(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-501610
(P2025-501610A)
(43)公表日　令和7年1月22日(2025.1.22)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　47/64　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/64	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ　21/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	21/00	ＺＮＡ　４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　31/704　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/704	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　47/54　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/54	
Ａ６１Ｋ　47/61　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/61	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全133頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-538261(P2024-538261)
(86)(22)出願日　令和4年12月20日(2022.12.20)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月21日(2024.6.21)
(86)国際出願番号　PCT/NL2022/050734
(87)国際公開番号　WO2023/121444
(87)国際公開日　令和5年6月29日(2023.6.29)
(31)優先権主張番号　2030216
(32)優先日　令和3年12月22日(2021.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オランダ(NL)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　筋消耗性障害の治療のための治療用核酸と標的型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され得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、サイトゾル及び／又は核など、そこに治療用核酸が到達し、且つ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、筋細胞上に存在するエンドサイトーシス受容体のリガンドとの共有結合性のコンジュゲーションによって筋細胞に特異的に標的化されるエンドソーム脱出促進性サポニンを、治療用核酸を含む医薬組成物に提供することによって実現される。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する。
【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
サポニンと、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第１のリガンドとを含む共有結合的に連結した第１のコンジュゲート
を含み、前記サポニンがトリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、医薬組成物。
【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】
１～３０ｎＭの、好ましくは３～２５ｎＭである、より好ましくは５～２０ｎＭである、更により好ましくは約７～１５ｎＭである、最も好ましくは８～１２ｎＭ、例えば約１０ｎＭである前記サポニンを含む、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】
前記サポニンが、少なくともコンジュゲートされていない天然状態で前記サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項６】
前記サポニンのアグリコンコア構造が、
キラ酸；
ギプソゲニン；
２α－ヒドロキシオレアノール酸；
１６α－ヒドロキシオレアノール酸；
ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）；
１６α，２３－ジヒドロキシオレアノール酸；
プロトエスチゲニン－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－２２－アセテート；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノエート）；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－１６，２２－ジアセテート；
３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン；
ギプソゲン酸；及び
その誘導体
のいずれか１つ以上から選択される、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】
前記サポニンの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から選択さ

れ、好ましくは、前記サポニンのアグリコンコア構造がキラ酸である、請求項６に記載の使用のための組成物。

【請求項８】

前記サポニンの糖画分が、以下の表に提示されるグループＡ又はグループＢに挙げられるとおりの糖鎖のいずれか１つから選択される糖鎖を含む、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。

【表１】

グループ A
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
グループ B
[4,6-ジ-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である

【表２】

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-
Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である)
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4Z-メトキシ桂皮酸である

【請求項９】

前記サポニンが、前記グループＡから選択される第１の糖鎖を含み、且つ前記グループＢから選択される第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の糖鎖が末端グルクロン酸残基を含み、及び／又は前記第２の糖鎖が、分岐した配置の少なくとも４つの糖残基を含み；

より好ましくは、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】

前記サポニンが前記サポニンのアグリコンコア構造のＣ－３位に前記第１の糖鎖及び／又は前記サポニンの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の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／又は前記第２の糖鎖が前記サポニンの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９に記載の使用のための組成物。

【請求項１１】

前記第１のコンジュゲートが２分子以上の前記サポニンを含み、好ましくは２～３２分子の前記サポニン、更により好ましくは４～１６分子の前記サポニン、最も好ましくは４～８分子の前記サポニンである、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。

【請求項１２】

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・アルバム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）サポニン混合物又はサポニナム・アルバム（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、ギプソシド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、ギプ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、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６７４、ＳＯ１７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、ＳＯ１８３２、サポナリオシドＢ、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６２、ＳＯ１９０４、ＱＳ－７、ＱＳ－７　ａｐｉ、ＱＳ－１７、ＱＳ－１８、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ及びＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ

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；又は

ｄ）リストＤ：

エスチンＩａ、エスチネート、α－ヘデリン、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、ＡＳ６．２、ＡＳ６４Ｒ、アッサムサポニンＦ、ディプサコシドＢ、エスクレントシドＡ、マクラントイジンＡ、ＮＰ－００５２３６、ＮＰ－０１２６７２、プリムラ酸１、サイコサポニンＡ、サイコサポニンＤ、茶実サポニンＩ及び茶実サポニンＪ

から選択される、前記アグリコンの前記Ｃ－２３位にアルデヒド基のない１２，１３－デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン

のいずれか１つ以上であり、

好ましくは、前記サポニンが、リストＡ、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Ｂ又はＣから選択されるサポニン、更により好ましくはリストＣから選択されるサポニンのいずれか１つ以上である、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、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、サポナリオシドＢ、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、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１～１２のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１４】
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ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、サポナリオシドＢ、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；
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１～１３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（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、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】
前記第１のリガンドが、
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、前記第１のリガンドが、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、前記第１のリガンドが、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、前記第１のリガンドが、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】
前記第１のコンジュゲートが１分子の前記第１のリガンドにつき１～１６分子の前記サ

ポニンを含み；好ましくは１分子の前記第１のリガンドにつき２～８分子の前記サポニンであり；より好ましくは１分子の前記第１のリガンドにつき３～６分子の前記サポニンであり；更により好ましくは１分子の前記第１のリガンドにつき４～５分子の前記サポニンであり；最も好ましくは、前記第１のコンジュゲートが１分子の前記第１のリガンドにつき平均して４～４．５分子の前記サポニンを含む、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】

前記第１のコンジュゲートが更なる第３のリガンドを含み、好ましくは、前記更なる第３のリガンドが、細胞表面分子、場合により筋細胞上の更なるエンドサイトーシス受容体である前記細胞表面分子に特異的な抗体又はその結合断片である、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のサイズを有し、好ましくは８～１００ｎｔであり、最も好ましくは１０～５０ｎｔである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項２０】

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１９に記載の使用のための組成物。

【請求項２１】

前記オリゴヌクレオチドが、以下：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’－Ｏ－ＭＯＥ）ＲＮＡ｛２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）｝、ロックド／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のいずれか１つを含むか又はそれからなり；

好ましくは、前記オリゴヌクレオチド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１９又は２０に記載の使用のための組成物。

【請求項２２】

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、前記オリゴヌクレオチドが、前記エクソン５１スキッピング、又は前記エクソン５３スキッピング、又は前記エクソン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１９～２１のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項２３】

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１９～２２のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項２４】
前記核酸が第２のコンジュゲートに含まれ、前記核酸が第２のリガンドと共有結合的に連結され；
好ましくは、前記第２のリガンドが筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドであり；
より好ましくは、前記第２のリガンドが、前記サポニンを含む前記共有結合的に連結した第１のコンジュゲートの前記第１のリガンドと異なり、
更により好ましくは、前記第２のリガンドが、前記第１の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と異なる、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドである、請求項１～２３のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項２５】
前記第１のリガンドと前記第２のリガンドとの組み合わせが、以下のリガンドの組み合わせ：
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンド、
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びテトラスパニンＣＤ６３のリガンド；
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及び筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）のリガンド；
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びカチオン非依存性マンノース６リン酸受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）のリガンド
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）の２つのリガンドであって、一方のリガンドがトランスフェリンであり、及び他方のリガンドが、前記トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド；
・ＬＤＬ受容体の２つのリガンドであって、一方のリガンドがＬＤＬであるか又はそれを含み、及び他方のリガンドが、前記ＬＤＬ受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド
から選択され；
好ましくは、前記組み合わせ中の前記第１及び第２のリガンドの少なくとも一方が抗体又はその結合断片であり、場合により、前記組み合わせ中の前記第１及び第２のリガンドの少なくとも一方がトランスフェリン（Ｔｆ）又はインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）である、請求項２４に記載の使用のための組成物。
【請求項２６】
前記第２のリガンドが１分子の前記第２のリガンドにつき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分子の前記第２のリガンドにつき３～４分子の前記核酸であり；
より好ましくは、前記第２のリガンドが１分子の前記第２の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２４又は２５に記載の使用のための組成物。
【請求項２７】
前記第１のコンジュゲートの前記第１のリガンドが、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、前記第１のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第１の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、及び／又は任意選択で、前記第２のコンジュゲートの前記第２のリガンドも、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、前記核酸による前記第２の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分子以上の前記サポニンが１分子の前記第１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、及び／又は任意選択で、２分子以上の前記核酸が１分子の前記第２のリガンドに別個のシステイン及び／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、前記第１のリガンド及び／又は任意選択でまた前記第２のリガンドが、場合により配列ＨＲＷＣＣＰＧＣＣＫＴＦ（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、それぞれ前記第１のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第１のリガンドとの又は前記第２のコンジュゲート内での前記核酸による前記第２の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分子以上の前記サポニンが１分子の前記第１の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、及び／又は任意選択で、２分子以上の前記核酸が１分子の前記第２の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１～２６のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項２８】
前記第１のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第１のリガンドとの前記共有結合性の連結が、前記サポニンが共有結合的に結合している第１のリンカーを介して行われ；
好ましくは、前記第１のリンカーが、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、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、アミド結合、ペプチド結合及びエステル結合のいずれか１つ以上から選択される、好ましくはヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合である共有結合性の結合を含み；
より好ましくは、前記サポニンが、少なくともコンジュゲートされていない状態で前記サポニンの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であり、前記アルデヒド基が、前記第１のリンカーとの前記共有結合性の結合の形成に関与している、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】
前記第１のリンカーが、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、前記第１のリンカーが、
・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酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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、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／又はオキシム結合のいずれか１つ以上から選択される酸感受性結合であり、更に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２８に記載の使用のための組成物。

【請求項３０】
前記第１のリンカーが、ポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）デンドリマーなどのデンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０のいずれかなどのポリエチレングリコールのいずれかであるオリゴマー又はポリマー構造体を更に含み；
好ましくは、前記ポリマー又はオリゴマー構造体がＰＥＧ４～ＰＥＧ１２のいずれか１つ又はＧ２デンドロン、Ｇ３デンドロン、Ｇ４デンドロン及びＧ５デンドロンのいずれか１つであり、より好ましくはＧ２デンドロン若しくはＧ３デンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０である、請求項２８又は２９に記載の使用のための組成物。
【請求項３１】
前記第２のコンジュゲート内での前記核酸による前記第２の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第２のリンカーを介して行われ；
好ましくは、前記第２の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；
場合により、前記第２のリンカーが、前記核酸を、好ましくは前記第２のリガンドに含まれるリジン残基であるリジン残基又はグリカン残基、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１～３０のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項３２】
前記第２のリンカーが、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、前記第２のリンカーが、
・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酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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３１に記載の使用のための組成物。
【請求項３３】
請求項２４～２７又は３１若しくは３２のいずれか一項に従属する範囲内において、前記サポニンが少なくとも１分子のＳＯ１８６１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、及び前記第１のリガンドが抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片であり、及び好ましくは、前記第２のリガンドが抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片である、請求項１～３２のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項３４】
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１～３３のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項３５】
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１～３４のいずれか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項３６】
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）筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド；

（ｂ）筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第４のリガンドと共有結合的に連結したサポニンを含む第３のコンジュゲートであって、前記サポニンがトリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、第３のコンジュゲート
を含む治療的組み合わせ。
【請求項３７】
前記サポニンが、少なくともコンジュゲートされていない天然状態で前記サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む、請求項３６に記載の治療的組み合わせ。
【請求項３８】
前記サポニンのアグリコンコア構造が、
キラ酸；
ギプソゲニン；
２α－ヒドロキシオレアノール酸；
１６α－ヒドロキシオレアノール酸；
ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）；
１６α，２３－ジヒドロキシオレアノール酸；
プロトエスチゲニン－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－２２－アセテート；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノエート）；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－１６，２２－ジアセテート；
３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン；
ギプソゲン酸；及び
その誘導体
のいずれか１つ以上から選択される、請求項３６又は３７に記載の治療的組み合わせ。
【請求項３９】
前記サポニンの糖画分が、以下の表に提示されるグループＡ又はグループＢに挙げられるとおりの糖鎖のいずれか１つから選択される糖鎖を含む、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【表３】

グループ A
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
グループ B
[4,6-ジ-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-

【表４】

Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である)
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4Z-メトキシ桂皮酸である

【請求項４０】
前記サポニンが、前記グループＡから選択される第１の糖鎖を含み、且つ前記グループＢから選択される第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の糖鎖が末端グルクロン酸残基を含み、及び／又は前記第２の糖鎖が、分岐した配置の少なくとも４つの糖残基を含み；
より好ましくは、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３９に記載の治療的組み合わせ。
【請求項４１】
前記サポニンが前記サポニンのアグリコンコア構造のＣ－３位に前記第１の糖鎖及び／又は前記サポニンの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の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／又は前記第２の糖鎖が前記サポニンの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４０に記載の治療的組み合わせ。
【請求項４２】
前記第３のコンジュゲートが２分子以上の前記サポニンを含み、好ましくは２～３２分

子の前記サポニン、更により好ましくは４～１６分子の前記サポニン、最も好ましくは４～８分子の前記サポニンである、請求項３６～４１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・アルバム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）サポニン混合物又はサポニナム・アルバム（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、ギプソシド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、ギプ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、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６７４、ＳＯ１７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、サポナリオシドＢ、ＳＯ１８３２、ＳＯ１８６１、ＳＯ１８６２、ＳＯ１９０４、ＱＳ－７、ＱＳ－７　ａｐｉ、ＱＳ－１７、ＱＳ－１８、ＱＳ－２１　Ａ－ａｐｉｏ、ＱＳ－２１　Ａ－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ及びＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ

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；又は

ｄ）リストＤ：

エスチンＩａ、エスチネート、α－ヘデリン、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、ＡＳ６．２、ＡＳ６４Ｒ、アッサムサポニンＦ、ディプサコシドＢ、エスクレントシドＡ、マクラントイジンＡ、ＮＰ－００５２３６、ＮＰ－０１２６７２、プリムラ酸１、サイコサポニンＡ、サイコサポニンＤ、茶実サポニンＩ及び茶実サポニンＪ

から選択される、前記アグリコンの前記Ｃ－２３位にアルデヒド基のない１２，１３－デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン

のいずれか１つ以上であり、

好ましくは、前記サポニンが、リストＡ、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Ｂ又はＣから選択されるサポニン、更により好ましくはリストＣから選択されるサポニンのいずれか１つ以上である、請求項３６～４２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、ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１

７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、サポナリオシドＢ、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、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３６～４３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ＳＯ１５４２、ＳＯ１５８４、ＳＯ１６５８、ＳＯ１６７４、ＳＯ１７００、ＳＯ１７３０、ＳＯ１７７２、サポナリオシドＢ、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；
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３６～４４のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項４６】
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（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、請求項３６～４５のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項４７】
前記第４のリガンドが、
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、前記第４のリガンドが、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、前記第４のリガンドが、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、前記第４のリガンドが、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３６～４６のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項４８】
前記第３のコンジュゲートが１分子の前記第４のリガンドにつき１～１６分子の前記サポニンを含み；好ましくは１分子の前記第４のリガンドにつき２～８分子の前記サポニンであり；より好ましくは１分子の前記第４のリガンドにつき３～６分子の前記サポニンであり；更により好ましくは１分子の前記第４のリガンドにつき４～５分子の前記サポニンであり；最も好ましくは、前記コンジュゲートが１分子の前記第４のリガンドにつき平均して４～４．５分子の前記サポニンを含む、請求項３６～４７のいずれか一項に記載の治

療的組み合わせ。
【請求項４９】
前記第３のコンジュゲートが更なる第６のリガンドを含み、好ましくは、前記更なる第６のリガンドが、細胞表面分子、場合により筋細胞上の更なるエンドサイトーシス受容体である前記細胞表面分子に特異的な抗体又はその結合断片である、請求項３６～４８のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５０】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが１５０ｎｔを超えず、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドが５～１５０ｎｔのサイズを有し、好ましくは８～１００ｎｔであり、最も好ましくは１０～５０ｎｔである、請求項３６～４９のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５１】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、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５０に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５２】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下：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’－Ｏ－ＭＯＥ）ＲＮＡ｛２’－Ｏ－メトキシエチル－ＲＮＡ（ＭＯＥ）｝、ロックド／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のいずれか１つを含むか又はそれからなり；
好ましくは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド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５０又は５１に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５３】
前記アンチセンス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、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、前記エクソン５１スキッピング、又は前記エクソン５３スキッピング、又は前記エクソン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、前記アンチセンス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５０～５２のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５４】
２つ以上の異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５５】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、第４のコンジュゲートの第５のリガンドと共有結合的に連結され；
好ましくは、前記第５のリガンドが筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドであり；

より好ましくは、前記第５のリガンドが、前記サポニンを含む前記共有結合的に連結した第３のコンジュゲートの前記第４のリガンドと異なり、
更により好ましくは、前記第５のリガンドが、前記第４の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と異なる、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドである、請求項３６～５４のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５６】
前記第３のコンジュゲートの前記第４のリガンドと前記第４のコンジュゲートの前記第５のリガンドとの組み合わせが、以下のリガンドの組み合わせ：
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンド、
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びテトラスパニンＣＤ６３のリガンド；
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及び筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）のリガンド；
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びカチオン非依存性マンノース６リン酸受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）のリガンド、
・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）の２つのリガンドであって、一方のリガンドがトランスフェリンであり、及び他方のリガンドが、前記トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド；
・ＬＤＬ受容体の２つのリガンドであって、一方のリガンドがＬＤＬであるか又はそれを含み、及び他方のリガンドが、前記ＬＤＬ受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド
から選択され；
好ましくは、前記組み合わせ中の前記第４及び第５のリガンドの少なくとも一方が抗体又はその結合断片であり、場合により、前記組み合わせ中の前記第４及び第５のリガンドの少なくとも一方がトランスフェリン（Ｔｆ）又はインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）である、請求項５５に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５７】
前記第４のコンジュゲートの前記第５のリガンドが１分子の前記第５のリガンドにつき２～５分子の前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされ；好ましくは１分子の前記第５のリガンドにつき３～４分子の前記アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、
より好ましくは、前記第５のリガンドが１分子の前記第５のリガンドにつき平均して４分子の前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされる、請求項５５又は５６に記載の治療的組み合わせ。
【請求項５８】
前記サポニンを含む前記第３のコンジュゲートの前記第４のリガンドが、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、前記第３のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第４の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、及び／又は任意選択で、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む前記第４のコンジュゲートの前記第５のリガンドも、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、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドによる前記第５の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分子以上の前記サポニンが１分子の前記第４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、及び／又は任意選択で、２分子以上の前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが１分子の前記第５のリガンドに別個のシステイン及び／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、前記第４のリガンド及び／又は任意選択でまた前記第５のリガンドが、場合により配列ＨＲＷＣＣＰＧＣＣＫＴＦ（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、それぞれ前記第３のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第４のリガンドとの又は前記第４のコンジュゲート内での前記アンチセンスオリゴヌクレオチドによる前記第５の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分子以上の前記サポニンが１分子の前記第４の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、及び／又は任意選択で、２分子以上の前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが１分子の前記第５の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３６～５７のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項５９】

前記第３のコンジュゲート内での前記サポニンによる前記第４のリガンドとの前記共有結合性の連結が、前記サポニンが共有結合的に結合している第３のリンカーを介して行われ；
好ましくは、前記第３のリンカーが、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、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、アミド結合、ペプチド結合及びエステル結合のいずれか１つ以上から選択される共有結合性の結合を含み、好ましくはヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合であり；
より好ましくは、前記サポニンが、少なくともコンジュゲートされていない状態で前記サポニンの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であり、前記アルデヒド基が、前記第３のリンカーとの前記共有結合性の結合の形成に関与している、請求項３６～５８のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。

【請求項６０】

前記第３のリンカーが、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、前記第３のリンカーが、
・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酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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５９に記載の治療的組み合わせ。

【請求項６１】

前記第３のリンカーが、ポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）デンドリマーなどのデンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０のいずれかなどのポリエチレングリコールのいずれかであるオリゴマー又はポリマー構造体を更に含み；
好ましくは、前記ポリマー又はオリゴマー構造体がＰＥＧ４～ＰＥＧ１２のいずれか１つ又はＧ２デンドロン、Ｇ３デンドロン、Ｇ４デンドロン及びＧ５デンドロンのいずれか１つであり、より好ましくはＧ２デンドロン若しくはＧ３デンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０である、請求項５９又は６０に記載の治療的組み合わせ。

【請求項６２】
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドによる前記第５の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第４のリンカーを介して行われ；
好ましくは、前記第４の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；
場合により、前記第４のリンカーが、前記核酸を、好ましくは前記第５のリガンドに含まれるリジン残基であるリジン残基又はグリカン残基、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３６～６１のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項６３】
前記第４のリンカーが、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、前記第４のリンカーが、
・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酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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、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／又はオキシム結合のいずれか１つ以上から選択される酸感受性結合であり、更に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６２に記載の治療的組み合わせ。
【請求項６４】
請求項５５～５８又は６２若しくは６３のいずれか一項に従属する範囲内において、前記サポニンが少なくとも１分子のＳＯ１８６１であるか又はそれを含み、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがドリサペルセン又はエテプリルセンであり、及び前記第４のリガンドが抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片であり、及び好ましくは、前記第５のリガンドが抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片である、請求項３６～６１のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項６５】
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更に含む、請求項３６～６４のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【請求項６６】
請求項３６～６５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。
【請求項６７】
前記成分（ａ）及び（ｂ）が別個のバイアル中にある、請求項６６に記載のキット。
【請求項６８】
医薬としての使用のための、請求項３６～６５のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ又は請求項６５若しくは６６に記載のキット。
【請求項６９】
請求項１～３又は３４若しくは３５のいずれか一項に記載の使用のための、請求項３６～６５のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ又は請求項６５若しくは６６に記載のキ

ット。
【請求項７０】
前記第１のリガンドが前記第４のリガンドと同じであり、及び／又は前記第２のリガンドが前記第５のリガンドと同じであり、及び／又は前記第３のリガンドが前記第６のリガンドと同じであり、好ましくは、前記第１のコンジュゲートが前記第３のコンジュゲートと同じであり、及び／又は前記第２のコンジュゲートが前記第４のコンジュゲートと同じであり、より好ましくは、前記第１及び第３のコンジュゲートが同じであり、且つ前記第２及び第４のコンジュゲートが同じである、請求項３６～６９のいずれか一項に記載の治療的組み合わせ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
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され得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、サイトゾル及び／又は核など、そこに治療用核酸が到達し、且つ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、筋細胞上に存在するエンドサイトーシス受容体のリガンドとの共有結合性のコンジュゲーションによって筋細胞に特異的に標的化されるエンドソーム脱出促進性サポニンを、治療用核酸を含む医薬組成物中に提供することによって実現される。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する。
【背景技術】
【０００２】
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るか［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。
【０００３】
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（ＳＣ）と呼ばれる常在筋幹細胞が存在するため、それが傷害時に活性化、増殖及び融合して筋繊維の損傷を修復するか又はそれを新しく形成することにより［Ｄｕｍｏｎｔ，２０１６］、運動又は日常活動中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［Ｕｙｇｕｒ，２０１６］。
【０００４】
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、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［Ｓｌｏｒｄａｌｍ　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］。

【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、多くの場合に姑息的治療が、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、多くの場合に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よく見られる健康上の問題となる［Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ｊａｍｅｔｔ，２０１７］。

【０００８】
筋細胞関連遺伝性障害のよく見られる分類の１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。即ち、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、大きい力が発生し得る。

【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。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、多くの場合に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によって作られる［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。

【００１１】

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ト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、単に内部でト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。

【００１２】

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）、多くの場合に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スプライシング中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、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（ドリサペルセン）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。

【００１３】

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］。代わりに、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のためのマイクロＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ模倣産物、アンチｍｉＲ、アンタゴｍｉＲなど、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［Ａｒａｎｅｇａ，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。

【００１４】

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［Ｂｌａｎｄｅｎ，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α２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（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。

【００１５】

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、従って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か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試験で臨床的に失敗に終わってきた。

【００１６】
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か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ず、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。
【００１７】
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、ＤＣ　Ｅｂｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，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、輸送体ベース及び抗体ベースの標的化技法に言及していると共に、一般に筋細胞では細胞取込みが依然として大きい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が、例えば、国際公開第２０１８１２９３８４号パンフレット又は国際公開第２０２００２８８５７号パンフレットに示されている。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１８】
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も喫緊に必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【００１９】
この必要性に対処するため、本発明者らは、１２，１３－デヒドロオレアナン型の筋細胞標的型トリテルペノイドサポニンと組み合わせた治療用核酸を含む新規の医薬組成物を開発したと共に、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２０２０１２６６２０号パンフレットに、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特徴付けられ、報告された。
【００２０】
腫瘍細胞に関連して、こうしたサポニンは、国際公開第２０２０１２６６２７号パンフレット、国際公開第２０２０１２６０６４号パンフレット、国際公開第２０２０１２６６０４号パンフレット、国際公開第２０２０１２６６００号パンフレット及び国際公開第２０２０１２６６０９号パンフレットに更に開示されており、これらは、腫瘍細胞マーカーに向けられるモノクローナル抗体とサポニンとの第１のコンジュゲート及び腫瘍細胞マーカーに向けられるモノクローナル抗体とＨＳＰ２７をサイレンシングするためのＢＮＡとの第２のコンジュゲートの組み合わせによる腫瘍モデルのＨＳＰ２７遺伝子のサイレンシングについて記載している。
【００２１】
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、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［Ｈａｎａｈａｎ ａｎｄ Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，２０１１］、これは、筋組織に供給する健常なタイトジャンクションに富む血管と大きく異なる。

【００２２】

これらの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１２，１３－デヒドロオレアナン型トリテルペノイドサポニンをエクソンスキッピング治療用ＡＳＯと組み合わせると、ヒト及びマウスＤＭＤ転写物におけるエクソンスキッピング効率に意外なロ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に（治療薬にとって非常に望ましいが、十分に解明されていない、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能力があるのみならず、また意外にも、ＡＳＯと共に製剤化し、筋細胞エンドサイトーシス受容体特異的リガンドによって標的化すると、極めて低用量のＡＳＯであっても、こうしたサポニンによるエクソンスキッピングイベントの促進が成功したことを示していると仮定した。一部の予備的なデータは、かかる筋細胞標的型サポニンが、静脈内共投与したとき、血中から筋細胞の外部環境へのインビボでの内皮細胞トランスサイトーシスまでも受けることができ、意外にも、それが原因でエンドソーム脱出を経てペイロード含有カーゴが内皮細胞の内部区画に失われることは全くないように見えることさえ示唆している。

【００２３】

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共に、これらの複合体のいずれも、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。従って、ＷａｎｇらによってそのＤＭＤモデルシステムにおけるエクソンスキッピング活性の誘導に使用されたとおりのサポニン並びに核酸の両方の濃度とも、本明細書の続く部分に提示されるとおりの新規組成物中でのそれぞれの成分の濃度を大幅に超えた。

【００２４】

まとめると、先行技術の欠点に対処するため、本明細書において、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並びに筋細胞への治療用核酸の送達のための１２，１３－デヒドロオレアナン型エンドソーム脱出促進性サポニンの筋特異的エンドサイトーシス受容体標的型新規コンジュゲートであって、恐らくは標的筋細胞において特異的にエンドソーム脱出を容易にすることにより、インビトロで治療用核酸を横紋筋細胞に効率的に送達する独特な能力を有することを本発明者らが確認したコンジュゲートを提示する。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、治療負荷の低い、従って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。

【００２５】

これら及び他の利点を、続く部分に更に提示する。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。

【００２６】
本開示の実施形態の幾つかの目的の１つは、筋消耗性障害に罹患しており、且つ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非特異性の問題の解決法を提供することである。
【００２７】
本実施形態の幾つかの目的の更なる１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。
【００２８】
本発明の実施形態の幾つかの目的のなおも更なる１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。
【００２９】
上記の目的の少なくとも１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、
治療用核酸、有利には筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドである治療用核酸、及び
サポニンと、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第１のリガンドとを含む共有結合的に連結した第１のコンジュゲート
を含み、サポニンがエンドソーム脱出促進性トリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、医薬組成物を提供することによって実現される。
【００３０】
更なる態様では、上記の目的の少なくとも１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）筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド；
（ｂ）筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第４のリガンドと共有結合的に連結したサポニンを含む第３のコンジュゲートであって、サポニンがトリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、第３のコンジュゲート
を含む治療的組み合わせを提供することによって実現される。
【００３１】
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及び／又はサポニンの筋標的型共有結合性コンジュゲート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１つ以上に更に対処するものである。
【００３２】
特に有利な態様では、各種のエンドソーム脱出促進性サポニンと、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体を標的とするのに有利なリガンド又はそれらの組み合わせと、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、様々な異なる治療用核酸と、恐ら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も構成されている、少なくともサポニンをリガンドと一体につなぐ有利な共有結合性のリンカーとの有利な筋標的型コンジュゲートを含む本開示の様々な異なる実施形態が提供される。
【００３３】
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。
【００３４】
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又は合成のもの（即ち天然に存在しないもの）であり得る。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、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異なる分子である。本発明のコンジュゲートに関連して、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。

【００３５】

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に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。本発明に関連して、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。サポニン誘導体に関連して、「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。

【００３６】

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、ＳＯ１８６１、ＱＳ－７及びＱＳ２１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。

【００３７】

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るか、又は例えばＱＳ－２１に存在するなど、４Ｅ－メトキシ桂皮酸、４Ｚ－メトキシ桂皮酸及び５－Ｏ－［５－Ｏ－Ａｒａ／Ａｐｉ－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタノイル］－３，５－ジヒドロキシ－６－メチル－オクタン酸）のいずれか１つなど、更なる部分も含み得る。

【００３８】

糖鎖の名称に関連して、用語「Ａｐｉ／Ｘｙｌ－」又は「Ａｐｉ－又はＸｙｌ－」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、アピオース（Ａｐｉ）部分を含むか、又はキシロース（Ｘｙｌ）部分を含むか、いずれかの糖鎖を指す。

【００３９】
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。
【００４０】
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。
【００４１】
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、多くの場合にいわゆる「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、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、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。
【００４２】
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。
【００４３】
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い、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、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の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。

【００４４】

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であり、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、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得る。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り得る。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。

【００４５】

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。

【００４６】

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、ＩｇＡｌ、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＭ及びＩｇＥ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ＶＨ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ＶＬ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、Ｆｃ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ＩｇＧ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　ＣＨＩ、ＣＨ２及び／又は（例えば、及び）ＣＨ３ドメインを含む。一部の実施形態では、ＶＨ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Ｋａｂａｔ　Ｅ　Ａ　ｅｔ　ａｌ，（１９９１）、前掲を参照のこと。一部の実施形態では、ＶＨ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、ＳＵＭＯ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、ＧＰＩ化（ＧＰＩ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、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８；Ｐｏｌｊａｋ，Ｒ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　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り得る。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ｓｃＦｖ分子の作成（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｈｕｍａｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ　６：９３－１０１）並びにシステイン残基、マーカーペプチド及びＣ末端ポリヒスチジンタグを使用した二価のビオチン化ｓｃＦｖ分子の作成（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：１０４７－１０５８）が挙げられる。

【００４７】

用語「シングルドメイン抗体」若しくは略して「ｓｄＡｂ」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ｓｄＡｂに関連して、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、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５０００ダルトン未満、更により好ましくは２０００ダルトン未満、最も好ましくは１５００ダルトン未満の分子量を有する。

【００４８】

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。

【００４９】

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、且つ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は、１つ以上のサポニン又はサポニン分子を、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と共に含み得る。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得る。コンジュゲートでは、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。

【００５０】

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

【００５１】

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他に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）。

【００５２】

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。

【００５３】

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。

【００５４】

特許請求の範囲で使用される用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、例えば、その後に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てはならず；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。

【００５５】

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１つのみある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。

【００５６】

用語「サポニナム・アルバム（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、ギプソフィラ・パニキュラタ（Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ　ｐａｎｉｃｕｌａｔａ）及びギプソフィラ・アロスティ（Ｇｙｐｓｏｐｈｉｌａ　ａｒｏｓｔｉｉ）由来のサポニンを含有するＭｅｒｃｋ　ＫＧａＡ（Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって製造されるサポニンの混合物を指す。

【００５７】

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。

【００５８】

「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。

【００５９】

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。

【００６０】

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。

【００６１】

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を含有していて、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－ａｄｊｕｖａｎｔ Ａｃｔｉｖｅ Ｓａｐｏｎｉｎｓ ｉｎ Ｑｕｉｌｌａｊａ Ｓａｐｏｎａｒｉａ Ｍｏｌｉｎａ Ｅｘｔｒａｃｔ Ｑｕｉｌ Ａ，ＲＡＰＩＤ ＣＯＭＭＵＮＩＣＡＴＩＯＮＳ ＩＮ ＭＡＳＳ ＳＰＥＣＴＲＯＭＥＴＲＹ，ＶＯＬ．９，６６０－６６６（１９９５）］。Ｑｕｉｌ－Ａ及びまたキラヤサポニンは、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を含有する。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。

【００６２】

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 Ｖｅｒｚａ，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バリアント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。

【００６３】

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。

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【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前駆体の合成によるｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯの作製

【図２Ｃ】ｈＣＤ７１－ＰＥＧ４－ＳＰＤＰ前駆体の合成によるｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯの作製

【図２Ｄ】ｍＣＤ７１－ＳＭＣＣの合成

【図２Ｅ】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８も参照のこと
【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、０．０１３ｎＭ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６Ａ】ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ又はＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミドのいずれかを用いて、インタクトなｍＡｂが鎖間システインによってＳＯ１８６１とコンジュゲートした、当該技術分野において公知のとおりの様々な力によって一体に保持されているものが得られるｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１の合成；注：概略表現を明確にするため、これらの図中、重鎖間の間隔は広げた
【図６Ｂ】ｍＣＤ７１－ＳＨ中間体の生成を用いて、インタクトなｍＡｂが鎖間システインによってＳＯ１８６１とコンジュゲートした、当該技術分野において公知のとおりの様々な力によって一体に保持されているものが得られるｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１の合成；注：概略表現を明確にするため、これらの図中、重鎖間の間隔は広げた
【図６Ｃ】ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１の合成を用いて、インタクトなｍＡｂが鎖間システインによってＳＯ１８６１とコンジュゲートした、当該技術分野において公知のとおりの様々な力によって一体に保持されているものが得られるｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１の合成；注：概略表現を明確にするため、これらの図中、重鎖間の間隔は広げた
【図６Ｄ】ＩＧＦ－１リガンドをＳＯ１８６１－ヒドラゾン－ＮＨＳにコンジュゲートしてＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１を作製した
【図７】分化したマウスＣ２Ｃ１２筋管における（Ａ）ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨと合成した）＋Ｍ２３Ｄ（左のパネル）及びｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１（ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌと合成した）＋Ｍ２３Ｄ（右のパネル）、及び（Ｂ）ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１＋Ｍ２３Ｄ（左のパネル）及び対照（右のパネル）を使用したエクソンスキップ
【図８】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９】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
【図１０Ａ】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１０Ｂ】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１０Ｃ】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－

ＭＡＢ－ＭＩＤＤ（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１１】ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ（群２）及び媒体対照（群１）での単回用量研究からの治療後４日目、１４日目及び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１２Ａ】中間体３の（中間体１及び２を経る）合成が関わる合成スキームによるＤＢＣＯ－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$の合成。
【図１２Ｂ】中間体４の合成が関わる合成スキームによるＤＢＣＯ－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$の合成。
【図１２Ｃ】中間体４とＭＡＢ－ＭＩＤＤ－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が関わる合成スキームによるＤＢＣＯ－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$の合成。
【図１２Ｄ】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－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$、即ち２つのＭＡＢ－ＭＩＤＤ　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－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$の合成。
【図１３Ａ】ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ及びｍＣＤ６３－ＭＡＢ－ＭＩＤＤなど、ｍＡｂ－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ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１３Ｂ】ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ及びｍＣＤ６３－ＭＡＢ－ＭＩＤＤなど、ｍＡｂ－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ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、トリミングされ及びアジド修飾されたｍＡｂグリカンとＤＢＣＯ－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_2$との間のコンジュゲーション、ｍＡｂ－（ＭＡＢ－ＭＩＤＤ）$_4$が得られる。注：概略表現を明確にするため、ｍＡｂ－ＭＡＢ－ＭＩＤＤはＤＡＲ４で示す。
【図１３Ｃ】ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ及びｍＣＤ６３－ＭＡＢ－ＭＩＤＤなど、ｍＡｂ－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ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１３Ｄ】ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ及びｍＣＤ６３－ＭＡＢ－ＭＩＤＤなど、ｍＡｂ－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ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１４】分化したマウスＣ２Ｃ１２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ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤ、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ｍＣＤ６３－ＭＡＢ－ＭＩＤＤのエクソン２３スキップ分析。
【図１５】ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１など、ｍＡｂ－ＳＯ１８６１のコンジュゲーション手順の概略表現。ｍＡｂと還元した鎖間ジスルフィド結合上のＳＯ１８６１との間のコンジュゲーションにより、ｍＡｂ－（ＳＯ１８６１）$_4$が得られる。注：概略表現を明確にするため、ｍＡｂ－ＳＯ１８６１はＤＡＲ４で示す。
【図１６Ａ】分化したマウスＣ２Ｃ１２筋管におけるｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１＋ＭＡＢ－ＭＩＤＤのエクソン２３スキップ分析。
【図１６Ｂ】分化したマウスＣ２Ｃ１２筋管におけるｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１＋ｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤのエクソン２３スキップ分析。
【図１６Ｃ】分化したマウスＣ２Ｃ１２筋管におけるＭＡＢ－ＭＩＤＤ、ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１又はｍＣＤ７１－ＭＡＢ－ＭＩＤＤを単独で対照として使用したエクソンスキップ。
【図１７Ａ】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）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１～５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ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１７Ｂ】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）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１～５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ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１７Ｃ】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）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１～５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ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１７Ｄ】図の凡例が関わる、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１～５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ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１８】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ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．１）、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ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）（ＤＡＲ２．２）のエクソン５１スキップ分析。

【図１９Ａ】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－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（１）（ＤＡＲ２．１）のエクソン５１スキップ分析。

【図１９Ｂ】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－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（２）（ＤＡＲ３．０）のエクソン５１スキップ分析。

【図１９Ｃ】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－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（３）（ＤＡＲ２．６）のエクソン５１スキップ分析。

【図２０】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ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（４）（ＤＡＲ２．３）、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ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（５）（ＤＡＲ２．１）のエクソン５３スキップ分析。

【図２１】ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１など、ｈＡｂ－ＳＯ１８６１のコンジュゲーション手順の概略表現。ｈＡｂと鎖間ジスルフィド結合上のＳＯ１８６１との間のコンジュゲーション、ｈＡｂ－（ＳＯ１８６１）$_4$が得られる。注：概略表現を明確にするため、ｈＡｂ－ＳＯ１８６１はＤＡＲ４で示す。

【図２２】非ＤＭＤ（健常）ドナー（ＫＭ１５５）からの分化したヒト筋管における、（Ａ）ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．８）の共投与有りでのｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．１）、及び（Ｂ）ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．０）の共投与有りでのｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．３）のエクソン５１スキップ分析。

【図２３】（Ａ）非ＤＭＤ（健常）ドナー（ＫＭ１５５）からの分化したヒト筋管、及び（Ｂ）ＤＭＤ罹患ドナー（ＫＭ１３２８）からの分化したヒト筋管におけるｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．１）の共投与有りでのｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．８）のエクソン５１スキップ分析。

【発明を実施するための形態】

【００６５】

本明細書には、治療用核酸と、筋細胞表面エンドサイトーシス受容体標的化リガンドとエンドサイトーシス脱出促進性サポニンとの共有結合的に連結したコンジュゲート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。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。

【００６６】

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、本明細書を読み、且つ図面及びグラフを検討することで、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。

【００６７】

本開示の実施形態の幾つかの目的の１つは、筋消耗性障害に罹患しており、且つ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、非特異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更なる１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。本発明の実施形態の幾つかの目的のなおも更なる１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。

【００６８】

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に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。

【００６９】

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一連の機能に特化した、複雑で多機能の膜オルガネラである。小胞は、組成が単純な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一連の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。

【００７０】

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。

【００７１】

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。

【００７２】

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、本開示の治療用組成物及びコンジュゲートにトリテルペノイド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に効率的に抜け出るのが刺激されるように見えたばかりでなく、また意外にも、予備的なデータは、それが血中から筋細胞の外部環境へのインビボでの内皮細胞トランスサイトーシスの妨げとならないことを示しているように見え、従って筋肉塊への静脈内送達にそれが適合していることが示唆される。

【００７３】

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

サポニンと、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第１のリガンドとを含む共有結合的に連結した第１のコンジュゲート

を含み、サポニンがトリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、医薬組成物を提供する。

【００７４】

本明細書で使用されるとき、用語「共有結合的に連結した第１のコンジュゲート」とは、サポニンと、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドとを含む共有結合的に連結したコンジュゲートに関連して、サポニン及びリガンドが一体に共有結合的に結合しているコンジュゲートを指すと解釈されるべきである。

【００７５】

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し得るかを分かっているであろうと共に、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、本明細書に開示されるとおりの新規組成物にいずれ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。

【００７６】

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、且つ／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。

【００７７】
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。
【００７８】
適用によっては、様々な実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物は、核酸を第２のコンジュゲートの一部として含んで、核酸が第２のリガンドと共有結合的に連結され得るか、又は代わりに核酸をコンジュゲートされていない形態で含むか若しくは少なくとも標的型でない、即ち共有結合的にリガンド結合していない形態で含み得る。
【００７９】
サポニンと第１のリガンドとを含む第１のコンジュゲートに核酸がコンジュゲートしていないことに伴い、サポニンを含む筋細胞標的型の第１のコンジュゲートと共投与するときは、有効なエンドソーム脱出が促進される細胞内送達が実現するような核酸のサイズを考慮しなければならない。
【００８０】
上記を踏まえて、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が開示され、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。
【００８１】
関連する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（ＡＳＯ）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、最も好ましくは筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。
【００８２】
実際、本明細書に提示される有利な組成物の開発は、本発明のコンジュゲートにエンドソーム脱出促進性サポニンが含まれるため、ＡＳＯなどの核酸ベースの治療薬を向上した効率で筋細胞内に送達することができるため、筋消耗性障害の治療及び／又は予防を促進するという意外な認識に基づいた。
【００８３】
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遺伝子の突然変異した転写物を標的とするように適合された治療用ＡＳＯ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。
【００８４】
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、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

され得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、ＬＭＯＤ３／レイオモジン－３、ＭＹＰＮ／ミオパラジン等（ネマリンミオパチー）又は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（先天性筋線維タイプ不均等症ミオパチー）のような遺伝子又は有利にはＴＴＮ遺伝子（タイチン）に見出すことができる。

【００８５】

上記を踏まえた別の有利な態様では、本明細書には、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）筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド；

（ｂ）筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第４のリガンドと共有結合的に連結したサポニンを含む第３のコンジュゲートであって、サポニンがトリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンである、第３のコンジュゲート

を含む治療的組み合わせが更に開示される。

【００８６】

好ましい実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、１５０ｎｔを超えず、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。

【００８７】

エンドサイトーシス受容体標的化と本明細書に提示されるサポニンのエンドソーム脱出促進活性との相乗的な性質のため意外にも、筋細胞特異的転写物における突然変異に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドなど、治療用核酸の筋細胞内への効率的な送達を実現するのに、サポニンは、ごく少量のみ必要であることが発見された。

【００８８】

これを踏まえて、好ましい実施形態では、１～３０ｎＭの、好ましくは３～２５ｎＭである、より好ましくは５～２０ｎＭである、更により好ましくは約７～１５ｎＭである、最も好ましくは８～１２ｎＭ、例えば約１０ｎＭであるサポニンを含む、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に係る治療的組み合わせが提供される。

【００８９】

典型的には、本明細書に開示される標的型サポニンコンジュゲートにおける適用に好適なサポニンは、エンドソーム脱出促進活性を示すサポニンである。表１を見ると分かるとおり、かかるサポニンは、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）である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。

【００９０】

【表１】

表 1. (後期)エンドソーム/リソソーム脱出促進活性を示し, 12,13-デヒドロオレアナン型のアグリコンコアを持つサポニン [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-3β-OH 基の炭水化物置換基**	**C-28-OH 基の炭水化物置換基**
NP-017777	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4E-メトキシ桂皮酸)
NP-017778	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4Z-メトキシ桂皮酸)
NP-017774	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110[c], NP-017772[d]	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-

【００９１】

【表２】

NP-018109	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R = 4E-メトキシ桂皮酸)
NP-017888	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-017889	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641[a], AEX55[b]	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1658	ギプソゲニン	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
ギプソシド A[6)]	ギプソゲニン	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	ギプソゲニン	無し	無し
カスミソウサポニン 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)

【００９２】

【表３】

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-
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-
サポナリオシド 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) = サポナリオシド 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-

【００９３】

【表４】

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-
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)

【００９４】

【表５】

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 ((スキーム Q) として示される構造もまた参照のこと)
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-
サポニン名	**C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア**	**C-3β-OH 基の炭水化物置換基**	**C-28-OH 基の炭水化物置換基**
NP-005236	2α-ヒドロキシオレアノール酸	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16α-ヒドロキシオレアノール酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
AMR	16α-ヒドロキシオレアノール酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
α-ヘデリン	ヘデラゲニン (23-ヒドロキシオレアノール酸)	Rha-(1→2)-Ara-	存在しない
NP-012672	16α,23-ジヒドロキシオレアノール酸	Ara/Xyl-(1 → 4)-Rha/Fuc-(1 → 2)-Glc/Gal-(1 → 2)-Rha/Fuc-(1 → 2)-GlcA-	Ara/Xyl-
β-エスチン (エスチン Ia と記載される)	プロトエスチゲニン-21(2-メチルブタ-2-エノエート)-22-アセテート	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	存在しない
エスチネート	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	存在しない

【００９５】

【表６】

ディプサコシド B	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	存在する
エスクレントシド A	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	存在しない
茶実サポニン I	23-オキソ-バリングトゲノール C -21,22-ビス(2-メチルブタ-2-エノエート)	Glc-(1 → 2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	存在しない
茶実サポニン J	23-オキソ-バリングトゲノール C -21,22-ビス(2-メチルブタ-2-エノエート)	Xyl-(1 → 2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	存在しない
アッサムサポニン F	23-オキソ-バリングトゲノール C -21(2-メチルブタ-2-エノエート)-16,22-ジアセテート	Glc-(1 → 2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	存在しない
プリムラ酸 1	3,16,28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン	Rha-(1 → 2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	存在しない
AS64R	ギプソゲン酸	無し	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
マクラントイジン A	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	存在する
サイコサポニン A	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	無し
サイコサポニン D	C-23 位にアルデヒド基のないアグリコンコア	存在する	無し

【００９６】

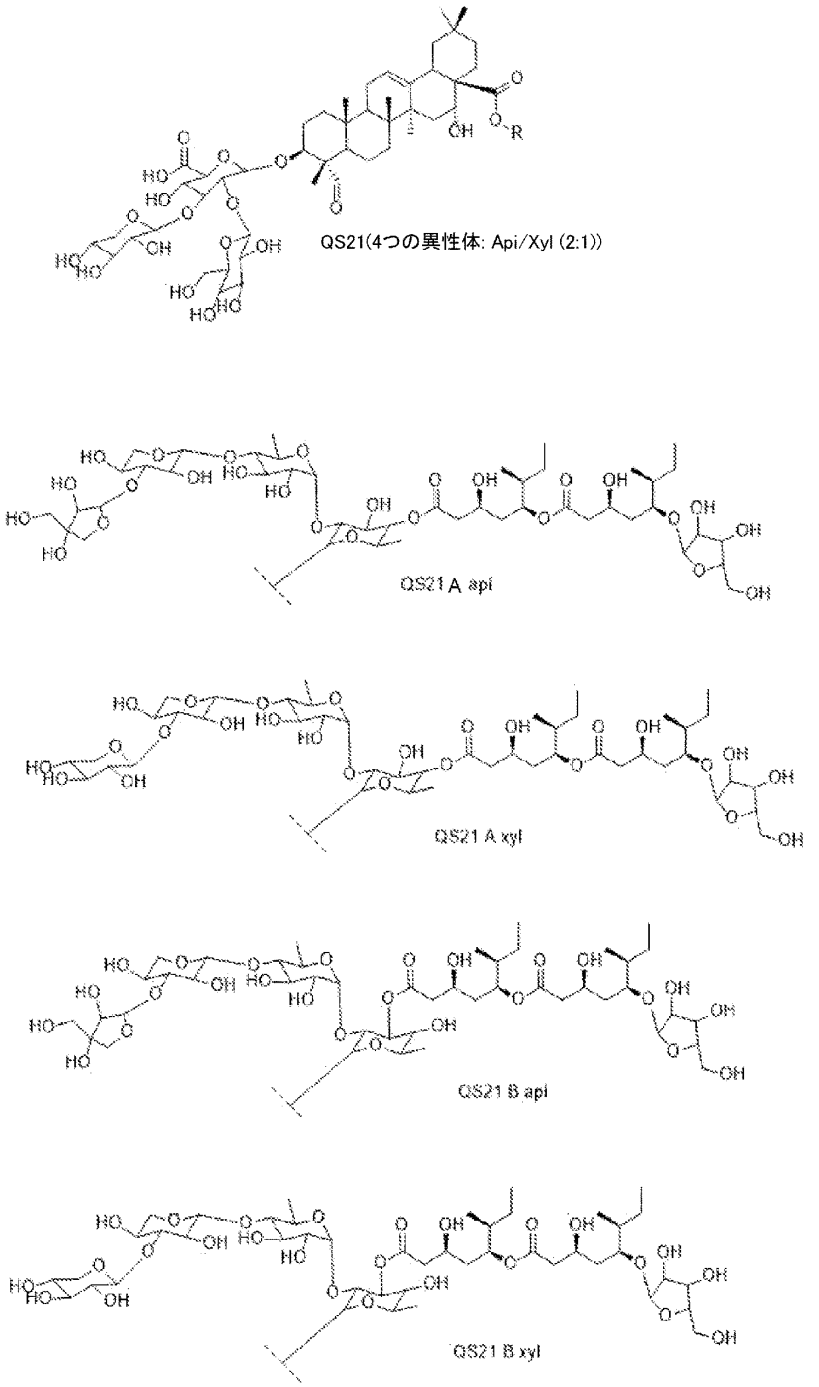
【表７】

		C-23-OH 基の炭水化物置換基	
AS6.2	**ギプソゲン酸**	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-

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 *Saponaria officinalis*(**サボンソウ山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 *et al*, A new acetylated triterpene saponin from Agrostemma githago 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 Saponaria officinalis L. (**サボンソウの根山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 Saponaria officinalis 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

【００９７】

【化１】



（スキームQ）

【００９８】
表１を見ると分かるとおり、トリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンの多くは、サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む。
【００９９】
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及び／又は増強する能力にとって有益であることが観察された。
【０１００】

従って、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンは、
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にあるアルデヒド基、又は
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある共有結合性の結合であって、第１（又は第３）のコンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する共有結合性の結合
のいずれかを含み、
好ましくは、ここで、Ｃ－２３位の共有結合性の結合は、エンドソーム又はリソソームに存在する条件下で切断を受けることになる切断可能な結合であり、
より好ましくは、ここで、Ｃ－２３位の切断可能な共有結合性の結合は、切断に伴いＣ－２３位にアルデヒド基が回復するように適合され；
又はここで、コンジュゲートの調製に使用されるサポニンは、例えば本明細書に開示されるコンジュゲート内で共有結合的に連結される前の、少なくともコンジュゲートされていない状態、例えばその供給源植物材料に存在するままの又はそれから抽出されたままのその自然の形態でサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む。

【０１０１】

かかるサポニンは、当該技術分野において公知のとおりのコンジュゲーションに好適なとおりの前記サポニンに存在する任意の官能基によって筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第１（又は第３）のリガンドに共有結合的に連結され得るか、又はサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある前記アルデヒド基を反応させて、その反応の結果、Ｃ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換され、Ｃ－２３位の前記共有結合性の結合がサポニンを第１（第３）のコンジュゲート内に共有結合的に連結することによって共有結合的に連結され得る。

【０１０２】

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、かかる遊離アルデヒド基は、トリテルペノイド１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンにとって、そのエンドソーム脱出刺激特性に有益であることが観察されており、小胞膜の不安定化の促進に関係があるものと見られる。

【０１０３】

従って、サポニンのエンドソーム脱出促進特性をなおも更に増強するために、従って開示される医薬組成物／治療的組み合わせの一部としてエンドソーム区画にサポニンと共に提供される治療用核酸の脱出を更に改良するために、Ｃ－２３位の共有結合性の結合は、その（例えば、哺乳類エンドソーム又はリソソームに存在する条件に反応した）切断に伴い、サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基が回復するように選択することができる。

【０１０４】

このアルデヒド基の回復を目的に設計することができる好適な結合の種類の例としては、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１つ以上が挙げられる。本明細書において以下で実施例に示すとおり、本明細書に開示されるとおりのコンジュゲートのかかる官能基設計をサポニンと共に実現することに成功しており、それに伴い天然でサポニンのＣ－２３位に存在するアルデヒド基が、サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある、コンジュゲート内でサポニンを連結するセミカルバゾン又はヒドラゾン共有結合に変換された。Ｃ－２３位のこうした結合は、酸性条件に反応してコンジュゲートからサポニンを効率的に放出し、それに伴いサポニンの放出により、Ｃ－２３位にアルデヒド基が回復した。

【０１０５】

上記を踏まえて、かかるサポニンのエンドソーム脱出促進特性は、アルデヒド基が、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ときにも極めて明白であり、ここで、サポニンのアグリコンコア構

造のＣ－２３位にある前記アルデヒド基は、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の前記切断に伴い回復する。

【０１０６】

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。

【０１０７】

例えば、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の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若しくはそれからなる分子の一部であることができるか（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の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若しくはそれからなる分子の一部である（以下ＥＭＣＨと称する）。

【０１０８】

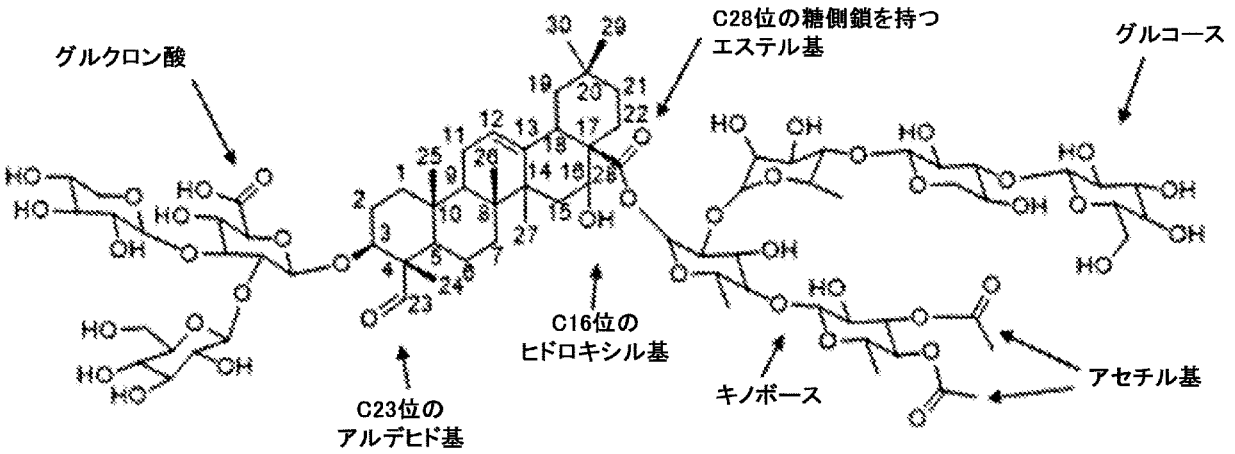
その自然のままの又はコンジュゲートされていない形態において天然でＣ－２３位にアルデヒド基を含む本発明の１２，１３－デヒドロオレアナン型のサポニンのコンジュゲートには、アグリコンコア構造がキラ酸又はギプソゲニンのいずれかであるサポニンが特に好適である。これを踏まえて、本発明のコンジュゲートに特に好適なサポニンは、キラ酸アグリコン又はギプソゲニンアグリコンコア構造を含む１２，１３－デヒドロオレアナン型サポニンであるか、又はこうしたアグリコンコア構造のＣ－２３アルデヒド基がコンジュゲーションに使用された場合、これらの両方のアグリコンのＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されている前記サポニンの誘導体であることが観察された。

【０１０９】

Ｃ－２３位にアルデヒド基があるコンジュゲートされていないサポニンの例は、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。

【０１１０】

【化２】



（サポニンA）

【０１１１】

しかしながら、異なる１２，１３－デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニンも十分なエンドソーム脱出促進特性を呈することが観察されており、従って表１に掲載される他のアグリコン構造も本開示の目的上有利であり得ることに留意しなければならない。

【０１１２】

従って、更なる実施形態において、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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は、
キラ酸；
（及び／又はキラ酸のＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されているキラ酸誘導体を含む、好ましくは、ここで、前記共有結合性の結合は、コンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する結合である；）
ギプソゲニン；
（及び／又はギプソゲニンのＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されているギプソゲニン誘導体を含む、好ましくはここで前記共有結合性の結合は、コンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する結合である；）
２α－ヒドロキシオレアノール酸；
１６α－ヒドロキシオレアノール酸；
ヘデラゲニン（２３－ヒドロキシオレアノール酸）；
１６α，２３－ジヒドロキシオレアノール酸；
プロトエスチゲニン－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－２２－アセテート；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１，２２－ビス（２－メチルブタ－２－エノエート）；
２３－オキソ－バリングトゲノールＣ－２１（２－メチルブタ－２－エノエート）－１６，２２－ジアセテート；
３，１６，２８－トリヒドロキシオレアナン－１２－エン；
ギプソゲン酸；及び
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、サポニンのアグリコンコア構造は、
キラ酸；
（及び／又はキラ酸のＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されているキラ酸誘導体を含む、好ましくはここで前記共有結合性の結合は、コンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する結合である）；
ギプソゲニン；
（及び／又はギプソゲニンのＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されているギプソゲニン誘導体、好ましくはここで前記共有結合性の結合は、コンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する結合である）
から選択され；
より好ましくは、ここで、サポニンのアグリコンコア構造は、キラ酸（及び／又はキラ酸のＣ－２３位のアルデヒド基がＣ－２３位の共有結合性の結合に変換されているキラ酸誘導体を含む、好ましくはここで前記共有結合性の結合は、コンジュゲート内でサポニンを共有結合的に連結する結合である）から選択される。

【０１１３】

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コンジュゲートの好ましいサポニンは、任意選択でＣ－２３位にアルデヒド基を含んでいるトリテルペン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（即ちビデスモシド型である）を含む。

【０１１４】

糖鎖は、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。

【０１１５】

上記を踏まえて更なる実施形態において、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンの糖画分は、以下の表２に提示されるグループＡ又はグループＢに挙げられるとおりの糖鎖

のいずれか１つから選択される糖鎖を含む。

【０１１６】

【表８】

表 2. 糖鎖
グループ A
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
グループ B
[4,6-ジ-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、R は、5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-

【０１１７】

【表９】

Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-ジ-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である)
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4E-メトキシ桂皮酸である
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 式中、Rは、4Z-メトキシ桂皮酸である

【０１１８】

例えば、コンジュゲーション選択肢に有利な実施形態では、サポニンは、ビデスモシド型サポニンである。

【０１１９】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンは、グループＡから選択される第１の糖鎖を含み、且つグループＢから選択される第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、末端グルクロン酸残基を含み、及び／又はここで、第２の糖鎖は、分岐した配置の少なくとも４つの糖残基を含み；より好ましくは、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。

【０１２０】

本発明のコンジュゲートの有利な実施形態では、サポニンは、アグリコンコア構造のＣ－３原子又はＣ－２８原子に結合した第１の糖鎖の一方又は両方を含み、好ましくは、アグリコンコア構造のＣ－３原子に結合した１つの糖鎖及びＣ－２８原子に結合した第２の

糖鎖を含む。
【０１２１】
かかる例において、本発明のコンジュゲートに含まれるサポニンが前記２つのグリカン（糖鎖）を担持しているとき、第１の糖鎖はアグリコンコア構造のＣ－３位に結合し、第２の糖鎖は典型的にはサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２８位に結合するが、Ｃ－２３位の位置にアルデヒド基を欠いている一部のサポニンについては、第２のグリカンは前記Ｃ－２３位に結合することができる（表１を参照のこと）。
【０１２２】
従って、更なる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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンは、サポニンのアグリコンコア構造のＣ－３位に第１の糖鎖及び／又はサポニンの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、サポニンの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、サポニンの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。
【０１２３】
特に好ましい実施形態では、サポニンが、少なくともコンジュゲートされていない状態でサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む、且つ炭水化物置換基としてサポニンのアグリコンコアのＣ－３β－ＯＨ基に、グループＡから選択される、且つ末端グルクロン酸残基を含む糖鎖であって、好ましくはＧａｌ－（１→２）－［Ｘｙｌ－（１→３）］－ＧｌｃＡである糖鎖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コンジュゲートが提供される。
【０１２４】
次の実施形態では、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第１又は第３のコンジュゲートは、２分子以上のサポニンをそれぞれ含み、好ましくは２～３２分子のサポニン、更により好ましくは４～１６分子のサポニン、最も好ましくは４～８分子のサポニンである。
【０１２５】
これらの分子は、同一のサポニン又は同じアグリコンコア構造及び異なる糖鎖のサポニンであり得るか、又は例えば表１から選択される異なるサポニンの混合物である、異なる１２，１３－デヒドロオレアナン型エンドソーム脱出促進性サポニンの混合物であることさえあり得る。
【０１２６】
別の実施形態において、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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；
－サポニナム・アルバム（Ｓａｐｏｎｉｎｕｍ　ａｌｂｕｍ）サポニン混合物又はサポニナム・アルバム（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、ギプソシドＡ、ＮＰ－０１７７７２、ＮＰ－０１７７７４、ＮＰ－０１

７７７７、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、ギプ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－ｘｙｌｏ、ＱＳ－２１　Ｂ－ａｐｉｏ及びＱＳ－２１　Ｂ－ｘｙｌｏ
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；又は
ｄ）リストＤ：
エスチンＩａ、エスチネート、α－ヘデリン、ＡＭＡ－１、ＡＭＲ、ＡＳ６．２、ＡＳ６４Ｒ、アッサムサポニンＦ、ディプサコシドＢ、エスクレントシドＡ、マクラントイジンＡ、ＮＰ－００５２３６、ＮＰ－０１２６７２、プリムラ酸１、サイコサポニンＡ、サイコサポニンＤ、茶実サポニンＩ及び茶実サポニンＪ
から選択される、アグリコンのＣ－２３位にアルデヒド基のない１２，１３－デヒドロオレアナン型アグリコンコア構造を含むサポニン
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Ａ、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Ｂ又はＣから選択されるサポニン、更により好ましくはリストＣから選択されるサポニンのいずれか１つ以上である。

【０１２７】

詳細な実施形態において、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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、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。

【０１２８】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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、サポニンは、ＳＯ１８３２及びＳＯ１８６１であり；最も好ましくはＳＯ１８６１である。

【０１２９】

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及び本開示の治療的組み合わせのための、筋細胞標的型サポニンコンジュゲートを含む組成物が提供され得、ここで、以下の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．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、
ｉｉ．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
ｉｉｉ．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。

【０１３０】

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及び治療的組み合わせのための組成物が提供され得、ここで、少なくとも１つのサポニンは、
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－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、ＥＭＣＨ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（ＢＭＰＨ）との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、ＢＭＰＨ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（ＫＭＵＨ）との反応を通じたヒドラゾン結合への変換（ここで、ＫＭＵＨ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
ｉｉ．２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（ＡＭＰＤ）又はＮ－（２－アミノエチル）マレイミド（ＡＥＭ）との反応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
ｉｉｉ．脱アセチル化によるヒドロキシル基（ＨＯ－）への変換によって誘導体化されているアセトキシ基（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）を含む第２の糖鎖；又は
ｉｖ．２つ又は３つの誘導体化ｉ．、ｉｉ．及び／又はｉｉｉ．の任意の組み合わせ、好ましくはｉ．、ｉｉ．及び／又はｉｉｉ．の２つの誘導体化の任意の組み合わせ
を含む。

【０１３１】

ある具体的な実施形態において、標的型サポニンコンジュゲートを含む組成物が提供され、ここで、少なくとも１つのサポニンは、それぞれ表２のグループＡ及びグループＢに係る第１の糖鎖を含み、及び第２の糖鎖を含み、ここで、第１の糖鎖は、２個以上の糖部分を含み、及び第２の糖鎖は２個以上の糖部分を含み、及びここで、アグリコンコア構造は、好ましくは、キラ酸又はギプソゲニン、より好ましくはキラ酸であり、ここで、以下の１つ、２つ又は３つ、好ましくは１つ又は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、
ｉｉ．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
ｉｉｉ．第２の糖鎖にある少なくとも１つのアセトキシ（Ｍｅ（ＣＯ）Ｏ－）基は誘導体化されている。

【０１３２】

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、
ｉｖ．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。

【０１３３】

ある具体的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治療的組み合わせ又は組成物が提供され、ここで、少なくとも１つの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、リンカーＥＭＣＨに共有結合的に結合し、このＥＭＣＨは、システインのスルフヒドリル基など、共有結合性サポニンコンジュゲートのオリゴマー分子又はポリマー分子のスルフヒドリル基にチオエーテル結合を介して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リンカーが結合すると、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切断可能な結合の典型的な例である。以上に説明したとおり、本発明者らは、意外にも、サポニン媒介性エンドソーム脱出に、サポニンがエンドソーム又はリソソームに遊離形態で存在することは必須でないことを認識した。本明細書に開示される第１又は第３のコンジュゲートに含まれるサポニンは、治療用核酸のエンドソーム／リソソームから標的筋細胞のサイトゾル内への送達を増強することもできる。第１又は第３のコンジュゲートに含まれるそれぞれ第１又は第４のリガンドにカップリングされているサポニンは、リガンドが結合し得るエンドサイトーシス受容体を露出している標的筋細胞のエンドソーム又はリソソームに送達された後には、本発明のコンジュゲートから放出可能である。このように、コンジュゲートにおいて第１又は第４のリガンドにカップリングされたサポニンは、細胞外からエンドソーム（又はリソソーム）中に移され、エンドソーム（又はリソソーム）において、ｐＨ駆動によるヒドラゾン結合の切断に伴い、サポニンはコンジュゲートの残りの部分から放出される。エンドソーム（又はリソソーム）では、遊離サポニンは、筋細胞のサイトゾルへの上述のＡＳＯなどの治療用核酸の送達時にその刺激活性を発揮することができる。

【０１３４】

完全を期するならば、有利には本明細書に開示される組成物及び／又は治療的組み合わせの一部である核酸又はオリゴヌクレオチドについて、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、従って化学的に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又は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’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－０－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ），２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－０－ＤＭＡＥ０Ｅ）、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、エチレン架橋型核酸（ＥＮＡ）及び（Ｓ）－拘束エチル架橋型核酸（ｃＥｔ）等から選択することができる２’修飾型ヌクレオシドを含み得る。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）、ホスホル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。

【０１３５】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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、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。

【０１３６】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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’－Ｏ－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（ＬＮＡ又は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；

【０１３７】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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、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。

【０１３８】

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若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る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、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（ｐｈｏｓｐｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）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。

【０１３９】

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。

【０１４０】

有利な実施形態では、好ましくは２つ以上の異なるオリゴヌクレオチドである２分子以上の核酸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に係る治療的組み合わせが提供され、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。２つ以上の治療用核酸を含む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 ｅｌ ａｌ，２０１１］。

【０１４１】

次に、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体の第１又は第４のリガンドに関する詳細な

実施形態について、筋細胞の表面上に発現する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ず、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。代わりに、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り得るか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ＧＦ１Ｒ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り得る。

【０１４２】

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が提供され、ここで、第１の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）及びＬＤＬ受容体から選択される。

【０１４３】

同様に、別の好ましい実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第４の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）及びＬＤＬ受容体から選択される。

【０１４４】

更に好ましい実施形態では、本開示に係る本明細書に開示される治療薬又は予防薬のための組成物が提供され、ここで、第１のリガンドは、

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、第１のリガンドは、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る。

【０１４５】

これに類して、更に好ましい実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第４のリガンドは、

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、第４のリガンドは、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る。

【０１４６】
関連する特に有利な実施形態では、第１又は第４のリガンドは、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、ここで、第１又は第４のリガンドは、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。

【０１４７】
更なる有利な実施形態では、第１又は第４のリガンドは、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、ＩｇＧ、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ＶＨＨドメイン、好ましくはラクダ科動物ＶＨ、可変重鎖新規抗原受容体（ＶＮＡＲ）ドメイン、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆ（ａｂ）２及びＦｃａｂ断片である。

【０１４８】
特定の実施形態では、筋細胞の標的化の向上のため又は特異的なサブタイプの筋細胞を標的とするため、サポニンコンジュゲートに更なるリガンドを含めることが有利であり得る。

【０１４９】
従って、更に有利な実施形態では、本開示に係る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、第１のコンジュゲートは、更なる第３のリガンドを含み、好ましくは、ここで、更なる第３のリガンドは、細胞表面分子、場合により筋細胞上の更なるエンドサイトーシス受容体である細胞表面分子に特異的な抗体又はその結合断片である。

【０１５０】
これに類して、別の実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第３のコンジュゲートは、更なる第６のリガンドを含み、好ましくは、ここで、更なる第６のリガンドは、細胞表面分子、場合により筋細胞上の更なるエンドサイトーシス受容体である細胞表面分子に特異的な抗体又はその結合断片である。

【０１５１】
既に手短に上述したとおり、特定の有利な実施形態では、本明細書に開示される組成物及び／又は治療的組み合わせに提供される核酸、場合によりアンチセンスオリゴヌクレオチドである核酸は、更なる少なくとも１つのリガンド分子とのコンジュゲーションによって筋細胞に標的化されることも想定され得る。

【０１５２】
これを踏まえて、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が提供され、ここで、核酸は、第２のコンジュゲートに含まれ、ここで、核酸は、第２のリガンドと共有結合的に連結され；好ましくは、ここで、第２のリガンドは、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドであり；より好ましくは、ここで、第２のリガンドは、サポニンを含む共有結合的に連結した第１のコンジュゲートの第１のリガンドと異なり、及び更により好ましくは、ここで、第２のリガンドは、第１のリガンド

が結合する、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体と異なる、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドである。

【０１５３】

同様に、これに類して可能な代替的実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、第４のコンジュゲートの第５のリガンドと共有結合的に連結され；好ましくは、ここで、第５のリガンドは、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドであり；より好ましくは、ここで、第５のリガンドは、サポニンを含む共有結合的に連結した第３のコンジュゲートの第４のリガンドと異なり、及び更により好ましくは、ここで、第５のリガンドは、第４の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と異なる、筋細胞上のエンドサイトーシス受容体のリガンドである。

【０１５４】

ある組成物又は１つの治療的組み合わせに２つのリガンド標的型コンジュゲートが存在する例では、潜在的には選択の筋細胞タイプ又はサブタイプ向けにさえも、標的化戦略を最適化するのに有利なリガンドの組み合わせを想定することができる。リガンドの組み合わせとしては、目的の細胞に対する有効な標的化を一緒になって確実にする２つ以上の異なるリガンドの組み合わせであって、好ましくは交差干渉が全くないか又は最小限にのみあり、場合により相乗的に機能し、且つ好ましくはその可能な共通の標的エンドサイトーシス受容体上又はその異なる標的受容体上にある例えば結合部位又はエピトープに関して互いに競合することのないものが意図される。

【０１５５】

可能な実施形態では、本明細書に記載される組成物の第１及び第２のリガンド又はこれに類して、本明細書に開示される組み合わせの第４のリガンド及び第５のリガンドは、潜在的に同じリガンドであり得る。これは、例えば、用量並びに例えば両方のコンジュゲートに存在するリガンドが並行して標的とするエンドサイトーシス受容体の存在量及び分布に依存して起こり得る、それらの２リガンド結合型コンジュゲート（例えば、一方が例えば第１のリガンド－サポニンコンジュゲートであり、２つ目が第２のリガンド－ＡＳＯコンジュゲートであるもの）の結合に関して競合するイベントが全く又はほとんど予想されないときに起こり得る。かかる状況の例は、第４のリガンド及び第５のリガンドが同じ例えばモノクローナル抗体、例えばＣＤ７１に特異的なモノクローナル抗体であるような治療用組成物である。

【０１５６】

代わりに、有利な実施形態では、本明細書に記載される組成物の第１及び第２のリガンド又はこれに類して、本明細書に開示される組み合わせの第４のリガンド及び第５のリガンドは、同じエンドサイトーシス受容体の異なるリガンドであり得る。かかる状況は、特に、２つのかかるリガンドが、それらの共通の標的受容体上にある互いに空間的に十分離れているエピトープを標的化するとき、標的受容体上の結合部位に関する競合は少ないと予想され得るために有利である。第１のリガンド及び第２のリガンドについての又はこれに類して第４のリガンド及び第５のリガンドについてのかかる組み合わせの例を挙げれば、ＣＤ７１を標的とする２つの異なる抗体の組み合わせ、例えば一方がモノクローナルＩｇＧであり、他方がシングルドメインＶＨＨである組み合わせとなり得る。同様にＣＤ７１に向けられる代替的な例を挙げれば、例えば一方のリガンドがトランスフェリン又はその断片であり、他方のリガンドがＣＤ７１標的化抗体であるものが関わり得る。別の例を挙げれば、組み合わせの一方のリガンドがＩＧＦ１Ｒ特異抗体であると同時に、他方のリガンドが例えばＩＧＦ－Ｉ又はそれに由来する受容体結合合成ペプチドである場合となり得る。

【０１５７】

別の実施形態では、本明細書に記載される組成物の第１及び第２のリガンド又はこれに類して、本明細書に開示される組み合わせの第４のリガンド及び第５のリガンドは、各々が異なるエンドサイトーシス受容体に特異的な異なるリガンドであり得る。可能な例示的

かかるリガンドの組み合わせとしては、例えば、トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンドとインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンドとを含む組み合わせ；又はトランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンドとテトラスパニンＣＤ６３のリガンドとを含む第２の組み合わせ；又はトランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンドと、インスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンドと、テトラスパニンＣＤ６３のリガンド及び／又は筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）のリガンドとの更なるマルチリガンドの組み合わせが挙げられる。しかしながら、同じリガンド、同じエンドサイトーシス受容体の異なるリガンド及び／又は本開示のとおりの特異的組成物又は治療的組み合わせに関した試験が必要になるものと見られる組み合わせである、異なるエンドサイトーシス受容体のリガンドによるマルチリガンドの組み合わせが関わるような、他の多くの組み合わせも可能であり得る。

【０１５８】

従って、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が提供され、ここで、第１のリガンドと第２のリガンドとの組み合わせは、以下のリガンドの組み合わせ：

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンド、

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びテトラスパニンＣＤ６３のリガンド；

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及び筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）のリガンド；

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びカチオン非依存性マンノース６リン酸受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）のリガンド

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）の２つのリガンドであって、一方のリガンドがトランスフェリンであり、及び他方のリガンドが、トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド；

・ＬＤＬ受容体の２つのリガンドであって、一方のリガンドがＬＤＬであるか又はそれを含み、及び他方のリガンドが、ＬＤＬ受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド

から選択され；

好ましくは、ここで、組み合わせ中の第１及び第２のリガンドの少なくとも一方は、抗体又はその結合断片であり、場合により、ここで、組み合わせ中の第１及び第２のリガンドの少なくとも一方は、トランスフェリン（Ｔｆ）又はインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）である。

【０１５９】

同じように、更なる実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第３のコンジュゲートの第４のリガンドと第４のコンジュゲートの第５のリガンドとの組み合わせは、以下のリガンドの組み合わせ：

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）受容体のリガンド、

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びテトラスパニンＣＤ６３のリガンド；

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及び筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）のリガンド；

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）のリガンド及びカチオン非依存性マンノース６リン酸受容体（ＣＩ－ＭＰＲ）のリガンド受容体、

・トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）の２つのリガンドであって、一方のリガンドがトランスフェリンであり、及び他方のリガンドが、トランスフェリン受容体（ＣＤ７１）への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド；

・ＬＤＬ受容体の２つのリガンドであって、一方のリガンドがＬＤＬであるか又はそれ

を含み、及び他方のリガンドが、ＬＤＬ受容体への結合に特異的な抗体又はその結合断片である、２つのリガンド
から選択され；
好ましくは、ここで、組み合わせ中の第４及び第５のリガンドの少なくとも一方は、抗体又はその結合断片であり、場合により、ここで、組み合わせ中の第４及び第５のリガンドの少なくとも一方は、トランスフェリン（Ｔｆ）又はインスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）である。

【０１６０】

通常、組み合わせにおける２つの異なるリガンドの互換性が予想されるべきであり、これは、即ち、理論上、有効な組み合わせのいずれのリガンドが第１のリガンドとしてサポニンとコンジュゲートされるか、又は第２のリガンドとしてオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされるかによって差が生じるべきではないということを意味する。しかしながら、時には、特定のリガンドとそれがコンジュゲートしている分子との間の親和性、空間的な考察点及び／又は非共有結合性相互作用に起因して、例えば第１のリガンド又は第２のリガンドが、ある特定の組み合わせからの他方でなく、むしろ優先的に一方の具体的なリガンドである方が好ましいこともある。しかしながら、原則的には、リガンドのある特定の組み合わせが好ましいとき、その中の任意の１つを、本明細書に開示されるとおりの組成物についての第１のリガンドとして、第２のリガンドとして又は更なる第３のリガンドとしてさえ割り当てることができる。

【０１６１】

詳細な実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、第１のリガンドは、第４のリガンドと同じであり、及び／又は第２のリガンドは、第５のリガンドと同じであり、及び／又は第３のリガンドは、第６のリガンドと同じであり、好ましくは、ここで、第１のコンジュゲートは、第３のコンジュゲートと同じであり、及び／又は第２のコンジュゲートは、第４のコンジュゲートと同じであり、より好ましくは、第１及び第３のコンジュゲートは、同じであり、第２及び第４のコンジュゲートは、同じである。

【０１６２】

更なる可能な実施形態では、本明細書に記載されるとおりの標的型サポニンコンジュゲートと同様に、２分子以上の、場合により２～１６分子又は２～８分子、場合により２、３、４、５又は６分子である核酸又はオリゴヌクレオチドを含むような標的型核酸又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートも提供され得る。

【０１６３】

詳細な実施形態では、本開示に係る使用のための組成物が提供され、ここで、第２のリガンドは、１分子の第２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分子の第２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、第２のリガンドは、１分子の第２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。

【０１６４】

同様に、代替的実施形態では、本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第４のコンジュゲートの第５のリガンドは、１分子の第５のリガンドにつき２～５分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされ；好ましくは１分子の第５のリガンドにつき３～４分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり；より好ましくは、ここで、第５のリガンドは、１分子の第５のリガンドにつき平均して４分子のアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされる。

【０１６５】

臨床診療を踏まえて、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に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、２分子以上の核酸又はオリゴヌクレオチドは、それぞれ第２のコンジュゲートの一部として又は第３のコンジュゲートの一部として一緒にコンジュゲートした２つ以上の異なるオリゴヌクレオチドであり、ここで、２つ以上の異なるオリゴヌクレオチドの少なくとも１つ（好

ましくは複数）は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。
【０１６６】
コンジュゲートの共有結合性の連結という選択肢について、多くの異なる実施形態が可能であり、一部の好ましいものは、一部の有利なサポニンに関連して既に手短に上述したとおりの条件的に切断可能な結合の使用が関わる実施形態である。
【０１６７】
従って、可能な実施形態では、本開示に係る使用のための組成物が提供され、ここで、第１のコンジュゲートの第１のリガンドは、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、ここで、第１のコンジュゲート内でのサポニンによる第１の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、及び／又は任意選択で、ここで、第２のコンジュゲートの第２のリガンドも、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、ここで、核酸による第２の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分子以上のサポニンは、１分子の第１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、及び／又は任意選択で、ここで、２分子以上の核酸は、１分子の第２のリガンドに別個のシステイン及び／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、第１のリガンド及び／又は任意選択でまた第２のリガンドは、場合により、配列ＨＲＷＣＣＰＧＣＣＫＴＦ（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、ここで、それぞれ第１のコンジュゲート内でのサポニンによる第１のリガンドとの又は第２のコンジュゲート内での核酸による第２の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分子以上のサポニンは、１分子の第１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、及び／又は任意選択で、ここで、２分子以上の核酸は、１分子の第２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る。
【０１６８】
別の実施形態では、本開示に係る使用のための組成物が提供され、ここで、第１のコンジュゲート内でのサポニンによる第１のリガンドとの共有結合性の連結は、サポニンが共有結合的に結合している第１のリンカーを介して行われ；好ましくは、ここで、第１のリンカーは、セミカルバゾン結合、イミン結合、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、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、アミド結合、ペプチド結合及びエステル結合のいずれか１つ以上から選択される共有結合性の結合を含み、好ましくはヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合であり；より好ましくは、ここで、サポニンは、
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にあるアルデヒド基、又は
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある共有結合性の結合であって、第１のコンジュゲート内でサポニンを第１のリンカーを介して共有結合的に連結する、且つ第１のリンカーの一部として含まれる共有結合性の結合において、好ましくは、Ｃ－２３位にある共有結合性の結合は、エンドソーム又はリソソームに存在する条件下で切断を受けることになる切断可能な結合であり、より好ましくは、Ｃ－２３位にある切断可能な共有結合性の結合は、切断に伴いＣ－２３位にアルデヒド基が回復するように適合されている、共有結合性の結合
のいずれかを含むか；
又は少なくともコンジュゲートされていない状態でサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む、前記アルデヒド基が第１のリンカーとの共有結合性の結合の形成に関与したサポニンである。
【０１６９】

関連する実施形態では、かかる組成物が提供され、ここで、第１のリンカーは、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、第１のリンカーは、
・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、
好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受けることになる結合であり；
より好ましく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／又はオキシム結合のいずれか１つ以上から選択される酸感受性結合であり、更に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。

【０１７０】

更なる及び有利な実施形態では、本開示に係る使用のための組成物が提供され、ここで、第２のコンジュゲートにおける核酸による第２の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第２のリンカーを介して行われ；好ましくは、ここで、第２のリンカーは、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（ＳＰＤＰ）を含むか又はそれからなり；場合により、ここで、第２のリンカーは、核酸を、好ましくは第２のリガンドに含まれるリジン残基であるリジン残基又はグリカン残基、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。

【０１７１】

関連する実施形態では、かかる組成物が提供され、ここで、第２のリンカーは、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、第２のリンカーは、
・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、第２のリンカーは、
・セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合
・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。

【０１７２】

関連する実施形態では、かかる組成物が提供され、ここで、第２のリンカーは、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、第２のリンカーは、

セミカルバゾン結合、ヒドラゾン結合など、酸性条件下で切断を受けることになる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酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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、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／又はオキシム結合のいずれか１つ以上から選択される結合であり、更に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。

【０１７３】

特定の実施形態では、サポニンが、サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある共有結合（好ましくは酸感受性結合である）によってコンジュゲートされるとき、Ｃ－２３位の前記共有結合性の結合は、切断（例えば酸性条件下での）に伴いＣ－２３位のアルデヒド基が回復するように選択されるか、又はそのように適合されることが有利となり得る。有利には、かかる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つ以上から選択することができ、好ましく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。

【０１７４】

これに類して、可能な実施形態では本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンを含む第３のコンジュゲートの第４のリガンドは、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、ここで、第３のコンジュゲート内でのサポニンによる第４の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、及び／又は任意選択で、ここで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む第４のコンジュゲートの第５のリガンドも少なくとも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、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる第５の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分子以上のサポニンは、１分子の第４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、及び／又は任意選択で、ここで、２分子以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、１分子の第５のリガンドに別個のシステイン及び／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、第４のリガンド及び／又は任意選択でまた第５のリガンドが、場合により、配列ＨＲＷＣＣＰＧＣＣＫＴＦ（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、ここで、それぞれ第３のコンジュゲート内でのサポニンによる第４のリガンドとの又は第４のコンジュゲート内でのアンチセンスオリゴヌクレオチドによる第５の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分子以上のサポニンは、１分子の第４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、及び／又は任意選択で、ここで、２分子以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、１分子の第５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る。

【０１７５】

別の実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、第３のコンジュゲート内でのサポニンによる第４のリガンドとの共有結合性の連結は、サポニンが共有結合的に結合している第３のリンカーを介して行われ；好ましくは、ここで、第３のリンカーは、セミカルバゾン結合、イミン結合、ヒドラゾン結合、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、オキシム結合、チオエーテル結合、アミド結合、ペプチド結合及びエステル結合のいずれか１つ以上から選択される共有結合性の結合を含み、好ましくはヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合であり；より好ましくは、こ

こで、サポニンは、
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にあるアルデヒド基、又は
サポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にある共有結合性の結合であって、第１のコンジュゲート内でサポニンを第１のリンカーを介して共有結合的に連結する、且つ第１のリンカーの一部として含まれる共有結合性の結合において、好ましくは、Ｃ－２３位にある共有結合性の結合は、エンドソーム又はリソソームに存在する条件下で切断を受けることになる切断可能な結合であり、より好ましくは、Ｃ－２３位にある切断可能な共有結合性の結合は、切断に伴いＣ－２３位にアルデヒド基が回復するように適合されている、共有結合性の結合
のいずれかを含み；
又はここで、コンジュゲートの調製に使用されるサポニンは、少なくともコンジュゲートされていない状態でサポニンのアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含む、前記アルデヒド基が第３のリンカーとの共有結合性の結合の形成に関与したサポニンである。

【０１７６】

関連する実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、第３のリンカーは、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、第３のリンカーは、
・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、
好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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結合であり；最も好ましくはヒドラゾン結合である。

【０１７７】

更なる及び有利な実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる第５の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第４のリンカーを介して行われ；好ましくは、ここで、第４のリンカーは、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（ＳＰＤＰ）を含むか又はそれからなり；場合により、ここで、第４のリンカーは、核酸を、好ましくは第５のリガンドに含まれるリジン残基であるリジン残基又はグリカン残基、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。

【０１７８】

関連する実施形態では、かかる治療的組み合わせが提供され、ここで、第４のリンカーは、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、第４のリンカーは、
・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、第２のリンカーは、
・セミカルバゾン結合及びヒドラゾン結合など、酸性条件下で切断を受けることになる結合
・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み；
より好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在する酸性条件下、好ましくはｐＨ４．０～６．５、より好ましくはｐＨ≦５．５においてインビボで切断を受ける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結合であり；最も好ましくはヒドラゾン結合である。

【０１７９】

上記で既に説明したとおり、アグリコンのＣ－２３位置にアルデヒド基を含むサポニンは、それがオリゴヌクレオチドなどの核酸に向かって呈するエンドソーム脱出促進活性の効力が高いため、特に好ましい。従って、第１のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートに好ましいサポニンは、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のアグリコンコア構造のＣ－２３位にアルデヒド基を含むか又はそれを形成するものである。

【０１８０】

例えば、上記に記載されるグループＢ及びグループＣのサポニンがコンジュゲートにおいてアルデヒド基の関わるリンカー化学（例えば、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合の形成）によって共有結合的に結合しているときは、コンジュゲートがエンドサイトーシスにより取り込まれ、切断可能な結合の切断によってサポニンが切断されて第１のコンジュゲート又は第３のコンジュゲートの残りの部分から離れると、エンドソーム又はリソソームにおいてアルデヒド基が再形成される（回復する）ことが好ましい。この目的に好適なかかるサポニンの例を表１に掲載し、例えば、ここで以上に概要を説明したとおりの、グループＡ～Ｃ、詳細にはグループＢ及びグループＣのサポニンである。表１からのサポニンの特に有利な例は、ＳＯ１８６１である。

【０１８１】

以上に説明したとおり、開示される様々な異なるサポニン含有コンジュゲート及び／又は核酸含有コンジュゲートの様々な異なる例示的実施形態を想定することができ、従ってそれぞれサポニン及び場合によりまた核酸の、標的化用リガンド及び／又はオリゴマー若しくはポリマー構造体（更に足場、例えばＰＥＧベースと称される）との様々な異なるコンジュゲーション様式が想定される。上記に説明した実施形態を踏まえて、このコンジュゲーションは、コンジュゲートに含まれる少なくとも２種類の分子の直接の共有結合によってなされるか、或いは上記に記載される第１若しくは第３のリンカー（サポニンをリガンドに連結するため）又は第２若しくは第４のリンカー（核酸をリガンドに連結するため）などのリンカーを介して行われるかのいずれでもあり得る。リンカーを使用すると、本発明の組成物及び／又は組み合わせにおけるサポニンによる及び場合によりまた核酸（好ましくはＡＳＯ又はＰＭＯのようなオリゴヌクレオチドである）によるリガンド（例えば、免疫グロブリン、ｍＡｂ、ｓｄＡｂ、ＶＨＨ等）への、即ちそのそれぞれの標的化用リガンドへの共有結合性の結合を確立することができる。以上に説明したとおり、可能な実施形態では、こうしたリンカーは、哺乳類（例えば、ヒト）エンドソーム／リソソームに存在する条件下で安定しているか又は前記条件下で不安定（即ち切断可能）であり得、後者は、即ち、こうしたリンカーが前記条件に反応して切断され、従ってかかる切断可能なリンカーによって共有結合的に連結した少なくともサポニンが（及び標的型の場合には核酸も）そのそれぞれの標的化用リガンドから放出されることを意味する。

【０１８２】

サポニンをリガンドに共有結合的に連結する切断可能な第１又は第３のリンカーの多くの例が、サポニンアグリコンコアのＣ－２３位にある酸感受性結合を介してサポニンに結

合した切断可能な第１のリンカーの更に詳細に記載される実施形態を含め、上記に記載され、この酸感受性結合は、好ましくは、かかるサポニンのアグリコンコアのＣ－２３位のアルデヒド基が反応することによって確立されたものであり、哺乳類（例えば、ヒト）エンドソーム／リソソームに存在する酸性条件下で前記基を回復させるように構成される。

【０１８３】

代わりに、受容体インターナリゼーション率が律速因子でないとき、他の可能な実施形態では、本発明の組成物／組み合わせにおいてサポニンをリガンドに共有結合的に連結する第１又は第３のリンカーは、安定リンカーであり得、これは、例えば、好ましくは及び存在する場合にはグルクロン酸基を介して、サポニンのアグリコンコア構造のＣ３β－ＯＨ基に結合した第１の糖鎖におけるグルクロン酸単位と反応することによってサポニンに連結され得る。かかる反応の結果として、サポニンのアグリコンコア構造のＣ３β－ＯＨ基に結合した第１の糖鎖に安定な（即ち切断可能でない）結合を含む安定な第１のリンカーを作り出すことができ、この安定な第１のリンカーが、サポニンを標的化用リガンド（例えば、ｍＡｂ、ｓｄＡｂ、ＶＨＨ等のような免疫グロブリン）に又は存在する場合には足場に共有結合的に連結する。これを踏まえて、可能な実施形態は、提供されるとおりのサポニンコンジュゲートであり、ここで、サポニンは、サポニンのアグリコンコア構造のＣ$_3$β－ＯＨ基にある第１の糖鎖にグルクロン酸単位を含むサポニンに属し、ここで、グルクロン酸単位が反応すると、リンカーが、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造のＣ３β－ＯＨ基に結合した第１の糖鎖に作り出されたアミド結合を介して、より好ましくはリガンドに存在するアミン基（リジンのアミン基又は免疫グロブリンなど、タンパク質性リガンドのＮ末端など）に又は加えて存在する場合には足場に共有結合的に結合する。グルクロン酸官能基は、それが反応すると、リガンドとの又は本発明のサポニンコンジュゲートの足場とのサポニンの共有結合性の連結を直接の共有結合性の結合又はリンカーのいずれを介しても確立し得るために特に有利であり、ここで、リンカーは、安定リンカーであるが、切断可能なリンカーであるように設計することもできる。

【０１８４】

切断可能な第１のリンカーと安定な第１のリンカーとの間の選択は完全に当業者次第となり、例えば、リガンドの選択及び本明細書に開示されるとおりのコンジュゲートに含まれる特徴的な異なる分子のいずれかに望ましい放出速度に応じて行うことができる。切断可能な第１のリンカー又は安定な第１のリンカーを介してコンジュゲートしたサポニンは、本明細書に開示されるとおりの任意の実施形態、例えば本発明の使用のための医薬組成物／治療的組み合わせの実施形態の一部であり得、ここでは核酸（例えば、オリゴヌクレオチド、好ましくはＰＭＯ又はＡＳＯ）も標的化され、切断可能な第２のリンカー又は安定な第２のリンカーのいずれかを介してその標的化用リガンドに連結されている。安定な第２のリンカー及び切断可能な第２のリンカーの両方の例を上記に提供したが、両方とも、本発明の組成物／組み合わせの核酸含有コンジュゲート内で核酸のコンジュゲーションに使用される可能性が極めて高い。これらの間の選択は、使用される核酸の種類及び意図される療法に極めて大きく依存することになる。例えば、安定リンカーは、細胞において一本鎖形態で作用するように設計されることになる治療用核酸の鎖の１本のみのコンジュゲーションへの使用が極めて容易であり得る。かかる治療用核酸の２本の鎖は、エンドソーム／リソソームに存在する条件に反応して解離し、従ってコンジュゲートから治療用の鎖が放出され、本明細書に記載されるエンドソーム脱出促進性サポニンの存在によって促進される形でサイトゾルに入るように選択することができる。二本鎖核酸について、一部の実施形態では、切断可能な第２のリンカーが有利である可能性があり、これはリガンドにコンジュゲートされているか、又は足場にコンジュゲートされているかのいずれかと見なすことができる。

【０１８５】

具体的な実施形態では、本開示に係る使用のための組成物が提供され、ここで、サポニンは、少なくとも１分子のＳＯ１８６１であるか又はそれを含み、核酸は、ドリサペルセン又はエテプリルセンであり、及び第１のリガンドは、抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片

であり、及び好ましくは、第２のリガンドは、抗ＣＤ７１抗体又は結合断片である。

【０１８６】

これに類して、同様の具体的な実施形態では、治療的組み合わせが提供され、ここで、サポニンは、少なくとも１分子のＳＯ１８６１であるか又はそれを含み、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ドリサペルセン又はエテプリルセンであり、及び第４のリガンドは、抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片であり、及び好ましくは、第５のリガンドは、抗ＣＤ７１抗体又はその結合断片である。

【０１８７】

複雑な共有結合性のコンジュゲートを構築するため、例えば、大型の若しくは決まった数の抗体などのリガンド、又は複数の核酸分子、又は特にサポニン分子を含めるために、オリゴマー又はポリマー構造体を含む分子足場を用いることができる。これの利点の１つは、足場をそれが決められた数の分子、例えばサポニンを含むように設計し得ることである。例えば、足場は厳密に１個のサポニン分子を含み得るが、数個の（例えば、２、３又は４個の）サポニン又は多数の（例えば、１０、２０又は１００個の）比較的一定の決められた数のサポニンも含み得る。場合により、かかるオリゴマー又はポリマー構造体は、ポリ（アミン）類、例えば、ポリエチレンイミン及びポリ（アミドアミン）又は代わりにポリエチレングリコール、ポリ（ラクチド）類などのポリ（エステル）類、ポリ（ラクタム）類、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリドコポリマー、ポリ（デキストリン）、又はペプチド若しくはタンパク質、又は天然及び／又は人工ポリアミノ酸、例えば、ポリ－リジン、２～１００ヌクレオチドを含むＤＮＡなどのＤＮＡポリマー、例えば２～２００ヌクレオチドを含む安定化ＲＮＡポリマー又はＰＮＡ（ペプチド核酸）ポリマーでできた、直鎖状、分岐状又は環状ポリマー、オリゴマー、デンドリマー、デンドロン（例えば、それぞれ４、８、１６又は３２個のサポニン部分を最大限共有結合するためのＧ２、Ｇ３、Ｇ４又はＧ５デンドロンのいずれか）、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー又はこれらの構造体の純粋な若しくは混合のいずれかの集合体のいずれかとして現れるものとなるであろう。好ましくは、かかる足場は、デンドリマー、デンドロン、デンドロン化ポリマー、デンドロン化オリゴマー、ＤＮＡ、例えば、２～２００個の核酸、ポリエチレングリコール、OEG_3、OEG_4及びOEG_5などのオリゴエチレングリコール（ＯＥＧ）など、オリゴマー及び／又はポリマー構造体でできたものであり得る。

【０１８８】

従って、有利な実施形態において、本明細書に開示される治療的若しくは予防的使用のための組成物又は本開示に係る治療的組み合わせが提供され、ここで、第１のリンカー又は第３のリンカーは、ポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ）デンドリマーなどのデンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０のいずれかなどのポリエチレングリコールのいずれかであるオリゴマー又はポリマー構造体をそれぞれ更に含み；好ましくはポリマー又はオリゴマー構造体は、ＰＥＧ４～ＰＥＧ１２のいずれか１つ又はＧ２デンドロン、Ｇ３デンドロン、Ｇ４デンドロン及びＧ５デンドロンのいずれか１つであり、より好ましくはＧ２デンドロン若しくはＧ３デンドロン又はＰＥＧ３～ＰＥＧ３０である。

【０１８９】

かかるオリゴマー／ポリマー足場を形成する構造体は、有利には、内因的な生物学的活性を欠いている。典型的には、足場は、潜在的な健康リスクを回避するため、不活性分子でできている。本明細書に提示される筋標的化用コンジュゲートの詳細な実施形態に取り込まれることになる選択のサポニンの数に応じて、オリゴマー／ポリマー構造体の種類及びサイズ又は長さを適切に選択することができる。換言すると、コンジュゲートの一部としてリガンド及び核酸にカップリングするサポニンの数により、所望の数のサポニンをカップリングして、それと共に共有結合性サポニン結合構造体を提供するのに十分な数の結合部位を担持した、好適なオリゴマー又はポリマー構造体の選択が決まり得る。例えば、ＯＥＧの長さ又はデンドロン若しくはポリリジン分子のサイズにより、コンジュゲート内の第１のリンカーの一部として含まれる可能性のあるかかるオリゴマー又はポリマー構造体に共有結合的に連結することのできるサポニンの最大数が決まる。

【０１９０】
有利な実施形態では、かかる足場を含むコンジュゲートは、そこに共有結合的に連結したサポニンをランダムな数でなく、むしろ決められた数又は範囲で含むことになり得る。これは、医薬品開発に際して製造販売承認取得の点で特に有利である。これに関して、決められた数とは、コンジュゲートが予め決められた数のサポニンを含んでいる可能性があることを意味する。これは、例えば、１つ又は複数のサポニンが会合することが可能な基を一定数持つオリゴマー／ポリマー構造体を含む足場を設計することによって実現する。理想的な状況下では、これら基が各１つずつサポニン分子と会合するため、従って決められた数のサポニンを含むコンジュゲートとなり得る。例えば、２、４、８、１６、３２、６４等を含む標準的な一組の足場を提供することが想定される。
【０１９１】
本発明のコンジュゲートのある実施形態では、例えば、かかるオリゴマー／ポリマーに存在する全ての基がサポニン分子と会合することにはならないであろう理想的でない結合状況に関しては、サポニン分子の数が範囲として定義されることになるであろうような足場が提供される可能性がある。かかる範囲は、例えば、各足場につき２～４個のサポニン分子、各足場につき３～６個のサポニン分子、各足場につき４～８個のサポニン分子、各足場につき６～８個のサポニン分子、各足場につき６～１２個のサポニン分子などであり得る。
【０１９２】
オリゴマー又はポリマー分子に結合したサポニンを幾つも含むかかる第１のリンカーは、一部の実施形態では、複数のサポニン部分の担体（支持体、足場）として機能する可能性があり、それがリガンド及び核酸に結合することで、従って本明細書に開示される筋細胞標的化用治療用コンジュゲートの特定の実施形態を形成する。有利な実施形態では、サポニン分子が負荷されたかかるオリゴマー又はポリマー分子含有リンカーは、筋細胞標的化用コンジュゲートの残りの部分に、好ましくは切断可能な結合によって結び付いている可能性がある。
【０１９３】
更なる可能な実施形態では、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、本開示に係る使用のための組成物が提供される。
【０１９４】
更なる極めて可能性の高い実施形態では、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開示に係る使用のための組成物及び／又は本開示に係る治療的組み合わせが提供される。
【０１９５】
更なる態様において、本開示の治療的組み合わせの成分（ａ）及び（ｂ）を含むキットが提供され、場合により、ここで、成分（ａ）及び（ｂ）は、別個のバイアルに提供されるか、又は静脈内又は皮下又は筋肉内注射に好適な混合物中に提供される。
【０１９６】
最後に付け加えると、更なる可能な実施形態では、医薬としての使用のための、本開示の治療的組み合わせ又はキットが提供される。
【実施例】
【０１９７】
材料：
ＳＯ１８６１は、Ｅｘｔｒａｓｙｎｔｈｅｓｅ、Ｆｒａｎｃｅ及び／又はＡｎａｌｙｔｉｃｏｎ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＧｍｂＨ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。
【０１９８】
配列５’－ＵＣＡＡＧＧＡＡＧＡＵＧＧＣＡＵＵＵＣＵ－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　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔ

ｉｃｓ　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’－ＧＧＣＡＧＴＴＴＣＣＴＴＡＧＴＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＴＧＴＧＴ－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’－ＧＴＴＧＣＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－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’－ＣＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－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。

【０１９９】

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。ヒトＣＤ６３を標的とする抗ＣＤ６３抗体（クローンＨ５Ｃ６）（ｈＣＤ６３）及びマウスを標的とする抗ＣＤ６３抗体（クローンＮＶＧ－２）（ｍＣＤ６３）は、両方ともＢｉｏｌｅｇｅｎｄから購入した。ＩＧＦ－１リガンドは、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈから購入した。

【０２００】

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－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　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０．２μｍ及び０．４５μｍ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｖｉｖａｓｐｉｎ　Ｔ４及びＴ１５コンセントレーター（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、Ｐｒｏｔｉｎｏ）、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　ＭｉｎｉＴｒａｐ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（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　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　０．２μｍフィルタ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、Ｍｉｎｉｓａｒｔ　０．４５μｍフィルタ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）、ＰＤ　Ｍｉｎｉｔｒａｐ　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。

【０２０１】

【表１０】

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
Biosep s3000 aSECカラム	Phenomenex

【０２０２】

【表１１】

hCD63コンジュゲートに関連する材料

説明	供給業者
hCD63ヒト抗CD63抗体	Biolegend
SO1861-SC-マレイミド	Symeres
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-ASO-チオール (5'-DMD-ASO)	Hanugen Therapeutics Pvt
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
プレゼンテーション緩衝液 (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
PBS-T	Fleet Bioprocessing Ltd
MOPSランニング緩衝液 (20X)	Fleet Bioprocessing Ltd
LDS試料緩衝液 (4X)	Thermo
トランスファー緩衝液 (1X)	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	Thermo Sigma
エルマン試薬	Thermo
0.2µm Minisartフィルタ	Sartorius
0.2µm Spinフィルタ	Millipore
Zeba 2ml 7K MWCO	Thermo
PD10 G25 Sephadex	Cytiva
2.6 × 30 cm Sephadex G25	Fleet Bioprocessing Ltd
2.6 × 40 cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing Ltd
2.6 × 60 cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing Ltd
Vivaspin 20 (10K MWCO)	Sartorius
Vivaspin T15 (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
Biosep s3000 aSECカラム	Phenomenex

【０２０３】

略語

Ａｂ　抗体

Ａｃ　アセチル

ＡＯＮ　アンチセンスオリゴヌクレオチド

ＡＳＯ　アンチセンスオリゴヌクレオチド

ＢＣＡ　ビシンコニン酸

ＢＧＧ　ウシガンマグロブリン

ａＳＥＣ　分析用サイズ排除クロマトグラフィー

ＤＡＲ　薬物抗体比
ＤＢＣＯ　ジベンゾシクロオクチン
ＤＢＣＯ－ＮＨＳ　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
ＤＣＭ　ジクロロメタン
ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＭＥＭ　ダルベッコ変法イーグル培地
ＤＭＦ　Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
ＤＭＳＯ　ジメチルスルホキシド
ＤＰＢＳ　ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
ＤＴＭＥ　ジチオビスマレイミドエタン
ＤＴＮＢ　５，５’－ジチオビス－（２－ニトロ安息香酸）
ＤＴＴ　ジチオスレイトール
ＥＤＴＡ　エチレンジアミン四酢酸
ＥＤＣＩ．ＨＣｌ　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
ＥＭＣＨ．ＴＦＡ　Ｎ－（ε－マレイミドカプロン酸）ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩
Ｅｑｕｉｖ．当量
ＥｔＢｒ　臭化エチジウム
ＦＢＳ　ウシ胎仔血清
ＧａｌＴ　ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ
ＨＡＴＵ　１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート
ＨＲＰ　西洋ワサビペルオキシダーゼ
ＩＰＡ　イソプロピルアルコール
ＬＣ－ＭＳ　液体クロマトグラフィー－質量分析法
ＬＤＳ　ドデシル硫酸リチウム
ＬＲＭＳ　低分解能質量分析法
ＮＥＭ　Ｎ－エチルマレイミド
ＮＨＳ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル
ｍＡｂ　モノクローナル抗体
ｍｉｎ　分
ＭＯＰＳ　３－（モルホリン－４－イル）プロパン－１－スルホン酸
ＭＰＬＣ　中圧液体クロマトグラフィー
ＭＷＣＯ　分子量カットオフ
ＮＭＭ　４－メチルモルホリン
ＰＢＳ　リン酸緩衝生理食塩水
ＰＢＳ－Ｔ　Ｔｗｅｅｎ－２０含有リン酸緩衝生理食塩水
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
ＰＭＯ　ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー
ＰＤＴ　ピリジン２－チオン
ｒｐｍ　毎分回転数
ＲＴ　室温
ｒ．ｔ．保持時間
ＳＤＳ　ドデシル硫酸ナトリウム
ＳＥＣ　サイズ排除クロマトグラフィー
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
ＴＢＥＵ　（トリス－ヒドロキシメチル）－アミノメタン）－ホウ酸－ＥＤＴＡ－尿素（ｒｅａ）

ＴＢＳ　トリス緩衝生理食塩水
ＴＣＥＰ　トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩
ＴＣＯ４－ＮＨＳ　ｔｒａｎｓ－シクロオクテン－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
Ｔｅｍｐ　温度
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸
ＴＨＰＰ　トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン
ＴＭＢ　３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン
ＴＮＢＳ　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
ＵＤＰ－ＧａｌＮＡｚ　ウリジン二リン酸－Ｎ－アジドアセチルマンノサミン

【０２０４】
方法（実施例１～５において実施されるとおり）
ＳＯ１８６１－マレイミド、ＳＯ１８６１－ＮＨＳ合成
　ＳＯ１８６１は、サボンソウ（Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ　Ｌ）に由来し（Ｅｘｔｒａｓｙｎｔｈｅｓｅ、Ｆｒａｎｃｅ及び／又はＡｎａｌｙｔｉｃｏｎ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＧｍｂＨ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｓｙｍｅｒｅｓ（ＮＬ）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。

【０２０５】
抗体及びタンパク質へのＳＯ１８６１のコンジュゲーション
　ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１、ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１の注文生産は、Ｆｌｅｅｔ　Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ（ＵＫ）により実施された。

【０２０６】
抗体への５’－ジスルフィドアミド－ＤＭＤ－ＰＭＯ、５’－チオール－ＤＭＤ－ＡＳＯ及び３’－ジスルフィドアミド－Ｍ２３Ｄのコンジュゲーション
　ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ、ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ、ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ、ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ－ＳＯ１８６１の注文生産は、Ｆｌｅｅｔ　Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ（ＵＫ）により実施された。

【０２０７】
分析及び調製方法
ＬＣ－ＭＳ方法１
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；バイナリポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ　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：１５００～２４００又は２０００～３０００の範囲内でｎｅｇ又はｎｅｇ／ｐｏｓ；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃；カラム：Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｃ１８、５０×２．１ｍｍ、１．７μｍ　温度：６０℃、流量：０．６ｍＬ／分、直線グラジエントは生成物の極性に依存：
^{A}ｔ$_{0}$＝２％Ａ、ｔ$_{5.0min}$＝５０％Ａ、ｔ$_{6.0min}$＝９８％Ａ
^{B}ｔ$_{0}$＝２％Ａ、ｔ$_{5.0min}$＝９８％Ａ、ｔ$_{6.0min}$＝９８％Ａ
ポストタイム：１．０分、溶出液Ａ：アセトニトリル、溶出液Ｂ：水中１０ｍＭ重炭酸アンモニウム（ｐＨ＝９．５）。

【０２０８】
ＬＣ－ＭＳ方法２
装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；バイナリポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ　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／ｎｅｇ１００～８００又はｎｅｇ２０００～３０００；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：２５℃、流量：０．５ｍＬ／分、グラジエント：ｔ$_{0}$

ｍｉｎ＝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（ｐＨ＝９．５）。

【０２０９】

ＬＣ－ＭＳ方法３

装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；バイナリポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ　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　１０５～８００、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。

【０２１０】

ＬＣ－ＭＳ方法４

装置：Ｗａｔｅｒｓ　ＩＣｌａｓｓ；バイナリポンプ：ＵＰＩＢＳＭ、ＳＭ：ＵＰＩＳＭ　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／ｎｅｇ１００～８００又はｎｅｇ２０００～３０００；ＥＬＳＤ：ガス圧４０ｐｓｉ、ドリフトチューブ温度：５０℃　カラム：Ｗａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　Ｓｈｉｅｌｄ　ＲＰ１８、５０×２．１ｍｍ、１．７μｍ、温度：２５℃、流量：０．５ｍＬ／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（ｐＨ＝９．５）。

【０２１１】

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％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：

^{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。

【０２１２】

分取ＭＰ－ＬＣ方法２

機種：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：

^{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。
【０２１３】
分取ＬＣ－ＭＳ方法３
ＭＳ機種：Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｇ６１３０Ｂ四重極；ＨＰＬＣ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 t_0＝２０％Ａ、$t_{2.5min}$＝２０％Ａ、t_{11min}＝６０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｂ t_0＝５％Ａ、$t_{2.5min}$＝５％Ａ、t_{11min}＝４０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ；検出：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づくフラクション収集。
【０２１４】
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 t_0＝２％Ａ、$t_{2.5min}$＝２％Ａ、t_{11min}＝３０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｂ t_0＝１０％Ａ、$t_{2.5min}$＝１０％Ａ、t_{11min}＝５０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ
Ｃ t_0＝５％Ａ、$t_{2.5min}$＝５％Ａ、t_{11min}＝４０％Ａ、t_{13min}＝１００％Ａ、t_{17min}＝１００％Ａ；検出：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～８００；ＤＡＤに基づくフラクション収集
【０２１５】
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。
【０２１６】
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ε４９５＝５８，７００Ｍ－１ｃｍ－１及びＲｚ２８０：４９５＝０．４２８をＳＡＭＳＡ－フルオレセインに使用した。
Ｍ２３Ｄ－ＳＳ－アミド；質量ＥＣ２６５＝２５９，２１０Ｍ－１ｃｍ－１
エルマン試薬（ＴＮＢ）；モルＥＣ４１２＝１４，１５０Ｍ－１ｃｍ－１
ＤＭＤ－ＰＭＯ；モルＥＣ２６５＝３１８，０５０ １３５，０２７Ｍ－１ｃｍ－１
ＤＭＤ－ＡＳＯ；モルＥＣ２６５＝３１０，０００ ２５２，５１２Ｍ－１ｃｍ－１
ピリジン２－チオン（ＰＤＴ）；モルε３６３＝８，０８０Ｍ－１ｃｍ－１
【０２１７】
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（６０μｌ）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、５０μｌの１０％ＳＤＳ及び２５μｌ　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。

【０２１８】

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。

【０２１９】

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５μｇ（１０μｌ）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ＰＡＧＥＢｌｕｅ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。

【０２２０】

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、調製したて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、ろ過したての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。

【０２２１】

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Ｐ

ＡＧＥ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５０～５μｇ／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H_2Oを含んだ。試料及び標準物質を７０℃で３分間熱処理し、各ウェルに１０μｌを加えて、各レーンにつき５μｇのタンパク質及びコンジュゲート試料並びに０．５／０．２／０．１／０．５μｇ（ＤＭＤ－ＡＳＯ）又は０．２／０．１／０．０５μｇ（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（２μｌ）中０．１μｇ／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、それを調製したてのエチジウムブロマイド溶液（１μｇ／ｍＬ）で振盪しながら（４０分、２００ｒｐｍ）染色した。得られたゲルを紫外線落射照明（２５４ｎｍ）によって可視化し、ＩｍａｇｅＪ（Ｒａｓｂａｎｄ、Ｗ．Ｓ．、ＩｍａｇｅＪ、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。

【０２２２】

ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ

ｍＣＤ７１のアリコート（４２．９ｍｇ、４．２０ｍｌ）をＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で緩衝液交換し、２．５ｍｇ／ｍｌに標準化した。ｍＣＤ７１のアリコート（３４．４ｍｇ、０．２３μｍｏｌ、２．５３ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＳＭＣＣ溶液のアリコート（２．０ｍｇ／ｍｌ、３．５３モル当量、０．８１μｍｏｌ）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、調製したてのグリシン溶液のアリコート（２．０ｍｇ／ｍｌ、約２０モル当量、４．０５μｍｏｌ）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（３１．７ｍｇ、収率：９６％、０．９４２ｍｇ／ｍｌ、ＳＭＣＣ対ｍＣＤ７１比＝２．１）。

【０２２３】

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（１７．２ｍｇ、１．９９μｍｏｌ、１０．０ｍｇ／ｍｌ）を調製したてのＴＨＰＰ溶液（５０ｍｇ／ｍｌ、１０モル当量、１９．９μｍｏｌ、８２．８μｌ）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（１４．８ｍｇ、収率：８６％、チオール対Ｍ２３Ｄ比＝０．９８）。

【０２２４】

ｍＣＤ７１－ＳＭＣＣのアリコート（３１．７ｍｇ，０．２１μｍｏｌ，０．９４２ｍｇ／ｍｌ）に、Ｍ２３Ｄ－ＳＨのアリコート（４．１２２ｍｇ／ｍｌ、４．０モル当量、０．８５μｍｏｌ、１．７７１ｍｌ）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　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２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、０．２μｍ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＝２５．７ｍｇ、７３％、Ｍ２３Ｄ対ｍＣＤ７１比＝１．２）。

【０２２５】

ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１

ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１の生成のため、ＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミド又はＳＯ１８６１－ＥＭＣＨのいずれかを使用して２つの異なるｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１コンジュ

ゲートを生成した。ｍＣＤ７１とＳＯ１８６１－ＥＭＣＨとの間のコンジュゲーションについて、手順を例示的に記載する。

【０２２６】

アリコートｍＣＤ７１（５５．１ｍｇ、０．３７μｍｏｌ、８．１０ｍｇ／ｍｌ、６．８０ｍｌ）をＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で５ｍｇ／ｍｌに標準化し、次に、１：１：１ｖ／ｖで組み合わせた濃縮トリス（１２７ｍｇ／ｍｌ、１．０５Ｍ）、濃縮トリス．ＨＣｌ（６２３ｍｇ／ｍｌ、３．９５Ｍ）及び濃縮ＥＤＴＡ．２Ｎａ．２H_2O（９５ｍｇ／ｍｌ、０．２６Ｍ）を含む３０μｌ／ｍｌ（３３０μｌ）の予め混合した濃縮トリス／トリス．ＨＣｌ／ＥＤＴＡを加えて、５０ｍＭ　ＴＢＳ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ緩衝液　ｐＨ約７．５を得た。ｍＣＤ７１（５０ｍｇ、０．３３μｍｏｌ、５．０４４ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＴＣＥＰ溶液のアリコート（２．００ｍｇ／ｍｌ、２．７４モル当量、０．９１２μｍｏｌ）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２１０分間インキュベートした。インキュベーション後（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨを加える前）、ｍＣＤ７１－ＳＨを多重コンジュゲーション用に分配し、１．０ｍｇ（０．２０１ｍｌ）アリコートを取り出し、ＴＢＳ　ｐＨ７．５でＺｅｂａスピン脱塩カラムを使用したゲルろ過により精製した。このアリコートを紫外可視分析及びエルマンアッセイによって特徴付けた（３．２４８ｍｇ／ｍｌ、チオール対ｍＣＤ７１比＝３．９７）。ｍＣＤ７１－ＳＨのアリコート（４２ｍｇ、０．２８μｍｏｌ、４．９７８ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ溶液のアリコート（２．０ｍｇ／ｍｌ、８モル当量、２．２４μｍｏｌ、２．３２ｍｌ）を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に２０℃で１２０分間インキュベートした。このコンジュゲーション反応の他に、２つの脱塩したｍＣＤ７１－ＳＨのアリコート（０．２５ｍｇ、０．０７７ｍｌ、１．６７ｎｍｏｌ）を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてＮＥＭ（８．００当量、１３４ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後、ｍＣＤ７１－ＳＯ８１６１混合物の約０．４ｍｇアリコートを取り出し、ＴＢＳ　ｐＨ７．５でＺｅｂａスピン脱塩カラムを使用したゲルろ過により精製し、エルマンアッセイによって陽性及び陰性対照と並行して特徴付けることにより、ＳＯ１８６１取込みを入手した。バルクｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１混合物に調製したてのＮＥＭ溶液（５モル当量、１．４０μｍｏｌ、７０．１μｌの２．５ｍｇ／ｍｌ溶液）のアリコートを加えて反応をクエンチした。このコンジュゲートをＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００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－ＳＯ１８６１コンジュゲートを得た。この生成物を濃縮し、次に２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、０．２μｍでろ過し、次に、特性評価用、生成物試験用及び更なるコンジュゲーション用のアリコートに分配した。結果は、ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１コンジュゲートであった（全収率＝３７．３ｍｇ、８９％、ＳＯ１８６１対ｍＣＤ７１比＝３．８）。

【０２２７】

ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１

ＩＧＦ－１（４ｍｇ）をＤＰＢＳ　ｐＨ７．５（１．６０ｍｌ）に溶解させた。ＩＧＦ－１（３．８８ｍｇ、０．５１μｍｏｌ、４．８２１ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＳＯ１８６１－ヒドラゾン－ＮＨＳ溶液のアリコート（２．０ｍｇ／ｍｌ、５モル当量、２．５３μｍｏｌ、３．８０ｍｌ）を加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に２０℃で６０分間インキュベートした。コンジュゲーション後、調製したてのグリシン溶液のアリコート（２５当量、１３μｍｏｌ、９５μｌの１０ｍｇ／ｍｌ溶液）を加え、次にコンジュゲートをＺｅｂａ　１０ｍｌ　７Ｋ　ＭＷＣＯスピン脱塩カラムによりＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出して精製することにより、精製ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１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て新しいＥＣ値を確かめ、次に遠心ろ過（３，０００ｇ、２０℃、１０分間隔）により濃縮し、２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、０．２μｍでろ過し、特性評価用及び顧客試験用のアリコートに分配した。結果は、ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１コンジュゲートであった（全収率＝２．８３ｍｇ、７３％、Ｓ

Ｏ１８６１対ＩＧＦ－１比＝２．７）。
【０２２８】
ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ
ｈＣＤ７１のアリコート（６０ｍｇ、４．２０ｍｌ）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、０．３８μｍｏｌ、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、３．８μｍｏｌ）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、１９μｍｏｌ）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）。
【０２２９】
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、２μｍｏｌ、１０．０ｍｇ／ｍｌ）を調製したてのＴＨＰＰ溶液（５０ｍｇ／ｍｌ、１０モル当量、２０μｍｏｌ、８２．８μｌ）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ｐ
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）。
【０２３０】
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、０．２μｍ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）。
【０２３１】
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、０．３８μｍｏｌ、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、３．８μｍｏｌ）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、１９μｍｏｌ）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）。
【０２３２】

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、２μｍｏｌ、１０．０ｍｇ／ｍｌ）を調製したてのＴＨＰＰ溶液（５０ｍｇ／ｍｌ、１０モル当量、２０μｍｏｌ、８２．８μｌ）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）。

【０２３３】

ｈＣＤ７１－ＰＥＧ４－ＳＰＤＰのアリコート（２５ｍｇ、０．１６μｍｏｌ、０．９５ｍｇ／ｍｌ）に、ＤＭＤ－ＰＭＯ－ＳＨのアリコート（４．１ｍｇ／ｍｌ、４．０モル当量、０．６５μｍｏｌ、１．５９ｍｌ）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。約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－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２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、０．２μｍ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＝２８．２ｍｇ、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）。

【０２３４】

ｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１

供給されたままのｈＣＤ７１（５５．１ｍｇ、０．３７μｍｏｌ、８．１０ｍｇ／ｍｌ、６．８０ｍｌ）を、Ｚｅｂａスピン脱塩カラムを使用してＴＢＳ　ｐＨ７．５で溶出して緩衝液交換し、３ｍｇ／ｍｌに標準化した。ｈＣＤ７１（５０ｍｇ、０．３３μｍｏｌ、５．０４４ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＴＣＥＰ溶液のアリコート（２．００ｍｇ／ｍｌ、３モル当量、１μｍｏｌ）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２１０分間インキュベートした。インキュベーション後（ＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミドを加える前）、ｈＣＤ７１溶液の１．０ｍｇ（０．２０１ｍｌ）アリコートを取り出し、ＴＢＳ　ｐＨ７．５でＺｅｂａスピン脱塩カラムを使用したゲルろ過により精製した。このアリコートを紫外可視分析及びエルマンアッセイによって特徴付けた（２．２３ｍｇ／ｍｌ、チオール対ｈＣＤ７１比＝４．３５）。バルクｈＣＤ７１－ＳＨのアリコート（４２ｍｇ、０．２８μｍｏｌ、４．９７８ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミド溶液のアリコート（２．０ｍｇ／ｍｌ、８モル当量、２．２４μｍｏｌ、２．３２ｍｌ）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１２０分間インキュベートした。このコンジュゲーション反応の他に、２つの脱塩したｈＣＤ７１－ＳＨのアリコート（０．２５ｍｇ、０．０７７ｍｌ、１．６７ｎｍｏｌ）を、それぞれ陽性対照及び陰性対照としてＮＥＭ（８．００当量、１３．４ｎｍｏｌ、６．７μｌの０．２５ｍｇ／ｍｌ溶液）又はＴＢＳ　ｐＨ７．５緩衝液（６．７μｌ）と２０℃で１２０分間反応させた。インキュベーション後、ｈＣＤ７１－ＳＯ８１６１混合物の約０．４ｍｇアリコートを取り出し、ＴＢＳ　ｐＨ７．５でＺｅｂａスピン脱塩カラムを使用するゲルろ過により精製し、エルマンアッセイによって陽性及び陰性対照と並行して特徴付けることにより、ＳＯ１８６１取込みを入手した。バルクｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１混合物に、調製したてのＮＥＭ溶液のアリコート（５モル当量、１．４μｍｏｌの２．５ｍｇ／ｍｌ溶液）を加えて反応をクエンチした。このコンジュゲートをＺｅｂａ　４０Ｋ　ＭＷＣＯスピン脱塩カラムによりＤＰＢＳ　ｐＨ７．５で溶出して精製することにより、精製ｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１コンジュゲートを得た。生成物のアリコートをＢＣＡ比色アッセイにより分析して、新しいＥＣ２８０値を確かめた。次に、生成物を２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、０．２μｍでろ過し、次に、特性評価用

、生成物試験用及び更なるコンジュゲーション用のアリコートに分配した。結果は、ｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１コンジュゲートであった（全収率＝３７．８ｍｇ、８９％、ＳＯ１８６１対ｈＣＤ７１比＝４．２）。

【０２３５】

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。

【０２３６】

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４０，０００ｃｐｗで維持培地（ＤＭＥＭ培地＋Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ中１０％ＦＢＳ）に播き、３７℃にて５％CCO_2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、２４ｗｐの細胞をエクソンスキップ分析用に回収し、９６ｗｐで細胞生存能力を評価した。

【０２３７】

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１０００ｎｇの全ＲＮＡを使用し、適量のＲＮアーゼフリー水に希釈して８μｌ　ＲＮＡ希釈を生じさせた。プライミングプレミックスは、１μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）及び１μｌ特異的リバースプライマー（ＫＭ１５５については、ｈ５３Ｒ　５’－ＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－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℃で５分間加熱し、次に氷上で少なくとも１分間冷却した。０．５μｌ　ｒＲＮａｓｉｎ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、４．０μｌ　ＲＴ緩衝液、１．０μｌ　Ｔｅｔｒｏ　ＲＴ（Ｂｉｏｌｉｎｅ）及び４．５μｌ　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２０μｌ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、２．５μｌ　１０×ＳｕｐｅｒＴａｑ　ＰＣＲ緩衝液、０．５μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．１２５μｌ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）　１６．８７５μｌ　ＲＮアーゼフリー水の混合物に３μｌ　ｃＤＮＡを加え、１μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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’－ＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＧＧＧＣＡＧＣＴＴＧ－３’［配列番号７］及びｈ５３Ｒ　５’－ＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－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’－ＣＣＡＡＧＡ

ＧＧＣＡＴＴＧＡＴＡＴＴＣＴＣ－３’［配列番号９］を使用した。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、５μｌ　１０×ＳｕｐｅｒＴａｑ　ＰＣＲ緩衝液、１μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．２５μｌ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）、３８．２５μｌ　ＲＮアーゼフリー水の混合物に１．５μｌ　ＰＣＲ１試料を加え、２μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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’－ＣＣＣＡＴＡＡＧＣＣＣＡＧＡＡＧＡＧＣ－３’［配列番号１２］及びｈ５３Ｒ　５’－ＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－３’［配列番号１３］を使用した。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。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。代わりに、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において分離した。ゲルを画像化し、ＩｍａｇｅＪ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。

【０２３８】

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、５．０μｌ中の０．５μｇ　ＲＮＡに、各反応につき２０．０μｌの総容積が生じるように１０．０μｌ　ｄｄH_2O、４μｌ　５×ｉＳｃｒｉｐｔ（商標）Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｍｉｘ及び１．０μｌ　ｉＳｃｒｉｐｔ（商標）逆転写酵素（ＢｉｏＲａｄ）を加えた。ＲＴ－ＰＣＲを２５℃で５分間、４６℃で６０分間及び９５℃で２分間実行した。スキップ分析については、ＳａｐｐｈｉｒｅＡｍｐ（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、９．７μｌ　ＲＮアーゼフリー水、１２．５μｌの２×マスターミックス、０．４μｌの１０μＭ　ＦＷプライマー５’－ＡＣＣＣＡＧＴＣＴＡＣＣＡＣＣＣＴＡＴＣ－３’（配列番号１４）及び０．４μｌの１０μＭ　ＲＶプライマー５’－ＣＴＣＴＴＴＡＴＣＴＴＣＴＧＣＣＣＡＣＣＴＴ－３’（配列番号１５）をＰＣＲチューブに加え、混合し、その後、２５μｌの総容積が生じるように２μｌ　ｃＤＮＡ（５０ｎｇ）を加えた。これらの試料を、９４℃で１分と、９８℃で５秒、５５℃で５秒、７２℃で５秒を３５サイクルと、続く７２℃で１分のＰＣＲランに供した。試料を２μｌ　６×ローディング緩衝液と混合し、次に２％アガロースゲルに１６μｌをロードして、８０Ｖ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７８８ｂｐであり、スキップ産物は、５７５ｂｐである。

【０２３９】

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Ｓｐｅｃｔｒａ

Ｍａｘ　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（×１００）によって処理／未処理細胞の細胞生存率を計算した。

【０２４０】

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（ｉｖ）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。

【０２４１】

【表１２】

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

【０２４２】

結果（実施例１～５）

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（ｐｈｏｓｐｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）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（４μＭ）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）：２０μＭ　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、０．０８μＭ　ＤＭＤ－ＡＳＯ＋ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨで既に４０％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、２０μＭ　ＤＭＤ－ＰＭＯに曝露すると４％のスキップが生じたが、一方、１．２５μＭ　ＤＭＤ－ＡＳＯ＋ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨで既に５％のスキップが実現し、２０μＭでは３４％が実現したことから、非標的型ＳＯ１８６１－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１Ｂ）。

【０２４３】

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。

【０２４４】
【表１３】

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

% 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%	60%	67%	53%	40%
DMD-PMO	Femto	4%	0%	0%	0%	0%
DMD-PMO + SO1861-EMCH	Femto	34%	19%	5%	0%	0%

【０２４５】
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－ＳＳ－アミドを、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、４μＭ　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、４μＭ　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨと組み合わると、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、２１８１ｎＭ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１８．２～１０９ｎＭで既にスキップが１８～２４％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２０２２ｎＭ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、２．８～１６．９ｎＭ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、３６３ｎＭ　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０．５０ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ＋４μＭ　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１８．２～１０９ｎＭ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、ＤＭ８０３６筋管でも、ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ単独では３３７ｎＭで２１％のスキップ率に達したが（図４Ｂ、左のパネル）、一方、既に０．０８～０．４７ｎＭの曝露濃度のｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ＋４μＭ　ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨで明らかに測定可能なスキップが生じ（７～１３％）、これは１０１ｎＭでは最高３３％まで増加し（図４Ｂ、右のパネル）、１～２桁の改善を実現した。

【０２４６】

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。

【０２４７】

【表１４】

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	

【０２４８】

【表１５】

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	

【０２４９】

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＋８μＭ　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）。

【０２５０】
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。
【０２５１】
実施例３．ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１＋Ｍ２３Ｄ又はＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１＋Ｍ２３Ｄ
マウスＣＤ７１を標的とするＴＣＥＰ処理した抗ＣＤ７１モノクローナル抗体（ｍＣＤ７１－ＳＨ、図６Ｂ）に、それぞれＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ又はＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミドのいずれか（図６Ａ）をコンジュゲートして、ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ３．８）の２つの異なるコンジュゲートを作製した（図６Ｃ）。これらのコンジュゲートの各々を０～７２０ｎＭの濃度範囲で一定濃度の５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄと共にＣ２Ｃ１２分化型筋管に共投与した。これにより、ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１（ＳＯ１８６１－ＥＭＣＨ）＋５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄ（７１０ｎＭで１２％スキップ率、１４２ｎＭで８％スキップ率）（図７Ａ、左のパネル）及びｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１（ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌ）＋５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄ（７１０ｎＭで１９％スキップ率及び１４２ｎＭで１０％スキップ率）の組み合わせについて、エクソン２３スキッピングにおけるＭ２３Ｄ有効性が同程度に強力に促進されたことが明らかになった一方、５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄ単独（０ｎＭコンジュゲート）は、５％のスキップ率を示したに過ぎなかった（図７Ａ、右のパネル）。このデータは、ｍＣＤ７１－ＳＯ１８６１－Ｍａｌコンジュゲートを加えると、コンジュゲーション及びリンカーとは無関係に、Ｍ２３Ｄによって媒介されるオンターゲット効果、即ちエクソンスキップが著しく増加することを示している。
【０２５２】
次に、図６Ｄに示されるとおり、ＩＧＦ－１リガンドをＳＯ１８６１－ヒドラゾン－ＮＨＳにリジンを介してコンジュゲートして、ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ２．７）を作製した。ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１をＣ２Ｃ１２分化型筋管において、０～３３３３ｎＭの濃度範囲で５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄとの共投与にて試験した。これにより、ＩＧＦ－１－ＳＯ１８６１＋５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄの組み合わせについて、Ｍ２３Ｄ細胞質送達、即ちジストロフィンエクソン２３スキッピングの促進が明らかになった（３３３３ｎＭで１９％スキップ率、６６７ｎＭで１１％スキップ率、１３３ｎＭで８％スキップ率）（図７Ｂ）。
【０２５３】
まとめると、これらのデータは、抗体及び非抗体リガンドがコンジュゲートされた、即ち標的型ＳＯ１８６１が、共投与セッティングでは著しい効力促進、即ち筋細胞におけるＰＭＯペイロードのオンターゲット送達につながることを示している。
【０２５４】
実施例４．ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ－ＳＯ１８６１又はｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ－ＳＯ１８６１
ヒトＣＤ７１を標的とするＴＣＥＰ処理した抗ＣＤ７１モノクローナル抗体（ｈＣＤ７１－ＳＨ）にＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌを、システインを介してコンジュゲートし、ＰＥＧ４－ＳＰＤＰをリジンにコンジュゲートしてｈＣＤ７１－ＳＯ１８６１－ＰＥＧ４－ＳＰＤＰを生じさせた。ＤＭＤ－ＡＳＯ－ＳＨ又はＤＭＤ－ＰＭＯ－ＳＨも（図２Ｂ及び図２Ｃに先述したとおり）、ヒトＣＤ７１を標的とする抗ＣＤ７１モノクローナル抗体（ｈＣＤ７１）に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８Ａ、左のパネル；表Ａ６）及び０．０７８ｎＭ～６１０ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ（図８Ｂ、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、全くないか又はごく僅かのみあったことが明らかになった。しかしながら、４μＭ　ＳＯ１８６１－ＳＣ－ＭａｌをｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯ（図８Ａ、右のパネル；表Ａ７）又はｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ（図８Ｂ、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：既に約０．５ｎＭで、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が観察された。これは、１０９ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＡＳＯでは２９～４０％まで及び１０２ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯでは４～５％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。

【０２５５】

より関連性が高いことには、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８Ａ、左のパネル；表Ａ７）及び６１０ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ（図８Ｂ、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４μＭ　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９Ａ、右のパネル）及び１０２ｎＭ　ｈＣＤ７１－ＤＭＤ－ＰＭＯ＋ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌで３７～５７％のスキップ率（図９Ｂ、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、なおも測定可能であり、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。

【０２５６】

【表１６】

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% ImageJ 及び Femto 分析		[nM コンジュゲート]						
		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	% DMD エクソン 51 スキッピング率
	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	

【０２５７】
【表１７】

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% ImageJ 及び Femto 分析		**[nM コンジュゲート]**						
		109/ 102	**18.1/ 16.9**	**3.0/ 2.8**	**0.50/ 0.47**	**0.084/ 0.078**	**0.014/ 0.013**	% DMD エクソン 51 スキッピング率
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	

【０２５８】
実施例５．ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ（インビボ有効性）
ＣＤ－１雄マウスがｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ（ＤＡＲ１．２）の単回注射を受けた（図２）。加えて、媒体対照群が含まれた。
【０２５９】
図１０（Ａ～Ｃ）が示すとおり、媒体（群１）又はｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ（２．８０ｍｇ／ｋｇ　ＰＭＯ；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、１４日目又は２８日目も）エクソン２３スキップを示さなかった。
【０２６０】
このデータは、標的型ＳＯ１８６１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。
【０２６１】
ＣＤ－１マウスにおけるｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄのインビボ忍容性
コンジュゲートｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ（図２）を表Ａ２に詳述するとおり投与した。この試験の経過中、ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄで治療した１匹の動物（群２の残り６匹中）は、１１日目に死亡しているのが見つかり、２８日目には、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。１４日目の犠牲死時点で、群２におけるｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ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１１Ａ）。腎臓バイオマーカーＡＬＴの顕著な又は持続性の変化は明らかでなかった（図１１Ｂ）。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。
【０２６２】
方法（実施例６～７において実施されるとおり）
ＳＯ１８６１
ＳＯ１８６１は、サボンソウ（Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ　Ｌ）に由来し（Ｅｘｔｒａｓｙｎｔｈｅｓｅ、Ｆｒａｎｃｅ）、Ｓｙｍｅｒｅｓ（ＮＬ）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。
【０２６３】
ＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$の合成
ＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$の合成は、Ｓｙｍｅｒｅｓ（ＮＬ）により実施された。
【０２６４】
ＳＯ１８６１と抗体のコンジュゲーション
ｍＣＤ６３－ＳＯ１８６１の特注のコンジュゲート生産は、Ａｂｚｅｎａ（ＵＫ）により実施された。
【０２６５】
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（ＵＫ）により実施された。
【０２６６】
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、２００Å、１．７μｍ、４．６ｍｍ×１５０ｍｍ；移動相：緩衝液Ａ（０．２Ｍリン酸カリウム緩衝液、ｐＨ６．８、０．２Ｍ 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：０．３５ｍｌ／分；実行時間：１０分；検出ＵＶ：２１４ｎｍ、２４８ｎｍ、２６０ｎｍ及び２８０ｎｍ；カラムオーブン：３０℃；オートサンプラー：周囲；注入量：１０μＬ；試料調製：最終的な試料は、試料をＤＰＢＳで１．０ｍｇ／ｍｌに希釈することにより分析した。
【０２６７】
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、５μｍ 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：３．０ｋＶ、コーン電圧：１２０Ｖ、コーン温度：１４０℃、脱溶媒和温度：４５０℃、：流量：０．４ｍｌ／分：実行時間：１０分：検出：ＴＩＣ；カラムオーブン：６０℃；オートサンプラー：周囲；注入量：１０μＬ；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０．０５ｍｇ／ｍｌに希釈することにより分析した。
【０２６８】
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２１０～３２０ｎｍ）、ＰＤＡ（２１０～３２０ｎｍ）、Ｇ６１３０Ｂ ＭＳＤ（ＥＳＩ ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲９０～１５００、カラム：ＸＳｅｌｅｃｔ ＣＳＨ Ｃ１８（３０×２．１ｍｍ ３．５μｍ）流量：１ｍｌ／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_{0min}＝５％Ｂ、$t_{1.6min}$＝９８％Ｂ、t_{3min}＝９８％Ｂ、ポストラン：１．３分。
【０２６９】
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２

１０～３２０ｎｍ）、ＰＤＡ（２１０～３２０ｎｍ）、Ｇ６１３０Ｂ　ＭＳＤ（ＥＳＩ　ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲９０～１５００、カラム：ＸＳｅｌｅｃｔ　ＣＳＨ　Ｃ１８（３０×２．１ｍｍ　３．５μｍ）、流量：１ｍｌ／分、カラム温度：２５℃、溶出液Ａ：水中１０ｍＭ炭酸水素アンモニウム（ｐＨ９．５）；溶出液Ｂ：アセトニトリル、グラジエント：t_{0min}＝５％Ｂ、$t_{1.6min}$＝９８％Ｂ、t_{3min}＝９８％Ｂ、ポストラン：１．２分。

【０２７０】

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（２１０～３２０ｎｍ、２１０及び２２０ｎｍ）、ＰＤＡ（２１０～３２０ｎｍ）、Ｇ６１３０Ｂ　ＭＳＤ（ＥＳＩ　ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲９０～１５００、カラム：Ｗａｔｅｒｓ　Ｃ４　ＢＥＨ（５０×２．１ｍｍ　３．５μｍ）流量：１ｍｌ／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：

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

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

ポストラン：１．５分。

【０２７１】

分取方法

分取ＭＰ－ＬＣ方法１

機種：Ｂｕｃｈｉ　Ｒｅｖｅｌｅｒｉｓ（商標）分取ＭＰＬＣ；カラム：ＷａｔｅｒｓＸＳｅｌｅｃｔ（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_{0min}＝５０％Ｂ、t_{4min}＝５０％Ｂ、t_{16min}＝１００％Ｂ、t_{21min}＝１００％Ｂ；検出ＵＶ：２２０、２５４、２７０ｎｍ；ＵＶに基づくフラクション収集。

【０２７２】

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_{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：２２０、２４０、２８０ｎｍ；ＵＶに基づくフラクション収集。

【０２７３】

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、１０μ）；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％Ａ，$t_{2.5min}$＝１０％Ａ，t_{11min}＝５０％Ａ，t_{13min}＝１００％Ａ，t_{17min}＝１００％Ａ；検出：ＤＡＤ（２２０～３２０ｎｍ）；検出：ＭＳＤ（ＥＳＩ　ｐｏｓ／ｎｅｇ）質量範囲：１００～１０００；ＤＡＤに基づくフラクション収集。

【０２７４】

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。

【０２７５】

ＤＢＣＯ－（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－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ＤＢＣＯ酸（５０．０ｍｇ、０．１６４ｍｍｏｌ）の溶液にＤＩＰＥＡ（３４．０μＬ、０．１９５ｍｍｏｌ）及びＨＡＴＵ（６２．３ｍｇ、０．１６４ｍｍｏｌ）を加え、この混合物を１５分間撹拌した。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（５９．６ｍｇ、０．１９７ｍｍｏｌ）を加え、この反応混合物を室温で撹拌した。３０分後、反応混合物を水（１０．０ｍｌ）に加えた。得られた濃厚な懸濁液を遠心すると（５０００ＲＰＭ、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（１０．０ｍｌ）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（９０．０ｍｇ、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）：２．１２^{1}

【０２７６】

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－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－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（９０．０ｍｇ、０．１５２ｍｏｌ）をＤＣＭ（２．００ｍｌ）に溶解させて、０℃に冷却した。次に、ＴＦＡ（２．００ｍｌ、２６．０ｍｍｏｌ）を加え、この反応混合物を０℃で４０分間撹拌した。反応混合物を１０分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（５ｍｌ）で希釈した。得られた溶液を真空中で濃縮し、ＤＣＭ（２×５ｍｌ）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）

【０２７７】

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－１（１２），４（９），５，－７，１３，１５－ヘキサエン－１０－イン－２－イル｝－Ｎ－［２－（｛［（１Ｓ，４Ｅ）－シクロオクター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）－シクロオクター４－エン－１－イル

ＤＭＦ（１．００ｍｌ）及びＤＩＰＥＡ（２００μＬ、１．１５ｍｍｏｌ）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－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（０．１５２ｍｍｏｌ）の溶液にＴＣＯ４－ＮＨＳ炭酸塩（１０２ｍｇ、０．３８０ｍｍｏｌ）を加え、この混合物を室温で撹拌した。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（９０．０ｍｇ、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）
【０２７８】
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（８００μＬ）中のメチルテトラジン－ＮＨＳエステル（５０．０ｍｇ、０．１５３ｍｍｏｌ）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（４０．８ｍｇ、０．１８３ｍｍｏｌ）及びＤＩＰＥＡ（５３．０μＬ、０．３０６ｍｍｏｌ）を加えた。この反応混合物を室温で撹拌した。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、冷凍して一晩凍結乾燥させて、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）
【０２７９】
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撹拌した。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撹拌した。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、一晩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）
【０２８０】
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撹拌した。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、冷凍して一晩凍結乾燥させて、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）

【０２８１】

マウス抗ＣＤ６３（ｍＣＤ６３）ｍＡｂとＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$のコンジュゲーション

１．ｍＣＤ６３の調製

ｍＣＤ６３を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ（５０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を使用してＴＢＳで１０．０ｍｇ／ｍｌの最終濃度となるように緩衝液交換した。

【０２８２】

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。

【０２８３】

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。

【０２８４】

３．ＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$とのコンジュゲーション

ｍＣＤ６３を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ（５０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を使用してＤＰＢＳで最終濃度が１０．０ｍｇ／ｍｌ　ＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$（５．０当量、ＤＰＢＳ中１ｍＭ、ｐＨ７．４）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　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。

【０２８５】

【表１８】

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

【０２８６】
マウス抗ＣＤ６３（ｍＣＤ６３）ｍＡｂとＳＯ１８６１のコンジュゲーション
１．ｍＣＤ６３の調製
ｍＣＤ６３を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ（５０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を使用してＤＰＢＳ＋５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４で８．０ｍｇ／ｍｌの最終濃度となるように緩衝液交換した。
【０２８７】
２．ｍＣＤ６３のコンジュゲーション
ｍＣＤ６３を３７℃で約１５分間プレインキュベートし、続いてＴＣＥＰ（３．８当量）を加えた。この反応混合物を６．５ｍｇ／ｍｌに希釈し、次に３７℃で１時間インキュベートした。ｍＣＤ６３の還元を変性ＬＣ－ＭＳによりモニタした。反応物を２２℃で平衡化し、ＳＯ１８６１（８．０当量）を加えた。反応のモニタリングを変性ＬＣ－ＭＳで実施し、反応が完了したとき、それをＤＴＴ（１００当量）でクエンチした。
【０２８８】
３．ｍＣＤ６３コンジュゲートの精製
この反応混合物をＰ２脱塩カラムによりＤＰＢＳを使用して直接精製した。コンジュゲートをＳＥＣ及び変性ＬＣ－ＭＳにより特徴付け（ＤＡＲの決定、最終的な吸光係数）、次にＶｉｖａｓｐｉｎ（５０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を使用して１０ｍｇ／ｍｌを上回るまで濃縮し、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。
【０２８９】

【表１９】

試験	結果
SEC (%単量体)	100
LC-MS (MW)	構造に一致
HIC (平均 DAR)	N/A
LC-MS (平均 DAR)	4.08
UV (平均 DAR)	N/A
エンドトキシン (EU/mg)	0.629
容積 (ml)	1.65
濃度 (mg/ml)	10.0
量 (mg)	16.5
収率 (%)	74.0

【０２９０】
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（５０ｋＤａ　ＭＷＣＯ）を使用してＴＢＳで１０．０ｍｇ／ｍｌの最終濃度となるように緩衝液交換した。
【０２９１】
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。
【０２９２】
　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。
【０２９３】
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。
【０２９４】

【表２０】

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
エンドトキシン (EU/mg)	1.418
容積 (ml)	4.6
濃度 (mg/ml)	10.76
量 (mg)	49.54
収率 (%)	69.7

【０２９５】
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％CO_2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、４８時間インキュベートした。処理から合計４８時間経った後、２４ｗｐの細胞をエクソンスキップ分析用に回収し、９６ｗｐで細胞生存能力を評価した。
【０２９６】
エクソン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１～５において実施されるとおり）に記載したとおり実施した。
【０２９７】
細胞生存能力（マウスインビトロ）
上記で「方法」（実施例１～５において実施されるとおり）に記載したとおり実施した。
【０２９８】
結果（実施例６～７）
実施例６．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ＤＢＣＯ－（Ｍ２３Ｄ）$_2$を図１２に示されるとおり作製した。ＤＢＣＯ－（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１３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１４Ａ、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１４Ｂ、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、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１４Ａ、左のパネル）、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１４Ｂ、左のパネル）。ＣＴＧアッセイで決定したとき、処理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。

【０２９９】

実施例７．ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１＋Ｍ２３Ｄ又はｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ（インビトロ）

マウスＣＤ６３を標的とする抗ＣＤ６３モノクローナル抗体に、ＳＯ１８６１－ＳＣ－ＭａｌをコンジュゲートしてｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．１）を作製した（コンジュゲーション手順については図１５を参照のこと）。ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１を一定濃度の５００ｎＭ　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）と共に分化したＣ２Ｃ１２マウス筋管に共投与した。これにより、４８時間の処理後に６６２ｎＭのｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１で２８％のスキップ率及び１．６ｎＭで２％のスキップ率のエクソン２３スキッピングの促進が明らかになり（図１６Ａ）、一方、５００ｎＭ　Ｍ２３Ｄ単独ではエクソンスキップ活性が見られなかった（図１６Ｃ）。これらのデータは、ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１がＭ２３Ｄの細胞質送達のオンターゲット促進を誘導するため、エクソン２３スキッピングの促進が誘導されることを実証している。

【０３００】

次に、ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１（図１５）を一定濃度の８０ｎＭ　ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄと共投与した（図１３）。８０ｎＭ　ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄ単独による処理では、エクソンスキップは見られなかった（図１６Ｃ）。ｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１を８０ｎＭ　ｍＣＤ７１－Ｍ２３Ｄと共投与すると、４８時間の治療後に６６２ｎＭのｍＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１で１０％のスキップ率及び５．３ｎＭでもなお４％のスキップ率のエクソン２３スキッピングの促進が明らかになった（図１６Ｂ）。

【０３０１】

まとめると、これらのデータは、リガンド１をコンジュゲートしたＳＯ１８６１（即ち標的型ＳＯ１８６１）を、リガンド２をコンジュゲートしたＰＭＯペイロード（即ち標的型Ｍ２３Ｄ）と組み合わせると、著しい効力の促進につながることを示している（標的型２成分システムの例）。

【０３０２】

方法（実施例８～９において実施されるとおり）

ＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミド

ＳＯ１８６１は、サボンソウ（Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ　Ｌ）に由来し（Ｅｘｔｒａｓｙｎｔｈｅｓｅ、Ｆｒａｎｃｅ）、Ｓｙｍｅｒｅｓ（ＮＬ）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。

【０３０３】

ＳＯ１８６１と抗体のコンジュゲーション

ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１の特注のコンジュゲート生産は、Ｆｌｅｅｔ　Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ（ＵＫ）により実施された。

【０３０４】

５’－チオール－ＤＭＤ－ＡＳＯ、５’－ジスルフィドアミド－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）及び３’－ジスルフィドアミド－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１、２、３、４及び５）と抗体のコンジュゲーション

ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（

１）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（２）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（３）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（４）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯの特注のコンジュゲート生産は、Ｆｌｅｅｔ Ｂｉｏ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ（ＵＫ）により実施された。

【０３０５】

分析及び調製方法

コンジュゲートを紫外可視分光光度法、ＢＣＡ比色アッセイ、分析的ＳＥＣ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロッティング及び尿素－ＰＡＧＥゲル電気泳動で特徴付けた。ＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミドとのコンジュゲーション前、還元したｍＡｂ－ＳＨ（ｈＣＤ７１－ＳＨ又はｈＣＤ６３－ＳＨのいずれか）を紫外可視分光光度法及びエルマンアッセイで分析した。

【０３０６】

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（ＥＣ）値で使用して決定した：

実験的に決定されたモルε４９５＝５８，７００Ｍ－１ｃｍ－１及びＲｚ２８０：４９５＝０．４２８をＳＡＭＳＡ－フルオレセインに使用した。

エルマン試薬（ＴＮＢ）；モルε４１２＝１４，１５０Ｍ－１ｃｍ－１

ピリジン２－チオン（ＰＤＴ）；モルε３６３＝８，０８０Ｍ－１ｃｍ－１

加えて、ＤＭＤオリゴヌクレオチド取込みを、紫外可視分光光度法及びＢＣＡ比色アッセイにより以下のε[265]文献値を使用して決定した：

ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）；モルε３６３＝３１８，０５０（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

ＤＭＤ－ＰＭＯ（２）；モルε３６３＝３１８，１２０（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

ＤＭＤ－ＰＭＯ（３）；モルε３６３＝３０８，１８０（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

ＤＭＤ－ＰＭＯ（４）；モルε３６３＝２４７，７１０（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

ＤＭＤ－ＰＭＯ（５）；モルε３６３＝２０７，８９０（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

ＤＭＤ－ＡＳＯ；モルε３６３＝３１０，００（ｍｇ／ｍｌ）－１ｃｍ－１

【０３０７】

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。

【０３０８】

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ＰＡＧＥＢｌｕｅ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。

【０３０９】

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、調製したて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。

【０３１０】

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。

【０３１１】

ｈＡｂ－ＳＣ－ＳＯ１８６１

ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１など、ｈＡｂ－ＳＯ１８６１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－ＳＣ－ＳＯ１８６１について例として示すものである。

【０３１２】

ｈＡｂのアリコートをＴＢＳ ｐＨ７．５で緩衝液交換し、５ｍｇ／ｍｌに標準化した。ｈＡｂのアリコート（９５．８ｍｇ、６．３９×１０$^{-4}$ｍｍｏｌ、４．９４ｍｇ／ｍｌ）に、ＴＢＳ ｐＨ７．５（１ｍｇ／ｍｌ）中に調製したてのＴＣＥＰのアリコート（３．１８当量、２．０３×１０$^{-3}$ｍｍｏｌ、０．５８ｍｇ、０．５８２ｍｌ）を穏やかに撹拌しながら加えた。この混合物を回転混合しながら２０℃で２１０分間インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物の１．０ｍｇアリコート（０．２０３ｍｌ）を取り出し、Ｚｅｂａ ７Ｋスピン脱塩カラムによりＴＢＳ ｐＨ７．５で溶出して精製し、紫外可視及びエルマンアッセイによって特徴付けた（３．４０７ｍｇ／ｍｌ、ＳＨ対ｈＡｂ比＝４．８）。このバルク反応物に、ＴＢＳ ｐＨ７．５（２ｍｇ／ｍｌ）中に調製したてのＳＯ１８６１－ＳＣ－マレイミドのアリコート（６ｍｏｌ当量、３．７９×１０$^{-3}$ｍｍｏｌ、８．３ｍｇ、４．１４ｍｌ）を穏やかに撹拌しながら加え、この混合物を短時間ボルテックスし、次に２０℃で１２０分間インキュベートした。２×０．２５ｍｇの脱塩したｈＡｂ－ＳＨ（１．６７×１０$^{-6}$ｍｍｏｌ、０．０７３ｍｌ）を分配して分け、ＮＥＭ（８ｍｏｌ当量、１．３４×１０$^{-5}$ｍｍｏｌ、６．７μｌ、０．２５ｍｇ／ｍｌ）又はＴＢＳ ｐＨ７．５（６．７μｌ）と反応させて、次に、それぞれ陽性及び陰性反応対照としてのバルクコンジュゲーションと並行してインキュベートした。インキュベーション後、０．５ｍｇアリコート（約０．１００ｍｌ）のｈＡｂ－ＳＣ－ＳＯ１８６１混合物を取り出し、Ｚｅｂａ ７Ｋスピン脱塩カラムによりＴＢＳ ｐＨ７．５で溶出して精製し、エルマンアッセイにより陽性及び陰性対照と並行して特徴付けて、ＳＯ１８６１取込みを入手した。反応後、バルクｈＡｂ－ＳＣ－ＳＯ１８６１混合物に調製したてのＮＥＭ溶液のアリコート（５ｍｏｌ当量、３．１６×１０$^{-3}$ｍｍｏｌ、１５８μｌ

の２．５ｍｇ／ｍｌ溶液）を加えて反応をクエンチした。クエンチした反応混合物を消毒済みの２．６×４０ｃｍ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００カラムを使用することによりＤＰＢＳ ｐＨ７．５で溶出して精製した。精製したｈＡｂ－ＳＣ－ＳＯ１８６１を回収し、紫外可視分光光度法により分析した。次にＶｉｖａｓｐｉｎ ２０遠心フィルタを使用して２．５ｍｇ／ｍｌ超に濃縮し、２．５ｍｇ／ｍｌに標準化し、層流下に０．２μｍでろ過した。この生成物を生成物試験用、特性評価用及び更なるコンジュゲーション作業用にアリコートに分配した。結果は以下であった：
ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１（全収率＝７８．４ｍｇ、８２％、ＳＯ１８６１対ｈＣＤ７１比＝４．０）
ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１コンジュゲート（全収率＝５８．８ｍｇ、ＳＯ１８６１対ｈＣＤ６３比＝４．８）。

【０３１３】
ｈＡｂ－ＤＭＤ－オリゴヌクレオチド
ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）、ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（１－５）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ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。

【０３１４】
ｈＡｂ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。ｈＡｂのアリコート（ｈＣＤ７１、２０．０ｍｇ、１．３３×１０－４ｍｍｏｌ、２．５ｍｇ／ｍｌ）に、調製したてのＰＥＧ４－ＳＰＤＰ溶液のアリコート（１０．０ｍｇ／ｍｌ、１０．０モル当量、１．３３×１０－３ｍｍｏｌ、０．０７５ｍｌ）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（１０ｍｇ／ｍｌ、５０モル当量、６．６５×１０－３ｍｍｏｌ、８．１μｌ）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 ４０Ｋスピン脱塩カラムを使用してＴＢＳ ｐＨ７．５で溶出し、０．４５μｍ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、２１．２ｍｇ、２．０４ｍｇ／ｍｌ、ＳＰＤＰ対ｈＣＤ７１比＝３．９）。ｈＡｂ－ＳＰＤＰは、すぐに使用した。

【０３１５】
別途、所望のＤＭＤオリゴヌクレオチド（ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）－５’－アミド、２０．２ｍｇ、１．９９×１０－３ｍｍｏｌ、１０．００ｍｇ／ｍｌｌ）をＴＢＳ ｐＨ７．５を使用して再構成し、単一のアリコートにプールし、紫外可視により分析して、ε_{280}、ε_{260}及びこれらの比$\varepsilon_{260}/\varepsilon_{280}$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（５０ｍｇ／ｍｌ、１０モル当量、１．９９×１０－２ｍｍｏｌ，８３μｌ）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 ｐＨ７．５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、１６．４ｍｇ、８１％、チオール対ＤＭＤ－ＰＭＯ（１）比＝１．０２）。

【０３１６】
ｈＡｂ－ＳＰＤＰ（ｈＣＤ７１－ＳＰＤＰ、１０．２ｍｇ、６．７９×１０－５ｍｍｏｌ、２．０４ｍｇ／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、２．７３ｍｇ／ｍｌ、８．０モル当量、５．４３×１０－４ｍｍｏｌ、２．０１ｍｌ）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２．６×６０ｃ

ｍ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ＰＧカラムを使用してＤＰＢＳ ｐＨ７．５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（３０Ｋ 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：

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）

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）

ｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（全収率＝６０％、ＤＭＤ－ＡＳＯ対ｈＣＤ６３比＝２．３）

【０３１７】

細胞培養（ヒト）

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１～５において実施されるとおり）に記載したとおり培養した。

【０３１８】

固定化したＤＭＤ罹患ドナー（ＫＭ１３２８）からのヒト筋芽細胞を、２０％ウシ胎仔血清（Ｇｉｂｃｏ、Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ）、５０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、２５μｇ／ｍｌフェチュイン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５ｎｇ／ｍｌヒト上皮成長因子（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、０．５ｎｇ／ｍｌ塩基性（ｂａｓｉｓ）線維芽細胞成長因子（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５μｇ／ｍｌインスリン（Ｓｉｇｍａ）及び０．２μｇ／ｍｌデキサメタゾン（Ｓｉｇｍａ）を補足した８０ｍｌ １９９培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び３２０ｍｌ ＤＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を含有する自家製の成長培地で培養した。分化のため、１ｍｌのＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）当たり０．１ｍｇ Ｃｏｒｎｉｎｇ（商標）Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）基底膜マトリックス（Ｃｏｒｎｉｎｇ）と共に３７℃で６０分間インキュベートすることによって調製したものである、Ｍａｔｒｉｇｅｌをコートした表面上に細胞を播種した。１００％コンフルエンスになったところで、成長培地を、２％ウシ胎仔血清（Ｇｉｂｃｏ）、１０μｇ／ｍｌインスリン（Ｓｉｇｍａ）及び５０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）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き処理を開始した）。

【０３１９】

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１０００ｎｇ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８μｌＲＮＡ希釈を生じさせた。

【０３２０】
ＫＭ１５５筋管におけるエクソン５１及びエクソン５３スキップ分析について、プライミングプレミックスは、１μｌ ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）及び１μｌ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’－ＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－３’［配列番号５］；エクソン５３：ｈ５５Ｒ ５’－ＡＴＣＣＴＧＴＡＧＧＡＣＡＴＴＧＧＣＡＧＴＴ－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。０．５μｌ ｒＲＮａｓｉｎ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、４．０μｌ ５×ＲＴ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）、１．０μｌ Ｍ－ＭＬＶ ＲＴ（Ｐｒｏｍｅｇａ）及び４．５μｌ 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２０μｌ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、２．５μｌ １０×ＳｕｐｅｒＴａｑ ＰＣＲ緩衝液、０．５μｌ ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．１２５μｌ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）、１６．８７５μｌ ＲＮアーゼフリー水及び１μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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３μｌ 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’－ＣＴＣＣＧＧＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＧＴＴＣ－３’［配列番号５］；エクソン５３：ｈ５０Ｆ ５’－ＡＧＧＡＡＧＴＴＡＧＡＡＧＡＴＣＴＧＡＧＣ－３’［配列番号２０］及びｈ５５Ｒ ５’－ＡＴＣＣＴＧＴＡＧＧＡＣＡＴＴＧＧＣＡＧＴＴ－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、５μｌ １０×ＳｕｐｅｒＴａｑ ＰＣＲ緩衝液、１μｌ ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．２５μｌ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）、３８．２５μｌ ＲＮアーゼフリー水及び２μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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１．５μｌ 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’－ＣＣＡＧＣＣＡＣＴＣＡＧＣＣＡＧＴＧ－３’［配列番号１０］及びｈ５２Ｒ２５’－ＴＴＣＴＴＣＣＡＡＣＴＧＧＧＧＡＣＧＣ－３’［配列番号１１］、エクソン５３：ｈ５２Ｆ ５’－ＣＣＣＣＡＧＴＴＧＧＡＡＧＡＡＣＴＣＡＴＴ－３’［配列番号２１］及びｈ５４Ｒ ５’－ＣＣＡＡＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＴＡＴＴＣＴＣ－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Ｆｅｍｔｏ 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。代わりに、Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ ２１００をＤＮＡ１０００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４０８ｂｐ（ＫＭ１５５）であり、スキップ産物は１７５ｂｐ（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４３８ｂｐ（ＫＭ１５５）であり、スキップ産物は２２６ｂｐ（ＫＭ１５５）である。

【０３２１】
ＫＭ１３２８筋管におけるエクソン５１スキップ分析について、プライミングプレミックスは、１μｌ ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）及び１μｌ特異的リバースプライマー（ＫＭ１３２８について、エクソン５１：ｈ５７Ｒ ５’－ＴＣＴＧＡＡＣＴＧＣＴＧＧＡＡＡＧＴＣＧ－３’［配列番号２２］）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。０．５μｌ ｒＲＮａｓｉｎ（Ｐｒｏｍｅｇａ）、４．０μｌ ５×ＲＴ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）、１．０μｌ Ｍ－ＭＬＶ ＲＴ（Ｐｒｏｍｅｇａ）及び４．５μｌ 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２０μｌ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７０℃で１０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、２．５μｌ１０×ＳｕｐｅｒＴａｑ　ＰＣＲ緩衝液、０．５μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．１２５μｌ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）１６．８７５μｌ　ＲＮアーゼフリー水及び１μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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３μｌ　ｃＤＮＡを加えた。以下のプライマーを使用した：ＫＭ１３２８について、エクソン５１：ｈ４８Ｆ　５’－ＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＧＧＧＣＡＧＣＴＴＧ－３’［配列番号７］及びｈ５７Ｒ　５’－ＴＣＴＧＡＡＣＴＧＣＴＧＧＡＡＡＧＴＣＧ－３’［配列番号２２］。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、１．５μｌ　ＰＣＲ１試料を、５μｌ　１０×ＳｕｐｅｒＴａｑ　ＰＣＲ緩衝液、１μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．２５μｌ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＴＡＱ－ＲＯ（５Ｕ／μｌ；Ｒｏｃｈｅ）、３８．２５μｌ　ＲＮアーゼフリー水及び２μｌ（１０ｐｍｏｌ／μｌ）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加えた。以下のプライマーを使用した：ＫＭ１３２８について、エクソン５１：ｈ４９Ｆ２　５’－ＡＡＡＣＴＧＡＡＡＴＡＧＣＡＧＴＴＣＡＡＧＣ－３’［配列番号２３］及びｈ５４Ｒ　５’－ＣＣＡＡＧＡＧＧＣＡＴＴＧＡＴＡＴＴＣＴＣ－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９０秒を３２サイクル、その後７２℃で７分のＰＣＲランに供した。Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　２１００をＤＮＡ１０００チップと共に使用して（ラボ・オン・チップ；Ａｇｉｌｅｎｔ）、特異的ＰＣＲ断片を分析することによりエクソンスキッピングレベルを定量化した。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７９３ｂｐ（ＫＭ１３２８）であり、スキップ産物は５６０ｂｐ（ＫＭ１３２８）である。

【０３２２】

結果（実施例８～９）

実施例８．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、ドリサペ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（ｐｈｏｓｐｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）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１７Ａ～図１７Ｄ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１８Ａ、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スキッピング率が明らかになった（図１８Ａ、右のパネル；表Ａ９）。同様に、ｈＣＤ７１－５’－Ｓ

Ｓ－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１８Ｂ、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１８Ｂ、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。

【０３２３】

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、Ｅｃｈｉｇｏｙａ 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、Ｅｃｈｉｇｏｙａ 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１７Ａ～図１７Ｄ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１９Ａ、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１９Ａ、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％まで増加し（図１９Ｂ、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１９Ｂ、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％まで増加し（図１９Ｃ、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った（０．０％）（図１９Ｃ、左のパネル；表Ａ８）。このように、ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌをｈ

ＣＤ７１－３’－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改善され、顕著なエクソン５１スキッピングが誘導される。

【０３２４】

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１７Ａ～図１７Ｄ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スキッピングが促進されることが明らかになった：６００ｎＭ 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２０Ａ、左のパネル；表Ａ８）、２．７８ｎＭ 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２０Ａ、右のパネル；表Ａ９）。同様に、６００ｎＭ 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２０Ｂ、左のパネル；表Ａ８）、２．７８ｎＭ ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（５）＋ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌで既に（図２０Ｂ、右のパネル；表Ａ９）、６．０％のエクソン５３スキッピング率となり、これは１００ｎＭ ｈＣＤ７１－３’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯ（５）では８．４％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促進され、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。

【０３２５】

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。

【０３２６】

【表２１】

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

% 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	

【０３２７】

【表２２】

表 A9: ヒト筋管における抗 CD71 コンジュゲート型 DMD オリゴヌクレオチドのスキップ有効性

% 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**	**0.077**	**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
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
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

% DMD エクソン 51 スキッピング率

% DMD エクソン 53 スキッピング率

【０３２８】
実施例９．ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ＋ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１又はｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ＋ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１（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又はヒトＣＤ６３を標的とする抗ＣＤ６３モノクローナル抗体のいずれかにＤＭＤ－ＡＳＯ－ＳＨをコンジュゲートして、それぞれｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．１）及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ（ＤＡＲ２．３）を生成した（コンジュゲーション手順については図１７Ａ～図１７Ｄを参照のこと）。ＳＯ１８６１－ＳＣ－Ｍａｌも、ヒトＣＤ７１を標的とする抗ＣＤ７１モノクローナル抗体又はヒト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ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．０）及びｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１（ＤＡＲ４．８）を作製した（コンジュゲーション手順については図２１を参照のこと）。非ＤＭＤ（健常）ドナー（ＫＭ１５５）からの分化したヒト筋管に対し、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯ及びｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＰＭＯを、一定濃度のそれぞれ１００ｎＭ ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１又はｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１と共投与した。際立つことに、ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯを１００ｎＭ ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１と共投与すると、０．４６ｎＭ ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯで既に２８．７％のエクソンスキップ率と、エクソン５１スキッピングが促進されることが明らかとなり、これは１６．６～１００ｎＭ ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯでは５０．０～６８．１％のエクソンスキップ率まで増加した（図２２Ａ；表Ａ１０）。ｈＣＤ６３－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯを１００ｎＭ ｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１と共投与すると、１６．６ｎＭで２９．２％のエクソンスキップ率と、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（図２２Ｂ；表Ａ１０）。これらのデータは、ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１及びｈＣＤ７１－ＳＣ－ＳＯ１８６１がｈＣＤ７１標的型又はｈＣＤ６３標的型ＤＭＤ－ＡＳＯのオンターゲット細胞質送達の促進を誘導するため、エクソン５１スキッピングの促進が誘導されることを示している。
【０３２９】
次に、漸増したコンジュゲート及び一定濃度での共投与したコンジュゲートを切り替えた。非ＤＭＤ（健常）ドナー（ＫＭ１５５）からの分化したヒト筋を、一定濃度の５５．６ｎＭ ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯと組み合わせたｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１で処理した。これにより、１６．６ｎＭ ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１で７２．６％のエクソンスキップ率、２．７８ｎＭで５３．１％のエクソンスキップ率、０．４６ｎＭでなおも２１．０％のエクソンスキップ率と、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（図２３Ａ；表Ａ１１）。より際立つことに及び関連性が高いことに、ＤＭＤ罹患ドナー（ＫＭ１３２８）からの分化した筋管では、ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１を一定濃度の５５．６ｎＭ ｈＣＤ７１－５’－ＳＳ－ＤＭＤ－ＡＳＯと共投与すると、０．４６ｎＭ ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１で既に５３．８％のスキップ率となり、これは１６．６ｎＭで９３．４％のスキップ率まで増加し、６００ｎＭ ｈＣＤ６３－ＳＣ－ＳＯ１８６１では９７．０％スキップ率となった（図２３Ｂ、表Ａ１１）。
【０３３０】
まとめると、これらのデータは、リガンド１コンジュゲート型オリゴヌクレオチドペイロード（即ちｈＣＤ７１標的型又はｈＣＤ６３標的型のいずれかのＤＭＤ－ＡＳＯ）をリガンド２コンジュゲート型ＳＯ１８６１（即ちｈＣＤ７１標的型又はｈＣＤ６３標的型のいずれかのＳＯ１８６１）と組み合わせるか又はその逆、即ちリガンド２コンジュゲート型オリゴヌクレオチドペイロードをリガンド１コンジュゲート型ＳＯ１８６１と組み合わせると、ヒト筋管における、具体的にはＤＭＤ罹患ドナーからの分化した筋管など、疾患関連細胞系における効力の著しい促進につながることを示している（２標的２成分システムの例）。

【０３３１】
【表２３】

表 A10: 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 分析)	[nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO 又は hCD63-5'-SS-DMD-ASO]						
	100	16.6	2.78	0.46	0.077	0.013	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.1) + 100 nM hCD63-SC-SO1861 (DAR4.8) (KM155)	50.0	68.1	29.8	28.7	0.0	0.0	% DMD エクソン 51 スキッピング率
hCD63-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.3) + 100 nM hCD71-SC-SO1861 (DAR4.0) (KM155)	6.9	29.2	0.0	0.6	0.0	0.0	

【０３３２】
【表２４】

表 A11: 抗 CD61-SC-SO1861 の抗 CD71-コンジュゲート型 DMD オリゴ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 hCD63-SC-SO1861]						
		600	100	16.6	2.78	0.46	0.077	
hCD63-SC-SO1861 (DAR4.8) + 55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.1) (KM155)	Femto	61.3	58.9	72.6	53.1	21.0	0.7	% DMD エクソン 51 スキッピング率
hCD63-SC-SO1861 (DAR4.8) + 55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO (DAR2.1) (KM1328)	ラボ・オン・チップ	97.0	95.5	93.4	89.3	53.8	0.7	

【０３３３】
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
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.

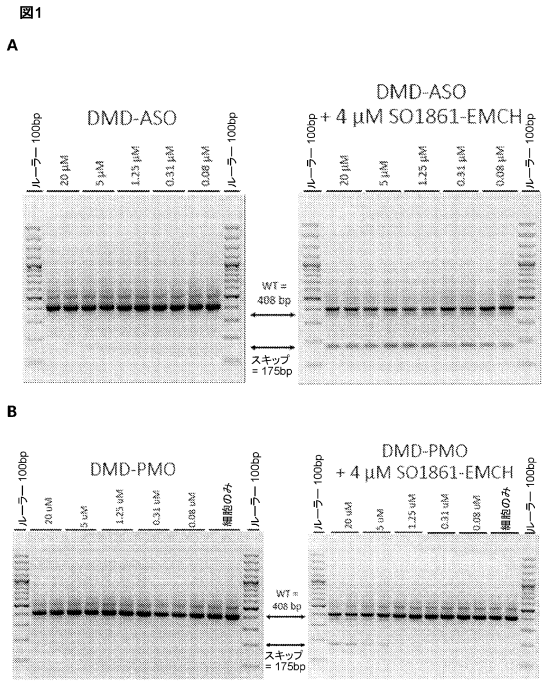
01.018
Slordal L, Spigset O. Heart failure induced by non-cardiac drugs, Drug Saf 2006;Volume 29(7):pp.567-86, doi:10.2165/00002018-200629070-00003
Ebner et al., Strategies for Skeletal Muscle Targeting in Drug Discovery, Current Pharmaceutical Design 2015, Volume 21(10), pp.1327-1336, DOI:10.2174/1381612820666140929095755
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. (2

021 Apr), Volume 22(8):4236, doi:10.3390/ijms22084236
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, Mo

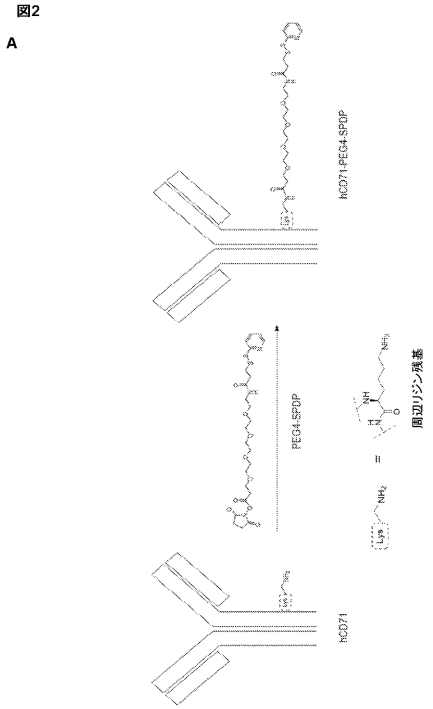
ｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ２５（１１），ｐｐ．２５６１ －２５７２ （２０１７），ＤＯＩ：１０．１０１６／ｊ．ｙｍｔｈｅ．２０１７．０７．０１４

【図面】

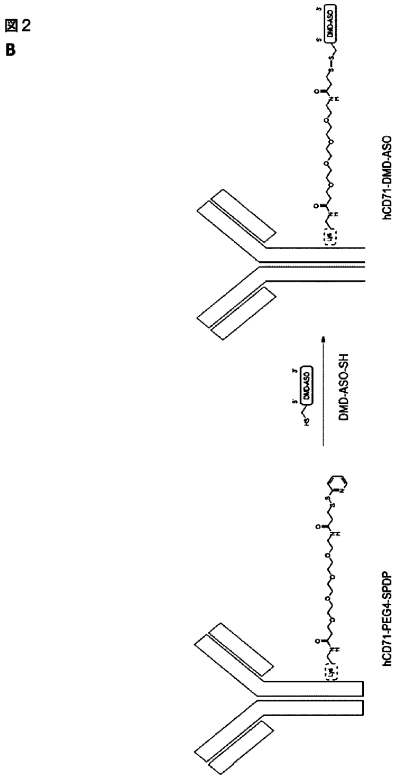
【図１】



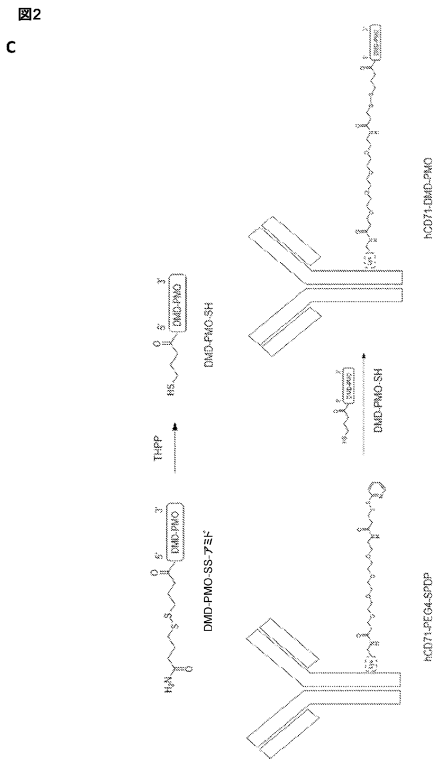
【図２Ａ】



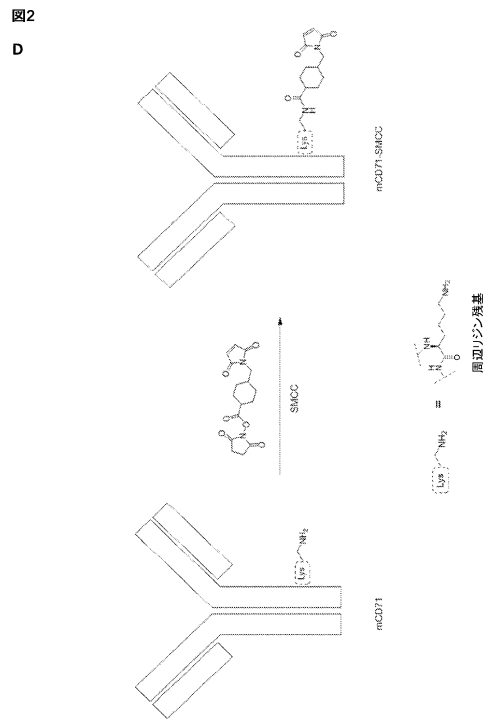
【図２Ｂ】



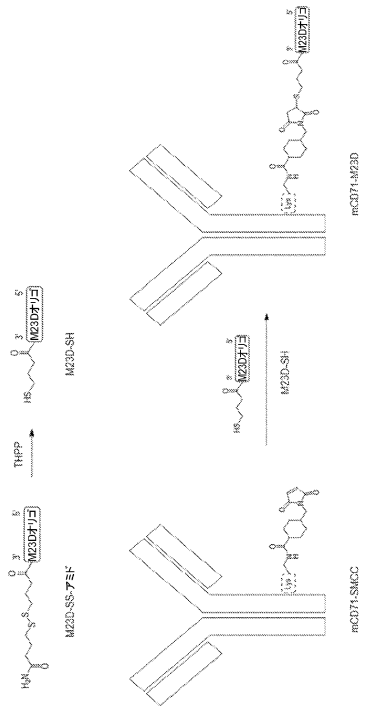
【図２Ｃ】



【図２Ｄ】

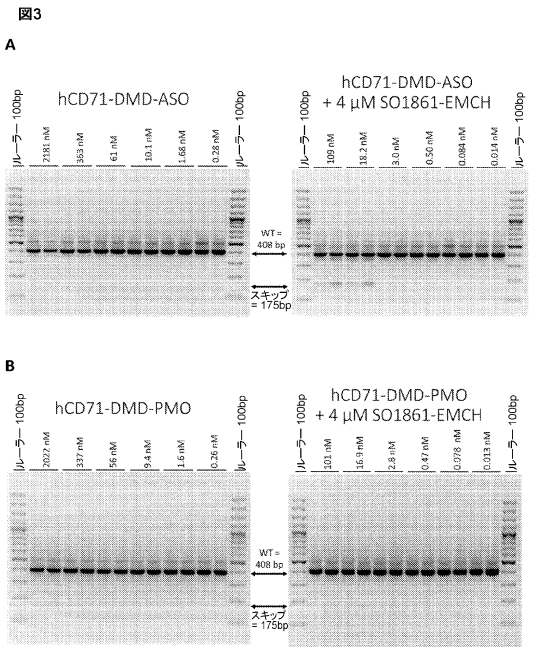


【図２Ｅ】



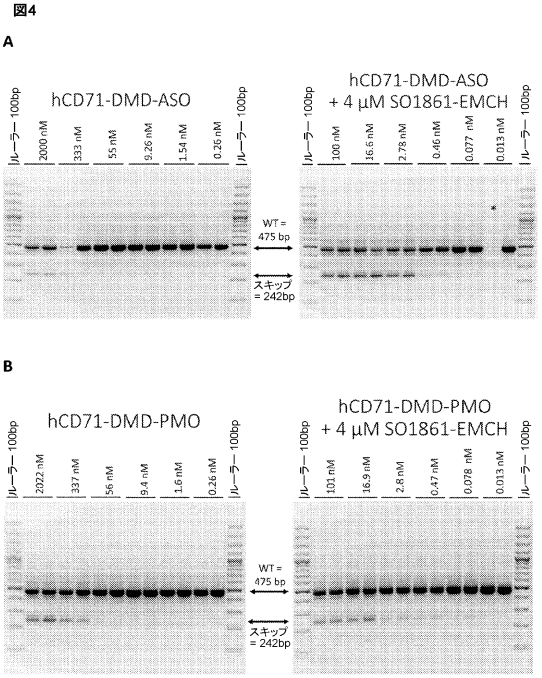
【図３】

図3



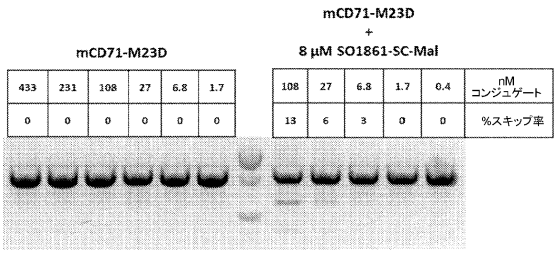
【図４】

図4



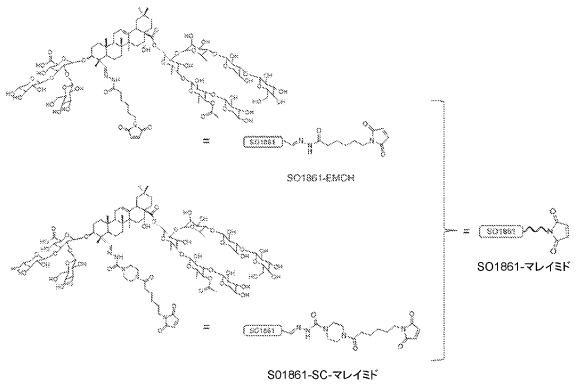
【図５】

図5



【図６Ａ】

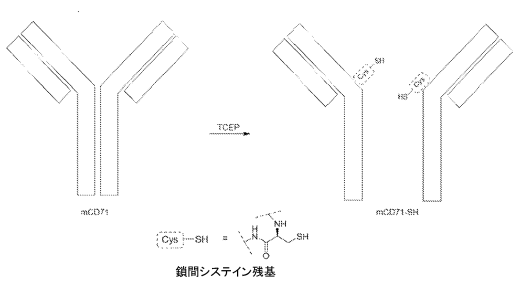
図6



【図６Ｂ】

図6

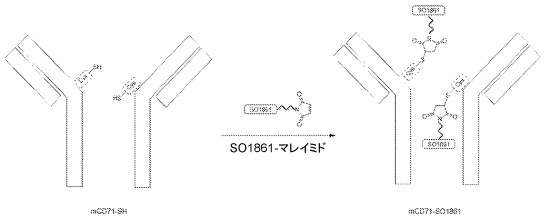
B



【図６Ｃ】

図6

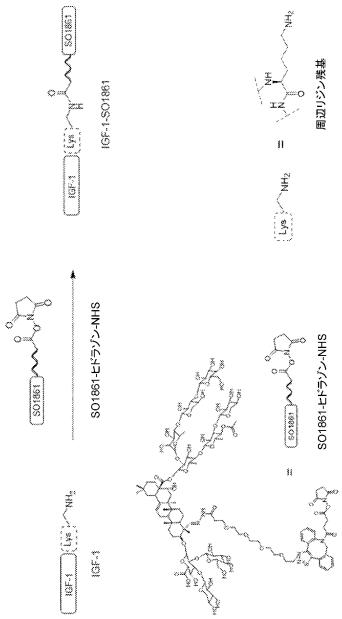
C



【図６Ｄ】

図6

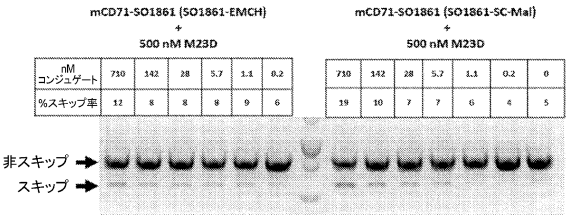
D



【図７】

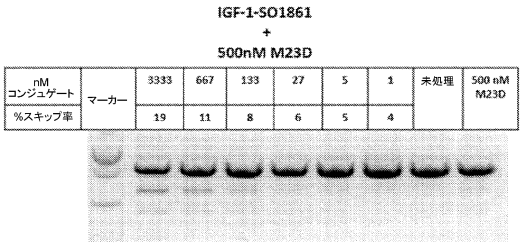
図7

A



nM コンジュゲート	710	142	28	5.7	1.1	0.2	710	142	28	5.7	1.1	0.2	0
%スキップ率	12	8	8	8	9	6	19	10	7	7	6	4	5

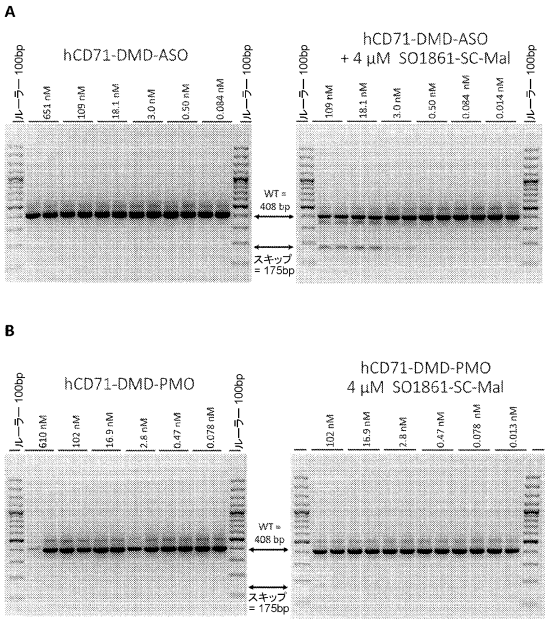
B



nM コンジュゲート	マーカー	3333	667	133	27	5	1	未処理	500 nM M23D
%スキップ率		19	11	8	6	5	4		

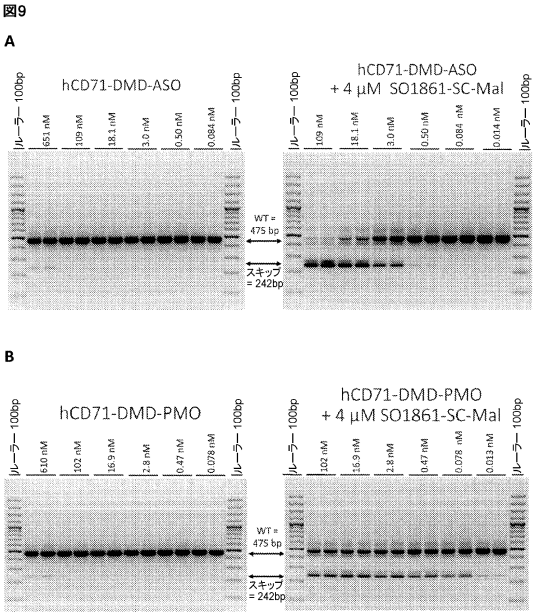
【図８】

図8



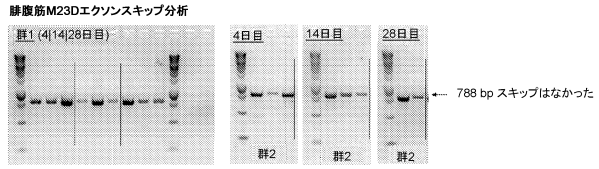
【図９】

図9



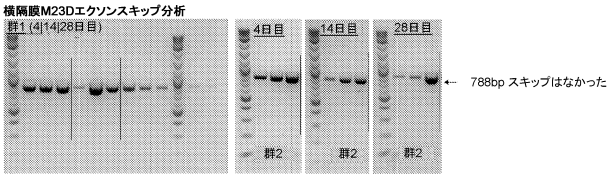
【図１０Ａ】

図10



【図１０Ｂ】

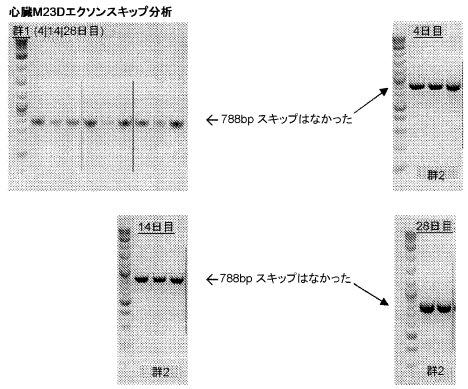
図10



【図１０Ｃ】

図10

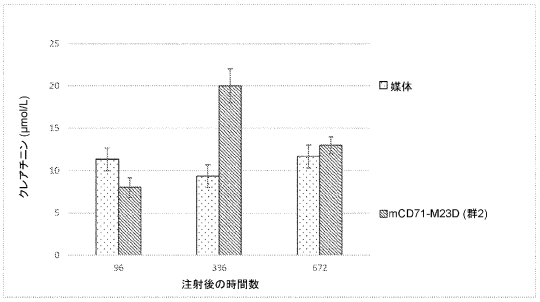
C



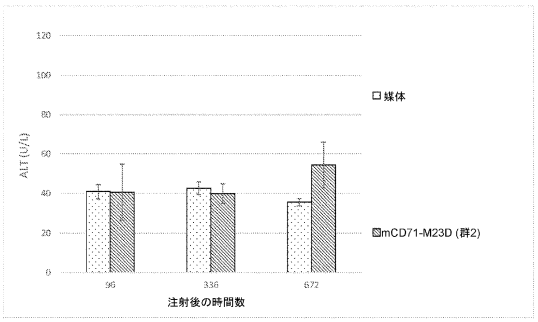
【図１１】

図11

A



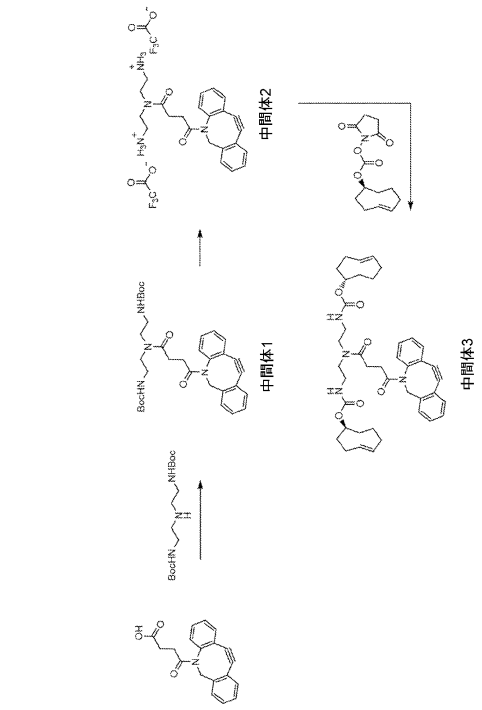
B



【図１２Ａ】

図12

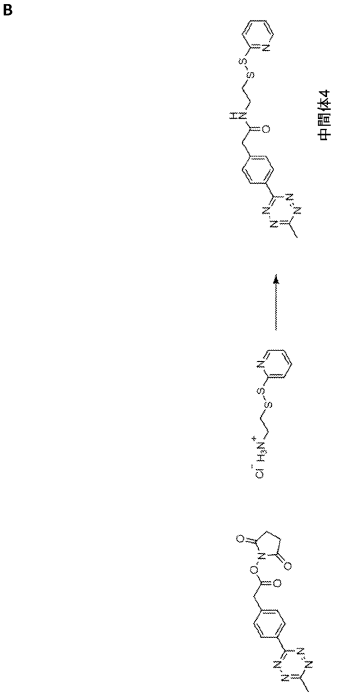
A



【図１２Ｂ】

図12

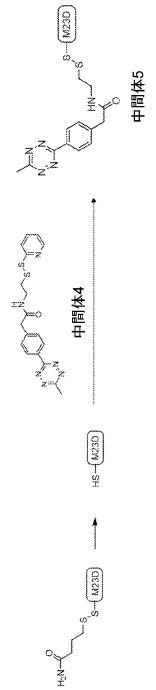
B



【図１２Ｃ】

図12

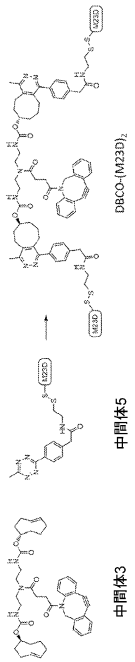
C



【図１２Ｄ】

図12

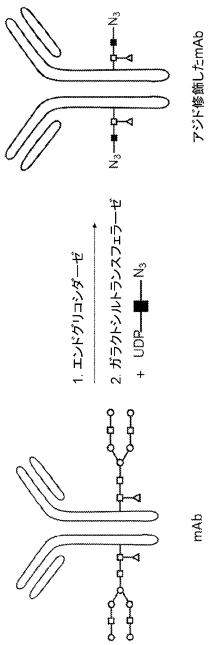
D



【図１３Ａ】

図13

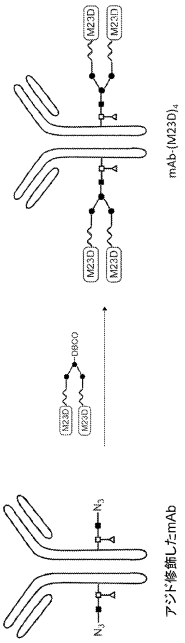
A



【図１３Ｂ】

図13

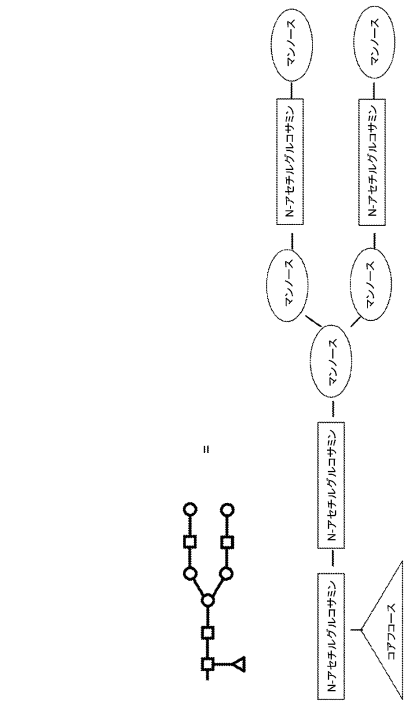
B



【図１３Ｃ】

図13

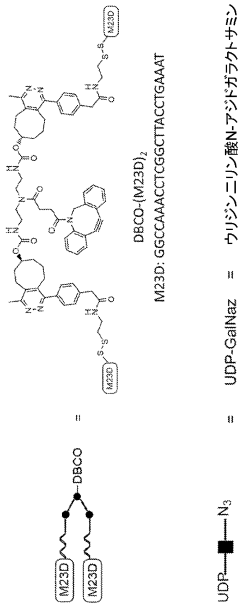
C



【図１３Ｄ】

図13

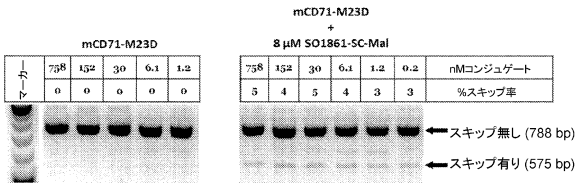
D



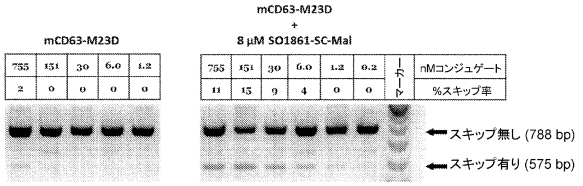
【図１４】

図14

A

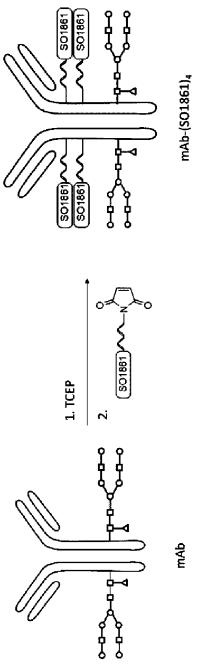


B



【図１５】

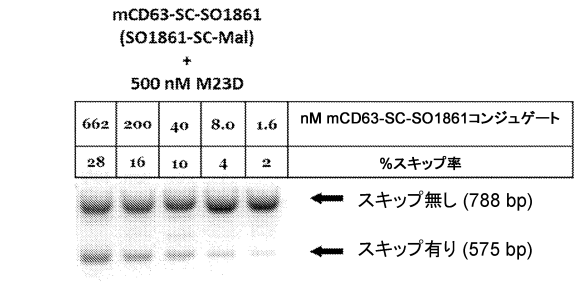
図15



【図１６Ａ】

図16

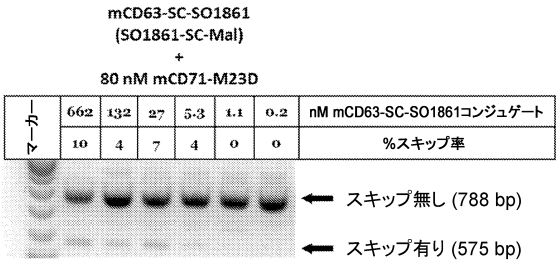
A



【図１６Ｂ】

図16

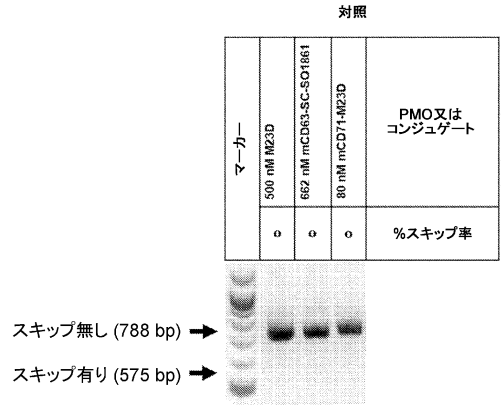
B



【図１６Ｃ】

図16

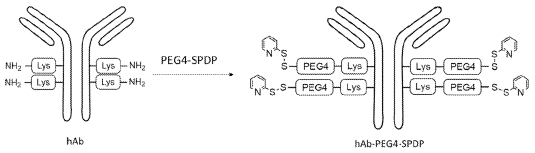
C



【図１７Ａ】

図17

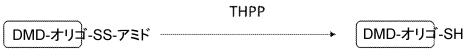
A



【図１７Ｂ】

図17

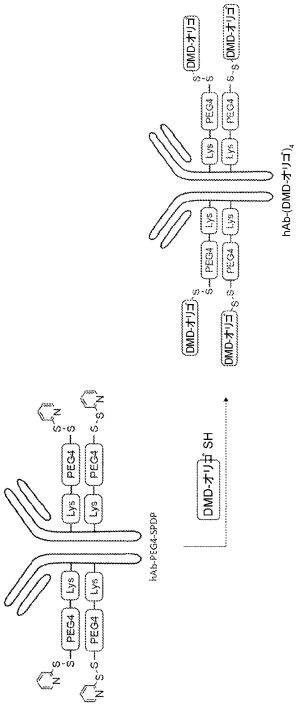
B



【図１７Ｃ】

図17

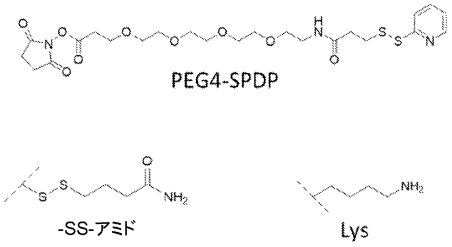
C



【図１７Ｄ】

図17

D



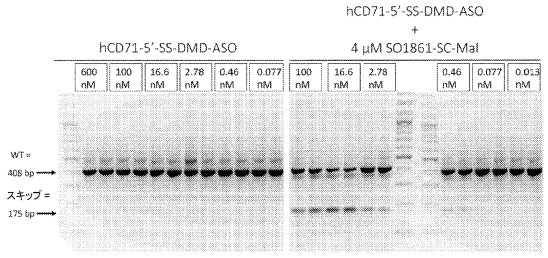
hAb = hCD71又はhCD63

DMD-オリゴ 1 ～ 7:
オリゴ1 = 5’-SS-DMD-PMO(I)
オリゴ2 = 3’-SS-DMD-PMO(I)
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 = S’-SS-DMD-ASO

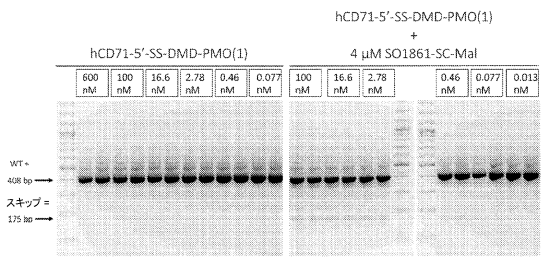
【図１８】

図18

A



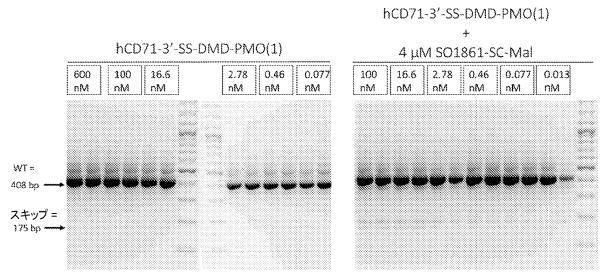
B



【図１９Ａ】

図19

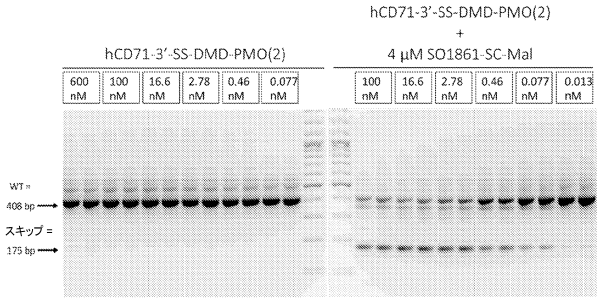
A



【図１９Ｂ】

図19

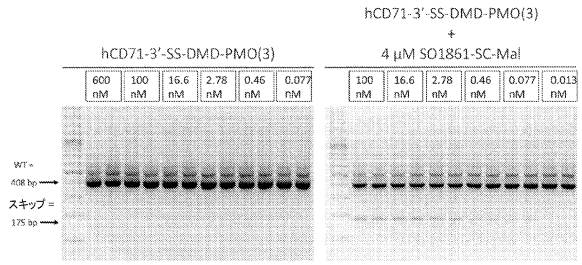
B



【図１９Ｃ】

図19

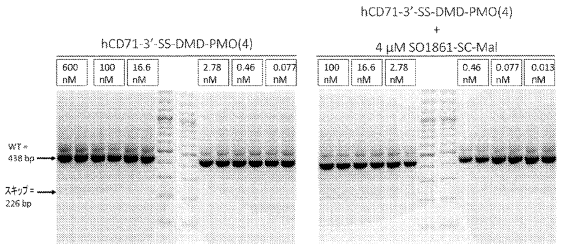
C



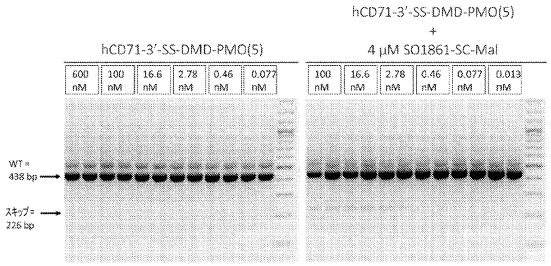
【図２０】

図20

A

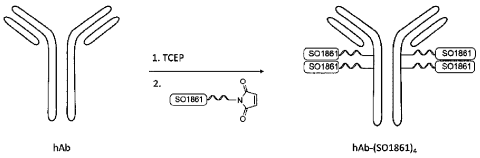


B



【図２１】

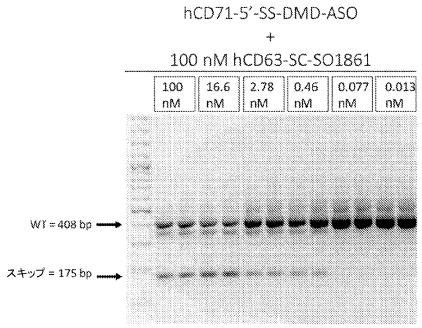
図２１



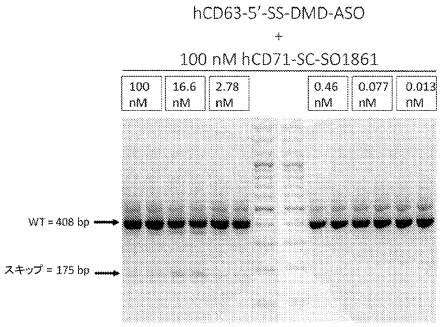
【図２２】

図22

A



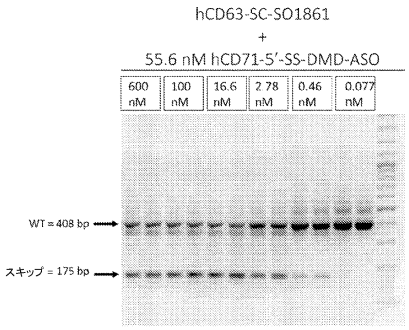
B



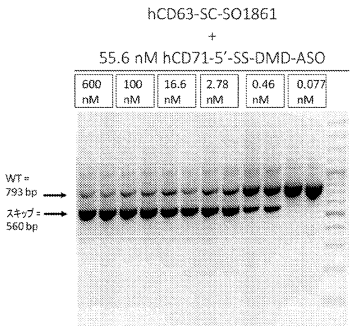
【図２３】

図23

A



B



【配列表】
20255016100000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/54 A61K31/712 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.
A	WO 2020/126064 A1 (SAPREME TECH BV [NL]; UNIV BERLIN CHARITE [DE]) 25 June 2020 (2020-06-25) claims 1, 11, 14, 29 page 11, lines 31-40	1-70

-/--

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 March 2023	20/03/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050734

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	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 the whole document -----	1-70

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2022/050734

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

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

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

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2022/050734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020126064 A1	25-06-2020	AU 2019400630 A1	12-08-2021
		AU 2019407234 A1	19-08-2021
		AU 2019408811 A1	12-08-2021
		AU 2019411276 A1	12-08-2021
		AU 2019411278 A1	12-08-2021
		AU 2019411289 A1	12-08-2021
		CA 3123978 A1	25-06-2020
		CA 3124064 A1	25-06-2020
		CA 3124065 A1	25-06-2020
		CA 3124129 A1	25-06-2020
		CA 3124151 A1	25-06-2020
		CA 3124406 A1	25-06-2020
		CN 113453722 A	28-09-2021
		CN 113474009 A	01-10-2021
		CN 113474010 A	01-10-2021
		CN 113498350 A	12-10-2021
		CN 113507941 A	15-10-2021
		CN 113747923 A	03-12-2021
		DK 3773737 T3	04-10-2021
		EP 3773737 A1	17-02-2021
		EP 3808379 A1	21-04-2021
		EP 3856254 A2	04-08-2021
		EP 3897735 A1	27-10-2021
		EP 3897738 A1	27-10-2021
		EP 3897739 A1	27-10-2021
		EP 3897741 A1	27-10-2021
		EP 3897742 A2	27-10-2021
		EP 3897743 A1	27-10-2021
		EP 3915587 A1	01-12-2021
		EP 4015003 A1	22-06-2022
		ES 2899612 T3	14-03-2022
		IL 284265 A	31-08-2021
		IL 284272 A	31-08-2021
		IL 284273 A	31-08-2021
		IL 284274 A	31-08-2021
		IL 284276 A	31-08-2021
		IL 284278 A	31-08-2021
		IL 284279 A	31-08-2021
		IL 284280 A	31-08-2021
		JP 2022515250 A	17-02-2022
		JP 2022515251 A	17-02-2022
		JP 2022515797 A	22-02-2022
		JP 2022516043 A	24-02-2022
		JP 2022516044 A	24-02-2022
		JP 2022516045 A	24-02-2022
		KR 20210107073 A	31-08-2021
		KR 20210110323 A	07-09-2021
		KR 20210117274 A	28-09-2021
		KR 20210117275 A	28-09-2021
		KR 20210117276 A	28-09-2021
		KR 20210119976 A	06-10-2021
		KR 20210119978 A	06-10-2021
		KR 20210119979 A	06-10-2021
		SG 11202106572Q A	29-07-2021
		SG 11202106574U A	29-07-2021
		SG 11202106575Y A	29-07-2021
		SG 11202106603U A	29-07-2021
		SG 11202106606R A	29-07-2021

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2022/050734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SG 11202106612Q A	29-07-2021
		SG 11202106664P A	29-07-2021
		SG 11202106672S A	29-07-2021
		US 2022023433 A1	27-01-2022
		US 2022054643 A1	24-02-2022
		US 2022072149 A1	10-03-2022
		US 2022111066 A1	14-04-2022
		US 2022218837 A1	14-07-2022
		US 2022313834 A1	06-10-2022
		WO 2020126064 A1	25-06-2020
		WO 2020126600 A1	25-06-2020
		WO 2020126604 A1	25-06-2020
		WO 2020126609 A2	25-06-2020
		WO 2020126610 A1	25-06-2020
		WO 2020126620 A2	25-06-2020
		WO 2020126626 A1	25-06-2020
		WO 2020126627 A1	25-06-2020

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	

,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,CO,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,IR,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，３７２１ エムアー ビルトホーフェン，アントニ ファン レーウェンフックラーン９，ビルディング アー１２－１
(72)発明者　ポステル，ルーベン
オランダ王国，３７２１ エムアー ビルトホーフェン，アントニ ファン レーウェンフックラーン９，ビルディング アー１２－１
(72)発明者　ヘアマンス，ガイ
オランダ王国，３７２１ エムアー ビルトホーフェン，アントニ ファン レーウェンフックラーン９，ビルディング アー１２－１

Ｆターム（参考）　4C076　AA95 BB13 BB16 CC09 EE59
4C084　AA02 AA13 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA94
4C086　AA01 AA02 EA10 EA16 MA01 MA04 MA66 NA05 NA14 ZA94