(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7593925号
(P7593925)

(45)発行日　令和6年12月3日(2024.12.3)

(24)登録日　令和6年11月25日(2024.11.25)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　47/54　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/54	
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ　39/395　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ　37/06　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	37/06	

FＩ

請求項の数　45　（全203頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-536414(P2021-536414)
(86)(22)出願日　令和1年12月9日(2019.12.9)
(65)公表番号　特表2022-515797(P2022-515797A)
(43)公表日　令和4年2月22日(2022.2.22)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/084242
(87)国際公開番号　WO2020/126620
(87)国際公開日　令和2年6月25日(2020.6.25)
審査請求日　令和4年12月9日(2022.12.9)
(31)優先権主張番号　2022283
(32)優先日　平成30年12月21日(2018.12.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(31)優先権主張番号　2023468
(32)優先日　令和1年7月10日(2019.7.10)
最終頁に続く

(73)特許権者　521271727
サプリーム テクノロジーズ，ベー．フェー．
ＳＡＰＲＥＭＥ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ Ｂ．Ｖ．
オランダ王国，３７２１ エムアー ビルトホーフェン，アントニ ファン レーウェンフックラーン ９，ビルディング アー１２－１
Ａｎｔｏｎｉｅ ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋｌａａｎ ９ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ａ１２－１ ３７２１ ＭＡ Ｂｉｌｔｈｏｖｅｎ ＮＥＴＨＥＲＬＡＮＤＳ
(74)代理人　110002000
弁理士法人栄光事務所
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　改善された抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクター部分を含み、さらに少なくとも１つの共有結合されたサポニンを含む、コンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニンが、トリテルペノイドサポニンおよび／またはキラヤ酸アグリコンコアを有するサポニンおよびジプソゲニンアグリコンコアを有するサポニンからなる群から選択される、Ｃ－２３位にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンおよび／またはビスデスモシドトリテルペンサポニンであり、少なくとも１つのサポニンが、Ｃ－３位に分岐した炭水化物側鎖を含み、前記炭水化物側鎖がグルクロン酸官能基を含み、サポニンが、Ｃ－２８位にデオキシ炭水化物を含む分岐した炭水化物側鎖を含む、コンジュゲート。

【請求項２】

少なくとも１つのサポニンが、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種のいずれか１つ以上から単離されるサポニンである、請求項１に記載のコンジュゲート。

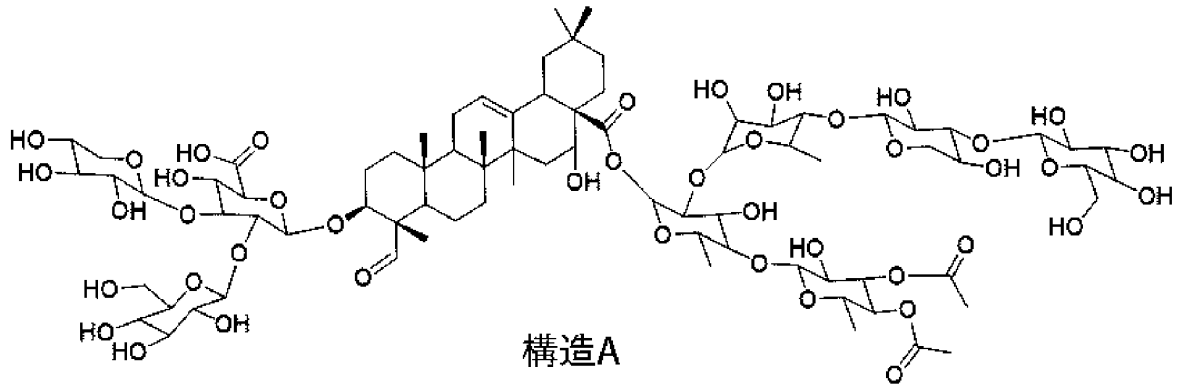
【請求項３】

少なくとも１つのサポニンが、単一の特定のサポニンであるか、又は２つ以上の異なるサポニンの混合物である、請求項１又は２に記載のコンジュゲート。

【請求項４】

少なくとも１つのサポニンが、３．０００ダルトン以下の分子質量を有する、請求項１

～３のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項５】
少なくとも１つのサポニンが、ＮＰ－００５２３６、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、α－Ｈｅｄｅｒｉｎ、ＮＰ－０１２６７２、ＮＰ－０１７７７７、ＮＰ－０１７７７８、ＮＰ－０１７７７４、ＮＰ－０１８１１０、ＮＰ－０１７７７２、ＮＰ－０１８１０９、ＮＰ－０１７８８８．ＮＰ－０１７８８９、ＮＰ－０１８１０８、ＡＥ　Ｘ５５、ＮＰ－０１７６７４、ＮＰ－０１７８１０、ＮＰ－００３８８１、ＮＰ－０１７６７６、ＮＰ－０１７６７７、ＮＰ－０１７７０６、ＮＰ－０１７７０５、ＮＰ－０１７７７３、ＮＰ－０１７７７５、ＱＳ－７、ＱＳ－１７、ベーターエスシンＩａ、ティーシードサポニンＩ、ティーシードサポニンＪ、アッサムサポニンＦ、ジギトニン、プリムラ酸１、ＡＳ６４Ｒ、ＡＳ６．２、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナムアルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｇｙｐ１、ギプソシド（ｇｙｐｓｏｓｉｄｅ）Ａ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、構造Ａを有するサポニン；
【化１】



の１つ以上、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせである、請求項１～４のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項６】
少なくとも１つのサポニンがビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基を含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有有するオレアナン型トリテルペンを含み、サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、或いは、少なくとも１つのサポニンは、ＱＳ－２１、又はＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ－１８、ＱＳ－１８６１、プロトン化ＱＳ１８６１（ＱＳ１８６２）のいずれか１つ以上である、請求項１～５のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項７】
細胞表面分子標的化分子が、細胞表面分子に結合するためのリガンド又はタンパク質性リガンド又はタンパク質性結合分子を含むか又はそれからなる、請求項１～６のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項８】
細胞表面分子標的化分子が、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するた

めの非タンパク質性リガンド及び／又はタンパク質性リガンドを含むか、又はそれからなり、並びに／或いは、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメント、例えば抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなり、これらは細胞表面分子に結合し得る、請求項１～７のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項９】

細胞表面分子標的化分子が、腫瘍細胞表面分子に結合し得る、請求項１～８のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１０】

腫瘍細胞受容体が、請求項１及び７～９のいずれか１項に記載の細胞表面分子標的化分子並びに請求項１～９のいずれか１項に記載のコンジュゲートに結合した後に、腫瘍細胞によって内在化される、請求項９に記載のコンジュゲート。

【請求項１１】

細胞表面分子標的化分子が、モノクローナル抗体又はその少なくとも１つの細胞表面分子結合フラグメント又はドメインであるか、又はそれからなる、請求項１～１０のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１２】

少なくとも１つのエフェクター部分が、オリゴヌクレオチド、核酸、及びゼノ核酸のいずれか１つ以上を含むか又はそれらの誘導体からなる、請求項１～１１のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１３】

少なくとも１つのエフェクター部分が、少なくとも１つのタンパク質性分子を含むか又はそれらからなる、請求項１～１２のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１４】

少なくとも１つのエフェクター分子が、少なくとも１つのペイロードを含むか又はそれからなる、請求項１～１３のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１５】

少なくとも１つのエフェクター部分が、少なくとも１つのリンカーを介して細胞表面分子標的化分子に共有結合されるか、又は細胞表面分子標的化分子に直接的に結合されるかどちらかである、請求項１～１４のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１６】

少なくとも１つのエフェクター部分が、細胞表面分子標的化分子に共有結合され、それによって、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチン抗体－薬物コンジュゲート、並びにＡｆｆｉｌｕｔｉｎ、ＡＤＣＴ－５０２、ＡＧＳ－１６Ｍ１８、ＡＧＳ－６７Ｅ、ＡＭＧ－１７２、ＡＭＧ－５９５、ＡＳＧ－１５ＭＥ、ＡＳＧ－５ＭＥ、ＡＳＰ－６１８３、ＡＶＥ－９６３３、Ａｖｉｃｉｄｉｎ、ＢＡＹ－７９４６２０、Ｂｉｓｍａｂ－Ａ、ＢＩＷＩ－１、ｃａｎｔｕｚｕｍａｂ ｒａｖｔａｎｓｉｎｅ、ＣＤＸ－０１４、ｃｏｌｔｕｘｉｍａｂ ｒａｖｔａｎｓｉｎｅ、ＤＣＤＳ－０７８０Ａ、ｄｅｎｉｎｔｕｚｕｍａｂ ｍａｆｏｄｏｔｉｎ、ＨＴＩ－１５１１、ＨｕＭａｘ－ＣＤ７４－ＡＤＣ、ＩＭＧＮ－２８９、ＩＭＧＮ－３８８、ＩＭＧＮ－７７９、ＩｍｍｕＲＡＩＴ－ＬＬ２、ｉｎｄｕｓａｔｕｍｕｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ、ｌｉｆａｓｔｕｚｕｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ，ｌｏｒｖｏｔｕｚｕｍａｂ ｍｅｒｔａｎｓｉｎｅ、ＭＬＮ－２７０４、ＭＭ－３１０、Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ Ｓ、ＰＦ－０６２６３５０７、ＰＦ－０６６４７２６３、ＰＦ－０６６５０８０８、ｐｉｎａｔｕｚｕｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ、ＲＧ－７５９８、ＲＧ－７６００、ＲＧ－７６３６、ＲＧ－７８４１、ＲＧ－７８８２、ｓａｃｉｔｕｚｕｍａｂ ｇｏｖｉｔｅｃａｎ、ＳＡＲ－４２８９２６、ＳＡＲ－５６６６５８、ＳＣ－００４、ＳＣ－００６、ＳＧＮ－１５、ＳＧＮＣＤ－１２

３Ａ、ＳＧＮＣＤ－１９Ｂ、ＳＧＮＣＤ－３５２Ａ、ＳＧＮ－ＣＤ７０Ａ、ｓｏｆｉｔｕｚｕｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ、ｖａｎｄｏｒｔｕｚｕｍａｂ ｖｅｄｏｔｉｎ、ｖｏｒｓｅｔｕｚｕｍａｂ ｍａｆｏｄｏｔｉｎ、ＸＭＴ－１５２２、ＺＷ－３３、トラスツズマブ・エムタンシン、ＭＭ－３０２、イブリツモマブ・チウキセタン、イノツズマブ・オゾガマイシン、ロバルピツズマブ・テシリン、ニューラジアブ、クリバツズマブ・テトラキセタン、デパツキシズマブ・マホドチン、バダストキシマブ・タリリン、グレムバツマブ・ベドチン、オンコライシンＢの抗体－薬物コンジュゲートのいずれか１つを形成する、請求項１～１５のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１７】

少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に、サポニン上のアルデヒド官能基を介して、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、サポニン上のアルデヒド官能基を介して、共有結合される、請求項１～１６のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項１８】

少なくとも１つのサポニンのアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、チオ－エーテル結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる、請求項１７に記載のコンジュゲート。

【請求項１９】

少なくとも１つのサポニンが、１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、サポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含み、サポニンは、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、前記グルクロン酸官能基を介して、共有結合される、請求項１～１８のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項２０】

少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のアミン基、例えば細胞表面分子標的化分子の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分のリジン又はＮ末端のアミン基に、共有結合的にカップリングされる、請求項１８に記載のコンジュゲート。

【請求項２１】

少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／或いは少なくとも１つのエフェクター部分に、直接的に、或いは少なくとも１つのリンカー、例えばＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づく及び／若しくは１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに基づく二官能性リンカー、又は三官能性リンカーで共有結合される、請求項１～２０のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項２２】

三官能性リンカーが、それに少なくとも１つのサポニンが共有結合される第２の化学基、細胞表面分子標的化分子に共有結合するための第３の化学基、及び少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための第１の化学基を含む、請求項２１に記載のコンジュゲート。

【請求項２３】

少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に、三官能性リンカーを含む少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、この三官能性リンカーには、細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクタ

ー部分両方が結合される、請求項１～１８のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項２４】
少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含む、請求項１８、２０～２３のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項２５】
少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含み、前記切断可能なリンカーは、哺乳類細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下においてインビボで切断を受ける、請求項１８、２０～２４のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項２６】
少なくとも１つのサポニンが、アミド結合を形成するリジン側鎖に及び／又はチオ－エーテル結合若しくはジスルフィド結合を形成するシステイン側鎖に共有結合され、リジン及び／又はシステインは、細胞表面分子標的化分子に含まれ、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に含まれ、少なくとも１つのサポニンは、直接的にリジン及び／若しくはシステインに結合されるか、又は少なくとも１つのリンカーを介して結合される、請求項１～２５のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項２７】
リンカーが、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づき、及び／又は１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、三官能性リンカー、切断可能なリンカーに基づき、並びに／或いはジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ヒドラジド結合のいずれか１つ以上が関わる、請求項２６に記載のコンジュゲート。
【請求項２８】
少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、リンカーは、ポリマー又はオリゴマー構造を含み、かつさらに骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための少なくとも１つの第４の化学基を含む骨格であるか、又はそれを含む、請求項１～２７のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項２９】
少なくとも１つのサポニンが、切断可能な結合を介して及び／又は非切断可能な結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される、請求項２８に記載のコンジュゲート。
【請求項３０】
切断可能な結合が、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、及び光誘導性条件のいずれかの下で切断を受ける、請求項２９に記載のコンジュゲート。
【請求項３１】
切断可能な結合が、哺乳類細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下においてインビボで切断を受ける、請求項２９又は３０に記載のコンジュゲート。
【請求項３２】
少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、ヒドラジド結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、ジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ペプチド結合、又はエステル結合のいずれか１つ以上を介して、共有結合される、請求項２８～３１のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項３３】
少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、及びヒドラジド結合のいずれか１つ以上を介して共有結合される、請求項２８～３１のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項３４】

少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーが、チオ－エーテル結合を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる、請求項３３に記載のコンジュゲート。

【請求項３５】

少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造にアミド結合を介して共有結合される、請求項２８～３１のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項３６】

少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のアミン基、例えば骨格のポリマー又はオリゴマー構造のリジン又はＮ末端のアミン基に共有結合的にカップリングされる、請求項３５に記載のコンジュゲート。

【請求項３７】

少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が関わり、及び／又は、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が関わる、請求項２８～３６のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項３８】

骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合的にカップリングするための骨格の少なくとも１つの第４の化学基が、クリックケミストリー基である、請求項２８～３７のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項３９】

骨格のポリマー又はオリゴマー構造が、直鎖、分岐、及び／若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、ＤＮＡ、ポリペプチド、ポリリジン、ポリエチレングリコール、又はこれらのポリマー若しくはオリゴマー構造の集合体を含む、請求項２８～３８のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項４０】

少なくとも１つのサポニンが、定められた数のサポニン又は定められた範囲のサポニンである、請求項１～３９のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項４１】

コンジュゲートが、１つよりも多くのサポニンを含み、直接的に、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分を介して共有結合され、並びに／或いは、請求項２８～４０のいずれか１項に記載の少なくとも１つのリンカーを介して及び／又は少なくとも１つの切断可能なリンカーを介して及び／又は少なくとも１つのポリマー若しくはオリゴマー骨格を介して共有結合され、１～３２個のサポニンが、少なくとも１つの骨格に共有結合される、請求項１～４０のいずれか１項に記載のコンジュゲート。

【請求項４２】

少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に三官能性リンカーを介して共有結合され、三官能性リンカーは、少なくとも１つのサポニンが直接的に或いは切断可能なリンカーなどのリンカーを介して及び／又はポリマー若しくはオリゴマー構造を含む骨格を介してどちらかでそれに共有結合される第２の化学基と、三官能性リンカーへの骨格の共有結合的カップリングのための請求項２８～４１のいずれか１項に記載の第４の化学基とを含み、三官能性リンカーは、さらに、細胞表面分子標的化分子への共有結合のための第３の化学基を含み、かつ少なくとも１つの

エフェクター部分への共有結合のための第１の化学基を含み、細胞表面分子標的化分子は第３の化学基に結合され、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分は第１の化学基に結合される、請求項１～４１のいずれか１項に記載のコンジュゲート。
【請求項４３】
請求項１～４２のいずれか１項に記載のコンジュゲートを含む医薬組成物。
【請求項４４】
医薬として使用するための、請求項１～４２のいずれか１項に記載のコンジュゲート、又は請求項４３に記載の医薬組成物。
【請求項４５】
癌又は自己免疫疾患の処置又は防止において使用するための、請求項１～４２又は４４のいずれか１項に記載のコンジュゲート、或いは請求項４３又は４４に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、少なくとも１つのサポニンを提供されるリガンド－エフェクター部分に、及び少なくとも１つのサポニンを提供される抗体－エフェクター部分、例えば抗体－薬物コンジュゲート及び抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。本発明のある態様は、組成物であり、本発明の少なくとも１つのサポニンを提供されるリガンド－エフェクター部分又は少なくとも１つのサポニンを提供される抗体－エフェクター部分を含む。本発明は、共有結合的に連結されたサポニンを含む抗体－薬物コンジュゲート及び共有結合的に連結されたサポニンを含む抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートにもまた関する。本発明のある態様は、医薬組成物に関し、本発明の少なくとも１つのサポニンを提供されるリガンド－エフェクター部分又は少なくとも１つのサポニンを提供される抗体－エフェクター部分を含み、任意にさらに薬学的に許容される賦形剤を含む。本発明は、医薬として使用するための、少なくとも１つのサポニンを提供されるリガンド－エフェクター部分又は少なくとも１つのサポニンを提供される抗体－エフェクター部分にもまた関する。本発明は、癌の処置又は予防において使用するための、本発明の少なくとも１つのサポニンを提供されるリガンド－エフェクター部分又は少なくとも１つのサポニンを提供される抗体－エフェクター部分にもまた関する。
【背景技術】
【０００２】
治療的な生物活性を有する分子は、多くの場合に、その必要があるヒト患者の癌などの疾患の処置のための有効な治療薬物としての適用にとって理論上好適である。典型的な例は低分子の生物活性部分である。しかしながら、現行で臨床に用いられている全てではないにしても多くの可能性としての薬物様分子及び治療薬は、過多な短所及び欠点の少なくとも１つを患っている。人体に投与されるときに、治療的に活性な分子は、処置されるべき疾患又は健康問題の基礎となる側面を指向する生物活性に加えて、オフターゲット効果を発揮し得る。かかるオフターゲット効果は望ましくなく、投与された分子の健康又はさらには生命を脅かす副作用の誘導のリスクを持つ。多くの薬物様化合物及び治療薬部分が第ＩＩＩ相治験又はさらには第ＩＶ相治験（上市後フォローアップ）に失敗することを引き起こすのは、かかる有害事象の生起である。よって、低分子治療薬などの薬物分子を提供する強い要望があり、薬物分子の治療効果は、例えば、特に（１）疾患を駆動する生物学的因子若しくは生物学的プロセスに対して高度に特異的であり、（２）十分に安全であり、（３）十分に有効であり、（４）非有疾患細胞に対するオフターゲット活性なし若しくはほとんどなしに、有疾患細胞を十分に指向し、（５）十分に適時的な作用機序を有し（例えば、投与された薬物分子は、ある種の時間枠内にヒト患者の標的部位に達するべきであり、ある種の時間枠に渡って標的部位に留まるべきである）、及び／又は（６）患者の体内において十分に長く続く治療活性を有するべきである 。既に長く続くかつ鋭意の研究にもかかわらず、並びに個々に対処された直面した困難及び欠点のいくつかのエリアにおいてなされた印象的な進歩にもかかわらず、残念ながら、今日まで、ここで上に概説

された有益な特徴の多く又はさらに全てを有する「理想的な」治療薬は患者にとって利用可能ではない。

【０００３】

化学療法は、癌処置のための最も重要な治療オプションの１つである。しかしながら、それは健康な組織の分裂細胞と比べて癌細胞に対する特異性を有さないので、それはしばしば低い治療ウィンドウと関連する。モノクローナル抗体の本発明は、正常細胞は見逃しながら、癌細胞への細胞毒性薬剤の標的化された送達のためのメカニズムとして、それらの特異的結合特性を活用する可能性を提供した。これは、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を作り出すための、抗体への細胞毒性エフェクター（ペイロード又は弾頭としてもまた公知）の化学的コンジュゲート化によって達成され得る。典型的には、それらの非コンジュゲート化形態において限定された治療指数（毒性なドーズを有効なドーズと比較する比）を有するエムタンシン（ＤＭ１）などの非常に強力なペイロードが用いられる。Ｋａｄｃｙｃｌａとしてもまた公知のトラスツズマブへのＤＭ１のコンジュゲート化（アドトラスツズマブエムタンシン）は、サルにおいて、ＤＭ１の忍容ドーズを少なくとも２倍向上させる。過去数十年に、治療薬ＡＤＣを開発するために膨大な努力及び投資がなされてきた。しかしながら、有望な前臨床データにもかかわらず、ＡＤＣを臨床に持ち込むことは難しいままである。臨床使用を認可された最初のＡＤＣは、２０００年の再発急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）のためのゲムツズマブオゾガマイシン（ＣＤ３３標的化マイロターグ、Ｐｆｉｚｅｒ／Ｗｙｅｔｈ）であった。しかしながら、マイロターグは、その安全性プロファイルを包含するいくつもの懸念を原因として、連邦医薬品局（ＦＤＡ）の要請で市場から取り下げられた。マイロターグによって処置された患者は、従来の化学療法によって処置された患者よりもしばしば死亡することが見出された。マイロターグは、より低い推奨ドーズ、化学療法との組み合わせで又はそれ自体での異なるスケジュール、及び新たな患者集団でもって２０１７年に再び上市承認された。今日まで、５つのＡＤＣのみが臨床使用を認可されており、一方で、およそ５５個のＡＤＣの臨床開発が取りやめられている。しかしながら、関心は高いままであり、現在、およそ８０個のＡＤＣが６００近くの治験によって依然として臨床開発中である。

【０００４】

通常は患者によって忍容されない毒性のペイロードを用いるポテンシャルにもかかわらず、低い治療指数（毒性のドーズを有効なドーズと比較する比）は、臨床開発における多くのＡＤＣの中止を説明する主要な問題である。これは、いくつかのメカニズム、例えば正常細胞に対するオフターゲット毒性、細胞毒性薬剤に対する抵抗性の発生、及び循環中の薬物の尚早な放出によって引き起こされ得る。ＡＤＣのＦＤＡによる系統的なレビューは、ほとんどのＡＤＣの毒性プロファイルが、用いられる抗体ではなく用いられるペイロードに従ってカテゴリー分けされ得るということを見出しており、毒性がペイロードの尚早な放出によってほとんど決定されるということを示唆する。中止されたおよそ５５個のＡＤＣのうち、少なくとも２３個が不良な治療指数を原因としたということが見積もられる。例えば、かなりのレベルのＨＥＲ２を発現する肺組織におけるオンターゲット正常組織効果をおそらく原因とする狭い治療指数を原因として、トラスツズマブ・テシリンコンジュゲート（ＨＥＲ－２標的化ＡＤＣＴ－５０２、ＡＤＣ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）の開発は最近中止された。加えて、第３相試験中のいくつかのＡＤＣは、欠けているプライマリーエンドポイントを原因として中止された。例えば、新たに診断された神経膠芽細胞腫の患者において試験されたデパツキシズマブマホドチンコンジュゲート（ＥＧＦＲ標的化ＡＢＴ－４１４、ＡｂｂＶｉｅ）及び白金抵抗性卵巣癌の患者において試験されたミルベツキシマブソラブタンシンコンジュゲート（葉酸受容体アルファ（ＦＲα）標的化ＩＭＧＮ８５３、ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ）の第３相試験は、最近停止され、生残の利益を示さなかった。いくつかのＡＤＣの臨床的に用いられるドーズは、その完全な抗癌活性にとって十分ではなくあり得るということに留意することが重要である。例えば、アドトラスツズマブエムタンシンはヒトでは３．６ｍｇ／ｋｇのＭＴＤを有する。乳癌の前臨床モデルにおいて、アドトラスツズマブエムタンシンは、３ｍｇ／ｋｇの又はそれよりも上のドー

ズレベルで腫瘍退縮を誘導したが、より強力な有効性が１５ｍｇ／ｋｇにおいて観察された。これは、臨床投与されるドーズでは、アドトラスツズマブエムタンシンが、その最大の可能性としての抗腫瘍効果を発揮せずにあり得るということを示唆する。

【０００５】

ＡＤＣは、主に、抗体、ペイロードなどの細胞毒性部分、及びリンカーからなる。既存の問題を克服するための新たなＡＤＣの設計及び開発において、いくつかの新規の戦略が提案及び実施されており、ＡＤＣのコンポーネントのそれぞれを標的化している。例えば、抗体コンポーネントの満足な抗原性標的の同定及びバリデーションにより、腫瘍においては高い発現レベルを有しかつ正常な組織においては発現を有さないか又はほとんど有さない抗原、循環するＡＤＣにとってアクセス可能であるように細胞表面上に存在する抗原、及び結合後の細胞内へのＡＤＣの内在化を許す抗原を選択することによる；並びに活性の代替的なメカニズム；ＡＤＣの可溶性及び薬物対抗体比（ＤＡＲ）を向上させ、並びに化学療法薬剤を細胞外に輸送し得るタンパク質により誘導される抵抗性を克服するリンカーを設計並びに最適化する；より多くのペイロードの包含によってＤＡＲ比を向上させ、抗体の均質性及び開発可能性を改善するように抗体を選択及び最適化する。ＡＤＣのテクノロジー開発に加えて、治療指数を最大化、例えば分割投薬による投薬スケジュールを変化させ；生体内分布研究を行い；バイオマーカーを包含して患者の選択を最適化、応答シグナルを早く捕捉、応答の持続時間及び深さをモニタリング、並びに併用研究に情報提供するための、新たな臨床的及び橋渡し的戦略もまた展開されつつある。

【０００６】

臨床的なポテンシャルを有するＡＤＣの例は、リンパ系悪性物及び多発性骨髄腫の処置オプションとして評価されているＡＤＣ、例えばブレンツキシマブベドチン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチンである。（悪性）Ｂ細胞上のＣＤ７９ｂに結合するポラツズマブベドチン及びＣＤ２２に結合するピナツズマブベドチンが、治験によって試験されている。ＡＤＣは、それぞれ、ＣＤ２０に結合するモノクローナル抗体の同時投与のリツキシマブと組み合わせられ、ペイロードは提供されなかった（Ｂ．Ｙｕ ａｎｄ Ｄ．Ｌｉｕ，Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｉｎ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｌｙｍｐｈｏｉｄ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ；Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ ＆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１９）１２：９４）。これらの例などのモノクローナル抗体の組み合わせは、なおさらなるアプローチであり、ＡＤＣの前に言及された所望の特徴の多く又はさらには全てを組み合わせる「魔法の弾丸」に到達することを試みる。

【０００７】

一方で、過去数十年に、核酸に基づく治療薬が開発中である。治療薬核酸は、遺伝子治療、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）などのアプローチのための、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、及び短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ、並びにＤＮＡ及びＲＮＡアプタマーに基づき得る。それらの多くは、ＤＮＡ又はＲＮＡ発現どちらかの阻害による作用の同じ根源的な基礎を共有し、これによって、疾患に関係する異常なタンパク質の発現を防止する。最も多数の治験は遺伝子治療の分野で行われており、世界的にはほぼ２６００の進行中又は完了した治験であるが、約４％のみが第３相に入る。これの次に、ＡＳＯによる治験である。ＡＤＣと類似に、多数の技術が探求されているにもかかわらず、治療薬核酸は、臨床開発中に２つの主要なイシューを共有する；細胞内への送達及びオフターゲット効果である。例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、及びブリッジ型核酸（ＢＮＡ）などのＡＳＯが、標的遺伝子、特に低分子阻害剤又は中和抗体によって標的化することが困難である遺伝子を特異的に阻害するための魅力的な戦略として検討されつつある。現行では、異なるＡＳＯの有効性が、多くの神経変性疾患、例えばハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び筋萎縮性側索硬化症において、並びにいくつかの癌ステージにおいてもまた

研究されつつある。可能性としての治療薬剤としてのＡＳＯの適用は、標的細胞及び組織の細胞質及び／又は核へのそれらの送達のための安全かつ有効な方法を要求する。ＡＳＯの臨床的妥当性は実証されているが、インビトロ及びインビボ両方の非効率的な細胞取り込みはＡＳＯの有効性を限定し、治療薬開発のバリアであった。細胞取り込みはドーズの＜２％であり得、有効なかつ持続的な結果にとっては低すぎるＡＳＯ濃度を活性部位においてもたらす。これは帰結的に投与ドーズの増大を要求し、これはオフターゲット効果を誘導する。最も普通の副作用は、補体カスケードの活性化、凝血カスケードの阻害、及び免疫系のｔｏｌｌ様受容体によって媒介される刺激である。

【０００８】

化学療法薬は最も普通には低分子である。しかしながら、それらの有効性は、重度の副次的オフターゲット毒性、並びにそれらの不良な溶解性、急速なクリアランス、及び限定された腫瘍暴露によって妨害される。骨格－低分子薬物コンジュゲート、例えばポリマー－薬物コンジュゲート（ＰＤＣ）は薬理学的活性を有する高分子構築物であり、これは、担体骨格（例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ））に結合された低分子薬物の１つ以上の分子を含む。

【０００９】

かかるコンジュゲート原理は大いなる注目を引きつけており、数十年に渡って検討中である。前臨床又は臨床開発中の低分子薬物のコンジュゲートの大多数は、腫瘍学的適応症のためである。しかしながら、最新では、癌に関係しない１つの薬物（オピオイドアンタゴニストナロキソンのＰＥＧオリゴマーコンジュゲートＭｏｖａｎｔｉｋ、アストラゼネカ）のみが、慢性疼痛患者におけるオピオイド誘導性の便秘について２０１４年に認可されている。これは非腫瘍学的適応症である。ヒト対象の処置への薬物－骨格コンジュゲートの橋渡し適用は、これまでほとんど臨床的成功を提供していない。例えば、ＰＫ１（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド（ＨＰＭＡ）コポリマードキソルビシン；Ｐｈａｒｍａｃｉａによる開発、Ｐｆｉｚｅｒ）は、マウスモデルにおいて固形腫瘍及び白血病両方に多大な抗癌活性を示しており、腫瘍学的適応症について臨床的検討中であった。それは人間において非特異的毒性の有意な縮減及び改善された薬物動態を実証したにもかかわらず、抗癌有効性の改善は患者において些細であることが判明し、帰結として、ＰＫ１のさらなる開発は中止された。

【００１０】

骨格－低分子薬物コンジュゲートの失敗は、少なくとも部分的には、腫瘍部位におけるその不良な蓄積に帰せられる。例えば、ネズミモデルにおいて、ＰＫ１は、健康な組織（肝臓、腎臓、肺、脾臓、及び心臓）よりも腫瘍において４５～２５０倍高い蓄積を示したが、腫瘍における蓄積は、治験において患者の小さいサブセットにおいてのみ観察された。

【００１１】

前に言及された問題の可能性としての解決は、リポソームなどの薬物送達のためのナノ粒子系の適用である。リポソームは１つ以上のリン脂質二重層からなる球形のベシクルであり、リン脂質が水中に分散されるときに自発的に形成される。リン脂質の両親媒性特性は、自己集合、乳化、及び濡れ特徴の特性をそれに提供し、これらの特性は、新たな薬物及び新たな薬物送達系の設計に使用され得る。リポソーム送達系に内包された薬物は、薬物の直接投与と比べていくつかの利点、例えば薬物動態学及び薬力学の改善及びコントロール、組織標的化特性、減少した毒性、並びに向上した薬物活性をもたらし得る。かかる成功の例は、低分子化学療法薬剤ドキソルビシンのリポソーム内包形態であり（Ｄｏｘｉｌ：ドキソルビシンのペグ化リポソーム内包形態；Ｍｙｏｃｅｔ：非ペグ化リポソームドキソルビシン）、これは臨床的な使用を認可されている。

【００１２】

よって、所望のときには非全身的使用に適用可能な抗腫瘍治療などの薬物治療を許す解決が見出される必要が依然としてあり、薬物は、例えば、許容される安全性プロファイル、ほとんどないオフターゲット活性、十分な有効性、患者の体からの十分に低いクリアランス速度などを有する。

【発明の概要】
【００１３】
本発明のある実施形態では、改善された生物活性な化合物、又はかかる改善された生物活性な化合物を含む組成物を提供することが第１のゴールである。
【００１４】
低分子の治療的に活性な化合物をその必要があるヒト患者に投与するときに直面する非特異性の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。疾患を駆動する生物学的因子又は生物学的プロセスに対する非最適な特異性を有する薬物の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物の不十分な安全性特徴の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が所望よりも有効ではないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、非有疾患細胞に対するオフターゲット活性なしに又はほとんどなしに、現行の薬物が有疾患細胞を十分に指向しないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が十分に適時的な作用機序を有さない（例えば、投与された薬物分子は、ある種の時間枠内にヒト患者の標的部位に達するべきであり、ある種の時間枠に渡って標的部位に留まるべきである）という問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が患者の体内において十分に長く続く治療活性を有さないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。
【００１５】
本発明の実施形態の上の目的の少なくとも１つは、本発明の抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）又は抗体－オリゴヌクレオチド（ＡＯＣ）、例えば抗体－ＢＮＡの共有結合的複合体を提供することによって達成され、本発明に従う細胞標的化部分並びに少なくとも１つのサポニン並びに少なくとも１つのエフェクター部分、例えばタンパク質性毒素及び／又はオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡを含む。ＡＤＣ及び／又はＡＯＣは、本発明に従う医薬としての使用にとってもまた好適である。
【００１６】
本発明は具体的な実施形態について記載されるが、本発明はそれらにではなく請求項によってのみ限定される。本明細書に記載される本発明の実施形態は、別様に特定されない限り、組み合わせで及び協同で働き得る。
【００１７】
本発明のある態様は、コンジュゲートに関し、細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクター部分を含み、さらに、少なくとも１つの共有結合されたサポニンを含む。
【００１８】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、トリテルペノイドサポニン、並びに／或いは位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、かつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、並びに／或いはＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種のいずれか１つ以上、例えばＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａから単離されるサポニンである。
【００１９】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、単一の特定のサポニンであるか、又は２つ以上の異なるサポニンの混合物である。
【００２０】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、３．０

００ダルトン以下、好ましくは２．５００ダルトン以下、より好ましくは２．３００ダルトン以下、最も好ましくは２．０００ダルトン以下、例えば１．５００ダルトン～１．９００ダルトンの分子質量を有する。

【００２１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、表Ａ１又はスキームＩのサポニン、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナムアルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ギプソシド（ｇｙｐｓｏｓｉｄｅ）Ａ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２の１つ以上、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせである。好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１及び／又はＧＥ１７４１及び／又はＳＡ１６４１及び／又はＱＳ－２１、並びに／或いはキラヤ酸アグリコンコア、Ｃ－３ベーター－ＯＨ基のＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ炭水化物置換基、及びＣ－２８－ＯＨ基のＧｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ炭水化物置換基を有するサポニンである。並びに／或いは、３－Ｏ－ベーター－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－ベーター－Ｄ－グルクロノピラノシルキラヤ酸２８－Ｏ－ベーター－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－アルファ－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４－ＯＡｃ－ベーター－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－ベーター－Ｄ－フコピラノシドである。より好ましくは、少なくとも１つのサポニンはＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１である。

【００２２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンがビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基と任意にＣ－１６位にヒドロキシル基とを含有するオレアナン型トリテルペンを含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有し、この第１の分岐炭水化物側鎖は任意にグルクロン酸を含有する。サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、この第２の分岐炭水化物鎖は好ましくは少なくとも４つの炭水化物単位を含み、任意に少なくとも１つのアセチル残基、例えば２つのアセチル残基を含有し、及び／又は任意にデオキシ炭水化物を含み、及び／又は任意にキノボースを含み、及び／又は任意にグルコースを含み、及び／又は任意に４－メトキシケイ皮酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、エステル結合を介して炭水化物に結合されている。或いは、少なくとも１つのサポニンは、ＱＳ－２１、又はＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ－１８、ＱＳ－１８６１、プロトン化ＱＳ１８６１（ＱＳ１８６２）、Ｑｕｉｌ－Ａのいずれか１つ以上である。

【００２３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、細胞表面分子に結合するためのリガンド又はタンパク質性リガンド又はタンパク質性結合分子を含むか又はそれからなる。

【００２４】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、ＥＧＦ又

はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための非タンパク質性リガンド及び／又はタンパク質性リガンドを含むか、又はそれからなり、並びに／或いは、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメント、例えば抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなり、これらは細胞表面分子に結合し得る。

【００２５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、腫瘍細胞表面分子、好ましくは腫瘍細胞受容体、例えば腫瘍細胞特異的受容体、より好ましくは、ＣＤ７１、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）、ＣＤ５２、ＣＥＡ、ＣＤ４４ｖ６、ＦＡＰ、ＥＧＦ－ＩＲ、インテグリン、シンデカン－１、血管インテグリンアルファ－Ｖベーター－３、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ受容体、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ６、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ３８、ＦＧＦＲ３、ＣＤ７、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＣＤ５２、ＰＤＧＦＲＡ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２から選択される、好ましくはＣＤ７１、ＨＥＲ２、及びＥＧＦＲから選択される受容体に結合し得る。

【００２６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、腫瘍細胞受容体は、本発明の細胞表面分子標的化分子に結合した後に腫瘍細胞によって内在化されるか、又は腫瘍細胞受容体は、本発明のコンジュゲートに結合した後に腫瘍細胞によって内在化され、好ましくは、腫瘍細胞受容体への細胞表面分子標的化分子の結合及びコンジュゲートの結合には、コンジュゲートと腫瘍細胞受容体との複合体の例えばエンドサイトーシスを介した腫瘍細胞受容体により媒介される内在化が後続する。

【００２７】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、モノクローナル抗体又はその少なくとも１つの細胞表面分子結合フラグメント又はドメインであるか、又はそれを含み、好ましくは、セツキシマブ、ダラツムマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、パニツムマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、ポラツズマブ、オビヌツズマブ、ＩｇＧ型のＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ハーセプチン、アレムツズマブ、ピナツズマブ、ＯＫＴ－１０抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、表Ａ２又は表Ａ３又は表Ａ４の抗体のいずれか１つ、好ましくはセツキシマブ又はトラスツズマブ又はＯＫＴ－９、或いはその少なくとも１つの細胞表面分子結合フラグメント又はドメインを含むか、或いはそれからなる。

【００２８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、オリゴヌクレオチド、核酸、及びゼノ核酸のいずれか１つ以上を含むか又はそれからなり、好ましくは、ベクター、遺伝子、細胞自殺を誘導するトランスジーン、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、ｍＲＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ブリッジ型核酸（ＢＮＡ）、２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノ核酸（ＦＡＮＡ）、２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレンブリッジ型核酸、３’－フルオロヘキシトール核酸（ＦＨＮＡ）、プラスミド、グリコール核酸（ＧＮＡ）、及びトレオース核酸（ＴＮＡ）、又はその誘導体、より好ましくはＢＮＡ、例えばＨＳＰ２７タンパク質発現をサイレンシングするためのＢＮＡのいずれか１つ以上から選択され

る。

【００２９】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、オリゴヌクレオチド、核酸、及びゼノ核酸のいずれか１つ以上を含むか又はそれからなり、好ましくは、ベクター、遺伝子、細胞自殺を誘導するトランスジーン、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、ｍＲＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ブリッジ型核酸（ＢＮＡ）、２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノ核酸（ＦＡＮＡ）、２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレンブリッジ型核酸、３’－フルオロヘキシトール核酸（ＦＨＮＡ）、プラスミド、グリコール核酸（ＧＮＡ）、及びトレオース核酸（ＴＮＡ）、又はその誘導体、より好ましくはＢＮＡ、例えばＨＳＰ２７タンパク質発現をサイレンシングするためのＢＮＡのいずれか１つ以上から選択される。少なくとも１つのエフェクター部分は、例えば、２つの異なる遺伝子をサイレンシングするための２つの異なる（アンチセンス）オリゴヌクレオチドである。

【００３０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分は、少なくとも１つのタンパク質性分子を含むか又はそれからなり、好ましくは、ペプチド、タンパク質、酵素、例えばウレアーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼ、リボソーム不活性化タンパク質、表Ａ５から選択されるタンパク質性毒素のいずれか１つ以上から選択され、より好ましくは、ウイルス毒素、例えばアポプチン、細菌毒素、例えば志賀毒素、志賀毒素様毒素、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素（ＰＥ）若しくはＰＥの外毒素Ａ、全長若しくは短縮型ジフテリア毒素（ＤＴ）、コレラ毒素；真菌毒素、例えばアルファサルシン；リボソーム不活性化タンパク質及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖を包含する植物毒素、例えばジアンチン、例えばジアンチン－３０若しくはジアンチン－３２、サポリン、例えばサポリン－Ｓ３若しくはサポリン－Ｓ６、ブーガニン、ブーガニンの脱免疫化誘導体デブーガニン、志賀毒素様毒素Ａ、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、リシン、リシンＡ鎖、モデシン、モデシンＡ鎖、アブリン、アブリンＡ鎖、ボルケンシン、ボルケンシンＡ鎖、ビスクミン、ビスクミンＡ鎖；又は動物若しくはヒト毒素、例えばカエルＲＮａｓｅ、又はヒトからのグランザイムＢ若しくはアンギオゲニン、又はそのいずれかのフラグメント若しくは誘導体のいずれか１つ以上から選択され；好ましくは、タンパク質毒素はジアンチン及び／又はサポリンである。

【００３１】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター分子が、少なくとも１つのペイロードを含むか又はそれからなり、好ましくは、リボソームを標的化する毒素、伸長因子を標的化する毒素、チューブリンを標的化する毒素、ＤＮＡを標的化する毒素、及びＲＮＡを標的化する毒素のいずれか１つ以上、より好ましくは、エムタンシン、パスドトクス、メイタンシノイド誘導体ＤＭ１、メイタンシノイド誘導体ＤＭ４、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ、ベドチン）、モノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ、マホドチン）、カリケアミシン、Ｎ－アセチル－γ－カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）二量体、ベンゾジアゼピン、ＣＣ－１０６５アナログ、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ミトキサントロン、チューブリシン、インドリノベンゾジアゼピン、ＡＺ１３５９９１８５、クリプトフィシン、リゾキシン、メトトレキサート、アントラサイクリン、カンプトテシンアナログ、ＳＮ－３８、ＤＸ－８９５１ｆ、エキサテカンメシレート、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素の短縮型形態（ＰＥ３８）、デュオカルマイシン誘導体、アマニチン、α－アマニチン、スプライソスタチン、タイランスタチン、オゾガマイシン、テシリン、アンバースタチン２６９、及びソラブタンシンのいずれか１

つ以上、又はその誘導体から選択される。

【００３２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、少なくとも１つのリンカーを介して細胞表面分子標的化分子に共有結合されるか、又は細胞表面分子標的化分子に直接的に結合されるかどちらかである。

【００３３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、細胞表面分子標的化分子に共有結合され、それによって、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチン抗体－薬物コンジュゲート、並びに表Ａ２及び表Ａ３の抗体－薬物コンジュゲートのいずれか１つを形成する。

【００３４】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子、好ましくは細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に、サポニン上のアルデヒド官能基を介して、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分上のアミノ酸残基を介して、サポニン上のアルデヒド官能基、好ましくは１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基を介して、共有結合される。

【００３５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのアルデヒド官能基、好ましくは少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、チオ－エーテル結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる。

【００３６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、サポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含み、サポニンは、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、前記グルクロン酸官能基を介して、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分上のアミノ酸残基を介して、共有結合される。

【００３７】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のアミン基、例えば細胞表面分子標的化分子の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分のリジン又はＮ末端のアミン基に、共有結合的にカップリングされる。

【００３８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／或いは少なくとも１つのエフェクター部分に、直接的に、或いは少なくとも１つのリンカー、例えばＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づく及び／若しくは１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに基づく二官能性リンカー、又は三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーを介してどちらかで、共有結合される。

【００３９】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、三官能性リンカーが、それに少なくとも１つのサポニンが共有結合される第２の化学基、細胞表面分子標的化分子に共有結合するための第３の化学基、及び少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための第１の化学基を含み、好ましくは、三官能性リンカーが、スキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【００４０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に、三官能性リンカーを含む少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、この三官能性リンカーには、細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクター部分両方が結合され、好ましくは、三官能性リンカーは、スキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【００４１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含み、任意に、前記切断可能なリンカーは、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能なリンカーは、酸性条件下での切断を受けるヒドラゾン結合若しくはヒドラジド結合、及び／又はタンパク質分解、例えばカテプシンＢによるタンパク質分解に感受性の結合、及び／又は還元的条件下での切断に感受性の結合、例えばジスルフィド結合から選択される切断可能な結合を含む。

【００４２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含み、前記切断可能なリンカーは、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５で、より好ましくはｐＨ≦５．５で、インビボで切断を受ける。

【００４３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、アミド結合を形成するリジン側鎖に及び／又はチオ－エーテル結合若しくはジスルフィド結合を形成するシステイン側鎖に共有結合され、リジン及び／又はシステインは、細胞表面分子標的化分子に含まれ、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に含まれ、少なくとも１つのサポニンは、直接的にリジン及び／若しくはシステインに結合されるか、又は任意に切断可能なリンカー及び／若しくは三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーを含む少なくとも１つのリンカーを介して結合されるかどちらかである。

【００４４】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、リンカーが、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づき、及び／又は１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカー、切断可能なリンカーに基づき、並びに／或いはジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ヒドラジド結合のいずれか１つ以上が関わる。

【００４５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、リンカーは、ポリマー又はオリゴマー構造を含み、かつさらに骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための少なくとも１つの第４の化学基を含む骨格であるか、又はそれを含む。

【００４６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、切断可能な結合を介して及び／又は非切断可能な結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される。

【００４７】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、切断可能な結合が、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、及び光誘導性条件のいずれかの下で切断を受け、好ましくは、切断可能な結合は、酸性条件下での切断を受けるヒドラゾン結合若しくはヒドラジド結合、及び／又はタンパク質分解、例えばカテプシンＢによるタンパク質分解に感受性の結合、及び／又は還元的条件下での切断を受ける結合、例えばジスルフィド結合を含む。
【００４８】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、切断可能な結合は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５で、より好ましくはｐＨ≦５．５で、インビボでの切断を受ける。
【００４９】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、ヒドラジド結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、ジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ペプチド結合、又はエステル結合のいずれか１つ以上を介して、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介して、共有結合される。
【００５０】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、及びヒドラジド結合のいずれか１つ以上を介して共有結合され、この結合は、好ましくは、本発明に従う切断可能であり、好ましくは、少なくとも１つのサポニンは、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基を介して共有結合される。
【００５１】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーが、チオ－エーテル結合を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる。
【００５２】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造にアミド結合を介して共有結合され、好ましくは、少なくとも１つのサポニンは、存在するときには、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される。
【００５３】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のアミン基、例えば骨格のポリマー又はオリゴマー構造のリジン又はＮ末端のアミン基に共有結合的にカップリングされる。
【００５４】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が関わり、及び／又は、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が関わる。

【００５５】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合的にカップリングするための骨格の少なくとも１つの第４の化学基が、クリックケミストリー基であり、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン、又はアルキン、又はこれらの基の環状誘導体のいずれか１つ以上、好ましくはアジド基から選択される。
【００５６】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、骨格のポリマー又はオリゴマー構造が、直鎖、分岐、及び／若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、ＤＮＡ、ポリペプチド、ポリリジン、ポリエチレングリコール、又はこれらのポリマー若しくはオリゴマー構造の集合体を含み、この集合体が、好ましくは共有結合的な架橋によって組み上げられる。
【００５７】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、定められた数のサポニン又は定められた範囲のサポニン、好ましくは１～１２８個のサポニン、又は少なくとも２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、又は１２８個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば７、９、１２個のサポニンである。
【００５８】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、コンジュゲートが、１つよりも多くのサポニン、好ましくは２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、又は１～１００個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば、７、９、１２個のサポニンを含み、直接的に、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分のアミノ酸残基を介して、好ましくはシステインに及び／又はリジンに、共有結合され、並びに／或いは、請求項２８～４０のいずれか１つの少なくとも１つのリンカーを介して及び／又は少なくとも１つの切断可能なリンカーを介して及び／又は少なくとも１つのポリマー若しくはオリゴマー骨格、好ましくはかかる骨格の１～８つ若しくはかかる骨格の２～４つを介して、共有結合され、１～３２個のサポニン、好ましくは２、３、４、５、６、８、１０、１６、又は３２個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば７、９、１２個のサポニンが、少なくとも１つの骨格に共有結合される。
【００５９】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に三官能性リンカーを介して共有結合され、三官能性リンカーは、少なくとも１つのサポニンが直接的に或いは切断可能なリンカーなどのリンカーを介して及び／又はポリマー若しくはオリゴマー構造を含む骨格を介してどちらかでそれに共有結合される第２の化学基と、三官能性リンカーへの骨格の共有結合的カップリングのための本発明に従う第４の化学基とを含み、三官能性リンカーは、さらに、細胞表面分子標的化分子への共有結合のための第３の化学基を含み、かつ少なくとも１つのエフェクター部分への共有結合のための第１の化学基を含み、細胞表面分子標的化分子は第３の化学基に結合され、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分は第１の化学基に結合され、好ましくは、三官能性リンカーはスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。
【００６０】
本発明のある態様は医薬組成物に関し、本発明のコンジュゲートと、任意に薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤とを含む。
【００６１】
本発明のある態様は、医薬として使用するための、本発明のコンジュゲートに関するか、又は本発明の医薬組成物に関する。
【００６２】
本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の処置又は防止において使用するための、本

発明のコンジュゲートに関するか、又は本発明の医薬組成物に関する。
【００６３】
本発明のある態様は、次のＡＤＣ及びＡＯＣ並びにそれらの半完成コンジュゲートのいずれかに関し、本発明の細胞表面分子標的化分子を含み、かつ本発明の少なくとも１つのエフェクター部分を含むか若しくは本発明の少なくとも１つのサポニンを含むかどちらか、又はその両方である：
【００６４】
抗ＥＧＦＲ抗体－サポニン；
抗ＥＧＦＲ抗体－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン；
抗ＥＧＦＲ抗体－ＳＯ１８６１；
抗ＥＧＦＲ抗体－ＧＥ１７４１；
抗ＥＧＦＲ抗体－ＳＡ１６４１；
抗ＥＧＦＲ抗体－Ｑｕｉｌ－Ａ；
抗ＥＧＦＲ抗体－ＱＳ－２１；
抗ＥＧＦＲ抗体－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００６５】
セツキシマブ－サポニン；
セツキシマブ－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン；
セツキシマブ－ＳＯ１８６１；
セツキシマブ－ＧＥ１７４１；
セツキシマブ－ＳＡ１６４１；
セツキシマブ－Ｑｕｉｌ－Ａ；
セツキシマブ－ＱＳ－２１；
セツキシマブ－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００６６】
抗ＨＥＲ２抗体－サポニン；
抗ＨＥＲ２抗体－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン；
抗ＨＥＲ２抗体－ＳＯ１８６１；
抗ＨＥＲ２抗体－ＧＥ１７４１；
抗ＨＥＲ２抗体－ＳＡ１６４１；
抗ＨＥＲ２抗体－Ｑｕｉｌ－Ａ；
抗ＨＥＲ２抗体－ＱＳ－２１；
抗ＨＥＲ２抗体－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００６７】
トラスツズマブ－サポニン；
トラスツズマブ－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテル

ペンサポニン；
トラスツズマブ－ＳＯ１８６１；
トラスツズマブ－ＧＥ１７４１；
トラスツズマブ－ＳＡ１６４１；
トラスツズマブ－Ｑｕｉｌ－Ａ；
トラスツズマブ－ＱＳ－２１；
トラスツズマブ－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００６８】
抗ＣＤ７１抗体－サポニン；
抗ＣＤ７１抗体－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン；
抗ＣＤ７１抗体－ＳＯ１８６１；
抗ＣＤ７１抗体－ＧＥ１７４１；
抗ＣＤ７１抗体－ＳＡ１６４１；
抗ＣＤ７１抗体－Ｑｕｉｌ－Ａ；
抗ＣＤ７１抗体－ＱＳ－２１；
抗ＣＤ７１抗体－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００６９】
ＯＫＴ－９－サポニン；
ＯＫＴ－９－トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン；
ＯＫＴ－９－ＳＯ１８６１；
ＯＫＴ－９－ＧＥ１７４１；
ＯＫＴ－９－ＳＡ１６４１；
ＯＫＴ－９－Ｑｕｉｌ－Ａ；
ＯＫＴ－９－ＱＳ－２１；
ＯＫＴ－９－Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニン；
【００７０】
抗ＥＧＦＲ抗体－オリゴヌクレオチド；
抗ＥＧＦＲ抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
抗ＥＧＦＲ抗体－ｓｉＲＮＡ；
抗ＥＧＦＲ抗体－アンチセンスＢＮＡ；
抗ＥＧＦＲ抗体－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
抗ＥＧＦＲ抗体－タンパク質性毒素；
抗ＥＧＦＲ抗体－リボソーム不活性化タンパク質；
抗ＥＧＦＲ抗体－ジアンチン；
抗ＥＧＦＲ抗体－サポリン；
【００７１】
セツキシマブ－オリゴヌクレオチド；
セツキシマブ－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
セツキシマブ－ｓｉＲＮＡ；
セツキシマブ－アンチセンスＢＮＡ；
セツキシマブ－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
セツキシマブ－タンパク質性毒素；

セツキシマブ－リボソーム不活化タンパク質；
セツキシマブ－ジアンチン；
セツキシマブ－サポリン；
【００７２】
抗ＨＥＲ２抗体－オリゴヌクレオチド；
抗ＨＥＲ２抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
抗ＨＥＲ２抗体－ｓｉＲＮＡ；
抗ＨＥＲ２抗体－アンチセンスＢＮＡ；
抗ＨＥＲ２抗体－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
抗ＨＥＲ２抗体－タンパク質性毒素；
抗ＨＥＲ２抗体－リボソーム不活性化タンパク質；
抗ＨＥＲ２抗体－ジアンチン；
抗ＨＥＲ２抗体－サポリン；
【００７３】
トラスツズマブ－オリゴヌクレオチド；
トラスツズマブ－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
トラスツズマブ－ｓｉＲＮＡ；
トラスツズマブ－アンチセンスＢＮＡ；
トラスツズマブ－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
トラスツズマブ－タンパク質性毒素；
トラスツズマブ－リボソーム不活化タンパク質；
トラスツズマブ－ジアンチン；
トラスツズマブ－サポリン；
抗ＣＤ７１抗体－オリゴヌクレオチド；
抗ＣＤ７１抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
抗ＣＤ７１抗体－ｓｉＲＮＡ；
抗ＣＤ７１抗体－アンチセンスＢＮＡ；
抗ＣＤ７１抗体－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
抗ＣＤ７１抗体－タンパク質性毒素；
抗ＣＤ７１抗体－リボソーム不活性化タンパク質；
抗ＣＤ７１抗体－ジアンチン；
抗ＣＤ７１抗体－サポリン；
【００７４】
ＯＫＴ－９－オリゴヌクレオチド；
ＯＫＴ－９－アンチセンスオリゴヌクレオチド；
ＯＫＴ－９－ｓｉＲＮＡ；
ＯＫＴ－９－アンチセンスＢＮＡ；
ＯＫＴ－９－アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）；
ＯＫＴ－９－タンパク質性毒素；
ＯＫＴ－９－リボソーム不活性化タンパク質；
ＯＫＴ－９－ジアンチン；
ＯＫＴ－９－サポリン；
【００７５】
抗ＥＧＦＲ抗体（－オリゴヌクレオチド）（－サポニン）。オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＢＮＡ、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）のいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーターＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａ

の水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＥＧＦＲ抗体は好ましくはセツキシマブである；

【００７６】

抗ＥＧＦＲ抗体（－タンパク質性毒素）（－サポニン）。タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン、及びサポリンのいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＥＧＦＲ抗体は好ましくはセツキシマブである；

【００７７】

抗ＨＥＲ２抗体（－オリゴヌクレオチド）（－サポニン）。オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＢＮＡ、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）のいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＨＥＲ２抗体は、好ましくはトラスツズマブである；

【００７８】

抗ＨＥＲ２抗体（－タンパク質性毒素）（－サポニン）。タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン、及びサポリンのいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＨＥＲ２抗体は、好ましくはトラスツズマブである；

【００７９】

抗ＣＤ７１抗体（－オリゴヌクレオチド）（－サポニン）。オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＢＮＡ、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）のいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＣＤ７１抗体は、好ましくはＯＫＴ－９である；

【００８０】

抗ＣＤ７１抗体（－タンパク質性毒素）（－サポニン）。タンパク質性毒素は、リボソーム不活性化タンパク質、ジアンチン、及びサポリンのいずれか１つ以上であり、サポニンは、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、抗ＣＤ７１抗体は、好ましくはＯＫＴ－９である。

【００８１】

ある実施形態は、本発明の半完成コンジュゲート又は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子はセツキシマブ、トラスツズマブ、ＯＫＴ－９から選択され、並びに／或いはエフェクター部分はジアンチン、サポリン、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）から選択され、並びに／或いはサポニンはＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンから選択される。

【００８２】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子はセツキシマブ、トラスツズマブ、ＯＫＴ－９から選択され、並びに／或いはエフェクター部分はジアンチン、サポリン、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）から選択され、並びに／或いはサポニンはＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンから選択される。

【００８３】

本発明のある態様は、構造ＣのＡＤＣ、ＡＯＣ、又は半完成ＡＤＣコンジュゲート若しくは半完成ＡＯＣコンジュゲートに関し、本発明の細胞表面分子標的化分子を含み、かつ本発明の少なくとも１つのエフェクター部分を含み、及び／又は本発明の少なくとも１つのサポニンを含む：

Ａ（－Ｓ）ｂ（－Ｅ）ｃ

構造Ｃ

式中、Ａは、細胞表面分子標的化分子であり；

Ｓはサポニンであり；

Ｅは、エフェクター部分であり；

ｂ＝０～６４、好ましくは０、１、２、３、４、８、１６、３２、６４、又はその間のいずれかの整数又は分数であり；

ｃ＝０～８、好ましくは０、１、２、３、４、６、８、又はその間のいずれかの整数又は分数であり、

ＳはＡ及び／又はＥにカップリングされ、ＥはＡ及び／又はＳにカップリングされ、好ましくは、ＳはＡにカップリングされ、ＥはＡにカップリングされる。

【００８４】

ある実施形態は本発明の構造Ｃであり、式中、Ａは抗ＥＧＦＲ抗体、例えばセツキシマブ、抗ＨＥＲ２抗体、例えばトラスツズマブ、抗ＣＤ７１抗体、例えばＯＫＴ－９であり、並びに／或いは式中、Ｓは、サポニン、トリテルペノイドサポニン、及び／又は位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有しかつ任意にサポニンのＣ－３ベーターＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分中のサポニンのいずれか１つ以上であり、並びに／或いは式中、Ｅは、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＢＮＡ、及びアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）のいずれか１つ以上、及び／又はタンパク質性毒素、リボソーム不活化タンパク質、ジアンチン、及びサポリンのいずれか１つ以上である。

【００８５】

ある実施形態は、本発明の構造Ｃ、本発明のコンジュゲート、又は本発明の半完成コンジュゲートであり、存在する場合にはサポニン及び／又は存在する場合にはエフェクター部分は、切断可能なリンカーなどの少なくとも１つのリンカーを介して、及び／又は少なくとも１つのオリゴマー若しくはポリマー骨格、例えばＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート若しくは３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＰＤＰ）、及び１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ）

に基づくリンカー、及び例えばＧ４－デンドロンなどのデンドロンに基づく骨格、又はスキームＩＩの三官能性リンカーなどの三官能性リンカーを介して共有結合的にカップリングされる。並びに／或いは、少なくとも１つの細胞表面分子標的化分子、好ましくはモノクローナル抗体又はそのフラグメント若しくはドメインの少なくとも１つのリジン側鎖及び／又はシステイン側鎖が、サポニン及び／又はエフェクター部分及び／又はリンカー及び／又は切断可能なリンカー及び／又は骨格との共有結合に関わり、好ましくは、サポニン及び／又はエフェクター部分は、細胞表面分子標的化分子、好ましくは抗体に共有結合的に連結され、共有結合的な連結は、アミド結合、ヒドラゾン結合、ジスルフィド結合を含むか又はそれからなる。

【００８６】

本発明のある態様は、医薬としての、前に言及されたコンジュゲート、ＡＤＣ、ＡＯＣ、半完成ＡＤＣ、半完成ＡＯＣのいずれかの使用に関する。

【００８７】

本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の処置又は予防において使用するための、前に言及されたコンジュゲート、ＡＤＣ、ＡＯＣ、半完成ＡＤＣ、半完成ＡＯＣのいずれかの使用に関する。

【００８８】

定義

用語「リンカー」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、ペプチド結合を介して複合体化したアミノ酸残基の直線状ストレッチ又は化学的部分を言う。これは、分子又は原子を別の分子に、例えばリガンドに又はエフェクター分子に又は骨格に取り付ける。典型的には、リンカーは化学結合によって連結された原子の鎖を含む。当分野で公知のいずれかのリンカー分子又はリンカーテクノロジーが本開示に用いられ得る。指示されているところでは、リンカーは、リンカーとの共有結合的連結又は共有結合を形成することに好適なかかる分子上の化学基を介した分子の共有結合のためのリンカーである。リンカーは非切断可能なリンカーであり得る。例えば、リンカーは生理条件において安定である。リンカーは、切断可能なリンカー、例えば、酵素の存在下において、又は特定のｐＨ範囲又は値において、又はヒト細胞などの哺乳類細胞のリソソーム及び後期エンドソームなどのエンドソームの細胞内条件などの生理条件下において切断可能であるリンカーであり得る。本開示の文脈において用いられ得る例示的なリンカーは、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）、スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート、又は３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＰＤＰ）、及び１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ）を包含するが、これらに限定されない。

【００８９】

用語「三官能性リンカー」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、３つの分子のそれぞれの化学基を介して３つの分子に取り付くリンカーを言う。当業者は、本開示及び普通の一般的な知識に基づいて、かかる三官能性リンカーを設計することができる。かかる三官能性リンカーは、例えば、チオール－エン反応を行うためのチオール基を見せる標的化リガンドへのコンジュゲート化のために用いられ得るマレイミド基を見せ得る。加えて、三官能性リンカーは、アジドを持つサポニンとのいわゆる歪み促進型のアルキン－アジド環化付加（ＳＰＡＡＣ、クリックケミストリー）を行うためのジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）基を見せ得る。最後に、三官能性リンカーは、トランス－シクロオクチン（ＴＣＯ）基などの第３の官能基を得て、テトラジン（Ｔｚ）を持つエフェクター分子とのいわゆる逆電子要請型Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ（ＩＥＤＤＡ）反応を行い得る。当業者は、三官能性リンカーの化学基が３つ全て同じであり得るか若しくは異なり得るか、又はリンカーは、分子を三官能性リンカーに連結するための同じ化学基の２つを含み得るということを了解するであろう。三官能性リンカー間の形成される結合は、共有結合的又は非共有結合的であり得、共有結合が好ましい。それぞれの化学基を介する三官能性リンカーと

１つ又は２つ又は３つの結合分子との間における形成される結合は、例えばヒト細胞などの哺乳類細胞のエンドソーム及びリソソームなどの細胞内の酸性条件下において切断可能な、切断可能な（不安定な）結合であり得るか、又は非切断可能な結合であり得る。当然のことながら、三官能性リンカーは共有結合を形成するための１つ又は２つの化学基を包摂し得、さらなる２つ又は１つの化学基（単数又は複数）はそれぞれ非共有結合を形成するためである。当然のことながら、三官能性リンカーは切断可能な結合を形成するための１つ又は２つの化学基を包摂し得、さらなる２つ又は１つの化学基（単数又は複数はそれぞれ非切断可能な結合を形成するためである。

【００９０】

例えば用語「切断可能なリンカー」又は「切断可能な結合」において用いられる用語「切断可能な」は、その通例の科学的意味を有し、ここでは、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、又は光誘導性条件下において切断を受けることを言う。例えば、切断可能なリンカーは酸性条件下で切断を受け得る。好ましくは、前記切断可能なリンカーは、インビボにおいて、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５において、より好ましくはｐＨ≦５．５において切断を受ける。別の例として、切断可能なリンカーは、酵素による、例えばカテプシンによる切断を受け得る。さらにその上、還元条件下で切断可能な共有結合の例は、ジスルフィド結合である。

【００９１】

オリゴマー又はポリマー骨格の文脈における用語「オリゴマー」及び「ポリマー」は、その通例の科学的意味を有する。ここでは、ポリマーは、主として又は完全に、一緒に結合された多数の等しいか又は類似の単位から組み上げられた分子構造を有する物質を言う；ここでは、オリゴマーは、その分子が比較的少数の繰り返し単位からなるポリマーを言う。例えば、５～１０個以下の等しいか又は類似の単位を含む構造はオリゴマー構造と呼ばれ得、１０～５０個以上のモノマー単位を含む構造はポリマー構造と呼ばれ得、１０個のモノマー単位の構造はオリゴマー的又はポリマー的どちらかと呼ばれ得る。

【００９２】

用語「結合部位」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、別の分子が結合し得るある分子、例えばタンパク質、ＤＮＡ、又はＲＮＡ上の領域又はエピトープを言う。

【００９３】

用語「骨格」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、１つ以上の分子、例えばリガンド分子、本発明のサポニン、グリコシド、エフェクター分子が直接的に又は切断可能なリンカーなどのリンカーを介してどちらかで共有結合され得るオリゴマー又はポリマー鋳型又は担体又はベース（ベース分子又はベース構造）を言う。骨格は、構造的に秩序だった形成、例えばポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン化ポリマー、若しくはデンドロン化オリゴマーを有し得るか、又は集合体化したポリマー構造、例えばヒドロゲル、ミクロゲル、ナノゲル、安定化したポリマーミセル、若しくはリポソームを有し得るが、コレステロール／リン脂質混合物などのモノマーの非共有結合的集合体からなる構造は排除する。骨格は、ポリマー又はオリゴマー構造、例えばポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）；又はポリエチレングリコール、ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマーなどの構造；又はポリ（デキストリン）、多又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン又はポリデキストロース；又は天然の及び／若しくは人工のポリ若しくはオリゴアミノ酸、例えばポリリジン若しくはペプチド若しくはタンパク質、ＤＮＡオリゴ若しくはポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー若しくはＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーなどの構造を含み得る。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は生体適合性であり、生体適合性は、ポリマー又はオリゴマー構造が、生物における実質的な急性又は慢性毒性を示さず、そのまま排泄され得るか、又は体の代謝によって排泄可能な及び／若しくは生理的な化合物まで完全に分解され得るかどちらかであるということを意味する。

【００９４】
用語「リガンド」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、標的細胞、例えば標的癌細胞又は標的自己免疫細胞に発現される標的細胞表面分子又は標的細胞表面受容体に選択的に結合し得るいずれかの分子（単数又は複数）を言う。リガンドは、標的細胞上の受容体又は他の抗原によって含まれるエピトープに結合し得る。好ましくは、細胞結合リガンドは抗体である。
【００９５】
本明細書で用いられる用語「抗体」は最も幅広い意味で用いられ、これは、クラスＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、又はＩｇＤ（又はそのいずれかのサブクラス）に属するタンパク質として定められる免疫グロブリン（Ｉｇ）、或いは免疫グロブリンの機能的な結合フラグメント又は結合ドメインを言い得る。本発明の文脈において、免疫グロブリンの「結合フラグメント」又は「結合ドメイン」は、親の免疫グロブリンの抗原結合フラグメント若しくはドメイン又は他の誘導体として定められ、これはかかる親の免疫グロブリンの抗原結合活性を本質的に維持する。機能的なフラグメント及び機能的なドメインは、本発明の意味において、抗原に対するそれらの親和性が親の免疫グロブリンのものよりも低い場合であっても、抗体である。本発明に従う「機能的なフラグメント及びドメイン」は、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆａｂフラグメント、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、１価ＩｇＧ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、還元型ＩｇＧ（ｒＩｇＧ）、ミニボディ、ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、Ｆｃ融合タンパク質、ナノボディ、可変Ｖドメイン、例えばＶＨＨ、Ｖｈ、並びに他の型の抗原認識免疫グロブリンフラグメント及びドメインを包含するが、これらに限定されない。フラグメント及びドメインは、ＣＨ１及びＣＬドメインの間で起こる分子間ジスルフィド相互作用を最小化又は完全に除去するように操作され得る。機能的なフラグメント及びドメインは、それらのより小さいサイズゆえに、より多大な腫瘍透過という利点を提供する。加えて、機能的なフラグメント又はドメインは、免疫グロブリン丸ごとと比較して、より均一に腫瘍塊に分布し得る。
【００９６】
本発明の抗体（免疫グロブリン）は、二機能性又は多機能性であり得る。例えば、二機能性抗体は１つの受容体又は抗原に対する特異性を有する１つのアームを有し、他のアームは異なる受容体又は抗原を認識する。代替的には、二機能性抗体の各アームは、標的細胞の同じ受容体又は抗原の異なるエピトープに対する特異性を有し得る。
【００９７】
本発明の抗体（免疫グロブリン）は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、リサーフェシングされた抗体、抗イディオタイプ抗体、マウス抗体、ラット抗体、ラット／マウスハイブリッド抗体、ラマ抗体、重鎖のみのラマ抗体、重鎖のみの抗体、及び獣医学的抗体であり得るが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の抗体（免疫グロブリン）はモノクローナル抗体である。リサーフェシングされた、キメラ、ヒト化、及び完全ヒト抗体もまたより好ましい。なぜなら、それらはヒトにおいて免疫原性を引き起こすことがより蓋然的でないからである。本発明のＡＤＣの抗体は、好ましくは、癌細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞の表面に発現された抗原に特異的に結合しながら、いずれかの健康な細胞は本質的に変わらずに残す（例えば、かかる正常細胞に結合しないことによるか、又はより少ない程度の数及び／若しくは親和性によってかかる健康な細胞に結合することによる）。
【００９８】
本発明のＡＤＣに用いられ得る特異的な抗体は、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、例えばトラスツズマブ及びペルツズマブ、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体、例えばリツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、及びイブリツモマブ、抗ＣＡ１２５モノクローナル抗体、例えばオレゴボマブ、抗ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）モノクローナル抗体、例えばエドレコロマブ、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、及びニモツズマブ、抗ＣＤ３０モノクローナル抗体、例えばブレンツキシマブ、抗ＣＤ３３

モノクローナル抗体、例えばゲムツズマブ及びｈｕＭｙ９－６、抗血管インテグリンアルファ－ｖベーター３モノクローナル抗体、例えばエタラシズマブ、抗ＣＤ５２モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ、抗ＣＤ２２モノクローナル抗体、例えばエプラツズマブ、抗ＣＥＡモノクローナル抗体、例えばラベツズマブ、抗ＣＤ４４ｖ６モノクローナル抗体、例えばビバツズマブ、抗ＦＡＰモノクローナル抗体、例えばシブロツズマブ、抗ＣＤ１９モノクローナル抗体、例えばｈｕＢ４、抗ＣａｎＡｇモノクローナル抗体、例えばｈｕＣ２４２、抗ＣＤ５６モノクローナル抗体、例えばｈｕＮ９０１、抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、例えばダラツムマブ、抗ＣＡ６モノクローナル抗体、例えばＤＳ６、抗ＩＧＦ－ＩＲモノクローナル抗体、例えばシクスツムマブ及び３Ｂ７、抗インテグリンモノクローナル抗体、例えばＣＮＴＯ９５、及び抗シンデカン－１モノクローナル抗体、例えばＢ－Ｂ４を包含するが、これらに限定されない。ある実施形態は、Ｓｔｅｍｌｉｎｅのタンパク質－毒素コンジュゲートである：ＥＬＺＯＮＲＩＳ（商標）（ｔａｇｒａｘｏｆｕｓｐ、ＳＬ－４０１）のタンパク質－毒物コンジュゲートである。ＥＬＺＯＮＲＩＳは、広い範囲の悪性物上に存在する標的であるインターロイキン－３（ＩＬ－３）受容体α（ＣＤ１２３）を指向した新規の標的化治療である。

【００９９】

標的細胞の細胞受容体又は抗原に結合する抗体以外のいずれかの分子もまた、本発明のリガンド－薬物コンジュゲートの細胞結合リガンドとして用いられ得る。リガンドは、本発明に従って、共有結合されたサポニンを提供される。これらのリガンドは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、低分子を包含するが、これらに限定されない。これらの非抗体リガンドの例は、インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、及びＩＦＮ－γ）、トランスフェリン、レクチン、上皮成長因子（ＥＧＦ）及びＥＧＦ様ドメイン、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）、血小板由来成長因子（ＴＧＦ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、ワクシニア成長因子（ＶＧＦ）、インスリン及びインスリン様成長因子（ＩＧＦ、例えばＩＧＦ－１及びＩＧＦ－２）、他の好適なホルモン、例えば甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＴＲＨ）、メラニン細胞刺激ホルモン（ＭＳＨ）、ステロイドホルモン（例えばエストロゲン及びアンドロゲン）、ソマトスタチン、リンホカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、及びＩＬ－６）、コロニー刺激因子（ＣＳＦ、例えばＧ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、及びＧＭ－ＣＳＦ）、ボンベシン、ガストリン、Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ又はＲＧＤ、アプタマー（例えば、ＡＳ－１４１１、ＧＢＩ－１０、ＨＩＶ糖タンパク質に対するＲＮＡアプタマー）、低分子（例えば葉酸、アニスアミドフェニルボロン酸）、ビタミン（例えばビタミンＤ）、炭水化物（例えばヒアルロン酸、ガラクトース）である。

【０１００】

「エフェクター分子」又は「エフェクター部分」又は「ペイロード」は、その通例の科学的意味を有し、本発明の文脈においては、細胞内のエフェクター分子標的との相互作用によって細胞の代謝に影響するいずれかの物質である。このエフェクター分子標的は、エンドサイトーシス及びリサイクル経路の区画及び小胞の内腔を排除するがこれらの区画及び小胞の膜を包含する細胞内のいずれかの分子又は構造である。それゆえに、細胞内の前記構造は、核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体、ゴルジ体、他の輸送小胞、原形質膜の内部、及び細胞質基質を包含する。

【０１０１】

エフェクター分子又は部分は、原薬、例えば毒素、例えば、タンパク質性毒素、薬物、ポリペプチド、又はポリヌクレオチドである。本発明における原薬は、生物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳類、例えば非ヒト対象又は人類／ヒト対象において有益な結果を達成するために用いられるエフェクター分子又は部分である。利益は、疾患及び／又は症状及び／又は健康上の問題の診断、予後予測、処置、治癒、及び防止（予防）を包含する。原薬は、望まれないかつ場合によってはさらには有害な副作用（例えば治験中に観察される有害事象）にもまた至り得る。このケースでは、原薬が特定のケースにおいて好適であるかどうかを決めるために、長短が秤にかけられなければならない。ある細胞内

における原薬の効果が丸ごととして生物にとって圧倒的に有益である場合には、細胞は標的細胞と呼ばれる。ある細胞内における効果が丸ごととして生物にとって圧倒的に有害である場合には、細胞はオフターゲット細胞と呼ばれる。細胞培養及びバイオリアクターなどの人工系では、標的細胞及びオフターゲット細胞は目的に依存し、ユーザにより定められる。エフェクター分子及び部分の例は、薬物、毒素、ポリペプチド（例えば酵素）、ポリヌクレオチド（非天然アミノ酸又は核酸を含むポリペプチド及びポリヌクレオチドを包含する）、及びそれらのいずれかの組み合わせである。

【０１０２】

薬物であるエフェクター分子又はエフェクター部分は、抗癌剤、抗炎症剤、及び抗感染（例えば、抗真菌、抗細菌、抗寄生虫、抗ウイルス）薬剤を包含し得るが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の薬物分子は抗癌剤又は抗自己免疫薬剤である。好適な抗癌剤は、アルキル化剤、代謝阻害剤、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞毒性／抗腫瘍性抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、光増感剤、及びキナーゼ阻害剤を包含するが、これらに限定されない。「抗癌剤」の定義には：例えば、（ｉ）腫瘍に対するホルモン作用を制御又は阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節剤；（ｉｉ）副腎におけるエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤；（ｉｉｉ）抗アンドロゲン；（ｉｖ）タンパク質キナーゼ阻害剤；（ｖ）脂質キナーゼ阻害剤；（ｖｉ）アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの；（ｖｉｉ）リボザイム、例えばＶＥＧＦ発現阻害剤及びＨＥＲ２発現阻害剤；（ｖｉｉｉ）ワクチン、例えば遺伝子治療ワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤；（ｉｘ）血管新生阻害剤；並びに上のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、溶媒和物、及び誘導体もまた包含される。

【０１０３】

毒素であるエフェクター分子又は部分は、タンパク質性毒素（例えば細菌由来毒素及び植物由来毒素）、チューブリンフィラメントを標的化する毒素、ＤＮＡを標的化する毒素、ＲＮＡを標的化する毒素を包含し得るが、これらに限定されない。タンパク質性毒素の例は、サポリン、ジアンチン、リシン、モデシン、アブリン、ボルケンシン、ビスクミン、志賀毒素、志賀毒素様毒素、シュードモナス外毒素（ＰＥ。外毒素Ａとしても公知）、ジフテリア毒素（ＤＴ）、及びコレラ毒素である。チューブリンフィラメント標的化毒素の例は、メイタンシノイド（例えば、ＤＭ１及びＤＭ４）、オーリスタチン（例えば、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）及びモノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ））、トキソイド、チューブリシン、クリプトフィシン、リゾキシンである。ＤＮＡ標的化毒素の例は、カリケアミシン：Ｎ－アセチル－γ－カリケアミシン、ＣＣ－１０６５アナログ、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、ベンゾジアゼピン、カンプトテシンアナログ、及びアントラサイクリンである。ＤＮＡ標的化毒素の例は、アマニチン、スプライソスタチン、及びタイランスタチン（Ｔｈａｉｌａｎｓｔａｔｉｎ）である。本発明において用いられる毒素は、細胞を殺すか又は不活性化することができる原薬として定められる。好ましくは、標的化された毒素は、オフターゲット細胞に対してではなく、標的細胞に対してのみ又は少なくとも圧倒的に毒性である毒素である。標的化された毒素の正味の効果は、好ましくは、丸ごととして生物にとって有益である。

【０１０４】

ポリペプチドであるエフェクター分子又は部分は、例えば、例えば酵素補充、遺伝子制御機能などの失われた機能を回復するポリペプチド、又は毒素であり得る。エフェクター分子としてのポリペプチドの例は、例えばＣａｓ９；毒素（例えばサポリン、ジアンチン、ゲロニン、（デ）ブーガニン、アグロスチン、リシン（毒素Ａ鎖）；ポークウィード抗ウイルスタンパク質、アポプチン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素）、代謝酵素（例えば、アルギニノコハク酸リアーゼ、アルギニノコハク酸シンテターゼ）、凝血カスケードの酵素、修復酵素；細胞シグナル伝達の酵素；細胞周期制御因子；遺伝子制御因子（転写因子、例えばＮＦ－κＢ又は遺伝子リプレッサー、例えばメチオニンリプレッサー

）である。

【０１０５】

ポリヌクレオチドであるエフェクター分子又はエフェクター部分は、例えば、コード情報を含むポリヌクレオチド、例えばタンパク質をコードする遺伝子又はオープンリーディングフレームであり得る。それは、制御情報、例えばプロモーター若しくは制御エレメント結合領域、又はマイクロＲＮＡをコードする配列をもまた含み得る。かかるポリヌクレオチドは天然の及び人工の核酸を含み得る。人工核酸は、例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルフォリーノ及びロックド核酸（ＬＮＡ）、並びにグリコール核酸（ＧＮＡ）及びトレオース核酸（ＴＮＡ）を包含する。これらのそれぞれは、分子の骨格の変更によって、天然に存在するＤＮＡ又はＲＮＡから区別される。エフェクター分子としてのヌクレオチドの例は、例えば、ＤＮＡ：１本鎖ＤＮＡ（例えば、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのＤＮＡ）；直鎖２本鎖ＤＮＡ（例えば、凝固因子ＩＸ遺伝子）；環状２本鎖ＤＮＡ（例えば、プラスミド）；ＲＮＡ：ｍＲＮＡ（例えば、ＴＡＬエフェクター分子ヌクレアーゼ）、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ；アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ、例えばＰＮＡ、ＰＭＯ、ＬＮＡ、及びＢＮＡ）であるが、これらに限定されない。

【０１０６】

例えば、「タンパク質性分子」及び「タンパク質性毒素」に用いられる用語「タンパク質性」は、単一のｍＲＮＡからの発現産物として得られ得るアミノ酸残基の少なくとも１本のストリングを含む分子及び毒素である。かかる分子又は毒素は、さらに、いずれかの翻訳後修飾、炭水化物、例えばＮ又はＯ結合炭水化物、ジスルフィド結合、リン酸化、硫酸化（ｓｕｌｐｈａｔａｔｉｏｎ）などをいずれかの翻訳後修飾の結果として含み得、及び／又は、さらに、いずれかの他の修飾、例えば化学修飾からもたらされるものを含み得る（例えば、直接的に例えばアミノ酸側鎖への、又はタンパク質性分子を化学的に修飾するために分子に（共有結合的に）結合されかつタンパク質性分子に（共有結合的に）化学的に結合される少なくとも１つのリンカーを介したどちらかの、エフェクター部分、サポニン、骨格、リガンドなどの連結）から生じるもの）。用語「タンパク質性」は、かかる分子の集合体、例えばホモ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ六量体、又は複雑な集合体、例えばリボソームをもまた包摂及び包含する。

【０１０７】

例えば「特異的結合」及び「腫瘍細胞の表面に特異的に存在又は発現する受容体又は分子標的」及び同類の文脈において、用語「特異的」及び「特異的に」は当分野で公知のそれらの通常の科学的意味を有する。ここでは、例えば、第２の分子とは異なるさらなる分子への第１の分子のいずれかの推測上の結合に対して相対的により高い親和性でもって起こる第２の分子との第１の分子の結合相互作用、或いは、例えば受容体又は分子標的の数が考えられるときに、例えば、健康な細胞などの第２の型の細胞における　同じ受容体又は分子標的の発現の程度に対して相対的に腫瘍細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞などの第１の型の細胞の表面上の細胞表面受容体又は分子標的の発現又はより高い程度の発現を言うなどである。第２の型の細胞における発現は、腫瘍細胞上の発現のいずれかの程度に対して相対的に完全に不在か又は非常に低くあり得るなどである。さらにその上、例えば「特異的結合」において、用語「特異的」は当分野で公知のその通常の科学的意味を有し、ここでは、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性による別の分子との相互作用を有し得る分子を指示するという意味を有する。類似に、用語「特異性」は、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性を有する例えば２つの分子間の又は細胞と分子との間の相互作用を言う。免疫グロブリンなどの結合分子は、それらの結合部位、例えば免疫グロブリンの免疫グロブリン可変領域を介して、分子、例えばエピトープ、細胞表面受容体などの上の結合部位に、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性でもって結合する。本発明の文脈において、バックグラウンド相互作用は、典型的には、１０Ｅ－４ＭのK_Dよりも低い親和性による相互作用である。類似に、「特異的結合ドメイン」は、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親

和性でもって、分子、例えばエピトープ、細胞表面受容体などの上の結合部位に選好的に結合するドメインである。本発明の文脈において、「バックグラウンド相互作用」は、典型的には、１０Ｅ－４MのK$_D$よりも低い親和性による相互作用である。好ましくは、特異的結合ドメインは、約１０Ｅ－５MのK$_D$よりも高い親和性でもって結合する。

【０１０８】

用語「結合」は、バックグラウンド相互作用から区別され得る分子間の相互作用として定められる。

【０１０９】

本明細書において、用語「フラグメント」は、タンパク質ドメインの一部であるか又はインタクトなタンパク質ドメインを組み上げているアミノ酸配列を言う。本発明に従う結合フラグメントは、例えば腫瘍細胞などの有疾患細胞の表面上の細胞表面受容体などのそれぞれの標的に対する結合特異性を有さなければならない。

【０１１０】

用語「ＡＤＣ」又は「抗体－薬物コンジュゲート」は当業者に公知のその通例の科学的意味を有し、ここでは、例えば癌を処置するための標的化された治療として設計されたバイオ医薬品の薬物のあるクラスを言う。化学療法とは違って、ＡＤＣは、健康な細胞は見逃しながら、腫瘍細胞を標的化し殺すことを意図される。ＡＤＣは、生物活性な細胞毒性（抗癌性）のペイロード又は薬物に連結された抗体からなる。ＡＤＣは、モノクローナル抗体の標的化能を細胞毒性薬物の殺癌能と組み合わせる。それらは、健康な細胞と腫瘍中の腫瘍細胞などの有疾患組織とを識別する意図をもって設計される。

【０１１１】

用語「サポニナムアルブム」はその通常の意味を有し、ここでは、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ ｐａｎｉｃｕｌａｔａ及びＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ ａｒｏｓｔｉｉからのサポニンを含有するＭｅｒｃｋ ＫＧａＡ（ダルムシュタット、ドイツ）により産生されるサポニンの混合物を言い、ＳＡ１６５７及び主にＳＡ１６４１を含有する。

【０１１２】

用語「キラヤサポニン」はその通常の意味を有し、ここでは、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａのサポニン画分、それゆえに全ての他のＱＳサポニンの供給源を言い、主にＱＳ－１８及びＱＳ－２１を含有する。

【０１１３】

「ＱＳ－２１」又は「ＱＳ２１」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉ（～６３％）、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ（～３２％）、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉ（～３．３％）、及びＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌ（～１．７％）の混合物を言う。

【０１１４】

類似に、「ＱＳ－２１Ａ」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉ（～６５％）とＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ（～３５％）との混合物を言う。

【０１１５】

類似に、「ＱＳ－２１Ｂ」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉ（～６５％）とＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌ（～３５％）との混合物を言う。

【０１１６】

用語「Ｑｕｉｌ－Ａ」は、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからの市販の半精製抽出物を言い、可変な数量の５０個よりも多くの別個のサポニンを含有する。これらの多くは、ＱＳ－７、ＱＳ－１７、ＱＳ１８、及びＱＳ－２１に見出されるＣ－３ベーターＯＨ基におけるトリテルペン－三糖部分構造Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－を組み込んでいる。Ｑｕｉｌ－Ａに見出されるサポニンは、ｖａｎ Ｓｅｔｔｅｎ（１９９５）の表２に挙げられている（Ｄｉｒｋ Ｃ．ｖａｎ Ｓｅｔｔｅｎ，Ｇｅｒｒｉｔ ｖａｎ ｄｅ Ｗｅｒｋｅｎ，Ｇｉｊｓｂｅｒｔ Ｚｏｍｅｒ ａｎｄ Ｇｉｄｅｏｎ Ｆ．Ａ．Ｋｅｒｓｔｅｎ，Ｇｌｙｃｏｓｙｌ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ｉｍｍｕｎｏ－ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｃｔｉｖｅ Ｓａｐｏｎｉｎｓ ｉｎ ｔ

ｈｅ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａ Ｍｏｌｉｎａ Ｅｘｔｒａｃｔ ＱｕｉｌＡ，ＲＡＰＩＤ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ ＩＮ ＭＡＳＳ ＳＰＥＣＴＲＯＭＥＴＲＹ，ＶＯＬ．９，６６０－６６６（１９９５））。Ｑｕｉｌ－Ａ、及びキラヤサポニンもまた、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからのサポニンの画分であり、両方とも大きい種々の異なるサポニンを含有し、大きくオーバーラップする内容を有する。２つの画分は異なる精製手順によって獲得されるので、２つの画分はそれらの特定の組成が異なる。

【０１１７】

用語「ＱＳ１８６１」及び用語「ＱＳ１８６２」はＱＳ－７及びＱＳ－７ａｐｉを言う。ＱＳ１８６１は１８６１ダルトンの分子質量を有し、ＱＳ１８６２は１８６２ダルトンの分子質量を有する。ＱＳ１８６２は、Ｆｌｅｃｋ ｅｔ ａｌ．（２０１９）において表１のｎｏ．２８行に記載されている（Ｊｕｌｉａｎｅ Ｄｅｉｓｅ Ｆｌｅｃｋ，Ａｎｄｒｅｓａ Ｈｅｅｍａｎｎ Ｂｅｔｔｉ，Ｆｒａｎｃｉｎｉ Ｐｅｒｅｉｒａ ｄａ Ｓｉｌｖａ，Ｅｄｕａｒｄｏ Ａｒｔｕｒ Ｔｒｏｉａｎ，Ｃｒｉｓｔｉｎａ Ｏｌｉｖａｒｏ，Ｆｅｒｎａｎｄｏ Ｆｅｒｒｅｉｒａ ａｎｄ Ｓｉｍｏｎｅ Ｇａｓｐａｒｉｎ Ｖｅｒｚａ，Ｓａｐｏｎｉｎｓ ｆｒｏｍ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａ ａｎｄ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ：Ｐａｒｔｉｃｕｌａｒ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ２０１９，２４，１７１；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ２４０１０１７１）。記載されている構造はＱＳ－７のａｐｉバリアントＱＳ１８６２である。分子質量は１８６２ダルトンである。なぜなら、この質量はグルクロン酸にプロトンを包含する名目上の質量であるからである。中性ｐＨにおいては、分子は脱プロトン化される。ネガティブイオンモードで質量分析法によって測定するときに、測定される質量は１８６１ダルトンである。

【０１１８】

明細書及び請求項における用語第１、第２、第３及び同類は、必ずしもシークエンス的又は年代学的な順序を記載するためではなく、類似の要素を区別するために用いられる。用語は適当な状況においては交換可能である。本発明の実施形態は、本明細書に記載又は例解される以外のシークエンスで作動し得る。

【０１１９】

さらにその上、種々の実施形態は、「好ましい」又は「例えば（ｅ．ｇ．）」又は「例えば（ｆｏｒ ｅｘａｍｐｌｅ）」又は「具体的に」と言われるが、本発明の範囲を限定するよりはむしろ本発明が実装され得る例示的な様式として解釈されるべきである。

【０１２０】

請求項に用いられる用語「含む」は、その後に挙げられる要素又はステップに制限されると解釈されるべきではない；それは他の要素又はステップを排除しない。それは、言及された特徴、完全体、ステップ、又はコンポーネントの存在を特定すると解釈されることを必要とするが、１つ以上の他の特徴、完全体、ステップ、若しくはコンポーネント、又はそれらの群の存在又は追加を除外しない。それゆえに、表現「Ａ及びＢを含む医薬組成物」の範囲は、成分Ａ及びＢのみからなる医薬組成物に限定されるべきではなく本発明に関しては、医薬組成物の列挙された成分はＡ及びＢのみであり、さらに、請求項は、それらの成分の同等物を包含すると解釈されるべきである。類似に、表現「ステップＡ及びステップＢを含む方法」の範囲は、ステップＡ及びＢのみからなる方法に限定されるべきではなく、むしろ、本発明に関しては、方法の列挙されたステップはＡ及びＢのみであり、さらに、請求項は、それらのステップの同等物を包含すると解釈されるべきである。

【０１２１】

加えて、文脈が特徴のただ１つのみがあるということを明瞭に要求しない限り、不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」によるある特徴の参照は、特徴の１つよりも多く、例えばコンポーネント、賦形剤、サポニンなどが存在する可能性を排除しない。それゆえに、不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」は通常は「少なくとも１つ」を意味する。

【図面の簡単な説明】
【０１２２】
【図１－１】腫瘍標的化されたタンパク質毒素送達は、腫瘍を持つマウスにおいて、腫瘍体積縮減及び腫瘍成長阻害をもたらす。Ａ）Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおけるセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}の用量漸増（腹腔内ｉ．ｐ．）は、対照と比較して、腫瘍体積縮減を明らかにする。Ｂ、Ｃ）Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおけるセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}の用量漸増（腹腔内ｉ．ｐ．（Ｂ）又は静脈内ｉ．ｖ．（Ｃ））は、対照と比較して、腫瘍成長縮減を明らかにする。
【図１－２】腫瘍標的化されたタンパク質毒素送達は、腫瘍を持つマウスにおいて、腫瘍体積縮減及び腫瘍成長阻害をもたらす。Ａ）Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおけるセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}の用量漸増（腹腔内ｉ．ｐ．）は、対照と比較して、腫瘍体積縮減を明らかにする。Ｂ、Ｃ）Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおけるセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}の用量漸増（腹腔内ｉ．ｐ．（Ｂ）又は静脈内ｉ．ｖ．（Ｃ））は、対照と比較して、腫瘍成長縮減を明らかにする。
【図２】対照と比較した腫瘍を持つマウスにおける腫瘍標的化アンチセンスＢＮＡオリゴヌクレオチド送達及び遺伝子サイレンシング。Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおける３０ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1,8}は、対照と比較して、誘導された効率的な腫瘍標的化遺伝子サイレンシングを明らかにしている。
【図３】対照と比較した腫瘍を持つマウスにおける腫瘍標的化アンチセンスＢＮＡオリゴヌクレオチド送達及び遺伝子サイレンシング。Ａ４３１腫瘍を持つマウスにおける３０ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}は、対照と比較して、誘導された効率的な腫瘍標的化遺伝子サイレンシングを明らかにする。
【図４－１】本発明に従う、癌細胞におけるＨＥＲ２又はＥＧＦＲ標的化タンパク質毒素送達及び殺細胞。Ａ、Ｂ）ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（ＨＥＲ２$^{-}$）における、トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}処置及び対照。Ｃ、Ｄ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。
【図４－２】本発明に従う、癌細胞におけるＨＥＲ２又はＥＧＦＲ標的化タンパク質毒素送達及び殺細胞。Ａ、Ｂ）ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（ＨＥＲ２$^{-}$）における、トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}処置及び対照。Ｃ、Ｄ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。
【図４－３】本発明に従う、癌細胞におけるＨＥＲ２又はＥＧＦＲ標的化タンパク質毒素送達及び殺細胞。Ａ、Ｂ）ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（ＨＥＲ２$^{-}$）における、トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}処置及び対照。Ｃ、Ｄ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,}

^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1}，^{7}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1}，^{7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図４－４】本発明に従う、癌細胞におけるＨＥＲ２又はＥＧＦＲ標的化タンパク質毒素送達及び殺細胞。Ａ、Ｂ）ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（ＨＥＲ２$^{-}$）における、トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1}，^{7}又はトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1}，^{7}処置及び対照。Ｃ、Ｄ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1}，^{7}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1}，^{7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図５－１】本発明に従う、癌細胞におけるＥＧＦＲ標的化アンチセンスＢＮＡオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。Ａ、Ｂ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1}，^{7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図５－２】本発明に従う、癌細胞におけるＥＧＦＲ標的化アンチセンスＢＮＡオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。Ａ、Ｂ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1}，^{7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図６】本発明に従う癌細胞におけるＨＥＲ２標的化アンチセンスＢＮＡオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）に対する、トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3}，^{8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3}，^{5}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図７】本発明に従う、癌細胞におけるＥＧＦＲ標的化アンチセンスＢＮＡオリゴ送達及び遺伝子サイレンシング。Ａ、Ｂ）Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）におけるセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3}，^{7}処置及び対照。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図８－１】全細胞株の対照処置。Ａ～Ｄ）トラスツズマブ（Ａ）、セツキシマブ（Ｂ）、Ｔ－ＤＭ１、（Ｃ）遊離毒素：サポリン及びジアンチン（Ｄ）又は非細胞結合ＩｇＧにカップリングされたサポリン（Ｄ）が、指示されている細胞株ＳＫ－ＢＲ－３、ＪＩＭＴ－１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、Ａ４３１、ＣａＳｋｉ、ＨｅＬａ、Ａ２０５８、ＢＴ－４７４で処置されるときの細胞生存率。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図８－２】全細胞株の対照処置。Ａ～Ｄ）トラスツズマブ（Ａ）、セツキシマブ（Ｂ）、Ｔ－ＤＭ１、（Ｃ）遊離毒素：サポリン及びジアンチン（Ｄ）又は非細胞結合ＩｇＧにカップリングされたサポリン（Ｄ）が、指示されている細胞株ＳＫ－ＢＲ－３、ＪＩＭＴ－１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、Ａ４３１、ＣａＳｋｉ、ＨｅＬａ、Ａ２０５８、ＢＴ－４７４で処置されるときの細胞生存率。備考：各細胞株の標的受容体発現データ（ＦＡＣＳ分析により決定）は表２３参照。

【図９】（Ｓ）ｎ－（Ｌ）（Ｅ）概念：ｍＡｂ－（ＳＯ１８６１）^{n}（タンパク質毒素）^{n}。標的細胞への送達及び内在化のために、ＳＯ１８６１をシステイン残基（Ｃｙｓ）において、タンパク質毒素（リボソーム不活性化タンパク質）をリジン残基において、両方を同じ抗体（ｍＡｂ）にコンジュゲート化する。１）ｍＡｂ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}（Ｌｙｓ－タンパク質毒素）^{2}がその対応する細胞表面受容体に結合し、２）コンジュゲート受容体により媒介されるエンドサイトーシスが起こり、３）低いエンドリソソームｐＨ及び適当な濃度において、ＳＯ１８６１は活性になってエンドリソソーム脱出を可

能化し、４）細胞質への毒素の放出が起こり、５）毒素が細胞死を誘導する。
【図１０】（Ｓ）ｎ－（Ｌ）（Ｅ）概念：ｍＡｂ－（ＳＯ１８６１）^{n}（アンチセンスＢＮＡオリゴ）^{n}。システイン残基（Ｃｙｓ）におけるＳＯ１８６１及びリジン残基におけるアンチセンスＢＮＡオリゴヌクレオチド両方が、標的細胞への送達及び内在化のために同じ抗体（ｍＡｂ）にコンジュゲート化される。１）ｍＡｂ－（Ｃｙｓ－ＳＯ１８６１）^{4}（Ｌｙｓ－ＢＮＡオリゴ）^{2}は、その対応する細胞表面受容体に結合し、２）両方のコンジュゲートの受容体により媒介されるエンドサイトーシスが起こり、３）低いエンドリソソームｐＨ及び適当な濃度において、ＳＯ１８６１は活性になってエンドリソソーム脱出を可能化し、４）ＢＮＡオリゴの細胞質への放出が起こり、５）標的遺伝子サイレンシングが誘導される。
【図１１】（Ｓ）ｎ－（Ｌ）（Ｅ）概念：ｍＡｂ－（ＳＯ１８６１－骨格－アンチセンスＢＮＡオリゴ）^{n}。（ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ）^{n}は、標的細胞への送達及び内在化のために抗体（ｍＡｂ）にコンジュゲート化される。１）ｍＡｂ－（ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ）^{4}は、その対応する細胞表面受容体に結合し、２）両方のコンジュゲートの受容体により媒介されるエンドサイトーシスが起こり、３）低いエンドリソソームｐＨ及び適当な濃度において、ＳＯ１８６１は活性になってエンドリソソーム脱出を可能化し、４）ＢＮＡオリゴの細胞質への放出が起こり、５）標的遺伝子サイレンシングが誘導される。
【図１２】抗体－ＳＯ１８６１コンジュゲーション手順。抗体の軽鎖上の４つのシステインへの植物由来サポニンＳＯ１８６１の４つの部分の連結のカップリング反応が示されている。第１に、ＩｇＧ上のジスルフィド結合は、ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン）への暴露の影響下で遮断される；第２に、それに結合された化学リンカーを含むサポニンＳＯ１８６１が、トリフルオロ酢酸と一緒に追加され、４つのサポニン部分がＩｇＧに連結される。切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」サポニンを産生するために、ＳＯ１８６１のアルデヒド基をＥＭＣＨ（ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）リンカーと反応させた。ＥＭＣＨのヒドラジド基は、ＳＯ１８６１のアルデヒドとの酸切断可能なヒドラゾン結合を形成する。同時に、ＥＭＣＨリンカーはチオール（スルフヒドリル基）反応性であるマレイミド基を提示し、それゆえにＩｇＧ、すなわちリガンド部分のチオールにコンジュゲート化され得る。これによって、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートが提供され、及び／又は本発明の第１の結合分子が提供される。
【図１３】ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成
【図１４－１】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１４－２】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１４－３】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１４－４】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１４－５】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１４－６】デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１５－１】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{8}合成。
【図１５－２】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{8}合成。
【図１５－３】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{8}合成。
【図１５－４】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{8}合成。
【図１５－５】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{8}合成。
【図１６－１】ＳＯ１８１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ合成。
【図１６－２】ＳＯ１８１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ合成。
【図１６－３】ＳＯ１８１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ合成。
【図１６－４】ＳＯ１８１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ合成。
【図１７】ＨＳＰ２７ＢＮＡ－デンドロン－（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}合成。
【図１８】デンドロン（ＮＥＭ）^{4}合成。
【図１９】サポニン連結部のための４つのアミノ基及びクリックケミストリーのためのアジド基を有する骨格前駆体。

【図２０】モデル骨格へのサポニンのカップリングの証拠。挿入図は、結合サポニンについて理論的に予想されるピーク及び強度分布を示す。ＬＣ－ＭＳ／ＥＳＩ－ＭＳにより得られた実験データはほぼ厳密に同じピークをｍ／ｚ７５８～７６０Ｄａにおいて示し、首尾良いサポニンカップリングを証明している。
【図２１】標的化された毒素ジアンチン－上皮成長因子（ジアンチン－ＥＧＦ）を用いた細胞毒性アッセイ。無処置細胞を１に正規化した。ポリマー構造（ペントリマー）は、ジアンチン－ＥＧＦ及びサポニン（ＳＡ１６４１）の存在下でも不在下でも細胞生存率への影響を有さず、ポリマー構造の本来的な細胞毒性なしを指示している。クリック可能な標的化された毒素（ジアンチン－ＥＧＦ－アルキン）は、顕著に縮減された活性を有する。これは毒素修飾の結果であるが、骨格とのいずれかの関係を有さない。機能化されたポリマー構造は、クリックされていない標的化された毒素と同じ活性を有し、骨格の機能化がエフェクター分子活性を損なわないことを指示している。サポニンの効果は、ポリマー構造の存在下及び不在下で同一であり、ポリマー構造が２コンポーネント系におけるサポニンの有効性を損なわないことを示している。
【図２２－１】（Ａ）ＳＯ１８６１及び（Ｂ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＨ－ＮＭＲスペクトル（ＥＭＣＨ＝Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）。（Ａ）９．４３ｐｐｍのピーク（H^a）は、ＳＯ１８６１のアルデヒドプロトンに対応する。（Ｂ）６．７９ｐｐｍ（H^c）のピークは、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミドプロトンに対応し、７．６８ｐｐｍ（H^b）のピークは、ヒドラゾンプロトンに対応する。９．４３ｐｐｍのシグナルの不在は、アルデヒド基の定量的変換を指示している。
【図２２－２】（Ａ）ＳＯ１８６１及び（Ｂ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＨ－ＮＭＲスペクトル（ＥＭＣＨ＝Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）。（Ａ）９．４３ｐｐｍのピーク（H^a）は、ＳＯ１８６１のアルデヒドプロトンに対応する。（Ｂ）６．７９ｐｐｍ（H^c）のピークは、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミドプロトンに対応し、７．６８ｐｐｍ（H^b）のピークは、ヒドラゾンプロトンに対応する。９．４３ｐｐｍのシグナルの不在は、アルデヒド基の定量的変換を指示している。
【図２３】（Ａ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及び（Ｂ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノールのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。（Ａ）ＲＰモード：ｍ／ｚ　２１２４Ｄａ（［ＭＫ］、サポニン－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ　２１０９　Ｄａ（［ＭＫ］，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ　２０９４　Ｄａ（［ＭＮａ］，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）。（Ｂ）ＲＰモード：ｍ／ｚ　２１９３　Ｄａ（［ＭＫ］，サポニン－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ　２１８５　Ｄａ（［ＭＫ］，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ　２１７０　Ｄａ（［ＭＮａ］，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）。
【図２４】ポリマー構造へのエンドソーム脱出を向上させるサポニンのコンジュゲート化のための強調された化学基を有する、ＳＯ１８６１構造。強調されている基は、アルデヒド（黒い円）、カルボン酸（破線の円）、アルケン（破線の五角形）、及びアルコール（破線のボックス）である。アルデヒド基（矢印）は、化学選択的及び可逆的なコンジュゲート化反応にとって最も好適な基である。
【図２５】（Ａ）安定な、及び（Ｂ）切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」エンドソーム脱出向上因子サポニンを産生するための戦略。
【図２６】酸性条件下のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのヒドラゾン結合の加水分解。
【図２７】ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ構造。（Ａ）標準分子構造及び（Ｂ）３Ｄモデル。マレイミド基は円でマークされている。
【図２８－１】（Ａ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成スキーム。（Ｂ）ネガティブリフレクターモードによるＳＯ１８６１（ｍ／ｚ　１８６１Ｄａ）及び（Ｃ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ｍ／ｚ　２０６８Ｄａ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２８－２】（Ａ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成スキーム。（Ｂ）ネガティブリフレクターモードによるＳＯ１８６１（ｍ／ｚ　１８６１Ｄａ）及び（Ｃ）ＳＯ１８６１－ＥＭ

ＣＨ（ｍ／ｚ　２０６８Ｄａ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２８－３】（Ａ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成スキーム。（Ｂ）ネガティブリフレクターモードによるＳＯ１８６１（ｍ／ｚ　１８６１Ｄａ）及び（Ｃ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ｍ／ｚ　２０６８Ｄａ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２９－１】ｐＨ３のＨＣｌ溶液中での加水分解の前（Ａ）及び後（Ｂ）のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図２９－２】ｐＨ３のＨＣｌ溶液中での加水分解の前（Ａ）及び後（Ｂ）のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３０】いずれかのアミンを持つポリマー構造へのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲート化の反応スキーム。
【図３１】（Ａ）ＢＳＡ－ＳＯ１８６１（ｍ／ｚ　７０．０ｋＤａ、７２．１ｋＤａ、７４．２ｋＤａ）、及び（Ｂ）ＢＳＡ（ｍ／ｚ　６６．６ｋＤａ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３２】（Ｂ）シアニン３色素標識されたポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）Ｇ５デンドリマーへの（Ａ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及び（Ｂ）ＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ（ＨＡＴＵ＝１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート）コンジュゲート化の反応スキーム。
【図３３－１】（Ａ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ、（Ｂ～Ｄ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み当量を（Ｂ）から下の（Ｄ）まで増大させることによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。（Ｂ）は、ＰＡＭＡＭ当たり５つのＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応し、（Ｃ）は、ＰＡＭＡＭ当たり１３個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応し、（Ｄ）は、ＰＡＭＡＭ当たり５１個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応する。
【図３３－２】（Ａ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ、（Ｂ～Ｄ）ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み当量を（Ｂ）から下の（Ｄ）まで増大させることによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。（Ｂ）は、ＰＡＭＡＭ当たり５つのＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応し、（Ｃ）は、ＰＡＭＡＭ当たり１３個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応し、（Ｄ）は、ＰＡＭＡＭ当たり５１個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１に対応する。
【図３４】（Ａ）５当量の仕込みのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１及び（Ｂ）３０当量の仕込みのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３５】Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル（ＮＣ＝安定な結合（「非切断可能」）。
【図３６－１】（Ａ）反応スキーム及び（Ｂ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、（Ｃ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ＤＢＣＯ、及び（Ｄ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３６－２】（Ａ）反応スキーム及び（Ｂ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、（Ｃ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ＤＢＣＯ、及び（Ｄ）Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３７－１】（Ａ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８及び（Ｂ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－N_3の反応スキーム。（Ｃ）ジアンチン－ＥＧＦ、（Ｄ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、及び（Ｅ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａ

ｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル；Ａｌｅｘａ４８８：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８色素。
【図３７－２】（Ａ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８及び（Ｂ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$の反応スキーム。（Ｃ）ジアンチン－ＥＧＦ、（Ｄ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、及び（Ｅ）ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル；Ａｌｅｘａ４８８：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８色素。
【図３８－１】（Ａ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８及び（Ｂ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$の反応スキーム。（Ｃ）ジアンチン、（Ｄ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８、及び（Ｅ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル；Ａｌｅｘａ４８８：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８色素。
【図３８－２】（Ａ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８及び（Ｂ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$の反応スキーム。（Ｃ）ジアンチン、（Ｄ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８、及び（Ｅ）ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル；Ａｌｅｘａ４８８：Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８色素。
【図３９】ＶｅｒｓａＤｏｃイメージングシステムによって行われたＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの蛍光画像。Ｍ＝マーカー、Ｐ＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯ、Ｄ＝ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$、Ｃ１＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃ２＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、及びＣ３＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８。
【図４０】（Ａ）還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１の合成スキーム。（Ｂ及びＣ）それぞれのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図４１】モノマーとしてＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、重合開始剤としてＡＰＳ／ＴＭＥＤＡ系、及びラジカルクエンチ剤としてアミノプロパンチオールを用いた、ポリ（ＳＯ１８６１）の生成の反応スキーム。
【図４２】ポリ（ＳＯ１８６１）反応バッチのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。（Ａ）６０℃のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、（Ｂ）６０℃のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ１１$^{-3}$当量ＡＰＳ、（Ｃ）６０℃のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ１１$^{-3}$当量ＡＰＳ／ＴＭＥＤＡ。
【図４３】ＤＮＡアプローチ。グリコシド分子をコンジュゲート化及び放出することができるＤＮＡに基づく骨格を生成するための、ＤＮＡオリガミの原理の使用法。加えて、ＤＮＡストランドの１つは、機能化された骨格を形成するための標的化された毒素へのコンジュゲート化のために用いられ得るクリックケミストリー部分を得る。ｂｐ：塩基対。
【図４４】ポリペプチド（ペプチド－ＳＯ１８６１）アプローチ。グリコシド分子をコンジュゲート化及び放出し得、かつそのものと反応してポリ（ペプチド－ＳＯ１８６１）構築物を形成し得るペプチド配列の使用法。ポリ（ペプチド）鎖の終端は、毒素へのコンジュゲート化のために用いられ得るクリックケミストリー部分（例えばＢＣＮ－ＮＨＳリンカー）によってさらに修飾され得る。
【図４５】（Ａ）ネイティブなペプチド、（Ｂ）ペプチド－ＳＯ１８６１コンジュゲートのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図４６】保護されたアミノ基を有するＧ４－デンドロンの分子構造。
【図４７】デンドロンに基づく骨格及び機能的な骨格の生成のための合成スキーム。
【図４８】（Ａ）Ｇ４－デンドロンの部分的な色素標識及び脱保護のための反応スキーム。（Ｂ）脱保護及び部分的に色素標識されたＧ４－デンドロンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図４９】（Ａ）２２仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、（Ｂ）１０仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、及び（Ｃ）３仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＧ４－

デンドロン－ＳＯ１８６１骨格のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５０－１】（Ａ）ＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析によって決定されたＥＧＦＲ細胞表面発現による、処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率曲線。（Ｂ、表１９参照）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ（Ｄｉａ－ＥＧＦ）、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ６６７ｎＭデンドロンによって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。（Ｃ）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$によって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。（Ｄ）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{3}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{8}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{18}$によって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。
【図５０－２】（Ａ）ＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析によって決定されたＥＧＦＲ細胞表面発現による、処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率曲線。（Ｂ、表１９参照）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ（Ｄｉａ－ＥＧＦ）、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ６６７ｎＭデンドロンによって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。（Ｃ）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$によって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。（Ｄ）ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{3}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{8}$、ＳＯ１８６１ジアンチン－ＥＧＦ５００ｎＭ ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{18}$によって処置されたＨｅＬａ細胞の細胞生存率。
【図５１－１】（Ａ）チオール化試薬２－イミノチオランを用いたＰＡＭＡＭのチオール化の反応スキーム。（Ｂ）ネイティブなＰＡＭＡＭ、（Ｃ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、（Ｄ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、及び（Ｅ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５１－２】（Ａ）チオール化試薬２－イミノチオランを用いたＰＡＭＡＭのチオール化の反応スキーム。（Ｂ）ネイティブなＰＡＭＡＭ、（Ｃ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、（Ｄ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、及び（Ｅ）チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５２－１】（Ａ）ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。（Ｂ）ネイティブなＰＡＭＡＭ、（Ｃ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$、（Ｄ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$、及び（Ｅ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{18}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５２－２】（Ａ）ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。（Ｂ）ネイティブなＰＡＭＡＭ、（Ｃ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$、（Ｄ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$、及び（Ｅ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{18}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５２－３】（Ａ）ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。（Ｂ）ネイティブなＰＡＭＡＭ、（Ｃ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$、（Ｄ）ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$、及び（Ｅ）ＰＥＧ化ＰＡＭ

ＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{２ｋ}$）$_{１８}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５３】いずれかの所望のエフェクター分子を連結するためのクリックケミストリー官能基を有する基本骨格。ユーザは、エフェクター分子上のクリックケミストリー位置の位置、及びエフェクター分子の全てのさらなる特性、例えば、任意のリガンドの選択肢及び位置を決定する。
【図５４】予め結合されたエフェクター分子といずれかの所望のリガンドを連結するためのクリックケミストリー官能基とを有する機能化された骨格。任意に、エンドソームに達した後の骨格からエフェクター分子を放出するためのｐＨ感受性の連結部が提供され得る。
【発明を実施するための形態】
【０１２３】
生物活性分子が働くためには、分子は、例えば血清中において、細胞表面の外側において、又は細胞若しくはオルガネラ内において、その標的と係合できなければならない。ほぼ全てのタンパク質に基づく標的化された毒素の活性部分は、例えば、その標的調節効果を媒介するためには標的細胞の細胞質基質に入らなければならない。多くのコンステレーションにおいて、毒素は無効のままである。なぜなら、（１）標的化部分が不良に内在化され、細胞の外側に結合したままであるか、（２）内在化後に細胞表面へとリサイクルされるか、又は（３）エンドリソソームに輸送され、そこでそれは分解されるからである。これらの根源的なイシューは数十年間公知であり、５００よりも多くの標的化された毒素が過去数十年に検討されているが、問題はまだ解決されず、抗体によって標的化されたタンパク質毒素の数個が、ただし重度の毒性についての警告ラベルを有して、今日までに上市承認されているのみである。モキセツモマブパスドトクス－ｔｄｆｋ（ＬＵＭＯＸＩＴＩ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　ＬＰ）は、今日までに、ＦＤＡにより再発性又は難治性有毛細胞白血病について認可されている。かかる承認されたＡＤＣの他のものは、エルゾンリス（Ｅｌｚｏｎｒｉｓ）、オンタック（Ｏｎｔａｋ）である。
【０１２４】
これらの問題を克服するための多くの戦略が記載されており、毒素を小胞体における生合成経路の内在性細胞膜輸送複合体へと転送するためのアプローチと、エンドソーム、すなわち細胞におけるエンドサイトーシス経路の区画の膜インテグリティを遮断するか又は弱め、それゆえにエンドソーム脱出を容易化するための技術とを包含する。これは、リソソーム親和性アミン、カルボン酸イオノフォア、カルシウムチャネルアンタゴニスト、ウイルス、細菌、植物、動物、ヒト、及び合成起源の種々の細胞透過ペプチド、他の有機分子、並びに光誘導性技術の使用を含む。標的化された毒素の有効性は、典型的には、細胞培養では１００倍又は１０００倍、例外的なケースでは１００万倍よりも多く増加したが、エンドソーム脱出向上因子を他の物質と同時投与するという要件は、追加の副作用、標的特異性の損失、治療ウィンドウを決定する困難さ、及び細胞型依存性な変動を包含する新たな問題を抱える。
【０１２５】
物理化学的技術を包含する全ての戦略は、膜と多かれ少なかれ直接的に相互作用し、かつ本質的に小さい化学分子、二次代謝物、ペプチド、及びタンパク質を含む向上因子の分子を要求する。全てのこれらの物質の共通の特徴は、それらが自体では標的細胞特異的ではなく、標的化された毒素以外の動態で分布するということである。これは現行のアプローチの１つの主要な欠点である。
【０１２６】
本発明は具体的な実施形態について記載されるが、本発明はそれらにではなく請求項によってのみ限定される。本明細書に記載される本発明の実施形態は、別様に特定されない限り、組み合わせで及び協同で働き得る。
【０１２７】
本発明がいくつかの実施形態の観点から記載されているが、それらの代替、改変、並べ替え、及び同等物は、明細書を読解することによって並びに図面及びグラフの研究によっ

て、当業者には明らかになるであろうということが企図される。本発明は例解されている実施形態に決して限定されない。添付の請求項により定められる範囲から逸脱することなしに、変更がなされ得る。

【０１２８】

本発明のある態様は、コンジュゲートに関し、細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクター部分を含み、さらに、少なくとも１つの共有結合されたサポニンを含む。

【０１２９】

本発明者は、コンジュゲートが投与される腫瘍を持つ哺乳類（マウス）に投与されるときに、抗体薬物コンジュゲート又は抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートなどのコンジュゲートの治療ウィンドウが増大するということを確立した。前記コンジュゲートは、少なくとも１つの共有結合されたサポニンを含む。本発明のコンジュゲートは、それに結合されたサポニンなどの少なくとも１つのグリコシドを、好ましくは共有結合的に、より好ましくは切断可能なリンカーを介して有する。蓋然的には、エフェクター部分の活性が所望される細胞質基質へのエフェクター部分のエンドソーム脱出を向上させることによって、サポニンは、細胞表面分子標的化分子に結合されたエフェクター部分の治療有効性を増加させる。このやり方で、ＡＤＣ又はＡＯＣ、すなわち本発明のコンジュゲートの従来のドーズよりも既に低いドーズにおいて、サポニン（単数又は複数）を含むコンジュゲートの存在の影響下において、治療効果が確立される。それによって、サポニン（単数又は複数）を標的細胞に、その近くに、及び／又はその内に持ち込む。標的細胞は、例えば、有疾患細胞、例えば腫瘍細胞又は自己免疫細胞又はＢ細胞疾患関連Ｂ細胞などである。本発明に従うと、エフェクター部分は、例えば、ＡＤＣの一部としての毒素又はＡＯＣの一部としてのアンチセンスＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドである。

【０１３０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、トリテルペノイドサポニン、並びに／或いは位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、かつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニン、並びに／或いはＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種のいずれか１つ以上、例えばＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａから単離されるサポニンである。

【０１３１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、単一の特定のサポニンであるか、又は２つ以上の異なるサポニンの混合物である。

【０１３２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、３．０００ダルトン以下、好ましくは２．５００ダルトン以下、より好ましくは２．３００ダルトン以下、最も好ましくは２．０００ダルトン以下、例えば１．５００ダルトン～１．９００ダルトンの分子質量を有する。

【０１３３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、表Ａ１又はスキームＩのサポニン、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナムアルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ギプソシド（ｇｙｐｓｏｓｉｄｅ）Ａ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２の１つ以上、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせである。好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１及び／又はＧＥ１７４１及

び／又はＳＡ１６４１及び／又はＱＳ－２１、並びに／或いはキラヤ酸アグリコンコア、Ｃ－３ベーター－ＯＨ基のＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ炭水化物置換基、及びＣ－２８－ＯＨ基のＧｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ炭水化物置換基を有するサポニンである。並びに／或いは、３－Ｏ－ベーター－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－ベーター－Ｄ－グルクロノピラノシルキラヤ酸２８－Ｏ－ベーター－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－アルファ－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４－ＯＡｃ－ベーター－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－ベーター－Ｄ－フコピラノシドである。より好ましくは、少なくとも１つのサポニンはＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１である。

【０１３４】

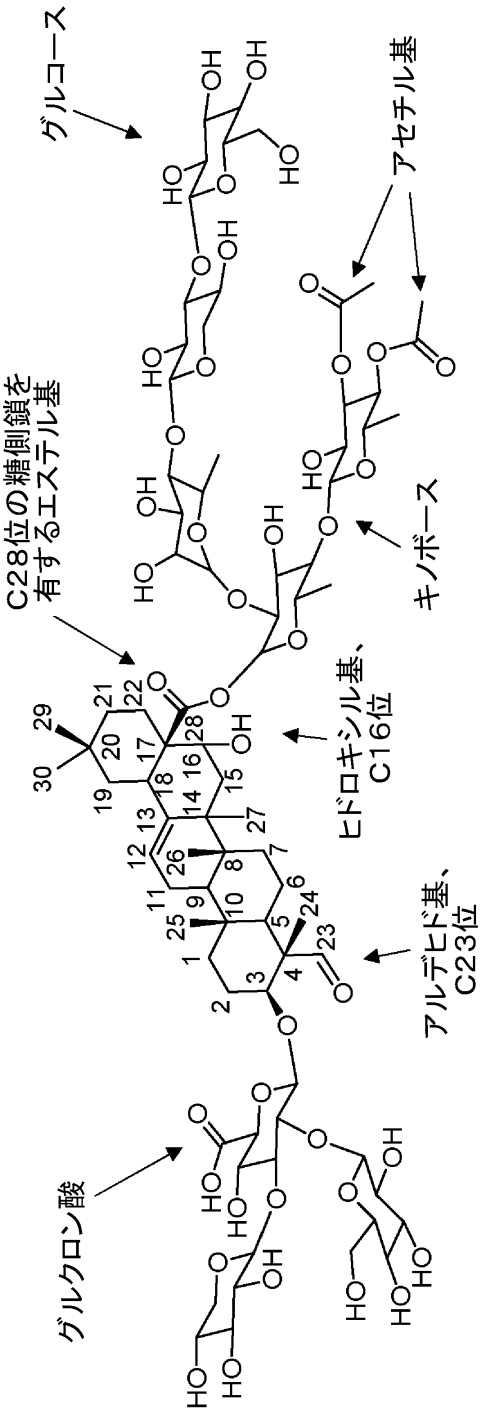
本発明者は、ここで、サポニン、例えばＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性画分、ＱＳ－２１、ＳＡ１６４１、ＳＯ１８６１、表Ａ１、スキームＩのサポニンを、タンパク質性分子などの細胞表面分子標的化分子に、例えば三官能性リンカー、例えばスキームＩＩの三官能性リンカーを介して、或いは骨格のオリゴマー又はポリマー構造を介して、共有結合的にカップリングし、共有結合されたサポニンを含むことが、コンジュゲート上の共有結合的にカップリングされたサポニンの影響下において、コンジュゲートに含まれる毒素などのエフェクター部分によって発揮される改善された細胞毒性をもたらすということを開示する。

【０１３５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、スキームＩの構造Ａのサポニンの指示されている構造的特徴の１つ又はいくつか又は全てを含むサポニン（構造Ａのサポニンは、本発明のコンジュゲートと接触した細胞のエンドソームに、エフェクター部分に対するエンドソーム脱出向上活性が存在するときには、「理想的な」構造を有するサポニンと言われる）、及び／又はスキームＩのさらなるサポニンのいずれか１つ以上から選択されるサポニンを含む：

【０１３６】

【化１】

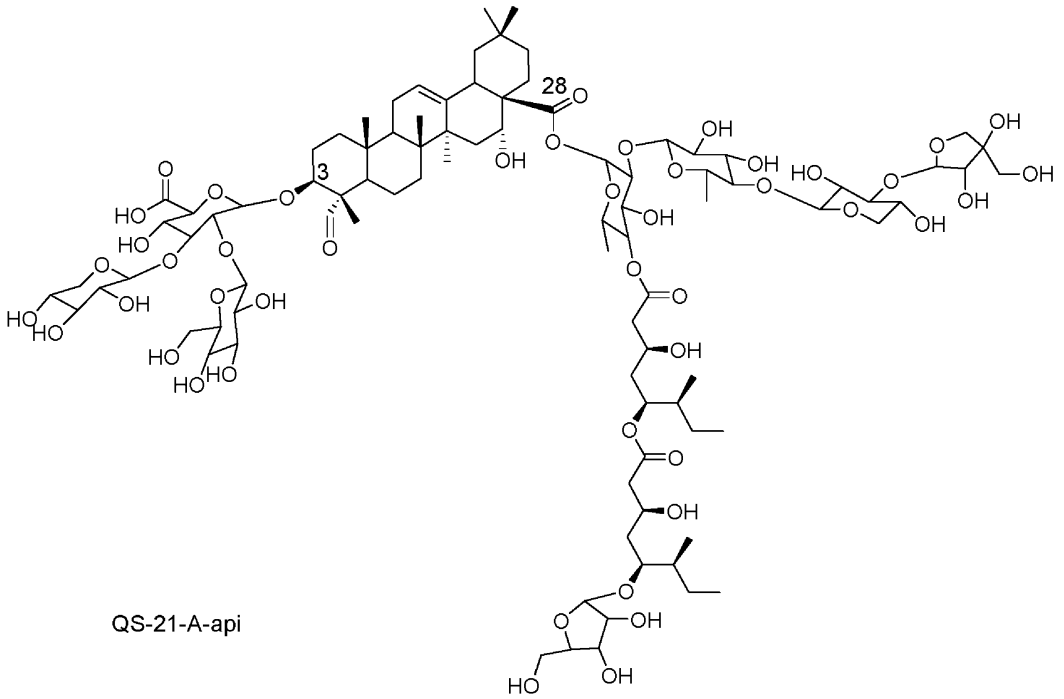

グルコース
アセチル基
C28位の糖側鎖を有するエステル基
キノボース
ヒドロキシル基、C16位
アルデヒド基、C23位
グルクロン酸

構造A

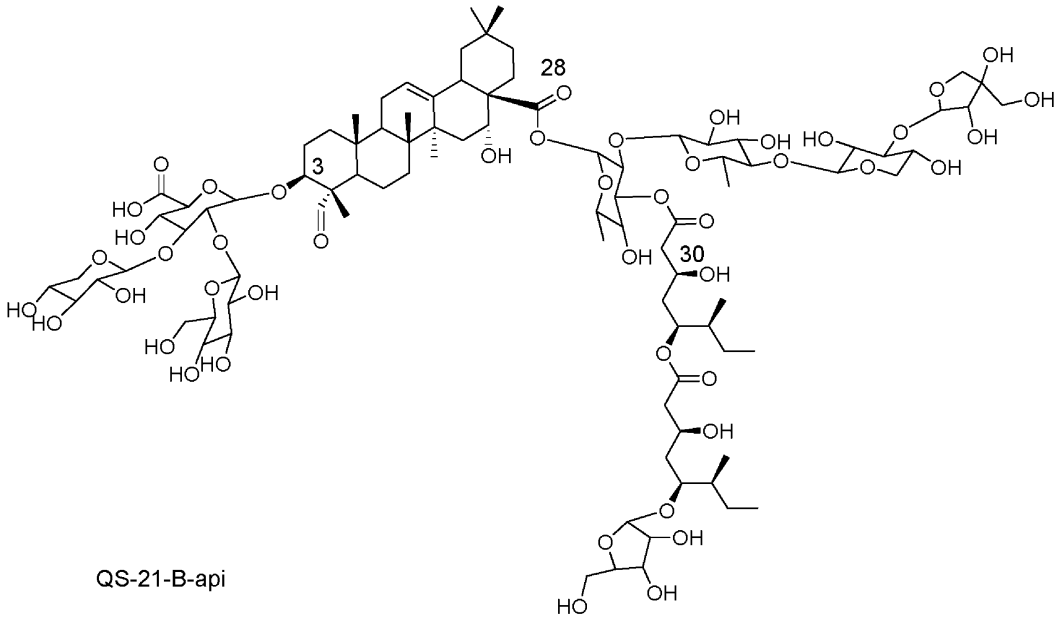
【０１３７】

【化２】

スキーム I（続き）



QS-21-A-api

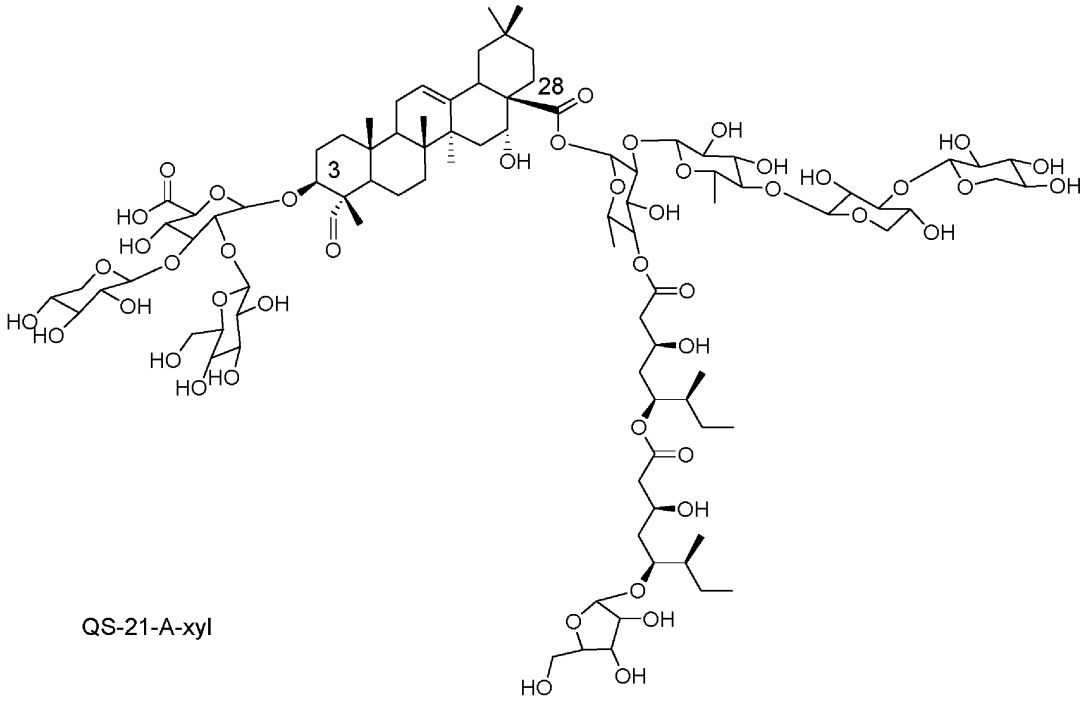


QS-21-B-api

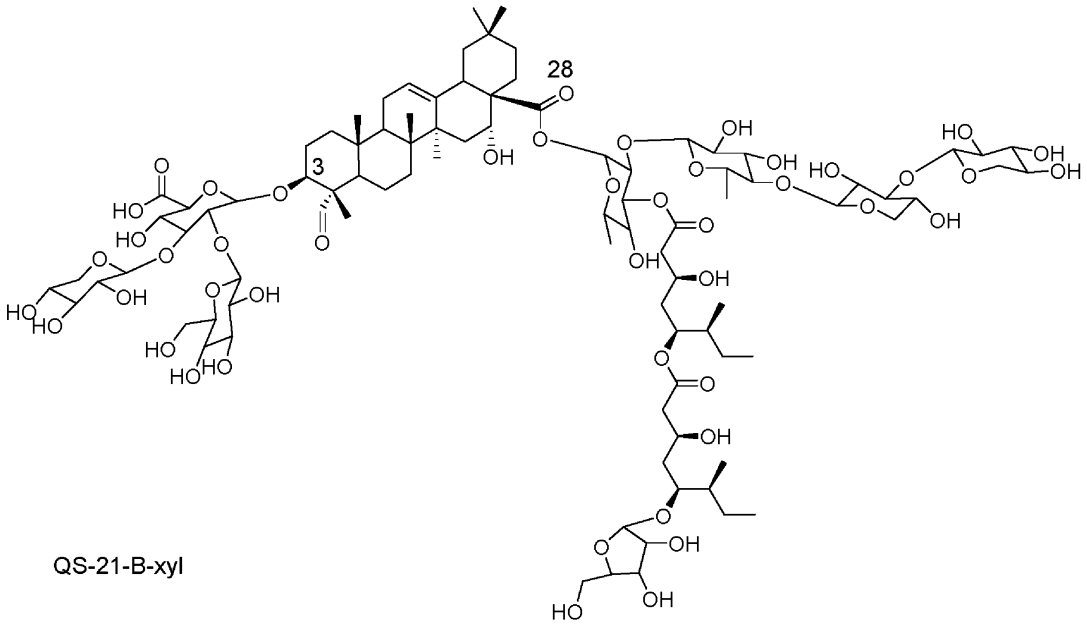
【０１３８】

【化３】

スキームＩ（続き）



QS-21-A-xyl

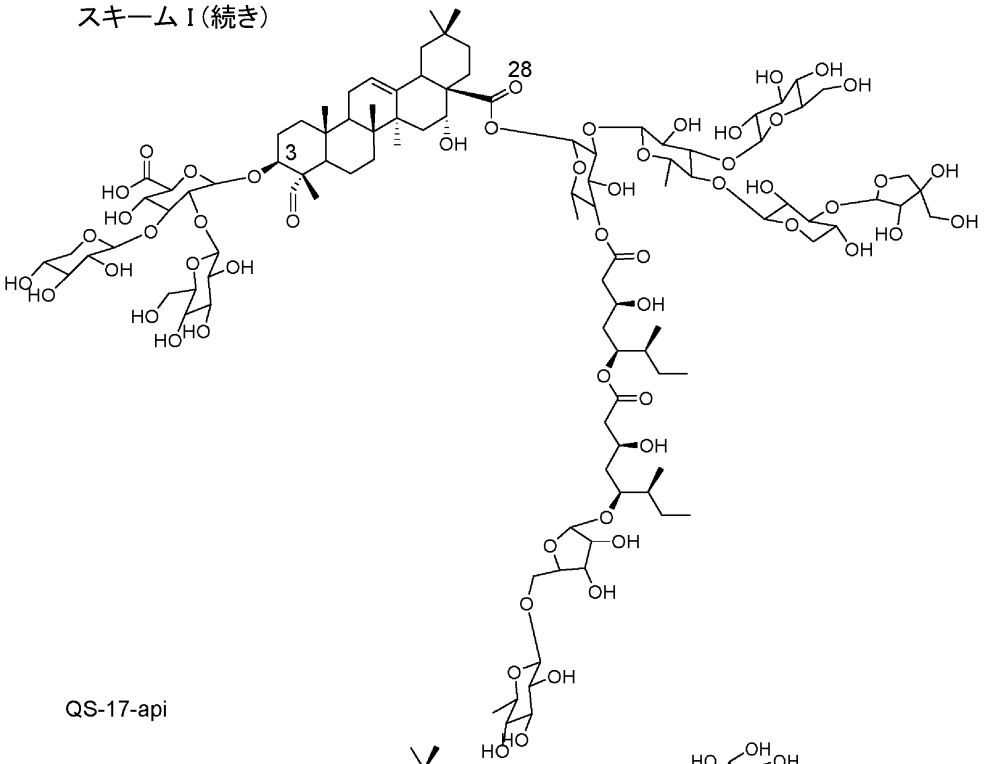


QS-21-B-xyl

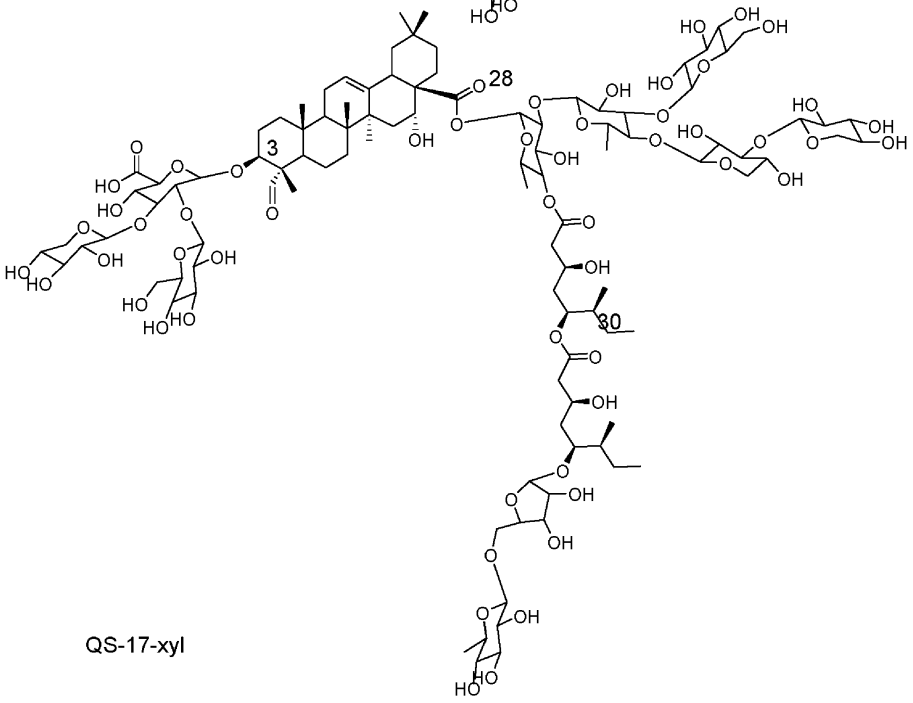
【０１３９】

【化４】

スキーム I（続き）



QS-17-api

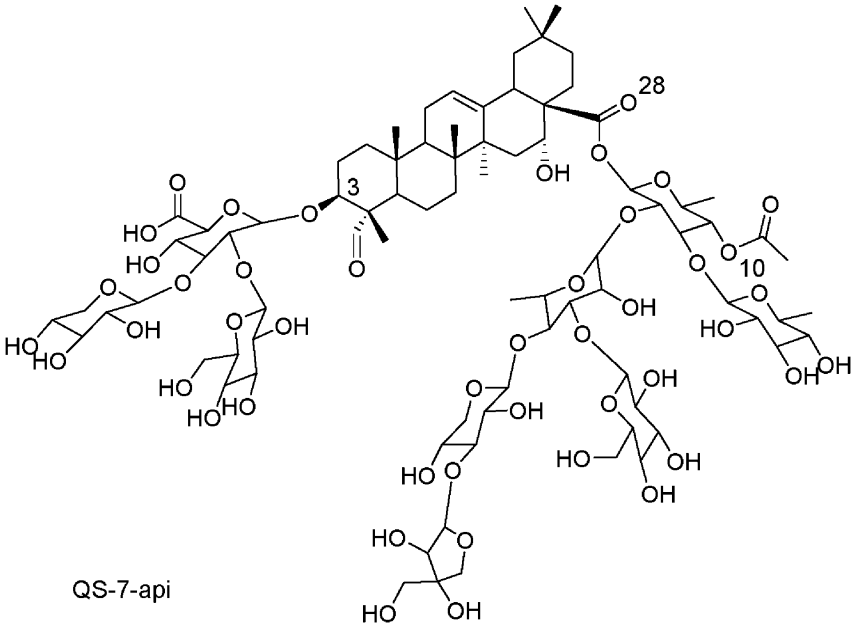


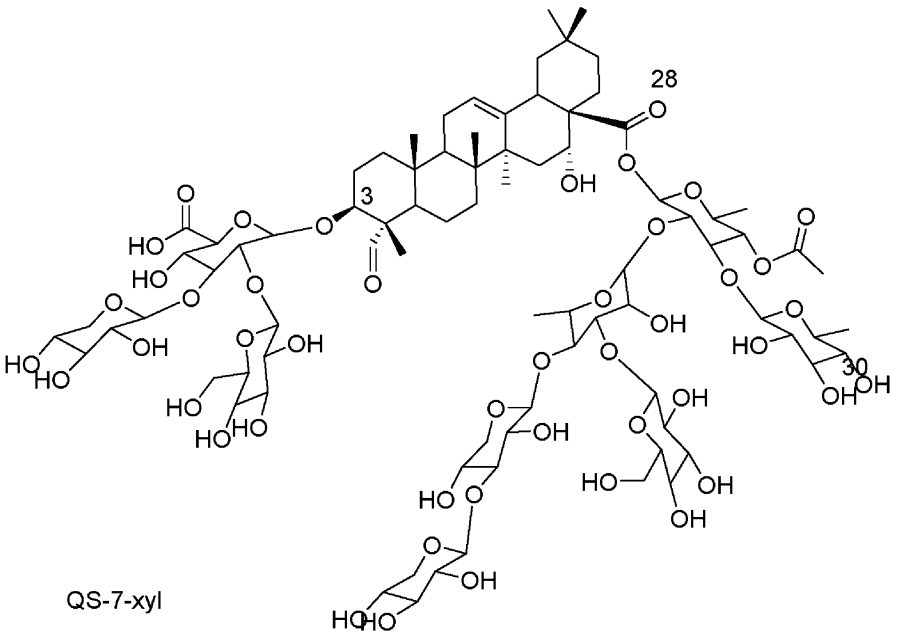
QS-17-xyl

【０１４０】

【化５】

スキームＩ（続き）





【０１４１】

本発明に従うと、本発明のコンジュゲートに含まれるエフェクター分子のエンドソーム脱出を向上させる目的のための「理想的な」構造を有する、本発明のコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子に結合された本発明に従うサポニンなどのグリコシドは、スキームＩの構造Ａに従うビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基と任意にＣ－１６位にヒドロキシル基とを含有するオレアナン型トリテルペンを含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有し、この第１の分岐炭水化物側鎖は任意にグルクロン酸を含有する。サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、この第２の分岐炭水化物鎖

は好ましくは少なくとも４つの炭水化物単位を含み、任意に少なくとも１つのアセチル残基、例えば２つのアセチル残基を含有し、及び／又は任意にデオキシ炭水化物を含み、及び／又は任意にキノボースを含み、及び／又は任意にグルコースを含み、及び／又は任意に４－メトキシケイ皮酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、エステル結合を介して炭水化物に結合されている。

【０１４２】

ＳＯ１８６１は、キノボースに１つのアセチル残基のみを有すること及び追加のキシロースを有することのみが、スキームＩ構造Ａによって表示されている「理想的な構造」とは異なる。エフェクター分子又はエフェクター部分のエンドソーム脱出を向上させるためのサポニンの「理想的な構造」は、好ましくはスキームＩの構造Ａを有するサポニンであり、エンドソーム脱出向上活性を見せるサポニンは、スキームＩの構造Ａによって表示される構造的特徴の１つ以上を有する。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、本発明者は、スキームＩの構造Ａが、エンドソーム脱出向上活性についての「理想的なサポニン」（かつ最小要件サポニンではない）に相当すると信ずる。これは、構造（化学基）の全てが、細胞質基質におけるエフェクター部分の蓄積を促進するための少なくとも十分なエンドソーム脱出向上活性を有する各サポニン上に存在し得るか又は存在しなければならないというわけではないということを意味する。かつ、これは、いくつかのサポニンがアシル鎖などの他の構造要素を有し得、及び／又は、エンドソーム脱出向上活性を見せるなお他のサポニンについて、糖がスキームＩによって表示される糖とは異なり得るということを意味する。例えば、スキームＩの構造Ａの理想的な構造が考えられるときに、ＱＳ－２１サポニン及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性画分（キラヤサポニン；Ｑｕｉｌ－Ａ）中のサポニンのいくつかは、Ｃ－２８の炭水化物修飾が異なる：例えば、ＱＳ－２１におけるアシル鎖の存在である。Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性画分中のＱＳ－７、ＱＳ１８６２などのサポニンは、理想的な構造Ａに類似であり、そしてＳＯ１８６１に類似である。

【０１４３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンがビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基と任意にＣ－１６位にヒドロキシル基とを含有するオレアナン型トリテルペンを含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有し、この第１の分岐炭水化物側鎖は任意にグルクロン酸を含有する。サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、この第２の分岐炭水化物鎖は好ましくは少なくとも４つの炭水化物単位を含み、任意に少なくとも１つのアセチル残基、例えば２つのアセチル残基を含有し、及び／又は任意にデオキシ炭水化物を含み、及び／又は任意にキノボースを含み、及び／又は任意にグルコースを含み、及び／又は任意に４－メトキシケイ皮酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、エステル結合を介して炭水化物に結合されている。或いは、少なくとも１つのサポニンは、ＱＳ－２１、又はＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ－１８、ＱＳ－１８６１、プロトン化ＱＳ１８６１（ＱＳ１８６２）、Ｑｕｉｌ－Ａのいずれか１つ以上である。

【０１４４】

表Ａ１及びスキームＩ並びに上の実施形態は、第２の分子（例えば、エフェクター部分又はエフェクター分子、例えば毒素、オリゴヌクレオチド）と一緒に遊離形態で哺乳類細

胞、特にヒト腫瘍細胞に接触させられたときの、それらのエンドソーム脱出向上活性について同定された一連のサポニンをまとめている。Ｂｏｅｔｔｇｅｒ（２０１３）の表９及び１０に挙げられているかかるエンドソーム脱出向上活性を有するサポニンの参照もまたなされる（Ｓｔｅｆａｎ Ｂｏｔｔｇｅｒ，Ｕｎｔｅｒｓｕｃｈｕｎｇｅｎ ｚｕｒ ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｓｃｈｅｎ Ｚｙｔｏｔｏｘｉｚｉｔａｔ ｚｗｉｓｃｈｅｎ Ｓａｐｏｎｉｎｅｎ ｕｎｄ Ｒｉｂｏｓｏｍｅｎ ｉｎａｋｔｉｖｉｅｒｅｎｄｅｎ Ｐｒｏｔｅｉｎｅｎ Ｔｙｐ Ｉ，Ｄｉｓｓｅｒｔａｔｉｏｎ ｚｕｒ Ｅｒｌａｎｇｕｎｇ ｄｅｓ ａｋａｄｅｍｉｓｃｈｅｎ Ｇｒａｄｅｓ ｄｅｓ Ｄｏｋｔｏｒｓ ｄｅｒ Ｎａｔｕｒｗｉｓｓｅｎｓｃｈａｆｔｅｎ（Ｄｒ．ｒｅｒ． ｎａｔ．），ｅｉｎｇｅｒｅｉｃｈｔ ｉｍ Ｆａｃｈｂｅｒｅｉｃｈ Ｂｉｏｌｏｇｉｅ，Ｃｈｅｍｉｅ，Ｐｈａｒｍａｚｉｅ ｄｅｒ Ｆｒｅｉｅｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｔ Ｂｅｒｌｉｎ，Ｔａｂｅｌｌｅ ９，Ｔａｂｅｌｌｅ １０，ｐａｇｅ ６７－７４）。実に、ヒト腫瘍細胞を用いた細胞に基づくバイオアッセイにおいて、表Ａ１に表化されているサポニン並びにスキームＩの及び本明細書に記載される本発明の種々の実施形態のものについて、本発明のコンジュゲートの一部であるときに、これらのサポニンの影響下では、コンジュゲートに含まれるエフェクター部分、例えば核酸及び／又は毒素、例えばタンパク質毒素（例えば、表Ａ５に挙げられているタンパク質毒素の１つ以上）は、おそらく（後期）エンドソーム及びリソソームからの細胞内放出によって、増大した効率及び／又は有効性でもって細胞質基質に送達されるということが確立された。つまり、本発明のコンジュゲートにより結合されたかかるエフェクター部分、例えば核酸及び／又は毒素のエンドソーム及び／又はリソソーム脱出は、サポニンの不在下ではより効率でない。

【０１４５】

驚くべきことに、ここで、本発明者は、ＱＳ－２１及びそのファミリーメンバーＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、ＱＳ－１８、及びＱｕｉｌ－Ａを含むＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからの水溶性サポニン画分もまた、例えばモノクローナル抗体に結合された核酸又はモノクローナル抗体に結合されたタンパク質毒素のインビトロの生物学的効果を増強する能力を見せるということを実証する（共有結合されたオリゴヌクレオチド又は（タンパク質）毒素などのペイロードを含む本発明のコンジュゲートの例）。このときには、哺乳類種（ヒト）の腫瘍細胞に、モノクローナル抗体（本発明の細胞表面分子標的化分子）を、結合されたエフェクター部分と、共有結合的なコンジュゲートとしてのコンジュゲートに含まれる少なくとも１つのグリコシド、例えばＱＳ－２１及びかかるＱＳ－２１調製物によって包摂されるそのファミリーメンバーサポニン（例えば、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性画分）と一緒に含む共有結合的なコンジュゲートの形態で投与されている。エフェクター分子及びグリコシド、例えばＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａのサポニン画分、ＱＳ－２１、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＧＥ１７４１は、直接的に又はリンカーを介して、又は直接的に若しくは少なくとも１つのリンカーを介してどちらかでポリマー若しくはオリゴマー構造を介して、例えば細胞表面分子標的化分子に共有結合される。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、インビトロでのＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａに由来するサポニンの存在下での、例えば、腫瘍細胞ＨＳＰ２７発現のアンチセンスＢＮＡにより媒介される縮減（ＨＳＰ２７遺伝子サイレンシング）の観察された刺激又は増強は、サポニンによる腫瘍細胞におけるインフラマソームの活性化に（もまた）関係し得、例えば、腫瘍細胞ピロトーシスをもたらす。本発明者は、コンジュゲートがサポニンを含み、その結果、サポニン（単数又は複数）が同じ（腫瘍）細胞へと標的化されるときには、例えばアンチセンスＢＮＡ又はジアンチン又はサポリンにコンジュゲート化された本発明の細胞表面分子標的化分子が、バイオ系細胞アッセイにおいて細胞と接触したときに、仮にもいずれかの抗腫瘍細胞活性を又は改善された抗腫瘍細胞活性をインビトロで発揮するということを確立した。一方、サポニン（単数又は複数）の不在下、すなわち連結され

たサポニン（単数又は複数）なしの従来のＡＤＣフォーマットにおいては、腫瘍細胞に対するかかる活性は観察されなかった。本発明のコンジュゲート上の共有結合的にカップリングされたサポニンの存在は、コンジュゲート上のエフェクター部分の活性の効率的な発揮にとって必須であることが判明した。

【０１４６】

ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからのＱＳ－２１を含む水溶性サポニン画分もまた、既に長い間公知であり、例えば、例えばサブユニットワクチンのアジュバントとしてのその免疫増強能力によって、先に鋭意に適用されている。例えば、ＱＳ－２１はヒト患者の２つの第ＩＩＩ相治験において適用されている。彼らは、ＱＳ－２１を含むアジュバントと混合されたサブユニットワクチンをワクチン接種された（Ｇｌａｘｏ－Ｓｍｉｔｈ－Ｋｌｉｎｅ、ＭＡＧＲＩＴ試験、ＤＥＲＭＡ研究）。サブユニットはＭＡＧＥ－Ａ３タンパク質であった。これは腫瘍細胞によって特異的に発現及び提示される。ＱＳ－２１によって増強された抗腫瘍ワクチン接種は、癌患者（黒色腫；非小細胞肺癌）の無病生残の延長を狙った。加えて、ＱＳ－２１は、抗癌ワクチン処置の開発のための、ＨＩＶ－１感染のワクチンのための、Ｂ型肝炎に対するワクチンの開発の、並びにＧｌａｘｏ－Ｓｍｉｔｈ－ＫｌｉｎｅのアジュバントＡＳ０１及びＡＳ０２を含むＱＳ－２１を用いた抗マラリアワクチン開発のための治験において、アジュバントとして試験されている。先の研究は、アジュバントを含むＱＳ－２１サポニンの影響下において、癌細胞表面に提示されるＭＡＧＥ－Ａ３ペプチドに対して誘発される免疫応答を明らかにした（ＡＳ１５；ＧＳＫ）。本発明者の驚いたことに、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａのサポニン画分、それゆえに蓋然的にはＱＳ－２１（Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分の一部として）は、本発明のコンジュゲート（例えば、リガンドＥＧＦ）上の細胞表面分子標的化分子（例えば、リガンドＥＧＦ）に結合された例えばタンパク質毒素（ジアンチン）などのペイロードの抗腫瘍細胞活性を増強する。

【０１４７】

例えば本発明のサポニンを欠く、それゆえに細胞標的化サポニン（本発明のコンジュゲート）なしの通例のＡＤＣのみと細胞を接触させることと比較して、本発明のコンジュゲートによって単一の細胞表面分子を標的化することによって、細胞表面に細胞表面分子を暴露する標的細胞の細胞質基質における及びその内における本発明のコンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子に結合されたエフェクター部分及びサポニンの送達が改善され、より特異的である。コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子により標的化するために選択される異常細胞は、理想的には、高い程度に（すなわち、例えば健康な細胞などの非標的細胞上の発現よりも、例えば腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの標的細胞上の標的細胞表面分子の比較的高い発現）、細胞表面分子標的化分子が結合し得る細胞表面分子上のエピトープを持つ。並びに／或いは、患者の（隣り合う）健康な細胞が考えられるときには、特異的に、コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子の結合のための標的細胞表面分子上のエピトープを暴露する。好ましくは、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子により標的化される細胞表面分子は、健康な細胞と比較して、標的（有疾患、腫瘍）細胞において比較的高度に及び／又は特異的に発現される。ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子の標的の細胞表面分子、例えば腫瘍細胞受容体は、健康な（隣り合う）細胞の表面上の細胞表面分子の発現と比較したときに、特異的に又は比較的高い程度に発現される。それゆえに、標的細胞表面分子上のエピトープは、理想的には、標的の有疾患細胞に固有であり、少なくとも特異的に標的細胞の表面に存在し、露出される。標的細胞上の細胞表面分子上のエピトープへの本発明のコンジュゲートの結合には、コンジュゲートと標的細胞表面分子との複合体のエンドサイトーシスが後続する。標的化されるべきではない健康な細胞と比較したときに、コンジュゲートは、標的細胞上に十分な程度に特異的に発現又は固有に発現される細胞表面分子との結合相互作用を介してのみ標的細胞に入り得るので、標的細胞内におけるコンジュゲートに含まれるエフェクター部分及びサポニンの治療上有効量の蓄積は、標的細胞表面分子の発現レベルがある種の最小発現閾値よりも上である場合にのみ可能であり、起こるであ

ろう。同時に、コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に結合されたエフェクター部分は、共有結合されたサポニンを持つまさに同じコンジュゲートの存在下においてのみその細胞内（例えば、細胞毒性又は遺伝子サイレンシング）活性を発揮することができるという事実は、共有結合されたサポニン（単数又は複数）なしのＡＤＣに対する細胞の暴露と比較したときに、例えばエフェクター部分によって標的化及び影響されることを意味されない健康な細胞及び健康な組織に対するエフェクター部分の負の望まれない副作用に対するセーフガードをもまた提供する。つまり、コンジュゲートが結合し得る暴露された細胞表面分子の十分に低い発現、又は不在は、理想的には、コンジュゲートに含まれるサポニンの影響下におけるエフェクター部分のエンドソーム脱出をもたらすであろう量までの、コンジュゲートの（非標的の）健康な細胞への進入を許さない。本発明に従うカップリングされたサポニンを有するＡＤＣ又は共有結合的にカップリングされたサポニンを有するＡＯＣは、カップリングされたサポニンなしのＡＤＣ又はＡＯＣが治療レジメンに適用されたときと比較して、より低いドーズで用いられ得るので、低い程度までの健康な細胞におけるカップリングされたサポニンを有するＡＯＣの進入又はカップリングされたサポニンを有するＡＯＣの進入は、例えば腫瘍細胞及び自己免疫細胞などの標的有疾患細胞の標的化及び殺細胞が考えられるときには、欲されない副作用の生起のより低いリスクを既に持つ。

【０１４８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、細胞表面分子に結合するためのリガンド又はタンパク質性リガンド又はタンパク質性結合分子を含むか又はそれからなる。

【０１４９】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための非タンパク質性リガンド及び／又はタンパク質性リガンドを含むか、又はそれからなり、並びに／或いは、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメント、例えば抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなり、これらは細胞表面分子に結合し得る。

【０１５０】

本発明者は、かかる免疫グロブリン、そのドメイン、リガンドなどが、標的細胞表面分子に結合するための結合部位を含むコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子としての適用にとって特に好適であるということを確立した。例えば、抗体及び抗体の結合ドメインは、細胞表面上に暴露された選択された細胞表面分子上のエピトープを標的化することにとって好適であり、コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子によって標的化される細胞表面分子を発現する標的細胞へと、コンジュゲート、それゆえにエフェクター部分及びサポニンを一緒に標的化することをもたらす。類似に、標的細胞上のＥＧＦＲを標的化するＥＧＦなどのリガンドは、コンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子としての適用にとって好適である。細胞表面分子へのコンジュゲートの結合について特異的である、標的細胞表面分子上のエピトープに結合するための細胞表面分子標的化分子が好ましい。抗体又はそのドメイン若しくは結合フラグメントに基づく本発明の細胞表面分子標的化分子は、例えば、標的化のための選択された細胞、例えば有疾患細胞、腫瘍細胞、自己免疫細胞などの選択された細胞表面分子上の選択されたエピトープに対するかかる所望の特異性を可能にする。よって、（ヒト、ヒト化、キメラ）モノクローナル抗体などの抗体又は結合分子（フラグメント、ドメイン）に基づく細胞表面分子標的化分子が、本発明のコンジュゲートにとって好ましい。

【０１５１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、腫瘍細胞表面分子、好ましくは腫瘍細胞受容体、例えば腫瘍細胞特異的受容体、より好ましくは、ＣＤ７１、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）、ＣＤ５２、ＣＥＡ、ＣＤ４４ｖ６、

ＦＡＰ、ＥＧＦ－ＩＲ、インテグリン、シンデカン－１、血管インテグリンアルファ－Ｖベータ－３、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ受容体、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ６、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ３８、ＦＧＦＲ３、ＣＤ７、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＣＤ５２、ＰＤＧＦＲＡ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２から選択される、好ましくはＣＤ７１、ＨＥＲ２、及びＥＧＦＲから選択される受容体に結合し得る。これらの受容体は、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子が結合し得るエピトープを持つ分子の好ましい例である。これらの分子は、コンジュゲートの結合のための選択される標的細胞の表面において十分に特異的であるか、又はさらには固有に発現される。その結果、受容体をより低い程度で発現及び暴露するか又は受容体を細胞表面に暴露しない細胞へのコンジュゲートの結合と比較して、コンジュゲートは、固有に及び／若しくは特異的に、又は少なくとも選好的にかつ少なくともより大きい程度に、前記標的細胞に結合する。標的細胞は、例えば、異常細胞、腫瘍細胞、悪性細胞、有疾患細胞、悪性物に関わるＢ細胞、自己免疫細胞などである。

【０１５２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、腫瘍細胞受容体は、本発明の細胞表面分子標的化分子に結合した後に腫瘍細胞によって内在化されるか、又は腫瘍細胞受容体は、本発明のコンジュゲートに結合した後に腫瘍細胞によって内在化され、好ましくは、腫瘍細胞受容体への細胞表面分子標的化分子の結合及びコンジュゲートの結合には、コンジュゲートと腫瘍細胞受容体との複合体の例えばエンドサイトーシスを介した腫瘍細胞受容体により媒介される内在化が後続する。

【０１５３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、腫瘍細胞受容体は、結合によって、腫瘍細胞によって内在化される。並びに／或いは、内在化は、本発明の細胞表面分子標的化分子への結合によって誘導される。或いは、腫瘍細胞受容体は、本発明のコンジュゲートへの結合後に腫瘍細胞により内在化されるか、又はコンジュゲートの腫瘍細胞受容体への結合によって及び／若しくはそれを原因として内在化される。好ましくは、腫瘍細胞受容体への細胞表面分子標的化分子の結合及びコンジュゲートの結合は、コンジュゲートと腫瘍細胞受容体との複合体の例えばエンドサイトーシスを介した腫瘍細胞受容体により媒介される内在化を誘導し、及び／又はもたらす。

【０１５４】

同期は、マウスの首尾良い送達戦略とヒトにおけるその適用との間のミッシングリンクである。実に、本発明者は、一連のインビボマウス腫瘍モデルにおいて、遊離サポニンの１ドーズ及びカップリングされたサポリンなしのＡＤＣの１ドーズをマウスに別々に投与することが、遊離サポニンの存在下のＡＤＣによって処置されない対照動物と比較して、いずれかの所望の抗腫瘍活性、例えば遅延した腫瘍成長、腫瘍退縮、逓減した及びよりゆっくりな腫瘍成長をもたらさないということを確立した。遊離サポニンは、ＡＤＣを投与する瞬間と比較して、種々の投与経路を用いて、かつ遊離サポニンを投与する種々の時点を用いて投与された（ＡＤＣを投与する前に、間に、及び後に遊離サポニンを投与した）。インビボ腫瘍モデルで試験されたＡＤＣは、セツキシマブ－ジアンチン（遊離ＳＯ１８６１あり）又はトラスツズマブ－サポリン（遊離ＳＯ１８６１あり）であった。遊離サポニンのドーズを変えることは、有効な抗腫瘍活性を可能にしなかった。参照されたＡＤＣは、腫瘍を持つ動物に対するいずれかの有益な抗腫瘍効果をそれ自体ではもたらさないドーズで投与された。驚くべきことに、ここで、本発明者は、ヒト腫瘍細胞を用いる種々のインビトロの哺乳類細胞に基づくバイオアッセイにおける及び／又は種々のインビボの動物腫瘍モデルにおける有益な抗腫瘍活性が、本発明に従うコンジュゲートによって細胞又は動物を処置することによって達成され得るということを確立した。コンジュゲートは、

任意に、本発明に従う骨格を含む（下記参照）。骨格は、例えば三官能性リンカーであり、切断可能又は非切断可能な連結部を介して共有結合されたサポニン（例えば、ＳＯ１８６１、ＱＳ－２１）を有し、並びに／或いは非切断可能な結合又は非切断可能な結合を介して共有結合されたエフェクター部分（例えばジアンチン、遺伝子サイレンシングアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）を有する。骨格は、共有結合によって、セツキシマブ、トラスツズマブ、ＯＫＴ－９などのモノクローナル抗体などのコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に連結される。或いは、骨格は、デンドロン、例えば、例えば４つのサポニン分子などの４つの部分が結合し得るデンドロン、例えばＧ４－デンドロンである。或いは、例えば、２つのサポニン及び２つのエフェクター分子に結合するためのデンドロンである。デンドロンは、コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子、例えばリガンド又は抗体又はそのフラグメントもしくはドメインへの（共有結合的）カップリングのための化学基を含む。本発明に従うこれらの骨格の種々のものを例示するさらなる実施形態及び実施例のセクションの参照がなされる。例えばタンパク質性毒素によって発揮される細胞毒性が考えられるときに又は腫瘍細胞における遺伝子サイレンシングが考えられるときに、インビボ及び／又はインビトロの抗腫瘍細胞活性を示している。

【０１５５】

いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、遊離サポニンと一緒のＡＤＣによる腫瘍を持つ動物の処置が考えられるときに観察される失敗から判断して、少なくとも１つのサポニンとエフェクター分子、好ましくは毒素又はオリゴヌクレオチドと両方の存在を、標的細胞、例えば腫瘍細胞又は自己免疫細胞のエンドサイトーシス経路の区画又は小胞において、同期することが好ましい。ＡＤＣ及び遊離サポニンでは、インビボの相乗効果を得るために後期エンドソームにおける分子の存在を同期することは、本発明者の試みに従うと有益には得られ得なかった。ある態様では、単一のコンジュゲート分子上にエフェクター部分とサポニン（単数又は複数）とを組み合わせることについて、本発明は好ましくは少なくとも次の問題を解決する：いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、例えば、（共有結合的な）特に単一のかつ切断可能な保持可能なカップリングに用いられ得るサポニン上の唯一の合理的な化学基が、エンドソーム脱出活性に要求される。最も蓋然的には、公知の制限は、例えば表Ａ１及びスキームＩに挙げられるサポニンの著しいエンドソーム脱出向上効果は１０年よりも多くに渡って公知であるが、なぜサポニンが、免疫増強アジュバント物質の使用を伴うワクチン接種レジメンにおけるサポニンの適用以外の臨床的検討において原薬との組み合わせで用いられていなかったかという理由である。例えば、共有結合されたサポニンを本発明のコンジュゲートに提供することは、例えば、いくつかのサポニンを抱える骨格の文脈において、これらの困難を少なくとも部分的に解決する。驚くべきことに、ここで、アジュバントコンポーネントとしてサポニンが関わるワクチン接種文脈においてそれらの免疫増強活性によって先に適用されたサポニンは、インビトロ及びインビボの抗腫瘍活性について、本発明のコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子への（共有結合的）カップリングにとってもまた好適である。

【０１５６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子が、モノクローナル抗体又はその少なくとも１つの細胞表面分子結合フラグメント又はドメインであるか、又はそれを含み、好ましくは、セツキシマブ、ダラツムマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、パニツムマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、ポラツズマブ、オビヌツズマブ、ＩｇＧ型のＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ハーセプチン、アレムツズマブ、ピナツズマブ、ＯＫＴ－１０抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、表Ａ２又は表Ａ３又は表Ａ４の抗体のいずれか１つ、好ましくはセツキシマブ又はトラスツズマブ又はＯＫＴ－９、或いはその少なくとも１つの細胞表面分子結合フラグメント又はドメインを含むか、或いはそれからなる。

【０１５７】

言われた通り、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子によって細胞表面分

子を標的化することによって、まさに同じ標的細胞の細胞質基質における及びその内におけるサポニン及びエフェクター部分の送達が改善され、より特異的である。コンジュゲートの細胞表面分子標的化分子により標的化するための選択される異常細胞は、理想的には、患者の（隣り合う）健康な細胞が考えられるときに、高い程度に及び／又は特異的に細胞表面分子を持つ。それゆえに、標的細胞表面分子上のエピトープは、理想的には標的有疾患細胞に固有であり、少なくとも特異的に標的細胞の表面に存在し、暴露される。コンジュゲートの結合には、コンジュゲートと標的細胞表面分子との複合体のエンドサイトーシスが後続する。

【０１５８】

表Ａ２、Ａ３、及びＡ４は、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子のエピトープを含む細胞表面分子の好ましい例を挙げている。細胞表面分子が標的細胞上に特異的に発現されるときに、好ましくは、細胞表面分子へのコンジュゲートの結合は、腫瘍細胞表面分子を暴露する腫瘍細胞などの所望の標的細胞へのコンジュゲートの特異的標的化をもたらす。一方、標的（異常）細胞上の細胞表面分子（単数又は複数）の発現と比較して細胞表面分子を発現しないか又は細胞表面分子をより低い程度には発現する健康な細胞などの他の細胞は、コンジュゲートによって標的化されないか又はより低い程度にのみ標的化される。

【０１５９】

本発明における原薬はエフェクター部分であり、これは、生物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは人類、例えば癌患者又は自己免疫患者において有益な結果を達成するために用いられる。利益は、疾患及び／又は症状の診断、予後予測、処置、治癒、及び／又は防止を包含する。原薬は、望まれない有害な副作用にもまた至り得る。このケースでは、原薬が特定のケースにおいて好適であるかどうかを決めるために、長短が秤にかけられなければならない。ある細胞内における原薬の効果が生物丸ごとにとって圧倒的に有益である場合には、細胞は標的細胞と呼ばれる。ある細胞内における効果が生物丸ごとにとって圧倒的に有害である場合には、細胞はオフターゲット細胞と呼ばれる。細胞培養及びバイオリアクターなどの人工系では、標的細胞及びオフターゲット細胞は目的に依存し、ユーザにより定められる。

【０１６０】

ポリペプチドであるエフェクター部分は、例えば、例えば酵素補充、遺伝子制御機能などの失われた機能を回復するポリペプチド、又は毒素であり得る。

【０１６１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、オリゴヌクレオチド、核酸、及びゼノ核酸のいずれか１つ以上を含むか又はそれからなり、好ましくは、ベクター、遺伝子、細胞自殺を誘導するトランスジーン、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、ｍＲＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ブリッジ型核酸（ＢＮＡ）、２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノ核酸（ＦＡＮＡ）、２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレンブリッジ型核酸、３’－フルオロヘキシトール核酸（ＦＨＮＡ）、プラスミド、グリコール核酸（ＧＮＡ）、及びトレオース核酸（ＴＮＡ）、又はその誘導体、より好ましくはＢＮＡ、例えばＨＳＰ２７タンパク質発現をサイレンシングするためのＢＮＡのいずれか１つ以上から選択される。

【０１６２】

本発明者は、共有結合的にカップリングされたアンチセンスＢＮＡ、例えばＢＮＡ（ＨＳＰ２７）を提供され、かつ本発明の共有結合的にカップリングされたサポニンを提供された腫瘍細胞標的化モノクローナル抗体が（これは腫瘍細胞と接触させられ、ＢＮＡ及びサポニン両方は切断可能な結合を介して抗体（例えばセツキシマブ）にカップリングされ

る）、対照と比較してかつサポニン（ＳＯ１８６１、Ｑｕｉｌ－Ａ）ではなくＢＮＡのみを持つＡＯＣと比較して、腫瘍のインビボのＨＳＰ２７をサイレンシングすることができるということを示す。それゆえに、本発明のＡＤＣ－サポニンコンジュゲート又は本発明の抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート－サポニンコンジュゲート（ＡＯＣ－サポニン）、例えば抗体－ＢＮＡ－サポニンコンジュゲートを投与することは、同じドーズにおけるモノクローナル抗体に共有結合されたサポニンを有さないＡＤＣのみ又はＡＯＣのみでは見られない抗腫瘍細胞活性をＡＤＣ－サポニン又はＡＯＣ－サポニンに授ける。注目すべきことに、２つの別々のコンジュゲートの組み合わせとしての、ＡＯＣ、及び共有結合的にカップリングされたサポニンを有する別のモノクローナル抗体は、別々のマウス群において腫瘍を持つマウスに別々に投与されたときには、対照群（基剤のみ投与）と比較して、腫瘍細胞のＨＳＰ２７発現を増大させる。本発明のエフェクター部分を含む本発明のＡＯＣ－サポニンコンジュゲートの投与のみが、対照と比較したときに、縮減されたＨＳＰ２７発現を見せる。アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）は、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１１）に従うオリゴ核酸配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’を有するＢＮＡであった（Ｙ Ｚｈａｎｇ，Ｚ Ｑｕ，Ｓ Ｋｉｍ，Ｖ Ｓｈｉ，Ｂ Ｌｉａｏ１，Ｐ Ｋｒａｆｔ，Ｒ Ｂａｎｄａｒｕ，Ｙ Ｗｕ，ＬＭ Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ａｎｄ ＩＤ Ｈｏｒａｋ，Ｄｏｗｎ－ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ ｔａｒｇｅｔｓ ｕｓｉｎｇ ｌｏｃｋｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ（ＬＮＡ）－ｂａｓｅｄ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈｏｕｔ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１１）１８，３２６－３３３）。注目すべきことに、本発明者の知る限り、ＢＮＡは遊離核酸としての適用のために設計されている。ここで、本発明者は、遺伝子サイレンシング活性がインビトロでかつより重要にはインビボで腫瘍を持つ動物の腫瘍細胞において保持されるやり方で、アンチセンスＢＮＡが（非）切断可能なリンカーを介してリガンド又は抗体に共有結合的にカップリングされ得るということを初めて実証する。ＢＮＡに基づくＡＯＣを提供するこのアプローチは、それを必要とするヒト（癌）患者に標的ＢＮＡを投与するための新たな道を開く。

【０１６３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分は、少なくとも１つのタンパク質性分子を含むか又はそれからなり、好ましくは、ペプチド、タンパク質、酵素、例えばウレアーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼ、リボソーム不活性化タンパク質、表Ａ５から選択されるタンパク質性毒素のいずれか１つ以上から選択され、より好ましくは、ウイルス毒素、例えばアポプチン、細菌毒素、例えば志賀毒素、志賀毒素様毒素、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素（ＰＥ）若しくはＰＥの外毒素Ａ、全長若しくは短縮型ジフテリア毒素（ＤＴ）、コレラ毒素；真菌毒素、例えばアルファサルシン；リボソーム不活性化タンパク質及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖を包含する植物毒素、例えばジアンチン、例えばジアンチン－３０若しくはジアンチン－３２、サポリン、例えばサポリン－Ｓ３若しくはサポリン－Ｓ６、ブーガニン、ブーガニンの脱免疫化誘導体デブーガニン、志賀毒素様毒素Ａ、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、リシン、リシンＡ鎖、モデシン、モデシンＡ鎖、アブリン、アブリンＡ鎖、ボルケンシン、ボルケンシンＡ鎖、ビスクミン、ビスクミンＡ鎖；又は動物若しくはヒト毒素、例えばカエルＲＮａｓｅ、又はヒトからのグランザイムＢ若しくはアンギオゲニン、又はそのいずれかのフラグメント若しくは誘導体のいずれか１つ以上から選択され；好ましくは、タンパク質毒素はジアンチン及び／又はサポリンである。

【０１６４】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター分子が、少なくとも１つのペイロードを含むか又はそれからなり、好ましくは、リボソームを標的化する毒素、伸長因子を標的化する毒素、チューブリンを標的化する毒素、ＤＮＡを標的化する毒素、及びＲＮＡを標的化する毒素のいずれか１つ以上、より好ましくは、エムタンシン、パスドトクス、メイタンシノイド誘導体ＤＭ１、メイタンシノイド誘導体ＤＭ４、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ、ベドチン）、モノメチルアウリスタチ

ンＦ（ＭＭＡＦ、マホドチン）、カリケアミシン、Ｎ－アセチル－γ－カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）二量体、ベンゾジアゼピン、ＣＣ－１０６５アナログ、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ミトキサントロン、チューブリシン、インドリノベンゾジアゼピン、ＡＺ１３５９９１８５、クリプトフィシン、リゾキシン、メトトレキサート、アントラサイクリン、カンプトテシンアナログ、ＳＮ－３８、ＤＸ－８９５１ｆ、エキサテカンメシレート、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素の短縮型形態（ＰＥ３８）、デュオカルマイシン誘導体、アマニチン、α－アマニチン、スプライソスタチン、タイランスタチン、オゾガマイシン、テシリン、アンバースタチン２６９、及びソラブタンシンのいずれか１つ以上、又はその誘導体から選択される。

【０１６５】

本発明に有用なエフェクター部分は好ましくはその効果を発揮するためには後期エンドソーム脱出に依拠する。例えばシュードモナス外毒素などのいくつかのエフェクターは、「後期エンドソームステージ」の前に他のオルガネラへと経路変更され、それゆえに、通常は、本発明に従う第２のタンパク質性分子へのカップリングから利さないであろう。しかしながら、かかる毒素は、例えばシグナルペプチドが担う経路変更を欠失することによって、本発明への使用のために適合させられ得る。具体的には、高度に毒性であり、エンドソームを脱出して細胞を殺すために１つの分子のみを要求するであろう毒素は、より強力でないように改変され得る。少なくとも２、より好ましくは少なくとも５、より好ましくは少なくとも１０、より好ましくは少なくとも２０、より好ましくは少なくとも５０、最も好ましくは少なくとも１００個の毒素分子がエンドソームから脱出する場合に細胞を殺す毒素を用いることが好ましい。本発明のコンジュゲートは、共有結合的にコンジュゲート化された機能化された骨格を含むということがさらに好ましい。すなわち、結合されたエフェクター部分（単数又は複数）を含む骨格を腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの標的細胞へと標的化するための共有結合されたエフェクター部分（単数又は複数）を含むオリゴマー又はポリマー骨格又は三官能性リンカーなどの骨格である。さらに、オフターゲット毒性を縮減するために、細胞膜非透過性の低分子毒素は、細胞膜透過性の毒素よりも好ましいエフェクター分子である。

【０１６６】

本発明において用いられる用語「リガンド」はその通常の意味を有し、好ましくは、標的細胞の細胞表面上の別の分子又は構造に結合することができる分子又は構造を意味する。細胞表面上の前記分子又は構造はエンドサイトーシスされ得、好ましくは、オフターゲット細胞上には不在であるか又はより顕著でない。好ましくは、細胞表面上の前記分子又は構造は恒常的にエンドサイトーシスされる。より好ましくは、コンジュゲート又はより具体的には細胞表面分子標的化分子は、本発明において、前記分子又は構造への結合後に、標的細胞の細胞表面上の前記分子又は構造のエンドサイトーシスを誘導する。これは、例えば、種々の癌細胞の表面に存在する上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＨＥＲ２、及びＣＤ７１に当てはまる。恒常的にエンドサイトーシスされる標的細胞の細胞表面上の分子又は構造の例は、例えば、クローディン－１又は主要組織適合性複合体クラスＩＩ糖タンパク質である。細胞表面分子標的化分子は、例えば、抗体、成長因子、又はサイトカインであり得る。本発明のコンジュゲートにおいて、毒素を細胞表面分子標的化分子と及び本発明の少なくとも１つのサポニンと組み合わせることは、標的化された毒素を作り出すための１つの可能性である。それが標的細胞においてのみ起こるプロセスに干渉するので標的細胞においてのみ毒性である毒素もまた、標的化された毒素として見られ得る（オフターゲット細胞におけるように、それはその毒性作用を発揮し得ない。例えばアポプチンである）。好ましくは、標的化された毒素は、（それが標的細胞にのみ結合され、エンドサイトーシスされるので）標的細胞において活性であり、オフターゲット細胞においては活性でないように、例えばモノクローナル抗体などの細胞表面分子標的化分子と組み合わせられている毒素である。例えばエフェクター部分及び／又はサポニン（単数又は複数）

を含む機能化された骨格を含む本発明のコンジュゲートでは、モノクローナル抗体などの細胞表面分子標的化分子は、骨格を介してエフェクター部分及び／又はサポニン（単数又は複数）を標的細胞へとガイドする。内在化後に、少なくとも１つのグリコシド、好ましくは本発明のコンジュゲートに含まれるサポニンは、エフェクター部分のエンドソーム脱出を媒介する。サポニンは、典型的には、表Ａ１及びスキームＩに挙げられているサポニンであり、好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１及び／又はＳＡ１６４１及び／又はＧＥ１７４１である。

【０１６７】

好ましくは、その効果がコンジュゲートに含まれるサポニンによって向上する本発明のコンジュゲートに含まれるエフェクター部分は、エンドサイトーシスされたときには、コンジュゲートから取り外される。例えば、細胞表面分子標的化分子としてコンジュゲート上に存在する抗体から取り外される。これは、例えば酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で壊れる切断可能な結合によって達成され得る。

【０１６８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、少なくとも１つのリンカーを介して細胞表面分子標的化分子に共有結合されるか、又は細胞表面分子標的化分子に直接的に結合されるかどちらかである。

【０１６９】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分が、細胞表面分子標的化分子に共有結合され、それによって、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチン抗体－薬物コンジュゲート、並びに表Ａ２及び表Ａ３の抗体－薬物コンジュゲートのいずれか１つを形成する。

【０１７０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子、好ましくは細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に、サポニン上のアルデヒド官能基を介して、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分上のアミノ酸残基を介して、サポニン上のアルデヒド官能基、好ましくは１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基を介して、共有結合される。

【０１７１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのアルデヒド官能基、好ましくは少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、チオ－エーテル結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる。

【０１７２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、サポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基の炭水化物置換基としてグルクロン酸官能基を含み、サポニンは、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、前記グルクロン酸官能基を介して、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分上のアミノ酸残基を介して、共有結合される。

【０１７３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカー

は、アミド結合を介して、細胞表面分子標的化分子上の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分上のアミン基、例えば細胞表面分子標的化分子の及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分のリジン又はＮ末端のアミン基に、共有結合的にカップリングされる。

【０１７４】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／或いは少なくとも１つのエフェクター部分に、直接的に、或いは少なくとも１つのリンカー、例えばＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づく及び／若しくは１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに基づく二官能性リンカー、又は三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーを介してどちらかで、共有結合される。

【０１７５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、三官能性リンカーが、それに少なくとも１つのサポニンが共有結合される第２の化学基、細胞表面分子標的化分子に共有結合するための第３の化学基、及び少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための第１の化学基を含み、好ましくは、三官能性リンカーが、スキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【０１７６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に、三官能性リンカーを含む少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、この三官能性リンカーには、細胞表面分子標的化分子及び少なくとも１つのエフェクター部分両方が結合され、好ましくは、三官能性リンカーは、スキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【０１７７】

ある実施形態は、本発明の三官能性リンカー、例えば、本発明のスキームＩＩ及び構造Ｂ及び／又は図１６の三官能性リンカーである。

【０１７８】

ある実施形態は、コンジュゲート、例えばＡＤＣ又はＡＯＣ、好ましくは、本発明の少なくとも１つのサポニンを含むコンジュゲート、本発明に従うＡＤＣ－サポニンコンジュゲート、及び／又はＡＯＣ－サポニンコンジュゲートの製造のための、本発明に従う三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーの使用である。

【０１７９】

ある実施形態は、本発明の三官能性リンカーを含む半完成製品である。本発明に従う少なくとも１つのサポニンが、三官能性リンカーに共有結合される。並びに／或いは、本発明に従う少なくとも１つのエフェクター部分が、三官能性リンカーに、直接的に又は少なくとも１つのリンカーを介して及び／若しくは少なくとも１つの本発明のオリゴマー若しくはポリマー骨格を介してどちらかで、共有結合される。リンカーは、好ましくは、本発明に従う切断可能なリンカーであり、本発明のエフェクター部分は、好ましくは、毒素、例えばジアンチン、サポリンから選択されるタンパク質毒素であり、及び／又は本発明のサポニンは、好ましくは、Ｑｕｉｌ－Ａ、ＱＳ－２１、ＱＳ－７、ＱＳ１８６１、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＧＥ１７４１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分のいずれか１つ以上である。

【０１８０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含み、任意に、前記切断可能なリンカーは、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能なリンカーは、酸性条件下での切断を受けるヒドラゾン結合若しくはヒドラジド結合、及び／又はタンパク質分解、例えばカテプシンＢによるタンパク質分解に感受性の結合、及び／又は還元的条件下での切断に感受性の結合、例えばジスルフィド結合から選択される切断可能な結合を含む。

【０１８１】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのリンカーが、少なくとも１つの切断可能なリンカーを含み、前記切断可能なリンカーは、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５で、より好ましくはｐＨ≦５．５で、インビボで切断を受ける。
【０１８２】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、アミド結合を形成するリジン側鎖に及び／又はチオ－エーテル結合若しくはジスルフィド結合を形成するシステイン側鎖に共有結合され、リジン及び／又はシステインは、細胞表面分子標的化分子に含まれ、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に含まれ、少なくとも１つのサポニンは、直接的にリジン及び／若しくはシステインに結合されるか、又は任意に切断可能なリンカー及び／若しくは三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーを含む少なくとも１つのリンカーを介して結合されるかどちらかである。
【０１８３】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、リンカーが、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに基づき、及び／又は１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカー、切断可能なリンカーに基づき、並びに／或いはジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ヒドラジド結合のいずれか１つ以上が関わる。
【０１８４】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に少なくとも１つのリンカーを介して共有結合され、リンカーは、ポリマー又はオリゴマー構造を含み、かつさらに骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合するための少なくとも１つの第４の化学基を含む骨格であるか、又はそれを含む。
【０１８５】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、切断可能な結合を介して及び／又は非切断可能な結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される。
【０１８６】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、切断可能な結合が、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、及び光誘導性条件のいずれかの下で切断を受け、好ましくは、切断可能な結合は、酸性条件下での切断を受けるヒドラゾン結合若しくはヒドラジド結合、及び／又はタンパク質分解、例えばカテプシンＢによるタンパク質分解に感受性の結合、及び／又は還元的条件下での切断を受ける結合、例えばジスルフィド結合を含む。
【０１８７】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、切断可能な結合は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５で、より好ましくはｐＨ≦５．５で、インビボでの切断を受ける。
【０１８８】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、ヒドラジド結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、ジスルフィド結合、チオ－エーテル結合、アミド結合、ペプチド結合、又はエステル結合のいずれか１つ以上を介して、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介して、共有結合される。
【０１８９】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格の

ポリマー又はオリゴマー構造に、イミン結合、ヒドラゾン結合、及びヒドラジド結合のいずれか１つ以上を介して共有結合され、この結合は、好ましくは、本発明に従う切断可能であり、好ましくは、少なくとも１つのサポニンは、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に、少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基を介して共有結合される。

【０１９０】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーが、チオ－エーテル結合を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる。

【０１９１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造にアミド結合を介して共有結合され、好ましくは、少なくとも１つのサポニンは、存在するときには、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される。

【０１９２】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が、リンカー１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造上のアミン基、例えば骨格のポリマー又はオリゴマー構造のリジン又はＮ末端のアミン基に共有結合的にカップリングされる。

【０１９３】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が関わり、及び／又は、共有結合には、存在するときには少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベータ－ＯＨ基の炭水化物置換基としてのグルクロン酸官能基が関わる。

【０１９４】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、骨格を細胞表面分子標的化分子に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に共有結合的にカップリングするための骨格の少なくとも１つの第４の化学基が、クリックケミストリー基であり、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン、又はアルキン、又はこれらの基の環状誘導体のいずれか１つ以上、好ましくはアジド基から選択される。

【０１９５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、骨格のポリマー又はオリゴマー構造が、直鎖、分岐、及び／若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、ＤＮＡ、ポリペプチド、ポリリジン、ポリエチレングリコール、又はこれらのポリマー若しくはオリゴマー構造の集合体を含み、この集合体が、好ましくは共有結合的な架橋によって組み上げられる。

【０１９６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、定められた数のサポニン又は定められた範囲のサポニン、好ましくは１～１２８個のサポニン、又は少なくとも２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、又は１２８個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば７、９、１２個のサポニンである。

【０１９７】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、コンジュゲートが、１つよりも多くの

サポニン、好ましくは２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、又は１～１００個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば、７、９、１２個のサポニンを含み、直接的に、細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基に及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分に、好ましくは少なくとも１つのエフェクター部分のアミノ酸残基を介して、好ましくはシステインに及び／又はリジンに、共有結合され、並びに／或いは、請求項２８～４０のいずれか１つの少なくとも１つのリンカーを介して及び／又は少なくとも１つの切断可能なリンカーを介して及び／又は少なくとも１つのポリマー若しくはオリゴマー骨格、好ましくはかかる骨格の１～８つ若しくはかかる骨格の２～４つを介して、共有結合され、１～３２個のサポニン、好ましくは２、３、４、５、６、８、１０、１６、又は３２個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば７、９、１２個のサポニンが、少なくとも１つの骨格に共有結合される。

【０１９８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンが、細胞表面分子標的化分子に及び少なくとも１つのエフェクター部分に三官能性リンカーを介して共有結合され、三官能性リンカーは、少なくとも１つのサポニンが直接的に或いは切断可能なリンカーなどのリンカーを介して及び／又はポリマー若しくはオリゴマー構造を含む骨格を介してどちらかでそれに共有結合される第２の化学基と、三官能性リンカーへの骨格の共有結合的カップリングのための本発明に従う第４の化学基とを含み、三官能性リンカーは、さらに、細胞表面分子標的化分子への共有結合のための第３の化学基を含み、かつ少なくとも１つのエフェクター部分への共有結合のための第１の化学基を含み、細胞表面分子標的化分子は第３の化学基に結合され、及び／又は少なくとも１つのエフェクター部分は第１の化学基に結合され、好ましくは、三官能性リンカーはスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【０１９９】

本発明に従うと、典型的には、サポニンは表Ａ１、スキームＩに挙げられているサポニンである。本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に共有結合的にカップリングされたエフェクター部分の細胞内への進入及び細胞質基質内における蓄積が考えられるときに、サポニンの活性、例えば細胞内におけるエンドソーム脱出向上活性にとっては、サポニンが細胞表面分子標的化分子に共有結合的にカップリングされ（直接的に、又はエフェクター部分への第１の結合を介して間接的に。エフェクター部分は直接的に細胞表面分子標的化分子にカップリングされる）、ヒドラゾン結合及び／又はヒドラジド結合及び／又はジスルフィド結合が関わるときが、有益だと証明された。かかる結合の型は、哺乳類細胞、例えばヒト細胞の（後期）エンドソーム及びリソソーム内の酸性条件下において、及び／又は還元的条件下において容易く切断する。代替的には、本発明者は、細胞、例えば（後期）エンドソーム、リソソーム、細胞質基質内の生理条件下において容易く切断可能ではない結合を介した細胞表面分子標的化分子へのサポニンの共有結合的カップリングもまた、例えば核酸（例えば、ＨＳＰ２７をサイレンシングするＢＮＡ）及びサポリンなどのタンパク質性毒素などのエフェクター部分の生物学的効果に対するサポニンの増強活性にとって有益であるということをもまた実証する。かかる結合の例は、サポニンをリジン側鎖に、直接的に或いは（切断可能な）リンカーを介して及び／又はオリゴマー若しくはポリマー骨格を介してどちらかで、カップリングするためのアミド結合である。請求項を包含する本願においては、本発明のコンジュゲート、例えばヒドラゾン結合又はジスルフィド結合を介してリンカー及び／又は骨格を介して細胞表面分子標的化分子にカップリングされたサポニンを有する骨格を任意に含むコンジュゲートが参照されるときに、用語「切断可能なリンカー」、「切断可能な結合」などは、例えば（後期）エンドソーム及び／又はリソソームにおけるかかる結合又はリンカーの切断の文脈において、「不安定なリンカー」（「Ｌ」）及び「不安定な結合」ともまた言われる。例えば、図２及び図３は、マウスのヒト腫瘍におけるインビボＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを示している。腫瘍を持つマウスを本発明のコンジュゲートによって処置した。本発明に従って、不安定なリンカー（ヒドラゾン結合）を介してそれに結合されたサポニンを有し、かつジスルフィ

ド結合を介してモノクローナル抗体に共有結合的にカップリングされた腫瘍細胞のＨＳＰ２７遺伝子をサイレンシングするためのアンチセンスＢＮＡを有するモノクローナル抗体からなった。つまり、いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、ひとたび本発明のコンジュゲートが例えばエンドサイトーシスによって内在化されると、ヒドラゾン結合及びジスルフィド結合は、標的細胞表面分子、ここではＥＧＦＲ上のエピトープを細胞表面に発現する標的腫瘍細胞の（後期）エンドソーム及び／又はリソソームにおいて切断される。エンドソーム及び／又はリソソームから細胞質基質へのＢＮＡの進入が考えられるときに、結合の切断は蓋然的にはサポニンのエンドソーム脱出向上活性に寄与するが、かかる切断は、本発明のセツキシマブ－ＳＯ１８６１－ＢＮＡコンジュゲートの遺伝子サイレンシング効果を観察することにとって不可欠事ではない。

【０２００】

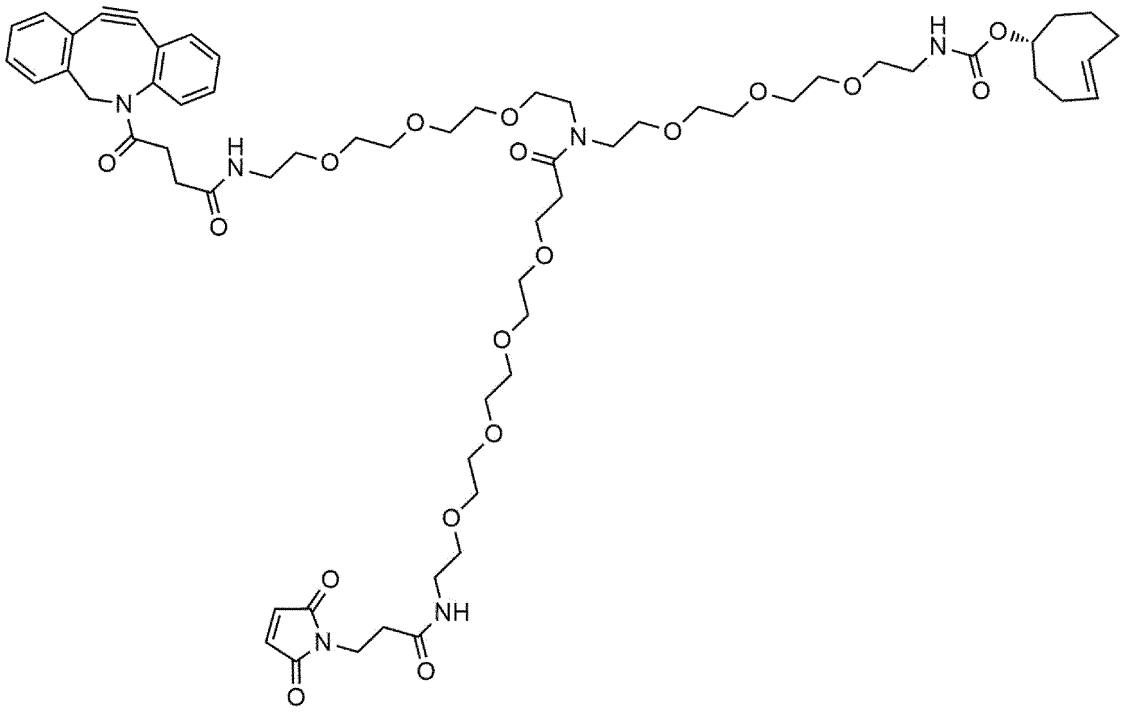
当業者は、三官能性リンカーが、１つ、２つ、又は３つのサポニン部分を共有結合的にカップリングすることにとって好適な本発明の骨格であるということを了解するであろう。三官能性リンカーでは、１つ又は２つのサポニン部分の共有結合的カップリングが好ましい。第２及び／又は第３の結合部位は、例えば、タンパク質性リガンド、例えば細胞表面分子標的化分子の共有結合的カップリングにとって好適である。典型的なタンパク質性リガンドは、細胞表面にＥＧＦＲを発現する（腫瘍）細胞を標的化するためのＥＧＦ、及び腫瘍細胞又は自己免疫細胞を標的化するためのサイトカインである。その上、三官能性リンカーの第２又は第３の結合部位は、モノクローナル抗体などの免疫グロブリン、すなわち、細胞表面分子、例えば腫瘍細胞表面分子、好ましくは腫瘍細胞特異的分子、より好ましくは腫瘍細胞の表面に特異的に（過剰）発現される腫瘍細胞受容体に結合するための細胞表面分子標的化分子の共有結合的カップリングにとって好適である。類似に、免疫グロブリン、又は免疫グロブリンの結合特異性を包摂するそのいずれかのフラグメント（単数又は複数）及び／又はドメイン（単数又は複数）は、自己免疫細胞の表面に発現される受容体などの細胞表面分子への結合にとって好適である。それゆえに、ある実施形態では、本発明のコンジュゲートは、三官能性リンカーを含む。前記リンカーは、共有結合されたサポニン、例えばＱＳ－２１、ＳＯ１８６１、及び共有結合された細胞表面分子標的化分子、例えば細胞標的化部分、例えば、腫瘍細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞、非健康細胞、Ｂ細胞疾患への（特異的）結合のためのリガンド又は抗体を含むか、又はそれからなる。

【０２０１】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、スキームＩＩに従う骨格コア構造としてオリゴマー三官能性リンカーを含む：

【０２０２】

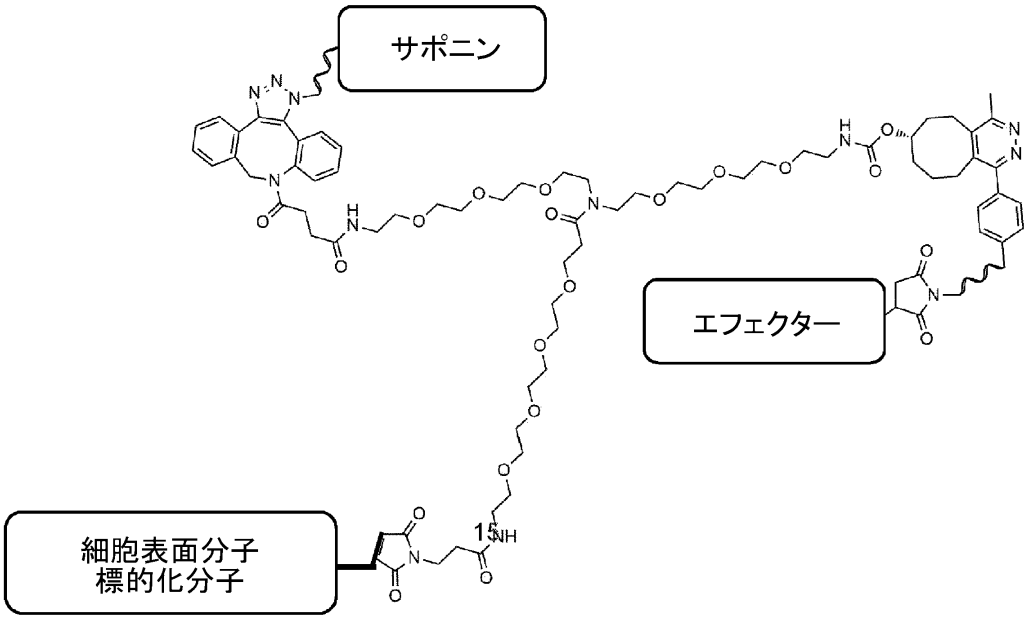
【化６】



スキームⅡ

【０２０３】
サポニン及びエフェクター部分は、三官能性リンカー骨格に、不安定な切断可能なヒドラゾンリンカー（酸感受性）を介して及び／又はマレイミドを含む結合を介して、共有結合される。一方、抗体などの細胞表面分子標的化分子への骨格の結合は、１、２、３、又は４つのシステインなどの結合部位のシステインとのマレイミドを含む結合を介して及び／又は不安定な切断可能なヒドラゾンリンカー（酸感受性）を介して確立され、それによって構造Ｂを形成し：
【０２０４】

【化７】



構造B

【０２０５】
その結果、１～４つの骨格が、単一の細胞表面分子標的化分子、例えばモノクローナル抗体などの抗体に共有結合される。
【０２０６】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、サポニンと細胞表面分子標的化分子との間の連結は、好ましくは、ｐＨ７．４で安定である酸に不安定な結合を介して起こり、好ましくは、ｐＨ６．５よりも下で、より好ましくはｐＨ６．５及び５．０の間でサポニンを放出する。これは、例えば、サポニン及び細胞表面分子標的化分子を連結するリンカーのアミノ基とサポニンのアルデヒド基とにより形成されるイミンによって実現される。ｐＨ条件を充たす他の化学結合もまた、アルデヒドカップリングに用いられ得る。例えば特定のヒドラゾン又はアセタールであり、それぞれリンカーの官能基としてヒドラジド及びヒドロキシル基を要求する。結合が切断可能な結合である場合に、サポニンは、好ましくは、サポニン上のカルボキシル基の１つを介して又はアルデヒド官能基を介して、より好ましくはアルデヒド官能基、好ましくは位置２３のアルデヒド官能基を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に取り付けられる。代替的には、サポニンは、好ましくは、骨格のポリマー又はオリゴマー構造を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造を接続するリンカーを介して、サポニンのカルボン酸官能基を介して又はアルデヒド官能基を介してどちらかで、細胞表面分子標的化分子に取り付けられる。
【０２０７】
ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンは、安定な結合を介して細胞表面分子標的化分子に結合される。より好ましい実施形態において、サポニンと細胞表面分子標的化分子との間の安定な結合は、好ましくは、アミドカップリング又はアミン形成によって起こる。これは、例えば、サポニン及び細胞表面分子標的化分子を一緒に連結するポリマー又はオリゴマー骨格構造のアミノ基とサポニンの活性化グルクロン酸基とによるカルボジイミドにより媒介されるアミド結合形成によって実現される。安定な結合の定義を充たす化学結合は、アルデヒドカップリングにもまた用いられ得る。例えば、特定のアミンが還元的アミノ化後に誘導され、リンカー又は骨格のポリマー又はオリゴマー構造の官能基として第１級アミノ基を要求する。結合が安定な結合である場

合に、サポニンは、好ましくは、サポニンのカルボキシル基の１つを介してリンカー又は骨格に取り付けられ、リンカー又は骨格はさらに細胞表面分子標的化分子に連結される。

【０２０８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、サポニンは、本発明に従う骨格を介して細胞表面分子標的化分子にカップリングされ、結合部位への骨格の共有結合的カップリングのための化学基は、クリックケミストリー基である。

【０２０９】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、サポニンは、本発明に従う骨格を介して細胞表面分子標的化分子にカップリングされ、クリックケミストリー基は、テトラジン、アジド、アルケン、又はアルキン、又はこれらの基のいずれかの環状誘導体、好ましくはアジドである。クリックケミストリー基はクリックケミストリーにとって好適な化学官能基である。これは、モジュラーであり、範囲が広く、非常に高い収量を与え、当たり障りがない副産物のみを生成し、異なる官能基に対する高い選択性及び高い忍容性を提供し、かつ立体特異的である反応として定められる。要求されるプロセス特徴は、単純な反応条件、容易く利用可能な出発材料及び試薬、無溶媒又は穏和である（例えば水）若しくは容易に除去される溶媒の使用、及び単純な産物単離を包含する。任意に骨格又はリンカーを介して本発明のコンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子にサポニンをカップリングするためのクリックケミストリー基は、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン、又はアルキン、又はそれらの反応性誘導体、例えばメチル－テトラジン又はマレイミド（アルケン）、より好ましくはアルキン、又はこれらの基の環状誘導体、例えばシクロオクチン（例えば、アザ－ジベンゾシクロオクチン、ジフルオロシクロオクチン、ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン、ジベンゾシクロオクチン）である。

【０２１０】

それゆえに、本発明に従うコンジュゲートは、少なくとも１つのサポニンを含む。この文脈における「少なくとも１つ」によって、コンジュゲートが１つのサポニン分子を含むが、数個（例えば２つ、３つ、又は４つ）のサポニン又は多数（例えば、１０個、２０個、又は１００個）のサポニンをもまた含み得るということが意味される。適用に依存して、コンジュゲートは、共有結合されたサポニンを有する共有結合された骨格を含み得る。骨格は、それが定められた数のサポニンを含むように設計され得る。好ましくは、本発明に従うコンジュゲートは、ランダムな数よりもむしろ定められた数又は範囲のサポニンを含む。これは薬物開発にとって販売承認に関して特に有利である。この点において、定められる数は、コンジュゲートが好ましくは予め定められた数のサポニンを含むことを意味する。これは、例えば、サポニン（単数又は複数）が取り付くためのある種の数の可能な部分を有するポリマー構造を含む骨格を設計することによって達成される。理想的な状況においては、これらの部分の全てがサポニンにカップリングされ、それから、骨格は、予め定められた数のサポニンを含む。例えば２、４、８、１６、３２、６４個などのサポニンを含む骨格の標準的なセットを提供することが想定され、その結果、最適な数は、ユーザによって彼の必要に従って容易に試験され得る。ある実施形態は、本発明の骨格を含む本発明のコンジュゲートであり、非理想的な状況では、ポリマー構造上に存在する全ての部分がサポニンを結合するわけではなく、サポニンは定められた範囲で存在する。かかる範囲は、例えば、骨格当たり２～４つのサポニン分子、骨格当たり３～６つのサポニン分子、骨格当たり４～８つのサポニン分子、骨格当たり６～８つのサポニン分子、骨格当たり６～１２個のサポニン分子などであり得る。それゆえに、かかるケースでは、範囲が２～４として定められる場合には、本発明に従う骨格を含むコンジュゲートは２、３、又は４つのサポニンを含む。

【０２１１】

骨格は、根源的には、骨格に共有結合されたサポニンの型に非依存的であり、骨格は、続いて（順次の順番で）コンジュゲートに共有結合的にカップリングされる。それゆえに、骨格を含むコンジュゲートは、新たなプラットフォームテクノロジーの基礎製品である。少なくとも１つの共有結合されたサポニンは、本発明のコンジュゲートに含まれる細胞

表面分子標的化分子に結合されたエフェクター部分の細胞内送達を媒介するので、本発明に従う骨格テクノロジーは、サポニンによるコントロールされた細胞内エフェクター部分送達を媒介する公知の初めての系である。骨格は最適化されたかつ機能的に活性な単位を提供し、これは、コンジュゲートに含まれるサポニン（単数又は複数）に及び細胞表面分子標的化分子、例えばリガンド、抗体などに、単一のかつ定められた位置で連結され得る。

【０２１２】

ある実施形態は本発明に従う骨格を含むコンジュゲートであり、ポリマー又はオリゴマー構造のモノマーの数は、厳密に定められた数又は範囲である。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、ポリ（アミン）などの構造、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、又はポリエチレングリコール、ポリ（エステル）などの構造、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、ポリ（デキストリン）、又はペプチド若しくはタンパク質、或いは天然及び／又は人工ポリアミノ酸などの構造、例えばポリリジン、ＤＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、又はＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーを含む。純粋または混合どちらかの、直鎖、分岐、又は環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、或いはこれらの構造の集合体として現れる。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は生体適合性であり、生体適合性は、ポリマー又はオリゴマー構造が、生物における実質的な急性又は慢性毒性を示さず、そのまま排泄され得るか、又は体の代謝によって排泄可能な及び／若しくは生理的な化合物まで完全に分解され得るかどちらかであるということを意味する。集合体は、共有結合的な架橋又は非共有結合及び／又は吸引力により組み上げられ得る。よって、それらはナノゲル、ミクロゲル、又はヒドロゲルをもまた形成し得る。或いは、それらは、担体、例えば無機ナノ粒子、コロイド、リポソーム、ミセル、又はコレステロール及び／若しくはリン脂質を含む粒子様構造に取り付けられ得る。前記ポリマー又はオリゴマー構造は、好ましくは、グリコシド分子（及び／又はエフェクター分子、及び／又は担体分子、例えばリガンド、モノクローナル抗体、若しくはそのフラグメント）のカップリングのために、厳密に定められた数又は範囲のカップリング部分を持つ。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造上の厳密に定められた数又は範囲のカップリング部分の少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、最も好ましくは１００％が、本発明に従う骨格においてグリコシド分子によって占められる。

【０２１３】

好ましくは、デンドロンは分岐した明瞭に定められた樹状ポリマーであり、フォーカルポイントと呼ばれる樹の起点に単一の化学的に対処可能な基を有する。デンドリマーは、それらのフォーカルポイントにおける２つ以上のデンドロンの接続である。デンドロン化ポリマーは、ポリマーへの１つ以上のデンドロンのフォーカルポイントの接続である。好ましい実施形態においては、本発明に従う骨格が提供され、ポリマー又はオリゴマー構造は、直鎖、分岐、若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、又はこれらの構造の集合体を、純粋または混合どちらかで含む。集合体は、共有結合的な架橋又は非共有結合的な吸引力によって組み上げられ得、ナノゲル、ミクロゲル、又はヒドロゲルを形成し得る。好ましくは、ポリマーは、ポリ（アミン）の誘導体、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、及びポリエチレングリコール、ポリ（エステル）などの構造、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、及びポリ（デキストリン）、並びに天然及び／又は人工ポリアミノ酸などの構造、例えばポリリジン、又はペプチド若しくはタンパク質又はＤＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、又はＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーである。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は生体適合性である。

【０２１４】

ある実施形態は、本発明に従う使用のための本発明のコンジュゲートであり、コンジュゲートは、１つよりも多くの共有結合されたサポニン、好ましくは２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、１２８、又は１～１００個のサポニン、又はその間のいずれかの数のサポニン、例えば、７、９、１２個のサポニン、又はいずれかを含む。

【０２１５】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンは、本発明に従う少なくとも１つの切断可能なリンカーを介して、オリゴマー又はポリマー骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合される。

【０２１６】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、コンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基へのオリゴマー又はポリマー骨格の共有結合的カップリングのためのオリゴマー又はポリマー骨格の化学基は、クリックケミストリー基であり、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン、又はアルキン、又はこれらの基の環状誘導体から選択される。より好ましくは、前記化学基はアジドである。

【０２１７】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、ポリマー又はオリゴマー骨格のポリマー又はオリゴマー構造が、直鎖、分岐、及び／若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、ＤＮＡ、ポリペプチド、ポリリジン、ポリエチレングリコール、又はこれらのポリマー若しくはオリゴマー構造の集合体を含み、この集合体が、好ましくは共有結合的な架橋によって組み上げられる。

【０２１８】

本発明者は、ここの上の実施形態のいずれかに従う本発明のコンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子へのサポニンの好ましくは切断可能な結合又はリンカーを介した共有結合的カップリングが、前記コンジュゲートに含まれるエフェクター部分の活性の効率的なかつ細胞標的化された増強を提供するということを確立した。直接的に又はリンカーを介して、モノクローナル抗体などのコンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子のシステイン側鎖又はリジン側鎖にサポニンをカップリングすることは、標的細胞内のエフェクター部分増強活性の特異的かつ効率的な送達の有益なやり方であることが判明した。このときには、サポニン（単数又は複数）もまた共有結合されているまさに同じ細胞表面分子標的化分子を用いることによって、エフェクター部分もまた同じ標的細胞に送達される。

【０２１９】

本発明をより詳細に説明するために、物質の細胞取り込みのプロセス（本発明者はいずれかの理論によって拘束されようとしないが）及び本発明に用いられる術語が記載される。小胞出芽による細胞内への細胞外物質の取り込みは、エンドサイトーシスと呼ばれる。前記の小胞出芽は、（１）細胞質基質タンパク質クラスリンにより媒介される受容体依存的なリガンド取り込み、（２）コレステロール結合タンパク質カベオリンにより媒介される脂質ラフト取り込み、（３）非特異的流体取り込み（飲作用）、又は（４）非特異的粒子取り込み（食作用）を特徴とし得る。エンドサイトーシスの全ての型は、エンドサイトーシス経路と呼ばれる小胞輸送及び物質選別の次の細胞プロセスに突入する。エンドサイトーシス経路は複雑であり、完全には理解されていない。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、オルガネラはデノボ形成され得、エンドサイトーシス経路に沿って次のオルガネラへと成熟し得る。しかしながら、ここで、エンドサイトーシス経路には、小胞の通行によって接続される安定な区画が関わるという仮説が立てられている。区画は、細胞に必須の機能の特定のセットに特化している複雑な多機能膜オルガネラである。小胞は一過性のオルガネラであると考えられ、組成がより単純であり、既存の区画からの出芽によってデノボ形成される膜で囲まれた容器として定められる。区画とは対照的に、小胞は成熟を経過し得、これは生理的に不可逆的な一連の生化学的変化である。初期エンドソーム及び後期エンドソームは、エンドサイトーシス経路における安定な区画に相当し、一次エンドサイトーシス小胞、ファゴソーム、多胞体（エンドソームキャリア小胞と

もまた呼ばれる）、分泌顆粒、さらにはリソソームは小胞に相当する。細胞膜において、最も顕著にはクラスリン被覆ピットから生起するエンドサイトーシス小胞は、まず、およそｐＨ６．５の主要な選別区画である初期エンドソームと融合する。内在化されたカーゴ及び膜の大部分は、リサイクル小胞（リサイクル経路）を介して原形質膜へとリサイクルされる。分解されるべきコンポーネントは、多胞体を介して酸性の後期エンドソーム（６よりも低いｐＨ）に輸送される。リソソームは成熟リソソーム酵素を貯蔵し得る小胞であり、必要とされるときに後期エンドソーム区画にそれらを送達する。もたらされたオルガネラは、ハイブリッドオルガネラ又はエンドリソソームと呼ばれる。リソソームは、リソソーム再形成と言われるプロセスによってハイブリッドオルガネラから出芽する。後期エンドソーム、リソソーム、及びハイブリッドオルガネラは、極度に動的なオルガネラであり、それらの間の区別はしばしば困難である。エンドサイトーシスされた分子の分解が、エンドリソソーム又はリソソーム内で生じる。エンドソーム脱出は、エンドサイトーシス経路からの、好ましくはクラスリン介在性エンドサイトーシス又は細胞質基質へのリサイクル経路からの、いずれかの種類の区画又は小胞の内腔からの物質の能動的又は受動的放出である。それゆえに、エンドソーム脱出は、それらの中間体及びハイブリッドオルガネラを包含するエンドソーム、エンドリソソーム、又はリソソームからの放出を包含するが、これらに限定されない。

【０２２０】

別様に具体的に指示されない限り、かつ特に本発明のサポニンなどのグリコシド分子のエンドソーム脱出メカニズムに関するときには、言葉「エンドソーム」又は「エンドソーム脱出」が本明細書において用いられるときはいつでも、それは、それぞれエンドリソソーム及びリソソーム並びにエンドリソソーム及びリソソームからの脱出をもまた包含する。細胞質基質に入った後に、前記物質は、核などの他の細胞単位に移動し得る。

【０２２１】

正式な用語では、グリコシドは、糖基がグリコシド結合によってそのアノマー炭素を介して別の基に結合されているいずれかの分子である。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、本発明の文脈におけるサポニンなどのグリコシド分子は、特にエフェクター部分のエンドソーム脱出を容易化することによってエフェクター部分の効果をさらに向上することができるような分子である。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、グリコシド分子（サポニン、例えば表Ａ１に挙げられているもの）は、エンドサイトーシス経路及びリサイクル経路の区画及び小胞の膜と相互作用し、それらを前記エフェクター部分について漏れ易くし、増加したエンドソーム脱出をもたらす。用語「骨格は、エフェクター部分のエンドソーム脱出を増加させることができる」によって、リンカーを介して若しくは直接的に細胞表面分子標的化分子に又は骨格のポリマー若しくはオリゴマー構造を介してカップリングされる少なくとも１つのサポニン（グリコシド分子）が、エフェクター部分のエンドソーム脱出を向上させることができるということが意味される。このときに、両方の分子はエンドソーム、例えば後期エンドソーム内にあり、任意にかつ好ましくは、サポニンなどの少なくとも１つのグリコシドが、コンジュゲートから、例えば前記コンジュゲートに含まれるリンカー又はポリマー若しくはオリゴマー構造から、例えば少なくとも１つのグリコシド（サポニン）とコンジュゲートとの間の（例えば、骨格のポリマー若しくはオリゴマー構造を介する及び／又はリンカーを介する）切断可能な結合の切断によって放出された後である。少なくとも１つのグリコシド、例えば本発明に従うサポニンと本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子との間の任意にリンカー又は骨格を介した結合は、「安定な結合」であり得るが、これは、かかる結合が、例えば酵素によりエンドソームにおいて切断され得ないということは意味しない。例えば、グリコシド又はサポニンは、任意にリンカー、又は骨格のオリゴマー若しくはポリマー構造の一部と一緒に、残りのリンカーフラグメント又はオリゴマー若しくはポリマー構造から切断され得る。例えば、プロテアーゼが（タンパク質性）リンカー又はタンパク質性ポリマー構造、例えばアルブミンを切り、それによって少なくとも１つのグリコシド、サポニンを放出するということがあり得る。しかしながら、グリコシド分子（好ましくは

サポニン）は、活性な形態で、好ましくは、それが任意にリンカー及び／又はオリゴマー若しくはポリマー骨格を介してコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子にカップリングされる（ように調製される）前にそれが有した元の形態で放出されるということが好ましい；それゆえに、グリコシド（サポニン）はかかる切断後にその天然の構造を有するか、又はグリコシド（サポニン）はかかる切断後にそれに結合された化学基若しくはリンカー（の一部）を有する。一方、グリコシド生物活性（サポニン生物活性）、例えば、同じエンドソーム又はリソソームに存在するエフェクター部分に対するエンドソーム／リソソーム脱出向上活性は、任意に本発明のリンカー及び／又は骨格を含む細胞表面分子標的化分子、例えば抗体とグリコシド（サポニン）との間の結合の前記切断によって、維持又は復元される。本発明では、用語「安定な」は、例えばサポニンと、コンジュゲート上の細胞表面分子標的化分子のアミノ酸残基、リンカー、ポリマー又はオリゴマー構造（骨格の）、リガンド、（モノクローナル）免疫グロブリン又はその結合ドメイン若しくはフラグメント、及び／或いはさらなるエフェクター（エフェクター部分、エフェクター分子）との間の結合について、結合が容易くは壊されないか、或いは、少なくとも、例えばｐＨ差、塩濃度、又はＵＶ光、還元的条件によって容易く壊されるようには設計されていないということを意味される。本発明では、用語「切断可能」は、例えばサポニンと、細胞表面分子標的化分子、リンカー、アミノ酸残基、骨格のポリマー又はオリゴマー構造、リガンド、抗体、及び／又はエフェクターとの間の結合について、結合が、例えばｐＨ差、塩濃度、還元条件下などにより容易く切断されるように設計されるということを意味される。当業者は、かかる切断可能な結合と、いかにそれらを調製するかということを熟知している。

【０２２２】

本発明よりも前には、ＡＤＣ及びＡＯＣを市場に導入することの主要なハードルの１つは、小さい治療ウィンドウであった：ＡＤＣ又はＡＯＣの治療上有効なドーズは（許容できない）副作用を伴い、ＡＤＣによる患者の処置における開発及び意義を阻害する。本発明のコンジュゲート、例えばＡＤＣ－サポニンコンジュゲート及びＡＯＣ－サポニンコンジュゲートの適用により、ここで、１つ又は複数のグリコシド分子（サポニン（単数又は複数））を、ペイロードを抱えるＡＤＣと一緒に又は本発明に従うＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドとコンジュゲート化された（モノクローナル）抗体と一緒に（標的）細胞へとガイドすることが可能になった。特に、ＡＤＣ若しくはＡＯＣ又はペイロードのいずれかの他のコンジュゲートのエフェクター部分と、（タンパク質性の）細胞表面分子標的化分子と、エフェクター部分当たり（予め定められたコントロール可能な）特定の数又は範囲のグリコシド分子（サポニン）とを、例えば細胞のエンドサイトーシス経路を介して、同時に細胞の細胞質基質へと特異的にガイドすることは、先には可能ではなかった。

【０２２３】

本発明により提供される解決は、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子への少なくとも１つのサポニンの共有結合を含む。本発明により提供されるさらなる解決は、（第１に）オリゴマー又はポリマー骨格を用いてグリコシド分子（サポニン）をポリマー化することと、共有結合されたサポニンのクラスターを本発明のコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子に提供することとを含み、例えばエンドサイトーシス後にサポニンの作用機序が所望される細胞内部位における１つ以上のサポニンの再モノマー化を可能化する。この文脈において、「ポリマー化する」は、リンカーを介して又は直接的に又は骨格を形成するためのポリマー若しくはオリゴマー構造を介してどちらかの第１のタンパク質性分子へのサポニン分子の可逆的及び／又は不可逆的な多重コンジュゲート化、或いは、それによって骨格を形成するためのポリマー若しくはオリゴマー構造を形成する（修飾された）サポニンの可逆的及び／又は不可逆的な多重コンジュゲート化を意味する。この文脈において、「再モノマー化」は、例えばエンドサイトーシス後の、コンジュゲートからの、サポニン（単数又は複数）をコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に連結するリンカーからの、又は骨格からのサポニンの切断と、結合していないサポニンの（ネイティブな）化学的状態を再獲得することとを意味する。これらの結合していないサポニンは、追加の化学基、例えばサポニンをリンカー、コンジュゲートのアミノ酸残基、若

しくは骨格に連結するための化学基、及び／又はアルデヒド基若しくはカルボン酸基などのサポニンの化学基に結合された（化学的）リンカーを含み得るか、又は含まずにあり得る。サポニンの複雑な化学を原因として、例えば、骨格又は他の連結リンカーにおけるサポニンの「重合」と、例えばエンドサイトーシス後の例えば細胞内の所望の場所におけるそれらの「再モノマー化」とは、難しいタスクであった。特に、コンジュゲートに共有結合するための共有結合的に連結されたグリコシド、例えばトリテルペノイドサポニンを含む骨格及びリンカーを提供するために用いられる化学反応（グリコシドのポリマー化）は、通常は水不含の有機溶媒中で起こるが、サポニンと、結合されたサポニンを持つための骨格として適用される例えば生体適合性ポリマーとは、水溶性分子である。未修飾のサポニンの化学的特性は、それ自体による重合をさらに妨げた。かつ、複数のサポニンを（直接的に）エフェクター分子に結合するための１つの他の解決はあまり有望ではないと見積もられた。なぜなら、エフェクター分子（薬物、毒素、ポリペプチド、又はポリヌクレオチド）は典型的には十分な結合部位を提供しないからである。かつ、なぜなら、カップリング産物は極めて不均質になり、及び／又はサポニンなどの生物活性分子と例えばペプチド、毒素、核酸とを一緒にカップリングすることは、かかるサポニンを含むコンジュゲートにおいて一緒に結合された１つの又はさらには両方の分子の活性に影響及び妨害するリスクを持つからである。さらに、サポニンが例えばＡＤＣ又は抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート（ＡＯＣ）にカップリングされるときには、本発明のコンジュゲートに含まれるエフェクター部分がその機能を失うというかなりのリスクがあった。本発明の実施形態は、これらの欠点の少なくとも１つを解決する。

【０２２４】

本発明の文脈において、エフェクター分子又はエフェクター部分は、細胞内のエフェクター分子標的との相互作用によって細胞の代謝に影響するいずれかの物質であり、このエフェクター分子標的は細胞内のいずれかの分子又は構造であり、エンドサイトーシス及びリサイクル経路の区画及び小胞の内腔を排除するが、これらの区画及び小胞の膜を包含する。それゆえに、細胞内の前記構造は、核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体、ゴルジ体、他の輸送小胞、原形質膜の内部、及び細胞質基質を包含する。本発明の文脈におけるエフェクター部分の細胞質基質送達は、好ましくは、エフェクター部分がエンドソーム（及び／又はリソソーム）を脱出することができ（これは、先に定められた通り、エンドリソソーム及びリソソームを脱出することをもまた包含する）、好ましくは、本明細書に記載されるエフェクター部分標的に達することができるということを意味する。本発明は、骨格と言われる新たな型の分子をもまた包摂する。これは、エフェクター部分が本発明のコンジュゲートに含まれかつサポニンがコンジュゲートに含まれるときに、エフェクター部分及び本発明のサポニンなどの少なくとも１つのグリコシド分子両方を同時に予め定められた比でエンドソームに持ち込むための用をなす。本発明の文脈において、骨格のポリマー又はオリゴマー構造は、構造的に秩序だった形成、例えばポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロニ化ポリマー、若しくはデンドロン化オリゴマーであるか、又はそれは、集合体化したポリマー構造、例えばヒドロゲル、ミクロゲル、ナノゲル、安定化したポリマーミセル、若しくはリポソームであるが、コレステロール／リン脂質混合物などのモノマーの非共有結合的な集合体からなる構造は排除する。用語「ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン化ポリマー、又はデンドロン化オリゴマー」は、それらの通常の意味を有する。具体的には、ポリマーは、一緒に結合された多数の等しい又は類似の単位から主に又は完全に組み上げられた分子構造を有する物質であり、オリゴマーは、その分子が比較的少数の繰り返し単位からなるポリマーである。それぞれポリマー及びオリゴマーの上の定義において用いられた「多くの」及び「少数の」について、１つの特定のカットオフのコンセンサスはない。しかしながら、骨格はポリマー若しくはオリゴマー構造又は両方を含み得るので、一緒に結合される類似の単位の数の完全な範囲、すなわち２つのモノマー単位から１００個のモノマー単位、１０００個のモノマー単位、及びより多くが、かかる構造に適用される。例えば、５つ以下を含む構造はオリゴマー構造と呼ばれ得、５０個のモノマー単位を含む構造はポリマー構造と呼ばれ得る。１０個のモノマー単

位の構造はオリゴマー又はポリマーどちらかで呼ばれ得る。本明細書で定められる骨格は、さらに、少なくとも１つのグリコシド分子、例えば本発明のサポニンを含む。骨格は、好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造、例えばポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、並びに生体適合性構造、例えばポリエチレングリコール、ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、及びポリ（デキストリン）、多又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン又はポリデキストロース、及びポリ又はオリゴアミノ酸、例えばポリリジン又はペプチド又はタンパク質、或いはＤＮＡオリゴ又はポリマーを包含する。本明細書で定められる集合体化したポリマー構造は、少なくとも１つの骨格、及び任意に他の個々のポリマー又はオリゴマー構造を含む。前記集合体の他の個々のポリマー又はオリゴマー構造は、（ａ）骨格（それゆえに、少なくとも１つのグリコシド分子、例えば本発明のサポニンを含む）、（ｂ）機能化された骨格（それゆえに、少なくとも１つのグリコシド分子、例えばサポニンと、少なくとも１つのエフェクター部分とを含む）、（ｃ）本発明のサポニン（例えば表Ａ１参照）などのグリコシド分子なしだが、少なくとも１つのエフェクター部分を有するポリマー又はオリゴマー構造であり得る。機能化された集合体化したポリマー構造は、（ａ）少なくとも１つの機能化された骨格又は（ｂ）少なくとも１つのエフェクター部分などを含む少なくとも１つのポリマー構造及び少なくとも１つの骨格を含有する、集合体化したポリマー構造であり、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に結合される。上で言及された分子のいずれかを含まない（すなわち、サポニンなどのグリコシドなし、エフェクター部分なし）集合体化したポリマー構造上のポリマー又はオリゴマー構造は、特に、集合体化した構造の構造的コンポーネントとして追加される。これは、集合体化した構造を組み上げること又は安定化することを助ける（「糊様」）。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、酸性環境はグリコシド（サポニン）とエフェクター部分との間の相乗作用にとっての前提条件であるように見える。

【０２２５】

１つ以上の（切断可能な）リンカー及び／又は任意に骨格をさらに含むか又は含まないかどちらかの、サポニンを含む本発明のコンジュゲートが、酸性環境を撹乱すること及び少なくとも１つのグリコシド（サポニン）のエンドソーム脱出機能を阻害することができるか否かは、例１２に記載される通りの及び当分野で公知の通りのアッセイによって容易に決定され得る。阻害は、「誘導される５０％殺細胞に必要なグリコシドの～倍の量の増大」として記載される。骨格は、少なくとも、クロロキンを正の対照として用いたときに観察される５０％殺細胞を得るために必要なグリコシド分子（サポニン）の増大である増大に至らないということが好ましい。代替的にはかつ好ましくは、１つ以上の（切断可能な）リンカー及び／又は任意に骨格をさらに含むか又は含まないかどちらかのサポニンを含むコンジュゲートは、５０％の殺細胞を誘導するためのグリコシド分子の少なくとも４倍の増大に至らず、より好ましくは少なくとも２倍の増大に至らない。～倍の増加は、本質的に例１２に記載される通りのアッセイにおいて測定されるはずであり、クロロキンは、正の対照として、グリコシド量、好ましくはサポニン量の２倍の増大を誘導し、サポニンは、５０％の殺細胞を観察するための本発明のサポニンのいずれか１つ以上である（表Ａ１、スキームＩ、先の実施形態参照）。

【０２２６】

用語「エフェクター部分の効果を改善又は向上させる」によって、グリコシド分子が、好ましくは本発明のサポニンが、そのエフェクター部分の機能的有効性（例えば、毒素又は薬物又はオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡの治療指数；バイオテクノロジープロセスにおける調節物質の代謝有効性；細胞培養研究実験における遺伝子のトランスフェクション有効性）を、好ましくはその標的係合を可能化又は改善することによって増大させるということが意味される。抗原特異的な免疫応答の加速、遷延、又は向上は、好ましくは包含されない。治療薬有効性は、好ましくはより低い投薬量による及び／又はより少ない副作用によるより強い治療効果を包含するが、これに限定されない。「エフェクター部分の

効果を改善する」は、効果の欠如ゆえに用いられ得なかった（及び例えばエフェクター部分であることが公知ではなかった）エフェクター部分が、本発明との組み合わせで用いられるときには有効になるということをもまた意味し得る。有益又は所望でありかつエフェクター部分とサポニンとの組み合わせに帰せられ得る、本発明によって提供されるいずれかの他の効果は、「改善された効果」であると考えられる。ある実施形態においては、結合されたサポニン（単数又は複数）を含み、かつ本発明のコンジュゲートに含まれる骨格は、前記コンジュゲートに含まれるエフェクター部分の効果を向上させる。この効果は意図及び／又は所望される。タンパク質性骨格に結合されたサポニンを含むコンジュゲートのケースでは、骨格のタンパク質性ポリマー構造そのものが、例えば血流中のコロイド浸透圧に対する効果を有し得る。かかる効果が、コンジュゲートに含まれるかかる機能化された骨格の意図又は所望される効果でない場合には、骨格のタンパク質性構造は、本発明において定められるエフェクター部分ではない。或いは、例えば、結合されたサポニンを抱え、かつコンジュゲートに含まれるＤＮＡ又はＲＮＡに基づく骨格のケースでは、そのＤＮＡ又はＲＮＡのパーツは、例えば発現に干渉することによって（意図されない）機能を有し得る。かかる干渉が究極的な機能化された骨格の意図される又は所望の効果ではない場合には、骨格のＤＮＡ又はＲＮＡポリマー構造は、本発明において定められるエフェクター部分ではない。

【０２２７】

いくつもの好ましい特徴が、本発明のコンジュゲートに含まれるエンドソーム脱出向上因子、すなわちグリコシド又はサポニン、好ましくは本発明に従うサポニンについて処方され得る：（１）好ましくは、それらは毒性ではなく、免疫応答を誘起せず、（２）好ましくは、それらはエフェクター部分のオフターゲット細胞への細胞質基質取り込みを媒介せず、（３）好ましくは、作用部位におけるそれらの存在はエフェクター部分の存在と同期され、（４）好ましくは、それらは生分解性又は排泄可能であり、（５）好ましくは、それらは、エンドソーム脱出向上因子が組み合わせられるエフェクター分子の生物活性に無関係の生物の生物学的プロセスに実質的に干渉、例えばホルモンと相互作用しない。前に言及された基準を少なくともある程度まで充たす本発明のサポニンなどのグリコシド分子の例は、ビスデスモシド型トリテルペン、好ましくはビスデスモシド型トリテルペンサポニン、例えばＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＧＥ１７４１、及び表Ａ１、スキームＩのサポニンである。

【０２２８】

ある実施形態は本発明のコンジュゲート、例えば本発明の抗体－薬物コンジュゲート又は抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート又はリガンド－薬物コンジュゲートであり、抗体が、ＣＤ７１、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）、ＣＤ５２、ＣＥＡ、ＣＤ４４ｖ６、ＦＡＰ、ＥＧＦ－ＩＲ、インテグリン、シンデカン－１、血管インテグリンアルファ－Ｖベータ－３、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ受容体、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ６、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ３８、ＦＧＦＲ３、ＣＤ７、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＣＤ５２、ＰＤＧＦＲＡ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、好ましくはＣＤ７１、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲのいずれか１つに結合し得る。並びに／或いは、セツキシマブ、ダラツムマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、パニツムマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、ポラツズマブ、オビヌツズマブ、ＩｇＧ型のＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ハーセプチン、アレムツズマブ、ピナツズマブ、ＯＫＴ－１０抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、表Ａ２又は表Ａ３又は表Ａ４の抗体、好ましくはセツキシマブ又はトラスツズマブ又はＯＫＴ－９、或いはその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合フラグメント及び／又はその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合ドメインのいずれか１つであるか又

はそれを含む。並びに／或いは、抗体－薬物コンジュゲートは、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチン、並びに表Ａ２及び表Ａ３の抗体－薬物コンジュゲートのいずれか１つを含む。或いは、リガンド－薬物コンジュゲートは、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための少なくとも１つのリガンドを含む。

【０２２９】

前に言われた通り、本発明に従うコンジュゲートに含まれる少なくとも１つのサポニンは、本発明において定められる少なくとも現行の及び新たなエフェクター部分の有効性を増大させる。潜在的な副作用は、コンジュゲートに含まれるエフェクター部分の投薬量の低下を原因として、有効性を低下させることなしに、減少するであろう。よって、本発明は、医学への使用のための又は医薬としての使用のための、本発明に従うコンジュゲートを提供する。それゆえに、本発明のある態様は、医薬としての使用のための、本発明に従うコンジュゲートに関し、コンジュゲートは、少なくともサポニン及び少なくとも１つのエフェクター部分を含む。医薬を製造するための、本発明に従うコンジュゲートの使用もまた提供される。特に、癌医学、特に古典的な化学療法医薬は、それらの副作用が悪名高い。コンジュゲートに含まれる原薬及びまさに同じコンジュゲート分子に含まれるサポニン両方の時間的及び場所的な同期及び標的化ゆえに、本発明に従う治療薬コンジュゲートは、特に医薬としての使用に、特に癌を処置する方法への使用に有益である。それゆえに、本発明は、癌を処置する方法への使用のための、本発明に従う治療薬コンジュゲートを提供する。本発明は、後天性又は遺伝性の障害、特に単一遺伝子性の欠損症を処置する方法への使用のための、本発明に従う治療薬コンジュゲートをもまた提供する。それゆえに、治療薬コンジュゲートは、少なくとも１つのサポニン及び少なくとも１つのエフェクター部分を含む。それゆえに、本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の処置のための方法への使用のための、本発明に従う治療薬コンジュゲートに関し、コンジュゲートは、共有結合されたエフェクター部分を含み、かつ共有結合されたサポニンを含む。

【０２３０】

本発明のコンジュゲートの医学へのさらなる適用は、不十分な量又は不十分な機能性でこれらの酵素を産生する標的細胞における細胞内酵素の置換である。もたらされる疾患は遺伝性又は後天性であり得る。ほとんどのケースでは、対症療法のみが可能であり、いくつもの希少疾患では、不十分な処置オプションが関係する患者の短くなった寿命に至る。かかる疾患の例はフェニルケトン尿症であり、これは、アミノ酸フェニルアラニンのアミノ酸であるフェニルアラニンの代謝が低下する先天的な代謝異常である。疾患は、肝酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝子の変異を特徴とする。フェニルケトン尿症は今日まで治癒可能ではない。発生率はおよそ１：１０，０００であり、最も高い公知の発生率はトルコにおいて１：２，６００である。結合されたフェニルアラニンヒドロキシラーゼを有するか又はフェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードする結合されたポリヌクレオチドを有する、本発明のコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子、好ましくは抗体は、好適な特異的抗体の使用によって肝臓細胞を標的化するために及び肝細胞の欠陥酵素を置換するために用いられ得る。これは、置換又は遺伝子治療のための、本発明に従うそれに結合したサポニン及びそれに結合した酵素又はオリゴヌクレオチドを含む本発明の治療薬コンジュゲートの使用の１つの例である。好ましい実施形態では、遺伝子治療又は置換療法の方法において使用するための、本発明に従う治療薬コンジュゲートが提供される。

【０２３１】

ここで、本発明のコンジュゲートによって、１コンポーネントの非ウイルス的な臨床的に適用可能な遺伝子送達テクノロジーを設計及び製造することが可能になった。例えば、本発明のコンジュゲートは、ウイルスに基づかない遺伝子送達テクノロジーの開発を許し、これは、より低い治療ドーズによる治療有効性を向上させ、それによって患者の健康を改善する。特に、（腫瘍、自己免疫）細胞表面特異的分子に結合するための共有結合され

たモノクローナル抗体などの細胞表面分子標的化分子を含むときに、かつエフェクター部分、例えばオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡに結合されるときに、本発明のコンジュゲートは、遺伝子送達の分野における長年のかつ主要なボトルネックを克服すること、すなわち、エンドソーム膜から細胞質基質／ヌクレオゾルへの遺伝子治療薬製品の効率的、安全、かつ費用効果的な移転を許す。実際、遺伝子治療は、幅広い範囲の疾患における将来の先進治療のための最も有望な処置オプションの１つである。首尾良い遺伝子送達は、標的細胞の認識、並びに遺伝子の細胞質基質及びヌクレオゾル取り込みを要求する。非ウイルス遺伝子治療の分野における主要な問題の１つは、患者への治療薬使用のための遺伝物質の非効率的かつ不十分に安全な送達である。

【０２３２】

それゆえに、細胞を標的化する細胞表面分子標的化分子、例えばリガンド又は好ましくは抗体（そのフラグメント、ドメイン）を含みかつアンチセンスＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートを適用するときに、本発明者は、ここで、遺伝子送達の分野における長年のかつ主要なボトルネックを克服することを可能にした：エンドソーム膜から細胞質基質／ヌクレオゾルへの遺伝子治療薬製品の安全な移転である。本発明のコンジュゲートは、全ての公知の遺伝子薬剤によるいずれかの対処可能な細胞型の標的化を許すために設計されたテクノロジーに相当し、それによって、遺伝性疾患に限定されないが癌治療についてもまたより良好な、よって大きい患者群にとって重要な患者治療を保証する。本発明のコンジュゲートに基づくテクノロジーは、ポリマー又はオリゴマー骨格を含み得る。これは、エンドソーム脱出向上因子（ＥＥＥ）、例えば表Ａ１及びスキームＩ並びに本発明に従う実施形態のいずれかのサポニンのための、標的化リガンド又は（モノクローナル）（腫瘍細胞特異的）抗体などの細胞表面分子標的化分子のための、及びエフェクター部分、ここではエフェクター遺伝子、例えばＬＮＡ又はＢＮＡのための、担体としての用をなす。例えば細胞標的化抗体（フラグメント）及びＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートの使用は、いずれかの種類の生物学的高分子を細胞質基質及び核に持ち込むポテンシャルを有する。新たな標的化リガンド及びモノクローナル（ヒト、ヒト化）抗体の開発が、世界的に多数の研究グループ及び企業によって継続的な検討中である。癌細胞などの疾患細胞の細胞質基質における送達を狙ったオリゴヌクレオチドについても同じである。それゆえに、本発明のコンジュゲートは分子インターフェースをもまた提示し、これによって、現在及び将来の標的化リガンド及び抗体並びに現在及び将来の治療薬オリゴヌクレオチド（並びにペイロード、例えばタンパク質毒素）が、例えばクリックケミストリーにより本発明のオリゴマー又はポリマー骨格モジュールに連結されるか又は連結され得、カスタムの薬物適用と、組織及び細胞標的化技術の分野における将来の開発とを許す。本発明のコンジュゲートは、細胞表面分子標的化分子として抗体及びリガンドを含み得る。遺伝子治療薬の世界市場は急速に成長しており、広い範囲の疾患エリア、例えば癌、心血管疾患、パーキンソン、アルツハイマー、ＨＩＶ、及び多くの希少（単一遺伝子）疾患についての可能性としての処置をカバーしている。現行のウイルスベクターに基づく遺伝子治療テクノロジーは、安全性、製造物流、及び関連する高コストなどの有意な課題を有する。本発明のコンジュゲートは、現行のウイルス的な遺伝子送達テクノロジーの代替に相当するテクノロジープラットフォームへの使用を許す。よって、本発明のコンジュゲートは、癌、心血管疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、ＨＩＶ感染、及び多くの希少（単一遺伝子）疾患などの疾患のための非ウイルス的な遺伝子処置を開発するためのアプローチへの実装にとって好適である。本発明のコンジュゲートは、例えば標的化されたアンチセンスＢＮＡに基づく非ウイルスベクターに基づく遺伝子治療薬を作ることによって、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）及びオリゴヌクレオチドに基づく治療薬の分野を変容させるための新規処置を開発することにとって好適である。特に抗体及びＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドと少なくとも１つのサポニンとの共有結合的なコンジュゲートとしての、本発明のコンジュゲートの適用は、本発明を原因として可能にされた多くの有益なアプローチの１つである。例えば、ここで、本発明のコンジュゲートの使用は哺乳類細胞のエンドサイトーシス経路の活用を許す。エンドサイ

トーシスは治療薬の送達のために活用され、本発明のコンジュゲートは、例えばコンジュゲートに含まれるｓｉＲＮＡの改善された取り込み及びエンドソーム脱出に寄与する。本発明のコンジュゲートは、例えばペイロード、オリゴヌクレオチドの送達向上因子として作用する低分子と一緒に好適に用いられる。これによって、共有結合的にカップリングされたオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡを持ち、かつ共有結合的にカップリングされた細胞標的化部分、例えばリガンド及び好ましくは抗体（ドメイン又はフラグメント）を持ち、かつ本発明のサポニンを持つ本発明のコンジュゲートは、２コンポーネントとしてのそれらの適用に関し、それゆえに治療薬の認可及び臨床適用性を難しくする現行のエンドソーム脱出向上因子及び遺伝子治療薬製品で見られる現行の問題の解決を提供する。なぜなら、本発明のかかるコンジュゲートは、サポニン、ＢＮＡなどの遺伝子産物、及び（モノクローナル）抗体などの（腫瘍）細胞標的化部分を包摂する単一のコンジュゲートの治療薬分子であるからである。それゆえに、本発明は非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーを提供し、エンドソーム脱出向上因子（例えば、表Ａ１、スキームＩ、本発明の実施形態のグリコシド）、遺伝子治療薬製品（本発明に従うオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡ）、及び標的化リガンド又は抗体（例えば、表Ａ２、Ａ３、Ａ４、本発明の実施形態に従う）が、全て本発明のコンジュゲートに含まれる。それゆえに、本発明のかかるコンジュゲートは、幅広い範囲の疾患及び大きい患者群について、現行の及び将来の高分子薬物の治療機会を提供する。少なくとも１つのサポニンと少なくとも１つのオリゴヌクレオチドと少なくとも１つの特異的細胞標的化部分、例えば免疫グロブリンとを含む本発明のかかるコンジュゲートの適用によって、エンドソーム脱出向上因子及び遺伝子治療薬製品を別々に適用する現行の方法について明らかである問題が対処される。これらの現行の方法は、両方の化合物が同時に相互作用部位に存在するということを保証しない。ここで、この問題は、本発明のコンジュゲートを用いることによって克服される。つまり、本発明のかかるコンジュゲートは、両方の化合物、すなわちサポニン及びＢＮＡなどの遺伝子産物の（時間的及び場所的な）増大した同期を有する非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーを提供する。

【０２３３】

遺伝子治療は、遺伝性の先には治癒不能な疾患、例えば嚢胞性線維症、コレア、ハンチントン病、又は血友病に役立ち得る。しかしながら、現行では、いくつかの問題が克服されていない：例えば、治療薬遺伝子は、体内の特定の標的細胞に精確に達しなければならない。他方で、治療薬遺伝子は標的細胞によって吸収されるべきであるが、治療薬遺伝子は破壊されるべきではない。現行の遺伝子治療アプローチはウイルスを遺伝子のフェリーとして用いる。しかしながら、これらの手順にはかなりのリスクが関わり、他の生体分子の導入に移転することができない。ある実施形態は、プラットフォームテクノロジーへの使用のための（植物由来の）グリコシドを含む本発明のコンジュゲートであり、これは、担体分子としてコンジュゲートに含まれるときの遺伝子の送達を許すのみならず、標的細胞に導入されるべき異なる治療薬生体分子の送達をもまた許す。よって、本発明のコンジュゲートは、嚢胞性線維症、コレア、ハンチントン病、又は血友病のための核酸に基づく処置を開発するために用いられる。これによって、本発明のコンジュゲートによって、嚢胞性線維症、ハンチントン病、及び血友病の患者を包含する遺伝子疾患の患者の健康を改善するための新たな遺伝子治療戦略が利用可能である。本発明の一部として、植物由来のエンドソーム脱出向上因子（グリコシド）、遺伝子治療薬製品、及び標的化リガンドを組み合わせる非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーが開発され、これらが全て単一のコンジュゲートに含まれている。本発明のコンジュゲートに基づくもたらされる非ウイルス的な遺伝子治療は、現行で利用可能な戦略と比べて、より低い用量において約４０倍増大した送達効率を見せる。これによって、本発明のコンジュゲートは、臨床適用への使用のため、例えば、嚢胞性線維症患者におけるような欠陥遺伝子の修復又は補充のため、及び例えば癌細胞を破壊するための特定の遺伝子の標的化された送達のためである。事実、本発明のコンジュゲートは、遺伝子欠陥により引き起こされ、現行では治癒不能である嚢胞性線維症、ハンチントン病、及び血友病などのいずれかの疾患の処置レジメンへの適用にと

って好適である。本発明のコンジュゲートを利用する遺伝子治療は、２つの現行の問題を克服することを助ける：第１に、本発明のコンジュゲートによって、体内の特定の標的細胞に治療薬遺伝子を送達することが可能である；第２に、治療薬遺伝子はこれらの細胞の内側に入るが、破壊されない。例えば本発明のオリゴマー又はポリマー骨格を用いることによって全て本発明のコンジュゲート上において共有結合的に連結された、サポニン（単数又は複数）、オリゴヌクレオチド産物、及び標的細胞に結合するための抗体などの標的化部分の存在を原因とする。

【０２３４】

本発明は、癌を処置する方法をもまた提供し、方法は、本発明に従う治療薬コンジュゲートを含む医薬をそれが必要な患者に投与すること、好ましくは、有効ドーズの前記医薬をそれが必要な患者、好ましくはヒト癌患者に投与することを含む。

【０２３５】

投与にとって好適な形態に関する考慮事項は当分野で公知であり、毒性効果、可溶性、投与経路、及び活性を維持することを包含する。例えば、血流中に注射される薬理学的組成物は可溶性であるべきである。

【０２３６】

好適な剤形は、例えば経皮又は注射による使用又は進入経路に部分的に依存する。標的細胞が多細胞宿主に存在するかどうかにかかわらず、かかる剤形は、化合物が標的細胞に達することを許すべきである。他の因子は当分野で公知であり、化合物又は組成物がその効果を発揮することを遅滞させる剤形及び毒性などの考慮事項を包含する。

【０２３７】

本発明のある態様は、本発明に従うエンドソーム脱出向上コンジュゲートを含有する容器を含むキットに関し、キットはさらに、コンジュゲートを用いるための説明書を含む。

【０２３８】

【表１】

表Ａ１．　（後期）エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を見せるサポニン、及び（後期）エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を見せるかかるサポニンを連想させる構造を含むサポニン			
サポニン名	アグリコンコア	Ｃ－３ベータ－ＯＨ基における炭水化物置換基	Ｃ－２８－ＯＨ基における炭水化物置換基
ＮＰ－００５２３６	２アルファ－ヒドロキシオレアノール酸	ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ／Ｇａｌ－
ＡＭＡ－１	１６アルファ－ヒドロキシオレアノール酸	Ｇｌｃ－	Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－
ＡＭＲ	１６アルファ－ヒドロキシオレアノール酸	Ｇｌｃ－	Ｒｈａ－（１→２）－［Ａｒａ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－
アルファ－ヘデリン	ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）	Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ－	－
ＮＰ－０１２６７２	１６アルファ，２３－ジヒドロキシオレアノール酸	Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－	Ａｒａ／Ｘｙｌ－
ＮＰ－０１７７７７	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－　（Ｒ＝４Ｅ－メトキシケイ皮酸）
ＮＰ－０１７７７８	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝４Ｚ－メトキシケイ皮酸）
ＮＰ－０１７７７４	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１８１１０[c]、ＮＰ－０１７７７２[d]	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－３，４－ジ－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１８１０９	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－	Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－

【０２３９】

【表２】

		（１→３）］－ＧｌｃＡ－	（１→２）－［Ｒ－（→４）］－３－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－　（Ｒ＝４Ｅ－メトキシケイ皮酸）
ＮＰ－０１７８８８	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７８８９	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１８１０８	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－［４－ＯＡｃ－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）］－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－
ＳＡ１６４１[a]、ＡＥ　Ｘ５５[b]	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７６７４	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７８１０	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＡＧ１	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＮＰ－００３８８１	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）－［Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）］－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７６７６	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒド

【０２４０】

【表３】

			ロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＮＰ－０１７６７７	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＮＰ－０１７７０６	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７７０５	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７７７３	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－
ＮＰ－０１７７７５	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－
ＳＡ１６５７	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－
ＡＧ２	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－
ＳＯ１８６１	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－

【０２４１】

【表４】

ＧＥ１７４１	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３，４－ジ－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－
ＳＯ１５４２	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＳＯ１５８４	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＳＯ１６５８	ギプソゲニン	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＳＯ１６７４	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－
ＳＯ１８３２	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－
ＱＳ－７（ＱＳ１８６１ともまた言われる）	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＱＳ－７ａｐｉ（ＱＳ１８６２ともまた言われる）	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－
ＱＳ－１７	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）

【０２４２】

【表５】

ＱＳ－１８	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＱＳ－２１Ａ－ａｐｉ	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＱＳ－２１Ａ－ｘｙｌ	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＱＳ－２１Ｂ－ａｐｉ	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→３）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ＱＳ－２１Ｂ－ｘｙｌ	キラヤ酸	Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－	Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→３）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒド

【０２４３】

【表６】

			ロキシ－６－メチル－オクタン酸）
ベータ－エスシン（記載：エスシンＩａ）	プロトエスシゲニン（ｐｒｏｔｏａｅｓｃｉｇｅｎｉｎ）－２１（２－メチルブタ－２－エノアート）－２２－アセタート	Ｇｌｃ－（１→２）－［Ｇｌｃ－（１→４）］－ＧｌｃＡ－	－
Ｔｅａｓｅｅｄサポニン Ｉ	２３－オキソ－バリントゲノール（ｂａｒｒｉｎｇｔｏｇｅｎｏｌ）Ｃ －２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノアート）	Ｇｌｃ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－	－
Ｔｅａｓｅｅｄサポニン Ｊ	２３－オキソ－バリントゲノール（ｂａｒｒｉｎｇｔｏｇｅｎｏｌ）Ｃ －２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノアート）	Ｘｙｌ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－	－
アッサムサポニンＦ	２３－オキソ－バリントゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノアート）－１６，２２－ジアセタート	Ｇｌｃ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－	－
ジギトニン	ジギトゲニン	Ｇｌｃ－（１→３）－Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－Ｇｌｃ－	－

【０２４４】

【表７】

		（１→４）－Ｇａｌ－	
プリムラ酸１	３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン	Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－	－
ＡＳ６４Ｒ	ギプソゲニン酸	－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→６）］－Ｇａｌ－
		Ｃ－２３－ＯＨ基における炭水化物置換基	
ＡＳ６．２	ギプソゲニン酸	Ｇａｌ－	Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→６）］－Ｇａｌ－
ａ、ｂ：異なる名称は、同じ構造の異なる単離物を言う ｃ、ｄ：異なる名称は、同じ構造の異なる単離物を言う			

【０２４５】

【表８】

表Ａ２－ヒト臨床条件において先に検討され、続いてさらなる臨床的検討から撤回されたＡＤＣ

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
腫瘍学のためのＥＧＦＲを標的化するためのモノクローナル抗体コンジュゲート	腫瘍学	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	創薬
アフィルチン（Ａｆｆｉｌｕｔｉｎ）	多発性骨髄腫（カーラー病）		創薬
ＩＭＧＮ－７７９	骨髄異形成症候群	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	ＩＮＤ／ＣＴＡ申請
ニューラジアブ（Ｎｅｕｒａｄｉａｂ）	非ホジキンリンパ腫	テネイシン（サイトタクチン、又はＧＭＥＭ、又はＧＰ１５０－２２５、又はグリオーマ関連細胞外マトリックス抗原、又はヘキサブラキオン、又はＪＩ、又は筋腱抗原、又はニューロネクチン、又はテネイシンＣ、又はＴＮＣ）を発現する細胞	第Ｉ相
ＩＭＧＮ－７７９	難治性急性骨髄性白血病；再発性急性骨髄性白血病	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＧＳ－６７Ｅ	急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ、急性骨髄芽球性白血病）	白血球抗原ＣＤ３７（テトラスパニン２６又はＣＤ３７）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＧＳ－６７Ｅ	毛様細胞白血病；非ホジキンリンパ腫；難治性慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）；再発性慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）；Ｔ細胞白血病	白血球抗原ＣＤ３７（テトラスパニン２６又はＣＤ３７）を発現する細胞	第Ｉ相

【０２４６】

【表９】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
ＡＳＧ－１５ＭＥ	転移性移行（尿路上皮）尿路癌	ＳＬＩＴ及びＮＴＲＫ様タンパク質６（ＳＬＩＴＲＫ６）を発現する細胞	第Ｉ相
バンドルツズマブベドチン	転移性ホルモン不応性（去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性）前立腺癌	メタロレダクターゼＳＴＥＡＰ１（前立腺の６回膜貫通上皮抗原１又はＳＴＥＡＰ１又はＥＣ１．１６．１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＣＤＸ－０１４	卵巣癌	Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体１（腎損傷分子１、又はＴ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質１、又はＴ細胞免疫グロブリンムチン受容体１、又はＴ細胞膜タンパク質１、又はＣＤ３６５、又はＨＡＶＣＲ１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＧＳ－１６Ｍ１８	肝癌；腎細胞癌		第Ｉ相
ボルセツズマブマホドチン	非ホジキンリンパ腫；腎細胞癌	ＣＤ７０抗原（ＣＤ２７リガンド又は腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー７又はＣＤ７０）を発現する細胞	第Ｉ相
デニンツズマブマホドチン	急性リンパ性白血病（ＡＬＬ、急性リンパ芽球性白血病）；Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫；バーキットリンパ腫；リンパ芽球性リンパ腫；マントル細胞リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第Ｉ相
ＳＧＮ－ＣＤ７０Ａ	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；濾胞性リンパ腫；マントル細胞リンパ腫；転移性腎細胞癌；非ホジキンリンパ腫	ＣＤ７０抗原（ＣＤ２７リガンド又は腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー７又はＣＤ７０）を発現する細胞	第Ｉ相
ＲＧ－７６３６	転移性黒色腫	エンドセリンＢ受容体（エンドセリン受容体非選択的型又はＥＤＮＲＢ）	第Ｉ相
ＳＣ－００６	転移性大腸癌		第Ｉ相

【０２４７】

【表１０】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
ＭＭ－３１０	乳癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；胃食道（ＧＥ）接合部癌；頭頸部癌、扁平上皮癌；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵管腺癌；前立腺癌；小細胞肺癌；軟部肉腫；固形腫瘍；移行上皮癌（尿路上皮癌）	エフリンＡ型受容体２（上皮細胞キナーゼ又はチロシンタンパク質キナーゼ受容体ＥＣＫ又はＥＰＨＡ２又はＥＣ２．７．１０．１）	第Ｉ相
ＰＦ－０６６４７２６３	転移性乳癌；卵巣癌	エフリンＡ４（ＥＰＨ関連受容体チロシンキナーゼリガンド４又はＥＦＮＡ４）を発現する細胞	第Ｉ相
ＰＦ－０６２６３５０７	固形腫瘍	栄養胚葉糖タンパク質（Ｍ６Ｐ１又は５Ｔ４癌胎児性抗原又は５Ｔ４癌胎児性栄養胚葉糖タンパク質又はＷｎｔ活性化阻害因子１又はＴＰＢＧ）を発現する細胞	第Ｉ相
ＰＦ－０６６５０８０８	転移性乳癌；非小細胞肺癌；卵巣癌	神経因性遺伝子座Ｎｏｔｃｈホモログタンパク質３（ＮＯＴＣＨ３）を発現する細胞	第Ｉ相
ＸＭＴ－１５２２	乳癌；胃癌；非小細胞肺癌	受容体チロシンタンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（転移性リンパ節遺伝子１９タンパク質又は癌原遺伝子Ｎｅｕ又は癌原遺伝子ＣＥｒｂＢ２又はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体ＨＥＲ２又はｐ１８５ｅｒｂＢ２又はＨＥＲ２又はＣＤ３４０又はＥＲＢＢ２又はＥＣ２．７．１０．１）；チューブリン	第Ｉ相
ＡＭＧ－５９５	退形成性星細胞腫；再発性多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	第Ｉ相
ピナツズマブベドチン	慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）	Ｂ細胞受容体ＣＤ２２（Ｂリンパ球細胞接着分子又はシアル酸結合Ｉｇ様レクチン２又はＴ細胞表面抗原Ｌ	第Ｉ相

【０２４８】

【表１１】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
		ｅｕ１４又はＣＤ２２）を発現する細胞	
カンツズマブラブタンシン	大腸癌；非小細胞肺癌；膵臓癌；固形癌		第Ｉ相
ＡＶＥ－９６３３	急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ、急性骨髄芽球性白血病）	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第Ｉ相
ＢＩＷＩ－１[(1)]	乳癌；癌腫；食道癌；頭頸部癌、扁平上皮癌	ＣＤ４４抗原（ＣＤｗ４４又はエピカン又は細胞外マトリックス受容体ＩＩＩ又はＧＰ９０リンパ球ホーミング／接着受容体、又はＨＵＴＣＨ　Ｉ又はヘパラン硫酸プロテオグリカン又はヘルメス抗原又はヒアルロン酸受容体又は食細胞糖タンパク質１又はＣＤ４４）を発現する細胞	第Ｉ相
ＲＧ－７８８２	上皮卵巣癌；卵管癌；膵臓癌；腹膜癌	ムチン１６（卵巣癌関連腫瘍マーカーＣＡ１２５又は卵巣癌抗原ＣＡ１２５又はＭＵＣ１６）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＳＧ－５ＭＥ	腺癌；ホルモン抵抗性（去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性）前立腺癌；膵臓の転移性腺癌	コリン輸送体様タンパク質４（溶質担体ファミリー４４メンバー４又はＳＬＣ４４Ａ４）を発現する細胞	第Ｉ相
ＤＣＤＳ－０７８０Ａ	Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫		第Ｉ相
ＳＣ－００４	子宮内膜癌；上皮卵巣癌；卵管癌；腹膜癌		第Ｉ相
ＲＧ－７６００	卵巣癌；膵管腺癌		第Ｉ相
ソフィツズマブベドチン	上皮卵巣癌；卵管癌；卵巣癌；膵臓癌；腹膜癌	ムチン１６（卵巣癌関連腫瘍マーカーＣＡ１２５又は卵巣癌抗原ＣＡ１２５又はＭＵＣ１６）を発現する細胞	第Ｉ相

【０２４９】

【表１２】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
ＩＭＧＮ－２８９	乳癌；食道癌；胃癌；頭頸部癌、扁平上皮癌；非小細胞肺癌；固形癌	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＳＡＲ－４２８９２６	乳癌；大腸癌；胃癌；非小細胞肺癌；卵巣癌；前立腺癌；固形腫瘍	リソソーム関連膜糖タンパク質１（ＣＤ１０７抗原様ファミリーメンバーＡ又はＣＤ１０７ａ又はＬＡＭＰ１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＳＧＮＣＤ－１９Ｂ	Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫；びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；濾胞性リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第Ｉ相
ＳＧＮＣＤ－１２３Ａ	難治性急性骨髄性白血病；再発性急性骨髄性白血病	インターロイキン３受容体サブユニットアルファ（ＣＤ１２３又はＩＬ３ＲＡ）を発現する細胞	第Ｉ相
ＳＧＮＣＤ－３５２Ａ	難治性多発性骨髄腫；再発性多発性骨髄腫	ＳＬＡＭファミリーメンバー６（活性化ＮＫ受容体又はＮＫ　Ｔ　Ｂ抗原又はＣＤ３５２又はＳＬＡＭＦ６）を発現する細胞	第Ｉ相
ＲＧ－７８４１	乳癌；非小細胞肺癌；固形腫瘍	リンパ球抗原６Ｅ（レチノイン酸誘導性遺伝子Ｅタンパク質又は幹細胞抗原２又は胸腺共通抗原１又はＬＹ６Ｅ）を発現する細胞	第Ｉ相
ＩＭＧＮ－３８８	固形腫瘍	インテグリンアルファＶ（ビトロネクチン受容体サブユニットアルファ又はＣＤ５１又はＩＴＧＡＶ）を発現する細胞	第Ｉ相
ロルボツズマブメルタンシン	難治性多発性骨髄腫；再発性多発性骨髄腫	神経細胞接着分子１（モノクローナル抗体５．１Ｈ１１により認識される抗原又はＣＤ５６又はＮＣＡＭ１）を発現する細胞	第Ｉ相
ロルボツズマブ	神経内分泌癌；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；皮膚癌	神経細胞接着分子１（モノクローナル抗体５．１Ｈ１１により認識される抗原又	第Ｉ相

【０２５０】

【表１３】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
ルタンシン		はＣＤ５６又はＮＣＡＭ１）を発現する細胞	
ＢＡＹ－７９４６２０	肺癌；固形腫瘍	炭酸脱水酵素９（炭酸脱水酵素ＩＸ又はｐＭＷ１、又は膜抗原ＭＮ、又はＰ５４／５８Ｎ、又は腎細胞癌関連抗原Ｇ２５０、又はＣＡ９、又はＥＣ４．２．１．１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＲＧ－７５９８	難治性多発性骨髄腫；再発性多発性骨髄腫		第Ｉ相
オンコリシン（Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ）Ｂ	Ｂ細胞白血病；リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＤＣＴ－５０２（１）	膀胱癌；乳癌；食道癌；胃癌；非小細胞肺癌	受容体チロシンタンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（転移性リンパ節遺伝子１９タンパク質又は癌原遺伝子Ｎｅｕ又は癌原遺伝子ＣＥｒｂＢ２又はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体ＨＥＲ２又はｐ１８５ｅｒｂＢ２又はＨＥＲ２又はＣＤ３４０又はＥＲＢＢ２又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	第Ｉ相
ＡＭＧ－１７２	腎細胞癌	ＣＤ７０抗原（ＣＤ２７リガンド又は腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー７又はＣＤ７０）を発現する細胞	第Ｉ相
ＩｍｍｕＲＡＩＴ－ＬＬ２	Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫	Ｂ細胞受容体ＣＤ２２（Ｂリンパ球細胞接着分子又はシアル酸結合Ｉｇ様レクチン２又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１４又はＣＤ２２）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
インデュサツマブベドチン	胃食道接合部の腺癌；胃癌	熱安定性エンテロトキシン受容体（グアニリルシクラーゼＣ又は腸グアニル酸シクラーゼ又はＧＵＣＹ２Ｃ	第Ｉ／ＩＩ相

【０２５１】

【表１４】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
		又はＥＣ　４．６．１．２）を発現する細胞	
クリバツズマブテトラキセタン	膵臓癌	ムチン１（乳癌関連抗原ＤＦ３又はエピシアリン又はＨ２３ＡＧ、又はクレブスフォンデンランゲン６又はＰＥＭＴ、又はピーナッツ反応性尿中ムチン、又は多型上皮ムチン、又は腫瘍関連上皮膜抗原、又は腫瘍関連ムチン、又はＣＤ２２７、又はＭＵＣ１）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
デパツキシズマブマホドチン（２）	再発性悪性グリオーマ	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）	第Ｉ／ＩＩ相
ＣＤＸ－０１４	転移性腎細胞癌；乳頭状腎細胞癌	Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体１（腎損傷分子１、又はＴ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質１、又はＴ細胞免疫グロブリンムチン受容体１、又はＴ細胞膜タンパク質１、又はＣＤ３６５、又はＨＡＶＣＲ１）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
バダスツキシマブタリリン（１）	難治性急性骨髄性白血病；再発性急性骨髄性白血病	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
バダスツキシマブタリリン	骨髄異形成症候群	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
ＭＬＮ－２７０４	転移性ホルモン不応性（去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性）前立腺癌	グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ２（葉酸ヒドロラーゼ１又は前立腺特異的膜抗原又はＰＳＭＡ、又はプテロイルポリガンマグルタミン酸カルボキシペプチ	第Ｉ／ＩＩ相

【０２５２】

【表１５】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
		ダーゼ、又は細胞成長阻害遺伝子２７タンパク質、又はＦＯＬＨ１、又はＥＣ３．４．１７．２１）を発現する細胞	
オンコリシン（Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ）Ｂ	ＡＩＤＳ関連リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第Ｉ／ＩＩ相
コルツキシマブラブタンシン（ｃｏｌｔｕｘｉｍａｂ ｒａｖｔａｎｓｉｎｅ）	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第ＩＩ相
コルツキシマブラブタンシン（ｃｏｌｔｕｘｉｍａｂ ｒａｖｔａｎｓｉｎｅ）	急性リンパ性白血病（ＡＬＬ、急性リンパ芽球性白血病）	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第ＩＩ相
コルツキシマブラブタンシン（ｃｏｌｔｕｘｉｍａｂ ｒａｖｔａｎｓｉｎｅ）	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第ＩＩ相
インデュサツマブベドチン（２）	胃食道接合部の腺癌；胃癌；膵臓の転移性腺癌	熱安定性エンテロトキシン受容体（グアニリルシクラーゼＣ又は腸グアニル酸シクラーゼ又はＧＵＣＹ２Ｃ又はＥＣ　４．６．１．２）を発現する細胞	第ＩＩ相

【０２５３】

【表１６】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
デパツキシズマブマホドチン	扁平上皮非小細胞肺癌	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）	第ＩＩ相
デパツキシズマブマホドチン（２）	退形成性星細胞腫；退形成性オリゴアストロサイトーマ；グリオサルコーマ；高グレードグリオーマ；オリゴデンドログリオーマ；小児びまん性内因性ポンチングリオーマ；再発性多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）	第ＩＩ相
リファスツズマブベドチン	非小細胞肺癌	ナトリウム依存性リン酸塩輸送タンパク質２Ｂ（リン酸ナトリウム輸送タンパク質２Ｂ又はＮａＰｉ３ｂ、又はナトリウム／リン酸共輸送体２Ｂ、又はＮａＰｉ２ｂ、又は溶質担体ファミリー３４メンバー２又はＳＬＣ３４Ａ２）	第ＩＩ相
リファスツズマブベドチン	卵巣癌	ナトリウム依存性リン酸塩輸送タンパク質２Ｂ（リン酸ナトリウム輸送タンパク質２Ｂ又はＮａＰｉ３ｂ、又はナトリウム／リン酸共輸送体２Ｂ、又はＮａＰｉ２ｂ、又は溶質担体ファミリー３４メンバー２又はＳＬＣ３４Ａ２）	第ＩＩ相
Ｂｉｓｍａｂ－Ａ	急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ、急性骨髄芽球性白血病）	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第ＩＩ相
デニンツズマブマホドチン	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；濾胞性リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第ＩＩ相

【０２５４】

【表１７】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
アビシジン（１）	大腸癌；前立腺癌	上皮細胞接着分子（腺癌関連抗原又は細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ１、又は上皮細胞表面抗原、又は上皮糖タンパク質３１４、又はＫＳ１／４抗原又はＫＳＡ、又は腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子１、又はＣＤ３２６、又はＥＰＣＡＭ）を発現する細胞	第ＩＩ相
ピナツズマブベドチン	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；濾胞性リンパ腫	Ｂ細胞受容体ＣＤ２２（Ｂリンパ球細胞接着分子又はシアル酸結合Ｉｇ様レクチン２又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１４又はＣＤ２２）を発現する細胞	第ＩＩ相
ＳＧＮ－１５	転移性乳癌；非小細胞肺癌；卵巣癌；前立腺癌	ルイスＹ抗原（ＣＤ１７４）を発現する細胞	第ＩＩ相
カンツズマブラブタンシン	胃癌；胃食道（ＧＥ）接合部癌		第ＩＩ相
ＡＳＰ－６１８３	卵巣癌		第ＩＩ相
ＳＡＲ－５６６６５８	転移性乳癌	シアログリコトープＣＡ６抗原を発現する細胞	第ＩＩ相
オンコリシンＳ	小細胞肺癌	神経細胞接着分子１（モノクローナル抗体５．１Ｈ１１により認識される抗原又はＣＤ５６又はＮＣＡＭ１）を発現する細胞	第ＩＩ相
ロルボツズマブメルタンシン	小細胞肺癌	神経細胞接着分子１（モノクローナル抗体５．１Ｈ１１により認識される抗原又はＣＤ５６又はＮＣＡＭ１）を発現する細胞	第ＩＩ相
グレムバツムマブベドチン	転移性黒色種；転移性ぶどう膜黒色腫；骨肉腫；扁平上皮非小細胞肺癌	膜貫通糖タンパク質ＮＭＢ（膜貫通糖タンパク質ＨＧＦＩＮ又はＧＰＮＭＢ）を発現する細胞	第ＩＩ相
ＭＭ－３０２	転移性乳癌	受容体チロシンタンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（転移性リンパ節遺伝子１９タンパク質又は癌原遺伝子Ｎｅｕ又は癌原遺伝子ＣＥｒｂ	第ＩＩ／ＩＩＩ相

【０２５５】

【表１８】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
		Ｂ２又はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体ＨＥＲ２又はｐ１８５ｅｒｂＢ２又はＨＥＲ２又はＣＤ３４０又はＥＲＢＢ２又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	
ニューラジアブ（Ｎｅｕｒａｄｉａｂ）	脳腫瘍；多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	テネイシン（サイトタクチン、又はＧＭＥＭ、又はＧＰ１５０－２２５、又はグリオーマ関連細胞外マトリックス抗原、又はヘキサブラキオン、又はＪＩ、又は筋腱抗原、又はニューロネクチン、又はテネイシンＣ、又はＴＮＣ）を発現する細胞	第ＩＩＩ相
クリバツズマブテトラキセタン	膵臓の転移性腺癌	ムチン１（乳癌関連抗原ＤＦ３又はエピシアリン又はＨ２３ＡＧ、又はクレブスフォンデンランゲン６又はＰＥＭＴ、又はピーナッツ反応性尿中ムチン、又は多型上皮ムチン、又は腫瘍関連上皮膜抗原、又は腫瘍関連ムチン、又はＣＤ２２７、又はＭＵＣ１）を発現する細胞	第ＩＩＩ相
デパツキシズマブマホドチン（２）	多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）	第ＩＩＩ相
バダスツキシマブタリリン（１）	急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ、急性骨髄芽球性白血病）	骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３又はｇｐ６７又はＣＤ３３）を発現する細胞	第ＩＩＩ相
グレムバツムマブベドチン（２）	転移性乳癌	膜貫通糖タンパク質ＮＭＢ（膜貫通糖タンパク質ＨＧＦＩＮ又はＧＰＮＭＢ）を発現する細胞	第ＩＩＩ相

【０２５６】

【表１９】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
オンコリシン（Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ）Ｂ	Ｂ細胞白血病；リンパ腫	Ｂリンパ球抗原ＣＤ１９（Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又は分化抗原ＣＤ１９又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１２又はＣＤ１９）を発現する細胞	第ＩＩＩ相
ＩｍｍｕＲＡＩＴ－ＬＬ２	Ｂ細胞白血病	Ｂ細胞受容体ＣＤ２２（Ｂリンパ球細胞接着分子又はシアル酸結合Ｉｇ様レクチン２又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ１４又はＣＤ２２）を発現する細胞	前臨床
インデュサツマブベドチン	転移性大腸癌	熱安定性エンテロトキシン受容体（グアニリルシクラーゼＣ又は腸グアニル酸シクラーゼ又はＧＵＣＹ２Ｃ又はＥＣ　４．６．１．２）を発現する細胞	前臨床
ＡＳＧ－１５ＭＥ	肺癌	ＳＬＩＴ及びＮＴＲＫ様タンパク質６（ＳＬＩＴＲＫ６）を発現する細胞	前臨床
ＨＴＩ－１５１１	胆管癌（胆管癌腫）；乳癌；大腸癌；非小細胞肺癌	上皮成長因子受容体（癌原遺伝子ｃＥｒｂＢ１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ１又はＨＥＲ１又はＥＲＢＢ１又はＥＧＦＲ又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	前臨床
ＺＷ－３３	胃癌；転移性乳癌	受容体チロシンタンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（転移性リンパ節遺伝子１９タンパク質又は癌原遺伝子Ｎｅｕ又は癌原遺伝子ＣＥｒｂＢ２又はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体ＨＥＲ２又はｐ１８５ｅｒｂＢ２又はＨＥＲ２又はＣＤ３４０又はＥＲＢＢ２又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	前臨床

【０２５７】

【表２０】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
ＺＷ－３３	卵巣癌	受容体チロシンタンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（転移性リンパ節遺伝子１９タンパク質又は癌原遺伝子Ｎｅｕ又は癌原遺伝子ＣＥｒｂＢ２又はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体ＨＥＲ２又はｐ１８５ｅｒｂＢ２又はＨＥＲ２又はＣＤ３４０又はＥＲＢＢ２又はＥＣ２．７．１０．１）を発現する細胞	前臨床
ＳＧＮＣＤ－３５２Ａ	非ホジキンリンパ腫	ＳＬＡＭファミリーメンバー６（活性化ＮＫ受容体又はＮＫ　Ｔ　Ｂ抗原又はＣＤ３５２又はＳＬＡＭＦ６）を発現する細胞	前臨床
ＨｕＭａｘ－ＣＤ７４－ＡＤＣ	腫瘍学	ＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原ガンマ鎖（ＨＬＡＤＲ抗原関連インバリアント鎖又はＩａ抗原関連インバリアント鎖、又はｐ３３又はＣＤ７４）を発現する細胞	前臨床
サシツズマブゴビテカン	膵管腺癌	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	
サシツズマブゴビテカン	腺癌；子宮頸癌；大腸癌；子宮内膜癌；上皮卵巣癌；食道癌；濾胞性甲状腺癌；胃癌；多形性膠芽腫（ＧＢＭ）；頭頸部癌、扁平上皮癌；肝細胞癌；腎臓癌（腎細胞癌）；転移性ホルモン不応性（去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性）前立腺癌；転移性移行上皮癌（尿路上皮癌）；移行上皮癌（尿路上皮癌）	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	

【０２５８】

【表２１】

薬物名	適応症	標的	最新の開発ステージ
サシツツズマブゴビテカン	肝細胞癌	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	
サシツツズマブゴビテカン	転移性乳癌；移行上皮癌（尿路上皮細胞癌）	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	
サシツツズマブゴビテカン	非小細胞肺癌；小細胞肺癌	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	
サシツツズマブゴビテカン	転移性乳癌	腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子２（細胞表面糖タンパク質Ｔｒｏｐ２又は膜コンポーネント染色体１表面マーカー１又は膵臓癌マーカータンパク質ＧＡ７３３－１又はＴＡＣＳＴＤ２）を発現する細胞	
（１）　有害事象を原因として中止 （２）　有効性の欠如を原因として中止			

【０２５９】

【表２２】

表Ａ３－第ＩＩＩ相臨床開発に達したＡＤＣ

薬物名	適応症	開発ステージ	最新の開発ステージ	中止の理由
トラスツズマブエムタンシン	胃癌	上市	第ＩＩ／ＩＩＩ相	特定されていない
ＭＭ－３０２	転移性乳癌	中止	第ＩＩ／ＩＩＩ相	事業／戦略的判断
トラスツズマブエムタンシン	転移性乳癌	上市	第ＩＩＩ相	特定されていない
トラスツズマブエムタンシン	胃癌	上市	第ＩＩＩ相	特定されていない
イブリツモマブチウキセタン	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫	上市	第ＩＩＩ相	
イノツズマブオゾガマイシン	濾胞性リンパ腫	上市	第ＩＩＩ相	
イノツズマブオゾガマイシン	びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫；非ホジキ	上市	第ＩＩＩ相	有効性の欠如

【０２６０】

【表２３】

	ンリンパ腫			
ロバルピツズマブテシリン	小細胞肺癌	第ＩＩＩ相	第ＩＩＩ相	
ロバルピツズマブテシリン	小細胞肺癌	第ＩＩＩ相	第ＩＩＩ相	
ニューラジアブ（Ｎｅｕｒａｄｉａｂ）	脳腫瘍；多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	休止中	第ＩＩＩ相	特定されていない
クリバツズマブテトラキセタン	膵臓の転移性腺癌	休止中	第ＩＩＩ相	特定されていない
デパツキシズマブマホドチン	多形性膠芽腫（ＧＢＭ）	休止中	第ＩＩＩ相	有効性の欠如
バダスツキシマブタリリン	急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ、急性骨髄芽球性白血病）	中止	第ＩＩＩ相	有害事象
グレムバツムマブベドチン	転移性乳癌	中止	第ＩＩＩ相	有効性の欠如
オンコリシン（Ｏｎｃｏｌｙｓｉｎ）Ｂ	Ｂ細胞白血病；リンパ腫	中止	第ＩＩＩ相	事業／戦略的判断

【０２６１】

【表２４】

表Ａ４．　本発明の細胞表面分子標的化分子、例えば本発明に従う免疫グロブリンによって標的化され得る腫瘍特異的な細胞表面受容体標的。並びに、本発明のＡＯＣ－サポニンコンジュゲート、本発明のＡＤＣ－サポニンコンジュゲートに用いられ得る抗体（限定として提示されてはいない；さらなる免疫グロブリンが本発明にとって等しく好適である）。	
標的細胞表面受容体	例のモノクローナル抗体
ＨＥＲ２	抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、例えばトラスツズマブ及びペルツズマブ
ＣＤ２０	抗ＣＤ２０モノクローナル抗体、例えばリツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、イブリツモマブ
ＣＡ１２５	抗ＣＡ１２５モノクローナル抗体、例えばオレゴボマブ
ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）	抗ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）モノクローナル抗体、例えばエドレコロマブ
ＥＧＦＲ	抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体、例えばセツキシマブ、パンチツムマブ、及びニモツズマブ
ＣＤ３０	抗ＣＤ３０モノクローナル抗体、例えばブレンツキシマブ
ＣＤ３３	抗ＣＤ３３モノクローナル抗体、例えばゲムツズマブ及びｈＵＭｙ９－６
血管インテグリンアルファ－ｖベータ－３	抗血管インテグリンアルファ－ｖベータ－３モノクローナル抗体、例えばエタラシズマブ
ＣＤ５２	抗ＣＤ５２モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ
ＣＤ２２	抗ＣＤ２２モノクローナル抗体、例えばエプラツズマブ
ＣＥＡ	抗ＣＥＡモノクローナル抗体、例えばラベツズマブ
ＣＤ４４ｖ６	抗ＣＤ４４ｖ６モノクローナル抗体、例えばビバツズマブ
ＦＡＰ	抗ＦＡＰモノクローナル抗体、例えばシブロツズマブ
ＣＤ１９	抗ＣＤ１９モノクローナル抗体、例えばｈｕＢ４
ＣａｎＡｇ	抗ＣａｎＡｇモノクローナル抗体、例えばｈｕＣ２４２
ＣＤ５６	抗ＣＤ５６モノクローナル抗体、例えばｈｕＮ９０１
ＣＤ３８	抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、例えばダラツムマブ
ＣＡ６	抗ＣＡ６モノクローナル抗体、例えばＤＳ６
ＩＧＦ－ＩＲ	抗ＩＧＦ－ＩＲモノクローナル抗体、例えばシクスツムマブ及び３Ｂ７
インテグリン	抗インテグリンモノクローナル抗体、例えばＣＮＴＯ９５
シンデカン－１	抗シンデカン－１モノクローナル抗体、例えばＢ－Ｂ４

【０２６２】

【表２５】

表Ａ５：植物からのＲＩＰ＊

植物科	植物種	タンパク質	分類
Ａｄｏｘａｃｅａｅ	Ｓａｍｂｕｃｕｓ ｅｂｕｌｕｓ Ｌ.	エブリチン（Ｅｂｕｌｉｔｉｎ）α、エブリチンβ、エブリチンγ	ＲＩＰ１
		エブリン（Ｅｂｕｌｉｎ）ｆ、エブリンｌ、エブリンｒ１、エブリンｒ２、ＳＥＡ	ＲＩＰ２
		ＳＥＡＩＩ、ＳＥＬｆｄ、ＳＥＬｌｄ、ＳＥＬｌｍ	レクチン
	Ｓａｍｂｕｃｕｓ ｎｉｇｒａ Ｌ.	α－ニグリチン（Ｎｉｇｒｉｔｉｎ）、β－ニグリチン、γ－ニグリチン、ニグリチンｆ１、ニグリチンｆ２	ＲＩＰ１
		塩基性ニグリン（Ｎｉｇｒｉｎ）ｂ、ニグリンｂ＝ＳＮＡ－Ｖ、ニグリンｆ＝ＳＮＡ－Ｖｆ、ニグリンｌ１、ニグリンｌ２、ニグリンｓ、ＳＮＡ－Ｉ、ＳＮＡ－Ｉ’、ＳＮＡ－Ｉｆ、ＳＮＡｆｌｕ－Ｉ、ＳＮＬＲＰ１、ＳＮＬＲＰ２	ＲＩＰ２
		ＳＮＡ－ｌｄ、ＳＮＡ－ｌｍ、ＳＮＡ－ＩＩ、ＳＮＡ－ＩＩＩ、ＳＮＡ－ＩＶ＝ＳＮＡ－ＩＶｆ、ＳＮＡ－ＩＶｌ、ＳＮＡｐｏｌ－Ｉ、ＳＮＡｐｏｌ－ＩＩ、ＴｒＳＮＡ－Ｉ、ＴｒＳＮＡ－Ｉｆ	レクチン
	Ｓａｍｂｕｃｕｓ ｒａｃｅｍｏｓａ Ｌ.	塩基性ラセモシン（ｒａｃｅｍｏｓｉｎ）ｂ、ＳＲＡ	ＲＩＰ２
		ＳＲＬｂｍ＝ＳＲＡｂｍ	レクチン
	Ｓａｍｂｕｃｕｓ ｓｉｅｂｏｌｄｉａｎａ（Ｍｉｑ.）Ｂｌｕｍｅ ｅｘ Ｇｒａｅｂｎ.	ＳＳＡ＝ＳＳＡ－ｂ－１、シエボルジン（Ｓｉｅｂｏｌｄｉｎ）－ｂ＝ＳＳＡ－ｂ－２	ＲＩＰ２
		ＳＳＡ－ｂ－３、ＳＳＡ－ｂ－４	レクチン
Ａｉｚｏａｃｅａｅ	Ｍｅｓｅｍｂｒｙａｎｔｈｅ－ｍｕｍ ｃｒｙｓｔａｌｌｉｎｕｍ Ｌ.	ＲＩＰ１	ＲＩＰ１
Ａｍａｒａｎｔｈａｃｅａｅ	Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ ｃａｕｄａｔｕｓ Ｌ.	アマランチン＝ＡＣＡ	レクチン
	Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ ｃｒｕｅｎｔｕｓ Ｌ.	ＡＣＬ	レクチン
	Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ ｈｙｐｏｃｈｏｎｄｒｉａｃｕｓ Ｌ.［Ｓｙｎ.：Ａｍａ	Ａ. ｌｅｕｃｏｃａｒｐｕｓレクチン	レクチン

【０２６３】

【表２６】

	ranthus leucocarpus S. Watson]		
	Amaranthus mangostanus L.	アマラマンジン（Amaramangin）	ＲＩＰ１
	Amaranthus tricolor L.	ＡＡＰ－２７	ＲＩＰ１
	Amaranthus viridis L.	アマランチン	ＲＩＰ１
	Beta vulgaris L.	ビーチン（Beetin）－２７＝ＢＥ２７、ビーチン－２９＝ＢＥ２９、ベータブルギン（Betavulgin）	ＲＩＰ１
	Celosia argentea L. ［Syn.：Celosia cristata L.］	ＣＣＰ－２５、ＣＣＰ－２７	ＲＩＰ１
	Chenopodium album L.	ＣＡＰ３０	ＲＩＰ１
	Spinacia oleracea L.	ＳｏＲＩＰ１＝ＢＰ３１	ＲＩＰ１
		ＳｏＲＩＰ２	ＲＩＰ１候補
Araliaceae	Aralia elata（Miq.）Seem.	アラリン	ＲＩＰ２
	Panaxginseng C. A. Mey	パナキサギン（Panaxagin）	特殊ＲＩＰ１候補／ＲＮａｓｅ
	Panaxquinquefolius L.	キンケギンシン（Quinqueginsin）	特殊ＲＩＰ１候補／ＲＮａｓｅ
Asparagaceae	Asparagus officinalis L.	アスパリン（Asparin）１、アスパリン２	ＲＩＰ１
	Drimia maritima（L.）Stearn［Syn.：Charybdis maritima（L.）Speta］	チャリブジン（Charybdin）	ＲＩＰ１

【０２６４】

【表２７】

	Muscari armeniacum Leichtlin ex Baker	ムサルミン（Musarmin）１、ムサルミン２、ムサルミン３、ムサルミン４	RIP1
	Polygonatum multiflorum (L.) All.	PMRIPm、PMRIPt	RIP2
	Yucca gloriosa var. tristis Carrière [Syn.: Yucca recurvifolia Salisb.]	ユッカ葉タンパク質＝YLP	RIP1
Basellaceae	Basella rubra L.	Basella RIP 2a、Basella RIP 2b、Basella RIP 3	RIP1
Caryophyllaceae	Agrostemma githago L.	アグロスチン２、アグロスチン５、アグロスチン６、アグロスチン	RIP1
	Dianthus barbatus L.	ジアンチン２９	RIP1
	Dianthus caryophyllus L.	ジアンチン３０、ジアンチン３２	RIP1
	Dianthus chinensis L. [Syn.:Dianthus sinensis Link]	D. sinensis RIP	RIP1
	Gypsophila elegans M. Bieb.	ジプソフィリン	RIP1
	Silene chalcedonica (L.) E. H. L. Krause [Syn.:Lychnis chalcedonica L.]	リクニン（Lychnin）	RIP1
	Silene glaucifolia Lag. [Syn.:Petrocoptis glaucifolia (Lag.) Boiss.]	ペトログラウシン（Petroglaucin）１、ペトログラウシン２	RIP1
	Silene laxipruinosa Mayol & Rosselló [Syn.: Petrocoptis grandiflora Rothm.]	ペトログランジン（Petrograndin）	RIP1

【０２６５】

【表２８】

	Ｓａｐｏｎａｒｉａ ｏｃｙｍｏｉｄｅｓ Ｌ.	オシモイジン（Ｏｃｙｍｏｉｄｉｎ）	ＲＩＰ１
	Ｓａｐｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ Ｌ.	サポリン－Ｌ１＝ＳＯ－Ｌ１、サポリン－Ｌ２＝ＳＯ－Ｌ２、サポリン－Ｌ３＝ＳＯ－Ｌ３、サポリン－１＝ＳＯ－１＝ＳＯ－４、サポリン－Ｒ１＝ＳＯ－Ｒ１、サポリン－Ｒ２＝ＳＯ－Ｒ２、サポリン－Ｒ３＝ＳＯ－Ｒ３、ＳＯ３ａ、ＳＯ３ｂ、サポリン－Ｓ５＝サポリン５＝ＳＯ－Ｓ５、サポリン－Ｓ６＝サポリン６＝ＳＯ－６＝ＳＯ－Ｓ６、サポリン－Ｓ８＝ＳＯ－Ｓ８、サポリン－Ｓ９＝サポリン９＝ＳＯ－Ｓ９、ＳＡＰ－Ｃ、ＳＡＰ－Ｓ	ＲＩＰ１
	Ｍｙｏｓｏｔｏｎ ａｑｕａｔｉｃｕｍ （Ｌ.）Ｍｏｅｎｃｈ ［Ｓｙｎ.： Ｓｔｅｌｌａｒｉａ ａｑｕａｔｉｃａ （Ｌ.）Ｓｃｏｐ.］	ステラリン（Ｓｔｅｌｌａｒｉｎ）	ＲＩＰ１
	Ｓｔｅｌｌａｒｉａ ｍｅｄｉａ （Ｌ.）Ｖｉｌｌ.	ＲＩＰ Ｑ３	ＲＩＰ１
	Ｖａｃｃａｒｉａ ｈｉｓｐａｎｉｃａ （Ｍｉｌｌ.）Ｒａｕｓｃｈｅｒｔ ［Ｓｙｎ.：Ｖａｃｃａｒｉａ ｐｙｒａｍｉｄａｔａ Ｍｅｄｉｋ.］	ピラミダチン（Ｐｙｒａｍｉｄａｔｉｎ）	ＲＩＰ１
Ｃｕｃｕｒｂｉｔａｃｅａｅ	Ｂｅｎｉｎｃａｓａ ｈｉｓｐｉｄａ （Ｔｈｕｎｂ.）Ｃｏｇｎ.	ヒスピン（Ｈｉｓｐｉｎ）	ＲＩＰ１
		α－ベニンカシン（ｂｅｎｉｎｃａｓｉｎ）、β－ベニンカシン	ｓＲＩＰ１
	Ｂｒｙｏｎｉａ ｃｒｅｔｉｃａ ｓｕｂｓｐ. ｄｉｏｉｃａ （Ｊａｃｑ.）Ｔｕｔｉｎ.［Ｓｙｎ.：Ｂｒｙｏｎｉａ ｄｉｏｉｃａ Ｌ.］	ブリオジン（Ｂｒｙｏｄｉｎ）１＝ＢＤ１、ブリオジン２、ブリオジン－Ｌ、ブリオジン－Ｒ	ＲＩＰ１
		ＢＤＡ	レクチン／ＲＩＰ２様
	Ｃｉｔｒｕｌｌｕｓ ｃｏｌｏｃｙｎｔｈｉｓ （Ｌ.）Ｓｃｈｒａｄ.	コロシン（Ｃｏｌｏｃｉｎ）１、コロシン２	ＲＩＰ１
	Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｆｏｅｔｉｄｉｓｓｉｍａ Ｋｕｎｔｈ	フォエチジシミン（Ｆｏｅｔｉｄｉｓｓｉｍｉｎ）	特殊ＲＩＰ２

【０２６６】

【表２９】

		フォエチジシミンＩＩ	ＲＩＰ２
	Ｃｕｃｕｍｉｓ ｆｉｃｉｆｏｌｉｕｓ Ａ．Ｒｉｃｈ．［Ｓｙｎ．：Ｃｕｃｕｍｉｓ ｆｉｇａｒｅｉ Ｄｅｌｉｌｅ ｅｘ Ｎａｕｄｉｎ］	Ｃｕｃｕｍｉｓ ｆｉｇａｒｅｉ ＲＩＰ＝ＣＦ－ＲＩＰ	ＲＩＰ１候補
	Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｍａｘｉｍａ Ｄｕｃｈｅｓｎｅ	ククルモスキン（Ｃｕｃｕｒｍｏｓｃｈｉｎ）	ｓＲＩＰ１候補
	Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｍｏｓｃｈａｔａ Ｄｕｃｈｅｓｎｅ［Ｓｙｎ．：Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｍｏｓｃｈａｔａ（Ｄｕｃｈｅｓｎｅ ｅｘ Ｌａｍ．）Ｄｕｃｈｅｓｎｅ ｅｘ Ｐｏｉｒ．］	ククルモシン（Ｃｕｃｕｒｍｏｓｉｎ）、ククルモシン２、Ｃ．ｍｏｓｃｈａｔａ ＲＩＰ、モスカチン（Ｍｏｓｃｈａｔｉｎ）、ＰＲＩＰ１、ＰＲＩＰ２	ＲＩＰ１
		α－モスキン（ｍｏｓｃｈｉｎ）、β－モスキン	ｓＲＩＰ１候補
	Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｐｅｐｏ Ｌ．	ペポシン（Ｐｅｐｏｃｉｎ）	ＲＩＰ１
	Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｐｅｐｏ ｖａｒ．ｔｅｘａｎａ（Ｓｃｈｅｅｌｅ） Ｄ．Ｓ．Ｄｅｃｋｅｒ［Ｓｙｎ．：Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ ｔｅｘａｎａ（Ｓｃｈｅｅｌｅ） Ａ．Ｇｒａｙ］	テキサニン	ＲＩＰ１
	Ｇｙｎｏｓｔｅｍｍａ ｐｅｎｔａｐｈｙｌｌｕｍ（Ｔｈｕｎｂ．）Ｍａｋｉｎｏ	ジノステミン（Ｇｙｎｏｓｔｅｍｍｉｎ）	ＲＩＰ１
	Ｌａｇｅｎａｒｉａ ｓｉｃｅｒａｒｉａ（Ｍｏｌｉｎａ）Ｓｔａｎｄｌ．	ラゲニン（Ｌａｇｅｎｉｎ）	ＲＩＰ１候補
	Ｌｕｆｆａ ａｃｕｔａｎｇｕｌａ（Ｌ．）Ｒｏｘｂ．	ルファクリン（Ｌｕｆｆａｃｕｌｉｎ）－１、ルファクリン－２	ＲＩＰ１
		ルファングリン（Ｌｕｆｆａｎｇｕｌｉｎ）	ｓＲＩＰ１
		Ｌｕｆｆａ ａｃｕｔａｎｇｕｌａ果実レクチン	レクチン
	Ｌｕｆｆａ ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ（Ｌ．）Ｍ．Ｒｏｅｍ［Ｓｙｎ．：Ｌｕｆｆａ	ルフィン（Ｌｕｆｆｉｎ）、ルフィン－ａ、ルフィン－ｂ、α－ルフィン、β－ルフィン、ＬＲＩＰ	ＲＩＰ１

【０２６７】

【表３０】

	aegyptiaca Mill.]	ルファシリン（Luffacylin）、ルフィンＰ１	sRIP1
		ルフィン－Ｓ、ルフィンＳ（１）、ルフィンＳ（２）＝ルフィンＳ２、ルフィンＳ（３）	sRIP1候補
	Marah oreganus（Torr. & A. Gray）Howell	ＭＯＲ－Ｉ、ＭＯＲ－ＩＩ	ＲＩＰ１
	Momordica balsamina L.	バルサミン（Ｂａｌｓａｍｉｎ）、ＭｂＲＩＰ－１、モモルディンＩＩ	ＲＩＰ１
	Momordica charantia L.	ＭＡＰ ３０、α－モモルカリン＝α－ＭＭＣ、β－モモルカリン＝β－ＭＣ＝β－ＭＭＣ、δ－モモルカリン＝δ－ＭＭＣ、モモルディン、モモルディン＝Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、モモルディンＩＩ、モモルディン－ａ、モモルディン－ｂ	ＲＩＰ１
		γ－モモルカリン＝γ－ＭＭＣ、カランチン	sRIP1
		ＲＩＰ１候補	ＲＩＰ１候補
		ＭＣＬ＝Ｍ．ｃｈａｒａｎｔｉａレクチン、抗Ｈレクチン、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａアグルチニン、モモルディン、タンパク質画分１、タンパク質画分２	レクチン
		ＭＣＬ＝Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ種子レクチン＝Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａレクチン、ＭＣＬ１	ＲＩＰ２
	Momordica cochinchinensis Spreng.	コキニン（Ｃｏｃｈｉｎｉｎ）Ｂ、モモルコキン（Ｍｏｍｏｒｃｏｃｈｉｎ）、モモルコキン－Ｓ	ＲＩＰ１
	Siraitia grosvenorii（Swingle）C. Jeffrey exA. M. Lu & Zhi Y. Zhang［Syn.：Momordica grosvenorii Swingle］	モモルグロスビン（Ｍｏｍｏｒｇｒｏｓｖｉｎ）	ＲＩＰ１
	Sechium edule（Jacq.）Sw.	セキウミン（Ｓｅｃｈｉｕｍｉｎ）	ＲＩＰ１

【０２６８】

【表３１】

		Ｓｅｃｈｉｕｍ　ｅｄｕｌｅ果実レクチン	レクチン
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ａｎｇｕｉｎａ　Ｌ．	トリコアングイン（Ｔｒｉｃｈｏａｎｇｕｉｎ）	ＲＩＰ１
		ＳＧＳＬ	レクチン／ＲＩＰ２様
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｃｏｒｄａｔａ　Ｒｏｘｂ．	ＴＣＡ－Ｉ、ＴＣＡ－ＩＩ	レクチン
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｃｕｃｕｍｅｒｉｎａ　Ｌ．	ＴＣＳＬ	レクチン／ＲＩＰ２候補
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｃｕｃｕｍｅｒｏｉｄｅｓ（Ｓｅｒ．）Ｍａｘｉｍ．	β－トリコサンチン（ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｉｎ）＝β－ＴＣＳ	ＲＩＰ１
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｋｉｒｉｌｏｗｉｉ　Ｍａｘｉｍ．	α－キリロウィン（ｋｉｒｉｌｏｗｉｎ）、β－キリロウィン、ＴＡＰ２９、ＴＫ－３５、トリコビタシン（Ｔｒｉｃｈｏｂｉｔａｃｉｎ）、トリコキリン（Ｔｒｉｃｈｏｋｉｒｉｎ）、トリコミスリン（Ｔｒｉｃｈｏｍｉｓｌｉｎ）＝ＴＣＭ、トリコサンチン＝Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ抗ウイルスタンパク質＝ＴＡＰ＝ＴＣＳ＝α－トリコサンチン＝α－ＴＣＳ＝ＧＬＱ２２３、トリコサンチン、β－トリコサンチン＝β－ＴＣＳ、γ－トリコサンチン＝γ－ＴＣＳ	ＲＩＰ１
		トリコキリン（Ｔｒｉｃｈｏｋｉｒｉｎ）Ｓ１、Ｓ－トリコキリン、トリコキサントリップ（Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｒｉｐ）	ｓＲＩＰ１
		ＴＫＬ－１＝Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｅｓ　ｋｉｒｉｌｏｗｉｉレクチン－１	レクチン／ＲＩＰ２候補
		ＴＫ－Ｉ、ＴＫ－ＩＩ、ＴＫ－ＩＩＩ、Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｅｓ　ｋｉｒｉｌｏｗｉｉレクチン	レクチン

【０２６９】

【表３２】

	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ ｋｉｒｉｌｏｗｉｉ Ｍａｘｉｍｏｖｉｃｚ ｖａｒ．ｊａｐｏｎｉｃａ （Ｍｉｑｕｅｌ）Ｋｉｔａｍｕｒａ	カラスリン（Ｋａｒａｓｕｒｉｎ）－Ａ、カラスリン－Ｂ、カラスリン－Ｃ	ＲＩＰ１
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ ｌｅｐｉｎｉａｔｅ	トリコマグリン（Ｔｒｉｃｈｏｍａｇｌｉｎ）	ＲＩＰ１
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ ｄｉｏｉｃａ Ｒｏｘｂ．	ＴＤＳＬ	レクチン／ＲＩＰ２候補
	Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ ｓｐ．Ｂａｃ Ｋａｎ ８－９８	トリコバキン（Ｔｒｉｃｈｏｂａｋｉｎ）	ＲＩＰ１
Ｃｕｐｒｅｓｓａｃｅａｅ	Ｔｈｕｊａ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ Ｌ．	Ａｒｂｏｒｖｉｔａｅ ＲＩＰ	ＲＩＰ候補
Ｅｕｐｈｏｒｂｉａｃｅａｅ	Ｃｒｏｔｏｎ ｔｉｇｌｉｕｍ Ｌ．	クロチン（Ｃｒｏｔｉｎ）Ｉ	ＲＩＰ１候補
		クロチン２	ＲＩＰ１
	Ｅｕｐｈｏｒｂｉａ ｃｈａｒａｃｉａｓ Ｌ．	Ｅ．ｃｈａｒａｃｉａｓレクチン	レクチン
	Ｓｕｒｅｇａｄａ ｍｕｌｔｉｆｌｏｒａ（Ａ．Ｊｕｓｓ．）Ｂａｉｌｌ．［Ｓｙｎ．：Ｇｅｌｏｎｉｕｍ ｍｕｌｔｉｆｌｏｒｕｍ Ａ．Ｊｕｓｓ．］	ゲロニン＝ＧＡＰ３１	ＲＩＰ１
	Ｈｕｒａ Ｃｒｅｐｉｔａｎｓ Ｌ．	Ｈｕｒａ ｃｒｅｐｉｔａｎｓ ＲＩＰ、Ｈｕｒａ ｃｒｅｐｉｔａｎｓ ＲＩＰ－５	ＲＩＰ１
		Ｈｕｒａ ｃｒｅｐｉｔａｎｓラテックスレクチン	ＲＩＰ２
		クレピチン（Ｃｒｅｐｉｔｉｎ）、フーリン（Ｈｕｒｉｎ）、Ｈｕｒａ ｃｒｅｐｉｔａｎｓ種子レクチン	レクチン
	Ｊａｔｒｏｐｈａ ｃｕｒｃａｓ Ｌ．	カーシン（Ｃｕｒｃｉｎ）、カーシン２、カーシン－Ｌ、Ｊｃ－ＳＣＲＩＰ	ＲＩＰ１
	Ｍａｎｉｈｏｔ ｐａｌｍａｔａ Ｍüｌｌ．Ａｒｇ．	マパルミン（Ｍａｐａｌｍｉｎ）	ＲＩＰ１

【０２７０】

【表３３】

	Manihot esculenta Crantz.［Syn.：Manihot utilissima Pohl］	マヌチン（Manutin）１、マヌチン２	RIP１
	Ricinus communis L.	リシン＝結晶リシン＝リシンD、リシンE、RCA＝Ricinus communisusアグルチニン＝RCAI＝RCA１２０＝R. communis ヘマグルチニン＝RCB－PHA I、RCAII＝RCA６０＝RCB－PHA II	RIP２
	Ricinus communis、USA	リシン１、リシン２、リシン３	RIP２
	Ricinus communis、インド	リシンI、リシンII、リシンIII	RIP２
	Ricinus sanguienus、フランス	リシン$_{11}$、リシン$_{12}$、リシンR_2	RIP２
Fabaceae	Abrus precatorius L.	アブリン（Abrin）、アブリン－a＝アブリンC＝アブリン－III、アブリン－b、アブリン－c＝アブリンA＝アブリン－I、アブリン－d、アブリン－II、APA＝Abrus precatoriusアグルチニン＝Abrusレクチン＝AAG、APA－I、APA－II	RIP２
	Abrus pulchellus Thwaites	プルケリン（Pulchellin）、プルケリンPI、プルケリンPII、プルケリンPIII	RIP２
	Pisum sativum subsp. sativum L.［Syn.：Pisum sativum var. arvense（L.）Poir.］	α－ピサビン（pisavin）、β－ピサビン	RIP１
	Pisum sativum var. macrocarpon	サチビン（sativin）	RIP１候補
Iridaceae	Iris hollandica var. Professor Blaauw	IrisRIP＝IRIP、IrisRIP.A1、IrisRIP.A2、IrisRIP.A3	RIP１
		IRA、IRAb、IRAr	RIP２
Lamiac	Clerodendrum aculeatum（L.）Schltdl.	CA－SRI	RIP１候補

【０２７１】

【表３４】

eae	Clerodendrum inerme (L.) Gaertn.	ＣＩＰ－２９	ＲＩＰ１
		ＣＩＰ－３４	ＲＩＰ１候補
	Leonurus japonicus Houtt.	レオヌリン	ＲＩＰ候補
Lauraceae	Cinnamomum bodinieri H. Lév.	ボジニエリン（Ｂｏｄｉｎｉｅｒｉｎ）	ＲＩＰ２
	Cinnamomum camphora (L.) J. Presl	カンフォリン（Ｃａｍｐｈｏｒｉｎ）	ＲＩＰ１
		シンナモミン（Ｃｉｎｎａｍｏｍｉｎ）、シンナモミン１、シンナモミン２、シンナモミン３	ＲＩＰ２
		シンフォリン（Ｃｉｎｐｈｏｒｉｎ）	ｓＲＩＰ２
	Cinnamomum parthenoxylon (Jack) Meisn. [Syn.: Cinnamomum porrectum (Roxb.) Kosterm.]	ポレクチン（Ｐｏｒｒｅｃｔｉｎ）	ＲＩＰ２
Malvaceae	Abelmoschus esculentus (L.) Moench	アベレスキュリン（Ａｂｅｌｅｓｃｕｌｉｎ）	ＲＩＰ１
Nyctaginaceae	Boerhaavia diffusa L.	Ｂｏｅｒｈａａｖｉａ阻害剤	ＲＩＰ１候補
	Bougainvillea spectabilis Willd.	ＢＡＰ Ｉ、ブーガニン＝Ｂｏｕｇａｉｎｖｉｌｌｅａ ＲＩＰ Ｉ	ＲＩＰ１
	Bougainvillea × buttiana cv. Enid Lancester	ＢＢＰ－２４、ＢＢＰ－２８	ＲＩＰ１
	Bougainvillea × buttiana cv. Mahara	ＢＢＡＰ１	ＲＩＰ１
	Mirabilis expansa (Ruiz & Pav.) Standl.	ＭＥ１、ＭＥ２	ＲＩＰ１

【０２７２】

【表３５】

	Ｍｉｒａｂｉｌｉｓ ｊａｌａｐａ Ｌ.	ＭＡＰ、ＭＡＰ－２、ＭＡＰ－３、ＭＡＰ－４、ＭＡＰ－Ｓ	ＲＩＰ１
Ｏｌａｃａｅａｅ	Ｍａｌａｎｉａ ｏｌｅｉｆｅｒａ Ｃｈｕｎ ＆ Ｓ. Ｋ. Ｌｅｅ	マラニン（Ｍａｌａｎｉｎ）	レクチン／ＲＩＰ２候補
	Ｘｉｍｅｎｉａ ａｍｅｒｉｃａｎａ Ｌ.	リプロキシミン（Ｒｉｐｒｏｘｉｍｉｎ）＝Ｒｐｘ、Ｒｐｘ－Ｉ、Ｒｐｘ－ＩＩ	ＲＩＰ２
Ｐａｓｓｉｆｌｏｒａｃｅａｅ	Ａｄｅｎｉａ ｄｉｇｉｔａｔａ （Ｈａｒｖ.）Ｅｎｇｌ.	モデシン（Ｍｏｄｅｃｃｉｎ）＝モデシン４Ｂ、モデシン６Ｂ	ＲＩＰ２
	Ａｄｅｎｉａ ｅｌｌｅｎｂｅｃｋｉｉ Ｈａｒｍｓ	Ａ. ｅｌｌｅｎｂｅｃｋｉｉレクチン	ＲＩＰ２候補
	Ａｄｅｎｉａ ｆｒｕｔｉｃｏｓａ Ｂｕｒｔｔ Ｄａｖｙ	Ａ. ｆｒｕｔｉｃｏｓａレクチン	レクチン
	Ａｄｅｎｉａ ｇｌａｕｃａ Ｓｃｈｉｎｚ	Ａ. ｇｌａｕｃａレクチン	ＲＩＰ２候補
	Ａｄｅｎｉａ ｇｏｅｔｚｅｉ Ｈａｒｍｓ（未解決の名前）	Ａ. ｇｏｅｔｚｅｉレクチン	ＲＩＰ２
	Ａｄｅｎｉａ ｋｅｒａｍａｎｔｈｕｓ Ｈａｒｍｓ	Ａ. ｋｅｒａｍａｎｔｈｕｓレクチン	ＲＩＰ２候補
	Ａｄｅｎｉａ ｌａｎｃｅｏｌａｔａ Ｅｎｇｌ.	ランセオリン（Ｌａｎｃｅｏｌｉｎ）	ＲＩＰ２
	Ａｄｅｎｉａ ｒａｃｅｍｏｓａ Ｗ. Ｊ. ｄｅ Ｗｉｌｄｅ	Ａ. ｒａｃｅｍｏｓａレクチン	レクチン
	Ａｄｅｎｉａ ｓｐｉｎｏｓａ Ｂｕｒｔｔ Ｄａｖｙ	Ａ. ｓｐｉｎｏｓａレクチン	ＲＩＰ２候補
	Ａｄｅｎｉａ ｓｔｅｎｏｄａｃｔｙｌａ Ｈａｒｍｓ	ステノダクチリン（Ｓｔｅｎｏｄａｃｔｙｌｉｎ）	ＲＩＰ２
	Ａｄｅｎｉａ ｖｅｎｅｎａｔａ Ｆｏｒｓｓｋ.	Ａ. ｖｅｎｅｎａｔａレクチン	ＲＩＰ２候補
	Ａｄｅｎｉａ ｖｏｌｋｅｎｓｉｉ Ｈａｒｍｓ	ボルケンシン	ＲＩＰ２
Ｐｈｙｔｏｌａｃ	Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａ Ｌ.	α－ＰＡＰ、ＰＡＰ＝Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質＝ポークウィード抗ウイルスタンパク質、ＰＡＰ－Ｉ、ＰＡＰ－	ＲＩＰ１

【０２７３】

【表３６】

ｃａｃｅａｅ		ＩＩ、ＰＡＰ－ＩＩＩ、ＰＡＰ－Ｃ、ＰＡＰ－Ｈ、ＰＡＰ－Ｒ、ＰＡＰ－Ｓ、ＰＡＰ－Ｓ１、ＰＡＰ－Ｓ２	
	Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｄｉｏｉｃａ Ｌ.	ジオシン（Ｄｉｏｃｉｎ）１、ジオシン２、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＰＤ－Ｌ３、ＰＤ－Ｌ４、ＰＤ－Ｓ１、ＰＤ－Ｓ２、ＰＤ－Ｓ３	ＲＩＰ１
	Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｄｏｄｅｃａｎｄｒａ Ｌ’Ｈéｒ.	ドデカンドリン（Ｄｏｄｅｃａｎｄｒｉｎ）、ドデカンドリンＣ	ＲＩＰ１
	Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｈｅｔｅｒｏｔｅｐａｌａ Ｈ. Ｗａｌｔｅｒ	ヘテロテパリン（Ｈｅｔｅｒｏｔｅｐａｌｉｎ）４、ヘテロテパリン５ｂ	ＲＩＰ１
	Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｉｎｓｕｌａｒｉｓ Ｎａｋａｉ	インスラリン＝ＰＩＰ＝Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｉｎｓｕｌａｒｉｓ抗ウイルスタンパク質、ＰＩＰ２＝Ｐ. ｉｎｓｕｌａｒｉｓ抗ウイルスタンパク質２	ＲＩＰ１
Ｐｏａｃｅａｅ	Ｈｏｒｄｅｕｍ ｖｕｌｇａｒｅ Ｌ.	オオムギ毒素＝オオムギ翻訳阻害剤＝オオムギタンパク質合成阻害剤＝ＢＰＳＩ＝ＲＩＰ３０、オオムギ毒素Ｉ＝オオムギ翻訳阻害剤Ｉ、オオムギ毒素ＩＩ＝オオムギ翻訳阻害剤ＩＩ＝オオムギタンパク質合成阻害剤ＩＩ＝ＢＰＳＩ ＩＩ、オオムギ毒素ＩＩＩ＝オオムギ翻訳阻害剤ＩＩＩ、ＪＩＰ６０	ＲＩＰ１
	Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ Ｌ.	Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ ＲＩＰ	ＲＩＰ１
	Ｓｅｃａｌｅ ｃｅｒｅａｌｅ Ｌ.	ＲＰＳＩ	ＲＩＰ１
	Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ Ｌ.	トリチン（Ｔｒｉｔｉｎ）、トリチン１、トリチン２、トリチン３、トリチン－Ｓ、トリチン－Ｌ	ＲＩＰ１
	Ｚｅａ ｍａｙｓ Ｌ.	ｂ－３２＝トウモロコシＲＩＰ＝トウモロコシｐｒｏＲＩＰ１、トウモロコシｐｒｏＲＩＰ２	ＲＩＰ３／特殊ＲＩＰ１
Ｒａｎｕｎｃｕｌａｃｅａｅ	Ｅｒａｎｔｈｉｓ ｈｙｅｍａｌｉｓ （Ｌ.） Ｓａｌｉｓｂ.	ＥＨＬ	ＲＩＰ２

【０２７４】

【表３７】

Santalaceae	Phoradendron californicum Nutt.	PCL	RIP2
	Viscum album L.（ヒマラヤヤドリギ）	HmRip、HmRip 1、HmRip 2、HmRip 3、HmRip 4	RIP2
	Viscum album L.（ヨーロッパヤドリギ）	ML－I＝ヤドリギレクチンI＝ビスクミン＝Eu－ML＝EML－1＝VAA－I、ML－II＝ヤドリギレクチンII＝VAA－II、ML－III＝ヤドリギレクチンIII＝VAA－III	RIP2
	Viscum articulatum Burm. f.	アーティキュラチン（Articulatin）－D	RIP2
	Viscum coloratum（Kom.）Nakai［Syn.：Viscum album subsp. coloratum Kom.］	KML、KML－C、KML－IIL、KML－IIU、VCA	RIP2
Solanaceae	Nicotiana tabacum L.	CIP31	RIP様タンパク質
		TRIP	RIP1候補
Thymelaeaceae	Phaleria macrocarpa（Scheff.）Boerl.	P. macrocarpa RIP	RIP候補
＊Schrot J, Weng A, Melzig MF, et al. Ribosome－inactivating and related proteins. Toxins（Basel）. 2015 May 8；7（5）：1556－615.			

【０２７５】

治療薬コンジュゲートは、さらに結合分子又は結合部分とサポニンとの共有結合的なコンジュゲート（複合体）と組み合わせられるか、或いはさらに医薬化合物、抗体などと組み合わせられ、それによって２つ又はさらには３つ又はより多くの向上因子、原薬などを含む組成物を提供するということが、本発明の一部である。例えば、エフェクター分子と複合体化した結合部分と組み合わせられ、さらに任意に医薬品と組み合わせられた本発明のコンジュゲートである。これは、サポニンに連結されるか又はされないかどちらかであり、かつ、これはリガンド、例えば標的化免疫グロブリン、そのドメイン、又はフラグメントにカップリングされるか又はされないかどちらかである。さらにその上、ある実施形態は本発明の治療薬コンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子は、２つ以上のエフ

ェクター部分、例えば毒素又は免疫毒素を提供され、２つ以上のエフェクター部分は同じか又は異なる。

【０２７６】

例示的な実施形態

ある実施形態は、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートであり、サポニンは、位置２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、サポニンは、好ましくは、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ又はＳａｐｏｎａｒｉａ種から単離され得るサポニンであり、より好ましくは、サポニンは、サポニンＳＯ１８６１又はそのジアステレオマーのいずれかである。

【０２７７】

ある実施形態は、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子は少なくとも免疫グロブリンなどのリガンドであり、それに結合された少なくともエフェクター部分を有する。

【０２７８】

ある実施形態は、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートであり、細胞表面分子標的化分子は、細胞表面分子に結合するための免疫グロブリン又は少なくともその結合ドメインであり、好ましくは、細胞表面分子は、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ７１のいずれかから選択される。

【０２７９】

ある実施形態は、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートであり、リンカーは、切断可能な結合を介してサポニンにカップリングされ、細胞表面分子標的化分子は免疫グロブリンである。好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能な結合は、共有結合、好ましくは、イミン結合、ヒドラゾン結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、又はエステル結合であり、好ましくは、切断可能な結合はジスルフィド結合又はペプチド結合である。

【０２８０】

ある実施形態は、本発明のエンドソーム脱出向上コンジュゲートであり、サポニン部分は末端サポニン、好ましくはサポニンＳＯ１８６１であり、リンカーは、サポニンを、本発明のコンジュゲートの細胞表面分子標的化分子に共有結合的に連結する化学的リンカーであり、細胞表面分子標的化分子は、免疫グロブリン、例えばトラスツズマブ又はセツキシマブであり、リンカーは、好ましくは、末端サポニン部分とコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子との間に切断可能な結合を提供する。

【０２８１】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンがビスデスモシド型トリテルペンである。

【０２８２】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンがビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【０２８３】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンは、位置２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【０２８４】

ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンは、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ又はＳａｐｏｎａｒｉａ種から単離され得るサポニンである。

【０２８５】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンは、ＳＯ１８６１又はそのジアステレオマーのいずれかである。
【０２８６】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、少なくとも１つのサポニンは、細胞表面分子標的化分子（細胞表面分子上のエピトープの結合部位）に、切断可能な結合を介して結合される。好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で切断を受け、切断可能な結合は、好ましくは、ジスルフィド結合又はペプチド結合である。
【０２８７】
ある実施形態は、本発明に従うコンジュゲートであり、切断可能な結合は、共有結合、好ましくは、イミン結合、ヒドラゾン結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、又はエステル結合である。
【０２８８】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、エンドソーム脱出向上コンジュゲートは、定められた数のグリコシド又は定められた範囲を含む。
【０２８９】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、定められた範囲は、１～３０個のグリコシド（単数又は複数）、好ましくは１～２０、より好ましくは１～１０、より好ましくは１～６、より好ましくは２～６、より好ましくは２～５、より好ましくは３～５、より好ましくは３～４つのグリコシドである。
【０２９０】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、エフェクター部分は、原薬、例えば毒素、例えばタンパク質性毒素、薬物、ポリペプチド、又はポリヌクレオチドである。
【０２９１】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、標的細胞は、有疾患細胞又は疾患関連細胞、好ましくは、腫瘍細胞又は腫瘍関連細胞（例えば、腫瘍血管細胞）、又は免疫細胞（例えば、制御性Ｔ細胞）、又は自己免疫細胞である。
【０２９２】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、少なくとも１つのエフェクター部分は、コンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子に、切断可能な結合を介して結合される。好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下で切断を受け、並びに／或いは、切断可能な結合はジスルフィド結合又はペプチド結合である。
【０２９３】
ある実施形態は本発明に従うコンジュゲートであり、サポニンが、エフェクター分子のエンドソーム脱出を増加させることができる。
【０２９４】
ある実施形態は、医薬として使用するための、本発明に従うコンジュゲートである。
【０２９５】
ある実施形態は医薬組成物であり、本発明に従うコンジュゲート（先の実施形態）及び薬学的に許容される賦形剤を含む。
【０２９６】
ある実施形態は本発明に従う医薬組成物であり、さらに、少なくとも１つのさらなる原薬、例えばさらなる免疫グロブリンを含む。
【０２９７】
ある実施形態は、癌又は自己免疫疾患の処置方法において使用するための、本発明に従う使用のためのコンジュゲート又は本発明に従う医薬組成物である。
【０２９８】
ある実施形態は癌の処置方法であり、方法は、本発明に従うコンジュゲートを、それを

必要とする患者に投与することを含む。
【０２９９】
ある実施形態は癌の処置方法であり、方法は、本発明に従う医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。
【０３００】
ある実施形態は、本発明に従うエンドソーム脱出向上コンジュゲートを含有する容器を含むキットであり、キットはさらに、結合分子を用いるための説明書を含む。
【０３０１】
本発明に従う少なくとも１つのサポニンを含む骨格は、機能化されたＡＤＣ又は機能化されたＡＯＣの製造のための半完成製品としての使用にとって好適であり、機能化されたＡＤＣ又は機能化されたＯＡＣは、本発明の少なくとも１つの共有結合的にカップリングされたサポニンと本発明の少なくとも１つのエフェクター部分とを含む。ある実施形態は、本発明の骨格であり、さらに、本発明の骨格に共有結合された毒素又はオリゴヌクレオチドなどの本発明のペイロード又はエフェクター部分を含み、直接的に、又は本発明のリンカー、好ましくは本発明の切断可能なリンカーを介するかどちらかである。かかる機能化された骨格は、それに共有結合された骨格とそれに結合されたエフェクター部分とを有する前記骨格を含むＡＤＣ－サポニンコンジュゲート又はＡＯＣ－サポニンコンジュゲートの製造のために用いられ得る。例えば、かかる機能化されたＡＤＣ又はＯＡＣは２～４つのサポニンを含み、例えば、本発明に従うコンジュゲート上のシステイン側鎖に共有結合的にカップリングされ、例えば、例えばリガンド又は抗体（フラグメント）である細胞表面分子標的化分子に、直接的に、又は（切断可能な）リンカーを介して共有結合的にカップリングされる。或いは、かかる機能化されたＡＤＣ又はＯＡＣは、例えば、Ｇ４－デンドロンなどのデンドロンを含み、デンドロンは、それに結合した１～１６個の共有結合的にカップリングされたサポニンを含み、デンドロンは、例えば、本発明に従うコンジュゲートに含まれる細胞表面分子標的化分子のシステイン側鎖及び／又はリジン側鎖に共有結合的にカップリングされる。
【０３０２】
本発明のある態様は医薬組成物に関し、本発明のコンジュゲートと、任意に薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤とを含む。
【０３０３】
本発明のある態様は、医薬として使用するための、本発明のコンジュゲートに関するか、又は本発明の医薬組成物に関する。
【０３０４】
本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の処置又は防止において使用するための、本発明のコンジュゲートに関するか、又は本発明の医薬組成物に関する。
【０３０５】
本発明は次の例によりさらに例解される。これらは決して本発明を限定すると解釈されるべきではない。
【実施例】
【０３０６】
例Ａ－ＡＤＣとの組み合わせで本発明のコンジュゲートによって哺乳類の腫瘍を持つ動物を処置することは、生残及び腫瘍退縮をもたらす
雌Ｂａｌｂ／ｃヌードマウスに、ヒトＡ４３１腫瘍細胞の懸濁液を皮下注射した。マウスの皮膚下に、ヒト表皮癌腫をゼノグラフト動物腫瘍モデルにおいて発生させた。腫瘍細胞の注射後に、ゼノグラフト腫瘍がおよそ１７０～１８０mm^3のサイズまで発生することを許した。Ａ４３１腫瘍細胞は次の特徴を有する：高ＥＧＦＲ発現体、中度ＣＤ７１発現体、低ＨＥＲ２発現体。Ａ４３１腫瘍細胞に基づく腫瘍モデルは、特に腫瘍が急速に成長して行くので、侵攻性のモデルである。
【０３０７】
表Ａでは、対照マウス及び腫瘍を持つマウスの処置の結果が提示されている。腫瘍を持

つマウスを、ゼノグラフト腫瘍上の細胞表面受容体であるヒトＨｅｒ２／ｎｅｕ、ヒトＥＧＦＲ、又はヒトＣＤ７１どちらかを指向する指示されている抗体によって処置した。セツキシマブをサポニンＳＯ１８６１と共有結合的にコンジュゲート化した。最初に、ＳＯ１８６１にリンカーＥＭＣＨ（Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）を提供した。このＥＭＣＨは、スルフヒドリル（抗体の還元型システイン）をカルボニル（アルデヒド又はケトン；ここでは、サポニンの位置Ｃ－２３におけるアルデヒドのカルボニル）に共有結合的にコンジュゲート化するためのマレイミド及びヒドラジド架橋剤である。サポニン－ＥＭＣＨを、セツキシマブの還元されたシステインに共有結合的にカップリングし、ＥＭＣＨとシステイン側鎖との間にチオ－エーテル共有結合を形成した。ＡＤＣのトラスツズマブ－サポリン（共有結合的なコンジュゲート）及び抗ＣＤ７１　ｍＡｂ（ＯＫＴ－９，ＩｇＧ）－サポリン（共有結合的なコンジュゲート）を、マウスにおけるそれらの腫瘍攻撃有効性について試験した。ＡＤＣによる処置の開始後の時間的な腫瘍体積として測定した。ＡＤＣのドーズは、腫瘍モデルにおいて準最適であった。つまり、先の実験から、ＡＤＣのどの準最適なドーズにおいて、腫瘍退縮又は腫瘍成長の停止が観察可能ではないであろうかということが確立された。

【０３０８】

【表３８】

表Ａ：ＡＤＣとの組み合わせで本発明のコンジュゲートによって哺乳類の腫瘍を持つ動物を処置する結果は、生残及び腫瘍退縮をもたらす

処置群	患者／健康な動物	処置	腫瘍サイズ（mm^3による体積、又は成長は「＋」、退縮は「－」、成長も退縮もなしは「安定」）
１	ゼノグラフト	基剤	２０００mm^3（死亡／安楽死）
２	ゼノグラフト	トラスツズマブ－サポリン	２０００mm^3（死亡／安楽死）
３	ゼノグラフト	抗ＣＤ７１ｍＡｂ　ＯＫＴ－９－サポリン（共有結合的なコンジュゲート）	２０００mm^3（死亡／安楽死）
４	ゼノグラフト	セツキシマブ－ＳＯ１８６１（共有結合的なコンジュゲート）	２０００mm^3（死亡／安楽死）
５	ゼノグラフト	セツキシマブ	＞１７０mm^3だが、＜２０００mm^3（死亡／安楽死）
６	ゼノグラフト	トラスツズマブ－サポリン（共有結合的なコンジュゲート）＋セツキシマブ－ＳＯ１８６１（共有結合的なコンジュゲート）	処置の開始における１８０mm^3から８０mm^3への腫瘍退縮（生残）
７	ゼノグラフト	抗ＣＤ７１　ｍＡｂＯＫＴ－９－サポリン（共有結合的なコンジュゲート）＋セツキシマブ－ＳＯ１８６１（共有結合的なコンジュゲート）	処置の開始における１８０mm^3から４０mm^3への腫瘍退縮（生残）

【０３０９】

これらの結果は、ＡＤＣ単独による腫瘍を持つマウスの処置が考えられるときには無効である（腫瘍成長、マウスの死亡が防止されない（安楽死））ドーズにおけるＡＤＣの、サポニン、すなわちＳＯ１８６１に共有結合された腫瘍細胞特異的受容体を標的化する抗体からなる本発明のコンジュゲートとの組み合わせ治療が、（実験の継続期間を越えて）処置された動物の退縮中の腫瘍及び遷延した生残として表現される効率的かつ有効な処置計レジメンを提供するということを実証している。共有結合的なコンジュゲートは、単独で投与されるときには有効でない（腫瘍成長、マウスの死亡は防止されない（安楽死））ドーズにおいて、癌を患っているマウスに投与される。それゆえに、単独で投与されるときには抗腫瘍活性を有さない本発明の共有結合されたサポニンを含有するコンジュゲートと組み合わせられたＡＤＣの準最適ドーズは、癌患者にとっての有効な処置オプションを提供し、ＡＤＣの比較的低いドーズが有効である。ＡＤＣのより低いドーズは、有害事象

のより少ないリスク、又はさらには全く副作用なしという有望さを持つ。加えて、ＡＤＣの有効性が考えられるときの本発明のサポニンを持つコンジュゲートの刺激効果は、腫瘍患者の処置が関するときに有効性を欠くことが先に判明しているＡＤＣが、改まった注目及び価値を獲得し得るということを示している。なぜなら、ＡＤＣの有効性は、本例が実証した通り組み合わせ治療条件では改善されるからである。ＡＤＣをまとめている表Ａ２及び表Ａ３の参照がなされる。これらはヒト臨床条件において先に検討されたが、それから、いくつかのＡＤＣについてはさらなる臨床的検討から撤回された。特に、有効性の観察された欠如を原因として及び／又は許容できない有害事象の生起を原因として臨床開発が終結したＡＤＣは、本発明の共有結合されたサポニンを含むコンジュゲート、例えば試験されたセツキシマブ－サポニンと組み合わせられるときに、癌患者にとって改まった価値を獲得し得るＡＤＣである。

【０３１０】

例Ｂ－エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を有するＱＳ－２１を含むＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａのサポニン混合物

スキームＩは、一連のＱＳ－２１サポニンの共通の分子構造を見せている（Ｃｏｎｒａｄｏ Ｐｅｄｅｂｏｓ，Ｌａｅｒｃｉｏ Ｐｏｌ－Ｆａｃｈｉｎ，Ｒａｍｏｎ Ｐｏｎｓ，Ｃｉｌａｉｎｅ Ｖ．Ｔｅｉｘｅｉｒａ Ｈｕｇｏ Ｖｅｒｌｉ，Ａｔｏｍｉｃ Ｍｏｄｅｌ ａｎｄ Ｍｉｃｅｌｌｅ Ｄｙｎａｍｉｃｓ ｏｆ ＱＳ－２１ Ｓａｐｏｎｉｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ２０１４，１９，３７４４－３７６０から抜粋）。Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａから得られる水溶性サポニンの混合物（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、製品Ｎｏ．Ｓ４５２１；Ｒｏｔｈ、アイテムＮｏ．６８５７；ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ、製品「Ｑｕｉｌ－Ａ」）は、混合物中に存在する少なくとも１つの個々のサポニン、例えばＱＳ－２１のエンドソーム／リソソーム脱出向上特性に基づいて、又は混合物によって含まれる２つ以上のサポニンの組み合わせ、例えばＱＳ－２１及びＱＳ－７に基づいて、本発明のエンドソーム／リソソーム脱出向上コンジュゲート、組成物、組み合わせに適用され得る。

【０３１１】

本発明者は、細胞に基づくバイオアッセイによって哺乳類腫瘍細胞で試験されると、２．５マイクログラム／ｍｌドーズのＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからのサポニンの混合物が、ジアンチンのエンドソーム脱出を向上させることができるということを実証した。細胞に暴露されたエフェクター部分は、リガンドＥＧＦに共有結合的にカップリングされたジアンチン：ＥＧＦ－ジアンチンであった。試験された細胞は、遊離サポニンについては腫瘍細胞株ＨｅＬａ、セツキシマブに共有結合的にカップリングされたときのサポニンを試験するためにはＡ４３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＣａＳｋｉ、及びＡ２０５８であった。

【０３１２】

例１

セツキシマブ（ヒトＥＧＦＲを認識及び結合するモノクローナル抗体）に、ＳＯ１８６１をシステイン残基（Ｃｙｓ）を介してコンジュゲート化し（不安定）、ジアンチン（タンパク質毒素）をリジン残基（Ｌｙｓ）を介してコンジュゲート化し（安定）、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}の産生をもたらした。セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}コンジュゲートを、図９に例示される通りＥＧＦＲ腫瘍標的化殺細胞について、Ａ４３１（ＥＧＦＲ）ゼノグラフマウス腫瘍モデルにおいて試験した。腫瘍が～１５０mm^3のサイズに達した第１２日に、投薬を開始し、腫瘍体積を毎投薬後に決定した。マウス（ｎ＝３）を、第１２日：０．５ｍｇ／ｋｇ；第１５日：１ｍｇ／ｋｇ、及び第２４日：１．５ｍｇ／ｋｇで、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}又はセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,6}によって処置した（腹腔内；ｉ．ｐ．；用量漸増）。第２６日に、対照群と比較して、腫瘍体積縮減が、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}で処置した腫瘍を持

つマウスにおいて観察され得た（図１Ａ）。これは、抗体－タンパク質毒素（安定）コンジュゲートへのＳＯ１８６１の不安定なコンジュゲート化が、腫瘍標的化抗体－タンパク質毒素の標的化治療有効性を向上させ得、それによってより有効な腫瘍標的化治療を誘導するということを示す。

【０３１３】

次に、セツキシマブ（ヒトＥＧＦＲを認識し、結合するモノクローナル抗体）に、ＳＯ１８６１をシステイン残基（Ｃｙｓ）を介してコンジュゲート化し（不安定）、ジアンチン（タンパク質毒素）をリジン残基（Ｌｙｓ）を介してコンジュゲート化し（不安定）、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}の産生をもたらした。コンジュゲートを、図９に例示される通りＥＧＦＲ腫瘍標的化殺細胞について、Ａ４３１（ＥＧＦＲ）ゼノグラフマウス腫瘍モデルにおいて試験した。腫瘍が～１５０ｍｍ^{3}のサイズに達した第１２日に、投薬を開始し、腫瘍体積を毎投薬後に決定した。マウス（ｎ＝３）を１２日目に治療（腹腔内投与；ｉ．ｐ．；用量漸増）した０．５ｍｇ／ｋｇ；第１５日：１ｍｇ／ｋｇ、第２４日：１．５ｍｇ／ｋｇで、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）２又はセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,6}によって処置した（腹腔内；ｉ．ｐ．；用量漸増）。これは、対照と比較して３５日後に、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}で処置した腫瘍を持つマウスが、腫瘍成長阻害を示すということを明らかにした（図１Ｂ）。マウス（ｎ＝３；）に１２日目に投与（静脈内投与、用量漸増）した時。０．５ｍｇ／ｋｇ；第１５日：１ｍｇ／ｋｇ、第１８日：２ｍｇ／ｋｇ、第２４日：２．５ｍｇ／ｋｇで、本発明に従うセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}によって処置したときにもまた（静脈内ｉ．ｖ．；用量漸増）、対照と比較して、腫瘍成長阻害が観察され得た（２匹のマウスが処置中に死んだので、データは１匹のマウスを表す）。これは、抗体－タンパク質毒素（不安定）コンジュゲートへのＳＯ１８６１の不安定なコンジュゲート化が、腫瘍標的化抗体－タンパク質毒素の標的化治療有効性を向上させ、それによってより有効な腫瘍標的化治療を誘導し得るということを示している。

【０３１４】

次に、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、システイン残基（Ｃｙｓ）を介してＤＡＲ　３，９でセツキシマブ（ヒトＥＧＦＲを認識し、結合するモノクローナル抗体）に、アンチセンスＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴヌクレオチド（癌細胞における癌標的ｈｓｐ２７　ｍＲＮＡを標的化し、その分解（遺伝子サイレンシング）を誘導する）を不安定な（Ｌ）リンカーを介してＤＡＲ１，８で抗体のリジン残基（Ｌｙｓ）にコンジュゲート化し、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1,8}の産生をもたらした。セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1,8}を、図１０に例解される通り本発明に従って、ＥＧＦＲにより媒介される腫瘍標的化ＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングについて、Ａ４３１ゼノグラフ「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて試験した。腫瘍が～１５０ｍｍ^{3}のサイズに達した第１２日に投薬を開始し、ＨＳＰ２７　ｍＲＮＡ発現を決定した。このためには、腫瘍サンプルを、最初の投薬の後の７２ｈにおいて収集し、細胞の対照ｍＲＮＡ発現レベル（参照遺伝子）と比較したＨＳＰ２７遺伝子発現レベルについて分析した。３０ｍｇ／ｋｇのセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1,8}で処置した（腹腔内；ｉ．ｐ．）腫瘍を持つマウス（ｎ＝３）は、１投薬のセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}又はセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{1,5}と比較して、１投薬後に腫瘍におけるＨＳＰ２７　ｍＲＮＡ発現の４０％縮減を示した（図２）。基剤対照の腫瘍と比較して、２５％のＨＳＰ２７遺伝子発現の縮減が観察された。これは、本発明に従う同じ標的化抗体へのＳＯ１８６１及びＨＳＰ２７ＢＮＡのコンジュゲート化が、腫瘍を持つマウスの固形腫瘍における治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドのＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、腫瘍標的化遺伝子サイレンシングを誘導するということを示し、可能化する。

【０３１５】
別の例では、ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡを産生するために、１つのアーム上のＳＯ１８６１及び他方のアーム上のＨＳＰ２７ＢＮＡとのコンジュゲート化のための３つの特定の化学末端基を有する三官能性リンカー骨格を設計及び産生した。次に、ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡを、その第３アームによって抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブのシステイン残基（Ｃｙｓ）にコンジュゲート化し（セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}）、Ａ４３１ゼノグラフ「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて、ＥＧＦＲにより媒介される腫瘍標的化遺伝子サイレンシング活性について、図１１に例解される通り本発明に従って試験した。腫瘍が～１５０ｍｍ^{3}のサイズに達した第１２日に投薬を開始し、ＨＳＰ２７　ｍＲＮＡ発現を決定した。このためには、腫瘍サンプルを、最初の投薬の後の７２ｈにおいて収集し、細胞の対照ｍＲＮＡ発現レベル（参照遺伝子）と比較したＨＳＰ２７遺伝子発現レベルについて分析した。これは、３０ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}の１投薬が、２５ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}又は２５ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{4}単独療法の一投薬と比較して、腫瘍におけるＨＳＰ２７遺伝子発現の４０％縮減をもたらすということを明らかにした（図３）。基剤対照腫瘍と比較して、２５％のＨＳＰ２７遺伝子発現の縮減が、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}の１投薬で処置した腫瘍を持つマウスにおいて観察された。これは、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}が、腫瘍を持つマウスの固形腫瘍において、治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドのＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、インビボの標的遺伝子サイレンシングを誘導するということを示し、可能化する。

【０３１６】
例２
本発明に従う別の例では、ＳＯ１８６１（不安定）及びタンパク質毒素ジアンチン（不安定又は安定）を、ＨＥＲ２標的化抗体トラスツズマブにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}又はトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}を産生し、図９に例解される通り、ＳＫ－ＢＲ－３（ＨＥＲ２）及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８（ＨＥＲ２$^{-}$）細胞における向上した殺細胞について試験した。　トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}（ＩＣ５０＝０，８ｎＭ）及びトラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}（ＩＣ５０＝０，８ｎＭ）両方は、ＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）の殺細胞を効率的に誘導する（図４Ａ）。これは、トラスツズマブ、トラスツズマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,7}、トラスツズマブ－（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}、又はトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}単独で処置したＳＫ－ＢＲ－３細胞では観察されなかった（図４Ａ）。ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞（ＨＥＲ２$^{-}$）では、本発明に従うコンジュゲートのいずれかについて殺細胞活性は観察され得ない（図４Ｂ）。これは、ＨＥＲ標的化抗体－タンパク質毒素コンジュゲートへのＳＯ１８６１のコンジュゲート化が、標的細胞におけるタンパク質毒素のＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、標的細胞死をもたらすということを示す。

【０３１７】
本発明に従う別の例では、ＳＯ１８６１（不安定）及びタンパク質毒素ジアンチン（不安定又は安定）を、ＥＧＦＲ標的化抗体セツキシマブにコンジュゲート化した。セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{2}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{2}を、図９に例解される通りＡ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）における向上した殺細胞について試験した。　セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,9}（Ｌｙｓ

－Ｌ－ジアンチン）^{2}（ＩＣ５０＝０，３ｎＭ）及びセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,7}（ＩＣ５０＝０，３ｎＭ）両方は、Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）において、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ジアンチン）^{1,6}（ＩＣ５０＝２ｐＭ）、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｓ－ジアンチン）^{1,6}（ＩＣ５＝２ｐＭ）単独と比較して向上した殺細胞を示した（図４Ｃ）。Ａ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）では、本発明に従う組み合わせは、いずれかの殺細胞活性を示さなかった（ＩＣ５０＞２００ｎＭ；図４Ｄ）。これは、ＥＧＦＲ標的化抗体－タンパク質毒素コンジュゲートへのＳＯ１８６１のコンジュゲート化が、標的細胞におけるタンパク質毒素のＳＯ１８６１により媒介される細胞質送達を効率的に向上させ、向上した標的細胞死をもたらすということを示す。

【０３１８】

例３

本発明に従う別の例では、ＳＯ１８６１（不安定）及びＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴ（不安定）を、ＥＧＦＲ標的化抗体セツキシマブにコンジュゲート化した。セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,8}を、図１０に例解される通り本発明に従って、Ａ４３１細胞（ＥＧＦＲ）及びＡ２０５８（ＥＧＦＲ$^{-}$）細胞における向上したＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングについて試験した。セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,8}は、セツキシマブ、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,9}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}単独と比較して、Ａ４３１細胞におけるＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（ＩＣ５０＝３ｎＭ）（図５Ａ）。Ａ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）では、遺伝子サイレンシング活性は、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,8}によって観察され得ない（ＩＣ５０＞１００ｎＭ；図５Ｂ）。これは、本発明に従う同じ標的化抗体へのＳＯ１８６１及びＨＳＰ２７ＢＮＡのコンジュゲート化が、標的細胞における治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドのＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、標的遺伝子サイレンシングを誘導するということを示し、可能化する。

【０３１９】

本発明に従う別の例では、ＳＯ１８６１（不安定）及びＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴ（不安定）を、ＨＥＲ２標的化抗体トラスツズマブにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,5}を、図１０に例解される通り本発明に従ってＳＫ－ＢＲ－３細胞（ＨＥＲ２）の細胞における向上したＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングについて試験した。トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,8}（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,5}は、トラスツズマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{4,4}単独と比較して、ＳＫ－ＢＲ－３細胞においてＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（ＩＣ５０＝９ｎＭ）（図６）。これは、本発明に従うＨＥＲ２標的化抗体へのＳＯ１８６１及びＨＳＰ２７ＢＮＡのコンジュゲート化が、標的細胞における治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドのＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、標的遺伝子サイレンシングを誘導するということを示し、可能化する。

【０３２０】

別の例では、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}を、図１１に例解される通り本発明に従ってＡ４３１（ＥＧＦＲ）細胞及びＡ２０５８（ＥＧＦＲ$^{-}$）細胞における向上したＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングについて試験した。セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{3,7}は、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{4}又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{3,7}単独と比較して、Ａ４３１細胞におけるＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（ＩＣ５０＝２ｎＭ）（図７Ａ）。Ａ２０５８細胞（ＥＧＦＲ$^{-}$）では、遺伝子サイレンシング活性は、高い（＞８０ｎＭ）濃度のセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ

２７ＢＮＡ）^{3,7}においてのみ観察された（ＩＣ５０＝１００ｎＭ；図７Ｂ）。これは、高ＥＧＦＲ発現細胞においては、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）３，７が、標的細胞における治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドのＳＯ１８６１により媒介される向上した細胞質送達を効率的に誘導し、標的遺伝子サイレンシングを誘導するということを示し、可能化する。

【０３２１】

例４

図８Ａ～Ｄは、トラスツズマブ（図８Ａ）、セツキシマブ（図８Ｂ）、又はＴ－ＤＭ１（図８Ｃ）、非コンジュゲート化タンパク質毒素、サポリン、ジアンチン、及び（非細胞結合）ＩｇＧ抗体にコンジュゲート化されたサポリン（図８Ｄ）が種々の癌細胞株ＳＫ－ＢＲ－３、ＪＩＭＴ－１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、Ａ４３１、ＣａＳｋｉ、ＨｅＬａ、Ａ２０５８に投与されるときの、相対的細胞生存率を表示している。

【０３２２】

トラスツズマブ及びセツキシマブは、細胞株のほとんどに暴露されたときに、細胞生存率に影響しないか又はほとんど影響しない。トラスツズマブが比較的高いドーズでＳＫ－ＢＲ－３細胞に暴露されるときには、ＨＥＲ２成長因子受容体の機能をブロックすることによって、細胞成長阻害に対するいくらかの効果を有する。セツキシマブが比較的高いドーズでＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞に暴露されるときには、ＥＧＦＲ成長因子受容体の機能をブロックすることによって、細胞成長阻害に対するいくらかの効果を有する。

【０３２３】

ＴＤＭ－１又はアドートラスツズマブエムタンシンは、ハーセプチン（化学名：トラスツズマブ）及びタキサン化学療法で先に処置されたＨＥＲ２陽性転移性乳癌；ハーセプチン及びタキサン化学療法でのネオアジュバント（術前）処置後に残存疾患が見出された場合の、術後の早期ＨＥＲ２陽性乳癌を処置するために米国食品医薬品局により認可された標的化治療である。ＴＤＭ－１は、ハーセプチン（トラスツズマブ）と化学療法薬エムタンシンとの組み合わせである。図８Ｃは、ＴＤＭ－１が、＞１０００ｐＭ濃度で試験した全ての細胞株について減少した細胞生存率をもたらすということを示す。

遊離の毒素サポリン及びジアンチン、並びに試験された細胞株上の細胞表面分子のいずれかに対して親和性を有さない対照ＩｇＧにカップリングされた毒素サポリンは、１００．０００ｐＭまでの試験された広範囲の濃度の毒素において、細胞生存率に対するいずれかの影響を有さないか、又はほとんど有さない（図８Ｄ）。

【０３２４】

例５

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}合成（図１３、１４、１５）

材料及び方法

略語

ＤＣＭ　ジクロロメタン

ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン

ＤＭＦ　Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド

ＥＤＣＩ・ＨＣｌ　３－（（エチルイミノ）メチレンアミノ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－１－アミニウムクロリド

ＥＭＣＨ．ＴＦＡ　Ｎ－（ε－マレイミドカプロン酸）ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩

ｍｉｎ　分

ｒ．　ｔ．　保持時間

ＴＣＥＰ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩

Ｔｅｍｐ　温度

ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸

ＴＨＦ　テトラヒドロフラン

【０３２５】

分析方法

ＬＣ－ＭＳ法１，[1]
装置：Ａｇｉｌｅｎｔ １２００ Ｂｉｎ．ポンプ：Ｇ１３１２Ａ、脱気装置；オートサンプラー、ＣｏｌＣｏｍ、ＤＡＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｇ１３１６Ａ、２１０、２２０、及び２２０～３２０ｎｍ、ＰＤＡ：２１０－３２０ｎｍ、ＭＳＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ ＬＣ／ＭＳＤ Ｇ６１３０Ｂ ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ １００－１０００；ＥＬＳＤ Ａｌｌｔｅｃｈ ３３００ガス流量 １．５ｍｌ／ｍｉｎ、ガスｔｅｍｐ：４０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ Ｃ１８、３０×２．１ｍｍ、３．５μｍ、Ｔｅｍｐ：３５℃、流量：１ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_0＝５％Ａ、$t_{1.6min}$＝９８％Ａ、t_{3min}＝９８％Ａ、ポストタイム：１．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、溶離液Ｂ：水中の０．１％ギ酸

【０３２６】
ＬＣ－ＭＳ法２，[2]
装置：Ａｇｉｌｅｎｔ １２６０ Ｂｉｎ．ポンプ：Ｇ７１１２Ｂ、マルチサンプラー、カラムＣｏｍｐ、ＤＡＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｇ７１１５Ａ、２１０、２２０、及び２２０－３２０ｎｍ、ＰＤＡ：２１０－３２０ｎｍ、ＭＳＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ ＬＣ／ＭＳＤ Ｇ６１３０Ｂ ＥＳＩ、質量範囲は産物の分子量に依存する：
[A]ｐｏｓ／ｎｅｇ １００－１０００
[B]ｐｏｓ／ｎｅｇ １００－１４００
；ＥＬＳＤ Ａｌｌｔｅｃｈ ３３００ガス流量１．５ｍｌ／ｍｉｎ、ガスｔｅｍｐ：４０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）Ｃ１８、３０×２．１ｍｍ、３．５μｍ、Ｔｅｍｐ：４０℃、流量：１ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_0＝５％Ａ、$t_{1.6min}$＝９８％Ａ、t_{3min}＝９８％Ａ、ポストタイム：１．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、溶離液Ｂ：水中の０．１％ギ酸

【０３２７】
ＬＣ－ＭＳ法３，[3]
装置：Ｗａｔｅｒｓ ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ ＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２ ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ ８００－１５００；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブｔｅｍｐ：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ Ｔｅｍｐ：２５℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_0＝５％Ａ、$t_{2.0min}$＝９８％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：０．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル、溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０３２８】
ＬＣ－ＭＳ法４，[4]
装置：Ｗａｔｅｒｓ ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ ＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２ ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ １５００－２５００；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブｔｅｍｐ：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ Ｔｅｍｐ：２５℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_0＝１５％Ａ、$t_{2.0min}$＝６０％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：０．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル、溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０３２９】
ＬＣ－ＭＳ法５，[5]
装置：Ｗａｔｅｒｓ ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ ＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２ ＥＳＩ、質量範囲は産物の分子量に依存する：
[A]ｐｏｓ／ｎｅｇ １５００－２５００
[B]ｎｅｇ ２０００－３０００

；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブｔｅｍｐ：５０℃；カラム：Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｃ１８、５０×２．１mm、１．７μｍ　Ｔｅｍｐ：６０℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_0＝２％Ａ、$t_{5.0min}$＝５０％Ａ、$t_{6.0min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：１．０ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル、溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０３３０】

調製方法

分取ＭＰ－ＬＣ法１，[1]

機器の型：Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）ｐｒｅｐ　ＭＰＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ　Ｃ１８（１４５×２５mm、１０μ）；流量：４０ｍＬ／ｍｉｎ；カラムｔｅｍｐ：室温；溶離液Ａ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウムｐＨ＝９．０）；溶離液Ｂ：９９％アセトニトリル水中の１％　１０ｍＭ重炭酸アンモニウム；勾配：t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝１０％Ｂ、t_{17min}＝５０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ；検出ＵＶ：２１０、２２５、２８５ｎｍ。

【０３３１】

分取ＭＰ－ＬＣ法２，[2]

機器の型：Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）ｐｒｅｐ　ＭＰＬＣ；カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＬＵＮＡ　Ｃ１８（３）（１５０×２５mm、１０μ）；流量：４０ｍＬ／ｍｉｎ；カラムｔｅｍｐ：室温；溶離液Ａ：水中の０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸、溶離液Ｂ：アセトニトリル中の０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸；勾配：t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝１０％Ｂ、t_{17min}＝５０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ；検出ＵＶ：２１０、２２５、２８５ｎｍ。

【０３３２】

分取ＬＣ－ＭＳ法１，[3]

ＭＳ機器の型：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｇ６１３０Ｂ四重極；ＨＰＬＣ機器型：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　１２９０分取ＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ（Ｃ１８、１００×３０mm、１０μ）；流量：２５ｍｌ／ｍｉｎ；カラムｔｅｍｐ：室温；溶離液Ａ：１００％アセトニトリル；溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウムｐＨ＝９．０；産物の極性に依存するｌｉｎ．勾配：

[A] t_0＝２０％Ａ、t_{2min}＝２０％Ａ、$t_{8.5min}$＝６０％Ａ、t_{10min}＝１００％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ

[B] t_0＝５％Ａ、t_{2min}＝５％Ａ、$t_{8.5min}$＝４０％Ａ、t_{10min}＝１００％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ

[C] t_0＝１０％Ａ、t_{2min}＝１０％Ａ、$t_{8.5min}$＝５０％Ａ、t_{10min}＝１００％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ

；検出：ＤＡＤ（２２０～３２０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ　ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づく画分収集。

【０３３３】

分取ＬＣ－ＭＳ法２，[4]

ＭＳ機器の型：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｇ６１３０Ｂ四重極；ＨＰＬＣ機器型：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　１２９０分取ＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｓｈｉｅｌｄ（Ｃ１８、１５０×１９mm、５μ）；流量：２５ｍｌ／ｍｉｎ；カラムｔｅｍｐ：室温；溶離液Ａ：１００％アセトニトリル；溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウムｐＨ＝９．０；ｌｉｎ．勾配：t_0＝５％Ａ、$t_{2.5min}$＝５％Ａ、t_{11min}＝４０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ；検出：ＤＡＤ（２２０～３２０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ　ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；フラクションコレクションに基づくＤＡＤ

【０３３４】

フラッシュクロマトグラフィー
Ｇｒａｃｅ　Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ　Ｘ２（登録商標）Ｃ－８１５　Ｆｌａｓｈ；溶媒送達系：３ピストンポンプ、オートプライミング、一ランで４つの独立したチャンネル、４つまでの溶媒、溶媒が枯渇したときにラインを自動切り替え；最大ポンプ流量２５０ｍＬ／ｍｉｎ；最大圧力５０ｂａｒ（７２５ｐｓｉ）；検出：ＵＶ２００～４００ｎｍ、４つまでのＵＶシグナルの組み合わせ、全ＵＶ範囲の走査、ＥＬＳＤ；カラムサイズ：装置上４－３３０ｇ、ルアー型、オプションホルダーによって７５０ｇから３０００ｇまで。
【０３３５】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成（図１３）
ＳＯ１８６１（１２１ｍｇ、０．０６５ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（１１０ｍｇ、０．３２５ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、３．００ｍＬ）及びＴＦＡ（０．０２０ｍＬ、０．２６０ｍｍｏｌ）を追加した。反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣ[1]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１２０ｍｇ、９０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０６９［Ｍ－１］[1-]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．０８[4]
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[4]合成（図１４）
【０３３６】
中間体１：
ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート
６－アジドヘキサン酸（０．９４３ｇ、６．００ｍｍｏｌ）、ＥＤＣＩ．ＨＣｌ（１．２１ｇ、６．３０ｍｍｏｌ）、及びＯｘｙｍａＰｕｒｅ（０．９３８ｇ、６．６０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１０．０ｍＬ）に溶解し、混合物を５分間撹拌した。次に、ＤＭＦ中のジ－ｔｅｒｔ－ブチル（アザンジイルビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート（１．８２ｇ、６．００ｍｍｏｌ）の溶液（５．００ｍＬ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。５時間後に、反応混合物を真空において蒸発させ、残渣を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（５０ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（２×５０ｍＬ）、及びブライン（５０ｍＬ）によって洗浄し、Na_2SO_4によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（酢酸エチル－ヘプタン勾配、１０：９０が１００：０まで上昇）により精製して、表題化合物（２．６７ｇ、１００％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９８％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２８７／３４３／４６５［Ｍ－１５５／Ｍ－９９／Ｍ２３］[1]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．０２[2A]
【０３３７】
中間体２：
Ｎ，Ｎ－ビス（２－アミノエチル）－６－アジドヘキサンアミド二塩酸塩
ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート（２．６６ｇ、６．００ｍｍｏｌ）に、イソプロパノール中のＨＣｌ（５－６　Ｎ、２０．０ｍＬ、１１０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。４時間後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物（１．４９ｇ、７９％）を白色固体として与えた。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４３［Ｍ１］[1]
【０３３８】
中間体３：
テトラ－ｔｅｒｔ－ブチル（（５Ｓ，５Ｓ）－（（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（６－オキソヘ

キサン－６，１，５－トリイル））テトラカルバメート
ＤＭＦ（３０．０ｍＬ）及びＤＩＰＥＡ（２．６２ｍＬ、１５．１ｍｍｏｌ）中のＮ，Ｎ－ビス（２－アミノエチル）－６－アジドヘキサンアミドジヒドロクロリド（１．１９ｇ、３．７６ｍｍｏｌ）の溶液に、Ｂｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＮｐ（３．６９ｇ、７．９０ｍｍｏｌ）を追加し、混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（１００ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を１Ｎ重硫酸カリウム溶液（１００ｍＬ）及び飽和重炭酸ナトリウム溶液（５×１００ｍＬ）によって洗浄し、Na_2SO_4によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、標題産物（３．０７ｇ、９１％）をわずかに黄色がかった固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９４％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：８００／９００／９２２［Ｍ－９９／Ｍ１／Ｍ２３］[1]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１７[2A]
【０３３９】
中間体４：
４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート
４－ニトロフェニルトリフルオロアセタート（５．１７ｇ、２２．０ｍｍｏｌ）及び３－（アセチルチオ）プロピオン酸（２．９６ｇ、２０．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（６．９７ｍＬ、４０．０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（５０ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（５×５０ｍＬ）、及びブライン（５０ｍＬ）によって洗浄し、Na_2SO_4によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、標題産物（４．９０ｇ、９１％）をわずかに黄色がかった固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２９２［Ｍ２３］[1]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９４[2A]
【０３４０】
中間体５：
（Ｓ）－２，６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミドテトラヒドロクロリド
テトラ－ｔｅｒｔ－ブチル（（５Ｓ，５’Ｓ）－（（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（６－オキソヘキサン－６，１，５－トリイル））テトラカルバメート（１．８０ｇ、２．００ｍｍｏｌ）を、イソプロパノール中のＨＣｌ（５－６Ｎ、５０．０ｍｌ、２７５ ｍｍｏｌ）に溶解し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物を白色固体として与えた。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２５０［Ｍ２］[2]，５００［Ｍ１］[1]
【０３４１】
中間体６：
（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］－Ｎ－［２－（６－アジド－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］ヘキサンアミド
ＤＭＦ（３０ｍＬ）及びＤＩＰＥＡ（３．４８ｍＬ、２０．０ｍｍｏｌ）中の（Ｓ）－２，６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）テトラヒドロクロリド（１．２９ｇ、２．００ｍｍｏｌ）の溶液に、４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）

プロパノエート（２．２６ｇ、８．４０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を週末をかけて室温で撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣をＤＣＭ／メタノール（９５：５ｖ／ｖ、１００ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（１００ｍＬ）、１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（３×１００ｍＬ）、及びブライン（１００ｍＬ）によって洗浄し、Na_2SO_4によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、表題産物（１．３３ｇ、６５％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳによって、１つの脱保護されたチオ酢酸基を有する産物に対応するｍ／ｚ値を有する不純物（１５％）が見出された。不純物は、ワークアップ中に又は後に形成された。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８５％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５１０［Ｍ２］^{2}，１０１９／１０４１［Ｍ１／Ｍ２３］^{1}

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．８６^{2B}

【０３４２】

中間体７：

Ｎ，Ｎ’－（（９Ｓ，１９Ｓ）－１４－（６－アミノヘキサノイル）－１－メルカプト－９－（３－メルカプトプロパンアミド）－３，１０，１８－トリオキソ－４，１１，１４，１７－テトラアザトリコサン－１９，２３－ジイル）ビス（３－メルカプトプロパンアミド）ホルマート

骨格２（１０２ｍｇ、０．１００ｍｍｏｌ）をメタノール（１．００ｍｌ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（０．４４０ｍｌ、０．４４０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（０．５００ｍｌ、０．５００ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を室温で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、メタノール（２×１０ｍＬ）と同時蒸発させた。残渣をメタノール／水の混合物（９：１ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）に溶解し、もたらされた溶液を分取ＭＰ－ＬＣ^{2}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（７５．６ｍｇ、８７％）を無色のネバネバした油として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９６％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５１３［Ｍ２］^{2}，８２５［Ｍ１］^{1}

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．４２^{2A}

【０３４３】

中間体８：

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}－アミン

Ｎ，Ｎ’－（（９Ｓ，１９Ｓ）－１４－（６－アミノヘキサノイル）－１－メルカプト－９－（３－メルカプトプロパンアミド）－３，１０，１８－トリオキソ－４，１１，１４，１７－テトラアザトリコサン－１９，２３－ジイル）ビス（３－メルカプトプロパンアミド）ホルマート（２．７３ｍｇ、３．１３μｍｏｌ）を、２０ｍＭ NH_4HCO_3の０．５ｍＭＴＣＥＰ／アセトニトリルとの混合物（３：１ｖ／ｖ、３．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（２９．２ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ^{3B}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１２．３ｍｇ、４３％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１５１７［Ｍ－６］$^{6-}$，１８２１［Ｍ－５］$^{5-}$，２２７６［Ｍ－４］$^{4-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．３９^{5A}

【０３４４】

中間体９：

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}－アジド

デンドロン（ＳＯ１８６１）$_{4}$－アミン（６．８１ｍｇ、０．７４８μｍｏｌ）及び２，５－ジオキソピロリジン－１－イル１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタ

デカン－１５－オアート（２．９０ｍｇ、７．４８μｍｏｌ）をＤＭＦ（１．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（１．３０２μＬ、７．４８μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3C]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５．８６ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９０％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３４４［Ｍ－４］[4－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．７８[5B]

【０３４５】

中間体１０：

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[4]－マレイミド１

デンドロン（ＳＯ１８６１）[4]－アミン（８．１２ｍｇ、０．８９１μｍｏｌ）及び２，５－ジオキソピロリジン－１－イル１－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－オアート（３．９４ｍｇ、８．９１μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（１．５５μＬ、８．９１μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3C]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（６．７６ｍｇ、８０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度６６％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３５８［Ｍ－４］[4－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１３[6C]

【０３４６】

中間体１１：

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[4]－マレイミド２

骨格２（５．１０ｍｇ、５．００μｍｏｌ）をメタノール（１００μＬ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（２２．０μＬ、２２．０μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（２５．０μＬ、２５．０μｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、メタノール（２×５ｍＬ）と同時蒸発させた。もたらされた残渣を、０．５ｍＭ ＴＣＥＰ／アセトニトリルとの２０ｍＭ NH_4HCO_3 の混合物（３：１ｖ／ｖ、３．２４２ｍＬ）に溶解した。この溶液から、直接的に、１０００μＬをＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（１４．４ｍｇ、６．９４μｍｏｌ、骨格と比較して４．５当量）に追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１０ｍｉｎ後に、反応混合物を一晩凍結乾燥した。もたらされた残渣に、２，５－ジオキソピロリジン－１－イル３－（２－（２－（３－（２，５－ジオキソ－２ｈ－ピロル－１（５ｈ）－イル）プロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパノエート（５．８４ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（１．００ｍＬ）を追加した。次に、ＤＩＰＥＡ（２．３９μＬ、０．０１４ｍｍｏｌ）を追加し、懸濁液を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3C]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１０．９ｍｇ、８５％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８０％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３５４［Ｍ－４］[4－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．１６[5B]

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[8]合成（図１５）

【０３４７】

中間体１：

ｔｅｒｔ－ブチルＮ－［（１Ｓ）－１－｛［（１Ｓ）－１－｛［２－（６－アジド－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［（２Ｓ）－２，６－ビス（｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝）ヘキサンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサン

アミド）エチル］カルバモイル｝－５－［（２Ｓ）－２，６－ビス（｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝）ヘキサンアミド］ペンチル］カルバモイル｝－５－｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝ペンチル］カルバメート
（Ｓ）－２－６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミドテトラヒドロクロリド（９６４ｍｇ、１．５０ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２５．０ｍＬ）及びトリエチルアミン（２．０８ｍＬ、１５．０ｍｍｏｌ）に溶解した。次に、Ｂｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＮｐ（３．３６ｇ、７．１８ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、表題産物（２．７１ｇ、１００％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：８０７［Ｍ－１９８］^{2}
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．３５^{2B}
【０３４８】
中間体２：
（２Ｓ，２’Ｓ）－Ｎ，Ｎ’－（（５Ｓ，１５Ｓ，２２Ｓ）－２２，２６－ジアミノ－１０－（６－アジドヘキサノイル）－１５－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）－６，１４，２１－トリオキソ－７，１０，１３，２０－テトラアザヘキサコサン－１，５－ジイル）ビス（２，６－ジアミノヘキサンアミド）オクタヒドロクロリド
中間体１（２．７１ｇ、１．５０ｍｍｏｌ）を、イソプロパノール中のＨＣｌ（５－６Ｎ、２５．０ｍｌ、１３８ｍｍｏｌ）に溶解し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。次に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物を白色固体として与えた。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０３／２５４［Ｍ－２００／Ｍ４］^{4}，３３８［Ｍ３］^{3}，５０７［Ｍ２］^{2}，１０１２［Ｍ１］^{1}
【０３４９】
中間体３：
（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］－Ｎ－［（１Ｓ）－１－｛［２－（６－アジド－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］カルバモイル｝－５－［（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］ペンチル］ヘキサンアミド
（２Ｓ，２’Ｓ）－Ｎ，Ｎ’－（（５Ｓ，１５Ｓ，２２Ｓ）－２２，２６－ジアミノ－１０－（６－アジドヘキサノイル）－１５－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）－６，１４，２１－トリオキソ－７，１０，１３，２０－テトラアザヘキサコサン－１，５－ジイル）ビス（２，６－ジアミノヘキサンアミド）オクタヒドロクロリド（３００ｍｇ、０．２３０ｍｍｏｌ）に、ＤＭＦ（２０．０ｍＬ）、トリエチルアミン（３２０μｌ、２．３０ｍｍｏｌ）、及び４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート（５９５ｍｇ、２．２１ｍｍｏｌ）を追加した。もたらされた懸濁液を６０℃で３０ｍｉｎソニケーションし、室温で一晩撹拌させた。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を、最初にフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）を行うこと、次に分取ＭＰ－ＬＣ^{2}によって精製して、表題産物（７０ｍｇ、１５％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：６８５［Ｍ３］^{3}
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９１^{2A}
【０３５０】
中間体４：

（２Ｓ）－Ｎ－［（１Ｓ）－１－｛［２－（６－アミノ－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［（２Ｓ）－２，６－ビス（３－スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］カルバモイル｝－５－［（２Ｓ）－２，６－ビス（３－スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミド］ペンチル］－２，６－ビス（３－スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミドホルマート
骨格４（１０．０ｍｇ、４．８７μｍｏｌ）をメタノール（２００μＬ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（４２．９μＬ、０．０４３ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（２４．４μＬ、０．０２４ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を水（１ｍＬ）で希釈し、直接的に分取ＭＰ－ＬＣ[2]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（４．０２ｍｇ、４８％）を白色の綿毛状の固体として与えた。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５６４［Ｍ３］[3]，８４６［Ｍ２］[2]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．５４[2C]
【０３５１】
中間体５：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[8]－アミン
骨格５（０．５２ｍｇ、０．２９９μｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（２９．２ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を、２０ｍＭ　NH_4HCO_3の０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ／アセトニトリルとの混合物（３：１ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＣＥＰ（０．３０ｍｇ、１．０５μｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪した。次に、混合物を、直接的に分取ＬＣ－ＭＳ[3B]に付した。産物に対応する画分を、直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（２．１７ｍｇ、４０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２２８２［Ｍ－８］[8－]，２６０７［Ｍ－７］[7－]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．４１[5A]
【０３５２】
例６
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ合成（図１６）
材料及び方法
三官能性リンカー
三官能性リンカー（ＤＢＣＯ、ＴＣＯ、マレイミド）はＢｉｏ－Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｉｎｃ．（ルイスビル、テキサス）に注文した。
ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴ
ＨＳＰ２７ＢＮＡ（－チオール）オリゴ（配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’）（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）を、Ｂｉｏ－ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｉｎｃ．（ルイスビル、テキサス）から購入した。
【０３５３】
中間体１：
ＳＯ１８６１－アジド
ＳＯ１８６１　６０ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ））及び１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－ヒドラジド（３９．３ｍｇ、０．１２９ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、１．００ｍＬ）及びＴＦＡ（９．８６μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣ[1]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１５０［Ｍ－１］[1－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．１０[3B]
【０３５４】
中間体２：
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー
ＳＯ１８６１－アジド（４５ｍｇ、０．０２１ｍｍｏｌ）及び三官能性リンカー（２６．５ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２．５０ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3C]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６７７［Ｍ－２］[2－]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５４[6A]
【０３５５】
中間体３：
（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド
１－（４－ホルミルベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（２８．０ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（２４．５ｍｇ、０．０７２ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、２．００ｍＬ）及びＴＦＡ（１１．１μＬ、０．１４５ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を５０℃で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされた残渣をＭＰ－ＬＣ[1]により精製した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（３３．４ｍｇ、８８％）を鮮紫色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：３９４［Ｍ２］[2]，７８９［Ｍ１］[1]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．２８[7A]
【０３５６】
中間体４：
メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ
ＨＳＰ２７　ＢＮＡオリゴジスルフィド（７０．０ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）を２０ｍＭ NH_4HCO_3（２０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＴＣＥＰ（１４．３ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルター（５０００×ｇ、３０ｍｉｎ）を用いることによって濾過した。次に、２．５ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ NH_4HCO_3の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を上に記載されている同じ条件下で再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ NH_4HCO_3（３０．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を、アセトニトリル（１０．０ｍＬ）中の（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１４．８ｍｇ、１８．８μｍｏｌ）の溶液に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を凍結し、週末をかけて凍結乾燥して、クルードな表題産物をピンク色の綿毛状の固体として与えた。クルードな産物に２０ｍＭ NH_4HCO_3（２０．０ｍＬ）を追加し、もたらされた懸濁液を０．４５μｍシリンジフィルターで濾過した。濾液を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて濾過した。次に、再び、２０ｍＭ NH_4HCO_3の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を、上に記載されて

いる同じ条件によって遠心フィルターを用いて再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　ＮＨ$_4$ＨＣＯ$_3$（２０．０ｍＬ）で希釈し、もたらされた混合物を一晩凍結乾燥して、表題産物（９０．０ｍｇ、１１５％）をピンク色の綿毛状の固体として生んだ。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９１％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６３１［Ｍ－４］$^{4-}$，２１７４［Ｍ－３］$^{3-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．７３^{7B}

【０３５７】

中間体５：

ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ

メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ（９０．０ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－三官能性リンカー（４８．６ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（４：１ｖ／ｖ、１２．０ｍＬ）の混合物に溶解した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１５ｍｉｎ後に、混合物を分取ＬＣ－ＭＳ^{4A}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（８２．０ｍｇ、６０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％（両方のｍ／ｚ値が表題化合物に対応する、２つのピーク）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６４１［Ｍ－６］$^{6-}$，１９７０［Ｍ－５］$^{5-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．２４及び３．４０^{6B}

【０３５８】

中間体１：

ＳＯ１８６１－アジド

ＳＯ１８６１　６０ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ））及び１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－ヒドラジド（３９．３ｍｇ、０．１２９ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、１．００ｍＬ）及びＴＦＡ（９．８６μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣ^{1}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１５０［Ｍ－１］$^{1-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．１０^{3B}

【０３５９】

中間体２：

ＳＯ１８６１－三官能性リンカー

ＳＯ１８６１－アジド（４５ｍｇ、０．０２１ｍｍｏｌ）及び三官能性リンカー（２６．５ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２．５０ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ^{3C}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８９％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６７７［Ｍ－２］$^{2-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５４^{6A}

【０３６０】

中間体３：

（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド

１－（４－ホルミルベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（２８．０ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（２４．５ｍｇ、０．

０７２ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、２．００ｍＬ）及びＴＦＡ（１１．１μＬ、０．１４５ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を５０℃で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされた残渣をＭＰ－ＬＣ[1]により精製した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（３３．４ｍｇ、８８％）を鮮紫色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：３９４［Ｍ２］[2]，７８９［Ｍ１］[1]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．２８[7A]

【０３６１】

中間体４：

メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ

ＨＳＰ２７　ＢＮＡオリゴジスルフィド（７０．０ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）を２０ｍＭ NH_4HCO_3（２０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＴＣＥＰ（１４．３ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルター（５０００×ｇ、３０ｍｉｎ）を用いることによって濾過した。次に、２．５ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　NH_4HCO_3の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を上に記載されている同じ条件下で再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　NH_4HCO_3（３０．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を、アセトニトリル（１０．０ｍＬ）中の（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１４．８ｍｇ、１８．８μｍｏｌ）の溶液に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を凍結し、週末をかけて凍結乾燥して、クルードな表題産物をピンク色の綿毛状の固体として与えた。クルードな産物に２０ｍＭ　NH_4HCO_3（２０．０ｍＬ）を追加し、もたらされた懸濁液を０．４５μｍシリンジフィルターで濾過した。濾液を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて濾過した。次に、再び、２０ｍＭ　NH_4HCO_3の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　NH_4HCO_3（２０．０ｍＬ）で希釈し、もたらされた混合物を一晩凍結乾燥して、表題産物（９０．０ｍｇ、１１５％）をピンク色の綿毛状の固体として生んだ。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９１％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６３１［Ｍ－４］[4－]，２１７４［Ｍ－３］[3－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．７３[7B]

【０３６２】

中間体５：

ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ

メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ（９０．０ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－三官能性リンカー（４８．６ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（４：１ｖ／ｖ、１２．０ｍＬ）の混合物に溶解した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１５ｍｉｎ後に、混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[4A]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（８２．０ｍｇ、６０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％（両方のｍ／ｚ値が表題化合物に対応する、２つのピーク）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６４１［Ｍ－６］[6－]，１９７０［Ｍ－５］[5－]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．２４及び３．４０[6B]

【０３６３】

例７

ＳＯ１８６１－ＢＮＡオリゴコンジュゲート化

ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴジスルフィド（１．１０ｍｇ、０．１８７μｍｏｌ）を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　NH_4HCO_3（５００μＬ）に溶解し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１時間後に、反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いることによって濾過した（１４０００×ｇ、３０ｍｉｎ）。残渣溶液を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　NH_4HCO_3（５００μＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を再び上に記載されている同じ条件下で濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　NH_4HCO_3／アセトニトリル（３：１ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物をＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（３．５４ｍｇ、０．３７５μｍｏｌ）に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ^{4A}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１．２５ｍｇ、８５％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１５６１［Ｍ－５］$^{5-}$，１９５１［Ｍ－４］$^{4-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．４６^{6B}

【０３６４】

デンドロン（ＳＯ１８６１）４－ＢＮＡオリゴコンジュゲート（図１７）

ＨＳＰ２７　ＢＮＡオリゴジスルフィド（１．１ｍｇ、０．１８７μｍｏｌ）を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　NH_4HCO_3（５００μＬ）に溶解し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１時間後に、反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いることによって濾過した（１４０００×ｇ、３０ｍｉｎ）。残渣溶液を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　NH_4HCO_3（５００μＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を再び上に記載されている同じ条件下で濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　NH_4HCO_3／アセトニトリル（３：１ｖ／ｖ、１．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物をデンドロン（ＳＯ１８６１）４－マレイミド１（３．５４ｍｇ、０．３７５μｍｏｌ）に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ^{4A}に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１．２５ｍｇ、８５％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９４％

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１８９６［Ｍ－８］$^{8-}$，２１６７［Ｍ－７］$^{7-}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．７７^{6B}

デンドロン（ＮＥＭ）^{4}合成（図１８）

ベンジルビス（２－（（Ｓ）－２，６－ビス（３－メルカプトプロパンアミド）ヘキサンアミド）エチル）カルバメート（１．６９ｍｇ、２．００μｍｏｌ）及びＮ－エチルマレイミド（１．０５ｍｇ、８．４０μｍｏｌ）に、２０ｍＭ　NH_4HCO_3／アセトニトリル（３：１ｖ／ｖ、２．００ｍＬ）の混合物を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。２時間後に、反応混合物を一晩凍結乾燥した。もたらされた残渣を、分取ＬＣ－ＭＳ^{3A}を用いて精製して、表題化合物（１．５３ｍｇ、５７％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９８％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１３４６　［Ｍ１］^{1}

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．４３^{3A}

【０３６５】

例８

Ａ４３１マウス腫瘍マウスモデル並びにビトロ及びビボの遺伝子サイレンシング研究

材料及び方法

リンカーオリゴを有するＨＳＰ２７ＢＮＡ（配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’）（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）をＢｉｏ－Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｉｎｃ．（ルイスビル、テキサス）から購入した。

ビトロのＲＮＡ単離及び遺伝子発現分析

細胞からのＲＮＡを単離し、標準的なプロトコール（Ｂｉｏｒａｄ）に従って分析した。

ビボのマウス腫瘍モデル

マウス研究を、標準的なプロトコール及び手順に従ってＣｒｏｗｎＢｉｏ（中国）で行った。モデル：雌ＢＡＬＢ／ｃヌードマウスにおける皮下Ａ４３１ヒト類表皮癌ゼノグラフトモデル。腫瘍体積をモニタリングし、腫瘍サンプルを遺伝子サイレンシング分析のために収集した（下参照）。
マウスからの腫瘍サンプルのＲＮＡ単離及び遺伝子発現分析
トータルＲＮＡを、製造者の説明書に従ってＴｒｉＺｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて腫瘍から単離した。単離されたＲＮＡを、ヌクレアーゼ不含水（ＮＦＷ）に再懸濁した。ＲＮＡサンプルをゲル上でそれらのＲＮＡインテグリティについてチェックした。ｃＤＮＡを調製するために、最初に、１００ｎｇのトータルＲＮＡを、ＮＦＷ中に１２．５μｌの最終体積でランダムヘキサマー（Ｑｉａｇｅｎ；最終濃度２μＭ）と混合し、７０℃で５ｍｉｎ変性し、直ちに氷冷した。次に、４μｌの５×ＲＴ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）、０．４μｌの２５ｍＭ　ｄＮＴＰ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、１μｌの２００Ｕ／μＬ　ＭＭＬＶ　ＲＴ酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）、０．５μＬの４０Ｕ／μｌ　ＲＮＡｓｅ阻害剤（Ｐｒｏｍｅｇａ）、及び１．６μＬ　ＮＦＷからなる７．５μｌのｃＤＮＡ合成ミックスを追加した。次のｃＤＮＡ合成プロトコールを用いた：１）１０分２５℃、２）６０分３７℃、３）５分８５℃、４）無限４℃。
単一のｑＰＣＲ反応には、次のミックスを調製した：１μＬのｃＤＮＡ、０．０５μＬのフォワードプライマー（２５０μＭ）、０．０５μＬのリバースプライマー（２５０μＭ）、８．９μｌのＬＮＦＷ、１０μｌのＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）。次のｑＰＣＲプロトコールを用いた：１サイクル：５分９５℃、４０サイクル：１５ｓ　９５℃　３０ｓ　６０℃。
【０３６６】
ＨＳＰ２７遺伝子発現を、$2^{-(Ct_{HSP27}-GEOMEAN(Ct_{ref1};Ct_{ref2};Ct_{ref3};Ct_{ref4}))}$を用いて計算した。式中、ｒｅｆ１、ｒｅｆ２、ｒｅｆ３、及びｒｅｆ４は、腫瘍の分析のための参照遺伝子ＩＭＭＴ、ＥＩＦ２Ｓ２、ＧＵＳＢ、及びＵＢＣである。この腫瘍サンプルについて最も理想的かつ安定な参照遺伝子を選ぶために、試験された９つの参照遺伝子の中から、４つの参照遺伝子をＧｅＮＯＲＭ分析の性能に基づいて選んだ。そうするためには、ｑＰＣＲ結果をＱｂａｓｅソフトウェアプログラムにインポートした。これによって、２つの品質尺度が計算される：正規化された参照遺伝子発現レベルの変動係数（Ｖ）；及びｇｅＮｏｒｍ安定性Ｍ値（Ｍ）１である。Ｍ＜０．２及びＶ＜０．１５を有する参照遺伝子は非常に安定だと考えられる。この分析に基づいて、ＩＭＭＴ及びＥＩＦ２Ｓ２を最も安定な参照遺伝子として選んだ。しかしながら、ＵＢＣ及びＧＵＳＢをもまた参照遺伝子のグループに追加して、正規化の正確度をさらに向上させた。各サンプルはＣＦＸ９６リアルタイムｑＰＣＲマシン（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によってテクニカルトリプリケートとして分析した。
【０３６７】

【表３９】

表１．　ｑＰＣＲに用いられたプライマーを下に示す：

遺伝子	プライマー	配列（５’－３’）
ＵＢＣ	フォワード	ＣＡＧＣＣＧＧＧＡＴＴＴＧＧＧＴＣＧ
	リバース	ＣＡＣＧＡＡＧＡＴＣＴＧＣＡＴＴＧＴＣＡＡＧＴ
ＧＵＳＢ	フォワード	ＴＧＣＧＴＡＧＧＧＡＣＡＡＧＡＡＣＣＡＣ
	リバース	ＧＧＧＡＧＧＧＧＴＣＣＡＡＧＧＡＴＴＴＧ
ＩＭＭＴ	フォワード	ＡＡＣＣＣＡＣＡＣＣＴＧＣＡＣＴＴＴＣＡ
	リバース	ＴＴＴＴＣＣＴＧＴＴＧＴＧＣＡＡＧＧＣＧ
ＥＩＦ２Ｓ２	フォワード	ＣＣＡＣＡＡＧＴＣＧＴＣＣＧＡＧＴＡＧＧ
	リバース	ＧＧＡＧＡＴＧＴＴＴＧＧＧＣＴＧＡＣＧＡ
ＨＳＰ２７	フォワード	ＧＣＡＧＴＣＣＡＡＣＧＡＧＡＴＣＡＣＣＡ
	リバース	ＴＡＡＧＧＣＴＴＴＡＣＴＴＧＧＣＧＧＣＡ

【０３６８】

例９

コンジュゲート合成

モノクローナル抗体、ＳＯ１８６１、ＱＳサポニン

トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））、及びＴ－ＤＭ１（Ｋａｄｃｙｌａ（登録商標））を、薬局（Ｃｈａｒｉｔｅ、ベルリン）から購入した。ＣＤ７１モノクローナル抗体をＢｉｏＣｅｌｌから購入した（Ｏｋｔ９、＃ＢＥ００２３）。ＳＯ１８６１は、Ｓａｐｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ Ｌ．から得た生の植物抽出物から、Ａｎａｌｙｔｉｃｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ＧｍｂＨによって単離及び精製された。Ｑｕｉｌｌａｊａ Ｓａｐｏｎａｒｉａサポニン抽出物（ＱＳミックス）を購入した（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、＃Ｓ４５２１）。

【０３６９】

材料

トラスツズマブ（Ｔｒａｓ、ハーセプチン（登録商標）、Ｒｏｃｈｅ）、セツキシマブ（Ｃｅｔ、アービタックス（登録商標）、Ｍｅｒｃｋ ＫＧａＡ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンヒドロクロリド（ＴＣＥＰ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、５，５′－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ、エルマン試薬、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｚｅｂａ（商標）スピン脱塩カラム（２ｍＬ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４－１２％ビス－トリスプロテインゲル（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）ＭＥＳ ＳＤＳ泳動緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｎｏｖｅｘ（商標）Ｓｈａｒｐ染色済みタンパク質標準（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＰａｇｅＢｌｕｅ（商標）タンパク質染色溶液（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，４－ジチオスレイトール（ＤＴＴ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、セファデックスＧ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、セファデックスＧ５０Ｍ

（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、セファデックス２００Ｐ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、イソプロピルアルコール（ＩＰＡ、９９．６％、ＶＷＲ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（トリス・ＨＣＬ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｌ－ヒスチジン（９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｄ－（）－トレハロース脱水物（９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート（ＴＷＥＥＮ ２０、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＤＰＢＳ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、グアニジン塩酸塩（９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物（ＥＤＴＡ－Ｎａ２、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、無菌フィルター０．２μｍ及び０．４５μｍ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ジアンチン－Ｃｙｓ（Ｄｉａ－Ｃｙｓ。単一のＣ末端システイン官能基を有するジアンチン変異体、Ｐｒｏｔｅｏｇｅｎｉｘ）、Ｖｉｖａｓｐｉｎ Ｔ４及びＴ１５濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ＰＧ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、テトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＰＥＧ４－ＳＰＤＰ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド（Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）、［Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ，Ｎ－テトラメチルウロニウム－ヘキサフルオロホスファート］（ＨＡＴＵ、９７％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｎ－（２－アミノエチル）マレイミドトリフルオロ酢酸塩（ＡＥＭ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｌ－システイン（９８．５％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、脱イオン水（ＤＩ）はＵｌｔｒａｐｕｒｅ Ｌａｂ Ｗａｔｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＭｉｌｌｉＱ、Ｍｅｒｃｋ）から新しく取った、ニッケル－ニトリロトリ酢酸アガロース（Ｎｉ－ＮＴＡアガロース、Ｐｒｏｔｉｎｏ）、グリシン（９９．５％、ＶＷＲ）、５，５－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸（エルマン試薬、ＤＴＮＢ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｓ－アセチルメルカプトコハク酸無水物フルオレセイン（ＳＡＭＳＡ試薬、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、重炭酸ナトリウム（９９．７％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、炭酸ナトリウム（９９．９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＰＤ ＭｉｎｉＴｒａｐ脱塩カラム－セファデックスＧ－２５樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、ＰＤ１０ Ｇ２５脱塩カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、Ｚｅｂａスピン脱塩カラム０．５、２、５、及び１０ｍＬ（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｖｉｖａｓｐｉｎ遠心フィルターＴ４ １０ｋＤａ ＭＷＣＯ、Ｔ４ １００ｋＤａ ＭＷＣＯ、及びＴ１５（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｂｉｏｓｅｐ ｓ３０００ ａＳＥＣカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）、Ｖｉｖａｃｅｌｌ限外濾過ユニット１０及び３０ｋＤａ ＭＷＣＯ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｎａｌｇｅｎｅ Ｒａｐｉｄ－Ｆｌｏｗフィルター（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）。

【０３７０】

方法

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ

マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）スペクトルを、ＭＡＬＤＩ－質量分析計（Ｂｒｕｋｅｒ Ｕｌｔｒａｆｅｘ ＩＩＩ）で記録した。典型的には、ナノモルからマイクロモル範囲でＭｉｌｌｉＱ水に溶解したサンプルを、液滴乾燥法によって、アセトニトリル（ＭＡＤＬＩ－ＴＯＦ－ＭＳ試験済み、Ｓｉｇｍａ）／０．１％ＴＦＡ（７：３ｖ／ｖ）に溶解したマトリックスとしてｓｕｐｅｒ－ＤＨＢ（９９％、Ｆｌｕｋａ）又はシナピン酸（ＳＡ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）どちらかを用いて、ターゲット（ＭＴＰ３８４ターゲットプレート研磨済みスチールＴＦ、Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｓ）上にスポットした。ＰｅｐＭｉｘ（ペプチド較正標準、Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｓ）又はＰｒｏｔｅＭａｓｓ（タンパク質較正標準、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）が較正標準としての用をなした。ＲＰモードはリフレクターのポジ

ティブモードを言う。ＲＮモードはリフレクターのネガティブモードを言う。ＬＰモードはリニアポジティブモードを言う。

【０３７１】

透析

再生セルロース膜：ＭＷＣＯ＝１及び２ｋＤａ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ）及びＭＷＣＯ＝１２～１４ｋＤａ（Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）を用いて透析を行った。典型的には、透析は１Ｌの溶媒で２４ｈ行い、これはプロセスの最初の６ｈの後に交換した。

【０３７２】

凍結乾燥

凍結乾燥は、Ａｌｐｈａ　１－２　ＬＤ　ｐｌｕｓ（Ｍａｒｔｉｎ　Ｃｈｒｉｓｔ　Ｇｅｆｒｉｅｒｔｒｏｃｋｎｕｎｇｓａｎｌａｇｅｎ　ＧｍｂＨ）で行った。典型的には、サンプルを液体窒素で凍結し、高真空で凍結乾燥機内に置いた。

【０３７３】

ＵＶ－Ｖｉｓ

吸光度測定は、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｌａｍｂｄａ　２５　ＵＶ－Ｖｉｓによって又はＴｈｅｒｍｏ　ＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－２０００分光光度計によって、２００～７５０ｎｍのスペクトル範囲で行った。

【０３７４】

濃度は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｎａｎｏｄｒｏｐ　２０００又はＬａｍｂｄａ　２５分光計を用いて、次のパラメータを用いて決定された：

トラスツズマブ　OD_{280}＝１．５（ｍｇ／ｍｌ）$^{-1}$　cm^{-1}

セツキシマブ　OD_{280}＝１．４（ｍｇ／ｍｌ）$^{-1}$　cm^{-1}

ＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド　OD_{260}＝１５３，０００　M^{-1}　cm^{-1}；$Rz_{260:280}$＝１．８１９

Ｄｉａ－Ｃｙｓ　OD_{280}＝０．５７（ｍｇ／ｍｌ）$^{-1}$　cm^{-1}

PEG_4－ＳＰＤＰ（ＰＤＴ）OD_{343}＝８，０８０　M^{-1}　cm^{-1}

ＳＡＭＳＡ－フルオレセイン　OD_{495}＝６４，５００　M^{-1}　cm^{-1}；$Rz_{280:495}$＝０．２３２

エルマン（ＴＮＢ）OD_{412}＝１４，１５０　M^{-1}　cm^{-1}

固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＣＡ）

ニッケル－ニトリロ三酢酸（Ｎｉ－ＮＴＡ）クロマトグラフィーを行って、ヒスチジンタグ付きタンパク質及びタンパク質コンジュゲートを精製した。手短には、Ｎｉ－ＮＴＡアガロース（１０ｍＬ）を、５ｍＬベッド体積の重力流カラムへとピペッティングした。樹脂を２０ｍＬの脱イオン水で洗浄し、５ｍＬの１００ｍＭ　ＮｉＳＯ４溶液を再充填した。樹脂を５ｍＬの脱イオン水で再び５回洗浄し、ＤＰＢＳで５回平衡化した。タンパク質溶液を、４℃で３０ｍｉｎ、回転する洗浄済みＮｉ－ＮＴＡアガロースとインキュベーションした。その後、Ｎｉ－ＮＴＡタンパク質溶液を重力流カラムへと再びピペッティングした。フロースルーを収集し、樹脂を５ｍＬのＤＰＢＳで３回洗浄した。それから、固定化されたサンプルを、イミダゾール濃度を５０ｍＬの１２５ｍＭ、ｐＨ８から５０ｍＬの２５０ｍＭ、ｐＨ８まで増大させることによって溶出した。溶出画分をＰＢＳ　ｐＨ７．４に対して透析して、精製サンプルを得た。

【０３７５】

サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を、ＡＫＴＡ精製装置によって行った。サンプルを、Ｂｉｏｓｅｐ　ＳＥＣ－Ｓ３０００カラム又はセファデックスＧ５０Ｍカラム（１０×４０ｃｍ）どちらかを用いたＳＥＣによって分析した。ＴＢＳ／イソプロピルアルコール溶液（８５：１５　ｖ／ｖ）で溶出した。サンプル純度は、トレースのアグリゲートピークに対して抗体サンプルピークの積分により決定した。

【０３７６】

エルマンアッセイ

エルマン試験（又はエルマンアッセイ）を行って、分光光度法によりサンプル中のチオール濃度を定量的に決定した。チオールの存在は、チオールの存在下でのエルマン試薬からの２－ニトロ－５－チオベンゾエート（ＴＮＢ）の化学量論的放出によって指示された。ＴＮＢは、緩衝系において、４１２ｎｍの吸収極大及びOD_{412}＝１４，１５０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を得る。手短には、リン酸緩衝液（０．１Ｍ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）中のエルマン試薬（５，５－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）、ＤＴＮＢ）の０．５ｍｇ／ｍＬ溶液の２μＬを、緩衝液中のチオール含有サンプル２０μＬと混合した。混合物を５ｓｅｃボルテックスした。それから、４１２ｎｍのＵＶ－Ｖｉｓ吸光度をＴｈｅｒｍｏ　Ｎａｎｏｄｒｏｐ　２０００で測定して、ＴＮＢ濃度、それゆえにサンプルのチオール含量を決定した。

【０３７７】

ジアンチン産生

ジアンチンを細菌培養によって発現させ、タンパク質を、当分野で公知の従来の細胞培養及びタンパク質精製ステップを踏襲して精製した。

【０３７８】

サポリンコンジュゲートの産生

カスタムトラスツズマブ－サポリン、セツキシマブ－サポリン、ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンコンジュゲートは、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（サンディエゴ、ＣＡ）から産生及び購入された。ＩｇＧ－サポリン及びサポリンは、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した。

抗体－（Ｃｙｓ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_n$）$_n$合成

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを樹状サポニン（デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－マレイミド）にテトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（PEG_4－ＳＰＤＰ）リンカーを介してコンジュゲート化し、Ａｂ及び樹状サポニン間のチオール－エンマイケル型反応を行なった。セツキシマブ－（Ｓ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$について手順を例示的に記載する：

セツキシマブをＤＰＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液中で脱塩し、それから２．５０ｍｇ／ｍｌに正規化した。Ａｂのアリコート（９．１９ｍｇ、６１ｎｍｏｌ）に、新しく調製したPEG_4－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（５．０ｍｇ／ｍｌ、６．７０モル当量、４１１ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で６０分間インキュベーションした。インキュベーション後に、反応をグリシン（２０ｍｇ／ｍｌ、７．７μｌ）の追加によってクエンチし、それから、ＳＰＤＰ部分をＴＣＥＰ（５．０ｍｇ／ｍｌ、ＳＰＤＰ当たり４．０モル当量、１．６４μｍｏｌ）の追加によってインサイチュ還元した。この混合物を、ローラー混合によって２０℃で１５分間ローラー混合した。もたらされたＡｂ－ＳＨを、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いたＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。Ａｂ－ＳＨを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによってキャラクタリゼーションした（チオール対Ａｂ比＝５．４）。バルクＡｂ－ＳＨ（７．４１ｍｇ、１．９３ｍｇ／ｍｌ、４９ｎｍｏｌ）に、ＤＭＳＯ中の新しく調製したデンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－マレイミド溶液のアリコートを追加し（１０ｍｇ／ｍｌ、Ａｂ当たり８．０モル当量、０．４μｍｏｌ、３．１６ｍｇ、０．３２ｍｌ）、混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で一晩インキュベーションした。コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．２５ｍｇ、１．６７ｎｍｏｌ）をコンジュゲート化の前に取り分け、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（Ａｂ当たり８．０モル当量、１３．３　ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で一晩反応させ。（ＮＥＭの追加前に）１８時間のインキュベーション後に、クルードなコンジュゲート混合物を手短に遠心し、１００μｌアリコートをＵＶ－ｖｉｓによる分析のために取り出し、正及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$の組み込みを得た。バルクＡｂ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１

８６１）$_4$混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（２．５ｍｇ／ｍｌ、５．０モル当量、０．２５μｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３０ｃｍセファデックスＧ５０カラムにより精製して、精製されたセツキシマブ－（Ｓ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$コンジュゲートを与えた。産物を０．２μｍに濾過して清澄化し、それから、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ１５濃縮器を用いてｃａ．３ｍｇ／ｍｌに注意深く濃縮して（３，０００ｇ、５分インターバル、５℃）、最終的なセツキシマブ－（Ｓ－デンドロン（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$コンジュゲートを与えた。収量：４．４１ｍｇ、４８％。デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$対Ａｂ比＝４．４。

【０３７９】

【表４０】

表２．　まとめの反応アウトカム

バッチ	Ａｂ仕込み（ｍｇ）	ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰモル当量	デンドロン（ＳＯ１８６１）$_4$－マレイミドモル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度	収量
トラスツズマブ－（Ｃｙｓ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$	９．０	６．８１	８	４．７	９９．２％	２．３４ｍｇ（２６％）
セツキシマブ－（Ｃｙｓ－デンドロン－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$	９．２	６．７	８	４．４	９６．７％	４．４１ｍｇ（４８％）

【０３８０】

抗体－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}（図１２によって例解されている）

トラスツズマブ、セツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、１、２、３、４、５、及び６のＤＡＲで、マイケル型チオール－エンコンジュゲート化反応によってサポニンＳＯ１８１６１－ＥＭＣＨにコンジュゲート化した。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ分子は、サポニンとＡｂとの間に不安定な結合を生成する不安定な（Ｌ）ヒドラゾン結合をその構造とそのマレイミド官能基との間に得る。トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$について手順を例示的に記載する：

セツキシマブ（４０ｍｇ、８．０ｍｌ）の溶液に、それぞれ１０μｌ／ｍｌのトリス濃縮液（１２７ｍｇ／ｍｌ、１．０５Ｍ）、トリスＨＣｌ濃縮液（６２３ｍｇ／ｍｌ、３．９５Ｍ）、及びＥＤＴＡ－Ｎａ$_2$濃縮液（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を追加して、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液ｐＨ７．５を与えた。

【０３８１】

４つに分けたセツキシマブ（それぞれ９．７３ｍｇ、４．８６４ｍｇ／ｍｌ、６５ｎｍｏｌ）に、新しく調製したＴＣＥＰ溶液のアリコート（０．５～２．０ｍｇ／ｍｌ、１．１５～７．０２モル当量、７５～４５５ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で３００分間インキュベーションした。インキュベーション後に（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの追加前に）、Ａｂ－ＳＨのｃａ．１ｍｇ（０．２１０ｍｌ）アリコートを各混合物から取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過によって精製した。これらのアリコートを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションした（それぞれ、チオー

ル対Ａｂ比＝２．０、４．２、５．９、及び６．８）。バルクＡｂ－ＳＨのそれぞれに、新しく調製したＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ溶液のアリコート（２ｍｇ／ｍｌ、「チオール」当たり１．３モル当量、０．１５～０．６１μｍｏｌ、０．１６～０．６３ｍｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で１２０分間インキュベーションした。各コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．２５ｍｇ、１．６７ｎｍｏｌ）を、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（「チオール」当たり１．３モル当量、４．３～１７．４ｎｍｏｌ、２．２～８．７ μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ 溶液）又はＴＢＳ ｐＨ７．５緩衝液（２．２～８．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後に（ＮＥＭの追加前に）、Ａｂ－ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ混合物の０．２００ｍｌアリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートをＵＶ－ｖｉｓによりキャラクタリゼーションし、正の対照及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ組み込みを得た。バルクＡｂ－ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（２．５ｍｇ／ｍｌ、２．５～１０モル当量、０．１５～０．５８μｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａスピン脱塩カラムにより精製して、精製されたセツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）コンジュゲートを与えた。産物を２．５ｍｇ／ｍｌに正規化し、生物学的評価のために分注する前に０．２μｍに濾過した。

【０３８２】

【表４１】

表３． トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１コンジュゲートのまとめの反応条件及び結果

バッチ	Ａｂ仕込み	ＴＣＥＰ仕込みモル当量	ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_2$	９．９１ｍｇ６６ｎｍｏｌ	１．１０	０．１５μｍｏｌ	１．６	９９．２	７９
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_3$	９．９１ｍｇ６６ｎｍｏｌ	２．３５	０．３１μｍｏｌ	３．０	９９．０	８１
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$	９．９１ｍｇ６６ｎｍｏｌ	３．８３	０．４６μｍｏｌ	４．０	９８．４	８１
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_5$	９．９１ｍｇ６６ｎｍｏｌ	５．７７	０．６２μｍｏｌ	５．３	９８．５	７９

【０３８３】

【表４２】

表４．　セツキシマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１コンジュゲートのまとめの反応条件及び結果

バッチ	Ａｂ仕込み	ＴＣＥＰ仕込みモル当量	ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収　　量（％）
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_1$	９．７３ｍｇ６５ｎｍｏｌ	１．１５	０．１５μｍｏｌ	１．４	９９．７	７４
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_3$	９．７３ｍｇ６５ｎｍｏｌ	２．４９	０．３１μｍｏｌ	２．８	９９．６	８０
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$	９．７３ｍｇ６５ｎｍｏｌ	４．１９	０．４６μｍｏｌ	４．１	９９．０	７７
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_6$	９．７３ｍｇ６５ｎｍｏｌ	７．０２	０．６１μｍｏｌ	５．６	９８．３	８０

【０３８４】

抗体－（Ｓ－ＳＯ１８６１）^{n}合成

ＳＯ１８６１－Ｓ－Ｍａｌ合成

Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ　ＬからのＳＯ１８６１（１５．４ｍｇ、８．２８μｍｏｌ）及びＨＡＴＵ（１４０ｍｇ、３６８μｍｏｌ、４４．５モル当量）を固体として磁石撹拌子と共に２０ｍＬガラスバイアル内に置き、５ｍＬ　ＤＭＳＯを追加して材料を溶解させた。溶解した混合物を室温で３０ｍｉｎ撹拌した。３０ｍｉｎ後に、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＡＥＭ溶液（６５ｍｇ、２５６μｍｏｌ、３１モル当量）の１ｍＬを、撹拌しているＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ混合物に追加した。反応混合物を室温で１７時間撹拌した。１７時間の撹拌後に、混合物を脱イオン水で希釈し、１ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ７）を用いて脱イオン水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、溶液を凍結乾燥して白色粉末を得た。

【０３８５】

収量：７．２２ｍｇ（４４％）。

【０３８６】

乾燥したアリコートを、さらに、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるキャラクタリゼーションに用いた。

【０３８７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＮモード）（図ｘａ）：ｍ／ｚ　１９８３　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^-$，ＳＯ１８６１－Ｓ－Ｍａｌコンジュゲート），２１３６　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^-$，サポニン－Ｓ－Ｍａｌコンジュゲート）。

【０３８８】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＰモード）（図ｘｂ）：ｍ／ｚ　２００７　Ｄａ（［ＭＮａ］，ＳＯ１８６１－Ｓ－Ｍａｌコンジュゲート），２１０７　Ｄａ（［Ｍ－Ｎａ］，サポニン－Ｓ－Ｍａｌコンジュゲート）。

【０３８９】

マレイミド官能性を、精製ＳＯ１８６１－Ｓ－Ｍａｌを新しく調製したＬ－システイン溶液（１０００モル過剰）と混合することと、ｍ／ｚ　２１０３Ｄａにシステインコンジュゲートを生むＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図ｘ）における予想される質量シフトを観察することとによって検証した。

【０３９０】

抗体コンジュゲート化

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂをマイケル型チオール－エンコンジュゲート化反応によってサポニンＳＯ１８１６１－Ｓ－Ｍａｌにコンジュゲート化した。サポニンは、サポニンとＡｂとの間に安定な結合を生成する安定な（Ｓ）アミド結合をその構造とそのマレイミド官能基との間に得る。

【０３９１】

リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に溶解した５ｍｇのＡｂを、ｚｅｂａスピン脱塩カラムによってトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン緩衝食塩水（ＴＢＳ）ｐＨ７．５に緩衝液交換し、３ｍｇ／ｍＬの濃度に正規化した。Ａｂに、新しく調製したトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）溶液のアリコート（０．２５ｍｇ／ｍＬ、２．９２モル当量）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で９０ｍｉｎインキュベーションした。その後で、もたらされたＡｂ－ＳＨを、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。アリコートをエルマンアッセイにより分析して、スルフヒドリル含量を確かめた。得られたＡｂ－ＳＨを、コンジュゲート化のための１つの部分と対照のための０．２５ｍｇの２つのアリコートとに分割した。ＡＢ－ＳＨの主な部分には新しく調製したＳＯ１８６１－Ｓ－Ｍａｌ溶液のアリコート（２ｍｇ／ｍＬ、スルヒドリル含量に対して２モル当量）を追加し、第２の対照アリコートには緩衝液ＴＢＳ　ｐＨ７．５を追加した。各混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で２時間インキュベーションした。その後で、それぞれからのアリコートをエルマンアッセイにより分析して、対照に対して、コンジュゲート中に残っているスルフヒドリル含量を確かめた。ｚｅｂａスピン脱塩カラムによるゲル濾過によるダルベッコＰＢＳ　ｐＨ７．１への精製後に、Ａｂ－Ｓ－ＳＯ１８６１が得られた。コンジュゲートをさらにＳＥＣにより分析して、％純度を確かめた。

【０３９２】

トラスツズマブ－（Ｓ－ＳＯ１８６１）$_4$サンプルについて、９９％という純度が決定された。セツキシマブ－（Ｓ－ＳＯ１８６１）$_4$サンプルについて、９８．３％という純度が決定された。トラスツズマブ－（Ｓ－ＳＯ１８６１）$_4$（９．１ｍＬ）及びセツキシマブ－（Ｓ－ＳＯ１８６１）$_4$（８．８ｍＬ）の保持容量は類似であることが指摘された。非修飾Ａｂ（例えばＩｇＧ）と整合する。

【０３９３】

抗体－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）^{n}

ＤＡＲ４によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したトラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{4}、セツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{4}合成、及びＤＡＲ２によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したセツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{2}合成

トラスツズマブ、セツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、ＡｂとＨＳＰ２７　ＢＮＡとの間に不安定な（Ｌ）ジスルフィド結合を形成するテトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介してＨＳＰ２７　ＢＮＡジスルフィドにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）$_4$について手順を例示的に記載する：

ＨＳＰ２７　ＢＮＡジスルフィドオリゴ（２．７ｍｇ、４７０ｎｍｏｌ、６．１０ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（１０モル当量、４．７μｍｏｌ、１．３４ｍｇ、５０ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後に、オリゴ－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するＰＤ１０　Ｇ２５脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。オリゴ－ＳＨが得られた（２．４８ｍｇ、９０％、１．２４ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対オリゴ比＝０．８）。

トラスツズマブ（１．５ｍｇ、１０．３ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍｌ）（６．８１モル当量、７０．１ｎｍｏｌ、３９μｇ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後に、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の２ｍｇ／ｍｌの新しく調製した溶液の１５．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰのアリコートを取り出し、ＵＶ－Ｖｉｓ分析によって試験した。ＳＰＤＰ組み込みを、ピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）を遊離させるためのＴＣＥＰを用いて、及び３４３ｎｍでのＵＶ－ｖｉｓ分析によって、決定した（ＳＰＤＰ対Ａｂ比：４）。残りのＴｒａｓ－（Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）$_4$を、新しく調製したＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド（オリゴ－ＳＨ）のアリコート（８モル当量、８２．４ｎｍｏｌ、１．２４ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって一晩２０℃でインキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートをＵＶ－ｖｉｓ分析によって分析して、３４３ｎｍでのピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）の放出量によってＨＳＰ２７の組み込みを確かめた。クルードなコンジュゲートを、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３３ｃｍセファデックスＧ５０カラムを用いて精製した。もたらされたトラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$は単一画分として得られた。収率：ｎ．ｄ．。純度：９６％、ＨＳＰ２７　ＢＮＡ対Ａｂ比＝４．４。

【０３９４】

【表４３】

表５．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰモル当量	ＨＳＰ２７（オリゴ－ＳＨ）モル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収　量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）^{4}	６．８１	８	４．４	９６．０	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）^{4}	６．７０	８	３．９	９３．９	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）^{2}	２．３	３．６	１．５	９４．９	８７

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０３９５】

抗体－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ－Ｌ－ブロック）^{n}

トラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７－Ｌ－ブロック）^{4}、セツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７－Ｌ－ブロック）

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、以降では「ＨＳＰ２７－Ｍａｌ」と言われるマレイミド（Ｍａｌ）を持つＨＳＰ２７誘導体にコンジュゲート化した。Ａｂをマイケル型チオール－エンコンジュゲート化反応によってＨＳＰ２７－Ｍａｌにコンジュゲート化した。ＨＳＰ１７－Ｍａｌは、ＨＳＰ２７　ＢＮＡとＡｂとの間に不安定な結合を生成する不安定な（Ｌ）ヒドラゾン結合をその構造とそのマレイミド官能基との間に得る。トラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ブロック）^{n}について、手順を例示的に記載する：

トラスツズマブを、脱イオン水（ＤＩ）で２１ｍｇ／ｍｌに戻し、それから、ヒスチジン

緩衝液ｐＨ６を用いて５ｍｇ／ｍｌに希釈した。２０ｍｇ（４．０ｍｌ）アリコートに、それぞれ１０μｌ／ｍｌのトリス濃縮液（１２７ｍｇ／ｍｌ、１．０５Ｍ）、トリスＨＣｌ濃縮液（６２３ｍｇ／ｍｌ、３．９５Ｍ）、及びＥＤＴＡ－Na_2濃縮液（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を追加して、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液ｐＨ７．５を与えた。トラスツズマブ（２０．３０ｍｇ、４．９２０ｍｇ／ｍｌ、０．１４μｍｏｌ）に、新しく調製したＴＣＥＰ溶液のアリコート（１．００ｍｇ／ｍｌ、２．３５モル当量、０．３２μｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で９０分間インキュベーションした。インキュベーション後に（ＨＳＰ２７－Ｍａｌの追加前に）、Ａｂ－ＳＨのｃａ．２ｍｇ（０．４３９ｍｌ）アリコートを各混合物から取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによってキャラクタリゼーションした（チオール対Ａｂ比＝４．０）。バルクＡｂ－ＳＨ（５．１ｍｇ、３５ｎｍｏｌ）に、ＨＳＰ２７－Ｍａｌ誘導体のアリコート（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中に新しく調製、２ｍｇ／ｍｌ、「チオール」当たり１．３モル当量、１８２　ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それから１２０分間２０℃でインキュベーションした。トラスズマブ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ誘導体コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．５ｍｇ、３．３ｎｍｏｌ）を、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（「チオール」当たり１．３モル当量、１７．３ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後に（ＮＥＭの追加前に）、Ａｂ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ混合物の０．１００ｍｌアリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートをＵＶ－ｖｉｓによりキャラクタリゼーションし、正の対照及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ＨＳＰ２７組み込みを得た。バルクＡｂ－ＨＳＰ２７混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（０．２５ｍｇ／ｍｌ、２．５モル当量、８９ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３０ｃｍセファデックスＧ５０Ｍを用いたゲル濾過、次に１００ＫＤａ　ＭＷＣＯ濃縮器を用いた繰り返しの遠心濾過及び洗浄により精製して、精製トラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７－Ｌ－ブロック）$_4$コンジュゲートを与えた。生物学的評価のために分注する前に、産物を０．２μｍに濾過した。

【０３９６】

【表４４】

表６．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	Ａｂ－ＳＨ仕込み	チオール対Ａｂ比	ＨＳＰ２７－Ｍａｌ仕込み	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収　量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ブロック）$_4$	５．１ｍｇ　３５ｎｍｏｌ	３．９８	１．３６ｍｇ	３．６	９９．４	４０
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ－Ｌ－ブロック）$_4$	５．１ｍｇ　３５ｎｍｏｌ	４．１６	１．３６ｍｇ	３．６	９７．９	５０

【０３９７】

抗体－（Ｃｙｓ－三官能性リンカー－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ））$_n$

トラスツズマブ－［Ｓ－Ｔｒｉ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）］^{4}、トラスツズマブ－［Ｓ－Ｔｒｉ－（ブロック）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）］^{4}、セツキシマブ－［Ｓ－Ｔｒｉ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）］^{4}、セツキシマブ－［Ｓ－Ｔｒｉ－（ブロック）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）］^{4}
トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、マイケル型チオール－エン反応によって、以降では「ＨＳＰ２７－Ｍａｌ」と言われる２つの異なるマレイミド（Ｍａｌ）を持つＨＳＰ２７　ＢＮＡ誘導体にコンジュゲート化した。これらのＨＳＰ２７－Ｍａｌ誘導体は、すなわち：１）Ｍａｌ－三官能性リンカー－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）、２）Ｍａｌ－三官能性リンカー－（ブロック）－（Ｌ－ＨＳＰ２７）であった。トラスツズマブ－［Ｓ－三官能性リンカー－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）］^{4}について、手順を例示的に記載する：
トラスツズマブを、脱イオン水（ＤＩ）で２１ｍｇ／ｍｌに戻し、それから、ヒスチジン緩衝液ｐＨ６を用いて５ｍｇ／ｍｌに希釈した。２０ｍｇ（４．０ｍｌ）アリコートに、それぞれ１０μｌ／ｍｌのトリス濃縮液（１２７ｍｇ／ｍｌ、１．０５Ｍ）、トリスＨＣｌ濃縮液（６２３ｍｇ／ｍｌ、３．９５Ｍ）、及びＥＤＴＡ－Na_2濃縮液（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を追加して、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液ｐＨ７．５を与えた。

【０３９８】

トラスツズマブ（２０．３０ｍｇ、４．９２０ｍｇ／ｍｌ、０．１４μｍｏｌ）に、新しく調製したＴＣＥＰ溶液のアリコート（１．００ｍｇ／ｍｌ、２．３５モル当量、０．３２μｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で９０分間インキュベーションした。インキュベーション後に（構築物の追加前に）、Ａｂ－ＳＨのｃａ．２ｍｇ（０．４３９ｍｌ）アリコートを各混合物から取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。これらのアリコートを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションした（チオール対ａｂ比＝４．０）。バルクＡｂ－ＳＨを２つのアリコート（１．１ｍｇ、７．６　ｎｍｏｌ、及び１．２ｍｇ、８．３　ｎｍｏｌ）に分割し、各アリコートに、ＨＳＰ２７　ＢＮＡ－Ｍａｌ誘導体１－２（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中に新しく調製、２ｍｇ／ｍｌ、「チオール」当たり１．３モル当量、４０ｎｍｏｌ及び４３ｎｍｏｌ）のそれぞれのアリコートを追加し、混合物を手短にボルテックスし、それから１２０分間２０℃でインキュベーションした。トラスツズマブ－　ＨＳＰ２７　ＢＮＡ誘導体２コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．５ｍｇ、３．３ｎｍｏｌ）を、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（「チオール」当たり１．３モル当量、１７．３ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後に（ＮＥＭの追加前に）、Ａｂ－構築物２混合物の０．１００ｍｌアリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートをＵＶ－ｖｉｓによりキャラクタリゼーションし、正の対照及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ＨＳＰ２７　ＢＮＡ誘導体２組み込みを得た。各バルクＡｂ－構築物混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（０．２５ｍｇ／ｍｌ、２．５モル当量、１９及び２１ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３０ｃｍセファデックスＧ５０Ｍを用いたゲル濾過、次に１００ＫＤａ　ＭＷＣＯ濃縮器を用いた繰り返しの遠心濾過及び洗浄により精製して、精製されたトラスツズマブ－構築物１－２コンジュゲートを与えた。生物学的評価のために分注する前に、産物を０．２μｍに濾過した。

【０３９９】

【表４５】

表７．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	Ａｂ－ＳＨ仕込み	ＴＣＥＰ当量	チオール対ａｂ比	分析ＳＥＣによる純度（％）	収　量（％）
Ｔｒａｓ－［Ｓ－三官能性リンカー－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）］$_4$	１．１ｍｇ　７．６ｎｍｏｌ	２．３５	３．９８	９７．０	５７
Ｔｒａｓ－［Ｓ－三官能性リンカー－（ブロック）－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）］$_4$	１．２ｍｇ　８．３ｎｍｏｌ	２．３５	３．９８	９６．６	３３
Ｃｅｔ－［Ｓ－三官能性リンカー－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）］$_4$	１．１ｍｇ　７．６ｎｍｏｌ	２．７２	４．１６	９８．９	４７
Ｃｅｔ－［Ｓ－三官能性リンカー－（ブロック）－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）］$_4$	１．２ｍｇ　８．３ｎｍｏｌ	２．７２	４．１６	９９．１	５０

【０４００】

抗体－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ）^{n}

ＤＡＲ４によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{4}、セツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{4}合成、ＤＡＲ２によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したセツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}－（Ｌ－ＨＳＰ２７）^{2}（ＦＢＲ７０３　ＳＴＢ１７／７－８）合成

トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$、セツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$は以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、ＡｂとＨＳＰ２７　ＢＮＡの間に不安定な（Ｌ）ジスルフィド結合を形成するテトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２ピリジルジチオ）プロピオネート（ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介してＨＳＰ２７　ＢＮＡジスルフィドにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$について手順を例示的に記載する：

ＨＳＰ２７　ＢＮＡジスルフィドオリゴ（２．７ｍｇ、４７０ｎｍｏｌ、６．１０ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（１０モル当量、４．７μｍｏｌ、１．３４ｍｇ、５０ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後に、オリゴ－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するＰＤ１０　Ｇ２５脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。オリゴ－ＳＨが得られた（２．４８ｍｇ、９０％、１．２４ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対オリゴ比＝０．８）。

トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$（１．３ｍｇ、８．７ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍｌ）（９．２６モル当量、８０．３ｎｍｏｌ、４５μｍｏｌ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後に、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の

２ｍｇ／ｍｌの新しく調製した溶液の１５．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）のアリコートを取り出し、ＵＶ－Ｖｉｓ分析によって試験した。ＳＰＤＰ組み込みを、ピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）を遊離させるためのＴＣＥＰを用いて、及び３４３ｎｍでのＵＶ－ｖｉｓ分析によって、決定した（ＳＰＤＰ対Ａｂ比＝４）。

残りのＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）を、新しく調製したＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド（オリゴ－ＳＨ）のアリコート（８モル当量、５４．８ｎｍｏｌ、０．３２ｍｇ、１．２４ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって一晩２０℃でインキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートをＵＶ－ｖｉｓ分析によって分析して、３４３ｎｍにおけるピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）の放出量によってＨＳＰ２７の組み込みを確かめた。クルードなコンジュゲートを、ＤＰＢＳ ｐＨ７．５で溶出する１．６×３３ｃｍセファデックスＧ５０カラムを用いて精製した。もたらされたトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７ ＢＮＡ）$_4$は単一画分として得られた。収量：０．４７ｍｇ、４５％（０．４９ｍｇ／ｍｌ）、ＨＳＰ２７対Ａｂ比＝３．５。

【０４０１】

【表４６】

表８． まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰモル当量	ＨＳＰ２７（オリゴ－ＳＨ）モル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収 量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７ ＢＮＡ）$_4$	９．２６	８	３．５	８５．１	４５
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７ ＢＮＡ）$_4$	７．２１	８	３．８	８０．８	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７ ＢＮＡ）$_2$	３．３４	３．６	１．８	７６．２	８１

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０４０２】

抗体－（Ｌ－ＱＳミックス）$_n$

トラスツズマブ、セツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、マイケル型チオール－エンコンジュゲート化反応によってサポニンＱＳミックス－ＥＭＣＨにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－Ｌ－ＱＳミックスについて手順を例示的に記載する：

トラスツズマブ（「Ａｂ」、６００ｍｇ）を脱イオン水（ＤＩ）で２１ｍｇ／ｍＬに戻し、それから、新しく調製したヒスチジン緩衝液ｐＨ ６（５ｍＭヒスチジンｐＨ６、２％

トレハロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ　２０）を用いて５ｍｇ／ｍＬに希釈した。それぞれ１０μＬ／ｍＬのトリス濃縮液（１２７ｍｇ／ｍＬ、１．０５Ｍ）、トリスＨＣＬ濃縮液（６２３ｍｇ／ｍＬ、３．９５Ｍ）、及びＥＤＴＡ－Na_2濃縮液（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を追加して、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液ｐＨ７．５を与えた。トラスツズマブ（６０３．８ｍｇ、４．８８７ｍｇ／ｍＬ、４．０μｍｏｌ）に、新しく調製したＴＣＥＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍＬ、２．３５モル当量、９．５μｍｏｌ、２．７２ｍｇ）を追加し、混合物を手で旋回させて混合し、それからローラー混合しながら２０℃で９０分間インキュベーションした。インキュベーション後に（ＱＳミックス－ＥＭＣＨの追加前に）、Ａｂ－ＳＨの２ｍｇ（０．４０９ｍＬ）アリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションした。バルクＡｂ－ＳＨに、新しく調製したＱＳミックス－ＥＭＣＨ溶液のアリコート（２ｍｇ／ｍＬ、５．２モル当量、２１μｍｏｌ、２１．６ｍＬ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で１２０分間インキュベーションした。コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．５ｍｇ、０．１３４ｍＬ、３．３３ｎｍｏｌ）を、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（８．００モル当量、２６．６ｎｍｏｌ、３．３μｇ、１３．３μＬの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（１３．３μＬ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後に（ＮＥＭの追加前に）、Ａｂ－ＱＳミックス－ＥＭＣＨ混合物のｃａ．２ｍｇ（０．４８１ｍＬ）アリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートをＵＶ－ｖｉｓによりキャラクタリゼーションし、正の対照及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ＱＳミックス－ＥＭＣＨ組み込みを得た。バルクＡｂ－ＱＳミックス－ＥＭＣＨ混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（２．５ｍｇ／ｍＬ、５モル当量、２０μｍｏＬ、２．５１ｍｇ）を追加し、混合物を２～８℃で一晩保存した。コンジュゲートを、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１０×４０ｃｍセファデックスＧ５０Ｍカラムにより精製して、精製されたトラスツズマブ－（Ｌ－ＱＳミックス）コンジュゲートを与えた。それから、産物丸ごとを、ｖｉｖａｃｅｌｌ　１００濃縮器（２，０００ｇ、４℃、２００分）を用いて５ｍｇ／ｍＬに正規化した。産物を０．２μｍに濾過し、生物学的評価のために分注した。収量：ｎ．ｄ．。ＱＳミックス対Ａｂ比＝４．１。

【０４０３】

【表４７】

表９．　まとめの反応アウトカム

方法	尺度	結果
分析ＳＥＣ	純度	ｎ．ｄ．
収量	質量（パーセント）	ｎ．ｄ．
エルマンアッセイ	ＱＳミックス－ＥＭＣＨ組み込み	４．１

【０４０４】

抗体－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}

ＤＡＲ４によるトラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}、セツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）^{4}

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、サポニンＳＯ１８６１、及び以降では「ＨＳＰ２７－Ｍａｌ」と言われるマレイミド（Ｍａｌ）を持つＨＳＰ２７誘導体にコンジュゲート化した。Ａｂをマイケル型チオール－エンコンジュゲート化反応によってＨＳＰ２７－Ｍａｌにコンジュゲート化した。ＨＳＰ１７－Ｍａｌは、ＨＳＰ２７　ＢＮＡとＡｂとの間に不安定な結合を生成する不安定な（Ｌ）ヒドラゾン

結合をその構造とそのマレイミド官能基との間に得る。トラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$について手順を例示的に記載する：
トラスツズマブを、脱イオン水（ＤＩ）で２１ｍｇ／ｍｌに戻し、それから、ヒスチジン緩衝液ｐＨ６を用いて５ｍｇ／ｍｌに希釈した。２０ｍｇ（４．０ｍｌ）アリコートに、それぞれ１０μｌ／ｍｌのトリス濃縮液（１２７ｍｇ／ｍｌ、１．０５Ｍ）、トリスＨＣｌ濃縮液（６２３ｍｇ／ｍｌ、３．９５Ｍ）、及びＥＤＴＡ－Ｎａ$_2$濃縮液（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を追加して、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液ｐＨ７．５を与えた。トラスツズマブ（２０．３０ｍｇ、４．９２０ｍｇ／ｍｌ、０．１４μｍｏｌ）に、新しく調製したＴＣＥＰ溶液のアリコート（１．００ｍｇ／ｍｌ、２．３５モル当量、０．３２μｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で９０分間インキュベーションした。インキュベーション後に（ＨＳＰ２７－Ｍａｌの追加前に）、Ａｂ－ＳＨのｃａ．２ｍｇ（０．４３９ｍｌ）アリコートを各混合物から取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによってキャラクタリゼーションした（チオール対Ａｂ比＝４．０）。バルクＡｂ－ＳＨ（４．７ｍｇ、３２　ｎｍｏｌ）に、ＨＳＰ２７－Ｍａｌ誘導体のアリコート（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中に新しく調製、２ｍｇ／ｍｌ、「チオール」当たり１．３モル当量、１６６　ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、次に１２０分間２０℃でインキュベーションした。トラスズマブ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ誘導体コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．５ｍｇ、３．３ｎｍｏｌ）を、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（「チオール」当たり１．３モル当量、１７．３ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後に（ＮＥＭの追加前に）、Ａｂ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ混合物の０．１００ｍｌアリコートを取り出し、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いてＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。このアリコートをＵＶ－ｖｉｓによりキャラクタリゼーションし、正の対照及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ＨＳＰ２７組み込みを得た。バルクＡｂ－ＨＳＰ２７混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（０．２５ｍｇ／ｍｌ、２．５モル当量、８０ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３０ｃｍセファデックスＧ５０Ｍを用いたゲル濾過、次に１００ＫＤａ　ＭＷＣＯ濃縮器を用いた繰り返しの遠心濾過及び洗浄により精製して、精製されたトラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$コンジュゲートを与えた。生物学的評価のために分注する前に、産物を０．２μｍに濾過した。

【０４０５】

【表４８】

表１０．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	Ａｂ－ＳＨ仕込み	チオール対Ａｂ比	ＨＳＰ２７－　Ｍａｌ仕込み	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＨＳＰ２７　ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$	４．７ｍｇ３２ｎｍｏｌ	３．９８	１．５７ｍｇ	９９．４	４０
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$	４．７ｍｇ３２ｎｍｏｌ	４．１６	１．５７ｍｇ	９７．９	５０

【０４０６】

抗体－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}－（Ｓ－ジアンチン）^{n}

ＤＡＲ２によるＳＭＣＣを介したトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_2$及びセツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_2$の合成

トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１及びセツキシマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１は以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）リンカーを介してジアンチン－Ｃｙｓにコンジュゲート化し、Ａｂとジアンチンとの間に安定な（Ｓ）アミド結合を提供した。トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_2$について手順を例示的に記載する：ジアンチン－Ｃｙｓ（７．８ｍｇ、２６１ｎｍｏｌ、０．７８ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（５モル当量、１．３１μｍｏｌ、０．３７ｍｇ、１ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後で、タンパク質－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。タンパク質－ＳＨが得られた（５．２ｍｇ、６７％、０．５２ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対タンパク質比＝１±０．１）。

【０４０７】

トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$（１．５ｍｇ、１０ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＳＭＣＣ溶液のアリコート（０．５ｍｇ／ｍｌ）（４．８３モル当量、４８．３ｎｍｏｌ、１６μｇ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後で、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の新しく調製した１ｍｇ／ｍｌ溶液の１８．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｓ－ＳＭＣＣ）（１．２２ｍｇ、８．１ｎｍｏｌ、２．０３ｍｇ／ｍｌ）を、新しく還元したジアンチン－Ｃｙｓ（３．２モル当量、３２．５ｎｍｏｌ、０．９７ｍｇ、０．５２ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって２０℃で一晩インキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートを、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ４濃縮器を用いて≦１ｍｌに濃縮し、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３７ｃｍ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ＰＧカラムを用いて精製した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_2$コンジュゲートを、高分子量（ＨＭＷ）（０．３６ｍｇ、３０％、０．３４ｍｇ／ｍｌ、ジアンチン対Ａｂ比＝決定せず）及び低分子量（ＬＭＷ）（０．４９ｍｇ、４０％、０．３０ｍｇ／ｍｌ、ジアンチン対Ａｂ比＝決定せず）画分として得た。収量：ｎ．ｄ．。純度：７９．３％。

【０４０８】

【表４９】

表１１．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＳＭＣＣモル当量	ジアンチン－Ｃｙｓモル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_x$	４．８２	３．２	ｎ．ｄ．	７９．３	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｓ－ジアンチン）$_2$	４．４６	３．２	２．０	８７．６	９２

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０４０９】

１２．抗体－（Ｓ－ジアンチン）^{n}

ＤＡＲ２によるＳＭＣＣを介したトラスツズマブ－（Ｓ－ジアンチン）^{2}、セツキシマブ－（Ｓ－ジアンチン）^{2}合成

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）リンカーを介してジアンチン－Ｃｙｓにコンジュゲート化し、Ａｂとジアンチンとの間に安定な（Ｓ）アミド結合を提供した。トラスツズマブ－（Ｓ－ジアンチン）$_2$について手順を例示的に記載する：

ジアンチン－Ｃｙｓ（７．８ｍｇ、２６１ｎｍｏｌ、０．７８ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（５モル当量、１．３１μｍｏｌ、０．３７ｍｇ、１ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後で、タンパク質－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。タンパク質－ＳＨが得られた（５．２ｍｇ、６７％、０．５２ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対タンパク質比＝１±０．１）。

【０４１０】

トラスツズマブ（１．５ｍｇ、１０ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＳＭＣＣ溶液のアリコート（０．５ｍｇ／ｍｌ）（３．１６モル当量、３１．６ｎｍｏｌ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後で、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の新しく調製した１ｍｇ／ｍｌ溶液の１８．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｓ－ＳＭＣＣ）（１．２２ｍｇ、８．１ｎｍｏｌ、２．０３ｍｇ／ｍｌ）を、新しく還元したジアンチン－Ｃｙｓのアリコート（３．２モル当量、３２．５ｎｍｏｌ、０．９７ｍｇ、０．５２ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって２０℃で一晩インキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートを、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ４濃縮器を用いて≦１ｍｌに濃縮し、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３７ｃｍ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ＰＧカラムを用いて精製した。

【０４１１】

収量：ｎ．ｄ．。純度：９９％。

【０４１２】

【表５０】

表１２．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＳＭＣＣモル当量	ジアンチン－Ｃｙｓモル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｓ－ジアンチン）$_x$	３．１６	３．２	ｎ．ｄ．	９９．０	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｓ－ジアンチン）$_2$	３．７０	３．２	１．６	９７．２	９３

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０４１３】

抗体－（Ｌ－ＳＯ１８６１）^{n}－（Ｌ－ジアンチン）^{n}

ＤＡＲ２によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ジアンチン）$_2$及びセツキシマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ジアンチン）$_2$合成

トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１及びセツキシマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１は以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、Ａｂとジアンチンとの間に不安定な（Ｌ）ジスルフィド結合を形成するテトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介してジアンチン－Ｃｙｓにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１について手順を例示的に記載する：

ジアンチン－Ｃｙｓ（７．８ｍｇ、２６１ｎｍｏｌ、０．７８ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（５モル当量、１．３１μｍｏｌ、０．３７ｍｇ、１ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後で、タンパク質－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。タンパク質－ＳＨが得られた（５．２ｍｇ、６７％、０．５２ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対タンパク質比＝１±０．１）。

【０４１４】

トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$（０．７５ｍｇ、５ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍｌ）（４．９５モル当量、２４．７５ｎｍｏｌ、１４μｍｏｌ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後で、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の新しく調製した１ｍｇ／ｍｌ溶液の１８．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）のアリコートを取り出し、ＵＶ－Ｖｉｓ分析によって試験した。ＳＰＤＰ組み込みを、ピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）を遊離させるためのＴＣＥＰを用いて、及び３４３ｎｍでのＵＶ－ｖｉｓ分析によって、決定した（ＳＰＤＰ対Ａｂ比＝２．４）。残りのＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）を、新しく調製したジアンチン－Ｃｙｓ（タンパク質－ＳＨ）のアリコート（４モル当量、２０ｎｍｏｌ、０．６ｍｇ、０．５２ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって一晩２０℃でインキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートのアリコートをＵＶ－ｖｉｓ分析により分析して、ＰＤＴの放出量によってジアンチン－Ｃｙｓの組み込みを確かめた。その後、コンジュゲートを、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ４濃縮器を用いて≦１ｍｌに濃縮し、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３７ｃｍ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ＰＧカラムを用いて精製した。ジアンチン対Ａｂ比＝２）。収量：ｎ．ｄ．。純度：６０．５％。

【０４１５】

【表５１】

表１３．まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰモル当量	ジアンチン－Ｃｙｓモル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ジアンチン）$_2$	４．９５	４	１．７	６０．５	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ジアンチン）$_2$	４．９５	４	２．１	８５．２	８９

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０４１６】

抗体－（Ｌ－ジアンチン）^{n}

トラスツズマブ－（Ｌ－ジアンチン）$_2$、セツキシマブ－（Ｌ－ジアンチン）$_2$、及びＤＡＲ２によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介した合成

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、Ａｂとジアンチンとの間に不安定な（Ｌ）ジスルフィド結合を形成するテトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介してジアンチン－Ｃｙｓにコンジュゲート化した。トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１について手順を例示的に記載する：

ジアンチン－Ｃｙｓ（７．８ｍｇ、２６１ｎｍｏｌ、０．７８ｍｇ／ｍｌ）をＴＣＥＰ（５モル当量、１．３１μｍｏｌ、０．３７ｍｇ、１ｍｇ／ｍｌ）と、３０分間、２０℃で、ローラー混合によって反応させた。その後で、タンパク質－ＳＨを、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって精製し、すぐに用いた。タンパク質－ＳＨが得られた（５．２ｍｇ、６７％、０．５２ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対タンパク質比＝１±０．１）。

【０４１７】

トラスツズマブ（０．７５ｍｇ、５ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍｌ）（３．３５モル当量、１６．７５ｎｍｏｌ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後で、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の新しく調製した１ｍｇ／ｍｌ溶液の１８．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）のアリコートを取り出し、ＵＶ－Ｖｉｓ分析によって試験した。ＳＰＤＰ組み込みを、ピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）を遊離させるためのＴＣＥＰを用いて、及び３４３ｎｍでのＵＶ－ｖｉｓ分析によって、決定した。残りのＴｒａｓ－（Ｓ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）を、新しく調製したジアンチン－Ｃｙｓ（タンパク質－ＳＨ）のアリコート（４モル当量、２０ｎｍｏｌ、０．６ｍｇ、０．５２ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって一晩２０℃でインキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートのアリコートをＵＶ－ｖｉｓ分析により分析して、ＰＤＴの放出量によってジアンチン－Ｃｙｓの組み込みを確かめた。その後、コンジュゲートを、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ４濃縮器を用いて≦１ｍｌに濃縮し、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３７ｃｍ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ＰＧカラムを

用いて精製した。ジアンチン対Ａｂ比＝２）。収量：ｎ．ｄ．。純度：６７．７％。

【０４１８】

【表５２】

表１４．　まとめの反応条件及び結果

バッチ	ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰモル当量	ジアンチン－Ｃｙｓモル当量	得られたＤＡＲ	分析ＳＥＣによる純度（％）	収量（％）
Ｔｒａｓ－（Ｌ－ジアンチン）$_2$	３．３５	４	１．６	６７．７	ｎ．ｄ．
Ｃｅｔ－（Ｌ－ジアンチン）$_2$	３．３５	４	１．６	９５．２	８８

ｎ．ｄ．＝未決定。

【０４１９】

例１０

材料及び方法

我々の現行の研究において、我々は、シッフ塩基（イミン）を介したサポニン結合のための４つの分子アームとクリックケミストリーのための１つのアームとからなるモデル骨格を検討した。ポリマー構造（図１９）は第１世代（すなわち、繰り返される分岐サイクル数）の五価のポリエチレングリコールに基づくデンドリマーである。これはＩｒｉｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ（マルクトレドヴィッツ、ドイツ）から購入した。サポニン（この例ではＳＡ１６４１）を、Ｍｅｒｃｋ（ダルムシュタット、ドイツ）から得られたサポニナムアルブムと呼ばれるＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ種からのサポニンの複合的な生抽出液から精製した。粉末状の生の抽出物（２．５ｇ）を、水（１００ｍＬ）中において水酸化ナトリウム（０．２ｇ）によって加水分解した。溶液を４０℃で２０ｈ撹拌し、それから、ｐＨ５．０に達するまで氷酢酸を足した。タンニンを除去するために、溶液を分液漏斗中で３０ｍＬのブタノールと共に振盪した。水相を再取得し、ブタノール抽出を２回繰り返した。ブタノール相に無水硫酸ナトリウムを足し、濾過し、プールした。ブタノールを蒸発させ、残りのサポニン粉末を２０％メタノール中に最終濃度３０ｍｇ／ｍＬで溶かした。短いソニケーション後に、異なるサポニンを高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分離した。チューブ（カラム排除）を、１．５ｍＬ／ｍｉｎの流量の温水（４０℃）によって、それから、Ｅｕｒｏｓｐｈｅｒ ＲＰ－Ｃ１８カラム（５μｍ、２５０×８ｍｍ）を包含してイソプロパノール（１００％）によってリンスした。サポニンをカラムにかけ、メタノール勾配によって溶出した（０．０１％トリフルオロ酢酸を足した水中において１．５ｍＬ／ｍｉｎで３０ｍｉｎ以内の２０％メタノールから７０％メタノール、次にさらに６０ｍｉｎの７０％メタノール）（Ｓａｍａ ｅｔ ａｌ，２０１８）。画分のアリコートを、エレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）によってそれらのＳＡ１６４１含量について分析した。純粋なＳＡ１６４１を含有する画分をプールし、メタノールを蒸発させた。水溶液を、ドライアイスの使用によって回転丸底フラスコ中で薄膜として凍結した。－８０℃での１６ｈの保存後に、サンプルを凍結乾燥した。本発明で定められる骨格を産生するために、ポリマー構造（０．２ｍＭ）及びＳＡ１６４１（３．２ｍＭ）を水（およそｐＨ８）に溶解し、等体積を混合し、２６℃で２４ｈ振盪した。それから、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＣＮＢＨ$_3$；０．１Ｍ）を、ＳＡ１６４１を参照して４倍モル過剰で追加し、サンプルをさらに２４ｈインキュベーションした。それから、構造を超高速高分離液体クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ）／ＥＳＩ－ＭＳにより検証した。サンプルをＲＰ－Ｃ４カラムにかけ、メタノール勾配によって溶出した（０．０１％トリフルオロ酢酸を足した水中において１５ｍｉｎ以内の２５％メタノールから８

０％メタノール、次にさらに１０ｍｉｎの８０％メタノール）。Ｗａｔｅｒｓ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎからのＬＣ－飛行時間型（ＬＣ－ＴＯＦ）質量分析計を用いて、エレクトロスプレーイオン化による精密質量測定のために特に設計されたイオン源であるＬｏｃｋＳｐｒａｙ（商標）の使用によって、画分を分析した。

【０４２０】

結果

図２０の挿入図は、同位体パターン計算機ｅｎｖｉＰａｔ　Ｗｅｂ　２．０による計算から得られた理論的に予想される質量スペクトルを示す。パターンは、分子の電荷及び同位体の天然の存在率を考える。これは、１つよりも多いピークが単一の物質について予想される理由である。ＵＰＬＣ／ＥＳＩ－ＭＳにより得られた実験データ（図２０）は、予測された同じ強度で、ｍ／ｚ　７５８～７６０においてほぼ厳密に同じピークを示し、それゆえに、ポリマー構造への首尾良いＳＡ１６４１カップリングを証明した。

【０４２１】

例１１

材料及び方法

原薬の例として、我々は、標的化された毒素のジアンチン－上皮成長因子（ジアンチン－ＥＧＦ）を用いた。プラスミドのＨｉｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－ｐＥＴ１１ｄ（Ｗｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ，２００９）（１００ｎｇ）を、２０μＬのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　Ｒｏｓｅｔｔａ（商標）２（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳコンピテントセル（Ｎｏｖａｇｅｎ、サンディエゴ、ＣＡ、ＵＳＡ）に追加した。細胞を、熱ショックによってトランスフォーメーションした（氷上で３０ｍｉｎ、４２℃で９０ｓ、氷上で１ｍｉｎ）。その後に、３００μＬの溶原培地（ＬＢ）を追加し、懸濁液を２００ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１ｈインキュベーションした。５０μｇ／ｍＬアンピシリンを有する予熱した溶原培地寒天プレートに、１００μｌの細菌懸濁液を接種し、プレートを３７℃で一晩インキュベーションした。５０μｇ／ｍＬアンピシリン有する溶原培地（３ｍＬ）に、プレートからのコロニーを接種し、細菌を３７℃かつ２００ｒｐｍで８ｈインキュベーションした。懸濁液（５０μＬ）を、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを有する５００ｍＬの溶原培地に追加し、３７℃かつ２００ｒｐｍで一晩インキュベーションした。続いて、体積を２．０Ｌにスケールアップし、０．９という波長６００ｎｍの光学密度に達するまで、細菌を同じ条件下で成長させた。その後に、タンパク質発現を、１ｍＭの最終濃度でのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）の追加によって誘導した。タンパク質発現は３７℃かつ２００ｒｐｍで３ｈ続いた。最終的に、細菌懸濁液を５，０００ｇかつ４℃で５ｍｉｎ遠心し、２０ｍＬのＰＢＳ（１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、８．１ｍＭ　Na_2HPO_4、１．４７ｍＭ　KH_2PO_4）に再懸濁し、使用まで－２０℃で保存した。精製のために、細菌懸濁液を融解し、ソニケーションによりリシスした。ライセートを遠心し（１５，８００ｇ、４℃、３０分）、イミダゾールを最終濃度２０ｍＭで追加した。上清を、２０ｍＭイミダゾールの存在下で、４℃で３０ｍｉｎに渡って、連続振盪下において、２ｍＬのＮｉ－ニトリロ三酢酸アガロースとインキュベーションした。続いて、材料を２０ｍＬカラムに注加し、１０ｍＬ洗浄緩衝液（５０ｍＭ　NaH_2PO_4、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール）で３回洗浄し、ジアンチン－ＥＧＦを、洗浄緩衝液中の１０ｍＬずつの増大して行く濃度のイミダゾール（３１、６５、１２５、及び２５０ｍＭ）によって溶出した。溶出液画分（２ｍＬ）を、２．０ＬのＰＢＳに対して４℃で一晩透析した。脱塩されたジアンチン－ＥＧＦを、Ａｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ－１５（１０ｋＤａ）によって濃縮し、タンパク質濃度を定量した。

【０４２２】

好適なクリックケミストリー基をジアンチン－ＥＧＦに導入するために、ジアンチン－ＥＧＦを参照して８倍モル過剰のアルキン－PEG_5－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルを、ジメチルスルホキシドに溶解し、９体積のジアンチン－ＥＧＦ（０．２Ｍ　NaH_2PO_4／Na_2HPO_4、ｐＨ８中に１ｍｇ）に追加した。室温で４ｈのインキュベーション後に、結合していないアルキンを、ＰＤ１０カラム（ＧＥ－Ｈｅａｌｔｈｃａ

ｒｅ、フライブルク、ドイツ）の使用により分離した。ポリマー構造とのクリックケミストリーを、銅（Ｉ）によって触媒されるアルキン－アジド環化付加によって実行した。アルキン－ジアンチン－ＥＧＦ（０．０２ｍＭ）、デンドリマー（０．０５ｍＭ）、ＣｕＳＯ４（０．１ｍＭ）、トリス（３－ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル）アミン（０．５ｍＭ）、及びアスコルビン酸ナトリウム（５ｍＭ）を、０．１Ｍ NaH_2PO_4／Na_2HPO_4、ｐＨ８中で、室温で１ｈに渡って、穏やかなアジテーション下においてインキュベーションした。それから、低分子質量物質をＰＤ１０カラムを用いて分離した。

【０４２３】

本発明の有効性を試験するために、我々はＨＥＲ１４細胞による生存率アッセイを実行した。これらの細胞は、ヒト上皮成長因子受容体によって安定にトランスフェクションされた線維芽細胞であり、よって、標的化された毒素のジアンチン－ＥＧＦの標的細胞である。ＨＥＲ１４細胞（２，０００細胞／１００μＬ／ウェル）を９６ウェル細胞培養プレートのウェルに播種し、１０％ウシ胎児血清及び１％ペニシリン／ストレプトマイシンを足したＤＭＥＭ培地によって、３７℃、５％ CO_2、かつ９８％湿度で２４ｈインキュベーションした。それから、異なる試験物質（結果及び図２１参照）を、２５μＬの体積でトリプリケートで追加し、さらに２５μＬの培地を足した。７２ｈのインキュベーション後に、３０μＬの３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド（水中に０．５ｍｇ／ｍＬ）をウェル当たり追加し、２ｈインキュベーションした。その後に、培地を注意深く除去し、１０％（ｖ／ｖ）イソプロパノール、５％（ｗ／ｖ）ドデシル硫酸ナトリウム、及び４００ｍＭ ＨＣｌを含有する水溶液で置き換え、５ｍｉｎインキュベーションした。可溶化したホルマザンを、マイクロプレートリーダー（Ｓｐｅｃｔｒａ ＭＡＸ ３４０ＰＣ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、サニーベール、ＣＡ、ＵＳＡ）によって５７０ｎＭで測光的に定量化した。無処置細胞を１に正規化し、全てのサンプルは無処置対照を参照した。有意性は、対応のない２標本ｔ検定によって決定した。

【０４２４】

結果

例のポリマー構造、五量体デンドリマー（ペントリマー）は、ＳＡ１６４１の不在下でも存在下でも、標的細胞に対するいずれかの細胞毒性効果を有さない（図２７、カラム２及び３）。骨格の不在下では、標的化された毒素（ジアンチン－ＥＧＦ）は、０．１ｎＭの濃度において最大毒性の半分を示す（カラム４）。ＳＡ１６４１の存在下では、同じ濃度は全ての細胞の死をもたらし、エンドソーム脱出の向上因子として作用するＳＡ１６４１の一般的能力を指示している（カラム５）。ポリマー構造の存在は、ＳＡ１６４１の存在下でも不在下でも、ジアンチン－ＥＧＦの毒性に影響せず（カラム６及び７）、骨格がジアンチン－ＥＧＦの毒性に影響しないということを指示している。クリックケミストリーによってモデルポリマー構造をジアンチン－ＥＧＦという例の原薬にカップリングするためには、物質は前にはアルキン基とカップリングされなければならなかった。この修飾の帰結として、ジアンチン－ＥＧＦはいくらかの活性を失った（それぞれ、カラム８及び９を６及び７と比較せよ）。しかしながら、非指向的なアルキン修飾は本発明の発想には影響せず、将来の適用にもまた要求されない。我々は試験目的のためにのみ非指向的なやり方でアルキンを導入しなければならず、毒素の薬学的活性中心を妨害するリスクを有した。原薬の製造業者は、物質の活性が影響されないままである彼の選んだ位置において、合成中にクリック位置を物質に直接的に導入し得る。アルキン修飾された原薬をポリマー構造とクリックしたときに、活性の追加の損失はなく、ポリマー構造そのものは毒性ではないということを指示した（カラム１０及び１１）。

【０４２５】

例１２

材料

次の化学物質を購入のまま用いた：メタノール（ＭｅＯＨ、ＬｉＣｈｒｏｓｏｌｖ、Ｍｅｒｃｋ）、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ、９５％、ＴＣＩ Ｃｈ

ｅｍｉｃａｌｓ）、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ、９９．８％、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）、２－メルカプトエタノール（９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭデンドリマー、エチレンジアミンコア、５．０世代溶液、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、シアニン３カルボン酸（Ｃｙ３－ＣＯＯＨ、９５％、Ｌｕｍｉｐｒｏｂｅ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン）－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ－［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、Ｎ－［（ジメチルアミノ）－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ－［４，５－ｂ］ピリジン－１－イルメチレン］－Ｎ－メチルメタンアミニウムヘキサフルオロホスフェートＮ－オキシド（ＨＡＴＵ、９７％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ウシ血清アルブミン画分Ｖ（ＢＳＡ、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ、９９％、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）、２－イミノチオランヒドロクロリド（９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ローダミンｂ（ＲｈｏｄＢ、９５％、Ｍｅｒｃｋ）、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ）、塩酸（ＨＣｌ、３７％、Ｍｅｒｃｋ）、ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{13}$－ＤＢＣＯ（Ｃｌｉｃｋ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｔｏｏｌｓ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８　５－ＴＦＰ（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｃｈｅｒ）、アジド－ＰＥＧ３－ＳＳ－ＮＨＳ（Ｃｏｎｊｕ－Ｐｒｏｂｅ）、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＣＮＢＨ$_3$、９５％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、過硫酸アンモニウム（ＡＰＳ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ′，Ｎ′－テトラメチルエチレンジアミン（ＴＭＥＤＡ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、カスタムペプチドＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫ（９５％、ＰｅｐｔｉｄｅＳｙｎｔｈｅｔｉｃｓ）、アジド－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳ（９５％、Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ）、ＰＦｄ－Ｇ４－アジド－ＮＨ－ＢＯＣデンドロン（Ｇ４－デンドロン、９５％、Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｆａｃｔｏｒｙ）、シアニン５－ＤＢＣＯ（Ｃｙ５－ＤＢＣＯ、９５％、Ｌｕｍｉｐｒｏｂｅ）、クロロホルム（ＣＨＣｌ$_3$、９９．５％、Ｓｉｇｍａ）、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　０．５ｍＬ遠心フィルター（３ｋＤａ　ＭＷＣＯ、Ｓｉｇｍａ）、ｍＰＥＧ－ＳＣＭ（ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳ、９５．６％、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　ＰＥＧ　Ｗｏｒｋｓ）、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５ｍＬ遠心フィルター（１０ｋＤａ　ＭＷＣＯ、Ｓｉｇｍａ）。

【０４２６】

方法

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦスペクトルはＭＡＬＤＩ質量分析計（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｕｌｔｒａｆｅｘ　ＩＩＩ）で記録した。典型的には、ナノモルからマイクロモル範囲でＭｉｌｌｉＱ水に溶解したサンプルを、液滴乾燥法によって、アセトニトリル（ＭＡＤＬＩ－ＴＯＦ－ＭＳ試験済み、Ｓｉｇｍａ）／０．１％　ＴＦＡ（７：３ｖ／ｖ）に溶解したマトリックスとしてｓｕｐｅｒ－ＤＨＢ（９９％、Ｆｌｕｋａ）又はシナピン酸（ＳＡ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）どちらかを用いて、ターゲット（ＭＴＰ３８４ターゲットプレート研磨済みスチールＴＦ、Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｓ）上にスポットした。ＰｅｐＭｉｘ（ペプチド較正標準、Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｓ）又はＰｒｏｔｅＭａｓｓ（タンパク質較正標準、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）が較正標準としての用をなした。ＲＰモードはリフレクターのポジティブモードを言う。ＲＮモードはリフレクターのネガティブモードを言う。ＬＰモードはリニアポジティブモードを言う。

【０４２７】

Ｈ－ＮＭＲ

^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析はＢｒｕｋｅｒ　４００ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計を用いて行った。サンプル調製は測定の２４時間前に行われた。これによって、２ｍｇのサンプルが０．８ｍＬのメタノール－Ｄ$_4$（９９％、Ｄｅｕｔｅｒｏ）に溶解された。

【０４２８】

ＵＶ－Ｖｉｓ

ＵＶ－Ｖｉｓ測定は、ＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計で、２００～７５０ｎｍのスペクトル範囲で行った。

【０４２９】
サイズ排除クロマトグラフィー
サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、ＧＥ ＨｅａｌｔｈｃａｒｅからのセファデックスＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅによって、かつプレパックＰＤ１０カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、セファデックスＧ２５Ｍ）で行った。クロマトグラフィーを行う前に、材料をそれぞれの溶離液中で膨潤させることにより活性化した。
【０４３０】
透析
再生セルロース膜：ＭＷＣＯ＝１及び２ｋＤａ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ）及びＭＷＣＯ＝１２～１４ｋＤａ（Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）を用いて透析を行った。典型的には、透析は１Ｌの溶媒で２４ｈ行い、これはプロセスの最初の６ｈの後に交換した。
【０４３１】
凍結乾燥
凍結乾燥は、Ａｌｐｈａ １－２ ＬＤ ｐｌｕｓ（Ｍａｒｔｉｎ Ｃｈｒｉｓｔ Ｇｅｆｒｉｅｒｔｒｏｃｋｎｕｎｇｓａｎｌａｇｅｎ ＧｍｂＨ）で行った。典型的には、サンプルを液体窒素で凍結し、高真空で凍結乾燥機内に置いた。
【０４３２】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成
Ｓａｐｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ ＬからのＳＯ１８６１（５９ｍｇ、３１．７μｍｏｌ）及びＥＭＣＨ（３０１ｍｇ、８８８μｍｏｌ）を、スターラーと共にラウンドフラスコ内に置き、１３ｍＬメタノールに溶解した。ＴＦＡ（４００μＬ、ｃａｔ．）を溶液に追加し、反応混合物を８００ｒｐｍかつ室温で３ｈ、ＲＣＴ Ｂマグネットスターラー（ＩＫＡ Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ）で撹拌した。３ｈの撹拌後に、ミックスをＭｉｌｌｉＱ水又はＰＢＳどちらかで希釈し、ＭｉｌｌｉＱ水又はＰＢＳどちらかに対して鋭意に２４ｈ透析した。１ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ７）を用いた。透析後に、溶液を凍結乾燥して白色粉末を得た。収量６２．４ｍｇ（９５％）。乾燥したアリコートを、さらに、^{1}Ｈ ＮＭＲ及びＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるキャラクタリゼーションに用いた。
【０４３３】
^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，メタノール－Ｄ$_{4}$）（図２２Ａ、ＳＯ１８６１）：δ＝０．５０－５．５０（ｍ，サポニントリテルペノイド及び糖バックボーンプロトン），９．４３（１Ｈ，ｓ，サポニンのアルデヒドプロトン，Ｈ^{a}）。
【０４３４】
^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，メタノール－Ｄ$_{4}$）（図２２Ｂ． ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ，ＰＢＳワークアップ）：δ＝０．５０－５．５０（ｍ，サポニントリテルペノイド及び糖バックボーンプロトン），６．７９（２ Ｈ，ｓ，マレイミドプロトン，Ｈ^{c}），７．６２－７．６８（１ Ｈ，ｍ，ヒドラゾンプロトン，Ｈ^{b}）。
【０４３５】
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＰモード）（図２３Ａ）：ｍ／ｚ ２１２４ Ｄａ（[ＭＫ]，サポニン－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ ２１０９ Ｄａ（[ＭＫ]，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ ２０９４ Ｄａ（[ＭＮａ]，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＮモード）（図２８Ｃ）：ｍ／ｚ ２２７５ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２２４４ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２２２２ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１７８ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１４４ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１２２ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２０９２ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２０７０ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ），２０３８ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，ＳＯ１８３２－ＥＭＣＨ），１９３６ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，ＳＯ１７３０－ＥＭＣＨ），１８６１ Ｄａ（[Ｍ－Ｈ]$^{-}$，ＳＯ１８６１

）。

【０４３６】

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（０．１ｍｇ、４８ｎｍｏｌ）に、２００μＬメルカプトエタノール（１８ｍｇ、２３０μｍｏｌ）を追加し、溶液をＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１ｈ振盪した。１ｈの振盪後に、溶液をメタノールで希釈し、１ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ７）を用いてメタノールに対して鋭意に４ｈ透析した。透析後に、アリコートを取り出し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳにより分析した。

【０４３７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図２３Ｂ）（ＲＰモード）；ｍ／ｚ ２１９３ Ｄａ（[ＭＫ]，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ ２１８５ Ｄａ（[ＭＫ]，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ ２１７０ Ｄａ（[ＭＮａ]，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）。

【０４３８】

ＢＳＡ－ＳＯ１８６１合成

４７μＬのＰＢＳに溶解した２－イミノチオラン（２３１μｇ、１．１μｍｏｌ）を、２００μＬのＰＢＳ中のＢＳＡ－ＲｈｏｄＢ溶液（１０ｍｇ、０．１５μｍｏｌ）に追加し、ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で４０ｍｉｎ振盪した。４０ｍｉｎの振盪後に、反応ミックスを直ちにセファデックスＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅサイズ排除カラム（１６ｍＬカラム体積）に通し、１００μＬ ＰＢＳに溶解したＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（１ｍｇ、０．５μｍｏｌ）を収集されたＢＳＡ－ＳＨ画分に追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの振盪後に、ＢＳＡ－ＳＯ１８６１を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：決定されなかった。

【０４３９】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図１５Ａ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ７４．２ ｋＤａ（[ＭＨ]，４つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１），７２．２ ｋＤａ（[ＭＨ]，３つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１），７０．２ ｋＤａ（[ＭＨ]，２つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１），３７．０ ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，４つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１），３５．９ ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，３つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１），３４．７ ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，２つのＳＯ１８６１が取り付けられたＢＳＡ－ＳＯ１８６１）。

【０４４０】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ

メタノールに溶解した７２０μＬのＰＡＭＡＭ（３０ｍｇ、１．０４μｍｏｌ）を、２５０ｍＬラウンドフラスコ内に置き、メタノールをロータリーエバポレータ（２０ｍｂａｒ、６０℃）によって除去した。残りのＰＡＭＡＭを９ｍＬのＤＭＳＯに溶解した。０．５ｍＬのＤＭＳＯに溶解したＨＡＴＵ（７．６ｍｇ、２０μｍｏｌ）を、ＤＭＳＯ中のＣｙ３－ＣＯＯＨ（０．６ｍｇ、１．２μｍｏｌ）溶液に追加し、ミックスを、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１ｈ振盪した。１ｈの振盪後に、ＨＡＴＵ－Ｃｙ３溶液を撹拌ＰＡＭＡＭ溶液に追加し、反応ミックスを室温で１２ｈ撹拌した。１２ｈの撹拌後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、２ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ６）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、コンジュゲート溶液の体積をロータリーエバポレータ（２０ｍｂａｒ、６０℃）によって縮減し、濃縮されたコンジュゲート溶液をセファデックスＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅサイズ排除カラム（１６ｍＬカ

ラム体積）に通した。第１の画分を収集し、凍結乾燥して、粘稠なピンク色のＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３コンジュゲートを得た。ＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３コンジュゲート形成を、薄層クロマトグラフィー（メタノール／水、ｖ／ｖ１：１）によるクロマトグラフィーと、セファデックスＧ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅカラムによるより速いバンドの出現とによって確認した。収量２１．３ｍｇ（６３％）。ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度法により測定したＰＡＭＡＭ当たりの色素モル比は、０．４３であった。

【０４４１】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３　Ａ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　２８．０　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ）。

【０４４２】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$について、手順を例示的に記載する。２５０μＬのＭｉｌｌｉＱ水に溶解した２－イミノチオラン（１ｍｇ、６．７μｍｏｌ）を、１２５μＬのＭｉｌｌｉＱ水中のＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３溶液（０．５ｍｇ、１７ｎｍｏｌ）に追加し、ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で４０ｍｉｎ振盪した。４０ｍｉｎの振盪後に、反応ミックスを直ちにセファデックスＧ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅサイズ排除カラム（１６ｍＬカラム体積）に通し、４０μＬのＭｉｌｌｉＱ水に溶解したＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（１７６μｇ、８５ｎｍｏｌ）を、収集されたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＨ画分に追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの撹拌後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルターによる４０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：０．５ｍｇ（７５％）。

【０４４３】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図３３Ｂ～Ｄ及び図３４に例解されている。Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_6$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３　Ｂ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３８．４　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１），１７．９　ｋＤａ（［ＭＨ］^{2}，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１）。

【０４４４】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{13}$、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{51}$、及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料２－イミノチオラン及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１５において強調されている。

【０４４５】

【表５３】

表１５．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１合成の反応パラメータ。

２－イミノチオラン仕込み当量，対Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ	ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み当量，対Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるコンジュゲートの質量	ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたＳＯ１８６１分子	もたらされたコンジュゲート
３８４	６	３８．７ｋＤａ	～５	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{6}$、図３３Ｂ
３８４	２０	５３．９ｋＤａ	～１３	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{13}$、図３３Ｃ
３８４	５７	１３３．９ｋＤａ	～５１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{51}$、図３３Ｄ
８	５	３７．７ｋＤａ	～５	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$、図３４Ａ
３２	３０	８７．０ｋＤａ	～２７	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$、図３４Ｂ

【０４４６】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１の合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ（０．５ｍｇ、１８ｎｍｏｌ）、ＳＯ１８６１（２．３ｍｇ、１．２４μｍｏｌ）、及びＨＡＴＵ（６４．６ｍｇ、１７０μｍｏｌ）を、別々に２００μＬＤＭＳＯに溶解した。ＳＯ１８６１及びＨＡＴＵ溶液を混合し、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒＣ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で２０ｍｉｎ振盪した。２０ｍｉｎの振盪後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ溶液を振盪ＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ溶液に追加し、反応混合物がＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪することを許した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のために取った。収量：０．７７ｍｇ（６９％）。

【０４４７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３５）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　６２．３　ｋＤａ（［Ｍ

Ｈ］，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１），３５．７　ｋＤａ（［ＭＨ］^{2}，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１）。

【０４４８】

Ｇ４－デンドロン色素標識及び脱保護

ＰＦｄ－Ｇ４－アジド－ＮＨ－ＢＯＣ（Ｇ４－デンドロン）（９．７５ｍｇ、２．１１μｍｏｌ）を、２ｍＬ反応チューブ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）内に置き、２００μＬ　ＤＭＳＯに溶解した。ＤＭＳＯ中の１００μＬのＣｙ５－ＤＢＣＯ溶液（１．７２μｍｏｌ＊ｍＬ$^{-1}$、１７０ｎｍｏｌ）をＧ４－デンドロン溶液に追加し、ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で室温かつ８００ｒｐｍで１２時間振盪した。１２ｈの撹拌後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ７）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、溶液を凍結乾燥して、青色粉末を得た。クルードな産物を、凍結乾燥から得られたままで脱保護ステップに用いた。

【０４４９】

部分的にＣｙ５標識された凍結乾燥Ｇ４－デンドロンを、撹拌子を有する５０ｍＬラウンドフラスコ内の１２ｍＬ　ＣＨＣｌ$_{3}$に溶解した。１２ｍＬのＴＦＡを追加し、反応ミックスを、ＲＣＴ　Ｂマグネットスターラー（ＩＫＡ　Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ）上で、８００ｒｐｍかつ室温で３ｈ撹拌した。３ｈの撹拌後に、溶媒をロータリーエバポレータ（Ｈｅｉｄｏｌｐｈ　ＷＢ　２０００）上で減圧（５０℃、３０ｍｂａｒ）下において除去した。蒸発後に、バッチをＭｉｌｌｉＱ水に溶解し、ＰＤ１０サイズ排除カラムに通した。Ｇ４－デンドロンコンジュゲート形成を、薄層クロマトグラフィー（メタノール／水、ｖ／ｖ１：１）によるクロマトグラフィーと、ＰＤ１０カラムによるより速いバンドの出現とによって確認した。サイズ排除クロマトグラフィーの得られた画分を凍結乾燥して、青色粉末を得た。

【０４５０】

収量５．７ｍｇ（９３％）。ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度法により測定されたＧ４－デンドロン当たりの色素モル比は、０．０１２であった。

【０４５１】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３２Ｂ）（ＲＰモード）：ｍ／ｚ　３９５６　Ｄａ（［ＭＮａ］，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロンＰＦ$_{6}$$^{-}$対イオン），３８２０　Ｄａ（［ＭＮａ］，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－ＰＦ$_{6}$$^{-}$対イオン），３６１７　Ｄａ（［ＭＨ］，Ｇ４－デンドロン不純物），３０１７（［ＭＨ］，Ｇ４－デンドロン）。

【０４５２】

Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１合成

最も低いＧ４－デンドロン対ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ比についての手順を例示的に記載する。３００μＬのＭｉｌｌｉＱ水に溶解した２－イミノチオラン（２．６５ｍｇ、１９．２μｍｏｌ）を、２５２μＬのＭｉｌｌｉＱ水中の部分的にＣｙ５標識されたＧ４－デンドロン溶液（０．５７７ｍｇ、１９２　ｎｍｏｌ）に追加し、ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で４０ｍｉｎ振盪した。４０ｍｉｎの振盪後に、反応ミックスを直ちにＰＤ１０サイズ排除カラムに通し、１００μＬのＭｉｌｌｉＱ水に溶解したＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（１．１９ｍｇ、５７５ｎｍｏｌ）を、収集されたＧ４－デンドロン－ＳＨ画分に追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスを、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心フィルター（３ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を用いた遠心濾過により濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：９０ｎｍｏｌ（４７％）。

【０４５３】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図３３に例解されている。Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　１０．１９　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_{3}$），９．２７

ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_3$），７．９２　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_2$），７．１４　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_2$），５．８６　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_1$），５．０７　ｋＤａ（［ＭＨ］，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_1$）。

【０４５４】

他のＧ４－デンドロン－（ＳＯ１８６１）$_n$コンジュゲートの合成は上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１６において強調されている。

【０４５５】

【表５４】

表１６．　Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１合成の反応パラメータ

２－イミノチオラン仕込み当量，対Ｇ４－デンドロン	ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み当量，対Ｇ４－デンドロン	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるコンジュゲートの質量	Ｇ４－デンドロン当たり取り付けられたＳＯ１８６１分子	もたらされたＭＳスペクトル
１００	３	５．０７～１０．１８ｋＤａ	～１～３	図４９Ｃ
１００	１０	５．０７～１１．６４ｋＤａ	～１～４	図４９Ｂ
１００	２２	６．２０～２２．０２ｋＤａ	～１～９	図４９Ａ

【０４５６】

ＰＡＭＡＭチオール化

最も高いＰＡＭＡＭ対２－イミノチオラン比について手順を例示的に記載する。３０μＬのメタノールに溶解したＰＡＭＡＭ（３３３μｇ、１２．８　ｎｍｏｌ）溶液に、１２８μＬのＭｉｌｌｉＱ水に溶解した２－イミノチオラン（０．５３ｍｇ、３．８４μｍｏｌ）を追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスを、１５℃かつ１３５００ｒｐｍにおけるＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心フィルター（３ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を用いた遠心濾過によって、ＭｉｌｌｉＱ水で４回洗浄した。洗浄後に、サンプルを凍結乾燥して白色固体を得た。収量は決定されなかった。

【０４５７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを図５１に例解する。ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図５１Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　４１．５　ｋＤａ（［ＭＨ］，ＰＡＭＡＭ－［ＳＨ］$_{108}$）。

【０４５８】

他のＰＡＭＡＭ－イミノチオランコンジュゲートの合成は、上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料２－イミノチオランの仕込み当量が異なる。最も低い２－イミノチオラン仕込みの反応のために、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭを用いた。

【０４５９】

出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１７において強調されている。

【０４６０】

【表５５】

表１７．　ＰＡＭＡＭ－ＳＨ合成の反応パラメータ

２－イミノチオラン仕込み当量，対ＰＡＭＡＭ	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるコンジュゲートの質量	ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたイミノチオラン分子	もたらされたＭＳスペクトル
５０	３４．４ｋＤａ	～１６	図５１Ｃ
１００	３５．９ｋＤａ	～６５	図５１Ｄ
３００	４１．５ｋＤａ	～１０８	図５１Ｅ

【０４６１】

ＰＡＭＡＭ　ＰＥＧ化

最も低いＰＡＭＡＭ対ｍＰＥＧ$_{2k}$比について手順を例示的に記載する。１０μＬのＤＭＳＯに溶解したＰＡＭＡＭ（３３３μｇ、１２．８ｎｍｏｌ）溶液に、１３μＬのＤＭＳＯに溶解したｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳ（０．２６８ｍｇ、１２８ｎｍｏｌ）を追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、２ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ６）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、バッチを、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ　１５ｍＬ遠心フィルター（１０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を用いた遠心濾過によって濃縮した。濃縮されたバッチをＰＤ１０サイズ排除カラムに通し、次に凍結乾燥をして、白色の綿毛状の粉末を得た。収量は決定されなかった。

【０４６２】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図５２に例解されている。ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図５２Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３３．４６　ｋＤａ（［ＭＨ］，ＰＡＭＡＭ－［ｍＰＥＧ$_{2k}$］$_3$）。

【０４６３】

他のＰＡＭＡＭ－ｍＰＥＧ$_{2k}$コンジュゲートの合成は、上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１８において強調されている。

【０４６４】

【表５６】

表１８．　ＰＡＭＡＭ－ｍＰＥＧ$_{2k}$合成の反応パラメータ

ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳ仕込み当量，対ＰＡＭＡＭ	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるコンジュゲートの質量	ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたｍＰＥＧ$_{2k}$分子	もたらされたＭＳスペクトル
１０	２８．５ｋＤａ	～３	図５２Ｃ
２０	４３．０ｋＤａ	～８	図５２Ｄ
１００	６２．８ｋＤａ	～１８	図５２Ｅ

【０４６５】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$について、手順を例示的に

記載する。Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$（０．４１ｍｇ、４．７１ｎｍｏｌ）をフリーズドライし、１００μＬのＤＭＳＯに溶解した。ＤＭＳＯに溶解したＤＢＣＯ－ＰＥＧ$_{13}$－ＮＨＳエステル（０．１９７ｍｇ、１８８ｎｍｏｌ）をＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１溶液に追加し、混合物を８００ｒｐｍかつ室温でＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で振盪した。３ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：０．１ｍｇ（２２％）。

【０４６６】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３６Ｄ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ９２．５ ｋＤａ（[ＭＨ]，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ），５３．０ ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ）。

【０４６７】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$－（ＤＢＣＯ）$_{38}$及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$の合成は、上に記載されている方法論によって行われた。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１９において強調されている。

【０４６８】

【表５７】

表１９． Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成の反応パラメータ

用いられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－サポニンバッチ	ＤＢＣＯ－ＰＥＧ１３－ＮＨＳ仕込み当量	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによる質量	ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたＤＢＣＯ分子	もたらされたコンジュゲート
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$	４０	７６．３ｋＤａ	～３８	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$－（ＤＢＣＯ）$_{38}$、図３６Ｃ
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$	４０	９２．５ｋＤａ	～１０	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$、図３６Ｄ

【０４６９】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$（０．３ｍｇ、４．８ｎｍｏｌ）をフリーズドライし、１００μＬのＤＭＳＯに溶解した。ＤＭＳＯに溶解したＤＢＣＯ－ＰＥＧ$_{13}$－ＮＨＳエステル（０．２０２ｍｇ、１９４ｎｍｏｌ）をＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－Ｎ

Ｃ－ＳＯ１８６１溶液に追加し、混合物を８００ｒｐｍかつ室温でＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で振盪した。３ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：０．１ｍｇ（２２％）。質量分析は、ＰＡＭＡＭ分子当たり３０個のＤＢＣＯ部分のコンジュゲート化を指示している。

【０４７０】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３６Ｂ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ９３．２ ｋＤａ（[ＭＨ]，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ），４９．６ ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ）。

【０４７１】

ＥＧＦジアンチン及びジアンチン発現

プラスミドＤＮＡ（Ｈｉｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－ｐＥＴ１１ｄ又はＨｉｓ－ジアンチン－ｐＥＴ１１ｄ）［２０］を、ケミカルコンピテントＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＮｉＣｏ２１（ＤＥ３）（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（登録商標），Ｉｎｃ．）にトランスフォーメーションし、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを足した３ｍＬ溶原培地によって３７℃において２００ｒｐｍで５ｈ成長させた。これらの細菌を用いて、３７℃での一晩培養のために、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを足した５００ｍＬ溶原培地に接種した。続いて、培養体積を２Ｌにスケールアップし、細菌を、０．９という光学密度（Ａ６００）まで成長させた。タンパク質発現を、１ｍＭの最終濃度でのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）の追加によって誘導した。細胞を３７℃かつ２００ｒｐｍでさらに３ｈ成長させた。遠心（５ｍｉｎ、５，０００ｇ、４℃）後に、細胞ペレットを、２０ｍＬのリン酸緩衝食塩水（$Ｃａ^{2}$及び$Ｍｇ^{2}$を有するダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．４）に再懸濁し、－２０℃で保存した。融解後に、タンパク質を超音波装置（Ｂｒａｎｓｏｎ Ｓｏｎｉｆｉｅｒ ２５０、Ｇ． Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ）によって放出した。溶液を遠心し（１５，８００ｇ、３０ｍｉｎ、４℃）、２０ｍＭイミダゾール濃度に調整した。構築物はＮ末端Ｈｉｓタグを含有し、ニッケルニトリロ三酢酸クロマトグラフィー（Ｎｉ－ＮＴＡアガロース、Ｑｉａｇｅｎ、ヒルデン、ドイツ）により精製した。イミダゾール（２０～２５０ｍＭ）による溶出後に、溶出液を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）（１２％）によって分析した。ジアンチン－ＥＧＦ又はジアンチンを含有する画分を、２Ｌのキチン結合ドメイン緩衝液（２０ｍＭトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン／ＨＣｌ、５００ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ８．０）に対して４℃で透析した。キチンカラムアフィニティークロマトグラフィーによるさらなる精製が、Ｎｉ－ＮＴＡアガロースに対する結合活性を有する細菌タンパク質を除去するための用をなした。キチン結合ドメイン緩衝液による溶出後に、画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１２％）によって分析した。ジアンチン－ＥＧＦ又はジアンチンを含有する画分を、５ＬのＰＢＳに対して４℃で透析した。精製タンパク質を、Ａｍｉｃｏｎ遠心フィルターデバイス（１０ｋＤａ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、エシュボルン、ドイツ）により濃縮した。タンパク質濃度をビシンコニン酸アッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ、ロックフォード、ＵＳＡ）によって決定した。

【０４７２】

ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８合成

ＰＢＳ中のジアンチン－ＥＧＦ（２４０μｇ、６．７ｎｍｏｌ）溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルター内に置き、４，０００ｒｐｍかつ４℃で３０ｍｉｎ、３回遠心した。各サイクル後に、Ａｍｉｃｏｎフィルターに、ｐＨ９の０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液を再充填した。第３の遠心サイクルの後に、体積を遠心

により０．５ｍＬまで縮減した。ジアンチン－ＥＧＦ炭酸ナトリウム溶液を２ｍＬ反応チューブ内に置き、１０μＬ　ＤＭＳＯに溶解したＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８５－ＴＦＰ（５０μｇ、５６ｎｍｏｌ）をタンパク質溶液に追加した。ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で８０ｍｉｎ振盪した。振盪後に、ミックスをセファデックスＧ２５Ｍサイズ排除カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＰＤ１０カラム）に通した。ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８コンジュゲートを、ｐＨ９の０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液中の溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のために取った。収量：２１０μｇ（８５％）。

【０４７３】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３７Ｄ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３６．８　ｋＤａ（[ＭＨ]，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８），ｍ／ｚ　３３．６　ｋＤａ（[ＭＨ]，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８），１８．８　ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８），１６．６　ｋＤａ（[ＭＨ]^{2}，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８）。

【０４７４】

ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８合成

ＰＢＳ中のジアンチン（１８４μｇ、６．２ｎｍｏｌ）溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルター内に置き、４，０００ｒｐｍかつ４℃で３０ｍｉｎ、３回遠心した。各サイクル後に、Ａｍｉｃｏｎフィルターに、ｐＨ９の０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液を再充填した。第３の遠心サイクルの後に、体積を遠心により０．５ｍＬまで縮減した。ジアンチン炭酸ナトリウム溶液を２ｍＬ反応チューブ内に置き、３．５μＬ　ＤＭＳＯに溶解したＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８　５－ＴＦＰ（１６．７μｇ、１９ｎｍｏｌ）をタンパク質溶液に追加した。ミックスを、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で、８００ｒｐｍかつ室温で８０ｍｉｎ振盪した。振盪後に、ミックスをセファデックスＧ２５Ｍサイズ排除カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＰＤ１０カラム）に通した。ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８コンジュゲートを、ｐＨ９の０．１Ｍ炭酸ナトリウム緩衝液中の溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のために取った。収量：決定されなかった。

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３８Ｄ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３０．７　ｋＤａ（[ＭＨ]，ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８）。

【０４７５】

ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_{3}$及びジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ$_{12}$－Ｎ$_{3}$合成

ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_{3}$について、手順を例示的に記載する。ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８（７０μｇ、１．９ｎｍｏｌ）炭酸ナトリウム溶液を２ｍＬ反応チューブ内に置き、９μＬ　ＤＭＳＯに溶解したアジド－ＰＥＧ$_{3}$－Ｓ－Ｓ－ＮＨＳ（１２０μｇ、２７２ｎｍｏｌ）をタンパク質溶液に追加した。ミックスを、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で、８００ｒｐｍかつ１５℃で１２ｈ振盪した。振盪後に、反応ミックスをＰＢＳで希釈し、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルターを用いて、４，０００ｒｐｍかつ４℃での遠心濾過によってＰＢＳで洗浄した。

【０４７６】

収量：５４μｇ（７０％）。

【０４７７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３７Ｅ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　４０．８　ｋＤａ（[ＭＨ]，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_{3}$），ｍ／ｚ　３７．５　ｋＤａ（[ＭＨ]，ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_{3}$）。

【０４７８】

ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_{3}$及びジアンチン－ＥＧ

Ｆ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ$_{12}$－Ｎ$_3$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、用いられたアジド－ＰＥＧリンカーが異なった。それぞれのアジド－ＰＥＧリンカー、それらの仕込み当量、及びコンジュゲートのそれぞれの質量が、表２０において強調されている。

【０４７９】

【表５８】

表２０．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ－Ｎ$_3$合成の反応パラメータ

用いられた毒素バッチ	用いられたアジド－ＰＥＧリンカー	アジド－ＰＥＧリンカー仕込み当量	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるコンジュゲートの質量	もたらされたコンジュゲート
ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８	アジド－ＰＥＧ$_3$－Ｓ－Ｓ－ＮＨＳ	１３５	４０．８ｋＤａ	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_3$－Ｎ$_3$
ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８	アジド－ＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳ	１３５	４３．３ｋＤａ	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ$_{12}$－Ｎ$_3$

【０４８０】

ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$

ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８（２４．５μｇ、０．８ｎｍｏｌ）炭酸ナトリウム溶液を２ｍＬ反応チューブ内に置き、９μＬのＤＭＳＯに溶解したアジド－ＰＥＧ$_3$－Ｓ－Ｓ－ＮＨＳ（３４μｇ、７８ｎｍｏｌ）をタンパク質溶液に追加した。ミックスを、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で、８００ｒｐｍかつ１５℃で１２ｈ振盪した。振盪後に、反応ミックスをＰＢＳで希釈し、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルターを用いて、４，０００ｒｐｍかつ４℃での遠心濾過によってＰＢＳで洗浄した。

【０４８１】

収量：１０．３μｇ（３９％）。

【０４８２】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３８　Ｅ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３２．９　ｋＤａ（［ＭＨ］，ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$）。

【０４８３】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－サポニン－毒素コンジュゲート合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯについての手順を例示的に記載する。ＭｉｌｌｉＱ水中のＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯ（１７μｇ、０．１８４ｎｍｏｌ）溶液を、１．５ｍＬ反応チューブ内のＰＢＳ中のジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ$_3$－Ｎ$_3$（３．６μｇ、０．０８９ｎｍｏｌ）溶液と混合し、反応ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ１５℃で２ｈ振盪した。振盪後に、小さいアリコートを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析、及びＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｅｒ（登録商標）ＶｅｒｓａＤｏｃ（商標）ＭＰ４０００イメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）による蛍光イメージングのために取り出した（図３９）。

【０４８４】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ

４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８、及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８の合成は、上に記載されている方法論によって行われたが、用いられたＰＡＭＡＭ－サポニン－ＤＢＣＯバッチ、用いられたアジド－毒素バッチ、及びそれらの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量が表２１において強調されている。

【０４８５】

【表５９】

表２１．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－サポニン－毒素合成の反応パラメータ

用いられたＰＡＭＡＭ－サポニン－ＤＢＣＯバッチ	ＰＡＭＡＭ－サポニン－ＤＢＣＯ仕込み当量	用いられたアジド－毒素バッチ	アジド－毒素仕込み当量	もたらされたコンジュゲート
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$－（ＤＢＣＯ）$_{38}$	３	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_{3}$－Ｎ$_{3}$	１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$	２．１	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_{3}$－Ｎ$_{3}$	１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－（ＤＢＣＯ）$_{30}$	２．３	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_{3}$－Ｎ$_{3}$	１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－（ＤＢＣＯ）$_{30}$	７．１	ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ$_{3}$－Ｎ$_{3}$	１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－（ＤＢＣＯ）$_{30}$	２．３	ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ$_{12}$－Ｎ$_{3}$	１	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８

【０４８６】

還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ（０．１９ｍｇ、１３　ｎｍｏｌ）及びＳＯ１８６１（０．７３ｍｇ

、０．３９μｍｏｌ）を、ｐＨ５の２００μＬの０．１Ｍ酢酸緩衝液に別々に溶解した。ＳＯ１８６１及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ溶液を混合し、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で２０ｍｉｎ振盪した。２０ｍｉｎの振盪後に、ＮａＣＮＢＨ$_3$（５ｍｇ、８１μｍｏｌ）を振盪反応溶液に追加し、反応混合物がＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪することを許した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：決定されなかった。

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図４０Ｂ、Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ８８．７ ｋＤａ（[ＭＨ]，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１），４９．２ ｋＤａ（[ＭＨ]^2，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１）。

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{30}$及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{10}$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、還元剤ＮａＣＮＢＨ$_3$が反応バッチに追加される前の時間が異なる。ＮａＣＮＢＨ$_3$追加のそれぞれの時間及びコンジュゲートのそれぞれの質量が、表２２において強調されている。

【０４８７】

【表６０】

表２２． 還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１合成、反応パラメータ

ＮａＣＮＢＨ$_3$追加前の反応ミックスを振盪する時間	ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによる質量	ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたＳＯ１８６１分子	もたらされたコンジュゲート
２０ｍｉｎ	８８．８ ｋＤａ	～３０	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{30}$、図４０Ｃ
１２ｈ	４８．０ ｋＤａ	～１０	Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{10}$、図４０Ｂ

【０４８８】

ポリ（ＳＯ１８６１）合成

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（０．１３ｍｇ、６３ ｎｍｏｌ）を３０μＬの脱気済みＭｉｌｌｉＱ水に溶解した。４μＬの脱気済みＭｉｌｌｉＱ水に溶解したＡＰＳ（０．２μｇ、０．８ ｎｍｏｌ）をＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ溶液に追加し、溶液をＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上に６０℃で置いた。それから、ＴＭＥＤＡ（ｃａｔ．、０．５μＬ）をミックスに追加し、ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ６０℃で２ｈ振盪した。２ｈ後に、小さいアリコートを質量分析による分析のために取り出した。

【０４８９】
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図４２Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　１８．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_9$），１６．０　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_8$），１４．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_7$），１２．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_6$），１０．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_5$），８．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_4$），６．２　ｋＤａ（［ＭＨ］，ポリ（ＳＯ１８６１）$_3$）。
【０４９０】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨペプチドカップリング
配列ＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫを有するカスタムペプチド（０．６ｍｇ、０．３μｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（０．８ｍｇ、０．３９μｍｏｌ）を、別々に２００μＬのＰＢＳに溶解した。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及びペプチド溶液を混合し、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。振盪後に、小さいアリコートを分析のために取り出した。収量：決定されなかった。
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図４５Ｂ）（ＲＮモード）：ｍ／ｚ　４．０５　ｋＤａ（［ＭＨ］$^-$，ペプチド－ＳＯ１８６１），３．９２　ｋＤａ（［ＭＨ］$^-$，ペプチド－ＳＯ１７３０），１．９８　ｋＤａ（［ＭＨ］$^-$，ペプチド），１．８６　ｋＤａ（［ＭＨ］$^-$，ＳＯ１８６１）。
【０４９１】
細胞生存率アッセイ
処置後に、細胞を３７℃で７２ｈｒインキュベーションした後、細胞生存率を、製造者の説明書に従って行われたＭＴＳアッセイによって決定した（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　９６（登録商標）ＡＱｕｅｏｕｓ　Ｏｎｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ細胞増殖アッセイ、Ｐｒｏｍｅｇａ）。手短には、ＭＴＳ溶液を、１０％ＦＢＳ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）を足したフェノールレッドなしのＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）によって２０ｘ希釈した。細胞をウェル当たり２００μＬ　ＰＢＳで１回洗浄し、これの後に１００μＬの希釈されたＭＴＳ溶液をウェル当たり追加した。プレートを３７℃でおよそ２０～３０分間インキュベーションした。続いて、４９２ｎｍの光学密度をＴｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で測定した。定量化のために、「培地のみ」ウェルのバックグラウンドシグナルを、全ての他のウェルから差し引いた後に、無処置／処置細胞の比を、処置ウェルのバックグラウンド補正済みシグナルに対して無処置ウェルのバックグラウンド補正済みシグナルを割ることによって計算した。
【０４９２】
ＦＡＣＳ分析
ＨｅＬａ細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）を足したＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）によって、５００，０００ｃ／プレートで、１０ｃｍディッシュ上に播種し、９０％のコンフルエンシーに達するまで４８　ｈｒ（５％CO_2、３７℃）インキュベーションした。次に、細胞を単一細胞へとトリプシン処理した（ＴｒｙｐｌＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ、Ｇｉｂｃｏ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。０．７５×10^6細胞を１５ｍＬファルコンチューブに移し、遠心した（１４００ｒｐｍ、３ｍｉｎ）。細胞ペレットを沈めたまま、上清を捨てた。ペレットを、ボルテックスシェーカー上でＦａｌｃｏｎチューブを穏やかにタップすることにより解離させ、細胞を４ｍＬの冷ＰＢＳ（Mg^2及びCa^2不含、２％ＦＢＳ）で洗浄した。洗浄後に、細胞を３ｍＬの冷ＰＢＳ（Mg^2及びCa^2不含、２％ＦＢＳ）に再懸濁し、３つの丸底ＦＡＣＳチューブに等しく分割した（１ｍＬ／チューブ）。細胞を再び遠心し、２００μＬの冷ＰＢＳ（Mg^2及びCa^2不含、２％ＦＢＳ）、又は１９５μＬの冷ＰＢＳ（Mg^2及びCa^2不含、２％ＦＢＳ）中に５μＬ抗体を含有する２００μＬの抗体溶液に再懸濁した。ＡＰ

ＣマウスＩｇＧ１κアイソタイプＣｔｒｌ ＦＣ（＃４００１２２、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）をアイソタイプ対照として用い、ＡＰＣ抗ヒトＥＧＦＲ（＃３５２９０６、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を用いて、ＥＧＦＲ受容体を染色した。ＨＥＲ２：ＡＰＣ抗ヒトＣＤ３４０（ｅｒｂＢ２／ＨＥＲ－２）（３２４４０８、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）。ＣＤ７１：ＡＰＣ抗ヒトＣＤ７１ ＃３３４１０８、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ。サンプルを、チューブローラーミキサー上で４℃において３０ｍｉｎインキュベーションした。その後で、細胞を冷ＰＢＳ（Mg^{2}及びCa^{2}不含、２％ＦＢＳ）で３ｘ洗浄し、ＰＢＳ中の２％ＰＦＡ溶液を用いて室温で２０ｍｉｎ固定した。細胞を冷ＰＢＳで２ｘ洗浄し、ＦＡＣＳ分析のために２５０～３５０μＬの冷ＰＢＳに再懸濁した。サンプルを、ＢＤ ＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩフローサイトメトリーシステム（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びＦｌｏｗＪｏソフトウェアによって分析した。

【０４９３】

【表６１】

表２３． 種々の細胞のＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、及びＣＤ７１の発現レベル

細胞株	ＥＧＦＲ発現レベル（ＭＦＩ）	ＨＥＲ２発現レベル（ＭＦＩ）	ＣＤ７１発現レベル（ＭＦＩ）
ＭＤＡ－ＭＢ－４６８	１６５６	１	１８６
Ａ４３１	１５９３	１０	３２２
ＣａＳｋｉ	４８１	１２	１８９
ＳＫ－ＢＲ－３	２８	１１６２	３３１
ＪＩＭＴ－１	５８	７４	１０７
ＨｅＬａ	９１	７	３１２
Ａ２０５８	１	５	５９

【０４９４】

結果

ＳＯ１８６１分子へのコンジュゲート化反応のための利用可能な化学基を考えて、４つの化学基を同定した。糖残基のアルコール及びジオール、トリテルペノイドバックボーン上のアルデヒド基、糖残基の１つの上のカルボン酸（グルクロン酸）、及びトリテルペノイドバックボーン上のアルケン基が、図２４において強調されている。

【０４９５】

各同定された化学基の長短（表２４）から判断すると、アルデヒド及びアルコール基は、可逆的コンジュゲート化反応にとって最も良く好適であり、アルケン及びカルボン酸（グルクロン酸）は、不可逆的／安定なコンジュゲート化反応にとって最も良く好適な基である。しかしながら、ＳＯ１８６１の分子構造上のアルデヒド基は、アルコールと比べて、可逆的コンジュゲート化反応にとって最も好適である。なぜなら、一方では、化学選択的な反応を許す１つのアルデヒドのみが構造上に存在するからである。なぜなら、他方では、アルデヒドは、種々の化学基、例えばアミン、ヒドラジド、及びヒドロキシルアミンとの可逆的コンジュゲート化反応を行い、イミン、ヒドラゾン、及びオキシムのような酸切断可能な部分を形成し得るからである。この因子は、所望の可逆的コンジュゲート化反応のための化学基についての選択の自由を可能化する。反対に、アルコールも、アセタール及びケタールの形成を介した可逆的コンジュゲート化反応の良好な候補であるが、それらはグリコシド構造上に大量に存在するので、化学選択性を欠く。

【０４９６】

不可逆的かつ安定な結合の形成のためには、カルボン酸が最も好適である。なぜなら、それは、ペプチド化学に用いられる普通のツール（例えば、カルボジイミドにより媒介されるアミド形成を介したアミンとの反応）によってアミド及びエステルを形成し得るからである。

【０４９７】

【表６２】

表２４．　サポニンコンジュゲート化反応に利用可能である官能基

官能基	長所	短所
アルコール（ジオール）	－　可逆的アセタール／ケタール形成にとって好適 －　活性化カルボン酸とのエステル形成にとって好適	－　化学選択性なしのアセタール／ケタール形成 －　化学選択性なしのエステル形成
アルデヒド	－　ヒドラジドとの化学選択的な可逆的ヒドラゾン形成にとって好適 －　アミンとの化学選択的な可逆的イミン形成にとって好適 －　ヒドロキシルアミンとの化学選択的な可逆的オキシム形成にとって好適	－　無保護のサポニン糖ジオールの存在下でのアセタール形成にとって好適でない
アルケン	－　化学選択的な不可逆的ラジカル反応にとって好適	－　可逆的なコンジュゲート化反応にとって好適でない －　水素化ステップが関わる反応にとって好適ではない
カルボン酸	－　活性化後のアミン及びアルコールとの化学選択的なアミド／エステル形成にとって好適	－　穏やかな条件下での可逆的なコンジュゲート化反応にとって好適でない

【０４９８】

それゆえに、エンドソーム脱出を向上させるサポニン（例えば、ＳＯ１８６１）の開発のために、ＳＯ１８６１上に存在する最も好適な化学基を用いて、非切断可能な及び切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」サポニンの生成を許す方法論を確立した（図２５）。

【０４９９】

非切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」サポニンを産生するために、ＳＯ１８６１のカルボン酸基を、ペプチドカップリング化学に用いられる試薬によって活性化して、活性なエステルを生成した（例えば、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、ＨＡＴＵ）。ＳＯ１８６１のもたらされた活性エステルはアミンと反応することができ、安定なアミド結合されたコンジュゲートを形成する（図２５Ａ）。

【０５００】

切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」サポニンを産生するために、ＳＯ１８６１のアルデヒド基をＥＭＣＨ（ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）リンカーと反応させる。ＥＭＣＨのヒドラジド基は、ＳＯ１８６１のアルデヒドとの酸切断可能なヒドラゾン結合を形成する。同時に、ＥＭＣＨリンカーはチオール（スルフヒドリル基）反応性であるマレイミド基を提示し、それゆえにチオールにコンジュゲート化され得る（図２５Ｂ）。

【０５０１】
６．５～７．５のｐＨ範囲で行われるときには、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミド基は、チオール及びチオールを持つポリマー構造との急速かつ特異的なマイケル付加反応を行う（図２５Ｂ）。加えて、ＳＯ１８６１とＥＭＣＨとの間の酸感受性のヒドラゾン連結部を利用して、酸性環境における骨格からのサポニン放出を行い得る（図２６）。それゆえに、ＥＭＣＨリンカーは、ｐＨ切断可能な戦略及びポリマー構造へのコンジュゲート化戦略両方の必要を充たす。
【０５０２】
ポリマー構造へのコンジュゲート化のための理想的なＥＭＣＨスペーサー長について、コンピュータシミュレーション（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ＣｈｅｍＢｉｏ３Ｄ　Ｖｅｒ．１３．０．０．３０１５）は、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ上のマレイミド基が分子の辺縁部に位置し、それゆえにチオールを持つポリマー構造にとってアクセス可能であるはずであるということを示している（図２７）。
【０５０３】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを合成するために、ＳＯ１８６１上のアルデヒド基からＥＭＣＨへの変換を許す戦略を開発した（図２８Ａ）。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲートを単離し、核磁気共鳴分光法（材料及び方法のセクション、図２２Ｂ参照）及びマトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）によって、図２８Ｂ及び２８Ｃ、及び図２３Ａに示されている通り、首尾良くキャラクタリゼーションした。
【０５０４】
ヒドラゾン結合のｐＨ依存的な加水分解を試験するために、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨをｐＨ　３のＨＣｌ溶液に溶解し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを２つの異なる時点で記録した（図２９）。図２９Ａ及び２９Ｂに示されている通り、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨに対応するｍ／ｚ　２０７０Ｄａのピークの明瞭な減少傾向が、図２９Ｂにおいて可視である。ＳＯ１８６１は加水分解中に生成されるので、ｍ／ｚ　１８６１Ｄａのピークの増大が記録され、これはｍ／ｚ　２０７０Ｄａの減少傾向に伴った。これらの結果は、ヒドラゾン結合が加水分解に対して応答性であり、それがＳＯ１８６１上に取り付けられている場合であっても切断されて来るということを示す。
【０５０５】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨをポリマー構造にコンジュゲート化するために、ポリマー構造のアクセス可能なアミンは、薬剤の２－イミノチオランの助けによってチオールに変換される。それから、ポリマー構造上の生成した自由なチオールは、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミド基へのチオール－エンマイケル型付加の求核剤として作用する（図３０）。この開発された方法論は、アクセス可能なアミン基を得るいずれかの利用可能なポリマー構造へのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのコンジュゲート化にとって好適であり、さらにその上、それぞれ、ポリマー構造に依存してコンジュゲート化されるＳＯ１８６１分子の数のコントロールを許す。
【０５０６】
「レディ・トゥ・コンジュゲート化サポニン」のポリマー構造へのコンジュゲート化の第１の概念実証は、タンパク質（ポリアミノ酸骨格の例）のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）のアミンの使用により得られた。コンジュゲート化後に、質量分析は、ｍ／ｚ～７０、～７２、及び～７４ｋＤａのＢＳＡ－ＳＯ１８６１の対応するピークを得た（図３１Ａ）。ｍ／ｚ　６６ｋＤａを有するＢＳＡの検出質量（図３１Ｂ）と比較して、得られたＢＳＡ－ＳＯ１８６１の質量は、ＢＳＡ当たり２、３、及び４つのＳＯ１８６１分子からなるＢＳＡ－ＳＯ１８６１コンジュゲートの混合物に対応する。
【０５０７】
「レディ・トゥ・コンジュゲート化サポニン」のポリマー構造へのコンジュゲート化の次の概念実証は、アミンを持つ第５世代（Ｇ５）デンドリマーポリ（アミドアミン）（共有結合的にカップリングされた赤色蛍光色素（Ｃｙ３）を有するＰＡＭＡＭ）の使用によ

り得られた。ＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３が、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及びＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ両方へのコンジュゲート化のためのポリマー構造として利用され、ＳＯ１８６１のポリマー構造へのコンジュゲート化のモデルとしての用をなした（図３２）。

【０５０８】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭの全てのアクセス可能なアミン基を、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭアミン当たり３倍過剰の２－イミノチオランを用いてチオールに変換し、次にＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの反応をした。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの３つの異なる仕込み当量（５、２０、及び５７）を３つの反応バッチに用いた。反応後に、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳでのＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１コンジュゲートの記録質量は、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込みを増大させることによって、対応する質量の増加を示す（図３３）。図３３Ｂ～Ｄに示されている通り、３つの異なる仕込みは、ＰＡＭＡＭデンドリマー当たり取り付けられた６、１３、及び５１個のＳＯ１８６１分子に対応するＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１コンジュゲートのｍ／ｚ　３８．４ｋＤａ、ｍ／ｚ　５３．９ｋＤａ、及びｍ／ｚ　１３３．８ｋＤａという得られた質量に対応した。

【０５０９】

別の反応では、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによる反応の前に、ある種の数のＰＡＭＡＭアミンのみがチオールに変換された。ここでは、２－イミノチオランの２つの異なる仕込み当量（８及び３２）及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの２つの異なる仕込み当量（５及び３０）をそれぞれ用いた。図３４に示される通り、反応後に、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳでのＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１コンジュゲートのそれぞれのスペクトルは、ｍ／ｚ　３７．７ｋＤａ（５仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）及びｍ／ｚ　８７．０ｋＤａ（３０仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）のピークを示す。ｍ／ｚ　３７．７ｋＤａ及びｍ／ｚ　８７．０ｋＤａの得られた質量は、５つ及び３０個のＳＯ１８６１分子が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１コンジュゲートに対応し、この方法によって、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのほぼ全ての仕込みがコンジュゲート化されたということを実証している。

【０５１０】

非ｐＨ切断可能なサポニンコンジュゲートの生成のために、ＳＯ１８６１のカルボン酸をＨＡＴＵによって活性化し、それから、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭのアミンと反応させ、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭとＳＯ１８６１との間に結合されたｐＨ安定なアミドを形成した。コンジュゲートのもたらされた質量を、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによってｍ／ｚ　６２．３ｋＤａの質量で検出した。これは、ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられた１７．５個のＳＯ１８６１分子を有するＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１（ＮＣ＝非切断可能）コンジュゲートに対応する（図３２Ｂ、図３５）。

【０５１１】

次に、サポニンがコンジュゲート化された骨格を、いわゆる歪み促進型のアルキン－アジド環化付加（ＳＰＡＡＣ、ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）による標的化された治療薬（例えば、標的化された毒素）への可能なコンジュゲート化のための連結点にコンジュゲート化して、機能化された骨格を得た。この反応のためには、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１（図３６Ｃ、Ｄ）及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１（図３６Ｂ）を、ヘテロ二官能性ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{13}$－ＤＢＣＯリンカーにコンジュゲート化した。これは、コンジュゲートの表面上に歪みのあるアルキンを生成した（図３６Ａ）。リンカーのＮＨＳ（Ｎヒドロキシスクシンイミド）部分は、ＰＡＭＡＭ－サポニンコンジュゲートの残りのアミンと反応し、骨格とリンカーとの間にアミド結合を形成した。コンジュゲート上のもたらされたＤＢＣＯ（ジベンゾシクロオクチン）部分は、標的化された治療薬上の対応するアジドとのＳＰＡＡＣを行うことができる。

【０５１２】

ジアンチン－ＥＧＦがモデルの標的化された毒素としての用をなし、ジアンチンは標的化されていない毒素としての用をなした。両方の毒素を、色素のテトラフルオロフェニルエステル（ＴＦＰ）誘導体を用いて、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８で標識した

。それから、色素標識されたタンパク質をヘテロ二官能性ＮＨＳ－ＳＳ－ＰＥＧ$_3$－アジドリンカーにコンジュゲート化して、ＰＡＭＡＭ－サポニンコンジュゲートに対するＳＰＡＡＣのための対応する化学部分を得た。Ｍａｌｄｉ－ＴＯＦ－ＭＳ測定は、１つのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８色素及び９つのＮＨＳ－ＳＳ－ＰＥＧ３－アジド分子が、ジアンチン－ＥＧＦ分子に取り付けられたということを示した（図３７、図３８）。さらにその上、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８標識されたジアンチン－ＥＧＦを、ヘテロ二官能性ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{12}$－アジドリンカーにコンジュゲート化した。これは、ジスルフィド結合を欠き、それゆえに非毒素切断可能な構築物を生成する。

【０５１３】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯコンジュゲートを、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８標識されたアジド毒素と反応させて、歪み促進型のアルキン－アジド環化付加を行った。反応物間のコンジュゲート化は、ゲル電気泳動と、ゲル電気泳動後のポリアクリルアミドゲル上のＰＡＭＡＭポリマーにのみ取り付けられたＣｙ３及び毒素にのみ取り付けられたＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８の蛍光シグナルの共局在とによって指示された（図３９）。

【０５１４】

ＰＡＭＡＭデンドリマーの代替的なポリマー構造として、１６個の官能性アミノ末端基とフォーカルポイントにアジド基とを有するＧ４‐デンドロン（ＰＦｄ‐Ｇ４‐アジド‐ＮＨ‐ＢＯＣ、Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｆａｃｔｏｒｙ）をＳＯ１８６１へのコンジュゲート化に利用した（図４６）。デンドリマーと比べてデンドロンを用いる利点は、デンドロン構造が見せるフォーカルポイントである。このフォーカルポイントは、オルソゴナルなクリック官能基によるそのポスト修飾の必要なしに、標的化された毒素への直接的コンジュゲート化を許す（図４７）。図４７に示されている通り、デンドロンは、ＰＡＭＡＭデンドリマーについて記載されている同じ方法論を経過した。手短には、部分的な色素標識及び脱保護の後に（図４８）、デンドロンのアミノ基を、チオール化試薬２－イミノチオランを用いてチオールに変換し、次にＳＯ１８６１－ＥＭＣＨへのコンジュゲート化をした。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨへのコンジュゲート化には、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの３つの異なる仕込み当量を用いた。デンドロン－ＳＯ１８６１コンジュゲートをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって分析した。予想された通り、３及び１０という低いＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ仕込み当量を用いたときに、デンドロン分子当たり１及び２つのＳＯ１８６１分子のコンジュゲート種が得られた（図４９Ｂ、Ｃ）。デンドロン分子当たり２２個のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ分子の仕込み当量を用いたときには、デンドロン当たり９つまでのＳＯ１８６１分子というより高いデンドロン－ＳＯ１８６１コンジュゲート種が得られた（図４９Ａ）。さらなる実験では、サポニンによって機能化されたデンドロンは、機能化された骨格を生むためにそのフォーカルポイントにおいて標的化された毒素にコンジュゲート化され、生物学的に評価されるであろう。

【０５１５】

先の例は、標的化された毒素などの治療薬物質の向上した細胞質送達のために、決定された量のＳＯ１８６１分子又は他のエンドソーム脱出向上因子分子のポリマー構造へのコンジュゲート化を許す方法論が開発されたということを実証している。

【０５１６】

ポリマー構造へのＳＯ１８６１の他のコンジュゲート化方法論をさらに試験するために、還元的アミノ化経路を用いた。これのためには、ＳＯ１８６１のアルデヒド基をＰＡＭＡＭアミンに直接的に結合し、結合されたイミンを形成した。イミン結合形成の次に、還元剤のシアノ水素化ホウ素ナトリウムの追加によって還元的アミノ化ステップをし、ＳＯ１８６１とＰＡＭＡＭとの間にｐＨ安定なアミン結合を形成した（図４０Ａ）。ＥＭＣＨ及びＨＡＴＵのアプローチと類似に、この方法論は、図４０Ｂ、Ｃに示されている通り、ポリマー当たりのコンジュゲート化されたサポニンの数のコントロールを許す。ここでは、ＰＡＭＡＭ－サポニンコンジュゲートが産生され、これらは、ＰＡＭＡＭ当たり１０個（図４０Ｂ）及び３０個（図４０Ｃ）のＳＯ１８６１分子という数を得た。

【０５１７】
論じられているポリマー及びタンパク質のアプローチの中のＳＯ１８６１骨格の開発のための別のアプローチは、ポリ（ＳＯ１８６１）アプローチである。このアプローチの発想は、ＳＯ１８６１を放出するｐＨ感受性の切断可能な結合を有するＳＯ１８６１分子のみからなるポリマーを生成することである。加えて、ポリ（ＳＯ１８６１）は、毒素及びバイオポリマーへのコンジュゲート化反応を行うことができるべきである。このアプローチの主なゴールは、それを可能な限り単純かつ費用効果的に保つことである。酸切断可能なＳＯ１８６１の生成のプロトコールは既に開発されている（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨアプローチ）ので、ＳＯ１８６１をさらに改変することなしに又はＳＯ１８６１分子上の他のコンジュゲート化部位を同定することなしに、重合開始剤の単純な追加によってＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを重合することが可能であるかどうかを見ることは興味深いであろう。過去には、いくつかの論文が、マレイミド基の二重結合を攻撃しそれゆえにマレイミドの二重結合に沿ってラジカル重合を開始するラジカル開始剤を用いることによって、マレイミド基の重合を論じている（２９～３１）。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはその構造上にマレイミド基を明らかにするので、この基は、酸切断可能な官能基を有するポリ（ＳＯ１８６１）を生むためのラジカル重合反応について可能性として探求され得る。重合反応が合理的な反応時間を有する場合には、生成したＳＯ１８６１ポリマーは、反応をクエンチするのみならず毒素又はバイオポリマーコンジュゲート化のための官能基をもまた生成するラジカルクエンチ剤によって、クエンチされ得る。かかる反応スキームは図４１によって例解される。ここでは、過硫酸アンモニウム（ＡＰＳ）及びテトラメチルエチレンジアミン（ＴＭＥＤＡ）の系がラジカル発生剤として例示として示され、アミノプロパンチオールがモデルラジカルクエンチ剤としての用をなす。クエンチ剤の例としてアミノプロパンチオールを用いて、生成したアミン基は、クリック可能な基へと特異的にさらに改変され得るか、又はポリ（ＳＯ１８６１）を毒素に直接的にコンジュゲート化するために用いられ得る。

【０５１８】
フリーラジカル重合において、反応条件はポリマー特性及び反応結果に対する莫大な影響を有する。例えば、温度、モノマー濃度、及び開始剤濃度は、ポリマーを形成することについて主要な役割を演じ、所望のポリマー特性に従って微調整されなければならない。ラジカル重合は通常は５０℃よりも上の温度で行われるので、第１の反応は６０℃の温度で行われた。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ重合が自発的に開始され得るかどうか、並びにＡＰＳ及びＴＭＥＤＡが重合度への影響を有するかどうかを見ることは興味深かった。それゆえに、３つの反応が同じＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ濃度を用いて行われたが、それらのＡＰＳ／ＴＭＥＤＡ組成は異なる。第１の反応では、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのみを６０℃に３ｈ加熱し、第２の反応はＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及びＡＰＳを含有し、第３の反応はＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、ＡＰＳ、及びＴＭＥＤＡを含有した。（これらの実験では、材料及び方法のセクション「ポリ（ＳＯ１８６１）合成」で言及される出発材料の同じ量及び濃度が用いられた）。バッチを、図４２Ａ～Ｃに示されている通りＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって分析した。興味深いことに、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨは、６０℃まで加熱されたときに、２、３、４、５、及び６つのＳＯ１８６１分子からなるオリゴマーを自発的に形成し始めるということが示された（図４２Ａ）。同じ温度における11^{-3}当量のＡＰＳの追加は、この傾向に対する影響を有さなかった（図４２Ｂ）。しかしながら、ＡＰＳ／ＴＭＥＤＡの開始剤系を用いたときには、１８．２ｋＤａの分子量を有する９つまでのＳＯ１８６１分子のＳＯ１８６１オリゴマーが検出され得た（図４２Ｃ）。加えて、オリゴマーの得られたピークは、図４２　Ａ及び４２　Ｂのピークと比較して大分大きいように見え、この反応ではＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのより高い消費を指示した。

【０５１９】
反応条件をさらに微調整するために、他の開始剤、例えば２，２’－アゾビス［２－メチル－Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）プロピオンアミド］及びアゾビスイソブチロニトリルのようなアゾ開始剤、並びに他の重合技術、例えばコントロールされたラジカル重合（原

子移動ラジカル重合、可逆的付加解裂連鎖移動など）が試験されるであろう。さらに、ＥＭＣＨの代わりとしての別のヒドラジドリンカーが考えられ得る。これは、マレイミド基よりもラジカル重合にとって好適である官能基（例えば、アクリル又はアクロリオール残基）を得る。

ＳＯ１８６１骨格の開発のための別のアプローチは、ＤＮＡアプローチである。このアプローチの発想は、いわゆるＤＮＡオリガミの概念を利用することである（Ｋｏｌｂ　ｅｔ　ａｌ，２００４；Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ，１９８８）。サポニンをそれにコンジュゲート化するためのポリマー構造又は集合体化したポリマー構造としてのＤＮＡオリガミは、もたらされるＤＮＡ－サポニン骨格の安定性、スケーラビリティ、並びに最終サイズ及び形状の精確なコントロールを包含するいくつかの固有の利点を提供し得る。これらのＤＮＡナノキャリアは天然ＤＮＡからなるので、それらは生体適合性であり、生細胞に対する毒性を示さず、内部細胞区画からのカーゴの放出を容易にし得る。かかる構造の多価性は、さらに、種々のペイロード、例えばフルオロフォア及び毒素についての標的化能を微調整すること及び高い容量を許し得る。それゆえに、このアプローチでは、それぞれ３’及び５’終端に化学的官能基を提供し、かつ構築物の最終形状のコントロールを許す配列のある種の欲されるエリアにおいてのみハイブリダイゼーションすることができるＤＮＡストランドが同定される。化学基は、例えば、既に開発されたＳＯ１８６１－ＥＭＣＨと３’及び５’ＤＮＡストランドの１つの上のチオール基との間のチオール－エン反応によって、サポニンをカップリングするために利用されるはずである。相補ＤＮＡストランドは、標的化された毒素へのカップリングのために用いられ得るクリック官能基を提供し得る。この概念が図４３に例解されている。

【０５２０】

サポニンを結合及び放出することができ、かつ重合して大きいポリ（ペプチド）様構造を形成し得るＤＮＡストランドの代わりに、特定のペプチド配列を用いることによる類似のアプローチが想像可能である。このアプローチでは、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ分子の計算されたサイズにフィットする長さを有するペプチド配列を同定し、購入した。これは配列の途中にシステイン残基を提供し、かつこれはＮ末端及びＣ末端両方にアミン基を得る。システイン残基を利用して、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミド基とシステイン残基のチオール基とのチオール－エン反応によって、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨをコンジュゲート化し得る。２つのアミン基を利用して、図４４に示される通り、好適な架橋剤によってペプチド－ＳＯ１８６１コンジュゲートを重合させ得る。

【０５２１】

コンジュゲート化研究は、カスタムペプチド（配列：ＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫ）へのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのコンジュゲート化が首尾良いということを示した。配列の途中のマレイミド反応性のシステイン及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨへのそのコンジュゲート化を持つペプチドを、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって分析した（図４５）。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルは、ｍ／ｚ　４０５３Ｄａのペプチド－ＳＯ１８６１コンジュゲートの予想されるピーク、及びＳＯ１７３０の対応するサポニン－ＥＭＣＨのペプチド－ＳＯ１８６１コンジュゲートであるｍ／ｚ　３８２１Ｄａの追加のピークを示している。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨがわずかに過剰（１．３当量）で用いられ、反応後にＳＯ１８６１－ＥＭＣＨピークが検出されなかったので、コンジュゲート化は定量的であったと見なされ得る。ペプチド－ＳＯ１８６１の第１の重合反応を開始するためには、酒石酸ジスクシンイミジルがアミン反応性架橋剤として利用されるであろう。

【０５２２】

ＳＯ１８６１のエンドソーム脱出向上特性は低いエンドソームｐＨ（＜ｐＨ５）でのみ暴露されるので、骨格又は機能化された骨格は、エンドソームの酸性化に干渉すること及びそれゆえにＳＯ１８６１の活性をブロックすることができる化学基を含有すべきではない。

【０５２３】

Ｇ５　ＰＡＭＡＭ（１２８個の第１級アミン及びおよそ１２６個の第３級アミン）及び

Ｇ４－デンドロン（１６個の第１級アミン）のアミン含有ポリマー構造を、これらの分子がＳＯ１８６１のエンドソーム脱出向上能を阻害するかどうかを決定するために試験した。ＨｅＬａ細胞におけるジアンチン－ＥＧＦ及び種々のＳＯ１８６１濃度との組み合わせの（ネイティブな又はチオール化された）ＰＡＭＡＭ又はデンドロン（ネイティブ）の同時投与実験を行った。エンドソーム酸性化の阻害の対照として、クロロキンを用いた。

【０５２４】

ＨｅＬａ細胞は十分なＥＧＦＲ細胞表面レベルを示す（図５０Ａ）。「ネイティブな」ＰＡＭＡＭ及びクロロキン両方は、Ｈｅｌａ細胞において、標的化された毒素のＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出、及び続いての殺細胞を阻害するということが観察される（図５０Ｂ）。５００ｎＭのＰＡＭＡＭはエンドソーム酸性化阻害剤クロロキンと等しい程度までも阻害するが、６６７ｎＭデンドロンは全く効果を有さない。「ネイティブな」ＰＡＭＡＭの阻害活性が、ＰＡＭＡＭ上のアミノ基の利用可能性を原因とするかどうかにさらに対処するために、ＰＡＭＡＭの第１級アミノ基を、２－イミノチオランとの反応により部分的にチオール化し（図５１）、１２８のうち１６個の（図５１Ｃ）、６５／１２８個の（図５１Ｄ）、及び１０８／１２８個の（図５１Ｅ）ブロックされた第１級アミンをもたらした。６５及び１０８個の第１級アミンのチオール化は、ＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害を克服するが、１６個までのアミン基のチオール化は、依然として、標的化された毒素のＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害効果を示すということが観察される（図５０Ｃ）。ＰＡＭＡＭの第１級アミノ基を、ｍＰＥＧ２ｋ－ＮＨＳとの反応によってもまた部分的にＰＥＧ化し（図５２）、１２８のうちの３つの（図５２Ｃ）、８／１２８個の（図５２Ｄ）、及び１８／１２８個の（図５２Ｅ）ブロックされた第１級アミンをもたらした。ＰＥＧ化により３つの第１級アミンのみをブロックすることは、ＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害を逆行させるために既に十分である（図５１Ｄ）。ＰＥＧ化の遮蔽効果は、最も蓋然的には、変換される少数のアミンを越えて拡がる。なぜなら、ＰＥＧ化は、十分なレベルに達する場合には、分子全体を遮蔽し得る水和層を導入することが公知であるからである。

【０５２５】

これらの結果は、ＰＡＭＡＭなどのポリマー構造上のある種の数の自由なアミノ基の存在が、エンドソーム酸性化をブロックし得、それゆえにＳＯ１８６１又は他のグリコシドのエンドソーム脱出活性を阻害し得るということを実証している。Ｇ４－デンドロンについて示された通り、アミノ基の数がより低い場合には、又はチオール化又はＰＥＧ化などのアミノ基が遮蔽されている場合には、阻害効果は逆行する。

【０５２６】

参照

Ｗｅｎｇ，Ａ．；Ｔｈａｋｕｒ，Ｍ．；Ｂｅｃｅｒｅｎ－Ｂｒａｕｎ，Ｆ．；Ｂａｃｈｒａｎ，Ｄ．；Ｂａｃｈｒａｎ，Ｃ．；Ｒｉｅｓｅ，Ｓ．Ｂ．；Ｊｅｎｅｔｔ－Ｓｉｅｍｓ，Ｋ．；Ｇｉｌａｂｅｒｔ－Ｏｒｉｏｌ，Ｒ．；Ｍｅｌｚｉｇ，Ｍ．Ｆ．；Ｆｕｃｈｓ，Ｈ．Ｔｈｅ ｔｏｘｉｎ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｏｆ ｔａｒｇｅｔｅｄ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ｔｏｘｉｎｓ ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｓ ｔｈｅｉｒ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｉｎｃｒｅａｓｅ ｂｙ ｓａｐｏｎｉｎｓ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｏｎｃｏｌｏｇｙ ２０１２，６，３２３－３３２．ｓａｐｏｎｉｎｕｍ ａｌｂｕｍ ｉｎ ａ ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃ ｗａｙ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ２００９，３２，７１３－７２５．

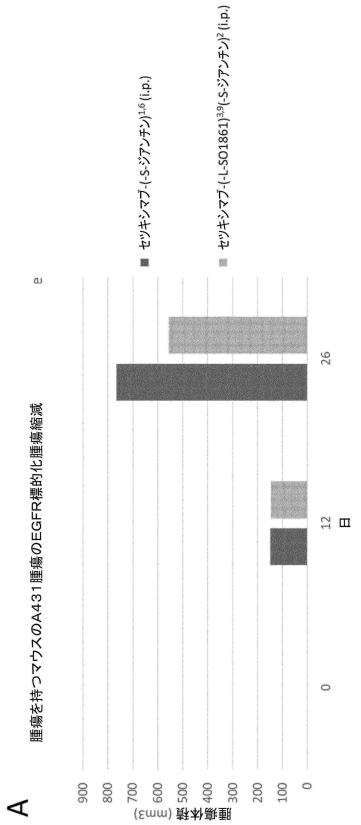
Ｓａｍａ，Ｓ．；Ｊｅｒｚ，Ｇ．；Ｓｃｈｍｉｅｄｅｒ，Ｐ．；Ｊｏｓｅｐｈ，Ｊ．Ｆ．；Ｍｅｌｚｉｇ，Ｍ．Ｆ．；Ｗｅｎｇ，Ａ．Ｐｌａｎｔ ｄｅｒｉｖｅｄ ｔｒｉｔｅｒｐｅｎｅｓ ｆｒｏｍ Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ ｅｌｅｇａｎｓ Ｍ．Ｂｉｅｂ．ｅｎａｂｌｅ ｎｏｎ－ｔｏｘｉｃ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｇｅｎｅ ｌｏａｄｅｄ ｎａｎｏｐｌｅｘｅｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１８，２８４，１３１－１３９．

Ｋｏｌｂ，Ｈ．Ｃ．；Ｆｉｎｎ，Ｍ．Ｇ．；Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ，Ｋ．Ｂ．Ｃｌｉｃｋ

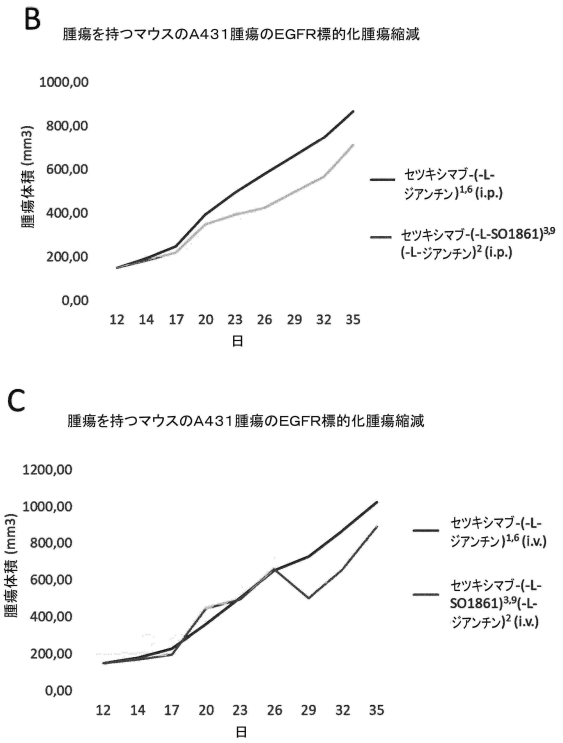
Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angewandte Chemie 2001, 40, 2004−2021.
Bird, R. E.; Hardmann, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S.; Whitlow, M. Single−chain antigen−binding proteins. Science 1988, 242, 423−426.
Y Zhang, Z Qu, S Kim, V Shi, B Liao1, P Kraft, R Bandaru, Y Wu, LM Greenberger and ID Horak, Down−modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)−based antisense oligonucleotides without transfection, Gene Therapy (2011) 18, 326−333.

【図面】

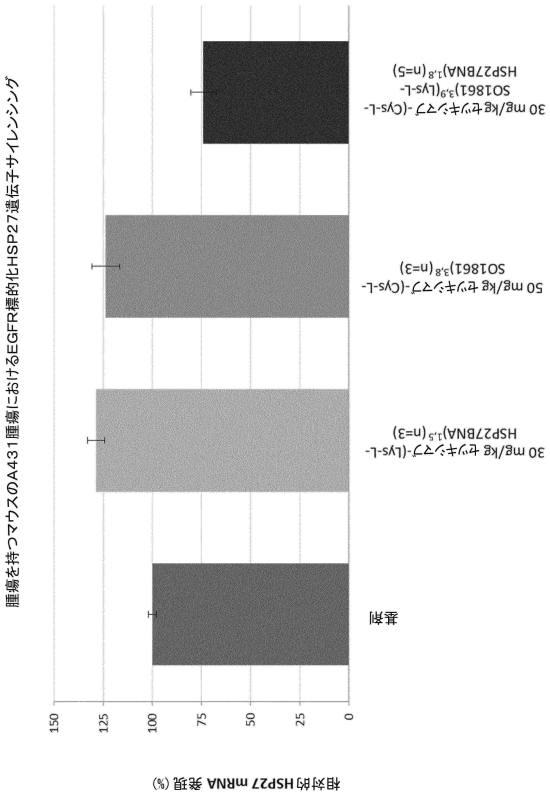
【図１－１】



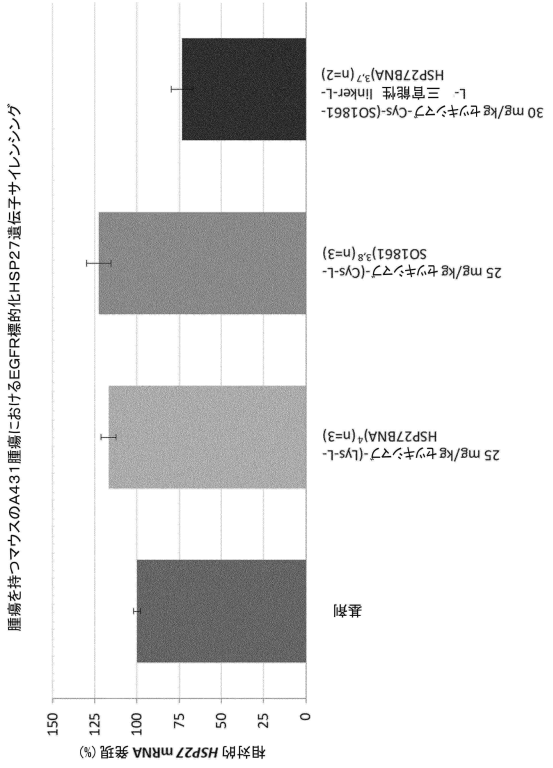
【図１－２】



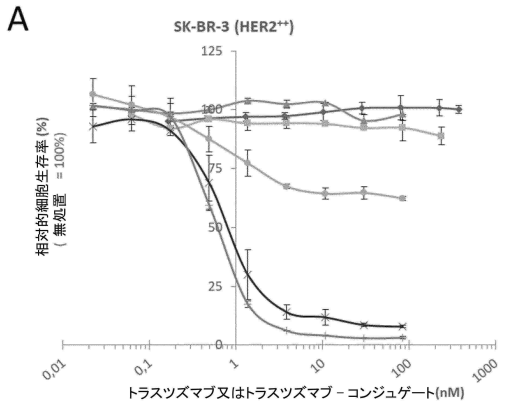
【図２】


腫瘍を持つマウスのA431腫瘍におけるEGFR標的化HSP27遺伝子サイレンシング
相対的HSP27 mRNA 発現 (%)
150
125
100
75
50
25
0
基剤
30 mg/kg ヒツキシラフ-(Lys-L-HSP27BNA)1.3 (n=3)
50 mg/kg ヒツキシラフ-(Cys-L-SO1861)3.8 (n=3)
30 mg/kg ヒツキシラフ-(Cys-L-SO1861)3.9(Lys-L-HSP27BNA)1.8 (n=5)

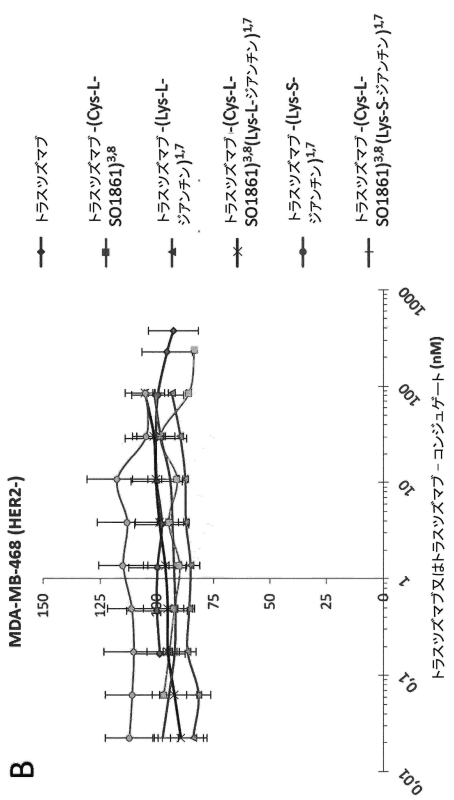
【図３】


腫瘍を持つマウスのA431腫瘍におけるEGFR標的化HSP27遺伝子サイレンシング
相対的 HSP27 mRNA 発現 (%)
150
125
100
75
50
25
0
基剤
25 mg/kg ヒツキシラフ-(Lys-L-HSP27BNA)4 (n=3)
25 mg/kg ヒツキシラフ-(Cys-L-SO1861)3.8 (n=3)
30 mg/kg ヒツキシラフ-(Cys-(SO1861-L- 三官能性 linker-L-HSP27BNA)3.7 (n=2)

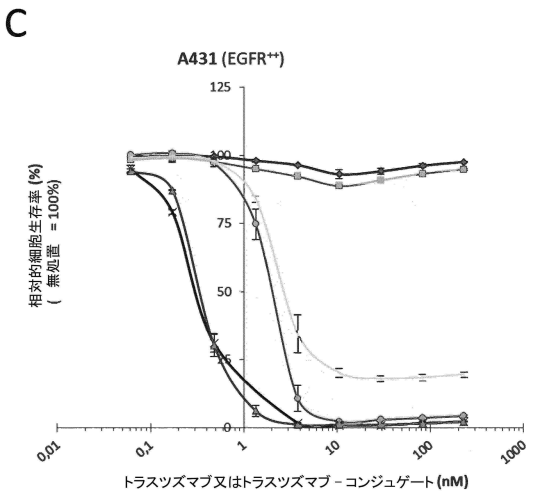
【図４－１】


A
SK-BR-3 (HER2++)
相対的細胞生存率 (%)
(無処置 = 100%)
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
トラスツズマブ又はトラスツズマブ－コンジュゲート(nM)

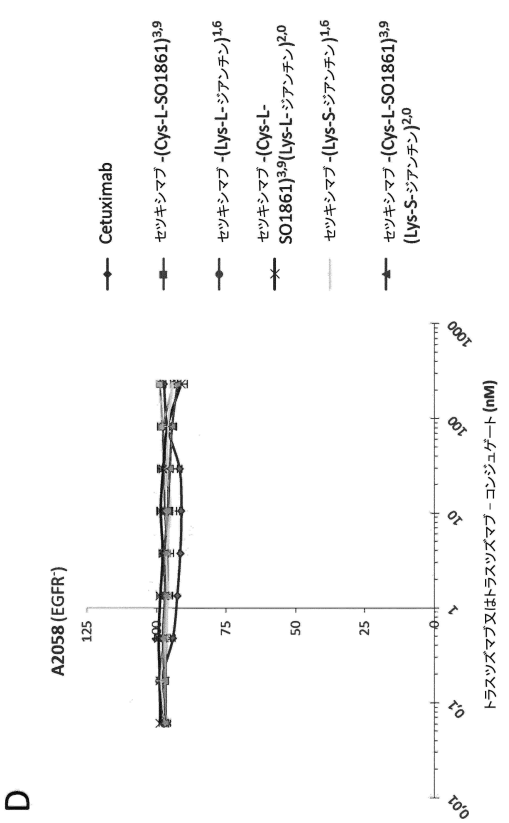
【図４－２】


トラスツズマブ
トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)3.8
トラスツズマブ-(Lys-L-ジアンチン)1.7
トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)3.8(Lys-L-ジアンチン)1.7
トラスツズマブ-(Lys-S-ジアンチン)1.7
トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)3.8 (Lys-S-ジアンチン)1.7
MDA-MB-468 (HER2-)
B
150
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
トラスツズマブ又はトラスツズマブ－コンジュゲート (nM)

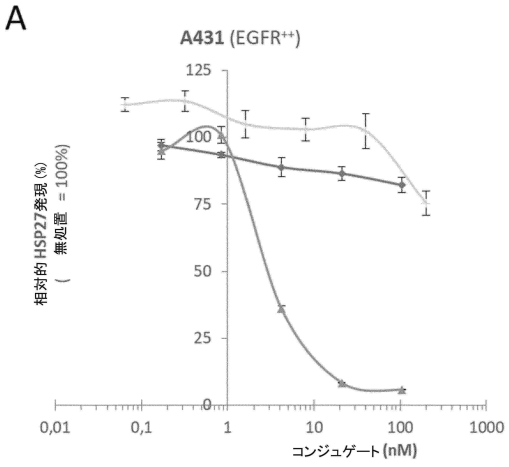
【図４－３】



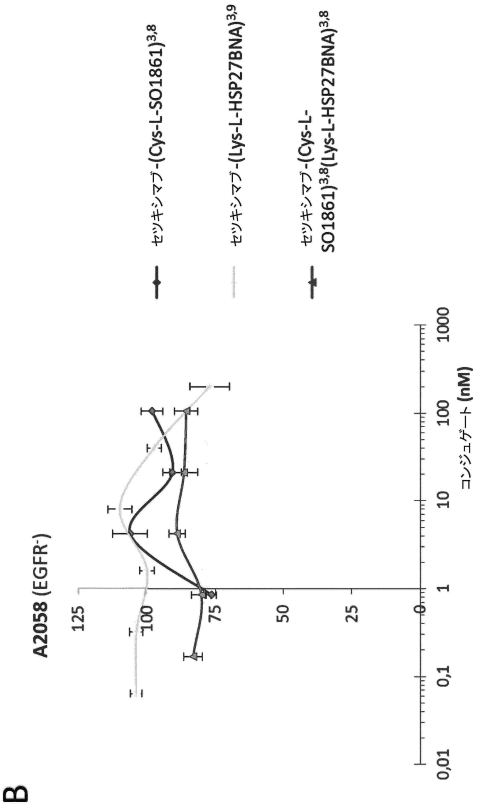
【図４－４】



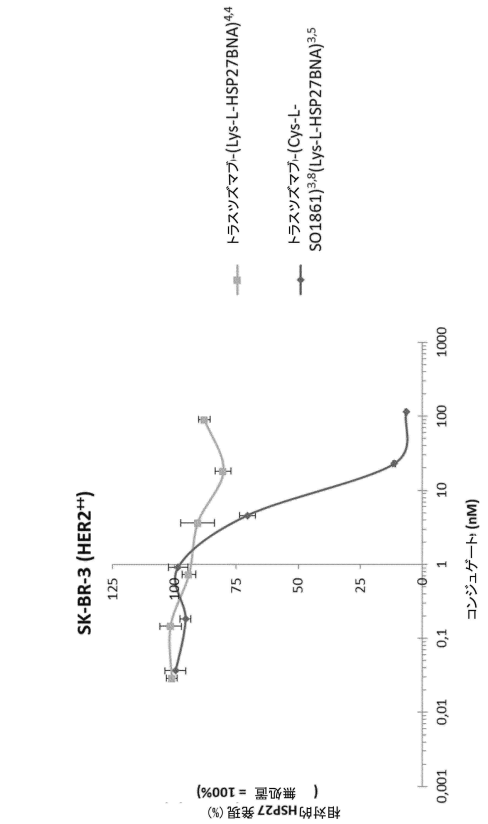
【図５－１】



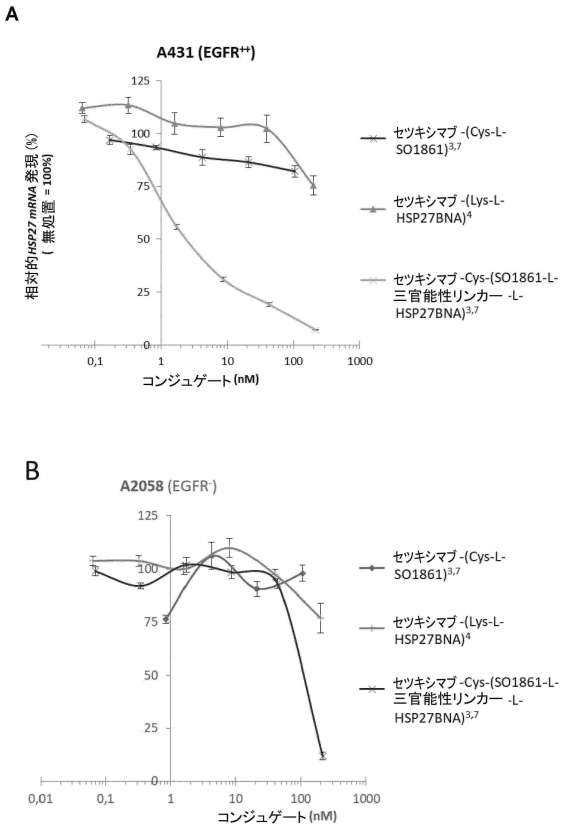
【図５－２】



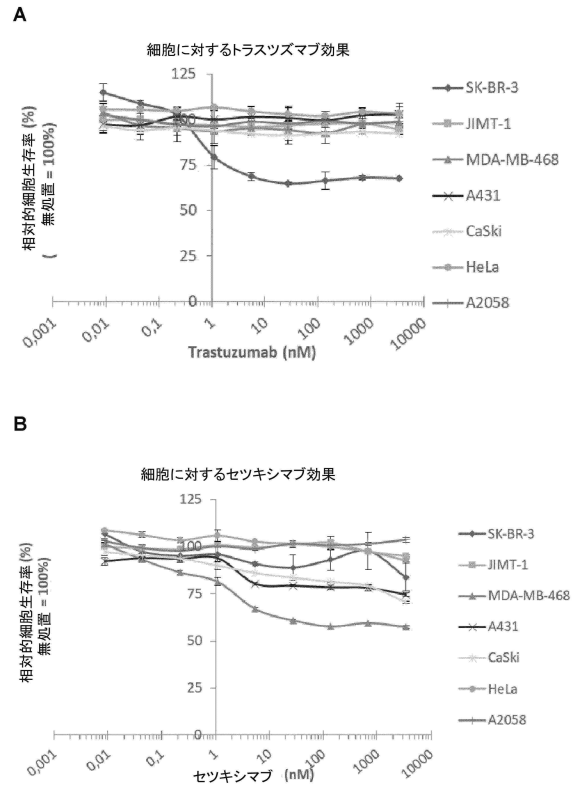
【図６】


トラスツズマブ-(Lys-L-HSP27BNA)4,4
トラスツズマブ-(Cys-L-SO1861)3,8(Lys-L-HSP27BNA)3,5
SK-BR-3 (HER2++)
コンジュゲート (nM)
相対的HSP27 発現 (%)
(無処置 = 100%)

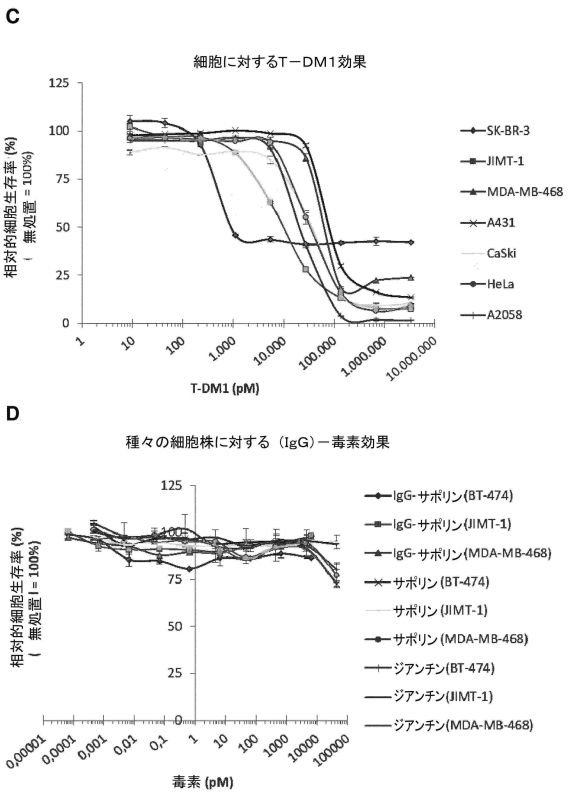
【図７】


A
A431 (EGFR++)
相対的HSP27 mRNA 発現 (%)
(無処置 = 100%)
コンジュゲート (nM)
セツキシマブ -(Cys-L-SO1861)3,7
セツキシマブ -(Lys-L-HSP27BNA)4
セツキシマブ -Cys-(SO1861-L-三官能性リンカー -L-HSP27BNA)3,7
B
A2058 (EGFR-)
コンジュゲート (nM)

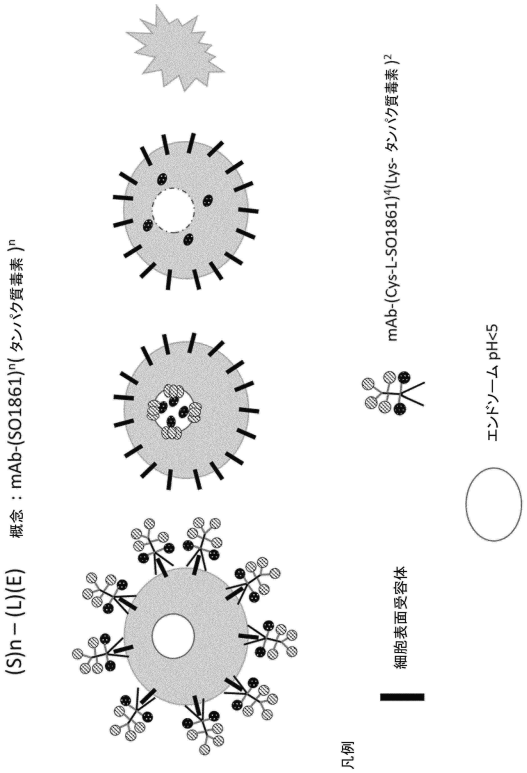
【図８－１】


A
細胞に対するトラスツズマブ効果
相対的細胞生存率 (%)
(無処置 = 100%)
Trastuzumab (nM)
SK-BR-3
JIMT-1
MDA-MB-468
A431
CaSki
HeLa
A2058
B
細胞に対するセツキシマブ効果
セツキシマブ (nM)

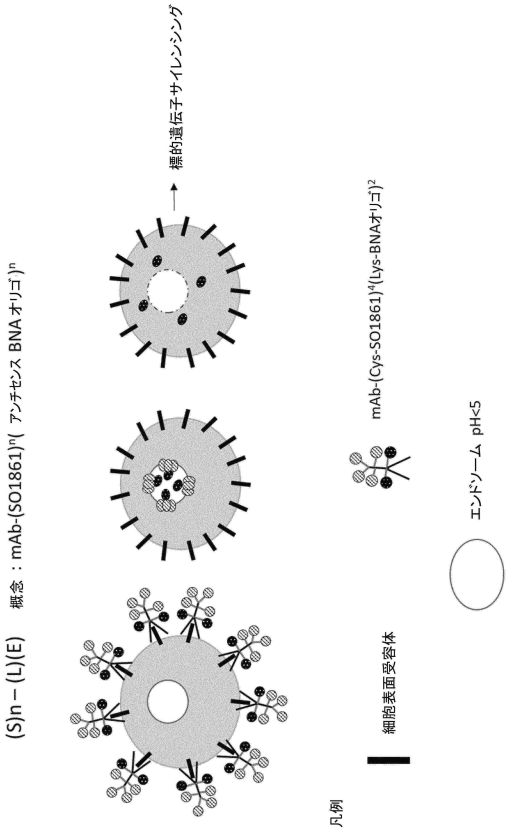
【図８－２】


C
細胞に対するT－DM1効果
相対的細胞生存率 (%)
(無処置 = 100%)
T-DM1 (pM)
SK-BR-3
JIMT-1
MDA-MB-468
A431
CaSki
HeLa
A2058
D
種々の細胞株に対する（IgG）－毒素効果
毒素 (pM)
IgG-サポリン(BT-474)
IgG-サポリン(JIMT-1)
IgG-サポリン(MDA-MB-468)
サポリン(BT-474)
サポリン(JIMT-1)
サポリン(MDA-MB-468)
ジアンチン(BT-474)
ジアンチン(JIMT-1)
ジアンチン(MDA-MB-468)

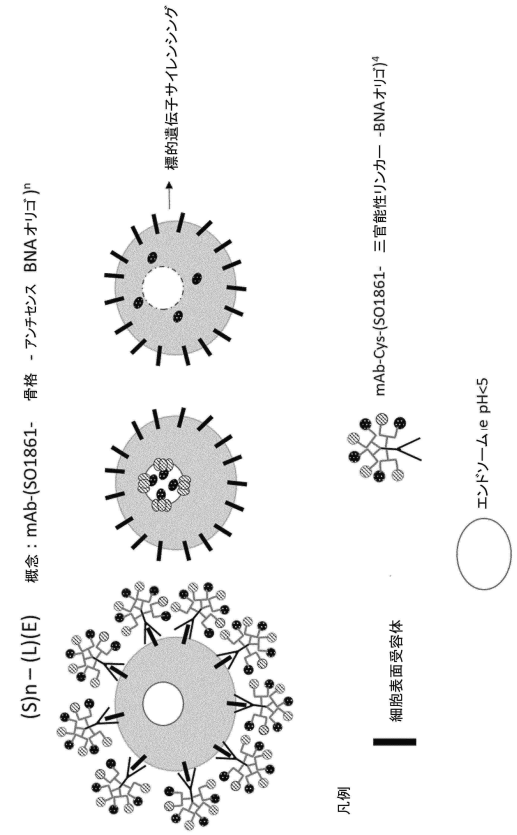
【図９】



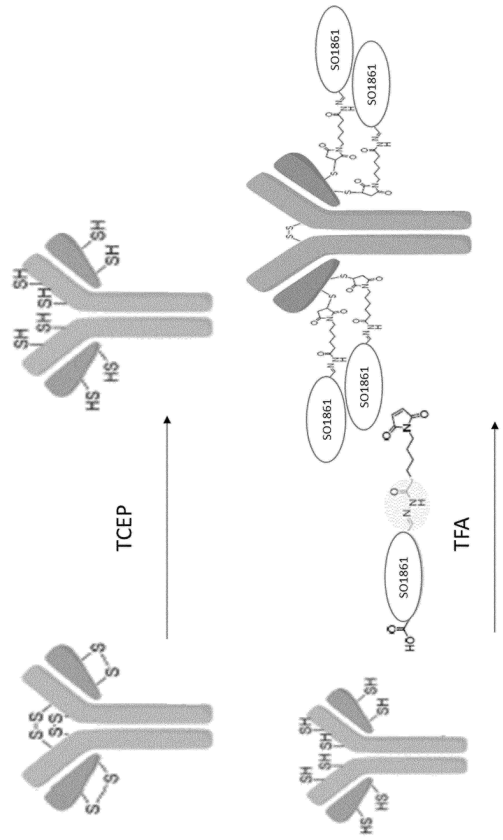
【図１０】



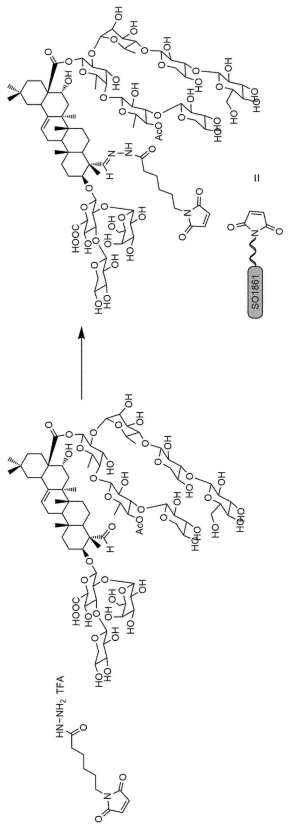
【図１１】



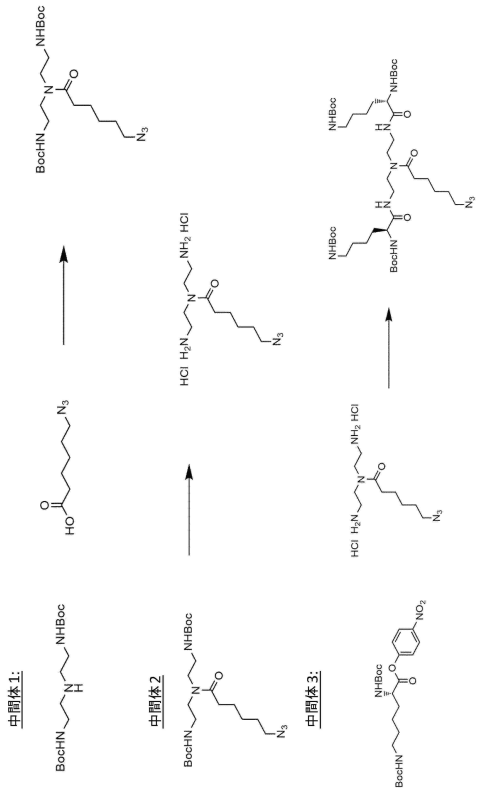
【図１２】



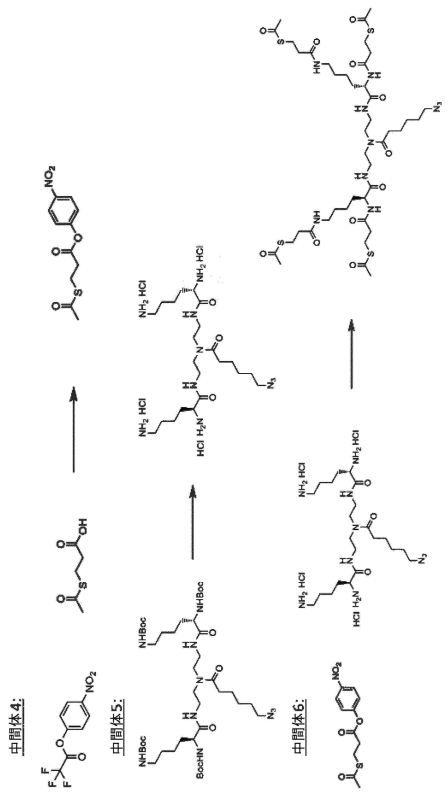
【図１３】



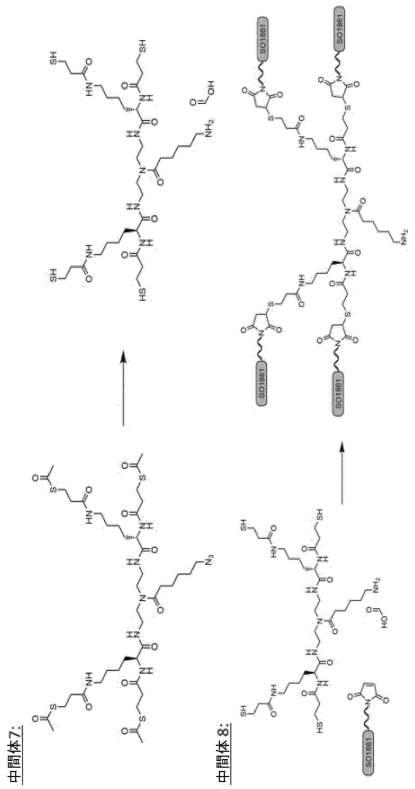
【図１４－１】



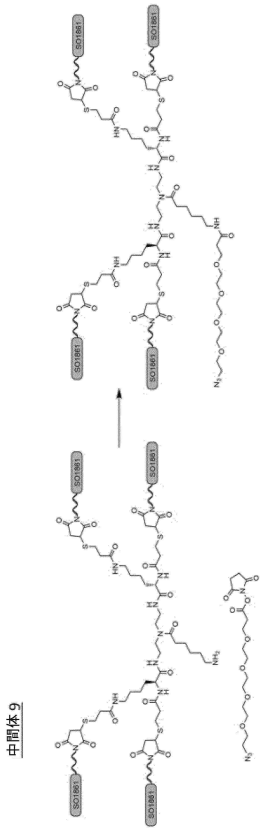
【図１４－２】



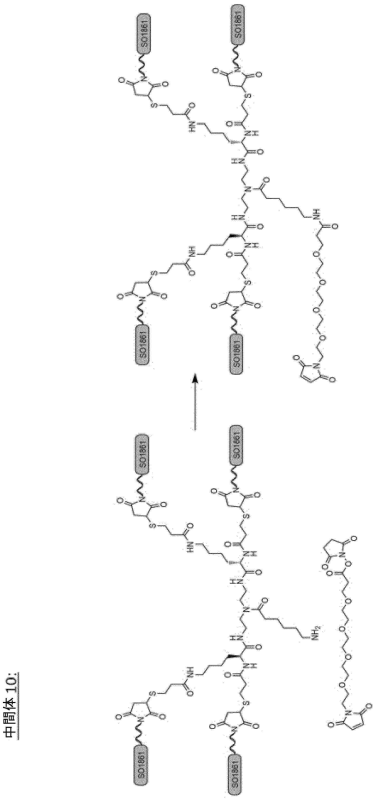
【図１４－３】



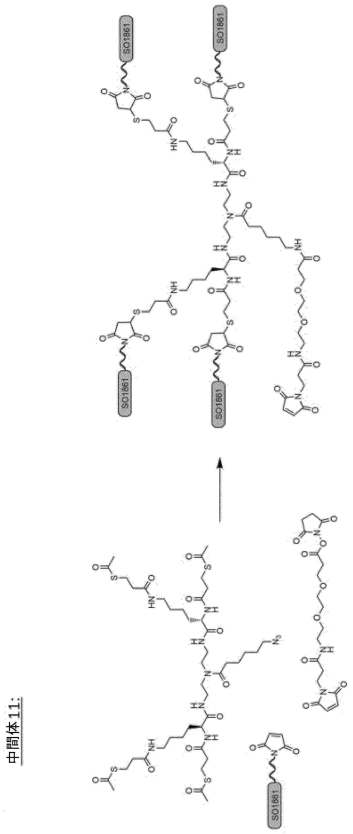
【図１４－４】



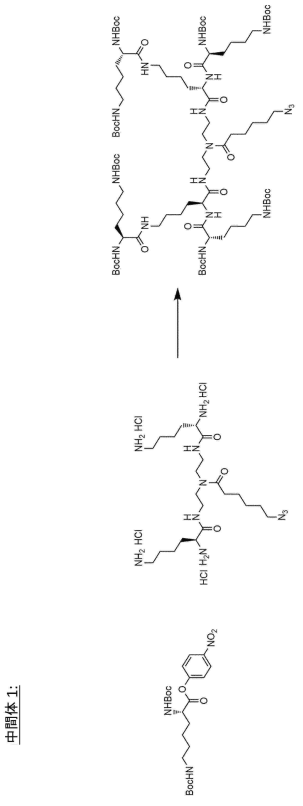
【図１４－５】



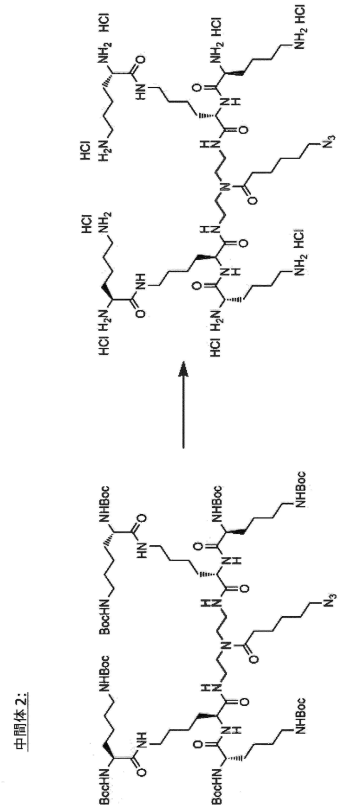
【図１４－６】



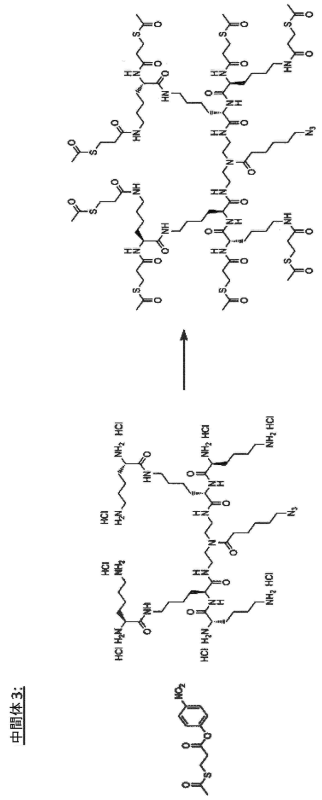
【図１５－１】



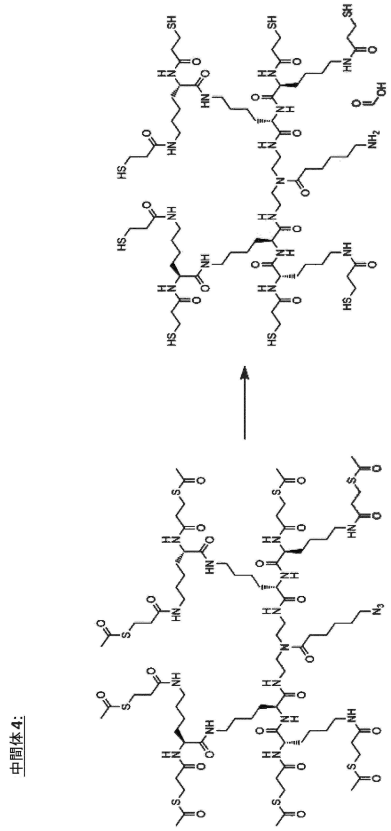
【図１５－２】



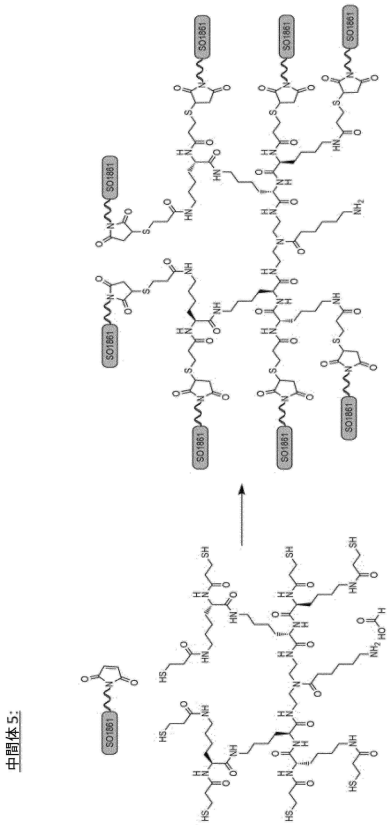
【図１５－３】



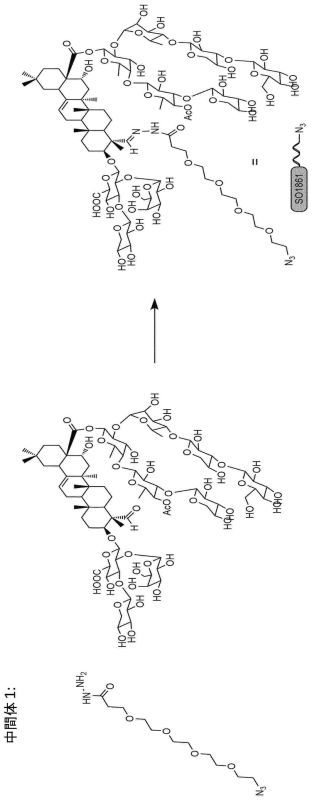
【図１５－４】



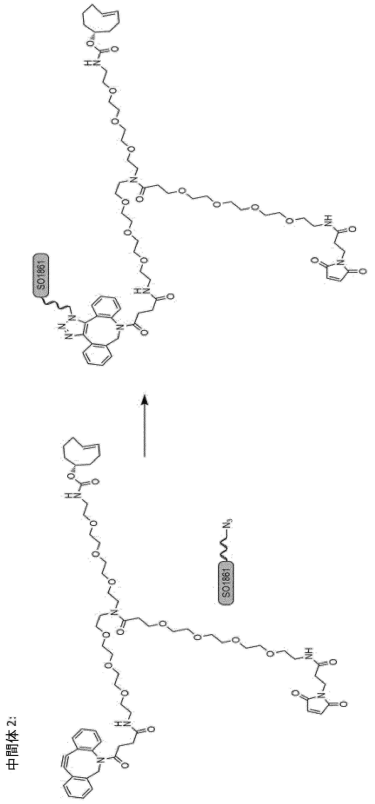
【図１５－５】



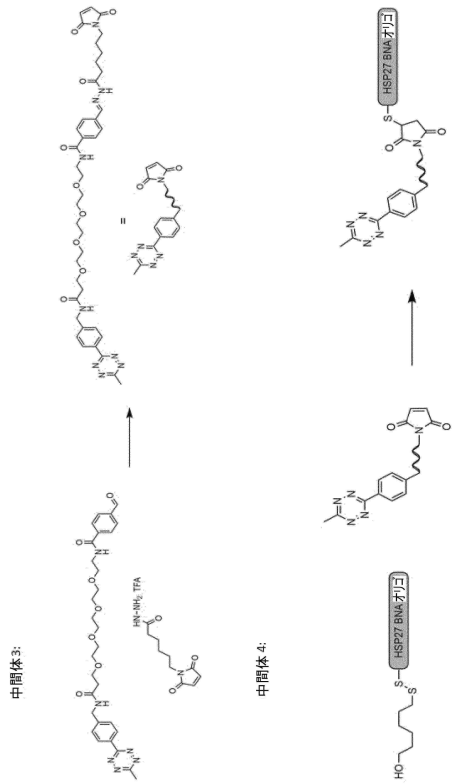
【図１６－１】



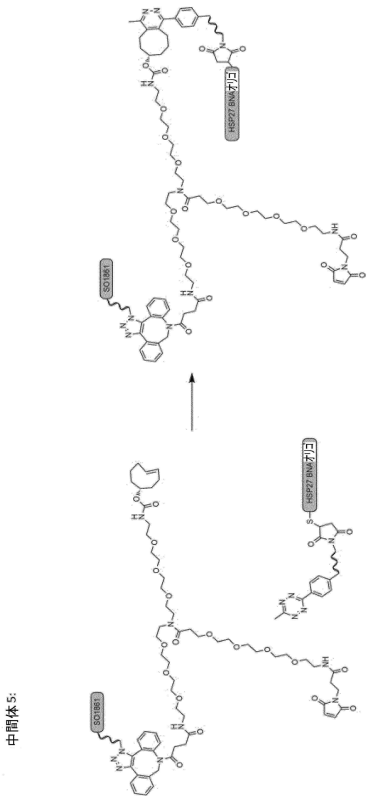
【図１６－２】



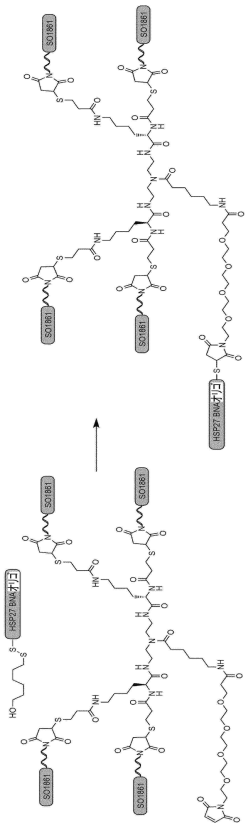
【図１６－３】



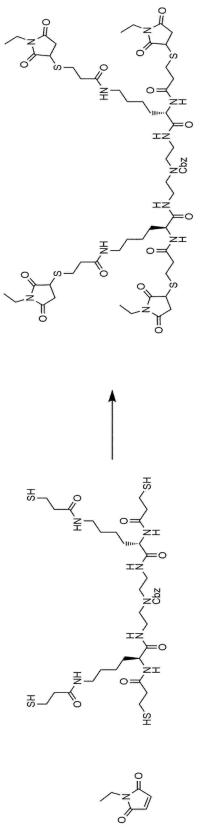
【図１６－４】



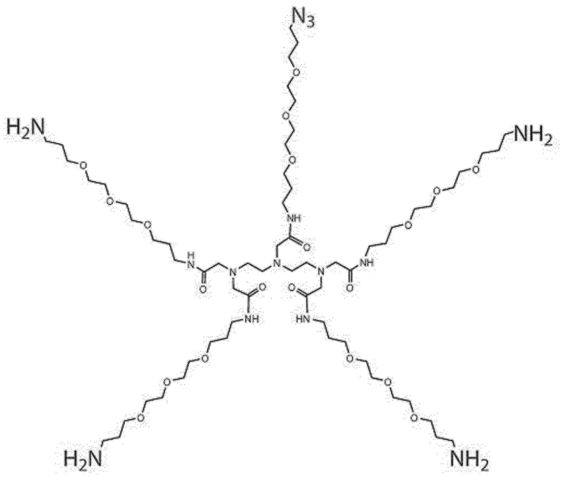
【図１７】



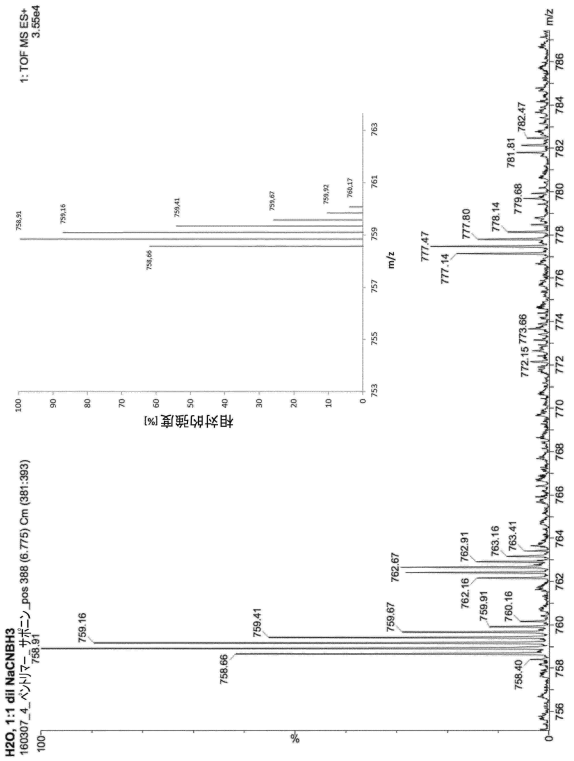
【図１８】



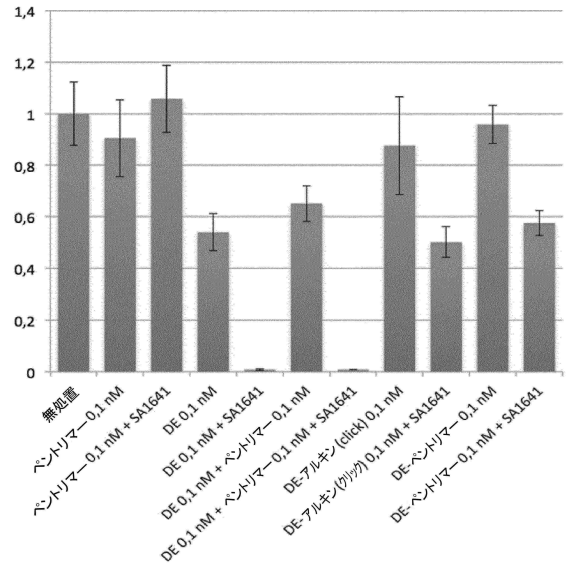
【図１９】



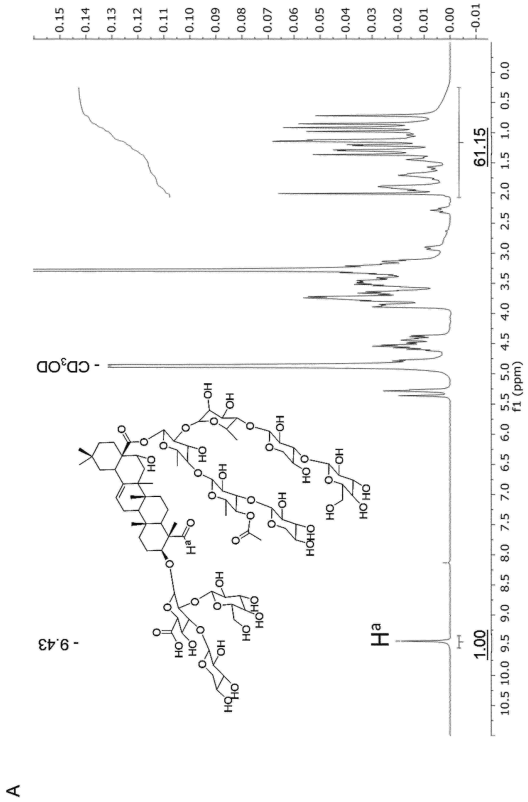
【図２０】



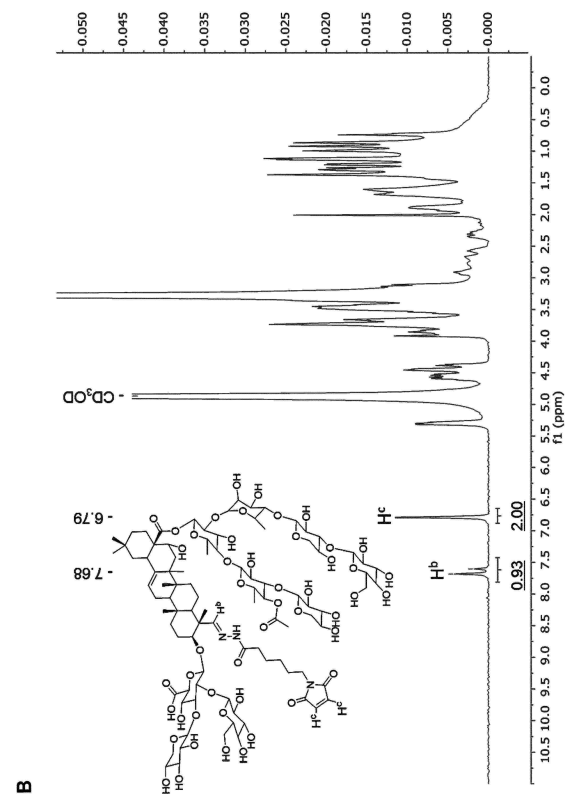
【図２１】



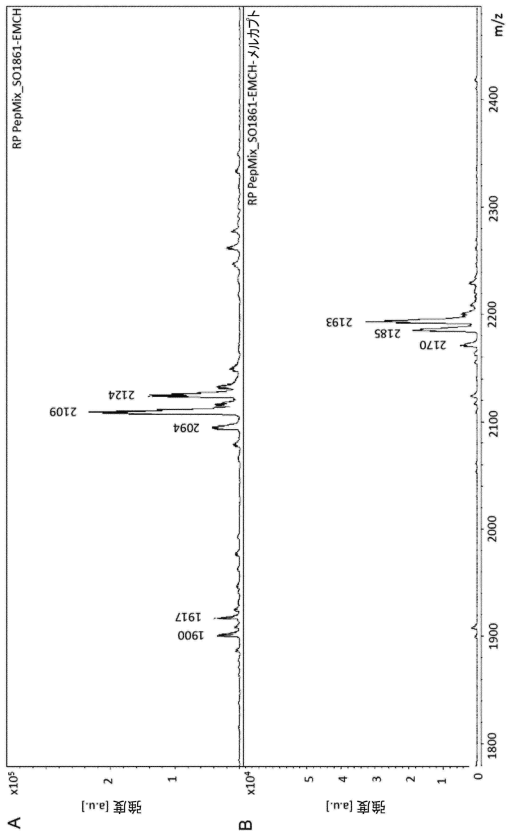
【図２２－１】



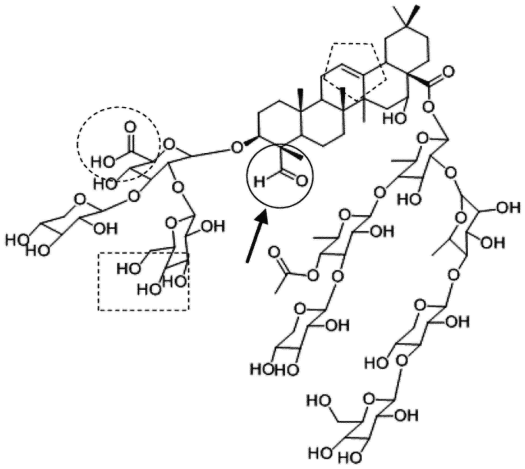
【図２２－２】



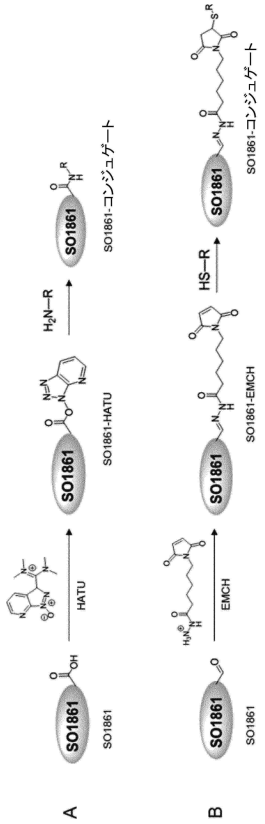
【図２３】



【図２４】



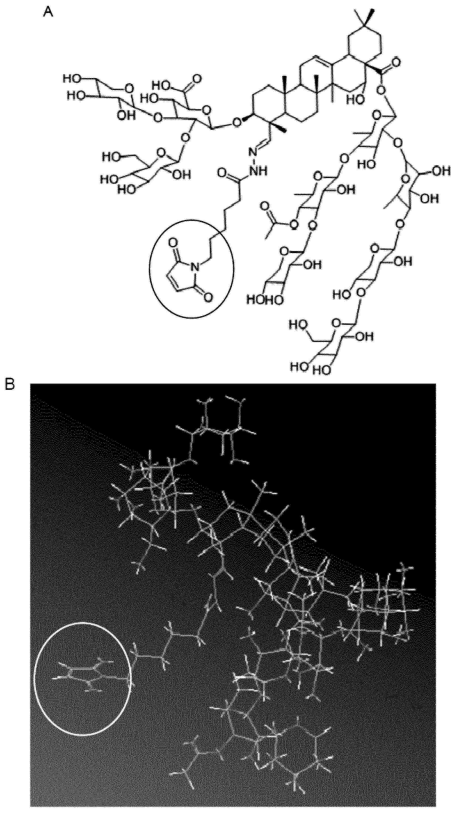
【図２５】



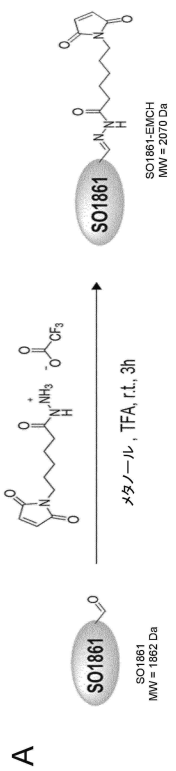
【図２６】



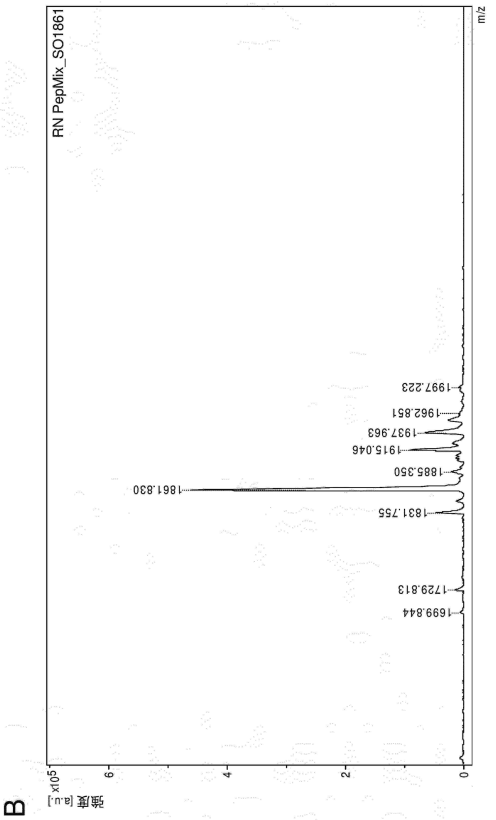
【図２７】



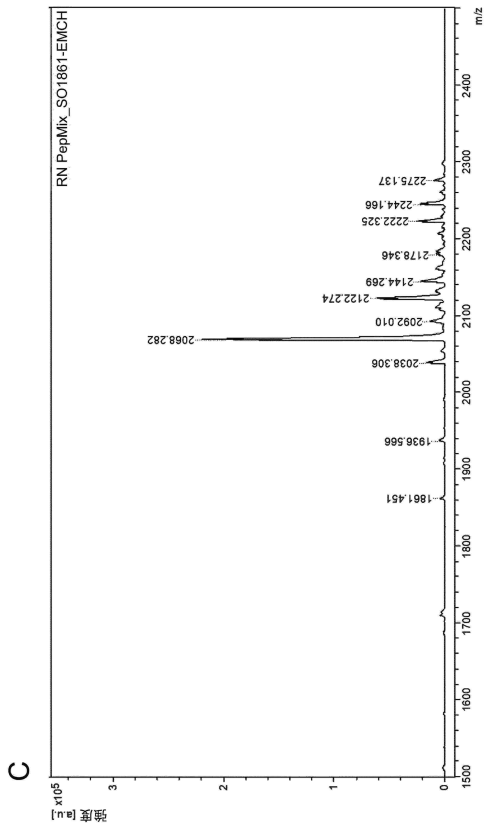
【図２８－１】



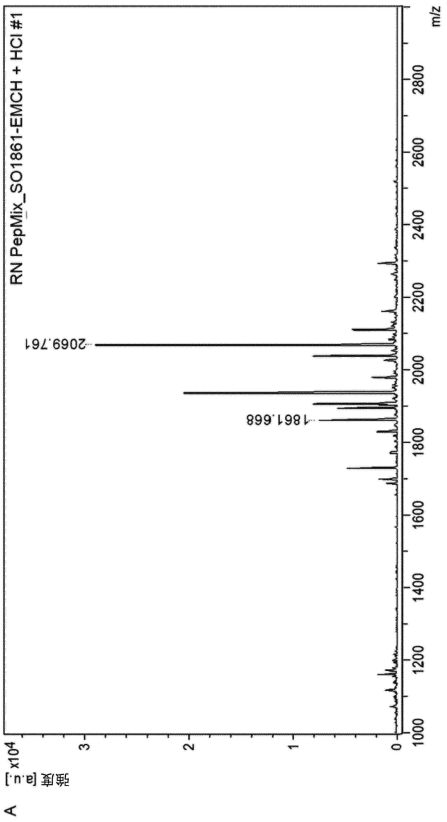
【図２８－２】



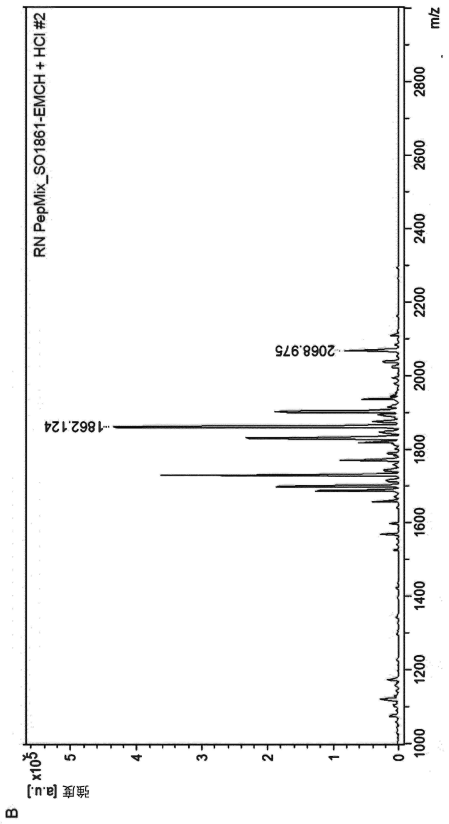
【図２８－３】



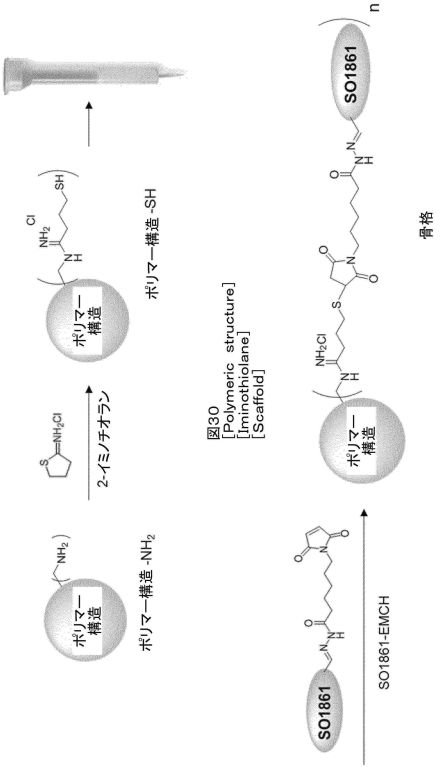
【図２９－１】



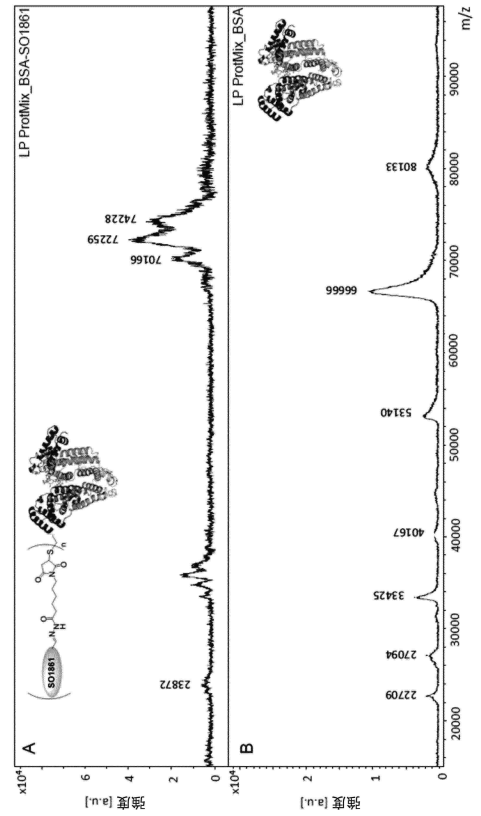
【図２９－２】



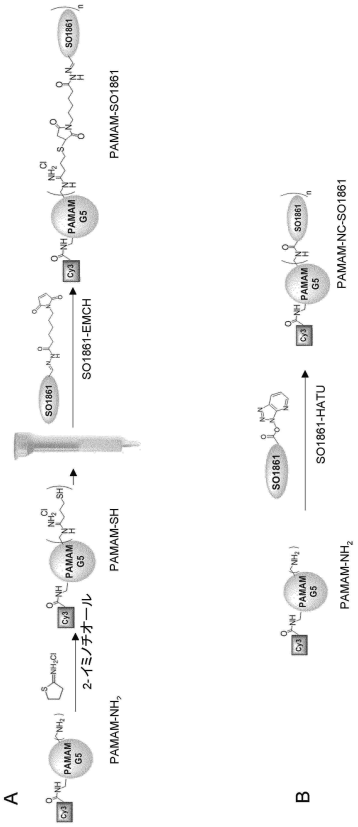
【図３０】



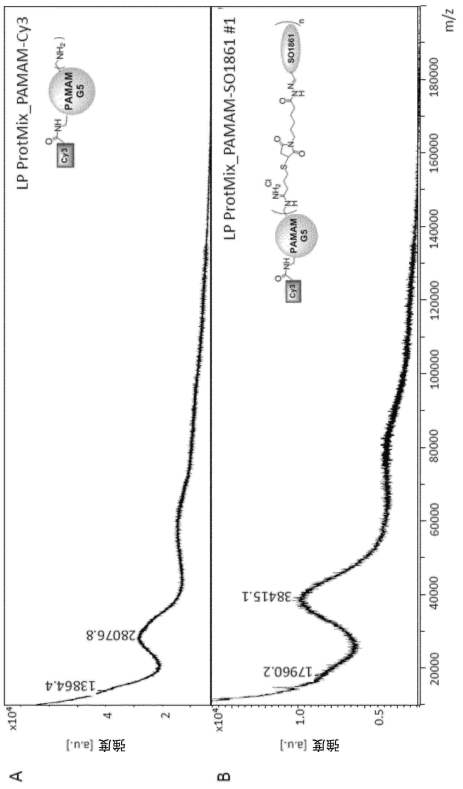
【図３１】



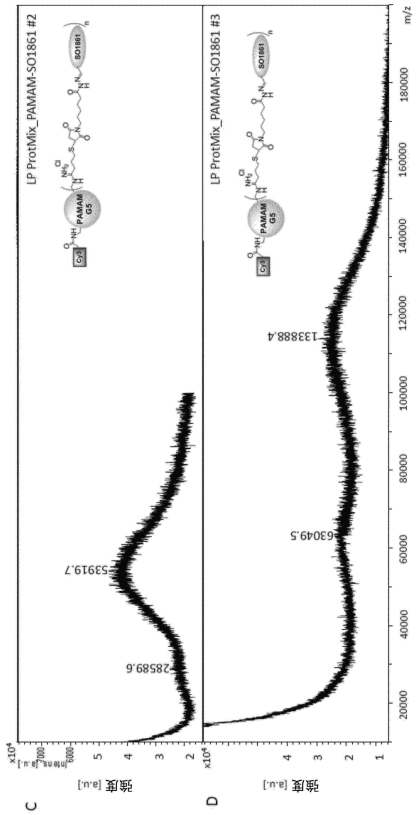
【図３２】



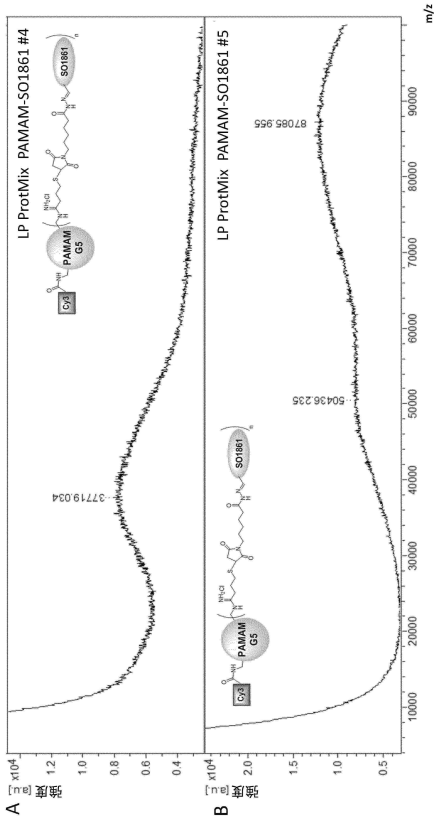
【図３３－１】



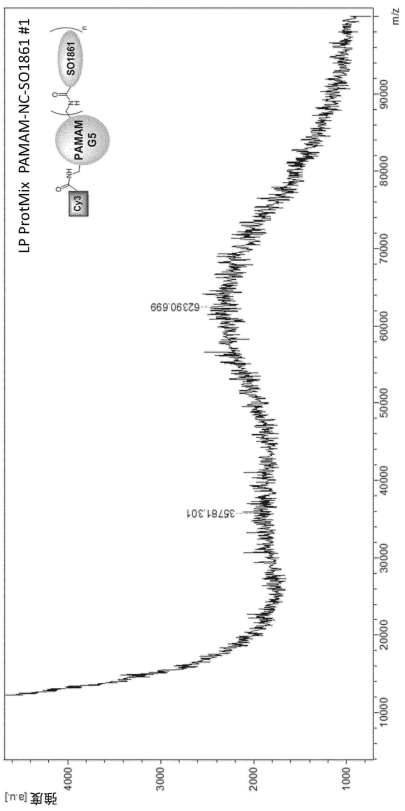
【図３３－２】



【図３４】



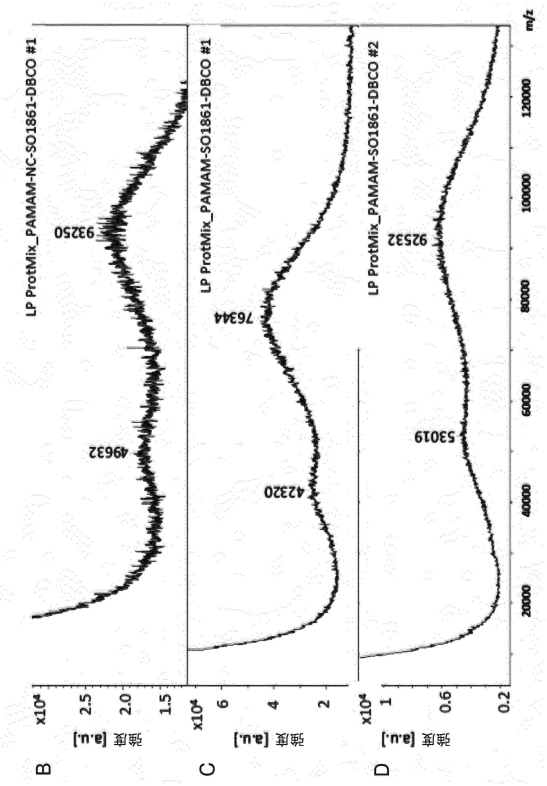
【図３５】



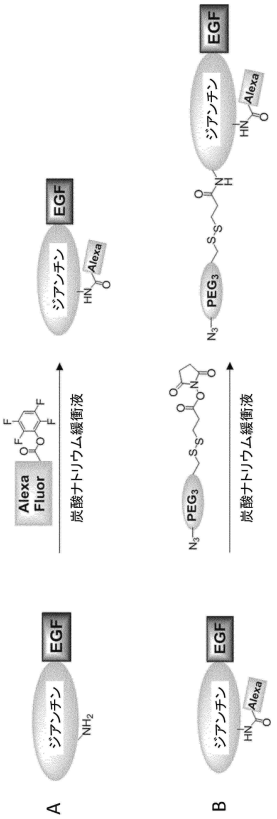
【図３６－１】



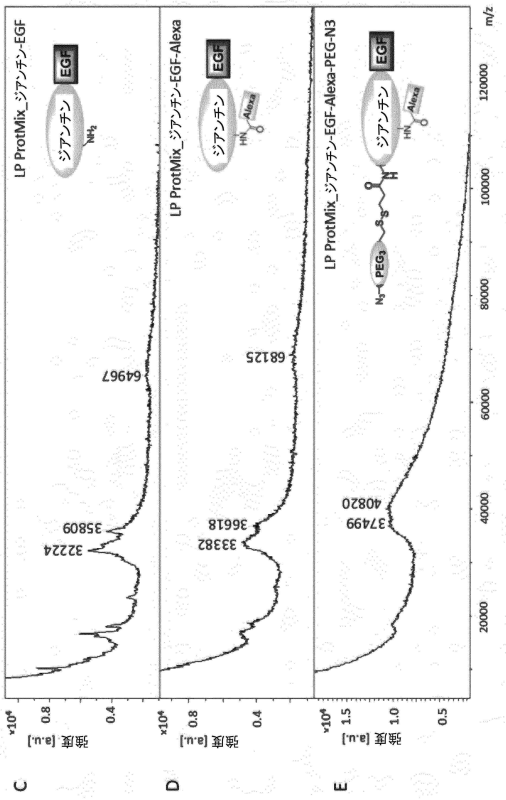
【図３６－２】



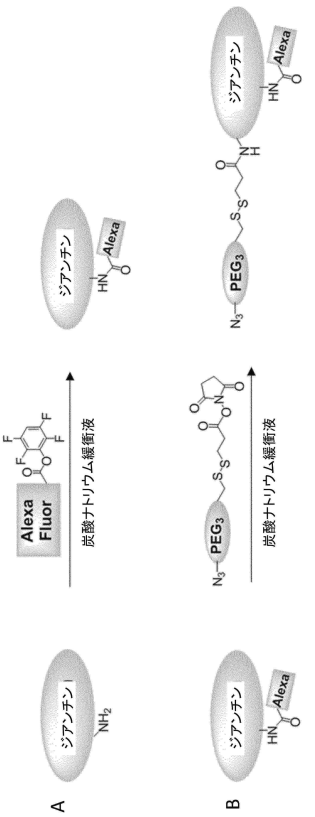
【図３７－１】



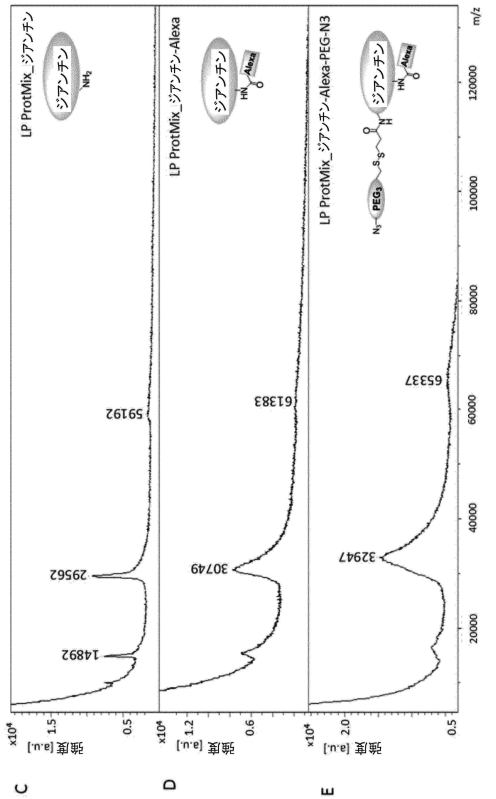
【図３７－２】



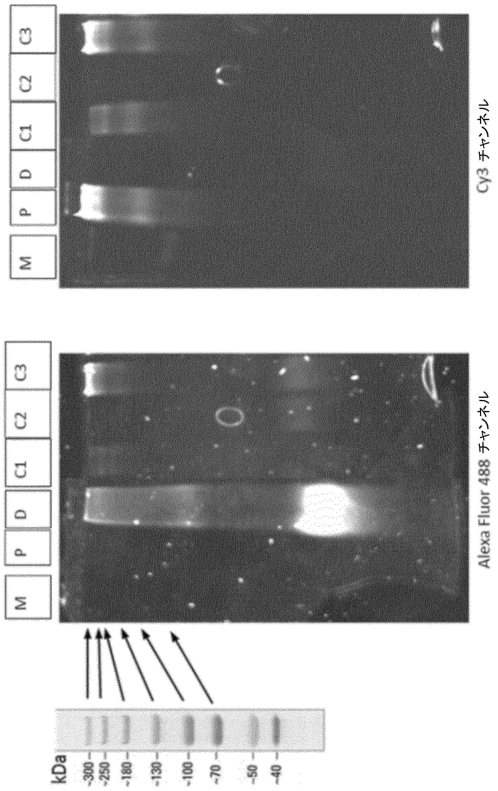
【図３８－１】



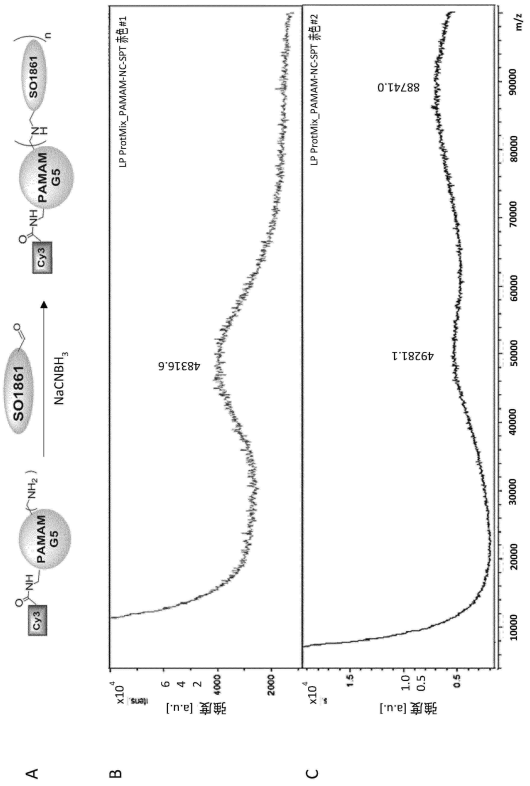
【図３８－２】



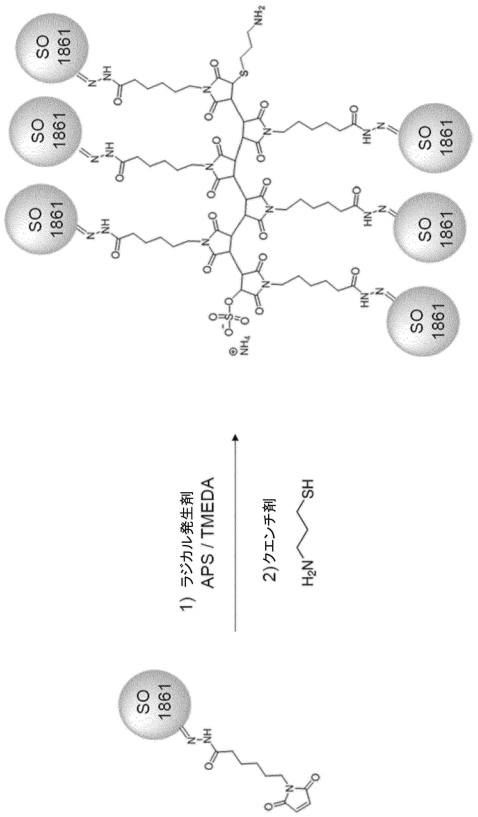
【図３９】



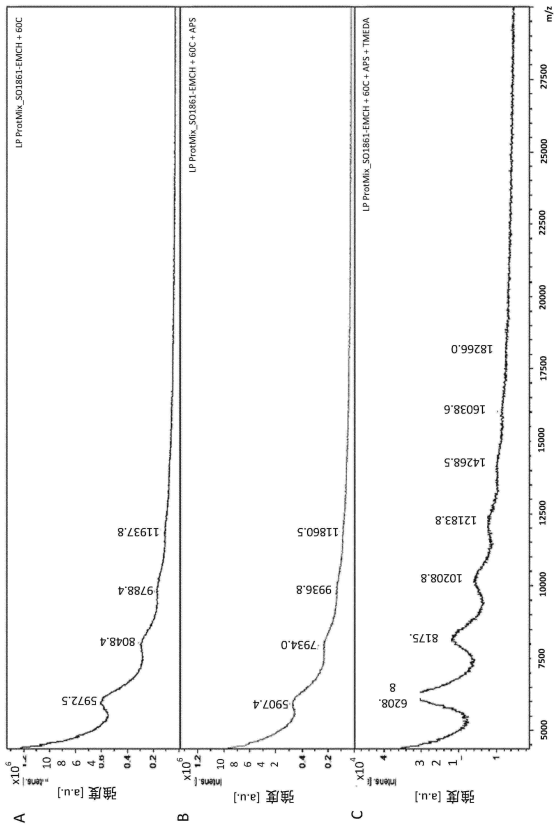
【図４０】



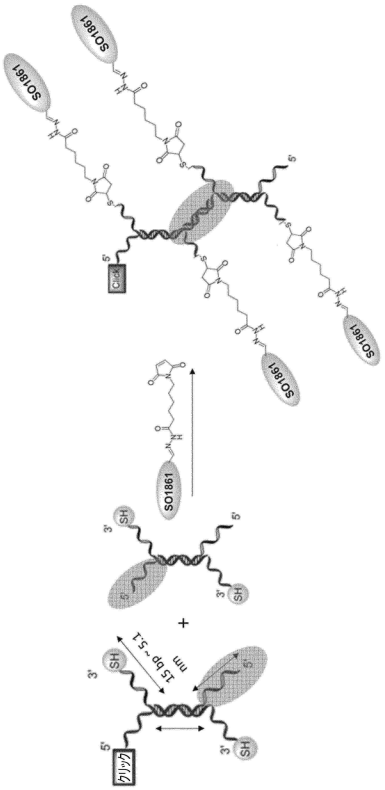
【図４１】



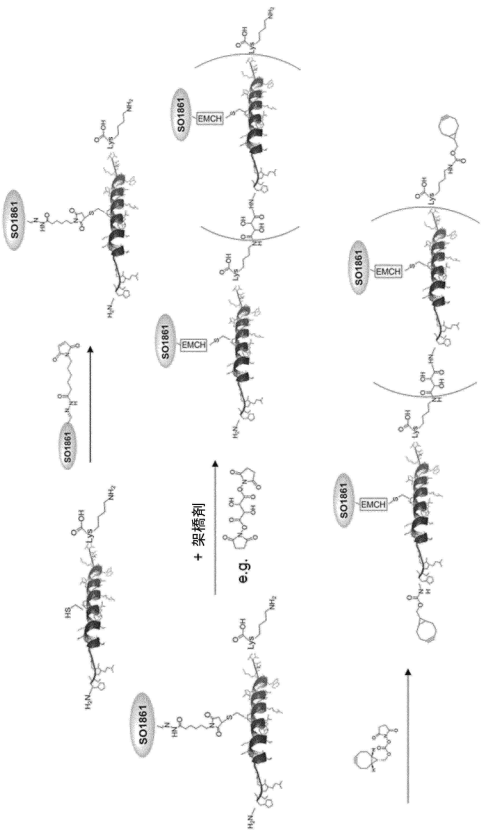
【図４２】



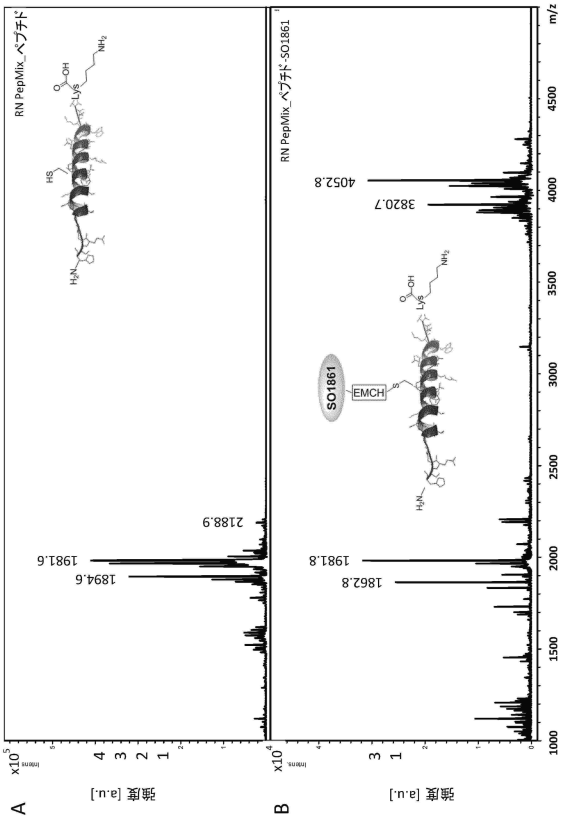
【図４３】



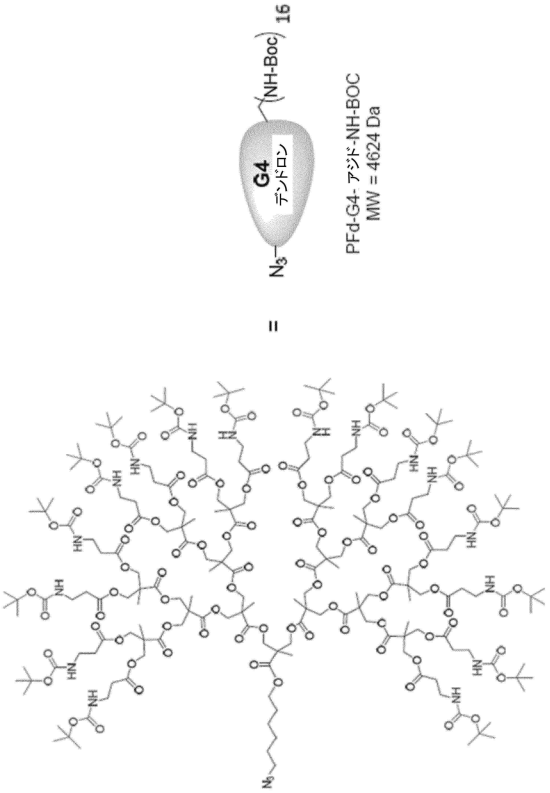
【図４４】



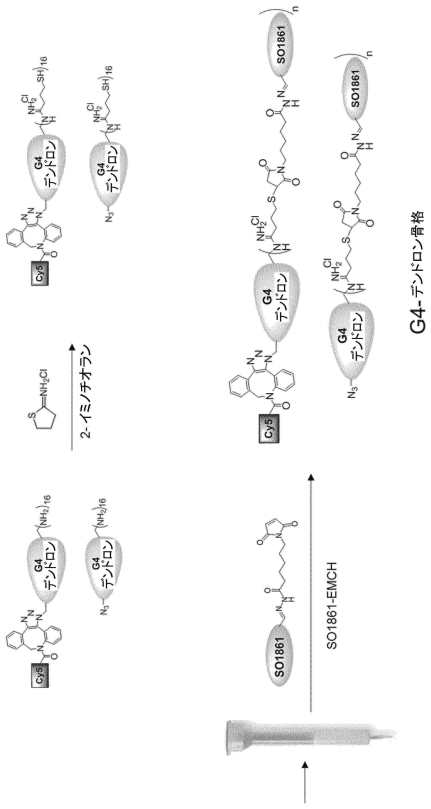
【図４５】



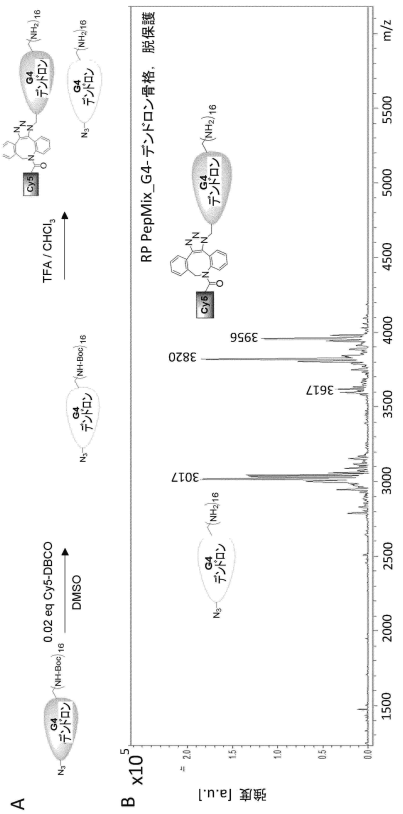
【図４６】



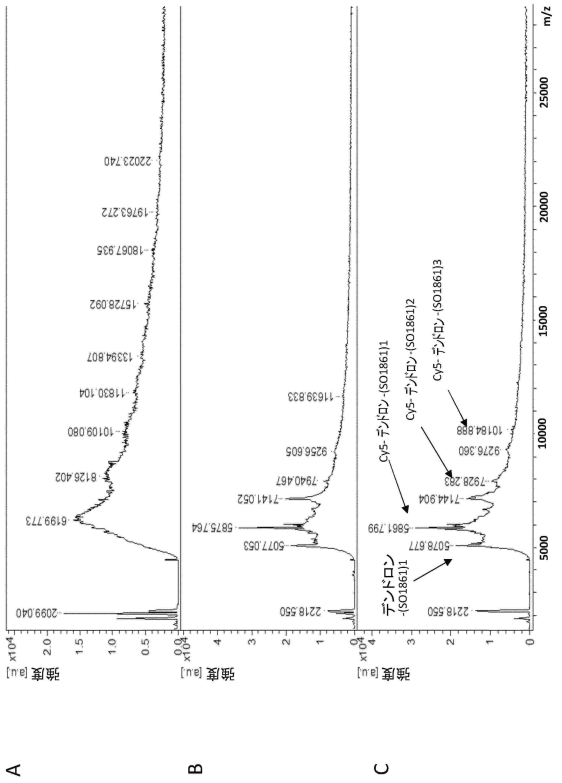
【図４７】



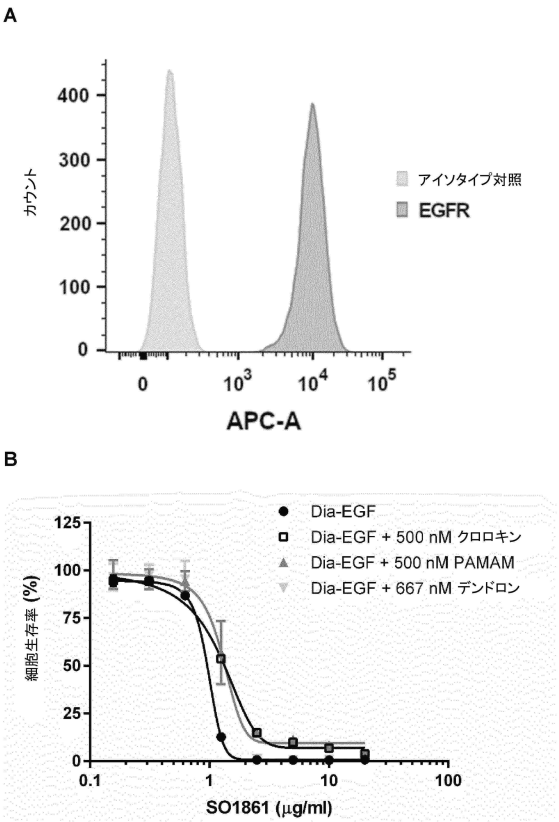
【図４８】



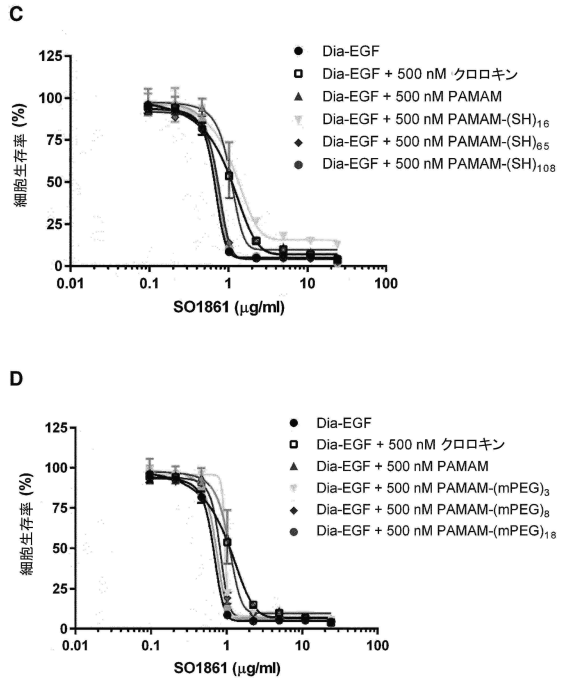
【図４９】



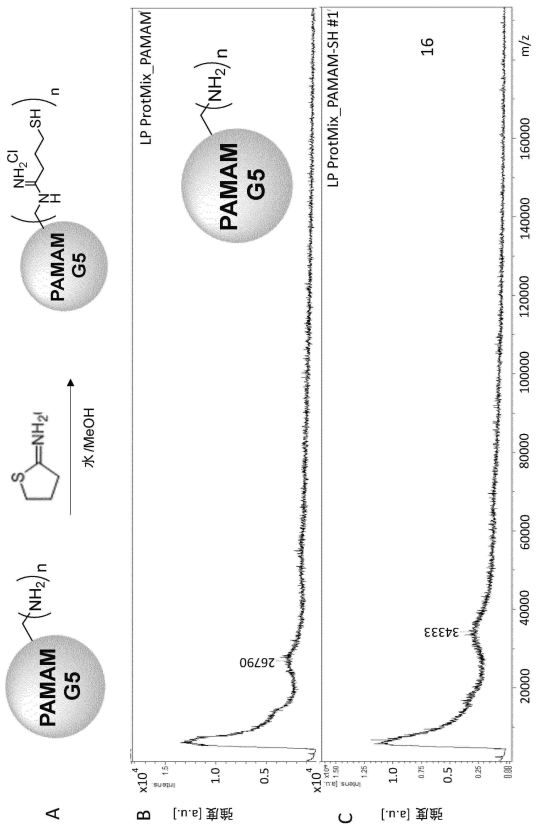
【図５０－１】



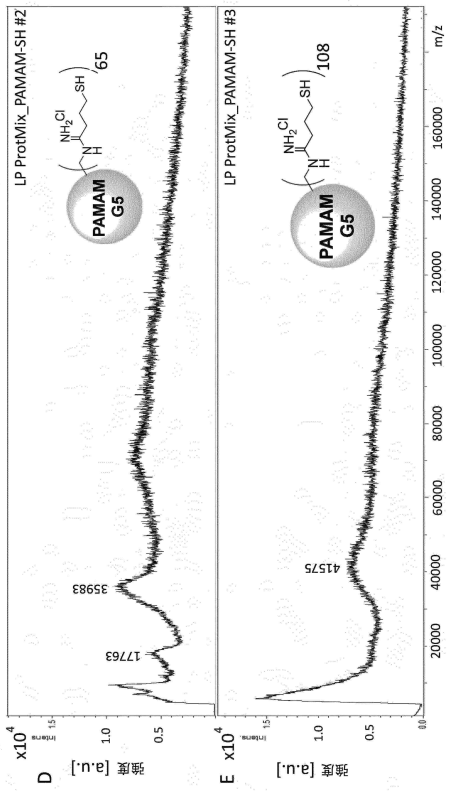
【図５０－２】



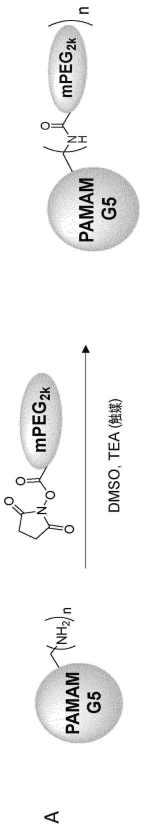
【図５１－１】



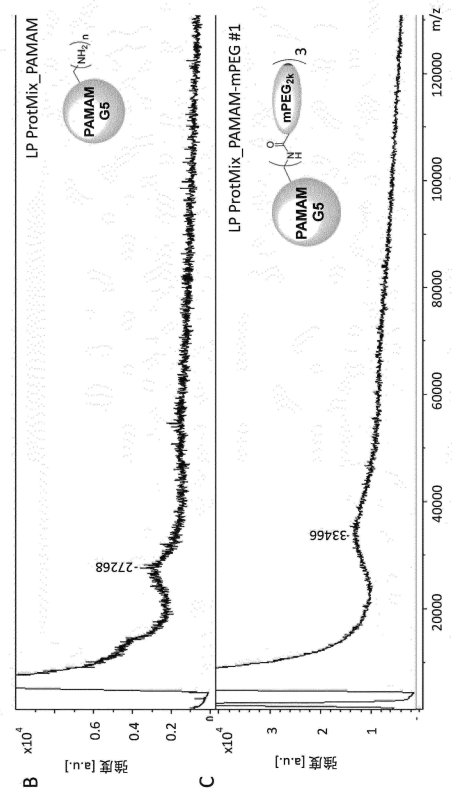
【図５１－２】



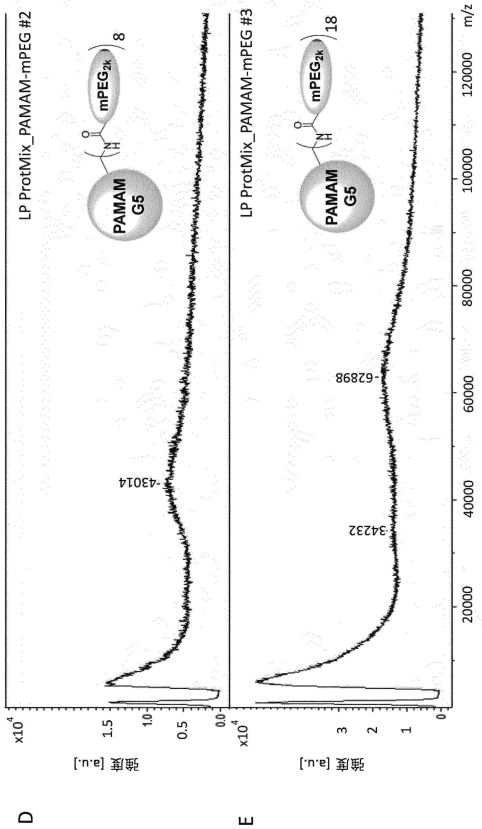
【図５２－１】



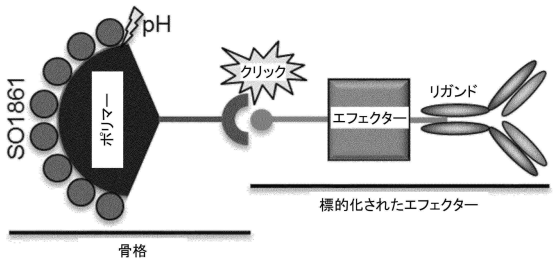
【図５２－２】



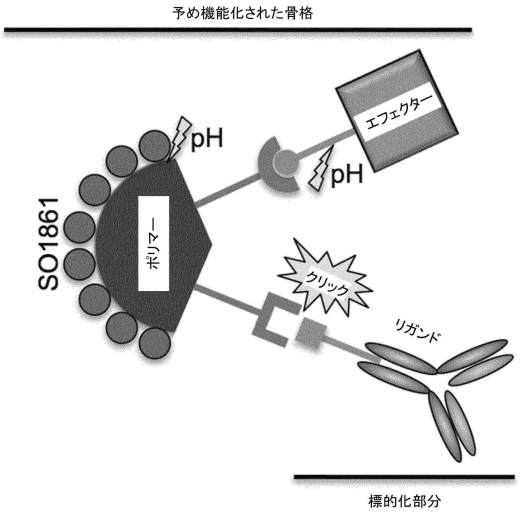
【図５２－３】



【図５３】



【図５４】



【配列表】

0007593925000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類 FI

Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	

(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(31)優先権主張番号 2023568
(32)優先日 令和1年7月25日(2019.7.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(72)発明者 ポステル，ルーベン
オランダ王国，３５８４ セーエム ユトレヒト エルエスアイ，ローム ２．０９ ヤレラーン ６２
(72)発明者 フュッヒ，ヘンドリック
ドイツ連邦共和国，デー－１３３５３ ベルリン アウグステンブルガー プラッツ １ フィルヒョウ－クリニクム シャリテ－ウニヴェルズィテートメディツィーン，ベルリン キャンパス，クリニシェ ヒェミー ウント パトビオヒェミー インスティテュート フュア ラボラトーリウムスメディツィン
審査官 三上 晶子
(56)参考文献 特表平０７－５０４１５６（ＪＰ，Ａ）
特表２００８－５０５９５８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１７－５０６２２０（ＪＰ，Ａ）
Hendrik FUCHS et al.，“ Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies ”，Biomedicines，2017年03月29日，Vol. 5, No. 4，p.14，DOI: 10.3390/biomedicines5020014
Cheenu BHARGAVA et al.，“ Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene SO1861 ”，Molecular Oncology，2017年09月15日，Vol. 11, No. 11，p.1527-1543，DOI: 10.1002/1878-0261.12115
Roger GILABERT-ORIOL et al.，“ Immunotoxins Constructed with Ribosome-Inactivating Proteins and their Enhancers: A Lethal Cocktail with Tumor Specific Efficacy ”，Current Pharmaceutical Design，2014年10月22日，Vol. 20, No. 42，p.6584-6643，DOI: 10.2174/1381612820666140826153913
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ９／００－ ９／７２
Ａ６１Ｋ ４７／００－ ４７／６９
Ａ６１Ｋ ３１／００－ ３３／４４
Ａ６１Ｐ １／００－ ４３／００
Ａ６１Ｋ ４５／００
Ａ６１Ｋ ４８／００
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｋ ３１／７０８８
Ｃ０７Ｋ １６／２８
Ｃ１２Ｎ １５／１３
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）