

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-524812

(P2023-524812A)

(43)公表日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 H	19/10 (2006.01)	C 0 7 H	19/10	C S P	4 B 0 6 3
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 B 0 6 5
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713		4 C 0 5 7
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	M	4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-567560(P2022-567560)	(71)出願人	517437807
(86)(22)出願日	令和3年5月7日(2021.5.7)		エムペグ エルエイ リミテッド ライア
(85)翻訳文提出日	令和5年1月6日(2023.1.6)		ピリティィ カンパニー
(86)国際出願番号	PCT/US2021/031287		アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 メリーラン
(87)国際公開番号	WO2021/226454		ド州 チェビー チェイス ウィスコンシン
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		アベニュー 5 4 2 5 スイート 8 0 1
(31)優先権主張番号	63/022,313	(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和2年5月8日(2020.5.8)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リンカー化合物

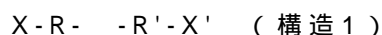
(57)【要約】

リンカー化合物、それらを作製する方法、ならびにそれらをオリゴヌクレオチドおよび他の化学物質および生化学的物質のための連結剤として用いる方法が記載される。リンカー化合物の態様は、細胞内ヌクレアーゼに比べて血清ヌクレアーゼによる切断に対して高い安定性を示すように構成されるかまたは選択され、対象に投与された場合に、そのようなリンカー化合物によって一緒に連結された化学物質および生化学的物質についての、寿命、およびしたがって標的細胞に対する生物学的利用能の、増強された制御を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造 1:



を含む、リンカー化合物であって、

構造中、

XおよびX'が各々独立して、官能基であり；

RおよびR'が各々独立して、スペーサー基であり；かつ

が、少なくとも1つのヌクレオチドを含む共有結合性リンカーである、

前記リンカー化合物。

10

【請求項 2】

XとX'が、異なる官能基である、請求項1記載のリンカー化合物。

【請求項 3】

XおよびX'が各々独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである、請求項2記載のリンカー化合物。

【請求項 4】

XとX'が、同じ官能基である、請求項1記載のリンカー化合物。

【請求項 5】

XおよびX'が、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである、請求項4記載のリンカー化合物。

20

【請求項 6】

RおよびR'が各々独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、またはアルキル-ヘテロシクリルである、請求項1～5のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項 7】

RおよびR'が各々独立して、 $C_1 \sim 10$ アルキル、 $C_1 \sim 10$ アルキルエーテル、6～10員アリール、5～10員ヘテロアリール、5～10員ヘテロシクリル、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(6～10員アリール)、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5～10員ヘテロアリール)、または($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5～10員ヘテロシクリル)である、請求項6記載のリンカー化合物。

【請求項 8】

RおよびR'が各々独立して、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキルエーテル、または $C_6 \sim C_{10}$ アリールである、請求項6記載のリンカー化合物。

30

【請求項 9】

RおよびR'が各々独立して、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、または C_6 アルキルである、請求項6記載のリンカー化合物。

【請求項 10】

RおよびR'が C_6 アルキルである、請求項6記載のリンカー化合物。

【請求項 11】

RおよびR'が1,4-フェニレンである、請求項6記載のリンカー化合物。

【請求項 12】

共有結合性リンカー が、少なくとも2つのヌクレオチド；少なくとも3つのヌクレオチド；または少なくとも4つのヌクレオチドを含む、請求項1～11のいずれか一項記載のリンカー化合物。

40

【請求項 13】

共有結合性リンカー が、少なくとも1つの逆位ヌクレオチドを含む、請求項1～12のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項 14】

共有結合性リンカー が、同じである少なくとも2つのヌクレオチドを含む、請求項1～12のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項 15】

50

各ヌクレオチドがウリジンを含む、請求項14記載のリンカー化合物。

【請求項16】

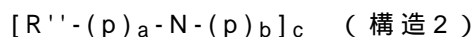
各ヌクレオチドがチミジンを含む、請求項14記載のリンカー化合物。

【請求項17】

共有結合性リンカーが、互いに異なる少なくとも2つのヌクレオチドを含む、請求項1~13のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項18】

共有結合性リンカーが、構造2：



を含み、

構造中、

cが1以上の整数であり；かつ

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、

R''が、スペーサー基であるか、または存在せず；

各pが独立して、リン酸の誘導体であり；

Nがヌクレオシドであり；

aおよびbが各々独立して、0以上の整数であり、但し、aおよびbが、両方とも0であることはできず；任意で、aおよびbが各々独立して、0、1、2または3であり、但し、aおよびbが、両方とも0であることはできない、

請求項1~17のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項19】

cが、1~10の整数である、請求項18記載のリンカー化合物。

【請求項20】

cが、2、3、または4である、請求項19記載のリンカー化合物。

【請求項21】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、アルキル-ヘテロシクリルであるか、または存在しない、請求項18~20のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項22】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、C₁~10アルキル、C₁~10アルキルエーテル、6~10員アリール、5~10員ヘテロアリール、5~10員ヘテロシクリル、(C₁~10アルキル)-(6~10員アリール)、(C₁~10アルキル)-(5~10員ヘテロアリール)、または(C₁~10アルキル)-(5~10員ヘテロシクリル)であるか、または存在しない、請求項21記載のリンカー化合物。

【請求項23】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、C₂~C₁₀アルキル、C₂~C₁₀アルキルエーテル、C₆~C₁₀アリールであるか、または存在しない、請求項21記載のリンカー化合物。

【請求項24】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、C₂、C₃、C₄、C₅もしくはC₆アルキルであるか、または存在しない、請求項21記載のリンカー化合物。

【請求項25】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、C₆アルキルであるか、または存在しない、請求項21記載のリンカー化合物。

【請求項26】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''が独立して、1,4-フェニレンであるか、または存在しない、請求項21記載のリンカー化合物。

【請求項27】

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、各pが独立して、ホスファート、ホスホロチオ

10

20

30

40

50

アート、ジチオホスファート、またはホスホナートである、請求項18～26のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項28】

少なくとも1つのNが、逆位ヌクレオシドである、請求項18～27のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項29】

cが2以上であり、かつ少なくとも2つのNが、同じヌクレオシドである、請求項18～27のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項30】

各Nがウリジンである、請求項29記載のリンカー化合物。

10

【請求項31】

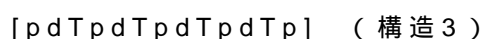
各Nがチミジンである、請求項29記載のリンカー化合物。

【請求項32】

cが2以上であり、かつ少なくとも1つのNが、別のNとは異なっている、請求項18～28のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項33】

構造2が、構造3：

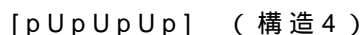


に記載の化合物であり、
構造中、dTがチミジンである、
請求項29記載のリンカー化合物。

20

【請求項34】

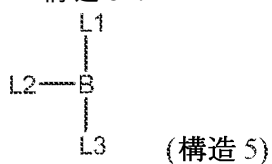
構造2が、構造4：



に記載の化合物であり、
構造中、Uがウリジンである、
請求項29記載のリンカー化合物。

【請求項35】

構造5：

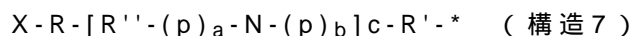
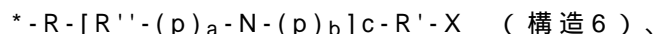


30

のリンカー化合物であって、
構造中、

Bが三価の分岐点であり；

L1、L2およびL3の各々が独立して、構造6または構造7：



40

であり、

構造中、構造6および7の各々において、

*が、Bへの結合点であり；

各Xが独立して、官能基であり；

RおよびR'が各々独立して、スペーサー基であり；

cが1以上の整数であり；かつ

$[\text{R''-(p)}_a\text{-N-(p)}_b\text{}]$ の各反復において、

R''が、スペーサー基であるか、または存在せず；

各pが独立して、リン酸の誘導体であり；

Nがヌクレオシドであり；

50

aおよびbが各々独立して、0以上の整数であり、但し、aおよびbが、両方とも0であることはできず；任意で、aおよびbが各々独立して、0、1、2または3であり、但し、aおよびbが、両方とも0であることはできない、前記リンカー化合物。

【請求項36】

前記リンカー化合物内の1つのXが、前記リンカー化合物内の他の2つのXとは異なる、請求項35記載のリンカー化合物。

【請求項37】

前記リンカー化合物内の各Xが、前記リンカー化合物内の他のXとは異なる、請求項35記載のリンカー化合物。

10

【請求項38】

各Xが独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである、請求項36または37記載のリンカー化合物。

【請求項39】

前記リンカー化合物内のXの全てが、同じである、請求項35記載のリンカー化合物。

【請求項40】

Xが、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである、請求項39記載のリンカー化合物。

【請求項41】

RおよびR'が各々独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、またはアルキル-ヘテロシクリルである、請求項35～40のいずれか一項記載のリンカー化合物。

20

【請求項42】

RおよびR'が各々独立して、 C_{1-10} アルキル、 C_{1-10} アルキルエーテル、6～10員アリール、5～10員ヘテロアリール、5～10員ヘテロシクリル、(C_{1-10} アルキル)-(6～10員アリール)、(C_{1-10} アルキル)-(5～10員ヘテロアリール)、または(C_{1-10} アルキル)-(5～10員ヘテロシクリル)である、請求項41記載のリンカー化合物。

【請求項43】

RおよびR'が各々独立して、 C_2-C_{10} アルキル、 C_2-C_{10} アルキルエーテル、または C_6-C_{10} アリールである、請求項41記載のリンカー化合物。

30

【請求項44】

RおよびR'が各々独立して、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、または C_6 アルキルである、請求項41記載のリンカー化合物。

【請求項45】

RおよびR'が C_6 アルキルである、請求項41記載のリンカー化合物。

【請求項46】

RおよびR'が1,4-フェニレンである、請求項41記載のリンカー化合物。

【請求項47】

cが、1～10の整数である、請求項35～46のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項48】

cが、2、3、または4である、請求項47記載のリンカー化合物。

40

【請求項49】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、アルキル-ヘテロシクリルであるか、または存在しない、請求項35～48のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項50】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、 C_{1-10} アルキル、 C_{1-10} アルキルエーテル、6～10員アリール、5～10員ヘテロアリール、5～10員ヘテロシクリル、(C_{1-10} アルキル)-(6～10員アリール)、(C_{1-10} アルキル)-(5～10員ヘテロア

50

ール)、または(C₁~₁₀アルキル)-(5~10員ヘテロシクリル)であるか、または存在しない、請求項49記載のリンカー化合物。

【請求項51】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、C₂~C₁₀アルキル、C₂~C₁₀アルキルエーテル、C₆~C₁₀アリールであるか、または存在しない、請求項49記載のリンカー化合物。

【請求項52】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、C₂、C₃、C₄、C₅もしくはC₆アルキルであるか、または存在しない、請求項49記載のリンカー化合物。

【請求項53】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、C₆アルキルであるか、または存在しない、請求項49記載のリンカー化合物。

【請求項54】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、R''が独立して、1,4-フェニレンであるか、または存在しない、請求項49記載のリンカー化合物。

【請求項55】

[R''-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、各pが独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートである、請求項35~54のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項56】

少なくとも1つのNが、逆位ヌクレオシドである、請求項35~55のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項57】

cが2以上であり、かつ少なくとも2つのNが、同じヌクレオシドである、請求項35~55のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項58】

各Nがウリジンである、請求項57記載のリンカー化合物。

【請求項59】

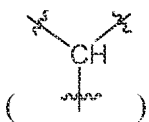
各Nがチミジンである、請求項57記載のリンカー化合物。

【請求項60】

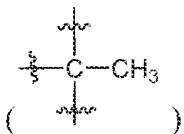
cが2以上であり、かつ少なくとも1つのNが、別のNとは異なっている、請求項35~56のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項61】

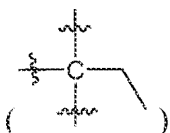
Bが、メタントリイル



、エタントリイル



、プロパントリイル



10

20

30

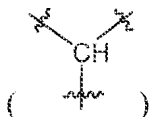
40

50

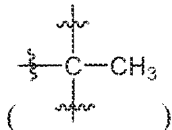
、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、三置換アリール、または置換アンモニアである、請求項35～60のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項62】

Bが、メタントリイル

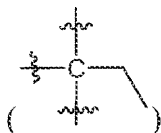


、エタントリイル



10

、プロパントリイル



20

、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンである、請求項61記載のリンカー化合物。

【請求項63】

各ヌクレオチドが独立して、天然に存在するヌクレオチド、人工もしくは非天然のヌクレオチド類似体、または前述のいずれかの化学修飾されたバージョンである、請求項1～17のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項64】

各ヌクレオチドが独立して、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである、請求項63記載のリンカー化合物。

【請求項65】

各Nが独立して、天然に存在するヌクレオシド、人工もしくは非天然のヌクレオシド類似体、または前述のいずれかの化学修飾されたバージョンである、請求項18～62のいずれか一項記載のリンカー化合物。

30

【請求項66】

各Nが独立して、リボヌクレオシドまたはデオキシリボヌクレオシドである、請求項65記載のリンカー化合物。

【請求項67】

細胞内ヌクレアーゼに比べて血清ヌクレアーゼによる切断に対して高い安定性を示すように構成されるかまたは選択される、請求項1～66のいずれか一項記載のリンカー化合物。

40

【請求項68】

少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%純粋である、請求項1～67のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項69】

約85%～約95%純粋である、請求項1～67のいずれか一項記載のリンカー化合物。

【請求項70】

75%以上純粋；85%以上純粋；または95%以上純粋である、請求項1～67のいずれか一項記載のリンカー化合物。

50

【請求項 7 1】

サブユニットを含む多量体オリゴヌクレオチドであって、サブユニットの各々が独立して、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつサブユニットの1つまたは複数、請求項1～70のいずれか一項記載の化合物との反応により形成される共有結合を介して、別のサブユニットに連結される、前記多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 2】

サブユニットの各々が、請求項1～70のいずれか一項記載の化合物との反応により形成される共有結合を介して、隣接するサブユニットに連結される、請求項71記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 3】

少なくとも2つのサブユニットが、実質的に異なっている、請求項71または72記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 4】

全てのサブユニットが実質的に同じである、請求項71または72記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 5】

2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのサブユニットを含む、請求項71～74のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 6】

各サブユニットが、15～30、17～27、19～26、または20～25ヌクレオチド長である、請求項71～75のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 7】

1つまたは複数のサブユニットが、二本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項71～76のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 8】

1つまたは複数のサブユニットが、一本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項71～77のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 7 9】

1つまたは複数のサブユニットが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項78記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 8 0】

各サブユニットが独立して、siRNA、saRNA、またはmiRNAである、請求項77記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 8 1】

各サブユニットが二本鎖siRNAである、請求項80記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 8 2】

ターゲティング剤をさらに含む、請求項71～81のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチド。

【請求項 8 3】

請求項1～34のいずれか一項記載のリンカー化合物との反応によって第2の生物活性化合物に連結された第1の生物活性化合物を含む、コンジュゲート。

【請求項 8 4】

第1および第2の生物活性化合物の各々が独立して、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、有機金属化合物、または小分子薬物である、請求項83記載のコンジュゲート。

【請求項 8 5】

生物活性化合物の少なくとも1つが、オリゴヌクレオチドである、請求項83または84記載のコンジュゲート。

【請求項 8 6】

生物活性化合物の少なくとも1つが、抗体または抗体断片である、請求項83～85のい

10

20

30

40

50

ずれか一項記載のコンジュゲート。

【請求項 87】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項86記載のコンジュゲート。

【請求項 88】

第1の生物活性化合物がモノクローナル抗体であり、かつ第2の生物活性化合物がオリゴヌクレオチドである、請求項83記載のコンジュゲート。

【請求項 89】

ターゲティング剤をさらに含む、請求項83～88のいずれか一項記載のコンジュゲート。

【請求項 90】

一緒に連結されて多量体オリゴヌクレオチドを形成する2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む、請求項83～89のいずれか一項記載のコンジュゲート。

【請求項 91】

請求項35～62のいずれか一項記載のリンカー化合物との反応によって一緒に連結された第1の、第2のおよび第3の生物活性化合物を含む、マルチコンジュゲート。

【請求項 92】

第1の、第2のおよび第3の生物活性化合物の各々が独立して、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、有機金属化合物、または小分子薬物である、請求項91記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 93】

生物活性化合物の少なくとも1つが、オリゴヌクレオチドである、請求項91または92記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 94】

生物活性化合物の2つが各々独立して、オリゴヌクレオチドである、請求項91または92記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 95】

少なくとも1つの生物活性化合物が、抗体または抗体断片である、請求項91～94のいずれか一項記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 96】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項95記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 97】

第1の生物活性化合物がモノクローナル抗体であり、かつ第2のおよび第3の生物活性化合物が各々独立して、オリゴヌクレオチドである、請求項91記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 98】

ターゲティング剤をさらに含む、請求項92～97のいずれか一項記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 99】

一緒に連結されて多量体オリゴヌクレオチドを形成する2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む、請求項91～98のいずれか一項記載のマルチコンジュゲート。

【請求項 100】

第1の化合物Aとリンカー化合物との間の第1の共有結合および第2の化合物Bとリンカー化合物との間の第2の共有結合の形成を促進する反応条件下で、請求項1～34のいずれか一項記載のリンカー化合物をAおよびBと、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、第1の化合物Aを第2の化合物Bに連結するための方法。

【請求項 101】

AがBと異なる、請求項100記載の方法。

【請求項 102】

リンカー化合物上の官能基 XとX'が、異なる官能基である、請求項101記載の方法。

【請求項 103】

10

20

30

40

50

AとBが同じである、請求項100記載の方法。

【請求項104】

リンカー化合物上の官能基 XとX'が、同じ官能基である、請求項103記載の方法。

【請求項105】

AおよびBが各々、オリゴヌクレオチドである、請求項100～104のいずれか一項記載の方法。

【請求項106】

オリゴヌクレオチドがsiRNAである、請求項105記載の方法。

【請求項107】

Aがオリゴヌクレオチドまたは多量体オリゴヌクレオチドであり、かつBが抗体または抗体断片である、請求項100記載の方法。 10

【請求項108】

オリゴヌクレオチドがsiRNAである、請求項107記載の方法。

【請求項109】

リンカー化合物と化合物A、BおよびCの各々との間の共有結合の形成を促進する反応条件下で、請求項35～62のいずれか一項記載のリンカー化合物をA、BおよびCの各々と、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、化合物A、BおよびCと一緒に連結するための方法。

【請求項110】

A、BおよびCの少なくとも1つが、他の2つとは異なっている、請求項109記載の方法。 20

【請求項111】

リンカー化合物内の少なくとも1つの官能基が、他の2つの官能基と異なる官能基である、請求項110記載の方法。

【請求項112】

A、BおよびCの1つが抗体であり、かつ他の2つがオリゴヌクレオチドである、請求項110または111記載の方法。

【請求項113】

抗体がモノクローナル抗体であり、かつオリゴヌクレオチドがsiRNAである、請求項112記載の方法。 30

【請求項114】

3つの化合物A、BおよびCが全て異なっている、請求項109記載の方法。

【請求項115】

リンカー化合物内の各官能基が、異なる官能基である、請求項114記載の方法。

【請求項116】

3つの化合物A、BおよびCが全て同じである、請求項109記載の方法。

【請求項117】

リンカー化合物内の各官能基が、同じ官能基である、請求項116記載の方法。

【請求項118】

請求項71～82のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチドを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法。 40

【請求項119】

請求項83～89のいずれか一項記載のコンジュゲートを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法。

【請求項120】

請求項91～98のいずれか一項記載のマルチコンジュゲートを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法。

【請求項121】

請求項71～82のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。 50

【請求項 1 2 2】

請求項 83～89のいずれか一項記載のコンジュゲートと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

【請求項 1 2 3】

請求項 91～98のいずれか一項記載のマルチコンジュゲートと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

【請求項 1 2 4】

医薬の製造における使用のための、請求項 71～82のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 1 2 5】

医薬の製造における使用のための、請求項 83～89のいずれか一項記載のコンジュゲートを含む、組成物。

【請求項 1 2 6】

医薬の製造における使用のための、請求項 91～98のいずれか一項記載のマルチコンジュゲートを含む、組成物。

【請求項 1 2 7】

細胞を、請求項 71～82のいずれか一項記載の多量体オリゴヌクレオチドと接触させる工程、および

多量体オリゴヌクレオチドが細胞に進入しかつ標的遺伝子の活性が調節される条件下で、細胞を維持する工程

を含む、細胞において標的遺伝子の活性を調節する方法。

【請求項 1 2 8】

細胞を、請求項 83～89のいずれか一項記載のコンジュゲートと接触させる工程、および

コンジュゲートが細胞に進入しかつ生物活性化合物の活性が観察される条件下で、細胞を維持する工程

を含む、細胞において生物活性化合物の活性を観察する方法。

【請求項 1 2 9】

細胞を、請求項 91～98のいずれか一項記載のマルチコンジュゲートと接触させる工程、および

マルチコンジュゲートが細胞に進入しかつ生物活性化合物の活性が観察される条件下で、細胞を維持する工程

を含む、細胞において生物活性化合物の活性を観察する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先出願に対する参照による組み入れ

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2020年5月8日に出願された米国特許仮出願第63/022,313号に対して優先権を主張する。

【0002】

開示の分野

本開示は、化合物、化合物を作製する方法、ならびにオリゴヌクレオチドおよび他の化学物質および生化学的物質のための連結剤としての化合物の関連する使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

オリゴヌクレオチドは現在、複数の応用および進行中の臨床試験を伴う、十分に確立された治療薬のクラスである。しかしながら、多くの要因、例えば、所望の治療効果を達成するのに十分な量での、標的細胞へのオリゴヌクレオチドの送達およびその後の標的細胞内へのオリゴヌクレオチドの内部移行が、オリゴヌクレオチド治療薬の開発および使用を

10

20

30

40

50

依然として制限している。

【0004】

この課題に対応するために、特定の細胞表面受容体を標的とするリガンドにコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドが、研究されている。1つのそのようなリガンドであるN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の使用は、肝細胞の表面上に数多く発現しているアシアロ糖タンパク質受容体に対するその高度に特異的かつ効率的な結合のために、肝細胞へのオリゴヌクレオチド送達のための選択される方法となっている。

【0005】

しかしながら、GalNAcコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを使用したとしても、高い割合の化合物が、腎臓による排出を介して失われる。これに対抗するために、共有結合された中間体または「リンカー」を介して個々のオリゴヌクレオチドサブユニットが一緒に連結されている、オリゴヌクレオチドの多量体が調製されている。これらのリンカーは、合成機で、またはオリゴヌクレオチドの合成、脱保護、および精製後に水溶液中で導入されている。

10

【0006】

多種多様なリンカーが利用されており、これらには、インピボ条件下で安定なもの、および標的細胞の内部で切断され、それによって個々のオリゴヌクレオチドサブユニットを遊離させるものなどが含まれる。用いられる切断可能なリンカーの最も一般的なタイプは、細胞内ヌクレアーゼによって切断される一本鎖の保護されていないヌクレオチドの短い配列、例えば、dTdTdTdTおよびdCdA、ならびに細胞の内部での還元環境によって切断されるジスルフィドに基づくリンカーである。

20

【0007】

多量体オリゴヌクレオチドの合成で成功裏に利用されている別の技術は、リンカーを介して別のオリゴヌクレオチドに結合された一本鎖オリゴヌクレオチドが、相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドにアニーリングされ、任意で、リンカーを介して別のオリゴヌクレオチドにも結合され、これらの工程が、所望の長さの多量体が得られるまで繰り返される、非対称性アニーリング (asymmetric annealing) である。

【0008】

ホモ多量体とヘテロ多量体のどちらも、これらの方法を介して調製されていて、4-merから8-merの範囲での多量体は、特に増強された血清半減期および生物活性を示す。

30

【0009】

しかしながら、これらの方法には限界がある。ヌクレアーゼ切断可能なリンカーは、合成機を介して概して5'から3'方向にのみ導入することができ、これは、多量体オリゴヌクレオチドの合成のための非対称性アニーリング技術の利用を制限する。また、治療用オリゴヌクレオチドに直接隣接する核酸連結配列の存在は、リンカーの切断性、オリゴの活性、または両方に影響を及ぼす場合がある。

【0010】

ジスルフィド連結は、合成機でおよび前駆体の精製後に水溶液中での両方で導入することができる。しかしながら、後者の場合には、チオール反応によるジスルフィド結合の形成は、特にヘテロ系を伴う、生成物の混合物をもたらす可能性がある。この問題を回避するために、代替のアプローチは、予め形成された内部ジスルフィド結合も含有するチオール部分と反応することができる中間体連結剤を用いることである。そのようなリンカーは、内部ジスルフィド基と、各々が別の分子上のチオール基と反応することができる2つの末端マレイミド基とを有する、ジチオビスマレイミドエタン (DTME) である。

40

【0011】

DTMEは通常、2つの同一のチオール化された実体を連結してホモ二量体誘導体を生成するための、二価のリンカーとして用いられる。しかしながら、それは、2つのマレイミド部分の一方のみがチオール化された分子と反応できる、単量体中間体を介するヘテロ二量体種を作製するためにも用いられている。結果として生じるモノ-DTME中間体は、次いで、第2のチオール化部分と反応され、DTME連結ヘテロ二量体を作り出す。ヘテロ二

50

量体の合成のためのこの技法は、WO 2016/205410 (特許文献1)に記載される。

【0012】

この方法論は、ホモおよびヘテロ多量体形態の両方において八量体のサイズまでの多量体オリゴヌクレオチドを作り出すために用いられている。

【0013】

しかしながら、ジスルフィド結合のある特定の局面は、化学物質全般の合成での使用、特に、多量体オリゴヌクレオチドでの使用には最適ではない場合がある。例えば、その後の連結反応のために同時に末端ジスルフィドをチオールに還元しながら、多量体内に内部ジスルフィド基を維持することはできない。

【0014】

さらに、ジスルフィド連結した分子は、他のチオール化された種を解離させるおよび/またはそれと交差反応することが報告されている。加えて、ジスルフィド含有分子の長期保存は、ジスルフィド結合の酸化およびその後の切断の可能性のために問題がある可能性がある。

【0015】

例えば治療剤を含めた、特に多量体オリゴヌクレオチドを含めた、化学物質の構築および合成において、ジスルフィド含有分子の認識されている弱点なしにDTMEなどの切断可能なリンカーの利点を保持する、さらなる方法およびリンカーとして機能する物質の必要性が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

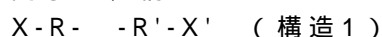
【特許文献1】WO 2016/205410

【発明の概要】

【0017】

開示の概要

本開示は、構造1:



を含む、リンカー化合物を提供し、

構造中、

XおよびX'は各々独立して、官能基であり;

RおよびR'は各々独立して、スペーサー基であり;かつ

は、少なくとも1つのヌクレオチドを含む共有結合性リンカーである。

【0018】

リンカー化合物のある態様において、XとX'は異なる官能基であり;任意で、XおよびX'は各々独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【0019】

リンカー化合物のある態様において、XとX'は同じ官能基であり;任意で、XおよびX'は、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【0020】

リンカー化合物のある態様において、RおよびR'は各々独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、またはアルキル-ヘテロシクリルである。

【0021】

ある態様において、RおよびR'各々独立して、C₁-10アルキル、C₁-10アルキルエーテル、6-10員アリール、5-10員ヘテロアリール、5-10員ヘテロシクリル、(C₁-10アルキル)-(6-10員アリール)、(C₁-10アルキル)-(5-10員ヘテロアリール)、または(C₁-10アルキル)-(5-10員ヘテロシクリル)である。

【0022】

10

20

30

40

50

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、C₂~C₁₀アルキル、C₂~C₁₀アルキルエーテル、またはC₆~C₁₀アリーールである。

【0023】

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、C₂、C₃、C₄、C₅、またはC₆アルキルである。

【0024】

ある態様において、RおよびR'はC₆アルキルである。

【0025】

ある態様において、RおよびR'は1,4-フェニレンである。

【0026】

リンカー化合物のある態様において、共有結合性リンカーは、少なくとも2つのヌクレオチド；少なくとも3つのヌクレオチド；または少なくとも4つのヌクレオチドを含む。

【0027】

ある態様において、共有結合性リンカーは少なくとも1つの逆位ヌクレオチドを含む。

【0028】

ある態様において、共有結合性リンカーは、同じである少なくとも2つのヌクレオチドを含む。

【0029】

ある態様において、各ヌクレオチドはウリジンを含む。

【0030】

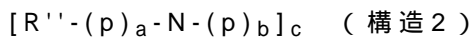
ある態様において、各ヌクレオチドはチミジンを含む。

【0031】

リンカー化合物のある態様において、共有結合性リンカーは、互いに異なる少なくとも2つのヌクレオチドを含む。

【0032】

リンカー化合物のある態様において、共有結合性リンカーは、構造2：



を含み、

構造中、

cは1以上の整数であり；かつ

$[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、

R''は、スペーサー基であるか、または存在せず；

各pは独立して、リン酸の誘導体であり；

Nはヌクレオチドであり；かつ

aおよびbは各々独立して、0以上の整数であり、但し、aおよびbは、両方とも0であることはできない。

【0033】

ある態様において、cは、1~10の整数である。

【0034】

ある態様において、cは、2、3、または4である。

【0035】

ある態様において、aおよびbは各々独立して、0、1、2または3であり、但し、aおよびbは、両方とも0であることはできない。

【0036】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''は独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリーール、ヘテロアリーール、ヘテロシクリル、アルキル-アリーール、アルキル-ヘテロアリーール、アルキル-ヘテロシクリルであるか、または存在しない。

【0037】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、R''は独立して、C₁~10

10

20

30

40

50

アルキル、 $C_1 \sim 10$ アルキルエーテル、6～10員アリアル、5～10員ヘテロアリアル、5～10員ヘテロシクリル、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(6～10員アリアル)、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5～10員ヘテロアリアル)、もしくは($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5～10員ヘテロシクリル)であるか、または存在しない。

【0038】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキルエーテル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリアルであるか、または存在しない。

【0039】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 もしくは C_6 アルキルであるか、または存在しない。 10

【0040】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 C_6 アルキルであるか、または存在しない。

【0041】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、1,4-フェニレンであるか、または存在しない。

【0042】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、各 p は独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートである。 20

【0043】

ある態様において、少なくとも1つの N は、逆位ヌクレオシドである。

【0044】

ある態様において、 c は2以上であり、かつ少なくとも2つの N は、同じヌクレオシドである。

【0045】

ある態様において、各 N はウリジンである。

【0046】

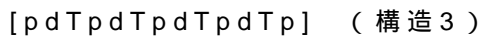
ある態様において、各 N はチミジンである。

【0047】

ある態様において、 c は2以上であり、かつ少なくとも1つの N は、別の N とは異なっている。 30

【0048】

リンカー化合物のある態様において、構造2は、構造3：

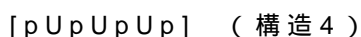


に記載の化合物であり、

構造中、 dT はチミジンである。

【0049】

リンカー化合物のある態様において、構造2は、構造4：

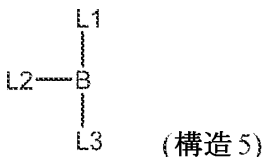


に記載の化合物であり、

構造中、 U はウリジンである。 40

【0050】

リンカー化合物のある態様において、リンカー化合物は、構造5：

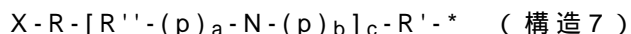
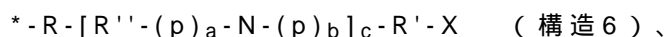


を含み、

構造中、

Bは三価の分岐点であり；かつ

L1、L2およびL3の各々は独立して、構造6または構造7：



であり、

構造中、構造6および7の各々において、

*は、Bへの結合点であり；

各Xは独立して、官能基であり；

RおよびR'は各々独立して、スペーサー基であり；

cは1以上の整数であり；かつ

[R'-(p)_a-N-(p)_b]の各反復において、

R'は、スペーサー基であるか、または存在せず；

各pは独立して、リン酸の誘導体であり；

Nはヌクレオシドであり；

aおよびbは各々独立して、0以上の整数であり、但し、aおよびbは、両方とも0であることはできない。

10

【0051】

ある態様において、リンカー化合物内の1つのXは、リンカー化合物内の他の2つのXとは異なり；任意で、各Xは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

20

【0052】

ある態様において、リンカー化合物内の各Xは、リンカー化合物内の他のXとは異なり；任意で、各Xは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【0053】

ある態様において、リンカー化合物内のXの全ては、同じであり；任意で、Xは、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【0054】

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリーール、ヘテロアリーール、ヘテロシクリル、アルキル-アリーール、アルキル-ヘテロアリーール、またはアルキル-ヘテロシクリルである。

30

【0055】

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、C₁~10アルキル、C₁~10アルキルエーテル、6~10員アリーール、5~10員ヘテロアリーール、5~10員ヘテロシクリル、(C₁~10アルキル)-(6~10員アリーール)、(C₁~10アルキル)-(5~10員ヘテロアリーール)、または(C₁~10アルキル)-(5~10員ヘテロシクリル)である。

【0056】

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、C₂~C₁₀アルキル、C₂~C₁₀アルキルエーテル、またはC₆~C₁₀アリーールである。

40

【0057】

ある態様において、RおよびR'は各々独立して、C₂、C₃、C₄、C₅、またはC₆アルキルである。

【0058】

ある態様において、RおよびR'はC₆アルキルである。

【0059】

ある態様において、RおよびR'は1,4-フェニレンである。

【0060】

ある態様において、cは、1~10の整数である。

【0061】

50

ある態様において、cは、2、3、または4である。

【0062】

ある態様において、aおよびbは各々独立して、0、1、2または3であり、但し、aおよびbは、両方とも0であることはできない。

【0063】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、アルキル、アルキルエーテル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アルキル-アリール、アルキル-ヘテロアリール、アルキル-ヘテロシクリルであるか、または存在しない。

【0064】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 $C_1 \sim 10$ アルキル、 $C_1 \sim 10$ アルキルエーテル、6~10員アリール、5~10員ヘテロアリール、5~10員ヘテロシクリル、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(6~10員アリール)、($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5~10員ヘテロアリール)、もしくは($C_1 \sim 10$ アルキル)-(5~10員ヘテロシクリル)であるか、または存在しない。

10

【0065】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキルエーテル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリールであるか、または存在しない。

【0066】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 もしくは C_6 アルキルであるか、または存在しない。

20

【0067】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、 C_6 アルキルであるか、または存在しない。

【0068】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、 R'' は独立して、1,4-フェニレンであるか、または存在しない。

【0069】

ある態様において、 $[R''-(p)_a-N-(p)_b]$ の各反復において、各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートである。

30

【0070】

ある態様において、少なくとも1つのNは、逆位ヌクレオシドである。

【0071】

ある態様において、cは2以上であり、かつ少なくとも2つのNは、同じヌクレオシドである。

【0072】

ある態様において、各Nはウリジンである。

【0073】

ある態様において、各Nはチミジンである。

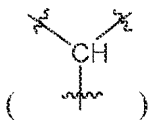
【0074】

ある態様において、cは2以上であり、かつ少なくとも1つのNは、別のNとは異なっている。

40

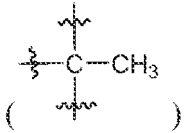
【0075】

ある態様において、Bは、メタントリイル

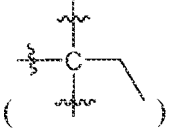


、エタントリイル

50



、プロパントリイル

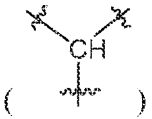


10

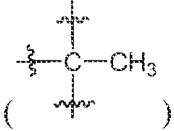
、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、三置換アリアル、または置換アンモニアである。

【0076】

ある態様において、Bは、メタントリイル

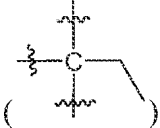


、エタントリイル



20

、プロパントリイル



30

、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンである。

【0077】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、各ヌクレオチドは独立して、天然に存在するヌクレオチド、任意で、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド；人工もしくは非天然のヌクレオチド類似体；または前述のいずれかの化学修飾されたバージョンである。

【0078】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、各Nは独立して、天然に存在するヌクレオチド、任意で、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド；人工もしくは非天然のヌクレオチド類似体、または前述のいずれかの化学修飾されたバージョンである。

40

【0079】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、化合物は、細胞内ヌクレアーゼに比べて血清ヌクレアーゼによる切断に対して高い安定性を示すように構成されるかまたは選択される。

【0080】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、リンカー化合物は、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、

50

または約100%純粋である。

【0081】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、リンカー化合物は約85%~約95%純粋である。

【0082】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、リンカー化合物は、75%以上純粋；85%以上純粋；または95%以上純粋である。

【0083】

本開示は、サブユニットを含む多量体オリゴヌクレオチドを提供し、サブユニットの各々は独立して、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつサブユニットの1つまたは複数は、前述のリンカー化合物のいずれかとの反応によって形成される共有結合を介して別のサブユニットに連結される。

10

【0084】

ある態様において、サブユニットの各々は、前述のリンカー化合物のいずれかとの反応によって形成される共有結合を介して隣接するサブユニットに連結される。

【0085】

ある態様において、少なくとも2つのサブユニットは、実質的に異なっている。

【0086】

ある態様において、サブユニットの全ては、実質的に同じである。

【0087】

ある態様において、多量体オリゴヌクレオチドは、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのサブユニットを含む。

20

【0088】

ある態様において、各サブユニットは、15~30、17~27、19~26、または20~25ヌクレオチド長である。

【0089】

ある態様において、1つまたは複数のサブユニットは、二本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0090】

ある態様において、1つまたは複数のサブユニットは、一本鎖オリゴヌクレオチドである。

30

【0091】

ある態様において、1つまたは複数のサブユニットは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0092】

ある態様において、各サブユニットは独立して、siRNA、saRNA、またはmiRNAである。

【0093】

ある態様において、各サブユニットは二本鎖siRNAである。

【0094】

ある態様において、多量体オリゴヌクレオチドは、ターゲティング剤をさらに含む。

40

【0095】

本開示は、前述の二価のリンカー化合物のいずれかとの反応により第2の生物活性化合物に連結された第1の生物活性化合物を含むコンジュゲートを提供する。

【0096】

ある態様において、第1および第2の生物活性化合物の各々は独立して、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、有機金属化合物、または小分子薬物である。

【0097】

ある態様において、生物活性化合物の少なくとも1つは、オリゴヌクレオチドである。

【0098】

50

ある態様において、生物活性化合物の少なくとも1つは、抗体または抗体断片である。

【0099】

ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0100】

ある態様において、第1の生物活性化合物はモノクローナル抗体であり、かつ第2の生物活性化合物はオリゴヌクレオチドである。

【0101】

ある態様において、コンジュゲートは、ターゲティング剤をさらに含む。

【0102】

ある態様において、コンジュゲートは、一緒に連結されて多量体オリゴヌクレオチドを形成する、2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。 10

【0103】

本開示は、構造5を含む三価のリンカー化合物との反応により一緒に連結された第1の、第2のおよび第3の生物活性化合物を含むマルチコンジュゲートを提供する。

【0104】

ある態様において、第1の、第2のおよび第3の生物活性化合物の各々は独立して、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、有機金属化合物、または小分子薬物である。

【0105】

ある態様において、生物活性化合物の少なくとも1つは、オリゴヌクレオチドである。

【0106】

ある態様において、生物活性化合物の2つは各々独立して、オリゴヌクレオチドである。 20

【0107】

ある態様において、少なくとも1つの生物活性化合物は、抗体または抗体断片である。

【0108】

ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0109】

ある態様において、第1の生物活性化合物はモノクローナル抗体であり、かつ第2のおよび第3の生物活性化合物は各々独立して、オリゴヌクレオチドである。

【0110】

ある態様において、マルチコンジュゲートは、ターゲティング剤をさらに含む。 30

【0111】

ある態様において、マルチコンジュゲートは、一緒に連結されて多量体オリゴヌクレオチドを形成する、2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【0112】

本開示は、第1の化合物Aとリンカー化合物との間の第1の共有結合および第2の化合物Bとリンカー化合物との間の第2の共有結合の形成を促進する反応条件下で、前述の二価のリンカー化合物のいずれかをAおよびBと、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、第1の化合物Aを第2の化合物Bに連結するための方法を提供する。

【0113】

ある態様において、AはBと異なり；任意で、リンカー化合物上の末端官能基は、異なる官能基である。 40

【0114】

ある態様において、AとBは同じであり；任意で、リンカー化合物上の末端官能基は、同じ官能基である。

【0115】

ある態様において、AおよびBは各々、オリゴヌクレオチド；任意で、siRNAである。

【0116】

ある態様において、Aは、オリゴヌクレオチドまたは多量体オリゴヌクレオチドであり、かつBは、抗体または抗体断片である。 50

【0117】

ある態様において、オリゴヌクレオチドはsiRNAである。

【0118】

本開示は、リンカー化合物とA、BおよびCの各々との間の共有結合の形成を促進する反応条件下で、前述の三価のリンカー化合物のいずれかをA、BおよびCの各々と、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、化合物A、BおよびCと一緒に連結するための方法を提供する。

【0119】

ある態様において、A、BおよびCの少なくとも1つは、他の2つと異なり；任意で、リンカー化合物内の少なくとも1つの官能基は、他の2つの官能基とは異なる官能基である。 10

【0120】

ある態様において、A、BおよびCの1つは抗体であり、かつ他の2つはオリゴヌクレオチドであり；任意で、抗体はモノクローナル抗体であり、かつオリゴヌクレオチドはsiRNAである。

【0121】

ある態様において、3つの化合物A、BおよびCは全て異なり；任意で、リンカー化合物内の各官能基は、異なる官能基である。

【0122】

ある態様において、3つの化合物A、BおよびCは全て同じであり；任意で、リンカー化合物内の各官能基は、同じ官能基である。 20

【0123】

本開示は、前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法を提供する。

【0124】

本開示は、前述のコンジュゲートのいずれかを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法を提供する。

【0125】

本開示は、前述のマルチコンジュゲートのいずれかを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法を提供する。

【0126】

本開示は、前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかと、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物を提供する。 30

【0127】

本開示は、前述のコンジュゲートのいずれかと、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物を提供する。

【0128】

本開示は、前述のマルチコンジュゲートのいずれかと、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物を提供する。

【0129】

本開示は、医薬の製造における使用のための、前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかを含む組成物を提供する。 40

【0130】

本開示は、医薬の製造における使用のための、前述のコンジュゲートのいずれかを含む組成物を提供する。

【0131】

本開示は、医薬の製造における使用のための、前述のマルチコンジュゲートのいずれかを含む組成物を提供する。

【0132】

本開示は、細胞を、前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかと接触させる工程、および多量体オリゴヌクレオチドが細胞に進入しかつ標的遺伝子の活性が調節される条件下 50

で、細胞を維持する工程を含む、細胞において標的遺伝子の活性を調節する方法を提供する。

【0133】

本開示は、細胞を、前述のコンジュゲートのいずれかと接触させる工程、およびコンジュゲートが細胞に進入しかつ生物活性化合物の活性が観察される条件下で、細胞を維持する工程を含む、細胞において生物活性化合物の活性を観察する方法を提供する。

【0134】

本開示は、細胞を、前述のマルチコンジュゲートのいずれかと接触させる工程、およびマルチコンジュゲートが細胞に進入しかつ生物活性化合物の活性が観察される条件下で、細胞を維持する工程を含む、細胞において生物活性化合物の活性を観察する方法を提供する。

10

【発明を実施するための形態】

【0135】

詳細な説明

本明細書において説明され、特許請求される開示の日付の時点で当業者に公知の最先端技術を本明細書においてより完全に説明するために、本明細書において参照される任意の特許、特許出願、および刊行物の開示は、これによってその全体が参照により本出願に組み入れられる。

【0136】

「アルキル」は、直鎖型または分岐型の飽和脂肪族ラジカルを指す。アルキル基中に存在する炭素原子の数は、数値によって指定され得る（例えば、 C_3 アルキルは3個の炭素原子を含有する）。アルキル基のサイズ範囲は、炭素原子の数の範囲を表示することによって指定することができる（例えば、1～3個の炭素原子を含有するアルキル基では C_1 ～ C_3 アルキル）。例えば、 C_1 ～ C_6 アルキルには、これらに限定されないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル等が含まれる。アルキル基の非限定的な例としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、1-メチルブチル（すなわち、2-ペンチル）、1-エチルプロピル（すなわち、3-ペンチル）、および3-メチルペンチル等が挙げられる。アルキルは、任意の数の炭素、例えば、1～2個、1～3個、1～4個、1～5個、1～6個、1～7個、1～8個、1～9個、1～10個、2～3個、2～4個、2～5個、2～6個、3～4個、3～5個、3～6個、4～5個、4～6個、および5～6個の炭素を含むことができる。アルキル基は典型的には一価であるが、例えば、アルキル基は2つの部分を一緒に連結すると、二価になることができ、「アルキル」は、2つ官能性が付加されるとアルキレンを含むと理解される。

20

30

【0137】

「アルキルエーテル」は、鎖の中に1～12個の炭素原子および1～12個の酸素原子を含有する、直鎖型または分岐鎖型の飽和炭化水素を指す。アルキルエーテルの例としては、 $-(\text{アルキル})-\text{O}-$ または $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ によって表されるものが挙げられ、式中、 n は1～6の範囲での整数であり、かつ m は、1～12の範囲での整数である。ポリエチレングリコール（PEG）基またはリンカーは、 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$ によって表され得るアルキルエーテルの例である。「アルコキシ」は、アルキル基の末端に結合している1個の酸素原子を含有するアルキルエーテルの一例、例えば、 $-\text{O}-$ (アルキル)である。アルコキシ基の例としては、限定されないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、*t*-ブトキシ、またはペントキシ基が挙げられる。

40

【0138】

「アリール」は、6～16個の環炭素原子を含有する、単環式または縮合二環式もしくは三環式以上の芳香族環アセンブリーを指す。アリール基の例としては、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル、フェナントレニル、ナフタセニル、フルオレニル、およびピレニル等が挙げられる。「アリレン」は、アリール基に由来する二価ラジカルを意味する。アリール基は、それらの全てが、例えば、前述で規定されたように、任意でさらに

50

置換される、アルキル、アルコキシ、アリール、ヒドロキシ、ハロゲン、シアノ、アミノ、アミノ-アルキル、トリフルオロメチル、アルキレンジオキシ、およびオキシ-C2-C3-アルキレンから選択される1、2または3つのラジカル；または1-もしくは2-ナフチル；または1-もしくは2-フェナントレニルによって一置換、二置換または三置換することができる。

【0139】

「ヘテロアリール」は、その環原子の1~4個が各々、N、OおよびSから独立して選択されるヘテロ原子である、5~16個の環原子を含有する単環式または縮合二環式もしくは三環式の芳香環アセンブリーを指す。ヘテロアリールの非限定的な例としては、ピリジル、インドリル、インダゾリル、キノキサリニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、フラニル、ピロリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チエニル、または例えばアルキル、ニトロまたはハロゲンによって置換されている、特に、一置換または二置換されている任意の他のラジカルが挙げられる。ピリジルは、2-、3-または4-ピリジル、有利には2-または3-ピリジルである。チエニルは2-または3-チエニルである。キノリニルは、好ましくは2-、3-または4-キノリニルである。イソキノリニルは、好ましくは1-、3-または4-イソキノリニルである。ベンゾピラニル、ベンゾチオピラニルはそれぞれ、好ましくは3-ベンゾピラニルまたは3-ベンゾチオピラニルである。チアゾリルは、好ましくは2-または4-チアゾリル、最も好ましくは4-チアゾリルである。トリアゾリルは、好ましくは1-、2-または5-(1,2,4-トリアゾリル)である。テトラゾリルは、好ましくは5-テトラゾリルである。

10

20

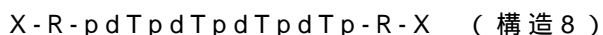
【0140】

「ヘテロシクリル」は、3個の環員~約20個の環員およびN、OおよびSから独立して選択される1~約5個のヘテロ原子を有する環系を指す。例えば、ヘテロシクリルには、これらに限定されないが、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフエニル、モルホリン、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、ピペリジニル、インドリニル、キヌクリジニル、および1,4-ジオキサ-8-アザ-スピロ[4.5]デカ-8-イルが含まれる。

【0141】

リンカー化合物

本開示の概要に記載されるリンカー化合物に加えて、本開示は、構造8：



のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンであり；各Rは独立して、C₂~C₆アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

30

【0142】

構造8のリンカー化合物のある態様において、各Xはマレイミドである。

【0143】

構造8のリンカー化合物のある態様において、各Xはアジドである。

40

【0144】

構造8のリンカー化合物のある態様において、各Xはアルキンである。

【0145】

構造8のリンカー化合物のある態様において、各Xは活性化カルボキシルである。

【0146】

構造8のリンカー化合物のある態様において、各Xはアミンである。

【0147】

構造8のリンカー化合物のある態様において、一方のXはマレイミドであり、かつもう一方のXは独立して、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

50

【 0 1 4 8 】

構造8のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアジドであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【 0 1 4 9 】

構造8のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアルキンであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【 0 1 5 0 】

構造8のリンカー化合物のある態様において、一方のXは活性化カルボキシルであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、またはアミンである。

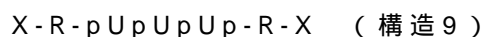
【 0 1 5 1 】

構造8のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアミンであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、または活性化カルボキシである。

10

【 0 1 5 2 】

ある態様において、本開示は、構造9：



のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンであり；各Rは独立して、C₂～C₆アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

20

【 0 1 5 3 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、各Xはマレイミドである。

【 0 1 5 4 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、各Xはアジドである。

【 0 1 5 5 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、各Xはアルキンである。

【 0 1 5 6 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、各Xは活性化カルボキシルである。

【 0 1 5 7 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、各Xはアミンである。

30

【 0 1 5 8 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、一方のXはマレイミドであり、かつもう一方のXは独立して、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【 0 1 5 9 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアジドであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【 0 1 6 0 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアルキンであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、活性化カルボキシル、またはアミンである。

【 0 1 6 1 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、一方のXは活性化カルボキシルであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、またはアミンである。

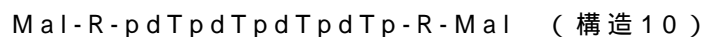
40

【 0 1 6 2 】

構造9のリンカー化合物のある態様において、一方のXはアミンであり、かつもう一方のXは独立して、マレイミド、アジド、アルキン、または活性化カルボキシである。

【 0 1 6 3 】

ある態様において、本開示は、構造10：



のリンカー化合物を提供し、

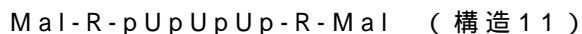
構造中、Malはマレイミドであり；各Rは独立して、C₂～C₆アルキルであり；各pは独立

50

して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

【0164】

ある態様において、本開示は、構造11：

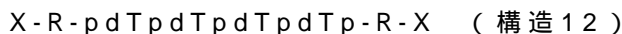


のリンカー化合物を提供し、

構造中、Malはマレイミドであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

【0165】

ある態様において、本開示は、構造12：

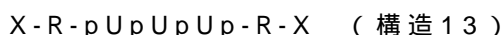


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、アルキンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり、各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

【0166】

ある態様において、本開示は、構造13：

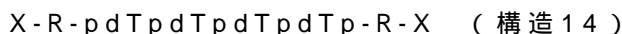


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、アルキンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり、各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

【0167】

ある態様において、本開示は、構造14：

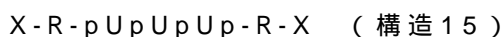


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは、アジドであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

【0168】

ある態様において、本開示は、構造15：

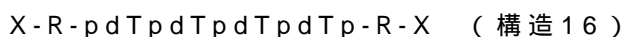


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは、アジドであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

【0169】

ある態様において、本開示は、構造16：

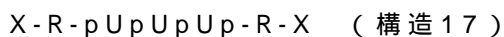


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、活性化カルボキシルであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

【0170】

ある態様において、本開示は、構造17：



のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、活性化カルボキシルであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、

10

20

30

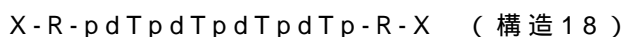
40

50

またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

【0171】

ある態様において、本開示は、構造18：

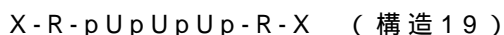


のリンカー化合物を提供し、

構造中、各Xは独立して、アミンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

【0172】

ある態様において、本開示は、構造19：



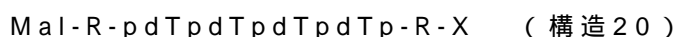
のリンカー化合物を提供し、

構造中、Xは独立して、アミンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

10

【0173】

ある態様において、本開示は、構造20：



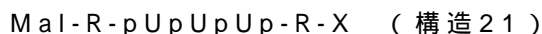
のリンカー化合物を提供し、

構造中、Malはマレイミドであり；Xは、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。

20

【0174】

ある態様において、本開示は、構造21：



のリンカー化合物を提供し、

構造中、Malはマレイミドであり；Xは、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンであり；各Rは独立して、 $C_2 \sim C_6$ アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつUはウリジンである。

30

【0175】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、Nは独立して、天然に存在するヌクレオシド（例えば、リボヌクレオシドまたはデオキシリボヌクレオシド）、人工もしくは非天然のヌクレオシド類似体、または前述のいずれかの化学修飾されたバージョンである。

【0176】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、リンカー化合物は、細胞内ヌクレアーゼに比べて血清ヌクレアーゼによる切断に対して高い安定性を示すように構成されるかまたは選択される。

40

【0177】

前述のリンカー化合物のいずれかのある態様において、リンカー化合物は、単離されているか、または実質的に純粋である。例えば、化合物は、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%純粋であることができる。1つの態様において、化合物は、約85%～約95%純粋である。

【0178】

調整可能なリンカー化合物

本開示は、細胞内ヌクレアーゼに比べて血清ヌクレアーゼによる切断に対して高い安定性を示すように構成されるかまたは選択されるリンカー化合物の態様に関する。この特徴は、そのようなリンカー化合物によって一緒に連結された化合物が、投与された場合に増

50

強された寿命、およびしたがって標的細胞に対する増強された生物学的利用能を有し、依然として細胞進入後に活性形態で容易に放出されることを可能にする。

【0179】

ヌクレアーゼ - DNAおよびRNAなどの核酸を切断する酵素 - は、人体において遍在性であり、それらは、感染性因子に対する防御とさらに代謝プロセスの重要な部分との両方を形成する。ヌクレアーゼの2つの主なタイプが公知であり、エキソヌクレアーゼは末端から核酸を分解し、エンドヌクレアーゼは内部から核酸を分解する。エキソヌクレアーゼは実質的には、血液および血清などの体液中に認められる唯一の種類 (variety) であり、身体の細胞内では、両方のタイプが認められる。開示されるリンカー化合物のそのような態様の重要な局面は、エキソヌクレアーゼに対する耐性および同時のエンドヌクレアーゼに対する感受性である。

10

【0180】

種々の態様において、末端にある連結官能基は本質的に非核酸であり、したがってリンカー全体はエキソヌクレアーゼに対して感受性を有さないことから、リンカー化合物はエキソヌクレアーゼに対して耐性を有する。それに対して、そのようなリンカー化合物の内部領域は、エンドヌクレアーゼに対して感受性を有する1つまたは複数の核酸残基を含有することができる。この感受性は、ヌクレオシド、リン酸誘導体、および介在スペーサー基の数、種類および位置を変更することによって、好みに応じて増加または減少させることができる。したがって、エンドヌクレアーゼに対するリボヌクレオチドのより高い不安定性を利用することによって、リンカーは、迅速な切断のためにUpUpUp配列を含有してもよい。あるいは、内部リンカー配列は、エンドヌクレアーゼに対するより高い安定性のためにdTp-アルキル-dTpであってもよい。一般に、リボヌクレオチドより高い割合のデオキシリボヌクレオチド、より高い割合のスペーサー基、および単純なホスファートとは対照的により高い割合のリン酸誘導体は、リンカーの安定性の増大および対応するエンドヌクレアーゼによる切断の速度の低下をもたらす。逆も同様である。

20

【0181】

このように、リンカー化合物の生物学的特徴は、使用者の要求に対して「調整」することができる。

【0182】

リンカー化合物を含むコンジュゲートおよびマルチコンジュゲート

30

リンカー化合物は、その種々の態様の全てにおいて上記されるように、例えば生物活性化合物を含む、種々の化学的または生物学的化合物を連結するための連結またはコンジュゲーション反応において用いられてもよい。生物活性化合物は、生物学的作用、一部の場では測定可能な生物学的作用を有する任意の分子または作用物質である。生物活性化合物としては、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、オリゴヌクレオチド、ターゲティング剤、炭水化物、多糖、脂質、有機化合物、無機化学化合物、有機金属化合物、小分子薬物、検出可能な標識、および前述のいずれかの誘導体が挙げられる。

【0183】

用語「検出可能な標識」は、本明細書において用いられる場合、当業者によって理解されるその通常の意味を有する。それは、蛍光分光法などの画像化技術によって検出可能である、化学基を指す。例えば、検出可能な標識は、エネルギーの吸収後に規定された波長で放射線を放出する、フルオロフォアを含む色素であってもよい。多数の適した蛍光標識または色素が公知である。例えば、Welch et al. (Chem. Eur. J. 5(3):951-960, 1999)は、ダンシルで官能化された蛍光部分を開示し、Zhu et al. (Cytometry 28:206-211, 1997)は、蛍光標識Cy3およびCy5の使用を記載する。他の標識は、Prober et al. (Science 238:336-341, 1987); Connell et al. (BioTechniques 5(4):342-384, 1987), Ansorge et al. (Nucl. Acids Res. 15(11):4593-4602, 1987)、およびSmith et al. (Nature 321:674, 1986)に記載される。市販の蛍光標識の例としては、これらに限定されないが、フルオレセイン、ローダミン (例えば、TMR、テキサスレッドまたはRox)、アレクサ、ボディパイ、アクリジン、クマリン、ピレン

40

50

、ベンズアントラセン、およびシアニン（例えばCy2またはCy4）が挙げられる。検出可能な標識の他の形態には、量子ドット（Empodocles, et al., Nature 399:126-130, 1999）、金ナノ粒子（Reichert et al., Anal. Chem. 72:6025-6029, 2000）、マイクロビーズ（Lacoste et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 97(17):9461-9466, 2000）、および質量分析によって検出可能なタグを含む、マイクロ粒子が含まれる。検出可能な標識は、検出のために別の化合物との相互作用に依拠するマルチコンポーネント標識、例えば、ビオチン-ストレプトアビジンシステムであってもよい。

【0184】

生物活性化合物のコンジュゲートには、これらに限定されないが小分子薬物またはオリゴヌクレオチド治療剤を含む薬剤にコンジュゲートされた抗体または抗体断片を含む抗体薬物コンジュゲート；他のタンパク質コンジュゲート；およびオリゴヌクレオチドコンジュゲートが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、コンジュゲートは、CRISPR/Ca、TALE、TALEN、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）などの遺伝子編集システムに關与するオリゴヌクレオチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含む。

10

【0185】

ある態様において、コンジュゲートは、これらに限定されないが構造1~4および6~21のいずれかに記載の二価のリンカー化合物を含む、本開示における種々の態様のいずれかに記載のリンカー化合物との反応によって形成される共有結合を介して第2の化合物にコンジュゲートされた第1の化合物を含む。ある態様において、第1の化合物および第2の化合物の各々は独立して、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、オリゴヌクレオチド、ターゲティング剤、炭水化物、多糖、脂質、他の有機化合物、無機化合物、有機金属化合物、小分子薬物、または前述のいずれかの誘導体である。

20

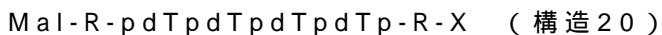
【0186】

さらなる態様において、コンジュゲートは、本明細書において記載される態様のいずれかによるか、または当技術分野において公知の多量体オリゴヌクレオチドの他の種類による、多量体オリゴヌクレオチドを含み、これらには、例えば、異なる種類のリンカーおよび異なる合成戦略から作製されるものが含まれる（例えば、それらの各々が参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、WO 2016/205410 A2；WO 2018/145086 A1；WO 2020/180897；WO 2021/026476；WO 2021/021959 A2およびWO 2021/026490を参照）。

30

【0187】

ある態様において、コンジュゲートは、これらに限定されないが構造1~4および6~21の態様を含む、開示された態様のいずれかに記載のリンカー化合物との反応によって形成される共有結合を介してオリゴヌクレオチドまたは多量体オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされた抗体または抗体断片である。1つのそのような態様において、リンカー化合物は、構造20：



に記載の化合物であり、

構造中、Malはマレイミドであり；Xは、アジド、アルキン、活性化カルボキシル、またはアミンであり；各Rは独立して、C₂~C₆アルキルであり；各pは独立して、ホスファート、ホスホロチオアート、ジチオホスファート、またはホスホナートであり；かつdTはチミジンである。別の態様において、リンカー化合物内の一方の末端官能基（X）はマレイミドであり、かつもう一方の末端官能基（X'）はシクロオクチニルである。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である；あるいは、モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体である。ある態様において、オリゴヌクレオチドまたは多量体オリゴヌクレオチドはsiRNAである。

40

【0188】

他の態様において、リンカー化合物は、複数の化学的または生物学的作用物質を連結して「マルチコンジュゲート」を形成するための一連のリンカーまたはコンジュゲーション

50

反応で用いられてもよい。

【0189】

ある態様において、マルチコンジュゲートは、これらに限定されないが構造5に記載の三価のリンカー化合物を含む、本開示における種々の態様のいずれかに記載の多価リンカー化合物との反応によって形成される共有結合を介して一緒にコンジュゲートされる第1の化合物、第2の化合物、および第3の化合物を含む。ある態様において、第1の、第2の、および第3の化合物の各々は独立して、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、オリゴヌクレオチド、ターゲティング剤、炭水化物、多糖、脂質、他の有機化合物、無機化合物、有機金属化合物、小分子薬物、または前述のいずれかの誘導体である。

【0190】

マルチコンジュゲートのある態様において、第1の、第2の、および第3の化合物の各々は独立して、抗体、抗体断片、オリゴヌクレオチド、または多量体オリゴヌクレオチドである。

【0191】

ある態様において、マルチコンジュゲートは、構造1~4および6~21のような二価または構造5のような多価にかかわらず、本明細書における態様のいずれかに記載のリンカー化合物との反応によって形成される共有結合を介して、少なくとも2つのサブユニットと一緒に連結されている、2つ以上のオリゴヌクレオチド「サブユニット」(各々が独立して「サブユニット」)で構成されている多量体オリゴヌクレオチドである。ある態様において、サブユニットは、同じサブユニットの複数のコピーまたは異なるサブユニットであってもよい。ある態様において、サブユニットの各々は独立して、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0192】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、サブユニットの各々は、構造1~4および6~21のような二価または構造5のような多価にかかわらず、本明細書における態様のいずれかに記載のリンカー化合物との反応によって形成される共有結合を介して隣接するサブユニットに連結される。

【0193】

前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかにおいて、少なくとも2つのサブユニットは、実質的に異なっている；あるいは、多量体オリゴヌクレオチド内のサブユニットの全ては、実質的に互いに異なる。

【0194】

前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかにおいて、少なくとも2つのサブユニットは同じである；あるいは、多量体オリゴヌクレオチド内のサブユニットの全ては、同じである。

【0195】

ある態様において、多量体オリゴヌクレオチドは、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのサブユニットを含む。

【0196】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、各サブユニットは、15~30、17~27、19~26、または20~25ヌクレオチド長である。

【0197】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、1つまたは複数のサブユニットは、二本鎖RNAである；あるいは、1つまたは複数のサブユニットは一本鎖RNAである。

【0198】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、1つまたは複数のサブユニットは、一本鎖または二本鎖形態でのDNAを含む。

【0199】

前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかにおいて、サブユニットの1つまたは複数は、一本鎖RNAまたはDNAである；あるいは、サブユニットの全ては、一本鎖RNAまた

10

20

30

40

50

はDNAである。

【0200】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、サブユニットは、一本鎖オリゴヌクレオチドと二本鎖オリゴヌクレオチドとの組み合わせを含む。

【0201】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、各サブユニットは、siRNA、saRNA、またはmiRNAである。

【0202】

多量体オリゴヌクレオチドのある態様において、各サブユニットは二本鎖siRNAである。

【0203】

ある態様において、多量体オリゴヌクレオチドは、siRNAの2つのサブユニットおよび構造8のリンカー化合物を含む。

【0204】

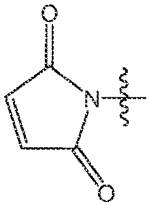
前述の多量体オリゴヌクレオチドのいずれかにおいて、サブユニットの1つまたは複数は、自己ハイブリダイズ二本鎖セグメント、例えば、これらに限定されないがアプタマーを含む、RNAまたはDNAである。

【0205】

コンジュゲート、マルチコンジュゲート、および多量体オリゴヌクレオチドは、例えば、低分子干渉RNA (siRNA)、低分子活性化RNA (saRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンタゴミル、CRISPR RNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用性RNA、メッセンジャーRNA (mRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、アプタマー、リボザイム、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、ギャップマー) を含む、核酸、二本鎖および一本鎖の全ての公知の種類を含み得る。

【0206】

末端マレイミド基



を含むリンカー化合物がコンジュゲートまたはマルチコンジュゲートの形成で用いられる前述のコンジュゲートおよびマルチコンジュゲートのいずれかのある態様において、マレイミド基は、連結反応における官能化化合物との反応時に、以下のような閉環構造または開環構造：



または

を形成し、後者の構造は、2種類の可能性のある開環位置異性体を表す複合構造であり、スクシニアミド酸の誘導体である。

【0207】

前述のコンジュゲートおよびマルチコンジュゲート化合物のいずれかのある態様において、化合物は単離されているか、または実質的に純粋である。例えば、化合物は、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%純粋であることができる。1つの態様において、化合物は約85%～約95%純粋である。

【0208】

コンジュゲートおよびマルチコンジュゲートを作製する方法

本開示は、第1の化合物とリンカー化合物との間の第1の共有結合および第2の化合物とリンカー化合物との間の第2の共有結合の形成を促進する反応条件下で、リンカー化合物を第1の化合物および第2の化合物と、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、第1の化合物を第2の化合物に連結するための方法であって、リンカー化合物が構造1~4および6~21のいずれかを含む、方法に関する。

【0209】

ある態様において、第1のおよび第2の化合物の少なくとも1つは生物活性化合物である；あるいは、第1のおよび第2の化合物の両方は生物活性化合物である。

10

【0210】

ある態様において、第1の化合物は第2の化合物と異なる。

【0211】

ある態様において、第1の化合物は第2の化合物と異なり、かつリンカー化合物は、異なる末端官能基を含む。

【0212】

ある態様において、第1の化合物と第2の化合物は同じである。

【0213】

ある態様において、第1の化合物と第2の化合物は同じであり、かつリンカー化合物は、同じである末端官能基を含む。

20

【0214】

ある態様において、第1のおよび第2の化合物は、オリゴヌクレオチドである。ある態様において、第1のおよび第2の化合物はsiRNAである。ある態様において、第1のおよび第2の化合物はsiRNAであり、かつリンカー化合物は構造8である。

【0215】

ある態様において、第1の化合物は、オリゴヌクレオチドまたは多量体オリゴヌクレオチドであり、かつ第2の化合物は抗体である。ある態様において、第1の化合物はsiRNAであり、かつ第2の化合物は抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。ある態様において、第1の化合物はsiRNAであり、第2の化合物は抗体（例えば、モノクローナル抗体）であり、かつリンカー化合物は構造18を含む。ある態様において、ある態様において、第1の化合物はsiRNAであり、第2の化合物は抗体（例えば、モノクローナル抗体）であり、かつリンカー化合物は、一方の末端官能基としてマレイミドおよびもう一方の官能基としてシクロオクチニルを含む。

30

【0216】

本開示は、構造5を含む三価のリンカー化合物と3つの化合物の各々との間の共有結合の形成を促進する反応条件下で、三価のリンカー化合物を3つの化合物の各々、同時にまたは連続して反応させる工程を含む、3つの化合物を一緒に連結するための方法に関する。

【0217】

ある態様において、3つの化合物の少なくとも1つは生物活性化合物である。

40

【0218】

ある態様において、3つの化合物の全ては生物活性化合物である。

【0219】

ある態様において、3つの化合物の少なくとも1つは、他の化合物と異なる。ある態様において、三価のリンカー化合物は、構造中、少なくとも1つのXは、他の2つのXとは異なる官能基であり、任意で、化合物の1つは抗体であり、かつ他の2つの化合物はオリゴヌクレオチド、任意でsiRNAである、構造5を含む。

【0220】

ある態様において、3つの化合物の各々は他と異なる。ある態様において、三価のリンカー化合物は、構造中、各Xは、他のXと比較して異なる官能基である、構造5を含む。

50

【0221】

核酸および修飾

種々の態様において、リンカー化合物および/もしくはコンジュゲート、マルチコンジュゲートの核酸、または多量体オリゴヌクレオチドは、例えば、インビトロおよびインビボでの改善された効力および安定性を含む、様々な作用を生じさせるために、当技術分野において公知の種々の戦略を用いて修飾されてもよい。これらの戦略の中には、これらに限定されないが2'-O-メチル置換RNAおよび2'-フルオロ-2'デオキシRNA；ペプチド核酸（PNA）；モルホリノ；ロックド核酸（LNA）；アンロックド核酸（UNA）；架橋核酸（BNA）；グリコール核酸（GNA）；トレオース核酸（TNA）；リボチミン（ribothymine）、プソイドウリジン、メチル-プソイドウリジン、およびモノ-およびジメチルグアニン；またはより一般的には、天然に存在するRNAおよびDNAに構造上類似しているが、天然に存在する分子のホスファート骨格、糖、または核酸塩基部分の1つまたは複数において変更を有する、核酸類似体、例えば、二環式および三環式ヌクレオチド類似体を含む、化学修飾された人工の核酸および希少核酸がある。類似体核酸塩基は、特に、異なる塩基対形成および塩基スタッキング特性を付与する。例としては、4種類の正規の塩基全てと対形成することができる、ユニバーサル塩基が挙げられる。

10

【0222】

他の態様において、核酸は、核酸塩基（多くの場合、当技術分野において単純に「塩基」と呼ばれる）修飾または置換を含むように修飾されてもよい。修飾された核酸塩基には、天然の核酸では稀にまたは一過性にのみ見出される核酸塩基、例えば、ヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン類、特に5-メチルシトシン（5-メチル-2'デオキシシトシンとも呼ばれ、当技術分野において多くの場合5-Me-Cと言及される）、5-ヒドロキシメチルシトシン（HMC）、グリコシルHMCおよびгентピオシルHMC、ならびに合成核酸塩基、例えば、2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニン、または他のヘテロ置換アルキルアデニン類、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N6(6-アミノヘキシル)アデニン、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp 75-77 (1980); Gebeyehu et al., Nucl. Acids Res, 15: 4513 (1997)。当技術分野において公知の「ユニバーサル」塩基、例えばイノシンもまた含むことができる。5-me-C置換は、0.6~1.2 で核酸二重鎖安定性を増大させることが示されていて (Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, pp 276-278 (1993)、塩基置換の局面である。修飾された核酸塩基は、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、および2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の8-置換アデニン類およびグアニン類、5-ハロ、特に、5-プロモ、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシル類およびシトシン類、7-メチルグアニン（methylguanin）および7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの、他の合成核酸塩基および天然核酸塩基を含むことができる。

20

30

40

【0223】

他の修飾はリン含有結合を含んでもよく、これには、これらに限定されないが、ホスホロチオアート、鏡像異性的に濃縮したホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'アルキレンホスホナートおよび鏡像異性的に濃縮したホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホ

50

スフィナート、3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含むホスホルアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、および通常の3'-5'結合を有するボラノホスファート、これらの2'-5'結合した類似体、ならびに、3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ連結される逆位の隣接するヌクレオシド単位を有するものが含まれる。

【0224】

種々の態様において、リンカー化合物、コンジュゲート、マルチコンジュゲート、または多量体オリゴヌクレオチドは、1個または複数個のホスホロチオアート基を含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、5'端に1~3個のホスホロチオアート基、または3'端に1~3個のホスホロチオアート基、または5'端および3'端に1~3個のホスホロチオアート基を含んでもよい。種々の態様において、各オリゴヌクレオチドは、0~15個の合計ホスホロチオアート基を含んでもよい。特定の態様において、各オリゴヌクレオチドは、10個未満、9個未満、8個未満、7個未満、6個未満、5個未満、4個未満、または3個未満の合計ホスホロチオアート基を含んでもよい。

10

【0225】

核酸の末端にある水酸基(-OH)は、スルフヒドリル基(-SH)、カルボキシル基(-COOH)またはアミン基(-NH₂)、ホルミル基(-CHO)、カルボニル基(-CO-)、エーテル基(-O-)、エステル基(-COO-)、ニトロ基(-NO₂)、アジド基(-N₃)、またはスルホン酸基(-SO₃H)、アルキン(-C≡C-)、またはアルケン(-CH=CH-)などの官能基で置換することができる。置換は、3'端または5'端で行うことができる。

20

【0226】

抗体

本開示は、治療剤または治療剤の複数のコピー(同じ剤または異なる剤にかかわらず)に抗体を連結できるリンカー化合物に関する。抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、またはその断片であってよい。リンカー化合物は、異なる直交性反応基(orthogonal reactive group)を介して治療剤に連結されつつ、マレイミド基を介して抗体または断片上のシステイン残基に結合するように用いられてもよい。

【0227】

あるいは、リンカー化合物は、マレイミド基を介して治療剤、例えばチオール化されたsiRNAに連結されつつ、シクロ-オクチン基を介して非天然のアミノ酸、例えば、p-アジドメチル-L-フェニルアラニンまたはアジド-リジンを含む抗体に連結されてもよい。

30

【0228】

全てのそのような場合において、正確な化学量論量の治療剤または作用物質が、これらに限定されないが構造5を含む三価のリンカー化合物を含む、構造1~4および6~21のいずれかを含むリンカー化合物の分枝型形態の利用によって、抗体上の連結されるアミノ酸の各々に対して導入されてもよい。異なる速度のエンドヌクレアーゼによる切断をもたらすリンカーの種々のアームにおいて異なる構成成分を有することによって、そのようなリンカー化合物に結合された治療剤の各々の異なる細胞内放出速度を有することも可能である。全ての場合において、そのような放出の速度は、抗体それ自体の分解の速度とは無関係である。

40

【0229】

ターゲティング剤

薬物送達システムは、特定の細胞または組織への送達を促進するように、ターゲティンググリガンドまたはコンジュゲートシステムを用いて設計されている。例えば、オリゴヌクレオチドは、特定の細胞タイプ内への送達を促進するために、コレステロール、糖、ペプチド、および他の核酸(例えば、アプタマー)にコンジュゲートすることができる。多くの場合、そのようなコンジュゲートシステムは、特定の細胞表面受容体に結合することによって特定の細胞タイプ内への送達を促進する。

【0230】

本開示のリンカー化合物は、細胞ターゲティングもしくは組織ターゲティンググリガンド

50

または他のターゲティング部分（以下、「ターゲティング剤」）を、細胞内または組織送達を目的とする任意の物質であるペイロードにコンジュゲートするために用いられ得る。ターゲティング剤は、パッケージを特定の標的に送達することを目的とする、ペイロードを含有するナノ粒子、エキソソーム、マイクロベシクル、ウイルスベクター、他のベクター、担体物質、または他の送達システム（「パッケージ」）の表面上にアクセス可能に作製され得る。あるいは、ターゲティング剤は、パッケージに製剤化する必要なく、標的への直接送達のためにペイロードに直接コンジュゲートされてもよい。

【0231】

本開示の範囲内のターゲティング剤には、これらに限定されないが、抗体、抗体断片、二本鎖抗体断片、または一本鎖抗体断片；他のタンパク質、例えば、糖タンパク質（例えば、トランスフェリン）および成長因子；ペプチド、細胞透過性ペプチド、ウイルスまたは細菌エпитープ、エンドソーム脱出ペプチドまたは他のエンドソーム脱出作用物質；ペプチドの化学的誘導体、例えば、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸（DUPA）；天然のまたは合成の炭水化物、例えば、単糖（例えば、ガラクトース、マンノース、N-アセチルガラクトサミン[「GalNAc」]）、多糖、またはクラスター、例えば、レクチン結合オリゴ糖、二分岐型GalNAc、または三分岐型GalNAc；脂質、例えば、ステロール（例えば、コレステロール）、リン脂質（例えば、リン脂質エーテル、ホスファチジルコリン、レシチン）；ビタミン化合物（例えば、トコフェロールまたは葉酸）；免疫賦活剤（例えば、CpGオリゴヌクレオチド）；アミノ酸（例えば、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（「RGD」）、核酸（例えば、アプタマー）；元素（例えば、金）；ならびに合成分子（例えば、アニスアミドおよびポリエチレングリコール）が含まれる。ある態様において、ターゲティング剤は、アプタマー、GalNAc、葉酸、脂質、コレステロール、またはトランスフェリンを含む。

【0232】

薬物送達システム

当業者により理解されるように、生物学的標的または作用の機構にかかわらず、治療用オリゴヌクレオチドは、生物体（例えば、治療の必要がある、ヒトなどの動物）における標的細胞にアクセスするために、一連の生理学的ハードルを克服しなければならない。例えば、治療用オリゴヌクレオチドは一般に、全てが望ましくない免疫応答を誘発することなく、血流におけるクリアランスを回避し、標的細胞タイプに進入し、次いで細胞質に進入しなければならない。このプロセスは一般に、非効率的と考えられており、例えば、インビボでエンドソームに進入するsiRNAの95%以上が、いずれの遺伝子サイレンシングにも影響を及ぼすことなく、リソソームにおいて分解されるかまたは細胞から外へ押し出される可能性がある。

【0233】

これらの障害を克服するために、科学者らは、数多くの薬物送達ビヒクルが設計している。これらのビヒクルは、小分子薬物、タンパク質薬物、および他の治療用分子に加えて、治療用RNAを送達するために用いられている。薬物送達ビヒクルは、糖、脂質、脂質様材料、タンパク質、ポリマー、ペプチド、金属、ヒドロゲル、コンジュゲート、およびペプチドのような多様な材料から作製されている。多くの薬物送達ビヒクルは、これらの群の組み合わせからの局面を組み入れ、例えば、一部の薬物送達ビヒクルは、糖と脂質とを組み合わせることができる。いくつかの他の例において、薬物は、細胞を模倣することを意味する「細胞様」材料中に直接隠すことができ、他の場合には、薬物は、細胞自体の中に、または細胞自体の上に置くことができる。薬物送達ビヒクルは、pH変化、生体分子濃度、磁界、および熱などの刺激に反応して薬物を放出するように設計することができる。

【0234】

多くの研究が、siRNAなどのオリゴヌクレオチドを肝臓に送達することに焦点を合わせている。インビボでの肝細胞への有効なsiRNA送達に必要なとされる用量は、過去10年間に10,000倍より多く減少しており、2006年に報告された送達ビヒクルは、標的タン

10

20

30

40

50

パク質産生のために10 mg/kg超のsiRNAを必要とする場合があったが、標的タンパク質産生のための新たな送達ビヒクルは、現在、0.001 mg/kg siRNAの全身注射後に低減することができる。オリゴヌクレオチド送達効率の増大は、少なくとも部分的に、送達ビヒクルの開発に起因し得る。

【0235】

別の重要な進歩は、ヘルパー成分が送達に影響を及ぼす方法の理解が増大していることである。ヘルパー成分は、根本の薬物送達システムに加えられる化学構造物を含むことができる。多くの場合、ヘルパー成分は、粒子の安定性または特定の器官への送達を改善することができる。例えば、ナノ粒子は、脂質で作製することができるが、これらの脂質ナノ粒子により媒介される送達は、親水性ポリマーおよび/または疎水性分子の存在により影響を受ける可能性がある。ナノ粒子送達に影響を及ぼす1つの重要な親水性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)である。他の親水性ポリマーは、非イオン性界面活性剤を含む。ナノ粒子送達に影響を及ぼす疎水性分子は、コレステロール、1-2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1-2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTMA)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、および他のものを含む。

10

【0236】

当業者は、公知の送達ビヒクルおよびターゲティングリガンドは一般に、本開示による使用のために適合できることを認識している。

【0237】

送達ビヒクルおよびターゲティングリガンド、ならびにそれらの使用の例は、以下において認めることができる：

Sahay, G., et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 31: 653-658 (2013); Wittrup, A., et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* (2015); Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8: 129-138 (2009); Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12: 967-977 (2013); Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704-717 (2016); Akinc, A., et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1357-1364 (2010); Nair, J.K., et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-

20

30

40

50

mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136: 16958-16961 (2014); Ostergaard, M.E., et al. Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015); Sehgal, A., et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21: 492-497 (2015); Semple, S.C., et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28: 172-176 (2010); Maier, M.A., et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21: 1570-1578 (2013); Love, K.T., et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107: 1864-1869 (2010); Akinc, A., et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26: 561-569 (2008); Eguchi, A., et al. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27: 567-571 (2009); Zuckerman, J.E., et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111: 11449-11454 (2014); Zuckerman, J.E. & Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 843-856 (2015); Hao, J., et al. Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29: 9206- 9209 (2015); Siegwart, D.J., et al. Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108: 12996-13001 (2011); Dahlman, J.E., et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648-655 (2014); Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1-20 (2001); Kim, H.J., et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8: 8979-8991 (2014); Krebs, M.D., Jeon, O. & Alsberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem Soc* 131, 9204-9206 (2009); Zimmermann, T.S., et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441: 111-114 (2006); Dong, Y., et al. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman

10

20

30

40

50

primates. *Proc Nat Acad USA*, 111: 3955-3960 (2014); Zhang, Y., et al. Lipid-modified aminoglycoside derivatives for in vivo siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25: 4641-4645 (2013); Molinaro, R., et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016); Hu, C.M., et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526: 118-121 (2015); Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. & Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34: 3647-3657 (2013); Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, 49-60 (2012); Mui, B.L., et al. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e139 (2013); Draz, M.S., et al. Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics*, 4: 872-892 (2014); Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 403-419 (2003); Kauffman, K.J., et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15: 7300-7306 (2015); Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 123, 1-10 (2007); Illum, L. & Davis, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 167: 79-82 (1984); Felgner, P.L., et al. Improved Cationic Lipid Formulations for In vivo Gene Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772: 126-139 (1995); Meade, B.R. & Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 134-140 (2007); Endoh, T. & Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 704-709 (2009); and Lee, H., et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nano*, 7: 389-393 (2012).

10

20

30

40

【 0 2 3 8 】

リンカー化合物を含む薬学的組成物

本開示は、活性医薬剤を含む薬学的組成物に関する。ある態様において、活性医薬剤は、これらに限定されないが構造1～4および6～21のいずれかを含む、本明細書に記載されるような二価のリンカー化合物、またはこれらに限定されないが構造5を含む本明細書に記載されるような多価リンカーとの反応によって形成される共有結合によって、別の物質または化合物に連結することができる。活性医薬剤は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、ターゲティングリガンド、炭水化物、多糖、脂質、有機化合物、または無機化合物であってもよい。

【 0 2 3 9 】

本明細書において用いられる場合、薬学的組成物には、疾患を予防、診断、緩和、処置

50

、または治癒するために用いることができる、1種または複数種の活性医薬剤を含有する、食物以外の物質の組成物が含まれる。同様に、本開示による種々の化合物または組成物は、医薬としての使用のためおよび/または医薬の製造における使用のための態様を含むように理解されるべきである。

【0240】

薬学的組成物は、これらに限定されないが構造1~21のいずれかのリンカー化合物を含む、本明細書に記載されるリンカー化合物との反応によって形成される共有結合により連結される活性医薬剤と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物を含むことができる。本明細書において用いられる場合、賦形剤は、活性成分と一緒に製剤化される天然または合成の物質であることができる。賦形剤は、長期安定化、体積の増大（例えば、増量剤、充填剤、または希釈剤）の目的で、または薬物吸収の促進、粘性の低減、もしくは溶解性の増強など、最終剤形において活性成分に対して治療上の増強を付与するために、含めることができる。賦形剤はまた、例えば、活性成分の取り扱いを助けるため、および/またはインビトロ安定性を助けるために（例えば、変性または凝集を阻止することにより）、製造および流通において有用であることもできる。当業者により理解されるように、適切な賦形剤の選択は、投与の経路、剤形、および活性成分を含む、種々の要因によって決定することができる。

【0241】

薬学的組成物は、局所的にまたは全身的に送達することができ、本開示の薬学的組成物のための投与経路は、適用によって異なってもよい。投与は、いずれかの特定の送達システムに限定される必要はなく、非限定的に、非経口（皮下、静脈内、髄内、関節内、筋肉内、腹腔内、実質内、脳室内、および髄腔内、大槽、および腰部を含む）、直腸、局所、経皮、または経口によるものを含んでもよい。個体への投与は、単一用量でもしくは反復投与で、ならびに様々な生理学的に許容される塩形態のいずれかで、ならびに/または薬学的組成物の一部としての許容される薬学的担体および/もしくは添加物またはアジュバントと共に行われてもよい。生理学的に許容される製剤、ならびに標準的な薬学的製剤の技法、投薬量、および賦形剤は、当業者に周知である（例えば、Physicians' Desk Reference (PDR(登録商標)) 2005, 59th ed., Medical Economics Company, 2004;およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennad o et al. 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005を参照）。

【0242】

薬学的組成物は、本明細書に記載されるリンカー化合物を用いて作製されるコンジュゲートまたはマルチコンジュゲートの有効量を含むことができる。本明細書において用いられる場合、有効量は、特定の目的を達成することを結果としてもたらす濃度もしくは量、または例えばプラセボとの比較などにおいて変化を引き起こすのに妥当な量であることができる。有効量が治療的有效量である場合、それは、治療的使用に妥当な量、例えば、疾患または状態を予防、診断、緩和、処置、または治癒するのに十分な量であることができる。有効量は、当技術分野において公知である方法によって決定することができる。有効量は、例えばヒト臨床試験によって、経験的に決定することができる。有効量はまた、当技術分野において公知である換算係数を用いて、1種の動物（例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ）から別の動物（例えば、ヒト）における使用のために外挿することもできる。例えば、Freireich et al., Cancer Chemother Reports 50(4):219-244 (1966)を参照。

【0243】

リンカー化合物を含む生成物を用いる方法

本開示はまた、これらに限定されないが、遺伝子発現の調節、生物学的研究、医学的状態の処置もしくは予防、および/または新たなもしくは改変された表現型の生成を目的とするインビトロもしくはインビボでの細胞への送達を含む、種々の適用において上記のリンカー化合物を含有する化合物を用いる方法に関する。

【0244】

10

20

30

40

50

本開示は、これらに限定されないが構造1~21のいずれかに記載のリンカー化合物を含む、本明細書に記載されるリンカー化合物に共有結合によって連結された活性医薬剤を含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、対象において疾患または状態を処置する方法に関する。

【0245】

本開示は、これらに限定されないが構造2~21のいずれかに記載のリンカー化合物を含む、本明細書に記載されるリンカー化合物に共有結合によって連結された活性医薬剤を含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、遺伝子発現を調節するための、例えば、対象において遺伝子発現を停止、阻害、または活性化するための、方法に関する。この方法のある態様において、活性医薬剤は、siRNA、saRNA、miRNA、アンタゴミル、CRISPR RNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用性RNA、メッセンジャーRNA、低分子ヘアピンRNA、アプタマー、リボザイム、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、ギャップマー）である。別の態様において、リンカー化合物は、遺伝子発現を調節するのに関与するタンパク質またはタンパク質断片、例えば、CRISPR-Casタンパク質エフェクター（例えば、Cas9）、TALE、TALEN、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、または前述のいずれかの誘導体のいずれかにコンジュゲートされてもよい。

10

【0246】

これらの方法の態様において、リンカー化合物は、タンパク質（これらに限定されないが、抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体または前述の断片を含む）、ペプチド、アミノ酸、核酸（これらに限定されないが、siRNA、saRNA、miRNA、アンタゴミル、CRISPR RNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用性RNA、メッセンジャーRNA、低分子ヘアピンRNA、アプタマー、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む）、ターゲティング剤、炭水化物、多糖、脂質、有機化合物、無機化合物、有機金属化合物、小分子薬物、造影剤、または前述のいずれかの誘導体の1つまたは複数にコンジュゲートされる。

20

【0247】

本明細書において用いられる場合、「対象」には、これらに限定されないが、霊長類、げっ歯類、および家畜（agricultural animal）などの哺乳動物が含まれる。霊長類対象には、これらに限定されないが、ヒト、チンパンジー、およびアカゲザルが含まれる。げっ歯類対象には、これらに限定されないが、マウスおよびラットが含まれる。家畜対象には、これらに限定されないが、ウシ、ヒツジ、仔ヒツジ、ニワトリ、およびブタが含まれる。

30

【0248】

以下の実施例は、例証となるものであり、制限となるものではない。技術の多くのバリエーションが、本開示の検討時に当業者に明らかになるであろう。そのため、技術の範囲は、実施例に関連せずに決定されるべきであるが、その代わりに、添付の特許請求の範囲に関連して、等価物のそれらの完全な範囲と共に決定されるべきである。

【実施例】

【0249】

オリゴリボヌクレオチドを、ホスホラミダイト化学を用いて、10 μmol スケールでABI 394および3900合成機（Applied Biosystems）で、または28 μmol スケールでOligopilot 10合成機でアSEMBルした。固体支持体は、2'-デオキシチミジン（Glen Research, Sterling, Virginia, USA）をロードしたポリスチレン、またはコントロールされた多孔性ガラス（controlled pore glass）（CPG、520、75 $\mu\text{mol/g}$ のローディングを有し、Prime Synthesis, Aston, PA, USAから入手）であった。補助的な合成試薬である、DNA-、2'-O-メチルRNA-、および2'-デオキシ-2'-フルオロ-RNAホスホラミダイトを、SAFC Proligo（Hamburg, Germany）から入手した。具体的には、2'-O-メチル-ウリジン（2'-OMe-U）、4-N-アセチル-2'-O-メチル-シチジン（2'-OMe-CAC）、6-N-ベンゾイル-2'-O-メチル-アデノシン（2'-OMe-Abz）、およ

40

50

び2-N-イソブチリルグアノシン (wasobutyrilguanosine) (2'-OMe-GiBu) の5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル (diwasopropyl))ホスホラミダイト単量体を用いて、オリゴマー配列を構築した。2'-OMe RNAビルディングブロックと同じ核酸塩基保護基を保有する、対応するホスホラミダイトを利用して、2'-フルオロ修飾を導入した。すべてのホスホラミダイト (アセトニトリル中70 mM) についてのカップリング時間は、活性化物質として5-エチルチオ-1H-テトラゾール (ETT、アセトニトリル中0.5 M) を利用して3分であった。ピリジンとアセトニトリルの1:1 (v/v) 混合物中の50 mM 3-((ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン (DDTT、AM Chemicals, Oceanside, California, USA) を用いて、ホスホロチオアート連結を導入した。公開されている方法 (Wincott, F. et al: Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23: 2677-2684 (1995)) にしたがって、DMT基の除去を含む固相合成 (「DMTオフ合成」) の完了時に、オリゴヌクレオチドを、固体支持体から切断し、水性メチルアミン (41%) と濃アンモニア水 (32%) からなる1:1混合物を用いて3時間、25 °C で脱保護した。

10

【0250】

その後、粗オリゴマーを、Source Q15 (GE Healthcare) で充填されたカラムおよびAKTA Explorerシステム (GE Healthcare) を用いて陰イオン交換HPLCにより精製した。緩衝液Aは、20%水性アセトニトリル中に10 mM過塩素酸ナトリウム、20 mMトリリス、1 mM EDTA、pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland) であった。緩衝液Bは、500 mM過塩素酸ナトリウムを有して緩衝液Aと同じであった。32カラム体積 (CV) 内で22% Bから42% Bの勾配を利用した。280 nmでのUVトレースを記録した。適切な画分をプールし、3M NaOAc、pH = 5.2および70%エタノールで沈殿させた。ペレットを、遠心分離により収集した。あるいは、Sephadex HiPrepカラム (GE Healthcare) を用い、製造業者の推奨にしたがって脱塩を行った。

20

【0251】

オリゴヌクレオチドを水中で再構成し、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により、オリゴヌクレオチドの同一性を確認した。純度を、分析用陰イオン交換HPLCにより評価した。

【0252】

実施例1：固相合成による、保護されたテトラ-チミジン三リン酸の調製

5'端にジメトキシトリチル基、3'端に遊離ヒドロキシル、および2-シアノエチル基によって保護された各ヌクレオチド間連結を有するチミジンの四量体を固相合成によって調製する。

30

【0253】

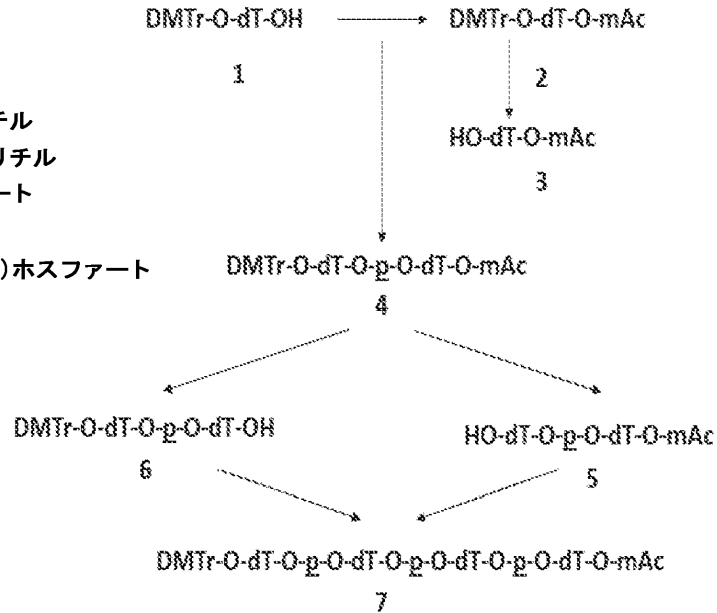
実施例2：溶液化学による、保護されたテトラ-チミジン三リン酸の調製

40

50

重要なスルーアウト:-

dT	チミジン
DMTr	ジメトキシトリチル
MMTr	モノメトキシトリチル
mAc	メトキシアセタート
Mal	マレイミド
<u>P</u>	(2-シアノエチル)ホスファート
P	ホスファート



10

5'-O-ジメトキシトリチルチミジン (1) (Sigma Aldrich) を、ピリジン中でメトキシ-酢酸無水物で処理する。1時間後、混合物を飽和炭酸水素ナトリウムで処理し、混合物を蒸発させる。残留物をジクロロメタンと炭酸水素ナトリウムとの間で分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、蒸発乾固させて、5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O'-メトキシアセチルチミジン (2) を得る。

20

【0254】

この物質をテトラヒドロフラン中に溶解し、トリクロロ酢酸で処理して、ジメトキシトリチル基を除去する。イミダゾールでの中和後、混合物を蒸発乾固させ、残留物を水で洗浄し、次いで五酸化リン上での真空下で乾燥させて、3'-O-メトキシアセチルチミジン (3) を得る。

【0255】

5'-O-ジメトキシトリチルチミジン 3'-O-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト (Glen Research) をアセトニトリル中に溶解し、テトラゾールで処理する。5分後、アセトニトリル中の3'-O-メトキシアセチルチミジン (2) を加え、さらに15分間全体を攪拌する。次いで、含水ピリジン中のヨウ素を加え、さらに15分後、含水チオ硫酸ナトリウムを加える。混合物を蒸発乾固させ、残留物をジクロロメタンと炭酸水素ナトリウムとの間で分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、蒸発乾固させる。残留物をシリカゲル上で短カラムクロマトグラフィーによって精製して、保護されたジチミジンホスファート 5'-O-ジメトキシトリチルチミジン 3'-O-(2-シアノエチル)ホスホロ-5'-O-チミジン-3'-O-メトキシアセタート (4) を得る。

30

【0256】

この物質を二分割する。第1の部分をトリクロロ酢酸で処理して、ジメトキシトリチル基を除去する。イミダゾールでの中和後、混合物を蒸発乾固させ、残留物を水で洗浄し、次いで五酸化リン上での真空下で乾燥させて、チミジン 3'-O-(2-シアノエチル)ホスホロ-5'-O-チミジン-3'-O-メトキシアセタート (5) を得る。

40

【0257】

第2の部分を希メタノール溶解性アンモニア (dilute methanolic ammonia) で5分処理し、次いで蒸発乾固させて、所望の5'-O-ジメトキシトリチルチミジン 3'-O-(2-シアノエチル)ホスホロ-5'-O-チミジン (6) を得る。この物質をアセトニトリル中で溶解し、(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルクロロホスホルアミダイトおよびトリエチルアミンで処理する。15分後、溶液を飽和炭酸水素ナトリウムで処理し、蒸発乾固させ、飽和炭酸水素ナトリウムとジクロロメタンとの間で分配する。有機層を乾燥させ、蒸発

50

乾固させて、所望の 5'-O-ジメトキシトリチルチミジン-3'-O-(2-シアノエチル)ホスホロ-5'-O-チミジン-3'-O-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイトを得る。

【0258】

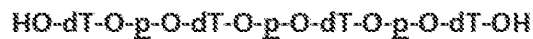
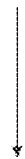
この物質をアセトニトリル中に溶解し、テトラゾールで処理する。5分後、アセトニトリル中のチミジン 3'-O-(2-シアノエチル)ホスホロ-5'-O-チミジン-3'-O-メトキシアセタート(5)を加え、さらに15分間全体を攪拌する。次いで、含水ピリジン中のヨウ素を加え、さらに15分後、含水チオ硫酸ナトリウムを加える。混合物を蒸発乾固させ、残留物をジクロロメタンと炭酸水素ナトリウムとの間で分配し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、蒸発乾固させる。残留物をシリカゲルで短カラムクロマトグラフィーによって精製して、5'端にジメトキシトリチル基、3'端にメトキシアセタート、および2-シアノエチル基によって保護された各ヌクレオチド間連結を有する、必要とされるテトラ-チミジン三リン酸(7)を得る。

【0259】

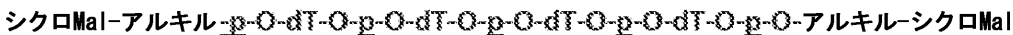
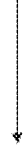
実施例3：末端マレイミド部分を有するホモ二官能性リンカー化合物の調製



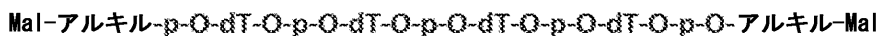
7



8



9

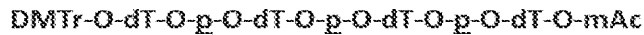


10

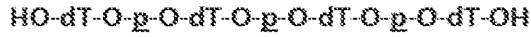
5'および3'末端マレイミド部分を有するテトラ-チミジン三リン酸(10)を、i)希メタノール溶解性アンモニアおよびii)トリクロロ酢酸を有するジオキサン中に溶解した実施例2で調製した完全に保護された物質(7)を連続的に処理し、その後続いて、イミダゾールにより中和することによって、調製する。ワークアップ後、生成物(8)を、2当量の2-(1,7-ジメチル-3,5-ジオキソ-10-オキサ-4-アザトリシクロ[5.2.1.0_{2,6}]デカ-8-エン-4-イル)-エチル-1-O-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト(Glen Research)およびテトラゾールで、続いて含水ピリジン中のヨウ素で処理して、2個の末端で保護されたマレイミド基を導入する(9)。ジオキサン中での厳密な無水テトラメチルグアニジンによるこの物質の処理は、ヌクレオチド間連結からシアノエチル保護基を除去する。精製後、生成物を厳密な無水トルエンで懸濁し、90 に加熱して、末端マレイミドの保護を解除し、所望のホモ二官能性リンカー化合物(10)を得る。

【 0 2 6 0 】

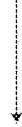
実施例 4：末端シクロオクチニル部分を有するホモ二官能性リンカー化合物の調製



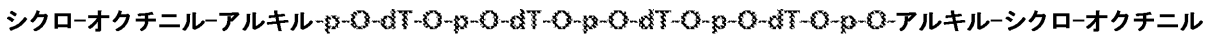
7



8



11



12

5'および3'末端-シクロオクチニル部分を有するテトラ-チミジン三リン酸(12)を、ジオキサン中の実施例2で調製した完全に保護された物質(7)をi)希メタノール溶解性アンモニアおよびii)トリクロロ酢酸で連続的に処理し、その後続いて、イミダゾールで中和することによって、調製する。ワークアップ後、生成物(8)を、2当量の10-(6-オキソ-6-(ジゼンゾ[b,f]アザシクロオクタ-4-イン-1-イル)-カプラミド-N-エチル)-O-トリエチレングリコール-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト(Glen Research)およびテトラゾールで、続いて含水ピリジン中のヨウ素で処理して、2個の末端シクロオクチニル基を導入した(11)。ジオキサン中での厳密な無水テトラメチルゲアニジンによるこの物質の処理は、ヌクレオチド間連結からシアノエチル保護基を取り除き、精製後に所望のホモ二官能性リンカー化合物(12)をもたらす。

【 0 2 6 1 】

実施例 5：5'-マレイミド部分および3'-シクロオクチニル部分を有するヘテロ二官能性リンカー化合物の調製

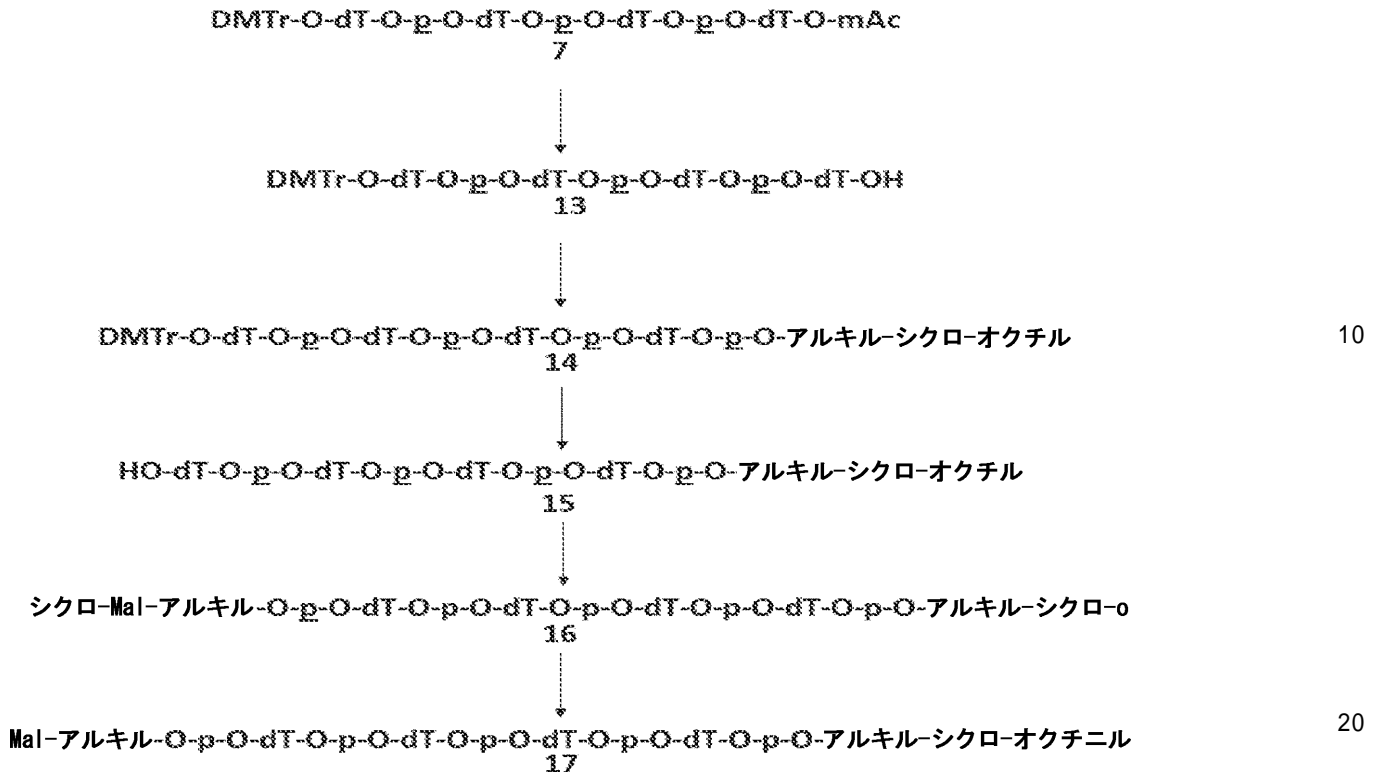
10

20

30

40

50



10

20

5'および3'末端にマレイミド部分およびシクロオクチン部分をそれぞれ有するテトラチミジン三リン酸(17)を、ジオキササン中に溶解した実施例2で調製した完全に保護された物質(7)を希メタノール溶解性アンモニアで処理し、蒸発乾固することによって、調製する。生成物(13)を、10-(6-オキソ-6-(ジゼンゾ[b,f]アザシクロオクタ-4-イン-1-イル)-カブラミド-N-エチル)-O-トリエチレングリコール-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト(Glen Research)で処理し、3'端にシクロオクチン部分を加える(14)。

【0262】

5'-ジメトキシトリチル基の除去を、トリクロロ酢酸、続いてイミダゾールによるジクロロメタン中の(14)の処理によって達成し、5'保護を解除された四量体(15)を得る。この物質を、2-(1,7-ジメチル-3,5-ジオキソ-10-オキサ-4-アザトリシクロ[5.2.1.0^{2,6}]デカ-8-エン-4-イル)-エチル-1-O-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト(Glen Research)およびテトラゾール、続いて含水ピリジン中のヨウ素によって処理し、5'端に保護されたマレイミド基を導入する(16)。ジオキササン中の厳密な無水テトラメチルグアニジンによるこの物質の処理は、ヌクレオチド間連結からシアノエチル保護基を除去する。精製後、生成物を厳密な無水トルエンで懸濁し、90に加熱して、末端マレイミドの保護を解除し、所望のヘテロ二官能性リンカー化合物(17)を得る。

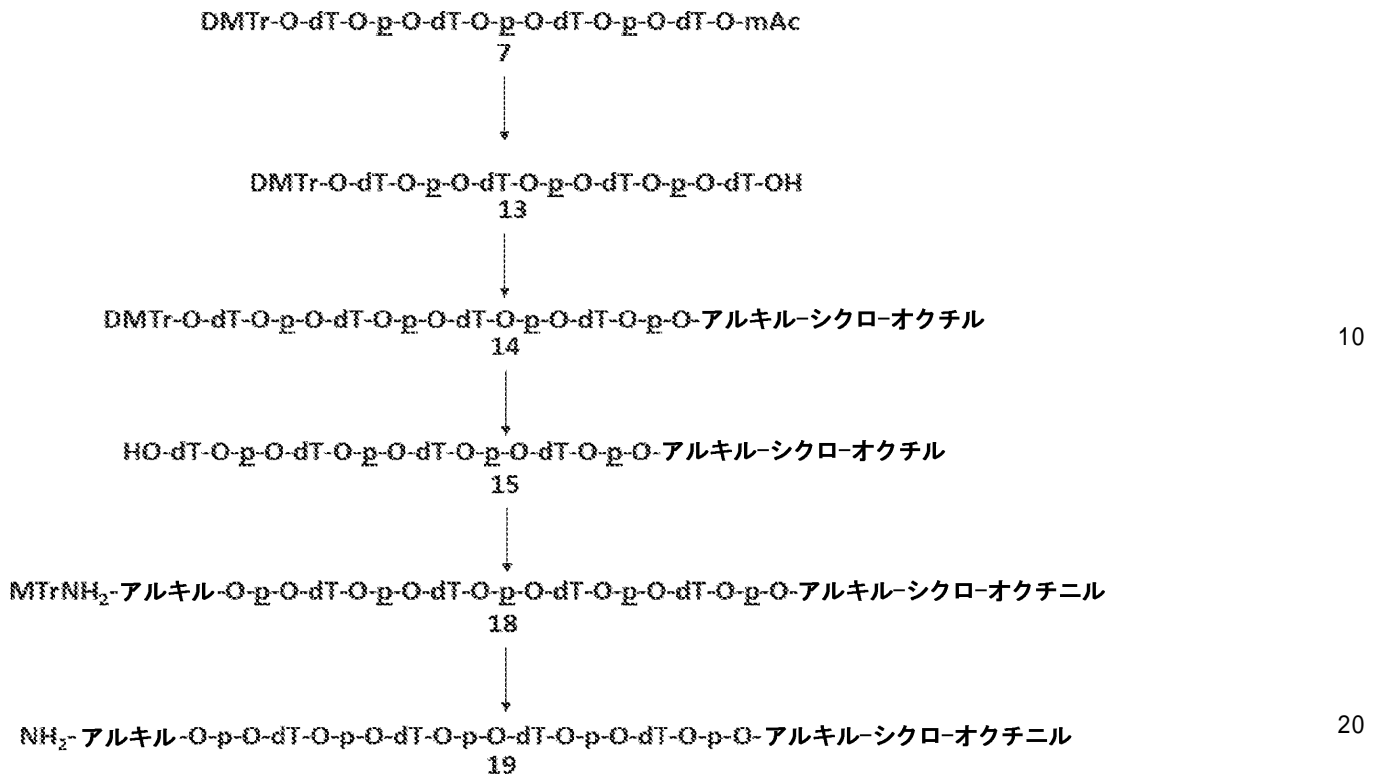
【0263】

実施例6：5'-アミノ部分および3'-シクロオクチン部分を有するヘテロ二官能性リンカー化合物の調製

30

40

50



5'-および3'-末端にアミノ部分およびシクロオクチン部分をそれぞれ有するテトラ-チミジン三リン酸 (19) を、ジオキサン中に溶解させた実施例2で調製した完全に保護された物質 (7) を希メタノール溶解性アンモニアで処理し、蒸発乾固させることによって、調製する。生成物 (13) を、10-(6-オキソ-6-(ジゼンゾ[b,f]アザシクロオクタ-4-イン-1-イル)-カブラミド-N-エチル)-O-トリエチレングリコール-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト (Glen Research) で処理し、3'端にシクロオクチン部分を加える (14)。5'-ジメトキシトリチル基の除去を、トリクロロ酢酸、続いてイミダゾールによる (14) の処理によって達成し、5'保護を解除された四量体 (15) を得る。この物質を、2当量の6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイト (Glen Research)、続いて含水ピリジン中のヨウ素で処理し、5'端に保護されたアミノ基を導入する (18)。ジオキサン中のi) 厳密な無水テトラメチルグアニジンおよびii) トリクロロ酢酸によるジオキサン中でのこの物質の処理はそれぞれ、ヌクレオチド間連結およびアミノ官能基から保護基を取り除いて、所望のヘテロ二官能性リンカー化合物 (19) をもたらす。

30

【0264】

実施例7: ピス(マレイミド)リンカー化合物を介するsiRNAのコンジュゲーション

5'および3'末端マレイミド基を有するテトラ-チミジン三リン酸 (10) (実施例3で調製) を重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (TEABc, 0.1M, pH 8.5, Sigma-Aldrich) 中に溶解し、同じ緩衝液中で末端3'-チオール基を有する2当量のsiRNAで処理する。15分後、緩衝液を蒸発によって取り除き、必要とされる二量体化siRNAを得る。

40

【0265】

実施例8: マレイミド-シクロオクチニルリンカー化合物を介するsiRNAの抗体へのコンジュゲーション

5'-および3'-末端にマレイミド基およびシクロオクチニル基をそれぞれ有するテトラ-チミジン三リン酸 (17) を、重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (TEABc, 0.1M, pH 8.5, Sigma-Aldrich) 中に溶解し、同じ緩衝液中で末端3'-アジド基を有する1当量のsiRNAで処理する。15分後、遊離チオール基を有する抗体の溶液を加え、室温で1時間全体を攪拌する。所望の抗体-リンカー-siRNAコンジュゲートを、分取クロマトグ

50

ラフィーによって単離する。

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/31287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 47/54; C12N 15/11; C12N 15/113 (2021.01)
CPC - A61K 47/549; C12N 15/11; C12N 15/113; A61K 31/7088

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

10

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WINKLER, Johannes. 'Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Applications', Ther. Deliv. 2013, Vol. 4(7), pp. 791-809. pg. 801, Figure 4	1-10 11; 35-40
Y	WO 2015/085142 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.) 11 June 2015 (11.08.2015) pg. 12, para 6; pg. 13, para 3 and para 8	11
Y	US 2016/0339109 A1 (IMMUNWORK, Inc.) 24 November 2016 (24.11.2016) para [0221]; [0238]; Schemes 6 and 7	35-40
A	US 5,916,750 A (IYER et al.) 29 June 1999 (29.06.1999) ENTIRE DOCUMENT	1-11; 35-40
A	WO 2013/173337 A2 (SEATTLE GENETICS, INC.) 21 November 2013 (21.11.2013) ENTIRE DOCUMENT	1-11; 35-40
A	US 2012/0157509 A1 (HADWIGER et al.) 21 June 2012 (21.06.2012) ENTIRE DOCUMENT	1-11; 35-40

20

30

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D" document cited by the applicant in the international application	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&" document member of the same patent family
"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	

40

Date of the actual completion of the international search 31 JULY 2021	Date of mailing of the international search report SEP 27 2021
---	--

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---	--

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/31287

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 12-34 and 41-129
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 40

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 C 0 8 6
C 0 7 H 21/02 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	4 H 0 4 5
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	1 0 0 Z
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	

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,N
E,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,K
E,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,N
G,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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブラウン ジョナサン マイルズ

アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 メリーランド州 チェビー チェイス ウィスコンシン アベニュー 5
4 2 5 スイート 8 0 1 エムペグ エルエイ リミテッド ライアビリティ カンパニー内

(72)発明者 ニューマン クリスティン ケイ . エイチ .

アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 メリーランド州 チェビー チェイス ウィスコンシン アベニュー 5
4 2 5 スイート 8 0 1 エムペグ エルエイ リミテッド ライアビリティ カンパニー内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QR35 QR48 QR72

4B065 AB01 BA01 CA44

4C057 BB02 CC03 DD03 LL10 LL14 LL16 LL21 MM05

4C076 AA95 CC26 DD66 EE59 FF70

4C085 AA14 CC31 DD11 DD61 DD62 EE01 EE05

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA03 NA05 NA13 ZB21

4H045 AA11 AA30 BA50 BA54 DA76 EA28