腎機能異常；腎不全；および急性腎尿細管壊死から選択される。

【0373】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象の群への投与は、対象にIL-2コンジュゲートの投与後に1%超の対象に1つまたはそれ以上の有害事象を引き起こさなく、1つまたはそれ以上の有害事象は、十二指腸潰瘍；腸壊死；心筋炎；上室性頻脈；視神経炎に二次的な永続性または一過性の失明；一過性脳虚血発作；髄膜炎；脳浮腫；心外膜炎；アレルギー性間質性腎炎；および気管食道瘻から選択される。

10

【0374】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、有効量のIL-2コンジュゲートの対象の群への投与は、対象にIL-2コンジュゲートの投与後に1%超の対象に1つまたはそれ以上の有害事象を引き起こさなく、1つまたはそれ以上の有害事象は、悪性高熱症；心停止；心筋梗塞；肺塞栓；発作；腸穿孔；肝臓または腎不全；自殺に至る重篤なうつ；肺水腫；呼吸停止；呼吸不全から選択される。

20

【0375】

本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象の末梢性CD8+TおよびNK細胞の数を増加させ、対象の末梢性CD4+制御性T細胞の数を増加させることはない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、IL-2コンジュゲートの対象への投与は、対象の末梢性CD8+TおよびNK細胞の数を増加させ、対象の末梢性好酸球の数を増加させることはない。本明細書に記載されるがんを治療する方法の一部の実施形態では、対象にIL-2コンジュゲートを投与すると、対象の末梢血CD8+T細胞およびNK細胞の数が増加するが、対象の腫瘍内CD8+T細胞およびNK細胞の数は増加することなく、対象の腫瘍内CD4+制御性T細胞の数も増加しない。

30

【0376】

医薬組成物および製剤

本明細書に記載される、有効量のIL-2コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物について本明細書に記載される。

【0377】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるサイトカインコンジュゲート（例えば、IL-2コンジュゲート）を含む医薬組成物および製剤は、非経口、経口、頬側、直腸、舌下、または経皮投与経路を含む、ただしこれらに限定されない複数の投与経路により対象に投与される。場合によっては、非経口投与として、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、脳内投与、鼻腔内投与、動脈内投与、関節内投与、皮内投与、硝子体内投与、骨内注入、腹腔内投与、またはクモ膜下腔内投与が挙げられる。一部の例では、医薬組成物は、局所投与用に製剤化される。他の例では、医薬組成物は、全身投与用に製剤化される。一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物および製剤は、対象に、静脈内投与、皮下投与、および筋肉内投与によって投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物および製剤は、対象に、静脈内投与によって投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物および製剤は、（***）投与により対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物および製剤は、対象に、筋肉内投与によって投与される。

40

【0378】

50

一部の実施形態では、医薬製剤として、以下に限定されないが、水性液体分散系、自己乳化型分散系、固溶体、リポソーム型分散系、エロゾル、固形剤型、粉末、即時放出製剤、放出制御製剤、急速溶融製剤、タブレット、カプセル、ビル、遅延放出製剤、徐放性製剤、パルス放出製剤、多粒子製剤（例えばナノ粒子製剤）、および即時性と放出制御を混合した製剤が挙げられる。

【0379】

一部の実施形態では、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との適合性、および所望の剤型の放出プロファイル特性に基づいて選択されるキャリアまたはキャリア材料を含む。例示的なキャリア材料の例として、結合剤、懸濁化剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、潤滑剤、湿潤剤および希釈剤が挙げられる。薬学的に適合性のある担体物質として、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（PVP）、コレステロール、コレステロールエステル、カゼインナトリウム、ダイズレシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロースコンジュゲート、糖ステアロイル乳酸ナトリウム（sugars sodium stearoyl lactylate）、カラゲナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファ化スターチ等が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例えば、Remington: The Science and Practice's Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975年、Lieberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980, and Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)を参照（各これらの開示は本明細書において参照により組み入れられている）。

【0380】

場合によっては、医薬組成物は、免疫リポソームとして製剤化され、これは、リポソームの脂質二重層に直接的に、または間接的に結合した複数のIL-2コンジュゲートを含む。例示的な脂質として、以下に限定されないが、脂肪酸；リン脂質；ステロール、例えばコレステロール；スフィンゴ脂質、例えばスフィンゴミエリン；スフィンゴ糖脂質、例えばガングリオシド、グロボシドおよびセレブロシド；界面活性剤アミン、例えば、ステアaryl、オレイルおよびリノレイルアミンが挙げられる。一部の例では、脂質はカチオン脂質を含む。一部の例では、脂質はリン脂質を含む。例示的なリン脂質として、以下に限定されないが、ホスファチジン酸（「PA」）、ホスファチジルコリン（「PC」）、ホスファチジルグリセリン（「PG」）、ホスファチジエタノールアミン（「PE」）、ホスファチジイノシトール（「PI」）およびホスファチジルセリン（「PS」）、スフィンゴミエリン（脳スフィンゴミエリンが挙げられる）、レシチン、リゾレシチン、リゾホスファチジエタノールアミン、セレブロシド、ジアラキドイルホスファチジルコリン（「DAPC」）、ジデカノイル-L-アルファ-ホスファチジルコリン（「DDPC」）、ジエラドイルホスファチジルコリン（「DEPC」）、ジラウロリルホスファチジルコリン（「DLPC」）、ジリノレオイルホスファチジルコリン、ジミリスティルホスファチジルコリン（「DMPC」）、ジオレオイルホスファチジルコリン（「DOPC」）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（「DPPC」）、ジステアロイルホスファチジルコリン（「DSPC」）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン（「POPC」）、ジアラキドイルホスファチジルグリセリン（「DAPG」）、ジデカノイル-L-アルファ-ホスファチジルグリセリン（「DDPG」）、ジエラド

10

20

30

40

50

イルホスファチジルグリセリン（「DEPG」）、ジラウロイルホスファチジルグリセリン（「DLPG」）、ジリノレオイルホスファチジルグリセリン、ジミリストイルホスファチジルグリセリン（「DMPG」）、ジオレオイルホスファチジルグリセリン（「DOPG」）、ジパルミトイルホスファチジルグリセリン（「DPPG」）、ジステアロイルホスファチジルグリセリン（「DSPG」）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルグリセリン（「POPG」）、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン（「DAPE」）、ジデカノイル-L-アルファ-ホスファチジルエタノールアミン（「DDPE」）、ジェライドイルホスファチジルエタノールアミン（「DEPE」）、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン（「DLPE」）、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（「DMPE」）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（「DOPE」）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（「DPEE」）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（「DSPE」）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（「POPE」）、ジアラキドイルホスファチジルイノシトール（「DAPI」）、ジデカノイル-L-アルファ-ホスファチジルイノシトール（「DDPI」）、ジェライドイルホスファチジルイノシトール（「DEPI」）、ジラウロイルホスファチジルイノシトール（「DLPI」）、ジリノレオイルホスファチジルイノシトール、ジミリストイルホスファチジルイノシトール（「DMPI」）、ジオレオイルホスファチジルイノシトール（「DOPPI」）、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール（「DPPPI」）、ジステアロイルホスファチジルイノシトール（「DSPPI」）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルイノシトール（「POPI」）、ジアラキドイルホスファチジルセリン（「DAPS」）、ジデカノイル-L-アルファ-ホスファチジルセリン（「DDPS」）、ジェライドイルホスファチジルセリン（「DEPS」）、ジラウロイルホスファチジルセリン（「DLPS」）、ジリノレオイルホスファチジルセリン、ジミリストイルホスファチジルセリン（「DMPS」）、ジオレオイルホスファチジルセリン（「DOPS」）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（「DPPS」）、ジステアロイルホスファチジルセリン（「DSPS」）、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルセリン（「POPS」）、ジアラキドイルスフィンゴミエリン、ジデカノイルスフィンゴミエリン、ジェライドイルスフィンゴミエリン、ジラウロイルスフィンゴミエリン、ジリノレオイルスフィンゴミエリン、ジミリストイルスフィンゴミエリン、スフィンゴミエリン、ジオレオイルスフィンゴミエリン、ジパルミトイルスフィンゴミエリン、ジステアロイルスフィンゴミエリンならびに1-パルミトイル-2-オレオイル-スフィンゴミエリンが挙げられる。

【0381】

一部の例では、医薬製剤はさらに、pH調整剤または緩衝剤を含み、これらとして、酸、例えば酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸および塩酸、塩基、例えば水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウムおよびトリスヒドロキシメチルアミノメタン、ならびにバッファ、例えばクエン酸/デキストロース、重炭酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムが挙げられる。そのような酸、塩基およびバッファは、組成物のpHを許容可能な範囲内に維持するのに必要とされる量で含まれる。

【0382】

一部の例では、医薬製剤は、1つまたはそれ以上の塩を、組成物のオスモル濃度を許容可能な範囲に導くのに必要とされる量で含む。そのような塩として、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムカチオン、および塩化物、クエン酸、アスコルビン酸、ホウ酸、リン酸、重炭酸、硫酸、チオ硫酸または重亜硫酸アニオンを有するものが挙げられ、適切な塩として、塩化ナトリウム、塩化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウムおよび硫酸アンモニウムが挙げられる。

【0383】

一部の実施形態では、医薬製剤は、以下に限定されないが、トレハロース、スクロース

10

20

30

40

50

、マンニトール、マルトース、グルコースのような糖、またはリン酸カリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸アンモニウムのような塩、ならびに／または、ポリペプチドの溶解性およびインビボ安定性を増大させるための他の剤、例えばヘパリンが挙げられる。

【0384】

一部の例では、医薬製剤はさらに、より安定した環境を提供することができるという理由で、化合物を安定させるのに用いられる希釈剤を含む。緩衝溶液中に溶解される塩（pHの制御または維持を実現することもできる）が、当技術分野において希釈剤として利用されており、以下に限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水溶液が挙げられる。特定の場合には、希釈剤は、組成物のバルクを増大させて、カプセル充填のために、圧縮を促進するか、十分な同質混合物用バルクを生じさせる。そのような化合物として、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、微結晶セルロース、例えばAvicel（登録商標）、リン酸水素カルシウム、リン酸二カルシウム二水和物、リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム、無水ラクトース、噴霧乾燥ラクトース、アルファ化デンプン、圧縮可能な糖、例えばDipac（登録商標）（Amstar）、マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、スクロースベースの希釈剤、粉砂糖、第一硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物、カルシウム乳酸塩三水和物、デキストレート、加水分解されたシリアル固形物、アミロース、粉末セルロース、炭酸カルシウム、グリシン、カオリン、マンニトール、塩化ナトリウム、イノシトール、およびベントナイトが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートは、ヒスチジン、ソルビトールおよびポリソルベート80、または、安定した製剤を与えて、かつこれを必要とする対象に投与することができるあらゆる組合せを含む医薬製剤に用いることができる。一実施形態では、本明細書に開示されるIL-2コンジュゲートは、適切なコンテナ、例えばバイアル内の完成した薬物製品と表現されてもよく、以下の通りである：IL-2コンジュゲート（約2mg～約10mg）；L-ヒスチジン（約0.5mg～約2mg）；L-ヒスチジンヒドロクロリド（約1mg～約2mg）；ソルビトール（約20mg～約80mg）；およびポリソルベート80（約0.1mg～約0.2mg）；開示される方法での使用に適した液体製剤を提供するのに十分な量の注射用水を伴う。

【0385】

場合によっては、医薬製剤は、物質の分解または崩壊を促進する崩壊剤（disintegration agentまたはdisintegrant）を含む。用語「崩壊する」は、消化管液と接触した場合の剤型の溶解および分散の双方を含む。崩壊剤の例として、デンプン、例えば天然のデンプン、例えばコーンスターチもしくはジャガイモデンプン、アルファ化デンプン、例えばNational 1551もしくはAmijel（登録商標）、またはデンプングリコール酸ナトリウム、例えばPromogel（登録商標）もしくはExplotab（登録商標）、セルロース、例えば木材製品、メチル結晶セルロース、例えば、Avicel（登録商標）、Avicel（登録商標）PH101、Avicel（登録商標）PH102、Avicel（登録商標）PH105、Elcema（登録商標）P100、Emcocel（登録商標）、Vivacel（登録商標）、Ming Tia（登録商標）、およびSolka-Floc（登録商標）、メチルセルロース、クロスカルメロース、または架橋セルロース、例えば架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（Ac-Di-Sol（登録商標））、架橋カルボキシメチルセルロースもしくは架橋クロスカルメロース、架橋デンプン、例えばデンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポリマー、例えばクロスボドン、架橋ポリビニルピロリドン、アルギネート、例えばアルギン酸もしくはアルギン酸の塩、例えばアルギン酸ナトリウム、クレイ、例えばVeegum（登録商標）HV（ケイ酸アルミニウムマグネシウム）、ゴム、例えばアガー、グアー、ローカストビーン、カラヤゴム、ペクチン、またはトラガカントゴム、デンプングリコール酸ナトリウム、ベントナイト、天然スポンジ、界面活性剤、樹脂、例えば陽イオン交換樹脂、シトラスパルプ、ラウリル硫酸ナトリウム、組み合わせたデンプン中のラウリル硫酸ナトリウムが挙げられる。

【0386】

一部の例では、医薬製剤として、充填剤、例えばラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストレート、デキストラン、デンプン、アルファ化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0387】

また、潤滑剤および滑剤が、場合により、材料の接着または摩擦を妨げるか、引き下げるか、または阻害するために、本明細書に記載される医薬製剤内に含まれる。例示的な潤滑剤として、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、ステアリルフマル酸ナトリウム、炭化水素、例えば鉱油、または水素化植物油、例えば水素化大豆油（Sterotex（登録商標））、高級脂肪酸ならびにそのアルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩、例えばアルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセリン、タルク、ワックス、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えばPEG-4000）、またはメトキシポリエチレングリコール、例えばCarbowax（商標）、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムもしくはラウリル硫酸ナトリウム、コロイドシリカ、例えばSyloid（商標）、Cab-O-Sil（登録商標）、デンプン、例えばコーンスターチ、シリコン油ならびに界面活性剤が挙げられる。

【0388】

可塑剤として、マイクロカプセル化材料またはフィルムコーティングを軟化させて、あまりもろくならないようにするのに用いられる化合物が挙げられる。適切な可塑剤の例として、ポリエチレングリコール、例えば、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350およびPEG 800、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロース、ならびにトリアセチンが挙げられる。また、可塑剤は、分散剤または湿潤剤として機能することができる。

【0389】

「可溶化剤」として、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、ビタミンE TP GS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁酸塩、ポリエチレングリコール200-600、グリコフロール、トランスキトール、プロピレングリコール、ならびにジメチルイソソルビド等の化合物が挙げられる。

【0390】

安定化剤として、あらゆる抗酸化剤、バッファ、酸、および防腐剤等の化合物が挙げられる。例示的な安定化剤として、L-アルギニンヒドロクロリド、トロメタミン、アルブミン（ヒト）、クエン酸、ベンジルアルコール、フェノール、ニリン酸二ナトリウム二水和物、プロピレングリコール、メタクレゾールもしくはm-クレゾール、酢酸亜鉛、ポリソルベート-20もしくはTween（登録商標）20、またはトロメタモールが挙げられる。

【0391】

懸濁化剤として、ポリビニルピロリドン、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25またはポリビニルピロリドンK30、ビニルピロリドン/酢酸ビニルコポリマー（S630）、ポリエチレングリコール（ポリエチレングリコールは、例えば、約300~約6000、または約3350~約4000、または約7000~約5400の分子量を有し得る）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースアセテートステアレート、ポリソルベート-80、ヒドロキシエチルセル

10

20

30

40

50

ロース、アルギン酸ナトリウム、ゴム、例えばトラガカントゴムおよびアラビアゴム、グアーゴム、キサンタン（キサンタンゴムが挙げられる）、糖、セルロース誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ならびにポビドン等の化合物が挙げられる。

【0392】

界面活性剤として、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセートナトリウム、Tween 60 または 80、トリアセチン、ビタミン E TPGS、ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリソルベート、ポロキサマー、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリル、酸化エチレンおよび酸化プロピレンのコポリマー、例えば Pluronic（登録商標）（BASF）等の化合物が挙げられる。さらなる界面活性剤として、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン（60）水素化ヒマシ油、ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール 10、オクトキシノール 40 が挙げられる。時折、物理的安定性を増強するために、または他の目的のために、界面活性剤が含まれる。

【0393】

粘性増強剤の例として、メチルセルロース、キサンタンゴム、カルボキシメチルセルロース、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、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギネート、アラビアゴム、キトサンおよびそれらの組合せが挙げられる。

【0394】

湿潤剤として、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリン、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ドクセートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセートナトリウム、トリアセチン、Tween 80、ビタミン E TPGS、アルミニウム塩等の化合物が挙げられる。

【0395】

一部の例では、IL-2 コンジュゲート（例えば式（I~XVII）のもの等）および免疫チェックポイント阻害剤を含む医薬組成物は、両薬物を含む製剤として投与される。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、10 : 1 ~ 1 : 10 の間である。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、7 : 1 ~ 1 : 2 の間である。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、5 : 1 ~ 1 : 5 の間である。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、3 : 1 ~ 1 : 3 の間である。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、約 10 : 1、または約 9 : 1、約 8 : 1、約 7 : 1、約 6 : 1、約 5 : 1、約 4 : 1、約 3 : 1、約 2 : 1、または約 1 : 1 である。一部の例では、免疫チェックポイント阻害剤に対する IL-2 コンジュゲートの重量パーセントまたはその逆は、10 : 1 ~ 1 : 1、7 : 1 ~ 2 : 1、5 : 1 ~ 1 : 1、または 3 : 1 ~ 1 : 1 である。

【0396】

特定の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1 阻害剤等）と IL-2 コンジュゲート（例えば、式（I~XVII）のもの等）の組合せは、純粋な化学薬剤として投与される。その他の実施形態では、本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れる免疫チェックポイント阻害剤とIL-2コンジュゲートの組合せは、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21st Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005) (その開示は参照により本明細書に組み入れられている)に記載されているように、選ばれた投与経路および標準的な薬学実践法に基づいて選択された薬学的に適するまたは許容される担体(本明細書では、薬学的に適する(または許容される)賦形剤、生理学的に適する(または許容される)賦形剤、または生理学的に適する(または許容される)担体とも呼ばれる)と併用される。一部の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲートは、個々の組成物としてそれぞれ投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤および/またはIL-2コンジュゲートの個々の組成物は、適するまたは許容される賦形剤と併用される。一部の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲートは、単一組成物、併用組成物として投与される。

【0397】

1つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体と共に、本明細書に記載されるIL-2コンジュゲートおよび免疫チェックポイント阻害剤を含む医薬組成物本明細書が提示される。担体が組成物のその他の成分と適合性を有し、かつ組成物のレシピエント(すなわち、対象または患者)に対して有害でない場合には、担体(または賦形剤)は、許容されるまたは適する。特定の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲートは、例えば、合成法の1つまたはそれ以上の工程において生み出されるその他の有機小分子、例えば未反応中間体または合成副生成物等を約5%未満、または約1%未満、または約0.1%未満しか含有しないという点で、実質的に純粋である。一部の例では、医薬組成物は、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲート、ならびに1つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む。一部の例では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲート、またはその組合せを含む医薬組成物は、賦形剤、例えば0.9%塩化ナトリウム注射液USP、無水アルコール、d,l-アルファトコフェロール、無水クエン酸、ポリソルベート80、ポリエチレングリコール400、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、クエン酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、クレモフォールEL、アルブミン等、または任意のこれらの組合せを(非限定的な例として)含む。一部の例では、医薬組成物はナノ粒子を含む。一部の例では、医薬組成物は、注射可能な組成物で一般的に使用されるその他の賦形剤を含む。一部の例では、医薬組成物は、医薬組成物の送達の可視化に役立つように造影剤を含む。一部の例では、医薬組成物は、液体、懸濁物、溶液、またはゲルを含む。一部の例では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲート、またはその組合せを含む医薬組成物は注射可能である。一部の例では、医薬組成物は、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲート、またはその組合せを可溶化させる賦形剤を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲートを含む医薬組成物は、1つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤または担体を含む、非経口投与用の投与剤形として提供される。一部の例では、本明細書に記載される免疫チェックポイント阻害剤およびIL-2コンジュゲート、またはその組合せを含む医薬組成物は注射可能である。医薬組成物が、静脈内、皮膚または皮下注射用として製剤化される場合、有効成分は、パイロジェンフリーであり、かつ適するpH、等張性、および安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態である。関連する当業者は、例えば等張ビヒクルを使用して、適する溶液、例えば塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、または乳酸加リンゲル注射剤等を調製することが十分可能である。一部の実施形態では、防腐剤、安定剤、賦形剤、バッファー、酸化防止剤、および/またはその他の添加剤が含まれる。

【0398】

キット／製品

本明細書に開示されるのは、特定の実施形態では、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の方法および組成物に用いられるキットおよび製品である。そのようなキットは、バイアルおよびチューブ等の1つまたはそれ以上のコンテナを受けるように区画されている、キャリア、パッケージ、またはコンテナを含み、各コンテナは、本明細書に記載される方法に用いられることとなる別個の要素の1つを含む。適切なコンテナの例として、ボトル、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。一実施形態では、コンテナは、ガラスまたはプラスチック等の種々の材料から形成される。

【0399】

キットは典型的に、コンテンツおよび／または指示事項を記載する標識、ならびに指示事項を記したパッケージ内の印刷物を含む。また、一セットの指示事項が典型的に含まれることとなる。

10

【0400】

一実施形態では、標識は、コンテナ上にあるか、またはコンテナに関連する。一実施形態では、標識は、標識を形成する文字、数字または他の記号がコンテナそれ自体に添付されるか、成形されるか、またはエッチングされる場合、コンテナ上にあり、標識は、例えばパッケージ内の印刷物として、コンテナを保持するレセプタクルまたはキャリア内に存在する場合、コンテナに関連する。一実施形態では、標識は、コンテンツが特定の治療用途に用いられるべきであることを示すために用いられる。また、標識は、例えば本明細書に記載される方法における、コンテンツの使用指示を示す。

【0401】

20

特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提供される化合物を含有する1つまたはそれ以上の単位剤型を含有するパックまたはディスペンサー装置内に示される。パックは、例えば、金属またはプラスチックホイル、例えばブリスターパックを含有する。一実施形態では、パックまたはディスペンサー装置は、投与についての指示事項が付随する。また、一実施形態では、パックまたはディスペンサーは、医薬の製造、使用または販売を管理する政府機関によって処方される形態のコンテナに関連する通知を伴い、当該通知は、ヒト投与または獣医学的投与用の薬物の形態の機関による承認を反映する。そのような通知は、例えば、薬物についての米国食品医薬品局によって承認される標識、または認可された製品内の印刷物である。また、一実施形態では、適合する医薬キャリア内に製剤化される、本明細書で提供される化合物を含有する組成物が、調製され、適切なコンテナ内に入れられ、そして示される症状の治療について標識される。

30

【0402】

例示的な実施形態

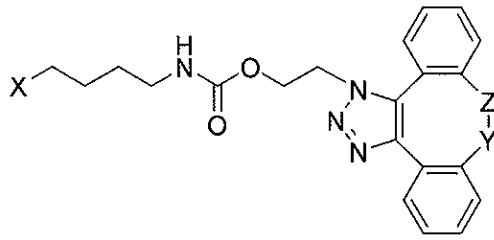
本開示は、以下の実施形態によってさらに記載される。実施形態の各々の特徴は、適切かつ実地的である場合に他の実施形態のいずれかと組み合わせることができる。

【0403】

実施形態1．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2 コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(I)の構造：

40

【化 1 1 5】



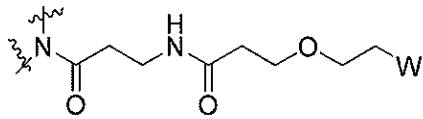
式(I);

10

(式中：

ZはCH₂であり、Yは

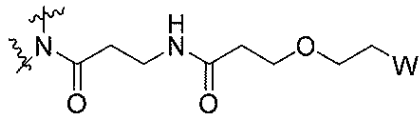
【化 1 1 6】



であり；

YはCH₂であり、Zは

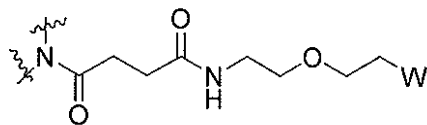
【化 1 1 7】



であり；

ZはCH₂であり、Yは

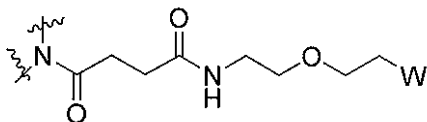
【化 1 1 8】



であり；または

YはCH₂であり、Zは

【化 1 1 9】



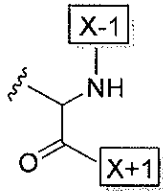
であり；

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

50

【化120】



を有する)；

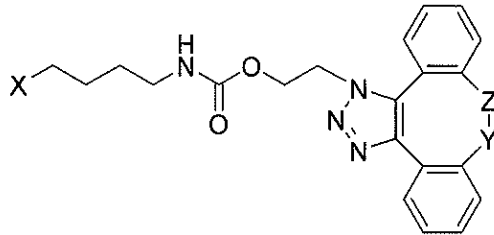
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

10

【0404】

実施形態1. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(I)の構造：

【化121】



20

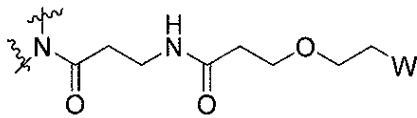
式(I);

(式中：

ZはCH₂であり、Yは

30

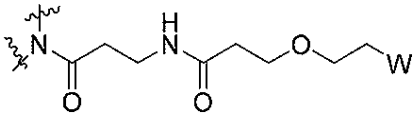
【化122】



であり；

YはCH₂であり、Zは

【化123】



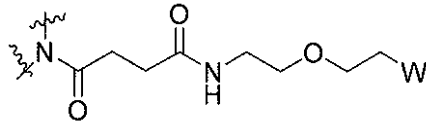
40

であり；

ZはCH₂であり、Yは

50

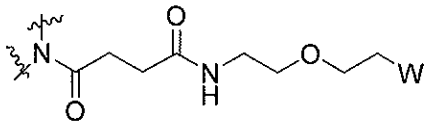
【化 1 2 4】



であり；または

YはCH₂であり、Zは

【化 1 2 5】

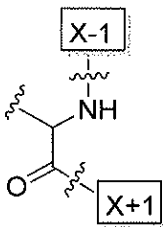


であり；

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 2 6】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

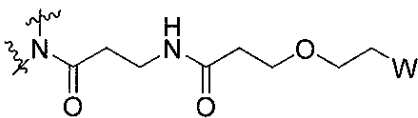
X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【0 4 0 5】

実施形態2．IL-2コンジュゲートにおいて、ZはCH₂であり、Yは

【化 1 2 7】

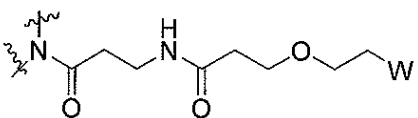


である、実施形態1または1.1に記載の方法。

【0 4 0 6】

実施形態3．IL-2コンジュゲートにおいて、YはCH₂であり、Zは

【化 1 2 8】



10

20

30

40

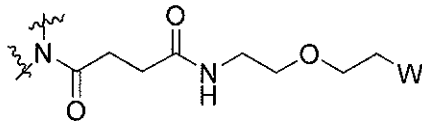
50

である、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0407】

実施形態 4. IL-2 コンジュゲートにおいて、Z は CH₂ であり、Y は

【化129】

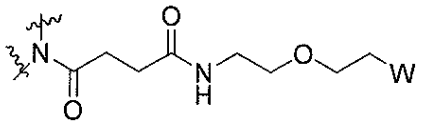


である、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0408】

実施形態 5. IL-2 コンジュゲートにおいて、Z は CH₂ であり、Y は

【化130】

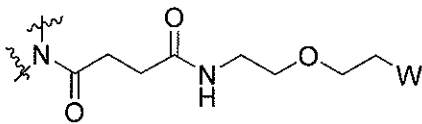


である、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0409】

実施形態 6. IL-2 コンジュゲートにおいて、Y は CH₂ であり、Z は

【化131】



である、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0410】

実施形態 7. IL-2 コンジュゲートにおいて、PEG 基は、5 kDa、10 kDa、20 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0411】

実施形態 8. IL-2 コンジュゲートにおいて、PEG 基は、10 kDa、20 kDa、もしくは 30 kDa の平均分子量を有する、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0412】

実施形態 9. IL-2 コンジュゲートにおいて、PEG 基は、30 kDa の平均分子量を有する、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0413】

実施形態 10. IL-2 コンジュゲートにおいて、IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、および L71 から選択される、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0414】

実施形態 11. IL-2 コンジュゲートにおいて、IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (I) の構造の位置は、F41、E61、および P64 から選択される、実施形態 1 または 1. 1 に記載の方法。

【0415】

10

20

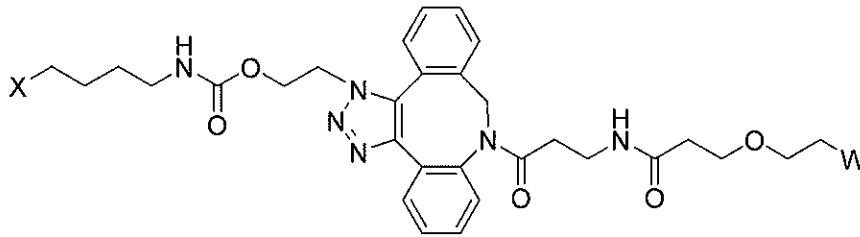
30

40

50

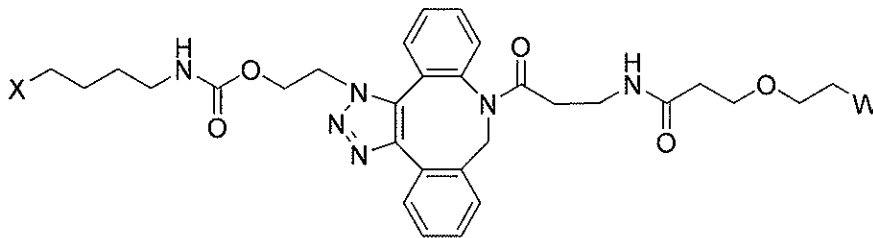
実施形態 12. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 15~19 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[A z K_P E G] は、式 (II) もしくは式 (III)、または式 (II) および式 (III) の混合物の構造：

【化 132】



10

式(II);



20

式(III);

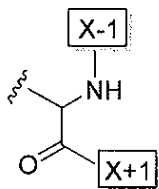
(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

30

Xは構造：

【化 133】



を有する)；

40

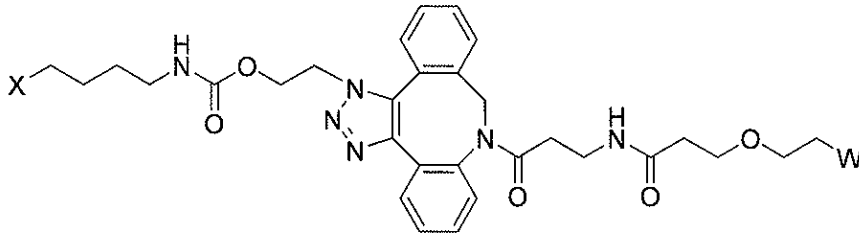
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0416】

実施形態 12. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 15~19 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[A z K_P E G] は、式 (II) もしくは式 (III)、または式 (II) および式 (III) の混合物の構造：

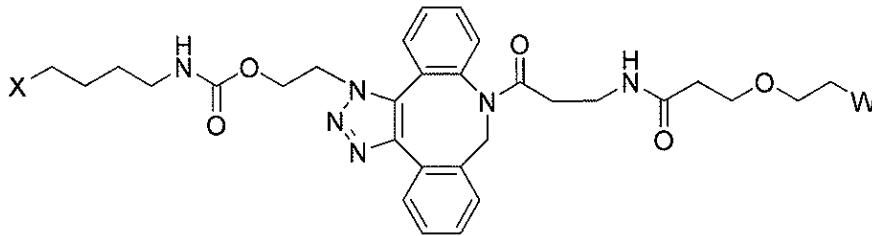
50

【化 1 3 4】



式(II);

10



式(III);

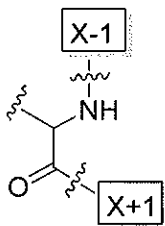
20

(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 3 5】



30

を有し；

X - 1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0 4 1 7】

実施形態13．[AzK__PEG]は、式(II)および式(III)の混合物である、実施形態12または12.1に記載の方法。

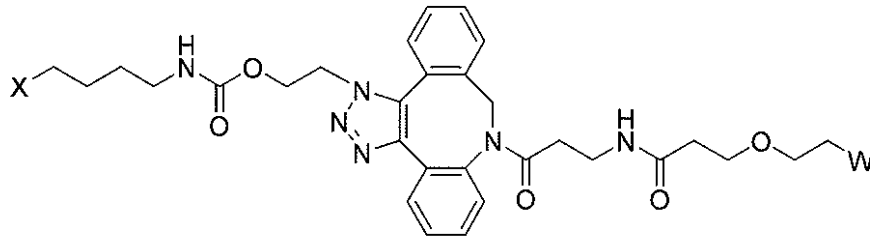
40

【0 4 1 8】

実施形態14．[AzK__PEG]は、式(II)の構造：

50

【化 1 3 6】



式(II);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

【0 4 1 9】

実施形態 1 5 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 4 に記載の方法。

【0 4 2 0】

実施形態 1 6 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 5 に記載の方法。

20

【0 4 2 1】

実施形態 1 7 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 6 に記載の方法。

【0 4 2 2】

実施形態 1 8 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 7 に記載の方法。

【0 4 2 3】

実施形態 1 9 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 7 に記載の方法。

30

【0 4 2 4】

実施形態 2 0 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

【0 4 2 5】

実施形態 2 1 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 2 0 に記載の方法。

【0 4 2 6】

実施形態 2 2 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 2 1 に記載の方法。

40

【0 4 2 7】

実施形態 2 3 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 2 2 に記載の方法。

【0 4 2 8】

実施形態 2 4 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 2 2 に記載の方法。

【0 4 2 9】

実施形態 2 5 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

【0 4 3 0】

50

実施形態 26. Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 25に記載の方法。

【0431】

実施形態 27. Wは、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 26に記載の方法。

【0432】

実施形態 28. Wは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 27に記載の方法。

【0433】

実施形態 29. Wは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 27に記載の方法。

【0434】

実施形態 30. IL-2コンジュゲートは、配列番号18のアミノ酸配列を有する、実施形態 12または12.1に記載の方法。

【0435】

実施形態 31. Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 30に記載の方法。

【0436】

実施形態 32. Wは、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 31に記載の方法。

【0437】

実施形態 33. Wは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 32に記載の方法。

【0438】

実施形態 34. Wは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 32に記載の方法。

【0439】

実施形態 35. IL-2コンジュゲートは、配列番号19のアミノ酸配列を有する、実施形態 12または12.1に記載の方法。

【0440】

実施形態 36. Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 35に記載の方法。

【0441】

実施形態 37. Wは、5 kDaおよび30 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基である、実施形態 36に記載の方法。

【0442】

実施形態 38. Wは、5 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 37に記載の方法。

【0443】

実施形態 39. Wは、30 kDaの平均分子量を有するPEG基である、実施形態 37に記載の方法。

【0444】

実施形態 40. [AzK__PEG] は、式 (III) の構造

10

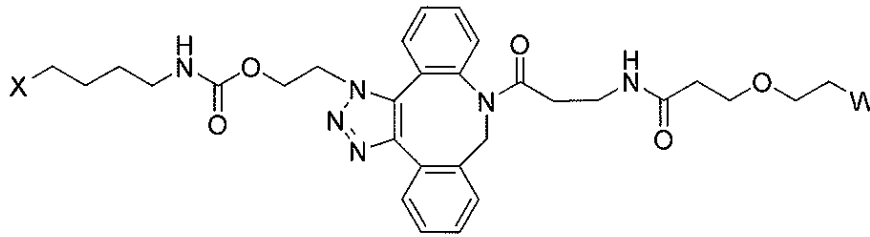
20

30

40

50

【化 1 3 7】



式(III);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

【0 4 4 5】

実施形態 4 1 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する、実施形態 4 0 に記載の方法。

【0 4 4 6】

実施形態 4 2 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 1 に記載の方法。

20

【0 4 4 7】

実施形態 4 3 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 2 に記載の方法。

【0 4 4 8】

実施形態 4 4 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 3 に記載の方法。

【0 4 4 9】

実施形態 4 5 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 3 に記載の方法。

【0 4 5 0】

実施形態 4 6 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

30

【0 4 5 1】

実施形態 4 7 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 6 に記載の方法。

【0 4 5 2】

実施形態 4 8 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 7 に記載の方法。

【0 4 5 3】

実施形態 4 9 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 8 に記載の方法。

40

【0 4 5 4】

実施形態 5 0 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 4 8 に記載の方法。

【0 4 5 5】

実施形態 5 1 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 2 または 1 2 . 1 に記載の方法。

【0 4 5 6】

実施形態 5 2 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、

50

および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 51 に記載の方法。

【0457】

実施形態 53. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 52 に記載の方法。

【0458】

実施形態 54. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 53 に記載の方法。

【0459】

実施形態 55. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 53 に記載の方法。

10

【0460】

実施形態 56. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する、実施形態 12 または 12.1 に記載の方法。

【0461】

実施形態 57. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 56 に記載の方法。

【0462】

実施形態 58. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 57 に記載の方法。

20

【0463】

実施形態 59. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 58 に記載の方法。

【0464】

実施形態 60. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 58 に記載の方法。

【0465】

実施形態 61. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する、実施形態 12 または 12.1 に記載の方法。

30

【0466】

実施形態 62. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 61 に記載の方法。

【0467】

実施形態 63. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 62 に記載の方法。

【0468】

実施形態 64. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 63 に記載の方法。

40

【0469】

実施形態 65. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 63 に記載の方法。

【0470】

実施形態 66. W は、直鎖状または分枝状 PEG 基である、実施形態 1～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0471】

実施形態 67. W は、直鎖状 PEG 基である、実施形態 1～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0472】

50

実施形態 68. Wは、分枝状 PEG 基である、実施形態 1～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0473】

実施形態 69. Wは、メトキシ PEG 基である、実施形態 1～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0474】

実施形態 70. メトキシ PEG 基は、直鎖状または分枝状である、実施形態 69 に記載の方法。

【0475】

実施形態 71. メトキシ PEG 基は、直鎖状である、実施形態 70 に記載の方法。

10

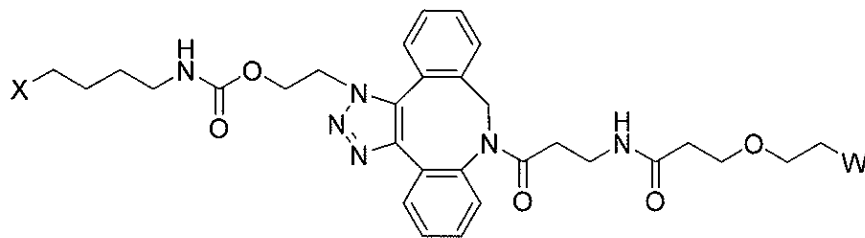
【0476】

実施形態 72. メトキシ PEG 基は、分枝状である、実施形態 70 に記載の方法。

【0477】

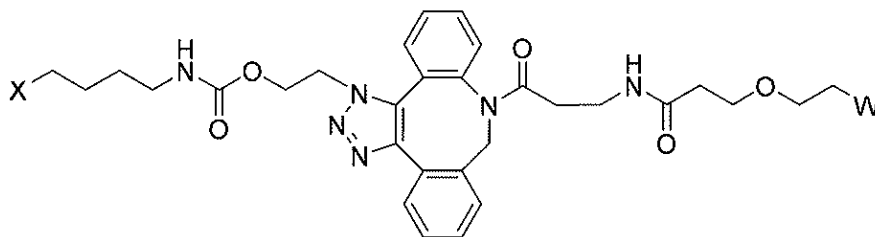
実施形態 73. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 20～24 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[AzK_PEG5kD] は、式 (II) もしくは式 (III)、または式 (II) および式 (III) の混合物の構造：

【化138】



式(II);

20



式(III);

30

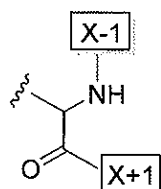
(式中：

Wは、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基であり；

40

Xは構造：

【化139】



を有する)；

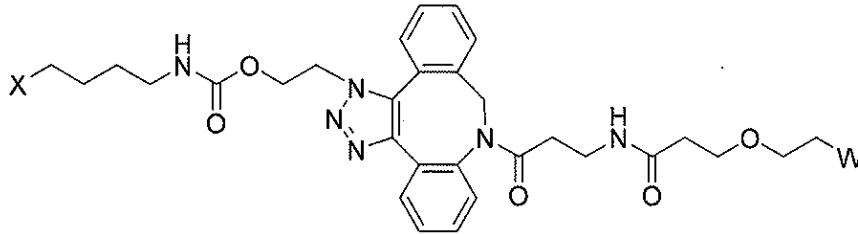
50

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

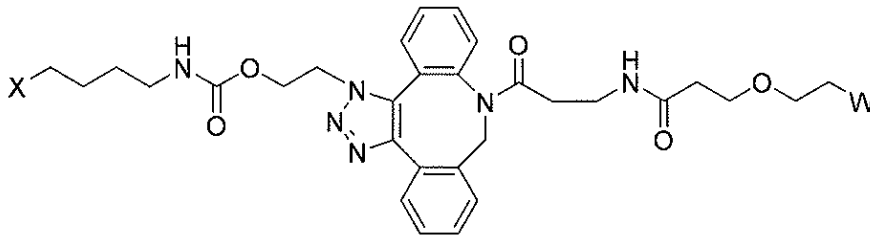
【0478】

実施形態73. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号20~24のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 5 k D] は、式 (II) もしくは式 (III)、または式 (II) および式 (III) の混合物の構造：

【化140】



式(II);



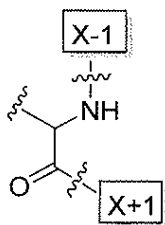
式(III);

(式中：

Wは、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

【化141】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0479】

実施形態74. IL-2 コンジュゲートは、配列番号20のアミノ酸配列を有する、実施形態73または73. 1に記載の方法。

【0480】

実施形態75. IL-2 コンジュゲートは、配列番号21のアミノ酸配列を有する、実施形態73または73. 1に記載の方法。

【0481】

実施形態 76. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する、実施形態 73 または 73.1 に記載の方法。

【0482】

実施形態 77. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 23 のアミノ酸配列を有する、実施形態 73 または 73.1 に記載の方法。

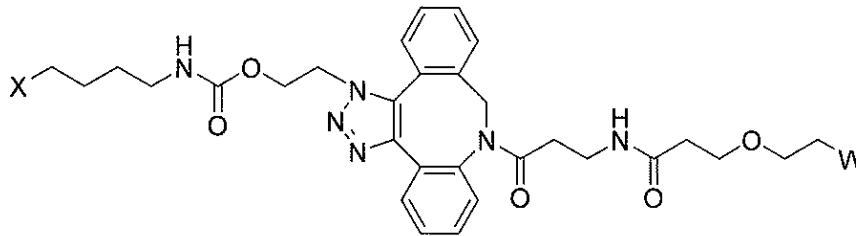
【0483】

実施形態 78. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する、実施形態 73 または 73.1 に記載の方法。

【0484】

実施形態 79. [AzK_PEG5kD] は、式 (II) の構造
【化142】

10



式(II);

20

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 73 または 73.1 に記載の方法。

【0485】

実施形態 80. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する、実施形態 79 に記載の方法。

【0486】

実施形態 81. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 21 のアミノ酸配列を有する、実施形態 79 に記載の方法。

【0487】

実施形態 82. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する、実施形態 79 に記載の方法。

【0488】

実施形態 83. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 23 のアミノ酸配列を有する、実施形態 79 に記載の方法。

【0489】

実施形態 84. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する、実施形態 79 に記載の方法。

【0490】

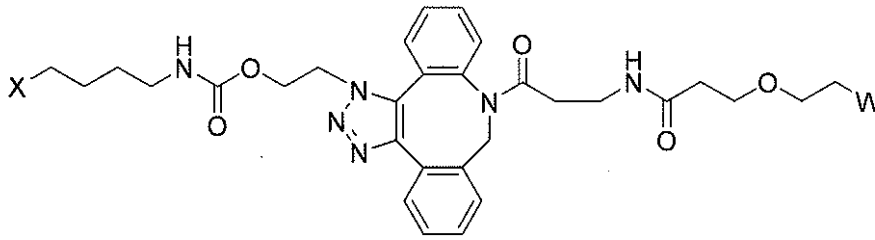
実施形態 85. [AzK_PEG5kD] は、式 (III) の構造

30

40

50

【化 1 4 3】



式(III);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 7 3 または 7 3 . 1 に記載の方法。

【0 4 9 1】

実施形態 8 6 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する、実施形態 8 5 に記載の方法。

【0 4 9 2】

実施形態 8 7 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する、実施形態 8 5 に記載の方法。

【0 4 9 3】

実施形態 8 8 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 8 5 に記載の方法。

【0 4 9 4】

実施形態 8 9 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 8 5 に記載の方法。

【0 4 9 5】

実施形態 9 0 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する、実施形態 8 5 に記載の方法。

【0 4 9 6】

実施形態 9 1 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 3 0 k D] は、式 (I I) もしくは式 (I I I) の構造を有し、もしくは式 (I I) および式 (I I I) の構造の混合物：

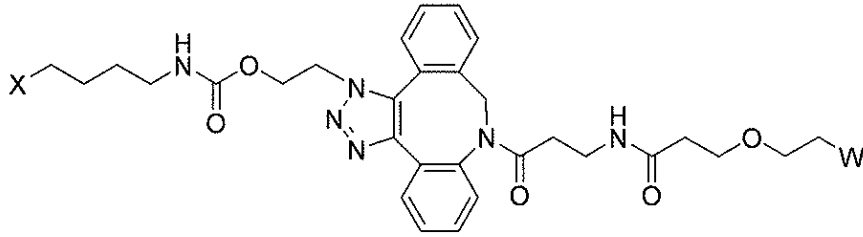
20

30

40

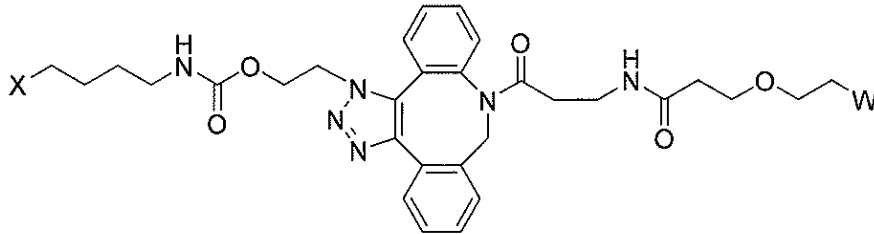
50

【化 1 4 4】



式(II);

10



式(III);

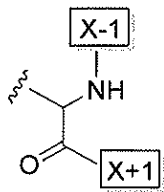
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 4 5】



30

を有する)

であり；またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

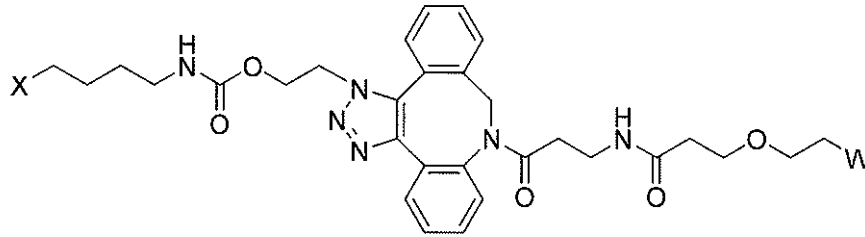
【0497】

実施形態91. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号25～29のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[A_zK_PEG30kD] は、式 (II) もしくは式 (III) の構造を有し、もしくは式 (II) および式 (III) の構造の混合物：

40

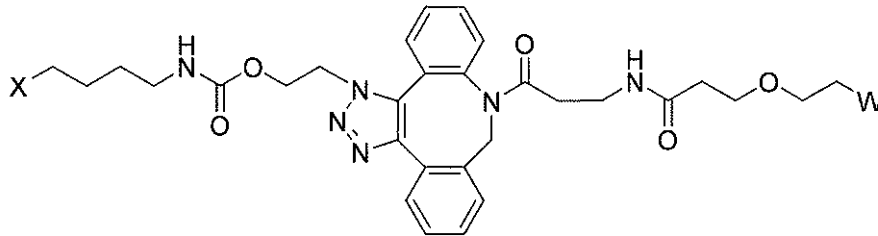
50

【化 1 4 6】



式(II);

10



式(III);

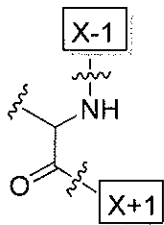
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 4 7】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)

であり；またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0498】

実施形態92．IL-2コンジュゲートは、配列番号25のアミノ酸配列を有する、実施形態91または91.1に記載の方法。

【0499】

実施形態93．IL-2コンジュゲートは、配列番号26のアミノ酸配列を有する、実施形態91または91.1に記載の方法。

【0500】

実施形態94．IL-2コンジュゲートは、配列番号27のアミノ酸配列を有する、実施形態91または91.1に記載の方法。

【0501】

実施形態95．IL-2コンジュゲートは、配列番号28のアミノ酸配列を有する、実施形態91または91.1に記載の方法。

【0502】

実施形態96．IL-2コンジュゲートは、配列番号29のアミノ酸配列を有する、実

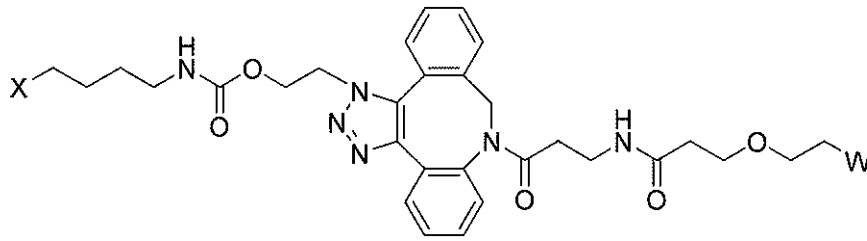
50

実施形態 91 または 91.1 に記載の方法。

【0503】

実施形態 97. [A z K _ P E G 3 0 k D] は、式 (II) の構造：

【化148】



10

式(II);

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 91 または 91.1 に記載の方法。

【0504】

実施形態 98. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する、実施形態 97 に記載の方法。

【0505】

実施形態 99. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する、実施形態 97 に記載の方法。

20

【0506】

実施形態 100. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する、実施形態 97 に記載の方法。

【0507】

実施形態 101. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する、実施形態 97 に記載の方法。

【0508】

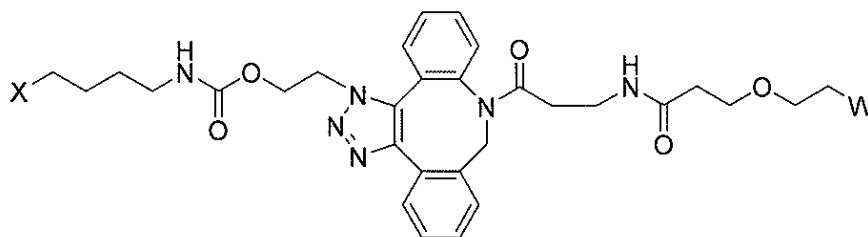
実施形態 102. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する、実施形態 97 に記載の方法。

30

【0509】

実施形態 103. [A z K _ P E G 3 0 k D] は、式 (III) の構造

【化149】



40

式(III);

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 91 または 91.1 に記載の方法。

【0510】

実施形態 104. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する、実施形態 103 に記載の方法。

【0511】

50

実施形態 105. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する、実施形態 103 に記載の方法。

【0512】

実施形態 106. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する、実施形態 103 に記載の方法。

【0513】

実施形態 107. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する、実施形態 103 に記載の方法。

【0514】

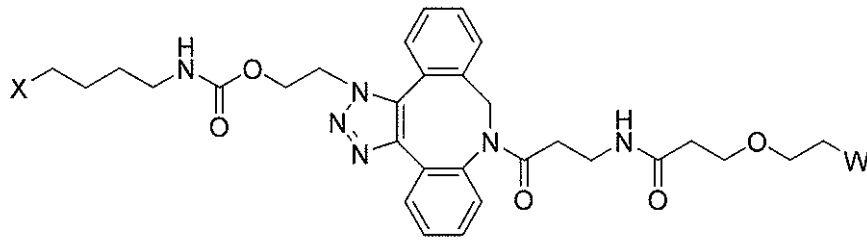
実施形態 108. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する、実施形態 103 に記載の方法。

10

【0515】

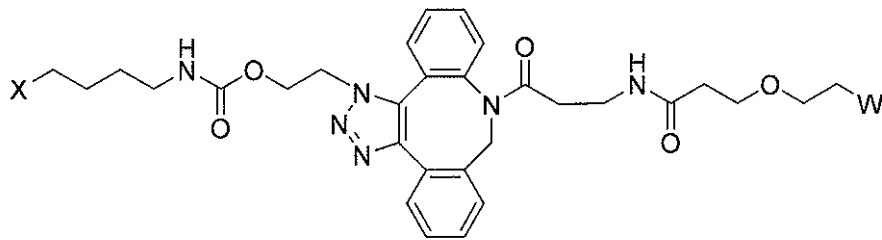
実施形態 109. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 15～19 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[AzK_PEG] は、式 (II) および式 (III) の構造の混合物：

【化 150】



式(II);

20



式(III);

30

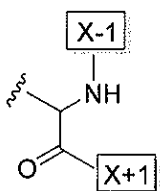
(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

40

Xは構造：

【化 151】



50

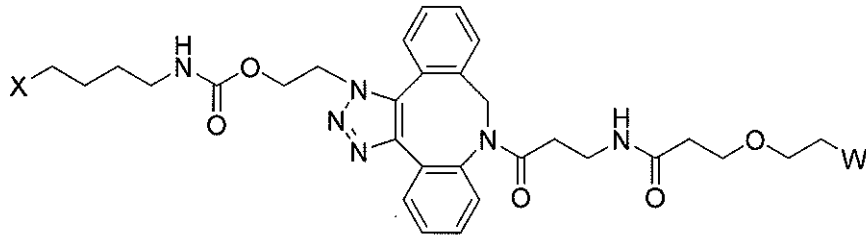
を有する)；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

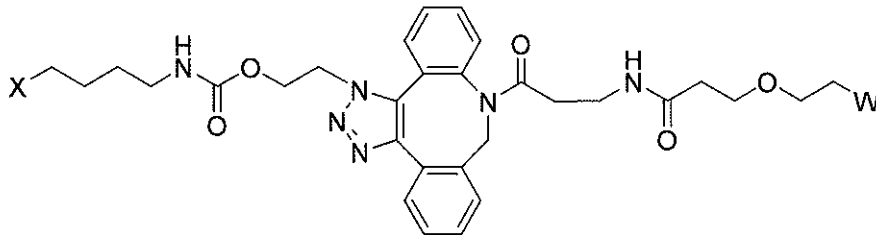
【0516】

実施形態109. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号15～19のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AZK_PEG] は、式(II)および式(III)の構造の混合物：

【化152】



式(II);



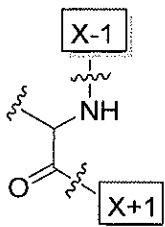
式(III);

(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化153】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す)；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0517】

実施形態110. IL-2 コンジュゲートにおける[AZK_PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、約1：1である、実施形態109または109. 1に記載の方法。

【0518】

実施形態111. IL-2コンジュゲートにおける[AzK__PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、1:1より大きい、実施形態109または109.1に記載の方法。

【0519】

実施形態112. IL-2コンジュゲートにおける[AzK__PEG]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、1:1より小さい、実施形態109または109.1に記載の方法。

【0520】

実施形態113. Wは、直鎖状または分枝状PEG基である、実施形態109～112のいずれか1つに記載の方法。

10

【0521】

実施形態114. Wは、直鎖状PEG基である、実施形態109～112のいずれか1つに記載の方法。

【0522】

実施形態115. Wは、分枝状PEG基である、実施形態109～112のいずれか1つに記載の方法。

【0523】

実施形態116. Wは、メトキシPEG基である、実施形態109～112のいずれか1つに記載の方法。

20

【0524】

実施形態117. メトキシPEG基は、直鎖状または分枝状である、実施形態116に記載の方法。

【0525】

実施形態118. メトキシPEG基は、直鎖状である、実施形態117に記載の方法。

【0526】

実施形態119. メトキシPEG基は、分枝状である、実施形態117に記載の方法。

【0527】

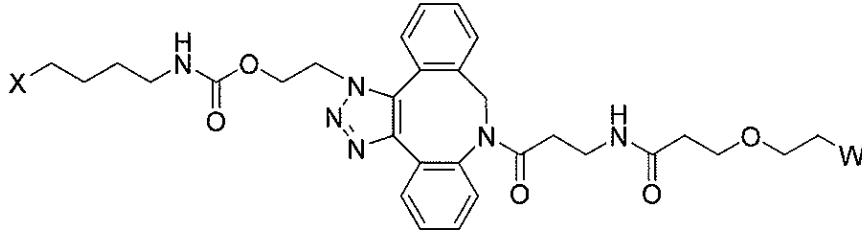
実施形態120. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号20～24のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AzK__PEG5kD]は、式(II)および式(III)の構造の混合物：

30

40

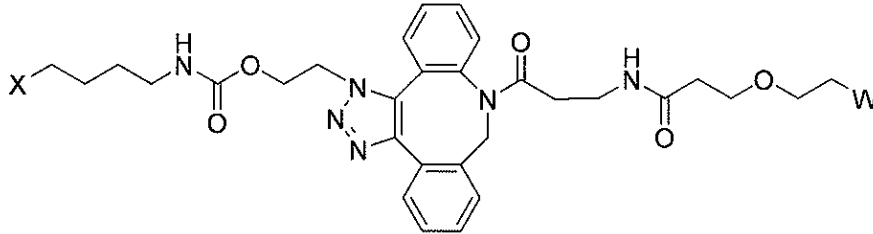
50

【化 1 5 4】



式(II);

10



式(III);

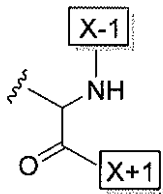
20

(式中：

Wは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基であり；

Xは構造：

【化 1 5 5】



30

を有する)；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

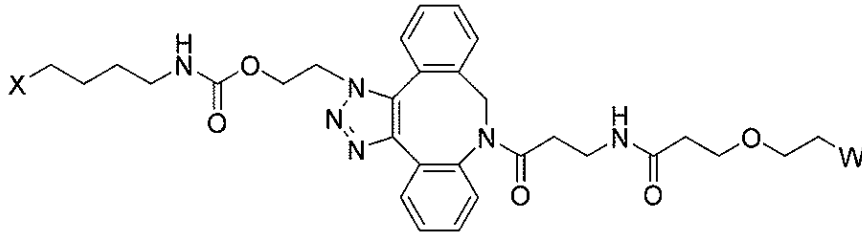
【0 5 2 8】

実施形態 1 2 0 . 1 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 2 0 ~ 2 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 5 k D] は、式 (I I) および式 (I I I) の構造の混合物：

40

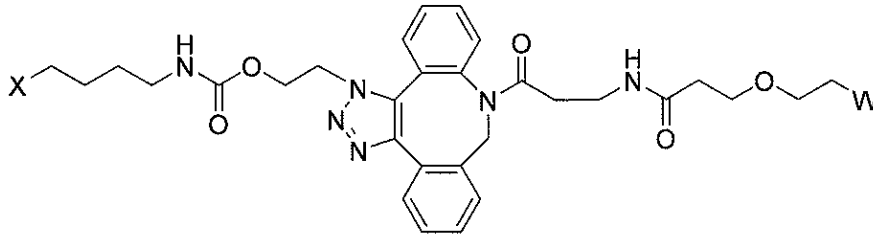
50

【化 1 5 6】



式(II);

10



式(III);

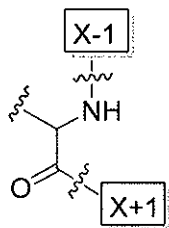
20

(式中：

Wは、5 k D aの平均分子量を有する P E G基であり；

Xは構造：

【化 1 5 7】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【 0 5 2 9】

実施形態 1 2 1 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比は、約 1 : 1 である、実施形態 1 2 0 または 1 2 0 . 1 に記載の方法。

40

【 0 5 3 0】

実施形態 1 2 2 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比は、1 : 1 より大きい、実施形態 1 2 0 または 1 2 0 . 1 に記載の方法。

【 0 5 3 1】

実施形態 1 2 3 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I I) の構造の量対式 (I I I) の構造の量の比は、1 : 1 より小さい、実施形態 1 2 0 または 1 2 0 . 1 に記載の方法。

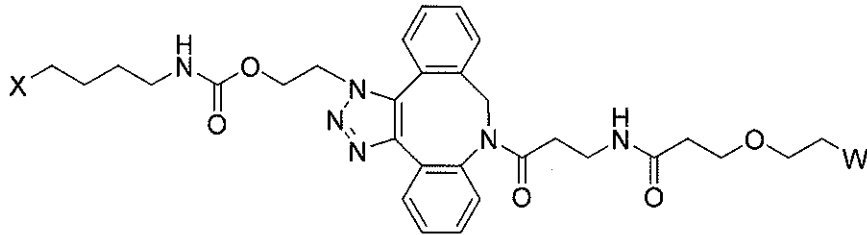
【 0 5 3 2】

実施形態 1 2 4 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L

50

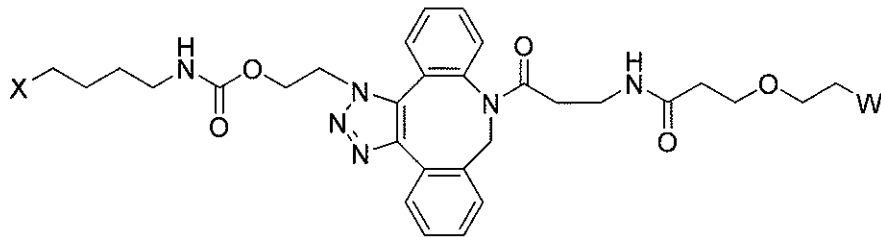
ー２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬー２コンジュゲートは、配列番号２５～２９のいずれか１つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 3 0 k D] は、式（ＩＩ）および式（ＩＩ）の構造の混合物：

【化１５８】



10

式(II);



20

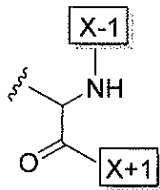
式(III);

（式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化１５９】



30

を有する）；

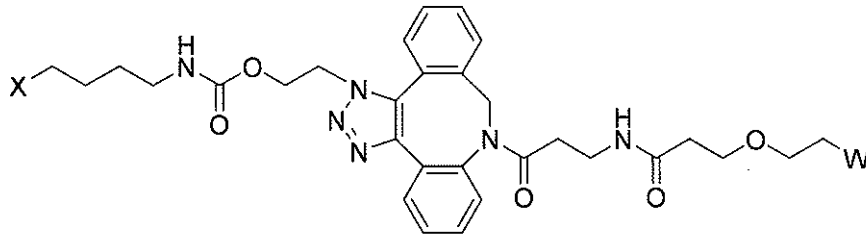
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【０５３３】

実施形態１２４．１．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（ａ）ＩＬー２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬー２コンジュゲートは、配列番号２５～２９のいずれか１つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ P E G 3 0 k D] は、式（ＩＩ）および式（ＩＩ）の構造の混合物：

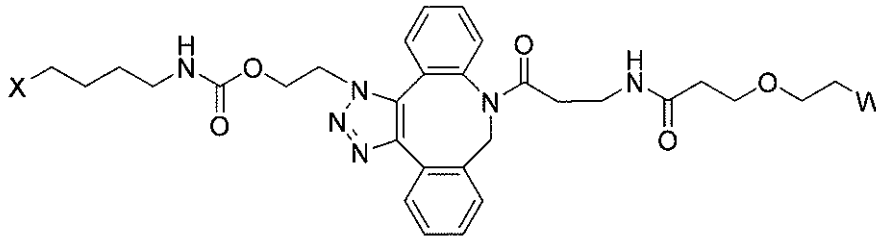
40

【化 1 6 0】



式(II);

10



式(III);

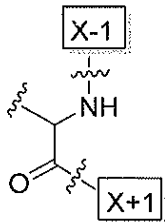
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 6 1】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0534】

実施形態125．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、約1：1である、実施形態124または124．1に記載の方法。

40

【0535】

実施形態126．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、1：1より大きい、実施形態124または124．1に記載の方法。

【0536】

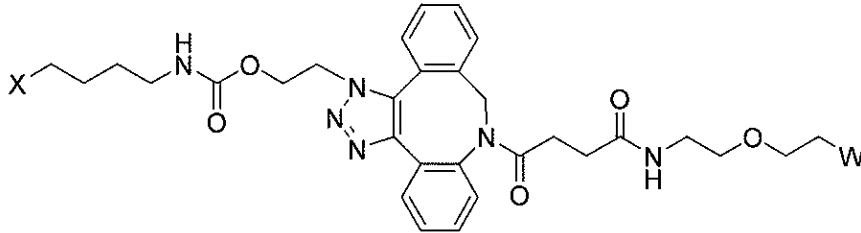
実施形態127．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__PEG30kD]の総量を含む、式(II)の構造の量対式(III)の構造の量の比は、1：1より小さい、実施形態124または124．1に記載の方法。

【0537】

50

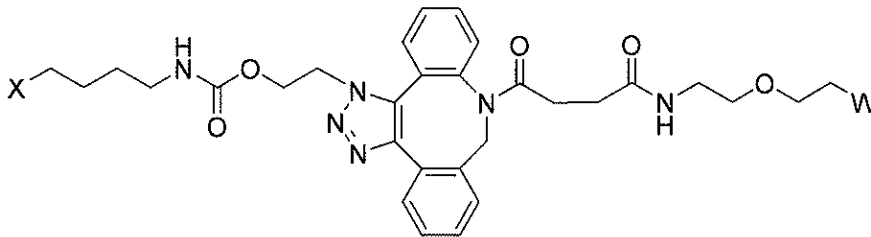
実施形態 128. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40~44 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G] は、式 (IV) もしくは式 (V)、または式 (IV) および式 (V) の混合物の構造：

【化 162】



10

式(IV);



20

式(V);

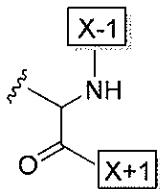
(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

30

【化 163】



を有する)；

40

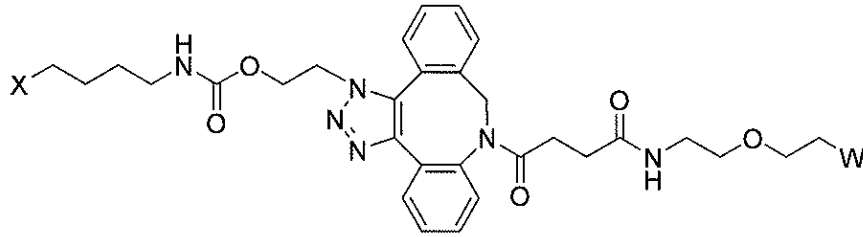
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0538】

実施形態 128. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 40~44 のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G] は、式 (IV) もしくは式 (V)、または式 (IV) および式 (V) の混合物の構造：

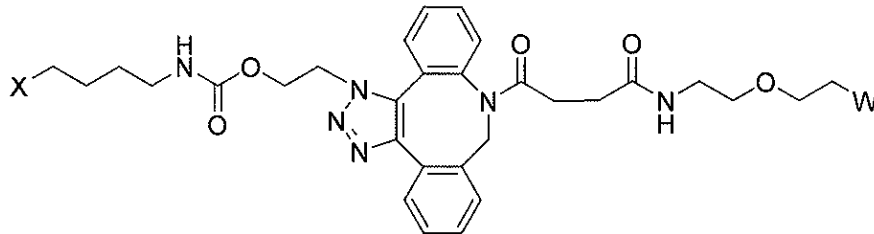
50

【化 1 6 4】



式(IV);

10



式(V);

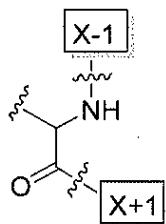
20

(式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 6 5】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0 5 3 9】

実施形態 1 2 9．[A z K__L 1__PEG] は、式 (I V) および式 (V) の混合物である、実施形態 1 2 8 または 1 2 8 . 1 に記載の方法。

40

【0 5 4 0】

実施形態 1 3 0．[A z K__L 1__PEG] は、式 (I V) の構造：

50

、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 141 に記載の方法。

【0553】

実施形態 143. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 142 に記載の方法。

【0554】

実施形態 144. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 143 に記載の方法。

【0555】

実施形態 145. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 143 に記載の方法。

10

【0556】

実施形態 146. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 43 のアミノ酸配列を有する、実施形態 128 または 128.1 に記載の方法。

【0557】

実施形態 147. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 146 に記載の方法。

【0558】

実施形態 148. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 147 に記載の方法。

20

【0559】

実施形態 149. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 148 に記載の方法。

【0560】

実施形態 150. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 148 に記載の方法。

【0561】

実施形態 151. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する、実施形態 128 または 128.1 に記載の方法。

30

【0562】

実施形態 152. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 151 に記載の方法。

【0563】

実施形態 153. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 152 に記載の方法。

【0564】

実施形態 154. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 153 に記載の方法。

40

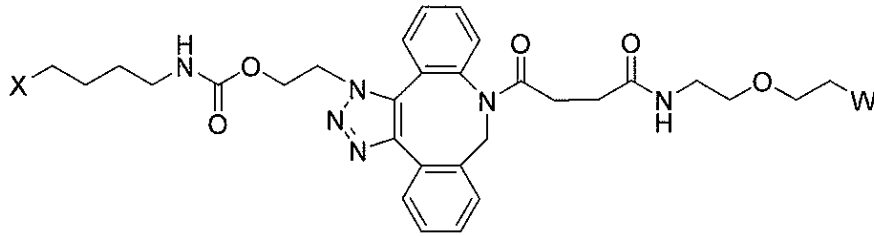
【0565】

実施形態 155. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 153 に記載の方法。

【0566】

実施形態 156. [AzK__L1__PEG] は、式 (V) の構造

【化 1 6 7】



式(V);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 1 2 8 または 1 2 8 . 1 に記載の方法。

【0 5 6 7】

実施形態 1 5 7 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 0 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 5 6 に記載の方法。

【0 5 6 8】

実施形態 1 5 8 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 5 6 に記載の方法。

20

【0 5 6 9】

実施形態 1 5 9 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 5 8 に記載の方法。

【0 5 7 0】

実施形態 1 6 0 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 5 9 に記載の方法。

【0 5 7 1】

実施形態 1 6 1 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 5 9 に記載の方法。

【0 5 7 2】

実施形態 1 6 2 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 5 6 に記載の方法。

30

【0 5 7 3】

実施形態 1 6 3 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a、および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 6 2 に記載の方法。

【0 5 7 4】

実施形態 1 6 4 . W は、5 k D a および 3 0 k D a から選択される平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 6 3 に記載の方法。

【0 5 7 5】

実施形態 1 6 5 . W は、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 6 4 に記載の方法。

40

【0 5 7 6】

実施形態 1 6 6 . W は、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基である、実施形態 1 6 4 に記載の方法。

【0 5 7 7】

実施形態 1 6 7 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 5 6 に記載の方法。

【0 5 7 8】

実施形態 1 6 8 . W は、5 k D a、1 0 k D a、1 5 k D a、2 0 k D a、2 5 k D a

50

、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 167 に記載の方法。

【0579】

実施形態 169. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 168 に記載の方法。

【0580】

実施形態 170. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 169 に記載の方法。

【0581】

実施形態 171. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 169 に記載の方法。

10

【0582】

実施形態 172. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 43 のアミノ酸配列を有する、実施形態 156 に記載の方法。

【0583】

実施形態 173. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 172 に記載の方法。

【0584】

実施形態 174. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 173 に記載の方法。

20

【0585】

実施形態 175. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 174 に記載の方法。

【0586】

実施形態 176. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 174 に記載の方法。

【0587】

実施形態 177. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する、実施形態 156 に記載の方法。

30

【0588】

実施形態 178. W は、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 177 に記載の方法。

【0589】

実施形態 179. W は、5 kDa および 30 kDa から選択される平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 178 に記載の方法。

【0590】

実施形態 180. W は、5 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 179 に記載の方法。

40

【0591】

実施形態 181. W は、30 kDa の平均分子量を有する PEG 基である、実施形態 179 に記載の方法。

【0592】

実施形態 182. W は、直鎖状または分枝状 PEG 基である、実施形態 128～181 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0593】

実施形態 183. W は、直鎖状 PEG 基である、実施形態 128～181 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0594】

50

実施形態 184. Wは、分枝状 PEG 基である、実施形態 128～181のいずれか 1つに記載の方法。

【0595】

実施形態 185. Wは、メトキシ PEG 基である、実施形態 128～181のいずれか 1つに記載の方法。

【0596】

実施形態 186. メトキシ PEG 基は、直鎖状または分枝状である、実施形態 185に記載の方法。

【0597】

実施形態 187. メトキシ PEG 基は、直鎖状である、実施形態 186に記載の方法。

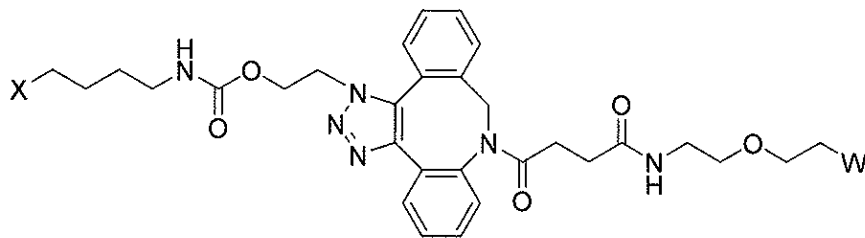
【0598】

実施形態 188. メトキシ PEG 基は、分枝状である、実施形態 186に記載の方法。

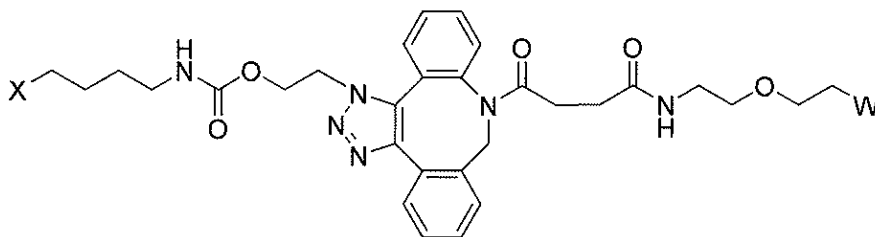
【0599】

実施形態 189. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 45～49のいずれか 1つのアミノ酸配列を含み、[AzK_L1_PEG5kD]は、式 (IV) もしくは式 (V)、または式 (IV) および式 (V) の混合物の構造：

【化168】



式(IV);



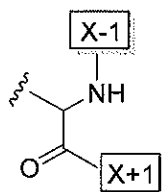
式(V);

(式中：

Wは、5 kDaの平均分子量を有する PEG 基であり；

Xは構造：

【化169】



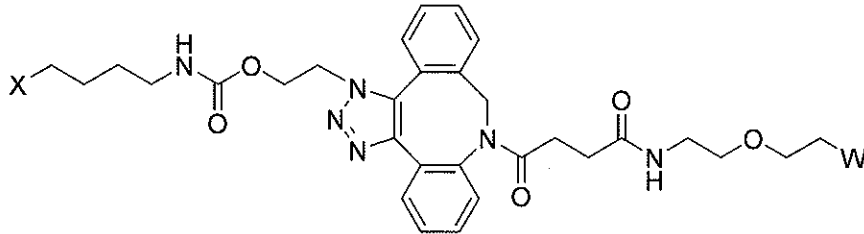
を有する)；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

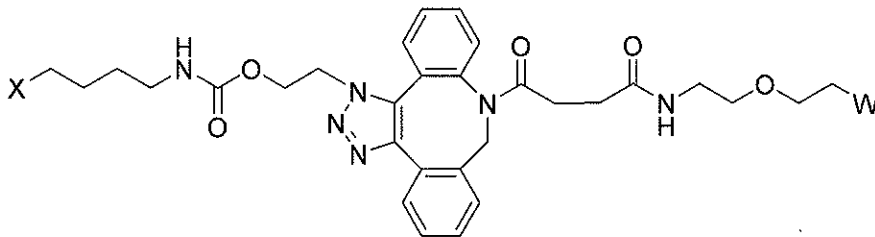
【0600】

実施形態189. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号45～49のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] は、式 (IV) もしくは式 (V)、または式 (IV) および式 (V) の混合物の構造：

【化170】



式(IV);



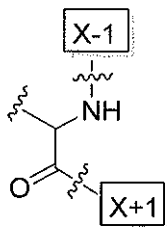
式(V);

(式中：

Wは、5 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

【化171】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、前記方法。

【0601】

実施形態190. IL-2 コンジュゲートは、配列番号45のアミノ酸配列を有する、実施形態189または189. 1に記載の方法。

【0602】

実施形態191. IL-2 コンジュゲートは、配列番号46のアミノ酸配列を有する、実施形態189または189. 1に記載の方法。

【0603】

実施形態 192. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する、実施形態 189 または 189.1 に記載の方法。

【0604】

実施形態 193. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 48 のアミノ酸配列を有する、実施形態 189 または 189.1 に記載の方法。

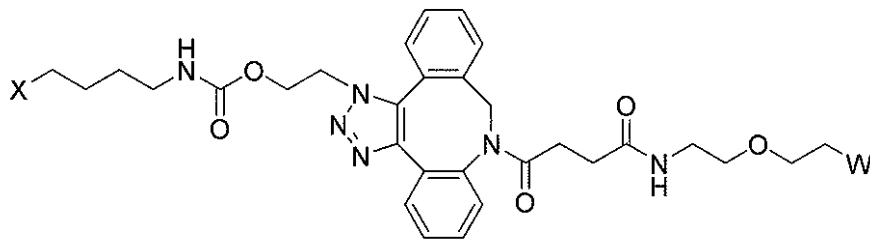
【0605】

実施形態 194. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する、実施形態 189 または 189.1 に記載の方法。

【0606】

実施形態 195. [AzK__L1__PEG5kD] は、式 (IV) の構造
【化172】

10



式(IV);

20

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 189 または 189.1 に記載の方法。

【0607】

実施形態 196. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 45 のアミノ酸配列を有する、実施形態 195 に記載の方法。

【0608】

実施形態 197. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 46 のアミノ酸配列を有する、実施形態 195 に記載の方法。

【0609】

実施形態 198. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する、実施形態 195 に記載の方法。

【0610】

実施形態 199. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 48 のアミノ酸配列を有する、実施形態 195 に記載の方法。

【0611】

実施形態 200. IL-2 コンジュゲートは、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する、実施形態 195 に記載の方法。

【0612】

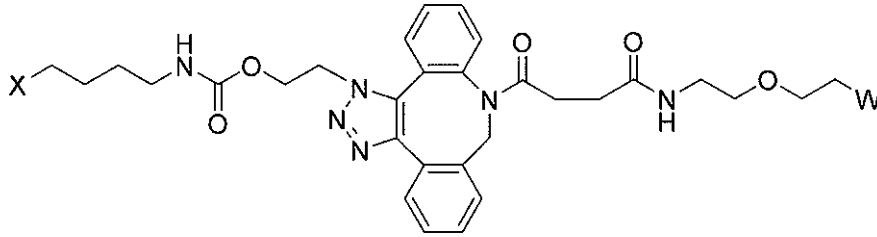
実施形態 201. [AzK__L1__PEG5kD] は、式 (V) の構造

30

40

50

【化 1 7 3】



式(V);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 1 8 9 または 1 8 9 . 1 に記載の方法。

【0 6 1 3】

実施形態 2 0 2 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 0 1 に記載の方法。

【0 6 1 4】

実施形態 2 0 3 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 0 1 に記載の方法。

【0 6 1 5】

実施形態 2 0 4 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 0 1 に記載の方法。

【0 6 1 6】

実施形態 2 0 5 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 0 1 に記載の方法。

【0 6 1 7】

実施形態 2 0 6 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 0 1 に記載の方法。

【0 6 1 8】

実施形態 2 0 7 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 ~ 5 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] は、式 (I V) もしくは式 (V) の構造を有し、もしくは式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

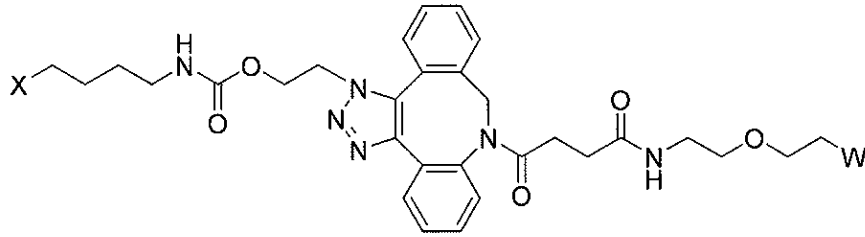
20

30

40

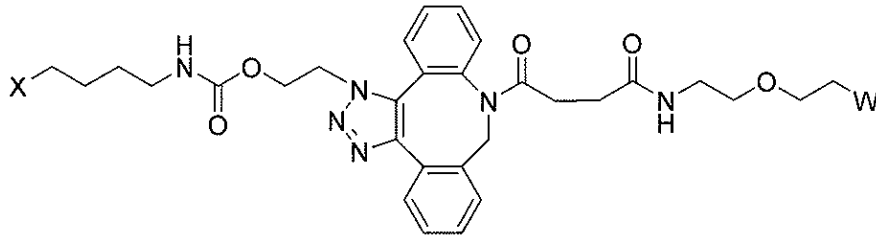
50

【化 1 7 4】



式(IV);

10



式(V);

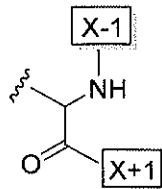
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 7 5】



30

を有する)

であり；またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

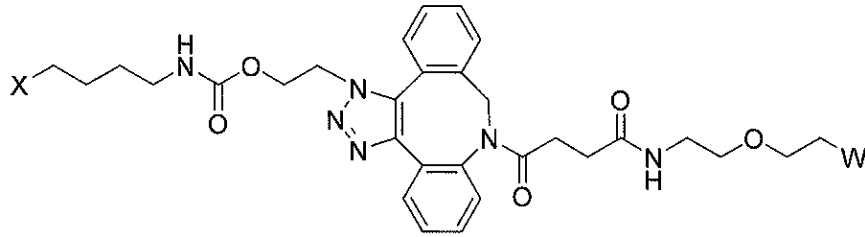
【0619】

実施形態207. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号50～54のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] は、式 (IV) もしくは式 (V) の構造を有し、もしくは式 (IV) および式 (V) の構造の混合物：

40

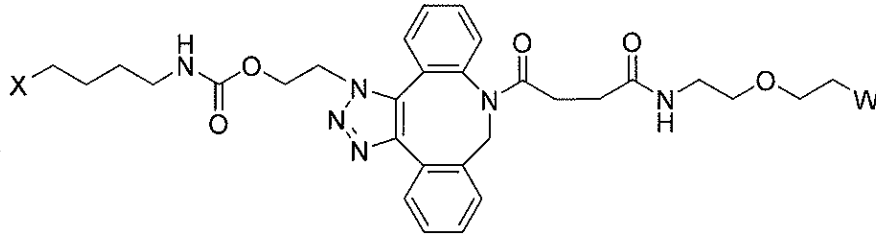
50

【化 1 7 6】



式(IV);

10



式(V);

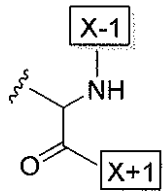
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 7 7】



30

を有する)

であり；またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0620】

実施形態208．IL-2コンジュゲートは、配列番号50のアミノ酸配列を有する、実施形態207または207．1に記載の方法。

【0621】

実施形態209．IL-2コンジュゲートは、配列番号51のアミノ酸配列を有する、実施形態207または207．1に記載の方法。

【0622】

実施形態210．IL-2コンジュゲートは、配列番号52のアミノ酸配列を有する、実施形態207または207．1に記載の方法。

【0623】

実施形態211．IL-2コンジュゲートは、配列番号53のアミノ酸配列を有する、実施形態207または207．1に記載の方法。

【0624】

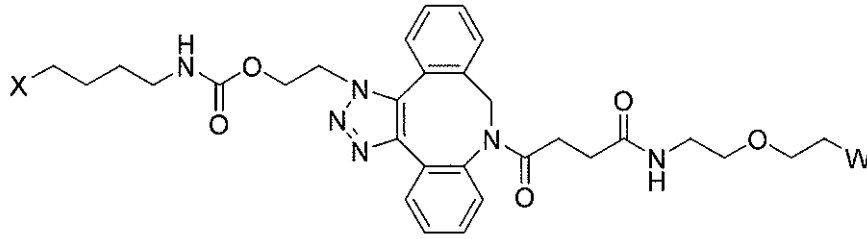
実施形態212．IL-2コンジュゲートは、配列番号54のアミノ酸配列を有する、実施形態207または207．1に記載の方法。

【0625】

実施形態213．[AzK__L1__PEG30kD]は、式(IV)の構造：

50

【化 1 7 8】



式(IV);

10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 2 0 7 または 2 0 7 . 1 に記載の方法。

【 0 6 2 6】

実施形態 2 1 4 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 3 に記載の方法。

【 0 6 2 7】

実施形態 2 1 5 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 3 に記載の方法。

20

【 0 6 2 8】

実施形態 2 1 6 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 3 に記載の方法。

【 0 6 2 9】

実施形態 2 1 7 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 3 に記載の方法。

【 0 6 3 0】

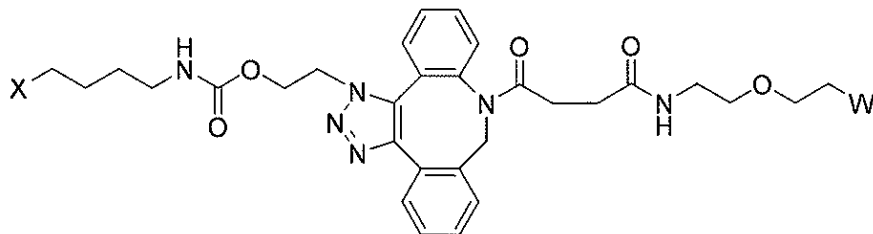
実施形態 2 1 8 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 3 に記載の方法。

【 0 6 3 1】

実施形態 2 1 9 . [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] は、式 (V) の構造

30

【化 1 7 9】



式(V);

40

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を有する、実施形態 2 0 7 または 2 0 7 . 1 に記載の方法。

【 0 6 3 2】

実施形態 2 2 0 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 9 に記載の方法。

【 0 6 3 3】

実施形態 2 2 1 . I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を有する、実施形態 2 1 9 に記載の方法。

50

【0634】

実施形態222．IL-2コンジュゲートは、配列番号52のアミノ酸配列を有する、実施形態219に記載の方法。

【0635】

実施形態223．IL-2コンジュゲートは、配列番号53のアミノ酸配列を有する、実施形態219に記載の方法。

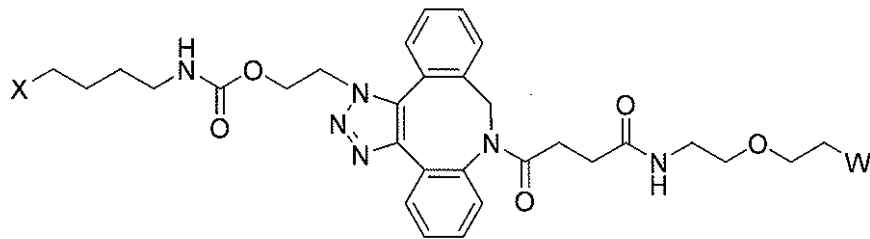
【0636】

実施形態224．IL-2コンジュゲートは、配列番号54のアミノ酸配列を有する、実施形態219に記載の方法。

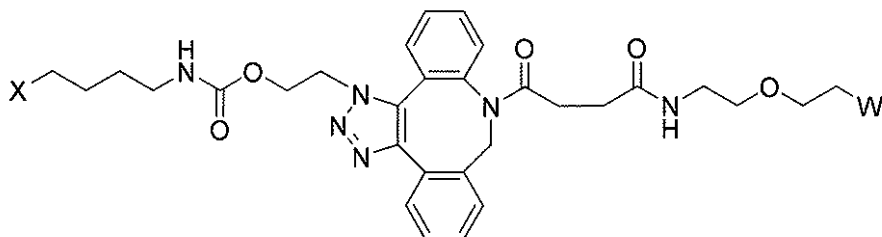
【0637】

実施形態225．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号40～44のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[A z k _ L 1 _ P E G]は、式（IV）および式（V）の構造の混合物：

【化180】



式(IV);



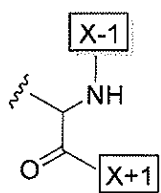
式(V);

（式中：

Wは、5 kDa、10 kDa、15 kDa、20 kDa、25 kDa、30 kDa、35 kDa、40 kDa、45 kDa、50 kDa、および60 kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化181】



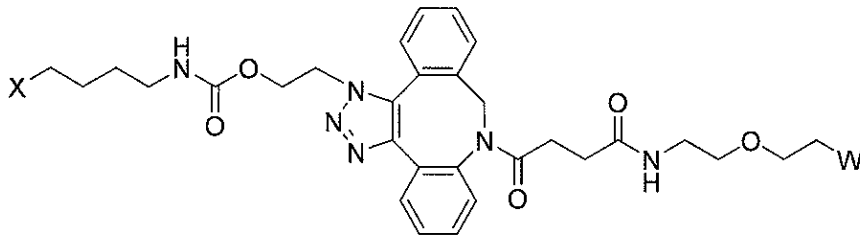
を有する）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

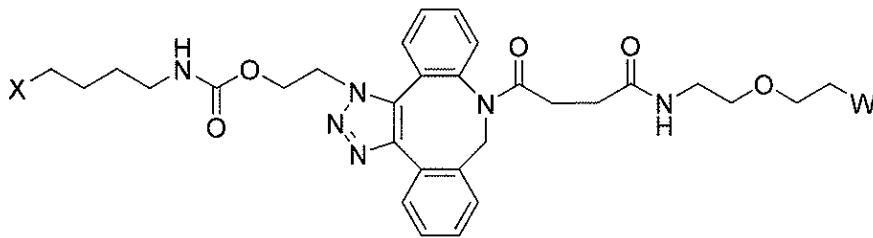
【0638】

実施形態225. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号40～44のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、[AzK__L1__PEG] は、式(IV)および式(V)の構造の混合物：

【化182】



式(IV);



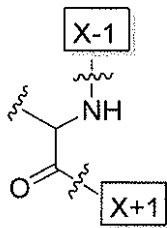
式(V);

(式中：

Wは、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、および60kDaから選択される平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化183】



を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0639】

実施形態226. IL-2 コンジュゲートにおける [AzK__L1__PEG] の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比は、約1：1である、実施形態225または225. 1に記載の方法。

【0640】

実施形態227. IL-2 コンジュゲートにおける [AzK__L1__PEG] の総量を

含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比は、1 : 1 より大きい、実施形態 2 2 5 または 2 2 5 . 1 に記載の方法。

【0 6 4 1】

実施形態 2 2 8 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比は、1 : 1 より小さい、実施形態 2 2 5 または 2 2 5 . 1 に記載の方法。

【0 6 4 2】

実施形態 2 2 9 . W は、直鎖状または分枝状 P E G 基である、実施形態 2 2 5 ~ 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 6 4 3】

実施形態 2 3 0 . W は、直鎖状 P E G 基である、実施形態 2 2 5 ~ 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 6 4 4】

実施形態 2 3 1 . W は、分枝状 P E G 基である、実施形態 2 2 5 ~ 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 6 4 5】

実施形態 2 3 2 . W は、メトキシ P E G 基である、実施形態 2 2 5 ~ 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 6 4 6】

実施形態 2 3 3 . メトキシ P E G 基は、直鎖状または分枝状である、実施形態 2 3 2 に記載の方法。

【0 6 4 7】

実施形態 2 3 4 . メトキシ P E G 基は、直鎖状である、実施形態 2 3 3 に記載の方法。

【0 6 4 8】

実施形態 2 3 5 . メトキシ P E G 基は、分枝状である、実施形態 2 3 3 に記載の方法。

【0 6 4 9】

実施形態 2 3 6 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] は、式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

10

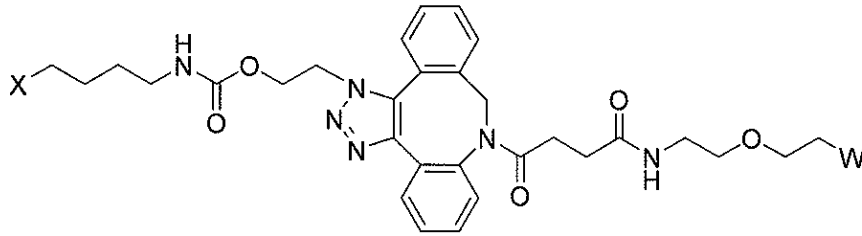
20

30

40

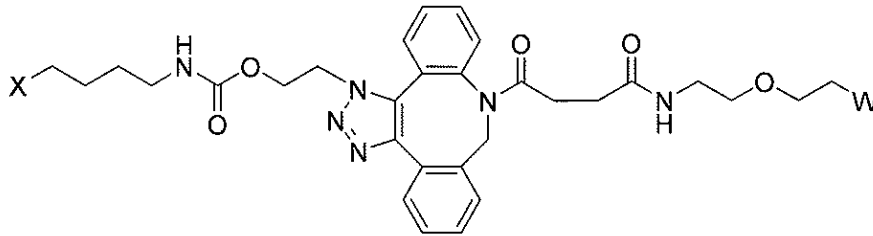
50

【化 1 8 4】



式(IV);

10



式(V);

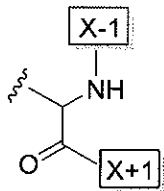
20

(式中：

Wは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基であり；

Xは構造：

【化 1 8 5】



30

を有する)；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

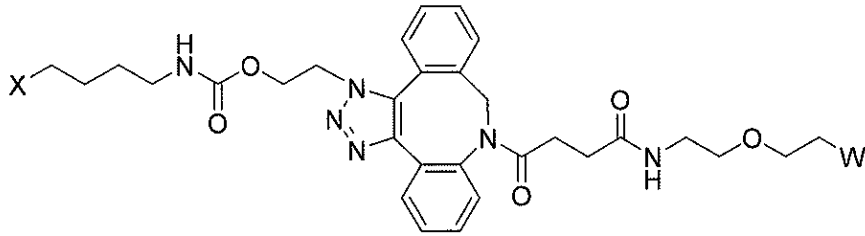
【0 6 5 0】

実施形態 2 3 6 . 1 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a)
I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要
とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 4 5 ~ 4 9 のい
ずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] は、式 (I V) およ
び式 (V) の構造の混合物：

40

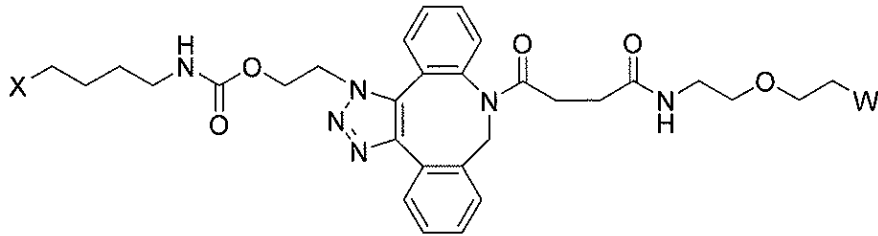
50

【化 1 8 6】



式(IV);

10



式(V);

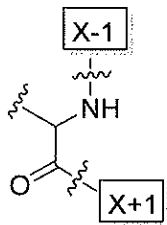
20

(式中：

Wは、5 k D aの平均分子量を有するP E G基であり；

Xは構造：

【化 1 8 7】



30

を有し；

X - 1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【 0 6 5 1】

実施形態 2 3 7 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比は、約 1 : 1 である、実施形態 2 3 6 または 2 3 6 . 1 に記載の方法。

40

【 0 6 5 2】

実施形態 2 3 8 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比は、1 : 1 より大きい、実施形態 2 3 6 または 2 3 6 . 1 に記載の方法。

【 0 6 5 3】

実施形態 2 3 9 . I L - 2 コンジュゲートにおける [A z K _ L 1 _ P E G 5 k D] の総量を含む、式 (I V) の構造の量対式 (V) の構造の量の比は、1 : 1 より小さい、実施形態 2 3 6 または 2 3 6 . 1 に記載の方法。

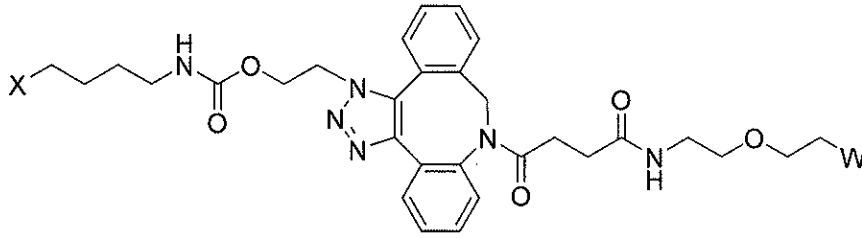
【 0 6 5 4】

実施形態 2 4 0 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L

50

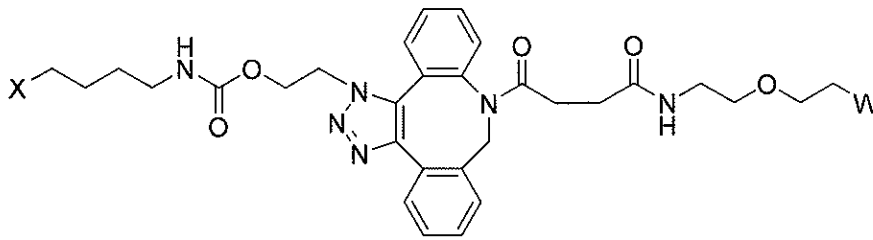
ー 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I Lー 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 ～ 5 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 P E G 3 0 k D] は、式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

【化 1 8 8】



10

式(IV);



20

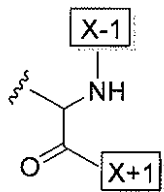
式(V);

(式中：

Wは、3 0 k D a の平均分子量を有する P E G 基であり；

Xは構造：

【化 1 8 9】



30

を有する)；

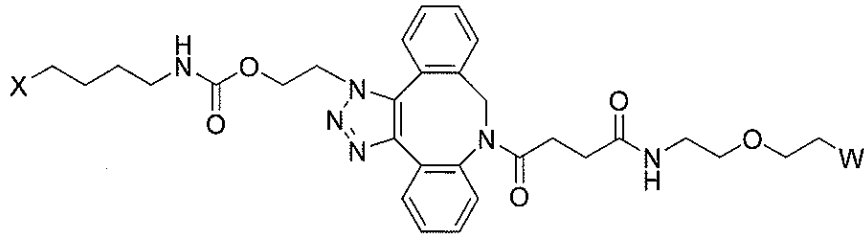
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0 6 5 5】

実施形態 2 4 0 . 1 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I Lー 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I Lー 2 コンジュゲートは、配列番号 5 0 ～ 5 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、[A z K _ L 1 P E G 3 0 k D] は、式 (I V) および式 (V) の構造の混合物：

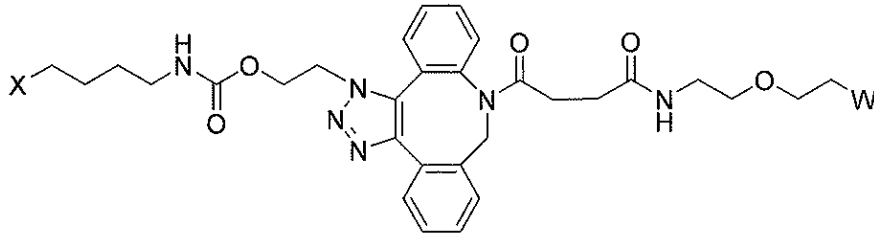
40

【化 1 9 0】



式(IV);

10



式(V);

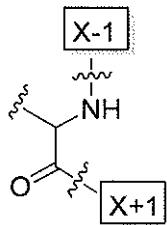
20

(式中：

Wは、30kDaの平均分子量を有するPEG基であり；

Xは構造：

【化 1 9 1】



30

を有し；

X-1は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X+1は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、前記方法。

【0656】

実施形態241．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG30kD]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比は、約1：1である、実施形態240または240.1に記載の方法。

40

【0657】

実施形態242．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG30kD]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比は、1：1より大きい、実施形態240または240.1に記載の方法。

【0658】

実施形態243．IL-2コンジュゲートにおける[AzK__L1__PEG30kD]の総量を含む、式(IV)の構造の量対式(V)の構造の量の比は、1：1より小さい、実施形態240または240.1に記載の方法。

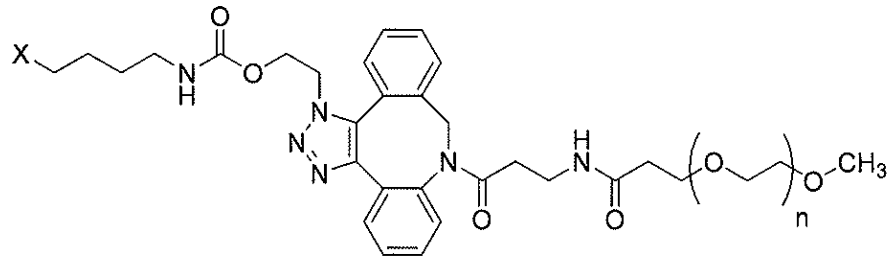
【0659】

実施形態244．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a)IL

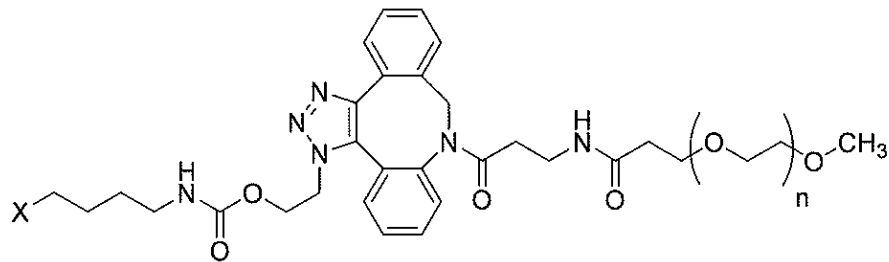
50

ー２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬー２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬー２コンジュゲートにおける少なくとも１つのアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは（ＶＩＩ）、または（ＶＩ）および（ＶＩＩ）の混合物の構造：

【化１９２】



式(VI)



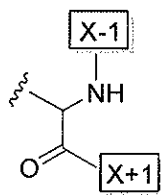
(VII)

（式中：

nは、約２～約５０００の範囲の整数であり；

Xは構造：

【化１９３】



を有する）、

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【０６６０】

実施形態２４４．１．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（ａ）ＩＬー２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬー２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬー２コンジュゲートにおける少なくとも１つのアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは（ＶＩＩ）、または（ＶＩ）および（ＶＩＩ）の混合物の構造：

10

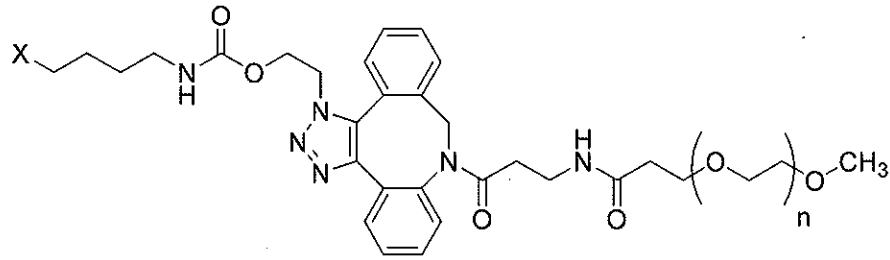
20

30

40

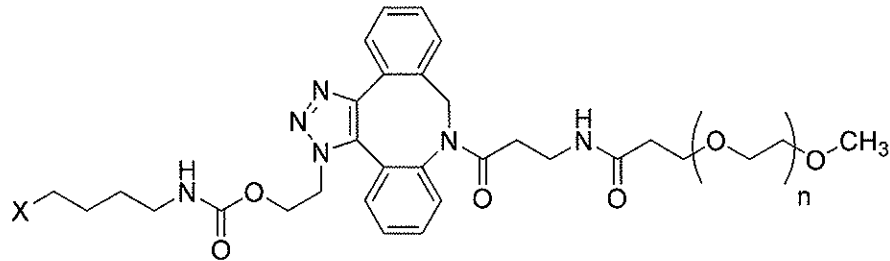
50

【化 1 9 4】



式(VI)

10



(VII)

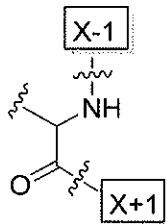
20

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

X は構造：

【化 1 9 5】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【0 6 6 1】

実施形態 2 4 5 . 式 (V I) および (V I I) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0、または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 6 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 4 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 3 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 2 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 6 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 5 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 4 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 2 3 0、または約

40

50

150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲である、実施形態244または244.1に記載の方法。

10

【0662】

実施形態246. 式(VI)および(VII)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である、実施形態244または244.1に記載の方法。

20

【0663】

実施形態247. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される、実施形態244～246のいずれか1つに記載の方法。

【0664】

実施形態248. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、K34である、実施形態247に記載の方法。

30

【0665】

実施形態249. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、F41である、実施形態247に記載の方法。

【0666】

実施形態250. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、F43である、実施形態247に記載の方法。

40

【0667】

実施形態251. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、K42である、実施形態247に記載の方法。

【0668】

実施形態252. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(VII)、または式(VI)および(VII)の混合物の構造の位置は、E61である、実施形態247に記載の方法。

【0669】

実施形態253. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VI)、式(V

50

ⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、P 6 4である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 0】

実施形態2 5 4. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、R 3 7である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 1】

実施形態2 5 5. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、T 4 0である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 2】

実施形態2 5 6. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、E 6 7である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 3】

実施形態2 5 7. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、Y 4 4である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 4】

実施形態2 5 8. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、V 6 8である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 5】

実施形態2 5 9. ⅠⅠ-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VⅠ)、式(VⅠⅠ)、または式(VⅠ)および(VⅠⅠ)の混合物の構造の位置は、L 7 1である、実施形態2 4 7に記載の方法。

【0 6 7 6】

実施形態2 6 0. ⅠⅠ-2コンジュゲートの総量を含む、式(VⅠ)の構造の量対式(VⅠⅠ)の構造の量の比は、1:1より大きい、実施形態2 4 4~2 5 9のいずれか1つに記載の方法。

【0 6 7 7】

実施形態2 6 1. ⅠⅠ-2コンジュゲートの総量を含む、式(VⅠ)の構造の量対式(VⅠⅠ)の構造の量の比は、1:1より小さい、実施形態2 4 4~2 5 9のいずれか1つに記載の方法。

【0 6 7 8】

実施形態2 6 2. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、およびP 6 4から選択され、nは、約4 5 0~約8 0 0、または約4 5 4~約7 9 6、または約4 5 4~約6 8 2、または約5 6 8~約9 0 9の整数である、実施形態2 4 4または2 4 4. 1に記載の方法。

【0 6 7 9】

実施形態2 6 3. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、およびP 6 4から選択され、nは、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、1 1 3 7、および1 2 4 9から選択される整数である、実施形態2 4 4または2 4 4. 1に記載の方法。

【0 6 8 0】

実施形態2 6 4. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E 6 1およびP 6 4から選択され、nは、約4 5 0~約8 0 0、または約4 5 4~約7 9 6、または約4 5 4~約6 8 2、または約5 6 8~約9 0 9の整数である、実施形態2 4 4または2 4 4. 1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 6 8 1 】

実施形態 265. 式 (VI) および (VII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である、実施形態 264 に記載の方法。

【 0 6 8 2 】

実施形態 266. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 であり、n は、約 450 ~ 約 800、または約 454 ~ 約 796、または約 454 ~ 約 682、または約 568 ~ 約 909 の整数である、実施形態 244 または 244. 1 に記載の方法。

【 0 6 8 3 】

実施形態 267. 式 (VI) および (VII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である、実施形態 266 に記載の方法。

【 0 6 8 4 】

実施形態 268. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 であり、n は、約 500 ~ 約 1000 の整数である、実施形態 266 に記載の方法。

【 0 6 8 5 】

実施形態 269. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 であり、n は、約 550 ~ 約 800 の整数である、実施形態 266 に記載の方法。

【 0 6 8 6 】

実施形態 270. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 61 であり、n は、681 である、実施形態 267 に記載の方法。

【 0 6 8 7 】

実施形態 271. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P64 であり、n は、約 450 ~ 約 800、または約 454 ~ 約 796、または約 454 ~ 約 682、または約 568 ~ 約 909 の整数である、実施形態 244 または 244.1 に記載の方法。

【 0 6 8 8 】

実施形態 272. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P64 であり、式 (VI) および (VII) の化合物における n は、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および 910 から選択される整数である、実施形態 271 に記載の方法。

【 0 6 8 9 】

実施形態 273. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P 64 であり、n は、約 500 ~ 約 1000 の整数である、実施形態 271 に記載の方法。

【 0 6 9 0 】

実施形態 274. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P64 であり、n は、約 550 ~ 約 800 の整数である、実施形態 273 に記載の方法。

【 0 6 9 1 】

実施形態 275. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、P 64 であり、n は、681 である、実施形態 271 に記載の方法。

【 0 6 9 2 】

実施形態 276. n は、PEG 部分の分子量が、約 1,000 ダルトン～約 200,000 ダルトン、または約 2,000 ダルトン～約 150,000 ダルトン、または約 3,000 ダルトン～約 125,000 ダルトン、または約 4,000 ダルトン～約 100,000 ダルトン、または約 5,000 ダルトン～約 100,000 ダルトン、または約 6,000 ダルトン～約 90,000 ダルトン、または約 7,000 ダルトン～約 80,000 ダルトン、または約 8,000 ダルトン～約 70,000 ダルトン、または約 5,000 ダルトン～約 70,000 ダルトン、または約 5,000 ダルトン～約 65,000 ダルトン、または約 5,000 ダルトン～約 60,000 ダルトン、または約 5,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 6,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 7,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 7,000 ダルトン

トン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲であるような整数である、実施形態244または244.1に記載の方法。

【0693】

実施形態277. nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である、実施形態244または244.1に記載の方法。

【0694】

実施形態278. nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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、または約50,000ダルトンであるような整数である、実施形態244または244.1に記載の方法。

【0695】

実施形態279. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(VIII)もしくは(IX)、または(VIII)および(IX)の混合物の構造：

10

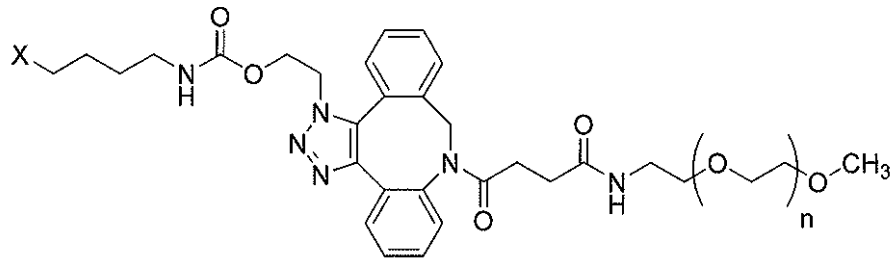
20

30

40

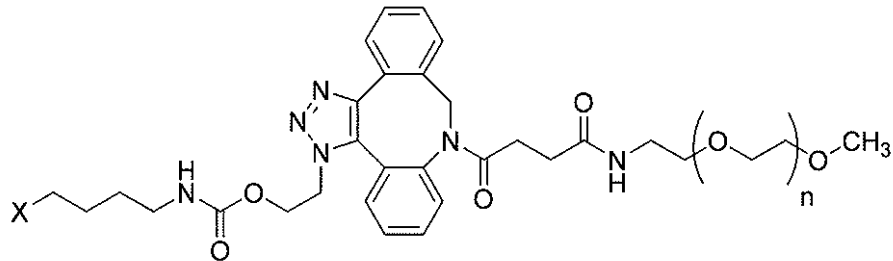
50

【化 1 9 6】



式(VIII)

10



(IX)

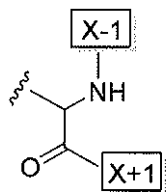
20

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

X は構造：

【化 1 9 7】



30

を有する)、

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

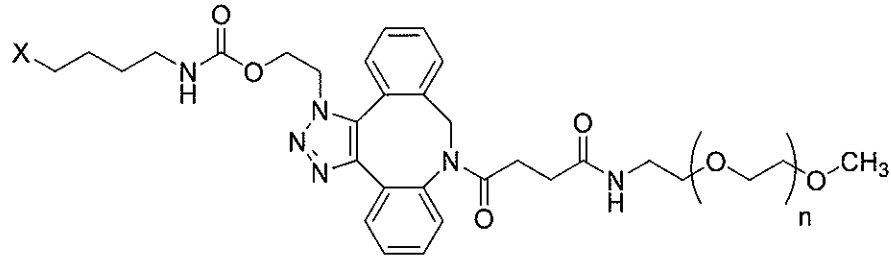
【0 6 9 6】

実施形態 2 7 9 . 1 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (V I I I) もしくは (I X) 、または (V I I I) および (I X) の混合物の構造：

40

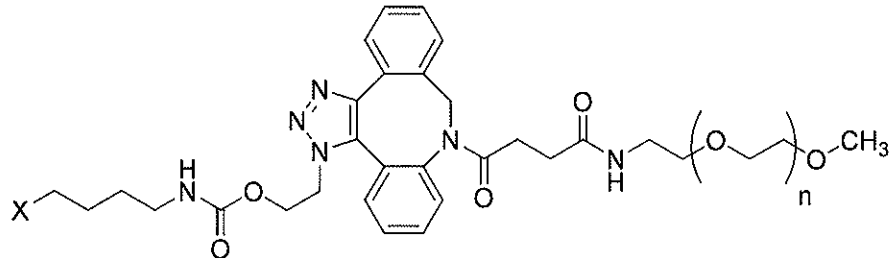
50

【化 1 9 8】



式(VIII)

10



(IX)

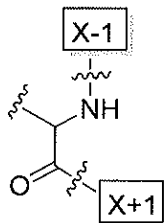
20

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

X は構造：

【化 1 9 9】



30

を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【0 6 9 7】

実施形態 280. 式 (VIII) および (IX) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0、または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 6 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 4 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 3 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 2 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 6 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 5 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 4 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 2 3 0、または

40

50

約150～約475、または約150～約340、または約113～約340、または約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約340～約795、または約341～約682、または約568～約909、または約227～約1500、または約225～約2280、または約460～約2160、または約460～約2050、または約341～約1820、または約341～約1710、または約341～約1250、または約225～約1250、または約341～約1250、または約341～約1136、または約341～約1023、または約341～約910、または約341～約796、または約341～約682、または約341～約568、または約114～約1000、または約114～約950、または約114～約910、または約114～約800、または約114～約690、または約114～約575の範囲である、実施形態279または279.1に記載の方法。

10

【0698】

実施形態281. 式(VIII)および(IX)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

20

【0699】

実施形態282. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される、実施形態279～281のいずれか1つに記載の方法。

【0700】

実施形態283. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、K34である、実施形態282に記載の方法。

30

【0701】

実施形態284. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、F41である、実施形態282に記載の方法。

【0702】

実施形態285. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、F43である、実施形態282に記載の方法。

40

【0703】

実施形態286. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、K42である、実施形態282に記載の方法。

【0704】

実施形態287. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(IX)、または式(VIII)および(IX)の混合物の構造の位置は、E61である、実施形態282に記載の方法。

【0705】

実施形態288. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式

50

(IX)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、P64である、実施形態282に記載の方法。

【0706】

実施形態289. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、R37である、実施形態282に記載の方法。

【0707】

実施形態290. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、T40である、実施形態282に記載の方法。

【0708】

実施形態291. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、E67である、実施形態282に記載の方法。

【0709】

実施形態292. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、Y44である、実施形態282に記載の方法。

【0710】

実施形態293. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、V68である、実施形態282に記載の方法。

【0711】

実施形態294. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(VIII)、式(X)、または式(VIII)および(X)の混合物の構造の位置は、L71である、実施形態282に記載の方法。

【0712】

実施形態295. IL-2コンジュゲートの総量を含む、式(VIII)の構造の量対式(X)の構造の量の比は、1:1より大きい、実施形態279~294のいずれか1つに記載の方法。

【0713】

実施形態296. IL-2コンジュゲートの総量を含む、式(VIII)の構造の量対式(X)の構造の量の比は、1:1より小さい、実施形態279~294のいずれか1つに記載の方法。

【0714】

実施形態297. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0715】

実施形態298. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0716】

実施形態299. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、nは、約450~約800、または約454~約796、または約454~約682、または約568~約909の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0717】

実施形態300. 式(VIII)および(IX)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態299に記載の方法。

【0718】

実施形態301. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0719】

実施形態302. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、式(VIII)および(IX)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態300に記載の方法。

10

【0720】

実施形態303. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、約500～約1000の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0721】

実施形態304. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、約550～約800の整数である、実施形態303に記載の方法。

【0722】

実施形態305. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、681である、実施形態302に記載の方法。

20

【0723】

実施形態306. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0724】

実施形態307. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、式(VIII)および(IX)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

30

【0725】

実施形態308. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約500～約1000の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0726】

実施形態309. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約550～約800の整数である、実施形態279または279.1に記載の方法。

【0727】

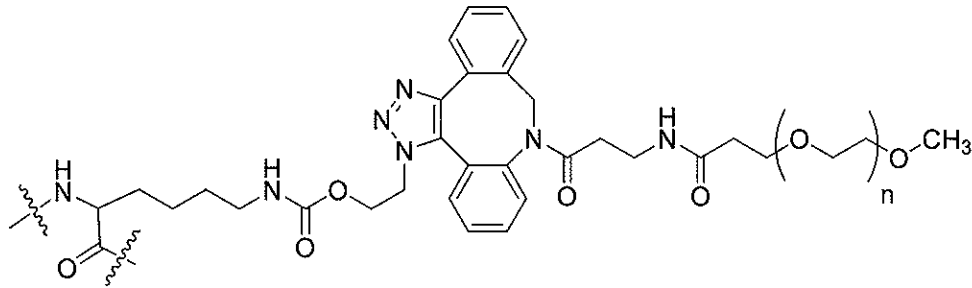
実施形態310. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、681である、実施形態307に記載の方法。

40

【0728】

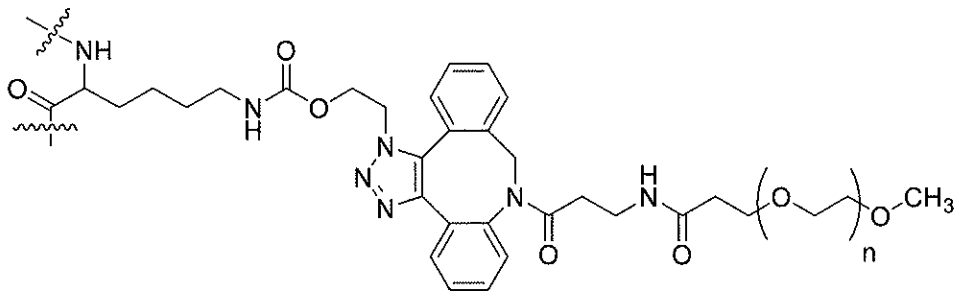
実施形態311. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、式(X)もしくは(XI)、または(X)および(XI)の混合物の構造：

【化 2 0 0】



式(X)

10



(XI)

20

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号 3 内のアミノ酸残基への共有結合を示す)
に置き換えられている、前記方法。

【 0 7 2 9】

実施形態 3 1 2 . 式 (X) および (X I) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0 、
 または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0 、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0 、
 または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0 、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0 、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0
 0 、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1
 9 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0 、または約 1 0 0 ～
 約 1 6 5 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 4 0 0 、または約 1 0
 0 ～ 約 1 3 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 2 5 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 5 0 、または約
 1 0 0 ～ 約 1 1 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 1 0 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 9 0 0 、または
 約 1 0 0 ～ 約 7 5 0 、または約 1 0 0 ～ 約 7 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 6 0 0 、または約
 1 0 0 ～ 約 5 7 5 、または約 1 0 0 ～ 約 5 0 0 、または約 1 0 0 ～ 約 4 5 0 、または約 1
 0 0 ～ 約 3 5 0 、または約 1 0 0 ～ 約 2 7 5 、または約 1 0 0 ～ 約 2 3 0 、または約 1 5
 0 ～ 約 4 7 5 、または約 1 5 0 ～ 約 3 4 0 、または約 1 1 3 ～ 約 3 4 0 、または約 4 5 0
 ～ 約 8 0 0 、または約 4 5 4 ～ 約 7 9 6 、または約 4 5 4 ～ 約 6 8 2 、または約 3 4 0 ～
 約 7 9 5 、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2 、または約 5 6 8 ～ 約 9 0 9 、または約 2 2 7 ～ 約
 1 5 0 0 、または約 2 2 5 ～ 約 2 2 8 0 、または約 4 6 0 ～ 約 2 1 6 0 、または約 4 6 0
 ～ 約 2 0 5 0 、または約 3 4 1 ～ 約 1 8 2 0 、または約 3 4 1 ～ 約 1 7 1 0 、または約 3
 4 1 ～ 約 1 2 5 0 、または約 2 2 5 ～ 約 1 2 5 0 、または約 3 4 1 ～ 約 1 2 5 0 、または
 約 3 4 1 ～ 約 1 1 3 6 、または約 3 4 1 ～ 約 1 0 2 3 、または約 3 4 1 ～ 約 9 1 0 、また
 は約 3 4 1 ～ 約 7 9 6 、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2 、または約 3 4 1 ～ 約 5 6 8 、または
 約 1 1 4 ～ 約 1 0 0 0 、または約 1 1 4 ～ 約 9 5 0 、または約 1 1 4 ～ 約 9 1 0 、または
 約 1 1 4 ～ 約 8 0 0 、または約 1 1 4 ～ 約 6 9 0 、または約 1 1 4 ～ 約 5 7 5 の範囲であ
 る、実施形態 3 1 1 に記載の方法。

30

40

50

【0730】

実施形態313. 式(X)および(XI)の化合物におけるnは、2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545、および4546から選択される整数である、実施形態311に記載の方法。

10

【0731】

実施形態314. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、およびL71から選択される、実施形態311~313のいずれか1つに記載の方法。

【0732】

実施形態315. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、K34である、実施形態314に記載の方法。

20

【0733】

実施形態316. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、F41である、実施形態314に記載の方法。

【0734】

実施形態317. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、F43である、実施形態314に記載の方法。

【0735】

実施形態318. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、K42である、実施形態314に記載の方法。

30

【0736】

実施形態319. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、E61である、実施形態314に記載の方法。

【0737】

実施形態320. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、P64である、実施形態314に記載の方法。

40

【0738】

実施形態321. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、R37である、実施形態314に記載の方法。

【0739】

実施形態322. IL-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X)、式(XI)、または式(X)および(XI)の混合物の構造の位置は、T40である、実施形態314に記載の方法。

【0740】

50

実施形態 3 2 3. I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X)、式 (X I)、または式 (X) および (X I) の混合物の構造の位置は、E 6 7 である、実施形態 3 1 4 に記載の方法。

【0 7 4 1】

実施形態 3 2 4. I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X)、式 (X I)、または式 (X) および (X I) の混合物の構造の位置は、Y 4 4 である、実施形態 3 1 4 に記載の方法。

【0 7 4 2】

実施形態 3 2 5. I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X)、式 (X I)、または式 (X) および (X I) の混合物の構造の位置は、V 6 8 である、実施形態 3 1 4 に記載の方法。

【0 7 4 3】

実施形態 3 2 6. I L - 2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (X)、式 (X I)、または式 (X) および (X I) の混合物の構造の位置は、L 7 1 である、実施形態 3 1 4 に記載の方法。

【0 7 4 4】

実施形態 3 2 7. I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (X) の構造の量対式 (X I) の構造の量の比は、1 : 1 より大きい、実施形態 3 1 1 ~ 3 2 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 4 5】

実施形態 3 2 8. I L - 2 コンジュゲートの総量を含む、式 (X) の構造の量対式 (X I) の構造の量の比は、1 : 1 より小さい、実施形態 3 1 1 ~ 3 2 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 7 4 6】

実施形態 3 2 9. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、および P 6 4 から選択され、n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、実施形態 3 1 1 に記載の方法。

【0 7 4 7】

実施形態 3 3 0. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、および P 6 4 から選択され、n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、9 1 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 1 3 5、1 1 3 6、1 1 3 7、および 1 2 4 9 から選択される整数である、実施形態 3 1 1 に記載の方法。

【0 7 4 8】

実施形態 3 3 1. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 6 1 および P 6 4 から選択され、n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、実施形態 3 1 1 に記載の方法。

【0 7 4 9】

実施形態 3 3 2. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、F 4 1、F 4 3、K 4 2、E 6 1、および P 6 4 から選択され、式 (X) および (X I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5 6 8、5 6 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、7 9 4、7 9 5、7 9 6、9 0 8、9 0 9、および 9 1 0 から選択される整数である、実施形態 3 3 0 に記載の方法。

【0 7 5 0】

実施形態 3 3 3. 置き換えられる配列番号 3 中のアミノ酸残基は、E 6 1 であり、n は、約 4 5 0 ~ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ~ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ~ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ~ 約 9 0 9 の整数である、実施形態 3 1 1 に記載の方法。

【0 7 5 1】

実施形態 3 3 4. 式 (X) および (X I) の化合物における n は、4 5 4、4 5 5、5

10

20

30

40

50

68、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態311に記載の方法。

【0752】

実施形態335．nは、約500～約1000である、実施形態311に記載の方法。

【0753】

実施形態336．nは、約550～約800である、実施形態335に記載の方法。

【0754】

実施形態337．nは、681である、実施形態332に記載の方法。

【0755】

実施形態338．置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態311に記載の方法。

10

【0756】

実施形態339．置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、式(X)および(XI)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態311に記載の方法。

【0757】

実施形態340．置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約500～約1000の整数である、実施形態311に記載の方法。

20

【0758】

実施形態341．置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約550～約800の整数である、実施形態340に記載の方法。

【0759】

実施形態342．置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、681である、実施形態339に記載の方法。

【0760】

実施形態343．nは、PEG部分の分子量が、約1,000ダルトン～約200,000ダルトン、または約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、または約3,000ダルトン～約125,000ダルトン、または約4,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約90,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約80,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約65,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約60,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または

30

40

50

約 15,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 15,000 ダルトン～約 30,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 50,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 45,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 40,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 35,000 ダルトン、または約 20,000 ダルトン～約 30,000 ダルトンの範囲であるような整数である、実施形態 311 に記載の方法。

【0761】

実施形態 344. n は、PEG 部分の分子量が、約 5,000 ダルトン、約 7,500 ダルトン、約 10,000 ダルトン、約 15,000 ダルトン、約 20,000 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 60,000 ダルトン、約 70,000 ダルトン、約 80,000 ダルトン、約 90,000 ダルトン、約 100,000 ダルトン、約 125,000 ダルトン、約 150,000 ダルトン、約 175,000 ダルトンまたは約 200,000 ダルトンであるような整数である、実施形態 311 に記載の方法。

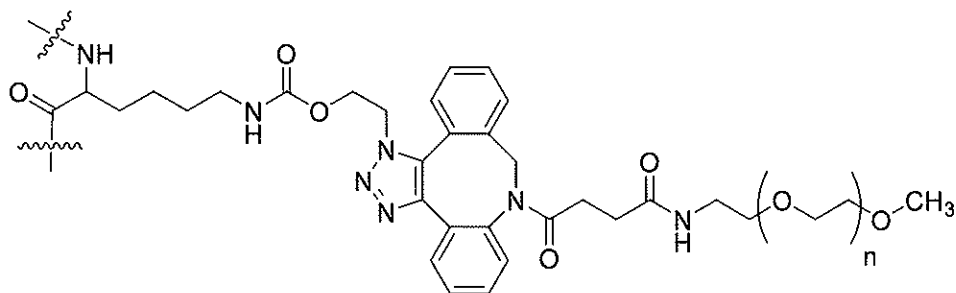
【0762】

実施形態 345. n は、PEG 部分の分子量が、約 5,000 ダルトン、約 7,500 ダルトン、約 10,000 ダルトン、約 15,000 ダルトン、約 20,000 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、または約 50,000 ダルトンであるような整数である、実施形態 311 に記載の方法。

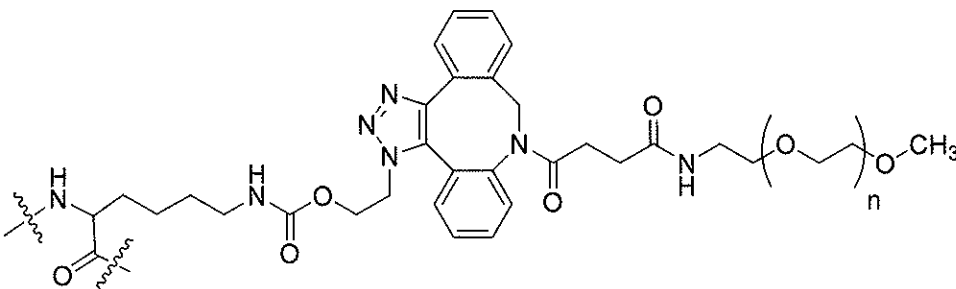
【0763】

実施形態 346. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、式 (XII) もしくは (XIII)、または (XII) および (XIII) の混合物の構造：

【化 201】



式(XII)



(XIII)

(式中：

n は、約 2 ～ 約 5 0 0 0 の範囲の整数であり；

波線は、置き換えられていない配列番号 3 内のアミノ酸残基への共有結合を示す)
に置き換えられている、前記方法。

【0764】

実施形態 347. 式 (XII) および (XIII) の化合物における n は、約 5 ～ 約 4 6 0 0、または約 1 0 ～ 約 4 0 0 0、または約 2 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 5 0 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 2 5 ～ 約 2 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 8 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 6 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 4 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 3 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 2 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 1 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 9 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 7 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 6 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 5 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 5 0 0、または約 1 0 0 ～ 約 4 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 3 5 0、または約 1 0 0 ～ 約 2 7 5、または約 1 0 0 ～ 約 2 3 0、または約 1 5 0 ～ 約 4 7 5、または約 1 5 0 ～ 約 3 4 0、または約 1 1 3 ～ 約 3 4 0、または約 4 5 0 ～ 約 8 0 0、または約 4 5 4 ～ 約 7 9 6、または約 4 5 4 ～ 約 6 8 2、または約 3 4 0 ～ 約 7 9 5、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2、または約 5 6 8 ～ 約 9 0 9、または約 2 2 7 ～ 約 1 5 0 0、または約 2 2 5 ～ 約 2 2 8 0、または約 4 6 0 ～ 約 2 1 6 0、または約 4 6 0 ～ 約 2 0 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 8 2 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 7 1 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 2 5 0、または約 2 2 5 ～ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 2 5 0、または約 3 4 1 ～ 約 1 1 3 6、または約 3 4 1 ～ 約 1 0 2 3、または約 3 4 1 ～ 約 9 1 0、または約 3 4 1 ～ 約 7 9 6、または約 3 4 1 ～ 約 6 8 2、または約 3 4 1 ～ 約 5 6 8、または約 1 1 4 ～ 約 1 0 0 0、または約 1 1 4 ～ 約 9 5 0、または約 1 1 4 ～ 約 9 1 0、または約 1 1 4 ～ 約 8 0 0、または約 1 1 4 ～ 約 6 9 0、または約 1 1 4 ～ 約 5 7 5 の範囲である、実施形態 346 に記載の方法。

【0765】

実施形態 348. 式 (XII) および (XIII) の化合物における n は、2、5、1 0、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、4 55、568、569、680、681、682、794、795、796、908、9 09、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、124 9、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、147 8、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、181 8、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、215 8、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、284 1、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、397 7、3978、4544、4545、および 4546 から選択される整数である、実施形 態 346 に記載の方法。

【0766】

実施形態 349. IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (XII)、式 (XIII)、または式 (XII) および (XIII) の混合物の構造の位置は、K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68、および L71 から選択される、実施形態 346 ～ 348 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0767】

実施形態 350. IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (XII)、式 (XIII)、または式 (XII) および (XIII) の混合物の構造の位置は、K34 である、実施形態 349 に記載の方法。

【0768】

実施形態 351. IL-2 コンジュゲートのアミノ酸配列における式 (XII)、式 (

X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、F 4 1である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 6 9】

実施形態3 5 2. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、F 4 3である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 0】

実施形態3 5 3. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、K 4 2である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 1】

実施形態3 5 4. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、E 6 1である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 2】

実施形態3 5 5. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、P 6 4である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 3】

実施形態3 5 6. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、R 3 7である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 4】

実施形態3 5 7. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、T 4 0である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 5】

実施形態3 5 8. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、E 6 7である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 6】

実施形態3 5 9. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、Y 4 4である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 7】

実施形態3 6 0. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、V 6 8である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 8】

実施形態3 6 1. I L-2コンジュゲートのアミノ酸配列における式(X I I)、式(X I I I)、または式(X I I)および(X I I I)の混合物の構造の位置は、L 7 1である、実施形態3 4 9に記載の方法。

【0 7 7 9】

実施形態3 6 2. I L-2コンジュゲートの総量を含む、式(X I I)の構造の量対式(X I I I)の構造の量の比は、1:1より大きい、実施形態3 4 6~3 6 1のいずれか1つに記載の方法。

【0 7 8 0】

実施形態3 6 3. I L-2コンジュゲートの総量を含む、式(X I I)の構造の量対式(X I I I)の構造の量の比は、1:1より小さい、実施形態3 4 6~3 6 1のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0781】

実施形態364. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態346に記載の方法。

【0782】

実施形態365. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、nは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、および1249から選択される整数である、実施形態346に記載の方法。

10

【0783】

実施形態366. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61およびP64から選択され、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態346に記載の方法。

【0784】

実施形態367. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、F41、F43、K42、E61、およびP64から選択され、式(XII)および(XIII)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態365に記載の方法。

20

【0785】

実施形態368. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、E61であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態346に記載の方法。

【0786】

実施形態369. 式(XII)および(XIII)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態346に記載の方法。

【0787】

実施形態370. nは、約500～約1000である、実施形態346に記載の方法。

30

【0788】

実施形態371. nは、約550～約800である、実施形態370に記載の方法。

【0789】

実施形態372. nは、681である、実施形態369に記載の方法。

【0790】

実施形態373. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約450～約800、または約454～約796、または約454～約682、または約568～約909の整数である、実施形態346に記載の方法。

【0791】

実施形態374. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、式(XII)および(XIII)の化合物におけるnは、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、および910から選択される整数である、実施形態346に記載の方法。

40

【0792】

実施形態375. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約500～約1000の整数である、実施形態346に記載の方法。

【0793】

実施形態376. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、約550～約800の整数である、実施形態375に記載の方法。

50

【0794】

実施形態377. 置き換えられる配列番号3中のアミノ酸残基は、P64であり、nは、681である、実施形態374に記載の方法。

【0795】

実施形態378. nは、PEG部分の分子量が、約1,000ダルトン～約200,000ダルトン、または約2,000ダルトン～約150,000ダルトン、または約3,000ダルトン～約125,000ダルトン、または約4,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約100,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約90,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約80,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約70,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約65,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約60,000ダルトン、または約5,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約6,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約7,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約40,000ダルトン、または約8,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約35,000ダルトン、または約9,500ダルトン～約30,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約10,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約15,000ダルトン～約30,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約50,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約45,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約40,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約35,000ダルトン、または約20,000ダルトン～約30,000ダルトンの範囲であるような整数である、実施形態346に記載の方法。

【0796】

実施形態379. nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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60,000ダルトン、約70,000ダルトン、約80,000ダルトン、約90,000ダルトン、約100,000ダルトン、約125,000ダルトン、約150,000ダルトン、約175,000ダルトンまたは約200,000ダルトンであるような整数である、実施形態346に記載の方法。

【0797】

実施形態380. nは、PEG部分の分子量が、約5,000ダルトン、約7,500ダルトン、約10,000ダルトン、約15,000ダルトン、約20,000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、または約50,000ダルトンであるような整数である、実施形態346に記載の方法。

【0798】

実施形態381. 1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻

10

20

30

40

50

害剤、PD-L2阻害剤、CTLA-4阻害剤、OX40アゴニストおよび4-1BBアゴニストからなる群から選択される1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤である、実施形態1～380のいずれか1つに記載の方法。

【0799】

実施形態382. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤から選択される、実施形態381に記載の方法。

【0800】

実施形態383. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ (GSK)、PDR001 (Novartis)、MGA012 (Macrogenics/Incyte)、GLS-010 (Arcus/Wuxi)、AGEN2024 (Agenus)、セトレリマブ (Janssen)、ABBV-181 (Abbvie)、AMG-404 (Amgen)、BI-754091 (Boehringer Ingelheim)、CC-90006 (Celgene)、JTX-4014 (Jounce)、PF-06801591 (Pfizer)、およびゲノリムズマブ (Apollomics/Genor Biopharma) から選択される、実施形態382に記載の方法。

【0801】

実施形態384. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態383に記載の方法。

【0802】

実施形態385. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ニボルマブである、実施形態383に記載の方法。

【0803】

実施形態386. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、セミプリマブである、実施形態383に記載の方法。

【0804】

実施形態387. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ランブロリズマブである、実施形態383に記載の方法。

【0805】

実施形態388. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、AMP-224である、実施形態383に記載の方法。

【0806】

実施形態389. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、シンチリマブである、実施形態383に記載の方法。

【0807】

実施形態390. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、トリパリマブである、実施形態383に記載の方法。

【0808】

実施形態391. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、カムレリズマブである、実施形態383に記載の方法。

【0809】

実施形態392. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、チスレリズマブである、実施形態383に記載の方法。

【0810】

実施形態393. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1阻害剤から選択される、実施形態381に記載の方法。

【0811】

実施形態394. 1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-0

10

20

30

40

50

72 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、コシベリマブ (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte)、およびTG-1501 (TG Therapeutics) から選択される、実施形態393に記載の方法。

【0812】

実施形態395. 1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブである、実施形態394に記載の方法。

【0813】

実施形態396. 1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アベルマブである、実施形態394に記載の方法。

【0814】

実施形態397. 1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、デュルバルマブである、実施形態394に記載の方法。

【0815】

実施形態398. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される、実施形態381に記載の方法。

【0816】

実施形態399. 1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリムマブ、イピリムマブ、およびAGEN-1884 (Agenus) から選択される、実施形態398に記載の方法。

【0817】

実施形態400. 1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリムマブである、実施形態399に記載の方法。

【0818】

実施形態401. 1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、イピリムマブである、実施形態399に記載の方法。

【0819】

実施形態402. 対象におけるがんは、腎細胞癌 (RCC)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、頭頸部扁平上皮がん (HNSCC)、古典的ホジキンリンパ腫 (cHL)、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫 (PMBC L)、尿路上皮癌、マイクロサテライト不安定性がん、マイクロサテライト安定性がん、胃がん、子宮頸がん、肝細胞癌 (HCC)、メルケル細胞癌 (MCC)、黒色腫、小細胞肺癌 (SCLC)、食道の、膠芽腫、中皮腫、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、前立腺がん、去勢抵抗性前立腺がん、転移性去勢抵抗性前立腺がん、またはDNAダメージ応答 (DDR) 欠損を有する転移性去勢抵抗性前立腺がん、膀胱がん、卵巣がん、中度から軽度の変異性負荷の腫瘍、皮膚扁平上皮癌 (CSCC)、扁平上皮皮膚がん (SCSC)、低発現から非発現のPD-L1の腫瘍、その原発性解剖学的起源部位を超えて肝臓およびCNSに全身的に播種された腫瘍、ならびにびまん性大細胞型B細胞リンパ腫から選択される、実施形態1～401のいずれか1つに記載の方法。

【0820】

実施形態403. 対象におけるがんは、腎細胞癌 (RCC)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、尿路上皮癌および黒色腫から選択される、実施形態402に記載の方法。

【0821】

実施形態404. IL-2コンジュゲートは、1週当たり一回、2週毎に一回、3週毎に一回、4週毎に一回、5週毎に一回、6週毎に一回、7週毎に一回または8週毎に一回、それを必要とする対象に投与される、実施形態1～403のいずれか1つに記載の方法。

【0822】

実施形態405. IL-2コンジュゲートは、それを必要とする対象に、1週当たり一回、2週毎に一回、または3週毎に一回投与される、実施形態404に記載の方法。

【0823】

10

20

30

40

50

実施形態 406. IL-2 コンジュゲートは、それを必要とする対象に、2 週毎に一回投与される、実施形態 405 に記載の方法。

【0824】

実施形態 407. IL-2 コンジュゲートは、それを必要とする対象に、3 週毎に一回投与される、実施形態 405 に記載の方法。

【0825】

実施形態 408. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 1～407 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0826】

実施形態 409. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象におけるグレード 2、グレード 3 またはグレード 4 の血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 408 に記載の方法。

10

【0827】

実施形態 410. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象におけるグレード 2 の血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 409 に記載の方法。

【0828】

実施形態 411. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象におけるグレード 3 の血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 409 に記載の方法。

【0829】

実施形態 412. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象におけるグレード 4 の血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 409 に記載の方法。

20

【0830】

実施形態 413. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における血管緊張の喪失を引き起こさない、実施形態 1～412 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0831】

実施形態 414. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における血管外空間への血漿タンパク質および流体の溢出を引き起こさない、実施形態 1～413 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0832】

実施形態 415. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における低血圧および低下した臓器灌流を引き起こさない、実施形態 1～414 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0833】

実施形態 416. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における好中球機能障害を引き起こさない、実施形態 1～415 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0834】

実施形態 417. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における走化性の低下を引き起こさない、実施形態 1～415 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0835】

実施形態 418. 対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象における播種性感染のリスクの増加と関連しない、実施形態 1～417 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0836】

実施形態 419. 播種性感染は、敗血症または細菌性心内膜炎である、実施形態 418 に記載の方法。

【0837】

実施形態 420. 播種性感染は敗血症である、実施形態 419 に記載の方法。

【0838】

実施形態 421. 播種性感染は細菌性心内膜炎である、実施形態 419 に記載の方法。

【0839】

実施形態 422. 対象は、IL-2 コンジュゲートの投与前に、いずれかの既存の細菌

50

感染について治療されている、実施形態 1～4 2 1 のいずれか 1 つに記載の対象におけるがんを治療する方法。

【0 8 4 0】

実施形態 4 2 3 . 対象は、I L - 2 コンジュゲートの投与前に、オキサシリン、ナフシリン、シプロフロキサシンおよびバンコマイシンから選択される抗菌剤で治療されている、実施形態 4 2 2 に記載の方法。

【0 8 4 1】

実施形態 4 2 4 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象における自己免疫疾患または炎症性障害の既存または初期の発現を悪化させない、実施形態 1～4 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 4 2】

実施形態 4 2 5 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象における自己免疫疾患の既存または初期の発現を悪化させない、実施形態 4 2 4 に記載の方法。

【0 8 4 3】

実施形態 4 2 6 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象における炎症性障害の既存または初期の発現を悪化させない、実施形態 4 2 4 に記載の方法。

【0 8 4 4】

実施形態 4 2 7 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は、クローン病、強皮症、甲状腺炎、炎症性関節炎、糖尿病、眼球重症筋無力症、半月体形成性 I g A 糸球体腎炎、胆嚢炎、脳血管炎、スチーブンスージョン症候群および水疱性類天疱瘡から選択される、実施形態 4 2 4 に記載の方法。

【0 8 4 5】

実施形態 4 2 8 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害はクローン病である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 4 6】

実施形態 4 2 9 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は強皮症である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 4 7】

実施形態 4 3 0 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は甲状腺炎である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 4 8】

実施形態 4 3 1 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は炎症性関節炎である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 4 9】

実施形態 4 3 2 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は糖尿病である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 0】

実施形態 4 3 3 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は眼球重症筋無力症である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 1】

実施形態 4 3 4 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は半月体形成性 I g A 糸球体腎炎である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 2】

実施形態 4 3 5 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は胆嚢炎である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 3】

実施形態 4 3 6 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は脳血管炎である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 4】

実施形態 4 3 7 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害はスチーブンスージョン

10

20

30

40

50

ソン症候群である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 5】

実施形態 4 3 8 . 対象における自己免疫疾患または炎症性障害は水疱性類天疱瘡である、実施形態 4 2 7 に記載の方法。

【0 8 5 6】

実施形態 4 3 9 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象において精神状態の変化、言語障害、皮質盲、四肢もしくは歩行失調、幻覚、動揺、鈍麻または昏睡を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 3 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 5 7】

実施形態 4 4 0 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象において発作を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0 8 5 8】

実施形態 4 4 1 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、既知の発作性障害を有する対象において禁忌ではない、実施形態 1 ~ 4 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 5 9】

実施形態 4 4 2 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象において毛細血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 6 0】

実施形態 4 4 3 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象においてグレード 2、グレード 3 またはグレード 4 の毛細血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 4 4 2 に記載の方法。

20

【0 8 6 1】

実施形態 4 4 4 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象においてグレード 2 の毛細血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 4 4 3 に記載の方法。

【0 8 6 2】

実施形態 4 4 5 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象においてグレード 3 の毛細血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 4 4 3 に記載の方法。

【0 8 6 3】

実施形態 4 4 6 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象においてグレード 4 の毛細血管漏出症候群を引き起こさない、実施形態 4 4 3 に記載の方法。

30

【0 8 6 4】

実施形態 4 4 7 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象への I L - 2 コンジュゲートの投与後、対象において平均動脈圧の低下を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 4 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 6 5】

実施形態 4 4 8 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象への I L - 2 コンジュゲートの投与後、対象において低血圧を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 6 6】

実施形態 4 4 9 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与により、対象への I L - 2 コンジュゲートの投与後、対象は 9 0 mm H g 以下の収縮期血圧またはベースラインの収縮期圧から 2 0 mm H g の低下を経験しない、実施形態 4 4 8 に記載の方法。

40

【0 8 6 7】

実施形態 4 5 0 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象への I L - 2 コンジュゲートの投与後、対象において浮腫を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 4 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 8 6 8】

実施形態 4 5 1 . 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、対象への I L - 2 コンジュゲートの投与後、対象において腎機能または肝機能の障害を引き起こさない、実施形態 1 ~ 4 5 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【0869】

実施形態452. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象において好酸球増加症を引き起こさない、実施形態1～451のいずれか1つに記載の方法。

【0870】

実施形態453. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与により、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象の末梢血中の好酸球数は1μL当たり500個を超えない、実施形態452に記載の方法。

【0871】

実施形態454. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与により、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象の末梢血中の好酸球数は1μL当たり500個から1μL当たり1500個を超えない、実施形態452に記載の方法。

10

【0872】

実施形態455. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与により、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象の末梢血中の好酸球数は1μL当たり1500個から1μL当たり5000個を超えない、実施形態452に記載の方法。

【0873】

実施形態456. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与により、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象の末梢血中の好酸球数は1μL当たり5000個を超えない、実施形態452に記載の方法。

20

【0874】

実施形態457. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、向精神薬の既存のレジメンでの対象において禁忌でない、実施形態1～456のいずれか1つに記載の方法。

【0875】

実施形態458. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、腎毒性、骨髄毒性、心臓毒性または肝毒性薬物の既存のレジメンでの対象において禁忌でない、実施形態1～457のいずれか1つに記載の方法。

【0876】

実施形態459. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、アミノグリコシド、細胞毒性化学療法、ドキソルビシン、メトトレキサートまたはアスパラギナーゼの既存のレジメンでの対象において禁忌でない、実施形態458に記載の方法。

30

【0877】

実施形態460. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、抗腫瘍剤を含有する併用レジメンを受けている対象において禁忌でない、実施形態1～459のいずれか1つに記載の方法。

【0878】

実施形態461. 抗腫瘍剤は、ダカルバジン、シスプラチン、タモキシフェンおよびインターフェロナーアルファから選択される、実施形態460に記載の方法。

【0879】

実施形態462. 対象への有効量のIL-2コンジュゲートの投与は、対象へのIL-2コンジュゲートの投与後、対象において1つまたはそれ以上のグレード4の有害事象を引き起こさない、実施形態1～461のいずれか1つに記載の方法。

40

【0880】

実施形態463. 1つまたはそれ以上のグレード4の有害事象は、低体温症；ショック；徐脈；心室性期外収縮；心筋虚血；卒倒；出血；心房性不整脈；静脈炎；第2度房室ブロック；心内膜炎；心膜液貯留；末梢性壊疽；血栓症；冠動脈障害；口内炎；悪心嘔吐；肝機能試験異常；消化管出血；吐血；血性下痢；消化管障害；腸穿孔；脾炎；貧血症；白血球減少症；白血球増加症；低カルシウム血症；アルカリホスファターゼ増加；血中尿素窒素（BUN）増加；高尿酸血症；非タンパク性窒素（NPN）増加；呼吸性アシドーシ

50

ス；傾眠；動揺；ニューロパシー；妄想反応；けいれん；大発作けいれん；せん妄；ぜんそく、肺水腫；過換気；低酸素症；喀血；低換気；気胸；散瞳；瞳孔障害；腎機能異常；腎不全；および急性尿細管壊死から選択される、実施形態 462 に記載の方法。

【0881】

実施形態 464．対象の群への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象への IL-2 コンジュゲートの投与後、対象の 1% 超において 1 つまたはそれ以上のグレード 4 の有害事象を引き起こさない、実施形態 1～463 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0882】

実施形態 465．1 つまたはそれ以上のグレード 4 の有害事象は、低体温症；ショック；徐脈；心室性期外収縮；心筋虚血；卒倒；出血；心房性不整脈；静脈炎；第 2 度房室ブロック；心内膜炎；心膜液貯留；末梢性壊疽；血栓症；冠動脈障害；口内炎；悪心嘔吐；肝機能試験異常；消化管出血；吐血；血性下痢；消化管障害；腸穿孔；脾炎；貧血症；白血球減少症；白血球増加症；低カルシウム血症；アルカリホスファターゼ増加；血中尿素窒素（BUN）増加；高尿酸血症；非タンパク性窒素（NPN）増加；呼吸性アシドーシス；傾眠；動揺；ニューロパシー；妄想反応；けいれん；大発作けいれん；せん妄；ぜんそく、肺水腫；過換気；低酸素症；喀血；低換気；気胸；散瞳；瞳孔障害；腎機能異常；腎不全；および急性尿細管壊死から選択される、実施形態 464 に記載の方法。

【0883】

実施形態 466．対象の群への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象への IL-2 コンジュゲートの投与後、対象の 1% 超において 1 つまたはそれ以上の有害事象を引き起こさず、1 つまたはそれ以上の有害事象は、十二指腸潰瘍；腸壊死；心筋炎；上室性頻拍；視神経炎に続発する永久的または一過性失明；一過性脳虚血発作；髄膜炎；脳浮腫；心膜炎；アレルギー性間質性腎炎；および気管食道瘻から選択される、実施形態 1～465 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0884】

実施形態 467．対象の群への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、対象への IL-2 コンジュゲートの投与後、対象の 1% 超において 1 つまたはそれ以上の有害事象を引き起こさず、1 つまたはそれ以上の有害事象は、悪性高熱症；心停止；心筋梗塞；肺動脈塞栓；脳卒中；腸穿孔；肝不全または腎不全；自殺につながる重度抑鬱；肺水腫；呼吸停止；呼吸不全から選択される、実施形態 1～466 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0885】

実施形態 468．対象への IL-2 コンジュゲートの投与は、対象において末梢 CD4 + 制御性 T 細胞の数を増加させずに対象において末梢 CD8 + T および NK 細胞の数を増加させる、実施形態 1～467 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0886】

実施形態 469．対象への IL-2 コンジュゲートの投与は、対象において末梢好酸球の数を増加させずに対象において末梢 CD8 + T および NK 細胞の数を増加させる、実施形態 1～468 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0887】

実施形態 470．対象への IL-2 コンジュゲートの投与は、対象において腫瘍内 CD4 + 制御性 T 細胞の数を増加させずに対象において腫瘍内 CD8 + T および NK 細胞の数を増加させる、実施形態 1～469 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0888】

実施形態 471．対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、集中治療施設または心肺もしくは集中治療医学の熟練した専門医の利用可能性を必要としない、実施形態 1～470 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0889】

実施形態 472．対象への有効量の IL-2 コンジュゲートの投与は、集中治療施設の利用可能性を必要としない、実施形態 471 に記載の方法。

【0890】

10

20

30

40

50

実施形態 473. 対象への有効量の I L - 2 コンジュゲートの投与は、心肺または集中治療医学の熟練した専門医の利用可能性を必要としない、実施形態 471 に記載の方法。

【0891】

実施形態 474. がんは、固形腫瘍の形態である、実施形態 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0892】

実施形態 475. がんは、液性腫瘍の形態である、実施形態 1 ~ 473 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0893】

実施形態 476. I L - 2 コンジュゲートは、1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤の対象への投与の前に、対象に投与される、実施形態 381 ~ 475 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0894】

実施形態 477. 1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、I L - 2 コンジュゲートの対象への投与の前に、対象に投与される、実施形態 381 ~ 475 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0895】

実施形態 478. I L - 2 コンジュゲートおよび 1 つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、対象に、同時に投与される、実施形態 381 ~ 475 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0896】

実施形態 479. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L - 2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、I L - 2 コンジュゲートは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、I L - 2 コンジュゲートにおける少なくとも 1 つのアミノ酸残基は、P E G 基に共有結合したシステインに置き換えられている、前記方法。

【0897】

実施形態 480. P E G 基は、5 k D a、10 k D a、15 k D a、20 k D a、25 k D a、30 k D a、35 k D a、40 k D a、45 k D a、50 k D a、および 60 k D a から選択される分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

30

【0898】

実施形態 481. P E G 基は、5 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

【0899】

実施形態 482. P E G 基は、10 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

【0900】

実施形態 483. P E G 基は、15 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

【0901】

実施形態 484. P E G 基は、20 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

40

【0902】

実施形態 485. P E G 基は、25 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

【0903】

実施形態 486. P E G 基は、30 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の方法。

【0904】

実施形態 487. P E G 基は、35 k D a の分子量を有する、実施形態 479 に記載の

50

方法。

【0905】

実施形態488．PEG基は、40kDaの分子量を有する、実施形態479に記載の方法。

【0906】

実施形態489．PEG基は、45kDaの分子量を有する、実施形態479に記載の方法。

【0907】

実施形態490．PEG基は、50kDaの分子量を有する、実施形態479に記載の方法。

【0908】

実施形態491．PEG基は、60kDaの分子量を有する、実施形態479に記載の方法。

【0909】

実施形態492．IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられているIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、K34、T36、R37、T40、F41、K42、F43、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、L71、およびY106から選択される、実施形態479～491のいずれか1つに記載の方法。

【0910】

実施形態493．IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられているIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、K34、T40、F41、K42、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、およびL71から選択される、実施形態479～491のいずれか1つに記載の方法。

【0911】

実施形態494．IL-2コンジュゲートは、配列番号4のアミノ酸配列を含み、システインに置き換えられているIL-2コンジュゲートにおける少なくとも1つのアミノ酸残基は、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、およびY107から選択される、実施形態479～491のいずれか1つに記載の方法。

【0912】

実施形態495．1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、PD-L2阻害剤、CTLA-4阻害剤、OX40アゴニストおよび4-1BBアゴニストからなる群から選択される1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤である、実施形態479～494のいずれか1つに記載の方法。

【0913】

実施形態496．1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤から選択される、実施形態495に記載の方法。

【0914】

実施形態497．1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ（GSK）、PDR001（Novartis）、MGA012（Macrogenics／Incyte）、GLS-010（Arcus／Wuxi）、AGEN2024（Agenus）、セトレリマブ（Janssen）、ABBV-181（Abbvie）、AMG-404（Amgen）、BI-754091（Boehringer Ingelheim）、CC-90006（Celgene）、JTX-4014（Jounce）、PF-06801591（Pfizer）、およびゲノリムズマブ（Apollomics／Genor BioPharma）から選択される、実施形態496に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0915】

実施形態498. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1阻害剤から選択される、実施形態495に記載の方法。

【0916】

実施形態499. 1つまたはそれ以上のPD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-072 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、コシベリマブ (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte)、およびTG-1501 (TG Therapeutics) から選択される、実施形態498に記載の方法。

10

【0917】

実施形態500. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される、実施形態495に記載の方法。

【0918】

実施形態501. 1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリマブ、イピリマブ、およびAGEN-1884 (Agenus) から選択される、実施形態500に記載の方法。

【0919】

実施形態502. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、少なくとも1つの非リジン残基は、リンカーおよび水溶性ポリマーを含むリジンに置き換えられている、前記方法。

20

【0920】

実施形態503. 水溶性ポリマーは、PEG基である、実施形態502に記載の方法。

【0921】

実施形態504. 1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、PD-L2阻害剤、CTLA-4阻害剤、OX40アゴニストおよび4-1BBアゴニストからなる群から選択される1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤である、実施形態502または503に記載の方法。

30

【0922】

実施形態505. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤から選択される、実施形態504に記載の方法。

【0923】

実施形態506. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ (GSK)、PDR001 (Novartis)、MGA012 (Macrogenics/Incyte)、GLS-010 (Arcus/Wuxi)、AGEN2024 (Agenus)、セトレリマブ (Janssen)、ABBV-181 (Abbvie)、AMG-404 (Amgen)、BI-754091 (Boehringer Ingelheim)、CC-90006 (Celgene)、JTX-4014 (Jounce)、PF-06801591 (Pfizer)、およびゲノリムズマブ (Apollomics/Genor BioPharma) から選択される、実施形態505に記載の方法。

40

【0924】

実施形態507. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1阻害剤から選択される、実施形態506に記載の方法。

【0925】

実施形態508. PD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-072 (Cytomx)

50

、CS1001 (Cstone)、コシベリマブ (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte)、およびTG-1501 (TG Therapeutics) から選択される、実施形態507に記載の方法。

【0926】

実施形態509. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される、実施形態508に記載の方法。

【0927】

実施形態510. 1つまたはそれ以上のCTLA-4阻害剤は、トレメリマブ、イピリマブ、およびAGEN-1884 (Agenus) から選択される、実施形態509に記載の方法。

【0928】

実施形態511. IL-2コンジュゲートは、遊離可能でない連結を介して共有結合したPEG基を含む、実施形態1～510のいずれか1つに記載の方法。

【0929】

実施形態512. IL-2コンジュゲートは、遊離可能でない共有結合したPEG基を含む、実施形態11～511のいずれか1つに記載の方法。

【0930】

実施形態513. IL-2コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤の投与後に、対象は、固形腫瘍における免疫関連応答評価基準 (iRECIST) により測定される奏功を経験する、実施形態1～512のいずれか1つに記載の方法。

【0931】

実施形態514. 奏功は、完全奏功、部分奏功または安定疾患である、実施形態513に記載の方法。

【0932】

実施形態515. IL-2コンジュゲートは、対象に、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、脳内投与、鼻腔内投与、動脈内投与、関節内投与、皮内投与、硝子体内投与、骨内注入、腹腔内投与、またはクモ膜下腔内投与によって投与される、実施形態1～514のいずれか1つに記載の方法。

【0933】

実施形態516. IL-2コンジュゲートは、対象に、静脈内投与、皮下投与、または筋肉内投与によって投与される、実施形態515に記載の方法。

【0934】

実施形態517. IL-2コンジュゲートは、対象に、静脈内投与によって投与される、実施形態515に記載の方法。

【0935】

実施形態518. IL-2コンジュゲートは、対象に、皮下投与によって投与される、実施形態515に記載の方法。

【0936】

実施形態519. IL-2コンジュゲートは、対象に、筋肉内投与によって投与される、実施形態515に記載の方法。

【0937】

実施形態520. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2コンジュゲート、および (b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、IL-2コンジュゲートにおける非リジンアミノ酸が、リジン残基に置き換えられており、リジン残基が、1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーおよび共有結合リンカーを含む、配列番号3を有するIL-2コンジュゲートである、前記方法。

【0938】

実施形態521. リジン残基は、配列番号3のK34～Y106の領域に位置する、実施形態520に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0939】

実施形態522. リジン残基は、K34に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0940】

実施形態523. リジン残基は、F41に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0941】

実施形態524. リジン残基は、F43に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0942】

実施形態525. リジン残基は、K42に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0943】

実施形態526. リジン残基は、E61に位置する、実施形態521に記載の方法。

10

【0944】

実施形態527. リジン残基は、P64に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0945】

実施形態528. リジン残基は、R37に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0946】

実施形態529. リジン残基は、T40に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0947】

実施形態530. リジン残基は、E67に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0948】

実施形態531. リジン残基は、Y44に位置する、実施形態521に記載の方法。

20

【0949】

実施形態532. リジン残基は、V68に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0950】

実施形態533. リジン残基は、L71に位置する、実施形態521に記載の方法。

【0951】

実施形態534. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の(a) IL-2コンジュゲート、および(b) 1つまたはそれ以上の追加の薬剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、インターロイキン-2 (IL-2) バリエーションのアミノ酸配列における非リジンアミノ酸が、(a) リジン; (b) 共有結合リンカー; および(3) 1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーを含むアミノ酸に置き換えられているIL-2バリエーションである、前記方法。

30

【0952】

実施形態535. 1つまたはそれ以上の水溶性ポリマーは、PEG基を含む、実施形態520~534のいずれか1つに記載の方法。

【0953】

実施形態536. PEG基は、分枝状または直鎖状PEG基である、実施形態535に記載の方法。

【0954】

実施形態537. 1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、PD-L2阻害剤、CTLA-4阻害剤、OX40アゴニストおよび4-1BBアゴニストからなる群から選択される1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤である、実施形態520~536のいずれか1つに記載の方法。

40

【0955】

実施形態538. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤から選択される、実施形態537に記載の方法。

【0956】

実施形態539. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、ランブロリズマブ、AMP-224、シンチリマブ、トリパリマブ、カムレリズマブ、チスレリズマブ、ドスタリマブ (GSK)、PDR001 (Novartis)、MGA012 (Macrogenics/Incyte)、GLS-01

50

0 (Arcus/Wuxi)、AGEN2024 (Agenus)、セトレリマブ (Janssen)、ABBV-181 (Abbvie)、AMG-404 (Amgen)、BI-754091 (Boehringer Ingelheim)、CC-90006 (Celgene)、JTX-4014 (Jounce)、PF-06801591 (Pfizer)、およびゲノリムズマブ (Apollomics/Genor BioPharma) から選択される、実施形態538に記載の方法。

【0957】

実施形態540. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1阻害剤から選択される、実施形態539に記載の方法。

【0958】

実施形態541. PD-L1阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-072 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、コシベリマブ (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte)、およびTG-1501 (TG Therapeutics) から選択される、実施形態540に記載の方法。

【0959】

実施形態542. 1つまたはそれ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤から選択される、実施形態541に記載の方法。

【0960】

実施形態543. CTLA-4阻害剤は、トレメリマブ、イピリムマブ、およびAGEN-1884 (Agenus) から選択される、実施形態542に記載の方法。

【0961】

実施形態544. 対象に、治療有効量の1つまたはそれ以上の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 経路またはラパマイシンの哺乳動物標的 (mTOR) 阻害剤を投与することをさらに含む、実施形態381~543のいずれか1つに記載の方法。

【0962】

実施形態545. 対象は、1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤を投与される、実施形態544に記載の方法。

【0963】

実施形態546. 1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤は、血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) および抗VEGFモノクローナル抗体からなる群から選択される、実施形態545に記載の方法。

【0964】

実施形態547. 1つまたはそれ以上のVEGF経路阻害剤は、1つまたはそれ以上のVEGFR TKIから選択される、実施形態546に記載の方法。

【0965】

実施形態548. 1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、カボザンチニブ、アキシチニブ、パゾパニブ、スニチニブ、またはソラフェニブからなる群から選択される、実施形態547に記載の方法。

【0966】

実施形態549. 1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、カボザンチニブである、実施形態548に記載の方法。

【0967】

実施形態550. 1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、アキシチニブである、実施形態548に記載の方法。

【0968】

実施形態551. 1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、パゾパニブである、実施形態548に記載の方法。

【0969】

実施形態552. 1つまたはそれ以上のVEGFR TKIは、スニチニブである、実

10

20

30

40

50

施形態 5 4 8 に記載の方法。

【0 9 7 0】

実施形態 5 5 3 . 1 つまたはそれ以上の V E G F R T K I は、ソラフェニブである、実施形態 5 4 8 に記載の方法。

【0 9 7 1】

実施形態 5 5 4 . 1 つまたはそれ以上の V E G F 経路阻害剤は、1 つまたはそれ以上の抗 V E G F モノクローナル抗体から選択される、実施形態 5 4 6 に記載の方法。

【0 9 7 2】

実施形態 5 5 5 . 1 つまたはそれ以上の抗 V E G F モノクローナル抗体は、ベバシズマブである、実施形態 5 5 4 に記載の方法。

【0 9 7 3】

実施形態 5 5 6 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、ラパマイシン、エベロリムス、テムシロリムス、リダホロリムス、およびデホロリムスからなる群から選択される、実施形態 5 4 4 に記載の方法。

【0 9 7 4】

実施形態 5 5 7 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、ラパマイシンである、実施形態 5 5 6 に記載の方法。

【0 9 7 5】

実施形態 5 5 8 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、エベロリムスである、実施形態 5 5 6 に記載の方法。

【0 9 7 6】

実施形態 5 5 9 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、テムシロリムスである、実施形態 5 5 6 に記載の方法。

【0 9 7 7】

実施形態 5 6 0 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、リダホロリムスである、実施形態 5 5 6 に記載の方法。

【0 9 7 8】

実施形態 5 6 1 . 1 つまたはそれ以上の m T O R 阻害剤は、デホロリムスである、実施形態 5 5 6 に記載の方法。

【0 9 7 9】

実施形態 5 6 2 . 対象におけるがんは、腎細胞癌 (R C C) である、実施形態 5 4 4 ~ 5 6 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 9 8 0】

実施形態 5 6 3 . 1 つまたはそれ以上の V E G F R T K I は、アキシチニブまたはカボザンチニブである、実施形態 5 6 2 に記載の方法。

【0 9 8 1】

実施形態 5 6 4 . 1 つまたはそれ以上の V E G F R T K I は、カボザンチニブである、実施形態 5 6 2 に記載の方法。

【0 9 8 2】

実施形態 5 6 5 . 1 つまたはそれ以上の追加の薬剤は、1 つまたはそれ以上の化学療法剤をさらに含む、実施形態 3 8 1 ~ 5 4 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 9 8 3】

実施形態 5 6 6 . 1 つまたはそれ以上の化学療法剤は、1 つまたはそれ以上の白金ベースの化学療法剤を含む、実施形態 5 6 5 に記載の方法。

【0 9 8 4】

実施形態 5 6 7 . 1 つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよびペメトレキセドを含む、実施形態 5 6 5 に記載の方法。

【0 9 8 5】

実施形態 5 6 8 . 1 つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよび n a b - パクリタキセルを含む、実施形態 5 6 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0986】

実施形態569. 1つまたはそれ以上の化学療法剤は、カルボプラチンおよびドセタキセルを含む、実施形態565に記載の方法。

【0987】

実施形態570. 対象におけるがんは、非小細胞肺癌（NSCLC）である、実施形態565～569のいずれか1つに記載の方法。

【0988】

実施形態571. 1つまたはそれ以上の追加の薬剤は、1つまたはそれ以上の化学療法剤である、実施形態1～570のいずれか1つに記載の方法。

【0989】

実施形態572. 1つまたはそれ以上の化学療法剤は、1つまたはそれ以上の白金ベースの化学療法剤を含む、実施形態571に記載の方法。

【0990】

実施形態573. 対象は、IL-2コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤の投与の前に、ヒトパピローマウイルス（HPV）について陽性であると検査で判定されている、実施形態1～572のいずれか1つに記載の方法。

【0991】

実施形態574. 対象におけるがんは、頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）である、実施形態572に記載の方法。

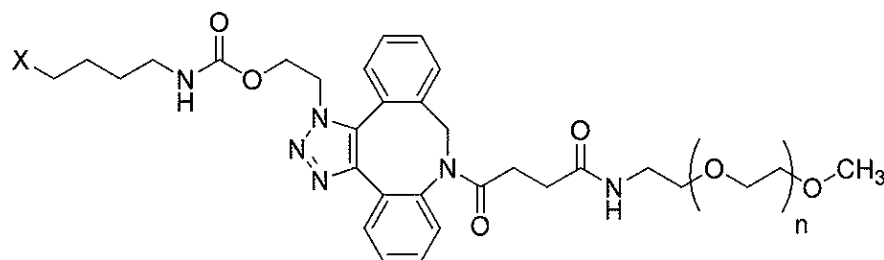
【0992】

実施形態575. 対象が、ヒトパピローマウイルス（HPV+）について陽性であると検査で判定され、それに続いてIL-2コンジュゲートおよび1つまたはそれ以上の追加の薬剤を投与することをさらに含む、実施形態1～572のいずれか1つに記載の方法。

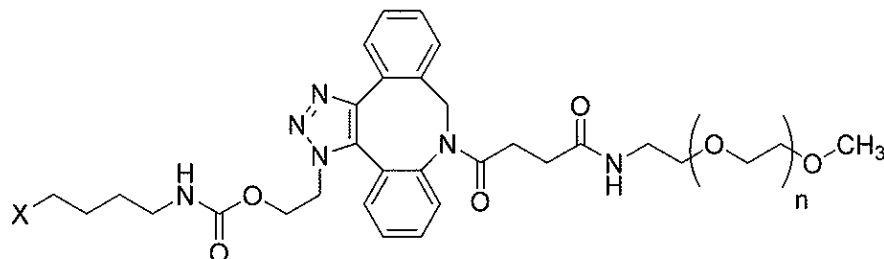
【0993】

実施形態576. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（a）IL-2コンジュゲート、および（b）1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2コンジュゲートは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、IL-2コンジュゲートにおけるE61またはP64のアミノ酸残基は、式（VII）もしくは（IX）、または（VII）および（IX）の混合物の構造：

【化202】



式(VIII)



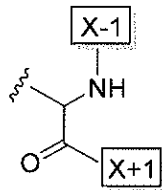
(IX)

（式中：

n は、PEG 基の分子量が、約 15,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンであるような整数であり；

X は構造：

【化 203】



10

を有する)

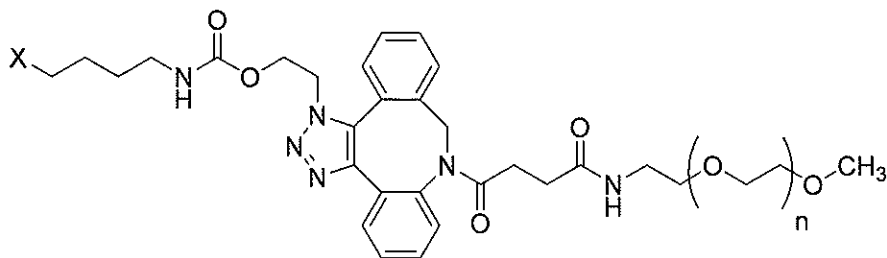
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【0994】

実施形態 576. 1. 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) IL-2 コンジュゲート、および (b) 1 つまたはそれ以上の PD-1 阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、IL-2 コンジュゲートは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み、IL-2 コンジュゲートにおける E61 または P64 のアミノ酸残基は、式 (VIII) もしくは (IX)、または (VIII) および (IX) の混合物の構造：

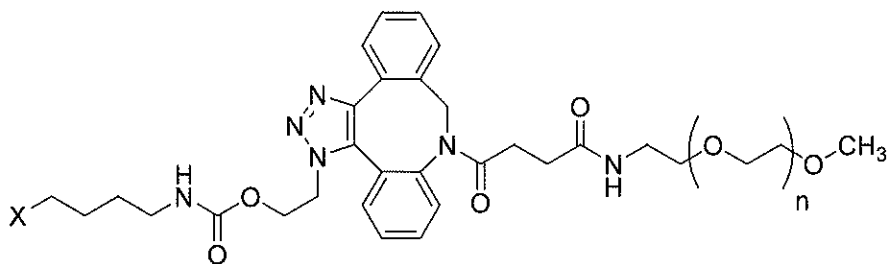
20

【化 204】



式(VIII)

30



(IX)

40

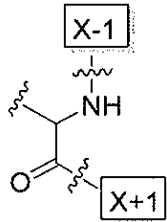
(式中：

n は、PEG 基の分子量が、約 15,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンであるような整数であり；

X は構造：

50

【化 2 0 5】



を有し；

X - 1 は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

X + 1 は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【0 9 9 5】

実施形態 5 7 7 . I L - 2 コンジュゲートにおける E 6 1 のアミノ酸残基は、式 (V I I I) もしくは (I X) 、または (V I I I) および (I X) の混合物の構造に置き換えられており、n は、P E G 基の分子量が、約 2 0 , 0 0 0 ダルトン～約 4 0 , 0 0 0 ダルトンであるような整数である、実施形態 5 7 6 または 5 7 6 . 1 に記載の方法。

【0 9 9 6】

実施形態 5 7 8 . n は、P E G 基の分子量が、約 3 0 , 0 0 0 ダルトンからであるような整数である、実施形態 5 7 7 に記載の方法。

【0 9 9 7】

実施形態 5 7 9 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはニボルマブである、実施形態 5 7 7 または 5 7 8 に記載の方法。

【0 9 9 8】

実施形態 5 8 0 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態 5 7 9 に記載の方法。

【0 9 9 9】

実施形態 5 8 1 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ニボルマブである、実施形態 5 7 9 に記載の方法。

【1 0 0 0】

実施形態 5 8 2 . I L - 2 コンジュゲートにおける P 6 4 のアミノ酸残基は、式 (V I I I) もしくは (I X) 、または (V I I I) および (I X) の混合物の構造に置き換えられており、n は、P E G 基の分子量が、約 2 0 , 0 0 0 ダルトン～約 4 0 , 0 0 0 ダルトンであるような整数である、実施形態 5 7 6 または 5 7 6 . 1 に記載の方法。

【1 0 0 1】

実施形態 5 8 3 . n は、P E G 基の分子量が、約 3 0 , 0 0 0 ダルトンからであるような整数である、実施形態 5 8 2 に記載の方法。

【1 0 0 2】

実施形態 5 8 4 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはニボルマブである、実施形態 5 8 2 または 5 8 3 に記載の方法。

【1 0 0 3】

実施形態 5 8 5 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態 5 8 4 に記載の方法。

【1 0 0 4】

実施形態 5 8 6 . 1 つまたはそれ以上の P D - 1 阻害剤は、ニボルマブである、実施形態 5 8 4 に記載の方法。

【1 0 0 5】

実施形態 5 8 7 . 対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の (a) I L

10

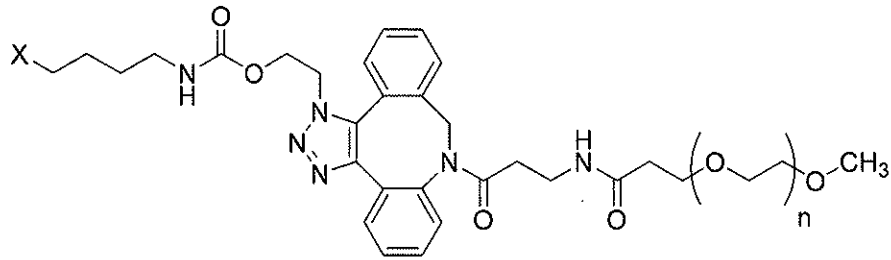
20

30

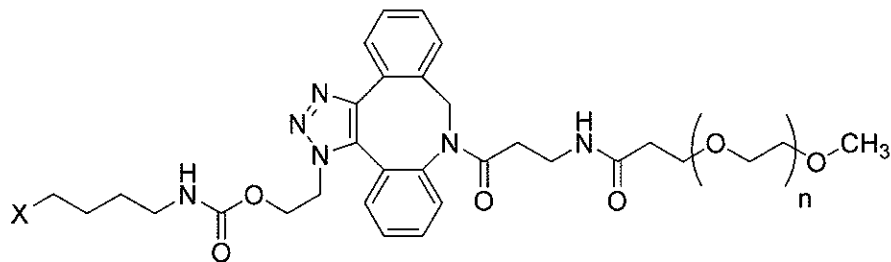
40

50

ー２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上のＰＤ－１阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬ－２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬ－２コンジュゲートにおけるＥ６１またはＰ６４のアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは（ＶＩＩ）、または（ＶＩ）および（ＶＩＩ）の混合物の構造：
【化２０６】



式(VI)



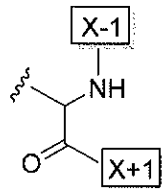
(VII)

（式中：

n は、PEG 基の分子量が、約 15,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンであるような整数であり；

X は構造：

【化２０７】



を有する）、

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられている、前記方法。

【１００６】

実施形態５８７．１．対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の（ａ）ＩＬ－２コンジュゲート、および（ｂ）１つまたはそれ以上のＰＤ－１阻害剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、ＩＬ－２コンジュゲートは、配列番号３のアミノ酸配列を含み、ＩＬ－２コンジュゲートにおけるＥ６１またはＰ６４のアミノ酸残基は、式（ＶＩ）もしくは（ＶＩＩ）、または（ＶＩ）および（ＶＩＩ）の混合物の構造：

10

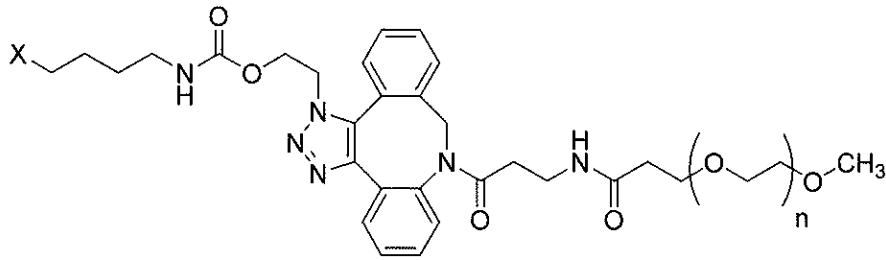
20

30

40

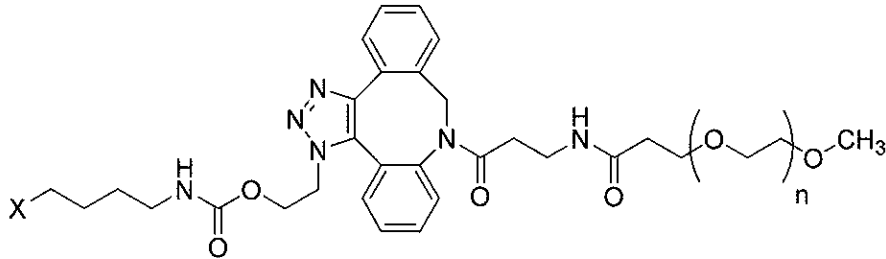
50

【化 2 0 8】



式(VI)

10



(VII)

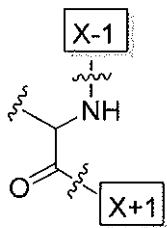
20

(式中：

n は、PEG 基の分子量が、約 15,000 ダルトン～約 60,000 ダルトンであるような整数であり；

X は構造：

【化 2 0 9】



30

を有し；

$X-1$ は、先行するアミノ酸残基への結合点を示し；

$X+1$ は、後続するアミノ酸残基への結合点を示す）；

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物に置き換えられて、前記方法。

【1 0 0 7】

40

実施形態 588. IL-2 コンジュゲートにおける E61 のアミノ酸残基は、式 (VI) もしくは (VII)、または (VI) および (VII) の混合物の構造に置き換えられており、 n は、PEG 基の分子量が、約 20,000 ダルトン～約 40,000 ダルトンであるような整数である、実施形態 587 または 587.1 に記載の方法。

【1 0 0 8】

実施形態 589. n は、PEG 基の分子量が、約 30,000 ダルトンからであるような整数である、実施形態 588 に記載の方法。

【1 0 0 9】

実施形態 590. 1 つまたはそれ以上の PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはニボルマブである、実施形態 588 または 589 に記載の方法。

50

【1010】

実施形態591. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態590に記載の方法。

【1011】

実施形態592. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ニボルマブである、実施形態590に記載の方法。

【1012】

実施形態593. IL-2コンジュゲートにおけるP64のアミノ酸残基は、式(VI)もしくは(VII)、または(VI)および(VII)の混合物の構造に置き換えられており、nは、PEG基の分子量が、約20,000ダルトン～約40,000ダルトンであるような整数である、実施形態587または587.1に記載の方法。

10

【1013】

実施形態594. nは、PEG基の分子量が、約30,000ダルトンであるような整数である、実施形態593に記載の方法。

【1014】

実施形態595. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはニボルマブである、実施形態593または594に記載の方法。

【1015】

実施形態596. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ペムブロリズマブである、実施形態595に記載の方法。

20

【1016】

実施形態597. 1つまたはそれ以上のPD-1阻害剤は、ニボルマブである、実施形態595に記載の方法。

【1017】

実施形態598. IL-2コンジュゲートは、薬学的に許容される塩、溶媒和物、または水和物である、実施形態1～597のいずれか1つに記載の方法。

【1018】

実施形態599. 実施形態1～598のいずれか1つに記載の方法における使用のための、IL-2コンジュゲート。

【1019】

実施形態600. 実施形態1～598のいずれか1つに記載の方法に従ってがんを治療するための医薬の製造のための、IL-2コンジュゲートの使用。

30

【実施例】

【1020】

これらの実施例は、説明を目的とするのみで提供されるものであり、本明細書で提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

【1021】

実施例2～8で開示されている化合物のそれぞれは、配列番号4および[AzK__PEG]部分を利用しており、IL-2コンジュゲート中の置換アミノ酸の位置は、配列番号4での位置に関するものである。

40

【1022】

例えば、表3Aおよび3Bで「P65__5kD」と標識された化合物を、65位のプリンがN6-(2-アジドエトキシ)-カルボニル-L-リジン(AzK)(配列番号10)に置き換えられた、配列番号4を有するタンパク質を最初に調製する、実施例2で開示されているものと同様の方法を使用して調製した。次いで、このAzK含有タンパク質を、平均分子量が5kDaのメトキシ直鎖PEG基を含むDBCOと、クリックケミストリー条件下で反応させて、式(II)、式(III)、または式(II)および(III)の混合物を含む配列番号20を有する生成物を得、Wは、平均分子量が5kDaのメトキシ直鎖PEG基である。

【1023】

50

別の例では、実施例 4、実施例 5、実施例 6、および実施例 11 で使用された、表 3 A および 3 B 中の化合物である、標識された「P 6 5 _ 3 0 k」（実施例 11 においては「I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ P E G 3 0 k D]」とも呼ばれ、また実施例 11 および複数の図において「化合物 A」とも称される）を、6 5 位のプロリンが N 6 - (2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジン (A z K) (配列番号 1 0) に置き換えられた、配列番号 4 を有するタンパク質を最初に調製することにより調製した。次いで、この A z K 含有タンパク質を、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基を含む D B C O と、クリックケミストリー条件下で反応させて、式 (I I)、式 (I I I)、または式 (I I) および (I I I) の混合物を含む配列番号 2 5 を有する生成物を得、W は、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基である。該化合物は、6 5 位のプロリン (P 6 5) が、式 (V I) もしくは (V I I)、または (V I) および (V I I) の混合物の構造に置き換えられ、n は、P E G 基の分子量が約 3 0 k D a であるような整数である、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むものとしても定義することができる。この化合物はまた、6 5 位のプロリン (P 6 5) が式 (X) もしくは (X I)、または (X) および (X I) の混合物の構造に置き換えられ、n は、P E G 基は分子量が約 3 0 k D a であるような整数である、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むとも定義される。

【1 0 2 4】

別の例では、表 3 A および 3 B で「E 6 2 _ 5 k D」と標識された化合物を、6 2 位のグルタミン酸が N 6 - (2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジン A z K (配列番号 1 1) に置き換えられた、配列番号 4 を有するタンパク質を最初に調製することにより調製した。次いで、この A z K 含有タンパク質を、平均分子量が 5 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基を含む D B C O と、クリックケミストリー条件下で反応させて、式 (I I)、式 (I I I)、または式 (I I) および (I I I) の混合物を含む配列番号 2 1 を有する生成物を得、W は、平均分子量が 5 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基である。

【1 0 2 5】

別の例では、実施例 4 でも使用された、表 3 A および 3 B 中の化合物である、標識された「E 6 2 _ 3 0 k D」を、6 2 位のグルタミン酸が、N 6 - (2 - アジドエトキシ) - カルボニル) - L - リジン (A z K) に置き換えられた、配列番号 4 を有するタンパク質を最初に調製することにより調製した (配列番号 1 1)。次いで、この A z K 含有タンパク質を、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基を含む D B C O と、クリックケミストリー条件下で反応させて、式 (I I)、式 (I I I)、または式 (I I) および (I I I) の混合物を含む配列番号 2 6 を有する生成物を得、W は、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基である。該化合物は、6 2 位のグルタミン酸 (E 6 2) が、式 (V I) もしくは (V I I)、または (V I) および (V I I) の混合物の構造で置き換えられ、n は、P E G 基の分子量が約 3 0 k D a であるような整数である、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むものとしても定義することができる。該化合物は、6 2 位のグルタミン酸 (E 6 2) が、式 (X) もしくは (X I)、または (X) および (X I) の混合物の構造に置き換えられ、n は、P E G 基の分子量が約 3 0 k D a であるような整数である、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むものとしても定義することができる。

【1 0 2 6】

別の例では、実施例 8 で使用される化合物である、標識された「K 3 5 _ 3 0 k D」を、3 5 位のリジンが、N 6 - (2 - アジドエトキシ) カルボニル) - L - リジン (A z K) により置き換えられた、配列番号 4 を有するタンパク質を最初に調製することにより調製した (配列番号 1 4)。次いで、この A z K 含有タンパク質を、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基を含む D B C O と、クリックケミストリー条件下で反応させて、式 (I I)、式 (I I I)、または式 (I I) および (I I I) の混合物を含む配列番号 2 9 を有する生成物を得、W は、平均分子量が 3 0 k D a のメトキシ直鎖 P E G 基である。この化合物はまた、3 5 位のリジン (K 3 5) が式 (V I) もしくは (V I I)、または (V I) および (V I I) の混合物の構造に置き換えられ、n は、P E G 基は分子量が約 3 0 k D a であるような整数である、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むとも定義される。

この化合物はまた、35位のリジン（K35）が式（X）もしくは（XI）、または（X）および（XI）の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基は分子量が約30kDaであるような整数である、配列番号4のアミノ酸配列を含むとも定義される。

【1027】

実施例9および10では、64位のプロリンがAzK__L1__PEG30kDに置き換えられ、AzK__L1__PEG30kDが、30kDa、直鎖状mPEG鎖の式（IV）もしくは（V）、または式（IV）および（V）の混合物の構造として定義される、配列番号50を含む化合物（IL-2__P65__[AzK__L1__PEG30kD]-1）を利用した。化合物IL-2__P65__[AzK__L1__PEG30kD]-1はまた、64位のプロリン残基（P64）が式（VII）もしくは（IX）、または（VII）および（IX）の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である、配列番号3を含む化合物とも定義される。化合物IL-2__P65__[AzK__L1__PEG30kD]-1はまた、64位のプロリン残基（P64）が式（XII）もしくは（XIII）、または（XII）および（XIII）の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である、配列番号3を含む化合物とも定義される。化合物IL-2__P65__[AzK__L1__PEG30kD]-1は、実施例12以降において、および複数の図において、「化合物B」とも呼ばれる。該化合物を、実施例2で開示する方法と類似した方法を使用して調製したが、この場合、64位のプロリンが、N6-（（2-アジドエトキシ）-カルボニル）-L-リジンAzKにより置換された、配列番号3を有するタンパク質を最初に調製した（配列番号35）。次に、AzK含有タンパク質を、平均分子量が30kDaのメトキシ直鎖PEG基を含むDBCOと共に、クリックケミストリー条件下で反応させた。

【1028】

実施例11では、上記したような、化合物「IL-2__P65__[AzK__PEG30kD]」（本明細書では「P65__30kD」とも呼ばれる）を利用した。

【1029】

実施例1

キナーゼおよびサイトカイン受容体二量体化アッセイ 細胞の取り扱い

PathHunter細胞株を、標準的手順に従って冷凍庫ストックから拡大させた。細胞を、白色の壁の384ウェルマイクロプレート中に20μLの総量で播種し、試験前に適切な時間にわたりインキュベートした。

【1030】

アゴニスト形態

アゴニスト決定のために、細胞をサンプルと共にインキュベートして、応答を誘発させた。サンプルストックの中間希釈をアッセイ緩衝液で実施して、5倍サンプルを生成した。5倍サンプル 約5μLを細胞に添加し、このアッセイに応じて6～16時間にわたり、37℃でインキュベートした。ビヒクル濃度は1%であった。

【1031】

シグナル検出

アゴニストアッセイおよびアンタゴニストアッセイそれぞれのためのPathHunter Detection試薬カクテル 12.5または15μL（50v/v%）の単回添加により、アッセイシグナルを生じさせ、続いて室温で1時間にわたりインキュベートした。一部のアッセイの場合は、高感度検出試薬（PathHunter Flash Kit）を使用して活性を検出し、アッセイ性能を改善させた。これらのアッセイでは、等量の検出試薬（25または30μL）を細胞に添加し、続いて室温で1時間にわたりインキュベートした。シグナル発生後に、PerkinElmer Envision™機器で化学発光シグナルを検出してマイクロプレートを読み取った。

【1032】

データ分析

化合物の活性を、C B I S データ分析スイート (ChemInnovation, CA) を使用して分析した。アゴニストモードアッセイの場合には、活性の割合を、下記式を使用して算出した：

活性% = 100% × (試験サンプルの平均RLU - ビヒクル対照の平均RLU) / (平均MAX RLU対照リガンド - ビヒクル対照の平均RLU)。

【1033】

アンタゴニストモードアッセイの場合には、阻害の割合を、下記式を使用して算出した：

阻害% = 100% × (1 - (試験サンプルの平均RLU - ビヒクル対照の平均RLU) / (EC80対照の平均RLU - ビヒクル対照の平均RLU))。

【1034】

実施例 2

IL-2 R α が結合しないペグ化 IL-2 化合物の同定のための細胞ベースのスクリーニング

例示的な IL-2 コンジュゲートについて、機能分析：K35、F42、K43、E62、および P65 を実施した。IL-2 コンジュゲートを、本明細書に開示される方法を使用して、大腸菌 (E. coli) において封入体として発現させたが、その場合、

(a) 非天然アミノ酸 N6 - ((2-アジドエトキシ) - カルボニル) - L-リジン (AzK) が組み込まれた所望の位置にコドン、および tRNA においてはマッチングアンチコドンを提供するための、第1の非天然ヌクレオチドおよび第2の非天然ヌクレオチドを含む非天然の塩基対、

(b) M. マゼイ (M. Mazei) PyL に由来する tRNA をコードし、かつその天然配列の代わりにマッチングアンチコドンを提供するための非天然ヌクレオチドを含むプラスミド、

(c) M. バルケリ (M. barkeri) 由来のピロリジル-tRNA シンテターゼ (Mb PyLRS) をコードするプラスミド、ならびに

(d) N6 - ((2-アジドエトキシ) - カルボニル) - L-リジン (AzK) を含有した、

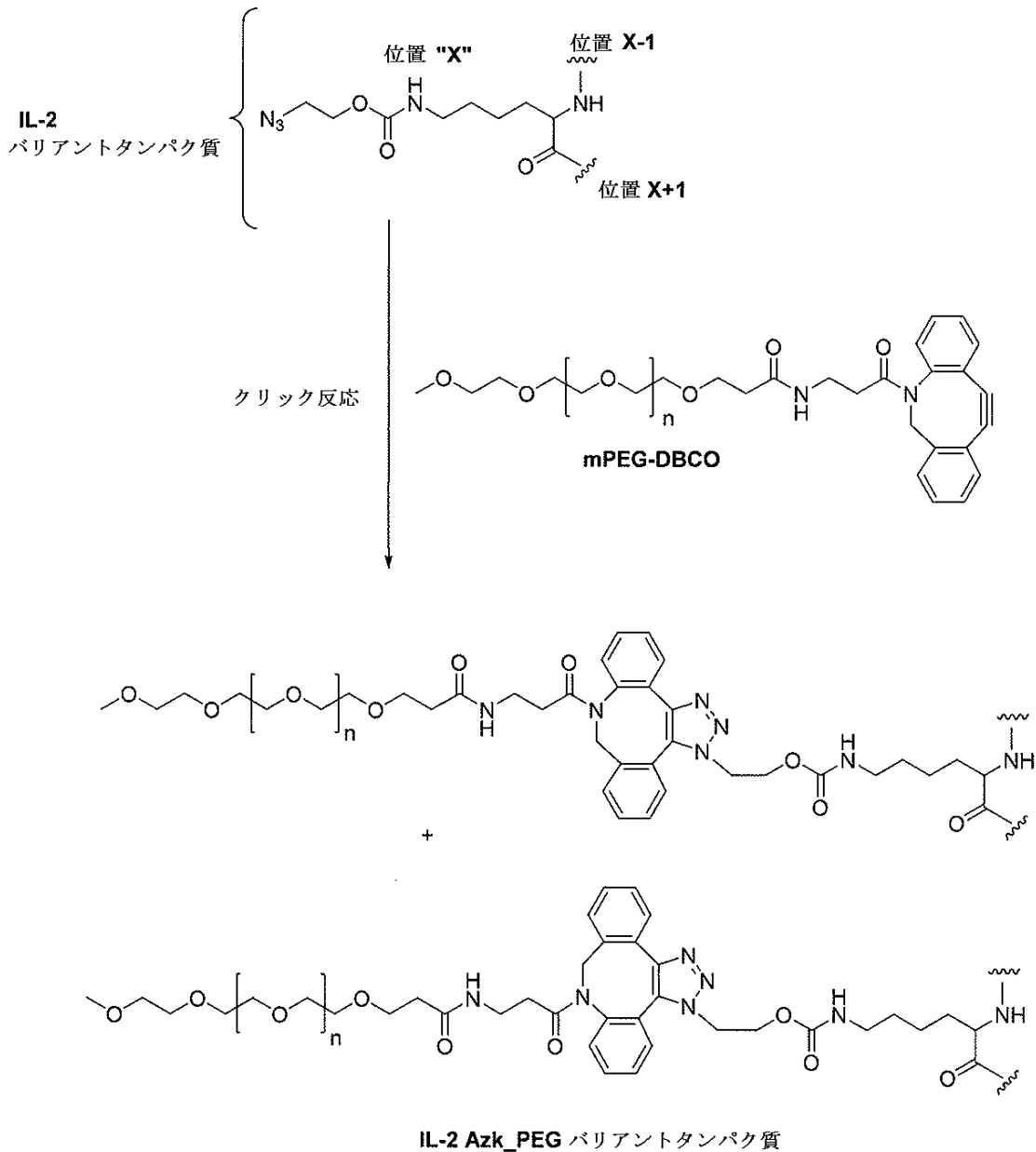
所望のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする発現プラスミドを調製した。所望の IL-2 バリエーションのアミノ酸配列をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドは、例えば配列番号3を有するタンパク質をコードする配列の34、37、40、41、42、43、44、61、64、68位、もしくは71位、または配列番号4を有するタンパク質をコードする配列の35、38、41、42、43、45、62、65、69位、もしくは72位に、コドンAXC (ただし、Xは本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチドである) を含有した。一部の実施形態では、細胞は、タンパク質発現プラスミドであってもまた別のプラスミドであってもよいプラスミドをさらに含み、同プラスミドは、その天然配列の代わりにAXCマッチングアンチコドンであるGYT (ただし、Yは本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチドであり、またコドン中の非天然ヌクレオチドと同一であってもまた異なってもよい) を含む、M. マゼイ由来の直交性tRNA遺伝子 (orthogonal tRNA gene) をコードする。XおよびYは、本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチドdTPT3、dNaM、およびdCNMOから選択した。発現したタンパク質を、標準的な手順を使用して精製し、再度折り畳んだ後、DBCO媒介式の銅フリークリックケミストリー (copper-free click chemistry) を使用して、AzK含有IL-2生成物を部位特異的にペグ化し、安定な共有結合性mPEG部分をAzKに連結した (スキーム1)。

【1035】

スキーム1. AzK-PEGインターロイキンバリエーションの例示的な合成 (ただし、nはPEGユニットの反復数を表す)。AzK部分とDBCOアルキニル部分との反応は、1つの位置異性生成物または位置異性生成物の混合物をもたらすことができる。

【1036】

【化 2 1 0】



【1037】

IL-2コンジュゲートを、PathHunter IL-2 Cytokine Receptorアッセイを使用して、Discoverx (Fremont, CA) で機能活性に関してスクリーニングした。このアッセイでは、IL-2受容体 β (IL-2R β) および γ (IL-2R γ) サブユニット（それぞれは分割レポーター酵素 β -ガラクトシダーゼの半分に融合している）を発現する組換えヒトU2OS細胞株を使用した。別の細胞株は、IL-2R α サブユニットを発現するようにさらに操作されていた。これら2種の細胞株による並行試験により、IL-2受容体 $\alpha\beta\gamma$ のバリエーション活性化および基本 $\beta\gamma$ 複合体の評価が可能になった。IL-2 $\beta\gamma$ 受容体複合体へのIL-2アゴニスト活性は、受容体の二量体化、および化学発光シグナルを生じるレポーター β -ガラクトシダーゼの再構成を刺激した。このアッセイをアゴニストモードで実行して各試験物のEC₅₀を決定し、IL-2R α 陽性細胞型とIL-2R α 陰性細胞型との間での用量応答曲線プロファイルの比較により、観察された活性に対するIL-2R α の寄与の決定が可能であった。

【1038】

表 2 は、10 kD（特記した場合を除く）の PEG 化 IL-2 コンジュゲートに関する細胞ベースのスクリーンにおける IL-2 受容体アゴニズムの EC50 データを示す。

【1039】

【表 2】

表 2.

部位	$\beta \gamma$ EC50 (nM)	$\alpha \beta \gamma$ EC50 (nM)	$\beta \gamma / \alpha \beta \gamma$ 比
天然	1.68	0.074	23
理想	1.68	1.68	1
K35	6.75	0.15	45
F42	6.09	0.515	12
K43	9.84	0.131	75
E62	3	1.5	2
P65*	23.8	4.44	5
R38	4.16	0.165	25
T41	6.37	0.0489	130
E68	7.70	0.0893	86
Y45*	9.06	0.110	83
V69*	9.99	0.083	121

*は、30kD の PEG 化 IL-2 コンジュゲートを示す。

【1040】

PEG 化 IL-2 とヒト IL-2 受容体サブユニットとの生化学的相互作用

ヒト IL-2 受容体サブユニットとの PEG 化 IL-2 化合物相互作用の動態を、Biosensor Tools LLC (Salt Lake City, UT) で表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用して測定した。この試験のために、ヒト IgG1 Fc 融合 IL-2 R α (Sino Biological #10165-H02H) および β (Sino Biological #10696-H02H) 細胞外ドメインを、Biacore Protein A でコーティングされた CM4 センサーチップの表面上で捕捉した。この表面を、Biacore 2000 SPR 機器を使用して、天然 IL-2（野生型 IL-2；Thermo #PHC0021）、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD、または E62_5kD のいずれか 2 μ M で始まる 2 倍希釈系列により、2 回反復でプローブした。試験サンプルを 60 秒にわたり注入して会合を測定し、続いて 30 秒にわたり緩衝液のみ（洗浄）を注入して解離を測定した。応答単位 (RU、Y 軸) を、時間 (秒、X 軸) に対してプロットした。

【1041】

β に対する IL-2 結合への IL-2 受容体 α サブユニットの効果を評価するために、 β と比べて α を約 2 倍過剰に捕捉した。この表面に、天然 IL-2（野生型 IL-2）、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD、または E62_5kD を、2.5 μ M で始まる 3 倍希釈系列で塗布した。結合データを、バルクシフトを含む 1:1 相互作用モデルにフィットさせ、抽出した動態パラメータの概要を表 3 A および表 3 B にまとめる。表 3 A および表 3 B に示すように、小さい PEG は、IL-2 R アルファ結合を抑制するが、IL-2 R ベータ結合への非特異的効果は小さい。

【1042】

【表 3】

表 3A. 個々の IL-2 受容体サブユニット表面との IL-2 バリエーション相互作用に関する動態パラメータ-IL-2 受容体 α 表面。

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
IL-2 天然	$4.5 \pm 0.3 \times 10^7$	0.410 ± 0.01	0.009 ± 0.002
P65_30kD	$114 \pm 36 \times 10^7$	0.018 ± 0.008	158 ± 21
P65_5kD	$797 \pm 226 \times 10^7$	0.033 ± 0.004	42 ± 7
E62_30kD	$333 \pm 88 \times 10^7$	0.050 ± 0.01	162 ± 7
E62_5kD	$1010 \pm 41 \times 10^7$	0.035 ± 0.002	34.4 ± 0.3

10

【1043】

【表 4】

表 3B. 個々の IL-2 受容体サブユニット表面との IL-2 バリエーション相互作用に関する動態パラメータ-IL-2 受容体 β 表面。

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
IL-2 天然	$1.3 \pm 0.2 \times 10^6$	0.185 ± 0.009	0.145 ± 0.005
P65_30kD	$1.8 \pm 0.2 \times 10^5$	0.370 ± 0.01	2.09 ± 0.09
P65_5kD	$9.0 \pm 0.4 \times 10^5$	0.270 ± 0.01	0.305 ± 0.002
E62_30kD	$1.8 \pm 0.4 \times 10^5$	0.208 ± 0.006	1.14 ± 0.01
E62_5kD	$6.6 \pm 0.8 \times 10^5$	0.281 ± 0.004	0.428 ± 0.00

20

30

【1044】

初代ヒト白血球除去システム (human leukocyte reduction system) (LRS) 由来 PBMC サンプルにおける IL-2 化合物の ex-vivo 免疫応答プロファイリング

IL-2 P65_30kD、K64_30kD、K43_30kD、K35_30kD、および F42_30kD の異なる受容体特異性が、初代免疫細胞の亜集団の活性化にどの程度影響を及ぼすかを決定するために、マルチカラーフローサイトメトリーを使用し、ヒト LRS 由来末梢血単核細胞 (PBMC) サンプルでのリンパ球活性化の濃度応答プロファイリングを実施した。この試験を、PrimityBio LLC (Fremont, CA) で実施した。新鮮な LRS 由来サンプルを、 $30 \mu g/mL$ の最高濃度で始まる 5 倍希釈系列で、天然 IL-2、L-2 P65_30kD、K64_30kD、K43_30kD、K35_30kD、および F42_30kD により処置した。45 分間のインキュベーション後、サンプルを固定し、IL-2 受容体シグナル伝達複合体の上流の結合および活性化のマーカーである、転写因子 STAT5 (pSTAT5) のリン酸化形態を検出するための抗体と、特定の T 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞の亜集団での pSTAT5 形成を追跡するための表面マーカーのパネルとで染色した。LRS 由来 PBMC サンプルのフローサイトメトリー試験のための染色パネルは、エフェクター T 細胞用のマーカー (Teff: CD3+, CD4+, CD8+, CD127+)、NK 細胞用のマーカー (CD3-, CD16+)、および調節性 T 細胞用のマーカー (Treg

40

50

：CD3+、CD4+、CD8-、IL-2R α +、CD127-1)を含んだ。

【1045】

フローサイトメトリーデータを、濃度応答モードで、様々なT細胞およびNK細胞のサブセットの活性化に関して分析し、天然IL-2による処置後のpSTAT5蓄積を読み取った。IL-2R α のTreg特異的発現の結果として、天然IL-2は、CD8 T eff細胞およびNK細胞と比較してTregでのpSTAT5刺激の効力の増加を示した。この天然化合物と比較して、PEG化バリエーションは、CD8 T細胞およびNK細胞の集団への効力のわずかな減少を示したが、天然IL-2と比較して、IL-2R α 発現Treg細胞での効力の差次的減少を示した。

【1046】

表4は、示されたIL-2バリエーションで処置されたヒトLRSサンプルまたはCTL-2増殖でのpSTAT5シグナル伝達の用量応答EC50 (EC50)を提供する。

【1047】

【表5】

表4. 示されたIL-2バリエーションで処置されたヒトLRSサンプルまたはCTL-2の増殖でのpSTAT5シグナル伝達の用量応答EC50(EC50)。

処置	NK細胞	Treg細胞	CD8+ T細胞	CD8/Treg比	CTL-2
天然 IL-2	5150.5	62.5	25703.5	411.3	846
E62_30kD	12834	37213	66644	1.8	398,012
E62_5kD	5327.5	18146	41552.5	2.3	275,590
E62K	10305	11086	64037	5.8	58,213
P65_30kD	15741	40740.5	113638	2.8	677,198
P65_5kD	1920	6324.5	13769.5	2.2	194,924
K35_30kD	14021	358	63023	176.0	N.D.
F42_30kD	16397	36856	107944	2.9	123,936
K43_30kD	9004	4797	50504	10.5	N.D.

N.D.=未測定。

【1048】

EC50値 (pg/mL)を、MFIプロットから作成された用量応答曲線から算出した。

【1049】

実施例3

PEGおよび残基置換は、非アルファ薬理に寄与する

PEGおよび残基置換がIL-2 E62の非アルファ薬理に影響を及ぼしたかどうかを決定するために、マルチカラーフローサイトメトリーを使用して、ヒトLRS由来末梢血単核細胞(PBMC)サンプルでのリンパ球活性化の濃度応答プロファイリングを実施した。この試験を、Primity Bio LLC (Fremont, CA)で実施した。新鮮なLRS由来サンプルを、30 μ g/mLの最高濃度で始まる5倍希釈系列で、天然IL-2、E62K、またはE62_30kDにより処置した。45分間のインキュベーション後、サンプルを固定し、IL-2受容体シグナル伝達複合体の上流の結合および活性化のマーカーである、転写因子STAT5 (pSTAT5)のリン酸化形態を検出するための抗体と、特定のT細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞の亜集団でのpSTAT5形成を追跡するための表面マーカーのパネルとで染色した。LRS由来PBMCサンプルのフローサイトメトリー試験のための染色パネルは、下記のマーカー：CD4、CD4+メモリー中心、CD4+メモリーエフェクト、CD4+メモリーT細胞、CD4+ナイーブT細胞、CD4+ T細胞、CD8、CD8+メモリー中心、CD8+メモリーエフェクト、CD8+メモリーT細胞、CD8+ナイーブT細胞、CD8+ T細胞、NK細胞、およびT調節性細胞を含んだ。

【1050】

実施例4

ナイーブ（E3826-U1704）およびB16-F10腫瘍担持（E3826-U1803）C57BL/6マウスでのPK/PD試験

試験デザインの概要を表5および表6にまとめており、用量を、PEG部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。指定点で、心臓穿刺により最終血液サンプルを採取した。試験E3826-U1704は、各時点当たり3匹のマウスを殺する13個の時点（0、13、25、50、100、200、400、800、1600、3200、6400、12800時間）を含み、試験E3826-U1803は、各時点当たり4～7匹のマウスを殺する9個の時点（2、8、12、24、48、72、120、168、および240時間）を含んだ。PK分析およびPD分析のために、（両方の試験では）血漿および血液細胞を採取し、ならびに試験E3826-U1803では腫瘍を採取した。

【1051】

血漿サンプルの生物分析を、適格なヒトIL-2 ELISAアッセイ（Abcam, Cambridge, UK）を使用して実施した。血漿由来のサンプル中のアルデスロイキン、E62_30kD、およびP65_30kD、ならびに内部標準の濃度を、ELISAアッセイを使用して決定した。PKデータ分析を、NW Solutions（Seattle, WA）で実施した。このPKデータを、Phoenix WinNonlin v6.4（Certara/Pharsight, Princeton, NJ）にインポートして分析した。群平均血漿濃度対時間データを、IVボラス投与モデルを使用する非コンパートメント法により分析した。

【1052】

【表6】

表5. PK/PD 試験番号 E3826-U1704-ナイーブ C57/BL6 マウスにおける対照群および試験処置群。

処置	用量*(mg/Kg)	経路、スケジュール	時点数	N
対照	0	IV、単回用量	13	3
アルデスロイキン	0.3	IV、単回用量	13	3
P65_30kD	0.3	IV、単回用量	13	3
E62_30kD	0.3	IV、単回用量	13	3

*用量は、P65_30kD IL-2 ポリペプチド量を指しており、この用量は、PEG部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。

【1053】

【表7】

表6. PK/PD 試験番号 E3826-U1803-対照群および試験処置群-B16F-10 黒色腫瘍担持マウス(用量は、PEG部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した)。

処置	用量 (mg/kg)	経路、スケジュール	時点数	N
なし(用量前)	0 mg/kg	なし	1	6
ビヒクル対照	0 mg/kg	IV、単回用量	9	3
P65_30kD	1 mg/kg	IV、単回用量	9	4
P65_30kD	3 mg/kg	IV、単回用量	9	4

【1054】

試験E3826-U1704では、表7にまとめたように、P65_30kDおよびE62_30kDの両方が、アルデスロイキンと比べて優れたPKプロファイルを示す。アルデスロイキンの単回IVボラス用量後に、用量後0.03時間（投与後に最初に測定した時点）でT_{max}を観察し、用量後4時間まで平均血漿濃度が測定可能であった。P65_30kDおよびE62_30kDの単回IVボラス投与後に、用量後0.03時間でT_{max}を観察し、用量後120時間（最後に測定した時点）まで平均血漿濃度が測定可能であった。別の試験では、E62_5kDのIV投与後に、用量後0.133時間でT_{max}を観察し、用量後12時間まで平均血漿濃度が測定可能であった。

【1055】

C_{max}およびAUC_{0-t}を基準とする曝露量は、下記の通りであった：P65_30kD>E62_30kD>>E62_5kD>アルデスロイキン。PEGがより小さいE62_5kDは、PKプロファイルがrIL-2により近かった（表7）。P65_30kD曝露量は、C_{max}およびAUC_{0-t}を基準として、アルデスロイキンと比べてそれぞれ5.5倍および200倍高かった。加えて、P65_30kDは、アルデスロイキンと比較して、23倍長いt_{1/2}（13.3時間対0.57時間）を示し、かつ約198倍低いCL（6.58対1300mL/時間/kg）を示した。P65_30kDおよびE62_30kDの両方に関して、分布容積（それぞれ82.4および92.3mL/kg）は、アルデスロイキンと比べて約4.2~4.7倍低く、マウスの血液量（85mL/Kg；[Boersen 2013]）と同程度であった。このことは、P65_30kDおよびE62_30kDが主に体循環内に分布していることを示唆する。

【1056】

【表8】

表7. C57BL/6 雌マウスでの P65_30kD PK パラメータ。

パラメータ	単位	P65_30kD	E62_30kD	E62_5kD	アルデスロイキン
T _{max}	時間	0.030	0.030	0.133	0.030
C _{max}	ng/mL	4,870	4,230	936	884
AUC _{0-t}	時間*ng/mL	45,600	37,100	798	229
R ²		0.992	0.986	0.851	0.900
AUC _{INF}	時間*ng/mL	45,600	37,100	807	230
t _{1/2}	時間	13.300	14.500	2.56	0.573
CL	mL/時間/Kg	6.580	8.07	372	1300
V _{ss}	mL/Kg	82.4	92.3	404	390

注記:R²は、各濃度対時間プロファイルの最終段階に関する適合度パラメータである。全てのパラメータを、3桁の有効数字で示す。

【1057】

実施例5

末梢血区画での薬力学的観察

P65_30kDの薬物動態に対するその薬理学的プロファイルを評価するために、薬力学的読み取りとして、STAT5リン酸化および細胞増殖の誘発（初期分子マーカーKi-67および細胞数）を使用した。pSTAT5 PDマーカーは、CD8+エフェクターT細胞におけるP65_30kDおよびアルデスロイキンの両方に関するPKとの良好な相関関係を示した（表7）。pSTAT5の持続的上昇を、NK細胞およびCD8+T細胞の両方では72時間まで観察し、Tregでは24時間まで観察した。pSTAT

5 誘発は、アルデスロイキンを投与したマウスでは、わずか2時間後にベースラインに戻った。STAT5リン酸化は、CD8+エフェクターT細胞およびNK細胞の増殖応答（72～120時間）に変換されたが、Tregでは変換されず、CD8+エフェクターT細胞の表現型分析から、この集団内でのCD44+メモリー細胞の実質的な拡大が明らかになった。

【1058】

B16-F10腫瘍担持（E3826-U1803）C57BL/6マウスでの腫瘍区画における薬力学観察

表8は、B16-F10腫瘍担持マウスにおける3mg/kgでのP65_30kDの単回用量後の血漿および腫瘍薬物濃度を示し、用量を、PEG部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。腫瘍半減期は血漿半減期の2倍（24.4対12.6）であり、このことは、P65_30kDが腫瘍に浸透してこの腫瘍内に保持されることを示す。曲線の最後尾の交差は、血漿が腫瘍と比べて速く消失することを示す（データは示さない）。腫瘍：血漿AUCの比率は、1および3mg/kg用量それぞれに関して9.7%および8.4%であった。

【1059】

【表9】

表8. P65_30kD 血漿および腫瘍の PK パラメータ

B16-F10 腫瘍担持 C57BL/6 雌マウス。

パラメータ	P65_30kD (3 mg/kg)	
	血漿	腫瘍
T _{max} (時間)	*2.00	8
C _{max} (ng/mL)	40000	1550
t _{1/2} (時間)	12.60	24.4
AUC _{0-t} (時間*ng/mL)	656,000	55200
R ²	0.974	0.988
AUC _{INF} (時間*ng/mL)	656,000	55200

【1060】

Balb/cマウスE3826-U1802を対象とするMTD試験

P65_30kDの用量範囲試験を、Crown Biosciences, Inc. (San Diego, CA) にてナীব雌Balb/cマウスで実行した。試験デザインを表9に示し、用量を、PEG部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。8個の時点（0.25、1、4、12、24、34、48、および72時間）で、顎下腺静脈から血液サンプルを採取した。血漿および血液細胞の両方を、PK分析およびPD分析のために採取した。

【1061】

全ての血漿サンプルを、市販のELISAキットを用いて、ヒトIL-2サイトカイン、ならびにマウスIL-2サイトカイン、TNF-αサイトカイン、IFNγサイトカイン、IL-5サイトカイン、およびIL-6サイトカインに関して分析した。

【1062】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 9. PK/PD および MTD 試験番号 E3826-U1802-ナイーブ Balb/C マウスにおける対照群および試験処置群。

処置	用量 (mg/kg)	経路、スケジュール	時点数	N
ナイーブ	0 mg/kg		0	3
ビヒクル対照	0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	0.01 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	0.03 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	0.1 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	1.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	3.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
アルデスロイキン	5.0 mg/kg	IV, BID x 3	3	3
P65_30kD	0.01 mg/kg	IV、単回用量	3	3
P65_30kD	0.03 mg/kg	IV、単回用量	3	3
P65_30kD	0.1 mg/kg	IV、単回用量	3	3
P65_30kD	1.0 mg/kg	IV、単回用量	3	3
P65_30kD	3.0 mg/kg	IV、単回用量	3	3
P65_30kD	5.0 mg/kg	IV、単回用量	3	3
#P65_30kD	0.3 mg/kg	IV、単回用量	8	3

*72 時間の時点を除く全ての時点で、顎下腺静脈から採血した。72 時間の時点は、最終採血であった。

#PK/PD評価に、P65_30kDの0.3mg/kg用量のみを使用した。

【1063】

Balb/c マウスを使用する MTD 試験での毒物学的観察

高用量アルデスロイキンと関連する主な毒性は、血管漏出症候群および関連するサイトカイン放出症候群 (CRS) である。マウスでのこの効果の可能性を評価するために、0.01~5.0 mg/kg 用量の範囲の用量での P65_30kD の単回用量 IV 投与を実施し (表 9)、用量を、PEG 部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。実施した分析は、血液学的分析、組織病理学的分析、臓器重量分析、およびサイトカイン分析であった。P65_30kD またはアルデスロイキンの両方により、ビヒクル対照マウスと比較して、血液、組織病理、または体重では異常を観察しなかった。サイトカイン分析に関しては、1 mg/kg ~ 5 mg/kg で始まる血漿 IL-5 レベルをアルデスロイキンが上昇させることを観察した。P65_30kD により、5 mg/kg 用量でのみ、IL-5 の中程度の増加 (但し、アルデスロイキンと比べて少ない) が見られた。アルデスロイキンおよび P65_30kD の両方により、IFN γ の全身レベルの一過性の上昇を観察した。

【1064】

実施例 6

カニクイザルでの PK/PD - 試験番号 20157276

P65_30kD の薬物動態プロファイルおよび薬力学的プロファイルを、0.3 mg/kg での単回静脈内用量の投与後に非ナイーブカニクイザルで評価し、この用量を、PEG 部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。この試験を Charles River Laboratories, Inc. (Reno, NV) で実行し、PK データ分析を NW Solutions (Seattle, WA) で実施した。血液サンプルを、投与前に、ならびに 15 個の時点 (投与後 0.5、1、2、4、8、12

、24、36、48、72、120、144、168、192、および240時間）で採取した。血漿および血液細胞の両方を、PK分析およびPD分析のために採取した。選択された時点で、PK、PD、細胞集団、および血液学的分析を行なった。

【1065】

全ての血漿サンプルを、市販のELISAキットを用いてヒトIL-2（PK読み取り）に関して分析した。

【1066】

表10は、カニクイザルでのP65__30kD PKパラメータを示す。

【1067】

【表11】

10

表 10.

			0.3 mg/kg		
			動物 2699	動物 2705	平均
ROA	パラメータ	単位	推定値		
IV	T _{max}	時間	0.500	0.500	0.500
	C _{max}	ng/mL	11000	11400	11200
	AUC ₀₋₁	時間*ng/mL	121000	120000	121000
	t _{1/2}	時間	13.4	13.9	13.6
	CL	mL/時間/kg	2.47	2.49	2.48
	V _{ss}	mL/kg	29.0	32.1	30.5

20

【1068】

単回IVボラス投与後、用量後0.5時間（投与後最初に測定した時点）でT_{max}を観察し、用量後168時間（最後の測定）まで平均血漿濃度が測定可能であった。P65__30kDのt_{1/2}およびAUCは、それぞれ13.6時間および121000時間*ng/mLであった。

30

【1069】

血液学的パラメーターカニクイザル試験番号20157276

血液学的パラメータに関して、評価時点は、用量前-1日目、および用量後1、3、6、8、10、12、14、17、19、21に対応する。

【1070】

実施例7

初代ヒト白血球除去システム（LRS）由来PBMCサンプルにおける例示的なIL-2化合物のex-vivo免疫応答プロファイリング

例示的なIL-2化合物の異なる受容体特異性が、初代免疫細胞の亜集団の活性化にどの程度影響を及ぼすかを決定するために、マルチカラーフローサイトメトリーを使用して、ヒトLRS由来末梢血単核細胞（PBMC）サンプルでのリンパ球活性化の濃度応答プロファイリングを実施した。表12のコンジュゲートを、配列番号1の改変により合成した。この試験を、Primity Bio LLC（Fremont, CA）で実施した。ヒトLRSサンプルに由来する初代リンパ球を、例示的なIL-2化合物の希釈系列で処置し、表11に示すパネルを使用して、各リンパ球細胞型でのpSTAT5シグナル伝達に基づいて定量した。

40

【1071】

50

【表 1 2】

表 11. 細胞集団を示す手がかり。

マーカー	細胞集団
CD3	T 細胞
CD4	Th 細胞
CD8	T エフェクター細胞
CD45RA	ナイーブ T 細胞
CD56	NK 細胞
CD14/19	単球/B 細胞
CD25	Treg または感作 T 細胞
CD127	Treg ではない
CD62L	メモリーT 対エフェクターメモリーT 細胞
pSTAT5 (Y694)	活性化マーカー

【1 0 7 2】

フローサイトメトリーデータを、濃度応答モードで、様々なT細胞およびNK細胞のサブセットの活性化に関して分析し、例示的なIL-2バリエーションK9_30kDによる処置後のpSTAT5蓄積を読み取った。

【1 0 7 3】

表12は、示されたIL-2バリエーションで処置されたヒトLRSサンプルまたはCTLIL-2増殖におけるpSTAT5シグナル伝達の用量応答EC50（EC50）を示す。

【1 0 7 4】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 12. 示された IL-2 バリエーションで処置されたヒト LRS サンプルまたは CTLL-2 増殖での pSTAT5 シグナル伝達の用量応答 EC50(EC50)。

化合物	NK 細胞	CD8+ T 細胞	Treg 細胞	CD8+/Treg 比	天然 IL-2 に対する Treg EC50 の倍数増加	CTLL-2 増殖
天然 IL-2	4586	31024	75	414	1	455.8
K9_30kD	169578	1100679	2217	496	30	504
H16_30kD	2545257	12070108	34976	345	466	80755
L19_30kD	6756768	22436430	93205	241	1243	3510
D20_30kD	2643930	9505217	1129455	8	15059	689939
M23_30kD	143620	539824	1030	524	14	1102
N26_30kD	258531	1188859	2459	483	33	2594
N88_30kD	3298113	11111537	323201	34	4309	66606
E100_30kD	35088	195823	483	405	6	1676
N119_30kD	34010	143380	535	268	11	1215
T123_30kD	33396	152928	269	569	6	255
Q126_30kD	3676807	19722480	29454	670	393	3584
S127_30kD	20210	92190	150	615	3	123
T131_30kD	24207	132922	258	515	3	641
N88R/D109_30kD	2780819	12503386	175805	71	3663	59577
V91K	20537	102255	142	720	3	99.5
N88R	2312847	15025734	11082	1356	148	363

*個々の実験における、天然 IL-2(野生型 IL-2)試験と比較した Treg の効力変化。

【1 0 7 5】

EC50 値 (pg/mL) を、MFI プロットから作成された用量応答曲線から算出した。

【1 0 7 6】

実施例 8

C57BL/6 マウスでの PK 試験

実験の詳細の概要を表 1 3 にまとめ、用量を、PEG 部分の質量を含まないタンパク質成分の質量を参照して算出した。

【1 0 7 7】

【表 1 4】

表 13.

群	動物の数	試験/対照物(用量)	経路、投与レジメン	エンドポイント
1	9	天然 IL-2 (野生型) (3.0 mg/kg) 濃度: 0.6 mg/mL	IV、5mL/kg で 0 日目 T=0 に単回用量	用量後 0.08、0.25、 0.5、1、2、4、8、12、 および 24 時間で採血
2	9	K35_30kD (3.0 mg/kg) 濃度: 0.6 mg/mL	IV、5mL/kg で 0 日目 T=0 に単回用量	
3	9	K35_30kD (0.3 mg/kg) 濃度: 0.6 mg/mL	IV、5mL/kg で 0 日目 T=0 に単回用量	
予備	6	N/A	N/A	ブランクマトリックス 採取(時間制限なし)
合計	33			

10

20

30

40

50

【1078】

2つの用量レベルでの例示的なPEG化IL-2化合物K35__30kDの薬物動態特性を評価した。凍結乾燥された試験物をPBSで再構成し、9匹の雄C57BL/6マウスに、各用量群に関して尾静脈内注射により0.3および3mg/kgで投与した（下記の採取の詳細を参照されたい）。血液サンプルを、用量後0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、12、および24時間で採取した。天然マウスIL-2と交差反応しないAbcamのhIL-2 ELISAキット（ab100566）を、試験物の検出および定量に使用した。天然化合物およびPEG化化合物のキット検出の感度でのELISA特異的差違を調整するために、天然IL-2およびK35__30kD試験物の標準曲線を、試験物希釈緩衝液を使用して作成し、それぞれの標準曲線に関してデータを分析した。プロットされたデータは、上記で説明されている3つの個々のサンプル（生物学的複製）の平均およびSEMを表し、K35__30kD試験物のPKパラメータを抽出して概要を表14にまとめた。

【1079】

【表15】

表 14.

分析物		単位	用量	
			0.3 mg/kg	3 mg/kg
			推定値	
IL-2 K35-mPEG30kD	T _{max}	時間	0.250	0.250
	C _{max}	ng/mL	6080	57700
	AUC _{0-t}	時間*/ng/mL	38500	425000
	R ²		0.994	0.947
	AUC _{1/2extrap}	%	35.3	37.4
	AUC _{0-∞}	時間*ng/mL	59600	679000
	t _{1/2}	時間	18.2	19.5
	C _{max} /D	kg*ng/mL/mg	20300	19200
	AUC _{0-t} /D	時間*ng/mL	128000	142000

【1080】

実施例 9

ヒトIL-2 RアルファおよびIL-2 Rベータに対する結合性の特徴付け

【1081】

試験を実行して、ヒトIL-2 RアルファおよびIL-2 Rベータに対する例示的なIL-2コンジュゲートIL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD] -1の結合性を特徴付けた。化合物IL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD] -1はこれまでに記載された通りであり、また配列番号50を含み、ただし64位のプロリンが、AzK__L1__PEG30kDに置き換えられ、AzK__L1__PEG30kDは、30kD、直鎖状鎖PEG鎖の、式(IV)もしくは式(V)、または式(IV)もしくは式(V)の混合物の構造として定義される。化合物IL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD] -1は、配列番号3を含む化合物としてもやはり定義され、その場合、64位のプロリン残基(P64)が、式(VIII)もしくは式(IX)、または式(VIII)もしくは式(IX)の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である。化合物IL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD] -1は、配列番号3を含む化合物としてもやはり定義され、その場合、64位のプロリン残基(P64)は、式(XII)もしくは式(XIII)、または式(XII)もしくは式(XIII)の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である。

【1082】

該化合物を、実施例 2 で開示した方法と類似した方法を使用して調製したが、その場合、64 位のプロリンが、N6-((2-アジドエトキシ)-カルボニル)-L-リジン AzK により置換された、配列番号 3 を有するタンパク質を最初に調製した（配列番号 35）。次に、AzK 含有タンパク質を、クリックケミストリー条件下で、平均分子量が 30 kDa のメトキシ直鎖 PEG 基を含む DBCO と反応させた。要するに、バイオコンジュゲーション用として採用された IL-2 を、

(a)

(i) 所望のアミノ酸配列を有するタンパク質であって、その遺伝子が非天然アミノ酸 N6-((2-アジドエトキシ)-カルボニル)-L-リジン (AzK) が組み込まれた所望の位置においてコドンを提供するための第 1 の非天然塩基対を含有するタンパク質と、

(ii) M. マゼイ PyL に由来する tRNA であって、その遺伝子とその天然配列の代わりにマッチングアンチコドンを提供するための第 2 の非天然のヌクレオチドを含む tRNA と

をコードする発現プラスミドと、

(b) M. バルケリ由来のピロリジル-tRNA シンテターゼ (Mb PyLRS) をコードするプラスミドと、

(c) AzK と、

(d) 完全長タンパク質の最初の 65 個のアミノ酸残基が削除された、ヌクレオチドトリホスフェートトランスポーター PtNTT2 のトランケートされたバリエーションと

を使用する、本明細書に開示される方法を使用して、大腸菌において封入体として発現させた。IL-2 バリエーションのアミノ酸配列をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドは、P64 が本明細書に記載される非天然アミノ酸で置き換えられている、配列番号 3 を有するタンパク質をコードする配列のコドン 64 としてコドン AXC を含有した。M. マゼイ由来の直交性 tRNA 遺伝子をコードするプラスミドは、その天然配列の代わりに AXC マッチングアンチコドンである GYT (ただし、Y は本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチドである) を含んだ。X および Y を、本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチド dTPT3 および dNaM から選択した。発現したタンパク質を封入体から抽出し、標準的な手順を使用して再度折り畳んだ後、DBCO 媒介式の銅フリークリックケミストリーを使用して、AzK 含有 IL-2 生成物を部位特異的にペグ化し、安定な共有結合性の mPEG 部分（平均分子量が 30 kDa のメトキシ直鎖 PEG 基）を AzK に連結した（上記スキーム S6 で概説した通り）。

【1083】

IL-2 R アルファに結合する試験物サンプル。溶液中の試験物サンプルを、IL-2 R アルファ受容体表面上での結合に関して試験した。応答データを、Scrubber-2 (Biologic Software Pty Ltd) を使用して、受容体を含まない参照表面および緩衝液注射の平均からシグナルを減算して処理した。rhIL-2 濃度系列に関する応答を、質量輸送のための工程を含む 1:1 相互作用モデルに包括的にフィットさせた。結合定数の概要を、表 15 に示す。

【1084】

【表 16】

表 15.

	K _D (nM)	
	IL-2R アルファ	IL-2R ベータ
rhIL-2	11 ± 1	0.7 ± 1
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1	n.d.	3.1 ± 0.3

10

20

30

40

50

【1085】

タンパク質がコーティングされたCM4センサーチップ上でのFcタグ付きIL-2Rベータの捕捉。CM4センサーチップを、Biacore 4000光学バイオセンサーに結合させ、この機器を、HBS-Pランニング緩衝液（HBS-Pは、0.005% Tween-20が添加された1×HBS-Nである）で3回ブライミングした。プロテインAを、標準NHS/EDCカップリング条件を使用してカップリングさせた。IL-2Rベータ-Fcを、0.1mg/mLの濃度まで水に溶解させ、次いで、HBS-Pランニング緩衝液で1/1000に希釈した。IL-2Rベータ-Fcを、様々な長さの時間にわたり注射して、2種の異なる密度の受容体表面（約750RUおよび1500RU、データは示さない）を作成した。

10

【1086】

IL-2Rベータに結合するサンプルの特徴付け。溶液中の試験物サンプルを、IL-2Rベータ受容体表面上での結合に関して試験した。応答データを、Scrubber-2（Biologic Software Pty Ltd）を使用して、受容体を含まない参照表面および緩衝液注射の平均からシグナルを減算して処理した。2回反復で試験したrhIL-2（4μM最高濃度2倍希釈）およびIL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1サンプル（8μM最高濃度2倍希釈）に関する応答を、質量輸送のための工程を含む1:1相互作用モデルに包括的にフィットさせた。結合定数の概要を、表15に示す。

【1087】

結果。Hisタグ付きIL-2Rアルファを、Biacore SPRバイオセンサーシステム内のニッケル荷電NTAセンサーチップ上で様々な密度にて捕捉した。Fcタグ付きIL-2Rベータを、プロテインAがコーティングされたCM4センサーチップ上で様々な密度にて捕捉した。応答データを1:1相互作用モデルにフィットさせて、各相互作用に関する結合定数を決定した。組換えヒトIL-2（rhIL-2）は、約11nMの親和性でIL-2Rアルファに結合したが、IL-2RアルファへのIL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1サンプルの結合を検出し得なかった。これらの試験条件下では、rhIL-2は、約700nMの親和性でIL-2Rベータに結合し、IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1は、約3μMの親和性でIL-2Rベータに結合した。

20

【1088】

実施例10

試験を実行して、リン酸化型の転写因子STAT5（pSTAT5）シグナル伝達効力のヒト初代免疫細胞型に関する、IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1対組換えヒトインターロイキン-2（hIL-2）の効力および異なる細胞型特異性を決定した。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1は、これまでに記載された通りであり、また配列番号50を含み、ただし64位のプロリンは、AzK_L1_PEG30kDに置き換えられ、AzK_L1_PEG30kDは、30kD、直鎖状PEG鎖の、式（IV）もしくは式（V）、または式（IV）もしくは式（V）の混合物の構造として定義される。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1は、配列番号3を含む化合物としてもやはり定義され、その場合、64位のプロリン残基（P64）は、式（VII）もしくは式（IX）、または式（VII）もしくは式（IX）の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1は、配列番号3を含む化合物としてもやはり定義され、その場合、64位のプロリン残基（P64）は、式（XII）もしくは式（XIII）、または式（XII）もしくは式（XIII）の混合物の構造に置き換えられ、nは、PEG基の分子量が約30kDaであるような整数である。該化合物を、実施例2で開示する方法と類似した方法を使用して調製したが、その場合、64位のプロリンが、N6-（（2-アジドエトキシ）-カルボニル）-L-リジンAzKに置き換えられた、配列番号3を有するタンパク質を最初に調

30

40

50

製した（配列番号35）。次に、AzK含有タンパク質を、クリックケミストリー条件下で、平均分子量が30kDaのメトキシ直鎖PEG基を含むDBCOと反応させた。

【1089】

ヒトPBMCサンプル処置方法。IL-2（対照、1mg/mL）およびIL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD] -1（「ロット1」：1.27mg/mL；「ロット2」：2.29mg/mL）のストックを、-20℃で凍結させたストック溶液として保存した。

【1090】

IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD] -1 ロット1およびロット2の化合物をPBSで希釈し、IL-2をPBS+0.1% BSAで希釈して、10倍ストックを作製した。10倍IL-2ストックの濃度は、5μg/mLであり、GLP-1ストックおよびGLP-2ストックは、実験に応じて6~300μg/mLであった。10倍ストックを、連続5倍希釈で希釈して、10点用量滴定液を作製した。IL-2の最高用量は、5μg/mLであり、ロット1ストックおよびロット2ストックは、実験に応じて6~300μg/mLであった。各ストック10μLを、細胞サンプル90μLに添加して、500ng/mLというIL-2に関する最終最高用量、ならびにロット1およびロット2のそれぞれに関する0.6~30μg/mLを実現した。

【1091】

サンプルの刺激

刺激するために、上記で概説した用量漸増液10μLを、37℃に事前平衡化した血液サンプル90μLに添加した。サンプルを37℃で45分間インキュベートした。インキュベーション期間終了時に、赤血球を溶解し、以下のように細胞を同時に固定した：

【1092】

細胞100μLを、BD Lyse/Fix Buffer (Beckton Dickinson、カタログ番号558049) 900μLに移し、直ちにボルテックス処理した。添加直前にストックを細胞培養水で1：5に希釈することにより、BD Lyse/Fixを調製した。サンプルを室温で10分間インキュベートし、次に450×gで5分間遠心分離して細胞をペレット化した。ペレット化した細胞をPBS+0.5% BSAで洗浄し、分析まで-37℃で保管した。

【1093】

染色プロトコール。

工程1．室温で細胞を解凍した。工程2．Fc Block (TruStain FcX (商標)) を添加した。工程3．室温で5分間インキュベートした。工程4．表16の下記抗体を添加した：

【1094】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 16. ヒトパネルの抗体。

	フルオロフォア
CD4	BUV737
CD56	BV711
CD16	BV711
CD8	BUV805
CD27	BV786
CD45RA	BUV395
CD127	FITC
CD25	ビオチン

10

【1095】

工程 5. 室温で 20 分間インキュベートした。工程 6. 細胞を PBS + 0.5% BSA を用いて 2 回洗浄した。工程 7. 細胞 1 体積に対してメタノール 10 体積を添加することにより、細胞を透過処理した。工程 8. 細胞を 4℃で 10 分間インキュベートした。工程 9. PBS で洗浄した。工程 10. 細胞を PBSw / 0.5% BSA で洗浄した。工程 11. Fc Block (TruStain FcX (商標)) を添加した。工程 12. 表 17 に由来する下記透過処理後染色パネルを添加した。

20

【1096】

【表 18】

表 17. 染色試薬。

	フルオロフォア
CD3	PE-Cy7
STAT5	Ax647
ストレプトアビジン	BV421
FOXP3	PE

30

【1097】

フローサイトメトリーおよびデータ分析。サンプルを、Becton Dickinson Fortessa、ならびに 5 個のレーザー (372 nm、405 nm、488 nm、561 nm、および 640 nm) を備えた LSR II 機器に流した。これらの機器は、散乱パラメーターを含む 20 個の検出器を備えていた。これらの機器を、Becton Dickinson Cytometer Setup & Tracking Beads を使用して定期的に校正した。染色されたサンプルが入った 96 ウェルプレート、96 ウェルハイスループットサンプラーを使用して、8,000 個未満の細胞 / 秒で流した。

40

【1098】

データを、. fcs ファイルとしてネットワークデバイスにエクスポートし、フルオロフォアの溢流を考慮して補正し、この fcs ファイルに注釈を付けた。次いで、この fcs

50

s ファイルを、ゲートした。最初に、F S C - H により F S C - A を使用して細胞をシングルレットでゲートして、あらゆる凝集体またはダブルレットを排除した。このゲート内では、細胞を、中程度から高い前方散乱 (F S C - A) および側方散乱 (S S C - A) でゲートして、赤血球、残骸、および顆粒球を排除した。次いで、T 細胞を、C D 3 +、C D 5 6 / 1 6 陰性集団としてゲートした (3 枚目のパネル)。N K 細胞を、C D 3 陰性、C D 5 6 / 1 6 高集団と同定した (3 枚目のパネル)。次いで、T 細胞を、C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞に分類した。次いで、T r e g 細胞を、C D 2 5 ^{h i} × C 1 2 7 ^{l o} 集団として、C D 4 + T 細胞からゲートした。

【1099】

E C 5 0 値の導出のための統計およびプロット。細胞集団、ドナー、および化合物処理のそれぞれに関する蛍光強度中央値 (M F I) を、リン酸化を検出するチャンネルでのシグナルから算出した。この統計を、S p o t f i r e を使用して分析した。S p o t f i r e 内では、データを、化合物の用量に関して対数スケールでプロットし、M F I 読み取りに関して線形スケールでプロットした。これらのデータを、4 パラメータロジスティック回帰方程式を使用してフィットさせた。E C 5 0 を、曲線の変曲点として算出した。

【1100】

結果。ヒト I L - 2 および I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] - 1 サンプルを希釈し、上記で説明されているように3個の個々のドナーのそれぞれに対して3回反復で試験した。算出された最大半量有効濃度 (E C 5 0) 値を、表 1 9 に列挙する。結果は、I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] - 1 が、ヒト由来のリンパ球での I L - 2 受容体シグナル伝達の強力なアゴニストであることを示す。I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] - 1 は I L - 2 R β サブユニットに特異的に結合するが I L - 2 R α には結合しないことを示したこれまでの i n v i v o での結合試験と一致して、高レベルの I L - 2 R α を構成的に発現しない T e f f および N K 細胞と比較して、効力に関して I L - 2 R α 結合に依存する T r e g 細胞では、シグナル伝達効力の特異的低下を示した。

【1101】

【表 1 9】

表 18. ヒトドナー由来の初代 C D 8 + T 細胞、N K 細胞、および T r e g 細胞の亜集団に対する h I L - 2 および I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] - 1 ロットの効力の特徴。

ヒト細胞 E C 5 0 (ng/mL)					
物質	C D 8 + T	M e m C D 8 + T	N K	T r e g	C D 8 / T r e g 比
ヒト I L - 2	12.4 ± 1.29	11.3 ± 1.63	2.88 ± 1.63	0.027 ± 0.005	460
lot 1*	224 ± 25.3	240 ± 27.3	54.7 ± 6.55	114 ± 20.3	2.0
lot 2*	265 ± 12.4	284 ± 18.3	55.7 ± 8.62	132 ± 24.0	2.0

データは、3例の独立したドナーからのサンプルの3回反復試験から算出された平均±平均の標準誤差 (S E M) である。

*I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ L 1 _ P E G 3 0 k D] - 1。

【1102】

実施例 1 1

C T - 2 6 担腫瘍 B a l b / c マウスの処置における化合物 A + チェックポイント阻害剤の使用。化合物 I L - 2 _ P 6 5 [A z K _ P E G 3 0 k D] (本明細書では「P 6 5 _ 3 0 k D」、および複数の図では「化合物 A」とも呼ばれる) を、本明細書に開示する方法に基づき、6 5 位のプロリンが、N 6 - ((2 - アジドエトキシ) - カルボニル) -

Ｌ－リジン（ＡｚＫ）に置き換えられた、配列番号４を有するタンパク質を最初に調製することにより調製した（配列番号１０）。次に、ＡｚＫ含有タンパク質を、平均分子量が３０ｋＤａのメトキシ直鎖ＰＥＧ基を含むＤＢＣＯと、クリックケミストリー条件下で反応させて、式（ＩＩ）、式（ＩＩＩ）、または式（ＩＩ）および式（ＩＩＩ）の混合物を含む配列番号２５を有する生成物を得たが、ただしＷは、平均分子量が３０ｋＤａのメトキシ直鎖ＰＥＧ基である。該化合物は、６５位のプロリン（Ｐ６５）が、式（ＶＩ）もしくは式（ＶＩＩ）、または式（ＶＩ）および式（ＶＩＩ）の混合物の構造に置き換えられ、 n は、ＰＥＧ基の分子量が約３０ｋＤａであるような整数である、配列番号４のアミノ酸配列を含むものとしても定義することができる。該化合物は、６５位のプロリン（Ｐ６５）が、式（Ｘ）もしくは式（ＸＩ）、または式（Ｘ）および式（ＸＩ）の混合物の構造に置き換えられ、 n は、ＰＥＧ基の分子量が約３０ｋＤａであるような整数である、配列番号４のアミノ酸配列を含むものとしても定義することができる。

【１１０３】

単剤療法としてのおよび抗ＰＤ－１抗体と併用された化合物Ａの試験を、Ｂａｌｂ／ｃマウス（メス）において実施した。平均体重が１６ｇ～２１ｇ、６～８週齢のＢａｌｂ／ｃマウス（メス）を、試験１および試験２用として、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ、ＣＡ）から購入した。平均体重が１８～２２ｇ、７～８週齢のＢａｌｂ／ｃマウス（メス）を、試験３用として、ＨＤ ＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓによりＴａｃｏｎｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した。極低温で保存したＣＴ－２６結腸がん細胞のバイアルを、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｔｙｐｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（ＡＴＣＣ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）から購入した。細胞を解凍し、製造業者のプロトコールに従い培養した。腫瘍細胞のインキュレーション当日に、細胞を無血清培地中で洗浄し、カウントし、０．１ｍＬあたり生存細胞２５０，０００個（試験１および試験２）または３００，０００個（試験３）の濃度で冷却した無血清培地中に再懸濁した。ＣＴ－２６細胞（０．１ｍＬ）を、個々のマウスの側腹部に皮下注射し、腫瘍を増殖させた。

【１１０４】

化合物Ａと抗ＰＤ－１抗体が併用された試験１および試験２の場合、使用した抗体は、抗マウスＰＤ－１（ＢｉｏＸｃｅｌｌ；ＲＭＰ１－１４）であり、また対照抗体は、ＩｇＧ１アイソタイプ抗体（ＢｉｏＸｃｅｌｌ；カタログ番号ＢＰ００８９、ロット番号２Ａ３）であった。抗ＰＤ－１抗体が使用された試験３の場合、使用した抗体は、抗マウスＰＤ－１（ＢｉｏＸｃｅｌｌ；カタログ番号ＢＰ０１４６、ＲＭＰ１－１４、ロット番号６９５３１８Ａ１）であり、また対照抗体は、ＩｇＧ１アイソタイプ抗体（ＢｉｏＸｃｅｌｌ；カタログ番号ＢＰ００８９、ロット番号２Ａ３）であった。

【１１０５】

真空凍結乾燥した化合物Ａを、０．１Ｍ酢酸を含むストックに１０ｍｇ／ｍＬで再構成した。次に、それを１×リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を用いて作業濃度にさらに希釈した。化合物を再構成し、動物に投与するまでの１時間内に希釈し、投与まで氷上保管した。使用前に、真空凍結乾燥された化合物を－８０℃で保管した。ビヒクルを４℃で保管した。

【１１０６】

３件の異なる効能試験を、ＣＴ－２６担腫瘍Ｂａｌｂ／ｃマウスを使用して実施した。化合物Ａを単一薬剤として、用量依存性の効能について評価した試験１デザインを表１９に概説する。抗ＰＤ－１抗体と併用する化合物Ａの効能を評価した試験２および試験３のデザインを、表２０および表２１にそれぞれ概説する。化合物Ａの投与経路は静脈内（ＩＶ）であった。マウスへのＩＶ投与を、尾静脈を介して実施した。抗体を腹腔内（ＩＰ）に投与した。各投与の直前に取得した各動物の個々の体重に基づき、全ての薬剤を投与した。投与レジメンに関する詳細を以下に記載する。

【１１０７】

10

20

30

40

50

【表 20】

表 19. 試験番号 1:CT-26 担腫瘍マウスにおける対照群およびテスト処置群。

薬剤	用量(mg/kg)	経路, スケジュール	マウスの数
ビヒクル対照	0	IV, QWx3	10
化合物 A	0.3	IV, QWx3	10
化合物 A	0.3	IV, Q2Wx2	10
化合物 A	1	IV, QWx3	10
化合物 A	1	IV, Q2Wx2	10
化合物 A	3	IV, QWx3	10
化合物 A	3	IV, Q2Wx2	10

IV = 静脈内; QW×3 = 1 週間に 1 回、合計 3 回投与; Q2W×2 = 2 週間に 1 回、合計 2 回投与。

【1108】

【表 21】

表 20. 試験番号 2: CT-26 担腫瘍マウスにおける対照群およびテスト処置群。

薬剤	用量(mg/kg)	経路, スケジュール	マウスの数
ビヒクル対照 + IgG アイソタイプ対照	0 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物 A	3	IV, QWx3	14
化合物 A	6	IV, QWx3	14
抗 PD-1 抗体	10	IP, BIWx3	14
化合物 A + 抗 PD-1 抗体	6 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14

BIW×3 = 1 週間に 2 回を 3 週間、合計 6 回投与; IP = 腹腔内; IV = 静脈内; QW×3 = 1 週間に 1 回、合計 3 回投与。

【1109】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 21. 試験番号 3: CT-26 担腫瘍マウスにおける対照群およびテスト処置群。

薬剤	用量(mg/kg)	経路, スケジュール	マウスの数
ビヒクル対照 + IgG アイソタイプ対照	0 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物 A	1	IV, QWx3	14
化合物 A	3	IV, QWx3	14
化合物 A	6	IV, QWx3	14
化合物 A	9	IV, QWx3	14
抗 PD-1 抗体	10	IP, BIWx3	14
化合物 A + 抗 PD-1 抗体	1 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物 A + 抗 PD-1 抗体	3 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物 A + 抗 PD-1 抗体	6 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14

BIW×3 = 1 週間に 2 回を 3 週間、合計 6 回投与; IP = 腹腔内; IV = 静脈内; QW×3 = 1 週間に 1 回、合計 3 回投与。Q2W×2 = 2 週間に 1 回、合計 2 回投与。

【1 1 1 0】

試験 1 では、腫瘍細胞イノキュレーション後 4 日目の平均腫瘍容積が約 80 mm³であったときに開始して、CT-26 担腫瘍マウスを、ビヒクルを IV で、1 週間に 1 回、合計 3 回投与 (QW×3) することにより、または 0.3、1、もしくは 3 mg/kg の化合物 A を IV で、1 週間に 1 回、合計 3 回投与 (QW×3) することにより、もしくは 2 週間に 1 回、合計 2 回投与 (Q2W×2) することにより処置した。

【1 1 1 1】

試験 2 では、腫瘍細胞イノキュレーション後 5 日目の平均腫瘍容積が約 80 mm³であったときに、CT-26 担腫瘍マウスを処置した。投与では、IV でのビヒクル (QW×3) + IP での IgG アイソタイプ対照、または QW×3 投与スケジュールに基づく IV での 3 もしくは 6 mg/kg の化合物 A、または IP での 10 mg/kg の抗 PD-1 抗体、または IV での 6 mg/kg の化合物 A (QW×3) + IP での 10 mg/kg の抗 PD-1 抗体の組合せを用いた。抗体の IP 投与は、いずれのケースにおいても、1 週間に 2 回、3 週間、合計 6 回投与 (BIW×3) であった。

【1 1 1 2】

試験 3 では、腫瘍細胞イノキュレーション後 7 日目の平均腫瘍容積が約 70 mm³であったときに、CT-26 担腫瘍マウスを処置した。投与では、IV でのビヒクル (QW×3) + IP での IgG アイソタイプ対照 (BIW×3); または QW×3 投与スケジュールに基づく、IV での 1、3、6、もしくは 9 mg/kg の化合物 A、または IP での 10 mg/kg の抗 PD-1 抗体 (BIW×3); または IV での 1、3、もしくは 6 mg/kg の化合物 A (QW×3) + IP での 10 mg/kg の抗 PD-1 抗体 (BIW×3) の組合せを用いた。

【1 1 1 3】

3 試験全ての要約を表 2 2 に示す。動物を臨床兆候について毎日観察した。IACUC ガイドラインに基づき、腫瘍の容積が 2000 mm³ 超まで増殖したとき、または継続して悪化状態を有することが認められたとき、または重度の苦痛および/もしくは疼痛の明らかな兆候を示しているとき、動物を人道的に安楽死させた。

【1 1 1 4】

各マウスの生存率を100日間モニタリングし、その時に生存していた試験2および試験3の無腫瘍動物を、2カ月間隔で2サイクル目を行うために本試験の再チャレンジ継続に含めた。特に、無腫瘍動物には、同一種類の腫瘍細胞（CT-26）を、反対側の側腹部下部にイノキュレーションすることにより再チャレンジを行った。対照動物は、同一数のCT-26腫瘍細胞を用いて、反対側の側腹部下部に同時にイノキュレーションされた、年齢が一致したナイーブマウスであった。

【1115】

腫瘍増殖を、デジタルカリパス測定を使用して、3～4日毎に試験終了までモニタリングした。腫瘍容積を幅²×長さ／2として計算したが、ただし幅は最小寸法であり、また長さは最大寸法である。腫瘍容積の生データを試験報告書に示す。

10

【1116】

群毎の平均腫瘍容積データを、平均の標準誤差（SEM）のバーと共に経時的にプロットした。さらに、動物を絶命させる前の最後の日における個々の腫瘍容積データを、平均およびSEMのバーと共にプロットしてデータの分布を調べた。

【1117】

動物を絶命させる前の最後の日における腫瘍容積データの統計分析を、GraphPad Prism v. 7.0を使用して実施した。データを、一元ANOVAを使用して有意性について分析した。ペアワイズ比較、Tukeyの検定手順（両側）を使用して行った。個々の比較毎にp値を報告した。

【1118】

対照群に対する各処置群の腫瘍増殖阻害率（%）（TGI%）を、 $[(\text{対照群}-\text{対照群のベースライン})-(\text{処置群}-\text{処置群のベースライン})]/(\text{対照群}-\text{対照群ベースライン})\times 100\%$ として計算した。

20

【1119】

各マウスの生存率を記録し、Kaplan-Meierプロットを生成して処置群毎の生存率を示し、優位性を、対数順位（Mantel-Cox）検定により評価した。生存率を、試験番号1、試験番号2、および試験番号3において、処置開始後100日間、ならびに試験番号2および試験番号3においては、生き残った無腫瘍マウスを対象に2回の再チャレンジサイクルにおいてモニタリングした。分析を、GraphPad Prism バージョン7.0を使用して実施した。

30

【1120】

40

50

【表 2 3】

表 22. 化合物 A を単剤療法として用いた、および抗マウス PD-1 抗体と併用したマウスにおける腫瘍増殖阻害。

	化合物 A の用量 [抗体用量 ^a] (mg/kg)	%TGI (ビヒクル対照に対する)			
		試験番号 1		試験番号 2	試験番号 3
		QWx3	Q2Wx2	QWx3	QWx3
化合物 A の 単剤療法	0.3	19	20	-	-
	1	31	27	-	30
	3	51*	45*	56	59***
	6	-	-	36*	86***
	9	-	-	-	85***
	抗体 [10]	-	-	44 [#]	44 [#]
併用療法 ^b	6 + [10]	-	-	75**	84**

^a BIW を 3 週間投与した(合計 6 回投与); ^b 1 および 3mg/kg の化合物 A 併用群に関するデータは図示せず。

%TGI を、15 日目(試験 1)および 17 日目(試験 2 および試験 3)に計算した。

結果は平均 ± SEM である。

【1 1 2 1】

QW×3 = 1 週間に 1 回、合計 3 回投与；Q2W×2 = 2 週間に 1 回、合計 2 回投与；TGI = 腫瘍増殖阻害。*ビヒクル対照に対して $p < 0.05$ ；**単剤療法（化合物 A または抗体）に対して $p < 0.05$ ；***ビヒクルまたは抗体アイソタイプ対照に対して $p < 0.001$ ；# 抗体アイソタイプ対照に対して $p < 0.01$ 。

【1 1 2 2】

試験 1 では、皮下に確立された CT-26 結腸腫瘍を担持するメスの Balb/c マウスにおいて、化合物 A を、単一薬剤として、用量依存性の効能について評価した。試験は、IACUC により定められた人道的エンドポイントに従い、対照群内のいくつかの腫瘍の容積が 2000 mm³ 超に達したとき、処置始開後の 15 日目に正式に終了した。図 1 は、化合物 A を用いて QW×3 投与で処置された群について、平均腫瘍容積を経時的に示す。図 2 は、化合物 A を用いて QW×3 投与で処置された動物毎に、処置後 15 日目の腫瘍容積を示す。図 3 は、化合物 A を用いて Q2W×2 投与で処置された群について、平均腫瘍容積を経時的に示す。図 4 は、化合物 A を用いて Q2W×2 投与された動物毎に、処置後 15 日目の腫瘍容積を示す。

【1 1 2 3】

QW×3 投与スケジュールに基づく場合、化合物 A は用量依存性の単一薬剤抗腫瘍活性を示し、ビヒクル対照と比較して、0.3、1、および 3 mg/kg 投与群について、それぞれ 31%、19%、および 52% の TGI % を実現した。同様に、Q2W×2 投与スケジュールに基づく場合、化合物 A は、用量依存性の単一薬剤抗腫瘍活性を示し、ビヒクル対照と比較して、0.3、1、および 3 mg/kg 投与群について、それぞれ 20%、27%、および 45% の TGI % を実現した。しかしながら、両投与スケジュールにおいて、3 mg/kg の用量のみが、ビヒクル対照と比較して統計的に有意であった ($p < 0.05$)。両投与スケジュールは匹敵する抗腫瘍活性を示した。したがって、このマウスモデルを対象とする後続試験のために、QW×3 投与スケジュールを選択した。

【1 1 2 4】

図1、3、5、および8において、黒色の矢印は化合物Aを投与した日を示す。図1および図3のデータは、化合物Aを用いてQW×3投与およびQ2W×2投与したときの平均腫瘍増殖曲線である；黒色の矢印は化合物Aを投与した日を示す。図2および図4のデータは、化合物Aを用いてQW×3およびQ2W×2投与したときの、処置後15日目の個々の腫瘍容積および平均腫瘍容積±平均の標準誤差（SEM）（マウス10匹／群）を表す。データは個々の腫瘍容積を表す；ビヒクル対照と比較した平均値±SEMおよびTGI%も示す。

【1125】

図3のデータは、化合物Aを用いてQ2W×2投与された動物における平均腫瘍容積±平均の標準誤差（SEM）（マウス10匹／群）を表す。図4のデータは、化合物Aを用いてQ2W×2投与により処置した後15日目の個々のおよび平均した腫瘍容積データを表す。*15日目のビヒクル対照に対して $p < 0.05$ 。

【1126】

単一薬剤としておよびマウス抗PD-1チェックポイント阻害剤抗体と併用される化合物Aを評価するために、2つの異なる試験（試験2および試験3）がCT-26結腸腫瘍マウスを対象に実施された。両試験の間で化合物Aの用量範囲は重複したが、試験3の方がより広い用量範囲を有した。両試験では、化合物AはQW×3で投与され、同一投与レベルの抗体がBIW×3で投与された。

【1127】

試験2では、皮下に確立されたCT-26結腸腫瘍を担持するメスBalb/cマウスを対象に、化合物Aの抗腫瘍活性を、単一薬剤として3および6mg/kg（QW×3）において評価した。さらに、6mg/kg（QW×3）での化合物AのIV投与、および10mg/kg（BIW×3）での抗PD-1抗体のIP投与を用いて、併用抗腫瘍活性を評価した。ビヒクル対照群内のいくつかの腫瘍の容積が2000mm³超に達したので、処置開始後15日目に、TGI%を計算した。ただし、完全腫瘍退縮を示した処置群の動物については、1週間に1回または2回の頻度で腫瘍測定を継続した。

【1128】

化合物Aは単一薬剤抗腫瘍活性を示し、3および6mg/kg投与群について、ビヒクル対照と比較して、それぞれ56.3%および35.6%のTGI%を実現した。併用試験では、6mg/kgの化合物Aを用いてIVによりQW×3で、または抗PD-1抗体を用いてIPによりBIW×3で、または投与スケジュールが同一の組合せで、CT-26担腫瘍マウスを処置したが、ただし腫瘍細胞イノキュレーションから5日後、平均腫瘍容積が約80mm³であったときに開始した。ビヒクルにより、単一薬剤として6mg/kgの化合物Aにより、単一薬剤として抗PD-1抗体により、および6mg/kgの化合物Aと抗PD-1抗体との組合せによりマウスを処置した場合の平均腫瘍増殖曲線を、図5に示す。図5のデータは、平均腫瘍容積±SEM（マウス14匹／群）を表す。上段矢印は化合物Aを投与した日、および下段矢印は抗PD-1抗体を投与した日を示す。併用抗腫瘍活性は、化合物Aまたは抗PD-1抗体単独と比較して、有意に強化された（ $p < 0.05$ ）。TGI%データを図6に示すが、同データより、ビヒクル、化合物A単独、または抗PD-1抗体単独を用いて処置された群と比較して、化合物Aと抗PD-1抗体との組合せを用いて処置された群では、処置後15日目に有意な抗腫瘍効果が明らかである（化合物A単独群について35.6%；抗PD-1抗体単独群について44.1%；および化合物Aと抗PD-1抗体との組合せを投与された群について74.6%）。データは個々の腫瘍容積を表す；ビヒクル対照と比較した平均値±SEMおよびTGI%も表示する。ビヒクル対照に対して* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.01$ 。[†]抗PD-1抗体に対して $p < 0.05$ 。[#]化合物Aに対して $p < 0.05$ 。群のメジアン生存時間を図7に示し、対照、化合物A、抗PD-1抗体、および化合物A+抗PD-1抗体群について、それぞれ17、27、27.5、および38日であった。併用群のメジアン生存時間は、化合物A（ $p < 0.05$ ）および抗PD-1抗体（ $p < 0.05$ ）単一薬剤処置群のいずれよりも有意に長かった。処置後の98日目に、化合物Aおよ

10

20

30

40

50

び抗PD-1抗体の各投与群において、動物14匹のうち1匹(7%)しか無腫瘍で生き残らなかった一方、併用群の動物14匹のうち4匹(29%)が無腫瘍で生き残った。図7のデータは、処置群についてKaplan-Meier生存曲線を表す。*ビヒクル対照に対して $p < 0.05$ 。[†]抗PD-1抗体に対して $p < 0.05$ 。[#]化合物Aに対して $p < 0.05$ 。

【1129】

試験3では、SCCT-26結腸腫瘍を担持するメスBalb/cマウスを対象として、より広い用量範囲(1、3、6、および9mg/kg)において、化合物Aの単一薬剤抗腫瘍活性を、同一のIVによるQW×3投与スケジュールに基づく試験2と比較して評価した。図8のデータは、化合物Aを、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、および9mg/kgの単一薬剤として投与したときの平均腫瘍増殖曲線を表す。データは、平均腫瘍容積±SEMを表す(マウス14匹/群; 9mg/kg化合物Aのマウス12匹/群を除く)。黒色の矢印は、化合物Aを投与した日を示す。1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、および9mg/kgで化合物Aを単独投与すると、やはり用量依存性の抗腫瘍活性を示し、1、3、6、および9mg/kgの投与群について、ビヒクル対照と比較して、それぞれ29.8%、58.8%、86.2%、および84.8%のTGI%を実現した(図9)。ビヒクル対照群内のいくつかの腫瘍の容積が2000mm³以上に達したので、処置開始後15日目に、TGI%を計算した。ただし、完全腫瘍退縮を示した処置群の動物については、1週間に1回または2回の頻度で腫瘍測定を継続した。図9のデータは、処置後15日目の個々の腫瘍容積を表す。データは、個々の腫瘍容積を表す; ビヒクル対照と比較した平均値±SEMおよびTGI%も表示する。***ビヒクル対照に対して $p < 0.01$ 。最低用量(1mg/kg)は統計的に有意な抗腫瘍活性を示さなかった一方、他方の3投与群は、ビヒクル処置群と比較して統計的に有意であった($p < 0.001$)。データは、2高用量群(6mg/kgおよび9mg/kg)におけるTGI%は類似しており、6mg/kgの用量において最大抗腫瘍活性に達したことも表している。9mg/kg投与群において、動物14匹のうち2匹が、処置に起因して15%を超える体重減少の後死亡したことが判明した。

【1130】

試験の併用相では、1、3、または6mg/kg(QW×3)の化合物Aを、IPによる10mg/kgの抗PD-1抗体(BIW×3)と共に投与した。CT-26担腫瘍マウスを、1、3、6、または9mg/kgの化合物Aを用いて、QW×3でIVにより、または抗PD-1抗体を用いて、BIW×3でIPにより、または組合せを用いて、同一の投与スケジュールにより処置したが、ただし腫瘍細胞イノキュレーションから7日後、平均腫瘍容積が約70mm³であったときに開始した。9mg/kgの化合物A単一薬剤群の場合、2匹の動物が、15%を超えて体重が減少した後死亡したことが判明し、分析には含まれないことに留意すること。1mg/kgの化合物A+抗PD-1抗体の組合せを用いた場合、生存データに基づき、相加的な抗腫瘍活性は認められなかった。化合物Aの処置後のある日数において、抗PD-1抗体群内の動物14匹のうちの1匹(7%)が生き残った一方、3mg/kgの単一薬剤群内の動物で生き残ったものはいなかった。しかしながら、3mg/kgの化合物A+抗PD-1抗体群では、動物14匹のうち2匹(14%)が化合物Aの日数まで生き残った。図10に示すように、6mg/kgの化合物A+抗PD-1抗体の組合せは、各単一薬剤単独と比較して生存延長を実現した。メジアン生存時間は、ビヒクル対照、化合物A(6mg/kg)、抗PD-1抗体(10mg/kg)、および化合物A+抗PD-1抗体群(6mg/kgの化合物Aおよび10mg/kgの抗PD-1抗体)について、それぞれ21、35、24.5、および49日であった。併用群のメジアン生存時間は、化合物Aおよび抗PD-1抗体単一薬剤処置群よりも有意に長かった($p < 0.05$)。特に、化合物Aの処置後の日数において、6mg/kgの化合物A群内の動物で生き延びたものはなかった一方、抗PD-1抗体群では動物14匹のうち1匹(7%)が無腫瘍で生き延びた。しかしながら、併用群では、14匹のうち5匹(36%)の動物が無腫瘍で生き延びた($p < 0.05$)。図10のデータは、処

置群についてKaplan-Meier生存曲線を表す。*ビヒクル対照に対して $p < 0.05$ 。†抗PD-1抗体に対して $p < 0.05$ 。#化合物Aに対して $p < 0.05$ 。

【1131】

実施例12

全血サイトカイン放出アッセイ

健常ドナー6例から得たヒト全血サンプルを、連続的に用量設定したIL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD]-1 (化合物B) またはIL-2単独と共に、またはPEM「(「Pembro」もしくはペンブロリズマブ) もしくはNIVO (ニボルマブ) と組み合わせて、24時間インキュベートした。処置後に全血から上清中に放出されたサイトカインを、Meso Scale Discovery (MSD) U-plexキットを使用して、6つのアナライト (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、TNF- α) について測定した。

【1132】

プロトコール

健常ドナー6例から得られたヘパリンチューブ内の血液を、The Scripps Research Institute (TSRI; San Diego, CA) 血液ドナーサービスから取得した。サンプルを収集日当日にテストした; ドナー1~3についてある日、ドナー4~6について別の日。

【1133】

ヒト全血を、様々な濃度のIL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD]-1、および $90 \mu\text{g}/\text{mL}$ のペンブロリズマブまたは $127 \mu\text{g}/\text{mL}$ のニボルマブ (臨床的用量の予測される C_{max} 値) と共にインキュベートした。

【1134】

RPMI 1640 ビヒクルを用いて全血を最初に2倍希釈した。容積 $180 \mu\text{L}$ の事前希釈した全血を96ウェル組織培養プレートに播種した。次に、 $10\times$ 最終テスト濃度の化合物 $20 \mu\text{L}$ を、アッセイプレートに添加した。テスト条件には、連続的に用量設定したIL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD]-1 ($4.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、および $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$)、またはIL-2 ($0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、および $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$)、および連続的に用量設定したIL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD]-1、またはIL-2+ $90 \mu\text{g}/\text{mL}$ のPEMもしくは $127 \mu\text{g}/\text{mL}$ のNIVOが含まれた。それに加えて、アッセイの検出および特異性を示すために、陽性および陰性対照が含まれた: アッセイ用の陽性対照として、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の事前コーティングされたUltra LEAFマウス抗ヒトCD3を使用した。 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の事前コーティングされたUltra LEAFマウスIGg1、 κ は、上記抗ヒトCD3に対するアイソタイプ対照である。IL-2__P65 [AzK__L1__PEG30kD]-1処方用バッファーのみが、アッセイ用の陰性対照であった。無処置もアッセイ用の陰性対照としての役目を果たした。

【1135】

化合物をウェルに添加後、血液を 37°C でインキュベートした。サンプルの遠心分離後、上清を処置後24時間に収集し、分析の前に -80°C で保管した。アッセイから放出されたヒトサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-8、IL-6、IL-5、IL-4) を、MSD U-plexキットを用いて定量した。アッセイの最低検出限界を下記の表にリスト化する。各プレートの検出限界は、MSDソフトウェア、Discovery workbenchから報告されている。各プレートは若干異なる検出限界を有する。

【1136】

材料

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 23. 使用した材料および供給源。

材料	ベンダー	カタログ 番号	配合	ストック
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1 パイロット 2 #0590-164	Cytovance	N/A	配合用 バッファ	2.18 mg/mL
配合用バッファ: 10 mM ヒス チジン pH 6.0, 5% ソルビトール, 0.01% ポリソルベート 80	Cytovance	N/A	N/A	N/A
IL-2	R&D Systems	202-IL-500	0.1M 酢酸	1 mg/mL
Biolegend Ultra-LEAF(商標) 精 製抗ヒト CD3 (UCHT1)	Biolegend	300438	PBS	1 mg/mL
Biolegend Ultra-LEAF(商標) 精 製マウス IgG1, κ アイソタイプ 対照 (MOPC-21)	Biolegend	400166	PBS	1 mg/mL
ペンプロリズマブ (PEM)	Selleckchem	A200502	PBS	9.97 mg/mL
Ultra-LEAF(商標) 精製ヒト IgG4 アイソタイプ対照組換え 抗体	Biolegend	403702	PBS	1 mg/mL
U-plex バイオマーカー群 1 (ヒ ト IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL- 4, IL-5)	Meso Scale Discovery) (MSD)	K15067L-2	N/A	N/A
Gibco(商標) RPMI 1640 培地, HEPES	Gibco(商標)	22400089		
Falcon(商標) ポリスチレンマ イクロプレート, 96 ウェル, TC 処理	Corning	353072		

【1 1 3 7】

結果

IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD] -1 および IL-2 は、処置から 24 時間において IFN- γ の用量依存性の誘発を惹起したが、しかしアッセイでテストされた他の 5 つのサイトカイン (IL4、IL5、IL8、TNF α 、IL6) について有意な放出を惹起しなかった。Pem または Nivo と併用しても、IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD] -1 および IL-2 (R&D) のいずれも、試験でテストされたサイトカインプロファイル (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-8、TNF- α 、IL-6) に対して有意な変化をもたらさなかった。個々のドナーに関するデータを表 24～32 にリスト化する。単一ドナーに関する代表的なグラフを、図 11A～11B に示す。

【1 1 3 8】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 24. IFN- γ および IL-6 レベルに対する対照条件。

処置	濃度 ug/ml	IFN- γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B の配合用 バッファ	n/a	43.91	8.77	7.75	9.31	268.77	13.03	2.77	0.68	1.31	0.49	5.60	0.73
非処置 (培養培地)	n/a	21.58	5.12	8.35	7.03	288.70	11.78	0.93	0.31	0.99	2.23	4.53	1.28
IgG4 アイ ソタイプ 対照	50	33.42	29.17	7.86	12.79	262.93	10.33	4.73	0.47	1.50	0.56	8.54	21.30
マウス IgG1, κ	100	21.75	BDL	7.19	6.44	94.74	132.02	1.64	0.88	0.89	0.71	4.27	1.85
PEM	90	52.78	9.62	8.80	11.71	301.71	10.08	1.09	0.39	0.92	0.65	8.95	1.06
NIVO	127	29.77	9.34	6.61	7.56	256.75	9.51	1.28	0.48	1.09	0.59	3.29	0.62
コーティ ングされ た抗 CD3	100	13095.85	110278.12	2890.41	12415.49	46221.98	137695.00	279.20	106.57	20.18	66.79	452.34	1414.77

BDL = 検出限界未満。

【1 1 3 9】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 25. IL-5 および IL-8 レベルに対する対照条件。

処置	濃度 ug/ ml	IL-8						TNF- α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B の配合用 バツファ	n/a	48.07	8.77	39.07	39.28	143.62	30.69	4.17	0.68	1.2	1	5.82	1.04
非処置 (培養培地)	n/a	20.56	8.77	7.84	27.93	78.91	23.45	3.03	0.68	1.24	1.11	5.61	1.25
IgG4 アイ ソタイプ対 照	50	37.11	12.77	9.58	24.88	91.61	BDL	2.66	1.33	1.82	0.75	6.58	0.91
マウス IgG1, κ	100	20.37	7.42	7.92	22.37	57.12	24.8	1.42	0.27	0.14	0.69	3.44	BDL
PEM	90	22.01	8.48	11.36	23.29	95.5	28.32	2.33	0.68	1.67	0.97	5.88	1.43
NIVO	127	20.59	7.68	7.95	22.61	67.38	19.68	2.35	0.44	1.33	1.21	4.89	BDL
コーディ ングされた 抗 CD3	100	5211.87	1780.7	1346.96	4031.78	5306.3	10117.33	475.92	2519.34	136.1	894.5	1187.77	3780.63

BDL = 検出限界未満。

【1 1 4 0】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 26. TNF- α および IL-4 レベルに対する対照条件。

処置	濃度 ug/ml	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B の 配合用バッ ファ	n/a	0.71	0.06	0.59	BDL	BDL	BDL	0.05	0.06	0.08	0.09	BDL	BDL
非処置 (培養培地)	n/a	0.81	0.14	0.87	BDL	BDL	BDL	0.11	0.06	0.11	0.05	BDL	BDL
IgG4 アイソ タイプ対照	50	0.26	0.23	0.64	BDL	0.77	BDL	0.05	0.12	BDL	0.12	BDL	BDL
マウス IgG1, κ	100	0.66	0.09	0.56	BDL	BDL	BDL	0.04	0.14	0.16	BDL	BDL	0.09
PEM	90	1.03	0.72	0.79	BDL	BDL	BDL	0.10	0.03	0.03	0.09	BDL	BDL
NIVO	127	2.65	1.50	0.91	BDL	BDL	BDL	0.11	0.11	0.05	0.10	BDL	BDL
コーティン グされた抗 CD3	100	34.49	308.57	7.64	31.81	137.92	656.77	11.33	47.81	1.33	11.65	18.59	82.57

BDL = 検出限界未満。

【 1 1 4 1 】

10

20

30

40

50

【表 28 - 1】

表 27. IFN- γ および IL-6 レベルでの IL-2 を用いた処置。

処置	濃度 μg/ml	IFN- γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	115.31	290.42	314.96	81.72	61.31	850.98	22.76	17.26	10.13	19.67	17.12	51.15
IL-2	0.45	105.72	352.81	331.98	85.34	58.16	433.00	18.47	11.07	7.20	12.82	18.02	65.04
IL-2	0.2	104.20	228.19	278.17	104.40	51.97	437.67	15.93	5.48	4.12	6.96	12.56	49.09
IL-2	0.1	95.61	135.05	224.27	68.31	47.44	387.76	13.48	2.66	2.73	4.02	10.94	28.98
IL-2	0.03	64.49	62.13	81.74	45.09	39.50	170.85	7.89	1.07	1.35	2.31	9.18	16.60
IL-2 + Pembro	0.8	138.79	274.43	318.86	117.65	51.99	437.11	27.72	17.63	10.91	22.39	32.49	50.58
IL-2 + Pembro	0.45	107.58	247.26	354.82	111.66	55.99	430.47	23.19	11.71	7.45	31.52	15.11	55.85
IL-2 + Pembro	0.2	112.00	231.40	283.69	76.41	64.28	244.58	20.84	6.54	4.93	7.65	14.72	29.07
IL-2 + Pembro	0.1	99.87	151.13	241.42	106.24	50.17	274.30	16.91	3.10	3.44	13.06	13.48	28.87
IL-2 + Pembro	0.03	76.19	44.44	87.79	40.85	38.04	131.98	11.01	1.46	1.47	2.10	9.98	15.04
IL-2 + Nivo	0.8	112.83	245.07	396.28	67.50	53.02	344.33	24.21	17.31	12.10	19.46	16.29	50.22
IL-2 + Nivo	0.45	98.79	262.60	335.91	66.15	47.95	457.22	17.85	13.65	7.85	11.72	13.01	40.96

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 2】

IL-2 + Nivo	0.2	101.09	204.58	260.76	59.56	46.18	238.28	17.54	6.37	4.23	6.38	13.08	30.47
IL-2 + Nivo	0.1	100.69	423.63	230.39	92.71	37.74	206.75	2.71	3.10	3.98	9.98	9.74	20.84
IL-2 + Nivo	0.03	72.59	40.13	76.36	nd	38.22	49.74	8.23	1.22	1.44	29.61	8.51	14.21

各ドナー(例えば、D1〜D6)に関するデータは、その特定の配合用バッファ値により標準化された。nd=未測定。

【 1 1 4 2】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 28. IL-8 および IFN- α レベルでの IL-2 を用いた処置。

処置	濃度 $\mu\text{g/ml}$	IL-8						TNF- α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	5.88	6.00	4.53	2.28	5.80	25.94	5.97	14.38	13.84	4.88	16.45	24.31
IL-2	0.45	4.67	5.98	4.98	2.02	5.32	36.29	5.04	14.83	13.27	4.48	16.22	37.41
IL-2	0.2	4.34	5.42	4.01	1.88	4.89	27.24	5.10	12.68	11.74	4.18	15.14	26.06
IL-2	0.1	3.80	5.00	3.76	1.60	4.44	17.45	4.60	11.07	10.68	3.16	12.89	16.94
IL-2	0.03	2.70	2.50	1.42	1.38	3.95	11.11	3.52	3.88	4.45	2.55	10.86	12.96
IL-2 + Pembro	0.8	7.00	6.95	4.83	2.97	7.84	24.43	6.02	17.35	13.48	6.42	16.66	23.88
IL-2 + Pembro	0.45	5.77	6.41	4.43	3.71	5.86	27.94	5.46	17.44	12.60	6.33	15.51	25.44
IL-2 + Pembro	0.2	5.37	6.73	3.59	2.24	6.01	15.52	5.20	15.55	11.03	3.54	15.96	17.18
IL-2 + Pembro	0.1	5.39	4.85	3.08	2.73	5.47	18.57	4.85	11.49	10.45	5.06	13.80	16.99
IL-2 + Pembro	0.03	3.60	2.28	1.52	1.65	4.72	8.60	4.24	4.94	4.19	2.82	11.29	8.91
IL-2 + Nivo	0.8	6.66	6.26	4.31	2.02	6.22	26.11	5.71	17.11	13.39	4.52	14.18	26.91
IL-2 + Nivo	0.45	5.06	6.42	4.04	1.80	5.28	22.75	5.35	15.39	12.10	4.61	13.60	22.81
IL-2 + Nivo	0.2	4.09	4.96	3.16	1.49	4.82	19.00	4.97	11.83	9.17	3.23	12.57	17.17
IL-2 + Nivo	0.1	3.80	4.31	2.97	3.04	5.09	12.19	4.33	10.74	7.90	5.14	11.43	11.44
IL-2 + Nivo	0.03	2.28	1.88	1.03	2.86	3.65	8.55	3.35	4.04	3.60	5.41	10.15	9.42

各ドナー(例えば、D1～D6)に関するデータは、その特定の配合用バツファ値により標準化された。

【1 1 4 3】

10

20

30

40

50

【表 3 0】

表 29. IL-5 および IL-4 レベルでの IL-2 を用いた処置の効果。

処置	濃度 $\mu\text{g/ml}$	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	9.45	6.04	4.34	0.71	10.86	22.27	0.25	0.21	0.21	0.13	0.85	1.02
IL-2	0.45	10.57	11.00	5.85	BDL	15.40	22.08	0.14	0.34	0.32	0.08	0.68	0.89
IL-2	0.2	14.53	8.79	3.46	0.93	12.29	28.22	0.30	0.42	0.28	0.10	0.77	1.05
IL-2	0.1	5.24	6.79	3.85	0.26	9.57	23.02	0.21	0.32	0.14	0.09	0.75	0.83
IL-2	0.03	7.56	3.73	1.35	0.66	22.70	13.05	0.27	0.18	0.15	0.14	0.74	0.52
IL-2 + Pembro	0.8	5.62	8.14	4.45	1.55	14.17	24.07	0.24	0.35	0.33	0.28	0.78	1.15
IL-2 + Pembro	0.45	4.54	7.16	3.00	0.93	9.82	21.83	0.16	0.39	0.27	0.26	0.70	1.20
IL-2 + Pembro	0.2	8.95	11.58	6.50	0.56	12.53	15.88	0.31	0.31	0.47	0.12	0.82	0.76
IL-2 + Pembro	0.1	7.42	7.03	1.90	BDL	8.53	23.41	0.21	0.27	0.36	0.12	0.64	0.76
IL-2 + Pembro	0.03	5.87	2.86	2.05	0.42	14.25	8.53	0.17	BDL	0.13	0.08	0.82	0.51
IL-2 + Nivo	0.8	7.16	7.98	4.18	1.38	20.46	20.83	0.22	0.25	0.44	0.14	1.00	1.21
IL-2 + Nivo	0.45	7.14	7.05	4.22	BDL	11.55	18.52	0.21	0.31	0.28	0.17	0.54	0.88
IL-2 + Nivo	0.2	7.32	7.45	4.18	1.97	12.97	20.73	0.21	0.34	0.30	0.25	0.74	0.75
IL-2 + Nivo	0.1	8.67	5.37	3.43	3.04	10.46	16.09	0.26	0.21	0.18	0.14	0.61	0.62
IL-2 + Nivo	0.03	3.77	2.02	1.37	BDL	11.82	12.10	0.17	BDL	0.11	0.19	0.74	0.63

BDL = 検出限界未満。

【 1 1 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1】

表 30. IFN- γ および IL-6 レベルでの化合物 B(IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)を用いた処置。

処置	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B	4.5	213.24	135.44	233.77	75.99	36.04	611.22	39.77	0.56	2.49	4.94	10.61	38.95
化合物 B	1.5	93.02	96.56	195.89	49.83	31	122.98	11.82	0.84	1.82	1.87	8.33	16.01
化合物 B	0.8	66.82	53.46	119.28	44.78	26.93	92.69	9.38	0.43	1.45	1.71	7.56	11.61
化合物 B	0.45	49.07	35.17	85.18	33.58	21.99	74.08	7.87	0.74	1.06	1.29	6.06	3.41
化合物 B	0.2	32.02	12.82	32.15	27.63	14.39	21.95	4.50	BDL	0.91	1.11	3.84	1.09
化合物 B + Pembro	4.5	102.42	164.69	263.89	68.16	38.09	275.34	15.12	1.79	3.26	3.03	10.86	36.39
化合物 B + Pembro	1.5	80.56	82.28	161.63	49.21	35.01	98.36	11.90	1.29	1.96	3.01	11.07	9.88
化合物 B + Pembro	0.8	74.09	43.39	130.28	38.2	29.55	62.73	12.28	0.82	1.71	1.31	9.23	6.49
化合物 B + Pembro	0.45	46.77	27.81	86.44	31.51	19.78	37.93	7.53	0.46	1.17	1.52	6.70	1.78
化合物 B + Pembro	0.2	29.43	8.62	25.97	20.27	14.52	17.75	5.59	BDL	0.74	0.93	5.04	0.86
化合物 B + Nivo	4.5	91.59	126.64	269.98	59.66	38.57	901.52	11.56	1.33	4.23	2.83	9.24	34.57

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2】

化合物 B + Nivo	1.5	82.94	71.26	185.79	50.31	30.37	210.47	10.75	1.04	1.97	1.40	7.14	11.44
化合物 B + Nivo	0.8	59.41	67.83	124.17	30.37	24.23	41.88	7.60	7.56	1.56	0.87	6.38	2.36
化合物 B + Nivo	0.45	51.93	21.19	84.35	26.44	18.76	30.17	7.73	0.48	1.17	1.33	4.39	2.01

「化合物 B」は、IL-2 P65[AzK_L1_PEG30kD]-1 である。各 ドナー(例えば、D1~D6)に関するデータは、その特定の配合用バッファ値により標準化された。BDL = 検出限界未満。

【 1 1 4 5】

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 1】

表 31. IL-8 および TNF- α レベルでの化合物 B(IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)を用いた処置。

処置	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	IL-8						TNF- α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B	4.5	7.67	4.09	2.99	2.18	4.24	20.12	6.23	11.39	10.42	4.96	12.33	26.03
化合物 B	1.5	2.83	3.87	3.09	1.66	3.64	11.46	4.43	8.33	8.80	3.30	10.85	13.94
化合物 B	0.8	3.08	2.86	2.20	1.36	3.30	6.84	4.16	6.48	6.68	2.92	9.94	8.02
化合物 B	0.45	2.21	2.61	1.43	1.42	2.69	3.50	3.56	5.28	4.56	3.12	8.20	5.30
化合物 B	0.2	1.48	1.60	0.71	1.27	2.22	1.30	2.64	3.10	2.84	2.24	6.23	2.00
化合物 B + Pembro	4.5	4.19	4.64	2.61	2.13	4.65	21.72	5.10	11.12	8.91	4.49	12.42	20.50
化合物 B + Pembro	1.5	4.10	3.46	2.79	2.66	4.45	15.57	4.87	8.68	8.24	3.80	12.07	15.39
化合物 B + Pembro	0.8	3.36	2.80	2.10	1.53	4.13	5.51	4.41	6.88	6.21	3.15	10.56	6.04
化合物 B + Pembro	0.45	2.35	2.19	1.58	1.69	3.21	2.09	3.51	4.09	4.89	2.52	8.33	3.46
化合物 B + Pembro	0.2	1.66	1.41	0.62	1.20	2.46	1.23	2.97	2.59	2.41	2.69	6.18	2.09
化合物 B + Nivo	4.5	3.97	4.16	3.22	1.63	4.05	16.97	5.36	9.71	9.57	3.83	12.26	21.81

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2】

化合物 B + Nivo	1.5	2.86	2.62	2.16	1.42	3.70	6.78	4.84	6.45	7.11	3.15	10.53	9.76
化合物 B + Nivo	0.8	2.97	2.55	1.97	1.19	3.56	1.99	3.95	5.33	5.87	2.87	8.88	3.17
化合物 B + Nivo	0.45	2.15	1.72	1.19	1.10	2.53	2.05	3.66	3.88	3.94	2.86	7.22	3.38
化合物 B + Nivo	0.2	1.45	1.30	0.59	0.91	1.86	0.90	2.67	2.35	2.21	1.88	4.85	2.31

「化合物 B」は、IL-2 P65[AzK_L1_PEG30kD]-1 である。各ドナー(例えば、D1〜D6)に関するデータは、その特定の配合用バッファ値により標準化された。

【1 1 4 6】

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 1】

表 32. IL-5 および IL-4 レベルでの化合物 B(IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)を用いた処置。

処置	濃度 (µg/ml)	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物 B	4.5	6.39	6.87	1.39	0.91	8.54	31.80	0.18	0.12	0.18	0.21	0.44	1.07
化合物 B	1.5	3.73	5.22	1.57	1.02	8.15	12.23	0.20	0.13	0.16	0.14	0.60	0.43
化合物 B	0.8	8.67	2.03	1.51	BDL	3.16	4.73	0.20	BDL	BDL	0.06	0.20	0.25
化合物 B	0.45	3.63	1.17	1.03	BDL	1.26	5.18	0.08	0.14	0.10	0.11	0.29	0.25
化合物 B	0.2	0.66	BDL	BDL	BDL	0.31	0.27	0.10	0.08	0.12	0.07	0.04	BDL
化合物 B + Pembro	4.5	7.22	8.02	2.77	0.74	9.13	27.48	0.26	0.30	0.20	0.14	0.59	1.10
化合物 B + Pembro	1.5	3.91	4.10	1.36	BDL	7.45	5.54	0.21	0.13	0.16	0.09	0.59	0.41
化合物 B + Pembro	0.8	4.74	6.45	0.92	BDL	5.71	2.69	0.18	0.10	0.11	0.11	0.48	0.15
化合物 B + Pembro	0.45	2.54	0.59	0.82	BDL	2.69	BDL	0.17	0.08	BDL	0.07	0.30	0.08
化合物 B + Pembro	0.2	0.84	BDL	0.71	BDL	0.33	0.35	0.14	BDL	BDL	0.09	0.03	BDL
化合物 B + Nivo	4.5	4.76	5.65	3.54	0.20	9.21	20.27	0.23	0.27	0.24	0.15	0.74	1.00
化合物 B + Nivo	1.5	3.66	2.11	1.41	0.36	9.57	5.42	0.20	0.09	0.17	0.16	0.69	0.30
化合物 B + Nivo	0.8	3.20	BDL	0.90	BDL	3.96	1.10	0.21	BDL	0.14	0.09	0.34	0.07

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 2】

化合物 B + Nivo	0.45	5.11	BDL	1.03	0.11	2.08	1.06	0.16	BDL	0.13	0.08	0.20	0.07
化合物 B + Nivo	0.2	2.83	0.60	0.73	BDL	1.97	BDL	0.10	0.14	BDL	0.05	0.07	BDL

「化合物 B」は、IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1である。BDL = 検出限界未満。

10

20

30

40

【1 1 4 7】

実施例 1 3

同種異系ヒト混合リンパ球反応 (MLR) アッセイ

同種異系ヒト混合リンパ球反応 (MLR) アッセイを、特異抗原または新生抗原を提示する腫瘍細胞に対する細胞溶解応答に関するモデルとして、化合物 B (IL-2_P65 [AzK_L1_PEG30kD] - 1) を単一薬剤として使用し、およびチェックポイント阻害剤 (ニボルマブまたはペンブロリズマブ) と併用したときの、その TCR 活性化強化能力を評価するのに使用した。

【1 1 4 8】

50

【表 3 4】

表 33. 材料。

材料	ベンダー	カタログ番号	配合	ストック濃度
化合物 B (IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)	Synthorx	Lot #0590-187	配合用バッファ (see below)	2 mg/mL
配合用バッファ: 10 mM ヒスチジン pH 6.0, 5% ソルビトール, 0.01% ポリソルベート 80	Cytovance	N/A	N/A	N/A
ニボルマブ(nivo)	Selleckchem	A2002	PBS	5 mg/mL
ニボルマブ	Bristol-Meyers Squibb	NDC 0003-3772-11	N/A	10mg/mL
ペンブロリズマブ	Merck & Co.	NDC 0006-3026-01	N/A	25mg/mL
Ultra-LEAF(商標) 精製ヒト IgG4 アイソタイプ対照組換え抗体	Biolegend	403702	PBS	1 mg/mL
EasySep ヒト CD4+ T 細胞単離キット	Stemcell	17952	N/A	N/A
EasySep ヒト単球単離キット	Stemcell	19359	N/A	N/A
ヒト IFN- γ ELISA キット	Abcam	Ab46025	N/A	N/A

【1 1 4 9】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 34. 材料(続き)。

成分	ベンダー	カタログ番号	ストック濃度	ワーキング濃度
モノ DC 分化転換培地				
BioWhittaker X-VIVO15 造血性無血清培養培地	Lonza	04418Q	N/A	N/A
FBS	Corning	35011CV	100%	5%
ペニシリン-ストレプトマイシン	Fisher Scientific	15140122	100%	1%
MEM 非必須アミノ酸溶液	Gibco	11140-050	100x	1x
ピルビン酸ナトリウム	Gibco	11360-070	100 mM	1 mM
HEPES	Gibco	15630080	1 M	10 mM
組換えヒト IL-4 タンパク質 (/CF)	R&D	204-IL-050	1.5e+6 IU/mL	1500 IU/mL
組換えヒト GM-CSF タンパク質 (/CF)	R&D	215-GM-050	1.5e+6 IU/mL	1500 IU/mL
MLR 同時培養培地				
RPMI 1640 培地, HEPES	Gibco	22400089	N/A	N/A
FBS	Corning	35011CV	100%	5%
ペニシリン-ストレプトマイシン	Fisher Scientific	15140122	100%	1%
MEM 非必須アミノ酸溶液	Gibco	11140-050	100x	1x
ピルビン酸ナトリウム	Gibco	11360-070	100 mM	1 mM
HEPES	Gibco	15630080	1 M	10 mM
2-メルカプトエタノール	Gibco	21985023	50 mM	50 μ M

【1150】

正常健常ドナー 2 例から得た末梢血液単核球 (P B M C) を、アッセイラン毎に使用した。ネガティブ単球選択キット (S t e m c e l l) を使用して、P B M C から単離された単球を、1, 5 0 0 I U / m L の I L - 4、および 1, 5 0 0 I U / m L の G M - C S F の添加を含め、i n v i t r o で 7 日間培養することにより、モノ DC を生成した。培養培地を 3 日目および 5 日目に交換した。モノ DC を 7 日目に収集した。その当日、C D 4 + T 細胞を、ネガティブ選択キット (S t e m c e l l) を用いて異なるドナーから単離した。C D 4 + T 細胞 (1×10^5) および同種異系モノ DC (1×10^4) を、ある濃度範囲の化合物 B ($0.005 \sim 100 \mu\text{g} / \text{mL}$) 単独の存在下、または 5、50、または 500 n g / m L のニボルマブ、ペンブロリズマブまたはアイソタイプ I g G 対照の共存下、96 ウェルマイクロタイタープレート内で同時培養した。各ランを、処置条件毎に 3 回繰り返すように設定した。同時培養から 5 日後に、培養物上清中の I F N - γ 分泌を、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) キット (A b c a m ; カタログ番号 A b 4 6 0 2 5) を利用して分析した。化合物 B とペンブロリズマブとの組合せから得られた I F N - γ レベルを、図 1 2 に示す。化合物 B とニボルマブとの組合せから得られた I F N - γ レベルを、図 1 3 および図 1 4 に示す。図 1 3 に示すデータを生成するのに臨床

的グレードのニボルマブを使用し、また図14に示すデータを生成するのに、研究グレードのニボルマブ (S e l l e c k c h e m) を使用した。結果は、化合物B、ニボルマブ、およびペンブロリズマブを単一薬剤として使用すると、濃度依存性の様式でIFN- γ の放出を惹起することを実証した。驚くべきことに、(a) 化合物Bとニボルマブ、および(b) 化合物Bとペンブロリズマブとを併用すると、MLRアッセイにおいて相乗的効果を示した。図12、図13、および図14に示すデータは、ドナーペア1例から得られた3回の繰り返しの平均±平均の標準誤差を表す。

【1151】

実施例14

化合物Bは、CD8+T、NK、およびTreg細胞内でKi67の発現を誘発するが、しかし末梢血液内およびCT-26腫瘍内では、CD8+TおよびNK細胞のみが増殖し、Tregは増殖しない。

【1152】

化合物Bの薬物動態学的特性(PK)および薬力学的特性(PD)を評価するために、Balb/cメスマウス(平均体重16~22gの6~8週齢、Jackson LaboratoriesまたはTaconic Biosciences)に対して、CT-26腫瘍細胞(ATCC)を、側腹部領域内の皮下にイノキュレーションした。腫瘍増殖を、1週間に3回腫瘍を測定することによりモニタリングした。腫瘍容積がおよそ150 mm³に達したとき、マウスを対照群および処置群にランダム化した。CT-26担腫瘍マウスに対して、3 mg/kgの化合物Bを単回用量でIV投与した後、末端部血液および腫瘍サンプルを、0日目(2時間、8時間、および12時間)、投与後1日目(各時点においてN=3匹のマウス)、2、3、5、7、10日目、および12日目(各時点においてN=4匹のマウス)において収集した。血漿および腫瘍サンプルを、ELISAアッセイ法を使用して化合物Bについて分析した。

【1153】

薬物動態学的分析

腫瘍を二等分に分割し、一方の半分を秤量し、腫瘍PK分析用として液体窒素中で凍結した。凍結した腫瘍サンプルを、溶解バッファー(1×PBS、10 mL中に1錠剤のプロテアーゼ阻害剤(SIGMA、カタログ番号4693159001))を用いてホモジナイズした。組織0.1 gを、それぞれ溶解バッファー0.4 mLと混合した。各組織採集管に対して、5 mmのステンレススチールビーズを添加した(Qiagen、カタログ番号69989)後、Tissue Lyser II(Qiagen)と共に、20 Hzで20秒間ホモジナイズした。ホモジナイゼーション後、腫瘍ライセートをスピンドウンさせ、上清を、化合物BのPK分析用として収集した。

【1154】

化合物Bの腫瘍暴露は、図15に示すように血漿暴露のおよそ4%であった(血漿および腫瘍について、それぞれ429,000および15,900時間・ng/mLのAUC_{0~t})。腫瘍のt_{1/2}は、血漿のt_{1/2}のほぼ2倍であり(腫瘍および血漿において、それぞれ19.9時間および9.8時間)、化合物Bは腫瘍中に分布し、血液コンパートメントと比較してそれより長時間その場に保持されることを示している。

【1155】

薬力学的分析

フローサイトメトリー。全血免疫細胞の表現型では、血液サンプルを溶解し、末端部から収集した直後に固定した。要するに、製造業者のプロトコールに従い、事前加温した1×lyse/fix buffer(BD phosflow(商標)、カタログ番号558049)20体積を用いて血液サンプルを処理した。抗体染色前に、細胞懸濁物を、Fc block(TruStain fc-X anti CD16/32、BioLegend)でブロックした。ブロックした後、細胞を、下記の細胞表面マーカー: Ax488抗マウスCD3(17A2)、Bv786抗マウスCD4(RM4-5)、Bv711抗マウスCD8a(53-6.7)、Bv421抗マウスCD49b(DX5)、ビオチ

ン抗マウスCD25 (REA568)、Bv605抗マウスCD335 (29A1.4)を用いて最初に染色した。次に、4℃事前冷却したメタノール (Fisher Chemical、A412-4)を用いて細胞に透過処理を施し、PE抗マウスFoxP3 (FJK-16s)、PerCP-eFluor710抗Ki67、およびAx647抗Pstat5 (Py694)を用いて、ならびにPEcy7抗CD44 (IM7)およびビオチンに対してはBUV395ストレプトアビジンを用いて内部的に染色した。FlowJoソフトウェアにより分析しながら、BD LSRFortessaを利用して、サンプルから数値を読み取った。

【1156】

CD8細胞を、CD3+CD8a+として同定した。Treg細胞を、CD3+CD4+CD25+FoxP3+として同定した。ナチュラルキラー細胞を、CD3-CD335+CD49b+を用いてゲートした。メモリーCD8細胞を、CD3+CD8+CD44^{hi}を用いて評価した。

10

【1157】

腫瘍FACS。腫瘍を細断して小片化にすることにより、マウス腫瘍サンプルの単一細胞浮遊液を調製し、製造業者のプロトコールに従い、MACSマウス腫瘍解離キット (Miltenyi、130-096-730)を用いて消化した。生存細胞を、eFluor780固定可能細胞生死判定色素 (eBioscience、65-0865-14)により同定した。細胞懸濁物を、抗マウスCD16/32抗体 (TruStain FcX、BioLegend、カタログ番号101319)でブロックし、細胞表面マーカー染色が後続した。次に細胞を、FoxP3/転写因子固定/透過処理試薬 (eBioscience、カタログ番号00-5521-00)を用いて固定および透過処理し、次に細胞内マーカーについて染色した。表面抗原に対して使用した抗体は、PEcy7抗マウスCD45 (30-F11)、BUV395抗マウスCD3e (17A2)、BV510抗マウスCD4 (GK1.5)、PE-eF610 CD8a (53-6.7)、Bv605抗マウスCD335 (29A1.4)、AF700抗マウスCD25 (PC61)、APC抗マウスCD49b (DX5)であった。細胞内抗原に対する抗体は、PE抗FoxP3 (FJK-16s)およびAF488抗Ki67 (11F6)であった。CD8細胞集団をCD3+CD8+として同定した一方、NK細胞集団をCD3-CD335+CD49b+として定義した。Treg細胞を、CD3+CD4+CD25+FoxP3+を用いてゲートした。イベントを、BD LSRFortessa用いてを取得し、FlowJoソフトウェアにより分析した。

20

【1158】

結果。血液および腫瘍サンプルを、細胞内リン酸化STAT5 (pSTAT5、受容体占拠および初期シグナル伝達のマーカー)、Ki67 (細胞増殖マーカー)を含む、細胞部分集団 (CD8+T、NK、およびTreg細胞)におけるPDの読み取りについて、ならびにCD8+T、NK、およびTregの細胞数について分析した。様々な細胞型上のpSTAT5を血液中のみにおいて測定した。

30

【1159】

3mg/kgの化合物Bを投与されたCT-26担腫瘍マウスは、CD8+T、CD8+メモリーT、NK、およびTreg細胞集団において、末梢血液中のpSTAT5の持続的誘発を示した。末梢血液CD8+T細胞 (図16A)およびCD8+メモリーT細胞 (図16B)中のpSTAT5+細胞の割合 (%)は、投与後2時間でピークに達し、およそ48時間上昇したまま留まり、72時間までにベースラインに戻った。NK細胞 (図16C)では、pSTAT5+細胞は、投与後徐々に増加して48時間でピークに達し、120時間までにベースラインに戻った。Treg細胞におけるpSTAT5+の誘発 (図16D)は、CD8+T細胞の誘発と類似したパターンに従った。

40

【1160】

pSTAT5誘発後、化合物Bは、3細胞集団 (CD8+T、NK、およびTreg細胞)すべてにおいてKi67の有意な活性化を、1日目~7日目において同一程度に誘発

50

した ($p < 0.05$) 後、10日目にはビヒクル対照レベルまで戻った (図17A~17F)。図17Aおよび図17Bに示すように、化合物BによりKi67が活性化することで、3~12日にかけてCD8+T細胞の有意な増殖応答をもたらした (対照に対して $p < 0.05$)。CD8+T細胞の表現型分析から、同じタイムコースにおいて、この集団内のCD44+メモリー細胞の実質的増殖が明らかになった。CD8+T細胞とは対照的に、化合物Bは、投与後3日で最大NK細胞増殖を誘発し、5日目も上昇したまま留まり (対照に対して $p < 0.05$)、その後7日目までにビヒクル処置された対照レベルに戻った (図17Cおよび図17D)。CD8+TおよびNK細胞のいずれとも対照的に、化合物Bは、投与後の3日目に、Treg細胞増殖についてきわめて一過性かつ大幅なレベル低下 (CD8+TおよびNK細胞の15~25%と比較してわずか2.5%) を引き起こしたにすぎない (図17Eおよび17F)。CD8+T細胞が増殖する一方、CD4+Treg細胞部分集団の有意な増殖が欠けることで、その結果3mg/kg投与群において、CD8+T/Treg比が徐々に増加し、7日目にピークに達した (図17G)。

【1161】

腫瘍サンプルの分析から、化合物Bを用いた処置から7日後に、CD8+T細胞およびNK細胞の両方が腫瘍内で有意に増殖し (対照に対して $p < 0.05$)、10日目まで上昇したまま留ることが判明した (図18A~18B)。しかしながら、化合物Bに対する応答において、腫瘍内Treg細胞集団は、ビヒクルと比較して有意な増殖を経時的に示さなかった (図18C)。CD8+T細胞が増殖する一方、CD4+Treg細胞部分集団の増殖が欠けることで、その結果3mg/kg投与群において、CD8+T/Treg比が徐々に増加し、7日目にピークに達した (図18D)。

【1162】

まとめ。CT-26担腫瘍マウスにおいて、3mg/kgの化合物Bは、CD8+T、CD8+メモリー、NK、およびTreg細胞を含む、全ての免疫細胞型において、IL-2R β / γ 受容体複合体の関与を示す末梢血pSTAT5の活性化を誘発した。さらに、化合物Bは、この用量で、これらの細胞型全てにおいて、増殖マーカーKi-67を誘発したが、ただし増殖はCD8+TおよびNK細胞においてのみ観察された。これは、この用量で、末梢血液内CD8/Treg比、およそ20をもたらした。化合物Bの腫瘍暴露は、血漿暴露のおよそ4%であったものの、それが腫瘍内に保持される時間は2倍であり、腫瘍増殖阻害を示すのに十分なCD8T/Treg比をもたらした。6および9mg/kgというより高用量では、腫瘍退縮を引き起こすより高い腫瘍増殖阻害が観察された。

【1163】

実施例15

化合物Bは、マウスCT-26腫瘍において、腫瘍内T細胞分画およびTCR多様性を増加させる

【1164】

T細胞レパートリーに対する、単一薬剤としてのおよび抗PD-1抗体と併用される化合物Bの効果を、CT-26担腫瘍マウスを使用して調べた。Balb/c雌マウス (平均体重16~22gの6~8週齢、Jackson LaboratoriesまたはTaconic Biosciences) に対して、CT-26腫瘍細胞(ATCC)を、側腹部領域内の皮下にイノキュレーションし、腫瘍増殖を、1週間に3回、腫瘍を測定することによりモニタリングした。腫瘍がおよそ180mm³に達したとき、マウス (1群あたりN=4) を、下記の群：対照 (化合物Bビヒクル+アイソタイプ対照)、化合物B (0日目に6mg/kgでIVにより単回投与)、マウス抗PD-1抗体 (0および3日目に、10mg/kgでIPにより2回投与)、または化合物B+抗PD-1抗体の組合せにランダム化した。投与前、ならびに投与後5、8、12、および16日目に、血液および腫瘍サンプルを収集し、分析まで-80℃で保管した。サンプルを、腫瘍内T細胞分画およびTCR多様性について分析した (Adaptive Biotechnologies、Seattle、WA)。immunoSEQ (商標) により、浸潤性T細胞上でTCRシーケンシングを実施した。

【1165】

8日目までに、6 mg/kgの化合物B単独により、またはマウス抗PD-1抗体との併用により処置されたCT-26腫瘍は、Dunnの事後検定により決定されるように、ビヒクルまたは抗PD-1抗体群単独と比較して有意に低いTCRレパートリークローン性を示した ($p = 0.005$)。クローン頻度分布の形状を測定することにより、レパートリー内のモノまたオリゴクローナルドミナンスの程度を求め、その程度によりクローン性を定量化した。クローン多様性を、テンプレートの最低数までダウンサンプリングすることにより決定した。クローン性と整合して、5日目および8日目に、TCR多様性は逆の傾向を示し、化合物Bまたは化合物+抗PD-1抗体の組合せにより処置された群においてより高かった ($p < 0.05$) (図19)。12日目または16日目のT細胞レパートリーメトリクスにおいて、化合物B処置または抗PD-1抗体との併用処置に有意差は認められなかった。

10

【1166】

図20に示すように、TCRシーケンシングでも、化合物Bは、単独または抗PD-1抗体との併用において、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)分画を上昇させることが実証された ($p < 0.05$)。8日目の末梢血液サンプル分析から、腫瘍においてなされた観察と整合して、化合物Bは、ビヒクル対照と比較して、T細胞クローン性も有意に低下させる ($p = 0.001$) ことが判明した (図21)。

【1167】

実施例16

化合物Bは、高Teff活性、IFN- γ 誘発、およびチェックポイントリガンド発現について、CT-26腫瘍微小環境をリプログラミングする

20

【1168】

実施例15において上記した試験から得られたCT-26腫瘍サンプルについても、mRNAseq (Ominiseq、Buffalo、NY) によるプロファイル化を行い、GeneCentric (Research Triangle Park、NC) による分析を行って、リンパ球浸潤および活性化の細胞および分子シグネチャーを同定した。対照(ビヒクル)、化合物B (6 mg/kg)、マウス抗PD-1 (10 mg/kg)、または化合物Bとマウス抗PD-1との組合せを用いて処置した後の、8日目のCT26腫瘍サンプルに由来する発現ヒートマップとして、データを提示する (1群あたりN=10のマウス)。K-Wのp値が0.05未満の全てのシグネチャーおよび個々の遺伝子を示す (PD-L1の $p = 0.23$ を除く)。化合物Bおよび抗PD1の処置により誘発された免疫の活性化は、異なる免疫シグネチャーを構成する遺伝子および個々の遺伝子のlog2メジアン集中化発現値を使用して生成される数値に基づくヒートマップとして表される。個々の免疫活性化シグネチャーまたは個々の遺伝子発現レベルを示す箱ひげ図も作成した。この箱ひげ図において、8日目および12日目の対照群および処置群について、それらを横断するペアワイズ比較を実施し、Wilcoxonの順位和検定p値が < 0.05 であったとき、p値を表示した。ヒートマップおよび箱ひげ図を、Rプログラムバージョン3.5.3を使用して生成した。箱ひげ図は、下部四分位、メジアン、および上部四分位発現データを示す。プロットのひげは発現データの分布全体を表す。図22に提示する命名法は、ヒトオルソログ遺伝子に対応する。

30

【1169】

図22のヒートマップの最上段の列は、化合物Bの単回投与から8日後に、CT26腫瘍が、活性化したCD8+エフェクター、およびメモリーT細胞、およびCD56dim (細胞溶解表現型) NK細胞による浸潤を受けたことを示す。これらの細胞集団は、抗PD-1抗体との併用によりさらに強化された。平均集中化log2発現レベル (図23) から、化合物Bは、投与前レベルと比較して、これらの腫瘍において活性化およびメモリーCD8+T細胞を有意に ($p < 0.05$) 上昇させた一方、化合物Bと抗PD-1抗体とを併用することで、投与前レベルまたは対照と比較して、CD56dimNK細胞を有意に ($p < 0.01$) 増加させたことが明らかである。図22に示すように、化合物Bは、3

40

50

つのIL-2受容体鎖CD28、4-1BB、およびCD40を含む、IL-2応答およびT細胞活性化の複数のマーカーを誘発した。それに加えて、化合物Bの処置は、チェックポイント阻害受容体PD-1およびCTLA4、ならびにPD-1リガンドであるPD-L1およびPD-L2の発現上昇を引き起こした。化合物Bは、IFN- γ 放出およびIFN- γ シグナル伝達経路の活性化について報告する遺伝子も誘発した（図24A）。
【1170】

CT-26担腫瘍マウスにおいて化合物Bに対するシグネチャー応答を構築するために、教師つき分析を、処置後8日目に、ビヒクル対照で処置された動物と化合物Bで処置された動物との間のID差次的発現遺伝子（FDR<0/01）に対して実施した。8日目の化合物B処置マウスと8日目のビヒクル対照サンプルとの間で、遺伝子発現プロファイルを、有意性分析を使用して対比した。多重比較を、偽陽性率を使用して調整した（FDR=0.01）。遺伝子をFDR調整p値によりランク付けすると共に、対応する倍率変化を、表35にリスト化する。1を上回る倍率変化は、遺伝子発現は化合物B処置群においてより高いことを示唆する；1未満の倍率変化は、遺伝子発現は対照群においてより高いことを示唆する。

【1171】

【表36】

表35. 新たな遺伝子マーカーを同定して化合物Bの予測的応答シグネチャ(PRS)を開発するための発現変化に関する監視分析。

遺伝子	生p値	P値	倍率	遺伝子	生p値	P値	倍率
F10	1.12E-6	0.000	3.2	NR4A3	9.24E-6	0.011	2.5
<u>IL2RA</u>	<u>1.12E-6</u>	<u>0.008</u>	<u>3.8</u>	BCL2L14	9.24E-6	0.011	6.1
CDH1	2.24E-6	0.008	3.0	DCSTAMP	9.24E-6	0.011	4.1
<u>GZMK</u>	<u>2.24E-6</u>	<u>0.009</u>	<u>4.0</u>	<u>CTLA4</u>	<u>1.20E-5</u>	<u>0.012</u>	<u>3.7</u>
SEPT3	5.88E-6	0.009	5.3	ARHGEF37	1.20E-5	0.012	3.0
F7	5.88E-6	0.011	5.4	STRIP2	1.57E-5	0.015	4.6
PDCD1LG2	5.88E-6	0.011	4.6	FAM169A	2.24E-5	0.015	1.7
ASGR2	5.88E-6	0.011	4.6	<u>CCL22</u>	<u>2.41E-5</u>	<u>0.015</u>	<u>3.8</u>
RAMP3	5.88E-6	0.011	3.1	MEX3B	2.55E-5	0.015	1.6
IL12B	5.88E-6	0.011	6.5	HR	2.58E-5	0.015	4.3
FLT3	8.12E-6	0.011	3.9	TACR1	2.69E-5	0.015	2.7
<u>CCL17</u>	<u>8.96E-6</u>	<u>0.011</u>	<u>7.3</u>				

【1172】

最も差次的に発現されている遺伝子43個のうち42個を、プロトタイプ化合物B PRSに使用した。遺伝子GT(ROSA)26は、マウスにおいてノックイン遺伝子座として使用されるので、この遺伝子はプロトタイプPRSから除外された。プロトタイプ化合物Bコールを作成し、対照、化合物B、および抗PD1処置群において比較した。8日目および12日目の対照群および処置群において、PRSのペアワイズ比較を行い、箱ひげ図として表す（図24A）。ペアワイズWilcoxon順位検定により生み出されたp値（p値<0.05）を示す。下部四分位、メジアン、および上部四分位発現データを示す箱ひげ図を、Rプログラムバージョン3.5.3を使用して生成した。プロットのひげは、四分位間範囲（IQR）の1.5倍、または最低値／最大値がIQRの1.5倍

内にあるときには最低／最大発現データを示す。

【1173】

42個の遺伝子が、化合物Bにより、8日目に、対照と比較して上方制御された。応答のプロトタイプシグネチャーを構築するのに、表35に示す23個のヒトオルソログを使用した。表35で下線付きのテキストによって示す通り、IL-2関連の生物学が既知であるいくつかの遺伝子が検出された。化合物B単一薬剤およびマウス抗PD-1抗体との組合せにおいて、ビヒクルで処置されたマウスと比較して、有意なシグネチャーコールが認められた(図24B)。

【1174】

実施例17

化合物Bは、メモリーT細胞の持続的応答の確立を促進し、CT-26細胞の再注入によってチャレンジを受けた生存動物におけるCT-26腫瘍増殖を防止する

【1175】

実施例15では、100日目においてもマウス7匹が無腫瘍のまま留まり、それには3mg/kgの化合物B、6mg/kgの化合物B、および抗PD-1抗体の各群に由来する動物各1匹、および6mg/kgの化合物B+抗PD-1抗体の併用群に由来する動物4匹が含まれた。これら7匹のマウスおよび7匹のナイーブ対照マウスに対して、同一数のCT-26腫瘍細胞を、121日目に同時にイノキュレーションした(試験番号2)。図25に示すように、化合物B、抗PD-1抗体、または組合せを用いてこれまでに処置されたマウス7匹のいずれも腫瘍を発症しなかった一方、対照動物の全てで腫瘍が増殖し、初期の処置に応答してメモリーT細胞集団が長期にわたり確立されたことを示している。2カ月後の181日目に、1回目の再チャレンジを生き延びた処置済みの無腫瘍動物7匹に対して、対照マウス7匹と共にCT-26腫瘍細胞を再度イノキュレーションした。やはり、処置済みの無腫瘍動物7匹は腫瘍を発症しなかった一方、対照動物では腫瘍が増殖した(図25)。試験が終了した202日目まで、無腫瘍動物7匹は生存していた。

【1176】

再チャレンジ実験を、さらなる試験(試験番号3)において生存動物を用いて繰り返した。102日目において腫瘍が完全退縮した合計9匹の生存無腫瘍マウス(9mg/kgの化合物Bおよび抗PD-1抗体群からそれぞれ動物1匹、3mg/kgの化合物B+抗PD-1抗体併用群から動物2匹、および6mg/kgの化合物B+抗PD-1抗体併用群から動物5匹)に対して、CT-26腫瘍細胞の皮下イノキュレーションによる再チャレンジを施した。追加のナイーブ対照マウス10匹に対しても、同時にイノキュレーションした。図26に示すように、9匹の動物のいずれも腫瘍を発症せず、初期の処置に応答してメモリーT細胞集団が長期にわたり確立されたことを示している。対照的に、対照動物10匹全てが腫瘍を発症した。2カ月後の163日目に、1回目の再チャレンジを生き延びた同一の動物9匹を対象に2回目の再チャレンジを実施した；追加のナイーブ動物9匹は対照としての役目を果たした。1回目の再チャレンジの場合と同様に、生存動物9匹は腫瘍を発症せず、初期の処置後にメモリーT細胞応答が持続することが確認された一方、対照動物では腫瘍が増殖した(図26)。試験が終了した184日目まで、無腫瘍動物9匹は生存していた。

【1177】

化合物Bが持続性のT細胞、メモリー応答を促進する能力を確認するために、2回目の再チャレンジから60日後に、試験番号2由来の生存マウス7匹から血液サンプルを収集した。メモリー細胞の発現について血液サンプルのFACS分析を行い、化合物Bは、メモリーCD8+T細胞を含む末梢血メモリーT細胞(CD3+)の全体的な増加として観測される、CT-26腫瘍に対する長期にわたる免疫学的メモリーの確立を促進することが判明した(図27A~27B)。

【1178】

まとめ。6mg/kgの化合物Bで処置された腫瘍においてTILの分析を行い、T細胞レポーターおよび活性化CD8+T細胞(エフェクターメモリーを含む)、ならびに

10

20

30

40

50

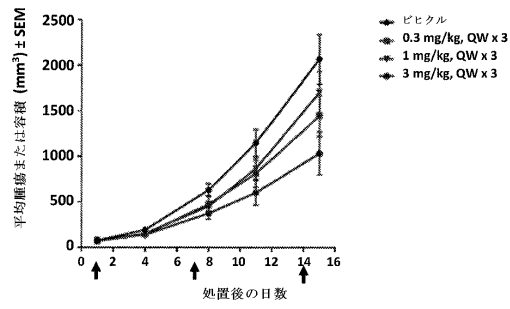
チェックポイントリガンドを誘発するNK細胞およびIFN γ シグネチャーの増加が判明した。免疫チェックポイント療法は幅広く使用されており、また転移性メラノーマおよび腎細胞癌を含む、その数が増加傾向にあるがんにおいて効能を示した(Hodi F. S. et. al., N. Engl. J. Med. (2010) 363 (8) : 711~723; Topalian S. L. et. al., N. Engl. J. Med. (2012) 366 (26) : 2443~2454; Wolchok J. D. et. al., N. Engl. J. Med. (2013) 369 (2) : 122~133; Sharma P. et. al., Cell (2015) 161 (2) : 205~214; Alsaab H. O. et. al., Frontiers in Pharmacology (2017) 8 : 561, 1~15; Pardoll D. M. Nat. Rev. Cancer (2016) 12 (4) : 252~264)。しかしながら、完全応答率はなおもきわめて低い。チェックポイント阻害剤は、機能不全に陥った細胞傷害性Tリンパ球に対するブレーキを緩め、それを刺激する一方、サイトカイン療法、例えばIL-2等は、その活性化および増殖を可能にする。それに加えて、IL-2に基づく療法は、Fc α リンパ球、例えばNK細胞等の増殖および活性化を可能にする。したがって、チェックポイント阻害剤をIL-2補体と相互に併用することで、免疫応答に対する効果が、抗腫瘍応答が改善するように促される。現行の試験において、化合物Bと抗PD-1とを併用して治療すると、活性化細胞傷害性CD8 $^{+}$ TおよびNK細胞の多様性およびクローン性の両方が強化されることに起因して、各単一薬剤と比較して生存上の長所がもたらされた。それに加えて、化合物Bまたは組合せを用いて処置された無腫瘍マウスは、持続性のメモリーT細胞集団を有した。これは、化合物B、抗PD-1抗体、または組合せで最後に処置してから100日目に1回目の再チャレンジを行い、2カ月の間隔を置き、同一の腫瘍細胞を用いて2回目の再チャレンジした後の生存マウスにおいて、腫瘍細胞の排除を引き起こした。

【1179】

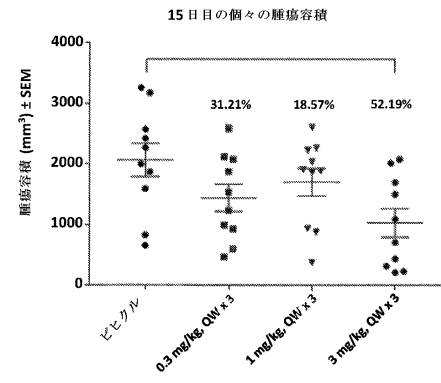
本明細書では、本発明の好ましい実施形態が示されており、かつ説明されているが、そのような実施形態は例示としてのみ提供されることが当業者には明らかであるだろう。当業者は、本発明から逸脱することなく、多数のバリエーション、変更、および置換を思い付くだろう。本明細書に記載されている本発明の実施形態に対する様々な代替が本発明の実施で採用され得ることを理解すべきである。下記の特許請求の範囲が本発明の範囲を画定し、それにより、この特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにこれらの均等物がカバーされることが意図されている。本明細書で引用されたすべての特許および科学文献の開示は、参照によって本明細書にそのまま明示的に組み入れられている。

【図面】

【図 1】

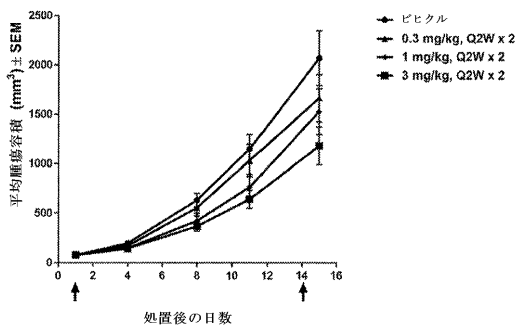


【図 2】

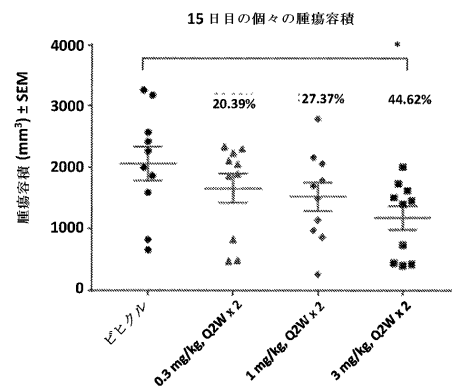


10

【図 3】



【図 4】



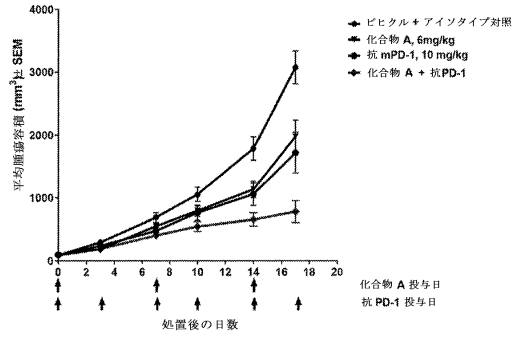
20

30

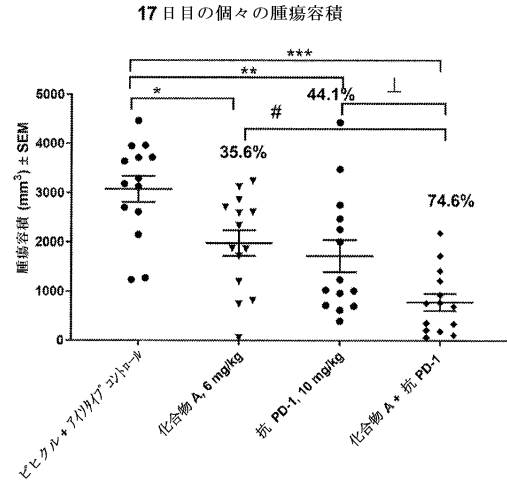
40

50

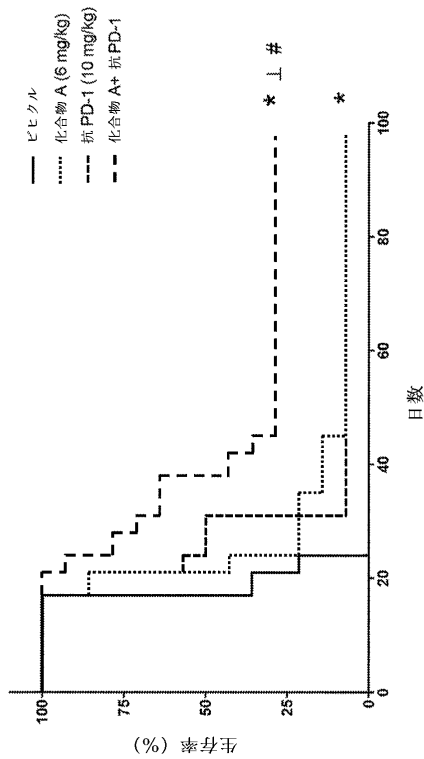
【図 5】



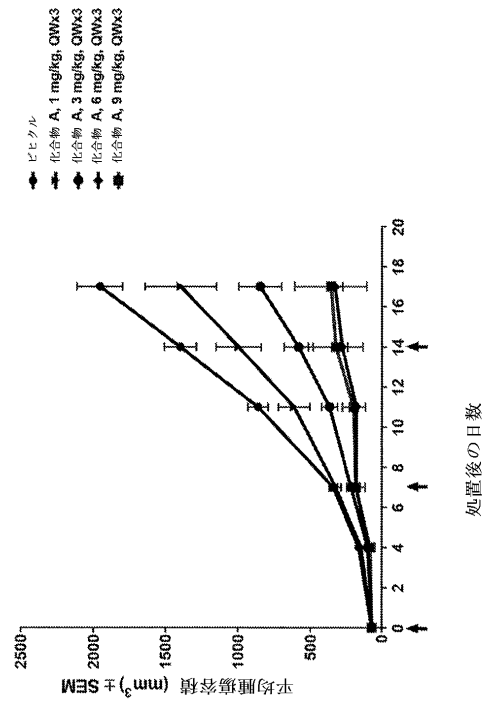
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

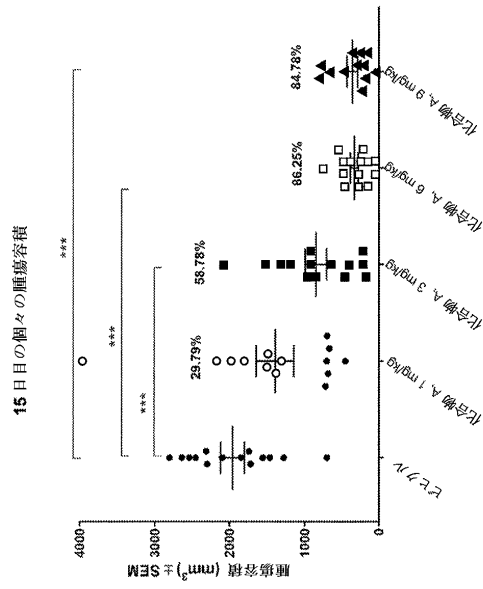
20

30

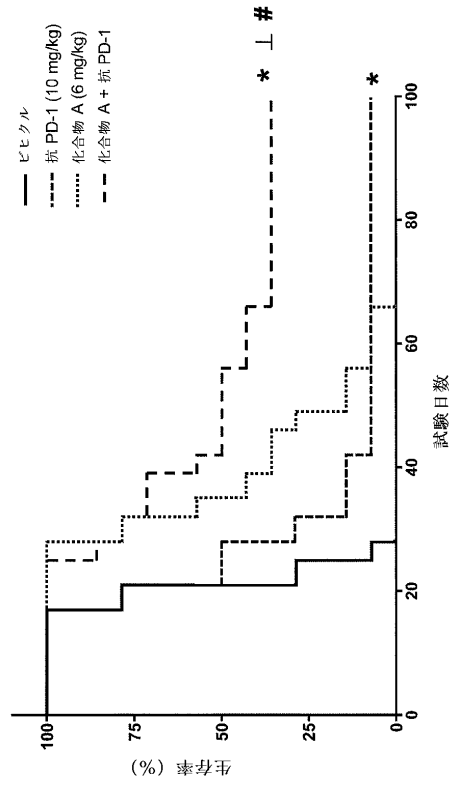
40

50

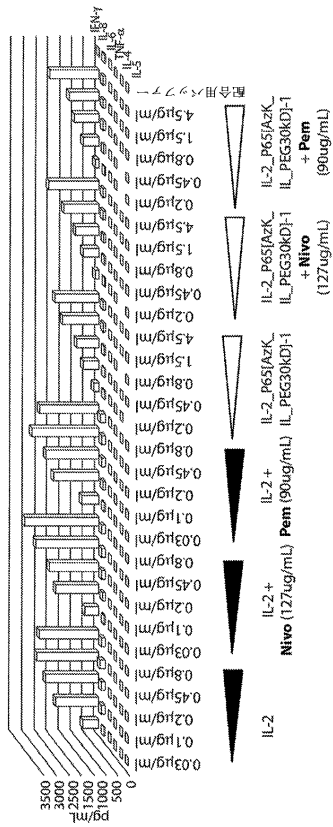
【図 9】



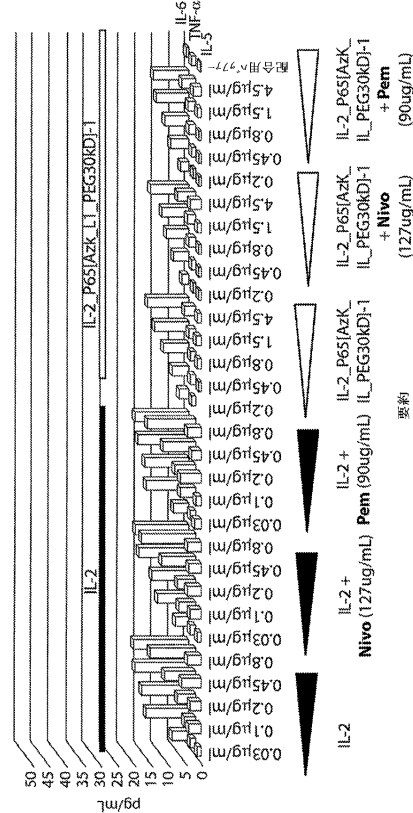
【図 10】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

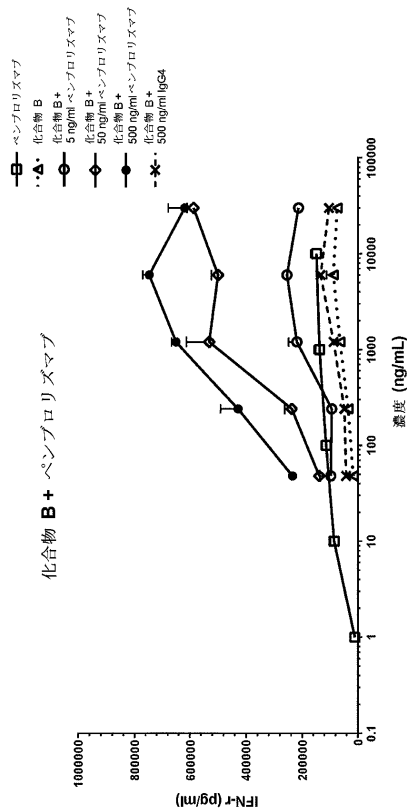
20

30

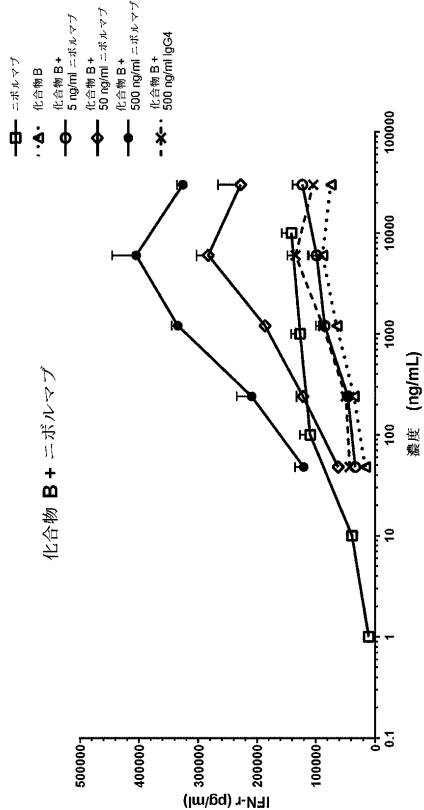
40

50

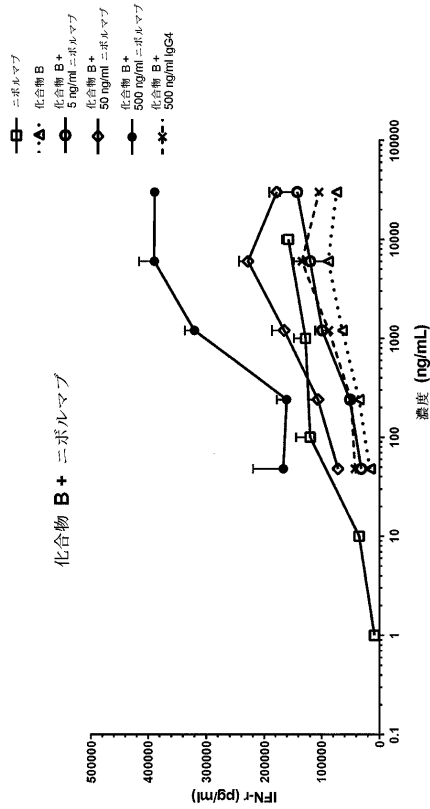
【図 1 2】



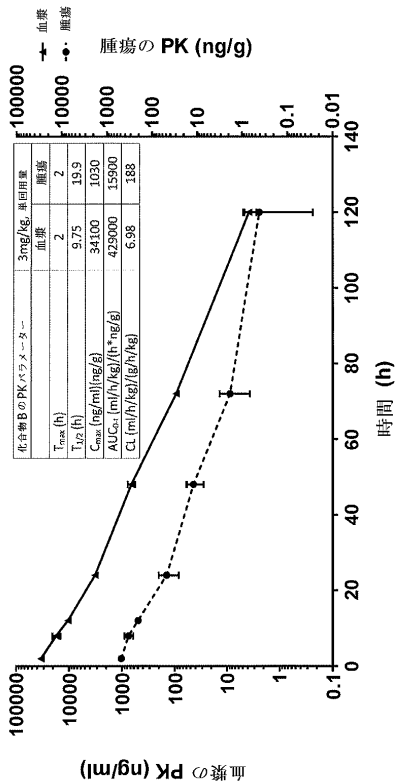
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

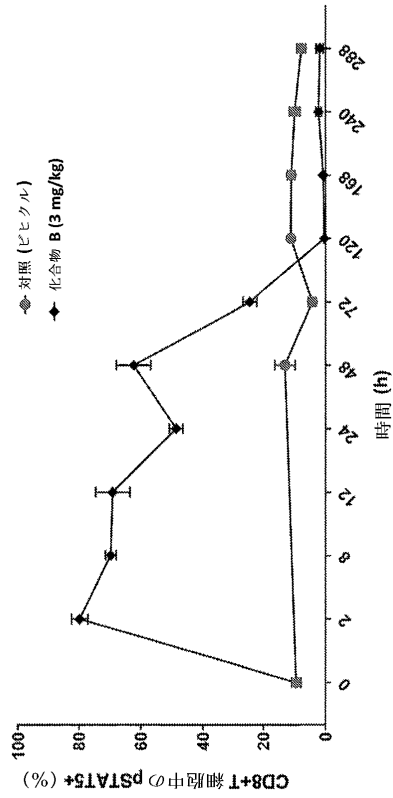
20

30

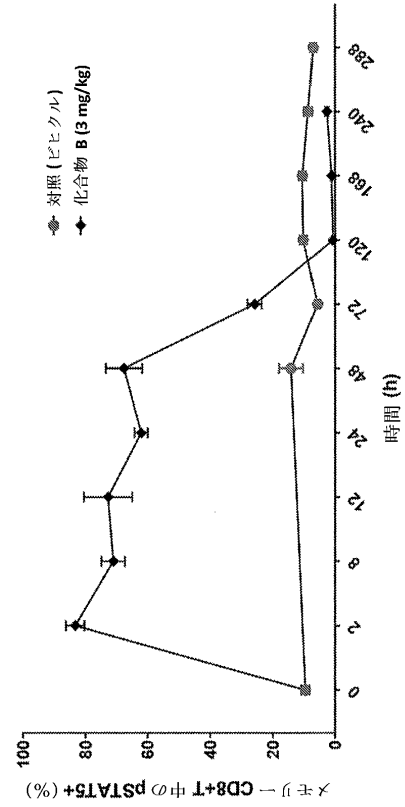
40

50

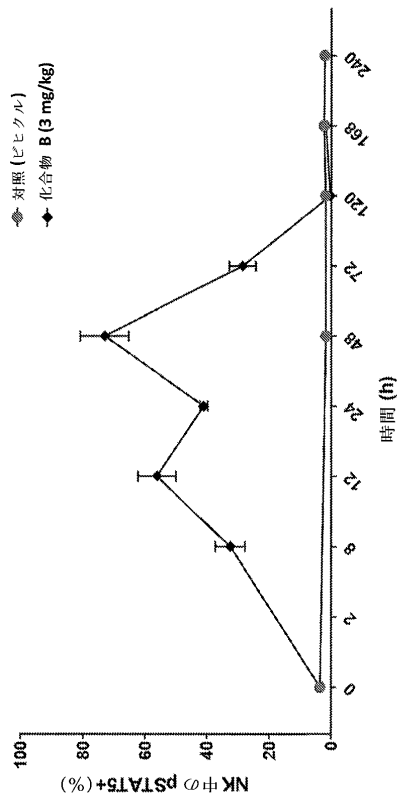
【図 16 A】



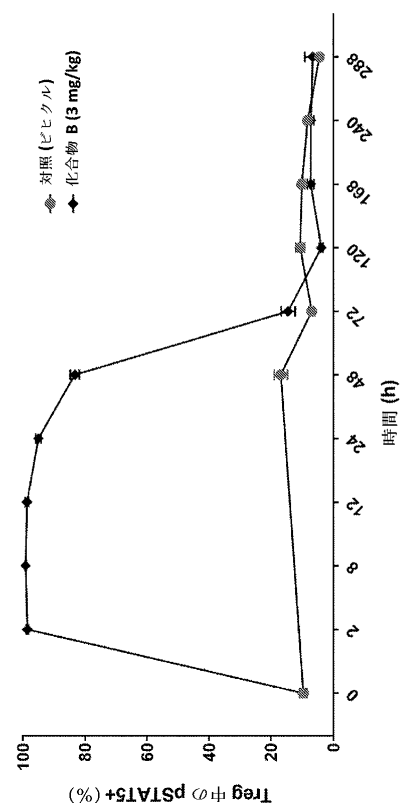
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 16 D】



10

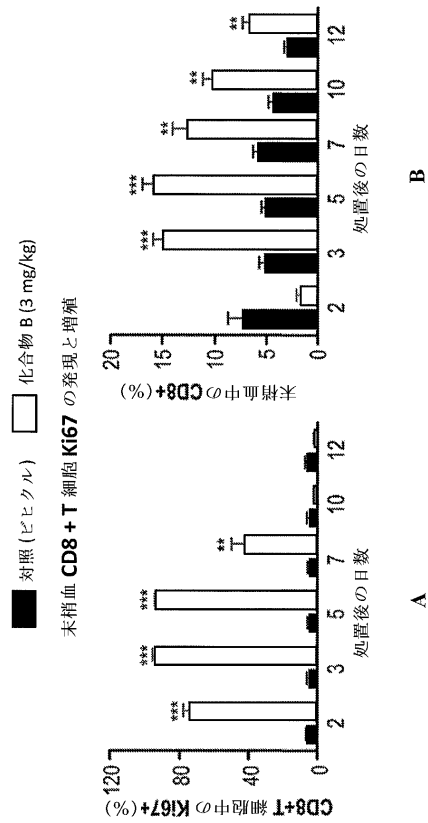
20

30

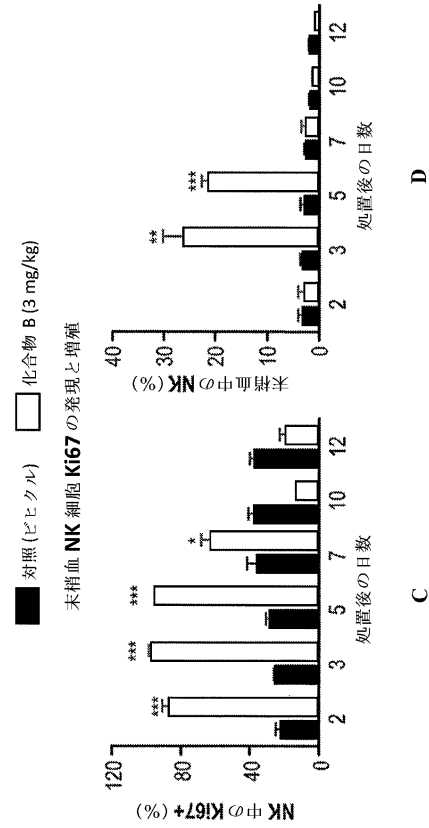
40

50

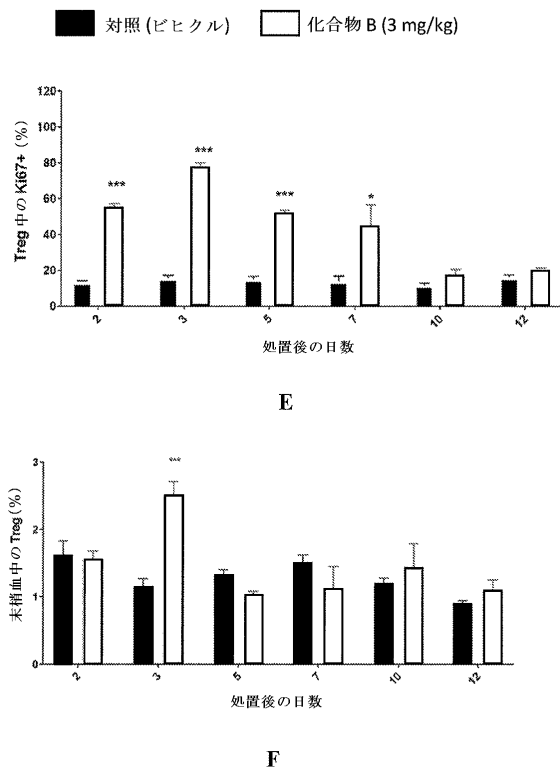
【図 1 7 - 1】



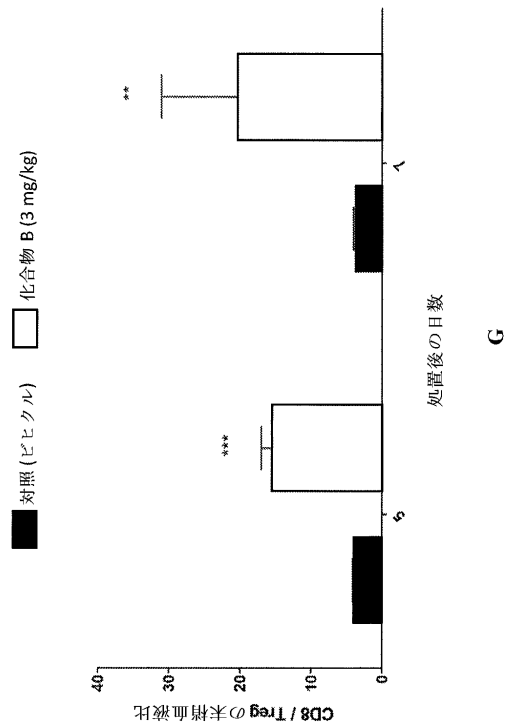
【図 1 7 - 2】



【図 1 7 - 3】



【図 1 7 - 4】



10

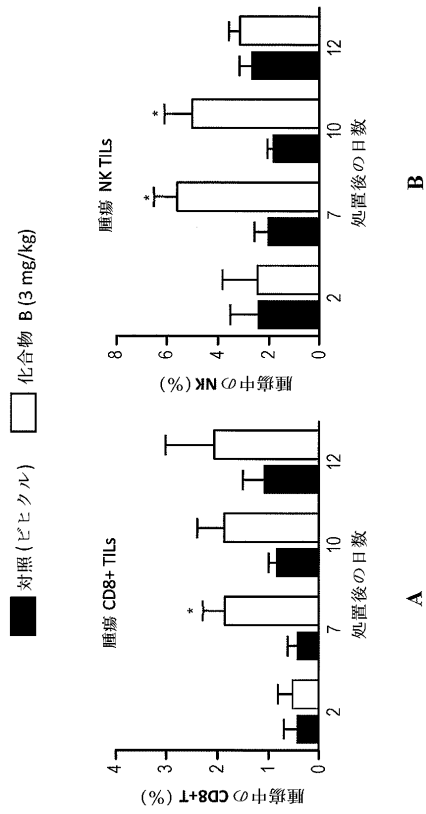
20

30

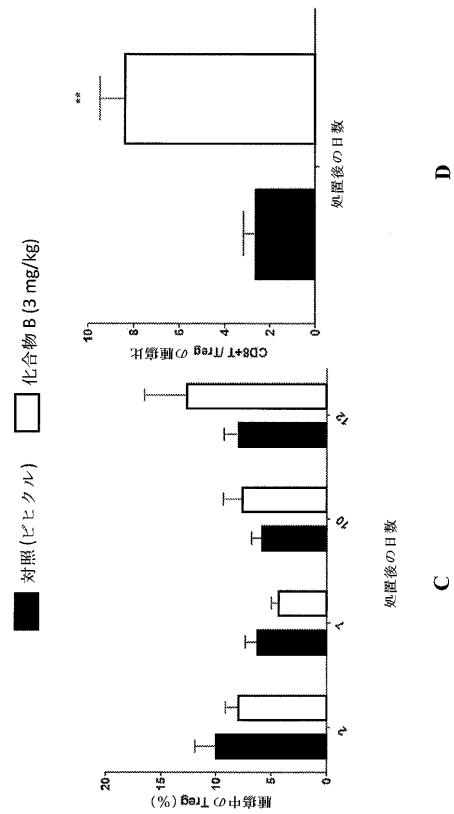
40

50

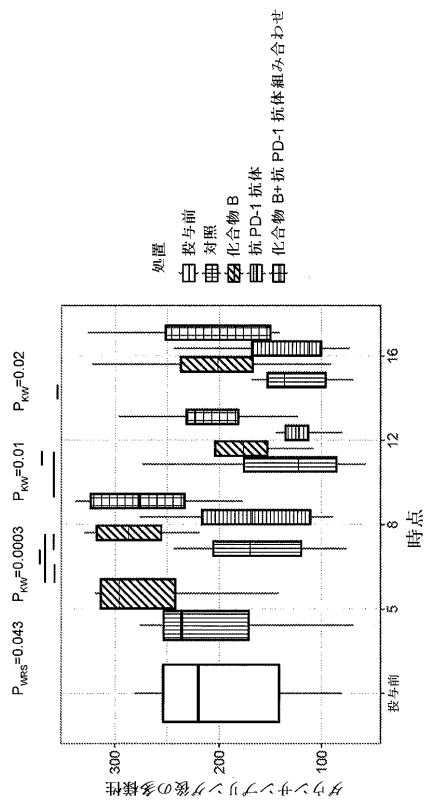
【図 18-1】



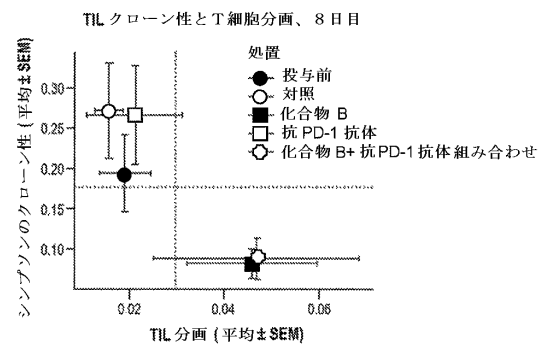
【図 18-2】



【図 19】



【図 20】



10

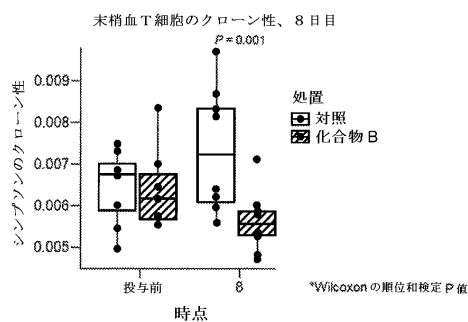
20

30

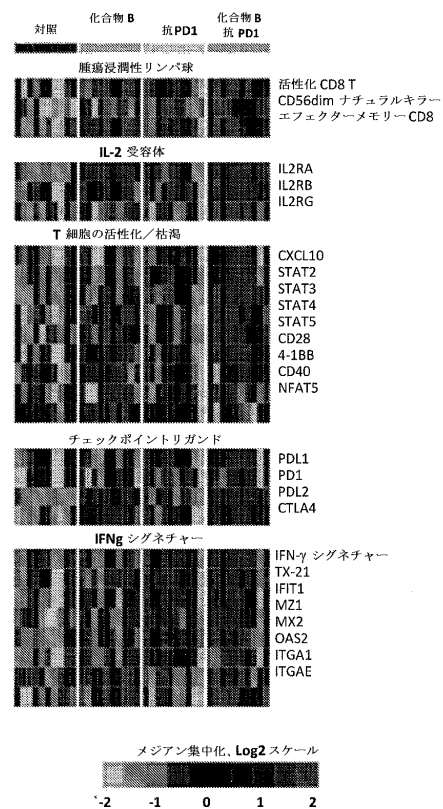
40

50

【図 2 1】



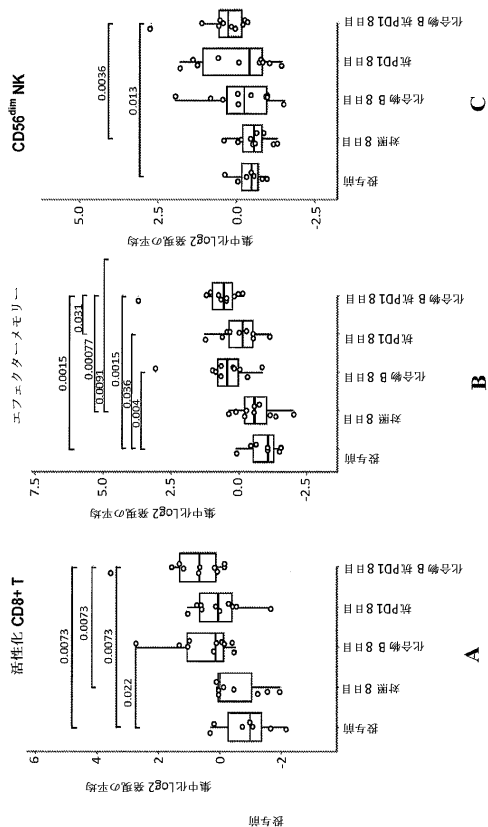
【圖 2 2】



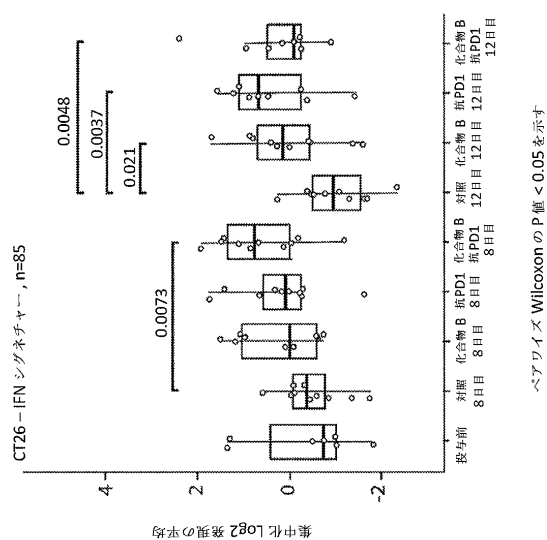
10

20

【図 23】



【図 2 4 A】

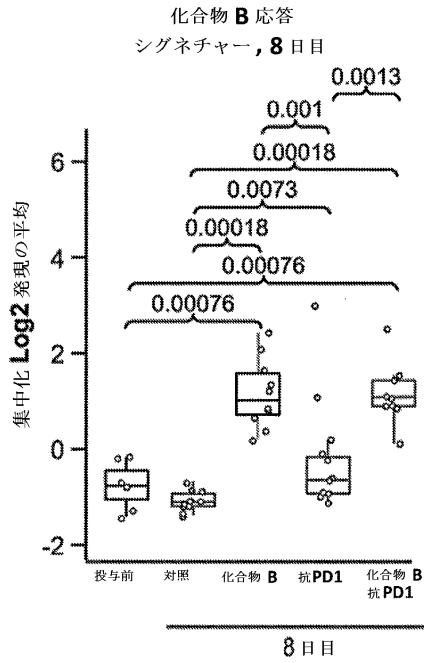


30

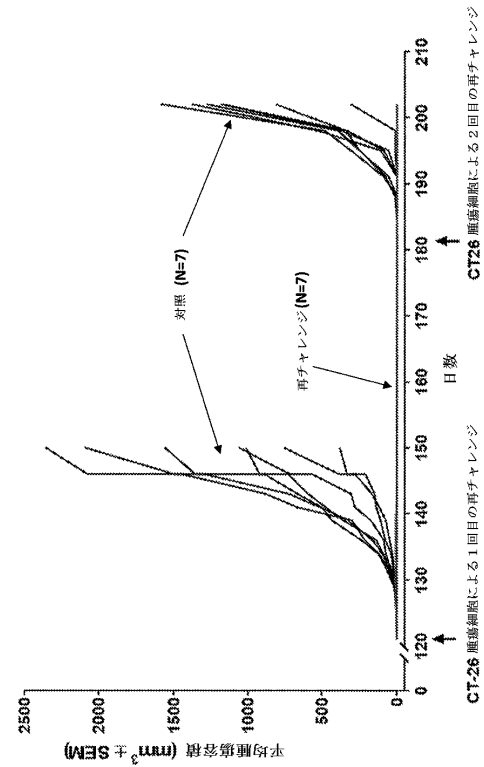
40

50

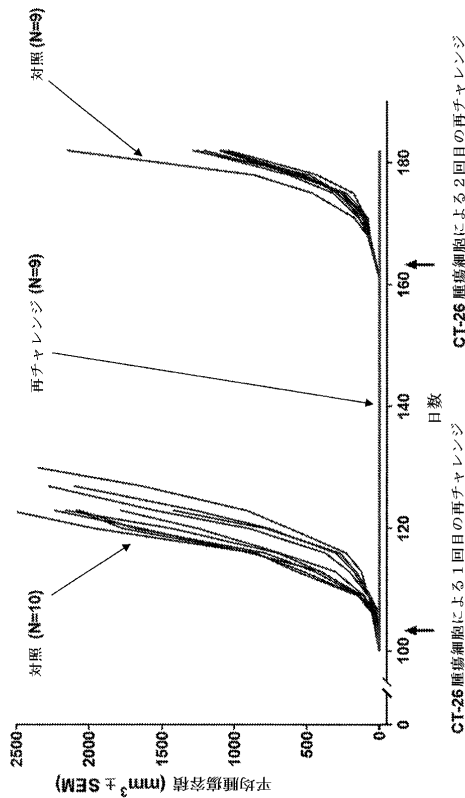
【図 2 4 B】



【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】

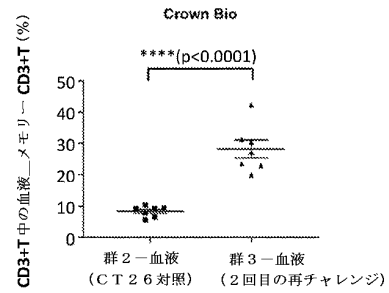


FIG. 27A

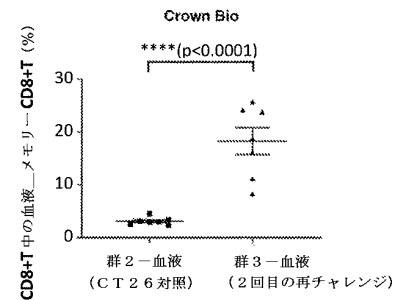


FIG. 27B

【配列表】
0007679355000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/64 (2017.01)

A 6 1 K 47/64

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

C 0 7 K 14/55 (2006.01)

C 0 7 K 14/55

Z N A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/26 (2006.01)

C 1 2 N 15/26

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/962,668

(32)優先日 令和2年1月17日(2020.1.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 カロリーナ・イー・カッファーク

アメリカ合衆国カリフォルニア州92037. ラ・ホーヤ. ノース・トーリー・パインズ・ロード
11099. スイート190

(72)発明者 マルコス・ミラ

アメリカ合衆国カリフォルニア州92037. ラ・ホーヤ. ノース・トーリー・パインズ・ロード
11099. スイート190

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2019/028419 (WO, A1)

J Biol Chem., 2017年, 292(20), pp.8498-8506

J Cell Commun Signal., 2018年11月29日, 2019, 13, pp.319-330

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 38/20

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 47/64

A 6 1 K 47/60

A 6 1 K 47/54

C 0 7 K 14/55

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/26