(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-532040
(P2023-532040A)
(43)公表日　令和5年7月26日(2023.7.26)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/54*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54		４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全121頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-580236(P2022-580236)
(86)(22)出願日　令和3年6月18日(2021.6.18)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月24日(2023.2.24)
(86)国際出願番号　PCT/NL2021/050384
(87)国際公開番号　WO2021/261992
(87)国際公開日　令和3年12月30日(2021.12.30)
(31)優先権主張番号　2025899
(32)優先日　令和2年6月24日(2020.6.24)
(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　2026442
(32)優先日　令和2年9月10日(2020.9.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　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 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】　ＧａｌＮＡｃ及びサポニンのコンジュゲート、前記コンジュゲート及びＧａｌＮＡｃ－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む治療組成物

(57)【要約】
本発明は、少なくとも１つのＧａｌＮＡｃを含むＡＳＧＰＲのリガンドに共有結合されたサポニンを含む、サポニンコンジュゲートに関する。本発明はまた、本発明のサポニンコンジュゲートを含む第１の医薬組成物、及びエフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートを含む第２の医薬組成物、又はエフェクター分子と細胞表面分子に結合するための結合分子との第３のコンジュゲートを含む医薬配合物に関する。加えて、本発明は、本発明のサポニンコンジュゲート及び第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。さらに、本発明は、薬剤としての使用のための、本発明の医薬配合物又は医薬組成物に関する。本発明はまた、発現産物が、以下の遺伝子：アポＢ、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、ＡＡＴ及びＬＤＨに関連する疾患又は健康問題の治療又は予防に使用するための、且つ、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病Ａ、血友病Ｂ、ＡＡＴ関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、ＴＴＲアミロイドーシス、補体媒介性疾患、Ｂ型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防に使用するための本発明の医薬配合物又は医薬組成物に関する。最後に、本発明は、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを細胞外から前記細胞内に移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドに共有結合された少なくとも１つのサポニンを含むサポニンコンジュゲートであって、前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分、好ましくは、３つ又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは、前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、$(GalNAc)_3$トリスを含むか又はそれからなり、前記少なくとも１つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、サポニンコンジュゲート。
【請求項２】
前記サポニンが、
２α－ヒドロキシオレアノール酸；
１６α－ヒドロキシオレアノール酸；
ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）；
１６α，２３－ヒドロキシオレアノール酸；
ギプソゲニン；
キラ酸；
プロトエシゲニン－２１（２－メチルブタ－２－エノアート）－２２－アセテート；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノアート）；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノアート）－１６，２２－ジアセテート；
ジギトゲニン；
３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン；
ギプソゲン酸；
及び
これらの誘導体からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含み、
好ましくは、前記サポニンが、キラ酸及びギプソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、前記サポニンアグリコンコア構造は、キラ酸又はその誘導体である、請求項１に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３】
請求項１又は２に記載のサポニンコンジュゲートであって、
・前記サポニンが、群Ａ：
ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－、
Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ－、
Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→２）－［Ｇｌｃ－（１→４）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－Ｇｌｃ－（１→４）－Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、

Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、及び
これらの誘導体から選択される、前記アグリコン構造に結合された糖鎖を含み、
又は
・前記サポニンが、群Ｂ：
Ｇｌｃ－、
Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－、
Ｒｈａ－（１→２）－［Ａｒａ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－、
Ａｒａ－、
Ｘｙｌ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１は４Ｅ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ２－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ２は４Ｚ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－３、４－ジ－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ３－（→４）］－３－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ３は４Ｅ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
（Ａｒａ－若しくはＸｙｌ－）（１→３）－（Ａｒａ－若しくはＸｙｌ－）（１→４）－

（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）（１→２）－［４－ＯＡｃ－（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）（１→４）］－（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）－［Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ４－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ４は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ５－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ５は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３、４－ジ－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ６－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ６は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ７－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ７は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／

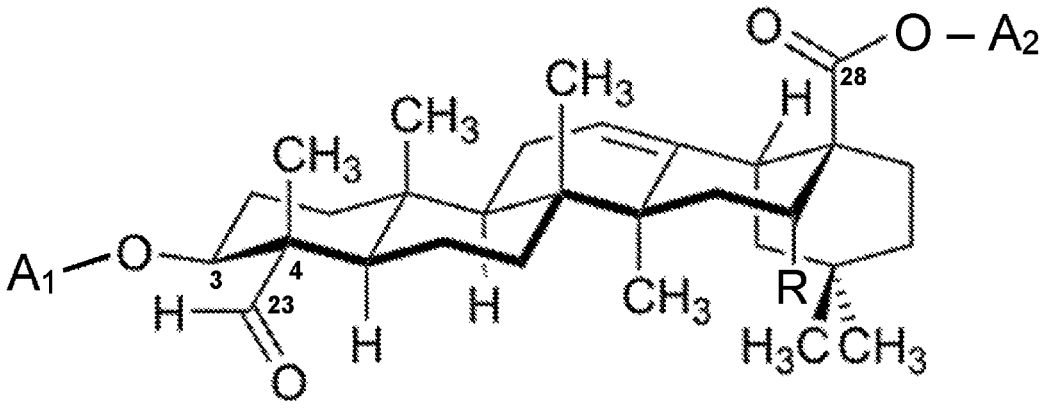
Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ８－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ８は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ９－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ９は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１０－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１０は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１１－（→３）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１１は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１２－（→３）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１２は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→６）］－Ｇａｌ－、及び
これらの誘導体から選択される、前記アグリコン構造に結合された糖鎖を含み、
又は
・前記サポニンが、前記アグリコンコア構造に結合された前記群Ａから選択される第１の糖鎖を含み、前記アグリコンコア構造に結合された前記群Ｂから選択される第２の糖鎖を含む、ビデスモシドトリテルペン配糖体である、サポニンコンジュゲート。
【請求項４】
前記サポニンが、キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシドＢ、サイコサポニンＡ、サイコサポニンＤ、マクラントイジンＡ、エスクレントシド（ｅｓｃｕｌｅｎｔｏｓｉｄｅ Ａ）、フィトラッカゲニン、エシネート、ＡＳ６．２、ＮＰ－００５２３６、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、α－ヘデリン、ＮＰ－０１２６７２、ＮＰ－０１７７７７、ＮＰ－０１７７７８、ＮＰ－０１７７７４、ＮＰ－０１８１１０、ＮＰ－０１７７７２、ＮＰ－０１８１０９、ＮＰ－０１７８８８、ＮＰ－０１７８８９、ＮＰ－０１８１０８、ＳＡ１６４１、ＡＥＸ５５、ＮＰ－０１７６７４、ＮＰ－０１７８１０、ＡＧ１、ＮＰ－００３８８１、ＮＰ－０１７６７６、ＮＰ－０１７６７７、ＮＰ－０１７７０６、ＮＰ－０１７７０５、ＮＰ－０１７７７３、ＮＰ－０１７７７５、ＳＡ１６５７、ＡＧ２、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、ＳＯ１８６２、ＳＯ１９０４、ＱＳ－７、ＱＳ１８６１、ＱＳ－７ ａｐｉ、ＱＳ１８６２、ＱＳ－１７、ＱＳ－１８、ＱＳ－２１ Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１ Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１ Ｂ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１ Ｂ－ｘｙｌｏ、β－エスシン、エスシンＩａ、茶種子サポニンＩ、茶種子サポニンＪ、アッサムサポニンＦ、ジギトニン、プリムラ酸１及びＡＳ６４Ｒ、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択され、好ましくはＱＳ－２１、ＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６１誘導体、ＳＡ１６４１、ＳＡ１６４１誘導体、ＧＥ１７４１、ＧＥ１７４１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくはＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくはＳＯ１８６１誘導体である、請求項１～３のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項５】
前記サポニンがサポニン誘導体であり、

ｉ．前記サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；
ｉｉ．前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が誘導体化されているカルボキシル基を含み；
ｉｉｉ．前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、誘導体化されているアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基を含むか；又は
ｉｖ．前記サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．の任意の組み合わせ、好ましくは誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．のうちの２つの誘導体化の任意の組み合わせを含む、請求項３又は４に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項６】
前記サポニンが、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ジプソシドＡ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、ＳＯ１９０４、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組み合わせのいずれか１つ以上であり、好ましくはＱＳ－２１、ＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６１誘導体、ＳＡ１６４１、ＳＡ１６４１誘導体、ＧＥ１７４１、ＧＥ１７４１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくはＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくはＳＯ１８６１誘導体である、請求項１～５のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項７】
前記サポニンが、請求項２に記載のキラ酸サポニン又はギプソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子１：

【化１】



(分子1)

［式中、
A_1は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を表し、より好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；
A_2は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を表し、より好ましくは請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つ少なくとも１つのアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基、例えば１、２、３、

又は４つのアセトキシ基を含み、
A_1及びA_2の少なくとも１つは水素でなく、好ましくはA_1及びA_2の両方がオリゴ糖鎖であり：
並びに、Ｒはギプソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである］で表され：
前記サポニン誘導体は、分子１で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：
ｉ．前記キラ酸又はギプソゲニンのC_{23}位のアルデヒド基が誘導体化されている；
ｉｉ．A_1が請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を表し、且つA_1がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A_1のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている；及び
ｉｉｉ．A_2が請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つ少なくとも１つのアセトキシ基を含む場合、A_2の１つの糖部分又は２つ以上の糖部分のうち１つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている、の少なくとも１つ、好ましくは１又は２つ、より好ましくは１つが存在する、請求項１～６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項８】

A_1が請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、A_1のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されているか、及び／又は、A_2が請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つA_2が少なくとも１つのアセトキシ基を含み、A_2の少なくとも１つのアセトキシ基が誘導体化されている、請求項７に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項９】

分子１で表される前記サポニンが、ビデスモシドトリテルペンサポニンである、請求項７又は８に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１０】

前記サポニン誘導体が、分子１で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：
ｉ．前記キラ酸又はギプソゲニンのC_{23}位のアルデヒド基が、
－アルコールへの還元；
－Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ、前記ＥＭＣＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；
－Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、前記ＢＭＰＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；又は
－Ｎ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、前記ＫＭＵＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換によって誘導体化されており；
ｉｉ．A_1が請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を表し、且つA_1がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A_1のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ、又はＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされ；
ｉｉｉ．A_2が請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つA_2が少なくとも１つのアセトキシ基を含む場合、A_2の１つの糖部分又は２つ以上の糖部分のうち１つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（ＨＯ－）へ

の転換によって誘導体化されている、の少なくとも１つ、好ましくは１又は２つ、より好ましくは１つが存在する、請求項７～９のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１１】

A_1が、Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ、及び／又は、A_2が、Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃであり、好ましくは、分子１で表される前記サポニンが、３－Ｏ－β－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－β－Ｄ－グルクロノピラノシルキラ酸２８－Ｏ－β－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－α－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４ＯＡｃ－β－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－β－Ｄ－フコピラノシドであり、より好ましくはＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１及びＱＳ－２１、又はこれらの誘導体、最も好ましくはＳＯ１８６１又はその誘導体のいずれか１つ以上である、請求項７～１０のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１２】

前記サポニンがサポニン誘導体であり、

ｉ．前記サポニン誘導体が、

－アルコールへの還元；

－Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ、前記ＥＭＣＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；

－Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、前記ＢＭＰＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；又は

－Ｎ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、前記ＫＭＵＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換によって誘導体化されており；

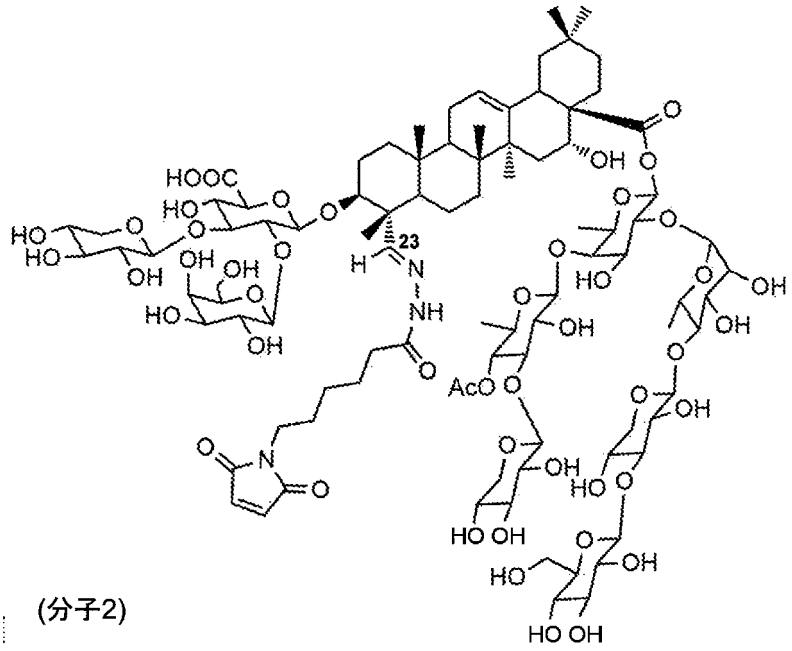
ｉｉ．前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ、又はＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされ；

ｉｉｉ．前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ｂから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（ＨＯ－）への変換によって誘導体化されているアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基を含むか；又は

ｉｖ．前記サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．の任意の組み合わせ、好ましくは誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．のうちの２つの誘導体化の任意の組み合わせを含み；

好ましくは、前記サポニン誘導体が、ＥＭＣＨとの反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成される前記アグリコンコア構造を含み、前記ＥＭＣＨのマレイミド基は、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、請求項５～１１のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

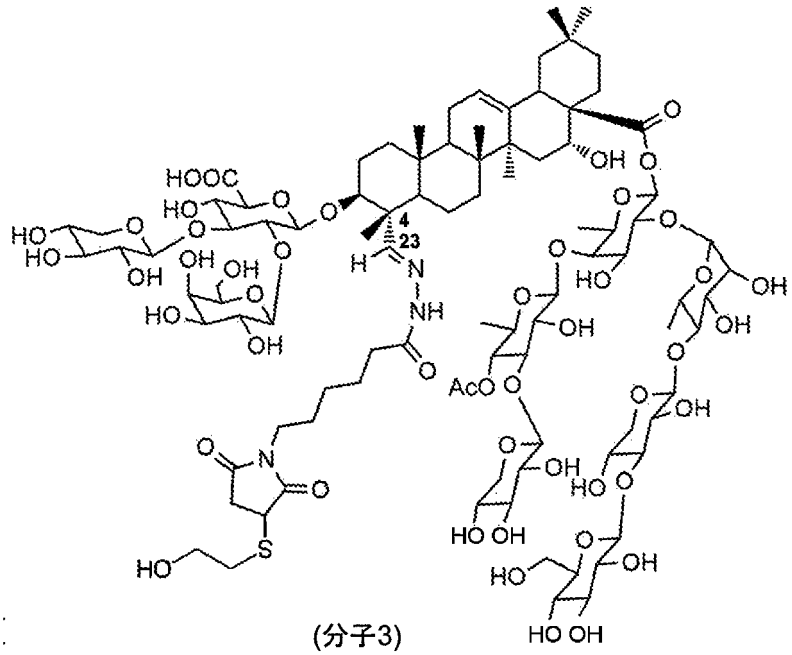
【請求項１３】
前記サポニンがサポニン誘導体であり、
ｉ．前記サポニン誘導体が、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ；
ｉｉ．前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされるか；又は
ｉｉｉ．前記サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．及びｉｉ．の組み合わせを含む、請求項１２に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項１４】
前記サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項３に記載の群Ａから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む、請求項１２に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項１５】
前記サポニンが、分子２：
【化２】



(分子2)

で表されるサポニン誘導体であるか、
又は、前記サポニンが、分子３：

【化３】



(分子3)

で表されるサポニン誘導体である、請求項１～１２のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

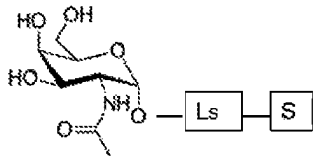
【請求項１６】

前記少なくとも１つのサポニン及び前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、直接共有結合されているか、又は少なくとも１つのリンカーを介して共有結合されている、請求項１～１５のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１７】

前記ＧａｌＮＡｃ部分が、式（ＩＩ）ｓ：

【化４】



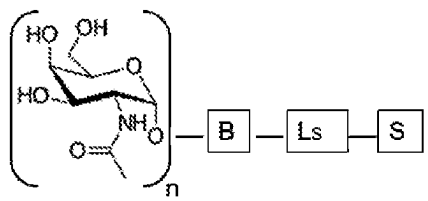
(II)s

に示されるように、好ましくはサポニンリンカーＬｓを介して前記サポニンＳに結合されている、請求項１～１６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１８】

前記ＧａｌＮＡｃ部分が、式（ＩＩＩ）ｓ：

【化５】



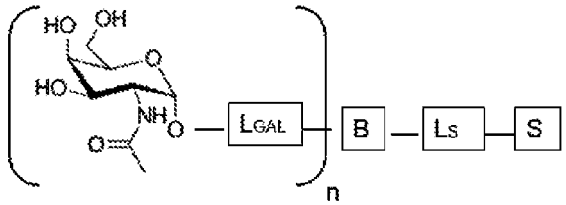
(III)s

（式中、ｎは２以上の整数であり、好ましくはｎは３であり、ＬｓはサポニンＢ部分リンカーであり、Ｓは前記サポニン部分である）に示すように、前記ＧａｌＮＡｃ部分の「１」位の酸素を介して中央の架橋部分Ｂにそれぞれ別々に共有結合され、これによって、好ましくはサポニン部分リンカーＬｓを介して前記ＧａｌＮＡｃ部分と前記サポニン部分との間に架橋が効果的に形成される、請求項１～１６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項１９】

前記ＧａｌＮＡｃ部分が、式（ＩＶ）ｓ：

【化６】



(IV)s

（式中、ｎは２以上の整数であり、好ましくはｎは３であり、ＬｓはサポニンＢ部分リンカーであり、Ｓは前記サポニン部分である）に示すように、ＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}を介して前記架橋部分Ｂに結合される、請求項１８に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２０】

前記サポニンＢ部分リンカーＬｓが、式（ＩＩ）ｓにおけるようなＧａｌＮＡｃ、又は式（ＩＩＩ）ｓ及び（ＩＶ）ｓにおけるような前記架橋部分Ｂにサポニンを共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す、請求項１７～１９のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２１】

前記サポニンＢ部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は前記架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体L_{s1}と、前記サポニン部分に共有結合された第２の前駆体L_{s2}との間のカップリング反応の結果生じるものであり、L_{s1}は、ＧａｌＮＡｃ又は前記架橋部分Ｂに共有結合された前記サポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、L_{s2}は、前記サポニン部分に共有結合された前記サポニン部分リンカーＬｓの前駆体である、請求項１７～２０のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２２】

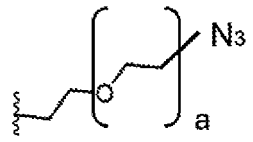
前記サポニンＢ部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は前記架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体L_{s1}と、前記サポニン部分に共有結合された第２の前駆体L_{s2}との間のカップリング反応の結果生じるものであり、前記カップリング反応は、アジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応及び炭素－炭素二重結合の付加からなる群から選択され、好ましくはアジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジド－アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである、請求項１７～２１のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２３】

前記サポニンＢ部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は前記架橋部分Ｂに共有結合され、アジドを含む第１の前駆体L_{s1}と、前記サポニン部分に共有結合され、アルキンを含み、好ましくは前記サポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含む第２の前駆体L_{s2}との間のカップリング反応の結果生じるものである、請求項１７～２２のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

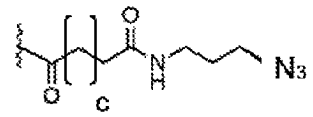
【請求項２４】

前記前駆体Ｌｓ１の構造が、以下の式（ＸＶＩＩ）のアジド：
【化７】



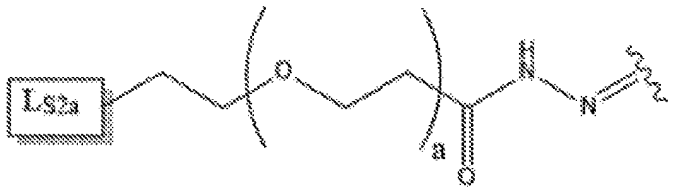
(XVII)

（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは１、２、及び３から選択される整数を表し、より好ましくは２を表す）であるか、又は
前記前駆体Ｌｓ１の構造が、以下の式（ＸＶＩＩＩ）のアジド：
【化８】



(XVIII)

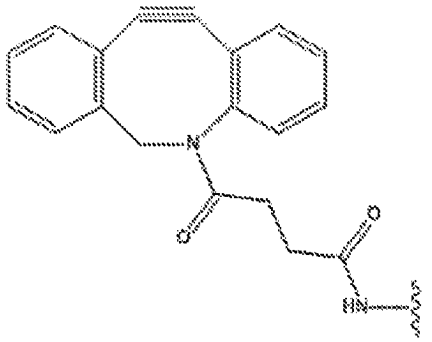
（式中、ｃは０以上の整数を表し、好ましくは５～１５の範囲の整数を表し、より好ましくは９を表す）を含む、請求項２１～２３のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項２５】
前記前駆体Ｌｓ２の構造が、以下の式（ＸＩＸ）のヒドラゾン：
【化９】



(XIX)

（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは２～６の範囲の整数を表し、より好ましくは４を表し、Ｌｓ２ａはアルキン含有部分を表す）を含む、請求項２１～２４のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項２６】
Ｌｓ２ａが、２０個未満の炭素原子を含み、好ましくは、式（ＸＸ）に従った部分：

【化１０】



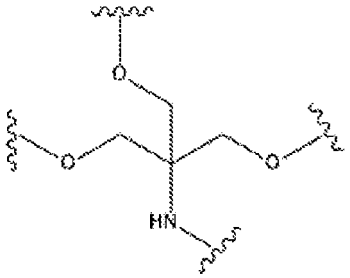
(XX)

を表す、請求項２５に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２７】

前記架橋部分が、式（ＸＶ）の化合物：

【化１１】



(XV)

であり、

前記式（ＸＶ）の化合物の酸素原子が、ＧａｌＮＡｃ又は前記ＧａｌＮＡｃリンカーＬ$_{GAL}$に結合され、前記式（ＸＶ）の化合物の窒素原子が、前記サポニン部分リンカーＬ$_{S}$に結合されている、請求項１８～２６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項２８】

Ｌ$_{GAL}$が、ＧａｌＮＡｃを前記架橋部分Ｂに共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す、請求項１９～２７のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

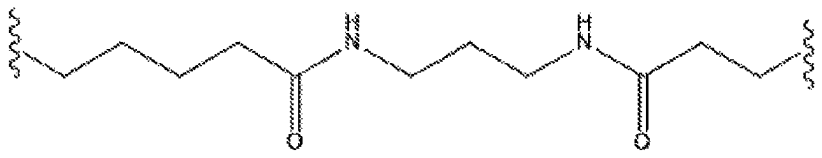
【請求項２９】

Ｌ$_{GAL}$が、２～２５個の炭素原子、好ましくは７～１５個の炭素原子、より好ましくは１１個の炭素原子を含み、少なくとも１つ、好ましくは２つのアミド部分を含む、請求項１９～２８のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項３０】

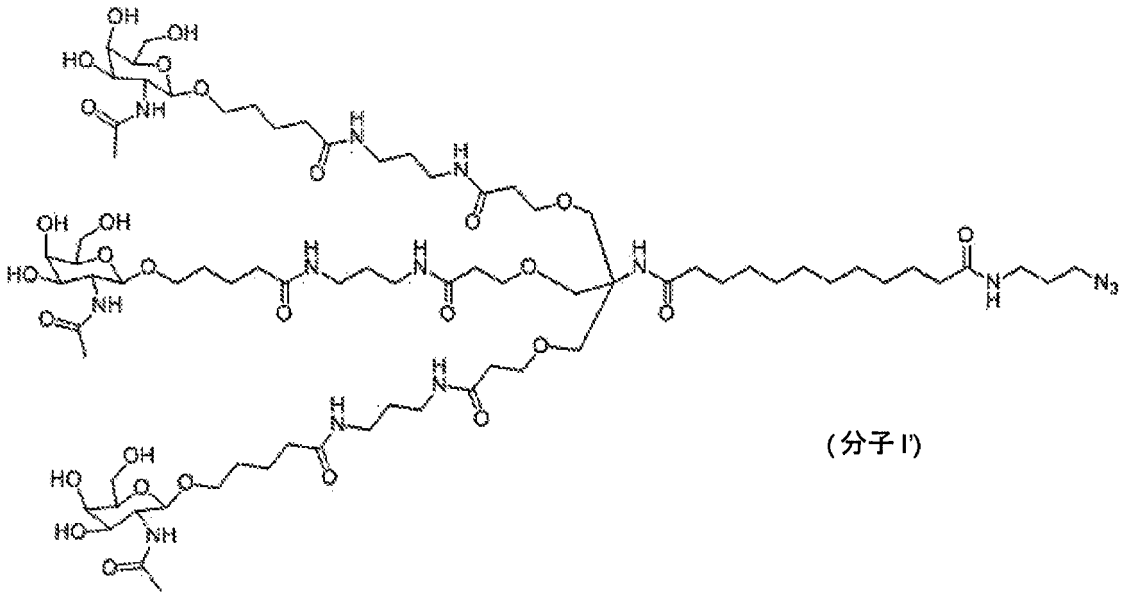
Ｌ$_{GAL}$が、式（ＸＶＩ）に従った化合物：

【化１２】



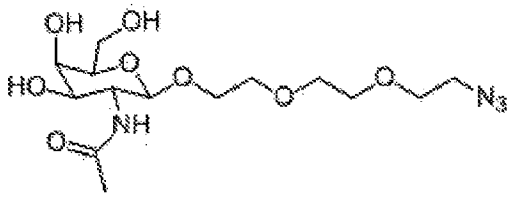
(XVI)

である、請求項１９～２９のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３１】
前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、分子Ｉ’で表される（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリス：
【化１３】



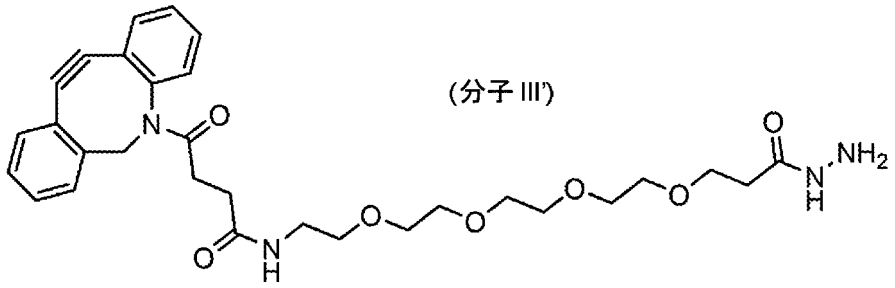
(分子I')

であるか、又は前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、分子ＩＩ’で表されるモノ－ＧａｌＮＡｃ：
【化１４】



(分子II')

である、請求項１７～３０のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３２】
前記少なくとも１つのサポニンが、分子ＩＩＩ’：
【化１５】



(分子III')

で表されるリンカーを介して請求項３１に記載の分子Ｉ’又は分子ＩＩ’に共有結合され、分子ＩＩＩ’のヒドラジド部分が、前記サポニンのアルデヒド基と共有ヒドラゾン結合を形成し、ジベンゾシクロオクチン基が、分子Ｉ’又は分子ＩＩ’のアジド基と共有結合を形成する、請求項１～３１のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【請求項３３】
前記少なくとも１つのサポニンが、少なくとも１つの切断可能リンカーを介して前記ＡＳＧＰＲのリガンドに共有結合されている、請求項１～３２のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３４】
前記切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び／又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、前記切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／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を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む、請求項３３に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３５】
前記切断可能リンカーが、例えば、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ような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５でインビボ切断を受ける、請求項３３又は３４に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３６】
前記コンジュゲートが、１、２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、１２８若しくは１～１００つのサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば７、９、１２つのサポニン部分を含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。
【請求項３７】
医薬配合物であって、
－請求項１～３６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、第１の医薬組成物と；
－エフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートであって、前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若しくは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは$(GalNAc)_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む第２の医薬組成物とを含む、医薬配合物。
【請求項３８】
医薬組成物であって、
－請求項１～３６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート；
－エフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートであって、前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若しくは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは$(GalNAc)_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物。
【請求項３９】
前記エフェクター分子が、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、ＢＮＡ、異種核酸若しくはｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせの少なくとも１つを含むか又はそれからなり、好ましくは毒素、酵素又はオリゴヌクレオチドである、請求項３７に記載の医薬配合物又は請求項３８に記載の医薬組成物。
【請求項４０】
前記ＡＳＧＰＲのリガンドが、$(GalNAc)_3$トリスを含むか若しくは（ＧａｌＮ

Ａｃ）$_3$トリスであり、及び／又は、前記ＡＳＧＰＲのリガンド及び前記エフェクター分子が、共有結合によって、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介してコンジュゲートされている、請求項３７若しくは３９に記載の医薬配合物又は請求項３８若しくは３９に記載の医薬組成物。

【請求項４１】

前記エフェクター分子が、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、アンチヘアピン型マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡ、アプタマーＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、アンチマイクロＲＮＡ、（アンチｍｉＲＮＡ、アンチｍｉＲ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡ、ロックド核酸（ＬＮＡ）、架橋型核酸（ＢＮＡ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸（ＢＮＡ^{NC}）、ＢＮＡベースのｓｉＲＮＡ、及びＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＢＮＡ－ＡＯＮ）のいずれか１つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである、請求項３７若しくは３９～４０のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４０のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４２】

前記エフェクター分子が、アンチｍｉＲＮＡ、ＢＮＡ－ＡＯＮ又はｓｉＲＮＡ、例えば、化学的に修飾されたｓｉＲＮＡ、代謝的に安定したｓｉＲＮＡ、及び化学的に修飾され、代謝的に安定したｓｉＲＮＡから選択される、ＢＮＡベースのｓｉＲＮＡのいずれか１つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである、請求項３７若しくは３９～４１のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４３】

前記エフェクター分子が、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質Ｂ（アポＢ）、ＨＳＰ２７、トランスサイレチン（ＴＴＲ）、プロタンパク質転換酵素であるサブチリシン／ケキシン９型（ＰＣＳＫ９）、δ－アミノレブリン酸シンターゼ１（ＡＬＡＳ１）、アンチトロンビン３（ＡＴ３）、グリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）、補体成分Ｃ５（ＣＣ５）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、α１－アンチトリプシン（ＡＡＴ）及び乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）のいずれか１つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、異常なｍｉＲＮＡを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項３７若しくは３９～４２のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４２のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４４】

前記エフェクター分子が、オリゴヌクレオチド、好ましくはＢＮＡベースのｓｉＲＮＡなどのｓｉＲＮＡ、又はＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、好ましくは哺乳類細胞の内部に存在する場合、アポリポタンパク質Ｂ（アポＢ）遺伝子をサイレンシングすることができる２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸をベースとしたＡＯＮである、請求項３７若しくは３９～４３のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４５】

前記エフェクター分子が、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：アポＢ、ＨＳＰ２７、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子の発現産物、ＨＢＶのＳ遺伝子の発現産物、ＡＡＴ及びＬＤＨのいずれか１つの発現に関与するｍＲＮＡを標的とすることができるか、又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、発癌性ｍｉＲＮＡ（ｏｎｃｏ－ｍｉＲ）の阻害若しくはｏｎｃｏ－ｍｉＲの発現の抑制などのｍｉＲＮＡ機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである、請求項３７若しくは３９～４４のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４６】

前記エフェクター分子が、オリゴヌクレオチド、好ましくはＢＮＡベースのｓｉＲＮＡ

などのｓｉＲＮＡ、又はＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、好ましくは哺乳類細胞の内部に存在する場合、タンパク質アポＢの発現に関与するｍＲＮＡを標的化することができる２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸をベースとしたＡＯＮである、請求項３７若しくは３９～４５のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４７】

前記エフェクター分子が、毒素であるか又は毒素を含み、この毒素は、ペプチド、タンパク質、ウレアーゼ及びＣｒｅ－リコンビナーゼなどの酵素、タンパク性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、並びに／又は、細菌毒素、より好ましくはアポプチンなどのウイルス毒素のいずれか１つ以上から選択される植物毒素；志賀毒素、志賀様毒素、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素（ＰＥ）若しくはＰＥの外毒素Ａなどの細菌毒素、完全長若しくはトランケートされたジフテリア毒素（ＤＴ）、コレラ毒素；αサルシンなどの真菌毒素；リボソーム不活性化タンパク質を含む植物毒素及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖、例えば、ダイアンシン（例えば、ダイアンシン－３０若しくはダイアンシン－３２）、サポリン（例えば、サポリン－Ｓ３若しくはサポリン－Ｓ６）、ブーガニン若しくはブーガニンの脱免疫化誘導体であるデブーガニング、志賀様毒素Ａ、ヤマゴボウ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、ビスキュミン、ビスキュミンＡ鎖；又はカエルＲＮａｓｅなどの動物若しくはヒト毒素、又はヒト由来のグランザイムＢ若しくはアンギオゲニン、又はこれらの任意のフラグメント若しくは誘導体のいずれか１つ以上から選択される少なくとも１つの分子を含むか又はそれからなり；好ましくは、前記タンパク毒素は、ダイアンシン及び／若しくはサポリンであり、並びに／又は毒素標的化リボソーム、毒素標的化延長因子、毒素標的化チューブリン、毒素標的化ＤＮＡ及び毒素標的化ＲＮＡの少なくとも１つ、より好ましくは、エムタンシン、パスドトクス、マイタンシノイド誘導体ＤＭ１、マ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）、カリケアマイシン、Ｎ－アセチル－γ－カリケアマイシン、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類似体、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ミトキサントロン、ツブリシン、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、メトトレキセート、アントラサイクリン、カンプトセシン類似体、ＳＮ－３８、ＤＸ－８９５１ｆ、メシル酸エキサテカン、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素（ＰＥ３８）のトランケート形態、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、若しくはこれらの誘導体のいずれか１つ以上を含むか若しくはそれからなる、請求項３７若しくは３９～４６のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４８】

前記第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む前記結合分子が、細胞表面分子のリガンドであるか、又は細胞表面分子の結合部位若しくは前記結合部位を含む少なくとも１つのドメイン若しくはこれらのフラグメントを含む抗体である、請求項３７若しくは３９～４７のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４７のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項４９】

前記第３のコンジュゲートが、抗体－毒素コンジュゲート、受容体－リガンド－毒素コンジュゲート、抗体－薬物コンジュゲート、受容体－リガンド－薬物コンジュゲート、抗体－核酸コンジュゲート又は受容体－リガンド－核酸コンジュゲートのいずれか１つ以上である、請求項３７若しくは３９～４８のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３

８～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５０】
前記第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む前記結合分子が、以下の細胞表面分子：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αＶβ３、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αＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソセリン、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、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のいずれか１つ、好ましくは、ＨＥＲ２、ＣＤ７１、ＡＳＧＰＲ及びＥＧＦＲのいずれか１つ、より好ましくはＣＤ７１に結合することができる、請求項３７若しくは３９～４９のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～４９のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５１】
前記第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む前記結合分子が、抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、ＩｇＧ、単一ドメイン抗体、少なくとも１つのV_{HH}ドメインを含むか又はそれからなる分子、好ましくはラクダ科V_H、可変重鎖新規抗原受容体（V_{NAR}）ドメイン、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）２及びＦｃａｂフラグメントのいずれか１つであるか、又はそれらを含む、請求項３７若しくは３９～５０のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～５０のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５２】
薬剤としての使用のための、請求項３７、３９～５１のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～５１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５３】
発現産物が、以下の遺伝子：アポＢ、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、ＡＡＴ及びＬＤＨのいずれか１つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防の使用のための、請求項３７、３９～５１のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～５１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５４】
発現産物がアポＢ遺伝子に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防の使用のための、請求項３７、３９～５１若しくは５３のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～５１若しくは５３のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項５５】
癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病Ａ、血友病Ｂ、ＡＡＴ関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、ＴＴＲ媒介性アミロイドーシス、遺伝性ＴＴＲアミロイドーシス（ｈＡＴＴＲ）、補体媒介性疾患、Ｂ型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防に使用するための、請求項３７、３９～５１のいずれか一項に記載の医薬配合物又は請求項３８～５１のいずれか一項に記載の医薬組成物、又は請求項５３に記載の使用のための医薬配合物若しくは医薬組成物。
【請求項５６】
前記サポニンが、サポニン誘導体、好ましくは請求項４～１５のいずれか一項に記載のＱＳ－２１誘導体又はＳＯ１８６１誘導体である、請求項５３、５４若しくは５５に記載の使用のための医薬配合物又は請求項５３、５４若しくは５５に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項５７】

請求項３７～５１のいずれか一項に記載の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを細胞外から前記細胞内に移行させ、好ましくは、その後に請求項３７～５１のいずれか一項に記載の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートによって構成される前記エフェクター分子を前記細胞の細胞質ゾルに移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法であって、
ａ）ＡＳＧＰＲをその表面に発現する細胞であり、前記第３のコンジュゲートを前記細胞に移行させるときに、前記第３のコンジュゲートが前記細胞表面分子に結合するための結合分子を含む、前記細胞表面分子を発現する細胞を提供する工程であって、前記細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、提供する工程；
ｂ）工程ａ）で提供された前記細胞に移行させるための、請求項３７～５１のいずれか一項に記載の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを提供する工程；
ｃ）請求項１～３６のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲートを提供する工程；
ｄ）工程ａ）の前記細胞を、工程ｂ）の前記第２のコンジュゲート又は前記第３のコンジュゲート、及び工程ｃ）の前記サポニンコンジュゲートとインビトロ又はエクスビボで接触させる工程であって、それによって前記細胞外から前記細胞への前記第２のコンジュゲート若しくは前記第３のコンジュゲートの前記移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後前記細胞の細胞質ゾルへの前記第２のコンジュゲート若しくは前記第３のコンジュゲートの前記移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後前記第２のコンジュゲート若しくは前記第３のコンジュゲートによって構成される少なくとも前記エフェクター分子の前記細胞の細胞質ゾルへの前記移行を生じさせる、接触させる工程を含む方法。

【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ＧａｌＮＡｃを含むＡＳＧＰＲのリガンドに共有結合されたサポニンを含む、サポニンコンジュゲートに関する。本発明はまた、本発明のサポニンコンジュゲートを含む第１の医薬組成物、及びエフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートを含む第２の医薬組成物、又はエフェクター分子と細胞表面分子に結合するための結合分子との第３のコンジュゲートを含む医薬配合物に関する。加えて、本発明は、本発明のサポニンコンジュゲート及び第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。さらに、本発明は、薬剤としての使用のための、本発明の医薬配合物又は医薬組成物に関する。本発明はまた、発現産物が、以下の遺伝子：アポＢ、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、ＡＡＴ及びＬＤＨに関連する疾患又は健康問題の治療又は予防に使用するための、且つ、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病Ａ、血友病Ｂ、ＡＡＴ関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、ＴＴＲアミロイドーシス、補体媒介性疾患、Ｂ型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防に使用するための本発明の医薬配合物又は医薬組成物に関する。最後に、本発明は、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを細胞外から前記細胞内に移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

ヒトであれ、又は病原体であれ、タンパク質の機能を阻害する能力は、新薬を発見するのに不可欠なものである。従来の小分子薬物及び抗体は、利用可能な標的のサブセットに強く限定されている。小分子は、主に補助因子部位又は伝達物質部位に結合し、小分子を収容するように設計された部位に効果的に結合する。抗体は、さらに多くの種類のタンパク質に結合することができるが、一般的に、細胞外の標的に限定されている。

【０００３】

オリゴヌクレオチド療法は、遺伝子転写及び翻訳経路を直接操作することによって、小分子薬物又は抗体薬物に直面する問題の多くを克服することを目的とした、比較的新しく

、急速に発展している分野である。オリゴヌクレオチドの効力及び多用途性は、特に「アンドラッガブル」なタンパク質をコードする遺伝子を古典的な小分子薬物によって抑制することが見込まれるため、魅力的な薬物候補となっている。最初のオリゴヌクレオチド薬物は、一本鎖核酸分子がそれらと相補的なｍＲＮＡ標的に特異的な配列と結合することにより、ＲＮアーゼＨ系によって二重鎖の分解を引き起こすアンチセンス技法に基づくものであった。

【０００４】

１９９８年に、Ａｎｄｒｅｗ　Ｆｉｒｅ及びＣｒａｉｇ　Ｍｅｌｌｏによって、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）の原因物質として同定する、影響力の大きい論文がＣａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓに公開され、この現象をＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と称した。ＲＮＡｉの発見は、植物及び菌類における遺伝子サイレンシングの不可解な知見を説明するものであり、生物学に革命を巻き起こすきっかけとなり、最終的に非コードＲＮＡが多細胞生物における遺伝子発現の中心的調節因子であることが示された。その後ほどなくして、小分子ｄｓＲＮＡ（典型的には１５～３０ｂｐ）が、非特異的なインターフェロン応答を誘発することなく、哺乳類細胞にＲＮＡｉサイレンシングを触媒的に誘導することができることが発見された。低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）及び低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）などの小分子ｄｓＲＮＡによるＲＮＡｉ経路の標的化には、著しくより効率的（触媒的）であり、且つ遺伝子発現をより長く阻害するという、アンチセンスに勝るいくつかの理論上の利点がある。このことは、投与頻度がより少なくなると共に、用量がより少なく、コストがより低くなると言い換えることができよう。曝露が低ければ低いほど、ｓｉＲＮＡの毒性問題が低くなることも意味し得る。

【０００５】

しかしながら、ｓｉＲＮＡがインビボにおいてその標的に到達する前に、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）機構に対する経路を遮断するという、多数の大きな障壁に直面する。血流に入ると、ｓｉＲＮＡは、そのサイズの小ささや高いアニオン特性によって、内因性ヌクレアーゼによって分解しやすくなり、腎排泄を受けやすくなる。加えて、ｓｉＲＮＡは、その標的細胞に到達する前に、血管のタイトな内皮結合を移動し、細胞外マトリックスを通じて拡散されなければならない。ｓｉＲＮＡは、その多くの負電荷により、細胞膜に容易に結合したり、又は細胞膜を通過したりすることがなく、また、一度細胞の内部に入ると、エンドソームから脱出してその細胞内のタンパク質標的と相互作用する必要がある。

【０００６】

従って、オリゴヌクレオチド（ｓｉＲＮＡなど）療法がうまくいくかどうかは、細胞外から細胞質ゾルに薬物を効果的に送達することに強く依存する。従って、オリゴヌクレオチド（ｓｉＲＮＡなど）送達を改善する送達システムを開発することに、かなりの注目が集まっている。ウイルス送達の他に、細胞へのｓｉＲＮＡ（又は他のオリゴヌクレオチド）送達を向上させるために利用される主な方法は、リポソーム、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）及びそれらの模倣体、又はナノ粒子を利用するものである（Ｇｏｏｄｉｎｇ，Ｍａｔｔ，ｅｔ　ａｌ．Ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｂｉｏｌｏｇｙ　＆　ｄｒｕｇ　ｄｅｓｉｇｎ　８０．６（２０１２）；７８７－８０９）。挿入突然変異誘発及び免疫発生の可能性などの安全性上の懸念は、ウイルス手法の将来性を限定するものと見なされる。

【０００７】

リポソームは、ｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチドに最も一般的に使用されている送達ベクターであり、この場合、オリゴヌクレオチドは脂質二重層内に封入されている。リポソームによるオリゴヌクレオチド送達では、遺伝子調節及び炎症反応に影響する酸素ラジカル媒介毒性（カチオン性リポソームに典型的なもの）、細胞毒性などのいくつかの問題に直面する。さらに、脂質を使用したインビボ送達は、主に肝臓及び脾臓を標的化するものと思われている。

【０００８】

細胞透過性ペプチド（ＣＣＰ）は、タンパク質形質導入ドメインとも呼ばれており、細胞膜を通過することができる珍しい性質を持った短いペプチド（通常＜３０アミノ酸残基長）である。ＣＰＰは、オリゴヌクレオチドと共有結合しているか、又はオリゴヌクレオチドと非共有結合複合体を形成することにより、オリゴヌクレオチドの細胞内取り込みを向上させることができる。ＣＰＰに媒介されるオリゴヌクレオチド送達の分野は、決して成熟しているとは言えない２つの分野である、オリゴヌクレオチド技術及びペプチド技術の両方によって引き起こされる問題が、単一の薬剤に組み合わされているため、極めて複雑である。オリゴヌクレオチドに関連する問題とは別に、ＣＰＰで直面する典型的な問題は、ペプチド鎖のインビボ安定性（の欠如）に関連するものであり、多くの場合、合成が複雑となる可能性があるか、及び／又は細胞透過活性の低減を示し得る、非天然ペプチド誘導体を使用することが必要となる。

【０００９】

細胞送達の向上に関わらず、エンドソームによる捕捉を克服することは、効率的なＣＰＰ及び他の輸送システムを設計するのに主要な課題の１つである（Ｇｏｏｄｉｎｇ　ｅｔａｌ）。

【００１０】

ナノ粒子及びナノ担体は、典型的にはポリマー、生物学的安定剤、及びオリゴヌクレオチドと複合体化した細胞標的リガンドから構成される、ナノスケールのオリゴヌクレオチド送達システムである。例示的なｓｉＲＮＡナノ担体システムは、ｓｉＲＮＡダイナミックポリコンジュゲート（Ｄｙｎａｍｉｃ　Ｐｏｌｙ－Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）の名称で知られている。このシステムは、生物学的安定剤としてのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と肝細胞標的リガンドとに連結された両親媒性ポリマーに基づくものであり、ジスルフィド結合によってｓｉＲＮＡがポリマーに共有結合されている。標的部分及びＰＥＧ部分は、マレアマート結合を介してポリマーに結合され、血清タンパク質に結合しない、負に帯電したナノ粒子を形成する。マレアマート結合は、エンドサイトーシスにより内部移行した後に、エンドソームの酸性化を受けて速やかに加水分解し、ポリマーのカチオン性アミン基を露出させ、プロトンスポンジ効果によりエンドソーム脱出を誘導する。ナノ担体は、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）（時にシクロデキストリンと組み合わされる）などのカチオン性ポリマーの形態でも知られており、これによって、ｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチドと静電複合体を形成し、分解からの保護と内部移行の促進を提供することができる。しかしながら、膜破壊及びアポトーシス誘導から生じるより高濃度での毒性は、治療用送達剤としてのカチオン性ポリマーの用途を限定してしまう可能性がある。ナノ粒子及びナノ担体の複雑な調製だけでなく、それらの長期間の安定性が、商業的に実現可能な用途に対して大きな障壁となっている。

【００１１】

心血管疾患を引き起こすリポタンパク質、例えば、ＬＤＬ、レムナントリポタンパク質、及びＬｐ（ａ）は、遺伝子サイレンシング療法を使用して、これらのリポタンパク質の産生又は除去に重要な役割を有するアポリポタンパク質（アポＢ）を標的化することによって減少させることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをベースとした手法、及び低分子干渉ＲＮＡをベースとした手法が適用されている。臨床試験により、アポＢ遺伝子を標的化することによるそのような遺伝子サイレンシング療法の有効性が評価されている。脂質を低下させるアンチセンスオリゴヌクレオチド及びｓｉＲＮＡ療法の有害作用としては、注射部位反応、インフルエンザ様症状、及び血小板数の減少が挙げられる。有害作用は、ＧａｌＮＡｃコンジュゲーションを使用してより効率的に薬物を肝臓細胞に送達し、血漿中の薬物の濃度を低下させる、より新しい世代のこれらの薬物によって、恐らく対処されている。これらの送達システムのいくつかによって達成することのできる、細胞への改善されたオリゴヌクレオチド（ｓｉＲＮＡなど）送達とは裏腹に、エンドソーム脱出がオリゴヌクレオチドベースの治療薬、例えばＲＮＡｉベースの治療薬を適用するのに依然として大きな障壁となっている。エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドのごく僅かな部分のみが細胞質空間に脱出し、そこで意図された機能を発揮するが、その大部

分はエンドサイトーシスコンパートメントに捕捉されたままとなり、不活性化する。最近の文献では、受動的なｓｉＲＮＡの脱出率は＜０．０１％であることが示唆されている（Ｓｅｔｔｅｎ，Ｒｙａｎ Ｌ．，ｅｔ ａｌ．．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ １８．６（２０１９）；４２１－４４６）。さらに、オリゴヌクレオチドを機能的に内部移行して目的の効果を生じさせる（例えば、ノックダウン）細胞の能力は、細胞が大量のオリゴヌクレオチドを内部移行する程度とは無関係であるように見えることが示されている。これらの知見により、別の「生産的な」及び「非生産的な」自由取り込み経路があるという仮説が導き出されているが、これらの経路を識別する分子機構は依然として不明なままとなっている（Ｓｅｔｔｅｎ，Ｒｙａｎ Ｌ．，Ｊｏｈｎ Ｊ．Ｒｏｓｓｉ，ａｎｄ Ｓｉ－ｐｉｎｇ Ｈａｎ．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ １８．６（２０１９）；４２１－４４６）。

【００１２】

概して、根底にある機構（改善されたエンドソーム脱出、「生産的な」経路による取り込みの増大、又は別の機構）に関わらず、増大した効力（例えば、標的のノックダウン）、毒性の低下及び／又はオフターゲット効果の低下をもたらす改善されたオリゴヌクレオチドの送達システムに対する大きな必要性が依然として存在する。

【００１３】

新たな戦略は、オリゴヌクレオチドの効力を増大させるために、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を受容体リガンドにコンジュゲートし、選択された組織に分布させることを必然的に伴うものである。例えば、３分岐型Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）をオリゴヌクレオチド治療薬にコンジュゲートすることで、単離肝細胞だけでなくインビボでの肝臓で１０～３０倍の効力の増大がもたらされる。ＧａｌＮＡｃは、糖タンパク質のペンダントオリゴ糖から末端のシアル酸残基が欠損した、損傷した糖タンパク質で見られるものである。肝臓は、肝細胞の表面上に非常に高いレベル（細胞当たり10^5～10^6のオーダー）の三量体アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）を発現することによって、体循環からこれらのタンパク質を除去するように機能する。ＡＳＧＰＲは、血液から循環中の巨大分子をエンドサイトーシスするために中性ｐＨでＧａｌＮＡｃに特異的に結合し、初期エンドソーム内にカーゴを下ろすために酸性ｐＨ（約５～６）でＧａｌＮＡｃを放出する。遊離したＡＳＧＰＲは、次いで再利用するために細胞表面に再度リサイクルされる。現在臨床治験中の約１／３のＲＮＡｉ薬物は、ＡＳＧＰＲを標的化する多価ＧａｌＮＡｃリガンドにコンジュゲートされた、単一分子の化学的に改変されたＲＮＡｉトリガーである。肝臓の好適な生理機能、ＡＳＧＰＲの特有の特性、ＧａｌＮＡｃリガンドの無毒性及びＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡコンジュゲートの簡便さにより、このことが肝細胞への全身的なＲＮＡｉ送達のための魅力的な手法となっている。

【００１４】

しかしながら、オリゴヌクレオチドシステム（例えば、ＧａｌＮＡｃ－オリゴヌクレオチドコンジュゲート）を標的化するＡＳＧＰＲの効力をさらに増大させ、毒性を減少させ、及び／又はオフターゲット効果を減少させた、改善された送達システムに対する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１５】

本発明の第１の態様は、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドに共有結合された少なくとも１つのサポニンを含むサポニンコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分、好ましくは３つ又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは$(GalNAc)_3$トリスを含むか又はそれからなり、少なくとも１つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、サポニンコンジュゲートに関する。

【００１６】

本発明の第２の態様は、
－本発明のサポニンコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、第１の医薬組成物と；
－エフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若しくは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む第２の医薬組成物とを含む、医薬配合物に関する。

【００１７】

本発明の第３の態様は、
－本発明のサポニンコンジュゲート；
－エフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若しくは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【００１８】

本発明の第４の態様は、薬剤としての使用のための、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物に関する。

【００１９】

本発明の第５の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：アポＢ、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、ＡＡＴ及びＬＤＨのいずれか１つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防に使用するための、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物に関する。

【００２０】

本発明の第６の態様は、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを細胞外から前記細胞内に移行させ、好ましくはその後に本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートによって構成されるエフェクター分子を前記細胞の細胞質ゾルに移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法であって、
ａ）ＡＳＧＰＲをその表面に発現する細胞であり、第３のコンジュゲートを細胞に移行させるときに、第３のコンジュゲートが細胞表面分子に結合するための結合分子を含む、前記細胞表面分子を発現する細胞を提供する工程であって、細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、提供する工程；
ｂ）工程ａ）で提供された細胞に移行させるための、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートのいずれか１つを提供する工程；
ｃ）本発明のサポニンコンジュゲートを提供する工程；
ｄ）工程ａ）の細胞を、工程ｂ）の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲート、及び工程ｃ）のサポニンコンジュゲートとインビトロ又はエクスビボで接触させる工程であって、それによって細胞外から前記細胞への第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートの移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後前記細胞の細胞質ゾルへの第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートの移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートによって構成される少なくともエフェクター分子の前記細胞の細胞質ゾルへの移行を生じさせる、接触させる工程を含む方法に関する。

【００２１】

定義
「ＧａｌＮＡｃ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、Ｎ－アセ

チルガラクトサミン及びそのＩＵＰＡＣ名：２－（アセチルアミノ）－２－デオキシ－Ｄ－ガラクトースを指す。

【００２２】

「（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリス」という用語は、例えば、ｓｉＲＮＡベースの療法の分野におけるその通常の科学的意味を有し、本明細書では３つのＧａｌＮＡｃ単位を含む部分を指し、そのそれぞれが別々に、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介してトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）（ＩＵＰＡＣ名：２－アミノ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－１，３－ジオール）のヒドロキシル基に共有結合されている。（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスは、遊離アミンを含む分子として存在することができるか、又は、例えば本明細書に記載されるコンジュゲートを含む（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリス部分を形成するように、残存するアミン結合部位を介してさらに官能化してもよい。

【００２３】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では一連の２つ以上のヌクレオチドを指し、即ち、オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドで構成されている短いオリゴマーである。例としては、ＲＮＡ及びＤＮＡ、並びにあらゆる改変ＲＮＡ又はＤＮＡ、例えばロックド核酸（ＬＮＡ）又は２’－Ｏ，４’－Ｃ－アミノエチレン若しくは２’－Ｏ，４’－Ｃ－アミノメチレン架橋型核酸（ＢＮＡ^{NC}）としても公知の架橋型核酸（ＢＮＡ）などのヌクレオチド類似体を含む一連の核酸があり、ここで、ヌクレオチドはリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドである。

【００２４】

「ＲＮＡｉ媒介遺伝子標的法」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、遺伝子の転写に関与するｍＲＮＡを標的化する小型の二本鎖ＲＮＡ分子などのオリゴヌクレオチドを細胞に移行することによって前記細胞内の遺伝子の機能に影響を与えるインビボ、エクスビボ又はインビトロ手法を指し、例えば、小型の二本鎖ＲＮＡ分子によって特定の遺伝子のＲＮＡｉサイレンシングを効率的に引き起こすことができる。

【００２５】

「架橋型核酸」、即ち端的には「ＢＮＡ」、又は「ロックド核酸」、即ち端的には「ＬＮＡ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では改変ＲＮＡヌクレオチドを指す。ＢＮＡは、「拘束ＲＮＡ分子」又は「インアクセシブル（ｉｎａｃｃｅｓｓｉｂｌｅ）ＲＮＡ分子」とも称される。ＢＮＡ単量体は、「固定された」Ｃ$_3$’エンド型糖パッカリングによる５員、６員又はさらに７員の架橋構造を含み得る。合成によりリボースの２’，４’位に架橋を組み込むと、２’，４’－ＢＮＡ単量体が得られる。ＢＮＡ単量体は、当該技術分野において公知の標準的なホスホラミダイト化学特性を用いてオリゴヌクレオチド高分子構造体に組み込むことができる。ＢＮＡは、結合親和性及び安定性が増大した、構造的に強固なオリゴヌクレオチドである。

【００２６】

アンチセンスオリゴヌクレオチドという用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では端的に「ＡＯＮ」又は「ＡＳＯ」として示される場合がある。

【００２７】

「ＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド」、又は端的には「ＢＮＡ－ＡＯＮ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、前記ヌクレオチドの少なくとも１つがＢＮＡである、一連のアンチセンスヌクレオチドを指す。

【００２８】

「タンパク性」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、タンパク質様（分子がある程度までタンパク質の物理化学的特性を有することを意味する）の、タンパク質の、タンパク質に関する、タンパク質を含む、タンパク質に属する、タンパク質からなる、タンパク質に似ている、又はタンパク質である分子を指す。「タンパク性」という用語は、例えば、「タンパク性分子」において用いられる場合、タンパク質に似ているか、又はタンパク質である分子の少なくとも一部が存在することを指し、「タンパク質

」は、少なくとも２残基長のアミノ酸残基の鎖を含み、従って、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質、並びにタンパク質又はタンパク質ドメインの会合体を含むものと理解すべきである。タンパク性分子では、少なくとも２アミノ酸残基が、例えばペプチド結合などのアミド結合を介して結合されている。タンパク性分子では、アミノ酸残基は、天然アミノ酸残基及び／又は改変された天然アミノ酸残基などの人工アミノ酸残基である。好ましい実施形態では、タンパク性分子は、少なくとも２アミノ酸残基、好ましくは２～約２，０００アミノ酸残基を含む分子である。一実施形態では、タンパク性分子は、２～２０（ペプチドに典型的な）アミノ酸を含む分子である。一実施形態では、タンパク性分子は、２１～１，０００（ポリペプチド、タンパク質、タンパク質ドメイン、例えば抗体、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、ＥＧＦなどの受容体のリガンドに典型的な）アミノ酸を含む分子である。アミノ酸残基は、（典型的には）ペプチド結合を介して結合されていることが好ましい。本発明によれば、前記アミノ酸残基は、（改変された）（非）天然アミノ酸残基であるか、又はそれを含む。

【００２９】

「エフェクター分子」、又は「エフェクター部分」という用語は、例えば、共有結合コンジュゲートの一部としてのエフェクター分子を言及する場合、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、例えば、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖、（リン）脂質、ＤＮＡ、ＲＮＡなどの核酸、酵素のいずれか１つ以上に選択的に結合し、そのような１つ以上の標的分子の生物活性を調節することのできる分子を指す。エフェクター分子は、例えば、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、ＢＮＡ、異種核酸若しくはｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせのいずれか１つ以上から選択される分子である。従って、例えば、エフェクター分子又はエフェクター部分は、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、ＢＮＡ、異種核酸若しくはｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせのいずれか１つ以上から選択される分子又は部分であり、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖、（リン）脂質、ＤＮＡ、ＲＮＡなどの核酸、酵素のいずれか１つ以上に選択的に結合し、標的分子に結合したときに、そのような１つ以上の標的分子の生物活性を調節することのできる分子又は部分である。典型的には、エフェクター分子は、哺乳類細胞、例えばヒト細胞などの細胞内に、例えば、前記細胞の細胞質ゾルに生物学的効果を及ぼすことができる。従って、典型的なエフェクター分子は、薬物分子、プラスミドＤＮＡ、抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）によって構成される毒素などの毒素、ｓｉＲＮＡ、ＢＮＡ、抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート（ＡＯＣ）によって構成される核酸などのオリゴヌクレオチドである。例えば、エフェクター分子は、（細胞内）酵素活性、遺伝子発現、又は細胞シグナル伝達を増加又は減少させることのできるリガンドとして機能することができる分子である。

【００３０】

「健康問題」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、健康なヒトの身体又はその一部の状態と比較した場合に最適以下となり、それによって対象の適切な機能及び／又は健康を妨げる、例えば、ヒトの身体の通常の機能を損なう、ヒト患者などの対象の身体、又はその一部、臓器、筋肉、静脈、動脈、皮膚、四肢、血液、細胞などのあらゆる状態を指す。

【００３１】

「ＧａｌＮＡｃ修飾オリゴヌクレオチド薬物」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では遺伝子の転写に干渉するオリゴヌクレオチドを指し、１つ以上のＧａｌＮＡｃ単位が、例えば少なくとも１つのリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合されている。

【００３２】

「ロックド核酸」、端的には「ＬＮＡ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、当該技術分野において公知のように、Ｃ３’エンド型立体配座「β－Ｄ－

ＬＮＡ」、又はＣ２’エンド型（α－Ｌ－ＬＮＡ）立体配座のいずれかで、追加のエチレン架橋によってリボース部分を固定する、１つ以上のヌクレオチドビルディングブロックを含有するオリゴヌクレオチドを指す。

【００３３】

「架橋型核酸ＮＣ」、端的には「ＢＮＡ^{NC}」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、当該技術分野において公知のように、Ｎ原子における置換（メチル基がこれまでに最も一般的に使用されている）が異なる、追加の２’－Ｏ，４’－Ｃ－アミノエチレン架橋型核酸から構成される、１つ以上のヌクレオチドビルディングブロックを含有するオリゴヌクレオチドを指す。

【００３４】

「化学的に修飾された、代謝的に安定したｓｉＲＮＡ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、修飾ｓｉＲＮＡ分子が代謝分解、消化、酵素溶解などに対してより耐性のある、即ちより安定化するように、天然に存在するヌクレオチドからなるＲＮＡオリゴヌクレオチドと比較して化学修飾を含むｓｉＲＮＡ分子を指す。

【００３５】

「サポニン」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、サポゲニンである親油性アグリコンコアと組み合わされた１つ以上の親水性グリコン部分を含む、両親媒性グリコシドの群を指す。サポニンは、天然に存在するものあっても、又は合成（即ち、天然に存在しない）であってもよい。「サポニン」という用語には、天然に存在するサポニン、天然に存在するサポニンの誘導体だけでなく、化学的及び／又は生物工学的合成経路によって新規に合成されたサポニンも含まれる。

【００３６】

「サポニン誘導体」（「修飾サポニン」としても知られている）という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、官能基の酸化、官能基の還元、及び／又は別の分子との共有結合の形成などの１つ以上の化学修飾によって誘導体化されている、天然に存在するサポニンに相当する化合物を指す。好ましい修飾としては、アグリコンコアのアルデヒド基の誘導体化、糖鎖のカルボキシル基の誘導体化、又は糖鎖のアセトキシ基の誘導体化が挙げられる。典型的には、サポニン誘導体には天然の対応物がなく、即ち、サポニン誘導体は、例えば植物又は木から天然に生成されることがない。「サポニン誘導体」という用語には、天然に存在するサポニンを誘導体化することによって得られる誘導体だけでなく、１つ以上の化学修飾によって誘導体化された天然に存在するサポニンに相当する化合物を生じさせる、化学的及び／又は生物工学的合成経路によって新規に合成された誘導体も含まれる。

【００３７】

「アグリコンコア構造」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、１個又は２個の炭水化物アンテナ又は糖鎖（グリカン）がそこに結合されていないサポニンのアグリコンコアを指す。例えば、キラ酸は、ＳＯ１８６１、ＱＳ－７、ＱＳ－２１のアグリコン配糖体コア構造である。

【００３８】

「糖鎖」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、グリカン、炭水化物アンテナ、単一の糖部分（単糖）又は複数の糖部分を含む鎖（オリゴ糖、多糖）のいずれかを指す。糖鎖は、糖部分のみから構成されてもよく、又は、例えば、ＱＳ－２１に存在するような、４Ｅ－メトキシケイ皮酸、４Ｚ－メトキシケイ皮酸、及び５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）のいずれか１つなどのさらなる部分も含み得る。

【００３９】

糖鎖の名称の文脈における「Ａｐｉ／Ｘｙｌ－」或いは「Ａｐｉ－又はＸｙｌ－」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、アピオース（Ａｐｉ）部分を含むか、又はキシロース（Ｘｙｌ）部分を含むかのいずれかの糖鎖を指す。

【００４０】
「抗体薬物コンジュゲート」又は「ＡＤＣ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、ＩｇＧ、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメント、１つ又は複数のＶｈドメインなどの抗体と、ヒト患者などの対象の細胞と接触させたときに治療効果を発揮することができるあらゆる分子（例えば、活性薬剤成分、毒素、オリゴヌクレオチド、酵素、小分子薬物化合物など）とのあらゆるコンジュゲートを指す。
【００４１】
「抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート」又は「ＡＯＣ」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、ＩｇＧ、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメント、１つ又は複数のＶｈドメインなどの抗体と、ヒト患者などの対象の細胞と接触させたときに治療効果を発揮することができるあらゆるオリゴヌクレオチド分子（例えば、ＤＮＡ、改変ＤＮＡ、ＲＮＡ、改変ＲＮＡ、一本鎖分子又は二本鎖分子として存在する合成核酸、例えばＢＮＡ、アレル特異的オリゴヌクレオチド、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ：サイレンシングＲＮＡ）、アンチセンスＤＮＡ、アンチセンスＲＮＡなどを包含する天然又は合成の一連の核酸から選択されるオリゴヌクレオチド）とのあらゆるコンジュゲートを指す。
【００４２】
「コンジュゲート」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、少なくとも第２の分子に共有結合された少なくとも第１の分子を指し、それによって、第１の分子及び第２の分子を含むか又はそれからなる共有結合した会合体が形成される。典型的なコンジュゲートとしては、トリス（ＧａｌＮＡｃ）$_3$－ｓｉＲＮＡ、ＡＤＣ、ＡＯＣ、及びＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（サポニンのアグリコン配糖体コア構造のアルデヒド基にＥＭＣＨが連結されている）がある。
【００４３】
「部分」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、さらなる分子、リンカー、分子の会合体などに結合、連結、コンジュゲートされた分子を指し、それによって、より大きい分子、コンジュゲート、分子の会合体が形成される。典型的には、部分は、第２の分子に共有結合された第１の分子であり、第１の分子と第２の分子上に最初に存在する１つ以上の化学基を含む。例えば、サポリンは典型的なエフェクター分子である。抗体薬物コンジュゲートの一部として、サポリンはＡＤＣにおける典型的なエフェクター部分である。抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部として、ＢＮＡ又はｓｉＲＮＡはＡＯＣにおける典型的なエフェクター部分である。
【００４４】
リンカーを含む抗体サポニンコンジュゲート又は構築物などにおいて使用される「Ｓ」という用語は、エンドソーム及び細胞質ゾル内でインタクトに維持される「安定化リンカー」を表す。
【００４５】
リンカーを含む抗体サポニンコンジュゲート又は構築物などにおいて使用される「Ｌ」という用語は、エンドソーム内の弱酸条件下で切断される「不安定リンカー」を表す。
【００４６】
「部分」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、さらなる分子、リンカー、分子の会合体などに結合、連結、コンジュゲートされた分子を指し、それによって、より大きい分子、コンジュゲート、分子の会合体が形成される。典型的には、部分は、第２の分子に共有結合された第１の分子であり、最初に第１の分子上に存在し、第２の分子上に存在する１つ以上の化学基を含む。例えば、サポリンは典型的な分子であり、エフェクター分子の一例である。抗体薬物コンジュゲートの一部として、サポリンはＡＤＣにおける典型的なエフェクター部分である。抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部として、ＢＮＡ又はｓｉＲＮＡはＡＯＣにおける典型的なエフェクター部分である。
【００４７】

「ＤＡＲ」という用語は、通常、薬物抗体比を表すものであり、所与の抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）製剤の薬物と抗体の平均比率を指し、本明細書では、コンジュゲート分子に対してＳＯ１８６１部分、又はＳＰＴ００１に結合した量の比率を指す。

【００４８】

本明細書及び特許請求の範囲における第１、第２、第３などの用語は、例えば、類似の要素、組成物、組成物中の構成成分、又は別々の方法工程を区別するために使用され、必ずしも連続した順序又は時系列的な順序について説明するものではない。この用語は適切な状況下で互換可能であり、本発明の実施形態は、特に明記されない限り、本明細書に記載又は例示されたもの以外の他の順序で操作することができる。

【００４９】

本明細書に記載される発明の実施形態は、特に明記されない限り、組み合わせて、且つ協働して操作することができる。

【００５０】

さらに、様々な実施形態は、「好ましくは」又は「例えば（ｅ．ｇ．）」又は「例えば（ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ）」又は「特に」などと言及されるが、本発明が本発明の範囲を限定するというよりはむしろ、例示的な方法として実現され得るものと解釈すべきである。

【００５１】

特許請求の範囲に使用される「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、例えば、これ以降に列挙される要素又は方法工程又は組成物の構成成分に限定されるものと解釈すべきではなく、他の要素又は方法工程又は特定の組成物の構成成分を除外するものではない。このことは、記載された特徴、整数、（方法）工程又は構成成分の存在を、言及されるように規定するものと解釈する必要があるが、１つ以上の他の特徴、整数、工程若しくは構成成分、又はそれらの群が存在又は追加されていることを排除するものではない。従って、「工程Ａ及びＢを含む方法」という表現の範囲は、工程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、列挙された方法の工程のみがＡ及びＢであり、さらに、特許請求の範囲は、これらの方法工程の等価物を含むものと解釈すべきである。従って、「構成成分Ａ及びＢを含む組成物」という表現の範囲は、構成成分Ａ及びＢのみからなる組成物に限定されるべきではなく、むしろ、本発明に関しては、列挙された組成物の構成成分のみがＡ及びＢであり、さらに、特許請求の範囲は、これらの構成成分の等価物を含むものと解釈すべきである。

【００５２】

加えて、不定冠詞「１つの（ａ）」又は「１つの（ａｎ）」によって要素又は構成成分を言及することは、文脈によって明らかに要素又は構成成分の１つ及び１つだけが存在する必要がない限り、２つ以上の要素又は構成成分が存在する可能性を排除するものではない。従って、不定冠詞「１つの（ａ）」又は「１つの（ａｎ）」は、通常「少なくとも１つの」を意味する。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１】三価ＧａｌＮＡｃの合成。

【図２】ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯの合成。

【図３】一価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成。

【図４】三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成。

【図５】一価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡの合成。

【図６】三価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡの合成。

【図７】三価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡの合成。

【図８Ａ】三価ＧａｌＮＡｃの合成。

【図８Ｂ】三価ＧａｌＮＡｃの合成。

【図９Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株におけるＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の一般毒性（ＭＴＳ）。図９Ｂの隣に表示され

ている凡例は、図９Ａにも適用される。
【図９Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株におけるＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の一般毒性（ＭＴＳ）。図９Ｂの隣に表示されている凡例は、図９Ａにも適用される。
【図１０Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞死滅アッセイ（ＭＴＳ）。図１０Ｂの隣に表示されている凡例は、図１０Ａにも適用される。
【図１０Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞死滅アッセイ（ＭＴＳ）。図１０Ｂの隣に表示されている凡例は、図１０Ａにも適用される。
【図１１Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。
【図１１Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。
【図１２Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１２Ｂの隣に表示されている凡例は、図１２Ａにも適用される。
【図１２Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１２Ｂの隣に表示されている凡例は、図１２Ａにも適用される。
【図１３Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞生存アッセイ。図１３Ｂの隣に表示されている凡例は、図１３Ａにも適用される。
【図１３Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞生存アッセイ。図１３Ｂの隣に表示されている凡例は、図１３Ａにも適用される。
【図１４Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１４Ｂの隣に表示されている凡例は、図１４Ａにも適用される。
【図１４Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１４Ｂの隣に表示されている凡例は、図１４Ａにも適用される。
【図１５Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞生存アッセイ。図１５Ｂの隣に表示されている凡例は、図１５Ａにも適用される。
【図１５Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における細胞生存アッセイ。図１５Ｂの隣に表示されている凡例は、図１５Ａにも適用される。
【図１６Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１６Ｂの隣に表示されている凡例は、図１６Ａにも適用される。
【図１６Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１６Ｂの隣に表示されている凡例は、図１６Ａにも適用される。
【図１７Ａ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１７Ｂの隣に表示されている凡例は、図１７Ａにも適用される。
【図１７Ｂ】ＨｅｐＧ２（Ａ）及びＨｕｈ７（Ｂ）細胞株における遺伝子発現解析。図１７Ｂの隣に表示されている凡例は、図１７Ａにも適用される。
【図１８】マウス初代肝細胞におけるアポＢのＲＮＡ発現解析。
【図１９】Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの肝臓組織におけるアポＢのＲＮＡ発現解析。
【図２０】Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける血清アポＢタンパク質分析。ＮＢ、１ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２及び０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０３＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ８６１群では、３３６時間の分析値が報告されていない。
【図２１】Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの血清ＬＤＬコレステロール（ＬＤＬ－Ｃ）分析。
【図２２】Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスの血清ＡＬＴ分析。
【図２３】初代ヒト肝細胞における細胞生存アッセイ（ＣＴＧ）。
【図２４Ａ】初代ヒト肝細胞におけるアポＢのＲＮＡ発現解析及び細胞生存率アッセイ。
【図２４Ｂ】初代ヒト肝細胞におけるアポＢのＲＮＡ発現解析及び細胞生存率アッセイ。
【図２５】（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌｓ－ＳＯ１８６１の合成、中間体２２、２３。
【図２６】（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌｓ－ＳＯ１８６１の合成、中間体２４。
【図２７】（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌｓ－ＢＮＡ）の合成、中間体２５、２６。
【図２８】（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌｓ－ＢＮＡ）の合成。
【図２９Ａ】ＳＯ１８６１とコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧＮ）$_3$－ＳＰＴ

）の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした１０ｐＭのモノクローナル抗体である抗ＣＤ７１（ＣＤ７１－ＳＰＲＮ）及びアグリコンのアルデヒド基と結合したＥＭＣＨを含むＳＯ１８６１（ＳＰＴ－ＥＭＣＨ）の濃度系列の組み合わせ、１０ｐＭのＣＤ７１－ＳＰＲＮ及び（ＧＮ）$_3$－ＳＰＴの濃度系列の組み合わせ、並びに１０ｐＭのＣＤ７１－ＳＰＲＮ、及びそこに共有結合された４つのＳＯ１８６１部分を含むデンドロンとコンジュゲートした（ＧＮ）$_3$の濃度系列（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝４）（（ＧＮ）$_3$－ｄＳＰＴ４）の組み合わせと細胞を接触させたときの（未処置細胞「Ｕｎｔｒ」（１００％に設定される）と比較した）初代ヒト肝細胞の相対細胞生存率。

【図２９Ｂ】アポＢのｍＲＮＡ及びアポＢタンパク質発現をサイレンシングするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）$_3$－アポＢ）の濃度系列、３００ｎＭのＳＯ１８６１とコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）$_3$－ＳＰＴ００１）及び（ＧａｌＮＡｃ）$_3$－アポＢの濃度系列の組み合わせと細胞を接触させたときの（未処置細胞「Ｕｎｔｒ」（１００％に設定される）と比較した）初代ヒト肝細胞の相対アポＢ遺伝子発現。「Ｕｎｔｒ」は、アポＢ発現が１００％と設定される未処置細胞である。

【図３０Ａ】ＳＯ１８６１とコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした１０ｐＭのモノクローナル抗体である抗ＣＤ７１（ＣＤ７１－サポリン）及び共有結合コンジュゲートの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１の濃度系列の組み合わせと細胞を接触させたときの（どちらも未処置細胞「Ｕｎｔｒ」（１００％に設定される）と比較した）初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の細胞生存率。

【図３０Ｂ】ＳＯ１８６１とコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした１０ｐＭのモノクローナル抗体である抗ＣＤ７１（ＣＤ７１－サポリン）及び共有結合コンジュゲートの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１の濃度系列の組み合わせと細胞を接触させたときの（どちらも未処置細胞「Ｕｎｔｒ」（１００％に設定される）と比較した）初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の細胞生存率。

【図３０Ｃ】共有結合の三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１コンジュゲートの模式図（ＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１）。模式図の「Ｓ」は、ＳＰＴ００１、ＳＯ１８６１である。

【図３０Ｄ】抗ＣＤ７１抗体サポリンコンジュゲート（ＯＫＴ－９）の模式図であり、「Ｔ」は抗体重鎖に共有結合された毒素サポリンである。

【図３１Ａ】アポＢのｍＲＮＡ及びアポＢタンパク質発現をサイレンシングするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ）の濃度系列、ＳＯ１８６１とコンジュゲートした３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）（結合したＳＰＴ００１（ＳＯ１８６１）に対して、ＤＡＲ＝１）及び三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列の組み合わせと細胞を接触させたときの初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の相対アポＢ遺伝子発現。

【図３１Ｂ】アポＢのｍＲＮＡ及びアポＢタンパク質発現をサイレンシングするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ）の濃度系列、ＳＯ１８６１とコンジュゲートした３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）（結合したＳＰＴ００１（ＳＯ１８６１）に対して、ＤＡＲ＝１）及び三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列の組み合わせと細胞を接触させたときの初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の相対アポＢ遺伝子発現。

【図３１Ｃ】共有結合の三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡコンジュゲートの模式図。模式図の「Ａ」はアンチセンスオリゴヌクレオチドのアポＢ（アポＢＢＮＡ）である。

【図３２Ａ】三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列、３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１及び三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列の組み合わせと細胞を

接触させる条件下における初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の絶対アポＢタンパク質発現。
【図３２Ｂ】三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列、３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１及び三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡの濃度系列の組み合わせと細胞を接触させる条件下における初代ヒト肝細胞（Ａ）及び肝細胞細胞株Ｈｕｈ７細胞（Ｂ）の絶対アポＢタンパク質発現。
【図３３Ａ】デンドロン（ＳＰＴ００１）$_4$－ＮＨ$_2$の合成（分子１３及び１４からの分子１５）。
【図３３Ｂ】デンドロン（ＳＰＴ００１）$_4$－アジドの合成（分子１５及び１８からの分子１９）。
【図３３Ｃ】デンドロン（ＳＰＴ００１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃの合成（分子１９及び２３からの分子２４）。
【発明を実施するための形態】
【００５４】
本発明は、特定の実施形態について説明しているが、本発明はそれに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。
【００５５】
本発明の第１の態様は、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドに共有結合された少なくとも１つのサポニンを含むサポニンコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分、好ましくは３つ又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか又はそれからなり、少なくとも１つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、サポニンコンジュゲートに関する。
【００５６】
トリテルペン配糖体型のサポニンは、エフェクター分子を標的細胞の外側から前記細胞の内側に送達し、続いて前記細胞の細胞質ゾルに送達することを促進する能力を持つ。サポニンは、例えば、受容体によって媒介される、ＡＤＣに含まれるタンパク毒素などの特定のエフェクター分子の取り込みを促進する。ＡＤＣの一部としての毒素をエンドサイトーシスすることにより、標的細胞のエンドソーム内及び／又はリソソーム内に毒素が送達される。あらゆる論理に束縛されるものではないが、その後のＡＤＣ、又は少なくとも毒素のエンドソーム又はリソソームから細胞の細胞質ゾルへの放出は、トリテルペノイドサポニンによって促進又は媒介される。標的細胞が細胞内で影響を及ぼすには低すぎる毒素用量で毒素と接触する場合、標的細胞がＡＤＣ及びサポニンの両方と接触するように、例えばＡＤＣの一部としての毒素と遊離サポニンを同時投与することにより、サポニンの不在下では細胞と接触させた場合に無効となる同一の毒素用量で、標的細胞の死滅が媒介される効果的な毒素を生じさせることができる。従って、サポニンの影響下で毒素の治療域が改善される。なお、効果的且つ十分に標的細胞を死滅させるのに必要となる毒素用量は、例えば、ＡＤＣによって標的化される腫瘍細胞受容体が本物の腫瘍細胞特異的受容体でない場合、また、例えば、健康な細胞の表面、患者の身体の他の箇所、又は標的細胞が存在する同一の臓器に存在する細胞において幾分低い程度で発現する場合であっても、望ましくないオフターゲット効果を伴う可能性がある。さらに、十分な程度の毒素活性（標的細胞の細胞質ゾルにおける毒素の送達）に到達するために要求される遊離サポニンの必要用量は、サポニンによって媒介される副作用のリスクが明確になるようなレベルであり得る。毒素によって治療される標的（腫瘍）細胞を考慮すると、サポニンは全身投与され、且つ非標的化されているため、標的細胞のレベルで局所的なサポニン用量に到達するように、毒素治療を必要とする患者に比較的高用量のサポニンを投与すべきである。
【００５７】
ここで、驚くべきことに、本発明者らは、受容体リガンド（例えば、ＥＧＦ又はサイトカイン）、抗体、又は結合フラグメント若しくはそのドメインなどの標的細胞の標的部分

をサポニンに提供した場合に、腫瘍細胞に及ぼす毒素の効果を増強するのに必要となるサポニンの用量を約１００～１０００倍低下させることができることを見出した。腫瘍細胞の場合、今日では、そのような異常細胞の表面上に特異的に発現する一連の細胞表面受容体が公知である。本発明者らによって、腫瘍細胞に特異的な受容体に結合する抗体及びリガンド、例えば、抗ＣＤ７１抗体、ＯＫＴ－９、トラスツズマブ、セツキシマブなどに、サポニンがうまく結合される。そのような標的サポニンコンジュゲートは、実際に、例えば、標的細胞内の毒素の細胞毒性効果を促進することができるが、腫瘍細胞を標的化する結合分子が提供されていない遊離形態の同一のサポニンに必要な用量と比較して、１００倍～１０００倍低いサポニンの用量で促進することができる。現在、本発明者らはさらに、標的細胞に特異的な送達、及びその後の（標的）サポニンのエンドサイトーシスが、非異常細胞、又は、例えば癌に関連しない異常細胞（腫瘍細胞）、自己免疫疾患、ウイルス感染細胞などでも可能となることを発明した。即ち、驚くべきことに、本発明者らは、ＡＳＧＰＲがこの受容体を有する肝臓細胞などの細胞に好適な入口を提供し、ＡＳＧＰＲ、特にＡＳＧＰＲ１のリガンドが提供されたサポニンを移行させることを見出した。一価ＧａｌＮＡｃ及び三価ＧａｌＮＡｃなどの公知のリガンドは、１つ又は複数（２、４、８つなど）のサポニン分子とうまく結合し、ＡＳＧＰＲリガンドを含み、且つ少なくとも１つのサポニン部分を含むサポニンコンジュゲートを提供する。

【００５８】

肝臓細胞などのＡＳＧＰＲを発現する細胞をＡＳＧＰＲのリガンドを含むサポニンコンジュゲートと接触させることにより、例えば、遺伝子サイレンシング核酸及び標的細胞表面分子、例えばＣＤ７１、ＡＳＧＰＲの結合分子を含むコンジュゲートと同時標的化した場合に明らかなように、そのような細胞によってサポニンの取り込みが驚くべきことに生じ、標的細胞、又は標的細胞のそのような結合分子及び毒素を含むコンジュゲートにサポニン依存的な遺伝子サイレンシングをもたらし、結果としてサポニン依存的な細胞毒性が生じる。サポニンがＡＳＧＰＲのリガンドを含むことにより、標的オリゴヌクレオチド又は毒素などのエフェクター分子（例えば、核酸又は毒素と結合した抗ＣＤ７１抗体又はＡＳＧＰＲリガンド）を同時投与することで発揮される効果が標的細胞にもたらされる。そのような効果は、標的サポニンがない場合に標的細胞をエフェクター分子のみと接触させる場合、仮にあるとしてもはるかに低い程度で現れる。従って、本発明のサポニンコンジュゲートは、その表面にＡＳＧＰＲを含む標的細胞が考慮され、且つそのような標的細胞を本発明のサポニン－ＡＳＧＰＲリガンド及び（標的）エフェクター分子の両方と接触させる場合に、エフェクター分子の治療効果を改善する。これと共に、エフェクター分子の治療域は、サポニンコンジュゲートの同時投与の影響下、同一用量でより高い治療効果に改善されるか、又はサポニンコンジュゲートの同時投与の影響下、より低用量で類似した治療効果に改善される。本発明者らはまた、サポニンにＡＳＧＰＲのリガンドが提供されていないときに、類似した効果に到達するのに必要となるサポニン用量と比較した場合、（標的）エフェクター分子、例えばＡＳＯ、ｓｉＲＮＡ、ＢＮＡ、タンパク毒素などの毒素を同時投与することによって誘発される、肝臓細胞などの標的となるＡＳＧＰＲ発現細胞で一定のレベルの治療効果に到達するには、約１００倍～１０００倍低い用量のサポニンコンジュゲートが必要となることを見出した。

【００５９】

従って、驚くべきことに、本発明者らはここで、ＡＳＧＰＲ発現細胞の細胞質ゾル内のエフェクター分子をサポニン媒介送達するための標的受容体としてＡＳＧＰＲを使用し、且つ本発明のサポニンコンジュゲートがない場合に可能となる用量よりも低用量でエフェクター分子によって誘発される類似の治療効果をもたらす、改善された治療方法を提供する。従って、本発明は、例えば、肝臓細胞の細胞質ゾルにエフェクター分子を送達することを考慮する場合に、本発明のサポニン－ＡＳＧＰＲリガンドコンジュゲートを提供することによって、サポニンの刺激効果の治療的使用の改善を提供するものである。本発明者らによって達成された利点は、特に、（標的）エフェクター分子とサポニンを同時投与することによって、エフェクター分子に必要とされる用量をさらに低下させること、並びに

サポニンを三価ＧａｌＮＡｃなどのＡＳＧＰＲリガンド、及び１つ以上のサポニン部分の共有結合コンジュゲートとして提供することによって、サポニンに必要とされる用量をさらに低下させることである。驚くべきことに、ＡＳＧＰＲのリガンドは、サポニンコンジュゲート及び標的エフェクター分子コンジュゲートにおけるものと同一であり、これにより、サポニンによる刺激の影響下で標的細胞に効率的なエフェクター分子媒介効果を生じさせることができる。即ち、サポニンコンジュゲート及びエフェクター分子コンジュゲートは、どちらも共有結合された三価ＧａｌＮＡｃなどのＡＳＧＰＲのリガンドを含み、どちらのコンジュゲートも同一の受容体を標的化し、細胞へのエンドサイトーシスに同一経路を使用しながら、エフェクター分子の所望の治療効果が効率的に得られるように、それらの表面にＡＳＧＰＲを露出した肝臓細胞などの標的細胞に同時投与することができる。この驚くべき知見は、肝臓細胞がＡＳＧＰＲを発現し、ＡＳＧＰＲが肝臓細胞に特異的でありながら、さらに肝臓細胞を標的化する療法で使用するのに十分に特異的な肝臓細胞受容体が実質上存在していないため、肝臓細胞を標的化する療法、例えば核酸（いくつか例を挙げると、ＡＳＯ、ＢＮＡ、ｓｉＲＮＡ）を細胞質ゾルに送達することを含む療法に極めて有用である。従って、本発明は、エフェクター分子を細胞内に送達し、それらの作用機序を特定する必要のある、肝臓細胞を対象とした療法を改善するための新規な方法を開拓するものである。本発明のサポニンコンジュゲートとして提供される標的サポニンは、そのようなエフェクター分子の治療域を広げるものであり、同時に、本発明に従ってサポニンに肝臓細胞を標的化する結合分子を提供することによって、サポニンの治療域も同様に改善される。

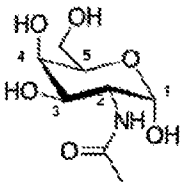
【００６０】

サポニンコンジュゲート－序論

本発明は、本明細書において「サポニンコンジュゲート」と称する、サポニン及びアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドのコンジュゲートを提供するものである。ＡＳＧＰＲリガンドは、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分を含む。本発明の好ましい実施形態によれば、各ＧａｌＮＡｃ部分は、式（Ｉ）：

【００６１】

【化１】



(I)

【００６２】

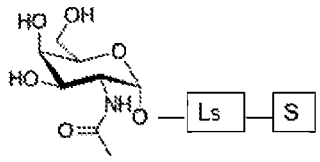
に示すように、「１」位の酸素への共有結合を介して、ＡＳＧＰＲリガンドの残部と結合されるか、又は、ＡＳＧＰＲリガンドが単一のＧａｌＮＡｃ部分からなる場合はサポニン部分に結合される。

【００６３】

式（ＩＩ）ｓに示すように、ＡＳＧＰＲリガンドは、好ましくはサポニン部分リンカーＬｓを介してサポニン部分Ｓと結合された単一のＧａｌＮＡｃ部分からなる。

【００６４】

【化２】



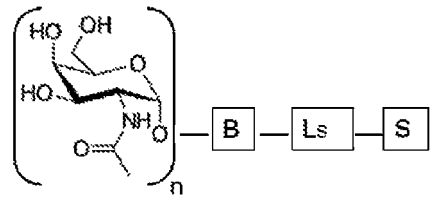
(II)s

【００６５】

ＡＳＧＰＲリガンドは、２つ以上のＧａｌＮＡｃ部分、例えば、２、３、４、５又は６つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み得る。そのような場合、ＧａｌＮＡｃ部分がそれぞれ別々に「１」位の酸素を介して中央の架橋部分Ｂに共有結合されていることが好ましく、これによって、好ましくはＧａｌＮＡｃ部分とサポニン部分の間にサポニン部分リンカーＬｓを介して架橋が効果的に形成される。ＧａｌＮＡｃ部分は、式（ＩＩＩ）ｓ：

【００６６】

【化３】



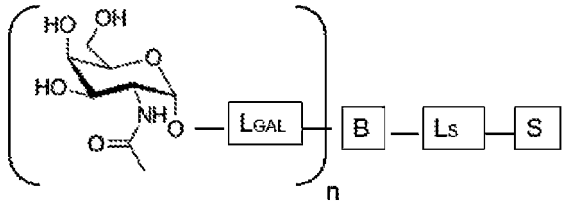
(III)s

【００６７】

（式中、ｎは２以上の整数であり、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、Ｓはサポニン部分である）に示すように、架橋部分Ｂに直接結合されてもよい。より好ましくは、ＧａｌＮＡｃ部分は、式（ＩＶ）ｓ：

【００６８】

【化４】



(IV)s

【００６９】

（式中、ｎは２以上の整数であり、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、Ｓはサポニン部分である）に示すように、ＧａｌＮＡｃリンカーＬＧＡＬを介して架橋部分Ｂに結合されている。ＬＧＡＬは出現する度に独立して選択してもよいが、当業者であれば、ＬＧＡＬのそれぞれの出現が同一部分を表す場合、サポニンコンジュゲートの合成が簡略化されることを理解するであろう。

【００７０】

サポニンコンジュゲート－リンカーＬｓ

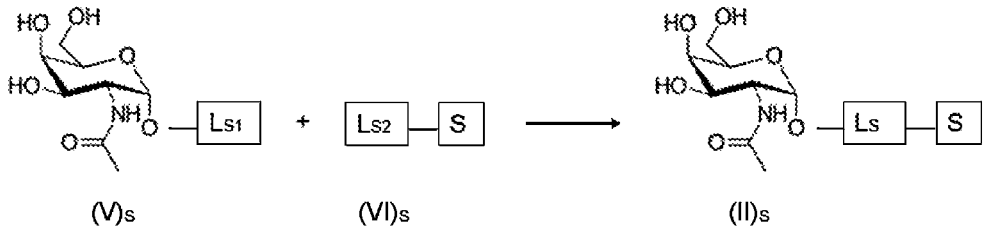
サポニン部分リンカーＬｓは、式（ＩＩ）ｓにおけるようなＧａｌＮＡｃ又は式（ＩＩＩ）ｓ及び（ＩＶ）ｓにおけるような架橋部分Ｂにサポニンが共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。リンカーの同一性及びサイズに特に制限はなく、式（ＩＩ）ｓにおけるようなＧａｌＮＡｃ又は式（ＩＩＩ）ｓ及び（ＩＶ）ｓにおけるような架橋部分Ｂにサポニンを共有結合することは、「通常の」化学官能基（例えば、エステル結合）により、並びに、典型的には長い鎖長を有する「クリックケミストリー」型のリンカーを介して実施してもよく、例えば、結果として１０個超又は２０個超の炭素原子を含むリンカーＥｓが生じる。分子を互いに結合させるのに好適なリンカーＬｓ及び関連するカップリング反応は、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇｒｅｇ Ｔ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，２０１３というハンドブックに記載されている。

【００７１】

当業者に理解されるように、サポニン部分リンカーＬｓは、典型的には、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体$Ｌ_{ｓ1}$と、サポニン部分に共有結合された第２の前駆体$Ｌ_{ｓ2}$との間のカップリング反応（例えば、「クリックケミストリー」型）の結果生じるものである。この原理は、式（ＩＩ）ｓの化合物の以下の反応スキームに例示される：

【００７２】

【化５】



(V)s (VI)s (II)s

【００７３】

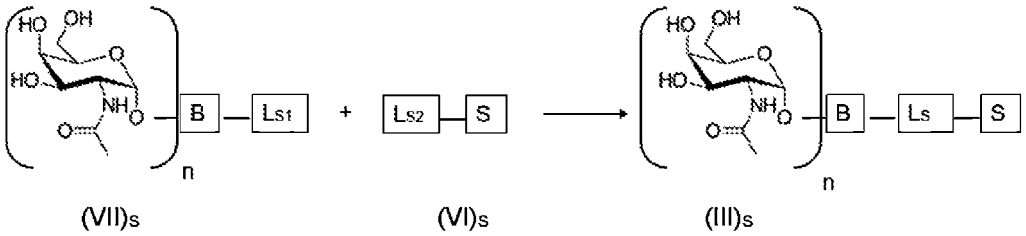
式中、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、$Ｌ_{ｓ1}$はＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、$Ｌ_{ｓ2}$はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、Ｓはサポニン部分である。

【００７４】

式（ＩＩＩ）ｓの化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

【００７５】

【化６】



(VII)s (VI)s (III)s

【００７６】

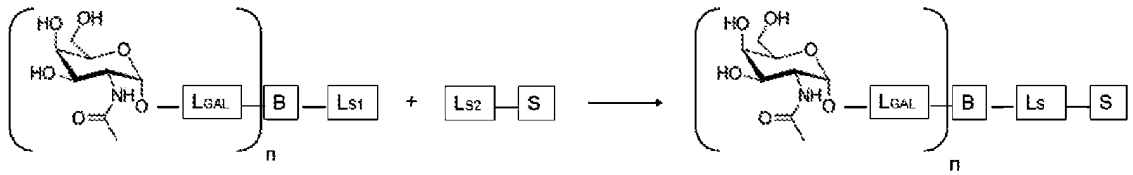
式中、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、$Ｌ_{ｓ1}$はＧａｌＮＡｃに共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、$Ｌ_{ｓ2}$はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、ｎは２以上の整数であり、Ｂは架橋部分であり、Ｓはサポニン部分である。

【００７７】

式（ＩＶ）ｓの化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

【００７８】

【化７】



【００７９】

式中、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、Ｌｓ１はＧａｌＮＡｃに共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、Ｌｓ２はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、ｎは２以上の整数であり、Ｂは架橋部分であり、Ｓはサポニン部分であり、ＬＧＡＬはＧａｌＮＡｃリンカーである。

【００８０】

サポニン部分リンカーＬｓは、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体Ｌｓ１と、サポニン部分に共有結合された第２の前駆体Ｌｓ２との間のカップリング反応の結果として生じさせることができ、カップリング反応は、例えば、アジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤（アジリジン、エポキシド、環状硫酸エステル、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオンなど）の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応（尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド若しくは芳香族ヘテロ環形成など）又は炭素－炭素二重結合の付加（エポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシル化、ハロゲン化スルフェンチル（ｓｕｌｆｅｎｔｙｌ　ｈａｌｉｄｅ）付加、ハロゲン化ニトロシル付加若しくはマイケル付加など）であり、好ましくはアジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジド－アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである。

【００８１】

本発明のいくつかの実施形態によれば、サポニン部分リンカーＬｓは、ヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール、好ましくはヒドラゾン及び１，２，３－トリアゾールを含む。本出願のリンカーの文脈において１，２，３－トリアゾールに言及する場合は必ず、１Ｈ－１，２，３－トリアゾールを意味することが好ましい。

【００８２】

そのようなヒドラゾンは、例えば、末端ヒドラジドとアルデヒド含有化合物（アルデヒド含有サポニンなど）との間のカップリングの結果生じるものである。このヒドラジド／アルデヒドカップリングは、バイオコンジュゲーションの分野では「クリック」ケミストリーツールとして知られており、例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇｒｅｇ　Ｔ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ　ｐｒｅｓｓ，２０１３に記載されている。

【００８３】

そのような１，２，３－トリアゾールは、例えば、アジドとアルキン含有化合物との間のカップリングの結果生じるものである。このアジド／アルキンカップリングは、バイオコンジュゲーションの分野では「クリック」ケミストリーツールとして一般に知られており、例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇｒｅｇ　Ｔ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ　ｐｒｅｓｓ，２０１３に記載されている。

【００８４】

従って、サポニン部分リンカーＬｓは、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合され、

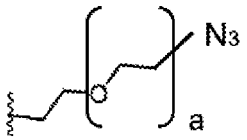
アジドを含む第１の前駆体Ｌｓ１と、サポニン部分に共有結合され、アルキンを含み、好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含む第２の前駆体Ｌｓ２との間のカップリング反応の結果生じるものであることが好ましい。

【００８５】

式（Ｖ）ｓの化合物に存在する前駆体Ｌｓ１の構造の実施形態は、以下のアジド：

【００８６】

【化８】



(XVII)

【００８７】

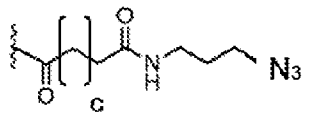
（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは１、２、及び３から選択される整数を表し、より好ましくは２を表す）である。

【００８８】

式（ＶＩＩ）ｓ又は（ＶＩＩＩ）ｓの化合物に存在する前駆体Ｌｓ１の構造の実施形態は、以下のアジド：

【００８９】

【化９】



(XVIII)

【００９０】

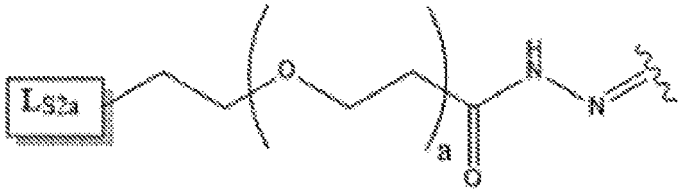
（式中、ｃは０以上の整数を表し、好ましくは５～１５の範囲の整数を表し、より好ましくは９を表す）である。

【００９１】

式（ＶＩ）ｓの化合物に存在する前駆体Ｌｓ２の構造の実施形態は、以下のヒドラゾン：

【００９２】

【化１０】



(XIX)

【００９３】

（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは２～６の範囲の整数を表し、より好ましくは４を表し、Ｌｓ２ａはアルキン含有部分を表す）である。本開示の見地から当業者によ

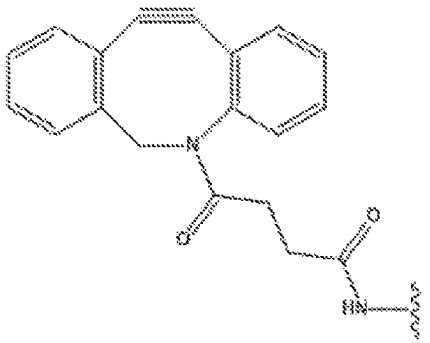
って理解されるように、式（ＸＩＸ）に示すヒドラゾンは、ヒドラジドをサポニン部分のアルデヒドと反応させた結果として生じるものである。

【００９４】

好ましくは、Ｌｓ２ａは、２０個未満の炭素原子を含み、より好ましくは、Ｌｓ２ａは、式（ＸＸ）に従った部分：

【００９５】

【化１１】



(XX)

【００９６】

を表す。

【００９７】

従って、いくつかの実施形態では、サポニンコンジュゲートは、本明細書に記載されるような式（ＩＩ）ｓ、（ＩＩＩ）ｓ又は（ＩＶ）ｓの化合物であり、サポニン部分リンカーＬｓが式（Ｖ）ｓ、（ＶＩＩ）ｓ又は（ＶＩＩＩ）ｓの化合物と式（ＶＩ）ｓの化合物との間のカップリング反応の結果生じるものであり、第１の前駆体Ls_1がアジド、例えば、式（ＸＶＩＩ）又は式（ＸＶＩＩＩ）のアジドであり、第２の前駆体Ls_2がアルキン含有部分Ｌｓ２ａ、例えば、式（ＸＸ）のアルキン及びヒドラジドとサポニン部分のアルデヒドとの反応から生じるヒドラゾンを含む式（ＸＩＸ）の化合物である。

【００９８】

サポニンコンジュゲート－サポニン

本発明の態様は、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドに共有結合された少なくとも１つのサポニンを含むサポニンコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分、好ましくは３つ又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは$(GalNAc)_3$トリスを含むか又はそれからなり、少なくとも１つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、サポニンコンジュゲートに関する。

【００９９】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンが、

２α－ヒドロキシオレアノール酸；

１６α－ヒドロキシオレアノール酸；

ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）；

１６α，２３－ヒドロキシオレアノール酸；

ギプソゲニン；

キラ酸；

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

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

２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノアート）－１６

，２２－ジアセテート；
ジギトゲニン；
３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン；
ギプソゲン酸；
及び
これらの誘導体からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含む。好ましくは、サポニンは、キラ酸及びギプソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンアグリコンコア構造は、キラ酸又はその誘導体である。そのような好ましいアグリコンは、Ｃ－２３原子にアルデヒド基を含むか、又は他の箇所に本明細書に記載されるようなこれらの誘導体を含む。任意の論理に束縛されるものではないが、このようなアルデヒド基は、群Ｃから選択されるアグリコン、特にキラヤ酸及びギプソゲニンを含むトリテルペン配糖体型のサポニンのエンドソーム脱出を促進する活性に寄与する。

【０１００】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニンが、Ｃ－２３位にアルデヒド基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの種類に属し、任意選択によりサポニンのＣ－３β－ＯＨ基の炭水化物置換基にグルクロン酸基を含む、モノデスモシド又はビデスモシドトリテルペンサポニンであり、好ましくはＣ－２３位にアルデヒド基を含む１２，１３－デヒドロオレアナンの種類に属し、サポニンのＣ－３β－ＯＨ基の炭水化物置換基にグルクロン酸基を含む、ビデスモシドトリテルペンサポニンである。

【０１０１】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニンが、少なくとも１つのサポニンのアグリコンコア構造のC_3原子又はC_{28}原子、好ましくはC_3原子に結合された第１の糖鎖を含み、及び／又は、少なくとも１つのサポニンが、少なくとも１つのサポニンのアグリコンコア構造のC_{28}原子に結合された第２の糖鎖を含み、好ましくは、サポニンが第１の糖鎖と第２の糖鎖とを含む。従って、本発明のサポニンコンジュゲートによって構成されるサポニンが、２つのグリカン（糖鎖）を有する場合、第１の糖鎖はアグリコンコア構造のC_3位で結合され、第２の糖鎖はアグリコンコア構造のC_{28}位で結合される。

【０１０２】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、
・サポニンが、群Ａ：
ＧｌｃＡ－
Ｇｌｃ－、
Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ－、
Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→２）－［Ｇｌｃ－（１→４）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→２）－Ａｒａ－（１→３）－［Ｇａｌ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－Ｇｌｃ－（１→４）－Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→２）］－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、

Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ａｒａ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｒｈａ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇｌｃ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｆｕｃ－（１→２）－Ｇａｌ－（１→２）－Ｆｕｃ－（１→２）－ＧｌｃＡ－、及び
これらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含むか、
又は
・サポニンが、群Ｂ：
Ｇｌｃ－、
Ｇａｌ－、
Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－、
Ｒｈａ－（１→２）－［Ａｒａ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－、
Ａｒａ－、
Ｘｙｌ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１は４Ｅ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ２－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ２は４Ｚ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－３、４－ジ－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ３－（→４）］－３－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ３は４Ｅ－メトキシケイ皮酸である）、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
（Ａｒａ－若しくはＸｙｌ－）（１→３）－（Ａｒａ－若しくはＸｙｌ－）（１→４）－

（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）（１→２）－［４－ＯＡｃ－（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）（１→４）］－（Ｒｈａ－若しくはＦｕｃ－）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇａｌ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ａｒａ／Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ／Ｆｕｃ－（１→４）－［Ｇｌｃ／Ｇａｌ－（１→２）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ４－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ４は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ５－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ５は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４－ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３－ＯＡｃ－－Ｒｈａ－（１→３）］－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［３、４－ジ－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
６－ＯＡｃ－Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）］－Ｒｈａ－（１→２）－Ｆｕｃ－、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒｈａ－（１→３）］－４ＯＡｃ－Ｆｕｃ－、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ６－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ６は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ｒｈａ－（１→２）－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ７－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ７は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／

Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ／Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－［Ｇｌｃ－（１→３）］－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ８－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ８は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ９－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ９は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１０－（→４）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１０は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ａｐｉ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１１－（→３）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１１は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｘｙｌ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｒ１２－（→３）］－Ｆｕｃ－（式中、Ｒ１２は５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸である）、
Ｇｌｃ－（１→３）－［Ｇｌｃ－（１→６）］－Ｇａｌ－、及び
これらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造に結合された糖鎖を含むか、
又は
・サポニンが、アグリコンコア構造に結合された群Ａから選択される第１の糖鎖を含み、アグリコンコア構造に結合された群Ｂから選択される第２の糖鎖を含む、ビデスモシドトリテルペン配糖体である。従って、本発明のサポニンコンジュゲートによって構成されるサポニンが、２つのグリカン（糖鎖）を有する場合、第１の糖鎖はアグリコンコア構造のC_3位で結合され、第２の糖鎖はアグリコンコア構造のC_{28}位で結合される。

【０１０３】

任意の論理に束縛されるものではないが、アルデヒド基又はその誘導体がアグリコンコア構造（本明細書では、「アグリコン」とも称される）に存在することで、そのようなサポニンが細胞内で（前記細胞のエンドソーム内で）これらの（エフェクター）分子と共存する場合、サポニンが（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を促進及び／又は増強する能力に有利なものとなる。従って、アルデヒド基を含むアグリコンを有するサポニンから構成される本発明のサポニンコンジュゲートが好ましい。キラヤ酸及びギプソゲニンでは、アルデヒド基はアグリコンのC_{23}原子に存在する。

【０１０４】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンが、キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシドＢ、サイコサポニンＡ、サイコサポニンＤ、マクラントイジンＡ、エスクレントシド（ｅｓｃｕｌｅｎｔｏｓｉｄｅ　Ａ）、フィトラッカゲニン、エシネート、ＡＳ６．２、ＮＰ－００５２３６、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、α－ヘデリン、ＮＰ－０１２６７２、ＮＰ－０１７７７７、ＮＰ－０１７７７８、ＮＰ－０１７７７４、ＮＰ－０１８１１０、ＮＰ－０１７７７２、ＮＰ－０１８１０９、ＮＰ－０１７８８８、ＮＰ－０１７８８９、ＮＰ－０１８１０８、ＳＡ１６４１、ＡＥ　Ｘ５５、ＮＰ－０１７６７４、ＮＰ－０１７８１０、ＡＧ１、ＮＰ－００３８８１、ＮＰ－０１７６７６、ＮＰ－０１７６７７、ＮＰ－０１７７０６、ＮＰ－０１７７０５、ＮＰ－０１７７７３、ＮＰ－０１７７７５、ＳＡ１６５７、ＡＧ２、ＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、ＳＯ１８６２、ＳＯ１９０４、ＱＳ－７、ＱＳ１８６１、ＱＳ－７　ａｐｉ、ＱＳ１８６２、ＱＳ－１７、ＱＳ－１８、ＱＳ

－２１　Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ、β－エスシン、エスシンＩａ、茶種子サポニンＩ、茶種子サポニンＪ、アッサムサポニンＦ、ジギトニン、プリムラ酸１及びＡＳ６４Ｒ、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択され、好ましくはＱＳ－２１、ＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６１誘導体、ＳＡ１６４１、ＳＡ１６４１誘導体、ＧＥ１７４１、ＧＥ１７４１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくはＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくはＳＯ１８６１誘導体である。

【０１０５】

そのようなトリテルペン配糖体型のサポニンは、サポニンが細胞内でそのような（エフェクター）分子と共存する場合に、細胞のエンドソーム（又はリソソーム）に存在する（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を促進することができる。本発明者らは、サポニンが本発明のコンジュゲートによって構成される場合、これらのサポニンのエンドソーム脱出を促進する活性が、サポニンを細胞と接触させたときに約１００～１０００倍強力なものとなることを立証した。遊離サポニンは、細胞外からエンドソーム内へ、最終的には前記細胞の細胞質ゾルに（エフェクター）分子を送達するのと同じ程度の送達を達成するのに必要とされる、本発明のサポニンコンジュゲートによって構成される同一のサポニンの濃度と比較して、１００～１０００倍高いサポニン濃度で、そのような細胞を（エフェクター）分子及びサポニンと接触させたときに細胞の細胞質ゾルの（エフェクター）分子の送達を促進することができる。そのようなエンドソーム脱出を促進する活性を呈するサポニン、及び（エフェクター）分子の細胞質ゾル送達を増強する能力が確立されているサポニンと高度な構造的類似性を有するサポニンを、表Ａ１に列挙する。サポニンが本発明のサポニンコンジュゲートの一部である場合、ＡＳＧＰＲのリガンドが標的細胞（前記細胞）の細胞表面結合部位に結合し、その後前記細胞のエンドソームにエンドサイトーシスするときのサポニンの標的送達は、従って、標的細胞のＡＳＧＰＲに結合するためのＡＳＧＰＲのリガンドが提供されていない遊離した非標的サポニンと同細胞を接触させた場合と比較して、約１００～１０００倍効果的である。

【０１０６】

実施形態では、サポニンコンジュゲートは少なくとも１つのサポニンを含み、サポニンは以下の誘導体である：

ｉ．サポニンのアグリコンコア構造が、誘導体化されたアルデヒド基を含み；

ｉｉ．サポニンの糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖が、誘導体化されたカルボキシル基を含み；

ｉｉｉ．サポニンの糖鎖、好ましくは群Ｂから選択される糖鎖が、誘導体化されたアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基を含むか；又は

ｉｖ．誘導体化（ｉ）、（ｉｉ）及び／若しくは（ｉｉｉ）の任意の組み合わせが存在する。

【０１０７】

アグリコンコア構造のアルデヒド基に対する例示的な誘導体化（ｉ）としては、一級アルコールなどのアルコールへの還元；ヒドラゾンへの変換；ヘミアセタールへの変換；アセタールへの変換；カルボキシルへの酸化；イミンへの変換、オキシムへの変換；β－ヒドロキシケトンへの変換；又はエノンへの変換、好ましくは一級アルコールなどのアルコールへの還元；又はヒドラゾンへの変換が挙げられる。

【０１０８】

実施形態では、サポニンは誘導体であり、アグリコンコア構造は、

－一級アルコールなどのアルコールへの還元；又は

－式$R^{b}HC=NNHR^{a}$のヒドラゾンへの転換；好ましくは式$R^{b}HC=NNH(CO)R^{a}$のヒドラゾンへの転換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、

式中、R^{a}は、２０個未満の炭素原子、好ましくは１０個未満の炭素原子を含む基であり、R^{b}はサポニンの残部である。好ましくは、R^{a}はＮ－アルキル化マレイミドである。

特定の実施形態では、アルデヒド基は、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）、Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）、又はＮ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応によってヒドラゾン結合に転換されている。

【０１０９】

糖鎖のカルボキシル基に対する例示的な誘導体化（ｉｉ）としては、一級アルコールなどのアルコールへの還元；アミドへの変換；エステルへの変換、一級若しくは二級アミンなどのアミンへの変換；又は脱炭酸、好ましくは一級アルコールなどのアルコールへの還元；アミドへの変換；又はエステルへの転換；より好ましくはアミドへの転換が挙げられる。

【０１１０】

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

【０１１１】

実施形態では、サポニンは誘導体であり、糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは、

－一級アルコールなどのアルコールへの還元；

－式$R^{a}NH(CO)R^{b}$のアミドへの変換；又は

－式$R^{a}O(CO)R^{b}$のエステルへの変換によって誘導体化されている、グルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、

式中、R^{a}は、２０個未満の炭素原子、好ましくは１０個未満の炭素原子を含む基であり、R^{b}はサポニンの残部である。好ましくは、R^{a}はＮ－アルキル化マレイミド又はジオールである。特定の実施形態では、カルボキシル基は、２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている。

【０１１２】

糖鎖のアセトキシ基に対する例示的な誘導体化（ｉｉｉ）としては、脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換、任意選択により、その後得られたアルコールのエーテル、エステル又はケトンへの変換；好ましくは脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換が挙げられる。

【０１１３】

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

【０１１４】

実施形態では、サポニンは誘導体であり、糖鎖、好ましくは群Ｂから選択される糖鎖は、

－脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換；又は

－脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換、その後得られたアルコールの式$R^{a}OR^{b}$のエーテル、式$R^{a}(CO)OR^{b}$のエステル、若しくは式$R^{a}(CO)R^{b}$のケトンへの変換によって誘導体化されているアセトキシ基を含み、

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

【０１１５】

従って、実施形態では、サポニンは誘導体であり：

・アグリコンコア構造が、

－アルコールへの還元；

－Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換；

－Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換；又は

－Ｎ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み；
・群Ａから選択される糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）若しくはＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている、グルクロン酸部分のカルボキシル基を含み；
・群Ｂから選択される糖鎖が、ヒドロキシル基（ＨＯ－）への変換によって誘導体化されているアセトキシ基（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）を含むか；又は
・誘導体化（ｉ）、（ｉｉ）及び／若しくは（ｉｉｉ）の任意の組み合わせが存在する。

【０１１６】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンがサポニン誘導体であり、
ｉ．サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；
ｉｉ．サポニン誘導体が、誘導体化されたカルボキシル基を含む糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖を含み；
ｉｉｉ．サポニン誘導体が、誘導体化されたアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基を含む糖鎖、好ましくは群Ｂから選択される糖鎖を含むか；又は
ｉｖ．サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．の任意の組み合わせ、好ましくは誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．のうちの２つの誘導体化の任意の組み合わせを含む。

【０１１７】

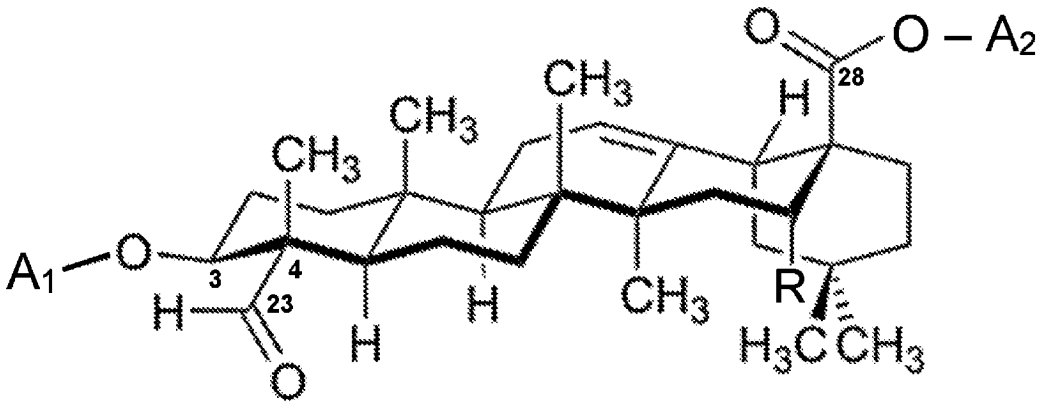
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンが、ＳＯ１８６１、ＳＡ１６５７、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１、ＱＳ－２１、ＱＳ－２１Ａ、ＱＳ－２１Ａ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌ、ＱＳ－２１Ｂ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉ、ＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ｘｙｌ、ＱＳ－７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ａｐｉ、ＱＳ－１７－ｘｙｌ、ＱＳ１８６１、ＱＳ１８６２、キラヤサポニン、サポニナム・アルブム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）、ＱＳ－１８、Ｑｕｉｌ－Ａ、Ｇｙｐ１、ジプソシドＡ、ＡＧ１、ＡＧ２、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１８３２、ＳＯ１９０４、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組み合わせのいずれか１つ以上であり、好ましくはＱＳ－２１、ＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６１誘導体、ＳＡ１６４１、ＳＡ１６４１誘導体、ＧＥ１７４１、ＧＥ１７４１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、より好ましくはＱＳ－２１誘導体、ＳＯ１８６１誘導体及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、最も好ましくはＳＯ１８６１誘導体である。

【０１１８】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンが、本発明によるキラ酸サポニン又はギプソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子１：

【０１１９】

【化１２】



(分子1)

【０１２０】
式中、
［Ａ１は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは群Ａから選択される糖鎖を表し、より好ましくは群Ａから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；
Ａ２は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは群Ｂから選択される糖鎖を表し、より好ましくは群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つ少なくとも１つのアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基、例えば１、２、３、又は４つのアセトキシ基を含み、
Ａ１及びＡ２の少なくとも１つは水素でなく、好ましくはＡ１及びＡ２の両方がオリゴ糖鎖であり：
並びに、Ｒはギプソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである］で表され：
サポニン誘導体は、分子１で表されるサポニンに対応するものであり、以下の誘導体化：
ｉ．キラ酸又はギプソゲニンのＣ２３位のアルデヒド基が誘導体化されている；
ｉｉ．Ａ１が群Ａから選択される糖鎖を表し、且つＡ１がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、Ａ１のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている；及び
ｉｉｉ．Ａ２が群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つ少なくとも１つのアセトキシ基を含む場合、Ａ２の１つの糖部分又は２つ以上の糖部分のうち１つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている、の少なくとも１つ、好ましくは１又は２つ、より好ましくは１つが存在する。
【０１２１】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、Ａ１が群Ａから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、Ａ１のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されているか、及び／又は、Ａ２が群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つＡ２が少なくとも１つのアセトキシ基を含み、Ａ２の少なくとも１つのアセトキシ基が誘導体化されている。
【０１２２】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、分子１で表されるサポニンが、ビデスモシドトリテルペンサポニンである。
【０１２３】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン誘導体が、分子１で表されるサポニンに対応するものであり、以下の誘導体化：
ｉ．キラ酸又はギプソゲニンのＣ２３位のアルデヒド基が、
－アルコールへの還元；

－Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ、ＥＭＣＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；
－Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、前記ＢＭＰＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；又は
－Ｎ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、ＫＭＵＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換によって誘導体化されており；
ｉｉ．A_1が群Ａから選択される糖鎖を表し、且つA_1がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A_1のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ、又はＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされ；
ｉｉｉ．A_2が群Ｂから選択される糖鎖を表し、且つA_2が少なくとも１つのアセトキシ基を含む場合、A_2の１つの糖部分又は２つ以上の糖部分のうち１つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（ＨＯ－）への転換によって誘導体化されている、の少なくとも１つ、好ましくは１又は２つ、より好ましくは１つが存在する。

【０１２４】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、A_1が、Ｇａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡ、及び／又は、A_2は、Ｇｌｃ－（１→３）－Ｘｙｌ－（１→４）－Ｒｈａ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）－４－ＯＡｃ－Ｑｕｉ－（１→４）］－Ｆｕｃであり、好ましくは、分子１で表されるサポニンが、３－Ｏ－β－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→２）－［β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）］－β－Ｄ－グルクロノピラノシルキラ酸２８－Ｏ－β－Ｄ－グルコピラノシル－（１→３）－β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→４）－α－Ｌ－ラムノピラノシル－（１→２）－［β－Ｄ－キシロピラノシル－（１→３）－４ＯＡｃ－β－Ｄ－キノボピラノシル－（１→４）］－β－Ｄ－フコピラノシドであり、より好ましくはＳＯ１８６１、ＧＥ１７４１、ＳＡ１６４１及びＱＳ－２１、又はこれらの誘導体、最も好ましくはＳＯ１８６１又はその誘導体のいずれか１つ以上である。

【０１２５】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンがサポニン誘導体であり、
ｉ．サポニン誘導体が、
－アルコールへの還元；
－Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ、ＥＭＣＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換；
－Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド（ＢＭＰＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、ＢＭＰＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への

転換；又は
－Ｎ－［κ－マレイミドウンデカン酸］ヒドラジド（ＫＭＵＨ）との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、ＫＭＵＨのマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への転換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；
ｉｉ．サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＭＰＤ、又はＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされ；
ｉｉｉ．サポニン誘導体が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（ＨＯ－）への変換によって誘導体化されているアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基を含む糖鎖、好ましくは群Ｂから選択される糖鎖を含むか；或いは
ｉｖ．サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．の任意の組み合わせ、好ましくは誘導体化ｉ．、ｉｉ．及びｉｉｉ．のうちの２つの誘導体化の任意の組み合わせを含み；
好ましくは、サポニン誘導体が、ＥＭＣＨとの反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、ＥＭＣＨのマレイミド基は、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される。

【０１２６】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニンがサポニン誘導体であり、
ｉ．サポニン誘導体が、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨ若しくはＱＳ－２１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨなどのサポニン－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされ；
ｉｉ．サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってＱＳ－２１－Ｇｌｕ－ＡＥＭ若しくはＳＯ１８６１－Ｇｌｕ－ＡＥＭなどのサポニン－Ｇｌｕ－ＡＥＭがもたらされるか；又は
ｉｉｉ．サポニン誘導体が、誘導体化ｉ．及びｉｉ．の組み合わせを含む。

【０１２７】

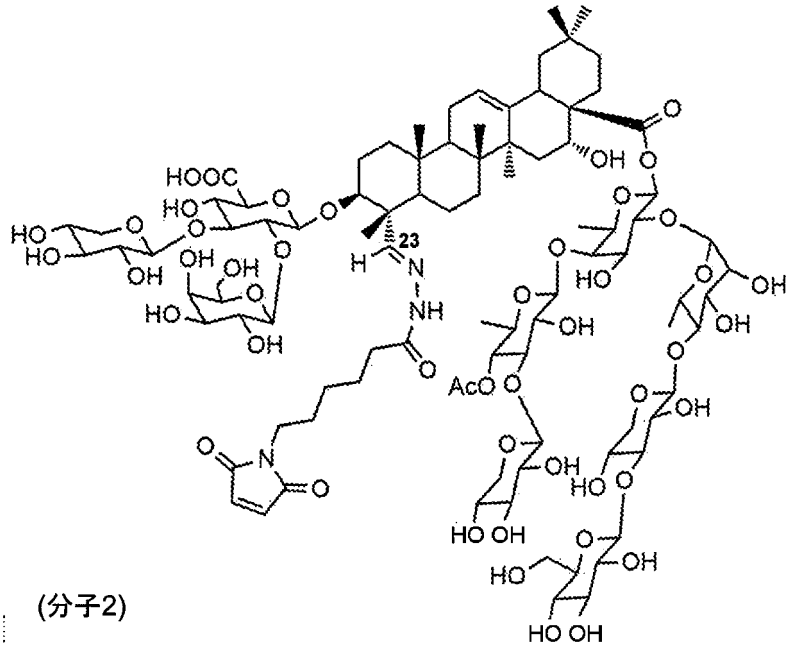
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは群Ａから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む。

【０１２８】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン誘導体が、分子２：

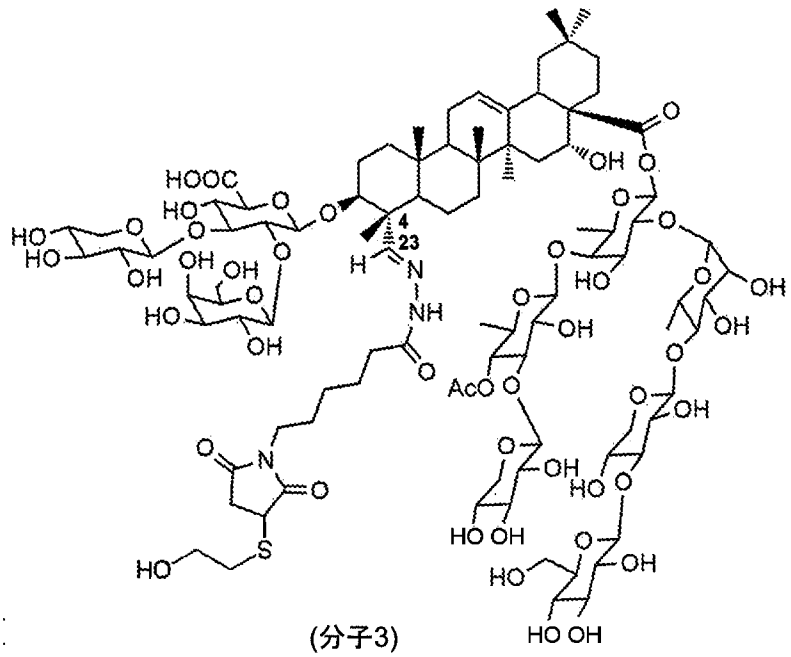
【０１２９】

【化１３】



(分子2)

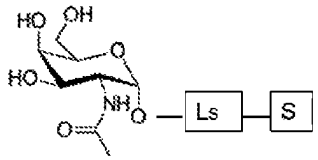
【０１３０】
で表されるか、
又は、サポニン誘導体が、分子３：
【０１３１】
【化１４】



(分子3)

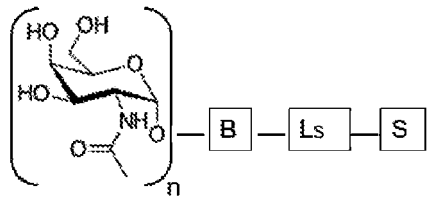
【０１３２】
で表される。
【０１３３】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニン及びＡＳＧＰＲのリガンドが、直接共有結合されているか、又は少なくとも１つのリンカーを介して共有結合されている。

【０１３４】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、式（ＩＩ）ｓ：
【０１３５】
【化１５】



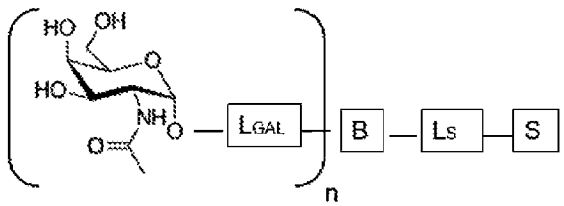
(II)s

【０１３６】
に示されるように、ＧａｌＮＡｃ部分が、好ましくはサポニンリンカーＬｓを介してサポニンＳに結合されている。
【０１３７】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、式（ＩＩＩ）ｓ：
【０１３８】
【化１６】



(III)s

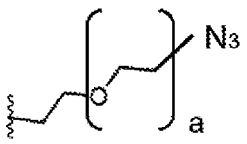
【０１３９】
（式中、ｎは２以上の整数であり、好ましくはｎは３であり、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、Ｓはサポニン部分である）に示すように、ＧａｌＮＡｃ部分が、ＧａｌＮＡｃ部分の「１」位の酸素を介して中央の架橋部分Ｂにそれぞれ別々に共有結合され、これによって、好ましくはサポニン部分リンカーＬｓを介してＧａｌＮＡｃ部分とサポニン部分との間に架橋が効果的に形成される。
【０１４０】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、式（ＩＶ）ｓ：
【０１４１】
【化１７】



(IV)s

【０１４２】
（式中、ｎは２以上の整数であり、好ましくはｎは３であり、Ｌｓはサポニン部分リンカーであり、Ｓはサポニン部分である）に示すように、ＧａｌＮＡｃ部分が、ＧａｌＮＡｃリンカーＬＧＡＬを介して架橋部分Ｂに結合されている。

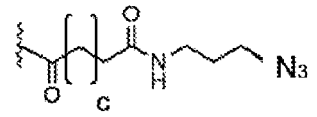
【０１４３】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン部分リンカーＬｓが、式（ＩＩ）ｓにおけるようなＧａｌＮＡｃ、又は式（ＩＩＩ）ｓ及び（ＩＶ）ｓにおけるような架橋部分Ｂにサポニンを共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。
【０１４４】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体Ｌｓ１と、サポニン部分に共有結合された第２の前駆体Ｌｓ２との間のカップリング反応の結果生じるものであり、Ｌｓ１はＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体であり、Ｌｓ２はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカーＬｓの前駆体である。
【０１４５】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体Ｌｓ１と、サポニン部分に共有結合された第２の前駆体Ｌｓ２との間のカップリング反応の結果生じるものであり、カップリング反応は、アジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応及び炭素－炭素二重結合の付加からなる群から選択され、好ましくはアジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジド－アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである。
【０１４６】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、サポニン部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合され、アジドを含む第１の前駆体Ｌｓ１と、サポニン部分に共有結合され、アルキンを含み、好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含む第２の前駆体Ｌｓ２との間のカップリング反応の結果生じるものである。
【０１４７】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、前駆体Ｌｓ１の構造が、以下の式（ＸＶＩＩ）のアジド：
【０１４８】
【化１８】



(XVII)

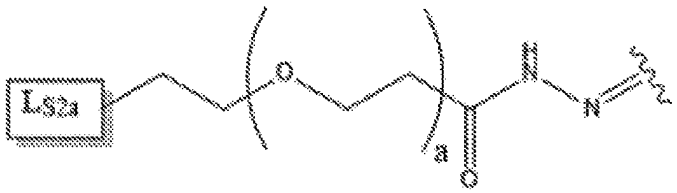
【０１４９】
（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは１、２、及び３から選択される整数を表し、より好ましくは２を表す）であるか、又は
前駆体Ｌｓ１の構造は、以下の式（ＸＶＩＩＩ）のアジド：
【０１５０】

【化１９】



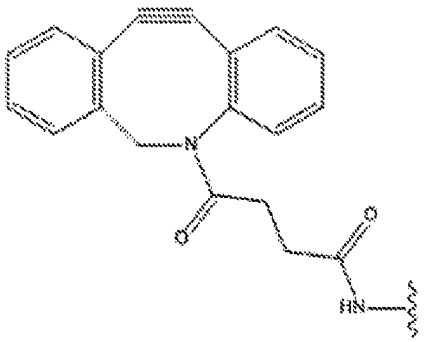
(XVIII)

【０１５１】
（式中、ｃは０以上の整数を表し、好ましくは５～１５の範囲の整数を表し、より好ましくは９を表す）を含む。
【０１５２】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、前駆体Ｌｓ２の構造が、以下の式（ＸＩＸ）のヒドラゾン：
【０１５３】
【化２０】



(XIX)

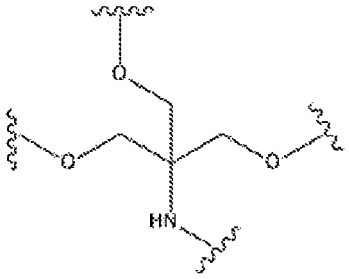
【０１５４】
（式中、ａは０以上の整数を表し、好ましくは２～６の範囲の整数を表し、より好ましくは４を表し、Ｌｓ２ａはアルキン含有部分を表す）を含む。
【０１５５】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、Ｌｓ２ａが、２０個未満の炭素原子を含み、好ましくは、式（ＸＸ）に従った部分：
【０１５６】
【化２１】



(XX)

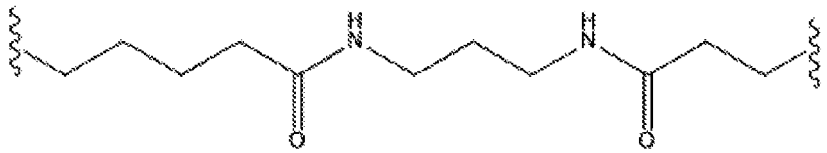
【０１５７】
を表す。
【０１５８】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、架橋部分が、式（ＸＶ）の化合物：

【０１５９】
【化２２】



(XV)

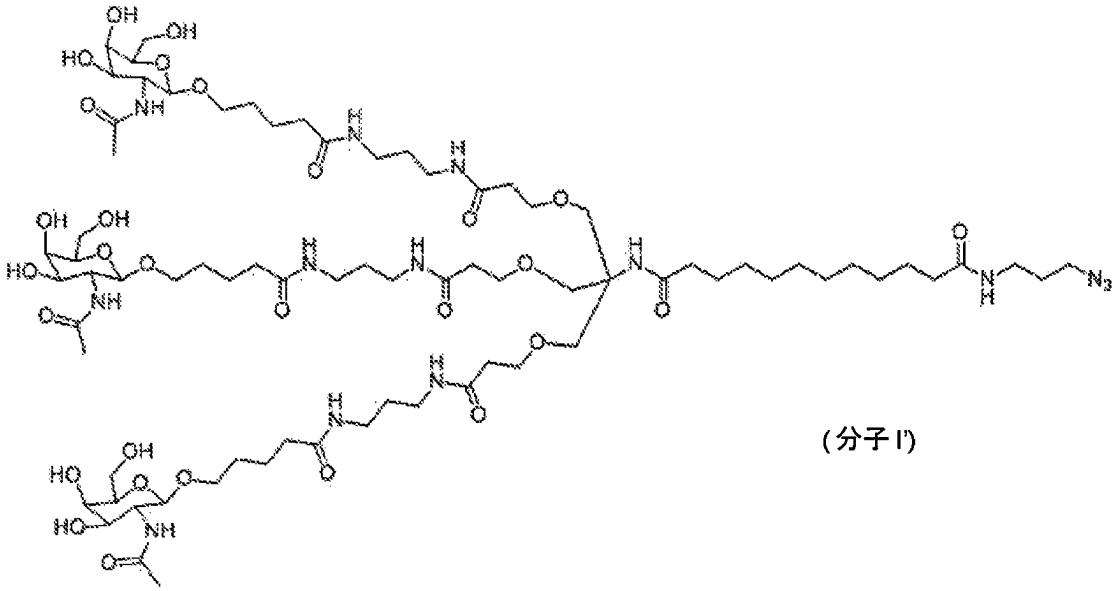
【０１６０】
であり、
式（ＸＶ）の化合物の酸素原子が、ＧａｌＮＡｃ又はＧａｌＮＡｃリンカーＬ$_{GAL}$に結合され、式（ＸＶ）の化合物の窒素原子が、サポニン部分リンカーＬ$_{S}$に結合されている。
【０１６１】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、Ｌ$_{GAL}$が、ＧａｌＮＡｃを架橋部分Ｂに共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。
【０１６２】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、Ｌ$_{GAL}$が、２～２５個の炭素原子、好ましくは７～１５個の炭素原子、より好ましくは１１個の炭素原子を含み、少なくとも１つ、好ましくは２つのアミド部分を含む。
【０１６３】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、Ｌ$_{GAL}$が、式（ＸＶＩ）に従った化合物：
【０１６４】
【化２３】



(XVI)

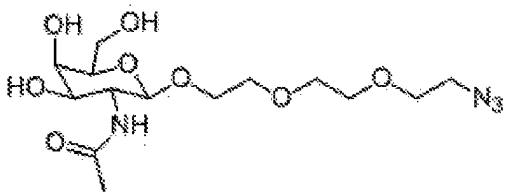
【０１６５】
である。
【０１６６】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、分子Ｉ’で表される（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリス：
【０１６７】

【化２４】



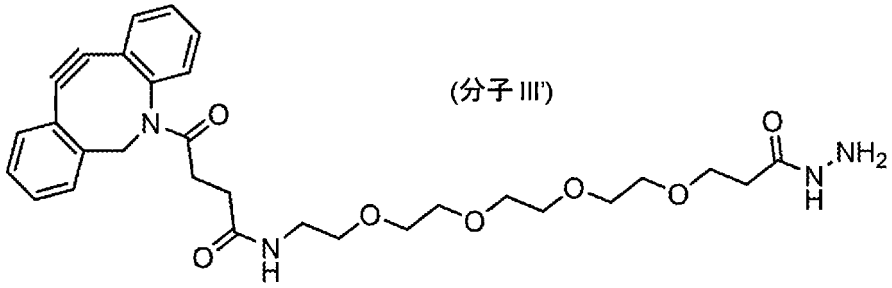
(分子I')

【０１６８】
であるか、又はＡＳＧＰＲのリガンドが、分子ＩＩ’で表されるモノ－ＧａｌＮＡｃ：
【０１６９】
【化２５】



(分子II')

【０１７０】
である。
【０１７１】
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニンが、分子ＩＩＩ’で表されるリンカー：
【０１７２】
【化２６】



(分子III')

【０１７３】
を介して本発明の分子Ｉ’又は分子ＩＩ’に共有結合され、

分子ＩＩＩ’のヒドラジド部分が、サポニンのアルデヒド基と共有ヒドラゾン結合を形成し、ジベンゾシクロオクチン基が、分子Ｉ’又は分子ＩＩ’のアジド基と共有結合を形成する。

【０１７４】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、少なくとも１つのサポニンが、少なくとも１つの切断可能リンカーを介してＡＳＧＰＲのリガンドに共有結合されている。

【０１７５】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び／又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／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を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む。

【０１７６】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、切断可能リンカーが、例えば、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ような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５でインビボ切断を受ける。

【０１７７】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、コンジュゲートが、１、２、３、４、５、６、８、１０、１６、３２、６４、１２８若しくは１～１００つのサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば７、９、１２つのサポニン部分を含む。

【０１７８】

本発明のサポニンコンジュゲートに含まれるサポニンが、本明細書に記載されるような式（ＩＩ）$_S$、（ＩＩＩ）$_S$又は（ＩＶ）$_S$の化合物であり、サポニン部分リンカーＬｓが、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分に共有結合された第１の前駆体L_{s1}と、サポニン部分に共有結合された第２の前駆体L_{s2}との間のカップリング反応の結果生じるものである場合、第２の前駆体L_{s2}は、本明細書に記載されるようなサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じたヒドラゾンを含んでおり、このことは、アルデヒド基がすでにリンカーによって占有されているため、好適なサポニン誘導体は、サポニンが（ｉｉ）本明細書に記載されるような糖鎖のカルボキシル基、及び／又は（ｉｉｉ）本明細書に記載されるような糖鎖のアセトキシ基によって誘導体化されたものであることを意味することが当業者であれば理解されよう。

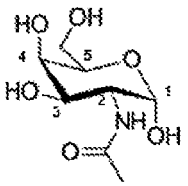
【０１７９】

エフェクター分子コンジュゲート－序論

本発明の特定の医薬配合物及び特定の医薬組成物は、本明細書では「エフェクター分子コンジュゲート」と称される、エフェクター分子とアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のリガンドとの第２のコンジュゲートを含む。エフェクター分子がエフェクター分子コンジュゲートの残部に結合されている場合、本明細書では「エフェクター部分」と称する。ＡＳＧＰＲリガンドは、少なくとも１つのＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分を含む。本発明の好ましい実施形態によれば、各ＧａｌＮＡｃ部分は、式（Ｉ）：

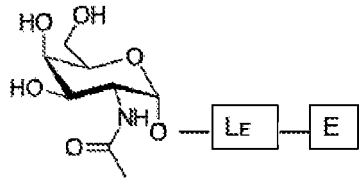
【０１８０】

【化２７】



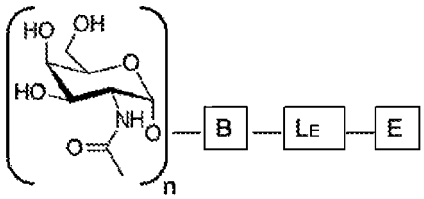
(I)

【０１８１】
に示すように、「１」位の酸素への共有結合を介して、ＡＳＧＰＲリガンドの残部と結合されるか、又は、ＡＳＧＰＲリガンドが単一のＧａｌＮＡｃ部分からなる場合はエフェクター部分に結合される。
【０１８２】
式（ＩＩ）$_E$に示すように、ＡＳＧＰＲリガンドは、好ましくはエフェクター部分リンカーL_Eを介してエフェクター部分Ｅに結合された単一のＧａｌＮＡｃ部分からなる。
【０１８３】
【化２８】



(II)$_E$

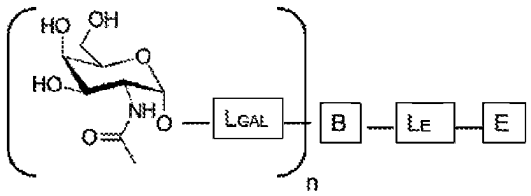
【０１８４】
ＡＳＧＰＲリガンドは、２つ以上のＧａｌＮＡｃ部分、例えば、２、３、４、５又は６つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３又は４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み得る。そのような場合、ＧａｌＮＡｃ部分がそれぞれ別々に「１」位の酸素を介して中央の架橋部分Ｂに共有結合されていることが好ましく、これによって、好ましくはエフェクター部分リンカーL_Eを介してＧａｌＮＡｃ部分とエフェクター部分の間に架橋が効果的に形成される。ＧａｌＮＡｃ部分は、式（ＩＩＩ）$_E$：
【０１８５】
【化２９】



(III)$_E$

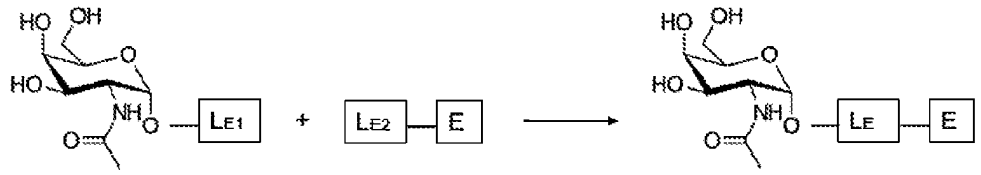
【０１８６】
（式中、ｎは２以上の整数であり、L_Eはエフェクター部分リンカーであり、Ｅはエフェクター部分である）に示されるように、架橋部分Ｂに直接結合されていてもよい。より好ましくは、ＧａｌＮＡｃ部分は、式（ＩＶ）$_E$：

【０１８７】
【化３０】



(IV)E

【０１８８】
（式中、ｎは２以上の整数であり、L_Eはエフェクター部分リンカーであり、Ｅはエフェクター部分である）に示すように、ＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}を介して架橋部分Ｂに結合されている。L_{GAL}は出現する度に独立して選択されてもよいが、当業者であれば、L_{GAL}のそれぞれの出現が同一部分を表す場合、コンジュゲートの合成が簡略化されることを理解するであろう。
【０１８９】
エフェクター分子コンジュゲート－リンカーL_E
エフェクター部分リンカーL_Eは、式（ＩＩ）$_E$におけるようなＧａｌＮＡｃ又は式（ＩＩＩ）$_E$及び（ＩＶ）$_E$におけるような架橋部分Ｂにエフェクター部分が共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。リンカーの同一性及びサイズに特に制限はなく、式（ＩＩ）$_E$におけるようなＧａｌＮＡｃ又は式（ＩＩＩ）$_E$及び（ＩＶ）$_E$におけるような架橋部分Ｂにエフェクター分子を共有結合することは、「通常の」化学官能基（例えば、エステル結合）により、並びに、典型的には長い鎖長を有する「クリックケミストリー」型のリンカーを介して実施してもよく、例えば、結果として１０個超又は２０個超の炭素原子を含むリンカーE_Lが生じる。好適なエフェクター部分リンカーL_E及び関連するカップリング反応は、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇｒｅｇ Ｔ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，２０１３というハンドブックに記載されている。
【０１９０】
当業者に理解されるように、エフェクター部分リンカーL_Eは、典型的には、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合された少なくとも第１の前駆体L_{E1}と、エフェクター部分に共有結合された第２の前駆体L_{E2}との間のカップリング反応（例えば、「クリックケミストリー」型）の結果生じるものである。この原理は、式（ＩＩ）の化合物の以下の反応スキームに例示される：
【０１９１】
【化３１】



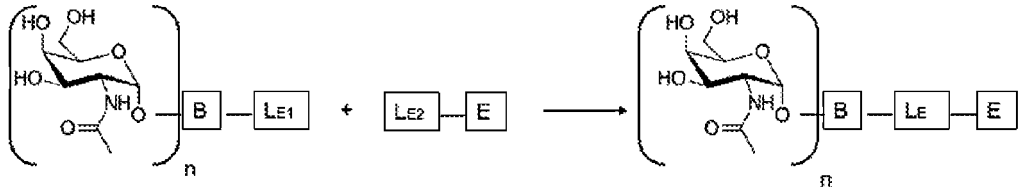
(V)E　　(VI)E　　(II)E

【０１９２】
式中、L_Eはエフェクター部分リンカーであり、L_{E1}はＧａｌＮＡｃに共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、L_{E2}はエフェクター部分に共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、Ｅはエフェクター部分である。
【０１９３】

式（ＩＩＩ）の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

【０１９４】

【化３２】



(VII)E　　(VI)E　　(III)E

【０１９５】

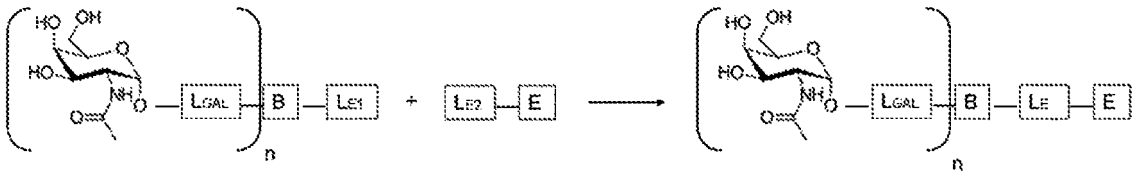
式中、L_Eはエフェクター部分リンカーであり、L_{E1}はＧａｌＮＡｃに共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、L_{E2}はエフェクター部分に共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、ｎは２以上の整数であり、Ｅはエフェクター部分である。

【０１９６】

式（ＩＶ）$_E$の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

【０１９７】

【化３３】



(VIII)E　　(VI)E　　(IV)E

【０１９８】

式中、L_Eはエフェクター部分リンカーであり、L_{E1}はＧａｌＮＡｃに共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、L_{E2}はエフェクター部分に共有結合されたエフェクター部分リンカーL_Eの前駆体であり、ｎは２以上の整数であり、Ｅはエフェクター部分であり、L_{GAL}はＧａｌＮＡｃリンカーであり、Ｂは架橋部分である。

【０１９９】

エフェクター部分リンカーL_Eは、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分に共有結合された少なくとも第１の前駆体L_{E1}と、エフェクター部分に共有結合された第２の前駆体L_{E2}との間のカップリング反応の結果生じさせることができ、カップリング反応は、例えば、アジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤（アジリジン、エポキシド、環状硫酸エステル、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオンなど）の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応（尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド若しくは芳香族ヘテロ環形成など）又は炭素－炭素二重結合の付加（エポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシル化、ハロゲン化スルフェンチル（ｓｕｌｆｅｎｔｙｌ　ｈａｌｉｄｅ）付加、ハロゲン化ニトロシル付加若しくはマイケル付加など）であり、好ましくはアジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジド－アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである。

【０２００】

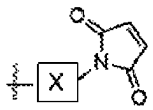
本発明のいくつかの実施形態によれば、エフェクター部分リンカーL_Eは、スクシンイミドチオエーテル部分を含む。そのようなスクシンイミドチオエーテルは、例えば、Ｎ－置換マレイミドとチオール又はスルフヒドリル含有化合物との間のチオールマレイミドカップリングの結果生じるものである。このチオールマレイミドカップリングは、バイオコンジュゲーションの分野では「クリック」ケミストリーツールとして一般に知られており、例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇｒｅｇ Ｔ．Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ．Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，２０１３ ｐａｇｅ ２８９に記載されている。従って、エフェクター部分リンカーL_Eは、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分に共有結合され、Ｎ－置換マレイミドを含む第１の前駆体L_{E1}と、エフェクター部分に共有結合され、チオール又はその前駆体を含む第２の前駆体L_{E2}との間のカップリング反応の結果生じるものであることが好ましい。好適なチオール前駆体は、対応するチオールへの還元によって、（例えば、ｉｎ－ｓｉｔｕで）切断され得るジスルフィドである。

【０２０１】

式（Ｖ）$_E$、（ＶＩＩ）$_E$又は（ＶＩＩＩ）$_E$の化合物に存在する前駆体L_{E1}の好ましい構造は、以下の末端Ｎ－置換マレイミド：

【０２０２】

【化３４】



(IX)

【０２０３】

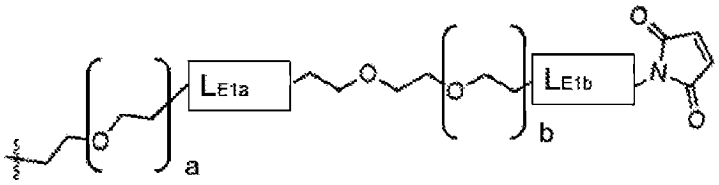
（式中、Ｘは末端Ｎ－置換マレイミドをＧａｌＮＡｃ又は架橋部分Ｂに共有結合させるのに好適なあらゆるリンカーを表す）である。当業者に理解されるように、Ｘは、ＧａｌＮＡｃ又は架橋部分に共有結合された第１の部分と、マレイミドに共有結合された第２の部分との間のカップリング反応の結果生じ得る。Ｘは、ヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾールを含むことができる。本出願のリンカーの文脈において１，２，３－トリアゾールに言及する場合は必ず、１Ｈ－１，２，３－トリアゾールを意味することが好ましい。

【０２０４】

式（Ｖ）$_E$、（ＶＩＩ）$_E$又は（ＶＩＩＩ）$_E$の化合物に存在する前駆体L_{E1}の構造の実施形態は、以下の末端Ｎ－置換マレイミド：

【０２０５】

【化３５】

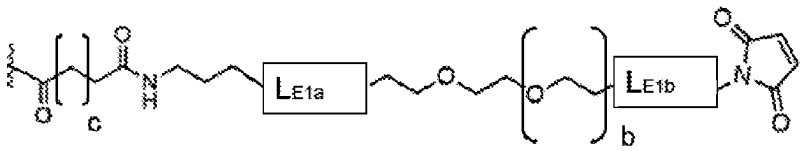


(X)

【０２０６】

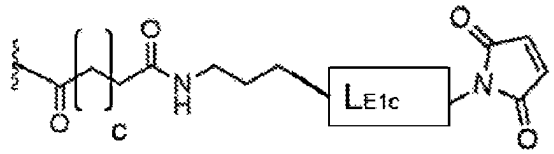
（式中、ａ及びｂはそれぞれ独立して０以上の整数を表し、好ましくはａ及びｂはそれぞれ独立して０、１、２、及び３から選択される整数を表し、より好ましくはａ及びｂは２を表し、L_{E1a}はヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール、好ましくは１，２，３－トリアゾールを表し、L_{E1b}はヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール

、好ましくはヒドラゾンを表す）；
【０２０７】
【化３６】



(XI)

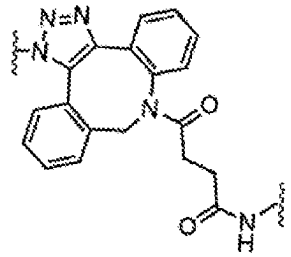
【０２０８】
（式中、ｂ及びｃはそれぞれ独立して０以上の整数を表し、好ましくはｂは０、１、２、及び３から選択される整数を表し、且つｃは５～１５の範囲の整数を表し、より好ましくはｂは２を表し、且つｃは９を表し、L_{E1a}はヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール、好ましくは１，２，３－トリアゾールを表し、L_{E1b}はヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール、好ましくはヒドラゾンを表す）；
並びに
【０２０９】
【化３７】



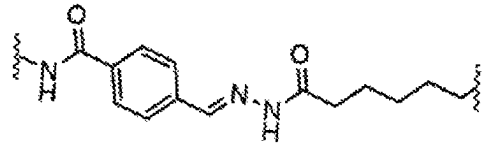
(XII)

【０２１０】
（式中、ｃは０以上の整数を表し、好ましくは５～１５の範囲の整数を表し、より好ましくは９を表し、L_{E1c}はヒドラゾン及び／又は１，２，３－トリアゾール、好ましくは１，２，３－トリアゾールを表す）である。
【０２１１】
L_{E1a}、L_{E1b}及びL_{E1c}は、好ましくはそれぞれ２０個未満の炭素原子を含み、より好ましくはそれぞれ独立して式（ＸＩＩＩ）、（ＸＩＶ）又は（ＸＶ）に従う部分を表し、好ましくは、L_{E1a}は式（ＸＩＩＩ）の１，２，３－トリアゾールであり、L_{E1b}は式（ＸＩＶ）のヒドラゾンであり、L_{E1c}は式（ＸＶ）の１，２，３－トリアゾールである：
【０２１２】

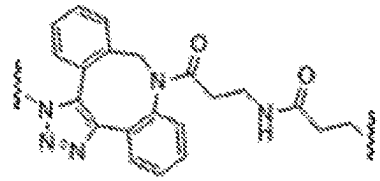
【化３８】



(XIII)



(XIV)



(XV)

【０２１３】

従って、いくつかの実施形態では、エフェクター分子コンジュゲートは、本明細書に記載されるような式（ＩＩ）$_E$、（ＩＩＩ）$_E$又は（ＩＶ）$_E$の化合物であり、エフェクター部分リンカーＬ$_E$が式（Ｖ）$_E$、（ＶＩＩ）$_E$又は（ＶＩＩＩ）$_E$の化合物と式（ＶＩ）$_E$の化合物との間のカップリング反応の結果生じるものであり、第１の前駆体Ｌ$_{E1}$は式（Ｘ）、（ＸＩ）又は（ＸＩＩ）の末端Ｎ－置換マレイミドであり、Ｌ$_{E1a}$は、例えば、式（ＸＩＩＩ）の１，２，３－トリアゾールであり、Ｌ$_{E1b}$は、例えば、式（ＸＩＶ）のヒドラゾンであり、Ｌ$_{E1c}$は、例えば、式（ＸＶ）の１，２，３－トリアゾールである。

【０２１４】

エフェクター分子コンジュゲート－エフェクター部分

本発明の態様は、

－本発明のサポニンコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、第１の医薬組成物と；

－エフェクター分子とＡＳＧＰＲのリガンドとの第２のコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若しくは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む第２の医薬組成物とを含む、医薬配合物に関する。

【０２１５】

本発明の態様は、

－本発明のサポニンコンジュゲート；

－エフェクター分子とＡＳＧＰＲとのリガンドの第２のコンジュゲートであって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、好ましくは少なくとも１つのＧａｌＮＡｃ部分、好ましくは３つ若し

くは４つのＧａｌＮＡｃ部分を含み、より好ましくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか若しくはそれからなる第２のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第３のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【０２１６】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、ＢＮＡ、異種核酸若しくはｓｉＲＮＡなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせの少なくとも１つを含むか又はそれからなり、好ましくは毒素、酵素又はオリゴヌクレオチドである。

【０２１７】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、ＡＳＧＰＲのリガンドが、（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスを含むか若しくは（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスであり、及び／又は、ＡＳＧＰＲのリガンド及びエフェクター分子が、共有結合によって、好ましくは少なくとも１つのリンカーを介してコンジュゲートされている。

【０２１８】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、アンチヘアピン型マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、一本鎖ＲＮＡ、アプタマーＲＮＡ、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、アンチマイクロＲＮＡ、（アンチｍｉＲＮＡ、アンチｍｉＲ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡ、ロックド核酸（ＬＮＡ）、架橋型核酸（ＢＮＡ）、２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸（ＢＮＡ^{NC}）、ＢＮＡベースのｓｉＲＮＡ、及びＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＢＮＡ－ＡＯＮ）のいずれか１つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである。

【０２１９】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、アンチｍｉＲＮＡ、ＢＮＡ－ＡＯＮ又はｓｉＲＮＡ、例えば、化学的に修飾されたｓｉＲＮＡ、代謝的に安定したｓｉＲＮＡ、及び化学的に修飾され、代謝的に安定したｓｉＲＮＡから選択される、ＢＮＡベースのｓｉＲＮＡのいずれか１つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである。

【０２２０】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質Ｂ（アポＢ）、ＨＳＰ２７、トランスサイレチン（ＴＴＲ）、プロタンパク質転換酵素であるサブチリシン／ケキシン９型（ＰＣＳＫ９）、δ－アミノレブリン酸シンターゼ１（ＡＬＡＳ１）、アンチトロンビン３（ＡＴ３）、グリコール酸オキシダーゼ（ＧＯ）、補体成分Ｃ５（ＣＣ５）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、α１－アンチトリプシン（ＡＡＴ）及び乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）のいずれか１つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、異常なｍｉＲＮＡを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

【０２２１】

生活習慣の変化の実践や、予防のための薬物治療が進歩したにもかかわらず、心血管疾患は依然として全体的な損失生存年数の重大な原因となっている［Ｂ．Ｇ．Ｎｏｒｄｅｓｔｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ ｌｉｐｉｄ－ｌｏｗｅｒｉｎｇ ｔｈｅｒａｐｙ ｔｈｒｏｕｇｈ ｇｅｎｅ－ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｃａｒｄｉｏｌｏｇｙ，Ｖ １５，Ｍａｙ ２０１８，ｐｐ．２６１－２７２］。最適な生活習慣への介入、降圧治療、高用量のスタチン療法の後であっても、並びに比較的新しい部類の脂質低下療法、例えば、コレステロール吸収阻害剤のエゼチマイブ、ＰＣＳＫ９阻害剤であるエボロクマブ及びボコシズマブ、

脂質を低下させるフィブラート系薬剤であるベザフィブラート、コレステリルエステル転送タンパク質阻害剤であるアナセトラピブ、及び抗炎症剤であるカナキヌマブによる治療の後であっても、実質的な残存する心血管疾患リスクがいまだに存在する。発症における療法、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドの阻害又は低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）ベースの手法では、ｍＲＮＡ分解による遺伝子サイレンシング技法が用いられる。小分子脂質低下薬は経口投与されるのに対し、遺伝子サイレンシング薬物は通常皮下注射される。遺伝子サイレンシング技法は、細胞核又は細胞質内の遺伝子発現を阻害してタンパク質産生を低減させ、結果として血漿のリポタンパク質レベルをグラム量で減少させる。アンチセンスオリゴヌクレオチド及びｓｉＲＮＡは、血漿中よりも肝臓細胞内ではるかに高い濃度に到達させるために製剤化される。遺伝子サイレンシング療法は、血漿中及び細胞内の両方のタンパク質を標的化する。

【０２２２】

ＬＤＬは、コレステロールが内膜に沈着することによりアテローム性動脈硬化症を引き起こす可能性が最も高い。心筋梗塞（ＭＩ）又は虚血性脳卒中事象の前提条件は、冠状動脈及び他の動脈内でアテローム性動脈硬化症が発症することである。アテローム斑は、血圧勾配によって促進される、血漿から動脈の内膜へのＬＤＬ及びレムナントリポタンパク質の湿潤によって惹起される。ＬＤＬ及びレムナントリポタンパク質のレベルが長期間にわたって血漿中で上昇したまま維持される場合、アテローム斑の進行が生じる可能性がある。内皮機能不全により、これらのリポタンパク質の内膜への流入の増加が引き起こされ、アテローム性動脈硬化症の進行がさらに促進される可能性がある。ＭＩ又は虚血性脳卒中をもたらすプラーク破綻は、典型的には進行中の局所炎症を伴い、線維皮膜のない不安定なアテローム斑の部位で生じる。プラーク破綻の後に、活性化した血小板及びフィブリンにより血栓が生成されるが、この血栓は、高レベルのＬｐ（ａ）がプラスミノーゲンとの相同性によって線維素溶解を阻害すると、さらに大きなサイズに進行する可能性がある。最終的に、血漿中のＬＤＬ及びレムナントリポタンパク質を実質的に減少させることによって、プラークのサイズ及び局所炎症を低減させることでプラークを安定化させることができる。遺伝子サイレンシング技法は、分子生物学のセントラルドグマ（ＤＮＡからｍＲＮＡへの転写及びｍＲＮＡからタンパク質への転写）を利用するものである。ある遺伝子のＤＮＡ配列が心血管疾患の原因となるリポタンパク質分画のレベルに影響を与えることが公知である場合、その遺伝子のｍＲＮＡ産物に結合してこれを不活性化し、その遺伝子を効果的に遮断（又はサイレンシング）する、一本鎖のＲＮＡ（アンチセンスオリゴヌクレオチド）又は二重鎖のＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を合成することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド又はｓｉＲＮＡをベースとした遺伝子サイレンシング手法による課題は、潜在的なオフターゲット効果又は有害作用があることであるが、薬物を肝臓細胞に優先的に送達すること、及びそれによって身体の他の部位で薬物濃度を低く保つことによって最小限に抑えられる。現在、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はｓｉＲＮＡのいずれかを肝臓細胞に選択的に送達する最善の方法は、これらの薬物又はそれらの送達システムをＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）部分に結合させることであり、これによってアシアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓細胞への選択的取り込みが促進される。コンジュゲートされたＧａｌＮＡｃ部分を含む、そのような遺伝子サイレンシング薬物は、薬物効力を向上させ、血漿中の薬物のレベルを低下させ、有害作用がより低減することが見込まれる。

【０２２３】

脂質低下遺伝子サイレンシング療法は、第２相及び第３相治験で評価されている。アポリポタンパク質Ｂ遺伝子のサイレンシングに加えて、いくつかのリポタンパク質経路で活性化する、遺伝子ＡＮＧＰＴＬ３、ＡＰＯＣ３、ＬＰＡ、及びＰＣＳＫ９もまた、遺伝子サイレンシング療法の標的となる。リポタンパク質遺伝子サイレンシング療法の一例には、ミポメルセンがあり、これは、ＬＤＬ、レムナントリポタンパク質、及びＬｐ（ａ）が保持する主要なタンパク質、アポＢタンパク質をコードするｍＲＮＡ配列に直接結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【０２２４】
本発明の一部は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、オリゴヌクレオチド、好ましくはＢＮＡベースのｓｉＲＮＡなどのｓｉＲＮＡ、又はＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、好ましくは哺乳類細胞の内部に存在する場合、アポリポタンパク質Ｂ（アポＢ）遺伝子をサイレンシングすることができる２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸をベースとしたＡＯＮである。
【０２２５】
一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：アポＢ、ＨＳＰ２７、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子の発現産物、ＨＢＶのＳ遺伝子の発現産物、ＡＡＴ及びＬＤＨのいずれか１つの発現に関与するｍＲＮＡを標的化することができるか、又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、発癌性ｍｉＲＮＡ（ｏｎｃｏ－ｍｉＲ）の阻害若しくはｏｎｃｏ－ｍｉＲの発現の抑制などのｍｉＲＮＡ機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである。
【０２２６】
本発明の一部は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子が、オリゴヌクレオチド、好ましくはＢＮＡベースのｓｉＲＮＡなどのｓｉＲＮＡ、又はＢＮＡベースのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、好ましくは哺乳類細胞の内部に存在する場合、タンパク質であるアポＢの発現に関与するｍＲＮＡを標的化することができる２’－Ｏ，４’－アミノエチレン架橋型核酸をベースとしたＡＯＮである。即ち、アポＢのｍＲＮＡへのコンジュゲートを含むエフェクター部分によって構成されるオリゴヌクレオチドが結合することにより、タンパク質であるアポリポタンパク質Ｂの発現のサイレンシングがもたらされる。
【０２２７】
ここで、驚くべきことに、本発明者らは、ＡＳＧＰＲのリガンド（本明細書では三価ＧａｌＮＡｃ）及びサポニンのコンジュゲートと組み合わせたＢＮＡ－ＡＯＮで治療することによって、改善された効果的なアポＢの遺伝子サイレンシングを確立した。サポニン（本明細書では一例としてＳＯ１８６１）は、例えば、受容体媒介性細胞内取り込みを介してエンドソームに移行する分子のエンドソーム脱出を促進する活性が知られている。アポＢの遺伝子サイレンシングにより、ＧａｌＮＡｃを含むＡＯＮコンジュゲートとＧａｌＮＡｃを含むサポニンコンジュゲートとの治療用配合物によって治療した後に、アポＢタンパク質を発現するｍＲＮＡレベルの低減が生じ、血漿のアポＢレベルが低下し、結果としてＬＤＬの血漿レベルの低下がもたらされる。遺伝子サイレンシング効果は、前記２つのコンジュゲートの組み合わせを単回投与して７２時間後、さらに１０日以上、例えば１４日後であっても顕著である。
【０２２８】
一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、エフェクター分子は、毒素であるか又は毒素を含み、毒素は、ペプチド、タンパク質、ウレアーゼ及びＣｒｅ－リコンビナーゼなどの酵素、タンパク性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、並びに／又は、細菌毒素、より好ましくはアポプチンなどのウイルス毒素のいずれか１つ以上から選択される植物毒素；志賀毒素、志賀様毒素、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素（ＰＥ）若しくはＰＥの外毒素Ａなどの細菌毒素、完全長若しくはトランケートされたジフテリア毒素（ＤＴ）、コレラ毒素；αサルシンなどの真菌毒素；リボソーム不活性化タンパク質を含む植物毒素及び２型リボソーム不活性化タンパク質のＡ鎖、例えば、ダイアンシン（例えば、ダイアンシン－３０若しくはダイアンシン－３２）、サポリン（例えば、サポリン－Ｓ３若しくはサポリン－Ｓ６）、ブーガニン若しくはブーガニンの脱免疫化誘導体であるデブーガニング、志賀様毒素Ａ、ヤマゴボウ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、ビスキュミン、ビスキュミンＡ鎖；又はカエルＲＮａｓｅなどの動物若しくはヒト毒素、又はヒト由来のグランザイムＢ若しくはアンギオゲニン、又はこれらの任意のフラグメント若しくは誘導体のいずれか１つ以上から選択される少なくとも１つの分子を含むか又はそれからなり；好ましくは、タンパク毒素は、ダイアンシン及び／若しくはサポリンであり、並びに／又は毒素標的化リボソーム、毒素標的化延長因子、毒素標的化チューブリン、毒素標的化ＤＮＡ及び毒素標的化ＲＮＡの少なくとも１つ、より好ましくは、エムタンシン、パスドトクス、マイタンシノイド誘導体ＤＭ１、マ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）、カリケアマイシン、Ｎ－アセチル－γ－カリケアマイシン、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類似体、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ミトキサントロン、ツブリシン、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、メトトレキセート、アントラサイクリン、カンプトセシン類似体、ＳＮ－３８、ＤＸ－８９５１ｆ、メシル酸エキサテカン、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素（ＰＥ３８）のトランケート形態、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、若しくはこれらの誘導体のいずれか１つ以上を含むか若しくはそれからなる。

【０２２９】

コンジュゲート－架橋部分Ｂ

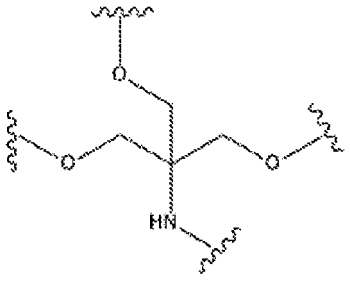
本明細書に記載される式（ＩＩＩ）$_S$又は（ＩＶ）$_S$のサポニンコンジュゲート及び（ＩＩ）$_E$又は（ＩＶ）$_E$の式のエフェクター分子コンジュゲートに存在する架橋部分Ｂは、２つ以上、好ましくは３又は４つ、より好ましくは３つのＧａｌＮＡｃ部分とサポニン部分リンカーＬ$_S$又はエフェクター部分リンカーＬ$_E$とを共有結合するのに好適なあらゆる部分を表す。

【０２３０】

好ましい実施形態によれば、架橋部分Ｂは、式（ＸＶ）の化合物：

【０２３１】

【化３９】



(XV)

【０２３２】

であり、

式（ＸＶ）の化合物の酸素原子が、ＧａｌＮＡｃ（式（ＩＩＩ）$_S$若しくは（ＩＩＩ）$_E$の化合物に対応する）又はＧａｌＮＡｃリンカーＬ$_{GAL}$（式（ＩＶ）$_S$若しくは（ＩＶ）$_E$の化合物に対応する）に結合され、式（ＸＶ）の化合物の窒素原子が、サポニン部分リンカーＬ$_S$又はエフェクター部分リンカーＬ$_E$に結合される。

【０２３３】

当業者であれば、架橋部分Ｂが式（ＸＶ）の化合物である式（ＩＩＩ）$_S$、（ＩＩＩ）

$_E$、（ＩＶ）$_S$又は（ＩＶ）$_E$のこれらの化合物が、ＡＳＧＰＲリガンドが（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスからなるエフェクター分子コンジュゲートに対応することが理解されよう。

【０２３４】

コンジュゲート－リンカーL_{GAL}

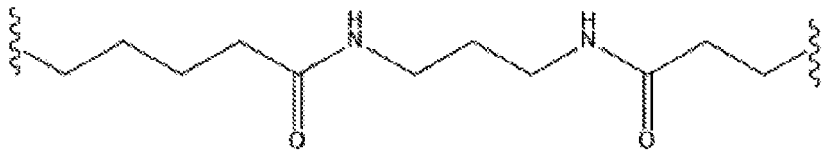
ＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}は、式（ＩＶ）$_S$又は（ＩＶ）$_E$におけるように、ＧａｌＮＡｃを架橋部分に共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。リンカーの同一性及びサイズに特に制限はない。

【０２３５】

実施形態によれば、ＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}は、それぞれ２～２５個の炭素原子、好ましくは７～１５個の炭素原子、より好ましくは１１個の炭素原子を含む。好ましくは、ＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}は、少なくとも１つ、好ましくは２つのアミド部分を含む。特に好ましいＧａｌＮＡｃリンカーL_{GAL}は、式（ＸＶＩ）に従った化合物：

【０２３６】

【化４０】



(XVI)

【０２３７】

である。

【０２３８】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、細胞表面分子のリガンドであるか、又は細胞表面分子の結合部位若しくは前記結合部位を含む少なくとも１つのドメイン若しくはこれらのフラグメントを含む抗体である。

【０２３９】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、第３のコンジュゲートが、抗体－毒素コンジュゲート、受容体－リガンド－毒素コンジュゲート、抗体－薬物コンジュゲート、受容体－リガンド－薬物コンジュゲート、抗体－核酸コンジュゲート又は受容体－リガンド－核酸コンジュゲートのいずれか１つ以上である。

【０２４０】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、以下の細胞表面分子：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αＶβ３、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αＶ、ＣＡ６、ＣＤ３３、メソセリン、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、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）のいずれか１つ、好ましくはＨＥＲ２、ＣＤ７１、ＡＳＧＰＲ及びＥＧＦＲのいずれか１つ、より好ましくはＣＤ７１に結合することができる。

【０２４１】

一実施形態は、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物であって、第３のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、ＩｇＧ、単一ドメイン抗体、少なくとも１つのV_{HH}ドメインを含むか又はそれからなる分子、好ましくはラクダ科V_H、可変重鎖新規抗原受容体（V_{NAR}）ドメイン、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）２及びＦｃａｂフラグメントのいずれか１つであるか、又はそれらを含む。

【０２４２】

本発明の態様は、薬剤としての使用のための、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物に関する。

【０２４３】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：アポＢ、ＴＴＲ、ＰＣＳＫ９、ＡＬＡＳ１、ＡＴ３、ＧＯ、ＣＣ５、ＨＢＶのＸ遺伝子、ＨＢＶのＳ遺伝子、ＡＡＴ及びＬＤＨのいずれか１つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防に使用するための、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物に関する。

【０２４４】

本発明の一部は、発現産物が、遺伝子アポＢに関連する疾患又は健康問題の治療又は予防に使用するための、本発明の医薬配合物又は本発明の医薬組成物である。アポＢ遺伝子の発現産物は、リポタンパク質であるアポリポタンパク質Ｂ（アポＢ）であり、ＬＤＬ、レムナントリポタンパク質及びＬｐ（ａ）の一部として存在する。典型的には、疾患は心血管疾患であり、通常、ＬＤＬ、Ｌｐ（ａ）及びレムナントリポタンパク質を含むアポＢの１つ以上に関連するアテローム斑の蓄積及び存在に関連付けられる。ここで、驚くべきことに、本発明者らは、ＡＳＧＰＲのリガンド（本明細書では三価ＧａｌＮＡｃ）及びサポニンのコンジュゲートと組み合わせたＢＮＡ－ＡＯＮで治療することによって、改善された効果的なアポＢの遺伝子サイレンシングを確立した。サポニン（本明細書では一例としてＳＯ１８６１）は、例えば、受容体媒介性細胞内取り込みを介してエンドソームに移行する分子のエンドソーム脱出を促進する活性が知られている。アポＢの遺伝子サイレンシングにより、ＧａｌＮＡｃを含むＡＯＮコンジュゲートとＧａｌＮＡｃを含むサポニンコンジュゲートとの治療用配合物によって治療した後に、アポＢタンパク質を発現するｍＲＮＡレベルの低減が生じ、血漿のアポＢタンパク質レベルが低減し、結果としてＬＤＬの血漿レベルの低下がもたらされる。遺伝子サイレンシング効果は、前記２つのコンジュゲートの組み合わせを単回投与して７２時間後、さらに１０日以上、例えば１４日後であっても顕著である。

【０２４５】

一実施形態は、本発明の医薬配合物若しくは本発明の医薬組成物、又は本発明で使用するための、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病Ａ、血友病Ｂ、ＡＡＴ関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、ＴＴＲ媒介性アミロイドーシス、遺伝性ＴＴＲアミロイドーシス（ｈＡＴＴＲ）、補体媒介性疾患、Ｂ型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防に使用するための、医薬配合物又は医薬組成物である。

【０２４６】

一実施形態は、本発明で使用するための医薬配合物又は本発明で使用するための医薬組成物であって、サポニンが、サポニン誘導体、好ましくは本発明によるＱＳ－２１誘導体又はＳＯ１８６１誘導体である。

【０２４７】

本発明の態様は、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを細胞外から前記細胞内に移行させ、好ましくは、その後に本発明による第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートによって構成されるエフェクター分子を前記細胞の細胞質ゾルに移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法であって、

ａ）ＡＳＧＰＲをその表面に発現する細胞であり、第３のコンジュゲートを細胞に移行させるときに、第３のコンジュゲートが細胞表面分子に結合するための結合分子を含む、細

胞表面分子を発現する細胞を提供する工程であって、細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、提供する工程；
ｂ）工程ａ）で提供された細胞に移行させるための、本発明の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートを提供する工程；
ｃ）本発明のサポニンコンジュゲートを提供する工程；
ｄ）工程ａ）の細胞を、工程ｂ）の第２のコンジュゲート又は第３のコンジュゲート、及び工程ｃ）のサポニンコンジュゲートとインビトロ又はエクスビボで接触させる工程であって、それによって細胞外から前記細胞への第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートの移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後前記細胞の細胞質ゾルへの第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートの移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後第２のコンジュゲート若しくは第３のコンジュゲートによって構成される少なくともエフェクター分子の前記細胞の細胞質ゾルへの移行を生じさせる、接触させる工程を含む方法に関する。

【０２４８】

いくつかの実施形態の観点から本発明を説明してきたが、明細書を読み、図面を精査すれば、それらの代替、変更、並べ替え、及び均等物が当業者に明らかになることが意図される。本発明は、例示された実施形態にいかなる形であっても限定されるものではない。変更は、添付の特許請求の範囲によって規定される範囲を逸脱することなく行うことができる。

【０２４９】

多数の例示的な実施形態を参照しながら、本発明を上記で説明してきた。変更は、添付の特許請求の範囲に規定されるような保護の範囲内で可能であり、この範囲に包含される。本発明をさらに以下の実施例で説明するが、本発明をいかなる形であっても限定するものと解釈すべきでない。

【実施例】

【０２５０】

実施例及び例示的な実施形態

実施例１．ＣＤ７１－サポリン＋４０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１

三価ＧａｌＮＡｃは、肝細胞上のＡＳＧＰＲ１受容体を認識し、結合する標的リガンドである。三価ＧａｌＮＡｃを生成し（図１及び図８）、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対して１のＤＡＲで三価ＧａｌＮＡｃとコンジュゲートした（不安定、未誘導体化ＳＯ１８６１について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートするが、ここでＳＰＴ００１はＳＯ１８６１と同義である）（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１）。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１を指し、アルデヒド基がＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされる。図１及び８に示すような「三価ＧａｌＮＡｃ」は、エフェクター分子又はサポニンに結合するのに好適な、典型的な（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスコンジュゲートである。対照として、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対して１のＤＡＲで一価ＧａｌＮＡｃ（図３）ともコンジュゲートした（不安定）（ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１）。ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^+$；ＣＤ７１$^+$、表Ａ３）細胞及びＨｕｈ７（ＡＳＧＰＲ１$^+$／$^-$；ＣＤ７１$^+$、表Ａ３）細胞を、１０ｐＭのＣＤ７１－サポリン（タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたＣＤ７１を標的化するモノクローナル抗体ＯＫＴ－９）の存在下及び不在下で、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１）及びＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１（ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１）の濃度範囲で処置した。ＣＤ７１－サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１）（又は三価ＧａｌＮＡｃ）は有毒でなく、最大で１５０００ｎＭであることが示されている（図９）。

【０２５１】

また、ＨｅｐＧ２細胞及びＨｕｈ７細胞を、１０００ｎＭ又は４０００ｎＭの三価Ｇａ

ｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の固定濃度と組み合わせて、ＣＤ７１－サポリンの濃度範囲で処置した（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１）。ＡＳＧＰＲ１／ＣＤ７１発現細胞（ＨｅｐＧ２及びＨｕｈ７）の、標的タンパク毒素によって媒介される細胞死滅を測定した。これにより、両細胞株で低濃度のＣＤ７１－サポリンにおいて強力な細胞死滅が明らかとなった（ＩＣ５０＝１ｐＭ）一方で、同等濃度のＣＤ７１－サポリン（ＣＤ７１－ＳＰＲＮ）、ＣＤ７１－サポリン＋１０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）３）又はＣＤ７１－サポリン＋４０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ）は、両細胞株で高濃度のＣＤ７１－サポリンでしか細胞死滅を誘発することができなかった（ＩＣ５０＝１００ｐＭ）（図１０）。

【０２５２】

このことは全て、低濃度のＣＤ７１－サポリン（ＣＤ７１－ＳＰＲＮ）と組み合わせた三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１（（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ）が、ＡＳＧＰＲ１／ＣＤ７１発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

【０２５３】

実施例２　三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ／Ｓ－ＢＮＡ＋ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ

ＨＳＰ２７ＢＮＡを三価ＧａｌＮＡｃにコンジュゲートし（図６～７）、ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）細胞又はＨｕｈ７（ＡＳＰＧＲ１$^{+/-}$）を、４０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの固定濃度と組み合わせて、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（不安定なコンジュゲーション、図６）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（安定なコンジュゲーション、図７）の濃度範囲で処置した。ＨｅｐＧ２及びＨｕｈ７細胞におけるＨＳＰ２７の遺伝子サイレンシングを測定した。４０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの組み合わせにおいてのみ、ＨｅｐＧ２及びＨｕｈ７細胞の両方で低濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌ－ＨＳＰ２７とも称する）（ＨｅｐＧ２：ＩＣ５０＝０，１ｎＭ；Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＝３ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｓ－ＨＳＰ２７とも称する）（ＨｅｐＧ２：ＩＣ５０＝０，１ｎＭ；Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＝３ｎＭ）で効果的な遺伝子サイレンシングが観察された一方で、同等濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞２０００ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞２０００ｎＭ）は、ＨｅｐＧ２及びＨｕｈ７細胞株で遺伝子サイレンシング活性を示さなかった（図１１）。

【０２５４】

次に、アポＢＢＮＡを同様の方法（図６～７）で三価ＧａｌＮＡｃにコンジュゲートし、ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）細胞又はＨｕｈ７（ＡＳＰＧＲ１$^{+/-}$）を、４０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ＳＰＴ－ＥＭＣＨとも称する）の固定濃度と組み合わせて、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌ－アポＢとも称する）（不安定なコンジュゲーション、図６、図１２、図１３）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｓ－アポＢとも称する）（安定なコンジュゲーション、図７、図１４、図１５）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌ－アポＢ（Ｓｃｒ．）とも称する）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－Ｌ－アポＢ（Ｓｃｒ．）とも称する）（この場合、スクランブルアポＢＢＮＡは、アポＢのｍＲＮＡに結合しないオリゴ配列をスクランブルしたアンチセンス、つまり非特異対照ＢＮＡである）の濃度範囲で処置した。ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）細胞又はＨｕｈ７（ＡＳＰＧＲ１$^{+/-}$）におけるアポＢの遺伝子サイレンシングを測定した。４０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの組み合わせにおいてのみ、ＨｅｐＧ２細胞で低濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝１０ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝１０ｎＭ）で効果的な遺伝子サイレンシングが観察された一方で、同等濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＞２０００ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢ

ＮＡ（ＩＣ５０＞２０００ｎＭ）は、ＨｅｐＧ２細胞では遺伝子サイレンシング活性を示さなかった（図１２、図１４）。処置は両細胞株の生存能に影響しなかった（図１３、図１５）。「Ｌ」は、「不安定」リンカーを指し、リンカーが細胞内、即ち、エンドソーム及びリソソーム内に存在するようなｐＨで切断されることを示す。対照的に、「Ｓ」は、「安定リンカー」を指し、リンカーが細胞内、即ち、エンドソーム及びリソソーム内に存在するようなｐＨでは切断されないことを示す。従って、コンジュゲートを形成するか、又はコンジュゲートによって構成される任意の２つの分子間に不安定な結合を含むコンジュゲートは、不安定リンカー内の位置で切断され、それによって２つの連結又は結合された分子が分離する。一例としては、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内で顕著な、酸性条件下におけるヒドラゾン結合の切断がある。

【０２５５】

このことは全て、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨが、２つの独立した遺伝子標的に対して、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＢＮＡ又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－ＢＮＡのエンドソーム脱出及び標的遺伝子のサイレンシングを促進することができることを示している。遺伝子サイレンシングは、Ｈｕｈ７細胞と比較すると、ＨｅｐＧ２細胞の方が効率的であり、このことは、ＡＳＧＰＲ１が細胞の原形質膜により高レベルで発現することによって、ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡコンジュゲートの取り込みの増加が促進されることを示唆している。

【０２５６】

実施例３　三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ／Ｓ－ＢＮＡ＋三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１で三価ＧａｌＮＡｃとコンジュゲートした（不安定な、未誘導体化ＳＯ１８６１（ＳＰＴ００１という名称でもある）について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートした）（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１、又は（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１、又は（ＧＮ）３－ＳＰＴと称する）。ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）細胞又はＨｕｈ７（ＡＳＰＧＲ１$^{+/-}$）細胞を、４０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１の固定濃度と組み合わせて、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（不安定なコンジュゲーション、図１６）、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ（安定なコンジュゲーション（図１７））、又はスクランブルした非特異対照のコンジュゲート（三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ）の濃度範囲で処置した（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１）。ＨｅｐＧ２（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）細胞及びＨｕｈ７（ＡＳＰＧＲ１$^{+/-}$）のアポＢの遺伝子サイレンシングを測定した。４０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１（（ＧＮ）３－ＳＰＴ）との組み合わせにおいてのみ、ＨｅｐＧ２細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）で低濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝５０ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝５０ｎＭ）で効果的な遺伝子サイレンシングが観察された。Ｈｕｈ７細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+/-}$）において両方を組み合わせた処置では、効果に乏しい遺伝子サイレンシングが示された（三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ：ＩＣ５０＝７００ｎＭ；三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ：ＩＣ５０＝７００ｎＭ）。同等濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢＢＮＡ（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞１０００ｎＭ）又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢＢＮＡ（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞１０００ｎＭ）は、ＨｅｐＧ２及びＨｕｈ７細胞株で遺伝子サイレンシング活性を示さず、４０００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１も、スクランブル三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ＋（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞１０００ｎＭ）又はスクランブル三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ$_{scrambled}$ＢＮＡ（ＨｅｐＧ２／Ｈｕｈ７：ＩＣ５０＞１０００ｎＭ）の遺伝子サイレンシングを誘導／促進しなかった（図１６）。Ｔ

【０２５７】

このことは全て、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１（（ＧＮ）３－ＳＰＴ）と組み合わせた、非常に低濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＨＳＰ２７ＢＮＡ又は三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－ＨＳＰ２７ＢＮＡが、ＡＳＧＰＲ１発現細胞の遺伝子サイレンシングを効果的に

誘導し、またこの場合も、ＡＳＧＰＲ１がより高発現した細胞でより強力な効果が見られることを示している。

【０２５８】

実施例４　初代マウス肝細胞における（ＧａｌＮＡｃ）３－ＢＮＡ（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の効力

（ＧａｌＮＡｃ）３を、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１でＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを含むリンカー（「Ｌｓ」）にコンジュゲートすると、（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１が現れた（図２５、２６）。次に、マウスアポＢ配列標的化ＢＮＡ、より具体的にはアポＢ＃０２　ＢＮＡ^{NC}、又はアポＢ＃０２又はチオール１３－アポＢ　ＢＮＡを、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１でリンカー（「Ｌｓ」）にコンジュゲートすると、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２が現れた（図２７、２８）。

【０２５９】

初代マウス肝細胞を、アポＢ＃０２　ＢＮＡ単独で、又は（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２、若しくは（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋２０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、若しくは（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１のいずれかの濃度範囲で処置し、アポＢのＲＮＡ発現を７２時間インキュベートした後にｑＰＣＲで測定した（図１８）。２０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの組み合わせ、又は２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１との組み合わせにおいてのみ、低濃度の（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２　ＢＮＡで効果的なアポＢのｍＲＮＡ発現の抑制的調節、即ち遺伝子発現阻害が観察され、２０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの組み合わせではＩＣ５０が約０．０３ｎＭ、及び２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１との組み合わせではＩＣ５０が約０．２ｎＭであった。アポＢＢＮＡ＃０２単独での処置では、アポＢのＲＮＡの抑制的調節は約１００～６６７倍低い効力であった（アポＢ＃０２：ＩＣ５０＝２０ｎＭ）が、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２は、ＩＣ５０が約２ｎＭであり、効力は約１０～６７倍低かった。

【０２６０】

このことは、（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１又はＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの組み合わせにおいてのみ、非常に低濃度の（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２　ＢＮＡによって、アポＢのＲＮＡの抑制的調節、即ちマウス初代肝細胞における遺伝子サイレンシングが効果的に誘導されることを示している。

【０２６１】

実施例５　Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける（ＧａｌＮＡｃ）３－ＢＮＡ＋（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１のインビボ効力

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを記載されているように処置し、表Ａ５に従って投与した。本試験に使用するコンジュゲート、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２及び（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１を、図２５～２８に記載されている通りに生成した。臨床観察を記録し、有効性と忍容性とで異なるバイオマーカーを分析した。

【０２６２】

図１９に示すように、２４時間後、アポＢのＲＮＡレベル、即ち遺伝子発現が、０．１ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２　ＢＮＡ（アポＢ＃０２）で処置した動物では著しく減少することがなく、１ｍｇ／ｋｇ又は２ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２　ＢＮＡをそれぞれ投与された群（全て各群につきｎ＝３動物）では、溶媒投与群（ｎ＝５動物）と比較して約１５％及び２１％減少した。同様に、１ｍｇ／ｋｇの用量（０．５８ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２ＢＮＡに相当する）の（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２では、２４時間後の溶媒対照と比較してアポＢの発現が約５３％（ｎ＝３動物）減少したが、０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２単独では、溶媒と比較して際立った減少が示されなかった（ｎ＝３）。対照的に、０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２を５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と同時投与した場合、アポＢの発現がすでに２４時間後には速やかに約６９％（ｎ＝２動物）減少したが、０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２では、５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と

同時投与した場合、溶媒と比較して、それでも１６％（ｎ＝２動物）の小幅な減少を示している。７２時間後、投与された最高用量のアポＢ＃０２　ＢＮＡ（２ｍｇ／ｋｇ）では、溶媒（ｎ＝５動物）と比較して３９％（ｎ＝３動物）の最大の減少を示したが、１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２では、アポＢ発現が６８％（ｎ＝３動物）減少する結果となった。また、対照的に、１０倍低い用量の０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２を５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と同時投与した場合、アポＢの発現レベルが８２％も減少する（ｎ＝３動物）結果となったが、０．１ｍｇ／ｋｇの（（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２単独では、１２％の減少（ｎ＝３動物）を示すに過ぎなかった。効果は持続可能であり、３３６時間後のアポＢの発現レベルが、２ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃２　ＢＮＡの場合は３０％（ｎ＝２動物）、及び１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２の場合は２５％減少した。１０倍低いペイロード、（即ち、０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の同時投与群は、なお２５％の減少を示しており、従って、投与されたペイロードを基準として、アポＢ発現の減少が１０倍向上したということになる。

【０２６３】

図２０に示すように、アポＢのＲＮＡの抑制的調節（図１９に示す）は、アポＢのタンパク質レベルに良好に変換されている。２４時間後、アポＢのタンパク質レベルは、対照（ｎ＝１４動物）と比較して、１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２（ｎ＝８動物）と、それと同様に、１０倍低い（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の同時投与群（即ち０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１（ｎ＝８動物））との両方で、約５０％と最も著しく減少した。７２時間後、全ての処置群で、溶媒対照群と比較してアポＢタンパク質が減少することが示されたが、最も明らかな効果は、０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２を５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と同時投与した場合のみで観察され、アポＢが約９０％（ｎ＝５動物）減少する結果となった。０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２でさえも、５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と同時投与した場合にアポＢタンパク質を約２５％減少させた（ｎ＝４動物）が、１０倍高い用量の０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２は、投与して７２時間後、単独でアポＢタンパク質を３５％減少させた（ｎ＝５動物）。この場合も、効果は持続可能であり、アポＢタンパク質の減少は、全ての分析した処置群で３３６時間時点でなお観察可能であった（全て各群につきｎ＝２動物；１ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２及び０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ８６１群については、３３６時間で試料を分析しなかった）。また、本明細書では、１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２と、１０倍低い用量の０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の同時投与群とで、類似した持続性が示された（３３６時間後にアポＢタンパク質が２３％減少した）。

【０２６４】

図２１に示すように、観察されたアポＢタンパク質の抑制的調節（図２０に示す）は、ＬＤＬコレステロール（ＬＤＬ－Ｃ）レベルに良好に変換されている。２４時間後、ＬＤＬ－Ｃレベルは、溶媒（ｎ＝６動物）と比較して、０．１、１、又は２ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２　ＢＮＡで処置した動物（各群につきｎ＝３動物）では著しく減少しなかった。１ｍｇ／ｋｇの用量の標的化（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２は、ＬＤＬ－Ｃをすでに２４時間以内に平均で２．７ｍｇ／ｄｌまで減少させたが（ｎ＝３動物）、即ち、これは溶媒及びアポＢ＃０２　ＢＮＡ群と比較して５３％の減少であった。ＬＤＬ－Ｃの２４時間以内での平均２．７ｍｇ／ｄｌまでの同様の減少（ｎ＝３動物）、即ち５３％の減少は、１０倍低い用量の０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２を５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と同時投与した場合ですでに観察されているが、０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡ

ｃ）３－ＳＯ１８６１の群は、結論付けるには変動が大きすぎるものであった（ｎ＝２動物）。７２時間後、最高用量のアポＢ＃０２　ＢＮＡ（２ｍｇ／ｋｇ）では、ＬＤＬ－Ｃが溶媒（ｎ＝６動物）と比較して５０％減少したことを示した（ｎ＝３動物）が、１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２では７２％の減少であり（ｎ＝３動物）、また、１０倍低い用量の０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１ですら７８％減少し（ｎ＝３動物）、その一方で０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１では１３％の減少であった（ｎ＝２動物）。効果は持続可能であり、３３６時間後のＬＤＬ－Ｃレベルは、２ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２　ＢＮＡの場合は４０％、並びに１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２及び０．１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の同時投与群の場合は４８％減少しており、このことは、投与されるペイロードを基準として、ＬＤＬ－Ｃの減少が１０倍向上したことを示している。

【０２６５】

結論として、このことは、５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１との組み合わせにおいてのみ、非常に低濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢ＃０２　ＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２　ＢＮＡ）によって、アポＢのＲＮＡの抑制的調節、即ちアポＢタンパク質及びＬＤＬコレステロールなどのＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスの肝臓における遺伝子サイレンシング、並びに全ての有効性の「下流」バイオマーカーが効果的に誘導されることを示している。

【０２６６】

実施例５　Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにおける（ＧａｌＮＡｃ）３－ＢＮＡ＋（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１のインビボ忍容性

本試験に使用するコンジュゲートである、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２及び（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１を、図２５～２８に記載されている通りに生成した。

【０２６７】

試験過程の間、表Ａ５に記載されるような全ての処置、用量、及び用法は、忍容性が良好であり、処置特有の有害な所見又はコンジュゲートが忍容性不良であることを示すあらゆる特有の臨床観察は示されなかった。処置群のマウスは、溶媒を与えられたマウスと同等に体重が増加した。血清ＡＬＴレベルを測定し、結果を図２２に示す。試験期間中、溶媒処置マウスのＡＬＴレベルは各群につき平均で４７～６１Ｕ／Ｌの範囲であった（溶媒ではｎ＝６動物）。ＡＬＴのレベルは、異なる時点の異なる用量群で一時的に上昇し、時に各群で動物毎に変動が大きく、特定化合物との相関又は用量相関を示さなかった（２４時間及び７２時間の全ての群でそれぞれｎ＝３だが、０．０１ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１（両方の時点でｎ＝２）を除く）。注目すべきことに、３３６時間後、全ての投与群のＡＬＴレベルがベースラインまで戻り、溶媒対照群と同等となった（全ての群でｎ＝２）。

【０２６８】

結論として、このことは、アポＢ＃０２、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２、及び（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１（単独で又は（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２と組み合わせて）は、適用される用量及び用法で忍容性が良好であり、特に、（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ＃０２の同時投与は、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスモデルにおいて高い効力を示しながら、即時的な忍容性の問題が存在しなかったことを示している。

【０２６９】

実施例６．（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１＋１０ｐＭのＣＤ７１－サポリン及び（ＧａｌＮＡｃ）３－ＢＮＡ＋２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１

ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１で三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）３）とコンジュゲートし（不安定な、未誘導体化ＳＯ１８６１について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートし）、これを（Ｇａｌ

ＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と称した。ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１を指し、アルデヒド基がＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされる。図１及び８に示すような「三価ＧａｌＮＡｃ」は、エフェクター分子又はサポニンに結合するのに好適な、典型的な（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスコンジュゲートである。初代ヒト肝細胞を、１０ｐＭ（非有効濃度）のＣＤ７１－サポリン（タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたＣＤ７１を標的化するモノクローナル抗体ＯＫＴ－９）の存在下及び不在下で、ＳＯ１８６１（未誘導体化）又は（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の濃度範囲で処置した（図２３）。これにより、効率的なＣＤ７１－サポリンによって媒介される初代ヒト肝細胞の細胞死滅は、ＳＯ１８６１（ＩＣ５０＝２００ｎＭ）で効果があった一方で、標的化（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１では、はるかに低濃度（ＳＯ１８６１　ＩＣ５０＝１０ｎＭ）ですでに効果があったことが明らかとなった（図２３）。このことは全て、コンジュゲートされた、酸感受性の切断可能な（ＥＭＣＨ）ＳＯ１８６１のＡＳＧＰＲ１受容体媒介性送達には、増強された効力を露わにするためにＳＯ１８６１の量を減少させることが必要であることが明らかとなった。

【０２７０】

次に、アポＢ　ＢＮＡ（配列番号２）を三価ＧａｌＮＡｃ（（ＧａｌＮＡｃ）３）にコンジュゲートして、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡを生成し（図６）、初代ヒト肝細胞で２０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ又は２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１と組み合わせて、アポＢのＲＮＡ発現の調節（図２４Ａ）及び細胞生存率（図２４Ｂ）を試験した。これにより、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ単独では、アポＢのＲＮＡ発現を効果的に減少させることができず（ＩＣ５０＞１０００ｎＭ）（図２４Ａ）、細胞生存率に及ぼす影響が観察されなかったことが明らかとなった（図２４Ｂ）。しかしながら、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ＋２０００ｎＭのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨは効果が高く、低濃度の（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝８ｎＭ；図２４Ａ）でアポＢのＲＮＡ発現を強力に下方制御することを示し、細胞生存率をＩＣ５０＝６００ｎＭで低下させることが観察された（図２４Ｂ）。（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ＋２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１もまた、細胞生存率に著しく影響を与えることなく（図２４Ｂ）、低濃度の（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ（ＩＣ５０＝１５ｎＭ；図２４Ａ）でアポＢのＲＮＡを強力に下方制御することを示した。興味深いことに、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡ＋２５０ｎＭの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ１８６１の組み合わせでは、１００ｎＭを上回る（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢＢＮＡで、（ＧａｌＮＡｃ）３コンジュゲートがＡＳＧＰＲ１受容体への結合に競合することが観察され、それによって細胞に到達するための両方のコンジュゲートの最適濃度が制限されるため、アポＢのＲＮＡの下方制御が元に戻っている。

【０２７１】

実施例７．ＣＤ７１－サポリン＋三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１、三価ＧａｌＮＡｃ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）４、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの濃度系列

三価ＧａｌＮＡｃを生成し（図１及び図８）、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを三価ＧａｌＮＡｃとコンジュゲートし、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１で（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１；（ＧＮ）３－ＳＰＴ）、又はＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを最初にデンドロンに結合させることによってＤＡＲを４として（三価ＧａｌＮＡｃ－デンドロン（ＳＯ１８６１）４；（ＧＮ）３－ｄＳＰＴ４；図３３Ｃ）コンジュゲートした（不安定、未誘導体化ＳＯ１８６１について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートし、ここでＳＰＴ及びＳＰＴ００１はＳＯ１８６１と同義である）。この場合も、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１を指し、アルデヒド基がＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされる。図１及び８に示すような「三価ＧａｌＮＡｃ」は、エフェクター分子又はサポニンに結合するのに好適な、典型的な（ＧａｌＮＡｃ）$_3$トリスコンジュゲートである。対照として、ＳＯ１８６１

－ＥＭＣＨを一価ＧａｌＮＡｃ（図３）ともコンジュゲートし（不安定）、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１、又は結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝４で（デンドロンを用いて）コンジュゲートした（ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及びＧａｌＮＡｃ－（ＳＯ１８６１）４）。初代肝細胞は高密度で受容体を発現するため、標的化することが可能である。ＡＳＧＰＲ１を高発現する初代肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）を、１０ｐＭのＣＤ７１－サポリン（タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたＣＤ７１を標的化するモノクローナル抗体ＯＫＴ－９）の存在下で、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ、三価ＧａｌＮＡｃ－（ＳＯ１８６１）４の濃度範囲で処置した。ＣＤ７１－サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１は有毒でなく、最大で少なくとも１．０００ｎＭであることが示されている（図２９Ａ；相対細胞生存率）。抗ＣＤ７１　ＭｏＡｂ－サポリン（「ＭｏＡｂ」＝モノクローナル抗体）と、ＳＯ１８６１とコンジュゲートしたＧａｌＮＡｃ（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１、又は結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝４のいずれか）との組み合わせで処置した細胞の細胞生存率は、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ＳＰＴ－ＥＭＣＨ）と組み合わせた抗ＣＤ７１　ＭｏＡｂ－サポリン（ＣＤ７１－ＳＰＲＮ）で処置した細胞の細胞生存率と比較すると約１００倍低い（図２９Ａ）。

【０２７２】

このことは全て、低濃度のＣＤ７１－サポリンと組み合わせた三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及び三価ＧａｌＮＡｃ－（ＳＯ１８６１）$_{4}$が、ＡＳＧＰＲ１／ＣＤ７１発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。従って、ＳＰＴ００１及びＧａｌＮＡｃ標的化ＳＰＴ００１（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１）の両方で、業界標準のＧａｌＮＡｃ標的化ＡＳＯであるＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの効力を向上させ、肝臓細胞の細胞生存率を考慮すると約１０倍、（ＧＮ）３－ＳＰＴ及び（ＧＮ）３－ｄＳＰＴ４の両方では約１００倍の向上となる。

【０２７３】

実施例８．アポＢアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ＋三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１

三価ＧａｌＮＡｃを生成し（図１及び図８）、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを三価ＧａｌＮＡｃとＤＡＲを１としてコンジュゲートした（不安定、未誘導体化ＳＯ１８６１について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートし、ここでＳＰＴ及びＳＰＴ００１はＳＯ１８６１と同義である）（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１；（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ００１）；図３０Ｃ）。この場合も、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１を指し、アルデヒド基がＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされる。また、アポＢのアンチセンスＢＮＡオリゴヌクレオチドであるアポＢＢＮＡ（配列番号２）と、４つの共有結合されたＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを含むデンドロンとの両方に結合された三価ＧａｌＮＡｃの共有結合コンジュゲートも調製した。コンジュゲートを調製するための概略については、本明細書の下記の「三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及びＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成（図２、４）」の項、並びに「三価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡオリゴ合成（図６、７）」の項、並びに「三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成」及び「三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成」の項、並びに「デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{4}$－三価ＧａｌＮＡｃの合成」の項も参照されたい。

【０２７４】

ＡＳＧＰＲ１を高発現する初代肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+}$）を、３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１（（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ００１）の存在下又は不在下のいずれかで、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ（（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢ）の濃度範囲で処置した（図２９Ｂ）。（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ００１の不在下で細胞を処置すると、三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１が、（ＧａｌＮＡｃ）３－アポＢのみで処置した

細胞のアポＢ遺伝子発現と比較して、初代肝細胞のアポＢ遺伝子発現の減少に高い効果があることを示している（図２９Ｂ）。

【０２７５】

このことは全て、（ＧａｌＮＡｃ）$_3$－アポＢと組み合わせた三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１が、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のアポＢ遺伝子発現のサイレンシングを効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のＢＮＡのエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

【０２７６】

実施例９．ＳＯ１８６１とコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ、又はＯＫＴ－９抗ＣＤ７１モノクローナル抗体の固定用量の存在下における三価ＧａｌＮＡｃ－（Ｌ－ＳＯ１８６１）のコンジュゲートの濃度系列

三価ＧａｌＮＡｃを生成し（図１及び図８）、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１で三価ＧａｌＮＡｃとコンジュゲートした（不安定、未誘導体化ＳＯ１８６１について図２及び図４に記載されるものと同様の方法でコンジュゲートし、ここでＳＰＴ及びＳＰＴ００１はＳＯ１８６１と同義である）（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１；（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ００１；図３０Ｃ）。この場合も、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１を指し、アルデヒド基がＮ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨがもたらされる。コンジュゲートを調製するための概略については、本明細書の下記の「三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及びＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成（図２、４）」の項も参照されたい。

【０２７７】

ＡＳＧＰＲ１を高発現する初代肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^+$）及び細胞株Ｈｕｈ７の肝細胞（ＡＳＧＰＲ$^{+/-}$）を、１０ｐＭのＣＤ７１－サポリン（タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたＣＤ７１を標的化するモノクローナル抗体ＯＫＴ－９；図３０Ｄ）の存在下又は不在下のいずれかで、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）の濃度範囲で処置した。ＣＤ７１－サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１は有毒でなく、最大で少なくとも１．０００ｎＭであることが示されている（図３０Ａ、３０Ｂ；相対細胞生存率）。抗ＣＤ７１　ＭｏＡｂ－サポリンと、ＳＯ１８６１とコンジュゲートした低ｎＭ用量のＧａｌＮＡｃ（結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１；三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）との組み合わせで処置した細胞の細胞生存率は、同じ用量の三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１と組み合わせた同じ用量の抗ＣＤ７１　ＭｏＡｂ－サポリン（ＣＤ７１－サポリン）で処置したＨｕｈ７細胞の細胞生存率と比較すると、初代肝細胞を死滅させる効果が高い（図３０Ａ及び３０Ｂ）。

【０２７８】

このことは全て、低濃度のＣＤ７１－サポリンと組み合わせた低用量の三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１が、ＡＳＧＰＲ１発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。従って、低ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１は、初代肝細胞における低ｐＭのＣＤ７１　ＭｏＡｂ－サポリンの細胞質送達を促進し、ＡＳＧＰＲ１を発現しない肝細胞は、低ｎＭ濃度の三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１に応答しない。

【０２７９】

実施例１０．アポＢアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価ＧａｌＮＡｃ＋三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－ＳＯ１８６１

三価ＧａｌＮＡｃを生成し、実施例８に記載されるように、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを、結合したＳＯ１８６１に対してＤＡＲ＝１で三価ＧａｌＮＡｃとコンジュゲートした（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１；（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＰＴ００１；図３０Ｃ）。加えて、三価ＧａｌＮＡｃ及びアポＢのアンチセンスＢＮＡオリゴヌクレオチドであるアポＢ

ＢＮＡ（配列番号２）のコンジュゲートを調製した（図３１Ｃ）。コンジュゲートを調製するための概略については、本明細書の下記の「三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及びＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成（図２、４）」の項、並びに「三価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡオリゴ合成（図６、７）」の項、並びに「三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成」及び「三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成」の項、並びに「デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃ及びデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－三価ＧａｌＮＡｃの合成」及び「デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃの合成」の項も参照されたい。

【０２８０】

ＡＳＧＰＲ１を高発現する初代肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^+$）及び細胞株Ｈｕｈ７の肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+/-}$）を、３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）の存在下又は不在下のいずれかで、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ（三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ）の濃度範囲で処置した（図３１Ａ及びＢ）。三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１の不在下で細胞を処置すると、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１が、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡのみで処置した初代肝臓細胞のアポＢのｍＲＮＡ発現と比較して、初代肝細胞のアポＢのｍＲＮＡ発現の減少に高い効果（約１００倍以上の効力）があることを示している（図３１Ａ）。三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡも、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡと三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１との組み合わせのいずれもが、これらの肝臓細胞においてアポＢのｍＲＮＡ発現の低下を誘導しない。

【０２８１】

このことは全て、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡと組み合わせた三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１が、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のアポＢのｍＲＮＡ発現のサイレンシングを効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のＢＮＡのエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

【０２８２】

ＡＳＧＰＲ１を高発現する初代肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^+$）及び細胞株Ｈｕｈ７の肝細胞（ＡＳＧＰＲ１$^{+/-}$）を、３００ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１（三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１）の存在下又は不在下のいずれかで、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ（三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ）の濃度範囲で処置し（図３２Ａ及びＢ）、アポＢタンパク質発現を評価し、比較した。三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１の不在下で細胞を処置すると、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１が、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡのみで処置した初代肝臓細胞のアポＢタンパク質発現と比較して、初代肝細胞のアポＢタンパク質発現の減少に高い効果（１０００倍以上にわたる効力）があることを示している（図３２Ａ）。三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡも、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡと三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１との組み合わせのいずれもが、これらの肝臓細胞においてアポＢタンパク質発現の低下を誘導しない（図３２Ｂ）。

【０２８３】

このことは全て、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡと組み合わせた三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１が、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のアポＢタンパク質発現のサイレンシングを効果的に誘導することを示している。従って、三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１によって、ＡＳＧＰＲ１発現細胞のＢＮＡのエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

【０２８４】

従って、低ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ＋三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１は、エンドソーム脱出及びアポＢＢＮＡの細胞質送達を促進し、初代肝細胞内でアポＢのｍＲＮＡのサイレンシングをもたらすことができ；低ｎＭの三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢＢＮＡ＋三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＰＴ００１は、エンドソーム脱出及びアポＢＢＮＡの細胞質送達を促進して、初代肝細胞内でアポＢタンパク質の崩壊をもたらすことができ；アポＢ発現を考慮する場合、ＡＳＧＰＲ１が低発現している細胞は、療法に応答しない。

【０２８５】

材料及び方法

略語
ＡＥＭ　Ｎ－（２－アミノエチル）マレイミドトリフルオロ酢酸塩
ＡＭＰＤ　２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール
ＢＯＰ　（ベンゾトリアゾル－１－イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート
ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＭＦ　Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
ＥＤＣＩ．ＨＣｌ　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
ＨＡＴＵ　１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート
ｍｉｎ　分
ＮＭＭ　４－メチルモルホリン
ｒ．ｔ．保持時間
ＴＣＥＰ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンハイドロクロライド
Ｔｅｍｐ　温度
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸

【０２８６】
分析方法
ＬＣ－ＭＳ方法１
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＳＯを含むＵＰＩＳＭＦＴＮ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０～３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、生成物の分子量に応じた質量範囲：ｎｅｇ又はｎｅｇ／ｐｏｓ　１５００～２４００又は２０００～３０００の範囲内；ＥＬＳＤ：ガス圧力　４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃；カラム：Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、１．７μｍ　温度：６０℃、流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、ｌｉｎ．生成物の極性に応じた勾配：
Ａ t_0＝２％Ａ、$t_{5.0min}$＝５０％Ａ、$t_{6.0min}$＝９８％Ａ
Ｂ t_0＝２％Ａ、$t_{5.0min}$＝９８％Ａ、$t_{6.0min}$＝９８％Ａ
ポスト時間：１．０分、溶出液Ａ：アセトニトリル、溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２８７】
ＬＣ－ＭＳ方法２
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＳＯを含むＵＰＩＳＭＦＴＮ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０～３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、生成物の分子量に応じた質量範囲：ｐｏｓ／ｎｅｇ　１００～８００又はｎｅｇ　２０００～３０００；ＥＬＳＤ：ガス圧力　４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＣＳＨ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ、温度：２５℃；流量：０．５ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_{0min}＝５％Ａ、$t_{2.0min}$＝９８％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポスト時間：０．３分、溶出液Ａ：アセトニトリル、溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２８８】
ＬＣ－ＭＳ方法３
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＳＯを含むＵＰＩＳＭＦＴＮ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０～３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、生成物の分子量に応じた質量範囲　ｐｏｓ／ｎｅｇ　１０５～８００、５００～１２００又は１５００～２５００；ＥＬＳＤ：ガス圧力　４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）

ＣＳＨ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ、温度：４０℃；流量：０．５ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_{0min}＝５％Ａ、$t_{2.0min}$＝９８％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポスト時間：０．３分、溶出液Ａ：アセトニトリル中０．１％ギ酸、溶出液Ｂ：水中０．１％ギ酸。

【０２８９】

ＬＣ－ＭＳ方法４

装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＳＯを含むＵＰＩＳＭＦＴＮ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０～３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、生成物の分子量に応じた質量範囲：ｐｏｓ／ｎｅｇ　１００～８００又はｎｅｇ　２０００～３０００；ＥＬＳＤ：ガス圧力　４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃カラム：Ｗａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｓｈｉｅｌｄ　ＲＰ１８、５０×２．１ｍｍ、１．７μｍ、温度：２５℃、流量：０．５ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_{0min}＝５％Ａ、$t_{2.0min}$＝９８％Ａ、$t_{2.7min}$＝９８％Ａ、ポスト時間：０．３分、溶出液Ａ：アセトニトリル、溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２９０】

ＬＣ－ＭＳ方法５

装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；Ｂｉｎ．ポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＳＯを含むＵＰＩＳＭＦＴＮ；ＵＰＣＭＡ、ＰＤＡ：ＵＰＰＤＡＴＣ、２１０～３２０ｎｍ、ＳＱＤ：ＡＣＱ－ＳＱＤ２　ＥＳＩ、質量範囲：ｐｏｓ／ｎｅｇ　１５００～２５００；ＥＬＳＤ：ガス圧力　４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＣＳＨ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、２．５μｍ、温度：２５℃；流量：０．６ｍＬ／ｍｉｎ、勾配：t_{0min}＝５％Ａ、$t_{1.3min}$＝９８％Ａ、$t_{1.7min}$＝９８％Ａ、ポスト時間：０．３分、溶出液Ａ：アセトニトリル、溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２９１】

分取方法

分取ＭＰ－ＬＣ方法１

機器型式：Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）分取ＭＰＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＣＳＨ　Ｃ１８（１４５×２５ｍｍ、１０μｍ）；流量：４０ｍＬ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム　ｐＨ＝９．０）；溶出液Ｂ：９９％アセトニトリル＋水中１％　１０ｍＭ重炭酸アンモニウム；勾配：

[A] t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝１０％Ｂ、t_{17min}＝５０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ

[A] t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝２０％Ｂ、t_{17min}＝６０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ

；検出ＵＶ：２１０、２３５、２５４ｎｍ及びＥＬＳＤ。

【０２９２】

分取ＭＰ－ＬＣ方法２

機器型式：Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）分取ＭＰＬＣ；カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＬＵＮＡ　Ｃ１８（３）（１５０×２５ｍｍ、１０μｍ）；流量：４０ｍＬ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：水中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸、溶出液Ｂ：アセトニトリル中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸；勾配：

[A] t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝２０％Ｂ、t_{17min}＝６０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ

[B] t_{0min}＝２％Ｂ、t_{1min}＝２％Ｂ、t_{2min}＝２％Ｂ、t_{17min}＝３０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ

[C] t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝１０％Ｂ、t_{17min}＝５０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ

[D] t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝５％Ｂ、t_{17min}＝４０％Ｂ

、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ
；検出ＵＶ：２１０、２３５、２５４ｎｍ及びＥＬＳＤ。
【０２９３】
分取ＬＣ－ＭＳ方法３
ＭＳ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｇ６１３０Ｂ Ｑｕａｄｒｕｐｏｌｅ；ＨＰＬＣ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ １２９０分取ＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＳｅｌｅｃｔ（商標） ＣＳＨ（Ｃ１８、１５０×１９ｍｍ、１０μｍ）；流量：２５ｍｌ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：１００％アセトニトリル；溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム ｐＨ＝９．０；勾配：
Ａ t_0＝２０％Ａ、$t_{2.5min}$＝２０％Ａ、t_{11min}＝６０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｂ t_0＝５％Ａ、$t_{2.5min}$＝５％Ａ、t_{11min}＝４０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
；検出：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づいた分画収集。
【０２９４】
分取ＬＣ－ＭＳ方法４
ＭＳ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｇ６１３０Ｂ Ｑｕａｄｒｕｐｏｌｅ；ＨＰＬＣ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ １２９０分取ＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ Ｘｂｒｉｄｇｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｃ４、１５０×１９ｍｍ、１０μｍ）；流量：２５ｍｌ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：１００％アセトニトリル；溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム ｐＨ＝９．０；勾配：
Ａ t_0＝２％Ａ、$t_{2.5min}$＝２％Ａ、t_{11min}＝３０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｂ t_0＝１０％Ａ、$t_{2.5min}$＝１０％Ａ、t_{11min}＝５０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｃ t_0＝５％Ａ、$t_{2.5min}$＝５％Ａ、t_{11min}＝４０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
；検出：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づいた分画収集
【０２９５】
分取ＬＣ－ＭＳ方法１、
ＭＳ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｇ６１３０Ｂ Ｑｕａｄｒｕｐｏｌｅ；ＨＰＬＣ機器型式：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ １２９０分取ＬＣ；カラム：Ｗａｔｅｒｓ Ｘｂｒｉｄｇｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｃ４、１５０×１９ｍｍ、１０μｍ）；流量：２５ｍｌ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：１００％アセトニトリル；溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム ｐＨ＝９．０；勾配：
Ａ t_0＝２％Ａ、$t_{2.5min}$＝２％Ａ、t_{11min}＝３０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｂ ｔ０＝１０％Ａ、$t_{2.5min}$＝１０％Ａ、t_{11min}＝５０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
；検出：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づいた分画収集
【０２９６】
分取ＭＰ－ＬＣ方法１、
機器型式：Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）分取ＭＰＬＣ；カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＬＵＮＡ Ｃ１８（３）（１５０×２５ｍｍ、１０μｍ）；流量：４０ｍＬ／ｍｉｎ；カラム温度：室温；溶出液Ａ：水中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸、溶出液Ｂ：アセトニトリル中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸；勾配：
Ａ t_{0min}＝２％Ｂ、t_{1min}＝２％Ｂ、t_{2min}＝２％Ｂ、t_{17min}＝３０％Ｂ

、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ
Ｂ t_{0min}＝５％Ｂ、t_{1min}＝５％Ｂ、t_{2min}＝５％Ｂ、t_{17min}＝４０％Ｂ、t_{18min}＝１００％Ｂ、t_{23min}＝１００％Ｂ
Ｃ 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、２３５、２５４ｎｍ及びＥＬＳＤ。
【０２９７】
フラッシュクロマトグラフィー
Ｇｒａｃｅ　Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ　Ｘ２（登録商標）Ｃ－８１５　Ｆｌａｓｈ；溶媒送達システム：自吸式３ピストンポンプ、単一ランで最大４種の溶媒を含む４つの独立チャネル、溶媒が空になった場合の自動切替ライン；最大ポンプ流量　２５０ｍＬ／ｍｉｎ；最大圧力　５０バール（７２５ｐｓｉ）；検出；ＵＶ　２００～４００ｎｍ、最大４種のＵＶ信号の組み合わせ及び全ＵＶ範囲の走査、ＥＬＳＤ；カラムサイズ：機器上で４～３３０ｇ、ルアー型、７５０ｇ～オプションのホルダーを含めて最大３０００ｇ。
【０２９８】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨの合成（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨはＳＯ１８６１－Ａｌｄ－ＥＭＣＨとも称される）
ＳＯ１８６１（１２１ｍｇ、０．０６５ｍｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（１１０ｍｇ、０．３２５ｍｍｏｌ）に、メタノール（超無水（ｅｘｔｒａ　ｄｒｙ）、３．００ｍＬ）及びＴＦＡ（０．０２０ｍＬ、０．２６０ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１２０ｍｇ、９０％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０６９［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．０８^{4}
【０２９９】
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（ブロック化））
ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（０．１ｍｇ、４８ｎｍｏｌ）に２００μＬのメルカプトエタノール（１８ｍｇ、２３０μｍｏｌ）を添加し、この溶液をＴｈｅｒｍｏＭｉｘｅｒ　Ｃ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）上で８００ｒｐｍで１時間、室温で振盪した。１時間振盪させた後、溶液をメタノールで希釈し、１ｋＤａのＭＷＣＯを含む再生セルロース膜チューブ（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ　７）を用いて、メタノールに対して４時間広範に透析した。透析後、アリコートを取り出し、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳで分析した。
ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ＲＰモード）：ｍ／ｚ　２１９３Ｄａ（［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）、ｍ／ｚ　２１８５Ｄａ（［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）、ｍ／ｚ　２１７０Ｄａ（［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ－メルカプトエタノール）。
【０３００】
三価ＧａｌＮＡｃ－アジドの合成
中間体１：
ｔｅｒｔ－ブチル１－アジド－１７，１７－ビス（（３－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－３－オキソプロポキシ）メチル）－１５－オキソ－３，６，９，１２，１９－ペンタオキサ－１６－アザドコサン－２２－オエート
ジ－ｔｅｒｔ－ブチル３，３’－（（２－アミノ－２－（（３－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－３－オキソプロポキシ）メチル）プロパン－１，３－ジイル）ビス（オキシ））ジプロピオネート（１．２７ｇ、２．５１ｍｍｏｌ）に、３－アジド（ｐｅｇ４）プロピオン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（９７７ｍｇ、２．５１ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１０ｍＬ）溶液を添加した。次に、ＤＩＰＥＡ（６５７μＬ、３．７７ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（

１００ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液を０．５Ｎの硫酸水素カリウム溶液（２×１００ｍＬ）及びブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥させて濾過し、真空で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－ＤＣＭ中１０％メタノール（ｖ／ｖ）勾配を１００：０から０：１００に上昇）で精製し、表題化合物（１．２７ｇ、６５％）を無色の油状物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％（ＥＬＳＤ）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：７８０［Ｍ＋１］$^{1+}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１０[2]

【０３０１】

中間体２：

１－アジド－１７，１７－ビス（（２－カルボキシエトキシ）メチル）－１５－オキソ－３，６，９，１２，１９－ペンタオキサ－１６－アザドコサン－２２－オイック酸

ｔｅｒｔ－ブチル１－アジド－１７，１７－ビス（（３－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－３－オキソプロポキシ）メチル）－１５－オキソ－３，６，９，１２，１９－ペンタオキサ－１６－アザドコサン－２２－オエート（１．２７ｇ、１．６３ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（５．０ｍＬ）溶液に、ＴＦＡ（５．０ｍＬ、６５ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、トルエン（３×１０ｍＬ）及びＤＣＭ（３×１０ｍＬ）で同時蒸発させて、粗製の表題生成物を無色の油状物として得た。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：６１１［Ｍ＋１］$^{1+}$

【０３０２】

中間体３：

ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（１０－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）－１０－（１３，１３－ジメチル－５，１１－ジオキソ－２，１２－ジオキサ－６，１０－ジアザテトラデシル）－５，１５－ジオキソ－８，１２－ジオキサ－４，１６－ジアザノナデカン－１，１９－ジイル）ジカルバメート

１－アジド－１７，１７－ビス（（２－カルボキシエトキシ）メチル）－１５－オキソ－３，６，９，１２，１９－ペンタオキサ－１６－アザドコサン－２２－オイック酸（９９７ｍｇ、１．６３ｍｍｏｌ）、Ｏｘｙｍａ　Ｐｕｒｅ（１．０４ｇ、７．３５ｍｍｏｌ）及びＥＤＣＩ．ＨＣｌ（１．１７ｇ、６．１２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１０．０ｍＬ）に溶解させた。次に、ＤＩＰＥＡ（１．９９ｍＬ、１１．４ｍｍｏｌ）を添加した後、そのままＮ－ＢＯＣ－１，３－プロパンジアミン（１．０７ｇ、６．１２ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１０．０ｍＬ）溶液に添加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を酢酸エチル（１００ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液を０．５Ｎの硫酸水素カリウム溶液（１００ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（２×１００ｍＬ）及びブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥させて濾過し、真空で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－ＤＣＭ中１０％メタノール（ｖ／ｖ）　勾配を０：１００から１００：０に上昇、生成物が溶出するまで１００：０で維持）で精製し、表題化合物（１．１６ｇ、６６％）を黄色がかった粘性油状物として得た。ＬＣ－ＭＳ　９９％（ＥＬＳＤ）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１０８０［Ｍ＋１］$^{1+}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．５１[3]

【０３０３】

中間体４：

３，３’－（（２－（（３－（（３－アミノプロピル）アミノ）－３－オキソプロポキシ）メチル）－２－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）プロパン－１，３－ジイル）ビス（オキシ））ビス（Ｎ－（３－アミノプロピル）プロパンアミド）トリス（２，２，２－トリフルオロアセテート）の合成

ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（１０－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）－１０－（１３，１３－ジメチル－５，１１－ジオキソ－２，１２

－ジオキサ－６，１０－ジアザテトラデシル）－５，１５－ジオキソ－８，１２－ジオキサ－４，１６－ジアザノナデカン－１，１９－ジイル）ジカルバメート（１．１６ｇ、１．０８ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（１０ｍＬ）溶液に、ＴＦＡ（１０ｍＬ、１３１ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で撹拌した。２時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、トルエン（３×１０ｍＬ）及びＤＣＭ（３×１０ｍＬ）で同時蒸発させて、粗製の表題生成物を黄色がかった粘性油状物として得た。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２６０［Ｍ＋３］$^{3+}$、３９０［Ｍ＋２］$^{2+}$、７８０［Ｍ＋１］$^{1+}$、

【０３０４】

中間体５：

（２Ｒ，３Ｒ，４Ｒ，５Ｒ，６Ｒ）－５－アセトアミド－２－（アセトキシメチル）－６－（（５－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－５－オキソペンチル）オキシ）テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－３，４－ジイルジアセテート

５－（（（２Ｒ，３Ｒ，４Ｒ，５Ｒ，６Ｒ）－３－アセトアミド－４，５－ジアセトキシ－６－（アセトキシメチル）テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－２－イル）オキシ）ペンタン酸（Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ．，２０１４，１３６，１６９５８－１６９６１に従って得られる、３．００ｇ、６．７０ｍｍｏｌ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（９２６ｍｇ、８．０５ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）に溶解させた。次に、ＥＤＣＩ．ＨＣｌ（１．５４ｇ、８．０５ｍｍｏｌ）及び４－（ジメチルアミノ）ピリジン（８２ｍｇ、０．６７ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で一晩撹拌した。反応混合物をＤＣＭで希釈し、得られた溶液を０．５Ｎの硫酸水素カリウム溶液（１５０ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム溶液（１５０ｍＬ）及びブライン（１５０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4上で乾燥させて濾過し、真空で蒸発させて、表題化合物（３．６０ｇ、９９％）を白色の泡状物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９９％（ＥＬＳＤ）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：５４５［Ｍ＋１］$^{1+}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．０７[3]

【０３０５】

中間体６：

［（３Ｒ，６Ｒ）－３，４－ビス（アセチルオキシ）－６－｛４－［（３－｛３－［２－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）－３－（２－｛［３－（５－｛［（２Ｒ，５Ｒ）－４，５－ビス（アセチルオキシ）－６－［（アセチルオキシ）メチル］－３－アセトアミドオキサン－２－イル］オキシ｝ペンタンアミド）プロピル］カルバモイル｝エトキシ）－２－［（２－｛［３－（５－｛［（２Ｒ，５Ｒ）－４，５－ビス（アセチルオキシ）－６－［（アセチルオキシ）メチル］－３－アセトアミドオキサン－２－イル］オキシ｝ペンタンアミド）プロピル］カルバモイル｝エトキシ）メチル］プロポキシ］プロパンアミド｝プロピル）カルバモイル］ブトキシ｝－５－アセトアミドオキサン－２－イル］メチルアセテート

３，３’－（（２－（（３－（（３－アミノプロピル）アミノ）－３－オキソプロポキシ）メチル）－２－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）プロパン－１，３－ジイル）ビス（オキシ））ビス（Ｎ－（３－アミノプロピル）プロパンアミド）トリス（２，２，２－トリフルオロアセテート）（１．２１ｇ、１．０８ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１０ｍＬ）及びＤＩＰＥＡ（１．６９ｍＬ、９．７０ｍｍｏｌ）の混合物に溶解させた。次に、（２Ｒ，３Ｒ，４Ｒ，５Ｒ，６Ｒ）－５－アセトアミド－２－（アセトキシメチル）－６－（（５－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－５－オキソペンチル）オキシ）テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－３，４－ジイルジアセテート（２．２０ｇ、４．０４ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で週末にかけて撹拌した。次に、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ－ＤＣＭ中３０％メタノール（ｖ／ｖ）　勾配を０：１００から１００：０に上昇）で精製し、表題化合物（１．８４ｇ、８３％）を黄色がかった泡状物として得た。ＬＣ－ＭＳ　９５％（ＥＬＳＤ）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０６８［Ｍ＋１］$^{1+}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．１８^{3}
【０３０６】
中間体７：
三価ＧａｌＮＡｃ－アジド
［（３Ｒ，６Ｒ）－３，４－ビス（アセチルオキシ）－６－｛４－［（３－｛３－［２－（１－アジド－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）－３－（２－｛［３－（５－｛［（２Ｒ，５Ｒ）－４，５－ビス（アセチルオキシ）－６－［（アセチルオキシ）メチル］－３－アセトアミドオキサン－２－イル］オキシ｝ペンタンアミド）プロピル］カルバモイル｝エトキシ）－２－［（２－｛［３－（５－｛［（２Ｒ，５Ｒ）－４，５－ビス（アセチルオキシ）－６－［（アセチルオキシ）メチル］－３－アセトアミドオキサン－２－イル］オキシ｝ペンタンアミド）プロピル］カルバモイル｝エトキシ）メチル］プロポキシ］プロパンアミド｝プロピル）カルバモイル］ブトキシ｝－５－アセトアミドオキサン－２－イル］メチルアセテート（３００ｍｇ、０．１４５ｍｍｏｌ）を、トリエチルアミン（２．００ｍＬ、１４．４ｍｍｏｌ）、メタノール（２．００ｍＬ）及び水（２．００ｍＬ）の混合物に溶解させ、反応混合物を室温で撹拌した。２時間後、反応混合物を真空で蒸発させた。残渣を分取ＭＰ－ＬＣで精製した。^{2B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１６４ｍｇ、６７％）を白色の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９７％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６８８［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９９^{1A}
【０３０７】
三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１及びＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１の合成（図２、４）
中間体８：
ＳＯ１８６１－NH_2
ＳＯ１８６１－アジド（６．８９ｍｇ、３．２０μｍｏｌ）を、３２ｍＭの炭酸カリウム（１５０μＬ、４．８０μｍｏｌ）及びアセトニトリル（１５０μＬ）の混合物に溶解させた。その直後に、ＴＨＦ（３２μＬ、３２μｍｏｌ）中の１．０Ｍのトリメチルホスフィン溶液を添加し、得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（５．３０ｍｇ、７８％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９４％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１０６２［Ｍ－２］$^{2-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５１^{1B}
【０３０８】
中間体９：
ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ
ＳＯ１８６１－アミン（４８．６ｍｇ、２２．９μｍｏｌ）及びＤＢＣＯ－ＮＨＳ（１３．０ｍｇ、３２．４μｍｏｌ）に、ＤＩＰＥＡ（５．９８μＬ、３４．３μｍｏｌ）及びＤＭＦ（２．０ｍＬ）の溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。４時間後、反応混合物を５０ｍＭの重炭酸ナトリウム（１．００ｍＬ、５０μｍｏｌ）溶液で希釈した。得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１６．９ｍｇ、３１％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９４％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４１２［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．４５^{1B}
【０３０９】
ＳＯ１８６１－Ｌ－三価ＧａｌＮＡｃの合成
ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ（７．５０ｍｇ、３．１１μｍｏｌ）及び三価ＧａｌＮＡｃ－ア

ジド（５．３１ｍｇ、３．１４μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（２：１、ｖ／ｖ、０．９０ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{3B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（９．６０ｍｇ、７５％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２０５０［Ｍ－２］$^{2-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．０４^{1B}
【０３１０】
ＳＯ１８６１－Ｌ－ＧａｌＮＡｃの合成
ＳＯ１８６１－ＤＢＣＯ（１．７５ｍｇ、０．７３μｍｏｌ）及びＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ３－アジド（０．８２ｍｇ、２．１８μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（１：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{3B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１．６３ｍｇ、８１％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２７９０［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．１５^{1B}
【０３１１】
三価ＧａｌＮＡｃ－ＢＮＡオリゴ合成（図６、７）
中間体１０：
４－｛２－アザトリシクロ［１０．４．０．０^{4,9}］ヘキサデカ－１（１２），４（９），５，７，１３，１５－ヘキサエン－１０－イン－２－イル｝－Ｎ－［２－（２－｛２－［２－（｛４－［（Ｅ）－｛［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド］イミノ｝メチル］フェニル｝ホルムアミド）エトキシ］エトキシ｝エトキシ）エチル］－４－オキソブタンアミド
４－｛２－アザトリシクロ［１０．４．０．０^{4,9}］ヘキサデカ－１（１２），４（９），５，７，１３，１５－ヘキサエン－１０－イン－２－イル｝－Ｎ－｛２－［２－（２－｛２－［（４－ホルミルフェニル）ホルムアミド］エトキシ｝エトキシ）エトキシ］エチル｝－４－オキソブタンアミド（２５．０ｍｇ、４０．９μｍｏｌ）及びＥＭＣＨ．ＴＦＡ（２０．８ｍｇ、６１．３μｍｏｌ）を、メタノール（超無水（ｅｘｔｒａ　ｄｒｙ）、２．００ｍＬ）に溶解させた。次に、ＴＦＡ（９．３９μＬ、１２３μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室内で一晩静置した。反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１６．２ｍｇ、４８％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９１％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：４１０．２［Ｍ＋２］$^{2+}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．４１^{2}
【０３１２】
中間体１１：
三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－マレイミド
三価ＧａｌＮＡｃ－アジド（２０．３ｍｇ、１２．０μｍｏｌ）及び４－｛２－アザトリシクロ［１０．４．０．０^{4,9}］ヘキサデカ－１（１２），４（９），５，７，１３，１５－ヘキサエン－１０－イン－２－イル｝－Ｎ－［２－（２－｛２－［２－（｛４－［（Ｅ）－｛［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド］イミノ｝メチル］フェニル｝ホルムアミド）エトキシ］エトキシ｝エトキシ）エチル］－４－オキソブタンアミド（１１．８ｍｇ、１４．４μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（２：１、ｖ／ｖ、０．９０ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{2C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２５．６ｍｇ、８５％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８８％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１０１［Ｍ－４０５］$^{1-}$、２３０４［Ｍ－２０２］$^{1-}$、２５０７［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９０^{1B}（異性体に起因する二重ピーク）
【０３１３】
中間体１２：
三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－マレイミド
三価ＧａｌＮＡｃ－アジド（２０．３ｍｇ、１２．０μｍｏｌ）及びＤＢＣＯ－マレイミド（１０．３ｍｇ、２４．０μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（２：１、ｖ／ｖ、０．９０ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{2D}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２２．２ｍｇ、８７％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８５％。１０％の加水分解マレイミドを含有する。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１１５［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．６０^{1B}（異性体に起因する二重ピーク）
【０３１４】
三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成
アポＢ　ＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８６μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－マレイミド（３．０２ｍｇ、１．４３μｍｏｌ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１．５時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（６．７５ｍｇ、定量）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９４％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３１８［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．６５^{1A}
【０３１５】
三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）スクランブルＢＮＡオリゴ合成
アポＢスクランブルＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８８μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価ＧａｌＮＡｃ－Ｓ－マレイミド（３．０９ｍｇ、１．４６μｍｏｌ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１．５時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（５．９１ｍｇ、９３％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８８％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３１１［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．６０^{1A}
【０３１６】
三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）ＢＮＡオリゴ合成

アポＢ　ＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８６μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－マレイミド（３．６３ｍｇ、１．４５μｍｏｌ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１．５時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（６．６８ｍｇ、定量）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９９％（極めてブロードなピーク）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４１６［Ｍ－４］$^{4-}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９７^{1A}

【０３１７】

三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－アポＢ（又はＨＳＰ２７）スクランブルＢＮＡオリゴ合成

アポＢスクランブルＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８８μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－マレイミド（３．６８ｍｇ、１．４７μｍｏｌ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１．５時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（４．７１ｍｇ、７１％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９６％（極めてブロードなピーク）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４０９［Ｍ－４］$^{4-}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．９３^{1A}

【０３１８】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃ及びデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－三価ＧａｌＮＡｃの合成

中間体１３：

三価ＧａｌＮＡｃ－アミンホルメート

三価ＧａｌＮＡｃ－アジド（３６．５ｍｇ、２１．６μｍｏｌ）を、炭酸カリウム（５．９７ｍｇ、４３．２μｍｏｌ）の水（１．００ｍＬ）及びアセトニトリル（１．００ｍＬ）溶液に溶解させた。次に、ＴＨＦ（２１６μＬ、２１６μｍｏｌ）中１．０Ｍのトリメチルホスフィン溶液を添加し、得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。４５分後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（９：１、ｖ／ｖ、１ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{2B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（３６．１ｍｇ、９８％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６６２［Ｍ－１］$^{1-}$

ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．６２^{1A}

【０３１９】

中間体１４：

三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ

三価ＧａｌＮＡｃ－アミンホルメート（１７．４ｍｇ、１０．２μｍｏｌ）及びＤＢＣＯ－ＮＨＳ（６．１４ｍｇ、１５．３μｍｏｌ）を、ＮＭＭ（２．２４μＬ、２０．３μｍｏｌ）のＤＭＦ（０．５０ｍＬ）溶液に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（８：２、ｖ／ｖ、１ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{2C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１４．２ｍｇ、７２％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度 ９６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１９５０［Ｍ－１］^{1}
ＬＣ－ＭＳ ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．８６^{1B}

【０３２０】

中間体１５：
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{8}$－アジド
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{8}$－アミン（１９．６ｍｇ、１．０８μｍｏｌ）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－オエート（４．１７ｍｇ、１０．８μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１．５０ｍＬ）に溶解させた。次に、ＤＩＰＥＡ（１．８７μＬ、１０．８μｍｏｌ）を添加し、混合物を１分間振盪させ、室温で一晩静置した。反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１１．７ｍｇ、５９％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度 ９２％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３１６［Ｍ－８］$^{8-}$）：２６４７［Ｍ－７］$^{7-}$
ＬＣ－ＭＳ ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．２９^{1A}

【０３２１】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{4}$－三価ＧａｌＮＡｃの合成
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{4}$－アジド（２．５０ｍｇ、０．２６６μｍｏｌ）、及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ（１．５６ｍｇ、０．７９９μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．７４ｍｇ、９１％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度 ８６％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２８３２［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．０７^{1A}

【０３２２】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{8}$－三価ＧａｌＮＡｃの合成
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{8}$－アジド（２．５０ｍｇ、０．１３５μｍｏｌ）、及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ（０．７９ｍｇ、０．４０５μｍｏｌ）を、水／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．０３ｍｇ、７４％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度 １００％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２５５９［Ｍ－８］$^{8-}$、２９２５［Ｍ－７］$^{7-}$
ＬＣ－ＭＳ ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．１８^{1A}

【０３２３】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{4}$－Ｌ－ＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃ及びデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_{8}$－Ｌ－ＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃの合成
中間体１６：
三価ＧａｌＮＡｃ－チオアセテート
三価ＧａｌＮＡｃ－アミンホルメート（１８．７ｍｇ、１１．０μｍｏｌ）及び４－ニト

ロフェニル３－（アセチルチオ）プロパノエート（５．９０ｍｇ、２１．９μｍｏｌ）を、ＮＭＭ（２．４１μＬ、２１．９μｍｏｌ）のＤＭＦ（０．５０ｍＬ）溶液に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水中０．１％ギ酸及びアセトニトリル中０．１％ギ酸（９：１、ｖ／ｖ、１ｍＬ）の混合物に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取ＭＰ－ＬＣにかけた。[2B]生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１３．０ｍｇ、６６％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１７４９［Ｍ－４３］[1-]、１７９２［Ｍ－１］[1]
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．２４[1B]

【０３２４】

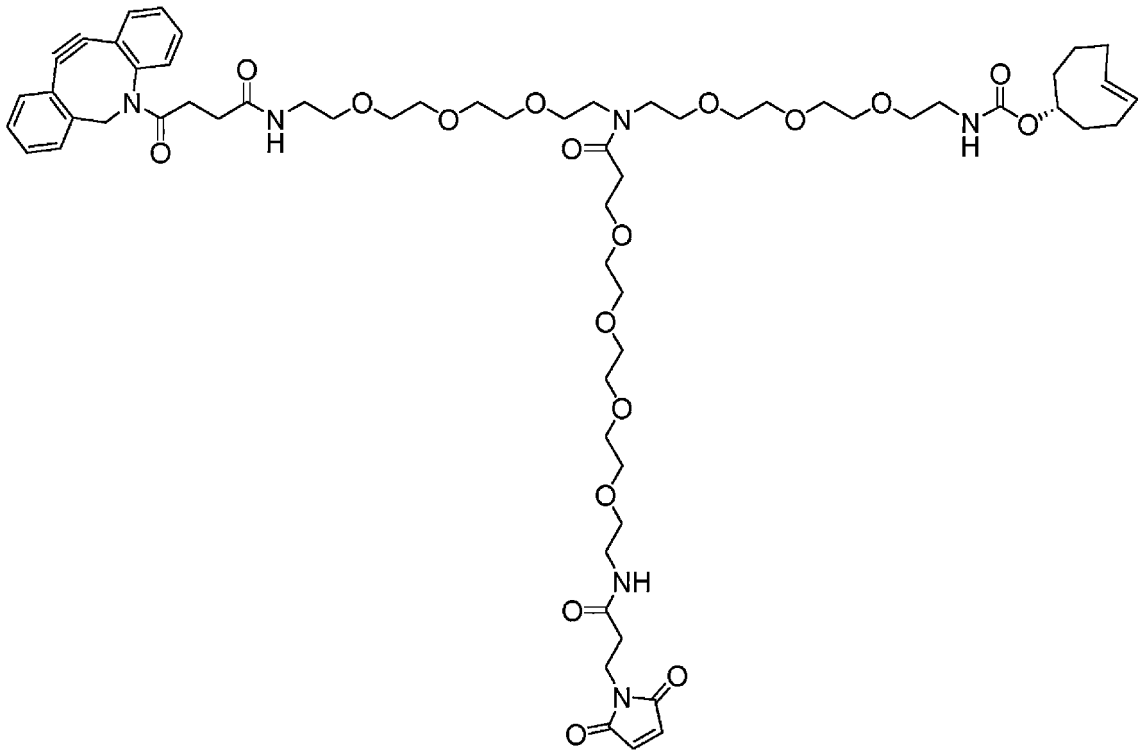
中間体１７：
ＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ
三価ＧａｌＮＡｃ－チオアセテート（１３．０ｍｇ、７．２５μｍｏｌ）をメタノール（０．５０ｍＬ）に溶解させた。次に、１Ｍの水酸化ナトリウム溶液（７．９８μＬ、７．９８μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、新たに調製した三官能基リンカー（Ｌｓ－ｔ）（即ち、サポニン部分リンカーＬｓの一実施例である）の２０ｍＭ重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、２．００ｍＬ）溶液（７．３９ｍｇ、６．１３μｍｏｌ）に、反応混合物を添加した。

【０３２５】

三官能性リンカーのＩＵＰＡＣ名は、５，８，１１，１８，２１，２４，２７－ヘプタオキサ－２，１４，３０－トリアザトリトリアコンタン酸、１４－［１６－（１１，１２－ジデヒドロジベンズ［ｂ，ｆ］アゾシン－５（６Ｈ）－イル）－１３，１６－ジオキソ－３，６，９－トリオキサ－１２－アザヘキサデス－１－イル］－３３－（２，５－ジヒドロ－２，５－ジオキソ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１５，３１－ジオキソ－、（１Ｒ，４Ｅ）－４－シクロオクテン－１－イルエステルである。三官能性リンカーは、以下の式（ＸＸＩ）：

【０３２６】

【化４１】



(XXI)

【０３２７】
を有する。
【０３２８】
得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。[2A]生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（３．８３ｍｇ、２１％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４０９［Ｍ－５４６］$^{1-}$、２９５５［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．６６[1B]
【０３２９】
中間体１８：
メチルテトラジン－Ｌ－アポＢ　ＢＮＡオリゴ
アポＢ　ＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８６μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１．５０ｍＬ）で希釈し、得られた溶液を、そのまま（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１．３６ｍｇ、１．７３μｍｏｌ）のアセトニトリル（０．５ｍＬ）溶液に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を冷凍し

て一晩凍結乾燥させ、粗製の表題生成物をピンク色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１．５０ｍＬ）溶液を添加し、得られた懸濁液を０．４５μｍのシリンジフィルターを通して濾過した。濾液を一晩凍結乾燥させ、表題生成物（５．４４ｍｇ、定量）をピンク色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９０％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２６４８［Ｍ－３］$^{3-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．６２^{4}
【０３３０】
中間体１９：
メチルテトラジン－Ｌ－アポＢスクランブルＢＮＡオリゴ
アポＢスクランブルＢＮＡオリゴジスルフィド（５．００ｍｇ、０．６８８μｍｏｌ）に、２．５ｍＭのＴＣＥＰ（１．００ｍＬ、２．５μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、２×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２．５ｍＭのＴＣＥＰ（０．５０ｍＬ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液で２回洗浄し、その度に上記に記載した同一条件下で濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１．５０ｍＬ）で希釈し、得られた溶液を、そのまま（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（１．３４ｍｇ、１．７０μｍｏｌ）のアセトニトリル（０．５ｍＬ）溶液に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させ、粗製の表題生成物をピンク色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１．５０ｍＬ）溶液を添加し、得られた懸濁液を０．４５μｍのシリンジフィルターを通して濾過した。濾液を一晩凍結乾燥させ、表題生成物（５．４８ｍｇ、定量）をピンク色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８４％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２６３９［Ｍ－３］$^{3-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．５８^{4}
【０３３１】
中間体２０：
ＤＢＣＯ－Ｌ－アポＢ　ＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃ
メチルテトラジン－Ｌ－アポＢ　ＢＮＡオリゴ（５．４４ｍｇ、０．６８４μｍｏｌ）及びＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ（２．０３ｍｇ、０．６８７μｍｏｌ）を、２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．８７ｍｇ、３９％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳは、正確なｍ／ｚ値で複数のブロードピークを示している。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１７５［Ｍ－５］$^{5-}$、２７１８［Ｍ－６］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．６０～３．００^{1A}
【０３３２】
中間体２１：
ＤＢＣＯ－Ｌ－アポＢスクランブルＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃ
メチルテトラジン－Ｌ－アポＢスクランブルＢＮＡオリゴ（５．４８ｍｇ、０．６９２μｍｏｌ）及びＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ（１．８０ｍｇ、０．６０９μｍｏｌ）に、２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一

晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．１５ｍｇ、３３％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳは、正確なｍ／ｚ値で複数のブロードピークを示している。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１６９［Ｍ－５］$^{5-}$、２７１１［Ｍ－６］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．５８～３．２０^{1A}
【０３３３】
三価リンカー－Ｌ－ＳＰＴ００１－（ブロック化ＴＣＯ）－三価ＧａｌＮＡｃの合成
中間体２２（図２５）
三価ＧａｌＮＡｃ－チオール
三価ＧａｌＮＡｃ－チオアセテート（１６．２ｍｇ、９．０２μｍｏｌ）をメタノール（５００μＬ）に溶解させた。次に、１．００Ｍの水酸化ナトリウム溶液（１１．０μＬ、１１．０μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１３．１ｍｇ、８３％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９８％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１７４８［Ｍ－Ｈ］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．７８^{1A}
【０３３４】
中間体２３：（図２５）
ＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ
三官能性リンカー（１５．０ｍｇ、１２．４μｍｏｌ）をアセトニトリル（０．５０ｍＬ）に溶解させた。次に、２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１．５０ｍＬ）溶液を添加し、得られた溶液を、そのまま三価ＧａｌＮＡｃ－チオール（２２．７ｍｇ、１３．０μｍｏｌ）に移した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させ、粗製の表題生成物を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８４％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２４０９［Ｍ－５４６］$^{1-}$、２９５５［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．６３^{1B}
【０３３５】
中間体２４（図２６）：
Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－２－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）フェニル）アセトアミド
メチルテトラジン－ＮＨＳエステル（３０．０ｍｇ、９１．７μｍｏｌ）のＤＭＦ（１．００ｍＬ）溶液に、エタノールアミン（１１．１μＬ、０．１８４ｍｍｏｌ）及びトリエチルアミン（２５．５μＬ、０．１８３ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１９．２ｍｇ、７７％）を紫色の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８９％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２７４［Ｍ＋１］$^{1+}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．８５^{2}
【０３３６】
三価リンカー－Ｌ－ＳＰＴ００１－（ブロック化ＴＣＯ）－三価ＧａｌＮＡｃ
ＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ（３６．８ｍｇ、１２．５μｍｏｌ）のＤＭＦ（２．０ｍＬ）溶液に、ＳＯ１８６１－Ｌ－アジド（２６．８ｍｇ、１２．５μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－２－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）フェニル）アセトアミド（４．０８ｍｇ、１４．９μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（３７．３ｍｇ、５６％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９６％（位置異性体に起因する二重ピーク）。

ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２６７６［Ｍ－２］$^{2-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．２３^{1B}
【０３３７】
三価リンカー－（ブロック化ＤＢＣＯ）－ＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃの合成
中間体２５（図２７）：
メチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ
チオール－１３－アポＢ　ＢＮＡオリゴジスルフィド（２０ｍｇ、４．１７μｍｏｌ）に、５．０ｍＭのＴＣＥＰ（２．００ｍＬ、１０．０μｍｏｌ）を含有する２０ｍＭの重炭酸アンモニウム溶液に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、３０００Ｄａの分画分子量で遠心濾過機を使用することによって（３０分間で５０００×ｇ、４×０．５０ｍＬ）、反応混合物を濾過した。次に、残渣溶液を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（３．００ｍＬ）で希釈し、得られた溶液を、そのまま（Ｅ）－１－（４－（（２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル）ヒドラジンイリデン）メチル）ベンズアミド）－Ｎ－（４－（６－メチル－１，２，４，５－テトラジン－３－イル）ベンジル）－６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド（７．２２ｍｇ、９．１６μｍｏｌ）のアセトニトリル（１．０ｍＬ）溶液に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。１時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させ、粗製の表題生成物をピンク色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（２：１、ｖ／ｖ、２．００ｍＬ）を添加し、得られた溶液を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{1A}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２０．３ｍｇ、８９％）をピンク色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９３％（ブロードピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１８１７［Ｍ－３］$^{3-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：０．５９^{3}
【０３３８】
中間体２６（図２７）：
（ブロック化ＤＢＣＯ）－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ
１－アジド－３，６，９－トリオキサウンデカン－１１－オール（２．１７ｍｇ、９．８８μｍｏｌ）のＤＭＦ（０．５０ｍＬ）溶液を、ＤＢＣＯ－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ（１４．６ｍｇ、４．９４μｍｏｌ）に添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。^{1C}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１０．００ｍｇ、６４％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９８％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１７５０［フラグメント］
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．３３^{1B}
【０３３９】
三価リンカー－（ブロック化ＤＢＣＯ）－ＢＮＡオリゴ－三価ＧａｌＮＡｃ
（ブロック化ＤＢＣＯ）－ＴＣＯ－三価ＧａｌＮＡｃ（１０．０ｍｇ、３．１５μｍｏｌ）及びメチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ（１０．０ｍｇ、１．８３μｍｏｌ）を、２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）溶液に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させた。粗組成物を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１ｍＬ）に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{1B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１１．３ｍｇ、７２％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９５％（位置異性体に起因する複数の（ブロード）ピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２１４９［Ｍ－４］$^{4-}$、２８６６［Ｍ－３］$^{3-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：２．９２^{1A}
【０３４０】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－アミン（分子１５）
　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）ホルメート（２．７３ｍｇ、３．１３μｍｏｌ）を、２０ｍＭのNH_4HCO_3と０．５ｍＭのＴＣＥＰ／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、３．００ｍＬ）との混合物に溶解させた。次に、ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ（２９．２ｍｇ、０．０１４ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を室温で撹拌した。１．５時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。[3B]生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１２．３ｍｇ、４３％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９７％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１５１７［Ｍ－６］$^{6-}$、１８２１［Ｍ－５］$^{5-}$、２２７６［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．３９[5A]
【０３４１】
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃ（図３３Ａ～Ｃ）及びデンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－三価ＧａｌＮＡｃの合成
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－アジド（分子１９）
デンドロン（ＳＰＴ００１）$_4$－NH_2（分子１５、図３３Ｂ）（このアミンデンドロンは、塩基としてＤＩＰＥＡを含有するＤＭＦ中のアジド－ＰＥＧ$_4$－ＮＨＳエステル（分子１８）で処置したものである）をベースにして、デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－アジドを合成した。
【０３４２】
三価ＧａｌＮＡｃ－アミンホルメート（図３３Ｃの分子２２）
　三価ＧａｌＮＡｃ－アジド（３６．５ｍｇ、２１．６μｍｏｌ；図３３Ｃの分子２１）を、炭酸カリウム（５．９７ｍｇ、４３．２μｍｏｌ）の水（１．００ｍＬ）及びアセトニトリル（１．００ｍＬ）溶液に溶解させた。次に、ＴＨＦ（２１６μＬ、２１６μｍｏｌ）中１．０Ｍのトリメチルホスフィン溶液を添加し、得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。４５分後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（９：１、ｖ／ｖ、１ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取ＭＰ－ＬＣにかけた。[2B]生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（３６．１ｍｇ、９８％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１６６２［Ｍ－１］$^{1-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．６２[1A]
【０３４３】
三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ（図３３Ｃの分子２３）
　三価ＧａｌＮＡｃ－アミンホルメート（１７．４ｍｇ、１０．２μｍｏｌ；分子２２）及びＤＢＣＯ－ＮＨＳ（６．１４ｍｇ、１５．３μｍｏｌ；図３３Ｃの分子１０）を、ＮＭＭ（２．２４μＬ、２０．３μｍｏｌ）のＤＭＦ（０．５０ｍＬ）溶液に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（８：２、ｖ／ｖ、１ｍＬ）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取ＭＰ－ＬＣにかけた。[2C]生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１４．２ｍｇ、７２％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９６％。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：１９５０［Ｍ－１］^{1}
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：１．８６[1B]
【０３４４】
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－アジド
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－アミン（１９．６ｍｇ、１．０８μｍｏｌ）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－オエート（４．１７ｍｇ、１０．８μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（１．５０ｍＬ）に溶解させた。次に、ＤＩＰＥＡ（１．８７μＬ、１０．８μｍｏｌ）を添加し、混合物を１分間振盪させ、室温で一晩静置した。反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（１１．７ｍｇ、５９％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　９２％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２３１６［Ｍ－８］$^{8-}$）：２６４７［Ｍ－７］$^{7-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．２９^{1A}

【０３４５】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－三価ＧａｌＮＡｃ（図３３Ｃの分子２４）の合成
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_4$－アジド（２．５０ｍｇ、０．２６６μｍｏｌ；図３３Ａ～Ｃに示すような合成、図３３Ｃの分子１９）、及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ（１．５６ｍｇ、０．７９９μｍｏｌ；図３３Ｃの分子２３））を、水／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．７４ｍｇ、９１％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　８６％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２８３２［Ｍ－４］$^{4-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．０７^{1A}

【０３４６】

デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－三価ＧａｌＮＡｃの合成
デンドロン（－Ｌ－ＳＯ１８６１）$_8$－アジド（２．５０ｍｇ、０．１３５μｍｏｌ）、及び三価ＧａｌＮＡｃ－ＤＢＣＯ（０．７９ｍｇ、０．４０５μｍｏｌ；図３３Ｃの分子２３）を、水／アセトニトリル（３：１、ｖ／ｖ、１．００ｍＬ）の混合物に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＬＣ－ＭＳにかけた。^{4B}生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（２．０３ｍｇ、７４％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳに基づく純度　１００％（極めてブロードなピーク）。
ＬＲＭＳ（ｍ／ｚ）：２５５９［Ｍ－８］$^{8-}$、２９２５［Ｍ－７］$^{7-}$
ＬＣ－ＭＳ　ｒ．ｔ．（ｍｉｎ）：４．１８^{1A}

【０３４７】

抗ＣＤ７１－サポリンの合成
Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）から、カスタムＣＤ７１　ｍａｂ－サポリンコンジュゲートを生成させ、これを購入した。ＣＤ７１モノクローナル抗体をＩｎＶｉｖｏＭａｂから、抗ヒトＣＤ７１（ＯＫＴ－９）をＢｉｏＸＣｅｌｌから購入した。

【０３４８】

ＨＳＰ２７ＢＮＡ、アポＢ及びアポＢ$_{scrambled}$、並びにアポＢ＃０２オリゴ配列

ＨＳＰ２７（５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’）［配列番号１］（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］によるオリゴ核酸配列５’－ＧＧＣａｃａｇｃｃａｇｔｇＧＣＧ－３’を有するＢＮＡ、より具体的には^{NC}ＢＮＡであった

）、アポＢ（５’－ＧＣＣＴＣａｇｔｃｔｇｃｔｔｃＧＣＡＣＣ－３’）［配列番号２］及びアポＢｓｃｒａｍｂｌｅｄ（５’－ＧＧＣＣＴｃｔｃｔａｃａｃｃｇＣＴＣＧＴ－３’）［配列番号３］、並びにマウス及びヒト配列と適合性のあるアポＢ＃０２（５’－ＧＣａｔｔｇｇｔａｔＴＣＡ－３’）［配列番号１２］ＢＮＡ^{NC}オリゴを、５’チオールＣ６リンカーと共に、ＢＮＡ塩基を大文字で示し、完全なホスホロチオエート主鎖を有するものをＢｉｏ－Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｉｎｃで注文した。（Ｌｅｗｉｓｖｉｌｌｅ、Ｔｅｘａｓ）。

【０３４９】

ヒト細胞培養物からのＲＮＡ単離及び遺伝子発現解析

細胞からＲＮＡを単離し、標準的な手順（Ｂｉｏｒａｄ）に従って分析した。使用したｑＰＣＲプライマーを表Ａ２に示す。

【０３５０】

【表１】

表 A2. qPCR に使用したプライマーを下記に示す:

遺伝子	プライマー	配列(5′-3′)
HSP27	順方向	GCAGTCCAACGAGATCACCA [配列番号 4]
	逆方向	TAAGGCTTTACTTGGCGGCA [配列番号 5]
アポ B	順方向	AGGGTCCGGGAATCTGATGA [配列番号 6]
	逆方向	TGGGCACGTTGTCTTTCAGAG [配列番号 7]
HBMS	順方向	CACCCACACACAGCCTACTT [配列番号 8]
	逆方向	GTACCCACGCGAATCACTCT [配列番号 9]
GUSB	順方向	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCT [配列番号 10]
	逆方向	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA [配列番号 11]

【０３５１】

細胞生存率アッセイ（ＭＴＳ）

処置後に細胞を３７℃で７２時間インキュベートし、その後、細胞生存率をＭＴＳアッセイで測定し、製造業者の指示書（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　９６（登録商標）ＡＱｕｅｏｕｓ　Ｏｎｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ細胞増殖アッセイ、Ｐｒｏｍｅｇａ）に従って実行した。要約すると、１０％ＦＢＳを補充した、フェノールレッド不含ＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）で、ＭＴＳ溶液を２０倍に希釈した。細胞を２００μＬ／ＰＢＳウェルで一度洗浄し、その後１００μＬの希釈したＭＴＳ溶液をウェル毎に添加した。プレートを３７℃で約２０～３０分間インキュベートした。続いて、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣプレートリーダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で４９２ｎｍのＯＤを測定した。定量化のため、「培地のみ」の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き、その後、処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルを未処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルに対して除算する（×１００）ことによって処置細胞／未処置細胞の細胞生存率の百分率を算出した。

【０３５２】

細胞生存率アッセイ（ＣＴＧ）

処置後に細胞を３７℃で７２時間インキュベートし、その後、細胞生存率をＣＴＧアッセイで測定し、製造業者の指示書（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）２．０細胞生存アッセイ、Ｐｒｏｍｅｇａ）に従って実行した。要約すると、細胞プレートを最初に室温で３０分間平衡化した。次に、１２０μＬの処置培地を含有する各ウェルに、１２０

μＬのＣＴＧ溶液を添加した。プレートを短時間で混合し（１０秒、６００ｒｐｍ）、暗所で約１０分間、室温でインキュベートした。続いて、発光シグナルをＳｐｅｃｔｒａｍａｘ　ＩＤ５プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で測定した。定量化のため、「培地のみ」の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き、その後、処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルを未処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルに対して除算する（×１００）ことによって処置細胞／未処置細胞の細胞生存率の百分率を算出した。

【０３５３】

ＦＡＣＳ分析

Ｔ７５フラスコ中の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）を補充したＤＭＥＭ（ＰＡＮ－Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ）に、細胞をそれぞれの細胞株に適切な密度で播種し、コンフルエンシーが９０％に到達するまで７２～９６時間インキュベートした（５％　CO_2、３７℃）。次に、細胞をトリプシン処理（ＴｒｙｐｌＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ、Ｇｉｂｃｏ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）して単一細胞とし、１５ｍＬのｆａｌｃｏｎチューブに移して遠心分離した（１，４００ｒｐｍ、３分）。細胞ペレットを浸したままで上清を捨てた。５００．０００個の細胞を丸底ＦＡＣＳチューブに移し、３ｍＬの冷ＤＰＢＳ（Mg^{2+}及びCa^{2+}フリー、２％ＦＢＳ）で洗浄した。細胞を１８００ｒｐｍで３分間、４℃で遠心分離し、２００μＬの冷ＤＰＢＳ（Mg^{2+}及びCa^{2+}フリー、２％ＦＢＳ）又は１９５μＬの冷ＤＰＢＳ（Mg^{2+}及びCa^{2+}フリー、２％ＦＢＳ）中に５μＬの抗体を含有する２００μＬの抗体溶液に再懸濁した。トランスフェリン受容体を染色するためにＰＥ抗ヒトＣＤ７１（＃３３４１０６、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を使用し、それに一致するアイソタイプ対照として、ＰＥマウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ対照ＦＣ（＃４００２１２、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を使用した。ＡＳＧＰＲ１受容体を染色するためにＰＥ抗ヒトＡＳＧＰＲ１（＃１３０－１２２－９６３、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用し、それに一致するアイソタイプ対照としてＰＥマウスＩｇＧ１、アイソタイプ対照（＃１３０－１１３－７６２、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用した。試料を４℃で３０分間インキュベートした。その後、細胞を冷ＤＰＢＳ（Mg^{2+}及びCa^{2+}フリー、２％ＦＢＳ）で２回洗浄し、ＤＰＢＳ（Mg^{2+}及びCa^{2+}フリー、２％ＦＢＳ）中２％ＰＦＡ溶液を使用して室温で２０分間固定化した。細胞を冷ＤＰＢＳで１回洗浄し、ＦＡＣＳ分析のために１０００μＬの冷ＤＰＢＳ中に再懸濁した。Ｓｙｓｍｅｘ　Ｃｕｂｅ　８フローサイトメトリーシステム（Ｓｙｓｍｅｘ）及びＦＣＳ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　７　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ｅｄｉｔｉｏｎソフトウェアで試料を分析した。ＦＡＣＳ分析の結果は、表Ａ３にまとめられている。

【０３５４】

【表２】

表A3. HepG2及びHuh7細胞のASPGR1及びCD71の細胞膜受容体での発現レベル

細胞株	ASPGR1 発現レベル (MFI)	CD71 発現レベル (MFI)
HepG2	8.8	74.7
Huh7	1.6	109

【０３５５】

マウス初代肝細胞の処置

凍結保存した初代マウス肝細胞（ＰＲＩＭＡＣＹＴ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｔｅ

ｃｈｎｏｌｏｇｙ ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を、肝細胞解凍培地（ＨＴＭ、ＰＲＩＭＡＣＹＴ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）中で解凍し、肝細胞洗浄培地（ＨＷＭ、ＰＲＩＭＡＣＹＴ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）で１回洗浄した。肝細胞プレーティング培地（ＨＰＭ Ｃｒｙｏ、ＰＲＩＭＡＣＹＴ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）中に、細胞を約０．２７５×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で再懸濁した。Ｉ型コラーゲンコートプレートに、４８又は９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ ＢｉｏＯｎｅ）に対して８８．０００細胞／ウェル又は２６．４００細胞／ウェルの密度で細胞を播種した。処置を開始する前に、細胞培養プレートに細胞接着させるため、細胞を３７℃で４～６時間前培養した。プレーティング培地を３１５μｌ又は１０８μｌのアッセイ培地（ＭＨＭ、ＰＲＩＭＡＣＹＴ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に置き換え、その後、ＰＢＳ中１０倍の濃度のストック溶液からコンジュゲートを添加した。プレートを３７℃で７２時間インキュベートし、遺伝子発現及び細胞生存率を分析するために採取した。

【０３５６】

ヒト初代肝細胞の処置

凍結保存した初代ヒト肝細胞（Ｃｙｔｅｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｓ．Ｌ．、Ｓｐａｉｎ）を肝細胞解凍培地（Ｃｙｔｅｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｓ．Ｌ．、Ｓｐａｉｎ）中で解凍した。細胞を肝細胞プレーティング培地（Ｃｙｔｅｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｓ．Ｌ．、Ｓｐａｉｎ）中に再懸濁した。Ｉ型コラーゲンコートプレートに、４８又は９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ ＢｉｏＯｎｅ）に対して２１５．６００細胞／ウェル又は６６．６００細胞／ウェルの密度で細胞を播種した。処置を開始する前に、細胞培養プレートに細胞接着させるため、細胞を３７℃で４～６時間前培養した。プレーティング培地を３１５μｌ又は１０８μｌの維持培地（Ｃｙｔｅｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｓ．Ｌ．、Ｓｐａｉｎ）に置き換え、その後、ＰＢＳ中１０倍の濃度のストック溶液からコンジュゲートを添加した。プレートを３７℃で７２時間インキュベートし、遺伝子発現及び細胞生存率を分析するために採取した。

【０３５７】

初代マウス及びヒト肝細胞からのＲＮＡ単離及び遺伝子発現解析

ＴＲＩ Ｒｅａｇｅｎｔ（登録商標）溶液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を製造業者の指示書に従って使用して、細胞からＲＮＡを単離した。標準的な手順を用いて、ｉＳｃｒｉｐｔ（商標）ｃＤＮＡ合成キット（Ｂｉｏｒａｄ）を使用してｃＤＮＡへの変換を行った。アポＢ発現レベルと特異的肝細胞ハウスキーピング遺伝子のレベルを、表Ａ４に列挙した特異的ＤＮＡプライマーを含む、ｉＴａｑ（商標）Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ＢｉｏＲａｄ）及びＬｉｇｈｔ Ｃｙｃｌｅｒ ４８０（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｒｏｔｋｒｅｕｚ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を使用する、定量的リアルタイムＰＣＲアッセイ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を使用して測定した。アポＢの発現を２つの肝細胞特異的ハウスキーピング対照ｍＲＮＡと比較して測定するため、ΔＣｔ法によって分析を行った。各分析反応を３回実施した。

【０３５８】

【表３】

表 A4. マウス初代肝細胞の qPCR 分析に使用したプライマー

アポ B#02	順方向	GCTAACACTAAGAACCAGAAGATC [配列番号 13]
	逆方向	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [配列番号 14]
Mm PPIA	順方向	GCGGCAGGTCCATCTACG [配列番号 15]
	逆方向	GCCATCCAGCCATTCAGTC [配列番号 16]
Mm SDHA	順方向	GAGGAAGCACACCCTCTCAT [配列番号 17]
	逆方向	GGAGCGGATAGCAGGAGGTA [配列番号 18]

【０３５９】

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊモデルにおける三価ＧａｌＮＡｃ－コンジュゲートのインビボ忍容性及び有効性

・用量投与及び生存段階。各群につき、到着して約６～７週齢、投薬時には８～９週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊ雄マウスを、処置群の場合は８頭、溶媒対照群の場合は１４頭で投与した。表Ａ５に従い、ＰＢＳ中に製剤化した化合物又はＰＢＳ単独（溶媒）を、個々の体重に対応する用量容積で、尾静脈（静脈内、ｉｖ）に５ｍｌ／ｋｇで投与した。適用可能な場合、三価ＧａｌＮＡｃ－アポＢコンジュゲートの直後に三価ＧａｌＮＡｃ－ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを尾静脈（ｉｖ）に５ｍｌ／ｋｇで同時投与した。動物を毎週計量し、最初の４８時間以内は毎日２～３回、その後、試験が終了するまで少なくとも１日１回の臨床観察を実施した。

・血清、肝臓組織、及び腎臓組織の採取。投与前（ｂｅｆｏｒｅ　ｄｏｓｉｎｇ）（投与前（ｐｒｅｄｏｓｅ））、並びに投与後の２４時間、７２時間、１９６時間、及び３３６時間に血液を採取し、バイオマーカー分析のため、採取した血液から標準的な手順を用いて血清を生成した。投与後の２４時間及び７２時間時点で、時点毎に治療群につき３頭の動物を、溶媒対照群で６頭の動物を　　殺し、さらなる分析のために最終出血並びに肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節組織を採取した。３３６時間時点での試験の終了時には、各群につき残りの２頭の動物（対照群で４頭）を　　殺した。肝臓の半分と１つの腎臓とを冷凍し、組織ＲＮＡ分析に使用した。

【０３６０】

【表４】

表 A5. 三価 GalNAc-コンジュゲートの*インビボ*忍容性及び有効性の実験デザイン

群	コンジュゲート	用量 [mg/kg]	投与された相対 BNA 用量 [mg/kg]	同時投与された三価 GalNAc-SO1861-EMCH 用量[mg/kg]
1	PBS(溶媒)	n/a	0	
2	アポ BBNA#02	0,1	0,1	
3	アポ BBNA#02	1	1	
4	アポ BBNA#02	2	2	
5	(GalNAc)3-アポ BBNA#02	0.1	0.058	
6	(GalNAc)3-アポ BBNA#02	1	0.58	
7	(GalNAc)3-アポ BBNA#02	0.01	0.0058	5
8	(GalNAc)3-アポ BBNA#02	0.1	0.058	5

【０３６１】

肝臓組織のバイオマーカーＲＮＡ分析

製造業者の指示書に従い、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、冷凍した肝臓組織からｍＲＮＡを単離した。ｉＳｃｒｉｐｔ（商標）ｃＤＮＡ合成キット（Ｂｉｏｒａｄ）を使用して、ｃＤＮＡへの変換を行った。アポＢ発現レベルと特異的肝臓ハウスキーピング遺伝子のレベルを、表Ａ５に列挙した特異的ＤＮＡプライマーを含む、ｉＴａｑ（商標）Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ＢｉｏＲａｄ）及びＬｉｇｈｔ Ｃｙｃｌｅｒ ４８０（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｒｏｔｋｒｅｕｚ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を使用する、定量的リアルタイムＰＣＲアッセイ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を使用して測定した。アポＢの発現を２つの肝臓特異的ハウスキーピング対照ｍＲＮＡと比較して測定するため、ΔＣｔ法によって分析を行った。各分析反応を３回実施した。

【０３６２】

【表５】

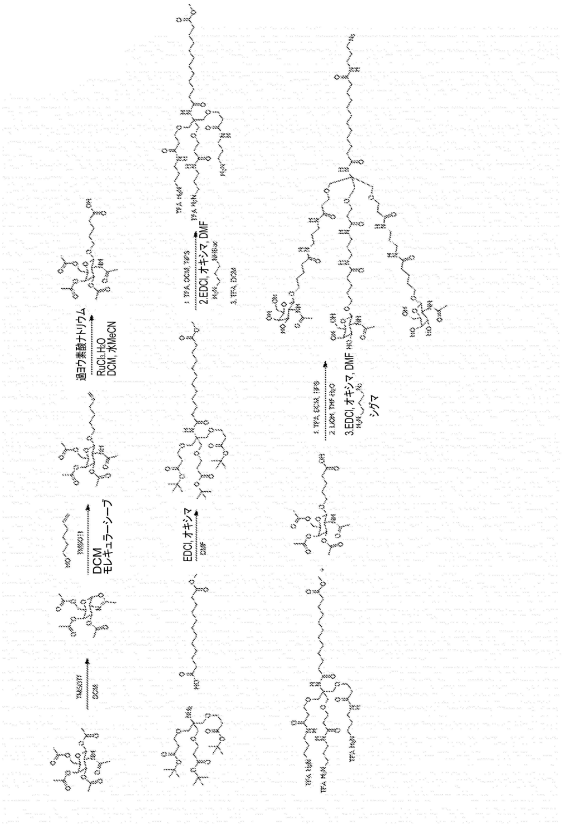
表 A6. 肝臓組織の qPCR 分析に使用したプライマー

アポ B#02	順方向	GCTAACACTAAGAACCAGAAGATC [配列番号 13]
	逆方向	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [配列番号 14]
Mm RSP17	順方向	GTGCGAGGAGATCGCCATTA [配列番号 19]
	逆方向	ATCCGCTTCATCAGATGCGT [配列番号 20]
Mm SDHA	順方向	GAGGAAGCACACCCTCTCAT [配列番号 17]
	逆方向	GGAGCGGATAGCAGGAGGTA [配列番号 18]

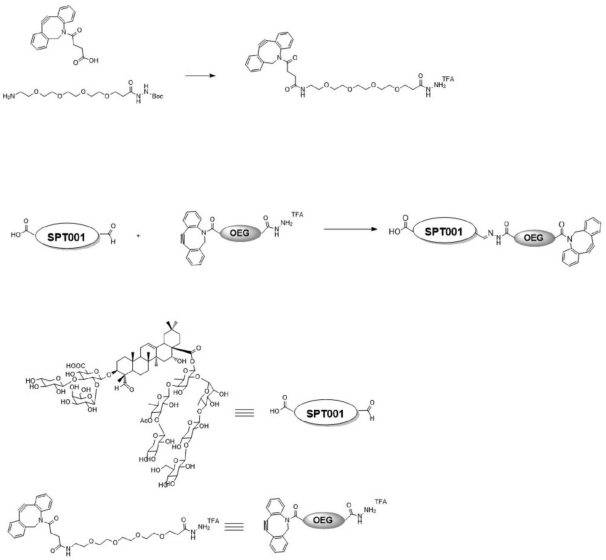
【０３６３】
バイオマーカー分析　アポＢタンパク質
　製造業者の指示書に従い、アポＢ　ＥＬＩＳＡ（ａｂ２３０９３２、Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）を使用して、マウス血清中のアポＢタンパク質レベルを測定した。１ｍｇ／ｋｇのアポＢ＃０２及び０．０１ｍｇ／ｋｇのＧａｌＮＡｃ３－アポＢ＃０３＋５ｍｇ／ｋｇの（ＧａｌＮＡｃ）３－ＳＯ８６１群からの試料については、３３６時間時点で分析しなかったことに留意されたい。
【０３６４】
バイオマーカー分析　コレステロール
　製造業者の指示書に従い、光度測定により、ＬＤＬコレステロールに特異的なＢｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ社製の２段階のＡＵ４８０アッセイキットをそれぞれ使用して、マウス血清中のＬＤＬコレステロールを測定した。
【０３６５】
バイオマーカー分析　コレステロール
　製造業者の指示書に従い、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ社製ＡＵ４８０アッセイキットを使用して（光度測定）、血清アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）レベルを測定した。

【図面】

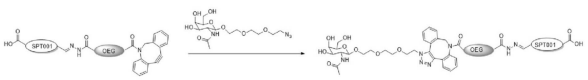
【図１】



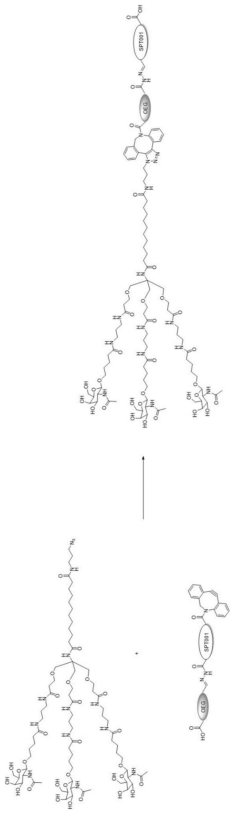
【図２】



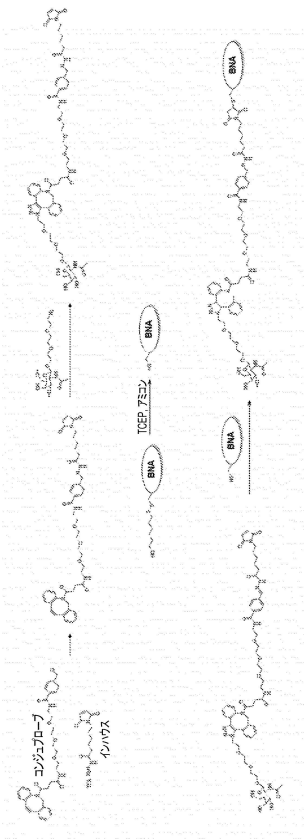
【図３】



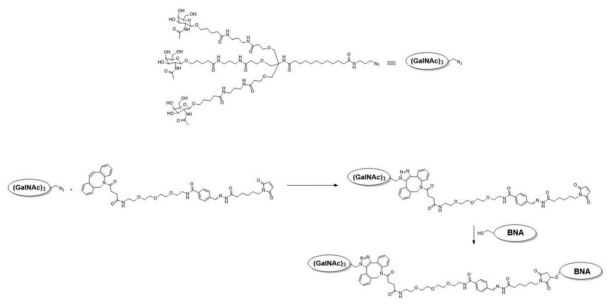
【図４】



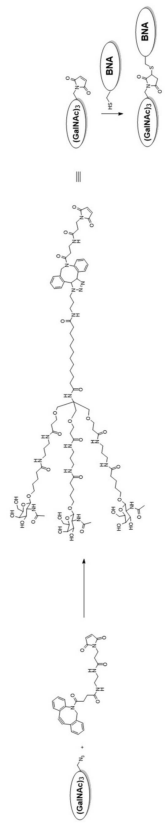
【図５】


BNA
TCEP, アミン
BNA
BNA
BNA
コンジュゲーブ
インバクス

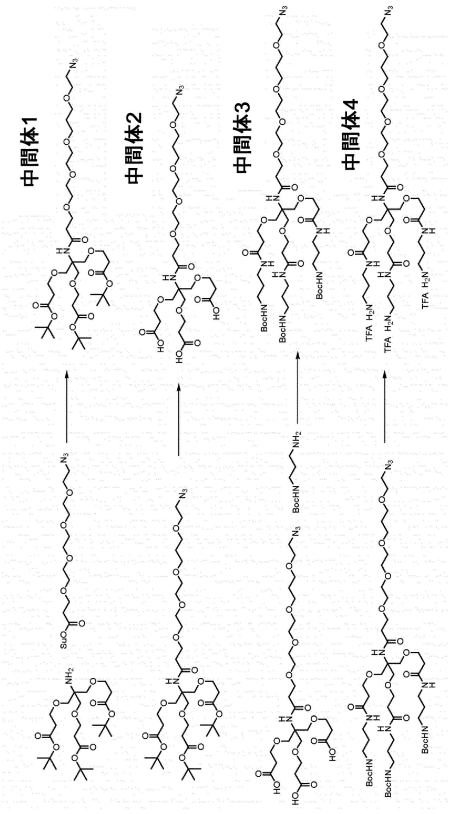
【図６】


(GalNAc)3
(GalNAc)3
(GalNAc)3
BNA
(GalNAc)3
BNA

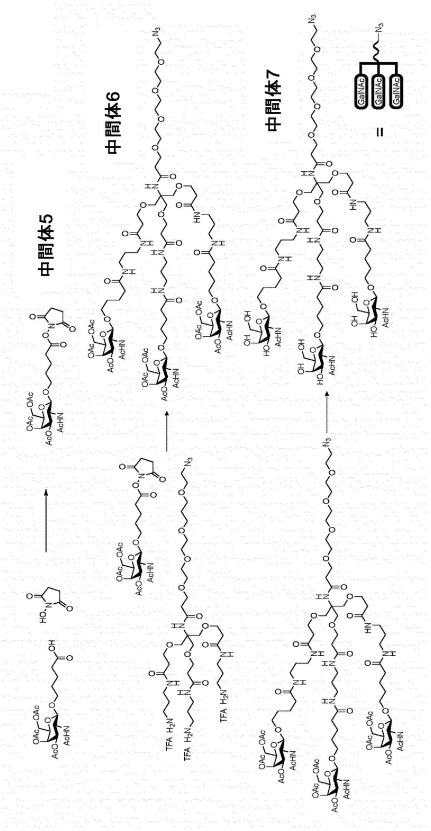
【図７】


BNA
BNA
(GalNAc)3
(GalNAc)3
(GalNAc)3

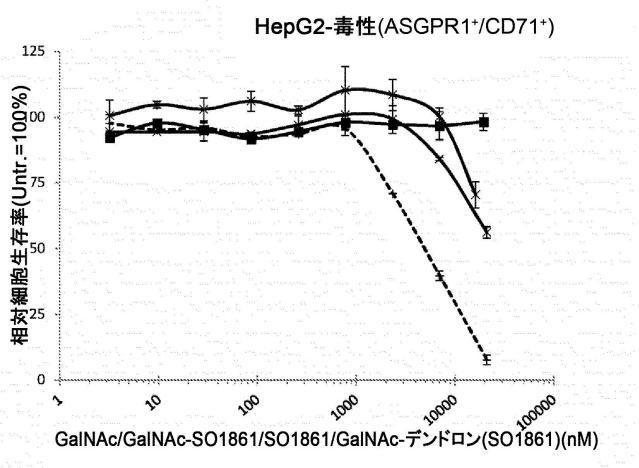
【図８Ａ】


中間体1
中間体2
中間体3
中間体4

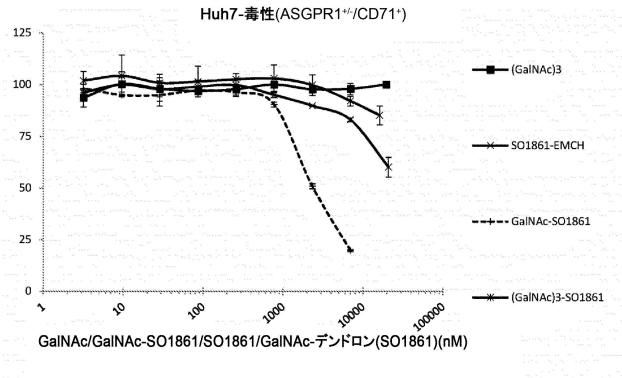
【図８Ｂ】



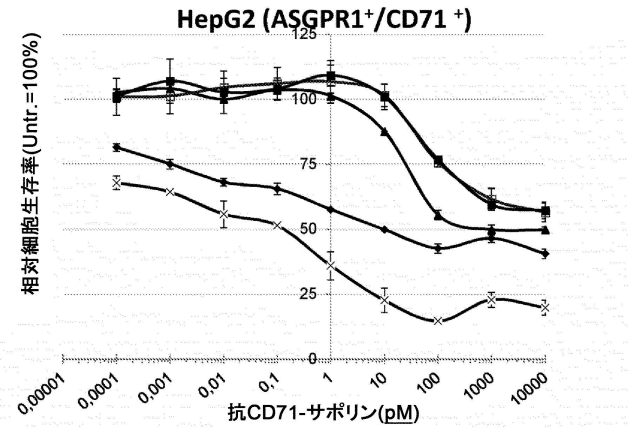
【図９Ａ】



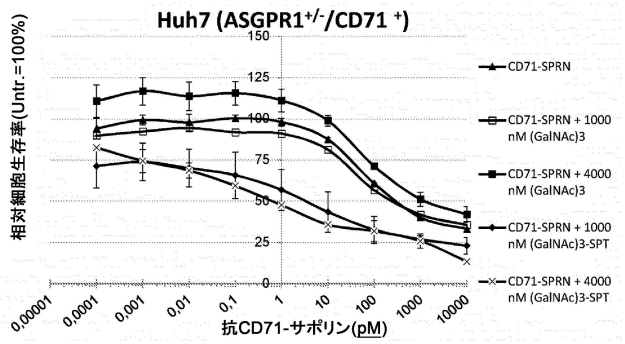
【図９Ｂ】



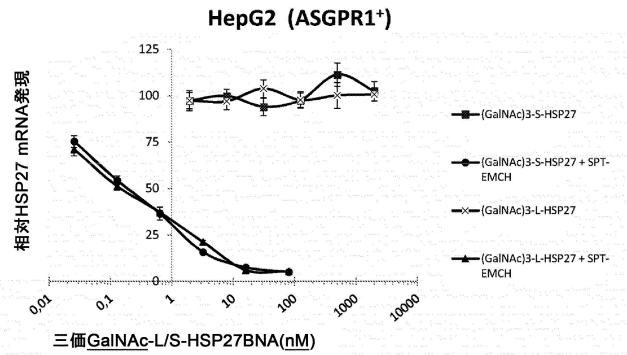
【図１０Ａ】



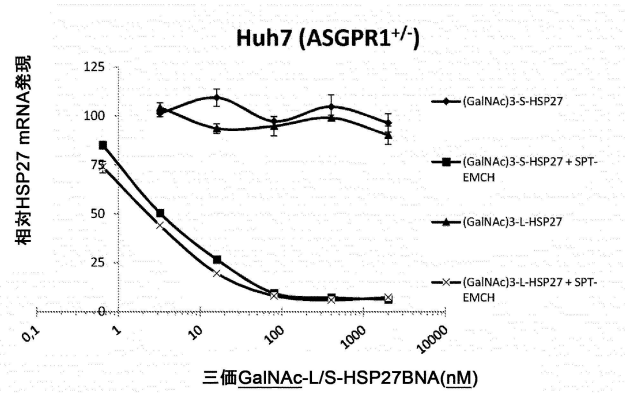
【図１０Ｂ】



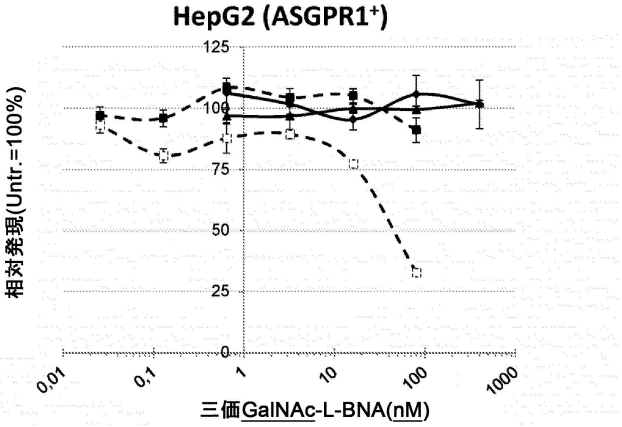
【図１１Ａ】



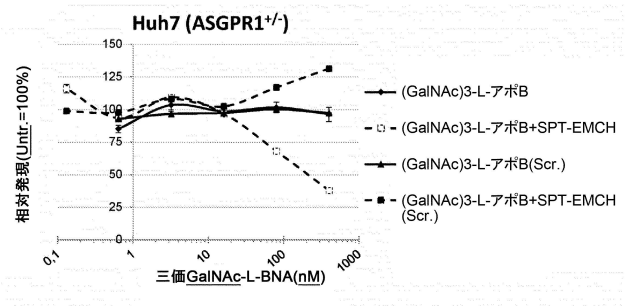
【図１１Ｂ】



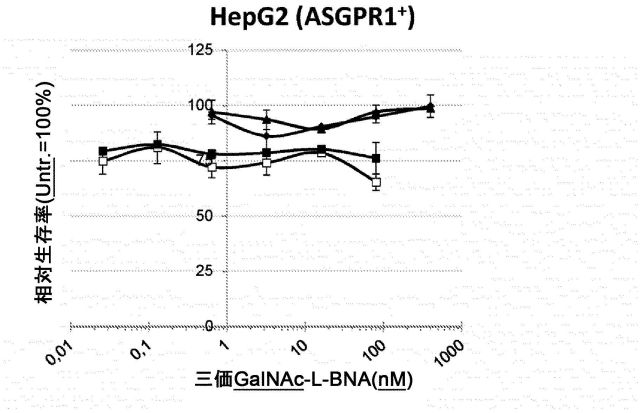
【図１２Ａ】



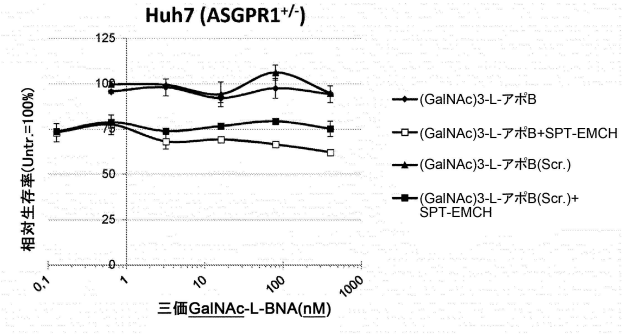
【図１２Ｂ】



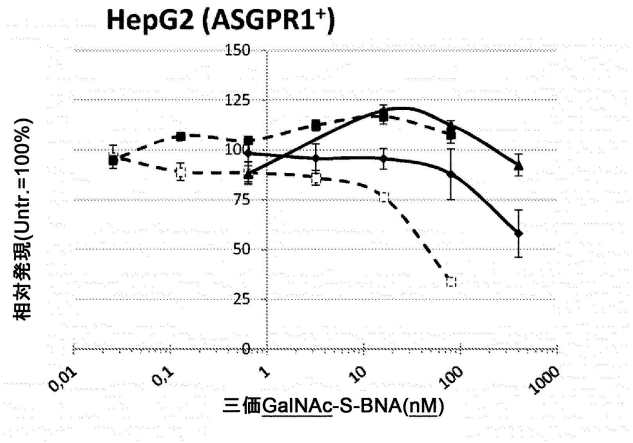
【図１３Ａ】



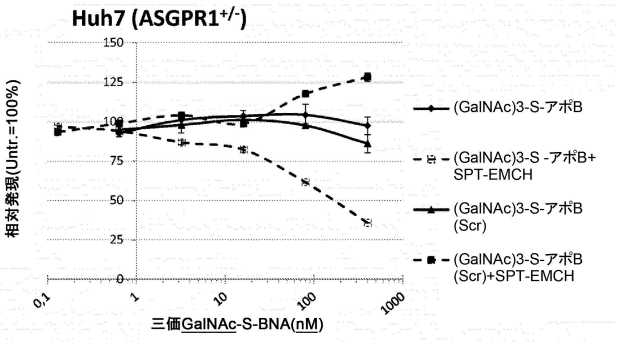
【図１３Ｂ】



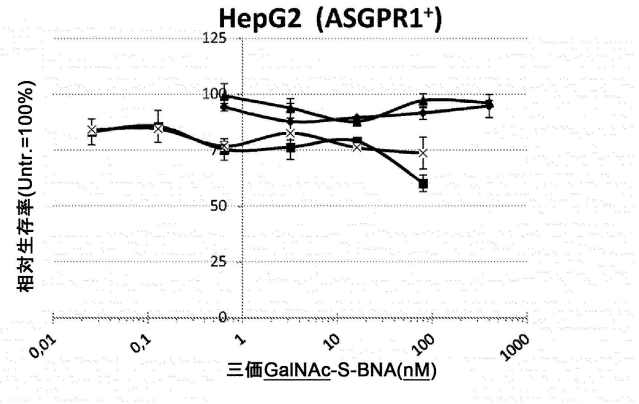
【図１４Ａ】



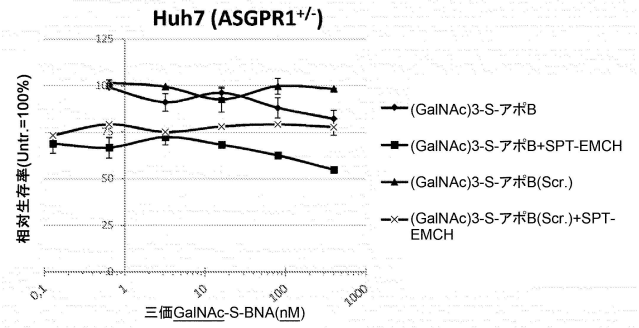
【図１４Ｂ】



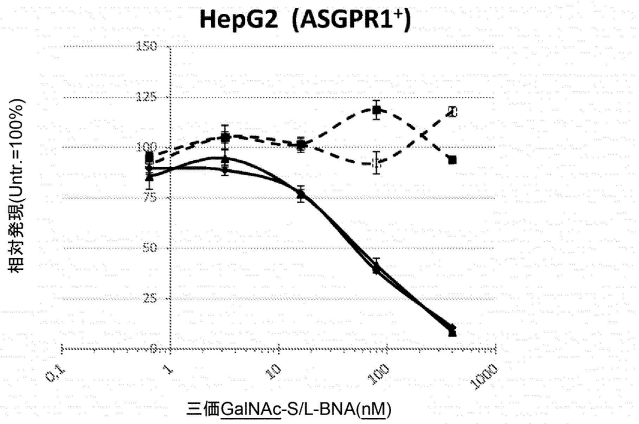
【図１５Ａ】



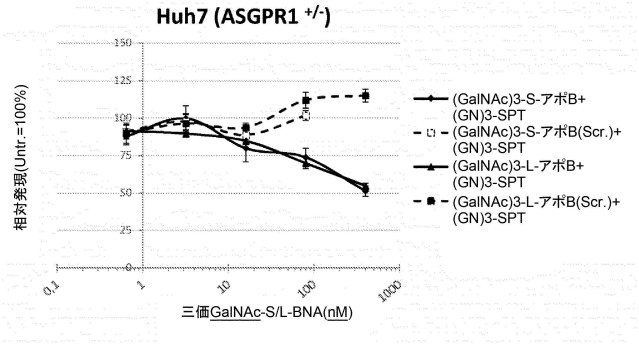
【図１５Ｂ】



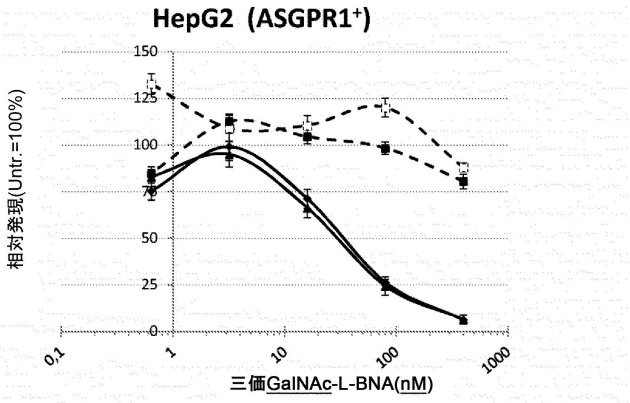
【図１６Ａ】



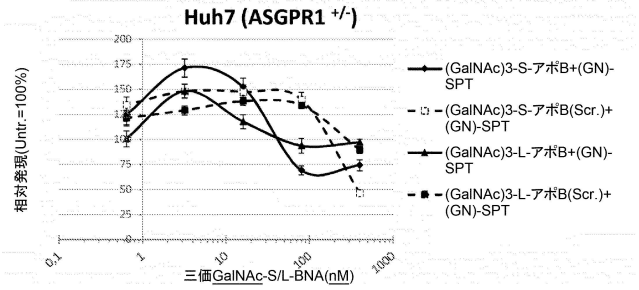
【図１６Ｂ】



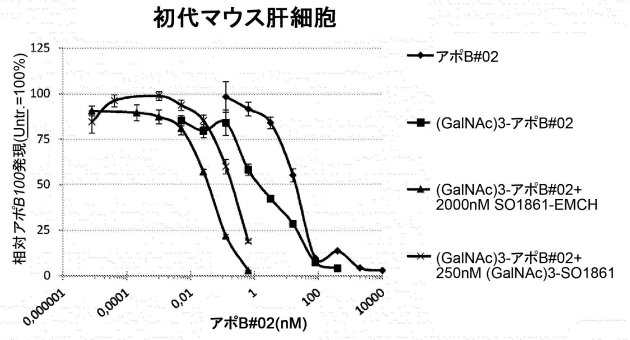
【図１７Ａ】



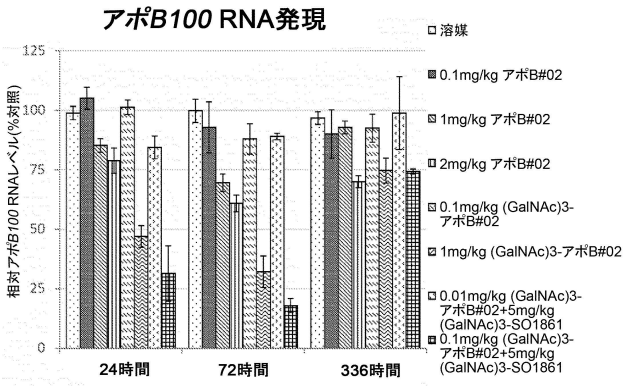
【図１７Ｂ】



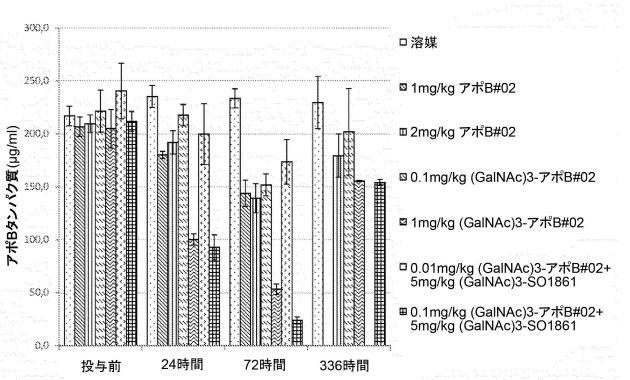
【図１８】



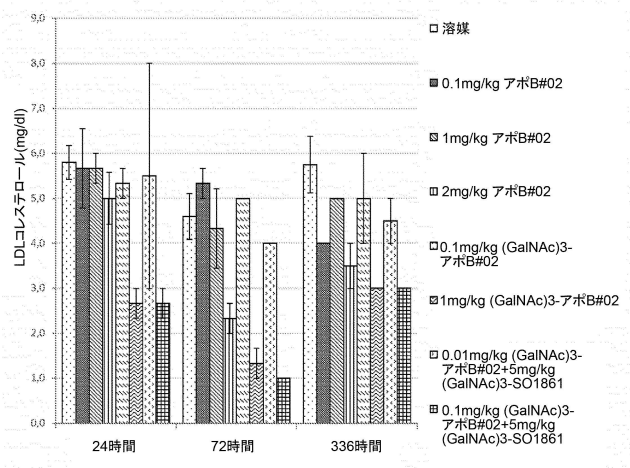
【図１９】



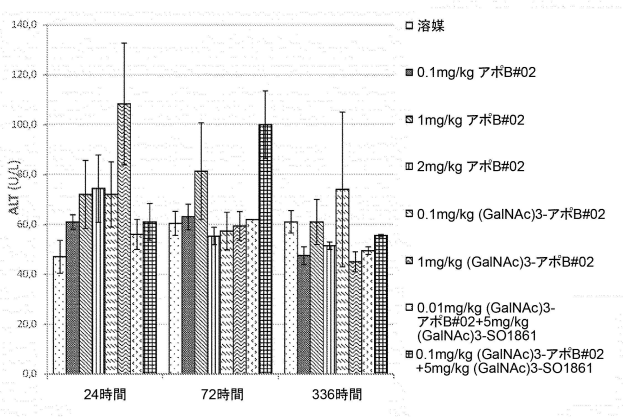
【図２０】



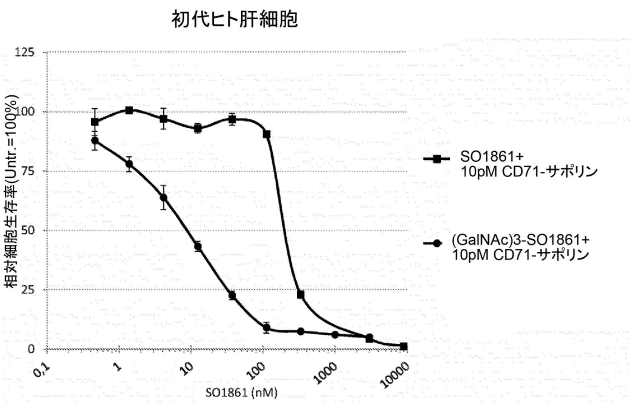
【図２１】



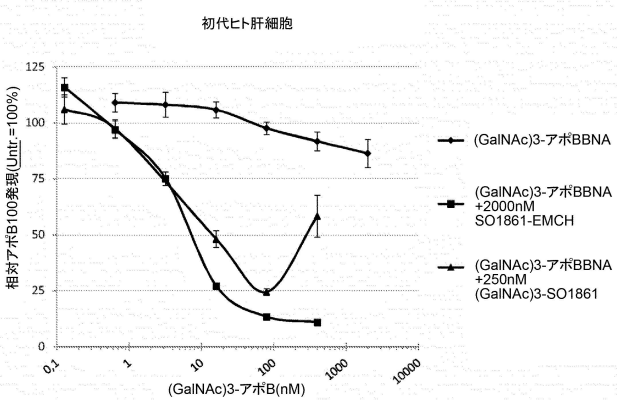
【図２２】



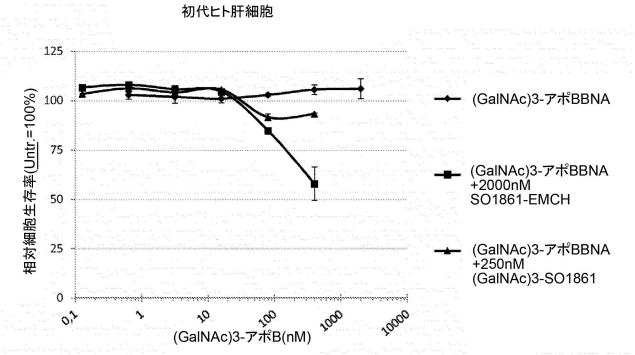
【図２３】



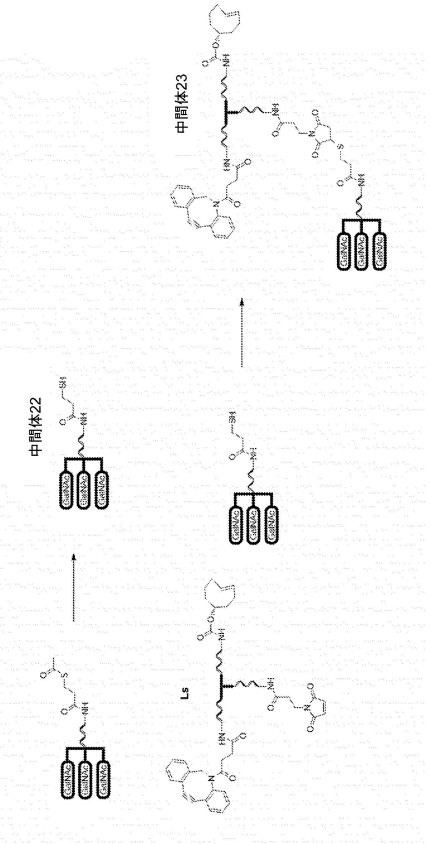
【図２４Ａ】



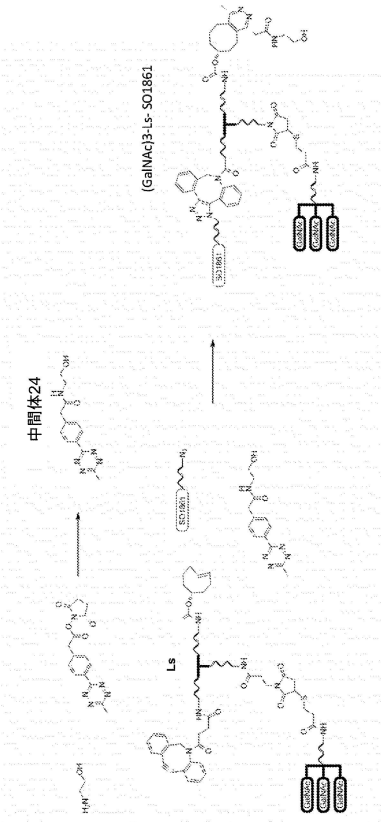
【図２４Ｂ】



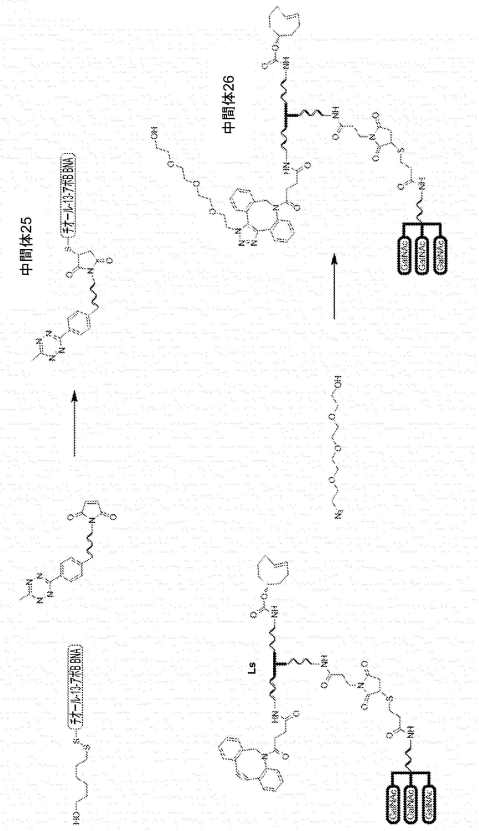
【図２５】



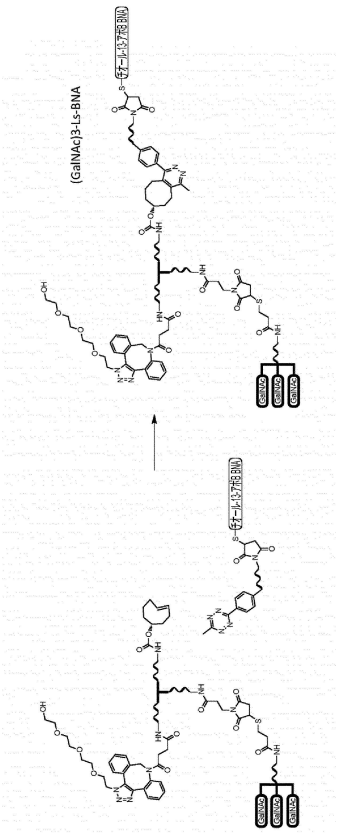
【図２６】



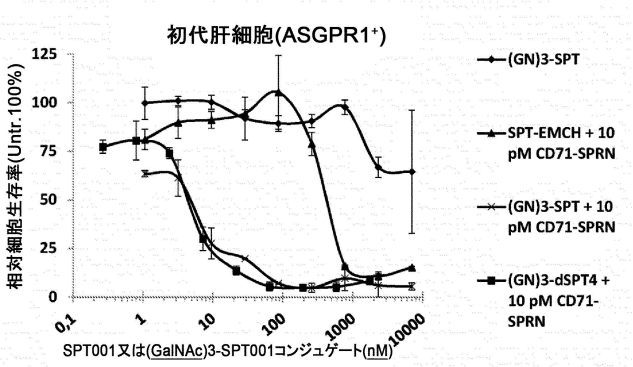
【図２７】



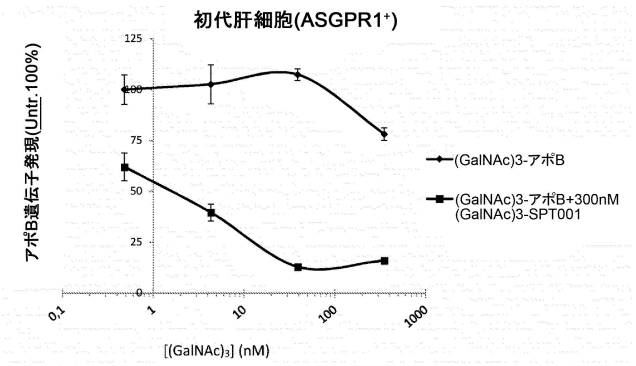
【図２８】



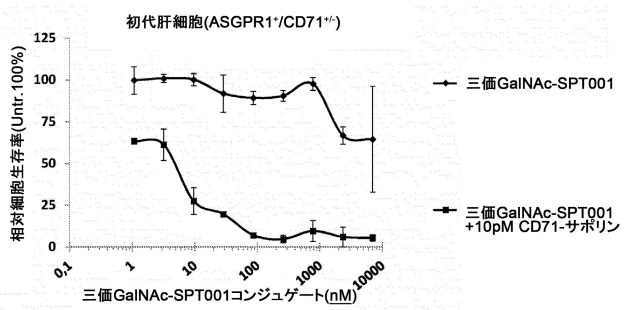
【図２９Ａ】



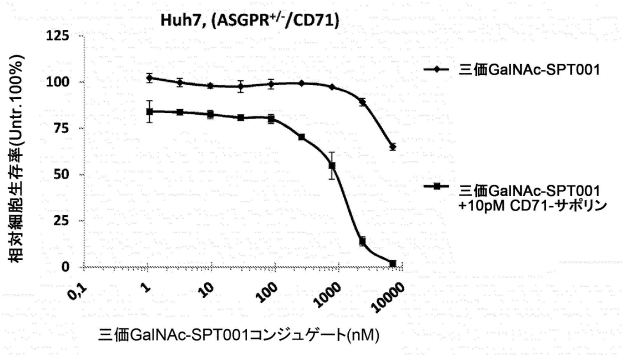
【図２９Ｂ】



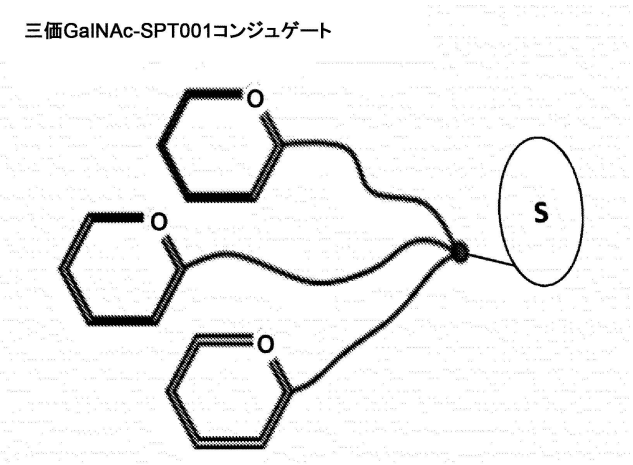
【図３０Ａ】



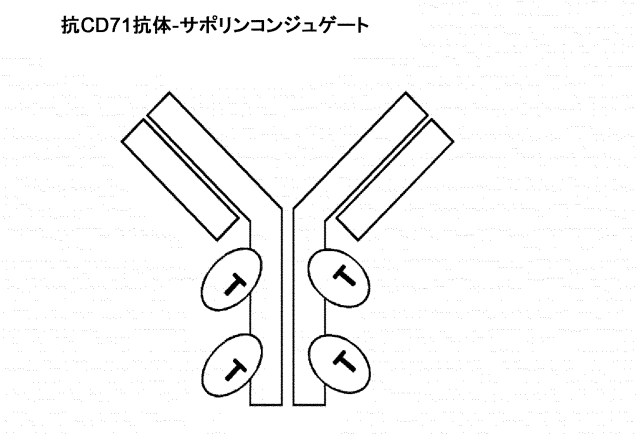
【図３０Ｂ】



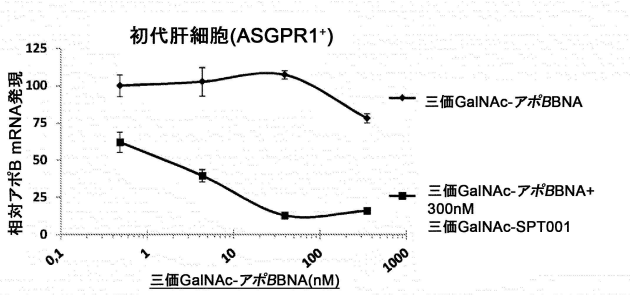
【図３０Ｃ】



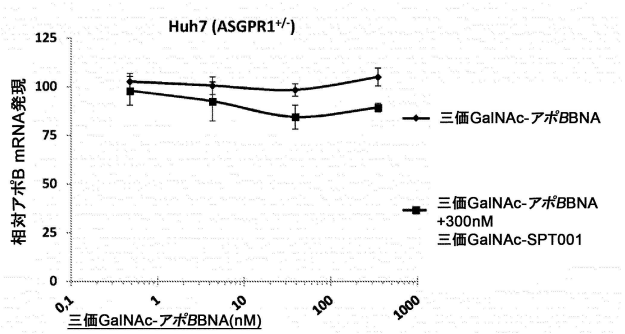
【図３０Ｄ】



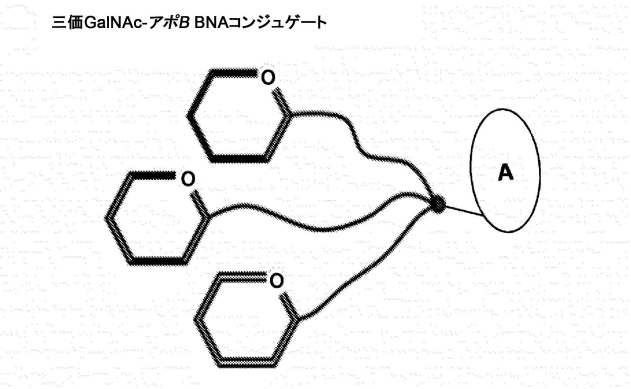
【図３１Ａ】



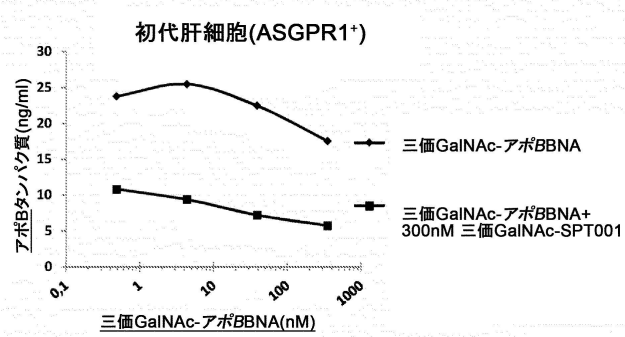
【図３１Ｂ】



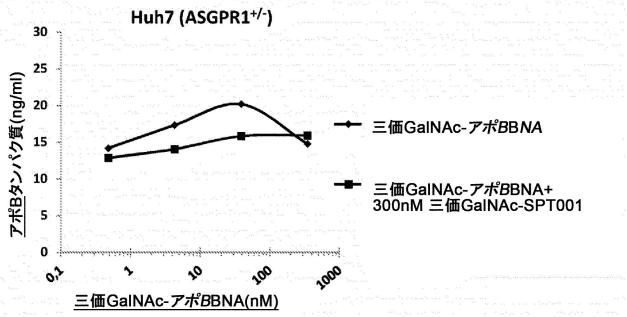
【図３１Ｃ】



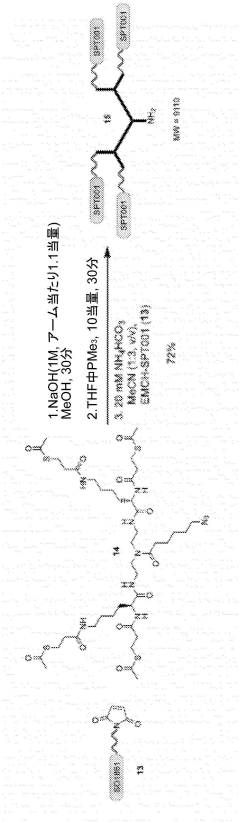
【図３２Ａ】



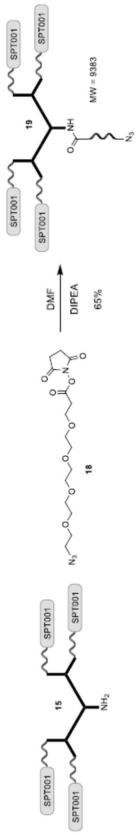
【図３２Ｂ】



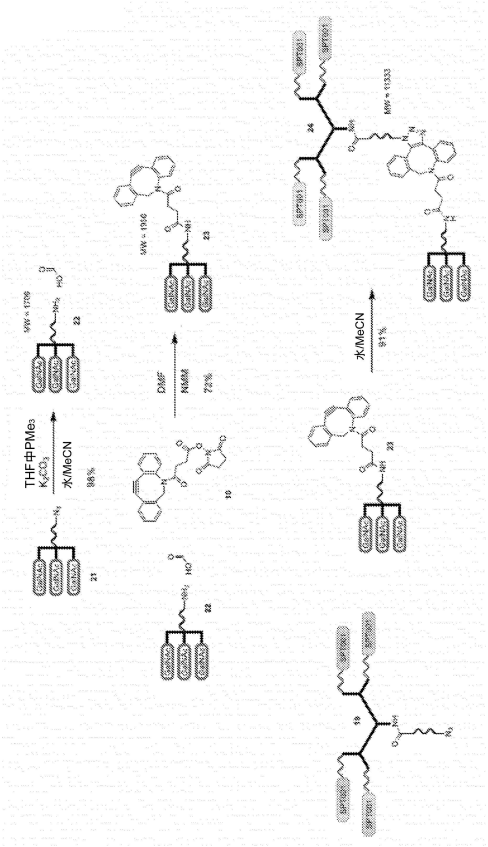
【図３３Ａ】



【図３３Ｂ】



【図３３Ｃ】



【配列表】
20235320400000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2021/050384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/54 A61K47/55 A61P35/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BACHRAN CHRISTOPHER ET AL: "Saponins in Tumor Therapy", MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 575-584, XP055775950, -----	1-57
A	SABINE SEWING ET AL: "GalNAc Conjugation Attenuates the Cytotoxicity of Antisense Oligonucleotide Drugs in Renal Tubular Cells", MOLECULAR THERAPY: NUCLEIC ACIDS., vol. 14, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 67-79, XP055762603, US ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1016/j.omtn.2018.11.005 ----- -/--	1-57

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 September 2021	13/10/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Langer, Miren

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2021/050384

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROGER GILABERT-ORIOL ET AL: "Modified Trastuzumab and Cetuximab Mediate Efficient Toxin Delivery While Retaining Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Target Cells", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 10, no. 11, 7 October 2013 (2013-10-07), pages 4347-4357, XP055677139, US ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp400444q -----	1-57
A	GILABERT-ORIOL ROGER ET AL: "Dianthin-30 or gelonin versus monomethyl auristatin E, each configured with an anti-calcitonin receptor antibody, are differentially potent in vitro in high-grade glioma cell lines derived from glioblastoma", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 66, no. 9, 13 May 2017 (2017-05-13), pages 1217-1228, XP036309505, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S00262-017-2013-Z [retrieved on 2017-05-13] -----	1-57
A	ROGER GILABERT-ORIOL ET AL: "Combinatorial approach to increase efficacy of Cetuximab, Panitumumab and Trastuzumab by dianthin conjugation and co-application of SO1861", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 97, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 247-255, XP055677222, US ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/j.bcp.2015.07.040 -----	1-57
A	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, vol. 11, no. 11, 15 September 2017 (2017-09-15), pages 1527-1543, XP055677214, ISSN: 1574-7891, DOI: 10.1002/1878-0261.12115 ----- -/--	1-57

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2021/050384

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEXANDER WENG ET AL: "The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins", MOLECULAR ONCOLOGY, ELSEVIER, vol. 6, no. 3, 12 January 2012 (2012-01-12), pages 323-332, XP028508748, ISSN: 1574-7891, DOI: 10.1016/J.MOLONC.2012.01.004 [retrieved on 2012-01-24]	1-57
A	HENDRIK FUCHS ET AL: "Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies", BIOMEDICINES, vol. 5, no. 2, 29 March 2017 (2017-03-29), page 14, XP055429235, DOI: 10.3390/biomedicines5020014	1-57
A	WO 2011/054811 A1 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; ENZON PHARMACEUTICALS INC [US] ET AL.) 12 May 2011 (2011-05-12)	1-57
T	WO 2020/126604 A1 (SAPREME TECH B V [NL]; UNIV BERLIN CHARITE [DE]) 25 June 2020 (2020-06-25) claims 1-10	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2021/050384

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2021/050384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011054811 A1	12-05-2011	NONE	
WO 2020126604 A1	25-06-2020	AU 2019400630 A1	12-08-2021
		AU 2019407234 A1	19-08-2021
		AU 2019408811 A1	12-08-2021
		AU 2019411276 A1	12-08-2021
		AU 2019411278 A1	12-08-2021
		AU 2019411289 A1	12-08-2021
		CA 3123978 A1	25-06-2020
		CA 3124064 A1	25-06-2020
		CA 3124065 A1	25-06-2020
		CA 3124129 A1	25-06-2020
		CA 3124151 A1	25-06-2020
		CA 3124406 A1	25-06-2020
		EP 3773737 A1	17-02-2021
		EP 3808379 A1	21-04-2021
		EP 3856254 A2	04-08-2021
		EP 3897735 A1	27-10-2021
		EP 3897738 A1	27-10-2021
		EP 3897739 A1	27-10-2021
		EP 3897741 A1	27-10-2021
		EP 3897742 A2	27-10-2021
		EP 3897743 A1	27-10-2021
		KR 20210107073 A	31-08-2021
		KR 20210110323 A	07-09-2021
		SG 11202106572Q A	29-07-2021
		SG 11202106574U A	29-07-2021
		SG 11202106575Y A	29-07-2021
		SG 11202106603U A	29-07-2021
		SG 11202106606R A	29-07-2021
		SG 11202106612Q A	29-07-2021
		SG 11202106664P A	29-07-2021
		SG 11202106672S A	29-07-2021
		WO 2020126064 A1	25-06-2020
		WO 2020126600 A1	25-06-2020
		WO 2020126604 A1	25-06-2020
		WO 2020126609 A2	25-06-2020
		WO 2020126610 A1	25-06-2020
		WO 2020126620 A2	25-06-2020
		WO 2020126626 A1	25-06-2020
		WO 2020126627 A1	25-06-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 3/06 (2006.01)		A61P	3/06		
A61P 13/02 (2006.01)		A61P	13/02		
A61P 3/00 (2006.01)		A61P	3/00		
A61P 7/04 (2006.01)		A61P	7/04		
A61P 1/16 (2006.01)		A61P	1/16		
A61P 37/06 (2006.01)		A61P	37/06		
A61P 31/20 (2006.01)		A61P	31/20		
A61K 48/00 (2006.01)		A61P	43/00	121	
A61K 31/704 (2006.01)		A61P	43/00	105	
A61K 31/713 (2006.01)		A61K	48/00		
A61K 31/7088 (2006.01)		A61K	31/704		
A61K 31/7105 (2006.01)		A61K	31/713		
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	31/7088		
C07K 14/415 (2006.01)		A61K	31/7105		
C12N 15/113 (2010.01)		A61K	45/00		
C12N 15/115 (2010.01)		C07K	14/415		
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/113	Z ZNA	
C12N 15/53 (2006.01)		C12N	15/115		
C07K 16/28 (2006.01)		C12N	15/12		
		C12N	15/53		
		C07K	16/28		

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

(72)発明者 ポステル，ルーベン
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 ９，ビルディング アー１２－１
(72)発明者 ヘアマンス，ガイ
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 ９，ビルディング アー１２－１

Fターム（参考） 4C076 AA95 CC26 CC29 DD66 DD69 EE59
4C084 AA13 AA17 MA02 NA05 NA13 ZA531 ZA532 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZB081 ZB082 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB311 ZB312 ZB331 ZB332 ZC211 ZC212 ZC331 ZC332 ZC411 ZC412 ZC75
4C086 AA01 AA03 EA10 EA16 MA01 MA02 MA04 NA05 NA13 ZA53 ZA75 ZA81 ZB08 ZB26 ZB31 ZB33 ZC21 ZC33 ZC41 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 DA76 DA83 DA89 EA20 FA74