(19)日本国特許庁(JP)

# (12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7652695号
(P7652695)

(45)発行日　令和7年3月27日(2025.3.27)

(24)登録日　令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ　47/54　(2017.01)* | Ａ６１Ｋ | 47/54 | ＺＮＡ | |
| *Ｃ０７Ｊ　63/00　(2006.01)* | Ｃ０７Ｊ | 63/00 | ＣＳＰ | |
| *Ａ６１Ｋ　39/395 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 39/395 | Ｎ | |
| *Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | | |
| *Ｃ０７Ｋ　7/08　(2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 7/08 | | |

ＦＩ

請求項の数　33　（全180頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-536407(P2021-536407)
(86)(22)出願日　令和1年12月9日(2019.12.9)
(65)公表番号　特表2022-516043(P2022-516043A)
(43)公表日　令和4年2月24日(2022.2.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/084290
(87)国際公開番号　WO2020/126626
(87)国際公開日　令和2年6月25日(2020.6.25)
審査請求日　令和4年12月9日(2022.12.9)
(31)優先権主張番号　2022283
(32)優先日　平成30年12月21日(2018.12.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(31)優先権主張番号　2023468
(32)優先日　令和1年7月10日(2019.7.10)
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　生物活性な分子のクラスター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ベースであって、

ａ）ポリマー又はオリゴマー構造、及び

ｂ）前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合された少なくとも１つの生物活性分子からなり、前記ベースは、さらに、

ｃ）前記ベースを担体分子に共有結合的にカップリングするための第１の化学基を含み；

ａ）前記ポリマー又はオリゴマー構造が：

・ポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、

・ポリエチレングリコール、

・ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、

・ポリ（ラクタム）、

・ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、

・多又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン及びポリデキストロース、

・ポリ又はオリゴ（アミノ酸）、例えばタンパク質、ペプチド、及びポリリジン、並びに

・ＤＮＡオリゴマー又はポリマー、ＲＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、及びＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーからなる群から選択され；

ｂ）前記少なくとも１つの生物活性分子が、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、キラヤ酸アグリコンコアを有するサポニン及びギプソゲニンアグリコンコアを有す

るサポニンからなる群から選択され、前記サポニンはＣ－３位置に分岐炭水化物側鎖を含み、前記炭水化物側鎖はグルクロン酸官能基を含み、前記サポニンは、デオキシ炭水化物を含むＣ－２８位の分岐炭水化物側鎖を含み、

位置Ｃ－２３の前記アルデヒド官能基が、ヒドラゾン結合を介して前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングされ、

前記ベースが、前記少なくとも１つの生物活性分子を前記担体分子に共有結合することにとって好適であり、

前記担体分子が、タンパク質性分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、脂肪、脂肪酸、ナノ粒子、及び炭水化物のいずれかを含むか又はそれからなる、ベース。

【請求項２】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、３．０００ダルトン以下の分子質量を有する、請求項１に記載のベース。

【請求項３】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、両親媒性分子である、請求項１又は２に記載のベース。

【請求項４】

１つよりも多くの生物活性分子が、ベースによって含まれるポリマー又はオリゴマー構造に共有結合されるときに、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、単一の特定の分子であるか又は異なる分子の混合物である、請求項１～３のいずれか１項に記載のベース。

【請求項５】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、前記サポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基に炭水化物置換基上のグルクロン酸官能基を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載のベース。

【請求項６】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種、例えばＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａから単離され得るサポニンである、請求項１～５のいずれか１項に記載のベース。

【請求項７】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、単一の特定のサポニンであるか、又は２つ以上の異なるサポニンの混合物、例えばサポニンＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ギプソシドＡ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせの１つ以上である、請求項１～５のいずれか１項に記載のベース。

【請求項８】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、ＳＯ１８６１並びに／或いはＧＥ１７４１並びに／或いはＳＡ１６４１並びに／或いはＱＳ－２１、並びに／或い

はキラヤ酸アグリコンコア、Ｃ－３ベーター－ＯＨ基にＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ炭水化物置換基、及びＣ－２８－ＯＨ基にＧｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ炭水化物置換基を有するサポニンであり、並びに／或いは３－Ｏ－ベーター－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－ベーター－Ｄ－グルクロノピラノシルキラヤ酸２８－Ｏ－ベーター－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－アルファ－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４－ＯＡｃ－ベーター－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－ベーター－Ｄ－フコピラノシドである、請求項１～５のいずれか１項に記載のベース。

【請求項９】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、ＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１である、請求項１～５のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１０】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有する、請求項１～９のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１１】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、ＱＳ－２１、又はＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ－１８、ＱＳ－１８６１、Ｑｕｉｌ－Ａのいずれか１つ以上である、請求項１～９のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１２】

少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基が、リンカーＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジドに共有結合的にカップリングされ、このリンカーが、チオ－エーテル結合を介してベースのポリマー又はオリゴマー構造上のスルフヒドリル基に共有結合的にカップリングされる、請求項１～１０のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１３】

担体分子へのベースの共有結合的カップリングのための化学基がクリックケミストリー基である、請求項１～１２のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１４】

クリックケミストリー基が、テトラジン、アジド、アルケン、若しくはアルキン、又はこれらの基のいずれかの環状誘導体である、請求項１３に記載のベース。

【請求項１５】

クリックケミストリー基がアジドである、請求項１４に記載のベース。

【請求項１６】

ベースが、三官能性リンカーであり、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンがそれに共有結合される第２の化学基を含み、分子への共有結合のための第３の化学基を含み、担体への共有結合のための第１の化学基を含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１７】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、定められた数のグリコシド分子又は定められた範囲のグリコシド分子である、請求項１～１６のいずれか１項に記載のベース。

【請求項１８】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、定められた数のグリコシド分子又は定められた範囲のグリコシド分子であり、１～１２８又は少なくとも２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、若しくは１２８個のグリコシド分子、又はその間のいずれかの数のグリコシド分子から選択される、請求項１７に記載のベース。

【請求項１９】

ポリマー又はオリゴマー構造が：

・ポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、

・ポリエチレングリコール、

・ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、並びに

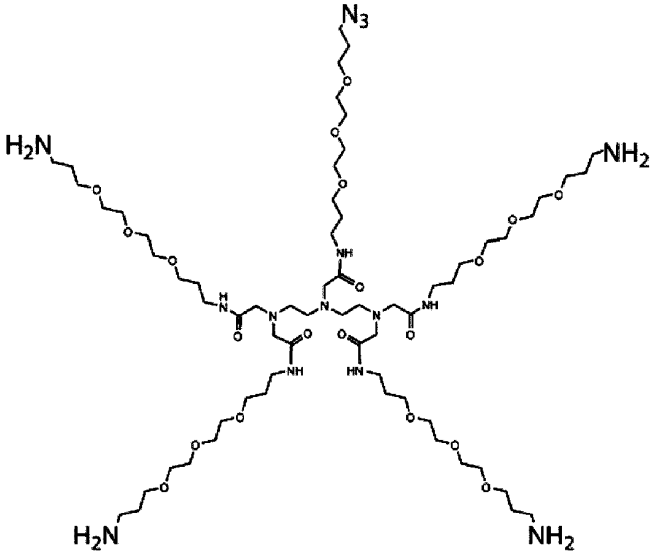
・ポリ又はオリゴ（アミノ酸）、例えばタンパク質、ペプチド、及びポリリジンからなる群から選択される、請求項１～１８のいずれか１項に記載のベース。

【請求項２０】

ポリマー又はオリゴマー構造が：

・次の構造の五価のポリエチレングリコールに基づくデンドリマー：

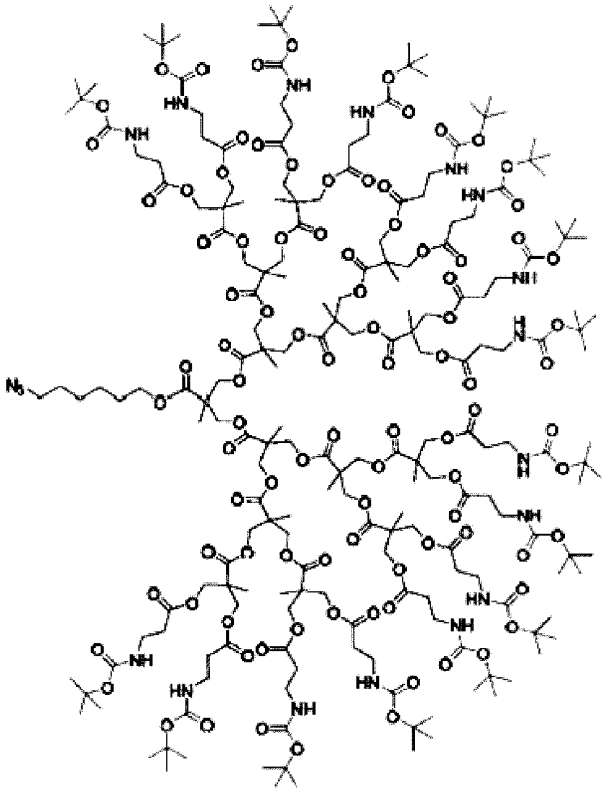
【化１】




・２－イミノチオランによって誘導体化されたエチレンジアミンコアを有する第５世代（Ｇ５）ポリ（アミドアミン）デンドリマー、

・１６個の官能性アミノ末端基及びフォーカルポイントのアジド基を有するポリエステルデンドロン（これは、そのＮＨ－ＢＯＣ保護形態では、次の構造に対応し：

【化２】



かつ、これは２－イミノチオランによって誘導体化されている）、
・ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、及び
・配列ＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫを有するペプチド、からなる群から選択される、請求項１～１９のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２１】
担体分子が、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメントを含むか又はそれからなるか、或いは、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための少なくとも１つの非タンパク質性リガンド及び／又は少なくとも１つのタンパク質性リガンドを含むか又はそれからなる、請求項１～２０のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２２】
担体分子が、抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなる、請求項１～２０のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２３】
担体分子が、ＣＤ７１、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）、ＣＤ５２、ＣＥＡ、ＣＤ４４ｖ６、ＦＡＰ、ＥＧＦ－ＩＲ、インテグリン、シンデカン－１、血管インテグリンアルファ－Ｖベーター－３、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ受容体、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ６、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ３８、ＦＧＦＲ３、ＣＤ７、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＣＤ５２、ＰＤＧＦＲＡ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２から選択される、腫瘍細胞特異的な細胞表面受容体などの細胞表面受容体に結合するための少なくとも１つの結合ドメイン及び／又は少なくとも１つの結合フラグメントを含むか、又はそれからなる、請求項１～２２のいずれか１項に記載のベース。

【請求項２４】
担体分子が、セツキシマブ、ダラツムマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、パニツムマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、ポラツズマブ、オビヌツズマブ、ＩｇＧ型のＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、アレムツズマブ、ピナツズマブ、ＯＫＴ－１０抗ＣＤ３８モノクローナル抗体バンドルツズマブ、ボルセツズマブ、デニンツズマブ、ソフィツズマブ、ロルボツズマブ、インデュサツマブ、クリバツズマブ、デパツキシズマブ、バダスツキシマブ、コルツキシマブ、リファスツズマブ、カンツズマブ、グレムバツムマブ、サシツズマブ、ロバルピツズマブ、ニューラジアブ、トシツモマブ、イブリツモマブ、オレゴボマブ、エドレコロマブ、ニモツズマブ、ｈｕＭｙ９－６、エタラシズマブ、エプラツズマブ、ラベツズマブ、ビバツズマブ、シブロツズマブ、ｈｕＢ４、ｈｕＣ２４２、ｈｕＮ９０１、ＤＳ６、シクスツムマブ、３Ｂ７、ＣＮＴＯ　９５、若しくはＢ－Ｂ４、又はその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合フラグメント及び／若しくはその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合ドメインのいずれか１つを含むか、又はそれからなる、請求項１～２３のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２５】
担体分子が、セツキシマブ又はトラスツズマブ又はＯＫＴ－９、或いはその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合フラグメント及び／又はその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合ドメイン、例えばその少なくとも１つの腫瘍細胞特異的受容体結合フラグメント及び／又はその少なくとも１つの腫瘍細胞特異的受容体結合ドメインのいずれか１つを含むか、又はそれからなる、請求項１～２３のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２６】
ベースが、担体分子との共有結合を形成することにとって好適である、請求項１～２５のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２７】
担体分子が、少なくとも１つのエフェクター分子を含むか又はそれからなり、或いは、前記担体は、さらに、請求項２１～２６のいずれか１項に従属する場合には少なくとも１つのエフェクター分子を含み、前記エフェクター分子は、原薬の少なくとも１つ、例えばペイロード、毒素、薬物、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ゼノ核酸、酵素、例えばウレアーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼ、タンパク質毒素、リボソーム不活性化タンパク質のいずれか１つ以上である、請求項１～２６のいずれか１項に記載のベース。
【請求項２８】
タンパク質毒素が、エブリチン（Ebulitin）α、エブリチンβ、エブリチンγ、エブリン（Ebulin）ｆ、エブリンｌ、エブリンｒ１、エブリンｒ２、ＳＥＡ、ＳＥＡＩＩ、ＳＥＬｆｄ、ＳＥＬｌｄ、ＳＥＬｌｍ、α－ニグリチン（Nigritin）、β－ニグリチン、γ－ニグリチン、ニグリチンｆ１、ニグリチンｆ２、塩基性ニグリン（Nigrin）ｂ、ニグリンｂ（ＳＮＡ－Ｖ）、ニグリンｆ（ＳＮＡ－Ｖｆ）、ニグリンｌ１、ニグリンｌ２、ニグリンｓ、ＳＮＡ－Ｉ、ＳＮＡ－Ｉ’、ＳＮＡ－Ｉｆ、ＳＮＡｆｌｕ－Ｉ、ＳＮＬＲＰ１、ＳＮＬＲＰ２、ＳＮＡ－ｌｄ、ＳＮＡ－ｌｍ、ＳＮＡ－ＩＩ、ＳＮＡ－ＩＩＩ、ＳＮＡ－ＩＶ（ＳＮＡ－ＩＶｆ）、ＳＮＡ－ＩＶｌ、ＳＮＡｐｏｌ－Ｉ、ＳＮＡｐｏｌ－ＩＩ、ＴｒＳＮＡ－Ｉ、ＴｒＳＮＡ－Ｉｆ、塩基性ラセモシン（racemosin）ｂ、ＳＲＡ、ＳＲＬｂｍ（ＳＲＡｂｍ）、ＳＳＡ（ＳＳＡ－ｂ－１）、シーボルディン（Sieboldin）－ｂ（ＳＳＡ－ｂ－２）、ＳＳＡ－ｂ－３、ＳＳＡ－ｂ－４、ＲＩＰ１、アマランシン（Amaranthin）（ＡＣＡ）、ＡＣＬ、Ａ．ｌｅｕｃｏｃａｒｐｕｓレクチン、アマラマンギン（Amaramangin）、ＡＡＰ－２７、アマランシン、ビーチン（Beetin）－２７（ＢＥ２７）、ビーチン－２９（ＢＥ２９）、ベタブルギン（Betavulgin）、ＣＣＰ－２５、ＣＣＰ－２７、ＣＡＰ３０、ＳｏＲＩＰ１（ＢＰ３１）、ＳｏＲＩＰ２、アラリン（Aralin）、パナキサギン（Panaxagin）、キンケギンシン（Quinqueginsin）、アスパリン（Asparin）１、アスパリン２、シャリブディン（Charybdin）、ムサルミン（Musarmin）１、ムサルミン２、ムサルミン３、ムサルミン４、ＰＭＲＩＰｍ、ＰＭＲＩＰｔ、ユッカ葉タンパ

ク質（ＹＬＰ）、バセラＲＩＰ　２ａ、バセラＲＩＰ　２ｂ、バセラＲＩＰ　３、アグロスチン（Agrostin）２、アグロスチン５、アグロスチン６、アグロスチン、ジアンチン（Dianthin）２９、ジアンチン３０、ジアンチン３２、Ｄ．ｓｉｎｅｎｓｉｓ　ＲＩＰ、ジプソフィリン（Gypsophilin）、リクニン（Lychnin）、ペトログローシン（Petroglaucin）１、ペトログローシン２、ペトログランジン（Petrograndin）、オシモイジン（Ocymoidin）、サポリン－Ｌ１（ＳＯ－Ｌ１）、サポリン－Ｌ２（ＳＯ－Ｌ２）、サポリン－Ｌ３（ＳＯ－Ｌ３）、サポリン－ｌ（ＳＯ－ｌ、ＳＯ－４）、サポリン－Ｒ１（ＳＯ－Ｒ１）、サポリン－Ｒ２（ＳＯ－Ｒ２）、サポリン－Ｒ３（ＳＯ－Ｒ３）、ＳＯ３ａ、ＳＯ３ｂ、サポリン－Ｓ５（サポリン５、ＳＯ－Ｓ５）、サポリン－Ｓ６（サポリン６、ＳＯ－６、ＳＯ－Ｓ６）、サポリン－Ｓ８（ＳＯ－Ｓ８）、サポリン－Ｓ９（サポリン９、ＳＯ－Ｓ９）、ＳＡＰ－Ｃ、ＳＡＰ－Ｓ、ステラリン（Stellarin）、ＲＩＰ　Ｑ３、ピラミダチン（Pyramidatin）、ヒスピン（Hispin）、α－ベニンカシン（benincasin）、β－ベニンカシン、ブリオジン（Bryodin）１（ＢＤ１）、ブリオジン２、ブリオジン－Ｌ、ブリオジン－Ｒ、ＢＤＡ、コロシン（Colocin）１、コロシン２、フォーティディシミン（Foetidissimin）、フォーティディシミンＩＩ、ククミスフィガレイ（Ｃｕｃｕｍｉｓ　ｆｉｇａｒｅｉ）　ＲＩＰ（ＣＦ－ＲＩＰ）、ククルモスキン（Cucurmoschin）、ククルモシン（Cucurmosin）、ククルモシン２、Ｃ．モスカータ（ｍｏｓｃｈａｔａ）ＲＩＰ、モスカチン（Moschatin）、ＰＲＩＰ　１、ＰＲＩＰ　２、α－モスキン（moschin）、β－モスキン、ペポシン（Pepocin）、テキサニン（Texanin）、ジノステミン（Gynostemmin）、ラゲニン（Lagenin）、ルファキュリン（Luffaculin）－１、ルファキュリン－２、ルファンギュリン（Luffangulin）、パキスタンのヘチマ（Ｌｕｆｆａ　ａｃｕｔａｎｇｕｌａ）果実レクチン、ルフィン（Luffin）、ルフィン－ａ、ルフィン－ｂ、α－ルフィン、β－ルフィン、ＬＲＩＰ、ルファシリン（Luffacylin）、ルフィンＰ１、ルフィン－Ｓ、ルフィンＳ（１）、ルフィンＳ（２）（ルフィンＳ２）、ルフィンＳ（３）、ＭＯＲ－Ｉ、ＭＯＲ－ＩＩ、バルサミン（Balsamin）、ＭｂＲＩＰ－１、モモルジン（Momordin）ＩＩ、ＭＡＰ　３０、α－モモルチャリン（momorcharin）（α－ＭＣ、α－ＭＭＣ）、β－モモルチャリン（β－ＭＣ、β－ＭＭＣ）、δ－モモルチャリン（δ－ＭＭＣ）、モモルジン、モモルジン（ニガウリ（Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ）阻害剤）、モモルジンＩＩ、モモルジン－ａ、モモルジン－ｂ、γ－モモルチャリン（γ－ＭＭＣ）、シャランチン（Charantin）、ＲＩＰ　１候補、ＭＣＬ（Ｍ．ｃｈａｒａｎｔｉａレクチン）、抗Ｈレクチン、ニガウリ属アグルチニン、モモルジン、タンパク質フラクション１、タンパク質フラクション２、ＭＣＬ（ニガウリ（Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ）種子レクチン、ニガウリレクチン）、ＭＣＬ１、コキニン（Cochinin）Ｂ、モモルコキン（Momorcochin）、モモルコキン－Ｓ、モモルグロスビン（Momorgrosvin）、セキウミン（Sechiumin）、ハヤトウリ（Ｓｅｃｈｉｕｍ　ｅｄｕｌｅ）果実レクチン、トリコアングイン（Trichoanguin）、ＳＧＳＬ、ＴＣＡ－Ｉ、ＴＣＡ－ＩＩ、ＴＣＳＬ、β－トリコサンチン（trichosanthin）（β－ＴＣＳ）、α－キリロウィン（kirilowin）、β－キリロウィン、ＴＡＰ　２９、ＴＫ－３５、トリコビタシン（Trichobitacin）、トリコキリン（Trichokirin）、トリコミスリン（Trichomislin）（ＴＣＭ）、トリコサンチン（カラスウリ（Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ）抗ウイルスタンパク質、ＴＡＰ、ＴＣＳ）、α－トリコサンチン（α－ＴＣＳ、ＧＬＱ２２３）、β－トリコサンチン（β－ＴＣＳ）、γ－トリコサンチン（γ－ＴＣＳ）、トリコキリン（Trichokirin）Ｓ１、Ｓ－トリコキリン、トリコサントリップ（Trichosanthrip）、ＴＫＬ－１（キカラスウリ（Ｔｒｉｃｈｏｓａｎｔｈｅｓ　ｋｉｒｉｌｏｗｉｉ）レクチン－１）、ＴＫ－Ｉ、ＴＫ－ＩＩ、ＴＫ－ＩＩＩ、キカラスウリレクチン、カラスリン（Karasurin）－Ａ、カラスリン－Ｂ、カラスリン－Ｃ、トリコマグリン（Trichomaglin）、ＴＤＳＬ、トリコバキン（Trichobakin）、クロベ（Ａｒｂｏｒｖｉｔａｅ）　ＲＩＰ、クロチン（Crotin）Ｉ、クロチン２、Ｅ．ｃｈａｒａｃｉａｓレクチン、ゲロニン（Gelonin）（ＧＡＰ　３１）、スナバコノキ（Ｈｕｒａ　ｃｒｅｐｉｔａｎｓ）　ＲＩＰ、スナバコノキ　ＲＩＰ－５、スナバコノキラテックスレクチン、クレピチン（Crepitin）

、ハーリン（Hurin）、Ｈｕｒａ ｃｒｅｐｉｔａｎｓ種子レクチン、クルシン（Curcin）、クルシン２、クルシン－Ｌ、Ｊｃ－ＳＣＲＩＰ、マパルミン（Mapalmin）、マヌチン（Manutin）１、マヌチン２、リシン（結晶リシン、リシンＤ）、リシンＥ、ＲＣＡ（トウゴマ（Ｒｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ）アグルチニン、ＲＣＡＩ、ＲＣＡ１２０、トウゴマヘマグルチニン、ＲＣＢ－ＰＨＡ Ｉ、ＲＣＡＩＩ、ＲＣＡ６０、ＲＣＢ－ＰＨＡ ＩＩ）、リシン１、リシン２、リシン３、リシンＩ、リシンＩＩ、リシンＩＩＩ、リシン１１、リシン１２、リシン２、アブリン（Abrin）、アブリン－ａ（アブリンＣ、アブリン－ＩＩＩ）、アブリン－ｂ、アブリン－ｃ（アブリンＡ、アブリン－Ｉ）、アブリン－ｄ、アブリン－ＩＩ、ＡＰＡ（トウアズキ（Ａｂｒｕｓ ｐｒｅｃａｔｏｒｉｕｓ）アグルチニン、トウアズキ（Ａｂｒｕｓ）レクチン、ＡＡＧ）、ＡＰＡ－Ｉ、ＡＰＡ－ＩＩ、プルケリン（Pulchellin）、プルケリンＰＩ、プルケリンＰＩＩ、プルケリンＰＩＩＩ、α－ピサビン（pisavin）、β－ピサビン、サティビン（Sativin）、ＩｒｉｓＲＩＰ（ＩＲＩＰ）、ＩｒｉｓＲＩＰ．Ａ１、ＩｒｉｓＲＩＰ．Ａ２、ＩｒｉｓＲＩＰ．Ａ３、ＩＲＡ、ＩＲＡｂ、ＩＲＡｒ、ＣＡ－ＳＲＩ、ＣＩＰ－２９、ＣＩＰ－３４、レオヌリン（Leonurin）、ボディニエリン（Bodinierin）、カンフォリン（Camphorin）、シンナモミン（Cinnamomin）、シンナモミン１、シンナモミン２、シンナモミン３、シンフォリン（Cinphorin）、ポレクチン（Porrectin）、アベレスキュリン（Abelesculin）、ボエルハビア（Ｂｏｅｒｈａａｖｉａ）阻害剤、ＢＡＰ Ｉ、ブーガニン（Bouganin）（ブーゲンビリアＲＩＰ Ｉ）、ＢＢＰ－２４、ＢＢＰ－２８、ＢＢＡＰ１、ＭＥ１、ＭＥ２、ＭＡＰ、ＭＡＰ－２、ＭＡＰ－３、ＭＡＰ－４、ＭＡＰ－Ｓ、マラニン（Malanin）、リプロキシミン（Riproximin）（Ｒｐｘ、Ｒｐｘ－Ｉ、Ｒｐｘ－ＩＩ）、モデッシン（Modeccin）（モデッシン４Ｂ、モデッシン６Ｂ）、Ａ．エレンベッキー（ｅｌｌｅｎｂｅｃｋｉｉ）レクチン、クロバナエンジュ（Ａ．ｆｒｕｔｉｃｏｓａ）レクチン、アロエ・グラウカ（Ａ．ｇｌａｕｃａ）レクチン、Ａ．ゴエツイー（ｇｏｅｔｚｅｉ）レクチン、Ａ．ケラマンサス（ｋｅｒａｍａｎｔｈｕｓ）レクチン、ランセオリン（Lanceolin）、Ａ．ラセモサ（ｒａｃｅｍｏｓａ）レクチン、Ａ．スピノサ（ｓｐｉｎｏｓａ）レクチン、ステノダクチリン（Stenodactylin）、Ａ．ベネナータ（ｖｅｎｅｎａｔａ）レクチン、ボルケンシン（Volkensin）、α－ＰＡＰ、ＰＡＰ（アメリカヤマゴボウ（Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａ）タンパク質、ポークウィード抗ウイルスタンパク質）、ＰＡＰ－Ｉ、ＰＡＰ－ＩＩ、ＰＡＰ－ＩＩＩ、ＰＡＰ－Ｃ、ＰＡＰ－Ｈ、ＰＡＰ－Ｒ、ＰＡＰ－Ｓ、ＰＡＰ－Ｓ１、ＰＡＰ－Ｓ２、ディオシン（Diocin）１、ディオシン２、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＰＤ－Ｌ３、ＰＤ－Ｌ４、ＰＤ－Ｓ１、ＰＤ－Ｓ２、ＰＤ－Ｓ３、ドデカンドリン（Dodecandrin）、ドデカンドリンＣ、ヘテロテパリン（Heterotepalin）４、ヘテロテパリン５ｂ、インスラリン（Insularin）（ＰＩＰ、ヤマゴボウ・インスラリス（Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｉｎｓｕｌａｒｉｓ）抗ウイルスタンパク質）、ＰＩＰ２（Ｐ．ｉｎｓｕｌａｒｉｓ抗ウイルスタンパク質２）、大麦毒素（大麦翻訳阻害剤、大麦タンパク質合成阻害剤、ＢＰＳＩ、ＲＩＰ ３０）、大麦毒素Ｉ（大麦翻訳阻害剤Ｉ）、大麦毒素ＩＩ（大麦翻訳阻害剤ＩＩ、大麦タンパク質合成阻害剤ＩＩ、ＢＰＳＩ ＩＩ）、大麦毒素ＩＩＩ（大麦翻訳阻害剤ＩＩＩ）、ＪＩＰ６０、イネ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ） ＲＩＰ、ＲＰＳＩ、トリチン（Tritin）、トリチン１、トリチン２、トリチン３、トリチン－Ｓ、トリチン－Ｌ、ｂ－３２（トウモロコシＲＩＰ、トウモロコシｐｒｏＲＩＰ１）、トウモロコシｐｒｏＲＩＰ２、ＥＨＬ、ＰＣＬ、ＨｍＲｉｐ、ＨｍＲｉｐ １、ＨｍＲｉｐ ２、ＨｍＲｉｐ ３、ＨｍＲｉｐ ４、ＭＬ－Ｉ(ヤドリギレクチンI、ビスクミン（Viscumin）、Ｅｕ－ＭＬ、ＥＭＬ－１、ＶＡＡ－Ｉ）、ＭＬ－ＩＩ（ヤドリギレクチンＩＩ、ＶＡＡ－ＩＩ）、ＭＬ－ＩＩＩ（ヤドリギレクチンＩＩＩ、ＶＡＡ－ＩＩＩ）、アーティキュラチン（Articulatin）－Ｄ、ＫＭＬ、ＫＭＬ－Ｃ、ＫＭＬ－ＩＩＬ、ＫＭＬ－ＩＩＵ、ＶＣＡ、ＣＩＰ３１、ＴＲＩＰ、及びＰ．マクロカルパ（ｍａｃｒｏｃａｒｐａ） ＲＩＰ、並びに／或いはウイルス毒素、例えばアポプチン；細菌毒素、例えば志賀毒素、志賀毒素様毒素、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素（ＰＥ）、若しくはＰＥの外毒素Ａ、全長若しくは短縮型ジフテリア毒素（ＤＴ）、

コレラ毒素；真菌毒素、例えば、アルファ－サルシン；リボソーム不活性化タンパク質、及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖を包含する植物毒素、例えばジアンチン、例えばジアンチン－３０又はジアンチン－３２、サポリン、例えばサポリン－Ｓ３又はサポリン－Ｓ６、ブーガニン若しく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タンパク質、リシン、リシンＡ鎖、モデシン、モデシンＡ鎖、アブリン、アブリンＡ鎖、ボルケンシン、ボルケンシンＡ鎖、ビスクミン、ビスクミンＡ鎖；又は動物若しくはヒト毒素、例えばカエルＲＮａｓｅ、若しくはグランザイムＢ、若しくはヒトからのアンギオゲニン、或いはそのいずれかのフラグメント又は誘導体のいずれか１つ以上を含むか、或いはそれからなる、請求項２７に記載のベース。

【請求項２９】

オリゴヌクレオチド、ゼノ核酸、又は核酸が、ベクター、遺伝子、細胞自殺を誘導するトランスジーン、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、ｍＲＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ブリッジ型核酸（ＢＮＡ）、２’－デオキシ－２’－フルオロアラビノ核酸（ＦＡＮＡ）、２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレンブリッジ型核酸、３’－フルオロヘキシトール核酸（ＦＨＮＡ）、プラスミド、グリコール核酸（ＧＮＡ）、及びトレオース核酸（ＴＮＡ）、又はその誘導体のいずれか１つ以上を含むか、又はそれからなる、請求項２７又は２８に記載のベース。

【請求項３０】

エフェクター分子が、少なくとも１つのペイロードを含むか、またはそれからなる、請求項２７～２９のいずれか１項に記載のベース。

【請求項３１】

担体分子が、エフェクター分子とモノクローナル抗体との共有結合的に連結された組み合わせを含むか、又はそれからなる、請求項１～２６のいずれか１項に記載のベース。

【請求項３２】

位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンを担体分子に共有結合することにとって好適なベースを産生するための方法であって、前記方法が：

ａ）ポリマー又はオリゴマー構造を提供し、前記担体分子への前記ポリマー構造又はオリゴマー構造の共有結合的カップリングのための第１の化学基を含みかつ前記第１の化学基とは異なる第２の化学基の少なくとも１つを含み、各第２の化学基は、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する前記少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンの１つを前記オリゴマー又はポリマー構造に共有結合的にカップリングするためであることと；

ｂ）位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンを、前記第２の化学基（単数又は複数）を介して、前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングし、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する前記ビスデスモシド型トリテルペンサポニン（単数又は複数）は、請求項１～１１のいずれか１項に記載の位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンのいずれか１つであることと；を含み、

前記ポリマー又はオリゴマー構造は：

・ポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、
・ポリエチレングリコール、
・ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、
・ポリ（ラクタム）、
・ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、

・多又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン及びポリデキストロース、
・ポリ又はオリゴ（アミノ酸）、例えばタンパク質、ペプチド、及びポリリジン、並びに
・ＤＮＡオリゴマー又はポリマー、ＲＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、及びＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーからなる群から選択され；
位置Ｃ－２３の前記アルデヒド官能基は、ヒドラゾン結合を介して前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングされ、
これによって前記ベースを提供する、方法。
【請求項３３】
担体分子に共有結合されたベースを産生するための方法であって、前記ベースは、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つの共有結合されたビスデスモシド型トリテルペンサポニンを含み、前記方法は：
ａ）前記ベースのポリマー又はオリゴマー構造に共有結合された、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つのビスデスモシド型トリテルペンサポニンを含むベースを提供することと、
ｂ）請求項２１～３１のいずれか１項に記載の担体分子にａ）の前記ベースを共有結合的にカップリングすることと、を含み、
これによって、担体分子に共有結合された前記ベースを提供し、前記ベースは、位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つの共有結合されたビスデスモシド型トリテルペンサポニンを含み、
前記ポリマー又はオリゴマー構造は：
・ポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、
・ポリエチレングリコール、
・ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、
・ポリ（ラクタム）、
・ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、
・ポリ又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン及びポリデキストロース、
・ポリ又はオリゴ（アミノ酸）、例えばタンパク質、ペプチド、及びポリリジン、並びに
・ＤＮＡオリゴマー又はポリマー、ＲＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、及びＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーからなる群から選択され；
位置Ｃ－２３の前記アルデヒド官能基が、ヒドラゾン結合を介して前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングされ、
前記位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属する少なくとも１つの共有結合されたビスデスモシド型トリテルペンサポニンが、キラヤ酸アグリコンコアを有するサポニン及びギプソゲニンアグリコンコアを有するサポニンからなる群から選択され、前記サポニンはＣ－３位置に分岐炭水化物側鎖を含み、前記炭水化物側鎖はグルクロン酸官能基を含み、前記サポニンは、デオキシ炭水化物を含むＣ－２８位の分岐炭水化物側鎖を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、少なくとも１つの生物活性分子、例えば治療薬分子を担体分子に共有結合することにとって好適な分子骨格に関する。具体的には、本発明は、ＡＤＣへの増強物質分子（のクラスター）、例えばペイロード、例えばタンパク質毒素若しくはオリゴヌクレオチドの共有結合的な連結を原因として、又は代替的には、その必要がある患者へのＡＤＣと増強物質分子（のクラスター）を含む細胞標的化コンジュゲートとの同時投与を原因として、薬物の改善された治療ウインドウを有するモノクローナル抗体に基づく抗体－薬物コンジュゲートに関する。本発明は、少なくとも１つの生物活性分子を担体分子に共有結合することにとって好適な骨格を産生するための方法にもまた関し、かかる生物活性分子は骨格に共有結合される。
【背景技術】

【０００２】
治療的な生物活性を有する分子は、多くの場合に、その必要があるヒト患者の癌などの疾患の処置のための有効な治療薬物としての適用にとって理論上好適である。典型的な例は低分子の生物活性部分である。しかしながら、現行で臨床に用いられている全てではないにしても多くの可能性としての薬物様分子及び治療薬は、過多な短所及び欠点の少なくとも１つを患っている。人体に投与されるときに、治療的に活性な分子は、処置されるべき疾患又は健康問題の基礎となる側面を指向する生物活性に加えて、オフターゲット効果を発揮し得る。かかるオフターゲット効果は望ましくなく、投与された分子の健康又はさらには生命を脅かす副作用の誘導のリスクを持つ。多くの薬物様化合物及び治療薬部分が第ＩＩＩ相治験又はさらには第ＩＶ相治験（上市後フォローアップ）に失敗することを引き起こすのは、かかる有害事象の生起である。よって、低分子治療薬などの薬物分子を提供する強い要望があり、薬物分子の治療効果は、例えば、特に（１）疾患を駆動する生物学的因子若しくは生物学的プロセスに対して高度に特異的であり、（２）十分に安全であり、（３）十分に有効であり、（４）非有疾患細胞に対するオフターゲット活性なし若しくはほとんどなしに、有疾患細胞を十分に指向し、（５）十分に適時的な作用機序を有し（例えば、投与された薬物分子は、ある種の時間枠内にヒト患者の標的部位に達するべきであり、ある種の時間枠に渡って標的部位に留まるべきである）、及び／又は（６）患者の体内において十分に長く続く治療活性を有するべきである 。既に長く続くかつ鋭意の研究にもかかわらず、並びに個々に対処された直面した困難及び欠点のいくつかのエリアにおいてなされた印象的な進歩にもかかわらず、残念ながら、今日まで、ここで上に概説された有益な特徴の多く又はさらに全てを有する「理想的な」治療薬は患者にとって利用可能ではない。

【０００３】
化学療法は、癌処置のための最も重要な治療オプションの１つである。しかしながら、それは健康な組織の分裂細胞と比べて癌細胞に対する特異性を有さないので、それはしばしば低い治療ウインドウと関連する。モノクローナル抗体の本発明は、正常細胞は見逃しながら、癌細胞への細胞毒性薬剤の標的化された送達のためのメカニズムとして、それらの特異的結合特性を活用する可能性を提供した。これは、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を作り出すための、抗体への細胞毒性エフェクター（ペイロード又は弾頭としてもまた公知）の化学的コンジュゲート化によって達成され得る。典型的には、それらの非コンジュゲート化形態において限定された治療指数（毒性なドーズを有効なドーズと比較する比）を有するエムタンシン（ＤＭ１）などの非常に強力なペイロードが用いられる。Ｋａｄｃｙｃｌａとしてもまた公知のトラスツズマブへのＤＭ１のコンジュゲート化（アドトラスツズマブエムタンシン）は、サルにおいて、ＤＭ１の忍容ドーズを少なくとも２倍向上させる。過去数十年に、治療薬ＡＤＣを開発するために膨大な努力及び投資がなされてきた。しかしながら、有望な前臨床データにもかかわらず、ＡＤＣを臨床に持ち込むことは難しいままである。臨床使用を認可された最初のＡＤＣは、２０００年の再発急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）のためのゲムツズマブオゾガマイシン（ＣＤ３３標的化マイロターグ、Ｐｆｉｚｅｒ／Ｗｙｅｔｈ）であった。しかしながら、マイロターグは、その安全性プロファイルを包含するいくつもの懸念を原因として、連邦医薬品局（ＦＤＡ）の要請で市場から取り下げられた。マイロターグによって処置された患者は、従来の化学療法によって処置された患者よりもしばしば死亡することが見出された。マイロターグは、より低い推奨ドーズ、化学療法との組み合わせで又はそれ自体での異なるスケジュール、及び新たな患者集団でもって２０１７年に再び上市承認された。今日まで、５つのＡＤＣのみが臨床使用を認可されており、一方で、およそ５５個のＡＤＣの臨床開発が取りやめられている。しかしながら、関心は高いままであり、現在、およそ８０個のＡＤＣが６００近くの治験によって依然として臨床開発中である。

【０００４】
通常は患者によって忍容されない毒性のペイロードを用いるポテンシャルにもかかわらず、低い治療指数（毒性のドーズを有効なドーズと比較する比）は、臨床開発における多

くのＡＤＣの中止を説明する主要な問題である。これは、いくつかのメカニズム、例えば正常細胞に対するオフターゲット毒性、細胞毒性薬剤に対する抵抗性の発生、及び循環中の薬物の尚早な放出によって引き起こされ得る。ＡＤＣのＦＤＡによる系統的なレビューは、ほとんどのＡＤＣの毒性プロファイルが、用いられる抗体ではなく用いられるペイロードに従ってカテゴリー分けされ得るということを見出しており、毒性がペイロードの尚早な放出によってほとんど決定されるということを示唆する。中止されたおよそ５５個のＡＤＣのうち、少なくとも２３個が不良な治療指数を原因としたということが見積もられる。例えば、かなりのレベルのＨＥＲ２を発現する肺組織におけるオンターゲット正常組織効果をおそらく原因とする狭い治療指数を原因として、トラスツズマブ・テシリンコンジュゲート（ＨＥＲ－２標的化ＡＤＣＴ－５０２、ＡＤＣ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）の開発は最近中止された。加えて、第３相試験中のいくつかのＡＤＣは、欠けているプライマリーエンドポイントを原因として中止された。例えば、新たに診断された神経膠芽細胞腫の患者において試験されたデパツキシズマブマホドチンコンジュゲート（ＥＧＦＲ標的化ＡＢＴ－４１４、ＡｂｂＶｉｅ）及び白金抵抗性卵巣癌の患者において試験されたミルベツキシマブソラブタンシンコンジュゲート（葉酸受容体アルファ（ＦＲα）標的化ＩＭＧＮ８５３、ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ）の第３相試験は、最近停止され、生残の利益を示さなかった。いくつかのＡＤＣの臨床的に用いられるドーズは、その完全な抗癌活性にとって十分ではなくあり得るということに留意することが重要である。例えば、アドトラスツズマブエムタンシンはヒトでは３．６ｍｇ／ｋｇのＭＴＤを有する。乳癌の前臨床モデルにおいて、アドトラスツズマブエムタンシンは、３ｍｇ／ｋｇの又はそれよりも上のドーズレベルで腫瘍退縮を誘導したが、より強力な有効性が１５ｍｇ／ｋｇにおいて観察された。これは、臨床投与されるドーズでは、アドトラスツズマブエムタンシンが、その最大の可能性としての抗腫瘍効果を発揮せずにあり得るということを示唆する。

【０００５】

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

【０００６】

臨床的なポテンシャルを有するＡＤＣの例は、リンパ系悪性物及び多発性骨髄腫の処置オプションとして評価されているＡＤＣ、例えばブレンツキシマブ・ベドチン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチンである。（悪性）Ｂ細胞上のＣＤ７９ｂに結合するポラツズマブベドチン及びＣＤ２２に結合するピナツズマブベドチンが治験において試験されている。ＡＤＣは、それぞれが、ＣＤ２０に結合しかつペイロードを提供されていないモノクローナル抗体の同時投与リツキシマブと組み合わせられた（Ｂ．Ｙｕ ａｎｄ Ｄ．Ｌｉｕ，Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｉｎ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｌｙｍｐｈｏｉｄ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ；Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ ＆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１９）１２：９４）。これらの

例などのモノクローナル抗体の組み合わせは、なおさらなるアプローチであり、ＡＤＣの前に言及された所望の特徴の多く又はさらには全てを組み合わせる「魔法の弾丸」に到達することを試みる。

【０００７】

一方で、過去数十年に、核酸に基づく治療薬が開発中である。治療薬核酸は、遺伝子治療、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）などのアプローチのための、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ、ＡＯＮ）、及び短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ、並びにＤＮＡ及びＲＮＡアプタマーに基づき得る。それらの多くは、ＤＮＡ又はＲＮＡ発現どちらかの阻害による作用の同じ根源的な基礎を共有し、これによって、疾患に関係する異常なタンパク質の発現を防止する。最も多数の治験は遺伝子治療の分野で行われており、世界的にはほぼ２６００の進行中又は完了した治験であるが、約４％のみが第３相に入る。これの次に、ＡＳＯによる治験である。ＡＤＣと類似に、多数の技術が探求されているにもかかわらず、治療薬核酸は、臨床開発中に２つの主要なイシューを共有する；細胞内への送達及びオフターゲット効果である。例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ホスホロアミダートモルフォリーノオリゴマー（ＰＭＯ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、及びブリッジ型核酸（ＢＮＡ）などのＡＳＯが、標的遺伝子、特に低分子阻害剤又は中和抗体によって標的化することが困難である遺伝子を特異的に阻害するための魅力的な戦略として検討されつつある。現行では、異なるＡＳＯの有効性が、多くの神経変性疾患、例えばハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び筋萎縮性側索硬化症において、並びにいくつかの癌ステージにおいてもまた研究されつつある。可能性としての治療薬剤としてのＡＳＯの適用は、標的細胞及び組織の細胞質及び／又は核へのそれらの送達のための安全かつ有効な方法を要求する。ＡＳＯの臨床的妥当性は実証されているが、インビトロ及びインビボ両方の非効率的な細胞取り込みはＡＳＯの有効性を限定し、治療薬開発のバリアであった。細胞取り込みはドーズの＜２％であり得、有効なかつ持続的なアウトカムにとっては低すぎるＡＳＯ濃度を活性部位においてもたらす。これは帰結的に投与ドーズの増大を要求し、これはオフターゲット効果を誘導する。最も普通の副作用は、補体カスケードの活性化、凝血カスケードの阻害、及び免疫系のｔｏｌｌ様受容体によって媒介される刺激である。

【０００８】

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

【０００９】

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

【００１０】

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

【００１１】

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

【００１２】

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

【発明の概要】

【００１３】

本発明のある実施形態では、改善された生物活性な化合物、又はかかる改善された生物活性な化合物を含む組成物を提供することが第１のゴールである。

【００１４】

低分子の治療的に活性な化合物をその必要があるヒト患者に投与するときに直面する非特異性の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。疾患を駆動する生物学的因子又は生物学的プロセスに対する非最適な特異性を有する薬物の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物の不十分な安全性特徴の問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が所望よりも有効ではないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、非有疾患細胞に対するオフターゲット活性なしに又はほとんどなしに、現行の薬物が有疾患細胞を十分に指向しないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が十分に適時的な作用機序を有さない（例えば、投与された薬物分子は、ある種の時間枠内にヒト患者の標的部位に達するべきであり、ある種の時間枠に渡って標的部位に留まるべきである）という問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。その必要があるヒト患者に投与されたときに、現行の薬物が患者の体内において十分に長く続く治療活性を有さないという問題の解決を提供することが、本発明の実施形態のいくつかの目的の１つである。

【００１５】

本発明の実施形態の上の目的の少なくとも１つは、本発明の、少なくとも１つの生物活性分子、例えば治療薬分子を担体分子に共有結合することにとって好適な分子骨格を提供することにより達成される。

【００１６】

本発明は具体的な実施形態について記載されるが、本発明はそれらにではなく請求項によってのみ限定される。本明細書に記載される本発明の実施形態は、別様に特定されない限り、組み合わせで及び協同で働き得る。

【００１７】
本発明のある態様は、少なくとも１つの生物活性分子を担体分子に共有結合することにとって好適な骨格に関し、骨格はポリマー又はオリゴマー構造を含み、前記生物活性分子の少なくとも１つは前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、骨格は、さらに、担体分子への骨格の共有結合的カップリングのための第１の化学基を含む。
【００１８】
ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、３．０００ダルトン以下、好ましくは２．５００ダルトン以下、より好ましくは２．３００ダルトン以下、最も好ましくは２．０００ダルトン以下、例えば１．７００ダルトン～１．９５０ダルトンの分子質量を有する。
【００１９】
ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は両親媒性分子である。
【００２０】
ある実施形態は本発明の骨格であり、１つよりも多くの生物活性分子が、骨格によって含まれるポリマー又はオリゴマー構造に共有結合されているときに、少なくとも１つの生物活性分子は、単一の特定の分子であるか又は異なる分子の混合物である。
【００２１】
ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種、例えばＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａから単離され得るサポニンであるか、或いは単一の特定のサポニンであるか、或いは２つ以上の異なるサポニンの混合物、例えば、表Ａ１又はスキームＩのサポニンの１つ以上、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ギプソシド（ｇｙｐｓｏｓｉｄｅ）Ａ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせである。好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１並びに／又はＧＥ１７４１並びに／又はＳＡ１６４１並びに／又はＱＳ－２１、並びに／又はキラヤ酸アグリコンコア、Ｃ－３ベーター－ＯＨ基にＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ炭水化物置換基、及びＣ－２８－ＯＨ基にＧｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ炭水化物置換基を有するサポニンである。並びに／或いは、３－Ｏ－ベーター－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－ベーター－Ｄ－グルクロノピラノシルキラヤ酸２８－Ｏ－ベーター－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－アルファ－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４－ＯＡｃ－ベーター－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－ベーター－Ｄ－フコピラノシドである。より好ましくは、サポニンはＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１である。
【００２２】
ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は切断可能な結合を介して骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、前記切断可能な結合は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソーム中に存在するような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、インビボでの切断を受ける。
【００２３】
ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、定められた数

のグリコシド分子又は定められた範囲のグリコシド分子、好ましくは１～１２８個の又は少なくとも２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、若しくは１２８個のグリコシド分子、又はその間のいずれかの数のグリコシド分子、例えば７、９、１２個のグリコシド分子である。

【００２４】

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

【００２５】

ある実施形態は本発明の骨格であり、担体分子は、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメント、例えば抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）２、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなり、或いは、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための少なくとも１つの非タンパク質性リガンド及び／又は少なくとも１つのタンパク質性リガンドを含むか、又はそれからなる。

【００２６】

ある実施形態は本発明の骨格であり、担体分子は少なくとも１つのエフェクター分子を含むか若しくはそれからなり、又は担体はさらに少なくとも１つのエフェクター分子を含み、このときに担体は例えば免疫グロブリンもまた含み、エフェクター分子は、原薬の少なくとも１つ、例えばペイロード、毒素、薬物、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ゼノ核酸、酵素、例えばウレアーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼ、タンパク質毒素、リボソーム不活性化タンパク質のいずれか１つ以上である。

【００２７】

本発明のある態様は、少なくとも１つの生物活性分子を担体分子に共有結合することにとって好適な骨格を産生するための方法に関し、方法は：ａ）担体分子へのポリマー構造又はオリゴマー構造の共有結合的カップリングのための第１の化学基を含み、かつ第１の化学基とは異なる第２の化学基の少なくとも１つを含むポリマー又はオリゴマー構造を提供し、各第２の化学基は、少なくとも１つの生物活性分子の１つをオリゴマー又はポリマー構造に共有結合的にカップリングするためであることと；ｂ）第２の化学基（単数又は複数）を介して少なくとも１つの生物活性分子を前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングし、好ましくは、生物活性分子（単数又は複数）は、本発明の生物活性分子のいずれか１つ、例えばサポニン、トリテルペノイドサポニン、ビスデスモシド型トリテルペン、より好ましくはＳＯ１８６１及び／又はＧＥ１７４１及び／又はＳＡ１６４１及び／又はＱＳ－２１であることとを含み、それによって骨格を提供する。

【００２８】

本発明のある態様は、担体分子に共有結合された骨格を産生するための方法に関し、骨格は、少なくとも１つの共有結合された生物活性分子を含み、方法は：ａ）前記骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合された少なくとも１つの生物活性分子を含む骨格を提供すること、好ましくは、本発明に従う骨格又は本発明の方法によって得られ得る骨格又は本発明の方法によって得られる骨格を提供することと；ｂ）ａ）の骨格を本発明に従う担体分子に共有結合的にカップリングすることとを含み、それによって、担体分子に共有結合された骨格を提供し、骨格は、少なくとも１つの共有結合された生物活性分子を含む。

【００２９】

ある実施形態は、本発明に従う骨格又は本発明に従う方法であり、骨格は本発明に従うエフェクター分子のエンドソーム脱出及び／又はリソソーム脱出を増加させることができ、このときに前記エフェクター分子どちらかは骨格に共有結合され、哺乳類細胞と接触さ

せられるか、又はこのときに前記エフェクター分子は骨格の存在下で哺乳類細胞と接触させられる。

【００３０】

定義

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

【００３１】

用語「三官能性リンカー」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、３つの分子のそれぞれの化学基を介して３つの分子に取り付くリンカーを言う。当業者は、本開示及び普通の一般的な知識に基づいて、かかる三官能性リンカーを設計することができる。かかる三官能性リンカーは、例えば、チオール－エン反応を行うためのチオール基を見せる標的化リガンドへのコンジュゲート化のために用いられ得るマレイミド基を見せ得る。加えて、三官能性リンカーは、アジドを持つサポニンとのいわゆる歪み促進型のアルキン－アジド環化付加（ＳＰＡＡＣ、クリックケミストリー）を行うためのジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）基を見せ得る。最後に、三官能性リンカーは、トランス－シクロオクチン（ＴＣＯ）基などの第３の官能基を得て、テトラジン（Ｔｚ）を持つエフェクター分子とのいわゆる逆電子要請型Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ（ＩＥＤＤＡ）反応を行い得る。当業者は、三官能性リンカーの化学基が３つ全て同じであり得るか若しくは異なり得るか、又はリンカーは、分子を三官能性リンカーに連結するための同じ化学基の２つを含み得るということを了解するであろう。三官能性リンカー間の形成される結合は、共有結合的又は非共有結合的であり得、共有結合が好ましい。それぞれの化学基を介する三官能性リンカーと１つ又は２つ又は３つの結合分子との間における形成される結合は、例えばヒト細胞などの哺乳類細胞のエンドソーム及びリソソームなどの細胞内の酸性条件下において切断可能な、切断可能な（不安定な）結合であり得るか、又は非切断可能な結合であり得る。当然のことながら、三官能性リンカーは共有結合を形成するための１つ又は２つの化学基を包摂し得、さらなる２つ又は１つの化学基（単数又は複数）はそれぞれ非共有結合を形成するためである。当然のことながら、三官能性リンカーは切断可能な結合を形成するための１つ又は２つの化学基を包摂し得、さらなる２つ又は１つの化学基（単数又は複数はそれぞれ非切断可能な結合を形成するためである。

【００３２】

例えば用語「切断可能なリンカー」又は「切断可能な結合」において用いられる用語「切断可能」は、その通例の科学的意味を有し、ここでは、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、又は光誘導性条件などの条件下において切断を受けることを言う。例えば、切断可能なリンカーは酸性条件下で切断を受け得る。好ましくは、前記切断可能なリンカーは、インビボにおいて、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソー

ムに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５において、より好ましくはｐＨ≦５．５において切断を受ける。別の例として、切断可能なリンカーは、酵素による、例えばカテプシンＢなどのカテプシンによる切断を受け得る。さらにその上、還元的条件下で切断可能な共有結合の例はジスルフィド結合である。

【００３３】

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

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

用語「リガンド」はその通例の科学的意味を有し、ここでは、標的細胞、例えば標的癌細胞又は標的自己免疫細胞に発現される標的細胞表面分子又は標的細胞表面受容体に選択的に結合し得るいずれかの分子（単数又は複数）を言う。リガンドは、標的細胞上の受容体又は他の抗原によって含まれるエピトープに結合し得る。好ましくは、細胞結合リガンドは抗体である。

【００３７】

本明細書で用いられる用語「抗体」は最も幅広い意味で用いられ、これは、クラスＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、又はＩｇＤ（又はそのいずれかのサブクラス）に属するタンパク質として定められる免疫グロブリン（Ｉｇ）、或いは免疫グロブリンの機能的な結合フラグメント又は結合ドメインを言い得る。本発明の文脈において、免疫グロブリンの「結合フラグメント」又は「結合ドメイン」は、親の免疫グロブリンの抗原結合フラグメント若しくはドメイン又は他の誘導体として定められ、これはかかる親の免疫グロブリンの抗原結合活性を本質的に維持する。機能的なフラグメント及び機能的なドメインは、本発明の意味において、抗原に対するそれらの親和性が親の免疫グロブリンのものよりも低

い場合であっても、抗体である。本発明に従う「機能的なフラグメント及びドメイン」は、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆａｂフラグメント、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、１価ＩｇＧ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、還元型ＩｇＧ（ｒＩｇＧ）、ミニボディ、ダイアボディ、トライアボディ、テトラボディ、Ｆｃ融合タンパク質、ナノボディ、可変Ｖドメイン、例えばＶＨＨ、Ｖｈ、並びに他の型の抗原認識免疫グロブリンフラグメント及びドメインを包含するが、これらに限定されない。フラグメント及びドメインは、ＣＨ１及びＣＬドメインの間で起こる分子間ジスルフィド相互作用を最小化又は完全に除去するように操作され得る。機能的なフラグメント及びドメインは、それらのより小さいサイズゆえに、より多大な腫瘍透過という利点を提供する。加えて、機能的なフラグメント又はドメインは、免疫グロブリン丸ごとと比較して、より均一に腫瘍塊に分布し得る。

【００３８】

本発明の抗体（免疫グロブリン）は二機能性、または、多機能性であり得る。例えば、二機能性抗体は１つの受容体又は抗原に対する特異性を有する１つのアームを有し、他のアームは異なる受容体又は抗原を認識する。代替的には、二機能性抗体の各アームは、標的細胞の同じ受容体又は抗原の異なるエピトープに対する特異性を有し得る。

【００３９】

本発明の抗体（免疫グロブリン）は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、リサーフェシングされた抗体、抗イディオタイプ抗体、マウス抗体、ラット抗体、ラット／マウスハイブリッド抗体、ラマ抗体、重鎖のみのラマ抗体、重鎖のみの抗体、及び獣医学的抗体であり得るが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の抗体（免疫グロブリン）はモノクローナル抗体である。リサーフェシングされた、キメラ、ヒト化、及び完全ヒト抗体もまたより好ましい。なぜなら、それらはヒトにおいて免疫原性を引き起こすことがより蓋然的でないからである。本発明のＡＤＣの抗体は、好ましくは、癌細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞の表面に発現された抗原に特異的に結合しながら、いずれかの健康な細胞は本質的に変わらずに残す（例えば、かかる正常細胞に結合しないことによるか、又はより少ない程度の数及び／若しくは親和性によってかかる健康な細胞に結合することによる）。

【００４０】

本発明のＡＤＣに用いられ得る特異的な抗体は、抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、例えばトラスツズマブ及びペルツズマブ、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体、例えばリツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、及びイブリツモマブ、抗ＣＡ１２５モノクローナル抗体、例えばオレゴボマブ、抗ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）モノクローナル抗体、例えばエドレコロマブ、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、及びニモツズマブ、抗ＣＤ３０モノクローナル抗体、例えばブレンツキシマブ、抗ＣＤ３３モノクローナル抗体、例えばゲムツズマブ及びｈｕＭｙ９－６、抗血管インテグリンアルファ－ｖベータ－３モノクローナル抗体、例えばエタラシズマブ、抗ＣＤ５２モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ、抗ＣＤ２２モノクローナル抗体、例えばエプラツズマブ、抗ＣＥＡモノクローナル抗体、例えばラベツズマブ、抗ＣＤ４４ｖ６モノクローナル抗体、例えばビバツズマブ、抗ＦＡＰモノクローナル抗体、例えばシブロツズマブ、抗ＣＤ１９モノクローナル抗体、例えばｈｕＢ４、抗ＣａｎＡｇモノクローナル抗体、例えばｈｕＣ２４２、抗ＣＤ５６モノクローナル抗体、例えばｈｕＮ９０１、抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、例えばダラツムマブ、抗ＣＡ６モノクローナル抗体、例えばＤＳ６、抗ＩＧＦ－ＩＲモノクローナル抗体、例えばシクスツムマブ及び３Ｂ７、抗インテグリンモノクローナル抗体、例えばＣＮＴＯ９５、及び抗シンデカン－１モノクローナル抗体、例えばＢ－Ｂ４を包含するが、これらに限定されない。

【００４１】

標的細胞の細胞受容体又は抗原に結合する抗体以外のいずれかの分子もまた、本発明のリガンド－薬物コンジュゲートの細胞結合リガンドとして用いられ得る。リガンドは、本発明に従って、共有結合されたサポニンを提供される。これらのリガンドは、タンパク質

、ポリペプチド、ペプチド、低分子を包含するが、これらに限定されない。これらの非抗体リガンドの例は、インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、及びＩＦＮ－γ）、トランスフェリン、レクチン、上皮成長因子（ＥＧＦ）及びＥＧＦ様ドメイン、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）、血小板由来成長因子（ＴＧＦ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、ワクシニア成長因子（ＶＧＦ）、インスリン及びインスリン様成長因子（ＩＧＦ、例えばＩＧＦ－１及びＩＧＦ－２）、他の好適なホルモン、例えば甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（ＴＲＨ）、メラニン細胞刺激ホルモン（ＭＳＨ）、ステロイドホルモン（例えばエストロゲン及びアンドロゲン）、ソマトスタチン、リンホカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、及びＩＬ－６）、コロニー刺激因子（ＣＳＦ、例えばＧ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、及びＧＭ－ＣＳＦ）、ボンベシン、ガストリン、Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ又はＲＧＤ、アプタマー（例えば、ＡＳ－１４１１、ＧＢＩ－１０、ＨＩＶ糖タンパク質に対するＲＮＡアプタマー）、低分子（例えば葉酸、アニスアミドフェニルボロン酸）、ビタミン（例えばビタミンＤ）、炭水化物（例えばヒアルロン酸、ガラクトース）である。

【００４２】

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

【００４３】

エフェクター分子又は部分は、原薬、例えば毒素、例えば、タンパク質性毒素、薬物、ポリペプチド、又はポリヌクレオチドである。本発明における原薬は、生物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳類、例えば非ヒト対象又は人類／ヒト対象において有益なアウトカムを達成するために用いられるエフェクター分子又は部分である。利益は、疾患及び／又は症状及び／又は健康上の問題の診断、予後予測、処置、治癒、及び防止（予防）を包含する。原薬は、望まれないかつ場合によってはさらには有害な副作用（例えば治験中に観察される有害事象）にもまた至り得る。このケースでは、原薬が特定のケースにおいて好適であるかどうかを決めるために、長短が秤にかけられなければならない。ある細胞内における原薬の効果が丸ごととして生物にとって圧倒的に有益である場合には、細胞は標的細胞と呼ばれる。ある細胞内における効果が丸ごととして生物にとって圧倒的に有害である場合には、細胞はオフターゲット細胞と呼ばれる。細胞培養及びバイオリアクターなどの人工系では、標的細胞及びオフターゲット細胞は目的に依存し、ユーザにより定められる。エフェクター分子及び部分の例は、薬物、毒素、ポリペプチド（例えば酵素）、ポリヌクレオチド（非天然アミノ酸又は核酸を含むポリペプチド及びポリヌクレオチドを包含する）、及びそれらのいずれかの組み合わせである。

【００４４】

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

）リボザイム、例えばＶＥＧＦ発現阻害剤及びＨＥＲ２発現阻害剤；（ｖｉｉｉ）ワクチン、例えば遺伝子治療ワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤；（ｉｘ）血管新生阻害剤；並びに上のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、溶媒和物、及び誘導体もまた包含される。

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

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

【００４８】

例えば、「タンパク質性分子」及び「タンパク質性毒素」に用いられる用語「タンパク質性」は、単一のｍＲＮＡからの発現産物として得られ得るアミノ酸残基の少なくとも１

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

【００４９】

例えば「特異的結合」及び「腫瘍細胞の表面に特異的に存在又は発現する受容体又は分子標的」及び同類の文脈において、用語「特異的」及び「特異的に」は当分野で公知のそれらの通常の科学的意味を有する。ここでは、例えば、第２の分子とは異なるさらなる分子への第１の分子のいずれかの推測上の結合に対して相対的により高い親和性でもって起こる第２の分子との第１の分子の結合相互作用、或いは、例えば受容体又は分子標的の数が考えられるときに、例えば、健康な細胞などの第２の型の細胞における　同じ受容体又は分子標的の発現の程度に対して相対的に腫瘍細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞などの第１の型の細胞の表面上の細胞表面受容体又は分子標的の発現又はより高い程度の発現を言うなどである。第２の型の細胞における発現は、腫瘍細胞上の発現のいずれかの程度に対して相対的に完全に不在か又は非常に低くあり得るなどである。さらにその上、例えば「特異的結合」において、用語「特異的」は当分野で公知のその通常の科学的意味を有し、ここでは、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性による別の分子との相互作用を有し得る分子を指示するという意味を有する。類似に、用語「特異性」は、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性を有する例えば２つの分子間の又は細胞と分子との間の相互作用を言う。免疫グロブリンなどの結合分子は、それらの結合部位、例えば免疫グロブリンの免疫グロブリン可変領域を介して、分子、例えばエピトープ、細胞表面受容体などの上の結合部位に、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性でもって結合する。本発明の文脈において、バックグラウンド相互作用は、典型的には、１０Ｅ－４Ｍの$K_D$よりも低い親和性による相互作用である。類似に、「特異的結合ドメイン」は、分子間のバックグラウンド相互作用よりも高い結合親和性でもって、分子、例えばエピトープ、細胞表面受容体などの上の結合部位に選好的に結合するドメインである。本発明の文脈において、「バックグラウンド相互作用」は、典型的には、１０Ｅ－４Ｍの$K_D$よりも低い親和性による相互作用である。好ましくは、特異的結合ドメインは、約１０Ｅ－５Ｍの$K_D$よりも高い親和性でもって結合する。

【００５０】

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

【００５１】

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

【００５２】

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

の腫瘍細胞などの有疾患組織とを識別する意図をもって設計される。

【００５３】

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

【００５４】

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

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

用語「Ｑｕｉｌｌ－Ａ」は、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからの市販の半精製抽出物を言い、可変な数量の５０個よりも多くの別個の（水溶性）サポニンを含有し、これらの多くは、ＱＳ－７、ＱＳ－１７、ＱＳ１８、及びＱＳ－２１に見出されるＣ－３ベーター－ＯＨ基におけるトリテルペン－三糖部分構造Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－を組み込んでいる。Ｑｕｉｌ－Ａに見出されるサポニンは、ｖａｎ Ｓｅｔｔｅｎ （１９９５）表２に挙げられている（Ｄｉｒｋ Ｃ．ｖａｎ Ｓｅｔｔｅｎ，Ｇｅｒｒｉｔ ｖａｎ ｄｅ Ｗｅｒｋｅｎ，Ｇｉｊｓｂｅｒｔ Ｚｏｍｅｒ ａｎｄ Ｇｉｄｅｏｎ Ｆ．Ａ．Ｋｅｒｓｔｅｎ，Ｇｌｙｃｏｓｙｌ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ｉｍｍｕｎｏ－ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｃｔｉｖｅ Ｓａｐｏｎｉｎｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａ Ｍｏｌｉｎａ Ｅｘｔｒａｃｔ Ｑｕｉｌ Ａ，ＲＡＰＩＤ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ ＩＮ ＭＡＳＳ ＳＰＥＣＴＲＯＭＥＴＲＹ，ＶＯＬ．９，６６０－６６６（１９９５））。Ｑｕｉｌ－Ａ、及びキラヤサポニンもまた、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａからのサポニンの画分であり、両方とも大きい種々の異なるサポニンを含有し、大きくオーバーラップする内容を有する。２つの画分は異なる精製手続きによって獲得されるので、２つの画分はそれらの特定の組成が異なる。

【００５９】

用語「ＱＳ１８６１」及び用語「ＱＳ１８６２」はＱＳ－７及びＱＳ－７ａｐｉを言う。ＱＳ１８６１は１８６１ダルトンの分子質量を有し、ＱＳ１８６２は１８６２ダルトンの分子質量を有する。ＱＳ１８６２は、Ｆｌｅｃｋ ｅｔ ａｌ．（２０１９）において、表１の行ｎｏ．２８に記載されている（Ｊｕｌｉａｎｅ Ｄｅｉｓｅ Ｆｌｅｃｋ，Ａｎｄｒｅｓａ Ｈｅｅｍａｎｎ Ｂｅｔｔｉ，Ｆｒａｎｃｉｎｉ Ｐｅｒｅｉｒａ ｄａ Ｓｉｌｖａ，Ｅｄｕａｒｄｏ Ａｒｔｕｒ Ｔｒｏｉａｎ，Ｃｒｉｓｔｉｎａ Ｏｌｉｖａｒｏ，Ｆｅｒｎａｎｄｏ Ｆｅｒｒｅｉｒａ ａｎｄ Ｓｉｍｏｎｅ Ｇａｓｐａｒｉｎ Ｖｅｒｚａ，Ｓａｐｏｎｉｎｓ ｆｒｏｍ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａ ａｎｄ Ｑｕｉｌｌａｊａ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ：Ｐａｒｔｉｃｕｌａｒ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｃｔｉｖｉ

ｔｉｅｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ２０１９，２４， １７１； ｄｏｉ：１０．３３９０／ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ２４０１０１７１）。記載されている構造はＱＳ－７のａｐｉバリアントＱＳ１８６２である。分子質量は１８６２ダルトンである。なぜなら、この質量はグルクロン酸にプロトンを包含する名目上の質量であるからである。中性ｐＨにおいては、分子は脱プロトン化される。ネガティブイオンモードで質量分析法によって測定するときに、測定される質量は１８６１ダルトンである。

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

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

【００６３】

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

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【図１】３０ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）、２５ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$_4$、又は２５ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）によって処置されたＡ４３１ゼノグラフ「ヌード」マウス腫瘍モデルにおける、インビボのＨＳＰ２７発現。

【図２】セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$_4$、又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）による処置による、ＥＧＦＲ発現Ａ４３１細胞におけるインビトロの向上したＨＳＰ２７遺伝子サイレンシング。

【図３－１】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ． セツキシマブ、セツキサミブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_3$，$_9$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_3$，$_9$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ． トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１

８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＨｅＬａ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図３－２】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ．　セツキシマブ、セツキサミブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＨｅＬａ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図３－３】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ．　セツキシマブ、セツキサミブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、及びセツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンによる、ＥＧＦＲ発現細胞（ＨｅＬａ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、及びトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンによる、ＨＥＲ２発現細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図４－１】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）４）３，９＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4,4}$、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4,4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋＋／ＣＤ７１＋細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋＋／ＣＤ７１＋　（ＳＫ－ＢＲ－３）細胞株における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$、又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋／ＣＤ７１＋細胞（ＣａＳｋｉ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）4）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋／－／ＣＤ７１＋細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図４－２】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）4）3，9＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋＋／ＣＤ７１＋細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋＋／ＣＤ７１＋　（ＳＫ－ＢＲ－３）細胞株における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$、又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋／ＣＤ７１＋細胞（ＣａＳｋｉ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）4）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋／－／ＣＤ７１＋細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図４－３】図Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤの凡例及び軸は同じである。Ａ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）4）3，9＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋＋／ＣＤ７１＋細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）における殺細胞活性。Ｂ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋＋／ＣＤ７１＋　（ＳＫ－ＢＲ－３）細胞株における殺細胞活性。Ｃ．　セツキシマブ、セツキシマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3}$，$^{9}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、セツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$、又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＥＧＦＲ＋／ＣＤ７１＋細胞（ＣａＳｋｉ）における殺細胞活性。Ｄ．　トラスツズマブ、トラスツズマブ＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）4）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、トラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$、又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$，$^{7}$＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンの、ＨＥＲ２＋／－／ＣＤ７１＋細胞（ＪＩＭＴ－１）における殺細胞活性。

【図５】Ｔ－ＤＭ１、Ｔ－ＤＭ１＋２５．６ｎＭトラスツズマブ、又はＴ－ＤＭ１＋５．３ｎＭトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$のＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）における殺細胞活性。

【図６】ＨＳＰ２７ＢＮＡ単独と比較したＨＳＰ２７ＢＮＡ－デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$のＨＳＰ２７遺伝子サイレンシング活性。

【図７－１】Ａ．　酸性条件下におけるデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$からのＳＯ１８６１の放出の模式図。Ｂ．　デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）４そのもの（上）、３０分後のデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$及び水／アセトニトリル／ＴＦＡを含有する溶液５０μＬを含む反応混合物（中央）、及び１．５時間後の反応混合物（下）のＵＰＬＣ　ＵＶトレース（ＰＤＡ）。Ｃ．　ＬＲＭＳによる図７Ｂの観察されたｍ／ｚ値の解釈。

【図７－２】Ａ．　酸性条件下におけるデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$からのＳＯ１８６１の放出の模式図。Ｂ．　デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）４そのもの（上）、３０分後のデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$及び水／アセトニトリル／ＴＦＡを含有する溶液５０μＬを含む反応混合物（中央）、及び１．５時間後の反応混合物（下）のＵＰＬＣ　ＵＶトレース（ＰＤＡ）。Ｃ．　ＬＲＭＳによる図７Ｂの観察されたｍ／ｚ値の解釈。

【図７－３】Ａ．　酸性条件下におけるデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$からのＳＯ１８６１の放出の模式図。Ｂ．　デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）４そのもの（上）、３０分後のデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$及び水／アセトニトリル／ＴＦＡを含有する溶液５０μＬを含む反応混合物（中央）、及び１．５時間後の反応混合物（下）のＵＰＬＣ　ＵＶトレース（ＰＤＡ）。Ｃ．　ＬＲＭＳによる図７Ｂの観察されたｍ／ｚ値の解釈。

【図８】図Ａ及びＢの凡例及び軸は同じである。Ａ．　「裸の」デンドロン（デンドロン（ＮＥＭ）$^{4}$）、デンドロン（ＮＥＭ）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチン、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$、又はデンドロン（Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチンによる、ＥＧＦＲ発現Ａ４３１細胞における殺細胞活性。Ｂ．　「裸の」デンドロン（デンドロン（ＮＥＭ）$^{4}$）、デンドロン（ＮＥＭ）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチン、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$、又はデンドロン（Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチンによる、ＥＧＦＲ発現ＨｅＬａ細胞における殺細胞活性。

【図９－１】図Ａ、Ｂ、及びＣの凡例及び軸は同じである。Ａ．　ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのトラスツズマブの効果。Ｂ．　ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのセツキシマブの効果。Ｃ．ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのＴ－ＤＭ１の効果。

【図９－２】図Ａ、Ｂ、及びＣの凡例及び軸は同じである。Ａ．　ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのトラスツズマブの効果。Ｂ．　ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのセツキシマブの効果。Ｃ．ある範囲の癌細胞の細胞生存率へのＴ－ＤＭ１の効果。
【図１０】モノクローナル抗体－（ＳＯ１８６１－骨格－アンチセンスＢＮＡオリゴ）コンジュゲートの模式図。
【図１１】毒素に結合されたモノクローナル抗体とサポニンを含む骨格に結合された同じモノクローナル抗体とを用いた、１標的２コンポーネント系の模式図。
【図１２】毒素に結合されたモノクローナル抗体とサポニンを含む骨格に結合された異なる標的を有する異なるモノクローナル抗体とを用いた、２標的２コンポーネント系の模式図。
【図１３】ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成の反応スキーム。
【図１４－１】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１４－２】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１４－３】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１４－４】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１４－５】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１４－６】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$合成の反応スキーム。
【図１５－１】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成の反応スキーム。
【図１５－２】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成の反応スキーム。
【図１５－３】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成の反応スキーム。
【図１５－４】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成の反応スキーム。
【図１５－５】デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成の反応スキーム。
【図１６－１】ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡの合成の反応スキーム。
【図１６－２】ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡの合成の反応スキーム。
【図１６－３】ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡの合成の反応スキーム。
【図１６－４】ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡの合成の反応スキーム。
【図１７】デンドロン（ＳＯ１８６１）$^{4}$－ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴコンジュゲートの合成の反応スキーム。
【図１８】デンドロン（ＮＥＭ）$^{4}$（「裸の」デンドロン）合成の反応スキーム。
【図１９】シッフ塩基（イミン）を介したサポニン結合のための４つの分子アーム及びクリックケミストリーのための１つのアームからなるモデル骨格。ポリマー構造は、第１世代の５価のポリエチレングリコールに基づくデンドリマーである。
【図２０】挿入図は、同位体パターン計算機ｅｎｖｉＰａｔ　Ｗｅｂ　２．０による計算から得られた、ＳＡ１６４１サポニンを有するモデル骨格の理論的に予想される質量スペクトルを示す。ＬＣ－ＭＳ／ＥＳＩ－ＭＳにより得られた実験データはほぼ厳密に同じピークをｍ／ｚ７５８～７６０Ｄａにおいて示し、首尾良いサポニンカップリングを証明している。
【図２１】５量体デンドリマー（ペントリマー）、ＳＡ１６４１の存在下のペントリマー、ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＡ１６４１の存在下のジアンチン－ＥＦＧ、ジアンチン－ＥＦＧの存在下のペントリマー、並びにジアンチン－ＥＧＦ及びＳＡ１６４１の存在下のペントリマーによる処置後の、ＨＥＲ１４細胞の細胞生存率。
【図２２－１】Ａ．　ＳＯ１８６１のＨ－ＮＭＲスペクトル。Ｂ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ＥＭＣＨ＝Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）コンジュゲートのＨ－ＮＭＲスペクトル。
【図２２－２】Ａ．　ＳＯ１８６１のＨ－ＮＭＲスペクトル。Ｂ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ＥＭＣＨ＝Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド）コンジュゲートのＨ－ＮＭＲ

スペクトル。
【図２３】Ａ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲートのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノールコンジュゲートのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図２４】ポリマー構造へのエンドソーム脱出を向上させるサポニンのコンジュゲート化のための強調された化学基を有する、ＳＯ１８６１構造。強調されている基は、アルデヒド（黒い円）、カルボン酸（破線の円）、アルケン（破線の五角形）、及びアルコール（破線のボックス）である。
【図２５】Ａ．　安定な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」エンドソーム脱出向上因子サポニンの産生の模式図。Ｂ．　切断可能な「レディ・トゥ・コンジュゲート化」エンドソーム脱出向上因子サポニンの産生の模式図。
【図２６】酸性条件下のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのヒドラゾン結合の加水分解。
【図２７】Ａ．　ＳＯ－１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲートの標準的な分子構造。マレイミド基は円でマークされている。Ｂ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲートの３Ｄモデル。マレイミド基は円でマークされている。
【図２８－１】Ａ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの合成スキーム。Ｂ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。Ｃ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２８－２】Ａ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの合成スキーム。Ｂ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。Ｃ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２８－３】Ａ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの合成スキーム。Ｂ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。Ｃ．　ネガティブリフレクターモードにおけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、ｒ．ｔ．：室温、ｈ：時間、及びＭＷ：分子量。
【図２９－１】Ａ．　ｐＨ３のＨＣｌ溶液中の加水分解前のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　ｐＨ３のＨＣｌ溶液中の加水分解後のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図２９－２】Ａ．　ｐＨ３のＨＣｌ溶液中の加水分解前のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　ｐＨ３のＨＣｌ溶液中の加水分解後のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３０】いずれかのアミンを持つポリマー構造へのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲート化の反応スキーム。
【図３１】Ａ．　ＢＳＡ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　ＢＳＡのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３２】Ａ．　シアニン３色素標識されたポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）Ｇ５デンドリマーへのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲート化の反応スキーム。Ｂ．　（Ｂ）　シアニン３色素標識されたポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）Ｇ５デンドリマーへの、ＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ（ＨＡＴＵ＝１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート）コンジュゲート化の反応スキーム。
【図３３－１】Ａ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．ＰＡＭＡＭ当たり５つのＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＡＭＡＭ当たり１３個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペ

クトル。Ｄ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＰＡＭＡＭ当たり５１個のＳＯ１８６１が取り付けられた。
【図３３－２】Ａ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．ＰＡＭＡＭ当たり５つのＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＡＭＡＭ当たり１３個のＳＯ１８６１が取り付けられたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。ＰＡＭＡＭ当たり５１個のＳＯ１８６１が取り付けられた。
【図３４】Ａ．　５当量の仕込みのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　３０当量の仕込みのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３５】Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル（ＮＣ＝安定な結合（「非切断可能」））。
【図３６－１】Ａ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）の反応スキーム。Ｂ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトル。Ｃ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３６－２】Ａ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）の反応スキーム。Ｂ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトル。Ｃ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３７－１】Ａ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８の反応スキーム。Ｂ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ３の反応スキーム。Ｃ．　ジアンチン－ＥＧＦのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３７－２】Ａ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８の反応スキーム。Ｂ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ３の反応スキーム。Ｃ．　ジアンチン－ＥＧＦのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３８－１】Ａ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８の反応スキーム。Ｂ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$の反応スキーム。Ｃ．　ジアンチンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３８－２】Ａ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８の反応スキーム。Ｂ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$の反応スキーム。Ｃ．　ジアンチンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図３９】ＶｅｒｓａＤｏｃイメージングシステムによって行われたＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの蛍光画像。Ｍ＝マーカー、Ｐ＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯ、Ｄ＝ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$、Ｃ１＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃ２＝Ｃｙ

３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、及びＣ３＝Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８。

【図４０】Ａ．　還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１の合成スキーム。Ｂ．　ＰＡＭＡＭ当たり１０個のＳＯ１８６１による還元的アミノ化により合成されたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＡＭＡＭ当たり３０個のＳＯ１８６１による還元的アミノ化により合成されたＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図４１】モノマーとしてＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、重合開始剤としてＡＰＳ／ＴＭＥＤＡ系、及びラジカルクエンチ剤としてアミノプロパンチオールを用いた、ポリ（ＳＯ１８６１）の生成の反応スキーム。

【図４２】Ａ．　６０℃におけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのポリ（ＳＯ１８６１）反応バッチのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　６０℃におけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ＋１１$^{-3}$当量ＡＰＳのポリ（ＳＯ１８６１）反応バッチのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　６０℃におけるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ＋１１$^{-3}$当量ＡＰＳ／ＴＭＥＤＡのポリ（ＳＯ１８６１）反応バッチのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図４３】ＤＮＡアプローチの模式図。グリコシド分子をコンジュゲート化及び放出することができるＤＮＡに基づく骨格を生成するための、ＤＮＡオリガミの原理の使用法。加えて、ＤＮＡストランドの１つは、機能化された骨格を形成するための標的化された毒素へのコンジュゲート化のために用いられ得るクリックケミストリー部分を得る。ｂｐ：塩基対。

【図４４】ポリ（ペプチド－ＳＯ１８６１）アプローチの模式図。グリコシド分子をコンジュゲート化及び放出し得、かつそのものと反応してポリ（ペプチド－ＳＯ１８６１）構築物を形成し得るペプチド配列の使用法。ポリ（ペプチド）鎖の終端は、毒素へのコンジュゲート化のために用いられ得るクリックケミストリー部分（例えばＢＣＮ－ＮＨＳリンカー）によってさらに修飾され得る。

【図４５】Ａ．　ネイティブなペプチドのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　ペプチド－ＳＯ１８６１コンジュゲートのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図４６】保護されたアミノ基を有するＧ４－デンドロンの分子構造。

【図４７】デンドロンに基づく骨格の生成のための合成スキーム。

【図４８－１】Ａ．　Ｇ４－デンドロンの部分的な色素標識及び脱保護のための反応スキーム。Ｂ．　脱保護及び部分的に色素標識されたＧ４－デンドロンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図４８－２】Ａ．　Ｇ４－デンドロンの部分的な色素標識及び脱保護のための反応スキーム。Ｂ．　脱保護及び部分的に色素標識されたＧ４－デンドロンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図４９】Ａ．　２２仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＧ４－デンドロン－ＳＯ１８６１骨格のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｂ．　１０仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＧ４－デンドロン－ＳＯ１８６１骨格のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　３仕込み当量のＳＯ１８６１－ＥＭＣＨによるＧ４－デンドロン－ＳＯ１８６１骨格のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５０－１】Ａ．　ＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析により決定されたＥＧＦＲ細胞表面発現。Ｂ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ（Ｄｉａ－ＥＧＦ）、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋６６７ｎＭデンドロンによって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。Ｃ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$

によって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。Ｄ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{3}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{8}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{18}$によって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。

【図５０－２】Ａ．　ＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析により決定されたＥＧＦＲ細胞表面発現。Ｂ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ（Ｄｉａ－ＥＧＦ）、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋６６７ｎＭデンドロンによって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。Ｃ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$によって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。Ｄ．　ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭクロロキン、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{3}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{8}$、ＳＯ１８６１＋ジアンチン－ＥＧＦ＋５００ｎＭ　ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ）$_{18}$によって処置された、ＨｅＬａ細胞の細胞生存率。

【図５１－１】Ａ．　チオール化試薬２－イミノチオランを用いたＰＡＭＡＭのチオール化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５１－２】Ａ．　チオール化試薬２－イミノチオランを用いたＰＡＭＡＭのチオール化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５１－３】Ａ．　チオール化試薬２－イミノチオランを用いたＰＡＭＡＭのチオール化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{16}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{65}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　チオール化ＰＡＭＡＭ－（ＳＨ）$_{108}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５２－１】Ａ．　ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{18}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５２－２】Ａ．　ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｅ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{18}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

【図５２－３】Ａ．　ＰＥＧ化試薬ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳを用いたＰＡＭＡＭのＰＥＧ化の反応スキーム。Ｂ．　ネイティブなＰＡＭＡＭのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｃ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{3}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。Ｄ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{8}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。

Ｅ．　ＰＥＧ化ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_{18}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトル。
【図５３】いずれかの所望のエフェクター分子を連結するためのクリックケミストリー官能基を有する基本的な骨格の模式図。
【図５４】予め結合されたエフェクター分子と、いずれかの所望のリガンドを連結するためのクリックケミストリー官能基とを有する機能化された骨格の模式図。任意に、エンドソームに達した後の骨格からエフェクター分子を放出するためのｐＨ感受性の連結部が提供され得る。
【発明を実施するための形態】
【００６５】
生物活性分子が働くためには、分子は、例えば血清中において、細胞表面の外側において、又は細胞若しくはオルガネラ内において、その標的と係合できなければならない。ほぼ全てのタンパク質に基づく標的化された毒素の活性部分は、例えば、その標的調節効果を媒介するためには標的細胞の細胞質基質に入らなければならない。多くのコンステレーションにおいて、毒素は無効のままである。なぜなら、（１）標的化部分が不良に内在化され、細胞の外側に結合したままであるか、（２）内在化後に細胞表面へとリサイクルされるか、又は（３）エンドリソソームに輸送され、そこでそれは分解されるからである。これらの根源的なイシューは数十年間公知であり、５００よりも多くの標的化された毒素が過去数十年に検討されているが、問題はまだ解決されず、１つの抗体によって標的化されたタンパク質毒素のモキセツモマブパスドトクス－ｔｄｆｋ（ＬＵＭＯＸＩＴＩ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　ＬＰ）が、今日までにＦＤＡによって再発性又は難治性有毛細胞白血病について認可されているのみである。
【００６６】
これらの問題を克服するための多くの戦略が記載されており、毒素を小胞体における生合成経路の内在性細胞膜輸送複合体へと転送するためのアプローチと、エンドソーム、すなわち細胞におけるエンドサイトーシス経路の区画の膜インテグリティを遮断するか又は弱め、それゆえにエンドソーム脱出を容易化するための技術とを包含する。これは、リソソーム親和性アミン、カルボン酸イオノフォア、カルシウムチャネルアンタゴニスト、ウイルス、細菌、植物、動物、ヒト、及び合成起源の種々の細胞透過ペプチド、他の有機分子、並びに光誘導性技術の使用を含む。標的化された毒素の有効性は、典型的には、細胞培養では１００倍又は１０００倍、例外的なケースでは１００万倍よりも多く増加したが、エンドソーム脱出向上因子を他の物質と同時投与するという要件は、追加の副作用、標的特異性の損失、治療ウインドウを決定する困難さ、及び細胞型依存性な変動を包含する新たな問題を抱える。
【００６７】
物理化学的技術を包含する全ての戦略は、膜と多かれ少なかれ直接的に相互作用し、かつ本質的に小さい化学分子、二次代謝物、ペプチド、及びタンパク質を含む向上因子の分子を要求する。全てのこれらの物質の共通の特徴は、それらが自体では標的細胞特異的ではなく、標的化された毒素以外の動態で分布するということである。これは現行のアプローチの１つの主要な欠点である。
【００６８】
本発明は具体的な実施形態について記載されるが、本発明はそれらにではなく請求項によってのみ限定される。本明細書に記載される本発明の実施形態は、別様に特定されない限り、組み合わせで及び協同で働き得る。
【００６９】
本発明がいくつかの実施形態の観点から記載されているが、それらの代替、改変、並べ替え、及び同等物は、明細書を読解することによって並びに図面及びグラフの研究によって、当業者には明らかになるであろうということが企図される。本発明は例解されている実施形態に決して限定されない。添付の請求項により定められる範囲から逸脱することなしに、変更がなされ得る。
【００７０】

本発明のある態様は、少なくとも１つの生物活性分子を担体分子に共有結合することにとって好適な骨格であり、骨格はポリマー又はオリゴマー構造を含み、前記生物活性分子の少なくとも１つは前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、骨格は、さらに、骨格を担体分子に共有結合的にカップリングするための第１の化学基を含む。

【００７１】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、３．０００ダルトン以下、好ましくは２．５００ダルトン以下、より好ましくは２．３００ダルトン以下、最も好ましくは２．０００ダルトン以下、例えば１．７００ダルトン～１．９５０ダルトンの分子質量を有する。

【００７２】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は両親媒性分子である。かかる両親媒性分子、例えば（リン）脂質、グリコシド、例えばサポニンは、典型的には、二重層及び脂質層、例えば細胞膜などの層の一部であり得るか若しくはそれらを形成し得、及び／又は例えば細胞内の小胞の一部であり得る。

【００７３】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、１つよりも多くの生物活性分子が、骨格によって含まれるポリマー又はオリゴマー構造に共有結合されるときには、少なくとも１つの生物活性分子は、単一の特定の分子であるか又は異なる分子の混合物である。典型的には、生物活性分子は天然の供給源から得られるか若しくは誘導され、及び／又は、典型的には、生物活性分子は１つ、２つ、又はより多くの同一に近い又は類似の分子を含む。例は、Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａから得られるサポニンを含む水溶性画分（「Ｑｕｉｌ－Ａ」）であり、これは、一連のキラヤサポニン、例えばＱＳ－２１、ＱＳ－１８、ＱＳ－７を包摂する。別の例は、ＱＳ－２１ｘｙｌとＱＳ－２１ａｐｉとの混合物である。

【００７４】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、グリコシド、好ましくはビスデスモシド型トリテルペン又はトリテルペノイドサポニン、より好ましくはビスデスモシド型トリテルペンサポニン、最も好ましくは位置Ｃ－２３にアルデヒド官能基を有し、かつ任意にサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基に炭水化物置換基上のグルクロン酸官能基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属するビスデスモシド型トリテルペンサポニンである。

【００７５】

本発明よりも前には、単一の又は複数のグリコシド分子を（標的）細胞へとガイドすることは可能ではなかった。特に、例えばＡＤＣの一部としてのエフェクター分子とエフェクター分子当たり特定の数又は範囲のグリコシド分子とを、同時に、例えば細胞のエンドサイトーシス経路を介して細胞の細胞質基質へと特異的にガイドすることは可能ではなかった。本発明によって提供される解決は、グリコシド分子を固定化及びさらには重合し、例えばエンドサイトーシス後にグリコシドの作用機序が望まれる細胞内部位における再モノマー化を可能化する。この文脈において、「重合する」は、骨格を形成するためのポリマー又はオリゴマー構造へのグリコシド分子の可逆的及び／又は不可逆的な多重コンジュゲート化を意味する。或いは、（修飾された）グリコシド分子の可逆的及び／又は不可逆的な多重コンジュゲート化を意味し、それによって、骨格を形成するためのポリマー又はオリゴマー構造を形成する。この文脈において、「再モノマー化」は、例えばエンドサイトーシス後の骨格からのグリコシド分子の切断と、結合していないグリコシド分子の（ネイティブな）化学的状態を再獲得することとを意味する。この結合していないグリコシド分子は、追加の化学基、例えば、グリコシドを骨格に連結するための化学基、及び／又は（化学的）リンカーを含み得るか又は含まずにあり得る。グリコシド分子の複雑な化学を原因として、グリコシド分子の「重合」と、例えばエンドサイトーシス後の例えば細胞内の所望の位置におけるそれらの「再モノマー化」とは、難しいタスクであった。特に、共有結合的に連結されたグリコシド、例えばトリテルペノイドサポニンを含む本発明の骨格

を提供するために用いられる化学反応（グリコシドの重合）は、水不含の有機溶媒中において通常は起こるが、グリコシド分子及び生体適合性ポリマーは水溶性分子である。未修飾のグリコシド分子の化学的特性は、それ自体による重合をさらに妨げた。かつ、 複数のグリコシド分子を（直接的に）エフェクター分子に結合するための１つの他の解決はあまり有望ではないと見積もられた。なぜなら、エフェクター分子（薬物、毒素、ポリペプチド、又はポリヌクレオチド）は典型的には十分な結合部位を提供しないからである。かつ、なぜなら、カップリング産物は極めて不均質になり、及び／又はグリコシドなどの生物活性分子と例えばペプチド、毒素、核酸とを一緒にカップリングすることは、かかるグリコシドを含むコンジュゲートにおいて一緒に結合された１つの又はさらには両方の分子の活性に影響及び妨害するリスクを持つからである。さらに、エフェクター分子がカップリング後にその機能を失うかなりのリスクがあった。本発明は、これらの欠点の少なくとも１つを解決する。

【００７６】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ種及び／又はＳａｐｏｎａｒｉａ種及び／又はＡｇｒｏｓｔｅｍｍａ種及び／又はＱｕｉｌｌａｊａ種、例えばＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａから単離され得るサポニンであるか、或いは単一の特定のサポニンであるか、或いは２つ以上の異なるサポニンの混合物、例えば、表Ａ１又はスキームＩのサポニンの１つ以上、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ギプソシドＡ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、又はそれらの立体異性体（ｓｔｅｒｅｏｍｅｒ）のいずれか及び／若しくはそれらのいずれかの組み合わせである。好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１並びに／又はＧＥ１７４１並びに／又はＳＡ１６４１並びに／又はＱＳ－２１、並びに／又はキラヤ酸アグリコンコア、Ｃ－３ベーター－ＯＨ基にＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ炭水化物置換基、及びＣ－２８－ＯＨ基にＧｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ炭水化物置換基を有するサポニンである。並びに／或いは、３－Ｏ－ベーター－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－ベーター－Ｄ－グルクロノピラノシルキラヤ酸２８－Ｏ－ベーター－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－アルファ－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［ベーター－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４－ＯＡｃ－ベーター－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－ベーター－Ｄ－フコピラノシドである。より好ましくは、サポニンはＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１である。

【００７７】

表Ａ１及びスキームＩ並びに上の実施形態は、第２の分子（例えば、エフェクター部分又はエフェクター分子）と一緒に遊離形態でヒト細胞などの哺乳類細胞に接触させられたときの、それらのエンドソーム脱出向上活性について同定された一連のサポニンをまとめている。実に、細胞に基づくバイオアッセイでは、表Ａ１に表化されているサポニン及びスキームＩのサポニンについて、これらのサポニンの影響下においては、第２の分子、例えば核酸及び／又は毒素、例えばタンパク質毒素（例えば、表Ａ５に挙げられているタンパク質毒素の１つ以上）が、（後期）エンドソーム及びリソソームから細胞内に放出され、増大した効率及び／又は有効性を有するということが確立された。つまり、かかる第２の分子（すなわち、エフェクター部分、エフェクター分子）、例えば核酸及び／又は毒素のエンドソーム及び／又はリソソーム脱出は、サポニンの不在下においてはより効率的でない。

【００７８】

驚くべきことに、ここで、本発明者は、ＱＳ－２１及びそのファミリーメンバーＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、ＱＳ－１８を含み、かつ「Ｑｕｉｌ－Ａ」ともまた言われる、Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａからの水溶性サポニン画分が、例えばモノクローナル抗体に結合された核酸又はモノクローナル抗体に結合されたタンパク質毒素のインビトロの生物学的効果を増強する能力をもまた見せるということを実証する。このときに、モノクローナル抗体、エフェクター分子（前に言及された第２の分子）を含みかつＱＳ－２１及びかかるＱＳ－２１調製物によって包摂されるそのファミリーメンバーサポニンなどの少なくとも１つのグリコシドを含む単一の共有結合的なコンジュゲートとして、 哺乳類種（ヒト）の腫瘍細胞に同時投与される。エフェクター及びグリコシド、例えばＱＳ－２１、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＧＥ１７４１は、直接的に又は少なくとも１つのリンカーを介してどちらかでポリマー又はオリゴマー骨格に共有結合されるか、或いはグリコシドはエフェクター分子に共有結合され、エフェクター分子はポリマー又はオリゴマー骨格に共有結合される。代替的には、グリコシド及びエフェクター分子は、別々に骨格に共有結合され、モノクローナル抗体もまた、サポニン、毒素、骨格のこのコンジュゲートに別々に結合され、骨格は、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂに概説される骨格などのポリマー又はオリゴマー構造を包摂する三官能性リンカーである。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａ由来のサポニンの存在下における例えばサポリン又はジアンチンにより媒介される殺腫瘍細胞の観察される刺激又は増強は、サポニンによる腫瘍細胞のインフラマソームの活性化に（もまた）関し得、例えば腫瘍細胞のピロトーシスをもたらす。

【００７９】

ＱＳ－２１、及びＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分もまた、既に長い間公知であり、例えばサブユニットワクチンのアジュバントとしてのその免疫増強能力ゆえに、先に鋭意に適用されている。例えば、ＱＳ－２１はヒト患者の２つの第ＩＩＩ相治験において適用されている。彼らは、ＱＳ－２１を含むアジュバントと混合されたサブユニットワクチンをワクチン接種された（Ｇｌａｘｏ－Ｓｍｉｔｈ－Ｋｌｉｎｅ、ＭＡＧＲＩＴ試験、ＤＥＲＭＡ研究）。サブユニットはＭＡＧＥ－Ａ３タンパク質であった。これは腫瘍細胞によって特異的に発現及び提示される。ＱＳ－２１によって増強された抗腫瘍ワクチン接種は、癌患者（黒色腫；非小細胞肺癌）の無病生残の延長を狙った。加えて、ＱＳ－２１は、抗癌ワクチン処置の開発のための、ＨＩＶ－１感染のワクチンのための、Ｂ型肝炎に対するワクチンの開発の、並びにＧｌａｘｏ－Ｓｍｉｔｈ－Ｋｌｉｎｅのアジュバント ＡＳ０１及びＡＳ０２を含むＱＳ－２１を用いた抗マラリアワクチン開発のための治験において、アジュバントとして試験されている。先の研究は、アジュバントを含むＱＳ－２１サポニンの影響下において、癌細胞表面に提示されるＭＡＧＥ－Ａ３ペプチドに対して誘発される免疫応答を明らかにした（ＡＳ１５；ＧＳＫ）。本発明者が驚いたことに、ＱＳ－２１を含むＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａ画分中のサポニンは、例えば、タンパク質毒素（ジアンチン）などのペイロードの抗腫瘍細胞活性を増強する。サポニンは、例えばセツキシマブに共有結合的にカップリングされる。かつ、リガンド－ジアンチンコンジュゲートがセツキシマブ－サポニンの存在下において腫瘍細胞に暴露されるときには、いくつかのヒト腫瘍細胞株におけるジアンチンの毒性効果が確立される。さらなる詳細は実施例のセクションにおいて概説される。

【００８０】

類似に、サポニンは、（腫瘍）細胞におけるＨＳＰ２７発現をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドＢＮＡ（ＨＳＰ２７）などの核酸の抗腫瘍細胞活性を増強する。本発明者は、共有結合的にカップリングされたアンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）を提供されかつ共有結合的にカップリングされたサポニン（ここではＳＯ１８６１）を提供されたセツキシマブなどの腫瘍細胞標的化モノクローナル抗体が、対照と比較して、かつカップリングされたサポニンなしのＡＤＣのみと比較して、腫瘍のインビボのＨＳＰ２７をサイ

レンシングすることができるということを示す。ＢＮＡ及びサポニン両方は切断可能な結合（ここではヒドラゾン結合）によって抗体に結合され、これを介して、ＢＮＡ及びＳＯ１８６１両方は三官能性リンカー（ここではスキームＩＩの三官能性オリゴマー骨格）にカップリングされる。それゆえに、ＡＤＣをサポニンとコンジュゲート化することは、ＢＮＡ及びサポニンを含むコンジュゲートをもたらし、この組み合わせは、同じドーズのＡＤＣでは見られない抗腫瘍細胞活性をＡＤＣに授ける。注目すべきことに、サポニンと共有結合的にカップリングされたモノクローナル抗体及びＡＤＣは、マウスの別々の群において腫瘍を持つマウスに別々に投与されたときに、対照群（基剤のみを投与された）と比較して、腫瘍細胞におけるＨＳＰ２７発現を増大させる。共有結合的にカップリングされたサポニン及びエフェクター分子を有する本発明の骨格を含むＡＤＣのみが、対照と比較されたときに、縮減されたＨＳＰ２７発現を見せる。アンチセンスＢＮＡ（ＨＳＰ２７）は、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１１）（Ｙ Ｚｈａｎｇ，Ｚ Ｑｕ，Ｓ Ｋｉｍ，Ｖ Ｓｈｉ，Ｂ Ｌｉａｏ１，Ｐ Ｋｒａｆｔ，Ｒ Ｂａｎｄａｒｕ，Ｙ Ｗｕ，ＬＭ Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ａｎｄ ＩＤ Ｈｏｒａｋ，Ｄｏｗｎ－ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ ｔａｒｇｅｔｓ ｕｓｉｎｇ ｌｏｃｋｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ（ＬＮＡ）－ｂａｓｅｄ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈｏｕｔ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１１） １８，３２６－３３３）に従うオリゴ核酸配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’を有するＢＮＡであった。注目すべきことに、本発明者の知る限り、ＢＮＡは遊離核酸としての適用のために設計されている。ここで、本発明者は、遺伝子サイレンシング活性がインビトロでかつより重要にはインビボで腫瘍を持つ動物の腫瘍細胞において保持されるやり方で、アンチセンスＢＮＡが（非）切断可能なリンカーを介してリガンド又は抗体に共有結合的にカップリングされ得るということを初めて実証する。このアプローチは、標的化されたＢＮＡをその必要があるヒト（癌）患者に投与するための新たな道を開く。

【００８１】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子はビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基と任意にＣ－１６位にヒドロキシル基とを含有するオレアナン型トリテルペンを含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有し、この第１の分岐炭水化物側鎖は任意にグルクロン酸を含有する。サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、この第２の分岐炭水化物鎖は好ましくは少なくとも４つの炭水化物単位を含有し、任意に少なくとも１つのアセチル残基、例えば２つのアセチル残基を含有し、及び／又は任意にデオキシ炭水化物を含み、及び／又は任意にキノボースを含み、及び／又は任意にグルコースを含み、及び／又は任意に４－メトキシケイ皮酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、及び／又は任意に５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸を含み、エステル結合を介して炭水化物に結合されている。或いは、少なくとも１つのサポニンは、ＱＳ－２１、又はＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ－１８、ＱＳ－１８６１、プロトン化ＱＳ１８６１（ＱＳ１８６２）、Ｑｕｉｌ－Ａのいずれか１つ以上である。かかるサポニンは、表Ａ１及びスキームＩにおいてさらに例示される。本発明者は、サポニン、例えばＱＳ－２１、ＳＡ１６４１、ＳＯ１８６１、Ｑｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分を骨格、例えばデンドロン又は三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーに共有結合的にカップリングすることが、共有結合的にカップリングされたサポニンの影響下において、毒素によって発揮される改善された細胞毒性をもたらすということをここで実証する。骨格は、さらに、共有結合されたエフェクター分子（単数又は複数）、例えば、ジアンチン若しくはサポリンなどのタ

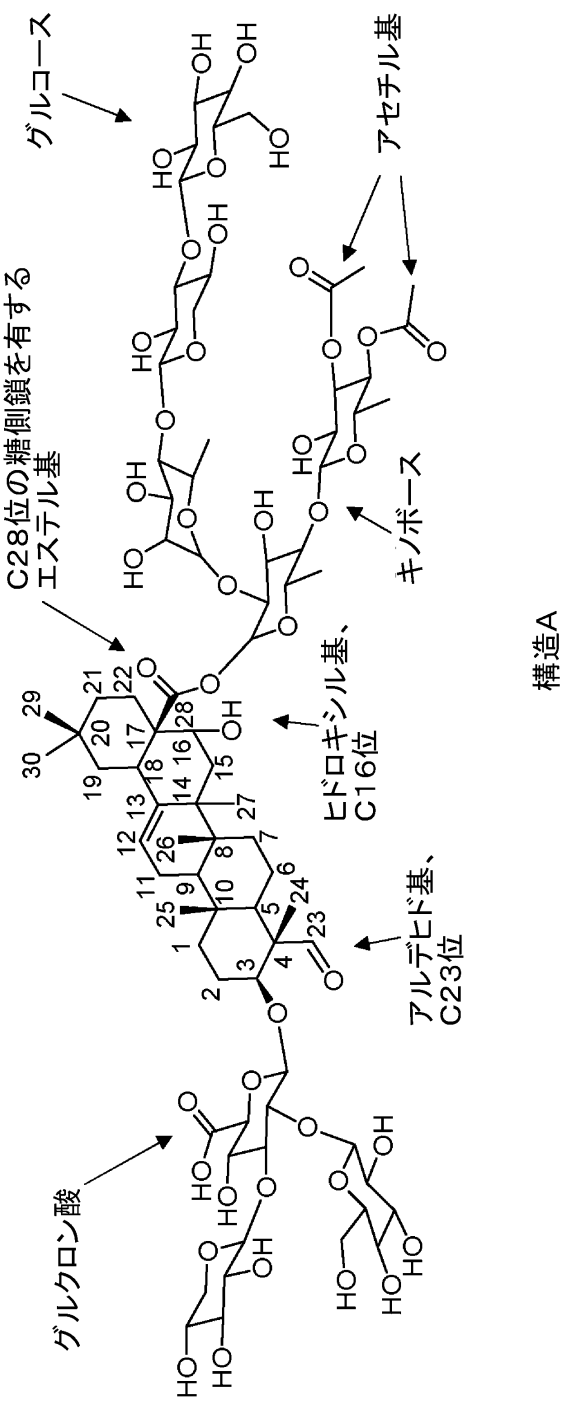
ンパク質性毒素及び／又は（腫瘍）細胞表面受容体に結合するためのモノクローナル抗体などの（腫瘍）細胞表面分子標的化リガンド若しくは部分を含む。

【００８２】

ある実施形態は本発明の骨格であり、生物活性分子として、スキームＩの構造Ａのサポニンの指示されている構造的特徴の１つ若しくはいくつか若しくは全てを含むサポニン、及び／又はスキームＩのさらなるサポニンのいずれか１つ以上から選択されるサポニンを含む：

【００８３】

【化１】

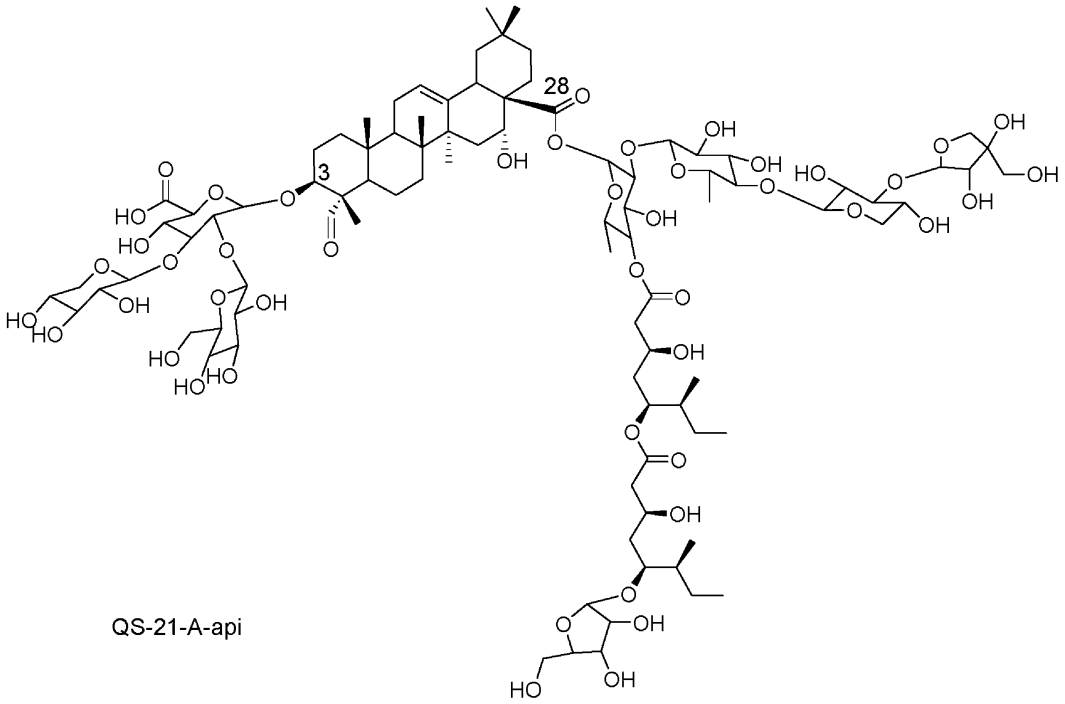



構造A

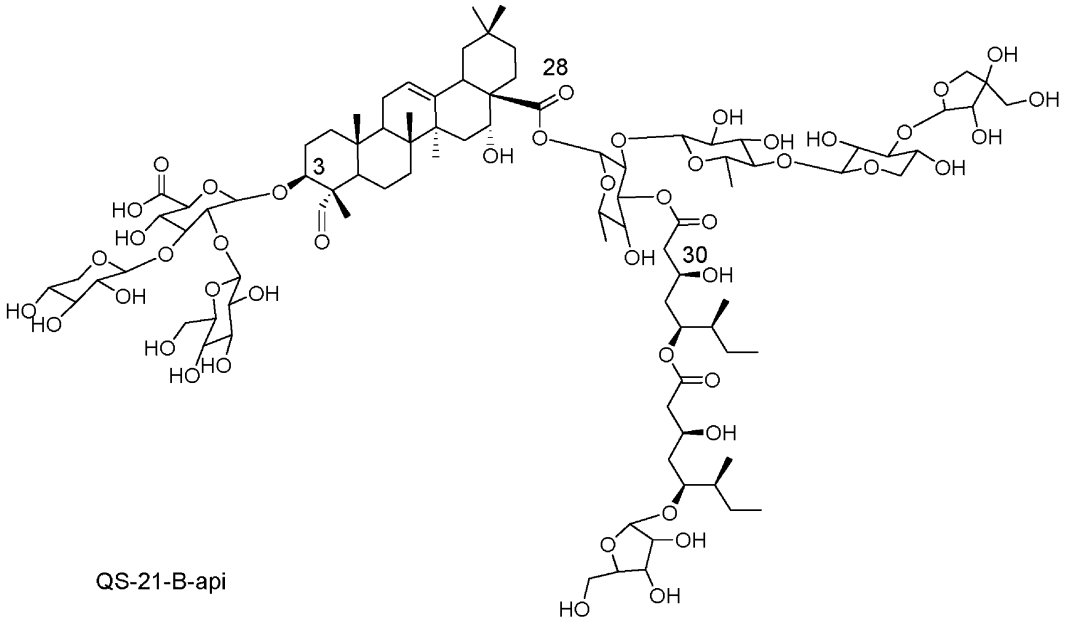
【００８４】

【化２】

スキームＩ（続き）




QS-21-A-api

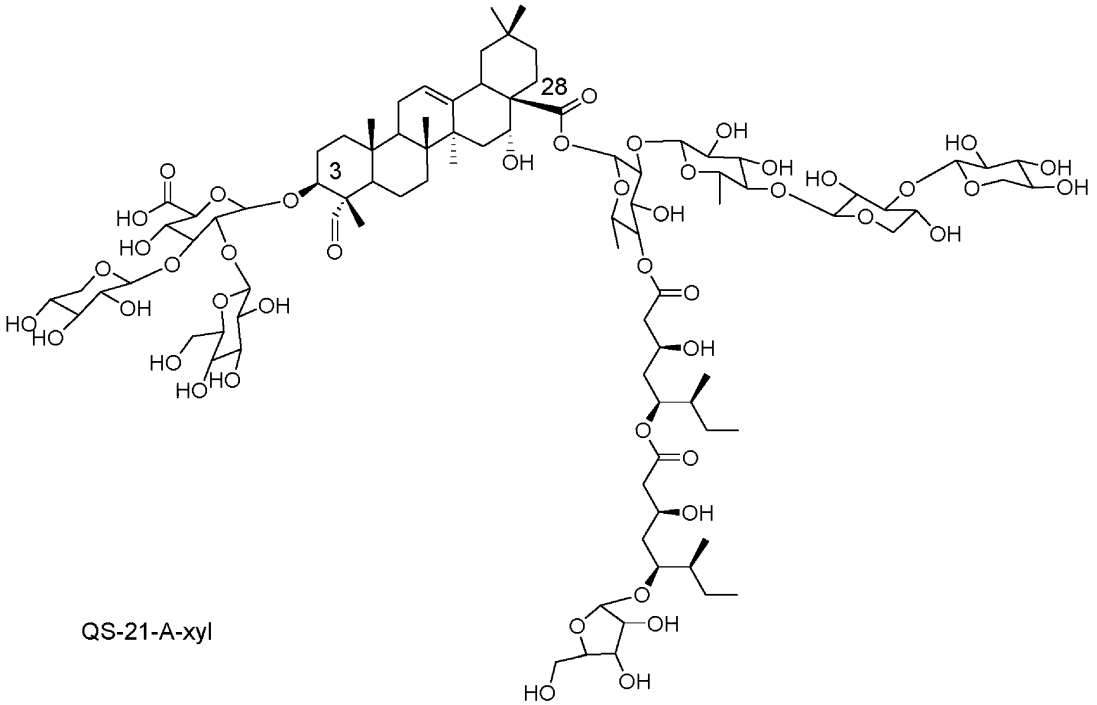



QS-21-B-api

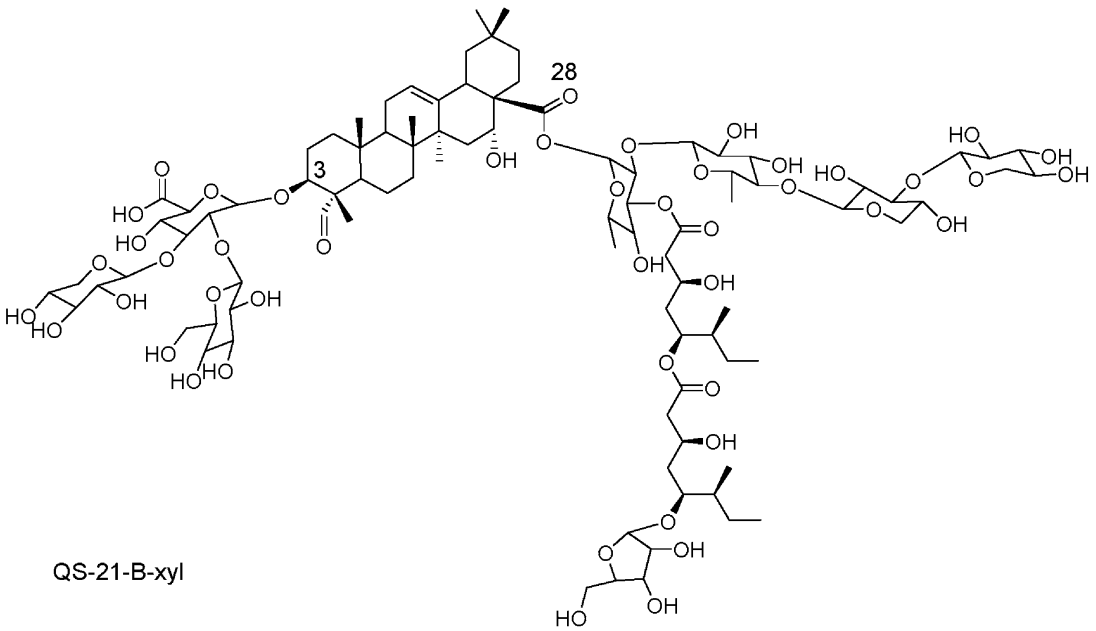
【００８５】

【化３】

スキームＩ（続き）




QS-21-A-xyl

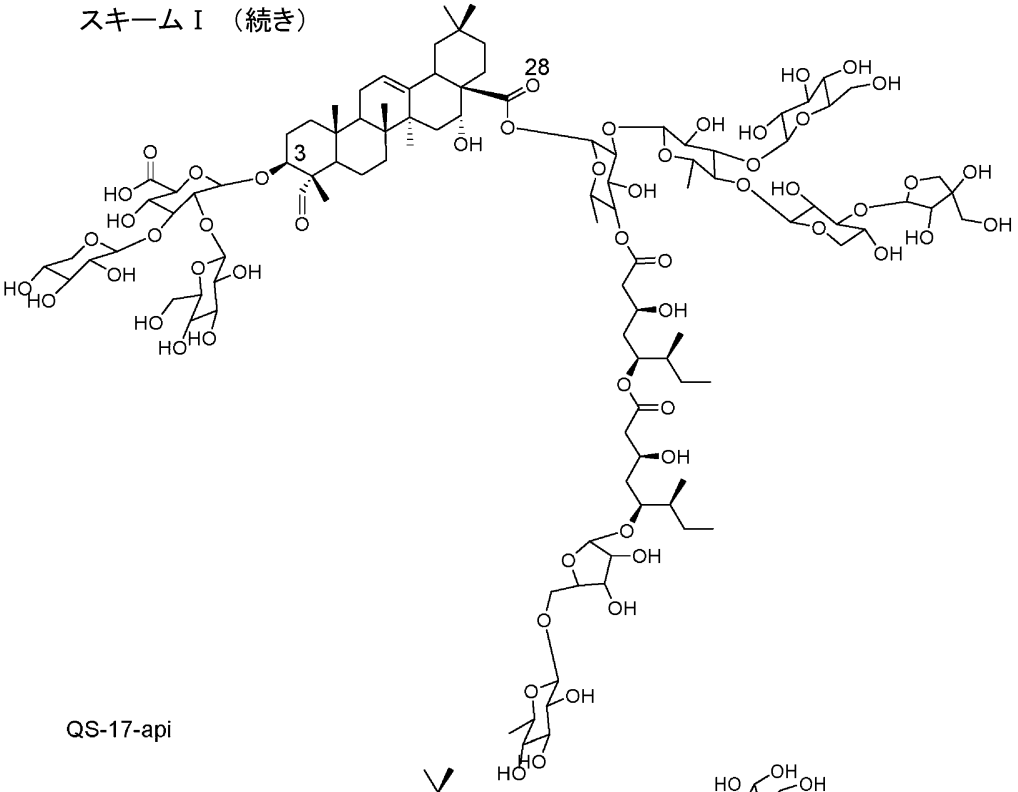



QS-21-B-xyl

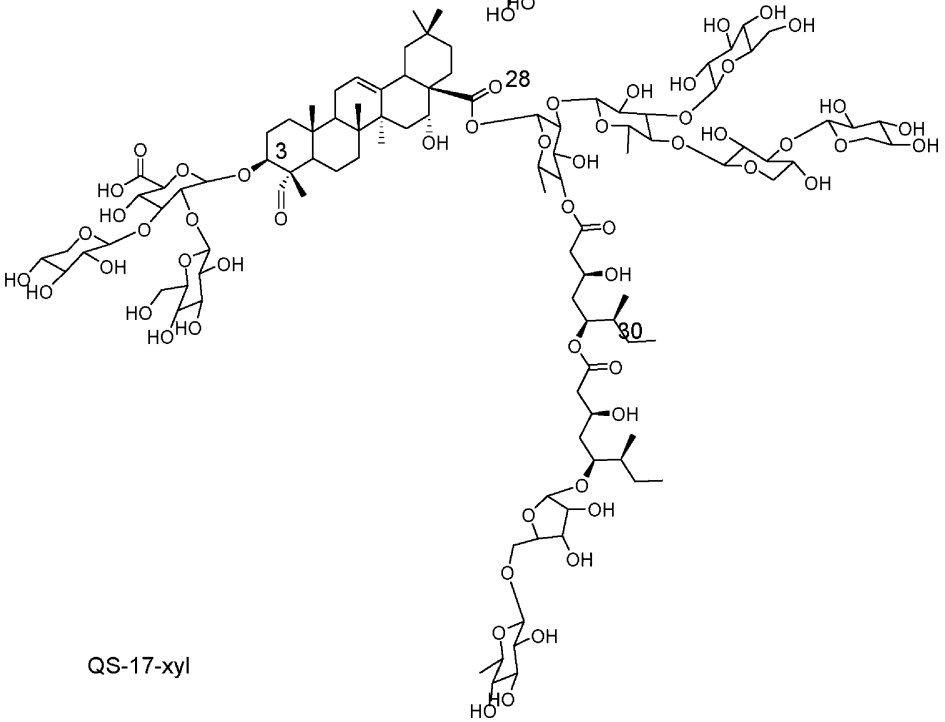
【００８６】

【化４】

スキームＩ（続き）



QS-17-api

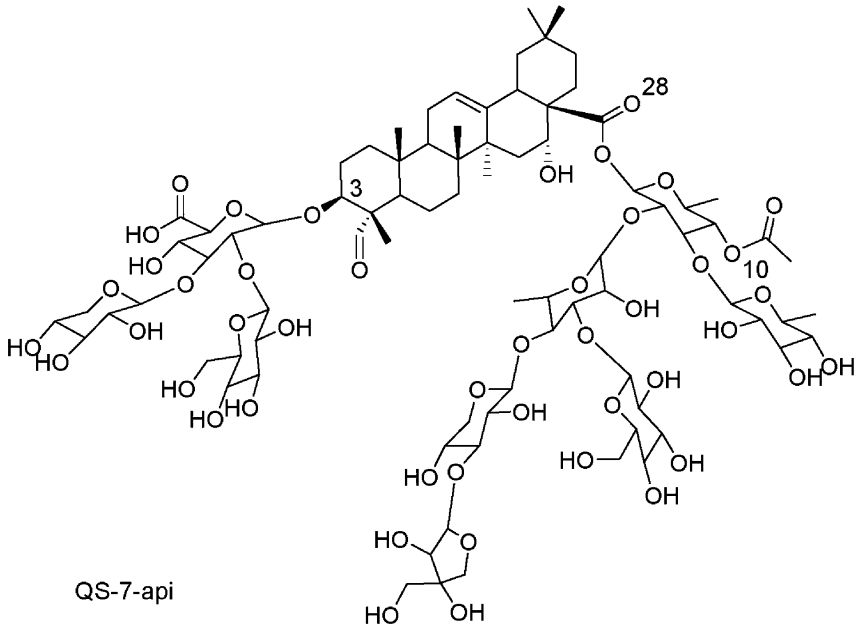


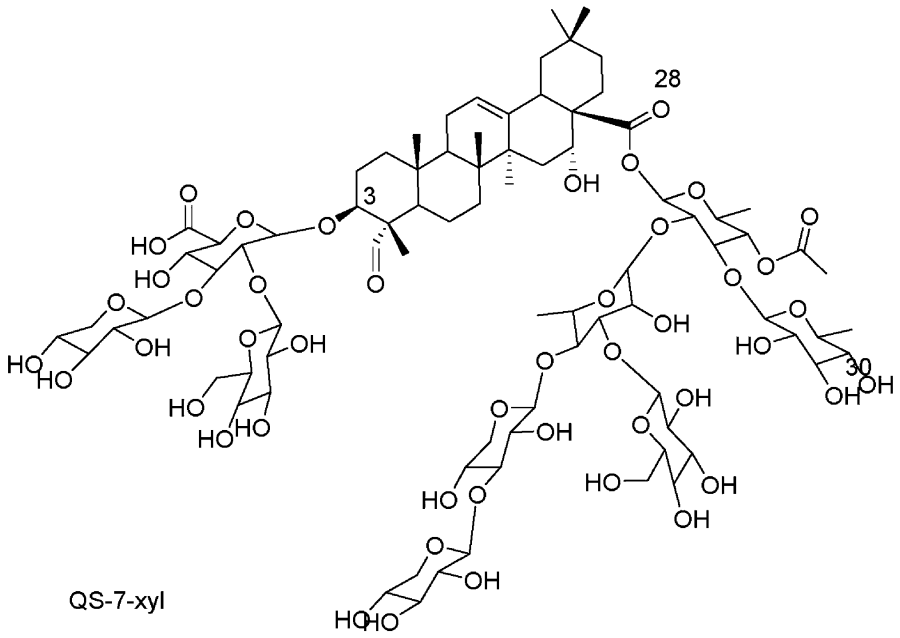
QS-17-xyl

【００８７】

【化５】

スキームＩ（続き）




【００８８】

発明に従うと、担体分子としての本発明の骨格に結合されたエフェクター分子のエンドソーム脱出を向上する目的のための「理想的な」構造を有する生物活性分子は、スキームＩの構造Ａに従うビスデスモシド型サポニンであり、少なくとも１．５００ダルトンの分子質量を有し、Ｃ－２３位にアルデヒド基と任意にＣ－１６位にヒドロキシル基とを含有するオレアナン型トリテルペンを含み、Ｃ－３位に第１の分岐炭水化物側鎖を有し、この第１の分岐炭水化物側鎖は任意にグルクロン酸を含有する。サポニンは、Ｃ－２８位に第２の分岐炭水化物側鎖を有するエステル基を含有し、この第２の分岐炭水化物鎖は好ましくは少なくとも４つの炭水化物単位を含有し、任意に少なくとも１つのアセチル残基、例

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

【００８９】

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

【００９０】

本発明をより詳細に説明するために、物質の細胞取り込みのプロセス（本発明者はいずれかの理論によって拘束されようとしないが）及び本発明に用いられる術語が記載される。小胞出芽による細胞内への細胞外物質の取り込みは、エンドサイトーシスと呼ばれる。前記の小胞出芽は、（１）細胞質基質タンパク質クラスリンにより媒介される受容体依存的なリガンド取り込み、（２）コレステロール結合タンパク質カベオリンにより媒介される脂質ラフト取り込み、（３）非特異的流体取り込み（飲作用）、又は（４）非特異的粒子取り込み（食作用）を特徴とし得る。エンドサイトーシスの全ての型は、エンドサイトーシス経路と呼ばれる小胞輸送及び物質選別の次の細胞プロセスに突入する。エンドサイトーシス経路は複雑であり、完全には理解されていない。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、オルガネラはデノボ形成され得、エンドサイトーシス経路に沿って次のオルガネラへと成熟し得る。しかしながら、ここで、エンドサイトーシス経路には、小胞の通行によって接続される安定な区画が関わるという仮説が立てられている。区画は、細胞に必須の機能の特定のセットに特化している複雑な多機能膜オルガネラである。小胞は一過性のオルガネラであると考えられ、組成がより単純であり、既存の区画からの出芽によってデノボ形成される膜で囲まれた容器として定められる。区画とは対照的に、小胞は成熟を経過し得、これは生理的に不可逆的な一連の生化学的変化である。初期エンドソーム及び後期エンドソームは、エンドサイトーシス経路における安定な区画に相当し、一次エンドサイトーシス小胞、ファゴソーム、多胞体（エンドソームキャリア小胞ともまた呼ばれる）、分泌顆粒、及びさらにリソソームは小胞に相当する。細胞膜において、最も顕著にはクラスリン被覆ピットから生起するエンドサイトーシス小胞は、まず、およそｐＨ６．５の主要な選別区画である初期エンドソームと融合する。内在化されたカーゴ及び膜の大部分は、リサイクル小胞（リサイクル経路）を介して原形質膜へとリサイク

ルされる。分解されるべきコンポーネントは、多胞体を介して酸性の後期エンドソーム（６よりも低いｐＨ）に輸送される。リソソームは成熟リソソーム酵素を貯蔵し得る小胞であり、必要とされるときに後期エンドソーム区画にそれらを送達する。もたらされたオルガネラは、ハイブリッドオルガネラ又はエンドリソソームと呼ばれる。リソソームは、リソソーム再形成と言われるプロセスによってハイブリッドオルガネラから出芽する。後期エンドソーム、リソソーム、及びハイブリッドオルガネラは、極度に動的なオルガネラであり、それらの間の区別はしばしば困難である。エンドサイトーシスされた分子の分解が、エンドリソソーム又はリソソーム内で生じる。エンドソーム脱出は、エンドサイトーシス経路からの、好ましくはクラスリン介在性エンドサイトーシス又は細胞質基質へのリサイクル経路からの、いずれかの種類の区画又は小胞の内腔からの物質の能動的又は受動的放出である。それゆえに、エンドソーム脱出は、それらの中間体及びハイブリッドオルガネラを包含するエンドソーム、エンドリソソーム、又はリソソームからの放出を包含するが、これらに限定されない。別様に具体的に指示されない限り、かつ特にグリコシド分子のエンドソーム脱出メカニズムに関するときには、言葉「エンドソーム」又は「エンドソーム脱出」が本明細書において用いられるときはいつでも、それは、それぞれエンドリソソーム及びリソソーム並びにエンドリソソーム及びリソソームからの脱出を包含する。細胞質基質に入った後に、前記物質は、核などの他の細胞単位に移動し得る。正式な用語では、グリコシドは、糖基がグリコシド結合によってそのアノマー炭素を介して別の基に結合されているいずれかの分子である。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、本発明の文脈におけるグリコシド分子は、特にエフェクター分子のエンドソーム脱出を容易化することによってエフェクター分子の効果をさらに向上することができるような分子である。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、グリコシド分子は、エンドサイトーシス経路及びリサイクル経路の区画及び小胞の膜と相互作用し、それらを前記エフェクター分子について漏れ易くし、増加したエンドソーム脱出をもたらす。用語「骨格はエフェクター分子のエンドソーム脱出を増加させることができる」は、両方の分子がエンドソーム、例えば後期エンドソーム内にあるときに、任意にかつ好ましくは、例えば少なくとも１つのグリコシドとポリマー又はオリゴマー構造との間の切断可能な結合の切断によって、少なくとも１つのグリコシドがポリマー又はオリゴマー構造から放出された後に、骨格のポリマー又はオリゴマー構造にカップリングされる少なくとも１つのグリコシド分子が、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ということを意味される。少なくとも１つのグリコシドと骨格との間の結合は「安定な結合」であり得るとしても、それは、かかる結合が例えば酵素によってエンドソームにおいて切断され得ないということを意味しない。例えば、グリコシドは、リンカー又はポリマー構造の一部と一緒になって、残りのポリマー構造から切断され得る。例えば、プロテアーゼがタンパク質性ポリマー構造、例えばアルブミンを切り、それによって少なくとも１つのグリコシドを放出するということがあり得る。しかしながら、グリコシド分子は、活性な形態で、好ましくはそれが骨格にカップリングされる（ように調製される）前にそれが有した元の形態で放出されるということが好ましい；それゆえに、グリコシドはかかる切断後にその天然の構造を有するか、又はグリコシドはかかる切断後にそれに結合された化学基若しくはリンカー（の一部）を有するが、グリコシドの生物活性、例えば同じエンドソーム又はリソソームに存在するエフェクター分子に対するエンドソーム／リソソーム脱出向上活性は、グリコシドと担体分子との間の結合、例えば本発明の骨格の前記切断によって維持又は復元される。本発明について、用語「安定な」は、サポニン、ポリマー又はオリゴマー構造（骨格の）、リガンド、（モノクローナル）免疫グロブリン又はその結合ドメイン若しくはフラグメント、及び／或いはエフェクター（エフェクター部分、エフェクター分子）の間の結合について、結合が容易くは壊されないか、或いは、少なくとも、例えばｐＨ差、塩濃度、又はＵＶ光によって容易く壊されるようには設計されていないということを意味される。本発明について、用語「切断可能な」は、サポニン、本発明の骨格のポリマー若しくはオリゴマー構造、リガンド、抗体、及び／又はエフェクターの間の結合について、結合が、例えばｐＨ差、塩濃度、還元的条件下、及び同類によって容易く

壊されるように設計されるということを意味する。当業者は、かかる切断可能な結合と、いかにそれらを調製するかを熟知している。

【００９１】

本発明の文脈において、エフェクター分子又はエフェクター部分は、細胞内のエフェクター分子標的との相互作用によって細胞の代謝に影響するいずれかの物質であり、このエフェクター分子標的は細胞内のいずれかの分子又は構造であり、エンドサイトーシス及びリサイクル経路の区画及び小胞の内腔を排除するが、これらの区画及び小胞の膜を包含する。それゆえに、細胞内の前記構造は、核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体、ゴルジ体、他の輸送小胞、原形質膜の内部、及び細胞質基質を包含する。本発明の文脈におけるエフェクター分子の細胞質基質送達は、好ましくは、エフェクター分子がエンドソーム（及び／又はリソソーム）を脱出することができ（これは、先に定められた通り、エンドリソソーム及びリソソームを脱出することをもまた包含する）、好ましくは、本明細書に記載されるエフェクター分子標的に達することができるということを意味する。本発明は分子の新たな型であり、エフェクター分子及び少なくとも１つのグリコシド分子両方を予め定められた比で同時にエンドソーム中に持ち込むための用をなす骨格と言われる。本発明の文脈において、骨格のポリマー又はオリゴマー構造は、構造的に秩序だった形成、例えばポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロニ化ポリマー、若しくはデンドロン化オリゴマーであるか、又はそれは、集合体化したポリマー構造、例えばヒドロゲル、ミクロゲル、ナノゲル、安定化したポリマーミセル、若しくはリポソームであるが、コレステロール／リン脂質混合物などのモノマーの非共有結合的な集合体からなる構造は排除する。用語「ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン化ポリマー、又はデンドロン化オリゴマー」は、それらの通常の意味を有する。具体的には、ポリマーは、一緒に結合された多数の等しい又は類似の単位から主に又は完全に組み上げられた分子構造を有する物質であり、オリゴマーは、その分子が比較的少数の繰り返し単位からなるポリマーである。それぞれポリマー及びオリゴマーの上の定義において用いられた「多くの」及び「少数の」について、１つの特定のカットオフのコンセンサスはない。しかしながら、骨格はポリマー若しくはオリゴマー構造又は両方を含み得るので、一緒に結合される類似の単位の数の完全な範囲、すなわち２つのモノマー単位から１００個のモノマー単位、１０００個のモノマー単位、及びより多くが、かかる構造に適用される。例えば、５つ以下を含む構造はオリゴマー構造と呼ばれ得、５０個のモノマー単位を含む構造はポリマー構造と呼ばれ得る。１０個のモノマー単位の構造はオリゴマー又はポリマーどちらかで呼ばれ得る。本明細書で定められる骨格はさらに少なくとも１つのグリコシド分子を含む。骨格は、好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造、例えばポリ又はオリゴ（アミン）、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、並びに生体適合性構造、例えばポリエチレングリコール、ポリ又はオリゴ（エステル）、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、及びポリ（デキストリン）、多又はオリゴ糖、例えばシクロデキストリン又はポリデキストロース、及びポリ又はオリゴアミノ酸、例えばポリリジン又はペプチド又はタンパク質、或いはＤＮＡオリゴ又はポリマーを包含する。本明細書で定められる集合体化したポリマー構造は、少なくとも１つの骨格、及び任意に他の個々のポリマー又はオリゴマー構造を含む。前記集合体の他の個々のポリマー又はオリゴマー構造は、（ａ）骨格（例えば、少なくとも１つのグリコシド分子を含む）、（ｂ）機能化された骨格（例えば、少なくとも１つのグリコシド分子、及びリガンド、抗体など、並びに／又はエフェクター分子を含む）、（ｃ）少なくとも１つのリガンド、抗体など、及び／又は少なくとも１つのエフェクターを含むポリマー又はオリゴマー構造、或いは（ｄ）グリコシド分子なしの、リガンド、抗体などなしの、及びエフェクター分子なしのポリマー又はオリゴマー構造であり得る。機能化された集合体化したポリマー構造は、（ａ）少なくとも１つの機能化された骨格或いは（ｂ）少なくとも１つの骨格及び少なくとも１つのリガンド、抗体など、並びに／又は少なくとも１つのエフェクターを含む少なくとも１つのポリマー構造を含有する、集合体化したポリマー構造である。上で言及された分子のいずれかを含まない（すなわち、グリコシド、リガンド、抗体、又はエ

フェクターなし）集合体化したポリマー構造上のポリマー又はオリゴマー構造は、特に、集合体化した構造の構造コンポーネントとして追加される。これは、集合体化した構造を組み上げること又は安定化することを助ける（「糊様」）。本発明者は、特に、グリコシド分子へのカップリング後に多くの第１級、第２級、及び／又は第３級アミン基を有するポリマー構造を含む骨格が、エンドソーム脱出を特に向上させないということを見出した。これについて、第２級アミン基を含むポリマー及びオリゴマー構造は特に好ましくない。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、酸性環境はグリコシドとエフェクターとの間の相乗的な作用にとっての前提条件であるように見え、かかるアミン基は、後期エンドソームの酸性環境を乱すということが信じられる。よって、例えばアミン基の存在ゆえに酸性環境を乱すことができる骨格は、好ましくは、本発明に従う骨格によって包摂されない。しかしながら、当然のことながら、第１級アミン基は、例えばチオール化又はＰＥＧ化によってブロック又は遮蔽され得る。この方法は当業者に公知である第１級アミン基の適当なブロック又は遮蔽の後に、かかる骨格は請求項によって包摂される。

【００９２】

特に好ましい実施形態において、本発明は、エフェクター分子のエンドソーム（及びリソソーム）脱出を実質的に阻害しない骨格を提供し、好ましくは、１０未満、より好ましくは５未満、より好ましくは２つ未満の第１級、第２級、又は第３級アミン基を含み、最も好ましくは含まない。明瞭性のために、例えばチオール化又はＰＥＧ化によりブロックされる第１級アミン基は、もはやアミン基とは呼ばれないということが強調される。

【００９３】

骨格が酸性環境を乱すこと及び少なくとも１つのグリコシドのエンドソーム脱出機能を阻害することができるか否かは、例４に記載される通りの及び当分野で公知の通りのアッセイによって容易に決定され得る。阻害は、「誘導される５０％殺細胞に必要なグリコシドの～倍の量の増大」として記載される。骨格は、少なくとも、クロロキンを正の対照として用いたときに観察される５０％殺細胞を得るために必要なグリコシド分子の増大である増大に至らないということが好ましい。代替的にはかつ好ましくは、骨格は、５０％殺細胞を誘導するためのグリコシド分子の少なくとも４倍の増大に至らず、より好ましくは少なくとも２倍の増大に至らない。～倍の増大は、本質的に例４に記載されているアッセイによって測定されるはずであり、正の対照としてのクロロキンは、５０％殺細胞を観察するためのグリコシド量の２倍の増大を誘導する。

【００９４】

用語「エフェクター分子の効果を改善又は向上させる」は、グリコシド分子が、そのエフェクター分子の機能的有効性（例えば、毒素又は薬物又はオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡの治療指数；バイオテクノロジープロセスにおける調節物質の代謝有効性；細胞培養研究実験における遺伝子のトランスフェクション有効性）を、好ましくはその標的係合を可能化又は改善することによって増大させるということを意味される。抗原特異的な免疫応答の加速、遷延、又は向上は、好ましくは包含されない。治療薬有効性は、好ましくはより低い投薬量による及び／又はより少ない副作用によるより強い治療効果を包含するが、これに限定されない。「エフェクター分子の効果を改善する」は、効果の欠如ゆえに用いられ得なかった（及び例えばエフェクター分子であることが公知ではなかった）エフェクター分子が、本発明との組み合わせで用いられるときには有効になるということをもまた意味し得る。有益又は所望でありかつエフェクター分子と骨格との組み合わせに帰せられ得る、本発明によって提供されるいずれかの他の効果は、「改善された効果」であると考えられる。ある実施形態では、骨格は、その効果が意図及び／又は望まれるエフェクター分子の効果を向上させる。タンパク質性骨格のケースでは、タンパク質性ポリマー構造そのものが、例えば血流中のコロイド浸透圧に対する効果を有し得る。かかる効果が、究極的な機能化された骨格の意図される又は所望の効果ではない場合には、骨格のタンパク質性構造は、本発明において定められるエフェクター分子ではない。又は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡに基づく骨格のケースでは、そのＤＮＡ又はＲＮＡの部分は例えば発現に干渉することによって（意図されない）機能を有し得る。かかる干渉が究極的な機能化さ

れた骨格の意図される又は所望の効果ではない場合には、骨格のＤＮＡ又はＲＮＡポリマー構造は、本発明において定められるエフェクター分子ではない。

【００９５】

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

【００９６】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子、好ましくはグリコシドは、非切断可能な結合を介して又は切断可能な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性条件、還元的条件、酵素的条件、又は光誘導性条件下において切断を受け、より好ましくは、切断可能な結合は、酸性条件下において切断を受けるヒドラゾン結合若しくはヒドラジド結合であり、及び／又はタンパク質分解、例えばカテプシンＢによるタンパク質分解に感受性の結合であり、及び／又は還元的条件下における切断に感受性の結合、例えばジスルフィド結合である。本発明に従うと、典型的には、生物活性分子は本発明のサポニンである（表Ａ１、スキームＩもまた見よ）。サポニンと同じ骨格に共有結合的にカップリングされたエフェクター分子の細胞内への進入及び細胞質基質内における蓄積が考えられるときに、サポニンの活性、例えば細胞内におけるエンドソーム脱出向上活性にとっては、サポニンが骨格に共有結合的にカップリングされ、ヒドラゾン結合及び／又はヒドラジド結合及び／又はジスルフィド結合が関わるときが、有益だと証明された。かかる結合の型は、哺乳類細胞、例えばヒト細胞の（後期）エンドソーム及びリソソーム内の酸性条件下において、及び／又は還元的条件下において容易く切断する。代替的には、本発明者は、細胞、例えば（後期）エンドソーム、リソソーム、細胞質基質内の生理条件下において容易く切断可能ではない結合を介した担体分子へのサポニンの共有結合的カップリングもまた、例えば核酸（例えば、ＢＮＡサイレンシングＨＳＰ２７）及びサポリンなどのタンパク質性毒素などのエフェクター部分の生物学的効果に対するサポニンの増強活性にとって有益であるということをもまた実証する。請求項を包含する本願においては、本発明のコンジュゲート、例えばヒドラゾン結合又はジスルフィド結合を介して骨格にカップリングされたサポニンを有する骨格が参照されるときに、用語「切断可能なリンカー」、「切断可能な結合」などは、例えば（後期）エンドソーム及び／又はリソソームにおけるかかる結合又はリンカーの切断の文脈において、「不安定なリンカー」（「Ｌ」）及び「不安定な結合」ともまた言われる。例えば、図１は、マウスの腫瘍におけるインビボのＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを示す。腫瘍を持つマウスを、オリゴマーの三官能性リンカーを含む本発明に従う骨格によって処置した（スキームＩＩ及び構造Ｂを参照）。サポニンＳＯ１８６１がヒドラゾン結合を介してそれに共有結合され、腫瘍細胞のＨＳＰ２７遺伝子をサイレンシングするためのアンチセンスＢＮＡがヒドラゾン結合を介して骨格に共有結合的にカップリングされ、モノクローナル抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブがジスルフィド結合を介して骨格に共有結合的にカップリングされた。ヒドラゾン結合及びジスルフィド結合は、切断可能な、それゆえに不安定な結合と言われる。つまり、いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、ひとたび本発明の骨格を含むコンジュゲートが例えばエンドサイトーシスによって内在化されると、ヒドラゾン結合及びジスルフィド結合は、細胞表面にＥＧＦＲを発現する標的腫瘍細胞の（後期）エンドソーム及び／又はリソソームにおいて切断される。エンドソーム及び／又はリソソームから細胞質基質へのＢＮＡの進入が考えられ

るときに、結合の切断は蓋然的にはサポニンのエンドソーム脱出向上活性に寄与するが、かかる切断は、三官能性リンカー、すなわち本発明の骨格を含むセツキシマブ（サポニン）（ＢＮＡ）コンジュゲートの遺伝子サイレンシング効果を観察することにとって不可欠事ではない。

【００９７】

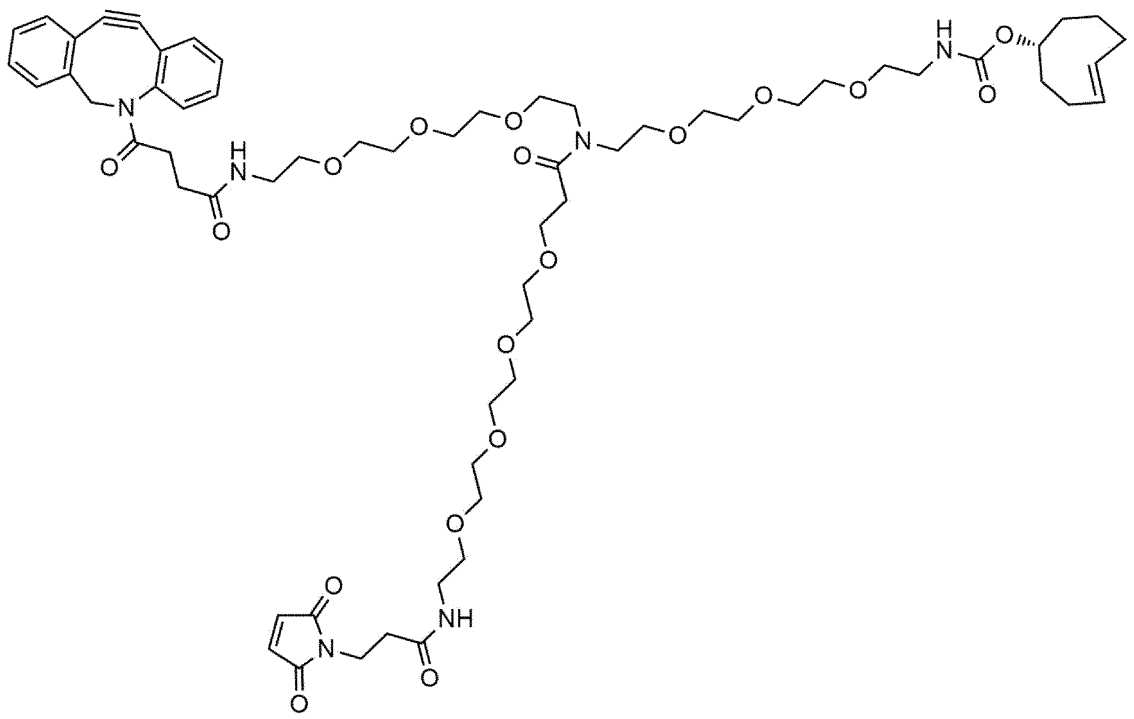
当業者は、かかる三官能性リンカーが、１つ、２つ、又は３つのサポニン部分を共有結合的にカップリングすることにとって好適な本発明の骨格であるということを了解するであろう。三官能性リンカーでは、１つ又は２つのサポニン部分の共有結合的カップリングが好ましい。第２及び／又は第３の結合部位は、例えば、ペイロードなどのエフェクター部分、例えばタンパク質毒素、低分子毒素、核酸を共有結合的にカップリングすることにとって好適である。三官能性リンカーの第２又は第３の結合部位は、例えば、腫瘍細胞若しくは自己免疫細胞などの細胞を標的化するための非タンパク質性リガンドの共有結合的カップリング及び／又はタンパク質性リガンドのカップリングにとってもまた好適である。典型的なタンパク質性リガンドは、細胞表面にＥＧＦＲを発現する（腫瘍）細胞を標的化するためのＥＧＦ、及び腫瘍細胞又は自己免疫細胞を標的化するためのサイトカインである。さらに、三官能性リンカーの第２又は第３の結合部位は、細胞表面分子、例えば腫瘍細胞表面分子、好ましくは、腫瘍細胞特異的分子、より好ましくは腫瘍細胞の表面に特異的に（過剰）発現される腫瘍細胞受容体に結合するための、モノクローナル抗体などの免疫グロブリンの共有結合的カップリングにとって好適である。類似に、免疫グロブリン、又は免疫グロブリンの結合特異性を包摂するそのいずれかのフラグメント（単数又は複数）及び／又はドメイン（単数又は複数）は、自己免疫細胞の表面に発現される受容体などの細胞表面分子への結合にとって好適である。それゆえに、ある実施形態では、三官能性リンカーは、共有結合されたサポニン、例えばＱＳ－２１，ＳＯ１８６１、共有結合されたエフェクター部分、例えば毒素又はオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡ、及び共有結合された細胞標的化部分、例えば腫瘍細胞、自己免疫細胞、有疾患細胞、異常細胞、非健康細胞、Ｂ細胞疾患への（特異的）結合のためのリガンド又は抗体を含むか、又はそれからなる。

【００９８】

ある実施形態は本発明の骨格であり、スキームＩＩに従う骨格コア構造としてオリゴマーの三官能性リンカーを含む：

【００９９】

【化６】



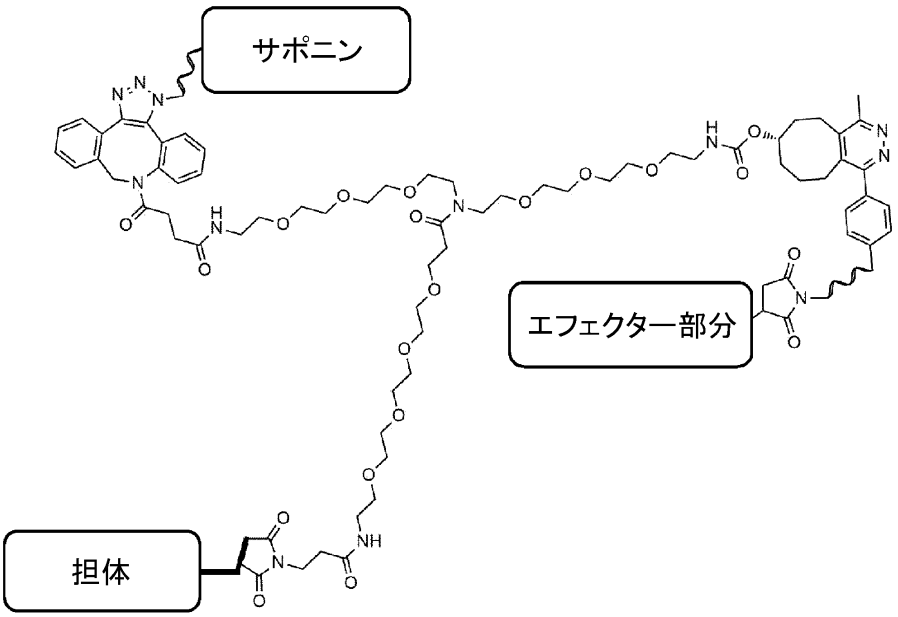
スキームⅡ

【０１００】

例として、サポニン及びここでは例としてエフェクター部分が、不安定な切断可能なヒドラゾンリンカー（酸感受性）を介して、及び／又はエフェクター部分が考えられるときには任意に担体分子上のシステインとのマレイミドを含む結合を介して、三官能性リンカー骨格に共有結合される。リンカー又は抗体などの担体分子への骨格の（任意の）結合は、不安定な切断可能なヒドラゾンリンカー（酸感受性）を介して、及び／又は担体分子上のシステイン、例えば１、２、３、又は４つのシステインとのマレイミドを含む結合を介して、確立される。それによって、構造Ｂを形成する：

【０１０１】

【化７】




構造B

【０１０２】

その結果、１～４個の骨格がモノクローナル抗体などの単一の担体分子に共有結合される。それゆえに、単一の担体分子、例えば抗体、リガンド、エフェクター部分が、単一の骨格、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーと、又は本発明に従う２つ以上の骨格と共有結合的にコンジュゲート化し得、２つ以上の骨格は同じか又は異なり、かつ２つ以上の骨格は同じ（数）か又は異なる（数の）共有結合されたサポニンを任意に含む。

【０１０３】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、切断可能な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造に共有結合され、前記切断可能な結合は、インビボにおいて、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において、好ましくはｐＨ４．０～６．５で、より好ましくはｐＨ≦５．５で、切断を受ける。かかる切断可能な結合は、骨格がかかる細胞内の酸性環境、例えば後期エンドソームにあるときに、１つ以上のサポニンなどの生物活性分子の放出を容易化する。いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、エンドソーム又はリソソーム内に存在するエフェクター部分のエンドソーム脱出が考えられるときに、エンドソーム及び／又はリソソーム内の遊離サポニンは、サポニンのエンドソーム脱出向上活性に寄与し得る。かかるエンドソーム脱出向上活性は、例えば骨格に結合されたサポニンの活性と比較して、より高いか又はより効率的である。本発明者は、ヒドラゾン結合、アミド結合、ジスルフィド結合などの結合を介して骨格及び担体分子に結合されたサポニンが、全て、（腫瘍）細胞内のエフェクター部分又は分子、例えばタンパク質性毒素及びアンチセンスＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドほども多様なペイロードの細胞毒性効果を改善することができるということを確立した。

【０１０４】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、イミン結合、ヒドラゾン結合、ヒドラジド結合、オキシム結合、１，３－ジオキソラン結合、ジスルフィド結合、チオ－エチル結合、アミド結合、ペプチド結合、又はエステル結合を介して、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造

に共有結合され、生物活性分子は、本発明の１つ以上のサポニンである。本発明者は、腫瘍細胞などの細胞が、共有結合的にカップリングされたサポニンを持つオリゴマー三官能性リンカー又はデンドロンなどの骨格とアンチセンスＢＮＡ又はサポリンなどのエフェクター部分と両方に暴露されるときに、かかる結合を用いた骨格への例えばサポニンの共有結合的カップリングが、エフェクター部分の効果及び活性の向上をもたらすということを実証した。

【０１０５】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つのサポニンの位置Ｃ－２３のアルデヒド官能基は、骨格のポリマー又はオリゴマー構造への共有結合に関わり、及び／或いは、存在する場合には、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基における炭水化物置換基上のグルクロン酸官能基は、骨格のポリマー又はオリゴマー構造への共有結合に関わり、直接的な結合を介するか又は少なくとも１つのリンカーを介するかどちらかである。

【０１０６】

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

【０１０７】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つのサポニンのＣ－３ベーター－ＯＨ基における炭水化物置換基上のグルクロン酸官能基は、リンカーの１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェートに共有結合的にカップリングされ、このリンカーは、アミド結合を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造中上のアミン基、例えばタンパク質性分子のリジン又はＮ末端のアミン基に共有結合的にカップリングされる。

【０１０８】

ある実施形態は本発明の骨格であり、グリコシド分子はサポニンであり、サポニンと骨格上のポリマー又はオリゴマー構造との間の連結部は、好ましくは、ｐＨ７．４で安定である酸に不安定な結合を介して起こり、好ましくはｐＨ６．５よりも下で、より好ましくはｐＨ６．５及び５．０の間でサポニンを放出する。これは、例えば、ポリマー又はオリゴマー構造のアミノ基及びサポニンのアルデヒド基により形成されるイミンを介して実現される。ｐＨ条件を充たす他の化学結合もまた、アルデヒドカップリングのために用いられ得る。例えば特定のヒドラゾン又はアセタールであり、それぞれポリマー又はオリゴマー構造の官能基としてヒドラジド及びヒドロキシル基を要求する。結合が切断可能な結合である場合に、サポニンは、好ましくは、サポニン中のカルボキシル基の１つを介して又はアルデヒド官能基を介して、より好ましくはアルデヒド官能基、好ましくは位置２３のアルデヒド官能基を介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に取り付けられる。代替的には、サポニンは、好ましくは、グリコシド分子のカルボン酸官能基を介して又はアルデヒド官能基を介してどちらかで、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に接合するリンカーを介して、骨格のポリマー又はオリゴマー構造に取り付けられる。

【０１０９】

ある実施形態は本発明の骨格であり、少なくとも１つのグリコシド分子は、安定な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造に結合される。より好ましい実施形態において、少なくとも１つのグリコシド分子はサポニンであり、サポニンと骨格のポリマー又はオリゴマー構造との間の安定な結合は、好ましくは、アミドカップリング又はアミン形成によって起こる。これは、例えば、ポリマー又はオリゴマー構造のアミノ基及びサポニンの活性化グルクロン酸基によるカルボジイミドにより媒介されるアミド結合形成を介して実現される。安定な結合の定義を充たす化学結合は、アルデヒドカップリングのためにもまた用いられ得る。例えば、特定のアミンが還元的アミノ化後に誘導され、ポリマー又はオリゴ

マー構造の官能基として第１級アミノ基を要求する。結合が安定な結合である場合には、サポニンは好ましくはサポニンのカルボキシル基の１つを介して骨格に取り付けられる。

【０１１０】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子への骨格の共有結合的カップリングのための化学基は、クリックケミストリー基である。

【０１１１】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、クリックケミストリー基は、テトラジン、アジド、アルケン、若しくはアルキン、又はこれらの基のいずれかの環状誘導体、好ましくはアジドである。

【０１１２】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、骨格は、さらに、エフェクター分子への及び／又はリガンド、抗体、結合ドメイン、若しくはそのフラグメントへのカップリングのためのクリックケミストリー基を含む。クリックケミストリー基はクリックケミストリーにとって好適な化学官能基である。これは、モジュラーであり、範囲が広く、非常に高い収量を与え、当たり障りがない副産物のみを生成し、異なる官能基に対する高い選択性及び高い忍容性を提供し、かつ立体特異的である反応として定められる。要求されるプロセス特徴は、単純な反応条件、容易く利用可能な出発材料及び試薬、無溶媒又は穏和である（例えば水）若しくは容易に除去される溶媒の使用、及び単純な産物単離を包含する。クリックケミストリー基は、好ましくは、テトラジン、アジド、アルケン、若しくはアルキン、又はそれらの反応性誘導体、例えばメチル－テトラジン若しくはマレイミド（アルケン）、より好ましくはアルキン、又はこれらの基の環状誘導体、例えばシクロオクチン（例えば、アザ－ジベンゾシクロオクチン、ジフルオロシクロオクチン、ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン、ジベンゾシクロオクチンである。）

【０１１３】

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

【０１１４】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、ポリマー又はオリゴマー構造のモノマーの数は、厳密に定められた数又は範囲である。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、ポリ（アミン）などの構造、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、又はポリエチレングリコール、ポリ（エステル）などの構造、例えばポリ（ラクチド）、ポリ

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

【０１１５】

好ましくは、デンドロンは分岐した明瞭に定められた樹状ポリマーであり、フォーカルポイントと呼ばれる樹の起点に単一の化学的に対処可能な基を有する。デンドリマーは、それらのフォーカルポイントにおける２つ以上のデンドロンの接続である。デンドロン化ポリマーは、ポリマーへの１つ以上のデンドロンのフォーカルポイントの接続である。好ましい実施形態においては、本発明に従う骨格が提供され、ポリマー又はオリゴマー構造は、直鎖、分岐、若しくは環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、又はこれらの構造の集合体を、純粋または混合どちらかで含む。集合体は、共有結合的な架橋又は非共有結合的な吸引力によって組み上げられ得、ナノゲル、ミクロゲル、又はヒドロゲルを形成し得る。好ましくは、ポリマーは、ポリ（アミン）の誘導体、例えばポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）、及びポリエチレングリコール、ポリ（エステル）などの構造、例えばポリ（ラクチド）、ポリ（ラクタム）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、及びポリ（デキストリン）、並びに天然及び／又は人工ポリアミノ酸などの構造、例えばポリリジン、又はペプチド若しくはタンパク質（例えばリガンド又は抗体、例えば表Ａ２～Ａ４のいずれかのモノクローナル抗体）、又はＤＮＡポリマー、安定化されたＲＮＡポリマー、又はＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーである。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は生体適合性である。

【０１１６】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、前記エフェクター分子は、原薬、例えば毒素、薬物、ポリペプチド、及び／又はポリヌクレオチドである。ある実施形態は本発明に従う骨格であり、エフェクター分子は、毒素、マイクロＲＮＡ、又はタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。典型的には、担体分子は、例えば腫瘍細胞又は自己免疫細胞又はＢ細胞疾患に関係する細胞へと骨格を標的化するためのタンパク質性分子を包摂する。好ましくは、担体分子は、免疫グロブリン、又はその少なくとも１つ以上の結合ドメイン及び／若しくはその結合フラグメントを含み、かかる免疫グロブリンは、好ましくは、表Ａ２～Ａ４のいずれかのモノクローナル抗体のいずれか、例えばセツキシマブ、ＯＫＴ－９、トラスツズマブから選択される。

【０１１７】

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

【０１１８】

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

【０１１９】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、骨格は三官能性リンカーであり、少なくとも１つの生物活性分子がそれに共有結合される第２の化学基を含み、分子への共有結合のための第３の化学基を含み、かつ担体への共有結合のための第１の化学基を含み、好ましくは、三官能性リンカーは、スキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーである。

【０１２０】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、少なくとも１つの生物活性分子は、定められた数のグリコシド分子又は定められた範囲のグリコシド分子、好ましくは１～１２８個の又は少なくとも２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、若しくは１２８個のグリコシド分子、又はその間のいずれかの数のグリコシド分子、例えば７、９、１２個のグリコシド分子である。

【０１２１】

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

【０１２２】

骨格は、根源的には、骨格に共有結合されるエフェクター分子の型に非依存的である。それゆえに、骨格は、新たなプラットフォームテクノロジーのための基礎の産物である。少なくとも１つの共有結合されたグリコシドは細胞内送達を媒介するので、本発明に従う骨格テクノロジーは、グリコシドによるコントロールされた細胞内エフェクター分子送達を媒介する初めての公知のシステムである。

【０１２３】

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

のインビボの動物腫瘍モデルにおける有益な抗腫瘍活性が、本発明に従う骨格を含む本発明に従うコンジュゲートによって動物を処置することによって達成され得るということを確立した。骨格は例えばデンドロンであり、切断可能なリンカーを介して４つまでの共有結合されたサポニン分子、例えばＳＯ１８６１を有する。骨格は例えば三官能性リンカーであり、切断可能な又は非切断可能な連結部を介して共有結合されたサポニン（例えば、ＳＯ１８６１、ＱＳ－２１）を有し、非切断可能な又は切断可能な連結部を介して共有結合されたエフェクター部分（例えば、ジアンチン、サイレンシングＢＮＡ（ＨＳＰ２７））を有し、かつ共有結合されたモノクローナル抗体、例えばセツキシマブ、トラスツズマブ、ＯＫＴ－９を有する。或いは、骨格はデンドロン、例えば、４つのサポニン分子などの４つの部分が結合し得るデンドロン、又は例えば２つのサポニン及び２つのエフェクター分子を結合するためのデンドロンであり、デンドロンは、リガンド又は抗体又はそのフラグメント又はドメインへの（共有結合的）カップリングのための化学基を含む。本発明に従うこれらの骨格の種々のものを例示する実施例のセクションの参照がなされ、例えば、タンパク質性毒素によって発揮される細胞毒性が考えられるときに又は腫瘍細胞における遺伝子サイレンシングが考えられるときに、インビボ及び／又はインビトロの抗腫瘍細胞活性を示す。

【０１２４】

本発明の骨格は、好ましくは共有結合を介して、かつ意図される目的のために所望のときには切断可能な共有結合を介して、単一の定められた位置において、エフェクター分子に及び／又はリガンド、抗体などに連結され得る、最適化されたかつ機能的に活性な単位を提供する。

【０１２５】

いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、遊離サポニンと一緒のＡＤＣによる腫瘍を持つ動物の処置が考えられるときに観察される失敗から判断して、標的細胞、例えば腫瘍細胞又は自己免疫細胞のエンドサイトーシス経路の区画又は小胞において、少なくとも１つのグリコシド、好ましくはサポニンと、エフェクター分子、好ましくは毒素又はＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドと両方の存在を同期することが好ましい。ＡＤＣ及び遊離サポニンでは、インビボの相乗効果を得るために後期エンドソームにおける分子の存在を同期することは、本発明者の多数の試みに従うと有益には得られ得なかった。１つの態様において、本発明は、好ましくは、本発明の骨格を含む１つの化合物としてエフェクター分子及びグリコシド分子を組み合わせることについて、次の問題の少なくとも１つを解決する：（１）エフェクター分子当たりの要求されるグリコシド分子の数は、定められた数又は範囲であり（例えば、好ましくは１以上、より好ましくは少なくとも２、より好ましくは少なくとも３、少なくとも５、より好ましくは少なくとも６、より好ましくは少なくとも１０、より好ましくは少なくとも１５、少なくとも２０、より好ましくは少なくとも２５、より好ましくは少なくとも２７、最も好ましくは少なくとも３０、又はより多く）、その結果、単純な化学的連結部は適当ではなく；（２）例えば、（共有結合的な）特に単一のかつ切断可能な保持可能なカップリングに用いられ得るサポニン上の唯一の合理的な化学基が、エンドソーム脱出活性のために要求され；（３）エフェクター分子は、カップリングのための好適な対応基を所有せずにあり得；（４）グリコシドは、自由に拡散性ではないときに、コレステロールと相互作用するそれらの必要なポテンシャルを失い得る。最も蓋然的には、これらの全ての制限は、例えば表Ａ１及びスキームＩに挙げられるサポニンの著しいエンドソーム脱出向上効果は１０年よりも多くに渡って公知であるが、なぜグリコシドが、免疫増強アジュバント物質の使用を伴うワクチン接種レジメンにおけるサポニンの適用以外の臨床的検討において原薬との組み合わせで用いられていなかったかという理由である。本発明に従う骨格は少なくとも部分的にこれらの困難を解決する。驚くべきことに、アジュバントコンポーネントとしてのサポニンが関わるワクチン接種の文脈においてそれらの免疫増強活性について先に適用されたサポニンは、ここで、本発明の骨格への（共有結合的）カップリングにとって、サポニンを持ちかつさらにそれに（共有）結合されたエフェクター分子及び任意に細胞標的化部分、例えばリガンド又は

抗体を有する骨格を含むコンジュゲートへの関わりにとって、インビトロ及びインビボでの抗腫瘍活性にとってもまた好適である。

【０１２６】

その基本的な形態において、骨格は、少なくとも１つのグリコシド分子、例えば特定のサポニン、例えばＳＯ１８６１を持つポリマー及び／又はオリゴマー構造を含む（表Ａ１、図１３）。好ましい実施形態においては、骨格が提供され、グリコシド分子は、切断可能な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造に結合され、好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性の条件下において、より好ましくは酸性条件下において切断を受ける。好ましくは、切断可能な結合は、イミン、ヒドラゾン、オキシム、１，３－ジオキソラン、ジスルフィド、ヒドラジド、又はエステルである。

【０１２７】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、グリコシド分子は、ＳＡ１６４１、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＱＳ－２１、又はそれらの立体異性体のいずれか、例えばそれらのジアステレオマーのいずれかである。

【０１２８】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は、タンパク質性分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、脂肪、脂肪酸、ナノ粒子、炭水化物、又はこれらの組み合わせのいずれかの共有結合コンジュゲート若しくは共有結合複合体を含むか、又はそれからなる。

【０１２９】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は、免疫グロブリン、免疫グロブリンの少なくとも１つの結合ドメイン、及び／又は免疫グロブリンの少なくとも１つの結合フラグメント、例えば抗体、ＩｇＧ、Ｖｈｈドメイン若しくはＶｈドメインを含むか若しくはそれからなる分子、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｃａｂフラグメントを含むか、又はそれからなり、或いは、ＥＧＦ又はサイトカインなどの細胞表面分子に結合するための少なくとも１つの非タンパク質性リガンド及び／又は少なくとも１つのタンパク質性リガンドを含むか、又はそれからなる。

【０１３０】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は、ＣＤ７１、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）、ＣＤ５２、ＣＥＡ、ＣＤ４４ｖ６、ＦＡＰ、ＥＧＦ－ＩＲ、インテグリン、シンデカン－１、血管インテグリンアルファ－Ｖベーター－３、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、葉酸受容体１、ＣＤ１４６、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ１３８、ＣＤ２７Ｌ受容体、ＰＳＭＡ、ＣａｎＡｇ、インテグリン－アルファＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソテリン、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３、ＣＤ３０、ＣＤ２３９、ＣＤ７０、ＣＤ１２３、ＣＤ３５２、ＤＬＬ３、ＣＤ２５、エフリンＡ４、ＭＵＣ１、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、ＣＥＡＣＡＭ６、ＨＥＲ３、ＣＤ７４、ＰＴＫ７、Ｎｏｔｃｈ３、ＦＧＦ２、Ｃ４．４Ａ、ＦＬＴ３、ＣＤ３８、ＦＧＦＲ３、ＣＤ７、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ４、ＣＤ５２、ＰＤＧＦＲＡ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２から選択され、好ましくはＣＤ７１、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２から選択される、腫瘍細胞特異的な細胞表面受容体などの細胞表面受容体に結合するための少なくとも１つの結合ドメイン及び／又は少なくとも１つの結合フラグメントを含むか、又はそれからなる。

【０１３１】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は、セツキシマブ、ダラツムマブ、ゲムツズマブ、トラスツズマブ、パニツムマブ、ブレンツキシマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、ポラツズマブ、オビヌツズマブ、ＩｇＧ型のＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ハーセプチン、アレムツズマブ、ピナツズマブ、ＯＫＴ－１０抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、表Ａ２又は表Ａ３又は表Ａ４の抗体、好ましくはセツキシマブ又はトラスツズマブ又はＯＫＴ－９、或いはその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合フラグメント又はその少なくとも１つの腫瘍細胞受容体結合ドメイン、例えばその少なくとも１つの腫瘍細胞特異的受容体結合フラグメン

ト及び／又はその少なくとも１つの腫瘍細胞特異的受容体結合ドメインのいずれか１つを含むか、或いはそれからなる。

【０１３２】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、骨格は、担体分子との共有結合を形成することにとって好適であり、前記共有結合には、好ましくは担体分子のシステイン側鎖及び／又は担体分子のリジン側鎖が関わり、このときに担体分子は少なくともシステイン及び／又はリジンを含む。

【０１３３】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は少なくとも１つのエフェクター分子を含むか若しくはそれからなり、又は担体はさらに少なくとも１つのエフェクター分子を含み、このときに本発明に従う免疫グロブリン、その結合フラグメント、結合ドメインなどなどをもまた含み、エフェクター分子は、原薬の少なくとも１つ、例えばペイロード、毒素、薬物、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ゼノ核酸、酵素、例えばウレアーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼ、タンパク質毒素、リボソーム不活性化タンパク質のいずれか１つ以上である。

【０１３４】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、タンパク質毒素は、表Ａ５から選択されるタンパク質毒素、及び／若しくはウイルス毒素、例えばアポプチン；細菌毒素、例えば志賀毒素、志賀毒素様毒素、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ外毒素（ＰＥ）、若しくはＰＥの外毒素Ａ、全長若しくは短縮型ジフテリア毒素（（ＤＴ）、コレラ毒素；真菌毒素、例えば、アルファ－サルシン；リボソーム不活性化タンパク質、及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖を包含する植物毒素、例えばジアンチン、例えばジアンチン－３０又はジアンチン－３２、サポリン、例えばサポリン－Ｓ３又はサポリン－Ｓ６、ブーガニン若しく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タンパク質、リシン、リシンＡ鎖、モデシン、モデシンＡ鎖、アブリン、アブリンＡ鎖、ボルケンシン、ボルケンシンＡ鎖、ビスクミン、ビスクミンＡ鎖；又は動物若しくはヒト毒素、例えばカエルＲＮａｓｅ、若しくはグランザイムＢ、若しくはヒトからのアンギオゲニン、或いはそのいずれかのフラグメント又は誘導体のいずれか１つ以上を含むか、或いはそれからなり；好ましくは、タンパク質毒素はジアンチン及び／或いはサポリンである。

【０１３５】

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

【０１３６】

ここで、本発明の骨格によって、１コンポーネントの非ウイルス的な臨床的に適用可能な遺伝子送達テクノロジーを設計及び製造することが可能になった。例えば、本発明の骨格は、ウイルスに基づかない遺伝子送達テクノロジーの開発を許し、これは、より低い治療ドーズによる治療有効性を向上させ、それによって患者の健康を改善する。特に、本発明の骨格は、（腫瘍、自己免疫）細胞表面特異的分子に結合するためのモノクローナル抗体などの担体分子に共有結合されるときに、及び担体分子、例えばオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡに結合されるときに、遺伝子送達の分野における長年のかつ主要なボトルネ

ックを克服すること、すなわち、エンドソーム膜を抜けて細胞質基質／ヌクレオゾルへの遺伝子治療薬製品の効率的、安全、かつ費用効果的な移転を許す。実際、遺伝子治療は、幅広い範囲の疾患における将来の先進治療のための最も有望な処置オプションの１つである。首尾良い遺伝子送達は、標的細胞の認識、並びに遺伝子の細胞質基質及びヌクレオゾル取り込みを要求する。非ウイルス遺伝子治療の分野における主要な問題の１つは、患者への治療薬使用のための遺伝物質の非効率的かつ不十分に安全な送達である。

【０１３７】

それゆえに、細胞を標的化する担体分子、例えばリガンド又は好ましくは抗体（そのフラグメント、ドメイン）を含みかつアンチセンスＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドを含む本発明の骨格を適用するときに、本発明者は、ここで、遺伝子送達の分野における長年のかつ主要なボトルネックを克服することを可能にした：エンドソーム膜を抜けて細胞質基質／ヌクレオゾルへの遺伝子治療薬製品の安全な移転である。本発明の骨格は、全ての公知の遺伝子薬剤によるいずれかの対処可能な細胞型の標的化を許すために設計され、それによって、遺伝性疾患に限定されないが癌治療についてもまたより良好な患者治療を保証し、よって大きい患者群にとって重要なテクノロジーに相当する。本発明の骨格に基づくテクノロジーは、ポリマー又はオリゴマー骨格であり、これは、エンドソーム脱出向上因子（ＥＥＥ）、例えば表Ａ１及びスキームＩ並びに本発明に従う実施形態のいずれかのサポニンのための、標的化リガンド又は（モノクローナル）（腫瘍細胞特異的）抗体のための、及びエフェクター部分、ここではエフェクター遺伝子、例えばＬＮＡ又はＢＮＡのための担体としての用をなす。例えば、細胞標的化抗体（フラグメント）及びオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡを含む本発明の骨格の使用は、いずれかの種類の生物学的高分子を細胞質基質及び核に持ち込むポテンシャルを有する。新たな標的化リガンド及びモノクローナル（ヒト、ヒト化）抗体の開発が、世界的に多数の研究グループ及び企業によって継続的な検討中である。癌細胞などの疾患細胞の細胞質基質における送達を狙ったオリゴヌクレオチドについても同じである。それゆえに、本発明の骨格は、現在及び将来の標的化リガンド及び抗体並びに現在及び将来の治療薬オリゴヌクレオチド（並びにペイロード、例えばタンパク質毒素）を、クリックケミストリーによって本発明のオリゴマー又はポリマー骨格モジュールに連結するための分子インターフェースを提供し、カスタム化された薬物適用と、組織及び細胞標的化技術の分野における将来の開発とを許す。本発明の骨格は、共有結合的にカップリングされた担体分子として抗体及びリガンドと組み合わせられ得る。遺伝子治療薬の世界市場は急速に成長しており、広い範囲の疾患エリア、例えば癌、心血管疾患、パーキンソン、アルツハイマー、ＨＩＶ、及び多くの希少（単一遺伝子）疾患についての可能性としての処置をカバーしている。現行のウイルスベクターに基づく遺伝子治療テクノロジーは、安全性、製造物流、及び関連する高コストなどの有意な課題を有する。本発明の骨格は、現行のウイルス遺伝子送達テクノロジーの代替に相当するテクノロジープラットフォームへの使用を許す。よって、本発明の骨格は、癌、心血管疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、ＨＩＶ感染、及び多くの希少（単一遺伝子）疾患などの疾患についての非ウイルス的遺伝子処置を開発するためのアプローチへの実装にとって好適である。本発明の骨格は、例えば標的化されたアンチセンスＢＮＡに基づく非ウイルスベクターに基づく遺伝子治療薬を作ることによって、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）及びオリゴヌクレオチドに基づく治療薬の分野を変容させるための新規処置を開発することにとって好適である。本発明の骨格の適用は、特に抗体及びＢＮＡなどのオリゴヌクレオチドとの共有結合的なコンジュゲートとして、本発明を原因として可能にされた多くの有益なアプローチの１つである。例えば、ここで、本発明の骨格の使用は哺乳類細胞のエンドサイトーシス経路の活用を許す。エンドサイトーシスは治療薬の送達のために活用され、本発明の骨格は、例えば骨格とコンジュゲート化されるｓｉＲＮＡの改善された取り込み及びエンドソーム脱出に寄与する。本発明の骨格は、例えばペイロード、オリゴヌクレオチドの送達向上因子として作用する低分子と一緒に好適に用いられる。これによって、共有結合的にカップリングされたオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡを持ち、かつ共有結合的にカップリングされた細胞標的化部分、例えばリガンド及び好ましくは抗

体（ドメイン又はフラグメント）を持つ本発明の骨格は、２コンポーネントとしての適用に関し、それゆえに治療薬の認可及び臨床適用性を難しくする現行のエンドソーム脱出向上因子及び遺伝子治療薬製品で見られる現行の問題の解決を提供する。なぜなら、本発明のかかる骨格は、サポニン、ＢＮＡなどの遺伝子産物、及び（モノクローナル）抗体などの（腫瘍）細胞標的化部分を包摂する単一のコンジュゲートの治療薬分子であるからである。それゆえに、本発明は非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーを提供し、ここでは、エンドソーム脱出向上因子（例えば、表Ａ１、スキームＩ、本発明の実施形態のグリコシド）、遺伝子治療薬製品（本発明に従うオリゴヌクレオチド、例えばＢＮＡ）、及び標的化リガンド又は抗体（例えば、表Ａ２、Ａ３、Ａ４、本発明の実施形態に従う）が全て本発明の１つの分子骨格に結合される。それゆえに、本発明のかかる骨格は、幅広い範囲の疾患及び大きい患者群について、現行の及び将来の高分子薬物の治療機会を提供する。少なくとも１つのサポニン、少なくとも１つのオリゴヌクレオチド、及び少なくとも１つの特異的細胞標的化部分、例えば免疫グロブリンを含む本発明のかかる骨格の適用によって、エンドソーム脱出向上因子及び遺伝子治療薬製品を別々に適用する現行の方法について明らかである問題が対処される。これらの現行の方法は、両方の化合物が同時に相互作用部位に存在することを保証しない。ここで、この問題は本発明の骨格を用いることによって克服される。つまり、本発明のかかる骨格は、両方の化合物、すなわちサポニン及びＢＮＡなどの遺伝子産物の（時間的及び場所的な）増大した同期を有する非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーを提供する。

【０１３８】

遺伝子治療は、遺伝性の先には治癒不能な疾患、例えば嚢胞性線維症、コレア、ハンチントン病、又は血友病に役立ち得る。しかしながら、現行では、いくつかの問題が克服されていない：例えば、治療薬遺伝子は、体内の特定の標的細胞に精確に達しなければならない。他方で、治療薬遺伝子は標的細胞によって吸収されるべきであるが、治療薬遺伝子は破壊されるべきではない。現行の遺伝子治療アプローチはウイルスを遺伝子のフェリーとして用いる。しかしながら、これらの手続きにはかなりのリスクが関わり、他の生体分子の導入に移転することができない。ある実施形態は、担体分子として骨格に結合されたときの遺伝子の送達を許すのみならず、標的細胞に導入されるべき異なる治療薬生体分子の送達をもまた許すプラットフォーム技術への使用のための（植物由来の）グリコシドを含む本発明の骨格である。よって、本発明の骨格は、嚢胞性線維症、コレア、ハンチントン病、又は血友病について、核酸に基づく処置を開発するために用いられる。これによって、本発明の骨格によって、嚢胞性線維症、ハンチントン病、及び血友病の患者を包含する遺伝子疾患の患者の健康を改善するための新たな遺伝子治療戦略が利用可能である。本発明の一部として、全て単一の分子骨格に結合された植物由来のエンドソーム脱出向上因子（グリコシド）、遺伝子治療薬製品、及び標的化リガンドを組み合わせる非ウイルス的な遺伝子送達テクノロジーが開発される。本発明の骨格に基づくもたらされる非ウイルス的な遺伝子治療は、現行で利用可能な戦略と比べて、より低い用量において約４０倍増大した送達効率を見せる。これによって、本発明の骨格は、臨床適用への使用のため、例えば、嚢胞性線維症患者におけるような欠陥遺伝子の修復又は補充のため、及び例えば癌細胞を破壊するための特定の遺伝子の標的化された送達のためである。事実、本発明の骨格は、遺伝子欠陥により引き起こされ、現行では治癒不能である嚢胞性線維症、ハンチントン病、及び血友病などのいずれかの疾患の処置レジメンへの適用にとって好適である。本発明の骨格を利用する遺伝子治療は、２つの現行の問題を克服することを助ける：第１に、本発明の骨格によって、体内の特定の標的細胞に治療薬遺伝子を送達することが可能である；第２に、治療薬遺伝子はこれらの細胞の内側に入るが、全て本発明のオリゴマー又はポリマー骨格に共有結合的に連結されたサポニン（単数又は複数）、オリゴヌクレオチド産物、及び標的細胞に結合するための抗体などの標的化部分の存在を原因として、破壊されない。

【０１３９】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、エフェクター分子は、好ましくは、リボソー

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

【０１４０】

ある実施形態は本発明に従う骨格であり、担体分子は、エフェクター分子と、好ましくはゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブ・ベドチン、トラスツズマブ・エムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、モキセツモマブパスドトクス、及びポラツズマブベドチン、並びに表Ａ２及び表Ａ３の抗体－薬物コンジュゲートから選択されるモノクローナル抗体との共有結合的に連結された組み合わせを含むか、又はそれからなる。

【０１４１】

本発明のある態様は、少なくとも１つの生物活性分子を担体分子に共有結合することにとって好適な骨格を産生するための方法に関し、方法は、ａ）担体分子へのポリマー構造又はオリゴマー構造の共有結合的カップリングのための第１の化学基を含みかつ第１の化学基とは異なる第２の化学基の少なくとも１つを含むポリマー又はオリゴマー構造を提供し、各第２の化学基は、少なくとも１つの生物活性分子の１つをオリゴマー又はポリマー構造に共有結合的にカップリングするためであることと；ｂ）少なくとも１つの生物活性分子を第２の化学基（単数又は複数）を介して前記ポリマー又はオリゴマー構造に共有結合的にカップリングすることとを含み、好ましくは、生物活性分子（単数又は複数）は、本発明の生物活性分子のいずれか１つ、より好ましくはＳＯ１８６１及び／若しくはＧＥ１７４１及び／若しくはＳＡ１６４１及び／若しくはＱＳ－２１並びに／又は表Ａ１及び／若しくはスキームＩのいずれかのサポニンであり、それによって骨格を提供する。

【０１４２】

ポリマー又はオリゴマー構造は、好ましくは、本発明に従うポリマー又はオリゴマー構造のいずれかである。類似に、共有結合的カップリングのための第１及び第２の化学基は、本発明の実施形態に従う化学基である。生物活性分子は、好ましくは、本発明の態様及び実施形態の生物活性分子のいずれかである。好ましくは、生物活性分子は本発明に従うサポニンであり、好ましくは、サポニンは、本発明に従う切断可能なリンカーなどのリンカーを介して骨格に共有結合的にカップリングもまたされる。本発明の典型的な骨格は、三官能性リンカー及びデンドロンである。

【０１４３】

ある実施形態は本発明の方法であり、少なくとも１つの生物活性分子は、本発明の先の態様及び実施形態のグリコシド及びサポニンのいずれか１つであり；並びに／或いは少なくとも１つの生物活性分子は、本発明の先の態様及び実施形態のいずれかに従うリンカーを介して骨格にカップリングされ；並びに／或いはサポニンは、本発明の先の実施形態及び態様のいずれか１つに従う共有結合を介して骨格に連結され；並びに／或いはサポニンは、本発明の先の実施形態のいずれか１つの切断可能な結合を介して骨格にカップリングされる。

本発明のある態様は、担体分子に共有結合された骨格を産生するための方法に関し、骨格

は、少なくとも１つの共有結合された生物活性分子を含み、方法は：ａ）前記骨格のポリマー又はオリゴマー構造に共有結合された少なくとも１つの生物活性分子を含む骨格を提供すること、好ましくは、本発明に従う骨格又は本発明の方法によって得られ得る骨格又は本発明の方法によって得られる骨格を提供することと；ｂ）ａ）の骨格を本発明に従う担体分子に共有結合的にカップリングすることとを含み、それによって、担体分子に共有結合された骨格を提供し、骨格は、少なくとも１つの共有結合された生物活性分子を含む。好ましくは本発明に従う骨格である。

【０１４４】

ある実施形態は本発明の方法であり、少なくとも１つの生物活性分子は、本発明の先の態様及び実施形態のグリコシド及びサポニンのいずれか１つであり；並びに／或いは少なくとも１つの生物活性分子は、本発明の先の態様及び実施形態のいずれかに従うリンカーを介して骨格にカップリングされ；並びに／或いはサポニンは、本発明の先の実施形態及び態様のいずれか１つに従う共有結合を介して骨格に連結され；並びに／或いはサポニンは、本発明の先の実施形態のいずれか１つの切断可能な結合を介して骨格にカップリングされ；並びに／或いは担体分子は本発明の先の実施形態及び態様のいずれかに従うペイロード及びエフェクター分子のいずれか１つであるか若しくはそれを含み、又は本発明の先の実施形態及び態様のいずれか１つに従うリガンド及び免疫グロブリン、モノクローナル抗体、及び／若しくはそのいずれかの結合ドメイン若しくはフラグメントのいずれか１つであるか若しくはそれを含む。典型的には、生物活性分子は、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＧＥ１７４１、ＱＳ－２１のいずれかである。典型的には、担体分子は、セツキシマブ、トラスツズマブ、ＯＫＴ－９を含むか、又はそれである。典型的には、エフェクター分子又はペイロードは、ＢＮＡ、タンパク質毒素、ジアンチン、サポリン、オリゴヌクレオチドである。本発明の好ましい生物活性分子は、Ｑｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａからのサポニン画分、例えばＱｕｉｌｌａｊａ　ｓａｐｏｎａｒｉａの水溶性サポニン画分である。

【０１４５】

ある実施形態は本発明に従う骨格又は本発明に従う方法であり、特に、このときに、少なくとも１つの生物活性分子は本発明のサポニンなどのグリコシドであり、より具体的には、このときに、サポニンはＳＯ１８６１、ＳＡ１６４１、ＧＥ１７４１、及び／又はＱＳ－２１である。骨格は、本発明に従うエフェクター分子の（後期）エンドソーム脱出及び／又はリソソーム脱出を増加させることができ、このときに、前記エフェクター分子は骨格に共有結合され、かつ哺乳類細胞、特に例えばヒト対象の腫瘍細胞と接触させられるか、又は、このときに、前記エフェクター分子は本発明の骨格の存在下において哺乳類細胞、特に例えばヒト対象の腫瘍細胞と接触させられるかどちらかである。

【０１４６】

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

【０１４７】

ポリヌクレオチドであるエフェクター分子は、例えば、タンパク質をコードする遺伝子又はオープンリーディングフレームなどのコード情報を含むポリヌクレオチドであり得る。それは、制御情報、例えばプロモーター若しくは制御エレメント結合領域、又はマイクロＲＮＡをコードする配列をもまた含み得る。かかるポリヌクレオチドは天然の及び人工の核酸を含み得る。人工核酸は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルフォリーノ及びロックド核酸（ＬＮＡ）、並びにグリコール核酸（ＧＮＡ）及びトレオース核酸（ＴＮＡ）を包含する。これらのそれぞれは、分子の骨格の変更によって、天然に存在するＤＮＡ又はＲＮ

Ａから区別される。エフェクター分子としてのヌクレオチドの例は、例えば、ＤＮＡ：１本鎖ＤＮＡ（例えば、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼのためのＤＮＡ）；直鎖２本鎖ＤＮＡ（例えば、凝固因子ＩＸ遺伝子）；環状２本鎖ＤＮＡ（例えば、プラスミド）；ＲＮＡ：ｍＲＮＡ（例えば、ＴＡＬエフェクター分子ヌクレアーゼ）、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡである。

【０１４８】

本発明における毒素は、細胞を殺すことができる原薬である。好ましくは、標的化された毒素は、オフターゲット細胞に対してではなく、標的細胞に対してのみ又は少なくとも圧倒的に毒性である。

【０１４９】

本発明に有用なエフェクター分子は好ましくはその効果を発揮するためには後期エンドソーム脱出に依存する。例えばシュードモナス外毒素などのいくつかのエフェクターは、「後期エンドソームステージ」の前に他のオルガネラへと経路変更され、それゆえに、通常は、本発明に従う骨格から利さない。しかしながら、かかる毒素は、例えばシグナルペプチドが担う経路変更を欠失することによって、本発明への使用のために適合させられ得る。具体的には、高度に毒性であり、エンドソームを脱出して細胞を殺すために１つの分子のみを要求するであろう毒素は、より強力でないように改変され得る。少なくとも２、より好ましくは少なくとも５、より好ましくは少なくとも１０、より好ましくは少なくとも２０、より好ましくは少なくとも５０、最も好ましくは少なくとも１００個の毒素分子がエンドソームから脱出する場合に細胞を殺す毒素を用いることが好ましい。さらに、機能化された骨格、すなわち、腫瘍細胞又は自己免疫細胞などの標的細胞へと骨格を標的化するための共有結合されたエフェクター分子（単数又は複数）及び／又はリガンド及び／又はモノクローナル抗体などを含む本発明の骨格は、少なくとも２：１、より好ましくは少なくとも５：１、より好ましくは少なくとも１０：１、より好ましくは少なくとも２０：１、最も好ましくは少なくとも５０：１のグリコシド分子の比を、骨格に共有結合された各エフェクター分子当たり含むということが好ましい。具体的には、集合体化したポリマー構造を含む機能化された骨格において（ここで、グリコシド分子及びエフェクター分子は、前記集合体内の異なるポリマー構造に取り付けられる）、少なくとも１０：１、より好ましくは少なくとも２０：１、より好ましくは少なくとも５０：１、より好ましくは少なくとも１００：１、最も好ましくは少なくとも２００：１のグリコシド分子の比を、かかる集合体中のエフェクター分子に対して有することが好ましい。さらに、オフターゲット毒性を縮減するために、細胞膜非透過性の低分子毒素は、細胞膜透過性の毒素よりも好ましいエフェクター分子である。

【０１５０】

本発明は、さらに、機能化された骨格を提供し、ａ）少なくとも１つのエフェクター分子、ｂ）少なくとも１つのリガンド、ｃ）少なくとも１つのエフェクター分子及び加えて少なくとも１つのリガンド（図１０～１２、５４）、ｄ）そのものが少なくとも１つのリガンドを持つ少なくとも１つのエフェクター分子（図５３）、又はｅ）そのものが少なくとも１つのエフェクター分子を持つ少なくとも１つのリガンドどちらかにカップリングされた本発明に従う少なくとも１つの骨格を含む。ａ）～ｅ）におけるかかるカップリングは、切断可能な（不安定な）又は安定な（非切断可能な）結合を介して達成され得る。好ましくは、ａ）～ｅ）におけるカップリングは独立してクリックケミストリー結合によって起こる。好ましくは、機能化された骨格はエフェクターのエンドソーム脱出を向上させることができる。ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は、本発明に従う機能化された骨格であり、前記少なくとも１つのエフェクター分子は、原薬、例えば毒素、薬物、ポリペプチド、及び／又はポリヌクレオチドである。ある実施形態は本発明の機能化された骨格であり、エフェクター分子は、毒素、又はタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

【０１５１】

本発明において用いられる用語「リガンド」はその通常の意味を有し、好ましくは、標

的細胞の細胞表面上の別の分子又は構造に結合することができる分子又は構造を意味する。細胞表面上の前記分子又は構造はエンドサイトーシスされ得、好ましくは、オフターゲット細胞上には不在であるか又はより顕著でない。好ましくは、細胞表面上の前記分子又は構造は恒常的にエンドサイトーシスされる。より好ましくは、本発明におけるリガンドは、前記分子又は構造に結合した後に、標的細胞の細胞表面上の前記分子又は構造のエンドサイトーシスを誘導する。これは、例えば、種々の癌細胞の表面上に存在する上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）に当てはまる。恒常的にエンドサイトーシスされる標的細胞の細胞表面上の分子又は構造の例は、例えば、クローディン－１又は主要組織適合性複合体クラスＩＩ糖タンパク質である。リガンドは例えば抗体、成長因子、又はサイトカインであり得る。担体分子上で毒素をリガンドと組み合わせることは、標的化された毒素を作り出すための１つの可能性である。それが標的細胞においてのみ起こるプロセスに干渉するので標的細胞においてのみ毒性である毒素もまた、標的化された毒素として見られ得る（オフターゲット細胞におけるように、それはその毒性作用を発揮し得ない。例えばアポプチンである）。好ましくは、標的細胞において活性でありかつオフターゲット細胞において活性ではないために、標的化された毒素は、リガンド又は例えばモノクローナル抗体と組み合わせられる毒素である（なぜなら、それは標的細胞によってのみ結合及びエンドサイトーシスされるからである）。リガンド及びエフェクター分子を含む担体分子を含む機能化された骨格において、リガンド又はモノクローナル抗体は、エフェクター分子及び骨格を標的細胞へとガイドする。内在化後に、少なくとも１つのグリコシド、好ましくはサポニンが、エフェクター分子のエンドソーム脱出を媒介する。サポニンは、典型的には、表Ａ１及びスキームＩに挙げられているサポニンであり、好ましくは、サポニンは、ＳＯ１８６１及び／又はＱＳ－２１及び／又はＳＡ１６４１及び／又はＧＥ１７４１である。

【０１５２】

骨格に共有結合的に連結された担体分子、例えばエフェクター分子及び／又は細胞標的化リガンド若しくは抗体を提供されていない本発明の骨格、すなわち機能化されていない骨格、提供された骨格は、例えば薬物製造者に供給され得る。これは、それから、骨格へのエフェクター分子単独又はエフェクター分子及びリガンド若しくは抗体のカップリングを担う。要求される場合には、薬物製造者は、エフェクター分子を骨格及び／又はリガンド、抗体から放出するための切断可能な単位を追加し得る。例えば、エフェクター分子及びリガンド並びに／又はエフェクター分子及びクリック位置の間にジスルフィドの橋かけを挿入することによる。本発明は、骨格の（予め）機能化されたバージョンをもまた提供し、この機能化された骨格は、既にエフェクター分子、例えば殺腫瘍細胞毒素を持つ（図５４）。エンドソームエフェクター分子放出に関して、本発明に従う骨格の活性は好ましくは骨格に既に包含される。機能化された骨格は、例えば既存及び将来の治療抗体のさらなる開発のために製薬産業に、及び標的化抗体を機能化するために抗体のいずれかの供給者又は所有者に供給され得る。機能化された骨格は、バイオテクノロジー企業によって又は研究のためにもまた用いられ得る。

【０１５３】

骨格に共有結合された担体分子上のエフェクター分子を含み、かつ例えば表Ａ２～Ａ４に挙げられる免疫グロブリンなどの骨格に共有結合された担体分子上の細胞標的化部分を含む本発明の骨格によって、ここで、本発明者は、初めて、共有結合されたグリコシド、エフェクター分子、及びモノクローナル抗体を有するコンジュゲート、並びに共有結合されたグリコシド及びエフェクター分子を有するコンジュゲート、並びに共有結合されたグリコシド及び細胞標的化分子、例えばリガンド又はモノクローナル抗体（フラグメント、ドメイン）を有するコンジュゲートを、腫瘍細胞などの標的有疾患細胞内のエフェクター分子の標的化された送達のために提供する。おそらくは全身的な様式でその必要がある患者に投与されるが（部位特異的な局所投与が好ましい）、本発明の骨格は、リガンド又は抗体の結合パートナーを持ちかつ暴露する標的細胞内で特異的にその細胞内活性を発揮する。このときに、骨格は、所望の標的細胞に選好的及び特異的に結合するかかるリガンド又は抗体を提供される。このやり方で、例えば、エフェクター分子が、標的腫瘍細胞又は

標的自己免疫細胞などの同じ標的細胞上に存在する同じか又は異なる細胞表面分子への結合について特異的な、同じか又は異なる標的細胞特異的リガンド又は抗体をもまた提供される場合には、リガンド又は抗体に結合されたグリコシド及びエフェクター分子は、エフェクター分子の殺細胞効果が意図される同じ標的（有疾患）細胞の同じ（後期）エンドソーム、リソソームに導かれ、理想的には蓄積する。

【０１５４】

新たな（機能化された）骨格は、いくつもの利点を提供する：

１）機能化された骨格、すなわち共有結合されたエフェクター分子及びリガンド又は抗体を含む本発明の骨格の使用は、１コンポーネント系をもたらす。すなわち、細胞標的化リガンド又は抗体、好ましくは表Ａ２～Ａ４の抗体のいずれか１つなどのモノクローナル抗体の存在を原因として、エフェクター分子及びエンドソーム脱出向上因子、すなわち少なくとも１つのグリコシドが、予め定められた比で同時にエンドソームに送達される。

【０１５５】

２）ここで、少なくとも１つのグリコシド分子もまた、エフェクター分子の標的化リガンド又はモノクローナル抗体の共同使用によって標的化され；それゆえに、グリコシドは全身に分布及び細胞によってランダムに取り込まれない。これは、可能性のある副作用を縮減することを助け、治療ウインドウを幅広くする。

【０１５６】

３）エフェクター分子当たりのグリコシド分子の数は厳密に定められ得、よって、要求される最小限まで縮減され得る；余剰のグリコシド分子による副作用は回避され得る。エフェクター分子当たり定められた数のグリコシド分子は、特定の医薬の販売承認をもまた容易化する。

【０１５７】

４）本発明は、いずれかの利用可能なリガンド及び／又は（モノクローナル）抗体（又はその少なくとも１つの結合フラグメント及び／若しくはドメイン）に用いられるための予め形成されたエフェクター分子を装填された骨格（機能化された骨格）を提供することを許す。これは、本発明をプラットフォーム開発にとって最適にする。

【０１５８】

５）骨格又は機能化された骨格が担体分子に取り付けられる場合に、担体分子はリガンド若しくは抗体及び／又はエフェクター分子を持つこともまた可能である。かかるケースでは、担体分子はリンカーと考えられる。

【０１５９】

本発明の１つの他の適用は、例えば遺伝子治療である。ポリヌクレオチドなどの生物学的高分子の効率的な細胞内送達は、現行では、依然として主要なハードルである。従来の非特異的ＤＮＡトランスフェクション系とは対照的に、本発明はＤＮＡに限定されず、標的細胞に特異的である。公知のウイルス系は効率的であり、標的細胞に特異的である。しかしながら、それらはＤＮＡにとってのみ好適である。その上、それらは、免疫及び炎症性応答のリスクを持ち、潜在的な発癌活性を所有し、各個々のケースにおける調製のためには複雑かつ高価な手続きを要求する。本明細書で提示されるテクノロジーの新規性は、その根源性、フレキシビリティー、及び使用の容易さに基づく。

【０１６０】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は機能化された骨格であり、骨格は、少なくとも１つのリガンド又は抗体を含む担体分子を含み、前記少なくとも１つのリガンド又は抗体は、標的細胞特異的な表面分子又は構造に特異的に結合することができ、好ましくは、機能化された骨格は、結合後に表面分子と一緒にエンドサイトーシスされる。好ましくは、前記標的細胞は、有疾患若しくは疾患関連細胞、好ましくは腫瘍細胞、腫瘍関連細胞（例えば、腫瘍血管細胞）、免疫細胞（例えば、制御性Ｔ細胞）、又は単一遺伝子性の欠陥を有する細胞である。用語「標的細胞特異的な表面分子」によって、分子が、定性的又は定量的どちらかで、好ましくは標的細胞において発現され、非標的細胞においてはより少ない程度に発現されるということを意味される。かかる標的細胞特異的な表面分子の例

は、腫瘍細胞上において上方制御されるが例えば皮膚の線維芽細胞上にもまた（より低いレベルで）発現される受容体ＥＧＦＲ、及び乳癌細胞において過剰発現されるＨＥＲ２である。しかしながら、多くの標的細胞特異的な表面分子の機能フラグメント及びドメインは、当分野で公知の利点を提供し、当業者は、特定の目的のために、すなわち特定の疾患又は適用について標的細胞を非標的細胞から識別するために、標的細胞特異的な表面分子を非常に良く選ぶことができる。腫瘍細胞特異的受容体に結合する抗体の例については、表Ａ２、Ａ３、及びＡ４をもまた見よ。本発明の骨格によって含まれる担体分子、例えばモノクローナル抗体による標的化にとって好適な腫瘍細胞特異的受容体に関しては、本明細書において上で記載された実施形態をもまた見よ。本明細書において用いられる「単一遺伝子性の欠陥」はその通常の意味を有し、これは、体の実質的に全ての細胞において起こる単一の遺伝子の改変である。変異は、１つ又は両方の染色体（１つの染色体が各親から遺伝する）上に存在し得る。比較的まれであるが、単一遺伝子性の欠陥は世界的に何百万もの人々が罹患している。現行では、科学者らは、ヒト疾患の１０，０００超が単一遺伝子性疾患であることが公知であると見積もっている。今日まで公知の単一遺伝子性疾患の非限定的な例は：鎌状赤血球疾患、嚢胞性線維症、多発性嚢胞腎疾患、及びテイ－サックス病である。

【０１６１】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は本発明に従う機能化された骨格であり、骨格は、それに共有結合された担体分子を含み、かつリガンド及び／又は抗体を含み、少なくとも１つのリガンドは、抗体又はその誘導体若しくはフラグメント（例えば、ＶＨＨ又はｓｃＦｖ）、サイトカイン、成長因子、又は抗体様分子、例えばアプタマー又は設計されたアンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）である。ＤＡＲＰｉｎは遺伝子操作された抗体ミメティックタンパク質であり、典型的には高度に特異的なかつ高親和性の標的タンパク質結合を見せる。それらは、多様な細胞機能を担う天然のアンキリンタンパク質に由来する。それらは、強力で特異的でかつ汎用的な小タンパク質（典型的には１４～１８ｋＤａ）治療の新たなクラスを構成し、種々の研究、診断、及び治療適用において検討ツールとして用いられる。今日まで公知の抗体又はその誘導体の他の非限定的な例は：（ｉ）Ｆａｂ’又はＦａｂフラグメント、可変軽ドメイン、可変重ドメイン、定常軽ドメイン、及び定常重ドメイン１からなる一価フラグメント、又はＷＯ２００７０５９７８２に記載されている一価抗体；（ｉｉ）ヒンジ領域におけるジスルフィド橋かけによって連結された２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメントのＦ（ａｂ’）２フラグメント；（ｉｉｉ）可変重ドメイン及び定常重１ドメインから本質的になるＦｄフラグメント；並びに（ｉｖ）抗体の単一のアームの可変軽及び可変重ドメインから本質的になるＦｖフラグメントである。さらにその上、可変軽及び可変重のＦｖフラグメントの２つのドメインは別々の遺伝子によりコードされるが、それらは、組み換え法を用いて、それらが単一のタンパク質鎖として作られることを可能化する合成リンカーによって繋がれ得る。これによって、可変軽及び可変重領域がペアリングして、一価分子を形成する（１本鎖抗体又は１本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知）。

【０１６２】

好ましくは、その効果がグリコシド分子（例えばサポニン）により向上するエフェクター分子は、エンドサイトーシスされたときには骨格及び／又はリガンド又は抗体から取り外される。これは、例えば、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下において壊れる切断可能な結合によって達成され得る。よって、ある実施形態は本発明の骨格であり、この骨格は本発明に従う機能化された骨格であり、前記少なくとも１つのエフェクター分子は切断可能な結合を介して前記骨格及び／又は前記少なくとも１つのリガンド若しくは抗体に結合される。好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下において切断を受ける。好ましくは、切断可能な結合は、イミン、ヒドラゾン、オキシム、１，３－ジオキソラン、ジスルフィド、又はエステル、より好ましくはジスルフィド又はヒドラゾン結合である。

【０１６３】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は本発明に従う機能化された骨格であり、前記少なくとも１つのエフェクター分子は、安定な結合を介して、例えばアミドカップリング又はアミン形成によって、前記骨格及び／又は前記少なくとも１つのリガンド若しくは抗体に結合される。例えば、これは、骨格のポリマー又はオリゴマー構造のアミノ基とエフェクター分子又はリガンド上の活性化カルボン酸基とによる、カルボジイミドにより媒介されるアミド結合形成によって実現される。

【０１６４】

ある実施形態は本発明に従う骨格又は機能化された骨格であり、さらに、担体、例えばナノ粒子、リポソーム、ミセル、コロイド、又はコレステロール及び／若しくはリン脂質を含む粒子様構造を含む。

【０１６５】

前に言われた通り、本発明に従う骨格上に含まれる少なくとも１つのグリコシド分子は、本発明において定められる少なくとも現行の及び新たなエフェクター分子の有効性を増大させる。可能性としての副作用は、有効性を低下させることなしに、エフェクター分子の投薬量を低下させることによって減少させられる。よって、本発明は、医学への使用のための又は医薬としての使用のための、本発明に従う骨格又は本発明に従う機能化された骨格を提供する。それゆえに、本発明のある態様は医薬としての使用のための本発明に従う骨格に関し、骨格は、少なくとも、本発明のエフェクター分子及び／又は本発明に従う抗体、好ましくはエフェクター分子及び抗体両方を含む。医薬を製造するための、本発明に従う骨格又は本発明に従う機能化された骨格の使用もまた提供される。特に、癌医学、特に古典的な化学療法医薬は、それらの副作用が悪名高い。原薬及びグリコシド分子両方の時間的及び場所的な同期及び標的化ゆえに、本発明に従う骨格又は機能化された骨格は、医薬としての使用にとって、特に癌を処置する方法への使用にとって特に有用である。それゆえに、本発明は、癌を処置する方法への使用のための、本発明に従う骨格又は本発明に従う機能化された骨格を提供する。本発明は、後天性又は遺伝性障害、特に単一遺伝子性の欠損症を処置する方法への使用のための本発明に従う骨格又は本発明に従う機能化された骨格をもまた提供する。それゆえに、本発明のある態様は、癌又は自己免疫疾患の処置のための方法への使用のための本発明に従う骨格に関し、骨格は共有結合された担体分子を含み、この担体分子は、少なくとも、本発明のエフェクター分子及び／又は本発明に従う抗体、好ましくはエフェクター分子及び抗体両方を含む。

【０１６６】

本発明のある態様は、癌の処置又は予防への使用のための、腫瘍細胞を標的化するための抗体及び／又はエフェクター分子を含む本発明の骨格に関し、骨格は、その必要があるヒト対象に投与される。

【０１６７】

本発明のある態様は、癌を患っているか又は癌を発生するリスクがありかつ前記処置を必要とするヒト対象の処置に関し、処置は、本発明の骨格を含むか又は本発明の機能化された骨格を含む有効ドーズの医薬組成物をヒト対象に投与するステップを含み、かかる骨格は、サポニンと一緒にエフェクター部分、若しくはサポニンと一緒にモノクローナル抗体、又はサポニンと一緒にエフェクター分子及びモノクローナル抗体両方を含む。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骨格に関する。本発明のある態様は、その必要があるヒト対象の癌又は自己免疫疾患の処置又は予防のための方法への使用のための、本発明の骨格に関する。本発明のある態様は、抗癌治療又は抗自己免疫疾患治療のための医薬の製造のための、本発明の骨格若しくは機能化された骨格、又は前記骨格若しくは機能化された骨格を含む医薬組成物の使用に関する。骨格又は機能化された骨格は、好ましくは、少なくとも、エフェクター分子及び／又は抗体、好ましくは抗体及びエフェクター分子両方を含む担体分子を含む。

【０１６８】

医学へのさらなる適用は、不十分な量又は不十分な機能性でこれらの酵素を産生する標的細胞における細胞内酵素の置換である。もたらされる疾患は遺伝性又は後天性であり得

る。ほとんどのケースでは、対症療法のみが可能であり、いくつもの希少疾患では、不十分な処置オプションが関係する患者の短くなった寿命に至る。かかる疾患の例はフェニルケトン尿症であり、これは、アミノ酸フェニルアラニンのアミノ酸であるフェニルアラニンの代謝が低下する先天的な代謝異常である。疾患は、肝酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝子変異を特徴とする。フェニルケトン尿症は今日まで治癒可能ではない。発生率はおよそ１：１０，０００であり、最も高い公知の発生率はトルコにおいて１：２，６００である。フェニルアラニンヒドロキシラーゼ又はフェニルアラニンヒドロキラーゼをコードするポリヌクレオチドを有する機能化された骨格は、好適なリガンドの使用によって肝臓細胞を標的化するために及び肝臓細胞の欠陥酵素を補充するために用いられ得る；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ又はフェニルアラニンヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む担体分子に共有結合された骨格は、好適なリガンドの使用によって肝臓細胞を標的化するために及び肝臓細胞の欠陥酵素を補充するために用いられ得る。これは、置換又は遺伝子治療のための、本発明に従う担体分子を含む骨格又は機能化された骨格の使用の１つの例である。好ましい実施形態においては、遺伝子治療又は補充治療の方法への使用のための、本発明に従う骨格又は本発明の担体分子を含む骨格又は本発明に従う機能化された骨格が提供される。

【０１６９】

本発明はバイオテクノロジープロセスにもまた用いられ得る。可能な適用は、真核生物の細胞内スイッチの生体分子工学である。転写スイッチはｍＲＮＡ重合のレベルにおける遺伝子発現を標的化し、翻訳スイッチはｍＲＮＡシグナルをタンパク質にするプロセスを標的化し、翻訳後スイッチはいかにタンパク質が互いと相互作用してシグナルを減弱又は中継するかをコントロールする。最適化されたときには、これらの細胞スイッチは、開発者により指定されたキューに基づいて細胞機能を「オン」及び「オフ」にし得る。これらのキューは、低分子、ホルモン、及び薬物を含む。スイッチを適用するには、キューが標的細胞に入らなければならない。よって、現行の適用では、標的細胞に特異的ではなく選択されたスイッチに対する高い特異性も有さない小さい拡散性の分子のみが用いられ得る。機能化された骨格、又はより複雑なそれゆえにより特異的な非拡散性のエフェクター分子を有する担体分子を含む骨格は、特定のスイッチを標的化するために用いられ得、好適なリガンドの使用は、効果を標的細胞に制限し得る。ある実施形態は、好ましくはインビトロで、エフェクター分子の効果を向上させるための、本発明の担体分子を含む骨格又は本発明に従う機能化された骨格の使用である。好ましくは、使用は、インビトロの転写スイッチの効果を向上するためである。

【０１７０】

別の適用は、基礎研究における本発明の使用である。細胞プロセスの機能的分析のためには、タンパク質を細胞内に持ち込むことがしばしば要求される。タンパク質トランスフェクションと呼ばれる方法である。例えば、真核細胞のアポトーシスに至るニワトリウイルスタンパク質アポプチンの分子メカニズムを検討するためには、精製タンパク質を標的細胞内に持ち込むことが要求される。しかしながら、既存のタンパク質トランスフェクションキットは、低い有効性、標的細胞に対する欠けている特異性、及び高い毒性を特徴とし、よって、特に代謝経路が検討の一部であるときにはいくつもの適用には用いられ得ない。それらのどちらもアポプチンを有する本発明の共有結合的に連結された担体分子を含む骨格又は機能化された骨格と、好適なリガンドの使用とは、かかる検討を実行するために用いられ得る。ある実施形態は、好ましくはインビトロのポリペプチドトランスフェクションのための、本発明の骨格、本発明に従う担体分子を含む骨格、又は本発明に従う機能化された骨格である。好ましくはインビトロにおけるポリヌクレオチドトランスフェクションのための、骨格、本発明に従う担体分子を含む骨格、又は本発明に従う機能化された骨格の使用もまた提供される。

【０１７１】

本発明は、癌を処置する方法をもまた提供し、方法は、本発明に従う骨格、又は好ましくは本発明に従う機能化された骨格、又は好ましくは本発明に従うエフェクター分子若し

くはモノクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体及びエフェクター分子両方を含む担体分子を含む本発明の骨格を含む医薬を、その必要がある患者に投与すること、好ましくは、有効ドーズの前記医薬をその必要がある患者、好ましくはヒト癌患者に投与することを含む。

【０１７２】

骨格又は機能化された骨格は、

・ＡＤＣが毒素、タンパク質毒素、オリゴヌクレオチド、ＢＮＡなどのペイロードを含み得る現行の及び新たなＡＤＣのための広げられた治療ウインドウを提供し得、

・高分子の高度に効率的な細胞質基質送達を提供し得、

・細胞研究及びバイオテクノロジー適用を容易化し得、

・複数の疾患、例えば癌及び自己免疫疾患、関節リウマチの治療ポテンシャルを有し得、

・細胞破壊（例えば、癌細胞の）を誘導するために用いられ得、

・有疾患細胞に要求される治療薬レベルを低下させることによって、欲されない副作用を縮減し得、

・エフェクター分子に対する免疫反応のリスクを縮減し得（なぜならより少ないエフェクター分子が必要とされるからである。かつ、いずれかの理論によって拘束されようとすることなしに、恐らく、なぜならＭＨＣ分子上へのエンドソームを介した抗原提示の経路が遮断されるからでもまたある）、

・遺伝子の高度に効率的な操作の可能性を開き得、

・それらの有効性を増大させることによって、失敗した薬物候補、特にＡＤＣを復活させ得、

・生体適合性の及び分解性の及び／又は排泄可能な材料から作られ得、

・エンドソームｐＨが引き金となる穏やかなかつ非有害なエフェクター分子放出に頼り得る、プラットフォームテクノロジーを象徴している。

フレキシビリティーは、いずれかの型のリガンド（例えば抗体、そのフラグメント及びドメイン、又はアプタマー）及びエフェクター分子を用いる可能性によって保証される。このテクノロジーを自前のリガンド及びエフェクター分子に適用するためのユーザーフレンドリーなインターフェースを提供するために、クリックケミストリーの精巧な実装が用いられ得る。本発明のプラットフォームテクノロジーは、種々の可能性、例えばユーザが彼の裁量で彼のエフェクター分子及び／又はリガンドのいずれかを単純にカップリングすること許すスタンドアローン製品としてのクリック可能な骨格の産生（図５３）、或いは機能化された骨格又はそれに共有結合的に連結された担体分子を含む骨格の産生を提供する。基礎的な骨格は、既にエフェクター分子（例えば、表Ａ５のタンパク質性毒素）に及び／又はリガンド（例えば、表Ａ２、Ａ３、Ａ４の抗体）にカップリングされている。これは、ユーザが、エフェクター分子を所望の標的細胞へとガイドするための彼のリガンドをカップリングすることを許す（図５４）。共有結合的にカップリングされた担体分子を含む可能な骨格、又は可能な機能化された骨格を含む可能な骨格は、リボソーム不活性化タンパク質、例えばジアンチン、サポリンに連結された骨格である。殺標的細胞の高いポテンシャルを有するこの毒性酵素は、腫瘍細胞を特異的に認識するように設計されている市場に既に存在する抗体又はいずれかの将来の抗体、例えばトラスツズマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ゲムツズマブ、ＯＫＴ－９、若しくはオビヌツズマブ（次世代ＡＤＣ技テクノロジー）、又は先の実施形態及び表Ａ２～Ａ４に挙げられている抗体のいずれかをクリックするために用いられ得る。核酸エフェクター分子として、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ。ポリヌクレオチド）又はｍｉＲＮＡ阻害剤又はＬＮＡ又はＢＮＡが、例えば、効率的且つ低ドーズの細胞質基質送達のための機能化された骨格を作り出すために用いられ得る。ｍｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ阻害剤は、細胞内の遺伝子プログラムを変更し、それによって細胞機能を変更することができる新規治療薬としての高いポテンシャルを有する。

【０１７３】

本発明は、さらに、骨格、好ましくは本発明に従う骨格を産生するための方法を提供し、骨格は、ポリマー又はオリゴマー構造に結合されたエフェクター分子の効果を改善する

ことができる少なくとも１つのグリコシド分子を含み、方法は：ポリマー又はオリゴマー構造を提供することと；少なくとも１つのグリコシド分子を前記ポリマー又はオリゴマー構造にカップリングすることとを含む。好ましくは、少なくとも１つのグリコシド分子は前記エフェクター分子のエンドソーム脱出を増加させる。好ましくは、グリコシドは、本発明に従う表Ａ１及びスキームＩに挙げられているサポニンのいずれかである。特に、このようにして得られた骨格は、前記エフェクター分子のエンドソーム脱出を増加させる。好ましくは、少なくとも１つのグリコシド分子は、ビスデスモシド型トリテルペン、より好ましくはビスデスモシド型トリテルペンサポニンであり、より好ましくは２３位にアルデヒド官能基を有する１２，１３－デヒドロオレアナンの型に属し、より好ましくはＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ又はＳａｐｏｎａｒｉａ種から単離され得るサポニン、最も好ましくはＳＡ１６４１及び／又はＳＯ１８６１、或いはそれらのジアステレオマーのいずれかである。好ましくは、少なくとも１つのグリコシド分子は切断可能な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造にカップリングされ、好ましくは、前記切断可能な結合は酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下において切断を受ける。より好ましくは、切断可能な結合は、イミン、ヒドラゾン、オキシム、１，３－ジオキソラン、ジスルフィド、又はエステル、より好ましくはジスルフィド又はヒドラゾン結合である。結合が切断可能な結合である場合には、サポニンは、好ましくは、サポニン上の位置２３におけるアルデヒド官能基を介して又はカルボキシル基の１つを介して、より好ましくはアルデヒド官能基を介して骨格に取り付けられる。

【０１７４】

ある実施形態は、本発明の骨格、又は本発明に従う担体分子に結合された骨格、又は本発明の機能化された骨格であり、少なくとも１つのグリコシド分子は、安定な結合を介してポリマー又はオリゴマー構造に結合される。ある実施形態は、本発明の骨格、又は本発明に従う共有結合された担体分子を含む骨格であり、少なくとも１つのグリコシド分子はサポニンであり、サポニンと骨格との間の安定な結合は、好ましくはアミドカップリング又はアミン形成によって起こる。これは、例えば、ポリマー又はオリゴマー構造のアミノ基及びサポニンの活性化グルクロン酸基によるカルボジイミドにより媒介されるアミド結合形成を介して実現される。安定な条件を充たす化学結合は、アルデヒドカップリングのためにもまた用いられ得る。例えば、還元的アミノ化後に誘導される特定のアミンであり、ポリマー又はオリゴマー構造の官能基として第１級アミン基を要求する。結合が安定な結合である場合には、サポニンは好ましくはサポニンのカルボキシル基の１つを介して骨格に取り付けられる。

【０１７５】

好ましくは、骨格は、さらに、担体分子、例えばエフェクター分子及び／又はリガンド及び／又はモノクローナル抗体（そのフラグメント、ドメイン）、好ましくはエフェクター分子及び免疫グロブリン両方へのカップリングのためのクリックケミストリー基を含む。免疫グロブリンは、好ましくは、表Ａ２、Ａ３、Ａ４のモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体及びエフェクター分子は、一緒になって、好ましくは、表Ａ４のＡＤＣなどの本発明に従うＡＤＣを形成する。好ましくは、クリックケミストリー基は、テトラジン、アジド、アルケン、若しくはアルキン、又はこれらの基の環状誘導体、例えばシクロオクチン（例えば、アザ－ジベンゾシクロオクチン、ジフルオロシクロオクチン、ビシクロ［６．１．０］ノナ４－イン、又はジベンゾシクロオクチン）である。

【０１７６】

ある実施形態は、骨格、好ましくは本発明の骨格を産生するための本発明に従う方法であり、グリコシド分子の数は、定められた数又は定められた範囲である。好ましくは、ポリマー又はオリゴマー構造は、直鎖、分岐鎖、又は環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、又はこれらの構造の集合体を、純粋または混合どちらかで含む。集合体は、共有結合的な架橋又は非共有結合的な吸引力によって組み上げられ得、ヒドロゲル又はナノゲルを形成し得る。好ましくは、ポリマーは、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポリアミノ酸、若しく

はＤＮＡポリマーの誘導体であるか、又はオリゴマー若しくはポリマーは、デキストラン、乳酸、核酸、若しくはペプチド核酸の誘導体である。好ましい実施形態において、エフェクター分子は、原薬、例えば毒素、薬物、ポリペプチド、及び／又はポリヌクレオチドである。

【０１７７】

本発明に従う担体分子を含む骨格又は本発明の機能化された骨格を産生するための方法もまた提供され、方法は：複数のグリコシド分子とポリマー又はオリゴマー構造とを含む骨格、好ましくは本発明に従うか又は骨格を産生するための本発明に従う方法によって得られ得る骨格を提供することと；ａ）少なくとも１つのエフェクター分子、ｂ）少なくとも１つのリガンド、例えばモノクローナル抗体、ｃ）少なくとも１つのエフェクター分子及び加えて少なくとも１つのリガンド、好ましくは腫瘍細胞受容体を標的化するモノクローナル抗体、ｄ）そのものが、腫瘍細胞受容体に結合するためのモノクローナル抗体などの少なくとも１つのリガンドを持つ少なくとも１つのエフェクター、又はｅ）少なくとも１つのリガンド、例えばそのものが少なくとも１つのエフェクターを持つ腫瘍細胞標的化モノクローナル抗体どちらかを、前記骨格にカップリングすることとを含む。好ましくは、ａ）～ｅ）におけるカップリングは独立してクリックケミストリー結合によって起こる。ある実施形態は本発明の方法であり、ｃ）において、骨格は、少なくとも１つのエフェクター分子及び加えて少なくとも１つのリガンド、好ましくは腫瘍細胞受容体を標的化するモノクローナル抗体にカップリングされる。エフェクター分子及びリガンド（例えば、モノクローナル抗体）両方は、そのものが骨格に結合されるリンカーに結合される。当業者は、本開示及び普通の一般的知識に基づいて、かかる三官能性リンカー、例えばスキームＩＩ及び構造Ｂの三官能性リンカーを設計することができる（図１６をもまた見よ）。かかる三官能性リンカーは、例えば、チオール－エン反応を行うためのチオール基を見せる標的化リガンドへのコンジュゲート化のために用いられ得るマレイミド基を見せ得る。加えて、三官能性リンカーは、アジドを持つサポニンとのいわゆる歪み促進型のアルキン－アジド環化付加（ＳＰＡＡＣ、クリックケミストリー）を行うためのジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）基を見せ得る。最後に、三官能性リンカーは、トランス－シクロオクチン（ＴＣＯ）基などの第３の官能基を得て、テトラジン（Ｔｚ）を持つエフェクター分子とのいわゆる逆電子要請型Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ（ＩＥＤＤＡ）反応を行い得る。ある実施形態は本発明の方法であり、前記少なくとも１つのエフェクター分子は、原薬、例えば毒素、薬物、ポリペプチド、又はポリヌクレオチドである。ある実施形態は本発明の方法であり、少なくとも１つのエフェクター分子は毒素又はポリヌクレオチドである。好ましくは、前記少なくとも１つのリガンド、例えば腫瘍細胞受容体に結合するためのモノクローナル抗体は、エンドサイトーシスを経過することができる標的細胞特異的な表面分子又は構造に特異的に結合することができる。好ましくは、抗体若しくはそのフラグメント、サイトカイン、成長因子、アプタマー、又は設計されたアンキリンリピートタンパク質である。好ましくは、前記標的細胞は、有疾患若しくは疾患関連細胞、好ましくは腫瘍細胞、腫瘍関連細胞（例えば、腫瘍血管細胞）、免疫細胞（例えば、制御性Ｔ細胞）、又は単一遺伝子性の欠陥を有する細胞である。ある実施形態は本発明に従う方法、本発明に従う機能化された骨格又は担体分子を含む骨格を産生するための方法であり、前記少なくとも１つのエフェクター分子は、切断可能な結合を介して骨格及び／又は前記少なくとも１つのリガンドにカップリングされる。好ましくは、前記切断可能な結合は、酸性、還元的、酵素的、又は光誘導性条件下において切断を受ける。ある実施形態は、骨格又は機能化された骨格を産生するための本発明に従う方法であり、方法は、さらに、前記骨格又は機能化された骨格を担体に結合することを含み、前記担体は、好ましくは、一種のナノ粒子、リポソーム、ミセル、コロイド、又はコレステロール及び／若しくはリン脂質を含む粒子様構造である。

【０１７８】

本発明は、医薬組成物を提供し、本発明に従う骨格、又は本発明に従う機能化された骨格、又は本発明に従う共有結合された担体分子と任意に許容される医薬担体とを含む骨格

を含む。かかる医薬組成物は、患者の処置への使用のため、特に、癌又は後天性若しくは遺伝性障害、特に単一遺伝子性の欠損症の処置への使用のためである。

【０１７９】

本発明の別の態様は、本発明に従う化合物又は化合物の組み合わせと生理的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。「薬理学的組成物」は、哺乳類、好ましくはヒトへの投与にとって好適な形態の組成物を言う。好ましくは、医薬組成物は、ヒトに対する治療効果を発揮するために十分量の本発明に従う化合物を適切な医薬形態で含有する。

【０１８０】

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

【０１８１】

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

【０１８２】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は、定められた数又は定められた範囲のグリコシドを含む。ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は、定められた数又は定められた範囲のグリコシドを含み、ここで、定められた範囲は、１～３０の間のグリコシド（単数又は複数）、好ましくは１～２０の間、より好ましくは１～１０の間、より好ましくは１～６の間、より好ましくは２～６の間、より好ましくは２～５の間、より好ましくは３～５の間、より好ましくは３～４の間のグリコシドである。

【０１８３】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は、共有結合された担体分子を含み、この担体分子は、細胞を標的化する結合部位を含み、かつ例えば標的細胞上の細胞表面受容体に結合するための（モノクローナル）抗体であるか、又はそれを含む。ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は共有結合された担体分子を含む。この担体分子は細胞を標的化する結合部位を含み、例えば標的細胞上の細胞表面受容体に結合するための（モノクローナル）抗体であるか又はそれを含む。標的細胞は、有疾患細胞又は疾患関連細胞、好ましくは、腫瘍細胞又は腫瘍関連細胞（例えば、腫瘍血管細胞）、又は免疫細胞（例えば、制御性Ｔ細胞）、又は自己免疫細胞である。

【０１８４】

ある実施形態は本発明の骨格であり、生物活性分子はグリコシドであり、前記グリコシドは、骨格に共有結合された担体分子によって含まれるエフェクター分子のエンドソーム脱出を増加させることができる。

【０１８５】

ある実施形態は本発明の骨格であり、骨格は、医薬組成物の一部であり、医薬組成物は、さらに、骨格に加えてさらなる免疫グロブリンなどの少なくとも１つのさらなる活性な医薬成分を含む。

【０１８６】

ある実施形態は、癌又は自己免疫疾患を処置する方法への使用のための、本発明の骨格又は本発明に従う医薬組成物である。

【０１８７】

ある実施形態は、癌を処置する方法への使用のための本発明の骨格であり、方法は、その必要がある患者に本発明の骨格を投与することを含み、骨格は、本発明のエフェクター分子及び／又は本発明のリガンド若しくは細胞標的化抗体を含むか又はそれからなる共有結合された担体分子を含む。

【０１８８】

ある実施形態は、癌を処置する方法への使用のための本発明の骨格であり、方法は、本

発明による医薬組成物をその必要がある患者に投与することを含む。

【０１８９】

【表１】

表Ａ１．　（後期）エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を見せるサポニン、及び（後期）エンドソーム／リソソーム脱出向上活性を見せるかかるサポニンを連想させる構造を含むサポニン

| サポニン名 | アグリコンコア | Ｃ－３ベータ－ＯＨ基における炭水化物置換基 | Ｃ－２８－ＯＨ基における炭水化物置換基 |
|---|---|---|---|
| ＮＰ－００５２３６ | ２アルファ－ヒドロキシオレアノール酸 | ＧｌｃＡ－ | Ｇｌｃ／Ｇａｌ－ |
| ＡＭＡ－１ | １６アルファ－ヒドロキシオレアノール酸 | Ｇｌｃ－ | Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－ |
| ＡＭＲ | １６アルファ－ヒドロキシオレアノール酸 | Ｇｌｃ－ | Ｒｈａ－（１→２）－［Ａｒａ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－ |
| アルファ－ヘデリン | ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸） | Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ－ | － |
| ＮＰ－０１２６７２ | １６アルファ，２３－ジヒドロキシオレアノール酸 | Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－ | Ａｒａ／Ｘｙｌ－ |
| ＮＰ－０１７７７７ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝４Ｅ－メトキシケイ皮酸） |
| ＮＰ－０１７７７８ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝４Ｚ－メトキシケイ皮酸） |
| ＮＰ－０１７７７４ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１８１１０[c]、ＮＰ－０１７７７２[d] | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－３，４－ジ－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－ |

【０１９０】

【表２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＮＰ－０１８１０９ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－３－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－（Ｒ＝４Ｅ－メトキシケイ皮酸） |
| ＮＰ－０１７８８８ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１７８８９ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１８１０８ | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→２）－［４－ＯＡｃ－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）］－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－ |
| ＳＡ１６４１[a]、ＡＥ Ｘ５５[b] | ギプソゲニン | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１７６７４ | キラヤ酸 | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１７８１０ | キラヤ酸 | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－ |
| ＡＧ１ | キラヤ酸 | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－００３８８１ | キラヤ酸 | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）－［Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）］－Ｆｕｃ－ |
| ＮＰ－０１７６７６ | キラヤ酸 | Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－ | Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ－（→４）］－Ｆｕｃ－（Ｒ＝５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒ |

【０１９１】

【表３】

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

【０１９２】

【表４】

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

【０１９３】

【表５】

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

【０１９４】

【表６】

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

【０１９５】

【表７】

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

【０１９６】

【表８】

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

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

【０１９７】

【表９】

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

【０１９８】

【表１０】

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

【０１９９】

【表１１】

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

【０２００】

【表１２】

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

【０２０１】

【表１３】

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

【０２０２】

【表１４】

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

【０２０３】

【表１５】

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

【０２０４】

【表１６】

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

【０２０５】

【表１７】

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

【０２０６】

【表１８】

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

【０２０７】

【表１９】

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

【０２０８】

【表２０】

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

【０２０９】

【表２１】

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

【０２１０】

【表２２】

表Ａ３－第ＩＩＩ相臨床開発に達したＡＤＣ

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

【０２１１】

【表２３】

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

【０２１２】

【表２４】

| 表Ａ４．　本発明に従う免疫グロブリンによって標的化され得る腫瘍特異的な細胞表面受容体標的、並びに、本発明のＡＤＣ、及びサポニンを提供される抗体、及びサポニンを提供されるＡＤＣに用いられ得る抗体（限定として提示されてはいない；さらなる免疫グロブリンが本発明にとって等しく好適である） | |
|---|---|
| 標的細胞表面受容体 | 例のモノクローナル抗体 |
| ＨＥＲ２ | 抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、例えばトラスツズマブ及びペルツズマブ |
| ＣＤ２０ | 抗ＣＤ２０モノクローナル抗体、例えばリツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、イブリツモマブ |
| ＣＡ１２５ | 抗ＣＡ１２５モノクローナル抗体、例えばオレゴボマブ |
| ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ） | 抗ＥｐＣＡＭ（１７－１Ａ）モノクローナル抗体、例えばエドレコロマブ |
| ＥＧＦＲ | 抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体、例えばセツキシマブ、パンチツムマブ、及びニモツズマブ |
| ＣＤ３０ | 抗ＣＤ３０モノクローナル抗体、例えばブレンツキシマブ |
| ＣＤ３３ | 抗ＣＤ３３モノクローナル抗体、例えばゲムツズマブ及びｈｕＭｙ９－６ |
| 血管インテグリンアルファ－ｖベータ－３ | 抗血管インテグリンアルファ－ｖベータ－３モノクローナル抗体、例えばエタラシズマブ |
| ＣＤ５２ | 抗ＣＤ５２モノクローナル抗体、例えばアレムツズマブ |
| ＣＤ２２ | 抗ＣＤ２２モノクローナル抗体、例えばエプラツズマブ |
| ＣＥＡ | 抗ＣＥＡモノクローナル抗体、例えばラベツズマブ |
| ＣＤ４４ｖ６ | 抗ＣＤ４４ｖ６モノクローナル抗体、例えばビバツズマブ |
| ＦＡＰ | 抗ＦＡＰモノクローナル抗体、例えばシブロツズマブ |
| ＣＤ１９ | 抗ＣＤ１９モノクローナル抗体、例えばｈｕＢ４ |
| ＣａｎＡｇ | 抗ＣａｎＡｇモノクローナル抗体、例えばｈｕＣ２４２ |
| ＣＤ５６ | 抗ＣＤ５６モノクローナル抗体、例えばｈｕＮ９０１ |
| ＣＤ３８ | 抗ＣＤ３８モノクローナル抗体、例えばダラツムマブ |
| ＣＡ６ | 抗ＣＡ６モノクローナル抗体、例えばＤＳ６ |
| ＩＧＦ－ＩＲ | 抗ＩＧＦ－ＩＲモノクローナル抗体、例えばシクスツムマブ及び３Ｂ７ |
| インテグリン | 抗インテグリンモノクローナル抗体、例えばＣＮＴＯ９５ |
| シンデカン－１ | 抗シンデカン－１モノクローナル抗体、例えばＢ－Ｂ４ |

【０２１３】

【表２５】

表Ａ５：植物からのＲＩＰ＊

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

【０２１４】

【表２６】

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

【０２１５】

【表２７】

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

【０２１６】

【表２８】

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

【０２１７】

【表２９】

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

【０２１８】

【表３０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | egyptiaca Mill.] | ルファシリン（Luffacylin）、ルフィンＰ１ | sRIP1 |
| | | ルフィン－Ｓ、ルフィンＳ（１）、ルフィンＳ（２）＝ルフィンＳ２、ルフィンＳ（３） | sRIP1候補 |
| | Marah oreganus（Torr.&A.Gray）Howell | ＭＯＲ－Ｉ、ＭＯＲ－ＩＩ | ＲＩＰ１ |
| | Momordica balsamina L. | バルサミン（Balsamin）、ＭｂＲＩＰ－１、モモルディンＩＩ | ＲＩＰ１ |
| | Momordica charantia L. | ＭＡＰ３０、α－モモルカリン＝α－ＭＭＣ、β－モモルカリン＝β－ＭＣ＝β－ＭＭＣ、δ－モモルカリン＝δ－ＭＭＣ、モモルディン、モモルディン＝Momordica charantia阻害剤、モモルディンＩＩ、モモルディン－ａ、モモルディン－ｂ | ＲＩＰ１ |
| | | γ－モモルカリン＝γ－ＭＭＣ、カランチン | sRIP1 |
| | | ＲＩＰ１候補 | ＲＩＰ１候補 |
| | | ＭＣＬ＝M. charantiaレクチン、抗Ｈレクチン、Momordicaアグルチニン、モモルディン、タンパク質画分１、タンパク質画分２ | レクチン |
| | | ＭＣＬ＝Momordica charantia種子レクチン＝Momordica charantiaレクチン、ＭＣＬ１ | ＲＩＰ２ |
| | Momordica cochinchinensis Spreng. | コキニン（Cochinin）Ｂ、モモルコキン（Momorcochin）、モモルコキン－Ｓ | ＲＩＰ１ |
| | Siraitia grosvenorii（Swingle）C.Jeffrey ex A.M.Lu & Zhi Y.Zhang［Syn.：Momordica grosvenorii Swingle］ | モモルグロスビン（Momorgrosvin） | ＲＩＰ１ |
| | Sechium edule（Jacq.）Sw. | セキウミン（Sechiumin） | ＲＩＰ１ |

【０２１９】

【表３１】

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

【０２２０】

【表３２】

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

【０２２１】

【表３３】

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

【０２２２】

【表３４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| eae | Clerodendrum inerme（L.）Gaertn. | ＣＩＰ－２９ | ＲＩＰ１ |
| | | ＣＩＰ－３４ | ＲＩＰ１候補 |
| | Leonurus japonicus Houtt. | レオヌリン | ＲＩＰ候補 |
| Lauraceae | Cinnamomum bodinieri H. Lév. | ボジニエリン（Ｂｏｄｉｎｉｅｒｉｎ） | ＲＩＰ２ |
| | Cinnamomum camphora（L.）J. Presl | カンフォリン（Ｃａｍｐｈｏｒｉｎ） | ＲＩＰ１ |
| | | シンナモミン（Ｃｉｎｎａｍｏｍｉｎ）、シンナモミン１、シンナモミン２、シンナモミン３ | ＲＩＰ２ |
| | | シンフォリン（Ｃｉｎｐｈｏｒｉｎ） | ｓＲＩＰ２ |
| | Cinnamomum parthenoxylon（Jack）Meisn.［Syn.：Cinnamomum porrectum（Roxb.）Kosterm.］ | ポレクチン（Ｐｏｒｒｅｃｔｉｎ） | ＲＩＰ２ |
| Malvaceae | Abelmoschus esculentus（L.） Moench | アベレスキュリン（Ａｂｅｌｅｓｃｕｌｉｎ） | ＲＩＰ１ |
| Nyctaginaceae | Boerhaavia diffusa L. | Ｂｏｅｒｈａａｖｉａ阻害剤 | ＲＩＰ１候補 |
| | Bougainvillea spectabilis Willd. | ＢＡＰ Ｉ、ブーガニン＝Ｂｏｕｇａｉｎｖｉｌｌｅａ ＲＩＰ Ｉ | ＲＩＰ１ |
| | Bougainvillea×buttiana cv. Enid Lancester | ＢＢＰ－２４、ＢＢＰ－２８ | ＲＩＰ１ |
| | Bougainvillea× buttiana cv. Mahara | ＢＢＡＰ１ | ＲＩＰ１ |
| | Mirabilis expansa（Ruiz&Pav.）Standl. | ＭＥ１、ＭＥ２ | ＲＩＰ１ |
| | Mirabilis jalapa L. | ＭＡＰ、ＭＡＰ－２、ＭＡＰ－３、ＭＡＰ－４、ＭＡＰ－Ｓ | ＲＩＰ１ |

【０２２３】

【表３５】

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

【０２２４】

【表３６】

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

【０２２５】

【表３７】

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

【０２２６】

本発明は次の例によりさらに例解される。これらは決して本発明を限定すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【０２２７】

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

雌Ｂａｌｂ／ｃヌードマウスに、ヒトＡ４３１腫瘍細胞の懸濁液を皮下注射した。マウスの皮膚下に、ヒト表皮癌腫をゼノグラフト動物腫瘍モデルにおいて発生させた。腫瘍細胞

の注射後に、ゼノグラフト腫瘍がおよそ１７０～１８０$mm^3$のサイズまで発生することを許した。Ａ４３１腫瘍細胞は次の特徴を有する：高ＥＧＦＲ発現体、中度ＣＤ７１発現体、低ＨＥＲ２発現体。

【０２２８】

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

【０２２９】

【表３８】

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

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

【０２３０】

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

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

【０２３１】

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

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

【０２３２】

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

【０２３３】

例１

１つのアーム上におけるＳＯ１８６１分子及び他方のアーム上におけるアンチセンスＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴヌクレオチド（癌細胞の癌標的ｈｓｐ２７ ｍＲＮＡを標的化し、その分解を誘導する）とのコンジュゲート化（不安定な（Ｌ）コンジュゲート化）のための特定の化学末端基（ＤＢＣＯ、ＴＣＯ）を有する三官能性リンカー骨格を設計及び産生して、ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡを産生した（図１６）。ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡを、その第３のアーム（マレイミド）によってシステイン残基（Ｃｙｓ）抗ＥＧＦＲ抗体のセツキシマブ（セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$_4$）にコンジュゲート化した。

【０２３４】

この骨格を含むコンジュゲートを、ＥＧＦＲにより媒介される腫瘍を標的化した遺伝子サイレンシング活性について、Ａ４３１ゼノグラフ「ヌード」マウス腫瘍モデルにおいて試験した。腫瘍がサイズ～１７０ｍｍ$^3$に達した第１２日に投薬を開始し、腫瘍サンプルを最初の投薬後の７２ｈにおいて収集し、細胞の対照ｍＲＮＡ発現（参照遺伝子）と比較

されたＨＳＰ２７遺伝子発現について分析した。これは、２５ｍｇ／ｋｇセツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$^{3,7}$の１投薬が、セツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{3,8}$又はセツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$^{4}$単独治療の一投薬と比較してＨＳＰ２７遺伝子発現の４０％縮減をもたらすということを明らかにした（図１）。基剤対照の腫瘍と比較して、２５％の遺伝子サイレンシングの縮減が観察された。これは、コンジュゲート化されたＳＯ１８６１が、インビボの腫瘍における治療薬オリゴヌクレオチドの標的化された送達を効率的に誘導し得るということを示し、かつ可能化する。

【０２３５】

これをさらに強めるために、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ　ＤＡＲ４）$^{4}$を、図２に例解されている通りインビトロで、ＥＧＦＲを発現するもの（Ａ４３１）における向上したＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングについて試験した。セツキシマブ－Ｃｙｓ－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$^{3,7}$は、セツキシマブ－（Ｌｙｓ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ）$^{4}$又はセツキシマブ－（Ｃｙｓ－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{3,8}$単独と比較して、Ａ４３１細胞におけるＨＳＰ２７遺伝子サイレンシングを効率的に誘導する（図２）。

【０２３６】

例２

１標的２コンポーネント系は、図１１に例解されるｍＡｂ１－（デンドロン（ＳＯ１８６１）$^{n}$）$^{n}$とｍＡｂ１－エフェクターとの組み合わせ処置であり、２標的２コンポーネント系は、図１２に例解されるｍＡｂ１－（デンドロン（ＳＯ１８６１）$^{n}$）$^{n}$＋ｍＡｂ２－エフェクターの組み合わせである。

【０２３７】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$を、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$、ＤＡＲ３，９によってシステイン残基（Ｃｙｓ）コンジュゲート化を介して抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブにコンジュゲート化し、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）において抗ＥＧＦＲ抗体－タンパク質毒素コンジュゲート（セツキシマブ－サポリン）との組み合わせで、向上した殺細胞活性について試験した。セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリンは、高ＥＧＦＲ発現細胞において毒素により媒介される殺細胞を効率的に誘導するが、これは、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$又はセツキシマブ（当量）＋１０ｐＭセツキシマブ－サポリン若しくはセツキシマブによっては誘導されなかった（図３Ａ）。低レベルのＥＧＦＲを発現する細胞（ＨｅＬａ）における類似の実験は、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{3,9}$の活性を明らかにせず（図３Ｃ）、十分なＥＧＦＲ受容体発現の不在下では、エンドソームのタンパク質毒素の脱出及び毒素により媒介される殺細胞を誘導するための有効な細胞内ＳＯ１８６１濃度（閾値）は達されないということを指示した。

【０２３８】

次に、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$を、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$、ＤＡＲ４によるシステインコンジュゲート化（Ｃｙｓ）によって抗ＨＥＲ２抗体トラスツズマブにコンジュゲート化し、ＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）において、抗ＨＥＲ２抗体－タンパク質毒素コンジュゲート（トラスツズマブ－サポリン）との組み合わせで、向上した殺細胞活性について試験した。トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$＋５０ｐＭトラスツズマブ－サポリンは、毒素により媒介される殺細胞を効率的に誘導するが、これは、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$又はトラスツズマブ（当量）＋５０ｎＭトラスツズマブ－サポリン若しくはトラスツズマブでは誘導されなかった（図３Ｂ）。低レベルのＨＥＲ２を発現する細胞（ＪＩＭＴ－１）における類似の実験は、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$）$^{4}$の活性を明らかにせず（図３Ｄ）、十分なＨＥＲ２受容体発現の不在下では、エンドソームのタンパク質毒素脱

出及び毒素により媒介される殺細胞を誘導するための有効な細胞内ＳＯ１８６１濃度（閾値）は達されないということを指示した。

【０２３９】

次に、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{3,9}$又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{4,4}$（Ｌｙｓ＝抗体のリジンにコンジュゲート化されたデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）を、ＥＧＦＲ＋＋／ＣＤ７１＋細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）において、２標的２コンポーネント系として１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンとの組み合わせで試験した。これは両方のコンジュゲートについて殺細胞活性の強い向上を示したが、これは、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{3,9}$、又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{4,4}$、又はセツキシマブ（当量）＋１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリン、又はセツキシマブによっては誘導されなかった（図４Ａ）。低レベルのＥＧＦＲを発現する細胞（ＣａＳＫｉ、ＥＧＦＲ＋／ＣＤ７１＋）における類似の実験は、高発現体における活性（図４Ａ）と比較して、セツキシマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{3,9}$又はセツキシマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{4,4}$（図４Ｃ）両方について縮減された活性を明らかにしており、より低いＥＧＦＲ受容体発現レベルを有する細胞では、有効な細胞内ＳＯ１８６１濃度は低く、縮減された毒素によって媒介される殺細胞活性をもたらすということを指示した。

【０２４０】

同じ実験を、ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンとの組み合わせのトラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{4,7}$によって、ＨＥＲ２＋＋／ＣＤ７１＋（ＳＫ－ＢＲ－３）細胞株について行い、対照と比較して強い殺細胞活性を明らかにした（図４Ｂ）。トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$又はトラスツズマブ－Ｌｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_{4,7}$を、１０ｐＭ　ＣＤ７１ｍａｂ－サポリンとの組み合わせでＨＥＲ２＋／－／ＣＤ７１＋（ＪＩＭＴ－１）について試験したときには、殺細胞活性は観察され得ず、十分なＨＥＲ２受容体発現の不在下では、エンドソームのタンパク質毒素脱出及び毒素により媒介される殺細胞を誘導するための有効な細胞内ＳＯ１８６１濃度（閾値）は達されないということを指示した。

【０２４１】

次に、トラスツズマブ－Ｃｙｓ－（デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$＋トラスツズマブ－エムタンシン（Ｔ－ＤＭ１、抗体－低分子毒素コンジュゲート）を、向上した殺細胞活性についてＨＥＲ２発現細胞（ＳＫ－ＢＲ－３）において試験した。エンドソーム膜は低分子が細胞質に達することにとってのバリアを形成しないので、Ｔ－ＤＭ１単独又はＴ－ＤＭ１＋当量のトラスツズマブと比較して、この組み合わせでは向上した殺細胞は観察されなかった（図５）。

【０２４２】

例３

材料及び方法

デンドロン（ＳＯ１８６１）$_4$－ＢＮＡオリゴ合成（図１７）

ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴジスルフィド（１．１ｍｇ、０．１８７μｍｏｌ）を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰ有する２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$（５００μＬ）に溶解し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１時間後に、反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルターを用いることによって濾過した（１４０００×ｇ、３０ｍｉｎ）。残渣溶液を、１．０ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$（５００μＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を再び上に記載されている同じ条件下で濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$／アセトニトリル（３：１ｖ／ｖ、１．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物をデンドロン（ＳＯ１８６１）４－マレイミド１（３．５４ｍｇ、０．３７５μｍｏｌ）に追加した（図１７）。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ$^{4A}$に付した。産物に対応

する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１．２５ｍｇ、８５％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９４％
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１８９６［Ｍ－８］$^{8-}$、２１６７［Ｍ－７］$^{7-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．７７$^{6B}$
結果
ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴ（癌標的のｍＲＮＡ転写物の熱ショックタンパク質２７を標的化するアンチセンスＢＮＡオリゴ（ＨＳＰ２７ＢＮＡ））を、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$にコンジュゲート化し（ＨＳＰ２７ＢＮＡ－デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$、図１７）、Ａ４３１癌細胞に同時投与した。読み出しとしては、Ａ４３１細胞におけるＨＳＰ２７　ｍＲＮＡの遺伝子サイレンシングを決定した。これは、ＨＳＰ２７ＢＮＡ－デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$処置が、ＨＳＰ２７ＢＮＡ単独と比較して、ＨＳＰ２７遺伝子サイレンシング活性の改善をもたらすということを明らかにした（図６）。

【０２４３】

例４

方法
ＳＯ１８６１放出アッセイ
デンドロン（ＳＯ１８６１）$_4$－Ｃｂｚ（０．０５ｍｇ）（図７Ａ）に、水／アセトニトリル／ＴＦＡ（１．００ｍＬ／１．００ｍＬ／４滴）を含有する溶液５０μＬを追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。ＳＯ１８６１放出を、ＵＰＬＣ－ＭＳ$^4$を用いて経時的に追跡した。
結果
酸性条件下におけるデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$（図７Ａ）からのＳＯ１８６１分子の放出効率が決定された（図７Ａ）。図７Ｂは、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$そのもの（上）、３０ｍｉｎ後の反応混合物（中央）、及び１．５時間後の反応混合物（下）のＵＰＬＣ　ＵＶトレース（ＰＤＡ）を示す。図７Ｃは、ＬＲＭＳによる観察されたｍ／ｚ値の解釈を示す。対応するＵＶｒ．ｔ．（ｍｉｎ）による次のｍ／ｚ値が観察された：ｒ．ｔ．＝１．４６、２２８２　［Ｍ－４］$^{4-}$（Ａ、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$）；ｒ．ｔ．＝１．４３、２４２７［Ｍ－３］$^{3-}$（Ｂ、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_3$）；ｒ．ｔ．＝１．３８、１８１２［Ｍ－３］$^{3-}$（Ｃ、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_2$）；ｒ．ｔ．＝１．２９、１７９７［Ｍ＋２］$^{2+}$（Ｄ、デンドロン－Ｌ－ＳＯ１８６１）；ｒ．ｔ．＝１．２２、１８６２［Ｍ－１］$^{1-}$（Ｅ、ＳＯ１８６１）；ｒ．ｔ．＝１．０５、１７４７／１７６９［Ｍ＋１／Ｍ＋２３］$^{1+}$（Ｆ、デンドロン－）。

【０２４４】

次に、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$を、ＥＧＦＲ発現細胞（Ａ４３１及びＨｅＬａ）において、標的化された毒素のＥＧＦジアンチンの向上した送達について試験した。これは、デンドロン（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチンは、向上した毒素により媒介される殺細胞を誘導し得るが、「裸の」デンドロン（デンドロン（ＮＥＭ）$_4$）又はデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$、又はデンドロン（ＮＥＭ）$_4$＋１０ｐＭ　ＥＧＦジアンチンは、これらの濃度においては向上した殺細胞　を示そうとしないということを示している（図８Ａ、８Ｂ）。

【０２４５】

例５

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^n$合成（図１３、１４、１５）
材料及び方法
略語
ＤＣＭ　ジクロロメタン
ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＭＦ　Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
ＥＤＣＩ・ＨＣｌ　３－（（エチルイミノ）メチレンアミノ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパ

ン－１－アミニウムクロリド
ＥＭＣＨ．ＴＦＡ　Ｎ－（ε－マレイミドカプロン酸）ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩
ｍｉｎ　分
ｒ．　ｔ．　保持時間
ＴＣＥＰ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩
Ｔｅｍｐ　温度
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸
ＴＨＦ　テトラヒドロフラン
分析方法
ＬＣ－ＭＳ法１，[1]
装置：Ａｇｉｌｅｎｔ　１２００　Ｂｉｎ．ポンプ：Ｇ１３１２Ａ、脱気装置；オートサンプラー、ＣｏｌＣｏｍ、ＤＡＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｇ１３１６Ａ、２１０、２２０、及び２２０～３２０ｎｍ、ＰＤＡ：２１０－３２０ｎｍ、ＭＳＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ　ＬＣ／ＭＳＤ　Ｇ６１３０Ｂ　ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ　１００－１０００；ＥＬＳＤ　Ａｌｌｔｅｃｈ　３３００ガス流量　１．５ｍｌ／ｍｉｎ、ガスｔｅｍｐ：４０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ　Ｃ１８、３０×２．１ｍｍ、３．５μｍ、Ｔｅｍｐ：３５℃、流量：１ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：$t_0$＝５％Ａ、$t_{1.6min}$＝９８％Ａ、$t_{3min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：１．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、溶離液Ｂ：水中の０．１％ギ酸
【０２４６】
　ＬＣ－ＭＳ法２，[2]
装置：Ａｇｉｌｅｎｔ　１２６０　Ｂｉｎ．ポンプ：Ｇ７１１２Ｂ、マルチサンプラー、カラムＣｏｍｐ、ＤＡＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｇ７１１５Ａ、２１０、２２０、及び２２０－３２０ｎｍ、ＰＤＡ：２１０－３２０ｎｍ、ＭＳＤ：Ａｇｉｌｅｎｔ　ＬＣ／ＭＳＤ　Ｇ６１３０Ｂ　ＥＳＩ、質量範囲は産物の分子量に依存する：
[A]ｐｏｓ／ｎｅｇ　１００－１０００
[B]ｐｏｓ／ｎｅｇ　１００－１４００
；ＥＬＳＤ　Ａｌｌｔｅｃｈ　３３００ガス流量１．５ｍｌ／ｍｉｎ、ガスｔｅｍｐ：４０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）Ｃ１８、３０×２．１ｍｍ、３．５μｍ、Ｔｅｍｐ：４０℃、流量：１ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：$t_0$＝５％Ａ、$t_{1.6min}$＝９８％Ａ、$t_{3min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：１．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル中の０．１％ギ酸、溶離液Ｂ：水中の０．１％ギ酸
【０２４７】
　ＬＣ－ＭＳ法３，[3]
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ　８００－１５００；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブｔｅｍｐ：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ　Ｔｅｍｐ：２５℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：$t_0$＝５％Ａ、$t_{2.0min}$＝９８％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポストタイム：０．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル、溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。
【０２４８】
　ＬＣ－ＭＳ法４，[4]
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、ｐｏｓ／ｎｅｇ　１５００－２５００；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブｔｅｍｐ：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）ＣＳＨ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ　Ｔｅｍｐ：２５℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：$t_0$＝１５％Ａ、$t_{2.0min}$＝６０％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ

、ポストタイム：０．３ｍｉｎ、溶離液Ａ：アセトニトリル、溶離液Ｂ：水中の１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２４９】

ＬＣ－ＭＳ法５，[5]

装置：Ｗａｔｅｒｓ ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ ＦＴＮ、ＳＯ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０－３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２ ＥＳＩ、質量範囲は産物の分子量に依存する：

[A]ｐｏｓ／ｎｅｇ １５００－２５００

[B]ｎｅｇ ２０００－３０００

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

【０２５０】

調製方法

分取ＭＰ－ＬＣ法１，[1]

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

【０２５１】

分取ＭＰ－ＬＣ法２，[2]

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

【０２５２】

分取ＬＣ－ＭＳ法１，[3]

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

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

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

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

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

【０２５３】

分取ＬＣ－ＭＳ法２，[4]

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

フラッシュクロマトグラフィー

Ｇｒａｃｅ Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ Ｘ２（登録商標）Ｃ－８１５ Ｆｌａｓｈ；溶媒送達系：３ピストンポンプ、オートプライミング、一ランで４つの独立したチャンネル、４つまでの溶媒、溶媒が枯渇したときにラインを自動切り替え；最大ポンプ流量２５０ｍＬ／ｍｉｎ；最大圧力５０ｂａｒ（７２５ｐｓｉ）；検出：ＵＶ２００～４００ｎｍ、４つまでのＵＶシグナルの組み合わせ、全ＵＶ範囲の走査、ＥＬＳＤ；カラムサイズ：装置上４－３３０ｇ、ルアー型、オプションホルダーによって７５０ｇから３０００ｇまで。

【０２５４】

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ 合成（図１３）

ＳＯ１８６１（１２１ｍｇ、０．０６５ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（１１０ｍｇ、０．３２５ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、３．００ｍＬ）及びＴＦＡ（０．０２０ｍＬ、０．２６０ｍｍｏｌ）を追加した。反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣに付した[1]。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（１２０ｍｇ、９０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９６％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０６９［Ｍ－１］[1-]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．０８[4]

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[4]合成（図１４）

【０２５５】

中間体１：

ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート

６－アジドヘキサン酸（０．９４３ｇ、６．００ｍｍｏｌ）、ＥＤＣＩ．ＨＣｌ（１．２１ｇ、６．３０ｍｍｏｌ）、及びＯｘｙｍａＰｕｒｅ（０．９３８ｇ、６．６０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１０．０ｍＬ）に溶解し、混合物を５分間撹拌した。次に、ＤＭＦ中のジ－ｔｅｒｔ－ブチル（アザンジイルビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート（１．８２ｇ、６．００ｍｍｏｌ）の溶液（５．００ｍＬ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。５時間後に、反応混合物を真空において蒸発させ、残渣を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（５０ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（２×５０ｍＬ）、及びブライン（５０ｍＬ）によって洗浄し、$Na_2SO_4$によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（酢酸エチル－ヘプタン勾配、１０：９０が１００：０まで上昇）により精製して、表題化合物（２．６７ｇ、１００％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９８％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２８７／３４３／４６５ ［Ｍ－１５５／Ｍ－９９／Ｍ＋２３］[1+]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．０２[2A]

【０２５６】

中間体２：

Ｎ，Ｎ－ビス（２－アミノエチル）－６－アジドヘキサンアミド二塩酸塩

ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ジカルバメート（２．６６ｇ、６．００ｍｍｏｌ）に、イソプロパノー

ル中のＨＣｌ（５－６　Ｎ、２０．０ｍＬ、１１０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。４時間後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物（１．４９ｇ、７９％）を白色固体として与えた。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４３［Ｍ＋１］$^{1+}$

【０２５７】

中間体３：

テトラ－ｔｅｒｔ－ブチル（（５Ｓ，５Ｓ）－（（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（６－オキソヘキサン－６，１，５－トリイル））テトラカルバメート

ＤＭＦ（３０．０ｍＬ）及びＤＩＰＥＡ（２．６２ｍＬ、１５．１ｍｍｏｌ）中のＮ，Ｎ－ビス（２－アミノエチル）－６－アジドヘキサンアミドジヒドロクロリド（１．１９ｇ、３．７６ｍｍｏｌ）の溶液に、Ｂｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＮｐ（３．６９ｇ、７．９０ｍｍｏｌ）を追加し、混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（１００ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を１Ｎ重硫酸カリウム溶液（１００ｍＬ）及び飽和重炭酸ナトリウム溶液（５×１００ｍＬ）によって洗浄し、$Na_2SO_4$によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、標題産物（３．０７ｇ、９１％）をわずかに黄色がかった固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９４％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：８００／９００／９２２　［Ｍ－９９／Ｍ＋１／Ｍ＋２３］$^{1+}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１７$^{2A}$

【０２５８】

中間体４：

４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート

４－ニトロフェニルトリフルオロアセタート（５．１７ｇ、２２．０ｍｍｏｌ）及び３－（アセチルチオ）プロピオン酸（２．９６ｇ、２０．０ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（６．９７ｍＬ、４０．０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（５０ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（５０ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（５×５０ｍＬ）、及びブライン（５０ｍＬ）によって洗浄し、$Na_2SO_4$によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、標題産物（４．９０ｇ、９１％）をわずかに黄色がかった固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９９％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２９２［Ｍ＋２３］$^{1+}$

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９４$^{2A}$

【０２５９】

中間体５：

（Ｓ）－２，６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミドテトラヒドロクロリド

テトラ－ｔｅｒｔ－ブチル（（５Ｓ，５’Ｓ）－（（（（６－アジドヘキサノイル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（６－オキソヘキサン－６，１，５－トリイル））テトラカルバメート（１．８０ｇ、２．００ｍｍｏｌ）を、イソプロパノール中のＨＣｌ（５－６Ｎ、５０．０ｍｌ、２７５　ｍｍｏｌ）に溶解し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物を白色固体として与えた。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２５０　［Ｍ＋２］$^{2+}$，　５００　［Ｍ＋１］$^{1+}$

【０２６０】
中間体６：
（２Ｓ）‐２，６‐ビス［３‐（アセチルスルファニル）プロパンアミド］‐Ｎ‐［２‐（６‐アジド‐Ｎ‐｛２‐［（２Ｓ）‐２，６‐ビス［３‐（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］ヘキサンアミド
ＤＭＦ（３０ｍＬ）及びＤＩＰＥＡ（３．４８ｍＬ、２０．０ｍｍｏｌ）中の（Ｓ）－２，６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）テトラヒドロクロリド（１．２９ｇ、２．００ｍｍｏｌ）の溶液に、４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート（２．２６ｇ、８．４０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を週末をかけて室温で撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣をＤＣＭ／メタノール（９５：５ｖ／ｖ、１００ｍＬ）に溶解した。もたらされた溶液を、１Ｎ重硫酸カリウム溶液（１００ｍＬ）、１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（３×１００ｍＬ）、及びブライン（１００ｍＬ）によって洗浄し、$Na_2SO_4$によって乾燥し、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、表題産物（１．３３ｇ、６５％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳによって、１つの脱保護されたチオ酢酸基を有する産物に対応するｍ／ｚ値を有する不純物（１５％）が見出された。不純物は、ワークアップ中に又は後に形成された。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８５％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５１０［Ｍ＋２］$^{2+}$，１０１９／１０４１［Ｍ＋１／Ｍ＋２３］$^{1+}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．８６[2B]
【０２６１】
中間体７：
Ｎ，Ｎ’－（（９Ｓ，１９Ｓ）－１４－（６－アミノヘキサノイル）－１－メルカプト－９－（３－メルカプトプロパンアミド）－３，１０，１８－トリオキソ－４，１１，１４，１７－テトラアザトリコサン－１９，２３－ジイル）ビス（３－メルカプトプロパンアミド）ホルマート
骨格２（１０２ｍｇ、０．１００ｍｍｏｌ）をメタノール（１．００ｍｌ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（０．４４０ｍｌ、０．４４０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（０．５００ｍｌ、０．５００ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を室温で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、メタノール（２×１０ｍＬ）と同時蒸発させた。残渣をメタノール／水の混合物（９：１ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）に溶解し、もたらされた溶液を分取ＭＰ－ＬＣ[2]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（７５．６ｍｇ、８７％）を無色のネバネバした油として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５１３［Ｍ＋２］$^{2+}$，８２５［Ｍ＋１］$^{1+}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．４２[2A]
【０２６２】
中間体８：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{4}$－アミン
Ｎ，Ｎ’－（（９Ｓ，１９Ｓ）－１４－（６－アミノヘキサノイル）－１－メルカプト－９－（３－メルカプトプロパンアミド）－３，１０，１８－トリオキソ－４，１１，１４，１７－テトラアザトリコサン－１９，２３－ジイル）ビス（３－メルカプトプロパンアミド）ホルマート（２．７３ｍｇ、３．１３μｍｏｌ）を、２０ｍＭ $NH_4HCO_3$の０．５ｍＭＴＣＥＰ／アセトニトリルとの混合物（３：１ｖ／ｖ、３．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（２９．２ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3B]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（

１２．３ｍｇ、４３％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１５１７［Ｍ－６］$^{6-}$，１８２１［Ｍ－５］$^{5-}$，２２７６［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．３９$^{5A}$
【０２６３】
中間体９：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－アジド
デンドロン（ＳＯ１８６１）４－アミン（６．８１ｍｇ、０．７４８μｍｏｌ）及び２，５－ジオキソピロリジン－１－イル１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－オアート（２．９０ｍｇ、７．４８μｍｏｌ）をＤＭＦ（１．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（１．３０２μＬ、７．４８μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ$^{3C}$に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５．８６ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９０％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３４４［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．７８$^{5B}$
【０２６４】
中間体１０：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－マレイミド１
デンドロン（ＳＯ１８６１）４－アミン（８．１２ｍｇ、０．８９１μｍｏｌ）及び２，５－ジオキソピロリジン－１－イル１－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－オアート（３．９４ｍｇ、８．９１μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１．００ｍＬ）に溶解した。次に、ＤＩＰＥＡ（１．５５μＬ、８．９１μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ$^{3C}$に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（６．７６ｍｇ、８０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度６６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３５８［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１３$^{6C}$
【０２６５】
中間体１１：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^4$－マレイミド２
骨格２（５．１０ｍｇ、５．００μｍｏｌ）をメタノール（１００μＬ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（２２．０μＬ、２２．０μｍｏｌ）を追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（２５．０μＬ、２５．０μｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、メタノール（２×５ｍＬ）と同時蒸発させた。もたらされた残渣を、０．５ｍＭ ＴＣＥＰ／アセトニトリルとの２０ｍＭ $NH_4HCO_3$の混合物（３：１ｖ／ｖ、３．２４２ｍＬ）に溶解した。この溶液から、直接的に、１０００μＬをＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（１４．４ｍｇ、６．９４μｍｏｌ、骨格と比較して４．５当量）に追加し、混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１０ｍｉｎ後に、反応混合物を一晩凍結乾燥した。もたらされた残渣に、２，５－ジオキソピロリジン－１－イル３－（２－（２－（３－（２，５－ジオキソ－２ｈ－ピロル－１（５ｈ）－イル）プロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパノエート（５．８４ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（１．００ｍＬ）を追加した。次に、ＤＩＰＥＡ（２．３９μＬ、０．０１４ｍｍｏｌ）を追加し、懸濁液を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ$^{3C}$に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化

合物（１０．９ｍｇ、８５％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８０％。
　ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３５４［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．１６$^{5B}$
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^{8}$合成（図１５）
【０２６６】
中間体１：
ｔｅｒｔ－ブチルＮ－［（１Ｓ）－１－｛［（１Ｓ）－１－｛［２－（６－アジド－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［（２Ｓ）－２，６－ビス（｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝）ヘキサンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］カルバモイル｝－５－［（２Ｓ）－２，６－ビス（｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝）ヘキサンアミド］ペンチル］カルバモイル｝－５－｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝ペンチル］カルバメート
（Ｓ）－２－６－ジアミノ－Ｎ－（２－（６－アジド－Ｎ－（２－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミド）エチル）ヘキサンアミドテトラヒドロクロリド（９６４ｍｇ、１．５０ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２５．０ｍＬ）及びトリエチルアミン（２．０８ｍＬ、１５．０ｍｍｏｌ）に溶解した。次に、Ｂｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＮｐ（３．３６ｇ、７．１８ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）により精製して、表題産物（２．７１ｇ、１００％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。
　ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：８０７［Ｍ－１９８］$^{2+}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．３５$^{2B}$
【０２６７】
中間体２：
（２Ｓ，２’Ｓ）－Ｎ，Ｎ’－（（５Ｓ，１５Ｓ，２２Ｓ）－２２，２６－ジアミノ－１０－（６－アジドヘキサノイル）－１５－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）－６，１４，２１－トリオキソ－７，１０，１３，２０－テトラアザヘキサコサン－１，５－ジイル）ビス（２，６－ジアミノヘキサンアミド）オクタヒドロクロリド
中間体１（２．７１ｇ、１．５０ｍｍｏｌ）を、イソプロパノール中のＨＣｌ（５－６Ｎ、２５．０ｍｌ、１３８ｍｍｏｌ）に溶解し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。次に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされたクルードな産物をＤＣＭ（３×２０ｍＬ）と同時蒸発させて、クルードな表題産物を白色固体として与えた。
　ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０３／２５４［Ｍ－２００／Ｍ$^{+4}$］４＋，３３８［Ｍ＋３］$^{3+}$，５０７［Ｍ＋２］$^{2+}$，１０１２［Ｍ＋１］$^{1+}$
【０２６８】
中間体３：
（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］－Ｎ－［（１Ｓ）－１－｛［２－（６－アジド－Ｎ－｛２－［（２Ｓ）－２，６－ビス［（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］ヘキサンアミド］エチル｝ヘキサンアミド）エチル］カルバモイル｝－５－［（２Ｓ）－２，６－ビス［３－（アセチルスルファニル）プロパンアミド］ヘキサンアミド］ペンチル］ヘキサンアミド
（２Ｓ，２’Ｓ）－Ｎ，Ｎ’－（（５Ｓ，１５Ｓ，２２Ｓ）－２２，２６－ジアミノ－１０－（６－アジドヘキサノイル）－１５－（（Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサンアミド）－６，１４，２１－トリオキソ－７，１０，１３，２０－テトラアザヘキサコサン－１，５－ジイル）ビス（２，６－ジアミノヘキサンアミド）オクタヒドロクロリド（３００ｍｇ、０．２３０ｍｍｏｌ）に、ＤＭＦ（２０．０ｍＬ）、トリエチルアミン（３２０μｌ、２．３０ｍｍｏｌ）、及び４－ニトロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート（５

９５ｍｇ、２．２１ｍｍｏｌ）を追加した。もたらされた懸濁液を６０℃で３０ｍｉｎソニケーションし、室温で一晩撹拌させた。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を、最初にフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－メタノール／ＤＣＭ（１／９ｖ／ｖ）勾配、１００：０が０：１００まで上昇）を行うこと、次に分取ＭＰ－ＬＣ[2]によって精製して、表題産物（７０ｍｇ、１５％）を白色固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：６８５［Ｍ＋３］[3+]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９１[2A]

【０２６９】

中間体４：

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

骨格４（１０．０ｍｇ、４．８７μｍｏｌ）をメタノール（２００μＬ）に溶解した。次に、新しく調製した１Ｎ水酸化ナトリウム溶液（４２．９μＬ、０．０４３ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＨＦ中の１．０Ｍトリメチルホスフィン溶液（２４．４μＬ、０．０２４ｍｍｏｌ）を追加し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を水（１ｍＬ）で希釈し、直接的に分取ＭＰ－ＬＣ[2]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（４．０２ｍｇ、４８％）を白色の綿毛状の固体として与えた。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５６４［Ｍ＋３］[3+]，　８４６［Ｍ＋２］[2+]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．５４[2C]

【０２７０】

中間体５：

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）[8]－アミン

骨格５（０．５２ｍｇ、０．２９９μｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（２９．２ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を、０．５ｍＭ　ＴＣＥＰ／アセトニトリルとの２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$の混合物（３：１ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、ＴＣＥＰ（０．３０ｍｇ、１．０５μｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪した。次に、混合物を、直接的に分取ＬＣ－ＭＳ[3B]に付した。産物に対応する画分を、直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（２．１７ｍｇ、４０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９７％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２２８２［Ｍ－８］[8−]，２６０７［Ｍ－７］[7−]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．４１[5A]

【０２７１】

デンドロン（ＮＥＭ）[4]合成（図１８）

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

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１３４６［Ｍ＋１］[1+]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．４３[3A]

【０２７２】

例６
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ合成、及び腫瘍サンプル遺伝子サイレンシング分析（図１６）
材料及び方法
三官能性リンカー
三官能性リンカー（ＤＢＣＯ、ＴＣＯ、マレイミド）をＢｉｏ－Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｉｎｃ．（ルイスビル、テキサス）に注文した。
ＨＳＰ２７ＢＮＡオリゴ
ＨＳＰ２７ＢＮＡ（－チオール）オリゴ（配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’）（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１）を、Ｂｉｏ－ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｉｎｃ．（ルイスビル、テキサス）に注文した。
【０２７３】
中間体１：
ＳＯ１８６１－アジド
ＳＯ１８６１ ６０ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ））及び１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－ヒドラジド（３９．３ｍｇ、０．１２９ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、１．００ｍＬ）及びＴＦＡ（９．８６μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣ[1]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１５０［Ｍ－１］[1－]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．１０[3B]
【０２７４】
中間体２：
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー
ＳＯ１８６１－アジド（４５ｍｇ、０．０２１ｍｍｏｌ）及び三官能性リンカー（２６．５ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２．５０ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[3C]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６７７［Ｍ－２］[2－]
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５４[6A]
【０２７５】
中間体３：
（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド
１－（４－ホルミルベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（２８．０ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（２４．５ｍｇ、０．０７２ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、２．００ｍＬ）及びＴＦＡ（１１．１μＬ、０．１４５ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を５０℃で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされた残渣をＭＰ－ＬＣ[1]により精製した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（３３．４ｍｇ、８８％）を鮮紫色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：３９４［Ｍ＋２］[2＋]，７８９［Ｍ＋１］[1＋]

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．２８[7A]
【０２７６】
中間体４：
メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ
ＨＳＰ２７　ＢＮＡオリゴジスルフィド（７０．０ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）を２０ｍＭ $NH_4HCO_3$（２０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＴＣＥＰ（１４．３ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルター（５０００×ｇ、３０ｍｉｎ）を用いることによって濾過した。次に、２．５ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を上に記載されている同じ条件下で再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$（３０．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を、アセトニトリル（１０．０ｍＬ）中の（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１４．８ｍｇ、１８．８μｍｏｌ）の溶液に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を凍結し、週末をかけて凍結乾燥して、クルードな表題産物をピンク色の綿毛状の固体として与えた。クルードな産物に２０ｍＭ　ＮＨ４ＨＣＯ３溶液（２０．０ｍＬ）を追加し、もたらされた懸濁液を０．４５μｍシリンジフィルターで濾過した。濾液を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて濾過した。次に、再び、２０ｍＭ　$NH_4HCO_3$の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ　ＮＨ４ＨＣＯ３（２０．０ｍＬ）で希釈し、もたらされた混合物を一晩凍結乾燥して、表題産物（９０．０ｍｇ、１１５％）をピンク色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９１％。
　ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６３１［Ｍ－４］$^{4-}$，２１７４［Ｍ－３］$^{3-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．７３[7B]
【０２７７】
中間体５：
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ
メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ（９０．０ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－三官能性リンカー（４８．６ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（４：１ｖ／ｖ、１２．０ｍＬ）の混合物に溶解した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。１５ｍｉｎ後に、混合物を分取ＬＣ－ＭＳ[4A]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（８２．０ｍｇ、６０％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％（両方のｍ／ｚ値が表題化合物に対応する、２つのピーク）。
　ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６４１［Ｍ－６］$^{6-}$，１９７０［Ｍ－５］$^{5-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．２４及び３．４０[6B]
【０２７８】
中間体１：
ＳＯ１８６１－アジド
ＳＯ１８６１　６０ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ））及び１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－ヒドラジド（３９．３ｍｇ、０．１２９ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、１．００ｍＬ）及びＴＦＡ（９．８６μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。２時間後に、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣ[1]に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度１００％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１５０［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．１０$^{3B}$
【０２７９】
中間体２：
ＳＯ１８６１－三官能性リンカー
ＳＯ１８６１－アジド（４５ｍｇ、０．０２１ｍｍｏｌ）及び三官能性リンカー（２６．５ｍｇ、０．０２２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２．５０ｍＬ）に溶解し、もたらされた混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳ$^{3C}$に付した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（５８．４ｍｇ、８４％）を白色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度８９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６７７［Ｍ－２］$^{2-}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５４$^{6A}$
【０２８０】
中間体３：
（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド
１－（４－ホルミルベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（２８．０ｍｇ、０．０４８ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（２４．５ｍｇ、０．０７２ｍｍｏｌ）に、メタノール（エクストラドライ、２．００ｍＬ）及びＴＦＡ（１１．１μＬ、０．１４５ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を５０℃で撹拌した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を真空中で蒸発させ、もたらされた残渣をＭＰ－ＬＣ$^{1}$により精製した。産物に対応する画分を直ちに一緒にプールし、凍結し、一晩凍結乾燥して、表題化合物（３３．４ｍｇ、８８％）を鮮紫色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９２％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：３９４［Ｍ＋２］$^{2+}$，７８９［Ｍ＋１］$^{1+}$
ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．２８$^{7A}$
【０２８１】
中間体４：
メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ
ＨＳＰ２７　ＢＮＡオリゴジスルフィド（７０．０ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）を２０ｍＭ $NH_4HCO_3$（２０．０ｍＬ）に溶解した。次に、ＴＣＥＰ（１４．３ｍｇ、０．０５０ｍｍｏｌ）を追加し、反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。反応混合物を、３０００Ｄａの分子量カットオフを有する遠心フィルター（５０００×ｇ、３０ｍｉｎ）を用いることによって濾過した。次に、２．５ｍＭ　ＴＣＥＰを有する２０ｍＭ $NH_4HCO_3$の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を上に記載されている同じ条件下で再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ $NH_4HCO_3$（３０．０ｍＬ）によって希釈し、もたらされた混合物を、アセトニトリル（１０．０ｍＬ）中の（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロル－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１４．８ｍｇ、１８．８μｍｏｌ）の溶液に追加した。反応混合物を１ｍｉｎ振盪し、室温で静置した。３０ｍｉｎ後に、反応混合物を凍結し、週末をかけて凍結乾燥して、クルードな表題産物をピンク色の綿毛状の固体として与えた。クルードな産物に２０ｍＭ $NH_4HCO_3$溶液（２０．０ｍＬ）を追加し、もたらされた懸濁液を０．４５μｍシリンジフィルターで濾過した。濾液を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて濾過した。次に、再び、２０ｍＭ　$NH_4$

$HCO_3$の溶液（２０．０ｍＬ）を残渣溶液に追加し、もたらされた混合物を、上に記載されている同じ条件によって遠心フィルターを用いて再び濾過した。残渣溶液を２０ｍＭ$NH_4HCO_3$（２０．０ｍＬ）で希釈し、もたらされた混合物を一晩凍結乾燥して、表題産物（９０．０ｍｇ、１１５％）をピンク色の綿毛状の固体として与えた。ＬＣ－ＭＳに基づく純度９１％。

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

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．７３$^{7B}$

【０２８２】

中間体５：

ＳＯ１８６１－三官能性リンカー－ＢＮＡオリゴ

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

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

ＬＣ－ＭＳｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：３．２４及び３．４０$^{6B}$

【０２８３】

腫瘍サンプルのＲＮＡ単離及び遺伝子発現分析

トータルＲＮＡを、製造者の説明書に従ってＴｒｉＺｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて腫瘍から単離した。単離されたＲＮＡを、ヌクレアーゼ不含水（ＮＦＷ）に再懸濁した。ＲＮＡサンプルをゲル上でそれらのＲＮＡインテグリティについてチェックした。ｃＤＮＡを調製するために、最初に、１００ｎｇのトータルＲＮＡを、ＮＦＷ中に１２．５μｌの最終体積でランダムヘキサマー（Ｑｉａｇｅｎ；最終濃度２μＭ）と混合し、７０℃で５ｍｉｎ変性し、直ちに氷冷した。次に、４μｌの５×ＲＴ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）、０．４μｌの２５ｍＭ　ｄＮＴＰ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、１μｌの２００Ｕ／μＬ　ＭＭＬＶ　ＲＴ酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）、０．５μＬの４０Ｕ／μｌ　ＲＮＡｓｅ阻害剤（Ｐｒｏｍｅｇａ）、及び１．６μＬ　ＮＦＷからなる７．５μｌのｃＤＮＡ合成ミックスを追加した。次のｃＤＮＡ合成プロトコールを用いた：１）１０分２５℃、２）６０分３７℃、３）５分８５℃、４）無限４℃。

単一のｑＰＣＲ反応には、次のミックスを調製した：１μＬのｃＤＮＡ、０．０５μＬのフォワードプライマー（２５０μＭ）、０．０５μＬのリバースプライマー（２５０μＭ）、８．９μｌのＬＮＦＷ、１０μｌのＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）。次のｑＰＣＲプロトコールを用いた：１サイクル：５分９５℃、４０サイクル：１５ｓ　９５℃＋　３０ｓ　６０℃。

【０２８４】

ＨＳＰ２７遺伝子発現を、２－（$Ct_{HSP27}$－ＧＥＯＭＥＡＮ（$Ct_{ref1}$；$Ct_{ref2}$；$Ct_{ref3}$；$Ct_{ref4}$））を用いて計算した。ここで、ｒｅｆ１、ｒｅｆ２、ｒｅｆ３、及びｒｅｆ４は、腫瘍の分析のための参照遺伝子ＩＭＭＴ、ＥＩＦ２Ｓ２、ＧＵＳＢ、及びＵＢＣである。この腫瘍サンプルについて最も理想的かつ安定な参照遺伝子を選ぶために、試験された９つの参照遺伝子の中から、２つの参照遺伝子をＧｅＮＯＲＭ分析の性能に基づいて選んだ。そうするためには、ｑＰＣＲ結果をＱｂａｓｅ＋ソフトウェアプログラムにインポートした。これによって、２つの品質尺度が計算される：正規化された参照遺伝子発現レベルの変動係数（Ｖ）；及びｇｅＮｏｒｍ安定性Ｍ値（Ｍ）１である。Ｍ＜０．２及びＶ＜０．１５を有する参照遺伝子は非常に安定だと考えられる。この分析に基づいて、ＩＭＭＴ及びＥＩＦ２Ｓ２を最も安定な参照遺伝子として選んだ。しかしながら、ＵＢＣ及びＧＵＳＢをもまた参照遺伝子のグループに追加して、正規化の正確度をさらに向上させた。各サンプルはＣＦＸ９６リアルタイムｑＰＣＲマシン（Ｂｉｏ－Ｒ

ａｄ）によってテクニカルトリプリケートとして分析した。
【０２８５】
ｑＰＣＲに用いられたプライマーを下の表Ｂ１に示す。
【０２８６】
【表３９】

表Ｂ１．　プライマー

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

【０２８７】
例７
抗体－（ＳＯ１８６１－Ｌ－三官能性リンカー－Ｌ－ＨＳＰ２７）（Ｃｙｓ）
抗体－デンドロン
抗体－サポリン
Ｔ－ＤＭ１
材料及び方法
トラスツズマブ（Ｔｒａｓ、ハーセプチン（登録商標）、Ｒｏｃｈｅ）、セツキシマブ（Ｃｅｔ、アービタックス（登録商標）、Ｍｅｒｃｋ　ＫＧａＡ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンヒドロクロリド（ＴＣＥＰ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ、エルマン試薬、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｚｅｂａ（商標）スピン脱塩カラム（２ｍＬ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓプロテインゲル（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＮｕＰＡＧＥ（商標）ＭＥＳ　ＳＤＳ泳動緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｎｏｖｅｘ（商標）Ｓｈａｒｐ染色済みタンパク質標準（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＰａｇｅＢｌｕｅ（商標）タンパク質染色溶液（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，４－ジチオスレイトール（ＤＴＴ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、セファデックスＧ２５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、イソプロピルアルコール（ＩＰＡ、９９．６％、ＶＷＲ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（トリス・ＨＣＬ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｌ－ヒスチジン（９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｄ－（＋）－トレハロース脱水物（９９％、Ｓｉｇｍａ

－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート（ＴＷＥＥＮ２０、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＤＰＢＳダルベッコリン酸緩衝食塩水（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、グアニジン塩酸塩（９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物（ＥＤＴＡ－$Ｎａ_2$、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、無菌フィルター０．２μｍ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ジアンチン－Ｃｙｓ（Ｄｉａ－Ｃｙｓ。単一のＣ末端システイン官能基を有するジアンチン変異体、Ｐｒｏｔｅｏｇｅｎｉｘ）、Ｖｉｖａｓｐｉｎ Ｔ４及びＴ１５濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ＰＧ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、テトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（$ＰＥＧ_4$－ＳＰＤＰ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ）、ＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド（Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）。

【０２８８】

方法

ＵＶ－Ｖｉｓ

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

【０２８９】

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

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

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

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

Ｄｉａ－Ｃｙｓ ＯＤ２８０＝０．５７ （ｍｇ／ｍｌ）$^{-1}$ $ｃｍ^{-1}$

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

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

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

サイズ排除クロマトグラフィー

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

【０２９０】

エルマンアッセイ

抗体－デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$^4$（Ｃｙｓ及びＬｙｓ）

ＤＡＲ４によるトラスツズマブ－（Ｌ－ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$及びセツキシマブ－（Ｌ－ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$合成（ＦＢＲ７０６ ＳＴＢ２２／９－１０）

トラスツズマブ及びセツキシマブは以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、不安定な（Ｌ）テトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（$ＰＥＧ_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介して、樹状ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ｄ（ＳＯ１８６１）４－ＥＭＣＨ）にコンジュゲート化した。セツキシマブ－Ｌ－（ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$についての手続きを例示的に記載する：

セツキシマブをＤＰＢＳ ｐＨ７．５緩衝液中で脱塩し、それから２．５０ｍｇ／ｍｌに正規化した。Ａｂのアリコート（９．１９ｍｇ、６１ｎｍｏｌ）に、新しく調製した$ＰＥＧ_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（５．０ｍｇ／ｍｌ、６．７０モル当量、４１１ｎｍｏｌ）を追加し、混合物を手短にボルテックスし、それからローラー混合によって２０℃で

６０分間インキュベーションした。インキュベーション後に、反応をグリシン（２０ｍｇ／ｍｌ、７．７μｌ）の追加によってクエンチし、それから、ＳＰＤＰ部分をＴＣＥＰ（５．０ｍｇ／ｍｌ、ＳＰＤＰ当たり４．０モル当量、１．６４μｍｏｌ）の追加によってインサイチュ還元した。この混合物を、ローラー混合によって２０℃で１５分間ローラー混合した。もたらされたＡｂ－ＳＨを、ｚｅｂａスピン脱塩カラムを用いたＴＢＳ　ｐＨ７．５へのゲル濾過により精製した。Ａｂ－ＳＨを、ＵＶ－ｖｉｓ分析及びエルマンアッセイによってキャラクタリゼーションした（ＳＨ対Ａｂ比＝５．４）。バルクＡｂ－ＳＨ（７．４１ｍｇ、１．９３ｍｇ／ｍｌ、４９ｎｍｏｌ）に、ＤＭＳＯ中の新しく調製したｄ（ＳＯ１８６１）$_4$－ＥＭＣＨ溶液のアリコートを追加し（１０ｍｇ／ｍｌ、Ａｂ当たり８．０モル当量、０．４μｍｏｌ、３．１６ｍｇ、０．３２ｍｌ）、混合物を手短にボルテックスし、それから２０℃で一晩インキュベーションした。コンジュゲート化反応以外に、脱塩されたＡｂ－ＳＨの２つのアリコート（０．２５ｍｇ、１．６７ｎｍｏｌ）をコンジュゲート化の前に取り分け、それぞれ正及び負の対照として、ＮＥＭ（Ａｂ当たり８．０モル当量、１３．３　ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で一晩反応させ。（ＮＥＭの追加前に）１８時間のインキュベーション後に、クルードなコンジュゲート混合物を手短に遠心し、１００μｌアリコートをＵＶ－ｖｉｓによる分析のために取り出し、正及び負の対照と並べてエルマンアッセイによりキャラクタリゼーションして、ｄ（ＳＯ１８６１）４の組み込みを得た。バルクＡｂ－ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$混合物に、新しく調製したＮＥＭ溶液のアリコート（２．５ｍｇ／ｍｌ、５．０モル当量、０．２５μｍｏｌ）を追加し、混合物を、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３０ｃｍセファデックスＧ５０カラムにより精製して、精製されたセツキシマブ－（Ｌ－ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$コンジュゲートを与えた。産物を０．２μｍに濾過して清澄化し、それから、ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ１５濃縮器を用いてｃａ．３ｍｇ／ｍｌに注意深く濃縮して（３，０００ｇ、５分インターバル、５℃）、最終的なセツキシマブ－（Ｌ－ｄ（ＳＯ１８６１）$_4$）$_4$コンジュゲートを与えた。収量：４．４１ｍｇ、４８％（１．６４ｍｇ／ｍｌ）。ｄ（ＳＯ１８６１）４対Ａｂ比＝４．４（表Ｂ２を見よ）。

【０２９１】

【表４０】

表Ｂ２．

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

【０２９２】

抗体－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（Ｃｙｓ）

ＤＡＲ４によるトラスツズマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$、セツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$、ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ、及びＤＡＲ２によるＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰを介したセツキシマブ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_2$合成

トラスツズマブ、セツキシマブ、トラスツズマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１、セツキシマブ－Ｌ－ＳＯ１８６１は以降では「Ａｂ」と言われる。Ａｂを、不安定な（Ｌ）テトラ（エチレングリコール）スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）リンカーを介してＨＳＰ２７にコンジュゲート化した。

【０２９３】

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

トラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$（１．３ｍｇ、８．７ｎｍｏｌ、２．５０ｍｇ／ｍｌ）を、ＤＭＳＯ中の新しく調製したＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１ｍｇ／ｍｌ）（９．２６モル当量、８０．３ｎｍｏｌ、４５μｍｏｌ）と、ローラー混合によって２０℃で６０分間反応させた。その後に、反応をグリシン（ＴＢＳ　ｐＨ７．５中の２ｍｇ／ｍｌの新しく調製した溶液の１５．１μｌ）でクエンチし、それから、ＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出するｚｅｂａ脱塩カラムによって脱塩した。もたらされたＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）のアリコートを取り出し、ＵＶ－Ｖｉｓ分析によって試験した。ＳＰＤＰ組み込みを、ピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）を遊離させるためのＴＣＥＰを用いて、及び３４３ｎｍでのＵＶ－ｖｉｓ分析によって、決定した（ＳＰＤＰ対Ａｂ比：４）。残りのＴｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＰＥＧ$_4$－ＳＰＤＰ）を、新しく調製したＨＳＰ２７オリゴヌクレオチド（オリゴ－ＳＨ）のアリコート（８モル当量、５４．８ｎｍｏｌ、０．３２ｍｇ、１．２４ｍｇ／ｍｌ）と反応させ、ローラー混合によって一晩２０℃でインキュベーションした。１７時間後に、コンジュゲートをＵＶ－ｖｉｓ分析によって分析して、３４３ｎｍでのピリジル－２－チオン（ＰＤＴ）の放出量によってＨＳＰ２７の組み込みを確かめた。クルードなコンジュゲートを、ＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出する１．６×３３ｃｍセファデックスＧ５０カラムを用いて精製した。もたらされたトラスツズマブ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）４－（Ｌ－ＨＳＰ２７）４は単一画分として得た。収量：０．４７ｍｇ、４５％（０．４９ｍｇ／ｍｌ）、ＨＳＰ２７対Ａｂ比＝３．５（表Ｂ３を見よ）。

【０２９４】

全収量：ＳＴＢ１７／１－８が必要とされる

【０２９５】

【表４１】

表Ｂ３．　まとめの反応条件及び結果

| バッチ | ＰＥＧ４－ＳＰＤＰモル当量 | ＨＳＰ２７（オリゴ－ＳＨ）モル当量 | 得られたＤＡＲ | 分析ＳＥＣによる純度（％） | 収　量（％） |
|---|---|---|---|---|---|
| Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$ | ９．２６ | ８ | ３．５ | ８５．１ | ４５ |
| Ｔｒａｓ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$ | ６．８１ | ８ | ４．４ | ９６．０ | ｎ．ｄ． |
| Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$ | ７．２１ | ８ | ３．８ | ８０．８ | ｎ．ｄ． |
| Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_4$ | ６．７０ | ８ | ３．９ | ９３．９ | ｎ．ｄ． |
| Ｃｅｔ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）４－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_2$ | ３．３４ | ３．６ | １．８ | ７６．２ | ８１ |
| Ｃｅｔ－（Ｌ－ＨＳＰ２７）$_2$ | ２．３ | ３．６ | １．５ | ９４．９ | ８７ |

【０２９６】

例８

材料及び方法

我々の現行の研究において、我々は、シッフ塩基（イミン）を介したサポニン結合のための４つの分子アームとクリックケミストリーのための１つのアームとからなるモデル骨格を検討した。ポリマー構造（図１９）は第１世代（すなわち、繰り返される分岐サイクル数）の五価のポリエチレングリコールに基づくデンドリマーである。これはＩｒｉｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ（マルクトレドヴィッツ、ドイツ）から購入した。サポニン（この例ではＳＡ１６４１）を、Ｍｅｒｃｋ（ダルムシュタット、ドイツ）から得られたサポニナム・アルブムと呼ばれるＧｙｐｓｏｐｈｉｌａ種からのサポニンの複合的な生抽出液から精製した。粉末状の生の抽出物（２．５ｇ）を、水（１００ｍＬ）中において水酸化ナトリウム（０．２ｇ）によって加水分解した。溶液を４０℃で２０ｈ撹拌し、それから、ｐＨ５．０に達するまで氷酢酸を足した。タンニンを除去するために、溶液を分液漏斗中で３０ｍＬのブタノールと共に振盪した。水相を再取得し、ブタノール抽出を２回繰り返した。ブタノール相に無水硫酸ナトリウムを足し、濾過し、プールした。ブタノールを蒸発させ、残りのサポニン粉末を２０％メタノール中に最終濃度３０ｍｇ／ｍＬで溶かした。短いソニケーション後に、異なるサポニンを高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分離した。チューブ（カラム排除）を、１．５ｍＬ／ｍｉｎの流量の温水（４０℃）によって、それから、Ｅｕｒｏｓｐｈｅｒ　ＲＰ－Ｃ１８カラム（５μｍ、２５０×８ｍｍ）を包含してイソプロパノール（１００％）によってリンスした。サポニンをカラ

ムにかけ、メタノール勾配によって溶出した（０．０１％トリフルオロ酢酸を足した水中において１．５ｍＬ／ｍｉｎで３０ｍｉｎ以内の２０％メタノールから７０％メタノール、次にさらに６０ｍｉｎの７０％メタノール）（Ｓａｍａ ｅｔ ａｌ， ２０１８）。画分のアリコートを、エレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）によってそれらのＳＡ１６４１含量について分析した。純粋なＳＡ１６４１を含有する画分をプールし、メタノールを蒸発させた。水溶液を、ドライアイスの使用によって回転丸底フラスコ中で薄膜として凍結した。－８０℃での１６ｈの保存後に、サンプルを凍結乾燥した。本発明で定められる骨格を産生するために、ポリマー構造（０．２ｍＭ）及びＳＡ１６４１（３．２ｍＭ）を水（およそｐＨ８）に溶解し、等体積を混合し、２６℃で２４ｈ振盪した。それから、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＣＮＢＨ$_3$；０．１Ｍ）を、ＳＡ１６４１を参照して４倍モル過剰で追加し、サンプルをさらに２４ｈインキュベーションした。それから、構造を超高速高分離液体クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ）／ＥＳＩ－ＭＳにより検証した。サンプルをＲＰ－Ｃ４カラムにかけ、メタノール勾配によって溶出した（０．０１％トリフルオロ酢酸を足した水中において１５ｍｉｎ以内の２５％メタノールから８０％メタノール、次にさらに１０ｍｉｎの８０％メタノール）。Ｗａｔｅｒｓ ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎからのＬＣ－飛行時間型（ＬＣ－ＴＯＦ）質量分析計を用いて、エレクトロスプレーイオン化による精密質量測定のために特に設計されたイオン源であるＬｏｃｋＳｐｒａｙ（商標）の使用によって、画分を分析した。

【０２９７】

結果

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

【０２９８】

例９

材料及び方法

原薬の例として、我々は、標的化された毒素のジアンチン－上皮成長因子（ジアンチン－ＥＧＦ）を用いた。プラスミドのＨｉｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－ｐＥＴ１１ｄ（Ｗｅｎｇ ｅｔ ａｌ， ２００９）（１００ｎｇ）を、２０μＬのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｒｏｓｅｔｔａ（商標）２（ＤＥ３）ｐＬｙｓＳコンピテントセル（Ｎｏｖａｇｅｎ、サンディエゴ、ＣＡ、ＵＳＡ）に追加した。細胞を、熱ショックによってトランスフォーメーションした（氷上で３０ｍｉｎ、４２℃で９０ｓ、氷上で１ｍｉｎ）。その後に、３００μＬの溶原培地（ＬＢ）を追加し、懸濁液を２００ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１ｈインキュベーションした。５０μｇ／ｍＬアンピシリンを有する予熱した溶原培地寒天プレートに、１００μｌの細菌懸濁液を接種し、プレートを３７℃で一晩インキュベーションした。５０μｇ／ｍＬアンピシリン有する溶原培地（３ｍＬ）に、プレートからのコロニーを接種し、細菌を３７℃かつ２００ｒｐｍで８ｈインキュベーションした。懸濁液（５０μＬ）を、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを有する５００ｍＬの溶原培地に追加し、３７℃かつ２００ｒｐｍで一晩インキュベーションした。続いて、体積を２．０Ｌにスケールアップし、０．９という波長６００ｎｍの光学密度に達するまで、細菌を同じ条件下で成長させた。その後に、タンパク質発現を、１ｍＭの最終濃度でのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）の追加によって誘導した。タンパク質発現は３７℃かつ２００ｒｐｍで３ｈ続いた。最終的に、細菌懸濁液を５，０００ｇかつ４℃で５ｍｉｎ遠心し、２０ｍＬのＰＢＳ（１３７ｍＭ ＮａＣｌ、２．７ｍＭ ＫＣｌ、８．１ｍＭ $Na_2HPO_4$、１．４７ｍＭ $KH_2PO_4$）に再懸濁し、使用まで２０℃で保存した。精製のために、細菌懸濁液を融解し、ソニケーションによりリシスした。ライセートを遠心し（１５，８００ｇ、４℃、３０分）、イミダゾールを最終濃度２０ｍＭで追

加した。上清を、２０ｍＭイミダゾールの存在下で、４℃で３０ｍｉｎに渡って、連続振盪下において、２ｍＬのＮｉ－ニトリロ三酢酸アガロースとインキュベーションした。続いて、材料を２０ｍＬカラムに注加し、１０ｍＬ洗浄緩衝液（５０ｍＭ　$NaH_2PO_4$、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール）で３回洗浄し、ジアンチン－ＥＧＦを、洗浄緩衝液中の１０ｍＬずつの増大して行く濃度のイミダゾール（３１、６５、１２５、及び２５０ｍＭ）によって溶出した。溶出液画分（２ｍＬ）を、２．０ＬのＰＢＳに対して４℃で一晩透析した。脱塩されたジアンチン－ＥＧＦを、Ａｍｉｃｏｎ（登録商標）Ｕｌｔｒａ－１５（１０ｋＤａ）によって濃縮し、タンパク質濃度を定量した。

【０２９９】

好適なクリックケミストリー基をジアンチン－ＥＧＦに導入するために、ジアンチン－ＥＧＦを参照して８倍モル過剰のアルキン－$PEG_5$－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジルエステルを、ジメチルスルホキシドに溶解し、９体積のジアンチン－ＥＧＦ（０．２Ｍ　$NaH_2PO_4$／$Na_2HPO_4$、ｐＨ８中に１ｍｇ）に追加した。室温で４ｈのインキュベーション後に、結合していないアルキンを、ＰＤ１０カラム（ＧＥ－Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、フライブルク、ドイツ）の使用により分離した。ポリマー構造とのクリックケミストリーを、銅（Ｉ）によって触媒されるアルキン－アジド環化付加によって実行した。アルキン－ジアンチン－ＥＧＦ（０．０２ｍＭ）、デンドリマー（０．０５ｍＭ）、$CuSO_4$（０．１ｍＭ）、トリス（３－ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル）アミン（０．５ｍＭ）、及びアスコルビン酸ナトリウム（５ｍＭ）を、０．１Ｍ　$NaH_2PO_4$／$Na_2HPO_4$、ｐＨ８中で、室温で１ｈに渡って、穏やかなアジテーション下においてインキュベーションした。それから、低分子質量物質を、ＰＤ１０カラムを用いて分離した。

【０３００】

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

【０３０１】

結果

例のポリマー構造、五量体デンドリマー（ペントリマー）は、ＳＡ１６４１の不在下でも存在下でも、標的細胞に対するいずれかの細胞毒性効果を有さない（図２１、カラム２及び３）。骨格の不在下では、標的化された毒素（ジアンチン－ＥＧＦ）は、０．１ｎＭの濃度において最大毒性の半分を示す（カラム４）。ＳＡ１６４１の存在下では、同じ濃度は全ての細胞の死をもたらし、エンドソーム脱出の向上因子として作用するＳＡ１６４１の一般的能力を指示している（カラム５）。ポリマー構造の存在は、ＳＡ１６４１の存在下でも不在下でも、ジアンチン－ＥＧＦの毒性に影響せず（カラム６及び７）、骨格がジアンチン－ＥＧＦの毒性に影響しないということを指示している。クリックケミストリーによってモデルポリマー構造をジアンチン－ＥＧＦという例の原薬にカップリングするた

めには、物質は前にはアルキン基とカップリングされなければならなかった。原薬の製造業者は、物質の活性が影響されないままである彼の選んだ位置において、合成中にクリック位置を物質に直接的に導入し得る。アルキン修飾された原薬をポリマー構造とクリックしたときに、活性の追加の損失はなく、ポリマー構造そのものは毒性ではないということを指示した。

【０３０２】

例１０

材料

次の化学物質を購入のまま用いた：メタノール（ＭｅＯＨ、ＬｉＣｈｒｏｓｏｌｖ、Ｍｅｒｃｋ）、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ、９５％、ＴＣＩ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ、９９．８％、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）、２－メルカプトエタノール（９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭデンドリマー、エチレンジアミンコア、５．０世代溶液、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、シアニン３カルボン酸（Ｃｙ３－ＣＯＯＨ、９５％、Ｌｕｍｉｐｒｏｂｅ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン）－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ－［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート、Ｎ－［（ジメチルアミノ）－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ－［４，５－ｂ］ピリジン－１－イルメチレン］－Ｎ－メチルメタンアミニウムヘキサフルオロホスフェートＮ－オキシド（ＨＡＴＵ、９７％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ウシ血清アルブミン画分Ｖ（ＢＳＡ、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ、９９％、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）、２－イミノチオランヒドロクロリド（９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ローダミンｂ（ＲｈｏｄＢ、９５％、Ｍｅｒｃｋ）、ダルベッコリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ）、塩酸（ＨＣｌ、３７％、Ｍｅｒｃｋ）、ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{13}$－ＤＢＣＯ（Ｃｌｉｃｋ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｔｏｏｌｓ）、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８ ５－ＴＦＰ（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｃｈｅｒ）、アジド－ＰＥＧ$_{3}$－ＳＳ－ＮＨＳ（Ｃｏｎｊｕ－Ｐｒｏｂｅ）、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＣＮＢＨ３、９５％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、過硫酸アンモニウム（ＡＰＳ、９８％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルエチレンジアミン（ＴＭＥＤＡ、９９％、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、カスタムペプチドＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫ（９５％、ＰｅｐｔｉｄｅＳｙｎｔｈｅｔｉｃｓ）、アジド－ｄＰＥＧ$_{12}$－ＮＨＳ（９５％、Ｑｕａｎｔａ Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ）、ＰＦｄ－Ｇ４－アジド－ＮＨ－ＢＯＣデンドロン（Ｇ４－デンドロン、９５％、Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｆａｃｔｏｒｙ）、シアニン５－ＤＢＣＯ（Ｃｙ５－ＤＢＣＯ、９５％、Ｌｕｍｉｐｒｏｂｅ）、クロロホルム（ＣＨＣｌ$_{3}$、９９．５％、Ｓｉｇｍａ）、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ ０．５ｍＬ遠心フィルター（３ｋＤａ ＭＷＣＯ、Ｓｉｇｍａ）、ｍＰＥＧ－ＳＣＭ（ｍＰＥＧ$_{2ｋ}$－ＮＨＳ、９５．６％、Ｃｒｅａｔｉｖｅ ＰＥＧ Ｗｏｒｋｓ）、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５ｍＬ遠心フィルター（１０ｋＤａ ＭＷＣＯ、Ｓｉｇｍａ）。

【０３０３】

方法

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ

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

モードを言う。ＬＰモードはリニアポジティブモードを言う。
【０３０４】
Ｈ－ＮＭＲ
$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ分析はＢｒｕｋｅｒ　４００ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計を用いて行った。サンプル調製は測定の２４時間前に行われた。これによって、２ｍｇのサンプルが０．８ｍＬのメタノール－$Ｄ_{4}$（９９％、　Ｄｅｕｔｅｒｏ）に溶解された。
【０３０５】
ＵＶ－Ｖｉｓ
ＵＶ－Ｖｉｓ測定は、ＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計で、２００～７５０ｎｍのスペクトル範囲で行った。
【０３０６】
サイズ排除クロマトグラフィー
サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、ＧＥ　ＨｅａｌｔｈｃａｒｅからのセファデックスＧ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅによって、かつプレパックＰＤ１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、セファデックスＧ２５Ｍ）で行った。クロマトグラフィーを行う前に、材料をそれぞれの溶離液中で膨潤させることにより活性化した。
【０３０７】
透析
再生セルロース膜：ＭＷＣＯ＝１及び２ｋＤａ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ）及びＭＷＣＯ＝１２～１４ｋＤａ（Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）を用いて透析を行った。典型的には、透析は１Ｌの溶媒で２４ｈ行い、これはプロセスの最初の６ｈの後に交換した。
【０３０８】
凍結乾燥
凍結乾燥は、Ａｌｐｈａ　１－２　ＬＤ　ｐｌｕｓ（Ｍａｒｔｉｎ　Ｃｈｒｉｓｔ　Ｇｅｆｒｉｅｒｔｒｏｃｋｎｕｎｇｓａｎｌａｇｅｎ　ＧｍｂＨ）で行った。典型的には、サンプルを液体窒素で凍結し、高真空で凍結乾燥機内に置いた。
【０３０９】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ合成
Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ　ＬからのＳＯ１８６１（５９ｍｇ、３１．７μｍｏｌ）及びＥＭＣＨ（３０１ｍｇ、８８８μｍｏｌ）を、スターラーと共にラウンドフラスコ内に置き、１３ｍＬメタノールに溶解した。ＴＦＡ（４００μＬ、ｃａｔ．）を溶液に追加し、反応混合物を８００ｒｐｍかつ室温で３ｈ、ＲＣＴ　Ｂマグネットスターラー（ＩＫＡ　Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ）で撹拌した。３ｈの撹拌後に、ミックスをＭｉｌｌｉＱ水又はＰＢＳどちらかで希釈し、ＭｉｌｌｉＱ水又はＰＢＳどちらかに対して鋭意に２４ｈ透析した。１ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ７）を用いた。透析後に、溶液を凍結乾燥して白色粉末を得た。収量６２．４ｍｇ（９５％）。乾燥したアリコートを、さらに、$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ及びＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによるキャラクタリゼーションに用いた。
【０３１０】
$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、メタノール－$Ｄ_{4}$）（図２２Ａ、ＳＯ１８６１）：δ＝０．５０－５．５０（ｍ，サポニントリテルペノイド及び糖バックボーンプロトン），　９．４３　（１Ｈ，ｓ，サポニンのアルデヒドプロトン，$Ｈ^{ａ}$）．
【０３１１】
$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、メタノール－$Ｄ_{4}$）（図２２Ｂ．　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、ＰＢＳワークアップ）：δ＝０．５０－５．５０（ｍ，サポニントリテルペノイド及び糖バックボーンプロトン），６．７９（２　Ｈ，ｓ，マレイミドプロトン，$Ｈ^{ｃ}$），７．６２－７．６８（１　Ｈ，ｍ，ヒドラゾンプロトン，$Ｈ^{ｂ}$）．
【０３１２】
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＰモード）（図２３Ａ）：ｍ／ｚ　２１２４　Ｄａ（$[Ｍ＋Ｋ]^{＋}$，サポニン－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ　２１０９　Ｄａ（$[Ｍ＋Ｋ]^{＋}$，ＳＯ１８６１

－ＥＭＣＨ），ｍ／ｚ　２０９４　Ｄａ（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＮモード）（図２８Ｃ）：ｍ／ｚ　２２７５　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２２４４　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２２２２　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１７８　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１４４　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２１２２　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２０９２　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，サポニン－ＥＭＣＨコンジュゲート），２０７０　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ），２０３８　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，ＳＯ１８３２－ＥＭＣＨ），１９３６　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，ＳＯ１７３０－ＥＭＣＨ），１８６１　Ｄａ（［Ｍ－Ｈ］$^{-}$，ＳＯ１８６１）．

【０３１３】

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール

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

【０３１４】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図２３Ｂ）（ＲＰモード）；ｍ／ｚ　２１９３　Ｄａ（［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ　２１８５　Ｄａ（［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール），ｍ／ｚ　２１７０　Ｄａ（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$，ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）．

【０３１５】

ＢＳＡ－ＳＯ１８６１合成

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

【０３１６】

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

【０３１７】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ

メタノールに溶解した７２０μＬのＰＡＭＡＭ（３０ｍｇ、１．０４μｍｏｌ）を、２５０ｍＬラウンドフラスコ内に置き、メタノールをロータリーエバポレータ（２０ｍｂａｒ

、６０℃）によって除去した。残りのＰＡＭＡＭを９ｍＬのＤＭＳＯに溶解した。０．５ｍＬのＤＭＳＯに溶解したＨＡＴＵ（７．６ｍｇ、２０μｍｏｌ）を、ＤＭＳＯ中のＣｙ３－ＣＯＯＨ（０．６ｍｇ、１．２μｍｏｌ）溶液に追加し、ミックスを、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１ｈ振盪した。１ｈの振盪後に、ＨＡＴＵ－Ｃｙ３溶液を撹拌ＰＡＭＡＭ溶液に追加し、反応ミックスを室温で１２ｈ撹拌した。１２ｈの撹拌後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、２ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ６）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、コンジュゲート溶液の体積をロータリーエバポレータ（２０ｍｂａｒ、６０℃）によって縮減し、濃縮されたコンジュゲート溶液をセファデックスＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅサイズ排除カラム（１６ｍＬカラム体積）に通した。第１の画分を収集し、凍結乾燥して、粘稠なピンク色のＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３コンジュゲートを得た。ＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３コンジュゲート形成を、薄層クロマトグラフィー（メタノール／水、ｖ／ｖ１：１）によるクロマトグラフィーと、セファデックスＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅカラムによるより速いバンドの出現とによって確認した。収量２１．３ｍｇ（６３％）。ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度法により測定したＰＡＭＡＭ当たりの色素モル比は、０．４３であった。

【０３１８】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３ Ａ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ２８．０ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ）．

【０３１９】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１合成

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

【０３２０】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図３３Ｂ～Ｄ及び図３４に例解されている。Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{6}$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３ Ｂ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ ３８．４ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１），１７．９ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{2+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１）．

【０３２１】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{13}$、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{51}$、及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料２－イミノチオラン及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表１において強調されている。

【０３２２】

【表４２】

表１．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１合成の反応パラメータ

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

【０３２３】

**Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１の合成**

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

【０３２４】

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

Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１），３５．７ ｋＤａ （［Ｍ＋Ｈ］$^{2+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１）．

【０３２５】

Ｇ４－デンドロン色素標識及び脱保護

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

【０３２６】

部分的にＣｙ５標識された凍結乾燥Ｇ４－デンドロンを、撹拌子を有する５０ｍＬラウンドフラスコ内の１２ｍＬ ＣＨＣｌ$_3$に溶解した。１２ｍＬのＴＦＡを追加し、反応ミックスを、ＲＣＴ Ｂマグネットスターラー（ＩＫＡ Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ）上で、８００ｒｐｍかつ室温で３ｈ撹拌した。３ｈの撹拌後に、溶媒をロータリーエバポレータ（Ｈｅｉｄｏｌｐｈ ＷＢ ２０００）上で減圧（５０℃、３０ｍｂａｒ）下において除去した。蒸発後に、バッチをＭｉｌｌｉＱ水に溶解し、ＰＤ１０サイズ排除カラムに通した。Ｇ４－デンドロンコンジュゲート形成を、薄層クロマトグラフィー（メタノール／水、ｖ／ｖ１：１）によるクロマトグラフィーと、ＰＤ１０カラムによるより速いバンドの出現とによって確認した。サイズ排除クロマトグラフィーの得られた画分を凍結乾燥して、青色粉末を得た。

【０３２７】

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

【０３２８】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３２Ｂ）（ＲＰモード）：ｍ／ｚ ３９５６ Ｄａ（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$， Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン ＋ ＰＦ$_6$－対イオン），３８２０ Ｄａ（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン － ＰＦ$_6$－ 対イオン）， ３６１７ Ｄａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，Ｇ４－デンドロン不純物）， ３０１７（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，Ｇ４－デンドロン）．

【０３２９】

Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１合成

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

【０３３０】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図３３に例解されている。Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３３Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ １０．

１９ ｋＤａ （［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_3$），９．２７ ｋＤａ （［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_3$），７．９２ ｋＤａ （［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_2$），７．１４ ｋＤａ （［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_2$），５．８６ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｃｙ５－Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_1$），５．０７ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］＋，Ｇ４－デンドロン－［ＳＯ１８６１］$_1$）．

【０３３１】

他のＧ４－デンドロン－（ＳＯ１８６１）ｎコンジュゲートの合成は上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表２において強調されている。

【０３３２】

【表４３】

表２． Ｇ４－デンドロン－ＳＯ１８６１合成の反応パラメータ

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

【０３３３】

ＰＡＭＡＭチオール化

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

【０３３４】

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

【０３３５】

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

【０３３６】

出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表３において

強調されている。
【０３３７】
【表４４】

表３．　ＰＡＭＡＭ－ＳＨ合成の反応パラメータ

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

【０３３８】
ＰＡＭＡＭ　ＰＥＧ化
最も低いＰＡＭＡＭ対ｍＰＥＧ$_{2k}$比について手続きを例示的に記載する。１０μＬのＤＭＳＯに溶解したＰＡＭＡＭ（３３３μｇ、１２．８ｎｍｏｌ）溶液に、１３μＬのＤＭＳＯに溶解したｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳ（０．２６８ｍｇ、１２８ｎｍｏｌ）を追加した。反応混合物を、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、２ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ６）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、バッチを、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５ｍＬ遠心フィルター（１０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を用いた遠心濾過によって濃縮した。濃縮されたバッチをＰＤ１０サイズ排除カラムに通し、次に凍結乾燥をして、白色の綿毛状の粉末を得た。収量は決定されなかった。
【０３３９】
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルが図５２に例解されている。ＰＡＭＡＭ－（ｍＰＥＧ$_{2k}$）$_3$のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図５２Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３３．４６ｋＤａ　（［Ｍ＋Ｈ］$^+$，ＰＡＭＡＭ－［ｍＰＥＧ$_{2k}$］$_3$）．
【０３４０】
他のＰＡＭＡＭ－ｍＰＥＧ$_{2k}$コンジュゲートの合成は、上に記載されている方法論によって行われたが、出発材料ｍＰＥＧ$_{2k}$－ＮＨＳの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表４において強調されている。
【０３４１】
【表４５】

表４．　ＰＡＭＡＭ－ｍＰＥＧ$_{2k}$合成の反応パラメータ。

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

【０３４２】
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$についての手続きを例示的に記載する。Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$（０．４１ｍｇ、４．７１ｎｍｏｌ）をフリーズドライし、１００μＬのＤＭＳＯに溶解した。ＤＭＳＯに溶解したＤＢＣＯ－ＰＥＧ$_{13}$－ＮＨＳエステル（０．１９７ｍｇ、１８８　ｎｍｏｌ）をＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１溶液に追加し、混合物を８００ｒｐｍかつ室温でＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で振盪した。３ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ　Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：０．１ｍｇ（２２％）。
【０３４３】
　ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３６Ｄ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　９２．５　ｋＤａ（[Ｍ＋Ｈ]$^{+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ），５３．０　ｋＤａ（[Ｍ＋Ｈ]$^{2+}$，Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ）．
【０３４４】
　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{5}$－（ＤＢＣＯ）$_{38}$及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－（ＤＢＣＯ）$_{10}$の合成は、上に記載されている方法論によって行われた。出発材料のそれぞれの仕込み当量及びコンジュゲートのそれぞれの質量が表５において強調されている。
【０３４５】
【表４６】

表５．　Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成の反応パラメータ

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

【０３４６】
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ合成
Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$（０．３ｍｇ、４．８ｎｍｏｌ）をフリーズドライし、１００μＬのＤＭＳＯに溶解した。ＤＭＳＯに溶解したＤＢＣＯ－ＰＥＧ$_{13}$－ＮＨＳエステル（０．２０２ｍｇ、１９４　ｎｍｏｌ）をＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－Ｎ

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

【０３４７】

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

【０３４８】

ＥＧＦジアンチン及びジアンチン発現

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

【０３４９】

ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８合成

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

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

【０３５０】

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

【０３５１】

ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８合成

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

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図３８Ｄ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ　３０．７　ｋＤａ　（[Ｍ＋Ｈ]$^{+}$，ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８）．

【０３５２】

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

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

【０３５３】

収量：５４μｇ（７０％）。

【０３５４】

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

【０３５５】

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

Ｆ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ$_{12}$－Ｎ$_3$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、用いられたアジド－ＰＥＧリンカーが異なった。それぞれのアジド－ＰＥＧリンカー、それらの仕込み当量、及びコンジュゲートのそれぞれの質量が、表６において強調されている。

【０３５６】

【表４７】

表６．　ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＰＥＧ－Ｎ３合成の反応パラメータ

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

【０３５７】

ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８－Ｓ－Ｓ－ＰＥＧ－Ｎ$_3$

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

【０３５８】

収量：１０．３μｇ（３９％）。

【０３５９】

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

【０３６０】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－サポニン－毒素コンジュゲート合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯについての手続きを例示的に記載する。ＭｉｌｌｉＱ水中のＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－ＤＢＣＯ（１７μｇ、０．１８４ｎｍｏｌ）溶液を、１．５ｍＬ反応チューブ内のＰＢＳ中のジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８－ＳＳ－ＰＥＧ３－Ｎ$_3$（３．６μｇ、０．０８９ｎｍｏｌ）溶液と混合し、反応ミックスをＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ１５℃で２ｈ振盪した。振盪後に、小さいアリコートを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析、及びＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｅｒ（登録商標）ＶｅｒｓａＤｏｃ（商標）ＭＰ４０００イメージングシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）による蛍光イメージングのために取り出した（図３９）。

【０３６１】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_5$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－（ＳＯ１８６１）$_{27}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチ

ン－ＥＧＦ－ Ａｌｅｘａ４８８、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－Ｓ－Ｓ－ジアンチン－Ａｌｅｘａ４８８、及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{17}$－ジアンチン－ＥＧＦ－Ａｌｅｘａ４８８の合成は、上に記載されている方法論によって行われたが、用いられたＰＡＭＡＭ－サポニン－ＤＢＣＯバッチ、用いられたアジド－毒素バッチ、及びそれらの仕込み当量が異なる。出発材料のそれぞれの仕込み当量が表７において強調されている。

【０３６２】

【表４８】

表７． Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－サポニン－毒素合成の反応パラメータ

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

【０３６３】

還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１合成

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ（０．１９ｍｇ、１３ ｎｍｏｌ）及びＳＯ１８６１（０．７３ｍｇ、０．３９μｍｏｌ）を、ｐＨ５の２００μＬの０．１Ｍ酢酸緩衝液に別々に溶解した。ＳＯ１８６１及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ溶液を混合し、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐ

ｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で２０ｍｉｎ振盪した。２０ｍｉｎの振盪後に、ＮａＣＮＢＨ３（５ｍｇ、８１μｍｏｌ）を振盪反応溶液に追加し、反応混合物がＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪することを許した。１２ｈの振盪後に、反応ミックスをＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、１２～１４ｋＤａのＭＷＣＯを有する再生セルロース膜チューブ（ＺｅｌｌｕＴｒａｎｓ、Ｃａｒｌ Ｒｏｔｈ）を用いてＭｉｌｌｉＱ水に対して鋭意に２４ｈ透析した。透析後に、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１溶液を、３ｋＤａのＭＷＣＯを有するＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １５フィルターによる４，０００ｒｐｍ（１５℃）での遠心濾過を用いて濃縮した。コンジュゲートを溶液として冷蔵庫に保存し、アリコートを分析のため取った。収量：決定されなかった。

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

【０３６４】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{30}$及びＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{10}$の合成は上に記載されている方法論によって行われたが、還元剤ＮａＣＮＢＨ$_{3}$が反応バッチに追加される前の時間が異なる。ＮａＣＮＢＨ$_{3}$追加のそれぞれの時間及びコンジュゲートのそれぞれの質量が、表８において強調されている。

【０３６５】

【表４９】

表８． 還元的アミノ化によるＣｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－ＳＯ１８６１合成、反応パラメータ

| ＮａＣＮＢＨ$_{3}$追加前の反応ミックスを振盪する時間 | ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによる質量 | ＰＡＭＡＭ当たり取り付けられたＳＯ１８６１分子 | もたらされたコンジュゲート |
|---|---|---|---|
| ２０ｍｉｎ | ８８．８ｋＤａ | ～３０ | Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{30}$、図４０Ｃ |
| １２ｈ | ４８．０ｋＤａ | ～１０ | Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭ－ＮＣ－（ＳＯ１８６１）$_{10}$、図４０Ｂ |

【０３６６】

ポリ（ＳＯ１８６１）合成

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

【０３６７】

ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図４２Ｃ）（ＬＰモード）：ｍ／ｚ １８．２ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{9}$），１６．０ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{8}$），１４．２ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{7}$），１２．２ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］＋，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{6}$），１０．２ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{5}$），８．２ ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{4}$）

，６．２　ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$，ポリ（ＳＯ１８６１）$_{3}$）．
【０３６８】
　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨペプチドカップリング
配列ＳＥＳＤＤＡＭＦＣＤＡＭＤＥＳＤＳＫを有するカスタムペプチド（０．６ｍｇ、０．３μｍｏｌ）及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（０．８ｍｇ、０．３９μｍｏｌ）を、別々に２００μＬのＰＢＳに溶解した。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及びペプチド溶液を混合し、ＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍかつ室温で１２ｈ振盪した。振盪後に、小さいアリコートを分析のために取り出した。収量：決定されなかった。
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（図４５Ｂ）（ＲＮモード）：ｍ／ｚ　４．０５　ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{-}$，ペプチド－ＳＯ１８６１），３．９２　ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{-}$，ペプチド－ＳＯ１７３０），１．９８　ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{-}$，ペプチド），１．８６　ｋＤａ（［Ｍ＋Ｈ］$^{-}$，ＳＯ１８６１）．
【０３６９】
　結果
ＳＯ１８６１分子へのコンジュゲート化反応のための利用可能な化学基を考えて、４つの化学基を同定した。糖残基のアルコール及びジオール、トリテルペノイドバックボーン上のアルデヒド基、糖残基の１つの上のカルボン酸（グルクロン酸）、及びトリテルペノイドバックボーン上のアルケン基が、図２４において強調されている。
【０３７０】
　各同定された化学基の長短（表９）から判断すると、アルデヒド及びアルコール基は、可逆的コンジュゲート化反応にとって最も良く好適であり、アルケン及びカルボン酸（グルクロン酸）は、不可逆的／安定なコンジュゲート化反応にとって最も良く好適な基である。しかしながら、ＳＯ１８６１の分子構造上のアルデヒド基は、アルコールと比べて、可逆的コンジュゲート化反応にとって最も好適である。なぜなら、一方では、化学選択的な反応を許す１つのアルデヒドのみが構造上に存在するからである。なぜなら、他方では、アルデヒドは、種々の化学基、例えばアミン、ヒドラジド、及びヒドロキシルアミンとの可逆的コンジュゲート化反応を行い、イミン、ヒドラゾン、及びオキシムのような酸切断可能な部分を形成し得るからである。この因子は、所望の可逆的コンジュゲート化反応のための化学基についての選択の自由を可能化する。反対に、アルコールも、アセタール及びケタールの形成を介した可逆的コンジュゲート化反応の良好な候補であるが、それらはグリコシド構造上に大量に存在するので、化学選択性を欠く。
【０３７１】
　不可逆的かつ安定な結合の形成のためには、カルボン酸が最も好適である。なぜなら、それは、ペプチド化学に用いられる普通のツール（例えば、カルボジイミドにより媒介されるアミド形成を介したアミンとの反応）によってアミド及びエステルを形成し得るからである。
【０３７２】

【表５０】

表９．　サポニンコンジュゲート化反応に利用可能である官能基

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

【０３７３】

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

【０３７４】

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

【０３７５】

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

【０３７６】

６．５～７．５のｐＨ範囲で行われるときには、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミド基は、チオール及びチオールを持つポリマー構造との急速かつ特異的なマイケル付加反応を行う（図２５Ｂ）。加えて、ＳＯ１８６１とＥＭＣＨとの間の酸感受性のヒドラゾン連結部を利用して、酸性環境における骨格からのサポニン放出を行い得る（図２６）。それ

ゆえに、ＥＭＣＨリンカーは、ｐＨ切断可能な戦略及びポリマー構造へのコンジュゲート化戦略両方の必要を充たす。

【０３７７】

ポリマー構造へのコンジュゲート化のための理想的なＥＭＣＨスペーサー長について、コンピュータシミュレーション（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ＣｈｅｍＢｉｏ３Ｄ　Ｖｅｒ．１３．０．０．３０１５）は、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ上のマレイミド基が分子の辺縁部に位置し、それゆえにチオールを持つポリマー構造にとってアクセス可能であるはずであるということを示している（図２７）。

【０３７８】

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを合成するために、ＳＯ１８６１上のアルデヒド基からＥＭＣＨへの変換を許す戦略を開発した（図２８Ａ）。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨコンジュゲートを単離し、核磁気共鳴分光法（材料及び方法のセクション、図２２Ｂを見よ）及びマトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）によって、図２８　Ｂ及び２８　Ｃ、及び図２３　Ａに示されている通り、首尾良くキャラクタリゼーションした。

【０３７９】

ヒドラゾン結合のｐＨ依存的な加水分解を試験するために、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨをｐＨ　３のＨＣｌ溶液に溶解し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを２つの異なる時点で記録した（図２９）。図２９Ａ及び２９Ｂに示さている通り、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨに対応するｍ／ｚ　２０７０Ｄａのピークの明瞭な減少傾向が、図２９Ｂにおいて可視である。ＳＯ１８６１は加水分解中に生成されるので、ｍ／ｚ　１８６１Ｄａのピークの増大が記録され、これはｍ／ｚ　２０７０Ｄａの減少傾向に伴った。これらの結果は、ヒドラゾン結合が加水分解に対して応答性であり、それがＳＯ１８６１上に取り付けられている場合であっても切断されて来るということを示す。

【０３８０】

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨをポリマー構造にコンジュゲート化するために、ポリマー構造のアクセス可能なアミンは、薬剤の２－イミノチオランの助けによってチオールに変換される。それから、ポリマー構造上の生成した自由なチオールは、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのマレイミド基へのチオール－エンマイケル型付加の求核剤として作用する（図３０）。この開発された方法論は、アクセス可能なアミン基を得るいずれかの利用可能なポリマー構造へのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのコンジュゲート化にとって好適であり、さらにその上、それぞれ、ポリマー構造に依存してコンジュゲート化されるＳＯ１８６１分子の数のコントロールを許す。

【０３８１】

「レディ・トゥ・コンジュゲート化サポニン」のポリマー構造へのコンジュゲート化の第１の概念実証は、タンパク質（ポリアミノ酸骨格の例）のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）のアミンの使用により得られた。コンジュゲート化後に、質量分析は、ｍ／ｚ～７０、～７２、及び～７４ｋＤａのＢＳＡ－ＳＯ１８６１の対応するピークを得た（図３１Ａ）。ｍ／ｚ　６６ｋＤａを有するＢＳＡの検出質量（図３１Ｂ）と比較して、得られたＢＳＡ－ＳＯ１８６１の質量は、ＢＳＡ当たり２、３、及び４つのＳＯ１８６１分子からなるＢＳＡ－ＳＯ１８６１コンジュゲートの混合物に対応する。

【０３８２】

「レディ・トゥ・コンジュゲート化サポニン」のポリマー構造へのコンジュゲート化の次の概念実証は、アミンを持つ第５世代（Ｇ５）デンドリマーポリ（アミドアミン）（共有結合的にカップリングされた赤色蛍光色素（Ｃｙ３）を有するＰＡＭＡＭ）の使用により得られた。ＰＡＭＡＭ－Ｃｙ３が、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ及びＳＯ１８６１－ＨＡＴＵ両方へのコンジュゲート化のためのポリマー構造として利用され、ＳＯ１８６１のポリマー構造へのコンジュゲート化のモデルとしての用をなした（図３２）。

【０３８３】

Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭの全てのアクセス可能なアミン基を、Ｃｙ３－ＰＡＭＡＭアミン当

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

【０３８４】

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

【０３８５】

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

【０３８６】

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

【０３８７】

ジアンチン－ＥＧＦがモデルの標的化された毒素としての用をなし、ジアンチンは標的化されていない毒素としての用をなした。両方の毒素を、色素のテトラフルオロフェニルエステル（ＴＦＰ）誘導体を用いて、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８で標識した。それから、色素標識されたタンパク質をヘテロ二官能性ＮＨＳ－ＳＳ－ＰＥＧ$_{3}$－アジドリンカーにコンジュゲート化して、ＰＡＭＡＭ－サポニンコンジュゲートに対するＳＰＡＡＣの対応する化学部分を得た。Ｍａｌｄｉ－ＴＯＦ－ＭＳ測定は、１つのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８色素及び９つのＮＨＳ－ＳＳ－ＰＥＧ$_{3}$－アジド分子が、ジアンチン－ＥＧＦ分子に取り付けられたということを示した（図３７、図３８）。さらにそ

の上、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）４８８標識されたジアンチン－ＥＧＦを、ヘテロ二官能性ＮＨＳ－ＰＥＧ$_{12}$－アジドリンカーにコンジュゲート化した。これは、ジスルフィド結合を欠き、それゆえに非毒素切断可能な構築物を生成する。

【０３８８】

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

【０３８９】

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

【０３９０】

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

【０３９１】

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

【０３９２】

論じられているポリマー及びタンパク質のアプローチの中のＳＯ１８６１骨格の開発のための別のアプローチは、ポリ（ＳＯ１８６１）アプローチである。このアプローチの発想は、ＳＯ１８６１を放出するｐＨ感受性の切断可能な結合を有するＳＯ１８６１分子のみからなるポリマーを生成することである。加えて、ポリ（ＳＯ１８６１）は、毒素及び

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

【０３９３】

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

【０３９４】

反応条件をさらに微調整するために、他の開始剤、例えば２，２’－アゾビス［２－メチル－Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）プロピオンアミド］及びアゾビスイソブチロニトリル、並びに他の重合技術、例えばコントロールされたラジカル重合（原子移動ラジカル重合、可逆的付加解裂連鎖移動など）が試験されるであろう。さらに、ＥＭＣＨの代わりとしての別のヒドラジドリンカーが考えられ得る。これは、マレイミド基よりもラジカル重合にとって好適である官能基（例えば、アクリル又はアクロリオール残基）を得る。

【０３９５】

ＳＯ１８６１骨格の開発のための別のアプローチは、ＤＮＡアプローチである。このア

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

【０３９６】

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

【０３９７】

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

【０３９８】

例４

細胞生存率アッセイ

ＨｅＬａ細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）を足したＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）によって、９６ウェルプレート上に、５，０００ｃ／ｗで１００μＬ／ウェルで播種し、３７℃かつ５％$CO_2$で一晩インキュベーションした。翌日に、ＰＡＭＡＭ、ＰＡＭＡＭコンジュゲート、Ｇ４－デンドロン（例３で調製された）、又はクロロキン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）サンプルの２０×濃縮ストックを、ＤＭＥＭ中に調製した。培地を細胞培養プレートから除去し、１６０μＬ培養培地で置き換え、次に、１０μＬサンプル／ウェルの追加（２０×濃縮ストックから）、及び３７℃での４５ｍｉｎインキュベーションをした。このインキュベーションの間に、ＳＯ

１８６１濃度曲線を調製した。ＳＯ１８６１マスターストックを、１２５０ｒｐｍで振盪しながら５０℃で１０ｍｉｎ加熱した。次に、１５ｓｅｃのソニケーション、及び１，２５０ｒｐｍで振盪しながらの５０℃における１ｍｉｎの手短な再加熱をした。続いて、ＳＯ１８６１の連続希釈物をＰＢＳ中に調製した。ＳＯ１８６１濃度曲線を１０×濃縮ストックとして調製し、これから２０μＬをウェル当たり追加した。３７℃での１５ｍｉｎインキュベーション後に、ＤＭＥＭによって３０ｐＭに希釈された）１０μＬのジアンチン－ＥＧＦ（例２で調製された）、又は等量のＰＢＳを含有するＤＭＥＭを、ウェル当たり追加し、１．５ｐＭという最終ジアンチン－ＥＧＦ濃度、並びに指示されているＳＯ１８６１及び異なるポリマー構造又はクロロキン濃度を、２００μＬ／ウェルの最終体積で得た。

【０３９９】

処置後に、細胞を３７℃で７２ｈｒインキュベーションした後、細胞生存率を、製造業者の説明書に従って行われたＭＴＳアッセイによって決定した（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ ９６（登録商標）ＡＱｕｅｏｕｓ Ｏｎｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ細胞増殖アッセイ、Ｐｒｏｍｅｇａ）。手短には、ＭＴＳ溶液を、１０％ＦＢＳを足したフェノールレッドなしのＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ）によって２０希釈した。細胞を２００μＬ／ＰＢＳウェルで１回洗浄し、これの後に１００μＬの希釈されたＭＴＳ溶液をウェル当たり追加した。プレートを３７℃でおよそ２０～３０分間インキュベーションした。続いて、４９２ｎｍのＯＤをＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ ＦＣプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で測定した。定量化のために、「培地のみ」ウェルのバックグラウンドシグナルを、全ての他のウェルから差し引いた後に、処置／無処置細胞の細胞生存率パーセンテージを、処置ウェルのバックグラウンド補正済みシグナルを無処置ウェルのバックグラウンド補正済みシグナルで割ることによって計算した（×１００）。

【０４００】

ＦＡＣＳ分析

ＨｅＬａ細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ）及び１％ペニシリン／ストレプトマイシン（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ）を足したＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ）によって、５００，０００ｃ／プレートで、１０ｃｍディッシュ上に播種し、９０％のコンフルエンシーに達するまで４８ ｈｒ（５％$CO_2$、３７℃）インキュベーションした。次に、細胞を単一細胞へとトリプシン処理した（ＴｒｙｐｌＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ、Ｇｉｂｃｏ Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。０．７５×$10^6$細胞を１５ｍＬファルコンチューブに移し、遠心した（１４００ｒｐｍ、３ｍｉｎ）。細胞ペレットを沈めたまま、上清を捨てた。ペレットを、ボルテックスシェーカー上でＦａｌｃｏｎチューブを穏やかにタップすることにより解離させ、細胞を４ｍＬの冷ＰＢＳ（$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$不含、２％ＦＢＳ）で洗浄した。洗浄後に、細胞を３ｍＬの冷ＰＢＳ（$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$不含、２％ＦＢＳ）に再懸濁し、３つの丸底ＦＡＣＳチューブに等しく分割した（１ｍＬ／チューブ）。細胞を再び遠心し、２００μＬの冷ＰＢＳ（$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$不含、２％ＦＢＳ）、又は１９５μＬの冷ＰＢＳ（$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$不含、２％ＦＢＳ）中に５μＬ抗体を含有する２００μＬの抗体溶液に再懸濁した。ＡＰＣマウスＩｇＧ１ κアイソタイプＣｔｒｌ ＦＣ（＃４００１２２、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）をアイソタイプ対照として用い、ＡＰＣ抗ヒトＥＧＦＲ（＃３５２９０６、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を用いて、ＥＧＦＲ受容体を染色した。サンプルを、チューブローラーミキサー上で４℃において３０ｍｉｎインキュベーションした。その後で、細胞を冷ＰＢＳ（$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$不含、２％ＦＢＳ）で３ｘ洗浄し、ＰＢＳ中の２％ＰＦＡ溶液を用いて室温で２０ｍｉｎ固定した。細胞を冷ＰＢＳで２ｘ洗浄し、ＦＡＣＳ分析のために２５０～３５０μＬの冷ＰＢＳに再懸濁した。サンプルを、ＢＤ ＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩフローサイトメトリーシステム（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びＦｌｏｗＪｏソフトウェアによって分析した。

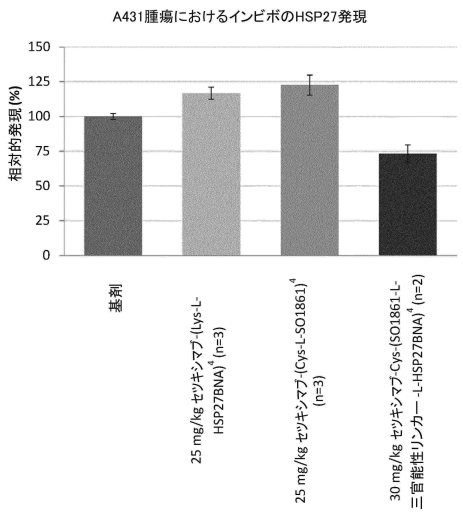
【０４０１】

結果
ＰＡＭＡＭ及びＰＥＩ（ポリエチレンイミン）などのアミン含有ポリマー構造上のアミノ基は、それらの固有のＨ＋緩衝能によってエンドソームの酸性化をブロックすることができるということが先に記載されている。ＳＯ１８６１のエンドソーム脱出向上特性は低いエンドソームｐＨ（＜ｐＨ５）でのみ暴露されるので、骨格又は機能化された骨格は、エンドソームの酸性化に干渉すること及びそれゆえにＳＯ１８６１の活性をブロックすることができる化学基を含有すべきではない。
【０４０２】
Ｇ５　ＰＡＭＡＭ（１２８個の第１級アミン及びおよそ１２６個の第３級アミン）及びＧ４－デンドロン（１６個の第１級アミン）のアミン含有ポリマー構造を、これらの分子がＳＯ１８６１のエンドソーム脱出向上能を阻害するかどうかを決定するために試験した。ＨｅＬａ細胞におけるジアンチン－ＥＧＦ及び種々のＳＯ１８６１濃度との組み合わせの（ネイティブな又はチオール化された）ＰＡＭＡＭ又はデンドロン（ネイティブ）の同時投与実験を行った。エンドソーム酸性化の阻害の対照として、クロロキンを用いた。
【０４０３】
ＨｅＬａ細胞は十分なＥＧＦＲ細胞表面レベルを示す（図５０Ａ）。「ネイティブな」ＰＡＭＡＭ及びクロロキン両方は、Ｈｅｌａ細胞において、標的化された毒素のＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出、及び続いての殺細胞を阻害するということが観察される（図５０Ｂ）。５００ｎＭのＰＡＭＡＭはエンドソーム酸性化阻害剤クロロキンと等しい程度までも阻害するが、６６７ｎＭデンドロンは全く効果を有さない。「ネイティブな」ＰＡＭＡＭの阻害活性が、ＰＡＭＡＭ上のアミノ基の利用可能性を原因とするかどうかにさらに対処するために、ＰＡＭＡＭの第１級アミノ基を、２－イミノチオランとの反応により部分的にチオール化し（図５１）、１２８のうち１６個の（図５１Ｃ）、６５／１２８個の（図５１Ｄ）、及び１０８／１２８個の（図５１Ｅ）ブロックされた第１級アミンをもたらした。６５及び１０８個の第１級アミンのチオール化は、ＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害を克服するが、１６個までのアミン基のチオール化は、依然として、標的化された毒素のＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害効果を示すということが観察される（図５０Ｃ）。ＰＡＭＡＭの第１級アミノ基を、ｍＰＥＧ２ｋ－ＮＨＳとの反応によってもまた部分的にＰＥＧ化し（図５２）、１２８のうちの３つの（図５２Ｃ）、８／１２８個の（図５２Ｄ）、及び１８／１２８個の（図５２Ｅ）ブロックされた第１級アミンをもたらした。ＰＥＧ化により３つの第１級アミンのみをブロックすることは、ＳＯ１８６１により媒介されるエンドソーム脱出の阻害を逆行させるために既に十分である（図５１Ｄ）。ＰＥＧ化の遮蔽効果は、最も蓋然的には、変換される少数のアミンを越えて拡がる。なぜなら、ＰＥＧ化は、十分なレベルに達する場合には、分子全体を遮蔽し得る水和層を導入することが公知であるからである。
【０４０４】
これらの結果は、ＰＡＭＡＭなどのポリマー構造上のある種の数の自由なアミノ基の存在が、エンドソーム酸性化をブロックし得、それゆえにＳＯ１８６１又は他のグリコシドのエンドソーム脱出活性を阻害し得るということを実証している。Ｇ４－デンドロンについて示された通り、アミノ基の数がより低い場合には、又はチオール化又はＰＥＧ化などのアミノ基が遮蔽されている場合には、阻害効果は逆行する。
【０４０５】
参照
Ｗｅｎｇ，Ａ．；Ｔｈａｋｕｒ，Ｍ．；Ｂｅｃｅｒｅｎ－Ｂｒａｕｎ，Ｆ．；Ｂａｃｈｒａｎ，Ｄ．；Ｂａｃｈｒａｎ，Ｃ．；Ｒｉｅｓｅ，Ｓ．Ｂ．；Ｊｅｎｅｔｔ－Ｓｉｅｍｓ，Ｋ．；Ｇｉｌａｂｅｒｔ－Ｏｒｉｏｌ，Ｒ．；Ｍｅｌｚｉｇ，Ｍ．Ｆ．；Ｆｕｃｈｓ，Ｈ．Ｔｈｅ ｔｏｘｉｎ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｏｆ ｔａｒｇｅｔｅｄ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ｔｏｘｉｎｓ ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｓ ｔｈｅｉｒ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｉｎｃｒｅａｓｅ ｂｙ ｓａｐｏｎｉｎｓ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｏｎｃｏｌｏｇｙ ２０１２，６，３２３－３３２．ｓａｐｏｎｉｎｕｍ ａｌｂｕｍ ｉｎ ａ ｓｙｎｅｒｇｉ

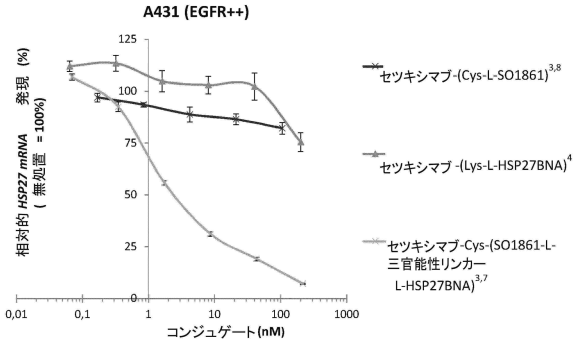
stic way. Journal of immunotherapy 2009, 32, 713−725.
Sama, S.; Jerz, G.; Schmieder, P.; Joseph, J. F.; Melzig, M. F.; Weng, A. Plant derived triterpenes from Gypsophila elegans M. Bieb. enable non−toxic delivery of gene loaded nanoplexes. Journal of Biotechnology 2018, 284, 131−139
Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angewandte Chemie 2001, 40, 2004−2021.
Bird, R. E.; Hardmann, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M.; Lee, T.; Pope, S. H.; Riordan, G. S.; Whitlow, M. Single−chain antigen−binding proteins. Science 1988, 242, 423−426.
Y Zhang, Z Qu, S Kim, V Shi, B Liao1, P Kraft, R Bandaru, Y Wu, LM Greenberger and ID Horak, Down−modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)−based antisense oligonucleotides without transfection, Gene Therapy (2011) 18, 326−333

【図面】

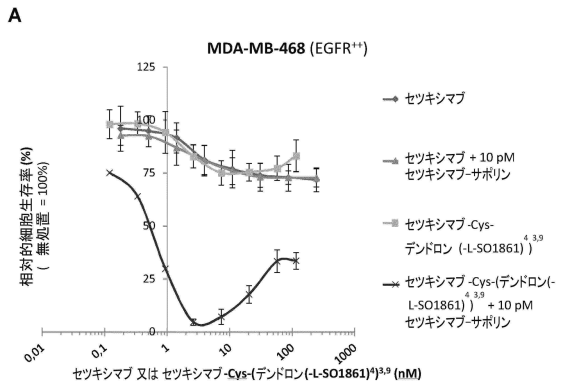
【図１】



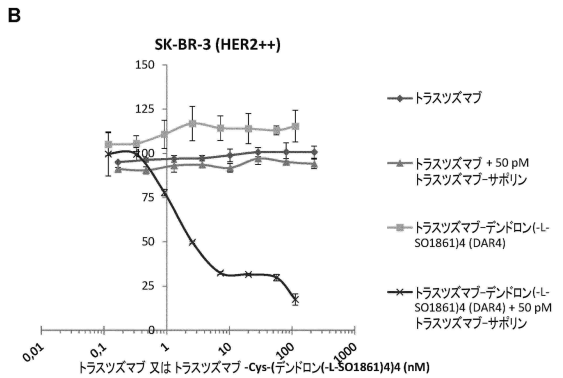

【図２】

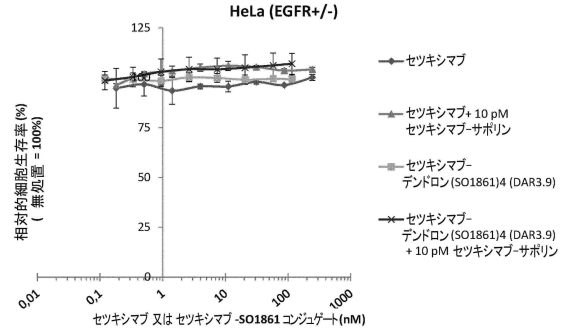


【図３－１】

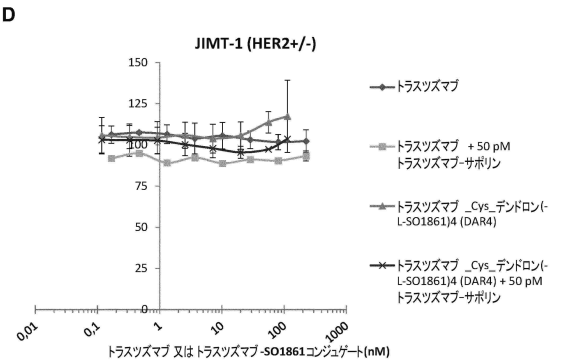



【図３－２】

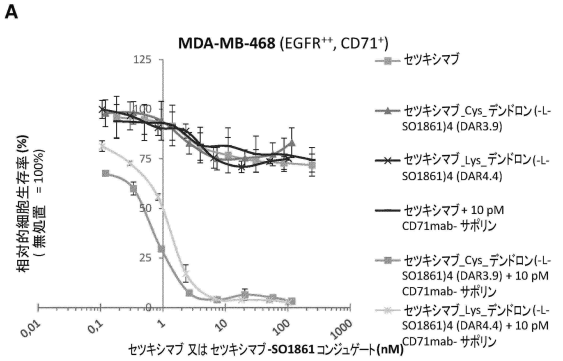


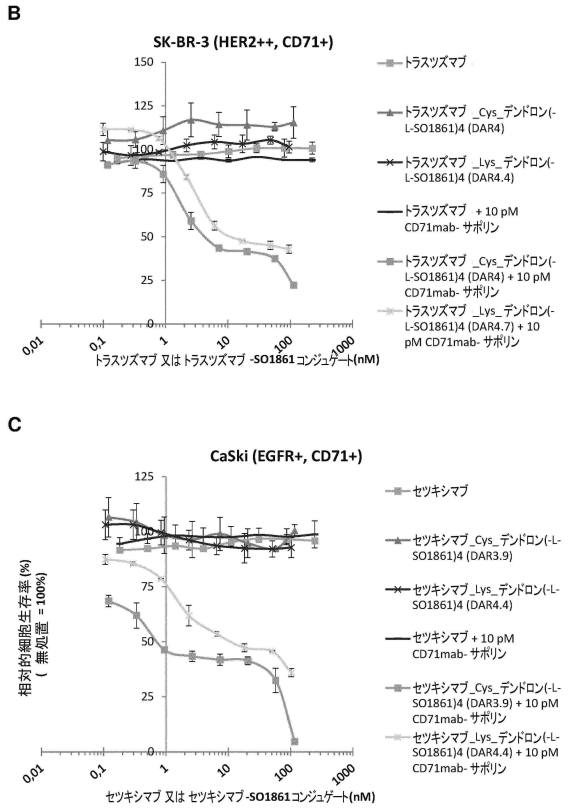

【図３－３】



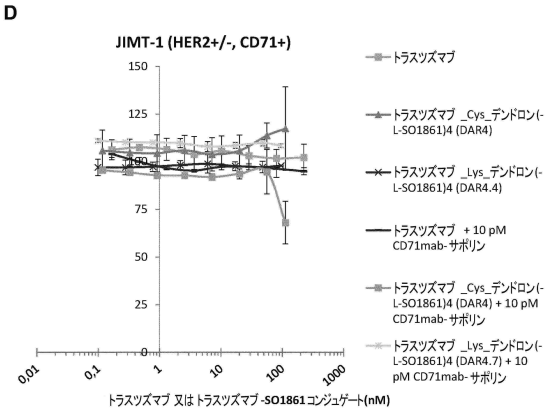

【図４－１】



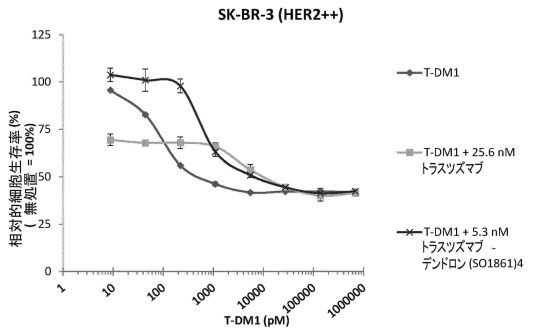
【図４－２】


B
SK-BR-3 (HER2++, CD71+)
トラスツズマブ
トラスツズマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4)
トラスツズマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.4)
トラスツズマブ + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4) + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.7) + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ 又はトラスツズマブ -SO1861コンジュゲート(nM)
C
CaSki (EGFR+, CD71+)
セツキシマブ
セツキシマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR3.9)
セツキシマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.4)
セツキシマブ + 10 pM CD71mab- サポリン
セツキシマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR3.9) + 10 pM CD71mab- サポリン
セツキシマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.4) + 10 pM CD71mab- サポリン
相対的細胞生存率 (%) ( 無処置 = 100%)
セツキシマブ 又は セツキシマブ -SO1861コンジュゲート(nM)

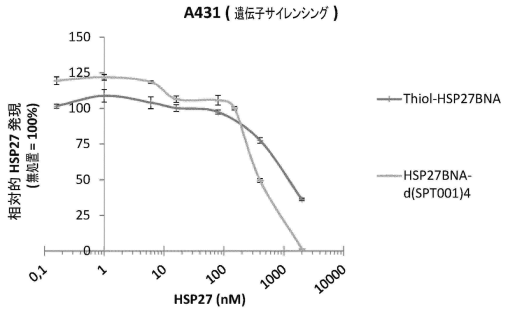
【図４－３】


D
JIMT-1 (HER2+/-, CD71+)
トラスツズマブ
トラスツズマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4)
トラスツズマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.4)
トラスツズマブ + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ _Cys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4) + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ _Lys_デンドロン(-L-SO1861)4 (DAR4.7) + 10 pM CD71mab- サポリン
トラスツズマブ 又はトラスツズマブ -SO1861コンジュゲート(nM)

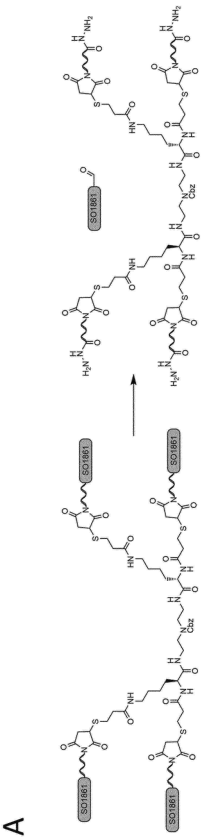
【図５】


SK-BR-3 (HER2++)
T-DM1
T-DM1 + 25.6 nM トラスツズマブ
T-DM1 + 5.3 nM トラスツズマブ - デンドロン (SO1861)4
相対的細胞生存率 (%) ( 無処置 = 100%)
T-DM1 (pM)

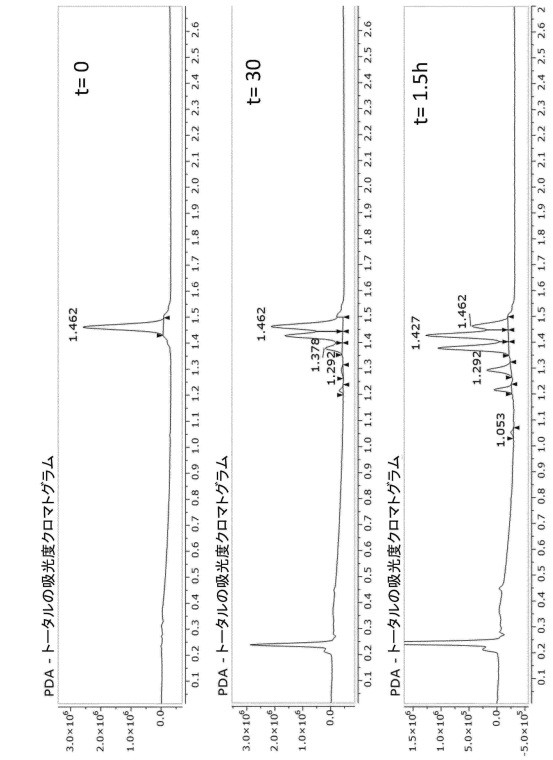
【図６】


A431 ( 遺伝子サイレンシング )
Thiol-HSP27BNA
HSP27BNA-d(SPT001)4
相対的 HSP27 発現 (無処置 = 100%)
HSP27 (nM)

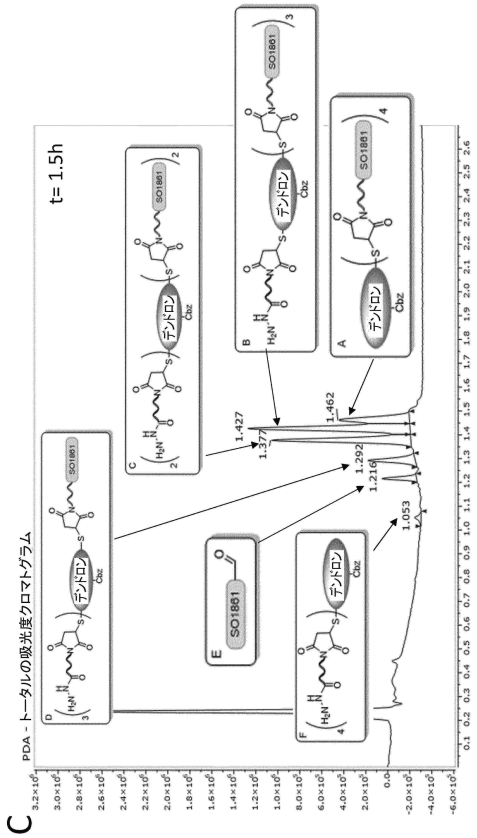
【図７－１】



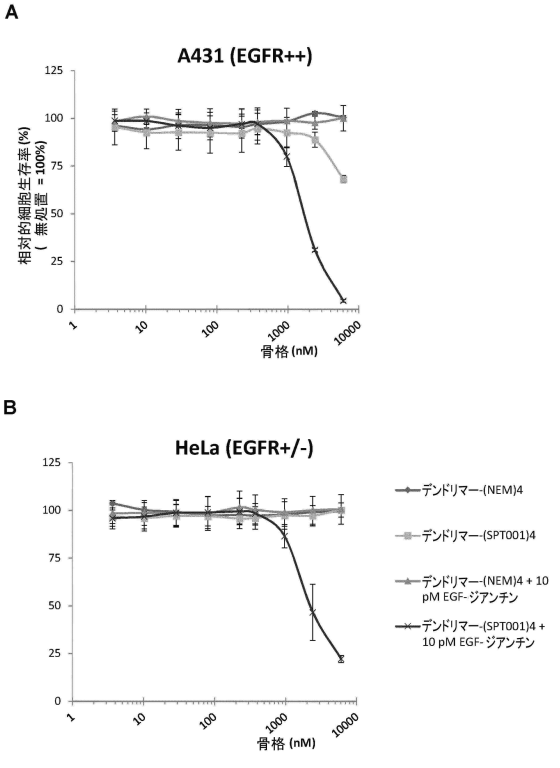

【図７－２】



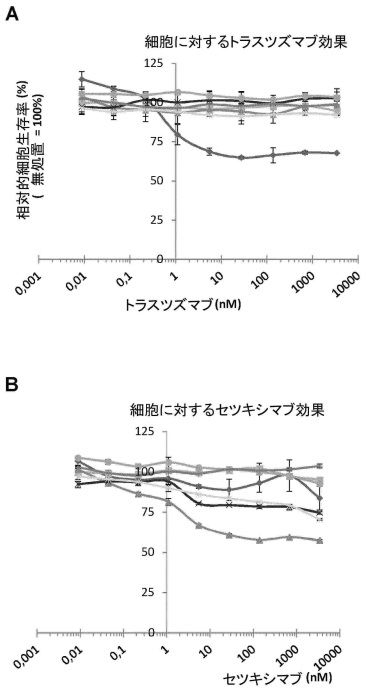

【図７－３】



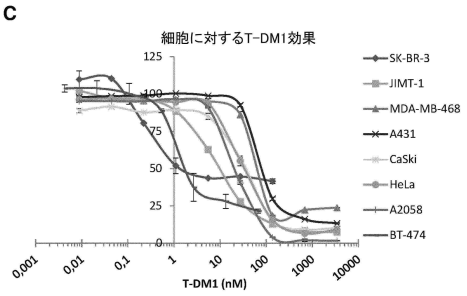

【図８】



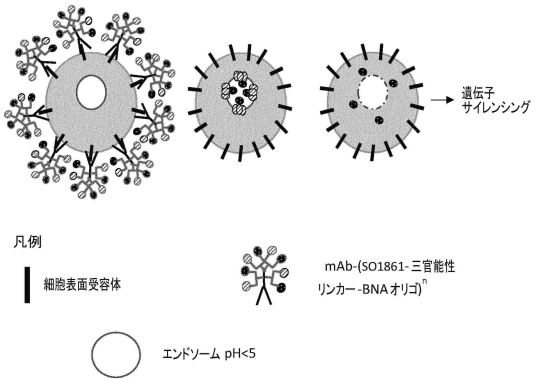
【図９－１】



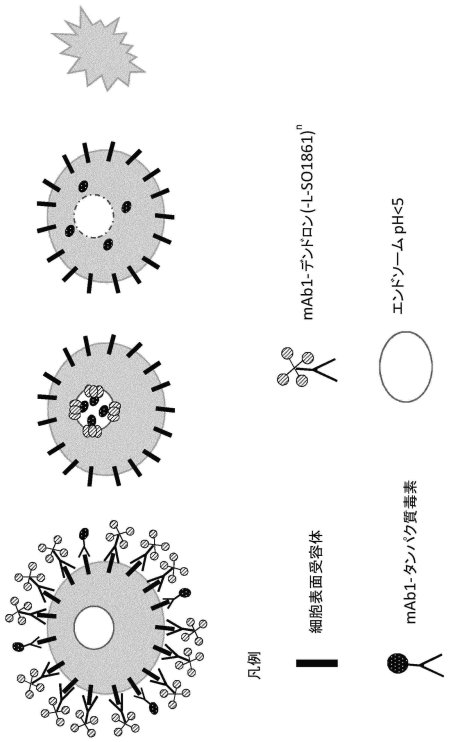

【図９－２】



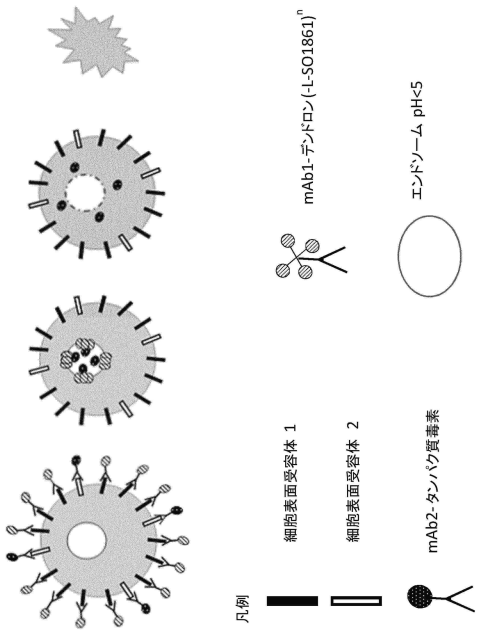

【図１０】



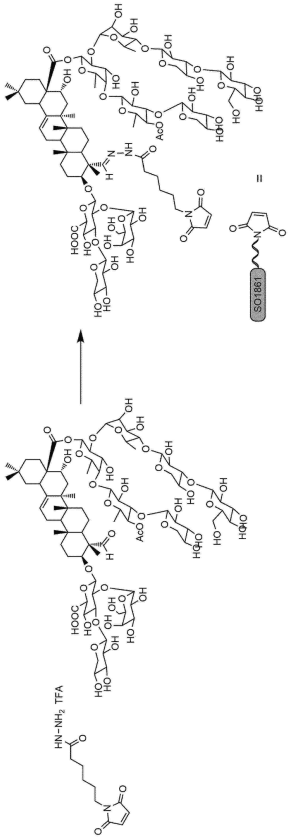

【図１１】



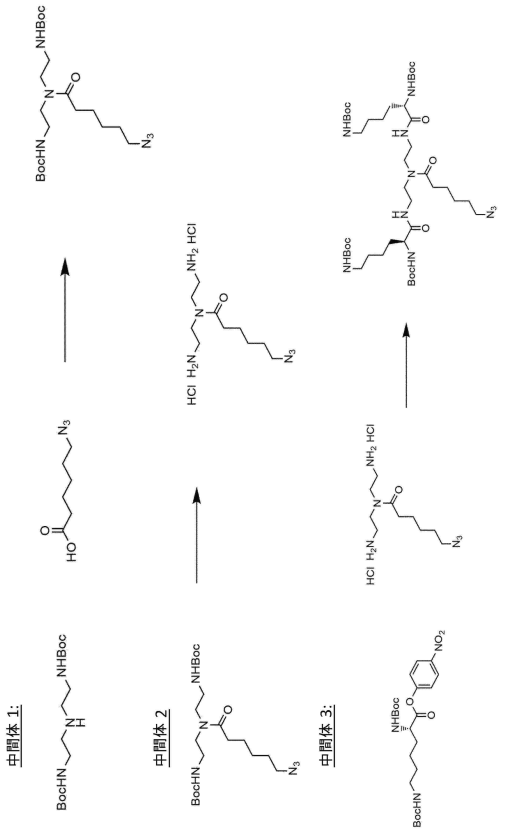
【図１２】



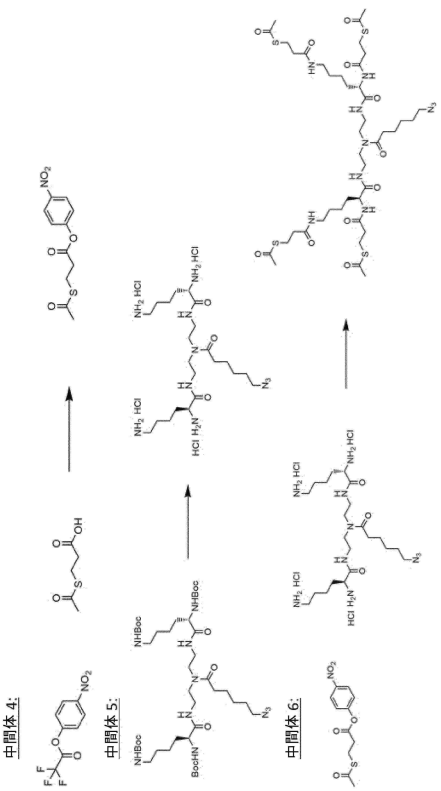

【図１３】



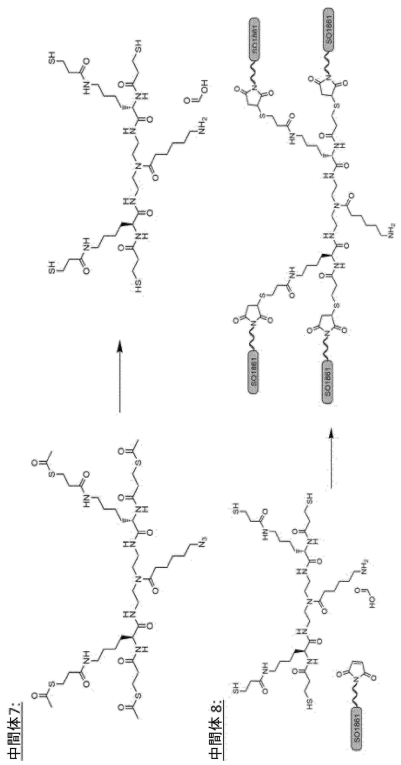

【図１４－１】



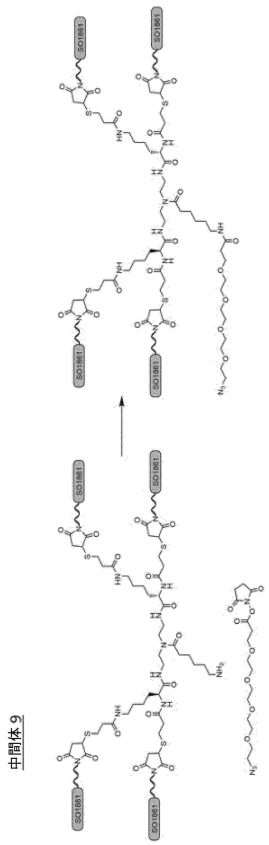

【図１４－２】



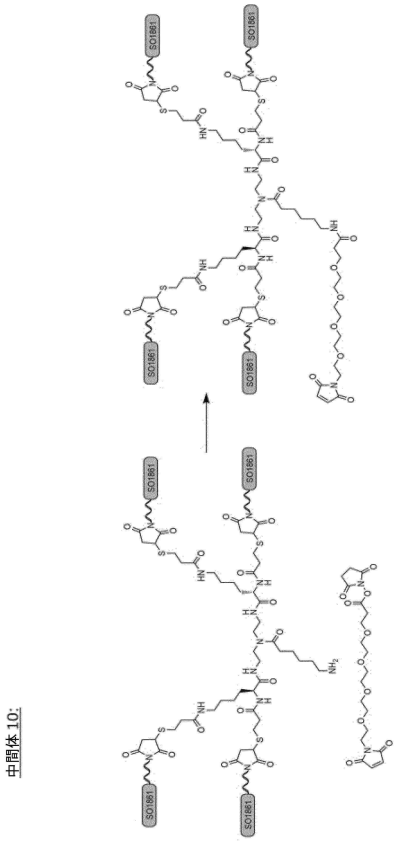
【図１４－３】



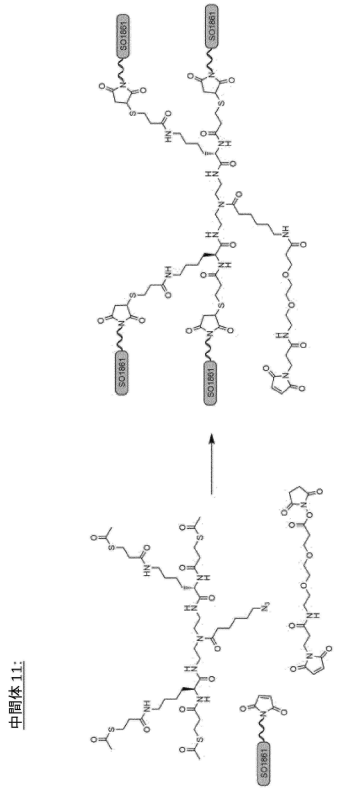

【図１４－４】



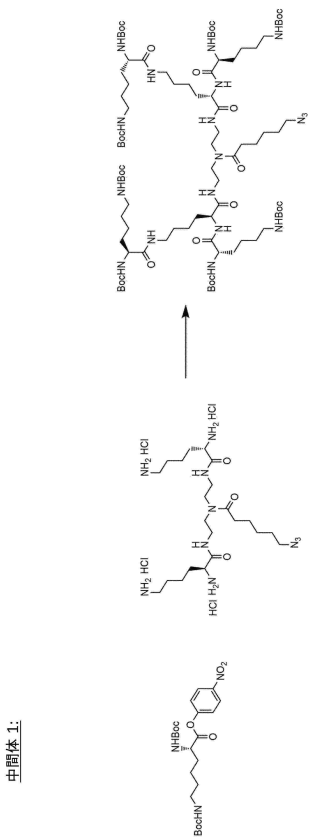

【図１４－５】




【図１４－６】

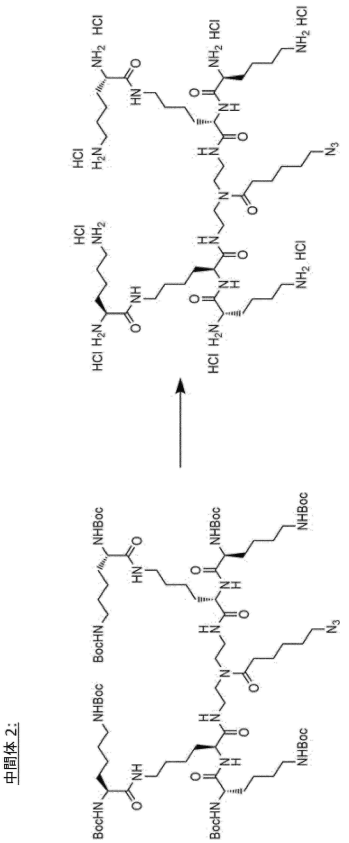


【図１５－１】



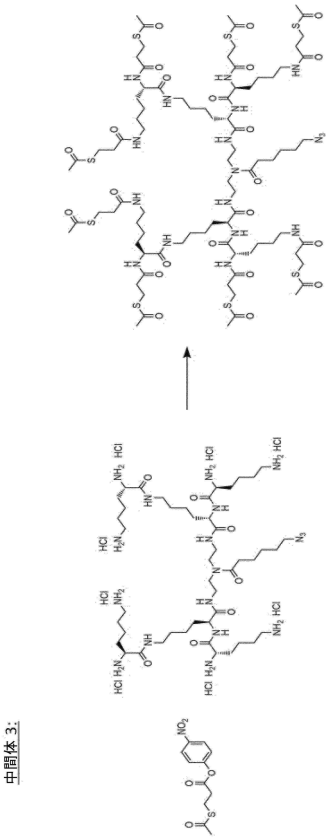
中間体 1:

【図１５－２】



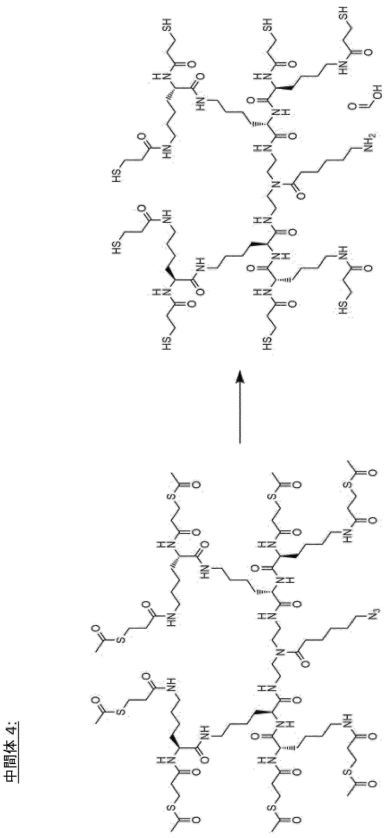
中間体 2:

【図１５－３】



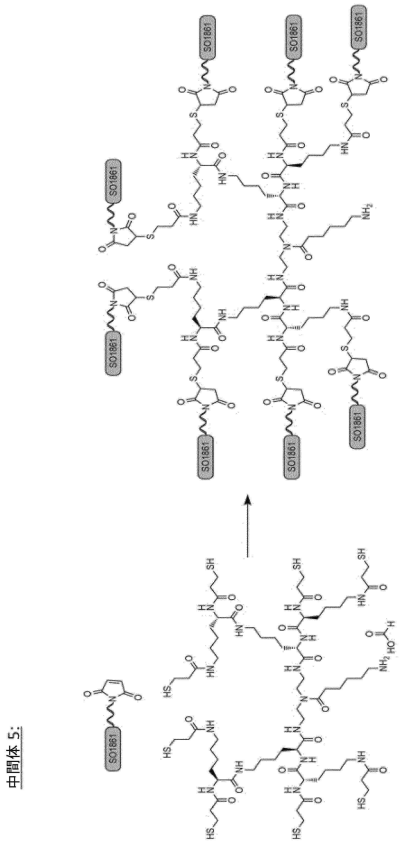
中間体 3:

【図１５－４】

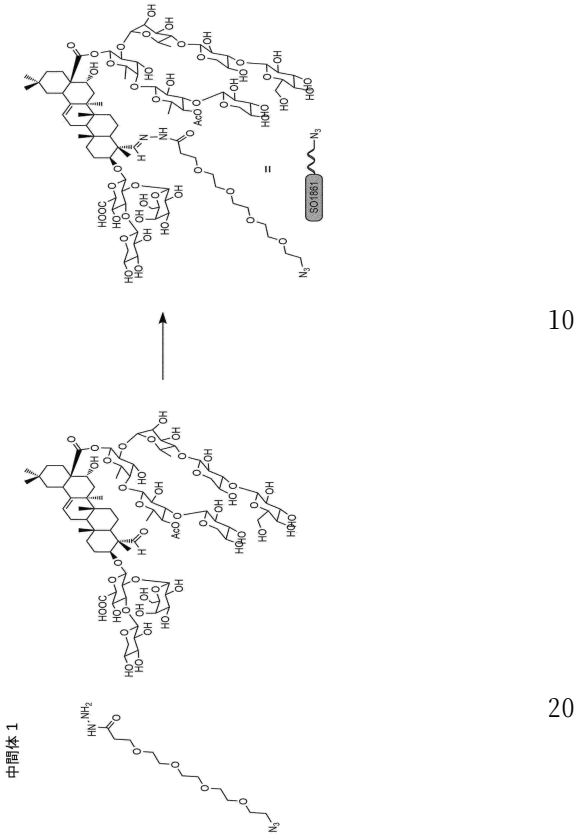


中間体 4:

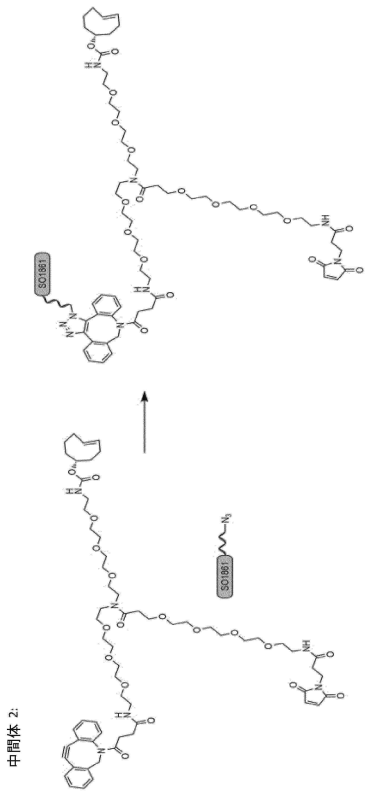
【図１５－５】



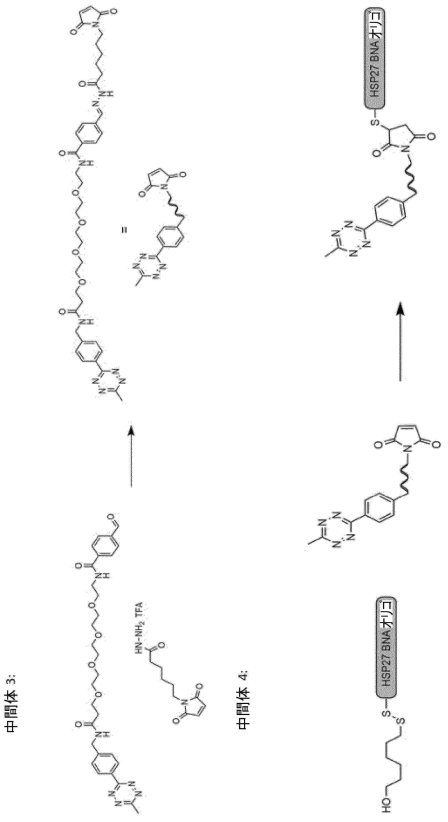

【図１６－１】



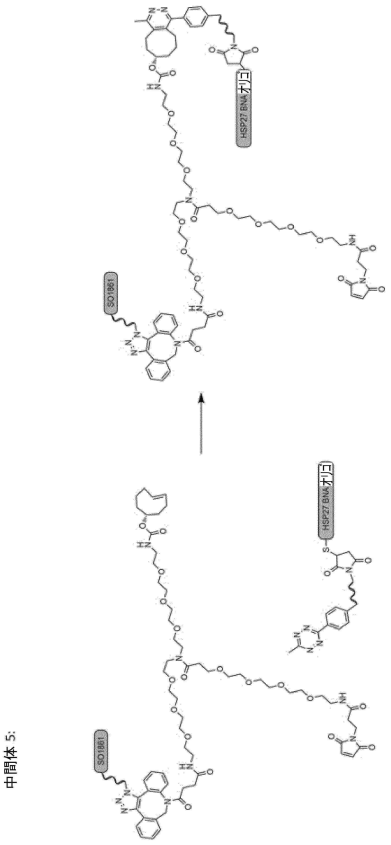

【図１６－２】



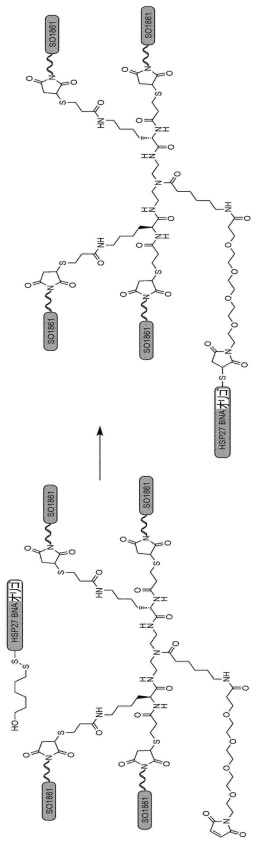

【図１６－３】



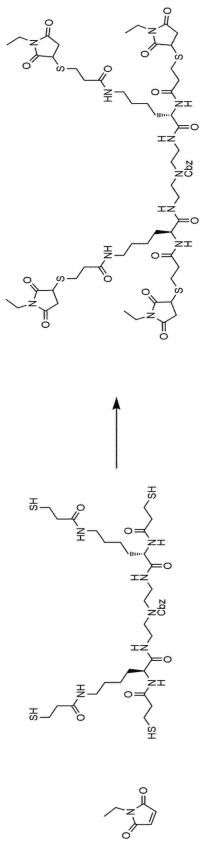
【図１６－４】



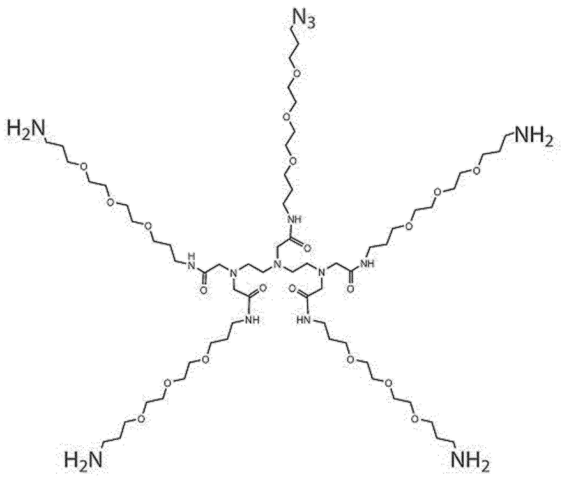

【図１７】



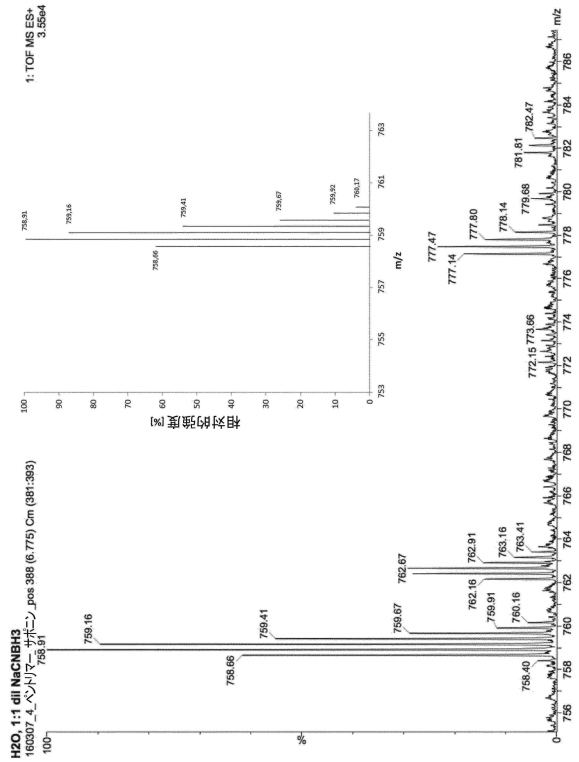

【図１８】



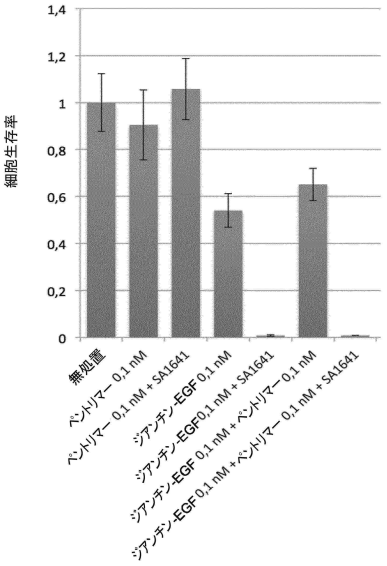

【図１９】



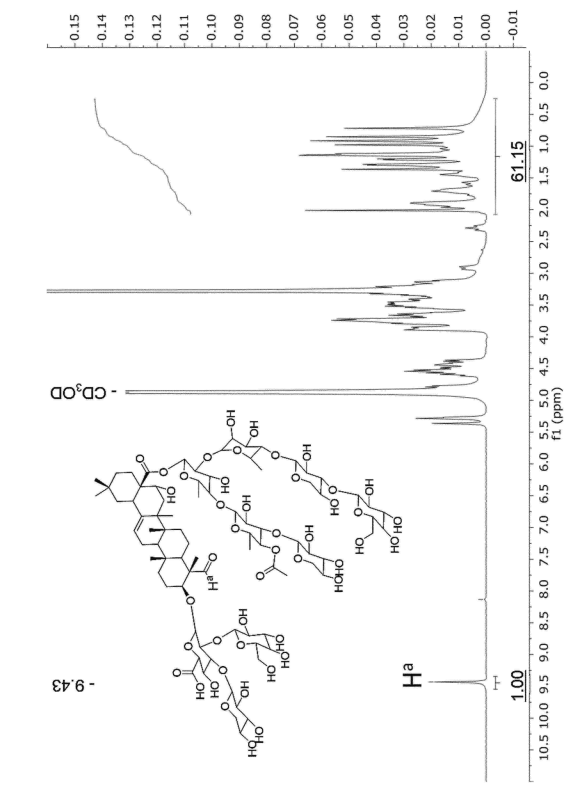
【図２０】



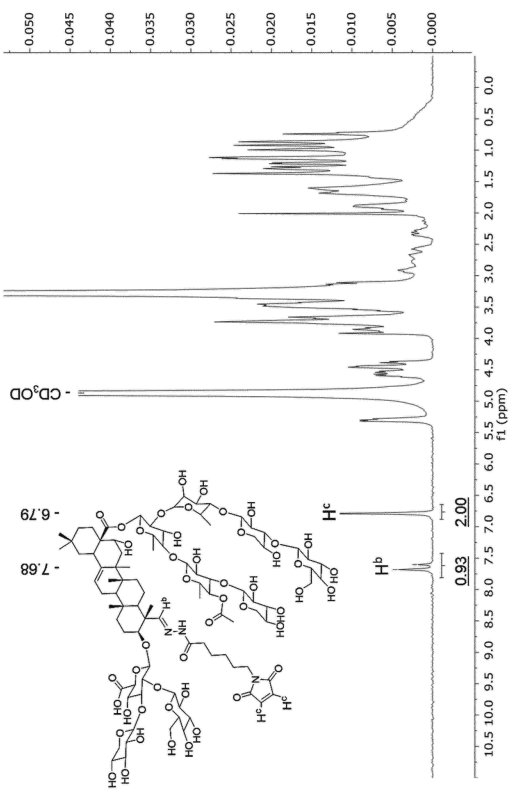

【図２１】



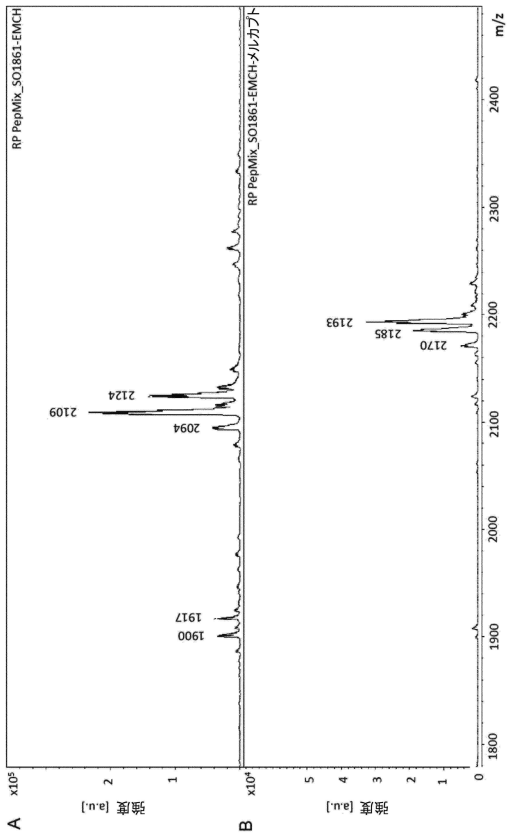

【図２２－１】



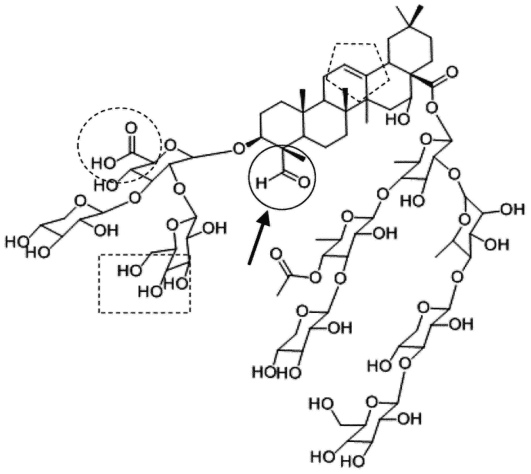

【図２２－２】



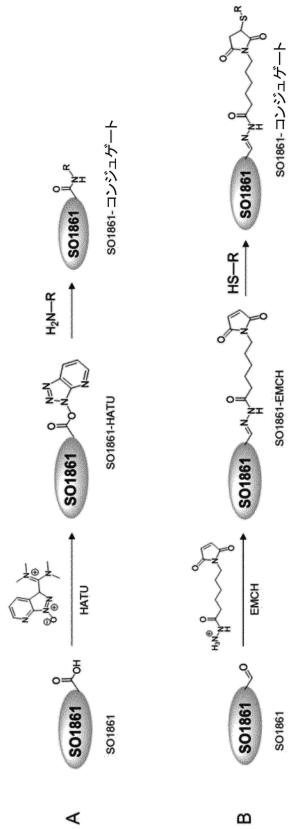
【図２３】



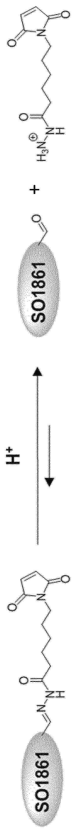

【図２４】



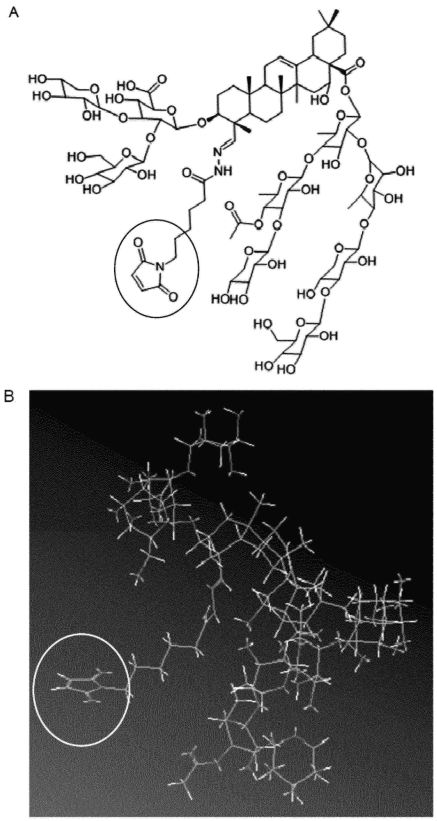
【図２５】



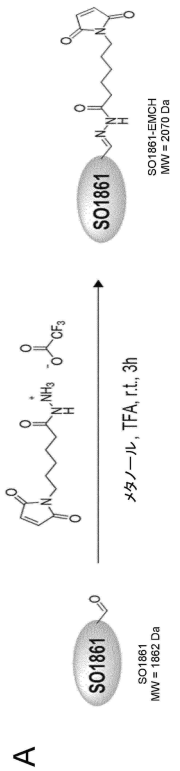

【図２６】



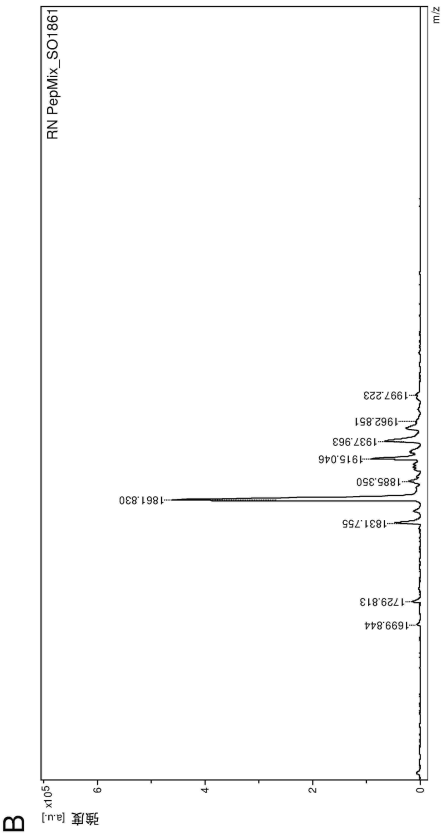
【図２７】



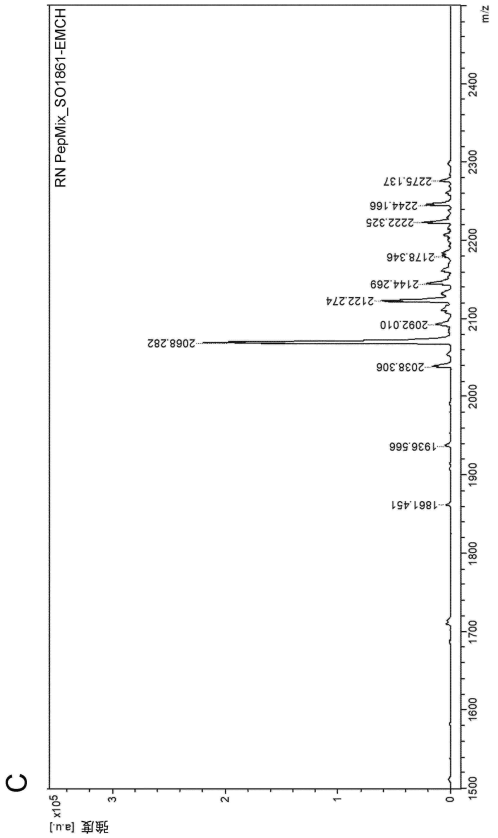

【図２８－１】



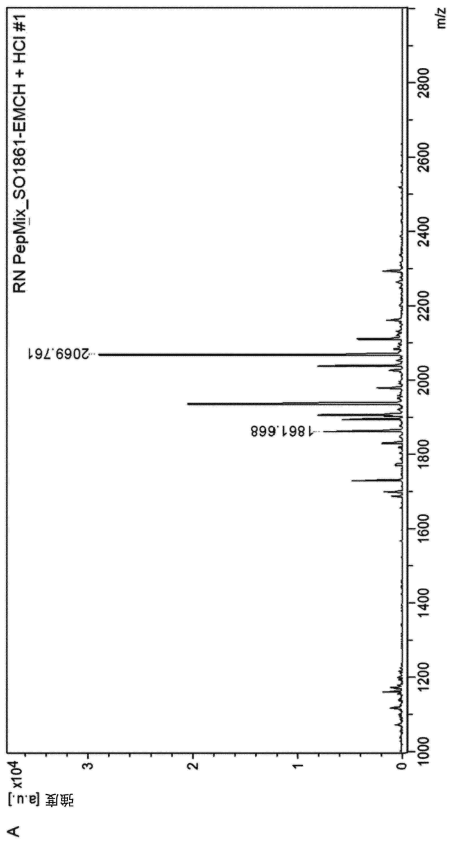

【図２８－２】



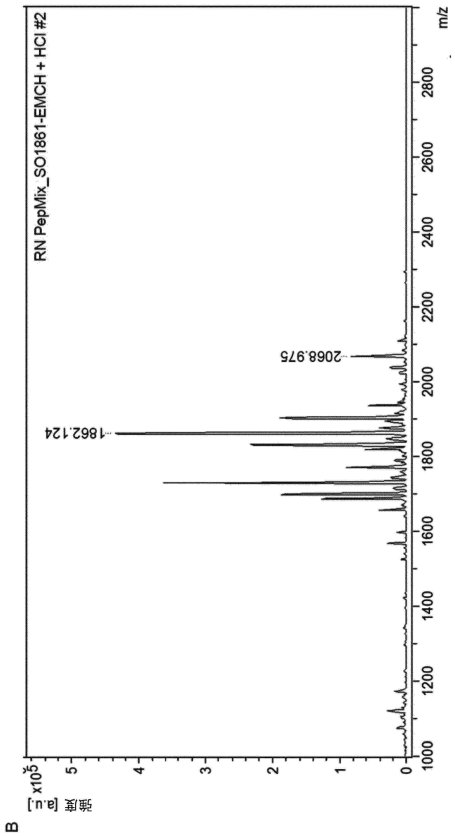

【図２８－３】



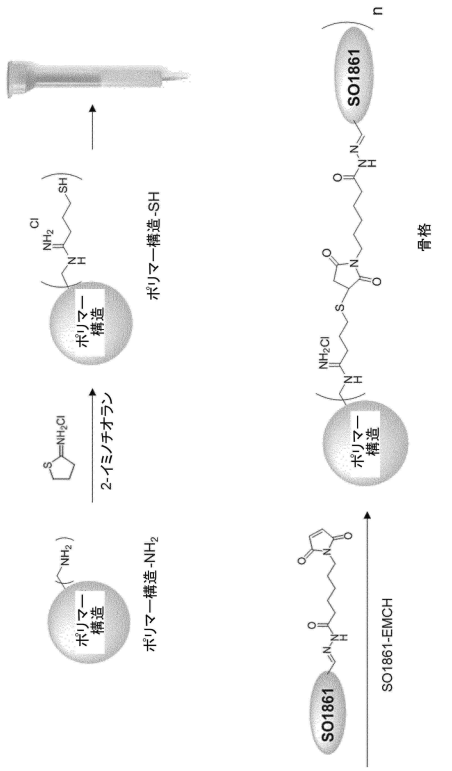
【図２９－１】



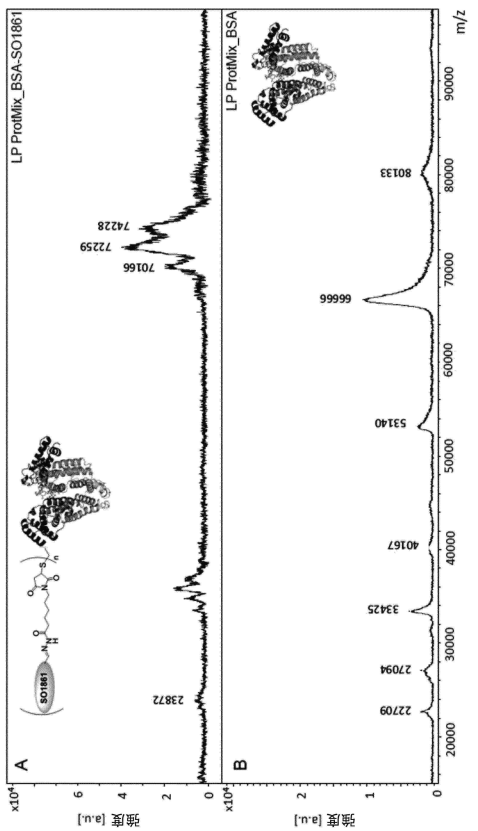

【図２９－２】



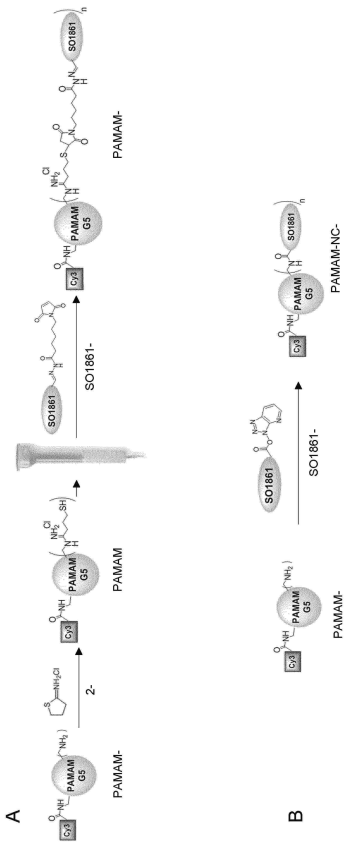

【図３０】



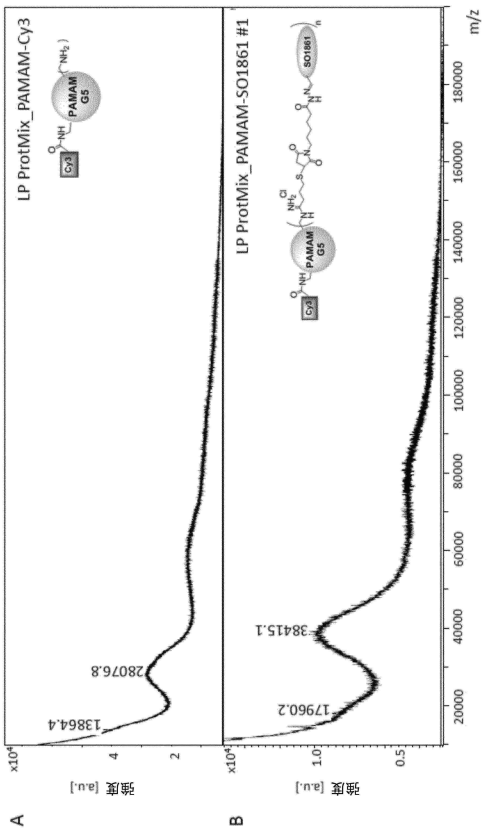

【図３１】



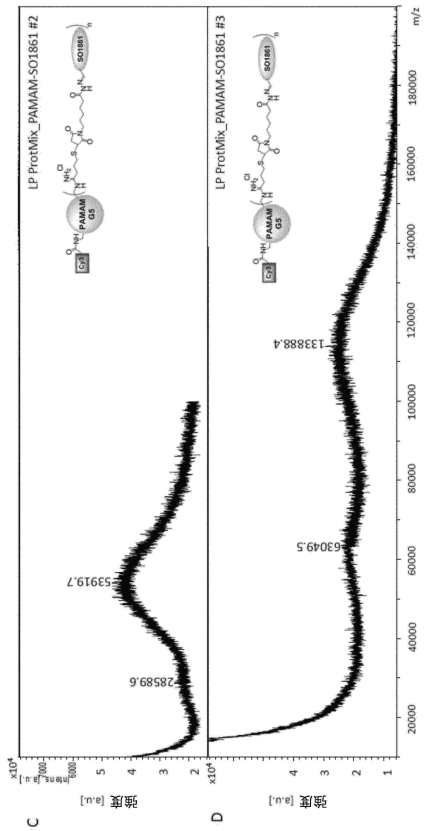
【図３２】



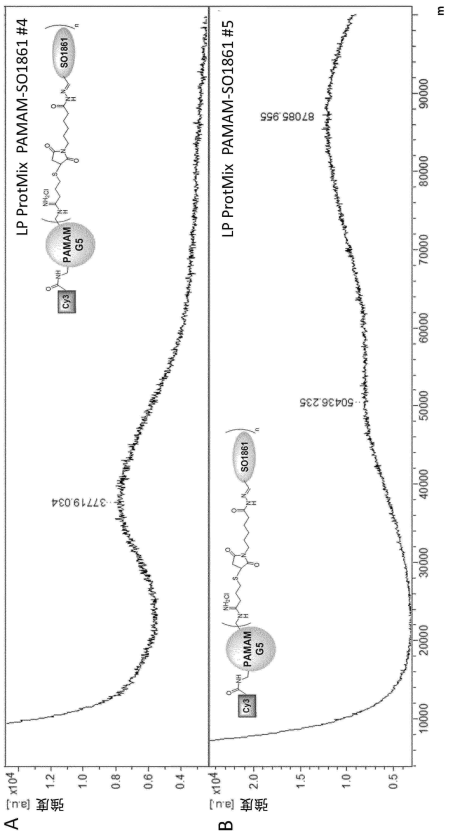

【図３３－１】



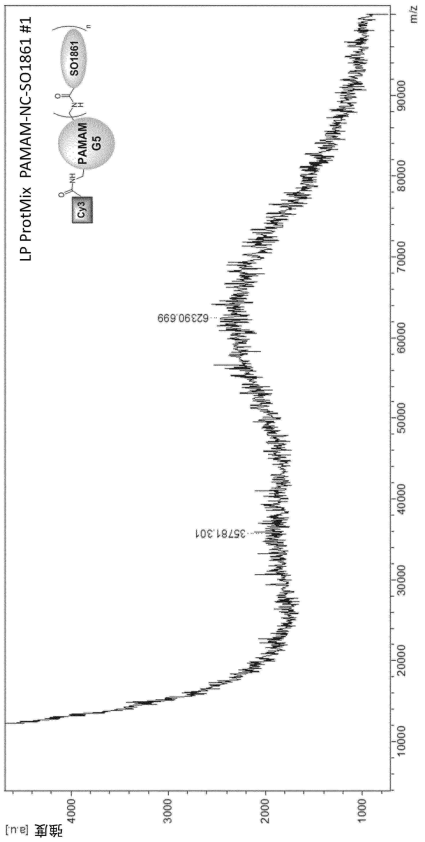

【図３３－２】




【図３４】



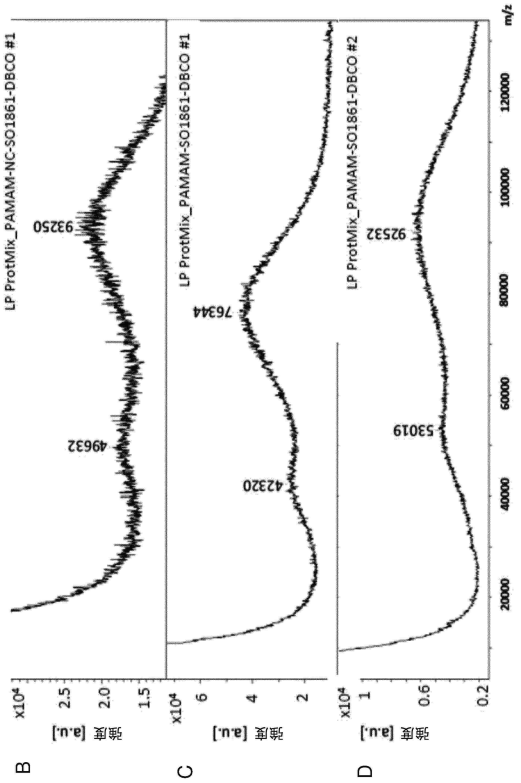
【図３５】



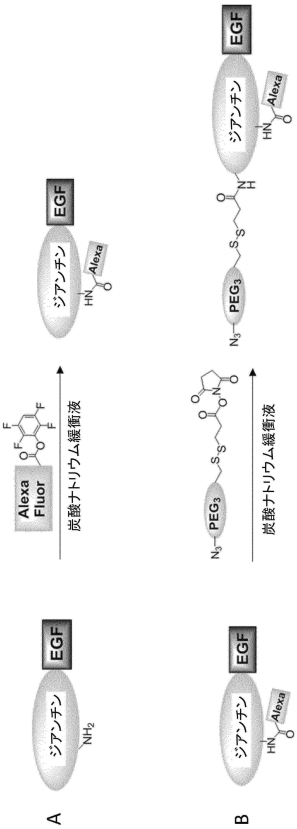

【図３６－１】



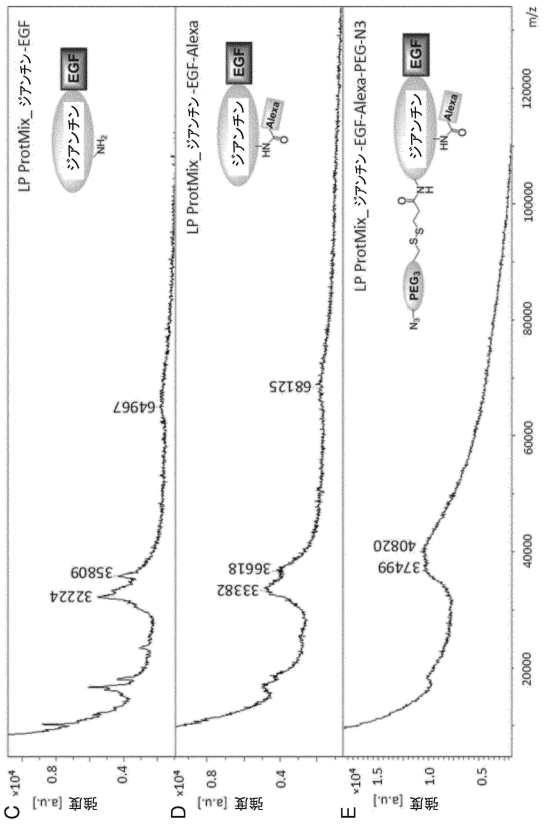

【図３６－２】



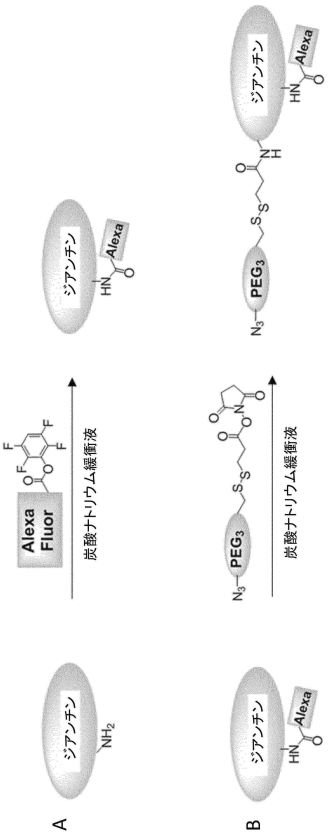

【図３７－１】



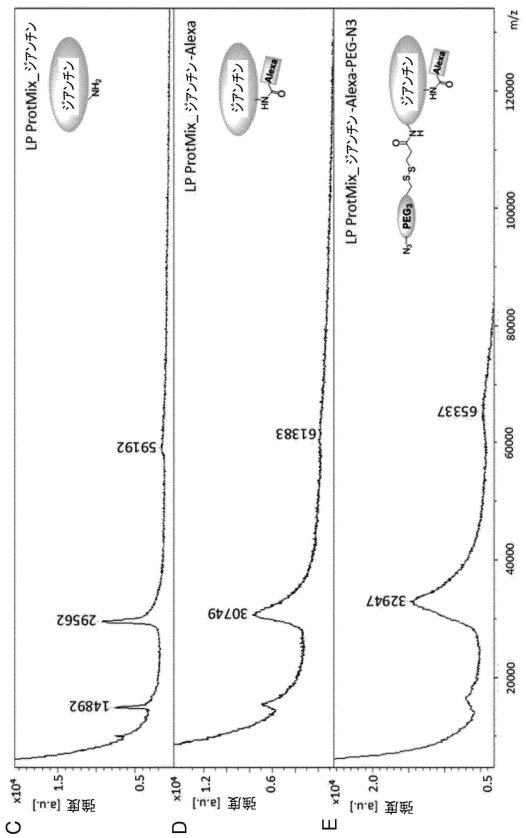
【図３７－２】



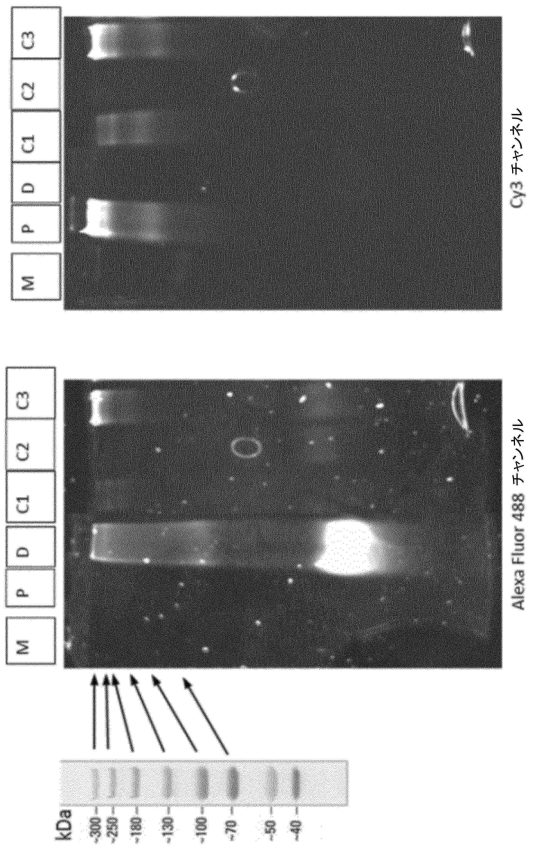

【図３８－１】



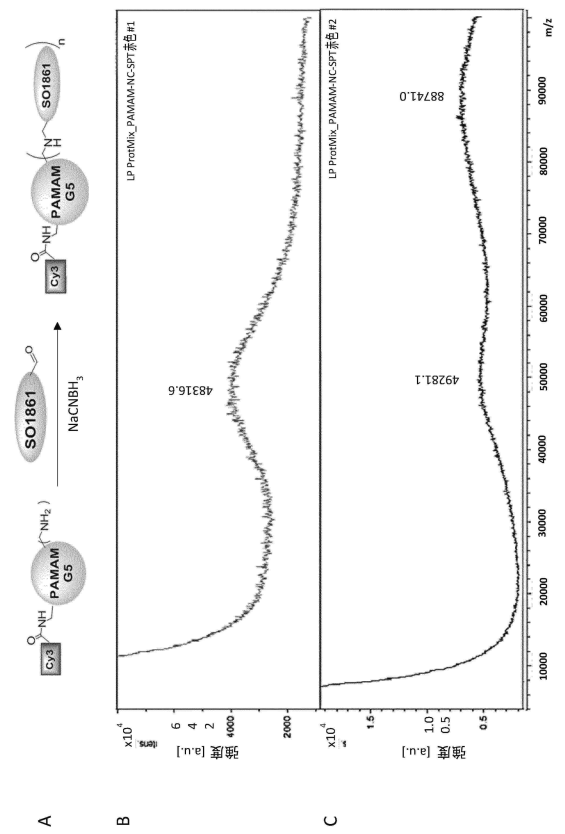

【図３８－２】



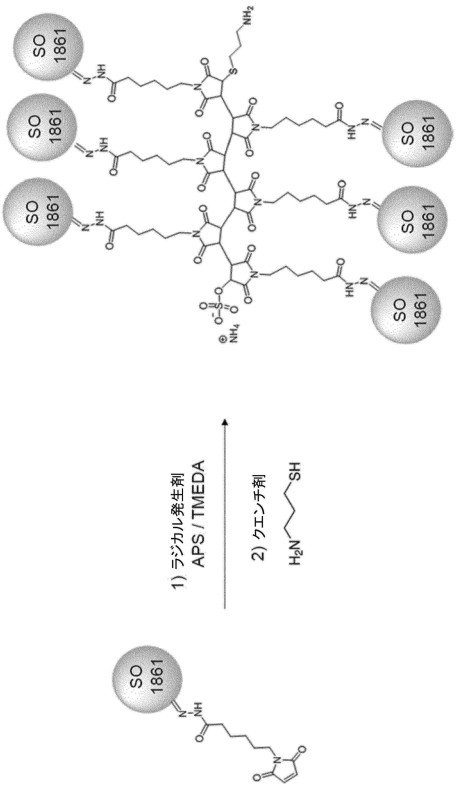

【図３９】



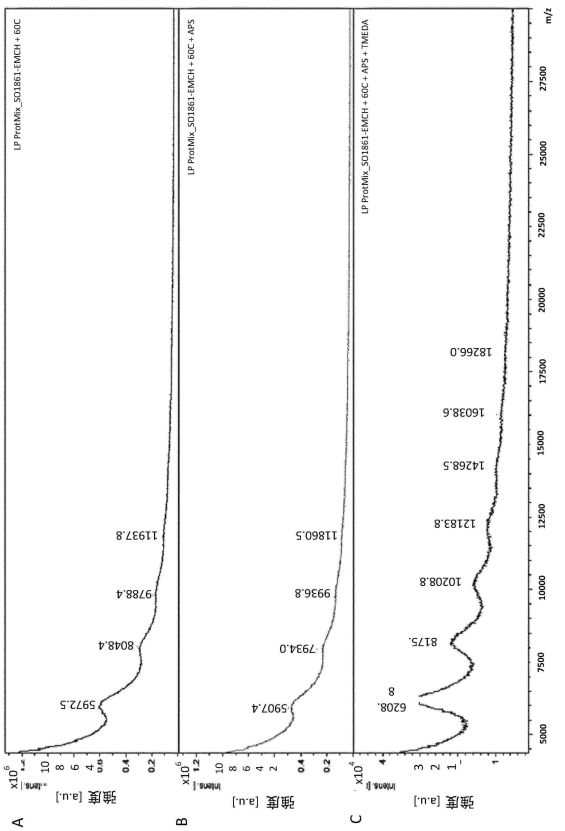
【図４０】



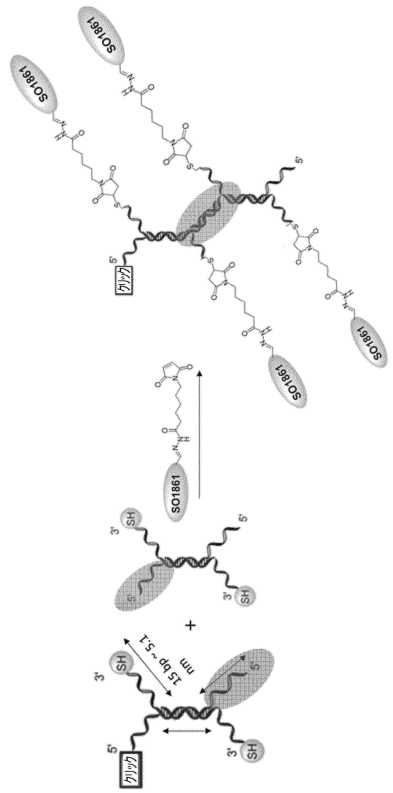

【図４１】



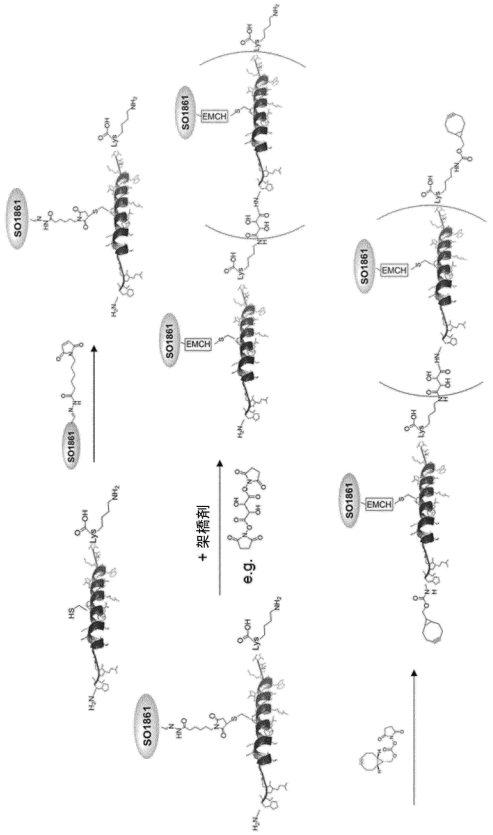

【図４２】



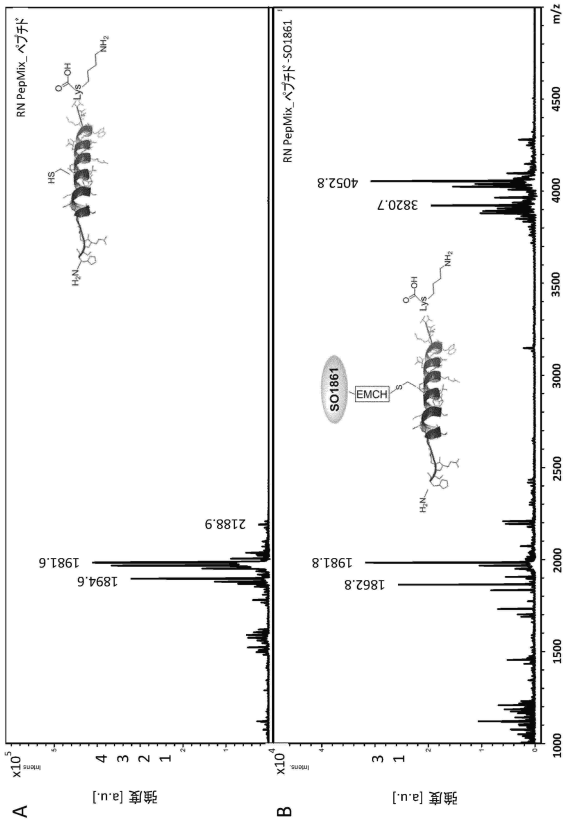

【図４３】



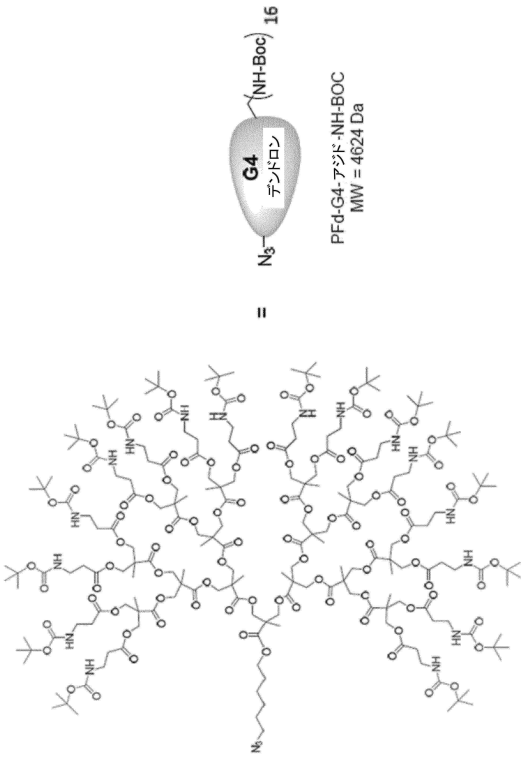
【図４４】



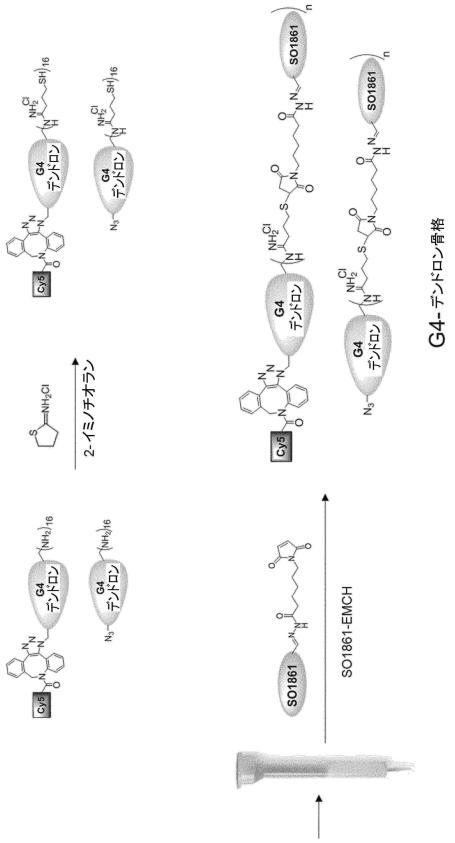

【図４５】



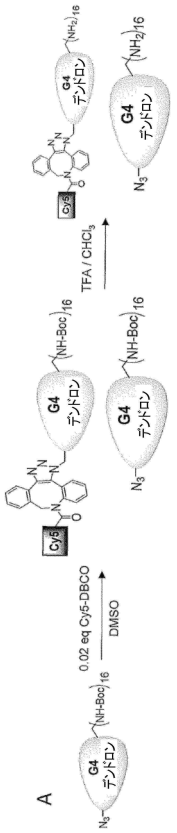

【図４６】



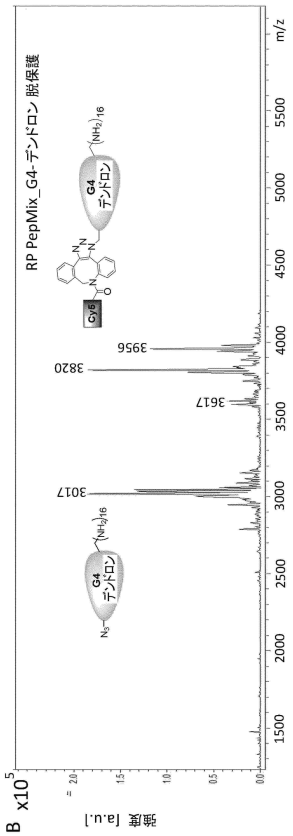

【図４７】



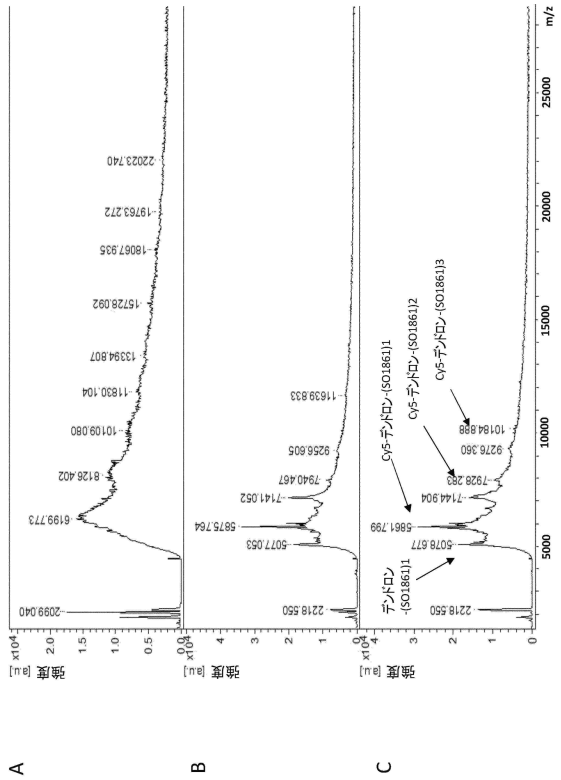
【図４８－１】



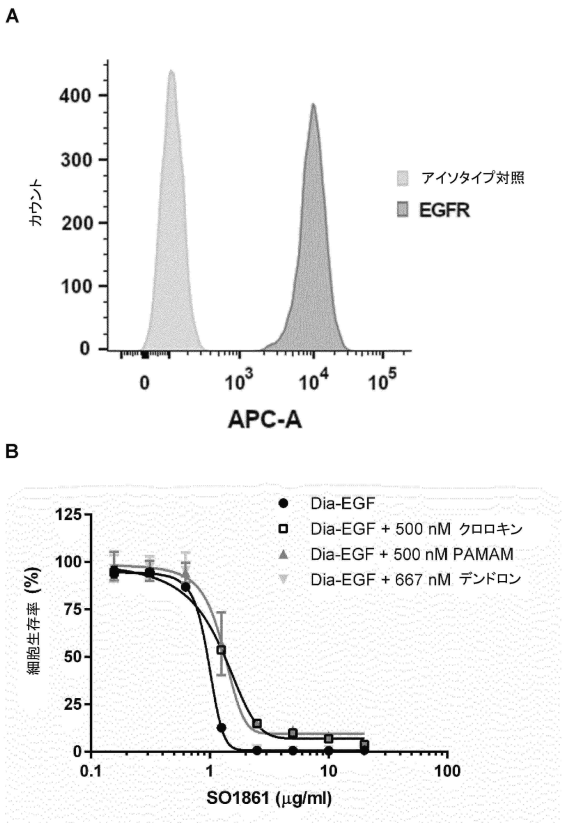

【図４８－２】



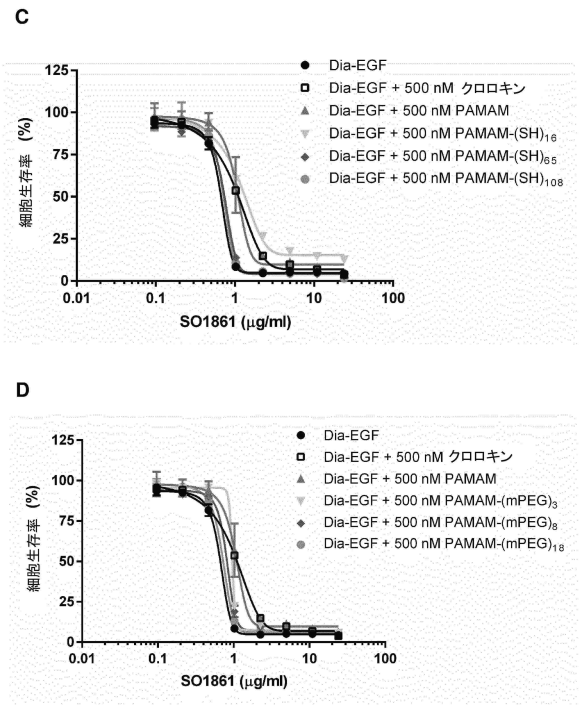

【図４９】



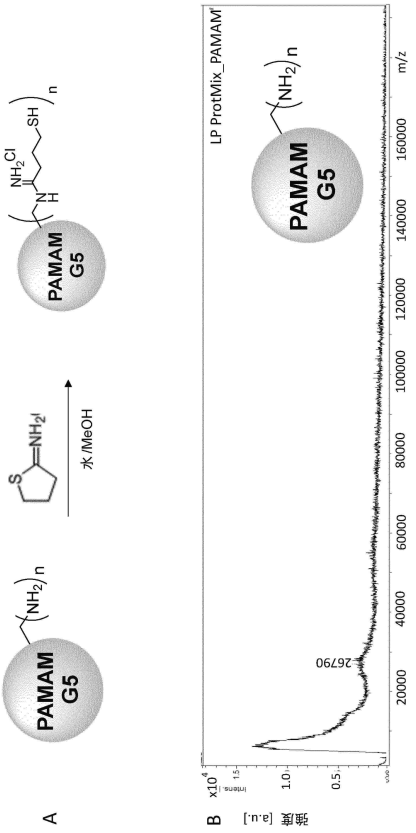

【図５０－１】



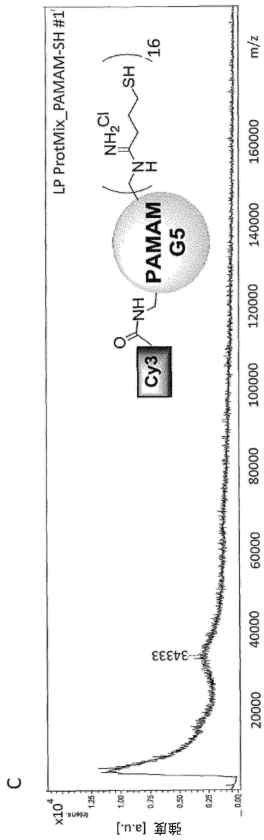
【図５０－２】



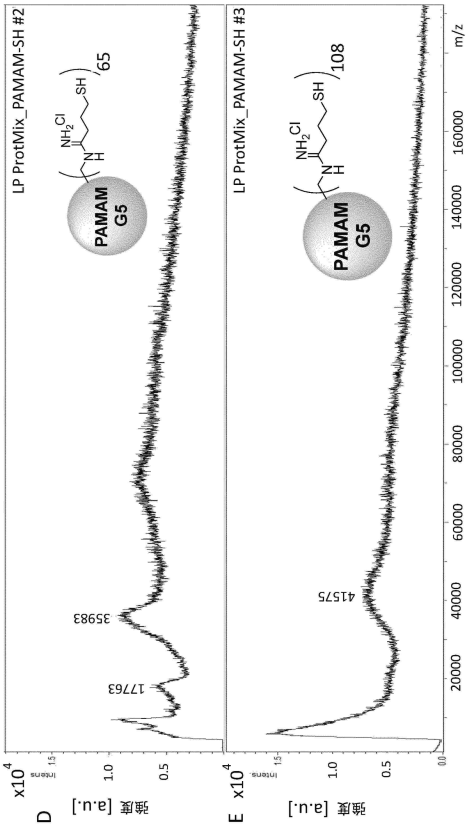

【図５１－１】




【図５１－２】



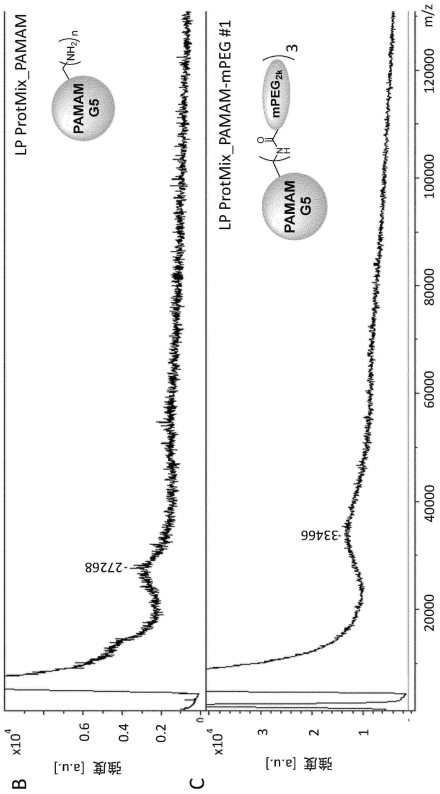

【図５１－３】



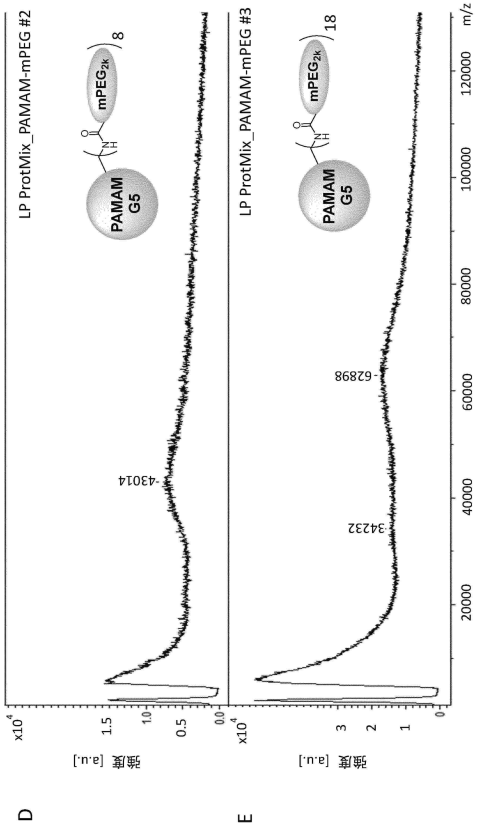
【図５２－１】



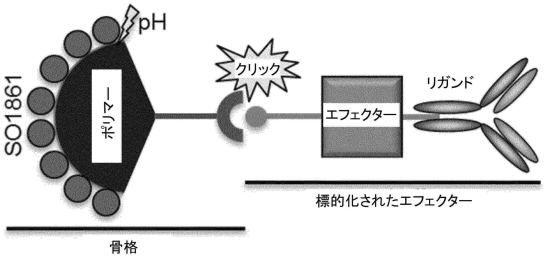

【図５２－２】



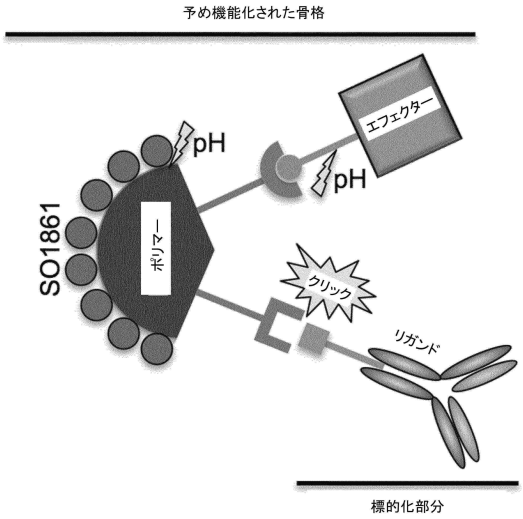

【図５２－３】




【図５３】



【図５４】




【配列表】

0007652695000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　FI
*C07K 14/765 (2006.01)*　　C07K 14/765

(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(31)優先権主張番号 2023568
(32)優先日　令和1年7月25日(2019.7.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(72)発明者　ポステル，ルーベン
オランダ王国，３５８４ セーエム ユトレヒト エルエスアイ，ローム ２．０９ ヤレラーン ６２
(72)発明者　フュッヒ，ヘンドリック
ドイツ連邦共和国，デー－１３３５３ ベルリン アウグステンブルガー プラッツ １ フィルヒョウ－クリニクム シャリテ－ウニヴェルズィテートメディツィーン，ベルリン キャンパス，クリニシェ ヒェミー ウント パトビオヒェミー インスティテュート フュア ラボラトーリウムスメディツィン
審査官　三上 晶子
(56)参考文献
特表平０７－５０４１５６（ＪＰ，Ａ）
特表２００８－５０５９５８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１７－５０６２２０（ＪＰ，Ａ）
Hendrik FUCHS et al.，“ Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies ”，Biomedicines，2017年03月29日，Vol. 5, No. 4，p.14，DOI: 10.3390/biomedicines5020014
Cheenu BHARGAVA et al.，“ Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene SO1861 ”，Molecular Oncology，2017年09月15日，Vol. 11, No. 11，p.1527-1543，DOI: 10.1002/1878-0261.12115
Roger GILABERT-ORIOL et al.，“ Immunotoxins Constructed with Ribosome-Inactivating Proteins and their Enhancers: A Lethal Cocktail with Tumor Specific Efficacy ”，Current Pharmaceutical Design，2014年10月22日，Vol. 20, No. 42，p.6584-6643，DOI: 10.2174/1381612820666140826153913
Daniel PULIDO et al.，“ Controlling Multivalency and Multimodality: Up to Pentamodal Dendritic Platforms Based on Diethylenetriaminepentaacetic Acid Cores ”，Organic Letters，2014年02月14日，Vol. 16, No. 5，p.1318-1321，DOI: 10.1021/ol500022n
Alexandre LANCELOT et al.，“ DNA Transfection to Mesenchymal Stem Cells Using a Novel Type of Pseudodendrimer Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid ”，Bioconjugate Chemistry，2017年03月13日，Vol. 28, No. 4，p.1135-1150，DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00037
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　９／００－　９／７２
Ａ６１Ｋ ４７／００－ ４７／６９
Ａ６１Ｐ　１／００－ ４３／００
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ｃ０７Ｊ　１／００－ ７５／００
Ｃ０７Ｋ　７／０８
Ｃ０７Ｋ １４／７６５
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）