

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-530839
(P2024-530839A)

(43)公表日 令和6年8月26日(2024.8.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55	4 C 0 9 1	
C 0 7 J	63/00 (2006.01)	C 0 7 J	63/00		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全277頁)
(21)出願番号	特願2023-578030(P2023-578030)		(71)出願人	521271727	
(86)(22)出願日	令和4年3月8日(2022.3.8)			サプリーム テクノロジーズ, ベー. フ	
(85)翻訳文提出日	令和6年2月19日(2024.2.19)			エー.	
(86)国際出願番号	PCT/NL2022/050127			S A P R E M E T E C H N O L O G I	
(87)国際公開番号	WO2022/265493			E S B. V.	
(87)国際公開日	令和4年12月22日(2022.12.22)			オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビル	
(31)優先権主張番号	PCT/NL2021/050384			トホーフェン, アントニ ファン レーウ	
(32)優先日	令和3年6月18日(2021.6.18)			エンフックラーン 9, ビルディング ア	
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)			ー12-1	
(31)優先権主張番号	PCT/NL2021/050549			A n t o n i e v a n L e e u w e n	
(32)優先日	令和3年9月9日(2021.9.9)			h o e k l a a n 9 B u i l d i n g	
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)			A 1 2 - 1 3 7 2 1 M A B i l t h	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	110002000	
		最終頁に続く		弁理士法人栄光事務所	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 サポニン、オリゴヌクレオチド、およびG a l N A cの複合体

(57)【要約】

本発明は、A S G P Rのリガンドに共有結合的に連結されたサポニンを含みかつサポニンおよびA S G P Rのリガンドに共有結合的に連結されたオリゴヌクレオチドを含む複合体に関し、リガンドは少なくとも1つのG a l N A c部分を含む。加えて、本発明は、本発明の複合体を含む薬学的組成物に関する。さらに、本発明は、医薬としての使用のための本発明の薬学的組成物に関する。本発明は、例えば遺伝子a p o B、H S P 1 7、T T R、P C S K 9、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B VのX遺伝子、H B VのS遺伝子、A A T、およびL D Hの発現生成物に関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに例えば癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、A A T関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T Rアミロイドーシス、補体関連疾患、B型肝炎感染、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のための、本発明の薬学的組成物にもまた関する。本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入するためのインビトロのまたはエクスピボの方法にもまた関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アジアロ糖蛋白質受容体 (ASGPR) のリガンドに共有結合的に連結され、さらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも 1 つのサポニンを含むオリゴヌクレオチド複合体であって、前記 ASGPR のリガンドは、少なくとも 1 つの N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは 3 つまたは 4 つの GalNAc 部分、より好ましくは 3 つの GalNAc 部分を含み、より好ましくは、ASGPR の前記リガンドは (GalNAc)₃Tris を含むか、またはそれから成り、

ここで、前記少なくとも 1 つのサポニンは 12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくは前記サポニンのアグリコンコア構造の位置 C23 にアルデヒド官能基を有し、

前記オリゴヌクレオチド複合体は、1~16 個のサポニン部分、好ましくは 1~8 つのサポニン部分、より好ましくは 1 つのサポニン部分、4 つのサポニン部分、または 8 つのサポニン部分を含む、

オリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの GalNAc 部分、好ましくは 3 つの GalNAc 部分、前記少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1~16 個のサポニン部分、より好ましくは 1~8 つのサポニン部分、例えば 1、4、または 8 つのサポニン部分、および前記オリゴヌクレオチドは、三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、前記 GalNAc 部分、前記サポニンまたはサポニン部分、および前記オリゴヌクレオチドのそれぞれが前記三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 3】

1 つのサポニン部分もしくは 4 つのサポニン部分、好ましくは、デンドロン、好ましくは G2 デンドロン、例えば、例えば 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) に共有結合された 4 つのサポニン部分、または 8 つのサポニン部分、好ましくは、デンドロン、好ましくは G3 デンドロン、例えば、例えば (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) ヘキサンアミドに共有結合された 8 つのサポニン部分、を含む請求項 1 または 2 に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチド複合体は 1 つのサポニン部分を含み、前記オリゴヌクレオチド複合体は分子 (EE) :

10

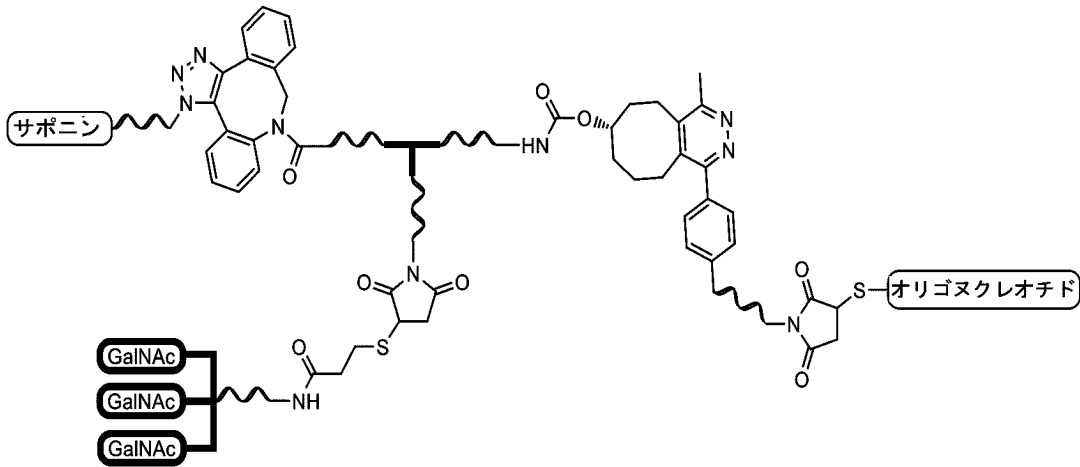
20

30

40

50

【化 1】



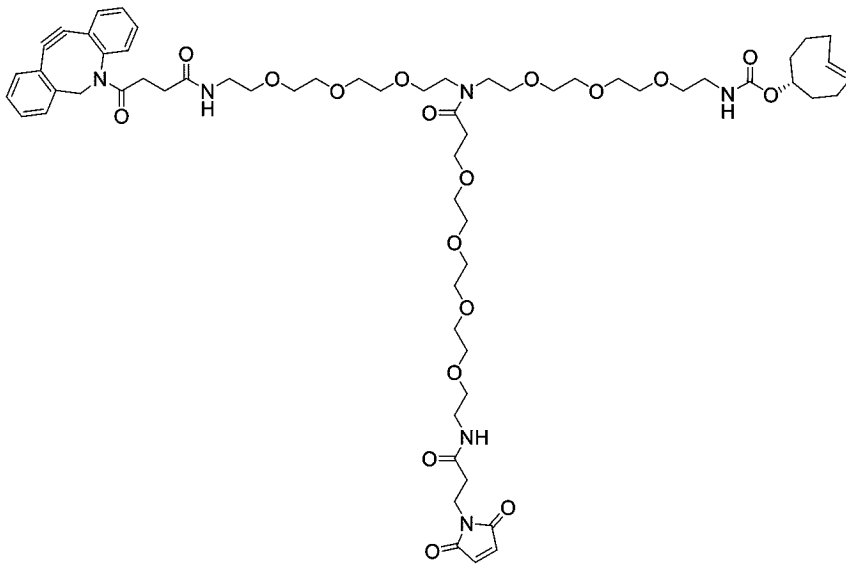
10

(E E)

に従い、この分子 (E E) は共有結合的複合体化生成物であり、式 (X X I) に従う三官能性リンカーの、以下との共有結合的複合体化によって得られる、

20

【化 2】



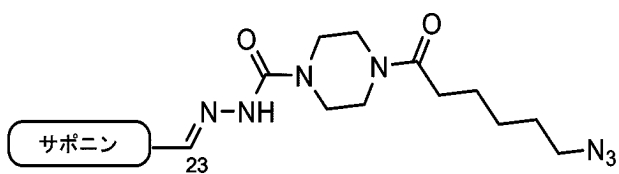
30

(X X I)

(1) 分子 (A A) に従うサポニン誘導体と、

40

【化 3】



(A A)

式中、

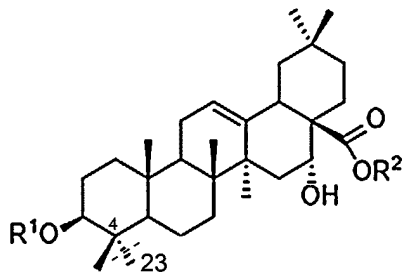
50

【化 4】

サポニン

は式（SM）に従うサポニン部分を表し、

【化 5】



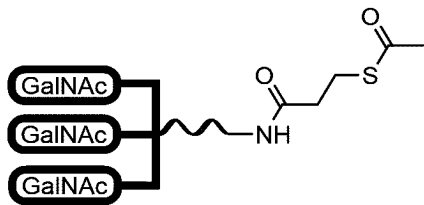
10

(SM)

式中、 R^1 および R^2 は独立して水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、式（SM）に従う前記サポニン部分は位置 C 23 にアルデヒド基を含むサポニンに基づき、

20

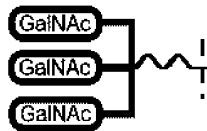
（2）分子（FF）に従う GalNAc 複合体と、
【化 6】



(FF)

30

式中、
【化 7】

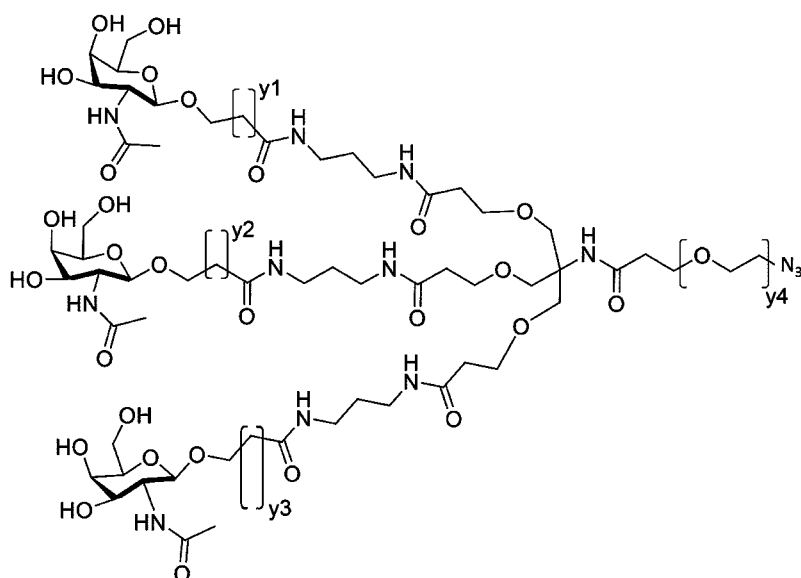


は、分子（DD1）に従うかまたは分子（DD2）に従うトリ GalNAc 複合体を表し、

40

50

【化 8】



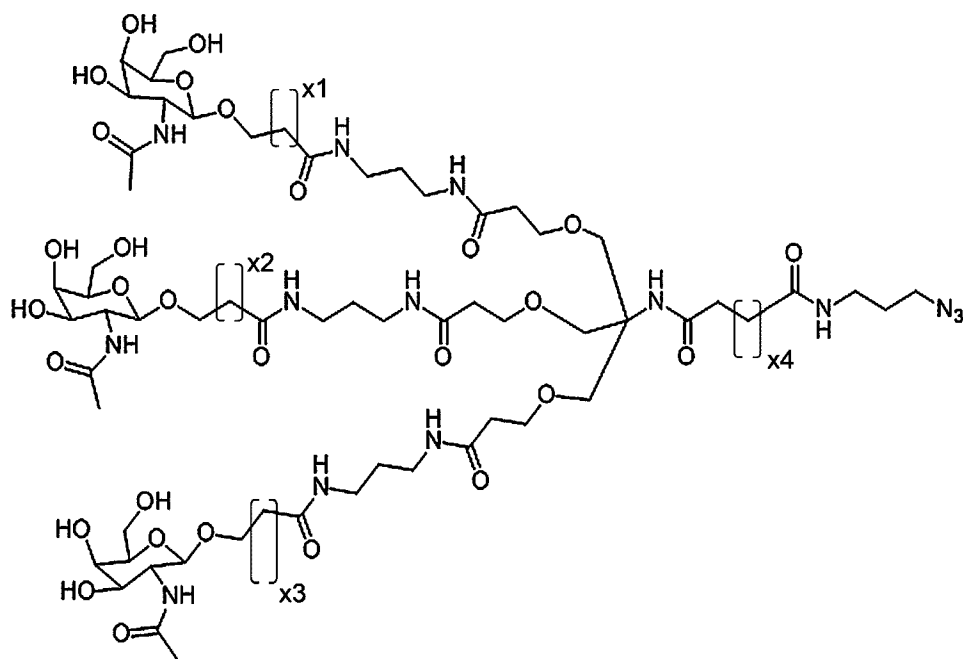
10

(DD 1)

20

式中、 y_1 、 y_2 、および y_3 は、それぞれが、独立して 0～20、好ましくは 1～15、より好ましくは 2～12、さらにより好ましくは 2～10、さらにより好ましくは 2～8、最も好ましくは 2 および 3 から選択される整数であり、好ましくは、 y_1 、 y_2 、および y_3 は同じであり、 y_4 は、1～100、好ましくは 2～80、より好ましくは 3～70、さらにより好ましくは 4～60、さらにより好ましくは 4～50、さらにより好ましくは 4～40、さらにより好ましくは 4～30、さらにより好ましくは 4～20、さらにより好ましくは 4～6、最も好ましくは 4～5、例えば 4 から選択される整数であり、

【化 9】



30

(DD 2)

40

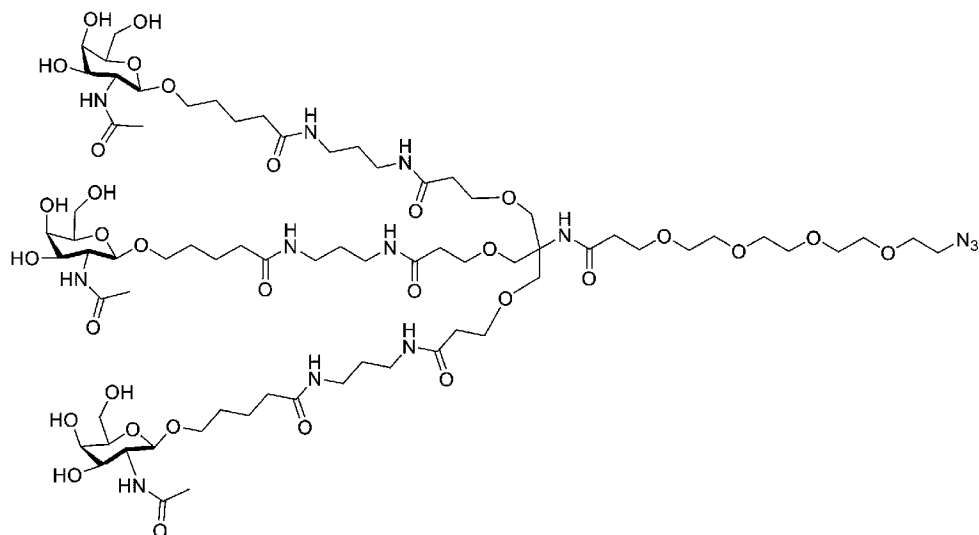
式中、 x_1 、 x_2 、および x_3 は、それぞれが、独立して 0～20、好ましくは 1～1

50

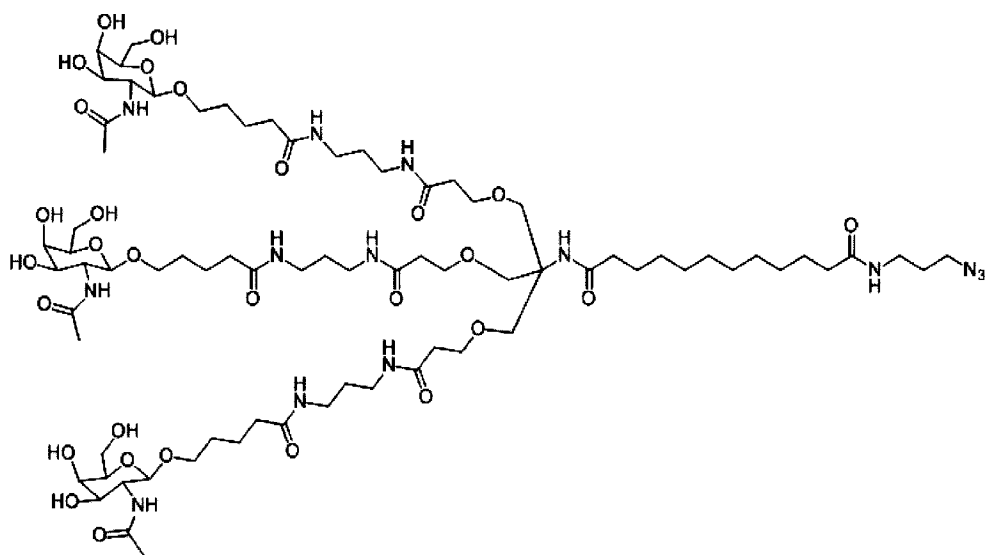
5、より好ましくは2～12、さらにより好ましくは2～10、さらにより好ましくは2～8、最も好ましくは2および3から選択される整数であり、好ましくはx1、x2、およびx3は同じであり、x4は1～50、好ましくは2～40、より好ましくは3～30、さらにより好ましくは4～20、さらにより好ましくは5～15、最も好ましくは8～12、例えば9から選択される整数であり、

好ましくは、分子(DD3)に従うか、または分子(DD4)に従うトリGalNAc複合体を表し、

【化10】



(DD3),



(DD4),

(3) 分子(GG)に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドと、

10

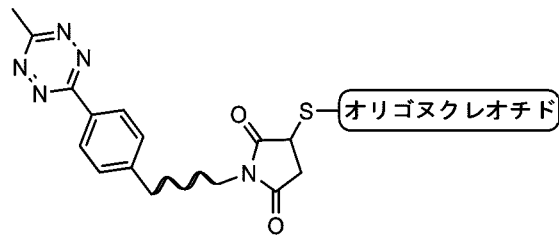
20

30

40

50

【化 1 1】

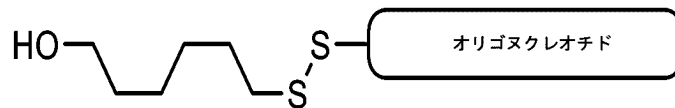


(G G)

10

式中、分子 (G G) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 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 - アミドと分子 (H H) に従うオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す

【化 1 2】



20

(H H)、

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 5】

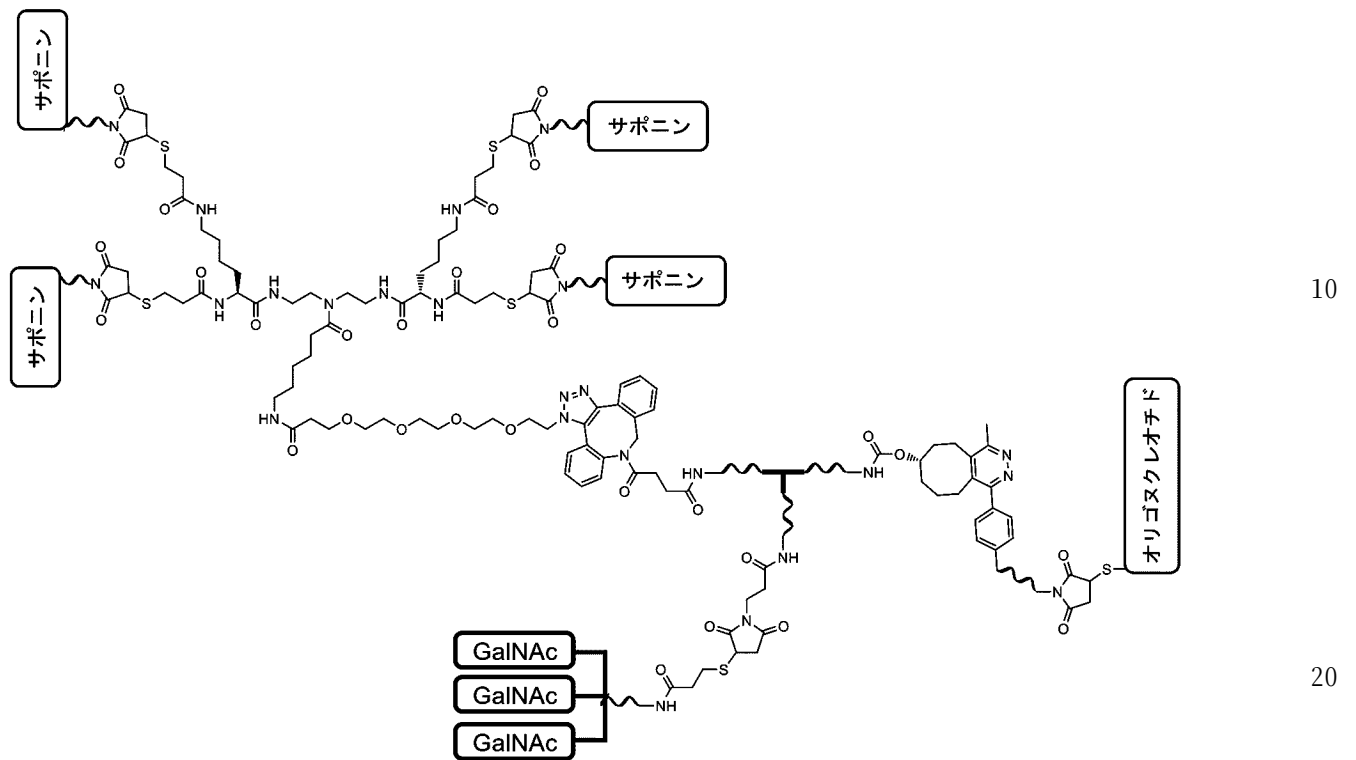
4 つのサポニン部分を含み、前記オリゴヌクレオチド複合体は分子 (P P) に従い、

30

40

50

【化 1 3】



(PP)

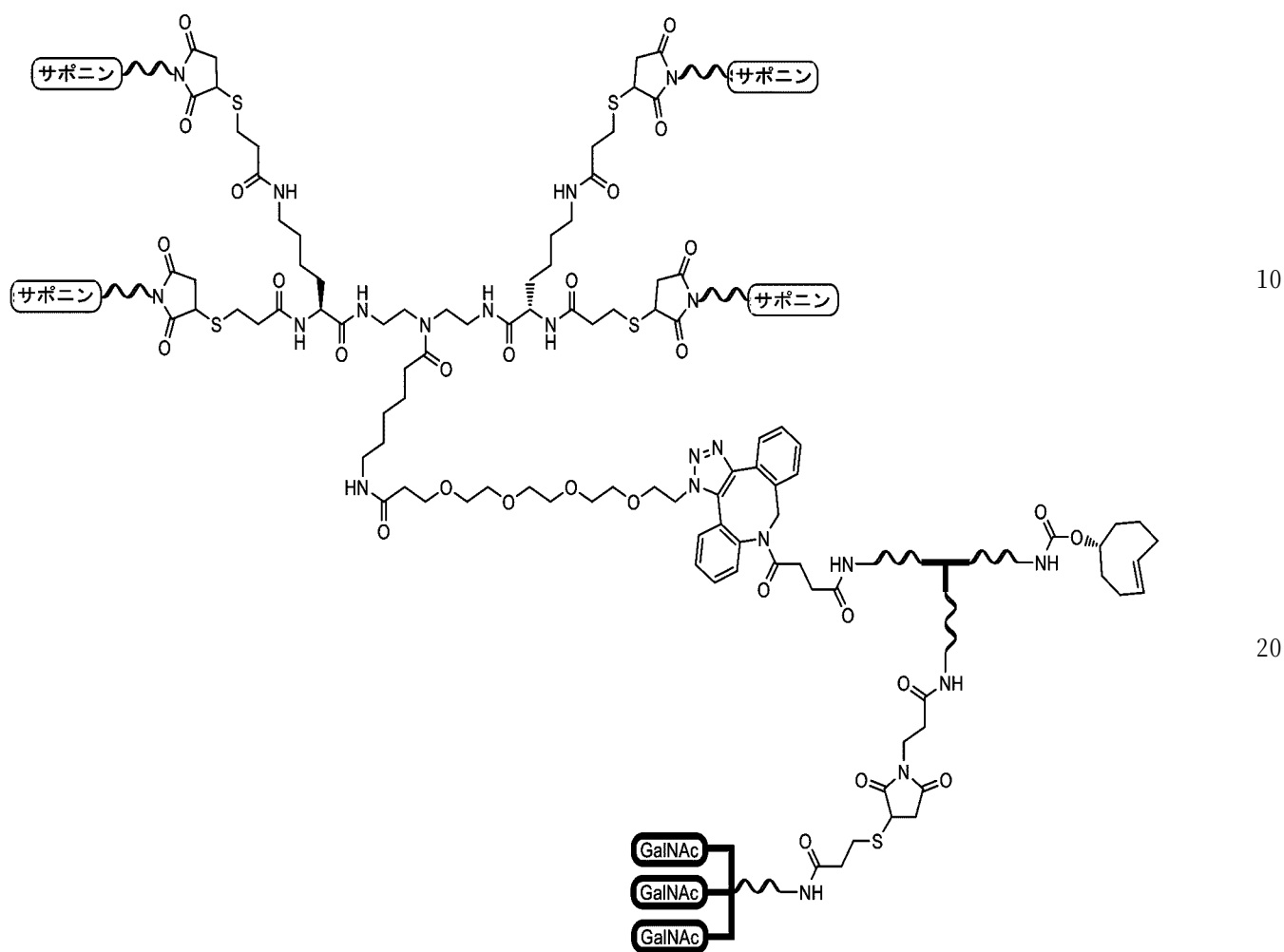
この分子 (PP) は共有結合的複合体化生成物であり、分子 (LL) に従うサポニン-GalNAc 複合体が、

30

40

50

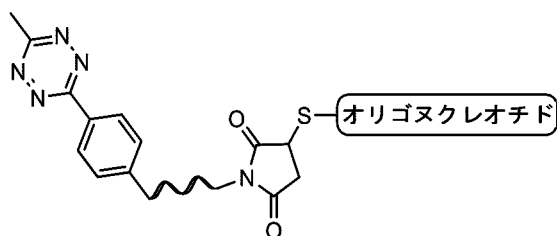
【化 1 4】



(L L)

分子 (G G) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られ、

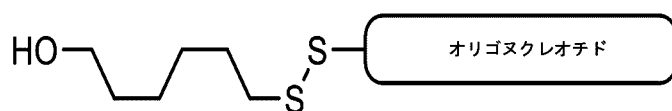
【化 1 5】



(G G)

ここで、前記分子 (G G) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 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 - アミドと分子 (H H) に従うオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表し、

【化 1 6】

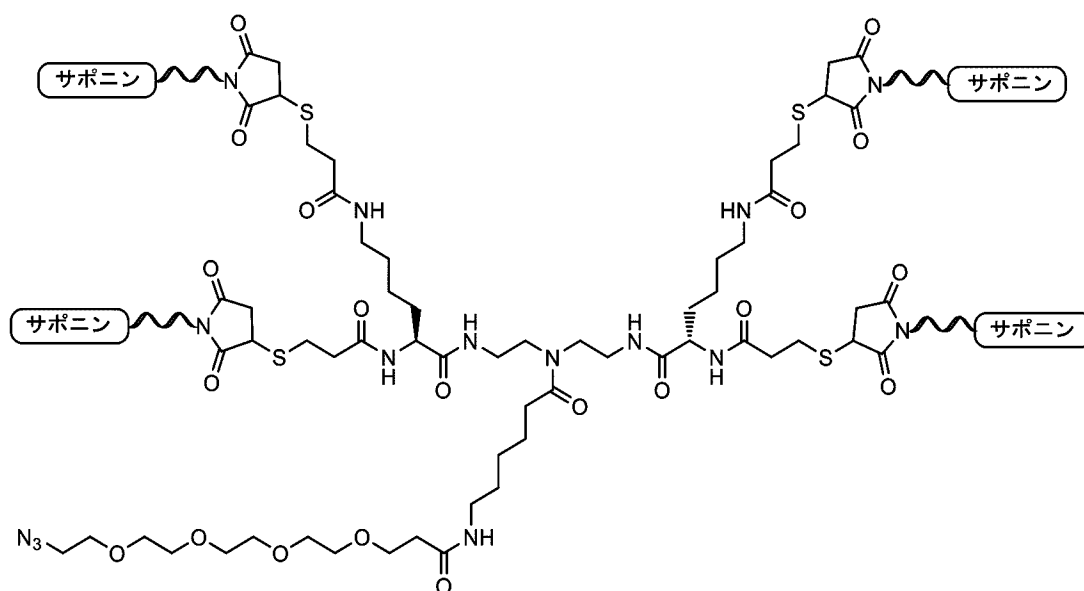


(HH)

この分子 (LL) は共有結合的複合体化生成物であり、分子 (JJ) に従うサポニン誘導体が、

10

【化 1 7】



20

30

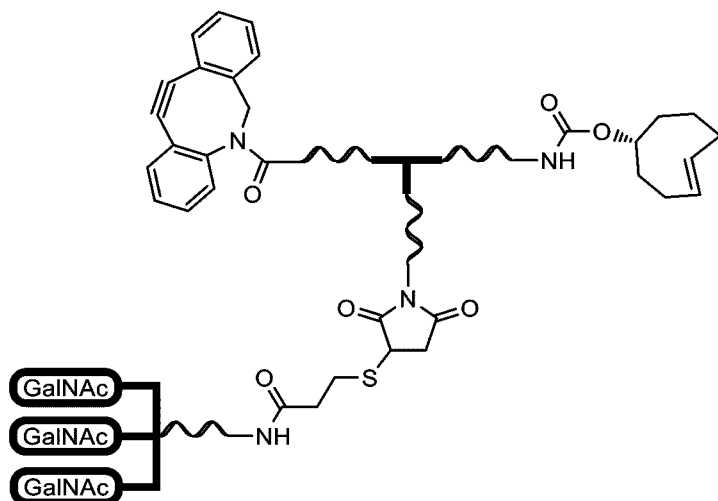
(JJ)

分子 (MM) に従う三官能性リンカーおよび G a l N A c の複合体との共有結合的複合体化によって得られ、

40

50

【化 1 8】



(MM)

この分子（JJ）は、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

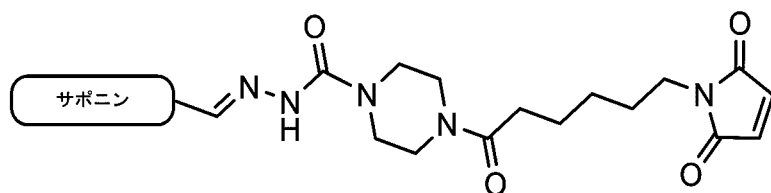
20

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の、以下との複合体化の複合体生成物であり、

最初に、分子（KK）に従うサポニン誘導体と、

【化 1 9】



30

(KK)

式中、

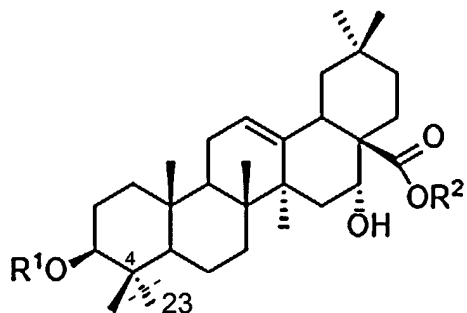
【化 2 0】

サポニン

は、式（SM）に従うサポニン部分を表し、

40

【化 2 1】



(SM)

10

式中、 R^1 および R^2 は、独立して、本発明に従う水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、式 (SM) に従う前記サポニン部分は、位置 C 2 3 にアルデヒド基を含むサポニンに基づき、

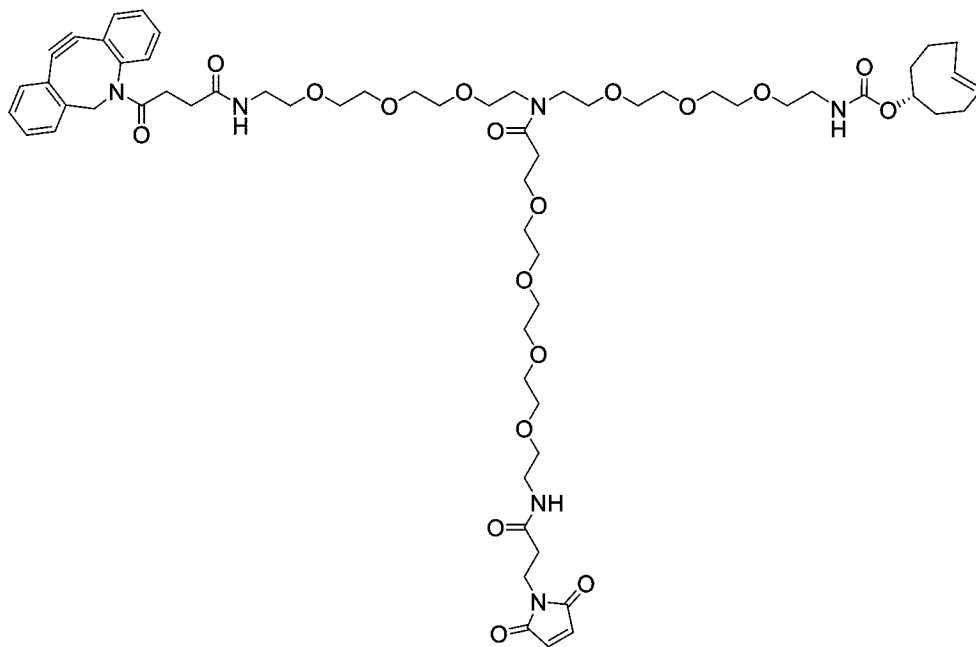
その次に、

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-オアートと、

ここで、分子 (MM) は、式 (XXI) に従う三官能性リンカー、

【化 2 2】

20

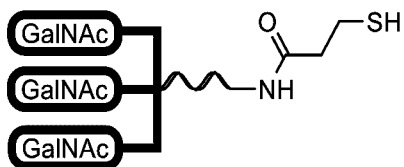


(XXI)

30

および分子 (NN) に従う GalNAc 複合体の複合体であり、

【化 2 3】

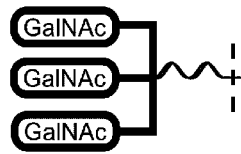


(NN)

40

50

式中、
【化 2 4】



は、請求項 4 に記載の分子（D D 1）または分子（D D 2）、好ましくは請求項 4 に記載の分子（D D 3）または分子（D D 4）、より好ましくは請求項 4 に記載の分子（D D 3）に従うトリ GalNAc 複合体を表す、

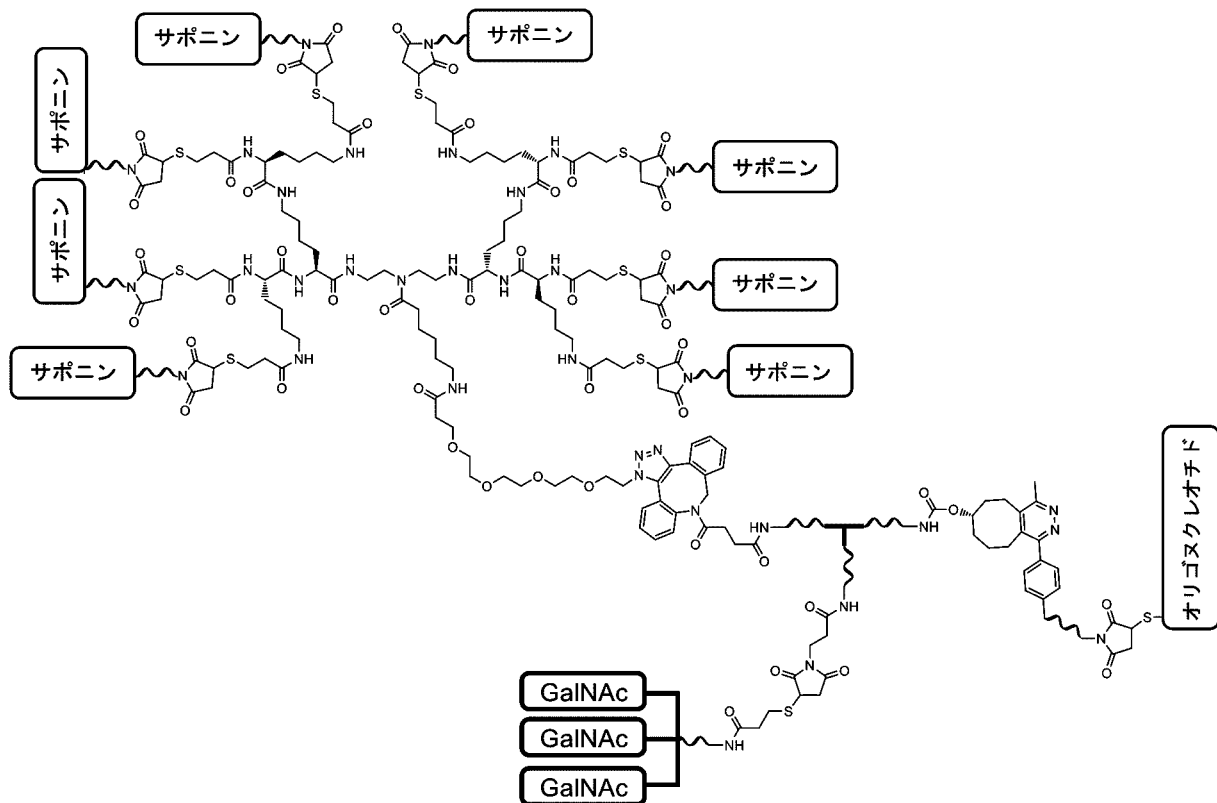
10

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 6】

8 つのサポニン部分を含み、前記オリゴヌクレオチド複合体は分子（S S）に従い、

【化 2 5】



20

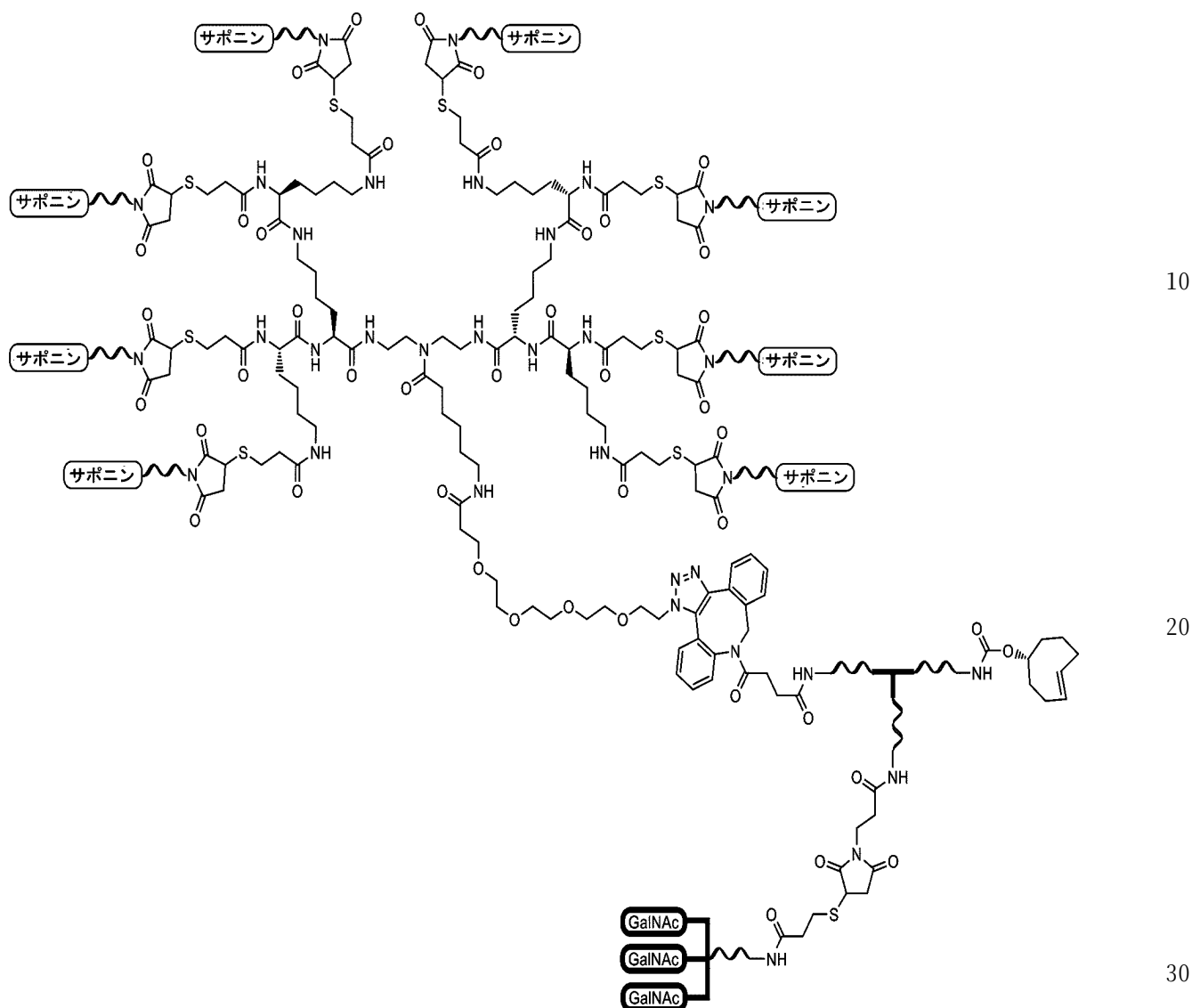
30

（S S）

この分子（S S）は共有結合的複合体化生成物であり、分子（R R）に従うサポニン - GalNAc 複合体：

40

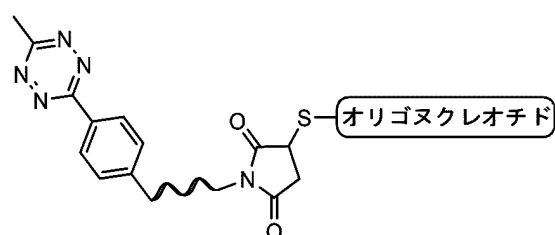
【化 2 6】



(RR)

の、分子 (GG) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られ、

【化 2 7】

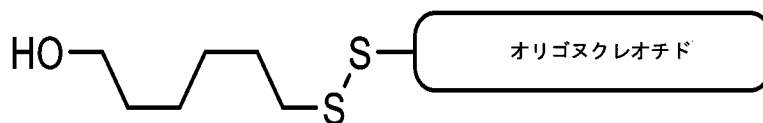


(GG)

ここで、前記分子 (GG) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 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－アミドと分子（ＨＨ）に従うオリゴヌクレオチド－リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表し、

【化２８】

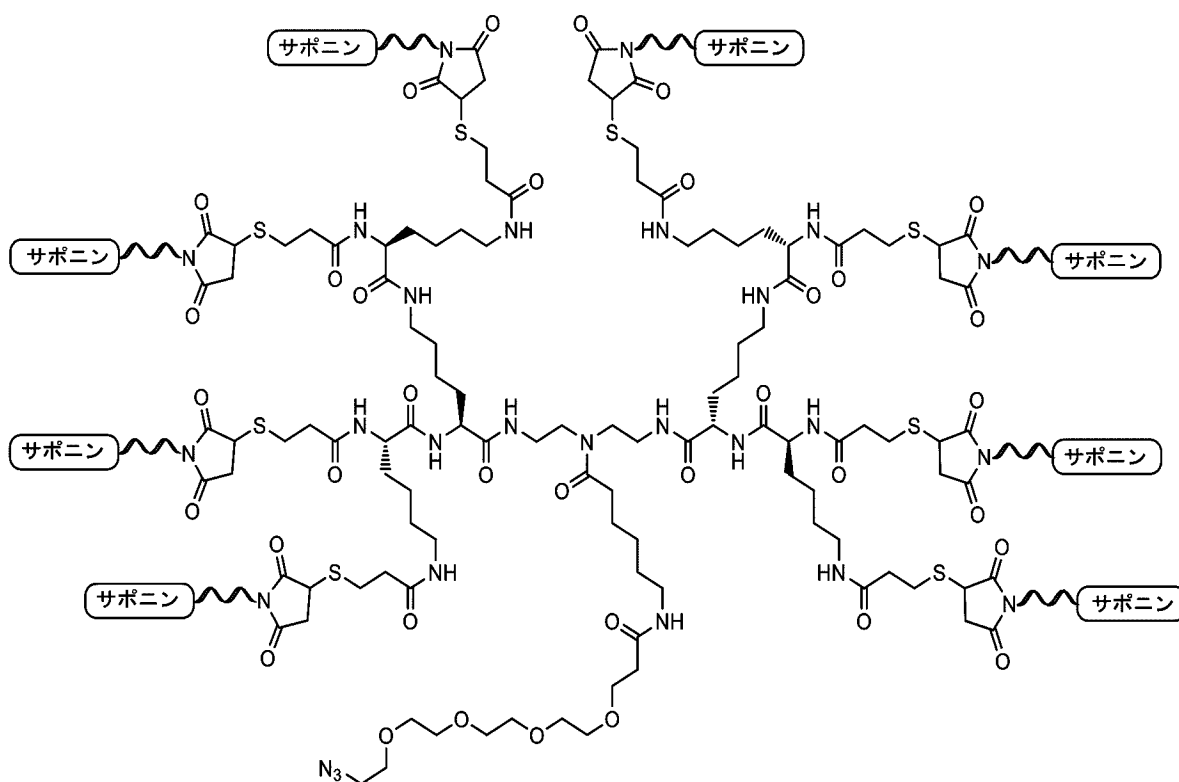


10

(HH)

この分子（ＲＲ）は共有結合的複合体化生成物であり、分子（ＱＱ）に従うサポニン誘導体が、

【化２９】



20

30

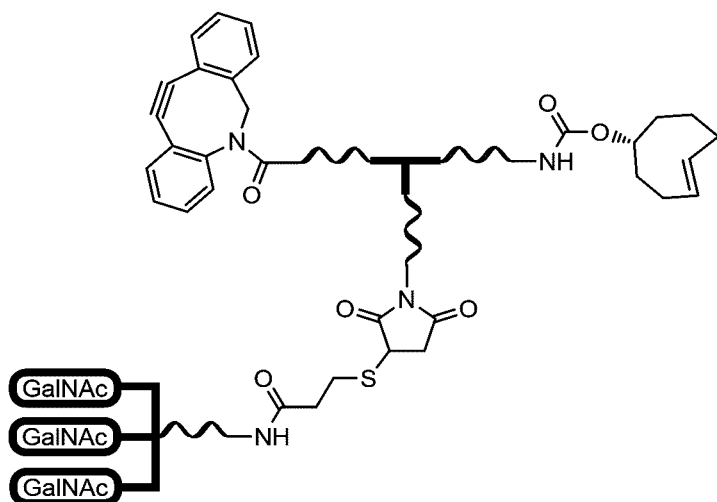
(QQ)

40

分子（ＭＭ）に従う三官能性リンカーおよびＧａｌＮＡｃの複合体との共有結合的複合体化によって得られ、

50

【化 3 0】



10

(MM)

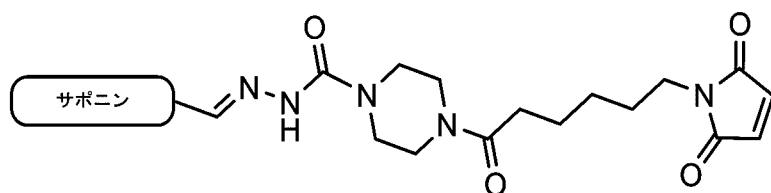
この分子 (QQ) は、(2S) - N - [(1S) - 1 - { [2 - (6 - アミノ - N - { 2 - [(2S) - 2, 6 - ビス [(2S) - 2, 6 - ビス (3 - スルファニルプロパンアミド) ヘキサンアミド] ヘキサンアミド] エチル } ヘキサンアミド) エチル] カルバモイル } - 5 - [(2S) - 2, 6 - ビス (3 - スルファニルプロパンアミド) ヘキサンアミド] ペンチル] - 2, 6 - ビス (3 - スルファニルプロパンアミド) ヘキサンアミドホル

20

マートの、以下との複合体化の複合体生成物であり、
最初に、

(a) 分子 (KK) に従うサポニン誘導体と、

【化 3 1】

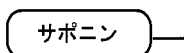


30

(KK)

式中、

【化 3 2】

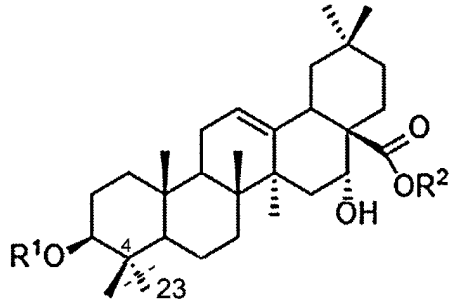


40

は、式 (SM) に従うサポニン部分を表し、

50

【化 3 3】



(SM)

10

式中、 R^1 および R^2 は、独立して、本発明に従う水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式 (SM) に従う前記サポニン部分は、位置 C 23 にアルデヒド基を含むサポニンに基づく

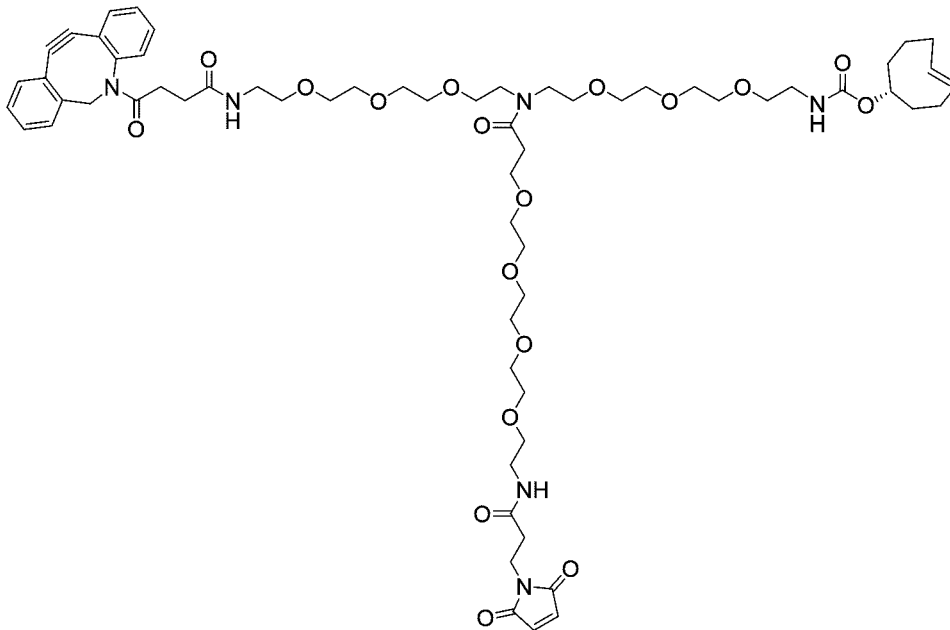
その次に、

(b) 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-オアートと、

ここで、分子 (MM) は、式 (XXI) に従う三官能性リンカー、

【化 3 4】

20



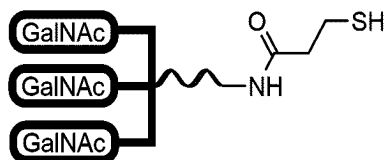
(XXI)

30

および分子 (NN) に従う GalNAc 複合体の複合体であり、

【化 3 5】

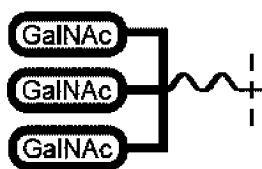
40



(NN)

50

式中、
【化 3 6】



は、請求項 4 に記載の分子（D D 1）または分子（D D 2）、好ましくは請求項 4 に記載の分子（D D 3）または分子（D D 4）、より好ましくは請求項 4 に記載の分子（D D 3）に従うトリ GalNAc 複合体を表す、

10

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 7】

前記複合体に含まれる前記サポニン、以下のいずれか 1 つ以上であり：

a) 以下のリスト A のいずれか 1 つ以上から選択されるサポニン：

－ キラヤ・サボナリアサポニン混合物、またはキラヤ・サボナリアから単離されるサポニン、例えば Quil-A、QS-17-api、QS-17-xylo、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xylo、

－ ジブソフィラ・エレガンスサポニン混合物、またはジブソフィラ・エレガンスから単離されるサポニン、

20

－ サポニナム・アルブムサポニン混合物、またはサポニナム・アルブムから単離されるサポニン、

－ サボナリア・オフィシナリスサポニン混合物、またはサボナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、および

－ キラヤ樹皮サポニン混合物、またはキラヤ樹皮から単離されるサポニン、例えば Quil-A、QS-17-api、QS-17-xylo、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xylo、あるいは

b) 以下のリスト B から選択される、ジブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン：

SA1641、ジブソシド A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658、およびフィトラッカゲニン、あるいは

30

c) 以下のリスト C から選択される、キラヤ酸アグリコンコア構造を含むサポニン：

AG1856、AG1、AG2、アグロステモシド E、GE1741、ジブソフィラサポニン 1 (Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、サボナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、10SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7api、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、および QS-21B-xylo、あるいは

40

d) 以下のリスト D から選択される、アグリコンの C23 位置にアルデヒド基なしの 12, 13-デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン：

エスシン Ia、エスシナート、アルファーヘデリン、AMA-1、AMR、AS6.2、AS64R、アッサムサポニン F、ディブサコシド B、エスクレントシド A、マ克蘭トイジン A、NP-005236、NP-012672、プリムラ酸 1、サイコサポニン A、サイコサポニン D、ティーシードサポニン I、およびティーシードサポニン J、

好ましくは、前記サポニンは、リスト A、B、または C から選択されるサポニン、より好ましくは、リスト B または C から選択されるサポニン、さらにより好ましくは、リスト C から選択されるサポニンのいずれか 1 つ以上である、

50

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 8】

前記サポニン、A G 1 8 5 6、G E 1 7 4 1、キラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、Q u i l - A、Q S - 1 7、Q S - 2 1、Q S - 7、S A 1 6 4 1、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、サポナリオシド B、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 7 0 0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2、および S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり、好ましくは、ここで、前記サポニンは Q S - 2 1、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S A 1 6 4 1、および G E 1 7 4 1 のいずれか 1 つ以上であり、より好ましくは、前記サポニンは Q S - 2 1、S O 1 8 3 2、または S O 1 8 6 1 であり、最も好ましくは S O 1 8 6 1 である、

10

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 9】

前記サポニンはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニンであり、好ましくは、前記サポニンはサポナリオシド B、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 7 0 0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2、および S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり、より好ましくは、前記サポニンは S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 7 0 0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2、および S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、前記サポニンは S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、および S O 1 8 6 2 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、前記サポニンは S O 1 8 3 2 および S O 1 8 6 1 であり、最も好ましくは S O 1 8 6 1 である、

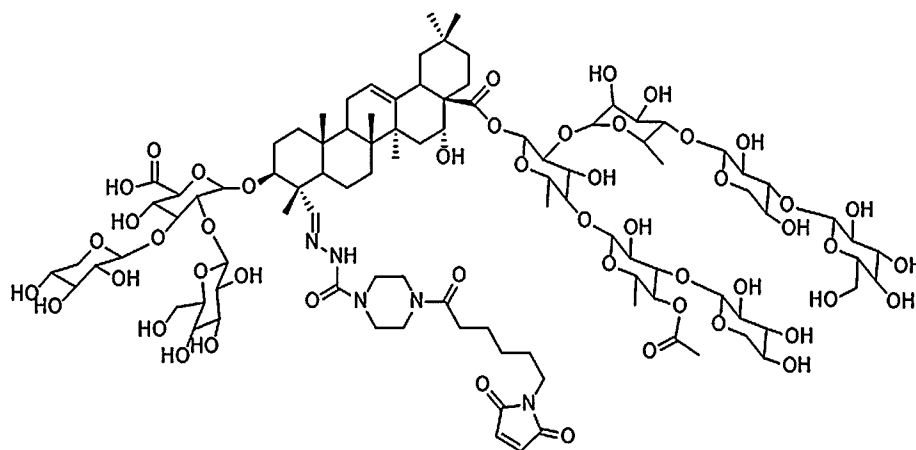
20

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 10】

前記サポニンは S O 1 8 6 1 であり、前記オリゴヌクレオチド複合体は、分子 (V I I) a に従う S O 1 8 6 1 サポニン誘導体

【化 3 7】



30

(V I I) a

の、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも 1 つの G a l N A c 部分との複合体化によって提供されて、前記オリゴヌクレオチド複合体を提供する、

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 11】

前記複合体に含まれる前記オリゴヌクレオチドは、1 5 0 n t よりも長くない核酸として定められ、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは 5～1 5 0 n t のサイズを有し、好ましくは 8～1 0 0 n t であり、最も好ましくは 1 0～5 0 n t である、請求項 1～1 0

50

のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 1 2】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体と、任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む第 2 の薬学的組成物。

【請求項 1 3】

医薬としての使用のための、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 1 4】

遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、および L D H のいずれか 1 つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、および L D H のいずれか 1 つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 3 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

10

【請求項 1 5】

遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、および C E B P A のいずれか 1 つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、および C E B P A のいずれか 1 つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 4 または 1 5 に記載の使用のための、ここで、前記使用は、遺伝子 H S P 2 7 および a p o B のいずれか 1 つ以上、好ましくは a p o B の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防においてである、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7 および a p o B のいずれか 1 つ以上、好ましくは a p o B が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

30

【請求項 1 7】

請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための、ここで、前記使用は、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病 A、血友病 B、A A T 関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T R 型アミロイドーシス、遺伝性 T T R アミロイドーシス (h A T T R)、補体関連疾患、B 型肝炎感染、C 型肝炎感染、α 1 - アンチトリプシン欠乏症、β - サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防においてである、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

40

【請求項 1 8】

請求項 1 4 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の使用のための、ここで、前記使用は、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、もしくは肝細胞癌、および／または心血管疾患、例えば高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防においてである、請求項 1 2 に記載の第 2 の薬学的組成物または請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項 1 9】

50

対象、好ましくはヒト対象におけるLDLコレステロールの低下における使用のための、請求項12に記載の第2の薬学的組成物または請求項1～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項20】

請求項1～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から前記細胞の内側に移入し、好ましくは、その後に、前記細胞のサイトゾル内に前記オリゴヌクレオチド複合体に含まれる前記オリゴヌクレオチドを移入するための、インビトロのまたはエキスピボの方法であって、

a) その表面上にASGPRを発現する細胞を提供し、前記細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択され、前記提供された細胞に移入するための請求項1～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド複合体を提供するステップと、

b) ステップa)の前記細胞をインビトロでまたはエキスピボでステップa)の前記オリゴヌクレオチド複合体と接触させ、それによって、前記細胞の外側から前記細胞内への前記オリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、好ましくは、それによって、その後に、前記細胞のサイトゾル内への前記オリゴヌクレオチド複合体に含まれる前記オリゴヌクレオチドの移入をもたらすステップと、

を含む方法。

【請求項21】

前記オリゴヌクレオチド複合体に含まれる前記サポニンが植物から単離される、請求項1～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ASGPRのリガンド(ASGPRリガンド)に共有結合的に連結されたサポニンを含みかつ共有結合的に連結されたオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド複合体、すなわち、ASGPRのリガンドに共有結合的に連結されたサポニンを含む(サポニン、オリゴヌクレオチド、ASGPRリガンド)複合体に関し、リガンドは少なくとも1つのGalNAcを含み、ここで、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンド複合体は、さらに、共有結合されたオリゴヌクレオチド、例えばsiRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む(本発明のオリゴヌクレオチド複合体と言われる)。さらに、本発明は、医薬としての使用のための、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンド複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。本発明は、例えば遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHの発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに例えば癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、 α 1-アンチトリプシン欠乏症、 β -サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のための、本発明の薬学的組成物にもまた関する。本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を生成するための方法にもまた関する。最後に、本発明は、本発明のサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンド複合体(本発明のオリゴヌクレオチド複合体ともまた言われる)を細胞の外側から上記細胞の内側に移入するためのインビトロのまたはエキスピボの方法に関する。

【背景技術】

【0002】

蛋白質の機能を阻害する能力は、ヒトにおいて、または病原体においてかにかかわらず、創薬の不可欠の一部である。従来の低分子薬物および抗体は利用可能な標的のサブセッ

10

20

30

40

50

トに強く限定される。低分子は、主として、補因子部位または伝達因子部位、低分子を受け容れるように設計されている部位に有効に結合する。抗体はより多種多様な蛋白質に結合し得るが、普通は細胞外標的に限定される。

【0003】

オリゴヌクレオチド治療は比較的若いかつ速く発展している分野であり、これは、遺伝学的な転写および翻訳経路を直接的に操作することによって、低分子薬物または抗体薬物によって遭遇される問題の多くを克服することを狙う。オリゴヌクレオチドの効力および汎用性、具体的には、古典的な低分子薬物によって「アンドラッグブル」である蛋白質をコードする遺伝子を抑圧するという期待は、それらを魅力的な薬物候補にする。最初のオリゴヌクレオチド薬物はアンチセンステクノロジーに基づいた。それによって、一本鎖核酸分子は配列特異性をもってそれらの相補的なmRNA標的に結合し、それゆえにRNAse H系による二重鎖の分解の引き金となるであろう。

10

【0004】

1998年に、アンドリュー・ファイヤー (Andrew Fire) およびクレイグ・メロ (Craig Mello) は、それらがRNA干渉 (RNAi) と名付けた現象のシノラブダイティス・エレガンスにおける転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) の原因物質として二本鎖RNA (dsRNA) を同定する画期的な論文を発表した。RNAiの発見は、植物および真菌における遺伝子サイレンシングの不可思議な観察を説明し、非コードRNAが多細胞生物における遺伝子発現の中心的な制御因子であることを遂には示した生物学における革命をキックオフした。その後まもなく、低分子dsRNA (典型的には15~30塩基対 (bp)) は、非特異的なインターフェロン応答を誘起することなしに哺乳類細胞におけるRNAiサイレンシングを触媒的に誘導し得るということが発見された。低分子干渉RNA (siRNA) および短鎖ヘアピンRNA (shRNA) などの低分子dsRNAによってRNAi経路を標的化することは、アンチセンスと比べていくつかの理論上の利点を有し、著しくより効率的 (触媒的) であり、遺伝子発現のより長い阻害を与える。これは、より低頻度の投薬と一緒に、より低い用量およびより低いコストに反映される。より低い暴露は、siRNAではより少数の毒性問題をもまた意味し得る。

20

【0005】

しかしながら、siRNAがインビボのその標的に到達する前に、それは、RNAによって誘導されるサイレンシング複合体 (RISC) 機構へのその経路をブロックするいくつかの有意な障壁に直面する。血流に入ると、siRNAは、内在性のヌクレアーゼによる分解、ならびにその小さいサイズおよび高度にアニオン性の性格を原因とする腎排泄を受けやすい。加えて、その標的細胞に到達する前に、siRNAは血管の内皮タイトジャンクションを通り抜け、細胞外マトリックス中を拡散しなければならない。その多数の負電荷を原因として、siRNAは直ちには細胞膜に結合またはそれを横断せず、ひとたび細胞の内側では、それはその細胞内蛋白質標的と相互作用するためにはエンドソームから脱出しなければならない。

30

【0006】

ゆえに、オリゴヌクレオチド (例えばsiRNA) 治療の成功は、細胞の外側からサイトゾル内への薬物の有効な送達に強く依存する。帰結として、かなりの注目がオリゴヌクレオチド (例えばsiRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド) 送達を改善する送達系を開発することに向けられている。ウイルス系送達の他に、細胞へのsiRNA (または他のオリゴヌクレオチド) 送達を向上させるために使用される主な方法は、リポソーム、細胞膜透過ペプチド (CPP) およびそれらの模倣分子、またはナノ粒子を使用する (非特許文献1)。安全性の懸念、例えば挿入変異導入および免疫発生の可能性は、ウイルス系のアプローチの未来を限定すると考えられる。

40

【0007】

リポソームは、siRNAなどのオリゴヌクレオチドに最も普通に用いられる送達ベクターであり、ここでは、オリゴヌクレオチドは脂質二重層内にカプセル化される。いくつかの問題、例えば、酸素ラジカルによって媒介される毒性 (カチオン性のリポソームに典

50

型的)、細胞毒性、遺伝子制御に対する効果、および炎症性応答が、リポソーム系のオリゴヌクレオチド送達では遭遇される。さらに、脂質を用いるインビボ送達は圧倒的に肝臓および脾臓を標的化するように見える。

【0008】

蛋白質導入ドメインともまた呼ばれる細胞膜透過ペプチド(CCP)は、細胞膜を横断することができるという珍しい特性を有する短いペプチド(通常は<30アミノ酸残基の長さ)である。オリゴヌクレオチドへの共有結合的な連結によってまたはオリゴヌクレオチドとの非共有結合的な複合体の形成によって、CPPはオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを向上させ得る。CPPによって媒介されるオリゴヌクレオチド送達の分野は極めて複雑である。なぜなら、それは、単一の薬物において、成熟からは程遠い2つの分野、オリゴヌクレオチドテクノロジーおよびペプチドテクノロジー両方によって課される課題を組み合わせるからである。オリゴヌクレオチドに関係する問題の他に、CPPで遭遇される典型的な課題はペプチド鎖のインビボ安定性(の欠如)に関係し、多くの場合には、合成することが複雑であり得るおよび/または縮減された細胞膜透過活性を発揮し得る非天然のペプチド誘導体の使用を要求する。

【0009】

向上した細胞送達にもかかわらず、エンドソームによるトラップを克服することは、効率的なCPPおよび他の輸送系の設計にとっての主要な課題の1つである(非特許文献1)。

【0010】

ナノ粒子およびナノ担体はナノスケールオリゴヌクレオチド送達系であり、典型的には、オリゴヌクレオチドと複合体化したポリマー、生物学的安定化剤、および細胞標的化リガンドから構成される。例示的なsiRNAナノ担体系は名称siRNAダイナミックポリ複合体で公知である。この系は、生物学的安定化剤としてのポリエチレングリコール(PEG)および肝細胞標的化リガンドに連結された両親媒性ポリマーに基づき、ここで、siRNAはジスルフィド結合によってポリマーに共有結合される。標的化部分およびPEG部分はマレアミド酸連結部によってポリマーに取り付けられ、負荷電ナノ粒子を形成する。これらは血清中蛋白質に結合しない。エンドサイトーシスによる内在化の後に、マレアミド酸結合はエンドソームの酸性化によって直ちに加水分解され、ポリマーのカチオン性のアミン基を暴露し、プロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出を誘導する。ナノ担体は(場合によっては、シクロデキストリンと組み合わせられる)ポリエチレンイミン(PEI)などのカチオン性ポリマーの形態でもまた公知であり、これらはsiRNAなどのオリゴヌクレオチドとの静電的複合体を形成し、分解からの保護を提供しかつ内在化を助け得る。しかしながら、膜の崩壊およびアポトーシス誘導からもたらされるより高い濃度における毒性は、治療薬送達剤としてのカチオン性ポリマーの適用を限定し得る。ナノ粒子およびナノ担体の複雑な調製の他に、それらの長期安定性は商業的に実現可能な使用にとっての主要な障壁である。

【0011】

オリゴヌクレオチドは、RNAi、RNaseHによって媒介される切断による標的分解、スプライシング調節、非コードRNA阻害、遺伝子活性化、およびプログラムされた遺伝子編集を包含するある範囲のプロセスによって、遺伝子発現を調節するために用いられ得る。オリゴヌクレオチドは、広い範囲の疾患を処置または管理するポテンシャルポテンシャルを有する核酸ポリマーである。オリゴヌクレオチド治療薬の大多数は遺伝子サイレンシングに焦点を合わせているが、スプライス調節および遺伝子活性化を包含する他の戦略が追求されつつあり、従来薬学的なモダリティにとって一般的にアクセス可能であるものから可能な標的の範囲を拡大している。

【0012】

薬学的なオリゴヌクレオチドの例は一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび二本鎖短鎖干渉RNA(siRNA)であり、これらは根本的な原理を共有する。オリゴヌクレオチドはワトソン・クリック塩基対形成によって標的RNAに結合し、もたらされた二

10

20

30

40

50

重鎖は標的メッセンジャーRNA (mRNA) の分解を導く。細胞質において (siRNA のケースでは) または核において (アンチセンスオリゴヌクレオチドのケースでは)、オリゴヌクレオチドは対応するRNAの発現を調節し得る。アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は多様なケミストリーの小さい (~18~30ヌクレオチド) 合成の一本鎖核酸ポリマーであり、これらは種々のメカニズムによって遺伝子発現を調節するために使用され得る。ASOは2つの主要なカテゴリーRNase Hコンピテントおよび立体ブロックに細分され得る。立体ブロックオリゴヌクレオチドは、高い親和性で標的転写物に結合するように設計されているASOであるが、それらはRNase Hコンピテンスを欠如するので標的転写物分解を誘導しない。立体ブロックオリゴヌクレオチドは標的転写物上の特異的配列をマスクし、それによって転写物RNA-RNAおよび/またはRNA-蛋白質相互作用に干渉し得る。siRNA分子はRNAiのエフェクター分子であり、古典的には、特徴的な19+2mer構造 (つまり、19個の相補的な塩基と末端の2ヌクレオチド3'オーバーハングとを有する2つの21ヌクレオチドRNA分子の二重鎖) からなる。siRNAの鎖の1つ (ガイドまたはアンチセンス鎖) は標的転写物に対して相補的であり、他方の鎖はパッセンジャーまたはセンス鎖と呼称される。siRNAは、RNAによって誘導されるサイレンシング複合体 (RISC) の一部としてのアルゴノート2蛋白質 (AGO2) を相補的な標的転写物へとガイドするように作用する。siRNAおよび標的転写物の間の完全な相補性は、AGO2によって触媒されるガイド鎖の標的の対向する位置10-11の切断 (つまり、スライサー活性) をもたらし、遺伝子サイレンシングに至る。siRNAアプローチは、Dicer基質siRNA、内部分割低分子siRNA、自己送達siRNA (非対称かつ疎水性)、一本鎖siRNA、および二価siRNAを包含する。立体ブロックASOは、RISC複合体内における低分子RNA種に対する直接的結合によってmiRNAを競合的に阻害する。かかるASOはアンチmiRNAオリゴヌクレオチド、アンチmiR、またはantagomirとして公知である。治験に入った最初のアンチmiRNA薬物はミラビルセン (SPC3649) であった。これは、肝臓特異的なmiRNAのmiR-122の標的化によって慢性のC型肝炎ウイルス (HCV) 感染を処置するために設計されたASOである。オリゴヌクレオチド治療薬の他のクラスはプレmRNA上のスプライス部位に結合することによってRNA機能を調節し、これは、例えば、筋ジストロフィーなどの疾患における変異含有エキソンのスキップをもたらす。

10

20

30

【0013】

臨床適用のためのオリゴヌクレオチドのさらなる例はマイクロRNA (miRNA) であり、これらは、例えば癌、細胞周期進行、感染性疾患、免疫、糖尿、代謝、骨格筋形成、および筋ジストロフィーに関係付けられている内在性のRNAiの引き金である。長い一次miRNA転写物上に埋め込まれたmiRNAヘアピンが、2つのRNase IIIファミリー酵素DICER1 (Dicer) およびDROSHAによって逐次的にプロセシングされ、これらはそれぞれヘアピンを遊離させ、それからループ配列を切断する。もたらされた二重鎖RNA (siRNAと相似) はアルゴノート蛋白質 (例えばAGO2) 上にローディングされ、1つの鎖が捨てられて、成熟した一本鎖miRNA種を作り出す。siRNAと同じく、miRNAはRISCを標的配列へとガイドし、そこで、それらは遺伝子サイレンシングを開始する。siRNAとは対照的に、miRNAは典型的には部分的な相補性によって結合し、スライサー非依存的なメカニズムによってサイレンシングを誘導する。

40

【0014】

治療薬オリゴヌクレオチドは長さが一般的に15から30ヌクレオチドであり、疾患に関係する蛋白質をコードするメッセンジャーRNA (mRNA) または制御性RNAの特異的な領域に対して相補的であるように設計される。非経口投与後に、オリゴヌクレオチドは細胞に入り、いずれかの相補的なRNAに結合する。ひとたびオリゴヌクレオチド薬物がその相補的なmRNAまたはプレmRNAに結合すると、一連のイベントが後続する。アウトカムは、標的化された配列の性質に部分的に依存し、酵素的切断の手段によるm

50

R N A の破壊（これは、m R N A が変異しており、病原性の蛋白質をコードするときに役に立つ）、プレm R N A スプライシングパターンの変化（これは、「デフォルトの」スプライシングパターンが病原性の生成物を生成するときに役に立つ）、または制御性 R N A の機能の変化を包含する。

【0015】

オリゴヌクレオチドを含む薬物分子の例は s i R N A - G a l N A c 複合体であり、これにおいては、s i R N A 部分は P C S K 9 酵素を標的化する。この酵素は、（低密度リポ蛋白質に結合したときに）低密度リポ蛋白質受容体に結合および分解し、心血管疾患の処置における標的である。さらなる例は、肝臓で発現されるアポリポ蛋白質（a）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む G a l N A c 複合体である。また、遺伝子 D M D はオリゴヌクレオチドに基づく薬物分子の標的である。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィンをコードする遺伝子 D M D の変異によって引き起こされる一様に致死性の疾患である。脊髄性筋萎縮症は常染色体劣勢疾患であり、S M N 1 蛋白質機能の喪失をもたらす S M N 1 の変異によって引き起こされる。オリゴヌクレオチドに基づく治療の標的は S M N 2 遺伝子である。

【0016】

疾患に関係するm R N A およびその蛋白質生成物のレベルを縮減するために配列によって駆動される切断メカニズムを用いるオリゴヌクレオチド薬物は、例えばミボメルセンおよびインクリシランであり、これらは切断メカニズムを用いてコレステロール動態を改変する。2つの薬物はそれぞれが異なる遺伝子産物を標的化し、これらのそれぞれは高コレステロール血症において重要である。各メカニズムにおける共通の因子は、標的に対する各オリゴヌクレオチド薬物のハイブリダイゼーションの結果として、内在性の酵素の活性化であり、これはハイブリダイゼーションの部位における標的化されたm R N A の切断をもたらす。ミボメルセンは、肝臓において生成される低密度リポ蛋白質（L D L）コレステロールの構成要素のアポリポ蛋白質 B（a p o B）をコードするR N Aのある部分に対して相補的である配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。ミボメルセンがアポリポ蛋白質 B のプレm R N A にハイブリダイゼーションするときには、D N A - R N A ヘテロ二重鎖の存在はR N a s e H を誘引および活性化し、これがヘテロ二重鎖上のm R N A を切断する。切断はアポリポ蛋白質 B m R N A を不活性にし、それによって、生成されるアポリポ蛋白質 B の量を縮減する。結果として、肝臓からの超低密度リポ蛋白質コレステロールの排出は縮減され、究極的には、L D L コレステロールの循環中レベルが遞減される。インクリシランは、L D L 受容体（L D L R）のレベルを負に制御する酵素のプロ蛋白質転換酵素サブチリシン-ケキシン9型（P C S K 9）をコードするm R N A の切断を誘導する。P C S K 9 の活性を縮減する天然に存在する遺伝学的バリエーションを有する者は、これらのバリエーションを有さない者と比較して、増大したL D L R レベル、縮減されたL D L コレステロールレベル、および縮減された心血管リスクを有する。インクリシランはP C S K 9 m R N A を切断および不活性化し、これは、P C S K 9 のレベルを減少させ、よってL D L R レベルおよびL D L コレステロールのクリアランス両方を増大させ、L D L コレステロールの循環中レベルを縮減する効果を有する。インクリシランは二本鎖の低分子干渉R N A（s i R N A）である。インクリシランのR N A 鎖の1つはP C S K 9 m R N A のある部分に対して相補的である。ひとたびインクリシランが細胞に入ると、相補的な鎖（またはガイド鎖）は、鎖を細胞内環境に提示する蛋白質複合体のR N A によって誘導されるサイレンシング複合体（R I S C）上にローディングされる。ひとたび完璧に近い相補的な配列（m R N A 分子上の）がガイド鎖の一部とハイブリダイゼーションすると、R I S C の一部である酵素がm R N A を切断する。m R N A 切断生成物は翻訳され得ず、P C S K 9 蛋白質レベルはそれによって縮減される。

【0017】

R N a s e H によって媒介されるおよびR I S C によって媒介される切断の引き金となるオリゴヌクレオチドに基づく薬物（それぞれイノテルセンおよびパチシラン）は、トランスサイレチン（T T R）アミロイドーシスの処置に用いられている。この形態のアミロ

10

20

30

40

50

イドーシスにおいては、TTRの変異は蛋白質生成物のミスフォールディングを誘導し、これが、末梢ニューロンおよび心臓を包含する複数の組織におけるアミロイド沈着物の形成をもたらす。

【0018】

肝臓を標的化するFDA承認済みオリゴヌクレオチド治療薬は、ミボメルセン（ホモ接合型の家族性高コレステロール血症を処置するために遺伝子apoBを標的化する）、デフィブロチド（肝中心静脈閉塞症）、パチシランTTR（遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス、ポリニューロパチー）、イノテルセンTTR（遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス、ポリニューロパチー）、およびギボシランである。ギボシランは急性肝性ポルフィリン症を処置するためのGalNAc複合体である。標的遺伝子はALAS1である。肝臓において遺伝子を標的化する臨床開発中のオリゴヌクレオチド薬物候補は、例えば以下である：miR-122を標的化するミラビルセン（C型肝炎感染）、miR-122を標的化するRG-101（C型肝炎感染）、B型肝炎ウイルスHBsAgを標的化するAB-729（B型肝炎感染）、AATを標的化するARO-AAT（ α 1-アンチトリプシン欠乏症）、遺伝子TMPRSS6を標的化するSLN124（ β -サラセミア）、LDHAを標的化するDCR-PHXC（原発性高シュウ酸尿症）、およびCEBPAを標的化するMTL-CEBPA（肝細胞癌）。

【0019】

相当な進歩にもかかわらず、2つの主要なハードル、薬物安全性および送達、オリゴヌクレオチド治療薬の広範な適用に立ち塞がっている。疾患に関係するRNAを発現している臓器および細胞にオリゴヌクレオチド薬物候補を送達することができないことは、オリゴヌクレオチド治療薬の首尾良い開発にとっての最も多大な障害物であることが判明している。オリゴヌクレオチドは従来の低分子薬物候補よりも相当に大きい。それらの高度にアニオン性の性質とカップリングされたそれらのサイズは、それらが細胞質および核コンパートメントに到達するために細胞膜を通して拡散することを困難にする。オリゴヌクレオチドは典型的には大きい親水性ポリアニオンである（一本鎖ASOは $\sim 4 \sim 10$ kDaであり、二本鎖siRNAは ~ 14 kDaである）。それらが直ちには形質膜を通過しないということを意味する特性である。加えて、サイトゾルおよび／または核におけるオリゴヌクレオチドの十分な放出および送達を考えるとときには、困難が持ち上がる。このときには、正しい細胞内の作用部位に到着することができるための、リソソーム分解またはエキソサイトーシスによる再排出よりも前のエンドリソソーム系からのオリゴヌクレオチドの脱出が考えられる。現行のオリゴヌクレオチド細胞送達戦略は非効率的であり、薬物の腎排泄、または治療上の対象ではない細胞および組織への薬物の大多数の送達に至る。前述の送達系のいくつかによって達成され得る細胞への改善されたオリゴヌクレオチド（例えばsiRNA）送達にもかかわらず、エンドソーム脱出は、RNAiに基づく治療薬などのオリゴヌクレオチドに基づく治療薬の適用にとっての主要な障壁のままだに残っている。エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドのわずかな部分のみが、それがその意図される機能を発揮し得る細胞質空間に脱出し、大多数はエンドサイトーシスコンパートメントにトラップされたままに残り、不活性である。最近の文献は $< 0.01\%$ という受動的なsiRNA脱出率を示唆している（非特許文献2）。さらに、標的効果（例えばノックダウン）を生成するためにオリゴヌクレオチドを機能的に内在化する細胞の能力は、細胞がバルクのオリゴヌクレオチドを内在化する度合いとは独立であるように見えるということが示されている。これらの観察は、別個の「生産的な」および「非生産的な」自由取り込み経路の仮説に至ったが、これらの経路を区別する分子メカニズムは判然としないままに残っている（非特許文献2）。

【0020】

概しては、裏側にあるメカニズム（改善されたエンドソーム脱出、増大した「生産的な」経路取り込み、または別のメカニズム）にもかかわらず、増大した効力（例えば標的ノックダウン）、より少ない毒性、および／またはより少ないオフターゲット効果をもたらすオリゴヌクレオチドの改善された送達系の有意な必要が残っている。

【0021】

ある新興の戦略は、オリゴヌクレオチドの効力および選択された組織への分布を増大させるために、受容体リガンドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の複合体化を要する。例えば、オリゴヌクレオチド治療薬に対するトリアンテナ型N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の複合体化は、単離された肝細胞およびインビボの肝臓において10～30倍増大した効力をもたらす。GalNAcは、それらのペンダントオリゴ糖から末端シアル酸残基を失った損傷した糖蛋白質上に見出される。肝臓は、肝細胞の表面上に非常に高いレベル（細胞あたり $10^5 \sim 10^6$ のオーダー）で三量体アシアロ糖蛋白質受容体（ASGPR）を発現することによって、全身循環からこれらの蛋白質をクリアランスするように機能する。ASGPRは、血液からの循環中高分子のエンドサイトーシスのために中性pHでGalNAcに特異的に結合し、初期エンドソームにおけるカーゴ荷降ろしのために酸性pH（ $\sim 5 \sim 6$ ）でGalNAcを放出する。遊離したASGPRは、それから、再利用のために細胞表面に再度リサイクルされる。現行で治験中のRNAi薬物のおよそ三分の一は、ASGPRを標的化する多価GalNAcリガンドに複合体化された単一分子の化学修飾されたRNAiの引き金である。肝臓の好適な生理学、ASGPRのユニークな特性、GalNAcリガンドの非毒性の性質、およびGalNAc-siRNA複合体の単純さは、これを肝細胞への全身RNAi送達のための魅力的なアプローチにしている。

10

【0022】

アシアロ糖蛋白質受容体（ASGPR）によって媒介される取り込みによる肝細胞へのオリゴヌクレオチド治療薬（オリゴヌクレオチドバイオ複合体）の標的化された送達によって、複合体およびその対応する細胞表面受容体蛋白質の間の相互作用が促進され、受容体によって媒介されるエンドサイトーシスによるその後の内在化に至る。細胞型に関連する受容体とのバイオ複合体の相互作用は、それによって、特異的な組織または組織内の細胞型への標的化された送達を可能にする。ASGPRは、例えば治療薬アンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化されたトリアンテナ型N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）に結合および内在化し、これらは内在化され、それから細胞の内側で放出され、そこで、それらはそれらの対応するプレメッセンジャーRNA（mRNA）にハイブリダイゼーションし、RNA-DNAヘテロ二重鎖の切断を誘導し得る。または、例えば疾患に関係する遺伝子を指向する低分子干渉RNA（siRNA）と複合体化される。エンドソームまたはリソソームコンパートメントからのsiRNAの放出の後に、今や細胞質のsiRNAはRNAによって誘導されるサイレンシング複合体（RISC）上にローディングし得る。ローディングされたRISCは、それから、全ての発現されたRNAを配列相補性についてスキャンし得る。相補的な配列がハイブリダイゼーションによって検出されるときには、RISCの一部である酵素が標的化されたmRNAを切断し、それによって疾患に関係する蛋白質の発現を縮減する。RNAiはRNA干渉の意である。この受容体によって媒介される取り込みは、未複合体化オリゴヌクレオチドの治療薬送達に要求されるものよりも低い投薬を許す。一本鎖および二本鎖オリゴヌクレオチド両方はGalNAc複合体の使用によって肝細胞に送達され得る。例えば、血友病Aおよび血友病Bなどの疾患の処置のための薬物、ならびに遺伝子PCSK9を標的化するsiRNA-GalNAc複合体のインクリシラン、および遺伝子ALAS1を標的化するsiRNA-GalNAc複合体のギボシランは、オリゴヌクレオチド-GalNAc複合体に基づいて開発されている。

20

30

40

【0023】

テクノロジー上の進展にもかかわらず、効率的なオリゴヌクレオチド送達を達成することは、主要な技術応用上の限定のままだに残っている。オリゴヌクレオチドに基づく薬物プラットフォームでは、オリゴヌクレオチド送達を改善することを狙ったアプローチ、例えばオリゴヌクレオチドの化学修飾、バイオ複合体化、およびオリゴヌクレオチドの送達のためのナノ担体の使用が用いられるが、送達の課題は依然として改善を必要とする。ASGPR標的化オリゴヌクレオチド系（例えばGalNAc-オリゴヌクレオチド複合体）

50

の効力をさらに増大させ、毒性を減少させ、および／またはオフターゲット効果を縮減する改善された送達系の必要が依然として存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0024】

【非特許文献1】グッディング (Gooding) , マット (Matt) 等著, ケミカルバイオロジー&ドラッグデザイン (Chemical Biology & Drug Design) 第80.6巻 (2012年) : p. 787-809

【非特許文献2】セッテン (Setten) , ライアン (Ryan) L. , ジョン (John) J. ロッシ (Rossi) , およびシーピン・ハン (Si-ping Han) 著, ネイチャーレビューズ・ドラッグディスカバリー (Nature Reviews Drug Discovery) 第18.6巻 (2019年) : p. 421-446

10

【発明の概要】

【0025】

本発明のある態様はオリゴヌクレオチド複合体に関し、アジア口糖蛋白質受容体 (ASGPR) のリガンド (ここで、ASGPRのリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは (GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる) に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、少なくとも1つのサポニンはモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。

20

【0026】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、アジア口糖蛋白質受容体 (ASGPR) のリガンド (ここで、ASGPRのリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは (GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる) に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、少なくとも1つのサポニンは12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有し、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は1~16個のサポニン部分、好ましくは1~8つのサポニン部分、より好ましくは1つのサポニン部分、4つのサポニン部分、または8つのサポニン部分を含む。

30

【0027】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1~16個のサポニン部分、より好ましくは1~8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドは、三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、GalNAc部分、サポニンまたはサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

40

【0028】

ある実施形態は、以下を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体である：1つのサポニン部分、または4つのサポニン部分、好ましくは4つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG2デンドロン、例えば、例えば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) に共有結合され、または8つのサポニン部分、好ましくは、8つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG3デンドロン、例えば、例えば(2S) -N-[(1S) -1-{ [2-(6-アミノ-N-

50

{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) ヘキサンアミドに共有結合される。

【0029】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニン部分はヒドラゾン結合を介してまたはセミカルバゾン結合を介して連結される。少なくとも1つのサポニンは、好ましくは、セミカルバゾン結合を介してオリゴヌクレオチド複合体上で共有結合される。かかるヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合（リンカーあり）は、例えば、サポニンのキラヤ酸アグリコンコア構造のまたはサポニンのジブソゲニンアグリコンコア構造のC23原子におけるアルデヒド基が関わって形成される。

10

【0030】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：上記複合体に含まれるオリゴヌクレオチドが、150ntよりも長くない核酸として定められ、好ましくは、ここで、オリゴヌクレオチドは5～150ntのサイズを有し、好ましくは8～100ntであり、最も好ましくは10～50ntである。

【0031】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体と任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む薬学的組成物に関する。

20

【0032】

本発明のある態様は、医薬としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

【0033】

本発明のある態様は、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

30

【0034】

本発明のある態様は、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

40

【0035】

本発明のある態様は、遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBの発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、ならびに／または遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBが関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

【0036】

50

本発明のある態様は、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症、 β -サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

【0037】

本発明のある態様は、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、もしくは肝細胞癌、および／または心血管疾患、例えば高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物に関する。

10

【0038】

本発明のある態様は、細胞の外側から上記細胞の内側に本発明のオリゴヌクレオチド複合体を移入し、好ましくはその後本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを上記細胞のサイトゾルにおよび／または核に移入するための、インビトロのまたはエキスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

a) ASGPR、好ましくはASGPR1をその表面上に発現する細胞を提供し、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染哺乳類細胞、および哺乳類腫瘍細胞から選択され、ここで、好ましくは上記細胞はヒト細胞であること、

b) ステップa) で提供された細胞に移入するための本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

20

c) ステップa) の細胞をインビトロでまたはエキスピボでステップb) のオリゴヌクレオチド複合体と好ましくは液体媒体中において接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、任意にかつ好ましくは、それによって、その後上記細胞のサイトゾルおよび／または核へのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をもたらすこと。

【0039】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくはその後上記オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを上記細胞のサイトゾルに移入するための、インビトロのまたはエキスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

30

a) ASGPRをその表面上に発現する細胞を提供し、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択され、提供された細胞に移入するための本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

b) ステップa) の細胞をインビトロでまたはエキスピボでステップa) のオリゴヌクレオチド複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、好ましくは、それによって、その後、上記細胞のサイトゾルへのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をもたらすこと。

【0040】

40

好ましくは細胞はヒト細胞である。好ましくは細胞は肝臓細胞である。

【0041】

本発明のある態様は、アジア糖蛋白質受容体(ASGPR)のリガンドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含むサポニン複合体に関し、ここで、ASGPRのリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなり、ここで、少なくとも1つのサポニンはモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。

【0042】

50

本発明のある態様は、以下を含む薬学的な組み合わせに関する：

- － 第1の薬学的組成物であって、本発明のサポニン複合体を含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む、ならびに
- － 第2の薬学的組成物であって、エフェクター分子およびASGPRのリガンドの第2の複合体（ここで、ASGPRのリガンドは好ましくは少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる）またはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体を含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む。

【0043】

10

本発明のある態様は、以下を含む薬学的組成物に関する：

- － 本発明のサポニン複合体、
- － エフェクター分子およびASGPRのリガンドの第2の複合体（ここで、ASGPRのリガンドは好ましくは少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる）またはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体、ならびに任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤。

【0044】

本発明のある態様は、医薬としての使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせにまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。

20

【0045】

本発明のある態様は、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。

【0046】

30

本発明のある態様は、本発明の第2の複合体または第3の複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくはその後に本発明の第2の複合体または第3の複合体に含まれるエフェクター分子を上記細胞のサイトゾルに移入するためのインビトロのまたはエクスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

a) ASGPRをその表面上に発現する細胞を提供し、第3の複合体が、第3の複合体が上記細胞表面分子に結合するための結合分子を含む細胞表面分子を発現する細胞に移入されるべきであるときには、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択されること、

b) ステップa)で提供された細胞に移入するための本発明のいずれか1つの第2の複合体または第3の複合体を提供すること、

40

c) 本発明のサポニン複合体を提供すること、

d) ステップa)の細胞をインビトロでまたはエクスピボでステップb)の第2の複合体または第3の複合体およびステップc)のサポニン複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内への第2の複合体または第3の複合体の移入をもたらすこと、好ましくはそれによって、その後に、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体または第3の複合体の移入をもたらすこと、あるいは好ましくはそれによって、その後に、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体または第3の複合体に含まれる少なくともエフェクター分子の移入をもたらすこと。

【0047】

本発明のある態様は、以下のステップを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供

50

するための方法に関する：

a) 共有結合された第1のリンカーを含む少なくとも1つのサポニン部分を提供し、ここで、第1のリンカーは、第2のリンカー上の第2の反応性基または第7のリンカー上の第7の反応性基に対する共有結合のための少なくとも1つの第1の反応性基を含むこと、

b) 共有結合された第3のリンカーを含むオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、第3のリンカーは、第4のリンカー上の第4の反応性基または第7のリンカー上の第8の反応性基に対する共有結合のための第3の反応性基を含むこと、

c) 共有結合された第5のリンカーを含む少なくとも1つのGalNAc部分を提供し、ここで、第5のリンカーは、第6のリンカー上の第6の反応性基または第7のリンカー上の第9の反応性基に対する共有結合のための第5の反応性基を含むこと、ならびに

(d1) 第1の反応性基および第2の反応性基の間の共有結合の形成によって第2のリンカーに第1のリンカーを連結し、第3の反応性基および第4の反応性基の間の共有結合の形成によって第4のリンカーに第3のリンカーを連結し、第5の反応性基および第6の反応性基の間の共有結合の形成によって第6のリンカーに第5のリンカーを連結し、第2のリンカー、第4のリンカー、および第6のリンカーと一緒に共有結合的に連結し、それによってオリゴヌクレオチドを提供すること、

あるいは

(d2) 第1の反応性基および第7の反応性基の間の共有結合の形成によって第7のリンカーに第1のリンカーを連結し、第3の反応性基および第8の反応性基の間の共有結合の形成によって第7のリンカーに第3のリンカーを連結し、第5の反応性基および第9の反応性基の間の共有結合の形成によって第7のリンカーに第5のリンカーを連結し、それによってオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

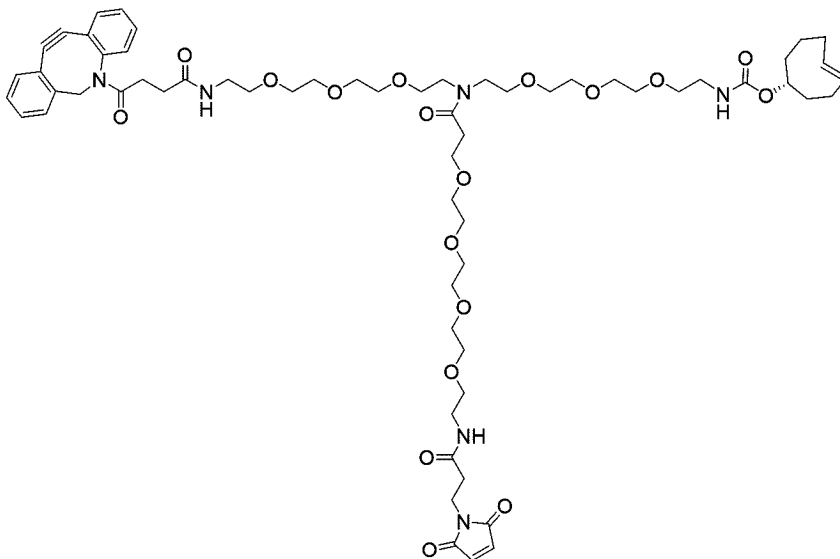
どちらか。

【0048】

ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法であり、ここで、第7のリンカーは、三官能性リンカー、例えば、式(XXI)によって表される三官能性リンカーである：

【0049】

【化1】



(XXI)。

【0050】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも

も1つのサポニン部分が1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分である。

【0051】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニンがSO1861、SO1832、QS-21、またはそのいずれかの機能的な誘導体、好ましくはSO1861またはSO1832である。

【0052】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニン部分がヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合を介して共有結合的に連結される。

【0053】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも1つのGalNAc部分が1～4つのGalNAc部分、好ましくは1または3つのGalNAc部分である。

【0054】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは植物から単離される。好ましくは、サポニンは、根などの植物の一部からまたは樹皮などの樹木の一部から単離される。好ましくは、サポニンは植物に由来する根から単離される。

【0055】

定義

用語「GalNAc」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、N-アセチルガラクトサミンおよびそのIUPAC名称2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトースを言う。

【0056】

用語「(GalNAc)₃Tris」は、例えばsiRNAに基づく治療の分野におけるその通例の科学的な意味を有し、ここでは、好ましくは少なくとも1つのリンカーを介してトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)(IUPAC名称：2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール)のヒドロキシル基にそれぞれが別個に共有結合された3つのGalNAc単位を含む部分を言う。(GalNAc)₃Trisは、自由なアミンを含む分子として存在し得るか、または残りのアミン結合部位を介してさらに官能化されて例えば本明細書に記載される(GalNAc)₃Tris部分を含む複合体を形成し得る。

【0057】

用語「オリゴヌクレオチド」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは1本の2つ以上のヌクレオチドを言う。すなわち、オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドから組成される短いオリゴマーである。例は、RNAおよびDNA、ならびにいずれかの修飾されたRNAまたはDNA、例えば、ロックド核酸(LNA)または2'-O, 4'-C-アミノエチレンもしくは2'-O, 4'-C-アミノメチレン架橋型核酸(BNA^{NC})としてもまた公知の架橋型核酸(BNA)などのヌクレオチドアナログを含む1本の核酸であり、ここで、ヌクレオチドはリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。

【0058】

本明細書において用いられる用語「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」は互いに同義であり、単位から作られたいずれかのポリマー分子を包含すると解釈されるべきであり、ここで、単位は、核酸塩基(または単純に「塩基」であって、例えば、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)、もしくはウラシル(U)のような古典的核酸塩基、または5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシルなどのようないずれかの公知の非古典的、修飾、もしくは合成核酸塩基である)あるいはその機能的同等物を含む。これらは、上記ポリマー分子を、適当なハイブリダイゼー

10

20

30

40

50

ション条件下においてデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）などの天然に存在する核酸との水素結合に基づく核酸塩基対形成（例えばワトソン・クリック塩基対形成）を行なうことができるようにする。これらの天然に存在する核酸は、ヌクレオチドである単位から作られたポリマー分子であると理解されるべきである。

【0059】

ゆえに、化学の観点からは、本定義による用語の核酸は、化学的にはDNAまたはRNAであるポリマー分子、ならびに単位の1つ以上（または全て）が修飾ヌクレオチドであるかまたはヌクレオチドの機能的同等物であるポリマー分子であるゼノ核酸（XNA）または人工核酸としてもまた公知である核酸アナログであるポリマー分子を包含すると解釈され得る。核酸アナログは当分野において周知であり、種々の特性、例えば改善された特異性および／または親和性、それらの標的に対するより高い結合強さ、ならびに／あるいはインビボの増大した安定性を原因として、それらは研究および医療に鋭意に用いられている。核酸アナログの典型的な例は、以下を包含するが、これらに限定されない：ロックド核酸（LNA）（これは架橋型核酸（BNA）としてもまた公知）、ホスホロジアミダートモルフォリノオリゴマー（モルフォリノとしてもまた公知のPMO）、ペプチド核酸（PNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ヘキシトール核酸（HNA）、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸（FANAまたはFNA）、2'-デオキシ-2'-フルオロリボ核酸（2'-FRNAまたはFRNA）、アルトリートル核酸（ANA）、シクロヘキセン核酸（CeNA）など。

【0060】

原則に従うと、核酸の長さは、本明細書においては、核酸の一本鎖が構築される単位の数によって表現される。各単位は、1つの塩基対形成イベントを行なうことができる厳密に1つの核酸塩基に対応するので、問題の核酸が一本鎖（ss）または二本鎖（ds）核酸であるかどうかにかかわらず、長さはいわゆる「塩基対」または「bp」によってしばしば表現される。天然に存在する核酸において、1bpは1ヌクレオチドに対応し、1ntと略称される。例えば、1000ヌクレオチドから作られた一本鎖核酸（またはそのそれぞれが1000ヌクレオチドから作られている2つの相補的な鎖から作られた二本鎖核酸）は、1000塩基対または1000bpの長さを有すると記述され、この長さは、1000nt、または1kbと略称される1キロベースとしてもまた表現され得る。2キロベースまたは2kbは2000塩基対の長さに等しく、これは一本鎖RNAまたはDNAの2000ヌクレオチドに相当する。混乱を避けるために、しかしながら、本明細書において定められる核酸が、化学的にヌクレオチドであるのみならずそれらの機能的同等物でもまたある単位を含み得るかまたはそれからなり得るという事実を照らして、核酸の長さは、当分野において等しく普通の表記「nt」よりもむしろ「bp」または「kb」によって本明細書においては選好的に表現されるであろう。

【0061】

有利な実施形態において、本明細書において開示される核酸は1kbよりも長くなく、好ましくは500bpよりも長くなく、最も好ましくは250bpよりも長くない。

【0062】

特に有利な実施形態において、核酸は、100bpよりも長くない核酸として定められるオリゴヌクレオチド（または単純にオリゴ）、すなわち、上で提供された定義に従うと100よりも多くない単位から作られたいずれかのポリマー分子であり、ここで、各単位は核酸塩基またはその機能的同等物を含む。これは、上記オリゴヌクレオチドを、DNAまたはRNAと適当なハイブリダイゼーション条件下において水素結合に基づく核酸塩基対形成を行なうことができるようにする。上記定義の範囲内で、本明細書において開示されるオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドであるのみならずそれらの合成同等物でもまたある単位を含み得るかまたはそれからなり得るということは直ちに了解されるであろう。換言すると、化学の観点からは、本明細書において用いられる用語のオリゴヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいはLNA（BNA）、PMO（モルフォリノ）、PNA、GNA、TNA、HNA、FANA、FRNA、ANA、CeNA、および／または同類な

どだがこれらに限定されない核酸アナログを含むかまたはそれからなることが可能だと解釈されるであろう。

【0063】

用語「RNAiによって媒介される遺伝子標的化」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、細胞における遺伝子の機能に、遺伝子の転写に関わるmRNAを標的化する低分子二本鎖RNA分子などのオリゴヌクレオチドを上記細胞に移入することによって影響するというインビボ、エクスピボ、またはインビトロのアプローチを言う。例えば、低分子二本鎖RNA分子は、効率的に特異的な遺伝子のRNAiサイレンシングの引き金となることができる。

【0064】

用語「架橋型核酸」もしくは短くして「BNA」または「ロックド核酸」もしくは短くして「LNA」または2'-O, 4'-C-アミノエチレンもしくは2'-O, 4'-C-アミノメチレン架橋型核酸(BNAC)は、その通例の科学的な意味を有し、ここでは、修飾されたRNAヌクレオチドを言う。BNAは「配座固定されたRNA分子」または「アクセス不可能なRNA分子」ともまた言われる。BNAモノマーは、「固定された」C₃'-エンド糖パッキングを有する五員、六員、またはさらには七員の架橋構造を含有し得る。架橋はリボースの2', 4'位置において合成的に組み込まれて、2', 4'-BNAMonomerを提供する。BNAモノマーは、当分野において公知の標準的なホスホロアミダイトケミストリーを用いてオリゴヌクレオチドポリマー構造上に組み込まれ得る。BNAは、増大した結合親和性および安定性を有する構造的に剛直なオリゴヌクレオチドである。用語「BNA」はBNACまたは2', 4'-BNAC(2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸)をもまた言い、その通例の科学的な意味を有し、ここでは、N-O連結部および(N-H)または(N-Me)残基を有する六員架橋構造を有する1つ以上のヌクレオチドビルディングブロックを含有するオリゴヌクレオチドをもまた言う。

【0065】

用語のアンチセンスオリゴヌクレオチドはその通例の科学的な意味を有し、本明細書においては短くして「AON」または「ASO」として指示され得る。

【0066】

用語「BNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド」または短くして「BNAON」は、その通例の科学的な意味を有し、ここでは、上記ヌクレオチドの少なくとも1つがBNAである1本のアンチセンスヌクレオチドを言う。

【0067】

用語「蛋白質性の」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、蛋白質様である分子を言う。分子が、何らかの程度まで、蛋白質に特徴的な物理化学的特性を所有するか、蛋白質製であるか、蛋白質に関するか、蛋白質を含有するか、蛋白質に付随するか、蛋白質からなるか、蛋白質に似ているか、または蛋白質であるということを意味する。例えば「蛋白質性の分子」において用いられる用語「蛋白質性の」は、蛋白質に似るかまたは蛋白質である分子の少なくとも一部の存在を言い、ここで、「蛋白質」は、少なくとも2残基の長さのアミノ酸残基の鎖を包含すると理解されるべきであり、それゆえにペプチド、ポリペプチド、および蛋白質、ならびに蛋白質または蛋白質ドメインのアセンブリを包含する。蛋白質性の分子において、少なくとも2アミノ酸残基は例えばペプチド結合などのアミド結合を介して連結される。蛋白質性の分子において、アミノ酸残基は天然アミノ酸残基および／または人工アミノ酸残基、例えば修飾された天然アミノ酸残基である。好ましい実施形態において、蛋白質性の分子は、少なくとも2アミノ酸残基、好ましくは2および約2,000の間のアミノ酸残基を含む分子である。1つの実施形態において、蛋白質性の分子は、2から20(ペプチドで典型的)アミノ酸を含む分子である。1つの実施形態において、蛋白質性の分子は、21から1,000(ポリペプチド、蛋白質、蛋白質ドメイン、例えば抗体、Fab、scFv、1つまたは複数のVhドメイン、受容体のリガンド、例えばEGFで典型的)アミノ酸を含む分子である。好ましくは、アミノ酸残基は(典型的には)ペプチド結合を介して連結される。本発明に従うと、上記アミノ酸残基は

10

20

30

40

50

(修飾された) (非) 天然アミノ酸残基であるかまたはそれを含む。

【0068】

用語「エフェクター分子」または「エフェクター部分」は、例えば共有結合的な複合体の一部としてのエフェクター分子を言うときには、その通例の科学的な意味を有し、ここでは、例えば、標的分子の蛋白質、ペプチド、炭水化物、糖、例えばグリカン、(リン)脂質、核酸、例えばDNA、RNA、酵素のいずれか1つ以上に選択的に結合し、かかる1つ以上の標的分子の生物活性を制御し得る分子を言う。エフェクター分子は、例えば、低分子、例えば薬物分子、毒素、例えば蛋白質毒素、オリゴヌクレオチド、例えばBNA、ゼノ核酸、もしくはsiRNA、酵素、ペプチド、蛋白質、またはそれらのいずれかの組み合わせのいずれか1つ以上から選択される分子である。それゆえに、例えば、エフェクター分子またはエフェクター部分は、低分子、例えば薬物分子、毒素、例えば蛋白質毒素、オリゴヌクレオチド、例えばBNA、ゼノ核酸もしくはsiRNA、酵素、ペプチド、蛋白質、またはそれらのいずれかの組み合わせのいずれか1つ以上から選択される分子または部分であり、これが、標的分子の蛋白質、ペプチド、炭水化物、糖、例えばグリカン、(リン)脂質、核酸、例えばDNA、RNA、酵素のいずれか1つ以上に選択的に結合し得、かつ標的分子に対する結合によってかかる1つ以上の標的分子の生物活性を制御する。典型的には、エフェクター分子は、ヒト細胞などの哺乳類細胞などの細胞の内側において、例えば上記細胞のサイトゾルにおいて生物学的効果を発揮し得る。典型的なエフェクター分子、それゆえに、薬物分子、プラスミドDNA、毒素例えば、抗体-薬物複合体(ADC)に含まれる毒素、オリゴヌクレオチド、例えばsiRNA、BNA、抗体-オリゴヌクレオチド複合体(AOC)に含まれる核酸である。例えば、エフェクター分子は、(細胞内)酵素活性、遺伝子発現、または細胞シグナル伝達を増大または減少させ得るリガンドとして作用し得る分子である。エフェクター部分は、本発明の複合体が基づくサポニンまたはサポニン誘導体ではない。エフェクター部分は本発明の複合体ではない。

10

20

【0069】

用語「健康上の問題」はその通例の科学的な意味を有する。ここでは、健康な対象におけるその体またはその一部の状態と比較して最適ではなく、それによって対象の適切な機能および／またはウェルビーイングを妨害し、例えばヒトの体の正常な機能を損なう、ヒト患者などの対象の体の、またはその一部、臓器、筋肉、静脈、動脈、皮膚、四肢、血液、細胞などのいずれかの状態を言う。

30

【0070】

用語「GalNAc装飾されたオリゴヌクレオチド薬物」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、遺伝子の転写に干渉するためのオリゴヌクレオチドを言い、ここで、1つ以上のGalNAc単位がオリゴヌクレオチドに例えば少なくとも1つのリンカーを介してカップリングされる。

【0071】

架橋型核酸である用語「ロックド核酸」、短くして「LNA」は、その通例の科学的な意味を有し、ここでは、追加のメチレン架橋が当分野において公知の通りC3'-エンド立体配座(ベーターD-LNA)またはC2'-エンド(アルファ-L-LNA)立体配座どちらかにリボース部分を固定する1つ以上のヌクレオチドビルディングブロックを含むオリゴヌクレオチドを言う。

40

【0072】

用語「化学修飾された代謝的に安定なsiRNA」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、修飾されたsiRNA分子が代謝的分解、消化、酵素的リシスなどに対してより耐性であり、すなわちより安定であるようにして、天然に存在するヌクレオチドからなるRNAオリゴヌクレオチドと比較して化学修飾を含むsiRNA分子を言う。

【0073】

用語「サポニン」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、サポゲニンである親油性アグリコンコアと組み合わせられた1つ以上の親水性グリコン部分を含む両親媒性グリコシドの群を言う。サポニンは天然に存在し得るかまたは合成(すなわち天然に存在しな

50

い) であり得る。用語「サポニン」は、天然に存在するサポニン、天然に存在するサポニンの誘導体、ならびに化学的および／またはバイオテクノロジー的合成経路によってデノボ合成されたサポニンを包含する。

【0074】

用語「サポニン誘導体」（「修飾サポニン」としてもまた公知）はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、1つ以上の化学修飾、例えば官能基の酸化、官能基の還元、および／または別の分子との共有結合の形成によって誘導体化されている天然に存在するサポニンに対応する化合物を言う。好ましい修飾は、アグリコンコアのアルデヒド基の、糖鎖のカルボキシル基の、または糖鎖のアセトキシ基の誘導体化を包含する。典型的には、サポニン誘導体は天然のカウンターパートを有さず、すなわち、サポニン誘導体は例えば植物または樹木によって天然には生成されない。用語「サポニン誘導体」は、天然に存在するサポニンの誘導体化によって得られる誘導体、ならびに1つ以上の化学修飾によって誘導体化されている天然に存在するサポニンに対応する化合物をもたらす化学的および／またはバイオテクノロジー的合成経路によってデノボ合成された誘導体を包含する。

10

【0075】

用語「アグリコンコア構造」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、それに結合した1つまたは2つの炭水化物アンテナまたは糖鎖（グリカン）なしのサポニンのアグリコンコアを言う。例えば、キラヤ酸はSO1861、QS-7、およびQS-21のアグリコングリコシドコア構造である。

【0076】

用語「糖鎖」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、グリカン、炭水化物アンテナ、単一の糖部分（単糖）、または複数の糖部分を含む鎖（オリゴ糖、多糖）のいずれかを言う。糖鎖は糖部分のみからなり得るか、またはさらなる部分、例えば以下のいずれか1つをもまた含み得る：4 E-メトキシケイ皮酸、4 Z-メトキシケイ皮酸、および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) であって、例えば、例えばQS-21上に存在する。

20

【0077】

用語「SO1861」および「SO1862」は、それぞれ脱プロトン化形態またはapi形態だがサポナリア・オフィシナリスの同じサポニンを言う。分子質量は、この質量がグルクロン酸上のプロトンを含む形式的な質量である1862ダルトンである。中性pHでは、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を用いて質量を測定するときには、測定される質量は1861ダルトンである。類似に、用語「SO1831」および「SO1832」は、それぞれ脱プロトン化形態またはapi形態だがサポナリア・オフィシナリスの同じサポニンを言う。分子質量は、この質量がグルクロン酸上のプロトンを含む形式的な質量である1832ダルトンである。中性pHでは、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を用いて質量を測定するときには、測定される質量は1831ダルトンである。

30

【0078】

糖鎖の名称の文脈における用語「Api/Xyl-」または「Api-またはXyl-」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、アピオース(Api)部分を含むかまたはキシロース(Xyl)部分を含むかどうかの糖鎖を言う。

40

【0079】

用語「抗体-薬物複合体」または「ADC」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、抗体、例えばIgG、Fab、scFv、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、1つまたは複数のVhドメインなどと、ヒト患者などの対象の細胞と接触させられたときに治療効果を発揮し得るいずれかの分子、例えば原薬、毒素、オリゴヌクレオチド、酵素、低分子薬物化合物などとのいずれかの複合体を言う。

【0080】

用語「抗体-オリゴヌクレオチド複合体」または「AOC」はその通例の科学的な意味

50

を有し、ここでは、抗体、例えば I g G、F a b、s c F v、免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、1つまたは複数の V h ドメインなどの、ヒト患者などの対象の細胞と接触させられたときに治療効果を発揮し得るいずれかのオリゴヌクレオチド分子、例えば以下を包含する天然のまたは合成の 1 本の核酸から選択されるオリゴヌクレオチドとのいずれかの複合体を言う：DNA、修飾された DNA、RNA、修飾された RNA、一本鎖分子または二本鎖分子として提出される合成核酸、例えば BNA、アレルト異的オリゴヌクレオチド（ASO）、短鎖または低分子干渉 RNA（siRNA、サイレンシング RNA）、アンチセンス DNA、アンチセンス RNA など。

【0081】

用語「複合体」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、少なくとも第 2 の分子に共有結合されている少なくとも第 1 の分子を言い、それによって、第 1 の分子および第 2 の分子を含むかまたはそれからなる共有結合的にカップリングされたアセンブリを形成する。典型的な複合体は、(GalNAc)₃Tris-siRNA、ADC、AOC、および SO1861-EMCH（サポニンのアグリコングリコシドコア構造のアルデヒド基に連結された EMCH）である。

【0082】

用語「部分」はその通例の科学的な意味を有し、ここでは、さらなる分子、リンカー、分子のアセンブリなどに結合、連結、複合体化され、それによって、より大きい分子、複合体、分子のアセンブリの一部を形成する分子を言う。典型的には、ある部分は、第 2 の分子に共有結合されている第 1 の分子であり、当初は第 1 の分子に存在するおよび第 2 の分子に存在する 1 つ以上の化学基が関わる。例えば、サポリンは典型的なエフェクター分子である。抗体-薬物複合体の一部として、サポリンは ADC 上の典型的なエフェクター部分である。抗体-オリゴヌクレオチド複合体の一部として、BNA または siRNA は AOC 上の典型的なエフェクター部分である。

【0083】

例えば、リンカーを含む抗体-サポニン複合体またはコンストラクトに用いられる用語「S」は、エンドソームおよびサイトゾルにおいて無傷のままに残る「安定なリンカー」を表す。

【0084】

例えば、リンカーを含む抗体-サポニン複合体またはコンストラクトに用いられる用語「L」は、エンドソームのやや酸性の条件下において切断される「不安定なリンカー」を表す。

【0085】

用語の第 1、第 2、第 3、および同類は、本明細書および請求項において、必ずしも配列上のまたは時間上の順序を記述するためではなく、例えば類似の要素、組成物、組成物の構成成分、または別個の方法ステップを区別するために用いられる。用語は適当な状況下では交換可能であり、本発明の実施形態は、別様に規定されない限り、本明細書において記載または例解される以外の配列で作動し得る。

【0086】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、別様に規定されない限り組み合わせおよび共同で作動し得る。

【0087】

さらに、種々の実施形態は、「好ましい」または「例えば (e.g.)」または「例えば (for example)」または「具体的には」および同類と言われるが、本発明の範囲を限定するとしてではなく、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。

【0088】

請求項において用いられる用語「含む」は、その後に挙げられている例えば要素または方法ステップまたは組成物の構成成分に制限されると解釈されるべきではない。それは他の要素または方法ステップまたはある種の組成物中の構成成分を排除しない。それは、参

10

20

30

40

50

照される申し立てられた特徴、物、（方法）ステップ、または構成要素の存在を規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、物、ステップ、もしくは構成要素、またはそれらの群の存在または追加を禁じない。それゆえに、表現「ステップAおよびBを含む方法」の範囲はステップAおよびBのみからなる方法に限定されるべきではなく、むしろ、本発明については、方法が列挙されているのみのステップがAおよびBであり、さらに、請求項はそれらの方法ステップの同等物を包含すると解釈されるべきである。それゆえに、表現「構成要素AおよびBを含む組成物」の範囲は構成要素AおよびBのみからなる組成物に限定されるべきではなく、むしろ、本発明については、組成物が列挙されているのみの構成要素がAおよびBであり、さらに、請求項はそれらの構成要素の同等物を包含すると解釈されるべきである。

10

【0089】

加えて、不定冠詞「a」または「an」による要素または構成要素の参照は、文脈が要素または構成要素のただ1つのみがあるということを明瞭に要求しない限り、要素または構成要素の1つよりも多くが存在するという可能性を排除しない。不定冠詞「a」または「an」は、それゆえに、通常は「少なくとも1つ」を意味する。

【0090】

用語「DAR」は通常は薬物抗体比を意味し、抗体薬物複合体（ADC）の所与の調製物についての平均の薬物対抗体比を言い、ここでは、複合体分子に対して、結合したSO1861部分もしくはSPT001または一般的にサポニン部分、あるいは結合したペイロード、例えばAON、例えばApoBBNAの数の比を言う。

20

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1A】図1A～C：三価GalNAcの合成。

【図1B】図1A～C：三価GalNAcの合成。

【図1C】図1A～C：三価GalNAcの合成。

【図2A】図2A～B：SO1861-DBCOの合成。

【図2B】図2A～B：SO1861-DBCOの合成。

【図3】図3：一価GalNAc-SO1861の合成。

【図4】図4：三価GalNAc-SO1861の合成。

【図5A】図5A～C：一価GalNAc-BNAの合成。

【図5B】図5A～C：一価GalNAc-BNAの合成。

【図5C】図5A～C：一価GalNAc-BNAの合成。

【図6A】図6A～B：三価GalNAc-BNAの合成。

【図6B】図6A～B：三価GalNAc-BNAの合成。

【図7】図7：三価GalNAc-BNAの合成。

【図8A】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8B】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8C】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8D】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8E】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8F】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図8G】図8A～G：三価GalNAcの合成。

【図9】図9Aおよび9B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株に対するGalNAc-SO1861、SO1861-EMCH、および三価GalNAc-SO1861の一般毒性（MTS）。図9Bの脇に提示されているレジェンドは図9Aにもまた適用される。

【図10】図10Aおよび10B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株細胞殺滅アッセイ（MTS）。図10Bの脇に提示されているレジェンドは図10Aにもまた適用される。

【図11】図11Aおよび11B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株におけ

30

40

50

る遺伝子発現分析。

【図12】図12Aおよび12B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における遺伝子発現分析。図12Bの脇に提示されているレジェンドは図12Aにもまた適用される。

【図13】図13Aおよび13B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における細胞生存率アッセイ。図13Bの脇に提示されているレジェンドは図13Aにもまた適用される。

【図14】図14Aおよび14B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における遺伝子発現分析。図14Bの脇に提示されているレジェンドは図14Aにもまた適用される。

【図15】図15Aおよび15B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における細胞生存率アッセイ。図15Bの脇に提示されているレジェンドは図15Aにもまた適用される。

【図16A】図16Aおよび16B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における遺伝子発現分析。図16Bの脇に提示されているレジェンドは図16Aにもまた適用される。

【図16B】図16Cおよび16D：HepG2（C）およびHuh7（D）細胞株における細胞生存率アッセイ。図16Dの脇に提示されているレジェンドは図16Cにもまた適用される。

【図17】図17Aおよび17B：HepG2（A）およびHuh7（B）細胞株における遺伝子発現分析。図17Bの脇に提示されているレジェンドは図17Aにもまた適用される。

【図18】図18A：初代ヒト肝細胞の相対的な細胞生存率（100%に設定されている無処置の細胞（「Unt r」）と比較される）。細胞を以下と接触させることによる：SO1861と複合体化された三価GalNAcの濃度系列（（GN）₃-SPT）、サポリンと複合体化された10pMモノクローナル抗体抗CD71（CD71-SPRN）およびEMCHによってアグリコンアルデヒド基に結合されたSO1861の濃度系列（SPT-EMCH）の組み合わせ、10pMのCD71-SPRNおよび（GN）₃-SPTの濃度系列の組み合わせ、ならびに10pMのCD71-SPRNとそれに共有結合された4つのSO1861部分を有するデンドロンと複合体化された（GN）₃の濃度系列との組み合わせ（DAR=4、すなわち、比（GN）₃：デンドロンは1：1であり、比デンドロン：SO1861は1：4である）（（GN）₃-dSPT4）。図18B：初代ヒト肝細胞における相対的なapoB発現（100%に設定されている無処置の細胞（「Unt r」）と比較される）。細胞を以下と接触させることによる：apoBmRNAを標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化された三価GalNAcの濃度系列（（GalNAc）₃-Ap oB）、サポニンSO1861と複合体化された300nM三価GalNAc（（GalNAc）₃-SPT001）および（GalNAc）₃-Ap oBの濃度系列の組み合わせ、またはそれに共有結合された4つのSO1861部分を有するデンドロン（DAR=4）と複合体化されたかつapoBを標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化された三価GalNAcの複合体（（GalNAc）₃-dSPT4-Ap oB）。SO1861は本明細書および請求項において「SPT001」および「dSPT」ともまた言われる。

【図19A】図19Aおよび19B：初代ヒト肝細胞（A）およびHuh7肝細胞細胞株（B）の細胞生存率（両方とも、100%に設定されている無処置の細胞（「Unt r」）と比較される）。細胞を以下と接触させることによる：SO1861と複合体化された三価GalNAcの濃度系列（三価GalNAc-SPT001）、サポリンと複合体化された10pMモノクローナル抗体抗CD71（CD71-サポリン）と共有結合的複合体三価GalNAc-SPT001の濃度系列との組み合わせ。

【図19B】図19C：共有結合的な三価GalNAc-SPT001複合体の絵（サポニンSO1861についてはDAR=1）。絵の中の「S」はSPT001のSO186

10

20

30

40

50

1である。図19D：抗CD71抗体－サポリン複合体（OKT-9）の絵。ここで、「T」は抗体重鎖に共有結合的に連結された毒素サポリンである。

【図19C】図19E：共有結合的な三価（GalNAc）₃-dSPT4（またはGN₃-dSPT4）複合体の絵（サポニンSO1861についてはDAR=4）。絵の中の「S」はSPT001のSO1861である。dSPT4は、他所に記載されている通り複合体化された4つのSO1861分子を有するデンドロンを記述する。

【図20A】図20AおよびB：初代ヒト肝細胞（A）およびHuh7肝細胞細胞株（B）における相対的なapoB発現。細胞を以下と接触させることによる：ApoBmRNAおよびApoB蛋白質発現をサイレンシング、すなわちapoBを標的化するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化された三価GalNAcの濃度系列（三価GalNAc-ApoBBNA）、SO1861と複合体化された300nM三価GalNAc（三価GalNAc-SPT001）（結合したSPT001（サポニンSO1861）についてはDAR=1）と三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列との組み合わせ、またはそれに共有結合された4つのSO1861部分（DAR=4）と複合体化されたかつApoBmRNAおよびApoB蛋白質発現をサイレンシング、すなわちapoBを標的化するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化された三価GalNAcの濃度系列（三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001。ここでは、4つのSO1861分子が単一のデンドロン部分によってGalNAc／オリゴヌクレオチド複合体に複合体化された）。

【図20B】図20C：共有結合的な三価GalNAc-ApoBBNA複合体の絵。絵の中の「A」はアンチセンスオリゴヌクレオチドApoB（ApoBBNA）である。図20D：三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の絵。絵の中の「S」はSO1861ともまた言われるSPT001である。絵の中の「E」は、apoBを標的化するエフェクター部分アンチセンスオリゴヌクレオチドである（ApoBBNA）。

【図20C】図20E：それに共有結合された4つのSO1861部分を有するデンドロンと複合体化された（GalNAc）₃-dSPT4-ApoBの絵（DAR=4）。絵の中の「S」はSO1861ともまた言われるSPT001である。絵の中の「E」はapoBを標的化するエフェクター部分アンチセンスオリゴヌクレオチドである（ApoBBNA）。

【図21】図21AおよびB：細胞を以下と接触させることの影響下における、初代ヒト肝細胞（A）およびHuh7肝細胞細胞株（B）における絶対的なapoB蛋白質発現：三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列、300nM三価GalNAc-SPT001および三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列の組み合わせ、または三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の濃度系列。ここでは、4つのSO1861分子が単一のデンドロン部分によってGalNAc／オリゴヌクレオチド複合体に複合体化された（よって、（GalNAc）₃-dSPT4-ApoBともまた呼ばれる）。

【図22A】図22A：サポニン－オリゴヌクレオチド－ASGPRリガンド複合体、すなわち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。（GalNAc）₃-SO1861-ApoBともまた言われる。

【図22B】図22B：サポニン－オリゴヌクレオチド－ASGPRリガンド複合体、すなわち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。（GalNAc）₃-SO1861-ApoBともまた言われる。

【図22C】図22C：サポニン－オリゴヌクレオチド－ASGPRリガンド複合体、すなわち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。（GalNAc）₃-SO1861-ApoBともまた言われる。

【図23A】図23A：SO1861-OEG-NHSの合成（SPT001-L-NHS、分子12。ここで、「L」は不安定な切断可能なリンカーを言う）。

【図23B】図23B：デンドロン（SPT001）₄-NH₂の合成（分子13および14からの分子15）。

【図23C】図23C：デンドロン（SPT001）₄-アジド合成（分子15および1

10

20

30

40

50

8からの分子19)。

【図23D】図23D～E：デンドロン(SPT001)₄-三価GalNAc合成(分子19および23からの分子24)。図23Dに示されている分子21は図8Gに示されている中間体7である。

【図23E】図23D～E：デンドロン(SPT001)₄-三価GalNAc合成(分子19および23からの分子24)。

【図24A】図24A～B：分子27および分子28(三官能性リンカー)からのDBCO-TCO-三価GalNAc(分子29)の合成。ここで、分子27は、三価GalNAc-アミンのギ酸塩の分子22および分子26(4-ニトロフェニル3-(アセチルチオ)プロパノエート(propanate)の間の反応から得られるGalNAc-チオアセテートである。

10

【図24B】図24A～B：分子27および分子28(三官能性リンカー)からのDBCO-TCO-三価GalNAc(分子29)の合成。ここで、分子27は、三価GalNAc-アミンのギ酸塩の分子22および分子26(4-ニトロフェニル3-(アセチルチオ)プロパノエート(propanate)の間の反応から得られるGalNAc-チオアセテートである。

【図24C】図24C：DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc(分子31)の合成。メチルテトラジン-L-ApoBBNAオリゴ(分子30)をDBCO-TCO-三価GalNAc(分子29)に複合体化することによる。

【図24D】図24D：デンドロン(-L-SO1861)₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc(分子34、「三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体」)の合成。分子31(DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc)および分子19(デンドロン(SPT001)₄-アジド)を複合体化することによる。

20

【図25】図25：C57BL/6Jマウスの肝臓組織におけるApoB発現分析。

【図26】図26：C57BL/6Jマウスにおける血清中apoB蛋白質分析。レベルは、0.1mg/kgのApoB#02(196時間)、0.01mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(196時間および336時間)、および0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(196時間)では報告されていない。

30

【図27】図27：C57BL/6Jマウスにおける血清中LDLコレステロール(LDL-C)分析。

【図28】図28：C57BL/6Jマウスにおける血清中ALT分析。

【図29A】図29A～C：ApoB#02複合体についての、初代ヒト肝細胞HepG2およびHuH7細胞におけるApoB発現分析および細胞生存率アッセイ。

【図29B】図29A～C：ApoB#02複合体についての、初代ヒト肝細胞HepG2およびHuH7細胞におけるApoB発現分析および細胞生存率アッセイ。

【図29C】図29A～C：ApoB#02複合体についての、初代ヒト肝細胞HepG2およびHuH7細胞におけるApoB発現分析および細胞生存率アッセイ。

【図30】図30：ApoB#02複合体についての、初代ヒト肝細胞におけるApoB発現分析および細胞生存率アッセイ。

40

【図31】図31：C57BL/6Jマウスの肝臓組織におけるApoB発現分析。

【図32】図32：C57BL/6Jマウスにおける血清中ApoB蛋白質分析。

【図33】図33：C57BL/6Jマウスにおける血清中LDLコレステロール(LDL-C)分析。

【図34】図34：C57BL/6Jマウスにおける血清中ALT分析。

【図35A】図35A～D：三官能性リンカー-(L-ヒドラゾン-SO1861)-(L-BNAオリゴ)-(三価GalNAc)合成。

【図35B】図35A～D：三官能性リンカー-(L-ヒドラゾン-SO1861)-(L-BNAオリゴ)-(三価GalNAc)合成。

50

【図 3 5 C】図 3 5 A～D：三官能性リンカー－（L－ヒドラゾン－SO1861）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 5 D】図 3 5 A～D：三官能性リンカー－（L－ヒドラゾン－SO1861）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 6 A】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 6 B】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 6 C】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 6 D】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 6 E】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 6 E の図面は、図 3 6 E および図 3 6 E（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 1 9 との分子 2 1 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 2 を形成する。

【図 3 6 F】図 3 6 A～E：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 6 E の図面は、図 3 6 E および図 3 6 E（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 1 9 との分子 2 1 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 2 を形成する。

【図 3 7 A】図 3 7 A～C：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 7 B】図 3 7 A～C：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 7 B の図面は、図 3 7 B および図 3 7 B（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 1 8 との分子 2 4 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 5（中間体 1 2）を形成する。

【図 3 7 C】図 3 7 A～C：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 7 B の図面は、図 3 7 B および図 3 7 B（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 1 8 との分子 2 4 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 5（中間体 1 2）を形成する。

【図 3 7 D】図 3 7 A～C：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 7 C の図面は、図 3 7 C および図 3 7 C（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 2 1 との分子 2 5 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 6 を形成する。

【図 3 7 E】図 3 7 A～C：三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図 3 7 B の図面は、図 3 7 B および図 3 7 B（続く）と標識された 2 枚を包含するということに注意。これらの 2 枚は一緒になって分子 1 8 との分子 2 4 の複合体化を提示し、それによって複合体分子 2 5（中間体 1 2）を形成する。

【図 3 8 A】図 3 8 A～C：三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 8 B】図 3 8 A～C：三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図 3 8 C】図 3 8 A～C：三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図39A】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図39B】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図39C】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図39D】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

【図39E】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図39Eの図面は、図39Eおよび図39E（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子20との分子40の複合体化を提示し、それによって複合体中間体24を形成する。

10

【図39F】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図39Eの図面は、図39Eおよび図39E（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子20との分子40の複合体化を提示し、それによって複合体中間体24を形成する。

【図39G】図39A～F：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。

20

【図40A】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Aの図面は、図40Aおよび図40A（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子37との分子43の複合体化を提示し、それによって複合体（分子44）中間体25を形成する。

【図40B】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Aの図面は、図40Aおよび図40A（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子37との分子43の複合体化を提示し、それによって複合体（分子44）中間体25を形成する。

30

【図40C】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Bの図面は、図40Bおよび図40B（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子18との分子44の複合体化を提示し、それによって複合体分子45（中間体26）を形成する。

【図40D】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Bの図面は、図40Bおよび図40B（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子18との分子44の複合体化を提示し、それによって複合体分子45（中間体26）を形成する。

40

【図40E】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Cの図面は、図40Cおよび図40C（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子20との分子45の複合体化を提示し、それによって複合体分子46（中間体27）を形成する。

【図40F】図40A～D：三官能性リンカー－（デンドロン（L－セミカルバゾン－SO1861）8）－（L－BNAオリゴ）－（三価GalNAc）合成。図40Cの図面は、図40Cおよび図40C（続く）と標識された2枚を包含するということに注意。これらの2枚は一緒になって分子20との分子45の複合体化を提示し、それによって複合体分子46（中間体27）を形成する。

50

【図40G】図40A～D：三官能性リンカー（デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）8）-（L-BNAオリゴ）-（三価GalNAc）合成。

【図41】図41：三価リンカー（L-SPT001）-（ブロックされたTCO）-（三価GalNAc）合成の合成。

【図42A】図42A～B：三価リンカー（ブロックされたDBCO）-（L-BNAオリゴ）-（三価GalNAc）合成。

【図42B】図42A～B：三価リンカー（ブロックされたDBCO）-（L-BNAオリゴ）-（三価GalNAc）合成。

【図43A】図43A～B：TFL（三官能性リンカー）方法論を適用することによって得られ得る複合体の概観。本発明のオリゴヌクレオチド複合体「複合体C1」のファミリーの合成のための一般的なスキームであって、GalNAc、サポニン、ここではSO1861、およびオリゴヌクレオチド、ここではBNAを三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合的に複合体化することによる（A）。（A）の一般的なスキームに従って合成される複合体C1の複合体のファミリーであって、複合体化されたサポニンについての指示されているオプションR1および複合体化されたBNAについての指示されているオプションR2を有する（B）。図43AおよびBの図面は、一緒になって、分子4と標識された三官能性リンカーの、分子41と標識された標的化リガンド、分子12と標識されたエフェクター、ならびに分子3、19、25、28、40、および45と標識されたエンハンサーの1つまたは分子5、12a、および50と標識された対照のためのブロック剤の1つとの複合体化を提示し、それによって、基R1および基R2を含む図43Bに図示される一般的な複合体構造「複合体C1」を有する複合体を形成する。ここで、R1は複合体の複合体C1の下に図示されている基R1のいずれか1つであり、複合体C1上のR2は図43Bにおいて複合体の複合体C1の下に図示されている基R2のいずれか1つである。

【図43B】図43A～B：TFL（三官能性リンカー）方法論を適用することによって得られ得る複合体の概観。本発明のオリゴヌクレオチド複合体「複合体C1」のファミリーの合成のための一般的なスキームであって、GalNAc、サポニン、ここではSO1861、およびオリゴヌクレオチド、ここではBNAを三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合的に複合体化することによる（A）。（A）の一般的なスキームに従って合成される複合体C1の複合体のファミリーであって、複合体化されたサポニンについての指示されているオプションR1および複合体化されたBNAについての指示されているオプションR2を有する（B）。図43AおよびBの図面は、一緒になって、分子4と標識された三官能性リンカーの、分子41と標識された標的化リガンド、分子12と標識されたエフェクター、ならびに分子3、19、25、28、40、および45と標識されたエンハンサーの1つまたは分子5、12a、および50と標識された対照のためのブロック剤の1つとの複合体化を提示し、それによって、基R1および基R2を含む図43Bに図示される一般的な複合体構造「複合体C1」を有する複合体を形成する。ここで、R1は複合体の複合体C1の下に図示されている基R1のいずれか1つであり、複合体C1上のR2は図43Bにおいて複合体の複合体C1の下に図示されている基R2のいずれか1つである。

【発明を実施するための形態】

【0092】

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のみによって限定される。

【0093】

本発明の第1の態様は、アジアロ糖蛋白質受容体（ASGPR）のリガンドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含むサポニン複合体に関し、ここで、ASGPRのリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは（GalNAc）₃Trisを含むかまたはそれからなり、ここで、少なくとも1

つのサポニンモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。好ましくは、ASGPRはASGPR1である。本発明のある態様は、少なくとも1つのサポニンを含むオリゴヌクレオチド複合体に関し、アシアロ糖蛋白質受容体(ASGPR)のリガンド(ここで、ASGPRのリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる)に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結され、ここで、少なくとも1つのサポニンはモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。典型的には、ASGPRはASGPR1である。トリテルペンサポニンは、典型的にはかつ好ましくは、12, 13-デヒドロオレアナン型のトリテルペノイドサポニン、例えば、位置C23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トリテルペノイドサポニンまたはビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンが好ましく、好ましくは位置C23にアルデヒド官能基を有する。以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：上記複合体に含まれるオリゴヌクレオチドが150 ntよりも長くない核酸として定められ、好ましくは、ここで、オリゴヌクレオチドは5~150 ntのサイズを有し、好ましくは8~100 ntであり、最も好ましくは10~50 ntである。

10

20

30

40

50

【0094】

驚くべきことに、本発明者は、以下のときに、遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド(ASO、AON、siRNA、BNA)の効力が、少なくとも係数10、つまり少なくとも係数100またはさらには係数1000超だけ向上するということを確認した：治療薬オリゴヌクレオチドが、ヒト肝臓細胞などのヒト細胞などのASGPRを保有する哺乳類細胞と、肝臓細胞特異的受容体ASGPR1のリガンドと共有結合的に複合体化されているSO1861などのサポニン、例えば三価GalNAc(GN₃) (すなわち、3つのGalNAc部分を含む複合体)の存在下において接触させられるときの、治療薬オリゴヌクレオチドによって標的化された標的遺伝子に関するmRNA発現および／または蛋白質発現が考えられる。例えばオリゴヌクレオチドとは別個のGalNAcを含む複合体として提供されるかまたは例えばASGPRリガンドおよびオリゴヌクレオチドの複合体に共有結合的に連結されたサポニン部分として提供されるサポニンと、癌を処置すること(例えば、HSP27発現をサイレンシングすることによる)に関するかまたはapoB遺伝子を標的化することによって(LDL)コレステロールの高すぎる血漿中レベルを処置することに関するsiRNAまたはASOなどの治療薬オリゴヌクレオチドを組み合わせることは、治療薬オリゴヌクレオチドの治療ウィンドウを広げる。ASGPR1のリガンドにカップリングされたオリゴヌクレオチドと標的細胞を接触させるときに、(ASGPR1標的化)サポニンの不在下で得られる遺伝子サイレンシングと比較したときに、共有結合的に連結されたサポニンを含むASGPR1標的化リガンドの存在下では、有効な遺伝子サイレンシング(いずれかの妥当する度合いのサイレンシング)が、より低いオリゴヌクレオチド用量において達成される。つまり、本発明者は、インビトロまたはインビボの受容体保有細胞が本発明のオリゴヌクレオチド複合体と接触させられるときに、完全に近い(少なくとも95%またはより高いとして定められる)RNA発現阻害を確認した。加えて、本発明者は、蛋白質発現の完全な(に近い)阻害をもまた達成した。これは、例えばapoB蛋白質では、その後、血清中のLDLコレステロールの完全な(に近い)クリアランスをもたらす。本発明のオリゴヌクレオチド複合体の影響下における遺伝子サイレンシングのこの驚くほど強い度合いおよび有効性は、サポニンが、ペイロード(エフェクター部分、ここではオリゴヌクレオチド)とASGPR、ここではASGPR1のリガンド、例えばGN₃を含む複合体の一部ではないときには達成され得ない。ASGPR1を発現する標的(肝臓)細胞を本発明のサポニンを含む複合体と接触させた後の遺伝子サイレンシングの改善された効力は、mRNA発現が評価されるときにおよび／ま

たは標的遺伝子に関する蛋白質発現が評価されるときにならびに間接的にはLDLコレステロールレベルが評価されるときに明らかである。なぜなら、LDL粒子は1コピーのapoB蛋白質（より具体的にはapoB100蛋白質）を含み、この発現は本発明のオリゴヌクレオチド複合体と細胞を接触させることによってサイレンシングされるからである。ASGPR1のリガンドにカップリングされた同じ用量のオリゴヌクレオチドと標的細胞を接触させるときに、サポニンの不在下で得られる遺伝子サイレンシングの有効性と比較したときに、共有結合的に連結されたサポニンを含むASGPR1標的化リガンドの存在下では、改善された遺伝子サイレンシングが、固定されたオリゴヌクレオチド用量において達成される。本発明者は、以下を見出した：サポニン複合体の不在下で得られる有効性と比較して、組み合わせがヒト肝臓細胞などのASGPR1保有細胞と接触させられるときに、治療薬オリゴヌクレオチドおよび(GalNAc)₃(GN₃または(GN)₃ともまた言われる)などのASGPR1のリガンドの複合体をサポニンおよび(GalNAc)₃などのASGPR1のリガンドの複合体と組み合わせることは、遺伝子サイレンシングの有効性の驚くほど高い改善をもたらした。本発明者は、以下をもまた見出した：GalNAc-オリゴヌクレオチド複合体上のサポニンの不在下で得られる有効性と比較して、組み合わせがヒト肝臓細胞などのASGPR1保有細胞と接触させられるときに、サポニンを治療薬オリゴヌクレオチドおよび(GalNAc)₃などのASGPR1のリガンドに共有結合的にカップリングすることは、遺伝子サイレンシングの有効性の驚くほど高い改善をもたらした。

10

20

30

40

【0095】

トリテルペングリコシド型のサポニンは、標的細胞の外側から上記細胞の内側へのおよびその後上記細胞のサイトゾルへのエフェクター分子の送達を刺激する能力を有する。サポニンは、例えば、ADC上に含まれる蛋白質毒素などのある種のエフェクター分子の受容体によって媒介される取り込みを促す。ADCの一部としての毒素のエンドサイトーシスが、標的細胞のエンドソームおよび／またはリソソームに毒素を送達する。いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、エンドソームまたはリソソームからの細胞のサイトゾルへのADCのまたは少なくとも毒素のその後の放出は、本発明において適用されるトリテルペノイドサポニンによって刺激または媒介される。標的細胞が、細胞内効果を発揮するためには低すぎる毒素用量において毒素と接触させられるときには、標的細胞がADCおよびサポニン両方と接触させられるようにした例えばADCの一部としての毒素および遊離のサポニンの共投与は、サポニンの不在下で細胞と接触させられるときには無効である同じ毒素用量において、標的細胞の効率的な毒素によって媒介される殺滅をもたらし得る。それゆえに、遊離のサポニンの影響下で、毒素の効力は改善される。例えば、ADCによって標的化された腫瘍細胞受容体が真に（専らに）腫瘍細胞特異的な受容体ではなく、例えば健康な細胞において、患者の体の他所において、または標的細胞が存する同じ臓器に存在する細胞においてもまた発現されるときには、依然として、効率的なかつ十分な標的細胞殺滅に要求される毒素用量は、望まれないオフターゲット効果によって随伴され得る。さらに、十分な度合いの毒素活性化（標的細胞サイトゾルへの毒素の送達、オンターゲット送達を媒介するためのサポニン閾値）に到達するために必要とされる遊離のサポニンの要求される用量は、望まれないオフターゲット効果を誘導するレベルであり得る。遊離のサポニンは全身投与され、毒素によって処置されるべき標的（腫瘍）細胞が考えられるときに標的化されていないので、標的細胞のレベルで局所的なサポニン用量に到達するためには、比較的高いサポニン用量が毒素処置の必要がある患者に投与されるべきである。その上、遊離のサポニンが例えばADCと共投与されるときに遭遇されるさらなる問題および短所の1つは、患者の標的細胞における正しい時間および場所におけるADC+SPT001（遊離のサポニン）の活性の同期を最適化することの困難である。本発明者は、今や、この問題の解決を提供する1構成要素の複合体溶液を提供する。

【0096】

本発明者は、今や、驚くべきことに、サポニンが細胞標的化部分、例えば受容体リガンド（例えばEGFまたはサイトカイン）、抗体、またはその結合断片もしくはドメインと

50

複合体化されるときに、腫瘍細胞に対する毒素の効果を増強するために要求されるサポニン用量が、10の係数だけ、またはさらに多く約100から1000の係数だけ低下し得るということを見出した。腫瘍細胞では、現在、一連の細胞表面受容体がかかる異常な細胞の表面上におけるそれらの特異的発現について公知である。サポニンは、本発明者によって、腫瘍細胞上に典型的に濃縮される受容体に結合するための抗体およびリガンド、例えばトラスツズマブ、セツキシマブなどに首尾良くカップリングされる。かかる標的化されたサポニン複合体は、実際に、例えば、標的細胞の内側における毒素の細胞毒性効果を向上させることができ、遊離形態の、すなわち腫瘍細胞標的化部分を備えていない同じサポニンで要求される用量と比較して、少なくとも10倍、例えば100倍から1000倍低い有効な用量の複合体を要求する。

10

【0097】

本発明者は、今や、さらに、（標的化された）サポニンの標的細胞特異的な送達およびその後のエンドサイトーシスが、例えば癌（腫瘍細胞）、自己免疫疾患、ウイルス感染細胞などに関係しない非異常細胞または異常細胞についてもまた可能であるということを開明した。つまり、驚くべきことに、本発明者は、ASGPRが、ASGPR、具体的にはASGPR1のリガンドを備えたサポニン（例は図3参照。単一のGalNAc部分と複合体化されたサポニンSO1861（「SPT001」ともまた言われる））の侵入のための、肝臓細胞などのこの受容体を保有する細胞上の好適な標的受容体を提供するということを見出した。一価GalNAcおよび三価GalNAc（GN）₃などの公知のリガンドは、1つまたは多数（2、4、8など）のサポニン分子に首尾良くカップリングされ、ASGPRリガンドを含みかつ少なくとも1つのサポニン部分、好ましくは位置C23にアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナン型のビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンを含むサポニン複合体を提供する。

20

【0098】

肝臓細胞などのASGPR1などのASGPRを発現する細胞をASGPRのリガンドを含むサポニン複合体と接触させることは（例えば図4および図19C参照）、驚くべきことに、かかる細胞が、例えば、標的細胞における改善されたサポニン依存的な遺伝子サイレンシングをもたらす遺伝子サイレンシング核酸および標的細胞表面分子、例えばCD71、ASGPRの結合分子を含む複合体、またはサポニン依存的な細胞毒性をもたらす標的細胞に対するかかる結合分子および毒素を含む複合体によって同時標的化されるときに明白なサポニンの取り込みをもたらす。肝臓細胞などのASGPR1などのASGPRを発現する細胞をASGPRのリガンドを含むサポニン複合体と接触させることは、驚くべきことに、かかる細胞が、サポニン、ASGPR1のリガンド、例えばGalNAcまたは（GN）₃を含みかつ細胞においてmRNAの発現をサイレンシングするためのおよび／または蛋白質発現をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドをさらに含むかかるサポニン複合体、すなわち、例えば三官能性リンカーを介して一緒に共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニン、ASGPR1のリガンド、およびオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体と接触させられるときに明白なサポニンの取り込みをもたらす。ASGPRのリガンドを有するサポニンを提供することは、共投与されたエフェクター分子、例えば標的化されたオリゴヌクレオチドもしくは毒素（例えば、核酸もしくは毒素にカップリングされた抗CD71抗体もしくはASGPRリガンド）によって発揮されるかまたはこれもまた本発明のオリゴヌクレオチド複合体上にサポニンおよびASGPR1のリガンドと複合体化されているオリゴヌクレオチドによって発揮される標的細胞における効果をもたらす（図22A～Cおよび図24Dもまた参照）。標的細胞が、標的化されたサポニンの不在下のエフェクター分子のみ、例えば遊離のオリゴヌクレオチドまたは例えば三価GalNAcと複合体化されたオリゴヌクレオチドと接触させられるときには、かかる効果はあるとしてもかなり低い度合いで明らかである。それゆえに、その表面にASGPRを含む標的細胞が考えられ、かかる標的細胞が、本発明のサポニン-ASGPRリガンドおよび（標的化された）エフェクター分子両方とまたは標的細胞のサイトゾルへのおよび／もしくは究極的には核へのエンドソームおよび／もしくはリソ

30

40

50

ソームからの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、A S G P R 1 のリガンドとしての G a l N A c、およびエフェクター部分としてのオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド複合体と接触させられるときには、本発明のサポニン複合体および本発明のオリゴヌクレオチド複合体は、オリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子の効力を改善する。これによって、エフェクター分子の治療ウィンドウは改善される。サポニン複合体の共投与の影響下でもしくはオリゴヌクレオチド複合体の影響下で同じ用量においてより高い治療効果、またはサポニン複合体の共投与の影響下でもしくはオリゴヌクレオチド複合体の影響下でより低い用量において類似の治療効果であって、ここで、オリゴヌクレオチドはエフェクター部分である。本発明者は、以下をもまた見出した：サポニンが A S G P R のリガンドを備えていないときに類似の効果に到達するために要求されるサポニン用量と比較したときに、共投与された（（A S G P R 1）標的化された）エフェクター分子、例えば A S O、s i R N A、B N A、毒素、例えば蛋白質毒素によって誘導されるかまたはオリゴヌクレオチド複合体上のエフェクター部分として含まれるオリゴヌクレオチドによって誘導される標的の A S G P R 発現細胞、例えば肝臓細胞におけるある種のレベルの治療効果に到達するために、サポニン複合体のまたはオリゴヌクレオチド複合体の少なくとも 10 倍、例えば約 100 倍から 1000 倍低い用量が要求される。本発明者は、以下をもまた見出した：少なくとも 1 つのサポニン部分、例えば S O 1 8 6 1 部分または S O 1 8 3 2 部分が少なくとも 1 つの G a l N A c、例えば三価 G a l N A c を含むオリゴヌクレオチド複合体に共有結合的に連結されるときには、細胞に投与される A S O、s i R N A、B N A などのエフェクター分子としての（（A S G P R 1）標的化された）オリゴヌクレオチドによって誘導される標的の A S G P R 発現細胞、例えば肝臓細胞におけるある種のレベルの治療効果に到達するために、オリゴヌクレオチドの少なくとも 10 倍、例えば約 100 倍から 1000 倍低い用量が要求される。

10

20

30

40

50

【0099】

それゆえに、驚くべきことに、本発明者は、今や、A S G P R 発現細胞のサイトゾルにおける治療薬オリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子のサポニンによって媒介される送達のための標的受容体として A S G P R を用いる改善された治療方法を提供し、本発明のサポニン複合体の不在下でまたはオリゴヌクレオチド複合体上の共有結合的に連結されたサポニンの不在下で可能なよりも低い用量において、エフェクター分子によって誘導される類似の治療効果をもたらす。それゆえに、本発明は、本発明のサポニン—A S G P R リガンド複合体を提供することによっておよび本発明のオリゴヌクレオチド複合体（例えば、単一の複合体上で一緒に共有結合的に連結されたサポニン、オリゴヌクレオチド、（G a l N A c）₃）を提供することによって、例えば肝臓細胞のサイトゾルまたは核へのエフェクター分子の送達が考えられるときに、サポニンの刺激効果の改善された治療上の使用を提供する。本発明者によって到達された利点は特に以下である：エフェクター分子、例えばオリゴヌクレオチド（s i R N A または A S O）に要求されるより低い用量。サポニンとの（（A S G P R 1）標的化された）エフェクター分子の共投与によるか、または以下を含む A S G P R 1 を標的化するための G a l N A c 部分を含むオリゴヌクレオチド複合体の投与による：オリゴヌクレオチド（例えば、選択された遺伝子に関する m R N A 発現をサイレンシングするためのおよび／または選択された遺伝子を標的化することによって蛋白質発現をサイレンシングするための s i R N A または A S O）、およびひとたびオリゴヌクレオチド複合体が、細胞の A S G P R 1 に対するオリゴヌクレオチド複合体上の A S G P R 1 リガンドの結合によってエンドサイトーシスされ、肝臓細胞などの A S G P R 1 保有細胞のエンドソーム／リソソームに送達されると、オリゴヌクレオチドのエンドソーム脱出を刺激するための少なくとも 1 つのサポニン。ならびに、サポニンに要求されるより低い用量。三価 G a l N A c などの A S G P R のリガンドおよび 1 つ以上のサポニン部分（本発明のサポニン複合体）および治療薬オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A または A S O）などのエフェクター部分の共有結合的複合体（本発明のオリゴヌクレオチド複合体）としてサポニンを提供することによる。驚くべきことに、A S G P R のリガンドは、サポニン複合体上および標的化されたエフェクター分子複合体上において同

じであり得、サポニンの刺激の影響下で、標的細胞において、効率的なエフェクター分子によって媒介される効果をもたらし得る。つまり、共有結合的に連結されたASGPRのリガンド、例えば三価GalNAcを両方が含むサポニン複合体およびエフェクター分子複合体が、それらの表面においてASGPRを暴露する肝臓細胞などの標的細胞に共投与され得る。その結果、両方の複合体は同じ受容体を標的化し、細胞内へのエンドサイトーシスの同じ経路を用いながら、エフェクター分子の所望の治療効果が効率的に得られる。この驚くべき所見は、核酸（少数を挙げるとASO、BNA、siRNA）のサイトゾル送達に関わる治療などの肝臓細胞標的化治療にとって高度に有益である。なぜなら、肝臓細胞はまさにASGPR、例えばASGPR1を発現し、このASGPRは肝臓細胞に特異的であるが、肝臓細胞標的化治療における使用にとって十分に特異的なさらなる肝臓細胞受容体は実質的に不在であるからである。

10

【0100】

本発明は、それゆえに、ASOおよびsiRNAなどのエフェクター分子がそれらの作用機序のために細胞内に送達および配置されなければならない肝臓細胞指向的な治療を改善するための新たな道を開く。本発明のサポニン複合体および本発明のオリゴヌクレオチド複合体として提供される標的化されたサポニンは、かかるエフェクター分子（オリゴヌクレオチド、例えばsiRNA、ASO）の治療ウィンドウを広げ、同時に、肝臓細胞標的化結合分子を有するサポニンを提供することによって、サポニンの治療ウィンドウもまた本発明に従って改善される。それゆえに、本発明者は効率的なオリゴヌクレオチド送達を達成し、それによって、治療薬オリゴヌクレオチドの分野において明らかである主要な技術応用上の限定の解決を提供した。オリゴヌクレオチドに基づく薬物プラットフォームでは、本発明者は、オリゴヌクレオチドの改善された送達のための本発明のバイオ複合体化に基づいて、オリゴヌクレオチド送達を改善することをもたらす解決を提供する。本発明の改善された送達系は、オリゴヌクレオチドの増大した効力をもたらす。これは、ASGPR標的化されたオリゴヌクレオチド系（例えば、GalNAc-オリゴヌクレオチド複合体）の毒性を減少させることを助け得、および／またはオフターゲット効果を縮減することを助け得る。

20

【0101】

本発明者は、例えばIgGなどの抗体に基づく（抗体-薬物）複合体において適用される抗体の分子サイズ（分子量）と比較したときに、2つまたは3つの生物活性低分子から組成される非蛋白質性の性質の複合体を合成し遂げた。本発明のこれらの複合体は、複合体、本発明のサポニン複合体および本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれる2または3つの低分子のそれぞれの生物活性が考えられるときに、依然として生物活性である。本発明の複合体は比較的小さいが、単一の分子上において一緒に共有結合的に複合体化されている2または3つの低分子は、依然として、低分子のそれぞれの性質に関係する生物活性を発揮することができる。つまり、サポニンは細胞によって取り込まれるオリゴヌクレオチドのエンドソームおよびリソソーム脱出を向上させる。つまり、ASGPR保有細胞は、本発明のGalNAcを含むサポニン複合体およびオリゴヌクレオチド複合体を取り込む。つまり、ASGPR保有細胞が本発明のオリゴヌクレオチド複合体と接触させられるときには、遺伝子サイレンシング効果が明らかである。本発明のサポニンおよびGalNAcを含む複合体は、オリゴヌクレオチドおよびGalNAcを含む複合体と同じ細胞に共投与されるときに、オリゴヌクレオチドに対してエンドソーム脱出向上活性を提供する。サポニンおよびオリゴヌクレオチド両方は、標的細胞上のASGPRに対するGalNAcの結合によって媒介され、それらの細胞によって取り込まれる。エンドソーム／リソソームにおけるサポニンの影響下でより高い度合いまでサイトゾルに送達されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド（例えば遺伝子HSP27およびapoBを標的化する）によって標的化された遺伝子のサイレンシングとして発現されるその細胞内生物活性を発揮する。本発明のオリゴヌクレオチド複合体は、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドに対してエンドソーム脱出向上活性を提供する。サポニンおよびオリゴヌクレオチド両方は、標的細胞上のASGPRに対するGalNAcの結合によ

30

40

50

って媒介され、本発明のオリゴヌクレオチド複合体の一部としてそれらの細胞によって取り込まれる。エンドソーム／リソソームにおけるサポニンの影響下でより高い度合いまでサイトゾルに送達されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド（例えば遺伝子HSP27またはapobを標的化する）によって標的化された遺伝子のサイレンシングとして発現されるその細胞内生物活性を発揮する。それゆえに、比較的低分子が単一の複合体へと一緒に複合体化されるが、少なくとも1つのサポニン（例えば1、4、8つのサポニン部分）、GalNAc部分またはGalNAc部分のクラスター（例えば(GN)₃）、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは、細胞が例えば遊離のサポニン（例えば、サイトゾルにおいてその活性を発揮する分子との組み合わせで）、GalNAc-オリゴヌクレオチド、遊離のオリゴヌクレオチドと接触させられるときに測定される生物活性と比較して、依然として生物活性である。サポニン、GalNAc、およびオリゴヌクレオチドは比較的low分子であるが、これらの分子と一緒に複合体化することはそれらの生物活性を妨害しない。

10

【0102】

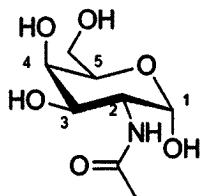
サポニン複合体序論

本発明は、本明細書においては「サポニン複合体」と言われるサポニンおよびアシアロ糖蛋白質受容体(ASGPR)のリガンドの複合体を提供する。ASGPRリガンドは少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分を含む。本発明の好ましい実施形態に従うと、各GalNAc部分は、ASGPRリガンドの残りに、またはASGPRリガンドが単一のGalNAc部分からなるケースではサポニン部分に、式(I)

20

【0103】

【化2】



(I)

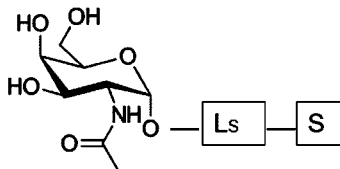
30

【0104】

式(II)_sに示される通り、ASGPRリガンドは、サポニン部分Sに好ましくはサポニン部分リンカーL_sを介して結合された単一のGalNAc部分からなる。

【0105】

【化3】



(II)_s

40

【0106】

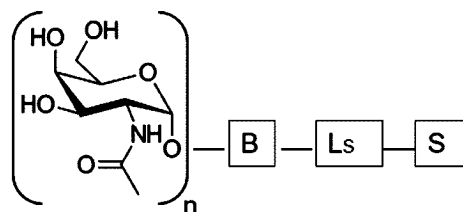
ASGPRリガンドは、1つよりも多くのGalNAc部分、例えば2、3、4、5、または6つのGalNAc部分、好ましくは3または4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分(moities)を含み得る。かかるケースでは、GalNAc部分は位置「1」の酸素を介して中心的な架橋部分Bにそれぞれが別個に共有結合さ

50

れ、これはG a l N A c 部分およびサポニン部分の間の架橋を有効に形成するということが好ましく、好ましくはサポニン部分リンカーL_sを介する。G a l N A c 部分は、式 (I I I) _s に示される通り架橋部分Bに直接的に結合され得る：

【0107】

【化4】



(I I I) _s

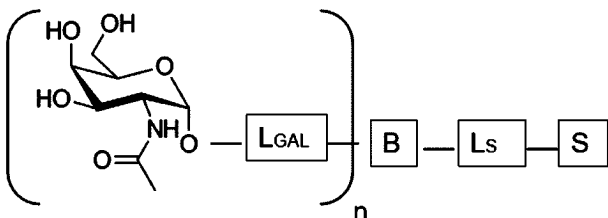
10

【0108】

式中、nは2に等しいかまたはより大きい整数であり、L_sはサポニン部分リンカーであり、Sはサポニン部分である。より好ましくは、G a l N A c 部分は、架橋部分BにG a l N A c リンカーL_{GAL}を介して式 (I V) _s に示される通り結合される：

【0109】

【化5】



(I V) _s

20

【0110】

式中、nは2に等しいかまたはより大きい整数であり、L_sはサポニン部分リンカーであり、Sはサポニン部分である。L_{GAL}のそれぞれは独立して選ばれるが、当業者は、L_{GAL}のそれぞれが同じ部分を表すケースでは、サポニン複合体の合成は単純化されるということを了解するであろう。

【0111】

サポニン複合体リンカーL_s

サポニン部分リンカーL_sは、サポニンを式 (I I) _s のG a l N A c にまたは式 (I I I) _s および (I V) _s の架橋部分Bに共有結合することによって好適ないずれかの部分を表す。リンカーのアイデンティティおよびサイズは具体的には限定されず、サポニンを式 (I I) _s のG a l N A c にまたは式 (I I I) _s および (I V) _s の架橋部分Bに共有結合することは、「通例の」化学官能基（例えばエステル結合）の手段によって、および例えば10よりも多くのまたは20よりも多くの炭素原子を含むリンカーE_sをもたらす長い鎖長を典型的に有する「クリックケミストリー」型リンカーによってもたらされ得る。分子を互いに結合するための好適なリンカーL_sおよび関連するカップリング反応は、ハンドブックのハーマンソン (Hermanson), グレグ (Greg) T. 著, バイオ複合体技術 (Bioconjugate techniques), アカデミック・プレス, 2013年に記載されている。

【0112】

当業者には当然のことながら、サポニン部分リンカーL_sは、典型的には、G a l N A c または架橋部分Bに共有結合された少なくとも第1の前駆体L_{s1}とサポニン部分に共

30

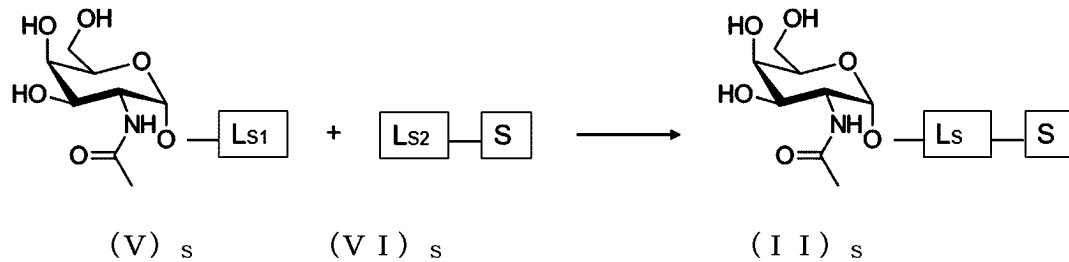
40

50

有結合された第2の前駆体 L_{S2} との間のカップリング反応（例えば「クリックケミストリー」型）の結果であろう。この原理は式 (I I) _s の化合物について次の反応スキームにおいて例解される：

【0113】

【化6】



10

【0114】

式中、 L_S はサポニン部分リンカーであり、 L_{S1} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これは $GalNAc$ にまたは架橋部分 B に共有結合され、 L_{S2} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これはサポニン部分に共有結合され、 S はサポニン部分である。

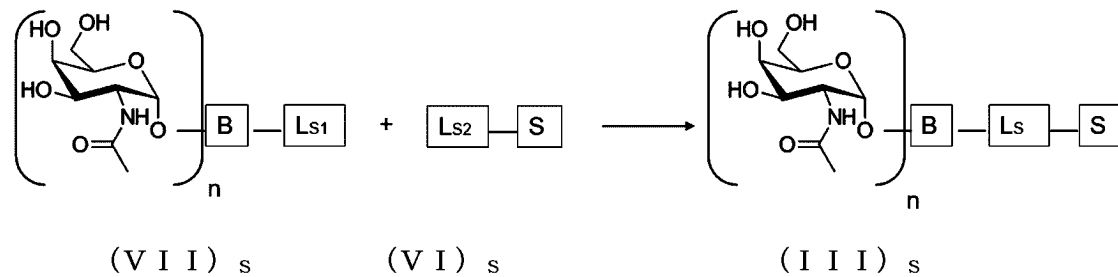
【0115】

20

式 (I I I) _s の化合物についての対応する反応スキームは次の通りである：

【0116】

【化7】



30

【0117】

式中、 L_S はサポニン部分リンカーであり、 L_{S1} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これは $GalNAc$ に共有結合され、 L_{S2} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これはサポニン部分に共有結合され、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、 B は架橋部分であり、 S はサポニン部分である。

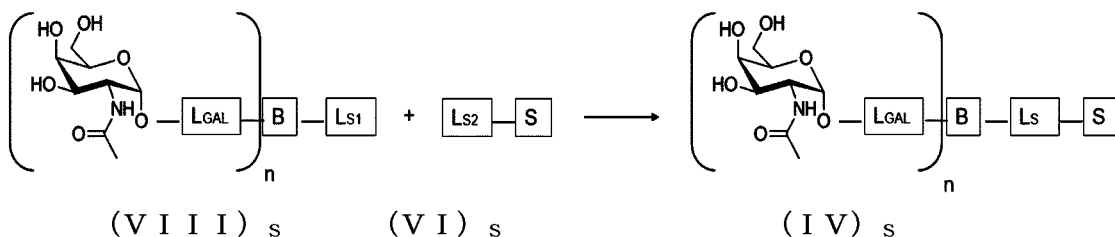
【0118】

式 (I V) _s の化合物についての対応する反応スキームは次の通りである：

【0119】

40

【化8】



【0120】

50

式中、 L_S はサポニン部分リンカーであり、 L_{S1} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これは $GaINAc$ に共有結合され、 L_{S2} はサポニン部分リンカー L_S の前駆体であり、これはサポニン部分に共有結合され、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、 B は架橋部分であり、 S はサポニン部分であり、 L_{GAL} は $GaINAc$ リンカーである。

【0121】

サポニン部分リンカー L_S は、少なくとも、 $GaINAc$ または架橋部分 B に共有結合された第1の前駆体 L_{S1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{S2} との間のカップリング反応の結果であり得、ここで、カップリング反応は例えばアジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環（例えばアジリジン、エポキシド、環状サルフェート、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオン）、非アルドール型のカルボニル反応（例えば尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド、または芳香族複素環形成）、または炭素-炭素二重結合への付加（例えばエポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシル化、ハロゲン化スルフェニル（sulfenyl halide）付加、ハロゲン化ニトロシル付加、またはマイケル（michael）付加）であり、好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環であり、より好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加またはチオールマレイミドカップリングである。

【0122】

本発明のいくつかの実施形態に従うと、サポニン部分リンカー L_S は、セミカルバゾンおよび／またはヒドラゾンおよび／または1, 2, 3-トリアゾール、好ましくはヒドラゾンおよび1, 2, 3-トリアゾールまたは少なくともセミカルバゾンを含む。本願のリンカーの文脈において1, 2, 3-トリアゾールの参照がなされるときには常に、これは好ましくは1H-1, 2, 3-トリアゾールを意味する。

【0123】

かかるヒドラゾンは、例えば、末端ヒドラジドおよびアルデヒドアルデヒド含有化合物（例えばアルデヒド含有サポニン）の間のカップリングの結果である。このヒドラジド／アルデヒドカップリングはバイオ複合体化の分野において公知の「クリック」ケミストリーツールであり、例えばハーマンソン（Hermanson）、グレッグ（Greg）T. 著、バイオ複合体技術（Bioconjugate techniques）、アカデミック・プレス、2013年に記載されている。かかるセミカルバゾンは、例えば、末端セミカルバジドおよびアルデヒド含有化合物（例えばアルデヒド含有サポニン）の間のカップリングの結果である。

【0124】

かかる1, 2, 3-トリアゾールは、例えば、アジドおよびアルキン含有化合物の間のカップリングの結果である。このアジド／アルキンカップリングはバイオ複合体化の分野において普通に公知の「クリック」ケミストリーツールであり、例えばハーマンソン（Hermanson）、グレッグ（Greg）T. 著、バイオ複合体技術（Bioconjugate techniques）、アカデミック・プレス、2013年に記載されている。

【0125】

帰結として、サポニン部分リンカー L_S は、 $GaINAc$ または架橋部分 B に共有結合された第1の前駆体 L_{S1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{S2} との間のカップリング反応の結果であり、第1の前駆体 L_{S1} はアジドを含み、第2の前駆体 L_{S2} はアルキンを含むということが好ましく、好ましくは、サポニン部分のアルデヒドに対するヒドラジド／アルデヒドカップリングからもたらされるヒドラゾンを含むか、または好ましくは、サポニン部分のアルデヒドに対するセミカルバジド／アルデヒドカップリングからもたらされるセミカルバゾンを含む。

【0126】

式（V） $_S$ の化合物上に存在する前駆体 L_{S1} の構造のいくつかの実施形態は次のアジドである：

10

20

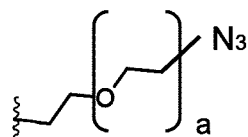
30

40

50

【 0 1 2 7 】

【 化 9 】



(XVI I)

10

【 0 1 2 8 】

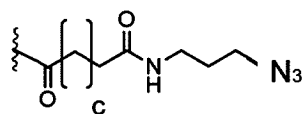
式中、 a は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は 1、2、および 3 から選択される整数を表し、より好ましくは a は 2 を表す。

【 0 1 2 9 】

式 (VII) _s または (VII I) _s の化合物上に存在する前駆体 L_{s1} の構造のいくつかの実施形態は、次のアジドである：

【 0 1 3 0 】

【 化 1 0 】



(XVII I)

20

【 0 1 3 1 】

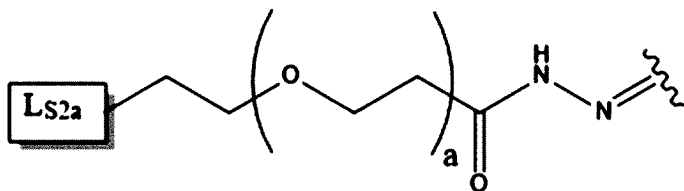
式中、 c は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは c は 5 ～ 15 の範囲の整数を表し、より好ましくは c は 9 を表す。

【 0 1 3 2 】

式 (VI) _s の化合物上に存在する前駆体 L_{s2} の構造のいくつかの実施形態は、次のヒドラゾンである：

【 0 1 3 3 】

【 化 1 1 】



(XIX)

30

40

【 0 1 3 4 】

式中、 a は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は 2 ～ 6 の範囲の整数を表し、より好ましくは a は 4 を表し、ここで、 L_{s2a} はアルキン含有部分を表す。本開示に照らせば当業者には当然のことながら、式 (XIX) に図示されているヒドラゾンは、サポニン部分のアルデヒドとのヒドラジドの反応からもたらされる。

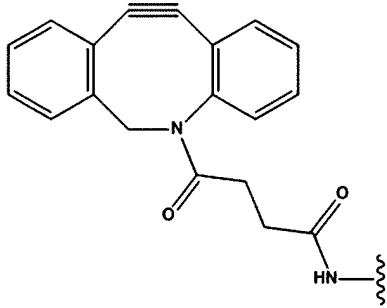
【 0 1 3 5 】

L_{s2a} は好ましくは 20 個未満の炭素原子を含み、より好ましくは、 L_{s2a} は式 (XX) に従う部分を表す：

【 0 1 3 6 】

50

【化 1 2】



(XX)

10

【0137】

ゆえに、いくつかの実施形態において、サポニン複合体は本明細書に記載される式 (I I)_s、(I I I)_s、または (I V)_s の化合物であり、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、式 (V I)_s の化合物との式 (V)_s、(V I I)_s、または (V I I I)_s の化合物の間のカップリング反応の結果であり、ここで、第 1 の前駆体 L_{s1} はアジド、例えば式 (X V I I) または式 (X V I I I) のアジドであり、ここで、第 2 の前駆体 L_{s2} は式 (X I X) の化合物であり、アルキン含有部分 L_{s2a}、例えば、式 (X X) のアルキン、およびサポニン部分のアルデヒドとのヒドラジドの反応からもたらされるヒドラゾンを含む。

20

【0138】

サポニン複合体サポニン

本発明のある態様は、アジア口糖蛋白質受容体 (A S G P R) のリガンドに共有結合的に連結された少なくとも 1 つのサポニンを含むサポニン複合体に関し、ここで、A S G P R のリガンドは、少なくとも 1 つの N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分、好ましくは 3 つまたは 4 つの G a l N A c 部分、より好ましくは 3 つの G a l N A c 部分 (トリ G a l N A c および (G N)₃ともまた言われる) を含み、より好ましくは、A S G P R のリガンドは (G a l N A c)₃ T r i s を含むかまたはそれからなり、ここで、少なくとも 1 つのサポニンは、モノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。

30

【0139】

本発明のある態様は、アジア口糖蛋白質受容体 (A S G P R) のリガンド (ここで、A S G P R のリガンドは、少なくとも 1 つの N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分、好ましくは 3 つまたは 4 つの G a l N A c 部分、より好ましくは 3 つの G a l N A c 部分を含み、より好ましくは、A S G P R のリガンドは (G a l N A c)₃ T r i s を含むかまたはそれからなる) に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1 ~ 3 2、より好ましくは 1 ~ 1 6、最も好ましくは 1 ~ 8 つのサポニン部分、例えば 1、4、または 8 つのサポニン部分を含むオリゴヌクレオチド複合体に関し、ここで、少なくとも 1 つのサポニンは、モノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。サポニンはそのエンドソーム脱出向上活性から選択され、このときには、サポニンの存在または不在で標的細胞と接触させられるときの、蛋白質性の毒素などの分子 (例えば、サポリン、ジアンチン) または H S P 2 7 B N A などの遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドの細胞内効果が評価される。本発明の複合体に適用されるサポニンでは、典型的には、細胞のエンドソームにおけるサポニンの存在は、毒素またはオリゴヌクレオチドが当初はエンドソーム中にサポニンと共配置されるときに、上記細胞のサイトゾルにおける生物活性 (例えば、遺伝子サイレンシング、毒性) を少なくとも係数 1 0 だけ増大させる。

40

【0140】

50

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは12, 13-デヒドロオレアナン型の五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する。

【0141】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する。

【0142】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは、以下からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含む：

2アルファ-ヒドロキシオレオノール酸、
16アルファ-ヒドロキシオレオノール酸、
ヘデラゲニン（23-ヒドロキシオレオノール酸）、
16アルファ, 23-ジヒドロキシオレオノール酸、
ジブソゲニン、
キラヤ酸、
プロトエスシゲニン-21（2-メチルブタ-2-エノアート）-22-アセテート、
23-オキソ-バリントゲノールC-21, 22-ビス（2-メチルブタ-2-エノアート）、
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-ジアセテート、
ジギトゲニン、
3, 16, 28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン、
ジブソゲン酸、
および
それらの誘導体。

【0143】

好ましくは、サポニンは、キラヤ酸およびジブソゲニンまたはそれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造はキラヤ酸またはその誘導体である。かかる好ましいアグリコン（またはその誘導体）は、本明細書において他所に記載される通りC23原子にアルデヒド基またはその誘導体を含む。いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、かかるアルデヒド基は、群C、特にキラヤ酸およびジブソゲニンから選択されるアグリコンを含むトリテルペングリコシド型のサポニンのエンドソーム脱出向上活性に寄与する。

【0144】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンは第1の糖鎖を含み、これは少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC3原子もしくはC28原子に、好ましくはC3原子に結合され、および／またはここで少なくとも1つのサポニンは第2の糖鎖を含み、これは少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC28原子に結合され、好ましくは、サポニンは第1および第2の糖鎖を含む。それゆえに、本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンが2つのグリカン（糖鎖）を保有するときには、第1の糖鎖はアグリコンコア構造の位置C3において結合され、第2の糖鎖はアグリコンコア構造の位置C28において結合される。

【0145】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、

- ・ サポニンは、以下の群Aから選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含

む：

G l c A -、
 G l c -、
 G a l -、
 R h a - (1 → 2) - A r a -、
 G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -、
 G l c - (1 → 2) - [G l c - (1 → 4)] - G l c A -、
 G l c - (1 → 2) - A r a - (1 → 3) - [G a l - (1 → 2)] - G l c A -、
 X y l - (1 → 2) - A r a - (1 → 3) - [G a l - (1 → 2)] - G l c A -、
 G l c - (1 → 3) - G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c - (1 → 4) - G a l -、
 R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 3) - [G l c - (1 → 2)] - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 A r a - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - G l c A -、および
 それらの誘導体、
 あるいは

・ サポニンは、以下の群Bから選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含む：

む：

G l c -、
 G a l -、

$Rha - (1 \rightarrow 2) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha -$ 、
 $Rha - (1 \rightarrow 2) - [Ara - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha -$ 、
 $Ara -$ 、
 $Xyl -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R1 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ であって、
 ここで、R1は4E-メトキシケイ皮酸である、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R2 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ であって、
 ここで、R2は4Z-メトキシケイ皮酸である、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Gal - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4-OAc-Fuc -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 3, 4-Glc-OAc-Fuc -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R3 - (\rightarrow 4)] - 3-OAc-Fuc -$ であって、ここで、R3は4E-メトキシケイ皮酸である、
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4-OAc-Fuc -$ 、
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4-OAc-Fuc -$ 、
 $(Ara - または Xyl -) (1 \rightarrow 3) - (Ara - または Xyl -) (1 \rightarrow 4) - (Rha - または Fuc -) (1 \rightarrow 2) - [4-OAc - (Rha - または Fuc -) (1 \rightarrow 4)] - (Rha - または Fuc -)$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Gal - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、
 $Ara / Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha / Fuc - (1 \rightarrow 4) - [Glc / Gal - (1 \rightarrow 2)] - Fuc -$ 、
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R4 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ であって、ここで、R4は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)である、
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R5 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ であって、ここで、R5は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)である、
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4-OAc-Fuc -$ 、
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4-OAc-Fuc -$ 、
 $6-OAc-Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3-OAc-Rha - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3-OAc-Rha - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Xyl - (1 \rightarrow 3)$

$\text{) - 4 - OAc - Qui - (1} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [3, 4 - ジ - OAc - Qui - (1} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$
 $\text{Glc - (1} \rightarrow \text{3) - [Xyl - (1} \rightarrow \text{4)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - Fuc -}$
 $\text{6 - OAc - Glc - (1} \rightarrow \text{3) - [Xyl - (1} \rightarrow \text{4)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - Fuc -}$
 $\text{Glc - (1} \rightarrow \text{3) - [Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - Fuc -}$
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - 4 - OAc - Qui - (1} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Rha - (1} \rightarrow \text{3)] - 4 OAc - Fuc -}$
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Rha - (1} \rightarrow \text{3)] - 4 OAc - Fuc -}$
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R6 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ であって、ここで、R6は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)である、
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R7 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ であって、ここで、R7は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)である、
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R8 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ であって、ここで、R8は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)である、
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R9 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ であって、ここで、R9は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)である、
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R10 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ であって、ここで、R10は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)である、
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R11 - (} \rightarrow \text{3)] - Fuc -}$ であって、ここで、R11は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)である、
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R12 - (} \rightarrow \text{3)] - Fuc -}$ であって、ここで、R12は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)である、
 $\text{Glc - (1} \rightarrow \text{3) - [Glc - (1} \rightarrow \text{6)] - Gal -}$ 、および
 それらの誘導体、
 あるいは
 ・ サポニン、ビスデスモシド型トリテルペングリコシド（ビスデスモシド型トリテルペノイドサポニン、好ましくは五環式サポニン、より好ましくは12, 13-デヒドロオレアナン型のサポニンであって、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する）であり、アグリコンコア構造に結合された群Aから選択される第1の糖鎖を含み、かつアグリコンコア構造に結合された群Bから選択される第2

の糖鎖を含む。

【0146】

それゆえに、本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンが2つのグリカン（糖鎖）を保有するときには、第1の糖鎖はアグリコンコア構造の位置C₃において結合され、第2の糖鎖はアグリコンコア構造の位置C₂₈において結合される。

【0147】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンのアグリコンコア構造はキラヤ酸、ジブソゲニン、およびその誘導体のいずれか1つ以上から選択され、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造はキラヤ酸またはジブソゲニン、より好ましくはキラヤ酸である。

10

【0148】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは、少なくとも、末端グルクロン酸残基を含む第1の糖鎖を含むビスデスモシド型サポニンであり、分岐構成で少なくとも4つの糖残基を含む第2の糖鎖を含む。好ましくは、ここで第1の糖鎖はGal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcAであり、ならびに／あるいはここで少なくとも4つの糖残基の分岐した第2の糖鎖は末端フコース残基および／または末端ラムノース残基を含む。

【0149】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンはサポニンのアグリコンコア構造の位置C₃に第1の糖鎖および／またはサポニンのアグリコンコア構造の位置C₂₈に第2の糖鎖を含む。好ましくは、ここで第1の糖鎖はサポニンのアグリコンコア構造のC₃ベーターOH基における炭水化物置換基であり、および／またはここで第2の糖鎖はサポニンのアグリコンコア構造のC₂₈-OH基における炭水化物置換基である。

20

【0150】

いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、アグリコンコア構造（ここでは「アグリコン」ともまた言われる）上のアルデヒド基またはその誘導体の存在は、かかるサポニンが細胞内で上記細胞のエンドソームにおいてオリゴヌクレオチドなどのこれらの（エフェクター）分子と共局在するときの、（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を刺激および／または増強するサポニンの能力にとって有益である。よって、アルデヒド基を有するアグリコンを有するサポニンを含む本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい。キラヤ酸およびジブソゲニンでは、アルデヒド基はアグリコンのC₂₃原子にある。

30

【0151】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは以下からなる群から選択される：キラヤ樹皮サポニン、ディブサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシドA、フィトラッカゲニン、エスシナート、AS6.2、NP-005236、AMA-1、AMR、アルファーヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AEX55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apiro、QS-21A-xyllo、QS-21B-apiro、QS-21B-xyllo、ベーターエスシン、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、

40

50

プリムラ酸 1、および AS 6 4 R、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニン QS-21、QS-21 誘導体、SO 1 8 6 1、SO 1 8 6 1 誘導体、SO 1 8 3 2、SO 1 8 3 2 誘導体、SA 1 6 4 1、SA 1 6 4 1 誘導体、GE 1 7 4 1、GE 1 7 4 1 誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。より好ましくは、サポニンは QS-21 誘導体、SO 1 8 6 1 誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。最も好ましくはサポニンは SO 1 8 6 1 誘導体である。より好ましいのは、サポニンは、QS-21、QS-21 誘導体、SO 1 8 6 1、SO 1 8 6 1 誘導体、SA 1 6 4 1、SA 1 6 4 1 誘導体、GE 1 7 4 1、GE 1 7 4 1 誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。より好ましくは、サポニンは QS-21 誘導体、SO 1 8 6 1 誘導体、SO 1 8 6 1、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。最も好ましくは、サポニンは SO 1 8 6 1 誘導体もしくは SO 1 8 6 1 または SO 1 8 3 2 誘導体もしくは SO 1 8 3 2 である。サポニンのかかる誘導体は、それらの誘導体化されていない天然のカウンターパートと同じかまたは類似の度合いでエンドソーム脱出向上誘導体である。

10

【0152】

好ましい実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体および／または本発明のサポニン複合体であり、ここで、複合体に含まれるサポニンは以下のいずれか 1 つ以上である：

a) 以下のリスト A のいずれか 1 つ以上から選択されるサポニン：

－ キラヤ・サポナリアサポニン混合物、またはキラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、例えば Quil-A、QS-17-api、QS-17-xy l、QS-21、QS-21 A、QS-21 B、QS-7-xy l、

20

－ ジブソフィラ・エレガンスサポニン混合物、またはジブソフィラ・エレガンスから単離されるサポニン、

－ サポニナム・アルBUMサポニン混合物、またはサポニナム・アルBUMから単離されるサポニン、

－ サポナリア・オフィシナリスサポニン混合物、またはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、および

－ キラヤ樹皮サポニン混合物、またはキラヤ樹皮から単離されるサポニン、例えば Quil-A、QS-17-api、QS-17-xy l、QS-21、QS-21 A、QS-21 B、QS-7-xy l、あるいは

30

b) 以下のリスト B から選択される、ジブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン：

SA 1 6 4 1、ジブソシド A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO 1 6 5 8、およびフィトラッカゲニン、あるいは

c) 以下のリスト C から選択される、キラヤ酸アグリコンコア構造を含むサポニン：

AG 1 8 5 6、AG 1、AG 2、アグロステモシド E、GE 1 7 4 1、ジブソフィラサポニン 1 (Gyp 1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA 1 6 5 7、サポナリオシド B、SO 1 5 4 2、SO 1 5 8 4、SO 1 6 7 4、SO 1 7 0 0、SO 1 7 3 0、SO 1 7 7 2、10 SO 1 8 3 2、SO 1 8 6 1、SO 1 8 6 2、SO 1 9 0 4、QS-7、QS-7 api、QS-17、QS-18、QS-21 A-api o、QS-21 A-xy l o、QS-21 B-api o、および QS-21 B-xy l o、あるいは

40

d) 以下のリスト D から選択される、アグリコンの C 2 3 位置にアルデヒド基なしの 1 2, 1 3-デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン：

エスシン Ia、エスシナート、アルファヘデリン、AMA-1、AMR、AS 6. 2、AS 6 4 R、アッサムサポニン F、ディブサコシド B、エスクレントシド A、マ克蘭トイジン A、NP-005236、NP-012672、プリムラ酸 1、サイコサポニン A、サイコサポニン D、ティーシードサポニン I、およびティーシードサポニン J。

50

好ましくは、サポニンは、リスト A、B、または C から選択されるサポニンのいずれか 1 つ以上、より好ましくはリスト B または C から選択されるサポニン、さらにより好ましくはリスト C から選択されるサポニンである。

【0153】

サポニンが以下のいずれか 1 つ以上である本発明のオリゴヌクレオチド複合体および／または本発明のサポニン複合体が好ましい：AG1856、GE1741、キラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、サポナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、および SO1904。好ましくは、ここで、サポニンは QS-21、SO1832、SO1861、SA1641、および GE1741 のいずれか 1 つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンは QS-21、SO1832、または SO1861 であり、最も好ましくは SO1861 である。

10

【0154】

より具体的な実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体および／または本発明のサポニン複合体であり、ここで、サポニンはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニンであり、好ましくは、ここで、サポニンはサポナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、および SO1904 のいずれか 1 つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンは SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、および SO1904 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンは SO1832、SO1861、および SO1862 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンは SO1832 および SO1861 であり、最も好ましくは SO1861 である。

20

【0155】

トリテルペングリコシド型のかかるサポニンは、サポニンが細胞の内側でかかる（エフェクター）分子と共局在するときには、細胞のエンドソーム（またはリソソーム）に存在する本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドなどの（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を向上させることができる。本発明者は、サポニンが本発明のサポニン複合体に含まれるときにまたはサポニンが本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるときに、サポニンが細胞と接触させられるときに、これらのサポニンのエンドソーム脱出向上活性が少なくとも約 5 倍強力、つまり少なくとも約 10 倍強力、例えば 10～1000 倍強力、または約 100 から 1000 倍強力であるということを確認した。遊離のサポニンは、細胞の外側からエンドソームの内側への、ならびに最後に上記細胞のサイトゾルおよび／または核における ASO または siRNA から選択されるオリゴヌクレオチドなどの（エフェクター）分子の同じ割合の送達を達成するために要求される本発明のサポニン複合体に含まれるかまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれる同じサポニンの濃度と比較して 100～1000 倍高いサポニン濃度で、かかる細胞が（エフェクター）分子およびサポニンと接触させられるときに細胞のサイトゾルにおける（エフェクター）分子の送達を刺激することができる。かかるエンドソーム脱出向上活性を提示するサポニン、および（エフェクター）分子のサイトゾル送達を増強する能力が確立されたサポニンとの高い構造的類似性を有するサポニンが、表 A1 に挙げられている。サポニンが本発明のサポニン複合体の一部であるかまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体の一部であるときに、標的細胞、好ましくは肝臓細胞上の細胞表面結合部位に対する ASGPR1 などの ASGPR のリガンド、例えば単一の GalNAc 部分または 3 つの共有結合的にカップリングされた GalNAc 部分のクラスターの結合による、上記細胞上の、およびエンドサイトーシス後には上記細胞のエンドソームへのサポニンの標的化された送達は、それゆえに、標的細胞の ASGPR に結合するための ASGPR のリガンド

30

40

50

を備えていない遊離の標的化されていないサポニンと同じ細胞を接触させることと比較して、少なくとも5～10倍有効（強力）、例えば約100から1000倍有効（強力）である。

【0156】

典型的には、本発明のサポニン複合体および本発明のオリゴヌクレオチド複合体では、ひとたび複合体がASGPR保有細胞によって取り込まれ、エンドソーム内に輸送されると、複合体上の共有結合されたサポニンは複合体から切り離される（放出される）。エンドソームでは、化学的条件および／またはpHは、サポニンおよび複合体の残りの間の共有結合が破断するようになっており、サポニンはエンドソーム内で遊離形態で放出される。切り離されたサポニンはその天然の化学構造を有するということが好ましい。例えば、サポニンのアルデヒド基がGalNAc部分に対する（典型的にはリンカーを介する）および／またはオリゴヌクレオチドに対する（典型的にはリンカーを介する）サポニンの共有結合的カップリングに関与するときには、エンドソーム内で複合体から放出されるサポニンは、再び、デカップリングケミストリーの影響下で形成されたこのアルデヒド基を含むということが好ましい。いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、サポニンは、その遊離形態において（好ましくは自由にアクセス可能なアルデヒド基を有し、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する）、エンドソームにおける最適なエンドソーム脱出向上活性を発揮するということが信じられる。サポニンは、例えば、細胞、例えば哺乳類細胞、例えばヒト細胞、例えば腫瘍細胞、肝臓細胞のエンドソームの酸性pHの影響下では、サポニンがヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合を介して結合されている複合体から切り離される。よって、サポニンは、本発明の複合体上において、切断可能な結合、好ましくは細胞のエンドソームの内側において切断される切断可能な共有結合、例えばエンドソームの酸性条件を原因として切断される結合を介して共有結合されるということが好ましい。

【0157】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 A 1. (後期) エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を提示しかつ 1 2, 1 3 - デヒドロオレアナン型のアグリコンコアを有するサポニン ⁴⁾			
サポニン名称	C 2 3 位置にアルデヒド基を有するアグリコンコア	C 3 ベータ - O H 基における炭水化物置換基	C 2 8 - O H 基における炭水化物置換基
N P - 0 1 7 7 7 7	ジブソゲニン	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 4)] - F u c - (R = 4 E - メトキシケイ皮酸)
N P - 0 1 7 7 7 8	ジブソゲニン	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 4)] - F u c - (R = 4 Z - メトキシケイ皮酸)
N P - 0 1 7 7 7 4	ジブソゲニン	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 4) - [G a l - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c -
N P - 0 1 8 1 1 0 ^a 、 N P - 0 1 7 7 7 2 ^d	ジブソゲニン	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 3, 4 - ジ - O A c - F u c -
N P - 0 1 8 1 0 9	ジブソゲニン	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 4)] - 3 - O A c - F u c - (R = 4 E - メトキシケイ皮酸)

【 0 1 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 2】

NP-017 888	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GalcA}-$	$\text{Glc}-(1 \rightarrow 3)-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 4)-[\text{Glc}-(1 \rightarrow 3)]-\text{Rha}-(1 \rightarrow 2)-4-\text{OAc-Fuc}-$
NP-017 889	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GlcA}-$	$\text{Glc}-(1 \rightarrow 3)-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 4)-\text{Rha}-(1 \rightarrow 2)-4-\text{OAc-Fuc}-$
NP-018 108	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GlcA}-$	$\text{Ara/Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\text{Ara/Xyl}-(1 \rightarrow 4)-\text{Rha/Fuc}-(1 \rightarrow 2)-[4-\text{OAc-Rha/Fuc}-(1 \rightarrow 4)]-\text{Rha/Fuc}-$
SA1641 ^a 、 AEX55 ^b	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GlcA}-$	$\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 4)-\text{Rha}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Qui}-(1 \rightarrow 4)]-\text{Fuc}-$
SO1658	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 2)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GlcA}-$	$\text{Glc}-(1 \rightarrow 3)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 4)]-\text{Rha}-(1 \rightarrow 2)-\text{Fuc}-$
ジブソシドA ⁶⁾	ジブソゲニン	$\text{Gal}-(1 \rightarrow 4)-\text{Glc}-(1 \rightarrow 4)-[\text{Ara}-(1 \rightarrow 3)]-\text{GlcA}-$	$\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\text{Fuc}-(1 \rightarrow 4)-[\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)-\text{Xyl}-(1 \rightarrow 3)]-\text{Rha}-$
フィトラッカ ゲニン	ジブソゲニン	不在	不在

【0159】

10

20

30

40

50

【表 3】

ジブソフィラ サボニン 1 (Gyp1)	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
NP-017 674	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
NP-017 810	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Gal} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
AG1	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
NP-003 881	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Ara/Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha/Fuc} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc/Gal} - (1 \rightarrow 2)] - \text{Fuc} -$
NP-017 676	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$ ($\text{R} = 5\text{-O} - [5\text{-O} - \text{Ara/Xyl} - 3, 5\text{-ジヒドロキシ}-6\text{-メチル}-\text{オクタノイル}] - 3, 5\text{-ジヒドロキシ}-6\text{-メチル}-\text{オクタノ酸}$)

【0160】

10

20

30

40

50

【表 4】

NP-017 677	キラヤ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GalcA-	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-017 706	キラヤ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GalcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017 705	キラヤ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GalcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017 773	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-017 775	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-

【0161】

10

20

30

40

50

【表 5】

AG 2	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Qui} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$
GE 1741	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [3, 4\text{-ジ-OAc-Qui} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$
SO 1542	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
SO 1584	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$6\text{-OAc-Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
SO 1674	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} -$
SO 1700 ³⁾	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{GlcA} -$	$\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - 4\text{-OAc-Qui} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$

【0162】

10

20

30

40

50

【表 6】

サボナリオシ ド B ¹⁾	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$X y l - (1 \rightarrow 3) - X y l - (1 \rightarrow 4) - R h a - (1 \rightarrow 2) - [4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$
S O 1 7 3 0 ³⁾	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$G l c - (1 \rightarrow 3) - X y l - (1 \rightarrow 4) - R h a - (1 \rightarrow 2) - [-4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$
S O 1 7 7 2 ³⁾	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$6 - O A c - G l c - (1 \rightarrow 3) - [X y l - (1 \rightarrow 4)] - R h a - (1 \rightarrow 2) - [4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$
S O 1 8 3 2 ¹⁾ (プロトン化 S O 1 8 3 1) =サボナリオシド A	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$X y l - (1 \rightarrow 3) - X y l - (1 \rightarrow 4) - R h a - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3) - 4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$
S O 1 8 6 1 (脱プロトン化 S O 1 8 6 2)	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$G l c - (1 \rightarrow 3) - X y l - (1 \rightarrow 4) - R h a - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3) - 4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$
S O 1 8 6 2 (プロトン化 S O 1 8 6 1) サボフェクトシドともまた言われる ⁵⁾	キラヤ酸	$G a l - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3)] - G l c A -$	$G l c - (1 \rightarrow 3) - X y l - (1 \rightarrow 4) - R h a - (1 \rightarrow 2) - [X y l - (1 \rightarrow 3) - 4 - O A c - Q u i - (1 \rightarrow 4)] - F u c -$

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 7】

SO1904 ³⁾	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$6 - \text{OAc} - \text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - 4 - \text{OAc} - \text{Qui} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$
QS-7 (QS1861ともまた言われる)	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Rha} - (1 \rightarrow 3)] - 4 \text{OAc} - \text{Fuc} -$
QS-7api (QS1862ともまた言われる)	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Rha} - (1 \rightarrow 3)] - 4 \text{OAc} - \text{Fuc} -$
QS-17	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$ ($\text{R} = 5 - \text{O} - [5 - \text{O} - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Ara} / \text{Api} - 3, 5 - \text{ジヒドロキシ} - 6 - \text{メチル} - \text{オクタノイル}] - 3, 5 - \text{ジヒドロキシ} - 6 - \text{メチル} - \text{オクタノ酸}$)
QS-18	キラヤ酸	$\text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Gal} -$	$\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$ ($\text{R} = 5 - \text{O} - [5 - \text{O} - \text{Ara} / \text{Api} - 3, 5 - \text{ジヒドロキシ} - 6 - \text{メチル} - \text{オクタノイル}] - 3, 5 - \text{ジヒドロキシ} - 6 - \text{メチル} - \text{オクタノ酸}$)

【0164】

10

20

30

40

50

【表 8】

Q S - 2 1 A - a p i o	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 4)] - F u c - (R = 5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 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)
Q S - 2 1 A - x y l o	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 4)] - F u c - (R = 5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 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)
Q S - 2 1 B - a p i o	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 3)] - F u c - (R = 5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 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)
Q S - 2 1 B - x y l o	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R - (→ 3)] - F u c - (R = 5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 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)

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 9】

Q S - 2 1	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	アグリコンのこの位置について、Q S - 2 1 A - a p i o、A - x y l o、B - a p i o、B - x y l oについて図示されている炭水化物鎖の組み合わせ（（スキーム Q）として図示されている構造もまた参照）
アグロステモシド E（A G 1 8 5 6、A G 2、8） ² ）	キラヤ酸	G a l - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3)] - G l c A -	[4, 6 - ジ - O A c - G l c - (1 → 3)] - [X y l - (1 → 4)] - R h a - (1 → 2) - [3, 4 - ジ - O A c - Q u i - (1 → 4)] - F u c -
サポニン名称	C 2 3 位置にアルデヒド基なしのアグリコンコア	C 3 ベータ - O H 基における炭水化物置換基	C 2 8 - O H 基における炭水化物置換基
N P - 0 0 5 2 3 6	2 アルファーヒドロキシオレアノール酸	G l c A -	G l c / G a l -
A M A - 1	1 6 アルファーヒドロキシオレアノール酸	G l c -	R h a - (1 → 2) - [X y l - (1 → 4)] - R h a -
A M R	1 6 アルファーヒドロキシオレアノール酸	G l c -	R h a - (1 → 2) - [A r a - (1 → 3) - X y l - (1 → 4)] - R h a -
アルファーヘデリン	ヘデラゲニン（2 3 - ヒドロキシオレアノール酸）	R h a - (1 → 2) - A r a -	存在しない

【 0 1 6 6 】

【表 10】

NP-012672	16アルファ, 23-ジヒドロキシオレアノール酸	Ar a / X y l - (1 → 4) - R h a / F u c - (1 → 2) - G l c / G a l - (1 → 2) - R h a / F u c - (1 → 2) - G l c A -	Ar a / X y l -
ペーター-エスシン (エスシン I a と記載される)	プロトエスシゲニン-21 (2-メチルブタ-2-エノアート) -22-アセテート	G l c - (1 → 2) - [G l c - (1 → 4)] - G l c A -	存在しない
エスシナート	C23位置にアルデヒド基なしのアグリコンコア	存在する	存在しない
ディブサコシド B	C23位置にアルデヒド基なしのアグリコンコア	存在する	存在する
エスクレントシド A	C23位置にアルデヒド基なしのアグリコンコア	存在する	存在しない
ティーシードサポニン I	23-オキソ-バリントゲノールC-21, 22-ビス (2-メチルブタ-2-エノアート)	G l c - (1 → 2) - A r a - (1 → 3) - [G a l - (1 → 2)] - G l c A -	存在しない

【0167】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

ティーシード サポニン J	2 3 - オキソ - バ リントゲノール C - 2 1, 2 2 - ビ ス (2 - メチルプ タ - 2 - エノア - ト)	X y l - (1 → 2) - A r a - (1 → 3) - [G a l - (1 → 2)] - G l c A -	存在しない
アッサムサポ ニン F	2 3 - オキソ - バ リントゲノール C - 2 1 (2 - メチ ルプタ - 2 - エノ アート) - 1 6, 2 2 - ジアセテ - ト	G l c - (1 → 2) - A r a - (1 → 3) - [G a l - (1 → 2)] - G l c A -	存在しない
プリムラ酸 1	3, 1 6, 2 8 - トリヒドロキシオ レアナン - 1 2 - エン	R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 3) - [G l c - (1 → 2)] - G l c A -	存在しない
A S 6 4 R	ジブソゲン酸	不在	G l c - (1 → 3) - [G l c - (1 → 6)] - G a l -
マクラントイ ジン A	C 2 3 位置にアル デヒド基なしのア グリコンコア	存在する	存在する
サイコサポニ ン A	C 2 3 位置にアル デヒド基なしのア グリコンコア	存在する	不在
サイコサポニ ン D	C 2 3 位置にアル デヒド基なしのア グリコンコア	存在する	不在

【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

		C 2 3 - O H 基における炭 水化物置換基	
A S 6 . 2	ジブソゲン酸	G a l -	G l c - (1 → 3) - [G l c - (1 → 6)] - G a l -
a、b：異なる名称は同じ構造の異なるアイソレートを言う c、d：異なる名称は同じ構造の異なるアイソレートを言う 1) ジャ (Jia) ら著, サボナリア・オフィシナリスからの主要なトリテルペノイドサポニン (Major Triterpenoid Saponins from Saponaria officinalis), ジャーナル・オブ・ナチュラル・プロダクツ (Journal of Natural Products), 1998年, 第61巻, 第11号, p. 1368-1373, 発表日: 9月19日, 1998年, https://doi.org/10.1021/np980167u 2) アグロステモシドE (AG1856またはAG2.8ともまた言われる) の構造は、J. クロチャード (Clochard) ら著, アグロステンマ・ギタゴL. からの新たなアセチル化トリテルペンサポニンは遺伝子送達を効率的に調節し、高い細胞忍容を示す (A new acetylated triterpene saponin from Agrostemma githago L. modulates gene delivery efficiently and shows a high cellular tolerance), インターナショナル・ジャーナル・オブ・ファーマシューティクス (International Journal of Pharmaceutics), 第589巻, 2020年11月15日, p. 119822の図4で与えられている。 3) S01700、S01730、S01772、S01904の構造は、モニューシュコ (Moniuszko) - シャジュバジュ (Szajwaj) ら著, サボナリア・オフィシナリスL. の根からの高度に極性のトリテルペノイドサポニン (Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of Saponaria officinalis L.), ヘルベティカ・キミカ・アクタ (Helvetica Chimica Acta), V99, pp. 347-354, 2016年 (doi.org/10.1002/hlca.201500224) で与えられている。			

【0169】

10

20

30

40

50

【表 13】

4) 例えば以下参照:

ーシュテファン・ペトガー (Stefan Bottger) 博士による学位論文 (2013年): サポニンおよびリボソーム不活性化蛋白質 I 型の間の細胞毒性相乗作用の研究 (Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I)、および

ーサーマ (Sama) ら著, トランスフェクション調節サポニンの構造-活性関係-最適な遺伝子トラフィッカーの追求 (Structure-Activity Relationship of Transfection-Modulating Saponins - A Pursuit for the Optimal Gene Trafficker), プランタ・メディカ (Planta Medica), 第85巻, pp. 513-518, 2019年 (doi:10.1055/a-0863-4795) および

ーフックス (Fuchs) ら著, 標的化された腫瘍治療におけるエンドソーム脱出エンハンサーとしてのグリコシル化トリテルペノイド (Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies), バイオメディシン (Biomedicine), 第5巻, 第14号, 2017年 (doi:10.3390/biomedicines5020014),

5) サーマ (Sama) ら著, サポフェクトシド-非毒性のかつ有効なDNAおよびRNA送達を保証する (Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery), インターナショナル・ジャーナル・オブ・ファーマシューティクス (International Journal of Pharmaceutics), 第534巻, 第1-2号, 2017年12月20日, 195-205頁 (dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.016) およびモニューシュコ (Moniuszko) - シャジュバジュ (Szajwa) ら著, サポナリア・オフィシナリスL. の根からの高度に極性のトリテルペノイドサポニン (Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of Saponaria officinalis L.), ヘルペティカ・キミカ・アクタ (Helvetica Chimica Acta), V99, pp. 347-354, 2016年 (doi.org/10.1002/hlca.201500224),

6) 例えば以下参照: doi:10.1016/s0040-4039(01)90658-6, テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters), No. 8, pp. 477-482, 1963年および pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gipsoside

【0170】

本発明のサポニン複合体のサポニンおよび/またはオリゴヌクレオチド複合体のサポニンは、植物に由来するサポニンであるということが好ましい。本発明のサポニン複合体に含まれるサポニンおよび/または本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは、好ましくは植物から単離されるサポニンである。用語「植物」は、植物および樹木を包含すると理解されるべきである。例えば、サポニンは植物の根からまたは樹木の樹皮から単離される。例えば、サポニンは植物の根から単離される。サポニンが由来する(単離される)かかる植物の例は、キラヤ・サポナリア、ジブソフィラ・パニキュレートL.、サポナリア・オフィシナリス、例えばサポナリア・オフィシナリスL.、およびジブソフィラ・エレガンス、例えばジブソフィラ・エレガンスM. ビーブである。好ましくは、サポニン複合体および/またはオリゴヌクレオチド複合体は以下を含む: 単一の型のサポニ

ン、好ましくは植物の根などの植物材料に由来する単一の型のサポニン、例えばサポナリア・オフィシナリス（例えばサポナリア・オフィシナリスL.、好ましくはサポナリア・オフィシナリスL.）（根）からのSO1861、SO1862、もしくはSO1832、または例えばキラヤ・サポナリア（根）からのQS-21、QS-7、もしくはQS-17。

【0171】

本発明に従うサポニン、すなわちエンドソーム脱出向上活性を提示するものを単離するための好適なソースは、キラヤ・サポナリア、ジプソフィラ・パニキュレートL.、サポナリア・オフィシナリス、およびジプソフィラ・エレガンス、ならびにキラヤ樹皮である。本発明のサポニン誘導体にとっておよび本発明のサポニン複合体にとって好適なサポニンは、それゆえに例えば以下である：

10

キラヤ・サポナリアサポニン、キラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、例えばQuil-A、QS-17-api、QS-17-xy l、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xy l、

サポニナム・アルBUM、サポニナム・アルBUMから単離されるサポニン、

サポナリア・オフィシナリスサポニン、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン（好ましい）、

キラヤ樹皮サポニン、キラヤ樹皮サポニンから単離されるサポニン、例えばQuil-A、QS-17-api、QS-17-xy l、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xy l。

20

【0172】

加えて、QS-21だけでなく、QS-21に存在する個々のサポニン、すなわちスキームQのサポニンとして図示されるサポニンもまた、本発明のサポニン複合体にとって好適なサポニンである：

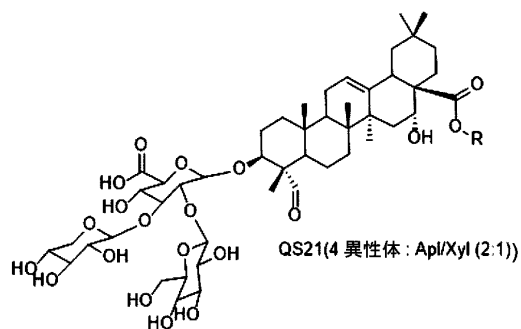
【0173】

30

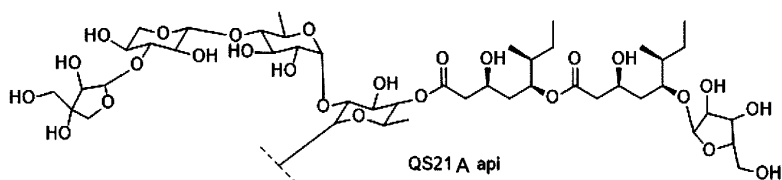
40

50

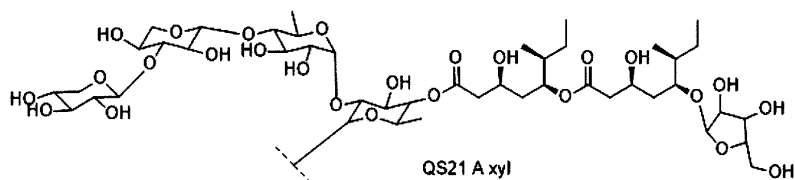
【化 1 3】



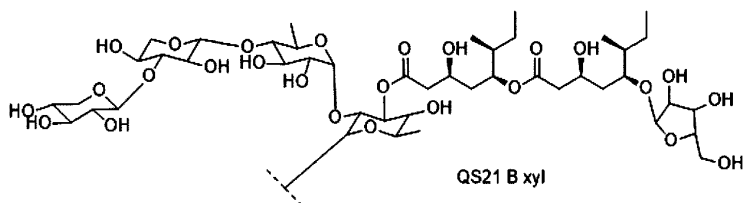
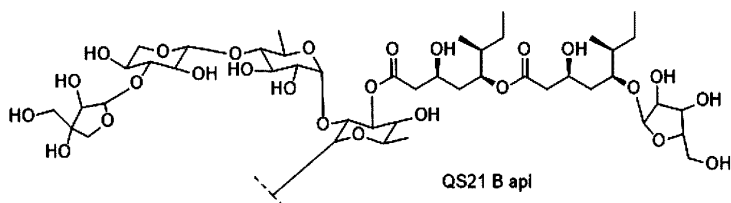
10



20



30



(スキームQ)

40

【0174】

それゆえに、本発明の全ての実施形態では、サポニン、好ましくは単一の型のサポニンは、好ましくは、例えば植物の根に由来する植物材料から単離されるサポニンである。

【0175】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは植物から単離される。好ましくは、サポニンは、根などの植物の一部からまたは樹皮などの樹木の一部から単離される。好ましくは、サポニンは植物に由来する根から単離される。

【0176】

50

いくつかの実施形態において、サポニン複合体またはオリゴヌクレオチド複合体は少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、サポニンは以下の誘導体である：

- i. サポニンのアグリコンコア構造が、誘導体化されているアルデヒド基を含むか、
- ii. サポニンの糖鎖、好ましくは群Aから選択される糖鎖が、誘導体化されているカルボキシル基を含むか、
- iii. サポニンの糖鎖、好ましくは群Bから選択される糖鎖が、誘導体化されているアセトキシ ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 基を含むか、あるいは
- iv. 誘導体化 (i)、(ii)、および/または (iii) のいずれかの組み合わせが存在する。

【0177】

アグリコンコア構造のアルデヒド基の例示的な誘導体化 (i) は、以下を包含する：第一級アルコールなどのアルコールへの還元、ヒドラゾン (官能基) またはセミカルバゾン (官能基) への変換、ヘミアセタールへの変換、アセタールへの変換、カルボキシルへの酸化、イミンへの変換、オキシムへの変換、 β -ヒドロキシケトンへの変換、あるいはエノンへの変換、好ましくは、第一級アルコールなどのアルコールへの還元、あるいはヒドラゾン (官能基) へまたはセミカルバゾン (官能基) への変換。ひとたび本発明のサポニン複合体またはオリゴヌクレオチド複合体を取り込む細胞のエンドソームに存在すると、本発明の複合体の誘導体化されたサポニンはそのエンドソーム脱出向上活性を依然として発揮する。

【0178】

いくつかの実施形態において、サポニンは誘導体であり、ここで、アグリコンコア構造は以下によって誘導体化されているアルデヒド基を含む：

- 第一級アルコールなどのアルコールへの還元、または
- 式 $\text{R}^b\text{HC}=\text{NNHR}^a$ のヒドラゾン、好ましくは式 $\text{R}^b\text{HC}=\text{NNH}(\text{CO})\text{R}^a$ のヒドラゾンへの変換、

式中、 R^a は、20個未満の炭素原子、好ましくは10個未満の炭素原子を含む基であり、 R^b はサポニンの残りである。好ましくは、 R^a はNアルキル化マレイミドである。具体的な実施形態において、アルデヒド基は、N- ϵ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH)、N-[β -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH)、またはN-[κ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換である。

【0179】

糖鎖のカルボキシル基の例示的な誘導体化 (ii) は以下を包含する：第一級アルコールなどのアルコールへの還元、アミドへの変換、エステルへの変換、アミン、例えば第一級もしくは第二級アミンへの変換、または脱カルボキシル化、好ましくは第一級アルコールなどのアルコールへの還元、アミドへの変換、またはエステルへの変換、より好ましくはアミドへの変換。

【0180】

好ましくは、誘導体化されるカルボキシル基はグルクロン酸部分の一部であり、好ましくは糖鎖は群Aから選択される。

【0181】

いくつかの実施形態において、サポニンは誘導体であり、ここで、糖鎖、好ましくは群Aから選択される糖鎖は、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、以下によって誘導体化されている：

- 第一級アルコールなどのアルコールへの還元、
- 式 $\text{R}^a\text{NH}(\text{CO})\text{R}^b$ のアミドへの変換、または
- 式 $\text{R}^a\text{O}(\text{CO})\text{R}^b$ のエステルへの変換、

式中、 R^a は、20個未満の炭素原子、好ましくは10個未満の炭素原子を含む基であり、 R^b はサポニンの残りである。好ましくは、 R^a はNアルキル化マレイミドまたはジオールである。具体的な実施形態において、カルボキシル基は、2-アミノ-2-メチル

10

20

30

40

50

ー 1, 3-プロパンジオール (AMPD) または N-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている。

【0182】

糖鎖のアセトキシ基の例示的な誘導体化 (iii) は以下を包含する：脱アセチル化によるアルコール、例えば第二級アルコールへの変換であって、任意に、次に、もたらされたアルコールからエーテル、エステル、またはケトンへの変換、好ましくは、脱アセチル化によるアルコール、例えば第二級アルコールへの変換。

【0183】

好ましくは、誘導体化されるアセトキシ基は、群 B から選択される糖鎖の一部である。

【0184】

いくつかの実施形態において、サポニン誘導体であり、ここで、糖鎖、好ましくは群 B から選択される糖鎖は、以下によって誘導体化されているアセトキシ基を含む：

- ー 脱アセチル化によるアルコール、例えば第二級アルコールへの変換、または
- ー 脱アセチル化によるアルコール、例えば第二級アルコールへの変換、次に、もたらされたアルコールから式 $R^a OR^b$ のエーテル、式 $R^a (CO) OR^b$ のエステル、または式 $R^a (CO) R^b$ のケトンへの変換、

式中、 R^a は、20 個未満の炭素原子、好ましくは 10 個未満の炭素原子を含む基であり、 R^b はサポニンの残りである。好ましくは、 R^a は N アルキル化マレイミドまたはジオールである。

【0185】

ゆえに、いくつかの実施形態において、サポニンは以下の誘導体である：

ii. アグリコンコア構造が、以下によって誘導体化されているアルデヒド基を含むか：

- ー アルコールへの還元、
- ー N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換、
- ー N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応によるヒドラゾン結合への変換、または
- ー N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換、

iii. 群 A から選択される糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これが 2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) または N-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているか、

iv. 群 B から選択される糖鎖が、ヒドロキシル基 (HO-) への変換によって誘導体化されているアセトキシ基 (Me (CO) O-) を含むか、あるいは

v. 誘導体化 (i)、(ii)、および／または (iii) のいずれかの組み合わせが存在する。

【0186】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i. サポニン誘導体は、誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含むか、

ii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているカルボキシル基を含むか、

iii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは群 B から選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含むか、あるいは

iv. サポニン誘導体は、誘導体化 i、ii、および iii のいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化 i、ii、および iii の 2 つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0187】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは以下のいずれか1つ以上である：SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xylyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xylyl、QS-7-xylyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xylyl、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシドA、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SO1832、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。より好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。最も好ましくはサポニンはSO1861誘導体である。最も好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、SO1861、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。さらにより好ましくは、サポニンはSO1861誘導体もしくはSO1861またはSO1832誘導体もしくはSO1832である。

10

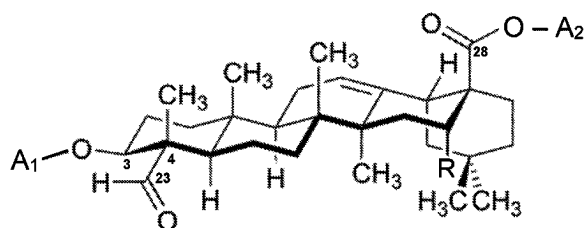
【0188】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは本発明に従うキラヤ酸サポニンまたはジブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子1によって表される：

20

【0189】

【化14】



(分子1)

30

【0190】

式中、

A₁は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₁は群Aから選択される糖鎖を表し、より好ましくは、A₁は群Aから選択される糖鎖を表し、A₁はグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、

A₂は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₂は群Bから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA₂は群Bから選択される糖鎖を表し、A₂は少なくとも1つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば1、2、3、または4つのアセトキシ基を含み、

40

ここで、A₁およびA₂の少なくとも1つは水素ではなく、好ましくはA₁およびA₂両方はオリゴ糖鎖であり、

Rはジブソゲニンの水素またはキラヤ酸のヒドロキシルであり、

ここで、サポニン誘導体は、次の誘導体化の少なくとも1つ、好ましくは1つまたは2つ、より好ましくは1つが存在する分子1によって表されるサポニンに対応する：

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置C₂₃におけるアルデヒド基が誘導体化されている、

ii. A₁が群Aから選択される糖鎖を表し、A₁がグルクロン酸部分を含むかまた

50

はそれからなるときに、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている、および

i i i. A_2 が群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 が少なくとも1つのアセトキシ基を含むときに、 A_2 の1つの糖部分のまたは2つ以上の糖部分のアセトキシ基の1つ以上、好ましくは全てが誘導体化されている。

【0191】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、 A_1 は群Aから選択される糖鎖を表し、グルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、ここで、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基は誘導体化されており、および／またはここで、 A_2 は群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 は少なくとも1つのアセトキシ基を含み、ここで、 A_2 の少なくとも1つのアセトキシ基は誘導体化されている。

10

【0192】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、分子1によって表されるサポニンはビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【0193】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニン誘導体は、次の誘導体化の少なくとも1つ、好ましくは1つまたは2つ、より好ましくは1つが存在する分子1によって表されるサポニンに対応する：

20

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置 C_{23} におけるアルデヒド基が以下によって誘導体化されている：

— アルコールへの還元、

— $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン- $Al d-EMCH$ 、例えば $SO1861-Al d-EMCH$ または $QS-21-Al d-EMCH$ を提供し、ここで、EMCHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

— $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、または

30

— $N-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

i i. A_1 が群Aから選択される糖鎖を表し、 A_1 がグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなるときに、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基は、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) または $N-(2$ -アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン- $Gl u-AMPD$ 、例えば $QS-21-Gl u-AMPD$ もしくは $SO1861-Gl u-AMPD$ 、またはサポニン- $Gl u-AEM$ 、例えば $QS-21-Gl u-AEM$ もしくは $SO1861-Gl u-AEM$ を提供する、ならびに

40

i i i. A_2 が群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 が少なくとも1つのアセトキシ基を含むときに、 A_2 の1つの糖部分のまたは2つ以上の糖部分のアセトキシ基の1つ以上、好ましくは全ては、脱アセチル化によるヒドロキシル基 ($HO-$) への変換によって誘導体化されている。

【0194】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、 A_1 は $Gal-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)]-GlcA$ であり、および／または A_2 は $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)-4-OAc-Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc$ であり、好ましくは、

50

分子 1 によって表されるサポニンは 3-O-ベータ-D-ガラクトピラノシル-(1→2)-[ベータ-D-キシロピラノシル-(1→3)]-ベータ-D-グルクロノピラノシルキラヤ酸 2,8-O-ベータ-D-グルコピラノシル-(1→3)-ベータ-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-D-キシロピラノシル-(1→3)-4-OAc-ベータ-D-キノボピラノシル-(1→4)]-ベータ-D-フコピラノシドである。より好ましくは、サポニンは、SO1861、SO1832、GE1741、SA1641、および QS-21、またはその誘導体のいずれか 1 つ以上であり、最も好ましくは SO1861 もしくはその誘導体または SO1832 誘導体もしくは SO1832 である。

【0195】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i. サポニン誘導体は、以下によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含むか：

— アルコールへの還元、

— N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン-Aldehyde-EMCH、例えば SO1861-Aldehyde-EMCH または QS-21-Aldehyde-EMCH を提供し、ここで、EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

— N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、あるいは

— N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

ii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これは、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (AMPD) または N-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン-Glu-AMPD、例えば QS-21-Glu-AMPD もしくは SO1861-Glu-AMPD、またはサポニン-Glu-AEM、例えば QS-21-Glu-AEM もしくは SO1861-Glu-AEM を提供するか、

iii. サポニン誘導体は糖鎖、好ましくは群 B から選択される糖鎖を含み、糖鎖は、脱アセチル化によるヒドロキシル基 (HO-) への変換によって誘導体化されているアセトキシ (Me(CO)O-) 基を含むか、あるいは

iv. サポニン誘導体は、誘導体化 i、ii、および iii のいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化 i、ii、および iii の 2 つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

好ましくは、サポニン誘導体はアグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造は、EMCH との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、ここで、EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される。

【0196】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i. サポニン誘導体は、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、それによって、サポニン-Aldehyde-EMCH、例えば SO1861-Aldehyde-EMCH または QS-21-Aldehyde-EMCH を提供するか、

i i . サポニン誘導体は糖鎖、好ましくは群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖はカルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これは、N-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン-Glu-AEM、例えばQS-21-Glu-AEMまたはSO1861-Glu-AEMを提供するか、あるいは

i i i . サポニン誘導体は誘導体化 i および i i の組み合わせを含む。

【0197】

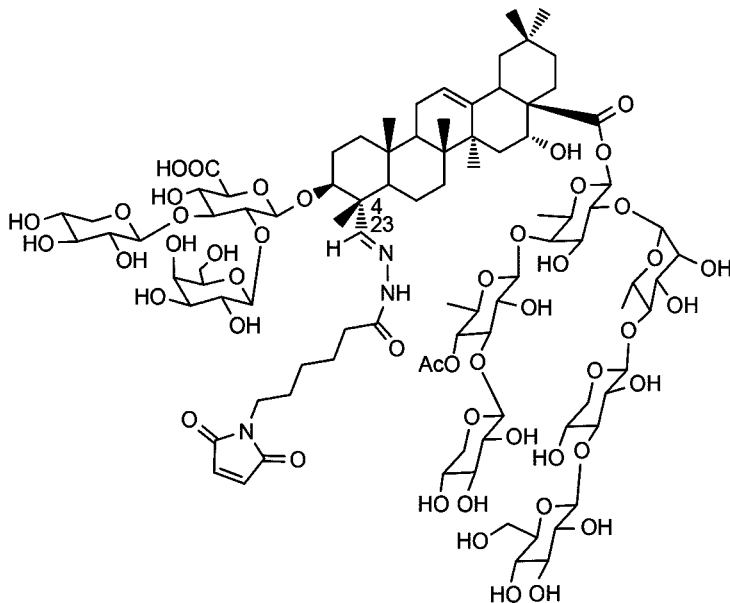
ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニン誘導体はアグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造はアルデヒド基を含み、ここで、サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、このグルクロン酸部分は、N-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている。

【0198】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニン誘導体は分子 2 によって表される：

【0199】

【化15】



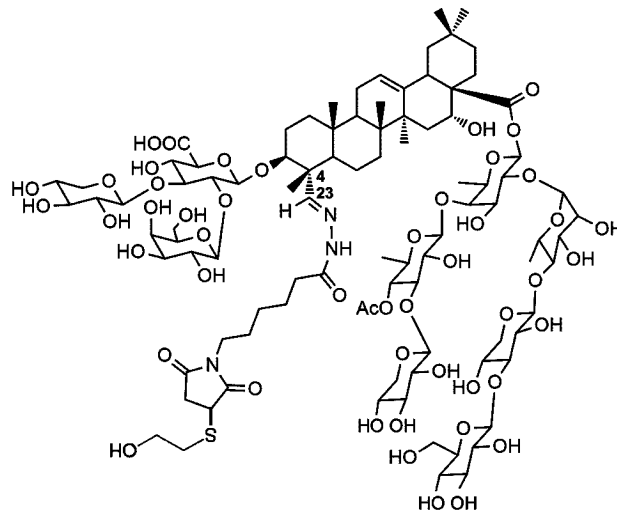
(分子 2)

【0200】

または、ここで、サポニン誘導体は分子 3 によって表される：

【0201】

【化 1 6】



(分子 3)

【0202】

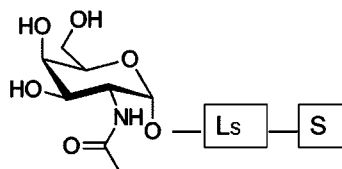
ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンおよびASGPRのリガンドは、直接的にまたは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合的に連結される。ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンおよびASGPRのリガンドは直接的にまたは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合的に連結され、ならびに／あるいはここで少なくとも1つのサポニンおよびオリゴヌクレオチドは直接的にまたは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合的に連結され、ならびに／あるいはここでASGPRのリガンドおよびオリゴヌクレオチドは直接的にまたは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合的に連結される。好ましくは、少なくとも1つのサポニン、ASGPRのリガンド、およびオリゴヌクレオチドは少なくとも1つのリンカーを介して連結される。

【0203】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、GalNAc部分は、サポニンSに好ましくはサポニンリンカーLsを介して式(II)sで表される通り結合される：

【0204】

【化 1 7】

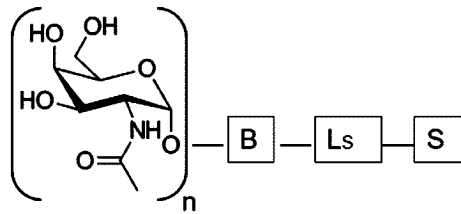
(II)_s

【0205】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、GalNAc部分はGalNAc部分の位置「1」の酸素を介して中心的な架橋部分Bにそれぞれが別個に共有結合され、これが、GalNAc部分およびサポニン部分の間の架橋を好ましくはサポニン部分リンカーLsを介して式(III)sに示される通り有効に形成する：

【0206】

【化18】

(III)_s

10

【0207】

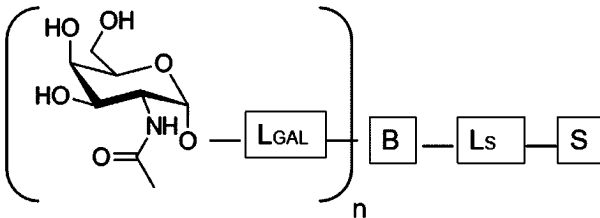
式中、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、好ましくは n は3であり、 L_s はサポニン部分リンカーであり、 S はサポニン部分である。

【0208】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、 $GaNAC$ 部分は、架橋部分 B に $GaNAC$ リンカー $LGAL$ を介して式(IV)_sに示される通り結合される：

【0209】

【化19】

(IV)_s

20

【0210】

式中、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、好ましくは n は3であり、 L_s はサポニン部分リンカーであり、 S はサポニン部分である。

30

【0211】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、サポニンを式(II)_sの通り $GaNAC$ にまたは式(III)_sおよび(IV)_sの通り架橋部分 B に共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。

【0212】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、少なくとも、 $GaNAC$ または架橋部分 B に共有結合された第1の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、ここで、 L_{s1} は $GaNAC$ にまたは架橋部分 B に共有結合されているサポニン部分リンカー L_s の前駆体であり、 L_{s2} はサポニン部分に共有結合されているサポニン部分リンカー L_s の前駆体である。

40

【0213】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、少なくとも、 $GaNAC$ または架橋部分 B に共有結合された第1の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、ここで、カップリング反応は、アジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環、非アルドール型のカルボニル反応、および炭素-炭素二重結合への付加からなる群から選択され、好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカッ

50

ブリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環であり、より好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加またはチオールマレイミドカップリングである。

【0214】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、 $G a l N A c$ または架橋部分 B に共有結合された第 1 の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第 2 の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、第 1 の前駆体 L_{s1} はアジドを含み、第 2 の前駆体 L_{s2} はアルキンを含み、好ましくは、サポニン部分のアルデヒドに対するヒドラジド／アルデヒドカップリングからもたらされるヒドラゾンを含む。

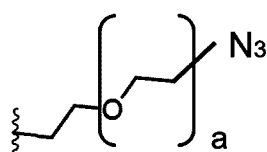
10

【0215】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、前駆体 L_{s1} の構造は式 (XVII) の次のアジドである：

【0216】

【化20】



20

(XVII)

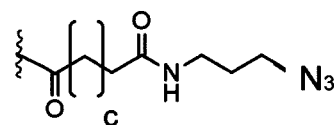
【0217】

式中、 a は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は 1、2、および 3 から選択される整数を表し、より好ましくは a は 2 を表す、または

ここで、前駆体 L_{s1} の構造は式 (XVIII) の次のアジドを含む：

【0218】

【化21】



30

(XVIII)

【0219】

式中、 c は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは c は 5 ~ 15 の範囲の整数を表し、より好ましくは c は 9 を表す。

40

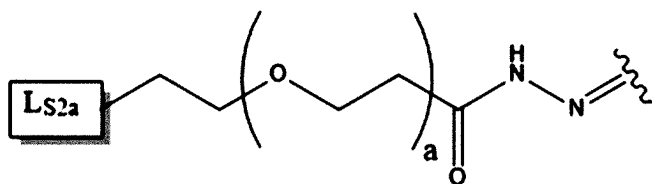
【0220】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、前駆体 L_{s2} の構造は式 (IX) を有する次のヒドラゾンを含む：

【0221】

50

【化 2 2】



(XIX)

10

【0 2 2 2】

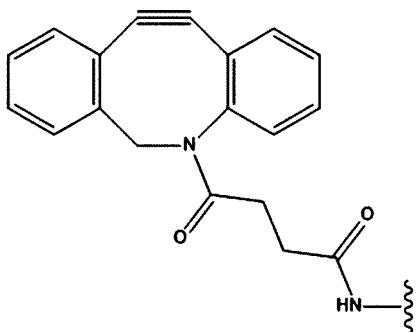
式中、 a は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は 2 ～ 6 の範囲の整数を表し、より好ましくは a は 4 を表し、ここで、 LS_{2a} はアルキン含有部分を表す。

【0 2 2 3】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、 LS_{2a} は 20 個未満の炭素原子を含み、好ましくは LS_{2a} は式 (XX) に従う部分を表す：

【0 2 2 4】

【化 2 3】



(XX)。

20

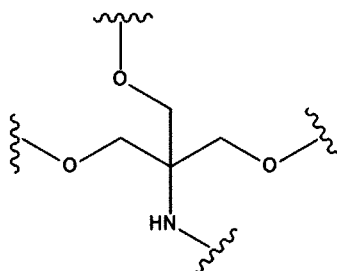
30

【0 2 2 5】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、架橋部分は式 (XV) の化合物である：

【0 2 2 6】

【化 2 4】



(XV)

40

【0 2 2 7】

式中、式 (XV) の化合物の酸素原子は $GALNAc$ にまたは $GALNAc$ リンカー L_{GAL} に結合され、式 (XV) の化合物の窒素原子はサポニン部分リンカー L_S に結合さ

50

れる。

【0228】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、L G A Lは、G a l N A cを架橋部分Bに共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。

【0229】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、L G A Lは、2～25個の炭素原子、好ましくは7～15個の炭素原子、より好ましくは11個の炭素原子を含み、ここで、L G A Lは、少なくとも1つ、好ましくは2つのアミド部分を含む。

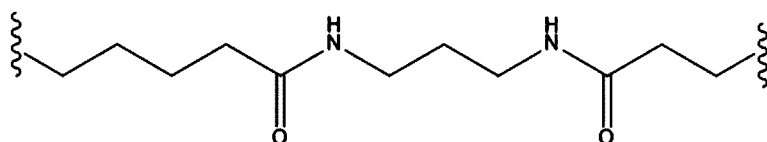
【0230】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、L G A Lは式(XVI)に従う化合物である：

10

【0231】

【化25】



(XVI)。

20

【0232】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのG a l N A c部分、少なくとも1つのサポニン、およびオリゴヌクレオチドは三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、G a l N A c部分、サポニン、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。本発明の好ましいオリゴヌクレオチド複合体は、以下のオリゴヌクレオチド複合体である：少なくとも1つのG a l N A c部分、好ましくは3つのG a l N A c部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、G a l N A c部分、サポニン／サポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。本発明のオリゴヌクレオチド複合体上への組み込みによって好適である三官能性リンカーの例は、式(XXI)によって表される三官能性リンカーである：

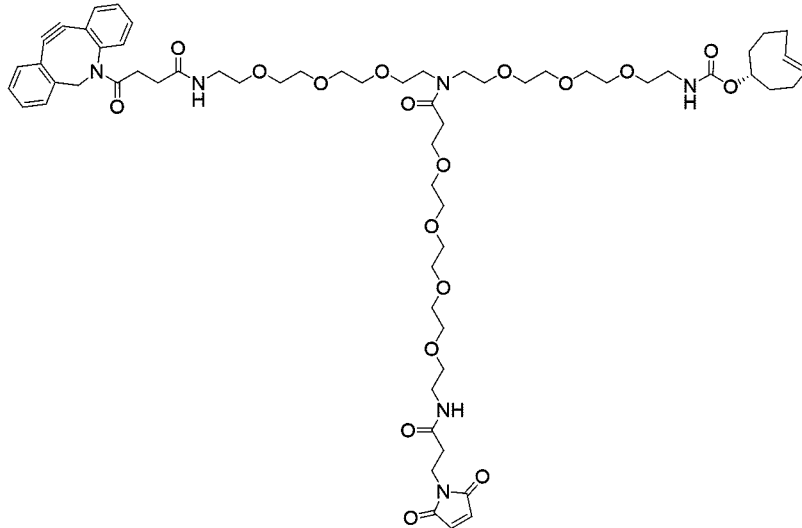
30

【0233】

40

50

【化 2 6】



(XXI)

【0234】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、三官能性リンカー、例えば式 (XXI) によって表される三官能性リンカーが、リンカーの第1の腕部を介して、1つ以上のサポニン部分、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分に共有結合され、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは1～4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分にリンカーの第2の腕部を介して共有結合され、オリゴヌクレオチド、好ましくはAON、例えばBNAまたはsiRNAに三官能性リンカーの第3の腕部を介して共有結合される。

【0235】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、ASGPRのリガンドは、分子 (DD3) または分子 (DD4) によって表される (GalNAc)₃Trisである：

【0236】

10

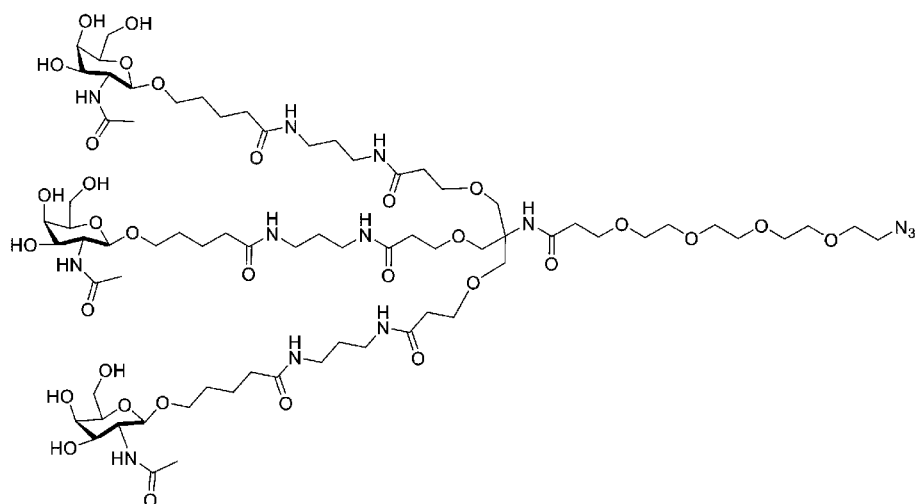
20

30

40

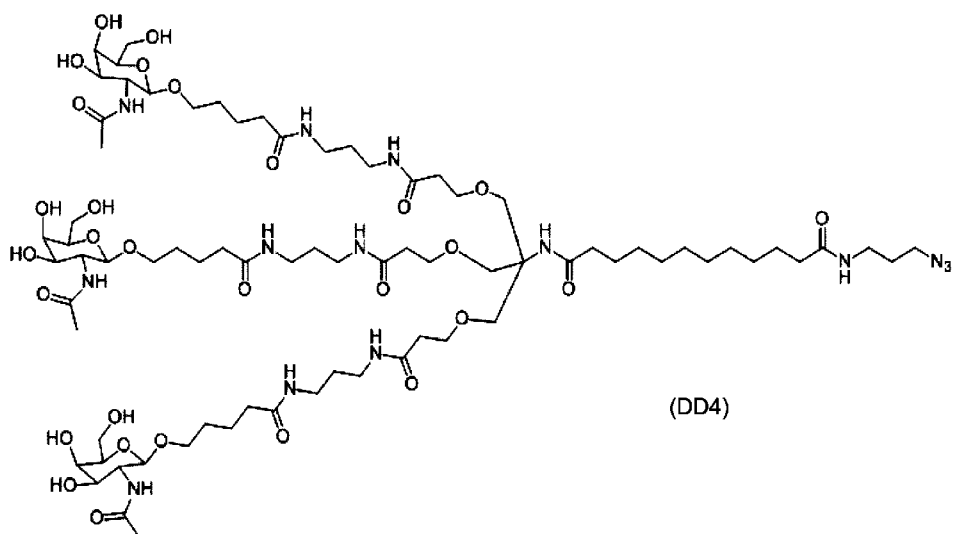
50

【化 2 7】



10

(DD3),



20

(DD4)

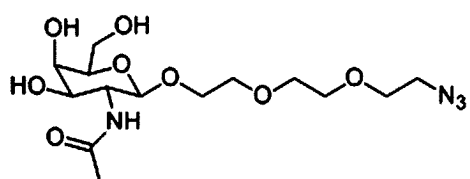
30

【 0 2 3 7】

あるいは、ここで、ASGPRのリガンドは分子II'によって表されるモノGalNAcである：

【 0 2 3 8】

【化 2 8】



(分子II')。

40

【 0 2 3 9】

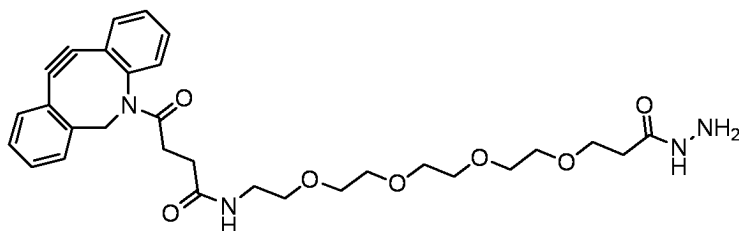
ある実施形態は本発明のサポニン複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンは

50

、本発明の分子（DD3）または分子（Molecule）（DD4）または分子II'に、分子III'によって表されるリンカーを介して共有結合される：

【0240】

【化29】



(分子III')

10

【0241】

式中、分子III'のヒドラジド部分はサポニン上のアルデヒド基との共有結合的なヒドラゾン結合を形成し、ここで、ジベンゾシクロオクチン基は、分子（DD3）または（ir）分子（DD4）または分子II'のアジド基との共有結合を形成した。

【0242】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンはASGPRのリガンドに少なくとも1つの切断可能なリンカーを介して共有結合され、および／またはここで、少なくとも1つのサポニンはオリゴヌクレオチドに少なくとも1つの切断可能なリンカーを介して共有結合される。

20

【0243】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニンはASGPRのリガンドに少なくとも1つの切断可能なリンカーを介して共有結合される。

【0244】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、切断可能なリンカーは酸性条件、還元的条件、酵素的条件、および／または光によって誘導される条件下における切断を受け、好ましくは、切断可能なリンカーは、以下から選択される切断可能な結合を含む：酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合およびヒドラジド結合、ならびに／あるいはプロテオリシス、例えばカテプシンBによるプロテオリシスに感受性の結合、ならびに／あるいはジスルフィド結合などの還元的条件下での切断に感受性の結合。

30

【0245】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、切断可能なリンカーは、例えば、例えば哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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。好ましくは、切断可能なリンカーは、pH4.0～6.5において、より好ましくはpH≤5.5においてインビボで切断を受ける。

40

【0246】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、複合体は、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、もしくは1～100個のサポニン部分、またはその間のいずれかの数のサポニン部分、例えば7、9、12個のサポニン部分、好ましくは1、4、または8つのサポニン部分を含む。サポニンSO1861もしくはSO1832またはその機能的な誘導体が好ましく、例えば、QS-21またはその機能的な誘導体もまた好適なサポニンである。

【0247】

ある実施形態は本発明のサポニン複合体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、複合体は1つのサポニン部分を含む。ある実施形態は本発明のサポニン複合

50

体または本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、複合体は4または8つのサポニン部分を含む。

【0248】

本発明の複合体、ならびに本発明のサポニン複合体およびオリゴヌクレオチド複合体の適用の多くの利益の1つは、オリゴヌクレオチドと一緒にサポニンと同時接触させられていない細胞によって取り込まれるときのオリゴヌクレオチドの活性と比較したときに、改善された細胞内オリゴヌクレオチド活性（例えば遺伝子サイレンシング活性）を達成することによって好適である複合体上のサポニン部分の数を選び選択する可能性である。本発明者は、本発明の複合体上の単一のサポニン部分の組み込みが、遺伝子サイレンシングとして測定される改善された細胞内オリゴヌクレオチド活性を達成するために既に十分であるということを実証する（実施例の項参照）。さらなる例においては、遺伝子サイレンシングが、例えば4または8つのサポニン部分を本発明の複合体上に包含することによってさらに改善されるということが実証される。サポニン複合体およびオリゴヌクレオチド複合体は、1～64の間のいずれかの数またはさらに多く、例えば128個のサポニン部分を、サポニン複合体ではGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分にまたはオリゴヌクレオチド複合体ではGalNAc部分およびオリゴヌクレオチドにカップリングする自由を提供する。先述の通り、本発明者は、驚くべきことに、サポニンおよびGalNAcを組み合わせることまたはサポニン、GalNAc、およびオリゴヌクレオチドを組み合わせることは、複合体の構成要素のいずれかの生物活性を妨害しないということを見出した。その上、複合体上のサポニン部分の数を増大させることはオリゴヌクレオチド活性を改善し得る。いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、サポニン部分の増大した数は、ひとたび細胞によって取り込まれ、エンドソームに移入されると、サポニンのエンドソーム脱出向上活性を増大させる。サポニンと一緒にエンドソーム内に存在するオリゴヌクレオチド複合体の一部としてのまたはGalNAc-オリゴヌクレオチド複合体として別個の投与されたオリゴヌクレオチドは、改善されたサポニンによって媒介されるエンドソーム脱出活性の帰結として、エンドソームからサイトゾルにより効率的に移入され、増大した遺伝子サイレンシング活性をもたらす。例えば、複合体上に1つ以上のサポニン部分を組み込む可能性は、選択されたオリゴヌクレオチドによる最適な遺伝子サイレンシングが考えられるときの複合体のテラ-メイド設計を許す。エンドソームからサイトゾルに比較的非効率的に、例えば1～2%の効率で移入するオリゴヌクレオチドは、複合体上の単一のサポニン部分の存在（オリゴヌクレオチド複合体上で1：1比）から利するが、より低い度合いでエンドソームからサイトゾルに放出されるオリゴヌクレオチドは、複合体上の単一のサポニン部分よりも多く、例えば2～100個の部分、2～64、2～34、2～16、4～12、4～8つの部分を適用することによって、サイトゾルにいっそう移入され得る。1つよりも多くのサポニン部分を組み込むための好適な方法は、例えば、例えば4または8または16個のサポニン部分を複合体上に一緒に結合するための、G2、G3、またはG4デンドロンなどの本発明の複合体上のデンドロンの組み込みである。実施例の項において、改善された遺伝子サイレンシング（選択された時点におけるサイレンシングの度合い、標的遺伝子のサイレンシングの持続時間）の例が、例えば、単一のサポニン部分、4つのサポニン部分、および8つのサポニン部分を含むオリゴヌクレオチド複合体について提供される。本発明者は、細胞を本発明のオリゴヌクレオチド複合体と接触させることによって、ある種の時点における遺伝子サイレンシングの度合いが改善されるということと、サポニンの不在下でオリゴヌクレオチドと接触させられる細胞における遺伝子サイレンシングと比較したときに、遺伝子サイレンシングの時間上の持続時間もまた引き延ばされるということとを確立した。

【0249】

本発明のオリゴヌクレオチド複合体では、複合体は1または3つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分を含むということが好適である（かつ好ましい）。

【0250】

本発明に従うと、サポニンは、典型的には、SO1861またはSO1832（これは

S O 1 8 3 1ともまた言われる) の1つ以上の部分、例えばS O 1 8 6 1またはS O 1 8 3 2の1～3 2個の部分、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の部分、より好ましくは1、2、4、8、12、または16個の部分、最も好ましくは1、4、または8つの部分、例えば1、4、もしくは8つのS O 1 8 6 1部分、または1、4、もしくは8つのS O 1 8 3 2部分である。本発明者は、エンドソーム内のオリゴヌクレオチド(または蛋白質毒素)に対するエンドソーム脱出向上活性が考えられるときに、S O 1 8 3 2はS O 1 8 6 1と約等しく活性であるということを確認した。この上で概説されている通り、細胞をオリゴヌクレオチドと接触させることによる遺伝子サイレンシングの度合いおよび持続時間が考えられるときに、サポニン部分の数は本発明の複合体に最適化され得る。本発明のオリゴヌクレオチド複合体では、これは本発明の複合体上のG a l N A c部分の数にもまた適用される。典型的には、1または3つのG a l N A c部分が本発明の複合体に含まれるときに、最適な遺伝子サイレンシング(度合いおよび/または持続時間)が確立される。

10

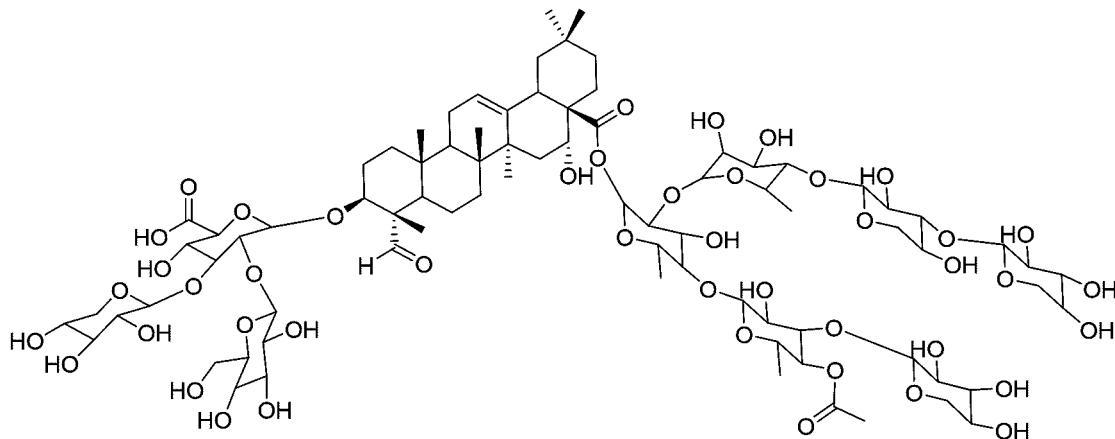
【0251】

サポニンS O 1 8 3 2は、炭水化物置換基G a l - (1→2) - [X y l - (1→3)] - G l c A -をC 3 ベータ-OH基にかつ炭水化物置換基X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [X y l - (1→3) - 4-O A c - Q u i - (1→4)] - F u c -をC 2 8-OH基に有するキラヤ酸アグリコンコアからなる(表A 1もまた参照)。化学式はC₈₂H₁₂₈O₄₅であり、厳密な質量は1832, 77ダルトンである。S O 1 8 3 2のサポニン構造は分子(S O 1 8 3 2)に従う：

20

【0252】

【化30】



30

(S O 1 8 3 2)。

【0253】

当業者は以下を理解するであろう：本発明のサポニン複合体に含まれるサポニンが、本明細書に記載される式(I I) _s、(I I I) _s、または(I V) _sの化合物であり、ここで、サポニン部分リンカーL _sが、G a l N A cまたは架橋部分に共有結合された第1の前駆体L _{s1}とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体L _{s2}との間のカップリング反応の結果であり、第2の前駆体L _{s2}が、サポニン部分のアルデヒドに対するヒドラジド/アルデヒドカップリングからもたらされるヒドラゾンを含むかまたはサポニン部分のアルデヒドに対するセミカルバジド/アルデヒドカップリングからもたらされるセミカルバゾン官能基を含む場合には、本明細書に記載される通り、これは、アルデヒド基が既にリンカーによって占有されているということを意味し、その結果、好適なサポニン誘導体は、サポニンが(i i)本明細書に記載される通り糖鎖のカルボキシル基および/または(i i i)本明細書に記載される通り糖鎖のアセトキシ基によって誘導体化されているそれらである。

40

【0254】

50

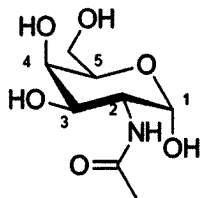
エフェクター分子複合体序論

本発明のある種の薬学的な組み合わせおよびある種の薬学的組成物は、本明細書において「エフェクター分子複合体」と言われるエフェクター分子およびアシア口糖蛋白質受容体（ASGPR）のリガンドの第2の複合体を含む。エフェクター分子がエフェクター分子複合体の残りに結合されるときには、それは本明細書において「エフェクター部分」と言われる。ASGPRリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分、好ましくは3つのGalNAc部分（GN）₃を含む。本発明の好ましい実施形態に従うと、各GalNAc部分は、ASGPRリガンドの残りに、またはASGPRリガンドが単一のGalNAc部分からなるケースではエフェクター部分に、式（I）で指示される位置「1」の酸素に対する共有結合を介して結合される：

10

【0255】

【化31】



(I)。

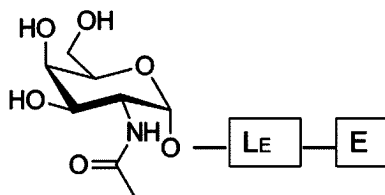
20

【0256】

式（II）_Eに示される通り、ASGPRリガンドは、好ましくはエフェクター部分リンカーL_Eを介してエフェクター部分Eに結合された単一のGalNAc部分からなる。

【0257】

【化32】

(II)_E

30

【0258】

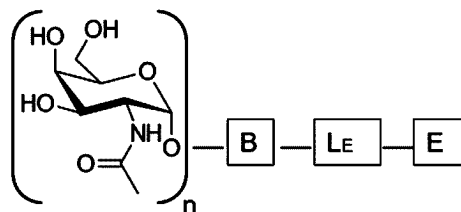
ASGPRリガンドは、1つよりも多くのGalNAc部分、例えば2、3、4、5、または6つのGalNAc部分、好ましくは3または4つのGalNAc部分、最も好ましくは3つの部分を含み得る。かかるケースでは、GalNAc部分は位置「1」の酸素を介して中心的な架橋部分Bにそれぞれが別個に共有結合されるということが好ましく、これは、GalNAc部分およびエフェクター部分の間の架橋を、好ましくはエフェクター部分リンカーL_Eを介して有効に形成する。GalNAc部分は式（II）_Eに示される通り架橋部分Bに直接的に結合され得る：

40

【0259】

50

【化 3 3】

(I I I) _E

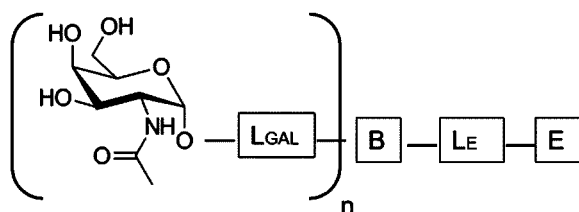
10

【 0 2 6 0】

式中、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、 L_E はエフェクター部分リンカーであり、 E はエフェクター部分である。より好ましくは、 $GalNAc$ 部分は架橋部分 B に $GalNAc$ リンカー L_{GAL} を介して式(IV)_Eに示される通り結合される：

【 0 2 6 1】

【化 3 4】

(I V) _E

20

【 0 2 6 2】

式中、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、 L_E はエフェクター部分リンカーであり、 E はエフェクター部分である。 L_{GAL} のそれぞれは独立して選ばれ得るが、当業者は、 L_{GAL} のそれぞれが同じ部分を表すケースでは、複合体の合成は単純化されるということを了解するであろう。

30

【 0 2 6 3】

エフェクター分子複合体リンカー L_E

エフェクター部分リンカー L_E は、エフェクター部分を式(II)_Eの $GalNAc$ にまたは式(III)_Eおよび(IV)_Eの架橋部分 B に共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。リンカーのアイデンティティおよびサイズは特に限定されず、エフェクター分子を式(II)_Eの $GalNAc$ にまたは式(III)_Eおよび(IV)_Eの架橋部分 B に共有結合することは、「通例の」化学官能基（例えばエーテル結合）の手段によって、および典型的には例えば10よりも多くのまたは20よりも多くの炭素原子を含むリンカー E_L をもたらす長い鎖長を有する「クリックケミストリー」型リンカーによってもたらされ得る。好適なエフェクター部分リンカー L_E および関連するカップリング反応は、ハンドブックのハーマンソン (Hermanson), グレグ (Greg) T. 著, バイオ複合体技術 (Bioconjugate techniques), アカデミック・プレス, 2013年に記載されている。

40

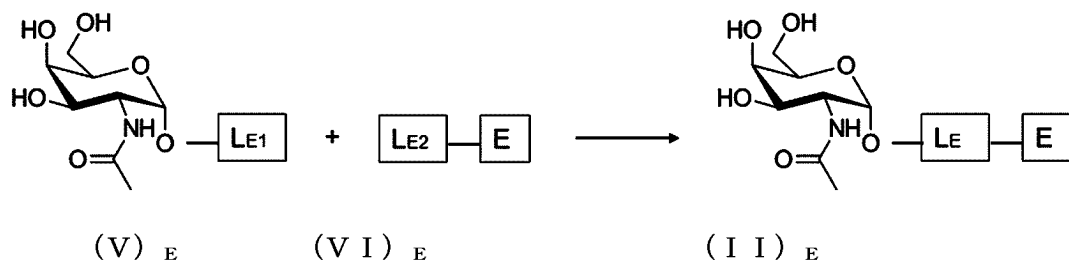
【 0 2 6 4】

当業者には当然のことながら、エフェクター部分リンカー L_E は、典型的には、少なくとも、 $GalNAc$ または架橋部分 B に共有結合された第1の前駆体 L_{E1} とエフェクター部分に共有結合された第2の前駆体 L_{E2} との間のカップリング反応（例えば「クリックケミストリー」型）の結果であろう。この原理は、式(II)の化合物について次の反応スキームで例解される：

50

【0265】

【化35】



10

【0266】

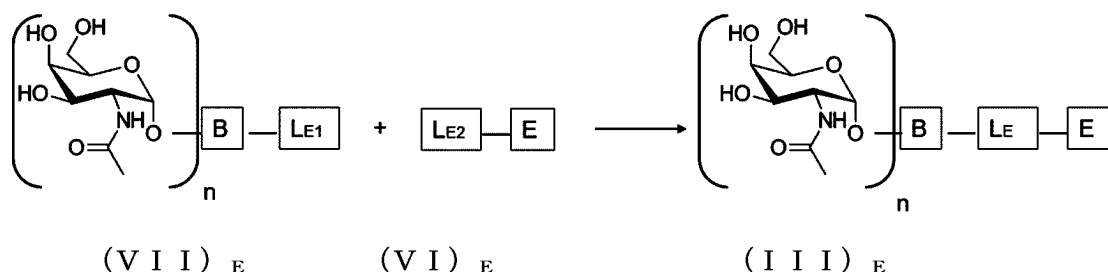
式中、 L_E はエフェクター部分リンカーであり、 L_{E1} はエフェクター部分リンカー L_E の前駆体であり、これは $GalNAc$ に共有結合され、 L_{E2} はエフェクター部分リンカー L_E の前駆体であり、これはエフェクター部分に共有結合され、 E はエフェクター部分である。

【0267】

式 (III)_E の化合物の対応する反応スキームは次の通りである：

【0268】

【化36】



20

【0269】

式中、 L_E はエフェクター部分リンカーであり、 L_{E1} はエフェクター部分リンカー L_E の前駆体であり、これは $GalNAc$ に共有結合され、 L_{E2} はエフェクター部分リンカー L_E の前駆体であり、これはエフェクター部分に共有結合され、 n は 2 に等しいかまたはより大きい整数であり、 E はエフェクター部分である。

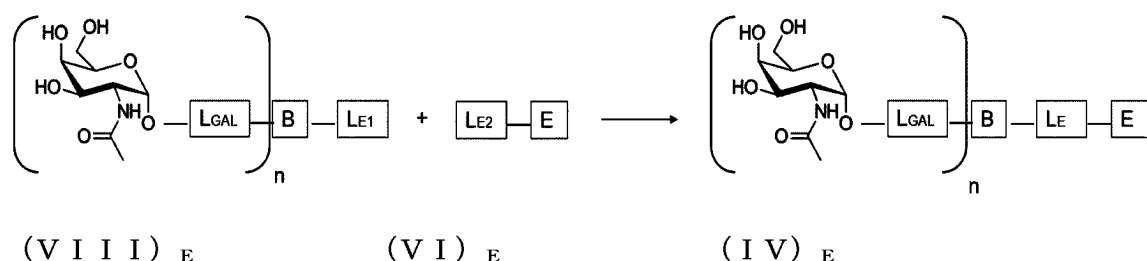
30

【0270】

式 (IV)_E の化合物の対応する反応スキームは次の通りである：

【0271】

【化37】



40

【0272】

式中、 L_E はエフェクター部分リンカーであり、 L_{E1} はエフェクター部分リンカー L_E の前駆体であり、これは $GalNAc$ に共有結合され、 L_{E2} はエフェクター部分リン

50

カー L_E の前駆体であり、これはエフェクター部分に共有結合され、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、 E はエフェクター部分であり、 L_{GAL} は $Ga l N A c$ リンカーであり、 B は架橋部分である。

【0273】

エフェクター部分リンカー L_E は、少なくとも、 $Ga l N A c$ または架橋部分に共有結合された第1の前駆体 L_{E1} とエフェクター部分に共有結合された第2の前駆体 L_{E2} との間のカップリング反応の結果であり得、ここで、カップリング反応は、例えばアジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディングー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環（例えばアジリジン、エポキシド、環状サルフェート、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオン）、非アルドール型のカルボニル反応（例えば尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド、または芳香族複素環形成）、または炭素-炭素二重結合への付加（例えばエポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシ化、ハロゲン化スルフェニル（sulfenyl halide）付加、ハロゲン化ニトロシル付加、またはマイケル付加）であり、好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディングー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環であり、より好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加またはチオールマレイミドカップリングである。

【0274】

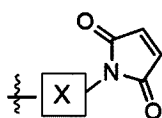
本発明のいくつかの実施形態に従うと、エフェクター部分リンカー L_E はスクシンイミドチオエーテル部分を含む。かかるスクシンイミドチオエーテルは、例えば、 N 置換マレイミドおよびチオールまたはスルフヒドリル含有化合物の間のチオールマレイミドカップリングの結果である。このチオールマレイミドカップリングは、バイオ複合体化の分野において普通に公知の「クリック」ケミストリーツールであり、例えば、ハーマンソン（Hermanson），グレッグ（Greg）T．著，バイオ複合体技術（Bioconjugate techniques），アカデミック・プレス，2013年，289頁に記載されている。帰結として、エフェクター部分リンカー L_E は、 $Ga l N A c$ または架橋部分に共有結合された第1の前駆体 L_{E1} とエフェクター部分に共有結合された第2の前駆体 L_{E2} との間のカップリング反応の結果であり、第1の前駆体 L_{E1} は N 置換マレイミドを含み、第2の前駆体 L_{E2} はチオールまたはその前駆体を含むということが好ましい。好適なチオール前駆体はジスルフィドであり、これは対応するチオールへの還元によって（例えばインサイチュで）切断され得る。

【0275】

式（V） E 、（VII） E 、または（VIII） E の化合物上に存在する前駆体 L_{E1} の好ましい構造は、次の末端 N 置換マレイミドである：

【0276】

【化38】



(IX)

【0277】

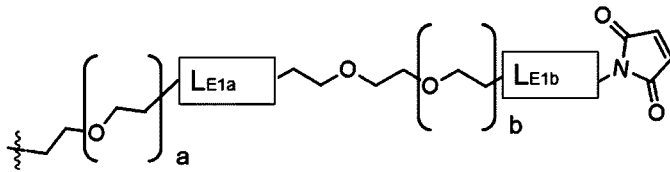
式中、 X は、末端 N 置換マレイミドを $Ga l N A c$ または架橋部分 B に共有結合することによって好適ないずれかのリンカーを表す。当業者には当然のことながら、 X は、 $Ga l N A c$ または架橋部分に共有結合された第1の部分とマレイミドに共有結合された第2の部分との間のカップリング反応の結果であり得る。 X はヒドラゾンおよび／または1，2，3-トリアゾールを含み得る。本願のリンカーの文脈において1，2，3-トリアゾールの参照がなされるときには常に、これは好ましくは1H-1，2，3-トリアゾールを意味する。

【0278】

式(V)_E、(VII)_E、または(VII)_Eの化合物上に存在する前駆体L_{E1}の構造のいくつかの実施形態は、次の末端N置換マレイミドである：

【0279】

【化39】



(X)

10

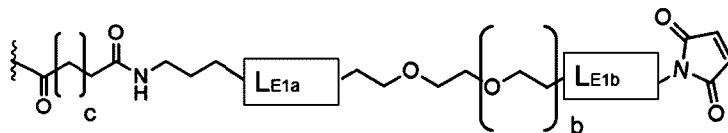
【0280】

〔式中、aおよびbはそれぞれが独立して0に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは、aおよびbは、それぞれが独立して、0、1、2、および3から選択される整数を表し、より好ましくはaおよびbは2を表し、ここで、L_{E1a}はヒドラゾンおよび／または1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは1, 2, 3-トリアゾールを表し、ここで、L_{E1b}はヒドラゾンおよび／または1, 2, 3-トリアゾール、好ましくはヒドラゾンを表す〕、

20

【0281】

【化40】



(XI)

30

【0282】

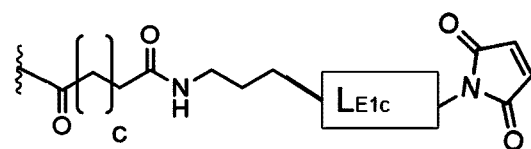
〔式中、bおよびcはそれぞれが独立して0に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくはbは0、1、2、および3から選択される整数を表し、cは5～15の範囲の整数を表し、より好ましくはbは2を表し、cは9を表し、ここで、L_{E1a}はヒドラゾンおよび／または1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは1, 2, 3-トリアゾールを表し、ここで、L_{E1b}はヒドラゾンおよび／または1, 2, 3-トリアゾール、好ましくはヒドラゾンを表す〕、

ならびに

【0283】

【化41】

40



(XII)

【0284】

〔式中、cは0に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくはcは5～15の範囲

50

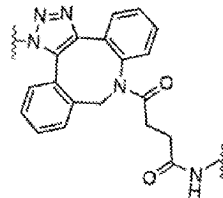
の整数を表し、より好ましくは c は 9 を表し、ここで、 L_{E1c} はヒドラゾンおよび／または 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾールを表す]。

【0285】

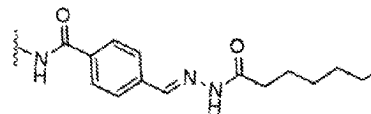
L_{E1a} 、 L_{E1b} 、および L_{E1c} はそれぞれが好ましくは 20 個未満の炭素原子を含み、より好ましくは、 L_{E1a} 、 L_{E1b} 、および L_{E1c} は、それぞれが独立して、式 (XIII)、(XIV)、または (XV) に従う部分を表し、好ましくは、 L_{E1a} は式 (XIII) の 1, 2, 3-トリアゾールであり、 L_{E1b} は式 (XIV) のヒドラゾンであり、 L_{E1c} は式 (XV) の 1, 2, 3-トリアゾールである：

【0286】

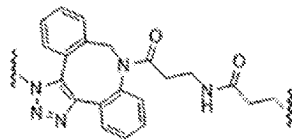
【化42】



(XIII)



(XIV)



(XV)

【0287】

ゆえに、いくつかの実施形態において、エフェクター分子複合体は本明細書に記載される式 (II)_E、(III)_E、または (IV)_E の化合物であり、ここで、エフェクター部分リンカー L_E は、式 (VI)_E の化合物と式 (V)_E、(VII)_E、または (VIII)_E の化合物との間のカップリング反応の結果であり、ここで、第1の前駆体 L_{E1} は式 (X)、(XI)、または (XII) の末端N置換マレイミドであり、ここで、 L_{E1a} は例えば式 (XIII) の 1, 2, 3-トリアゾールであり、 L_{E1b} は例えば式 (XIV) のヒドラゾンであり、 L_{E1c} は例えば式 (XV) の 1, 2, 3-トリアゾールである。

【0288】

エフェクター分子複合体エフェクター部分

本発明のある態様は、以下を含む薬学的な組み合わせに関する：

— 第1の薬学的組成物であって、本発明のサポニン複合体を含みかつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む、ならびに

— 第2の薬学的組成物であって、エフェクター分子および ASGPR のリガンドの第2の複合体（ここで、ASGPR のリガンドは、好ましくは少なくとも1つの GalNAc 部分、好ましくは3つまたは4つの GalNAc 部分を含み、より好ましくは、ASGPR のリガンドは (GalNAc)₃Tris を含むかまたはそれからなる）、あるいはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体を

10

20

30

40

50

含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む。

【0289】

本発明のある態様は、以下を含む薬学的組成物に関する：

- ー 本発明のサポニン複合体、
- ー エフェクター分子およびASGPRのリガンドの第2の複合体（ここで、ASGPRのリガンドは、好ましくは少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくは、ASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる）あるいはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体、

10

ならびに任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤。

【0290】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は、低分子、例えば薬物分子、毒素、例えば蛋白質毒素、オリゴヌクレオチド、例えばAON、例えばBNA、ゼノ核酸、もしくはsiRNA、酵素、ペプチド、蛋白質、またはそれらのいずれかの組み合わせの少なくとも1つを含むかまたはそれからなり、好ましくは、エフェクター分子は毒素、酵素、またはオリゴヌクレオチドである。

【0291】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、ASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかもしくはそれであり、ならびに／またはここで、ASGPRのリガンドおよびエフェクター分子は、共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つのリンカーを介して複合体化される。

20

【0292】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は以下のいずれか1つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである：短鎖干渉RNA (siRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、アンチヘアピン形状のマイクロRNA (miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (dsRNA)、アンチマイクロRNA (アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA^C)、BNAに基づくsiRNA、およびBNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON)。

30

【0293】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は以下のいずれか1つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである：アンチmiRNA、BNA-AON、またはsiRNA、例えば、BNAに基づくsiRNAであって、化学修飾されたsiRNA、代謝的に安定なsiRNA、および化学修飾された代謝的に安定なsiRNAから選択される。

40

【0294】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシニン9型 (PCSK9)、デルターアミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロンビン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体構成要素C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファ-1アンチトリプシン (AAT)、および乳酸脱水素酵素 (LDH) のいずれか1つをサイレンシン

50

グすることができるオリゴヌクレオチドであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子はオリゴヌクレオチドであり、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つをサイレンシングすることができ、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。好ましい標的遺伝子はHSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAである。遺伝子HSP27およびapoBがより好ましい。

10

【0295】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現生成物、HBVのS遺伝子の発現生成物、AAT、およびLDHのいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときにmiRNA機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌原性miRNA (onco-miR) またはonco-miRの発現の抑圧を阻害することができる。ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、蛋白質HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDH、好ましくはHSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときにmiRNA機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌原性miRNA (onco-miR) またはonco-miRの発現の抑圧を阻害することができる。

20

30

【0296】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、エフェクター分子は毒素であるかまたはそれを含み、この毒素は、以下の少なくとも1つの分子を含むかまたはそれからなる：ペプチド、蛋白質、酵素、例えばウレアーゼおよびCreリコンビナーゼ、蛋白質性の毒素、リボソーム不活性化蛋白質、および／または細菌毒素、植物毒素のいずれか1つ以上から選択され、より好ましくは、以下のいずれか1つ以上から選択される：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、シュードモナス・エルギノーザ外毒素 (PE) またはPEの外毒素A、全長のまたは短縮されたジフテリア毒素 (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蛋白質および2型リボソーム不活性化蛋白質の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またはジアンチン-32、サポリン、例えばサポリン-S3またはサポリン-S6、ブーガニンまたはブーガニンの脱免疫化誘導体デ

40

50

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蛋白質、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、あるいは動物またはヒト毒素、例えばカエル RNAse、またはヒトからのグランザイム B もしくはアンギオゲニン、あるいはそのいずれかの断片または誘導体。好ましくは、蛋白質毒素は、ジアンチンおよび／またはサポリンであり、ならびに／あるいは、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、および RNA を標的化する毒素の少なくとも 1 つ、より好ましくは、以下のいずれか 1 つ以上を含むかまたはそれからなる：エムタンシン、パストクス、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、ドキシソルピシン、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、SN38、DX8951f、エキサテカンメシル酸塩、シュードモナス・エルギノーザ外毒素の短縮された形態 (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、アンバスタチン 269、およびソラブタンシン、またはその誘導体。

10

20

【0297】

複合体架橋部分 B

式 (III) _S または (IV) _S のサポニン複合体および本明細書に記載される式 (III) _E または (IV) _E のエフェクター分子複合体に存在する架橋部分 B は、2 つ以上の、好ましくは 3 または 4 つの、より好ましくは 3 つの GalNAc 部分およびサポニン部分リンカー L_S またはエフェクター部分リンカー L_E を共有結合することによって好適ないずれかの部分を表す。

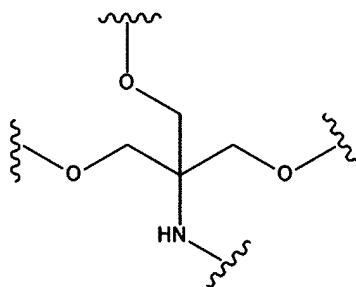
【0298】

好ましい実施形態に従うと、架橋部分 B は式 (XV) の化合物である：

【0299】

30

【化 43】



(XV)

40

【0300】

式中、式 (XV) の化合物の酸素原子は、GalNAc に (式 (III) _S または (III) _E の化合物に対応する) または GalNAc リンカー L_{GAL} に (式 (IV) _S または (IV) _E の化合物に対応する) 結合され、式 (XV) の化合物の窒素原子は、サポニン部分リンカー L_S またはエフェクター部分リンカー L_E に結合される。

【0301】

当業者は、架橋部分 B が式 (XV) の化合物である式 (III) _S、(III) _E、(IV) _S、または (IV) _E のこれらの化合物が、ASGPR リガンドが (GalNAc

50

) ${}_3\text{Tris}$ からなるエフェクター分子複合体に対応するということを理解するであろう。

【0302】

複合体リンカー L_{GAL}

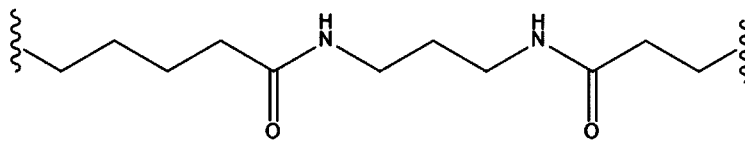
GalNAc リンカー L_{GAL} は、式 (IV)_S または (IV)_E の架橋部分に GalNAc を共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。リンカーのアイデンティティおよびサイズは特に限定されない。

【0303】

いくつかの実施形態に従うと、 GalNAc リンカー L_{GAL} はそれぞれが 2～25 個の炭素原子、好ましくは 7～15 個の炭素原子、より好ましくは 11 個の炭素原子を含む。好ましくは、 GalNAc リンカー L_{GAL} は、少なくとも 1、好ましくは 2 つのアミド部分を含む。特に好ましい GalNAc リンカー L_{GAL} は、式 (XVI) に従う化合物である：

【0304】

【化 4 4】



(XVI)

【0305】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、第 3 の複合体に含まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、細胞表面分子のリガンド、もしくは細胞表面分子に対する結合部位を含む抗体、または結合部位を含むその少なくとも 1 つのドメインもしくは断片である。

【0306】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、第 3 の複合体は以下のいずれか 1 つ以上である：抗体-毒素複合体、受容体リガンド-毒素複合体、抗体-薬物複合体、受容体リガンド-薬物複合体、抗体-核酸複合体、または受容体リガンド-核酸複合体。

【0307】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、第 3 の複合体に含まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、以下の細胞表面分子 CD71、CD63、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 α V β 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 α V β 3、CA6、CD33、メソテリン、Crypt o、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、アジア口糖蛋白質受容体 (ASGPR) のいずれか 1 つ、好ましくは、HER2、CD71、ASGPR および EGFR のいずれか 1 つ、より好ましくは CD71 に結合することができる。

【0308】

ある実施形態は、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物であり、ここで、第3の複合体に含まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、以下のいずれか1つであるかまたはそれを含む：抗体、好ましくはモノクローナル抗体、例えばヒトモノクローナル抗体、IgG、シングルドメイン抗体を含むかまたはそれからなる分子、少なくとも1つのV_HHドメイン、好ましいのはラクダV_H、可変重鎖新抗原受容体（V_{NAR}）ドメイン、Fab、scFv、Fv、dAb、F(ab)₂、およびFcab断片。

【0309】

本発明のある態様は、医薬としての使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせにまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。本発明のある態様は、医薬としての使用のための本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する。

【0310】

本発明のある態様は、遺伝子apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせにまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。本発明のある態様は、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDH、好ましくはHSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPA、より好ましくはHSP27、apoBのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせにまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物に関する。

【0311】

ある実施形態は、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、α₁-アンチトリプシン欠乏症、β-サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のための、本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む本発明の薬学的組成物、あるいは本発明の使用のための本発明のサポニン複合体を含む薬学的な組み合わせまたは本発明のサポニン複合体を含む薬学的組成物である。

【0312】

ある実施形態は、本発明の使用のための本発明のサポニン複合体を含む薬学的な組み合わせ、または本発明の使用のための本発明のサポニン複合体を含む薬学的組成物もしくは本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物であり、ここで、サポニンは本発明に従うサポニン誘導体、好ましくはQS-21誘導体、またはSO1861誘導体、またはSO1832誘導体である。

【0313】

本発明のある態様は、本発明の第2の複合体または第3の複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくはその後、本発明に従う第2の複合体または第3の複合体に含まれるエフェクター分子を上記細胞のサイトゾルに移入するためのインビトロのまたはエクスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

a) 細胞を提供し、これは、その表面上にASGPRを発現し、これは、第3の複合体が細胞に移入されるべきであるときには、第3の複合体が上記細胞表面分子に対する結合のための結合分子を含む細胞表面分子を発現し、上記細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイ

10

20

30

40

50

ルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択されること、

b) ステップa) で提供された細胞に移入するための本発明の第2の複合体または第3の複合体を提供すること、

c) 本発明のサポニン複合体を提供すること、

d) ステップa) の細胞を、インビトロでまたはエクスピボで、ステップb) の第2の複合体または第3の複合体およびステップc) のサポニン複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内への第2の複合体または第3の複合体の移入をもたらすこと、好ましくはそれによって、その後に、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体または第3の複合体の移入をもたらすこと、または好ましくはそれによって、その後に、少なくとも、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体または第3の複合体に含まれるエフェクター分子の移入をもたらすこと。

10

【0314】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドはBNA、ゼノ核酸、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか1つである。

【0315】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか1つ以上から選択される：短鎖干渉RNA (siRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、アンチヘアピン形状のマイクロRNA (miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (dsRNA)、アンチマイクロRNA (アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA^{NC})、BNAに基づくsiRNA、およびBNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON)。

20

【0316】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか1つ以上から選択される：アンチmiRNA、BNA-AON、またはsiRNA、例えば、BNAに基づくsiRNAであって、化学修飾されたsiRNA、代謝的に安定なsiRNA、および化学修飾された代謝的に安定なsiRNAから選択される。

30

【0317】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシニン9型 (PCSK9)、TMPRSS6、デルターアミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロニン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体構成要素C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファ-1アンチトリプシン (AAT)、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、および乳酸脱水素酵素 (LDH) のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。好ましくは、遺伝子は、蛋白質HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAを発現するための、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つである。

40

【0318】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在する

50

ときに、遺伝子のアポリポ蛋白質 B (a p o B) および H S P 2 7 のいずれか 1 つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである。

【0319】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質 a p o B、H S P 2 7、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子の発現生成物、H B V の S 遺伝子の発現生成物、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、および L D H のいずれか 1 つの発現に関わる m R N A を標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、m i R N A 機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌原性 m i R N A (o n c o - m i R) または o n c o - m i R の発現の抑圧を阻害することができる。好ましくは、蛋白質は以下から選択される肝臓蛋白質である：H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、および C E B P A。

10

【0320】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質 a p o B および H S P 2 7 のいずれか 1 つの発現に関わる m R N A を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

20

【0321】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法に関し、以下のステップを含む：

(a) 共有結合された第 1 のリンカーを含む少なくとも 1 つのサポニン部分を提供し、ここで、第 1 のリンカーは、第 2 のリンカー上の第 2 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 7 の反応性基に対する共有結合のための少なくとも 1 つの第 1 の反応性基を含むこと、

(b) 共有結合された第 3 のリンカーを含むオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、第 3 のリンカーは、第 4 のリンカー上の第 4 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 8 の反応性基に対する共有結合のための第 3 の反応性基を含むこと、

30

(c) 共有結合された第 5 のリンカーを含む少なくとも 1 つの G a l N A c 部分を提供し、ここで、第 5 のリンカーは、第 6 のリンカー上の第 6 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 9 の反応性基に対する共有結合のための第 5 の反応性基を含むこと、ならびに

(d 1) 第 1 の反応性基および第 2 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 2 のリンカーに第 1 のリンカーを連結し、第 3 の反応性基および第 4 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 4 のリンカーに第 3 のリンカーを連結し、第 5 の反応性基および第 6 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 6 のリンカーに第 5 のリンカーを連結し、第 2 のリンカー、第 4 のリンカー、および第 6 のリンカーを一緒に共有結合的に連結し、それによって、オリゴヌクレオチドを提供すること、

40

あるいは

(d 2) 第 1 の反応性基および第 7 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 1 のリンカーを連結し、第 3 の反応性基および第 8 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 3 のリンカーを連結し、第 5 の反応性基および第 9 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 5 のリンカーを連結し、それによって、オリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

どちらか。

【0322】

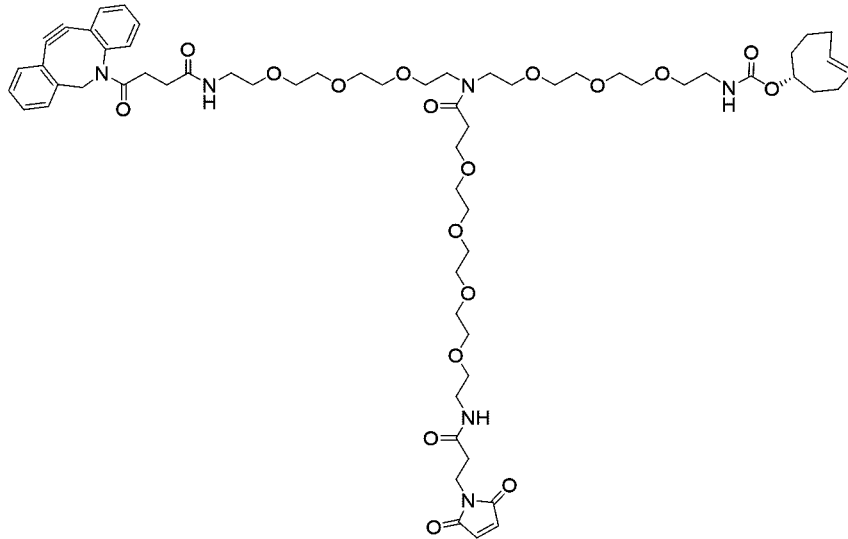
ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法であり、ここで、第 7 のリンカーは、三官能性リンカー、例えば式 (X X I) によって表される三官

50

能性リンカーである：

【 0 3 2 3 】

【 化 4 5 】



(XXI)。

10

20

【 0 3 2 4 】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分である。

【 0 3 2 5 】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニンが、SO1861、SO1832、QS-21、またはそのいずれかの機能的な誘導体、好ましくはSO1861またはSO1832である。

【 0 3 2 6 】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニン部分が、ヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合を介して共有結合的に連結される。

30

【 0 3 2 7 】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも1つのGalNAc部分が、1～4つのGalNAc部分、好ましくは1または3つのGalNAc部分である。

【 0 3 2 8 】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体と任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む薬学的組成物に関する。

【 0 3 2 9 】

本発明のある態様は、医薬としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体と任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む薬学的組成物に関する。本発明のある態様は、医薬としての使用のための本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する。

40

【 0 3 3 0 】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体と任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む薬学的組成物に、あるいは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関し、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問

50

題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。例えば、疾患は、腫瘍細胞におけるHSP27の（過剰）発現に関連する癌である。腫瘍成長がHSP27の（過剰）発現に関連する腫瘍を患う患者に、HSP27遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体を投与することは、HSP27遺伝子のサイレンシングをもたらし、それによって腫瘍成長を止める。例えば、apoB発現に関連する健康上の問題は、以下の血中のLDLコレステロールの上昇したレベルに係る健康上の問題である：ヒト対象、例えば、アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症のリスクがある患者、ならびに／あるいは上記アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を患う患者。apoB遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドを上記ヒト対象または患者に投与することは、apoB発現を阻害することまたは低下させることと、それによって、帰結として、LDL（コレステロール）の低下をもたらす。なぜなら、apoBはLDL粒子の蛋白質構成要素だからである。循環中LDLの低下したレベルは、より少ない循環中LDLコレステロールと、それによって、以下において明らかな健康のLDLコレステロール関連リスクおよび疾患症状の逡減したリスクとに関連する：アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を患う患者、あるいはLDLコレステロールの正常よりも高い血中レベルの影響下においてアテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を発生するリスクがある対象。

10

20

【0331】

本発明のある態様は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関し、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

30

【0332】

ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む本発明に従う使用のための薬学的組成物であるか、または本発明に従う使用のための本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、上記使用は、遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBの発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防においてであり、ならびに／あるいは遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBが関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0333】

ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む本発明に従う使用のための薬学的組成物であるか、または本発明に従う使用のための本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、上記使用は、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体関連疾患、B型肝炎感染、または自己免疫疾患の処置または予防においてである。

40

【0334】

ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む本発明に従う使用のための薬学的組成物であるか、または本発明に従う使用のための本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、上記使用は、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、および高コレス

50

テロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防においてである。

【0335】

本発明のある態様は、以下の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する：癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症、 β -サラセミア、または自己免疫疾患。

【0336】

本発明のある態様は、以下の処置または予防における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する：癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、または肝細胞癌、ならびに／あるいは心血管疾患、例えばアテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症、好ましくはアテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症。

【0337】

例えば、疾患は、腫瘍細胞におけるHSP27の（過剰）発現に関連する癌である。腫瘍成長がHSP27の（過剰）発現に関連する腫瘍を患う患者に、HSP27遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体を投与することは、HSP27遺伝子のサイレンシングをもたらす、それによって腫瘍成長を止める。例えば、apoB発現に関連する健康上の問題は、以下の血中のLDLコレステロールの上昇したレベルに関係する健康上の問題である：ヒト対象、例えば、アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症のリスクがある患者、ならびに／あるいは上記アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を患う患者。apoB遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体を上記ヒト対象または患者に投与することは、apoB発現を阻害することまたは低下させることと、それによって、帰結として、LDL（コレステロール）の低下をもたらす。なぜなら、apoBはLDL粒子の蛋白質構成要素だからである。循環中LDLの低下したレベルは、より少ない循環中LDLコレステロールと、それによって、以下において明らかな健康のLDLコレステロール関連リスクおよび疾患症状の逡減したリスクとに関連する：アテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を患う患者、あるいはLDLコレステロールの正常よりも高い血中レベルの影響下においてアテローム性動脈硬化および／または高コレステロール血症を発生するリスクがある対象。

【0338】

本発明のある態様は、対象におけるLDLコレステロールの低下における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する。本発明のある態様は、ヒト対象の血液中のLDLコレステロール濃度の低下のための方法における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する。本発明のある態様は、心血管疾患の処置または予防のための方法における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を含む薬学的組成物にまたは本発明のオリゴヌクレオチド複合体に関する。典型的には、処置または予防は、心血管疾患を患うヒト患者または心血管疾患を発生するリスクがあるヒト対象においてである。典型的には、心血管疾患は、正常なLDLコレステロールレベルの範囲の上限と比較してLDLコレステロールの上昇した血中レベルに関連する。

【0339】

本発明のある態様は、細胞の外側から上記細胞の内側に本発明のオリゴヌクレオチド複合体を移入し、好ましくは、その後、上記細胞のサイトゾルおよび／または核に本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを移入するためのインビトロのまたはエキスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

10

20

30

40

50

a) ASGPR、好ましくはASGPR1をその表面上に発現する細胞を提供し、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染哺乳類細胞、および哺乳類腫瘍細胞から選択され、ここで、好ましくは上記細胞はヒト細胞であること、

b) ステップa) で提供された細胞に移入するための本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

c) ステップa) の細胞を、インビトロでまたはエキスビボで、ステップb) のオリゴヌクレオチド複合体と好ましくは液体媒体中において接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、任意にかつ好ましくは、それによって、その後に、上記細胞のサイトゾルおよび／または核へのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をもたらすこと。

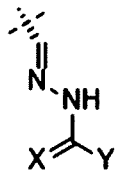
10

【0340】

驚くべきことに、本発明者は以下を見出した：アグリコンコア構造、好ましくはキラヤ酸に連結された本明細書において定められるトリテルペンアグリコンコア構造と第1の糖鎖「R¹」および第2の糖鎖「R²」の少なくとも1つを含むサポニンに基づくサポニン誘導体（ここで、サポニン誘導体はアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、ここで、アルデヒド基は式（I1）に従うセミカルバゾン官能基に変換される）

【0341】

【化46】



(I1)

20

【0342】

式中、R¹およびR²は独立して水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、

X = O、P、またはSであり、

30

Y = NR³R⁴であり、ここで、R³およびR⁴は、独立して、H、無置換のC1-C10直鎖、分岐、もしくは環式アルキル、無置換のC2-C10直鎖、分岐、もしくは環式アルケニル、または無置換のC2-C10直鎖もしくは分岐アルキニル、または共有結合されたリンカーを表し、好ましくはR³およびR⁴の1つはHであるか、あるいは

Y =

【0343】

【化47】



40

【0344】

であり、式中、nおよびmはそれぞれが独立して1、2、または3から選択される整数であり、

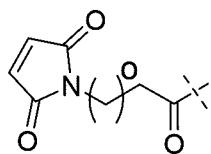
Z = CH₂、O、S、P、またはNR⁵であり、

式中、R⁵は、H、無置換のC1-C10直鎖、分岐、もしくは環式アルキル、無置換のC2-C10直鎖、分岐、もしくは環式アルケニル、無置換のC2-C10直鎖もしくは分岐アルキニル、または共有結合されたリンカー、あるいは式（II1）aに従うマレイミド部分：

50

【 0 3 4 5 】

【 化 4 8 】



(I I 1) a

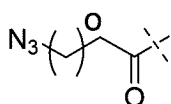
10

【 0 3 4 6 】

または式 (I I 1) b に従うアジド部分：

【 0 3 4 7 】

【 化 4 9 】



(I I 1) b

20

【 0 3 4 8 】

を表し、式中、 α は、0～10、好ましくは2～7、より好ましくは4～6から選択される整数である）

は、サポニン誘導体と接触させられた細胞の細胞生存率が考えられるときに、縮減された毒性を有し、アルデヒド官能基が式 (I 1) に従ってセミカルバゾン官能基に変換される場合に、例えば毒素の細胞毒性またはBNAによって媒介される遺伝子サイレンシングの増強が考えられるときに（いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、修飾サポニン（すなわちサポニン誘導体）の類似のまたは改善されたエンドソーム脱出向上活性に関する）、活性を有し、ならびに／あるいは未修飾サポニンの毒性、活性、および溶血活性と比較したときに縮減された溶血活性を有する。つまり、サポニン誘導体は以下の少なくとも1つ、好ましくは2つ（to）、より好ましくは3つ全てを有する：

30

（i）サポニン誘導体と接触させられた細胞の細胞生存率が考えられるときに、縮減された毒性、

（i i）アルデヒド官能基が式 (I 1) に従ってセミカルバゾン官能基に変換される場合に、例えばBNAによって媒介される遺伝子サイレンシングの増強が考えられるときに（いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、修飾サポニンの類似のまたは改善されたエンドソーム脱出向上活性に関する）、向上した活性、および／または

（i i i）縮減された溶血活性。

このときには、サポニン誘導体が基づく未修飾サポニンの毒性、活性、および溶血活性と比較される。それによって、本発明者は、改善された治療ウィンドウを有するサポニン誘導体を提供する。なぜなら、サポニン誘導体では、細胞毒性はそれらの天然に存在するカウンターパートについて決定される細胞毒性よりも低く、溶血活性はサポニン誘導体の天然に存在するカウンターパートについて決定される溶血活性よりも低く、細胞毒性のIC50値および例えば毒素増強のIC50値または遺伝子サイレンシングのIC50値の間の比は類似であるかまたは増大するからであり、ならびに／あるいはサポニン溶血活性のIC50値および例えば毒素増強のIC50値または遺伝子サイレンシングのIC50値の間の比は類似であるかまたは増大するからである。用語「エンドソーム脱出向上活性」は「活性」と略称され得る。

40

【 0 3 4 9 】

加えて、本発明者は、驚くべきことに、サポニン複合体に含まれる細胞表面分子結合分

50

子（例えば抗体）によって標的化される細胞表面受容体の中等度から低い発現にもかかわらず、および／またはADCによって標的化される細胞表面受容体の中等度から低い発現にもかかわらず、抗体－蛋白質毒素複合体などのADCと一緒にセミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体に基づくサポニン複合体とかかる細胞を接触させることによる（腫瘍）細胞殺滅を確立した。サポニン誘導体およびサポニン複合体はセミカルバゾン官能基を含む。例えば、比較例において、同じ細胞表面分子結合分子（例えば抗体）を含むがセミカルバゾン官能基の代わりにヒドラゾン官能基（ $=N-N(H)-C(O)-$ ）を含むサポニン複合体が細胞と接触させられたときには、かかる細胞殺滅は確立され得なかったかまたはより低い度合いでのみ確立され得た。それによって、本発明者は、ADCまたはAOCに含まれるエフェクター部分などのエフェクター部分の活性化または増強が考えられるときに、より強力なサポニン誘導体およびサポニン複合体を提供した。

10

【0350】

さらに、本発明者は、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体が、哺乳類細胞のエンドソームおよび／またはリソソームに存在する条件である酸性条件下において、当分野において公知のヒドラゾン官能基（ $=N-N(H)-C(O)-$ ）を含むサポニン誘導体と比較して、「自由な」アルデヒド官能基を含む対応するネイティブなサポニンへとより迅速にかつより高い量で加水分解するということを見出した。これは、例えばヒドラゾン官能基（ $=N-N(H)-C(O)-$ ）を含むサポニン誘導体の要求される量と比較して、標的化された毒素または標的化されたオリゴヌクレオチドのためのエンドソーム脱出エンハンサーとして作用するための「自由な」アルデヒドを含むネイティブなサポニンの同じ量を得るために、例えば、例えば1つ以上のGalNAc部分にカップリングされたADCもしくはAOCまたはBNAなどの遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドの増強の必要がある患者に、本発明に従うサポニン誘導体のより低い量が投与されるべきであるという利益を有する。いかなる理論により拘束を受けることを望まなければ、例えばヒドラゾン官能基を含むサポニン誘導体からのアルデヒド官能基を含むサポニンの放出と比較したときに、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体からのアルデヒド官能基を含むサポニンのより速いかつより有効性の放出が、本発明者によって確立されたセミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体を含むサポニン複合体、例えばサポニン、オリゴヌクレオチド、および細胞表面受容体リガンド、例えば1から3つのGalNAc部分（ASGPRを発現する（肝臓）細胞を標的化するための）を含む複合体の改善された活性の基礎にあり、ここで、活性は、エンドソーム脱出向上による標的の細胞のサイトゾルまたは核の内側における遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドなどのエフェクター部分活性の増強である。

20

30

【0351】

驚くべきことに、サポニンのアグリコンのC23のアルデヒド基から式（I1）に従うセミカルバゾン官能基への変換（誘導体化）は、かかるサポニン誘導体が細胞、すなわち種々の型の細胞と接触させられるときの細胞毒性の減少をもたらす。それゆえに、減少した細胞毒性を有するこれらの一連のサポニン誘導体を提供されるということは有益であり、ここで、細胞毒性の減少は、未修飾の天然に存在するサポニンカウンターパートについて決定される細胞毒性に対して相対的である。サポニン誘導体は、かかる天然に存在するサポニン、例えばSO1861、等しく活性なSO1832およびQS-21（アイソフォーム）から、好ましくはSO1861またはSO1832から形成され得る。細胞毒性の減少が考えられるときに、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体は、減少した細胞毒性を有するサポニンが提供されるべきであるときに等しく好適である。

40

【0352】

本発明者は、それゆえに、細胞毒性が考えられるときにおよび／または溶血活性が考えられるときに、ならびに例えば（遺伝子サイレンシング）オリゴヌクレオチドの増強が考えられるときに、対応する未誘導体化サポニンと比較して、改善された治療ウィンドウを有するサポニン誘導体を提供した。セミカルバゾン官能基を含むかかるサポニン誘導体は、例えば具体的には、GalNAc-オリゴヌクレオチド複合体が関わる治療レジメンに

50

おける適用にとって好適である。これはサポニン誘導体と組み合わせられるか、あるいはこの複合体は、共有結合的に連結されたサポニンを G a l N A c 部分およびオリゴヌクレオチドと一緒に含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、例えば、癌、高コレステロール血症、心血管疾患、またはその必要がある（ヒト）対象における健康な対象の正常なレベルよりも上の L D L コレステロールの向上したレベルの予防または処置のためである。細胞毒性および／または溶血活性が考えられるときに、特に、かかるサポニン誘導体が、例えば A D C もしくは A O C によるかまたは少なくとも 1 つの G a l N A c 部分を含みかつオリゴヌクレオチド、例えば H S P 2 7 および a p o B などの遺伝子をサイレンシングするための B N A を含む複合体による処置の必要がある患者に投与されるときに、あるいはセミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体が発明のオリゴヌクレオチド複合体の一部であるときに、かかるサポニン誘導体の安全性は改善される。

10

【 0 3 5 3 】

ある実施形態は、1つのサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体である。

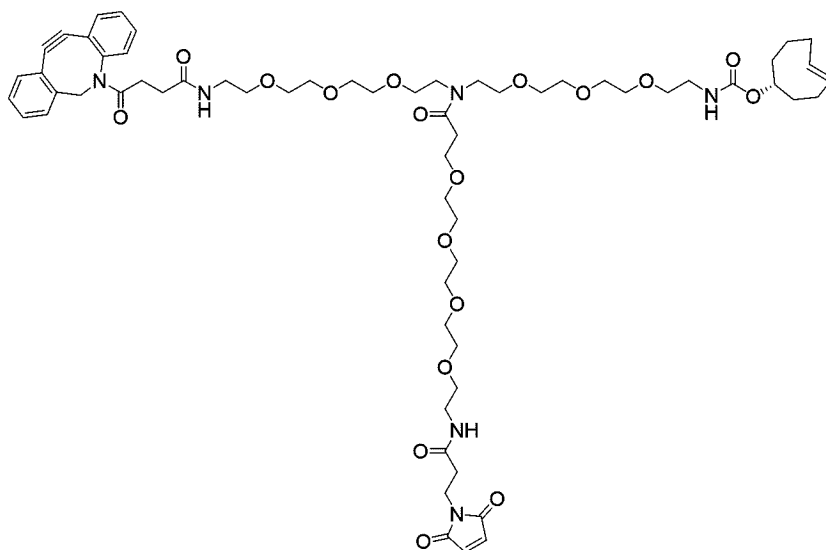
【 0 3 5 4 】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも 1 つの G a l N A c 部分、少なくとも 1 つのサポニン、およびオリゴヌクレオチドは三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、G a l N A c 部分、サポニン、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。本発明の好ましいオリゴヌクレオチド複合体は以下のオリゴヌクレオチド複合体である：少なくとも 1 つの G a l N A c 部分、好ましくは 3 つの G a l N A c 部分、少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1 ～ 1 6 個のサポニン部分、より好ましくは 1 ～ 8 つのサポニン部分、例えば 1 、 4 、または 8 つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドが三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、G a l N A c 部分、サポニン／サポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。本発明のオリゴヌクレオチド複合体上への組み込みにとって好適である三官能性リンカーの例は、式（X X I）によって表される三官能性リンカーである：

20

【 0 3 5 5 】

【化 5 0 】



30

(X X I)。

40

【 0 3 5 6 】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、三官能性リンカー、例えば式（X X I）によって表される三官能性リンカーが、リンカーの第 1 の腕部を介

50

して1つのサポニン部分またはより多くのサポニン部分、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分に共有結合され、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは1～4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分にリンカーの第2の腕部を介して共有結合され、オリゴヌクレオチド、好ましくはAON、例えばBNAまたはsiRNAに三官能性リンカーの第3の腕部を介して共有結合される。以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分、好ましくは1、4、または8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドが三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、GalNAc部分、サポニンまたはサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

10

【0357】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、アジアロ糖蛋白質受容体のリガンド(ASGPR)(ここで、ASGPRのリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる)に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、少なくとも1つのサポニンは12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有し、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8つのサポニン部分、より好ましくは1つのサポニン部分、4つのサポニン部分、または8つのサポニン部分を含む。

20

【0358】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドは三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、GalNAc部分、サポニンまたはサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

30

【0359】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、1つのサポニン部分、4つのサポニン部分、または8つのサポニン部分を含む。

【0360】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、少なくとも1つのサポニン部分はヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合を介して連結される。少なくとも1つのサポニンは、好ましくは、オリゴヌクレオチド複合体上においてセミカルバゾン結合を介して共有結合される。かかるヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合(リンカーあり)は、例えば、サポニンのキラヤ酸アグリコンコア構造のまたはサポニンのジプソゲニンアグリコンコア構造のC23原子においてアルデヒド基が関わって形成される(これらの型のサポニンは表A1参照)。

40

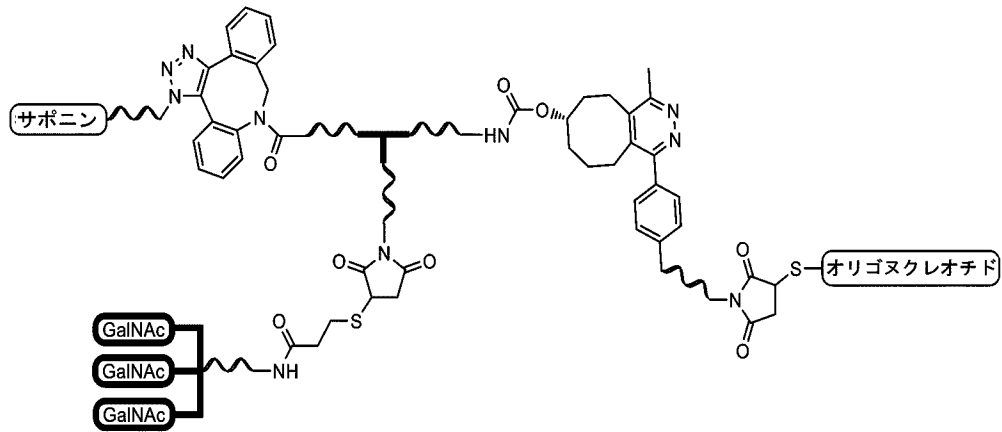
【0361】

本発明のある態様は、分子(EE)に従うオリゴヌクレオチド複合体に関する：

【0362】

50

【化 5 1】



10

(E E)

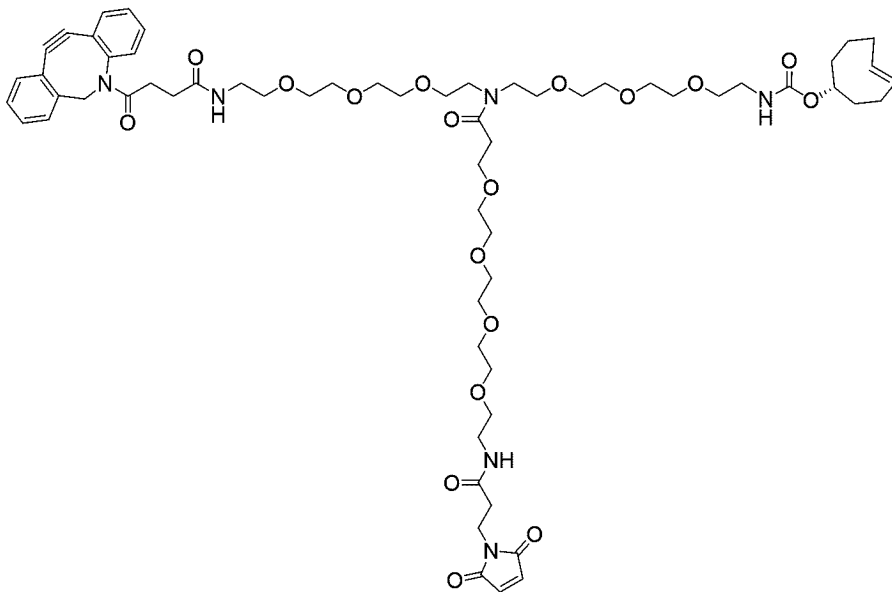
【 0 3 6 3】

この分子 (E E) は共有結合的複合体化生成物であり、式 (X X I) に従う三官能性リンカーの、以下との共有結合的複合体化によって得られる：

【 0 3 6 4】

20

【化 5 2】



30

(X X I)

【 0 3 6 5】

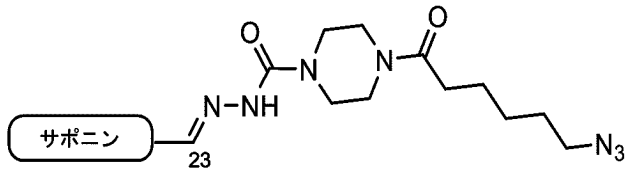
40

分子 (A A) に従うサポニン誘導体：

【 0 3 6 6】

50

【化 5 3】



(A A)

10

【 0 3 6 7 】

【 式中、

【 0 3 6 8 】

【 化 5 4 】

サポニン

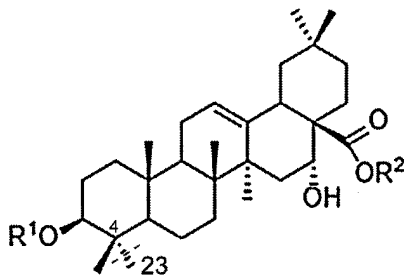
【 0 3 6 9 】

は、式 (S M) に従うサポニン部分を表す：

【 0 3 7 0 】

20

【 化 5 5 】



(S M)

30

【 0 3 7 1 】

式中、 R^1 および R^2 は独立して水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式 (S M) に従うサポニン部分は、位置 C 2 3 にアルデヒド基を含むサポニンに基づく】、

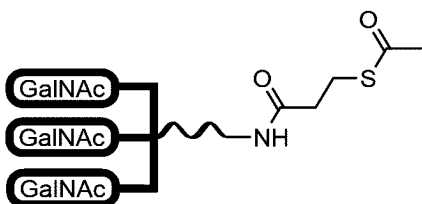
ならびに

(2) 分子 (F F) に従う G a l N A c 複合体：

【 0 3 7 2 】

【 化 5 6 】

40

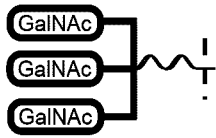


(F F)

【 0 3 7 3 】

50

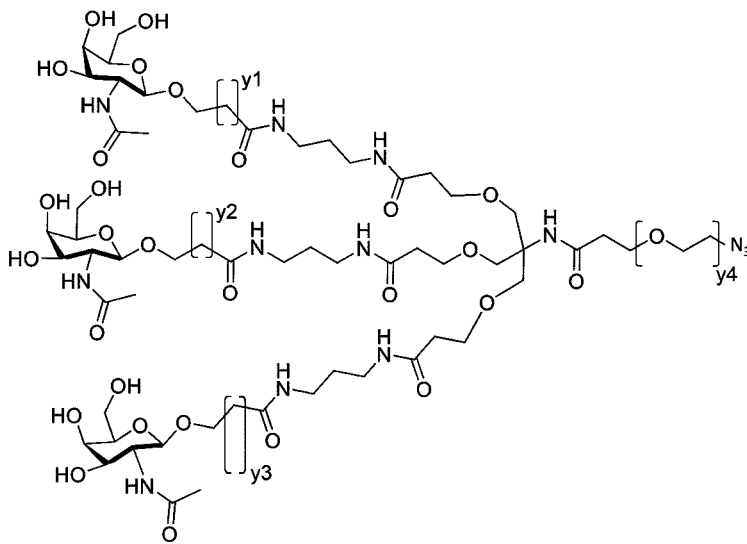
〔式中、
〔 0 3 7 4 〕
〔化 5 7 〕



〔 0 3 7 5 〕

は、分子（DD 1）に従うかまたは分子（DD 2）に従うトリGalNAc複合体を表す 10
：

〔 0 3 7 6 〕
〔化 5 8 〕



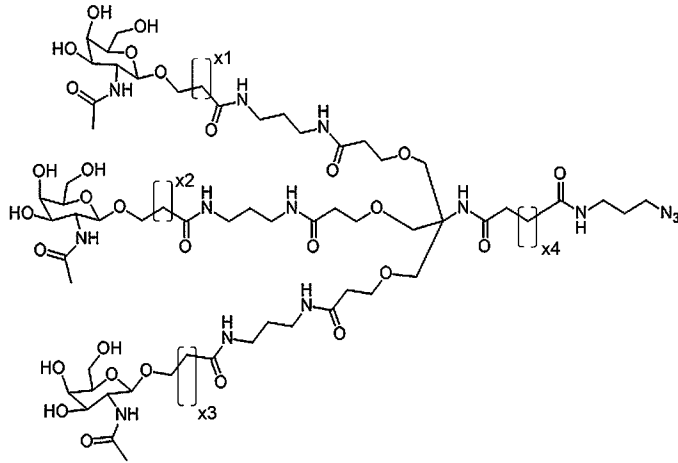
（DD 1）

〔 0 3 7 7 〕

〔式中、 y_1 、 y_2 、および y_3 は、それぞれが、独立して、0～20、好ましくは1～15、より好ましくは2～12、さらにより好ましくは2～10、さらにより好ましくは2～8、最も好ましくは2および3から選択される整数であり、好ましくは、 y_1 、 y_2 、および y_3 は同じであり、 y_4 は以下から選択される整数である：1～100、好ましくは2～80、より好ましくは3～70、さらにより好ましくは4～60、さらにより好ましくは4～50、さらにより好ましくは4～40、さらにより好ましくは4～30、さらにより好ましくは4～20、さらにより好ましくは4～6、最も好ましくは4～5、例えば4〕 40

〔 0 3 7 8 〕

【化 5 9】



(D D 2)

【 0 3 7 9】

〔式中、 x_1 、 x_2 、および x_3 は、それぞれが、独立して、 $0 \sim 20$ 、好ましくは $1 \sim 15$ 、より好ましくは $2 \sim 12$ 、さらにより好ましくは $2 \sim 10$ 、さらにより好ましくは $2 \sim 8$ 、最も好ましくは 2 および 3 から選択される整数であり、好ましくは x_1 、 x_2 、および x_3 は同じであり、 x_4 は以下から選択される整数である： $1 \sim 50$ 、好ましくは $2 \sim 40$ 、より好ましくは $3 \sim 30$ 、さらにより好ましくは $4 \sim 20$ 、さらにより好ましくは $5 \sim 15$ 、最も好ましくは $8 \sim 12$ 、例えば 9 〕

好ましくは、分子（D D 3）に従うかまたは分子（D D 4）に従うトリ G a l N A c 複合体を表す：

【 0 3 8 0】

10

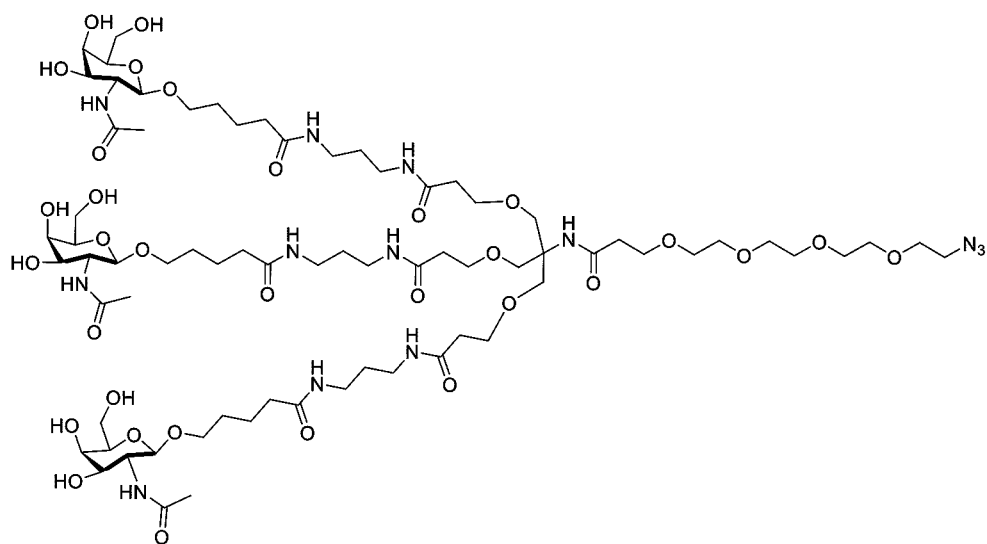
20

30

40

50

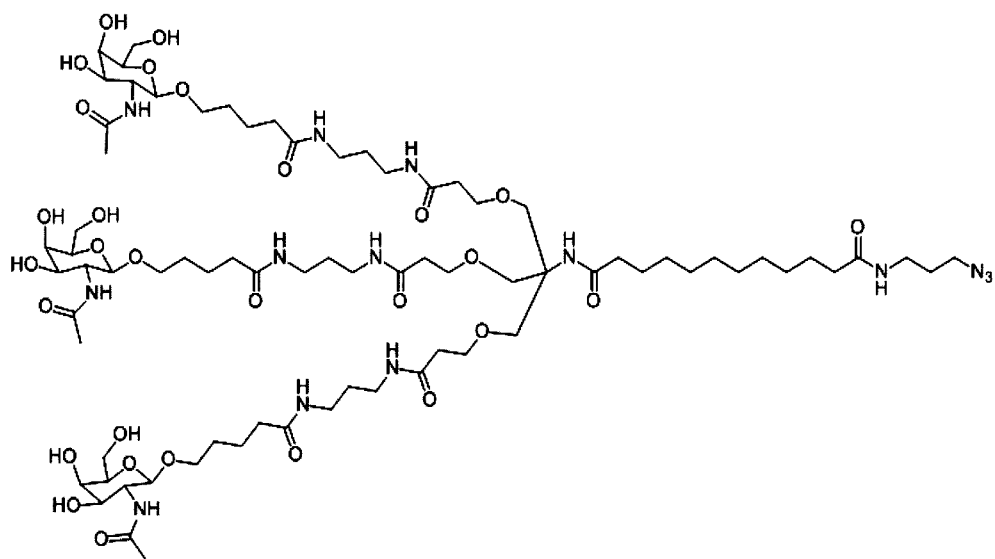
【化 6 0】



10

(DD3),

20



30

(DD4),

]

【 0 3 8 1】

40

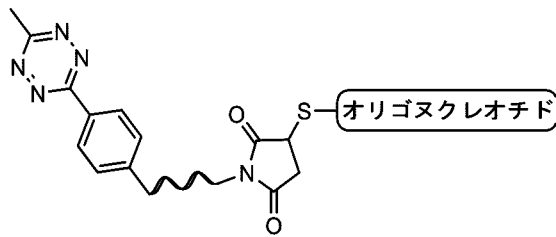
ならびに

(3) 分子 (GG) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチド：

【 0 3 8 2】

50

【化 6 1】



(GG)

10

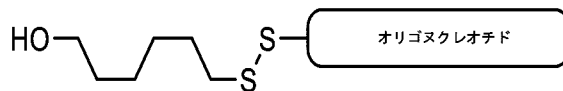
【0383】

ここで、分子 (GG) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 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 - アミドと分子 (HH) に従うオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す：

【0384】

【化 6 2】

20



(HH)。

【0385】

本発明の分子 (EE) に従うかかるオリゴヌクレオチド複合体は、サポニン部分のエンドソーム脱出向上活性が考えられるときに驚くほど改善された効力を提示する。改善された有効性は、ASGPR に対する複合体の結合によって媒介される複合体を取り込んだ細胞のエンドソーム中のやや酸性の pH の影響下におけるセミカルバゾン官能基の切断による、複合体からのサポニンの改善されたデカップリング (放出) に関係するということが思料される。それによって、類似だが共有結合的に連結されたサポニン部分なしの複合体を適用することと比較して、オリゴヌクレオチドのエンドソーム脱出は向上し、サイトゾルおよび／または核におけるオリゴヌクレオチドの (遺伝子サイレンシング) 活性は向上する。

30

【0386】

単一のサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体の例は、分子 13 として図 35D に提示されるオリゴヌクレオチドである。単一のサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチドの合成は、この下の実施例の項において分子 13 (図 35D) の合成の詳細な記載によって例示され、図 35 において提示される。サポニン部分は三官能性リンカーにリンカーを介して連結され、ここで、サポニン部分はリンカーにヒドラゾン結合を介して連結される。単一のサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体のさらなる例は、分子 31 として図 38C に提示されるオリゴヌクレオチドである。単一のサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の合成は、この下の実施例の項において分子 31 (図 38C) の合成の詳細な記載によって例示され、図 38 において提示される。サポニン部分は三官能性リンカーにリンカーを介して連結され、ここで、サポニン部分は上記リンカーにセミカルバゾン結合を介して連結される (図

40

50

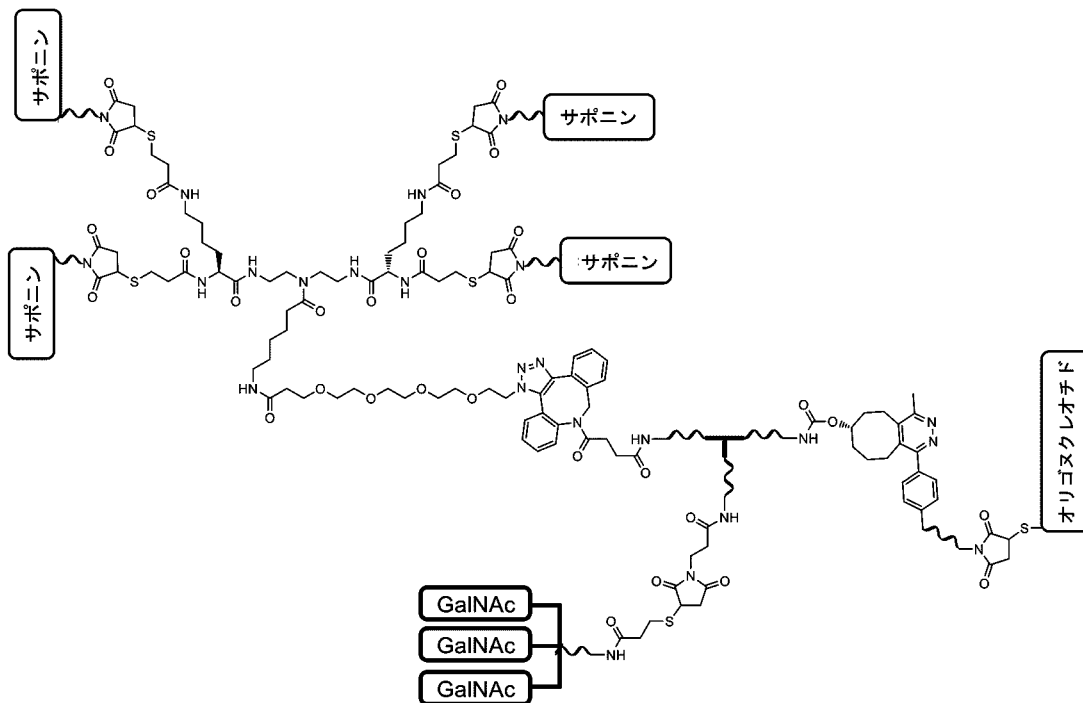
38Aの例えば分子28参照)。この上の分子(AA)に従うサポニン誘導体もまた参照。

【0387】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、4つのサポニン部分を含む。ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、デンドロン、好ましくはG2デンドロンに共有結合されされた4つのサポニン部分を含む。かかる(G2)デンドロンの例は、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)である。4つのサポニン部分に連結されたデンドロンの合成は、例えば、図39Bおよび実施例の項において、以下からの(form)中間体20(分子39)の合成について提示されている：分子37(マレイミドに連結されたサポニンであって、サポニン、ここではSO1861とマレイミド基を保有するリンカーとの間のセミカルバゾン結合が関わる)およびデンドロン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)ホルマートである分子38。本発明のある態様は、分子(PP)に従うオリゴヌクレオチド複合体に関する：

【0388】

【化63】



(PP)

【0389】

この分子(PP)は共有結合的複合体化生成物であり、分子(LL)に従うサポニン-GalNAc複合体：

【0390】

10

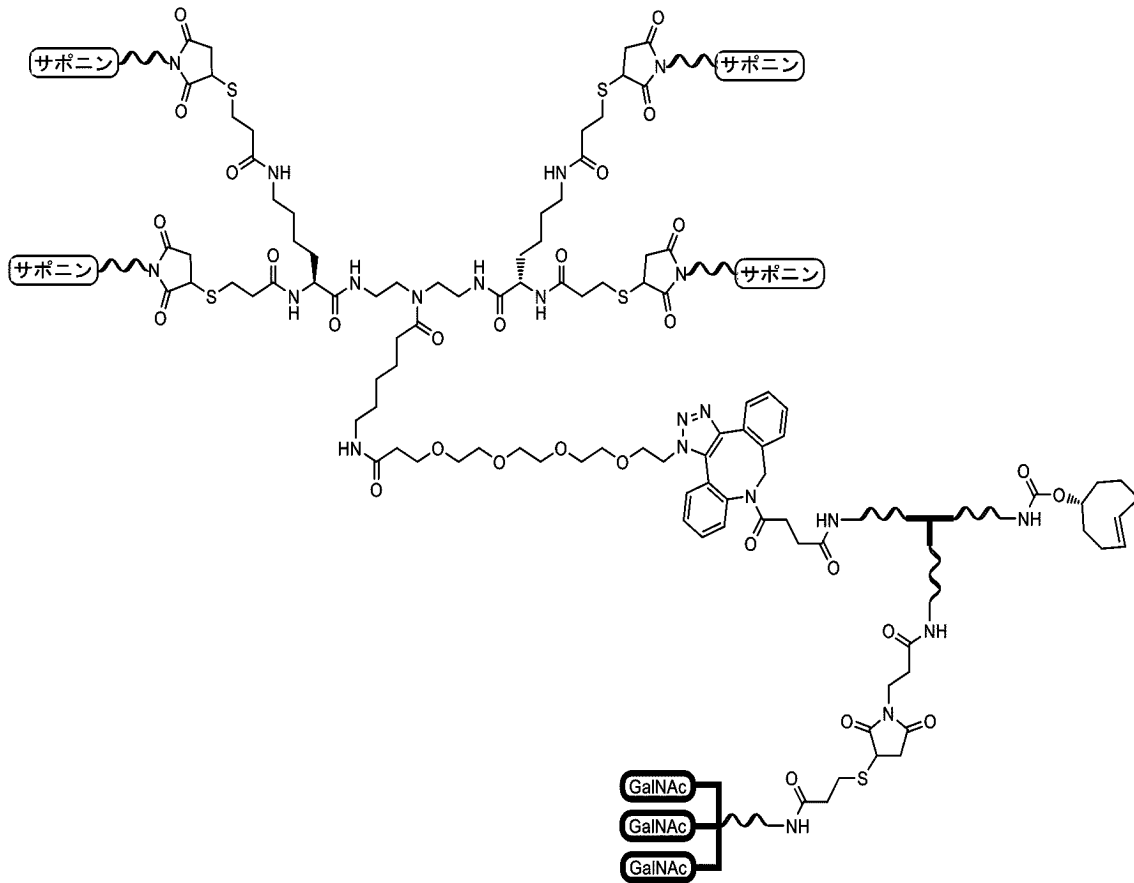
20

30

40

50

【化 6 4】



10

20

(L L)

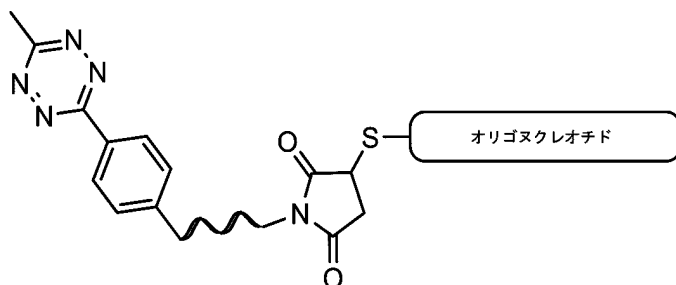
【0391】

の、分子 (G G) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られる：

30

【0392】

【化 6 5】



40

(G G)

【0393】

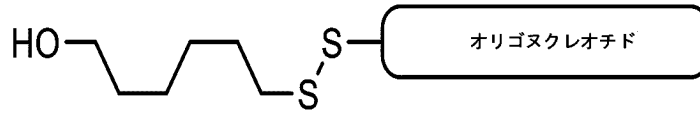
ここで、分子 (G G) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノイル) ヒドラジンイリデン) メチル) ベンズアミド) - N - (4 - (6 - メチル - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル) ベンジル) - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサペンタデカン - 15 - アミドと、分子 (H H) に従うオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間の複合体化反応の複合体

50

化生成物を表す：

【 0 3 9 4 】

【 化 6 6 】



(HH)

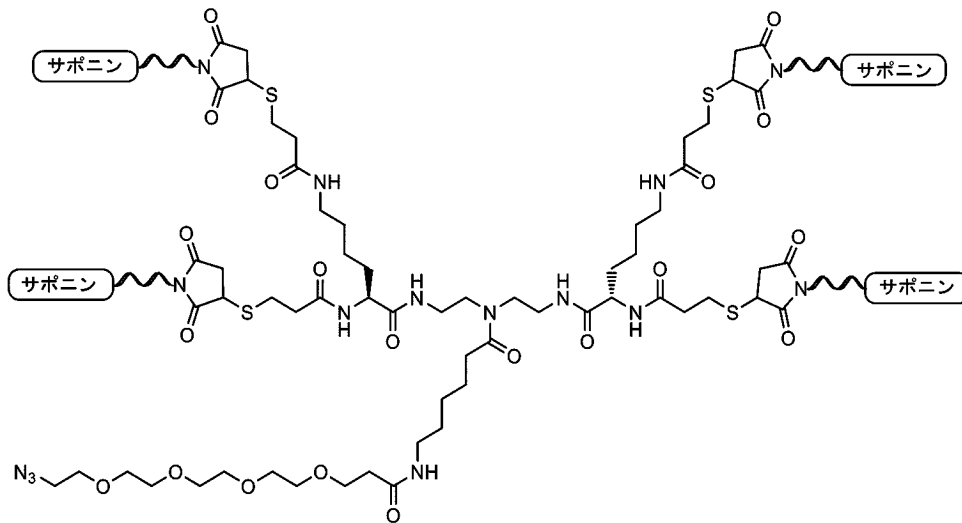
10

【 0 3 9 5 】

この分子（LL）は共有結合的複合体化生成物であり、分子（JJ）に従うサポニン誘導体：

【 0 3 9 6 】

【 化 6 7 】



(JJ)

20

30

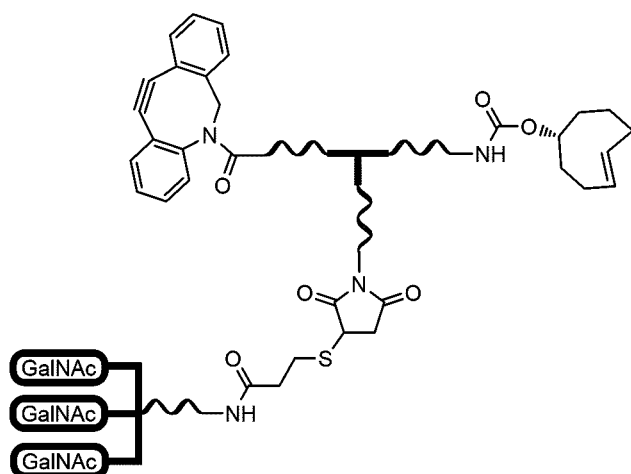
【 0 3 9 7 】

の、分子（MM）に従う三官能性リンカーおよびGalNAcの複合体との共有結合的複合体化によって得られる：

40

50

【化 6 8】



(MM)

【 0 3 9 8 】

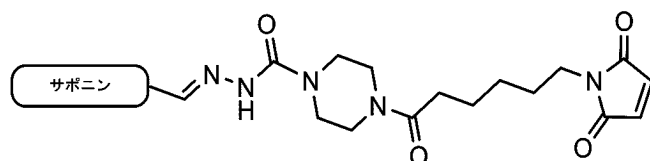
この分子（JJ）は、N，N'－（（9S，19S）－14－（6－アミノヘキサノイル）－1－メルカプト－9－（3－メルカプトプロパンアミド）－3，10，18－トリオキソ－4，11，14，17－テトラアザトリコサン－19，23－ジイル）ビス（3－メルカプトプロパンアミドの、以下との複合体化の複合体生成物である：

最初に、

分子 (K K) に従うサポニン誘導体：

【 0 3 9 9 】

【化 6 9】

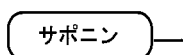

$$(KK)$$

【 0 4 0 0 】

[式中、

【 0 4 0 1 】

【化 7 0】

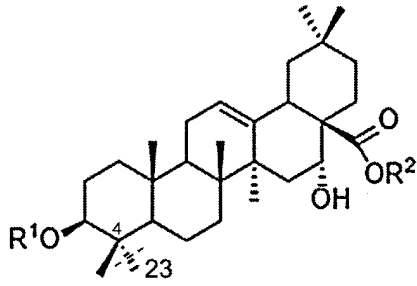


【 0 4 0 2 】

は、式（SM）に従うサポニン部分を表す：

【 0 4 0 3 】

【化 7 1】



(SM)

10

【0404】

式中、 R^1 および R^2 は、独立して、本発明に従う水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式 (SM) に従うサポニン部分は、本発明のサポニンのいずれか 1 つに従う例えば表 A 1 に挙げられている位置 C 23 にアルデヒド基を含むサポニン、例えば QS-21、SO1861、SO1832 に基づく]

ならびにその後、

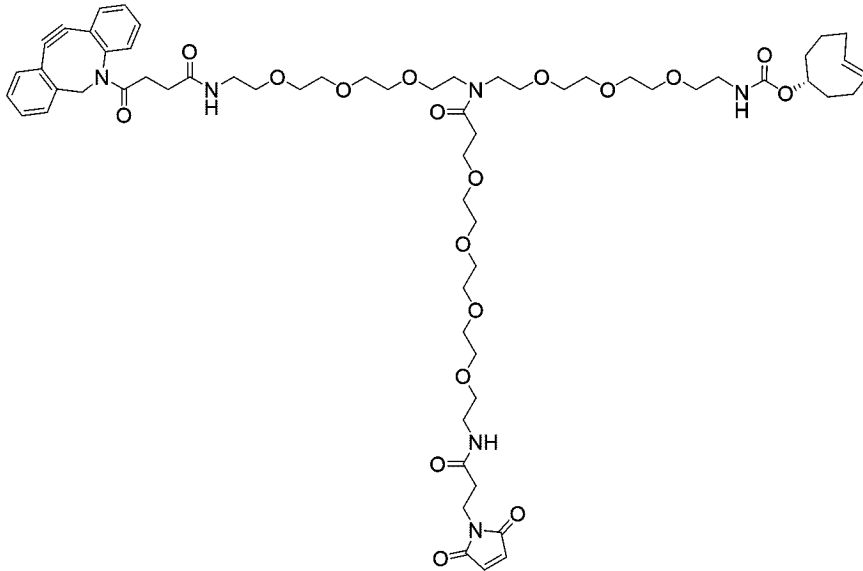
2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-オアート、

20

ここで、分子 (MM) は、式 (XXI) に従う三官能性リンカー：

【0405】

【化 7 2】



(XXI)

30

40

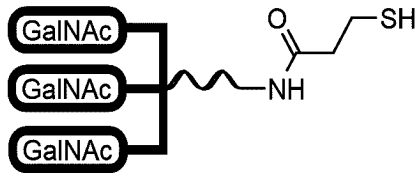
【0406】

および分子 (NN) に従う GalNAc 複合体の複合体である：

【0407】

50

【化 7 3】



(NN)

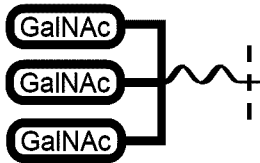
10

【0 4 0 8】

式中、

【0 4 0 9】

【化 7 4】



20

【0 4 1 0】

は、この上で詳述されている分子（DD1）または分子（DD2）、好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）または分子（DD4）、より好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）に従うトリGalNAc複合体を表す。

【0 4 1 1】

4つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の例は、分子22として図36Eに提示されるオリゴヌクレオチド複合体である。4つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の合成は、この下の実施例の項において分子22（図36E）の合成の詳細な記載によって例示され、図36において提示される。サポニン部分はデンドロンにリンカーを介して連結され、ここで、各サポニン部分はリンカーにヒドラゾン結合を介して連結される。4つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体のさらなる例は、分子42として図39Fに提示されるオリゴヌクレオチド複合体である。4つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の合成は、この下の実施例の項において分子42（図39F）の合成の詳細な記載によって例示され、図39において提示される。サポニン部分はデンドロンにリンカーを介して連結され、ここで、各サポニン部分はリンカーにセミカルバゾン結合を介して連結される。この上の分子（KK）に従うサポニン誘導体をもまた参照。

30

【0 4 1 2】

ある実施形態は、8つのサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体である。先述の通り、以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、GalNAc部分、単一のサポニンまたは1つよりも多くのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは、三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

40

【0 4 1 3】

ある実施形態は、デンドロン、好ましくはG3デンドロンに共有結合されされた8つの

50

サポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体である。かかる（G3）デンドロンの例は、（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)ヘキサナミド]ヘキサナミド]エチル}ヘキサナミド)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)ヘキサナミド]ペンチル]-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミドである。8つのサポニン部分に連結されたデンドロンの合成は、例えば図40Aおよび実施例の項において、以下からの(form)中間体25(分子44)の合成について提示される：分子37(マレイミドに連結されたサポニンであって、サポニン、ここではSO1861とマレイミド基を保有するリンカーとの間のセミカルバゾン結合に関わる)、およびデンドロン(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)ヘキサナミド]ヘキサナミド]エチル}ヘキサナミド)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)ヘキサナミド]ペンチル]-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミドホルマートである分子43。

10

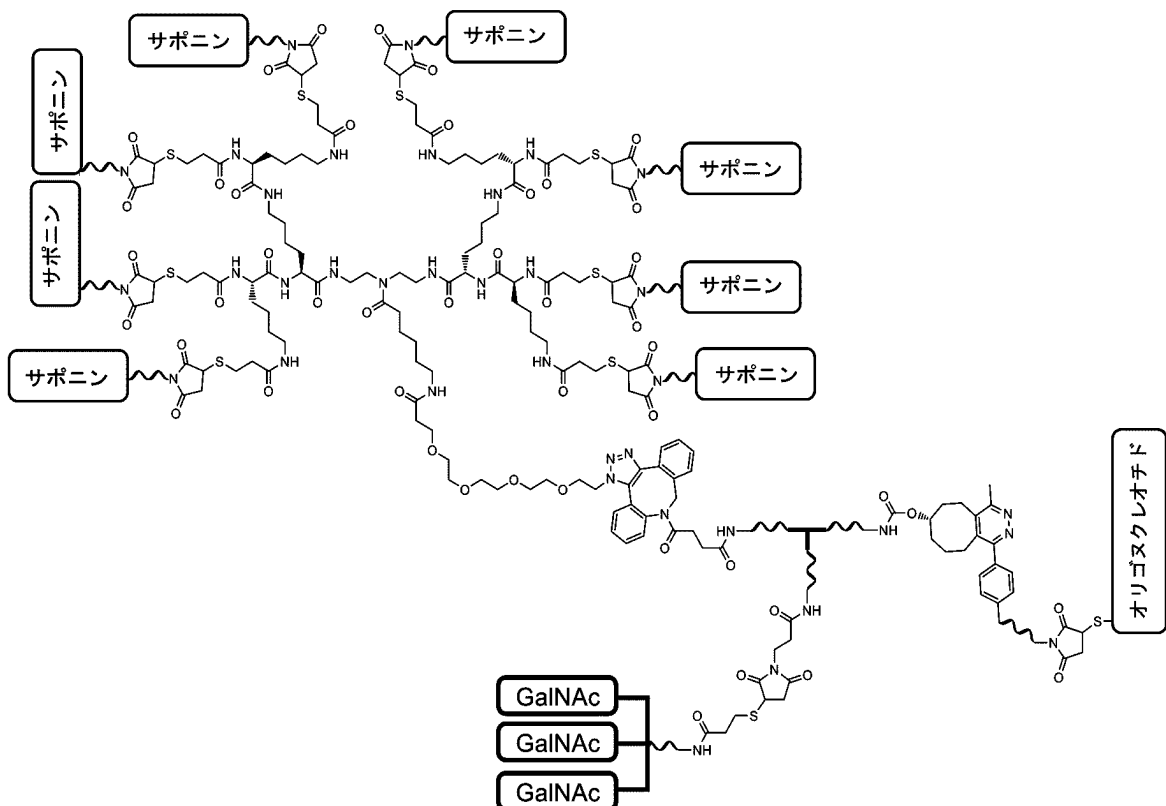
【0414】

本発明のある態様は、分子(SS)に従うオリゴヌクレオチド複合体に関する：

【0415】

【化75】

20



30

40

(SS)

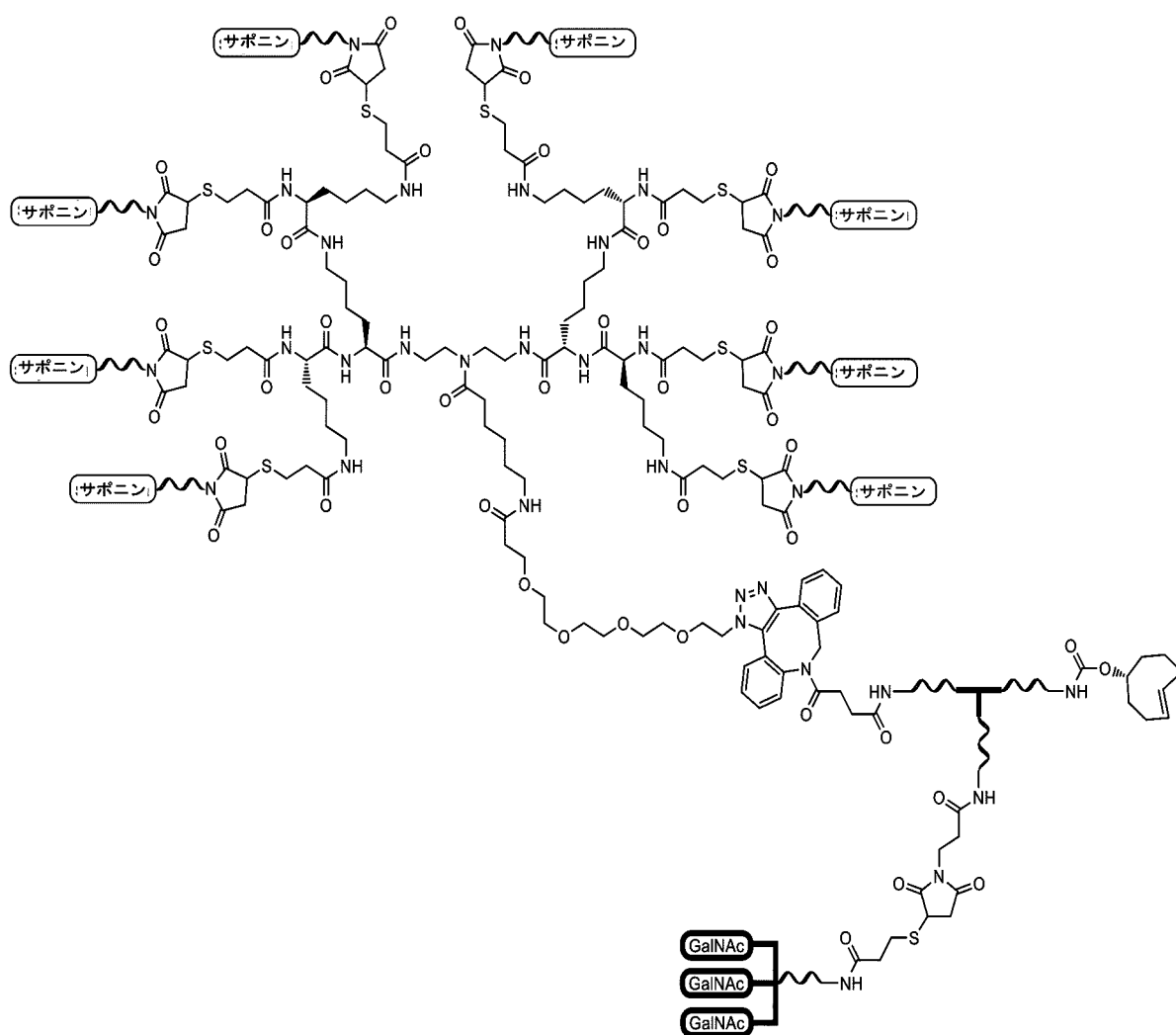
【0416】

この分子(SS)は共有結合的複合体化生成物であり、分子(RR)に従うサポニン-GalNAc複合体：

【0417】

50

【化 7 6】



10

20

30

(R R)

【0418】

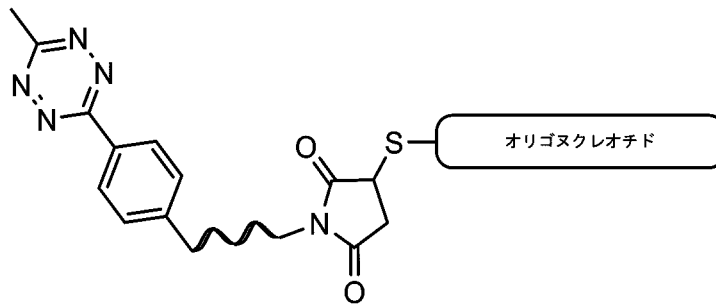
の、分子（GG）に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られる：

【0419】

40

50

【化 7 7】



10

(G G)

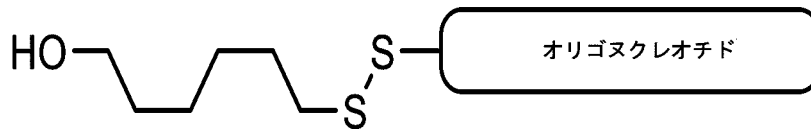
【0 4 2 0】

ここで、分子 (G G) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 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 - アミドと、分子 (H H) に従うオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す：

20

【0 4 2 1】

【化 7 8】



30

(H H)

【0 4 2 2】

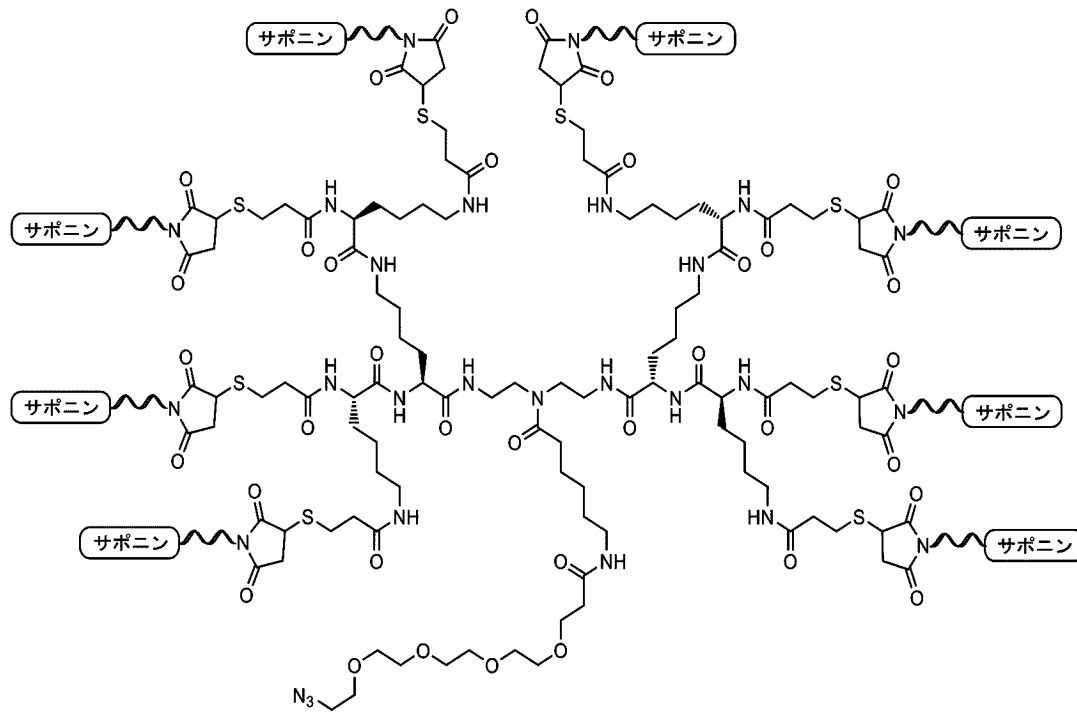
この分子 (R R) は共有結合的複合体化生成物であり、分子 (Q Q) に従うサポニン誘導体：

【0 4 2 3】

40

50

【化 7 9】



10

20

(Q Q)

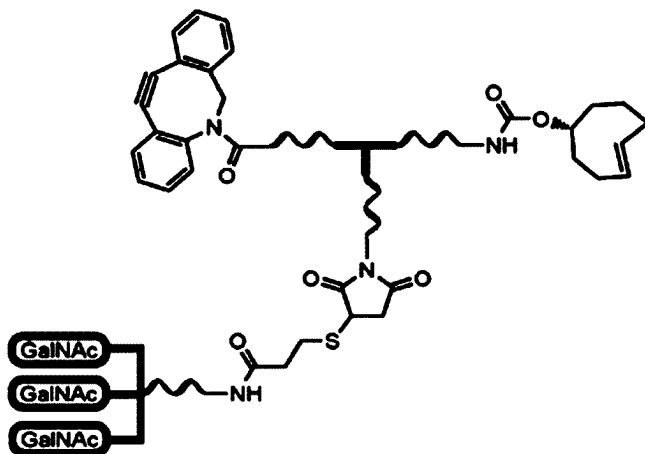
【 0 4 2 4】

の、分子 (MM) に従う三官能性リンカーおよび G a l N A c の複合体との共有結合的複合体化によって得られる：

【 0 4 2 5】

【化 8 0】

30



40

(MM)

【 0 4 2 6】

この分子 (Q Q) は、(2 S) - N - [(1 S) - 1 - { [2 - (6 - アミノ - N - { 2 - [(2 S) - 2, 6 - ビス [(2 S) - 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 - [(2 S) - 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]

50

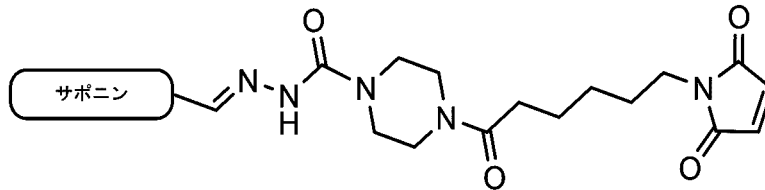
ド]ペンチル]-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサンアミドホルマートの、以下との複合体化の複合体生成物である：

最初に、

(a) 分子(KK)に従うサポニン誘導体：

【0427】

【化81】



10

(KK)

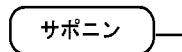
【0428】

[式中、

【0429】

【化82】

20

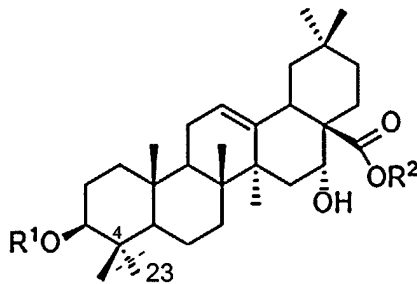


【0430】

は、式(SM)に従うサポニン部分を表す：

【0431】

【化83】



30

(SM)

【0432】

式中、 R^1 および R^2 は、独立して、本発明に従う水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式(SM)に従うサポニン部分は、本発明のサポニンのいずれか1つに従う例えば表A1に挙げられている位置C23にアルデヒド基を含むサポニン、例えばQS-21、SO1861、SO1832に基づく]、

40

ならびにその後に、

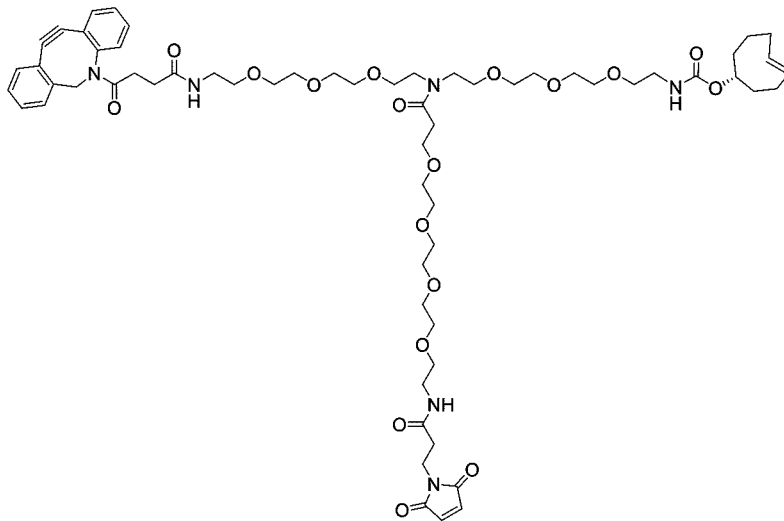
(b) 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-オアート、

ここで、分子(MM)は、式(XXI)に従う三官能性リンカー：

【0433】

50

【化 8 4】



10

(X X I)

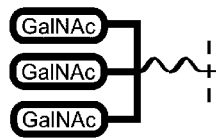
【 0 4 3 4】

20

および分子（NN）に従うGalNAc複合体（この上参照）の複合体であり、ここで、

【 0 4 3 5】

【化 8 5】



【 0 4 3 6】

30

は、この上で詳述されている分子（DD1）または分子（DD2）、好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）または分子（DD4）、より好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）に従うトリGalNAc複合体を表す。

【 0 4 3 7】

8つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の例は、分子26として図37Cに提示されるオリゴヌクレオチド複合体である。8つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の合成は、この下の実施例の項において分子26（図37C）の合成の詳細な記載によって例示され、図37において提示される。サポニン部分はデンドロンにリンカーを介して連結され、ここで、各サポニン部分はリンカーにヒドラゾン結合を介して連結される。8つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体のさらなる例は、分子47として図40Dに提示されるオリゴヌクレオチド複合体である。8つのサポニン部分を含む本発明のかかるオリゴヌクレオチド複合体の合成は、この下の実施例の項において分子47（図40D）の合成の詳細な記載によって例示され、図40において提示される。サポニン部分はデンドロンにリンカーを介して連結され、ここで、各サポニン部分は別個のリンカーにセミカルバゾン結合を介して連結される。この上の分子（KK）に従うサポニン誘導体もまた参照。

40

【 0 4 3 8】

以下を含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：1つのサポニン部分または4つのサポニン部分、好ましくは4つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG2デンドロン、例えば、例えばN，N'－（（9S，19S）－14－（6－アミノヘ

50

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) に共有結合されるか、あるいは8つのサポニン部分、好ましくは8つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG3デンドロン、例えば、例えば(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) ヘキサジアミド] ヘキサジアミド] エチル} ヘキサジアミド] 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) ヘキサジアミド] ペンチル] - 2, 6 - ビス(3 - スルファニルプロパンアミド) ヘキサジアミドに共有結合される。

10

【0439】

ある実施形態は、本発明に従いかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は、この上でおよび表A1で挙げられているサポニンのいずれか1つに従うサポニンに基づく。

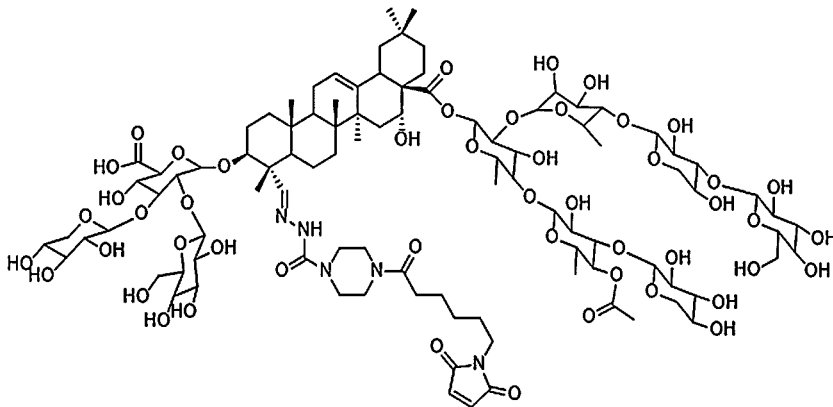
【0440】

以下の、本発明に従いかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体が好ましい：オリゴヌクレオチド複合体が、SO1861、SO1832、およびQS-21、好ましくはSO1861およびSO1832、より好ましくはSO1861またはSO1832から選択されるサポニンに基づく。サポニンがSO1861であるときに、分子(VII) aに従うサポニン誘導体：

20

【0441】

【化86】



30

(VII) a

【0442】

は、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも1つのGalNAc部分と複合体化されて、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供する。

40

【0443】

以下の、本発明に従いかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体もまた好ましい：セミカルバゾン官能基が、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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においてインビボで加水分解を受ける。

【0444】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、複合体に含まれるサポニンは以下のいずれか1つ以上である：

50

a) 以下のリストAのいずれか1つ以上から選択されるサポニン:

— キラヤ・サポナリアサポニン混合物、またはキラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、例えば Q u i l - A、Q S - 17 - a p i、Q S - 17 - x y l、Q S - 21、Q S - 21 A、Q S - 21 B、Q S - 7 - x y l、

— ジブソフィラ・エレガンスサポニン混合物、またはジブソフィラ・エレガンスから単離されるサポニン、

— サポニナム・アルBUMサポニン混合物、またはサポニナム・アルBUMから単離されるサポニン、

— サポナリア・オフィシナリスサポニン混合物、またはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、および

— キラヤ樹皮サポニン混合物、またはキラヤ樹皮から単離されるサポニン、例えば Q u i l - A、Q S - 17 - a p i、Q S - 17 - x y l、Q S - 21、Q S - 21 A、Q S - 21 B、Q S - 7 - x y l、あるいは

b) 以下のリストBから選択される、ジブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン:

S A 1641、ジブソシドA、N P - 017772、N P - 017774、N P - 017777、N P - 017778、N P - 018109、N P - 017888、N P - 017889、N P - 018108、S O 1658、およびフィトラッカゲニン、あるいは

c) 以下のリストCから選択される、キラヤ酸アグリコンコア構造を含むサポニン: A G 1856、A G 1、A G 2、アグロステモシドE、G E 1741、ジブソフィラサポニン1 (G y p 1)、N P - 017674、N P - 017810、N P - 003881、N P - 017676、N P - 017677、N P - 017705、N P - 017706、N P - 017773、N P - 017775、S A 1657、サポナリオシドB、S O 1542、S O 1584、S O 1674、S O 1700、S O 1730、S O 1772、10 S O 1832、S O 1861、S O 1862、S O 1904、Q S - 7、Q S - 7 a p i、Q S - 17、Q S - 18、Q S - 21 A - a p i o、Q S - 21 A - x y l o、Q S - 21 B - a p i o、およびQ S - 21 B - x y l o、あるいは

d) 以下のリストDから選択される、アグリコンのC23位置にアルデヒド基なしの12, 13-デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン:

エスシンI a、エスシナート、アルファーヘデリン、A M A - 1、A M R、A S 6. 2、A S 64 R、アッサムサポニンF、ディブサコシドB、エスクレントシドA、マ克蘭トイジンA、N P - 005236、N P - 012672、プリムラ酸1、サイコサポニンA、サイコサポニンD、ティーシードサポニンI、およびティーシードサポニンJ。

好ましくは、サポニンは、リストA、B、またはCから選択されるサポニン、より好ましくはリストBまたはCから選択されるサポニン、さらにより好ましくは、リストCから選択されるサポニンのいずれか1つ以上である。

【0445】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体が好ましい: サポニンが、A G 1856、G E 1741、キラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、Q u i l - A、Q S - 17、Q S - 21、Q S - 7、S A 1641、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、サポナリオシドB、S O 1542、S O 1584、S O 1658、S O 1674、S O 1700、S O 1730、S O 1772、S O 1832、S O 1861、S O 1862、およびS O 1904のいずれか1つ以上であり、好ましくは、ここで、サポニンはQ S - 21、S O 1832、S O 1861、S A 1641、およびG E 1741のいずれか1つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンはQ S - 21、S O 1832、またはS O 1861であり、最も好ましくはS O 1861である。

【0446】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体もまた好ましい: サポニンが、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニンであり、好ましくは、ここで、サポニンは、サポナリオシドB、S O 1542、S O 1584、S O 1658、S O 1674、S O 170

10

20

30

40

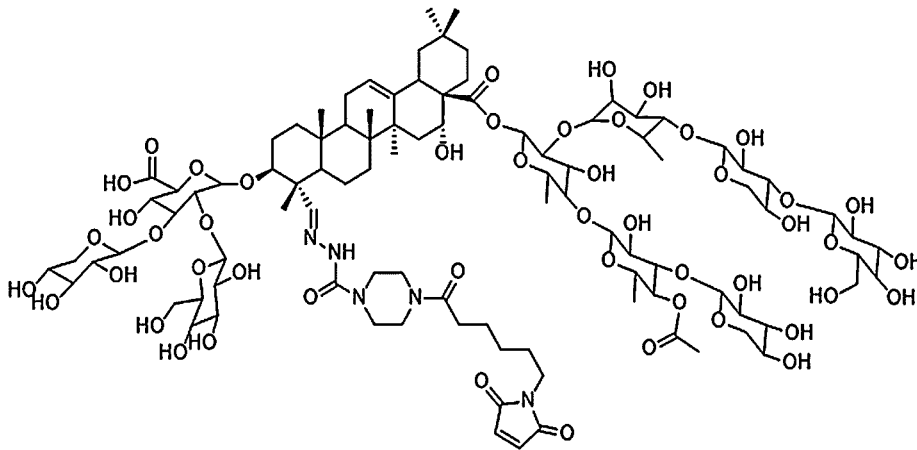
50

0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2、および S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンは、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 7 0 0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2、および S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンは、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、および S O 1 8 6 2 のいずれか 1 つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンは S O 1 8 3 2 および S O 1 8 6 1 であり、最も好ましくは S O 1 8 6 1 である。

【0447】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、サポニンは S O 1 8 6 1 であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は、分子 (V I I) a に従う S O 1 8 6 1 サポニン誘導体：

【化 8 7】



(V I I) a

【0448】

の、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも 1 つの G a l N A c 部分との複合体化によって提供されて、オリゴヌクレオチド複合体を提供する。

【0449】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、上記複合体に含まれるオリゴヌクレオチドは、150 nt よりも長くない核酸として定められ、好ましくは、ここで、オリゴヌクレオチドは 5 ~ 150 nt のサイズを有し、好ましくは 8 ~ 100 nt であり、最も好ましくは 10 ~ 50 nt である。

【0450】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、セミカルバゾン官能基は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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 pH 4.0 ~ 6.5 において、より好ましくは pH ≤ 5.5 においてインビボで加水分解を受ける。上記加水分解によって、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンのまたはサポニン部分のアルデヒド基が形成される。

【0451】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、ヒドラゾン官能基は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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 pH 4.0 ~ 6.5 において、より好ましくは pH ≤ 5.5 においてインビボで加水分解を受ける。上記加水分解によって、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンのまたはサポニン部分のアルデヒド基が形成される。

【0452】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子 (E E)、(

10

20

30

40

50

PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、AON、例えばBNA、ゼノ核酸、siRNAのいずれか1つである。

【0453】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか1つ以上から選択される：短鎖干渉RNA(sirNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、アンチヘアピン形状のマイクロRNA(miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA(dsRNA)、アンチマイクロRNA(アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸(LNA)、架橋型核酸(BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸(BNA^C)、BNAに基づくsirNA、およびBNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド(BNA-AON)。

【0454】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか1つ以上から選択される：アンチmiRNA、BNA-AON、またはsiRNA、例えば、BNAに基づくsiRNAであって、化学修飾されたsiRNA、代謝的に安定なsiRNA、および化学修飾された代謝的に安定なsiRNAから選択される。

【0455】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B(apoB)、HSP27、トランスサイレチン(TTR)、プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシシン9型(PCSK9)、TMPRSS6、デルターアミノレブリン酸シンターゼ1(ALAS1)、アンチトロニン3(AT3)、グリコール酸オキシダーゼ(GO)、補体構成要素C5(CC5)、B型肝炎ウイルス(HBV)のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファ-1アンチトリプシン(AAT)、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、および乳酸脱水素酵素(LDH)のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

【0456】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B(apoB)およびHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである。

【0457】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子(EE)、(PP)、および(SS)のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoB、HSP27、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現生成物、HBVのS遺伝子の発現生成物、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、miRNA機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌原性miRNA(onco-miR)またはonco-miRの発現の

抑圧を阻害することができる。

【0458】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、以下の蛋白質のいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPA。

【0459】

ある実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む本発明に従うかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoBおよびHSP2のいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

【0460】

本発明のある態様は第2の薬学的組成物に関し、本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体と、任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む。

【0461】

本発明のある態様は、本発明の第2の薬学的組成物に、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体に関し、医薬としての使用のためである。

【0462】

本発明のある態様は、本発明の第2の薬学的組成物に、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体に関し、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0463】

本発明のある態様は、本発明の第2の薬学的組成物に、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体に関し、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0464】

ある実施形態は、本発明の第2の薬学的組成物、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、この上で概説された使用のためであり、ここで、上記使用は、遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBの発現生成物が関わる疾患または健康

10

20

30

40

50

上の問題の処置または予防において、ならびに／あるいは遺伝子HSP27およびapobのいずれか1つ以上、好ましくはapobが関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0465】

ある実施形態は、本発明の第2の薬学的組成物、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、この上で概説された使用のためであり、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、 α 1-アンチトリプシン欠乏症、 β -サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のためである。

10

【0466】

ある実施形態は、本発明の第2の薬学的組成物、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体であり、この上で概説された使用のためであり、ここで、上記使用は、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、もしくは肝細胞癌、および／または心血管疾患、例えば高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防においてである。

【0467】

本発明のある態様は、本発明の第2の薬学的組成物に、または本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体に関し、対象におけるLDLコレステロールの低下における使用のためである。好ましくは、対象はヒト対象である。

20

【0468】

本発明のかつ例えば分子（EE）、（PP）、および（SS）のいずれか1つに従うオリゴヌクレオチド複合体のサポニン、植物に由来するサポニンであるということが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは、好ましくは植物から単離されるサポニンである。例えば、サポニンは植物の根から単離される。サポニンが由来する（単離される）かかる植物の例は、キラヤ・サポナリア、ジブソフィラ・パニキュレートL、サポナリア・オフィシナリス、例えばサポナリア・オフィシナリスL、およびジブソフィラ・エレガンス、例えばジブソフィラ・エレガンスM、ピーブである。好ましくは、オリゴヌクレオチド複合体は以下を含む：単一の型のサポニン、好ましくは、植物の根などの植物材料に由来する単一の型のサポニン、例えばサポナリア・オフィシナリス（例えば、サポナリア・オフィシナリスL、好ましくはサポナリア・オフィシナリスL）（根）からのSO1861、SO1862、もしくはSO1832、または例えばキラヤ・サポナリア（根）からのQS-21、QS-7、もしくはQS-17。本発明に従うサポニン、すなわちエンドソーム脱出向上活性を提示するものを単離するための好適なソースは、キラヤ・サポナリア、ジブソフィラ・パニキュレートL、サポナリア・オフィシナリス、およびジブソフィラ・エレガンス、ならびにキラヤ樹皮である。

30

【0469】

本発明のある態様は、本発明のこの上で概説された実施形態のいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくは、その後に、上記オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを上記細胞のサイトゾルに移入するためのインビトロまたはエキスピボの方法に関し、以下のステップを含む：

40

a) その表面上にASGPRを発現する細胞を提供し、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択され、提供された細胞に移入するための本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

b) ステップa)の細胞をインビトロまたはエキスピボでステップa)のオリゴヌクレオチド複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、好ましくはそれによって、その後に、上記細胞のサイ

50

トゾルへのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をたらしこと。

【0470】

本発明はいくつかの実施形態の観点から記載されたが、それらの代替、改変、順列、および同等物は、本明細書を読むことによっておよび図面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。本発明は決して例解された実施形態に限定されない。添付の請求項によって定められる範囲から外れることなしに、変更がなされ得る。

【0471】

本発明の実施形態

1. アシアロ糖蛋白質受容体 (ASGPR) のリガンドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含むサポニン複合体であって、ここで、ASGPRのリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくは、ASGPRのリガンドは (GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなり、ここで、少なくとも1つのサポニンはモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。

10

【0472】

2. 実施形態1のサポニン複合体であって、ここで、サポニンは、以下からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含む：

20

2アルファ-ヒドロキシオレアノール酸、

16アルファ-ヒドロキシオレアノール酸、

ヘデラゲニン (23-ヒドロキシオレアノール酸)、

16アルファ, 23-ジヒドロキシオレアノール酸、

ジブソゲニン、

キラヤ酸、

プロトエスシゲニン-21 (2-メチルブタ-2-エノアート) -22-アセテート、

23-オキソ-バリントゲノールC-21, 22-ビス (2-メチルブタ-2-エノアート)、

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

30

, 22-ジアセテート、

ジギトゲニン、

3, 16, 28-トリヒドロキシオレアナ-12-エン、

ジブソゲン酸、

および

それらの誘導体。

好ましくは、サポニンは、キラヤ酸およびジブソゲニンまたはそれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造はキラヤ酸またはその誘導体である。

【0473】

3. 実施形態1または2のサポニン複合体であって、ここで、

40

・ サポニンは、以下の群Aから選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含む：

GlcA-

Glc-

Gal-

Rha- (1→2) - Ara-

Gal- (1→2) - [Xyl- (1→3)] - GlcA-

Glc- (1→2) - [Glc- (1→4)] - GlcA-

Glc- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-

Xyl- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-

50

$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \text{Gal} -$
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 2)] - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{GlcA} -$
 および
 それらの誘導体、
 あるいは
 ・ サポニン、以下の群 B から選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含む：

$\text{Glc} -$
 $\text{Gal} -$
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Ara} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$
 $\text{Ara} -$
 $\text{Xyl} -$
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R1} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$ であって、
 ここで、R1 は 4 E-メトキシケイ皮酸である、
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R2} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$ であって、
 ここで、R2 は 4 Z-メトキシケイ皮酸である、
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Gal} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - 4 - \text{OAc} - \text{F}$

u c -、

X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 3, 4 - ジ - O
A c - F u c -、

X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - [R 3 - (→ 4
)] - 3 - O A c - F u c -であって、ここで、R 3は4 E - メトキシケイ皮酸である、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 →
2) - 4 - O A c - F u c -、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c
-、

(A r a - または X y l -) (1 → 3) - (A r a - または X y l -) (1 → 4) - (R h a - または F u c -) (1 → 2) - [4 - O A c - (R h a - または F u c -) (1
→ 4)] - (R h a - または F u c -)、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [Q u i - (1 → 4
)] - F u c -、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 →
2) - F u c -、

X y l - (1 → 4) - [G a l - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - F u c -、

X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - F u c -、

A r a / X y l - (1 → 4) - R h a / F u c - (1 → 4) - [G l c / G a l - (1
→ 2)] - F u c -、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 →
2) - [R 4 - (→ 4)] - F u c -であって、ここで、R 4は5 - O - [5 - O - A r
a / A p i - 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 - オクタノール)である、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R 5 - (→ 4)]
- F u c -であって、ここで、R 5は5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 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 - オクタノ
ール)である、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R h a - (1 → 3
)] - 4 - O A c - F u c -、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 →
2) - [R h a - (1 → 3)] - 4 - O A c - F u c -、

6 - O A c - G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [3 -
O A c - R h a - (1 → 3)] - F u c -、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [3 - O A c - R
h a - (1 → 3)] - F u c -、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [Q u i - (1 → 4
)] - F u c -、

G l c - (1 → 3) - [X y l - (1 → 4)] - R h a - (1 → 2) - [Q u i - (1
→ 4)] - F u c -、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3
)] - 4 - O A c - Q u i - (1 → 4)] - F u c -、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [3, 4 - ジ - O A
c - Q u i - (1 → 4)] - F u c -、

G l c - (1 → 3) - [X y l - (1 → 4)] - R h a - (1 → 2) - F u c -、

6 - O A c - G l c - (1 → 3) - [X y l - (1 → 4)] - R h a - (1 → 2) - F
u c -、

G l c - (1 → 3) - [X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4)] - R h a - (1 →
2) - F u c -、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [X y l - (1 → 3

10

20

30

40

50

) - 4 - OAc - Qui - (1 → 4)] - Fuc -、

Api / Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - [Glc - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - [Rha - (1 → 3)] - 4 OAc - Fuc -、

Api - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - [Glc - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - [Rha - (1 → 3)] - 4 OAc - Fuc -、

Api / Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - [Glc - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - [R6 - (→ 4)] - Fuc -であって、ここで、R6は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)である、

Api / Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - [Glc - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - [R7 - (→ 4)] - Fuc -であって、ここで、R7は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)である、

Api / Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - [Glc - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - [R8 - (→ 4)] - Fuc -であって、ここで、R8は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)である、

Api - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R9 - (→ 4)] - Fuc -であって、ここで、R9は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)である、

Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R10 - (→ 4)] - Fuc -であって、ここで、R10は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)である、

Api - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R11 - (→ 3)] - Fuc -であって、ここで、R11は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)である、

Xyl - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R12 - (→ 3)] - Fuc -であって、ここで、R12は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)である、

Glc - (1 → 3) - [Glc - (1 → 6)] - Gal -、および

それらの誘導体、

あるいは

・ サポニン はビスデスモシド型トリテルペングリコシドであり、アグリコンコア構造に結合された群Aから選択される第1の糖鎖を含み、かつアグリコンコア構造に結合された群Bから選択される第2の糖鎖を含む。

【0474】

4. 実施形態1～3のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニンは、以下からなる群から選択される：キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシドA、フィトラッカゲニン、エスシナート、AS6. 2、NP-005236、AMA-1、AMR、アルファヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AEX55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO

1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo、ベータ-エスシン、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、およびAS64R、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくは、サポニンはSO1861誘導体である。

10

【0475】

5. 実施形態3または4のサポニン複合体であって、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i. サポニン誘導体は、誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含むか、

ii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3において定められる群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているカルボキシル基を含むか、

iii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3において定められる群Bから選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含むか、あるいは

20

iv. サポニン誘導体は、誘導体化i、ii、およびiiiのいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化i、ii、およびiiiの2つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

【0476】

6. 実施形態1～5のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニンは以下のいずれか1つ以上である：SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xylo、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xylo、QS-7-xylo、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xylo、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシドA、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくは、サポニンはSO1861誘導体である。

30

【0477】

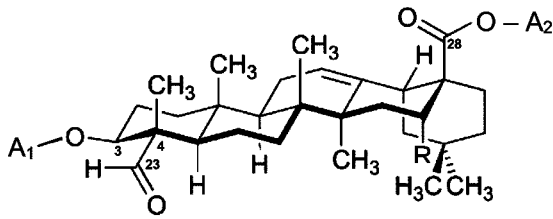
7. 実施形態1～6のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニンは、実施形態2のキラヤ酸サポニンまたはジブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子1によって表される：

40

【0478】

50

【化 8 8】



(分子 1)

10

【0 4 7 9】

式中、

A₁ は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₁ は、実施形態 3 において定められる群 A から選択される糖鎖を表し、より好ましくは、A₁ は、実施形態 3 において定められる群 A から選択される糖鎖を表し、A₁ はグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、

A₂ は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₂ は、実施形態 3 において定められる群 B から選択される糖鎖を表し、より好ましくは、A₂ は、実施形態 3 において定められる群 B から選択される糖鎖を表し、A₂ は、少なくとも 1 つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば 1、2、3、または 4 つのアセトキシ基を含み、

20

ここで、A₁ および A₂ の少なくとも 1 つは水素ではなく、好ましくは A₁ および A₂ 両方はオリゴ糖鎖であり、

R はジブソゲニンの水素またはキラヤ酸のヒドロキシルであり、

ここで、サポニン誘導体は分子 1 によって表されるサポニンに対応し、ここで、次の誘導体化の少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つまたは 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する：

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置 C₂₃ におけるアルデヒド基が誘導体化されている、

ii. A₁ が実施形態 3 において定められる群 A から選択される糖鎖を表し、A₁ がグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなるときに、A₁ のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている、ならびに

30

iii. A₂ が実施形態 3 において定められる群 B から選択される糖鎖を表し、A₂ が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含むときに、A₂ の 1 つの糖部分のまたは 2 つ以上の糖部分のアセトキシ基の 1 つ以上、好ましくは全てが誘導体化されている。

【0 4 8 0】

8. 実施形態 7 のサポニン複合体であって、ここで、A₁ は、実施形態 3 において定められる群 A から選択される糖鎖を表し、グルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、ここで、A₁ のグルクロン酸部分のカルボキシル基は誘導体化されており、および／またはここで、A₂ は実施形態 3 において定められる群 B から選択される糖鎖を表し、A₂ は少なくとも 1 つのアセトキシ基を含み、ここで、A₂ の少なくとも 1 つのアセトキシ基は誘導体化されている。

40

【0 4 8 1】

9. 実施形態 7 または 8 のサポニン複合体であって、ここで、分子 1 によって表されるサポニンはビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【0 4 8 2】

10. 実施形態 7 ～ 9 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、サポニン誘導体は分子 1 によって表されるサポニンに対応し、ここで、次の誘導体化の少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つまたは 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する：

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置 C₂₃ におけるアルデヒド基が、以下によ

50

て誘導体化されている：

－ アルコールへの還元、
 － $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン- $Al d-EMCH$ 、例えば $SO1861-Al d-EMCH$ または $QS-21-Al d-EMCH$ を提供し、ここで、EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

－ $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド（BMPH）との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、あるいは

－ $N-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド（KMUH）との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

i i . A_1 が実施形態 3 において定められる群 A から選択される糖鎖を表し、 A_1 がグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなるときに、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール（AMPD）または $N-(2-アミノエチル)$ マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン- $Gl u-AMPD$ 、例えば $QS-21-Gl u-AMPD$ もしくは $SO1861-Gl u-AMPD$ 、またはサポニン- $Gl u-AEM$ 、例えば $QS-21-Gl u-AEM$ もしくは $SO1861-Gl u-AEM$ を提供する、ならびに

i i i . A_2 が実施形態 3 において定められる群 B から選択される糖鎖を表し、 A_2 が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含むときに、 A_2 の 1 つの糖部分のまたは 2 つ以上の糖部分のアセトキシ基の 1 つ以上、好ましくは全てが、脱アセチル化によるヒドロキシル基（HO-）への変換によって誘導体化されている。

【0483】

1 1 . 実施形態 7 ～ 1 0 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、 A_1 は $Gal-(1 \rightarrow 2)-[Xyl-(1 \rightarrow 3)]-GlcA$ であり、および／または A_2 は $Glc-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)-Rha-(1 \rightarrow 2)-[Xyl-(1 \rightarrow 3)-4-OAc-Qui-(1 \rightarrow 4)]-Fuc$ であり、好ましくは、分子 1 によって表されるサポニンは 3-O-ベータ-D-ガラクトピラノシル-(1 → 2)-[ベータ-D-キシロピラノシル-(1 → 3)]-ベータ-D-グルクロノピラノシルキラヤ酸 28-O-ベータ-D-グルコピラノシル-(1 → 3)-ベータ-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-D-キシロピラノシル-(1 → 3)-4-OAc-ベータ-D-キノボピラノシル-(1 → 4)]-ベータ-D-フコピラノシドであり、より好ましくは、サポニンは、 $SO1861$ 、 $GE1741$ 、 $SA1641$ 、および $QS-21$ 、またはその誘導体、最も好ましくは $SO1861$ またはその誘導体のいずれか 1 つ以上である。

【0484】

1 2 . 実施形態 5 ～ 1 1 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i . サポニン誘導体は、以下によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含むか：

－ アルコールへの還元、
 － $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン- $Al d-EMCH$ 、例えば $SO1861-Al d-EMCH$ または $QS-21-Al d-EMCH$ を提供し、ここで、EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

－ $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド（BMPH）との反応によるヒド

10

20

30

40

50

ラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、あるいは

－ N－[κ－マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド(KMUH)との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

i i . サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3において定められる群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖はカルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これは、2－アミノ－2－メチル－1,3－プロパンジオール(AMPD)またはN－(2－アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン－Glu－AMPD、例えばQS－21－Glu－AMPDもしくはSO1861－Glu－AMPD、またはサポニン－Glu－AEM、例えばQS－21－Glu－AEMもしくはSO1861－Glu－AEMを提供するか、

i i i . サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3で定められている群Bから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、脱アセチル化によるヒドロキシル基(HO－)への変換によって誘導体化されているアセトキシ(Me(CO)O－)基を含むか、あるいは

i v . サポニン誘導体は、誘導体化i、i i、およびi i iのいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化i、i i、およびi i iの2つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

好ましくは、サポニン誘導体は、アグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造は、EMCHとの反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、ここで、EMCHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される。

【0485】

13 . 実施形態12のサポニン複合体であって、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i . サポニン誘導体は、N－ε－マレイミドカブロン酸ヒドラジド(EMCH)との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、それによって、サポニン－Al d－EMCH、例えばSO1861－Al d－EMCHまたはQS－21－Al d－EMCHを提供するか、

i i . サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3において定められる群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖はカルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これは、N－(2－アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン－Glu－AEM、例えばQS－21－Glu－AEMまたはSO1861－Glu－AEMを提供するか、あるいは

i i i . サポニン誘導体が誘導体化iおよびi iの組み合わせを含む。

【0486】

14 . 実施形態12のサポニン複合体であって、ここで、サポニン誘導体はアグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造はアルデヒド基を含み、ここで、サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態3において定められる群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、このグルクロン酸部分は、N－(2－アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている。

【0487】

15 . 実施形態1～12のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニンは分子2によって表されるサポニン誘導体である：

【0488】

10

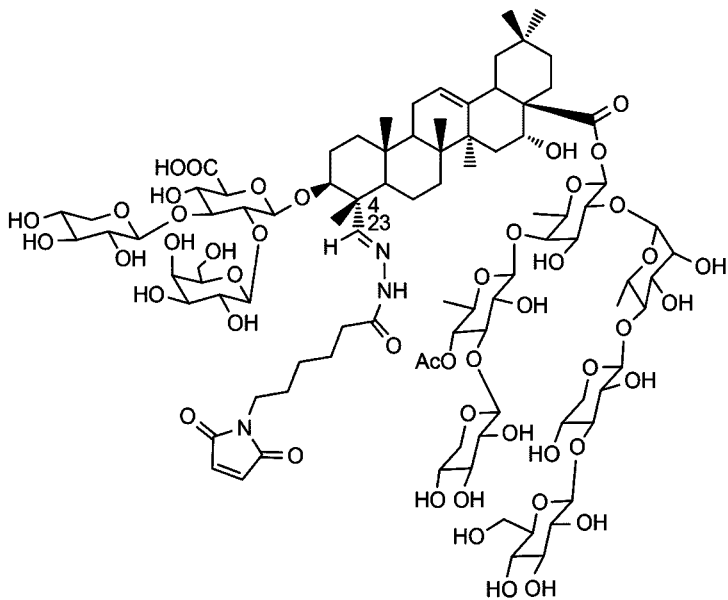
20

30

40

50

【化 8 9】



10

(分子 2)

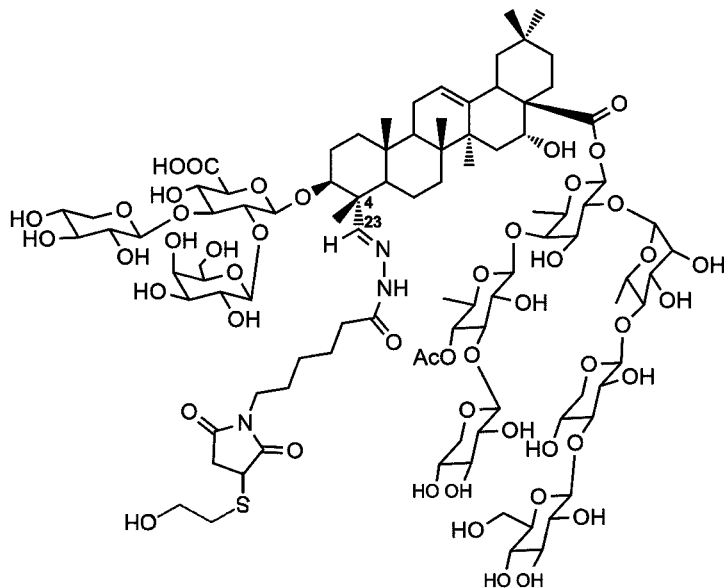
20

【 0 4 8 9】

または、ここで、サポニンは分子 3 によって表されるサポニン誘導体である：

【 0 4 9 0】

【化 9 0】



30

40

(分子 3)。

【 0 4 9 1】

16. 実施形態 1～15 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、少なくとも 1 つのサポニンおよび ASGPR のリガンドは、直接的にまたは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合的に連結される。

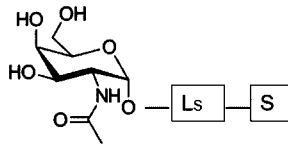
【 0 4 9 2】

50

17. 実施形態1～16のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、G a l N A c 部分は、サポニンSに、好ましくはサポニンリンカーL sを介して、式(I I) sに示される通り結合される：

【0493】

【化91】



10

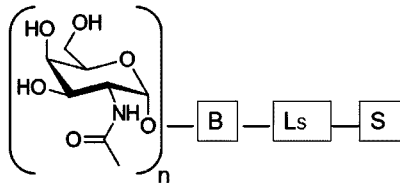
(I I) s。

【0494】

18. 実施形態1～16のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、G a l N A c 部分はG a l N A c 部分の位置「1」の酸素を介して中心的な架橋部分Bにそれぞれが別個に共有結合され、これが、G a l N A c 部分およびサポニン部分の間の架橋を、好ましくはサポニン部分リンカーL sを介して、式(I I I) sに示される通り有効に形成する：

【0495】

【化92】



20

(I I I) s

30

【0496】

式中、nは2に等しいかまたはより大きい整数であり、好ましくはnは3であり、L sはサポニン部分リンカーであり、Sはサポニン部分である。

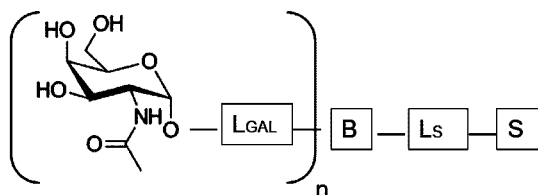
【0497】

19. 実施形態18のサポニン複合体であって、ここで、G a l N A c 部分は、架橋部分BにG a l N A c リンカーL G A Lを介して式(I V) sに示される通り結合される：

【0498】

【化93】

40



(I V) s

50

【0499】

式中、 n は2に等しいかまたはより大きい整数であり、好ましくは n は3であり、 L_s はサポニン部分リンカーであり、 S はサポニン部分である。

【0500】

20. 実施形態17～19のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、サポニンを式(I I)_SのG a l N A cにまたは式(I I I)_Sおよび(I V)_Sの架橋部分Bに共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。

【0501】

21. 実施形態17～20のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、少なくとも、G a l N A cまたは架橋部分Bに共有結合された第1の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、ここで、 L_{s1} はサポニン部分リンカー L_s の前駆体であり、これはG a l N A cにまたは架橋部分Bに共有結合され、 L_{s2} はサポニン部分リンカー L_s の前駆体であり、これはサポニン部分に共有結合される。

10

【0502】

22. 実施形態17～21のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、少なくとも、G a l N A cまたは架橋部分Bに共有結合された第1の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、ここで、カップリング反応は、アジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環、非アルドール型のカルボニル反応、および炭素-炭素二重結合への付加からなる群から選択され、好ましくは、ここで、カップリング反応は、アジド-アルキン環化付加、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、歪んだ複素環式求電子剤の求核開環であり、より好ましくは、ここで、カップリング反応はアジド-アルキン環化付加またはチオールマレイミドカップリングである。

20

【0503】

23. 実施形態17～22のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、サポニン部分リンカー L_s は、G a l N A cまたは架橋部分Bに共有結合された第1の前駆体 L_{s1} とサポニン部分に共有結合された第2の前駆体 L_{s2} との間のカップリング反応の結果であり、第1の前駆体 L_{s1} はアジドを含み、第2の前駆体 L_{s2} はアルキンを含み、好ましくは、サポニン部分のアルデヒドに対するヒドラジド/アルデヒドカップリングからもたらされるヒドラゾンを含む。

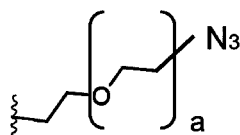
30

【0504】

24. 実施形態21～23のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、前駆体 L_{s1} の構造は式(X V I I)の次のアジドであるか：

【0505】

【化94】



40

(X V I I)

【0506】

[式中、 a は0に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は1、2、および3から選択される整数を表し、より好ましくは a は2を表す]

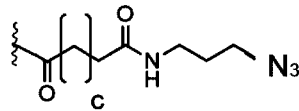
あるいは、

50

ここで、前駆体 L_{S1} の構造は式 (XVII) の次のアジドを含む：

【0507】

【化95】



(XVII)

10

【0508】

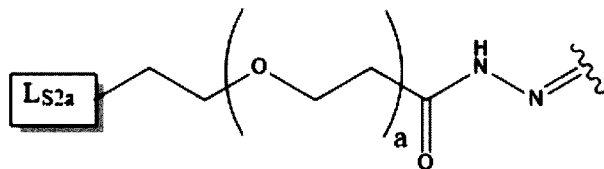
式中、 c は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは c は 5 ～ 15 の範囲の整数を表し、より好ましくは c は 9 を表す。

【0509】

25. 実施形態 21 ～ 24 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、前駆体 L_{S2} の構造は、式 (XIX) を有する次のヒドラゾンを含む：

【0510】

【化96】



(XIX)

20

【0511】

式中、 a は 0 に等しいかまたはより大きい整数を表し、好ましくは a は 2 ～ 6 の範囲の整数を表し、より好ましくは a は 4 を表し、ここで、 L_{S2a} はアルキン含有部分を表す。

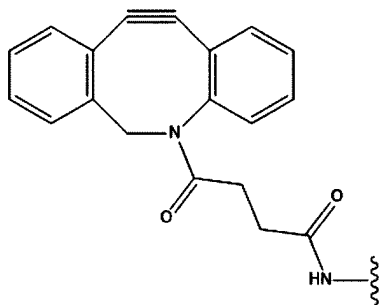
30

【0512】

26. 実施形態 25 のサポニン複合体であって、ここで、 L_{S2a} は 20 個未満の炭素原子を含み、好ましくは L_{S2a} は式 (XX) に従う部分を表す：

【0513】

【化97】



(XX)。

40

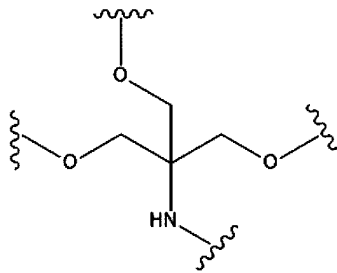
【0514】

27. 実施形態 18 ～ 26 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、架橋部分は式 (XV) の化合物である：

50

【 0 5 1 5 】

【 化 9 8 】



10

(X V)

【 0 5 1 6 】

式中、式 (X V) の化合物の酸素原子は G a l N A c にまたは G a l N A c リンカー L G A L に結合され、式 (X V) の化合物の窒素原子はサポニン部分リンカー L S に結合される。

【 0 5 1 7 】

28. 実施形態 19 ~ 27 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、L G A L は、架橋部分 B に G a l N A c を共有結合することによって好適ないずれかの化学的な部分を表す。

20

【 0 5 1 8 】

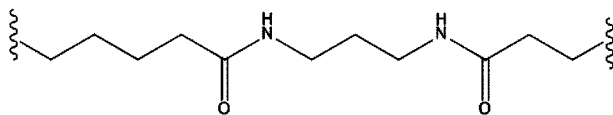
29. 実施形態 19 ~ 28 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、L G A L は 2 ~ 25 個の炭素原子、好ましくは 7 ~ 15 個の炭素原子、より好ましくは 11 個の炭素原子を含み、ここで、L G A L は少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つのアミド部分を含む。

【 0 5 1 9 】

30. 実施形態 19 ~ 29 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、L G A L は式 (X V I) に従う化合物である：

【 化 9 9 】

30



(X V I)。

【 0 5 2 0 】

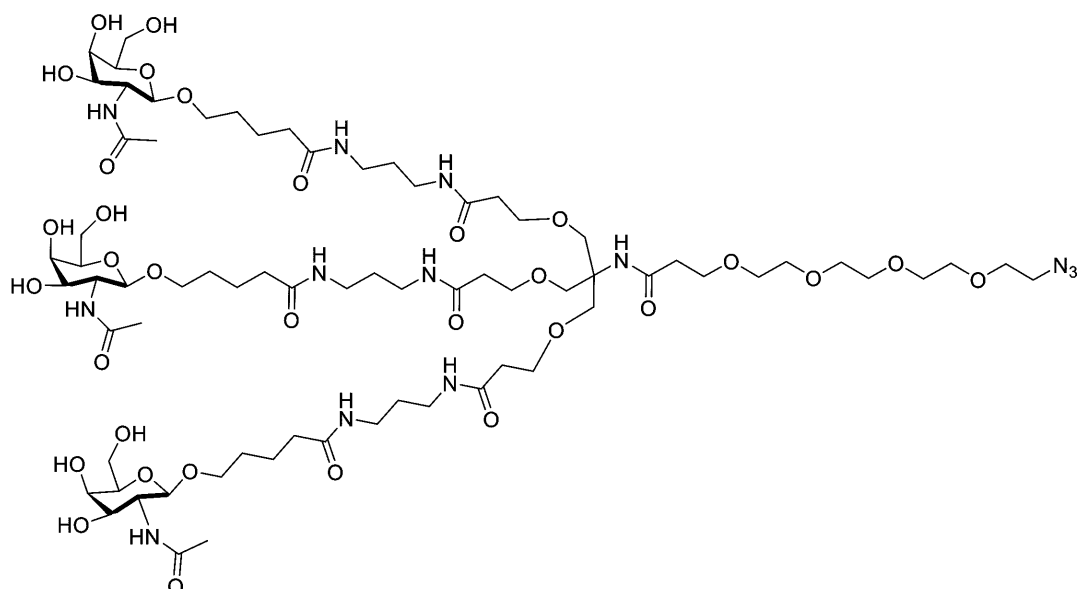
31. 実施形態 17 ~ 30 のいずれか 1 つのサポニン複合体であって、ここで、A S G P R のリガンドは、分子 (D D 3) または分子 (D D 4) によって表される (G a l N A c) ₃ T r i s である：

40

【 0 5 2 1 】

50

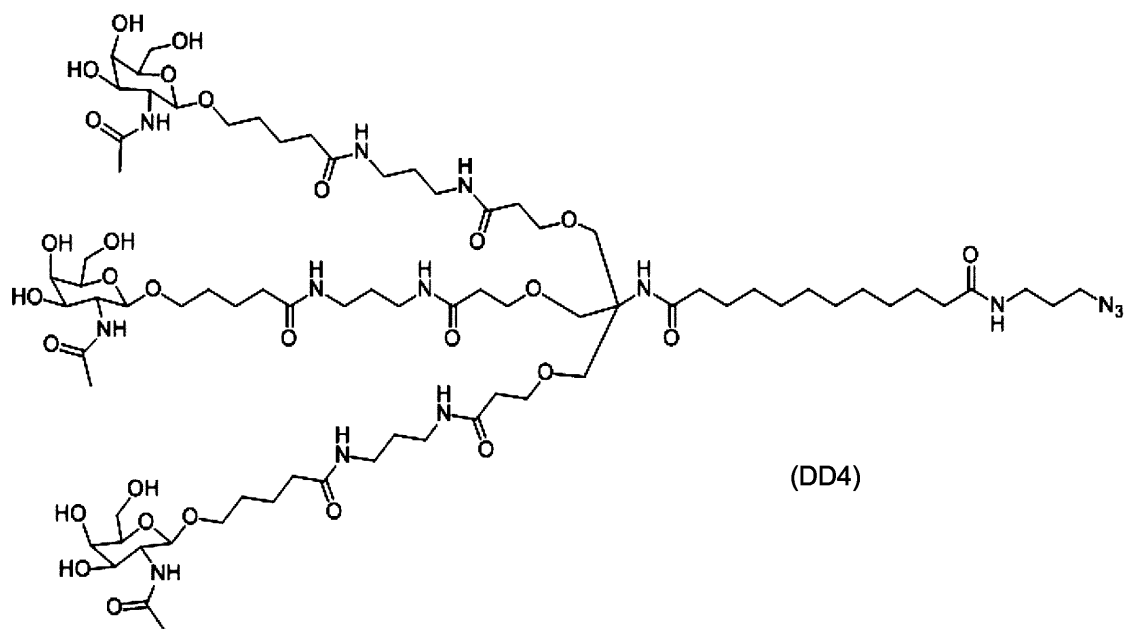
【化 1 0 0】



10

(DD3),

20



30

(DD4)

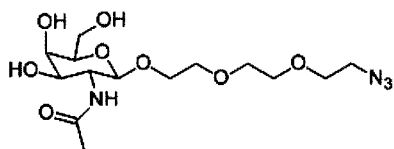
【 0 5 2 2】

あるいは、ここで、ASGPRのリガンドは分子II'によって表されるモノGalNAcである：

40

【 0 5 2 3】

【化 1 0 1】



(分子II')。

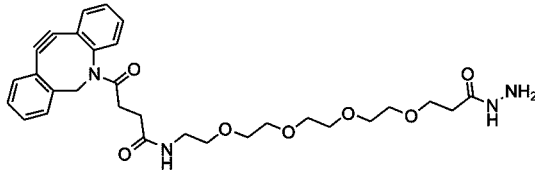
50

【0524】

32. 実施形態1～31のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、実施形態31の分子（DD3）または分子（DD4）または分子II'に、分子III'によって表されるリンカーを介して共有結合される：

【0525】

【化102】



10

(分子III')

【0526】

式中、分子III'のヒドラジド部分はサポニン上のアルデヒド基との共有結合的なヒドラゾン結合を形成し、ここで、ジベンゾシクロオクチン基は、分子（DD3）または分子（DD4）または分子II'のアジド基との共有結合を形成した。

20

【0527】

33. 実施形態1～32のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、ASGPRのリガンドに少なくとも1つの切断可能なリンカーを介して共有結合される。

【0528】

34. 実施形態33のサポニン複合体であって、ここで、切断可能なリンカーは、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、および／または光によって誘導される条件下において切断を受け、好ましくは、切断可能なリンカーは、以下から選択される切断可能な結合を含む：酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合およびヒドラジド結合、ならびに／あるいはプロテオリシス、例えばカテプシンBによるプロテオリシスに感受性の結合、ならびに／あるいはジスルフィド結合などの還元的条件下での切断に感受性の結合。

30

【0529】

35. 実施形態33または34のサポニン複合体であって、ここで、切断可能なリンカーは、例えば、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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、好ましくは、切断可能なリンカーは、pH4.0～6.5において、より好ましくはpH≤5.5においてインビボで切断を受ける。

【0530】

36. 実施形態1～35のいずれか1つのサポニン複合体であって、ここで、複合体は、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、または1～100個のサポニン部分、あるいはその間のいずれかの数のサポニン部分、例えば7、9、12個のサポニン部分を含む。

40

【0531】

37. 以下を含む薬学的な組み合わせ：

－ 第1の薬学的組成物であって、実施形態1～36のいずれか1つのサポニン複合体を含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む、ならびに

－ 第2の薬学的組成物であって、エフェクター分子およびASGPRのリガンドの第2の複合体（ここで、ASGPRのリガンドは、好ましくは少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGP

50

Rのリガンドは (G a l N A c)₃T r i s を含むかまたはそれからなる) またはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体を含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤を含む。

【0532】

38. 以下を含む、薬学的組成物：

- ー 実施形態1～36のいずれか1つのサポニン複合体、
- ー エフェクター分子およびA S G P Rのリガンドの第2の複合体（ここで、A S G P Rのリガンドは、好ましくは少なくとも1つのG a l N A c部分、好ましくは3つまたは4つのG a l N A c部分を含み、より好ましくは、A S G P Rのリガンドは (G a l N A c)₃T r i s を含むかまたはそれからなる) またはエフェクター分子および細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子の第3の複合体、

10

ならびに任意に薬学的に許容される賦形剤および／または薬学的に許容される希釈剤。

【0533】

39. 実施形態37の薬学的な組み合わせまたは実施形態38の薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子は以下の少なくとも1つを含むかまたはそれからなる：低分子、例えば薬物分子、毒素、例えば蛋白質毒素、オリゴヌクレオチド、例えばA O N、例えばB N A、ゼノ核酸、もしくはs i R N A、酵素、ペプチド、蛋白質、またはそれらのいずれかの組み合わせ。好ましくは、エフェクター分子は毒素、酵素、またはオリゴヌクレオチドである。

【0534】

20

40. 実施形態37もしくは39の薬学的な組み合わせまたは実施形態38もしくは39の薬学的組成物であって、ここで、A S G P Rのリガンドは (G a l N A c)₃T r i s を含むかまたはそれであり、ならびに／あるいはここで、A S G P Rのリガンドおよびエフェクター分子は、共有結合を介して、好ましくは少なくとも1つのリンカーを介して複合体化される。

【0535】

41. 実施形態37もしくは39～40のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～40のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子が、以下のいずれか1つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである：短鎖干渉RNA (s i R N A)、短鎖ヘアピンRNA (s h R N A)、アンチヘアピン形状のマイクロRNA (m i R N A)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (d s R N A)、アンチマイクロRNA (アンチm i R N A、アンチm i R)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (L N A)、架橋型核酸 (B N A)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (B N A^C)、B N Aに基づくs i R N A、およびB N Aに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド (B N A-A O N)。

30

【0536】

42. 実施形態37もしくは39～41のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～41のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子は、以下のいずれか1つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである：アンチm i R N A、B N A-A O N、またはs i R N A、例えば、B N Aに基づくs i R N Aであって、化学修飾されたs i R N A、代謝的に安定なs i R N A、および化学修飾された代謝的に安定なs i R N Aから選択される。

40

【0537】

43. 実施形態37もしくは39～42のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～42のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B (a p o B)、H S P 2 7、トランスサイレチン (T T R)、プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシニン9型 (P C S K 9)、デルターアミノレブリン酸シンターゼ1 (A L A S 1)、アンチトロニン3 (A T 3)、グリコール酸オキシダーゼ (G O)、補体構成要素C 5 (C

50

C 5)、B型肝炎ウイルス(HBV)のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファ-1アンチトリプシン(AAT)、および乳酸脱水素酵素(LDH)のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

【0538】

44. 実施形態37もしくは39～43のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～43のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現生成物、HBVのS遺伝子の発現生成物、AAT、およびLDHのいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときにmiRNA機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌性miRNA(onco-miR)またはonco-miRの発現の抑圧を阻害することができる。

【0539】

45. 実施形態37もしくは39～44のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～44のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、エフェクター分子は毒素であるかまたはそれを含み、この毒素は以下の少なくとも1つの分子を含むかまたはそれからなる：ペプチド、蛋白質、酵素、例えばウレアーゼおよびCreリコンビナーゼ、蛋白質性の毒素、リボソーム不活性化蛋白質、および／または細菌毒素、植物毒素のいずれか1つ以上から選択され、より好ましくは以下のいずれか1つ以上から選択される：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、シュードモナス・エルギノーザ外毒素(PE)またはPEの外毒素A、全長のまたは短縮されたジフテリア毒素(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蛋白質および2型リボソーム不活性化蛋白質の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またはジアンチン-32、サポリン、例えばサポリン-S3またはサポリン-S6、ブーガニンまたは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蛋白質、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、あるいは動物またはヒト毒素、例えばカエルRNAse、またはヒトからのグランザイムBもしくはアングリオゲニン、あるいはそのいずれかの断片または誘導体。好ましくは、蛋白質毒素は、ジアンチンおよび／またはサポリンであり、ならびに／あるい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、およびRNAを標的化する毒素の少なくとも1つ、より好ましくは、以下のいずれか1つ以上を含むかまたはそれからなる：エムタンシン、パストクス、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、ドキシソルピシン、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、SN38、DX8951f、エキサテカンメシル酸塩、シュードモナス・エルギノーザ外毒素の短縮された形態(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、およびソラブタンシン、またはその誘導体。

【0540】

46. 実施形態37もしくは39～45のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～45のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、第3の複合体に含

まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、細胞表面分子のリガンド、もしくは細胞表面分子に対する結合部位を含む抗体、または結合部位を含むその少なくとも1つのドメインもしくは断片である。

【0541】

47. 実施形態37もしくは39～46のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～46のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、第3の複合体は以下のいずれか1つ以上である：抗体－毒素複合体、受容体リガンド－毒素複合体、抗体－薬物複合体、受容体リガンド－薬物複合体、抗体－核酸複合体、または受容体リガンド－核酸複合体。

【0542】

48. 実施形態37もしくは39～47のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～47のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、第3の複合体に含まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、以下の細胞表面分子のいずれか1つに結合することができる：CD71、CD63、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、Cripito、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、アシアロ糖蛋白質受容体(ASGPR)、好ましくは、HER2、CD71、ASGPR、およびEGFRのいずれか1つ、より好ましくはCD71。

【0543】

49. 実施形態37もしくは39～48のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～48のいずれか1つの薬学的組成物であって、ここで、第3の複合体に含まれる細胞表面分子に対する結合部位を含む結合分子は、以下のいずれか1つであるかまたはそれを含む：抗体、好ましくはモノクローナル抗体、例えばヒトモノクローナル抗体、IgG、シングルドメイン抗体を含むかまたはそれからなる分子、少なくとも1つのV_Hドメイン、好ましいのはラクダV_H、可変重鎖新抗原受容体(V_{NAR})ドメイン、Fab、scFv、Fv、dAb、F(ab)₂、およびFcab断片。

【0544】

50. 医薬としての使用のための、実施形態37、39～49のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～49のいずれか1つの薬学的組成物。

【0545】

51. 実施形態37、39～49のいずれか1つの薬学的な組み合わせまたは実施形態38～49のいずれか1つの薬学的組成物であって、遺伝子apob、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0546】

52. 実施形態37、39～49のいずれか1つの薬学的な組み合わせ、または実施形態38～49のいずれか1つの薬学的組成物、または実施形態51の使用のための薬学的な組み合わせもしくは薬学的組成物であって、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hAATTR)、補体関連疾患、B型肝炎感染、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のためである。

10

20

30

40

50

【0547】

53. 実施形態51もしくは52の使用のための薬学的な組み合わせ、または実施形態51もしくは52の使用のための薬学的組成物であって、ここで、サポニンは、実施形態4～15のいずれか1つのサポニン誘導体、好ましくはQS-21誘導体またはSO1861誘導体である。

【0548】

54. 実施形態37～48のいずれか1つの第2の複合体または第3の複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくは、その後に、実施形態37～48のいずれか1つの第2の複合体または第3の複合体に含まれるエフェクター分子を上記細胞のサイトゾルに移入するための、インビトロのまたはエキスピボの方法であって、以下のステップを含む：

a) その表面上にASGPRを発現する細胞を提供し、第3の複合体が、第3の複合体が上記細胞表面分子に結合するための結合分子を含む細胞表面分子を発現する細胞に移入されるべきであるときには、細胞は、好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択されること、

b) ステップa) で提供された細胞に移入するための実施形態37～48のいずれか1つの第2の複合体または第3の複合体を提供すること、

c) 実施形態1～36のいずれか1つのサポニン複合体を提供すること、

d) ステップa) の細胞を、インビトロでまたはエキスピボで、ステップb) の第2の複合体または第3の複合体およびステップc) のサポニン複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内への第2の複合体または第3の複合体の移入をもたらすこと、好ましくは、それによって、その後に、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体もしくは第3の複合体の移入をもたらすこと、または好ましくは、それによって、その後に、少なくとも、上記細胞のサイトゾルへの第2の複合体もしくは第3の複合体に含まれるエフェクター分子の移入をもたらすこと。

【0549】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体および／または本発明のサポニン複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体またはサポニン複合体に含まれるサポニンは植物から単離される。好ましくは、サポニンは、根などの植物の一部からまたは樹皮などの樹木の一部から単離される。好ましくは、サポニンは植物に由来する根から単離される。

【0550】

本発明の実施形態

I. オリゴヌクレオチド複合体であって、アシアロ糖蛋白質受容体(ASGPR)のリガンド(ここで、ASGPRのリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分、好ましくは3つまたは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくは、ASGPRのリガンドは(GalNAc)₃Trisを含むかまたはそれからなる)に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、少なくとも1つのサポニンはモノデスモシド型トリテルペノイドサポニンおよびビスデスモシド型トリテルペノイドサポニンから選択される。

【0551】

II. 実施形態Iのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは12, 13-デヒドロオレアナン型の五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する。

【0552】

III. 実施形態IまたはIIのオリゴヌクレオチド複合体であって、サポニンは、12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有する。

【0553】

IV. 実施形態Ⅰ～ⅠⅠⅠのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニン、以下からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含む：

- 2 アルファーヒドロキシオレアノール酸、
- 16 アルファーヒドロキシオレアノール酸、
- ヘデラゲニン（23-ヒドロキシオレアノール酸）、
- 16 アルファ，23-ジヒドロキシオレアノール酸、
- ジブソゲニン、
- キラヤ酸、
- プロトエスシゲニン-21（2-メチルブタ-2-エノアート）-22-アセテート、
- 23-オキソ-バリントゲノールC-21，22-ビス（2-メチルブタ-2-エノアート）、
- 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-ジアセテート、
- ジギトゲニン、
- 3，16，28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン、
- ジブソゲン酸、
- および
- それらの誘導体。

好ましくは、サポニンは、キラヤ酸およびジブソゲニンまたはそれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造はキラヤ酸またはその誘導体である。

【0554】

V. 実施形態Ⅰ～ⅠⅤのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、

- ・ サポニンは、以下の群Aから選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含む：

- GlcA-、
- Glc-、
- Gal-、
- Rha-（1→2）-Ara-、
- Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-GlcA-、
- Glc-（1→2）-[Glc-（1→4）]-GlcA-、
- Glc-（1→2）-Ara-（1→3）-[Gal-（1→2）]-GlcA-、
- Xyl-（1→2）-Ara-（1→3）-[Gal-（1→2）]-GlcA-、
- Glc-（1→3）-Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-Glc-（1→4）-Gal-、
- Rha-（1→2）-Gal-（1→3）-[Glc-（1→2）]-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Rha-（1→2）-Glc-（1→2）-Rha-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Fuc-（1→2）-Glc-（1→2）-Rha-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Rha-（1→2）-Gal-（1→2）-Rha-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Fuc-（1→2）-Gal-（1→2）-Rha-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Rha-（1→2）-Glc-（1→2）-Fuc-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Fuc-（1→2）-Glc-（1→2）-Fuc-（1→2）-GlcA-、
- Ara-（1→4）-Rha-（1→2）-Gal-（1→2）-Fuc-（1→2）-

- G l c A - 、
 A r a - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - R h a - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) 10
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2)
 - G l c A - 、
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2)
 - G l c A - 、および
 それらの誘導体、 20
 あるいは
 ・ サポニンは、以下の群 B から選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含む：
 G l c - 、
 G a l - 、
 R h a - (1 → 2) - [X y l - (1 → 4)] - R h a - 、
 R h a - (1 → 2) - [A r a - (1 → 3) - X y l - (1 → 4)] - R h a - 、
 A r a - 、
 X y l - 、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R 1 - (→ 4)] - F u c - であって、 30
 ここで、R 1 は 4 E - メトキシケイ皮酸である、
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [R 2 - (→ 4)] - F u c - であって、
 ここで、R 2 は 4 Z - メトキシケイ皮酸である、
 X y l - (1 → 4) - [G a l - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c - 、
 X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 3 , 4 - ジ - O A c - F u c - 、
 X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - [R 3 - (→ 4)] - 3 - O A c - F u c - であって、ここで、R 3 は 4 E - メトキシケイ皮酸である、
 G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c - 、 40
 G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c - 、
 (A r a - または X y l -) (1 → 3) - (A r a - または X y l -) (1 → 4) - (R h a - または F u c -) (1 → 2) - [4 - O A c - (R h a - または F u c -) (1 → 4)] - (R h a - または F u c -) 、
 X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [Q u i - (1 → 4)] - F u c - 、
 A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [G l c - (1 → 3)] - R h a - (1 → 2) - F u c - 、 50

Xyl- (1→4) - [Gal- (1→3)] - Rha- (1→2) - Fuc-、
 Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→2) - Fuc-、
 Ara/Xyl- (1→4) - Rha/Fuc- (1→4) - [Glc/Gal- (1
 →2)] - Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→
 2) - [R4- (→4)] - Fuc-であって、ここで、R4は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)である、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [R5- (→4)]
 - Fuc-であって、ここで、R5は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)である、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Rha- (1→3
)] -4-OAc-Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→
 2) - [Rha- (1→3)] -4-OAc-Fuc-、

6-OAc-Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3-
 OAc-Rha- (1→3)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3-OAc--R
 ha- (1→3)] - Fuc-、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Qui- (1→4
)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - [Qui- (1
 →4)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Xyl- (1→3
) -4-OAc-Qui- (1→4)] - Fuc-、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [3, 4-ジ-OA
 c-Qui- (1→4)] - Fuc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - Fuc-、

6-OAc-Glc- (1→3) - [Xyl- (1→4)] - Rha- (1→2) - F
 uc-、

Glc- (1→3) - [Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4)] - Rha- (1→
 2) - Fuc-、

Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - [Xyl- (1→3
) -4-OAc-Qui- (1→4)] - Fuc-、

Api/Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha
 - (1→2) - [Rha- (1→3)] -4-OAc-Fuc-、

Api- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha- (1→
 2) - [Rha- (1→3)] -4-OAc-Fuc-、

Api/Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha
 - (1→2) - [R6- (→4)] - Fuc-であって、ここで、R6は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)である、

Api/Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha
 - (1→2) - [R7- (→4)] - Fuc-であって、ここで、R7は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)である、

Api/Xyl- (1→3) - Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] - Rha
 - (1→2) - [R8- (→4)] - Fuc-であって、ここで、R8は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

10

20

30

40

50

ヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)である、

A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [R 9 - (→4)] - F u c - であって、ここで、R 9 は 5-O-[5-O-A r a / A p i - 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)である、

X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [R 10 - (→4)] - F u c - であって、ここで、R 10 は 5-O-[5-O-A r a / A p i - 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)である、

A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [R 11 - (→3)] - F u c - であって、ここで、R 11 は 5-O-[5-O-A r a / A p i - 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)である、

X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [R 12 - (→3)] - F u c - であって、ここで、R 12 は 5-O-[5-O-A r a / A p i - 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)である、

G l c - (1→3) - [G l c - (1→6)] - G a l -、および

それらの誘導体、

あるいは

・ サポニン はビスデスモシド型トリテルペングリコシドであり、アグリコンコア構造に結合された群Aから選択される第1の糖鎖を含み、かつアグリコンコア構造に結合された群Bから選択される第2の糖鎖を含む。

【0555】

V I . 実施形態 I ~ V のいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは以下からなる群から選択される：キラヤ樹皮サポニン、ディブサコシド B、サイコサポニン A、サイコサポニン D、マクラントイジン A、エスクレントシド A、フィトラッカゲニン、エスシナート、A S 6 . 2、N P - 005236、A M A - 1、A M R、アルファヘデリン、N P - 012672、N P - 017777、N P - 017778、N P - 017774、N P - 018110、N P - 017772、N P - 018109、N P - 017888、N P - 017889、N P - 018108、S A 1641、A E X 55、N P - 017674、N P - 017810、A G 1、N P - 003881、N P - 017676、N P - 017677、N P - 017706、N P - 017705、N P - 017773、N P - 017775、S A 1657、A G 2、S O 1861、G E 1741、S O 1542、S O 1584、S O 1658、S O 1674、S O 1832、S O 1862、S O 1904、Q S - 7、Q S 1861、Q S - 7 a p i、Q S 1862、Q S - 17、Q S - 18、Q S - 21 A - a p i o、Q S - 21 A - x y l o、Q S - 21 B - a p i o、Q S - 21 B - x y l o、ベータエスシン、エスシン I a、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、および A S 6 4 R、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニンは、Q S - 21、Q S - 21 誘導体、S O 1861、S O 1861 誘導体、S A 1641、S A 1641 誘導体、G E 1741、G E 1741 誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくは、サポニンは、Q S - 21 誘導体、S O 1861 誘導体、S O 1861、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくは、サポニンは S O 1861 誘導体または S O 1861 である。

【0556】

V I I . 実施形態 V または V I のオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i . サポニン誘導体は、誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造

を含むか、

i i . サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態 V で定められている群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているカルボキシル基を含むか、

i i i . サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態 V で定められている群 B から選択される糖鎖を含み、糖鎖は誘導体化されているアセトキシ ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 基を含むか、あるいは

i v . サポニン誘導体は、誘導体化 i 、 i i 、および i i i のいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化 i 、 i i 、および i i i の 2 つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

【0557】

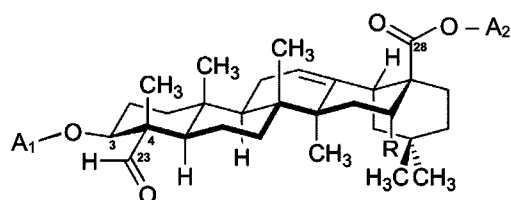
V I I I . 実施形態 I ~ V I I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは以下のいずれか 1 つ以上である：S O 1 8 6 1、S A 1 6 5 7、G E 1 7 4 1、S A 1 6 4 1、Q S - 2 1、Q S - 2 1 A、Q S - 2 1 A - a p i、Q S - 2 1 A - x y l、Q S - 2 1 B、Q S - 2 1 B - a p i、Q S - 2 1 B - x y l、Q S - 7 - x y l、Q S - 7 - a p i、Q S - 1 7 - a p i、Q S - 1 7 - x y l、Q S 1 8 6 1、Q S 1 8 6 2、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM、Q S - 1 8、Q u i l - A、G y p 1、ジブソシド A、A G 1、A G 2、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 8 3 2、S O 1 9 0 4、それらの立体異性体、それらの誘導体、およびそれらの組み合わせ。好ましくは、サポニンは以下からなる群から選択される：Q S - 2 1、Q S - 2 1 誘導体、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1 誘導体、S A 1 6 4 1、S A 1 6 4 1 誘導体、G E 1 7 4 1、G E 1 7 4 1 誘導体、およびそれらの組み合わせ。より好ましくは、サポニンは Q S - 2 1 誘導体、S O 1 8 6 1 誘導体、S O 1 8 6 1、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。最も好ましくは、サポニンは S O 1 8 6 1 誘導体または S O 1 8 6 1 である。

【0558】

I X . 実施形態 I ~ V I I I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは、実施形態 I V のキラヤ酸サポニンまたはジブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子 1 によって表される：

【0559】

【化 103】



(分子 1)

【0560】

式中、

A₁ は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₁ は実施形態 V で定められている群 A から選択される糖鎖を表し、より好ましくは、A₁ は実施形態 V で定められている群 A から選択される糖鎖を表し、A₁ はグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、

A₂ は水素、単糖、または直鎖もしくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは、A₂ は実施形態 V で定められている群 B から選択される糖鎖を表し、より好ましくは、A₂ は実施形態 V で定められている群 B から選択される糖鎖を表し、A₂ は少なくとも 1 つのアセトキシ ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 基、例えば 1、2、3、または 4 つのアセトキシ基を含み、

ここで、 A_1 および A_2 の少なくとも1つは水素ではなく、好ましくは A_1 および A_2 両方はオリゴ糖鎖であり、

R はジブソゲニンの水素またはキラヤ酸のヒドロキシルであり、

ここで、サポニン誘導体は分子1によって表されるサポニンに対応し、ここで、次の誘導体化の少なくとも1つ、好ましくは1つまたは2つ、より好ましくは1つが存在する：

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置 C_{23} におけるアルデヒド基が誘導体化されている、

ii. A_1 が実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を表し、 A_1 がグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなるときに、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている、ならびに

iii. A_2 が実施形態Vで定められている群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 が少なくとも1つのアセトキシ基を含むときに、 A_2 の1つの糖部分のまたは2つ以上の糖部分のアセトキシ基の1つ以上、好ましくは全てが誘導体化されている。

【0561】

X. 実施形態IXのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、 A_1 は実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を表し、グルクロン酸部分を含むかまたはそれからなり、ここで、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基は誘導体化されており、および／またはここで、 A_2 は実施形態Vで定められている群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 は少なくとも1つのアセトキシ基を含み、ここで、 A_2 の少なくとも1つのアセトキシ基が誘導体化されている。

【0562】

XI. 実施形態IXまたはXのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、分子1によって表されるサポニンはビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【0563】

XII. 実施形態IX～XIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニン誘導体は分子1によって表されるサポニンに対応し、ここで、次の誘導体化の少なくとも1つ、好ましくは1つまたは2つ、より好ましくは1つが存在する：

i. キラヤ酸またはジブソゲニンの位置 C_{23} におけるアルデヒド基が、以下によって誘導体化されている：

— アルコールへの還元、

— $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン- $Al d-EMCH$ 、例えば $SO1861-Al d-EMCH$ または $QS-21-Al d-EMCH$ を提供し、ここで、EMCHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

— $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、あるいは

— $N-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

ii. A_1 が実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を表し、 A_1 がグルクロン酸部分を含むかまたはそれからなるときに、 A_1 のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) または $N-(2-アミノエチル)$ マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン- $Gl u-AMPD$ 、例えば $QS-21-Gl u-AMPD$ もしくは $SO1861-Gl u-AMPD$ 、またはサポニン- $Gl u-AEM$ 、例えば $QS-21-Gl u-AEM$ もしくは $SO1861-Gl u-AEM$ を提供する、ならびに

iii. A_2 が実施形態Vで定められている群Bから選択される糖鎖を表し、 A_2 が

少なくとも1つのアセトキシ基を含むときに、 A_2 の1つの糖部分のまたは2つ以上の糖部分のアセトキシ基の1つ以上、好ましくは全てが、脱アセチル化によるヒドロキシル基 ($\text{HO}-$) への変換によって誘導体化されている。

【0564】

XIII. 実施形態IX~XIIIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、 A_1 は $\text{Gal}-(1\rightarrow2)-[\text{Xyl}-(1\rightarrow3)]-\text{GlcA}$ であり、および/または A_2 は $\text{Glc}-(1\rightarrow3)-\text{Xyl}-(1\rightarrow4)-\text{Rha}-(1\rightarrow2)-[\text{Xyl}-(1\rightarrow3)-4-\text{OAc}-\text{Qui}-(1\rightarrow4)]-\text{Fuc}$ であり、好ましくは、分子1によって表されるサポニン $3-\text{O}-\beta\text{-D-ガラクトピラノシル}-(1\rightarrow2)-[\beta\text{-D-キシロピラノシル}-(1\rightarrow3)]-\beta\text{-D-グルクロノピラノシルキラヤ酸}28-\text{O}-\beta\text{-D-グルコピラノシル}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-キシロピラノシル}-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-L-ラムノピラノシル}-(1\rightarrow2)-[\beta\text{-D-キシロピラノシル}-(1\rightarrow3)-4\text{OAc}-\beta\text{-D-キノボピラノシル}-(1\rightarrow4)]-\beta\text{-D-フコピラノシド}$ であり、より好ましくは、サポニンは SO1861 、 GE1741 、 SA1641 、および QS-21 、またはその誘導体、最も好ましくは SO1861 またはその誘導体のいずれか1つ以上である。

【0565】

XIV. 実施形態VII~XIIIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンはサポニン誘導体であり、ここで、

i. サポニン誘導体は、以下によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含むか：

- アルコールへの還元、
- $\text{N}-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、それによって、サポニン- Aldehyde-EMCH 、例えば $\text{SO1861-Aldehyde-EMCH}$ または $\text{QS-21-Aldehyde-EMCH}$ を提供し、ここで、 EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

- $\text{N}-[\beta\text{-マレイミドプロピオン酸}]$ ヒドラジド (BMPH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、 BMPH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、あるいは

- $\text{N}-[\kappa\text{-マレイミドウンデカン酸}]$ ヒドラジド (KMUH) との反応によるヒドラゾン結合への変換であって、ここで、 KMUH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって任意に誘導体化される、

ii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシ基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシ基を含み、これは、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (AMPD) または $\text{N}-(2\text{-アミノエチル})$ マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン- Glu-AMPD 、例えば QS-21-Glu-AMPD もしくは SO1861-Glu-AMPD 、またはサポニン- Glu-AEM 、例えば QS-21-Glu-AEM もしくは SO1861-Glu-AEM を提供するか、

iii. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態Vで定められている群Bから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、脱アセチル化によるヒドロキシル基 ($\text{HO}-$) への変換によって誘導体化されているアセトキシ ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) 基を含むか、あるいは

iv. サポニン誘導体は、誘導体化i、ii、およびiiiのいずれかの組み合わせ、好ましくは誘導体化i、ii、およびiiiの2つの誘導体化のいずれかの組み合わせを含む。

好ましくは、サポニン誘導体はアグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造は、 EMCH との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、ここで、 EMCH のマレイミド基はメルカプトエタノールとのチオエー

10

20

30

40

50

テル結合の形成によって任意に誘導体化される。

【0566】

X V . 実施形態X I Vのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニン誘導体であり、ここで、

a) サポニン誘導体は、N-ε-マレイミドカブロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、それによって、サポニン-Ald-EMCH、例えばSO1861-Ald-EMCHまたはQS-21-Ald-EMCHを提供するか、

b) サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシル基、好ましくは、グルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、これは、N-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって、サポニン-Glu-AEM、例えばQS-21-Glu-AEMまたはSO1861-Glu-AEMを提供するか、あるいは

c) サポニン誘導体は誘導体化 i および i i の組み合わせを含む。

【0567】

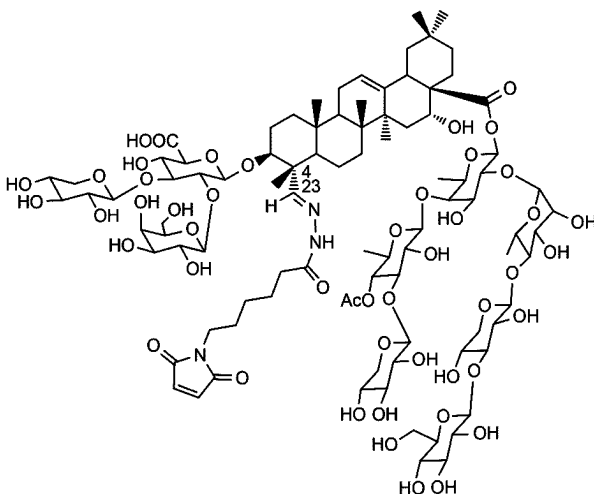
X V I . 実施形態X I Vのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニン誘導体はアグリコンコア構造を含み、ここで、アグリコンコア構造はアルデヒド基を含み、ここで、サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは実施形態Vで定められている群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖は、カルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、このグルクロン酸部分は、N-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている。

【0568】

X V I I . 実施形態I ~ X I Vのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは分子2によって表されるサポニン誘導体である：

【0569】

【化104】



(分子2)

【0570】

または、ここで、サポニンは分子3によって表されるサポニン誘導体である：

【0571】

10

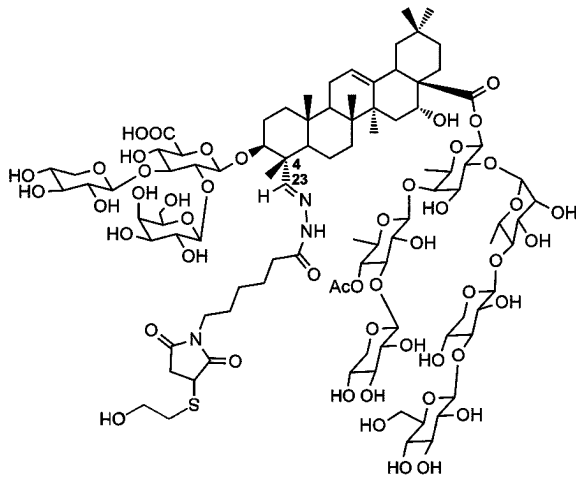
20

30

40

50

【化 1 0 5】



10

(分子 3)。

【 0 5 7 2】

X V I I I . 実施形態 I ~ X V I I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、少なくとも 1 つのサポニンおよび A S G P R のリガンドは直接的にまたは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合的に連結され、ならびに／あるいはここで、少なくとも 1 つのサポニンおよびオリゴヌクレオチドは直接的にまたは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合的に連結され、ならびに／あるいはここで、A S G P R のリガンドおよびオリゴヌクレオチドは直接的にまたは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合的に連結され、好ましくは、少なくとも 1 つのサポニン、A S G P R のリガンド、およびオリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つのリンカーを介して連結される。

20

【 0 5 7 3】

X I X . 実施形態 I ~ X V I I I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、少なくとも 1 つの G a l N A c 部分、少なくとも 1 つのサポニン、およびオリゴヌクレオチドは三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、G a l N A c 部分、サポニン、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

30

【 0 5 7 4】

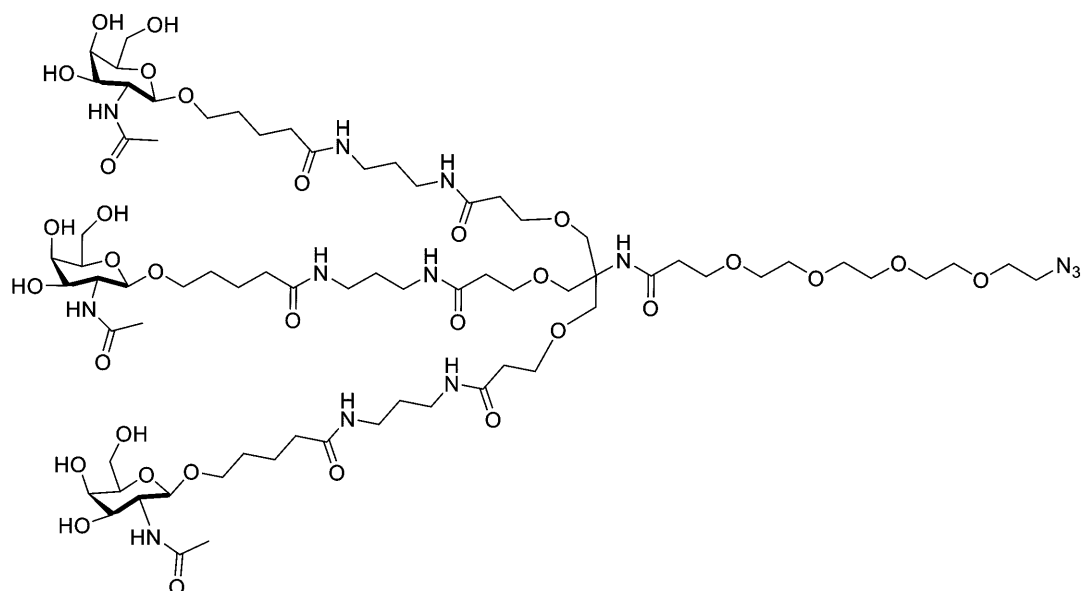
X X . 実施形態 I ~ X I X のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、A S G P R のリガンドは、分子 (D D 3) または分子 (D D 4) によって表される (G a l N A c)₃ T r i s であるか：

【 0 5 7 5】

40

50

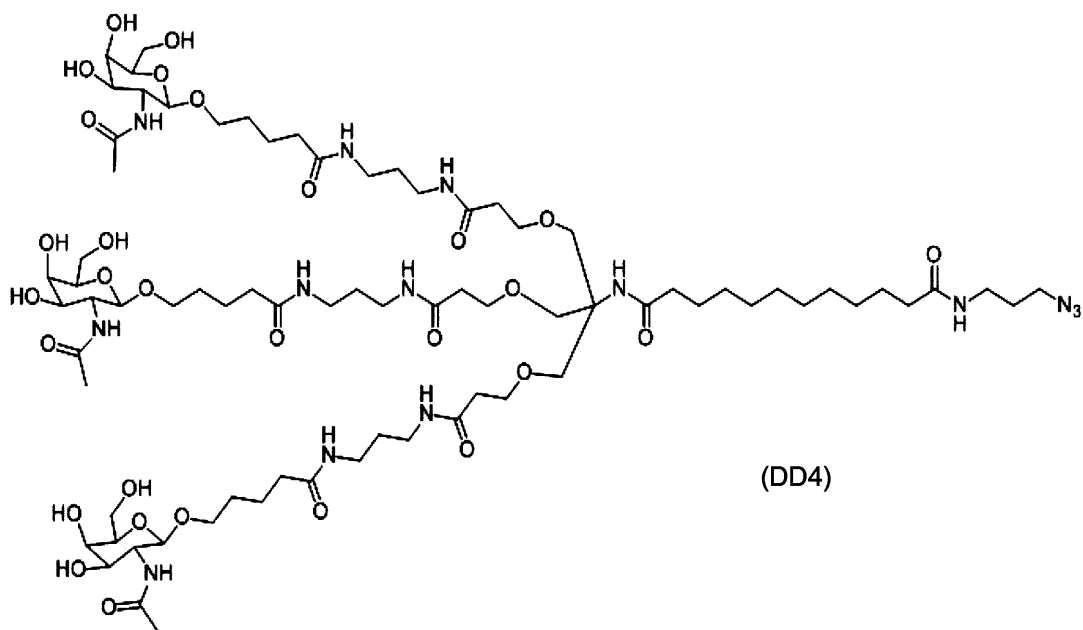
【化 1 0 6】



10

(DD3),

20



30

(DD4)

【 0 5 7 6】

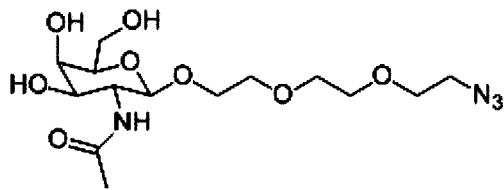
あるいは、ここで、ASGPRのリガンドは、分子II'によって表されるモノGalNAcである：

40

【 0 5 7 7】

50

【化 1 0 7】



(分子 I I')。

10

【0 5 7 8】

X X I. 実施形態 I ~ X X のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、少なくとも 1 つのサポニンは A S G P R のリガンドに少なくとも 1 つの切断可能なリンカーを介して共有結合され、および／またはここで、少なくとも 1 つのサポニンはオリゴヌクレオチドに少なくとも 1 つの切断可能なリンカーを介して共有結合される。

【0 5 7 9】

X X I I. 実施形態 X I X のオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、少なくとも 1 つのサポニンは三官能性リンカーの腕部に少なくとも 1 つの切断可能なリンカーを介して共有結合される。

20

【0 5 8 0】

X X I I I. 実施形態 X X I または X X I I のオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、切断可能なリンカーは、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、および／または光によって誘導される条件下において切断を受け、好ましくは、切断可能なリンカーは、以下から選択される切断可能な結合を含む：酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合およびヒドラジド結合、ならびに／あるいはプロテオリシス、例えばカテプシン B によるプロテオリシスに感受性の結合、ならびに／あるいはジスルフィド結合などの還元的条件下での切断に感受性の結合。

【0 5 8 1】

X X I V. 実施形態 X X I ~ X X I I I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、切断可能なリンカーは、例えば、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソームおよび／また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、好ましくは、切断可能なリンカーは、pH 4.0 ~ 6.5 において、より好ましくは pH ≤ 5.5 においてインビボで切断を受ける。

30

【0 5 8 2】

X X V. 実施形態 I ~ X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、もしくは 1 ~ 100 個のサポニン部分、またはその間のいずれかの数のサポニン部分、例えば 7、9、12 個のサポニン部分を含む。

【0 5 8 3】

X X V I. 実施形態 I ~ X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は 1 つのサポニン部分を含む。

40

【0 5 8 4】

X X V I I. 実施形態 I ~ X X V I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは B N A、ゼノ核酸、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか 1 つである。

【0 5 8 5】

X X V I I I. 実施形態 I ~ X X V I のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか 1 つ以上から選択される：短鎖干渉 R N A (s i R N A)、短鎖ヘアピン R N A (s h R N A)、アンチヘアピン形状のマ

50

イクロRNA (miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (dsRNA)、アンチマイクロRNA (アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA^C)、BNAに基づくsiRNA、およびBNAに基づくアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON)。

【0586】

XXIX. 実施形態I〜XXVIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは以下のいずれか1つ以上から選択される：アンチmiRNA、BNA-AON、またはsiRNA、例えば、BNAに基づくsiRNAであって、化学修飾されたsiRNA、代謝的に安定なsiRNA、および化学修飾された代謝的に安定なsiRNAから選択される。

10

【0587】

XXX. 実施形態I〜XXIXのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型 (PCSK9)、デルターアミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロニン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体構成要素C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、アルファー1アンチトリプシン (AAT)、および乳酸脱水素酵素 (LDH) のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、ならびに／あるいは例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

20

【0588】

XXXI. 実施形態I〜XXXIXのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、遺伝子のアポリポ蛋白質B (apoB) およびHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである。

【0589】

XXXII. 実施形態I〜XXXIXのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現生成物、HBVのS遺伝子の発現生成物、AAT、およびLDHのいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、あるいは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、miRNA機能に拮抗またはそれを回復、例えば癌原性miRNA (onco-miR) またはonco-miRの発現の抑圧を阻害することができる。

30

【0590】

XXXIII. クレームI〜XXXIIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、以下の蛋白質のいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPA。

40

【0591】

XXXIV. 実施形態I〜XXXIIIのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳類細胞の内側に存在するときに、好ましくはヒト細胞の内側に存在するときに、蛋白質apoBおよびHSP27のいずれか1つの発現に関わるmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

50

【0592】

X X X V. 薬学的組成物であって、実施形態 I ~ X X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体を含み、かつ任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤を含む。

【0593】

X X X V I. 医薬としての使用のための、実施形態 X X X V の薬学的組成物。

【0594】

X X X V I I. クレーム X X X V の薬学的組成物であって、遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、および L D H のいずれか 1 つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、および L D H のいずれか 1 つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

10

【0595】

X X X V I I I. クレーム X X X V の薬学的組成物であって、遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、および C E B P A のいずれか 1 つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、および C E B P A のいずれか 1 つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

20

【0596】

X X X I X. クレーム X X X V I または X X X V I I の使用のための薬学的組成物であって、遺伝子 H S P 2 7 および a p o B のいずれか 1 つ以上、好ましくは a p o B の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子 H S P 2 7 および a p o B のいずれか 1 つ以上、好ましくは a p o B が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

30

【0597】

X L. クレーム X X X V I ~ X X X I X のいずれか 1 つの使用のための薬学的組成物であって、癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病 A、血友病 B、A A T 関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T R 型アミロイドーシス、遺伝性 T T R アミロイドーシス (h A T T R)、補体関連疾患、B 型肝炎感染、C 型肝炎感染、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症、 β -サラセミア、または自己免疫疾患の処置または予防における使用のためである。

【0598】

X L I. クレーム X X X V I ~ X X X I X のいずれか 1 つの使用のための薬学的組成物であって、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、または肝細胞癌、および心血管疾患、例えば高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防における使用のためである。

40

【0599】

X L I I. 実施形態 I ~ X X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくは、その後に、実施形態 I ~ X X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを上記細胞のサイトゾルおよび／または核に移入するための、インビトロのまたはエクスピボの方法であって、以下のステップを含む：

a) A S G P R、好ましくは A S G P R 1 をその表面上に発現する細胞を提供し、細

50

胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染哺乳類細胞、および哺乳類腫瘍細胞から選択され、ここで、好ましくは上記細胞はヒト細胞であること、

b) ステップ a) で提供された細胞に移入するための実施形態 I ~ X X X I V のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

c) ステップ a) の細胞をインビトロでまたはエクスピボでステップ b) のオリゴヌクレオチド複合体と好ましくは液体媒体中において接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、任意にかつ好ましくは、それによって、その後に上記細胞のサイトゾルおよび／または核へのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をもたらすこと。

【0600】

本発明のある態様は、以下のステップを含む本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法に関する：

(a) 共有結合された第 1 のリンカーを含む少なくとも 1 つのサポニン部分を提供し、ここで、第 1 のリンカーは、第 2 のリンカー上の第 2 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 7 の反応性基に対する共有結合のための少なくとも 1 つの第 1 の反応性基を含むこと、

(b) 共有結合された第 3 のリンカーを含むオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、第 3 のリンカーは、第 4 のリンカー上の第 4 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 8 の反応性基に対する共有結合のための第 3 の反応性基を含むこと、

(c) 共有結合された第 5 のリンカーを含む少なくとも 1 つの G a l N A c 部分を提供し、ここで、第 5 のリンカーは、第 6 のリンカー上の第 6 の反応性基に対するまたは第 7 のリンカー上の第 9 の反応性基に対する共有結合のための第 5 の反応性基を含むこと、ならびに

(d1) 第 1 の反応性基および第 2 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 2 のリンカーに第 1 のリンカーを連結し、第 3 の反応性基および第 4 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 4 のリンカーに第 3 のリンカーを連結し、第 5 の反応性基および第 6 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 6 のリンカーに第 5 のリンカーを連結し、第 2 のリンカー、第 4 のリンカー、および第 6 のリンカーと一緒に共有結合的に連結し、それによって、オリゴヌクレオチドを提供すること、

あるいは

(d2) 第 1 の反応性基および第 7 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 1 のリンカーを連結し、第 3 の反応性基および第 8 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 3 のリンカーを連結し、第 5 の反応性基および第 9 の反応性基の間の共有結合の形成によって第 7 のリンカーに第 5 のリンカーを連結し、それによって、オリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

どちらか。

【0601】

ある実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法であり、ここで、第 7 のリンカーは、三官能性リンカー、例えば式 (X X I) によって表される三官能性リンカーである：

【0602】

10

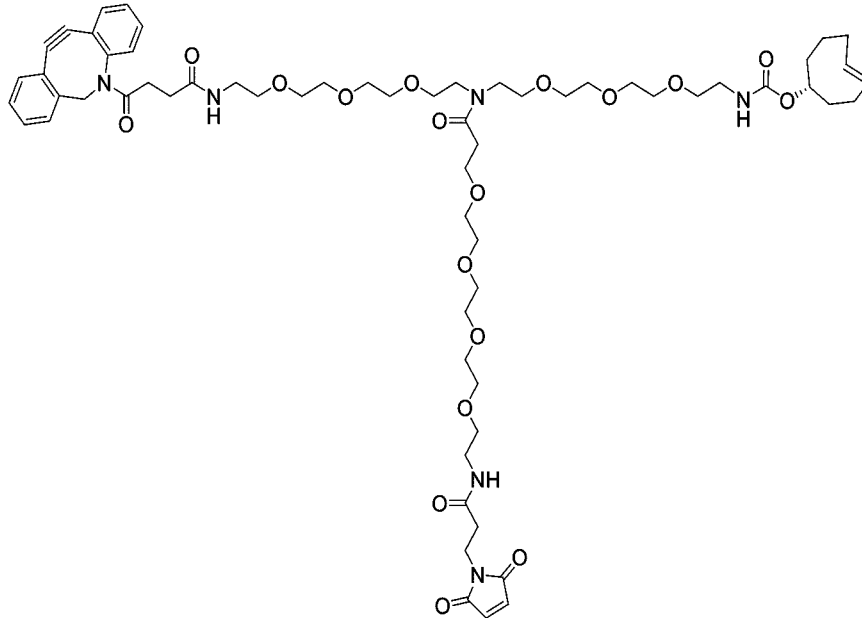
20

30

40

50

【化 1 0 8】



(X X I)。

【 0 6 0 3】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分である。

【 0 6 0 4】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニンが、S O 1 8 6 1、S O 1 8 3 2、Q S - 2 1、またはそのいずれかの機能的な誘導体、好ましくはS O 1 8 6 1またはS O 1 8 3 2である。

【 0 6 0 5】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：サポニン部分が、ヒドラゾン結合またはセミカルバゾン結合を介して共有結合的に連結される。

【 0 6 0 6】

以下の本発明のオリゴヌクレオチド複合体を提供するための方法が好ましい：少なくとも1つのG a l N A c部分が、1～4つのG a l N A c部分、好ましくは1または3つのG a l N A c部分である。

【 0 6 0 7】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは植物から単離される。好ましくは、サポニンは根などの植物の一部からまたは樹皮などの樹木の一部から単離される。好ましくは、サポニンは植物に由来する根から単離される。

【 0 6 0 8】

次は、本発明に従うオリゴヌクレオチド複合体の好ましい実施形態の概要である。

【 0 6 0 9】

1 A. オリゴヌクレオチド複合体であって、アジアロ糖蛋白質受容体 (A S G P R) のリガンド (ここで、A S G P R のリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分、好ましくは3つまたは4つのG a l N A c部分、より好ましくは3つのG a l N A c部分を含み、より好ましくは、A S G P R のリガンドは (G a l N A c) ₃ T r i s を含むかまたはそれからなる) に共有結合的に連結されかつさらにオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された少なくとも1つのサポニンを含み、ここで

、少なくとも1つのサポニンは、12，13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド型またはビスデスモシド型五環式トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の位置C23にアルデヒド官能基を有し、

ここで、オリゴヌクレオチド複合体は、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8つのサポニン部分、より好ましくは1つのサポニン部分、4つのサポニン部分、または8つのサポニン部分を含む。

【0610】

2A．実施形態1Aのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1～8つのサポニン部分、例えば1、4、または8つのサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドは、三官能性リンカーを介して共有結合され、好ましくは、GalNAc部分、サポニンまたはサポニン部分、およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは三官能性リンカーの別個の腕部に共有結合される。

10

【0611】

3A．以下を含む、実施形態1Aまたは2Aのオリゴヌクレオチド複合体：1つのサポニン部分、または4つのサポニン部分、好ましくは4つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG2デンドロン、例えば、例えば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)に共有結合され、あるいは8つのサポニン部分、好ましくは、8つのサポニン部分であって、デンドロン、好ましくはG3デンドロン、例えば、例えば(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)ヘキサナミド]ヘキサナミド]エチル}ヘキサナミド)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)ヘキサナミド]ペンチル]-2，6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミドに共有結合される。

20

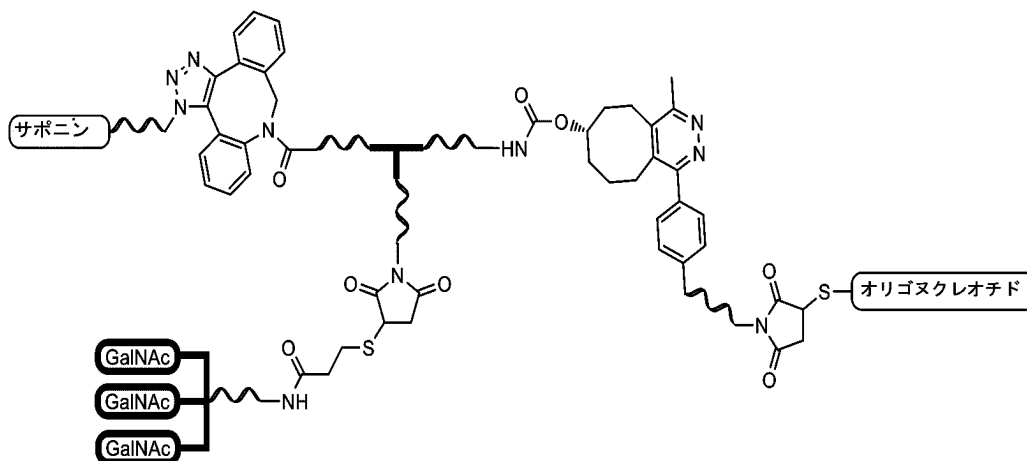
【0612】

4A．実施形態1A～3Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は1つのサポニン部分を含み、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は分子(E E)に従う：

30

【0613】

【化109】



40

(E E)

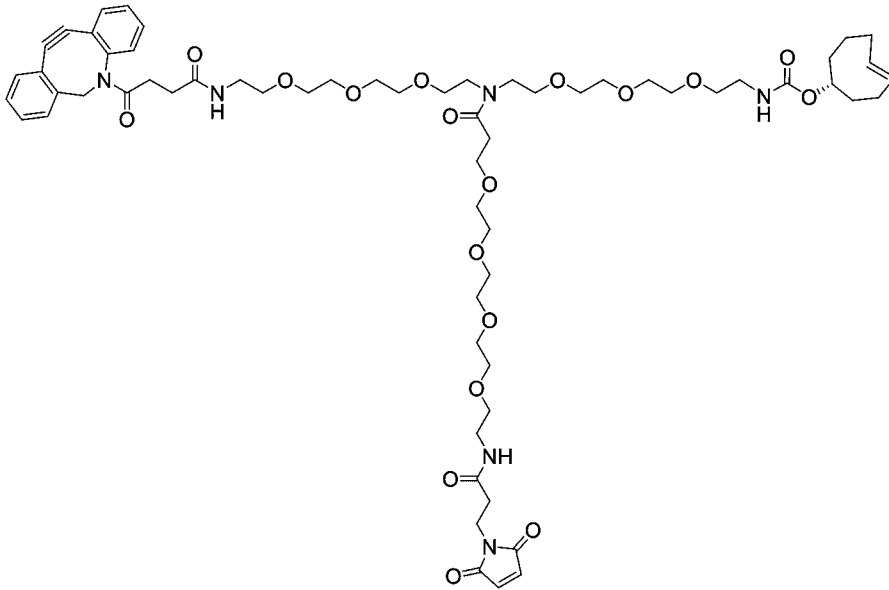
【0614】

50

この分子（E E）は共有結合的複合体化生成物であり、式（X X I）に従う三官能性リンカーの、以下との共有結合的複合体化によって得られる：

【0615】

【化110】



10

20

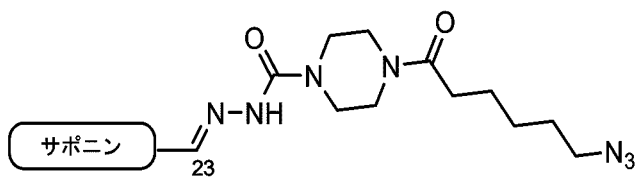
（X X I）

【0616】

（1）分子（A A）に従うサポニン誘導体：

【0617】

【化111】



30

（A A）

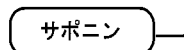
【0618】

【式中、

40

【0619】

【化112】



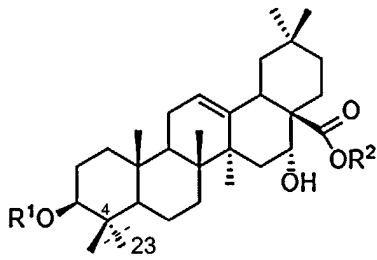
【0620】

は式（S M）に従うサポニン部分を表す：

【0621】

50

【化 1 1 3】



10

(S M)

【0 6 2 2】

式中、 R^1 および R^2 は独立して水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式 (S M) に従うサポニン部分は、位置 C 2 3 にアルデヒド基を含むサポニンに基づく]

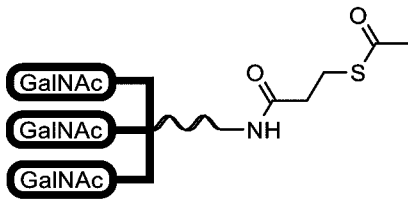
ならびに

(2) 分子 (F F) に従う G a l N A c 複合体:

【0 6 2 3】

【化 1 1 4】

20



(F F)

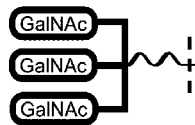
30

【0 6 2 4】

[式中、

【0 6 2 5】

【化 1 1 5】



【0 6 2 6】

40

は、この上で詳述されている分子 (D D 1) または分子 (D D 2)、好ましくはこの上で詳述されている分子 (D D 3) または分子 (D D 4)、より好ましくはこの上で詳述されている分子 (D D 3) に従うトリ G a l N A c 複合体を表す]

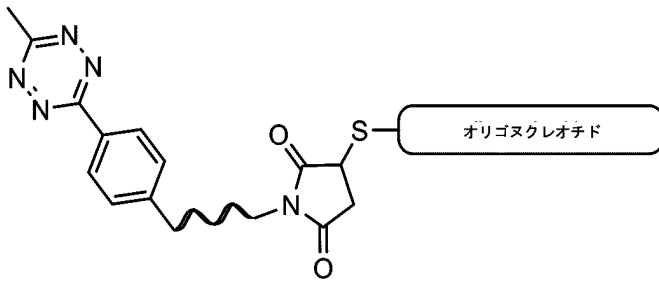
ならびに

(3) 分子 (G G) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチド:

【0 6 2 7】

50

【化 1 1 6】



10

(G G)

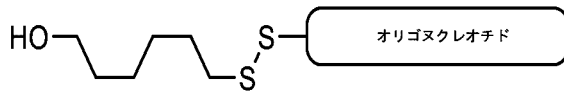
【0 6 2 8】

【式中、分子（G G）は、リンカー（E）－1－（4－（（2－（6－（2，5－ジオキソ－2，5－ジヒドロ－1H－ピロール－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－アミドと、分子（H H）に従うオリゴヌクレオチド－リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す：

20

【0 6 2 9】

【化 1 1 7】



(H H)] 。

【0 6 3 0】

30

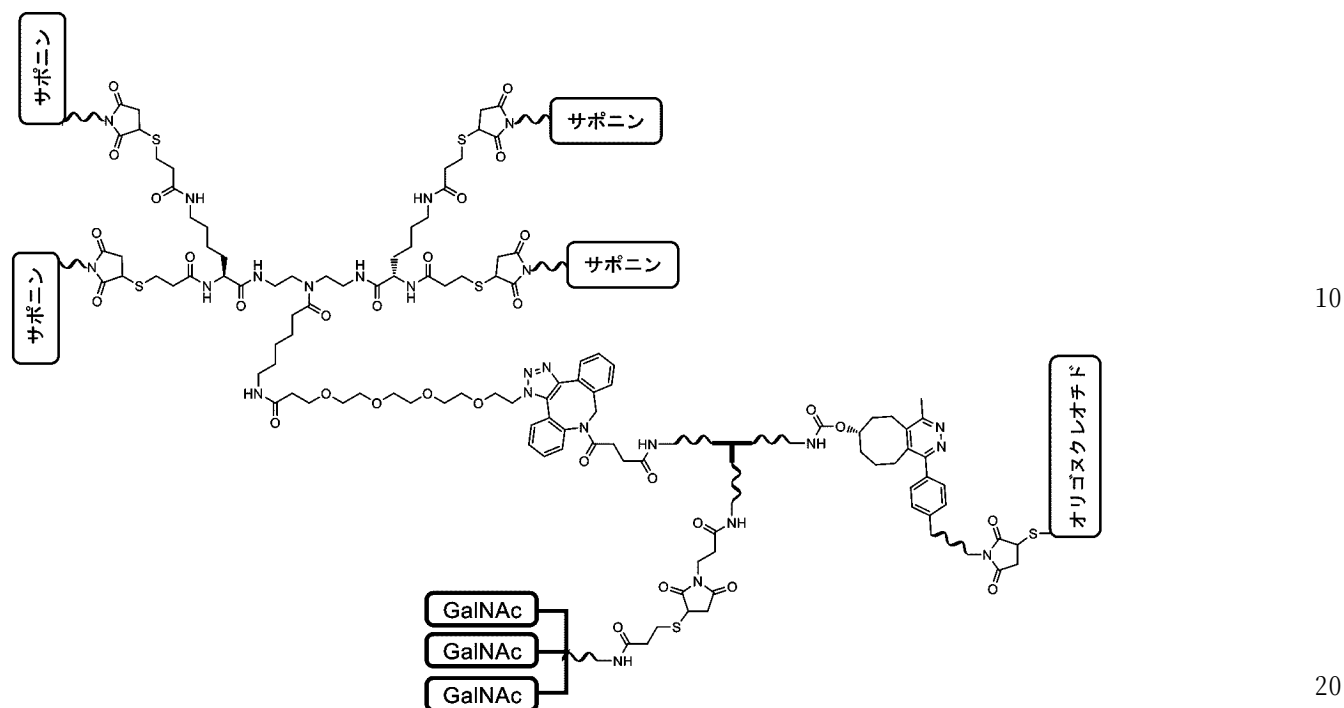
5 A．実施形態 1 A～3 A のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、4 つのサポニン部分を含み、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は分子（P P）に従う：

【0 6 3 1】

40

50

【化 1 1 8】



10

20

(P P)

【 0 6 3 2 】

この分子 (P P) は共有結合的複合体化生成物であり、分子 (L L) に従うサポニン - G a l N A c 複合体 :

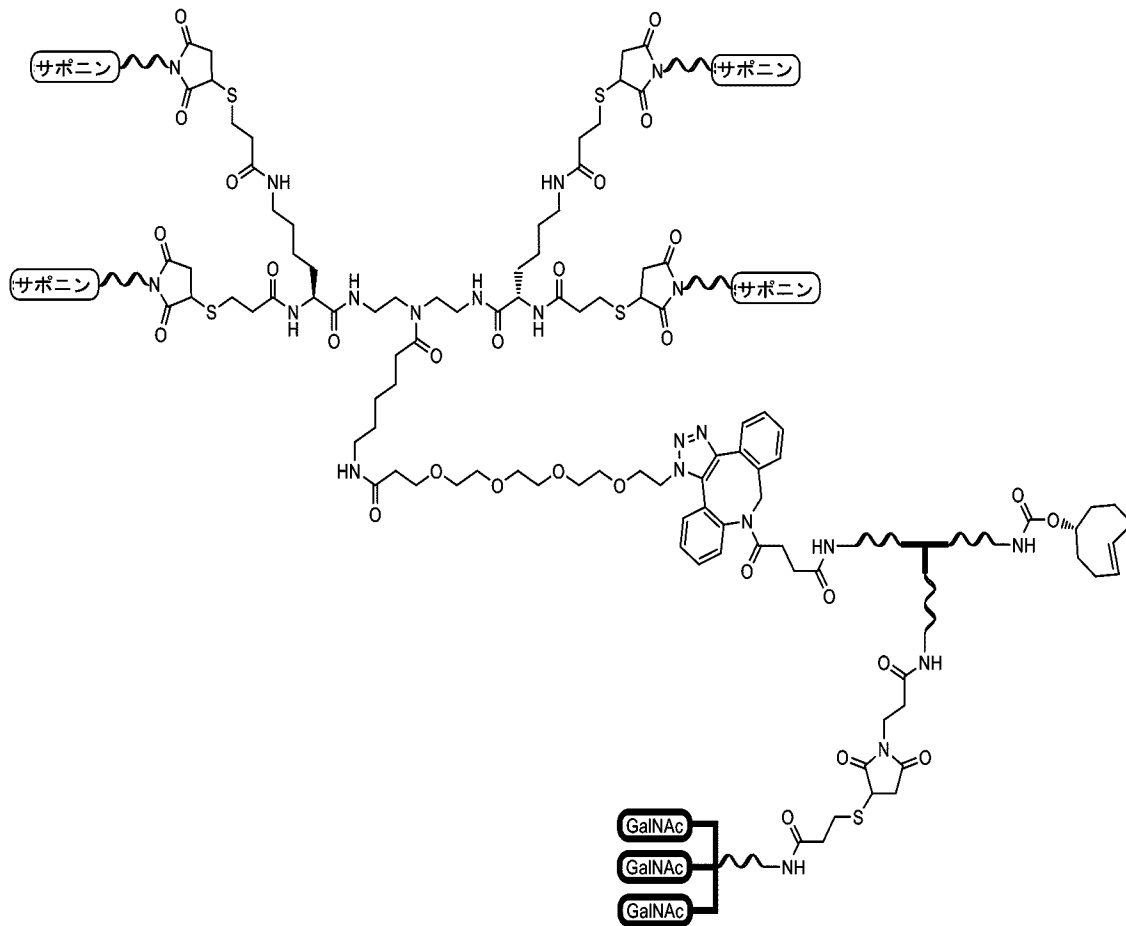
【 0 6 3 3 】

30

40

50

【化 1 1 9】



10

20

(L L)

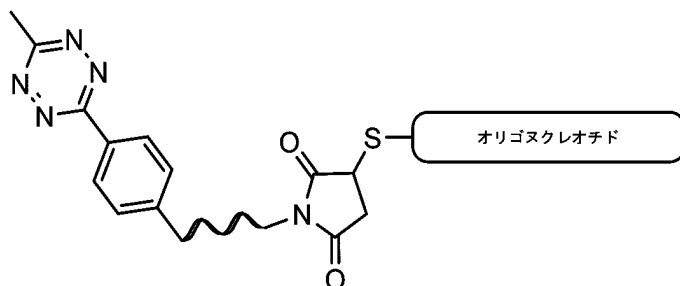
【 0 6 3 4】

30

の、分子 (G G) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られる：

【 0 6 3 5】

【化 1 2 0】



40

(G G)

【 0 6 3 6】

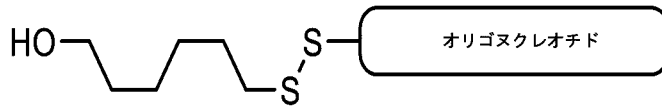
式中、分子 (G G) は、リンカー (E) - 1 - (4 - ((2 - (6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノイル) ヒドラジンイリデン) メチル) ベンズアミド) - N - (4 - (6 - メチル - 1 , 2 , 4 , 5 - テトラジン - 3 - イル) ベンジル) - 3 , 6 , 9 , 1 2 - テトラオキサペンタデカン - 1 5 - アミドと、

50

分子（HH）に従うオリゴヌクレオチド—リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す：

【0637】

【化121】



（HH）

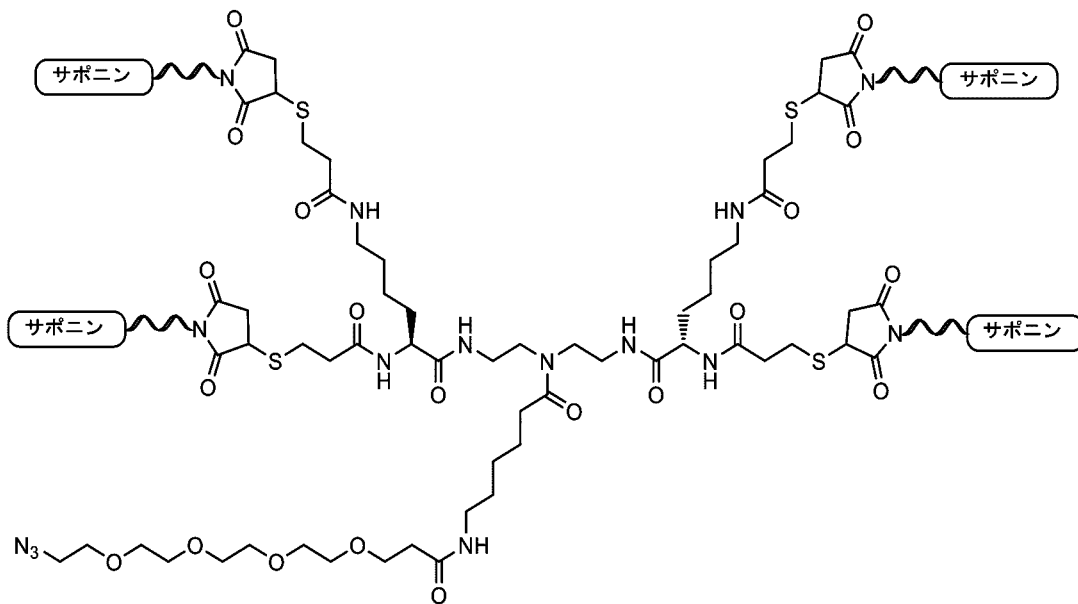
10

【0638】

この分子（LL）は共有結合的複合体化生成物であり、分子（JJ）に従うサポニン誘導体：

【0639】

【化122】



（JJ）

20

30

【0640】

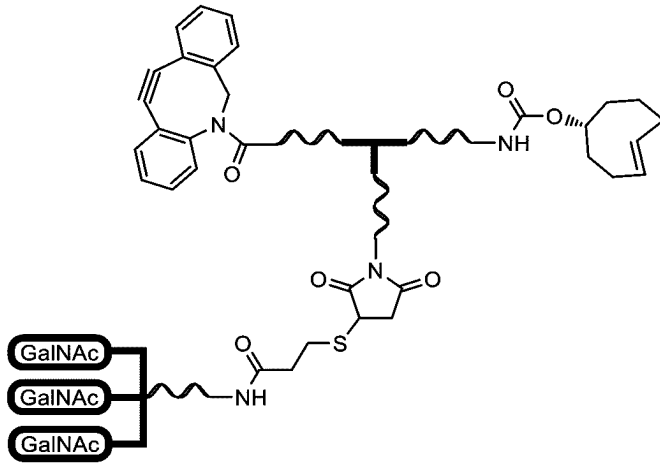
の、分子（MM）に従う三官能性リンカーおよびGalNAcの複合体との共有結合的複合体化によって得られる：

【0641】

40

50

【化 1 2 3】



10

(MM)

【0 6 4 2】

この分子（JJ）は、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の、以下との複合体化の複合体生成物である：

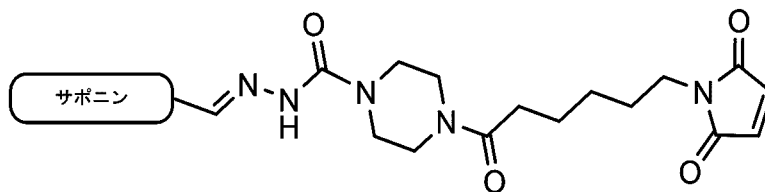
20

最初に、

分子（KK）に従うサポニン誘導体：

【0 6 4 3】

【化 1 2 4】



30

(KK)

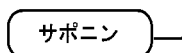
【0 6 4 4】

【式中、

【0 6 4 5】

【化 1 2 5】

40



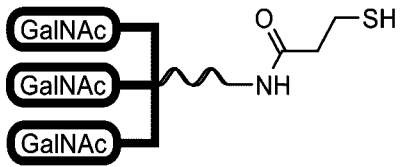
【0 6 4 6】

は、式（SM）に従うサポニン部分を表す：

【0 6 4 7】

50

【化 1 2 8】



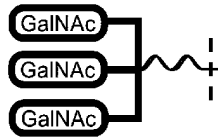
(N N)

【 0 6 5 2】

式中、

【 0 6 5 3】

【化 1 2 9】



【 0 6 5 4】

は、この上で詳述されている分子（D D 1）または分子（D D 2）、好ましくはこの上で詳述されている分子（D D 3）または分子（D D 4）、より好ましくはこの上で詳述されている分子（D D 3）に従うトリ G a l N A c 複合体を表す。

【 0 6 5 5】

6 A . 実施形態 1 A ～ 3 A のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド複合体であって、 8 つのサポニン部分を含み、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は分子（S S）に従う：

【 0 6 5 6】

10

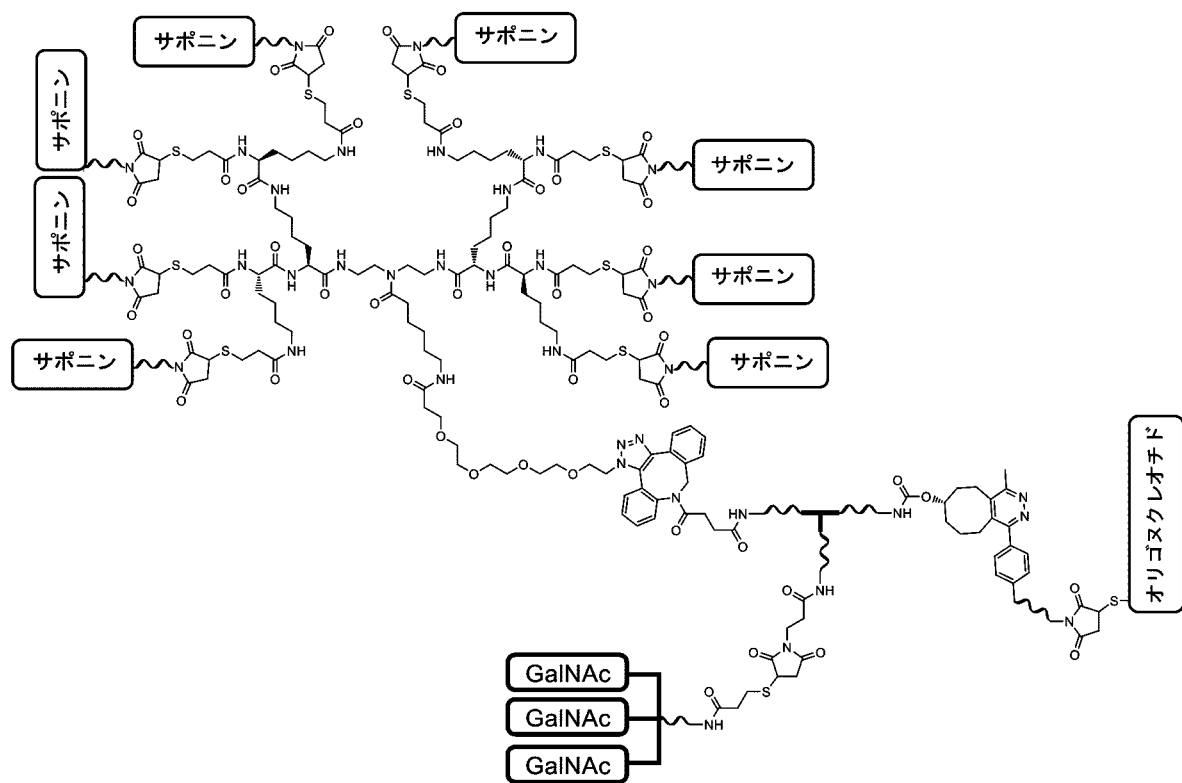
20

30

40

50

【化 1 3 0】



10

20

(S S)

【 0 6 5 7 】

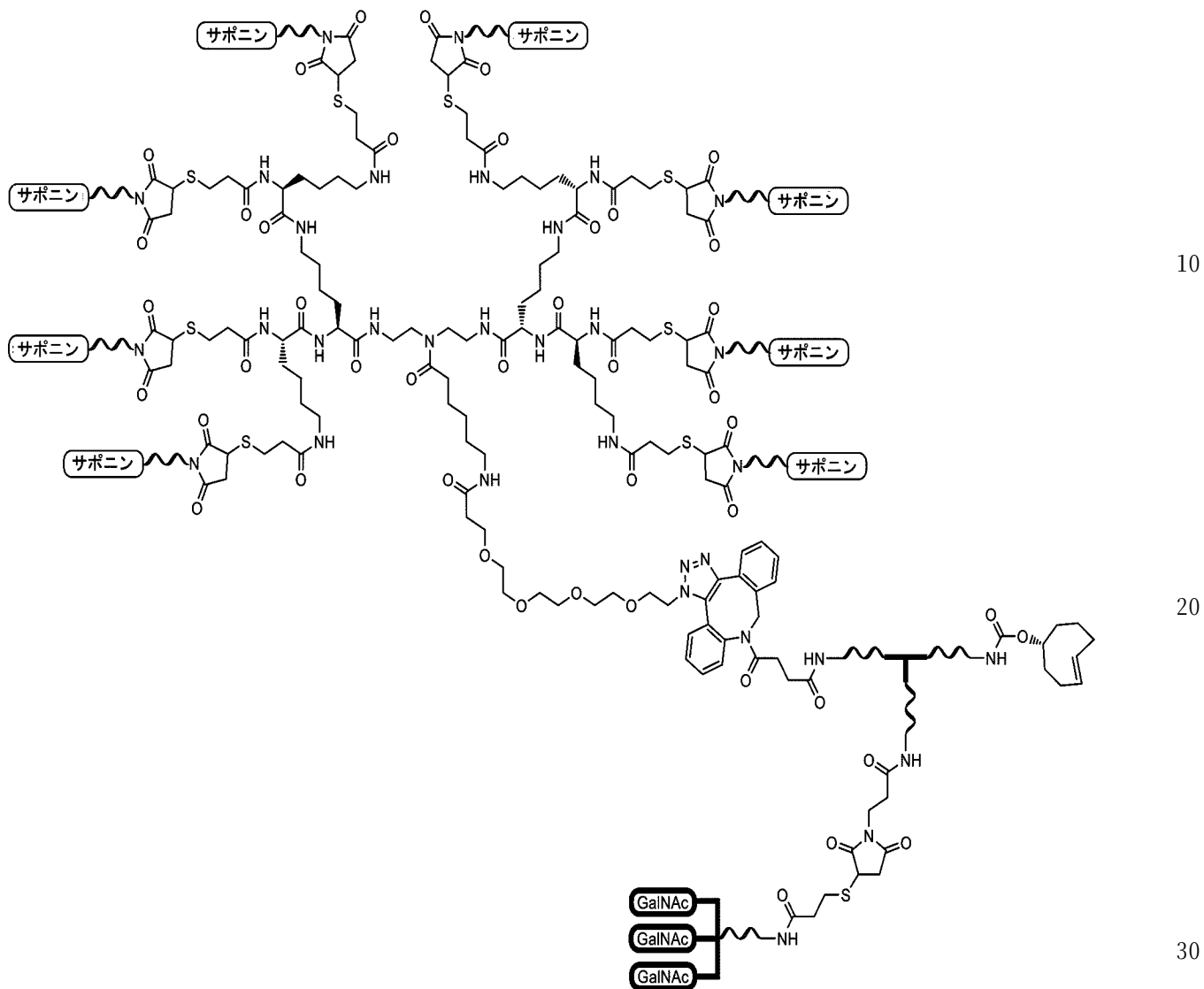
この分子 (S S) は共有結合的複合体化生成物であり、分子 (R R) に従うサポニン - GalNAc 複合体 :

30

40

50

【化 1 3 1】



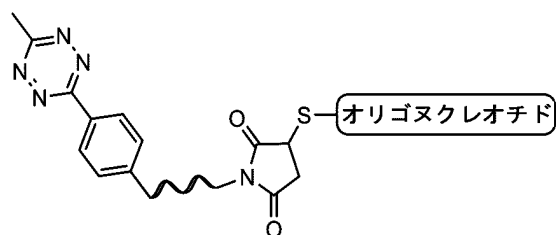
(R R)

【 0 6 5 8】

の、分子 (G G) に従うリンカーを備えるオリゴヌクレオチドとの共有結合的複合体化によって得られる：

【 0 6 5 9】

【化 1 3 2】



(G G)

40

50

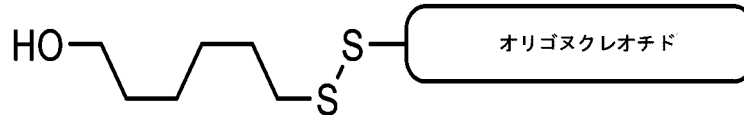
【 0 6 6 0 】

ここで、分子（GG）は、リンカー（E）－1－（4－（（2－（6－（2，5－ジオキソ－2，5－ジヒドロ－1H－ピロール－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－アミドと、分子（HH）に従うオリゴヌクレオチド－リンカー分子との間の複合体化反応の複合体化生成物を表す：

【 0 6 6 1 】

【 化 1 3 3 】

10



(HH)

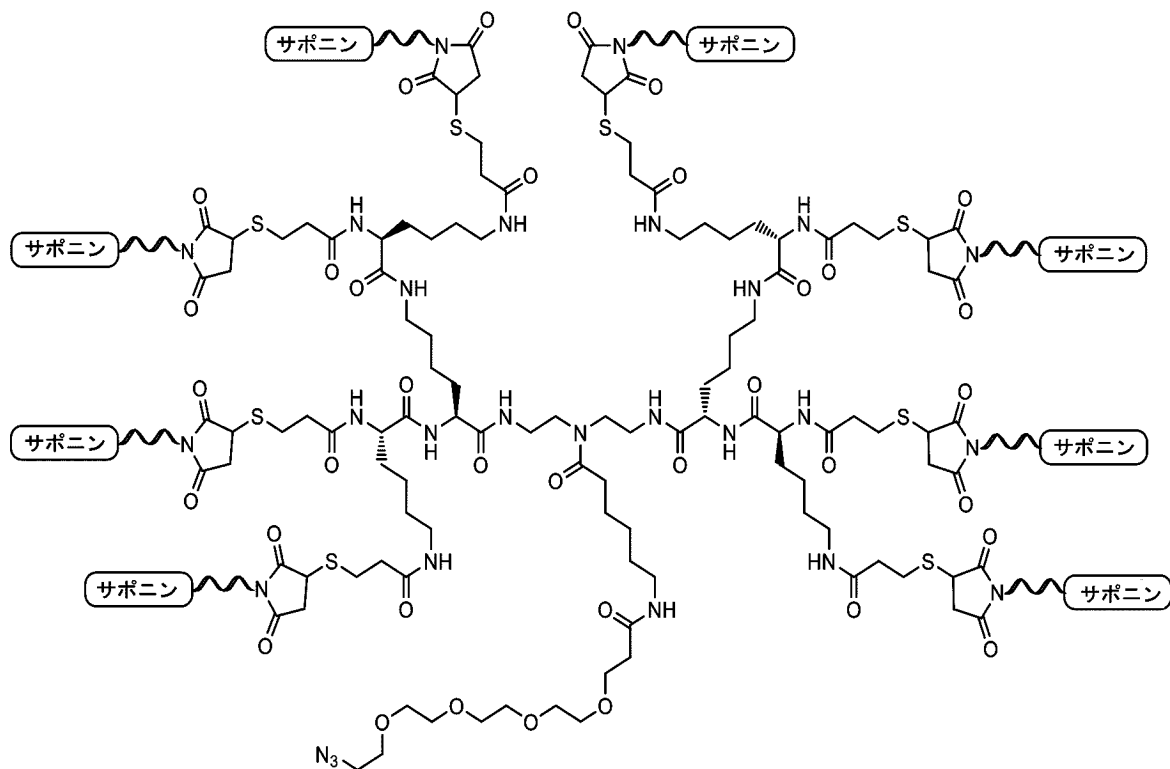
【 0 6 6 2 】

20

この分子（RR）は共有結合的複合体化生成物であり、分子（QQ）に従うサポニン誘導体：

【 0 6 6 3 】

【 化 1 3 4 】



30

40

(QQ)

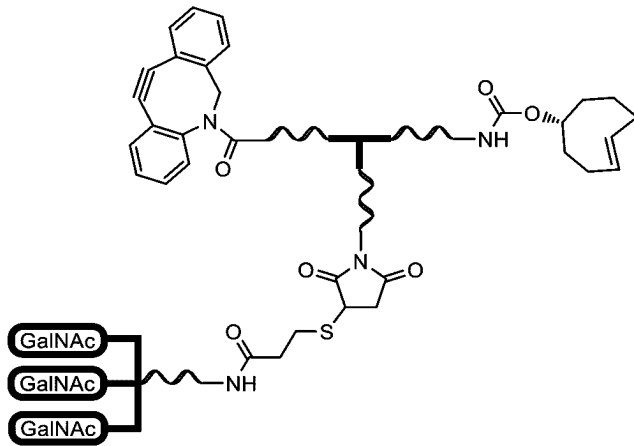
【 0 6 6 4 】

の、分子（MM）に従う三官能性リンカーおよびGalNAcの複合体との共有結合的複合体化によって得られる：

50

【 0 6 6 5 】

【 化 1 3 5 】



10

(MM)

【 0 6 6 6 】

この分子 (QQ) は、(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の、以下との複合体化の複合体生成物である：

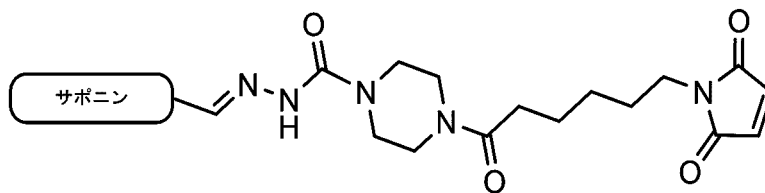
20

最初に、

(a) 分子 (KK) に従うサポニン誘導体：

【 0 6 6 7 】

【 化 1 3 6 】



30

(KK)

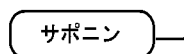
【 0 6 6 8 】

【 式中、

【 0 6 6 9 】

【 化 1 3 7 】

40

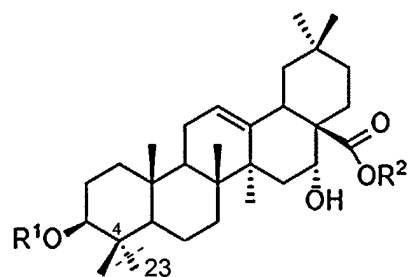


は、式 (SM) に従うサポニン部分を表す：

【 0 6 7 0 】

50

【化 1 3 8】



10

(S M)

【 0 6 7 1 】

式中、 R^1 および R^2 は、独立して、本発明に従う水素、単糖、直鎖オリゴ糖、および分岐オリゴ糖から選択され、ここで、式 (SM) に従うサポニン部分は、位置 C 2 3 にアルデヒド基を含むサポニンに基づく]

ならびに、その後

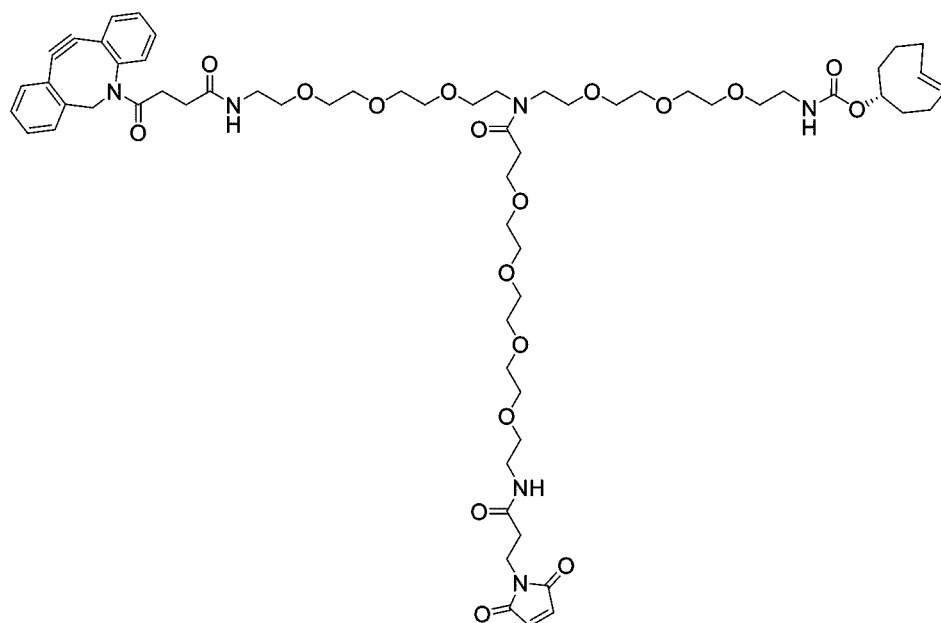
(b) 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-オアート、

ここで、分子（MM）は、式（XXI）に従う三官能性リンカー：

20

【 0 6 7 2 】

【化 1 3 9】



30

(X X I)

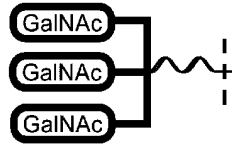
40

【 0 6 7 3 】

および分子（NN）に従うGaInAc複合体（分子（NN）はこの上の実施形態5A参照）の複合体であり、ここで、

【 0 6 7 4 】

【化 1 4 0】



【0 6 7 5】

は、この上で詳述されている分子（DD1）または分子（DD2）、好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）または分子（DD4）、より好ましくはこの上で詳述されている分子（DD3）に従うトリGalNAc複合体を表す。

10

【0 6 7 6】

7A. 実施形態1A～6Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、複合体に含まれるサポニンは以下のいずれか1つ以上である：

a) 以下のリストAのいずれか1つ以上から選択されるサポニン：

－キラヤ・サポナリアサポニン混合物、またはキラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、例えばQuil-A、QS-17-api、QS-17-xyI、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyI、

－ジブソフィラ・エレガンスサポニン混合物、またはジブソフィラ・エレガンスから単離されるサポニン、

20

－サポニナム・アルBUMサポニン混合物、またはサポニナム・アルBUMから単離されるサポニン、

－サポナリア・オフィシナリスサポニン混合物、またはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、ならびに

－キラヤ樹皮サポニン混合物、またはキラヤ樹皮から単離されるサポニン、例えばQuil-A、QS-17-api、QS-17-xyI、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyI、あるいは

b) 以下のリストBから選択される、ジブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン：

SA1641、ジブソシドA、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658、およびフィトラッカゲニン、あるいは

30

c) 以下のリストCから選択される、キラヤ酸アグリコンコア構造を含むサポニン：

AG1856、AG1、AG2、アグロステモシドE、GE1741、ジブソフィラサポニン1（Gyp1）、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、10SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7api、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、およびQS-21B-xylo、あるいは

40

d) 以下のリストDから選択される、アグリコンのC23位置にアルデヒド基なしの12，13-デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン：

エスシンIa、エスシナート、アルファーヘデリン、AMA-1、AMR、AS6.2、AS64R、アッサムサポニンF、ディブサコシドB、エスクレントシドA、マ克蘭トイジンA、NP-005236、NP-012672、プリムラ酸1、サイコサポニンA、サイコサポニンD、ティーシードサポニンI、およびティーシードサポニンJ。

好ましくは、サポニンは、リストA、B、またはCから選択されるサポニン、より好ましくはリストBまたはCから選択されるサポニン、さらにより好ましくはリストCから選択されるサポニンのいずれか1つ以上である。

50

【0677】

8A. 実施形態1A～7Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンは、AG1856、GE1741、キラヤ・サポナリアから単離されるサポニン、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、サポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニン、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、およびSO1904のいずれか1つ以上であり、好ましくは、ここで、サポニンはQS-21、SO1832、SO1861、SA1641、およびGE1741のいずれか1つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンはQS-21、SO1832、またはSO1861であり、最も好ましくはSO1861である。

【0678】

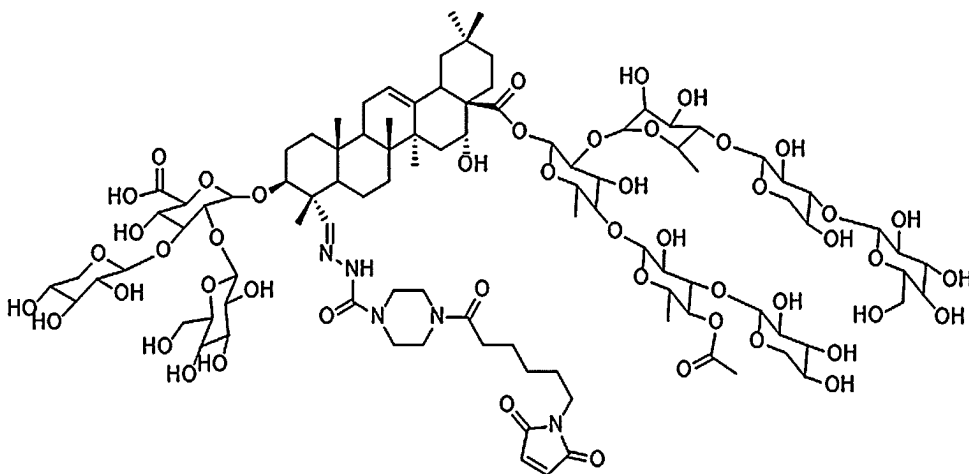
9A. 実施形態1A～8Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンはサポナリア・オフィシナリスから単離されるサポニンであり、好ましくは、ここで、サポニンは、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、およびSO1904のいずれか1つ以上であり、より好ましくは、ここで、サポニンは、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、およびSO1904のいずれか1つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンはSO1832、SO1861、およびSO1862のいずれか1つ以上であり、さらにより好ましくは、ここで、サポニンはSO1832およびSO1861であり、最も好ましくはSO1861である。

【0679】

10A. 実施形態1A～9Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、ここで、サポニンはSO1861であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体は、分子(VII)aに従うSO1861サポニン誘導体：

【0680】

【化141】



(VII) a

【0681】

の、オリゴヌクレオチドおよび少なくとも1つのGalNAc部分との複合体化によって提供されて、オリゴヌクレオチド複合体を提供する。

【0682】

11A. 実施形態1A～10Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって

、ここで、上記複合体に含まれるオリゴヌクレオチドが、150 nt よりも長くない核酸として定められ、好ましくは、ここで、オリゴヌクレオチドは5～150 nt のサイズを有し、好ましくは8～100 nt であり、最も好ましくは10～50 nt である。

【0683】

12A. 第2の薬学的組成物であって、実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体と、任意に薬学的に許容される賦形剤および／または任意に薬学的に許容される希釈剤とを含む。

【0684】

13A. 医薬としての使用のための、実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体。

【0685】

14A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、およびLDHのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0686】

15A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上の発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のため、ならびに／あるいは遺伝子HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、およびCEBPAのいずれか1つ以上が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0687】

16A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、実施形態14Aまたは15Aに従う使用のためであり、ここで、上記使用は、遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBの発現生成物が関わる疾患または健康上の問題の処置または予防において、ならびに／あるいは遺伝子HSP27およびapoBのいずれか1つ以上、好ましくはapoBが関わる疾患または健康上の問題の処置または予防における使用のためである。

【0688】

17A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、実施形態14A～16Aのいずれか1つに従う使用のためであり、ここで、上記使用は、以下の処置または予防においてである：癌、感染性疾患、ウイルス感染、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR型アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体関連疾患、B型肝炎感染、C型肝炎感染、α1-アンチトリプシン欠乏症、β-サラセミア、または自己免疫疾患。

【0689】

18A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、実施形態14A～17Aのいずれか1つに

10

20

30

40

50

従う使用のためであり、ここで、上記使用は、癌、例えば子宮内膜癌、乳癌、肺癌、もしくは肝細胞癌、および／または心血管疾患、例えば高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症の処置または予防においてである。

【0690】

19A. 実施形態12Aの第2の薬学的組成物または実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体であって、対象におけるLDLコレステロールの低下における使用のためである。

【0691】

20A. 実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体を細胞の外側から上記細胞の内側に移入し、好ましくは、その後、上記オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドを上記細胞のサイトゾルに移入するための、インビトロのまたはエキスピボの方法であって、以下のステップを含む：

a) その表面上にASGPRを発現する細胞を提供し、細胞は好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞、および腫瘍細胞から選択され、提供された細胞に移入するための実施形態1A～11Aのいずれか1つのオリゴヌクレオチド複合体を提供すること、

b) ステップa)の細胞をインビトロでまたはエキスピボでステップa)のオリゴヌクレオチド複合体と接触させ、それによって、細胞の外側から上記細胞内へのオリゴヌクレオチド複合体の移入をもたらす、好ましくは、それによって、その後、上記細胞のサイトゾルへのオリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの移入をもたらすこと。

【0692】

好ましくは、対象はヒト対象である。

【0693】

オリゴヌクレオチド複合体のサポニン、植物に由来するサポニンであるということが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは、好ましくは植物から単離されるサポニンである。例えば、サポニンは植物の根から単離される。サポニンが由来する（単離される）かかる植物の例は、キラヤ・サポナリア、ジブソフィラ・パニキュレートL.、サポナリア・オフィシナリス、例えばサポナリア・オフィシナリスL.、およびジブソフィラ・エレガンス、例えばジブソフィラ・エレガンスM.、ピーブである。好ましくは、オリゴヌクレオチド複合体は以下を含む：単一の型のサポニン、好ましくは植物の根などの植物材料に由来する単一の型のサポニン、例えばサポナリア・オフィシナリス（例えばサポナリア・オフィシナリスL.、好ましくはサポナリア・オフィシナリスL.）（根）からのSO1861、SO1862、もしくはSO1832、または例えばキラヤ・サポナリア（根）からのQS-21、QS-7、もしくはQS-17。本発明に従うサポニン、すなわちエンドソーム脱出向上活性を提示するものを単離するための好適なソースは、キラヤ・サポナリア、ジブソフィラ・パニキュレートL.、サポナリア・オフィシナリス、およびジブソフィラ・エレガンス、ならびにキラヤ樹皮である。

【0694】

ある実施形態は本発明のオリゴヌクレオチド複合体であり、ここで、オリゴヌクレオチド複合体に含まれるサポニンは植物から単離される。好ましくは、サポニンは根などの植物の一部からまたは樹皮などの樹木の一部から単離される。好ましくは、サポニンは植物に由来する根から単離される。

【0695】

本発明は上でいくつもの例示的な実施形態の参照によって記載された。改変が可能であり、添付の請求項に定められる保護の範囲に包含される。本発明は次の例によってさらに例解される。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】

【0696】

例および例示的な実施形態

例1. CD71-サポリン+4000nM三価GalNAc-L-SO1861

三価 GalNAc は肝細胞上の ASGPR1 受容体を認識し結合する標的化リガンドである。三価 GalNAc を生成し (図 1 A ~ C および 図 8 A ~ G)、 SO1861-EMCH を、三価 GalNAc に DAR1 で複合体化した (不安定。図 2 A ~ B および 図 4 で未誘導体化 SO1861 について記載されている類似の様式で。ここで、 SPT001 は SO1861 と同義である) (三価 GalNAc-SO1861)。 SO1861-EMCH は、アルデヒド基が $\text{N-}\epsilon\text{-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH)}$ との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化される SO1861 を言い、それによって、 SO1861-Ald-EMCH を提供する。図 1 A ~ C および 8 A ~ G に図示される「三価 GalNAc 」は、エフェクター分子またはサポニンに対するカップリングによって好適な典型的な $(\text{GalNAc})_3\text{Tris}$ 複合体である。対照として、 SO1861-EMCH を、一価 GalNAc (図 3) にもまた DAR1 で複合体化した (不安定) (GalNAc-SO1861)。 HepG2 ($\text{ASGPR1}^+/\text{CD71}^+$ 、表 A 3) および HuH7 ($\text{ASGPR1}^+/-\text{CD71}^+$ 、表 A 3) 細胞を、ある濃度範囲の三価 GalNAc-L-SO1861 および GalNAc-L-SO1861 によって、 10pM の CD71 -サポリン (蛋白質毒素サポリンに複合体化された CD71 を標的化するモノクローナル抗体クローン OKT-9) の存在下または不在下において処置した。 CD71 -サポリンの不在下における細胞処置は、単一の化合物としての三価 GalNAc-L-SO1861 (または三価 GalNAc) が最高で 15000nM までは毒性でないということを示している (図 9)。

10

20

30

40

50

【0697】

HepG2 および HuH7 細胞を、ある範囲の濃度の CD71 -サポリンによって、固定濃度の 1000nM または 4000nM 三価 GalNAc-SO1861 (DAR1) との組み合わせでもまた処置した。 $\text{ASGPR1}/\text{CD71}$ 発現細胞 (HepG2 および HuH7) の標的化された蛋白質毒素によって媒介される細胞殺滅を決定した。これは、強い細胞殺滅を CD71 -サポリンの低い濃度 ($\text{IC50} = 1\text{pM}$) において両方の細胞株で明らかにしたが、同等の濃度の CD71 -サポリン、 CD71 -サポリン + 1000nM 三価 GalNAc 、または CD71 -サポリン + 4000nM 三価 GalNAc は、細胞殺滅を高い濃度の CD71 -サポリン ($\text{IC50} = 100\text{pM}$) でのみ両方の細胞株において誘導し得た (図 10)。

【0698】

これは全て、三価 GalNAc-SO1861 が低い濃度の CD71 -サポリンとの組み合わせで細胞殺滅を $\text{ASGPR1}/\text{CD71}$ 発現細胞において有効に誘導するということを示している。それゆえに、三価 GalNAc-SO1861 は ASGPR1 発現細胞において蛋白質毒素のエンドソーム脱出を有効に誘導する。

【0699】

例 1 A. CD71 -サポリン + 三価 GalNAc-L-SO1861 、三価 $\text{GalNAc-(L-SO1861)}_4$ 、 SO1861-EMCH の濃度系列

三価 GalNAc を生成し (図 1 A ~ C および 図 8 A ~ G)、 SO1861-EMCH を、三価 GalNAc に DAR1 で (三価 GalNAc-SO1861 、 $(\text{GN})_3\text{-SPT}$) または DAR4 で、最初に SO1861-EMCH をデンドロンにカップリングすることによって (三価 $\text{GalNAc-デンドロン (SO1861)}_4$ 、 $(\text{GN})_3\text{-dSPT4}$ 、図 2 3 D ~ E)、複合体化した (不安定。図 2 A ~ B および 図 4 で未誘導体化 SO1861 について記載されている類似の様式で。ここで、 SPT および SPT001 はサポニン SO1861 と同義である)。再び、 SO1861-EMCH は、アルデヒド基が $\text{N-}\epsilon\text{-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH)}$ との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化される SO1861 を言い、それによって、 SO1861-Ald-EMCH を提供する。図 1 A ~ C および 図 8 A ~ G に図示される「三価 GalNAc 」は、エフェクター分子またはサポニンに対するカップリングによって好適な典型的な $(\text{GalNAc})_3\text{Tris}$ 複合体である。対照として、 SO1861-EMCH を、一価 GalNAc (図 3) にもまた DAR1 または DAR4 (デンドロンを用いる) で複

合体化した（不安定）（ GalNAc-SO1861 および GalNAc-(SO1861)_4 ）。 ASGPR1 を高発現する初代肝細胞（ $\text{ASGPR1}^{\text{高}}$ ）を、ある濃度範囲の三価 GalNAc-L-SO1861 、 SO1861-EMCH 、または $(\text{GN})_3\text{-dSPT4}$ によって、 10pM の CD71 -サポリン（蛋白質毒素サポリンに複合体化された CD71 を標的化するモノクローナル抗体 OKT-9 ）の存在下において処置した。 CD71 -サポリンの不在下における細胞処置は、単一の化合物としての三価 GalNAc-L-SO1861 が最高で少なくとも 1.000nM までは毒性でないことを示している（図18A、相対的な細胞生存率）。抗 CD71MoAb -サポリン（「 MoAb 」＝モノクローナル抗体）および SO1861 に複合体化された三価 GalNAc （ DAR1 または DAR4 どちらか）の組み合わせによって処置された細胞の細胞生存率は、 SO1861-EMCH （ SPT-EMCH ）と組み合わせられた抗 CD71MoAb -サポリン（ CD71-SPRN ）によって処置された細胞の細胞生存率と比較して約係数100だけ低かった（図18A）。

10

【0700】

これは全て、三価 GalNAc-SO1861 および三価 GalNAc-(SO1861)_4 が、低い濃度の CD71 -サポリンとの組み合わせで、 ASGPR1/CD71 発現細胞における細胞殺滅を、 SO1861 の不在下では無効な CD71 -サポリンの濃度において有効に誘導するということを示している。それゆえに、三価 GalNAc-SO1861 は、 ASGPR1 発現細胞において蛋白質毒素のエンドソーム脱出を有効に誘導する。それゆえに、肝臓細胞の細胞生存率が考えられるときに、 SPT001 および GalNAc 標的化された SPT001 （ DAR1 ）両方は、業界標準の GalNAc 標的化された ASO の効力を、 SO1861-EMCH は約係数10だけ、 $(\text{GN})_3\text{-SPT}$ および $(\text{GN})_3\text{-dSPT4}$ 両方は約 $100\times$ だけ増大させた。

20

【0701】

例1B. ApoB アンチセンスオリゴヌクレオチドに複合体化された三価 GalNAc +三価 GalNAc-L-SO1861 、または複体の三価 $\text{GalNAc-(L-SO1861)-ApoB}$ アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度系列（サポニン-オリゴヌクレオチド- ASGPR リガンド複合体、図22A~C）

三価 GalNAc を生成し（図1A~Cおよび図8A~G）、 SO1861-EMCH を三価 GalNAc に DAR1 で複合体化した（不安定。図2A~Bおよび図4で未誘導体化 SO1861 について記載されている類似の様式で。ここで、 SPT および SPT001 はサポニン SO1861 と同義である）（三価 GalNAc-SO1861 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-SPT001}$ ）、図19C）。再び、 SO1861-EMCH は、アルデヒド基が $\text{N-}\epsilon\text{-マレイミドカブロン酸ヒドラジド}$ （ EMCH ）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化される SO1861 を言い、それによって、 $\text{SO1861-Aldehyde-EMCH}$ を提供する。また、 ApoB アンチセンス BNA オリゴヌクレオチド ApoBBNA （配列番号2）と4つの共有結合的にカップリングされた SO1861-EMCH を含むデンドロンと両方にカップリングされた三価 GalNAc の共有結合的な複合体を調製した（図20E）。複合体を調製するための概説は、この下の、項「三価 GalNAc-SO1861 および GalNAc-SO1861 合成（図2A~B、4）」ならびに項「三価 GalNAc-BNA オリゴ合成（図5A~B、図6A~B、図7）」ならびに項「三価 GalNAc-S-ApoB （または HSP27 ） BNA オリゴ合成」および「三価 GalNAc-L-ApoB （または HSP27 ） BNA オリゴ合成」、ならびに項「デンドロン（ -L-SO1861 ） $_4$ -三価 GalNAc およびデンドロン（ -L-SO1861 ） $_8$ -三価 GalNAc 合成」および「デンドロン（ -L-SO1861 ） $_4$ -三価 GalNAc 合成」および「デンドロン（ -L-SO1861 ） $_4$ - BNA オリゴ-三価 GalNAc およびデンドロン（ -L-SO1861 ） $_8$ - BNA オリゴ-三価 GalNAc 合成」、ならびに項「デンドロン（ -L-SO1861 ） $_4$ - L-ApoBBNA オリゴ-三価 GalNAc 合成」もまた参照。

30

40

【0702】

50

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1^高）を、ある濃度範囲の三価GalNAc-ApoBBNA（（GalNAc）₃-ApoB）によって、300nM三価GalNAc-SO1861（（GalNAc）₃-SPT001）の存在下または非存在下どちらかにおいて処置した（図18B）。（GalNAc）₃-SPT001の不在下および存在下における細胞処置を比較することは、三価GalNAc-L-SO1861が、（GalNAc）₃-ApoBのみによって処置された細胞におけるapoB遺伝子発現と比較して、初代肝細胞におけるapoB遺伝子発現を縮減するASOの効力を増大させることにおいて高度に有効であるということを示している（図18B）。

【0703】

これは全て、三価GalNAc-SO1861が、（GalNAc）₃-ApoBとの組み合わせで、ASGPR1発現細胞においてapoB遺伝子発現のサイレンシングを有効に改善するということを示している。それゆえに、三価GalNAc-SO1861は、ASGPR1発現細胞においてBNAのエンドソーム脱出を有効に誘導する。

【0704】

加えて、初代肝細胞を、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPR1リガンド複合体、すなわち、SO1861（DARは4である）およびApoBBNA（配列番号2）両方と複合体化された三価GalNAc（（GalNAc）₃-dSPT₄-ApoB、図24D）の濃度系列と接触させ、apoB遺伝子発現を評価した（図18Bおよび図20A）。（GalNAc）₃-dSPT₄-ApoBのapoB遺伝子サイレンシング効力は、共有結合的に連結されたサポニンを欠如する（GalNAc）₃-ApoB複合体と比較して約係数100だけ高い。

【0705】

例1C．固定用量のOKT-9抗CD71モノクローナル抗体の存在下における、SO1861と複合体化された三価GalNAcまたは濃度系列の複合体の三価GalNAc-L-SO1861）

三価GalNAcを生成し（図1A～Bおよび図8A～G）、SO1861-EMCHを、三価GalNAcにDAR1で複合体化した（不安定。図2A～Bおよび図4で未誘導体化SO1861について記載されている類似の様式で。ここで、SPTおよびSPT001はサポニンSO1861と同義である）（三価GalNAc-SO1861、（GalNAc）₃-SPT001）、図19C）。再び、SO1861-EMCHは、アルデヒド基がN-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているSO1861を言い、それによって、SO1861-Aldehyde-EMCHを提供する。複合体を調製するための概説は、ここの下の項「三価GalNAc-SO1861およびGalNAc-SO1861合成（図2A～B、図4）」をもまた参照。

【0706】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1^高）およびHuH7肝細胞細胞株（ASGPR1^{+/+}発現）を、ある濃度範囲の三価GalNAc-SO1861（三価GalNAc-SPT001）によって、10pMのCD71-サポリン（蛋白質毒素サポリンに複合体化されたCD71を標的化するモノクローナル抗体OKT-9。図19D）の不在下または存在下どちらかにおいて処置した。CD71-サポリンの不在下における細胞処置は、単一の化合物としての三価GalNAc-SO1861が最高で少なくとも1000nMまでは毒性でないということを示している（図19A、19B、相対的な細胞生存率）。抗CD71MoAb-サポリンおよび低nM用量のSO1861と複合体化された三価GalNAc（DAR1、三価GalNAc-SPT001）の組み合わせによって処置された細胞の細胞生存率は、同じ用量の三価GalNAc-SPT001と組み合わせられた同じ用量の抗CD71MoAb-サポリン（CD71-サポリン）によって処置されたHuH7細胞の細胞生存率と比較して、初代肝細胞を殺滅することにおいて高度に有効である（図19Aおよび19B）。

【0707】

これは全て、低い用量の三価GalNAc-SO1861が低い濃度のCD71-サポリンとの組み合わせでASGPR1発現細胞において細胞殺滅を有効に誘導するが、どちらの化合物も他方の不在下では殺滅を誘導しないということを示している。それゆえに、三価GalNAc-SO1861は、ASGPR1発現細胞において蛋白質毒素のエンドソーム脱出を有効に誘導する。それゆえに、低nM三価GalNAc-SPT001は、初代肝細胞において低pMのADCの抗CD71MoAb-サポリンの細胞質送達を向上させ、低いASGPR1発現を有する肝細胞細胞株（Hu h 7）は低nM濃度の三価GalNAc-SPT001に対して応答性ではない。

【0708】

例1D. ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチドと複合体化された三価GalNAc+三価GalNAc-L-SO1861、または複合体の三価GalNAc-（L-SO1861）-ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチド（サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPR1リガンド複合体、図22A~C、三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001）の濃度系列

三価GalNAcを生成し、SO1861-EMCHを、三価GalNAcにDAR1で例1Bに記載される通り複合体化した（三価GalNAc-SO1861、（GalNAc）3-SPT001）、図19C）。また、ApoBアンチセンスBNAオリゴヌクレオチドApoBBNA（配列番号2）およびSO1861-EMCH両方にカップリングされた三価GalNAcの共有結合的な複合体を調製した（図20D）。加えて、三価GalNAcおよびApoBアンチセンスBNAオリゴヌクレオチドApoBBNA（配列番号2）の複合体を調製した（図20C）。複合体を調製するための概説は、この下の、項「三価GalNAc-SO1861およびGalNAc-SO1861合成（図2A~B、図4）」および項「三価GalNAc-BNAオリゴ合成（図5A、5B、図6A~B、図7）」、ならびに項「三価GalNAc-S-ApoB（またはHSP27）BNAオリゴ合成」および「三価GalNAc-L-ApoB（またはHSP27）BNAオリゴ合成」、ならびに項「デンドロン（-L-SO1861）₄-三価GalNAcおよびデンドロン（-L-SO1861）₈-三価GalNAc合成」および「デンドロン（-L-SO1861）₄-三価GalNAc合成」および「デンドロン（-L-SO1861）₄-L-BNAオリゴ-三価GalNAcおよびデンドロン（-L-SO1861）₈-L-BNAオリゴ-三価GalNAc合成」、ならびに項「デンドロン（-L-SO1861）₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc合成」もまた参照（図19E、図20E、図23、図24）。

【0709】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1^高）およびHu h 7肝細胞細胞株（低ASGPR1発現）を、ある濃度範囲の三価GalNAc-ApoBBNA（三価GalNAc-ApoBBNA）によって、300nM三価GalNAc-SO1861（三価GalNAc-SPT001）の存在下または不在下どちらかにおいて処置した（図20AおよびB）。三価GalNAc-SPT001の不在下における細胞処置は、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAのみによって処置された初代肝細胞におけるapoBmRNA発現と比較して、初代肝細胞におけるapoBmRNA発現を縮減することにおいて高度に有効（~係数100だけ強力）であることを示している（図20A）。Hu h 7細胞は非常に低いレベルのASGPR1を発現するので、三価GalNAc-ApoBBNAも、三価GalNAc-ApoBBNAおよび三価GalNAc-SPT001の組み合わせも、これらの肝細胞においてapoBmRNA発現の低下を誘導しない。

【0710】

これは全て、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAとの組み合わせで、存在する三価GalNAc-SPT001なしの対照条件と比べてASGPR1発現細胞におけるapoBmRNA発現のサイレンシングを有効に改善することであることを示している。それゆえに、三価GalNAc-SPT001はASGPR1発

10

20

30

40

50

現細胞においてBNAのエンドソーム脱出を有効に誘導する。

【0711】

加えて、初代肝細胞および細胞株Hu h 7の肝臓細胞を、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンド複合体、すなわち、SO1861（4つのSO1861分子を有するデンドロン上で、DARは4である）およびApoBBNA（配列番号2）両方と複合体化された三価GalNAc（（GalNAc）3-dSPT4-ApoB（図20E））、または三価GalNAc-ApoBBNA-デンドロン（SO1861）₄の濃度系列と接触させ、apoBmRNA発現を評価した（図20AおよびB）。（（GalNAc）3-dSPT4-ApoBのapoBmRNA発現サイレンシング効力は、共有結合的に連結されたSO1861を欠如する三価GalNAc-ApoBBNA複合体と比較して、約係数100だけ高い。

10

【0712】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1高）およびHu h 7肝細胞細胞株（低ASGPR1発現）を、ある濃度範囲の三価GalNAc-ApoBBNA（三価GalNAc-ApoBBNA）によって、300nM三価GalNAc-SO1861（三価GalNAc-SPT001）の存在下または不在下どちらかにおいて処置し（図21AおよびB）、apoB蛋白質発現を評価および比較した。三価GalNAc-SPT001の不在下における細胞処置は、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAのみによって処置された初代肝臓細胞におけるapoB蛋白質発現と比較して、初代肝細胞におけるapoB蛋白質発現を縮減することにおいて高度に有効である（1000超の係数だけ多くの効力を有する）ということを示している（図21A）。Hu h 7細胞は非常に低いレベルのASGPR1を発現するので、三価GalNAc-ApoBBNAも、三価GalNAc-ApoBBNAおよび三価GalNAc-SPT001の組み合わせも、これらの肝臓細胞においてapoB蛋白質発現の顕著な低下を誘導しなかった（図21B）。

20

【0713】

これは全て、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAとの組み合わせで、高ASGPR1発現細胞における三価GalNAc-ApoBBNAによるapoB蛋白質発現のサイレンシングを有効に改善するというを示している。それゆえに、三価GalNAc-SPT001は、高ASGPR1発現細胞においてBNA

30

【0714】

それゆえに、低nMの三価GalNAc-ApoBBNA+三価GalNAc-SPT001は、ApoBBNAのエンドソーム脱出および細胞質送達を向上させ、初代肝細胞におけるapoBmRNAサイレンシングをもたらし得る。低nM（（GalNAc）3-dSPT4-ApoBは、ApoBBNAのエンドソーム脱出および細胞質送達を向上させ、初代肝細胞におけるapoBmRNAサイレンシングをもたらし得る。非常に低いASGPR1発現を有する肝細胞は、両方の治療について応答性ではない。低nM三価GalNAc-ApoBBNA+三価GalNAc-SPT001は、ApoBBNAのエンドソーム脱出および細胞質送達を向上させ、初代肝細胞におけるapoB蛋白質減衰をもたらし得る。低nM（（GalNAc）3-dSPT4-ApoBは、ApoBBNAのエンドソーム脱出および細胞質送達を向上させ、初代肝細胞におけるapoB蛋白質減衰をもたらし得る。apoB発現が考えられるときに、非常に低いASGPR1発現を有する細胞は、両方の治療について応答性ではない。

40

【0715】

例2 三価GalNAc-L/S-BNA+SO1861-EMCH

HSP27BNAを三価GalNAcに複合体化し（図5A、B、図6、図7）、HepG2（ASGPR1⁺）細胞またはHu h 7（ASGPR1⁺/−）を、ある範囲の濃度の三価GalNAc-L-HSP27BNA（不安定な複合体化、図5A~B、図6A~B）または三価GalNAc-S-HSP27BNA（安定な複合体化、図7）によ

50

て、固定濃度の4000 nMのSO1861-EMCHとの組み合わせで処置した。HepG2およびHuh7細胞におけるHSP27遺伝子サイレンシングを決定した。4000 nMのSO1861-EMCHとの組み合わせでのみ、有効な遺伝子サイレンシングが、三価GalNAc-L-HSP27BNA (HepG2: IC50=0.1 nM、Huh7: IC50=3 nM) または三価GalNAc-S-HSP27BNA (HepG2: IC50=0.1 nM、Huh7: IC50=3 nM) の低い濃度で、HepG2およびHuh7細胞両方において観察されたが、同等の濃度の三価GalNAc-L-HSP27BNA (HepG2/Huh7: IC50>2000 nM) または三価GalNAc-S-HSP27BNA (HepG2/Huh7: IC50>2000 nM) は、HepG2およびHuh7細胞株において遺伝子サイレンシング活性を示さなかった (図11)

10

【0716】

次に、ApoBBNAを類似の様式で (図5A~B、図6A~B、図7) 三価GalNAcに複合体化し、HepG2 (ASGPR1⁺) 細胞またはHuh7 (ASGPR1⁺/-) を、ある範囲の濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA (不安定な複合体化。図5A~B、図6A~B、図12、図13) または三価GalNAc-S-ApoBBNA (安定な複合体化。図7、図14、図15) または三価GalNAc-L-ApoBスクランブルBNAまたは三価GalNAc-S-ApoBスクランブルBNA (ここでは、スクランブルApoBBNAは、apoBmRNAに結合しないアンチセンススクランブルオリゴヌクレオチド配列である。オフターゲット対照BNA) によって、固定濃度の4000 nMのSO1861-EMCHとの組み合わせで処置した。HepG2 (ASGPR1⁺) 細胞またはHuh7 (ASGPR1⁺/-) におけるApoB遺伝子サイレンシングを決定した。4000 nMのSO1861-EMCHとの組み合わせでのみ、有効な遺伝子サイレンシングが、三価GalNAc-L-ApoBBNA (IC50=10 nM) または三価GalNAc-S-ApoBBNA (IC50=10 nM) の低い濃度で、HepG2細胞において観察されたが、同等の濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA (IC50>2000 nM) または三価GalNAc-S-ApoBBNA (IC50>2000 nM) は、HepG2細胞において遺伝子サイレンシング活性を示さなかった (図12、図14)。処置は細胞株の生存率に影響しなかった (図13、図15)。「L」は「不安定な」リンカーを言い、これは、リンカーが細胞内において、すなわちエンドソームおよびリソソームで明らかなpHにおいて切断されるということを指示する。対照的に、「S」は「安定な」リンカーを言い、これは、リンカーが細胞内において、すなわちエンドソームおよびリソソームで明らかなpHにおいて切断されないということを指示する。それゆえに、複合体を形成するかまたは複合体に含まれるいずれかの2つの分子の間に不安定な結合を含む複合体は、不安定なリンカー上の位置において切断され、それによって、2つの連結または結合された分子を解離させるであろう。例は、ヒト細胞などの哺乳類細胞のエンドソームおよびリソソームで明らかな酸性条件下におけるヒドРАЗン結合の切断である。

20

30

【0717】

これは全て、SO1861-EMCHが、2つの独立した遺伝子標的について、三価GalNAc-L-BNAまたは三価GalNAc-S-BNAのエンドソーム脱出および標的遺伝子サイレンシングを向上させ得ることを示している。遺伝子サイレンシングはHuh7細胞と比較してHepG2細胞ではより効率的であり、細胞の形質膜におけるより高いレベルのASGPR1発現がGalNAc-BNA複合体の増大した取り込みを促すことを示唆する。

40

【0718】

例3 三価GalNAc-L/S-BNA+三価GalNAc-L-SO1861

SO1861-EMCH (SPTともまた言われる) を、三価GalNAc ((GalNAc) 3または(GN) 3) にDAR1で複合体化した (不安定。図2A~Bおよび図4で未誘導体化SO1861について記載されている類似の様式で) (三価GalNAc

50

－SO1861)。HepG2 (ASGPR1⁺) 細胞またはHuh7 (ASGPR1⁺/－) 細胞を、ある範囲の濃度の三価GalNAc－L－ApoBBNA (不安定な複合体化、図16、図17)、三価GalNAc－S－ApoBBNA (安定な複合体化 (図16、図17)、またはスクランブル (Scr.) オフターゲット対照複合体 (三価GalNAc－L－ApoBスクランブルBNAもしくは三価GalNAc－S－ApoBスクランブルBNA) によって、固定濃度の4000nM三価GalNAc－L－SO1861 (DAR1) との組み合わせで処置した。HepG2 (ASGPR1⁺) 細胞およびHuh7 (ASGPR1⁺/－) 細胞におけるApoB遺伝子サイレンシングを決定した。4000nM三価GalNAc－L－SO1861との組み合わせでのみ、有効な遺伝子サイレンシングが、三価GalNAc－L－ApoBBNA (IC50=50nM) または三価GalNAc－S－ApoBBNA (IC50=50nM) の低い濃度で、HepG2細胞 (ASGPR1⁺) において観察された。両方の組み合わせ処置は、より有効でない遺伝子サイレンシングをHuh7細胞 (ASGPR1⁺/－) において示した (三価GalNAc－L－ApoBBNA: IC50=700nM、三価GalNAc－S－ApoBBNA: IC50=700nM)。同等の濃度の三価GalNAc－L－ApoBBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM) または三価GalNAc－S－ApoBBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM) は、遺伝子サイレンシング活性をHepG2およびHuh7細胞株において示さず、4000nM三価GalNAc－L－SO1861は、スクランブル三価GalNAc－L－ApoBスクランブルBNA+ (HepG2/Huh7: IC50>1000nM) またはスクランブル三価GalNAc－S－ApoBスクランブルBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM) の遺伝子サイレンシングも誘導/向上させなかった (図16、図17)。処置は細胞株の生存率に影響しなかった (図16C、D)。

10

20

【0719】

これは全て、三価GalNAc－L－SO1861との組み合わせで、非常に低い濃度の三価GalNAc－L－HSP27BNAまたは三価GalNAc－S－HSP27BNAが、ASGPR1発現細胞における遺伝子サイレンシングを有効に誘導し、再び、より強い効果がより高いASGPR1発現を有する細胞で見られるということを示している。

30

【0720】

材料および方法

略称

AEM	N－(2－アミノエチル) マレイミドトリフルオロアセテート塩
AMPD	2－アミノ－2－メチル－1，3－プロパンジオール
BOP	(ベンゾトリアゾール－1－イルオキシ) トリス (ジメチルアミノ)
ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート	
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	1－エチル－3－(3－ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩
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
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
min	分
NMM	4－メチルモルホリン
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

40

【0721】

50

分析方法

LC-MS方法1

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMF T N、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320 nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：

1500～2400または2000～3000の範囲内でnegまたはneg / pos、ELSD：ガス圧40 psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：Acquity-C18、50×2.1 mm、1.7 μm、温度：60℃、フロー：0.6 mL / 分、生成物の極性に依存する直線勾配：

A t₀ = 2 % A、t_{5.0分} = 50 % A、t_{6.0分} = 98 % A

B t₀ = 2 % A、t_{5.0分} = 98 % A、t_{6.0分} = 98 % A

ポストタイム：1.0分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10 mM重炭酸アンモニウム、水中（pH = 9.5）。

【0722】

LC-MS方法2

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMF T N、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320 nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos / neg 100～800またはneg 2000～3000、ELSD：ガス圧40 psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18、50×2.1 mm、2.5 μm、温度：25℃、フロー：0.5 mL / 分、勾配：t_{0分} = 5 % A、t_{2.0分} = 98 % A、t_{2.7分} = 98 % A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10 mM重炭酸アンモニウム、水中（pH = 9.5）。

【0723】

LC-MS方法3

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMF T N、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320 nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos / neg 105～800、500～1200、または1500～2500、ELSD：ガス圧40 psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18、50×2.1 mm、2.5 μm、温度：40℃、フロー：0.5 mL / 分、勾配：t_{0分} = 5 % A、t_{2.0分} = 98 % A、t_{2.7分} = 98 % A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：0.1 % 蟻酸、アセトニトリル中、溶離液B：0.1 % 蟻酸、水中。

【0724】

LC-MS方法4

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMF T N、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320 nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos / neg 100～800またはneg 2000～3000、ELSD：ガス圧40 psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズAcquityシールドRP18、50×2.1 mm、1.7 μm、温度：25℃、フロー：0.5 mL / 分、勾配：t_{0分} = 5 % A、t_{2.0分} = 98 % A、t_{2.7分} = 98 % A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10 mM重炭酸アンモニウム、水中（pH = 9.5）。

【0725】

調製方法

分取MP-LC方法1

装置型：Reveleris（商標）分取MPLC、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18（145×25 mm、10 μm）、フロー：40 mL / 分、カラム温度：室温、溶離液A：10 mM重炭酸アンモニウム、水中、pH = 9.0）、溶離液B：99 % アセトニトリル + 1 % 10 mM重炭酸アンモニウム、水中、勾配：

10

20

30

40

50

A t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=10% B、 t_{17} 分=50% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

A t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=20% B、 t_{17} 分=60% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

検出UV: 210、235、254 nm、およびELSD。

【0726】

分取MP-LC方法2

装置型: Reveleris (商標) 分取MPLC、カラム: Phenomenex LUNA-C18 (3) (150×25 mm、10 μm)、フロー: 40 mL/分、カラム温度: 室温、溶離液A: 0.1% (v/v) 蟻酸、水中、溶離液B: 0.1% (v/v) 蟻酸、アセトニトリル中、勾配:

A t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=20% B、 t_{17} 分=60% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

B t_0 分=2% B、 t_1 分=2% B、 t_2 分=2% B、 t_{17} 分=30% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

C t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=10% B、 t_{17} 分=50% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

D t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=5% B、 t_{17} 分=40% B、 t_{18} 分=100% B、 t_{23} 分=100% B

検出UV: 210、235、254 nm、およびELSD。

【0727】

分取LC-MS方法3

MS装置型: アジレント・テクノロジーズG6130B四重極、HPLC装置型: アジレント・テクノロジーズ1290分取LC、カラム: ウォータースXSelect (商標) CSH (C18、150×19 mm、10 μm)、フロー: 25 mL/分、カラム温度: 室温、溶離液A: 100%アセトニトリル、溶離液B: 10 mM重炭酸アンモニウム、水中、pH=9.0、勾配:

A t_0 =20% A、 $t_{2.5}$ 分=20% A、 t_{11} 分=60% A、 t_{13} 分=100% A、 t_{17} 分=100% A

B t_0 =5% A、 $t_{2.5}$ 分=5% A、 t_{11} 分=40% A、 t_{13} 分=100% A、 t_{17} 分=100% A

検出: DAD (210 nm)、検出: MSD (ESIpos/neg) 質量範囲: 100~800、DADに基づくフラクションコレクション。

【0728】

分取LC-MS方法4

MS装置型: アジレント・テクノロジーズG6130B四重極、HPLC装置型: アジレント・テクノロジーズ1290分取LC、カラム: ウォータースXBridge蛋白質 (C4、150×19 mm、10 μm)、フロー: 25 mL/分、カラム温度: 室温、溶離液A: 100%アセトニトリル、溶離液B: 10 mM重炭酸アンモニウム、水中、pH=9.0、勾配:

A t_0 =2% A、 $t_{2.5}$ 分=2% A、 t_{11} 分=30% A、 t_{13} 分=100% A、 t_{17} 分=100% A

B t_0 =10% A、 $t_{2.5}$ 分=10% A、 t_{11} 分=50% A、 t_{13} 分=100% A、 t_{17} 分=100% A

C t_0 =5% A、 $t_{2.5}$ 分=5% A、 t_{11} 分=40% A、 t_{13} 分=100% A、 t_{17} 分=100% A

検出: DAD (210 nm)、検出: MSD (ESIpos/neg) 質量範囲: 100~800、DADに基づくフラクションコレクション。

【0729】

フラッシュクロマトグラフィー

Grace Reveleris-X2 (登録商標) C-815フラッシュ、溶媒送達系：3ピストンポンプ、オートプライミング、4つの独立したチャンネル、シングルランで最高で4つの溶媒、溶媒が枯渇するときにラインを自動切り替え、最大ポンプ流量250 mL/分、最大圧力50 bar (725 psi)、検出：UV200~400 nm、最高で4つのUVシグナルの組み合わせおよび全UV範囲のスキャン、ELSD、カラムサイズ：装置上で4~330 g、ルアー型、オプションのホルダーで750 gから最高で3000 g。

【0730】

SO1861-EMCH合成 (SO1861-EMCHはSO1861-Alld-EMCHおよびSPT-EMCHともまた言われる)

SO1861 (121 mg、0.065 mmol) および EMCH・TFA (110 mg、0.325 mmol) に、メタノール (超乾燥、3.00 mL) および TFA (0.020 mL、0.260 mmol) を追加した。反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (120 mg、90%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度96%。

【0731】

三価GalNAc-アジド合成

中間体1：

tert-ブチル1-アジド-17, 17-ビス((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-オアート

ジ-tert-ブチル3, 3'-((2-アミノ-2-((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロピオナート (1.27 g、2.51 mmol) に、DMF (10 mL) 中の3-アジド(peg4)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (977 mg、2.51 mmol) の溶液を追加した。次に、DIPEA (657 μ L、3.77 mmol) を追加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を減圧蒸発し、残渣を酢酸エチル (100 mL) 中に溶解した。もたらされた溶液を0.5 N重硫酸カリウム溶液 (2 $\times$ 100 mL) およびブライン (100 mL) によって洗浄し、Na₂SO₄によって乾燥し、濾過し、減圧蒸発した。残渣をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して (DCM-10%メタノール、DCM中(v/v)勾配、100:0から0:100まで上げる)、標題化合物 (1.27 g、65%) を無色の油として与えた。LC-MSに基づく純度100% (ELSD)。

LRMS (m/z) : 780 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分) : 2.10²

【0732】

中間体2：

1-アジド-17, 17-ビス((2-カルボキシエトキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-酸

DCM (5.0 mL) 中のtert-ブチル1-アジド-17, 17-ビス((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-オアート (1.27 g、1.63 mmol) の溶液に、TFA (5.0 mL、65 mmol) を追加した。反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、トルエン (3 $\times$ 10 mL) およびDCM (3 $\times$ 10 mL) と同時蒸発して、クルードな標題の生成物を無色の油として与えた。

LRMS (m/z) : 611 [M+1]¹⁺

【0733】

中間体3：

ジ-tert-ブチル(10-(1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド)-10-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデシル)-5,15-ジオキソ-8,12-ジオキサ-4,16-ジアザノナデカン-1,19-ジイル)ジカルバメート

1-アジド-17,17-ビス((2-カルボキシエトキシ)メチル)-15-オキソ-3,6,9,12,19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-酸(997mg、1.63mmol)、オキシマピュア(1.04g、7.35mmol)、およびEDCI·HCl(1.17g、6.12mmol)を、DMF(10.0mL)中に溶解した。次に、DIPEA(1.99mL、11.4mmol)を追加し、次に、直接的に、DMF(10.0mL)中のN-Boc-1,3-プロパンジアミン(1.07g、6.12mmol)の溶液の追加をした。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を減圧蒸発し、残渣を酢酸エチル(100mL)中に溶解した。もたらされた溶液を0.5N重硫酸カリウム溶液(100mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2×100mL)、およびブライン(100mL)によって洗浄し、Na₂SO₄によって乾燥し、濾過し、減圧蒸発した。残渣をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して(DCM-10%メタノール、DCM中(v/v)勾配、0:100から100:0まで上げる。生成物が溶出するまで100:0に留まる)、標題化合物(1.16g、66%)を黄色がかった粘性の油として与えた。LC-MS 99%(ELSD)。

LRMS (m/z): 1080 [M+1]¹⁺

LC-MS r.t. (分): 1.51³

[0734]

中間体4:

3,3'-((2-((3-((3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-2-(1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド)プロパン-1,3-ジイル)ビス(オキシ))ビス(N-(3-アミノプロピル)プロパンアミド)トリス(2,2,2-トリフルオロアセテート)合成

DCM(10mL)中のジ-tert-ブチル(10-(1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド)-10-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデシル)-5,15-ジオキソ-8,12-ジオキサ-4,16-ジアザノナデカン-1,19-ジイル)ジカルバメート(1.16g、1.08mmol)の溶液に、TFA(10mL、131mmol)を追加した。反応混合物を室温で攪拌した。2時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、トルエン(3×10mL)およびDCM(3×10mL)と同時蒸発して、クルードな標題の生成物を黄色がかった粘性の油として与えた。

LRMS (m/z): 260 [M+3]³⁺、390 [M+2]²⁺、780 [M+1]¹⁺

[0735]

中間体5:

(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-2-(アセトキシメチル)-6-((5-((2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-5-オキソペンチル)オキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン-3,4-ジイルジアセテート

5-((2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸(米国化学会誌,2014年,第136巻,p.16958-16961に従って得る。3.00g、6.70mmol)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(926mg、8.05mmol)を、DCM(50mL)中に溶解した。次に、EDCI·HCl(1.54g、8.05mmol)および4-(ジメチルアミノ)ピリジン(82mg、0.67mmol)を追加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物をDCMによって希釈し、もたらされた溶液を0.5N重硫酸カリウム溶液(150mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液(150mL)、およびブライン(150mL)によって洗浄し、Na

2 S O₄ によって乾燥し、濾過し、減圧蒸発して、標題化合物 (3.60 g、99%) を白色の泡状物質として与えた。LC-MSに基づく純度99% (ELSD)。

LRMS (m/z) : 545 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分) : 1.07³

【0736】

中間体6:

[(3R, 6R) - 3, 4-ビス (アセチルオキシ) - 6 - { 4 - [(3 - { 3 - [2 - (1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド) - 3 - (2 - { [3 - (5 - { [(2R, 5R) - 4, 5-ビス (アセチルオキシ) - 6 - [(アセチルオキシ) メチル] - 3-アセトアミドオキサ-2-イル] オキシ} ペンタンアミド) プロピル] カルバモイル} エトキシ) - 2 - [(2 - { [3 - (5 - { [(2R, 5R) - 4, 5-ビス (アセチルオキシ) - 6 - [(アセチルオキシ) メチル] - 3-アセトアミドオキサ-2-イル] オキシ} ペンタンアミド) プロピル] カルバモイル} エトキシ) メチル] プロポキシ] プロパンアミド} プロピル) カルバモイル] ブトキシ} - 5-アセトアミドオキサ-2-イル] メチルアセテート

10

3, 3' - ((2 - ((3 - ((3-アミノプロピル) アミノ) - 3-オキソプロポキシ) メチル) - 2 - (1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド) プロパン-1, 3-ジイル) ビス (オキシ)) ビス (N - (3-アミノプロピル) プロパンアミド) トリス (2, 2, 2-トリフルオロアセテート) (1.21 g、1.08 mmol) を、DMF (10 mL) およびDIPEA (1.69 mL、9.70 mmol) の混合物中に溶解した。次に、(2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 5-アセトアミド-2- (アセトキシメチル) - 6 - ((5 - ((2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) オキシ) - 5-オキソペンチル) オキシ) テトラヒドロ-2H-ピラン-3, 4-ジイルジアセテート (2.20 g、4.04 mmol) を追加し、反応混合物を室温で週末に攪拌した。次に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して (DCM-30%メタノール、DCM中 (v/v) 勾配、0:100から100:0まで上げる)、標題化合物 (1.84 g、83%) を黄色がかった泡状物質として与えた。LC-MS 95% (ELSD)。

20

LRMS (m/z) : 2068 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分) : 1.18³

30

【0737】

中間体7:

三価GalNAc-アジド

[(3R, 6R) - 3, 4-ビス (アセチルオキシ) - 6 - { 4 - [(3 - { 3 - [2 - (1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド) - 3 - (2 - { [3 - (5 - { [(2R, 5R) - 4, 5-ビス (アセチルオキシ) - 6 - [(アセチルオキシ) メチル] - 3-アセトアミドオキサ-2-イル] オキシ} ペンタンアミド) プロピル] カルバモイル} エトキシ) - 2 - [(2 - { [3 - (5 - { [(2R, 5R) - 4, 5-ビス (アセチルオキシ) - 6 - [(アセチルオキシ) メチル] - 3-アセトアミドオキサ-2-イル] オキシ} ペンタンアミド) プロピル] カルバモイル} エトキシ) メチル] プロポキシ] プロパンアミド} プロピル) カルバモイル] ブトキシ} - 5-アセトアミドオキサ-2-イル] メチルアセテート (300 mg、0.145 mmol) を、トリエチルアミン (2.00 mL、14.4 mmol)、メタノール (2.00 mL)、および水 (2.00 mL) の混合物中に溶解し、反応混合物を室温で攪拌した。2時間後に、反応混合物を減圧蒸発した。残渣を分取MP-LCによって精製した^{2B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (164 mg、67%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度97%。

40

LRMS (m/z) : 1688 [M-1]¹⁻

LC-MS r. t. (分) : 1.99^{1A}

【0738】

50

三価 GalNAc-SO1861 および GalNAc-SO1861 合成 (図 2、図 4)
中間体 8 :

SO1861-NH_2

SO1861 -アジド (6.89 mg、3.20 μmol) を、32 mM 炭酸カリウム (150 μL 、4.80 μmol) およびアセトニトリル (150 μL) の混合物中に溶解した。その直後に、THF (32 μL 、32 μmol) 中の 1.0 M トリメチルホスフィン溶液を追加し、もたらされた混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (5.30 mg、78%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 94%。

LRMS (m/z) : 1062 [$M-2$]²⁻

LC-MS $r.t.$ (分) : 2.51^{1B}

[0739]

中間体 9 :

SO1861-DBCO

SO1861 -アミン (48.6 mg、22.9 μmol) および DBCO-NHS (13.0 mg、32.4 μmol) に、DIPEA (5.98 μL 、34.3 μmol) および DMF (2.0 mL) の溶液を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。4 時間後に、反応混合物を 50 mM 重炭酸ナトリウム (1.00 mL、50 μmol) の溶液によって希釈した。もたらされた混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (16.9 mg、31%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 94%。

LRMS (m/z) : 2412 [$M-1$]¹⁻

LC-MS $r.t.$ (分) : 2.45^{1B}

[0740]

$\text{SO1861-L-三価 GalNAc}$ 合成

SO1861-DBCO (7.50 mg、3.11 μmol) および三価 GalNAc -アジド (5.31 mg、3.14 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (2:1、 v/v 、0.90 mL) 中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (9.60 mg、75%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 99%。

LRMS (m/z) : 2050 [$M-2$]²⁻

LC-MS $r.t.$ (分) : 2.04^{1B}

[0741]

SO1861-L-GalNAc 合成

SO1861-DBCO (1.75 mg、0.73 μmol) および GalNAc-P EG3-アジド (0.82 mg、2.18 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (1:1、 v/v 、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (1.63 mg、81%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 100%。

LRMS (m/z) : 2790 [$M-1$]¹⁻

LC-MS $r.t.$ (分) : 2.15^{1B}

[0742]

三価 GalNAc-BNA オリゴ合成 (図 6、7)

中間体 10 :

4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0^{4,9}] ヘキサデカー-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- [2- (2- {2

10

20

30

40

50

ー [2- ({4- [(E)- { [6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサナムイド] イミノ} メチル] フェニル} ホルムアミド) エトキシ] エトキシ} エトキシ) エチル] -4-オキソブタンアミド

4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0^{4,9}] ヘキサデカ-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- {2- [2- (2- {2- [(4-ホルミルフェニル) ホルムアミド] エトキシ} エトキシ) エトキシ] エチル] -4-オキソブタンアミド (25.0 mg、40.9 μmol) および EMCH・TFA (20.8 mg、61.3 μmol) を、メタノール (超乾燥、2.00 mL) 中に溶解した。次に、TFA (9.39 μL 、123 μmol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室内で一晩静置した。反応混合物を分取MP-LCに付した^{1B}。生成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、標題化合物 (16.2 mg、48%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度91%。

LRMS (m/z): 410.2 [M+2]²⁺

LC-MS r. t. (分): 1.41²

[0743]

中間体11:

三価GalNAc-L-マレイミド

三価GalNAc-アジド (20.3 mg、12.0 μmol) および4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0^{4,9}] ヘキサデカ-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- [2- (2- {2- [2- ({4- [(E)- { [6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサナムイド] イミノ} メチル] フェニル} ホルムアミド) エトキシ] エトキシ} エトキシ) エチル] -4-オキソブタンアミド (11.8 mg、14.4 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (2:1、v/v、0.90 mL) 中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{2C}。生成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、標題化合物 (25.6 mg、85%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度88%。

LRMS (m/z): 2101 [M-405]¹⁻、2304 [M-202]¹⁻、2507 [M-1]¹⁻

LC-MS r. t. (分): 1.90^{1B} (異性体を原因として二重のピーク)

[0744]

中間体12:

三価GalNAc-S-マレイミド

三価GalNAc-アジド (20.3 mg、12.0 μmol) およびDBCO-マレイミド (10.3 mg、24.0 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (2:1、v/v、0.90 mL) 中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{2D}。生成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、標題化合物 (22.2 mg、87%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度85%。10%の加水分解したマレイミドを含有する。

LRMS (m/z): 2115 [M-1]¹⁻

LC-MS r. t. (分): 1.60^{1B} (異性体を原因として二重のピーク)

[0745]

三価GalNAc-S-ApoB (またはHSP27) BNAオリゴ合成

ApoBBNAオリゴジスルフィド (5.00 mg、0.686 μmol) に、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μmol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。1時間後に、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した (5000 $\times$ g、30分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mMのTCEP

を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (0.50 mL) によって 2 回洗浄し、各回、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を 20 mM 重炭酸アンモニウム / アセトニトリル (3 : 1、v / v、1.00 mL) によって希釈し、もたらされた溶液を直接的に三価 GalNAc-S-マレイミド (3.02 mg、1.43 μ mol) に追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1.5 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (6.75 mg、quant.) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 94 % (非常に幅広いピーク)。ApoB BNA 配列は配列番号 2 参照。

LRMS (m/z) : 2318 [M-4]⁴⁻

LC-MS r. t. (分) : 1.65^{1A}

[0746]

三価 GalNAc-S-ApoB (または HSP27) スクランブル BNA オリゴ合成
ApoB スクランブル BNA オリゴジスルフィド (5.00 mg、0.688 μ mol) に、2.5 mM TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μ mol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1 時間後に、反応混合物を、3000 Da の分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した (5000 $\times$ g、30 分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (0.50 mL) によって 2 回洗浄し、各回、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を 20 mM 重炭酸アンモニウム / アセトニトリル (3 : 1、v / v、1.00 mL) によって希釈し、もたらされた溶液を直接的に三価 GalNAc-S-マレイミド (3.09 mg、1.46 μ mol) に追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1.5 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (5.91 mg、93 %) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 88 % (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z) : 2311 [M-4]⁴⁻

LC-MS r. t. (分) : 1.60^{1A}

[0747]

三価 GalNAc-L-ApoB (または HSP27) BNA オリゴ合成
ApoB BNA オリゴジスルフィド (5.00 mg、0.686 μ mol) に、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μ mol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1 時間後に、反応混合物を、3000 Da の分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した (5000 $\times$ g、30 分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (0.50 mL) によって 2 回洗浄し、各回、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を 20 mM 重炭酸アンモニウム / アセトニトリル (3 : 1、v / v、1.00 mL) によって希釈し、もたらされた溶液を直接的に三価 GalNAc-L-マレイミド (3.63 mg、1.45 μ mol) に追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1.5 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (6.68 mg、quant.) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 99 % (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z) : 2416 [M-4]⁴⁻

LC-MS r. t. (分) : 1.97^{1A}

[0748]

三価 GalNAc-L-ApoB (または HSP27) スクランブル BNA オリゴ合成
ApoB スクランブル BNA オリゴジスルフィド (5.00 mg、0.688 μ mol) に、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μ mol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1 時間後

に、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した(5000×g、30分間、2×0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液(0.50 mL)によって2回洗浄し、各回に、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を20 mM重炭酸アンモニウム／アセトニトリル(3:1、v/v、1.00 mL)によって希釈し、もたらされた溶液を直接的に三価GallNAc-L-マレイミド(3.68 mg、1.47 μmol)に追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。1.5時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(4.71 mg、71%)を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度96%(非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2409 [M-4]⁴⁻

LC-MS r. t. (分): 1.93^{1A}

[0749]

デンドロン(-L-SO1861)₄-三価GallNAc(図23D~E)およびデンドロン(-L-SO1861)₈-三価GallNAc合成

中間体13:

三価GallNAc-アミンホルマート

三価GallNAc-アジド(36.5 mg、21.6 μmol)(分子21)は、図8Gに示される中間体7である。これを、水(1.00 mL)およびアセトニトリル(1.00 mL)中の炭酸カリウム(5.97 mg、43.2 μmol)の溶液中に溶解した。次に、THF(216 μL、216 μmol)中の1.0 Mトリメチルホスフィン溶液を追加し、もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。45分後に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣を水／アセトニトリル(9:1、v/v、1 mL)中に溶解した。もたらされた溶液を直接的に分取MP-LCに付した^{2B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(36.1 mg、98%)を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度100%。

LRMS (m/z): 1662 [M-1]¹⁻

LC-MS r. t. (分): 1.62^{1A}

[0750]

中間体14:

三価GallNAc-DBCO

三価GallNAc-アミンホルマート(17.4 mg、10.2 μmol)およびDBCO-NHS(6.14 mg、15.3 μmol)を、DMF(0.50 mL)中のNMM(2.24 μL、20.3 μmol)の溶液中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣を水／アセトニトリル(8:2、v/v、1 mL)中に溶解した。もたらされた溶液を直接的に分取MP-LCに付した^{2C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(14.2 mg、72%)を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度96%。

LRMS (m/z): 1950 [M-1]¹

LC-MS r. t. (分): 1.86^{1B}

[0751]

中間体15:

デンドロン(-L-SO1861)₈-アジド

デンドロン(-L-SO1861)₈-アミン(19.6 mg、1.08 μmol)および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(4.17 mg、10.8 μmol)を、DMF(1.50 mL)中に溶解した。次に、DIPEA(1.87 μL、10.8 μmol)を追加し、混合物を1分間振盪し、室温で一晩静置した。反応混合物を分取LC-MSに付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題

化合物 (11.7 mg、59%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 92% (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2316 [M-8]⁸⁻、2647 [M-7]⁷⁻

LC-MS r. t. (分): 4.29^{1A}

【0752】

デンドロン (-L-SO1861)₄-三価 GalNAc 合成

デンドロン (-L-SO1861)₄-アジド (2.50 mg、0.266 μmol) および三価 GalNAc-DBCO (1.56 mg、0.799 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (3:1、v/v、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (2.74 mg、91%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 86% (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2832 [M-4]⁴⁻

LC-MS r. t. (分): 4.07^{1A}

【0753】

デンドロン (-L-SO1861)₈-三価 GalNAc 合成

デンドロン (-L-SO1861)₈-アジド (2.50 mg、0.135 μmol) および三価 GalNAc-DBCO (0.79 mg、0.405 μmol) を、水/アセトニトリルの混合物 (3:1、v/v、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (2.03 mg、74%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 100% (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2559 [M-8]⁸⁻、2925 [M-7]⁷⁻

LC-MS r. t. (分): 4.18^{1A}

【0754】

デンドロン (-L-SO1861)₄-L-BNA オリゴ-三価 GalNAc およびデンドロン (-L-SO1861)₈-L-BNA オリゴ-三価 GalNAc 合成

中間体 16:

三価 GalNAc-チオアセテート

三価 GalNAc-アミンホルマート (18.7 mg、11.0 μmol) および 4-ニトロフェニル 3-(アセチルチオ)プロパノエート (5.90 mg、21.9 μmol) を、DMF (0.50 mL) 中の NMM (2.41 μL、21.9 μmol) の溶液中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣を水中の 0.1% 蟻酸およびアセトニトリル中の 0.1% 蟻酸の混合物 (9:1、v/v、1 mL) 中に溶解した。もたらされた溶液を直接的に分取 MP-LC に付した^{2B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (13.0 mg、66%) を白色の固体として与えた。LC-MS に基づく純度 100%。

LRMS (m/z): 1749 [M-43]¹⁻、1792 [M-1]¹

LC-MS r. t. (分): 1.24^{1B}

【0755】

中間体 17:

DBCO-TCO-三価 GalNAc

三価 GalNAc-チオアセテート (13.0 mg、7.25 μmol) をメタノール (0.50 mL) 中に溶解した。次に、水酸化ナトリウムの 1M 溶液 (7.98 μL、7.98 μmol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL) 中の三官能性リンカー (Ls-t) (すなわち、サポニン部分リンカー Ls の

10

20

30

40

50

例である) (7.39 mg、6.13 μmol) の新しく調製された溶液に追加した。

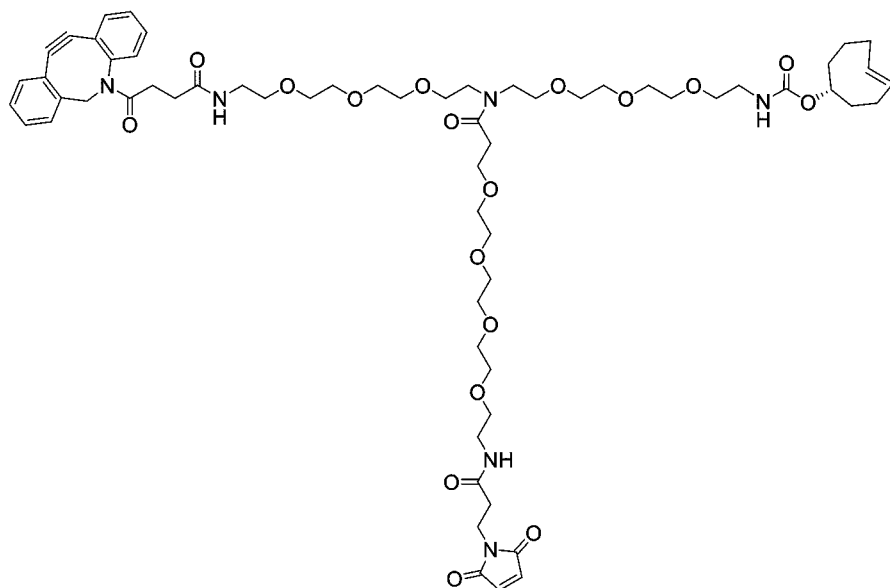
【0756】

三官能性リンカーは、IUPAC名称5, 8, 11, 18, 21, 24, 27-ヘプタオキサ-2, 14, 30-トリアザトリトリアコンタン酸, 14-[16-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル)-13, 16-ジオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-12-アザヘキサデカ-1-イル]-33-(2, 5-ジヒドロ-2, 5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-15, 31-ジオキソ-, (1R, 4E)-4-シクロオクテン-1-イルエステルを有する。三官能性リンカーは次の式 (XXI) を有する:

【0757】

10

【化142】



20

(XXI)。

30

【0758】

もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{2A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (3.83 mg、21%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度89%。

LRMS (m/z): 2409 [M-546]¹⁻、2955 [M-1]¹⁻

LC-MS r. t. (分): 2.66^{1B}

【0759】

中間体18:

40

メチルテトラジン-L-ApoBBNAオリゴ

ApoBBNAオリゴジスルフィド (5.00 mg、0.686 μmol) に、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μmol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。1時間後に、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した (5000 $\times g$ 、30分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液 (0.50 mL) によって2回洗浄し、各回に、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を20 mM重炭酸アンモニウム (1.50 mL) によって希釈し、もたらされた混合物を、直接的に、アセトニトリル (0.5 mL) 中の (E)-1-(4-((2-(6-(2, 5-ジオキソ-2,

50

5-ジヒドロ-1H-ピロール-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(1.36 mg、1.73 μmol)の溶液に追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥して、クルードな標題の生成物をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。クルードな生成物に、20 mM重炭酸アンモニウムの溶液(1.50 mL)を追加し、もたらされた懸濁液を0.45 μm シリンジフィルターによって濾過した。濾液を一晚凍結乾燥して、標題の生成物(5.44 mg、quant)をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。LC-MSに基づく純度90%(非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2648 [M-3]³⁻

LC-MS *r. t.* (分): 0.62⁴

[0760]

中間体19:

メチルテトラジン-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ

ApoBスクランブルBNAオリゴジスルフィド(5.00 mg、0.688 μmol)に、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液(1.00 mL、2.5 μmol)を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。1時間後に、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した(5000 $\times g$ 、30分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mMのTCEPを有する20 mM重炭酸アンモニウムの溶液(0.50 mL)によって2回洗浄し、各回に、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を20 mM重炭酸アンモニウム(1.50 mL)によって希釈し、もたらされた混合物を、直接的に、アセトニトリル(0.5 mL)中の(E)-1-(4-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-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(1.34 mg、1.70 μmol)の溶液に追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥して、クルードな標題の生成物をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。クルードな生成物に、20 mM重炭酸アンモニウムの溶液(1.50 mL)を追加し、もたらされた懸濁液を0.45 μm シリンジフィルターによって濾過した。濾液を一晚凍結乾燥して、標題の生成物(5.48 mg、quant)をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。LC-MSに基づく純度84%(非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z): 2639 [M-3]³⁻

LC-MS *r. t.* (分): 0.58⁴

[0761]

中間体20:

DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc

メチルテトラジン-L-ApoBBNAオリゴ(5.44 mg、0.684 μmol)およびDBCO-TCO-三価GalNAc(2.03 mg、0.687 μmol)に、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル(3:1、*v/v*、1.00 mL)を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(2.87 mg、39%)を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSは、正しい m/z 値を有する複数の幅広いピークを示す。

LRMS (m/z): 2175 [M-5]⁵⁻、2718 [M-6]⁴⁻

LC-MS *r. t.* (分): 2.60~3.00^{1A}

[0762]

中間体21:

10

20

30

40

50

DBCO-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ-三価GalNAc

メチルテトラジン-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ (5.48 mg、0.692 μmol) および DBCO-TCO-三価GalNAc (1.80 mg、0.609 μmol) に、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (2.15 mg、33%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSは、正しいm/z値を有する複数の幅広いピークを示す。

LRMS (m/z): 2169 [M-5]⁵⁻、2711 [M-6]⁴⁻

LC-MS r. t. (分): 2.58~3.20^{1A}

10

【0763】

デンドロン(-L-SO1861)₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc合成 (分子34、図24D)

DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc (1.49 mg、0.137 μmol 、分子31、図24C) およびデンドロン(-L-SO1861)₄-アジド (1.33 mg、0.142 μmol 、分子19、図23D。デンドロン(-L-SO1861)₄-アジドはデンドロン(SPT001)₄-NH₂ (分子15、図23C) に基づいて合成される。ここで、このアミンデンドロンは、塩基としてのDIPEAを有するDMF中においてアジド-PEG₄-NHSエステル (分子18) によって処置された) に、デンドロン(-L-SO1861)₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc (分子34、「三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体」) が合成されるようにして (図24D)、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、0.5 mL) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (0.96 mg、35%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度93% (非常に幅広いピーク)。

20

LRMS (m/z): 2025 [M-10]¹⁰⁻、2250 [M-9]⁹⁻、2532 [M-8]⁸⁻、2893 [M-7]⁷⁻

LC-MS r. t. (分): 3.68^{1A}

30

【0764】

DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc (分子31) を、メチルテトラジン-L-ApoBBNAオリゴ (分子30) をDBCO-TCO-三価GalNAc (分子29) に複合体化することによって合成した (図24A~Bおよび24C)。ここで、DBCO-TCO-三価GalNAc (分子29) は分子27および分子28 (三官能性リンカー) によって合成した。ここで、分子27はGalNAc-チオアセテートであり、三価GalNAc-アミンのギ酸塩の分子22と分子26 (4-ニトロフェニル3-(アセチルチオ)プロパノエート (propanate) との間の反応から得られる (図24A~B)。

【0765】

ApoBBNA、三価GalNAc、およびSPT001 (SO1861) は、三官能性リンカーを用いて単一の共有結合的な複合体へと複合体化される。図24D)。

40

【0766】

デンドロン(-L-SO1861)₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc (分子34、「三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体」) の合成と類似のアプローチを用いて、ApoBBNAがスクランブルApoB核酸配列を有するBNAに置き換えられた複合体を、対照試験目的で合成した。

【0767】

デンドロン(-L-SO1861)₄-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc (分子34、「三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体」) の合成と類似のアプローチを用いて、複合体のデンドロン(-L-SO1861)₈-L-ApoB

50

BNAオリゴ-三価GalNAcを合成した。これにおいては、ApoBBNAオリゴヌクレオチドは、mRNA／蛋白質発現をサイレンシングするためのApoBBNAであるかまたはスクランブルApoB核酸配列を有するBNAであるかどうかであった。

【0768】

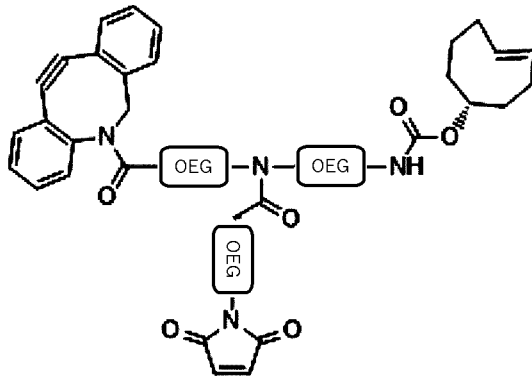
SO1861-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc合成（三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体、図22A～C）

図22A～Cを参照して、三価GalNAc、サポニンSO1861、およびApoBBNAを含む複合体を合成した。分子構造：

【0769】

【化143】

10



20

(TF L)

【0770】

を有する三価リンカーTF Lを用いた。

【0771】

複合体のSO1861-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc合成（三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001複合体）が形成された。

30

【0772】

デンドロン（-L-SO1861）₈-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc合成

DBCO-L-ApoBBNAオリゴ-三価GalNAc（1.38mg、0.127 μmol）およびデンドロン（-L-SO1861）₈-アジド（2.51mg、0.135 μmol）に、20mM重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（3：1、v／v、0.5mL）を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。4時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（0.75mg、20%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度99%（非常に幅広いピーク）。

40

LRMS (m/z) : 2099 [M-14]¹⁴⁻、2261 [M-13]¹³⁻、2450 [M-12]¹²⁻、2672 [M-11]¹¹⁻、2940 [M-10]¹⁰⁻
LC-MS r. t. (分) : 3.90^{1A}

【0773】

デンドロン（-L-SO1861）₄-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ-三価GalNAc合成

DBCO-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ-三価GalNAc（1.09mg、0.100 μmol）およびデンドロン（-L-SO1861）₄-アジド（0.96mg、0.102 μmol）に、20mM重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（3：1、v／v、0.5mL）を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時

50

間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (0.45 mg、22%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS は、正しい m/z 値を有する複数の幅広いピークを示す。

LRMS (m/z): 2023 [M-10]¹⁰⁻、2248 [M-9]⁹⁻、2528 [M-8]⁸⁻、2890 [M-7]⁷⁻

LC-MS r. t. (分): 3.60~4.00^{1A}

【0774】

抗 CD71-サポリン合成

カスタム CD71 mab-サポリン複合体は、アドバンスト・ターゲティング・システムズ (サンディエゴ、CA) から生成および購入した。In Vivo Mab グレード CD71 モノクローナル抗体は BioX Cell から購入した (抗ヒト CD71、クローン OKT-9)。

【0775】

HSP27 BNA、ApoB、および ApoB スクランブルオリゴ配列

HSP27 (5'-GGCacagccagtgGCG-3') [配列番号 1] (アンチセンス BNA (HSP27) は、チャン (Zhang) ら (2011 年) から改変されたオリゴ核酸配列 5'-GGCacagccagtgGCG-3' を有する BNA (NC) であった [Y チャン (Zhang), Z クー (Qu), S キム (Kim), V シ (Shi), B リャオ (Liao) 1, P クラフト (Kraft), R バンダル (Bandaru), Y ウー (Wu), L M グリーンバーガー (Greenberger) および ID ホラック (Horak) 著, トランスフェクションなしのロックド核酸 (LNA) に基づくアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる癌標的の下方調節 (Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection), ジーンセラピー (Gene Therapy) (2011 年) 第 18 巻, p. 326-333]、ApoB (5'-GCCTCagtcctgcttcGCACC-3') [配列番号 2]、および ApoB スクランブル (5'-GGCCTctctacacccgCTCGT-3') [配列番号 3] BNA オリゴは、5'-チオール C6 リンカーありで Bio-Synthesi社 (ルイスビル、テキサス) に発注した。

【0776】

ヒト初代肝細胞処置

凍結保存された初代ヒト肝細胞 (Cytes バイオテクノロジーズ社、スペイン) を肝細胞解凍培地 (Cytes バイオテクノロジーズ社、スペイン) 中で解凍した。それから、細胞を肝細胞プレーティング培地 (Cytes バイオテクノロジーズ社、スペイン) に再懸濁した。次に、細胞を、コラーゲン-I コーティングプレートに、48 または 96 ウェルプレート (グライナー・バイオワン) 上に 215,600 細胞/ウェルまたは 66,600 細胞/ウェルの密度で播種した。細胞を 37°C で 4~6 時間前培養し、処置の始まりの前に細胞培養プレートに対する細胞接着を許した。プレーティング培地を 315 μ l または 108 μ l 維持用培地に置き換え (Cytes バイオテクノロジーズ社、スペイン)、この後に、複合体を PBS 中の 10 $\times$ 濃縮ストック溶液から追加した。プレートを 37°C で 72 時間インキュベーションし、遺伝子発現および細胞生存率分析のために収穫した。

【0777】

ヒト細胞培養物からの RNA 単離および遺伝子発現分析

細胞からの RNA を単離し、標準的なプロトコールに従って分析した (バイオ・ラッド)。用いられた qPCR プライマーは表 A2 に指示されている。

【0778】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 A 2. 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')
HSP27	フォワード	GCAGTCCAACGAGATCACCA [配列番号 4]
	リバーズ	TAAGGCTTTACTTTGGCGGCA [配列番号 5]
Apob	フォワード	AGGGTCCGGGAATCTGATGA [配列番号 6]
	リバーズ	TGGGCACGTTGTCTTTCAGAG [配列番号 7]
HBMS	フォワード	CACCCACACACAGCCTACTT [配列番号 8]
	リバーズ	GTACCCACGCGAATCACTCT [配列番号 9]
GUSB	フォワード	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCT [配列番号 10]
	リバーズ	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA [配列番号 11]

10

【0779】

細胞生存率アッセイ (MTS)

化合物追加後に、細胞を 37℃ で 72 時間インキュベーションした後に、取扱説明書に従って行なわれた MTS アッセイによって細胞生存率を決定した (CellTiter 96 (登録商標) Aqueous One Solution 細胞増殖アッセイ、プロメガ)。手短には、MTS 溶液を、10% FBS を足したフェノールレッドなしの DMEM (PAN バイオテック GmbH) によって 20× 希釈した。細胞を 200 μL / PBS ウェルによって 1 回洗浄し、これの後に、100 μL / ウェルの希釈された MTS 溶液を追加した。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。その後に、492 nm における OD をサーモサイエンティフィック Multiskan FC プレートリーダー (サーモサイエンティフィック) によって測定した。定量的ために、「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、相対的なパーセンテージの細胞生存率パーセンテージを、無処置のウェルのバックグラウンド補正されたシグナルによって化合物処置されたウェルのバックグラウンド補正されたシグナルを除外することによって計算した (パーセンテージに対して ×100)。

20

30

【0780】

FACS 分析

細胞を、各細胞株について適当な密度で、T75 フラスコ中の 10% ウシ胎児血清 (PAN バイオテック GmbH) および 1% ペニシリン / ストレプトマイシン (PAN バイオテック GmbH) を足した DMEM (PAN バイオテック GmbH) に播種した。90% のコンフルエンスに到達するまで、培養物を 72～96 時間インキュベーションした (5% CO₂、37℃)。次に、細胞をトリプシン処理して (TrypLE エクスプレス、ギブコ・サーモサイエンティフィック) 単細胞懸濁液を得、15 mL フェルコンチューブに移入し、遠心した (1,400 rpm、3 分)。細胞ペレットは沈めたままで、上清を捨てた。500,000 細胞を丸底 FACS チューブに移入し、3 mL 冷 DPBS (Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含、2% FBS) によって洗浄した。細胞を 1800 rpm、3 分、4℃ で遠心し、200 μL 冷 DPBS (Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含、2% FBS)、または 195 μL 冷 DPBS (Mg²⁺ および Ca²⁺ 不含、2% FBS) 中に 5 μL 抗体を含有する 200 μL 抗体溶液に再懸濁した。PE 抗ヒト CD71 (#334106、Biolegend) を用いてトランスフェリン受容体を染色し、PE マウス IgG2a-κ アイソタイプ対照 FC (#400212、Biolegend) をその一致したアイソタイプ対照として用いた。PE 抗ヒト ASGPR1 (#130-122-963、ミルテニー) を用いて ASGPR1 受容体を染色し、PE マウス IgG1 アイソタイプ対照 (#130-113-762、ミルテニー) をその一致したアイソタイプ対照として用いた

40

50

。サンプルを4℃で30分間インキュベーションした。その後に、細胞を冷DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) によって2×洗浄し、DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) 中の2% PFA溶液を用いて室温で20分間固定処理した。細胞を冷DPBSによって1×洗浄し、FACS分析のための1000 μ L冷DPBSに再懸濁した。サンプルをシスメックスCube 8フローサイトメトリー系(シスメックス)およびFACSエクスプレス7研究版ソフトウェアによって分析した。FACS分析の結果は表A3にまとめられている。

【0781】

【表15】

表A3、HepG2およびHuh7細胞のASGPR1およびCD71の細胞膜受容体発現レベル

細胞株	ASGPR1発現レベル (MFI)	CD71発現レベル (MFI)
HepG2	8.8	74.7
Huh7	1.6	109

【0782】

例4

材料および方法

略称

AEM	N-(2-アミノエチル)マレイミドトリフルオロアセテート塩
AMPD	2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール
BOP	(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)
)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート	
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
DTME	ジチオビスマレイミドエタン
DTT	ジチオスレイトール
EDCI·HCl	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
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
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
min	分
NMM	4-メチルモルホリン
r.t.	保持時間
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
TBEU	(トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン)-ホウ酸-E
DTA-尿素	
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
TFL	三官能性リンカー

【0783】

分析方法

LC-MS方法1

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMFTN、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：

1500～2400または2000～3000の範囲内でnegまたはneg/pos、ELSD：ガス圧40psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：Acquity-C18、50×2.1mm、1.7μm、温度：60℃、フロー：0.6mL/分、生成物の極性に依存する直線勾配：

A t₀ = 2% A、t_{5.0分} = 50% A、t_{6.0分} = 98% A

B t₀ = 2% A、t_{5.0分} = 98% A、t_{6.0分} = 98% A

ポストタイム：1.0分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10mM重炭酸アンモニウム、水中（pH=9.5）。

【0784】

LC-MS方法2

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMFTN、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg100～800またはneg2000～3000、ELSD：ガス圧40psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18、50×2.1mm、2.5μm、温度：25℃、フロー：0.5mL/分、勾配：t_{0分} = 5% A、t_{2.0分} = 98% A、t_{2.7分} = 98% A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10mM重炭酸アンモニウム、水中（pH=9.5）。

【0785】

LC-MS方法3

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMFTN、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg105～800、500～1200、または1500～2500、ELSD：ガス圧40psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18、50×2.1mm、2.5μm、温度：40℃、フロー：0.5mL/分、勾配：t_{0分} = 5% A、t_{2.0分} = 98% A、t_{2.7分} = 98% A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：0.1% 蟻酸、アセトニトリル中、溶離液B：0.1% 蟻酸、水中。

【0786】

LC-MS方法4

機器：ウォーターズイクラス、バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPISMFTN、SO、UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD：ACQ-SQD2ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg100～800またはneg2000～3000、ELSD：ガス圧40psi、ドリフトチューブ温度：50℃、カラム：ウォーターズAcquityシールドRP18、50×2.1mm、1.7μm、温度：25℃、フロー：0.5mL/分、勾配：t_{0分} = 5% A、t_{2.0分} = 98% A、t_{2.7分} = 98% A、ポストタイム：0.3分、溶離液A：アセトニトリル、溶離液B：10mM重炭酸アンモニウム、水中（pH=9.5）。

【0787】

調製方法

分取MP-LC方法1

装置型：Reveleris（商標）分取MPLC、カラム：ウォーターズXSelect（商標）CSH-C18（145×25mm、10μm）、フロー：40mL/分、カラム温度：室温、溶離液A：10mM重炭酸アンモニウム、水中、pH=9.0）、溶離液B：99%アセトニトリル+1%10mM重炭酸アンモニウム、水中、勾配：

A t_{0分} = 5% B、t_{1分} = 5% B、t_{2分} = 10% B、t_{17分} = 50% B、t_{18分} =

10

20

30

40

50

100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

A t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=20% B、 $t_{1.7}$ 分=60% B、 $t_{1.8}$ 分=100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

検出UV：210、235、254 nm、およびELSD。

【0788】

分取MP-LC方法2

装置型：Reveleris（商標）分取MPLC、カラム：Phenomenex LUNA-C18（3）（150×25 mm、10 μm）、フロー：40 mL/分、カラム温度：室温、溶離液A：0.1%（v/v）蟻酸、水中、溶離液B：0.1%（v/v）蟻酸、アセトニトリル中、勾配：

A t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=20% B、 $t_{1.7}$ 分=60% B、 $t_{1.8}$ 分=100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

B t_0 分=2% B、 t_1 分=2% B、 t_2 分=2% B、 $t_{1.7}$ 分=30% B、 $t_{1.8}$ 分=100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

C t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=10% B、 $t_{1.7}$ 分=50% B、 $t_{1.8}$ 分=100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

D t_0 分=5% B、 t_1 分=5% B、 t_2 分=5% B、 $t_{1.7}$ 分=40% B、 $t_{1.8}$ 分=100% B、 $t_{2.3}$ 分=100% B

検出UV：210、235、254 nm、およびELSD。

【0789】

分取LC-MS方法3

MS装置型：アジレント・テクノロジーズG6130B四重極、HPLC装置型：アジレント・テクノロジーズ1290分取LC、カラム：ウォーターズXSelect（商標）C18（150×19 mm、10 μm）、フロー：25 mL/分、カラム温度：室温、溶離液A：100%アセトニトリル、溶離液B：10 mM重炭酸アンモニウム、水中、pH=9.0、勾配：

A t_0 =20% A、 $t_{2.5}$ 分=20% A、 $t_{1.1}$ 分=60% A、 $t_{1.3}$ 分=100% A、 $t_{1.7}$ 分=100% A

B t_0 =5% A、 $t_{2.5}$ 分=5% A、 $t_{1.1}$ 分=40% A、 $t_{1.3}$ 分=100% A、 $t_{1.7}$ 分=100% A

検出：DAD（210 nm）、検出：MSD（ESIpos/neg）質量範囲：100～800、DADに基づくフラクションコレクション。

【0790】

分取LC-MS方法4

MS装置型：アジレント・テクノロジーズG6130B四重極、HPLC装置型：アジレント・テクノロジーズ1290分取LC、カラム：ウォーターズXBridge蛋白質（C4、150×19 mm、10 μm）、フロー：25 mL/分、カラム温度：室温、溶離液A：100%アセトニトリル、溶離液B：10 mM重炭酸アンモニウム、水中、pH=9.0、勾配：

A t_0 =2% A、 $t_{2.5}$ 分=2% A、 $t_{1.1}$ 分=30% A、 $t_{1.3}$ 分=100% A、 $t_{1.7}$ 分=100% A

B t_0 =10% A、 $t_{2.5}$ 分=10% A、 $t_{1.1}$ 分=50% A、 $t_{1.3}$ 分=100% A、 $t_{1.7}$ 分=100% A

C t_0 =5% A、 $t_{2.5}$ 分=5% A、 $t_{1.1}$ 分=40% A、 $t_{1.3}$ 分=100% A、 $t_{1.7}$ 分=100% A

検出：DAD（210 nm）、検出：MSD（ESIpos/neg）質量範囲：100～800、DADに基づくフラクションコレクション。

【0791】

フラッシュクロマトグラフィー

Grace Reveleris-X2（登録商標）C-815フラッシュ、溶媒送達系

10

20

30

40

50

：3ピストンポンプ、オートブライミング、4つの独立したチャンネル、シングルランで最高で4つの溶媒、溶媒が枯渇するときにラインを自動切り替え、最大ポンプ流量250 mL／分、最大圧力50 bar (725 psi)、検出：UV200～400 nm、最高で4つのUVシグナルの組み合わせおよび全UV範囲のスキャン、ELSD、カラムサイズ：装置上で4～330 g、ルアー型、オプションのホルダーで750 gから最高で3000 g。

【0792】

UV-vis分光測色法

蛋白質濃度は、サーモNanodrop2000スペクトロメーター、 ϵ 280の吸光係数 ($\text{mg}/\text{mL} - 1\text{cm} - 1$) を用いて決定した。オリゴ濃度は ϵ 260の吸光 (extinction) 係数153, 000 M $-1\text{cm} - 1$ を用いて決定した。

10

【0793】

エルマンアッセイは、パーキンエルマーラムダ25分光測色計およびTNBについての14150 M $-1\text{cm} - 1$ の文献のモル吸光係数 ϵ 412を用いて実施した。実験的に決定されたモル吸光係数 ϵ 495 = 58, 700 M $-1\text{cm} - 1$ およびRz280 : 495 = 0.428をSAMSA-フルオレセインに用いた。

【0794】

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

複合体は、SECによって、Aktapurifier10系およびDPBS:IPA (85:15) によって溶出するBiosepSEC-s3000カラムを用いて、分析した。複合体純度は、不純物／凝集物形態のピーク積分面積に対する経時的な複合体ピークUVシグナルの積分によって決定された。

20

【0795】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティング

ネイティブな蛋白質および複合体は、熱変性非還元および還元条件下において、SDS-PAGEによって、蛋白質ラダーに対して、4～12%ビスートリスゲルおよびランニングバッファーとしてのMESを用いて分析した (200 V、～40分)。サンプルを0.5 mg/mLで調製した。LDSサンプル緩衝液およびMOPSSランニングバッファーを希釈剤として含んだ。サンプルを還元するために、DTTを50 mMの終濃度で追加した。サンプルを90～95℃で2分間熱処理し、5 μg (10 μl) を各ウェルに追加した。蛋白質ラダー (10 μl) を前処理なしでローディングした。空のウェルには1 $\times$ LDSサンプル緩衝液 (10 μl) を入れた。ゲルを流した後に、それを、振盪しながら (15分、200 rpm) DI水 (100 mL) によって3回洗浄した。クマシー染色を、ゲルをPAGEBlue蛋白質染色剤 (30 mL) と振盪インキュベーションすることによって行なった (60分、200 rpm)。余分な染色溶液を除去し、これの後に、ゲルをDI水 (100 mL) によって2回すすぎ、DI水 (100 mL) によって脱染した (60分、200 rpm)。もたらされたゲルをイメージングし、その後に、ImageJ (ラズバンド (Rasband), W. S., ImageJ、米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド、米国) を用いてさらに処理した。

30

【0796】

TBEU-PAGE

ネイティブな蛋白質、複合体、およびBNA標準を、熱変性非還元および還元条件下において、TBEU-PAGEによって、オリゴラダーに対して、15% TBE-尿素ゲルおよびランニングバッファーとしてのTBEを用いて分析した (180 V、～60分)。それぞれ、サンプルを0.5 mg/mLで調製し、BNA標準を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で調製した。全て、TBE尿素サンプル緩衝液および精製H₂Oを希釈剤として含んだ。サンプルおよび標準を70℃で3分間熱処理し、10 μl を各ウェルに追加した。レーンあたり、5 μg の蛋白質および複合体サンプル、ならびに0.2 μg のBNAに相当した。TE、pH7.5 (2 μl) 中で0.1 $\mu\text{g}/\text{バンド}/\text{mL}$ に水戻しされたオリゴラダーを、前処置なしでローディングした。ゲルを流した後に、それを、新しく調製された臭化エチジ

40

50

ウム溶液 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) によって振盪しながら染色した (40分、200rpm)。もたらされたゲルをUV落射照明 (254nm) によって可視化し、イメージングし、ImageJ (ラズバンド (Rasband), W. S., ImageJ、米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド、米国) を用いてさらに処理した。

【0797】

MALDI-TOF-MS

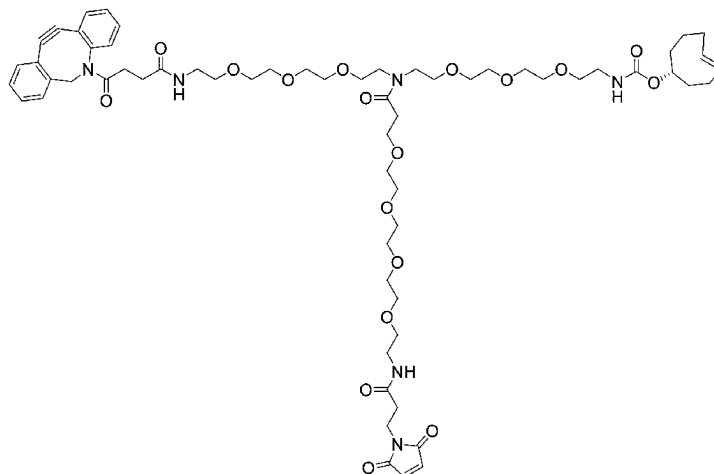
MALDI-TOFスペクトルはMALDI質量分析器 (ブルカーUltraflex I II) によって記録した。典型的には、ナノモルからマイクロモル範囲でミリQ水中に溶解されたサンプルを、ターゲット (MTP384ターゲットプレート研磨済みスチールTF、ブルカー・ダルトンズ) 上にスポットした。スーパーDHB (99%、フルカ) またはシナピン酸 (SA、99%、シグマアルドリッチ) どちらかを、アセトニトリル (MALDI-TOF-MS試験済み、シグマ) / 0.1% TFA (7:3 v/v) 中に溶解されたマトリックスとして用い、液滴乾燥法によった。PepMix (ペプチド校正標準、ブルカー・ダルトンズ) またはProteMass (蛋白質校正標準、シグマアルドリッチ) が校正標準としての用をなした。

【0798】

三官能性リンカー (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) 合成 (図35)

三官能性リンカー (TFL) は、IUPAC名称5, 8, 11, 18, 21, 24, 27-ヘプタオキサ-2, 14, 30-トリアザトリトリアコンタン酸, 14-[16-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル)-13, 16-ジオキソ-3, 6, 9-トリオキサ-12-アザヘキサデカ-1-イル]-33-(2, 5-ジヒドロ-2, 5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-15, 31-ジオキソ-, (1R, 4E)-4-シクロオクテン-1-イルエステルを有する。三官能性リンカーは次の式 (XXI) を有する:

【化144】



(XXI)。

【0799】

中間体1:

SO1861-L-ヒドラゾン-アジド (分子3)

SO1861 (60mg、0.032mmol、分子1) および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、分子2) に、メタノール (超乾燥、1.00mL) およびTFA (9.86μL、0.129mmol) を追加し、反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した¹。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (58.4mg、84%) を白色のフワ

フワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度99%。

LRMS (m/z): 2150 [M-H]¹⁻

LC-MS r. t. (分): 1.103^B

【0800】

中間体2:

三官能性リンカー-(L-ヒドラゾン-SO1861)-(TCO)-(マレイミド)(分子5)

DMF (2.0 mL) 中のTF L-(DBCO)-(TCO)-(マレイミド) (15 mg、12.5 μ mol、分子4) の溶液を、SO1861-L-ヒドラゾン-アジド (26.8 mg、12.5 μ mol、分子3) に追加した。反応混合物を30分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{1C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (31.4 mg、75%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度96%。

MS (m/z): 3354 [M-H]¹⁻

【0801】

中間体3:

三価GalNAc-チオアセテート (分子8)

三価GalNAc-アミンホルマート (18.7 mg、11.0 μ mol、分子6) および4-ニトロフェニル3-(アセチルチオ)プロパノエート (5.90 mg、21.9 μ mol、分子7) を、DMF (0.50 mL) 中のNMM (2.41 μ L、21.9 μ mol) の溶液中に溶解した。三価GalNAc-アミンホルマートは、図8Gに示される中間体7である三価GalNAc-アジドに基づいて得られる。図35Bでは、分子6のホルマートは単純にするために示していない。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣を、水中の0.1%蟻酸およびアセトニトリル中の0.1%蟻酸の混合物 (9:1、v/v、1 mL) 中に溶解した。もたらされた溶液を直接的に分取MP-LCに付した^{2B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (13.0 mg、66%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度100%。

LRMS (m/z): 1749 [M-43]¹⁻、1792 [M-H]¹

LC-MS r. t. (分): 1.24^{1B}

【0802】

中間体4:

三官能性リンカー-(L-SO1861)-(TCO)-(三価GalNAc) (分子9)

三価GalNAc-チオアセテート (13.0 mg、7.25 μ mol、分子8) をメタノール (0.50 mL) 中に溶解した。次に、水酸化ナトリウムの1M溶液 (7.98 μ L、7.98 μ mol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を、20mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL) 中のTF L-(DBCO)-(TCO)-(マレイミド) (20.6 mg、6.13 μ mol、分子5) の新しく調製された溶液に追加した。

【0803】

もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{2A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (3.83 mg、21%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度89%。

MS (m/z): 5106 [M+H]⁺

【0804】

中間体5:

メチルテトラジン-L-ApoBBNAオリゴ (分子12)

ApoB#02BNAオリゴジスルフィド (3.3 mg、0.686 μ mol、分子1

10

20

30

40

50

0) に、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (1.00 mL、2.5 μ mol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1 時間後に、反応混合物を、3000 Da の分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いて濾過した (5000 $\times$ g、30 分間、2 $\times$ 0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM の TCEP を有する 20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (0.50 mL) によって 2 回洗浄し、各回に、上に記載された同じ条件下で濾過した。次として、残渣の溶液を 20 mM 重炭酸アンモニウム (1.50 mL) によって希釈し、もたらされた混合物を、直接的に、アセトニトリル (0.5 mL) 中の (E)-1-(4-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-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 (1.36 mg、1.73 μ mol、分子 11) の溶液に追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥して、クルードな標題の生成物をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。クルードな生成物に、20 mM 重炭酸アンモニウムの溶液 (1.50 mL) を追加し、もたらされた懸濁液を 0.45 μ m シリンジフィルターによって濾過した。濾液を一晚凍結乾燥して、標題の生成物 (3.4 mg、89%) をピンク色のフワフワの固体としてもたらした。LC-MS に基づく純度 90%。

MS (m/z) : 5579 [M+Na]⁺

[0805]

三官能性リンカー - (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) (分子 13)

TFL - (L-ヒドラゾン-SO1861) - (TCO) - (三価 GalNAc) (16.1 mg、3.15 μ mol、分子 9) およびメチルテトラジン-BNAオリゴ (10.2 mg、1.83 μ mol、分子 12) を、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリルの溶液 (3:1、v/v、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。3 時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥した。クルードな生成物を 20 mM 重炭酸アンモニウム (1 mL) 中に溶解し、もたらされた溶液を直接的に分取 LC-MS に付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (27.2 mg、81%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 91%。

MS (m/z) : 10660 [M+H]⁺

[0806]

三官能性リンカー - (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) (分子 13) の合成と類似のアプローチを用いて、ApobBNA がスクランブル Apob 核酸配列を有する BNA (分子 12a) に置き換えられている複合体が、対照試験目的で合成され得る (分子 13a)。

[0807]

三官能性リンカー - (デンドロン-(L-ヒドラゾン-SO1861)4) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) 合成 (図 36)

中間体 6 :

SO1861-EMCH (分子 15)

SO1861 (121 mg、0.065 mmol、分子 1) および EMCH、TFA (110 mg、0.325 mmol、分子 14) に、メタノール (超乾燥、3.00 mL) および TFA (0.020 mL、0.260 mmol) を追加した。反応混合物を室温で攪拌した。1.5 時間後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した¹。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (120 mg、90%) を白色のフワフワ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-MS r. t. (分) : 1.084

10

20

30

40

50

【0808】

中間体7：

デンドロン(−L−SO1861)₄−アミン(分子17)

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(2.73mg、3.13μmol、分子16)を、20mMのNH₄HCO₃の0.5mMのTCEP／アセトニトリルとの混合物(3:1、v/v、3.00mL)中に溶解した。次に、SO1861−EMCH(29.2mg、0.014mmol、分子15)を追加し、反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後に、反応混合物を分取LC−MSに付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(12.3mg、43%)を白色のフワフワ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−MS r. t. (分): 4.39^{5A}

【0809】

中間体8

デンドロン(−L−SO1861)₄−アジド(分子19)

デンドロン(SO1861)₄−アミン(6.81mg、0.748μmol、分子17)および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、分子18)を、DMF(1.00mL)中に溶解した。次に、DIPEA(1.302μL、7.48μmol)を追加し、混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC−MSに付した^{3C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(5.86mg、84%)を白色のフワフワ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−MS r. t. (分): 4.78^{5B}

【0810】

中間体9：

三官能性リンカー(DBCO)−(TCO)−(三価GalNAc)(分子20)

三価GalNAc−チオアセテート(13.0mg、7.25μmol、分子8)をメタノール(0.50mL)中に溶解した。次に、水酸化ナトリウムの1M溶液(7.98μL、7.98μmol)を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を、20mM重炭酸アンモニウム／アセトニトリル(3:1、v/v、2.00mL)中の三官能性リンカー(7.39mg、6.13μmol、分子4)の新しく調製された溶液に追加した。もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP−LCに付した^{2A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(3.83mg、21%)を白色の固体として与えた。LC−MSに基づく純度89%。

LRMS(m/z): 2409 [M−546]^{1−}、2955 [M−1]^{1−}

LC−MS r. t. (分): 2.66^{1B}

【0811】

中間体10：

三官能性リンカー(DBCO)−(L−ApoBBNAオリゴ)−(三価GalNAc)(分子21)

メチルテトラジン−L−ApoBBNAオリゴ(5.82mg、0.684μmol、分子12)およびTFLL−(DBCO)−(TCO)−(三価GalNAc)(2.03mg、0.687μmol、分子20)に、20mM重炭酸アンモニウム／アセトニトリル

10

20

30

40

50

ル（3：1、v/v、1.00 mL）を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（3.73 mg、64%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSは、正しいm/z値を有する複数の幅広いピークを示す。

MS (m/z) : 8511 [M+H]⁺

【0812】

三官能性リンカー（デンドロン（-L-ヒドラゾン-SO1861）₄）-（L-ApoBBNAオリゴ）-（三価GalNAc合成）（分子22）

TFL-（DBCO）-（L-ApoBBNAオリゴ）-（三価GalNAc）（1.16 mg、0.137 μmol、分子21）およびデンドロン（-L-SO1861）₄-アジド（1.39 mg、0.142 μmol、分子19）に、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル（3：1、v/v、0.5 mL）を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{4B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（1.36 mg、54%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度92%（非常に幅広いピーク）。

MS (m/z) : 18336 [M+H]⁺

【0813】

三官能性リンカー（デンドロン（-L-ヒドラゾン-SO1861）₄）-（L-ApoBBNAオリゴ）-（三価GalNAc合成）（分子22）の合成と類似のアプローチを用いて、ApoBBNAがスクランブルApoB核酸配列を有するBNA（分子12a）に置き換えられている複合体が、対照試験目的で合成され得る（分子22a）。

【0814】

三官能性リンカー（デンドロン（-L-ヒドラゾン-SO1861）₈）-（BNAオリゴ）-（三価GalNAc）合成（図37）

中間体11：

デンドロン（-L-SO1861）₈-アミン（分子24）

（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（0.52 mg、0.299 μmol、分子23）およびSO1861-EMCH（29.2 mg、0.014 mmol、分子15）を、20 mMのNH₄HCO₃の0.5 mMのTCEP/アセトニトリルとの混合物（3：1、v/v、1.00 mL）中に溶解し、もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、TCEP（0.30 mg、1.05 μmol）を追加し、反応混合物を1分間振盪した。次に、混合物を直接的に分取LC-MSに付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（2.17 mg、40%）を白色のフワフワ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-MS r. t. (分) : 4.41^{5A}

【0815】

中間体12：

デンドロン（-L-SO1861）₈-アジド（分子25）

デンドロン（-L-SO1861）₈-アミン（19.6 mg、1.08 μmol、分子24）および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（4.17 mg、10.8 μmol、分子18）を、DMF（1.50 mL）中に溶解した。次に、DIPEA（1.87 μL、10

10

20

30

40

50

・ $8 \mu\text{mol}$) を追加し、混合物を 1 分間振盪し、室温で一晩静置した。反応混合物をそれから分取 LC-MS に付した^{4B}。生成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、標題化合物 (11.7 mg 、 59%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 92% (非常に幅広いピーク)。

LRMS (m/z) : 2316 [$M-8$]⁸⁻、 2647 [$M-7$]⁷⁻

LC-MS r. t. (分) : 4.29^{1A}

【0816】

三官能性リンカー (デンドロン ($-L-$ ヒドラゾン- $SO1861$)₈) - (L -ApoBBNAオリゴ) - (三価GalNAc合成) (分子26)

TFL- (DBCO) - (L -ApoBBNAオリゴ) - (三価GalNAc) (1.16 mg 、 $0.137 \mu\text{mol}$ 、分子21) およびデンドロン ($-L-$ SO1861)₈-アジド (2.72 mg 、 $0.142 \mu\text{mol}$ 、分子25) に、 20 mM 重炭酸アンモニウム / アセトニトリル ($3:1$ 、 v/v 、 0.5 mL) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。3 時間後に、反応混合物を分取 LC-MS に付した^{4B}。生成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、標題化合物 (1.6 mg 、 42%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 93% (非常に幅広いピーク)。

MS (m/z) : 27655 [$M+H$]⁺

【0817】

三官能性リンカー (デンドロン ($-L-$ ヒドラゾン- $SO1861$)₈) - (L -ApoBBNAオリゴ) - (三価GalNAc合成) (分子26) の合成と類似のアプローチを用いて、ApoBBNA がスクランブル ApoB 核酸配列を有する BNA (分子12a) に置き換えられている複合体が、対照試験目的で合成され得る (分子26a)。

【0818】

三官能性リンカー - (L -セミカルバゾン- $SO1861$) - (BNAオリゴ) - (三価GalNAc合成) (図38)

中間体13:

SO1861- L -セミカルバゾン-アジド (分子28)

SO1861 (60 mg 、 0.032 mmol 、分子1) および 4- (6-アジドヘキサノイル) ピペラジン-1-カルボヒドラジド (36.5 mg 、 0.129 mmol 、分子27) に、メタノール (超乾燥、 1.00 mL) および TFA ($9.86 \mu\text{L}$ 、 0.129 mmol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。2 時間後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した¹。生成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、標題化合物 (30 mg 、 44%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 99% 。

MS (m/z) : 2126 [$M-1$]¹⁻

【0819】

中間体14:

三官能性リンカー - (L -セミカルバゾン- $SO1861$) - (TCO) - (マレイミド) (分子29)

DMF (2.0 mL) 中の TFL- (DBCO) - (TCO) - (マレイミド) (15 mg 、 $12.5 \mu\text{mol}$ 、分子4) の溶液を、SO1861- L -アジド (26.6 mg 、 $12.5 \mu\text{mol}$ 、分子28) に追加した。反応混合物を 30 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した^{1C}。生成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、標題化合物 (27.5 mg 、 66%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 96% 。

MS (m/z) : 3331 [$M-1$]¹⁻

【0820】

中間体15:

三官能性リンカー - (L -セミカルバゾン- $SO1861$) - (TCO) - (三価Gal

10

20

30

40

50

NAc) (分子30)

三価GalNAc-チオアセテート (13.0 mg、7.25 μ mol、分子8) をメタノール (0.50 mL) 中に溶解した。次に、水酸化ナトリウムの1 M溶液 (7.98 μ L、7.98 μ mol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL) 中のTFL- (L-セミカルバゾン-SO1861) - (TCO) - (マレイミド) (20.4 mg、6.13 μ mol、分子29) の新しく調製された溶液に追加した。

【0821】

もたらされた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{2A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (16.7 mg、54%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度94%。

MS (m/z): 5081 [M-1]¹⁻

【0822】

三官能性リンカー- (L-セミカルバゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (分子31)

TFL- (L-セミカルバゾン-SO1861) - (TCO) - (三価GalNAc) (16 mg、3.15 μ mol、分子30) およびメチルテトラジン-BNAオリゴ (10.2 mg、1.83 μ mol、分子12) を、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリルの溶液 (3:1、v/v、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥した。クルードな生成物を20 mM重炭酸アンモニウム (1 mL) 中に溶解し、もたらされた溶液を直接的に分取LC-MSに付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (11.3 mg、59%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度92%。

MS (m/z): 10638 [M+H]⁺

【0823】

三官能性リンカー- (L-セミカルバゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (分子31) の合成と類似のアプローチを用いて、ApobBNAがスクランブルApob核酸配列を有するBNA (分子12a) に置き換えられた複合体を、対照試験目的で合成した (分子31a)。

【0824】

三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 4- (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) 合成 (図39)

中間体16:

ベンジル4- (2- (tert-ブトキシカルボニル) ヒドラジン-1-カルボニル) ピペラジン-1-カルボキシレート (分子33)

0°Cのトルエン中のホスゲンの攪拌溶液 (20%、w/w、15.8 mL、30.0 mmol) に、ジクロロメタン (25 mL) およびDIPEA (3.83 mL、22.0 mmol) 中の1-Cbz-ピペラジン (1.93 mL、10.0 mmol、分子1) の溶液をゆっくり (10分) 追加した。反応混合物を室温で攪拌した。30分後に、反応混合物を減圧蒸発し、ジクロロメタン (2×50 mL) と同時蒸発した。次に、残渣をジクロロメタン (100 mL) 中に溶解し、もたらされた溶液を0°Cで攪拌した。ジクロロメタン (20 mL) およびDIPEA (3.83 mL、22.0 mmol) 中のBocヒドラジン (2.33 mL、15.0 mmol) の溶液を追加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物をそれからジクロロメタン (100 mL) によって希釈し、もたらされた溶液を0.5 N重硫酸カリウム溶液 (2×100 mL) およびブライン (100 mL) によって洗浄し、Na₂SO₄によって乾燥し、濾過し、減圧蒸発した。残渣をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して (最初に酢酸エチル-ヘプタン勾配、5:95 (v/v

10

20

30

40

50

v) から 100% 酢酸エチルまで上げる。次に 10% メタノール、DCM 中 (v/v) によるフラッシュによる)、標題化合物 (2.42 g、64%) を白色の固体として与えた。LC-MS に基づく純度 100%。

LRMS (m/z) : 279 / 323 / 401 [M-99 / M-55 / M+23]¹⁺
LC-MS r. t. (分) : 1.27¹

【0825】

中間体 17 :

tert-ブチル 2-(ピペラジン-1-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボキシレート (分子 34)

ベンジル 4-(2-(tert-ブトキシカルボニル)ヒドラジン-1-カルボニル)ピペラジン-1-カルボキシレート (2.42 g、6.39 mmol、分子 33) に、メタノール (50 mL) を追加した。混合物を加熱して澄明な溶液を得た。次に、パラジウム (活性炭上に 10%、水で 50% 湿潤、1.50 g) を追加し、もたらされた混合物を、バルーンを用いることによって水素雰囲気下で攪拌した。1 時間後に、反応混合物をセライトによって濾過し、濾液を減圧蒸発して、標題の生成物 (1.56 g、quant.) を白色の固体として与えた。

LRMS (m/z) : 189 / 245 [M-55 / M+1]¹⁺

【0826】

中間体 18 :

tert-ブチル 2-(4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボキシレート (分子 36)

6-マレイミドカプロン酸 (810 mg、3.84 mmol、分子 35)、tert-ブチル 2-(ピペラジン-1-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボキシレート (781 mg、3.20 mmol、分子 34)、EDCI·HCl (735 mg、3.84 mmol)、およびオキシマピュア (591 mg、4.16 mmol) を、ジクロロメタン (25 mL) および DIPEA (835 μL、4.80 mmol) の混合物中に溶解し、反応混合物を室温で攪拌した。2 時間後に、反応混合物を減圧蒸発し、残渣を酢酸エチル (50 mL) 中に溶解した。もたらされた溶液を 0.5 N 重硫酸カリウム溶液 (50 mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (2×50 mL)、およびブライン (50 mL) によって洗浄し、Na₂SO₄ によって乾燥し、濾過し、減圧蒸発した。残渣をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して (DCM-10% メタノール、DCM 中 (v/v) 勾配、100:0 から 40:60 まで上げる)、標題化合物 (634 mg、45%) を白色の固体として与えた。LC-MS に基づく純度 97%。

LRMS (m/z) : 338 / 382 / 460 [M-99 / M-55 / M+23]¹⁺
LC-MS r. t. (分) : 1.02¹

【0827】

中間体 19 :

SO1861-SC-Mal (分子 37)

tert-ブチル 2-(4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボキシレート (25.0 mg、57.1 μmol、分子 36) を、ジクロロメタン (500 μL) および TFA (500 μL) の混合物中に溶解し、反応混合物を室温で攪拌した。30 分後に、反応混合物を減圧蒸発し、ジクロロメタン (3×5 mL) およびメタノール (5 mL) と同時蒸発した。残渣および SO1861 (21.3 mg、11.4 μmol、分子 1) をメタノール (超乾燥、1.00 mL) 中に溶解し、もたらされた混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。4 時間後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した²。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (13.7 mg、55%) を白色のフワフワの固体としてもたらした。LC-MS に基づく純度 97%。

10

20

30

40

50

L R M S (m/z) : 2181 [M-1]¹⁻

L C - M S r . t . (分) : 2 . 13³

【0828】

中間体20:

デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861)₄-アミン (分子39)

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、分子38) を、1MのNaOHおよびMeOH (1:1、v/v、3.00mL) の混合物中に溶解し、30分間攪拌した。次に、THF中に溶解された5mLのトリメチルホスフィン (9.5mg、125μmol) を追加し、混合物を30分間攪拌した。次に、20mMのNH₄HCO₃とアセトニトリル (3:1、v/v、3.00mL) 中に溶解されたSO1861-SC-Mal (30.54mg、0.014mmol、分子37) を追加し、反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (19mg、64%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度95%。

10

M S (m/z) : 9553 [M+H]⁺

【0829】

中間体21:

デンドロン (L-SO1861)₄-アジド (分子40)

デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861)₄-アミン (7.1mg、0.748μmol、分子39) および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、分子18) を、DMF (1.00mL) 中に溶解した。次に、DIPEA (1.302μL、7.48μmol) を追加し、混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した^{3C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (6.4mg、87%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度93%。

20

M S (m/z) : 9826 [M+H]⁺

30

【0830】

中間体22

三価GalNAc-チオール (分子41)

三価GalNAc-チオアセテート (16.2mg、9.02μmol、分子8) をメタノール (500μL) 中に溶解した。次に、水酸化ナトリウムの1.00M溶液 (11.0μL、11.0μmol) を追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{1A}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (13.1mg、83%) を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度98%。

L R M S (m/z) : 1748 [M-H]¹⁻

40

L C - M S r . t . (分) : 1 . 78^{1A}

【0831】

中間体23:

TFL- (DBCO) - (TCO) - (三価GalNAc) (分子20)

TFL- (DBCO) - (TCO) - (Mal) (15.0mg、12.4μmol、分子4) をアセトニトリル (0.50mL) 中に溶解した。次に、20mM重炭酸アンモニウムの溶液 (1.50mL) を追加し、もたらされた溶液を直接的に三価GalNAc-チオール (22.7mg、13.0μmol、分子41) に移入した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。1時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥して、クルードな標題の生成物を白色の固体としてもたらした。LC-MSに基づく純度84%。

50

L R M S (m/z) : 2409 [M-546]¹⁻、2955 [M-1]¹⁻

L C-M S r. t. (分) : 2.63^{1B}

【0832】

中間体24:

T F L- (デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 4) - (T C O) - (三価 G a l N A c) (分子41)

デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 4-アジド (5.2 mg、0.529 μmol、分子40) および T F L- (D B C O) - (T C O) - (三価 G a l N A c) (1.5 mg、0.5 μmol、分子20) を、D M F (2.00 mL) 中に溶解した。混合物を10分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取 L C-M S に付した^{3C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (6.1 mg、90%) を白色のフワフワの固体として与えた。L C-M S に基づく純度93%。

10

M S (m/z) : 12781 [M+H]⁺

【0833】

T F L- (デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) (分子42)

T F L- (デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 4) - (T C O) - (三価 G a l N A c) (5.2 mg、0.41 μmol、分子41) およびメチルテトラジン-B N A オリゴ (2.7 mg、0.5 μmol、分子12) を、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリルの溶液 (3:1、v/v、1.00 mL) 中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥した。クルードな生成物を20 mM 重炭酸アンモニウム (1 mL) 中に溶解し、もたらされた溶液を直接的に分取 L C-M S に付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (1.8 mg、24%) を白色のフワフワの固体として与えた。L C-M S に基づく純度96% (レジオ異性体を原因として複数の (幅広い) ピーク)。

20

M S (m/z) : 18336 [M+H]⁺

【0834】

三官能性リンカー (デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 4) - (L-A p o B B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c 合成) (分子42) の合成と類似のアプローチを用いて、A p o B B N A がスクランブル A p o B 核酸配列を有する B N A (分子12a) に置換されている複合体が、対照試験目的で合成され得る (分子42a)。

30

【0835】

三官能性リンカー- (デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 8) - B N A オリゴ-三価 G a l N A c 合成 (図40)

中間体25:

デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1861) 8-アミン (分子44)

(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 (0.61 mg、0.299 μmol、分子43) を、1 M の N a O H および M e O H (1:1、v/v、3.00 mL) の混合物中に溶解し、30分間攪拌した。次に、T H F 中に溶解された5 mL のトリメチルホスフィン (2 mg、24 μmol) を追加し、混合物を30分間攪拌した。次に、20 mM の N H₄ H C O₃ とアセトニトリル (3:1、v/v、3.00 mL) 中に溶解された S O 1861-S C-M a l (30.54 mg、0.014 mmol、分子37) を追加し、反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後に、反応混合物を分取 L C-M S に付した^{3B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、

40

50

一晚凍結乾燥して、標題化合物（4.6 mg、81%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度95%。

MS (m/z) : 19146 [M+H]⁺
[0836]

中間体26:

デンドロン（-L-SO1861）₈-アジド（分子45）

デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈-アミン（5.4 mg、0.28 μmol、分子44）および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（1.1 mg、2.8 μmol、分子18）を、DMF（1.00 mL）中に溶解した。次に、DIPEA（1.302 μL）を追加し、混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した³C。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（4.35 mg、80%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度93%。

MS (m/z) : 19420 [M+H]⁺
[0837]

中間体27:

TFL-（デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈）-（TCO）-（三価GalNAc）（分子46）

デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈-アジド（10.3 mg、0.529 μmol、分子45）およびTFL-（DBCO）-（TCO）-（三価GalNAc）（1.5 mg、0.5 μmol、分子20）を、DMF（2.00 mL）中に溶解した。混合物を10分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取LC-MSに付した³C。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（8.75 mg、74%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度91%。

MS (m/z) : 22373 [M+H]⁺
[0838]

TFL-（デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈）-（L-BNAオリゴ）-（三価GalNAc）（分子47）

TFL-（デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈）-（TCO）-（三価GalNAc）（9.2 mg、0.41 μmol、分子46）およびメチルテトラジン-BNAオリゴ（2.8 mg、0.5 μmol、分子12）を、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリルの溶液（3:1、v/v、1.00 mL）中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥した。クルードな生成物を20 mM重炭酸アンモニウム（1 mL）中に溶解し、もたらされた溶液を直接的に分取LC-MSに付した¹B。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物（1.26 mg、11%）を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度97%。

MS (m/z) : 27928 [M+H]⁺
[0839]

三官能性リンカー（デンドロン（L-セミカルバゾン-SO1861）₈）-（L-ApoBBNAオリゴ）-（三価GalNAc合成）（分子47）の合成と類似のアプローチを用いて、ApoBBNAがスクランブルApoB核酸配列を有するBNA（分子12a）に置き換えられている複合体が、対照試験目的で合成され得る（分子47a）。

[0840]

三価リンカー-（L-SPT001）-（ブロックされたTCO）-（三価GalNAc）合成（図41）

中間体28:

N-（2-ヒドロキシエチル）-2-（4-（6-メチル-1,2,4,5-テトラジン

10

20

30

40

50

ー 3-イル) フェニル) アセトアミド (分子 50)

DMF (1.00 mL) 中のメチルテトラジン-NHS エステル (30.0 mg、91.7 μ mol、分子 48) の溶液に、エタノールアミン (11.1 μ L、0.184 mmol、分子 49) およびトリエチルアミン (25.5 μ L、0.183 mmol) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。1 時間後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (19.2 mg、77%) を紫色の固体として与えた。LC-MS に基づく純度 89%。

LRMS (m/z): 274 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分): 0.85²

10

【0841】

TFL 上の TCO ブロックを次の複合体に対して行なった:

TFL-(L-ヒドラゾン-SPT001)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 51)

TFL-(デンドロン(L-ヒドラゾン-SPT001)4)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 52)

TFL-(デンドロン(L-ヒドラゾン-SPT001)8)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 53)

TFL-(L-セミカルバゾン-SPT001)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 54)

20

TFL-(デンドロン(L-セミカルバゾン-SPT001)4)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 55)

TFL-(デンドロン(L-セミカルバゾン-SPT001)8)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 56)

【0842】

手続きは TFL-(L-ヒドラゾン-SPT001)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 51) について記載され、例示的である:

【0843】

TFL-(L-ヒドラゾン-SPT001)-(ブロックされた TCO)-(三価 GalNAc) (分子 51)

30

DMF (2.0 mL) 中の TLF-(DBCO)-(TCO)-(三価 GalNAc) (36.8 mg、12.5 μ mol、分子 20) の溶液を、SO1861-L-ヒドラゾン-アジド (26.8 mg、12.5 μ mol、分子 3) に追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、N-(2-ヒドロキシエチル)-2-(4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)フェニル)アセトアミド (4.08 mg、14.9 μ mol、分子 50) を追加した。反応混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。30 分後に、反応混合物を分取 MP-LC に付した^{1C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物 (37.3 mg、56%) を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MS に基づく純度 96% (レジオ異性体を原因として二重のピーク)。

40

LRMS (m/z): 2676 [M-2]²⁻

LC-MS r. t. (分): 2.23^{1B}

【0844】

三価リンカー-(ブロックされた DBCO)-(L-BNA オリゴ)-(三価 GalNAc) 合成 (図 42)

中間体 29:

TFL-(ブロックされた DBCO)-(TCO)-(三価 GalNAc) (分子 58)

DMF (0.50 mL) 中の 1-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカン-11-オール (2.17 mg、9.88 μ mol、分子 57) の溶液を、TFL-(DBCO)-(TCO)-(三価 GalNAc) (14.6 mg、4.94 μ mol、分子 20) に

50

追加した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。2時間後に、反応混合物を分取MP-LCに付した^{1C}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(10.00mg、64%)を白色の固体として与えた。LC-MSに基づく純度98%。

MS (m/z) : 3175 [M+H]⁺

LC-MS r. t. (分) : 2.33^{1B}

【0845】

三価リンカー-(ブロックされたDBCO)-(BNAオリゴ)-(三価GalNAc)
(分子59)

TFL-(ブロックされたDBCO)-(TCO)-(三価GalNAc)(10.0mg、3.15μmol、分子58)およびメチルテトラジン-BNAオリゴ(10.0mg、1.83μmol、分子12)を、20mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリルの溶液(3:1、v/v、1.00mL)中に溶解した。反応混合物を1分間振盪し、室温で静置した。3時間後に、反応混合物を凍結し、一晚凍結乾燥した。クルードな生成物を20mM重炭酸アンモニウム(1mL)中に溶解し、もたらされた溶液を直接的に分取LC-MSに付した^{1B}。生成物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晚凍結乾燥して、標題化合物(11.3mg、72%)を白色のフワフワの固体として与えた。LC-MSに基づく純度95%。

LRMS (m/z) : 2149 [M-4]⁴⁻、2866 [M-3]³⁻

LC-MS r. t. (分) : 2.92^{1A}

【0846】

三価リンカー-(ブロックされたDBCO)-(BNAオリゴ)-(三価GalNAc)
(分子59)の合成と類似のアプローチを用いて、ApoBBNAがスクランブルApoB核酸配列を有するBNA(分子12a)に置き換えられている複合体が、対照試験目的で合成され得る(分子59a)。

【0847】

三官能性リンカー(TFL)方法論を適用することによって生成された全ての複合体「複合体C1」の概観が図43AおよびBに示されている。加えて、単一のGalNAc部分を含む本発明に従う複合体が合成および試験された。

【0848】

Cell-titer Glo (CTG) 細胞生存率アッセイ

化合物追加後に、細胞を37℃で72時間インキュベーションした後に、取扱説明書に従って行なわれたルミネセンスに基づく細胞生存率アッセイを用いて細胞生存率を決定した(CellTiter-Glo(登録商標)2.0細胞生存率アッセイ、プロメガ)。手短には、細胞プレートを最初にRTまで30分間平衡化した。次に、120μL処置培地を含有する各ウェルに、120μLのCTG溶液を追加した。プレートを手短に混合し(10秒、600rpm)、RTで暗所においておよそ10分間インキュベーションした。その後に、ルミネセンスシグナルをSpectramax ID5プレートリーダー(モレキュラーデバイス)によって測定した。定量のために、「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値から差し引いた後に、処置された細胞の相対的な細胞生存率パーセンテージを、無処置のウェルのバックグラウンド補正されたシグナルによって処置されたウェルのバックグラウンド補正されたシグナルを除算することによって計算した(パーセンテージに対して×100)。

【0849】

ヒト初代肝細胞処置

凍結保存された初代ヒト肝細胞(Cytesバイオテクノロジーズ社、スペイン)を肝細胞解凍培地(Cytesバイオテクノロジーズ社、スペイン)中で解凍した。それから、細胞を肝細胞プレティング培地(Cytesバイオテクノロジーズ社、スペイン)に再懸濁し、コラーゲン-Iコーティングプレートに、それぞれ48または96ウェルプレート(グライナー・バイオワン)上に215.600細胞/ウェルまたは66.600細胞

10

20

30

40

50

胞／ウェルの密度で播種した。細胞を37℃で4～6時間前培養し、処置の始まりの前に細胞培養プレートに対する細胞接着を許した。プレティング培地を315μlまたは108μl維持用培地（Cytes バイオテクノロジーズ社、スペイン）に置き換え、これの後に、複合体をPBS中の10×濃縮ストック溶液から追加した。プレートを37℃で72時間インキュベーションし、遺伝子発現および細胞生存率分析のために収穫した。

【0850】

ApoB#02オリゴ配列

ネズミおよびヒト配列適合性のApoB#02（5'－GCatttggtatTC A－3'）〔配列番号12〕はBNA^{NC}オリゴヌクレオチドであり、5'－チオールC6リンカーありで、Bio-Synthesi s社において、大文字のBNA^{NC}塩基および完全

10

【0851】

初代マウスおよびヒト肝細胞からのRNA単離および遺伝子発現分析

細胞からのRNAを、取扱説明書に従ってTRI試薬（登録商標）溶液（サーモサイエンティフィック）を用いて単離した。cDNAへの変換を、iScript（商標）cDNA合成キット（バイオ・ラッド）を用いて、標準的なプロトコルを用いて行なった。ApoB発現レベルおよび特定の肝細胞ハウスキーピング遺伝子のレベルを決定した。定量的リアルタイムPCRアッセイ（qRT-PCR）を用い、iTaq（商標）ユニバーサルSYBR（登録商標）グリーンスーパーミックス（バイオ・ラッド）およびライトサイクラー480（ロシュ・ダイアグノスティックス、ロートクロイツ、スイス）を、それぞれ表A4（研究A）および表A7（研究B）に挙げられている特異的なDNAプライマーと用いた。ΔCt法によって分析をして、2つの肝細胞特異的なハウスキーピング対照mRNAに対して相対的なapoB発現を決定した。各分析反応は3重で行なった。

20

【0852】

【表16】

表A4、マウス初代肝細胞／肝臓組織分析のqPCR分析に用いられたプライマー（研究A）

30

ApoB#02	フォワード	GCTAACACTAAGAACCAGAAGATC〔配列番号13〕
	リバース	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC〔配列番号14〕
MmPPIA	フォワード	GCGGCAGGTCCATCTACG〔配列番号15〕
	リバース	GCCATCCAGCCATTCAGTC〔配列番号16〕
MmSDHA	フォワード	GAGGAAGCACACCCTCTCAT〔配列番号17〕
	リバース	GGAGCGGATAGCAGGAGGTA〔配列番号18〕

40

【0853】

FACS分析

細胞を、各細胞株について適当な密度で、T75フラスコ中の10%ウシ胎児血清（PANバイオテックGmbH）および1%ペニシリン／ストレプトマイシン（PANバイオテックGmbH）を足したDMEM（PANバイオテックGmbH）に播種した。90%のコンフルエンスに到達するまで、培養物を72～96時間インキュベーションした（5%CO₂、37℃）。次に、細胞をトリプシン処理して（TrypLEエクспレス、ギブコ・サーモサイエンティフィック）、単細胞懸濁液を得、15mLファルコンチューブに移入し、遠心した（1,400rpm、3分）。細胞ペレットは沈めたままで、上清を捨てた。500,000細胞を丸底FACSチューブに移入し、3mL冷DPBS（M

50

g^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) によって洗浄した。細胞を 1800 rpm、3 分、4℃で遠心し、200 μ L 冷 DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS)、または 195 μ L 冷 DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) 中に 5 μ L 抗体を含有する 200 μ L 抗体溶液に再懸濁した。PE 抗ヒト CD71 (#334106、Biolegend) をトランスフェリン受容体を染色するために用い、PE マウス IgG2a κ アイソタイプ対照 FC (#400212、Biolegend) をその一致したアイソタイプ対照として用いた。PE 抗ヒト ASGPR1 (#130-122-963、ミルテニー) を用いて ASGPR1 受容体を染色し、PE マウス IgG1 アイソタイプ対照 (#130-113-762、ミルテニー) をその一致したアイソタイプ対照として用いた。サンプルを 4℃で 30 分間インキュベーションした。その後、細胞を冷 DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) によって 2×洗浄し、DPBS (Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含、2% FBS) 中の 2% PFA 溶液を用いて室温で 20 分間固定処理した。細胞を冷 DPBS によって 1×洗浄し、FACS 分析のための 1000 μ L 冷 DPBS に再懸濁した。サンプルをシスメックス Cube8 フローサイトメトリー系 (シスメックス) および FCS エクスプレス 7 研究版ソフトウェアによって分析した。FACS 分析の結果は表 A3 にまとめられている。

10

【0854】

C57BL/6J モデルにおける三価 GalNAc-複合体のインビボ忍容性および有効性

i. 用量投与およびインライフフェーズ. 到着時におよそ 6~7 週、投薬時に 8~9 週の、処置群の群あたり 8 匹の C57BL/6J 雄マウス (研究 A。基剤対照群では 14 匹のマウス) に投薬した。PBS 中に製剤された化合物または PBS 単独 (基剤) を、表 A5 および表 A6 に従って、5 ml/kg で、尾静脈から (静脈内 i.v.)、個々の体重に対応する用量体積によって投薬した。適用可能なところでは、三価 (GalNAc) 3-SO1861 (EMCH) を、5 ml/kg で、尾静脈から (i.v.)、三価 GalNAc-ApoB 複合体の直後に共投与した。動物を毎週秤量し、臨床観察を最初の 48 時間は毎日 2~3 回、その後は研究の終わりまで少なくとも毎日 1 回行なった。

20

【0855】

ii. 血清、肝臓、および腎臓組織のサンプリング. 血液を、投薬前に (プレドーズ) および指示されたポストドーズ時点において (例えば、ポストドーズの 24 時間、72 時間、196 時間、336 時間、672 時間) サンプリングし、血清を、収集された血液からバイオマーカー分析のために標準的な手続きを用いて作り出した。妥当する研究間のポストドーズ時点において、処置群あたり、時点あたり 3 匹の動物 (研究 A の基剤対照群では 6 匹の動物) を殺して、最終採血を収集し、妥当する臓器、例えば肝臓および腎臓組織をさらなる分析のために収集した。研究の終わりに、群あたり、残りの 2 匹の動物 (研究 A の対照群では 4) を殺した。肝臓の半分および 1 つの腎臓を凍結し、組織 RNA 分析に用いた。

30

【0856】

40

【表 17】

表 A 5. 実験設計 三価 G a l N A c 複合体のインビボ忍容性および有効性、研究 A

群	複合体	用量 [mg / kg]	投与された相 対的な B N A 用量 [mg / kg]	共投与された三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 - E M C H 用量 [mg / kg]
1	P B S (基剤)	N / A	0	N / A
2	A p o B # 0 2 B N A	0. 1	0. 1	N / A
3	A p o B # 0 2 B N A	1	1	N / A
4	A p o B # 0 2 B N A	2	2	N / A
5	(G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A	0. 1	0. 0 5 4	N / A
6	(G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A	1	0. 5 4	N / A
7	(G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A	0. 0 1	0. 0 0 5 4	5
8	(G a l N A c) 3 - A p o B B N A # 0 2	0. 1	0. 0 5 4	5
9	(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 A p o B # 0 2 (E M C H) B N A	1	0. 4 4	N / A
1 0	(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 A p o B # 0 2 (セミカルバゾ ン) B N A	1	0. 4 4	N / A

【0857】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 A 6. 実験設計 三価 G a l N A c 複合体のインビボ忍容性および有効性、研究 B

群	複合体	用量 [m g / k g]	投与された相 対的な B N A 用量 [m g / k g]	共投与された三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 - E M C H 用量 [m g / k g]
1	P B S (基剤)	N / A	0	N / A
2	A p o B # 0 2 B N A	2	2	N / A
3	(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 A p o B # 0 2 (セミカルバゾ ン) B N A	1	0. 4 4	N / A
4	(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 A p o B # 0 2 (セミカルバゾ ン) B N A	0. 1	0. 0 4 4	N / A
5	(G a l N A c) 3 - d S P T 4 - A p o B # 0 2 (セミカルバゾ ン) B N A	0. 1 7 3	0. 0 4 4	N / A
6	(G a l N A c) 3 - d S P T 8 - A p o B # 0 2 (セミカルバゾ ン) B N A	0. 2 6 5	0. 0 4 4	N / A
7	(G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A	1	1	0. 1
8	(G a l N A c) 3 - A p o B B N A # 0 2	0. 1	0. 1	0. 1

【0858】

肝臓組織におけるバイオマーカーRNA分析

mRNAを凍結肝臓組織からTRIzol（登録商標）試薬（サーモサイエンティフィック）を用いて取扱説明書に従って単離した。cDNAへの変換をiScript（商標）cDNA合成キット（バイオ・ラッド）を用いて行なった。ApoB発現レベルおよび特定の肝臓ハウスキーピング遺伝子のレベルを決定した。定量的リアルタイムPCRアッセイ（qRT-PCR）を用い、iTaq（商標）ユニバーサルSYBR（登録商標）グリーンスーパーミックス（バイオ・ラッド）およびライトサイクラー480（ロシュ・ダイアグノスティクス、ロートクロイツ、スイス）を、それぞれ表A4（研究A）および表A7（研究B）に挙げられている特異的なDNAプライマーと用いた。ΔCt法によって分析をして、2つの肝臓特異的なハウスキーピング対照mRNAに対して相対的なapoB発現を決定した。各分析反応は3重で行なった。

【0859】

【表19】

表A7. 肝臓組織のqPCR分析に用いられたプライマー（研究B）

ApoB#02	フォワード	GCTAAGACTAAGAACCAGAAGATC [配列番号13]
	リバース	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [配列番号14]
MmRPS17	フォワード	GTGCGAGGAGATCGCCATTA [配列番号19]
	リバース	ATCGGCTTCATCAGATGCGT [配列番号20]
MmPPIA	フォワード	GCGGCAGGTCCATCTACG [配列番号15]
	リバース	GCCATCCAGCCATTCAGTC [配列番号16]

10

【0860】

バイオマーカー分析 apoB蛋白質

マウス血清中のApoB蛋白質レベルを、ApoBELISA（ab230932、Abcam、ケンブリッジ、UK）を用いて、取扱説明書に従って決定した。

【0861】

バイオマーカー分析 コレステロール

LDLコレステロールを、マウス血清において、ベックマン・コールターからのそれぞれLDLコレステロール特異的な2ステップAU480アッセイキットを用いて、測光測定によって、取扱説明書に従って測定した。

20

【0862】

バイオマーカー分析 コレステロール

血清中アラントランスアミナーゼ（ALT）レベルを、ベックマン・コールターからのAU480アッセイキットを用いて（測光測定）、取扱説明書に従って測定した。

【0863】

結果

C57BL/6Jマウスにおける（GalNAc）₃-SO1861-ApoB#02のインビボ有効性（efficacy）（研究A）

30

研究Aでは、C57BL/6Jマウスを記載された通り処置し、表A5に従って投薬した。この研究に用いられた複合体の（GalNAc）₃-ApoB#02、（GalNAc）₃-SO1861、（GalNAc）₃-SO1861-ApoB#02（EMCH）、および（GalNAc）₃-SO1861-ApoB#02（sc）は、図35および図38、図41、および図42に記載される通り生成された。臨床観察を記録し、有効性および忍容性の異なるバイオマーカーを分析した。

【0864】

図25が示す通り、24時間後に、apoB RNAレベル、すなわち遺伝子発現は、0.1mg/kgのApoB#02 BNA（ApoB#02）によって処置された動物では著しくは縮減されず、それぞれ1mg/kgまたは2mg/kgのApoB#02 BNAを投薬された群では（全て、群あたりn=3匹の動物）、基剤投薬群（n=5匹の動物）と比較して、約15%および21%縮減された。同様に、（GalNAc）₃-ApoB#02は、1mg/kgの用量において（0.54mg/kgのApoB#02 BNAに対応する）、24時間後に基剤対照と比較してApoB発現を約53%縮減したが（n=3匹の動物）、0.1mg/kgの（GalNAc）₃-ApoB#02単独は、基剤と比較して著しい縮減を示さなかった（n=3）。対照的に、0.1mg/kgの（GalNAc）₃-ApoB#02を5mg/kgの（GalNAc）₃-SO1861と共投与したときには、apoB発現は既に24時間後に約69%だけ直ちに縮減された（n=2匹の動物）が、0.01mg/kgの（GalNAc）₃-ApoB#02は、5mg

40

50

／kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1と共投与されたときに、依然として、基剤と比較して16%という軽度の縮減を示す(n=2匹の動物)。最も著しくは、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (0.44mg/kgのA p o B # 0 2 B N A に対応する)による処置は、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (E M C H)では約77%の縮減、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (s c)では90%の縮減を、既に投薬の24時間後に対照と比較してもたらした(両方の群で各n=3匹の動物)。

【0865】

72時間後に、投与されたA p o B # 0 2 B N Aの最も高い用量(2mg/kg)は、最大で39%の縮減(n=3匹の動物)を基剤(n=5匹の動物)と比較して示したが、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2はa p o B発現の68%の縮減をもたらした(n=3匹の動物)。再び、対照的に、10倍低い用量の0.1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2は、5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1と共投与されたときに、a p o B発現レベルの82%の縮減さえもたらしたが(n=3匹の動物)、0.1mg/kgの((Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2単独は12%の縮減のみを示す(n=3匹の動物)。異なる1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A複合体による処置は、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (E M C H)では約76%の縮減、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (s c)では96%の縮減をもたらした(両方の群で各n=3匹の動物)。効果は持続性であり、336時間後に、a p o B発現レベルは、2mg/kgのA p o B # 2 B N Aでは30%(n=2匹の動物)、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2では25%だけ縮減された。10倍少ないペイロードの共投与群(すなわち、0.1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2+5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1は、依然として25%の減少を示した。異なる1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A複合体による処置は、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (E M C H)では約61%の縮減、(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 B N A (s c)では65%の縮減をもたらした(両方の群で各n=3匹の動物)。結論として、ペイロードに対するS O 1 8 6 1の複合体化は、ペイロードの効力をインビボでもまた顕著に改善する。

【0866】

図26が示す通り、肝臓におけるa p o B m R N A下方調節(図25に示されている)は、血清中のa p o B蛋白質縮減にもまた反映された。24時間後に、a p o B蛋白質レベルは、両方とも、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2では50%超だけ縮減され(n=8匹の動物、54%)、10倍少ない(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2+5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1、すなわち0.1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2+5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1の共投与群では等しくそうであった(n=8匹の動物、56%)。最も著しくは、それらは、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H)群(n=8匹の動物、69%の縮減)および1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c)群(n=8匹の動物、83%の縮減)で、対照(n=14匹の動物)と比較して縮減された。72時間後に、全ての処置群は基剤対照と比較してa p o B蛋白質の縮減を示し、最も顕著な効果は、1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H)群(n=5匹の動物、95%の縮減)および1mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c)群(n=5匹の動物、97%の縮減)で観察され、または0.1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2を5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1と共投与したときに、ほぼ90%のa p o B縮減をもたらした(n=5匹の動物)。0.01mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2さえも、それを5mg/kgの(Ga l N A c)₃-S O 1 8 6 1と共投与したときにはA p o B蛋白質を約25%だけ縮減し(n=4匹の動物)、10倍高い用量の0.1mg/kgの(Ga l N A c)₃-A p o B # 0 2単独は

、ポストドーズの72時間後にapoB蛋白質を35%だけ縮減した(n=5匹の動物)。効果は持続性であり、apoB蛋白質縮減は、分析された全ての処置群について192および336時間において依然として観察可能であった。NB：レベルは、0.1mg/kgのApoB#02(196時間)、0.01mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(196時間および336時間)、および0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(196時間)については報告されていない。192時間において、1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02は47%の縮減を示したが(n=2匹の動物)、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(EMCH)および1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)は、それぞれ87%および90%の縮減を示した(群あたりn=2匹の動物)。336時間において、1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02は28%の縮減を示したが(n=2匹の動物)、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(EMCH)および1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)は依然としてそれぞれ66%および65%の縮減を示した(群あたりn=2匹の動物)。

10

【0867】

図27が示す通り、観察された血清中apoB蛋白質縮減(図26に示されている)は、血清中LDLコレステロール(LDL-C)レベルに良好に反映された。24時間後に、LDL-Cレベルは、0.1、1、または2mg/kgのApoB#02BNAどちらかによって処置された動物では(群あたりn=3匹の動物)、基剤(n=5匹の動物)と比較して著しくは縮減されなかった。標的化された(GalNAc)₃-ApoB#02は、1mg/kgの用量において、既に24時間以内に平均で2.7mg/dlまでLDL-Cを縮減した(n=3匹の動物)。すなわち、基剤およびApoB#02BNA群と比較して53%の縮減である。24時間以内の平均で2.7mg/dlへのLDL-Cの同じ縮減(n=3匹の動物)、すなわち53%の縮減が、10倍低い用量の0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02で、それを5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861と共投与したときに既に観察され、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(EMCH)および1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)はそれぞれ66%および77%の縮減を示した。72時間後に、最も高い用量のApoB#02BNA(2mg/kg)は、基剤(n=5匹の動物)と比較してLDL-Cの約50%の縮減を示し(n=3匹の動物)、1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02は72%縮減され(n=3匹の動物)、10倍低い用量の0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861は78%さえも縮減された(n=3匹の動物)。1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(EMCH)は72%の縮減を示したが、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)では、LODよりも上のLDL-Cは測定可能のままに残らなかった。すなわち、対照と比較してapoB蛋白質の100%の縮減である(全てn=3匹の動物)。効果は持続性であり、336時間後に、LDL-Cレベルは、依然として、2mg/kgのApoB#02BNAでは約40%、1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02および0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02+5mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861の共投与群では両方とも48%だけ、縮減された(全ての群でn=2匹の動物)。後者では、投与されるペイロードに基づく、10倍改善されたLDL-C縮減を示している。再び、最も顕著な縮減は、74%の縮減を有する1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(EMCH)による群で観察され、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)は57%の縮減を示した。

20

30

40

【0868】

結論として、これは、ApoB#02の効力がSO1861との組み合わせで顕著に増

50

大し、a p o B R N A 下方調節、すなわち C 5 7 B L / 6 J マウスの肝臓における遺伝子サイレンシング、ならびに a p o B 蛋白質および L D L コレステロールなどの測定された有効性の全ての「下流」血清中バイオマーカーの下方調節を有効に誘導していることを示している。

【0869】

C 5 7 B L / 6 J マウスにおける (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 のインビボ忍容性 (研究 A)

この研究に用いられた複合体の (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 、 (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 、 (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (E M C H) 、および (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (s c) は、図 3 5 、図 3 8 、図 4 1 、および図 4 2 に記載される通り生成された)。

10

【0870】

研究の過程において、表 A 5 に記載される全ての処置、用量、および用量レジメンは良好に忍容され、処置に特異的な有害所見、または複合体が忍容されないことを指示するいずれかの特異的な臨床観察を示さなかった。処置群のマウスは基剤を受けたマウスと同程度の体重増加をした。血清中 A L T レベルが決定され、結果は図 2 8 に示されている。研究期間において、基剤マウスの A L T レベルは群あたり平均 4 7 から 6 1 U / L の範囲であった (基剤では n = 5 匹の動物)。A L T のレベルは異なる時点の異なる用量群において一過的に増大し、場合によっては、特異的な処置関係または用量関係を示すことなしに、群あたり、大きい動物あたりの変動を有した (それぞれ 2 4 時間および 7 2 時間における全ての群で n = 3。ただし 0 . 0 1 m g / k g の (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 + 5 m g / k g の (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 は例外とし、ここでは両方の時点で n = 2)。著しくは、3 3 6 時間後に、全ての投薬群における A L T レベルは再度ベースラインであり、基剤対照と同程度であった (全ての群について n = 2)。

20

【0871】

結論として、これは、A p o B # 0 2 、 (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 、 (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 (単独でまたは (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 との組み合わせで)、ならびに (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (E M C H) および (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (s c) が、適用された用量および用量レジメンにおいて良好に忍容されるということと、具体的には、S O 1 8 6 1 含有複合体の (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (E M C H) および (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (s c) の投与、ならびに (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 との (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 の共投与が、即時の忍容性の問題を有せずに、C 5 7 B L / 6 J マウスモデルにおいて高い効力を示すということを示している。

30

【0872】

(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 のインビトロ効力

a p o B 標的化 B N A の A p o B # 0 2 (配列番号 1 2) および S O 1 8 6 1 - E M C H または S O 1 8 6 1 - S C - M a l を三価 G a l N A c ((G a l N A c) 3) に複合体化して、(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (E M C H) および (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (s c) (図 3 5 および図 3 8)、(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 (図 4 1)、および (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A (図 4 2) を生成し、初代ヒト肝細胞ならびに H e p G 2 (A S G P R ⁺) および H u h 7 (A S G P R ⁺ / -) 細胞株に対して試験して、a p o B R N A レベルに対するそれらの効果を評価した。初代肝細胞では、この評価は以下を明らかにした：(G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (E M C H) および (G a l N A c) 3 - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 (s c) は = 1 n M の I C 5 0 を示すが (相対的な A p o B # 0 2 B N A 濃度)、S O 1 8 6 1 なしの (G a l N A c) 3 - A p o B # 0 2 B N A は I C 5 0 = 7 n M (相対的な A p o B # 0 2 B N A 濃度) を示し、R N A i - M A X による A p o B # 0 2 B N A トランスフェクションは I C 5 0 = 8 n M を示した。A p o B # 0

40

50

2 単独（いずれかのトランスフェクション剤なし）は $IC_{50} = 400 \text{ nM}$ を示し、 $(GalNAc)_3-SO1861$ は $apoB$ RNA レベルに対する効果を有さなかった（図 29 A）。これは全て、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ がヒト初代肝細胞における $ApoB\#02$ RNA の細胞質送達を向上させ、 $ApoB\#02$ RNA オリゴの低 nM レベルにおいて大体 10 倍改善された効力をもたらすということを示している。

【0873】

HepG2 細胞 ($ASGPR1^+$) では、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (EMCH) および $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (sc) のみが、測定された濃度において活性を示し（それぞれ $IC_{50} = 40 \text{ nM}$ および $IC_{50} = 20 \text{ nM}$ ）（図 29 B）、Huh7 細胞 ($ASGPR1^+/-$) では、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (EMCH) は $IC_{50} = 100 \text{ nM}$ の活性を示し、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (sc) は $IC_{50} = 40 \text{ nM}$ の活性を示した（図 29 C）。

10

【0874】

$(GalNAc)_3-dSPT4-ApoB\#02$ および $(GalNAc)_3-dSPT8-ApoB\#02$ のインビトロの効力

$apoB$ 標的化 RNA の $ApoB\#02$ （配列番号 12）および $SO1861-EMCH$ または $SO1861-sc-Mal$ を、三価 $GalNAc$ ($(GalNAc)_3$)（図 1、図 8）に複合体化して、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (EMCH)（図 35）、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (sc)（図 38）、 $(GalNAc)_3-d(SO1861)_4-ApoB\#02$ (sc) ($(GalNAc)_3-dSPT4-ApoB\#02$ 、図 39)、 $(GalNAc)_3-d(SO1861)_8-ApoB\#02$ (sc) ($(GalNAc)_3-dSPT8-ApoB\#02$ 、図 40)、および $(GalNAc)_3-ApoB\#02$ RNA（図 42）を生成し、複合体を初代ヒト肝細胞に対して試験して（図 30）、 $apoB$ RNA レベルに対するそれらの効果を評価した。初代肝細胞では、この評価は以下を明らかにした： $(GalNAc)_3-d(SO1861)_8-ApoB\#02$ (sc) は 1.5 nM （相対的な複合体濃度）の IC_{50} を示したが、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (EMCH)、 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (sc)、 $(GalNAc)_3-d(SO1861)_4-ApoB\#02$ (sc)、または $(GalNAc)_3-ApoB\#02$ はより強力でなかった（5 および 8 nM の間の IC_{50} ）（図 30）。これは、 $GalNAc$ 複合体あたりの $SO1861$ 分子の増大した量が、複合体の効力を向上させ、それによって、翻って、 $apoB$ mRNA のレベルを縮減するために必要とされる $ApoB\#02$ RNA ペイロードの量を縮減するということを示している。

20

30

【0875】

C57BL/6J マウスにおける $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ のインビボ有効性（研究 B）

研究 B では、C57BL/6J マウスを記載された通り処置し、表 A6 に従って投薬した。この研究に用いられた複合体 $(GalNAc)_3-SO1861-ApoB\#02$ (sc)、 $(GalNAc)_3-d(SO1861)_4-ApoB\#02$ (sc)、 $(GalNAc)_3-d(SO1861)_8-ApoB\#02$ (sc)、 $(GalNAc)_3-ApoB\#02$ 、および $(GalNAc)_3-SO1861$ は、図 38、図 39、図 40、図 41、図 42 に記載されている通り生成した。臨床観察を記録し、有効性および忍容性の異なるバイオマーカーを分析した。

40

【0876】

図 31 が示す通り、72 時間後に、 $apoB$ RNA レベル、すなわち遺伝子発現は、ベンチマークの 2 mg/kg の $ApoB\#02$ RNA によって処置された動物において縮減されたが（対照から 53%）、それぞれ 1 mg/kg の $(GalNAc)_3-ApoB\#02 + 0.1 \text{ mg/kg}$ の $(GalNAc)_3-SO1861$ および 1 mg/kg の

50

(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)を投薬された群では、さらにもっと縮減され(基剤対照のそれぞれ24%および21%まで)、SO1861を複合体に追加するときに顕著に改善された効力を示した(群あたりn=3匹の動物)。その上、ペイロードあたりのサポニンを増大させるときには、0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)中に含有される同じペイロード用量(0.044mg/kgのApoB02BNA)だがそれぞれ4倍および8倍多くのSO1861に対応する10倍少ないペイロード((GalNAc)₃-dSPT4-ApoB#02(sc)ともまた呼ばれる0.173mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)(手短にするために、図31では短くして0.1mg/kgと言われる)、またはGalNAc)₃-dSPT8-ApoB#02(sc)ともまた呼ばれる0.265mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)8-ApoB#02(sc))を投薬することによって、apoB発現はそれぞれ74%および38%まで縮減され、それは0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)では対照の89%であり、サポニンの増大が複合体の効力を顕著に増大させるということを示した。サポニン量の減少(0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(sc)+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02)は、より少ない効力をもたらした(基剤と比較して71%のapoB発現)。336時間後に、発現下方調節の効果は、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)用量群において依然として保たれ、基剤対照の49%であった(n=3匹のマウス)。

10

20

【0877】

図32が示す通り、肝臓におけるapoB RNA下方調節(図31に示されている)は、血清中のapoB蛋白質縮減にもまた反映された。プレドーズレベルは群間で156~198μg/mlの範囲であった(群あたりn=8)。ポストドーズの72時間に、apoB蛋白質レベルは、ベンチマークの2mg/kgのApoB#02BNAによって処置された動物において縮減されたが(基剤対照の156μg/mlと比較して平均57μg/ml)、それぞれ(1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861)および1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)を投薬された群では、さらにもっと縮減され(それぞれ基剤対照の18μg/mlおよび21μg/mlまで)、SO1861を複合体に追加するときの顕著に改善された効力を示した(群あたりn=8匹の動物)。RNAレベルと同じく、ペイロードあたりのサポニンを増大させるときに、それぞれ0.173mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)または0.265mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)8-ApoB#02(sc)を投薬することによって、血清中apoB蛋白質はそれぞれ89μg/mlおよび50μg/mlまで縮減されたが、それは0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)では141μg/mlであり、サポニンの増大が、apoB蛋白質を縮減することにおける複合体の効力を顕著に増大させるということを示した。サポニン量の減少(0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(sc)+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02)は、より少ない効力をもたらした(122μg/mlのapoB蛋白質)。336時間後に、蛋白質縮減の効果は、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)用量群において依然として保たれ、基剤対照の143μg/mlと比較して59μg/mlであった(全ての群でn=5匹のマウス)。672時間においては、apoB蛋白質レベルは全ての群(groups)で100~152μg/mlの間で変動した(n=2マウス)。

30

40

【0878】

図33が示す通り、観察された血清中apoB蛋白質縮減(図32に示されている)は、血清中LDLコレステロール(LDL-C)レベルに良好に反映された。ポストドーズの72時間に、LDL-Cレベルは、ベンチマークの2mg/kgのApoB#02BNAによって処置された動物において縮減されたが(基剤対照の4mg/dlと比較して2

50

mg/dl)、それぞれ(1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861)および1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)を投薬された群では、さらにもっと縮減され(それぞれ0.7mg/dlおよび1.3mg/dlμg/mlまで)、SO1861を複合体に追加するときの顕著に改善された効力を示した(群あたりn=3匹の動物)。RNAおよびapoB蛋白質レベルと同じく、ペイロードあたりのサポニンを増大させるときには、それぞれ0.173mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)または0.265mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)8-ApoB#02(sc)を投薬することによって、LDL-Cはそれぞれ2.3mg/dlおよび1.3mg/dlまで縮減されたが、それは0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)では4.3mg/dlであり、サポニンの増大が、LDL-Cを縮減することにおける複合体の効力を顕著に増大させるということを示した。サポニン量の減少(0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861(sc)+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02)は、より少ない効力をもたらした(3.7mg/dlのLDL-C)。336時間後に、LDL-C縮減の効果は、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)用量群(2mg/dl、n=3匹の動物)および(1mg/kgの(GalNAc)₃-ApoB#02+0.1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861)において依然として保たれ、ここではそれは3.3mg/dlであった(n=3匹の動物)。効果の持続性を示した。672時間において、LDL-Cレベルは全ての群(groups)で3~4mg/dlの間で変動した(n=2匹のマウス)。

10

20

【0879】

結論として、これは、ApoB#02の効力がSO1861との組み合わせで顕著に増大し、apoB RNA下方調節、すなわちC57BL/6Jマウスの肝臓における遺伝子サイレンシング、ならびにapoB蛋白質およびLDLコレステロールなどの測定された有効性の全ての「下流の」血清中バイオマーカーの下方調節を有効に誘導しているということを示している。

【0880】

C57BL/6Jマウスにおける(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02のインビボ忍容性(研究B)

30

この研究に用いられた複合体(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)、(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)、(GalNAc)₃-d(SO1861)8-ApoB#02(sc)、(GalNAc)₃-ApoB#02、および(GalNAc)₃-SO1861)は、図38、図39、図40、図41、図42に記載されている通り生成した。

【0881】

研究の過程において、表A6に記載される全ての処置、用量、および用量レジメンは良好に忍容され、処置に特異的な有害所見、または複合体が忍容されないことを指示するいずれかの特異的な臨床観察もしくは肉眼的な臓器形態学を示さなかった。処置群のマウスは基剤を受けたマウスと同程度の体重増加をした。血清中ALTレベルが決定され、結果は図34に示されている。ALTのレベルは、0.173mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)群では72時間において一過的に増大するように見えたが、ポストドーズの336時間までに基剤対照のレベルに戻った。同様に、それは0.265mg/kgの(GalNAc)₃-d(SO1861)4-ApoB#02(sc)群で増大したが、ポストドーズのより遅い時点において基剤レベルに戻った。著しくは、1mg/kgの(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)は最高で336時間までポストドーズの上昇を示さなかったが、672時間においては166U/Lと測定された(n=2匹のマウス)。

40

【0882】

結論として、このデータは、サポニン複合体が、適用された用量および用量レジメンに

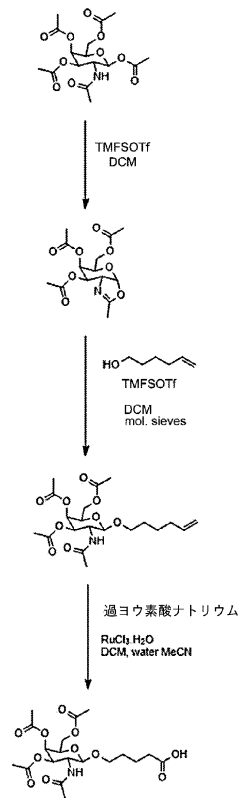
50

において良好に忍容されるということと、具体的には、SO1861含有複合体の(GalNAc)₃-SO1861-ApoB#02(sc)、(GalNAc)₃-d(SO1861)-4-ApoB#02(sc)、および(GalNAc)₃-d(SO1861)-8-ApoB#02(sc)の投与、ならびに(GalNAc)₃-ApoB#02との(GalNAc)₃-SO1861の共投与が、即時の忍容性の問題を有せずに、C57BL/6Jマウスモデルにおける高い効力を示すということを示している。

【図面】

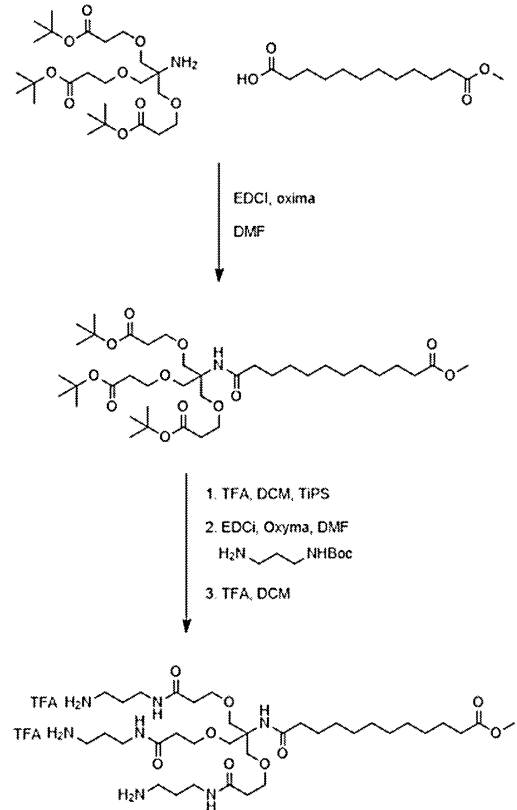
【図1A】

図1A



【図1B】

図1B



10

20

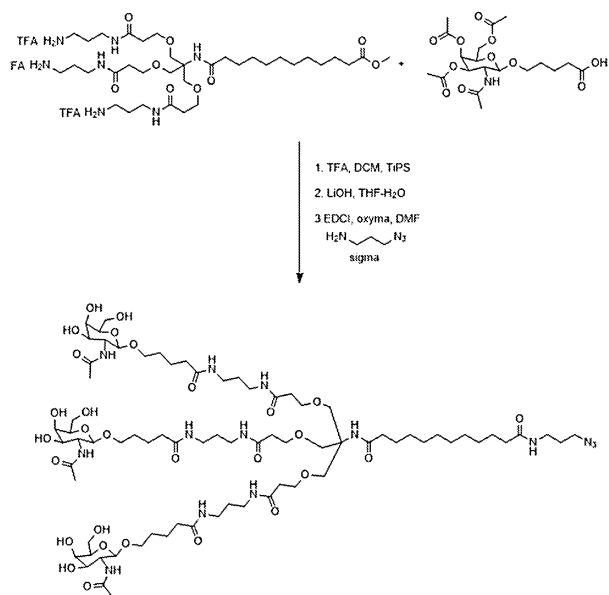
30

40

50

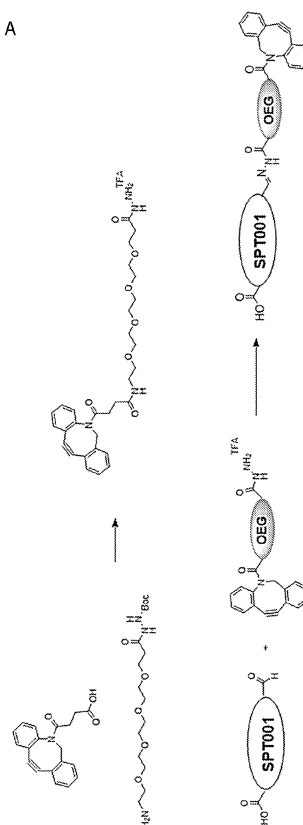
【図 1 C】

図 1 C



【図 2 A】

図 2 A

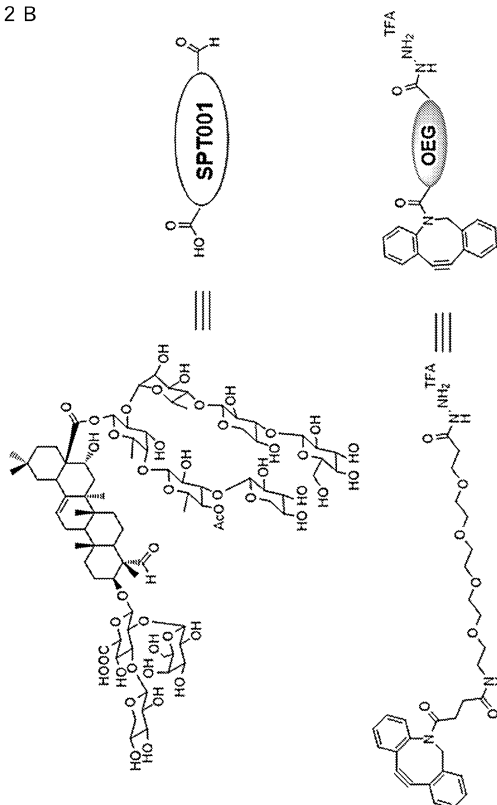


10

20

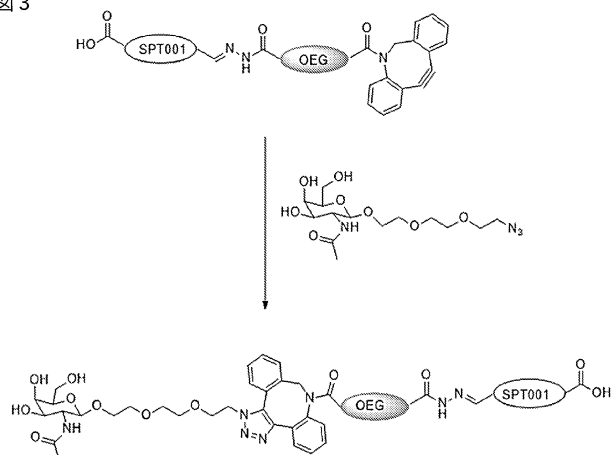
【図 2 B】

図 2 B



【図 3】

図 3



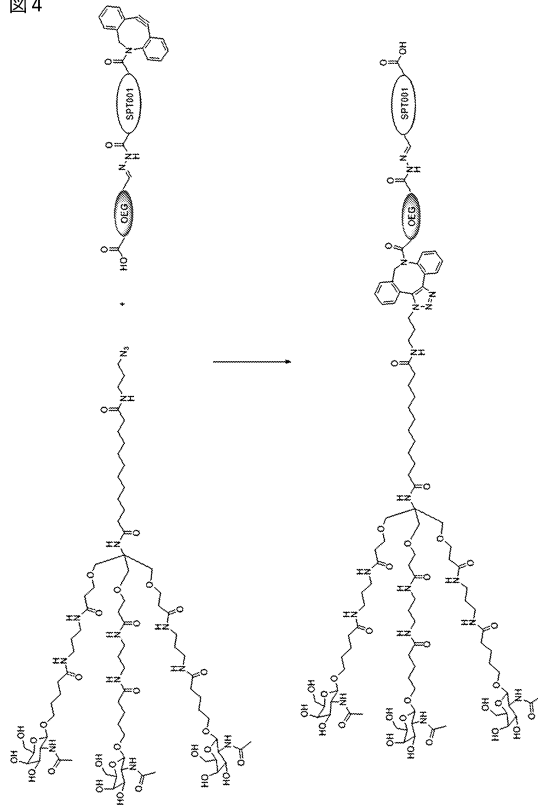
30

40

50

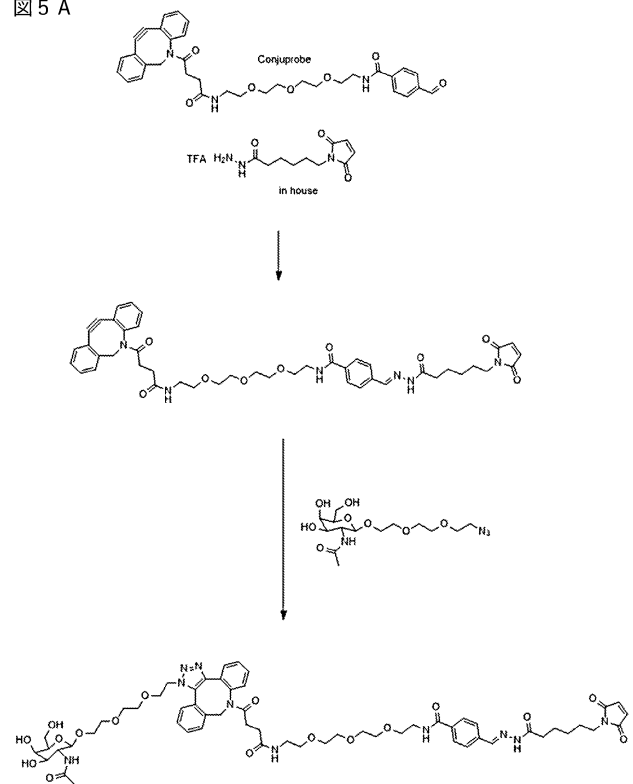
【図 4】

図 4



【図 5 A】

図 5 A

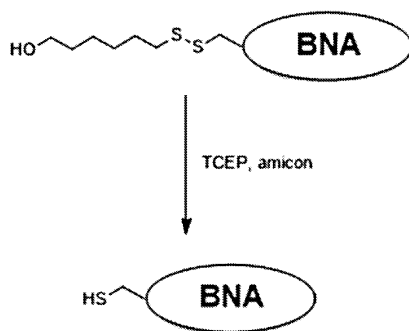


10

20

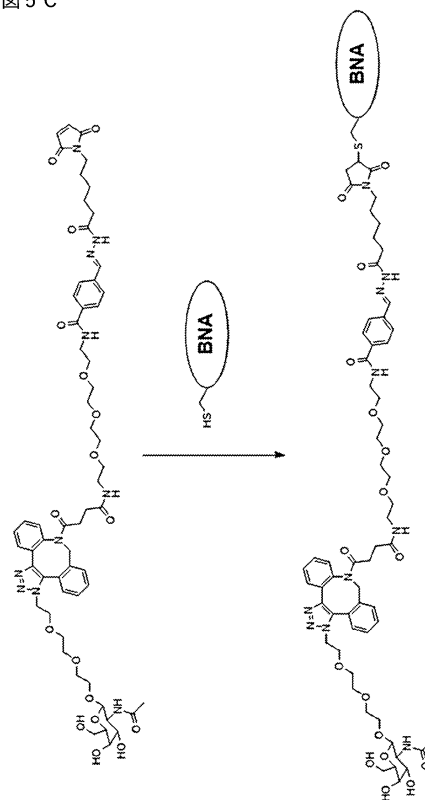
【図 5 B】

図 5 B



【図 5 C】

図 5 C



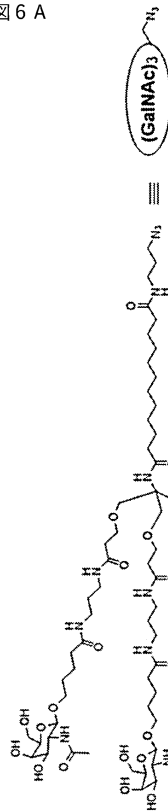
30

40

50

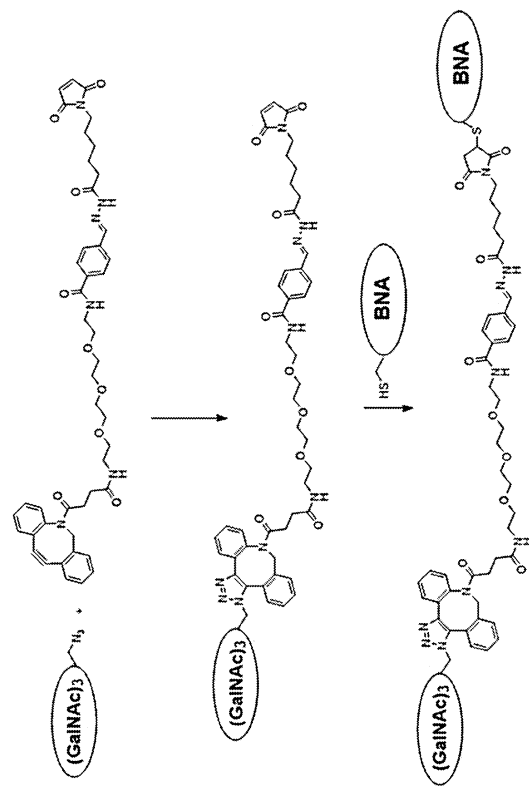
【図 6 A】

図 6 A



【図 6 B】

図 6 B

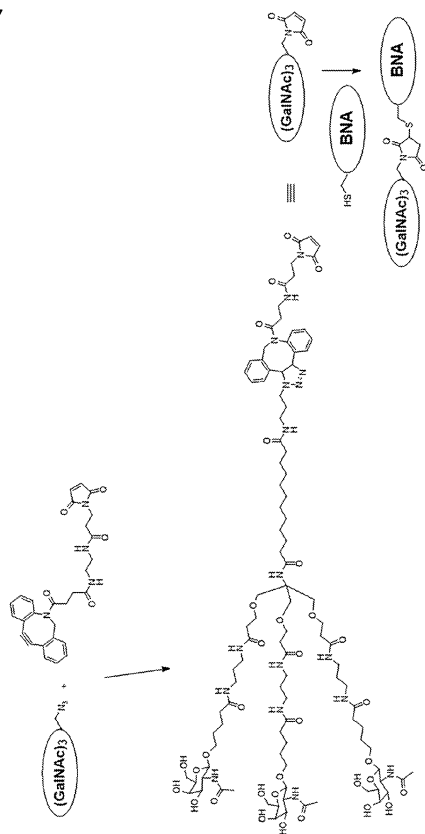


10

20

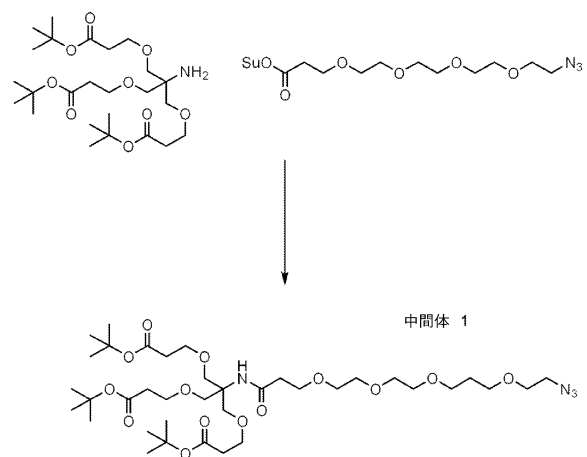
【図 7】

図 7



【図 8 A】

図 8 A



中間体 1

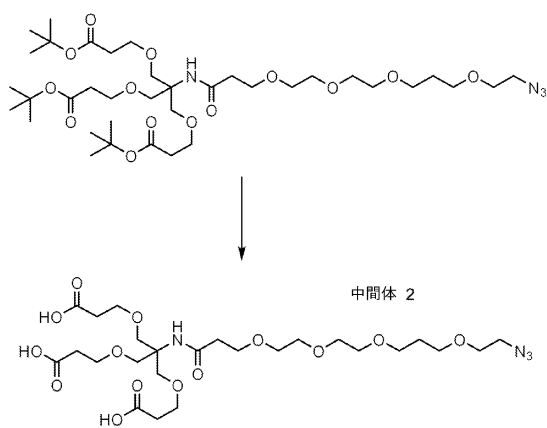
30

40

50

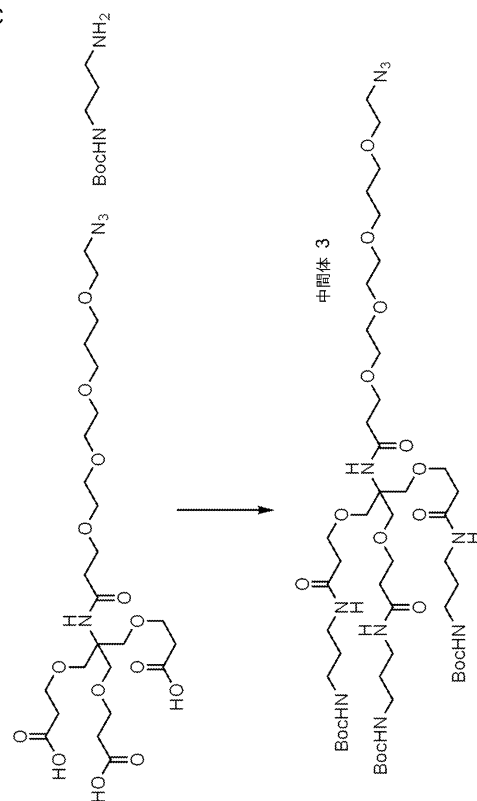
【図 8 B】

図 8 B



【図 8 C】

図 8 C

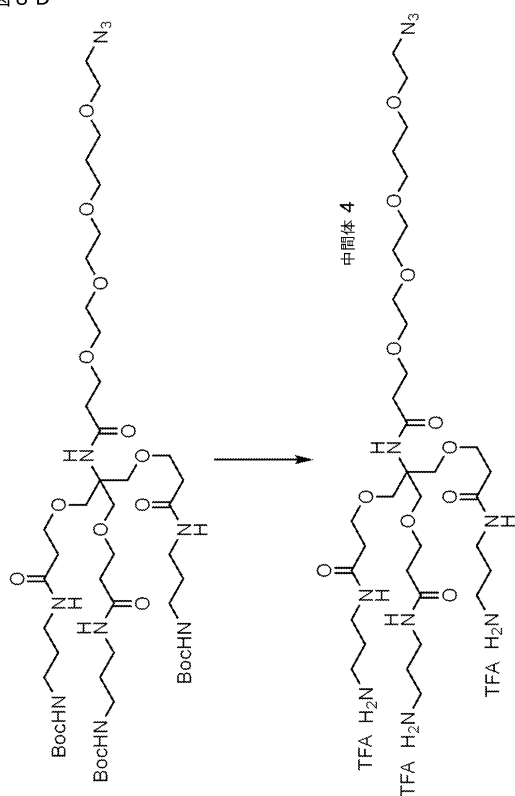


10

20

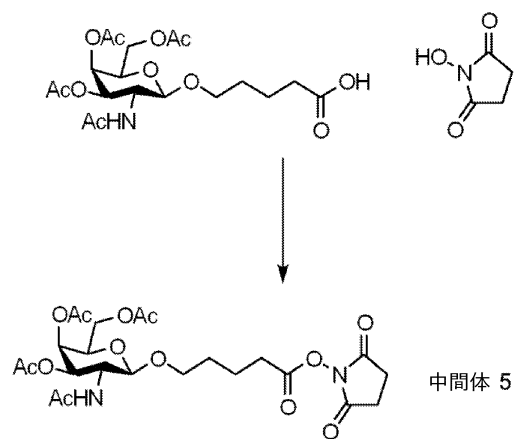
【図 8 D】

図 8 D



【図 8 E】

図 8 E



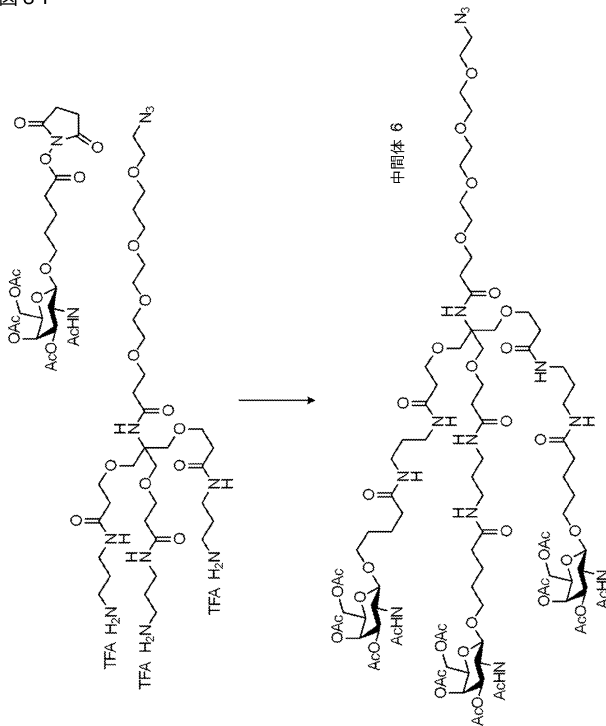
30

40

50

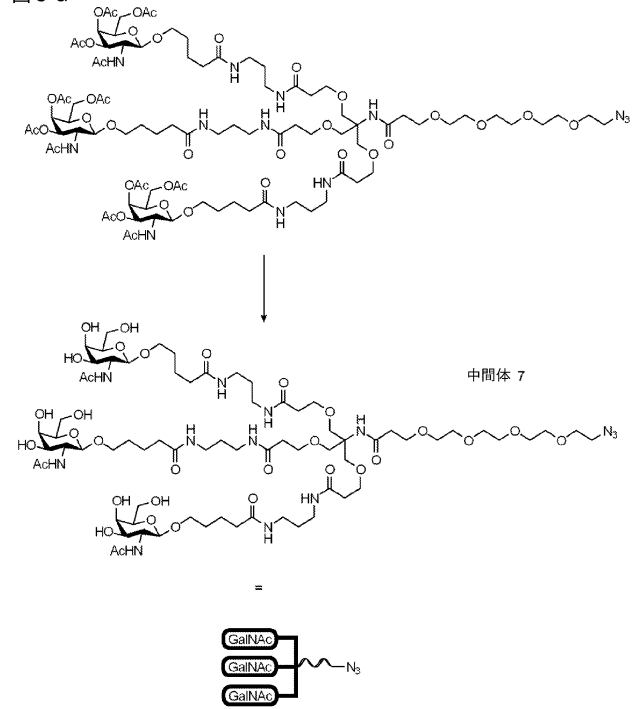
【図 8 F】

図 8 F



【図 8 G】

図 8 G

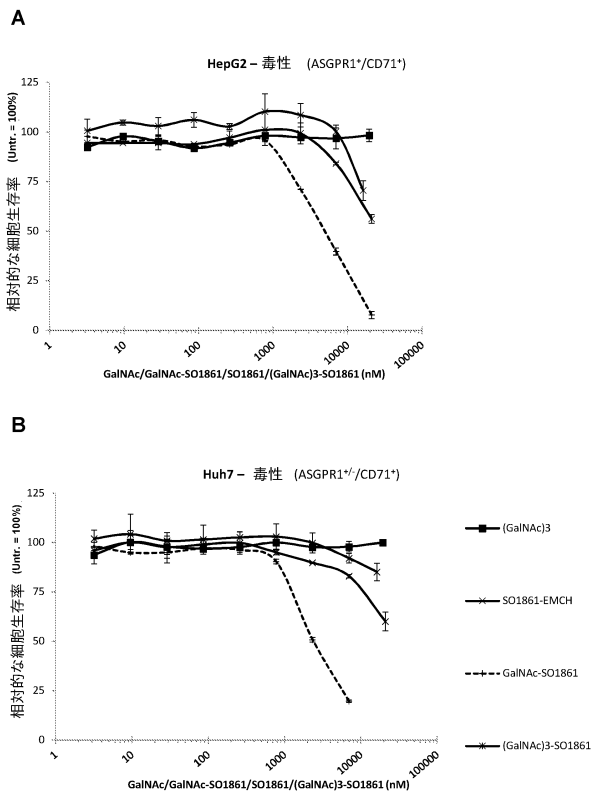


10

20

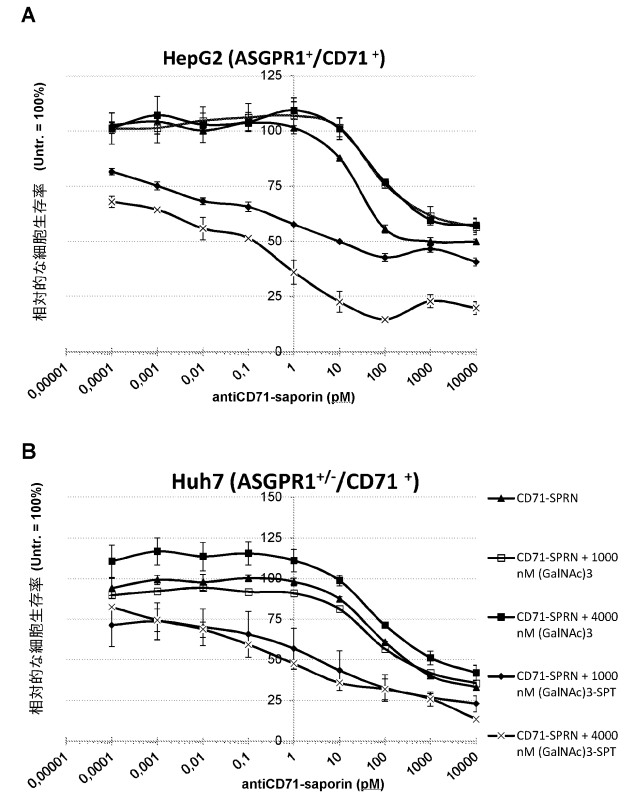
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10



30

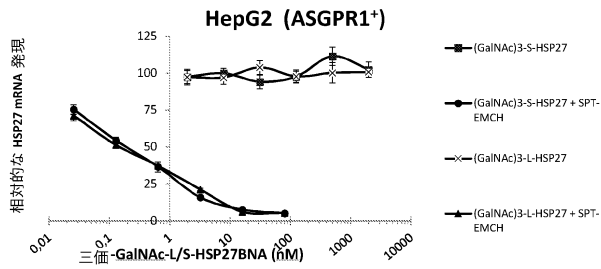
40

50

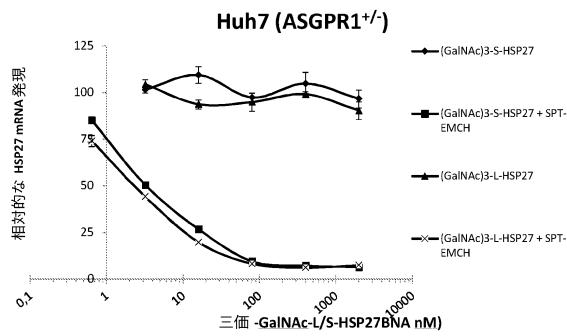
【図 1 1】

図 1 1

A



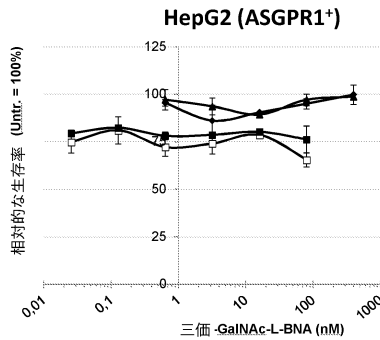
B



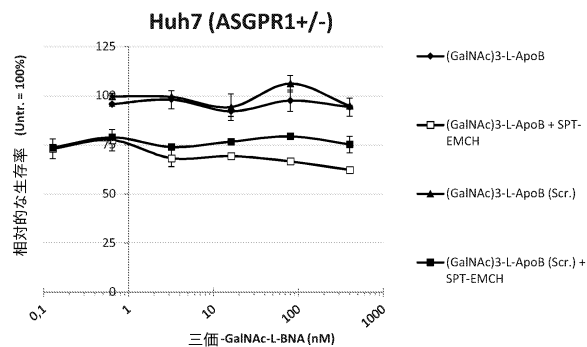
【図 1 3】

図 1 3

A



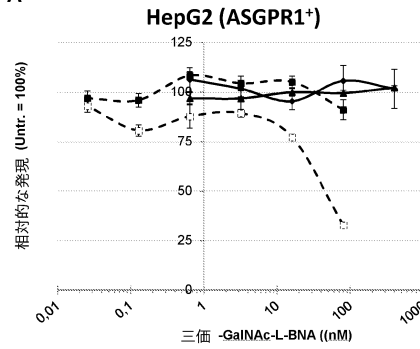
B



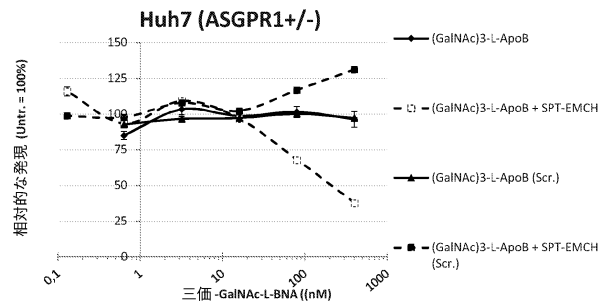
【図 1 2】

図 1 2

A



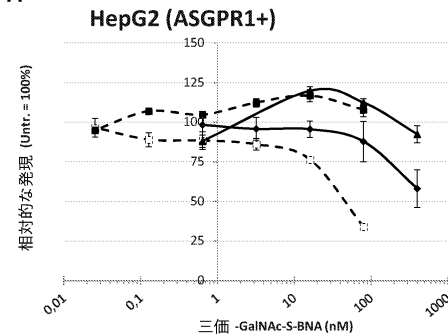
B



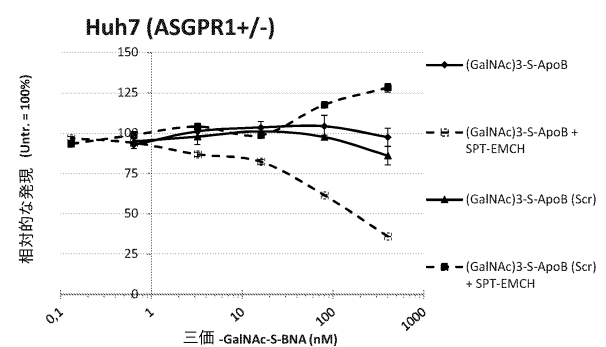
【図 1 4】

図 1 4

A

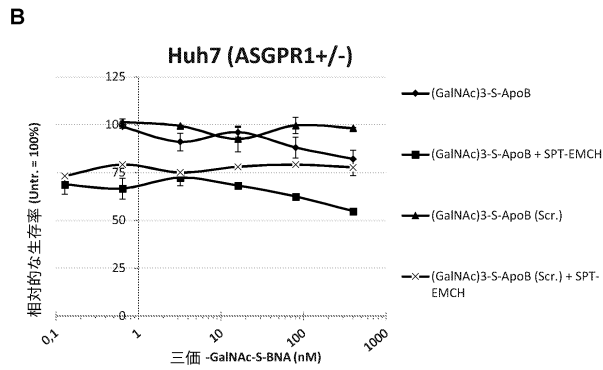
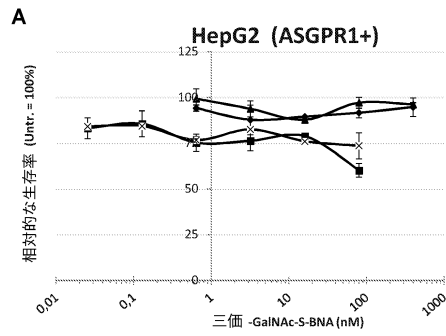


B



【図 1 5】

図 1 5



【図 1 6 B】

図 1 6

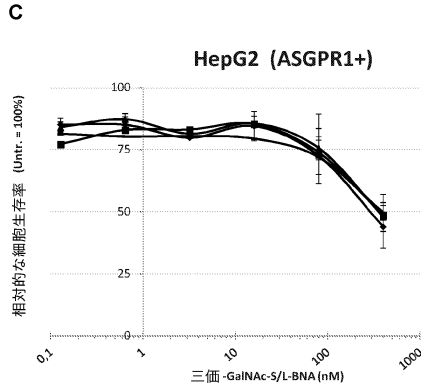
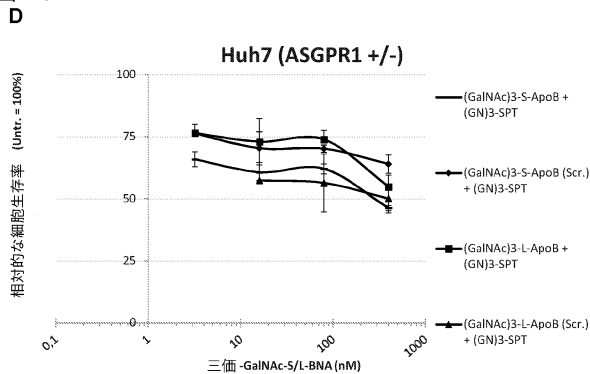
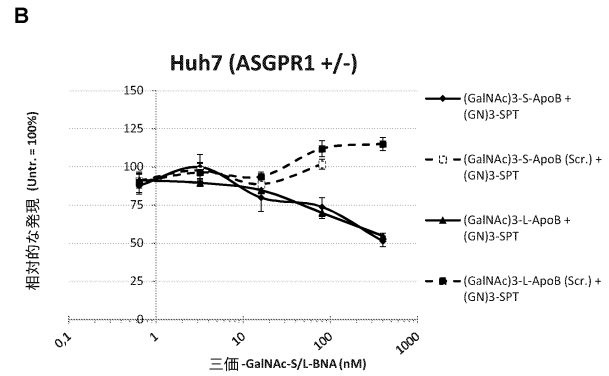
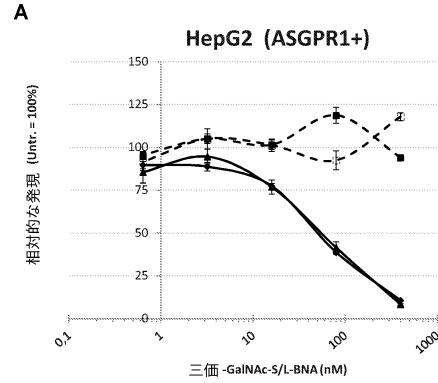


図 1 6



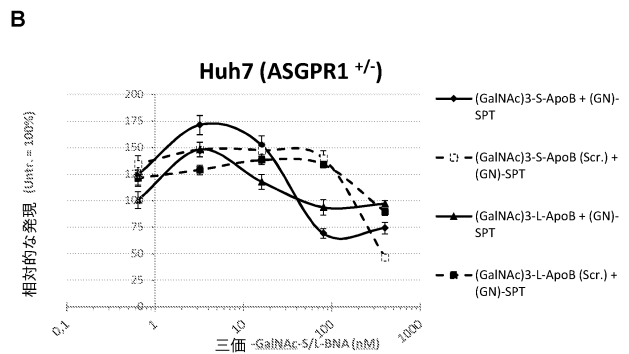
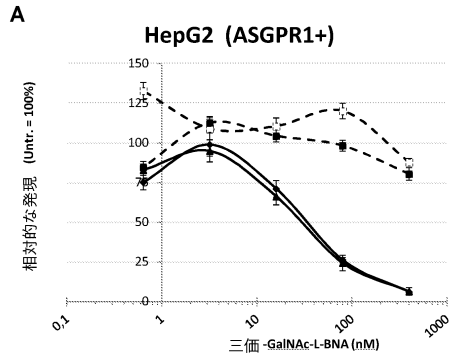
【図 1 6 A】

図 1 6



【図 1 7】

図 1 7



10

20

30

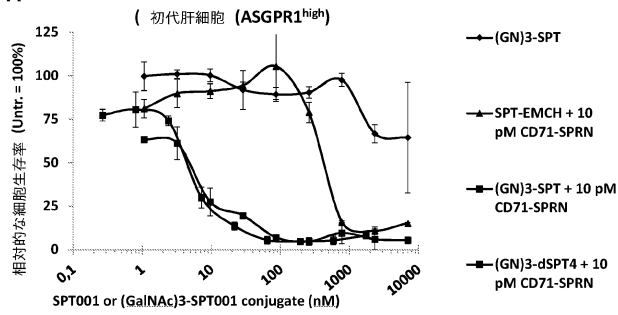
40

50

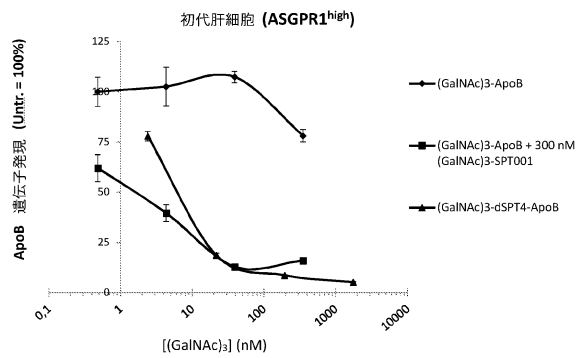
【図 18】

図 18

A



B

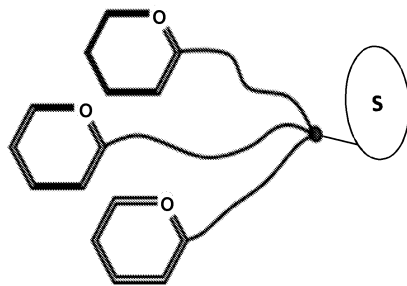


【図 19 B】

図 19

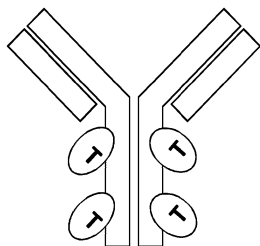
C

三価 GalNAc-SPT001 conjugate



D

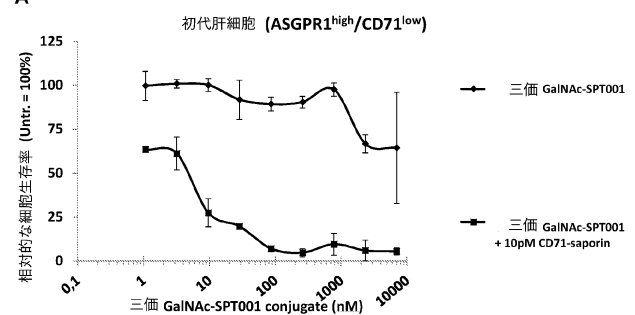
Anti-CD71 antibody - saporin conjugate



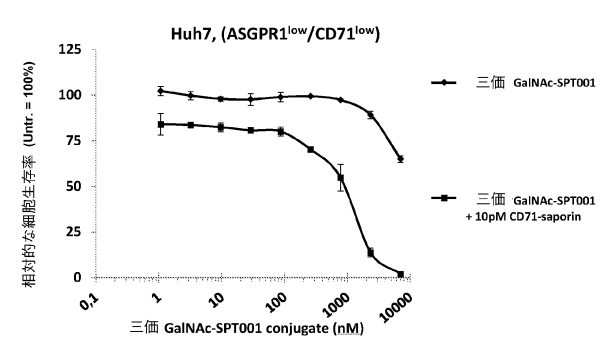
【図 19 A】

図 19

A



B

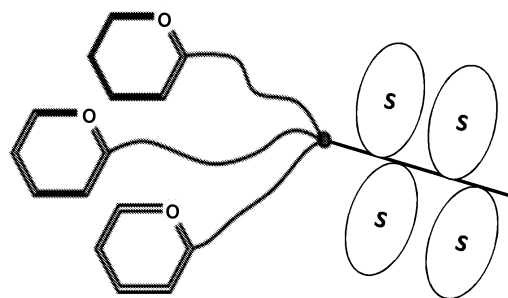


【図 19 C】

図 19

E

(GalNAc)3-dSPT4 conjugate



10

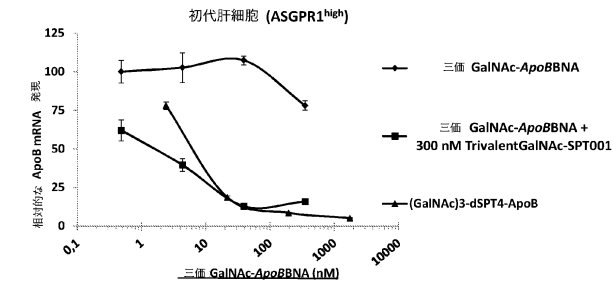
20

30

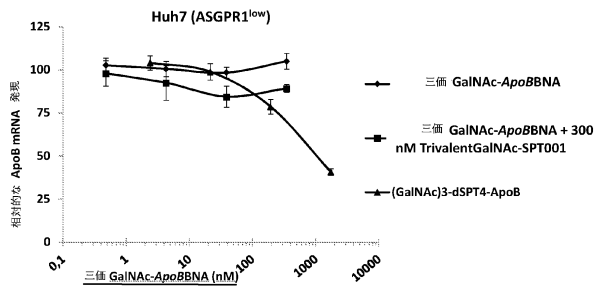
40

50

【図 20 A】

図 20
A

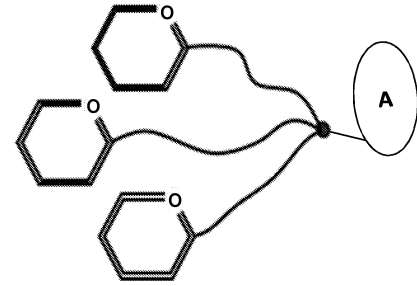
B



【図 20 B】

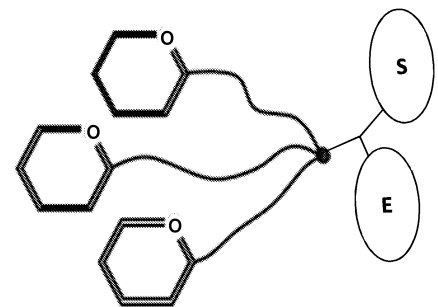
図 20
C

三価 GalNAc-ApoBBNA conjugate

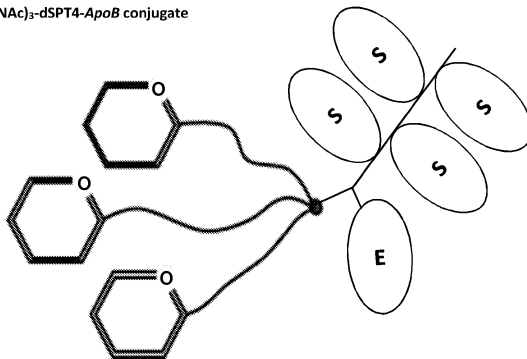


D

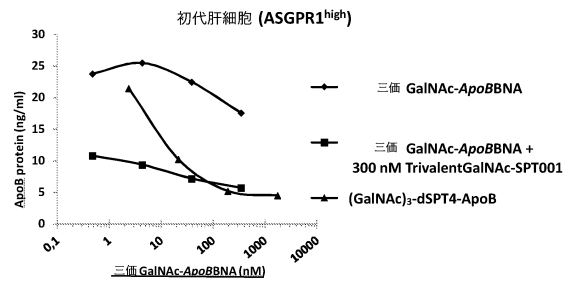
三価 GalNAc-ApoBBNA-SPT001 conjugate



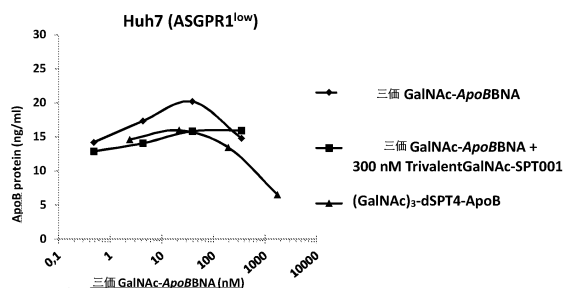
【図 20 C】

図 20
E(GalNAc)₃-dSPT4-ApoB conjugate

【図 21】

図 21
A

B



10

20

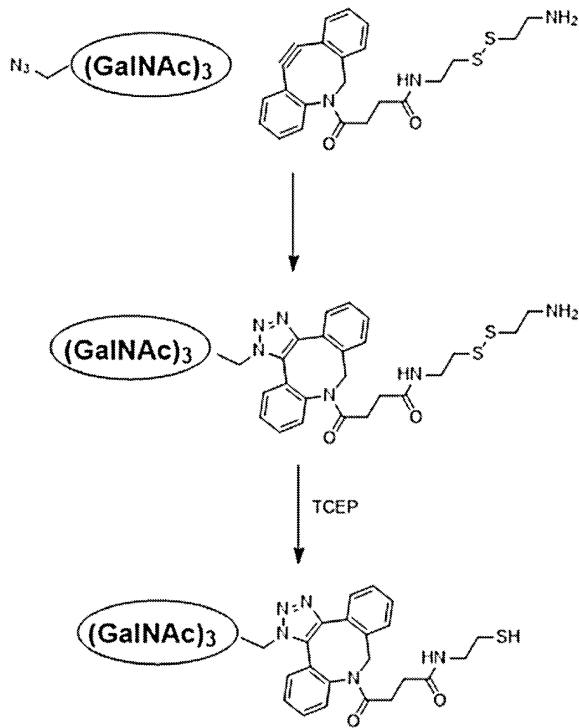
30

40

50

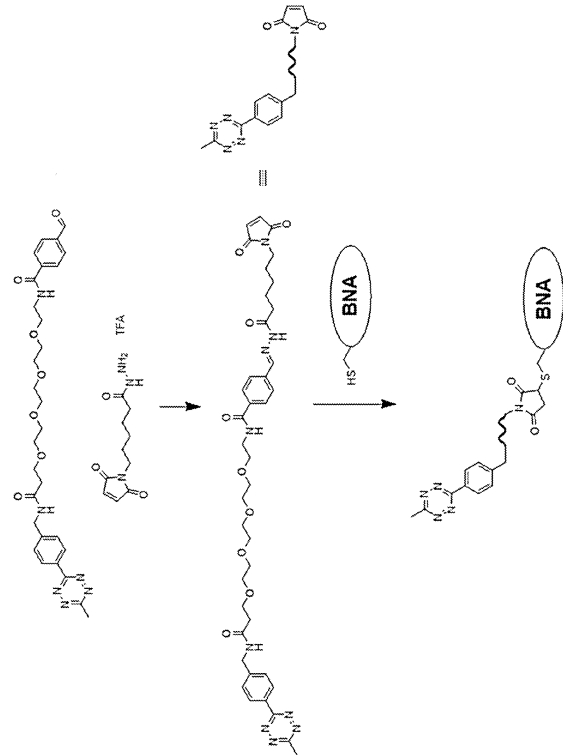
【図 2 2 A】

図 2 2
A



【図 2 2 B】

図 2 2
B

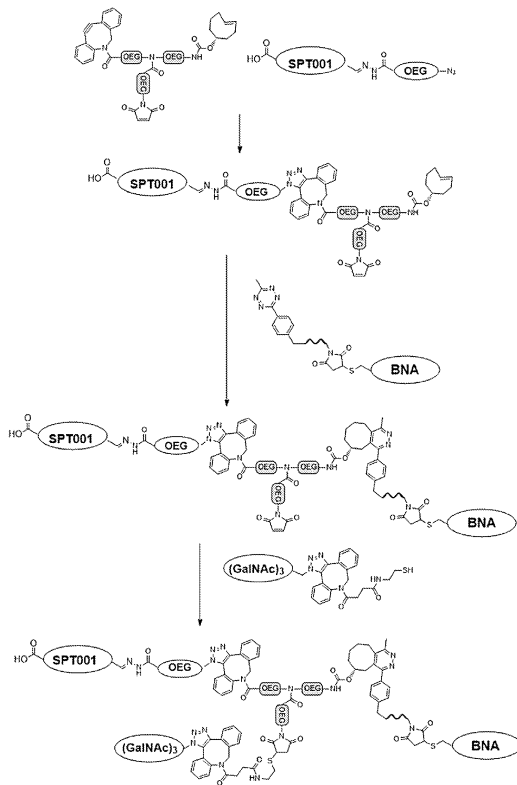


10

20

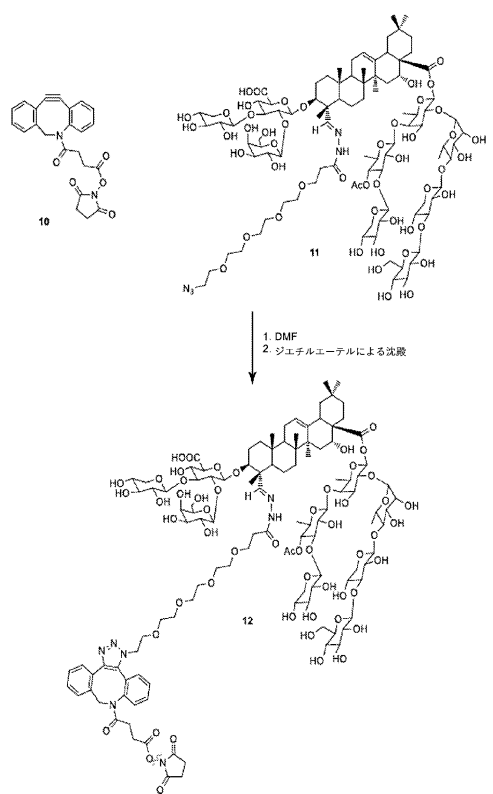
【図 2 2 C】

図 2 2
C



【図 2 3 A】

図 2 3
A

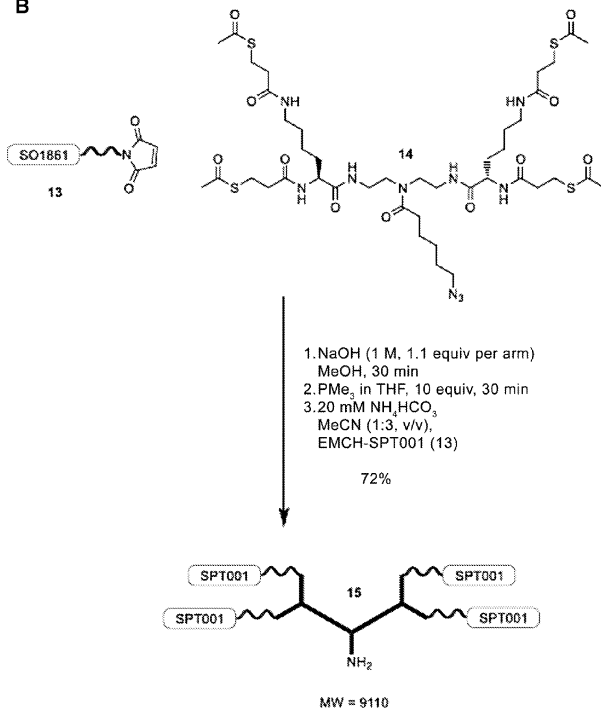


30

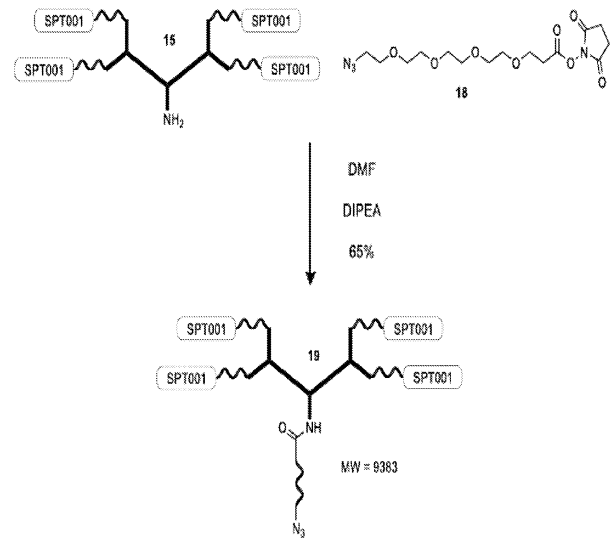
40

50

【図 2 3 B】

図 2 3
B

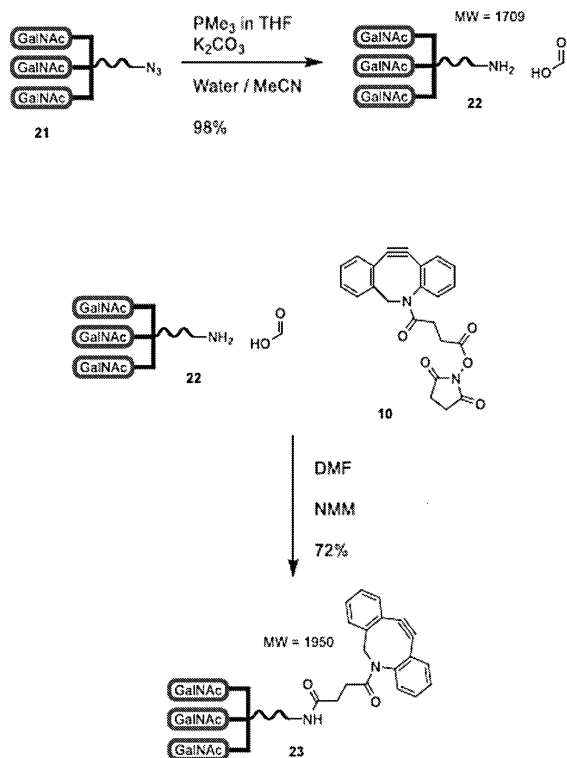
【図 2 3 C】

図 2 3
C

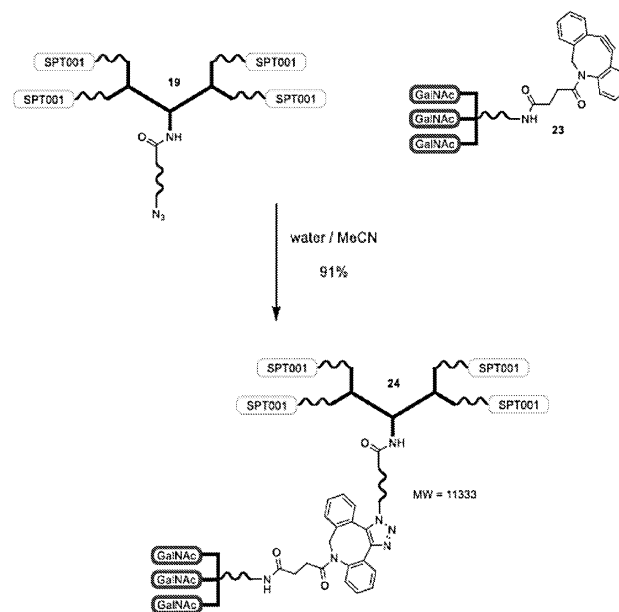
10

20

【図 2 3 D】

図 2 3
D

【図 2 3 E】

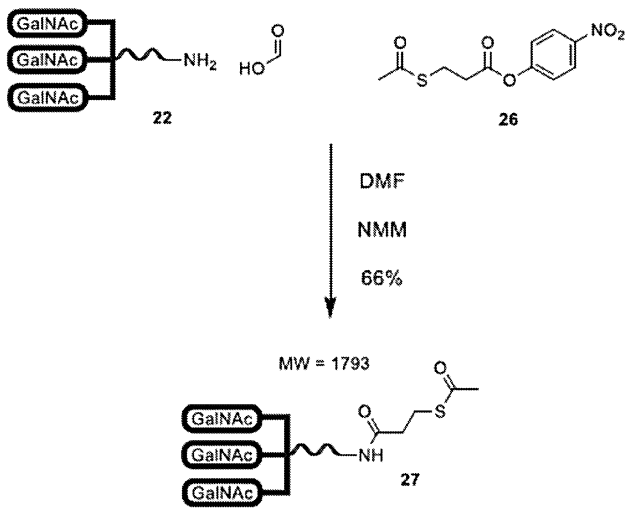
図 2 3
E

30

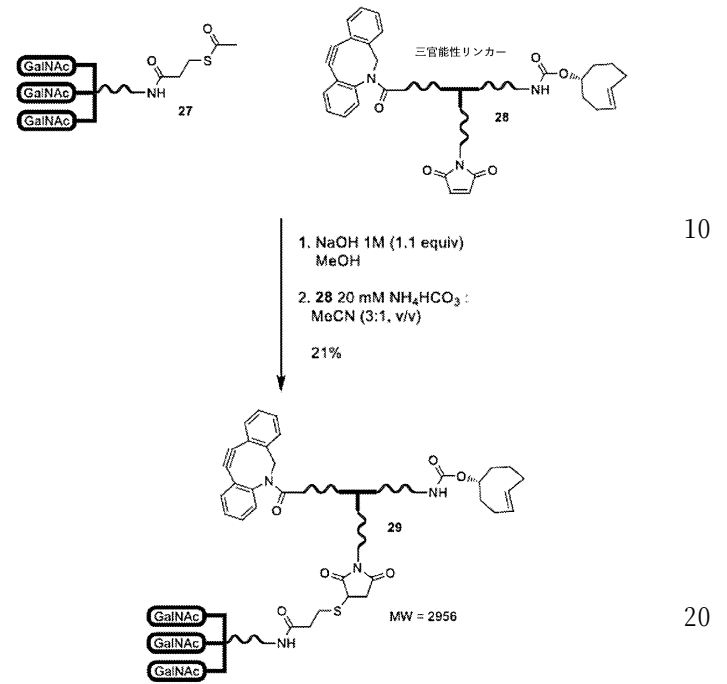
40

50

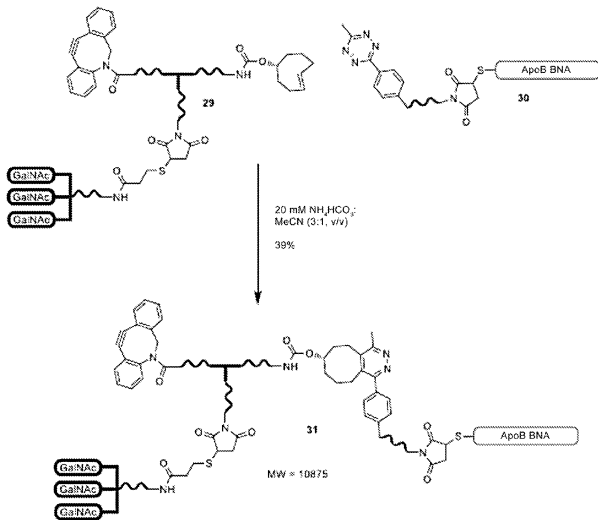
【図 2 4 A】

図 2 4
A

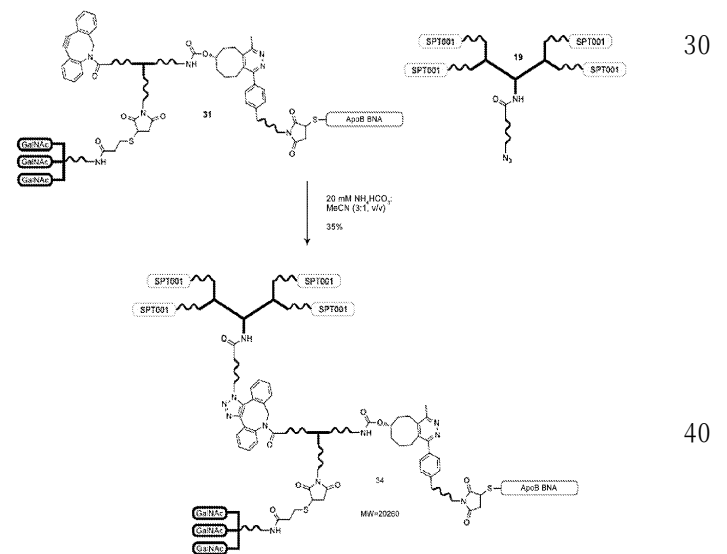
【図 2 4 B】

図 2 4
B

【図 2 4 C】

図 2 4
C

【図 2 4 D】

図 2 4
D

10

20

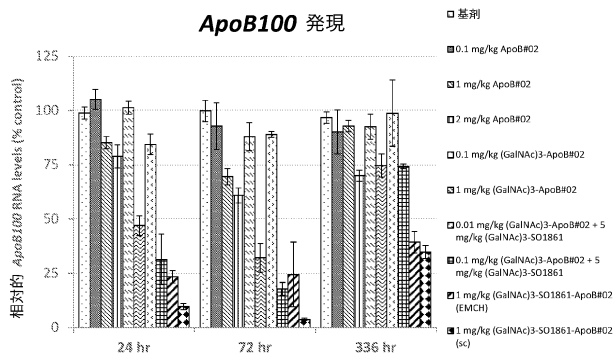
30

40

50

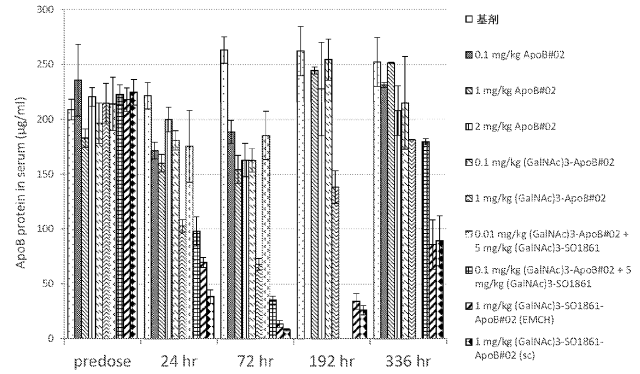
【図 25】

図 25



【図 26】

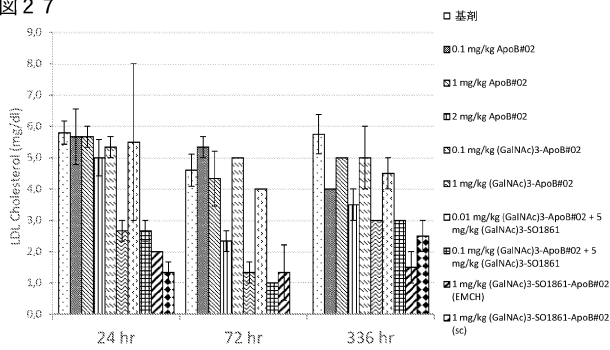
図 26



10

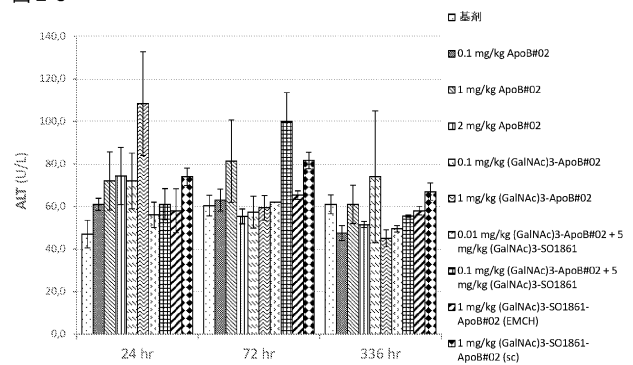
【図 27】

図 27



【図 28】

図 28



20

30

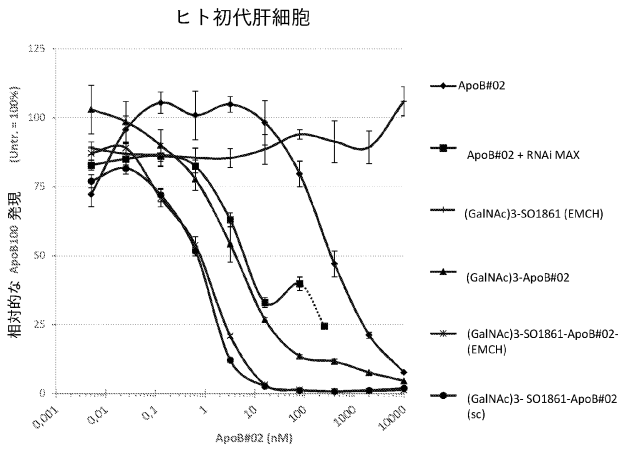
40

50

【図 29 A】

図 29

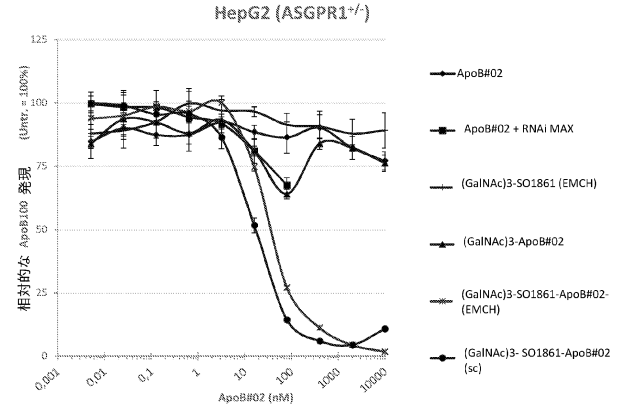
A



【図 29 B】

図 29

B

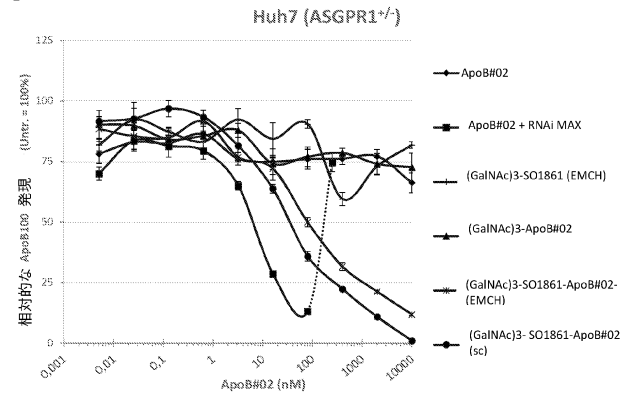


10

【図 29 C】

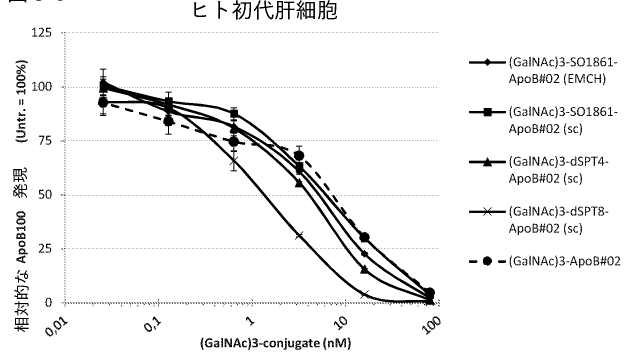
図 29

C



【図 30】

図 30



20

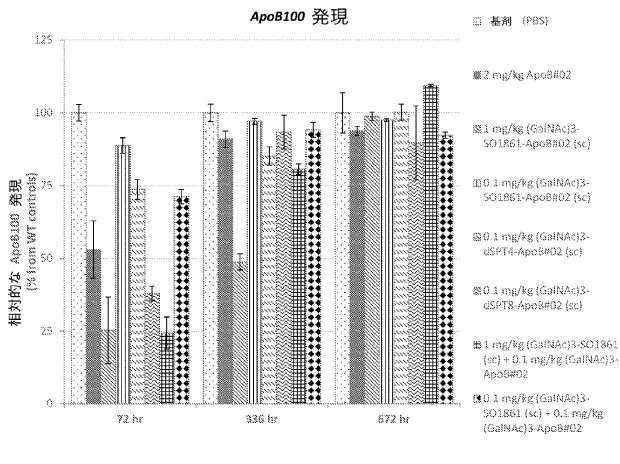
30

40

50

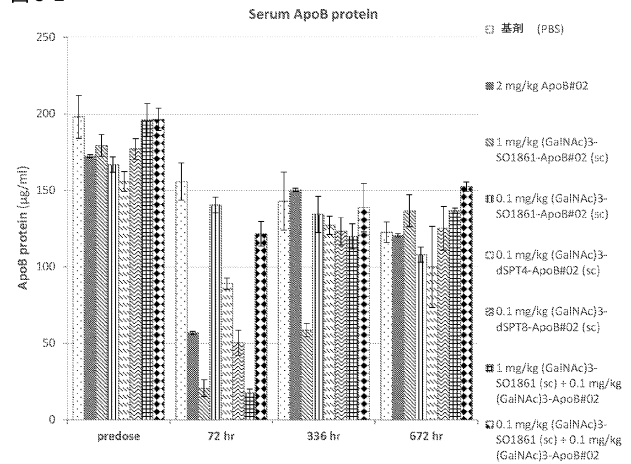
【図 3 1】

図 3 1



【図 3 2】

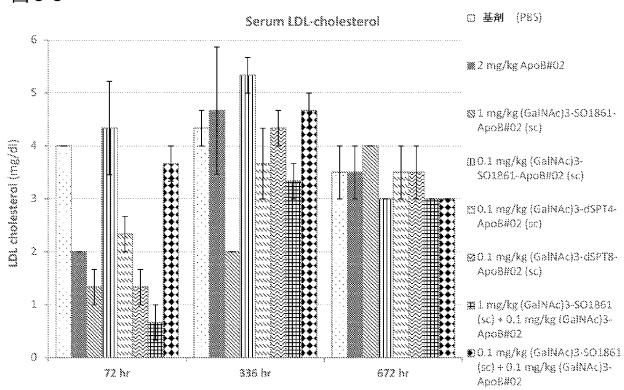
図 3 2



10

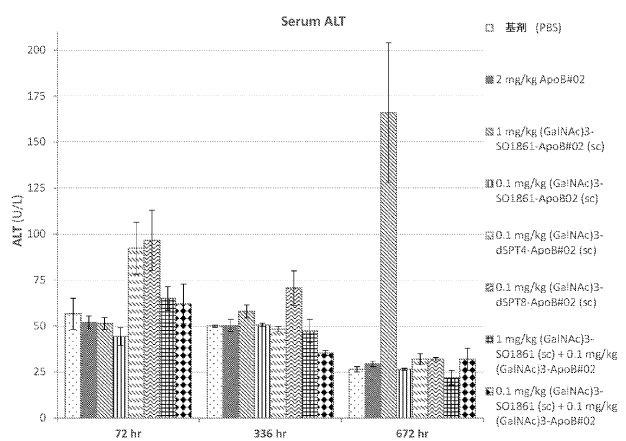
【図 3 3】

図 3 3



【図 3 4】

図 3 4



20

30

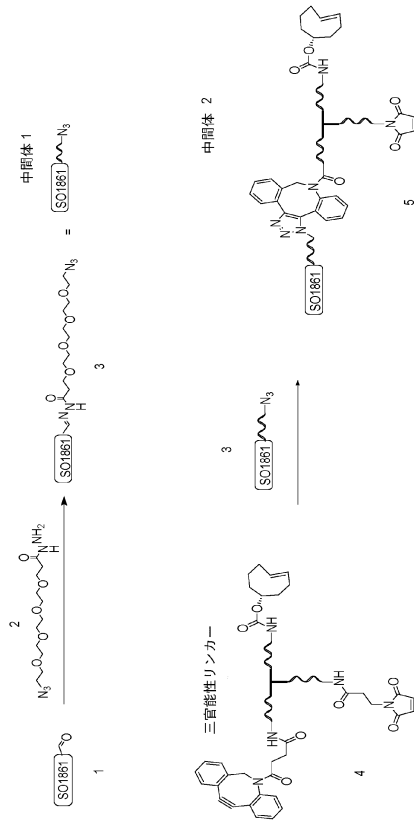
40

50

【図 3 5 A】

図 3 5

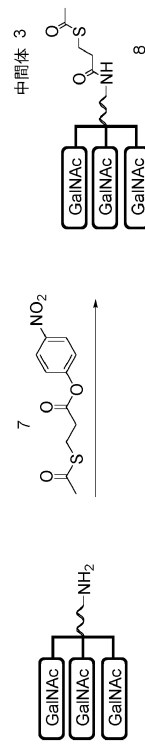
A



【図 3 5 B】

図 3 5

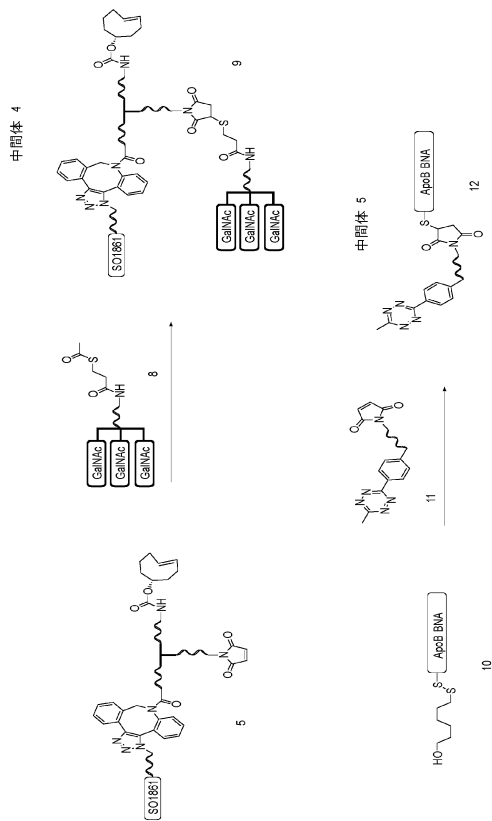
B



【図 3 5 C】

図 3 5

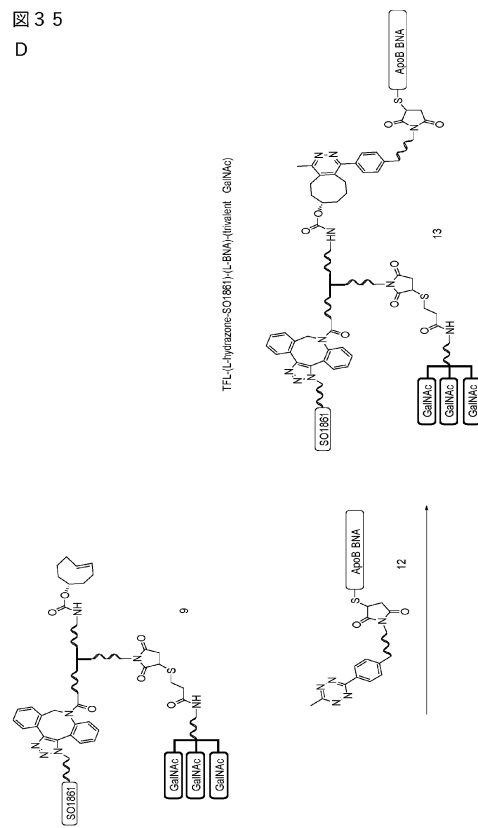
C



【図 3 5 D】

図 3 5

D



10

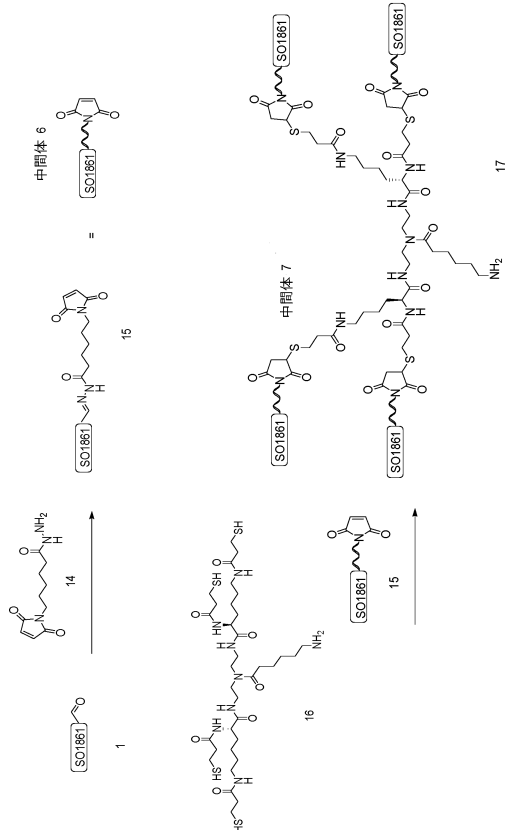
20

30

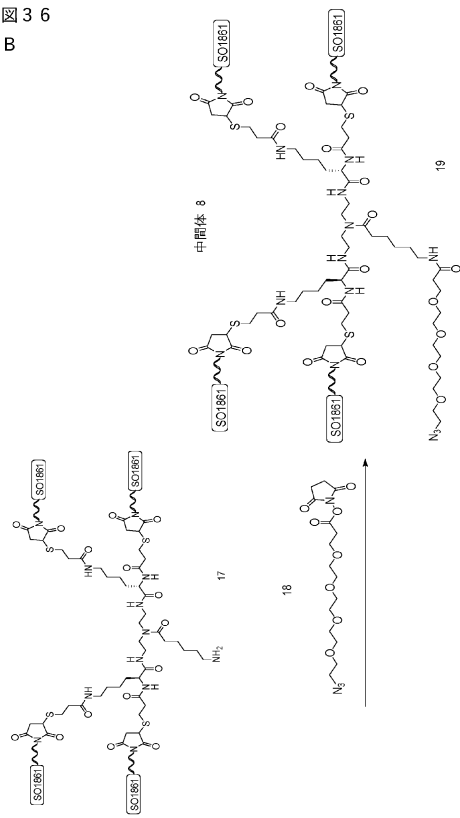
40

50

【図 3 6 A】

図 3 6
A

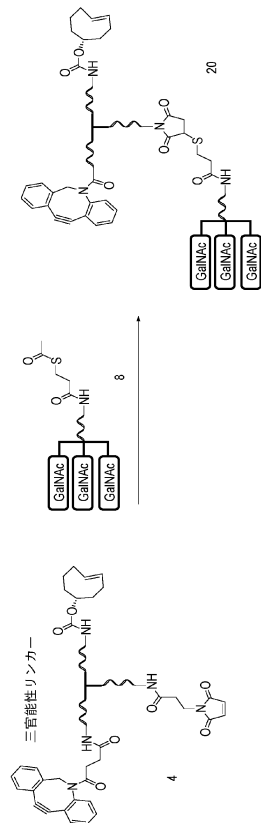
【図 3 6 B】

図 3 6
B

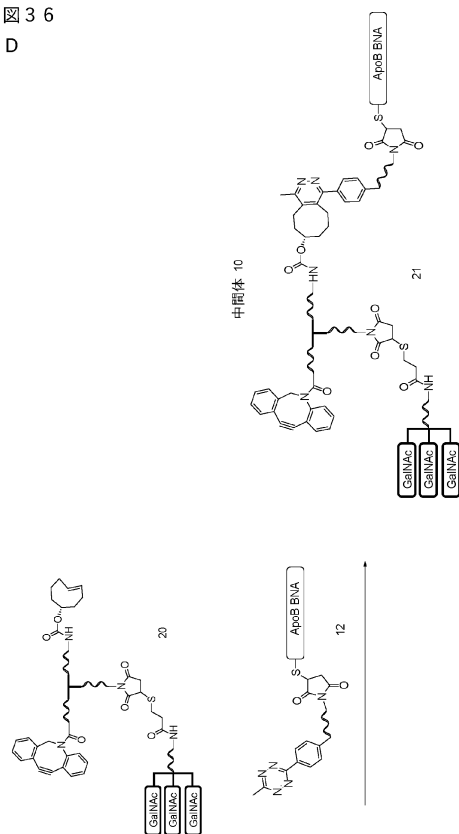
10

20

【図 3 6 C】

図 3 6
C

【図 3 6 D】

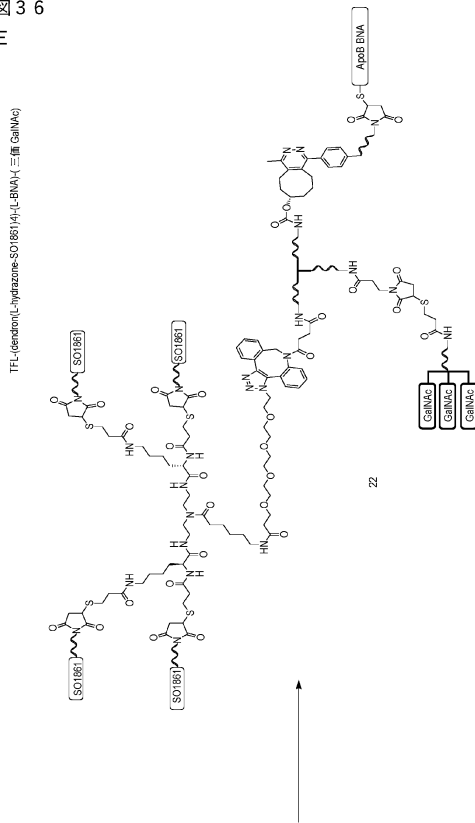
図 3 6
D

30

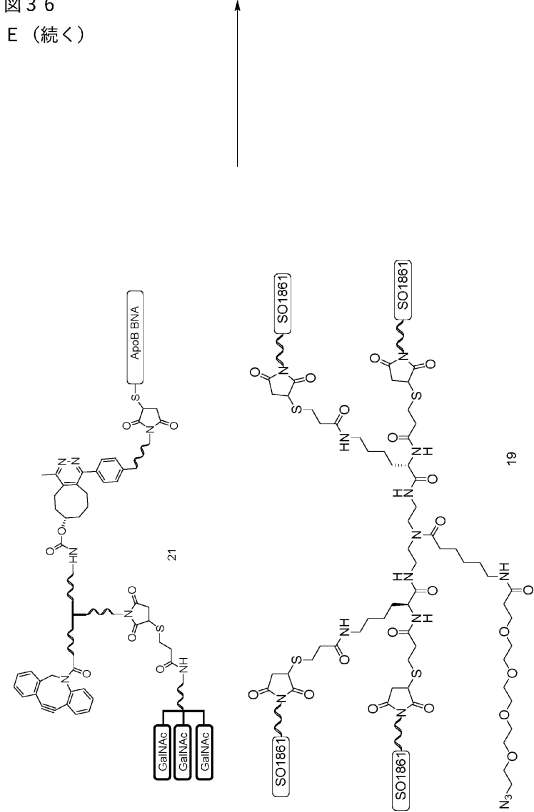
40

50

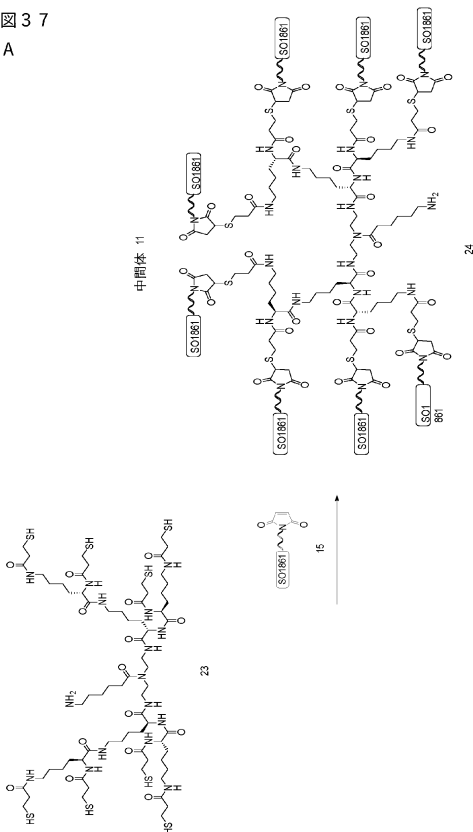
【図 3 6 E】

図 3 6
E

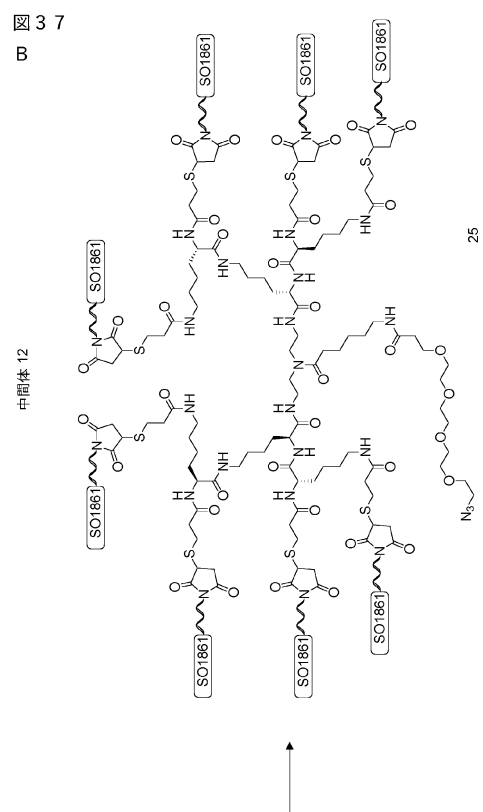
【図 3 6 F】

図 3 6
E (続く)

【図 3 7 A】

図 3 7
A

【図 3 7 B】

図 3 7
B

10

20

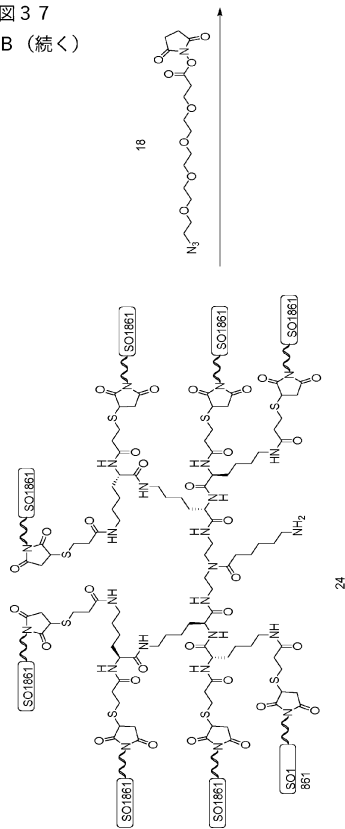
30

40

50

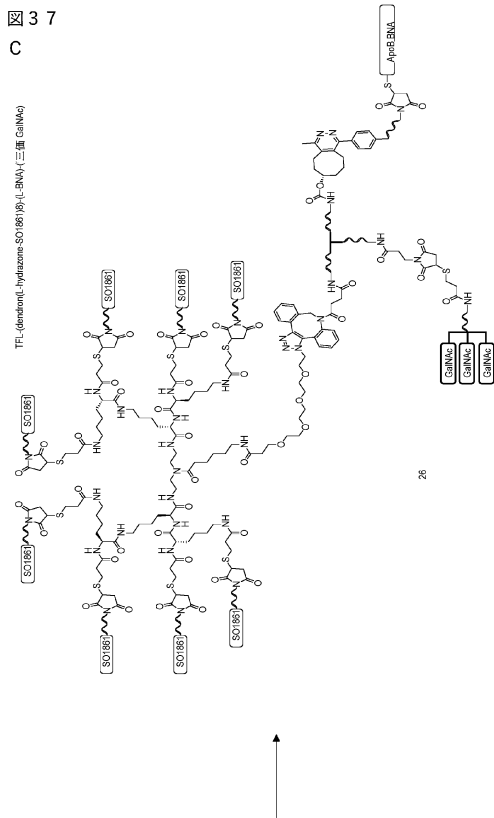
【図 3 7 C】

図 3 7
B (続く)



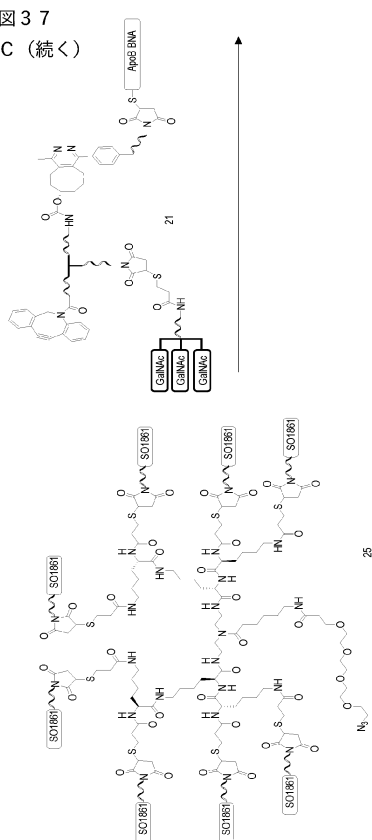
【図 3 7 D】

図 3 7
C



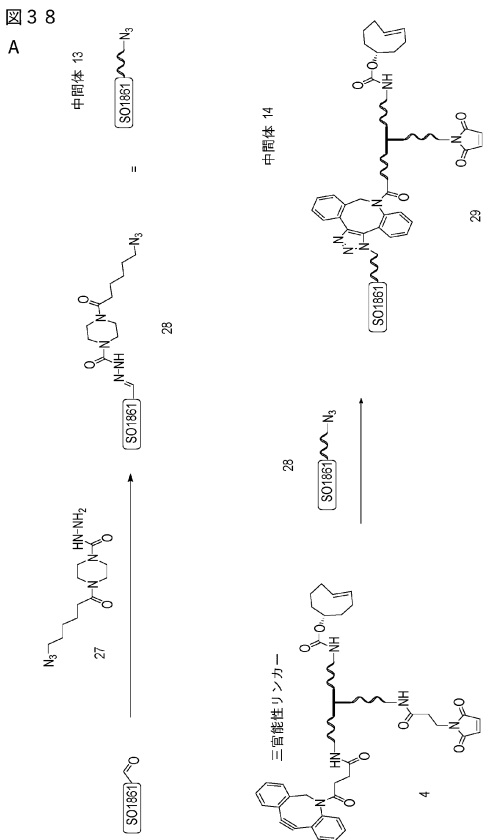
【図 3 7 E】

図 3 7
C (続く)



【図 3 8 A】

図 3 8
A



10

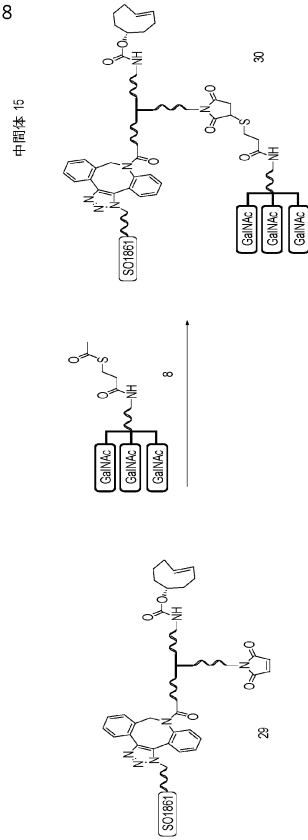
20

30

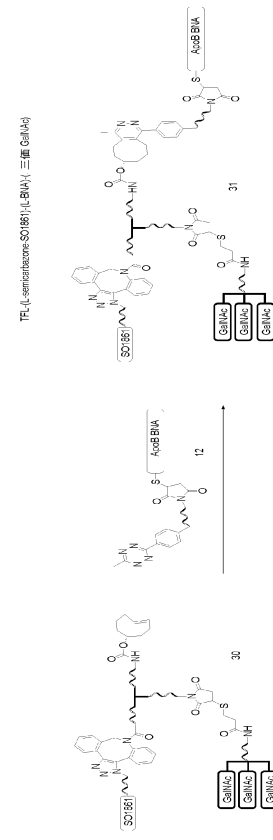
40

50

【図 3 8 B】

図 3 8
B

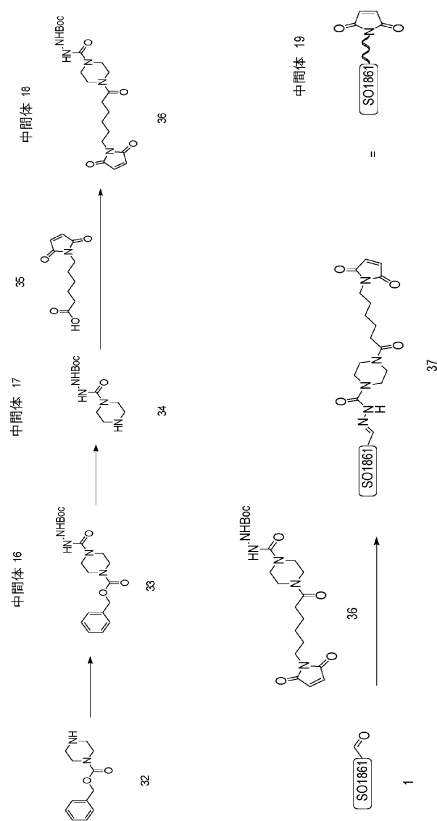
【図 3 8 C】

図 3 8
C

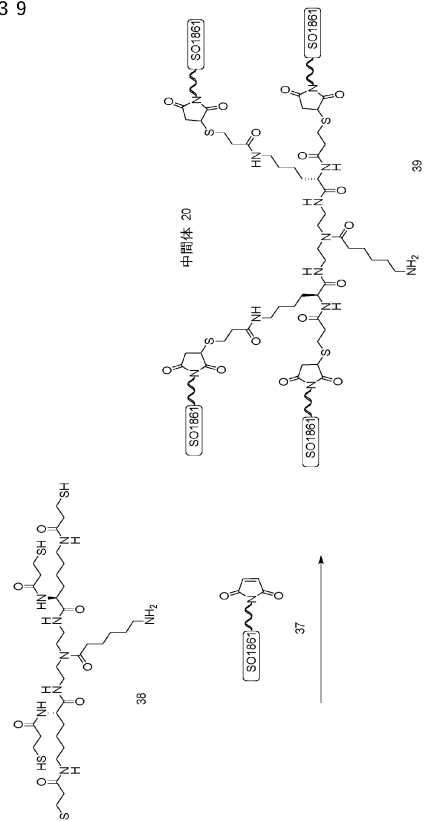
10

20

【図 3 9 A】

図 3 9
A

【図 3 9 B】

図 3 9
B

30

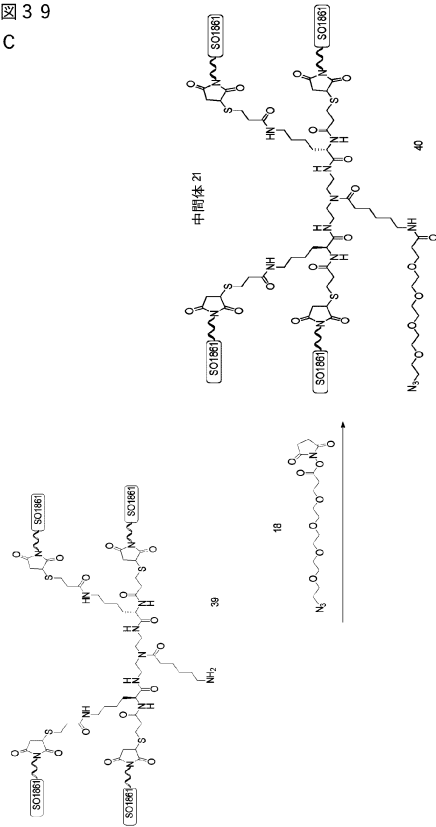
40

50

【図 39 C】

図 39

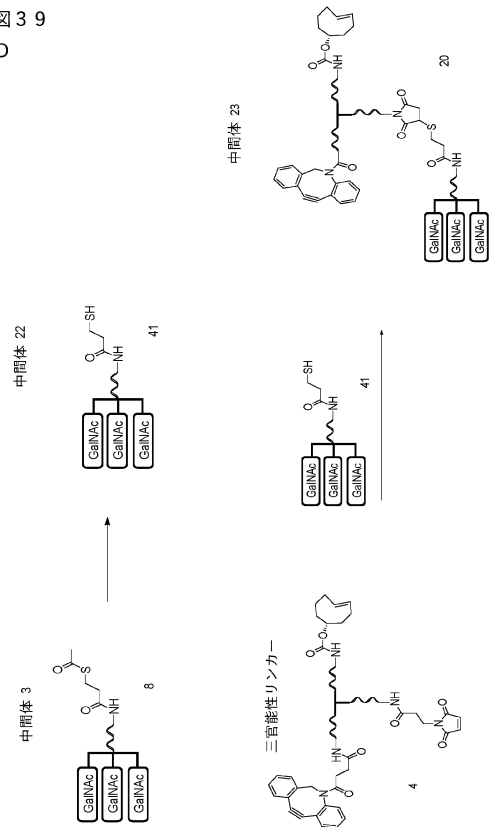
C



【図 39 D】

図 39

D



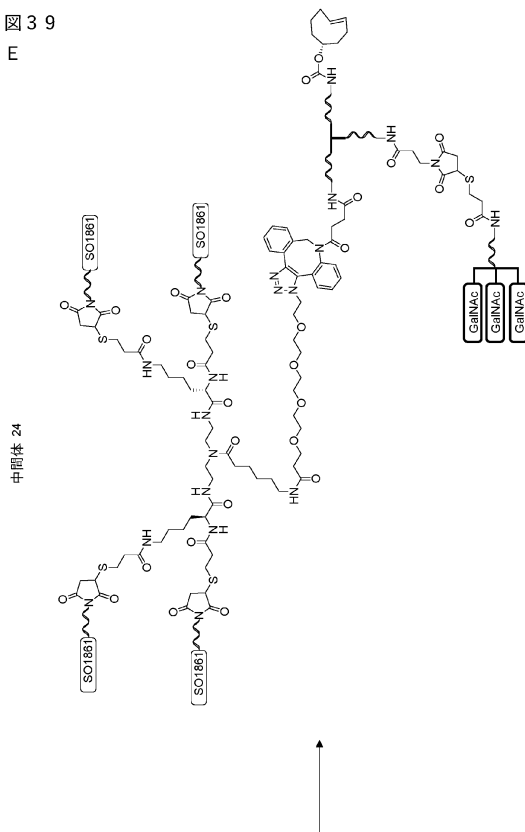
10

20

【図 39 E】

図 39

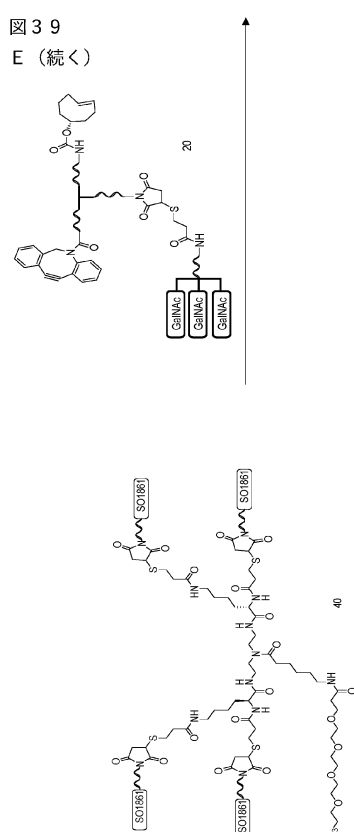
E



【図 39 F】

図 39

E (続く)



30

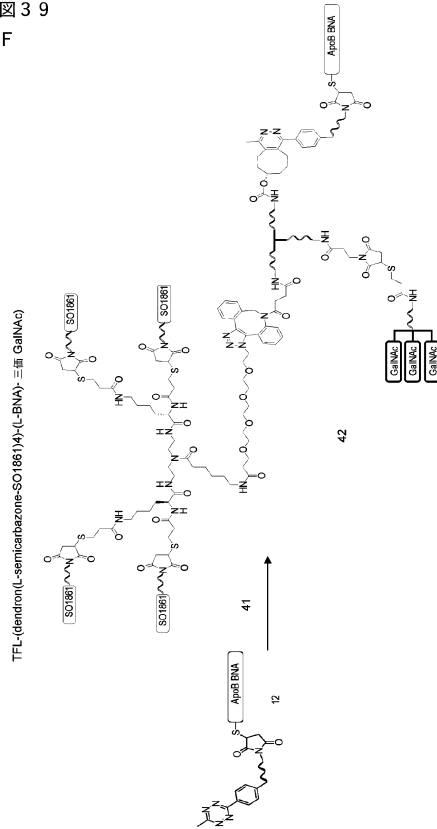
40

50

【図 39 G】

図 39

F

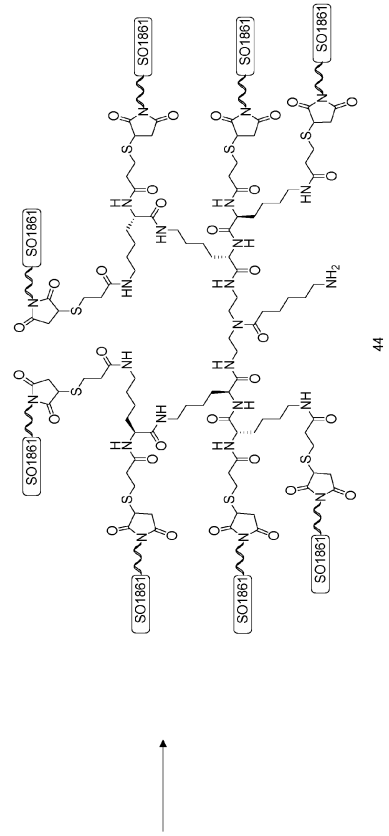


【図 40 A】

図 40

A

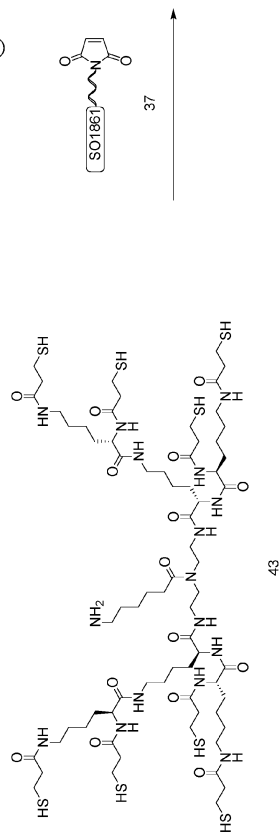
中間体 25



【図 40 B】

図 40

A (続く)

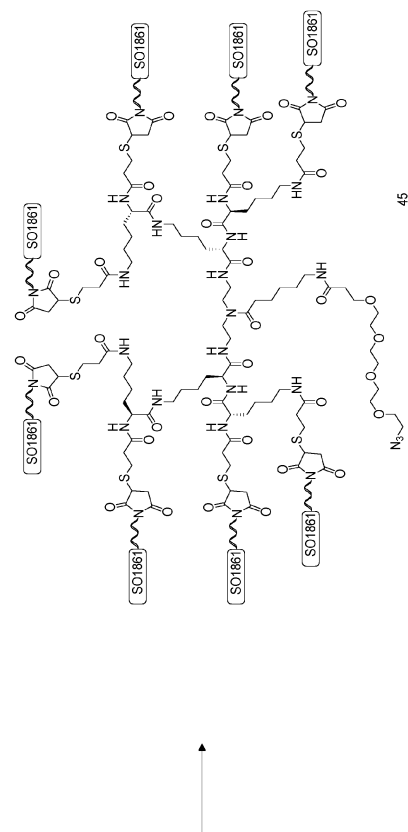


【図 40 C】

図 40

B

中間体 26



10

20

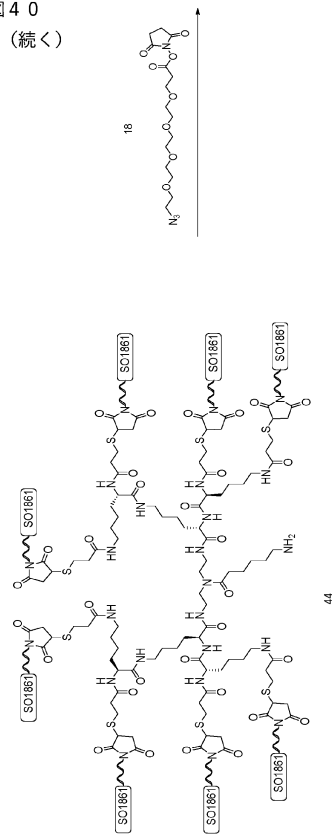
30

40

50

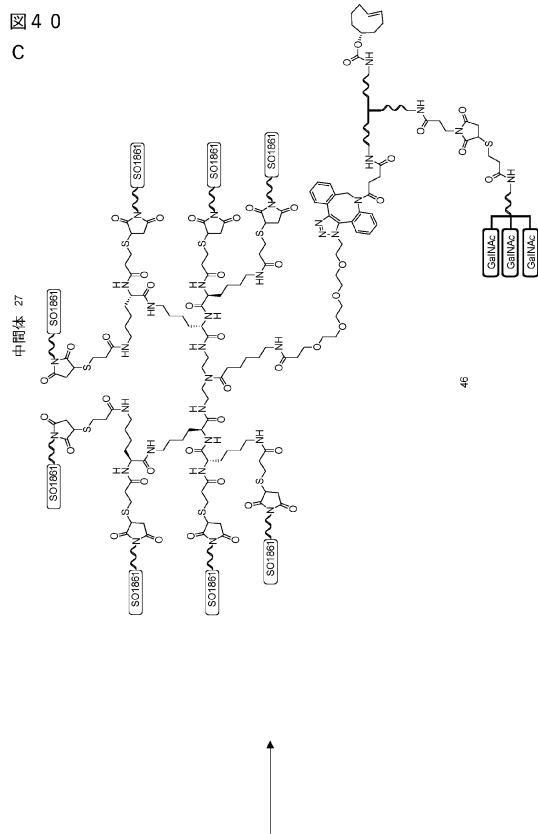
【図 40 D】

図 40
B (続く)



【図 40 E】

図 40
C

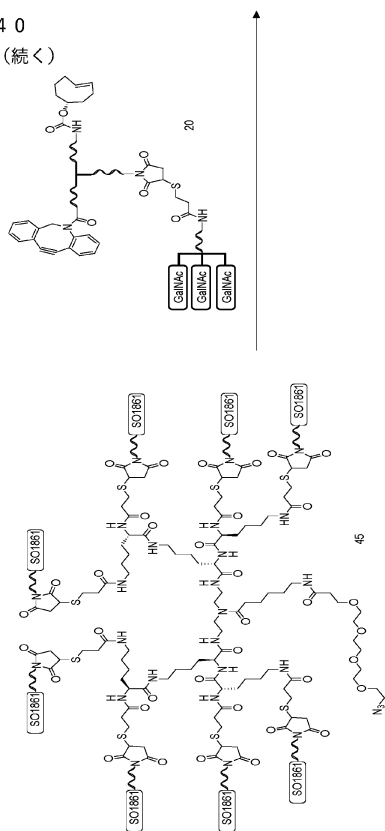


10

20

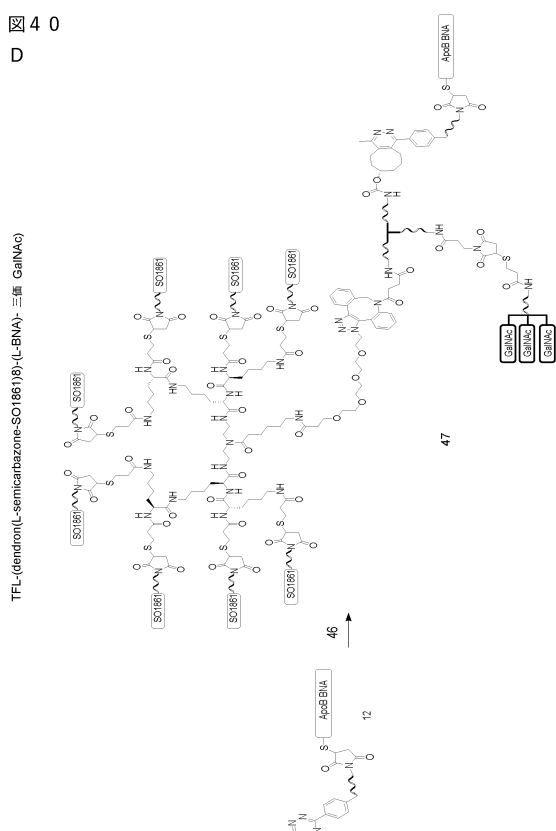
【図 40 F】

図 40
C (続く)



【図 40 G】

図 40
D



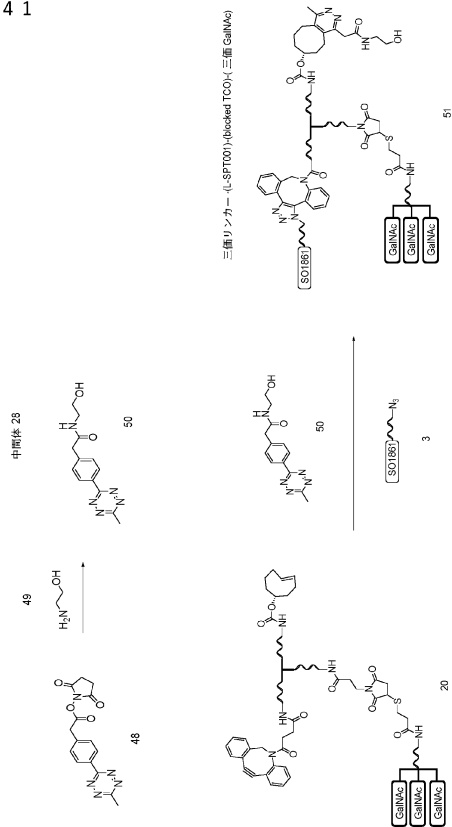
30

40

50

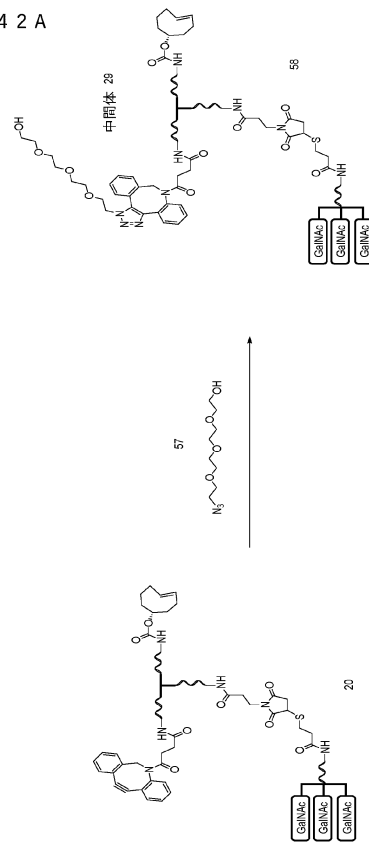
【図 4 1】

図 4 1



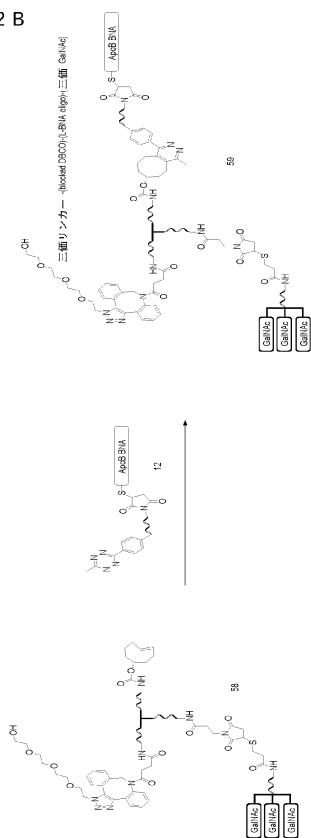
【図 4 2 A】

図 4 2 A



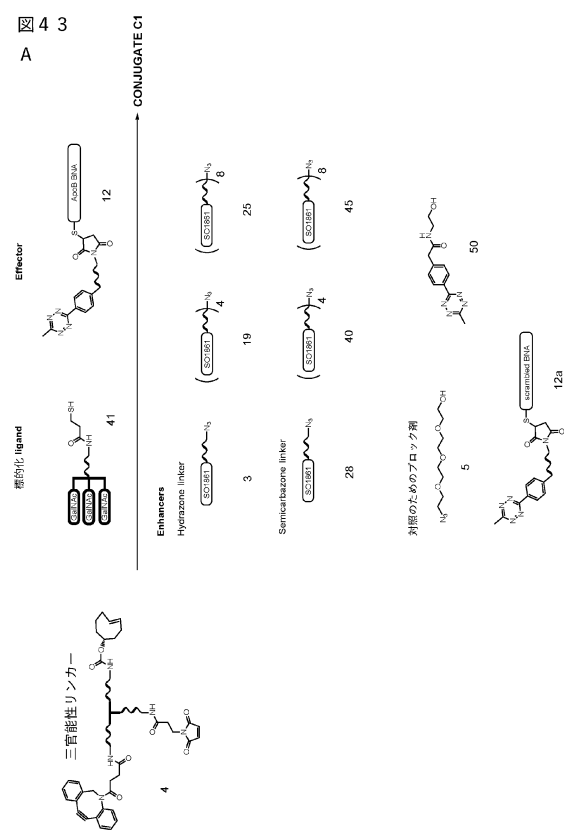
【図 4 2 B】

図 4 2 B



【図 4 3 A】

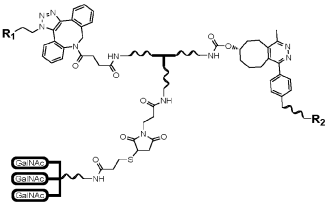
図 4 3
A



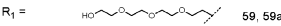
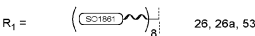
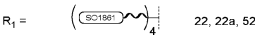
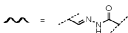
【図 4 3 B】

図 4 3
B

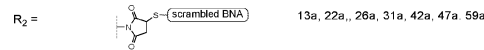
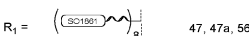
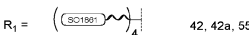
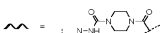
CONJUGATE C1 =



Hydrazone linker



Semicarbazone linker



【配列表】

202453083900001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/54 A61K47/55 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/126627 A1 (SAPREME TECH B V [NL]; UNIV BERLIN CHARITE [DE]) 25 June 2020 (2020-06-25) claims 1, 2; examples 5, 6 -----	1-21
A	SABINE SEWING ET AL: "GalNAc Conjugation Attenuates the Cytotoxicity of Antisense Oligonucleotide Drugs in Renal Tubular Cells", MOLECULAR THERAPY: NUCLEIC ACIDS., vol. 14, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 67-79, XP055762603, US ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1016/j.omtn.2018.11.005 abstract ----- -/-	1-21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 June 2022		Date of mailing of the international search report 15/06/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Langer, Miren

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050127

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/071388 A1 (ROCHE INNOVATION CT COPENHAGEN AS [DK]) 21 May 2015 (2015-05-21) page 50, paragraph 1 claims 1-3	1-21
A	XU RAN ET AL: "On the origins of triterpenoid skeletal diversity", PHYTOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM , NL, vol. 65, no. 3, 9 May 2017 (2017-05-09), pages 261-291, XP085002429, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2003.11.014 abstract	1-21
A	WO 2011/054811 A1 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; ENZON PHARMACEUTICALS INC [US] ET AL.) 12 May 2011 (2011-05-12) the whole document	1-21
A	AARON D. SPRINGER ET AL: "GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics", NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, vol. 28, no. 3, 1 June 2018 (2018-06-01), pages 109-118, XP055555952, US ISSN: 2159-3337, DOI: 10.1089/nat.2018.0736	1-21
A	BACHRAN CHRISTOPHER ET AL: "Saponins in Tumor Therapy", MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 575-584, XP055775950,	1-21
A	HENDRIK FUCHS ET AL: "Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies", BIOMEDICINES, vol. 5, no. 2, 29 March 2017 (2017-03-29), page 14, XP055429235, DOI: 10.3390/biomedicines5020014	1-21
A	WO 2020/126620 A2 (SAPREME TECH BV [NL]; UNIV BERLIN CHARITE [DE]) 25 June 2020 (2020-06-25)	1-21
7	E WO 2022/055351 A1 (SAPREME TECH BV [NL]) 17 March 2022 (2022-03-17) the whole document	1-21
1		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL2022/050127

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2022/050127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020126627 A1	25-06-2020	AU 2019400630 A1	12-08-2021
		AU 2019407234 A1	19-08-2021
		AU 2019408811 A1	12-08-2021
		AU 2019411276 A1	12-08-2021
		AU 2019411278 A1	12-08-2021
		AU 2019411289 A1	12-08-2021
		CA 3123978 A1	25-06-2020
		CA 3124064 A1	25-06-2020
		CA 3124065 A1	25-06-2020
		CA 3124129 A1	25-06-2020
		CA 3124151 A1	25-06-2020
		CA 3124406 A1	25-06-2020
		CN 113453722 A	28-09-2021
		CN 113474009 A	01-10-2021
		CN 113474010 A	01-10-2021
		CN 113498350 A	12-10-2021
		CN 113507941 A	15-10-2021
		CN 113747923 A	03-12-2021
		DK 3773737 T3	04-10-2021
		EP 3773737 A1	17-02-2021
		EP 3808379 A1	21-04-2021
		EP 3856254 A2	04-08-2021
		EP 3897735 A1	27-10-2021
		EP 3897738 A1	27-10-2021
		EP 3897739 A1	27-10-2021
		EP 3897741 A1	27-10-2021
		EP 3897742 A2	27-10-2021
		EP 3897743 A1	27-10-2021
		EP 3915587 A1	01-12-2021
		EP 4015003 A1	22-06-2022
		ES 2899612 T3	14-03-2022
		JP 2022515250 A	17-02-2022
		JP 2022515251 A	17-02-2022
		JP 2022515797 A	22-02-2022
		JP 2022516043 A	24-02-2022
		JP 2022516044 A	24-02-2022
		JP 2022516045 A	24-02-2022
		KR 20210107073 A	31-08-2021
		KR 20210110323 A	07-09-2021
		KR 20210117274 A	28-09-2021
		KR 20210117275 A	28-09-2021
		KR 20210117276 A	28-09-2021
		KR 20210119976 A	06-10-2021
		KR 20210119978 A	06-10-2021
		KR 20210119979 A	06-10-2021
		SG 11202106572Q A	29-07-2021
		SG 11202106574U A	29-07-2021
		SG 11202106575Y A	29-07-2021
		SG 11202106603U A	29-07-2021
		SG 11202106606R A	29-07-2021
		SG 11202106612Q A	29-07-2021
		SG 11202106664P A	29-07-2021
		SG 11202106672S A	29-07-2021
		US 2022023433 A1	27-01-2022
		US 2022054643 A1	24-02-2022
		US 2022072149 A1	10-03-2022
		US 2022111066 A1	14-04-2022
		WO 2020126064 A1	25-06-2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2022/050127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		WO 2020126600 A1	25-06-2020	
		WO 2020126604 A1	25-06-2020	
		WO 2020126609 A2	25-06-2020	
		WO 2020126610 A1	25-06-2020	
		WO 2020126620 A2	25-06-2020	
		WO 2020126626 A1	25-06-2020	
		WO 2020126627 A1	25-06-2020	

WO 2015071388	A1	21-05-2015	CA 2928349 A1	21-05-2015
			CN 105722980 A	29-06-2016
			EP 3068885 A1	21-09-2016
			HK 1220724 A1	12-05-2017
			JP 2017501684 A	19-01-2017
			KR 20160083876 A	12-07-2016
			RU 2016122168 A	19-12-2017
			US 2016289677 A1	06-10-2016
			WO 2015071388 A1	21-05-2015

WO 2011054811	A1	12-05-2011	NONE	

WO 2020126620	A2	25-06-2020	AU 2019400630 A1	12-08-2021
			AU 2019407234 A1	19-08-2021
			AU 2019408811 A1	12-08-2021
			AU 2019411276 A1	12-08-2021
			AU 2019411278 A1	12-08-2021
			AU 2019411289 A1	12-08-2021
			CA 3123978 A1	25-06-2020
			CA 3124064 A1	25-06-2020
			CA 3124065 A1	25-06-2020
			CA 3124129 A1	25-06-2020
			CA 3124151 A1	25-06-2020
			CA 3124406 A1	25-06-2020
			CN 113453722 A	28-09-2021
			CN 113474009 A	01-10-2021
			CN 113474010 A	01-10-2021
			CN 113498350 A	12-10-2021
			CN 113507941 A	15-10-2021
			CN 113747923 A	03-12-2021
			DK 3773737 T3	04-10-2021
			EP 3773737 A1	17-02-2021
			EP 3808379 A1	21-04-2021
			EP 3856254 A2	04-08-2021
			EP 3897735 A1	27-10-2021
			EP 3897738 A1	27-10-2021
			EP 3897739 A1	27-10-2021
			EP 3897741 A1	27-10-2021
			EP 3897742 A2	27-10-2021
			EP 3897743 A1	27-10-2021
			EP 3915587 A1	01-12-2021
			EP 4015003 A1	22-06-2022
			ES 2899612 T3	14-03-2022
			JP 2022515250 A	17-02-2022
			JP 2022515251 A	17-02-2022
			JP 2022515797 A	22-02-2022
			JP 2022516043 A	24-02-2022
			JP 2022516044 A	24-02-2022
			JP 2022516045 A	24-02-2022
			KR 20210107073 A	31-08-2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2022/050127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20210110323 A	07-09-2021
		KR 20210117274 A	28-09-2021
		KR 20210117275 A	28-09-2021
		KR 20210117276 A	28-09-2021
		KR 20210119976 A	06-10-2021
		KR 20210119978 A	06-10-2021
		KR 20210119979 A	06-10-2021
		SG 11202106572Q A	29-07-2021
		SG 11202106574U A	29-07-2021
		SG 11202106575Y A	29-07-2021
		SG 11202106603U A	29-07-2021
		SG 11202106606R A	29-07-2021
		SG 11202106612Q A	29-07-2021
		SG 11202106664P A	29-07-2021
		SG 11202106672S A	29-07-2021
		US 2022023433 A1	27-01-2022
		US 2022054643 A1	24-02-2022
		US 2022072149 A1	10-03-2022
		US 2022111066 A1	14-04-2022
		WO 2020126064 A1	25-06-2020
		WO 2020126600 A1	25-06-2020
		WO 2020126604 A1	25-06-2020
		WO 2020126609 A2	25-06-2020
		WO 2020126610 A1	25-06-2020
		WO 2020126620 A2	25-06-2020
		WO 2020126626 A1	25-06-2020
		WO 2020126627 A1	25-06-2020

WO 2022055351	A1	17-03-2022	NONE

フロントページの続き

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

(72)発明者 ポステル, ルーベン

オランダ王国, 3 7 2 1 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 9,
ビルディング アー 1 2 - 1

(72)発明者 ヘアマンズ, ガイ

ベルギー王国, 9 8 2 0 ミールベーク, フンデルヘムセステーションウェフ 8 4 8

(72)発明者 ファン デ ランゲムヒーン, ヘルムス

オランダ王国, 3 8 8 1 シーエル プッテン, ブルーノ ファブリクスストラート 2 3

(72)発明者 アサディアン ビルジャンド, マズダク

ドイツ連邦共和国, 1 2 1 6 5 ベルリン, ベルリクエスト 1 5

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC50 EE59

4C091 AA06 BB02 CC01 DD01 EE06 FF02 FF11 GG03 GG05 HH01

JJ03 KK01 LL03 LL06 MM01 NN12 PA01 QQ05