

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-500481
(P2025-500481A)

(43)公表日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/704(2006.01)	A 6 1 K	31/704	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	31/712(2006.01)	A 6 1 K	31/712		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全98頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-538257(P2024-538257)		(71)出願人	521271727	
(86)(22)出願日	令和4年12月20日(2022.12.20)			サプリーム テクノロジーズ, ベー. フ	
(85)翻訳文提出日	令和6年6月21日(2024.6.21)			エー.	
(86)国際出願番号	PCT/NL2022/050735			S A P R E M E T E C H N O L O G I	
(87)国際公開番号	WO2023/121445			E S B . V .	
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)			オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビル	
(31)優先権主張番号	2030217			トホーフェン, アントニ ファン レーウ	
(32)優先日	令和3年12月22日(2021.12.22)			エンフックラーン 9, ビルディング ア	
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)			ー12-1	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ			A n t o n i e v a n L e e u w e n	
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),			h o e k l a a n 9 B u i l d i n g	
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(			A 1 2 - 1 3 7 2 1 M A B i l t h	
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		(74)代理人	110002000	
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			弁理士法人栄光事務所	
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 筋消耗性障害を治療するための治療用核酸とサポニンとを含む組成物

(57)【要約】

本発明は、筋消耗性障害、詳細には、筋細胞への治療用核酸の送達によって標的化することのできる遺伝的因子が関わる筋消耗性障害の治療及び予防の分野に関する。後者の態様を踏まえて、本明細書には、サイトソル及び／又は核など、そこに治療用核酸が到達してその遺伝子標的に作用することのできる筋細胞の正しい細胞内区画への治療用核酸の有効な送達及び放出を実質的に促進する医薬組成物及びその有利な成分が開示される。本明細書に開示されるとおり、送達及び放出のこの実質的な促進は、治療用核酸と、任意選択で、それにコンジュゲートした筋細胞標的化用リガンドとを含む本明細書に開示される医薬組成物にエンドソーム脱出促進性サポニンを提供することにより実現する。本明細書において初めて実証されるとおり、こうした種類のサポニンは、意外にも、そのエンドソーム脱出促進特性を完全に分化した筋細胞で保持しているのみならず、コンジュゲートされていない状態でも、治療用核酸と併せたそこへの送達に成功することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

筋消耗性障害の治療又は予防における使用のための医薬組成物であって、
核酸、及び
サポニン

を含む組成物において、

前記サポニンが、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造の C-23 位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド 12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、組成物。

【請求項 2】

前記筋消耗性障害が、好ましくは先天性ミオパチー又は筋ジストロフィー

(好ましくは、前記先天性ミオパチーは、ネマリンミオパチー又は先天性筋線維タイプ不均等症ミオパチーから選択され、及び／又は前記筋ジストロフィーは、ジストロフィノパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー 1B、先天性筋ジストロフィーから選択される)；又は家族性拡張型心筋症である筋細胞関連遺伝性障害であり；

最も好ましくは、前記筋消耗性障害が、ジストロフィノパチーである、好ましくはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである筋細胞関連遺伝性障害である、

請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記筋消耗性障害の前記治療又は予防に、好ましくはエクソンスキッピングが関わるアンチセンス療法が関わる、請求項 1 又は 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位にある前記アルデヒド基が、遊離アルデヒド基であるか、又はヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で切断により外れる切断可能な共有結合性の結合で前記 C-23 位に結び付いたマレイミド含有部分によって置換されているアルデヒド基であって、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で前記切断に伴い回復する、前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位にあるアルデヒド基であるかのいずれかであり；

好ましくは前記切断可能な共有結合性の結合が、セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、又はヒドラジド結合から選択され；より好ましくは、セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択され；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記マレイミド含有部分が、セミカルバゾン結合の形成時に前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位に結び付く 4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部であり(以下 SC-マレイミドと称する)、又は前記マレイミド含有部分が、ヒドラゾン結合の形成時に前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位に結び付く N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部である(以下 EMCH と称する)、請求項 4 に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記サポニンが、核酸又はリガンドなど、巨大分子との直接の又は間接的な共有結合性のコンジュゲーションを欠いている 1 つ以上のサポニン分子からなるものとして定義される遊離サポニンである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸、ギブソゲニン、及びその誘導体のいずれか 1 つ以上から選択され、好ましくは前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又はギブソゲニン、より好ましくはキラ酸である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記サポニンが、末端グルクロン酸残基を含む第 1 の糖鎖を含み、且つ少なくとも 4 つの糖残基を分岐した配置で含む第 2 の糖鎖を含む少なくともビデスモシド型サポニンであり；

好ましくは前記第 1 の糖鎖が、Gal - (1 → 2) - [Xyl - (1 → 3)] - GlcA であり、及び／又は少なくとも 4 つの糖残基の前記分岐した第 2 の糖鎖が、末端フコース残基及び／又は末端ラムノース残基を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記サポニンが、前記サポニンアグリコンコア構造の C - 3 位に前記第 1 の糖鎖及び／又は前記サポニンアグリコンコア構造の C - 28 位に前記第 2 の糖鎖を含み；

好ましくは前記第 1 の糖鎖が、前記サポニンアグリコンコア構造の C - 3 β - OH 基における炭水化物置換基であり、及び／又は前記第 2 の糖鎖が、前記サポニンアグリコンコア構造の C - 28 - OH 基における炭水化物置換基である、請求項 8 に記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

前記サポニンが、

a) リスト A：

－キラヤ (Quillaja saponaria) サポニン混合物、又はキラヤ (Quillaja saponaria) から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl；

－サポニナム・アルBUM (Saponinum album) サポニン混合物、又はサポニナム・アルBUM (Saponinum album) から単離されたサポニン；

－サボンソウ (Saponaria officinalis) サポニン混合物、又はサボンソウ (Saponaria officinalis) から単離されたサポニン；及び

－キラヤ樹皮サポニン混合物、又はキラヤ樹皮から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl

のいずれか 1 つ以上から選択されるサポニン；又は

b) リスト B：

SA1641、ギブソシド A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658 及びフィトラッカゲニンから選択される、ギブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン；又は

c) リスト C：

AG1856、AG1、AG2、アグロステモシド E、GE1741、カスミソウサポニン 1 (Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、サポナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7-api、QS-17、QS-18、QS-21 A-api o、QS-21 A-xyl o、QS-21 B-api o 及び QS-21 B-xyl o

から選択される、キラ酸アグリコンコア構造を含むサポニン

のいずれか 1 つ以上であるか；又は

好ましくは、前記サポニンが、リスト B 又は C から選択されるサポニン、より好ましくは、リスト C から選択されるサポニンのいずれか 1 つ以上である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

前記サポニンが、AG1856、GE1741、キラヤ (*Quillaja saponaria*) から単離されたサポニン、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) から単離されたサポニン、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862及びSO1904のいずれか1つ以上であり；

好ましくは前記サポニンが、QS-21、SO1832、AG1856、SO1861、SA1641及びGE1741のいずれか1つ以上であり；より好ましくは前記サポニンが、QS-21、SO1832又はSO1861であり；

最も好ましくはSO1861である、請求項1～10のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 12】

前記サポニンが、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) から単離されたサポニンであり、好ましくは前記サポニンが、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862及びSO1904のいずれか1つ以上であり；

より好ましくは前記サポニンが、SO1832、SO1861及びSO1862のいずれか1つ以上であり；

20

更により好ましくは前記サポニンが、SO1832及びSO1861であり；

最も好ましくはSO1861である、請求項1～11のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

前記核酸が、150ntを超えない核酸として定義されるオリゴヌクレオチドであり、好ましくは前記オリゴヌクレオチドが、5～150ntのサイズであり、好ましくは8～100ntであり、最も好ましくは10～50ntであり、より好ましくは前記オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、更により好ましくは突然変異特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、最も好ましくはエクソンスキッピングを誘導するように設計されたオリゴヌクレオチドである、請求項1～12のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

30

【請求項 14】

前記核酸が、プラスミド又は別の環状遺伝子コンストラクトである、請求項1～13のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 15】

前記核酸が、以下のうちのいずれか1つ：モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (PMO)、2'-O-メチル (2'-OMe) ホスホロチオエートRNA、2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) RNA {2'-O-メトキシエチル-RNA (MOE)}、ロックド核酸又は架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNANC)、ペプチド核酸 (PNA)、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸 (FANA)、3'-フルオロヘキシトール核酸 (FHNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、サイレンシングRNA (siRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンタゴmir (miRNAアンタゴニスト)、アプタマーRNA又はアプタマーDNA、一本鎖RNA又は一本鎖DNA、二本鎖RNA (dsRNA) 又は二本鎖DNAを含むか、又はそれからなり；

40

好ましくは前記核酸が、モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (PMO) 又は2'-O-メチル (2'-OMe) ホスホロチオエートRNAを含むか、又はそれからなる、請求項1～14のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 16】

前記核酸が、ヒトジストロフィン遺伝子転写物のエクソンスキッピングを誘導するよう

50

に設計され、好ましくは前記エクソンスキッピングには、エクソン 5 1 スキッピング又はエクソン 5 3 スキッピング又はエクソン 4 5 スキッピングが関わり；

より好ましくは前記核酸が、前記エクソン 5 1 スキッピング又は前記エクソン 5 3 スキッピング又は前記エクソン 4 5 スキッピングを誘導するように設計される 2' オーメチルホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド又はホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

更により好ましくは前記核酸が、エテプリルセン、ドリサベルセン、ゴロディルセン、ビルトラルセン、及びカシメルセンから選択される、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 17】

前記組成物が 2 つ以上の異なる核酸を含み、好ましくは 2 つ以上の異なるオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは前記 2 つ以上の異なるオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つがアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 18】

前記核酸が、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドとコンジュゲートしている、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 19】

前記リガンドが結合する筋細胞上の前記エンドサイトーシス受容体が、トランスフェリン受容体 (CD71)、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) 受容体 (IGF1R)、テトラスパニン CD63；筋特異的キナーゼ (MuSK)、グルコース輸送体 GLUT4、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体 (CI-MPR) から選択される、請求項 18 に記載の使用のための組成物。

【請求項 20】

前記リガンドが、

インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 又はその断片；

インスリン様成長因子 2 (IGF-II) 又はその断片

マンノース 6 リン酸

トランスフェリン (Tf)、

ザイモザン A、及び

前記エンドサイトーシス受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片であって、前記エンドサイトーシス受容体が、好ましくは、トランスフェリン受容体 (CD71)、インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 受容体 (IGF1R)、テトラスパニン CD63、筋特異的キナーゼ (MuSK)、グルコース輸送体 GLUT4、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体 (CI-MPR)、及び LDL 受容体から選択される、抗体又はその結合断片

のいずれか 1 つから選択され；

好ましくは前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片であり、

より好ましくは前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクローナル抗体又は Fab' 断片又は少なくとも 1 つのシングルドメイン抗体であり、更により好ましくは、前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクローナル抗体である、請求項 18 又は 19 に記載の使用のための組成物。

【請求項 21】

前記リガンドが、1 分子の前記リガンドにつき 2～5 分子の前記核酸とコンジュゲートされ；

好ましくは 1 分子の前記リガンドにつき 3～4 分子の前記核酸であり；

より好ましくは前記リガンドは、1 分子の前記リガンドにつき平均して 4 分子の前記核酸とコンジュゲートされる、請求項 18～20 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 2 2】

前記リガンドが、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン残基を含むアミノ酸残基の鎖を含み、及び前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合性の連結が、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン残基との共有結合性の結合を含み；

好ましくは 2 分子以上の前記核酸が、1 分子の前記リガンドに別個のシステイン残基及び／又は別個のリジン残基を介して連結され；

より好ましくは前記リガンドが、場合によっては配列 H R W C C P G C C K T F（配列番号 4）によって表されるテトラシステインリピートであるマルチシステインリピートを含むアミノ酸残基の鎖を含み、及び前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合性の連結が、前記マルチシステインリピートの前記システイン残基のいずれか 1 つ以上との共有結合性の結合を含み；

最も好ましくは 2 分子以上の前記核酸が、1 分子の前記リガンドに前記マルチシステインリピートの別個のシステイン残基を介して連結される、請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項 2 3】

前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合性の連結が、前記核酸が共有結合的に結合しているリンカーを介して行われ；

好ましくは前記リンカーが、リンカー 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸スクシンイミジル (S P D P) を含むか、又はそれからなり；場合によっては前記リンカーが、前記核酸を前記リガンドのリジン残基に、又はグリカン残基、好ましくは部分的にトリミングされたグリカンに共有結合的に連結する、請求項 1 8 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

20

【請求項 2 4】

前記リンカーが、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ることになる切断可能なリンカーであり；

好ましくは前記リンカーが、

- ・セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、イミン結合、1, 3 - ジオキソラン結合を含めたアセタール結合、ケタール結合、エステル結合、及び／又はオキシム結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合；

30

- ・好ましくはカテプシン B によるタンパク質分解を受けることになる、タンパク質分解されやすい結合、例えばアミド又はペプチド結合；

- ・ジスルフィド結合など、酸化還元切断可能な結合、又はチオエーテル結合など、チオール交換反応しやすい結合

から選択される切断可能な結合を含み；

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、好ましくは $pH \leq 6.5$ 、好ましくは $pH \leq 6$ 、より好ましくは $pH \leq 5.5$ の酸性条件下でインビボ切断を受けることになる酸感受性結合であり、

より好ましくは、セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択される酸感受性結合であり；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である、請求項 2 3 に記載の使用のための組成物。

40

【請求項 2 5】

前記サポニンが、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1 - E M C H、又は S O 1 8 6 1 - S C - マレイミド、好ましくは S O 1 8 6 1 - E M C H 又は S O 1 8 6 1 - S C - マレイミドのいずれかの少なくとも 1 分子であるか、又はそれを含み、前記核酸が、ドリサペルセン又はエテプリルセンであり、前記核酸とコンジュゲートする前記リガンドが、抗 C D 7 1 抗体又はその結合断片である、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 2 6】

ヒト対象への静脈内又は皮下投与における使用のための、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか一

50

項に記載の使用のための組成物。

【請求項 27】

薬学的に許容可能な賦形剤及び／又は薬学的に許容可能な希釈剤を含む、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 28】

2～6 μM の前記サポニンを含み、好ましくは 3～5 μM であり、より好ましくは 3.5～4.5 μM であり、及び最もは約 4 μM である前記サポニンを含む、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 29】

治療的組み合わせであって、

(a) 核酸、及び

(b) サポニン

を含む治療的組み合わせにおいて、

前記サポニンが、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造の C-23 位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド 12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、治療的組み合わせ。

【請求項 30】

前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位にある前記アルデヒド基が、遊離アルデヒド基であるか、又はヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で切断により外れる切断可能な共有結合性の結合で前記 C-23 位に結び付いたマレイミド含有部分によって置換されているアルデヒド基であって、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で前記切断に伴い回復する、前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位にあるアルデヒド基であるかのいずれかであり；

好ましくは前記切断可能な共有結合性の結合が、セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、又はヒドラジド結合から選択され；より好ましくは、セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択され；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である、請求項 29 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 31】

前記マレイミド含有部分が、セミカルバゾン結合の形成時に前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位に結び付く 4-(6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部であり（以下 SC-マレイミドと称する）、又は前記マレイミド含有部分が、ヒドラゾン結合の形成時に前記サポニンアグリコンコア構造の C-23 位に結び付く N- ϵ -マレイミドカプロン酸ヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部である（以下 EMCH と称する）、請求項 30 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 32】

前記サポニンが、核酸又はリガンドなど、巨大分子との直接の又は間接的な共有結合性のコンジュゲーションを欠いている 1 つ以上のサポニン分子からなるものとして定義される遊離サポニンである、請求項 29～31 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 33】

前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸、ギプソゲニン、及びその誘導体のいずれか 1 つ以上から選択され、好ましくは前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又はギプソゲニン、より好ましくはキラ酸である、請求項 29～32 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 34】

前記サポニンが、末端グルクロン酸残基を含む第 1 の糖鎖を含み、且つ少なくとも 4 つの糖残基を分岐した配置で含む第 2 の糖鎖を含む少なくともビデスモシド型サポニンであり；

好ましくは前記第 1 の糖鎖が、Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA であり、及び／又は少なくとも 4 つの糖残基の前記分岐した第 2 の糖鎖が、末端フコース

10

20

30

40

50

残基及び／又は末端ラムノース残基を含む、請求項 29～33 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 35】

前記サポニンが、前記サポニンアグリコンコア構造の C-3 位に前記第 1 の糖鎖及び／又は前記サポニンアグリコンコア構造の C-28 位に前記第 2 の糖鎖を含み；

好ましくは前記第 1 の糖鎖が、前記サポニンアグリコンコア構造の C-3 β -OH 基における炭水化物置換基であり、及び／又は前記第 2 の糖鎖が、前記サポニンアグリコンコア構造の前記 C-28-OH 基における炭水化物置換基である、請求項 34 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 36】

前記サポニンが、

a) リスト A：

－キラヤ (*Quillaja saponaria*) サポニン混合物、又はキラヤ (*Quillaja saponaria*) から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl；

－サポニナム・アルBUM (*Saponinum album*) サポニン混合物、又はサポニナム・アルBUM (*Saponinum album*) から単離されたサポニン；

－サボンソウ (*Saponaria officinalis*) サポニン混合物、又はサボンソウ (*Saponaria officinalis*) から単離されたサポニン；及び

－キラヤ樹皮サポニン混合物、又はキラヤ樹皮から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl

のいずれか 1 つ以上から選択されるサポニン；又は

b) リスト B：

SA1641、ギブソシド A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658 及びフィトラッカゲニンから選択される、ギブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン；又は

c) リスト C：

AG1856、AG1、AG2、アグロステモシド E、GE1741、カスミソウサポニン 1 (Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、サポナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7-api、QS-17、QS-18、QS-21 A-apio、QS-21 A-xyl o、QS-21 B-apio 及び QS-21 B-xyl o

から選択される、キラ酸アグリコンコア構造を含むサポニン

のいずれか 1 つ以上であるか；又は

好ましくは、前記サポニンが、リスト B 又は C から選択されるサポニン、より好ましくは、リスト C から選択されるサポニンのいずれか 1 つ以上である、請求項 29～35 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 37】

前記サポニンが、AG1856、GE1741、キラヤ (*Quillaja saponaria*) から単離されたサポニン、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) から単離されたサポニン、サポナリオシド B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861

10

20

30

40

50

、S O 1 8 6 2 及び S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり；

好ましくは前記サポニンが、Q S - 2 1、S O 1 8 3 2、A G 1 8 5 6、S O 1 8 6 1、S A 1 6 4 1 及び G E 1 7 4 1 のいずれか 1 つ以上であり；より好ましくは前記サポニンが、Q S - 2 1、S O 1 8 3 2 又は S O 1 8 6 1 であり；

最も好ましくは S O 1 8 6 1 である、請求項 2 9 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 3 8】

前記サポニンが、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) から単離されたサポニンであり、好ましくは前記サポニンが、サポナリオシド B、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 7 0 0、S O 1 7 3 0、S O 1 7 7 2、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 2 及び S O 1 9 0 4 のいずれか 1 つ以上であり；

より好ましくは前記サポニンが、S O 1 8 3 2、S O 1 8 6 1 及び S O 1 8 6 2 のいずれか 1 つ以上であり；

更により好ましくは前記サポニンが、S O 1 8 3 2 及び S O 1 8 6 1 であり；

最も好ましくは S O 1 8 6 1 である、請求項 2 9 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 3 9】

前記核酸が、1 5 0 n t を超えない核酸として定義されるオリゴヌクレオチドであり、好ましくは前記オリゴヌクレオチドが、5 ～ 1 5 0 n t のサイズであり、好ましくは 8 ～ 1 0 0 n t であり、最も好ましくは 1 0 ～ 5 0 n t であり、より好ましくは前記オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、好ましくは突然変異特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、最も好ましくは、エクソンスキッピングを誘導するように設計されたオリゴヌクレオチドである、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 4 0】

前記核酸が、プラスミド又は別の環状遺伝子コンストラクトである、請求項 2 9 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 4 1】

前記核酸が、以下のうちのいずれか 1 つ：モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (P M O)、2' - O - メチル (2' - O M e) ホスホロチオエート RNA、2' - O - メトキシエチル (2' - O - M O E) RNA {2' - O - メトキシエチル - RNA (M O E)}、ロックド核酸又は架橋型核酸 (L N A 又は B N A)、2' - O、4' - アミノエチレン架橋型核酸 (B N A N C)、ペプチド核酸 (P N A)、2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノ核酸 (F A N A)、3' - フルオロヘキシトール核酸 (F H N A)、グリコール核酸 (G N A)、トレオース核酸 (T N A)、サイレンシング RNA (s i R N A)、低分子ヘアピン RNA (s h R N A)、マイクロ RNA (m i R N A)、アンタゴ m i r (m i R N A アンタゴニスト)、アプタマー RNA 又はアプタマー DNA、一本鎖 RNA 又は一本鎖 DNA、二本鎖 RNA (d s R N A) 又は二本鎖 DNA を含むか、又はそれからなり；

好ましくは前記核酸が、モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (P M O) 又は 2' - O - メチル (2' - O M e) ホスホロチオエート RNA を含むか、又はそれからなる、請求項 2 9 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 4 2】

前記オリゴヌクレオチドが、ヒトジストロフィン遺伝子転写物のエクソンスキッピングを誘導するように設計され、好ましくは前記エクソンスキッピングに、エクソン 5 1 スキッピング又はエクソン 5 3 スキッピング又はエクソン 4 5 スキッピングが関わり；

より好ましくは前記オリゴヌクレオチドが、前記エクソン 5 1 スキッピング又は前記エクソン 5 3 スキッピング又は前記エクソン 4 5 スキッピングを誘導するように設計される 2' - O - メチル - ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド又はホスホロジアミ

10

20

30

40

50

デートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、
更により好ましくは前記オリゴヌクレオチドが、エテプリルセン、ドリサペルセン、ゴロ
ディルセン、ビルトラルセン、及びカシメルセンから選択される、請求項 39～41 のい
ずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 43】

前記組成物が 2 つ以上の異なる核酸を含み、前記 2 つ以上の異なる核酸が好ましくは 2
つ以上の異なるオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは前記 2 つ以上の異なるオリゴ
ヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つがアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項
29～42 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 44】

前記核酸が、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドとコンジュゲートされる
、請求項 29～43 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 45】

前記リガンドが結合する筋細胞上の前記エンドサイトーシス受容体が、トランスフェリ
ン受容体 (CD71)、インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 受容体 (IGF-IR)、テトラスパニン CD63
、筋特異的キナーゼ (MUSK)、グルコース輸送体 GLUT4、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体 (CI-MPR) から選択される、請求
項 44 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 46】

前記リガンドが、

インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 又はその断片；

インスリン様成長因子 2 (IGF-II) 又はその断片

マンノース 6 リン酸

トランスフェリン (Tf)、

ザイモザン A、及び

前記エンドサイトーシス受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片であって、前
記エンドサイトーシス受容体が、好ましくは、トランスフェリン受容体 (CD71)、イン
スリン様成長因子 1 (IGF-I) 受容体 (IGF-IR)、テトラスパニン CD63
、筋特異的キナーゼ (MUSK)、グルコース輸送体 GLUT4、カチオン非依存性マン
ノース 6 リン酸受容体 (CI-MPR)、及び LDL 受容体から選択される、抗体又はそ
の結合断片

のいずれか 1 つから選択され；

好ましくは前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的な抗体又はその結
合断片であり、

より好ましくは前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクロ
ーナル抗体又は Fab' 断片又は少なくとも 1 つのシングルドメイン抗体であり、更により
好ましくは、前記リガンドが、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクロ
ーナル抗体である、請求項 44 又は 45 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 47】

前記リガンドが、1 分子の前記リガンドにつき 2～5 分子の前記核酸とコンジュゲート
され；

好ましくは 1 分子の前記リガンドにつき 3～4 分子の前記核酸であり；

より好ましくは前記リガンドが、1 分子の前記リガンドにつき平均して 4 分子の前記核酸
とコンジュゲートされる、請求項 44～46 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 48】

前記リガンドが、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン
残基を含むアミノ酸残基の鎖を含み、及び前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合
性の連結が、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン残基と
の共有結合性の結合を含み；

好ましくは 2 分子以上の前記核酸が、1 分子の前記リガンドに別個のシステイン残基及び

10

20

30

40

50

／又は別個のリジン残基を介して連結され；

より好ましくは前記リガンドが、場合によっては配列 H R W C C P G C C K T F（配列番号 4）によって表されるテトラシステインリピートであるマルチシステインリピートを含むアミノ酸残基の鎖を含み、及び前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合性の連結が、前記マルチシステインリピートの前記システイン残基のいずれか 1 つ以上との共有結合性の結合を含み；

最も好ましくは 2 分子以上の前記核酸が、1 分子の前記リガンドに前記マルチシステインリピートの別個のシステイン残基を介して連結される、請求項 44～47 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 49】

前記核酸による前記リガンドとの前記共有結合性の連結が、前記核酸が共有結合的に結合しているリンカーを介して行われ；

好ましくは前記リンカーが、リンカー 3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸スクシンイミジル（SPDP）を含むか、又はそれからなり；場合によっては前記リンカーが、前記核酸を前記リガンドのリジン残基に、又はグリカン残基、好ましくは部分的にトリミングされたグリカンに共有結合的に連結する、請求項 44～48 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 50】

前記リンカーが、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ることになる切断可能なリンカーであり；

好ましくは前記リンカーが、

- ・セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、イミン結合、1,3-ジオキソラン結合を含めたアセタール結合、ケタール結合、エステル結合、及び／又はオキシム結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合、

- ・好ましくはカテプシン B によるタンパク質分解を受けることになる、タンパク質分解されやすい結合、例えばアミド又はペプチド結合；

- ・ジスルフィド結合など、酸化還元切断可能な結合、又はチオエーテル結合など、チオール交換反応しやすい結合

から選択される切断可能な結合を含み、

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、好ましくは $pH \leq 6.5$ 、好ましくは $pH \leq 6$ 、より好ましくは $pH \leq 5.5$ の酸性条件下でインビボ切断を受けることになる酸感受性結合であり、

より好ましくは、セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択される酸感受性結合であり；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である、請求項 49 に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 51】

前記サポニンが、SO1861、SO1861-EMCH 又は SO1861-SC-マレイミド、好ましくは SO1861-EMCH 又は SO1861-SC-マレイミドのいずれかの少なくとも 1 分子であるか、又はそれを含み、前記核酸が、ドリサペルセン又はエテプリルセンであり、前記核酸とコンジュゲートする前記リガンドが、抗 CD71 抗体又はその結合断片である、請求項 29～50 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 52】

薬学的に許容可能な賦形剤及び／又は薬学的に許容可能な希釈剤を含む、請求項 29～51 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 53】

2～6 μM の前記サポニンを含み、好ましくは 3～5 μM であり、より好ましくは 3.5～4.5 μM であり、及び最もは約 4 μM である前記サポニンを含む、請求項 29～52 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項 54】

請求項 29～53 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせの前記成分（a）及び（b）を含むキット。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

前記成分（a）及び（b）が、別個のバイアルの中にある、請求項 5 4 に記載のキット。

【請求項 5 6】

医薬としての使用のための、請求項 2 9 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ又は請求項 5 4 又は 5 5 に記載のキット。

【請求項 5 7】

請求項 1 ～ 3 又は 2 6 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の使用のための、請求項 2 9 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ又は請求項 5 4 又は 5 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、筋消耗性障害、詳細には、筋細胞への治療用核酸の送達によって標的化することのできる遺伝的因子に関わる筋消耗性障害の治療及び予防の分野に関する。後者の態様を踏まえて、本明細書には、サイトゾル及び／又は核など、そこに治療用核酸が到達してその遺伝子標的に作用することのできる筋細胞の正しい細胞内区画への治療用核酸の有効な送達及び放出を実質的に促進する医薬組成物及びその有利な成分が開示される。本明細書に開示されるとおり、送達及び放出のこの実質的な促進は、治療用核酸と、任意選択で、それにコンジュゲートした筋細胞標的化用リガンドとを含む本明細書に開示される医薬組成物にエンドソーム脱出促進性サポニンを提供することにより実現する。本明細書において初めて実証されるとおり、こうした種類のサポニンは、意外にも、そのエンドソーム脱出促進特性を完全に分化した筋細胞で保持しているのみならず、コンジュゲートされていない状態でも、治療用核酸と併せたそこへの送達に成功することができる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

筋消耗性障害は、世界的にヒト疾患の主な原因となっている。筋消耗性障害は、とりわけ、各種の筋ジストロフィー又は先天性ミオパチーに見られるとおり、根底にある遺伝子病態によって引き起こされることもあり [Cardamone, 2008]、又はサルコペニアとして公知の加齢による筋量低下のように加齢が関係するか、若しくは外傷性筋傷害の結果として生じることもある。

【0 0 0 3】

遺伝性及び非遺伝性の両方の筋消耗性障害とも、主徴は、全身の酸素供給、代謝バランス、及び歩行運動にとりわけ関与する組織である横紋筋組織が弱まり又は失われることによる衰弱である。横紋筋組織は、2 種類の横紋筋細胞、即ち、骨格筋細胞と心筋細胞とにより構成されている [Shadrin, 2016]。骨格筋はヒトの全体重の 30 ～ 40 % を占め、衛星細胞 (satellite cell: SC) と呼ばれる常在筋幹細胞が存在するおかげで、それが傷害時に活性化し、増殖し、及び融合して筋繊維の損傷を修復し、又はそれを新しく形成することにより [Dumont, 2016]、運動又は日常活動の間に起こる筋断裂に応答して再生することができる。対照的に、心筋は心筋原幹細胞プールを持たず、再生能力がほとんど乃至全くないため、傷害されると線維性瘢痕が形成され、最終的にはポンプ機能が損なわれることになる [Uygun, 2016]。

【0 0 0 4】

これらの細胞型は、両方とも最終分化していて、構造的及び機能的に高度に特殊化しており、このような特徴は通常、ペイロードをかかると細胞の内部区画に標的化することの困難さの増大と相関する。詳細には、筋細胞は、筋鞘と称される、ニューロンと全く同じような興奮性を持つ特異な種類の細胞膜によって覆われている。更には、こうした細胞には、特に、収縮性、伸展性、及び弾力性によって特徴付けられる復元力があり、これらの特徴は、筋組織におけるその主要な機能、即ち、緊張が生じることにより筋細胞を収縮させる力が発生し、それによって種々の身体部位の随意又は不随意運動を生じさせるという機能を果たすために必要な鍵となる特色である。

【0005】

これを踏まえて、ある種の治療用ペイロードは筋細胞に送達されたときに有益な効果を生み出し得ることが広く認められているにもかかわらず、こうした細胞を標的化することは、例えば国際公開第2021142227号パンフレットが認めているとおり、悪名高い難題であると判明していることもまた極めて良く知られている。これは、薬物のいかなるオンターゲット及びオフターゲット活性も重大な安全上の不利益を引き起こす心筋細胞について特に当てはまる[Slordal 2006]。特異的に筋肉を標的とする治療薬であっても、その心臓への全身送達は有効性が極めて限られていることが公知であり、心臓に直接筋肉内注射したとしても、心臓曝露は限局的であることが示されている[Ebner, 2015]。

10

【0006】

上記の制限に加えて、後天性の進行期にある又は遺伝的な筋消耗性障害の罹患者については、利用可能な治療選択肢及び戦略が極めて少ない。実際、その大多数には利用可能な薬物がなく、往々にして姑息的治療が、そうした罹患者の苦痛を和らげる唯一の適用可能な解決法である。

【0007】

詳細には、現在までに、驚くほど広範囲にわたる筋細胞関連の遺伝性障害（時に、まとめて遺伝性ミオパチーとも称される）の記載があり、有病率が比較的低いため、その大多数は目録上「希少疾患」として整理されるが、様々な形態を総体として見れば、これらの障害は、往々にして死亡につながる衰弱性の合併症を引き起こす、世界的に何百万人もの患者の生活の質に影響を及ぼす比較的良好に見られる健康上の問題となる[Gonzalez-Jamett, 2017]。

20

【0008】

筋細胞関連遺伝性障害のよく見られる分類の一つは、筋細胞から発生する突然変異タンパク質産物の位置に基づく。つまり、先天性ミオパチーは、筋細胞内にある収縮装置の遺伝的欠陥によって引き起こされると見なされ、筋生検上の特有の静的組織化学変化又は超微細構造変化によって定義される。対照的に、筋ジストロフィーは、筋膜又はその支持タンパク質の疾患として記載され、概して、進行中の筋変性及び筋再生の病理学的エビデンスによって特徴付けられる[Cardamone, 2008]。

【0009】

端的には、収縮装置には、筋フィラメントを形成するアクチンとミオシンとで構成される筋原線維が含まれ、それらの筋フィラメントが互いに滑り合うことにより、筋細胞の形状を変化させる緊張が生じる。収縮装置の機能は、補強された筋細胞の細胞骨格と、人体にある多くの細胞膜と異なり、筋細胞周囲の基底膜と接触するグリコカリックスと称される多糖材料に重度に覆われている筋鞘内及びその周囲の高度に特殊化した構造とによるその相互作用に頼るところが大きい。この基底膜には、多数のコラーゲン原線維及びラミニンなど、特殊化した細胞外マトリックスタンパク質が含まれている。マトリックスタンパク質は、筋繊維が付着することのできる足場を提供する。筋細胞内部のアクチン骨格は、筋鞘の膜貫通タンパク質を通じて基底膜及び細胞の外部につながっている。このようなアンカリングされた多数の筋細胞が筋組織を作り上げており、筋細胞が同期した制御された形で緊張を生じることにより、大きな力が発生し得る。

30

【0010】

その細胞内収縮装置、筋鞘の特殊な機能及び構成を補強し及びそれを説明するタンパク質網、並びにその外側の多成分足場を含めた、筋細胞のこの構造的及び機能的複雑性は、大型の筋細胞特異的プロテオームの産物である。

【0011】

このプロテオームの実質的な部分は、広範な選択的スプライシングイベントが起こりがちな、往々にして極めて大型の多エクソン遺伝子から発生する純粋に筋細胞特異的な転写物から翻訳される大型の構造タンパク質である[Savarese, 2020]。実際、特に、DMD、TTN、NEB、RYR1を含め、ヒトゲノムの中でも特に大型の一部の

40

50

遺伝子に沿って散在する様々な突然変異が、とりわけ十分に特徴付けがなされている筋細胞関連遺伝性障害の根底にある原因であると認識されている。

【0012】

恐らく間違いなく、最も研究が進んでいる遺伝性筋細胞関連障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）であり、これは、ジストロフィンタンパク質をコードするDMD遺伝子の突然変異が原因となって、筋ジストロフィンアイソフォーム（Dp427m）の産生が妨げられることにより生じる。DMDは、特に重症度の高い疾患であり、進行性の衰弱及び骨格筋が線維状、骨性、又は脂肪質の組織に置き換わることを特徴とし、最終的には、通常心筋又は呼吸不全が原因で死亡に至る。DMDは、劣性且つX染色体連鎖性（X連鎖性）である。従って、ほとんどの患者が男性である。平均して2～3歳頃に初発症状が発生し、10～12歳頃には車椅子生活になり、最適なケアを行ったとしても、20～40歳で死亡する。スペクトラムの違いは、DMDがDMD遺伝子の正確に定義された部位特異的突然変異又は単一のホットスポット突然変異によって引き起こされるのではないという事実によって説明することができる。その逆に、DMDは、大型の多エクソン遺伝子における様々な異なる突然変異によって引き起こされる他の多くの筋細胞関連遺伝性障害と同様に、転写物のリーディングフレームがどの程度影響を受けたかに応じて表現型の重症度が決まる一連の障害のスペクトラムと見なすことができる。DMD症例は、通常は、非機能性の不安定なジストロフィンにつながる中途でのランケーションを引き起こすフレームシフト突然変異又はナンセンス突然変異を内包している。これと対照的に、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）と呼ばれる軽症型のジストロフィノパチーは、DMD遺伝子のインフレーム突然変異、即ち、リーディングフレームを維持していて、単に内部でランケートされるに過ぎないジストロフィン突然変異体タンパク質の産生につながる突然変異によって引き起こされる。

【0013】

ほとんどのフレーム外突然変異で重症のDMDになる一方、インフレーム突然変異では、圧倒的多数がより軽症のBMDになるという観察に基づき、ジストロフィン転写物のリーディングフレームを回復させることによって少なくとも部分的に機能性のタンパク質の産生を生じさせることを目標として、DMDに対して様々な異なるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）ベースの治療薬が試験され、開発されている。これらのASOは、短い（20～30ヌクレオチド）、往々にして化学的に修飾された核酸又は核酸類似体であって、プレmRNAスプライシングの間に標的エクソンに特異的に結合することによって欠陥のあるエクソンのいわゆるスキッピングを生じさせ、即ちmRNAへのそのインクルージョンを防ぐものである。エクソンスキッピングASO手法は、突然変異位置に応じた様々な異なるエクソンをスキップする必要があるため、突然変異特異的である。しかしながら、ある種のエクソンのスキッピングは、エクソン51（14%）、エクソン45（8%）、エクソン53（8%）、及びエクソン44（6%）のスキッピングを含め、より大きい患者群に適用することが可能である[Bladen, 2013]。現在までのところ、エクソン51（エテプリルセン）、エクソン53（ゴロディルセン及びビルトラルセン）、又はエクソン45（カシメルセン）をスキップするように設計された4つの異なるモルホリノ型ASOが、少数の患者コホートでジストロフィンの回復を誘導したというエビデンスを何らか示しており、ある種の全身性副作用を呈するにもかかわらず、FDAの承認が与えられた。2'-O-メチルホスホロチオエート修飾を有する別のエクソン51スキッピングASO（ドリサベルセン）がプラセボ対照試験で評価されたが、例えば、注射部位反応の発生、タンパク尿、及び一部の患者の血小板減少が原因で、結局のところFDAの承認は下りなかった[Goemans, 2018]。エクソンスキッピングを誘導する別の組成物については、国際公開第2018129384号パンフレットを参照することができる。

【0014】

DMDにおける他の核酸ベースの手法としては、高用量のベクターでマイクロジストロフィンcDNAを送達する試みがあった。これについては臨床試験が実施中であり、既に

マイクロジストロフィン発現の成功を報告したものもあるが、一部の患者には、一過性腎不全を含め、自然免疫応答が原因と見られる重篤な有害作用の観察がないわけではない [Mendell, 2020]。或いは、フォリスタチンなど、筋量を向上させることのできるタンパク質 [Mendell, 2020] 又は SERCA2a など、疾患機構を標的とするタンパク質 [Wasala, 2020] f) をコードする遺伝子の cDNA を送達する取り組みもまた進行中である。更なる考慮点には、覚醒した筋細胞の成長及び／又は再生を刺激するためのマイクロRNA、miRNA 模倣産物、アンチmiR、アンタゴmiR などの、単独又は他の核酸ベースの療法との共投与のいずれかでの使用が関わる [Aranea, 2021]。例えば、国際公開第 2018080658 号パンフレットは、DMD 治療用の LNA ベースの ASO 治療薬として miR-128-1 を開示している。例えばエクソン欠失によるか、又はスプライス部位を無効にすることによってリーディングフレームを回復させるように設計されたガイドRNA を伴う CRISPR/Cas9 技術に基づく更に別の代替的な手法が提案されており、その概念実証が DMD 細胞株及び動物モデルで試行された [Chemello, 2020; Nelson 2017]。しかしながら、ゲノム編集作業はいずれも未だ前臨床段階であり、それをヒトにおいて体系的に適用するには、ゲノム編集成分の最適な送達を含め、複数の難題を克服する必要がある。

10

【0015】

DMD 又は BMD 患者には、DMD の様々な異なる突然変異が何千と見付かっている [Blenden, 2015]。遺伝子突然変異標的が同定されている他の多くの遺伝性筋細胞関連障害についても、同様の状況が存在する。それらとしては、限定はされないが、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（疾患遺伝子：DUX4／ダブルホメオボックス4）、筋強直性ジストロフィー（DMPK）、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー（疾患遺伝子：EMD／エメリン及び LMNA／ラミンA／C）、肢帯型筋ジストロフィー1（疾患遺伝子：MYOT／ミオチリン、LMNA／ラミンA／C等）、先天性筋ジストロフィー（疾患遺伝子：LAMA2／メロシン又はラミニン α 2鎖／コラーゲン6AをコードするCOL6A遺伝子のいずれか）を含めた他の筋ジストロフィー；又は家族性拡張型心筋症（疾患遺伝子：LMNA／ラミンA／C）、並びに特にネマリンミオパチー（nemalin myopathy）（疾患遺伝子：NEB／ネブリン、ACTA／骨格筋 α アクチン、TPM3／ α トロポミオシン-3、TPM2／ β トロポミオシン-2、TNNT1／トロポニンT1、LMOD3／レイオモジン-3、MYPN／ミオパラジン等）又は先天性筋線維タイプ不均等症ミオパチー（疾患遺伝子：TPM3／ α トロポミオシン-3、CTA／骨格筋 α アクチン、RYR1／リアノジン受容体チャネル）を含む先天性ミオパチー、並びに例えばTTN遺伝子（タイチン）における突然変異が関わる任意の症候群が挙げられる。従って、多くの異なる筋消耗性障害の根底にある定義された遺伝子標的であっても、その突然変異にはばらつきがあるため、治療用核酸、かかるASO又はアンタゴmir [Cerro-Herreros, 2020] の使用は、様々な筋消耗性障害に対する新規療法の開発のための理に適った実際的な方法であるように見える。

20

30

【0016】

しかしながら、上記で既に説明したとおり、多大な利点にもかかわらず、かかる核酸ベースの治療薬を、例えば、アンチセンス療法のため筋細胞サイトゾルに持ち込むか、又は直接遺伝子編集するため、そこから核内に持ち込むといったような、筋細胞内部の適切な区画に効率的に持ち込むことは、各種の送達システムと組み合わせたときであっても困難である。インビボでの筋細胞トランスフェクションのこの効率の低さにより、必然的にその標的部位での核酸ベースの治療薬の濃度は、有効な持続性のあるアウトカムを実現するには低過ぎることになる。これにより、ひいては投与用量を増加させる必要が生じ、次にはオフターゲット効果が引き起こされる。最もよく見られるかかる副作用には、補体カスケードの活性化、凝固カスケードの阻害、及びトール様受容体の媒介による免疫系の刺激がある。当然ながら、これらの作用は極めて望ましくないものであり、臓器不全を含め、患者の健康を脅かす、又は生命さえも脅かす副作用を誘発するリスクをはらんでいる。こ

40

50

のような、及び同様の有害事象の発生により、DMDエクソンスキッピングASOドリサペルセンのように、多くの核酸ベースの治療薬が臨床試験で失敗に終わってきた。

【0017】

従って、筋細胞消耗性障害の治療用の新規核酸ベース薬物製剤を提供することが強く望まれており、それは、詳細には、インビボで筋細胞への効率的な核酸送達率を示すものとなるであろう。従って、治療用核酸の効果が、数ある中でも特に、(1)筋細胞消耗性障害に関係があるとされる、又はそれを引き起こすその遺伝子標的に高度に特異的であり、(2)十分に安全であり、(3)効果があり、(4)筋細胞に特異的に向かうものであって、他の細胞に対するオフターゲット活性がほとんど乃至全くなく、(5)十分に時宜を得た作用様式を呈し(例えば、投与された薬物が、ある一定の時間枠内にヒト患者の標的化した部位に到達しなければならない、且つある一定の時間枠にわたって標的化した部位に残っていなければならない)、及び／又は(6)患者の体内で十分に長く続く治療活性を有することになるであろう製剤が求められている。

10

【0018】

横紋筋細胞への様々な異なる薬物送達手法の包括的レビューについては、D C E b n e r e t a l . , 2015, Curr Pharm Des, 21(10):1327-36. doi:10.2174/1381612820666140929095755を参照することができ、これは、筋標的化用ペプチド、マイクロバブル、ナノ粒子、ウイルスベースの、輸送体ベースの、及び抗体ベースの標的化技法に言及しているとともに、一般に筋細胞では細胞取込みが依然として大きな問題であるという事実も浮き彫りにしている。輸送体ベースの、及び抗体ベースの標的化技法に関しては、リガンドの媒介によって筋細胞表面上のエンドサイトーシス(又はインターナリゼーション)受容体を標的化することによる核酸の送達、例えば、国際公開第2018/129384号パンフレット又は国際公開第2020/028857号パンフレットに示されている。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

しかしながら、本発明者らの知識及び経験の限りでは、公知の筋特異的送達手法のいずれも、上記に概要を示した有益な特徴(1)～(6)の全て又は少なくとも実質的な部分を実現するものではない。従って、本分野の幾つかの領域で個々に長年にわたって徹底した研究及び進歩がなされてきたにもかかわらず、筋消耗性障害に罹患している患者の筋細胞への核酸ベースの治療薬の送達効率を改善することがなお喫緊に必要とされている。

30

【課題を解決するための手段】

【0020】

この必要性に対処するため、本発明者らは、筋細胞標的型治療用核酸を12,13-デヒドロオレアナン型のトリテルペノイドサポニンと組み合わせて含む新規の医薬組成物を開発したとともに、本明細書に記載する。こうした特異的サポニン型については、例えば国際公開第2020/126620号パンフレットに開示される多成分コンジュゲートに記載されており、そこでそれらのサポニン型は、幾つかの癌細胞型において様々な抗体-薬物コンジュゲート(ADC)に対してエンドソーム脱出促進活性を備えているものとして記載された。

40

【0021】

更に腫瘍細胞の文脈で、こうしたサポニンについて例えば国際公開第2020126609号パンフレットに言及がなされており、そこでは、サポニンと、HSP27をサイレンシングするためのBNAとの組み合わせによるか、又は腫瘍細胞マーカーに向けられるモノクローナル抗体のコンジュゲートでのサポニンと、HSP27をサイレンシングするためのBNAとの組み合わせによる様々な腫瘍モデルにおけるHSP27遺伝子のサイレンシングが記載されている。

【0022】

しかしながら、最終分化した筋細胞、詳細には心筋細胞は、代謝の点、並びに細胞膜構

50

成及びエンドサイトーシス活性の点で、遺伝的に不安定な常に分裂している腫瘍細胞とはかなり異なる。更には、細胞シグナル伝達経路の乱れ及び無秩序な増殖活性に起因して、腫瘍は、透過性且つ漏出性の血管新生によって供給されることが公知であり [H a n a h a n a n d W e i n b e r g , 2 0 1 1]、これは、筋組織に供給する健全なタイトジャンクションに富む血管とは大きく異なる。

【0023】

このような違いにもかかわらず、本発明者らは、筋エンドサイトーシス受容体リガンドコンジュゲート型ASOを12, 13-デヒドロオレアナン型トリテルペノイドサポニンと組み合わせると、ヒト及びマウスDMD転写物において、エクソンススキッピング効率に意外な口バストな効果があることを観察した。いかなる理論によっても拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、これらの知見が、前記の特異的な一群のエンドソーム脱出促進性サポニンに、治療用核酸が筋細胞のエンドソームから適切な筋細胞内部区画へと（治療薬にとって非常に望ましい、しかし十分には解明されていない、エンドソーム脱出と称される現象で）効率的に抜け出るのを刺激する非常に高い能力があることを指し示していると仮定した。

【0024】

本発明者らの知る限りでは、サポニンを筋細胞消耗性障害の治療用核酸と組み合わせる唯一の例が、Wangらによって試みられた [Wang, 2018, Molecular Therapy: Nucleic Acids; Wang, 2018-Drug Design, Development and Therapy]。しかしながら、これらの報告では、著者らは、公知のインビトロトランスフェクション剤ジギトニンなど、主にステロイド性のサポニンとの非共有結合的に結合した非標的型核酸複合体の膜穿孔トランスフェクション活性に集中した。しかしながら、Wangらによって研究されたとおりのサポニンはいずれも、12, 13-デヒドロオレアナン型のエンドソーム脱出促進性サポニンではなかったとともに、これらの複合体はいずれも、エンドサイトーシス受容体リガンドを介して筋細胞を特異的に標的化するものではなかった。

【0025】

まとめると、先行技術の欠点に対処するため、本明細書では、筋消耗性障害、詳細には筋細胞関連遺伝性障害の治療又は予防における使用のための新規医薬組成物であって、12, 13-デヒドロオレアナン型のエンドソーム脱出促進性サポニンと、有利には筋特異的エンドサイトーシス受容体標的化用リガンドがコンジュゲートした治療用核酸とを含む組成物を提示する。本発明者らは、本明細書に記載されるサポニンが、恐らくは核酸のエンドソーム脱出を標的筋細胞において特異的に容易にすることにより、治療用核酸を横紋筋細胞へと効率的に送達する独特な能力を有することを観察した。本明細書に提示する知見は、筋消耗性障害に罹患している患者のための、潜在的に治療負荷の低い、ひいてはより安全な新規の治療方法を開発する道を開くものである。これら及び他の利点については、続く部分に更に提示する。

【0026】

上述の有望な知見を踏まえて、本明細書には、核酸と、サポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を持つ遊離形態の（即ち、巨大分子とコンジュゲートされていない）エンドサイトーシス脱出促進性12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンとを含む改良された生物学的に活性な化合物及び医薬組成物が開示される。

【0027】

本明細書に開示されるコンジュゲートは、特に心筋細胞を含めた、分化した筋細胞、詳細には横紋筋細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの治療用核酸の送達が促進され、有効に行われるという極めて望ましい特性を呈する特別な利点を備えている。

【0028】

本明細書に提示される革新的概念を詳細な実施形態を基に説明するが、それらの実施形態は説明と見なされるべきであり、特許請求の範囲に記載されるものを超えて限定するものと見なされてはならない。本明細書に記載されるとおりのこれらの実施形態は、特に指

10

20

30

40

50

定されない限り、組み合わせで協働して機能することができる。

【0029】

本開示の実施形態の幾つかの目的のうちの一つは、筋消耗性障害に罹患した、核酸ベースの治療薬を必要としているヒト患者にかかる治療薬を投与したときに直面する、核酸がその標的細胞の適切な区画に十分に送達されないこと、及びそれに関連する非特異性の問題の解決法を提供することである。

【0030】

これらの実施形態の幾つかの目的のうちの更なる一つは、現行の核酸ベースの薬物について、それを必要としているヒト患者に対して詳細には副作用が誘導されるような過剰用量で投与したときの不十分な安全特性の問題の解決法を提供することである。

10

【0031】

本発明の実施形態の幾つかの目的のうちのなお更なる一つは、現行の核酸ベースの療法が、それを必要としているヒト患者に投与したとき、非罹患細胞に対するオフターゲット活性はほとんど乃至全くなしに罹患筋細胞に到達し及び／又はその中に入る能力が十分でないことに起因して、それを必要としているヒト患者に投与したとき、所望されるよりも効果が低いという問題の解決法を提供することである。

【0032】

上記の目的のうちの少なくとも一つは、筋消耗性障害、詳細には、先天性ミオパチー又は特にデュシェンヌ型筋ジストロフィーを含めた筋ジストロフィーなど、筋細胞関連遺伝性障害である筋消耗性障害の治療又は予防における使用のための医薬組成物であって、

20

核酸、及び

サポニン、

を含む組成物において、

サポニンが、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条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、組成物を提供することにより実現する。

【0033】

更なる態様では、上記の目的のうちの少なくとも一つは、筋細胞関連遺伝性障害の治療又は予防のための治療的組み合わせであって、

(a) 核酸、及び

(b) サポニン

30

を含む治療的組み合わせにおいて、

サポニンが、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条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、治療的組み合わせを提供することにより実現する。

【0034】

更なる態様では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物の、及び／又は本開示に係る治療的組み合わせの更なる実施形態が提供され、これらの実施形態は、上述の目的のうちの1つ以上に更に対処するものである。

40

【0035】

特に有利な態様では、好ましいサブタイプのエンドソーム脱出促進性サポニンと、例えば、消耗性筋細胞障害関連遺伝子転写物の欠陥のあるエクソンのスキッピングを誘導するように構成された、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど、異なる治療用核酸と、前記核酸を筋細胞上のエンドサイトーシス受容体へと標的化するのに有利なリガンド又はその組み合わせとから選択されるものなど、有利な成分を含み、並びにリガンドを核酸とつなぐための、好ましくはヒトエンドソームに存在する条件下で切断可能であるように構成された共有結合性のリンカーも含む本開示の様々な異なる実施形態が提供される。

【0036】

本開示のこれら及び他の態様については、続きの部分に詳細に提示する。

50

【0037】

定義

用語「サポニン」は、その通常の確立された意味を有し、本明細書では、サポゲニンと称される親油性アグリコンコアと組み合わせになった1つ以上の親水性糖鎖を含む一群の両親媒性配糖体を指す。サポニンは、天然に存在するものであっても、又は合成のもの（即ち、天然に存在しないもの）であってもよい。用語「サポニン」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機能性誘導体並びに化学的及び／又は生物工学的合成経路を通じてデノボ合成されるサポニンが含まれる。本明細書のコンジュゲートに係るサポニンは、サポゲニン又はアグリコンとも称される、五環性C30テルペン骨格であるトリテルペン骨格を有する。本発明のコンジュゲート内では、サポニンはエフェクター分子とは見なされず、また本発明に係るコンジュゲートのエフェクター部分とも見なされない。従って、サポニンとエフェクター部分とを含むコンジュゲートにおいて、エフェクター部分とは、コンジュゲートしたサポニンとは異なる分子である。本発明のコンジュゲートの文脈では、用語サポニンとは、ヒト細胞など、哺乳類細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するとき、本発明のコンジュゲートに含まれる、且つ前記エンドソーム／リソソームにサポニンと一緒に存在するエフェクター部分に向けてエンドソーム／リソソーム脱出促進活性を発揮するようなサポニンを指す。

10

【0038】

本明細書で使用されるとき、用語「サポニン誘導体」（「修飾されたサポニン」としても知られる）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性の結合の形成（「コンジュゲーション」又は「共有結合性コンジュゲーション」とも称される）など、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（好ましくは、哺乳類細胞のエンドソーム又はリソソームと一緒に存在するとき、核酸など、治療用分子に向けてエンドソーム／リソソーム脱出促進活性がある）に対応する化合物を指すと理解されるものとする。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、サポニン誘導体は、天然の対応物を有さず、即ちサポニン誘導体は、例えば植物又は木によって天然に生成されない。用語「サポニン誘導体」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、並びに天然に存在するサポニンが1つ以上の化学修飾によって誘導体化されたものに対応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を通じてデノボ合成された誘導体も含まれる。本発明の文脈におけるサポニン誘導体は、サポニン機能性誘導体と理解されるべきである。サポニン誘導体の文脈における「機能性」は、サポニン又はサポニン誘導体と一緒に細胞と接触するエフェクター分子のエンドソーム脱出をサポニン又はサポニン誘導体が促進する能力又は活性と理解される。

20

30

【0039】

用語「アグリコンコア構造」は、サポニンのアグリコンコアから、そこに結合している炭水化物アンテナ又は糖鎖（グリカン）を除いたものを指すと理解されるものとする。例えば、キラ酸は、S O 1 8 6 1、Q S - 7 及び Q S 2 1 のアグリコンコア構造である。典型的には、サポニンのグリカンは、直鎖又は分岐グリカンなど、単糖又はオリゴ糖である。

40

【0040】

用語「糖鎖」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、糖部分のみからなることができ、又は、例えば Q S - 2 1 に存在するなどの、4 E - メトキシ桂皮酸、4 Z - メトキシ桂皮酸、及び 5 - O - [5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノ酸) のいずれか 1 つなど、更なる部分もまた含み得る。

【0041】

糖鎖の名称という文脈における用語「A p i / X y l -」又は「A p i - 又は X y l -

50

」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 (A p i) 部分を含むか、又はキシロース (X y l) 部分を含むか、いずれかの糖鎖を指す。

【0042】

本明細書で使用されるとき、用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、互いに同義語であり、任意のポリマー分子であって、核酸塩基（又は単に「塩基」、例えば、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、又はウラシル (U) のような標準的な核酸塩基であるか、又は5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、7-メチルグアニン；5, 6-ジヒドロウラシル等のような任意の公知の非標準的な、修飾された、若しくは合成の核酸塩基である）又はそれと機能的に等価な、デオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) などの天然に存在する核酸（この天然に存在する核酸とは、ヌクレオチドである単位でできているポリマー分子であると理解されるべきである）と適切なハイブリダイゼーション条件下で水素結合ベースの核酸塩基対合（ワトソン・クリックの塩基対合など）によって会合する能力を前記ポリマー分子に与える等価体が単位に含まれる場合の、それらの単位でできているポリマー分子を包含すると解釈されるべきである。

10

【0043】

従って、化学的観点からは、ここでの定義に基づく核酸という用語は、化学的にDNA又はRNAであるポリマー分子、並びにゼノ核酸 (XNA) 又は人工核酸としても知られる、核酸類似体であるポリマー分子であって、1つ以上の（又は全ての）単位が修飾ヌクレオチドであるか、又はヌクレオチドの機能等価体であるポリマー分子を包含すると解釈することができる。核酸類似体は当該技術分野において周知であり、向上した特異性及び／又は親和性、その標的に対するより高い結合強度及び／又はインビボでの安定性の増加など、様々な特性に起因して、核酸類似体は研究及び医療に幅広く用いられている。核酸類似体の典型的な例としては、限定はされないが、ロックド核酸 (LNA)（これは架橋型核酸 (BNA) としても知られる）、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO、別名モルホリノ)、ペプチド核酸 (PNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、ヘキシトール核酸 (HNA)、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸 (FANA又はFNA)、2'-デオキシ-2'-フルオロリボ核酸 (2'-F RNA又はFRNA)；アルトリトール核酸 (ANA)、シクロヘキセン核酸 (CeNA) 等が挙げられる。

20

30

【0044】

規則に従い、核酸の長さは、本明細書では、核酸の一本鎖を構築する単位の数で表される。各単位が、1つの塩基対合イベントで会合する能力を有する厳密に1つの核酸塩基に対応するため、長さは、問題の核酸が一本鎖 (ss) 核酸か、それとも二本鎖 (ds) 核酸かにかかわらず、往々にしていわゆる「塩基対」又は「bp」で表される。天然に存在する核酸では、1bpが、1ntと略される1ヌクレオチドに対応する。例えば、1000ヌクレオチドでできている一本鎖核酸（又は各相補鎖が1000ヌクレオチドでできている2本の相補鎖でできている二本鎖核酸）は、1000塩基対又は1000bpの長さを有すると記載され、この長さはまた、1000nt又は1kbと略される1キロベースとも表すことができる。2キロベース又は2kbは、2000ヌクレオチドの一本鎖RNA又はDNAと同じと見なされる2000塩基対の長さに等しい。しかしながら、混用を避けるため、本明細書に定義するとおりの核酸が、化学的にヌクレオチドであるのみならず、またその機能等価体でもある単位を含み得る又はそれからなり得るという事実を考慮して、核酸の長さは、本明細書では、当該技術分野において同様によく見られる表記「nt」よりむしろ、「bp」又は「kb」で優先的に表すものとする。

40

【0045】

本明細書に開示されるとおりの有利な実施形態では、核酸は1kbを超えず、好ましくは500bpを超えず、最も好ましくは250bpを超えない。

【0046】

特に有利な実施形態では、核酸は、150bpを超えない核酸として定義されるオリゴ

50

ヌクレオチド（又は単にオリゴ）であり、即ち、上記に提供される定義に従えば、核酸塩基又はそれと機能的に等価な、DNA又はRNAと適切なハイブリダイゼーション条件下で水素結合ベースの核酸塩基対合によって会合する能力を前記オリゴヌクレオチドに与える等価体が各単位に含まれる場合の、150単位以下でできている任意のポリマー分子であるオリゴヌクレオチドである。前記定義の範囲内では、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドが、ヌクレオチドであるのみならず、またその合成等価体でもある単位を含み得る又はそれからなり得ることは直ちに認識されるであろう。換言すれば、化学的観点からは、本明細書で使用されるとき用語オリゴヌクレオチドは、RNA、DNA、又は核酸類似体、限定はされないが、LNA（BNA）、PMO（モルホリノ）、PNA、GNA、TNA、HNA、FANA、FRNA、ANA、CeNAなどを含む又はそれからなる可能性がある」と解釈されることになる。

10

【0047】

本明細書で使用されるとき、用語「筋細胞上のエンドサイトーシス受容体」は、その特異的リガンドが筋細胞の筋鞘の外側又は表面から接触可能な、且つ、例えばリガンドが受容体に結合するなど、外部刺激があったとき、エンドサイトーシス経路を経るインターナリゼーションを起こす能力を有する受容体又は輸送体であり得る表面分子を指すと理解されるべきである。一部の実施形態では、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体はクラスリン媒介性エンドサイトーシスによってインターナライズされるが、またクラスリン非依存的な経路、例えば、食作用、マクロピノサイトーシス、カベオラ媒介性及びラフト媒介性取込み又は構成的クラスリン非依存的エンドサイトーシスなどによってもインターナライズされることができる。一部の実施形態では、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体は、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、及び／又は（例えば、及び）任意選択でリガンド結合ドメインを更に含み得る細胞外ドメインを含む。一部の実施形態では、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体は、リガンド結合後に筋細胞によってインターナライズされるようになる。一部の実施形態では、リガンドは、筋標的化剤又は筋標的化抗体であってもよい。一部の実施形態では、インターナリゼーション細胞表面受容体は、トランスフェリン受容体（CD71）又は例えば、テトラスパニンファミリーに属するCD63（別名LAMP-3）である。

20

【0048】

用語「抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート」又は「AOC」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、免疫グロブリン断片、1つ又は複数のV_Hドメイン、シングルドメイン抗体、V_{HH}、ラクダ科動物V_Hなどの抗体の任意のコンジュゲート、並びにBNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO、AON）、短鎖又は低分子干渉RNA（siRNA；サイレンシングRNA）、アンチセンスDNA、アンチセンスRNAなど、一本鎖分子又は二本鎖分子の体裁の、DNA、修飾されたDNA、RNA、mRNA、修飾されたRNA、合成核酸を包含する天然又は合成の一続きの核酸から選択されるオリゴヌクレオチドなど、ヒト患者などの対象の細胞と接触したときに治療効果を発揮することのできる任意のポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）分子を指す。

30

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体又はその結合断片」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン又は少なくとも1つの抗原決定基、例えば、抗原に特異的に結合するパラトープを含むポリペプチドを指す。一部の実施形態では、抗体は、完全長抗体である。一部の実施形態では、抗体は、キメラ抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。しかしながら、一部の実施形態では、抗体は、Fab断片、F（ab'）断片、F（ab'）₂断片、Fv断片又はscFv断片である。一部の実施形態では、抗体は、ラクダ科動物抗体に由来するナノボディ又はサメ抗体に由来するナノボディである。一部の実施形態では、抗体は、ダイアボディである。一部の実施形態では、抗体は、ヒト生殖系列配列を有するフレームワークを含む。別の実施形態では、抗体は、IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、Ig

40

50

A L、I g A 2、I g D、I g M、及びI g E定常ドメインからなる群から選択される重鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態では、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書ではV Hと省略する）、及び／又は（例えば、及び）軽（L）鎖可変領域（本明細書ではV Lと省略する）を含む。一部の実施形態では、抗体は、定常ドメイン、例えば、F c領域を含む。免疫グロブリン定常ドメインとは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを指す。ヒトI g G重鎖及び軽鎖定常ドメインアミノ酸配列及びその機能的変異は公知である。重鎖に関して、一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体の重鎖は、アルファ（a）、デルタ（D）、イプシロン（e）、ガンマ（g）又はミュー（m）重鎖であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体の重鎖は、ヒトアルファ（a）、デルタ（D）、イプシロン（e）、ガンマ（g）又はミュー（m）重鎖を含み得る。詳細な実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒトガンマ1 C H I、C H 2、及び／又は（例えば、及び）C H 3ドメインを含む。一部の実施形態では、V Hドメインのアミノ酸配列は、当該技術分野において公知のいずれかなど、ヒトガンマ（g）重鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。ヒト定常領域配列の非限定的な例については、当該技術分野において記載されており、例えば、米国特許第5,693,780号明細書及びK a b a t E A e t a l, (1991)、前掲を参照のこと。一部の実施形態では、V Hドメインは、本明細書に提供される可変鎖定常領域のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、抗体は修飾され、例えば、グリコシル化、リン酸化、S U M O化、及び／又は（例えば、及び）メチル化によって修飾される。一部の実施形態では、抗体は、1つ以上の糖又は炭水化物分子にコンジュゲートしているグリコシル化された抗体である。一部の実施形態では、1つ以上の糖又は炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、G P I化（G P Iアンカーの取付け）、及び／又は（例えば、及び）ホスホグリコシル化によって抗体にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、1つ以上の糖又は炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、又はグリカン類である。一部の実施形態では、1つ以上の糖又は炭水化物分子は、分岐オリゴ糖又は分岐グリカンである。一部の実施形態では、1つ以上の糖又は炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、又はリン脂質単位を含む。一部の実施形態では、抗体は、本開示の1つ以上の抗原結合断片を含むポリペプチドがリンカーポリペプチド又は免疫グロブリン定常ドメインに連結したものを含むコンストラクトである。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によってつなぎ合わされた2つ以上のアミノ酸残基を含み、1つ以上の抗原結合部分の連結に使用される。リンカーポリペプチドの例は、報告されている（例えば、H o l l i g e r, P, e t a l. (1993) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 90:6444-6448; P o l j a k, R. J., e t a l. (1994) S t r u c t u r e 2:1121-1123を参照のこと）。なおも更に、抗体は、抗体又は抗体部分と1つ以上の他のタンパク質又はペプチドの共有結合性又は非共有結合性の会合によって形成された、より大きい免疫接着分子の一部であってもよい。かかる免疫接着分子の例としては、ストレプトアビジンコア領域を使用した四量体s c F v分子の作成（K i p r i y a n o v, S. M., e t a l. (1995) H u m a n A n t i b o d i e s a n d H y b r i d o m a s 6:93-101）並びにシステイン残基、マーカーペプチド及びC末端ポリヒスチンタグを使用した二価のビオチン化s c F v分子の作成（K i p r i y a n o v, S. M., e t a l. (1994) M o l. I m m u n o l. 31:1047-1058）が挙げられる。

【0050】

用語「シングルドメイン抗体」、又は略して「s d A b」、又は「ナノボディ」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、例えば二価s d A bの文脈において、かかる単量体可変抗体ドメインの2つをタンデムで含むものなど、2つ以上の単量体可変抗体ドメインと称しない限り、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片を指す。二価ナノボディは、細胞上に存在する細胞表面分子の細胞外ドメイン上のエピトープなど、細胞

10

20

30

40

50

の細胞外側に存在する分子上のエピトープを標的とする2つのシングルドメイン抗体を含む分子である。好ましくは細胞表面分子は細胞表面受容体である。二価ナノボディはまた、二価シングルドメイン抗体との名称でも呼ばれる。好ましくはこれらの2つの異なるシングルドメイン抗体は、共有結合的に直接結合しているか、又は2つの異なるシングルドメイン抗体に共有結合的に結合する中間分子を通じて共有結合的に結合している。好ましくは二価ナノボディの中間分子は、10,000ダルトン未満、より好ましくは5,000ダルトン未満、更により好ましくは2,000ダルトン未満、最も好ましくは1,500ダルトン未満の分子量を有する。

【0051】

本明細書で使用されるとき、用語「共有結合的に連結した」は、2分子以上が少なくとも1つの共有結合性の結合によって一体に、即ち直接連結されているか、又は共有結合性の結合の鎖を介して、即ち少なくとも1つ以上の原子を含むリンカーを介して連結されているという特徴を指す。

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「コンジュゲート」は、共有結合的に結合された、及び共有結合的に結合している2つ以上の異なる分子の組み合わせと解釈されるべきである。例えば、本明細書に開示されるとおりのコンジュゲートを形成する異なる分子としては、1つ以上の核酸又はオリゴヌクレオチド分子、及び筋細胞の表面上に存在するエンドサイトーシス受容体に結合する1つ以上のリガンドであって、好ましくは、IgG、モノクローナル抗体(mAb)、VHHドメイン又は別のナノボディ型、2つのシングルドメイン抗体を含む二価ナノボディ分子等など、抗体又はその結合断片であるリガンドを挙げることができる。一部の態様では、本明細書に開示されるコンジュゲートは、例えば中央リンカー又は更なるリンカーへの連結を介するなど、リンカーなどの1つ以上の中間分子を介して異なる分子を共有結合的に連結することによって作られてもよい。コンジュゲートにおいては、3つなど、2つ以上の異なる分子全てが互いに直接共有結合的に結合している必要はない。コンジュゲート中の異なる分子が共有結合的に結合しているというのはまた、両方が同じリンカーなどの中間分子に共有結合的に結合することによってもよく、又は各々が更なるリンカー若しくは中央リンカーなどの中間分子に共有結合的に結合していて、2つの(異なる)リンカーなど、それらの2つの中間分子が互いに共有結合的に結合しているものによってもよい。この定義によれば、コンジュゲート中の2つの異なる分子の間には、共有結合的に結合した原子の鎖が間にある限りは、更に多くのリンカーなどの中間分子が存在し得る。

【0053】

本明細書で使用されるとき、用語「投与すること」又は「投与」は、(例えば、対象の病態を治療するのに)生理学的に及び/又は(例えば、及び)薬理学的に有用な方法で対象に複合体を提供することを意味する

【0054】

本明細書で使用されるとき、用語「近似的に」又は「約」は、1つ以上の目的とする値に適用されるとき、明記された基準値と同様の値を指す。特定の実施形態では、用語「近似的に」又は「約」は、特に明記されない限り、又はその他文脈上明らかでない限り、明記された基準値からいずれの向きにも(それより大きいか、又はそれより小さい)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又はそれ未満の範囲内にある値の範囲を指す(かかる数字が可能な値の100%を超えることになる場合を除く)。

【0055】

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、例えば同様の要素、組成物、組成物中の成分、又は別個の方法ステップの間を区別するために使用され、必ずしも逐次的又は時間的順序を記載するために使用されるわけではない。これらの用語は適切な状況下で交換可能であり、本発明のそれらの実施形態は、特に指定されない限り、本明細書に記載又は例示されている以外の他の順番でも機能し得る。

【0056】

本明細書に記載されるとおりの実施形態は、特に指定されない限り、組み合わせで協働して機能することができる。更に、様々な実施形態は、「好ましい」又は「例えば (e.g.)」又は「例えば (for example)」又は「詳細には」などと称されるが、限定するものではなく、本発明に開示される概念を実施し得る例示的な方法と解釈されるべきである。

【0057】

特許請求の範囲で使用される用語「含む (comprising)」は、例えば、その後列挙される要素又は方法ステップ又はある組成物の構成成分に限定されると解釈されるはならず；この用語は、他の要素又は方法ステップ又はある特定の組成物における構成成分を排除しない。この用語は、明記されている特徴、完全体、(方法)ステップ又は成分の存在を指定していると解釈される必要があるが、1つ以上の他の特徴、完全体、ステップ若しくは成分、又はそれらの群の存在又は追加を排除するものではない。従って、「ステップA及びBを含む方法」という表現の範囲は、ステップA及びBのみからなる方法に限定されるべきではなく、むしろ本発明に関しては、その方法の唯一列挙されているステップがA及びBであるというに過ぎず、更には特許請求の範囲には、それらの方法ステップの均等物が含まれると解釈されなければならない。従って、「成分A及びBを含む組成物」という表現の範囲は、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、その組成物の唯一列挙されている成分がA及びBであるというに過ぎず、更には特許請求の範囲には、それらの成分の均等物が含まれると解釈されなければならない。

【0058】

加えて、ある要素又は成分が不定冠詞「ある (a)」又は「ある (an)」で言及されても、文脈上その要素又は成分がただ1つしかないことが明確な要件でない限り、2つ以上の要素又は成分が存在する可能性を除外するものではない。従って、不定冠詞「ある (a)」又は「ある (an)」は、通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0059】

用語「サポニナム・アルBUM (Saponinum album)」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、SA1657及び主にSA1641を含有する、ギブソフィラ・パニキュラタ (Gypsophila paniculata) 及びギブソフィラ・アロステイ (Gypsophila arostii) 由来のサポニン含有する Merck KGaA (Darmstadt, Germany) によって製造されるサポニンの混合物を指す。

【0060】

用語「キラヤサポニン」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、キラヤ (Quillaja saponaria) のサポニン画分、従って、主にQS-18及びQS-21を含有する、他の全てのQSサポニンの供給源を指す。

【0061】

「QS-21」又は「QS21」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 A-apio (約63%)、QS-21 A-xylo (約32%)、QS-21 B-apio (約3.3%)、及びQS-21 B-xylo (約1.7%) の混合物を指す。

【0062】

同様に、「QS-21A」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 A-apio (約65%) 及びQS-21 A-xylo (約35%) の混合物を指す。

【0063】

同様に、「QS-21B」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、QS-21 B-apio (約65%) 及びQS-21 B-xylo (約35%) の混合物を指す。

【0064】

用語「Quil-A」は、キラヤ (*Quillaja saponaria*) 由来の市販されている半精製抽出物を指し、ばらつきのある分量の50種を超える異なるサポニン含有量を含み、その多くは、QS-7、QS-17、QS-18及びQS-21に見られるトリテルペン-三糖の部分構造 Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-をC-3β-OH基に組み込んでいる。Quil-Aに見られるサポニンは、van Setten (1995) の表2に列挙されている [Dirk C. van Setten, Gerrit van de Werken, Gijsbert Zomer and Gideon F. A. Kersten, Glycosyl Compositions and Structural Characteristics of the Potential Immuno-adjutant Active Saponins in *Quillaja Saponaria* Molina Extract Quil A, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 9, 660-666 (1995)]。Quil-Aは、またキラヤサポニンも、キラヤ (*Quillaja saponaria*) 由来のサポニンの画分であり、両方とも、大部分が重複する含有内容である多種多様な異なるサポニン含有する。これらの2つの画分は異なる精製手順によって得られるため、2つの画分は、その具体的な組成の点で異なる。

10

【0065】

用語「QS1861」及び用語「QS1862」は、QS-7及びQS-7 apiを指す。QS1861は1861ダルトンの分子量を有し、QS1862は1862ダルトンの分子量を有する。QS1862は、Fleck et al. (2019) の表1の第28行に記載されている [Juliane Deise Fleck, Andresa Heemann Betti, Francini Pereira da Silva, Eduardo Artur Troian, Cristina Olivaro, Fernando Ferreira and Simone Gasparin Verz a, Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities, Molecules 2019, 24, 171; doi:10.3390/molecules24010171]。記載されている構造は、QS-7のapiバリエーションQS1862である。分子量は1862ダルトンであり、この質量が、グルクロン酸にプロトンを含む正式な質量となるとおりである。中性pHでは、分子は脱プロトン化される。陰イオンモードで質量分析法により測定したとき、測定される質量は1861ダルトンである。

20

30

【0066】

用語「SO1861」及び「SO1862」は、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) の同じサポニンを指し、但し、それぞれ脱プロトン化形態又はapi形態である。分子量は1862ダルトンであり、この質量が、グルクロン酸にプロトンを含む正式な質量となるとおりである。中性pHでは、分子は脱プロトン化される。質量を質量分析法を用いて陰イオンモードで測定したとき、測定される質量は1861ダルトンである。

40

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】非DMD (健常) ドナー (KM155) からの分化したヒト筋管における (A) SO1861-EMCHの共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) でのDMD-ASO及び (B) SO1861-EMCHの共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) でのDMD-PMOを使用したエクソンスキップ

【図2A】hCD71-PEG4-SPDP前駆体の合成

【図2B】hCD71-PEG4-SPDP前駆体によるhCD71-DMD-ASOの

50

作製

【図 2 C】hCD71-PEG4-SPDP 前駆体による hCD71-DMD-PMO の作製

【図 2 D】mCD71-SMCC の合成

【図 2 E】mCD71-M23D の合成

【図 3】非 DMD (健常) ドナー (KM155) からの分化したヒト筋管における (A) SO1861-EMCH の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) 及び (B) SO1861-EMCH の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) を使用したエクソンスキップ; 図 7 もまた参照のこと

10

【図 4】DMD 罹患ドナー (DM8036) からの分化したヒト筋管における (A) SO1861-EMCH の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-ASO 及び (B) SO1861-EMCH の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-PMO を使用したエクソンスキップ; 注、(A、右のパネル) において、0.013 nM の最初の試料 (アスタリスク) は空のレーンを示す

【図 5】分化したマウス C2C12 筋管における SO1861-SC-Mal の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での mCD71-M23D-PMO を使用したエクソンスキップ

【図 6】SO1861-EMCH 及び SO1861-SC-マレイミド、概略表現。

20

【図 7】非 DMD (健常) ドナー (KM155) からの分化したヒト筋管における (A) SO1861-SC-Mal の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) 及び (B) SO1861-SC-Mal の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) を使用したエクソンスキップ評価

【図 8】DMD 罹患ドナー (DM8036) からの分化したヒト筋管における (A) SO1861-SC-Mal の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) 及び (B) SO1861-SC-Mal の共投与無し (左のパネル) 又は有り (右のパネル) での hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) を使用したエクソンスキップ評価

30

【図 9 A】治療後 4 日目、14 日目、及び 28 日目の腓腹筋における単回用量 mCD71-M23D (群 2) 及び媒体対照 (群 1) からのマウスのエクソンスキップ分析

【図 9 B】治療後 4 日目、14 日目、及び 28 日目の横隔膜における単回用量 mCD71-M23D (群 2) 及び媒体対照 (群 1) からのマウスのエクソンスキップ分析

【図 9 C】治療後 4 日目、14 日目、及び 28 日目の心臓における単回用量 mCD71-M23D (群 2) 及び媒体対照 (群 1) からのマウスのエクソンスキップ分析

【図 10】mCD71-M23D (群 2) 及び媒体対照 (群 1) での単回用量研究からの 4 日目、14 日目、28 日目における (A) 血清クレアチニン及び (B) 血清 ALT 分析

【図 11 A】中間体 3 の (中間体 1 及び 2 を経る) 合成

【図 11 B】中間体 4 の合成

40

【図 11 C】中間体 4 と M23D-SH (還元型) のカップリングにより中間体 5 の合成を実現すること

【図 11 D】中間体 3 及び 5 のカップリングにより所望の最終産物 DBCO-(M23D)₂、即ち、2 つの M23D-PMO オリゴヌクレオチドペイロードを担持する分岐した足場を得ることが関わる合成スキームによる DBCO-(M23D)₂ の合成。

【図 12 A】mCD71-M23D 及び mCD63-M23D など、mAb-M23D のコンジュゲーション手順の概略表現。トリミングされ及びアジド修飾された mAb グリカンの調製。

【図 12 B】mCD71-M23D 及び mCD63-M23D など、mAb-M23D のコンジュゲーション手順の概略表現。歪み促進型アジド-アルキンクリック反応による、

50

トリミングされ及びアジド修飾されたmAbグリカンとDBC O-(M23D)₂との間のコンジュゲーション、mAb-(M23D)₄が得られる。注：概略表現を明確にするため、mAb-M23DはDAR4で示す。

【図12C】mCD71-M23D及びmCD63-M23Dなど、mAb-M23Dのコンジュゲーション手順の概略表現。記号的に表現したグリカン残基を説明する凡例。

【図12D】mCD71-M23D及びmCD63-M23Dなど、mAb-M23Dのコンジュゲーション手順の概略表現。記号的に表現した分子を説明する凡例。

【図13】分化したマウスC2C12筋管における(A)SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのmCD71-M23D、及び(B)SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのmCD63-M23Dのエクソン23スキップ分析。

【図14A】活性化リジン(Lys)残基におけるPEG4-SPDPによるhAb官能化が関わる、hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1~5)など、hAb-DMD-オリゴのコンジュゲーション手順の概略表現。注：概略表現を明確にするため、hAb-DMD-オリゴはDAR4で示す。

【図14B】保護されたDMD-オリゴの活性化が関わる、hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1~5)など、hAb-DMD-オリゴのコンジュゲーション手順の概略表現。注：概略表現を明確にするため、hAb-DMD-オリゴはDAR4で示す。

【図14C】活性化DMD-オリゴ-SHとhAb-PEG4-SPDPとの間のジスルフィド結合形成が関わる、hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1~5)など、hAb-DMD-オリゴのコンジュゲーション手順の概略表現。注：概略表現を明確にするため、hAb-DMD-オリゴはDAR4で示す。

【図14D】図の凡例が関わる、hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1~5)など、hAb-DMD-オリゴのコンジュゲーション手順の概略表現。注：概略表現を明確にするため、hAb-DMD-オリゴはDAR4で示す。

【図15】非DMD(健常)ドナー(KM155)からの分化したヒト筋管における、(A)SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1)、及び(B)SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.2)のエクソン51スキップ分析。

【図16A】非DMD(健常)ドナー(KM155)からの分化したヒト筋管における、SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.1)のエクソン51スキップ分析。

【図16B】非DMD(健常)ドナー(KM155)からの分化したヒト筋管における、SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)(DAR3.0)のエクソン51スキップ分析。

【図16C】非DMD(健常)ドナー(KM155)からの分化したヒト筋管における、SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)(DAR2.6)のエクソン51スキップ分析。

【図17】非DMD(健常)ドナー(KM155)からの分化したヒト筋管における、(A)SO1861-SC-MaIの共投与無し(左のパネル)又は有り(右のパネル)でのhCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)(DAR2.3)、及び(B)SO1

10

20

30

40

50

861-SC-Malの共投与無し（左のパネル）又は有り（右のパネル）でのhCD71-3'-SS-DMD-PMO（5）（DAR2.1）のエクソン53スキップ分析。

【発明を実施するための形態】

【0068】

本明細書には、エンドサイトーシス脱出促進性サポニンと、好ましくは筋細胞表面エンドサイトーシス受容体標的化用リガンドに連結された治療用核酸とを含む改良された生物学的に活性な医薬組成物が開示される。本明細書に開示される組成物は、特に心筋細胞を含めた、分化した筋細胞、詳細には横紋筋細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの治療用核酸の送達が進められ、有効に行われるという極めて望ましい特性を呈する特別な利点を備えている。

10

【0069】

本明細書に提示される革新的概念を本開示の詳細な実施形態又は態様を基に説明するが、それらは説明と見なされるべきであり、特許請求の範囲に記載されるものを超えて限定するものと見なされてはならない。本明細書に記載されるとおりの詳細な態様は、特に指定されない限り、組み合わせで協働して機能することができる。本発明をいくつかの実施形態を参照して記載しているが、当業者には、本明細書を読めば、並びに図面及びグラフを検討すれば、その代替例、改良例、変形例及び均等物が明らかになるであろう。本発明は、いかなる形であれ、例示されている実施形態に限定されることはない。添付の特許請求の範囲によって定義される範囲から逸脱することなく、変更を加えることができる。

【0070】

20

本開示の実施形態の幾つかの目的のうちの一つは、筋消耗性障害に罹患した、核酸ベースの治療薬を必要としているヒト患者にかかる治療薬を投与したときに直面する送達の非効率性の問題の解決法を提供することである。本実施形態の幾つかの目的のうちの更なる一つは、現行の核酸ベースの療法が、それを必要としているヒト患者に投与したとき、非罹患細胞に対するオフターゲット活性はほとんど乃至全くなしに罹患筋細胞に到達し及び／又はその中に入る能力が十分でないことに起因して、それを必要としているヒト患者に投与したとき、所望されるよりも効果が低いという問題の解決法を提供することである。

【0071】

いかなる理論によっても拘束されることを望むものではないが、本明細書に開示される新規の医薬組成物は、エンドサイトーシス受容体媒介性エンドサイトーシスによって筋細胞へと標的化される核酸ベースの治療薬について、特異的な一群のトリテルペノイド12,13-デヒドロオレアナン型サポニンが強力なエンドソーム脱出促進特性を呈するように見えるという観察に基づいて企図された。

30

【0072】

エンドサイトーシス経路は複雑であり、十分には分かっていない。現在では、エンドサイトーシス経路に、小胞輸送によってつながる安定した区画が関わるという仮説が立てられている。区画とは、細胞に必須の特定の連続した機能に特化した、複雑で多機能の膜オルガネラである。小胞は、組成が単純で一過性のオルガネラであると考えられ、既存の区画から出芽することによってデノボで形成される膜に囲まれた入れ物と定義される。区画とは対照的に、小胞は、生理学的に不可逆な連続した生化学的変化である成熟を起こすことができる。初期エンドソーム及び後期エンドソームが、エンドサイトーシス経路における安定な区画に相当する一方、一次エンドサイトーシス小胞、ファゴソーム、多小胞体（エンドソーム担体小胞とも呼ばれる）、分泌顆粒、及び更にリソソームが小胞に相当する。

40

【0073】

エンドサイトーシス小胞は、原形質膜において、最も顕著にはクラスリン被覆ピットから生じるものであり、初めに、約pH6.5の主要な選別区画である初期エンドソームと融合する。インターナライズされたカーゴ及び膜の大部分は、リサイクリング小胞（リサイクル経路）を通じて原形質膜にリサイクルされる。分解されるべき成分は、多胞体を介して酸性の後期エンドソーム（6未満のpH）に輸送される。リソソームは、成熟リソソーム酵素を貯蔵し、必要に応じてそれを後期エンドソーム区画に送達することのできる小

50

胞である。得られたオルガネラは、ハイブリッドオルガネラ又はエンドリソソームと呼ばれる。リソソームは、リソソーム再形成と称される過程でハイブリッドオルガネラを出芽する。後期エンドソーム、リソソーム、及びハイブリッドオルガネラは、非常に動的なオルガネラであり、これらの間の区別は難しい場合が多い。エンドサイトーシスで取り込まれた分子の分解は、エンドリソソームの内部で起こる。

【0074】

エンドソーム脱出は、エンドサイトーシス経路、好ましくは、クラスリン媒介性エンドサイトーシス、又はリサイクリング経路からの任意の種類の区画又は小胞の内腔から物質が能動的又は受動的に細胞質に放出されることである。従って、エンドソーム脱出は、中間体及びハイブリッドオルガネラを含めた、エンドソーム、エンドリソソーム又はリソソームからの放出を含むが、これらに限定されない。細胞質ゾルに入った後、前記物質は、核など、他の細胞単位に移動する可能性がある。

【0075】

本明細書に提示されるデータによって実証されることになるとおり、サポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンを含む組成物を本開示の治療用組成物に含めると、治療用核酸が筋細胞のエンドソームから適切な筋細胞内部区画へと効率的に抜け出るのが刺激されるように見えた。

【0076】

これらの有望な観察及び知見を踏まえて、第1の一般的態様では、本発明は、筋消耗性障害の治療又は予防における使用のための医薬組成物であって、

核酸、及び
サポニン

を含む組成物において、

サポニンが、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、組成物を提供する。

【0077】

換言すると、一般的な態様では、本発明は、筋消耗性障害の治療又は予防における使用のための医薬組成物であって、

核酸、及び
サポニン、

を含む組成物において、

サポニンが、サポニンアグリコンコア構造のC-23位に、
アルデヒド基；又は

酸性条件下で切断されるように適合された、前記切断に伴いサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基が生成されるか、又は回復するような酸感受性の切断可能な共有結合性の結合

のいずれかを含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンであり、
ひいては、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、組成物を提供する。

【0078】

次の一般的態様では、本発明はまた、例えば筋細胞関連遺伝性障害の治療又は予防のための、治療的組み合わせであって、

(a) 核酸、及び
(b) サポニン

を含む治療的組み合わせにおいて、

サポニンが、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、治療的組み合わせも提供する。

【0079】

従って、次の一般的態様では、本発明は、好ましくは筋細胞関連遺伝性障害の治療又は予防のための、治療的組み合わせであって、

(a) 核酸、及び

(b) サポニン

を含む治療的組み合わせにおいて、

サポニン サポニンアグリコンコア構造のC-23位に、

アルデヒド基；又は

酸性条件下で切断されるように適合された、前記切断に伴いサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基が生成されるか、又は回復するような酸感受性の切断可能な共有結合性の結合

のいずれかを含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニン、

ひいては、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むトリテルペノイド12, 13-デヒドロオレアナン型サポニンである、治療的組み合わせを提供する。

【0080】

本明細書で使用されるとき、文脈から、治療を目的とする本明細書に開示される組成物の一部を形成する核酸及び治療的組み合わせが、選択された筋消耗性障害を治療し又はその予防を実施するための治療活性を備えるように選択されることが理解されるであろう。換言すると、本明細書に開示されるとおりの組成物／組み合わせに含まれるとおりの核酸は、ある障害に対する治療用核酸であることになるが、一方、別の障害に対しては、それはいかなる利益ももたらさないものであり得る。選択された障害の特異的治療を実施することを目指す当業者は、有望な治療用核酸の選択をどのように実施すればよいか分かっているであろうとともに、かかる障害を引き起こす突然変異に関する自身の知識、又は所与の患者の遺伝子突然変異スクリーニング結果のいずれかに基づいて、改良された治療を実施するためには、本明細書に開示されるとおりの新規組成物／組み合わせにどの治療用核酸を含めるべきかを決断することが可能であろう。

【0081】

好ましい実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物が提供され、ここで筋消耗性障害は、好ましくは先天性ミオパチー又は筋ジストロフィー（好ましくは先天性ミオパチーは、ネマリンミオパチー又は先天性筋線維タイプ不均等症ミオパチーから選択され、及び／又は筋ジストロフィーは、ジストロフィノパチー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー1B型、先天性筋ジストロフィーから選択される）；又は家族性拡張型心筋症である筋細胞関連遺伝性障害であり；最も好ましくは筋消耗性障害は、ジストロフィノパチーである、好ましくはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである筋細胞関連遺伝性障害である。

【0082】

特に有利な実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物が提供され、ここで筋消耗性障害の治療又は予防には、好ましくはエクソンスキッピングが関わるアンチセンス療法が関わる。

【0083】

本明細書に開示される組成物及び治療的組み合わせにおける適用に好適なサポニンは、トリテルペン骨格の基本構造が五環性C30テルペン骨格（サポゲニン又はアグリコンとも称される）であり、且つその天然の非誘導体状態でC-23位にアルデヒド基を更に含むようなトリテルペン12, 13-デヒドロオレアナン型骨格を有する。かかる公知のサポニンの例を表1に示す。

【0084】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 12,13-デヒドロオレアナン型のアグリコンコアを持つ、(後期)エンドソーム/リソソーム脱出促進活性を示すサポニン ⁴⁾			
サポニン名	C-23 位にアルデヒド基を持つアグリコンコア	C-3 β -OH 基の炭水化物置換基	C-28-OH 基の炭水化物置換基
NP-017777	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-($\rightarrow$ 4)]-Fuc- (R = 4E-メトキシ桂皮酸)
NP-017778	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-($\rightarrow$ 4)]-Fuc- (R = 4Z-メトキシ桂皮酸)
NP-017774	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Gal-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110 ^c , NP-017772 ^d	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-
NP-018109	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-($\rightarrow$ 4)]-3-OAc-Fuc- (R = 4E-メトキシ桂皮酸)
NP-017888	ギブソゲニン	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-OAc-Fuc-

10

20

【0085】

30

40

50

【表 2】

NP-017889	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641 ^a , AE X55 ^b	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1658	ギブソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
ギブソシド A ⁶⁾	ギブソゲニン	Gal-(1→4)-Glc(1→4)-[Ara-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Fuc-(1→4)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→3)]-Rha-
フィトラッカゲニン	ギブソゲニン	無し	無し
カスミソウサボニン 1 (Gyp1)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017674	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017810	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
AG1	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-003881	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
NP-017676	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
NP-017677	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
NP-017706	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017705	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

50

【表 3】

NP-017773	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
NP-017775	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1542	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1584	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1674	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1700 ³⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
サボナリオシド B ¹⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1730 ³⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1772 ³⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1832 ¹⁾ (プロトン化 SO1831) = サボナリオシド A	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1861 (脱プロトン化 SO1862)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1862 (プロトン化 SO1861), 別名 サポフェクトシド (Sapofectosid) ⁵⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1904 ³⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

【表 4】

QS-7 (別名 QS1861)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-7 api (別名 QS1862)	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-17	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-18	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 A-apio	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 A-xylo	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 B-apio	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21 B-xylo	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)
QS-21	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	アグリコンにおけるこの位置に関して、QS-21 A-apio, A-xylo, B-apio, B-xylo について示される炭水化物鎖の組み合わせ ((Scheme Q)として示される構造もまた参照のこと)

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

50

【表 5】

アグロステモシ ド E (AG1856, AG2.8) ²⁾	キラ酸	Gal-(1→2)-[Xyl- (1→3)]-GlcA-	[4,6-ジ-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→ 4)]-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1 →4)]-Fuc-
a, b: 異なる名前は、同じ構造の異なる単離体を指す c, d: 異なる名前は、同じ構造の異なる単離体を指す 1) Jia et al., Major Triterpenoid Saponins from <i>Saponaria officinalis</i> (サボンソウ由来の主要なトリテルペノイドサポニン), J. Nat. Prod. 1998, 61, 11, 1368-1373, Publication Date: September 19, 1998, https://doi.org/10.1021/np980167u 2) アグロステモシド E (別名 AG1856 又は AG2.8)の構造は, J. Clochard <i>et al</i>, A new acetylated triterpene saponin from <i>Agrostemma githago</i> L. modulates gene delivery efficiently and shows a high cellular tolerance (ムギセンノウ由来の新規アセチル化トリテルペンサポニンは遺伝子送達を効率的に調節し, 高い細胞耐性を示す), International Journal of Pharmaceutics, Volume 589, 15 November 2020, 119822 の図 4 に提示される。 3) SO1700, SO1730, SO1772, SO1904 の構造は, Moniuszko-Szajwaj et al., Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of <i>Saponaria officinalis</i> L. (サボンソウの根由来の極めて高い極性のトリテルペノイドサポニン), Helv. Chim. Acta, V99, pp. 347 - 354, 2016 (doi.org/10.1002/hlca.201500224)に提示される。 4) 例えば、以下を参照のこと: - Dr Stefan Böttger (2013)による論文: Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I, 及び - Sama et al., Structure-Activity Relationship of Transfection-Modulating Saponins - A Pursuit for the Optimal Gene Trafficker(トランスフェクション調節性サポニンの構造と活性の関係 - 最適な遺伝子輸送体の探究), Planta Med. Volume 85, pp. 513-518, 2019 (doi:10.1055/a-0863-4795)及び - Fuchs et al., Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies (標的型腫瘍療法におけるエンドソーム脱出促進剤としてのグリコシル化トリテルペノイド類), Biomedicine, Volume 5, issue 14, 2017 (doi:10.3390/biomedicines5020014)。 5) Sama et al., Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery (サポフェクトシド - 非毒性の有効な DNA 及び RNA 送達を確実にする), International Journal of Pharmaceutics, Volume 534, Issues 1-2, 20 December 2017, Pages 195-205 (dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.016)及び Moniuszko-Szajwaj et al., Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of <i>Saponaria officinalis</i> L. (サボンソウの根由来の極めて高い極性のトリテルペノイドサポニン), Helv. Chim. Acta, V99, pp. 347 - 354, 2016 (doi.org/10.1002/hlca.201500224)。 6) 例えば、以下を参照のこと: doi:10.1016/s0040-4039(01)90658-6, Tetrahedron Letters No. 8, pp. 477-482, 1963及びpubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gipsoside			

10

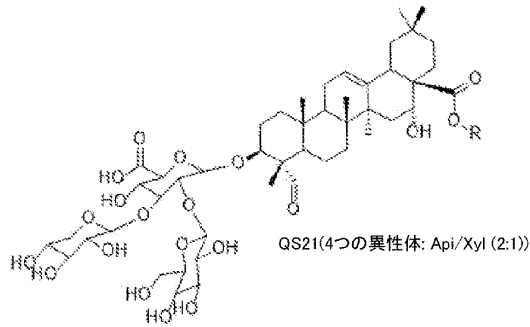
20

30

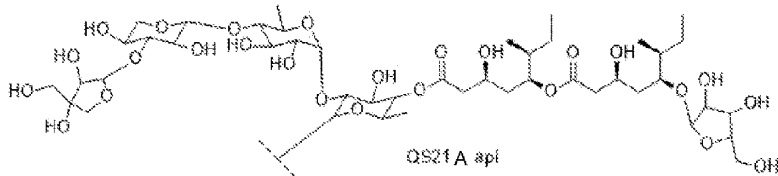
40

【 0 0 8 9 】

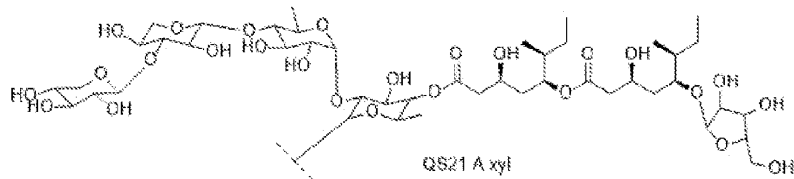
【化 1】



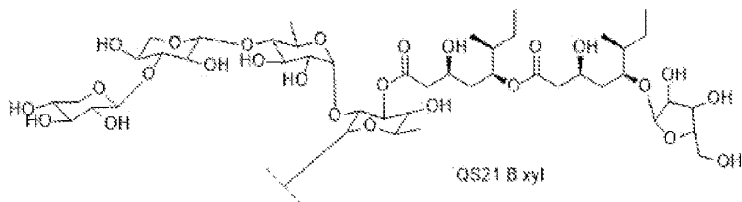
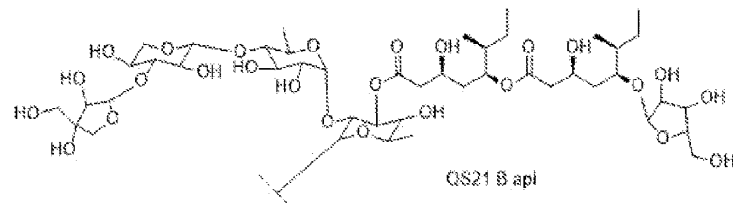
10



20



30



(スキームQ)

40

【0090】

これらのサポニンの注目すべき特徴は、サポニンアグリコンコア構造のC-23位にあるアルデヒド基である。いかなる理論によっても拘束されることを望むものではないが、サポニンのアグリコンコア構造（ここでは「アグリコン」とも称される）に前記アルデヒド基が存在することは、本発明のコンジュゲートに含まれる治療用核酸のエンドソーム脱出をサポニンが刺激し及び／又は増強する能力に特に有益であることが観察された。

【0091】

エンドソーム脱出促進特性には、サポニンアグリコンコア構造のC-23位にあるアルデヒド基が一たびエンドソームの内部に入ると遊離アルデヒド基となり、ひいては、表 1

50

にその天然形態が示される本明細書に開示される好適なサポニンに対し、原則的には、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位においてその位置の遊離アルデヒド基のキャップを取る、又はそれを回復させる任意の化学修飾を適用できることが特に有益であるように見える。

【0092】

本明細書に開示されるとおり、かかる化学修飾には、酸性条件下で切断されるように適合された、前記切断に伴いサポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基が生成されるか、又は回復するような酸感受性の切断可能な共有結合性の結合となるようにC-23位のアルデヒド基を変換すること、又は置き換えることが含まれ、その結果、アルデヒドでキャッピングされた（又はアルデヒドで保護された）サポニン誘導体が生成されることになり、これは、哺乳類（例えばヒト）細胞のエンドソーム区画内に入った後、サポニンアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド基を含むサポニンとなる。このように設計された結合について、C-23位におけるアルデヒド基の回復は、哺乳類／ヒトエンドソーム及び／又はリソソームの区画に存在する酸性条件に反応して、酸性であることによって前記酸感受性の共有結合性の結合の切断が引き起こされる結果である。

10

【0093】

上記を踏まえて、更なる実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は治療的組み合わせが開示され、ここで酸感受性の切断可能な共有結合性の結合は、セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、イミン結合、1,3-ジオキソラン結合を含めたアセタール結合、及び／又はオキシム結合のいずれか1つ以上から選択され、好ましくは酸感受性の切断可能な共有結合性の結合は、セミカルバゾン結合又はヒドラゾン結合のいずれかである。

20

【0094】

有利な実施形態では、かかる切断可能な共有結合性の結合は、セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、又はイミン結合から選択することができる。

【0095】

例えば、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下において切断により外れる切断可能な共有結合性の結合で前記C-23位に結び付いたマレイミド含有部分によってアルデヒド基が例えば置換されているとき、それによってサポニンアグリコンコア構造のC-23位にある前記アルデヒド基が、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下での前記切断に伴い回復するため、かかるサポニンのエンドソーム脱出促進特性はなおもまた極めて明白であることが観察された。

30

【0096】

従って、次の実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は治療的組み合わせが提供され、ここでは酸感受性の切断可能な共有結合性の結合がマレイミド含有部分をサポニンアグリコンコア構造のC-23位に結び付けている。

【0097】

例えば、更なる可能な実施形態では、マレイミド含有部分は、セミカルバゾン結合の形成時にサポニンアグリコンコア構造のC-23位に結び付く4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部であることができ（以下SC-マレイミドと称する）、又はここでマレイミド含有部分は、ヒドラゾン結合の形成時にサポニンアグリコンコア構造のC-23位に結び付くN-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部である（以下EMCHと称する）。

40

【0098】

従って、可能な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は治療的組み合わせが開示され、ここでサポニンアグリコンコア構造のC-23位にあるアルデヒド基は、遊離アルデヒド基であるか、又はヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で切断により外れる切断可能な共有結合性の結合で前記C-23位に結び付いたマレイミド含有部分によって置換されているアルデヒド基で

50

あって、ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下での前記切断に伴い前記サポニンアグリコンコア構造のC-23位にあるアルデヒド基が回復するようなアルデヒド基であるか、いずれかであり；好ましくはここで切断可能な共有結合性の結合は、セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、又はイミン結合から選択され；より好ましくはセミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択され；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である。

【0099】

別の実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでマレイミド含有部分は、セミカルバゾン結合の形成時にサポニンアグリコンコア構造のC-23位に結び付く4-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ピペラジン-1-カルボヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部であり（以下SC-マレイミドと称する）、又はここでマレイミド含有部分は、ヒドラゾン結合の形成時にサポニンアグリコンコア構造のC-23位に結び付くN-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジドを含むか又はそれからなる分子の一部である（以下EMCHと称する）。

【0100】

次に、更なる具体的な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、核酸又はリガンドなど、巨大分子との直接の又は間接的な共有結合性のコンジュゲーションを欠いている1つ以上のサポニン分子からなるものとして定義される遊離サポニンである。

【0101】

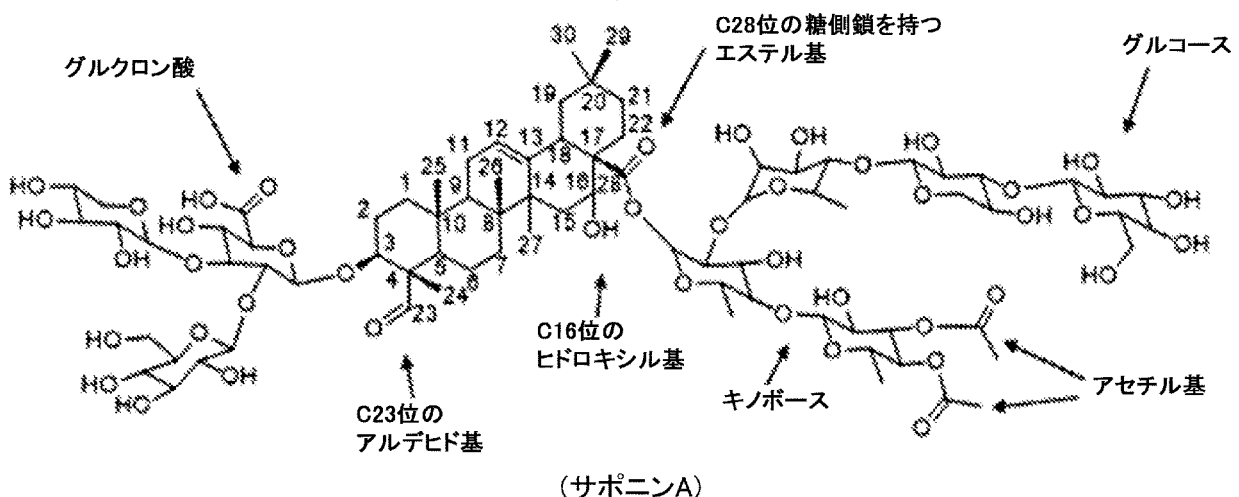
好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで組成物は、2~6 μMのサポニン、好ましくは3~5 μMであり、より好ましくは3.5~4.5 μMであり、及び最もは約4 μMであるサポニンを含む。

【0102】

その自然のままの又はコンジュゲートされていない形態でC-23位にアルデヒド基を天然で含む公知の12,13-デヒドロオレアナン型サポニンの多くは、そのアグリコンコア構造がキラ酸又はギブソゲニンのいずれかであるサポニンである。例示的なかかるサポニンは、サポニンAとして描かれ、以下の構造によって例示される：

【0103】

【化2】



【0104】

これを踏まえて、キラ酸アグリコン又はギブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニンが、本開示の目的上、特に好適であることが観察された。

【0105】

従って、更なる実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンアグリコンコア構造は、キラ酸、ギブソゲニン、及びその誘導体のいずれか1つ以上から選択され、好ましくはここでサポニンアグリコンコア構造は、キラ酸又はギブソゲニン、より好ましくはキラ酸である。

【0106】

上記を踏まえて、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンアグリコンコア構造は、

- ・キラ酸、
 - ・キラ酸のC-23位のアルデヒド基がキラ酸のC-23位の酸感受性の切断可能な共有結合性の結合に変換されているキラ酸誘導体；
 - ・ギブソゲニン、及び
 - ・ギブソゲニンのC-23位のアルデヒド基がギブソゲニンのC-23位の酸感受性の切断可能な共有結合性の結合に変換されているギブソゲニン誘導体のいずれか1つ以上から選択され；
- 好ましくはここでサポニンアグリコンコア構造は、キラ酸又はキラ酸のC-23位のアルデヒド基がキラ酸のC-23位の酸感受性の切断可能な共有結合性の結合に変換されているキラ酸誘導体である。

【0107】

サポニンは、アグリコンコア構造に結び付いた1つ以上の糖鎖を含むことができる。本開示の組成物又は治療的組み合わせの好ましいサポニンは、C-23位にアルデヒド基を含むトリテルペン12, 13-デヒドロオレアナンアグリコンコア構造に結び付いた単一の鎖を含むか（即ち、モノデスモシド型である）又は2つの鎖を含む（即ち、ビデスモシド型である）。

【0108】

糖鎖はまた、エンドソーム脱出促進特性においても役割を果たすと仮定された。

【0109】

上記を踏まえて、更なる実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、末端グルクロン酸残基を含む第1の糖鎖を含み、且つ少なくとも4つの糖残基を分岐した配置で含む第2の糖鎖を含む少なくともビデスモシド型サポニンであり；好ましくはここで第1の糖鎖は、Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcAであり、及び／又はここで少なくとも4つの糖残基の分岐した第2の糖鎖は、末端フコース残基及び／又は末端ラムノース残基を含む。

【0110】

関連する実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、サポニンアグリコンコア構造のC-3位に第1の糖鎖及び／又はサポニンアグリコンコア構造のC-28位に第2の糖鎖を含み；好ましくはここで第1の糖鎖は、サポニンアグリコンコア構造のC-3β-OH基における炭水化物置換基であり、及び／又はここで第2の糖鎖は、サポニンアグリコンコア構造のC-28-OH基における炭水化物置換基である。

【0111】

別の実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、

a) リストA：

－キラヤ (Quillaja saponaria) サポニン混合物、又はキラヤ (Quillaja saponaria) から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl；

ーサポニナム・アルBUM (Saponinum album) サポニン混合物、又はサポニナム・アルBUM (Saponinum album) から単離されたサポニン；

ーサボンソウ (Saponaria officinalis) サポニン混合物、又はサボンソウ (Saponaria officinalis) から単離されたサポニン；及び

ーキラヤ樹皮サポニン混合物、又はキラヤ樹皮から単離されたサポニン、例えば、Quil-A、QS-17-api、QS-17-xy l、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xy l

のいずれか1つ以上から選択されるサポニン；又は

b) リストB：

SA1641、ギブソシドA、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658及びフィトラッカゲニンから選択される、ギブソゲニンアグリコンコア構造を含むサポニン；又は

c) リストC：

AG1856、AG1、AG2、アグロステモシドE、GE1741、カスミソウサポニン1 (Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7 api、QS-17、QS-18、QS-21 A-apio、QS-21 A-xy lo、QS-21 B-apio及びQS-21 B-xy lo

から選択される、キラ酸アグリコンコア構造を含むサポニン

のいずれか1つ以上であり；

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

【0112】

詳細な実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、AG1856、GE1741、キラヤ (Quillaja saponaria) から単離されたサポニン、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、サボンソウ (Saponaria officinalis) から単離されたサポニン、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862及びSO1904のいずれか1つ以上であり；好ましくはここでサポニンは、QS-21、SO1832、AG1856、SO1861、SA1641及びGE1741のいずれか1つ以上であり；より好ましくはここでサポニンは、QS-21、SO1832又はSO1861であり；最も好ましくはSO1861である。

【0113】

より詳細な実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンは、サボンソウ (Saponaria officinalis) から単離されたサポニンであり、好ましくはここでサポニンは、サポナリオシドB、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862及びSO1904のいずれか1つ以上であり；より好ましくはここでサポニンは、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862及びSO1904のいずれか1つ以上であり、更により好ましくはここでサポニンは、SO1832、SO1861及びSO1862のいずれか1つ以上であり；更により好ましくはここでサポニ

10

20

30

40

50

ンは、S O 1 8 3 2 及び S O 1 8 6 1 であり；最も好ましくは S O 1 8 6 1 である。

【 0 1 1 4 】

更なる詳細な実施形態では、本明細書に開示されるとおりの組成物又は治療的組み合わせは、サポニンアグリコンコア構造の C - 2 3 位にアルデヒド基を含む好適なトリテルペノイド 1 2 , 1 3 - デヒドロオレアナン型サポニンと共に調製することができ、ここで、以下のうちの 1 つ以上、好ましくは 1 つ、即ち、

i . 少なくとも 1 つのサポニンのアグリコンコア構造にあるアルデヒド基は、存在するとき誘導体化されている、

i i . 少なくとも 1 つのサポニンの第 1 の糖鎖にあるグルクロン酸部分のカルボキシル基は、少なくとも 1 つのサポニンに存在するとき誘導体化されている、及び

i i i . 少なくとも 1 つのサポニンの第 2 の糖鎖にある少なくとも 1 つのアセトキシ (Me (C O) O -) 基は、存在する場合には誘導体化されている。

【 0 1 1 5 】

より詳細な実施形態では、開示されるとおりの組成物又は治療的組み合わせを提供することができ、ここでサポニンアグリコンコア構造の C - 2 3 位にアルデヒド基を含む少なくとも 1 つのトリテルペノイド 1 2 , 1 3 - デヒドロオレアナン型サポニンは、以下を更に含む：

i . アグリコンコア構造であって、

－アルコールへの還元；

－ N - ε - マレイミドカブロン酸ヒドラジド (E M C H) との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、E M C H のマレイミド基は、任意選択で、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって誘導体化される）；

－ N - [β - マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (B M P H) との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、B M P H のマレイミド基は、任意選択で、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって誘導体化される）；又は

－ N - [κ - マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (K M U H) との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、K M U H のマレイミド基は、任意選択で、メルカプトエタノールとのチオエーテル結合の形成によって誘導体化される）

によって誘導体化されているアルデヒド基を含むアグリコンコア構造；又は

i i . 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 , 3 - プロパンジオール (A M P D) 又は N - (2 - アミノエチル) マレイミド (A E M) との反応を通じたアミド結合への変換によって誘導体化されているカルボキシル基、好ましくはグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む第 1 の糖鎖；又は

i i i . 脱アセチル化によるヒドロキシル基 (H O -) への変換によって誘導体化されているアセトキシ基 (Me (C O) O -) を含む第 2 の糖鎖；又は

i v . 2 つ又は 3 つの誘導体化 i . , i i . 及び / 又は i i i . の任意の組み合わせ、好ましくは i . , i i . 及び / 又は i i i . のうちの 2 つの誘導体化の任意の組み合わせを含む。

【 0 1 1 6 】

具体的な実施形態では、組成物及び治療的組み合わせが提供され、ここで少なくとも 1 つのサポニンは第 1 の糖鎖と第 2 の糖鎖とを含み、ここで第 1 の糖鎖は 2 つ以上の糖部分を含み、第 2 の糖鎖は 2 つ以上の糖部分を含み、及びここでアグリコンコア構造はキラ酸又はギブソゲニンであり、より好ましくはキラ酸であり、ここで、以下のうちの 1 , 2 又は 3 つ、好ましくは 1 又は 2 つ、即ち、

i . アグリコンコア構造にあるアルデヒド基は誘導体化されている、

i i . 第 1 の糖鎖にあるグルクロン酸部分のカルボキシル基は誘導体化されている、及び

i i i . 第 2 の糖鎖にある少なくとも 1 つのアセトキシ (Me (C O) O -) 基は誘導体化されている。

【 0 1 1 7 】

ある実施形態は本発明のコンジュゲートであり、ここで以下のうちの 1 つ、2 つ又は 3

つ、好ましくは1つ又は2つ、より好ましくは1つ、即ち、

i v. 少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造にあるアルデヒド基は、存在するとき誘導体化されている、

v. 少なくとも1つのサポニンの第1の糖鎖にあるグルクロン酸部分のカルボキシル基は、少なくとも1つのサポニンに存在するとき誘導体化されている、及び

少なくとも1つのサポニンの第2の糖鎖にある少なくとも1つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基は、存在する場合には誘導体化されている。

【0118】

具体的な実施形態では、本開示に係る組成物又は治療的組み合わせが提供され、ここでサポニンのアグリコンコア構造のC-23位におけるアルデヒド官能基は、EMCHカップに共有結合的に結合している。サポニンのアグリコンのアルデヒド基にEMCHが結合すると、ヒドラゾン結合が形成されることになる。かかるヒドラゾン結合は、エンドソーム及びリソソーム内部の酸性条件下でサポニンアグリコンコア構造のC-23位にあるアルデヒド基が回復する切断可能な結合の典型的な例である。

【0119】

本明細書に提示される有利な組成物の開発は、本発明の組成物にエンドソーム脱出促進性サポニンが含まれるおかげで、核酸を向上した高い効率で筋細胞に送達することができるため、筋消耗性障害の治療及び／又は予防の助けとなるという意外な認識に基づいた。

【0120】

これを踏まえて、有利な実施形態では、核酸は、ある特定の筋細胞関連遺伝性障害の影響を受ける突然変異した転写物又は遺伝子内にあるゲノム突然変異に適合された治療用核酸である。かかる潜在的に標的化可能な遺伝子標的及びそれに関連する筋細胞関連遺伝性障害のリストについては、例えば、Cardamone M, et al., 2008を参照することができる。

【0121】

詳細な実施形態では、かかる遺伝子標的は、その発現がDMDなどのジストロフィノパチーの原因となる突然変異したヒトジストロフィン転写物であり、本明細書に開示される組成物の潜在的能力を実証するこれについての概念実証実験を、続く部分に提示する。しかしながら、公知の遺伝子における他の突然変異もまた、限定はされないが、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの根底にあるDUX4／ダブルホメオボックス4、又は筋強直性ジストロフィー1型の根底にあるDMPK、又はエメリ・ドレフュス型筋ジストロフィーの根底にあるEMD／エメリン及びLMNA／ラミンA／C、又は肢帯型筋ジストロフィー1の根底にあるMYOT／ミオチリン、LMNA／ラミンA／Cにおけるものなど、アンチセンス療法により標的化することができる。更なる例、先天性筋ジストロフィーにおいて突然変異した状態となるLAMA2／メロシン若しくはラミニンα2鎖／コラーゲン6AをコードするCOL6A遺伝子のいずれか又は家族性拡張型心筋症におけるLMNA／ラミンA／C。本明細書に開示されるコンジュゲート及び組成物に存在する核酸によって標的化することのできる更なる突然変異は、NEB／ネブリン、ACTA／骨格筋αアクチン、TPM3／αトロポミオシン-3、TPM2／βトロポミオシン-2、TNNT1／トロポニンT1、MOD3／レイオモジン-3、MYPN／ミオパラジン等（ネマリ

【0122】

可能な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸は、以下のうちのいずれか1つ：モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (PMO)、2'-O-メチル (2'-OMe) ホスホロチオエートRNA、2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) RNA {2'-O-メトキシエチル-RNA (MOE)}、ロックド核酸又は架橋型核酸 (BNA)、2

10

20

30

40

50

’-O, 4’-アミノエチレン架橋型核酸 (BNANC)、ペプチド核酸 (PNA)、2’-デオキシ-2’-フルオロアラビノ核酸 (FANA)、3’-フルオロヘキシトール核酸 (FHNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、サイレンシング RNA (siRNA)、低分子ヘアピン RNA (shRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、アンタゴmir (miRNAアンタゴニスト)、アプタマーRNA又はアプタマーDNA、一本鎖RNA又は一本鎖DNA、二本鎖RNA (dsRNA) 又は二本鎖DNAを含むか、又はそれからなり；好ましくはここで核酸オリゴヌクレオチドは、モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー (PMO) 又は2’-O-メチル (2’-OMe) ホスホロチオエートRNAを含むか、又はそれからなる。

【0123】

更なる実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は治療的組み合わせが提供され、ここで核酸は、ヒトジストロフィン遺伝子転写物のエクソンスキッピングを誘導するように設計され、好ましくはここでエクソンスキッピングには、エクソン51スキッピング又はエクソン53スキッピング又はエクソン45スキッピングが関わり；

より好ましくはここで核酸は、エクソン51スキッピング又はエクソン53スキッピング又はエクソン45スキッピングを誘導するように設計される2’-O-メチル-ホスホロチオエート (phosphorothioate) アンチセンスオリゴヌクレオチド又はホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、
更により好ましくはここで核酸は、エテプリルセン、ドリサベルセン、ゴロディルセン、ビルトラルセン、及びカシメルセンから選択される。

【0124】

特に有利な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸は、150ntを超えない核酸として定義されるオリゴヌクレオチドであり、好ましくはここでオリゴヌクレオチドは5~150ntのサイズであり、好ましくは8~100ntであり、最も好ましくは10~50ntである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、更により好ましくは突然変異特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、最も好ましくは、エクソンスキッピングを誘導するように設計されたオリゴヌクレオチドである。

【0125】

本明細書で使用されるとき、用語オリゴヌクレオチドとは、天然に存在するヌクレオチドでできている、ひいては化学的にはオリゴヌクレオチドであるオリゴマー、並びに修飾オリゴヌクレオチドその類似体を含むオリゴマーの両方を包含すると理解されるものとする。例えば、合成オリゴマーは、2’-フルオロ (2’-F)、2’-O-メチル (2’-OMe)、2’-O-メトキシエチル (2’-MOE)、2’-O-アミノプロピル (2’-OAP)、2’-O-ジメチルアミノエチル (2’-ODMAOE)、2’-O-ジメチルアミノプロピル (2’-ODMAP)、2’-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2’-ODMAEOE)、2’-O-N-メチルアセトアミド (2’-ONMA)、ロックド核酸 (LNA)、エチレン架橋型核酸 (ENA)、及び (S)-拘束エチレン架橋型核酸 (cet) 等から選択することができる2’修飾型ヌクレオチドを含み得る。これを踏まえて、可能な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、構造的又は機能的に、デオキシリボ核酸 (DNA) オリゴマー、リボ核酸 (RNA) オリゴマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO、AON)、低分子干渉性RNA (siRNA)、抗マイクロRNA (抗miRNA)、DNAアプタマー、RNAアプタマー、mRNA、ミニサークルDNA、ペプチド核酸 (PNA)、ホスホリアミデートモルホリノオリゴマー (PMO)、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2’-デオキシ-2’-フルオロアラビノ核酸 (FANA)、2’-O-メトキシエチル-RNA (MOE)、3’-フルオロヘキシトール核酸 (FHNA)、グリコール核酸 (GNA)、トレオース核酸 (TNA)、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）、化学的に修飾された siRNA、代謝的に安定している siRNA 及び化学的に修飾された、代謝的に安定している siRNA から選択される、BNA ベースの siRNA など、siRNA、又は当該技術分野において公知の任意の他のカテゴリーのいずれとしても定義することができる。

【0126】

機能的観点から、有利な実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、好ましくは突然変異特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、最も好ましくはエクソンスキッピングを誘導するように設計されたオリゴヌクレオチドである。

10

【0127】

関連する実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでオリゴヌクレオチドは、以下のうちのいずれか1つを含むか、又はそれからなる：モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー（PMO）、2'-O-メチル（2'-OMe）ホスホロチオエートRNA、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）RNA {2'-O-メトキシエチル-RNA（MOE）}、ロックド核酸又は架橋型核酸（BNA）、2'-O、4'-アミノエチレン架橋型核酸（BNANC）、ペプチド核酸（PNA）、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ核酸（FANA）、3'-フルオロヘキシトール核酸（FHNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、サイレンシングRNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンタゴmir（miRNAアンタゴニスト）、アプタマーRNA又はアプタマーDNA、一本鎖RNA又は一本鎖DNA、二本鎖RNA（dsRNA）又は二本鎖DNA。

20

【0128】

特に好ましい実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示に係るコンジュゲートが提供され、ここでオリゴヌクレオチドは、モルホリノホスホロジアミデートオリゴマー（PMO）又は2'-O-メチル（2'-OMe）ホスホロチオエートRNAを含むか、又はそれからなる。

【0129】

詳細な且つDMDに有利な具体的実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでオリゴヌクレオチドは、ヒトジストロフィン遺伝子転写物のエクソンスキッピングを誘導するように設計され、好ましくはここでエクソンスキッピングには、エクソン51スキッピング又はエクソン53スキッピング又はエクソン45スキッピングが関わり、より好ましくはここでオリゴヌクレオチドは、エクソン51スキッピング又はエクソン53スキッピング又はエクソン45スキッピングを誘導するように設計される2'-O-メチル-ホスホロチオエート（phosphorothioate）アンチセンスオリゴヌクレオチド又はホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

30

【0130】

直前の実施形態を踏まえた極めて詳細な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、エテプリルセン、ドリサベルセン、ゴロディルセン、ビルトラルセン、及びカシメルセンから選択される。

40

【0131】

有利な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで組成物は2つ以上の異なる核酸を含み、2つ以上の異なる核酸は好ましくは2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドであり、より好ましくはここで2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0132】

2つ以上の治療用核酸のかかる組み合わせは当該技術分野において公知であり、例えば

50

筋消耗性障害向けには、ミオスタチン及びジストロフィンにおける二重エクソンスキッピング用の2つのAONに基づく組み合わせ手法がデュシェンヌ型筋ジストロフィーの管理のために提案された [Kemaladewi et al, 2011]。

【0133】

特に好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸は、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドとコンジュゲートされている。

【0134】

筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドについて、筋細胞の表面上に発現する多くのエンドサイトーシス受容体は公知であることに留意しなければならない、トランスフェリン受容体 (CD71) 又は筋特異的キナーゼ (MuSK) のようなその一部については、国際公開第2018129384号パンフレット又は国際公開第2020028857号パンフレットに記載されている。好適な受容体の更なる例としては、筋膜貫通輸送体、例えばGLUT4又はENT2 (他多数と共にEbner, 2015に記載されている)、又は例えばテトラスパニンCD63 [Baik, 2021] を挙げることができる。実際、これまでに筋細胞の表面上に存在する多くのエンドサイトーシス受容体が特徴付けられており、トランスフェリン受容体 (CD71) 及び恐らくはインスリン様成長因子1 (IGF-I) 受容体 (IGF1R) が、最も研究の進んでいるものである。これらの受容体のリガンドは、CD71の天然リガンドであるトランスフェリン (Tf)、又はLDL受容体のリガンドであるLDLなど、天然リガンドから選択することができる。或いは、受容体は、各種の抗体又はその結合断片など、天然に存在しないリガンドであってもよく、又は代わりに、エンドサイトーシスマンノース受容体に結合するザイモザンAのような合成リガンドであるか、若しくはIGF1RのリガンドであるIGF-Iの断片又はCI-MPR (別名IGF2R) のリガンドであるIGF-IIの断片など、天然に存在するリガンドの合成断片であってもよい。

【0135】

好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸とコンジュゲートしているリガンドが結合する筋細胞上のエンドサイトーシス受容体は、トランスフェリン受容体 (CD71)、インスリン様成長因子1 (IGF-I) 受容体 (IGF1R)、テトラスパニンCD63；筋特異的キナーゼ (MuSK)、グルコース輸送体GLUT4、カチオン非依存性マンノース6リン酸受容体 (CI-MPR) から選択される。

【0136】

更に好ましい実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸とコンジュゲートしているリガンドは、

インスリン様成長因子1 (IGF-I) 又はその断片；
インスリン様成長因子2 (IGF-II) 又はその断片
マンノース6リン酸
トランスフェリン (Tf)、
ザイモザンA、及び

エンドサイトーシス受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片であって、エンドサイトーシス受容体が、好ましくは、トランスフェリン受容体 (CD71)、インスリン様成長因子1 (IGF-I) 受容体 (IGF1R)、テトラスパニンCD63、筋特異的キナーゼ (MuSK)、グルコース輸送体GLUT4、カチオン非依存性マンノース6リン酸受容体 (CI-MPR)、及びLDL受容体から選択される、抗体又はその結合断片

のいずれか1つから選択され；

好ましくはここでリガンドは、トランスフェリン受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片であり、より好ましくはここでリガンドは、トランスフェリン受容体への結合に

特異的なモノクローナル抗体又は F a b ' 断片又は少なくとも 1 つのシングルドメイン抗体であり、更により好ましくはここでリガンドは、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクローナル抗体である。

【 0 1 3 7 】

関連する特に有利な実施形態では、核酸とコンジュゲートしているリガンドは、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクローナル抗体又は F a b ' 断片又は少なくとも 1 つのシングルドメイン抗体であり、更により好ましくはここでリガンドは、トランスフェリン受容体への結合に特異的なモノクローナル抗体である。

【 0 1 3 8 】

更に有利な実施形態では、核酸とコンジュゲートしているリガンドは、ヒト化又はヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、 I g G、シングルドメイン抗体を含むか又はそれからなる分子、少なくとも 1 つの V_HH ドメイン、好ましくはラクダ科動物 V_H、可変重鎖新規抗原受容体 (V N A R) ドメイン、F a b、s c F v、F v、d A b、F (a b) 2 及び F c a b 断片である。

【 0 1 3 9 】

特定の有利な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでリガンドは、1 分子のリガンドにつき 2 ～ 5 分子の核酸とコンジュゲートされ；好ましくは 1 分子のリガンドにつき 3 ～ 4 分子の核酸であり；より好ましくはここでリガンドは、1 分子のリガンドにつき平均して 4 分子の核酸とコンジュゲートされる。

【 0 1 4 0 】

ある実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでリガンドは、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン残基を含むアミノ酸残基の鎖を含み、及びここで核酸によるリガンドとの共有結合性の連結は、少なくとも 1 つのシステイン残基及び／又は少なくとも 1 つのリジン残基との共有結合性の結合を含み；

好ましくはここで 2 分子以上の核酸が 1 分子のリガンドに別個のシステイン残基及び／又は別個のリジン残基を介して連結され；

より好ましくはここでリガンドは、場合によっては配列 H R W C C P G C C K T F (配列番号 4) によって表されるテトラシステインリピートであるマルチシステインリピートを含むアミノ酸残基の鎖を含み、及びここで核酸によるリガンドとの共有結合性の連結は、マルチシステインリピートのシステイン残基のいずれか 1 つ以上との共有結合性の結合を含み；

最も好ましくはここで 2 分子以上の核酸は、1 分子のリガンドにマルチシステインリピートの別個のシステイン残基を介して連結されている。

【 0 1 4 1 】

関連する実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここで核酸によるリガンドとの共有結合性の連結は、核酸が共有結合的に結合しているリンカーを介して行われ；

好ましくはここでリンカーは、リンカー 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸スクシンイミジル (S P D P) を含むか、又はそれからなり；場合によってはここでリンカーは、核酸をリガンドのリジン残基に、又はグリカン残基、好ましくは部分的にトリミングされたグリカンに共有結合的に連結する。

【 0 1 4 2 】

特定の適用では、核酸分子、例えばオリゴヌクレオチド分子の 1 つ以上が切断可能な結合を介してリガンドに結合している場合に有利であってよく、ここで切断可能な結合は、例えば、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ることになる。ヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下で切断を受けることになる切断可能な結合が好ましい。

【 0 1 4 3 】

上記を踏まえて、関連する有利な実施形態において、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでリンカーは、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ることになる切断可能なリンカーであり；

好ましくはここでリンカーは、

- ・セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、イミン結合、1,3-ジオキソラン結合を含めたアセタール結合、ケタール結合、エステル結合、及び／又はオキシム結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合、

- ・好ましくはカテプシンBによるタンパク質分解を受けることになる、タンパク質分解されやすい結合、例えばアミド又はペプチド結合；

- ・ジスルフィド結合など、酸化還元切断可能な結合、又はチオエーテル結合など、チオール交換反応しやすい結合

から選択される切断可能な結合を含み；

より好ましくはここでリンカーは、

- ・セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合、又はイミン結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合、

及び／又は

- ・タンパク質分解されやすい、例えばカテプシンBによってタンパク質分解されやすい結合、及び／又は

- ・ジスルフィド結合など、還元条件下で切断されやすい結合

から選択される切断可能な結合を含む。

【0144】

有利には、結合は酸感受性結合であり、即ち、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、好ましくは $\text{pH} \leq 6.5$ 、好ましくは $\text{pH} \leq 6$ 、より好ましくは $\text{pH} \leq 5.5$ の酸性条件下でインビボ切断を受けることになり、より好ましくは、セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合から選択される酸感受性結合であり；最も好ましくは、ヒドラゾン結合である。

【0145】

かかる切断可能な結合は、リガンドが筋細胞上のその標的エンドサイトーシス受容体に結合することによってコンジュゲートがエンドサイトーシス受容体と会合した後に核酸リガンドコンジュゲートが細胞の外側にあるか又はエンドサイトーシス小胞にあるなど、細胞のエンドソーム及びリソソームの外側に存在するとき、切断されにくい、又は切断が僅かな程度に過ぎないことが好ましい。例えば、切断可能な結合は、コンジュゲートがヒト対象の循環中に存在するとき、及び／又はヒト対象の臓器の細胞外に存在するとき、本明細書では筋細胞である標的細胞のエンドソーム又はリソソームにコンジュゲートがあるときの結合の切断されやすさと比較して、好ましくはあまり切断されにくい。

【0146】

詳細な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示に係るコンジュゲートが提供され、ここでリンカーはリガンドに直接又は間接的に共有結合的に連結している。

【0147】

更なる詳細な実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供され、ここでサポニン、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1-E M C H、又はS O 1 8 6 1-S C-マレイミド、好ましくはS O 1 8 6 1-E M C H又はS O 1 8 6 1-S C-マレイミドのいずれかの少なくとも1分子であるか、又はそれを含み、核酸は、ドリサベルセン又はエテプリルセンであり、核酸とコンジュゲートするリガンドは、抗CD71抗体又はその結合断片である。本明細書に開示される治療的又は予防的使用について、使用は、ヒト対象への静脈内又は皮下又は筋肉内投与における使用であり、好ましくは筋肉内投与における使用である。

【0148】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物、使用は、ヒト対象への静脈内又は皮下又は筋肉内投与における使用であり、好ましくは筋肉内投与における使用である。

【0149】

更に別の実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤及び／又は薬学的に許容可能な希釈剤を含む、本明細書に開示される治療的又は予防的使用のための組成物又は本開示の治療的組み合わせが提供される。

【0150】

関連する態様では、治療的組み合わせの成分（a）及び（b）を含むキットが更に提供され、場合によってはここで成分（a）及び（b）は、別個のバイアルの中にあり、好ましくはここで成分（a）及び（b）は、皮下又は筋肉内注射に好適な混合物中に提供される。

【0151】

最後に付け加えると、詳細な実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせ及び／又はキットは、医薬としての使用のために提供される。

【実施例】

【0152】

SO1861は、Extrasynthese, France及び／又はAnalyticon Discovery GmbH, Germanyにより、サボンソウ（*Saponaria officinalis* L）から得られた未加工の植物抽出物から単離され、精製された。

【0153】

配列5'-UCAAGGAAGAUUGGCAUUUCU-3' [配列番号1] のアンチセンスオリゴヌクレオチド、及び同じ配列でチオール修飾を有するASO（それぞれ、DMD-ASO及び5'-チオール-DMD-ASO）は、Hanugen Therapeutics Pvt Ltd. に特注して購入した。配列5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3' のPMO（DMD-PMO又はDMD-PMO（1）） [配列番号2]、及びジスルフィドアミド修飾を有する同じ配列のPMO（5'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO又は5'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（1））は、Gene Tools, LLC. に特注して購入した。配列5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3' のPMO（DMD-PMO（1）） [配列番号2] 及び3' にジスルフィドアミド修飾があるもの（3'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（1））は、Gene Toolsに特注して購入した。配列5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3' のPMO（M23D） [配列番号3]、及びジスルフィドアミド修飾を有する同じ配列のPMO（3'-ジスルフィドアミド-M23D）は、Gene Tools, LLC. に特注して購入した。配列5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3' のPMO（DMD-PMO（2）） [配列番号16] 及び3' にジスルフィドアミド修飾があるもの（3'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（2））は、Gene Toolsに特注して購入した。配列5'-GGCAGTTTCTCTTAGTAACACAGGTTGTGT-3' のPMO（DMD-PMO（3）） [配列番号17] 及び3' にジスルフィドアミド修飾があるもの（3'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（3））は、Gene Toolsに特注して購入した。配列5'-GTTGCCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' のPMO（DMD-PMO（4）） [配列番号18] 及び3' にジスルフィドアミド修飾があるもの（3'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（4））は、Gene Toolsに特注して購入した。配列5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' のPMO（DMD-PMO（5）） [配列番号19] 及び3' にジスルフィドアミド修飾があるもの（3'-ジスルフィドアミド-DMD-PMO（5））は、Gene Toolsに特注して購入した。

【0154】

10

20

30

40

50

ヒトCD71を標的とする抗CD71抗体（クローンOKT9）（hCD71）及びマウスを標的とする抗CD71抗体（クローンR17 217.1.3）（mCD71）は、両方ともBioXCellから購入した。マウスを標的とする抗CD63抗体（クローンNVG-2）（mCD63）は、BioLegendから購入した。IGF-1リガンドは、PeproTechから購入した。

【0155】

トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP、98%、Sigma-Aldrich）、5,5-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（DTNB、エルマン試薬、99%、Sigma-Aldrich）、Zeba（商標）スピン脱塩カラム（2mL、Thermo-Fisher）、NuPAGE（商標）4-12%ビスートリスタンパク質ゲル（Thermo-Fisher）、NuPAGE（商標）MES SDSランニング緩衝液（Thermo-Fisher）、Novex（商標）Sharp事前染色済みタンパク質標準液（Thermo-Fisher）、PageBlue（商標）タンパク質染色用溶液（Thermo-Fischer）、Pierce（商標）BCAタンパク質アッセイキット（Thermo-Fisher）、N-エチルマレイミド（NEM、98%、Sigma-Aldrich）、1,4-ジチオスレイトール（DTT、98%、Sigma-Aldrich）、Sephadex G25（GE Healthcare）、Sephadex G50M（GE Healthcare）、Superdex 200P（GE Healthcare）、イソプロピルアルコール（IPA、99.6%、VWR）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス、99%、Sigma-Aldrich）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩（トリス・HCL、Sigma-Aldrich）、L-ヒスチジン（99%、Sigma-Aldrich）、D-（+）-トレハロース脱水物（99%、Sigma-Aldrich）、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート（TWEEN（登録商標）-20、Sigma-Aldrich）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS、Thermo-Fisher）、塩酸グアニジン（99%、Sigma-Aldrich）、エチレンジアミン四酢酸ジナトリウム塩二水和物（EDTA- Na_2 、99%、Sigma-Aldrich）、滅菌フィルタ0.2 μm 及び0.45 μm （Sartorius）、Vivaspin T4及びT15コンセンレーター（Sartorius）、Superdex 200PG（GE Healthcare）、テトラ（エチレングリコール）、ジメチルスルホキシド（DMSO、99%、Sigma-Aldrich）、N-（2-アミノエチル）マレイミドトリフルオロ酢酸塩（AEM、98%、Sigma-Aldrich）、L-システイン（98.5%、Sigma-Aldrich）、脱イオン水（DI）は実験室用超純水システム（MilliQ、Merck）から取ったばかりのものであった、ニッケル-ニトリロ三酢酸アガロース（Ni-NTAアガロース、Protein）、グリシン（99.5%、VWR）、5,5-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（エルマン試薬、DTNB、98%、Sigma-Aldrich）、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物フルオレセイン（SAMSA試薬、Invitrogen）重炭酸ナトリウム（99.7%、Sigma-Aldrich）、炭酸ナトリウム（99.9%、Sigma-Aldrich）、Sephadex G-25樹脂のPD Mini Trap脱塩カラム（GE Healthcare）、PD10 G25脱塩カラム（GE Healthcare）、0.5、2、5、及び10mLのZebaスピン脱塩カラム（Thermo-Fisher）、Vivaspin遠心フィルタT4 10kDa MWCO、T4 100kDa MWCO、及びT15（Sartorius）、Biosep s3000 aSECカラム（Phenomenex）、Vivacell限外ろ過ユニット10及び30kDa MWCO（Sartorius）、Nalgene Rapid-Flowフィルタ（Thermo-Fisher）、ジクロルメタン（Sigma-Aldrich）、メタノール（Sigma-Aldrich）、ジエチルエーテル（Sigma-Aldrich）、アセトニトリル（Sigma-Aldrich）、ピリジン2-チオン（Sigma-Aldrich）、ヤギ抗ヒトIgG-HRP（S

10

20

30

40

50

outhern Biotech)、ヤギ抗ヒトκ-HRP (Southern Biotech)、濃縮トリス (Thermo-Fisher)、MOPSランニング緩衝液 (20×、Thermo-Fisher)、LDS試料緩衝液 (4×、Thermo-Fisher)、TBSブロッキング緩衝液 (Thermo-Fisher)、トリス (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、Merck)、トリスHCl (Sigma-Aldrich)、Minisart RC15 0.2 μmフィルタ (Sartorius)、Minisart 0.45 μmフィルタ (Sartorius)、PD Minitrapp G25 (Cytiva)、TNBS (2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸、Sigma-Aldrich)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、Sigma-Aldrich)、SMCC (4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸スクシンイミジル、Thermo-Fisher)、THPP (トリス (ヒドロキシプロピル) ホスフィン、Sigma-Aldrich)、DBCO-NHS (CAS 1353016-71-3、BroadPharm)、PEG4-SPDP (2-ピリジルジチオール-テトラオキサテトラデカン-N-ヒドロキシスクシンイミド、Thermo-Fisher)、Novex (商標) TBE-尿素ゲル、15% (Thermo-Fisher)、TBE緩衝液 (ris-Borat-EDTA、Thermo-Fisher)、GlyCLICK (商標) (10mg) アジド活性化キット (Genovis)、及び固定化GlycINATOR (商標) カラム (GlyCLICK (商標) アジド活性化キットから) (Genovis) を使用した。

10

20

30

40

50

【0156】

【表 6】

hCD71 コンジュゲートに関連する材料

説明	供給業者
hCD71ヒト抗CD71抗体	BioXcell
SO1861-SC-マレイミド	Symeres
DMD-PMO(1)-5'-SS-アミド (5'-DMD-PMO(1))	Gene Tools
DMD-PMO(1)-SS-アミド (3'-DMD-PMO(1))	Gene Tools
DMD-PMO(2)-SS-アミド (3'-DMD-PMO(2))	Gene Tools
DMD-PMO(3)-SS-アミド (3'-DMD-PMO(3))	Gene Tools
DMD-PMO(4)-SS-アミド (3'-DMD-PMO(4))	Gene Tools
DMD-PMO(5)-SS-アミド (3'-DMD-PMO(5))	Gene Tools
DMD-ASO-チオール (5'-DMD-ASO)	Hanugen Therapeutics Pvt Ltd
ヤギ抗ヒトIgG - HRP	Southern Biotech
ヤギ抗ヒトκ - HRP	Southern Biotech
コンジュゲーション緩衝液 (TBS pH 7.5)	Fleet Bioprocessing Ltd
ダルベッコPBS pH 7.5	Fleet Bioprocessing Ltd
SEC分析緩衝液 (DPBS:IPA 85:15)	Fleet Bioprocessing Ltd
6Mグアニジン.HCl	Fleet Bioprocessing Ltd
0.5M NaOH	Fleet Bioprocessing Ltd
PBS-T (ダルベッコPBS pH 7.5 Tween-20含有)	Fleet Bioprocessing Ltd
MOPSランニング緩衝液 (20X)	Fleet Bioprocessing Ltd
LDS試料緩衝液 (4X)	Thermo
NuPAGEトランスファー緩衝液 (10X)	Fleet Bioprocessing Ltd
TBSブロッキング緩衝液	Thermo
TCEP	Thermo
THPP	Sigma
DTT	Sigma
PEG4-SPDP	Thermo
NEM	Sigma
グリシン	VWR
DMSO	Sigma
エルマン試薬	Thermo
0.2μm Minisartフィルタ	Sartorius
0.45μm Minisartフィルタ	Sartorius
0.2μm Spin Xフィルタ	Corning
Zeba 2ml 7K MWCO	Thermo
Zeba 10ml 40K MWCO	Thermo
PD10 G25 Sephadex	Cytiva
2.6 × 30cm Sephadex G25	Fleet Bioprocessing Ltd
2.6 × 40cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing Ltd
2.6 × 60cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing Ltd
Vivaspin 20 (10K MWCO)	Sartorius
Vivaspin T15 (10K MWCO)	Sartorius
Vivacell 100 (10K MWCO)	Sartorius
Novexタンパク質標準ラダー	Life Technologies
4-12%ビストリスゲル	Thermo
ニトロセルロース膜	Thermo
PageBlueタンパク質染色剤	Thermo
Ultra TMBブロッティング溶液	Thermo
BCAアッセイキット	Thermo
2mg/ml BGG標準	Thermo
Bioseps s3000 aSECカラム	Phenomenex

10

20

30

40

【 0 1 5 7 】

略語

A b 抗体

A c アセチル

A O N アンチセンスオリゴヌクレオチド

A S O アンチセンスオリゴヌクレオチド

B C A ビシンコニン酸

B G G ウシガンマグロブリン

a S E C 分析用サイズ排除クロマトグラフィー

50

D A R	薬物抗体比	
D B C O	ジベンゾシクロオクチン	
D B C O - N H S	ジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル	
D C M	ジクロロメタン	
D I P E A	N, N-ジイソプロピルエチルアミン	
D M E M	ダルベッコ変法イーグル培地	
D M F	N, N-ジメチルホルムアミド	
D M S O	ジメチルスルホキシド	
D P B S	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	
D T M E	ジチオビスマレイミドエタン	10
D T N B	5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)	
D T T	ジチオスレイトール	
E D T A	エチレンジアミン四酢酸	
E D C I . H C l	1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド	
E M C H . T F A	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	
E q u i v .	当量	
E t B r	臭化エチジウム	
F B S	ウシ胎仔血清	
G a l T	ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ	20
H A T U	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	
H R P	西洋ワサビペルオキシダーゼ	
I P A	イソプロピルアルコール	
L C - M S	液体クロマトグラフィー-質量分析法	
L D S	ドデシル硫酸リチウム	
L R M S	低分解能質量分析法	
N E M	N-エチルマレイミド	
N H S	N-ヒドロキシスクシンイミドエステル	
m A b	モノクローナル抗体	30
m i n	分	
M O P S	3-(モルホリン-4-イル)プロパン-1-スルホン酸	
M P L C	中圧液体クロマトグラフィー	
M W C O	分子量カットオフ	
N M M	4-メチルモルホリン	
P B S	リン酸緩衝生理食塩水	
P B S - T	Tween-20含有リン酸緩衝生理食塩水	
P E G 4 - S P D P	2-ピリジルジチオール-テトラオキサテトラデカン-N-ヒドロキシスクシンイミド	
P M O	ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー	40
P D T	ピリジン2-チオン	
r p m	毎分回転数	
R T	室温	
r . t .	保持時間	
S D S	ドデシル硫酸ナトリウム	
S E C	サイズ排除クロマトグラフィー	
S M C C	4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸スクシンイミジル	
T B E U	(トリス-ヒドロキシメチル)-アミノメタン)-ホウ酸-EDTA-尿素(reagent)	50

T B S トリス緩衝生理食塩水
 T C E P トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩
 T C O 4－N H S t r a n s－シクロオクテン－N－ヒドロキシスクシンイミド
 T e m p 温度
 T F A トリフルオロ酢酸
 T H P P トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン
 T M B ３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン
 T N B S ２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸
 トリス トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン
 U D P－G a l N A z ウリジンニリン酸－N－アジドアセチルマンノサミン
 【０１５８】

10

実施例１～４の方法

S O 1 8 6 1－マレイミド、S O 1 8 6 1－N H S 合成

S O 1 8 6 1は、サボンソウ（*S a p o n a r i a o f f i c i n a l i s* L）に由来し（*A n a l y t i c o n D i s c o v e r y G m b H*、独国）、*S y m e r e s*（オランダ）により当該技術分野において公知の方法に従いそれぞれのハンドルにカップリングされた。

【０１５９】

抗体への５’－ジスルフィドアミド－D M D－P M O、５’－チオール－D M D－A S O、及び３’－ジスルフィドアミド－M 2 3 Dのコンジュゲーション

20

m C D 7 1－M 2 3 D、m C D 7 1－M 2 3 D－S O 1 8 6 1、及びh C D 7 1－D M D－A S O、h C D 7 1－D M D－P M O、h C D 7 1－D M D－A S O－S O 1 8 6 1、及びh C D 7 1－D M D－P M O－S O 1 8 6 1の注文生産は、*F l e e t B i o p r o c e s s i n g*（U K）により実施された。

【０１６０】

分析及び調製方法

L C－M S方法１

装置：W a t e r s I C l a s s；バイナリポンプ：U P I B S M、S M：U P I S M F T N S O 付属；U P C M A、P D A：U P P D A T C、2 1 0～3 2 0 n m、S Q D：A C Q－S Q D 2 E S I、質量範囲は生成物の分子量に依存：

30

1 5 0 0～2 4 0 0又は2 0 0 0～3 0 0 0の範囲内でn e g又はn e g／p o s；E L S D：ガス圧4 0 p s i、ドリフトチューブ温度：5 0℃；カラム：A c q u i t y C 1 8、5 0×2. 1 m m、1. 7 μ m 温度：6 0℃、流量：0. 6 m L／分、直線グラジエントは生成物の極性に依存：

A t₀＝2 % A、t_{5. 0 m i n}＝5 0 % A、t_{6. 0 m i n}＝9 8 % A

B t₀＝2 % A、t_{5. 0 m i n}＝9 8 % A、t_{6. 0 m i n}＝9 8 % A

ポストタイム：1. 0分、溶出液A：アセトニトリル、溶出液B：水中1 0 m M重炭酸アンモニウム（p H＝9. 5）。

【０１６１】

L C－M S方法２

装置：W a t e r s I C l a s s；バイナリポンプ：U P I B S M、S M：U P I S M F T N S O 付属；U P C M A、P D A：U P P D A T C、2 1 0～3 2 0 n m、S Q D：A C Q－S Q D 2 E S I、質量範囲は生成物の分子量に依存：p o s／n e g 1 0 0

40

～8 0 0又はn e g 2 0 0 0～3 0 0 0；E L S D：ガス圧4 0 p s i、ドリフトチューブ温度：5 0℃；カラム：W a t e r s X S e l e c t（商標）C S H C 1 8、5 0×2. 1 m m、2. 5 μ m、温度：2 5℃、流量：0. 5 m L／分、グラジエント：t_{0 m i n}＝5 % A、t_{2. 0 m i n}＝9 8 % A、t_{2. 7 m i n}＝9 8 % A、ポストタイム：0. 3分、溶出液A：アセトニトリル、溶出液B：水中1 0 m M重炭酸アンモニウム（p H＝9. 5）。

【０１６２】

50

LC-MS方法3

装置：Waters IClass；バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPIISM
FTN SO付属；UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD
：ACQ-SQD2 ESI、質量範囲は生成物の分子量に依存 pos/neg 10
5～800、500～1200又は1500～2500；ELSD：ガス圧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/分、グラジ
エント：t_{0min}=5%A、t_{2.0min}=98%A、t_{2.7min}=98%A、ポス
トタイム：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。

10

【0163】

LC-MS方法4

装置：Waters IClass；バイナリポンプ：UPIBSM、SM：UPIISM
FTN SO付属；UPCMA、PDA：UPPDATC、210～320nm、SQD
：ACQ-SQD2 ESI、質量範囲は生成物の分子量に依存：pos/neg 100
～800又はneg 2000～3000；ELSD：ガス圧40psi、ドリフトチュー
ブ温度：50℃ カラム：Waters Acquity Shield RP18、5
0×2.1mm、1.7μm、温度：25℃、流量：0.5mL/分、グラジエント：t
{0min}=5%A、t{2.0min}=98%A、t_{2.7min}=98%A、ポストタイム：
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（p
H=9.5）。

20

【0164】

分取MP-LC方法1

機種：Reveleris（商標）分取MPLC；カラム：Waters XSelect（商標）CSH C18（145×25mm、10μm）；流量：40mL/分；カ
ラム温度：室温；溶出液A：水中10mM炭酸水素アンモニウムpH=9.0；溶出液B：
水中99%Aセトニトリル+1% 10mM炭酸水素アンモニウム；グラジエント：
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。

30

【0165】

分取MP-LC方法2

機種：Reveleris（商標）分取MPLC；カラム：Phenomenex LUN
A C18（3）（150×25mm、10μm）；流量：40mL/分；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；グラジエント：
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、2
54nm及びELSD。

40

【0166】

分取LC-MS方法3

MS機種：Agilent Technologies G6130B四重極；HPLC

50

機種：Agilent Technologies 1290 分取LC；カラム：Waters XSelect（商標）CSH（C18、150×19mm、10μm）；流量：25mL／分；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；グラジエント：

A t₀ = 20％A、t_{2.5min} = 20％A、t_{11min} = 60％A、t_{13min} = 100％A、t_{17min} = 100％A

B t₀ = 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に基づくフラクション収集。

【0167】

分取LC-MS方法4

MS機種：Agilent Technologies G6130B四重極；HPLC機種：Agilent Technologies 1290 分取LC；カラム：Waters XBridge Protein（C4、150×19mm、10μm）；流量：25mL／分；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；グラジエント：

A t₀ = 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

C t₀ = 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に基づくフラクション収集

【0168】

フラッシュクロマトグラフィ

Grace Reveleris X2（商標）C-815 Flash；溶媒送達システム：自吸式3ピストンポンプ、1回のランで最大4種の溶媒の4つの独立したチャネル、溶媒が空になったときのライン自動切替え；最大ポンプ流量250mL／分；最大圧力50バール（725psi）；検出：UV200～400nm、最大4種のUVシグナルの組み合わせ及び全UV範囲スキャン、ELSD；カラムサイズ：ルアーデバイス型4～330g、オプションのホルダー取付け時750g～最大3000g。

【0169】

紫外可視分光光度法

濃度は、Thermo Nanodrop 2000分光計又はPerkin Elmer Lambda 365分光光度計のいずれか及び以下の質量吸光係数（EC）値を使用して決定した：

実験的に決定されたモルε 495 = 58, 700M⁻¹cm⁻¹及びRz 280 : 495 = 0.428をSAMSA-フルオレセインに使用した。

M23D-SS-アミド；質量EC 265 = 259, 210M⁻¹cm⁻¹

エルマン試薬（TNB）；モルEC 412 = 14, 150M⁻¹cm⁻¹

DMD-PMO；モルEC 265 = 318, 050 135, 027M⁻¹cm⁻¹

DMD-ASO；モルEC 265 = 310, 000 252, 512M⁻¹cm⁻¹

ピリジン2-チオン（PDT）；モルε 363 = 8, 080M⁻¹cm⁻¹

【0170】

TNBSアッセイ

グリシン標準（0、2.5、5、10、15及び20μg／mL）をDPBS pH7.5を使用して新鮮に調製した。TNBS（40μL）とDPBS pH7.5（9.96mL）とを組み合わせることにより、TNBSアッセイ試薬を調製した。DI水を使用して調製した10％w／v SDS。このアッセイには、60μLの各試料（シングルケート）及び標準（トリプリケート）をプレートアウトした。各ウェルにTNBS試薬（6

10

20

30

40

50

0 μ l)を加え、プレート振盪機を用いて37℃及び600rpmで3時間インキュベートした。その後、50 μ lの10%SDS及び25 μ l 1M HClを加え、プレートを340nmで分析した。非修飾タンパク質と比べたコンジュゲートのリジン濃度の枯渇によりSO1861-ヒドラゾン-NHS取込みを決定した。

【0171】

SEC

Akta purifier 10システム及びBiosep SEC-s3000カラムを使用したDPBS:IPA(85:15)で溶出するSECによりコンジュゲートを分析した。コンジュゲート純度を不純物/凝集体形態と比べたコンジュゲートピークの積分により決定した。

10

【0172】

SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング

未変性のタンパク質及びコンジュゲートをSDS-PAGEにより4~12%ビストリスゲル及びランニング緩衝液としてMOPSを使用してタンパク質ラダーに対し熱変性非還元及び還元条件下で分析した(200V、約40分)。LDS試料緩衝液及びMOPSランニング緩衝液を希釈液として含む試料を0.5mg/mLに調製した。還元試料については、50mMの最終濃度となるようにDTTを加えた。試料を90~95℃で2分間熱処理し、各ウェルに5 μ g(10 μ l)を加えた。タンパク質ラダー(10 μ l)は前処理なしにロードした。空の列に1×LDS試料緩衝液(10 μ l)を満たした。ゲルに流した後、それをDI水(100mL)で3回、振盪しながら(15分、200rpm)洗浄した。ゲルをPAGE Blueタンパク質染色剤(30mL)と共に振盪インキュベートすることにより(60分、200rpm)、クーマシー染色を実施した。過剰な染色溶液を除去し、DI水(100mL)で2回リンスし、DI水(100mL)で脱染した(60分、200rpm)。得られたゲルをImageJ(ImageJ(Rasband, W. S., ImageJ, 米国国立衛生研究所(U. S. National Institutes of Health), Bethesda, Maryland, USA)及びMyCurveFit(タンパク質ラダーの2点間相関)を用いて画像化し、処理した。

20

【0173】

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEから、X-Cellブロットモジュールを以下のセットアップ((-)BP-BP-FP-ゲル-NC-BP-BP-BP(+))及び条件(30V、60分)で使用して、調製したのトランスファー緩衝液を使用してゲルをニトロセルロース膜に転写した。BP-ブロッティングパッド;FP-フィルタパッド;NC-ニトロセルロース膜。その後、NCをPBS-T(100mL)で振盪しながら(5分、200rpm)2回洗浄し、非特異的部位をブロッキング緩衝液(50mL)で振盪しながら(30分、200rpm)ブロックし、次に活性部位を、ブロッキング緩衝液で希釈したヤギ抗ヒト κ -HRP(1:2000)とヤギ抗ヒトIgG-HRP(1:2000)(50mL)との組み合わせで振盪しながら(30分、200rpm)標識した。その後、NCをPBS-T(100mL)で振盪しながら(5分、200rpm)1回洗浄し、複合体化した抗体を調製したて、ろ過したのCN/DAB基質(25mL)で検出した。発色を目視で観察し、2分後にNCを水で洗浄することにより発色を停止させて、得られたブロットの写真を撮った。

30

40

【0174】

TBEU-PAGE

オリゴヌクレオチドコンジュゲート及びオリゴヌクレオチド標準物質をTBE-尿素PAGEにより15%TBE-尿素ゲル及びランニング緩衝液としてTBEを使用してオリゴラダーに対し熱変性非還元条件下で分析した(180V、約60分)。それぞれ、試料を0.5mg/mLに調製し、標準物質を50~5 μ g/mLに調製し、全てがTBE尿素試料緩衝液及び希釈剤として精製H₂Oを含んだ。試料及び標準物質を70℃で3分間

50

熱処理し、各ウェルに10 μ lを加えて、各レーンにつき5 μ gのタンパク質及びコンジュゲート試料、並びに0.5/0.2/0.1/0.5 μ g (DMD-ASO)又は0.2/0.1/0.05 μ g (DMD-PMO)のオリゴヌクレオチドに等しくなるようにした。TE pH7.5 (2 μ l)中0.1 μ g/バンド/mlに再構成したオリゴラダーを前処理なしにロードした。ゲルに流した後、それを調製したエチジウムブロマイド溶液 (1 μ g/ml)で振盪しながら (40分、200 rpm) 染色した。得られたゲルを紫外線落射照明 (254 nm) によって可視化し、Image J (Rasband、W. S.、Image J、米国国立衛生研究所 (U. S. National Institutes of Health)、Bethesda、Maryland、USA) を用いて画像化し、処理した。

10

【0175】

mCD71-M23D

mCD71のアリコート (42.9 mg、4.20 ml) をDPBS pH7.5で緩衝液交換し、2.5 mg/mlに標準化した。mCD71のアリコート (34.4 mg、0.23 μ mol、2.53 mg/ml) に、調製したSMCC溶液のアリコート (2.0 mg/ml、3.53モル当量、0.81 μ mol) を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次にローラー式混合により20℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、調製したグリシン溶液のアリコート (2.0 mg/ml、約20モル当量、4.05 μ mol) を加えることにより反応をクエンチし、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で15分超インキュベートした。コンジュゲートをSuperdex 200カラムによりTBS pH7.5で溶出して精製し、紫外可視により分析して、精製mCD71-SMCCを得た (31.7 mg、収率：96%、0.942 mg/ml、SMCC対mCD71比=2.1)。

20

【0176】

別途、TBS pH7.5を使用して再構成したM23D-SS-アミドのアリコート (17.2 mg、1.99 μ mol、10.0 mg/ml) を調製したTHPP溶液 (50 mg/ml、10モル当量、19.9 μ mol、82.8 μ l) に加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら37℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、オリゴをPD10 Sephadex G25MカラムによりTBS pH7.5で溶出して精製すると、M23D-SHがもたらされた (14.8 mg、収率：86%、チオール対M23D比=0.98)。

30

【0177】

mCD71-SMCCのアリコート (31.7 mg、0.21 μ mol、0.942 mg/ml) に、M23D-SHのアリコート (4.122 mg/ml、4.0モル当量、0.85 μ mol、1.771 ml) を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃でインキュベートした。約72時間後、コンジュゲート混合物を濃縮し、Superdex 200 PGカラムによりDPBS pH7.5で溶出して精製することにより、精製mCD71-M23Dコンジュゲートを得た。アリコートをBCA比色アッセイにより分析し、コンジュゲートに新しいEC値を割り当て、次に濃縮して2.5 mg/mlに標準化し、0.2 μ mでろ過し、次に特性評価用のアリコート及び生成物試験用のアリコートに分配した。結果は、mCD71-M23Dコンジュゲートであった (全収率=25.7 mg、73%、M23D対mCD71比=1.2)。

40

【0178】

hCD71-DMD-ASO

hCD71のアリコート (60 mg、4.20 ml) をDPBS pH7.5で緩衝液交換し、2.5 mg/mlに標準化した。hCD71のアリコート (58 mg、0.38 μ mol、2.53 mg/ml) に、調製したPEG4-SPDP溶液のアリコート (10 mg/ml、10モル当量、3.8 μ mol) を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、調製したグリシン溶液のアリコート (2.0 mg/ml、50モル当量、1

50

9 μmol) を加えることにより反応をクエンチし、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で15分超インキュベートした。コンジュゲートをZeba 40K スピン脱塩カラムによりTBS pH7.5で溶出して精製し、紫外可視により分析して、精製hCD71-PEG4-SPDPを得た(51.3mg、収率:88%、0.95mg/ml、PEG4-SPDP対hCD71比=4.5)。

【0179】

別途、TBS pH7.5を使用して再構成したDMD-ASO-SHのアリコート(14.4mg、2 μmol 、10.0mg/ml)を調製したてのTHPP溶液(50mg/ml、10モル当量、20 μmol 、82.8 μl)に加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら37℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、オリゴをPD10 Sephadex G25MカラムによりTBS pH7.5で溶出して精製すると、還元DMD-ASO-SHがもたらされた(13.2mg、収率:92%、チオール対DMD-ASO比=0.91)。

【0180】

hCD71-PEG4-SPDPのアリコート(25 mg、0.16 μmol 、0.95 mg/ml)に、DMD-ASO-SHのアリコート(4mg/ml、4.0モル当量、0.65 μmol 、1.17 ml)を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃でインキュベートした。反応の進行は、PDTの移動量により測定した。16時間後、コンジュゲート混合物を濃縮し、Superdex 200PGカラムによりDPBS pH7.5で溶出して精製することにより、精製hCD71-DMD-ASOコンジュゲートを得た。アリコートをBCA比色アッセイにより分析し、コンジュゲートに新しいEC値を割り当て、次に濃縮して2.5mg/mlに標準化し、0.2 μm でろ過し、次に特性評価用のアリコート及び生成物試験用のアリコートに分配した。結果は、hCD71-DMD-ASOコンジュゲートであった(全収率=23.1mg、82%、DMD-ASO対hCD71比=3.5)。第2の合成において、hCD71-DMD-ASOコンジュゲートを上述と同じ方法で合成した、DMD-ASO対hCD71比=2.1)。

【0181】

hCD71-DMD-PMO

hCD71(60mg、4.20ml)のアリコートをDPBS pH7.5で緩衝液交換し、2.5mg/mlに標準化した。hCD71のアリコート(58mg、0.38 μmol 、2.53mg/ml)に、調製したてのPEG4-SPDP溶液のアリコート(10mg/ml、10モル当量、3.8 μmol)を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、調製したてのグリシン溶液のアリコート(2.0mg/ml、50モル当量、19 μmol)を加えることにより反応をクエンチし、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で15分超インキュベートした。コンジュゲートをZeba 40K スピン脱塩カラムによりTBS pH7.5で溶出して精製し、紫外可視により分析して、精製hCD71-PEG4-SPDPを得た(51.3mg、収率:88%、0.95mg/ml、PEG4-SPDP対hCD71比=4.1)。

【0182】

別途、TBS pH7.5を使用して再構成したDMD-PMO-SS-アミドのアリコート(20.2mg、2 μmol 、10.0mg/ml)を調製したてのTHPP溶液(50mg/ml、10モル当量、20 μmol 、82.8 μl)に加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら37℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、オリゴをPD10 Sephadex G25MカラムによりTBS pH7.5で溶出して精製すると、DMD-PMO-SHがもたらされた(16.4mg、収率:81%、チオール対DMD-PMO比=0.97)。

【0183】

hCD71-PEG4-SPDPのアリコート(25mg、0.16 μmol 、0.9

10

20

30

40

50

5 mg / ml) に、DMD-PMO-SHのアリコート (4.1 mg / ml、4.0 モル当量、0.65 μ mol、1.59 ml) を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら 20 °C でインキュベートした。反応の進行は、PDT の移動量により測定した。約 16 時間後、コンジュゲート混合物を濃縮し、Superdex 200 PG カラムにより DPBS pH 7.5 で溶出して精製することにより、精製 hCD71-DMD-PMO コンジュゲートを得た。アリコートを BCA 比色アッセイにより分析し、コンジュゲートに新しい EC 値を割り当て、次に濃縮して 2.5 mg / ml に標準化し、0.2 μ m でろ過し、次に特性評価用のアリコート及び生成物試験用のアリコートに分配した。結果は、hCD71-DMD-PMO コンジュゲートであった (全収率 = 28.2 mg、92%、DMD-PMO 対 hCD71 比 = 3.9)。第 2 の合成において、hCD71-DMD-PMO コンジュゲートを同じ方法で合成した、及び DMD-PMO 対 hCD71 比 = 3.2)。

10

【0184】

細胞培養 (ヒト)

固定化した非 DMD ドナー (KM155) からのヒト筋芽細胞及び DMD 罹患ドナー (DM8036) からの筋芽細胞を、サプリメントパック入りの骨格筋細胞成長培地 (PromoCell, Germany) で、更に 15% ウシ胎仔血清 (Gibco, United Kingdom) 及び 0.5% ゲンタマイシン (Sigma-Aldrich, USA) を補足した上で、製造者の指示に従い培養した。分化のため、0.5% ゼラチンコート表面上に細胞を播種し、約 70~80% のコンフルエンスになったところで、増殖培地を、2% FBS (Gibco)、2% GlutaMAX、及び 1% グルコース (Sigma-Aldrich) 及び 0.5% ゲンタマイシンを補足した DMEM (Gibco) に交換した。3 日間以上、最長でも 5 日間以内の分化の後に (分化した筋管の存在に基づく)、処理を開始した。

20

【0185】

細胞培養及びインビトロ実験 (マウス)

マウス筋芽細胞株 C2C12 を 10% FBS DMEM 培地 + Pen / Strep に維持し、24 ウェルプレートでは 240,000 細胞毎ウェル (cells per well: cpw) 又は 96 ウェルプレート (well plate: wp) では 40,000 cpw で維持培地 (DMEM 培地 + Pen / Strep 中 10% FBS) に播き、37 °C にて 5% CO₂ でインキュベートした。播種から 24 時間後、細胞を分化培地 (DMEM 中 2% ウマ血清) に切り替えて、3 日間インキュベートした後、培地を交換した。更に 24 時間経った後、再び培地を交換し、化合物を加えて 48 時間インキュベートした。次に分化培地を交換し (化合物なし)、細胞を更に 24 時間インキュベートした。処理から合計 72 時間経った後、24 wp の細胞をエクソンスキップ分析用に回収し、96 wp で細胞生存能力を評価した。

30

【0186】

エクソンスキップ分析及び定量化 (ヒト)

RNA を TRIsure 単離試薬 (Bioline) で単離し、当業者に公知のとおり水相からの RNA のクロロホルム抽出; イソプロパノール沈殿を実施した。cDNA 合成には 1000 ng の全 RNA を使用し、適量の RNアーゼフリー水に希釈して 8 μ l RNA 希釈を生じさせた。プライミングプレミックスは、1 μ l dNTP ミックス (各 10 mM) 及び 1 μ l 特異的リバースプライマー (KM155 については、h53R 5' -CTCCGGTTCCTGAAGGTGTTTC-3' [配列番号 5]; DM8036 については、h55R 5' -ATCCTGTAGGACATTGGCAGTT-3' [配列番号 6]) を含有した。この混合物を 70 °C で 5 分間加熱し、次に氷上で少なくとも 1 分間冷却した。0.5 μ l rRNasin (Promega)、4.0 μ l RT 緩衝液、1.0 μ l Tetro RT (Bioline)、及び 4.5 μ l RNアーゼフリー水を含有する反応混合物を調製し、各反応につき 20 μ l の総容積が生じるように冷却した混合物に加えた。RT-PCR を 42 °C で 60 分間、次に 85 °C で 5 分間実行し、氷上

40

50

で冷却した。スキップ分析については、ネステッドPCR手法に従った。この目的上、1回目のPCRにて、 $2.5\mu\text{L}$ $10\times\text{Super Taq PCR}$ 緩衝液、 $0.5\mu\text{L}$ dNTPミックス（各 10mM ）、 $0.125\mu\text{L}$ Taq DNAポリメラーゼTAQ-RO（ $5\text{U}/\mu\text{L}$ ；Roche） $16.875\mu\text{L}$ RNアーゼフリー水の混合物に $3\mu\text{L}$ cDNAを加え、及び $1\mu\text{L}$ （ $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ ）の標的化したエクソンに隣接する各プライマー：KM155については、h48F 5'-AAAAGACCTTG GGCAGCTTG-3' [配列番号7] 及びh53R 5'-CTCCGGTTCTGA AGGTGTTTC-3' [配列番号5]；DM8036については、h47F2 5'-TGAAACTGGAGGACCCGTG-3' [配列番号8] 及びh54R 5'-CCA AGAGGCATTGATATTCTTC-3' [配列番号9]を使用した。これらの試料を 94°C で5分、次に、 94°C で40秒、 60°C で40秒、 72°C で180秒を25サイクル、その後 72°C で7分間のPCRランに供した。2回目のPCRについては、 $5\mu\text{L}$ $10\times\text{Super Taq PCR}$ 緩衝液、 $1\mu\text{L}$ dNTPミックス（各 10mM ）、 $0.25\mu\text{L}$ Taq DNAポリメラーゼTAQ-RO（ $5\text{U}/\mu\text{L}$ ；Roche）、 $38.25\mu\text{L}$ RNアーゼフリー水の混合物に $1.5\mu\text{L}$ PCR1試料を加え、及び $2\mu\text{L}$ （ $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ ）の標的化したエクソンに隣接する各プライマー：KM155については、h49F 5'-CCAGCCACTCAGCCAGTG-3' [配列番号10] 及びh52R2 5'-TTCTTCCAACTGGGGACGC-3' [配列番号11]；DM8036については、h47F 5'-CCCATTAAGCCCAAGAGAGC-3' [配列番号12] 及びh53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' [配列番号13]を使用した。これらの試料を、 94°C で5分、次に 94°C で40秒、 60°C で40秒、 72°C で60秒を32サイクル、その後 72°C で7分間のPCRランに供した。エクソンスキッピングレベルをFemto PulseシステムでUltra Sensitivity NGSキット（Agilent）を製造者の指示に従い使用して定量化した。或いは、特異的PCR断片をBioanalyzer 2100をDNA1000チップ（ラボ・オン・チップ；Agilent）と共に使用して分析するか、又は2%アガロースゲルランで120Vで分離した。ゲルを画像化し、Image Jを使用してバンド強度を定量化した。それぞれ、予想される非スキップ産物はサイズが408bp（KM155）及び475bp（DM8036）であり、スキップ産物は175bp（KM155）又は242bp（DM8036）である。

10

20

30

40

50

【0187】

エクソンスキップ分析及び定量化（マウス生体外及び生体内）

マウス細胞株からのスキップの分析のため、細胞を回収し、各試料につき 0.5mL TRIzol（商標）試薬（Thermo Scientific）を使用して、製造者の指示に従いRNAを単離した。組織の分析のため、初めに30～50mgの凍結組織を細かく切断し、TRIzol（商標）試薬（Thermo Scientific）及びTissueLyser LT（Qiagen）を製造者の指示に従い使用してmRNAを単離した。試料毎のcDNA合成のため、 $5.0\mu\text{L}$ 中の $0.5\mu\text{g}$ RNAに、各反応につき $20.0\mu\text{L}$ の総容積が生じるように $10.0\mu\text{L}$ ddH₂O、 $4.0\mu\text{L}$ $5\times\text{iScript}$ （商標）Reaction Mix及び $1.0\mu\text{L}$ iScript（商標）逆転写酵素（BioRad）を加えた。RT-PCRを 25°C で5分間、 46°C で60分間、及び 95°C で2分間実行した。スキップ分析については、Sapphire Amp（商標）Fast PCRマスターミックス（TakaraBio）を製造者の指示に従い使用した。この目的上、 $9.7\mu\text{L}$ RNアーゼフリー水、 $12.5\mu\text{L}$ の $2\times$ マスターミックス、及び $0.4\mu\text{L}$ の $10\mu\text{M}$ FWプライマー5'-ACCCAGTCT ACCACCCCTATC-3'（配列番号14）、及び $0.4\mu\text{L}$ の $10\mu\text{M}$ RVプライマー5'-CTCTTTATCTTCTGCCCCACCTT-3'（配列番号15）をPCRチューブに加え、混合し、その後、 $25\mu\text{L}$ の総容積が生じるように $2\mu\text{L}$ cDNA（ 50ng ）を加えた。これらの試料を、 94°C で1分と、 98°C で5秒、 55°C で5秒、 72°C で5秒を35サイクルと、続く 72°C で1分のPCRランに供した。試料を

2 μ l 6 $\times$ ローディング緩衝液と混合し、次に2%アガロースゲルに16 μ lをロードして、80 Vで60～90分泳動させた。ゲルを画像化し、バンド強度をChemidoc (商標) XRS+システム及びImage Lab (商標) ソフトウェア (BioRad) で定量化した。それぞれ、予想される非スキップ産物は、サイズが788 bpであり、スキップ産物は、575 bpである。

【0188】

細胞生存能力 (マウス生体外)

処理後、細胞生存能力をCellTiter-Glo (商標) 2.0アッセイにより製造者の指示 (Promega) に従い実施して決定した。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他の全てのウェルから差し引いた後、処理ウェルのバックグラウンド補正済シグナルを未処理ウェルのバックグラウンド補正済シグナルで除すこと ($\times 100$) によって処理／未処理細胞の細胞生存率を計算した。

【0189】

インビボ研究

各群9匹の雄CD-1マウス、投与時年齢6～7週齢に、表A2に掲載する化合物又は媒体の単回静脈内 (i.v.) 注射を与えた。治療期間中、動物を定期的に秤量し (投与前日、及び投与後は週2回)、臨床所見があれば記録した。4日目、14日目、及び28日目に、それぞれ各群3匹のマウスを犠牲にして脱血致死させて、様々な異なる組織及び臓器からの試料を分析用に摘出した。血清を調製し、ALT (AU480、Beckman Coulter) 及びクレアチニンレベル (比色法、Beckman Coulter) を分析した。組織をRNALaterに保存し、分析時まで急速凍結した。心臓、横隔膜及び腓腹筋試料において、ジストロフィンスキップレベルを決定した。

【0190】

【表7】

表 A2: 投与群のインビボ有効性及び忍容性

群	化合物名	動物の数	化合物総量 [mg/kg]	総用量中の 相対 PMO 量 [mg/kg]
1	媒体 (PBS)	9	0.0	N/A
2	mCD71-M23D (DAR1.2)	9	44.0	2.80

【0191】

実施例5の方法

SO1861-SC-マレイミド

SO1861は、サボンソウ (*Saponaria officinalis* L.) に由来し (Extrasynthese、仏国)、Symeres (オランダ) により当該技術分野において公知の方法に従いそれぞれのハンドルにカップリングされた。

【0192】

DBCO-(M23D)₂の合成

DBCO-(M23D)₂の合成は、Symeres (オランダ) により実施された。

【0193】

DBCO-(M23D)₂と抗体のコンジュゲーション

mCD71-M23D及びmCD63-M23Dの特注のコンジュゲート生産は、Abzena (英国) により実施された。

【0194】

分析及び調製方法

分析方法

SEC方法1

反応分析装置：分析用SEC機器DIONEX Ultimate 3000 UPLC (DIONEX 6)；カラム：Watersタンパク質BEH SECカラム、200 Å、1.7 μm、4.6 mm×150 mm；移動相：緩衝液A (0.2 Mリン酸カリウム緩衝液、pH 6.8、0.2 M KCl、超純水中15%イソプロパノール)；方法：イソクラティック緩衝液Aで10分間；流量：0.35 ml/分；実行時間：10分；検出UV：214 nm、248 nm、260 nm及び280 nm；カラムオープン：30℃；オートサンプラー：周囲；注入量：10 μL；試料調製：最終的な試料は、試料をDPBSで1.0 mg/mlに希釈することにより分析した。

10

【0195】

LC-MS方法1

質量分析 (LC-MS) 機器：XEVO-G2XS TOF；カラム：Agilent Poroshell 300SB-C3ガード、5 μm RPカラム；移動相：緩衝液A (水、0.1%ギ酸) 緩衝液B (MeCN、0.1%ギ酸)；注入方法：0~2.0分、10%B 2.0~7.0分、10~80%B 7.0~8.0分、100%B 8.0~8.01分、10%B 8.01~10.0分、10%B；MS方法：キャピラリー電圧：3.0 kV、コーン電圧：120 V、コーン温度：140℃、脱溶媒和温度：450℃、；流量：0.4 ml/分；実行時間：10分；検出：TIC；カラムオープン：60℃；オートサンプラー：周囲；注入量：10 μL；試料調製：a. 最終試料、中間体、及び反応混合物は、試料をDPBSで0.05 mg/mlに希釈することにより分析した。

20

【0196】

LC-MS方法2

機器：Agilent 1260 Infinity II、1260 G7112B バイナリポンプ、1260 G7167A マルチサンプラー、1290MCT G7116B カラムコンパートメント 1260 G7115A DAD (210、220及び210~320 nm)、PDA (210~320 nm)、G6130B MSD (ESI pos/neg) 質量範囲90~1500、カラム：XSelect CSH C18 (30×2.1 mm 3.5 μm) 流量：1 ml/分、カラム温度：40℃、溶出液A：水中0.1%ギ酸、溶出液B：アセトニトリル中0.1%ギ酸、グラジエント：t_{0 min} = 5%B、t_{1.6 min} = 98%B、t_{3 min} = 98%B、ポストラン：1.3分。

30

【0197】

LC-MS方法3

機器：Agilent 1260 Infinity II、1260 G7112B バイナリポンプ、1260 G7167A マルチサンプラー、1260MCT G7116A カラムコンパートメント 1260 G7115A DAD (210、220及び210~320 nm)、PDA (210~320 nm)、G6130B MSD (ESI pos/neg) 質量範囲90~1500、カラム：XSelect CSH C18 (30×2.1 mm 3.5 μm)、流量：1 ml/分、カラム温度：25℃、溶出液A：水中10 mM炭酸水素アンモニウム (pH 9.5)；溶出液B：アセトニトリル、グラジエント：t_{0 min} = 5%B、t_{1.6 min} = 98%B、t_{3 min} = 98%B、ポストラン：1.2分。

40

【0198】

LC-MS方法4

機器：Agilent 1260 Infinity II、1260 G7112B バイナリポンプ、1260 G7167A マルチサンプラー、1290MCT G7116B カラムコンパートメント 1260 G7115A DAD (210~320 nm、210及び220 nm)、PDA (210~320 nm)、G6130B MSD (ESI pos/neg) 質量範囲90~1500、カラム：Waters C4 BEH (50×2.1 mm 3.5 μm) 流量：1 ml/分；カラム温度：40℃、溶出液A：水

50

中 0.1% ギ酸、溶出液 B：アセトニトリル中 0.1% ギ酸、グラジエント：

A $t_{0\text{min}} = 5\% \text{ B}$ 、 $t_{2.5\text{min}} = 98\% \text{ B}$ 、 $t_{4\text{min}} = 98\% \text{ B}$

B $t_{0\text{min}} = 5\% \text{ B}$ 、 $t_{0.05\text{min}} = 5\% \text{ B}$ 、 $t_{5\text{min}} = 98\% \text{ B}$ 、 $t_{6\text{min}} = 98\% \text{ B}$

ポストラン：1.5 分。

【0199】

分取方法

分取 MP-LC 方法 1

機種：Buchi Reveleris (商標) 分取 MPLC；カラム：Waters XSelect (商標) CSH C18 (145×25mm、10μm)；流量：40ml/分；カラム温度：室温；溶出液 A：水中 10mM 炭酸水素アンモニウム pH=9.0；溶出液 B：水中 99% アセトニトリル + 1% 10mM 炭酸水素アンモニウム；グラジエント： $t_{0\text{min}} = 50\% \text{ B}$ 、 $t_{4\text{min}} = 50\% \text{ B}$ 、 $t_{16\text{min}} = 100\% \text{ B}$ 、 $t_{21\text{min}} = 100\% \text{ B}$ ；検出 UV：220、254、270nm；UV に基づくフラクション収集。

10

【0200】

分取 MP-LC 方法 2

機種：Buchi Reveleris (商標) 分取 MPLC；カラム：Phenomenex LUNA C18 (3) (150×25mm、10μm)；流量：40ml/分；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；グラジエント： $t_{0\text{min}} = 5\% \text{ B}$ 、 $t_{1\text{min}} = 5\% \text{ B}$ 、 $t_{2\text{min}} = 20\% \text{ B}$ 、 $t_{17\text{min}} = 60\% \text{ B}$ 、 $t_{18\text{min}} = 100\% \text{ B}$ 、 $t_{23\text{min}} = 100\% \text{ B}$ ；検出 UV：220、240、280nm；UV に基づくフラクション収集。

20

【0201】

分取 LC-MS 方法

MS 機種：Agilent Technologies G6120AA 四重極；HPLC 機種：Agilent Technologies 1200 分取 LC；カラム：Waters XBridge Protein (C4、150×19mm、10μm)；流量：25ml/分；カラム温度：室温；溶出液 A：水中 0.1% ギ酸；溶出液 B：100% アセトニトリル；グラジエント： $t_0 = 10\% \text{ A}$ 、 $t_{2.5\text{min}} = 10\% \text{ A}$ 、 $t_{11\text{min}} = 50\% \text{ A}$ 、 $t_{13\text{min}} = 100\% \text{ A}$ 、 $t_{17\text{min}} = 100\% \text{ A}$ ；検出：DAD (220~320nm)；検出：MSD (ESI pos/neg) 質量範囲：100~1000；DAD に基づくフラクション収集。

30

【0202】

フラッシュクロマトグラフィ

Grace Reveleris X2 (商標) C-815 Flash；溶媒送達システム：自吸式 3ピストンポンプ、1回のランで最大 4 種の溶媒の 4 つの独立したチャネル、溶媒が空になったときのライン自動切替え；最大ポンプ流量 250ml/分；最大圧力 50 バール (725 psi)；検出：UV 200~400nm、最大 4 種の UV シグナルの組み合わせ及び全 UV 範囲スキャン、ELSD；カラムサイズ：ルアーデバイス型 4~330g、オブションのホルダー取付け時 750g~最大 3000g。

40

【0203】

DBC O- (M23D)₂ 合成

中間体 1 (N- [2- (4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0^{4,9}] ヘキサデカー-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-N- (2- { [(tert-ブトキシ) カルボニル] アミノ} エチル)-4-オキソブタンアミド) エチル] カルバミン酸 tert-ブチル)

DMF (1.00ml) 中の DBC O 酸 (50.0mg、0.164mmol) の溶液に DIPEA (34.0μL、0.195mmol) 及び HATU (62.3mg、0.

50

164 mmol)を加え、この混合物を15分間攪拌した。次に、(アザンジイルビス(エタン-2,1-ジイル))ジカルバミン酸ジ-tert-ブチル(59.6 mg、0.197 mmol)を加え、この反応混合物を室温で攪拌した。30分後、反応混合物を水(10.0 ml)に加えた。得られた濃厚な懸濁液を遠心すると(5000 RPM、3分)、上に固体がある澄明な溶液が生じた。この溶液をピペットで取り除き、固体をアセトニトリル(10.0 ml)に溶解させた。得られた溶液を真空中で濃縮した。残渣をフラッシュクロマトグラフィ(DCM-メタノール/DCM(1/9, v/v)グラジエント100:0から0:50に上昇)により精製して、表題生成物(90.0 mg、93%)を無色の固化油として得た。LC-MSに基づく純度100%。

LRMS (m/z): 591 [M+H]¹⁺

LC-MS r. t. (分): 2.12¹

[0204]

中間体2 (N,N-ビス(2-アザニウムイルエチル)-4-{2-アザトリシクロ[10.4.0.0^{4,9}]ヘキサデカー-1(12), 4(9), 5, 7, 13, -15-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-4-オキソブタンアミドジトリフルオロ酢酸塩)

N-[2-(4-{2-アザトリシクロ[10.4.0.0^{4,9}]ヘキサデカー-1(12), 4(9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-N-(2-{[(tert-ブトキシ)カルボニル]アミノ}エチル)-4-オキソブタンアミド)エチル]カルバミン酸tert-ブチル(90.0 mg、0.152 mol)をDCM(2.00 ml)に溶解させて、0℃に冷却した。次に、TFA(2.00 ml、26.0 mmol)を加え、この反応混合物を0℃で40分間攪拌した。反応混合物を10分の間にわたって室温に達するまで放置した。次として、反応混合物を0℃に冷却し、トルエン(5 ml)で希釈した。得られた溶液を真空中で濃縮し、DCM(2×5 ml)と共蒸発させて、粗製の表題生成物をややピンク色がかった油として得て、これを次のステップに直接使用した。LC-MSに基づく純度88%。

LRMS (m/z): 196 [M+2]²⁺, 391 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分): 1.17 (LC-MS方法2)

[0205]

中間体3 N-[2-(4-{2-アザトリシクロ[10.4.0.0^{4,9}]ヘキサデカー-1(12), 4(9), 5, -7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-N-[2-(4-{[(1S, 4E)-シクロオクタ-4-エン-1-イルオキシ]カルボニル}アミノ)エチル]-4-オキソブタン-アミド)エチル]カルバミン酸(1S, 4E)-シクロオクタ-4-エン-1-イル

DMF(1.00 ml)及びDIPEA(200 µL、1.15 mmol)中の粗製のN,N-ビス(2-アザニウムイルエチル)-4-{2-アザトリシクロ[10.4.0.0^{4,9}]ヘキサデカー-1(12), 4(9), -5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-4-オキソブタンアミドジトリフルオロ酢酸塩(0.152 mol)の溶液にTCO4-NHS炭酸塩(102 mg、0.380 mmol)を加え、この混合物を室温で攪拌した。30分後、反応混合物を分取MP-LC(分取MP-LC方法1)にかけた。生成物に対応するフラクションを合わせて直ちにプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させて、表題化合物(90.0 mg、85%)をやや褐色がかった油として得た。LC-MSに基づく純度99%。

LRMS (m/z): 696 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分): 2.35 (LC-MS方法3)

[0206]

中間体4 2-[4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル]-N-[2-(ピリジン-2-イルジスルファニル)エチル]アセトアミド

DMF(800 µL)中のメチルテトラジン-NHSエステル(50.0 mg、0.153 mmol)の溶液に、2-(2-ピリジニルジスルファニル)エタンアミン塩酸塩(40.8 mg、0.183 mmol)及びDIPEA(53.0 µL、0.306 mmol)

10

20

30

40

50

l)を加えた。この反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた(分取MP-LC方法2)。生成物に対応するフラクションを合わせて直ちにプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させて、表題化合物(53.6mg, 88%)をピンク色の固体として得た。LC-MSに基づく純度100%。

LRMS (m/z): 399 [M+1]¹⁺

LC-MS r. t. (分): 1.87 (LC-MS方法3)

[0207]

中間体5: M23D-mTz

水(15.0ml)中のM23D-DSA(294mg、34.0μmol)の溶液にDTT(100mg、648μmol)を加えた。この反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を6等分のフラクションに分け、アセトニトリル(6×45ml)に注入した。得られた懸濁液を振盪し、30分間静置しておいた。次に、懸濁液を遠心した(7830RPM、20分)。溶液をデカントし、残渣をアセトニトリル(各バイアル20ml)で処理した。得られた懸濁液を遠心した(7830RPM、3分)。残渣を水に溶解させて(総量10.0ml)、これらの溶液を合わせた。次に、アセトニトリル(4.00ml)中の2-[4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)フェニル]-N-[2-(ピリジン-2-イルジスルファニル)エチル]アセトアミド(54.2mg、136μmol)の溶液を加えた。この反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を等分し、アセトニトリル(6×45ml)に注入した。得られた懸濁液を振盪し、遠心した(7830RPM、3分)。溶液をデカントし、残渣を水/アセトニトリル(6×2ml、1/1、v/v)に溶解させた。得られた溶液をアセトニトリル(6×20ml)に注入した。次に、懸濁液を遠心した(7830RPM、3分)。溶液をデカントし、残渣を水/アセトニトリル(総量15ml、1/1、v/v)に溶解させて、一晚凍結乾燥することにより、表題化合物(340mg、定量的収率)をピンク色の固体として得た。LC-MSに基づく純度99%。

LRMS (m/z): 1468 [M+6]⁶⁺、1259 [M+7]⁷⁺、1102 [M+8]⁸⁺、979 [M+9]⁹⁺、881 [M+10]¹⁰⁺

LC-MS r. t. (分): 1.75 (LC-MS方法4A)

[0208]

DBCO-(M23D)₂

水(1.00ml)及びアセトニトリル(0.400ml)中のM23D-mTz(16.4mg、1.86μmol)の溶液に、アセトニトリル(675μl)中のN-[2-(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-(1S,4E)-シクロオクタ-4-エン-1-イルオキシ]カルボニル}アミノ)エチル]-4-オキソブタンアミド)エチル]カルバミン酸(1S,4E)-シクロオクタ-4-エン-1-イル(0.67mg、0.964μmol)のストック溶液を加え、この反応混合物を室温で攪拌した。加えた後には毎回、LC-MS^{3A}で反応の進行をモニタした。このようにして、表題生成物への完全な変換を観察した。ストック溶液は、以下のとおり加えた; 400μl、10分後-100μl、10分後-100μl、10分後-25μl、10分後-25μl、10分後-25μl。次に、反応混合物を分取LC-MSにかけた。生成物に対応するフラクションを合わせて直ちにプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させて、表題化合物(10.5mg、62%)を白色の固体として得た。LC-MSに基づく純度100%(幅広のピーク)。

LRMS (m/z): 1142 [M+16]¹⁶⁺、1075 [M+17]¹⁷⁺、1015 [M+18]¹⁸⁺、既知の断片の複数のm/z値を含む

LC-MS r. t. (分): 2.84 (LC-MS方法4B)

[0209]

マウス抗CD63(mCD63)mAbとDBCO-(M23D)₂のコンジュゲーション

10

20

30

40

50

1. mCD63の調製

mCD63をVivaspin (50 kDa MWCO) を使用してTBSで10.0 mg/mlの最終濃度となるように緩衝液交換した。

【0210】

2. 抗体-Fcドメイン上の炭水化物の修飾

固定化したGlycINATOR (商標) カラム (GlyCLICK (商標) アジド活性化キット、Genovisから) を販売業者の指示に従い平衡化し、調製した。次に試料をカラムにロードし、培地を再懸濁し、混合物をインキュベートして室温で1時間混合した。次にカラムを遠心し、試料を溶出させた。

【0211】

UDP-GalNAz (GlyCLICK (商標) アジド活性化キット、Genovisから) を販売業者の指示に従いTBSで再構成し、プール溶出物にGALT (GlyCLICK (商標) アジド活性化キット、Genovisから) と一緒に移した。この混合物を暗所下30℃で一晩インキュベートした。その後、プレコンディショニングした脱塩カラムに反応物をロードし (販売業者の指示に従う)、遠心して、アジド修飾されたmAbを含有するフロースルーを収集した。これを後にコンジュゲーションに使用するまで暗所下4℃で保存した。

【0212】

3. DBCO-(M23D)₂とのコンジュゲーション

mCD63をVivaspin (50 kDa MWCO) を使用してDPBSで最終濃度が10.0 mg/ml DBCO-(M23D)₂ (5.0当量、DPBS中1 mM、pH 7.4) となるように緩衝液交換し、mAb溶液に加えた。この反応混合物を37℃で24時間インキュベートし、次に分取用SEC (HiLoad 26/600 Superdex 200 pg、DPBS) により直接精製した。コンジュゲートをSEC-UVにより特徴付けた (DARの決定)。プールしたフラクションを前述のVivaspinを使用して10.0 mg/mlより高い最終濃度となるように濃縮し、0.22 µmフィルタユニットで滅菌ろ過し、更なる使用時まで4℃で保存した。

【0213】

【表8】

試験	結果
SEC (%単量体)	98.4
LC-MS (MW)	N/A
HIC (平均DAR)	N/A
LC-MS (平均DAR)	N/A
UV (平均DAR)	3.42
エンドトキシン (EU/mg)	0.517
容積 (ml)	5.0
濃度 (mg/ml)	12.24
量 (mg)	61.2
収率 (%)	76.5

【0214】

マウス抗CD71 (mCD71) mAbとDBCO-(M23D)₂のコンジュゲーション

1. mCD71の調製 mCD71をVivaspin (50 kDa MWCO) を使用してTBSで10.0 mg/mlの最終濃度となるように緩衝液交換した。

【0215】

2. 抗体-Fcドメイン上の炭水化物の修飾

固定化したGlycINATOR（商標）カラム（GlyCLICK（商標）アジド活性化キット、Genovisから）を販売業者の指示に従い平衡化し、調製した。次に試料をカラムにロードし、培地を再懸濁し、混合物をインキュベートして室温で1時間混合した。次にカラムを遠心し、試料を溶出させた。

【0216】

UDP-GalNAz（GlyCLICK（商標）アジド活性化キット、Genovisから）を販売業者の指示に従いTBSで再構成し、プール溶出物にGalT（GlyCLICK（商標）アジド活性化キット、Genovisから）と一緒に移した。混合物を暗所下30℃で一晩インキュベートした。その後、プレコンディショニングした脱塩カラムに反応物をロードし（販売業の指示に従う）、遠心することにより、アジド修飾されたmCD71を含有するフロースルーを収集した。これを後のコンジュゲーションへの使用時まで暗所下4℃で保存した。

10

【0217】

3. DBCO-(M23D)₂とのコンジュゲーション

mCD71をVivaspin（50kDa MWCO）を使用してDPBSで10.0mg/mlの最終濃度となるように緩衝液交換した。mCD71溶液にDBCO-(M23D)₂（5.0当量、DPBS中1mM、pH7.4）を加え、この反応混合物を37℃で24時間インキュベートし、次に分取用SEC（HiLoad 26/600 Superdex 200pg、DPBS）により直接精製した。コンジュゲートをSEC-UVにより特徴付けた（DARの決定）。プールしたフラクションを前述のVivaspinを使用して10.0mg/mlより高い最終濃度となるように濃縮し、0.22μmフィルタユニットで滅菌ろ過し、更なる使用時まで4℃で保存した。

20

【0218】

【表9】

試験	結果
SEC (%単量体)	99.8
LC-MS (MW)	N/A
HIC (平均 DAR)	N/A
LC-MS (平均 DAR)	N/A
UV (平均 DAR)	3.49
エンドトキシ (EU/mg)	1.418
容積 (ml)	4.6
濃度 (mg/ml)	10.76
量 (mg)	49.54
収率 (%)	69.7

30

40

【0219】

細胞培養及びインビトロ実験（マウス）

マウス筋芽細胞株C2C12を10%FBS DMEM培地+Pen/Strepに維持し、24ウェルプレートでは240,000細胞毎ウェル（cpw）で、又は96ウェルプレート（wp）では40,000cpwで維持培地（DMEM培地+Pen/Strep中10%FBS）に播き、37℃にて5%CO₂でインキュベートした。播種から2

50

4 時間後、細胞を分化培地（D M E M 中 2 % ウマ血清）に切り替えて、3 日間インキュベートした後、培地を交換した。更に 2 4 時間経った後、再び培地を交換し、化合物を加え、4 8 時間インキュベートした。処理から合計 4 8 時間経った後、2 4 w p の細胞をエクソスキップ分析用に回収し、9 6 w p で細胞生存能力を評価した。

【0 2 2 0】

エクソスキップ分析及び定量化（マウスインビトロ）

上記で「方法」（実施例 1 ～ 4 において実施されるとおり）に記載したとおり実施した。

【0 2 2 1】

細胞生存能力（マウスインビトロ）

上記で「方法」（実施例 1 ～ 4 において実施されるとおり）に記載したとおり実施した。

【0 2 2 2】

実施例 6 の方法

S O 1 8 6 1 - S C - マレイミド

S O 1 8 6 1 は、サボンソウ（*Saponaria officinalis* L）に由来し（*Extrasynthese*、仏国）、*Symeres*（オランダ）により当該技術分野において公知の方法に従いそれぞれのハンドルのカップリングされた。

【0 2 2 3】

5' - チオール - D M D - A S O、5' - ジスルフィドアミド - D M D - P M O（1）、及び 3' - ジスルフィドアミド - D M D - P M O（1、2、3、4 及び 5）と抗体のコンジュゲーション

h C D 7 1 - 5' - S S - D M D - A S O、h C D 7 1 - 5' - S S - D M D - P M O（1）、h C D 7 1 - 3' - S S - D M D - P M O（1）、h C D 7 1 - 3' - S S - D M D - P M O（2）、h C D 7 1 - 3' - S S - D M D - P M O（3）、h C D 7 1 - 3' - S S - D M D - P M O（4）、及び h C D 7 1 - 3' - S S - D M D - P M O（5）の特注のコンジュゲート生産は、*Fleet Bioprocessing*（英国）により実施された。

【0 2 2 4】

紫外可視分光光度法

濃度は、*Thermo Nanodrop 2000* 分光計又は *Perkin Elmer Lambda 365* 分光光度計のいずれかを以下の質量吸光係数（ ϵ ）値で使用して決定した：

実験的に決定されたモル ϵ 4 9 5 = 5 8, 7 0 0 M - 1 c m - 1 及び R z 2 8 0 : 4 9 5 = 0 . 4 2 8 を S A M S A - フルオレセインに使用した。

エルマン試薬（T N B）；モル ϵ 4 1 2 = 1 4, 1 5 0 M - 1 c m - 1

ピリジン 2 - チオン（P D T）；モル ϵ 3 6 3 = 8, 0 8 0 M - 1 c m - 1

加えて、D M D オリゴヌクレオチド取込みを、紫外可視分光光度法及び B C A 比色アッセイにより以下の ϵ 2 6 5 文献値を使用して決定した：

D M D - P M O（1）；モル ϵ 3 6 3 = 3 1 8, 0 5 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

D M D - P M O（2）；モル ϵ 3 6 3 = 3 1 8, 1 2 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

D M D - P M O（3）；モル ϵ 3 6 3 = 3 0 8, 1 8 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

D M D - P M O（4）；モル ϵ 3 6 3 = 2 4 7, 7 1 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

D M D - P M O（5）；モル ϵ 3 6 3 = 2 0 7, 8 9 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

D M D - A S O；モル ϵ 3 6 3 = 3 1 0, 0 0 (m g / m l) - 1 c m - 1

【0 2 2 5】

S E C

Akta purifier 10 システム及び *Biosep SEC-s 3000* カラムを使用した、D P B S : I P A（8 5 : 1 5）で溶出する S E C によりコンジュゲートを分析した。コンジュゲート純度を不純物／凝集体形態と比べたコンジュゲートピーク

10

20

30

40

50

の積分により決定した。

【0226】

SDS-PAGE

未変性のタンパク質及びコンジュゲートをSDS-PAGEにより4～12%ビストリスゲル及びランニング緩衝液としてMOPSを使用してタンパク質ラダーに対し熱変性非還元及び還元条件下で分析した(200V、約40分)。LDS試料緩衝液及びMOPSランニング緩衝液を希釈液として含む試料を0.5mg/mLに調製した。還元試料については、50mMの最終濃度となるようにDTTを加えた。試料を90～95℃で15分間熱処理し、各ウェルに2.5μg(5μL)を加えた。タンパク質ラダー(10μL)は前処理なしにロードした。空の列に1×LDS試料緩衝液(10μL)を満たした。ゲルに流した後、それをDI水(100mL)で3回、振盪しながら(15分、200rpm)洗浄した。ゲルをPAGE Blueタンパク質染色剤(30mL)と共に振盪インキュベートすることにより(60分、200rpm)、クーマシー染色を実施した。過剰な染色溶液を除去し、DI水(100mL)で2回リンスし、DI水(100mL)で脱染した(60分、200rpm)。得られたゲルをImageJ(ImageJ(Rasband, W. S., ImageJ, 米国国立衛生研究所(U. S. National Institutes of Health), Bethesda, Maryland, USA)及びMyCurveFit(タンパク質ラダーの2点間相関)を用いて画像化し、処理した。

10

20

【0227】

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEから、X-Cellブロットモジュールを以下のセットアップ((-)BP-BP-FP-ゲル-NC-BP-BP-BP(+))及び条件(30V、60分)で使用して、調製した際のトランスファー緩衝液を使用してゲルをニトロセルロース膜に転写した。BP-ブロッティングパッド; FP-フィルタパッド; NC-ニトロセルロース膜。後に、NCをPBS-T(100mL)で振盪しながら(5分、200rpm)2回洗浄し、非特異的部位をブロッキング緩衝液(50mL)で振盪しながら(30分、200rpm)ブロックし、次に活性部位を、ブロッキング緩衝液で希釈したヤギ抗ヒトκ-HRP(1:2000)とヤギ抗ヒトIgG-HRP(1:2000)(50mL)との組み合わせで振盪しながら(30分、200rpm)標識した。その後、NCをPBS-T(100mL)で振盪しながら(5分、200rpm)1回洗浄し、複合体化した抗体をUltra TMB-ブロッティング溶液(25mL)で検出した。発色を目視で観察し、NCを水で洗浄することにより発色を停止させて、得られたブロットの写真を撮った。

30

【0228】

尿素-PAGEゲル電気泳動

コンジュゲートのこの特徴付けは、オリゴヌクレオチド標準品及びオリゴヌクレオチド標準ラダー(レポート残基「フリー」オリゴヌクレオチド)と比較して、EtBr又はSYBRグリーン染色で変性非還元条件下にて行った。

【0229】

40

hAb-DMD-オリゴヌクレオチド

hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)など、hAb標的型DMDオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションの概要を以下に示す。括弧内に斜体で提示される分量は、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)について例として示すものである。

【0230】

hAbのアリコートにDPBS pH7.5で緩衝液交換し、2.5mg/mLに標準化した。hAbのアリコート(hCD71、20.0mg、1.33×10⁻⁴mmol、2.5mg/mL)に、調製した際のPEG4-SPDP溶液のアリコート(10.0

50

mg/ml、10.0モル当量、 1.33×10^{-3} mmol、0.075 ml)を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、調製したてのグリシン溶液のアリコート(10 mg/ml、50モル当量、 6.65×10^{-3} mmol、8.1 μl)を加えることにより反応をクエンチし、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら20℃で15分超インキュベートした。コンジュゲートを精製し(Zeba 40 K スピン脱塩カラムを使用してTBS pH 7.5で溶出し、0.45 μmでろ過する)、次に紫外可視により分析して、精製hAb-SPDPを得た(hCD71-SPDP、21.2 mg、2.04 mg/ml、SPDP対hCD71比=3.9)。hAb-SPDPは、すぐに使用した。

10

【0231】

別途、所望のDMDオリゴヌクレオチド(DMD-PMO(1)-5'-アミド、20.2 mg、 1.99×10^{-3} mmol、10.00 mg/ml)をTBS pH 7.5を使用して再構成し、単一のアリコートにプールし、及び紫外可視により分析して、 ϵ_{280} 、 ϵ_{260} 及びこれらの比 $\epsilon_{260}/\epsilon_{280}$ を確かめた。このアリコートに、調製したてのTHPP溶液のアリコート(50 mg/ml、10モル当量、 1.99×10^{-2} mmol、83 μl)を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に回転混合しながら37℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、オリゴヌクレオチドをPD10 Sephadex G25カラムを使用してTBS pH 7.5で溶出して精製すると、還元DMDオリゴヌクレオチド-SHがもたらされた(DMD-PMO(1)-5'-SH、16.4 mg、81%、チオール対DMD-PMO(1)比=1.02)。

20

【0232】

hAb-SPDP(hCD71-SPDP、10.2 mg、 6.79×10^{-5} mmol、2.04 mg/ml)のアリコートにオリゴヌクレオチド-SHのアリコート(DMD-PMO(1)-SH、2.73 mg/ml、8.0モル当量、 5.43×10^{-4} mmol、2.01 ml)を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に20℃で回転混合しながら一晩インキュベートした。約16時間後、コンジュゲート混合物を紫外可視により分析して、PDTの移動によって取込みを確かめ、次に消毒済みの2.6×60 cm Superdex 200 PGカラムを使用してDPBS pH 7.5で溶出して精製した。コンジュゲートを紫外可視及びBCA比色アッセイにより分析し、新しい ϵ_{280} を割り当てた。材料を濃縮し(Vivacell 100(30 K MWCO))を使用、達成可能な最高濃度まで)、次に生成物試験用及び特性評価用にアリコートに分配した。結果は、例として、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)コンジュゲートであった(全収率=65%；DMD-PMO(1)対hCD71比=2.2)。他の結果は、以下であった：

30

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1) (全収率=58%、DMD-PMO(1)対hCD71比=2.1)

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2) (全収率=70%、DMD-PMO(2)対hCD71比=3.0)

40

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3) (全収率=65%、DMD-PMO(3)対hCD71比=2.6)

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4) (全収率=68%、DMD-PMO(4)対hCD71比=2.3)

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5) (全収率=67%、DMD-PMO(5)対hCD71比=2.1)

hCD71-5'-SS-DMD-ASO (全収率=76%、DMD-ASO対hCD71比=2.1)

【0233】

細胞培養(ヒト)

50

非DMDドナー（KM155）からの固定化したヒト筋芽細胞を上記の「方法」（実施例1～4において実施されるとおり）に記載したとおり培養した。

【0234】

エクソンスキップ分析及び定量化（ヒト）

RNAをTRI Sure単離試薬（Bio line）で単離し、当業者に公知のとおり水相からのRNAのクロロホルム抽出；イソプロパノール沈殿を実施した。cDNA合成には1000 ngの全RNAを使用し、適切な量のRNアーゼフリー水に希釈して8 μ l RNA希釈を生じさせた。プライミングプレミックスは、1 μ l dNTPミックス（各10 mM）及び1 μ l 特異的リバースプライマー（KM155については、エクソン51：h53R 5' -CTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' [配列番号5]；エ 10
クソン53：h55R 5' -ATCCTGTAGGACATTGGCAGTTT-3' [配列番号6]）を含有した。この混合物を70℃で5分間加熱し、次に氷上で少なくとも1分間冷却した。0.5 μ l rRNasin（Promega）、4.0 μ l 5×RT緩衝液（Promega）、1.0 μ l M-MLV RT（Promega）、及び4.5 μ l RNアーゼフリー水を含む反応混合物を調製し、各反応につき20 μ lの総容積が生じるように冷却した混合物に加えた。RT-PCRを42℃で60分間、次に85℃で5分間実行し、氷上で冷却した。スキップ分析については、ネステッドPCR手法に従った。この目的上、1回目のPCRにて、2.5 μ l 10×SuperTaq PCR緩衝液、0.5 μ l dNTPミックス（各10 mM）、0.125 μ l Taq DNAポリメラーゼTAQ-RO（5U/ μ l；Roche）、16.875 μ l RN 20
アーゼフリー水及び1 μ l（10 pmol/ μ l）の標的化したエクソンに隣接する各プライマーの混合物に3 μ l cDNAを加えた。以下のプライマーを使用した：KM155については、エクソン51：h48F 5' -AAAAGACCTTGGGCAGCTTG-3' [配列番号7] 及びh53R 5' -CTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3' [配列番号5]；エクソン53：h50F 5' -AGGAAGTTAGAAAGATCTGAGC-3' [配列番号20] 及びh55R 5' -ATCCTGTAGGACATTGGCAGTTT-3' [配列番号6]。これらの試料を94℃で5分、次に、94℃で40秒、60℃で40秒、72℃で180秒を25サイクル、その後72℃で7分間のPCRランに供した。2回目のPCRについては、5 μ l 10×SuperTaq PCR緩衝液、1 μ l dNTPミックス（各10 mM）、0.25 μ l Taq DNA 30
ポリメラーゼTAQ-RO（5U/ μ l；Roche）、38.25 μ l RNアーゼフリー水及び2 μ l（10 pmol/ μ l）の標的化したエクソンに隣接する各プライマーの混合物に1.5 μ l PCR1試料を加えた。以下のプライマーを使用した：KM155については、エクソン51：h49F 5' -CCAGCCACTCAGCCAGTGTG-3' [配列番号10] 及びh52R2 5' -TTCTTCCAACCTGGGGACGCG-3' [配列番号11]、エクソン53：h52F 5' -CCCCAGTTTGGAAAGAACTCATT-3' [配列番号21] 及びh54R 5' -CCAAGAGGCATTGATAATTC-3' [配列番号9]。これらの試料を、94℃で5分、次に94℃で40秒、60℃で40秒、72℃で60秒を32サイクル、その後72℃で7分間のPCRランに供した。Ultra Sensitivity NGSキットを使用したFem 40
to Pulseシステム（Agilent）を製造者の指示に従い使用して、エクソンスキッピングレベルを定量化した。或いは、Bioanalyzer 2100をDNA 1000チップと共に使用して（ラボ・オン・チップ；Agilent）、特異的PCR断片を分析した。エクソン51スキッピングについては、予想される非スキップ産物はサイズが408 bp（KM155）であり、スキップ産物は175 bp（KM155）である。エクソン53スキッピングについては、予想される非スキップ産物はサイズが438 bp（KM155）であり、スキップ産物は226 bp（KM155）である。

【0235】

結果

実施例1. DMD-PMO+SO1861及びDMD-ASO+SO1861

DMD-ASO（ヒトジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導する、ドリサ
ペルセンと同じ配列及び化学修飾を有する2'-O-メチル-ホスホロチオエート（phosphorothioate）アンチセンスオリゴヌクレオチド）及びDMD-PMO（ヒ
トジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導する、エテプリルセンと同じ配列を
有するが5'-修飾は有しないホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンス
オリゴヌクレオチド）について、非DMD（健常）ドナー（KM155）に由来する分化
したヒト筋管におけるエクソンスキッピング活性をエンドソーム脱出促進剤SO1861
-EMCH（4 μM）との組み合わせで評価した。意外にも、これにより、SO1861
と組み合わせたときのみ72時間後にエクソン51のエクソンスキッピングが強力に促進
されることが明らかになった（表A3）：20 μM DMD-ASO単独に曝露してもスキ
ッピング活性は見られなかったが、0.08 μM DMD-ASO+SO1861-EMCHで既に%のエクソンスキップが明らかになったことから、改善度が250倍を超える
ことが指摘される（図1A）。同様に、20 μM DMD-PMOに曝露すると4%の
スキップが生じたが、一方、1.25 μM DMD-ASO+SO1861-EMCHで
既に5%のスキップが実現し、20 μMでは34%が実現したことから、非標的SO18
61-EMCHと併せた非標的型オリゴについて16倍の効力の増加が指摘される（図1
B）。

【0236】

結論として、SO1861-EMCHを共投与すると、DMD-ASO及びDMD-PMOのオンターゲット送達が強力に促進され、SO1861-EMCHが存在しない条件
と比較して1～2桁低い曝露濃度で顕著なエクソン51スキッピングが誘導される。

【0237】

【表10】

表A3: SO1861-EMCHの共投与有り及び無しでのMDオリゴのヒト筋管(KM155)における
スキップ有効性

% エクソンスキッピング率 (ラボ・オン・チップ又は Femto 分析)		DMD オリゴ濃度				
		20 μM	5 μM	1.25 μM	0.31 μM	0.08 μM
DMD-ASO	ラボ・オン・ チップ	1%	1%	0%	0%	0%
DMD-ASO + SO1861-EMCH	ラボ・オン・ チップ	52%	61%	67%	53%	40%
DMD-PMO	Femto	4%	0%	0%	0%	0%
DMD-PMO + SO1861-EMCH	Femto	34%	19%	5%	0%	0%

【0238】

実施例2. hCD71-DMD-ASO+SO1861-EMCH又はhCD71-DMD-PMO+SO1861-EMCH又はmCD71-M23D+SO1861-EMCH

DMD-ASO-SH及びDMD-PMO-SHを、それぞれ図2B及び図2Cに示され
るとおり、PEG4-SPDP修飾ヒト抗CD71モノクローナル抗体（hCD71-
PEG4-SPDP、図2A）にコンジュゲートして、hCD71-DMD-ASO（DAR2.1）及びhCD71-DMD-PMO（DAR3.2）を作製した。得られた化

合物は、 $4\text{ }\mu\text{M}$ SO1861-EMCH無し、又はそれとの組み合わせのいずれかで、非DMDドナー（KM155）及びDMD罹患ドナー（DM8036）からの分化したヒト筋管における細胞質DMDオリゴ送達の促進及びジストロフィンエクソン51スキッピングの促進に関して試験した。これにより、 $4\text{ }\mu\text{M}$ SO1861-EMCHと組み合わせると、72時間の治療後に、それぞれhCD71-DMD-ASO単独、及びhCD71-DMD-PMO単独と比較して著しく低い濃度でエクソン51のエクソンスキッピングが強力に促進されたことが明らかになった（表A4及び表A5）：hCD71-DMD-ASOでは、 2181 nM でKM155におけるスキップ率は低かったが（3%）（図3A、左のパネル）、これは非標的型DMD-ASOと比較すると改善であり（表A3）、一方、hCD71-DMD-ASO+SO1861では、KM155において $18.2\sim 109\text{ nM}$ で既にスキップが18~24%にまで更に増加した（図3A、右のパネル）。同様に、hCD71-DMD-PMOでは、KM155において 2022 nM でスキップはなかったが（0%）（図3B、左のパネル）、一方、SO1861-EMCHを加えると、 $2.8\sim 16.9\text{ nM}$ の濃度のhCD71-DMD-PMOでエクソンスキップが見えた（図3B、右のパネル）。更に重要なことには、DMD罹患ドナー（DM8036）からの分化した筋管では、 333 nM hCD71-DMD-ASOで僅か17%のエクソン51スキップ率が観察されたに過ぎなかったが（図4A、左のパネル）、一方、意外にも、720倍低い濃度の 0.50 nM hCD71-DMD-ASO+ $4\text{ }\mu\text{M}$ SO1861-EMCHで既に同等のスキップが生じた（15%）。スキップ効率は、僅か $18.2\sim 109\text{ nM}$ の曝露濃度のhCD71-DMD-ASOで最高64~68%まで際立って増加した（図4A、右のパネル）。同様に、またDM8036筋管でも、hCD71-DMD-PMO単独では 337 nM で21%のスキップ率に達したが（図4B、左のパネル）、一方、既に $0.08\sim 0.47\text{ nM}$ の曝露濃度のhCD71-DMD-PMO+ $4\text{ }\mu\text{M}$ SO1861-EMCHで明らかに測定可能なスキップが生じ（7~13%）、これは 101 nM では最高33%にまで増加し（図4B、右のパネル）、1~2桁の改善を実現した。

10

20

30

40

50

【0239】

まとめると、これは、標的型オリゴヌクレオチドhCD71-DMD-ASO及びhCD71-DMD-PMOにSO1861-EMCHを共投与すると、オンターゲット細胞質送達が、具体的には、DMD罹患ドナーからの分化した筋管など、関連性のある細胞システムにおいて著しく改善されることを示している。

【0240】

【表 1 1】

表 A4: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴのヒト筋管におけるスキップ有効性 (DMD-ASO-コンジュゲートについては最高濃度, DMD-PMO-コンジュゲートについては最低濃度)

% エクソン スキッピング率 (Femto 分析)	[nM コンジュゲート]						
	2181/ 2022	363/ 337	61/ 56	10.1/ 9.4	1.68/ 1.56	0.28/ 0.26	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) (KM155)	3	0	0	0	0	0	% DMD エクソン 51 スキッ ピング率
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) (KM155)	0	0	0	0	0	0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) (DM8036)	24	17	0	0	0	0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) (DM8036)	45	21	0	0	0	0	

10

20

【 0 2 4 1 】

【表 1 2】

表 A5: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴの SO1861-EMCH との共投与でのヒト筋管におけるスキップ有効性 (DMD-ASO-コンジュゲートについては最高濃度, DMD-PMO-コンジュゲートについては最低濃度)

% エクソンスキッピング率 (Femto 分析)	[nM コンジュゲート]						
	109/ 101	18.2/ 16.9	3.0/ 2.8	0.50/ 0.47	0.084/ 0.078	0.014/ 0.013	
hCD71-DMD- ASO(DAR2.1) + SO1861-EMCH (KM155)	18	24	0	0	0	0	% DMD エクソン 51 スキッ ピング率
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) + SO1861-EMCH (KM155)	0	3	2	0	0	0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) + SO1861-EMCH (DM8036)	64	68	62	15	1	0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) + SO1861-EMCH (DM8036)	33	34	15	13	7	0	

30

40

【 0 2 4 2 】

50

次に、SMCCリンカーで修飾されたマウスCD71を標的とする抗CD71モノクローナル抗体（mCD71-SMCC、図2D）にM23D-SS-アミド（マウスジストロフィンのエクソン23スキッピングを誘導するホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチド）をコンジュゲートして、mCD71-M23D（DAR1.2）を作製した（図2E）。mCD71-M23D+8 μ M SO1861-SC-Malの共投与を分化したC2C12筋管で試験し、これにより、SO1861-SC-Malとの組み合わせでは、少なくとも1桁低い濃度のmCD71-M23Dによるエクソンスキッピングの強力な促進が明らかになり（27nMまで明確なバンド、図5、右のパネル）、一方、mCD71-M23D単独は、433nMまでの試験したいずれの濃度でも、活性を示さなかった（図5、左のパネル）。

10

【0243】

これは、SO1861化合物の共投与が、様々な異なる標的化用配列（様々な異なるエクソン、様々な異なる配列）を持つ標的型PMOの効力を有効に増加させるために広範に適用可能な交差種であることを示している。

【0244】

実施例3. hCD71-DMD-ASO+SO1861-SC-Mal又はhCD71-DMD-PMO+SO1861-SC-Mal

ヒトCD71を標的とする抗CD71モノクローナル抗体（hCD71）にDMD-ASO-SH又はDMD-PMO-SHを（図2B及び図2Cに先述したとおり）コンジュゲートして、hCD71-DMD-ASO（DAR2.2）及びhCD71-DMD-PMO（DAR3.1）を生じさせた。コンジュゲートを、対照を含め、非DMDドナー（KM155）及びDMD罹患ドナー（DM8036）の分化したヒト筋管において試験した。予想どおり、これらの処理では、hCD71-DMD-ASOについて0.084nM～651nM（図7A、左のパネル；表A6）及び0.078nM～610nM hCD71-DMD-PMO（図7B、左のパネル；表A6）の濃度範囲でKM155筋管におけるエクソンスキップは投与の72時間後に0～2.4%の範囲と、全く又はごく僅かしかなかったことが明らかになった。しかしながら、4 μ M SO1861-SC-MalをhCD71-DMD-ASO（図7A、右のパネル；表A7）又はhCD71-DMD-PMO（図7B、右のパネル；表A7）のいずれかに共投与すると、分化したヒト筋管においてエクソンスキップの強力な促進が観察された：約0.5nMで既に、hCD71-DMD-ASO及びhCD71-DMD-PMOについてそれぞれ0～5%及び0～4%のエクソンスキップ率が観察された。これは、109nM hCD71-DMD-ASOでは29～40%にまで、及び102nM hCD71-DMD-PMOでは4～5%にまで、それぞれ増加し、SO1861-SC-Malを加えない条件と比較して数桁の効力の改善を成した。

20

30

【0245】

より関連性の高いことに、DMD罹患ドナーからの分化した筋管では、標的型コンジュゲートhCD71-DMD-ASO及びhCD71-DMD-PMOによる処理により、投与後72時間にやはり、651nM hCD71-DMD-ASO（図7A、左のパネル；表A7）及び610nM hCD71-DMD-PMO（図7B、左のパネル；表A7）でそれぞれ最大7～11%のスキップ率が明らかになった。しかしながら、際立つことに、hCD71-DMD-ASO又はhCD71-DMD-PMOのいずれも、それに4 μ M SO1861-SC-Malを共投与すると、DMD罹患ドナーからの分化したヒト筋管においてエクソンスキップの強力な促進：109nM hCD71-DMD-ASO+SO1861-SC-Malで92～96%のスキップ率（図8A、右のパネル）及び102nM hCD71-DMD-PMO+SO1861-SC-Malで37～57%のスキップ率（図8B、右のパネル）が観察された。効果は、少なくとも0.50nM hCD71-DMD-ASOまで下がっても、なお測定可能であり、hCD71-DMD-PMO+SO1861-SC-Malについては0.013nMであってさえスキップが観察された。

40

50

【 0 2 4 6 】
【 表 1 3 】

表 A6: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴのヒト筋管におけるスキップ有効性 (DMD-ASO-
コンジュゲートについては最高濃度, DMD-PMO-コンジュゲートについては最低濃度)

エクソンスキップ率%		[nM コンジュゲート]						% DMD エクソン 51 スキッ ピング率
ImageJ 及び Femto 分析		651/ 610	109/ 102	18.1/ 16.9	3.0/ 2.8	0.50/ 0.47	0.084/ 0.078	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) (KM155)	ImageJ	1.9	0.0	0.5	1.0	1.1	1.5	
	Femto	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) (KM155)	ImageJ	0.3	1.4	2.4	2.0	1.8	2.0	
	Femto	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) (DM8036)	ImageJ	6.9	1.6	1.4	1.0	1.3	1.4	
	Femto	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) (DM8036)	ImageJ	7.3	3.5	3.2	2.8	3.3	2.2	
	Femto	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

【 0 2 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 A7: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴの SO1861-SC-Mal との共投与でのヒト筋管におけるスキップ有効性 (DMD-ASO については最高濃度、DMD-PMO については最低濃度)

エクソンスキップ率%		[nM コンジュゲート]						% DMD エクソン 51 スキップ ング率
ImageJ 及び Femto 分析		109/ 102	18.1/ 16.9	3.0/ 2.8	0.50/ 0.47	0.084/ 0.078	0.014/ 0.013	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) + SO1861-SC-Mal (KM155)	ImageJ	28.8	29.4	13.9	5.1	3.0	3.0	
	Femto	40.3	38.4	13.5	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) + SO1861-SC-Mal (KM155)	ImageJ	4.6	5.2	5.2	4.1	2.8	1.9	
	Femto	3.9	4.4	2.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.2) + SO1861-SC-Mal (DM8036)	ImageJ	92.2	56.6	34.1	7.0	2.2	0.0	
	Femto	96.1	88.0	53.8	7.4	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.1) + SO1861-SC-Mal (DM8036)	ImageJ	37.1	38.3	34.7	28.9	25.2	6.1	
	Femto	57.2	65.0	55.8	46.5	40.9	9.9	

【 0 2 4 8 】

実施例 4 . m C D 7 1 − M 2 3 D （インビボ有効性）

C D − 1 雄マウスが m C D 7 1 − M 2 3 D （ D A R 1 . 2 ） の単回注射を受けた（図 2 ） 。 加えて、媒体対照群が含まれた。

【 0 2 4 9 】

図 9 （ A 〜 C ） が示すとおり、媒体（群 1 ）又は m C D 7 1 − M 2 3 D （ 2 . 8 0 m g / k g P M O ； 群 2 ） を受けた動物は、試験した組織のいずれにおいても、又はいずれの時点でも（ 4 日目も、 1 4 日目も、又は 2 8 日目も）エクソン 2 3 スキップを示さなかった。

【 0 2 5 0 】

このデータは、標的型 S O 1 8 6 1 が存在しないコンジュゲートでは、試験した用量においていかなるスキップも実現しないことを示している。

【 0 2 5 1 】

C D − 1 マウスにおける m C D 7 1 − M 2 3 D のインビボ忍容性

コンジュゲート m C D 7 1 − M 2 3 D （図 2 ） を表 A 2 に詳述するとおり投与した。この試験の経過中、 m C D 7 1 − M 2 3 D で治療した 1 匹の動物（群 2 の残り 6 匹中）は、 1 1 日目に死亡しているのが見つかり、 2 8 日目にはまた、 3 匹中 1 匹のマウスについてもバイオマーカーデータが欠測値となった。 1 4 日目の犠牲死時点で、群 2 における m C D 7 1 − M 2 3 D を投与した（ 3 匹中） 2 匹のマウスに腎臓異常及び血清クレアチニンの

上昇が見られた（図10A）。腎臓バイオマーカーALTの顕著な又は持続性的変化は明らかでなかった（図10B）。注目すべきことに、14日及び28日以降、ALTレベルは媒体対照（群1）と同等であった。

【0252】

実施例5．mCD71-M23D+SO1861-SC-Mal又はmCD63-M23D+SO1861-SC-Mal（インビトロ）

2つのM23D（マウスジストロフィンのエクソン23スキッピングを誘導するホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーアンチセンスオリゴヌクレオチド）オリゴヌクレオチドペイロードを担持する分岐した足場であるDBC0-(M23D)₂を図11に示されるとおり作製した。DBC0-(M23D)₂をマウスCD71を標的とする抗CD71モノクローナル抗体又はマウスCD63を標的とする抗CD63モノクローナル抗体のいずれかにコンジュゲートして、それぞれmCD71-M23D（DAR3.5）及びmCD63-M23D（DAR3.4）を作製した（コンジュゲーション手順については、図12を参照のこと）。mCD71-M23Dコンジュゲート又はmCD63-M23Dコンジュゲートのいずれかを一定濃度の8µMのエンドソーム脱出促進剤SO1861-SC-Malと共投与し、48時間の治療後に、分化したC2C12マウス筋管におけるジストロフィンエクソン23スキッピングに関して試験した。8µM SO1861-SC-Malの共投与によるエクソン23スキッピングの強力な促進が、mCD71-M23D（0.2nMまで明確なバンド、少なくとも3桁の改善）（図13A、右のパネル）及びmCD63-M23D（6.0nMまで明確なバンド、2桁の改善）（図13B、右のパネル）の両方について明らかになった。mCD71-M23D単独では、最高758nMまでの試験したいずれの濃度においても活性は見られず（図13A、左のパネル）、及びmCD63-M23D単独では、755nMで僅か2%のスキップ率が見られたに過ぎなかった（図13B、左のパネル）。CTGアッセイで決定したとき、治療は細胞生存能力に影響を及ぼさなかった。これらのデータは、SO1861-SC-Malを共投与すると、筋管におけるCD71及びCD63を標的化したM23D送達が少なくとも2～3桁改善することを示している。

【0253】

実施例6．hCD71-5'-SS-DMD-ASO+SO1861-SC-Mal又はhCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）+SO1861-SC-Mal又はhCD71-3'-SS-DMD-PMO（1、2、3、4、又は5）+SO1861-SC-Mal（インビトロ）

ヒトCD71を標的とする抗CD71モノクローナル抗体に、DMD-ASO-SH（ヒトジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導し、ドリサベルセンと同じ配列及び化学修飾を有する活性型の2'-O-メチル-ホスホロチオエート（phosphorothioate）アンチセンスオリゴヌクレオチド）又はDMD-PMO（1）-SH（ヒトジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導する、エテプリルセンと同じ配列を有するが5'-修飾は有しない活性型のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー〔PMO〕アンチセンスオリゴヌクレオチド）を5'へのジスルフィド結合形成を通じてコンジュゲートし、それぞれ、hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）及びhCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）（DAR2.2）を作製した（コンジュゲーション手順については図14A～図14Dを参照のこと）。得られた化合物を、4µMのエンドソーム脱出促進剤SO1861-SC-Mal無し、又はそれとの組み合わせのいずれかで、非DMDドナー（KM155）からの分化したヒト筋管におけるジストロフィンエクソン51スキッピングに関して試験した。これにより、hCD71-5'-SS-DMD-ASO単独では、600nMでもエクソン51スキッピング率は低かったが（2.6%）（図15A、左のパネル；表A8）、4µM SO1861-SC-Malと組み合わせると、72時間の治療後にエクソン51のスキッピングが強力に促進されることが明らかになり、0.46～100nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO+SO1861-SC-Malで既に、13.4～43.6%のエクソン51スキップ

ング率が明らかになった（図15A、右のパネル；表A9）。同様に、hCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）に曝露したところ、16.6～600nMでエクソン51スキッピングは極めて少なかったが（0.4～1.1%）（図15B、左のパネル；表A8）、6倍低い曝露濃度の2.78～100nM hCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）+SO1861-SC-Malでエクソン51スキッピングは10.4～12.5%に増加し（図15B、右のパネル；表A9）、SO1861-SC-Malのない条件と比較して効力の著しい改善を成した。このように、SO1861-SC-MalをhCD71-5'-SS-DMD-ASO及びhCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）、即ち、5'でhCD71にコンジュゲートしている標的型DMDオリゴヌクレオチドと共投与すると、オンターゲット送達が改善され、顕著なエクソン51スキッピングが誘導される。

10

【0254】

次に、3'で抗hCD71にコンジュゲートしている標的型DMD-PMOについて、ヒト筋管に対するエクソン51スキッピング活性を試験した。ヒトCD71を標的とする抗CD71モノクローナル抗体に、DMD-PMO（1）-SH、DMD-PMO（2）-SH（ヒトジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導する活性型のPMOアンチセンスオリゴヌクレオチド、Echigo et al.（2017）に記載されるとおり）又はDMD-PMO（3）-SH（ヒトジストロフィンのエクソン51スキッピングを誘導する活性型のPMOアンチセンスオリゴヌクレオチド、Echigo et al.（2017）に記載されるとおり）を3'へのジスルフィド結合形成を通じてコンジュゲートして、それぞれ、hCD71-3'-SS-DMD-PMO（1）（DAR2.1）、hCD71-3'-SS-DMD-PMO（2）（DAR3.0）、及びhCD71-3'-SS-DMD-PMO（3）（DAR2.6）を作製した（コンジュゲーション手順については図14A～図14Dを参照のこと）。得られた化合物を、4μM SO1861-SC-Mal無し、又はそれとの組み合わせのいずれかで、非DMDドナー（KM155）からの分化したヒト筋管におけるジストロフィンエクソン51スキッピングに関して試験した。hCD71-5'-SS-DMD-PMO（1）について示されるとおり、これにより、4μM SO1861-SC-Malと組み合わせたhCD71-3'-SS-DMD-PMO（1）について、72時間の処理後にエクソン51スキッピングが促進されることが明らかになった：hCD71-3'-SS-DMD-PMO（1）単独に曝露しても、0.077～600nMでエクソン51スキッピングは極めて少なかったが（0.4～2.2%）（図16A、左のパネル；表A8）、2.78～100nMの曝露濃度のhCD71-3'-SS-DMD-PMO（1）+SO1861-SC-Malでエクソン51スキッピングは8.2～9.7%に増加した（図16A、右のパネル；表A9）。より際立つことには、4μM SO1861-SC-Malと組み合わせたhCD71-3'-SS-DMD-PMO（2）について、エクソン51スキッピングが強力に促進された：hCD71-3'-SS-DMD-PMO（2）+SO1861-SC-Malへの曝露は、0.013nMコンジュゲートで既にエクソン51スキッピングが明らかとなり（7.8%）、これは2.78～100nMコンジュゲートで75.6～80.4%にまで増加し（図16B、右のパネル；表A9）、一方でhCD71-3'-SS-DMD-PMO（2）単独への曝露では600nMコンジュゲートでも僅か5.7%のエクソン51スキッピングであったに過ぎず（図16B、左のパネル；表A8）、SO1861-SC-Malのない条件と比較して4桁の改善を成した。また、4μM SO1861-SC-Malと組み合わせたhCD71-3'-SS-DMD-PMO（3）に曝露すると、エクソン51スキッピングが強力に促進されることになった：hCD71-3'-SS-DMD-PMO（3）+SO1861-SC-Malは、0.077nMコンジュゲートで既にエクソン51スキッピングが明らかとなり（9.6%）、これは2.78～100nMで28.3～29.2%にまで増加し（図16C、右のパネル；表A9）、一方でhCD71-3'-SS-DMD-PMO（2）単独への曝露では、試験した全ての濃度で（最高600nMまで）、エクソン51スキッピングはなかつ

20

30

40

50

た (0.0%) (図 16 C、左のパネル; 表 A 8)。このように、SO1861-SC-Mal を hCD71-3'-SS-DMD-PMO (1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO (2)、及び hCD71-3'-DMD-PMO (3)、即ち、3' で hCD71 にコンジュゲートしている標的型 DMD オリゴヌクレオチドと共投与すると、オンターゲット送達が増進され、顕著なエクソン 51 スキッピングが誘導される。

【0255】

また、ヒトジストロフィンのエクソン 53 スキッピングを誘導する標的型 DMD-PMO もヒト筋管で試験した。ヒト CD71 を標的とする抗 CD71 モノクローナル抗体に、DMD-PMO (4)-SH (ヒトジストロフィンのエクソン 53 スキッピングを誘導する、ゴロディルセンと同じ配列及び化学修飾を有する活性型の PMO アンチセンスオリゴヌクレオチド) 又は DMD-PMO (5)-SH (ヒトジストロフィンのエクソン 53 スキッピングを誘導する、ビルトラルセンと同じ配列及び化学修飾を有する活性型の PMO アンチセンスオリゴヌクレオチド) を 3' へのジスルフィド結合形成を通じてコンジュゲートして、それぞれ、hCD71-3'-SS-DMD-PMO (4) (DAR2.3) 及び hCD71-3'-SS-DMD-PMO (5) (DAR2.1) を作製した (コンジュゲーション手順については図 14 A~図 14 D を参照のこと)。得られた化合物を、4 µM SO1861-SC-Mal 無し、又はそれとの組み合わせのいずれかで、非 DMD ドナー (KM155) からの分化したヒト筋管におけるジストロフィンエクソン 53 スキッピングに関して試験した。これにより、SO1861-SC-Mal と組み合わせたときのみ、72 時間の処理後にエクソン 53 スキッピングが増進されることが明らかになった: 600 nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO (4) 単独への曝露では、僅か 0.4% のエクソン 53 スキッピング率となるに過ぎなかったが (図 17 A、左のパネル; 表 A 8)、2.78 nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO (4) + SO1861-SC-Mal で既に、5.4% のエクソン 53 スキッピング率となった (図 17 A、右のパネル; 表 A 9)。同様に、600 nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO (5) 単独への曝露では、エクソン 53 スキッピング率は 0.3% となったが (図 17 B、左のパネル; 表 A 8)、2.78 nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO (5) + SO1861-SC-Mal で既に (図 17 B、右のパネル; 表 A 9)、6.0% のエクソン 53 スキッピング率となり、これは 100 nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO (5) では 8.4% にまで増加し、1~2 桁の改善を実現した。これらのデータは、SO1861-SC-Mal を hCD71-3'-SS-DMD-PMO (4) 及び hCD71-3'-SS-DMD-PMO (5)、即ち、3' で hCD71 にコンジュゲートしている標的型 DMD オリゴヌクレオチドと共投与すると、そのオンターゲット送達が増進され、エクソン 53 スキッピングが誘導されることを示している。

【0256】

まとめると、これらのデータは、様々な異なる標的化用配列 (様々な異なるエクソン、様々な異なる配列) 及びコンジュゲーション方法 (5' 端側又は 3' 端側のいずれか) の hCD71 標的型 DMD オリゴヌクレオチドのヒト筋管における効力を有効に増加させるために、SO1861-SC-Mal の共投与を幅広く適用可能であることを示している。

【0257】

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 A8: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴヌクレオチドのヒト筋管におけるスキップ有効性

% エクソンスキッピング率 (Femto 又はラボ・オン・チップ分析)		[nM コンジュゲート]						
		600	100	16.6	2.78	0.46	0.077	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.1) (KM155)	Femto	2.6	0.4	0.3	0.5	1.5	0.4	% DMD エクソン 51 スキッ ピング率
hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1) (DAR2.2) (KM155)	Femto	0.5	0.4	1.1	0.3	0.3	0.3	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1) (DAR2.1) (KM155)	Femto	2.2	0.4	0.5	0.4	1.6	0.5	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2) (DAR3.0) (KM155)	Femto	5.7	1.3	2.6	0.3	0.4	0.5	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3) (DAR2.6) (KM155)	ラボ・ オン・ チップ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4) (DAR2.3) (KM155)	Femto	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	% DMD エクソン 53 スキッ ピング率
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5) (DAR2.1) (KM155)	Femto	0.3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	

【 0 2 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 A9: 抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴヌクレオチドの SO1861-SC-Mal との共投与での
ヒト筋管におけるスキップ有効性

% エクソンスキッピング率 (Femto 又はラボ・オン・チップ分析)		[nM コンジュゲート]						
		100	16.6	2.78	0.46	0.07 7	0.013	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.1) + SO1861-SC-Mal (KM155)	Femto	43.6	63.8	21.9	13.4	0.0	0.0	% DMD エクソン 51 スキッ ピング 率
hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1) (DAR2.2) + SO1861-SC-Mal (KM155)	Femto	10.4	12.5	12.3	5.3	1.8	1.0	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1) (DAR2.1) + SO1861-SC-Mal (KM155)	Femto	9.5	9.7	8.2	5.4	2.2	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2) (DAR3.0) + SO1861-SC-Mal (KM155)	Femto	79.1	80.4	75.6	50.7	23.4	7.8	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3) (DAR2.6) + SO1861-SC-Mal (KM155)	ラボ・ オン・ チップ	29.2	29.1	28.3	14.6	9.6	1.0	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4) (DAR2.3) + SO1861-SC-Mal (KM155)	Femto	4.4	5.0	5.4	1.3	0.6	0.1	% DMD エクソン 53 スキッ ピング 率
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5) + SO1861-SC-Mal (DAR2.1) (KM155)	Femto	8.4	5.4	6.0	2.1	1.8	0.0	

【0259】

参考文献

Cardamone M, et al., 2008—Cardamone M; Darras BT; Ryan MM, 2008, 'Inherited myopathies and muscular dystrophies', *Seminars in Neurology*, vol. 28, pp. 250–259, [Http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1062269](http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1062269)

Shadrin et al, 2016—Striated muscle function, regeneration, and repair, *Cell Mol Life Sci*. 2016 November; 73(22): 4175–4202. doi: 10.1007/s00018-016-2285-z.

Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*. 2015; 142(9): 1572–1581, doi: 10.1242/dev.114223

Uygur and Lee, Mechanisms of Cardiac Regeneration. *Dev Cell*. 2016 Feb 22; Volume 36(4): pp. 362–374, doi: 10.1016/j.devcel.2016.01.018

Slordal L, Spigset O. Heart failure induced by non-cardiac drugs, *Drug Saf* 2006; Volume 29 (7) : pp. 567–86, doi:10.2165/00002018-200629070-00003

Ebner et al., Strategies for Skeletal Muscle Targeting in Drug Discovery, *Current Pharmaceutical Design* 2015, Volume 21 (10) , pp. 1327–1336, DOI:10.2174/1381612820666140929095755

Gonzalez-Jamett et al., Hereditary Myopathies, 2018, DOI:10.5772/intechopen.76076, www.intechopen.com/chapters/60283

Savarese et al., Is Gene-Size an Issue for the Diagnosis of Skeletal Muscle Disorders?, 2020, Volume 7 (3) , pp. 203–216, DOI:10.3233/JND-190459

Duan et al., Duchenne muscular dystrophy, *Nat Rev Dis Primers*, 2021 Feb 18; Volume 7 (1) :13, doi:10.1038/s41572-021-00248-3

Bladen, C. L. et al., The TREAT-NMD Duchenne muscular dystrophy registries: conception, design, and utilization by industry and academia. *Hum. Mutat.* 34, 1449–1457 (2013), DOI:10.1002/humu.22390.

Goemans, N. et al., A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* Volume 28 (1) , pp. 4–15 (2018) , doi:10.1016/j.nmd.2017.10.004.

Mendell, J. R. et al., Assessment of systemic delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in children with duchenne muscular dystrophy: a nonrandomized controlled trial. *JAMA Neurol.* Volume 77 (9) , pp. 1122–1131 (2020) , doi:10.1001/jamaneurol.2020.1484.

Mendell, J. R. et al., A phase I/IIa follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy, *Mol. Ther.* Volume 23 (1) , pp. 192–201 (2015) , doi:10.1038/mt.2014.200.

Wasala, N. B. et al., Single SERCA2a therapy ameliorated dilated cardiomyopathy for 18 months in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy, *Mol. Ther.* Volume 28 (3) , pp. 845–854 (2020) , doi:10.1016/j.ymthe.2019.12.011

Aranega, et al., Review MiRNAs and Muscle Regeneration: Therapeutic Targets in Duchenne Muscular Dystrophy, *Int J Mol Sci.* (2021 Apr) , Volume 22 (8) :4236, doi:10.3390/i

10

20

30

40

50

jms22084236

Chemello, et al., Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing, J. Clin. Invest. Volume 130 (6), pp. 2766–2776 (2020), doi:10.1172/JCI136873

Nelson, et al., Genome engineering: a new approach to gene therapy for neuromuscular disorders, Nat. Rev. Neurol. Volume 13 (11), pp. 647–661 (2017), doi:10.1038/nrneurol.2017.126

Cerro-Herreros et al., Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy, Mol Ther Nucleic Acids, 2020 Sep 4; Volume 21, pp. 837–849, doi.org/10.1016/j.omtn.2020.07.021

Bladen, C. L. et al., The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7000 Duchenne muscular dystrophy mutations. Hum. Mutat. Volume 36 (4), pp. 395–402 (2015), doi:10.1002/humu.22758

Hanahan and Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, Cell (2011, Mar 4); Volume 144 (5), pp. 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Wang et al., Saponins as Natural Adjuvant for Antisense Morpholino Oligonucleotides Delivery In Vitro and in mdx Mice, Molecular Therapy: Nucleic Acids, 2018, Volume 11, pp. 192–202, doi:10.1016/j.omtn.2018.02.004

Wang et al., Saponins enhance exon skipping of 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide in vitro and in vivo, Drug Design, Development and Therapy Volume 12: pp. 3705–3715 (2018), DOI:10.2147/DDDT.S179008

Kemaladewi et al, Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy, BMC Medical Genomics, Volume 4, 36 (2011), DOI:10.1186/1755-8794-4-36

Baik et al, Cell type-selective targeted delivery of a recombinant lysosomal enzyme for enzyme therapies, Molecular Therapy, Volume 29 (12), pp. 3512–3524 (2021), DOI:10.1016/j.ymthe.2021.08.020

Echigoya et al., Quantitative antisense screening and optimization for exon 51 skipping in Duchenne muscular dystrophy, Molecular Therapy, Volume 25 (11), pp. 2561–2572 (2017), DOI:10.1016/j.ymthe.2017.07.014

10

20

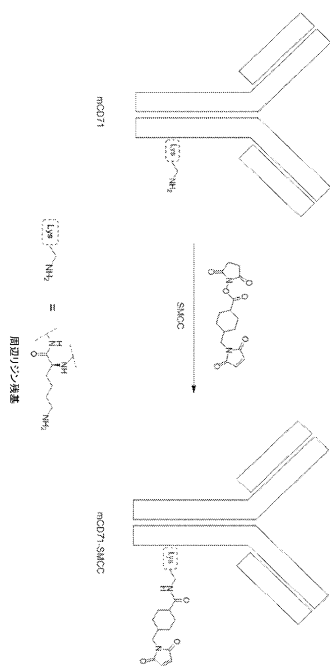
30

40

50

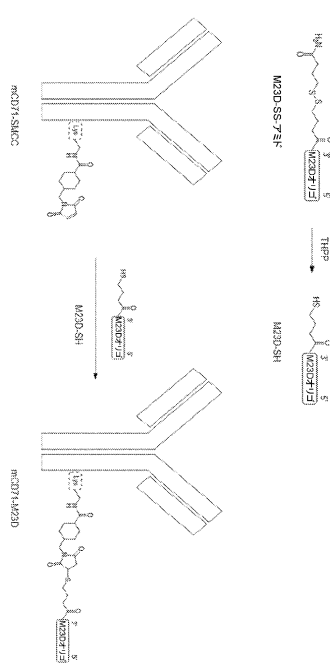
【図 2 D】

図2
D



【図 2 E】

図2
E

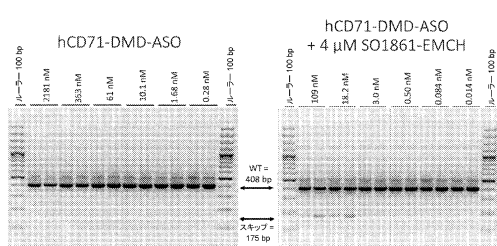


10

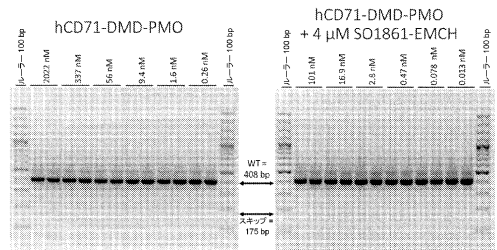
20

【図 3】

図3
A

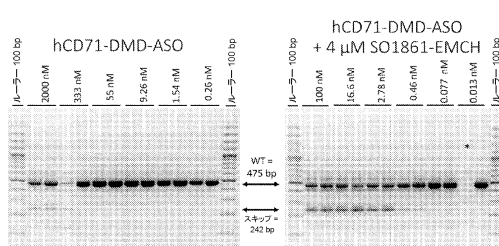


B

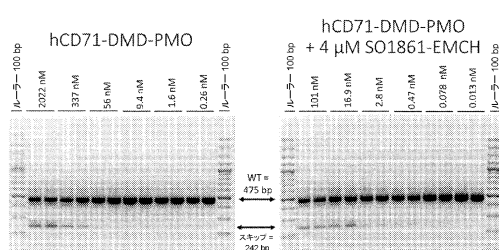


【図 4】

図4
A



B



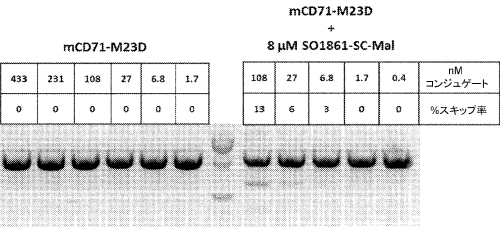
30

40

50

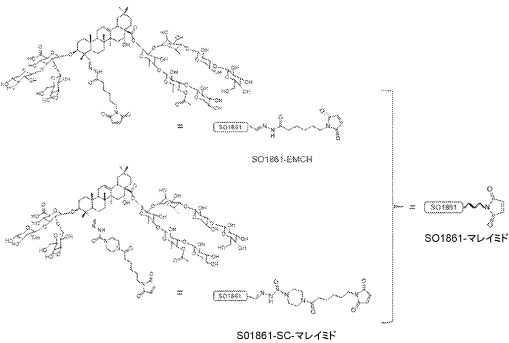
【 図 5 】

図5



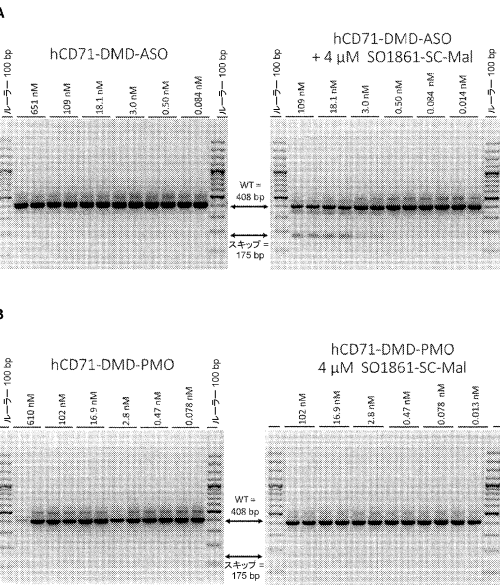
【 図 6 】

図6



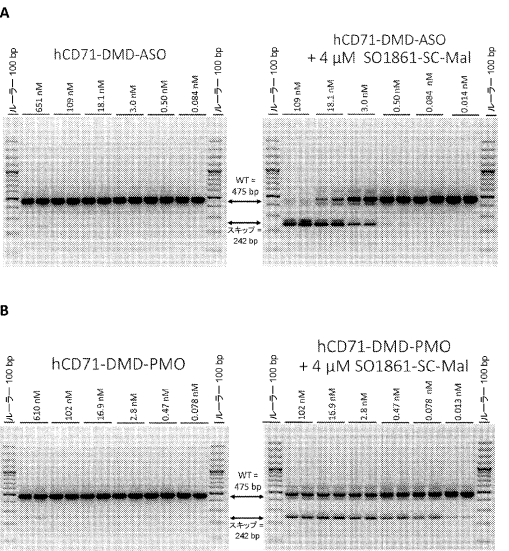
【 図 7 】

図7

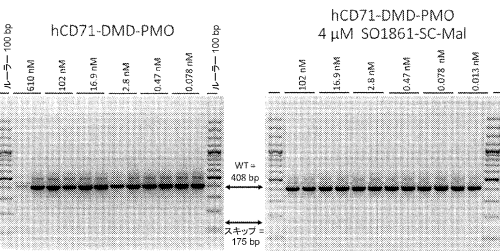


【 図 8 】

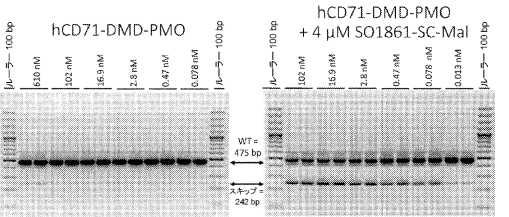
図8



B



B



10

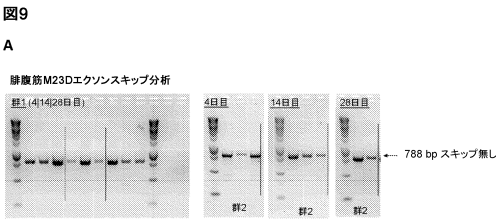
20

30

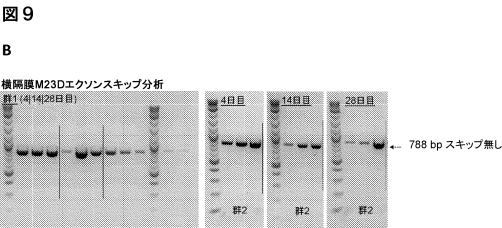
40

50

【図 9 A】

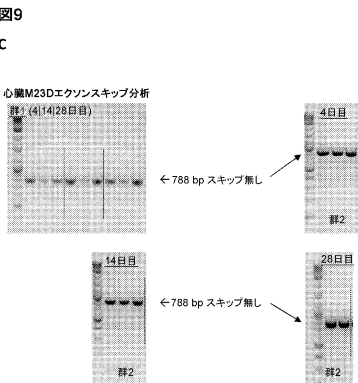


【図 9 B】

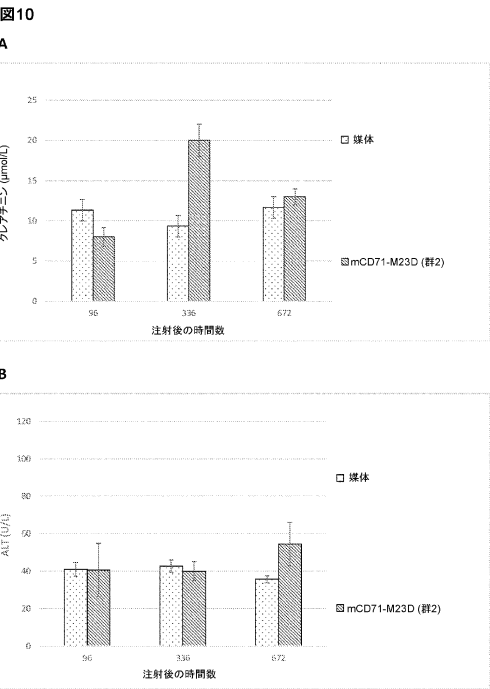


10

【図 9 C】



【図 1 0】



20

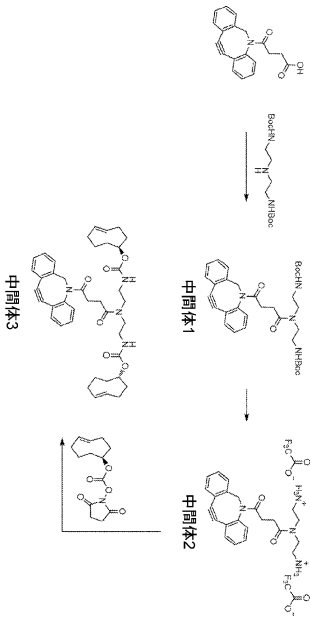
30

40

50

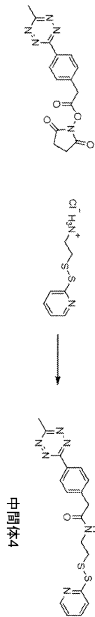
【図 1 1 A】

図11
A



【図 1 1 B】

図11
B



10

20

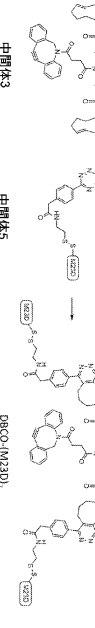
【図 1 1 C】

図11
C



【図 1 1 D】

図11
D



30

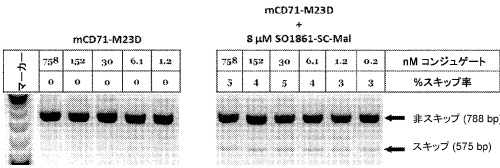
40

50

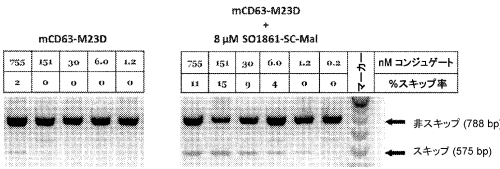
【図 1 3】

図13

A



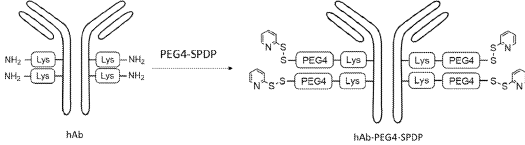
B



【図 1 4 A】

図14

A



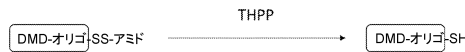
10

20

【図 1 4 B】

図14

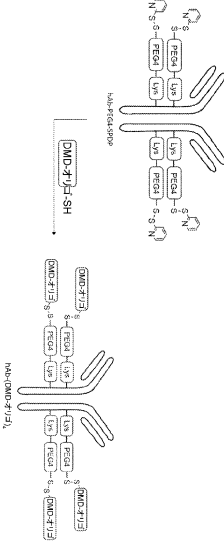
B



【図 1 4 C】

図14

C



30

40

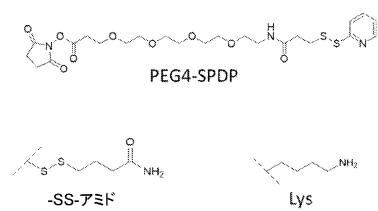
50

【図 14 D】

【図 15】

图14

D



hAb = hCD71

DMD-オリゴ1~7:

オリゴ1 = 5'-SS-DMD-PMO(1)

オリゴ2 = 3'-SS-DMD-PMO(1)

オリゴ3 = 3'-SS-DMD-PMO(2)

オリゴ4 = 3'-SS-DMD-PMO(3)

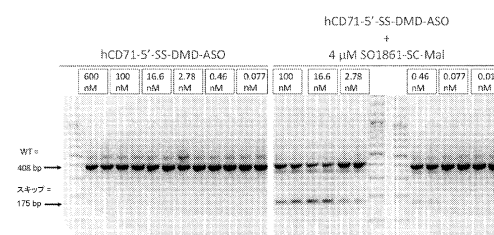
オリゴ5 = 3'-SS-DMD-PMO(4)

オリゴ6 = 3'-SS-DMD-PMO(5)

オリゴ7 = 5'-SS-DMD-ASO

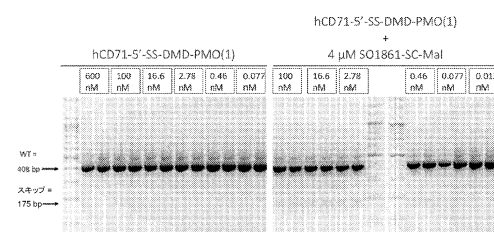
图15

A



10

B



20

【図 16 A】

【図 16 B】

图16

A

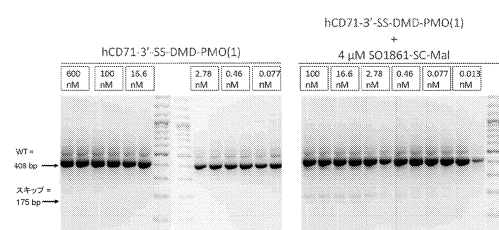
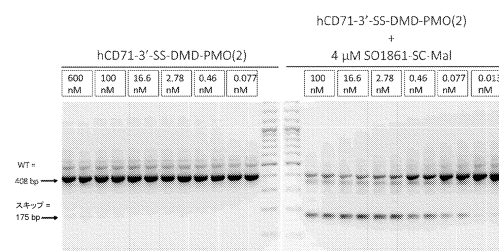


图16

B



30

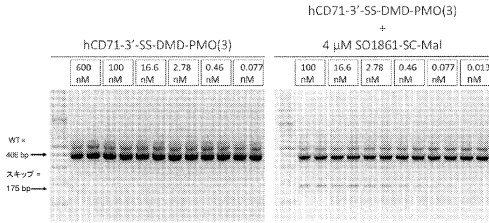
40

50

【図 16 C】

図16

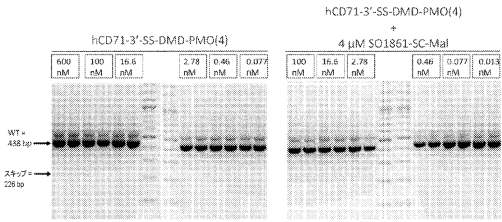
C



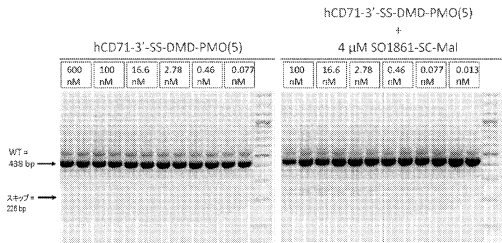
【図 17】

図17

A



B



【配列表】

2025500481000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K31/712 A61K31/704 A61K47/68 A61P21/00 C07K16/28	
	C12N15/113	
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 A61P C07K C12N		
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, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 739 118 A (CARRANO RICHARD A [US] ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) column 3, lines 6-18 column 11, lines 36-51 column 15, line 55 - column 16, line 8 ----- -/--	1-57
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 March 2023		Date of mailing of the international search report 23/03/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mooren, Nicolai

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050735

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG MINGXING ET AL: "Saponins enhance exon skipping of 2'-O-methyl phosphorothioate oligonucleotide in vitro and in vivo", DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY , vol. Volume 12 31 December 2018 (2018-12-31), pages 3705-3715, XP055948687, DOI: 10.2147/DDDT.S179008 Retrieved from the Internet: URL:https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=45802 cited in the application abstract figure 1	1-57
X	US 2004/242502 A1 (MARCIANI DANTE J [US]) 2 December 2004 (2004-12-02) claims 1,23 compound DMPS	29-41, 43, 52-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL2022/050735

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/NL2022/050735	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5739118	A	14-04-1998	AT	328589 T	15-06-2006
			AU	709659 B2	02-09-1999
			CA	2186913 A1	12-10-1995
			DE	69535035 T2	19-10-2006
			DK	0772437 T3	09-10-2006
			EP	0772437 A1	14-05-1997
			EP	1616578 A1	18-01-2006
			ES	2265147 T3	01-02-2007
			JP	H09511146 A	11-11-1997
			PT	772437 E	29-09-2006
			US	5739118 A	14-04-1998
			US	6197755 B1	06-03-2001
			WO	9526718 A1	12-10-1995

US 2004242502	A1	02-12-2004	CA	2522213 A1	28-10-2004
			US	2004242502 A1	02-12-2004
			WO	2004092329 A2	28-10-2004

10

20

30

40

50

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 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 3
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	A 6 1 K	47/54	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/65	
		C 1 2 N	15/113	Z Z N A
		C 0 7 K	16/28	

,MC,ME,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,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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 ブイニー, ミリアム ヴェレナ

オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフエン, アントニ ファン レーウエンフックラーン 9, ビルディング アー 1 2 - 1

(72)発明者 ポステル, ルーベン

オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフエン, アントニ ファン レーウエンフックラーン 9, ビルディング アー 1 2 - 1

(72)発明者 ヘアマンズ, ガイ

オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフエン, アントニ ファン レーウエンフックラーン 9, ビルディング アー 1 2 - 1

F ターム (参考) 4C076 BB13 BB16 CC01 CC09 CC11 CC26 DD66 EE41 EE59 FF34

4C084 AA13 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA011 ZA361 ZA941 ZB211 ZC751

4C086 AA01 AA02 EA10 EA16 MA02 MA04 MA66 NA05 NA10 NA14

NA15 ZA01 ZA36 ZA94 ZB21 ZC75

4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA27 FA74