(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-512373
(P2025-512373A)
(43)公表日　令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/61*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/61	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*47/65*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/65	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*38/19*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/19	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*38/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*38/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全72頁）　最終頁に続く

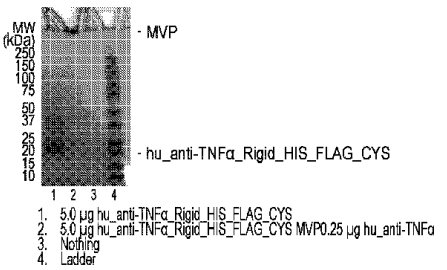
(21)出願番号　特願2024-560278(P2024-560278)
(86)(22)出願日　令和5年4月14日(2023.4.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月9日(2024.12.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/065779
(87)国際公開番号　WO2023/201337
(87)国際公開日　令和5年10月19日(2023.10.19)
(31)優先権主張番号　63/331,554
(32)優先日　令和4年4月15日(2022.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　520347214
バリター，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４０７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ８２０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
弁理士　池田 達則
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多価タンパク質－ヒアルロン酸ポリマーコンジュゲートを用いてぶどう膜炎を治療する方法

(57)【要約】
本発明は、慢性非感染性ぶどう膜炎などのぶどう膜炎を治療するための、多価タンパク質－ポリマーコンジュゲート、組成物、及び方法に関する。
【選択図】　図１Ａ

FIG. 1A



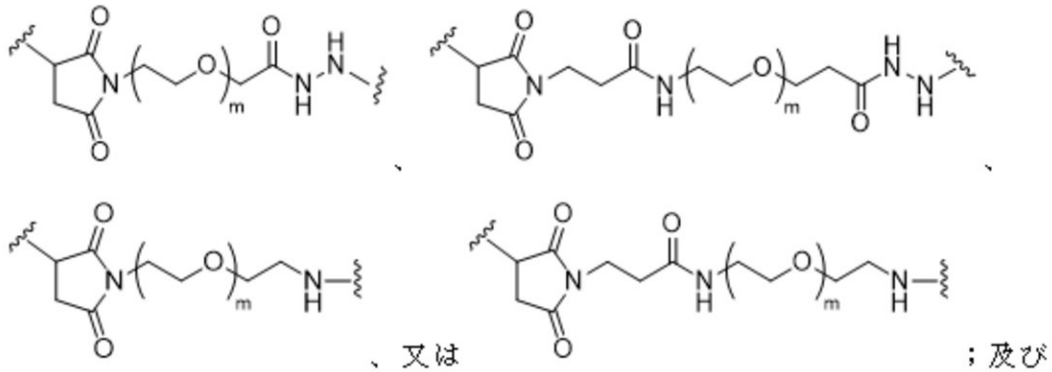
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ぶどう膜炎の治療を必要とする対象においてぶどう膜炎を治療するための方法であって、
前記対象に以下の式Ｖのコンジュゲート：
（Ｘ－Ｙ）$_{n}$－Ｚ　（Ｖ）、
（式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；
それぞれのＹは有機リンカーであり；
Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；
下付き文字ｎは１～１０００の整数である）
の治療有効量を投与することを含む、方法。
【請求項２】
それぞれのＸが、互いに独立して、抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗インターロイキン－１βペプチドである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
それぞれのＸが、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、単鎖ｓｃＦｖ、シングルドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤（engineered Kunitz-type inhibitor）である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
それぞれのＸが、配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１１８、及び１４５～１５４のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
それぞれのＸが、以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法：
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ

ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）。

【請求項６】

それぞれのＹが、以下の構造を有する有機リンカーであり：

【化１】



上式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である、

請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

Ｚが約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

Ｚが約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

Ｚが約０．８ＭＤａの分子量を有する、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

式Ｖのコンジュゲートが以下の式Ｖａの構造：

（$X^1-X^2-Y)_n-Z$　（Ｖａ）、

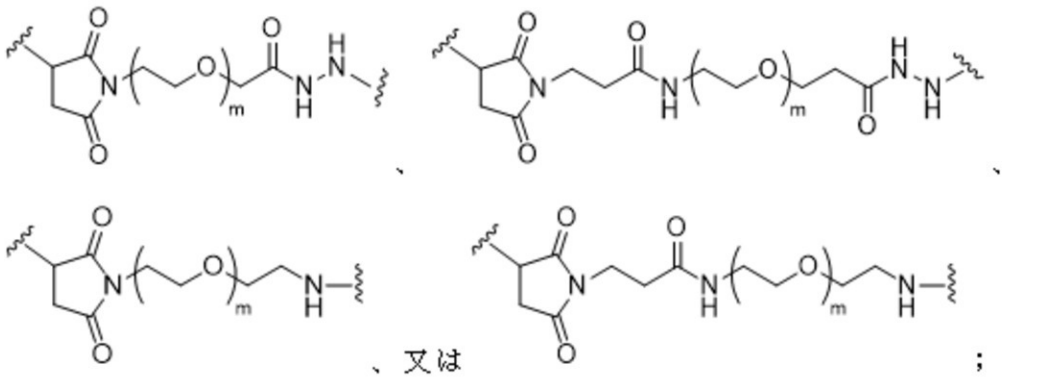
（式中、

それぞれのX^1は約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；

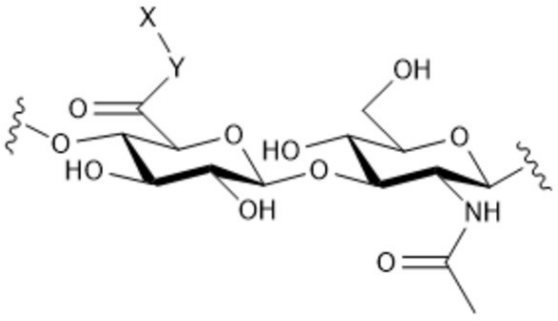
それぞれのX^2はαヘリックスを含むペプチドリンカーであり；

それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

【化２】



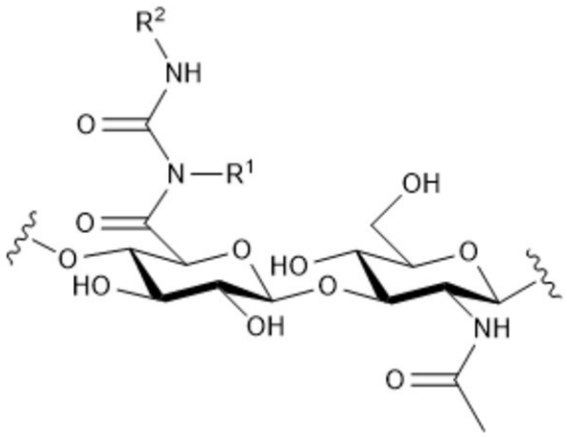
上式中、
Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；
下付き文字ｍは１～３００の整数である）
を有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
それぞれのＸ^{2}が以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである、請求項１０に記載の方法：
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、
ＡＥＥＥＥＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、
ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は
ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）。
【請求項１２】
前記式Ｖのコンジュゲートが、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であり：
（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$　（ＶＩ）、
式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；
それぞれのＹは有機リンカーであり；
それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：
【化３】



；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：

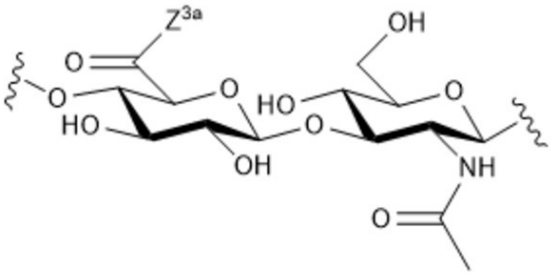
【化４】



;

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化５】



;

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；

それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；

それぞれのＺ^{3a}は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；

それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；

下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；

下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

下付き文字ｑは１００～１００００の整数である、

請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}が、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキル又は－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}である、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}が、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルである、請求項１２又は請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

下付き文字ｎが、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；

下付き文字ｐが、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

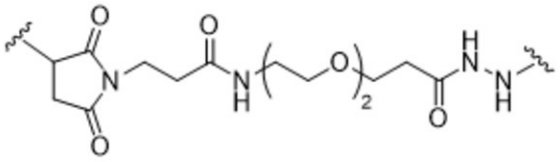
下付き文字ｑが１００～１００００の整数である、

請求項１２～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】
下付き文字ｎが、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｐが、１～８００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；
下付き文字ｑが１００～１００００の整数である、
請求項１２～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
下付き文字ｎが、１０～４５０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；
下付き文字ｐが、１～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｑが１０００～３０００の整数である、
請求項１２～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｐが、１～２４０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；
下付き文字ｑが１０００～３０００の整数である、
請求項１２～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｐが、１～６０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約２％未満であり；
下付き文字ｑが１０００～３０００の整数である、
請求項１２～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｐが、１～３０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１％未満であり；
下付き文字ｑが１０００～３０００の整数である、
請求項１２～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｐが、１～１５の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり；
下付き文字ｑが１０００～３０００の整数である、
請求項１２～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ぶどう膜炎が慢性ぶどう膜炎である、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ぶどう膜炎が慢性非感染性ぶどう膜炎である、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
硝子体内投与を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】
前記コンジュゲートの反復投与を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記コンジュゲートを１か月毎、２か月毎、又は３か月毎に投与することを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記コンジュゲートを年に２回又は３回投与することを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
前記コンジュゲートを年１回投与することを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であるコンジュゲートであって：
（Ｘ－Ｙ－Z^1）$_n$－（Z^2）$_p$－（Z^3）$_q$　（ＶＩ）、
式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、以下を含む抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗ＩＬ－１βペプチドであり：
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ
ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲ
ＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱ
ＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）；
それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

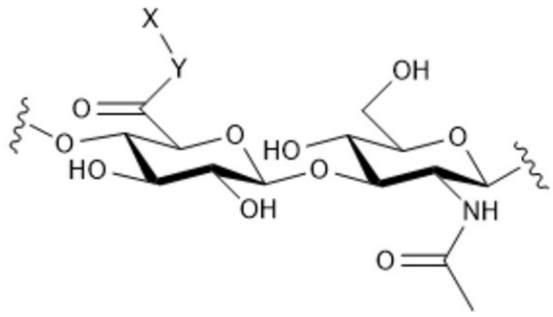
【化６】



；

それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：

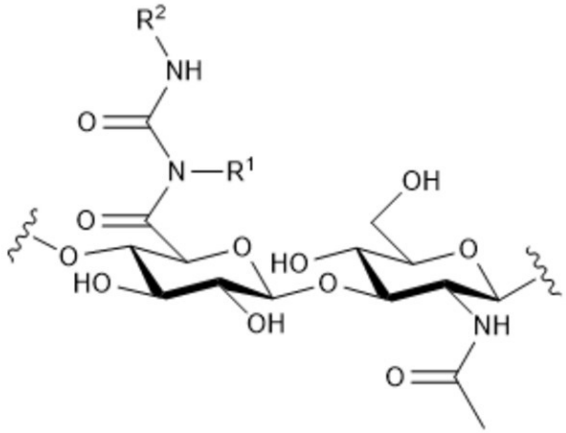
【化７】



；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：

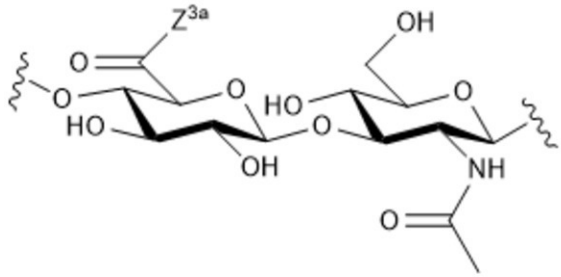
【化８】



；

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化９】



；

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；

それぞれのR^3及びR^4は、互いに独立して、H又はC_1～C_6アルキルであり；
それぞれのZ^{3a}は、互いに独立して、OH又はY’であり；
それぞれのY’は未反応の有機リンカーであり；
下付き文字nは、1～1500の整数であり、且つ、下付き文字n、p、及びqの合計の約15%未満であり；
下付き文字pは、0～1000の整数であり、且つ、下付き文字n、p、及びqの合計の約10%未満であり；
下付き文字qは100～100000の整数である、
コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2022年4月15日に出願された米国仮特許出願第63／331，554号に基づく優先権を主張するものであり、当該米国仮特許出願はあらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

添付の配列表中の資料は、その全体が参照によって本明細書に援用される。2023-04-11 Sequence_Listing_ST26 052566-508001WO.xmlという名称の添付のファイルは、2023年4月11日に作成されたものであり、サイズは117，702バイトである。

【背景技術】

【0003】

バイオポリマーを用いて生理活性物質の特性を変化させることは、医療及び生物学的用途において広い範囲にわたり繰り返し出現しているテーマである。様々な化学的リンカーを使用して生理活性ペプチド又は生理活性タンパク質をバイオポリマーに結合させることで、得られるコンジュゲートの薬理学的特性を改変し、それを、特定の疾患に最適な治療を提供できる薬剤として使用することができる。1種又は複数種のペプチドの複数コピーを単一のバイオポリマー鎖にコンジュゲートさせたものを含む、ペプチド－ポリマーコンジュゲートが、当該ペプチドの薬理学的特性に特定の改善を与えるために採用されており、この特定の改善としては、（1）生物学的標的への結合親和性の増加、（2）標的組織中の拡散性の低下、及び、（3）当該ペプチド又はタンパク質の生物活性を不活性化させ得るプロテアーゼの阻害、が挙げられる。

【0004】

これらの、ペプチド－ポリマーコンジュゲートの改善された薬理学的特性は、患部組織に直接送達される強力な薬剤を送達する上では特に有用である。組織に直接送達される投与量は、薬剤が標的組織に局所投与されることから、全身投与後に同じ治療効果を達成するために必要とされるであろう投与量よりも少なくすることができる。また、それ以外の方法では血液からの輸送性が悪い組織に、薬剤を投与することも可能である。直接的な薬剤投与が一般的である組織の具体例としては、硝子体内注射を介する後眼房と、関節内注射を介する関節が挙げられる。

【0005】

しかし、局所的な組織投与には、必要な注射を安全に提供するための専門家が必要となり、このことが、局所的な組織投与を、全身投与と比較して、より面倒でコストの高いものにしている。ペプチド薬がペプチド－ポリマーコンジュゲートの一部として投与される場合、薬剤投与の頻度を実質的に減少させることにより、効果的な治療を受けるための患者への負担を低減することが可能である。さらに、局所注射の回数が減少すると、局所的な組織傷害又は注射への悪影響のリスクが減少する。そして、少ない投与頻度で済むため、標的組織内の薬剤濃度が治療濃度を下回る時間を短縮することができ、それによって薬

剤の全体的効力が向上する。これらの利点から、種々の疾患に対するタンパク質－ポリマー製剤の開発の動機が高まっている。

【０００６】

ぶどう膜炎は、視力を脅かす眼内炎症性疾患群であり、全世界の失明症例のおよそ５～１０％に関与している。慢性的な非感染性のぶどう膜炎は神経損傷と視力喪失をもたらす可能性がある。大部分の患者は副腎皮質ステロイドを用いて治療されるが、副腎皮質ステロイドは重篤な副作用をもたらす可能性がある。生物学的ＴＮＦα阻害剤の硝子体内投与はステロイド類の必要性を実質的に減らすことができる。しかし、これらの製品は、硝子体内への使用のための設計・検証がなされておらず、既存のＴＮＦα阻害剤による適応外の硝子体内治療は推奨されない。

【０００７】

したがって、慢性非感染性ぶどう膜炎などのぶどう膜炎を治療するための、精製されたペプチド－ポリマーコンジュゲート及び方法を開発することが必要とされている。本発明は上記を含むニーズに応えるものである。

【発明の概要】

【０００８】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、ぶどう膜炎の治療を必要とする対象においてぶどう膜炎を治療するための方法であって、前記対象に以下の式Ｖのコンジュゲート：

（Ｘ－Ｙ）$_{n}$－Ｚ　（Ｖ）、

（式中、

それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；

それぞれのＹは有機リンカーであり；

Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；

下付き文字ｎは１～１０００の整数である）

の治療有効量を投与することを含む、方法である。

【０００９】

いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であって：

（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$　（ＶＩ）、

式中、

それぞれのＸは、互いに独立して、以下を含む抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗ＩＬ－１βペプチドであり：

ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、

ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、

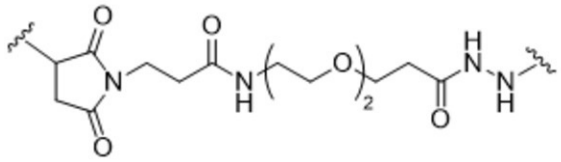
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、

ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、

ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）；

それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

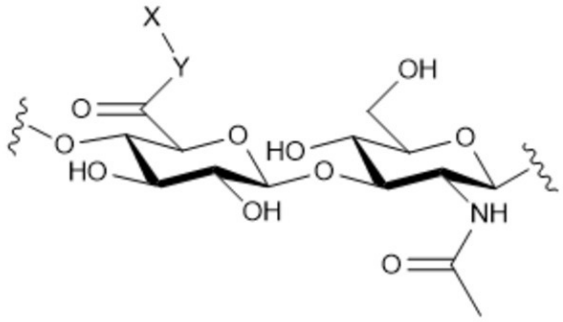
【化１】



；

それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：

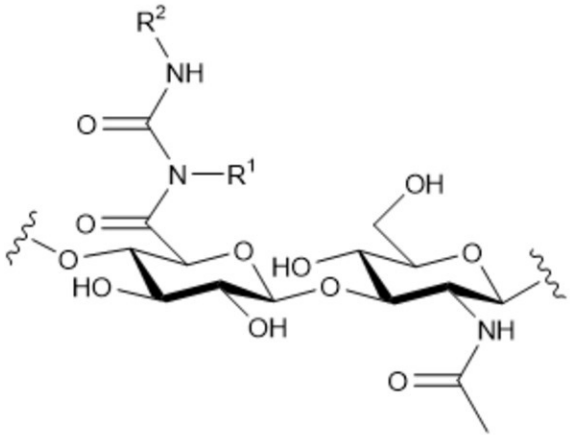
【化２】



；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：

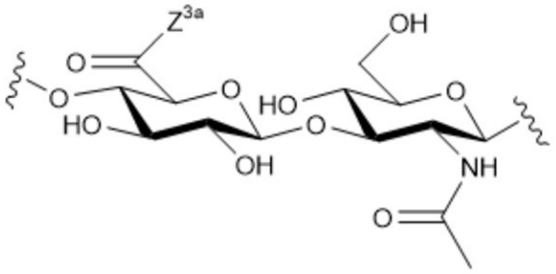
【化３】



；

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化４】



；

それぞれのＲ[1]及びＲ[2]は、互いに独立して、Ｃ[1]～Ｃ[6]アルキル、－（Ｃ[1]～Ｃ[6]アルキル）－ＮＲ[3]Ｒ[4]、又はＣ[5]～Ｃ[8]シクロアルキルであり；
それぞれのＲ[3]及びＲ[4]は、互いに独立して、Ｈ又はＣ[1]～Ｃ[6]アルキルであり；
それぞれのＺ[3a]は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；
それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；
下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；
下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；
下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である、
ランダム重合体である。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１Ａ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ａは、（Ａ）非コンジュゲート型ＶＨＨと比較した、結合価５５の、（配列番号１０１）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃２の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図１Ｂ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ｂは、（Ｂ）非コンジュゲート型ＶＨＨと比較した、結合価６５の、（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃３の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図１Ｃ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ｃは、（Ｃ）非コンジュゲート型ＶＨＨと比較した、結合価１２１の、（配列番号１０３）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃５の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図１Ｄ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ｄは、（Ｄ）非コンジュゲート型ＶＨＨと比較した、結合価５１の、（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃６の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図１Ｅ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ｅは、（Ｅ）非コンジュゲート型アフィボディと比較した、結合価２１の、（配列番号１０５）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃８の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図１Ｆ】図１は、配列番号ごとの、代表的な抗炎症性ペプチド重合体コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像を示している。図１Ｆは、（Ｆ）結合価１５の、（配列番号１０６）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃９の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ画像。

【図２Ａ】図２Ａは、（Ａ）バイオレイヤー干渉法で求めた場合に、結合価１２０の（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃４のＴＮＦα結合親和性が、非コンジュゲート型ＴＮＦαのそれよりも大きい（＊＊＊ｐ＜０．００１、スチューデン

トｔ検定、ｎ＝３）ことを示している。破線は装置の検出限界を示しており、コンジュゲートの結合親和性はその限界よりも低い。
【図２Ｂ】図２Ｂは、（Ｂ）非コンジュゲート型ＶＨＨよりも約１０倍大きい、結合価９の（配列番号１０１）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃１の、Ｌ９２９線維芽細胞におけるＴＮＦαによって誘導されるアポトーシスを阻害する生理活性。
【図３】図３は、結合価６５の（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）からなるコンジュゲート＃３の流体力学的半径が、非コンジュゲート型ＶＨＨのそれよりも大きい（＊＊＊ｐ＜０．００１、スチューデントｔ検定、ｎ＝３）ことを示している。
【図４Ａ】図４Ａは、（Ａ）温度上昇に伴う、非コンジュゲート型タンパク質（配列番号１０２）の、２８０ｎｍにおける吸光度（「Ａ２８０」）を正規化したものを示している。ＶＨＨの酸化型バージョンは、温度を３７℃から５０℃まで上昇させた場合、最小限の吸光度変化しか示さなかったが、還元型構築物は吸光度の増加が５０℃で始まり、このことは、還元型構築物がフォールディングされておらず、熱安定性が低かったことを示している。エラーバーはＳＤを表している。
【図４Ｂ】図４Ｂは、（Ｂ）バイオレイヤー干渉で測定された、３７℃で表示の日数の間インキュベーションを行った後の、３Ｍｕｔ安定性増強変異を含む、又は含まないｍｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ＿ＣＹＳコンジュゲートに対するＴＮＦα結合親和性の結合定数における変化。使用された試料は、結合価１２１の（配列番号１０３）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃５（「ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ」）又は結合価５１の（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃６（「ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿３Ｍｕｔ＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ」）のいずれかであった。３７℃で４日間経過した後は、３７℃で３５日後までコンジュゲート＃６の結合定数にはほとんど変化がなかった。対照的に、非変異型のコンジュゲート＃５の結合定数は３７℃で５日後には激減しており、これは安定性が減少していることを示している。
【図４Ｃ】図４Ｃは、（Ｃ）３７℃で最大３５日間のインキュベーションを行った後の、硝子体を模倣した緩衝液中の、コンジュゲートサイズの代表的なＤＬＳデータ。各コンジュゲートは、結合価５１の（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）（コンジュゲート＃６、「ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿３Ｍｕｔ＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ　１：５１」）又は結合価９８の（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）（コンジュゲート＃７、「ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿３Ｍｕｔ＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ　１：９８」）と作製された。ポリマー１個当たり約５０～約１００個の抗体という結合価範囲に基づいた場合、ＭＶＰサイズに有意差はなかった。各コンジュゲートは、３７℃で３５日後まで、サイズが元の半径の約７５％までゆっくりと減少した。エラーバーはＳＤを表す。
【図５】図５は、コンジュゲーションが、ウサギ硝子体内薬物動態モデルにおける抗炎症性治療剤の硝子体内半減期を延長可能であることを示している。各ウサギは、非コンジュゲート型配列番号１０２又は結合価１２０の（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）コンジュゲート＃４のいずれの、等モルの５０μＬ硝子体内注射を受けた。各時点のＶＨＨ濃度の非線形フィッティングを用いて、硝子体内半減期を求めた。多価コンジュゲーションは非コンジュゲート型ＶＨＨと比較して半減期を少なくとも２倍に延長させた。
【図６Ａ】図６Ａは、抗ＴＮＦαコンジュゲートがラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルにおいて眼炎症を有意に抑制したことを示している。コンジュゲート＃７は（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）及び結合価９８で作製した。（Ａ）溶媒、デキサメタゾン（５μｇ）、又はコンジュゲート＃７（「ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿３Ｍｕｔ＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ」）（１２．５μｇ）を硝子体内注射されたラット（ｎ＝８）における、ＥＡＵ誘導後のラットの眼で観察された、平均炎症スコア（０＝なし～４＝重症）。ＩＴＶ処置の１日後、溶媒コントロールと比較して、デキサメタゾン治療後の眼とコンジュゲート治療後の眼の両方が、炎症の低減を示した。
【図６Ｂ】図６Ｂは、（Ｂ）モデル誘導の１４日後に　　殺された同一ラットコホートにおける平均組織学的炎症スコア（０＝なし～４＝重症）。左のバー：溶媒、中央のバー：デキサメタゾン治療後、右のバー：コンジュゲート＃７治療後。コンジュゲート治療後の眼

（右のバー）は、溶媒処置後の眼（左のバー）よりも炎症が少なかった（＊ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定）。
【図７Ａ】図７Ａは、抗ＴＮＦαコンジュゲートがラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルにおいて眼炎症を有意に抑制したことを示している。コンジュゲート＃１０は（配列番号１０４）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）及び結合価９６．５で作製した。（Ａ）溶媒（ｎ＝２４）、トリアムシノロン（４０μｇ）（ｎ＝２２）、又はコンジュゲート＃１０（「コンジュゲートＩＤ：１０」）（１９μｇ）（ｎ＝２０）を硝子体内注射されたラットにおける、ＥＡＵ誘導後のラットの眼で観察された、平均炎症スコア（０＝なし～４＝重症）。ＩＴＶ処置の１日後、溶媒コントロールと比較して、トリアムシノロン治療後の眼とコンジュゲート治療後の眼の両方が、炎症の低減を示した。どの時点においても、トリアムシノロンとコンジュゲート＃１０との間で、測定値に統計的有意差はなかった。コンジュゲート＃１０と溶媒には、１０日目（ｐ＝０．００２）、１２日目（ｐ＜０．００１）、及び１４日目（ｐ＝０．００７）に有意差があった。
【図７Ｂ】図７Ｂは、（Ｂ）溶媒（ｎ＝２４）、トリアムシノロン（４０μｇ）（ｎ＝２２）、又はコンジュゲート＃１０（「コンジュゲートＩＤ：１０」）（１９μｇ）（ｎ＝２０）を硝子体内注射されたラットの眼から作製された硝子体試料のサイトカイン分析。棒グラフは、重要な炎症誘発性サイトカイン及び炎症制御因子の濃度を示している。
【図８Ａ】図８Ａは、抗ＴＮＦαコンジュゲートがウサギＴＮＦα誘導眼炎症モデルにおいて眼炎症を有意に抑制したことを示している。コンジュゲート＃１１は（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）及び結合価１３２で作製した。（Ａ）溶媒、又はコンジュゲート＃１１（「コンジュゲートＩＤ１１」）（０．２６ｍｇ）を硝子体内注射された、又は注射なしのウサギ（ｎ＝２６）における、７．５μｇのＴＮＦαを用いた炎症誘導後のウサギの眼で観察された、経時的な平均炎症スコア（０＝なし～４＝重症）。７．５μｇのＴＮＦαで処置されたウサギでは、２４時間及び４８時間の時点において、コンジュゲート＃１１治療後の眼と溶媒処置後の眼の間に統計的有意性があった。
【図８Ｂ】図８Ｂは、（Ｂ）４８時間後、全てのＴＮＦα投与濃度で、コンジュゲート＃１１治療後の眼は、炎症誘導の４８時間後の溶媒コントロールと比較して、炎症の低減を示した。５．０μｇ（ｐ＝０．０３）及び７．５μｇ（ｐ＜０．００１）のＴＮＦα投与量において、統計的有意差が確認された。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
Ｉ．定義
他に具体的に示されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。加えて、本明細書に記載の方法又は材料に類似した、又はそれと等価なあらゆる方法又は材料が、本発明の実施において使用することができる。本発明の目的のために、以下の用語が定義される。
【００１２】
「約」が数値に係っている場合、記載値±記載値の１０％が含まれる。例えば、約５０％には４５％から５５％までの範囲が含まれ、約２０モル当量には１８モル当量から２２モル当量までの範囲が含まれる。したがって、範囲に係っている場合、「約」とは、その範囲の各端点の、記載値±記載値の１０％をそれぞれ指す。例えば、約１から約３までの比率（重量／重量）には、０．９から３．３までの範囲が含まれる。
【００１３】
「アルキル」は、直鎖状又は分岐鎖状の、飽和した、一価又は二価の炭化水素である。例えば、アルキル基は、１～１０個の炭素原子を有することや（すなわち、$C_{1～10}$アルキル）、１～８個の炭素原子を有することや（すなわち、$C_{1～8}$アルキル）、１～６個の炭素原子を有することや（すなわち、$C_{1～6}$アルキル）、あるいは、１～４個の炭素原子を有することがある（すなわち、（$C_{1～4}$アルキル）。アルキル基の例としては、メチル（Ｍｅ、－CH_3）、エチル（Ｅｔ、－CH_2CH_3）、１－プロピル（ｎ－Ｐ

ｒ、ｎ－プロピル、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、２－プロピル（ｉ－Ｐｒ、ｉ－プロピル、－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、１－ブチル（ｎ－Ｂｕ、ｎ－ブチル、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、２－メチル－１－プロピル（ｉ－Ｂｕ、ｉ－ブチル、－ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、２－ブチル（ｓ－Ｂｕ、ｓ－ブチル、－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、２－メチル－２－プロピル（ｔ－Ｂｕ、ｔ－ブチル、－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$）、１－ペンチル（ｎ－ペンチル、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）$_2$）、２－メチル－２－ブチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－メチル－２－ブチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、３－メチル－１－ブチル（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、２－メチル－１－ブチル（－ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、１－ヘキシル（－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、２－ヘキシル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－ヘキシル（－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$））、２－メチル－２－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、３－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）、４－メチル－２－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、３－メチル－３－ペンチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）$_2$）、２－メチル－３－ペンチル（－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、２，３－ジメチル－２－ブチル（－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、３，３－ジメチル－２－ブチル（－ＣＨ（ＣＨ$_3$）Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、及びオクチル（－（ＣＨ$_2$）$_7$ＣＨ$_3$）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【００１４】

「シクロアルキル」は、３～２０個の環構成炭素原子を有する、単一の、飽和又は部分不飽和の、全ての炭素環（すなわち、Ｃ$_{3～20}$シクロアルキル）を指し、上記環構成炭素原子は、例えば、３～１２個の環構成原子、例えば３～１０個の環構成原子、又は３～８個の環構成原子、又は３～６個の環構成原子、又は３～５個の環構成原子、又は３～４個の環構成原子などである。「シクロアルキル」という用語は、多環式（ｍｕｌｔｉｐｌｅ）の、縮合した、飽和及び部分不飽和の、全ての炭素環系（例えば、２個、３個、又は４個の炭素環を含む環系）も包含する。したがって、シクロアルキルは、二環式炭素環（例えば、ビシクロ［３．１．０］ヘキサン及びビシクロ［２．１．１］ヘキサンなどの、６～１２個程度の環構成炭素原子を有する二環式炭素環）などの複環式（ｍｕｌｔｉｃｙｃｌｉｃ）炭素環、及び、多環式（ｐｏｌｙｃｙｃｌｉｃ）炭素環（例えば、最大で２０個程度の環構成炭素原子を有する、三環式炭素環及び四環式炭素環）を包含する。多環式縮合環系の環同士は、結合価の要件が許す場合、縮合結合、スピロ結合、及び架橋結合を介して互いに連結されていることがある。単環式シクロアルキルの非限定例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペンタ－１－エニル、１－シクロペンタ－２－エニル、１－シクロペンタ－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキサ－１－エニル、１－シクロヘキサ－２－エニル、及び１－シクロヘキサ－３－エニルが挙げられる。

【００１５】

「有機リンカー」とは、本明細書で使用される場合、直接的又は間接的に、ペプチドをポリマーに共有結合的に連結する化学的部分を指す。本発明で有用な有機リンカーは約１００Ｄａ～約５００Ｄａであり得る。本発明の有機リンカーの種類としては、イミド、アミド、アミン、エステル、カルバメート、尿素、チオエーテル、チオカルバメート、チオカーボネート、及びチオ尿素が挙げられるが、これらに限定はされない。他の種類の有機リンカーも本発明において有用であることは、当業者には理解される。

【００１６】

「チオール」とは－ＳＨ官能基を指す。

【００１７】

「チオール反応性基」とは、チオールと反応することで、硫黄原子に対し共有結合を形成することが可能な基を指す。代表的なチオール反応性基としては、チオール、ＴＮＢ－チオール、ハロアセチル、アジリジン、アクリロイル、ビニルスルホン、ＡＰＮ（３－ア

リールプロピオロニトリル）、マレイミド、及びピリジルジスルフィドが挙げられるが、これらに限定はされない。チオール反応性基とチオールの反応はジスルフィド又はチオエーテルを形成し得る。

【００１８】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書では同義的に使用されており、あらゆる長さの天然アミノ酸及び合成アミノ酸、並びに、天然アミノ酸に類似した様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。「ペプチド」という用語は、融合タンパク質を包含し、融合タンパク質としては、Ｎ末端にメチオニン残基を持つ又は持たない、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種リーダー配列との融合物及び同種リーダー配列との融合物；免疫学的にタグ付けされたタンパク質；などが挙げられるが、これらに限定はされない。ペプチドはさらに、翻訳後修飾ペプチドも包含する。

【００１９】

「ＶＨＨ」とは、本明細書で使用される場合、シングルドメインの重鎖抗体を指す。

【００２０】

「ＤＡＲＰｉｎ」とは、設計されたアンキリンリピートタンパク質を指し、これは、高度に特異的で高親和性の標的タンパク質結合を示すことができる、遺伝子操作がなされた抗体模倣タンパク質である。

【００２１】

「アルファヘリックス」又は「αヘリックス」は、タンパク質の二次構造における共通モチーフであり、右ねじれの高次構造であって、この高次構造においては、全ての骨格内Ｎ－Ｈ基が、タンパク質配列に沿って４残基前に位置しているアミノ酸の骨格内Ｃ＝Ｏ基に水素結合している。αヘリックスは、古典的にはポーリング－コリー－ブランソンα－ヘリックスとして、又は3.6_{13}－ヘリックスとしても知られており、この3.6_{13}は、ヘリックスターン当たりの平均残基数（３．６）と、水素結合によって形成された環には１３個の原子が含まれていることを表している。αヘリックスを含有するペプチドは、αヘリックス状（α－ｈｅｌｉｃａｌ）と言われる。このようなペプチドは、一部がαヘリックス状である場合もあれば、全体がαヘリックス状である場合もある。当該技術分野で理解されるように、αヘリックスは少なくとも４個のアミノ酸残基を有する。いくつかの実施形態において、αヘリックスは４～４０個のアミノ酸を有する。

【００２２】

また、本明細書に記載の化合物又はペプチドの製薬上許容される塩が提供される。「製薬上許容される」又は「生理学的に許容される」とは、化合物、塩、組成物、剤形、及び他の物質が、動物用又はヒト用の製薬学的用途に適した医薬組成物を調製する際に有用であることを言う。

【００２３】

「医薬組成物」とは、本明細書で使用される場合、特定の成分を特定の含量で含む製品、及び、直接的又は間接的に、特定の成分同士を特定の含量で組み合わせた結果得られるあらゆる製品を指す。医薬組成物は、通常、生物学的用途において安全である。

【００２４】

「製薬上許容される賦形剤」とは、本明細書で使用される場合、活性薬剤の投与と対象による吸収を助ける物質を指す。本発明で有用な製薬上許容される賦形剤としては、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、甘味剤、加香剤、及び着色剤が挙げられるが、これらに限定はされない。他の製薬上許容される賦形剤も本発明で有用であることは、当業者には認められるところである。

【００２５】

本明細書に記載のコンジュゲートは、製薬上許容される塩として、又は適切である場合は遊離塩基として、調製及び／又は製剤化され得る。製薬上許容される塩は、遊離塩基形態の化合物の非毒性塩であり、当該遊離塩基の所望の薬理活性を有する。これらの塩は無機酸若しくは無機塩基又は有機酸若しくは有機塩基から誘導され得る。例えば、塩基性の

窒素を含有するコンジュゲートは、当該化合物を無機酸又は有機酸と接触させることにより、製薬上許容される塩として調製され得る。製薬上許容される塩の非限定例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオン酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン－１，４－二酸塩、ヘキシン－１，６－二酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、プロピルスルホン酸塩、ベシル酸塩、キシレンスルホン酸塩、ナフタレン－１－スルホン酸塩、ナフタレン－２－スルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、γ－ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、及びマンデル酸塩が挙げられる。他の好適な製薬上許容される塩のリストはＲｅｍｉｎｇｔｏｎ： Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ， ２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ， Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ， Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ， Ｐａ．， ２００６に見出される。

【００２６】

本明細書で開示されるコンジュゲートの「製薬上許容される塩」の例には、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム）、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）、アンモニウム及びNR_4^+（式中、ＲはC_1～C_4アルキル）などの適切な塩基から誘導される塩も包含される。また、ナトリウム塩又はカリウム塩などの塩基付加塩も包含される。

【００２７】

「治療有効量」とは、本明細書で使用される場合、投与目的である治療効果を奏する投与量を指す。正確な投与量は治療目的に依存することとなり、公知の手法を用いて当業者によって確認可能である（例えば、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ， Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ （ｖｏｌｓ． １－３， １９９２）； Ｌｌｏｙｄ， Ｔｈｅ Ａｒｔ， Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇ （１９９９）； Ｐｉｃｋａｒ， Ｄｏｓａｇｅ Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎｓ （１９９９）； ａｎｄ Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ： Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ， ２０ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ， ２００３， Ｇｅｎｎａｒｏ， Ｅｄ．， Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ， Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ参照）。感作細胞では、治療有効用量は、非感作細胞に対する従来の治療有効用量よりも少なくなることがある。

【００２８】

「治療」又は「治療する」又は「治療すること」とは、本明細書で使用される場合、有益又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。本開示の目的上、有益又は所望の結果としては、症状の緩和、及び／又は症状の程度の低減、及び／又は疾患若しくは状態と関連した症状の悪化の阻止が挙げられるが、これらに限定はされない。１つの実施形態において、「治療」又は「治療すること」には以下のうちの１又は複数が含まれる：ａ）疾患又は状態を抑制すること（例えば、疾患若しくは状態に起因する１若しくは複数の症状を減らすこと、及び／又は疾患若しくは状態の程度を低減すること）；ｂ）疾患又は状態に関連した１又は複数の症状の発達を遅くすること、又は止めること（例えば、疾患若しくは状態を安定化すること、疾患又は状態の悪化又は進行を遅延すること）；並びに、ｃ）疾患又は状態を緩和すること、例えば、臨床症状の後退を引き起こすこと、病状を改善すること、疾患の進行を遅延すること、生活の質を上昇させること、及び／又は生存を延長させること。

【００２９】

「予防」とは、疾患を患っている患者において、臨床的罹患状態の進行を防止又は遅延

させることを言う。
【００３０】
本発明の「対象」は哺乳動物であり、この哺乳動物はヒト又はヒト以外の哺乳動物とすることができ、例えば、イヌ、ネコ、ラット又は同種のものなどの伴侶動物、又は、ウマ、ロバ、ラバ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、若しくはウシなどの農用動物である。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。
【００３１】
ＩＩ．コンジュゲート
いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートは以下の式Ｖのコンジュゲートであって：
（Ｘ－Ｙ）$_{n}$－Ｚ　（Ｖ）、
式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；
それぞれのＹは有機リンカーであり；
Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；
下付き文字ｎは１～１０００の整数である、
コンジュゲートである。
【００３２】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは、互いに独立して、抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗インターロイキン－１βペプチドである。
【００３３】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、単鎖ｓｃＦｖ、シングルドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤（engineered Kunitz-type inhibitor）である。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはモノクローナルＩｇＧである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはＩｇＧ断片である。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはシングルドメイン重鎖ＶＨＨである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはＤＡＲＰｉｎである。
【００３４】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１１８、及び１４５～１５１のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０１～１０９及び１４８～１５４のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。
【００３５】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９５、１０１～１０６、及び１１１～１１８のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。
【００３６】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドである：
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、

ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ
ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲ
ＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱ
ＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）。

【００３７】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０１を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０２を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０３を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０４を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０６を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【００３８】

それぞれのペプチドは、カリフォルニア州サンディエゴのブロード・ファーム社によって提供されているものなどの、抗体薬物複合体を形成するための、当該技術分野において一般的に知られている種々の有機リンカーによって、生体適合性ポリマーに連結されていることがある。バイオコンジュゲート結合を形成する方法は、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇｒｅｇ Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎに記載されている。有機リンカーは、アミン、カルボニル、カルボキシル、及び活性化エステルと反応するものであったり、（銅の存在下又は非存在下で）クリックケミストリーを介して反応するものであったり、あるいは、チオールと反応性であるものであったりする。

【００３９】

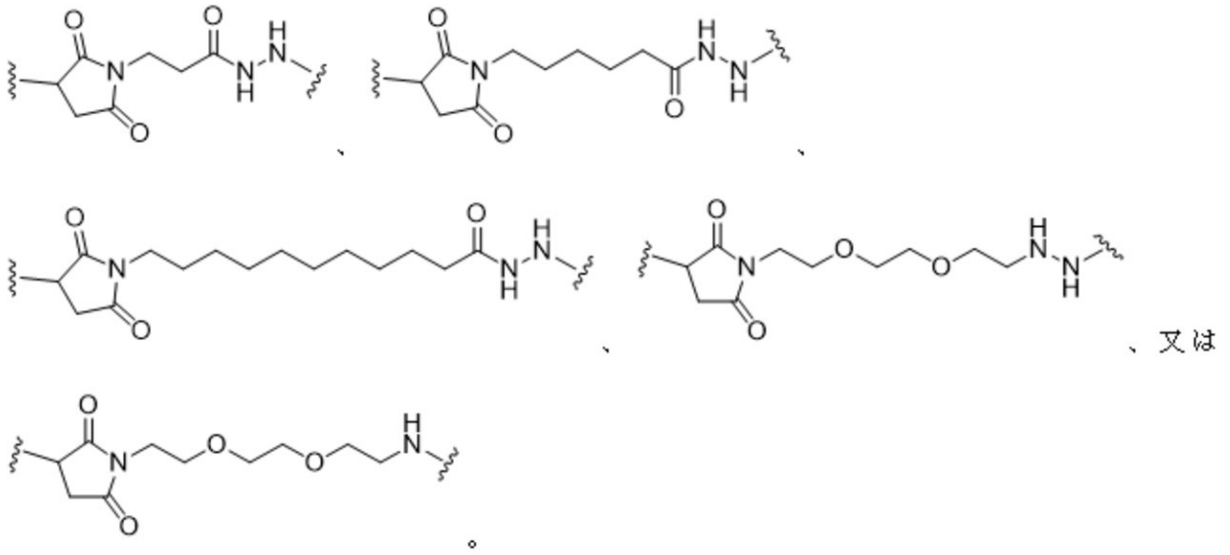
代表的な有機リンカーとしては、アミド又はジスルフィドが挙げられ、あるいは、無水コハク酸、スクシンイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｎ－クロロスクシンイミド、Ｎ－ブロモスクシンイミド、無水マレイン酸、マレイミド、ヒダントイン、フタルイミドなどの反応性基から形成されるものである。本発明で有用な有機リンカーは、低分子であり、通常、約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有し、マレイミドと、アミン又はヒドラジドとからなる２つの官能基を含有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、スルフィド結合と、約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有する有機リンカーとを介して、ポリマーに共有結合的に連結されている。いくつかの実施形態において、有機リンカーは約１００Ｄａ～約３００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、有機リンカーはスクシンイミドを含む。いくつかの実施形態において、有機リンカーは、Ｎ－β－マレイミドプロピオン酸ヒドラジド（ＢＭＰＨ）、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）、Ｎ－アミノエチルマレイミド、Ｎ－κ－マレイミドウンデカン酸ヒドラジド（ＫＵＭＨ）、ヒドラジド－ＰＥＧ２－マレイミド、アミン－ＰＥＧ２－マ

レイミド、ヒドラジド－ＰＥＧ３－マレイミド、又はアミン－ＰＥＧ３－マレイミドを用いて形成される。

【００４０】

いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有する：

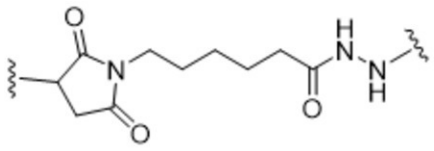
【化５】



【００４１】

いくつかの実施形態において、有機リンカーはＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）であり得る。

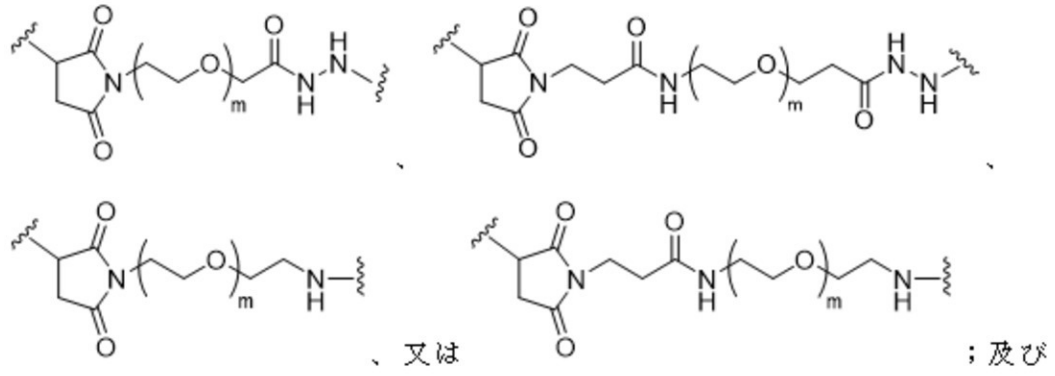
【化６】



【００４２】

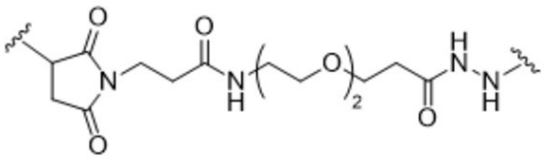
いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有し：

【化７】

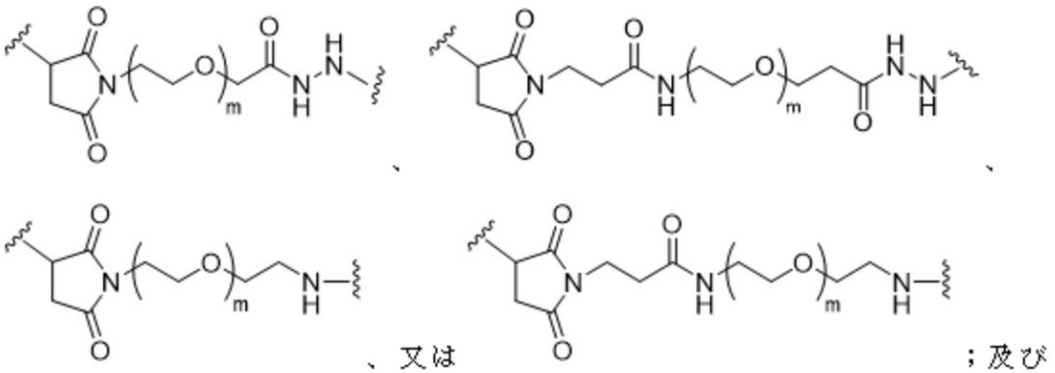


上式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｍは１～１００の整数である。

【００４３】
いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有する：
【化８】

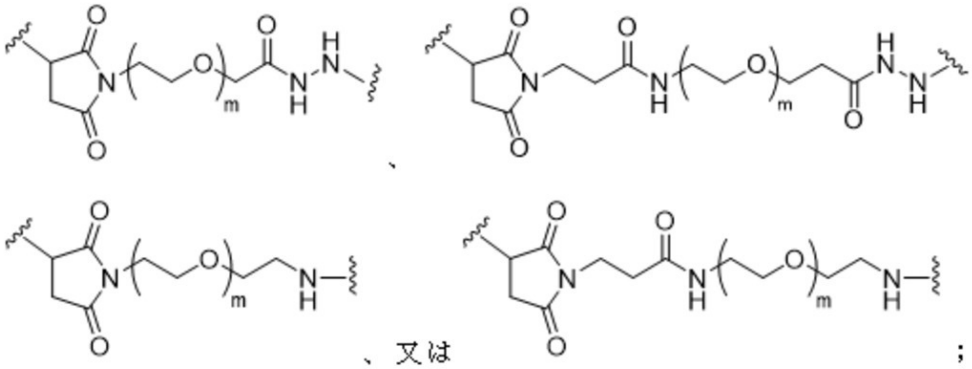


上記の構造を有する有機リンカーはＭＰ２Ｈとして知られている。
【００４４】
いくつかの実施形態において、それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：
【化９】



上式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。
【００４５】
いくつかの実施形態において、Ｚは約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｚは約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｚは約０．８ＭＤａの分子量を有する。
【００４６】
いくつかの実施形態において、式Ｖのコンジュゲートは以下の式Ｖａの構造：
（$X^1-X^2-Y)_n-Z$　（Ｖａ）、
（式中、
それぞれのX^1は、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗インターロイキン－１βペプチドである；
それぞれのX^2はαヘリックスを含むペプチドリンカーであり；
それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

【化１０】



上式中、
Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；
下付き文字ｍは１～３００の整数である）
を有する。

【００４７】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{1}は、配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、及び１１１～１１８のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

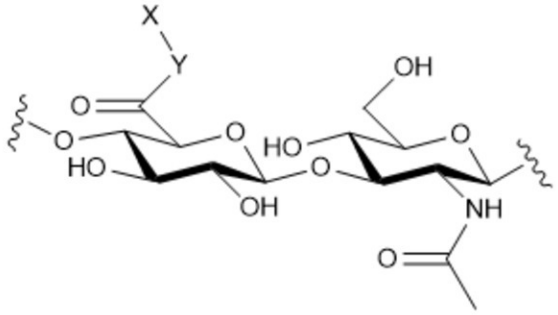
【００４８】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{2}は以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである：
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、
ＡＥＥＥＥＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、
ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は
ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）。

【００４９】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{2}はＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

【００５０】
いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{1}は配列番号１０７を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのＸ^{2}は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{1}は配列番号１０８を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのＸ^{2}は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸ^{1}は配列番号１０９を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのＸ^{2}は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

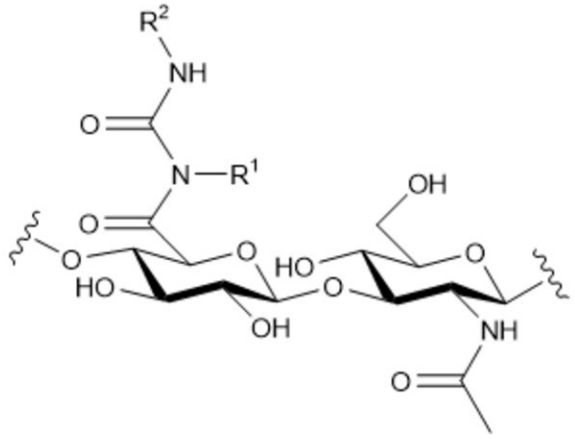
【００５１】
いくつかの実施形態において、式Ｖのコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であり：
（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$　（ＶＩ）、
式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎

症性ペプチドであり；
それぞれのＹは有機リンカーであり；
それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：
【化１１】



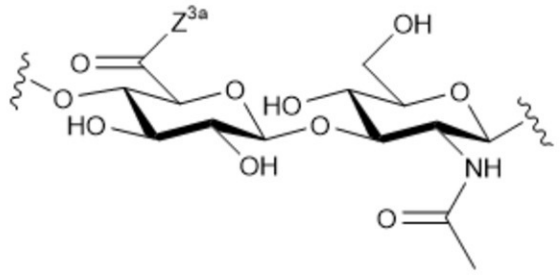
；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：
【化１２】



；

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：
【化１３】



；

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；
それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；
それぞれのＺ^{3a}は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；
それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；
下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；
下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。

【００５２】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１１８、及び１４５～１５４のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０１～１０９及び１４８～１５４のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【００５３】

いくつかの実施形態において、それぞれのR^1及びR^2は、互いに独立して、C_1～C_3アルキル又は－（C_1～C_3アルキル）－NR^3R^4である。いくつかの実施形態において、それぞれのR^1及びR^2はエチル又は－（CH_2）$_3$－NMe_2である。いくつかの実施形態において、それぞれのR^1はエチルであり；それぞれのR^2は－（CH_2）$_3$－NMe_2である。いくつかの実施形態において、それぞれのR^1は－（CH_2）$_3$－NMe_2であり；それぞれのR^2はエチルである。

【００５４】

いくつかの実施形態において、それぞれのR^3及びR^4は、互いに独立して、C_1～C_3アルキルである。

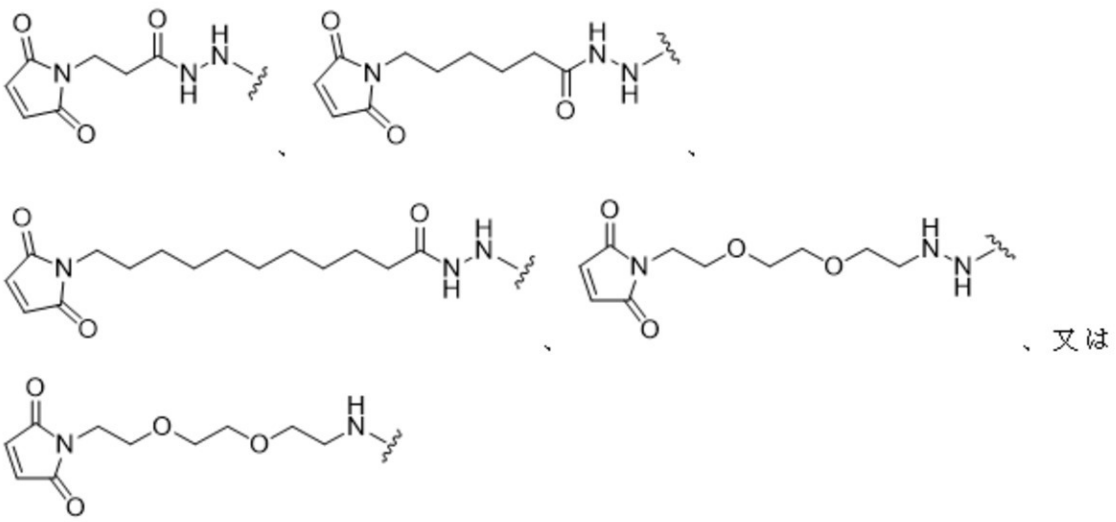
【００５５】

いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートの作製は、有機リンカーを生体適合性ポリマーに共有結合させ、その後、ペプチドを上記有機リンカーに共有結合させることを含む。いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートの作製後、未反応の有機リンカーが生体適合性ポリマー上に存在する。未反応の有機リンカーの構造は当該有機リンカーしだいであり、当業者には理解されるだろう。

【００５６】

代表的な未反応の有機リンカーとしては以下が挙げられるが、これらに限定はされない：

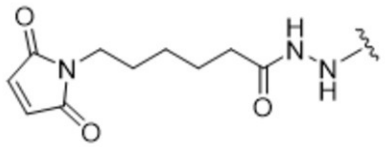
【化１４】



【００５７】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有する。

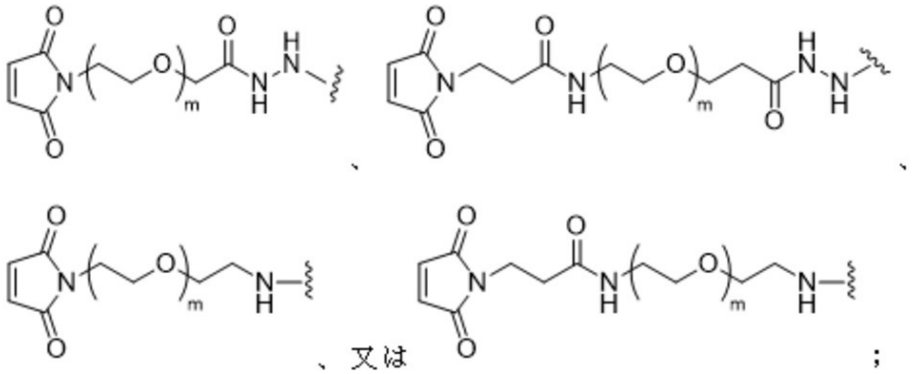
【化１５】



【００５８】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有し：

【化１６】



、又は

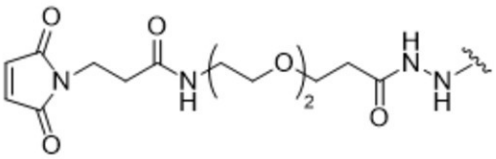
；

式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｍは１～１００の整数である。

【００５９】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有する。

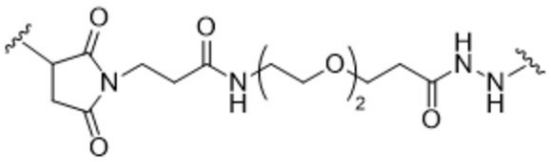
【化１７】



【００６０】

いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有し：

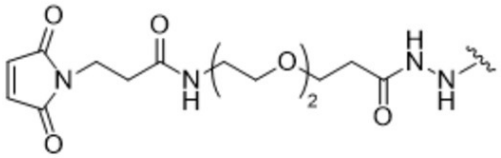
【化１８】



；

未反応の有機リンカーは以下の構造を有し：

【化１９】



【００６１】

いくつかの実施形態において、コンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であり：

（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$　（ＶＩ）、

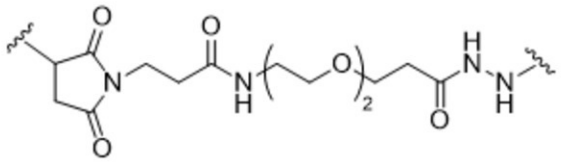
式中、

それぞれのＸは、互いに独立して、以下を含む抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗ＩＬ－１βペプチドであり：

ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ
ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲ
ＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱ
ＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）；

それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

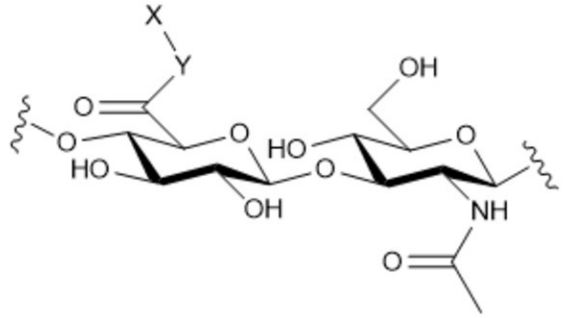
【化２０】



；

それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：

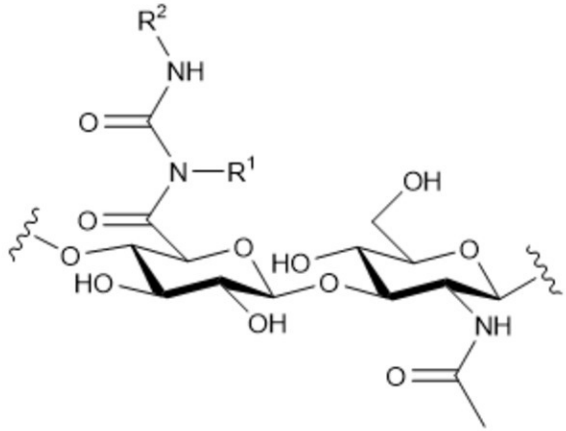
【化２１】



；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：

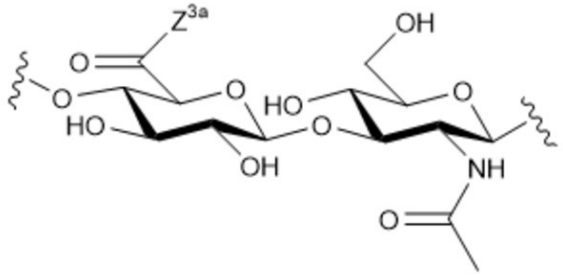
【化２２】



；

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化２３】



；

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；

それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；

それぞれのＺ^{3a}は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；

それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；

下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；

下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。

【００６２】
いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～８００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～４５０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～２４０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～６０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約２％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～３０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。
【００６３】
いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートは、本明細書に記載されているようなぶどう膜炎を治療する方法で使用するためのものである。
【００６４】
ＩＩＩ．組成物
いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載されているような医薬組成物に関する。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載されているようなコンジュゲートと、製薬上許容される賦形剤と、を含む医薬組成物である。
【００６５】
Ａ．製剤
本発明のコンジュゲートから医薬組成物を製剤化する際、製薬上許容される担体は固体であっても液体であってもよい。固形製剤としては散剤、カシェ剤、及び分散顆粒剤が挙げられる。固体担体は１種又は複数種の物質とすることができ、希釈剤、結合剤、保存剤、崩壊剤、又は封入材として働くものであってもよい。製剤化及び投与の技術に関する詳細は、科学文献及び特許文献で充分な説明がなされており、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、マック出版社、イーストン、ペンシルベニア州（「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ」）の最新版を参照されたい。
【００６６】
散剤では、担体は微細固体であり、微細な有効成分との混合物の状態にある。錠剤では、有効成分は必要な結合特性を有する担体と好適な比率で混合されており、所望の形状及びサイズに圧縮されている。散剤及び錠剤は、好ましくは、５％又は１０％から７０％の本発明のコンジュゲートを含有する。
【００６７】
液体製剤としては、水剤、懸濁剤、及び乳剤が挙げられ、例えば、水溶液又は水／プロピレングリコール溶液などである。非経口注射の場合、液体製剤は、水性ポリエチレング

リコール溶液に溶解させて製剤化することができる。

【００６８】

経口使用において好適な水溶液は、本発明のコンジュゲートを水に溶解し、所望により好適な着色剤、加香剤、安定剤、及び粘稠化剤を添加することで、調製することができる。経口使用に好適な水性懸濁剤は、微細有効成分を、以下を含んだ水に分散させることにより調製することができる：天然又は合成のゴム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシル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、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム及びアラビアゴムなどの粘稠性物質、並びに、天然ホスファチド（例えば、レシチン）、酸化アルキレンと脂肪酸の縮合物（例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、エチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルとの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、又はエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）などの分散剤又は湿潤剤。水性懸濁液は、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エチル又はｐ－ヒドロキシ安息香酸ｎ－プロピルなどの１又は複数の保存剤、１又は複数の着色剤、１又は複数の香味剤、及びスクロース、アスパルテーム、又はサッカリンなどの１又は複数の甘味剤も含有することがある。製剤は浸透圧を調整することができる。

【００６９】

また、固形製剤も包含され、使用の直前に、経口投与用の液体製剤に変換されることが意図される。このような液体製剤としては水剤、懸濁剤、及び乳剤が挙げられる。これらの製剤は、有効成分に加えて、着色剤、加香剤、安定剤、緩衝剤、人工及び天然の甘味剤、分散剤、増粘剤、溶解補助剤などを含有してもよい。

【００７０】

油懸濁剤は、本発明のコンジュゲートを、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、若しくはヤシ油などの植物油、又は流動パラフィンなどのミネラルオイル；又はこれらの混合物に懸濁することにより、製剤化することができる。油懸濁剤には、蜜蝋、固形パラフィン、又はセチルアルコールなどの粘稠化剤を含有させることができる。口当たりの良い経口剤とするために甘味剤を加えることができ、例えばグリセロール、ソルビトール、又はスクロースなどである。これらの製剤は、アスコルビン酸などの抗酸化剤を加えることで保存することができる。注射用油状媒体の例としては、Ｍｉｎｔｏ，　Ｊ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｅｘｐ．　Ｔｈｅｒ．　２８１　：９３－１０２，　１９９７を参照されたい。本発明の医薬製剤は水中油型乳剤の形態とすることもできる。油性相は、上記の植物油若しくはミネラルオイル、又はこれらの混合物とすることができる。好適な乳化剤としては、アラビアゴム及びトラガカントゴムなどの天然ゴム、ダイズレシチンなどの天然ホスファチド、ソルビタンモノオレエートなどの脂肪酸及びヘキシトール無水物由来のエステル又は部分エステル、並びに、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなどのこれらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物が挙げられる。乳剤には、シロップ剤及びエリキシル剤を製剤する場合のように、甘味剤及び香味剤を含有させることもできる。このような製剤には、粘滑剤、保存剤、又は着色剤を含有させることもできる。

【００７１】

本発明の組成物は、体内徐放用のミクロスフェアとして送達することもできる。例えば、ミクロスフェアは、皮下にゆっくりと放出する薬剤含有ミクロスフェアの皮内注射を介した投与用に（Ｒａｏ，　Ｊ．　Ｂｉｏｍａｔｅｒ　Ｓｃｉ．　Ｐｏｌｙｍ．　Ｅｄ．　７：６２３－６４５，　１９９５を参照　；生分解性注射用ゲル製剤としての投与用に（例えば、Ｇａｏ　Ｐｈａｒｍ．　Ｒｅｓ．　１２：８５７－８６３，　１９９５を参照）；又は、経口投与用ミクロスフェアとしての投与用に（例えば、Ｅｙｌｅｓ，　Ｊ．　Ｐｈａｒｍ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　４９：６６９－６７４，　１９９７を参照）、製剤化することができる。経皮経路及び皮内経路はともに、数週間又は数か月間に亘っての一定の送達を可能にする。

【００７２】
別の実施形態において、本発明の組成物は、眼内への硝子体内投与又は関節の関節腔内などの、体腔内への非経口投与用に製剤化することができる。投与用の製剤は、通常、本発明の組成物が製薬上許容される担体に溶解された溶液を含むこととなる。許容できる媒体及び溶媒の中で使用可能なものは、水及び等張食塩水であるリンゲル液である。加えて、無菌の不揮発性油が溶媒又は懸濁媒として従来より使用できる。この目的のために、あらゆる無刺激の（ｂｌａｎｄ）不揮発性油を使用することができ、例えば合成モノグリセリド又は合成ジグリセリドが挙げられる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も同様に注射剤の製剤で使用できる。これらの溶液は無菌であり、望ましくない物質を通常含まない。これらの製剤は従来の周知の滅菌法で滅菌されてよい。製剤には、生理的条件を近似させるために、製薬上許容される補助剤を必要に応じて含有させてもよく、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどのｐＨ調整剤、ｐＨ緩衝剤、毒性調整剤などである。これらの製剤中の本発明の組成物の濃度は大幅に変わることがあり、主に液量、粘度、体重などに基づいて、選択された特定の投与様式及び患者の要求に従って、選択されることとなる。ＩＶ投与又は硝子体内投与の場合、製剤は、無菌の注射用製剤とすることができ、例えば、無菌の注射用の水性又は油性の懸濁液などである。この懸濁液は、好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用いて、既知の技術に基づいて製剤化することができる。無菌注射用製剤は、１，３－ブタンジオール溶液などの、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤又は溶媒中の、無菌注射用の溶液又は懸濁液とすることもできる。

【００７３】
別の実施形態において、本発明の組成物の製剤は、細胞膜と融合する、すなわちエンドサイトーシスを起こす、リポソームの使用により、すなわち、エンドサイトーシスを引き起こす細胞の表面膜タンパク質受容体に結合するリガンドを、リポソームに結合したもの、又は、オリゴヌクレオチドに直接結合したもの、を使用することにより、送達することができる。リポソームを用いることにより、特にリポソーム表面が標的細胞に特異的なリガンドを担持している場合、又は別の方法で特定の臓器を優先的に対象とする場合、インビボにおいて本発明の組成物の送達を標的細胞に集中させることができる。（例えば、Ａｌ－Ｍｕｈａｍｍｅｄ，Ｊ．Ｍｉｃｒｏｅｎｃａｐｓｕｌ．１３：２９３－３０６，１９９６；Ｃｈｏｎｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：６９８－７０８，１９９５；Ｏｓｔｒｏ，Ａｍ．Ｊ．Ｈｏｓｐ．Ｐｈａｒｍ．４６：１５７６－１５８７，１９８９参照）。

【００７４】
脂質ベースの薬物送達システムとしては、脂質溶液、脂質乳液、脂質分散液、自己乳化型薬物送達システム（ＳＥＤＤＳ）、及び自己マイクロ乳化型薬物送達システム（ＳＭＥＤＤＳ）が挙げられる。特に、ＳＥＤＤＳ及びＳＭＥＤＤＳは、水性媒体中に自発的に分散し、微細エマルション（ＳＥＤＤＳ）又はマイクロエマルション（ＳＭＥＤＤＳ）を形成することができる脂質、界面活性剤、及びコサーファクタントの等方性混合物である。本発明の製剤で有用な脂質には、あらゆる天然脂質又は合成脂質が含まれ、ゴマ油、オリーブ油、ヒマシ油、ピーナッツ油、脂肪酸エステル、グリセロールエステル、Ｌａｂｒａｆｉｌ（登録商標）、Ｌａｂｒａｓｏｌ（登録商標）、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ（登録商標）、Ｓｏｌｕｔｏｌ（登録商標）、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）、Ｃａｐｒｙｏｌ（登録商標）、Ｃａｐｍｕｌ（登録商標）、Ｃａｐｔｅｘ（登録商標）、及びＰｅｃｅｏｌ（登録商標）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【００７５】
Ｂ．投与
本発明のコンジュゲート及び組成物は、経口的方法、非経口的方法、及び局所的方法を含む、あらゆる適切な手段で送達され得る。いくつかの実施形態において、送達法は硝子体内送達法である。

【００７６】

医薬製剤はユニットドーズ形態であることが好ましい。そのような形態では、製剤は、本発明のコンジュゲート及び組成物を適切な量含有するユニットドーズに分割される。ユニットドーズ形態はパッケージ化された製剤とすることができ、パッケージは個別量の製剤を含有し、例えば、バイアル又はアンプル内にパッケージ化された錠剤、カプセル剤、及び散剤などである。

【００７７】

本発明のコンジュゲート及び組成物は他の薬剤と同時投与することができる。同時投与には、他の薬剤の０．５時間、１時間、２時間、４時間、６時間、８時間、１０時間、１２時間、１６時間、２０時間、又は２４時間以内に、本発明のコンジュゲート及び組成物を投与することが含まれる。また、同時投与には、同時に、およそ同時に（例えば、互いに約１分間以内、約５分間以内、約１０分間以内、約１５分間以内、約２０分間以内、又は約３０分間以内）、又は任意の順番で順次に、投与することも含まれる。さらに、本発明のコンジュゲート及び組成物は、それぞれ、好ましい１日当たり投与レベルを達成するために、１日１回、又は１日２回、３回、若しくはそれ以上の回数投与することができる。

【００７８】

いくつかの実施形態において、同時投与は、合剤によって、すなわち、本発明のコンジュゲート及び組成物と任意の他の薬剤とを含む単一医薬組成物を調剤することによって、達成できる。あるいは、各種成分は別々に製剤化することもできる。

【００７９】

本発明のコンジュゲート及び組成物と、任意の他の薬剤は、任意の好適な量で存在させてよく、様々な要因に依存する可能性があり、対象の体重及び年齢、疾患の状態などが挙げられるが、これらに限定はされない。好適な投与量範囲としては、約０．１ｍｇ～約１００００ｍｇ、又は約１ｍｇ～約１０００ｍｇ、又は約１０ｍｇ～約７５０ｍｇ、又は約２５ｍｇ～約５００ｍｇ、又は約５０ｍｇ～約２５０ｍｇが挙げられる。好適な投与量には、約１ｍｇ、約５ｍｇ、約１０ｍｇ、約２０ｍｇ、約３０ｍｇ、約４０ｍｇ、約５０ｍｇ、約６０ｍｇ、約７０ｍｇ、約８０ｍｇ、約９０ｍｇ、約１００ｍｇ、約２００ｍｇ、約３００ｍｇ、約４００ｍｇ、約５００ｍｇ、約６００ｍｇ、約７００ｍｇ、約８００ｍｇ、約９００ｍｇ、又は約１０００ｍｇも含まれる。組成物には他の適合性の治療薬を含有させることもできる。本明細書に記載のコンジュゲートは、互いに組み合わせて、グルココルチコイド受容体を調節する際に有用であることが知られている他の活性薬剤と組み合わせて、又は単独では有効でないが活性薬剤の効力に寄与し得る補助剤と組み合わせて、投与することができる。

【００８０】

くつかの実施形態において、本発明の組成物は、本明細書に記載されているようなぶどう膜炎を治療する方法で使用するためのものである。

【００８１】

ＩＶ．治療法

いくつかの実施形態において、本発明は、ぶどう膜炎の治療を必要とする対象におけるぶどう膜炎の治療のための、本明細書に記載されているようなコンジュゲート又は組成物を含む、方法及び／又は使用に関する。ぶどう膜炎は、眼球の中間層が炎症を起こしている、赤色である、及び／又は肥大している場合に生じている眼疾患である。ぶどう膜と呼ばれるこの層には、眼に栄養を与える多くの血管がある。ぶどう膜炎は重要な眼組織に損傷を与え、永久的な視力喪失をもたらす可能性がある。ぶどう膜炎は前部ぶどう膜炎、中間部ぶどう膜炎、及び／又は後部ぶどう膜炎であり得る。

【００８２】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、ぶどう膜炎の治療を必要とする対象においてぶどう膜炎を治療するための方法であって、前記対象に以下の式Ｖのコンジュゲート：

（Ｘ－Ｙ）$_{n}$－Ｚ　（Ｖ）、

（式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；
それぞれのＹは有機リンカーであり；
Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；
下付き文字ｎは１～１０００の整数である）
の治療有効量を投与することを含む、方法である。

【００８３】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは、互いに独立して、抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗インターロイキン－１βペプチドである。

【００８４】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、単鎖ｓｃＦｖ、シングルドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤である。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはモノクローナルＩｇＧである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはＩｇＧ断片である。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはシングルドメイン重鎖ＶＨＨである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸはＤＡＲＰｉｎである。

【００８５】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１１８、及び１４５～１５４のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【００８６】

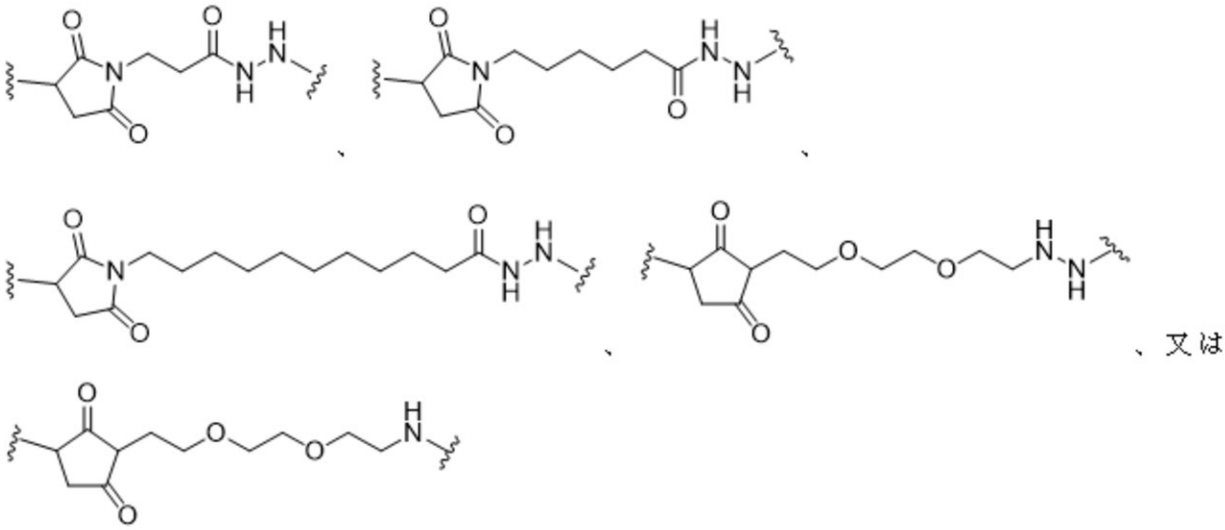
いくつかの実施形態において、それぞれのＸは以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドである：
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ
ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲ
ＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱ
ＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）。

【００８７】
それぞれのペプチドは、カリフォルニア州サンディエゴのブロード・ファーム社又はニューヨーク州シャーリーのクリエイティブ・バイオラボ社によって提供されているものなどの、抗体薬物複合体を形成するための、当該技術分野において一般的に知られている種々の有機リンカーによって、生体適合性ポリマーに連結されていることがある。バイオコンジュゲート結合を形成する方法は、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　３ｒｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，　Ｇｒｅｇ　Ｔ．　Ｈｅｒｍａｎｓｏｎに記載されている。有機リンカーは、アミン、カルボニル、カルボキシル、及び活性化エステルと反応するものであったり、（銅の存在下又は非存在下で）クリックケミストリーを介して反応するものであったり、あるいは、チオールと反応性であるものであったりする。

【００８８】
代表的な有機リンカーとしては、アミド又はジスルフィドが挙げられ、あるいは、無水コハク酸、スクシンイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｎ－クロロスクシンイミド、Ｎ－ブロモスクシンイミド、無水マレイン酸、マレイミド、ヒダントイン、フタルイミドなどの反応性基から形成されるものである。本発明で有用な有機リンカーは、低分子であり、通常、約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有し、マレイミドと、アミン又はヒドラジドとからなる２つの官能基を含有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、スルフィド結合と、約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有する有機リンカーとを介して、ポリマーに共有結合的に連結されている。いくつかの実施形態において、有機リンカーは約１００Ｄａ～約３００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、有機リンカーはスクシンイミドを含む。いくつかの実施形態において、有機リンカーは、Ｎ－β－マレイミドプロピオン酸ヒドラジド（ＢＭＰＨ）、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）、Ｎ－アミノエチルマレイミド、Ｎ－κ－マレイミドウンデカン酸ヒドラジド（ＫＵＭＨ）、ヒドラジド－ＰＥＧ２－マレイミド、アミン－ＰＥＧ２－マレイミド、ヒドラジド－ＰＥＧ３－マレイミド、又はアミン－ＰＥＧ３－マレイミドを用いて形成される。

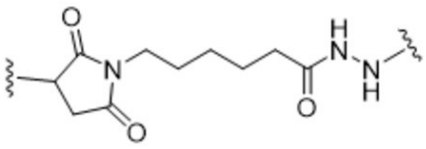
【００８９】
いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有する：

【化２４】



【００９０】
いくつかの実施形態において、有機リンカーはＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）であり得る。

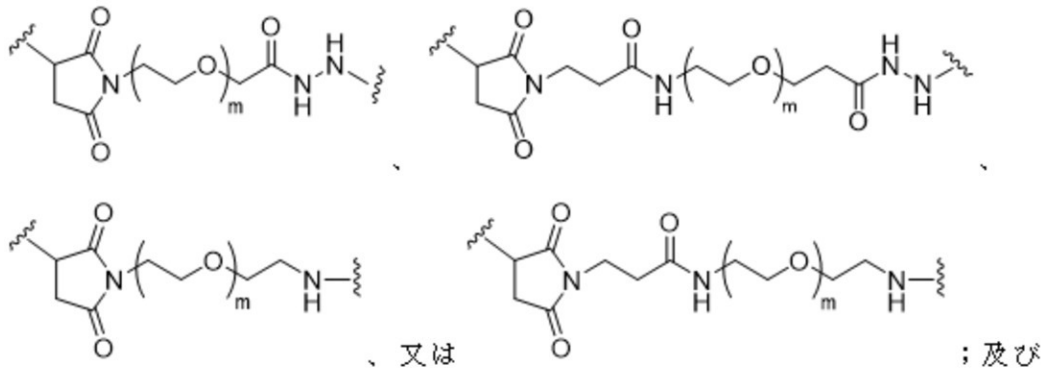
【化２５】



【００９１】

いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有し：

【化２６】



、又は

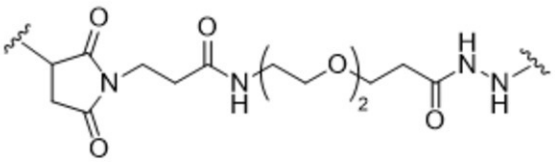
；及び

上式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｍは１～１００の整数である。

【００９２】

いくつかの実施形態において、有機リンカーは以下の構造を有する：

【化２７】

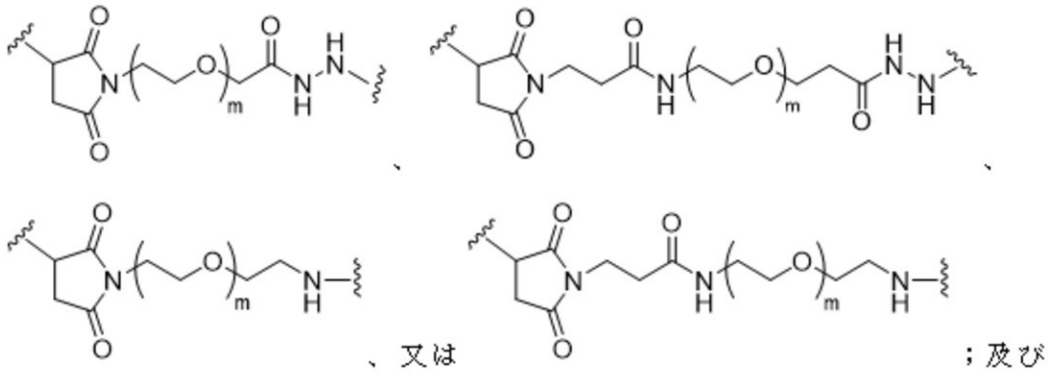


上記の構造を有する有機リンカーはＭＰ２Ｈとして知られている。

【００９３】

いくつかの実施形態において、それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

【化２８】



上式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。

【００９４】

いくつかの実施形態において、Ｚは約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｚは約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、Ｚは約０．８ＭＤａの分子量を有する。

【００９５】

いくつかの実施形態において、式Ｖのコンジュゲートは以下の式Ｖａの構造：

（$X^1-X^2-Y)_n-Z$　（Ｖａ）、

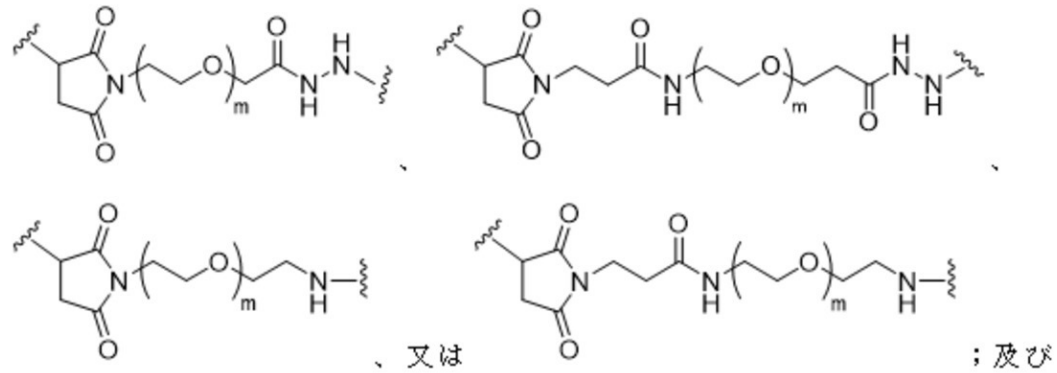
（式中、

それぞれのX^1は約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；

それぞれのX^2はαヘリックスを含むペプチドリンカーであり；

それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：

【化２９】



上式中、

Ｚは約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマーであり；

下付き文字ｍは１～３００の整数である）

を有する。

【００９６】

いくつかの実施形態において、それぞれのX^1は、互いに独立して、抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗インターロイキン－１βペプチドである。

【００９７】

いくつかの実施形態において、それぞれのX^2は以下を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである：

ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、

ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、
ＡＥＥＥＥＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、
ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は
ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）。

【００９８】

いくつかの実施形態において、それぞれのX^1は配列番号１０７を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのX^2は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。いくつかの実施形態において、それぞれのX^1は配列番号１０８を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのX^2は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。いくつかの実施形態において、それぞれのX^1は配列番号１０９を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、それぞれのX^2は配列番号２１を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

【００９９】

いくつかの実施形態において、式Ｖのコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であり：

$$(X-Y-Z^1)_n-(Z^2)_p-(Z^3)_q \quad (\text{VI}),$$

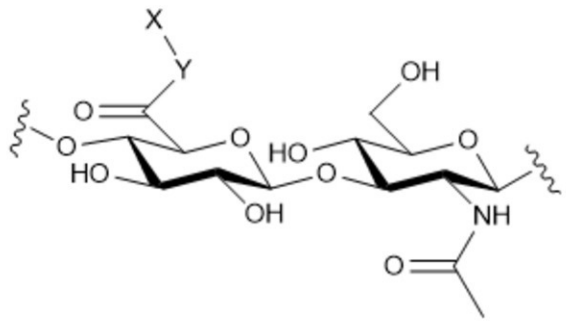
式中、

それぞれのＸは、互いに独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有する抗炎症性ペプチドであり；

それぞれのＹは有機リンカーであり；

それぞれのＸ－Ｙ－Z^1部分は以下の構造を有し：

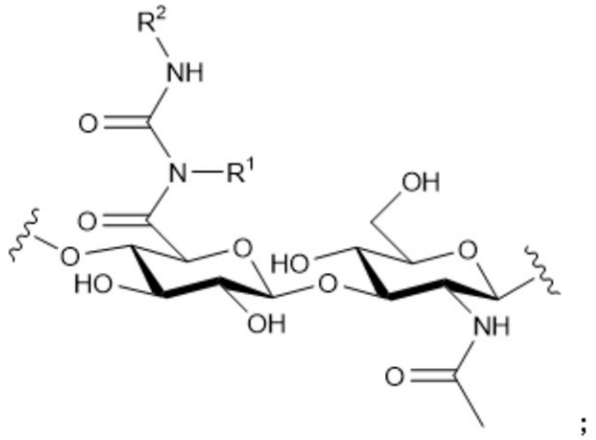
【化３０】



；

それぞれのZ^2は以下の構造を有し：

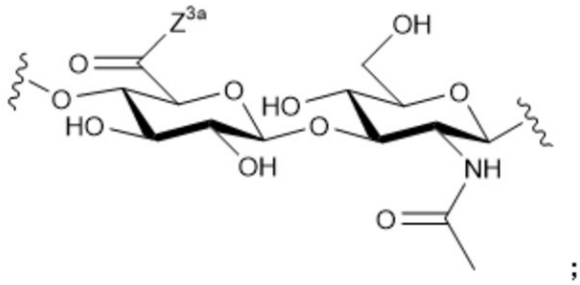
【化３１】



;

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化３２】



;

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；

それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；

それぞれのＺ^{3a}は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；

それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；

下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；

下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

下付き文字ｑは１００～１００００の整数である。

【０１００】

いくつかの実施形態において、それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキル又は－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}である。いくつかの実施形態において、それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}はエチル又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$である。いくつかの実施形態において、それぞれのＲ^{1}はエチルであり；それぞれのＲ^{2}は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$である。いくつかの実施形態において、それぞれのＲ^{1}は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$であり；それぞれのＲ^{2}はエチルである。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{3}$アルキルである。

【０１０２】

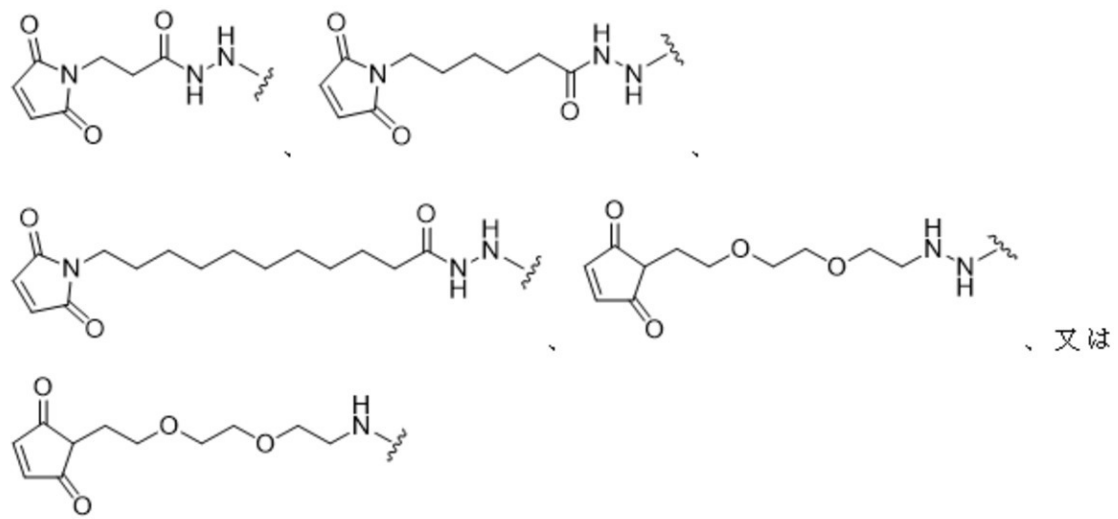
いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートの作製は、有機リンカーを生体適合性ポリマーに共有結合させ、その後、ペプチドを上記有機リンカーに共有結合させることを含む。いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートの作製後、未反応の

有機リンカーが生体適合性ポリマー上に存在する。未反応の有機リンカーの構造は当該有機リンカーしだいであり、当業者には理解されるだろう。

【０１０３】

代表的な未反応の有機リンカーとしては以下が挙げられるが、これらに限定はされない：

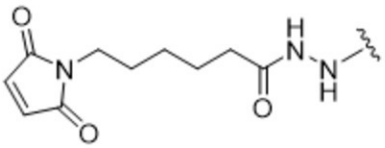
【化３３】



【０１０４】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有する。

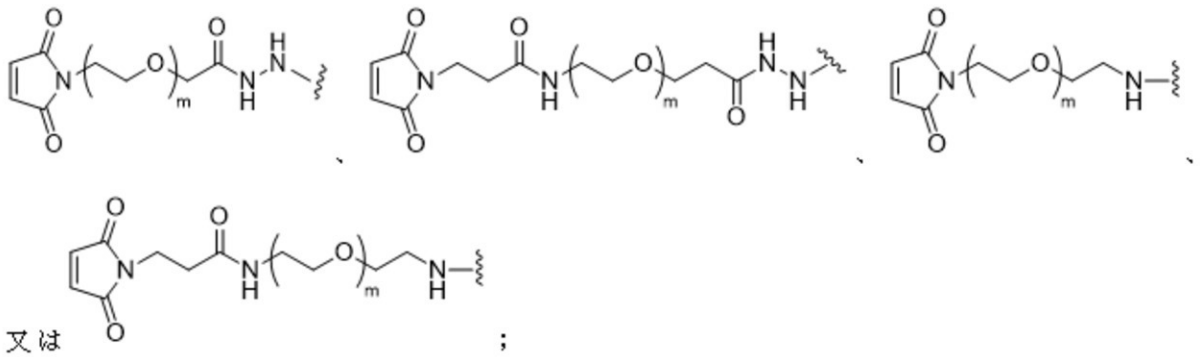
【化３４】



【０１０５】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有し：

【化３５】

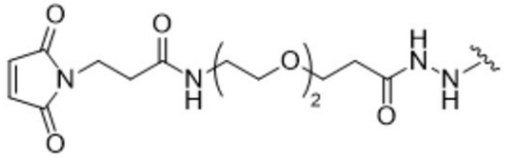


式中、下付き文字ｍは１～３００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｍは１～１００の整数である。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、未反応の有機リンカーは以下の構造を有する。

【化３６】



【０１０７】
いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～８００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～４５０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～２４０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～６０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約２％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～３０の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態において、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり；下付き文字ｑは１０００～３０００の整数である。

【０１０８】
いくつかの実施形態において、ぶどう膜炎は慢性ぶどう膜炎である。いくつかの実施形態において、ぶどう膜炎は慢性非感染性ぶどう膜炎である。

【０１０９】
いくつかの実施形態において、上記方法は硝子体内投与を含む。いくつかの実施形態において、上記方法はコンジュゲートの反復投与を含む。いくつかの実施形態において、上記方法はコンジュゲートを１か月毎、２か月毎、又は３か月毎に投与することを含む。いくつかの実施形態において、上記方法はコンジュゲートを年に２回又は３回投与することを含む。いくつかの実施形態において、上記方法はコンジュゲートを年１回投与することを含む。

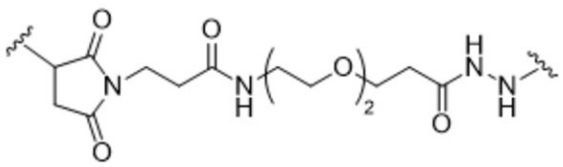
【０１１０】
いくつかの実施形態において、本発明の方法は、慢性非感染性ぶどう膜炎の治療を必要とする対象における慢性非感染性ぶどうぶどう膜炎を治療するための方法であって、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する、以下の式ＶＩのランダム重合体であるコンジュゲートの治療有効量を前記対象に投与することを含み：

$$(X-Y-Z^{1})_{n}-(Z^{2})_{p}-(Z^{3})_{q} \quad (VI),$$

式中、
それぞれのＸは、互いに独立して、以下を含む抗ＴＮＦ－αペプチド又は抗ＩＬ－１β

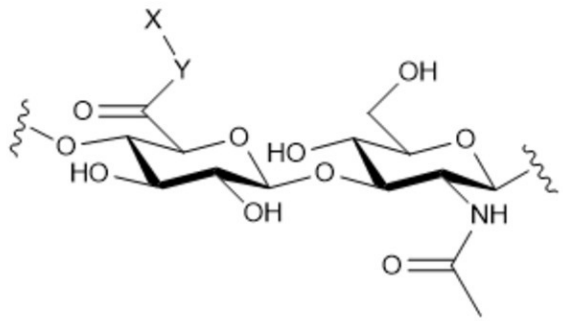
ペプチドであり：
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧ
ＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡ
ＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧ
ＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡ
ＰＧＫＥＲＥＦＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹ
ＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶ
ＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤ
ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳ
ＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲ
ＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬＷＧＱ
ＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）；

それぞれのＹは以下の構造を有する有機リンカーであり：
【化３７】



；

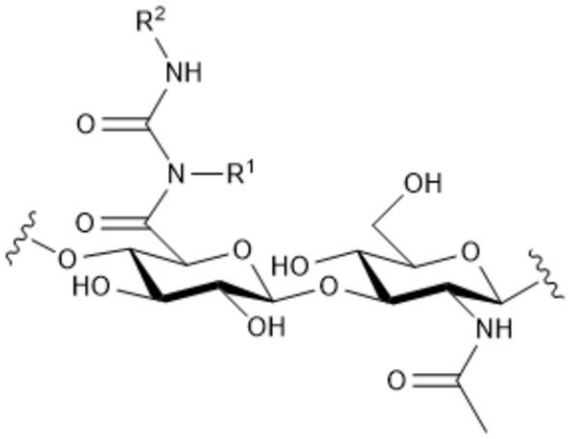
それぞれのＸ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は以下の構造を有し：
【化３８】



；

それぞれのＺ^{2}は以下の構造を有し：

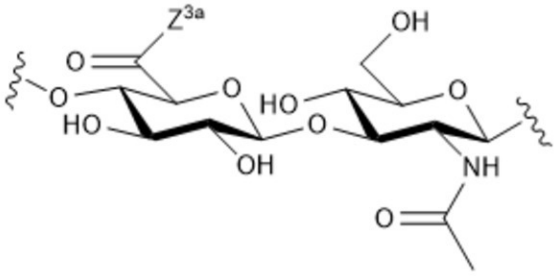
【化３９】



;

それぞれのＺ^{3}は、互いに独立して、以下の構造を有し：

【化４０】



;

それぞれのＲ^{1}及びＲ^{2}は、互いに独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり；

それぞれのＲ^{3}及びＲ^{4}は、互いに独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり；

それぞれのＺ^{3a}は、互いに独立して、ＯＨ又はＹ’であり；

それぞれのＹ’は未反応の有機リンカーであり；

下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；

下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、且つ、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；

下付き文字ｑは１００～１００００の整数である、

方法である。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、式ＶＩのランダム重合体は約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、式ＩＩＩのランダム重合体は約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態において、式ＩＩＩのランダム重合体は約０．８ＭＤａの分子量を有する。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０１を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０２を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０３を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０４を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態において、それぞれのＸは配列番号１０６を含むアミノ

酸配列を有するペプチドである。
【０１１３】
いくつかの実施形態において、本発明の用途は、本明細書に記載されているようなぶどう膜炎を治療する方法のための医薬の製剤化を含む。
【０１１４】
いくつかの実施形態において、対象はヒトである。
【０１１５】
いくつかの実施形態において、本発明の用途は、本明細書に記載されているようなコンジュゲート又は医薬組成物を含む、ぶどう膜炎を治療するための使用である。
【０１１６】
いくつかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されているようなコンジュゲートを含む、ぶどう膜炎を治療することで使用するための医薬組成物である。
【０１１７】
いくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートは、本明細書に記載されているようなぶどう膜炎を治療することで使用するためのコンジュゲートである。
【実施例】
【０１１８】
Ｖ．実施例
実験の詳細を説明する際に、ある特定の略語及び頭字語が使用されている。これらのほとんどは当業者には理解されるものであろうが、以下の表には、これらの略語及び頭字語のうちの多くのリストが含まれている。
【０１１９】

【表１】

表１．　略語及び頭字語のリスト

略語	意味
ａＨ	αヘリックス
ＢＬＩ	バイオレイヤー干渉
ＣＢＢ	クーマシーブリリアントブルー
Ｄａ	ダルトン
ＤＬＳ	動的光散乱
ＤＭＳＯ	ジメチルスルホキシド
ＤＭＴＭＭ	４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド
ＤＰＢＳ	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
ＤＴＴ	ジチオスレイトール
ＥＡＵ	実験的自己免疫性ぶどう膜炎
ＥＤＣ	１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド
ＥＤＴＡ	エチレンジアミン四酢酸
ＥＩＵ	エンドトキシン誘発ぶどう膜炎
ＥＬＩＳＡ	酵素結合免疫吸着測定法
ＦＰＬＣ	高速タンパク質液体クロマトグラフィー
ＨＡ又はＨｙＡ	ヒアルロン酸
ＩＬ	インターロイキン
ＩＴＶ	硝子体内の
ｋＤａ	キロダルトン
ＭＤａ	メガダルトン
ＭＥＳ	２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸
ＭＶＰ	多価タンパク質
ＭＷ	分子量
ＭＷＣＯ	分画分子量
ＮＨＳ	Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
ＰＢＳ	リン酸緩衝生理食塩水
ＲＰＭ	回転毎分
ＲＴ	室温
ＳＥＣ	分子ふるいクロマトグラフィー
ＳＥＣ　ＭＡＬＳ	分子ふるいクロマトグラフィー多角度光散乱法
ＴＣＥＰ	トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン
ＴＮＦα	腫瘍壊死因子α

【０１２０】

実施例１．ペプチドの調製

生物活性ペプチドを、所望によりポリマーへの結合のためのＣ末端ペプチドリンカーを持たせて調製した。

【０１２１】

【表２】

表２．　ペプチド

配列番号	タンパク質	種類
１０１	Ｈｕ＿抗ＴＮＦα－リジッド	ＶＨＨ
１０２	Ｈｕ＿抗ＴＮＦα－ａＨ	ＶＨＨ
１０３	ｍｕ＿抗ＴＮＦα－ａＨ	ＶＨＨ
１０４	ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿３Ｍｕｔ－ａＨ	ＶＨＨ
１０５	抗ＴＮＦα	アフィボディ
１０６	抗ＩＬ－１β－リジッド	ｓｃＦｖ
１０７	Ｈｕ＿抗ＴＮＦα	ＶＨＨ
１０８	Ｈｕ＿抗ＴＮＦα	ＶＨＨ
１０９	Ｈｕ＿抗ＴＮＦα	ＶＨＨ

【０１２２】

実施例２．精製されたチオール反応性ヒアルロン酸コンジュゲート中間体の作製

ヒアルロン酸（ＨＡ、８３０ｋＤａ）を、水又は０．１Ｍの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸緩衝液（ｐＨ５．７）に、４ｍｇ／ｍＬとなるように、穏やかな回転又はニューテーション混合により、室温で一晩懸濁した。３ｍｇ（３．６ｎｍｏｌ、ポリマーの組成とＭＷに基づいて量は変わる）のＨＡの溶液に、ＤＭＳＯ中の約５～１００ｍｇ／ｍＬの原液としてのヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）水和物、１０～１００％ＤＭＳＯ中のチオール反応性リンカー剤（例えば、ヒドラジド－Ｘ－チオール反応性基又はアミン－Ｘ－チオール反応性基、例えば、ＭＰ２Ｈ又はＥＭＣＨ）（１０～１００ｍｇ／ｍＬストック）、及び、水又は０．１Ｍ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．７）中の約１～０．０５ｇ／ｍＬストックとしてのカップリング剤（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）又は４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド）を添加する。上記反応を実行する異なる方法、及び例示方法について、ＨＡ１モル当たり、及びカルボキシレート１つ当たりの各反応物のモル当量を、以下の表に記載する：

【０１２３】

【表３】

表３．　各方法におけるカップリング剤、触媒、及びリンカーの相対比

反応物	方法１	方法２
カップリング剤（ＥＤＣ）	５００～７５０	９５００～１２，０００
ＨＯＢｔ	３０００	５０
リンカー剤	３０００	５００～１０００

【０１２４】

溶液は穏やかなピペッティングにより試薬添加毎に混合し、最終反応物体積は緩衝液で１ｍＬにメスアップした。最終混合物を、方法に応じてオービタルミキサー（ｎｕｔａｔｉｎｇ　ｍｉｘｅｒ）を用いて室温で４５分間～２時間反応させた。反応後、チオール反応性バイオポリマーを、１０ｖ／ｖ％のグリセロール（ｐＨ６．５）ＤＰＢＳ、及び０．０１ｖ／ｖ％のポリソルベート２０（任意）で平衡化された、ＭＷＣＯが７ｋＤａの５～１０ｍＬ　Ｚｅｂａ脱塩スピンカラムを用いて精製し、カラムには樹脂の２０体積％の粗反応物を添加した。所望の中間体を、清浄なコニカルチューブに、遠心機を用いて、室温で、約２５～６０分の溶出時間溶出させた。中間体はすぐにチオールとの反応に使用するか、又は、分注しドライアイス上で急速冷凍した。マレイミド濃度及びポリマー当たりの修飾の数は、ＵＶ吸光度、ＮＭＲ、又は改変エルマン反応アッセイを用いて求めた。

【０１２５】
あるいは、反応ｐＨ又はヒドラジドリンカー、触媒、及びカップリング剤（ＥＤＣ）の当量を高く又は低く変えることで、１バイオポリマー当たりに共有結合的に連結したチオール反応性小分子リンカーの数（結合価）を増加又は減少させた。
【０１２６】
ＥＤＣとＨＯＢｔの代わりに、ＤＭＴＭＭ又はオキシマなどの別のカップリング試薬を用いることができる。活性化バイオポリマー中間体は、分子ふるいクロマトグラフィー、他の脱塩カラム、タンジェンシャルフロー・フィルトレーション、イオン交換クロマトグラフィー、透析、又はアルコール／アセトン沈殿を用いて、反応物から精製することもできる。
【０１２７】
実施例３．コンジュゲート作製
固定濃度のペプチドをポリマーと、様々な所定供給比で、ＰＢＳ中で混合し、４℃又は周囲温度のいずれかで、それぞれ少なくとも４時間及び少なくとも２時間、回転ミキサー又はオービタルミキサーで混合しながら、反応させた（大部分の反応は溶解性を向上させるために室温で行われる）。このコンジュゲーション反応の前に、ペプチド間のジスルフィド架橋を減らすのに相当する、１タンパク質当たり１０～１００当量の、ＤＴＴ又はＴＣＥＰ　ＨＣｌなどの還元剤を添加した。この還元剤は、コンジュゲーション前のタンパク質溶液から脱塩カラム又は緩衝液交換で除去されたか、又は、ポリマービーズ上に固定されたＴＣＥＰの形態で直接的にコンジュゲーション反応に添加された。コンジュゲーション反応中、反応効率を向上させるために、以下のうちの１又は複数が添加された：遊離チオールの酸化を最小限にするための０．５～１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、タンパク質を安定化させるための、及び／又は、タンパク質と活性化されたバイオポリマーとの間の非特異的な相互作用を減らすのに役立つ、ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、炭水化物、又はグリセロール、タンパク質を安定化させるための、及び／又は、タンパク質と活性化されたバイオポリマーとの間の非特異的な相互作用を減らすのに役立つ、塩濃度の増減。未反応のペプチドは以下の方法のうちの１又は複数でペプチド－ポリマーコンジュゲートから除去した：適切な緩衝液（ｐＨはペプチドのｐＩよりも１ユニット超高くするか低くするべきである）に対しての、４℃～室温で、２回、それぞれ４時間、及び１回、少なくとも４時間の、ＭＷＣＯが５０～１０００ｋＤａの透析、ＥＤＴＡ及びｔｗｅｅｎ（登録商標）若しくはペプチドに応じたトレハロースのような他の添加剤を含有する、ＤＰＢＳ（ｐＨ６～８）、若しくは５０ｍＭトリス　１５０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８～８．５）に対してのタンジェンシャルフロー・フィルトレーション、サイズ排除カラムを用いたＦＰＬＣポリッシング、コンジュゲートのポリマー成分と結合するように設計されたアフィニティークロマトグラフィーカラムを用いたＦＰＬＣポリッシング、又はコンジュゲートの選択的沈殿。反応効率充分に高いのであれば（存在する未反応タンパク質が４％未満）、精製は必要でない場合がある。
【０１２８】
あるいは、活性化ポリマーの各溶液に、ペプチドを、適切なペプチド：ポリマーモル供給比で添加し、さらに、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０を最終濃度０．０１％～０．０３％となるように添加した（任意）。この溶液を、２時間～一晩、撹拌しながら、回転ミキサー（約５ｒｐｍ）又はオービタルミキサーにより、周囲温度で、反応させた。未反応のペプチドは、１００～１０００ｋＤａ　ＭＷＣＯの膜を使用する、０．０１～０．０３％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０を含有（任意）する、リン酸緩衝生理食塩水又は等価なクエン酸若しくはコハク酸緩衝生理食塩水（ｐＨ及び使用した緩衝塩はペプチドに依存）に対しての、３回～５回にわたる、それぞれ４～１８時間の、４℃～室温での、透析で除去した。別の方法としては、適切な緩衝液に対してのタンジェンシャルフロー・フィルトレーションやサイズ排除カラムを使用するＦＰＬＣポリッシングが挙げられる。所望により、ペプチドに応じて、タンパク質安定性を強化するために、ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、ＥＤＴＡ、及び炭水化物のような添加剤を添加した。

【０１２９】
【表４】

表４：ヒアルロン酸－タンパク質コンジュゲートの反応条件

コンジュゲートＩＤ	方法	反応性チオール（μＭ）	ペプチド	ポリマー（μＭ）	ペプチド（μＭ）	反応後の未コンジュゲートペプチドの％
１	２	－	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト）－リジッド（配列番号１０１）			－
２	２	７５．８５	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト）－リジッド（配列番号１０１）	０．５４	３８．０２	－
３	１	２９９．２１	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト）－ａＨ（配列番号１０２）	１．８５	３２９．２０	－
４	１	１６６．５９	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト）－ａＨ（配列番号１０２）	１．２３	３３３．１７	１．８
５	１	１９０．５９	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ（配列番号１０３）	１．１５	２０９．６０	＜ＬＯＤ
６	１	４１２．７８	抗ＴＮＦα　３ＭＵＴ　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ（配列番号１０４）	３．０３	４５４．０６	－
７	１	３０３．９１	抗ＴＮＦα　３ＭＵＴ　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ（配列番号１０４）	２．２２	３３４．３２	１３．３
８	２	－	抗ＴＮＦα　アフィボディ（配列番号１０５）	１．１１	６４．３５	－
９	２	－	抗ＩＬ－１β　ｓｃＦｖ－リジッド（配列番号１０６）	０．０９	５．３６	－
１０	１	５１５．０２	抗ＴＮＦα　３ＭＵＴ　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ（配列番号１０４）	３．０５	５６６．５３	１２．２
１１	１	６４６．１３	抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト）－ａＨ（配列番号１０２）	３．２０	７１０．７４	３．８
１２	２	６１０．６７	ＨｕａＴＮＦα　３ＭＵＴ　ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４９）	３．０３	６７１．７３	４．７
１３	２	６１０．５２	ＨｕａＴＮＦα　５ＭＵＴ　ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１５０）	３．０３	６７１．５７	３．２
１４	２	４３０．３６	ＨｕａＴＮＦα　７ＭＵＴ　ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１５１）	２．１３	４７３．４０	３．１

＜ＬＯＤ＝検出限界未満

【０１３０】
下記の表のコンジュゲートは、ヒアルロン酸（８３０ｋＤａ又は８５０ｋＤａのロット）を用いて作製した。精製後、コンジュゲーション反応の生成物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離により分析し、２０％未満のペプチドモノマーが分離用ゲルに進入したことと、９０％超のペプチドが巨大分子コンジュゲートとして濃縮用ゲルの頂部に存在したことが確認された（図１Ａ～図１Ｆ）。さらに、タンパク質濃度、非コンジュゲート型ペプチドのパーセント、コンジュゲート型ペプチドのパーセント、結合価（コンジュゲート型ペプチドのポリマーに対するモル比）、及び流体力学的半径（R_h）について、反応生成物を分析し

た。タンパク質濃度はＡ２８０での分光光度法に基づいて求め、非コンジュゲート型タンパク質のパーセントはＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルのデンシトメトリー分析によって求め、流体力学的半径は動的光散乱（ＤＬＳ）を用いて測定した。

【０１３１】

【表５】

表５．コンジュゲート

コンジュゲート番号	配列番号	方法番号	有機リンカー	タンパク質結合価（ＵＶ）	タンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）	K_d（ｎＭ、ＢＬＩ）	R_h（ｎｍ、ＤＬＳ）	R_h（％ＰＤ）
１	１０１	２	ＥＭＣＨ	９	０．０９４	－	－	－
２	１０１	２	ＭＰ２Ｈ	５５	０．３９±０．０２	≦０．００１		－
３	１０２	１	ＭＰ２Ｈ	６５	１．２４±０．０１	≦０．００１	８７．０９±９．８７	５４±８
４	１０２	１	ＭＰ２Ｈ	１２０	２．４６±０．０２	－	－	－
５	１０３	１	ＭＰ２Ｈ	１２１	２．２５±０．０８	≦０．００１	－	－
６	１０４	１	ＭＰ２Ｈ	５１	４．７７±０．０２	≦０．００１	７６．８±１．５８	－
７	１０４	１	ＭＰ２Ｈ	９８	２．６７±０．０２	≦０．００１	７６．４２±５．８９	－
８	１０５	２	ＥＭＣＨ	２１	０．１５±０．０１	０．１５２	－	－
９	１０６	２	ＥＭＣＨ	１５	０．０３０±０．００	０．３５３	－	－
１０	１０４	１	ＭＰ２Ｈ	９６．５	３．８０±０．０７	≦０．００１	９９．１４±５．０４	７１．０４±１３．１３
１１	１０２	１	ＭＰ２Ｈ	１３１	６．８０±０．１７	≦０．００１	１３５．８０±１０．７７	７８．２６±２１．９７
１２	１４９	２	ＭＰ２Ｈ	９９	４．３３±０．０１	≦０．００１	７０．１２±４．９８	４８．７４±１４．９８
１３	１５０	２	ＭＰ２Ｈ	１０２	６．２３±０．２３	≦０．００１	７１．６４±７．６４	４１．６５±１４．６７
１４	１５１	２	ＭＰ２Ｈ	１００	３．０２±０．３１	０．０１１５	９６．１０±９．４５	６５．０２±１８．７０

【０１３２】

実施例４．抗炎症性タンパク質を含むＭＶＰの効力

一例として、コンジュゲーション用にペプチドリンカー及びチオールリンカーを含む抗炎症性タンパク質を設計した。これらの抗体をＨｙＡにコンジュゲートすることで、一連の原子価の、ポリマー骨格とサイズが異なる、多価コンジュゲートを作製した。バイオレ

イヤー干渉法（ＢＬＩ）を行って、生理活性を評価するためのものとして精製されたＭＶＰの結合動態を、ＧａｔｏｒＰｒｉｍｅ（ゲーター・バイオ社）又は類似装置と、ＡＶＩタグ付きリガンドの場合のストレプトアビジンコートプローブ（カタログ番号１６０００２）又はＦｃタグ付きリガンドの場合の抗ヒトＦｃ（カタログ番号１６０００３）コートプローブと、を用いて定量化した。アナライト及びリガンドは全て、ＢＬＩ緩衝液（１×ｄＰＢＳ、０．１ｗ／ｖ％ＢＳＡ及び０．１ｖ／ｖ％ポリソルベート２０、０．２μｍフィルター滅菌）で希釈した。表６に記載されているような各アナライトに適したリガンドは、まず製造業者の指示書に従って再懸濁し、長期間使用のために保管した。非コンジュゲート型アナライトは５μＭ～１ｎＭの範囲の最高濃度に希釈した。多価コンジュゲートは、多価コンジュゲート全体の分子量（（タンパク質のＭＷ×結合価）＋ポリマーのｍｗ）に基づいて、５０～１．０ｎＭの最高濃度に希釈した。各リガンド－アナライト対の濃度範囲は、１０μＭから１ｎＭまでの広い濃度範囲で滴定を行う予備的な範囲探索実験において、用量依存的な結合親和性を示すものである。

【０１３３】

全ての試薬は使用前に少なくとも３０分間かけて室温に平衡化させた。１サンプル当たり２つのプローブ（１つはキネティックアッセイ用、１つはリガンドなしのコントロール用）を、ゲーター・バイオ社製Ｍａｘプレート内で、２５０μＬのＢＬＩ緩衝液（ＰＢＳｐＨ７．４、０．２％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）及び０．２％ＢＳＡ、０．２μｍでフィルター滅菌）中、最低１０分間、平衡化した。リガンドは予備反応での成績に基づいて２５～１００ｎＭの固定濃度にＢＬＩ緩衝液で希釈した。アナライトは、予備反応で決定された最高濃度にＢＬＩ緩衝液で調製し、ＢＬＩ緩衝液を用いて２～５回１：３連続希釈した（表６）。黒色平底未コーティング９６ウェルプレート（グライナー・バイオワン社、カタログ番号６５５２０９、又は同等品）に、リガンド、アナライトの希釈液を２００μＬずつ列単位で分注し、リガンド及びアナライトの列ごとに１列分のＢＬＩ緩衝液を分注した。各アナライト列の１ウェルは、参照減算用のブランクとして使用されるＢＬＩ緩衝液とした。サンプルプレートを、Ｇａｔｏｒの、２５℃に設定された傾斜したプラットフォーム上に置いた。Ｇａｔｏｒ　Ｋアッセイにおけるローティングステップとキネティクスステップは、表７に示されたダブルリファレンス及びステップ時間を用いて設定した。リガンドは、シグナルが０．４～０．６ｎｍに達するまでロードした後、バッファー列に戻し、６０～９０秒間ベースライン測定を行った。次に、キネティック測定を、上記ステップパラメーターを用いて開始した。リガンドがロードされたプローブでキネティック測定が完了したら、リガンドがロードされていない新しいプローブを用いてリガンドなしのコントロールを実行した。リガンドをロードしたプローブで分析したのと同じキネティックアッセイのタイミングとサンプルウェルを使用した。このデータは、サンプルとプローブ間の非特異的相互作用を補正するために使用した。

【０１３４】

キネティックアッセイが完了したら、Ｇａｔｏｒソフトウェアを用いてデータを解析した。１秒後から１８０秒後までの結合時間を含めるように生データを補正した。Ｙ軸は結合ステップの開始時点に揃え、ステップ間補正を使用した。データのサビツキー・ゴーレイフィルタリングを使用した。どのプローブ及びウェルをバッファーリファレンスとするかをソフトウェア内で指定することで、サンプルはダブルリファレンスに設定した。次に、各アッセイが、（キネティックアッセイウェル－リガンドなしアッセイウェル）－（キネティックアッセイバッファーリファレンスウェル－リガンドなしアッセイバッファーウェル）という式によるダブルリファレンスとなるように、各アッセイのリファレンス差し引き式を編集した。同じＭＶＰの全ての滴定は色でグループ化し、パラメーターは、グローバルな、Ｒｍａｘ非連結フィッティングによる、結合と解離の両方を含む、１：１結合モデルに調整した。対象となる時間枠を、解離の１００秒間のみを含むように移動させた。結合曲線をフィッティングし、残差が実際の曲線から１０％を超えて変動していないか、全体のR^2が０．９８を超え、全体のX^2が３．０未満であることを確認した。キネティクスと変数K_D、K_{on}、及び反応を記録した。

【０１３５】
【表６】

表６．　ＢＬＩのリガンド及びアナライトのペア

ＢＬＩリガンド	タグ	アナライト	供給業者	カタログ番号
ヒトＴＮＦα	Ａｖｉ、Ｈｉｓ	抗ＴＮＦα	アクロ・バイオシステムズ社	ＴＮＡ－Ｈ８２Ｅ３
ヒトＩＬ－１β	Ｆｃ	抗ＩＬ－１β	アクロ・バイオシステムズ社	ＩＬＡ－Ｈ５２５ｃ

【０１３６】
【表７】

表７．　ＢＬＩ法における速度論的定量化のためのパラメーター及び結果の仕様

パラメーター	**使用ウェル**	**ステップ時間（秒）又は情報**
プローブ平衡化	Ｍａｘプレートのバッファー	＞６００
基本パラメーター		５Ｈｚ、３０秒平衡化、１００ｒｐｍの振盪
バッファー		ＰＢＳ　ｐＨ７、０．２％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）及び０．２％ＢＳＡ、０．２μｍフィルター滅菌
ＢＬＩ実験パラメーター		
ベースライン	バッファー列１	６０
リガンドローディング	１００～２５ｎＭリガンド	ローディングシグナルが０．４～０．６である場合
ベースライン	バッファー列１	９０
結合	ＭＶＰサンプル	１８０
解離	バッファー列２	３００
リガンドなしコントロール（ブランクプローブ）		
ベースライン	バッファー列２	９０
結合	ＭＶＰサンプル	１８０
解離	バッファー列２	３００

【０１３７】
実施例５．ＭＶＰの流体力学的半径
コンジュゲーションのためのペプチドリンカーとチオールリンカーとを含む抗炎症剤を設計した。これらの薬剤をＨｙＡにコンジュゲートすることで、一連の原子価の、ポリマー骨格とサイズが異なる、多価コンジュゲートを作製した。サイズを評価するためのものとして精製された非コンジュゲート型のタンパク質又はＭＶＰの流体力学的半径（R_h）を定量化するために、ワイアット社製ＤｙｎａｐｒｏシングルキュベットＮａｎｏｓｔａｒ、プレートリーダー、又は類似装置のいずれかを用いて、動的光散乱法（ＤＬＳ）を行った。
【０１３８】
サンプルは少なくとも３０分間かけて室温に平衡化させた。この溶液を、ポリソルベート２０を含んでいない０．１μｍフィルター滅菌した調製用緩衝液で希釈し、１００μＬ中１００ｎＭの最終濃度にし（典型的には１：１０希釈）、１．５ｍＬ遠心チューブ内で

優しくトリチュレーションして、又は、オービタルミキサー（ｎｅｕｔａｔｏｒ）上に最大３０分間置いて混合した。大型の凝集物と塵粒子は、チューブを遠心機において５０００ｇで５分間スピンすることで取り除くことができた。ＮａｎｏＳｔａｒにおけるシングルキュベット測定では、サンプル溶液のサンプル４０μＬを、蓋付きのワイアット・テクノロジー社製使い捨てマイクロキュベット（ワイアット社カタログ番号ＷＮＤＭＣ）にロードし、タッピングして泡を取り除き、装置内に置き分析を行った。プレートリーダーを用いた複数回の読み取りでは、２５～３５μＬのサンプルをクリアボトム黒色ウェル３８４ウェルプレート（コーニング社、カタログ番号Ｐ８８０２－３８４又は同等品）に添加した。サンプルウェル内の泡を取り除いた。本明細書中のＤＬＳによるこのサンプルとその他のサンプル分析のための装置設定を表８に示す。ＤＬＳ取得パラメーターを表８に、結果の仕様を表９に示す。精製し、ろ過したＭＶＰの代表的なＤＬＳ強度プロットを図３に示す。

【０１３９】

【表８】

表８．　ＤＬＳ取得パラメーター

装置	
レーザー波長	６６４ｎｍ
レーザー出力	１００％
自動減衰	オン
温度	２５℃
取得時間（秒）	５～１０
取得数	５
固定パラメーター	
相関関数ローカットオフ	１．５μｓ
相関関数ハイカットオフ（μｓ）	１０３，０００μｓ
ピーク半径ローカットオフ	０ｎｍ
ピーク半径ハイカットオフ	１Ｅ６ｎｍ
分析タイプ	Ｄｙｎａｌｓ
測定時間制限係数	５
自動減衰時間制限	６０
サンプル	
Ｍｗ－Ｒモデル	球状タンパク質
溶媒	ＰＢＳ
ｄｎ／ｄｃ	０．１８５
Ｒｇモデル	球

【０１４０】

【表９】

表９．　多価タンパク質コンジュゲートのＤＬＳの結果の仕様

ピーク	非コンジュゲート型タンパク質	多価タンパク質コンジュゲート
０～２５ｎｍ（非コンジュゲート型）	＞８０％強度	＜１３％強度
２５～１０００ｎｍ	＞１３％強度	＞８０％強度
＞１０００ｎｍ	＜２％強度	＜２％強度

【０１４１】

実施例６．硝子体模倣緩衝液中のＭＶＰの安定性

長期治療として働く場合がある抗炎症性ＭＶＰを評価し、異なる構築物の相対的な安定性を比較するための代用として、熱安定性を用いた。調製用緩衝液で、非コンジュゲート型抗体は１．０ｍｇ／ｍＬに希釈し、抗炎症性ＭＶＰは０．５ｍｇペプチド／ｍＬに希釈した。３×３０μＬの各サンプルをＵＶ－ＶＩＳ適合性３８４ウェルプレート（グライナー・バイオワン社、カタログ番号７８１８０１、又は同等品）内に移し、泡を除去し、ＵＶ透明シールテープ（グライナー・バイオワン社、カタログ番号６７６０７０、又は同等品）でプレートを密封した。温度制御されたプレートリーダー（ＵＶ／ＶＩＳ機能付きＢｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴＸプレートリーダー、又は同等品）を使用し、温度を２５℃から３７℃に上昇させた。プレートを１５分間インキュベートし、各ステップの各ウェルにおける２８０ｎｍでの吸光度を測定した。このプログラムは装置が５０℃に達するまで継続し、サンプルを計６０分間保持し、１５分毎に２８０ｎｍでの吸光度を測定した。各温度で、調製用緩衝液の２８０ｎｍでの参照吸光度（Ａ２８０）値をサンプル測定Ａ２８０値から減算した後、３７℃における測定値に対し正規化し、プロットした。これらの熱安定性プロットを、異なる抗体間、変異体間、及びペプチドリンカー間で比較することで、熱変化に対して最も抵抗性が強いであろう、そしてそれ故に、長期眼内治療に充分な程度に安定性である可能性もより高いであろう、抗炎症性構築物を決定した。

【０１４２】

次に、熱安定性実験の成績優秀品を長期３７℃安定性試験に使用した。ＭＶＰを無菌条件下で合成し、フィルター滅菌ヒト硝子体模倣緩衝液（表１０参照）で約０．４ｍｇ／ｍＬに希釈するか、又は調製用緩衝液中で維持した。これらのサンプルは、使用前に無菌０．２μｍ又は５μｍスピンフィルターを用いてフィルター滅菌するか、又は、抗微生物剤としての０．０１％アジ化ナトリウムと混合した。次に、各サンプルのいくつかの１００～１５０μＬアリコートを無菌９６ウェルプレートのウェルに加え、１つの０日目アリコートを４℃で保存した。残りのウェルは、フィルター滅菌ヒト硝子体緩衝液＋蒸発を最小限にするための０．０１％アジ化ナトリウムで満たした。プレートを３７℃、５％CO_2の標準的な組織培養恒温器内でインキュベートした。離散的な時間点で、各サンプルの１アリコートを無菌条件下でプレートから取り出し、分析した。まず、サンプルのＵＶ－ＶＩＳスペクトラムを２００から６００ｎｍまで１０ｎｍ刻みで取得し、サンプル組成に何らかの劇的な変化がないかをモニターした。次に、生じ得る体積の違いを調整するために、タンパク質濃度を測定した。最高濃度として５～１０ｎＭのＭＶＰを使用する上記ＢＬＩ法を用いて、適切なリガンドに対する結合親和性を測定した。相対的安定性を経時的に評価するために、K_{on}（結合定数）の経時的変化を用いた。半径の経時的変化をモニターするために、サンプルを５０００ｇで５分間スピンして大型凝集物や塵粒子を除去し、上記のＤＬＳ法を用いて、ただし、装置は３７℃とし、サンプル希釈は行わずに、Ｒｈを測定した。

【０１４３】

【表１０】

表１０．　硝子体模倣緩衝液の組成

成分	ｍｇ／ｍＬ
ＮａＣｌ	７．１４
ＫＣｌ	０．３８
$CaCl_2$　$2H_2O$	０．１５４
$MgCl_2$　$6H_2O$	０．２
第二リン酸ナトリウム（NaH_2PO_4）	０．４２
$NaHCO_3$	２．１
ブドウ糖	０．９２
乳酸	０．３５８
$CuSO_4$	8.28×10^{-5}
$ZnSO_4$七水化物	０．０００５６１
$FeCl_2$テトラ水和物	０．０００６１８
トランスフェリン（２つのＦｅ結合部位）	０．０８７８
還元型グルタチオン（ＧＳＨ）	０．０１５４

【０１４４】

実施例７．ペプチド－ポリマーコンジュゲートは硝子体内滞留を示した

確立された薬物動態学モデルにおいて、コンジュゲートの硝子体内滞留時間延長が示された。ニュージーランドホワイト種のウサギ（ｎ＝９）を体重で無作為化された３群に分けた。全ての動物に、５０μＬのＩＴＶ注射で、ｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰを左眼に、非コンジュゲート型ＶＨＨを右眼に、３１Ｇインスリン注射器を用いて受けさせた。両眼に等モル量の抗体投与を受けさせた。注射の１時間後、５日後、及び１０日後の時点で、３匹のウサギからなる１つの群を　　殺し、それらの眼を摘出し、硝子体内ＶＨＨの分析を行った。両眼を急速冷凍し、硝子体（ｖｉｔｒｅｏｕｓ）、網膜、及び眼房水を凍結された眼から単離した。次に、各組織サンプルをビードビーターでホモジナイズした。ホモジナイズ後、ＥＬＩＳＡを用いて、又は、ペプチドをトリプシンで消化し、サンプルをＬＣ／質量分析若しくは類似の方法にかけることで、ＶＨＨ濃度を定量化した。バイオコンジュゲーション後のウサギの眼における硝子体内半減期延長の代表的な結果を図５に示す。

【０１４５】

実施例８．ぶどう膜炎ラットモデルにおけるＭＶＰ効力

ｍｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰの効力について、ぶどう膜炎の症状を充分に低減できる治療効果の奏効を検証した。実験的自己免疫性ぶどう膜炎（ＥＡＵ）ラットモデルを慢性後部ぶどう膜炎ヒトモデルとして用いた。このモデルを、ぶどう膜炎誘発性の光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）での全身免疫によって誘導したところ、ぶどう膜炎の症状は９～１１日後に現れた。ラットの硝子体内に、１２．５μｇのｍｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ（コンジュゲート＃７）処置を行った。ポジティブコントロールとして、デキサメタゾンを使用した。

【０１４６】

雄Ｌｅｗｉｓ系ラットを４群（ｎ＝８）に分け、体重に基づいて無作為化した。各群には、１２．５μｇのｍｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ＿ＣＹＳ　ＭＶＰ（コンジュゲート＃７）（抗マウスＴＮＦα　ＶＨＨを使用）、デキサメタゾン（４０μｇ）、又は溶媒コントロールを与えた。１日目に、ラットを、尾根部及び各大腿部における皮下注射で、０．２ｍＬのフロイントアジュバント中の３０μｇのウシＩＲＢＰペプチドＲ１６で免疫した。８日目及び１０日目に、ラットの眼を、左右とも、いずれかの割り付けられた処置の投与を行う５μＬのＩＴＶ注射で処置した。試験開始前と、７日目、９日目、１１日目、１４日目

に、細隙灯検査で眼炎症の評価を行い、炎症の外観に応じて０～４の臨床的ＥＡＵスコアを割り当てた。１４日目に、動物を安楽死させ、各動物からの一方の眼を組織病理学検査工程にかけ、炎症及び細胞浸潤の外観に基づいて０～４のスコアを割り当てた。ＥＡＵ及び組織病理学的特性を、公表されている標準採点法に基づいてスコア化した。試験結果を図６にまとめる。

【０１４７】

実施例９．第２のぶどう膜炎ラットモデルにおけるＭＶＰ効力

コンジュゲート＃１０の効力について、ぶどう膜炎の症状を充分に低減できる治療効果の奏効を検証した。雄Ｌｅｗｉｓ系ラットを４群（ＥＡＵ誘導群はｎ＝１２、未誘導コントロールはｎ＝８）に分け、体重に基づいて無作為化した。各群には１９μｇのコンジュゲート＃１０、トリアムシノロン（４０μｇ）、又は溶媒コントロールを与えた。１日目に、誘導群のラットに、０．１ｍＬのフロイント完全アジュバント中の２５μｇの光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）ペプチドＲ１６を、各側腹部に計５０μｇ、皮下注射で免疫した。４日目及び８日目に、ラットの眼を、左右とも、割り付けられた処置に基づいて、コンジュゲート＃１０若しくは溶媒コントロールの５μＬ硝子体内（ＩＴＶ）注射で、又は、トリアムシノロンの１μＬ　ＩＴＶ注射で、処置した。試験開始前と、３日目、６日目、１０日目、１２日目、及び１４日目に、細隙灯検査で眼炎症の評価（ａｃｃｅｓｓ）を行い、炎症の外観に応じて０～４の臨床的ＥＡＵスコアを割り当てた。図７Ａ～図７Ｂは、コンジュゲート＃１０の効果が、細隙灯による、及び、炎症性サイトカインレベル又は炎症性制御因子レベルで測られる、眼炎症の低減において、トリアムシノロンに匹敵したことを示している。

【０１４８】

１４日目に、動物を安楽死させ、各動物からの一方の眼を解剖して硝子体液と眼房水に分け、サイトカイン分析を行った。解剖後、各群からの眼房水をプールし、全ての組織を急速冷凍した。マルチプレックスラットサイトカイン／ケモカイン磁気ビーズパネル（ミリポア社、カタログ番号ＲＥＣＹＭＡＧ６５Ｋ２７ＰＭＸ）を用いて、製造業者のプロトコルに従って、組織中の相対サイトカイン濃度を評価した。簡潔に説明すると、眼組織を氷上で解凍し、サンプル体積を測定した。次に、デュプリケートで読み取りを行うため、アッセイ用緩衝液をサンプルに加えて最終体積５５μＬを達成させ、よく混合した。次に、２５μＬのサンプル、標準、又はコントロールをアッセイ用プレートに添加し、２５μＬのビーズと混合し、室温で２時間インキュベートした。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、２５μＬの検出用抗体と１時間インキュベートし、その後、２５μＬのストレプトアビジン（Ｓｔｒｅｐｔａｖａｄｉｎ）－フィコエリトリンと３０分間インキュベートした。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、１２５μＬのＳｈｅａｔｈ　Ｆｌｕｉｄ　Ｐｌｕｓをウェルごとに添加し、その後Ｌｕｍｉｎｅｘで読み取りを行った。各サンプルから回収されたサイトカインの量を、回収された組織の体積に対して正規化し、プロットした。重要な炎症誘発性サイトカイン及び炎症性制御因子のグラフ解析を図７Ｂに示す。選抜したサイトカイン濃度を表１１に示す。トリアムシノロン処置ラットとコンジュゲート＃１０処置ラットとの間で、サイトカインレベルに統計的有意性は確認されなかった。

【０１４９】

【表１１】

表１１．　ぶどう膜炎誘導の１４日後のラットの眼の硝子体（ｖｉｔｒｅｏｕｓ）内のサイトカイン濃度

	濃度（ｎｇ／ｍＬ）±ＳＤ			統計的有意性§
サイトカイン	溶媒コントロール	トリアムシノロン	コンジュゲート＃１０	溶媒コントロール対コンジュゲート＃１０
ＴＮＦα	０．１６９±０．０９７	０．０４６±０．０５１	０．０５８±０．０３８	＊
ＩＬ－１β	２．５５８±１．７６９	０．７２１±０．４４５	０．６６７±０．２７１	＊＊
ＩＬ－１α	５．５３２±３．５２７	１．３２１±０．８４４	１．５１１±０．７０９	＊＊
ＩＬ－６	７５．８５７±４８．９６０	１９．９３６±１７．１５６	２５．５６５±１５．７０２	＊
ＩＦＮγ	８．０４８±４．２８７	２．５４０±１．８０４	３．１１６±１．４３６	＊＊
ＭＣＰ－１	９．４３２±５．２３１	２．７０５±２．６４０	３．８４３±２．４９９	＊

§ＡＮＯＶＡ後のＴｕｋｅｙ検定のｐ値として示されている

【０１５０】

実施例１０．ウサギＴＮＦ－α誘導ぶどう膜炎モデルにおけるＭＶＰ効力

ヒトにおいて、他の炎症性サイトカインを増加させ、非感染性ぶどう膜炎（ＮＩＵ）の眼炎症特性を誘導する、ヒトＴＮＦ－αのＩＴＶ注射を含む、ＴＮＦ－α誘導ぶどう膜炎（ＥＩＵ）ウサギモデルで、抗ＴＮＦα　ＭＶＰを評価した。

【０１５１】

雄ニュージーランドホワイト（ＮＺＷ）種ウサギを、体重に基づいて無作為化された９群に分けた（ｎ＝３）。０日目に、各群に、０．２６ｍｇのｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰ（コンジュゲート＃１１）（４群）若しくは溶媒コントロール（４群）を、両側性５

０μＬ　ＩＴＶ注射で投与するか、又は、注射を行わなかった（１群）。ＩＴＶ薬物送達の１日後、７．５μｇ、５．０μｇ、若しくは２．５μｇのヒトＴＮＦα、又はＰＢＳ溶媒コントロールを、片側性５０μＬ　ＩＴＶ注射で、左眼に送達することで、眼炎症を誘導した。１つの未誘導群は硝子体内注射を受けなかった。ＴＮＦα注射前、並びにＴＮＦα投与の６時間後、２４時間後、及び４８時間後に、眼球検査により炎症の重症度を評価し、リバウンドトノメーターを用いて眼圧を測定した。公表されている尺度に基づいてそれぞれの眼に臨床スコアを割り当てた。ウサギはＴＮＦ－α注射の４８時間後に安楽死させた。結果を図８Ａ～図８Ｂに示す。

【０１５２】

左眼を解剖して眼房水と硝子体液に分け、硝子体液を炎症性サイトカイン分析のための処理にかけることがある。簡潔に説明すると、解剖後の硝子体液を氷上で解凍し、重量を計る。硝子体を、ＰＢＳ　０．０５ｖ．ｖ％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０、１ｗ／ｖ％カゼイン、及び０．０１ｖ／ｖ％プロテアーゼ阻害剤カクテルセットＩＩＩ（シグマ社、カタログ番号５３５１４０）というホモジナイゼーション用緩衝液に、５００ｍｇ硝子体／ｍＬという濃度となるように、優しく混合する。次に、５０μＭ　ＭｇＣｌ$_2$及び１００μＭ　ＣａＣｌ$_2$を含有するＰＢＳ中のウシ精巣ヒアルロニダーゼ（ＭＰバイオケミカルズ社、カタログ番号３７３２６－３３－３）の溶液を、ホモジナイゼーション用緩衝液中の硝子体組織に、０．０４ｍｇのヒアルロニダーゼ／１ｇの硝子体組織という最終濃度となるように加える。組織ホモジナイゼーション反応物を室温で１時間、その後４℃で一晩インキュベートする。最後に、ホモジナイズされた硝子体組織を５０００ｇで５分間スピンし、デブリをペレット化し、サイトカイン分析に使用する。

【０１５３】

マルチプレックスウシサイトカイン／ケモカイン磁気ビーズパネル（ミリポア社、カタログ番号ＢＣＹＴ１－３３Ｋ－１２）を用いて、製造業者のプロトコルに従って、組織中の相対サイトカイン濃度を評価することがある。解剖後の眼房水は解凍してそのまま使用し、硝子体液は上記のようにヒアルロニダーゼ中でホモジナイズする。まず、２５μＬのサンプル、標準、又はコントロールをアッセイ用プレートに添加し、２５μＬのビーズと混合し、室温で２時間インキュベートする。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、２５μＬの検出用抗体と１時間インキュベートし、その後、２５μＬのストレプトアビジン（Ｓｔｒｅｐｔａｖａｄｉｎ）－フィコエリトリンと３０分間インキュベートする。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、１２５μＬのＳｈｅａｔｈ　Ｆｌｕｉｄ　Ｐｌｕｓをウェルごとに添加し、その後Ｌｕｍｉｎｅｘで読み取りを行う。各サンプルから回収されたサイトカインの量を、回収された組織の体積に対して正規化し、プロットする。

【０１５４】

実施例１１．ウサギエンドトキシン誘導ぶどう膜炎モデルにおけるＭＶＰ効力

ヒトにおいて、ＴＮＦαレベルを上昇させ、ＮＩＵの眼炎症特性を誘導する、リポ多糖類（ＬＰＳ）のＩＴＶ注射を含む、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎（ＥＩＵ）ウサギモデルで、ｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰ　ＭＶＰを評価する。

【０１５５】

ＮＺＷ種ウサギを体重に基づいて無作為化された４群に分けた（ｎ＝７、雄３匹／雌３匹、１匹はランダム）。各群には、ｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰ、アダリムマブ若しくはトリアムシノロンというポジティブコントロール、又は、溶媒コントロールを、両側性５０μＬ　ＩＴＶ注射で投与する。２つの群に抗ＴＮＦα　ＭＶＰを投与し、１つの群には、各眼において抗原結合性エピトープの投与量と等モルのアダリムマブを投与する：２２５μｇの総ＶＨＨ抗体、１ｍｇのアダリムマブ、又は１ｍｇのトリアムシノロン。

【０１５６】

ＩＴＶ薬物送達の１５日後、抗ＴＮＦα　ＭＶＰ群の１つを除いて（耐久性コホート）、各動物の左眼への５０μＬのＩＴＶ注射液中の１０μｇのＬＰＳでＥＩＵを誘導する。ＩＴＶ薬物送達の６０日後、同じ方法を用いて耐久性コホートにＥＩＵを誘導する。ＬＰＳ注射前、並びにＬＰＳ投与後６時間及び２４時間の時点で、炎症及びＥＩＵの重症度を

眼球検査により評価する。公表されている尺度に基づいてそれぞれの眼にＥＩＵ臨床スコアを割り当てる。ウサギはＬＰＳ注射の２４時間後に安楽死させる。ＬＰＳ誘導後の眼は、眼房水細胞浸潤、炎症性サイトカイン分析、及び細胞浸潤物を定量化するための組織病理学のための処理にかける。未誘導の右眼は急速冷凍し、硝子体液及び眼房水中の抗ＴＮＦα濃度を測定する。

【０１５７】

実施例１２．ＴＮＦαぶどう膜炎ウサギモデルにおけるＭＶＰの持続性

ＮＺＷ種ウサギを体重に基づいて無作為化された４群に分けた（ｎ＝７、雄３匹／雌３匹、１匹はランダム）。各群には、ｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰ（０．２５ｍｇ）、トリアムシノロン（１ｍｇ）、又は溶媒コントロールを、両側性５０μＬ　ＩＴＶ注射で投与する。２つの群には抗ＴＮＦα　ＭＶＰを投与し、１つの群にはトリアムシノロンを投与する。

【０１５８】

ＩＴＶ薬物送達の１～３０日後、７．５μｇのヒトＴＮＦα、又はＰＢＳ溶媒コントロールを、片側性５０μＬ　ＩＴＶ注射で、左眼に送達することで、眼炎症を誘導する。１つの未誘導群は硝子体内注射を受けなかった。ＩＴＶ薬物送達の６０日後、同じ方法を用いて耐久性コホートにＥＩＵを誘導する。ＴＮＦα注射前、並びにＴＮＦα投与後６時間、２４時間、及び４８時間の時点で、炎症の重症度を眼球検査により評価する。眼圧の測定もリバウンドトノメーターを用いて毎日行う。公表されている尺度に基づいてそれぞれの眼に臨床スコアを割り当てる。ウサギはＴＮＦα注射の４８時間後に安楽死させる。

【０１５９】

左眼を解剖して眼房水と硝子体液に分け、硝子体液を炎症性サイトカイン分析のための処理にかける。簡潔に説明すると、解剖後の硝子体液を氷上で解凍し、重量を計る。硝子体を、ＰＢＳ　０．０５ｖ／ｖ％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０、１ｗ／ｖ％カゼイン、及び０．０１ｖ／ｖ％プロテアーゼ阻害剤カクテルセットＩＩＩ（シグマ社、カタログ番号５３５１４０）というホモジナイゼーション用緩衝液に、５００ｍｇ硝子体／ｍＬという濃度となるように、優しく混合する。次に、５０μＭ　ＭｇＣｌ２及び１００μＭ　ＣａＣｌ２を含有するＰＢＳ中のウシ精巣ヒアルロニダーゼ（ＭＰバイオケミカルズ社、カタログ番号３７３２６－３３－３）の溶液を、ホモジナイゼーション用緩衝液中の硝子体組織に、０．０４ｍｇのヒアルロニダーゼ／１ｇの硝子体組織という最終濃度となるように加える。組織ホモジナイゼーション反応物を室温で１時間、その後４Ｃで一晩インキュベートする。最後に、ホモジナイズされた硝子体組織を５０００ｇで５分間スピンし、デブリをペレット化し、サイトカイン分析に使用する。

【０１６０】

マルチプレックスウシサイトカイン／ケモカイン磁気ビーズパネル（ミリポア社、カタログ番号ＢＣＹＴ１－３３Ｋ－１２）を用いて、製造業者のプロトコルに従って、組織中の相対サイトカイン濃度を評価する。解剖後の眼房水は解凍して使用し、硝子体液は上記のようにヒアルロニダーゼ中でホモジナイズする。まず、２５μＬのサンプル、標準、又はコントロールをアッセイ用プレートに添加し、２５μＬのビーズと混合し、室温で２時間インキュベートする。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、２５μＬの検出用抗体と１時間インキュベートし、その後、２５μＬのストレプトアビジン（Ｓｔｒｅｐｔａｖａｄｉｎ）－フィコエリトリンと３０分間インキュベートする。ウェルを磁気プレート洗浄機で洗浄し、１２５μＬのＳｈｅａｔｈ　Ｆｌｕｉｄ　Ｐｌｕｓをウェルごとに添加し、その後Ｌｕｍｉｎｅｘで読み取りを行う。各サンプルから回収されたサイトカインの量を、回収された組織の体積に対して正規化し、プロットする。

【０１６１】

【表１２－１】

表１２．　配列

名称	配列
ブランク	配列番号１～４
フレームワーク領域１	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）
フレームワーク領域２	ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）
フレームワーク領域３	ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）
フレームワーク領域４	ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）
Ｎｂ４２　ＣＤＲ１	ＦＡＹＳＴＹＳ（配列番号９）
Ｎｂ４２　ＣＤＲ２	ＮＳＧＴＦＲＬＷ（配列番号１０）
Ｎｂ４２　ＣＤＲ３	ＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲ（配列番号１１）
ブランク	配列番号１２～１４
ａＴＮＦａ－ｍｕ　ＣＤＲ１	ＧＴＦＳＳＩＩ（配列番号１５）
ａＴＮＦａ－ｍｕ　ＣＤＲ２	ＳＷＳＧＧＴＴＶ（配列番号１６）
ａＴＮＦａ－ｍｕ　ＣＤＲ３	ＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶ（配列番号１７）
Ｅ１－１　ＣＤＲ１	ＧＧＳＤＡＧＴ（配列番号１８）
Ｅ１－１　ＣＤＲ２	ＳＷＡＧＴＡＷＲ（配列番号１９）
Ｅ１－１　ＣＤＲ３	ＬＧＳＹＥＭＤＨＨ（配列番号２０）
ａＨリンカー	ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）
ＡＥ３Ｋ２Ｒ（２）リンカー	ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）
ＡＥ３Ｋ２Ｒ（３）リンカー	ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）
Ｅ４Ｋ４（２）リンカー	ＡＥＥＥＥＫＫＫＫＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）
ＥＡ３Ｋ（２）リンカー	ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）
アルファリンカー	ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）
ミオシンＶＩリンカー	ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭ ＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）
スポットリンカー	ＰＤＲＶＲＡＶＳＨＷＳＳＣ（配列番号２８）
ＧＴ９リンカー	ＧＴＧＴＧＴＧＴＧＴＧＴＧＴＧＴＧＣ（配列番号２９）
改変リジッドリンカー	ＴＰＴＴＰＰＴＰＴＰＧＧＴＰＰＧＧＧＣ（配列番号３０）
ブランク	配列番号３１～６０

【表１２－２】

Ｎｂ４２	ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＳＬＱＡＧＡＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＶＳＧＫＥＲＥＧ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＳＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＭＬＹＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＩＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳ（配列番号６１）
ＨｕＮｂ４２	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６２）
ＨｕＮｂ４２　Ｐ１４Ａ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６３）
ＨｕＮｂ４２　Ｔ６１Ａ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６４）
ＨｕＮｂ４２　Ｓ７５Ａ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６５）
ＨｕＮｂ４２　Ｌ７９Ｖ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６６）
ＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳ（配列番号６７）
ＨｕＮｂ４２　Ｌ１２１Ｑ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳ（配列番号６８）
ＨｕＮｂ４２　Ｔ６１Ａ　Ａ８８Ｐ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６９）
ＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐ　Ｌ１１５Ｑ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳ（配列番号７０）

【表１２－３】

aTNF－a mu	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREF VGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVY YCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS（配列番号７１）
aTNF－a mu 3MU T	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREF VGAVSWSGGTTVYADSVKGRFTISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVY YCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS（配列番号７２）
aTNF－a VHH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPG KEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS（配列番号７３）
ブランク	配列番号７４～８０
E１－１	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREF VSAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAT YYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号８１）
E１－１ F１１L	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREF VSAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAT YYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号８２）
E１－１ S４９A	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREF VAAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAT YYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号８３）
E１－１ F１１L S４９A	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREF VAAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAT YYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号８４）
E１－１ CDR	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRRFSIEAMGWFRQAPGKEREF VSエイズGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYC AVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号８５）
ブランク	配列番号８６～９０
抗VEGF VHH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREF VVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYY CASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS（配列番号９１）

【表１２－４】

抗ＶＥＧＦ　ＤＡＲＰＩＮ	ＧＳＤＬＤＫＫＬＬＥＡＡＲＡＧＱＤＤＥＶＲＩＬＭＡＮＧＡＤＶＮＡＲＤＳＴＧＷＴＰＬＨＬＡＡＰＷ ＧＨＰＥＩＶＥＶＬＬＫＮＧＡＤＶＮＡＡＤＦＱＧＷＴＰＬＨＬＡＡＡＶＧＨＬＥＩＶＥＶＬＬＫＹＧＡ ＤＶＮＡＱＤＫＦＧＫＴＡＦＤＩＳＩＤＮＧＮＥＤＬＡＥＩＬＱＫＡＡＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号９２ ）
抗ＶＥＧＦ　ＨｕＮｂ２２ ２ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＹＡＹＤＴＹＹＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＧ ＶＡＧＩＴＳＬＶＳＧＶＡＹＹＫＹＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＤＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤ ＴＡＶＹＹＣＡＡＳＲＳＧＬＲＡＲＬＬＲＰＥＬＹＥＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９３）
抗ＶＥＧＦ　ＨｕＮｂ２３ ３ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＶＡＳＧＤＴＹＳＳＡＣＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＧ ＶＡＴＩＣＴＳＴＳＭＲＴＲＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡ ＶＹＹＣＡＴＧＨＴＶＧＳＳＷＲＤＰＧＡＷＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９４）
抗ＶＥＧＦ　ＨｕＮｂ３５ ４ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＬＳＹＲＰＧＹＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＧ ＶＡＩＩＴＴＧＧＶＴＨＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹ ＣＡＬＡＮＷＶＱＦＰＬＲＶＤＧＹＫＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９５）
Ｈｕ＿ａＶＥＧＦ＿ＶＨＨ＿ ３ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＳＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＳＫＧＧＹＫＹＤＡＶＳＬＥＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹ ＣＡＳＳＲＡＹＧＳＳＲＬＲＬＡＤＴＹＥＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９６）
Ｈｕ＿ａＶＥＧＦ＿ＶＨＨ＿ ５ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＳＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＳＫＧＧＹＫＹＤＡＶＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹ ＣＡＳＳＲＡＹＧＳＳＲＬＲＬＡＤＴＹＥＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９７）
Ｈｕ＿ａＶＥＧＦ＿ＶＨＨ＿ ６ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＳＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＳＫＧＧＹＫＹＹＡＶＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹ ＣＡＳＳＲＡＹＧＳＳＲＬＲＬＡＤＴＹＥＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９８）
ブランク	配列番号９９～１００
抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト） －リジッド	ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧ ＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥ ＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰ ＰＧＧＣＤＤＤＤＤＫ（配列番号１０１）
抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（ヒト） －ａＨ	ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧ ＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＡＩＳＲＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴＭＮＮＬＥＰＥ ＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥ ＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号１０２）

【表１２－５】

抗ＴＮＦα　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ	ＱＶＱＬＱＤＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲＦＥＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫＦＰＥＤＴＡＶ ＹＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫ ＡＧＣ（配列番号１０３）
抗ＴＮＦα　３ＭＵＴ　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ	ＱＶＱＬＱＥＳＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＳＡＲＫＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡ ＧＣ（配列番号１０４）
抗ＴＮＦαアフィボディ	ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱＦＲＡＦＩＩＳＬＷＤＤＰＳＱＳＡＮ ＬＬＡＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡＰＫ（配列番号１０５）
抗ＩＬ－１β　ｓｃＦｖ－リンカー－ジッド	ＥＩＶＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱＳＩＤＮＷＬＳＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬ ＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹＣＱＮＴＧＧＧ ＶＳＩＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶＬＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶ ＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳＬＳＳＡＡＭＡＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＩＩＹＤＳＡＳＴＹＹ ＡＳＷＡＫＧＲＦＴＩＳＲＤＴＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥＲＡＩＦＳＧＤＦ ＶＬＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）
Ｈｕ＿ａＴＮＦａＭｕ＿３ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１０７）
Ｈｕ＿ａＴＮＦａＭｕ＿５ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧＴＦＳＳＩＩＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＳＷＳＧＧＴＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１０８）
Ｈｕ＿ａＴＮＦａＨｕ＿７ＭＵＴ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＦＳＤＨＳＧＹＴＹＴＭＧＷＦＲＱＡＰＧ ＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥ ＤＴＡＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩＰＴＳＲＳＶＥＳＹＮＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１０９）
ブランク	配列番号１１０
Ｈｕ＿ａＥＧＦＲ＿３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＳＲＳＹＧＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＧＩＳＷＲＧＤＳＴＧＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＤＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＡＧＳＡＷＹＧＴＬＹＥＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１１）

【表１２－６】

Ｈｕ＿ａＨｅｒ２＿３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＩＴＦＭＲＹＡＭＧＷＹＲＱＡＰＧＫＱＲＥＭ ＶＡＳＩＮＳＧＧＴＴＮＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹ ＣＮＡＲＷＶＫＰＱＦＩＤＮＮＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１２）
Ｈｕ＿ａＰＤ１＿１０２Ｃ３ ３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＳＩＦＳＩＨＡＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＴＷＳＧＧＩＴＹＹＥＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＤＲＡＥＳＳＷＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１３）
Ｈｕ＿ａＰＤ１＿１０２Ｃ１ ２ ３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＳＩＡＳＩＨＡＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＶＩＴＷＳＧＧＩＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＧＤＫＨＱＳＳＷＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１４）
Ｈｕ＿ａＰＤ１＿１０２Ｅ２ ３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＳＩＳＳＩＨＡＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＡＩＴＷＳＧＧＩＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＤＲＡＱＳＳＷＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１５）
Ｈｕ＿ａＰＤ１＿１０２Ｅ８ ３ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＳＩＦＳＩＮＡＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＬＩＳＷＳＧＧＳＴＹＹＥＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＤＲＶＤＳＮＷＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１６）
Ｈｕ＿ａＰＤ１＿１０２Ｈ１ ２ ４ＭＵＴ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＡＦＳＳＧＴＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＡＳＩＰＷＳＧＧＲＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＶＫＥＲＳＴＧＷＤＦＡＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１７）
Ｈｕ　ａカフェイン　３ＭＵ Ｔ	ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲＴＧＴＩＹＳＭＡＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＬＡＴＩＧＷＳＳＧＩＴＹＹＭＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＴＲＡＹＳＶＧＹＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１１８）
ブランク	配列番号１１９～１４４
ＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐ　ａ Ｈ＿ＣＹＳ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＴＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＡ ＫＡＧＣ（配列番号１４５）
ＨｕＮｂ４２　Ｔ６１Ａ　Ａ ８８Ｐ　ａＨ＿ＣＹＳ	ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＡＹＳＴＹＳＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＡ ＶＡＴＩＮＳＧＴＦＲＬＷＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹ ＹＣＡＡＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＡ ＫＡＧＣ（配列番号１４６）

【表１２－７】

HuNb42 A88P L 115Q aH_CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREA VATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVY YCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAA KAGC（配列番号１４７）
抗TNFαアフィボディGI y	CGGGVDNKFNKEVGWAFGEIGALPNLNALQFRAFIISLWDDPSQSAN LLAEAKKLNDAQAPKGGG（配列番号１４８）
Hu_aTNFaMu_3M UT aH_CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREF VGAVSWSGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKA GC（配列番号１４９）
Hu_aTNFaMu_5M UT aH_CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREF VAAISWSGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKA GC（配列番号１５０）
Hu_aTNFaHu_7M UT aH_CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTMGWFRQAPG KEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKE AAAKAGC（配列番号１５１）
IL-2_C125S aH _CYS	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTAEAAAKEA AAKEAAAKAGC（配列番号１５２）
IL-15_5MUT aH _CYS	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMQCFLLSEL QVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEAK NIKEFLQSFVHIVQMFINTSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号１５３ ）
aTNFa_DARPin G3S_CYS	DLGKKLLEVARAGQDDEVRILMANGADVNAADHQSFTPLHLYAIFGH LEIVEVLLKNGADVNASDWHGNTPLHLAAWIGHLEIVEVLLKYGADV NATDHSGSTPLHLAATLGHLEIVEVLLKYGADVNAQDKFGKTAFDIS IDNGNEDLAEILQKAAGGSGGGSC（配列番号１５４）

【０１６２】

理解を明確にするため、説明及び例示として、上記の発明をいくらか詳細に記述したが、添付の特許請求の範囲の範囲から逸脱しない範囲で、特定の変形及び変更を行ってもよいことは、当業者には理解される。さらに、本明細書中で提供された各参考文献は、各参考文献が参照によって個々に援用されたのと同程度に、その全体が参照によって援用される。本願と本明細書中で提供された参考文献との間に矛盾がある場合、本願が優先されるものとする。

【図面】

【図１Ａ】

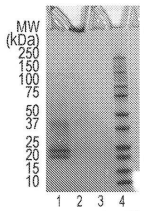


FIG. 1A

1. 5.0 μg hu_抗-TNFα_リジッド_HIS_FLAG_CYS
2. 5.0 μg hu_抗-TNFα_リジッド_HIS_FLAG_CYS MVP0.25 μg hu_抗-TNFα
3. なし
4. ラダー

【図１Ｂ】

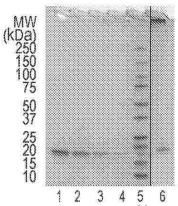


FIG. 1B

1. 1.0 μg hu_抗-TNFα_aH_CYS
2. 0.5 μg hu_抗-TNFα_aH_CYS
3. 0.25 μg hu_抗-TNFα_aH_CYS
4. 0.125 μg hu_抗-TNFα_aH_CYS
5. ラダー
6. 6.0 μg hu_抗-TNFα_aH_CYS MVP

【図１Ｃ】

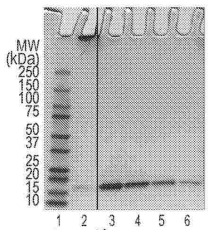


FIG. 1C

1. ラダー
2. 5.0 μg mu_抗-TNFα_aH_CYS MVP
3. 2.5 μg mu_抗-TNFα_aH_CYS
4. 1.25 μg mu_抗-TNFα_aH_CYS
5. 0.625 μg mu_抗-TNFα_aH_CYS
6. 0.313 μg mu_抗-TNFα_aH_CYS

【図１Ｄ】

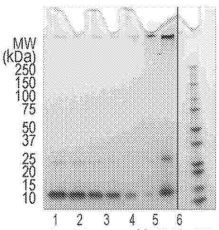


FIG. 1D

1. 1.0 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS
2. 0.8 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS
3. 0.6 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS
4. 0.4 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS
5. 0.2 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS
6. ローディングエラー
7. 6.0 μg mu_抗-TNFα_3Mut_aH_CYS MVP
8. ラダー

【図１Ｅ】

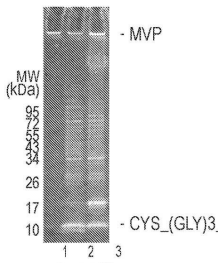


FIG. 1E

1. ラダー
2. 4.0 μg CYS_(GLY)3_hu_抗-TNFα アフィボディ
3. 4.0 μg CYS_(GLY)3_hu_抗-TNFα アフィボディ MVP

【図１Ｆ】

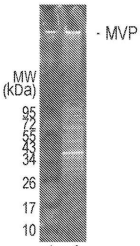
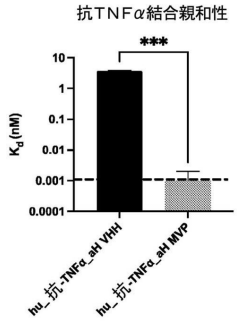


FIG. 1F

1. ラダー
2. 1.2 μg 抗-IL-1β_リジッド_CYS

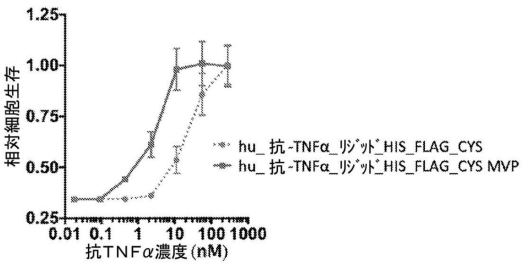
【図２Ａ】

FIG. 2A



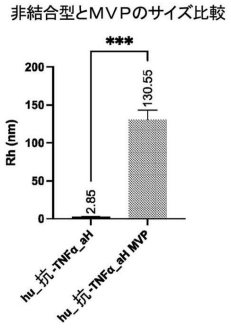
【図２Ｂ】

FIG. 2B



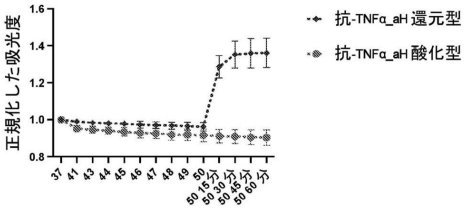
【図３】

FIG. 3



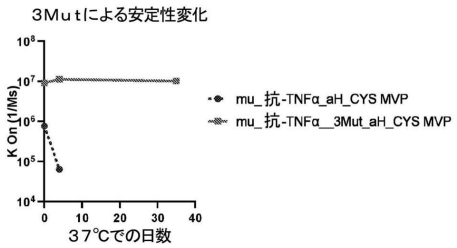
【図４Ａ】

FIG. 4A



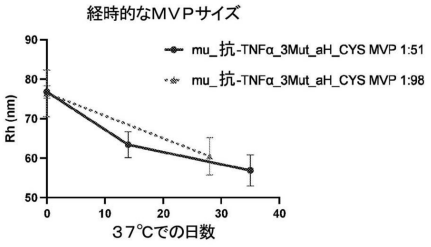
【図４Ｂ】

FIG. 4B



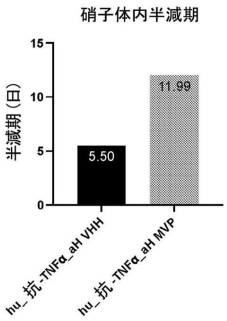
【図４Ｃ】

FIG. 4C



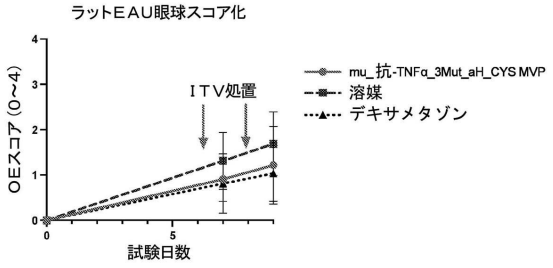
【図５】

FIG. 5



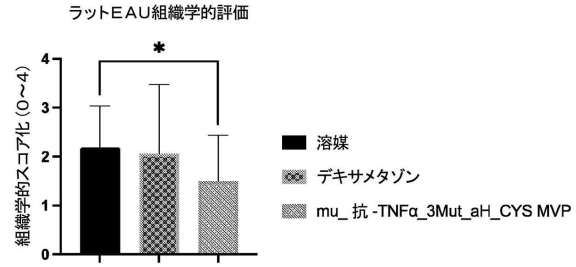
【図６Ａ】

FIG. 6A



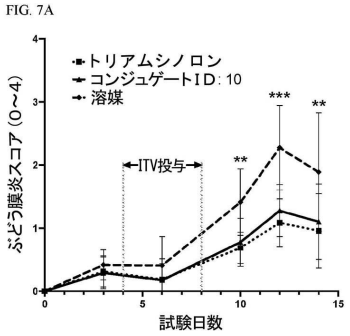
【図６Ｂ】

FIG. 6B



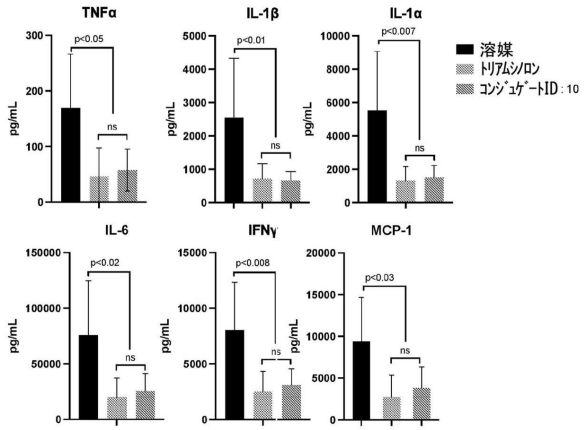
【図７Ａ】

FIG. 7A



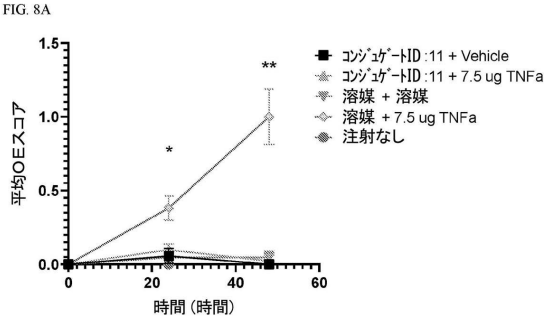
【図７Ｂ】

FIG. 7B

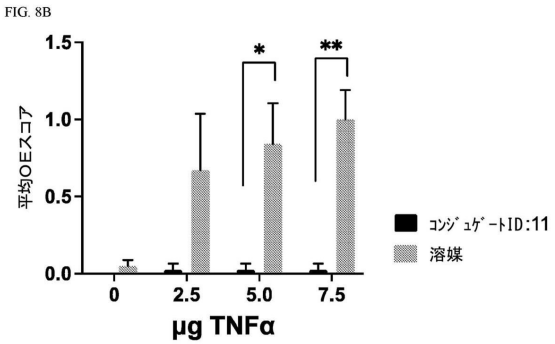


【図８Ａ】

FIG. 8A



【図８Ｂ】



【配列表】

2025512373000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 47/61 (2023.01)
ADD. A61K 31/728 (2023.01)

CPC - INV. A61K 47/6889, A61K 47/61, C07K 16/241
ADD. A61K 47/61, A61K 47/6903, A61P 27/02

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/003223 A1 (VALITOR INC.) 7 January 2021 (07.01.2021) abstract, para [0064], [0070], [0073], [0077], [0099], [0106], [0151], [0158], [0183]	1-3
A	WASHBURN et al. Polymer-conjugated inhibitors of tumor necrosis factor-a for local control of inflammation., Biomatter, 10 Jul 2013, vol 3, no 3, article e25597, pp1-7, abstract, Fig. 2A	1-3

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 September 2023	OCT 06 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65779

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65779

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

********** See Extra Sheet **********

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65779

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

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

Group I: Claims 1-3, directed to a method of for treating uveitis in a subject administering to the subject a therapeutically effective amount of a conjugate of Formula V: (X-Y).sub.n.-Z, wherein each X is an anti-inflammatory peptide from about 5 kDa to about 200 kDa, each Y an organic linker, Z is a hyaluronic acid polymer from about 0.1 MDa to about 3 MDa, and n is an integer of from 1 to 1000.

Group II+: Claim 29, directed to a composition comprising a random polymer conjugate of about 0.1 MDa to about 3 MDa having Formula VI: (X-Y-Z.sup.1).sub.n-(Z.sup.2).sub.p-(Z.sup.3).sub.q., wherein:
each X is an anti-TNF-alpha or anti-IL-1-beta, each Y is an organic linker [see structure], each Z.sup.1, Z.sup.2 and Z.sup.3 is a hyaluronic acid based molecule [see structures] having optional organic linker and/or alkyl /cyclo alkyl substituents; each n, p and q contributes to a polymer of 100-10,0000 or more units. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The random polymer conjugate composition may be searched, for example, to the extent that the X polypeptide sequence is an anti-TNF-alpha VHH comprising SEQ ID NO: 101. It is believed that claim 29, limited to said random polymer, read on this exemplary invention. Additional random polymer compositions will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected random polymer compositions. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a random polymer composition wherein X comprises an anti-IL-1beta scFv comprising SEQ ID NO: 106 (Claim 29).

The inventions listed as Group I and Group II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the anti-TNF-alpha or anti-IL-113beta polypeptides of Group II+, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group II+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group II+ requires a method of treating uveitis, not required by group I.

Group I requires an isolated random polymer composition, not required by group II+.

Common Technical Features

The inventions of Group I and Group II+ share the technical feature of each of a random polymer conjugate comprising (X-Y).sub.n.-Z, wherein each X is an anti-inflammatory peptide from about 5 kDa to about 200 kDa, each Y an organic linker, Z is a hyaluronic acid polymer from about 0.1 MDa to about 3 MDa, and n is an integer of from 1 to 1000. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2021/0046181 A1 to Valitor Inc. (hereinafter 'Valitor').

Valitor teaches random polymer conjugates (para [0077] "The conjugates of the present invention can be described as compounds of Formula I: (X-Y)n-Z, where X is [a] peptide ... Z is the biocompatible polymer ... Y is an optional linker, and subscript n is from 5 to 500") having a hyaluronic acid polymer from about 0.1 MDa to about 3 MDa (para [0047] "The present invention provides conjugates of high molecular weight polymers and a plurality of peptides that possess a potency greater than a similar concentration of the unconjugated peptide. In some embodiments, the present invention provides a conjugate of a biocompatible polymer having a molecular weight of from about 0.1 MDa to about 3 MDa", para [0050] " In some embodiments, the biocompatible polymer can be hyaluronic acid.") anti-inflammatory peptides (para [0133] "the conjugates can be engineered with specific macromolecular properties... conjugating an anti-inflammatory peptide to HyA [hyauronic acid moiety]") compare applicant's organic linkers with linkers shown in para [0081] and Fig. 1 of Valitor.

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Groups I and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｋ	*39/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ｃ０７Ｋ	*16/24*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/24	ＺＮＡ	

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

(74)代理人　100203828
弁理士　喜多村 久美
(72)発明者　ウェスリー エム．ジャクソン
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　エイミー エー．トゥワイト
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　アダム バーネベイ
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　リビア ウィルツ ブライアー
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド

Ｆターム（参考）　4C076　AA95 BB11 BB24 CC04 CC10 CC41 EE41 EE59
4C084　AA02 AA03 BA01 BA42 BA44 DA13 DA25 DA39 MA66 NA13 ZA33 ZB11
4C085　AA06 BB36 CC22 CC32 EE01 GG01
4H045　AA10 AA30 BA61 CA40 DA76 EA20