

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-542500

(P2023-542500A)

(43)公表日 令和5年10月10日(2023.10.10)

| (51)国際特許分類                       | F I                 | テーマコード (参考)     |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|
| A 6 1 K 47/54 (2017.01)          | A 6 1 K 47/54       | Z N A 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 47/55 (2017.01)          | A 6 1 K 47/55       | 4 C 0 8 6       |
| A 6 1 K 31/7088(2006.01)         | A 6 1 K 31/7088     | 4 C 0 9 1       |
| C 0 7 J 63/00 (2006.01)          | C 0 7 J 63/00       |                 |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)          | A 6 1 P 43/00 1 0 5 |                 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全250頁) 最終頁に続く |                     |                 |

|                   |                             |         |                                    |
|-------------------|-----------------------------|---------|------------------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2023-516250(P2023-516250) | (71)出願人 | 521271727                          |
| (86)(22)出願日       | 令和3年9月9日(2021.9.9)          |         | サプリーム テクノロジーズ, ベー. フ               |
| (85)翻訳文提出日        | 令和5年4月10日(2023.4.10)        |         | エー.                                |
| (86)国際出願番号        | PCT/NL2021/050549           |         | S A P R E M E T E C H N O L O G I  |
| (87)国際公開番号        | WO2022/055351               |         | E S B. V.                          |
| (87)国際公開日         | 令和4年3月17日(2022.3.17)        |         | オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビル            |
| (31)優先権主張番号       | 2026442                     |         | トホーフェン, アントニ ファン レーウ               |
| (32)優先日           | 令和2年9月10日(2020.9.10)        |         | エンフック 9, ビルディング アー12               |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | オランダ(NL)                    |         | ー1                                 |
| (31)優先権主張番号       | 2027405                     |         | A n t o n i e v a n L e e u w e n  |
| (32)優先日           | 令和3年1月26日(2021.1.26)        |         | h o e k k l a a n 9, B u i l d i n |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | オランダ(NL)                    |         | g A 1 2 - 1, 3 7 2 1 M A B i l     |
| (31)優先権主張番号       | PCT/NL2021/050384           | (74)代理人 | 110002000                          |
|                   | 最終頁に続く                      |         | 弁理士法人栄光事務所                         |
|                   |                             |         | 最終頁に続く                             |

(54)【発明の名称】 サポニン、オリゴヌクレオチド、及びG A L N A Cのコンジュゲート

## (57)【要約】

本発明は、少なくとも1つのG a l N A c部分を含むリガンドであるA S G P Rのリガンドに共有結合したサポニンを含み、サポニン及びA S G P Rのリガンドに共有結合したオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートに関する。加えて、本発明は、本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。更に、本発明は、医薬品としての使用のための本発明の医薬組成物に関する。本発明はまた、発現産物が、例えば以下の遺伝子：a p o B、H S P 1 7、T T R、P C S K 9、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B VのX遺伝子、H B VのS遺伝子、A A T及びL D Hに關与する疾患又は健康問題の治療又は予防で使用するための、及び例えば、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、A A T関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T Rアミロイドーシス、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するための、本発明の医薬配合物又は医薬組成物に関する。本発明はまた、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを生成するための方法に関する。最後に、本発明は、本発明のコンジュゲートを細胞外から当該細胞内へと移行させるためのインビトロ又はエクスピボ方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドに共有結合される少なくとも 1 つのサポニンを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、前記 ASGPR のリガンドが、少なくとも 1 つの N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分、好ましくは 3 つ又は 4 つの GalNAc 部分、より好ましくは 3 つの GalNAc 部分を含み、より好ましくは前記 ASGPR のリガンドが（GalNAc）<sub>3</sub> トリスを含むか又はそれからなり、前記少なくとも 1 つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、オリゴヌクレオチドと更に共有結合する、オリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

## 【請求項 2】

前記サポニンが、1,2,13-デヒドロオレアナン型の五環性トリテルペンサポニンであり、好ましくは、前記サポニンのアグリコンコア構造の C-2,3 位にアルデヒド官能基を有する、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 3】

前記サポニンが、前記 1,2,13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド又はビデスモシドの五環性トリテルペンサポニンであり、好ましくは、前記サポニンのアグリコンコア構造の C-2,3 位にアルデヒド官能基を有する、請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

## 【請求項 4】

前記サポニンが、以下：

2-アルファ-ヒドロキシオレアノール酸；

1,6-アルファ-ヒドロキシオレアノール酸；

ヘデラゲニン（2,3-ヒドロキシオレアノール酸）；

1,6-アルファ, 2,3-ジヒドロキシオレアノール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

プロトエシゲニン 2,1-（2-メチルブタ-2-エノエート）-2,2-アセテート；

2,3-オキソ-バリングトゲノール C-2,1, 2,2-ビス（2-メチルブタ-2-エノエート）；

30

2,3-オキソ-バリングトゲノール C-2,1-（2-メチルブタ-2-エノエート）-1,6, 2,2-ジアセテート；

ジギトゲニン；

3, 1,6, 2,8-トリヒドロキシオレアナン-1,2-エン；

ギブソゲン酸、

及び

これらの誘導体

を含む群から選択されるアグリコンコア構造を含むか、

好ましくは、前記サポニンが、キラ酸及びギブソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又はその誘導体である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

## 【請求項 5】

・前記サポニンが、群 A：

GlcA-、

Glc-、

Gal-、

Rha-（1→2）-Ara-、

Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-GlcA-、

Glc-（1→2）-[Glc-（1→4）]-GlcA-、

50

$\text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Ara} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Gal} - (1 \rightarrow 2)] - \text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 2) - \text{Ara} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Gal} - (1 \rightarrow 2)] - \text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4)$   
 $) - \text{Gal} -$ 、  
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 2)] - \text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$  10  
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$  20  
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$  30  
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、及び

これらの誘導体

から選択される、前記アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・前記サポニンが、群 B :

$\text{Glc} -$ 、  
 $\text{Gal} -$ 、  
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$ 、  
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Ara} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$ 、  
 $\text{Ara} -$ 、  
 $\text{Xyl} -$ 、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R1} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R  
1は4 E-メトキシケイ皮酸である)、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R2} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R 50

2 は 4 Z-メトキシケイ皮酸である)、

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Gal - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4 - OAc - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 3, 4 - ジ - OAc - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R3 - (\rightarrow 4)] - 3 - OAc - Fuc -$  (ここで、R3 は 4 E-メトキシケイ皮酸である)、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4 - OAc - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4 - OAc - Fuc -$ 、

(Ara-又はXyl-)  $(1 \rightarrow 3) - (Ara-又はXyl-) (1 \rightarrow 4) - (Rha-又はFuc-) (1 \rightarrow 2) - [4 - OAc - (Rha-又はFuc-) (1 \rightarrow 4)] - (Rha-又はFuc-) -$

$Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Gal - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、

$Ara / Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha / Fuc - (1 \rightarrow 4) - [Glc / Gal - (1 \rightarrow 2)] - Fuc -$ 、

$Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R4 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$  (ここで、R4 は 5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である)、

$Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R5 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$  (ここで、R5 は 5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である)、

$Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4 - OAc - Fuc -$ 、

$Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4 - OAc - Fuc -$ 、

$6 - OAc - Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3 - OAc - Rha - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3 - OAc - Rha - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Xyl - (1 \rightarrow 3) - 4 - OAc - Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3, 4 - ジ - OAc - Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、

$6 - OAc - Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、

$Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2)$

10

20

30

40

50

$\text{) - Fuc -}$ 、  
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - 4 - OAc - Qui - (1} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ 、  
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Rha - (1} \rightarrow \text{3)] - 4 OAc - Fuc -}$ 、  
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [Rha - (1} \rightarrow \text{3)] - 4 OAc - Fuc -}$ 、  
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R6 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ （ここで、R6は5-O-[5-O-Rha - (1→2) - Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R7 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ （ここで、R7は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である）、  
 $\text{Api / Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - [Glc - (1} \rightarrow \text{3)] - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R8 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ （ここで、R8は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である）、  
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R9 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ （ここで、R9は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R10 - (} \rightarrow \text{4)] - Fuc -}$ （ここで、R10は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $\text{Api - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R11 - (} \rightarrow \text{3)] - Fuc -}$ （ここで、R11は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $\text{Xyl - (1} \rightarrow \text{3) - Xyl - (1} \rightarrow \text{4) - Rha - (1} \rightarrow \text{2) - [R12 - (} \rightarrow \text{3)] - Fuc -}$ （ここで、R12は5-O-[5-O-Ara / Api - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル] - 3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））

10

20

30

$\text{Glc - (1} \rightarrow \text{3) - [Glc - (1} \rightarrow \text{6)] - Gal -}$ 、及び

これらの誘導体

から選択される、前記アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・前記サポニンが、前記アグリコンコア構造に結合した群Aから選択される第1の糖鎖を含み、前記アグリコンコア構造に結合した群Bから選択される第2の糖鎖を含む、ビデスモシドリテルペン配糖体である、

40

請求項1～4のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項6】

前記サポニンが、以下：キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシドA (esculentoside A)、フィトラッカゲニン、エシネート、AS6.2、NP-005236、AM A-1、AMR、アルファヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA

50

1641、AE X55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7 api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21 A-apio、QS-21 A-xylo、QS-21 B-apio、QS-21 B-xylo、ベータエスシン、エスシンIa、茶種子サポニンI、茶種子サポニンJ、アッサムサポニンF、ジギトニン、プリムラ酸1及びAS64R、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくは、前記サポニンが、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SO1832、SO1832誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、前記サポニンが、QS-21誘導体、SO1861誘導体、SO1861、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、前記サポニンが、SO1861誘導体若しくはSO1861、又はSO1832誘導体若しくはSO1832である、請求項1～5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

#### 【請求項7】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. 前記サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；

20

ii. 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Aから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、誘導体化されたカルボキシル基を含み；

iii. 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Bから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、誘導体化されたアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含み；又は

iv. 前記サポニン誘導体が、誘導体化i.、誘導体化ii. 及び誘導体化iii. の任意の組合せ、好ましくは誘導体化i.、誘導体化ii. 及び誘導体化iii. のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含む、

請求項5又は6に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

#### 【請求項8】

前記サポニンが、以下：SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21 A-apio、QS-21 A-xylo、QS-21B、QS-21 B-apio、QS-21 B-xylo、QS-7-xylo、QS-7-apio、QS-17-apio、QS-17-xylo、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM (Saponinum album)、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシドA、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組合せのいずれか1つ以上であり、好ましくは、前記サポニンが、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SO1832、SO1832誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、前記サポニンが、QS-21誘導体、SO1861誘導体、SO1861、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、前記サポニンが、SO1861誘導体若しくはSO1861、又はSO1832誘導体若しくはSO1832である、請求項1～7のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

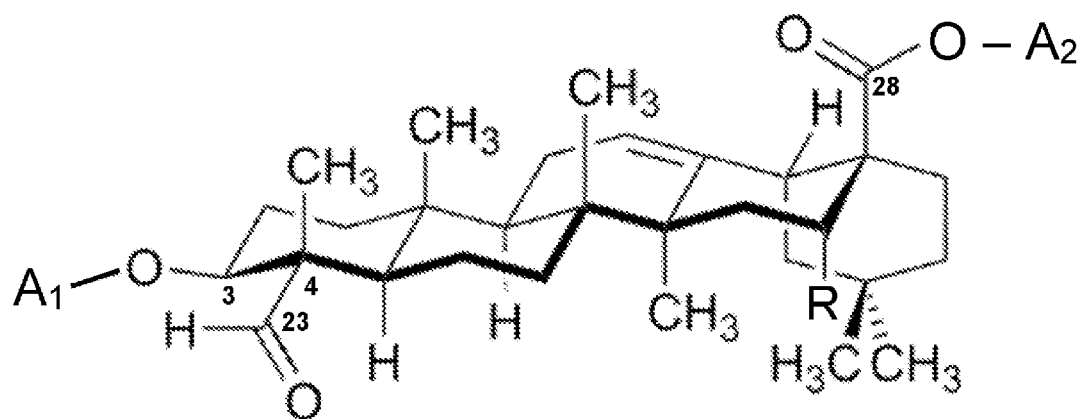
40

#### 【請求項9】

前記サポニンが、請求項4に記載のキラ酸サポニン又はギブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子1：

50

## 【化 1】



(分子1)

(式中、

$A_1$  が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは  $A_1$  が請求項 5 に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、より好ましくは  $A_1$  が請求項 5 に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、 $A_1$  がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；

$A_2$  が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは  $A_2$  が請求項 5 に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、より好ましくは  $A_2$  が請求項 5 に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、 $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば 1、2、3、又は 4 つのアセトキシ基を含み、

式中、 $A_1$  及び  $A_2$  の少なくとも 1 つが水素でなく、好ましくは  $A_1$  及び  $A_2$  の両方がオリゴ糖鎖であり；

並びに、R がギブソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである) で表され；

前記サポニン誘導体が、分子 1 で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. 前記キラ酸又はギブソゲニンの C<sub>23</sub> 位のアルデヒド基が、誘導体化されており；

ii.  $A_1$  が請求項 5 に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、 $A_1$  がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、 $A_1$  のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が誘導体化されており；及び

iii.  $A_2$  が請求項 5 に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、 $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含む場合、 $A_2$  の 1 つの糖部分又は 2 つ以上の糖部分のうち 1 つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている

のうち少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ又は 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 10】

$A_1$  が請求項 5 に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、及びグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、 $A_1$  のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が誘導体化されているか、並びに／又は  $A_2$  が請求項 5 に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、及び  $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含み、ここで  $A_2$  の少なくとも 1 つのアセトキシ基が誘導体化されている、請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 11】

分子 1 で表される前記サポニンが、ビデスモシドトリテルペンサポニンである、請求項 9 又は 10 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 12】

前記サポニン誘導体が、分子 1 で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. キラ酸又はギブソゲニンの C<sub>23</sub> 位のアルデヒド基が、

— アルコールへの還元；

10

20

30

40

50

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

－ N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記 BMPH の前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－ N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記 KMUH の前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されており、

i i. A<sub>1</sub> が請求項 5 に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、及び A<sub>1</sub> がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A<sub>1</sub> のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (AMPD) 又は N-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって QS-21-Glu-AMPD 若しくは SO1861-Glu-AMPD などのサポニン-Glu-AMPD、又は QS-21-Glu-AEM 若しくは SO1861-Glu-AEM などのサポニン-Glu-AEM がもたらされ；並びに

i i i. A<sub>2</sub> が請求項 5 に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、A<sub>2</sub> が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含む場合、A<sub>2</sub> の 1 つの糖部分又は 2 つ以上の糖部分のうち 1 つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基 (HO-) への転換によって誘導体化されている

のうち少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ又は 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する、請求項 9～11 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 13】

A<sub>1</sub> が、Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA であり、及び／又は A<sub>2</sub> が、Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc であり、好ましくは分子 1 で表される前記サポニンが、3-O-β-D-ガラクトピラノシル-(1→2)-[β-D-キシロピラノシル-(1→3)]-β-D-グルクロノピラノシルキラ酸 28-O-β-D-グルコピラノシル-(1→3)-β-D-キシロピラノシル-(1→4)-α-L-ラムノピラノシル-(1→2)-[β-D-キシロピラノシル-(1→3)-4-OAc-β-D-キノボピラノシル-(1→4)]-β-D-フコピラノシドであり、より好ましくは前記サポニンが、以下：SO1861、SO1832、GE1741、SA1641、及び QS-21、又はこれらの誘導体、最も好ましくは SO1861 若しくはその誘導体、又は SO1832 誘導体若しくは SO1832 のいずれか 1 つ以上である、請求項 9～12 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 14】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. 前記サポニン誘導体が、以下：

－ 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) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、それによって SO1861-ald-EMCH 若しくは QS-21-ald-EMCH などのサポニン-ald-EMCH がもたらされ、ここで、前記 EMCH のマレイミド基が、任意選択的にメルカプトエタノールとのチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

－ N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応を介したヒ

ドラゾン結合への変換であって、ここで、前記BMPHの前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－ N－[κ-マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記KMUHの前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

i i . 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Aから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール（AMPD）又はN-（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってQS-21-Glu-AMPD若しくはSO1861-Glu-AMPDなどのサポニン-Glu-AMPD、又はQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされ；

i i i . 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Bから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（HO-）への変換によって誘導体化されているアセトキシ（Me（CO）O-）基を含むか；又は

i v . 前記サポニン誘導体が、誘導体化i . 、誘導体化i i . 及び誘導体化i i i . の任意の組合せ、好ましくは誘導体化i . 、誘導体化i i . 及び誘導体化i i i . のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含み；

好ましくは、サポニン誘導体が、アグリコンコア構造を含み、アグリコンコア構造が、EMCHとの反応を介したヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、前記EMCHの前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、

請求項7～13のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項15】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i . 前記サポニン誘導体が、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってSO1861-Al d-EMCH若しくはQS-21-Al d-EMCHなどのサポニン-Al d-EMCHがもたらされ；

i i . 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Aから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされるか；又は

i i i . 前記サポニン誘導体が、誘導体化i . 及び誘導体化i i . の組合せを含む、請求項14に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項16】

前記サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項5に記載の群Aから選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む、請求項14に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項17】

前記サポニンが、分子2：

10

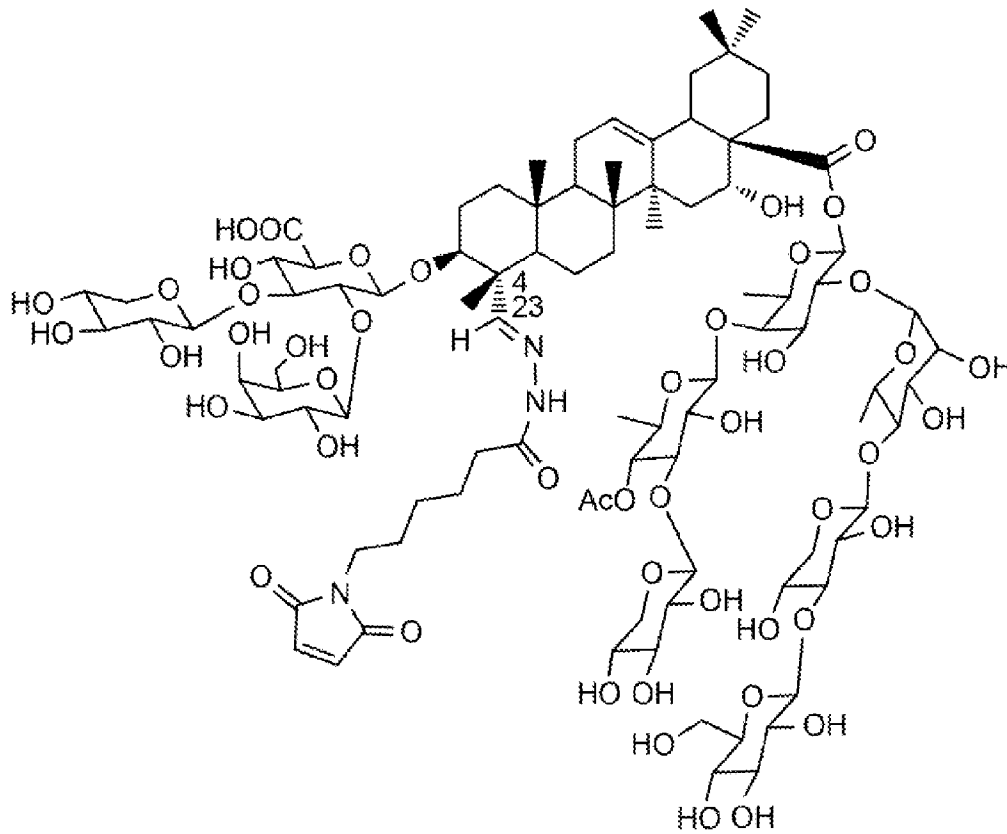
20

30

40

50

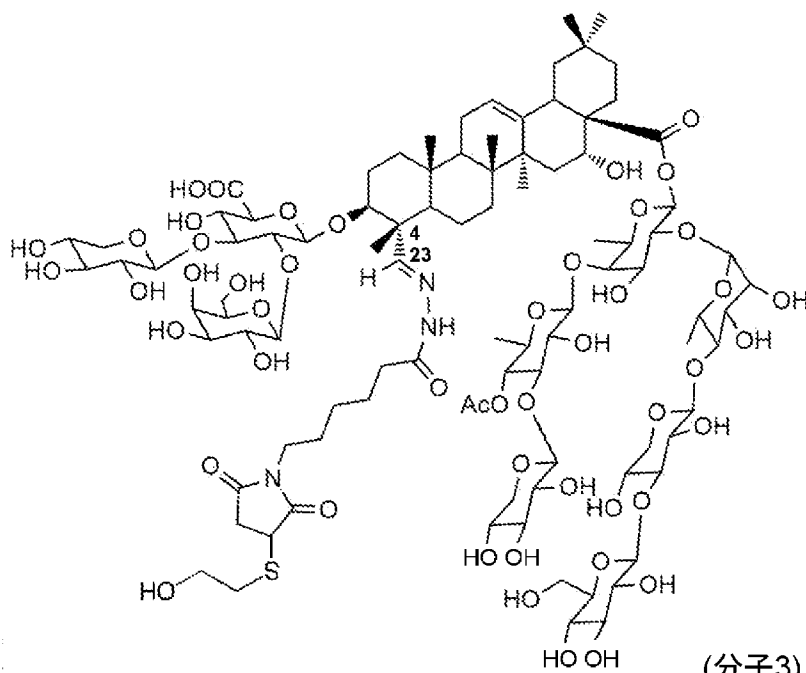
【化 2】



(分子2)

によって表されるサポニン誘導体であるか、又は、前記サポニンが、分子 3：

【化 3】



(分子3)

によって表されるサポニン誘導体である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のオリゴ

ヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つのサポニン及び前記 A S G P R のリガンドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は前記少なくとも 1 つのサポニン及び前記オリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は前記 A S G P R のリガンド及び前記オリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカー、好ましくは前記少なくとも 1 つのサポニンを介して共有結合しており、前記 A S G P R のリガンド及び前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つのリンカーを介して連結している、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項 19】

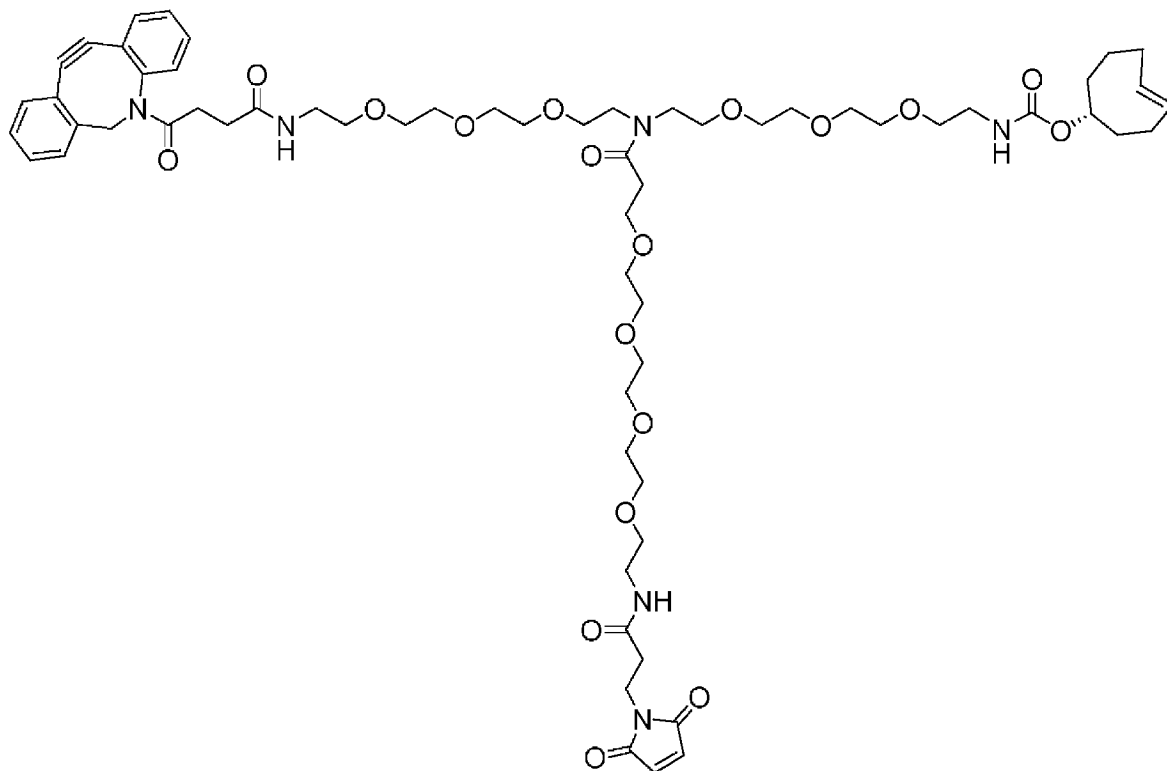
前記少なくとも 1 つの G a l N A c 部分、好ましくは 3 つの G a l N A c 部分、前記少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1 ～ 16 個のサポニン部分、より好ましくは 1 個、4 個、又は 8 個のサポニン部分などの 1 ～ 8 個のサポニン部分、及び前記オリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して、好ましくは前記三官能性リンカーの別個のアームに共有結合した前記 G a l N A c 部分、前記サポニン／サポニン部分、及び前記オリゴヌクレオチドの各々と共有結合している、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 20】

前記三官能性リンカーが、式 (X X I) :

20

【化 4】



30

40

(XXI)

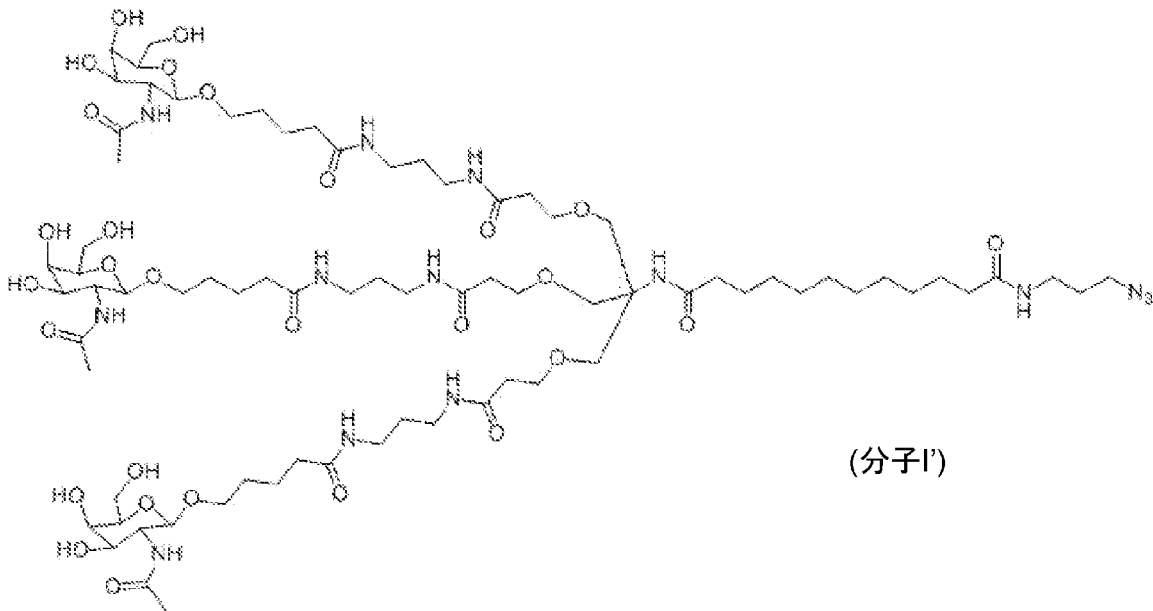
によって表される前記三官能性リンカーである、請求項 19 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 21】

前記 A S G P R のリガンドが、分子 I ' :

50

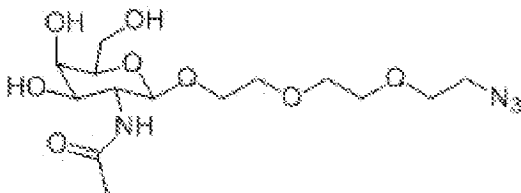
## 【化 5】



(分子I')

で表される前記 (GalNAc)<sub>3</sub> トリスであるか、又は前記 ASGPR のリガンドが、分子 II' :

## 【化 6】



(分子II')

によって表されるモノ-GalNAc である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 22】

前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記 ASGPR のリガンドに共有結合しており、及び／又は前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記オリゴヌクレオチドに共有結合している、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 23】

前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記三官能性リンカーのアームに共有結合されている、請求項 19 又は 20 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 24】

前記切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び／又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、前記切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／又はタンパク質分解、例えば、カテプシン B によるタンパク質分解を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む、請求項 22 又は 23 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 25】

前記切断可能リンカーが、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム

及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくは前記切断可能リンカーが、 $\text{pH } 4.0 \sim 6.5$ 、より好ましくは  $\text{pH} \leq 5.5$  でインビボ切断を受ける、請求項 22～24 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 26】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、若しくは 1～100 のサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば 7、9、12 などのサポニン部分、好ましくは 1、4、若しくは 8 つのサポニン部分を含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項 27】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1つのサポニン部分、又は4つのサポニン部分、又は8つのサポニン部分を含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 28】

前記サポニンが、SO1861、SO1832、又はQS-21、好ましくはSO1861又はSO1832である、請求項 1～27 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 29】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1つ又は3つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分を含む、請求項 1～28 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

【請求項 30】

前記オリゴヌクレオチドが、BNA、異種核酸、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか1つである、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 31】

前記オリゴヌクレオチドが、以下：低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、アンチヘアピン型マイクロRNA (miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (dsRNA)、アンチマイクロRNA (アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA<sup>NC</sup>)、BNAベースのsiRNA、及びBNAベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON) のいずれか1つ以上から選択される、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

【請求項 32】

前記オリゴヌクレオチドが、以下：アンチmiRNA、BNA-AON又はsiRNA、例えば、化学的に修飾されたsiRNA、代謝的に安定したsiRNA、及び化学的に修飾され、代謝的に安定したsiRNAから選択される、BNAベースのsiRNAなどのいずれか1つ以上から選択される、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

【請求項 33】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシニン9型 (PCSK9)、TMPRSS6、 $\delta$ -アミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロニン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体成分C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン (AAT)、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) のいずれか1つをサイレンシングするこ

50

とができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項34】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B（apoB）及びHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項35】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA（oncomiR）の阻害若しくはoncomiRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～34のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項36】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～34のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項37】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB及びHSP27のいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～34のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項38】

請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項39】

医薬品として使用するための、請求項38に記載の医薬組成物又は請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項40】

発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、請求項38に記載の医薬組成物又は請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項41】

発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、請求項38に記載の医薬組成物又は請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項42】

前記使用が、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上に関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、請求項37に記載の医薬組成物、又は請求項40若しくは41に記載の使用のための請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項43】

癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の前記治療又は予防で使用するための、請求項39～42のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

【請求項44】

子宮内膜癌、乳癌、肺癌、若しくは肝細胞癌などの癌、及び／又は高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの心血管疾患の前記治療又は予防で使用するための、請求項39～42のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項45】

対象におけるLDLコレステロールの低下で使用するための、請求項37に記載の医薬組成物又は請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

【請求項46】

請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを細胞外から前記細胞内へと移行させ、好ましくは、その後請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成される前記オリゴヌクレオチドを前記サイトゾル及び／又は前記細胞の核へ移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法であって、以下の工程：

a) 好ましくはヒト細胞である、ASGPR、好ましくはASGPR1をその表面に発現する細胞をもたらす工程であって、好ましくは、前記細胞が、肝臓細胞、ウイルス感染哺乳動物細胞、及び哺乳動物腫瘍細胞から選択され、好ましくは前記細胞が、ヒト細胞である、工程と、

40

b) 工程a)でもたらされる前記細胞へと移行する請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程と、

c) 工程a)の前記細胞を、インビトロ又はエクスビボで、好ましくは液体媒体中において、工程b)のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートの細胞外から前記細胞内への移行を引き起こし、任意選択的に好ましくは、それによってその後、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートを構成する前記オリゴヌクレオチドの前記細胞の前記サイトゾル及び／又は核内への移行を引き起こす、工程と、

を含む、インビトロ又はエクスビボ方法。

50

## 【請求項 47】

以下の工程：

(a) 共有結合した第1のリンカーを含む少なくとも1つのサポニン部分をもたらす工程であって、前記第1のリンカーが、第2のリンカー上の第2の反応性基又は第7のリンカー上の第7の反応性基への共有結合のための少なくとも1つの第1の反応性基を含む、工程と、

(b) 共有結合した第3のリンカーを含むオリゴヌクレオチドをもたらす工程であって、前記第3のリンカーが、第4のリンカー上の第4の反応性基又は第7のリンカー上の第8の反応性基への共有結合のための第3の反応性基を含む、工程と、

(c) 共有結合した第5のリンカーを含む少なくとも1つの G a l N A c 部分をもたらす工程であって、前記第5のリンカーが、第6のリンカー上の第6の反応性基又は前記第7のリンカー上の第9の反応性基への共有結合のための第5の反応性基を含む、工程と、

(d1) 前記第1の反応性基と前記第2の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第1のリンカーを前記第2のリンカーへと連結させ、前記第3の反応性基と前記第4の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第3のリンカーを前記第4のリンカーへと連結させ、前記第5の反応性基と前記第6の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第5のリンカーを前記第6のリンカーへと連結させ、前記第2のリンカー、前記第4のリンカー、及び前記第6のリンカーと一緒に共有結合させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

又は

(d2) 前記第1の反応性基と前記第7の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第1のリンカーを前記第7のリンカーへと連結させ、前記第3の反応性基と前記第8の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第3のリンカーを前記第7のリンカーへと連結させ、前記第5の反応性基と前記第9の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第5のリンカーを前記第7のリンカーへと連結させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程、

のいずれかと、

を含む、請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらすための方法。

## 【請求項 48】

前記第7のリンカーが、請求項20に記載の三官能性リンカーなどの三官能性リンカーである、請求項47に記載の方法。

## 【請求項 49】

前記少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8個のサポニン部分、例えば1、4、又は8個のサポニン部分などである、請求項47又は48に記載の方法。

## 【請求項 50】

前記サポニンが、S O 1 8 6 1、S O 1 8 3 2、Q S - 2 1、又はそれらの任意の官能性誘導体、好ましくはS O 1 8 6 1又はS O 1 8 3 2である、請求項47～49のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 51】

前記サポニン部分又は複数の前記サポニン部分が、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介して共有結合している、請求項47～50のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 52】

前記少なくとも1つの G a l N A c 部分が、1～4個の G a l N A c 部分、好ましくは1個又は3個の G a l N A c 部分である、請求項47～51のいずれか一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ASGPRのリガンド（ASGPRリガンド）に共有結合したサポニンを含み、更に共有結合したオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、即ち、（サポニン、オリゴヌクレオチド、ASGPRリガンド）コンジュゲートがASGPRのリガンドに共有結合したサポニンを含み、リガンドが少なくとも1つのGalNAcを含む、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、ここで、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲートは、siRNA又はアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの共有結合したオリゴヌクレオチドを更に含む（本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと称される）。更に、本発明は、医薬品として使用するための、サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物に関する。本発明はまた、発現産物が、例えば以下の遺伝子：HSP27、apob、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHと関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものであり、並びに例えば、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するためのものである、本発明の医薬組成物に関する。本発明はまた、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを生成するための方法に関する。最後に、本発明は、本発明のサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート（本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートとも称される）を細胞の外側から当該細胞の内側に移すためのインビトロ又はエクスピボ方法に関する。

10

20

30

40

50

#### 【背景技術】

#### 【0002】

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

#### 【0003】

オリゴヌクレオチド療法は、遺伝子転写及び翻訳経路を直接操作することによって、小分子薬物又は抗体薬物に直面する問題の多くを克服することを目的とした、比較的新しく、急速に発展している分野である。オリゴヌクレオチドの効力及び多用途性は、特に「アンドラッグブル」なタンパク質をコードする遺伝子を古典的な小分子薬物によって抑制することが見込まれるため、魅力的な薬物候補となっている。最初のオリゴヌクレオチド薬物は、一本鎖核酸分子がそれらと相補的なmRNA標的に特異的な配列と結合することにより、RNase H系によって二重鎖の分解を引き起こすアンチセンス技法に基づくものであった。

#### 【0004】

1998年に、Andrew Fire及びCraig Melloによって、二本鎖RNA（dsRNA）を転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）の原因物質として同定する、影響力の大きい論文がCaenorhabditis elegansに公開され、この現象をRNA干渉（RNAi）と称した。RNAiの発見は、植物及び菌類における遺伝子サイレンシングの不可解な知見を説明するものであり、生物学に革命を巻き起こすきっかけとなり、最終的に非コードRNAが多細胞生物における遺伝子発現の中心的調節因子であることが示された。その後ほどなくして、小分子dsRNA（典型的には15～30基対（bp））が、非特異的なインターフェロン応答を誘発することなく、哺乳動物細胞にRNAiサイレンシングを触媒的に誘導することができることが発見された。低分子干渉RNA（siRNA）及び低分子ヘアピン型RNA（shRNA）などの小分子

d s R N AによるR N A i経路の標的化には、著しくより効率的（触媒的）であり、及び遺伝子発現をより長く阻害するという、アンチセンスに勝るいくつかの理論上の利点がある。このことは、投与頻度がより少なくなると共に、用量がより少なく、コストがより低くなると言い換えることができよう。曝露が低ければ低いほど、s i R N Aの毒性問題が低くなることも意味し得る。

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

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

【0010】

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0011】

オリゴヌクレオチドを使用して、*RNAi*、*RNase H* 媒介性切断による標的分解、スプライシング調節、非コード *RNA* 阻害、遺伝子活性化、及びプログラム遺伝子編集を含む様々なプロセスを介して、遺伝子発現を調節することができる。オリゴヌクレオチドは、広範囲の疾患を治療又は管理する可能性を有する核酸ポリマーである。オリゴヌクレオチド治療薬の大部分は遺伝子サイレンシングに焦点を当てているが、スプライス調節及び遺伝子活性化を含む他の戦略が追求されており、従来の医薬品様式へと一般的にアクセス可能なものを超えて可能な標的の範囲を拡大している。

20

#### 【0012】

医薬オリゴヌクレオチドの例は、基本原理を共有する一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド及び二本鎖低分子干渉 *RNA* (*siRNA*) であり、オリゴヌクレオチドは、ワトソン-クリック塩基対合を介して標的 *RNA* に結合し、得られた二重鎖は標的メッセンジャー *RNA* (*mRNA*) の分解を指令する。細胞質 (*siRNA* の場合) 又は核 (アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合) において、オリゴヌクレオチドは同族 *RNA* の発現を調節することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド (*ASO*) は、多様な化学の小さい (約 18 ~ 30 ヌクレオチド) 合成一本鎖核酸ポリマーであり、これは、様々な機構を介して遺伝子発現を調節するために採用することができる。*ASO* は、2つの主要なカテゴリ (*RNase H* コンピテンス及び立体ブロック) へと細分化することができる。立体ブロックオリゴヌクレオチドは、標的転写物に高親和性で結合するが、*RNase H* コンピテンスを欠くので標的転写物分解を誘導しないように設計された *ASO* である。立体ブロックオリゴヌクレオチドは、標的転写物内の特定の配列をマスクし、それによって転写物 *RNA* - *RNA* 及び / 又は *RNA* - タンパク質相互作用に干渉することができる。

*siRNA* 分子は *RNAi* のエフェクター分子であり、古典的には、特徴的な 19 + 2 *mer* 構造 (即ち、19 個の相補的塩基及び末端 2 ヌクレオチドの 3' オーバーハングを有する、2つの 21 ヌクレオチド *RNA* 分子の二重鎖) からなる。*siRNA* の鎖の一方 (ガイド鎖又はアンチセンス鎖) は標的転写物に相補的であり、他方の鎖はパッセンジャー鎖又はセンス鎖と称される。*siRNA* は、*RNA* 誘導サイレンシング複合体 (*RISC*) の一部としてのアルゴノート 2 タンパク質 (*AGO2*) を相補的標的転写物へと誘導するように作用する。*siRNA* と標的転写物との間の完全な相補性は、*AGO2* によって触媒されるガイド鎖の標的対向位置 10 ~ 11 の切断 (即ち、スライサ活性) を起こし、遺伝子サイレンシングをもたらす。*siRNA* アプローチには、ダイサー基質 *siRNA*、小さな内部セグメント化 *siRNA*、自己送達 *siRNA* (非対称性及び疎水性)、一

30

40

50

本鎖 *siRNA* 及び二価 *siRNA* が含まれる。立体ブロック *ASO* は、*RISC* 複合体内の小型 *RNA* 種への直接結合を介して *miRNA* を競合的に阻害する。そのような *ASO* は、アンチ *miRNA* オリゴヌクレオチド、アンチ *miR*、又は *antagomir* として知られている。臨床試験に入った第1のアンチ *miRNA* 薬は、肝臓特異的 *miRNA* *miR-122* の標的化を介して慢性C型肝炎ウイルス (*HCV*) 感染を処置するように設計された *ASO* である、ミラビルセン (*SPC3649*) であった。他のクラスのオリゴヌクレオチド治療薬は、プレ *mRNA* 上のスプライス部位に結合することによって *RNA* 機能を調節し、これは、例えば、筋ジストロフィなどの疾患における突然変異含有エクソンのスキップをもたらす。

#### 【0013】

臨床用途のためのオリゴヌクレオチドの更なる例は、例えば、癌、細胞周期進行、感染症疾患、免疫、糖尿病、代謝、筋形成、及び筋ジストロフィに関与している内因性 *RNA* *i* トリガーである、マイクロ *RNA* (*miRNA*) である。長い一次 *miRNA* 転写物内に組み込まれた *miRNA* ヘアピンは、それぞれ、ヘアピンを遊離させ、次いでループ配列を切断する、2つの *RNAse III* ファミリー酵素である *DICER1* (*Dicer*) 及び *DROSHA* によって順次プロセシングされる。得られた二重鎖 *RNA* (*siRNA* に類似) をアルゴノートタンパク質 (例えば、*AGO2*) に負荷し、一方の鎖を捨てて、成熟した一本鎖 *miRNA* 種を作製する。*siRNA* と同様に、*miRNA* は、遺伝子サイレンシングを開始する標的配列に *RISC* を誘導する。*siRNA* とは対照的に、*miRNA* は、典型的には、部分的な相補性と結合し、スライサ非依存性機構を介してサイレンシングを誘導する。

#### 【0014】

治療用オリゴヌクレオチドは、一般に15~30ヌクレオチド長であり、疾患関連タンパク質又は調節 *RNA* をコードするメッセンジャ *RNA* (*mRNA*) の特定の領域に相補的であるように設計される。非経口投与後、オリゴヌクレオチドは細胞に入り、任意の相補的 *RNA* に結合する。オリゴヌクレオチド薬物がその相補的 *mRNA* 又はプレ *mRNA* に結合すると、一連の事象が発生する。結果は、標的配列の性質に部分的に依存し、酵素切断による *mRNA* の破壊 (*mRNA* が変異し、病原性タンパク質をコードする場合に有用である)、プレ *mRNA* スプライシングパターンの変化 (「デフォルト」のスプライシングパターンが病原性産物を産生する場合に有用である)、又は調節 *RNA* の機能の変化を含む。

#### 【0015】

オリゴヌクレオチド含有薬物分子の例は、*siRNA* 部分が *PCSK9* 酵素を標的とする、*siRNA-GalNAc* コンジュゲートである。この酵素は、低密度リポタンパク質受容体 (低密度リポタンパク質に結合した場合) に結合して分解し、心血管疾患の治療における標的である。更なる例は、肝臓で発現されるアポリポタンパク質 (*a*) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む *GalNAc* コンジュゲートである。また、遺伝子 *DMD* は、オリゴヌクレオチドベースの薬物分子の標的であった。デュシェンヌ型筋ジストロフィは、ジストロフィンをコードする遺伝子である *DMD* の変異によって引き起こされる一様に致死的な疾患である。脊髄性筋萎縮症は、*SMN1* タンパク質機能の喪失をもたらす *SMN1* の変異によって引き起こされる常染色体劣性疾患である。オリゴヌクレオチド系治療の標的は遺伝子 *SMN2* である。

#### 【0016】

疾患に関連する *mRNA* 及びそのタンパク質生成物のレベルを低下させるために配列駆動型切断機構を使用するオリゴヌクレオチド薬物は、例えば、コレステロールの配置を改変するために切断機構を使用するミボメルセン及びインクリシランである。2つの薬物は異なる遺伝子産物を各々標的とし、その各々が高コレステロール血症において重要である。各機構における共通の因子は、各オリゴヌクレオチド薬物の標的へのハイブリダイゼーションの結果として、内因性酵素の活性化であり、これは、ハイブリダイゼーション部位で標的 *mRNA* の切断をもたらす。ミボメルセンは、肝臓で生成される低密度リポタンパ

10

20

30

40

50

ク質 (LDL) コレステロールの成分である、アポリポタンパク質 B (apoB) をコードする RNA の一部に相補的な配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。ミボメルセンがアポリポタンパク質 B のプレ-mRNA にハイブリダイズする場合、DNA-RNA ヘテロ二重鎖の存在が RNase H を引きつけ活性化し、これがヘテロ二重鎖中の mRNA を切断する。切断はアポリポタンパク質 B mRNA を不活性にし、それによって生成されるアポリポタンパク質 B の量を減少させる。結果として、肝臓からの超低密度リポタンパク質コレステロールの排出が減少し、最終的に LDL コレステロールの循環レベルが低下する。インクリシランは、LDL 受容体 (LDLR) のレベルを負に調節する酵素である、プロタンパク質転換酵素サブチリシン-ケキシニン 9 型 (PCSK9) をコードする mRNA の切断を誘導する。PCSK9 の活性を低下させる天然に存在する遺伝的バリエーションを有する人は、これらのバリエーションを有しない人と比較して、LDLR レベルが上昇し、LDL コレステロールレベルが低下し、心血管リスクが低下している。インクリシランは PCSK9 mRNA を切断及び不活性化し、これは、PCSK9 のレベルを低下させ、したがって LDLR レベル及び LDL コレステロールのクリアランスの両方を増加させ、LDL コレステロールの循環レベルを低下させる効果を有する。インクリシランは二本鎖の低分子干渉 RNA (siRNA) である。インクリシランの RNA 鎖の 1 つは、PCSK9 mRNA の一部に相補的である。一旦、インクリシランが細胞に入ると、相補鎖 (又はガイド鎖) は、鎖を細胞内環境に提示するタンパク質複合体である RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に負荷される。(mRNA 分子内の) ほぼ完全な相補配列がガイド鎖の一部とハイブリダイズすると、RISC の一部である酵素が mRNA を切断する。mRNA 切断生成物は翻訳することができず、それによって PCSK9 タンパク質レベルが低下する。

10

20

#### 【0017】

RNase H 媒介性及び RISC 媒介性の切断を引き起こすオリゴヌクレオチド系薬物 (それぞれイノテルセン及びパチシラン) が、トランスサイレチン (TTR) アミロイドーシスの処置において使用されている。この形態のアミロイドーシスでは、TTR における変異がタンパク質産物のミスフォールディングを誘導し、その結果、末梢ニューロン及び心臓を含む複数の組織においてアミロイド沈着物が形成される。

#### 【0018】

肝臓を標的とする FDA 承認オリゴヌクレオチド治療薬は、ミボメルセン (ホモ接合型家族性高コレステロール血症を治療するための遺伝子 apoB を標的化)、デフィブロチド (肝静脈閉塞性疾患)、パチシラン TTR (遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス、多発性ニューロパシー)、イノテルセン TTR (遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス、多発性ニューロパシー)、及びジボシランである。ジボシランは急性肝性ポルフィリン症を処置するための GalNAc コンジュゲートであり、標的遺伝子は ALAS1 である。肝臓における遺伝子を標的とする、臨床開発中のオリゴヌクレオチド薬物候補は、例えば、miR-122 を標的とするミラビルセン (C 型肝炎感染症)、miR-122 を標的とする RG-101 (C 型肝炎感染症)、B 型肝炎ウイルス HBsAg を標的とする AB-729 (B 型肝炎感染症)、AAT を標的とする ARO-AAT ( $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠乏症)、SLN124 標的遺伝子 TMPRSS6 ( $\beta$ -サラセミア)、LDHA を標的とする DCR-PHX (原発性高シュウ酸尿症)、及び CEBPA を標的とする MTL-CEPBA (肝細胞癌) である。

30

40

#### 【0019】

かなりの進歩にもかかわらず、オリゴヌクレオチド治療薬の広範な適用には 2 つの大きな障害: 薬物の安全性及び送達がある。疾患関連 RNA を発現している器官及び細胞にオリゴヌクレオチド薬物候補を送達することができないことは、オリゴヌクレオチド治療薬の開発の成功に対する最大の障害であることが証明されている。オリゴヌクレオチドは従来の小分子薬物候補よりもかなり大きい。これらのサイズは、これらの高度にアニオン性の性質と相まって、これらが細胞膜を横切って拡散して細胞質区画及び核区画に到達することを困難にする。オリゴヌクレオチドは、典型的には、大きな親水性ポリアニオン (一

50

本鎖 A S O は約 4 ～ 1 0 k D a であり、二本鎖 s i R N A は約 1 4 k D a である）であり、それらが原形質膜を容易に通過しないことを意味する特性である。加えて、リソソーム分解前のエンドリソソーム系からのオリゴヌクレオチドの逃避又はエキソサイトーシスによる再輸送が、正しい細胞内作用部位に到達することを可能にするために考慮される場合、サイトゾル及び／又は核におけるオリゴヌクレオチドの十分な放出及び送達を考慮する場合に困難が生じる。現在のオリゴヌクレオチド細胞送達戦略は非効率的であり、治療目的ではない細胞及び組織への薬物の腎排泄又は薬物の大部分の送達をもたらす。前述した送達システムのいくつかによって達成することのできる、細胞への改善されたオリゴヌクレオチド（s i R N A など）送達とは裏腹に、エンドソーム脱出がオリゴヌクレオチド系治療薬、例えば R N A i ベースなどの治療薬を適用するのに依然として大きな障壁となっている。エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドのごく僅かな部分のみが細胞質空間に脱出し、そこで意図された機能を発揮するが、その大部分はエンドサイトーシスコンパートメントに捕捉されたままとなり、不活性化する。最近の文献では、0.01%未満の受動的 s i R N A 脱出率を示唆している（Setten, Ryan L. ら、「Nature Reviews Drug Discovery」、第 18.6 巻（2019 年）：第 421 ～ 446 頁）。更に、オリゴヌクレオチドを機能的に内部移行して目的の効果を生じさせる（例えば、ノックダウン）細胞の能力は、細胞が大量のオリゴヌクレオチドを内部移行する程度とは無関係であるように見えることが示されている。これらの知見により、別の「生産的な」及び「非生産的な」自由取り込み経路があるという仮説が導き出されているが、これらの経路を識別する分子機構は依然として不明なままとなっている（Setten, Ryan L., John J. Rossi, 及び Si-ping Han, 「Nature Reviews Drug Discovery」、第 18 巻 6 号（2019 年）；第 421 ～ 446 頁）。

10

20

#### 【0020】

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

#### 【0021】

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

30

40

#### 【0022】

アシアロ糖タンパク質受容体（A S G P R）媒介性取り込みを介したオリゴヌクレオチド治療薬（オリゴヌクレオチドバイオコンジュゲート）の肝細胞への標的化送達により、コンジュゲートとその対応する細胞表面受容体タンパク質との間の相互作用が促進され、受

50

容体媒介性エンドサイトーシスによるその後の内部移行がもたらされる。それによって、バイオコンジュゲートと細胞型関連受容体との相互作用は、特定の組織又は組織内の細胞型への標的化送達を可能にする。ASGPRは、例えば治療用アンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした3アンテナN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に結合して内部移行し、これが内部移行され、次いで細胞内に放出され、そこで、これらの同族プレメッセンジャRNA (mRNA) にこれらはハイブリダイズし、RNA-DNAヘテロ二本鎖の切断を誘導するか、又は例えば疾患関連遺伝子に対して向けられた低分子干渉RNA (siRNA) とコンジュゲートすることができる。エンドソーム区画又はリソソーム区画からのsiRNAの放出後、現在の細胞質siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に負荷することができる。次いで、負荷RISCは、配列相補性について全ての発現RNAを走査することができる。ハイブリダイゼーションにより相補的な配列が検出される場合、RISCの一部である酵素が標的mRNAを切断し、それによって疾患関連タンパク質の発現を低下させる。RNAiはRNA干渉を示す。この受容体媒介性取込みは、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドの治療的送達に必要な投薬量よりも低い投薬量を可能にする。一本鎖及び二本鎖オリゴヌクレオチドの両方を、GalNAcコンジュゲートを使用して肝細胞に送達することができる。例えば、血友病A及び血友病Bなどの疾患を治療するための薬物は、オリゴヌクレオチド-GalNAcコンジュゲート、並びにsiRNA-GalNAcコンジュゲートインクリシラン標的遺伝子PCSK9及びsiRNA-GalNAcコンジュゲートギボシラン標的遺伝子ALAS1に基づいて開発される。

10

20

#### 【0023】

技術的進歩にもかかわらず、効率的なオリゴヌクレオチド送達を達成することは、依然として大きな翻訳制限である。オリゴヌクレオチド系薬物プラットフォームでは、オリゴヌクレオチドの化学修飾、バイオコンジュゲーション、及びオリゴヌクレオチドの送達のためのナノキャリアの使用などのオリゴヌクレオチド送達の改善を目的としたアプローチが使用されるが、送達の課題は依然として改善を必要とする。オリゴヌクレオチドシステム (例えば、GalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲート) を標的化するASGPRの効力を更に増大させ、毒性を減少させ、及び／又はオフターゲット効果を減少させた、改善された送達システムに対する必要性が依然として存在する。

30

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0024】

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

40

#### 【0025】

本発明の態様は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、及び任意選択により薬学的に許容される賦形剤、及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物に関する。

#### 【0026】

本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

#### 【0027】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBV

50

のS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0028】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上に関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0029】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上に関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0030】

本発明の態様は、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0031】

本発明の一態様は、子宮内膜癌、乳癌、肺癌、若しくは肝細胞癌などの癌、及び高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの心血管疾患の治療又は予防で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物に関する。

【0032】

本発明の態様は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを細胞外から当該細胞内へと移行させ、好ましくは、その後本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成されるオリゴヌクレオチドをサイトゾル及び／又は当該細胞の核へ移行させるためのインビトロ又はエキスピボ方法であって、以下の工程：

a) 好ましくはヒト細胞である、ASGPR、好ましくはASGPR1をその表面に発現する細胞をもたらす工程であって、好ましくは、細胞が、肝臓細胞、ウイルス感染哺乳動物細胞、及び哺乳動物腫瘍細胞から選択され、好ましくは当該細胞が、ヒト細胞である、工程と、

b) 工程a)でもたらされる細胞へと移行する本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程と、

c) 工程a)の細胞を、インビトロ又はエキスピボで、好ましくは液体媒体中において、工程b)のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させ、それによって、オリゴヌクレオチドコンジュゲートの細胞外から細胞内への移行を引き起こし、任意選択的に好ましくは、それによってその後、オリゴヌクレオチドコンジュゲートを構成するオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドの細胞のサイトゾル及び／又は核内への移行を引き起こす、工程と、を含む、インビトロ又はエキスピボ方法に関する。

【0033】

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

10

【0034】

本発明の態様は、以下：

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

20

【0035】

本発明の態様は、以下：

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

30

【0036】

本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物に関する。

【0037】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物に関する。

40

【0038】

本発明の態様は、本発明の第2のコンジュゲート又は第3のコンジュゲートを細胞外から当該細胞内に移行させ、好ましくはその後本発明の第2のコンジュゲート又は第3のコンジュゲートによって構成されるエフェクター分子を当該細胞のサイトゾルに移行させるためのインビトロ又はエキスピボ方法であって、以下の工程：

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

50

当該細胞表面分子を発現する細胞をもたらす工程であって、細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、もたらす工程；

b) 工程 a) で提供された細胞に移行させるための、本発明の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲートのいずれか 1 つをもたらす工程；

c) 本発明のサポニンコンジュゲートをもたらす工程；

d) 工程 a) の細胞を、工程 b) の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲート、及び工程 c) のサポニンコンジュゲートとインビトロ又はエキスピボで接触させる工程であって、それによって細胞外から当該細胞への第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後当該細胞のサイトゾルへの第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートによって構成される少なくともエフェクター分子の当該細胞のサイトゾルへの移行を生じさせる、接触させる工程、

を含む、インビトロ又はエキスピボ方法に関する。

【0039】

本発明の態様は、以下の工程：

(a) 共有結合した第 1 のリンカーを含む少なくとも 1 つのサポニン部分をもたらす工程であって、第 1 のリンカーが、第 2 のリンカー上の第 2 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 7 の反応性基への共有結合のための少なくとも 1 つの第 1 の反応性基を含む、工程と、

(b) 共有結合した第 3 のリンカーを含むオリゴヌクレオチドをもたらす工程であって、第 3 のリンカーが、第 4 のリンカー上の第 4 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 8 の反応性基への共有結合のための第 3 の反応性基を含む、工程と、

(c) 共有結合した第 5 のリンカーを含む少なくとも 1 つの GalNAc 部分をもたらす工程であって、第 5 のリンカーが、第 6 のリンカー上の第 6 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 9 の反応性基への共有結合のための第 5 の反応性基を含む、工程と、

(d1) 第 1 の反応性基と第 2 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 1 のリンカーを第 2 のリンカーへと連結させ、第 3 の反応性基と第 4 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 3 のリンカーを第 4 のリンカーへと連結させ、第 5 の反応性基と第 6 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 5 のリンカーを第 6 のリンカーへと連結させ、第 2 のリンカー、第 4 のリンカー、及び第 6 のリンカーと一緒に共有結合させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

又は

(d2) 第 1 の反応性基と第 7 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 1 のリンカーを第 7 のリンカーへと連結させ、第 3 の反応性基と第 8 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 3 のリンカーを第 7 のリンカーへと連結させ、第 5 の反応性基と第 9 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 5 のリンカーを第 7 のリンカーへと連結させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

のいずれかと、

を含む、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法に関する。

【0040】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを提供する方法であって、ここで、第 7 のリンカーは、式 (XXI)：

【0041】

10

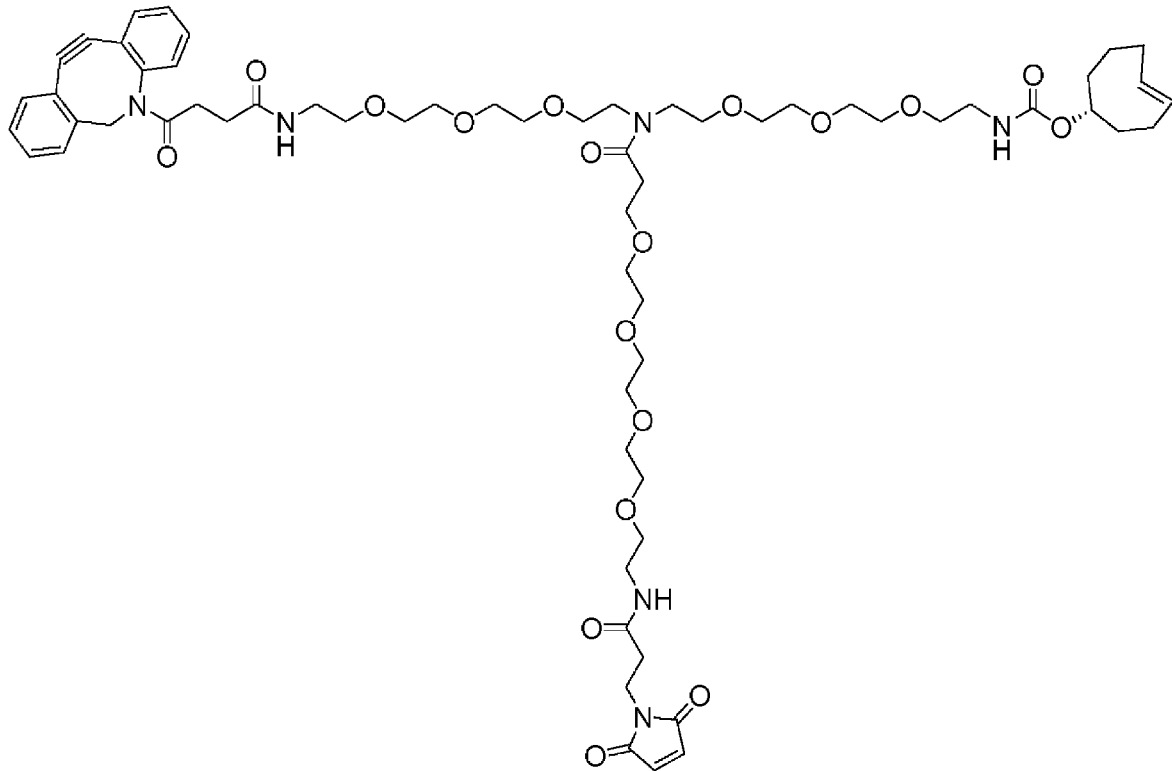
20

30

40

50

## 【化 1】



(XXI)

## 【0042】

によって表される三官能性リンカーなどの、三官能性リンカーである。

## 【0043】

少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8個のサポニン部分、例えば1、4、又は8個のサポニン部分などである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

## 【0044】

サポニンが、SO1861、SO1832、QS-21、又はこれらの任意の官能性誘導体、好ましくはSO1861又はSO1832である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらすための方法が好ましい。

## 【0045】

サポニン部分又はサポニン部分が、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介して共有結合している、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

## 【0046】

少なくとも1つのGalNAc部分が、1～4個のGalNAc部分、好ましくは1個又は3個のGalNAc部分である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

## 【0047】

定義

「GalNAc」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、N-アセチルガラクトサミン及びそのIUPAC名：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトースを指す。

## 【0048】

「(GalNAc)<sub>3</sub>トリス」という用語は、例えば、siRNAベースの療法の分野

におけるその通常の化学的意味を有し、本明細書では3つのGalNAc単位を含む部分を指し、その各々が別々に、好ましくは少なくとも1つのリンカーを介してトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）（IUPAC名：2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）プロパン-1, 3-ジオール）のヒドロキシル基に共有結合されている。（GalNAc）<sub>3</sub>トリスは、遊離アミンを含む分子として存在することができるか、又は、例えば本明細書に記載されるコンジュゲートを含む（GalNAc）<sub>3</sub>トリス部分を形成するように、残存するアミン結合部位を介して更に官能化してもよい。

【0049】

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

10

20

【0050】

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

【0051】

「架橋型核酸」、即ち端的には「BNA」、又は「ロックド核酸」、即ち端的には「LNA」、又は2'-O, 4'-C-アミノエチレン若しくは2'-O, 4'-C-アミノメチレン架橋型核酸（BNA<sup>NC</sup>）という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では修飾RNAヌクレオチドを指す。BNAはまた、「拘束RNA分子」又は「アクセス制限RNA分子」とも称される。BNAモノマーは、「固定化」C<sub>3</sub>'-endo糖パッキングを有する5員、6員又は7員の架橋構造を含有することができる。合成によりリボースの2', 4'位に架橋を組み込むと、2', 4'-BNAモノマーが得られる。BNAモノマーは、当該技術分野で知られる標準的なホスホロアミダイト化学を用いてオリゴヌクレオチドポリマー構造に組み込むことができる。BNAは、高い結合親和性及び安定性を有する構造的に剛直なオリゴヌクレオチドである。

30

【0052】

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

【0053】

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

40

【0054】

「タンパク性」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、タンパク質様（分子がある程度までタンパク質の物理化学的特性を有することを意味する）の、タンパク質の、タンパク質に関する、タンパク質を含有する、タンパク質に属する、タンパク質からなる、タンパク質に似ている、又はタンパク質である分子を指す。「タンパク質性の」という用語は、例えば「タンパク質性分子」において使用される場合、タンパク質に類似するか又はタンパク質である分子の少なくとも一部の存在を指し、「タンパク質」は少なくとも2残基長のアミノ酸残基の鎖を含むと理解されるべきであり、したがって、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質、並びにタンパク質又はタンパク質ドメインの集合体を含む。タンパク質性分子において、少なくとも2つのアミノ酸残基は、例えば、ペ

50

プチド結合などのアミド結合によって連結される。タンパク質性分子において、アミノ酸残基は、天然のアミノ酸残基であり及び／又は修飾された天然のアミノ酸残基などの人工的なアミノ酸残基である。好ましい実施形態では、タンパク質性分子は、少なくとも2個のアミノ酸残基、好ましくは2～約2,000個のアミノ酸残基を含む分子である。一実施形態では、タンパク質性分子は、2～20個（ペプチドに典型的）のアミノ酸を含む分子である。一実施形態では、タンパク質性分子は、21～1,000（ポリペプチド、タンパク質、タンパク質ドメイン、例えば抗体、Fab、scFv、EGFなどの受容体のリガンドに典型的な）アミノ酸を含む分子である。好ましくは、アミノ酸残基は、（典型的には）ペプチド結合によって連結される。本発明によれば、当該アミノ酸残基は、（修飾された）（非）天然アミノ酸残基であるか、又はそれを含む。

10

#### 【0055】

例えば、共有結合性コンジュゲートの一部としてエフェクター分子を参照する場合の「エフェクター分子」又は「エフェクター部分」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、例えば、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖類、（リン）脂質、DNA、RNAなどの核酸、酵素の任意の1つ以上に選択的に結合し、そのような1つ以上の標的分子の生物活性を調節することができる分子を指す。エフェクター分子は、例えば、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、BNA、異種核酸若しくはsiRNAなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はこれらの任意の組合せの任意の1つ以上から選択される分子である。したがって、例えば、エフェクター分子又はエフェクター部分は、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、BNA、異種核酸若しくはsiRNAなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はこれらの任意の組合せの任意の1つ以上から選択される分子又は部分であり、標的分子：タンパク質、ペプチド、炭水化物、グリカンなどの糖、（リン）脂質、DNA、RNAなどの核酸、酵素のうちいずれか1つ以上に選択的に結合することができる、及び標的分子への結合時に、そのような1つ以上の標的分子の生物活性を調節する、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、BNA、異種核酸若しくはsiRNAなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はその任意の組合せのいずれか1つ以上から選択される分子又は部分である。典型的には、エフェクター分子は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞などの細胞内、例えば当該細胞のサイトゾル内で、生物学的効果を発揮することができる。したがって、典型的なエフェクター分子は、薬物分子、プラスミドDNA、抗体薬物コンジュゲート（ADC）に含まれる毒素などの毒素、抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート（AOC）に含まれるsiRNA、BNA、核酸などのオリゴヌクレオチドである。例えば、エフェクター分子は、（細胞内）酵素活性、遺伝子発現、又は細胞シグナル伝達を増加又は減少させることができるリガンドとして作用することができる分子である。

20

30

#### 【0056】

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

40

#### 【0057】

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

#### 【0058】

「ロックド核酸」、端的には「LNA」という用語は、架橋型核酸であり、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、当該技術分野において公知のように、C3'エンド型立体配座「β-D-LNA」、又はC2'エンド型（α-L-LNA）立体配座のいずれ

50

かで、追加のエチレン架橋によってリボース部分を固定する、1つ以上のヌクレオチドビルディングブロックを含有するオリゴヌクレオチドを指す。

【0059】

「BNA」という用語は、 $BNA^{NC}$  又は  $2', 4' - BNA^{NC}$  ( $2' - O$ ,  $4' - \text{アミノエチレン架橋核酸}$ ) を指し、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、 $N - O$  結合を有する6員架橋構造及び ( $N - H$ ) 又は ( $N - Me$ ) 残基を有する1つ以上のヌクレオチド構成要素を含有するオリゴヌクレオチドを指す。

【0060】

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

10

【0061】

「サポニン」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、サポゲニンである親油性アグリコンコアと組み合わされた1つ以上の親水性グリコン部分を含む、両親媒性配糖体の群を指す。サポニンは、天然に存在するものであってもよいし、合成の (即ち、天然に存在しない) ものであってもよい。用語「サポニン」は、天然に存在するサポニン、天然に存在するサポニンの誘導体、並びに化学的合成経路及び／又は生物工学的合成経路を介して新規に合成されたサポニンを含む。

【0062】

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

20

30

【0063】

用語「アグリコンコア構造」は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、1つ又は2つの炭水化物アンテナ又はそれに結合される糖鎖 (グリカン) を有しないサポニンのアグリコンコアを指す。例えば、キラ酸は、SO1861、QS-7、及び QS-21 のアグリコン配糖体コア構造である。

【0064】

「糖鎖」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、グリカン、炭水化物アンテナ、単一の糖部分 (単糖) 又は複数の糖部分を含む鎖 (オリゴ糖、多糖) のいずれかを指す。糖鎖は、糖部分のみからなる場合があるか又は例えば、QS-21 中に存在するものなどの4-エトキシケイ皮酸、4-ジエトキシケイ皮酸、及び5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノ酸) のいずれか1つなどの更なる部分を含んでもよい。

40

【0065】

糖鎖の名称の文脈における用語「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) 部分又はキシロース (Xyl) 部分のいずれかを含有する糖鎖を指す。

【0066】

「抗体薬物コンジュゲート」又は「ADC」という用語は、その通常の科学的意味を有

50

し、本明細書では、IgG、Fab、scFv、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメント、1つ又は複数のVhドメインなどの抗体と、ヒト患者などの対象の細胞と接触させたときに治療効果を発揮することができるあらゆる分子（例えば、活性薬剤成分、毒素、オリゴヌクレオチド、酵素、小分子薬物化合物など）とのあらゆるコンジュゲートを指す。

【0067】

「抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート」又は「AOC」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、IgG、Fab、scFv、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメント、1つ又は複数のVhドメインなどの抗体と、ヒト患者などの対象の細胞と接触させたときに治療効果を発揮することができるあらゆるオリゴヌクレオチド分子（例えば、DNA、修飾DNA、RNA、修飾RNA、一本鎖分子又は二本鎖分子として存在する合成核酸、例えばBNA、アレルト異的オリゴヌクレオチド（ASO）、低分子干渉RNA（siRNA：サイレンシングRNA）、アンチセンスDNA、アンチセンスRNAなどを包含する天然又は合成の一連の核酸から選択されるオリゴヌクレオチド）とのあらゆるコンジュゲートを指す。

10

【0068】

「コンジュゲート」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、少なくとも第2の分子に共有結合された少なくとも第1の分子を指し、それによって、第1の分子及び第2の分子を含むか又はそれからなる共有結合した会合体が形成される。典型的なコンジュゲートとしては、(GalNAc)<sub>3</sub>トリス-siRNA、ADC、AOC、及びSO1861-EMCH（サポニンのアグリコン配糖体コア構造のアルデヒド基にEMCHが連結されている）がある。

20

【0069】

「部分」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、更なる分子、リンカー、分子の会合体などに結合、連結、コンジュゲートされた分子を指し、それによって、より大きい分子、コンジュゲート、分子の会合体が形成される。典型的には、部分は、第2の分子に共有結合された第1の分子であり、第1の分子と第2の分子上に最初に存在する1つ以上の化学基を含む。例えば、サポリンは、典型的なエフェクター分子である。抗体薬物コンジュゲートの一部として、サポリンは、ADC内の典型的なエフェクター部分である。抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部として、BNA又はsiRNAは、AOC内の典型的なエフェクター部分である。

30

【0070】

リンカーを含む抗体サポニンコンジュゲート又は構築物などにおいて使用される「S」という用語は、エンドソーム及びサイトゾル内でインタクトに維持される「安定化リンカー」を表す。

【0071】

リンカーを含む抗体サポニンコンジュゲート又は構築物などにおいて使用される「L」という用語は、エンドソーム内の弱酸条件下で切断される「不安定リンカー」を表す。

【0072】

「部分」という用語は、その通常の科学的意味を有し、本明細書では、更なる分子、リンカー、分子の会合体などに結合、連結、コンジュゲートされた分子を指し、それによって、より大きい分子、コンジュゲート、分子の会合体が形成される。典型的には、部分は、第2の分子に共有結合された第1の分子であり、最初に第1の分子上に存在し、第2の分子上に存在する1つ以上の化学基を含む。例えば、サポリンは典型的な分子であり、エフェクター分子の一例である。抗体薬物コンジュゲートの一部として、サポリンは、ADC内の典型的なエフェクター部分である。抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部として、BNA又はsiRNAは、AOC内の典型的なエフェクター部分である。

40

【0073】

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、組成物中の同様の要素、組成物、成分、又は別々の方法工程間で区別するために使用され、必ずし

50

も逐次的な又は時間的な順序を記載するためのものではない。用語は適切な状況下で交換可能であり、本発明の実施形態は別段の指定がない限り、本明細書に記載又は例示されている以外の他の順序で動作させることができる。

【0074】

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

【0075】

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「特に」などと参照されるが、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明が実施され得る例示的な様式として解釈されことになる。

【0076】

特許請求の範囲で使用される用語「含む」は、例えば、その後に列挙される組成物の要素又は方法工程又は成分に限定されると解釈すべきではなく；ある特定の組成物における他の要素又は方法工程又は成分を排除するものではない。言及された特徴、整数値、（方法）工程又は成分の存在を特定するものとして解釈される必要があるが、1つ又は複数の他の特徴、整数値、工程若しくは成分、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。したがって、「工程A及びBを含む方法」という表現の範囲は、工程A及びBのみからなる方法に限定されるべきではなく、むしろ本発明に関して、方法の列挙した工程がA及びBであるに過ぎず、更に、特許請求の範囲は、それらの方法の工程の等価物を含むと解釈されるべきである。したがって、「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、組成物の列挙した成分がA及びBであるに過ぎず、更に、特許請求の範囲は、それらの成分の等価物を含むと解釈されるべきである。

【0077】

加えて、ある要素又は構成成分に対する不定冠詞「1つの（a）」又は「1つの（an）」による参照は、文脈から要素又は構成成分が1つしかないことを明確に要求されない限り、2つ以上の要素又は構成成分が存在する可能性を排除するものではない。したがって、不定冠詞「1つの（a）」又は「1つの（an）」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。

【0078】

「DAR」という用語は、通常、薬物抗体比を表すものであり、所与の抗体薬物コンジュゲート（ADC）製剤の薬物と抗体の平均比率を指し、本明細書では、コンジュゲート分子に対して結合したSO1861部分、若しくはSPT001、又は結合したペイロード、例えばApob BNAなどのAONの数の比率を指す。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1A】三価GalNAcの合成。

【図1B】三価GalNAcの合成。

【図1C】三価GalNAcの合成。

【図2A】SO1861-DBCOの合成。

【図2B】SO1861-DBCOの合成。

【図3】一価GalNAc-SO1861の合成。

【図4】三価GalNAc-SO1861の合成。

【図5A】一価GalNAc-BNAの合成。

【図5B】一価GalNAc-BNAの合成。

【図5C】一価GalNAc-BNAの合成。

【図6A】三価GalNAc-BNAの合成。

【図6B】三価GalNAc-BNAの合成。

【図7】三価GalNAc-BNAの合成。

【図8A】三価GalNAcの合成。

- 【図 8 B】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 8 C】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 8 D】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 8 E】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 8 F】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 8 G】三価 G a l N A c の合成。
- 【図 9 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における G a l N A c - S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1 - E M C H、及び三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 の一般毒性 ( M T S )。図 9 B の隣に表示されている凡例は、図 9 A にも適用される。
- 【図 9 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における G a l N A c - S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1 - E M C H、及び三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 の一般毒性 ( M T S )。図 9 B の隣に表示されている凡例は、図 9 A にも適用される。
- 【図 1 0 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞死滅アッセイ ( M T S )。図 1 0 B の隣に表示されている凡例は、図 1 0 A にも適用される。
- 【図 1 0 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞死滅アッセイ ( M T S )。図 1 0 B の隣に表示されている凡例は、図 1 0 A にも適用される。
- 【図 1 1 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。
- 【図 1 1 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。
- 【図 1 2 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 2 B の隣に表示されている凡例は、図 1 2 A にも適用される。
- 【図 1 2 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 2 B の隣に表示されている凡例は、図 1 2 A にも適用される。
- 【図 1 3 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 3 B の隣に表示されている凡例は、図 1 3 A にも適用される。
- 【図 1 3 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 3 B の隣に表示されている凡例は、図 1 3 A にも適用される。
- 【図 1 4 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 4 B の隣に表示されている凡例は、図 1 4 A にも適用される。
- 【図 1 4 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 4 B の隣に表示されている凡例は、図 1 4 A にも適用される。
- 【図 1 5 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 5 B の隣に表示されている凡例は、図 1 5 A にも適用される。
- 【図 1 5 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 5 B の隣に表示されている凡例は、図 1 5 A にも適用される。
- 【図 1 6 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 6 B の隣に表示されている凡例は、図 1 6 A にも適用される。
- 【図 1 6 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 6 B の隣に表示されている凡例は、図 1 6 A にも適用される。
- 【図 1 6 C】H e p G 2 ( C ) 及び H u h 7 ( D ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 6 D の隣に表示されている凡例は、図 1 6 C にも適用される。
- 【図 1 6 D】H e p G 2 ( C ) 及び H u h 7 ( D ) 細胞株における細胞生存率アッセイ。図 1 6 D の隣に表示されている凡例は、図 1 6 C にも適用される。
- 【図 1 7 A】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 7 B の隣に表示されている凡例は、図 1 7 A にも適用される。
- 【図 1 7 B】H e p G 2 ( A ) 及び H u h 7 ( B ) 細胞株における遺伝子発現分析。図 1 7 B の隣に表示されている凡例は、図 1 7 A にも適用される。
- 【図 1 8 A】S O 1 8 6 1 とコンジュゲートした三価 G a l N A c ( ( G N ) <sub>3</sub> - S P T ) の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした 1 0 p M のモノクローナル抗体である抗 C D 7 1 ( C D 7 1 - S P R N ) 及びアグリコンのアルデヒド基と結合した E M C H を含む S O 1 8 6 1 ( S P T - E M C H ) の濃度系列の組合せ、1 0 p M の C D 7 1 - S P R N

及び (GN)<sub>3</sub>-SPT の濃度系列の組合せ、並びに 10 pM の CD71-SPRN、及びそこに共有結合された 4 つの SO1861 部分を含むデンドロンとコンジュゲートした (GN)<sub>3</sub> の濃度系列 (DAR = 4、即ち、(GN)<sub>3</sub>: デンドロンの比が 1: 1 であり、デンドロン: SO1861 の比が 1: 4 である) ((GN)<sub>3</sub>-dSPT4) の組合せと細胞を接触させたときの (未処置細胞「Unt r」(100% に設定される) と比較した) 初代ヒト肝細胞の相対細胞生存率。

【図 18 B】apoB mRNA を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートさせた三価 GalNAc ((GalNAc)<sub>3</sub>-Ap oB)、サポニン SO1861 とコンジュゲートさせた 300 nM の三価 GalNAc ((GalNAc)<sub>3</sub>-SPT001) の濃度系列と (GalNAc)<sub>3</sub>-Ap oB の濃度系列との組合せ、又はそれに共有結合した 4 つの SO1861 部分を有するデンドロンとコンジュゲートした (DAR = 4)、及び apoB を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価 GalNAc のコンジュゲート ((GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4-Ap oB) と、細胞を接触させた際の、初代ヒト肝細胞 (未処理細胞 (「Unt r」) と比較して、100% に設定) における相対的な apoB 発現。SO1861 はまた、明細書及び特許請求の範囲を通して、「SPT001」及び「dSPT」とも称される。

【図 19 A】SO1861 とコンジュゲートした三価 GalNAc (三価 GalNAc-SPT001) の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした 10 pM のモノクローナル抗体である抗 CD71 (CD71-サポリン) 及び共有結合コンジュゲートの三価 GalNAc-SPT001 の濃度系列の組合せと細胞を接触させたときの (どちらも未処置細胞 (Unt r) (100% に設定される) と比較した) 初代ヒト肝細胞 (A) 及び Huh7 肝細胞株 (B) の細胞生存率。

【図 19 B】SO1861 とコンジュゲートした三価 GalNAc (三価 GalNAc-SPT001) の濃度系列、サポリンとコンジュゲートした 10 pM のモノクローナル抗体である抗 CD71 (CD71-サポリン) 及び共有結合コンジュゲートの三価 GalNAc-SPT001 の濃度系列の組合せと細胞を接触させたときの (どちらも未処置細胞 (Unt r) (100% に設定される) と比較した) 初代ヒト肝細胞 (A) 及び Huh7 肝細胞株 (B) の細胞生存率。

【図 19 C】共有結合の三価 GalNAc-SPT001 コンジュゲートの模式図 (サポニン SO1861 に対して DAR = 1)。模式図の「S」は、SPT001、SO1861 である。

【図 19 D】抗 CD71 抗体サポリンコンジュゲート (OKT-9) の模式図であり、「T」は抗体重鎖に共有結合された毒素サポリンである。

【図 19 E】共有結合の三価 (GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4 (又は GN<sub>3</sub>-dSPT4) コンジュゲートの模式図 (サポニン SO1861 に対して DAR = 4)。「S」は模式図における SPT001 SO1861 であり、dSPT4 は、他の箇所に記載されているようにコンジュゲートされた、4 つの SO1861 分子を有するデンドロンを表す。

【図 20 A】Ap oB の mRNA 発現及び Ap oB のタンパク質発現をサイレンシングするための、即ち apoB (三価 GalNAc-Ap oB BNA) を標的化するための、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三価 GalNAc の濃度系列と、細胞を接触させた際の、初代ヒト肝細胞 (A) 及び Huh7 肝細胞株 (B) における相対的な apoB 発現、SO1861 とコンジュゲートされる 300 nM の三価 GalNAc (三価 GalNAc-SPT001) (結合した SPT001 (サポニン SO1861) に関して DAR = 1) と三価 GalNAc-Ap oB BNA の濃度系列との組合せ、又は Ap oB mRNA 及び Ap oB タンパク質発現をサイレンシングするための、即ち apoB (三価 GalNAc-Ap oB BNA-SPT001; 本明細書では、4 つの SO1861 分子を、GalNAc/オリゴヌクレオチドコンジュゲートに対して単一のデンドロン部分でコンジュゲートした) を標的化するための、そこに共有結合した 4 つの SO1861 部分 (DAR = 4) とコンジュゲートした、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした、三価 GalNAc の濃度系列。

10

20

30

40

50

【図20B】ApoBのmRNA発現及びApoBのタンパク質発現をサイレンシングするための、即ちapoB（三価GalNAc-ApoBBNA）を標的化するための、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三価GalNAcの濃度系列と、細胞を接触させた際の、初代ヒト肝細胞（A）及びHuh7肝細胞株（B）における相対的なapoB発現、SO1861とコンジュゲートされる300nMの三価GalNAc（三価GalNAc-SPT001）（結合したSPT001（サポニンSO1861）に関してDAR=1）と三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列との組合せ、又はApoB mRNA及びApoBタンパク質発現をサイレンシングするための、即ちapoB（三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001；本明細書では、4つのSO1861分子を、GalNAc／オリゴヌクレオチドコンジュゲートに対して単一のデンドロン部分でコンジュゲートした）を標的化するための、そこに共有結合した4つのSO1861部分（DAR=4）とコンジュゲートした、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした、三価GalNAcの濃度系列。

10

【図20C】共有結合の三価GalNAc-ApoBBNAコンジュゲートの模式図。模式図の「A」はアンチセンスオリゴヌクレオチドのApoB（ApoBBNA）である。

【図20D】三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の模式図。「S」は、SPT001であり、また、模式図においてSO1861とも称される。「E」は、模式図における、apoB（ApoBBNA）を標的とするエフェクター部分アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【図20E】そこに共有結合した4つのSO1861部分を有するデンドロンとコンジュゲートした（GalNAc）<sub>3</sub>-dSPT4-ApoBの模式図（DAR=4）。「S」は、SPT001であり、また、模式図においてSO1861とも称される。「E」は、模式図における、apoB（ApoBBNA）を標的とするエフェクター部分アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【図21A】三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列、300nMの三価GalNAc-SPT001と三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列と組合せ、又は三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の濃度系列と、細胞を接触させた影響下における、初代ヒト肝細胞（A）及びHuh7肝細胞株（B）における絶対的なapoBタンパク質発現；本明細書では、4つのSO1861分子を、GalNAc／オリゴヌクレオチドコンジュゲートに対して単一のデンドロン部分でコンジュゲートさせた（したがって、（GalNAc）<sub>3</sub>-dSPT4-ApoBとも称される）。

30

【図21B】三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列、300nMの三価GalNAc-SPT001と三価GalNAc-ApoBBNAの濃度系列と組合せ、又は三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の濃度系列と、細胞を接触させた影響下における、初代ヒト肝細胞（A）及びHuh7肝細胞株（B）における絶対的なapoBタンパク質発現；本明細書では、4つのSO1861分子を、GalNAc／オリゴヌクレオチドコンジュゲートに対して単一のデンドロン部分でコンジュゲートさせた（したがって、（GalNAc）<sub>3</sub>-dSPT4-ApoBとも称される）。

【図22A】（GalNAc）<sub>3</sub>-SO1861-ApoBとも称されるサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート、即ち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。

40

【図22B】（GalNAc）<sub>3</sub>-SO1861-ApoBとも称されるサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート、即ち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。

【図22C】（GalNAc）<sub>3</sub>-SO1861-ApoBとも称されるサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート、即ち三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001の合成。

【図23A】SO1861-OEG-NHS（SPT001-L-NHS、分子12（式中、「L」は、不安定な切断可能リンカーを指す））の合成。

【図23B】デンドロン（SPT001）<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>の合成（分子13及び14からの分

50

子 15)。

【図 23C】デンドロン (SPT001) 4-アジドの合成 (分子 15 及び 18 からの分子 19)。

【図 23D】デンドロン (SPT001) 4-三価 GalNAc の合成 (分子 19 及び 23 からの分子 24)。

【図 23E】デンドロン (SPT001) 4-三価 GalNAc の合成 (分子 19 及び 23 からの分子 24)。

【図 24A】分子 27 及び分子 28 (三官能性リンカー) からの DBCO-TCO-三価 GalNAc (分子 29) の合成であって、ここで、分子 27 は、分子 22、三価 GalNAc-アミンのギ酸塩、及び分子 26 (4-ニトロフェニル 3-(アセチルチオ) プロパネート) の間の反応から得られる GalNAc-チオアセテートである。

【図 24B】分子 27 及び分子 28 (三官能性リンカー) からの DBCO-TCO-三価 GalNAc (分子 29) の合成であって、ここで、分子 27 は、分子 22、三価 GalNAc-アミンのギ酸塩、及び分子 26 (4-ニトロフェニル 3-(アセチルチオ) プロパネート) の間の反応から得られる GalNAc-チオアセテートである。

【図 24C】メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ (分子 31) を DBCO-TCO-三価 GalNAc (分子 30) に結合させることによる DBCO-L-ApoB BNAオリゴ-三価 GalNAc (分子 29) の合成。

【図 24D】分子 31 (DBCO-L-ApoB BNAオリゴ三価 GalNAc) と分子 19 (デンドロン (SPT001) 4-アジド) とのコンジュゲートによる、デンドロン (-L-SO1861) 4-L-ApoB BNAオリゴ三価 GalNAc (分子 34; 「三価 GalNAc-ApoB BNA-SPT001コンジュゲート」) の合成。

【図 25】C57BL/6Jマウスの肝臓組織における ApoB の発現分析。

【図 26】C57BL/6Jマウスにおける血清 apoB タンパク質分析。0.1mg/kg の ApoB #02 (196 時間)、0.01mg/kg の (GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB + 5mg/kg の (GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861 (196 時間及び 336 時間) 及び 0.1mg/kg の (GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB + 5mg/kg の (GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861 (196 時間) についてのレベルは、報告されていない。

【図 27】C57BL/6Jマウスにおける血清 LDL コレステロール (LDL-C) 分析。

【図 28】C57BL/6Jマウスにおける血清 ALT 分析。

【図 29A】ApoB #02 コンジュゲートの初代ヒト肝細胞、HepG2、及び Huh7 細胞における、ApoB の RNA 発現分析及び細胞生存率アッセイ。

【図 29B】ApoB #02 コンジュゲートの初代ヒト肝細胞、HepG2、及び Huh7 細胞における、ApoB の RNA 発現分析及び細胞生存率アッセイ。

【図 29C】ApoB #02 コンジュゲートの初代ヒト肝細胞、HepG2、及び Huh7 細胞における、ApoB の RNA 発現分析及び細胞生存率アッセイ。

【図 30】ApoB #02 コンジュゲートの初代ヒト肝細胞における ApoB の発現分析及び細胞生存率アッセイ。

【図 31】C57BL/6Jマウスの肝臓組織における ApoB の発現分析。

【図 32】C57BL/6Jマウスにおける血清 ApoB タンパク質分析。

【図 33】C57BL/6Jマウスにおける血清 LDL コレステロール (LDL-C) 分析。

【図 34】C57BL/6Jマウスにおける血清 ALT 分析。

【図 35A】三官能性リンカー (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) 合成。

【図 35B】三官能性リンカー (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) 合成。

【図 35C】三官能性リンカー (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) 合成。

10

20

30

40

50

【図 3 5 D】三官能性リンカー－（L－ヒドラゾン－SO1861）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。

【図 3 6 A】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。

【図 3 6 B】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。

【図 3 6 C】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。

【図 3 6 D】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。

【図 3 6 E－1】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 6 E の図は、図 3 6 E 及び図 3 6 E（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子21と分子19とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子22を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 6 E－2】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）4）－（L－BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 6 E の図は、図 3 6 E 及び図 3 6 E（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子21と分子19とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子22を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 7 A】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 7 B の図は、図 3 7 B 及び図 3 7 B（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子24と分子18とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子25（中間体12）を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 7 B－1】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 7 B の図は、図 3 7 B 及び図 3 7 B（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子24と分子18とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子25（中間体12）を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 7 B－2】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 7 B の図は、図 3 7 B 及び図 3 7 B（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子24と分子18とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子25（中間体12）を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 7 C－1】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 7 C の図は、図 3 7 C 及び図 3 7 C（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子25と分子21とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子26を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 7 C－2】三官能性リンカー－（デンドロン（－L－ヒドラゾン－SO1861）8）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c）合成。図 3 7 C の図は、図 3 7 C 及び図 3 7 C（続き）とラベル付けされた2つのシートを包含し、この2つのシートは共に分子25と分子21とのコンジュゲーション（それによってコンジュゲート分子26を形成する）を示すことに留意されたい。

【図 3 8 A】三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c 合成）合成。

【図 3 8 B】三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリゴ）－（三価G a l N A c 合成）合成。

【図 3 8 C】三官能性リンカー－（L－セミカルバゾン－SO1861）－（BNAオリ

10

20

30

40

50

ゴ) - (三価 G a l N A c 合成) 合成。

【図 3 9 A】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。

【図 3 9 B】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。

【図 3 9 C】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。

【図 3 9 D】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。

【図 3 9 E-1】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 3 9 E の図は、図 3 9 E 及び図 3 9 E (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 0 と分子 2 0 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート中間体 2 4 を形成する) を示すことに留意されたい。

10

【図 3 9 E-2】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 3 9 E の図は、図 3 9 E 及び図 3 9 E (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 0 と分子 2 0 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート中間体 2 4 を形成する) を示すことに留意されたい。

【図 3 9 F】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 4) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。

20

【図 4 0 A-1】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 A の図は、図 4 0 A 及び図 4 0 A (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 3 と分子 3 7 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート (分子 4 4) 中間体 2 5 を形成する) を示すことに留意されたい。

【図 4 0 A-2】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 A の図は、図 4 0 A 及び図 4 0 A (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 3 と分子 3 7 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート (分子 4 4) 中間体 2 5 を形成する) を示すことに留意されたい。

30

【図 4 0 B-1】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 B の図は、図 4 0 B 及び図 4 0 B (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 4 と分子 1 8 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート分子 4 5 (中間体 2 6) を形成する) を示すことに留意されたい。

【図 4 0 B-2】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 B の図は、図 4 0 B 及び図 4 0 B (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 4 と分子 1 8 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート分子 4 5 (中間体 2 6) を形成する) を示すことに留意されたい。

40

【図 4 0 C-1】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 C の図は、図 4 0 C 及び図 4 0 C (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 5 と分子 2 0 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート分子 4 6 (中間体 2 7) を形成する) を示すことに留意されたい。

【図 4 0 C-2】三官能性リンカー-デンドロン (L-セミカルバゾン-S O 1 8 6 1) 8) - (L-B N A オリゴ) - (三価 G a l N A c) 合成。図 4 0 C の図は、図 4 0 C 及び図 4 0 C (続き) とラベル付けされた 2 つのシートを包含し、この 2 つのシートは共に分子 4 5 と分子 2 0 とのコンジュゲーション (それによってコンジュゲート分子 4 6 (中

50

間体 27) を形成する) を示すことに留意されたい。

【図 40D】三官能性リンカー—デンドロン (L—セミカルバゾン—SO1861) 8) — (L—BNA オリゴ) — (三価 GalNAc) 合成。

【図 41】三価リンカー— (L—SPT001) — (ブロックTCO) — (三価 GalNAc) の合成合成。

【図 42A】三価リンカー— (ブロックDBC O) — (L—BNA オリゴ) — (三価 GalNAc) の合成。

【図 42B】三価リンカー— (ブロックDBC O) — (L—BNA オリゴ) — (三価 GalNAc) の合成。

【図 43A】TFL (三官能性リンカー) 方法論を適用して得られるコンジュゲートの概要。GalNAc、サポニン、本明細書ではSO1861、及びオリゴヌクレオチド、本明細書ではBNAを、三官能性リンカー (A) の別々のアームに共有結合的にコンジュゲートすることによる、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートのファミリー「コンジュゲートC1」の合成のための一般的スキーム。コンジュゲートサポニンについて示された選択肢R1及びコンジュゲートBNA (B) について示された選択肢R2を伴う、(A) の一般スキームに従って合成されたコンジュゲートのファミリーであるコンジュゲートC1。図43A及び図43Bの図は、標的化リガンド標識分子41、エフェクター標識分子12、並びにエンハンサー標識分子3、19、25、28、40、及び45のうちの1つとの、又は対照標識分子5、12a、及び50のためのブロッキング剤のうち1つとの、三官能性リンカー標識分子4のコンジュゲートを一緒に示し、それによって、群R1及び群R2を含む、図43Bに示されるような一般的なコンジュゲート構造「コンジュゲートC1」とのコンジュゲートを形成し、ここで、R1は、コンジュゲートであるコンジュゲートC1の下に示される基R1のいずれか1つであり、コンジュゲートC1のR2は、図43BのコンジュゲートであるコンジュゲートC1の下に示される基R2のいずれか1つである。

【図 43B】TFL (三官能性リンカー) 方法論を適用して得られるコンジュゲートの概要。GalNAc、サポニン、本明細書ではSO1861、及びオリゴヌクレオチド、本明細書ではBNAを、三官能性リンカー (A) の別々のアームに共有結合的にコンジュゲートすることによる、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートのファミリー「コンジュゲートC1」の合成のための一般的スキーム。コンジュゲートサポニンについて示された選択肢R1及びコンジュゲートBNA (B) について示された選択肢R2を伴う、(A) の一般スキームに従って合成されたコンジュゲートのファミリーであるコンジュゲートC1。図43A及び図43Bの図は、標的化リガンド標識分子41、エフェクター標識分子12、並びにエンハンサー標識分子3、19、25、28、40、及び45のうちの1つとの、又は対照標識分子5、12a、及び50のためのブロッキング剤のうち1つとの、三官能性リンカー標識分子4のコンジュゲートを一緒に示し、それによって、群R1及び群R2を含む、図43Bに示されるような一般的なコンジュゲート構造「コンジュゲートC1」とのコンジュゲートを形成し、ここで、R1は、コンジュゲートであるコンジュゲートC1の下に示される基R1のいずれか1つであり、コンジュゲートC1のR2は、図43BのコンジュゲートであるコンジュゲートC1の下に示される基R2のいずれか1つである。

【発明を実施するための形態】

【0080】

本発明は、特定の実施形態について説明しているが、本発明はそれに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0081】

本発明の第1の態様は、アジアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) のリガンドに共有結合された少なくとも1つのサポニンを含むサポニンコンジュゲートであって、ASGPRのリガンドが、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つ又は4つのGalNAc部分を含み、より好ましくは (GalNAc)<sub>3</sub>

トリスを含むか又はそれからなり、少なくとも1つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、サポニンコンジュゲートに関する。本発明の態様は、アジア口糖タンパク質受容体 (ASGPR) のリガンドに共有結合された少なくとも1つのサポニンを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、当該ASGPRのリガンドが、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つ又は4つのGalNAc部分、より好ましくはASGPRのリガンドが (GalNAc)<sub>3</sub> トリスを含むか又はそれからなり、且つ少なくとも1つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、オリゴヌクレオチドと更に共有結合する、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。典型的には、ASGPRはASGPR 1である。トリテルペンサポニンは、典型的には、C-23位にアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナンのタイプに属するトリテルペノイドサポニン又はビデスモシドトリテルペンサポニンなどの、12, 13-デヒドロオレアナンの型のトリテルペノイドサポニンである。好ましくはC-23位にアルデヒド官能基を有する、12, 13-デヒドロオレアナンの型のモノデスモシドの又はビデスモシドの五環性トリテルペンサポニンが好ましい。

10

【0082】

驚くべきことに、本発明者らは、三価GalNAc (GN<sub>3</sub>) (即ち、3つのGalNAc部分を含むコンジュゲート) などの肝臓細胞特異的受容体ASGPR 1に対するリガンドと共有結合しているSO1861などのサポニンの存在下において、治療用オリゴヌクレオチドをヒト肝臓細胞などのヒト細胞などのASGPRを保有する哺乳動物細胞と接触させた場合に、治療用オリゴヌクレオチドにより標的化された標的遺伝子に関連するmRNA発現及び／又はタンパク質発現を考慮すると、遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド (ASO、AON、siRNA、BNA) の効力が、少なくとも第10倍、即ち少なくとも第100倍又は更には第1000倍増強されることを確立した。apoB遺伝子を標的化することによって、例えばオリゴヌクレオチドとは別個のGalNAc含有コンジュゲートとして提供される、又は例えばASGPRリガンドとオリゴヌクレオチドとのコンジュゲートに共有結合したサポニン部分として提供されるサポニンと、癌の治療 (例えば、HSP27発現のサイレンシングによる) 又は (LDL) コレステロールの高すぎる血漿レベルの治療に関連するsiRNA又はASOなどの治療用オリゴヌクレオチドを組み合わせるにより、治療用オリゴヌクレオチドの治療域が広がる。標的細胞をASGPR 1のリガンドにカップリングされたオリゴヌクレオチドと接触させるときに (ASGPR 1 標的化) サポニンの不在下において得られる遺伝子サイレンシングと比較した場合、共有結合したサポニンを含むASGPR 1 標的化リガンドの存在下において、より低いオリゴヌクレオチド用量で有効な遺伝子サイレンシング (任意の関連する程度のサイレンシング) が達成される。即ち、本発明者らは、受容体を保有する細胞をインビトロ又はインビボで本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させた場合、ほぼ完全な (少なくとも95%以上として定義される) RNA発現阻害を確立した。加えて、本発明者らはまた、タンパク質発現の (ほぼ) 完全な阻害を達成し、これは、例えば、apoBタンパク質については、その後の血清中のLDLコレステロールの (ほぼ) 完全なクリアランスをもたらす。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートの影響下における遺伝子サイレンシングのこの驚くほど強い程度及び有効性は、サポニンがペイロード及びASGPR 1のリガンド、例えばGN<sub>3</sub>などを含むコンジュゲートの一部でない場合には達成することができない。ASGPR 1を発現する標的 (肝臓) 細胞を本発明のサポニン含有コンジュゲートと接触させた後の遺伝子サイレンシングの改善された効力は、LDL粒子が、細胞を本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させた際に発現がサイレンシングされるapoBタンパク質 (より具体的には、apoB100タンパク質) の1コピーを含むので、mRNA発現が評価されるとき及び／又は標的遺伝子に関連するタンパク質発現が評価される場合には明らかであり、LDLコレステロールレベルが評価される場合には間接的に明らかである。標的細胞をASGPR 1のリガンドにカップリングされた

20

30

40

50

同じ用量のオリゴヌクレオチドと接触させたときにサポニンの不在下において得られる遺伝子サイレンシング有効性と比較した場合、共有結合サポニンを含むASGPR1標的化リガンドの存在下で固定オリゴヌクレオチド用量で改善された遺伝子サイレンシングが達成される。本発明者らは、治療用オリゴヌクレオチド及び(GalNAc)<sub>3</sub>(GN<sub>3</sub>又は(GN)<sub>3</sub>とも称される)などのASGPR1のリガンドとのコンジュゲートを、サポニン及び(GalNAc)<sub>3</sub>などのASGPR1のリガンドとのコンジュゲートと組み合わせることにより、その組合せをヒト肝臓細胞などのASGPR1保有細胞と接触させた場合に、サポニンコンジュゲートの不在下において得られる効力と比較して、遺伝子サイレンシング効力の驚くほど高い改善がもたらされることを見出した。本発明者らはまた、サポニンを治療用オリゴヌクレオチド及び(GalNAc)<sub>3</sub>などのASGPR1のリガンドに共有結合的にカップリングさせると、この組合せをヒト肝臓細胞などのASGPR1保有細胞と接触させた場合、GalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲート中のサポニンの不在下において得られる有効性と比較して、遺伝子サイレンシング有効性の驚くほど高い改善がもたらされることを見出した。

10

20

30

40

50

#### 【0083】

トリテルペン配糖体型のサポニンは、エフェクター分子を標的細胞の外側から当該細胞の内側に送達し、続いて当該細胞のサイトゾルに送達することを促進する能力を持つ。サポニンは、例えば、受容体によって媒介される、ADCに含まれるタンパク毒素などの特定のエフェクター分子の取り込みを促進する。ADCの一部としての毒素をエンドサイトーシスすることにより、標的細胞のエンドソーム及び／又はリソソームへと毒素が送達される。あらゆる論理に束縛されるものではないが、その後のADC、又は少なくとも毒素のエンドソーム又はリソソームから細胞のサイトゾルへの放出は、本発明で適用されるトリテルペノイドサポニンによって促進又は媒介される。標的細胞が細胞内で影響を及ぼすには低すぎる毒素用量で毒素と接触する場合、標的細胞がADC及びサポニンの両方と接触するように、例えばADCの一部などとしての毒素と遊離サポニンを同時投与することにより、サポニンの不在下では細胞と接触させた場合に無効となる同一の毒素用量で、標的細胞の死滅が媒介される効果的な毒素を生じさせることができる。したがって、遊離サポニンの影響下において、毒素の効力が改善される。なお、効果的且つ十分に標的細胞を死滅させるのに必要となる毒素用量は、例えば、ADCによって標的化される腫瘍細胞受容体が本物の(排他的な)腫瘍細胞特異的受容体でない場合ではなく、例えば、健康な細胞、患者の身体の他の箇所、又は標的細胞が存在する同一の臓器に存在する細胞において発現する場合、望ましくないオフターゲット効果を伴う可能性がある。更に、十分な程度の毒素活性化(標的細胞サイトゾルへの毒素の送達; オンターゲット送達を媒介するサポニン閾値)に達するのに必要な遊離サポニンの必要用量は、望ましくないオフターゲット効果を誘導するレベルであり得る。毒素によって治療される標的(腫瘍)細胞を考慮すると、遊離サポニンは全身投与され、且つ非標的化されているため、標的細胞のレベルで局所的なサポニン用量に到達するように、毒素治療を必要とする患者に比較的高用量のサポニンを投与すべきである。更に、遊離サポニンを例えばADCと同時投与する場合に遭遇する更なる問題及び欠点の1つは、患者の標的細胞内の正しい時間及び場所でADC+SP001(遊離サポニン)の活性の同期化を最適化することが困難である点である。

#### 【0084】

本発明者らはここで、この問題の解決策を提供する一成分コンジュゲート溶液を提供する。ここで、驚くべきことに、本発明者らは、受容体リガンド(例えば、EGF又はサイトカイン)、抗体、又は結合フラグメント若しくはそのドメインなどの細胞標的部分をサポニンにコンジュゲートした場合に、腫瘍細胞に及ぼす毒素の効果を増強するのに必要となるサポニンの用量を、10倍、又はより更に約100~1000倍低下させることを見出した。腫瘍細胞の場合、今日では、そのような異常細胞の表面上に特異的に発現する一連の細胞表面受容体が公知である。本発明者らによって、トラスツズマブ、セツキシマブなどの上に典型的に濃縮された受容体に結合する抗体及びリガンドに、サポニンがうまくカップリングされる。そのような標的サポニンコンジュゲートは、実際に、

例えば、標的細胞内の毒素の細胞毒性効果を増強することができ、同一のサポニンに必要な用量、即ち腫瘍細胞を標的化する部分が提供されていない遊離形態と比較して、少なくとも10倍、100倍～1000倍などの低い有効用量のコンジュゲートを必要とする。

【0085】

ここで、本発明者らは更に、標的細胞に特異的な送達、及びその後の（標的）サポニンのエンドサイトーシスが、非異常細胞、又は、例えば癌に関連しない異常細胞（腫瘍細胞）、自己免疫疾患、ウイルス感染細胞などでも可能となることを発明した。即ち、驚くべきことに、本発明者らは、ASGPRがこの受容体を有する肝臓細胞などの細胞に好適な標的受容体を提供し、ASGPR、特にASGPR1のリガンドが提供されたサポニンを移行させることを見出した（例として図3を参照されたい：単一のGalNAc部分とコンジュゲートしたサポニンSO1861（「SPT001」とも称される）。一価GalNAcや三価GalNAc（GN）<sub>3</sub>などの既知のリガンドは、1つ又は多数の（2、4、8など）サポニン分子に首尾よくカップリングされ、ASGPRリガンドを含み、且つC-23位にアルデヒド官能基を有する12, 13-デヒドロオレアナン型の少なくとも1つのサポニン部分、好ましくはビデスモシド五環性トリテルペンサポニンを含むサポニンコンジュゲートを提供する。

【0086】

ASGPR1といった、肝臓細胞などのASGPRを発現する細胞をASGPRの（例えば、図4及び図19Cを参照）リガンドを含むサポニンコンジュゲートと接触させることにより、例えば、遺伝子サイレンシング核酸及び標的細胞表面分子、例えばCD71、ASGPRの結合分子を含むコンジュゲートと同時に標的化した場合に明らかなように、そのような細胞によってサポニンの取り込みが驚くべきことに生じ、標的細胞、又は標的細胞のそのような結合分子及び毒素を含むコンジュゲートに改善されたサポニン依存的な遺伝子サイレンシングをもたらす、結果としてサポニン依存的な細胞毒性が生じる。肝臓細胞などのASGPR1などのASGPRを発現する細胞を、ASGPRのリガンドを含むサポニンコンジュゲートと接触させると、驚くべきことに、そのような細胞を、サポニン、ASGPR1のリガンド、例えばGalNAc又は（GN）<sub>3</sub>を含み、且つmRNAの発現をサイレンシングするための及び／又は細胞におけるタンパク質発現をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを更に含む、そのようなサポニンコンジュゲート、即ち、少なくとも1つのサポニン、ASGPR1のリガンド、及び三官能性リンカーを介してなどして互いに共有結合したオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させた場合に明らかなように、サポニンの取り込みがもたらされる。サポニンにASGPRのリガンドを提供することは、標的細胞において効果をもたらす、標的オリゴヌクレオチド若しくは毒素（例えば、核酸又は毒素にカップリングされた抗CD71抗体又はASGPRリガンド）などの同時投与されたエフェクター分子によって発揮され、又はサポニン及びASGPR1のリガンドともまたコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドによって本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに発揮される（図22A～図22C及び図24Dも参照のこと）。このような効果は、標的細胞を、標的サポニン、例えば遊離オリゴヌクレオチド又は例えば三価GalNAcとコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドなどの不在下でエフェクター分子のみと接触させた場合には、はるかに低い程度で明らかである。したがって、本発明のサポニンコンジュゲート及び本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、その表面にASGPRを含む標的細胞を考慮する場合にオリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子の効力を改善し、そのような標的細胞を、本発明のサポニン-ASGPRリガンド及び（標的化された）エフェクター分子の両方、又はエンドソーム及び／若しくはリソソームからサイトゾル及び／又は最終的に標的細胞の核へのエフェクター部分のエンドソーム脱出を増強するためのサポニンを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ASGPR1のリガンドとしてのGalNAc及びエフェクター部分としてのオリゴヌクレオチドと接触させる。これと共に、エフェクター分子の治療域は、サポニンコンジュゲートの同時投与の影響下若しくはオリゴヌクレオチドコンジュゲートの影響下における同じ用量でのより高い治療効果；又はサポニンコンジュゲ-

10

20

30

40

50

トの同時投与の影響下、若しくはオリゴヌクレオチドがエフェクター部分であるオリゴヌクレオチドコンジュゲートの影響下における、より低い用量での同様の治療効果を改善する。本発明者らはまた、サポニンがASGPRのリガンドを提供されない場合、同様の効果に達するのに必要なサポニン用量と比較した場合に、同時投与された（（ASGPR1）標的化）エフェクター分子、例えばASO、siRNA、BNA、例えばタンパク毒素などの毒素によって誘導されるか、又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート中のエフェクター部分として含まれるオリゴヌクレオチドによって誘導される、肝臓細胞などの標的ASGPR発現細胞において、少なくとも10倍、例えば約100倍～1000倍低い用量のサポニンコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートが一定レベルの治療効果に達するのに必要であることを見出した。本発明者らはまた、SO1861部分又はSO1832部分などの少なくとも1つのサポニン部分が、三価GalNAcなどの少なくとも1つのGalNAcを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートに共有結合している場合、細胞に投与されるASO、siRNA、BNAなどのエフェクター分子としての（（ASGPR1）標的化）オリゴヌクレオチドによって誘導される、肝臓細胞などの標的ASGPR発現細胞において一定レベルの治療効果に達するためには、少なくとも10倍、例えば約100倍～1000倍低い用量のオリゴヌクレオチドが必要であることを見出した。

10

【0087】

したがって、驚くべきことに、本発明者らはここで、ASGPR発現細胞のサイトゾル中の治療用オリゴヌクレオチドなどのエフェクター分子のサポニン媒介送達のための標的受容体としてASGPRを用いる改善された治療方法を提供することで、本発明のサポニンコンジュゲートの不在下又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート中の共有結合サポニンの不在下で可能であるよりも低い用量でエフェクター分子によって誘導される同様の治療効果が得られる。したがって、本発明は、本発明のサポニン-ASGPRリガンドコンジュゲートを提供することによって、及び本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート（例えば、サポニン、オリゴヌクレオチド、（GalNAc）<sub>3</sub>が単一のコンジュゲートで共有結合している）を提供することによって、例えば肝臓細胞のサイトゾル又は核へのエフェクター分子の送達が考慮される場合、サポニンの刺激効果の改善された治療的使用を提供する。本発明者らによって達成された利点は、特に、（（ASGPR1）標的化された）エフェクター分子とサポニンとの同時投与による、又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート中のASGPR1リガンドが細胞ASGPR1に結合する際にオリゴヌクレオチドコンジュゲートがエンドサイトーシスを受け、肝臓細胞などのASGPR1保有細胞のエンドソーム／リソソームに送達されると、オリゴヌクレオチド（例えば、選択された遺伝子に関連するmRNA発現をサイレンシングするための、及び／又は選択された遺伝子を標的化することによってタンパク質発現をサイレンシングするためのsiRNA又はASO）を含み、且つオリゴヌクレオチドコンジュゲートのエンドソーム脱出を刺激するための少なくとも1つのサポニンを含む、ASGPR1を標的化するためのGalNAc部分を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートの投与による、オリゴヌクレオチド（siRNA又はASO）などのエフェクター分子に必要なより低い用量、並びに三価GalNAcなどのASGPRのリガンドと1つ以上のサポニン部分（本発明のサポニンコンジュゲート）との共有結合コンジュゲートとしてサポニンを提供することによるサポニンに必要なより低い用量、並びに治療用オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA又はASO）（本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート）などのエフェクター部分である。驚くべきことに、ASGPRのリガンドは、サポニンコンジュゲート及び標的エフェクター分子コンジュゲートにおけるものと同一であり、これにより、サポニンによる刺激の影響下で標的細胞に効率的なエフェクター分子媒介効果を生じさせることができる。即ち、サポニンコンジュゲート及びエフェクター分子コンジュゲートは、どちらも共有結合された三価GalNAcなどのASGPRのリガンドを含み、どちらのコンジュゲートも同一の受容体を標的化し、細胞へのエンドサイトーシスに同一経路を使用しながら、エフェクター分子の所望の治療効果が効率的に得られるように、それらの表面にASGPRを露出した肝臓細胞な

20

30

40

50

どの標的細胞に同時投与することができる。この驚くべき知見は、肝臓細胞が A S G P R を発現し、この A S G P R、例えば A S G P R 1 が肝臓細胞に特異的でありながら、更に肝臓細胞を標的化する療法で使用するのに十分に特異的な肝臓細胞受容体を実質上存在していないため、肝臓細胞を標的化する療法、例えば核酸（いくつか例を挙げると、A S O、B N A、s i R N A）をサイトゾルに送達することを含む療法などに極めて有用である。

#### 【0088】

したがって、本発明は、A S O 及び s i R N A などのエフェクター分子を細胞内に送達し、それらの作用機序を特定する必要のある、肝細胞を対象とした療法を改善するための新規な方法を開拓するものである。本発明のサポニンコンジュゲート及び本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートとして提供される標的サポニンは、そのようなエフェクター分子（s i R N A、A S O などのオリゴヌクレオチド）の治療域を広げるものであり、同時に、本発明に従ってサポニンに肝臓細胞を標的化する結合分子を提供することによって、サポニンの治療域も同様に改善される。したがって、本発明者らは、効率的なオリゴヌクレオチド送達を達成し、それによって、治療用オリゴヌクレオチドの分野で明らかな主要な翻訳制限に対する解決策を提供した。オリゴヌクレオチド系薬物プラットフォームについて、本発明者らは、オリゴヌクレオチドの送達の改善のための本発明のバイオコンジュゲーションに基づいて、オリゴヌクレオチド送達の改善をもたらす解決策を提供する。本発明の改善された送達システムは、毒性の減少を助け得る、及び／又は A S G P R 標的化オリゴヌクレオチド系（例えば、G a l N A c-オリゴヌクレオチドコンジュゲート）のオフターゲット効果の減少を助け得る、オリゴヌクレオチドの効力の増加をもたらす。

#### 【0089】

本発明者らは、例えば、I g G などの抗体に基づく（抗体-薬物）コンジュゲートに適用される抗体の分子サイズ（分子量）と比較した場合、2つ又は3つの生物学的に活性な小分子で構成される非タンパク質性のコンジュゲートを合成することに成功したが、本発明のコンジュゲートは、コンジュゲートに含まれる2つ又は3つの小分子の各々の生物活性が考慮される場合、依然として生物学的に活性である（本発明のサポニンコンジュゲート及び本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート）。本発明のコンジュゲートは比較的小さいが、単一分子内で一緒に共有結合的にコンジュゲートされた2つ又は3つの小分子は、各小分子の性質に関連する生物活性を依然として発揮することができる。即ち、サポニンは、細胞によって取り込まれるオリゴヌクレオチドのエンドソーム及びリソソームへの脱出を増強する。即ち、A S G P R 保有細胞は、本発明のサポニンコンジュゲート及びオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む G a l N A c を取り込む。即ち、遺伝子サイレンシング効果は、A S G P R を有する細胞を本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させた場合に明らかである。本発明のサポニン含有コンジュゲート及び G a l N A c 含有コンジュゲートは、オリゴヌクレオチド含有コンジュゲート及び G a l N A c 含有コンジュゲートと同じ細胞に同時投与された場合、オリゴヌクレオチドに対するエンドソーム脱出増強活性を提供する。サポニン及びオリゴヌクレオチドの両方が、標的細胞上の A S G P R への G a l N A c の結合によって媒介されるそれらの細胞によって取り込まれる。エンドソーム／リソソーム中のサポニンの影響下においてより高い程度までサイトゾルに送達されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドによって標的化される遺伝子のサイレンシングとして発現されるその細胞内生物活性を発揮する（例えば、遺伝子 H S P 2 7 及び a p o B を標的化する）。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに含まれるオリゴヌクレオチドに対するエンドソーム脱出増強活性を提供する。サポニン及びオリゴヌクレオチドの両方は、標的細胞上の A S G P R への G a l N A c の結合によって媒介される、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部としてそれらの細胞に取り込まれる。エンドソーム／リソソーム中のサポニンの影響下においてより高い程度までサイトゾルに送達されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドによって標的化される遺伝子のサイレンシングとして発現されるその細胞内生物活性を発揮する（例えば、遺伝子 H S P 2 7 及び a p o B を標的化する）。した

がって、比較的小さい分子が一緒になって単一のコンジュゲートにコンジュゲートされるにもかかわらず、少なくとも1つのサポニン（例えば、1、4、8個のサポニン部分など）、G a l N A c 部分又はG a l N A c 部分のクラスター（例えば、(G N)<sub>3</sub>）、及びオリゴヌクレオチドの各々は、細胞を、例えば遊離サポニン（例えば、サイトゾルにおいてその活性を発揮する分子と組み合わせ）、G a l N A c-オリゴヌクレオチド、遊離オリゴヌクレオチドと接触させた場合に測定される生物活性と比較して、依然として生物学的に活性である。サポニン、G a l N A c、及びオリゴヌクレオチドは比較的小さい分子であるが、これらの分子を一緒にコンジュゲートさせることはそれらの生物活性を妨げない。

【0090】

10

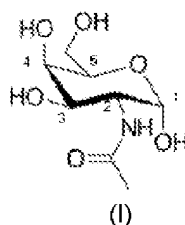
サポニンコンジュゲートー序論

本発明は、本明細書において「サポニンコンジュゲート」と称する、サポニン及びアシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) のリガンドのコンジュゲートを提供するものである。A S G P R リガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分を含む。本発明の好ましい実施形態によれば、各G a l N A c 部分は、式 (I) に示すように、「1」位の酸素への共有結合を介して、A S G P R リガンドの残部と結合されるか、又は、A S G P R リガンドが単一のG a l N A c 部分からなる場合はサポニン部分に結合される：

【0091】

【化2】

20



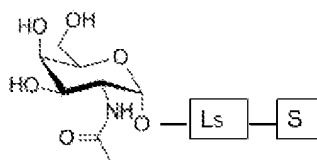
【0092】

式 (I I)<sub>s</sub> に示すように、A S G P R リガンドは、好ましくはサポニン部分リンカー L<sub>s</sub> を介してサポニン部分 S と結合された単一のG a l N A c 部分からなる。

30

【0093】

【化3】



40

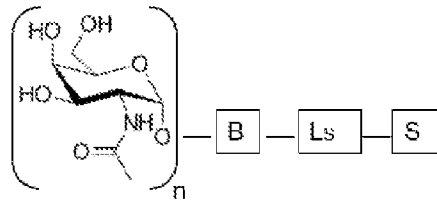
【0094】

A S G P R リガンドは、2つ以上のG a l N A c 部分、例えば、2、3、4、5又は6つなどのG a l N A c 部分、好ましくは3又は4つのG a l N A c 部分、より好ましくは3つのG a l N A c 部分 (m o i t i e s) を含み得る。そのような場合、G a l N A c 部分が各々別々に「1」位の酸素を介して中央の架橋部分 B に共有結合されていることが好ましく、これによって、好ましくはG a l N A c 部分とサポニン部分の間にサポニン部分リンカー L<sub>s</sub> を介して架橋が効果的に形成される。G a l N A c 部分は、式 (I I I)<sub>s</sub> に示すように、架橋部分 B に直接結合され得る：

【0095】

50

## 【化 4】

(III)<sub>s</sub>

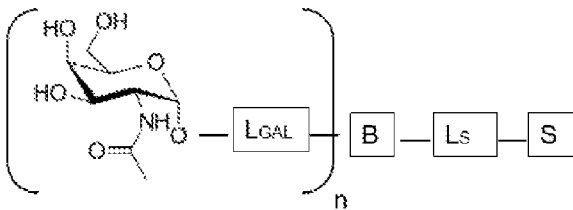
## 【0096】

10

式中、 $n$ は2以上の整数であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である。より好ましくは、 $GalNAc$ 部分は、式(IV)<sub>s</sub>に示すように、 $GalNAc$ リンカー $LGAL$ を介して架橋部分 $B$ に結合される：

## 【0097】

## 【化 5】

(IV)<sub>s</sub>

20

## 【0098】

式中、 $n$ は2以上の整数であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である。 $LGAL$ は出現する度に独立して選択してもよいが、当業者であれば、 $LGAL$ の各々の出現が同一部分を表す場合、サポニンコンジュゲートの合成が簡略化されることを理解するであろう。

## 【0099】

30

サポニンコンジュゲートーリンカー $L_s$

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

40

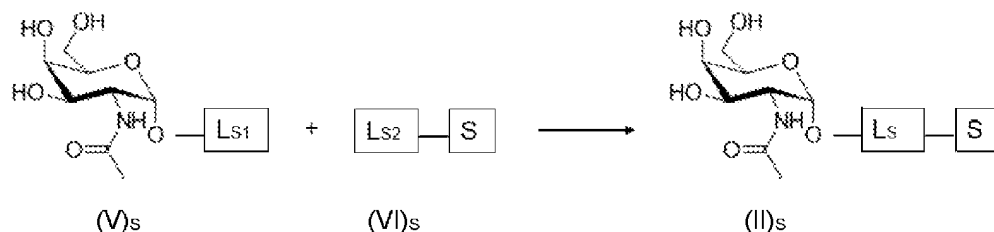
## 【0100】

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

## 【0101】

50

## 【化6】

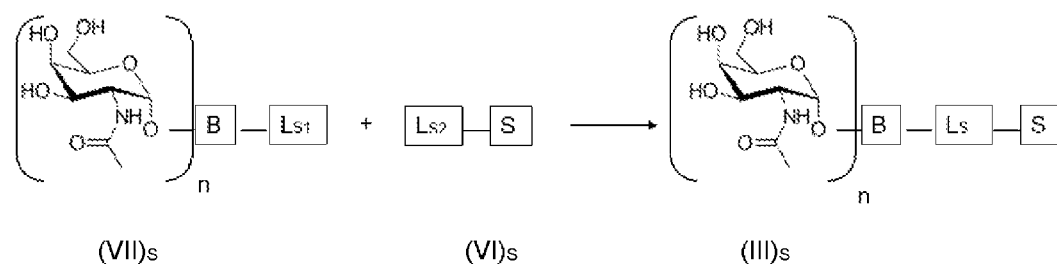


式中、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $L_{s1}$ はGalNAc又は架橋部分Bに共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体であり、 $L_{s2}$ はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体であり、 $S$ はサポニン部分である。

式(III)<sub>s</sub>の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

## 【0102】

## 【化7】



## 【0103】

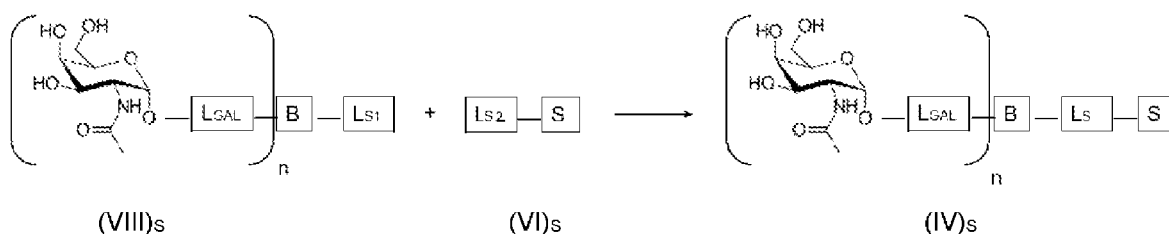
式中、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $L_{s1}$ はGalNAcに共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体であり、 $L_{s2}$ はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体であり、 $n$ は2以上の整数であり、 $B$ は架橋部分であり、 $S$ はサポニン部分である。

## 【0104】

式(IV)<sub>s</sub>の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

## 【0105】

## 【化8】



## 【0106】

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

## 【0107】

サポニン部分リンカー $L_s$ は、GalNAc又は架橋部分Bに共有結合された少なくとも第1の前駆体 $L_{s1}$ と、サポニン部分に共有結合された第2の前駆体 $L_{s2}$ との間のカップリング反応の結果として生じさせることができ、カップリング反応は、例えば、アジド-アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひ

10

20

30

40

50

ずんだ複素環式求電子剤（アジリジン、エポキシド、環状硫酸エステル、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオンなど）の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応（尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド若しくは芳香族ヘテロ環形成など）又は炭素－炭素二重結合の付加（エポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシル化、ハロゲン化スルフェンチル（sulfonyl halide）付加、ハロゲン化ニトロシル付加若しくはマイケル付加など）であり、好ましくはアジド－アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディングー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジド－アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

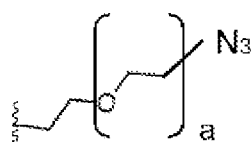
したがって、サポニン部分のリンカー $L_s$ は、GalNAcに共有結合した第1の前駆体 $L_{s1}$ 又は架橋部分B、アジドを含む第1の前駆体 $L_{s1}$ と、サポニン部分に共有結合した第2の前駆体 $L_{s2}$ 、アルキンを含み、好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含むか、又は好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのセミカルバジド／アルデヒドカップリングから生じるセミカルバゾンを含む第2の前駆体 $L_{s2}$ と、の間のカップリング反応の結果であることが好ましい。

【0112】

式（V） $s$ の化合物に存在する前駆体 $L_{s1}$ の構造の実施形態は、以下のアジドである：

【0113】

【化9】



(XVII)

10

20

30

40

50

【0114】

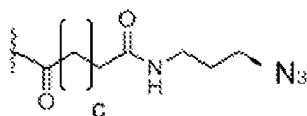
式中、 $a$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 1、2、及び 3 から選択される整数を表し、より好ましくは 2 を表す。

【0115】

式 (VII)  $_s$  又は (VIII)  $_s$  の化合物に存在する前駆体  $L_{s1}$  の構造の実施形態は、以下のアジドである：

【0116】

【化10】



(XVIII)

10

【0117】

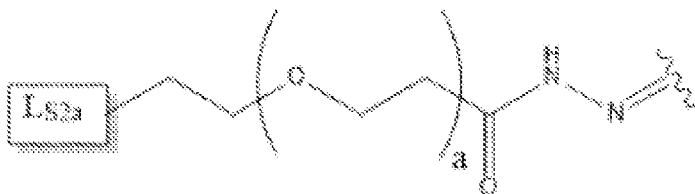
式中、 $c$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 5 ～ 15 の範囲の整数を表し、より好ましくは 9 を表す。

【0118】

式 (VI)  $_s$  の化合物に存在する前駆体  $L_{s2}$  の構造の実施形態は、以下のヒドラゾンである：

【0119】

【化11】



(XIX)

20

30

【0120】

式中、 $a$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 2 ～ 6 の範囲の整数を表し、より好ましくは 4 を表し、 $L_{s2a}$  はアルキン含有部分を表す。本開示の見地から当業者によって理解されるように、式 (XIX) に示すヒドラゾンは、ヒドラジドをサポニン部分のアルデヒドと反応させた結果として生じるものである。

【0121】

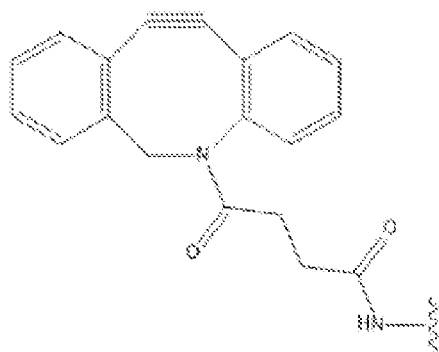
好ましくは、 $L_{s2a}$  は、20 個未満の炭素原子を含み、より好ましくは、 $L_{s2a}$  は、式 (XX) に従った部分を表す：

【0122】

40

50

## 【化 1 2】



(XX)

10

## 【0 1 2 3】

したがって、いくつかの実施形態では、サポニンコンジュゲートは、本明細書に記載されるような式 (I I) <sub>s</sub>、(I I I) <sub>s</sub> 又は (I V) <sub>s</sub> の化合物であり、サポニン部分リンカー L <sub>s</sub> が式 (V) <sub>s</sub>、(V I I) <sub>s</sub> 又は (V I I I) <sub>s</sub> の化合物と式 (V I) <sub>s</sub> の化合物との間のカップリング反応の結果生じるものであり、第 1 の前駆体 L <sub>s1</sub> がアジド、例えば、式 (X V I I) 又は式 (X V I I I) のアジドであり、第 2 の前駆体 L <sub>s2</sub> がアルキン含有部分 L <sub>s2a</sub>、例えば、式 (X X) のアルキン及びヒドラジドとサポニン部分のアルデヒドとの反応から生じるヒドラゾンを含む式 (X I X) の化合物である。

20

## 【0 1 2 4】

サポニンコンジュゲートーサポニン

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

30

## 【0 1 2 5】

本発明の態様は、アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) のリガンドに共有結合された、少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1 ~ 3 2 個、より好ましくは 1 ~ 1 6 個、最も好ましくは 1 ~ 8 個のサポニン部分、例えば、1 個、4 個、又は 8 個などのサポニン部分を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、当該 A S G P R のリガンドが、少なくとも 1 つの N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分、好ましくは 3 つ又は 4 つの G a l N A c 部分、より好ましくは 3 つの G a l N A c 部分を含み、より好ましくは A S G P R のリガンドが (G a l N A c) <sub>3</sub> トリスを含むか又はそれからなり、且つ少なくとも 1 つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、オリゴヌクレオチドと更に共有結合する、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。サポニンは、タンパク毒素 (例えば、サポリン、ジアンチン) 又は H S P 2 7 B N A などの遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドといった分子の細胞内効果が、サポニンの存在下又は不在下で標的細胞と接触したときに評価される場合、そのエンドソーム脱出増強活性について選択される。本発明のコンジュゲート中に適用されるサポニンについては、典型的には、細胞のエンドソーム中のサポニンの存在は、毒素又はオリゴヌクレオチドが最初にエンドソーム中のサポニンと同一位置にある場合に、少なくとも第 1 0 倍で当該細胞のサイトゾル中の生物活性 (例えば、遺伝子サイレンシング、毒性) を増加させる、

40

## 【0 1 2 6】

一実施形態は、サポニンが、1 2, 1 3 - デヒドロオレアナン型の五環性トリテルペン

50

サポニンであり、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド官能基を有する、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

【0127】

一実施形態は、サポニンが、12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシド又はビデスモシドの五環性トリテルペンサポニンであり、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド官能基を有する、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートである。

【0128】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、サポニンは、

2 アルファーヒドロキシオレオール酸；

16 アルファーヒドロキシオレオール酸；

ヘデラゲニン（23-ヒドロキシオレオール酸）；

16 アルファ, 23-ジヒドロキシオレオール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

プロトエシゲニン21（2-メチルブタ-2-エノエート）-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；

ジギトゲニン；

3, 16, 28-トリヒドロキシオレオナン-12-エン；

ギブソゲン酸、

及び

これらの誘導体、

からなる群から選択されるアグリコンコア構造を含み、

好ましくは、サポニンは、キラ酸及びギブソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンアグリコンコア構造は、キラ酸又はその誘導体である。そのような好ましいアグリコン（又はその誘導体）は、C-23原子にアルデヒド基を含むか、又は他の箇所に本明細書に記載されるようなこれらの誘導体を含む。あらゆる論理に束縛されるものではないが、このようなアルデヒド基は、群Cから選択されるアグリコン、特にキラ酸及びギブソゲニンを含むトリテルペン配糖体型のサポニンのエンドソーム脱出を促進する活性に寄与する。

【0129】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC<sub>3</sub>原子又はC<sub>28</sub>原子、好ましくはC<sub>3</sub>原子に結合された第1の糖鎖を含み、及び／又は、少なくとも1つのサポニンは、少なくとも1つのサポニンのアグリコンコア構造のC<sub>28</sub>原子に結合された第2の糖鎖を含み、好ましくは、サポニンが第1の糖鎖と第2の糖鎖とを含む。したがって、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成されるサポニンが、2つのグリカン（糖鎖）を有する場合、第1の糖鎖はアグリコンコア構造のC<sub>3</sub>位で結合され、第2の糖鎖はアグリコンコア構造のC<sub>28</sub>位で結合される。

【0130】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、

・サポニンは、群A：

GlcA-

G l c -、  
 G a l -、  
 R h a - (1→2) - A r a -、  
 G a l - (1→2) - [X y l - (1→3)] - G l c A -、  
 G l c - (1→2) - [G l c - (1→4)] - G l c A -、  
 G l c - (1→2) - A r a - (1→3) - [G a l - (1→2)] - G l c A -、  
 X y l - (1→2) - A r a - (1→3) - [G a l - (1→2)] - G l c A -、  
 G l c - (1→3) - G a l - (1→2) - [X y l - (1→3)] - G l c - (1→4)  
 ) - G a l -、  
 R h a - (1→2) - G a l - (1→3) - [G l c - (1→2)] - G l c A -、  
 A r a - (1→4) - R h a - (1→2) - G l c - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - F u c - (1→2) - G l c - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - R h a - (1→2) - G a l - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - F u c - (1→2) - G a l - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - R h a - (1→2) - G l c - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - F u c - (1→2) - G l c - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - R h a - (1→2) - G a l - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 A r a - (1→4) - F u c - (1→2) - G a l - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - G l c - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - F u c - (1→2) - G l c - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - G a l - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - F u c - (1→2) - G a l - (1→2) - R h a - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - G l c - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - F u c - (1→2) - G l c - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - G a l - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1→4) - F u c - (1→2) - G a l - (1→2) - F u c - (1→2) -  
 G l c A -、及び  
 これらの誘導体  
 から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、  
 又は  
 ・サポニンは、群 B :  
 G l c -、  
 G a l -、  
 R h a - (1→2) - [X y l - (1→4)] - R h a -、  
 R h a - (1→2) - [A r a - (1→3) - X y l - (1→4)] - R h a -、

A r a -、  
 X y l -、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ R 1 - (→4) ] - F u c - (ここで、R  
 1は4 E -メトキシケイ皮酸である)、  
 X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ R 2 - (→4) ] - F u c - (ここで、R  
 2は4 Z -メトキシケイ皮酸である)、  
 X y l - (1→4) - [ G a l - (1→3) ] - R h a - (1→2) - 4 - O A c - F u  
 c -、  
 X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2) - 3, 4 - ジ - O A  
 c - F u c -、  
 X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2) - [ R 3 - (→4)  
 ] - 3 - O A c - F u c - (ここで、R 3は4 E -メトキシケイ皮酸である)、  
 G l c - (1→3) - X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2  
 ) - 4 - O A c - F u c -、  
 G l c - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - 4 - O A c - F u c -  
 、  
 ( A r a -又はX y l - ) (1→3) - ( A r a -又はX y l - ) (1→4) - ( R h a  
 -又はF u c - ) (1→2) - [ 4 - O A c - ( R h a -又はF u c - ) (1→4) ] -  
 ( R h a -又はF u c - )、  
 X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ Q u i - (1→4)  
 ] - F u c -、  
 A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2  
 ) - F u c -、  
 X y l - (1→4) - [ G a l - (1→3) ] - R h a - (1→2) - F u c -、  
 X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2) - F u c -、  
 A r a / X y l - (1→4) - R h a / F u c - (1→4) - [ G l c / G a l - (1→  
 2) ] - F u c -、  
 A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2  
 ) - [ R 4 - (→4) ] - F u c - (ここで、R 4は5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i  
 - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メ  
 チル - オクタン酸である)、  
 A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ R 5 - (→4) ] -  
 F u c - (ここで、R 5は5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3, 5 - ジヒドロキシ -  
 6 - メチル - オクタノイル ] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である)  
 )、  
 A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ R h a - (1→3)  
 ] - 4 - O A c - F u c -、  
 A p i - (1→3) - X y l - (1→4) - [ G l c - (1→3) ] - R h a - (1→2  
 ) - [ R h a - (1→3) ] - 4 - O A c - F u c -、  
 6 - O A c - G l c - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ 3 - O  
 A c - R h a - (1→3) ] - F u c -、  
 G l c - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ 3 - O A c - - R h  
 a - (1→3) ] - F u c -、  
 X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ Q u i - (1→4)  
 ] - F u c -、  
 G l c - (1→3) - [ X y l - (1→4) ] - R h a - (1→2) - [ Q u i - (1→  
 4) ] - F u c -、  
 G l c - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ X y l - (1→3)  
 - 4 - O A c - Q u i - (1→4) ] - F u c -、  
 X y l - (1→3) - X y l - (1→4) - R h a - (1→2) - [ 3, 4 - ジ - O A c

10

20

30

40

50

$-Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $6-OAc-Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)-4-OAc-Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc-$ 、  
 $Api/Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[Rha-(1\rightarrow3)]-4-OAc-Fuc-$ 、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[Rha-(1\rightarrow3)]-4-OAc-Fuc-$ 、  
 $Api/Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[R6-(\rightarrow4)]-Fuc-$ （ここで、R6は5-O-[5-O-Rha-(1\rightarrow2)-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））、  
 $Api/Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[R7-(\rightarrow4)]-Fuc-$ （式中、R7は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Api/Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[R8-(\rightarrow4)]-Fuc-$ （式中、R8は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[R9-(\rightarrow4)]-Fuc-$ （ここで、R9は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[R10-(\rightarrow4)]-Fuc-$ （ここで、R10は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[R11-(\rightarrow3)]-Fuc-$ （ここで、R11は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[R12-(\rightarrow3)]-Fuc-$ （ここで、R12は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である））、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Glc-(1\rightarrow6)]-Gal-$ 、及び  
 これらの誘導体  
 から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、  
 又は  
 ・サポニンは、アグリコンコア構造に結合した群Aから選択される第1の糖鎖と、アグリコンコア構造に結合した群Bから選択される第2の糖鎖とを含む、ビデスモシドトリテルペン配糖体（ビデスモシドトリテルペノイドサポニン、好ましくは五環性サポニン、より好ましくは12, 13-デヒドロオレアナン型のサポニン、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド官能基を有するサポニン）である。  
 【0131】

10

20

30

40

50

したがって、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成されるサポニンが、2つのグリカン（糖鎖）を有する場合、第1の糖鎖はアグリコンコア構造のC<sub>3</sub>位で結合され、第2の糖鎖はアグリコンコア構造のC<sub>28</sub>位で結合される。

#### 【0132】

あらゆる論理に束縛されるものではないが、アルデヒド基又はその誘導体がアグリコンコア構造（本明細書では、「アグリコン」とも称される）に存在することで、そのようなサポニンが細胞内で（当該細胞のエンドソーム内で）オリゴヌクレオチドなどのこれらの（エフェクター）分子と共存する場合、サポニンが（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を促進及び／又は増強する能力に有利なものとなる。したがって、アルデヒド基を含むアグリコンを有するサポニンから構成される、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートが好ましい。キラ酸及びギブソゲニン中では、アルデヒド基はアグリコンのC<sub>23</sub>原子にある。

#### 【0133】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、サポニンは、キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシドA（esculentoside A）、フィトラッカゲニン、エシネート、AS6.2、NP-005236、AMA-1、AMR、アルファヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AEX55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo、ベータエスシン、エスシンIa、茶種子サポニンI、茶種子サポニンJ、アッサムサポニンF、ジギトニン、プリムラ酸1及びAS64R、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくはサポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SO1832、SO1832誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくはサポニンは、SO1861誘導体である。より好ましくは、サポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体、及びそれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、SO1861及びそれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、サポニンは、SO1861誘導体若しくはSO1861、又はSO1832誘導体若しくはSO1832である。サポニンのそのような誘導体は、それらの非誘導体化天然対応物と同じ又は同様の程度までの、エンドソーム脱出増強誘導体である。

#### 【0134】

そのようなトリテルペン配糖体型のサポニンは、サポニンが細胞内のそのような（エフェクター）分子と共存する場合、細胞のエンドソーム（又はリソソーム）中に存在する、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに含まれるオリゴヌクレオチドなどの（エフェクター）分子のエンドソーム脱出を増強することができる。本発明者らは、サポニンが本発明のサポニンコンジュゲートに含まれる場合又はサポニンが本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに含まれる場合に、サポニンを細胞と接触させるとき、これらのサポ

ニンのエンドソーム脱出増強活性が少なくとも約5倍強力であること、即ち、少なくとも約10倍強力であること、例えば、10～1000倍強力であること、又は約100～1000倍強力であることを確立した。遊離サポニンは、細胞の細胞質ゾル中の（エフェクター）分子の送達を刺激することができ、このような細胞を（エフェクター）分子及びサポニンと接触させる場合、細胞の外側からエンドソームの内側へ、最終的にはサイトゾル中及び／又は当該細胞の核中で、（エフェクター）分子、例えばASO又はsiRNAから選択されるオリゴヌクレオチドなどの送達と同程度を達成するために必要とされる、本発明のサポニンコンジュゲートによって構成される、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成される同じサポニンの濃度と比較して、100～1000倍高いサポニン濃度である。そのようなエンドソーム脱出を促進する活性を呈するサポニン、及び（エフェクター）分子のサイトゾル送達を増強する能力が確立されているサポニンと高度な構造的類似性を有するサポニンを、表A1に列挙する。サポニンが本発明のサポニンコンジュゲートの一部であるか、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部である場合、単一のGalNAc部分又は3つの共有結合したGalNAc部分のクラスターなどのリガンドがASGPR1などのASGPRのために結合する際、当該細胞上の標的細胞、好ましくは肝臓細胞上の細胞表面結合部位へと、及びエンドサイトーシス後に当該細胞のエンドソームへと、サポニンを標的送達することは、標的細胞のASGPRに結合するためのASGPRのリガンドが提供されていない遊離の非標的サポニンと同じ細胞を接触させることと比較して、少なくとも5～10倍効果的（強力）、例えば約100～1000倍効果的（強力）である。

10

20

#### 【0135】

典型的には、本発明のサポニンコンジュゲート及び本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートでは、コンジュゲートがASGPR保有細胞によって取り込まれ、エンドソームに輸送されると、コンジュゲート中の共有結合したサポニンがコンジュゲートから切断される（放出される）。エンドソームにおいて、化学的条件及び／又はpHとは、サポニンとコンジュゲートの残部との間の共有結合が切断され、サポニンがエンドソームにおいて遊離形態で放出されるようなものである。切断されたサポニンはその天然の化学構造を有することが好ましい。例えば、サポニンのアルデヒド基が、サポニンのGalNAc部分（典型的には、リンカーを介する）及び／又はオリゴヌクレオチド（典型的には、リンカーを介する）への共有結合的カップリングにおいて暗示される場合、エンドソームにおいてコンジュゲートから放出されるサポニンは、脱カップリング化学の影響下で形成されるこのアルデヒド基を再び含むことが好ましい。あらゆる論理に束縛されるものではないが、その遊離形態（好ましくは、自由にアクセス可能なアルデヒド基を有し、好ましくはサポニンのアグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド官能基を有する）のサポニンは、エンドソームにおいて最適なエンドソーム脱出増強活性を発揮すると考えられる。サポニンは、ヒト細胞、例えば腫瘍細胞、肝臓細胞などの哺乳動物細胞といった細胞のエンドソーム中の酸性pHの影響下において、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介してサポニンが結合しているコンジュゲートから切断される。したがって、サポニンは、切断可能な結合、好ましくは細胞のエンドソーム内で切断される切断可能な共有結合、例えばエンドソーム中の酸性条件に起因して切断される結合などを介して、本発明のコンジュゲート中で共有結合されることが好ましい。

30

40

#### 【0136】

50

【表 1】

| 表 A1.(後期)エンドソーム/リソソーム脱出増強活性を示すサポニン、及び(後期)エンドソーム/リソソーム脱出増強活性を示すこのようなサポニンによく似た構造を含むサポニン |                          |                                                                                                                       |                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| サポニン名                                                                                 | アグリコンコア                  | C-3 $\beta$ -OH 基<br>における炭水化物<br>置換基                                                                                  | C-28-OH 基における炭水化物置換基                                                                                                             |
| NP-005236                                                                             | 2 アルファ-ヒドロキシオレオノール酸      | GlcA-                                                                                                                 | Glc/Gal-                                                                                                                         |
| AMA-1                                                                                 | 16 アルファ-ヒドロキシオレオノール酸     | Glc-                                                                                                                  | Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-Rha-                                                                           |
| AMR                                                                                   | 16 アルファ-ヒドロキシオレオノール酸     | Glc-                                                                                                                  | Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-Rha-                                                   |
| アルファ-ヘデリン                                                                             | ヘデラゲニン(23-ヒドロキシオレオノール酸)  | Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-Ara-                                                                                          | -                                                                                                                                |
| NP-012672                                                                             | 16 アルファ,23-ジヒドロキシオレオノール酸 | Ara/Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-Glc/Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-GlcA- | Ara/Xyl-                                                                                                                         |
| NP-017777                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-( $\rightarrow$ 4)]-Fuc-(R=4E-メトキシケイ皮酸)                                       |
| NP-017778                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-( $\rightarrow$ 4)]-Fuc-(R=4Z-メトキシケイ皮酸)                                       |
| NP-017774                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Gal-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-OAc-Fuc-                                             |
| NP-018110 <sup>c</sup> 、NP-017772 <sup>d</sup>                                        | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-ジ-OAc-Fuc-                                         |
| NP-018109                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-( $\rightarrow$ 4)]-3-OAc-Fuc-(R=4E-メトキシケイ皮酸)       |
| NP-017888                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-OAc-Fuc-                     |
| NP-017889                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-OAc-Fuc-                                               |
| NP-018108                                                                             | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Ara/Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)-Ara/Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 4)]-Rha/Fuc- |
| SA1641 <sup>a</sup> 、AE X55 <sup>b</sup>                                              | ギブソゲニン                   | Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-                                                               | Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[Qui-(1 $\rightarrow$ 4)]-Fuc-                           |

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 2】

|           |     |                             |                                                                                                                                 |
|-----------|-----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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-<br>(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-<br>(R=5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸)             |
| NP-017706 | キラ酸 | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-                                                                            |
| NP-017705 | キラ酸 | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-                                                                |
| 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-                                                                                |
| SO1861    | 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-                                                                  |
| GE1741    | キラ酸 | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-di-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-                                                                                            |

10

20

30

40

【0138】

【表 3】

|                         |        |                             |                                                                                                                                               |    |
|-------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SO1584                  | キラ酸    | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | 6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-                                                                                                    |    |
| SO1658                  | ギブソゲニン | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-                                                                                                |    |
| SO1674                  | キラ酸    | Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA- | Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-                                                                                                |    |
| SO1832                  | 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-                                                                                | 10 |
| QS-7(QS1861 とも称される)     | 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(QS1862 とも称される) | 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-<br>(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) | 20 |
| 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-<br>(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-<br>(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-<br>(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)                           | 30 |
| 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-<br>(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-<br>(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)                           | 40 |

【 0 1 3 9 】

【表 4】

|                                                          |                                                       |                                                |                            |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|
| ベータエスシン(記載:エスシン Ia)                                      | プロトエシゲニン<br>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-                    | -                          |
| 茶種子サポニン I                                                | 23-オキソ-パリンゲトゲノール 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-          | -                          |
| 茶種子サポニン J                                                | 23-オキソ-パリンゲトゲノール 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-          | -                          |
| アッサムサポニン F                                               | 23-オキソ-パリンゲトゲノール 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-          | -                          |
| ジギトニン                                                    | ジギトゲニン                                                | Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal- | -                          |
| プリムラ酸 I                                                  | 3,16,28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン                            | Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-          | -                          |
| AS64R                                                    | ギブソゲン酸                                                | -                                              | Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal- |
|                                                          |                                                       | C-23-OH 基における炭水化物置換基                           |                            |
| AS6,2                                                    | ギブソゲン酸                                                | Gal-                                           | Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal- |
| a, b:異なる名称は、同じ構造の異なる単離株を指す<br>c, d:異なる名称は、同じ構造の異なる単離株を指す |                                                       |                                                |                            |

## 【0140】

実施形態では、サポニンコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、少なくとも1つのサポニンを含み、ここで、サポニンは以下の誘導体である：

- i. サポニンのアグリコンコア構造は、誘導体化されたアルデヒド基を含む；
- ii. サポニンの糖鎖、好ましくは群 A から選択される糖鎖は、誘導体化されたカルボキシル基を含む；
- iii. サポニンの糖鎖、好ましくは群 B から選択される糖鎖は、誘導体化されたアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含む；又は
- iv. 誘導体化 (i)、(ii) 及び／若しくは (iii) の任意の組合せが存在する。

## 【0141】

アグリコンコア構造のアルデヒド基に対する例示的な誘導体化 (i) としては、一級アルコールなどのアルコールへの還元；ヒドラゾン (官能基) 若しくはセミカルバゾン (官能基) への変換；ヘミアセタールへの変換；アセタールへの変換；カルボキシルへの酸化；イミンへの変換、オキシムへの変換；β-ヒドロキシケトンへの変換；又はエノンへの変換、好ましくは一級アルコールなどのアルコールへの還元；又はヒドラゾン (官能基) 若しくはセミカルバゾン (官能基) への変換が挙げられる。本発明のコンジュゲートの誘導体化サポニンは、本発明のサポニンコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートを取り込む細胞のエンドソーム中に一旦存在すると、そのエンドソーム脱出増強活性を依然として発揮する。

## 【0142】

実施形態では、サポニンは誘導体であり、アグリコンコア構造は、

— 一級アルコールなどのアルコールへの還元；又は

— 式  $R^b H C = N N H R^a$  のヒドラゾンへの転換；好ましくは式  $R^b H C = N N H (C O) R^a$  のヒドラゾンへの転換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、式中、 $R^a$  は、20個未満の炭素原子、好ましくは10個未満の炭素原子を含む基であり、 $R^b$  はサポニンの残部である。好ましくは、 $R^a$  はN-アルキル化マレイミドである。特定の実施形態では、アルデヒド基は、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH)、N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH)、又はN-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応によってヒドラゾン結合に変換されている。

10

【0143】

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

【0144】

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

【0145】

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

— 一級アルコールなどのアルコールへの還元；

— 式  $R^a N H (C O) R^b$  のアミドへの変換；又は

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

20

30

【0146】

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

【0147】

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

【0148】

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

40

— 脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換；又は

— 脱アセチル化による二級アルコールなどのアルコールへの変換、その後得られたアルコールの式  $R^a O R^b$  のエーテル、式  $R^a (C O) O R^b$  のエステル、若しくは式  $R^a (C O) R^b$  のケトンへの変換によって誘導体化されているアセトキシ基を含み、式中、 $R^a$  は、20個未満の炭素原子、好ましくは10個未満の炭素原子を含む基であり、 $R^b$  はサポニンの残部である。好ましくは、 $R^a$  はN-アルキル化マレイミド又はジオールである。

【0149】

したがって、実施形態では、サポニンは誘導体であり：

50

i. アグリコンコア構造は、

- アルコールへの還元；
- N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応による、ヒドラゾン結合への変換；
- N-[β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応による、ヒドラゾン結合への変換；又は
- N-[κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応による、ヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含むか；

ii. 群Aから選択される糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) 若しくはN-(2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されている、グルクロン酸部分のカルボキシル基を含み；

iii. 群Bから選択される糖鎖が、ヒドロキシル基 (HO-) への変換によって誘導体化されているアセトキシ基 (Me (CO) O-) を含むか；又は

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

【0150】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体は、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含むか；

ii. サポニン誘導体は、誘導体化されたカルボキシル基を含む糖鎖、好ましくは群Aから選択される糖鎖を含むか；

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

iv. サポニン誘導体は、誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. の任意の組合せ、好ましくは誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含む。

【0151】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、サポニンは、以下：SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21 A-apy、QS-21 A-xylyl、QS-21B、QS-21 B-apy、QS-21 B-xylyl、QS-7-xylyl、QS-7-apy、QS-17-apy、QS-17-xylyl、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM (Saponinum album)、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシドA、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組合せのうちいずれか1つ以上であり、好ましくはサポニンは、QS-21、QS-21誘導体、SO1861、SO1861誘導体、SO1832、SA1641、SA1641誘導体、GE1741、GE1741誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくはサポニンは、SO1861誘導体である。最も好ましくは、サポニンは、QS-21誘導体、SO1861誘導体、SO1861、及びそれらの組合せからなる群から選択され、更により好ましくは、サポニンは、SO1861誘導体若しくはSO1861、又はSO1832誘導体若しくはSO1832である。

【0152】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、サポニンは、本発明によるキラ酸サポニン又はギブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子1：

【0153】

10

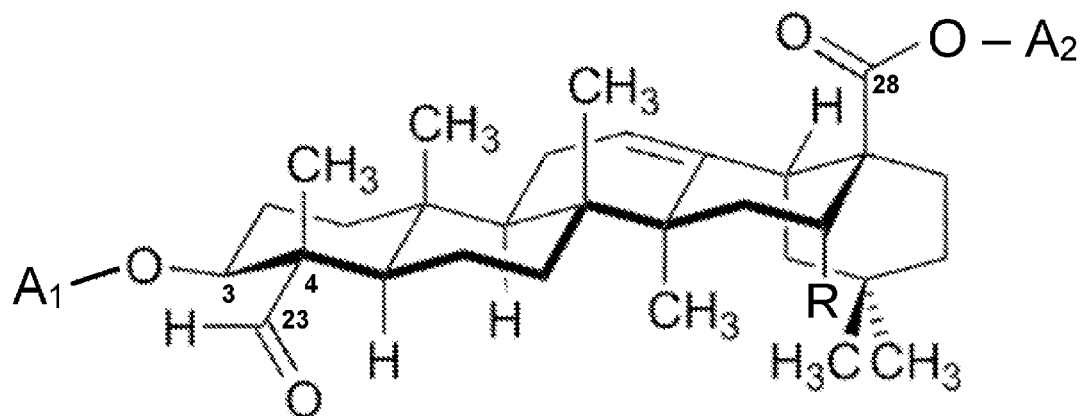
20

30

40

50

【化 1 3】



(分子1)

10

【0 1 5 4】

(式中、

A<sub>1</sub>は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>1</sub>は群Aから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>1</sub>は群Aから選択される糖鎖を表し、A<sub>1</sub>はグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；

20

A<sub>2</sub>は水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>2</sub>は群Bから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>2</sub>は群Bから選択される糖鎖を表し、及びA<sub>2</sub>は少なくとも1つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば1、2、3、又は4つなどのアセトキシ基を含み、

式中、A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の少なくとも1つが水素でなく、好ましくはA<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の両方がオリゴ糖鎖であり；

並びに、Rがギブソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである) で表され；

サポニン誘導体は、分子1で表されるサポニンに対応し、以下の誘導体化；

i. キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、誘導体化されており；

30

ii. A<sub>1</sub>が群Aから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されている；及び

iii. A<sub>2</sub>が群Bから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、A<sub>2</sub>の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている

のうち少なくとも1つ、好ましくは1又は2つ、より好ましくは1つが存在する。

【0 1 5 5】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、A<sub>1</sub>が群Aから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されているか、及び／又は、A<sub>2</sub>が群Bから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含み、A<sub>2</sub>の少なくとも1つのアセトキシ基が誘導体化されている。

40

【0 1 5 6】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、分子1で表されるサポニンが、ビデスモシドトリテルペンサポニンである。

【0 1 5 7】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、サポニン誘導体が、分子1で表されるサポニンに対応するものであ

50

り、以下の誘導体化：

i. キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、

— アルコールへの還元；

— N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、それによってSO1861-ALD-EMCH若しくはQS-21-ALD-EMCHなどのサポニン-ALD-EMCHがもたらされ、ここで、EMCHのマレイミド基が、任意選択的にメルカプトエタノールとのチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

— N-[β-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

— N-[κ-マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

ii. A<sub>1</sub>が群Aから選択される糖鎖を表し、及びA<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなる場合、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール（AMPD）若しくはN-（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによってQS-21-GLU-AMPD若しくはSO1861-GLU-AMPDなどのサポニン-GLU-AMPD、若しくはQS-21-GLU-AEM若しくはSO1861-GLU-AEMなどのサポニン-GLU-AEMがもたらされ；

iii. A<sub>2</sub>が群Bから選択される糖鎖を表し、及びA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、A<sub>2</sub>の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（HO-）への変換によって誘導体化されている

の少なくとも1つが存在する。

【0158】

—実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、A<sub>1</sub>は、Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-GlcA、及び／又は、A<sub>2</sub>は、Glc-（1→3）-Xyl-（1→4）-Rha-（1→2）-[Xyl-（1→3）-4-OAc-Qui-（1→4）]-Fucであり、好ましくは、分子1で表されるサポニンが、3-O-β-D-ガラクトピラノシル-（1→2）-[β-D-キシロピラノシル-（1→3）]-β-D-グルクロノピラノシルキラ酸28-O-β-D-グルコピラノシル-（1→3）-β-D-キシロピラノシル-（1→4）-α-L-ラムノピラノシル-（1→2）-[β-D-キシロピラノシル-（1→3）-4-OAc-β-D-キノボピラノシル-（1→4）]-β-D-フコピラノシドであり、より好ましくはSO1861、SO1832、GE1741、SA1641、及びQS-21、又はこれらの誘導体、最も好ましくはSO1861若しくはその誘導体、又はSO1832誘導体若しくはSO1832のいずれか1つ以上である。

【0159】

—実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体は、

— 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）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、それによってSO1861-ALD-EMCH若しくはQS-21-ALD-EMCHなどのサポニン-ALD-EMCHがもたらされ、ここで、EM

10

20

30

40

50

C Hのマレイミド基が、任意選択的にメルカプトエタノールとのチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

－ N－[β-マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド(BMPH)との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－ N－[κ-マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド(KMUH)との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

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

i i i. サポニン誘導体は、脱アセチル化によるヒドロキシル基(HO-)への変換によって誘導体化されているアセトキシ(Me(CO)O-)基を含む、好ましくは群Bから選択される糖鎖を含むか；又は

i v. サポニン誘導体は、誘導体化i.、誘導体化i i.及び誘導体化i i i.の任意の組合せ、好ましくは誘導体化i.、誘導体化i i.及び誘導体化i i i.のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含み；

好ましくは、サポニン誘導体は、アグリコンコア構造を含み、アグリコンコア構造が、EMCHとの反応を介したヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、EMCHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される。

#### 【0160】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、サポニンはサポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体は、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド(EMCH)との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってSO1861-Al d-EMCH若しくはQS-21-Al d-EMCHなどのサポニン-Al d-EMCHがもたらされ；

i i. サポニン誘導体は、糖鎖、好ましくは群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされるか；又は

i i i. サポニン誘導体は、誘導体化i.及び誘導体化i i.の組合せを含む。

#### 【0161】

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

#### 【0162】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコン

10

20

30

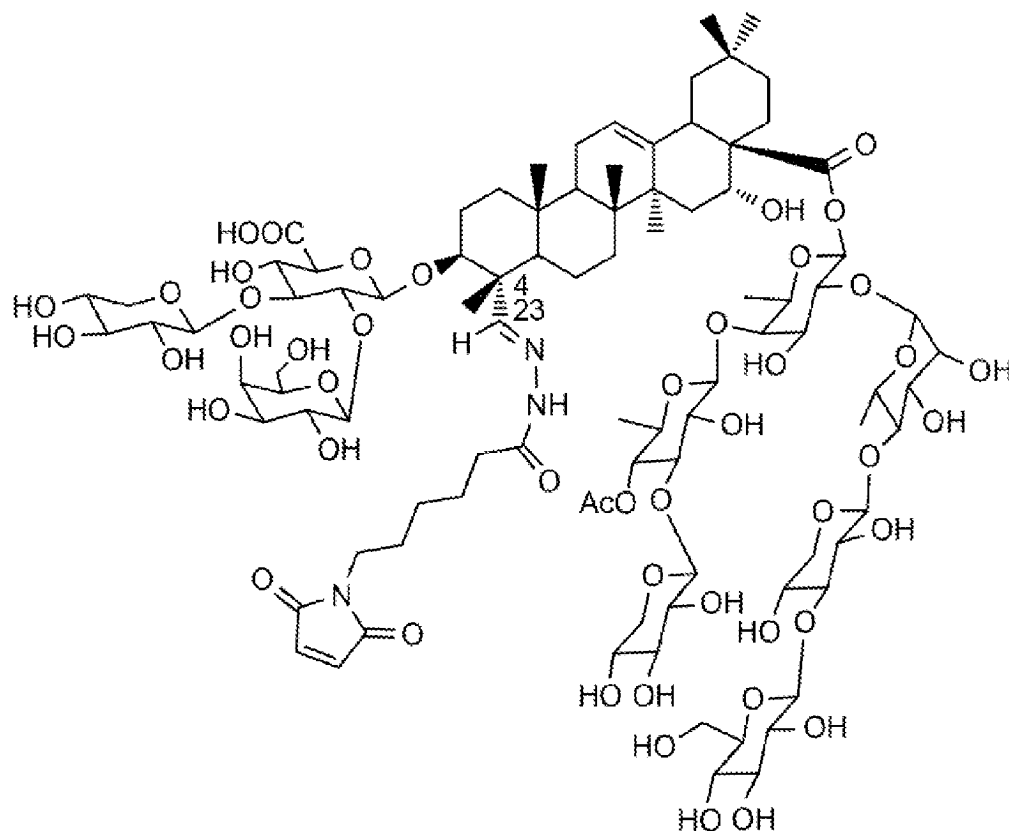
40

50

ジュゲートであり、ここで、サポニン誘導体は、分子 2 によって表されるか、

【 0 1 6 3 】

【 化 1 4 】



(分子2)

【 0 1 6 4 】

又は、サポニン誘導体は、分子 3 によって表される：

【 0 1 6 5 】

10

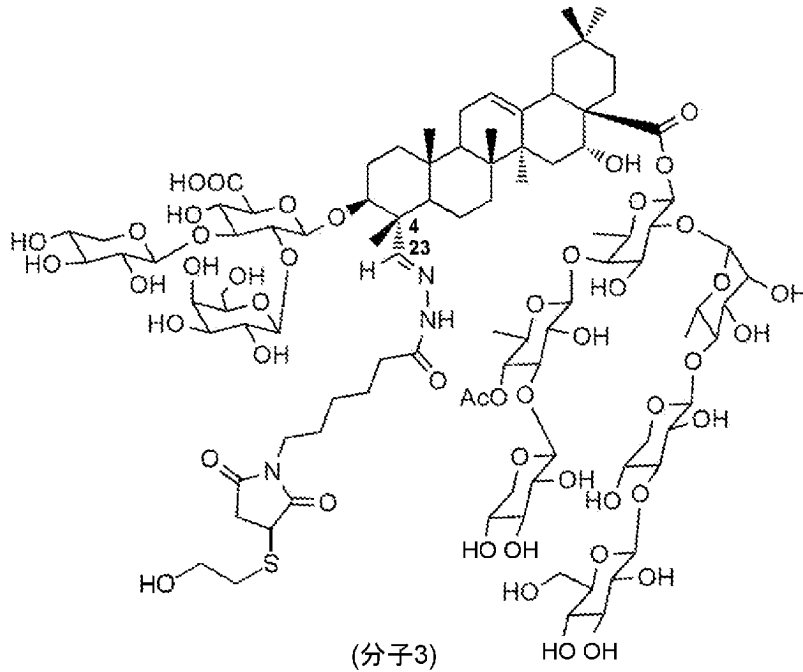
20

30

40

50

## 【化 1 5】



## 【0166】

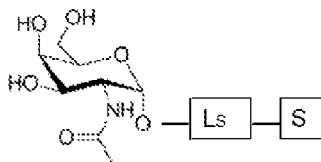
一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、少なくとも1つのサポニン及びASGPRのリガンドが、直接共有結合されているか、又は少なくとも1つのリンカーを介して共有結合されている。一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのサポニン及びASGPRのリガンドは、直接若しくは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は少なくとも1つのサポニン及びオリゴヌクレオチドは、直接若しくは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又はASGPRのリガンド及びオリゴヌクレオチドは、直接若しくは少なくとも1つのリンカー、好ましくは少なくとも1つのサポニンを介して共有結合しており、ASGPRのリガンド及びオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのリンカーを介して連結している。

## 【0167】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、GalNAc部分は、サポニンS、好ましくは式(II)<sub>s</sub>で表されるようなサポニンリンカーL<sub>s</sub>を介して結合される：

## 【0168】

## 【化 1 6】

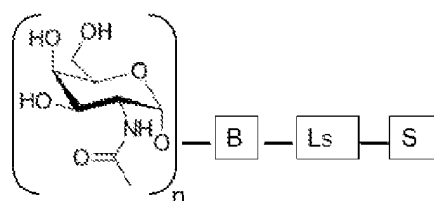
(II)<sub>s</sub>

## 【0169】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、GalNAc部分は、各々、GalNAc部分の「1」位の酸素を介して中央の架橋部分Bへと別々に共有結合しており、これは、式(III)<sub>s</sub>に示されるように、GalNAc部分とサポニン部分との間に、好ましくはサポニン部分リンカーL<sub>s</sub>を介して、架橋を効果的に形成する：

【 0 1 7 0 】

【 化 1 7 】

(III)<sub>s</sub>

10

【 0 1 7 1 】

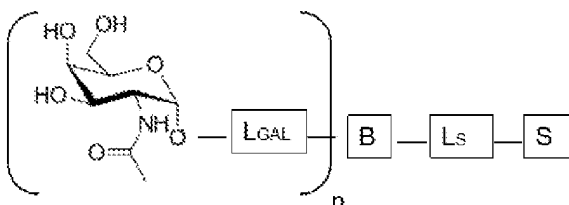
式中、 $n$ は2以上の整数であり、好ましくは $n$ は3であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である。

【 0 1 7 2 】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、 $GalNAc$ 部分は、式(IV)<sub>s</sub>に示すように、 $GalNAc$ リンカー $LGAL$ を介して架橋部分 $B$ へと結合される：

【 0 1 7 3 】

【 化 1 8 】

(IV)<sub>s</sub>

20

【 0 1 7 4 】

式中、 $n$ は2以上の整数であり、好ましくは $n$ は3であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である。

30

【 0 1 7 5 】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、サポニン部分リンカー $L_s$ は、式(II)<sub>s</sub>におけるような $GalNAc$ 、又は式(III)<sub>s</sub>及び(IV)<sub>s</sub>におけるような架橋部分 $B$ にサポニンを共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。

【 0 1 7 6 】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、サポニン部分リンカー $L_s$ は、 $GalNAc$ 又は架橋部分 $B$ に共有結合された少なくとも第1の前駆体 $L_{s1}$ と、サポニン部分に共有結合された第2の前駆体 $L_{s2}$ との間のカップリング反応の結果生じるものであり、 $L_{s1}$ は $GalNAc$ 又は架橋部分 $B$ に共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体であり、 $L_{s2}$ はサポニン部分に共有結合されたサポニン部分リンカー $L_s$ の前駆体である。

40

【 0 1 7 7 】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、サポニン部分リンカー $L_s$ は、 $GalNAc$ 又は架橋部分 $B$ に共有結合された少なくとも第1の前駆体 $L_{s1}$ と、サポニン部分に共有結合された第2の前駆体 $L_{s2}$ との間のカップリング反応の結果生じるものであり、カップリング反応は、アジド-アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応及び炭素-炭素二重結合の付加からなる群から選択され、好ましくはアジド-アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウデ

50

インガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環であり、より好ましくはアジドアルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである。

【0178】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、サポニン部分リンカー  $L_S$  は、 $G a l N A c$  又は架橋部分  $B$  に共有結合される第1の前駆体  $L_{S1}$ 、アジドを含む第1の前駆体  $L_{S1}$  と、サポニン部分に共有結合される第2の前駆体  $L_{S2}$ 、アルキンを含み、好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含む第2の前駆体  $L_{S2}$  と、の間のカップリング反応の結果生じるものである。

【0179】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、前駆体  $L_{S1}$  の構造は、以下の式 (XVII) のアジドである：

【0180】

【化19】



(XVII)

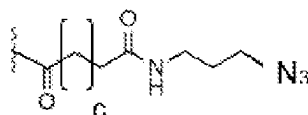
【0181】

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

前駆体  $L_{S1}$  の構造は、以下の式 (XVIII) のアジドを含み：

【0182】

【化20】



(XVIII)

【0183】

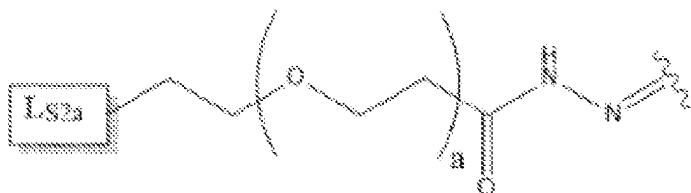
式中、 $c$  は0以上の整数を表し、好ましくは5～15の範囲の整数を表し、より好ましくは9を表す。

【0184】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、前駆体  $L_{S2}$  の構造は、以下の式 (XIX) のヒドラゾンを含み：

【0185】

【化21】



(XIX)

【0186】

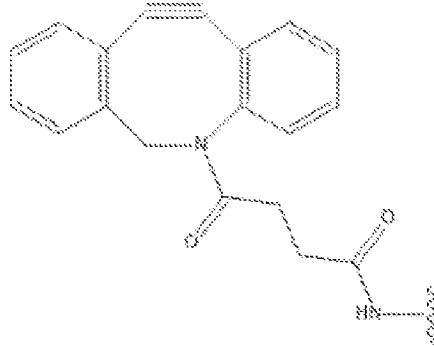
式中、 $a$  は0以上の整数を表し、好ましくは2～6の範囲の整数を表し、より好ましくは4を表し、 $L_{S2a}$  はアルキン含有部分を表す。

【0187】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、 $L_{S2a}$  は、20個未満の炭素原子を含み、好ましくは $L_{S2a}$  は、式 (XX) に従った部分を表す：

【0188】

【化22】



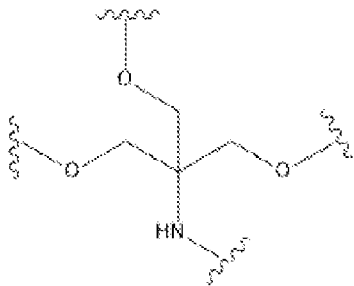
(XX)

【0189】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、架橋部分は、式 (XV) の化合物であり：

【0190】

【化23】



(XV)

【0191】

式中、式 (XV) の化合物の酸素原子は、 $GalNAc$  又は  $GalNAc$  リンカー- $L_{GAL}$  に結合され、式 (XV) の化合物の窒素原子は、サポニン部分リンカー- $L_S$  に結合されている。

【0192】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、 $L_{GAL}$  は、 $GalNAc$  を架橋部分 B に共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。

【0193】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、 $L_{GAL}$  は、2～25個の炭素原子、好ましくは7～15個の炭素原子、より好ましくは11個の炭素原子を含み、 $L_{GAL}$  は、少なくとも1つ、好ましくは2つのアミド部分を含む。

【0194】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、 $L_{GAL}$  は、式 (XVI) による化合物である：

10

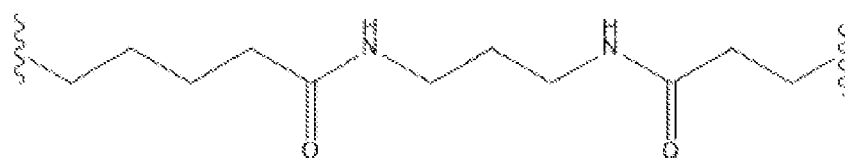
20

30

40

50

【化 2 4】



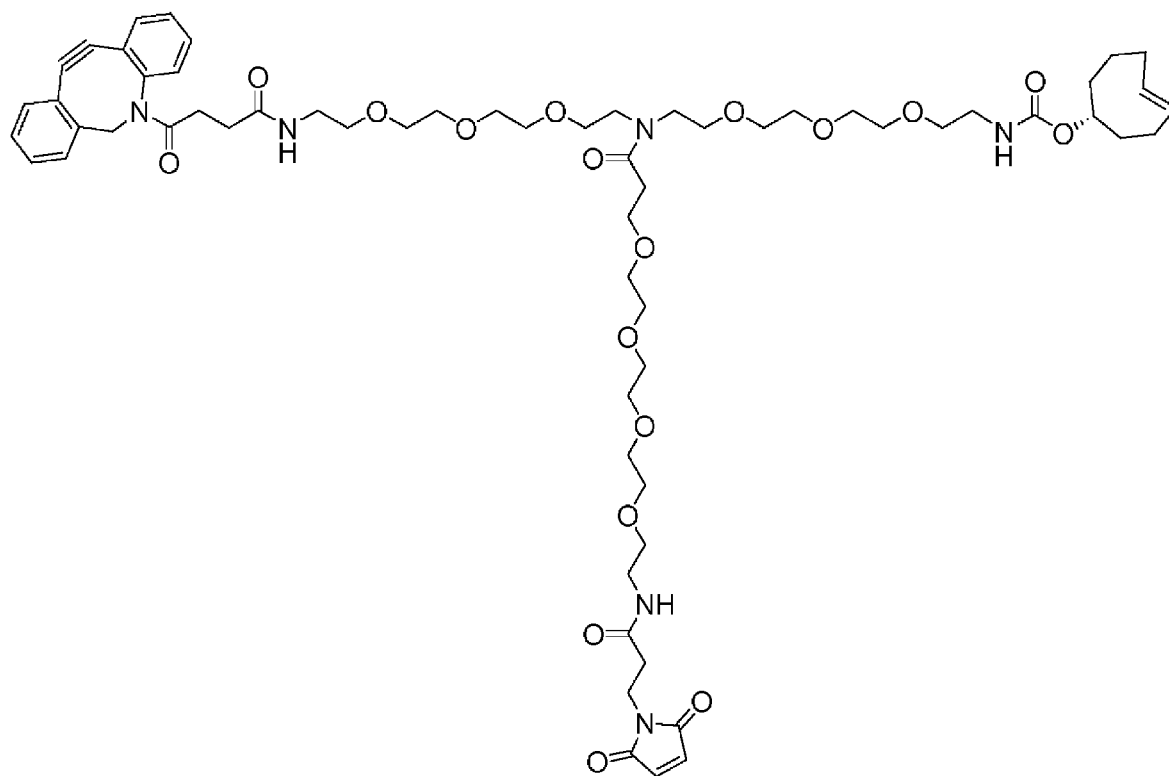
(XVI)

10

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、及びオリゴヌクレオチドは、三官能性リンカーを介して共有結合しており、好ましくは、GalNAc部分、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの各々が、三官能性リンカーの別個のアームに共有結合している。本発明の好ましいオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、オリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、好ましくは1～16個のサポニン部分、より好ましくは1個、4個、又は8個のサポニン部分などの1～8個のサポニン部分、及びオリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して、好ましくは三官能性リンカーの別個のアームに共有結合したGalNAc部分、サポニン部分、及びオリゴヌクレオチドの各々と共有結合している、オリゴヌクレオチドコンジュゲートである。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートへの組み込みに好適である三官能性リンカーの例は、式(XXI)：

20

【化 2 5】



(XXI)

30

40

50

によって表される三官能性リンカーである。

【0199】

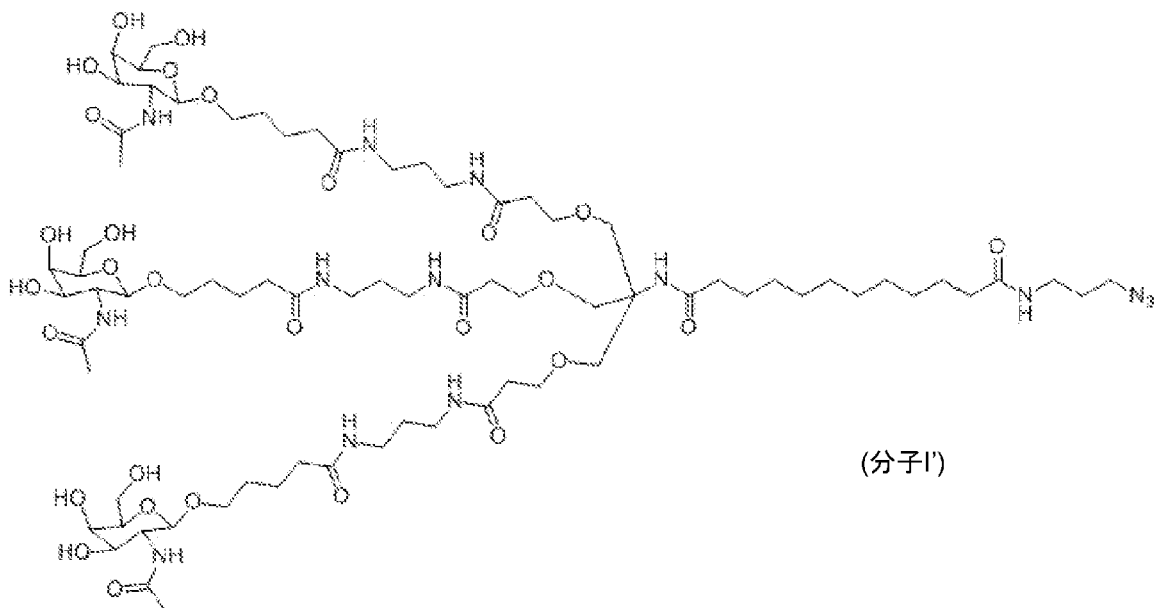
一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、式(XXI)によって表される三官能性リンカーなどの三官能性リンカーは、リンカーの第1アームを介して1つ以上のサポニン部分、好ましくは1~16個のサポニン部分、より好ましくは1、4又は8個のサポニン部分などの1~8個のサポニン部分に共有結合し、少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは1~4個のGalNAc部分、より好ましくは3個のGalNAc部分に共有結合し、三官能性リンカーの第3アームを介してオリゴヌクレオチド、好ましくはBNA又はsiRNAなどのAONに共有結合している。

【0200】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、ASGPRのリガンドは、分子I'によって表される(GalNAc)<sub>3</sub>トリスである：

【0201】

【化26】

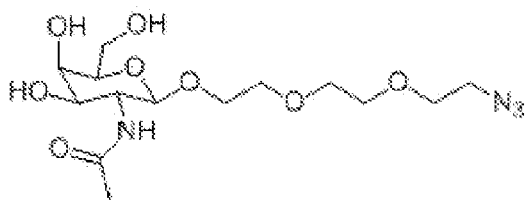


【0202】

又はASGPRのリガンドは、分子II'分子I'によって表されるモノ-GalNAcである：

【0203】

【化27】



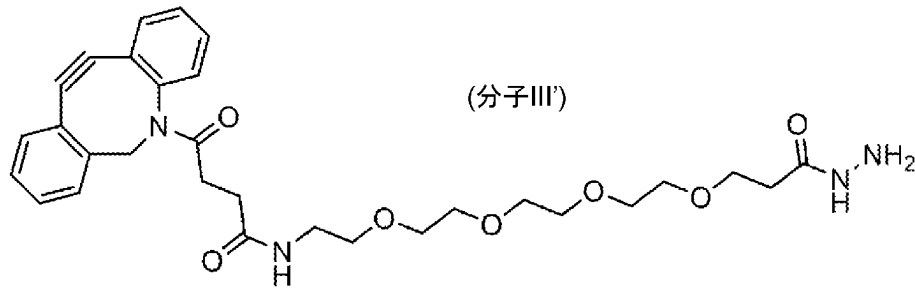
【0204】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、分子III'によって表されるリンカーを介して本発明の分子I'又は分子I 50

Ⅰ' に共有結合しており：

【0205】

【化28】



10

【0206】

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

【0207】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、少なくとも1つの切断可能リンカーを介してASGPRのリガンドに共有結合しており、及び／又は少なくとも1つのサポニンが、少なくとも1つの切断可能リンカーを介してオリゴヌクレオチドに共有結合している。

20

【0208】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、少なくとも1つのサポニンは、少なくとも1つの切断可能リンカーを介してASGPRのリガンドに共有結合している。

【0209】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、切断可能リンカーは、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、好ましくは、切断可能リンカーは、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／又はタンパク質分解、例えば、カテプシンBによるタンパク質分解を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む。

30

【0210】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、切断可能リンカーは、例えば哺乳動物細胞など、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくはpH4.0～6.5、より好ましくはpH≤5.5でインビボ切断を受ける。

【0211】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、コンジュゲートは、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、若しくは1～100のサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば7、9、12などのサポニン部分、好ましくは1、4、若しくは8つのサポニン部分を含む。サポニンSO1861若しくはSO1832又はそれらの官能性誘導体が好ましく、例えば、QS-21もまた好適なサポニン又はその官能性誘導体である。

40

【0212】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、コンジュゲートは、1個のサポニン部分を含む。一実施形態は、本

50

発明のサポニンコンジュゲート又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、コンジュゲートは、4個又は8個のサポニン部分を含む。

【0213】

本発明のコンジュゲート並びに本発明のサポニンコンジュゲート及びオリゴヌクレオチドコンジュゲートの適用の多くの利点の1つは、オリゴヌクレオチドと一緒にサポニンと同時接触していない細胞によって取り込まれたときのオリゴヌクレオチドの活性と比較した場合、改善された細胞内オリゴヌクレオチド活性（遺伝子サイレンシング活性など）を達成するのに好適なコンジュゲート中のサポニン部分の数を選択及び選択する可能性である。本発明者らは、本発明のコンジュゲート中に単一のサポニン部分を組み込むことが、遺伝子サイレンシングとして測定される場合、改善された細胞内オリゴヌクレオチド活性を達成するために既に充分であることを実証している（実施例の節を参照されたい）。更なる例では、遺伝子サイレンシングが、例えば、本発明のコンジュゲート中に4個又は8個のサポニン部分を含めることによって更に改善されることが実証される。サポニンコンジュゲート及びオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、サポニンコンジュゲートでは1～64個又は更にそれを超える任意の数、例えば128個などのサポニン部分をGalNAc部分、好ましくは3個のGalNAc部分に対して、又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートではGalNAc部分及びオリゴヌクレオチドに対して、カップリングさせる自由度を提供する。上記のように、本発明者らは、驚くべきことに、サポニンとGalNAcとを組み合わせること、又はサポニン、GalNAc、及びオリゴヌクレオチドを組み合わせることが、コンジュゲート中の成分のいずれの生物活性も妨げないことを見出した。更に、コンジュゲート中のサポニン部分の数を増加させることにより、オリゴヌクレオチド活性を改善することができる。あらゆる論理に束縛されるものではないが、サポニン部分の数の増加は、細胞によって取り込まれエンドソームに移されると、サポニンのエンドソーム脱出増強活性を増加させる。投与されたオリゴヌクレオチドは、サポニンと共にエンドソーム中に存在するオリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部として又はGalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲートとして分離して、改善されたサポニン媒介エンドソーム脱出活性の結果として、エンドソームからサイトゾルへとより効率的に移され、遺伝子サイレンシング活性の増加をもたらす。例えば、コンジュゲート中に1つ以上のサポニン部分を組み込む可能性は、選択されたオリゴヌクレオチドによる最適な遺伝子サイレンシングが考慮される場合、コンジュゲートの個別化された設計を可能にする。例えば1～2%の効率でエンドソームからサイトゾルに比較的非効率的に移行するオリゴヌクレオチドは、コンジュゲート中に単一のサポニン部分が存在することから利益を得る（オリゴヌクレオチドコンジュゲート中では1：1の比）が、一方でエンドソームからサイトゾル中へと低い程度まで放出されるオリゴヌクレオチドは、コンジュゲート中に単一のサポニン部分より多く、例えば2～100部分、2～64部分、2～34部分、2～16部分、4～12部分、4～8部分などを適用することによって、サイトゾル中に徐々に移行し得る。2つ以上のサポニン部分を組み込むための好適な方法は、例えば、G2、G3、又はG4デンドロンなどの本発明のコンジュゲート中にデンドロンを組み込むこと、例えば、コンジュゲート中で4つ又は8つ又は16個のサポニン部分を一緒に結合させることである。実施例の項では、改善された遺伝子サイレンシング（選択された時点でのサイレンシングの程度、標的遺伝子のサイレンシングの期間）の例が、例えば、単一のサポニン部分、4つのサポニン部分、及び8つのサポニン部分を含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートについて提供される。本発明者らは、細胞を本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させることによって、サポニンの不在下においてオリゴヌクレオチドと接触させた細胞における遺伝子サイレンシングと比較した場合、特定の時点での遺伝子サイレンシングの程度が改善され、遺伝子サイレンシングの持続時間も延長されることを確立した。

【0214】

本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートでは、1つ又は3つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分を含むコンジュゲートが好適である（且つ、好ましい）。

## 【0215】

本発明によれば、サポニンは、典型的には、SO1861又はSO1832の1つ以上の部分（SO1831ともまた称される）、例えばSO1861又はSO1832の1～32部分など、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、若しくは16部分、より好ましくは1、2、4、8、12、若しくは16部分、最も好ましくは1、4、若しくは8部分、例えば1、4、若しくは8 SO1861、又は1、4、若しくは8 SO1832である。本発明者らは、エンドソーム中のオリゴヌクレオチド（又はタンパク毒素）に対するエンドソーム脱出増強活性が考慮される場合、SO1832がSO1861とほぼ同等に活性であることを確立した。上記で概説したように、細胞をオリゴヌクレオチドと接触させた際の遺伝子サイレンシングの程度及び持続時間を考慮する場合、サポニン部分の数を本発明のコンジュゲートのために最適化することができる。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートでは、これはまた、本発明のコンジュゲート中のGalNAc部分の数にも当てはまる。典型的には、1つ又は3つのGalNAc部分が本発明のコンジュゲートに含まれる場合、最適な遺伝子サイレンシング（程度及び／又は持続時間）が確立される。

10

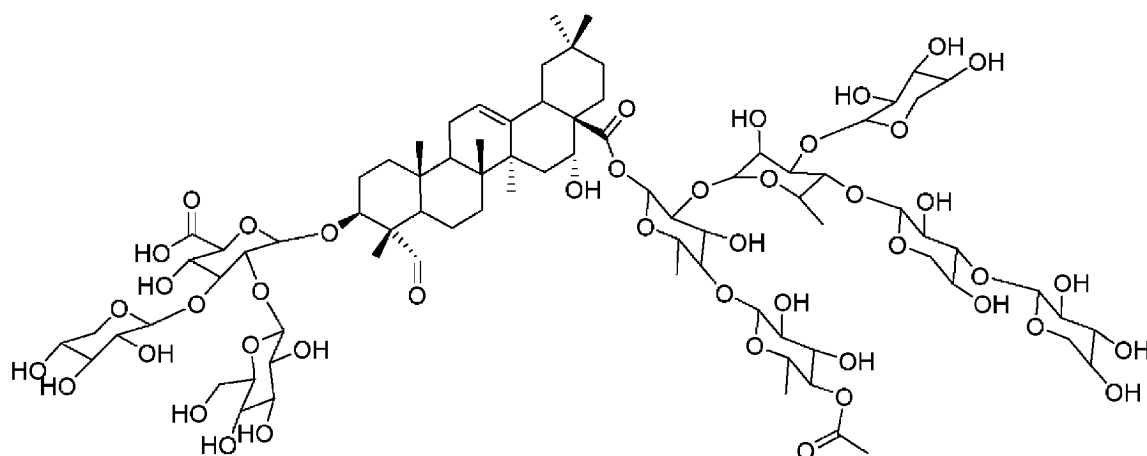
## 【0216】

サポニンSO1832は、C-3β-OH基に炭水化物置換基Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-を有し、C-28-OH基に炭水化物置換基Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-を有する、キラ酸アグリコンコアからなる（表A1も参照のこと）。化学式はC<sub>82</sub>H<sub>128</sub>O<sub>45</sub>であり、正確な質量は1832，77ダルトンである。SO1832のサポニン構造は以下の分子（SO1832）に従う：

20

## 【0217】

## 【化29】



30

(SO1832)

40

## 【0218】

当業者は、本発明のサポニンコンジュゲートに含まれるサポニンが、本明細書に記載の式(II)<sub>s</sub>、(III)<sub>s</sub>又は(IV)<sub>s</sub>の化合物であって、ここで、サポニン部分のリンカーL<sub>s</sub>は、GalNAc又は架橋部分に共有結合した第1の前駆体L<sub>s1</sub>と、サポニン部分に共有結合した第2の前駆体L<sub>s2</sub>との間のカップリング反応の結果であり、この第2の前駆体L<sub>s2</sub>は、本明細書に記載のように、サポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含むか、又はサポニン部分のアルデヒドへのセミカルバジド／アルデヒドカップリングから生じるセミカルバゾン官能基を含み、これは、好適なサポニン誘導体が、(ii)本明細書に記載の糖鎖のカルボキシル基及び／又は(iii)本明細書に記載の糖鎖のアセトキシ基によって誘導体化された

50

サポニン誘導体であるように、アルデヒド基が既にリンカーによって占有されていることを意味する。

【0219】

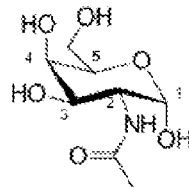
エフェクター分子コンジュゲートー序論

本発明の特定の医薬配合物及び特定の医薬組成物は、本明細書では「エフェクター分子コンジュゲート」と称される、エフェクター分子とアジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドとの第2のコンジュゲートを含む。エフェクター分子がエフェクター分子コンジュゲートの残部に結合されている場合、本明細書では「エフェクター部分」と称する。ASGPRリガンドは、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分、及び好ましくは3つのGalNAc部分（GN）<sub>3</sub>を含む。本発明の好ましい実施形態によれば、各GalNAc部分は、式（I）に示すように、「1」位の酸素への共有結合を介して、ASGPRリガンドの残部と結合されるか、又は、ASGPRリガンドが単一のGalNAc部分からなる場合は、エフェクター部分に結合される：

10

【0220】

【化30】



20

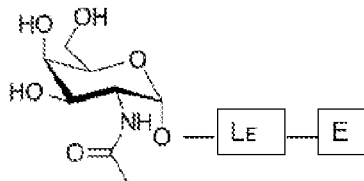
(I)

【0221】

式（II）<sub>E</sub>に示すように、ASGPRリガンドは、好ましくはエフェクター部分リンカーL<sub>E</sub>を介してエフェクター部分Eに結合された単一のGalNAc部分からなる。

【0222】

【化31】



30

(II)<sub>E</sub>

【0223】

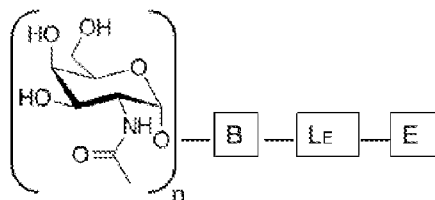
ASGPRリガンドは、2つ以上のGalNAc部分、例えば、2、3、4、5又は6つなどのGalNAc部分、好ましくは3又は4つのGalNAc部分、最も好ましくは3つの部分を含み得る。そのような場合、GalNAc部分が各々別々に「1」位の酸素を介して中央の架橋部分Bに共有結合されていることが好ましく、これによって、好ましくはエフェクター部分リンカーL<sub>E</sub>を介してGalNAc部分とエフェクター部分の間に架橋が効果的に形成される。GalNAc部分は、式（III）<sub>E</sub>に示すように、架橋部分Bに直接結合され得る：

40

【0224】

50

## 【化 3 2】

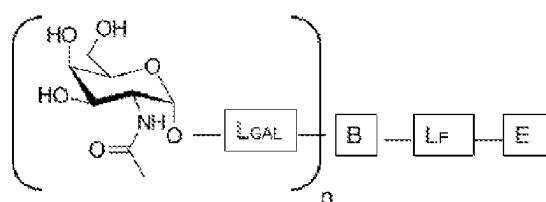
(III)<sub>E</sub>

式中、 $n$ は2以上の整数であり、 $L_E$ はエフェクター部分リンカーであり、 $E$ はエフェクター部分である。より好ましくは、 $GalNAc$ 部分は、式(IV)<sub>E</sub>に示すように、 $GalNAc$ リンカー $L_{GAL}$ を介して架橋部分 $B$ に結合される：

10

## 【0225】

## 【化 3 3】

(IV)<sub>E</sub>

20

## 【0226】

式中、 $n$ は2以上の整数であり、 $L_E$ はエフェクター部分リンカーであり、 $E$ はエフェクター部分である。 $L_{GAL}$ は出現する度に独立して選択されてもよいが、当業者であれば、 $L_{GAL}$ の各々の出現が同一部分を表す場合、コンジュゲートの合成が簡略化されることを理解するであろう。

## 【0227】

エフェクター分子コンジュゲートーリンカー $L_E$

30

エフェクター部分リンカー $L_E$ は、式(II)<sub>E</sub>におけるような $GalNAc$ 又は式(III)<sub>E</sub>及び(IV)<sub>E</sub>におけるような架橋部分 $B$ にエフェクター部分が共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。リンカーの同一性及びサイズに特に制限はなく、式(II)<sub>E</sub>におけるような $GalNAc$ 又は式(III)<sub>E</sub>及び(IV)<sub>E</sub>におけるような架橋部分 $B$ にエフェクター分子を共有結合することは、「通常の」化学官能基（例えば、エステル結合）により、並びに、典型的には長い鎖長を有する「クリックケミストリー」型のリンカーを介して実施してもよく、例えば、結果として10個超又は20個超の炭素原子を含むリンカー $E_L$ が生じる。好適なエフェクター部分リンカー $L_E$ 及び関連するカップリング反応は、Hermanson, Greg T., 「Bioconjugate techniques.」、Academic press (2013年)に記載されている。

40

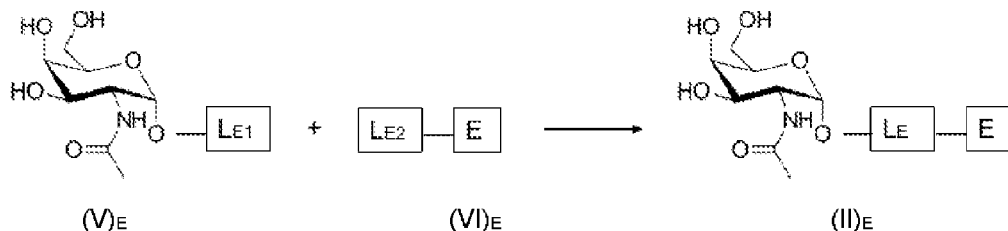
## 【0228】

当業者に理解されるように、エフェクター部分リンカー $L_E$ は、典型的には、 $GalNAc$ 又は架橋部分 $B$ に共有結合された少なくとも第1の前駆体 $L_{E1}$ と、エフェクター部分に共有結合された第2の前駆体 $L_{E2}$ との間のカップリング反応（例えば、「クリックケミストリー」型）の結果生じるものである。この原理は、式(II)の化合物の以下の反応スキームに例示される：

## 【0229】

50

## 【化 3 4】



## 【0 2 3 0】

10

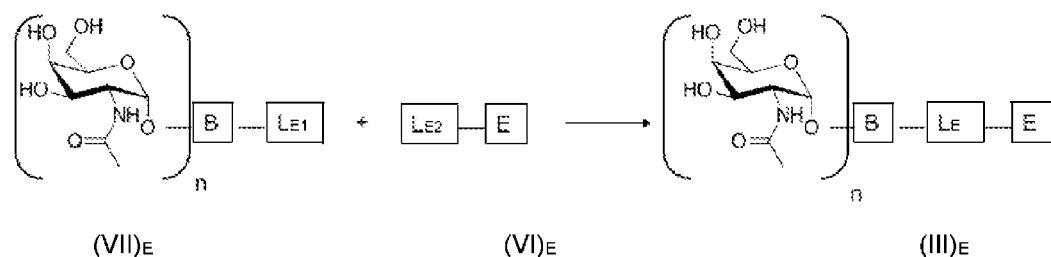
式中、 $L_E$  はエフェクター部分リンカーであり、 $L_{E1}$  は  $GalNAc$  に共有結合されたエフェクター部分リンカー  $L_E$  の前駆体であり、 $L_{E2}$  はエフェクター部分に共有結合されたエフェクター部分リンカー  $L_E$  の前駆体であり、 $E$  はエフェクター部分である。

## 【0 2 3 1】

式 (I I I) の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

## 【0 2 3 2】

## 【化 3 5】



20

## 【0 2 3 3】

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

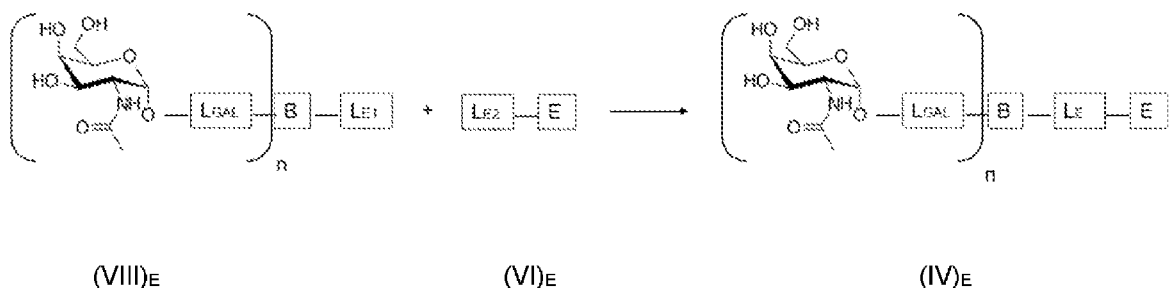
30

## 【0 2 3 4】

式 (I V)  $_E$  の化合物に対応する反応スキームは以下の通りである：

## 【0 2 3 5】

## 【化 3 6】



40

## 【0 2 3 6】

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

## 【0 2 3 7】

50

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

10

【0238】

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

20

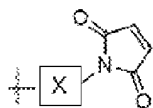
【0239】

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

30

【0240】

【化37】



(IX)

【0241】

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

40

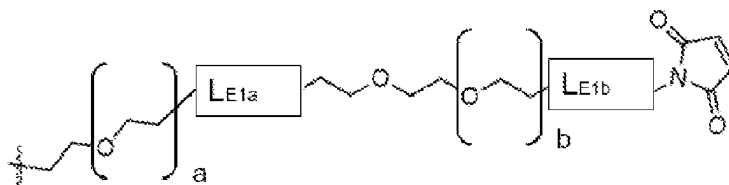
【0242】

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

【0243】

50

## 【化 3 8】



(X)

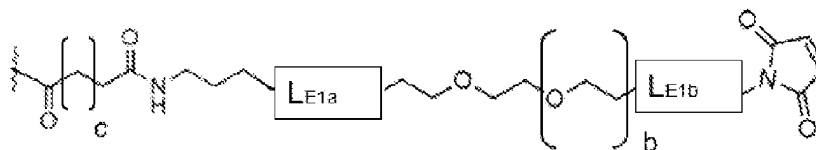
## 【0 2 4 4】

(式中、 $a$  及び  $b$  はそれぞれ独立して 0 以上の整数を表し、好ましくは  $a$  及び  $b$  は各々独立して 0、1、2、及び 3 から選択される整数を表し、より好ましくは  $a$  及び  $b$  は 2 を表し、 $LE1a$  はヒドラゾン及び／又は 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾールを表し、 $LE1b$  はヒドラゾン及び／又は 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくはヒドラゾンを表す)；

10

## 【0 2 4 5】

## 【化 3 9】



20

(XI)

## 【0 2 4 6】

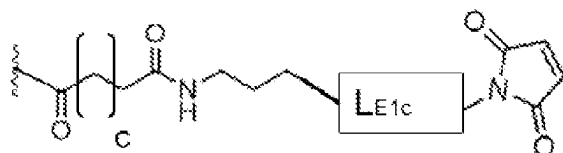
(式中、 $b$  及び  $c$  は各々独立して 0 以上の整数を表し、好ましくは  $b$  は 0、1、2、及び 3 から選択される整数を表し、及び  $c$  は 5～15 の範囲の整数を表し、より好ましくは  $b$  は 2 を表し、及び  $c$  は 9 を表し、 $LE1a$  はヒドラゾン及び／又は 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾールを表し、 $LE1b$  はヒドラゾン及び／又は 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくはヒドラゾンを表す)；

及び

30

## 【0 2 4 7】

## 【化 4 0】



(XII)

## 【0 2 4 8】

(式中、 $c$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 5～15 の範囲の整数を表し、より好ましくは 9 を表し、 $LE1c$  はヒドラゾン及び／又は 1, 2, 3-トリアゾール、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾールを表す) である。

40

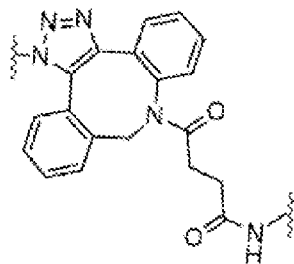
## 【0 2 4 9】

$LE1a$ 、 $LE1b$ 、及び  $LE1c$  は好ましくは各々 20 個未満の炭素原子を含み、より好ましくは  $LE1a$ 、 $LE1b$ 、及び  $LE1c$  は各々独立して式 (XIII)、(XIV)、又は (XV) に従う部分を表し、好ましくは  $LE1a$  は式 (XIII) の 1, 2, 3-トリアゾールであり、 $LE1b$  は式 (XIV) のヒドラゾンであり、 $LE1c$  は式 (XV) の 1, 2, 3-トリアゾールである；

## 【0 2 5 0】

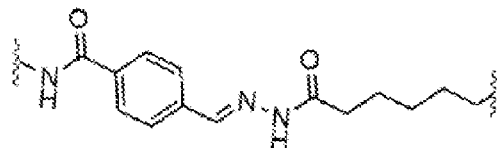
50

## 【化 4 1】

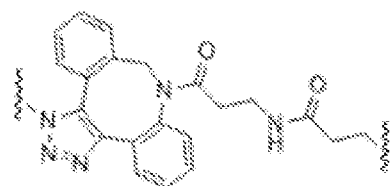


(XIII)

10



(XIV)



(XV)

20

## 【0251】

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

30

## 【0252】

エフェクター分子コンジュゲート-エフェクター部分

本発明の態様は、

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

40

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

## 【0253】

本発明の態様は、

－ 本発明のサポニンコンジュゲートと；

50

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

## 【0254】

ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、A O N といった、B N A、異種核酸若しくは s i R N A などのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組合せのうち少なくとも 1 つを含むか又はそれからなり、好ましくは毒素、酵素又はオリゴヌクレオチドである。

10

## 【0255】

ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、A S G P R のリガンドは、( G a l N A c )<sub>3</sub> トリスを含むか若しくは ( G a l N A c )<sub>3</sub> トリスであり、及び／又は、A S G P R のリガンド及びエフェクター分子が、共有結合によって、好ましくは少なくとも 1 つのリンカーを介してコンジュゲートされている。

20

## 【0256】

ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、低分子干渉 RNA ( s i R N A )、低分子ヘアピン型 RNA ( s h R N A )、アンチヘアピン型マイクロ RNA ( m i R N A )、一本鎖 RNA、アプタマー RNA、二本鎖 RNA ( d s R N A )、アンチマイクロ RNA ( アンチ m i R N A、アンチ m i R )、アンチセンスオリゴヌクレオチド ( A S O )、DNA、アンチセンス DNA、ロックド核酸 ( L N A )、架橋型核酸 ( B N A )、2' - O , 4' - アミノエチレン架橋型核酸 ( B N A<sup>N C</sup> )、B N A ベースの s i R N A、及び B N A ベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド ( B N A - A O N ) のいずれか 1 つ以上から選択されるオリゴヌクレオチドである。

30

## 【0257】

ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、アンチ m i R N A、B N A - A O N 又は s i R N A、例えば、化学的に修飾された s i R N A、代謝的に安定した s i R N A、及び化学的に修飾された、代謝的に安定した s i R N A から選択される、B N A ベースの s i R N A などのいずれか 1 つ以上から選択される。

## 【0258】

ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、遺伝子：A p o リポタンパク質 B ( a p o B )、H S P 2 7、トランスサイレチン ( T T R )、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型 ( P C S K 9 )、δ - アミノレブリン酸シンターゼ 1 ( A L A S 1 )、アンチトロピン 3 ( A T 3 )、グリコール酸オキシダーゼ ( G O )、補体成分 C 5 ( C C 5 )、B 型肝炎ウイルス ( H B V ) の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、α 1 - アンチトリプシン ( A A T ) 及び乳酸デヒドロゲナーゼ ( L D H ) のうちいずれか 1 つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、異常な m i R N A を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。ー実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又

40

50

は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのうちいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチド、並びに／又は遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものであるオリゴヌクレオチド、並びに／又は例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、異常なmiRNAを標的とすることができるオリゴヌクレオチドである。好ましい標的遺伝子は、HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAであり、遺伝子HSP27及びapoBがより好ましい。

10

【0259】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、遺伝子：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT及びLDHのうちいずれか1つの発現に関与するmiRNAを標的とすることができるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA（onco-miR）の阻害若しくはonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである。一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDH、好ましくはHSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つの発現に関与するmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA（onco-miR）の阻害若しくはonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである。

20

30

【0260】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、エフェクター分子は、毒素であるか又は毒素を含み、この毒素は、ペプチド、タンパク質、ウレアーゼ及びCre-リコンビナーゼなどの酵素、タンパク質性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、並びに／又は、細菌毒素、より好ましくはApopチンなどのウイルス毒素のいずれか1つ以上から選択される植物毒素；志賀毒素、志賀様毒素、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）外毒素（PE）若しくはPEの外毒素Aなどの細菌毒素、完全長若しくはトランケートされたジフテリア毒素（DT）、コレラ毒素；αサルシンなどの真菌毒素；リボソーム不活性化タンパク質を含む植物毒素及び2型リボソーム不活性化タンパク質のA鎖、例えば、ダイアンシン（例えば、ダイアンシン-30若しくはダイアンシン-32）、サポリン（例えば、サポリン-S3若しくはサポリン-S6）、ブーガニン若しくはブーガニンの脱免疫化誘導体であるデブーガニング、志賀様毒素A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、リシン、リシンA鎖、モデシン、モデシンA鎖、アブリン、アブリンA鎖、ボルケンシン、ボルケンシンA鎖、ビスキュミン、ビスキュミンA鎖；

40

50

又はカエルRNAseなどの動物若しくはヒト毒素、又はヒト由来のグランザイムB若しくはアンジオゲニン、又はこれらの任意のフラグメント若しくは誘導体のいずれか1つ以上から選択される少なくとも1つの分子を含むか又はそれからなり；好ましくは、タンパク毒素は、ダイアンシン及び／若しくはサポリンであり、並びに／又は毒素標的化リボソーム、毒素標的化延長因子、毒素標的化チューブリン、毒素標的化DNA及び毒素標的化RNAの少なくとも1つ、より好ましくは、エムタンシン、パストトクス、マイタンシノイド誘導体DM1、マイタンシノイド誘導体DM4、モノメチルアウリスタチンE（MMAE、ベドチン）、モノメチルアウリスタチンF（MMAF、マホドチン）、カリケアマイシン、N-アセチル-γ-カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）二量体、ベンゾジアゼピン、CC-1065類似体、デュオカルマイシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、5-フルオロウラシル（5-FU）、ミトキサントロン、ツブリシン、インドリノベンゾジアゼピン、AZ13599185、クリプトフィシン、リゾキシシン、メトトレキセート、アントラサイクリン、カンプトセシン類似体、SN-38、DX-8951f、メシル酸エキサテカン、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素（PE38）のトランケート形態、デュオカルマイシン誘導体、アマニチン、α-アマニチン、スプライソスタチン、タイランスタチン、オゾガマイシン、テシリン、アンバスタチン269及びソラブタンシン、若しくはこれらの誘導体のいずれか1つ以上を含むか若しくはそれからなる。

10

20

【0261】

コンジュゲートー架橋部分B

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

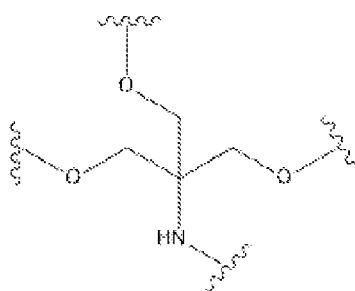
【0262】

好ましい実施形態によれば、架橋部分Bは、式（XV）の化合物であり：

【0263】

【化42】

30



(XV)

40

【0264】

式中、式（XV）の化合物の酸素原子は、GalNAc（式（III）<sub>S</sub>若しくは（III）<sub>E</sub>の化合物に対応する）又はGalNAcリンカーL<sub>GAL</sub>（式（IV）<sub>S</sub>若しくは（IV）<sub>E</sub>の化合物に対応する）に結合され、式（XV）の化合物の窒素原子は、サポニン部分リンカーL<sub>S</sub>又はエフェクター部分リンカーL<sub>E</sub>に結合される。

【0265】

当業者であれば、架橋部分Bが式（XV）の化合物である式（III）<sub>S</sub>、（III）<sub>E</sub>、（IV）<sub>S</sub>又は（IV）<sub>E</sub>のこれらの化合物が、ASGPRリガンドが（GalNAc）<sub>3</sub>トリスからなるエフェクター分子コンジュゲートに対応することが理解されよう。

50

## 【0266】

コンジュゲートーリンカー $L_{GAL}$

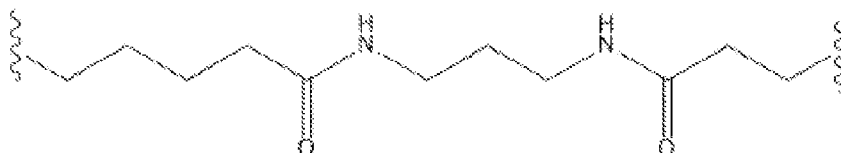
$GaINAc$ リンカー $L_{GAL}$ は、式 (IV)<sub>S</sub> 又は (IV)<sub>E</sub> におけるように、 $GaINAc$ を架橋部分に共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す。リンカーの同一性及びサイズに特に制限はない。

## 【0267】

実施形態によれば、 $GaINAc$ リンカー $L_{GAL}$ は、各々2～25個の炭素原子、好ましくは7～15個の炭素原子、より好ましくは11個の炭素原子を含む。好ましくは、 $GaINAc$ リンカー $L_{GAL}$ は、少なくとも1つ、好ましくは2つのアミド部分を含む。特に好ましい $GaINAc$ リンカー $L_{GAL}$ は、式 (XVI) による化合物である：

## 【0268】

## 【化43】



(XVI)

## 【0269】

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

## 【0270】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、第3のコンジュゲートは、抗体-毒素コンジュゲート、受容体-リガンド-毒素コンジュゲート、抗体-薬物コンジュゲート、受容体-リガンド-薬物コンジュゲート、抗体-核酸コンジュゲート又は受容体-リガンド-核酸コンジュゲートのうちいずれか1つ以上である。

## 【0271】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、第3のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子は、細胞表面分子： $CD71$ 、 $CD63$ 、 $CA125$ 、 $EpCAM(17-1A)$ 、 $CD52$ 、 $CEA$ 、 $CD44v6$ 、 $FAP$ 、 $EGF-IR$ 、インテグリン、シンデカン-1、血管インテグリン $\alpha V\beta3$ 、 $HER2$ 、 $EGFR$ 、 $CD20$ 、 $CD22$ 、葉酸受容体1、 $CD146$ 、 $CD56$ 、 $CD19$ 、 $CD138$ 、 $CD27L$ 受容体、 $PSMA$ 、 $CanAg$ 、インテグリン $\alpha V$ 、 $CA6$ 、 $CD33$ 、メソセリン、 $Cripto$ 、 $CD3$ 、 $CD30$ 、 $CD239$ 、 $CD70$ 、 $CD123$ 、 $CD352$ 、 $DLL3$ 、 $CD25$ 、エフリンA4、 $MUC1$ 、 $Trop2$ 、 $CEACAM5$ 、 $CEACAM6$ 、 $HER3$ 、 $CD74$ 、 $PTK7$ 、 $Notch3$ 、 $FGF2$ 、 $C4.4A$ 、 $FLT3$ 、 $CD38$ 、 $FGFR3$ 、 $CD7$ 、 $PD-L1$ 、 $TLA4$ 、 $CD52$ 、 $PDGFRA$ 、 $VEGFR1$ 、 $VEGFR2$ 、アジアロ糖タンパク質受容体 ( $ASGPR$ ) のうちいずれか1つ、好ましくは、 $HER2$ 、 $CD71$ 、 $ASGPR$ 、及び $EGFR$ のうちいずれか1つ、より好ましくは $CD71$ に結合することができる。

## 【0272】

一実施形態は、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明

のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物であって、ここで、第3のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子は、以下：抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、IgG、単ドメイン抗体、少なくとも1つのV<sub>H</sub>Hドメインを含むか又はそれからなる分子、好ましくはラクダ科V<sub>H</sub>、可変重鎖新規抗原受容体(V<sub>NAR</sub>)ドメイン、Fab、scFv、Fv、dAb、F(ab)<sub>2</sub>及びFcabフラグメントのうちいずれか1つであるか、又はそれらを含む。

#### 【0273】

本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物に関する。本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。

10

#### 【0274】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT及びLDHのうちいずれか1つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防の使用のための、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物に関する。本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA及びLDH、好ましくはHSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA及びCEBPA、より好ましくはHSP27、apoBのうちいずれか1つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防の使用のためのものである、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物。

20

#### 【0275】

一実施形態は、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、α1-アンチトリプシン欠乏症、β-サラセミア、又は自己免疫疾患の治療若しくは予防に使用するための、本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物若しくは本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物、又は本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬配合物若しくは本発明のサポニンコンジュゲートを含む本発明の医薬組成物である。

30

#### 【0276】

一実施形態は、本発明の使用のための本発明のサポニンコンジュゲートを含む医薬配合物若しくは本発明の使用のための本発明のサポニンコンジュゲートを含む医薬組成物、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物であって、ここで、サポニンは、本発明によるサポニン誘導体、好ましくはQS-21誘導体又はSO1861誘導体又はSO1832誘導体である。

40

#### 【0277】

本発明の態様は、本発明の第2のコンジュゲート又は第3のコンジュゲートを細胞外から細胞内に移行させ、好ましくは、その後本発明による第2のコンジュゲート又は第3のコンジュゲートによって構成されるエフェクター分子を当該細胞のサイトゾルに移行させるためのインビトロ又はエキスピボ方法であって、以下の工程：

a) ASGPRをその表面に発現する細胞であり、第3のコンジュゲートを細胞に移行させるときに、第3のコンジュゲートが細胞表面分子に結合するための結合分子を含む、当該細胞表面分子を発現する細胞をもたらす工程であって、細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、もたらす工程；

50

b) 工程 a) で提供された細胞に移行させるための、本発明の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲートを提供する工程；

c) 本発明のサポニンコンジュゲートをもたらす工程；

d) 工程 a) の細胞を、工程 b) の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲート、及び工程 c) のサポニンコンジュゲートとインビトロ又はエキスピボで接触させる工程であって、それによって細胞外から当該細胞への第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後当該細胞のサイトゾルへの第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートによって構成される少なくともエフェクター分子の当該細胞のサイトゾルへの移行を生じさせる、接触させる工程、を含む、インビトロ又はエキスピボ方法に関する。

10

【0278】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、BNA、異種核酸、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか 1 つである。

【0279】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、以下：低分子干渉 RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、アンチヘアピン型マイクロ RNA (miRNA)、一本鎖 RNA、アプタマー RNA、二本鎖 RNA (dsRNA)、アンチマイクロ RNA (アンチ miRNA、アンチ miR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンス DNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA<sup>NC</sup>)、BNA ベースの siRNA、及び BNA ベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON) のうちいずれか 1 つ以上から選択される。

20

【0280】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、以下：アンチ miRNA、BNA-AON 又は siRNA、例えば、化学的に修飾された siRNA、代謝的に安定した siRNA、及び化学的に修飾された、代謝的に安定した siRNA から選択される、BNA ベースの siRNA などのいずれか 1 つ以上から選択される。

30

【0281】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、遺伝子：アポリポタンパク質 B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型 (PCSK9)、TMPRSS6、 $\delta$ -アミノレブリン酸シンターゼ 1 (ALAS1)、アンチトロンビン 3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体成分 C5 (CC5)、B 型肝炎ウイルス (HBV) の X 遺伝子、HBV の S 遺伝子、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン (AAT)、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA、CEBPA、及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) のいずれか 1 つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、異常な miRNA を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。好ましくは、遺伝子は、タンパク質 HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA 及び CEBPA を発現するための遺伝子 HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA、及び CEBPA のいずれか 1 つである。

40

【0282】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴ

50

ヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、遺伝子：アポリポタンパク質B（apoB）及びHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである。

【0283】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、タンパク質：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA（onco-miR）の阻害若しくはonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである。好ましくは、タンパク質は、HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAから選択される肝タンパク質である。

10

【0284】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、タンパク質：apoB及びHSP27のいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

20

【0285】

本発明の態様は、以下の工程：

（a）共有結合した第1のリンカーを含む少なくとも1つのサポニン部分をもたらす工程であって、第1のリンカーが、第2のリンカー上の第2の反応性基又は第7のリンカー上の第7の反応性基への共有結合のための少なくとも1つの第1の反応性基を含む、工程と、

（b）共有結合した第3のリンカーを含むオリゴヌクレオチドをもたらす工程であって、第3のリンカーが、第4のリンカー上の第4の反応性基又は第7のリンカー上の第8の反応性基への共有結合のための第3の反応性基を含む、工程と、

30

（c）共有結合した第5のリンカーを含む少なくとも1つのGalNAc部分をもたらす工程であって、第5のリンカーが、第6のリンカー上の第6の反応性基又は第7のリンカー上の第9の反応性基への共有結合のための第5の反応性基を含む、工程と、

（d1）第1の反応性基と第2の反応性基との間に共有結合を形成することにより第1のリンカーを第2のリンカーへと連結させ、第3の反応性基と第4の反応性基との間に共有結合を形成することにより第3のリンカーを第4のリンカーへと連結させ、第5の反応性基と第6の反応性基との間に共有結合を形成することにより第5のリンカーを第6のリンカーへと連結させ、第2のリンカー、第4のリンカー、及び第6のリンカーを一緒に共有結合させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

40

又は

（d2）第1の反応性基と第7の反応性基との間に共有結合を形成することにより第1のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、第3の反応性基と第8の反応性基との間に共有結合を形成することにより第3のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、第5の反応性基と第9の反応性基との間に共有結合を形成することにより第5のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、  
のいずれかと、

を含む、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法に関する。

【0286】

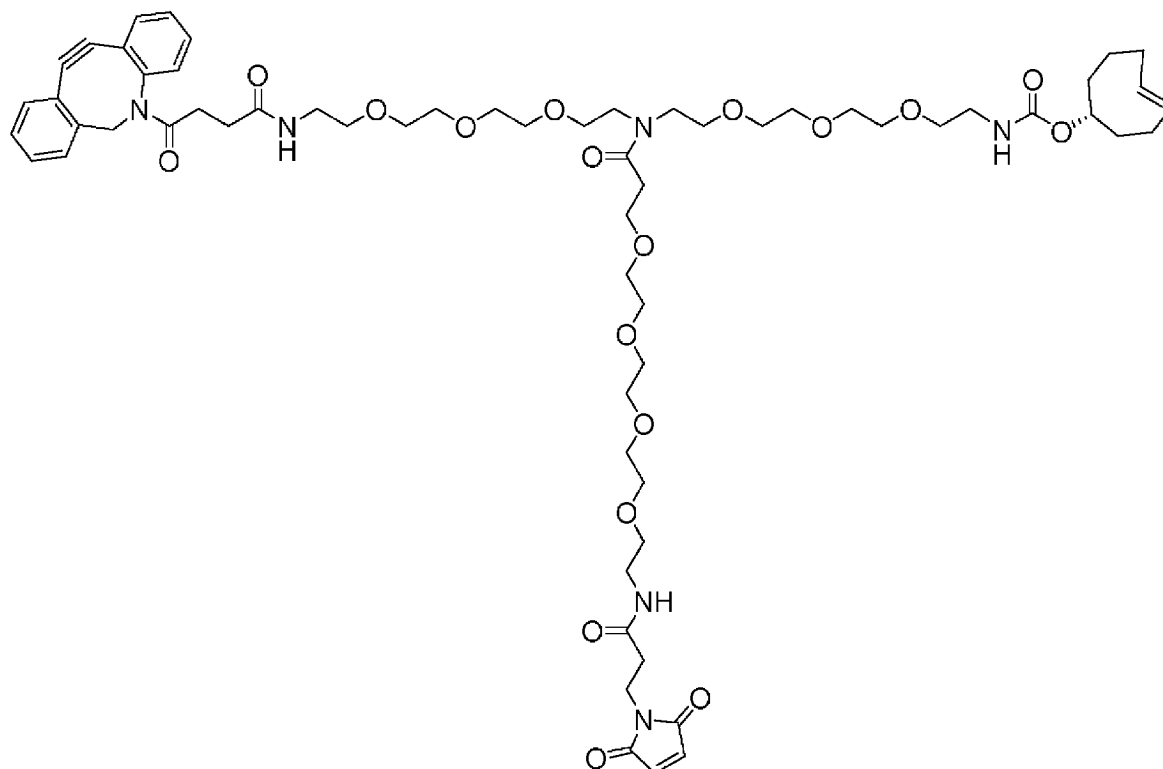
一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法であって、

50

ここで、第7のリンカーは、式（XXI）：

【0287】

【化44】



10

20

(XXI)

【0288】

によって表される三官能性リンカーなどの三官能性リンカーである。

30

【0289】

少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8個のサポニン部分、例えば1、4、又は8個のサポニン部分などである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

【0290】

サポニンが、SO1861、SO1832、QS-21、又はこれらの任意の官能性誘導体、好ましくはSO1861又はSO1832である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらすための方法が好ましい。

【0291】

サポニン部分又はサポニン部分が、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介して共有結合している、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

40

【0292】

少なくとも1つのGalNAc部分が、1～4個のGalNAc部分、好ましくは1個又は3個のGalNAc部分である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

【0293】

本発明の態様は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、及び任意選択により薬学的に許容される賦形剤、及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物に関する。

50

## 【0294】

本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、及び任意選択により薬学的に許容される賦形剤、及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物に関する。本発明の態様は、医薬品としての使用のための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。

## 【0295】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上に関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するための、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物、並びに場合により薬学的に許容される賦形剤及び／又は場合により薬学的に許容される希釈剤に、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。例えば、疾患は、腫瘍細胞におけるHSP27の（過剰）発現に関連する癌である。腫瘍成長がHSP27の（過剰）発現に関連する腫瘍に罹患している患者に、HSP27遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを投与すると、HSP27遺伝子のサイレンシング及びそれに伴う腫瘍成長の停止がもたらされる。例えば、apoB発現に関連する健康問題は、ヒト対象、例えば、粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症のリスクがある患者、並びに／又は当該粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症に罹患している患者の血液中のLDLコレステロールの溶出レベルに関連する健康問題である。apoBがLDL粒子のタンパク質成分であるので、apoB遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドを当該ヒト対象又は患者に投与すると、apoB発現が阻害又は低下し、結果としてLDL（-コレステロール）が低下する。循環LDLレベルの低下は、循環LDLコレステロールの低下に関連し、それに伴って、粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症に罹患している患者において、又はLDLコレステロールの血中レベルが正常より上である影響下において粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症を発症する年齢の対象において明らかなように、健康及び疾患症状に対するLDLコレステロール関連リスクの低下に関連する。

## 【0296】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。

## 【0297】

本発明の態様は、本発明による使用のための本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明による使用のための本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、当該使用は、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防におけるものであり、並びに／又は遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上に関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防にお

けるものである。

【0298】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む本発明による使用のための医薬組成物であるか、又は本発明による使用のための本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、当該使用は、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防におけるものである。

【0299】

一実施形態は、本発明による使用のための本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明による使用のための本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートであり、ここで、当該使用は、子宮内膜癌、乳癌、肺癌、及び高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの癌の治療又は予防におけるものである。

【0300】

本発明の態様は、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス（hATTR）、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。

【0301】

本発明の態様は、子宮内膜癌、乳癌、肺癌、若しくは肝細胞癌などの癌、並びに／又は粥状動脈硬化及び／若しくは高コレステロール血症などの心血管疾患、好ましくは粥状動脈硬化及び／若しくは高コレステロール血症の治療又は予防で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。

【0302】

例えば、疾患は、腫瘍細胞におけるHSP27の（過剰）発現に関連する癌である。腫瘍成長がHSP27の（過剰）発現に関連する腫瘍に罹患している患者に、HSP27遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを投与すると、HSP27遺伝子のサイレンシング及びそれに伴う腫瘍成長の停止がもたらされる。例えば、apoB発現に関連する健康問題は、ヒト対象、例えば、粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症のリスクがある患者、並びに／又は当該粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症に罹患している患者の血液中のLDLコレステロールの溶出レベルに関連する健康問題である。apoBがLDL粒子のタンパク質成分であるので、apoB遺伝子をサイレンシングするためのオリゴヌクレオチドを含む本発明のオリゴヌクレオチドを当該ヒト対象又は患者に投与すると、apoB発現が阻害又は低下し、結果としてLDL（ $\gamma$ -コレステロール）が低下する。循環LDLレベルの低下は、循環LDLコレステロールの低下に関連し、それに伴って、粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症に罹患している患者において、又はLDLコレステロールの血中レベルが正常より上である影響下において粥状動脈硬化症及び／若しくは高コレステロール血症を発症する年齢の対象において明らかなように、健康及び疾患症状に対するLDLコレステロール関連リスクの低下に関連する。

【0303】

本発明の態様は、対象におけるLDLコレステロールの低下において使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを含む医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する。本発明の態様は、ヒト対象の血中におけるLDLコレステロール濃度を低下させる方法で使用するための、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュ

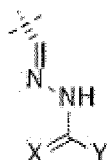
10

## 20

c) 工程 a) の細胞を、インビトロ又はエキスピボで、好ましくは液体媒体中において、工程 b) のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させ、それによって、オリゴヌクレオチドコンジュゲートの細胞外から細胞内への移行を引き起こし、任意選択的に好ましくは、それによってその後、オリゴヌクレオチドコンジュゲートを構成するオリゴヌクレオチドの当該細胞のサイトゾル及び／又は核内への移行を引き起こす、工程と、を含む、インビトロ又はエキスピボ方法に関する。

驚くべきことに、本発明者らは、トリテルペンアグリコンコア構造と、アグリコンコア構造に連結された本明細書で定義される第1の糖鎖「R<sup>1</sup>」及び第2の糖鎖「R<sup>2</sup>」の少なくとも一方を含む、サポニンに基づくサポニン誘導体、好ましくはキラ酸であって、ここで、サポニン誘導体はアルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、アルデヒド基は、以下の式(I1)：

【化 4 5】

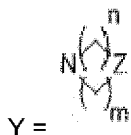


(11)

Y = NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>（式中、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、独立して、H、非置換C1～C10直鎖、分岐鎖若しくは環状アルキル、非置換C2～C10直鎖、分岐鎖若しくは環状アルケニル又は非置換C2～C10直鎖若しくは分岐アルキニルを表す）、又は共有結合リンカー、好ましくはR<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>の一方はHである）；又は

【 0 3 0 8 】

【化 4 6】



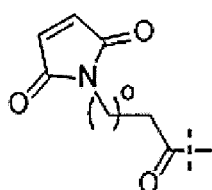
【0309】

(式中、n 及び m は各々、独立して、1、2 又は 3 から選択される整数であり、  
 $Z = CH_2$ 、O、S、P、又は  $NR^5$ 、及び

式中、 $R^5$  は、H、非置換  $C1 \sim C10$  直鎖、分岐鎖若しくは環状アルキル、非置換  $C2 \sim C10$  直鎖、分岐鎖若しくは環状アルケニル、非置換  $C2 \sim C10$  直鎖若しくは分岐アルキニル、又は共有結合リンカー、又は式 (II1) a :

【0310】

【化 4 7】



(II1)a

【0311】

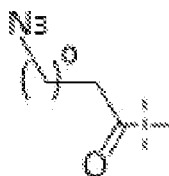
によるマレイミド部分によって表される)

によるセミカルバゾン官能基へと変換されるか、

又は式 (II1) b によるアジド部分

【0312】

【化 4 8】



(II1)b

【0313】

(式中、o は、0 ~ 10、好ましくは 2 ~ 7、より好ましくは 4 ~ 6 から選択される整数である)

は、サポニン誘導体と接触された細胞の細胞生存率が考慮される場合に低減された毒性を有し、アルデヒド官能基が式 (I1) によるセミカルバゾン官能基へと変換される場合には、例えば毒素の細胞毒性又は BNA 介在性遺伝子サイレンシングの増強が考慮される場合に (いかなる特定の理論にも縛られることを望むものではないが：修飾サポニンの同様の又は改善されたエンドソーム脱出増強活性に関連して) 活性を有し、並びに／又は非修飾サポニンの毒性、活性、及び溶血活性と比較した場合に低減された溶血活性を有することを見出した。即ち、サポニン誘導体は、サポニン誘導体が基づく非修飾サポニンの毒性、活性、及び溶血活性と比較した場合に、

(i) サポニン誘導体と接触した細胞の細胞生存率が考慮される場合に低減された毒性

;

(i i) アルデヒド官能基が式 (I 1) によるセミカルバゾン官能基に変換される場合、例えば B N A 媒介遺伝子サイレンシングの増強が考慮される場合に (いかなる特定の理論にも縛られることを望むものではないが: 修飾サポニンの同様の又は改善されたエンドソーム脱出増強活性に関する) 増強された活性; 並びに/又は

(i i i) 溶血活性の低下、

のうち少なくとも1つ、好ましくはこれに対して、より好ましくは3つ全てを有する。それにより、本発明者らは改善された治療濃度域を有するサポニン誘導体を提供するが、その理由は、サポニン誘導体について、細胞毒性が天然の対応物について測定された細胞毒性よりも低いこと、溶血活性がサポニン誘導体の天然の対応物について測定された溶血活性よりも低いこと、細胞毒性と例えば毒素増強に対する I C 5 0 値又は遺伝子サイレンシングに対する I C 5 0 値との、I C 5 0 値間の比率が同様か若しくは増加することから、並びに/又はサポニン溶血活性と例えば毒素増強に対する I C 5 0 値若しくは遺伝子サイレンシングに対する I C 5 0 値との、I C 5 0 値間の比率が同様か若しくは増加することからである。「エンドソーム脱出増強活性」という用語は「活性」と省略することができる。

【0314】

加えて、本発明者らは、驚くべきことに、サポニンコンジュゲートに含まれる細胞表面分子結合分子 (例えば、抗体) によって標的化される細胞表面受容体の発現が中程度から低いにもかかわらず、及び/又は A D C によって標的化される細胞表面受容体の発現が中程度から低いにもかかわらず、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体を抗体-タンパク毒素コンジュゲートなどの A D C と一緒にベースとするサポニンコンジュゲートとそのような細胞を接触させることによって、(腫瘍) 細胞死滅を確立した。サポニン誘導体及びサポニンコンジュゲートは、セミカルバゾン官能基を含む。例えば、比較例では、同じ細胞表面分子結合分子 (例えば、抗体) を含むが、セミカルバゾン官能基の代わりにヒドラゾン官能基 ( $=N-N(H)-C(O)-$ ) を含むサポニンコンジュゲートを細胞と接触させた場合、そのような細胞死滅は確立され得なかったか、又はより低い程度でしか確立され得なかった。それに伴い、本発明者らは、A D C 又は A O C に含まれるエフェクター部分などのエフェクター部分の活性化又は増強が考慮される場合、より強力なサポニン誘導体及びサポニンコンジュゲートを提供した。

【0315】

更に、本発明者らは、哺乳動物細胞のエンドソーム及び/又はリソソーム中に存在する条件である酸性条件下において、当該技術分野で公知のヒドラゾン官能基 ( $=N-N(H)-C(O)-$ ) を含むサポニン誘導体と比較して、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体が、「遊離」アルデヒド官能基を含む対応する天然サポニンに対してより迅速且つより多量に加水分解することを見出した。これは、例えばヒドラゾン官能基 ( $=N-N(H)-C(O)-$ ) を含むサポニン誘導体の必要量と比較して、標的毒素又は標的オリゴヌクレオチドのエンドソーム脱出エンハンサーとして作用する「遊離」アルデヒドを含む同じ量の天然サポニンを得るために、例えば A D C 若しくは A O C 又は遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチド、例えば B N A などの遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドの増強を必要とする患者に、例えば1つ以上の G a l N A c 部分にカップリングされた、より少ない量の本発明によるサポニン誘導体を投与すべきという利点を有する。あらゆる論理に束縛されるものではないが、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体からのアルデヒド官能基を含むサポニンのより迅速且つより効果的な放出は、例えばヒドラゾン官能基を含むサポニン誘導体からのアルデヒド官能基を含むサポニンの放出と比較した場合、本発明者らによって確立されたようなセミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体を含むサポニンコンジュゲート、例えば (A S G P R を発現する (肝臓) 細胞を標的化するための) サポニン、オリゴヌクレオチド、及び1~3個の G a l N A c 部分などの細胞表面受容体リガンドを含むコンジュゲートなどの改善された活性の基礎であって、ここで、活性はエンドソーム脱出増強による標的細胞のサイトゾル又は核内の遺伝子サイレンシングオリゴヌクレオチドなどのエフェクター部分活性の増強である。

## 【0316】

驚くべきことに、式（I1）によるサポニンのアグリコンのC-23のアルデヒド基のセミカルバゾン官能基への変換（誘導体化）は、そのようなサポニン誘導体を細胞、即ち様々な種類の細胞と接触させた場合に、細胞毒性の低下をもたらす。したがって、低減された細胞毒性を有するこれらの一連のサポニン誘導体が提供されることは、有益であって、ここで細胞毒性の低減とは、非修飾の天然サポニンの対応物について測定した場合の細胞毒性と比較したものである。サポニン誘導体は、そのような天然に存在するサポニン、例えばSO1861など、同等に活性なSO1832及びQS-21（アイソフォーム）から、好ましくはSO1861又はSO1832から形成され得る。細胞毒性の低下を考慮すると、細胞毒性が低下したサポニンを提供する場合、セミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体が等しく好適である。

10

## 【0317】

したがって、本発明者らは、細胞毒性が考慮される場合及び／又は溶血活性が考慮される場合、並びに例えば（遺伝子サイレンシング）オリゴヌクレオチドの増強が対応する未誘導体化サポニンと比較して考慮される場合、改善された治療域を有するサポニン誘導体を提供した。セミカルバゾン官能基を含むそのようなサポニン誘導体は、例えば、それを必要とする（ヒト）対象における、例えば癌、高コレステロール血症、心血管疾患又は正常レベルを超えるLDLコレステロールの上昇を予防又は処置するための、サポニン誘導体と組み合わせられる、又は共有結合したサポニンをGalNAc部分と一緒に含む本発明の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である、GalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関する治療レジメンにおける適用に特に好適である。そのようなサポニン誘導体の安全性は、細胞毒性及び／又は溶血活性が考慮される場合、特にそのようなサポニン誘導体が、例えばADCによる若しくは及びAOCによる、又は少なくとも1つのGalNAc部分を含み、且つオリゴヌクレオチド、例えばHSP27及びapoBなどの遺伝子をサイレンシングするためのBNAを含むコンジュゲートによる治療を必要とする患者に投与される場合、又はセミカルバゾン官能基を含むサポニン誘導体が本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部である場合に改善される。

20

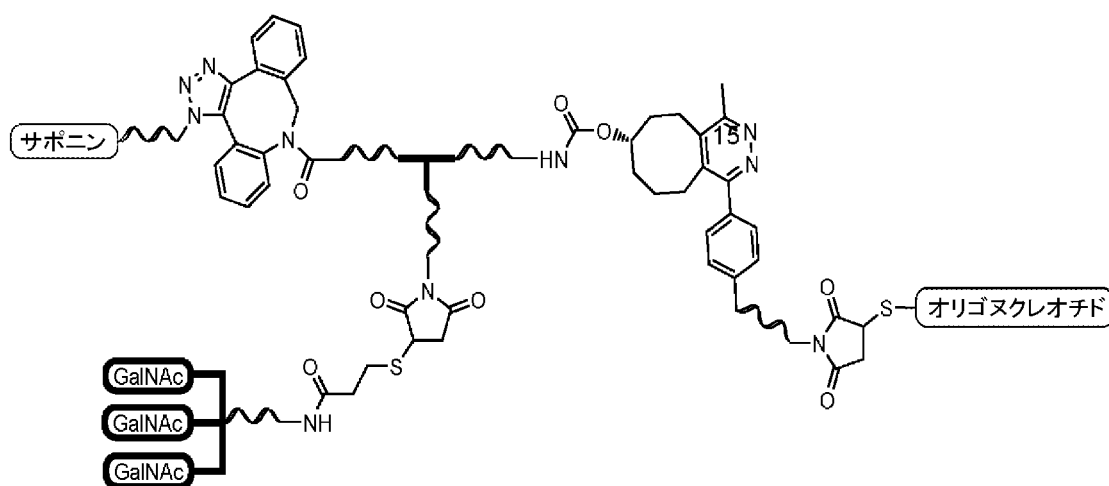
## 【0318】

一実施形態は、1つのサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートである。本発明の一態様は、分子（EE）：

30

## 【0319】

## 【化49】



40

(EE)

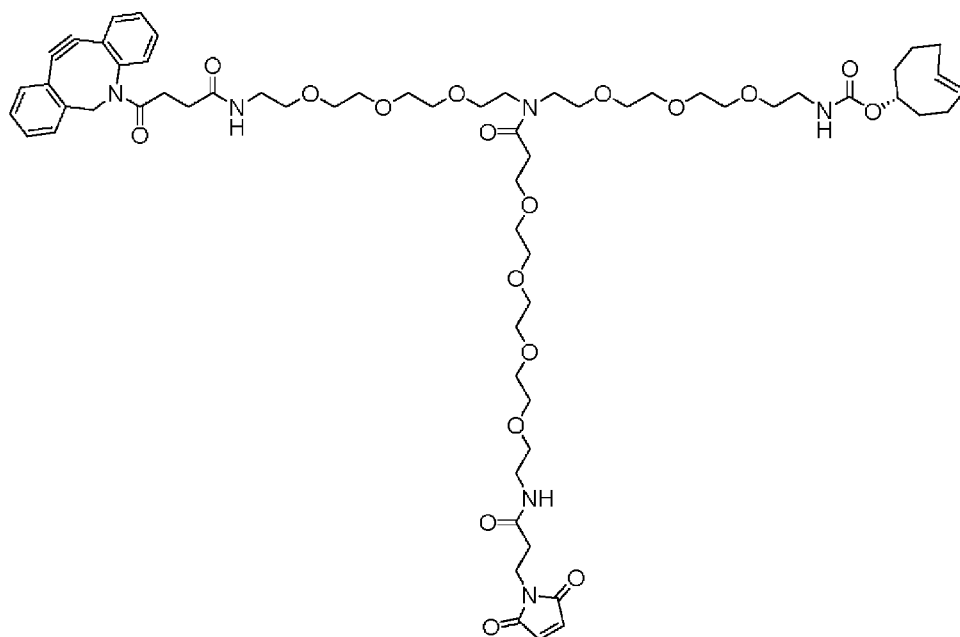
50

【 0 3 2 0 】

によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、ここで、分子（ E E ）は、式（ X X I ）：

【 0 3 2 1 】

【化 5 0】



10

20

(XXI)

【 0 3 2 2 】

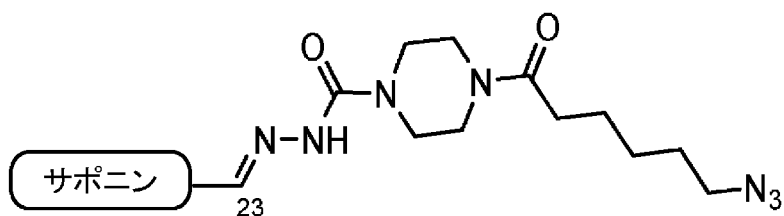
による三官能性リンカーの共有結合的コンジュゲーションによって得られる共有結合的コンジュゲーション生成物であり、分子（ E E ）は、

30

（ 1 ）分子（ A A ）：

【 0 3 2 3 】

【化 5 1】



40

(AA)

【 0 3 2 4 】

によるサポニン誘導体

（ 式中、

【 0 3 2 5 】

50

【化 5 2】

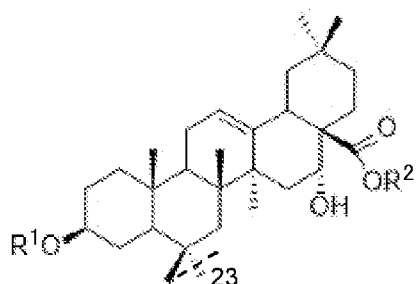
サポニン

【 0 3 2 6】

は、式 (SM) :

【 0 3 2 7】

【化 5 3】



(SM)

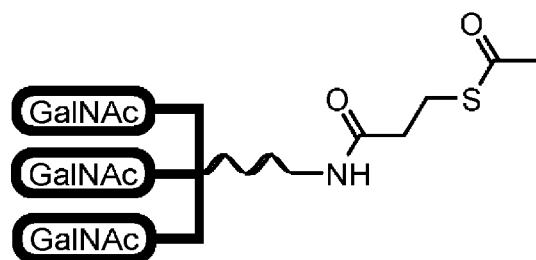
【 0 3 2 8】

によるサポニン部分を表し、式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、独立して、水素、単糖、直鎖、オリゴ糖及び分岐オリゴ糖から選択され、式 (SM) によるサポニン部分は、C-23 位にアルデヒド基を含むサポニンに基づく) を有し、及び

(2) 分子 (FF) :

【 0 3 2 9】

【化 5 4】



(FF)

【 0 3 3 0】

による GalNAc コンジュゲート  
(式中、

【 0 3 3 1】

10

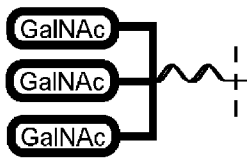
20

30

40

50

【化 5 5】



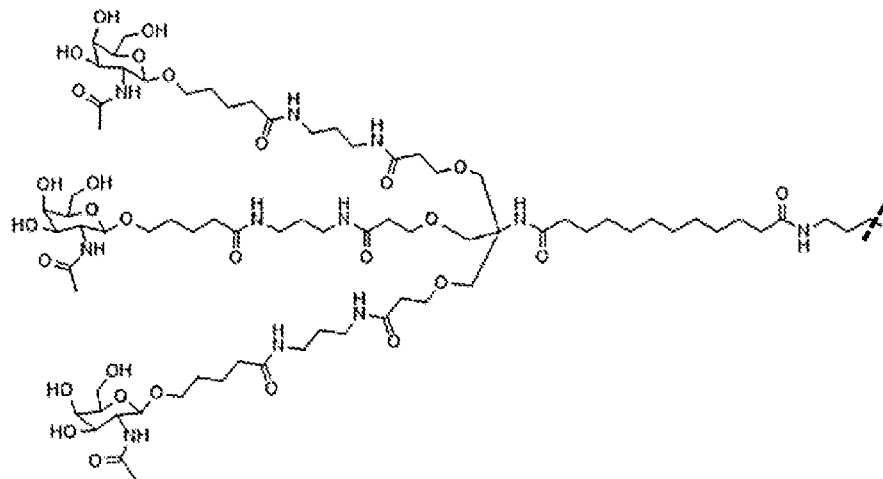
【 0 3 3 2】

は、分子 (D D)

【 0 3 3 3】

【化 5 6】

10



20

(DD)

【 0 3 3 4】

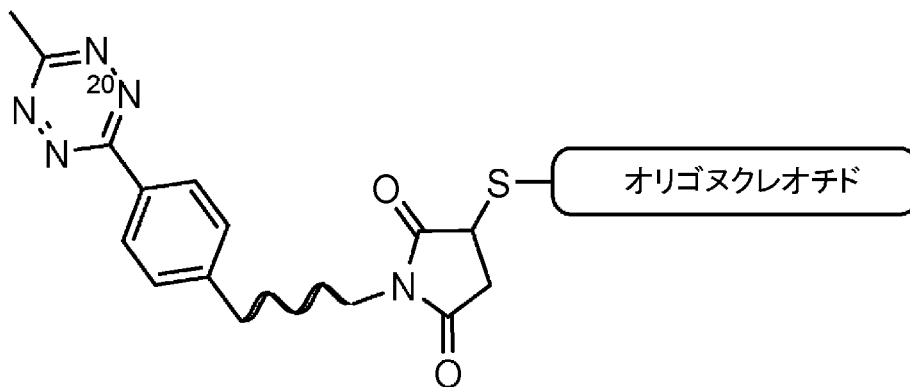
によるトリ-GalNAcコンジュゲートを表す)を有し、  
及び

(3) 分子 (G G) :

【 0 3 3 5】

【化 5 7】

30



40

(GG)

【 0 3 3 6】

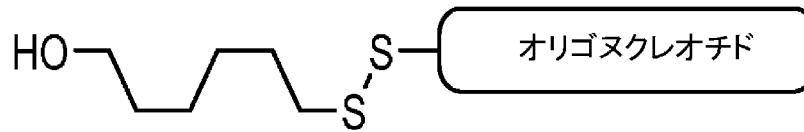
によるリンカーを備えたオリゴヌクレオチド

50

(式中、分子 (G G) は、分子 (H H) :

【0337】

【化58】



(HH)

10

【0338】

によるリンカー (E) - 1 - (4 - ( (2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノイル) ヒドラジネイリデン) メチル) ベンズアミド) - N - (4 - (6 - メチル - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル) ベンジル) - 3, 6, 9, 12 テトラオキサペンタデカン - 15 - アミドとオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間のコンジュゲーション反応のコンジュゲーション生成物を表す) を有する。

【0339】

本発明の分子 (E E) によるそのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、サポニン部分のエンドソーム脱出増強活性を考慮すると、驚くほど改善された効力を示す。有効性の改善は、A S G P R へのコンジュゲートの結合によって媒介されるコンジュゲートを取り込んだ細胞のエンドソーム中の弱酸性 pH の影響下における、セミカルバゾン官能基の切断によるコンジュゲートからのサポニンの脱カップリング (放出) の改善に関連すると考えられる。これにより、共有結合したサポニン部分を含まないが同様のコンジュゲートを適用することと比較して、オリゴヌクレオチドのエンドソーム脱出が増強され、サイトゾル及び／又は核におけるオリゴヌクレオチドの (遺伝子サイレンシング) 活性が増強される。

【0340】

一実施形態は、4つのサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートである。本発明の一態様は、分子 (P P) :

【0341】

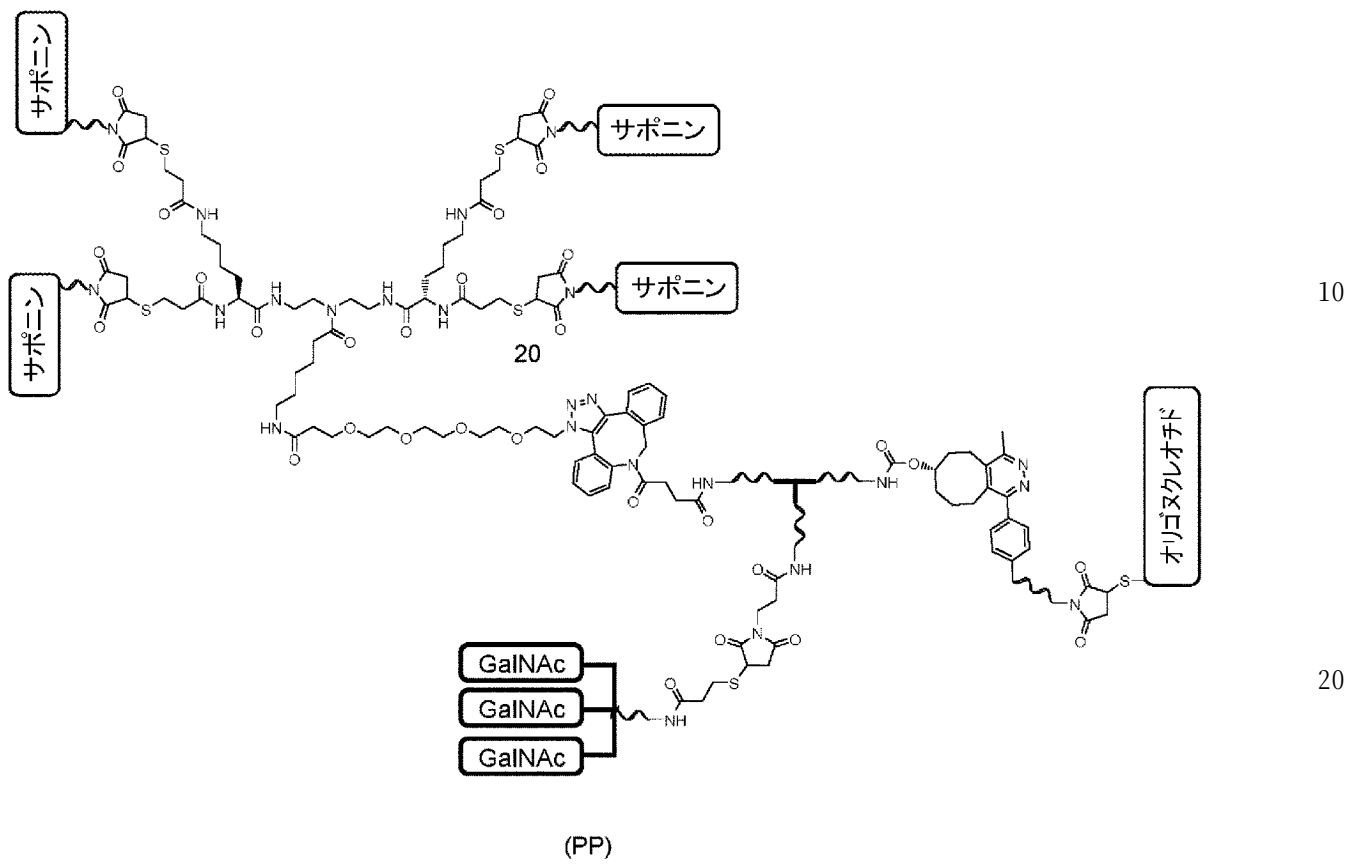
20

30

40

50

【化 5 9】



10

20

30

40

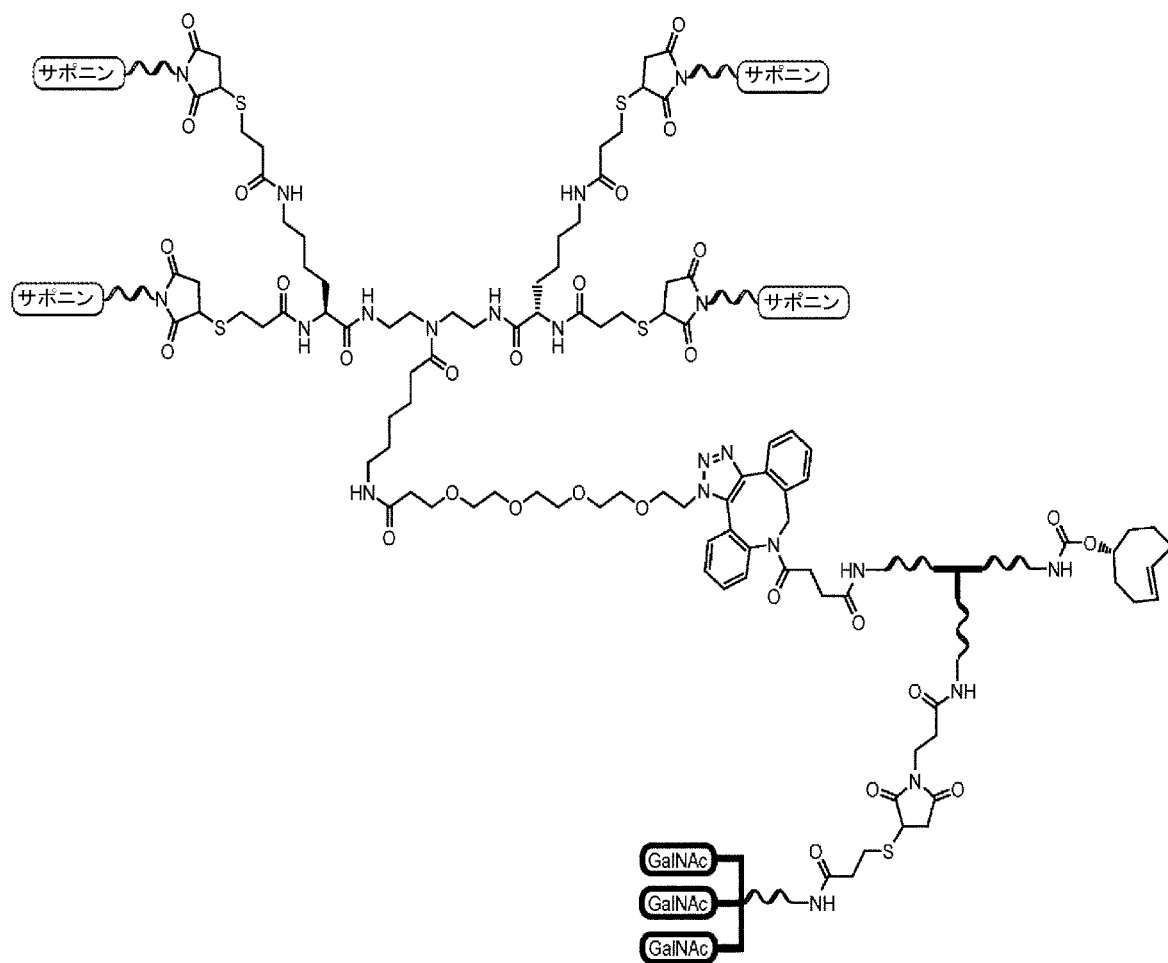
50

【 0 3 4 2】

によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、ここで、分子（PP）は、分子（LL）：

【 0 3 4 3】

【化 6 0】



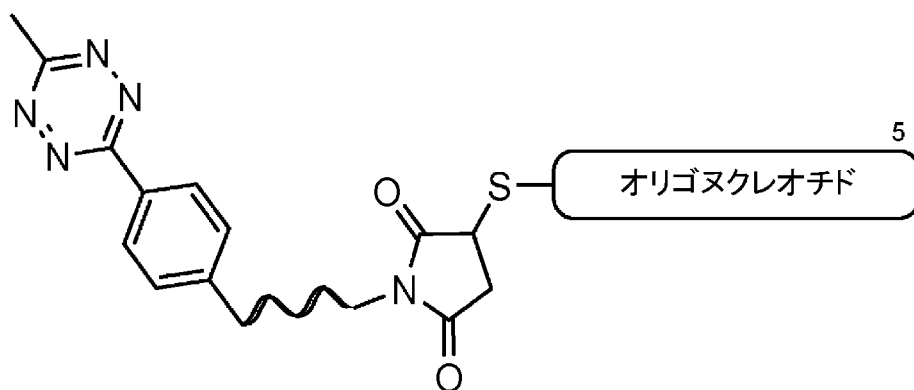
(LL)

【 0 3 4 4】

によるサポニン-GalNAcコンジュゲートの共有結合的コンジュゲーションによって得られる共有結合的コンジュゲーション生成物であって、この分子 (LL) は、

【 0 3 4 5】

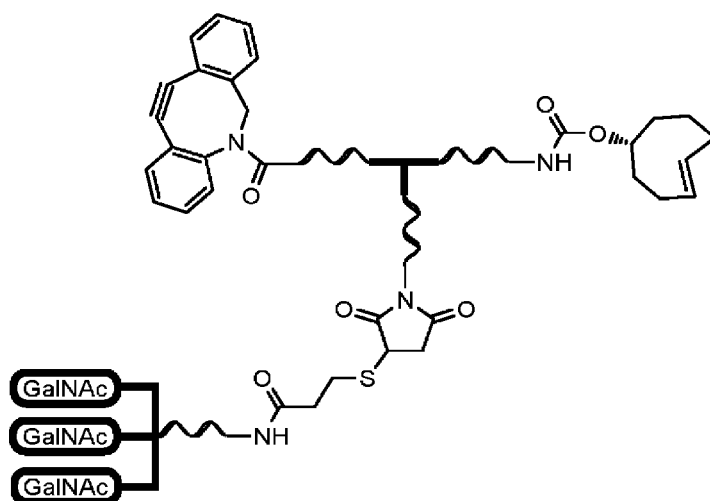
【化 6 1】



(GG)



【化 6 4】



(MM)

10

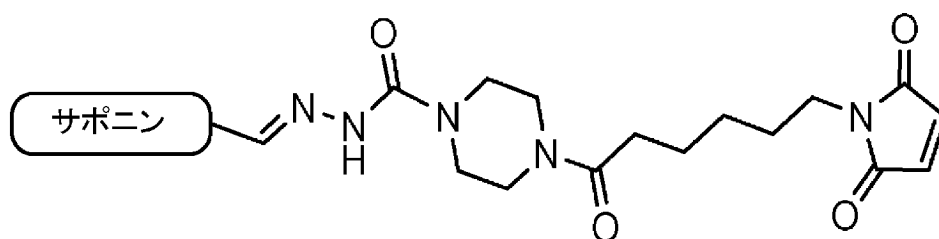
20

【 0 3 5 2】

による三官能性リンカーとGalNAcとのコンジュゲートを有し、式中、分子(JJ)は、N,N'-(9S,19S)-14-(6-アミノヘキサノイル)-1-メルカプト-9-(3-メルカプトプロパンアミド)-3,10,18トリオキソ-4,11,14,17テトラアザトリコサン-19,23ジイル)ビス(3-メルカプトプロパンアミドと分子(KK) :

【 0 3 5 3】

【化 6 5】



(KK)

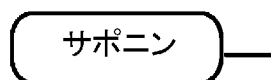
30

【 0 3 5 4】

によるサポニン誘導体との最初のコンジュゲート生成物であって、式中、

【 0 3 5 5】

【化 6 6】



【 0 3 5 6】

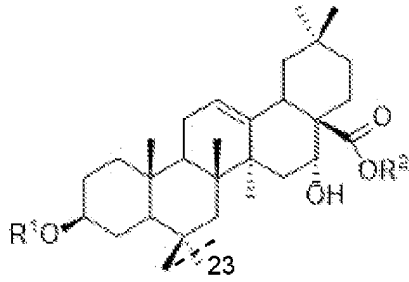
は、式(SM) :

【 0 3 5 7】

40

50

【化 6 7】



(SM)

10

【 0 3 5 8】

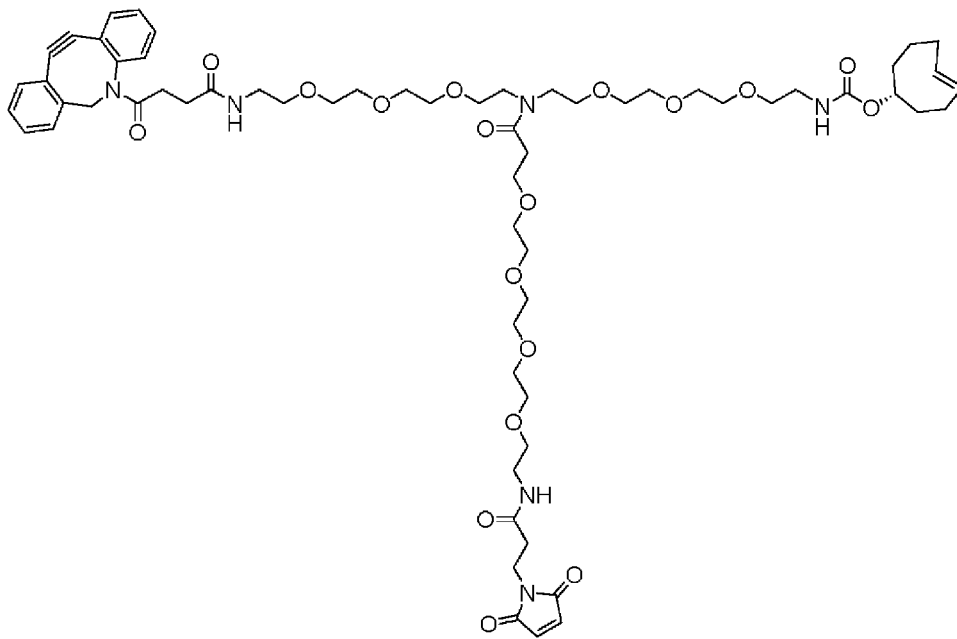
によるサポニン部分を表し、式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、本発明による水素、単糖、直鎖オリゴ糖及び分岐オリゴ糖から独立して選択され、式 (SM) によるサポニン部分は、本発明のサポニンのいずれか 1 つによる、例えば表 A 1 に列挙される、QS-21、SO1861、SO1832 などの、C-23 位にアルデヒド基を含むサポニンに基づき、

次いで、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12テトラオキサペンタデカン-15-オエートを有し、式中、分子 (MM) は、式 (XXI) :

【 0 3 5 9】

20

【化 6 8】



(XXI)

30

40

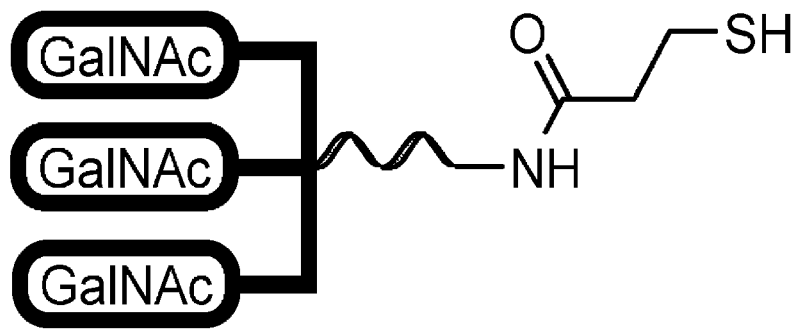
【 0 3 6 0】

による三官能性リンカーのコンジュゲート及び分子 (NN) :

【 0 3 6 1】

50

【化 6 9】



10

(NN)

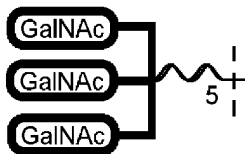
【 0 3 6 2】

による GalNAc コンjugate であって、式中、

【 0 3 6 3】

20

【化 7 0】



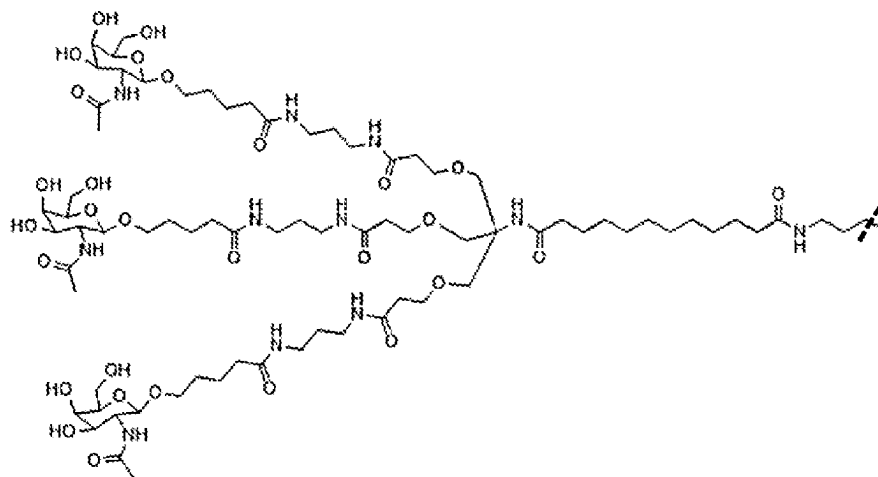
【 0 3 6 4】

は、分子 (DD) :

30

【 0 3 6 5】

【化 7 1】



40

(DD)

【 0 3 6 6】

50

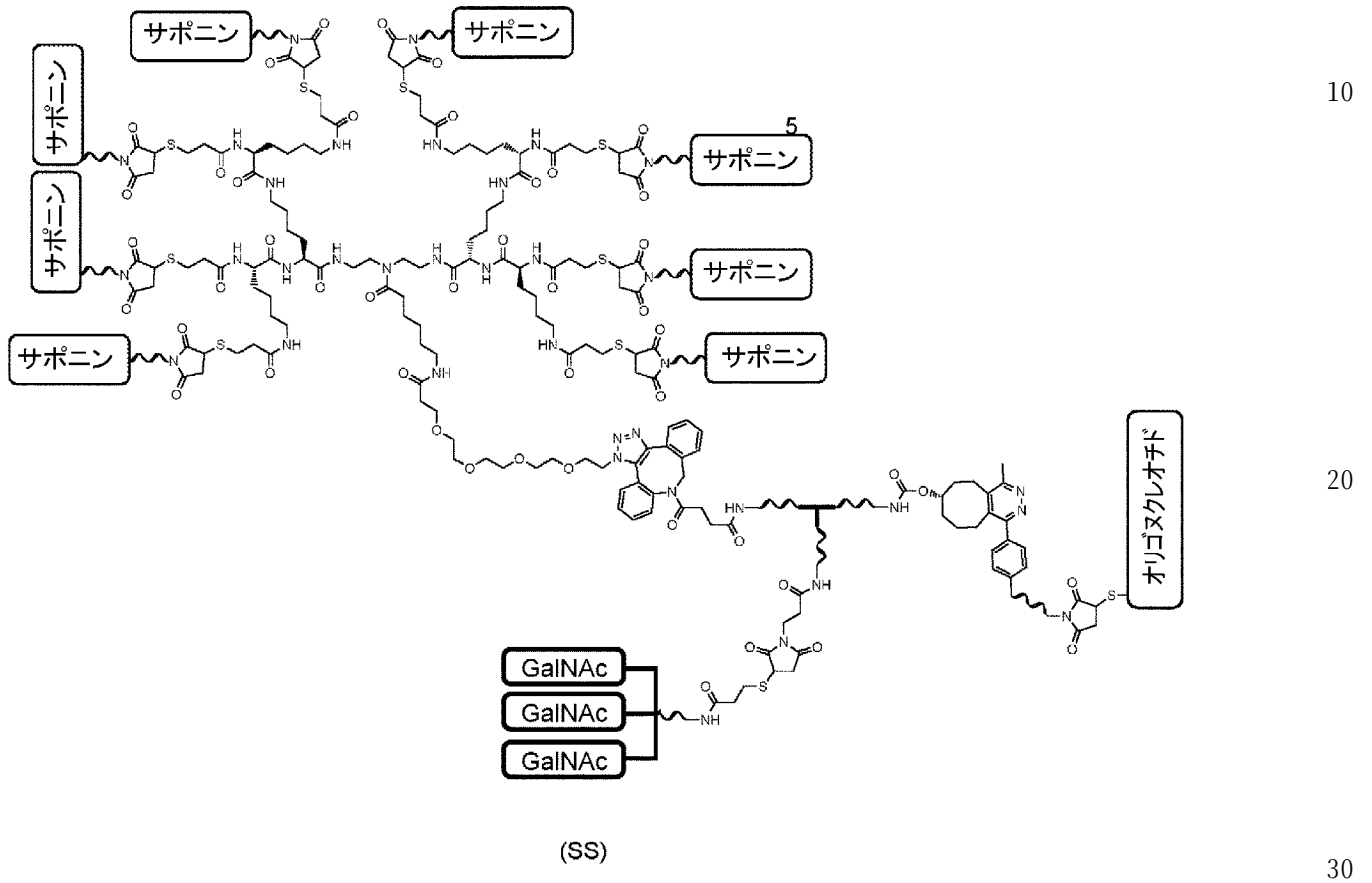
によるトリ-GalNAcコンジュゲートを表す。

【0367】

一実施形態は、8個のサポニン部分を含む本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートである。本発明の一態様は、分子（SS）：

【0368】

【化72】



【0369】

によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、ここで、分子（SS）は：

【0370】

10

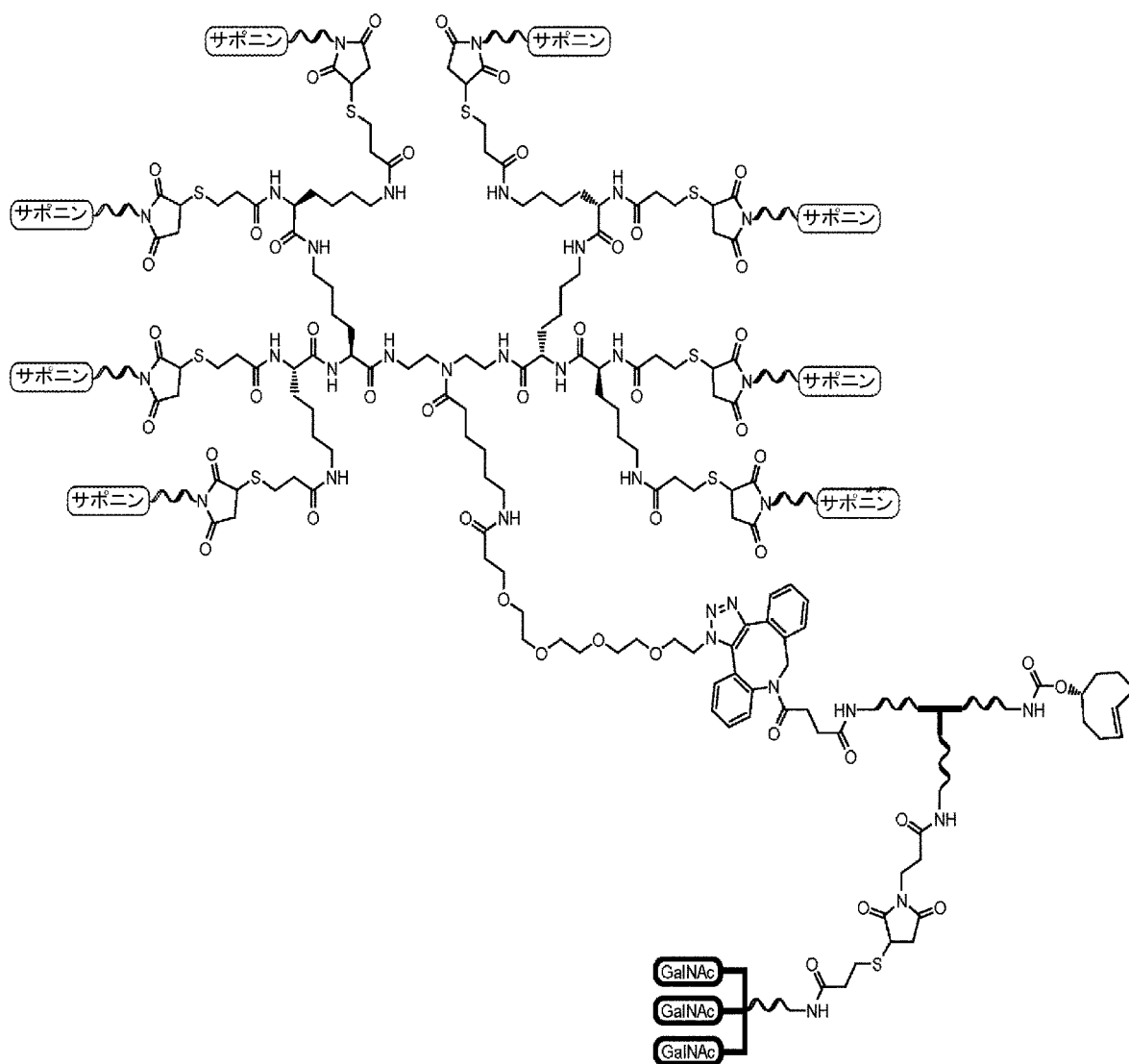
20

30

40

50

【化 7 3】



10

20

30

【0371】

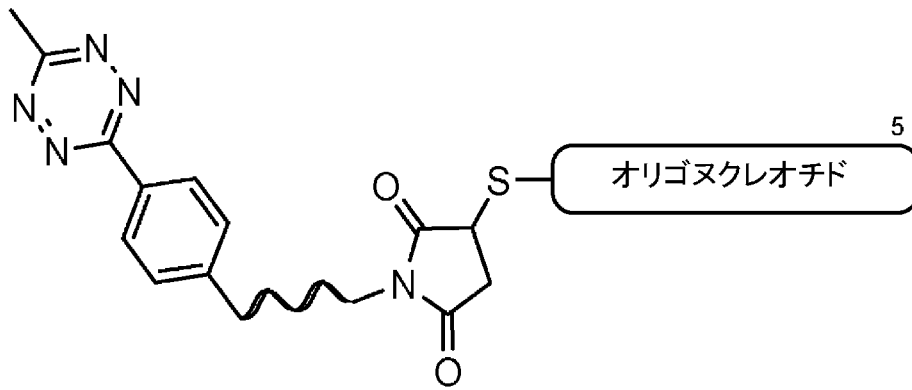
、分子（RR）によるサポニン-GalNAcコンジュゲートの共有結合的コンジュゲーションによって得られた共有結合的コンジュゲーション生成物であって、この分子（SS）は、分子（GG）によるリンカーを備えたオリゴヌクレオチドを有し、

【0372】

40

50

【化 7 4】



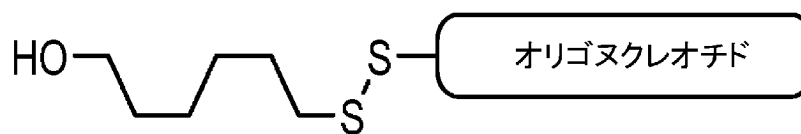
(GG)

【 0 3 7 3】

式中、分子 (GG) は、分子 (HH) :

【 0 3 7 4】

【化 7 5】



(HH)

【 0 3 7 5】

による、リンカー (E) - 1 - (4 - ( (2 - (6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノイル) ヒドラジネイリデン) メチル) ベンズアミド) - N - (4 - (6 - メチル - 1, 2, 4, 5 - テトラジン - 3 - イル) ベンジル) - 3, 6, 9, 12 テトラオキサペンタデカン - 15 - アミドとオリゴヌクレオチド - リンカー分子との間のコンジュゲーション反応のコンジュゲーション生成物を表し、この分子 (RR) は、分子 (QQ) :

【 0 3 7 6】

10

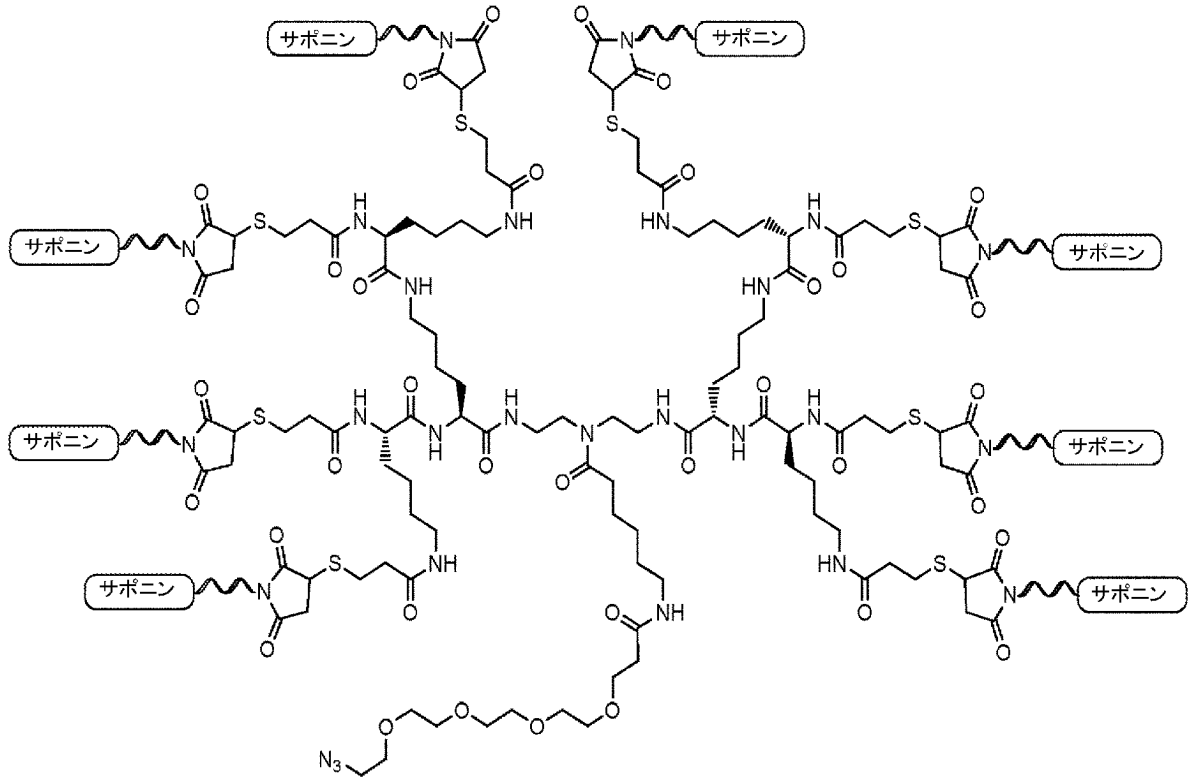
20

30

40

50

【化 7 6】



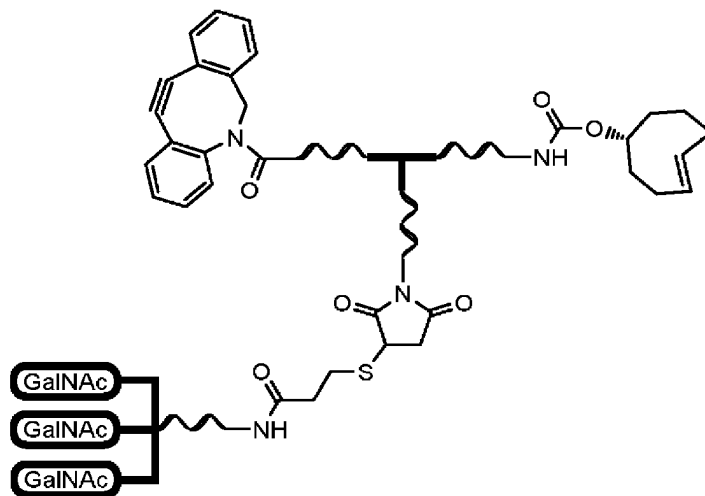
(QQ)

【 0 3 7 7】

によるサポニン誘導体の共有結合的コンジュゲーションによって得られる共有結合的コンジュゲーション生成物であって、分子（QQ）は、分子（MM）：

【 0 3 7 8】

【化 7 7】



(MM)

【 0 3 7 9】

による三官能性リンカーとGalNAcとのコンジュゲートを有し、分子（QQ）は、最初に（2S）-N-[（1S）-1-{[2-（6-アミノ-N-{2-[（2S）-2

10

20

30

40

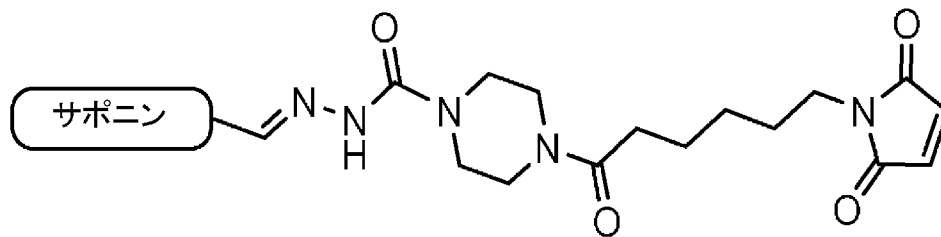
50

， 6 - ビス [ ( 2 S ) - 2 ， 6 - ビス ( 3 - スルファニルプロパンアミド ) ヘキサンアミド ] ヘキサンアミド ] エチル } ヘキサンアミド ) エチル ] カルバモイル } - 5 - [ ( 2 S ) - 2 ， 6 - ビス ( 3 - スルファニルプロパンアミド ) ヘキサンアミド ] ペンチル ] - 2 ， 6 - ビス ( 3 - スルファニルプロパンアミド ) ヘキサンアミドホルメートのコンジュゲーションのコンジュゲート生成物であって、

( a ) 分子 ( K K ) :

【 0 3 8 0 】

【 化 7 8 】



(KK)

10

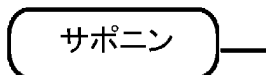
20

【 0 3 8 1 】

によるサポニン誘導体を有し、式中、

【 0 3 8 2 】

【 化 7 9 】



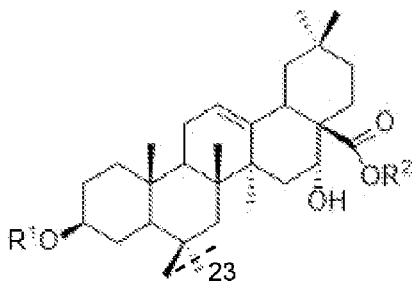
30

【 0 3 8 3 】

は、式 ( S M ) :

【 0 3 8 4 】

【 化 8 0 】



(SM)

40

【 0 3 8 5 】

によるサポニン部分を表し、式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、本発明による水素、単糖、直鎖オリゴ糖及び分岐オリゴ糖から独立して選択され、式 ( S M ) によるサポニン部分は、本発明のサポニンのいずれか 1 つによる、例えば表 A 1 に列挙される、Q S - 2 1、S O 1 8 6 1、S O 1 8 3 2 などの、C - 2 3 位にアルデヒド基を含むサポニンに基づき、

50

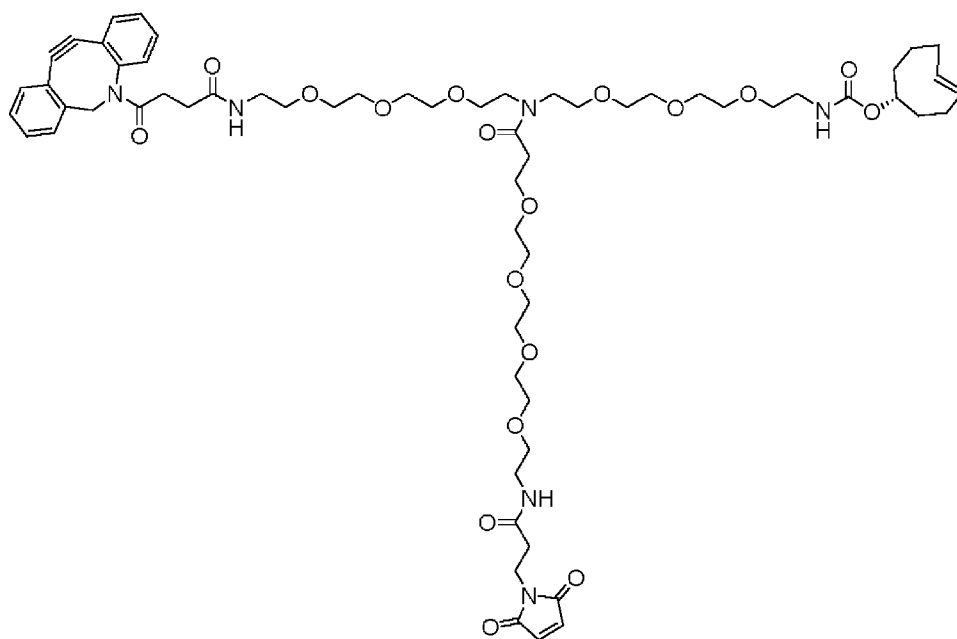
続いて、

(b) 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12テトラオキサペンタデカン-15-オエート、

(式中、分子(MM)は、式(XXI)：

【0386】

【化81】



(XXI)

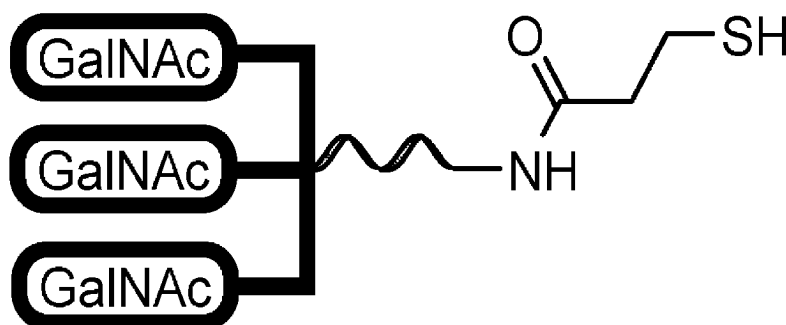
【0387】

による三官能性リンカーのコンジュゲートである)

及び分子(NN)：

【0388】

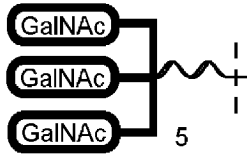
【化82】



(NN)

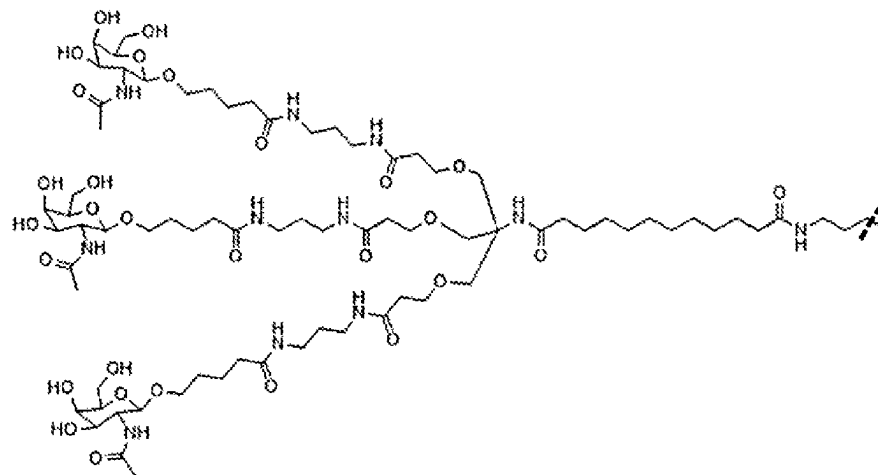
【0389】

によるGalNAcコンジュゲートを有し、  
 式中、  
 【0390】  
 【化83】



10

【0391】  
 は、分子(DD)：  
 【0392】  
 【化84】



20

(DD)

30

【0393】  
 によるトリ-GalNAcコンジュゲートを表す。  
 【0394】

一実施形態は、本発明による、分子(EE)、(PP)、及び(SS)のいずれか1つによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、上記及び表A1に列挙したサポニンのいずれか1つによるサポニンに基づく。

【0395】

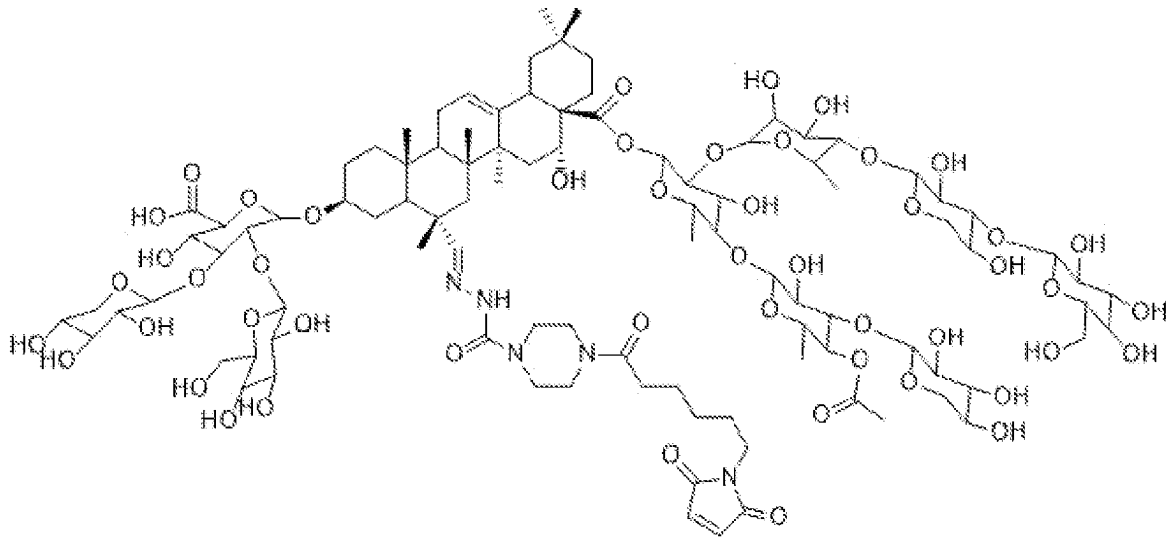
オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、SO1861、SO1832及びQS-21、好ましくはSO1861、及びSO1832、より好ましくはSO1861又はSO1832から選択されるサポニンに基づく、本発明による、並びに分子(EE)、(PP)、及び(SS)のいずれか1つによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートが好ましい。サポニンがSO1861である場合、分子(VII) a：

【0396】

40

50

【化 8 5】



(VII)a

【0397】

によるサポニン誘導体は、オリゴヌクレオチド及び少なくとも1つのGalNAc部分とコンジュゲートして、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを提供する。

【0398】

セミカルバゾン官能基が、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソーム中に存在するような酸性条件下において、好ましくはpH4.0～6.5、より好ましくはpH≤5.5でインビボ加水分解を受ける、本発明による、並びに分子(EE)、(PP)、及び(SS)のいずれか1つによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートもまた好ましい。

【0399】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子(EE)、(PP)、及びのうちのいずれか1つ(SS)によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、BNA、異種核酸、siRNAのいずれか1つなどのAONである。

【0400】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明による、並びに分子(EE)、(PP)、及び(SS)のいずれか1つによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、(n)：低分子干渉RNA(sirRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、アンチヘアピン型マイクロRNA(miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA(dsRNA)、アンチマイクロRNA(アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸(LNA)、架橋型核酸(BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸(BNA<sup>NC</sup>)、BNAベースのsiRNA、及びBNAベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド(BNA-AON)のうちのいずれか1つ以上から選択される。

【0401】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明による、並びに分子(EE)、(PP)、及び(SS)のいずれか1つによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、(n)：アンチmiRNA、BNA-AON又はsir

NA、例えば、化学的に修飾された siRNA、代謝的に安定した siRNA、及び化学的に修飾された、代謝的に安定した siRNA から選択される、BNA ベースの siRNA などのいずれか 1 つ以上から選択される。

【0402】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子 (EE)、(PP)、及びのうちのいずれか 1 つ (SS) によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質 B (apoB)、HSP 27、トランスサイレチン (TTR)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシシ 9 型 (PCSK9)、TMPRSS6、 $\delta$ -アミノレブリン酸シンターゼ 1 (ALAS1)、アンチトロピン 3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体成分 C5 (CC5)、B 型肝炎ウイルス (HBV) の X 遺伝子、HBV の S 遺伝子、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン (AAT)、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA、CEBPA、及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) のいずれか 1 つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、異常な miRNA を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

10

【0403】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子 (EE)、(PP)、及びのうちのいずれか 1 つ (SS) によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質 B (apoB) 及び HSP 27 のいずれか 1 つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである。

20

【0404】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子 (EE)、(PP)、及びのうちのいずれか 1 つ (SS) によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB、HSP 27、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBV の X 遺伝子の発現産物、HBV の S 遺伝子の発現産物、AAT、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA、CEBPA、及び LDH のいずれか 1 つの発現に關与する mRNA を標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性 miRNA (oncomiR) の阻害若しくは oncomiR の発現の抑制などの miRNA 機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである。

30

【0405】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子 (EE)、(PP)、及びのうちのいずれか 1 つ (SS) によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：HSP 27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B 型肝炎ウイルス HbsAg、LDHA、及び CEBPA のいずれか 1 つの発現に關与する mRNA を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

40

【0406】

一実施形態は、オリゴヌクレオチドを含む、本発明並びに分子 (EE)、(PP)、及びのうちのいずれか 1 つ (SS) によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、ここで、オリゴヌクレオチドは、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB 及び HSP 27 のいずれか 1 つの発現に關与する mRNA を標的化することができるオリゴヌクレオチドである。

【0407】

本発明の態様は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに分子 (EE)、

50

( P P )、及びのうちいずれか 1 つ ( S S ) による、並びに任意選択により薬学的に許容される賦形剤、並びに／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む、第 2 の医薬組成物に関する。

【 0 4 0 8 】

本発明の一態様は、医薬品としての使用のための、本発明の第 2 の医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つに関する。

【 0 4 0 9 】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、及び L D H のいずれか 1 つ以上に関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するための、並びに／又は以下の遺伝子：H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A T 3、G O、C C 5、H B V の X 遺伝子、H B V の S 遺伝子、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、C E B P A、及び L D H のいずれか 1 つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するための、本発明の第 2 の医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、且つ分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つによる。

【 0 4 1 0 】

本発明の態様は、発現産物が、以下の遺伝子：H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、及び C E B P A のいずれか 1 つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は遺伝子：H S P 2 7、a p o B、T T R、P C S K 9、T M P R S S 6、A L A S 1、A A T、m i R - 1 2 2、B 型肝炎ウイルス H b s A g、L D H A、及び C E B P A のいずれか 1 つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、本発明の第 2 の医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関し、且つ分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つによる。

【 0 4 1 1 】

本発明の態様は、上記で概説した使用のための、本発明の第 2 の医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート及び分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つによるものであって、ここで、当該使用は、以下の遺伝子：H S P 2 7 及び a p o B、好ましくは a p o B のいずれか 1 つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防における、並びに／又は遺伝子：H S P 2 7 及び a p o B、好ましくは a p o B のいずれか 1 つ以上と関連する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防におけるものである。

【 0 4 1 2 】

一実施形態は、上記で概説したように使用するための、癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病 A、血友病 B、A A T 関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T R 媒介性アミロイドーシス、遺伝性 T T R アミロイドーシス ( h A T T R )、補体媒介性疾患、B 型肝炎感染症、C 型肝炎感染症、 $\alpha$  1 - アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$  - サラセミア、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するための、本発明の第 2 の医薬組成物、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート及び分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つによるものである。

【 0 4 1 3 】

一実施形態は、上記で概説したように使用するための、本発明の第 2 の医薬組成物、又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート及び分子 ( E E )、( P P )、及び ( S S ) のいずれか 1 つによるものであって、ここで、当該使用は、子宮内膜癌、乳癌、肺癌若しくは肝細胞癌などの癌、及び／又は高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの心血管疾患の治療又は予防におけるものである。

## 【0414】

本発明の一態様は、対象のLDLコレステロールを低下させるのに使用するための、本発明の第2の医薬組成物又は本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに分子（EE）、（PP）、及び（SS）のいずれか1つに関する。

## 【0415】

いくつかの実施形態の観点から本発明を説明してきたが、明細書を読み、図面を精査すれば、それらの代替、変更、並べ替え、及び均等物が当業者に明らかになることが意図される。本発明は、図示した実施形態に決して限定されない。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。

## 【0416】

## 実施形態

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

## 【0417】

2. サポニンが、

2 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

16 アルファー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）；

16 アルファ，23-ジヒドロキシオレアノール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

プロトエシゲニン21（2-メチルブタ-2-エノエート）-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；

ジギトゲニン；

3，16，28-トリヒドロキシオレアナ-12-エン；

ギブソゲン酸、

及び

これらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、好ましくは、サポニンが、キラ酸及びギブソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又はその誘導体である、実施形態1に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【0418】

3. サポニンが、群A：

GlcA-

Glc-

Gal-

Rha-（1→2）-Ara-

Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-GlcA-

Glc-（1→2）-[Glc-（1→4）]-GlcA-

Glc-（1→2）-Ara-（1→3）-[Gal-（1→2）]-GlcA-

Xyl-（1→2）-Ara-（1→3）-[Gal-（1→2）]-GlcA-

Glc-（1→3）-Gal-（1→2）-[Xyl-（1→3）]-Glc-（1→4

10

20

30

40

50

) - Gal -,  
 Rha - (1 → 2) - Gal - (1 → 3) - [Glc - (1 → 2)] - GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Ara - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Rha - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Glc - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -,  
 Xyl - (1 → 4) - Fuc - (1 → 2) - Gal - (1 → 2) - Fuc - (1 → 2) -  
 GlcA -, 及び

これらの誘導体

から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・サポニンが、群 B :

Glc -,  
 Gal -,  
 Rha - (1 → 2) - [Xyl - (1 → 4)] - Rha -,  
 Rha - (1 → 2) - [Ara - (1 → 3) - Xyl - (1 → 4)] - Rha -,  
 Ara -,  
 Xyl -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R1 - (→ 4)] - Fuc - (ここで、R  
 1 は 4 E - メトキシケイ皮酸である) -,  
 Xyl - (1 → 4) - Rha - (1 → 2) - [R2 - (→ 4)] - Fuc - (ここで、R  
 2 は 4 Z - メトキシケイ皮酸である) -,  
 Xyl - (1 → 4) - [Gal - (1 → 3)] - Rha - (1 → 2) - 4 - OAc - Fuc -,

$Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 3, 4\text{-ジ-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R3 - (\rightarrow 4)] - 3\text{-OAc-Fuc-}$ （ここで、R3は4E-メトキシケイ皮酸である）、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - 4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $(Ara\text{-又は}Xyl -) (1 \rightarrow 3) - (Ara\text{-又は}Xyl -) (1 \rightarrow 4) - (Rha\text{-又は}Fuc -) (1 \rightarrow 2) - [4\text{-OAc-}(Rha\text{-又は}Fuc -) (1 \rightarrow 4)] - (Rha\text{-又は}Fuc -)$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、  
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Gal - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $Ara/Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha/Fuc - (1 \rightarrow 4) - [Glc/Gal - (1 \rightarrow 2)] - Fuc -$ 、  
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R4 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ （ここで、R4は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である）、  
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [R5 - (\rightarrow 4)] - Fuc -$ （ここで、R5は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である）、  
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Api - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - [Glc - (1 \rightarrow 3)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Rha - (1 \rightarrow 3)] - 4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $6\text{-OAc-Glc} - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3\text{-OAc-Rha} - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3\text{-OAc-} - Rha - (1 \rightarrow 3)] - Fuc -$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Qui - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Xyl - (1 \rightarrow 3) - 4\text{-OAc-Qui} - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [3, 4\text{-ジ-OAc-Qui} - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $6\text{-OAc-Glc} - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $Glc - (1 \rightarrow 3) - [Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4)] - Rha - (1 \rightarrow 2) - Fuc -$ 、  
 $Xyl - (1 \rightarrow 3) - Xyl - (1 \rightarrow 4) - Rha - (1 \rightarrow 2) - [Xyl - (1 \rightarrow 3) - 4\text{-OAc-Qui} - (1 \rightarrow 4)] - Fuc -$ 、

$\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Rha} - (1 \rightarrow 3)] - 4\text{OAc} - \text{Fuc} -$   
 $\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Rha} - (1 \rightarrow 3)] - 4\text{OAc} - \text{Fuc} -$   
 $\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R6} - (\rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R6は5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R7} - (\rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (式中、R7は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Api} / \text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R8} - (\rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (式中、R8は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R9} - (\rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R9は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R10} - (\rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R10は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Api} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R11} - (\rightarrow 3)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R11は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R12} - (\rightarrow 3)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R12は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である) )  
 $\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 6)] - \text{Gal} -$ 、及び

10

20

30

これらの誘導体

から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・サポニンが、アグリコンコア構造に結合された群Aから選択される第1の糖鎖を含み、アグリコンコア構造に結合された群Bから選択される第2の糖鎖を含む、ビデスモシドトリテルペン配糖体である、

実施形態1又は2に記載のサポニンコンジュゲート。

40

【0419】

4. サポニンが、キラヤ樹皮サポニン、ディブサコシドB、サイコサポニンA、サイコサポニンD、マクラントイジンA、エスクレントシド (esculentoside A)、フィトラッカゲニン、エシネート、AS6. 2、NP-005236、AMA-1、AMR、α-ヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AEX55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE17

50

41、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7 api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21 A-apio、QS-21 A-xyl、QS-21 B-apio、QS-21 B-xyl、 $\beta$ -エスシン、エスシン Ia、茶種子サポニン I、茶種子サポニン J、アッサムサポニン F、ジギトニン、プリムラ酸 1 及び AS64R、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくはサポニンが、QS-21、QS-21 誘導体、SO1861、SO1861 誘導体、SA1641、SA1641 誘導体、GE1741、GE1741 誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンが、QS-21 誘導体、SO1861 誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくはサポニンが、SO1861 誘導体である、実施形態 1～3 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

10

【0420】

5. サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；

ii. サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態 3 に記載の群 A から選択される糖鎖を含み、糖鎖が、誘導体化されたカルボキシル基を含み；

iii. サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態 3 に記載の群 B から選択される糖鎖を含み、糖鎖が、誘導体化されたアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含み；又は

20

iv. サポニン誘導体が、誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. の任意の組合せ、好ましくは誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. のうちの 2 つの誘導体化の任意の組合せを含む、

実施形態 3 又は 4 に記載のサポニンコンジュゲート。

【0421】

6. サポニンが、SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21 A、QS-21 A-api、QS-21 A-xyl、QS-21 B、QS-21 B-api、QS-21 B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM (Saponinum album)、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシド A、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくはサポニンが、QS-21、QS-21 誘導体、SO1861、SO1861 誘導体、SA1641、SA1641 誘導体、GE1741、GE1741 誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンが、QS-21 誘導体、SO1861 誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくはサポニンが、SO1861 誘導体である、実施形態 1～5 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

30

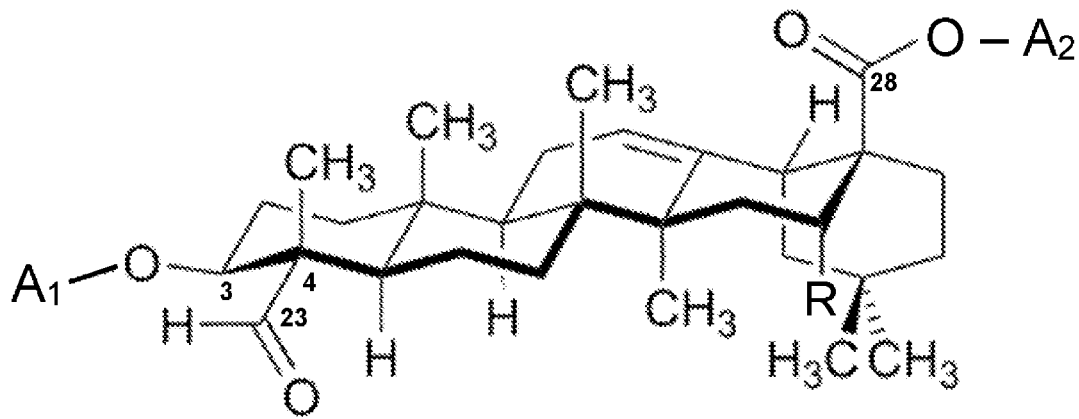
【0422】

7. サポニンが、実施形態 2 に記載のキラ酸サポニン又はギブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子 1：

40

【0423】

【化 8 6】



(分子1)

【0 4 2 4】

(式中、

A<sub>1</sub>が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>1</sub>が実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>1</sub>が実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；

A<sub>2</sub>が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>2</sub>が実施形態3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>2</sub>が実施形態3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば1、2、3、又は4つのアセトキシ基を含み、

式中、A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の少なくとも1つが水素でなく、好ましくはA<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の両方がオリゴ糖鎖であり；

並びに、Rがギブソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである) で表され；サポニン誘導体が、分子1で表されるサポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、誘導体化されており；

ii. A<sub>1</sub>が実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、A<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されており；及び

iii. A<sub>2</sub>が実施形態3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、A<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、A<sub>2</sub>の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されているのうち少なくとも1つ、好ましくは1つ又は2つ、より好ましくは1つが存在する、実施形態1～6のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0 4 2 5】

8. A<sub>1</sub>が実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されているか、及び／又は、A<sub>2</sub>が実施形態3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、且つA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含み、A<sub>2</sub>の少なくとも1つのアセトキシ基が誘導体化されている、実施形態7に記載のサポニンコンジュゲート。

【0 4 2 6】

9. 分子1で表されるサポニンが、ピデスモシドトリテルペンサポニンである、実施形態7又は8に記載のサポニンコンジュゲート。

【0 4 2 7】

10. サポニン誘導体が、分子1で表されるサポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、

－ アルコールへの還元；

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

－  $N$ -[ $\beta$ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－  $N$ -[ $\kappa$ -マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

i i.  $A_1$ が実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、 $A_1$ がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、 $A_1$ のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール（AMPD）又は $N$ -（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによってQS-21-Glu-AMPD若しくはSO1861-Glu-AMPDなどのサポニン-Glu-AMPD、又はQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされ；

i i i.  $A_2$ が実施形態3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、 $A_2$ が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、 $A_2$ の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（HO-）への変換によって誘導体化されている

のうち少なくとも1つ、好ましくは1つ又は2つ、より好ましくは1つが存在する、実施形態7～9のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0428】

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

【0429】

12. サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体が、

－ アルコールへの還元；

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

－  $N$ -[ $\beta$ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）との反応を介したヒ

10

20

30

40

50

ドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－ N－[κ-マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

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

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

i v. サポニン誘導体が、誘導体化i.、誘導体化i i.及び誘導体化i i i.の任意の組合せ、好ましくは誘導体化i.、誘導体化i i.及び誘導体化i i i.のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含み；

好ましくは、サポニン誘導体が、アグリコンコア構造を含み、アグリコンコア構造が、EMCHとの反応を介したヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、EMCHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、実施形態5～11のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0430】

13. サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体が、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってSO1861-Al d-EMCH若しくはQS-21-Al d-EMCHなどのサポニン-Al d-EMCHがもたらされ；

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

i i i. サポニン誘導体が、誘導体化i.及び誘導体化i i.の組合せを含む、実施形態12に記載のサポニンコンジュゲート。

【0431】

14. サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態3に記載の群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む、実施形態12に記載のサポニンコンジュゲート。

【0432】

15. サポニンが、分子2：

【0433】

10

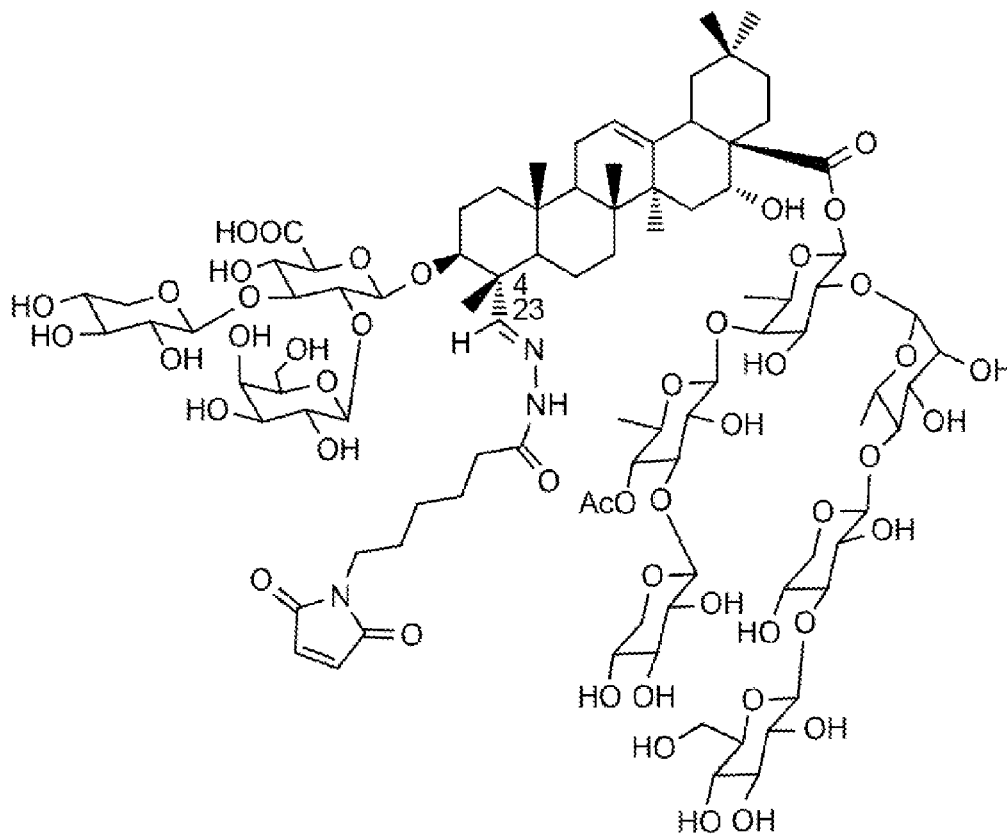
20

30

40

50

【化 8 7】



(分子2)

【 0 4 3 4】

によって表されるサポニン誘導体であるか、又は、サポニン誘導体が、分子 3：

【 0 4 3 5】

10

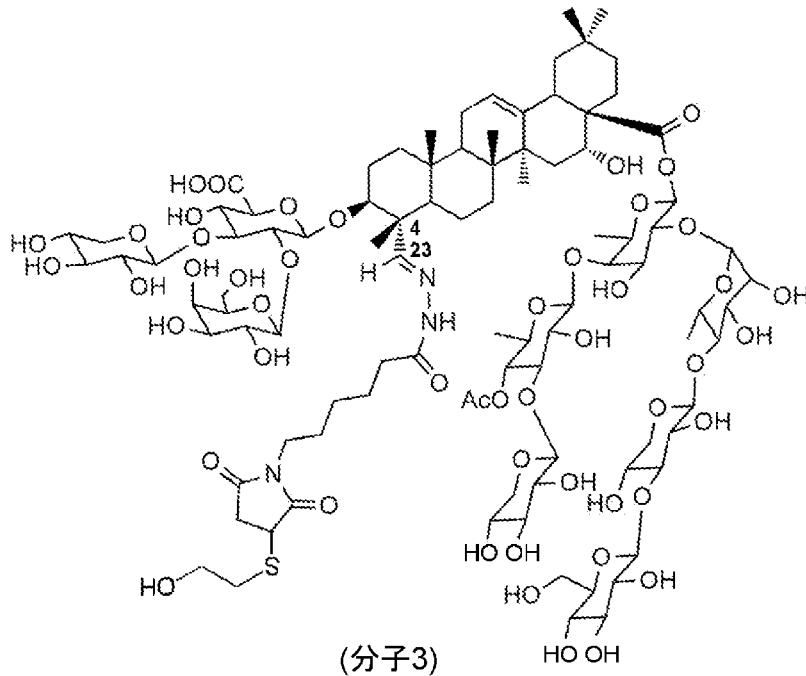
20

30

40

50

## 【化 8 8】



10

20

## 【0 4 3 6】

によって表されるサポニン誘導体である、実施形態 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【0 4 3 7】

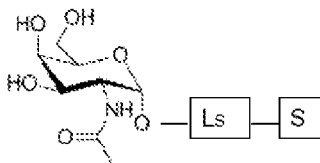
1 6 . 少なくとも 1 つのサポニン及び A S G P R のリガンドが、直接共有結合されているか、又は少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合されている、実施形態 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【0 4 3 8】

1 7 . G a l N A c 部分が、サポニン S、好ましくは式 ( I I ) s :

## 【0 4 3 9】

## 【化 8 9】



(II)s

30

40

## 【0 4 4 0】

で示されるようなサポニンリンカー L s を介して結合される、実施形態 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

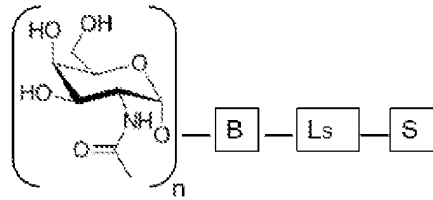
## 【0 4 4 1】

1 8 . G a l N A c 部分が、各々、G a l N A c 部分の「1」位の酸素を介して中央の架橋部分 B へと別々に共有結合しており、これは、式 ( I I I ) s :

## 【0 4 4 2】

50

## 【化 9 0】

(III)<sub>s</sub>

## 【 0 4 4 3】

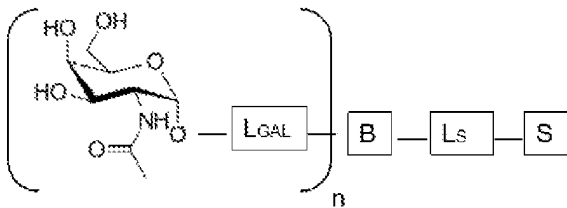
(式中、 $n$ は2以上の整数であり、好ましくは $n$ は3であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である)に示されるように、GalNAc部分とサポニン部分との間に、好ましくはサポニン部分リンカー $L_s$ を介して、架橋を効果的に形成する、実施形態1～16に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【 0 4 4 4】

19. GalNAc部分は、式(IV)<sub>s</sub>：

## 【 0 4 4 5】

## 【化 9 1】

(IV)<sub>s</sub>

## 【 0 4 4 6】

(式中、 $n$ は2以上の整数であり、好ましくは $n$ は3であり、 $L_s$ はサポニン部分リンカーであり、 $S$ はサポニン部分である)に示すように、GalNAcリンカー $LGAL$ を介して架橋部分 $B$ へと結合される、実施形態18に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【 0 4 4 7】

20. サポニン部分リンカー $L_s$ が、式(II)<sub>s</sub>におけるようなGalNAc、又は式(III)<sub>s</sub>及び(IV)<sub>s</sub>におけるような架橋部分 $B$ にサポニンを共有結合するのに好適なあらゆる化学的部分を表す、実施形態17～19のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

## 【 0 4 4 8】

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

## 【 0 4 4 9】

22. サポニン部分リンカー $L_s$ が、GalNAc又は架橋部分 $B$ に共有結合された少なくとも第1の前駆体 $L_{s1}$ と、サポニン部分に共有結合された第2の前駆体 $L_{s2}$ との間のカップリング反応の結果生じるものであり、カップリング反応は、アジド-アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤の求核性開環、非アルドール型のカルボニル反応及び炭素-炭素二重結合の付加からなる群から選択され、好ましくはカップリング反応が、アジド-アルキン付加環化、チオールマレイミドカップリング、シュタウディンガー反応、ひずんだ複素環式求電子剤

10

20

30

40

50

の求核性開環であり、より好ましくはカップリング反応が、アジド-アルキン付加環化又はチオールマレイミドカップリングである、実施形態 17～21 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0450】

23. サポニン部分リンカー  $L_S$  が、GalNAc 又は架橋部分 B に共有結合された第 1 の前駆体  $L_{S1}$ 、アジドを含む第 1 の前駆体  $L_{S1}$  と、サポニン部分に共有結合された第 2 の前駆体  $L_{S2}$ 、アルキンを含み、好ましくはサポニン部分のアルデヒドへのヒドラジド／アルデヒドカップリングから生じるヒドラゾンを含む第 2 の前駆体  $L_{S2}$  と、の間のカップリング反応の結果生じるものである、実施形態 17～22 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

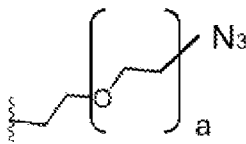
10

【0451】

24. 前駆体  $L_{S1}$  の構造が、以下の式 (XVII) のアジド：

【0452】

【化 9 2】



(XVII)

20

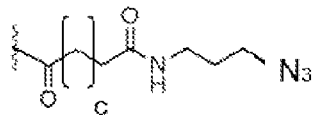
【0453】

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

前駆体  $L_{S1}$  の構造が、以下の式 (XVIII) のアジド：

【0454】

【化 9 3】



(XVIII)

30

【0455】

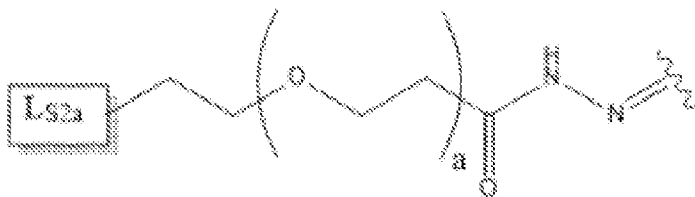
(式中、 $c$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 5～15 の範囲の整数を表し、より好ましくは 9 を表す) である、実施形態 21～23 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0456】

25. 前駆体  $L_{S2}$  の構造が、以下の式 (XIX) のヒドラゾン：

【0457】

【化 9 4】



(XIX)

40

【0458】

50

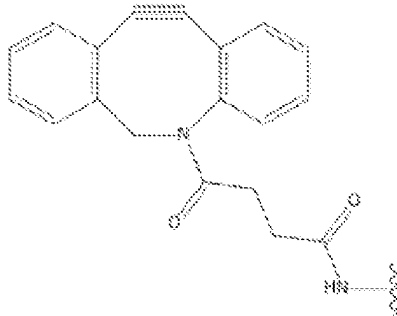
(式中、 $a$  は 0 以上の整数を表し、好ましくは 2 ～ 6 の範囲の整数を表し、より好ましくは 4 を表し、 $L_{S2a}$  はアルキン含有部分を表す) を含む、実施形態 21 ～ 24 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0459】

26.  $L_{S2a}$  が、20 個未満の炭素原子を含み、好ましくは、 $L_{S2a}$  が、式 (XX) :

【0460】

【化95】



(XX)

10

【0461】

による部分を表す、実施形態 25 に記載のサポニンコンジュゲート。

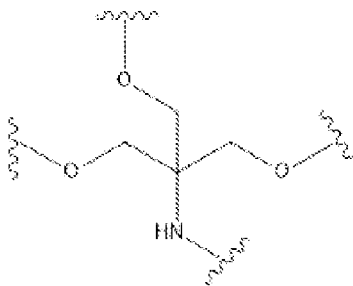
20

【0462】

27. 架橋部分が、式 (XV) の化合物 :

【0463】

【化96】



(XV)

30

【0464】

(式中、式 (XV) の化合物の酸素原子は、 $GalNAc$  又は  $GalNAc$  リンカー  $L_{GAL}$  に結合され、式 (XV) の化合物の窒素原子は、サポニン部分リンカー  $L_S$  に結合されている) の化合物である、実施形態 18 ～ 26 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

40

【0465】

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

【0466】

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

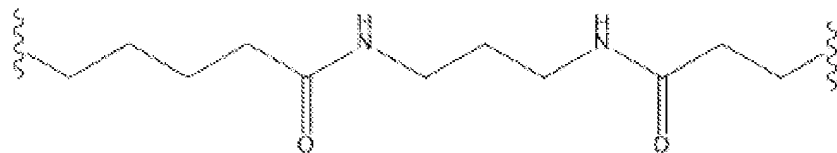
【0467】

30.  $L_{GAL}$  が、式 (XVI) :

【0468】

50

【化 9 7】



(XVI)

【 0 4 6 9】

10

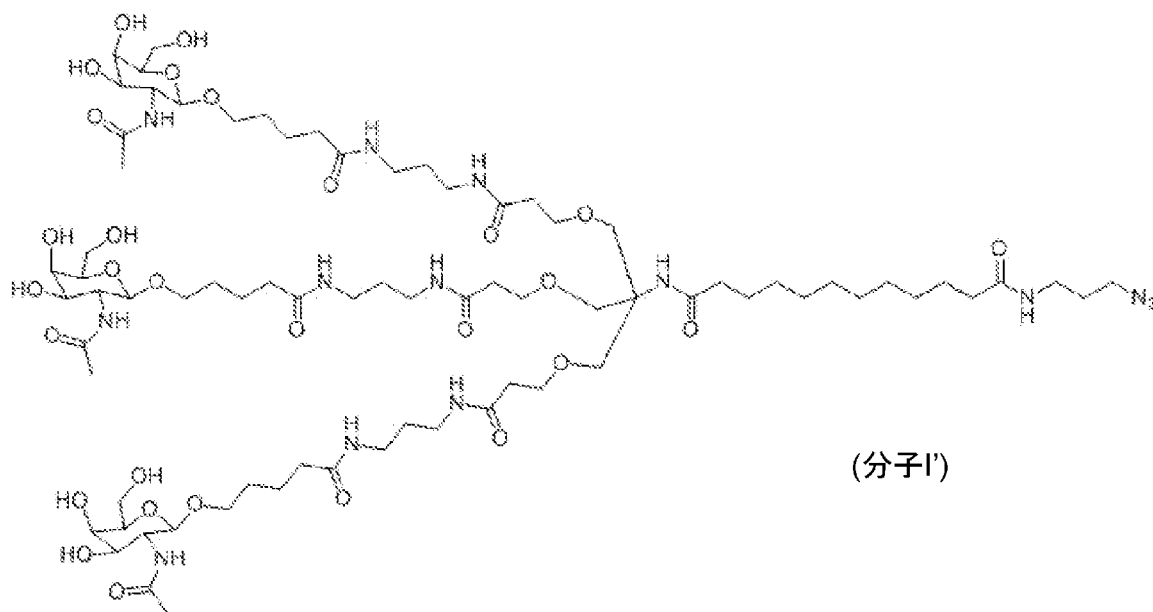
による化合物である、実施形態 19～29 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【 0 4 7 0】

31. ASGPR のリガンドが、分子 I' :

【 0 4 7 1】

【化 9 8】



(分子I')

20

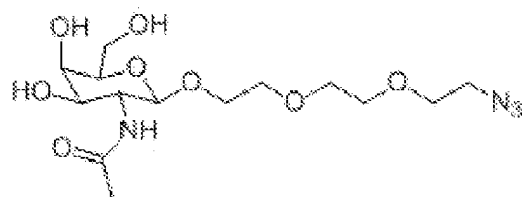
30

【 0 4 7 2】

によって表される (GalNAc) 3 トリスであるか、又は ASGPR のリガンドが、分子 II' :

【 0 4 7 3】

【化 9 9】



10  
(分子II')

40

【 0 4 7 4】

によって表されるモノ-GalNAc である、実施形態 17～30 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

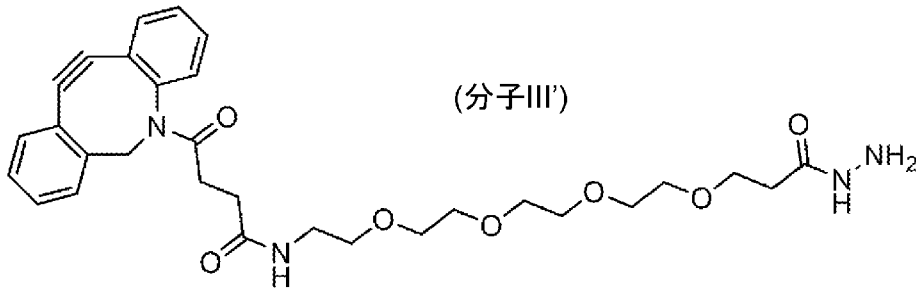
【 0 4 7 5】

50

32. 少なくとも1つのサポニンが、分子III' :

【0476】

【化100】



10

【0477】

(式中、分子III' のヒドラジド部分は、サポニンのアルデヒド基と共有ヒドラゾン結合を形成し、ジベンゾシクロオクチン基は、分子I' 又は分子II' のアジド基と共有結合を形成する) によって表されるリンカーを介して実施形態31の分子I' 又は分子II' に共有結合する、実施形態1～31のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0478】

33. 少なくとも1つのサポニンが、少なくとも1つの切断可能リンカーを介してASGPRのリガンドに共有結合されている、実施形態1～32のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

20

【0479】

34. 切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び／又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／又はタンパク質分解、例えば、カテプシンBによるタンパク質分解を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む、実施形態33に記載のサポニンコンジュゲート。

【0480】

35. 切断可能リンカーが、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくは切断可能リンカーが、pH4.0～6.5、より好ましくはpH≤5.5でインビボ切断を受ける、実施形態33又は34に記載のサポニンコンジュゲート。

30

【0481】

36. コンジュゲートが、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128若しくは1～100のサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば7、9、12などのサポニン部分を含む、実施形態1～35のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲート。

【0482】

37. 医薬配合物であって、以下：

40

－ 実施形態1～36のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、第1の医薬組成物と；

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

50

第2の医薬組成物と、  
を含む、医薬配合物。

【0483】

38. 医薬組成物であって、以下：

- － 実施形態1～36のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲートと；
- － エフェクター分子とASGPRのリガンドとの第2のコンジュゲートであって、ASGPRのリガンドが、好ましくは少なくとも1つのGalNAc部分、好ましくは3つ若しくは4つのGalNAc部分を含み、より好ましくはASGPRのリガンドが、(GalNAc)<sub>3</sub>トリスを含むか若しくはそれからなる第2のコンジュゲートか、又はエフェクター分子と細胞表面分子の結合部位を含む結合分子との第3のコンジュゲートを含み、任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は薬学的に許容される希釈剤を含む、第2のコンジュゲートと、

を含む、医薬組成物。

10

【0484】

39. エフェクター分子が、薬物分子などの小分子、タンパク毒素などの毒素、AONといった、BNA、異種核酸若しくはsiRNAなどのオリゴヌクレオチド、酵素、ペプチド、タンパク質、又はそれらの任意の組合せの少なくとも1つを含むか又はそれからなり、好ましくはエフェクター分子が、毒素、酵素又はオリゴヌクレオチドである、実施形態37に記載の医薬配合物又は実施形態38に記載の医薬組成物。

20

【0485】

40. ASGPRのリガンドが、(GalNAc)<sub>3</sub>トリスを含むか若しくは(GalNAc)<sub>3</sub>トリスであり、及び／又は、ASGPRのリガンド及びエフェクター分子が、共有結合によって、好ましくは少なくとも1つのリンカーを介してコンジュゲートされている、実施形態37若しくは39に記載の医薬配合物又は実施形態38若しくは39に記載の医薬組成物。

【0486】

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

30

【0487】

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

40

【0488】

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

50

に／又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、実施形態37若しくは39～42のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態38～42のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0489】

44. エフェクター分子が、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT及びLDHのいずれか1つの発現に関与するmRNAを標的とすることができるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA (onco-miR) の阻害若しくはonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである、実施形態37若しくは39～43のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態38～43のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0490】

45. エフェクター分子が、毒素であるか又は毒素を含み、この毒素は、ペプチド、タンパク質、ウレアーゼ及びCreーリコンビナーゼなどの酵素、タンパク性毒素、リボソーム不活性化タンパク質、並びに／又は、細菌毒素、より好ましくはアポプチンなどのウイルス毒素のいずれか1つ以上から選択される植物毒素；志賀毒素、志賀様毒素、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 外毒素 (PE) 若しくはPEの外毒素Aなどの細菌毒素、完全長若しくはトランケートされたジフテリア毒素 (DT)、コレラ毒素；αサルシンなどの真菌毒素；リボソーム不活性化タンパク質を含む植物毒素及び2型リボソーム不活性化タンパク質のA鎖、例えば、ダイアンシン (例えば、ダイアンシン-30若しくはダイアンシン-32)、サポリン (例えば、サポリン-S3若しくはサポリン-S6)、ブーガニン若しくはブーガニンの脱免疫化誘導体であるデブーガニング、志賀様毒素A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、リシン、リシンA鎖、モデシン、モデシンA鎖、アブリン、アブリンA鎖、ボルケンシン、ボルケンシンA鎖、ビスキュミン、ビスキュミンA鎖；又はカエルRNAseなどの動物若しくはヒト毒素、又はヒト由来のグランザイムB若しくはアンジオゲニン、又はこれらの任意のフラグメント若しくは誘導体のいずれか1つ以上から選択される少なくとも1つの分子を含むか又はそれからなり；好ましくは、タンパク毒素は、ダイアンシン及び／若しくはサポリンであり、並びに／又は毒素標的化リボソーム、毒素標的化延長因子、毒素標的化チューブリン、毒素標的化DNA及び毒素標的化RNAの少なくとも1つ、より好ましくは、エムタンシン、パストクス、マイタンシノイド誘導体DM1、マイタンシノイド誘導体DM4、モノメチルアウリスチンE (MMAE、ベドチン)、モノメチルアウリスチンF (MMAF、マホドチン)、カリケアマイシン、N-アセチル-γ-カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 二量体、ベンゾジアゼピン、CC-1065類似体、デュオカルマイシン、ドキシソルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、ドセタキセル、5-フルオロウラシル (5-FU)、ミトキサントロン、ツブリシン、インドリノベンゾジアゼピン、AZ13599185、クリプトフィシン、リゾキシシン、メトトレキセート、アントラサイクリン、カンプトセシン類似体、SN-38、DX-8951f、メシル酸エキサテカン、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) 外毒素 (PE38) のトランケート形態、デュオカルマイシン誘導体、アマニチン、α-アマニチン、スプライソスタチン、タイランスタチン、オゾガマイシン、テシリン、アンバースタチン269及びソラブタンシン、若しくはこれらの誘導体のいずれか1つ以上を含むか若しくはそれからなる、実施形態37若しくは39～44のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態38～44のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0491】

46. 第3のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、細胞表面分子のリガンドであるか、又は細胞表面分子の結合部位若しくは結合部位を含む少なくとも1つのドメイン若しくはこれらのフラグメントを含む抗体である、実施

形態 37 若しくは 39～45 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～45 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0492】

47. 第3のコンジュゲートが、以下：抗体-毒素コンジュゲート、受容体-リガンド-毒素コンジュゲート、抗体-薬物コンジュゲート、受容体-リガンド-薬物コンジュゲート、抗体-核酸コンジュゲート又は受容体-リガンド-核酸コンジュゲートのうちいずれか1つ以上である、実施形態 37 若しくは 39～46 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～46 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0493】

48. 第3のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、以下の細胞表面分子：CD71、CD63、CA125、EpCAM(17-1A)、CD52、CEA、CD44v6、FAP、EGF-IR、インテグリン、シンデカン-1、血管インテグリン $\alpha$ V $\beta$ 3、HER2、EGFR、CD20、CD22、葉酸受容体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L受容体、PSMA、CanAg、インテグリン $\alpha$ V、CA6、CD33、メソセリン、Crypto、CD3、CD30、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、エフリンA4、MUC1、Trop2、CEACAM5、CEACAM6、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD38、FGFR3、CD7、PD-L1、CTLA4、CD52、PDGFRA、VEGFR1、VEGFR2、アジアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)のうちいずれか1つ、好ましくは、HER2、CD71、ASGPR、及びEGFRのうちいずれか1つ、より好ましくはCD71に結合することができる、実施形態 37 若しくは 39～47 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～47 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0494】

49. 第3のコンジュゲートによって構成される、細胞表面分子の結合部位を含む結合分子が、以下：抗体、好ましくはヒトモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、IgG、単ドメイン抗体、少なくとも1つのV<sub>H</sub>Hドメインを含むか又はそれからなる分子、好ましくはラクダ科V<sub>H</sub>、可変重鎖新規抗原受容体(V<sub>NAR</sub>)ドメイン、Fab、scFv、Fv、dAb、F(ab)<sub>2</sub>及びFcabフラグメントのうちいずれか1つであるか、又はそれらを含む、実施形態 37 若しくは 39～48 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～48 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0495】

50. 医薬品としての使用のための、実施形態 37、39～49 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～49 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0496】

51. 発現産物が、apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT及びLDHのいずれか1つ以上に関連する疾患又は健康問題の治療又は予防の使用のためのものである、実施形態 37、39～49 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～49 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【0497】

52. 癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、又は自己免疫疾患の治療又は予防に使用するための、実施形態 37、39～49 のいずれか一項に記載の医薬配合物又は実施形態 38～49 のいずれか一項に記載の医薬組成物、又は実施形態 51に記載の使用のための医薬配合物若しくは医薬組成物。

【0498】

53. サポニンが、サポニン誘導体、好ましくは実施形態 4～15 のいずれか一項に記載のQS-21誘導体又はSO1861誘導体である、実施形態 51 若しくは 52 に記載の

10

20

30

40

50

使用のための医薬配合物又は実施形態 5 1 若しくは 5 2 に記載の使用のための医薬組成物。

【0499】

5 4. 実施形態 3 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲートを細胞外から細胞内に移行させ、好ましくは、その後に実施形態 3 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲートによって構成されるエフェクター分子を細胞のサイトゾルに移行させるためのインビトロ又はエクスビボ方法であって、以下の工程：

a) A S G P R をその表面に発現する細胞であり、第 3 のコンジュゲートを細胞に移行させるときに、第 3 のコンジュゲートが細胞表面分子に結合するための結合分子を含む、細胞表面分子を発現する細胞をもたらし工程であって、細胞が好ましくは肝臓細胞、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞から選択される、もたらし工程；

b) 工程 a) で提供された細胞に移行させるための、実施形態 3 7 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲートを提供する工程；

c) 実施形態 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のサポニンコンジュゲートを提供する工程；

d) 工程 a) の細胞を、工程 b) の第 2 のコンジュゲート又は第 3 のコンジュゲート、及び工程 c) のサポニンコンジュゲートとインビトロ又はエクスビボで接触させる工程であって、それによって細胞外から細胞への第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせ、好ましくは、それによってその後細胞のサイトゾルへの第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートの移行を生じさせるか、又は、好ましくは、それによってその後第 2 のコンジュゲート若しくは第 3 のコンジュゲートによって構成される少なくともエフェクター分子の細胞のサイトゾルへの移行を生じさせる、接触させる工程、

を含む、インビトロ又はエクスビボ方法。

【0500】

実施形態

I. アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) のリガンドに共有結合された少なくとも 1 つのサポニンを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、A S G P R のリガンドが、少なくとも 1 つの N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分、好ましくは 3 つ又は 4 つの G a l N A c 部分、より好ましくは A S G P R のリガンドが (G a l N A c) <sub>3</sub> トリスを含むか又はそれからなり、且つ少なくとも 1 つのサポニンが、モノデスモシドトリテルペノイドサポニン及びビデスモシドトリテルペノイドサポニンから選択される、オリゴヌクレオチドと更に共有結合する、オリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0501】

II. サポニンが、1 2, 1 3 - デヒドロオレアナン型の五環性トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の C - 2 3 位にアルデヒド官能基を有する、実施形態 I に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0502】

III. サポニンが、1 2, 1 3 - デヒドロオレアナン型のモノデスモシド又はビデスモシドの五環性トリテルペンサポニンであり、好ましくは、サポニンのアグリコンコア構造の C - 2 3 位にアルデヒド官能基を有する、実施形態 I 又は II に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0503】

IV. サポニンが、以下：

2 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

1 6 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

ヘデラゲニン (2 3 - ヒドロキシオレアノール酸) ；

1 6 アルファ, 2 3 - ジヒドロキシオレアノール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

10

20

30

40

50

プロトエシゲニン 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  
 アート) ;  
 23-オキソ-バリングトゲノール C-21 (2-メチルブタ-2-エノアート) - 1  
 6, 22-ジアセテート ;  
 ジギトゲニン ;  
 3, 16, 28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン ;  
 ギブソゲン酸、  
 及び

これらの誘導体

から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

好ましくは、サポニンが、キラ酸及びギブソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるア  
 グリコンコア構造を含み、より好ましくは、サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又は  
 その誘導体である、実施形態 I ~ III のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコン  
 ジュゲート。

【0504】

V.

・サポニンが、群 A :

GlcA-、  
 Glc-、  
 Gal-、  
 Rha- (1→2) - Ara-、  
 Gal- (1→2) - [Xyl- (1→3)] - GlcA-、  
 Glc- (1→2) - [Glc- (1→4)] - GlcA-、  
 Glc- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-、  
 Xyl- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-、  
 Glc- (1→3) - Gal- (1→2) - [Xyl- (1→3)] - Glc- (1→4  
 ) - Gal-、  
 Rha- (1→2) - Gal- (1→3) - [Glc- (1→2)] - GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Rha- (1→2) - Glc- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Fuc- (1→2) - Glc- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Rha- (1→2) - Gal- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Fuc- (1→2) - Gal- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Rha- (1→2) - Glc- (1→2) - Fuc- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Fuc- (1→2) - Glc- (1→2) - Fuc- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Rha- (1→2) - Gal- (1→2) - Fuc- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Ara- (1→4) - Fuc- (1→2) - Gal- (1→2) - Fuc- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - Glc- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Xyl- (1→4) - Fuc- (1→2) - Glc- (1→2) - Rha- (1→2) -  
 GlcA-、  
 Xyl- (1→4) - Rha- (1→2) - Gal- (1→2) - Rha- (1→2) -

G l c A -、  
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - R h a - (1 → 2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G l c - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) -  
 G l c A -、  
 X y l - (1 → 4) - F u c - (1 → 2) - G a l - (1 → 2) - F u c - (1 → 2) - 10  
 G l c A -、及び

これらの誘導体

から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・サポニンが、群 B：

G l c -、  
 G a l -、  
 R h a - (1 → 2) - [ X y l - (1 → 4) ] - R h a -、  
 R h a - (1 → 2) - [ A r a - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) ] - R h a -、  
 A r a -、 20  
 X y l -、  
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R 1 - (→ 4) ] - F u c - (ここで、R  
 1 は 4 E - メトキシケイ皮酸である)、  
 X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R 2 - (→ 4) ] - F u c - (ここで、R  
 2 は 4 Z - メトキシケイ皮酸である)、  
 X y l - (1 → 4) - [ G a l - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u  
 c -、  
 X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - 3, 4 - ジ - O A  
 c - F u c -、  
 X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R 3 - (→ 4) 30  
 ] - 3 - O A c - F u c - (ここで、R 3 は 4 E - メトキシケイ皮酸である)、  
 G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2  
 ) - 4 - O A c - F u c -、  
 G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - 4 - O A c - F u c -  
 、  
 ( A r a - 又は X y l - ) (1 → 3) - ( A r a - 又は X y l - ) (1 → 4) - ( R h a  
 - 又は F u c - ) (1 → 2) - [ 4 - O A c - ( R h a - 又は F u c - ) (1 → 4) ] -  
 ( R h a - 又は F u c - )、  
 X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ Q u i - (1 → 4) 40  
 ] - F u c -、  
 A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2  
 ) - F u c -、  
 X y l - (1 → 4) - [ G a l - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - F u c -、  
 X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - F u c -、  
 A r a / X y l - (1 → 4) - R h a / F u c - (1 → 4) - [ G l c / G a l - (1 →  
 2) ] - F u c -、  
 A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2  
 ) - [ R 4 - (→ 4) ] - F u c - (ここで、R 4 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i  
 - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - メ  
 チル - オクタン酸である) )、 50

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R 5 - ( → 4 ) ] - F u c - (ここで、R 5 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R h a - (1 → 3) ] - 4 - O A c - F u c - 、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R h a - (1 → 3) ] - 4 - O A c - F u c - 、

6 - O A c - G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ 3 - O A c - R h a - (1 → 3) ] - F u c - 、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ 3 - O A c - R h a - (1 → 3) ] - F u c - 、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ Q u i - (1 → 4) ] - F u c - 、

G l c - (1 → 3) - [ X y l - (1 → 4) ] - R h a - (1 → 2) - [ Q u i - (1 → 4) ] - F u c - 、

G l c - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ X y l - (1 → 3) - 4 - O A c - Q u i - (1 → 4) ] - F u c - 、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ 3 , 4 - ジ - O A c - Q u i - (1 → 4) ] - F u c - 、

G l c - (1 → 3) - [ X y l - (1 → 4) ] - R h a - (1 → 2) - F u c - 、

6 - O A c - G l c - (1 → 3) - [ X y l - (1 → 4) ] - R h a - (1 → 2) - F u c - 、

G l c - (1 → 3) - [ X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) ] - R h a - (1 → 2) - F u c - 、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ X y l - (1 → 3) - 4 - O A c - Q u i - (1 → 4) ] - F u c - 、

A p i / X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R h a - (1 → 3) ] - 4 O A c - F u c - 、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R h a - (1 → 3) ] - 4 O A c - F u c - 、

A p i / X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R 6 - ( → 4 ) ] - F u c - (ここで、R 6 は 5 - O - [ 5 - O - R h a - (1 → 2) - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、

A p i / X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R 7 - ( → 4 ) ] - F u c - (式中、R 7 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、

A p i / X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - [ G l c - (1 → 3) ] - R h a - (1 → 2) - [ R 8 - ( → 4 ) ] - F u c - (式中、R 8 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、

A p i - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R 9 - ( → 4 ) ] - F u c - (ここで、R 9 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、

X y l - (1 → 3) - X y l - (1 → 4) - R h a - (1 → 2) - [ R 10 - ( → 4 ) ] - F u c - (ここで、R 10 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ

10

20

30

40

50

る) )、

A p i - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 1 1 - ( → 3 ) ]  
- F u c - ( ここで、R 1 1 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
- 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ  
る ) )、

X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 1 2 - ( → 3 ) ]  
- F u c - ( ここで、R 1 2 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
- 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ  
る ) )

G l c - ( 1 → 3 ) - [ G l c - ( 1 → 6 ) ] - G a l -、及び

これらの誘導体

から選択される、アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・サポニンが、アグリコンコア構造に結合された群 A から選択される第 1 の糖鎖を含み  
、アグリコンコア構造に結合された群 B から選択される第 2 の糖鎖を含む、ビデスモシド  
トリテルペン配糖体である、

実施形態 I ~ I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 5 0 5 】

V I . サポニンが、キラヤ樹皮サポニン、ディブサコシド B、サイコサポニン A、サイコ  
サポニン D、マクラントイジン A、エスクレントシド ( e s c u l e n t o s i d e A  
)、フィトラッカゲニン、エシネート、A S 6 . 2、N P - 0 0 5 2 3 6、A M A - 1、  
A M R、α - ヘデリン、N P - 0 1 2 6 7 2、N P - 0 1 7 7 7 7、N P - 0 1 7 7 7 8  
、N P - 0 1 7 7 7 4、N P - 0 1 8 1 1 0、N P - 0 1 7 7 7 2、N P - 0 1 8 1 0 9  
、N P - 0 1 7 8 8 8、N P - 0 1 7 8 8 9、N P - 0 1 8 1 0 8、S A 1 6 4 1、A E  
X 5 5、N P - 0 1 7 6 7 4、N P - 0 1 7 8 1 0、A G 1、N P - 0 0 3 8 8 1、N P  
- 0 1 7 6 7 6、N P - 0 1 7 6 7 7、N P - 0 1 7 7 0 6、N P - 0 1 7 7 0 5、N P  
- 0 1 7 7 7 3、N P - 0 1 7 7 7 5、S A 1 6 5 7、A G 2、S O 1 8 6 1、G E 1 7  
4 1、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 8 3 2、S O  
1 8 6 2、S O 1 9 0 4、Q S - 7、Q S 1 8 6 1、Q S - 7 a p i、Q S 1 8 6 2、  
Q S - 1 7、Q S - 1 8、Q S - 2 1 A - a p i o、Q S - 2 1 A - x y l o、Q S  
- 2 1 B - a p i o、Q S - 2 1 B - x y l o、β - エスシン、エスシン I a、茶種  
子サポニン I、茶種子サポニン J、アッサムサポニン F、ジギトニン、プリムラ酸 1 及び  
A S 6 4 R、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組合せからなる群か  
ら選択され、好ましくはサポニンが、Q S - 2 1、Q S - 2 1 誘導体、S O 1 8 6 1、S  
O 1 8 6 1 誘導体、S A 1 6 4 1、S A 1 6 4 1 誘導体、G E 1 7 4 1、G E 1 7 4 1 誘  
導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンが、Q S - 2  
1 誘導体、S O 1 8 6 1 誘導体、S O 1 8 6 1、及びこれらの組合せからなる群から選択  
され、最も好ましくはサポニンが、S O 1 8 6 1 誘導体又は S O 1 8 6 1 である、実施形  
態 I ~ V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 5 0 6 】

V I I . サポニンが、サポニン誘導体であって、

i . サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造  
を含み；

i i . サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖  
を含み、糖鎖が、誘導体化されたカルボキシル基を含み；

i i i . サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態 V に記載の群 B から選択される糖  
鎖を含み、糖鎖が、誘導体化されたアセトキシ ( M e ( C O ) O - ) 基を含み；又は

i v . サポニン誘導体が、誘導体化 i .、誘導体化 i i . 及び誘導体化 i i i . の任意の  
組合せ、好ましくは誘導体化 i .、誘導体化 i i . 及び誘導体化 i i i . のうちの 2 つの  
誘導体化の任意の組合せを含む、

10

20

30

40

50

実施形態 V 又は V I に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0507】

V I I I . サポニンが、以下：S O 1 8 6 1、S A 1 6 5 7、G E 1 7 4 1、S A 1 6 4 1、Q S - 2 1、Q S - 2 1 A、Q S - 2 1 A - a p i、Q S - 2 1 A - x y l、Q S - 2 1 B、Q S - 2 1 B - a p i、Q S - 2 1 B - x y l、Q S - 7 - x y l、Q S - 7 - a p i、Q S - 1 7 - a p i、Q S - 1 7 - x y l、Q S 1 8 6 1、Q S 1 8 6 2、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM (S a p o n i n u m a l b u m)、Q S - 1 8、Q u i l - A、G y p 1、ジブソシド A、A G 1、A G 2、S O 1 5 4 2、S O 1 5 8 4、S O 1 6 5 8、S O 1 6 7 4、S O 1 8 3 2、S O 1 9 0 4、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくはサポニンが、Q S - 2 1、Q S - 2 1 誘導体、S O 1 8 6 1、S O 1 8 6 1 誘導体、S A 1 6 4 1、S A 1 6 4 1 誘導体、G E 1 7 4 1、G E 1 7 4 1 誘導体及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくはサポニンが、Q S - 2 1 誘導体、S O 1 8 6 1 誘導体、S O 1 8 6 1、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくはサポニンが、S O 1 8 6 1 誘導体又は S O 1 8 6 1 である、実施形態 I ~ V I I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

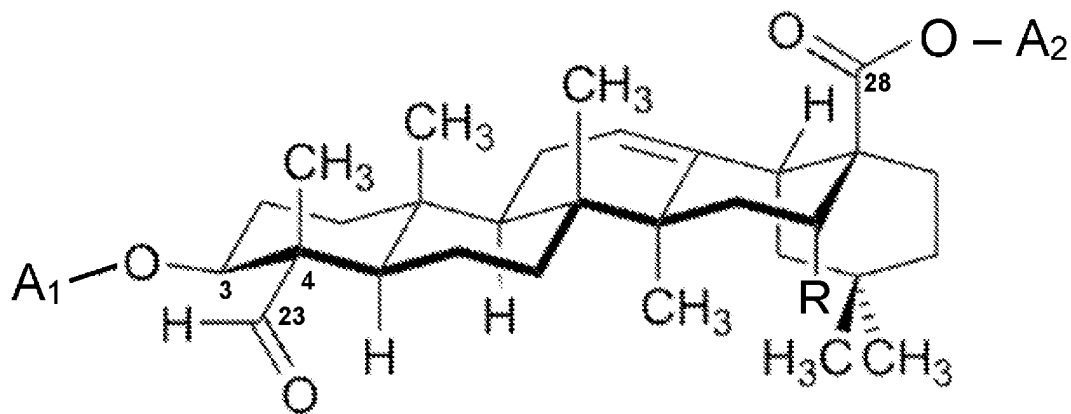
【0508】

I X . サポニンが、実施形態 I V に記載のキラ酸サポニン又はギブソゲニンサポニンのサポニン誘導体であり、分子 1：

【0509】

20

【化101】



30

(分子1)

【0510】

(式中、

A<sub>1</sub> が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは A<sub>1</sub> が実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、より好ましくは A<sub>1</sub> が実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、且つ A<sub>1</sub> がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；

40

A<sub>2</sub> が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくは A<sub>2</sub> が実施形態 V に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、より好ましくは A<sub>2</sub> が実施形態 V に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、且つ A<sub>2</sub> が少なくとも 1 つのアセトキシ (Me (CO) O -) 基、例えば 1、2、3、又は 4 つのアセトキシ基を含み、

式中、A<sub>1</sub> 及び A<sub>2</sub> の少なくとも 1 つが水素でなく、好ましくは A<sub>1</sub> 及び A<sub>2</sub> の両方がオリゴ糖鎖であり；

並びに、R がギブソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである) で表され；サポニン誘導体が、分子 1 で表されるサポニンに対応し、以下の誘導体化：

i . キラ酸又はギブソゲニンの C<sub>23</sub> 位のアルデヒド基が、誘導体化されており；

50

i i .  $A_1$  が実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、 $A_1$  がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、 $A_1$  のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されており；及び

i i i .  $A_2$  が実施形態 V に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、 $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含む場合、 $A_2$  の 1 つの糖部分又は 2 つ以上の糖部分のうち 1 つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている  
のうち少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ又は 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する、実施形態 I ~ V I I I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0511】

X .  $A_1$  が実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、且つグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、 $A_1$  のグルクロン酸部分のカルボキシル基が誘導体化されているか、及び／又は、 $A_2$  が実施形態 V に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、且つ  $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含み、 $A_2$  の少なくとも 1 つのアセトキシ基が誘導体化されている、実施形態 I X に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0512】

X I 分子 1 で表されるサポニンが、ビデスモシドリテルペンサポニンである、実施形態 I X 又は X に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0513】

X I I . サポニン誘導体が、分子 1 で表されるサポニンに対応し、以下の誘導体化：

i . キラ酸又はギブソゲニンの  $C_{23}$  位のアルデヒド基が、  
 - アルコールへの還元；  
 -  $N-\epsilon$ -マレイミドカブロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応による、ヒドラゾン結合への転換であって、それによって  $SO1861-ald-EMCH$  若しくは  $QS-21-ald-EMCH$  などのサポニン- $ald-EMCH$  がもたらされ、EMCH のマレイミド基が、任意選択によりメルカプトエタノールとチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；  
 -  $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPH のマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は  
 -  $N-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUH のマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

i i .  $A_1$  が実施形態 V に記載の群 A から選択される糖鎖を表し、 $A_1$  がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、 $A_1$  のグルクロン酸部分のカルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール (AMPD) 又は  $N-(2$ -アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによって  $QS-21-Glu-AMPD$  若しくは  $SO1861-Glu-AMPD$  などのサポニン- $Glu-AMPD$ 、又は  $QS-21-Glu-AEM$  若しくは  $SO1861-Glu-AEM$  などのサポニン- $Glu-AEM$  がもたらされ；

i i i .  $A_2$  が実施形態 V に記載の群 B から選択される糖鎖を表し、 $A_2$  が少なくとも 1 つのアセトキシ基を含む場合、 $A_2$  の 1 つの糖部分又は 2 つ以上の糖部分のうち 1 つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基 (HO-) への変換によって誘導体化されている

のうち少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ又は 2 つ、より好ましくは 1 つが存在する、実施形態 I X ~ X I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0514】

X I I I .  $A_1$  が、 $Gal-(1 \rightarrow 2)-[Xyl-(1 \rightarrow 3)]-GlcA$  であり、及

び／又は、 $A_2$ が、 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)-4-OAc-Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc$ であり、好ましくは分子1で表されるサポニンが、 $3-O-\beta-D-ガラクトピラノシル-(1\rightarrow2)-[\beta-D-キシロピラノシル-(1\rightarrow3)]-\beta-D-グルクロピラノシルキラ酸28-O-\beta-D-グルコピラノシル-(1\rightarrow3)-\beta-D-キシロピラノシル-(1\rightarrow4)-\alpha-L-ラムノピラノシル-(1\rightarrow2)-[\beta-D-キシロピラノシル-(1\rightarrow3)-4-OAc-\beta-D-キノボピラノシル-(1\rightarrow4)]-\beta-D-フコピラノシド$ であり、より好ましくはサポニンが、以下： $SO1861$ 、 $GE1741$ 、 $SA1641$ 及び $QS-21$ 、又はこれらの誘導体、最も好ましくは $SO1861$ 又はその誘導体のいずれか1つ以上である、実施形態IX～XIIのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【0515】

XIV. サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. サポニン誘導体が、以下：

－ アルコールへの還元；

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

20

－  $N-[\beta$ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド (BMPH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、BMPHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－  $N-[\kappa$ -マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド (KMUH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、KMUHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

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

30

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

iv. サポニン誘導体が、誘導体化i.、誘導体化ii. 及び誘導体化iii. の任意の組合せ、好ましくは誘導体化i.、誘導体化ii. 及び誘導体化iii. のうちの2つの誘導体化の任意の組合せを含み；

40

好ましくは、サポニン誘導体が、アグリコンコア構造を含み、アグリコンコア構造が、EMCHとの反応を介したヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、EMCHのマレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、

実施形態VII～XIIIのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0516】

XV. サポニンが、サポニン誘導体であって、

a) サポニン誘導体が、 $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応

50

によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによってSO1861-Al d-EMCH若しくはQS-21-Al d-EMCHなどのサポニン-Al d-EMCHがもたらされ；

b) サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態Vに記載の群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含み、それによってQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされるか；又は

c) サポニン誘導体が、誘導体化i. 及び誘導体化ii. の組合せを含む、実施形態XIVに記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【0517】

XVI. サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは実施形態Vに記載の群Aから選択される糖鎖を含み、糖鎖が、カルボキシル基、好ましくはN-(2-アミノエチル)マレイミド(AEM)との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む、実施形態XIVに記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

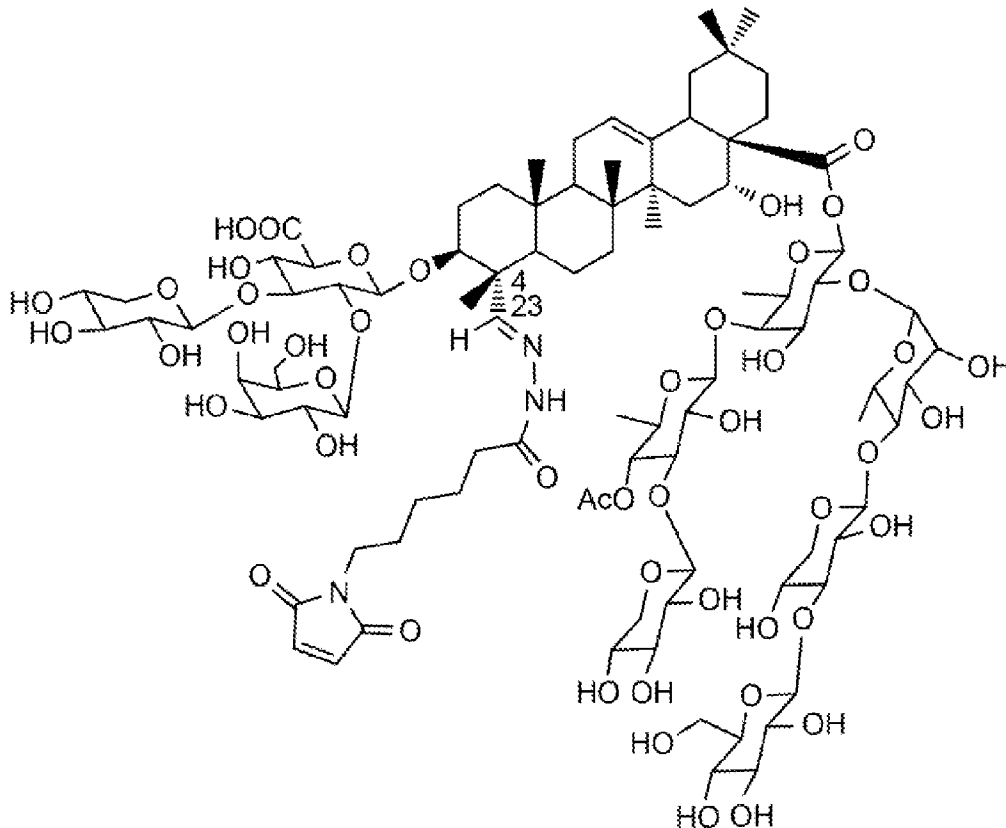
【0518】

XVII. サポニンが、分子2：

【0519】

【化102】

20



30

(分子2)

40

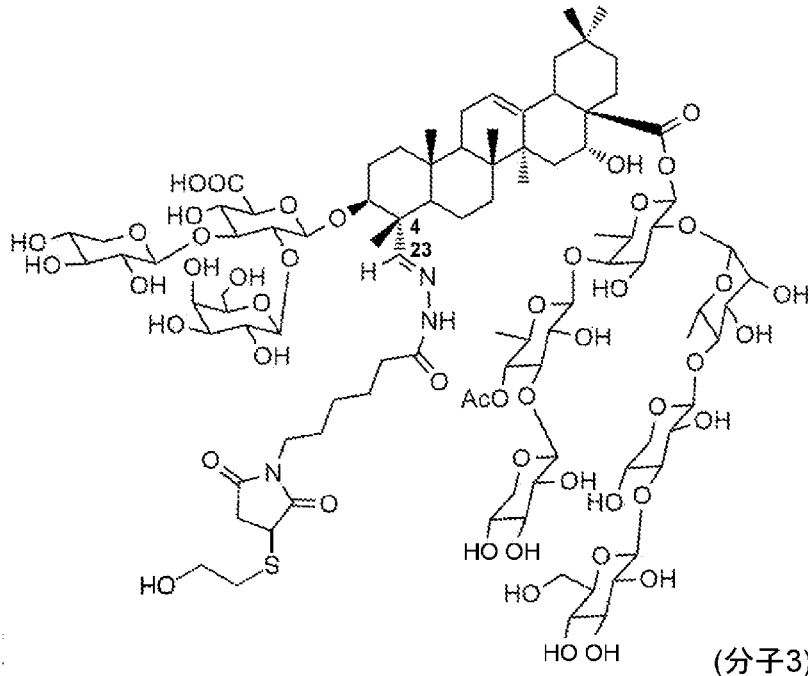
【0520】

によって表されるサポニン誘導体であるか、又は、サポニン誘導体が、分子3：

【0521】

50

【化 1 0 3】



10

20

【0 5 2 2】

によって表されるサポニン誘導体である、実施形態Ⅰ～ⅩⅤのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0 5 2 3】

ⅩⅤⅡⅡ．少なくとも1つのサポニン及びASGPRのリガンドが、直接若しくは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は少なくとも1つのサポニン及びオリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも1つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又はASGPRのリガンド及びオリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも1つのリンカー、好ましくは少なくとも1つのサポニンを介して共有結合しており、ASGPRのリガンド及びオリゴヌクレオチドが、少なくとも1つのリンカーを介して連結している、実施形態Ⅰ～ⅩⅤⅡⅡのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

【0 5 2 4】

ⅩⅨ．少なくとも1つのGalNAc部分、少なくとも1つのサポニン、及びオリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して共有結合しており、好ましくは、GalNAc部分、サポニン、及びオリゴヌクレオチドの各々が、三官能性リンカーの別個のアームに共有結合している、実施形態Ⅰ～ⅩⅤⅡⅡのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0 5 2 5】

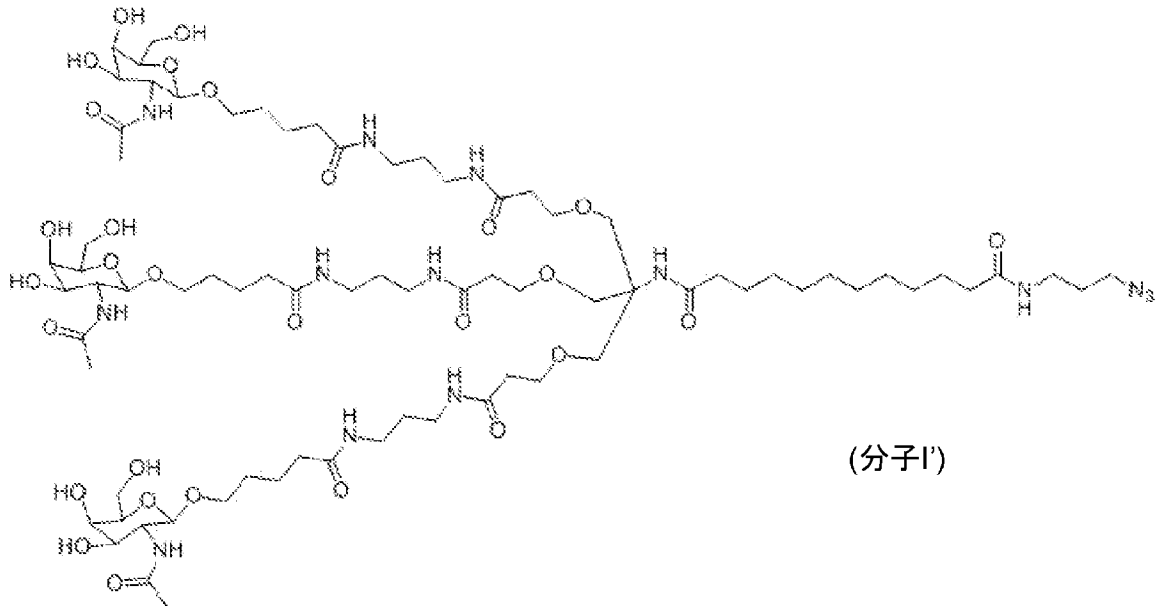
ⅩⅩ．ASGPRのリガンドが、分子Ⅰ'：

【0 5 2 6】

40

50

【化 1 0 4】



10

(分子I')

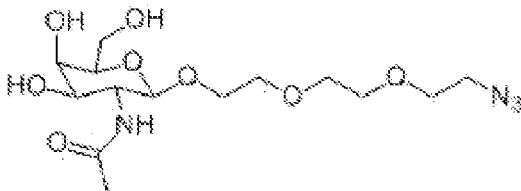
【 0 5 2 7】

20

によって表される (G a l N A c) 3 トリスであるか、又は A S G P R のリガンドが、分子 I I' :

【 0 5 2 8】

【化 1 0 5】



(分子II')

30

【 0 5 2 9】

によって表されるモノー G a l N A c である、実施形態 I ~ X I X のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 5 3 0】

X X I . 少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して A S G P R のリガンドに共有結合しており、及び / 又は少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介してオリゴヌクレオチドに共有結合している、実施形態 I ~ X X のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

【 0 5 3 1】

X X I I . 少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して三官能性リンカーのアームに共有結合されている、実施形態 X I X に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 5 3 2】

X X I I I . 切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び / 又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに / 又はタンパク質分解、例えば、カテプシン B によるタンパク質分解を受けやすい結合、並びに / 又はジスルフィド結合などの還元条

50

件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む、実施形態 X X I 又は X X I I に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0533】

X X I V . 切断可能リンカーが、例えば、哺乳動物細胞など、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくは切断可能リンカーが、pH 4.0～6.5、より好ましくは  $\text{pH} \leq 5.5$  でインビボ切断を受ける、実施形態 X X I ～X X I I I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0534】

X X V . オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128 若しくは 1～100 のサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば 7、9、12 などのサポニン部分を含む、実施形態 I ～X X I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【0535】

X X V I . オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1つのサポニン部分を含む、実施形態 I ～X X I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0536】

X X V I I . オリゴヌクレオチドが、BNA、異種核酸、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか1つである、実施形態 I ～X X V I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

【0537】

X X V I I I . オリゴヌクレオチドが、以下：低分子干渉RNA (s i R N A)、低分子ヘアピン型RNA (s h R N A)、アンチヘアピン型マイクロRNA (m i R N A)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (d s R N A)、アンチマイクロRNA (アンチm i R N A、アンチm i R)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (L N A)、架橋型核酸 (B N A)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (B N A<sup>N C</sup>)、BNAベースのs i R N A、及びBNAベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド (B N A-A O N) のうちいずれか1つ以上から選択される、実施形態 I ～X X V I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

【0538】

X X I X . オリゴヌクレオチドが、以下：アンチm i R N A、B N A-A O N 又はs i R N A、例えば、化学的に修飾されたs i R N A、代謝的に安定したs i R N A、及び化学的に修飾された、代謝的に安定したs i R N A から選択される、BNAベースのs i R N A などのうちいずれか1つ以上から選択される、実施形態 I ～X X V I のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0539】

X X X . オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B (a p o B)、H S P 27、トランスサイレチン (T T R)、プロタンパク質転換酵素であるサブチリシン／ケキシシン9型 (P C S K 9)、 $\delta$ -アミノレブリン酸シンターゼ1 (A L A S 1)、アンチトロンビン3 (A T 3)、グリコール酸オキシダーゼ (G O)、補体成分C5 (C C 5)、B型肝炎ウイルス (H B V) のX遺伝子、H B V のS遺伝子、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン (A A T) 及び乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば、哺乳類細胞の内部に存在する場合、異常なm i R N A を標的化することができるオリゴヌクレオチドである、実施形態 I ～X X I X のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

【0540】

X X X I . オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B (a p o B) 及

50

びHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである、実施形態I～XXIXのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0541】

XXXII. オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT及びLDHのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的とすることができるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA (onco-miR) の阻害若しくはonco-miRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである、実施形態I～XXXIのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【0542】

XXXIII. オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的とすることができるオリゴヌクレオチドである、実施形態I～XXXIのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

【0543】

XXXIV. オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB及びHSP27のいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、実施形態I～XXXIのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0544】

XXXV. 実施形態I～XXXIVのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物。

【0545】

XXXVI. 医薬品としての使用のための、実施形態XXXVに記載の医薬組成物。

30

【0546】

XXXVII. 発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、請求項XXXVに記載の医薬組成物。

40

【0547】

XXXVIII. 発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、実施形態XXXVに記載の医薬組成物。

【0548】

50

X X X I X . 発現産物が、以下の遺伝子：H S P 2 7 及び a p o B、好ましくは a p o B のいずれか 1 つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、並びに／又は以下の遺伝子：H S P 2 7 及び a p o B、好ましくは a p o B のいずれか 1 つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、実施形態 X X X V I 又は X X X V I I のいずれか一項に記載の医薬組成物。

#### 【0549】

X L . 癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病 A、血友病 B、A A T 関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、T T R 媒介性アミロイドーシス、遺伝性 T T R アミロイドーシス (h A T T R)、補体媒介性疾患、B 型肝炎感染症、C 型肝炎感染症、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の治療又は予防で使用するのための、実施形態 X X X V I ~ X X X I X のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

10

#### 【0550】

X L I . 子宮内膜癌、乳癌、肺癌、若しくは肝細胞癌などの癌、及び／又は高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの心血管疾患の治療又は予防で使用するのための、実施形態 X X X V I ~ X X X I X のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。

#### 【0551】

X L I I . 実施形態 I ~ X X X I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを細胞外から細胞内へと移行させ、好ましくは、その後に実施形態 I ~ X X X I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成されるオリゴヌクレオチドをサイトゾル及び／又は細胞の核へ移行させるためのインビトロ又はエクスピボ方法であって、以下の工程：

20

a) 好ましくはヒト細胞である、A S G P R、好ましくは A S G P R 1 をその表面に発現する細胞をもたらす工程であって、好ましくは、細胞が、肝臓細胞、ウイルス感染哺乳動物細胞、及び哺乳動物腫瘍細胞から選択され、好ましくは細胞が、ヒト細胞である、工程と、

b) 工程 a) でもたらされる細胞へと移行する実施形態 I ~ X X X I V のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程と、

30

c) 工程 a) の細胞を、インビトロ又はエクスピボで、好ましくは液体媒体中において、工程 b) のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させ、それによって、オリゴヌクレオチドコンジュゲートの細胞外から細胞内への移行を引き起こし、任意選択的に好ましくは、それによってその後、オリゴヌクレオチドコンジュゲートを構成するオリゴヌクレオチドの細胞のサイトゾル及び／又は核内への移行を引き起こす、工程と、を含む、インビトロ又はエクスピボ方法に関する。

#### 【0552】

本発明の態様は、以下の工程：

(a) 共有結合した第 1 のリンカーを含む少なくとも 1 つのサポニン部分をもたらす工程であって、第 1 のリンカーが、第 2 のリンカー上の第 2 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 7 の反応性基への共有結合のための少なくとも 1 つの第 1 の反応性基を含む、工程と、

40

(b) 共有結合した第 3 のリンカーを含むオリゴヌクレオチドをもたらす工程であって、第 3 のリンカーが、第 4 のリンカー上の第 4 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 8 の反応性基への共有結合のための第 3 の反応性基を含む、工程と、

(c) 共有結合した第 5 のリンカーを含む少なくとも 1 つの G a l N A c 部分をもたらす工程であって、第 5 のリンカーが、第 6 のリンカー上の第 6 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 9 の反応性基への共有結合のための第 5 の反応性基を含む、工程と、

(d 1) 第 1 の反応性基と第 2 の反応性基との間に共有結合を形成することにより第 1 のリンカーを第 2 のリンカーへと連結させ、第 3 の反応性基と第 4 の反応性基との間に共有

50

結合を形成することにより第3のリンカーを第4のリンカーへと連結させ、第5の反応性基と第6の反応性基との間に共有結合を形成することにより第5のリンカーを第6のリンカーへと連結させ、第2のリンカー、第4のリンカー、及び第6のリンカーを一緒に共有結合させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

又は

(d2) 第1の反応性基と第7の反応性基との間に共有結合を形成することにより第1のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、第3の反応性基と第8の反応性基との間に共有結合を形成することにより第3のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、第5の反応性基と第9の反応性基との間に共有結合を形成することにより第5のリンカーを第7のリンカーへと連結させ、それによって、オリゴヌクレオチドをもたらす工程、  
 のいずれかと、を含む、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法に関する。

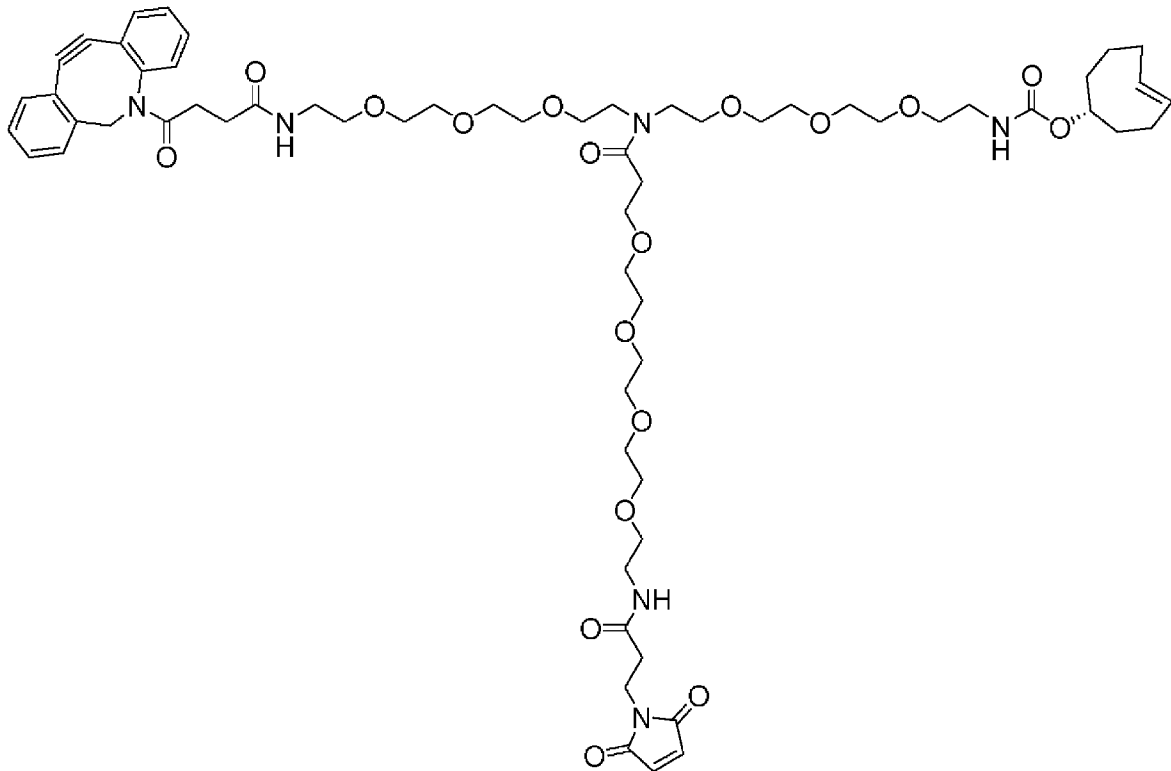
10

【0553】

一実施形態は、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法であって、ここで、第7のリンカーは、式(XXI)：

【0554】

【化106】



20

30

(XXI)

40

【0555】

によって表される三官能性リンカーなどの、三官能性リンカーである。

【0556】

少なくとも1つのサポニン部分が、1～16個のサポニン部分、好ましくは1～8個のサポニン部分、例えば1、4、又は8個のサポニン部分などである、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

【0557】

サポニンが、SO1861、SO1832、QS-21、又はこれらの任意の官能性誘

50

導体、好ましくはSO1861又はSO1832である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらすための方法が好ましい。

【0558】

サポニン部分又はサポニン部分が、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介して共有結合している、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

【0559】

少なくとも1つのGalNAc部分が、1～4個のGalNAc部分、好ましくは1個又は3個のGalNAc部分である、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす方法が好ましい。

【0560】

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

【実施例】

【0561】

実施例及び例示の実施形態

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

三価GalNAcは、肝細胞上のASGPR1受容体を認識し、結合する標的リガンドである。三価GalNAcを生成し(図1A～図1C及び図8A～図8G)、SO1861-EMCHを、DAR1で三価GalNAcとコンジュゲートした(不安定、未誘導体化SO1861について図2A～図2B及び図4に記載されるものと同様の様式でコンジュゲートするが、ここでSPT001はSO1861と同義である)(三価GalNAc-SO1861)。SO1861-EMCHはSO1861を指し、アルデヒド基がN-ε-マレイミドカブロン酸ヒドラジド(EMCH)と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってSO1861-Ald-EMCHがもたらされる。図1A～図1C及び図8A～図8Gに示すような「三価GalNAc」は、エフェクター分子又はサポニンに結合するのに好適な、典型的な(GalNAc)<sub>3</sub>トリスコンジュゲートである。対照として、SO1861-EMCHを、DAR1で一価GalNAc(図3)ともコンジュゲートした(不安定)(GalNAc-SO1861)。HepG2(ASGPR1<sup>+</sup>; CD71<sup>+</sup>、表A3)細胞及びHuh7(ASGPR1<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>、表A3)細胞を、10pMのCD71-サポリン(タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたCD71を標的化するモノクローナル抗体クローンOKT-9)の存在下及び不在下で、三価GalNAc-L-SO1861及びGalNAc-L-SO1861の濃度範囲で処置した。CD71-サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価GalNAc-L-SO1861(又は三価GalNAc)は有毒でなく、最大で15000nMであることが示されている(図9)。

【0562】

また、HepG2細胞及びHuh7細胞を、1000nM又は4000nMの三価GalNAc-SO1861の固定濃度と組み合わせて、CD71-サポリンの濃度範囲で処置した(DAR1)。ASGPR1/CD71発現細胞(HepG2及びHuh7)の、標的タンパク毒素によって媒介される細胞死滅を測定した。これにより、両細胞株で低濃度のCD71-サポリンにおいて強力な細胞死滅が明らかとなった(IC50=1pM)一方で、同等濃度のCD71-サポリン、CD71-サポリン+1000nMの三価GalNAc又はCD71-サポリン+4000nMの三価GalNAcは、両細胞株で高濃度のCD71-サポリンでしか細胞死滅を誘発することができなかった(IC50=100pM)(図10)。

【0563】

このことは全て、低濃度のCD71-サポリンと組み合わせた三価GalNAc-SO

10

20

30

40

50

1861が、ASGPR1／CD71発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。したがって、三価GalNAc-SO1861によって、ASGPR1発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

#### 【0564】

実施例1A．CD71-サポリン+三価GalNAc-L-SO1861、三価GalNAc-(L-SO1861)4、SO1861-EMCHの濃度系列

三価GalNAcを生成し(図1A~図1C及び図8A~図8C)、SO1861-EMCHを三価GalNAcとコンジュゲートし、DAR1で(三価GalNAc-SO1861;(GN)3-SPT)、又はSO1861-EMCHを最初にデンドロンに結合させることによってDARを4として(三価GalNAc-デンドロン(SO1861)4;(GN)3-dSPT4;図23D~図23E)コンジュゲートした(不安定、未誘導体化SO1861について図2A~図2B及び図4に記載されるものと同様の様式でコンジュゲートし、ここでSPT及びSPT001はサポニンSO1861と同義である)。この場合も、SO1861-EMCHはSO1861を指し、アルデヒド基がN-ε-マレイミドカブロン酸ヒドラジド(EMCH)と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってSO1861-Aldehyde-EMCHがもたらされる。図1A~図1C及び図8A~図8Gに示すような「三価GalNAc」は、エフェクター分子又はサポニンに結合するのに好適な、典型的な(GalNAc)<sub>3</sub>トリスコンジュゲートである。対照として、SO1861-EMCHを一価GalNAc(図3)ともコンジュゲートし(不安定)、DAR1で又はDAR4で(デンドロンを用いて)コンジュゲートした(GalNAc-SO1861及びGalNAc-(SO1861)<sub>4</sub>)。ASGPR1を高発現する初代肝細胞(ASGPR1<sup>high</sup>)を、10pMのCD71-サポリン(タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたCD71を標的化するモノクローナル抗体OKT-9)の存在下で、三価GalNAc-L-SO1861、SO1861-EMCH、又は(GN)<sub>3</sub>-dSPT4の濃度範囲で処置した。CD71-サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価GalNAc-L-SO1861は有毒でなく、最大で少なくとも1.000nMであることが示されている(図18A;相対細胞生存率)。抗CD71 MoAb-サポリン(「MoAb」=モノクローナル抗体)と、SO1861とコンジュゲートした三価GalNAc(DAR1又はDAR4のいずれか)との組合せで処置した細胞の細胞生存率は、SO1861-EMCH(SPT-EMCH)と組み合わせた抗CD71 MoAb-サポリン(CD71-SPRN)で処置した細胞の細胞生存率と比較すると約100倍低い(図18A)。

#### 【0565】

このことは全て、低濃度のCD71-サポリンと組み合わせた三価GalNAc-SO1861及び三価GalNAc-(SO1861)<sub>4</sub>が、ASGPR1／CD71発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。したがって、三価GalNAc-SO1861によって、ASGPR1発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。したがって、SPT001及びGalNAc標的化SPT001(DAR1)の両方で、業界標準のGalNAc標的化ASOであるSO1861-EMCHの効力を向上させ、肝臓細胞の細胞生存率を考慮すると約10倍、(GN)<sub>3</sub>-SPT及び(GN)<sub>3</sub>-dSPT4の両方では約100倍の向上となる。

#### 【0566】

実施例1B．ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価GalNAc+三価GalNAc-L-SO1861、又はコンジュゲートした三価GalNAc-(L-SO1861)-ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度系列(サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート;図22A~図22C)

三価GalNAcを生成し(図1A~図1C及び図8A~図8G)、SO1861-EMCHを三価GalNAcとDARを1としてコンジュゲートした(不安定、未誘導体化SO1861について図2A~図2B及び図4に記載されるものと同様の様式でコンジュゲートし、ここでSPT及びSPT001はサポニンSO1861と同義である)(三価

10

20

30

40

50

G a l N A c - S O 1 8 6 1 ; ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - S P T 0 0 1 ) ; 図 1 9 C ) 。この場合も、S O 1 8 6 1 - E M C H は S O 1 8 6 1 を指し、アルデヒド基が N - ε - マレイミドカブロン酸ヒドラジド ( E M C H ) と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによって S O 1 8 6 1 - A l d - E M C H がもたらされる。また、A p o B のアンチセンス B N A オリゴヌクレオチドである A p o B B N A ( 配列番号 2 ) と、4 つの共有結合された S O 1 8 6 1 - E M C H を含むデンドロンとの両方に結合された三価 G a l N A c の共有結合コンジュゲートも調製した ( 図 2 0 E ) 。コンジュゲートを調製するための概略についてはまた、本明細書の下記の「三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 及び G a l N A c - S O 1 8 6 1 合成 ( 図 2 A ~ 図 2 B 、 図 4 ) 」の項、「三価 G a l N A c - B N A オリゴ合成 ( 図 5 A ~ 図 5 B ; 図 6 A ~ 図 6 B 、 図 7 ) 」の項、並びに「三価 G a l N A c - S - A p o B ( 又は H S P 2 7 ) B N A オリゴ合成」及び「三価 G a l N A c - L - A p o B ( 又は H S P 2 7 ) B N A オリゴ合成」の項、並びに「デンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>4</sub> - 三価 G a l N A c 及びデンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>8</sub> - 三価 G a l N A c 合成」及び「デンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>4</sub> - 三価 G a l N A c 合成」及び「デンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>4</sub> - L - B N A オリゴ - 三価 G a l N A c 及びデンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>8</sub> - L - B N A オリゴ - 三価 G a l N A c 合成」の項、及び「デンドロン ( - L - S O 1 8 6 1 ) <sub>4</sub> - L - A p o B B N A オリゴ - 三価 G a l N A c 合成」の項も参照されたい。

10

【 0 5 6 7 】

A S G P R 1 を高発現する初代肝細胞 ( A S G P R 1 <sup>h i g h</sup> ) を、3 0 0 n M の三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 ( ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - S P T 0 0 1 ) の存在下又は不在下のいずれかで、三価 G a l N A c - A p o B B N A ( ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - A p o B ) の濃度範囲で処置した ( 図 1 8 B ) 。 ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - S P T 0 0 1 の不在下及び存在下における細胞処置を比較すると、三価 G a l N A c - L - S O 1 8 6 1 が、 ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - A p o B のみで処置された細胞における a p o B 遺伝子発現と比較して、初代肝細胞における a p o B 遺伝子発現を低下させるための A S O の効力を増大させることにおいて非常に効果的であることが示される ( 図 1 8 B ) 。

20

【 0 5 6 8 】

このことは全て、 ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - A p o B と組み合わせた三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 が、A S G P R 1 発現細胞の a p o B 遺伝子発現のサイレンシングを効果的に誘導することを示している。したがって、三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 によって、A S G P R 1 発現細胞の B N A のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。

30

【 0 5 6 9 】

加えて、初代肝細胞を、濃度系列のサポニン-オリゴヌクレオチド-A S G P R リガンドコンジュゲート、即ち、S O 1 8 6 1 ( D A R は 4 である ) 及び A p o B B N A ( 配列番号 2 ) ( ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - d S P T 4 - A p o B ; 図 2 4 D ) の両方とコンジュゲートした三価 G a l N A c と接触させ、a p o B 遺伝子発現を評価した ( 図 1 8 B 及び図 2 0 A ) 。 ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - d S P T 4 - A p o B の a p o B 遺伝子サイレンシング効力は、共有結合したサポニンを欠く ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - A p o B コンジュゲートと比較して約 1 0 0 倍高い。

40

【 0 5 7 0 】

実施例 1 C . S O 1 8 6 1 とコンジュゲートした三価 G a l N A c 、又は O K T - 9 抗 C D 7 1 モノクローナル抗体の固定用量の存在下における三価 G a l N A c - ( L - S O 1 8 6 1 ) のコンジュゲートの濃度系列

三価 G a l N A c を生成し ( 図 1 A ~ 図 1 B 及び図 8 A ~ 図 8 G ) 、S O 1 8 6 1 - E M C H を三価 G a l N A c と D A R を 1 としてコンジュゲートした ( 不安定、未誘導体化 S O 1 8 6 1 について図 2 A ~ 図 2 B 及び図 4 に記載されるものと同様の様式でコンジュゲートし、ここで S P T 及び S P T 0 0 1 はサポニン S O 1 8 6 1 と同義である ) ( 三価 G a l N A c - S O 1 8 6 1 ; ( G a l N A c ) <sub>3</sub> - S P T 0 0 1 ) ; 図 1 9 C ) 。この場合も、S O 1 8 6 1 - E M C H は S O 1 8 6 1 を指し、アルデヒド基が N - ε - マレイ

50

ミドカブロン酸ヒドラジド (EMCH) と反応することによってヒドラゾン結合に変換することで誘導体化され、それによってSO1861-ALD-EMCHがもたらされる。コンジュゲートを調製するための概略については、本明細書の下記の「三価GALNAc-SO1861及びGALNAc-SO1861の合成(図2A~図2B、図4)」の項も参照されたい。

#### 【0571】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞(ASGPR1<sup>high</sup>)及びHuh7の肝細胞株(ASGPR1<sup>+/+</sup>発現)を、10pMのCD71-サポリン(タンパク毒素サポリンにコンジュゲートされたCD71を標的化するモノクローナル抗体OKT-9;図19D)の存在下又は不在下のいずれかで、三価GALNAc-SO1861(三価GALNAc-SPT001)の濃度範囲で処置した。CD71-サポリンの不在下で細胞を処置すると、単一化合物としての三価GALNAc-SO1861は有毒でなく、最大で少なくとも1000nMであることが示されている(図19A、図19B;相対細胞生存率)。抗CD71 MoAb-サポリンと、SO1861とコンジュゲートした低nM用量の三価GALNAc(DAR1;三価GALNAc-SPT001)との組合せで処置した細胞の細胞生存率は、同じ用量の三価GALNAc-SPT001と組み合わせた同じ用量の抗CD71 MoAb-サポリン(CD71-サポリン)で処置したHuh7細胞の細胞生存率と比較すると、初代肝細胞を死滅させる効果が高い(図19A及び図19B)。

10

#### 【0572】

このことは全て、低濃度のCD71-サポリンと組み合わせた低用量の三価GALNAc-SO1861が、ASGPR1発現細胞の細胞死滅を効果的に誘導することを示している。したがって、三価GALNAc-SO1861によって、ASGPR1発現細胞のタンパク毒素のエンドソーム脱出が効果的に誘導される。したがって、低nMの三価GALNAc-SPT001は、初代肝細胞における低pMのADC抗CD71 MoAb-サポリンの細胞質送達を促進し、ASGPR1発現(Huh7)をしない肝細胞株は、低nM濃度の三価GALNAc-SPT001に応答しない。

20

#### 【0573】

実施例1D. ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした三価GALNAc+三価GALNAc-L-SO1861、又はコンジュゲートした三価GALNAc-(L-SO1861)-ApoBアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度系列(サポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート;図22A~図22C、三価GALNAc-ApoBBNA-SPT001)

30

三価GALNAcを生成し、実施例1Bに記載されるように、SO1861-EMCHをDAR1で三価GALNAcとコンジュゲートした(三価GALNAc-SO1861;(GALNAc)<sub>3</sub>-SPT001;図19C)。また、ApoBのアンチセンスBNAオリゴヌクレオチドであるApoBBNA(配列番号2)と、SO1861-EMCHとの両方に結合された三価GALNAcの共有結合コンジュゲートも調製した(図20D)。加えて、三価GALNAc及びApoBのアンチセンスBNAオリゴヌクレオチドであるApoBBNA(配列番号2)のコンジュゲートを調製した(図20C)。コンジュゲートを調製するための概略についてはまた、本明細書の下記の「三価GALNAc-SO1861及びGALNAc-SO1861合成(図2A~図2B、図4)」の項、「三価GALNAc-BNAオリゴ合成(図5A、図5B;図6A~図6B、図7)」の項、並びに「三価GALNAc-S-ApoB(又はHSP27)BNAオリゴ合成」及び「三価GALNAc-L-ApoB(又はHSP27)BNAオリゴ合成」の項、並びに「デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-三価GALNAc及びデンドロン(-L-SO1861)<sub>8</sub>-三価GALNAc合成」及び「デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-三価GALNAc合成」及び「デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-L-BNAオリゴ-三価GALNAc及びデンドロン(-L-SO1861)<sub>8</sub>-L-BNAオリゴ-三価GALNAc合成」の項、及び「デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-L-ApoB BN

40

50

Aオリゴ-三価GalNAc合成」の項も参照されたい（図19E；図20E；図23、図24）。

【0574】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1<sup>high</sup>）及びHuh7の肝細胞株（低ASGPR1発現）を、300nMの三価GalNAc-SO1861（三価GalNAc-SPT001）の存在下又は不在下のいずれかで、三価GalNAc-ApoBBNA（三価GalNAc-ApoBBNA）の濃度範囲で処置した（図20A及び図20B）。三価GalNAc-SPT001の不在下で細胞を処置すると、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAのみで処置した初代肝細胞のapoB mRNA発現と比較して、初代肝細胞のapoB mRNA発現の減少に高い効果（約100倍以上の効力）があることを示している（図20A）。Huh7細胞は非常に低レベルのASGPR1を発現するので、三価GalNAc-ApoBBNAも、三価GalNAc-ApoBBNAと三価GalNAc-SPT001との組合せのいずれもが、これらの肝細胞においてapoBのmRNA発現の低下を誘導しない。

10

【0575】

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

【0576】

加えて、初代肝細胞及び細胞株Huh7の肝細胞を、濃度系列のサポニン-オリゴヌクレオチド-ASGPRリガンドコンジュゲート、即ち、SO1861（4つのSO1861分子を有するデンドロンにおいて、DARが4である）及びApoBBNA（配列番号2）（（GalNAc）3-dSPT4-ApoB（図20E）、又は三価GalNAc-ApoBBNA-デンドロン（SO1861）<sub>4</sub>）と接触させ、apoB mRNA発現を評価した（図20A及び図20B）。（（GalNAc）3-dSPT4-ApoBのapoB mRNA発現サイレンシング効力は、共有結合したサポニンを欠く三価GalNAc-ApoBBNAコンジュゲートと比較して約100倍高い。

20

【0577】

ASGPR1を高発現する初代肝細胞（ASGPR1<sup>high</sup>）及びHuh7の肝細胞株（低ASGPR1発現）を、300nMの三価GalNAc-SO1861（三価GalNAc-SPT001）の存在下又は不在下のいずれかで、三価GalNAc-ApoBBNA（三価GalNAc-ApoBBNA）の濃度範囲で処置し（図21A及び図21B）、apoBタンパク質発現を評価し、比較した。三価GalNAc-SPT001の不在下で細胞を処置すると、三価GalNAc-SPT001が、三価GalNAc-ApoBBNAのみで処置した初代肝細胞のapoBタンパク質発現と比較して、初代肝細胞のapoBタンパク質発現の減少に高い効果（1000倍以上にわたる効力）があることを示している（図21A）。Huh7細胞は非常に低レベルのASGPR1を発現するので、三価GalNAc-ApoBBNAも、三価GalNAc-ApoBBNAと三価GalNAc-SPT001との組合せのいずれもが、これらの肝細胞においてapoBのタンパク質発現の著しい低下は誘導しなかった（図21B）。

30

【0578】

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

【0579】

したがって、低nMの三価GalNAc-ApoBBNA+三価GalNAc-SPT001は、初代肝細胞におけるapoB mRNAサイレンシングをもたらすApoBBNAのエンドソーム脱出及び細胞質送達を増強することができる。低nM（（GalNA

40

50

c) 3-d SPT 4-ApoBは、初代肝細胞におけるapoB mRNAサイレンシングをもたらすApoBBNAのエンドソーム脱出及び細胞質送達を増強することができる；ASGPR1発現が非常に低い肝細胞は両方の治療に対して応答性ではない；低nM三価GalNAc-ApoBBNA+三価GalNAc-SPT001は、初代肝細胞におけるapoBタンパク質崩壊をもたらすApoBBNAのエンドソーム脱出及び細胞質送達を増強することができる；低nM((GalNAc) 3-d SPT 4-ApoBは、初代肝細胞におけるapoBタンパク質崩壊をもたらすApoBBNAのエンドソーム脱出及び細胞質送達を増強することができる；apoB発現が考慮される場合、ASGPR1発現が非常に低い細胞は両方の治療に対して応答性ではない。

【0580】

実施例2 三価GalNAc-L/S-BNA+SO1861-EMCH

HSP27BNAを三価GalNAcにコンジュゲートし(図5A、図5B、図6、図7)、HepG2(ASGPR1<sup>+</sup>)細胞又はHuh7(ASGPR1<sup>+</sup>/-)を、4000nMのSO1861-EMCHの固定濃度と組み合わせて、三価GalNAc-L-HSP27BNA(不安定なコンジュゲーション、図5A~図5B、図6A~図6B)又は三価GalNAc-S-HSP27BNA(安定なコンジュゲーション、図7)の濃度範囲で処置した。HepG2及びHuh7細胞におけるHSP27の遺伝子サイレンシングを測定した。4000nMのSO1861-EMCHとの組合せにおいてのみ、HEPG2及びHuh7細胞の両方で低濃度の三価GalNAc-L-HSP27BNA(HepG2: IC50=0.1nM; Huh7: IC50=3nM)又は三価GalNAc-S-HSP27BNA(HepG2: IC50=0.1nM; Huh7: IC50=3nM)で効果的な遺伝子サイレンシングが観察された一方で、同等濃度の三価GalNAc-L-HSP27BNA(HepG2/Huh7: IC50>2000nM)又は三価GalNAc-S-HSP27BNA(HepG2/Huh7: IC50>2000nM)は、HepG2及びHuh7細胞株で遺伝子サイレンシング活性を示さなかった(図11)。

【0581】

次に、ApoBBNAを同様の様式(図5A~図5B、図6A~図6B、図7)で三価GalNAcにコンジュゲートし、HepG2(ASGPR1<sup>+</sup>)細胞又はHuh7(ASGPR1<sup>+</sup>/-)を、4000nMのSO1861-EMCHの固定濃度と組み合わせて、三価GalNAc-L-ApoBBNA(不安定なコンジュゲーション、図5A~図5B; 図6A~図6B、図12、図13)又は三価GalNAc-S-ApoBBNA(安定なコンジュゲーション、図7、図14、図15)、又は三価GalNAc-L-ApoBscrambledBNA若しくは三価GalNAc-S-ApoBscrambledBNA(この場合、スクランブルApoBBNAはapoBのmRNAに結合しない、オリゴヌクレオチド配列をスクランブルしたアンチセンス、つまり非特異的対照BNAである)の濃度範囲で処置した。HepG2(ASGPR1<sup>+</sup>)細胞又はHuh7(ASGPR1<sup>+</sup>/-)におけるApoBの遺伝子サイレンシングを測定した。4000nMのSO1861-EMCHとの組合せにおいてのみ、HepG2細胞で低濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA(IC50=10nM)又は三価GalNAc-S-ApoBBNA(IC50=10nM)で効果的な遺伝子サイレンシングが観察された一方で、同等濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA(IC50>2000nM)又は三価GalNAc-S-ApoBBNA(IC50>2000nM)は、HepG2細胞では遺伝子サイレンシング活性を示さなかった(図12、図14)。処置は細胞株の生存率に影響しなかった(図13、図15)。「L」は、「不安定」リンカーを指し、リンカーが細胞内、即ち、エンドソーム及びリソソーム内に存在するようなpHで切断されることを示す。対照的に、「S」は、「安定」リンカーを指し、リンカーが細胞内、即ち、エンドソーム及びリソソーム内に存在するようなpHでは切断されないことを示す。したがって、コンジュゲートを形成するか、又はコンジュゲートによって構成される任意の2つの分子間に不安定な結合を含むコンジュゲートは、不安定リンカー内の位置で切断され、それに

10

20

30

40

50

よって2つの連結又は結合された分子が分離する。一例としては、ヒト細胞などの哺乳動物細胞のエンドソーム及びリソソーム内で顕著な、酸性条件下におけるヒドラゾン結合の切断がある。

【0582】

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

10

【0583】

実施例3 三価GalNAc-L/S-BNA+三価GalNAc-L-SO1861  
SO1861-EMCH (SPTとも称される)を、DAR1 (三価GalNAc-SO1861)を用いて、三価GalNAc ((GalNAc)3又は(GN)3)にコンジュゲートした(未誘導体化SO1861について、図2A~図2B及び図4に記載されるのと同様の様式で不安定である)。HepG2 (ASGPR1<sup>+</sup>)細胞又はHuh7 (ASGPR1<sup>+</sup>/-)細胞を、4000nMの三価GalNAc-L-SO1861 (DAR1)の固定濃度と組み合わせ、三価GalNAc-L-ApoBBNA (不安定なコンジュゲーション、図16、図17)、三価GalNAc-S-ApoBBNA (安定なコンジュゲーション(図16、図17)、又はスクランブルした(Scr.)非特異対照のコンジュゲート(三価GalNAc-L-ApoBscrambledBNA又は三価GalNAc-S-ApoBscrambledBNA)の濃度範囲で処置した。HepG2 (ASGPR1<sup>+</sup>)細胞及びHuh7 (ASGPR1<sup>+</sup>/-)でのApoBの遺伝子サイレンシングを測定した。4000nMの三価GalNAc-L-SO1861との組合せにおいてのみ、低濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA (IC50=50nM)又は三価GalNAc-S-ApoBBNA (IC50=50nM)で効果的な遺伝子サイレンシングがHepG2細胞(ASGPR1<sup>+</sup>)において観察された。Huh7細胞(ASGPR1<sup>+</sup>/-)では、いずれの組合せの処置も効果に乏しい遺伝子サイレンシングが示された(三価GalNAc-L-ApoBBNA: IC50=700nM; 三価GalNAc-S-ApoBBNA: IC50=700nM)。同等濃度の三価GalNAc-L-ApoBBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM)又は三価GalNAc-S-ApoBBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM)は、HepG2及びHuh7細胞株で遺伝子サイレンシング活性を示さず、4000nMの三価GalNAc-L-SO1861も、スクランブル三価GalNAc-L-ApoBscrambledBNA+(HepG2/Huh7: IC50>1000nM)、又はスクランブル三価GalNAc-S-ApoBscrambledBNA (HepG2/Huh7: IC50>1000nM)の遺伝子サイレンシングを誘導/促進しなかった(図16、図17)。処置は細胞株の生存率に影響しなかった(図16C、図16D)。このことは全て、三価GalNAc-L-SO1861と組み合わせた、非常に低濃度の三価GalNAc-L-HSP27BNA又は三価GalNAc-S-HSP27BNAが、ASGPR1発現細胞の遺伝子サイレンシングを効果的に誘導し、またこの場合も、ASGPR1がより高発現した細胞でより強力な効果が見られることを示している。

20

30

40

【0584】

材料及び方法

略語

AEM N-(2-アミノエチル)マレイミドトリフルオロ酢酸塩

AMPD 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール

BOP (ベンゾトリアゾルー-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート

DIPEA N,N-ジイソプロピルエチルアミン

50

DMF N, N-ジメチルホルムアミド

EDCI・HCl 3-(エチルイミノ)メチレンアミノ)-N, N-ジメチルプロパン-1-アミニウムクロリド

EMCH・TFA N-(ε-マレイミドカプロン酸)ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩  
HATU 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3-トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート

min 分

NMM 4-メチルモルホリン

r. t. 保持時間

TCEP トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンハイドロクロライド

Temp 温度

TFA トリフルオロ酢酸

【0585】

分析方法

LC-MS方法1

装置: Waters IClass; Bin. ポンプ: UPIBSM、SM: SOを伴う  
UPISMFTN; UPCMA、PDA: UPPDATC、210~320nm、SQD  
: ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲:

1500~2400又は2000~3000の範囲内のneg又はneg/pos; ELSD: 気体圧力 40psi、ドリフトチューブ温度: 50℃; カラム: Acquity C18、50×2.1mm、1.7μm 温度: 60℃、流量: 0.6mL/分、lin  
生成物の極性に依存する勾配:

A t<sub>0</sub> = 2% A、t<sub>5.0分</sub> = 50% A、t<sub>6.0分</sub> = 98% A

B t<sub>0</sub> = 2% A、t<sub>5.0分</sub> = 98% A、t<sub>6.0分</sub> = 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)。

【0586】

LC-MS方法2

装置: Waters IClass; Bin. ポンプ: UPIBSM、SM: SOを伴う  
UPISMFTN; UPCMA、PDA: UPPDATC、210~320nm、SQD  
: ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲: pos/neg 10

0~800又はneg 2000~3000; ELSD: 気体圧力 40psi、ドリフトチューブ温度: 50℃; カラム: Waters XSelect (商標) CSH C18、50×2.1mm、2.5μm、温度: 25℃、流速: 0.5mL/分、勾配: t<sub>0分</sub> = 5% A、t<sub>2.0分</sub> = 98% A、t<sub>2.7分</sub> = 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)。

【0587】

LC-MS方法3

装置: Waters IClass; Bin. ポンプ: UPIBSM、SM: SOを伴う  
UPISMFTN; UPCMA、PDA: UPPDATC、210~320nm、SQD  
: ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲 pos/neg 1

05~800、500~1200又は1500~2500; ELSD: 気体圧力 40psi、ドリフトチューブ温度: 50℃; カラム: Waters XSelect (商標) CSH C18、50×2.1mm、2.5μm、温度: 40℃; 流量: 0.5mL/分、勾配: t<sub>0分</sub> = 5% A、t<sub>2.0分</sub> = 98% A、t<sub>2.7分</sub> = 98% A、ポストタイム: 0.3分、溶出液A: アセトニトリル中の0.1% ギ酸、溶出液B: 水中の0.1% ギ酸。

【0588】

LC-MS方法4

10

20

30

40

50

装置：Waters IClass; Bin. ポンプ：UPIBSM、SM：SOを伴う  
UPI SMFTN; UPCMA、PDA：UPPDATC、210~320 nm、SQD  
：ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg 10  
0~800又はneg 2000~3000; ELSD：気体圧力 40 psi、ドリフト  
チューブ温度：50℃カラム：Waters Acquity Shield RP18  
、50×2.1 mm、1.7 μm、温度：25℃、流量：0.5 mL/分、勾配：t<sub>0</sub>分  
= 5% A、t<sub>2.0</sub>分=98% A、t<sub>2.7</sub>分=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10 mM重炭酸アンモニウム (pH=9.  
5)。

【0589】

分取方法

分取MP-LC法1

機器タイプ：Reveleris (商標) 分取MPLC; カラム：Waters XSelect (商標) CSH C18 (145×25 mm、10 μm); 流量：40 mL/分  
; カラム温度：室温; 溶出液A：水中の10 mM炭酸水素アンモニウム pH=9.0; 溶  
出液B：水中の99% アセトニトリル+1% 10 mM 炭酸水素アンモニウム; 勾配：  
A t<sub>0</sub>分=5% B、t<sub>1</sub>分=5% B、t<sub>2</sub>分=10% B、t<sub>17</sub>分=50% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
A t<sub>0</sub>分=5% B、t<sub>1</sub>分=5% B、t<sub>2</sub>分=20% B、t<sub>17</sub>分=60% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
; 検出UV：210、235、254 nm及びELSD。

【0590】

分取MP-LC法2

機器タイプ：Reveleris (商標) 分取MPLC; カラム：Phenomenex  
LUNA C18 (3) (150×25 mm、10 μm); 流速：40 mL/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; 勾配：

A t<sub>0</sub>分=5% B、t<sub>1</sub>分=5% B、t<sub>2</sub>分=20% B、t<sub>17</sub>分=60% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
B t<sub>0</sub>分=2% B、t<sub>1</sub>分=2% B、t<sub>2</sub>分=2% B、t<sub>17</sub>分=30% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
C t<sub>0</sub>分=5% B、t<sub>1</sub>分=5% B、t<sub>2</sub>分=10% B、t<sub>17</sub>分=50% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
D t<sub>0</sub>分=5% B、t<sub>1</sub>分=5% B、t<sub>2</sub>分=5% B、t<sub>17</sub>分=40% B、t<sub>18</sub>  
分=100% B、t<sub>23</sub>分=100% B  
; 検出UV：210、235、254 nm及びELSD。

【0591】

分取LC-MS方法3

MS機器のタイプ：Agilent Technologies G6130B四重極;  
HPLC機器タイプ：Agilent Technologies 1290 分取LC  
; カラム：Waters XSelect (商標) CSH (C18、150×19 mm、  
10 μm); 流量：25 mL/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10 mM重炭酸アンモニウム pH=9.0; 勾配：

A t<sub>0</sub>=20% A、t<sub>2.5</sub>分=20% A、t<sub>11</sub>分=60% A、t<sub>13</sub>分=100%  
A、t<sub>17</sub>分=100% A  
B t<sub>0</sub>=5% A、t<sub>2.5</sub>分=5% A、t<sub>11</sub>分=40% A、t<sub>13</sub>分=100% A  
、t<sub>17</sub>分=100% A

; 検出：DAD (210 nm); 検出：MSD (ESI pos/neg) 質量範囲：1  
00~800; DADに基づく分画収集物。

【0592】

10

20

30

40

50

## 分取 LC-MS 方法 4

MS 機器のタイプ: Agilent Technologies G6130B 四重極;  
HPLC 機器タイプ: Agilent Technologies 1290 分取 LC;  
カラム: Waters XBridge Protein (C4、150×19mm、10 μm); 流量: 25 mL/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 10 mM 重炭酸アンモニウム pH=9.0; 勾配:

A t<sub>0</sub>=2% A、t<sub>2.5</sub>分=2% A、t<sub>11</sub>分=30% A、t<sub>13</sub>分=100% A、t<sub>17</sub>分=100% A

B t<sub>0</sub>=10% A、t<sub>2.5</sub>分=10% A、t<sub>11</sub>分=50% A、t<sub>13</sub>分=100% A、t<sub>17</sub>分=100% A

C t<sub>0</sub>=5% A、t<sub>2.5</sub>分=5% A、t<sub>11</sub>分=40% A、t<sub>13</sub>分=100% A、t<sub>17</sub>分=100% A

; 検出: DAD (210 nm); 検出: MSD (ESI pos/neg) 質量範囲: 100~800; DAD に基づく分画収集物

【0593】

## フラッシュクロマトグラフィ

Grace Reveleris X2 (登録商標) C-815 Flash; 溶媒送達系: 自動プライミングを有する 3 位置ポンプ、1 回の実行における最大 4 溶媒による 4 つの独立したチャネル、溶媒の枯渇時のラインの自動切り替え; 最大ポンプ流速 250 mL/分; 最大圧力 50 bar (725 psi); 検出: UV 200~400 nm、最大 4 UV シグナル及び全体 UV 範囲のスキンの組合せ、ELSD; カラムサイズ: 機器に対して 4~330 g、ルアータイプ、オプションのホルダーを伴って 750 g~3000 g。

【0594】

SO1861-EMCH の合成 (SO1861-EMCH は SO1861-Aldehyde-EMCH 及び SPT-EMCH とも称される)

SO1861 (121 mg、0.065 mmol) 及び EMCH・TFA (110 mg、0.325 mmol) に、メタノール (過剰乾燥、3.00 mL) 及び TFA (0.020 mL、0.260 mmol) を加えた。反応混合物を室温で攪拌した。1.5 時間後、反応混合物を分取 MP-LC にかけた。生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (120 mg、90%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 96% に基づく純度。

【0595】

## 三価 GalNAc-アジドの合成

中間体 1:

tert-ブチル 1-アジド-17, 17-ビス ((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-オエート

ジ-tert-ブチル 3, 3'-((2-アミノ-2-((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロピオネート (1.27 g、2.51 mmol) に、3-アジド(peg4)プロピオン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (977 mg、2.51 mmol) の DMF (10 mL) 溶液を添加した。次に、DIPEA (657 μL、3.77 mmol) を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル (100 mL) に溶解させた。得られた溶液を 0.5 N の硫酸水素カリウム溶液 (2×100 mL) 及びブライン (100 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させて濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィ (DCM-DCM 中 10% メタノール (v/v) 勾配を 100:0 から 0:100 に上昇) で精製し、表題化合物 (1.27 g、65%) を無色の油状物として得た。LC-MS に基づく純度 100% (ELSD)。

10

20

30

40

50

L R M S (m/z) : 780 [M+1]<sup>1+</sup>

L C - M S r. t. (分) : 2.10<sup>2</sup>

【0596】

中間体2:

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

tert-ブチル1-アジド-17, 17-ビス((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-オエート(1.27g、1.63mmol)のDCM(5.0mL)溶液に、TFA(5.0mL、65mmol)を添加した。反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、トルエン(3×10mL)及びDCM(3×10mL)で同時蒸発させて、粗製の表題生成物を無色の油状物として得た。

L R M S (m/z) : 611 [M+1]<sup>1+</sup>

【0597】

中間体3:

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

1-アジド-17, 17-ビス((2-カルボキシエトキシ)メチル)-15-オキソ-3, 6, 9, 12, 19-ペンタオキサ-16-アザドコサン-22-オイック酸(997mg、1.63mmol)、Oxyma Pure(1.04g、7.35mmol)及びEDCI・HCl(1.17g、6.12mmol)をDMF(10.0mL)に溶解させた。次に、DIPEA(1.99mL、11.4mmol)を添加した後、そのままN-BOC-1, 3-プロパンジアミン(1.07g、6.12mmol)のDMF(10.0mL)溶液に添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を酢酸エチル(100mL)に溶解させた。得られた溶液を0.5Nの硫酸水素カリウム溶液(100mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2×100mL)及びブライン(100mL)で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させて濾過し、真空で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィ(DCM-DCM中10%メタノール(v/v)勾配を0:100から100:0に上昇、生成物が溶出するまで100:0で維持)で精製し、表題化合物(1.16g、66%)を黄色がかった粘性油状物として得た。LC-MS 99%(ELSD)。

L R M S (m/z) : 1080 [M+1]<sup>1+</sup>

L C - M S r. t. (分) : 1.51<sup>3</sup>

【0598】

中間体4:

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

ジ-tert-ブチル(10-(1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド)-10-(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-1, 19-ジイル)ジカルバメート(1.16g、1.08mmol)のDCM(10mL)溶液に、TFA(10mL、131mmol)を添加した。反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、トルエン(3×10mL)及びDCM(3×10mL)で同時蒸発させて、粗製の表題生成物を黄色がかった粘性油状物として得た。

L R M S (m/z) : 260 [M+3]<sup>3+</sup>、390 [M+2]<sup>2+</sup>、780 [M+1]<sup>1+</sup>、

【0599】

中間体5：

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

5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル) テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル) オキシ) ペンタン酸 (「J. Am. Chem. Soc.」、2014年、第136巻第16958~16961頁に従って得られる、3.00g、6.70mmol) 及び N - ヒドロキシスクシンイミド (926mg、8.05mmol) を DCM (50mL) に溶解させた。次に、EDCI・HCl (1.54g、8.05mmol) 及び 4 - (ジメチルアミノ) ピリジン (82mg、0.67mmol) を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を DCM で希釈し、得られた溶液を 0.5N の硫酸水素カリウム溶液 (150mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (150mL) 及び ブライン (150mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させて濾過し、真空中で蒸発させて、表題化合物 (3.60g、99%) を白色の泡状物として得た。LC-MS に基づく純度 99% (ELSD)。

10

L R M S (m/z) : 545 [M+1]<sup>1+</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.07<sup>3</sup>

20

【0600】

中間体6：

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

30

3, 3' - ((2 - ((3 - ((3 - アミノプロピル) アミノ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) - 2 - (1 - アジド - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサペンタデカン - 15 - アミド) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ビス (N - (3 - アミノプロピル) プロパンアミド) トリス (2, 2, 2 - トリフルオロアセテート) (1.21g、1.08mmol) を、DMF (10mL) 及び DIPEA (1.69mL、9.70mmol) の混合物に溶解させた。次に、(2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 5 - アセトアミド - 2 - (アセトキシメチル) - 6 - ((5 - ((2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) オキシ) - 5 - オキソペンチル) オキシ) テトラヒドロ - 2H - ピラン - 3, 4 - ジイルジアセテート (2.20g、4.04mmol) を添加し、反応混合物を室温で週末にかけて攪拌した。次に、反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣をフラッシュクロマトグラフィー (DCM - DCM 中 30% メタノール (v/v) 勾配を 0 : 100 から 100 : 0 に上昇) で精製し、表題化合物 (1.84g、83%) を黄色がかった泡状物として得た。LC-MS 95% (ELSD)。

40

L R M S (m/z) : 2068 [M+1]<sup>1+</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.18<sup>3</sup>

【0601】

中間体7：

三価 GalNAc - アジド

[(3R, 6R) - 3, 4 - ビス (アセチルオキシ) - 6 - {4 - [(3 - {3 - [2

50

- (1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド)-3-(2-{[3-(5-{[(2R, 5R)-4, 5-ビス(アセチルオキシ)-6-[(アセチルオキシ)メチル]-3-アセトアミドオキサン-2-イル]オキシ}ペンタンアミド)プロピル]カルバモイル}エトキシ)-2-[(2-{[3-(5-{[(2R, 5R)-4, 5-ビス(アセチルオキシ)-6-[(アセチルオキシ)メチル]-3-アセトアミドオキサン-2-イル]オキシ}ペンタンアミド)プロピル]カルバモイル}エトキシ)メチル]プロポキシ]プロパンアミド}プロピル)カルバモイル]ブトキシ)-5-アセトアミドオキサン-2-イル]メチルアセテート (300 mg、0.145 mmol) を、トリエチルアミン (2.00 mL、14.4 mmol)、メタノール (2.00 mL) 及び水 (2.00 mL) の混合物に溶解させ、反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を真空で蒸発させた。残渣を分取MP-LCで精製した。<sup>2</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (164 mg、67%) を白色の固形物として得た。LC-MS 97%に基づく純度。

10

LRMS (m/z): 1688 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分): 1.99<sup>1A</sup>

[0602]

三価GalNAc-SO1861及びGalNAc-SO1861の合成 (図2、図4)  
 中間体8:

SO1861-NH<sub>2</sub>

SO1861-アジド (6.89 mg、3.20 μmol) を、32 mMの炭酸カリウム (150 μL、4.80 μmol) 及びアセトニトリル (150 μL) の混合物に溶解させた。その直後に、THF (32 μL、32 μmol) 中の1.0 Mのトリメチルホスフィン溶液を添加し、得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (5.30 mg、78%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 94%に基づく純度。

20

LRMS (m/z): 1062 [M-2]<sup>2-</sup>

LC-MS r. t. (分): 2.51<sup>1B</sup>

[0603]

中間体9:

SO1861-DBCO

SO1861-アミン (48.6 mg、22.9 μmol) 及びDBCO-NHS (13.0 mg、32.4 μmol) に、DIPEA (5.98 μL、34.3 μmol) 及びDMF (2.0 mL) の溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。4時間後、反応混合物を50 mMの重炭酸ナトリウム (1.00 mL、50 μmol) 溶液で希釈した。得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>1</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (16.9 mg、31%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 94%に基づく純度。

30

LRMS (m/z): 2412 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分): 2.45<sup>1B</sup>

[0604]

SO1861-L-三価GalNAcの合成

SO1861-DBCO (7.50 mg、3.11 μmol) 及び三価GalNAc-アジド (5.31 mg、3.14 μmol) を、水/アセトニトリル (2:1、v/v、0.90 mL) の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>3</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (9.60 mg、75%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 99%に基づく純度。

40

LRMS (m/z): 2050 [M-2]<sup>2-</sup>

50

LC-MS r. t. (分) : 2.04<sup>1B</sup>  
 [0605]

SO1861-L-GalNAcの合成

SO1861-DBCO (1.75mg、0.73 μmol) 及び GalNAc-PEG3-アジド (0.82mg、2.18 μmol) を、水/アセトニトリル (1:1、v/v、1.00mL) の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>3B</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (1.63mg、81%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 100%に基づく純度。

LRMS (m/z) : 2790 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 2.15<sup>1B</sup>  
 [0606]

三価GalNAc-BNAオリゴ合成 (図6、図7)

中間体10:

4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0<sup>4,9</sup>] ヘキサデカー-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- [2- (2- {2- [2- ( {4- [ (E)- { [6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサナムイド] イミノ} メチル] フェニル} ホルムアミド) エトキシ] エトキシ} エトキシ) エチル] -4-オキソブタンアミド

4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0<sup>4,9</sup>] ヘキサデカー-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- {2- [2- (2- {2- [ (4-ホルミルフェニル) ホルムアミド] エトキシ} エトキシ) エトキシ] エチル} -4-オキソブタンアミド (25.0mg、40.9 μmol) 及び EMCH. TFA (20.8mg、61.3 μmol) を、メタノール (超無水 (extra dry)、2.00mL) に溶解させた。次に、TFA (9.39 μL、123 μmol) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室内で一晩静置した。反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>1B</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (16.2mg、48%) を白色固形物として得た。LC-MS 91%に基づく純度。

LRMS (m/z) : 410.2 [M+2]<sup>2+</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.41<sup>2</sup>  
 [0607]

中間体11:

三価GalNAc-L-マレイミド

三価GalNAc-アジド (20.3mg、12.0 μmol) 及び 4- {2-アザトリシクロ [10.4.0.0<sup>4,9</sup>] ヘキサデカー-1 (12), 4 (9), 5, 7, 13, 15-ヘキサエン-10-イン-2-イル} -N- [2- (2- {2- [2- ( {4- [ (E)- { [6- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) ヘキサナムイド] イミノ} メチル] フェニル} ホルムアミド) エトキシ] エトキシ} エトキシ) エチル] -4-オキソブタンアミド (11.8mg、14.4 μmol) を、水/アセトニトリル (2:1、v/v、0.90mL) の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>2C</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (25.6mg、85%) を白色固形物として得た。LC-MS 88%に基づく純度。

LRMS (m/z) : 2101 [M-405]<sup>1-</sup>、2304 [M-202]<sup>1-</sup>、2507 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.90<sup>1B</sup> (異性体に起因する二重ピーク)  
 [0608]

中間体12:

三価GalNAc-S-マレイミド

10

20

30

40

50

三価G a l N A c-アジド (20.3 mg、12.0  $\mu$ mol) 及びD B C O-マレイミド (10.3 mg、24.0  $\mu$ mol) を、水/アセトニトリル (2:1、v/v、0.90 mL) の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取M P-L Cにかけた。<sup>2</sup>D生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (22.2 mg、87%) を白色固形物として得た。L C-M S 85%に基づく純度。10%の加水分解マレイミドを含有する。

L R M S (m/z) : 2115 [M-1] <sup>1-</sup>

L C-M S r. t. (分) : 1.60 <sup>1</sup>B (異性体に起因する二重ピーク)

[0609]

三価G a l N A c-S-A p o B (又はH S P 27) B N Aオリゴ合成

A p o B B N Aオリゴジスルフィド (5.00 mg、0.686  $\mu$ mol) に、2.5 mMのT C E P (1.00 mL、2.5  $\mu$ mol) を含有する20 mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した (30分間5000  $\times$  g、2  $\times$  0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM T C E Pを伴う20 mM 重炭酸アンモニウム (0.50 mL) の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣溶液を20 mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) で希釈し、得られた溶液をそのまま三価G a l N A c-S-マレイミド (3.02 mg、1.43  $\mu$ mol) に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1.5時間後、反応混合物を分取L C-M Sにかけた。<sup>4</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (6.75 mg、定量) を白色の綿毛状の固形物として得た。L C-M Sに基づく純度 94% (極めてブロードなピーク)。A p o B B N A配列については配列番号2を参照のこと。

L R M S (m/z) : 2318 [M-4] <sup>4-</sup>

L C-M S r. t. (分) : 1.65 <sup>1</sup>A

[0610]

三価G a l N A c-S-A p o B (又はH S P 27) スクランブルB N Aオリゴ合成

A p o BスクランブルB N Aオリゴジスルフィド (5.00 mg、0.688  $\mu$ mol) に、2.5 mMのT C E P (1.00 mL、2.5  $\mu$ mol) を含有する20 mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した (30分間5000  $\times$  g、2  $\times$  0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM T C E Pを伴う20 mM 重炭酸アンモニウム (0.50 mL) の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣溶液を20 mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) で希釈し、得られた溶液をそのまま三価G a l N A c-S-マレイミド (3.09 mg、1.46  $\mu$ mol) に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1.5時間後、反応混合物を分取L C-M Sにかけた。<sup>4</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (5.91 mg、93%) を白色の綿毛状の固形物として得た。L C-M Sに基づく純度 88% (極めてブロードなピーク)。

L R M S (m/z) : 2311 [M-4] <sup>4-</sup>

L C-M S r. t. (分) : 1.60 <sup>1</sup>A

[0611]

三価G a l N A c-L-A p o B (又はH S P 27) B N Aオリゴ合成

A p o B B N Aオリゴジスルフィド (5.00 mg、0.686  $\mu$ mol) に、2.5 mMのT C E P (1.00 mL、2.5  $\mu$ mol) を含有する20 mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによ

10

20

30

40

50

て濾過した（30分間5000×g、2×0.50mL）。次に、残渣の溶液を、2.5mM TCEPを伴う20mM 重炭酸アンモニウム（0.50mL）の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣溶液を20mMの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（3：1、v／v、1.00mL）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価GallNAc-L-マレイミド（3.63mg、1.45μmol）に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1.5時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>4</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（6.68mg、定量）を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 99%（極めてブロードなピーク）。

LRMS (m/z) : 2416 [M-4]<sup>4-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.97<sup>1</sup>A

【0612】

三価GallNAc-L-ApoB（又はHSP27）スクランブルBNAオリゴ合成

ApoBスクランブルBNAオリゴジスルフィド（5.00mg、0.688μmol）に、2.5mMのTCEP（1.00mL、2.5μmol）を含有する20mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した（30分間5000×g、2×0.50mL）。次に、残渣の溶液を、2.5mM TCEPを伴う20mM 重炭酸アンモニウム（0.50mL）の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣溶液を20mMの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（3：1、v／v、1.00mL）で希釈し、得られた溶液をそのまま三価GallNAc-L-マレイミド（3.68mg、1.47μmol）に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1.5時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>4</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（4.71mg、71%）を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 96%（極めてブロードなピーク）。

LRMS (m/z) : 2409 [M-4]<sup>4-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.93<sup>1</sup>A

【0613】

デンドロン（-L-SO1861）<sub>4</sub>-三価GallNAc（図23D～図23E）及びデンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-三価GallNAcの合成

中間体13：

三価GallNAc-アミンホルメート

三価GallNAc-アジド（36.5mg、21.6μmol）を、炭酸カリウム（5.97mg、43.2μmol）の水（1.00mL）及びアセトニトリル（1.00mL）溶液に溶解させた。次に、THF（216μL、216μmol）中1.0Mのトリメチルホスフィン溶液を添加し、得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。45分後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（9：1、v／v、1mL）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取MP-LCにかけた。<sup>2</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（36.1mg、98%）を白色固形物として得た。LC-MS 100%に基づく純度。

LRMS (m/z) : 1662 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.62<sup>1</sup>A

【0614】

中間体14：

三価GallNAc-DBCO

三価GallNAc-アミンホルメート（17.4mg、10.2μmol）及びDBCO-NHS（6.14mg、15.3μmol）を、NMM（2.24μL、20.3μmol）のDMF（0.50mL）溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水／アセトニトリル（8

10

20

30

40

50

：2、v/v、1 mL）に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取MP-LCにかけた。<sup>2</sup>C生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（14.2 mg、72%）を白色固形物として得た。LC-MS 96%に基づく純度。

LRMS (m/z) : 1950 [M-1]<sup>1</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.86<sup>1B</sup>

【0615】

中間体15：

デンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-アジド

デンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-アミン（19.6 mg、1.08 μmol）及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-オエート（4.17 mg、10.8 μmol）を、DMF（1.50 mL）に溶解させた。次に、DIPEA（1.87 μL、10.8 μmol）を添加し、混合物を1分間振盪させ、室温で一晩静置した。反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>4</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（11.7 mg、59%）を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 92%（極めてブロードなピーク）。

LRMS (m/z) : 2316 [M-8]<sup>8-</sup>、) : 2647 [M-7]<sup>7-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 4.29<sup>1A</sup>

【0616】

デンドロン（-L-SO1861）<sub>4</sub>-三価GalNAcの合成

デンドロン（-L-SO1861）<sub>4</sub>-アジド（2.50 mg、0.266 μmol）、及び三価GalNAc-DBCO（1.56 mg、0.799 μmol）を、水/アセトニトリル（3：1、v/v、1.00 mL）の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>4</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（2.74 mg、91%）を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 86%（極めてブロードなピーク）。

LRMS (m/z) : 2832 [M-4]<sup>4-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 4.07<sup>1A</sup>

【0617】

デンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-三価GalNAcの合成

デンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-アジド（2.50 mg、0.135 μmol）、及び三価GalNAc-DBCO（0.79 mg、0.405 μmol）を、水/アセトニトリル（3：1、v/v、1.00 mL）の混合物に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>4</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（2.03 mg、74%）を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 100%（極めてブロードなピーク）。

LRMS (m/z) : 2559 [M-8]<sup>8-</sup>、2925 [M-7]<sup>7-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 4.18<sup>1A</sup>

【0618】

デンドロン（-L-SO1861）<sub>4</sub>-L-BNAオリゴ-三価GalNAc及びデンドロン（-L-SO1861）<sub>8</sub>-L-BNAオリゴ-三価GalNAcの合成

中間体16：

三価GalNAc-チオアセテート

三価GalNAc-アミンホルメート（18.7 mg、11.0 μmol）及び4-ニトロフェニル3-（アセチルチオ）プロパノエート（5.90 mg、21.9 μmol）を、NMM（2.41 μL、21.9 μmol）のDMF（0.50 mL）溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を真空で蒸

10

20

30

40

50

発させ、残渣を水中 0.1%ギ酸及びアセトニトリル中 0.1%ギ酸 (9:1、v/v、1 mL) の混合物に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取 M P-L C にかけた。2 B 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (13.0 mg、66%) を白色固形物として得た。L C-M S 100% に基づく純度。L R M S (m/z): 1749 [M-43]<sup>1-</sup>、1792 [M-1]<sup>1</sup>  
L C-M S r. t. (分): 1.24<sup>1 B</sup>

【0619】

中間体 17:

D B C O-T C O-三価 G a l N A c

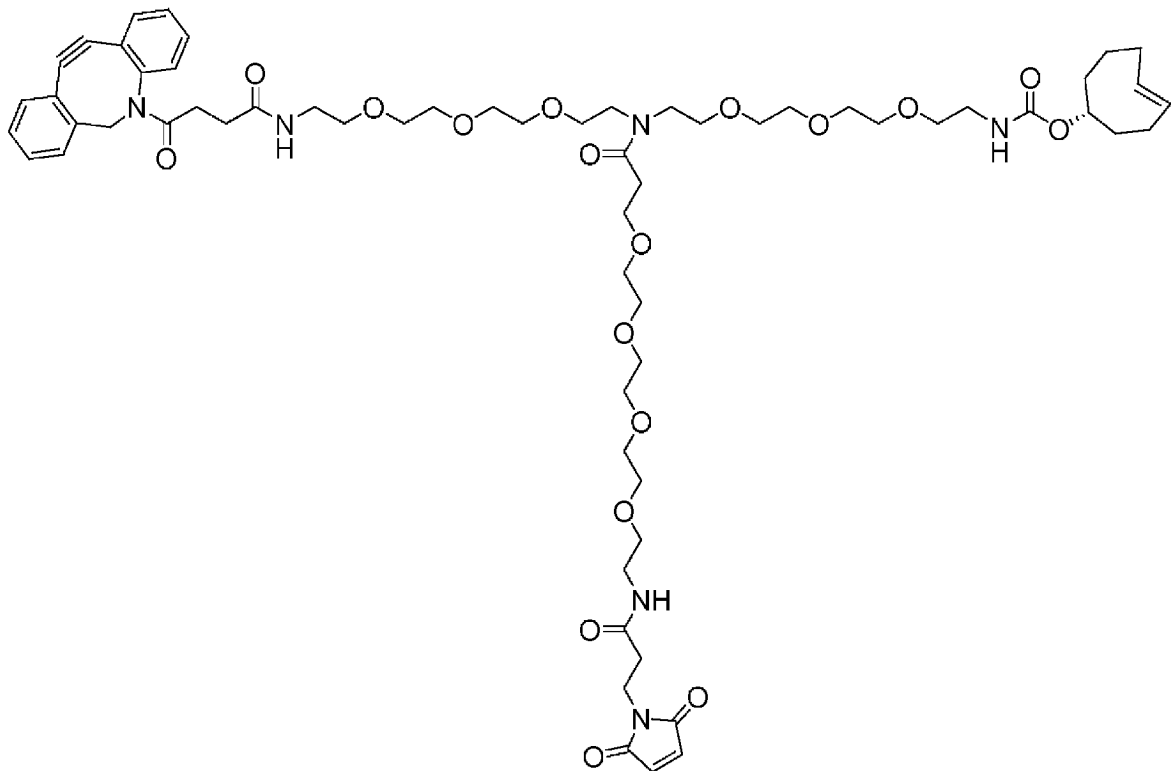
三価 G a l N A c-チオアセテート (13.0 mg、7.25 μmol) をメタノール (0.50 mL) に溶解させた。次に、1 M の水酸化ナトリウム溶液 (7.98 μL、7.98 μmol) を添加した。反応混合物を 1 分間振盪させ、室温で静置した。30 分後、新たに調製した三官能性リンカー (L s-t) (即ち、サポニン部分リンカー L s の一実施例である) の 20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL) 溶液 (7.39 mg、6.13 μmol) に、反応混合物を添加した。

【0620】

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

【0621】

【化107】



(XXI)

## 【0622】

得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取MPLCにかけた。<sup>2</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(3.83mg、21%)を白色固形物として得た。LC-MS 89%に基づく純度。

LRMS (m/z): 2409 [M-546]<sup>1-</sup>、2955 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分): 2.66<sup>1B</sup>

## 【0623】

中間体18:

メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ

ApoB BNAオリゴジスルフィド(5.00mg、0.686μmol)に、2.5mMのTCEP(1.00mL、2.5μmol)を含有する20mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した(30分間5000×g、2×0.50mL)。次に、残渣の溶液を、2.5mM TCEPを伴う20mM 重炭酸アンモニウム(0.50mL)の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣の溶液を、20mM 重炭酸アンモニウム(1.50mL)で希釈し、得られた混合物を、アセトニトリル(0.5mL)中の(E)-1-(4-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ヒドラジンイリデン)メチル)ベンズアミド)-N-(4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)ベンジル)-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド(1.36mg、1.73μmol)の溶液に直接的に加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を冷凍し、一晚凍結乾燥させて、粗製の表題生成物を桃色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に、20mM 重炭酸アンモニウム(1.50mL)の溶液を加え、得られた懸濁液を0.45μmシリンジフィルタ上で濾過した。濾液を一晚凍結乾燥させて、表題生成物(5.44mg、定量)を桃色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 90%(極めてブロードなピーク)。

LRMS (m/z): 2648 [M-3]<sup>3-</sup>

LC-MS r. t. (分): 0.62<sup>4</sup>

## 【0624】

中間体19:

メチルテトラジン-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ

ApoBスクランブルBNAオリゴジスルフィド(5.00mg、0.688μmol)に、2.5mMのTCEP(1.00mL、2.5μmol)を含有する20mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した(30分間5000×g、2×0.50mL)。次に、残渣の溶液を、2.5mM TCEPを伴う20mM 重炭酸アンモニウム(0.50mL)の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣の溶液を、20mM 重炭酸アンモニウム(1.50mL)で希釈し、得られた混合物を、アセトニトリル(0.5mL)中の(E)-1-(4-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ヒドラジンイリデン)メチル)ベンズアミド)-N-(4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)ベンジル)-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド(1.34mg、1.70μmol)の溶液に直接的に加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を冷凍し、一晚凍結乾燥させて、粗製の表題生成物を桃色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に、20mM 重炭酸アンモニウム(1.50mL)の溶液を加え、得られた懸濁液を0.45μmシリンジフィルタ上で濾過した。濾液を一晚凍結乾燥させて、表題生成物(5.48mg、定量)を桃色の綿毛状の固形物として得た。LC

－MSに基づく純度 84%（極めてブロードなピーク）。

L R M S ( $m/z$ ) : 2639 [M-3]<sup>3-</sup>

L C - M S r . t . (分) : 0.58<sup>4</sup>

【0625】

中間体20:

D B C O - L - A p o B B N A オリゴ三価 G a l N A c

メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ(5.44mg、0.684 $\mu$ mol)及びD B C O - T C O - 三価 G a l N A c (2.03mg、0.687 $\mu$ mol)を、20mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル(3:1、v/v、1.00mL)に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取L C - M S にかけた。<sup>4</sup>C生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(2.87mg、39%)を白色の綿毛状の固形物として得た。L C - M S は、正確な $m/z$ 値で複数のブロードピークを示している。

L R M S ( $m/z$ ) : 2175 [M-5]<sup>5-</sup>、2718 [M-6]<sup>4-</sup>

L C - M S r . t . (分) : 2.60~3.00<sup>1A</sup>

【0626】

中間体21:

D B C O - L - A p o B スクランブル B N A オリゴ三価 G a l N A c

メチルテトラジン-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ(5.48mg、0.692 $\mu$ mol)及びD B C O - T C O - 三価 G a l N A c (1.80mg、0.609 $\mu$ mol)に、20mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル(3:1、v/v、1.00mL)を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取L C - M S にかけた。<sup>4</sup>C生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(2.15mg、33%)を白色の綿毛状の固形物として得た。L C - M S は、正確な $m/z$ 値で複数のブロードピークを示している。

L R M S ( $m/z$ ) : 2169 [M-5]<sup>5-</sup>、2711 [M-6]<sup>4-</sup>

L C - M S r . t . (分) : 2.58~3.20<sup>1A</sup>

【0627】

デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-L-ApoB BNAオリゴ三価 G a l N A c 合成(分子34、図24D)

D B C O - L - A p o B B N A オリゴ三価 G a l N A c (1.49mg、0.137 $\mu$ mol; 分子31、図24C)及びデンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-アジド(1.33mg、0.142 $\mu$ mol; 分子19、図23D; デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-アジドは、デンドロン(SPT001)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(分子15、図23C)に基づいて合成され、ここで、このアミンデンドロンを、塩基としてD I P E Aを含むDMF中のアジド-PEG<sub>4</sub>-NHSエステル(分子18)で処理した)に、デンドロン(-L-SO1861)<sub>4</sub>-L-ApoB BNAオリゴ三価 G a l N A c (分子34; 「三価 G a l N A c - A p o B B N A - S P T 0 0 1 コンジュゲート」)が合成されるように20mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル(3:1、v/v、0.5mL)を加えた(図24D)。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を分取L C - M S にかけた。<sup>4</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(0.96mg、35%)を白色の綿毛状の固形物として得た。

L C - M S に基づく純度 93%（極めてブロードなピーク）。

L R M S ( $m/z$ ) : 2025 [M-10]<sup>10-</sup>、2250 [M-9]<sup>9-</sup>、2532 [M-8]<sup>8-</sup>、2893 [M-7]<sup>7-</sup>

L C - M S r . t . (分) : 3.68<sup>1A</sup>

【0628】

D B C O - L - A p o B B N A オリゴ三価 G a l N A c (分子31)は、メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ(分子30)をD B C O - T C O 三価 G a l N A c (分子29)に結合させることによって合成コンジュゲートされ(図24A~図24B及

10

20

30

40

50

び図 2 4 C)、ここで、DBCO-TCO 三価 GalNAc (分子 2 9) は、分子 2 7 及び分子 2 8 (三官能性リンカー) と合成され、ここで、分子 2 7 は、分子 2 2 と、三価 GalNAc-アミンのギ酸塩と、分子 2 6 (4-ニトロフェニル 3-(アセチルチオ) プロパネート) との間の反応から得られる GalNAc-チオアセテートである (図 2 4 A ~ 図 2 4 B)。

【0629】

ApoB BNA、三価 GalNAc 及び SPT001 (サポニン SO1861 である) を、三官能性リンカーを用いて単一の共有結合性コンジュゲートにコンジュゲートさせる (図 2 4 D)。

【0630】

デンドロン (-L-SO1861) 4-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc (分子 3 4; 「三価 GalNAc-ApoB BNA-SPT001 コンジュゲート」) の合成と同様の手法を用いて、ApoB BNA を、スクランブルされた ApoB 核酸配列を有する BNA に置き換えたコンジュゲートを、対照試験のために、合成した。

【0631】

デンドロン (-L-SO1861) 4-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc (分子 3 4; 「三価 GalNAc-ApoB BNA-SPT001 コンジュゲート」) の合成と同様の手法を用いて、ApoB BNA オリゴヌクレオチドが、mRNA/タンパク質発現をサイレンシングするための ApoB BNA 又はスクランブルされた ApoB 核酸配列を有する BNA のいずれかであるコンジュゲートデンドロン (-L-SO1861) 8-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc を合成した。

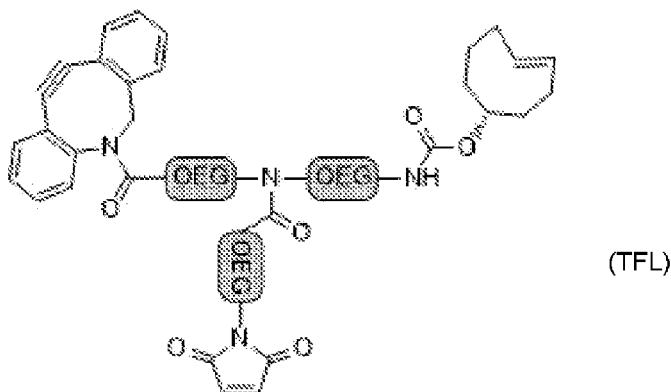
【0632】

SO1861-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc 合成 (三価 GalNAc-ApoB BNA-SPT001 コンジュゲート、図 2 2 A ~ 図 2 2 C)

図 2 2 A ~ 図 2 2 C を参照して、三価 GalNAc、サポニン SO1861 及び ApoB BNA を含むコンジュゲートを、以下の分子構造を有する三価リンカー TFL を使用して合成した:

【0633】

【化 1 0 8】



【0634】

コンジュゲート SO1861-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc 合成 (三価 GalNAc-ApoB BNA-SPT001 コンジュゲート) を形成した。

【0635】

デンドロン (-L-SO1861) 8-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc の合成

DBCO-L-ApoB BNA オリゴ三価 GalNAc (1.38 mg、0.127  $\mu$ mol) 及びデンドロン (-L-SO1861) 8-アジド (2.51 mg、0.13

5  $\mu\text{mol}$ ) に、20 mM 重炭酸アンモニウム／アセトニトリル (3 : 1、v / v、0.5 mL) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。4時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。 $^4\text{B}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (0.75 mg、20%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 99% (極めてブロードなピーク)。

LRMS ( $m/z$ ) : 2099 [M-14] $^{14-}$ 、2261 [M-13] $^{13-}$ 、2450 [M-12] $^{12-}$ 、2672 [M-11] $^{11-}$ 、2940 [M-10] $^{10-}$

LC-MS r. t. (分) : 3.90 $^{1A}$

【0636】

デンドロン (-L-SO1861) $_4$ -L-ApoBスクランブルBNAオリゴ三価GalNAcの合成 10

DBC O-L-ApoBスクランブルBNAオリゴ三価GalNAc (1.09 mg、0.100  $\mu\text{mol}$ ) 及びデンドロン (-L-SO1861) $_4$ -アジド (0.96 mg、0.102  $\mu\text{mol}$ ) に、20 mM 重炭酸アンモニウム／アセトニトリル (3 : 1、v / v、0.5 mL) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。 $^4\text{B}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (0.45 mg、22%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSは、正確な $m/z$ 値で複数のブロードピークを示している。

LRMS ( $m/z$ ) : 2023 [M-10] $^{10-}$ 、2248 [M-9] $^9-$ 、2528 [M-8] $^8-$ 、2890 [M-7] $^7-$  20

LC-MS r. t. (分) : 3.60~4.00 $^{1A}$

【0637】

抗CD71-サポリンの合成

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

【0638】

HSP27BNA、ApoB及びApoBscrambledオリゴ配列 30

HSP27 (5'-GGCacagccagtgGCG-3') [配列番号1] (アンチセンスBNA (HSP27) は、Zhangら (2011年) [Y Zhang、Z Qu、S Kim、V Shi、B Liao<sup>1</sup>、P Kraft、R Bandaru、Y Wu、LM Greenberger、及びID Horak、「Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection」、Gene Therapy (2011年) 第18巻第326~333頁] によって修飾されたオリゴ核酸配列5'-GGCacagccagtgGCG-3'を有するBNA (NC) であった)、ApoB (5'-GCCTCagtcctgcttcGCACC-3') [配列番号2] 及びApoBscrambled (5'-GCCTcctctacaccgCTCGT-3') [配列番号3] BNAオリゴを、Bio-Synthesis Inc. (ルイスビル、テキサス州) において5'-チオールC6リンカーと共に注文した。

【0639】

ヒト初代肝細胞の処置

凍結保存した初代ヒト肝細胞 (Cytes Biotechnologies S. L.、Spain) を肝細胞解凍培地 (Cytes Biotechnologies S. L.、Spain) 中で解凍した。細胞を肝細胞プレーティング培地 (Cytes Biotechnologies S. L.、Spain) 中に再懸濁した。I型コラーゲンコートプレートに、48又は96ウェルプレート (Greiner BioOne) に 50

対して215,600細胞／ウェル又は66,600細胞／ウェルの密度で細胞を播種した。処置を開始する前に、細胞培養プレートに細胞接着させるため、細胞を37℃で4～6時間前培養した。プレーティング培地を315μL又は108μLの維持培地（Cyt es Biotechnologies S. L.、Spain）に置き換え、その後、PBS中10倍の濃度のストック溶液からコンジュゲートを添加した。プレートを37℃で72時間インキュベートし、遺伝子発現及び細胞生存率を分析するために採取した。

【0640】

ヒト細胞培養物からのRNA単離及び遺伝子発現分析

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

【0641】

【表5】

表A2.qPCRに使用されるプライマーを以下に示す:

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

【0642】

細胞生存率アッセイ（MTS）

処置後に細胞を37℃で72時間インキュベートし、その後、細胞生存率をMTSアッセイで測定し、製造業者の指示書（CellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ、Promega）に従って実行した。簡潔に記載すると、MTS溶液を、10%FBSを補充したフェノールレッドを含まないDMEM（PAN-Biotech GmbH）で20倍に希釈した。細胞を1ウェル当たり200μLのPBSで1回洗浄し、その後、1ウェル当たり100μLの希釈MTS溶液を加えた。プレートを37℃で約20～30分間インキュベートした。続いて、Thermo Scientific Multiskan FCプレートリーダー（Thermo Scientific）で492nmのODを測定した。定量化のために、「培地のみ」のウェルのバックグラウンドシグナルを全ての他のウェルから差し引いた後、処理／未処理細胞の細胞生存率を、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割ることによって算出した（×100）。

【0643】

FACS分析

T75フラスコ中の10%ウシ胎児血清（PAN-Biotech GmbH）及び1%ペニシリン／ストレプトマイシン（PAN-Biotech GmbH）を補充したDMEM（PAN-Biotech GmbH）に、細胞を各々の細胞株に適切な密度で播種し、コンフルエンスが90%に到達するまで72～96時間インキュベートした（5%CO<sub>2</sub>、37℃）。次に、細胞を、単一の細胞に対してトリプシン処理して（TrypLE Express, Gibco Thermo Scientific）、15mLファルコンチューブに移して、遠心分離した（1400rpm、3分）。細胞ペレットを沈めたまま、上清を廃棄した。500,000個の細胞を丸底FACSチューブに移し

、3 mLの冷DPBS ( $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  フリー、2% FBS) で洗浄した。細胞を1800 rpmで3分間、4℃で遠心分離し、200  $\mu$ Lの冷DPBS ( $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  フリー、2% FBS) 又は195  $\mu$ Lの冷DPBS ( $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  フリー、2% FBS) 中に5  $\mu$ Lの抗体を含有する200  $\mu$ Lの抗体溶液に再懸濁した。トランスフェリン受容体を染色するためにPE抗ヒトCD71 (#334106、Biolegend) を使用し、それに一致するアイソタイプ対照として、PEマウスIgG2a、 $\kappa$ アイソタイプ対照FC (#400212、Biolegend) を使用した。ASGPR1受容体を染色するためにPE抗ヒトASGPR1 (#130-122-963、Miltenyi) を使用し、それに一致するアイソタイプ対照としてPEマウスIgG1、アイソタイプ対照 (#130-113-762、Miltenyi) を使用した。試料を4℃で30分間インキュベートした。その後、細胞を冷DPBS ( $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  フリー、2% FBS) で2回洗浄し、DPBS ( $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  フリー、2% FBS) 中2% PFA溶液を使用して室温で20分間固定化した。細胞を冷DPBSで1回洗浄し、FACS分析のために1000  $\mu$ Lの冷DPBS中に再懸濁した。Sysmex Cube 8フローサイトメトリーシステム (Sysmex) 及びFACS Express 7 Research editionソフトウェアで試料を分析した。FACS分析の結果は、表A3にまとめられている。

10

【0644】

【表6】

20

表A3. HepG2 及び Huh7 細胞の ASGPR1 及び CD71 の細胞膜受容体発現レベル

| 細胞株   | ASGPR1<br>発現レベル<br>(MFI) | CD71<br>発現レベル<br>(MFI) |
|-------|--------------------------|------------------------|
| HepG2 | 8.8                      | 74.7                   |
| Huh7  | 1.6                      | 109                    |

【0645】

実施例 4

30

材料及び方法

略語

AEM N-(2-アミノエチル) マレイミドトリフルオロ酢酸塩

AMPD 2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール

BOP (ベンゾトリアゾルー-1-イルオキシ) トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム  
ヘキサフルオロホスフェート

DIPEA N, N-ジイソプロピルエチルアミン

DMF N, N-ジメチルホルムアミド

DTME ジチオビスマレイミドエタン

DTT ジチオスレイトール

40

EDCI·HCl 3-((エチルイミノ) メチレンアミノ) -N, N-ジメチルプロパ  
ン-1-アミニウムクロリド

EDTA エチレンジアミン四酢酸

EMCH·TFA N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロン酸) ヒドラジド、トリフルオロ酢酸塩

HATU 1-[ビス (ジメチルアミノ) メチレン] -1H-1, 2, 3-トリアゾロ [4, 5-b] ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート

min 分

NMM 4-メチルモルホリン

r. t. 保持時間

SEC サイズ排除クロマトグラフィ

50

T B E U (トリスーヒドロキシメチル)ーアミノメタン)ーホウ酸ーE D T Aー尿素  
 T C E P トリス(2ーカルボキシエチル)ホスフィンハイドロクロライド  
 T e m p 温度  
 T F A トリフルオロ酢酸  
 T F L 三官能性リンカー  
 【0646】

#### 分析方法

##### LC-MS方法1

装置：Waters IClass; Bin. ポンプ：UPIBSM、SM：SOを伴う  
 UPI SMFTN; UPCMA、PDA：UPPDATC、210~320nm、SQD  
 : ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲： 10  
 1500~2400又は2000~3000の範囲内のneg又はneg/pos; EL  
 SD：気体圧力 40psi、ドリフトチューブ温度：50℃; カラム：Acquity  
 C18、50×2.1mm、1.7μm 温度：60℃、流量：0.6mL/分、lin  
 . 生成物の極性に依存する勾配：  
 A t<sub>0</sub> = 2% A、t<sub>5.0分</sub> = 50% A、t<sub>6.0分</sub> = 98% A  
 B t<sub>0</sub> = 2% A、t<sub>5.0分</sub> = 98% A、t<sub>6.0分</sub> = 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)。

【0647】

##### LC-MS方法2

装置：Waters IClass; Bin. ポンプ：UPIBSM、SM：SOを伴う  
 UPI SMFTN; UPCMA、PDA：UPPDATC、210~320nm、SQD  
 : ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg 10  
 0~800又はneg 2000~3000; ELSD：気体圧力40psi、ドリフトチ  
 ューブ温度：50℃; カラム：Waters XSelect (商標) CSH C18、  
 50×2.1mm、2.5μm、温度：25℃、流速：0.5mL/分、勾配：t<sub>0分</sub> =  
 5% A、t<sub>2.0分</sub> = 98% A、t<sub>2.7分</sub> = 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  
 )。 30

【0648】

##### LC-MS方法3

装置：Waters IClass; Bin. ポンプ：UPIBSM、SM：SOを伴う  
 UPI SMFTN; UPCMA、PDA：UPPDATC、210~320nm、SQD  
 : ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲 pos/neg 1  
 05~800、500~1200又は1500~2500; ELSD：気体圧力40ps  
 i、ドリフトチューブ温度：50℃; カラム：Waters XSelect (商標) C  
 SH C18、50×2.1mm、2.5μm、温度：40℃; 流量：0.5mL/分、  
 勾配：t<sub>0分</sub> = 5% A、t<sub>2.0分</sub> = 98% A、t<sub>2.7分</sub> = 98% A、ポストタイ  
 ム：0.3分、溶出液A：アセトニトリル中の0.1% ギ酸、溶出液B：水中の0.1  
 % ギ酸。 40

【0649】

##### LC-MS方法4

装置：Waters IClass; Bin. ポンプ：UPIBSM、SM：SOを伴う  
 UPI SMFTN; UPCMA、PDA：UPPDATC、210~320nm、SQD  
 : ACQ-SQD2 ESI、生成物の分子量に依存する質量範囲：pos/neg 10  
 0~800又はneg 2000~3000; ELSD：気体圧力40psi、ドリフトチ  
 ューブ温度：50℃カラム：Waters Acquity Shield RP18、  
 50×2.1mm、1.7μm、温度：25℃、流量：0.5mL/分、勾配：t<sub>0分</sub> =  
 5% A、t<sub>2.0分</sub> = 98% A、t<sub>2.7分</sub> = 98% A、ポストタイム：0.3分、 50

溶出液 A : アセトニトリル、溶出液 B : 水中 10 mM 重炭酸アンモニウム (pH = 9.5)。

#### 【0650】

##### 分取方法

##### 分取 MP-LC 法 1

機器タイプ: Reveleris (商標) 分取 MPLC; カラム: Waters XSelect (商標) CSH C18 (145 × 25 mm、10 μm); 流量: 40 mL/分; カラム温度: 室温; 溶出液 A: 水中の 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH = 9.0; 溶出液 B: 水中の 99% アセトニトリル + 1% 10 mM 炭酸水素アンモニウム; 勾配:

A t<sub>0</sub>分 = 5% B、t<sub>1</sub>分 = 5% B、t<sub>2</sub>分 = 10% B、t<sub>17</sub>分 = 50% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

A t<sub>0</sub>分 = 5% B、t<sub>1</sub>分 = 5% B、t<sub>2</sub>分 = 20% B、t<sub>17</sub>分 = 60% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

; 検出 UV: 210、235、254 nm 及び ELS D。

#### 【0651】

##### 分取 MP-LC 法 2

機器タイプ: Reveleris (商標) 分取 MPLC; カラム: Phenomenex LUNA C18 (3) (150 × 25 mm、10 μm); 流速: 40 mL/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; 勾配:

A t<sub>0</sub>分 = 5% B、t<sub>1</sub>分 = 5% B、t<sub>2</sub>分 = 20% B、t<sub>17</sub>分 = 60% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

B t<sub>0</sub>分 = 2% B、t<sub>1</sub>分 = 2% B、t<sub>2</sub>分 = 2% B、t<sub>17</sub>分 = 30% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

C t<sub>0</sub>分 = 5% B、t<sub>1</sub>分 = 5% B、t<sub>2</sub>分 = 10% B、t<sub>17</sub>分 = 50% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

D t<sub>0</sub>分 = 5% B、t<sub>1</sub>分 = 5% B、t<sub>2</sub>分 = 5% B、t<sub>17</sub>分 = 40% B、t<sub>18</sub>分 = 100% B、t<sub>23</sub>分 = 100% B

; 検出 UV: 210、235、254 nm 及び ELS D。

#### 【0652】

##### 分取 LC-MS 方法 3

MS 機器のタイプ: Agilent Technologies G6130B 四重極; HPLC 機器タイプ: Agilent Technologies 1290 分取 LC; カラム: Waters XSelect (商標) CSH (C18、150 × 19 mm、10 μm); 流量: 25 mL/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 10 mM 重炭酸アンモニウム pH = 9.0; 勾配:

A t<sub>0</sub> = 20% A、t<sub>2.5</sub>分 = 20% A、t<sub>11</sub>分 = 60% A、t<sub>13</sub>分 = 100% A、t<sub>17</sub>分 = 100% A

B t<sub>0</sub> = 5% A、t<sub>2.5</sub>分 = 5% A、t<sub>11</sub>分 = 40% A、t<sub>13</sub>分 = 100% A、t<sub>17</sub>分 = 100% A

; 検出: DAD (210 nm); 検出: MSD (ESI pos/neg) 質量範囲: 100 ~ 800; DAD に基づく分画収集物。

#### 【0653】

##### 分取 LC-MS 方法 4

MS 機器のタイプ: Agilent Technologies G6130B 四重極; HPLC 機器タイプ: Agilent Technologies 1290 分取 LC; カラム: Waters Xbridge Protein (C4、150 × 19 mm、10 μm); 流量: 25 mL/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 10 mM 重炭酸アンモニウム pH = 9.0; 勾配:

A t<sub>0</sub> = 2% A、t<sub>2.5</sub>分 = 2% A、t<sub>11</sub>分 = 30% A、t<sub>13</sub>分 = 100% A、t<sub>17</sub>

10

20

30

40

50

7分=100%A

B t<sub>0</sub>=10%A、t<sub>2.5分</sub>=10%A、t<sub>11分</sub>=50%A、t<sub>13分</sub>=100%A、

t<sub>17分</sub>=100%A

C t<sub>0</sub>=5%A、t<sub>2.5分</sub>=5%A、t<sub>11分</sub>=40%A、t<sub>13分</sub>=100%A、t<sub>17分</sub>=100%A

；検出：DAD(210nm)；検出：MSD(ESI pos/neg)質量範囲：100~800；DADに基づく分画収集物

【0654】

フラッシュクロマトグラフィ

Grace Reveleris X2(登録商標)C-815 Flash；溶媒送達系：自吸式3ピストンポンプ、単一ランで最大4種の溶媒を含む4つの独立チャンネル、溶媒が空になった場合の自動切替ライン；最大ポンプ流量 250mL/分；最大圧力 50バール(725psi)；検出；UV 200~400nm、最大4UVシグナル及び全体UV範囲のスキンの組合せ、ELSD；カラムサイズ：機器に対して4~330g、ルアータイプ、オプションのホルダーを伴って750g~3000g。

【0655】

UV-vis分光光度法

タンパク質濃度を、Thermo Nanodrop 2000質量分析計を使用して決定し、以下の質量ε280値(mg/mL)-1cm-1)を得た；オリゴ濃度は153,000M-1cm-1のモルε260値を用いて測定した。

エルマンアッセイを、Perkin Elmer Lambda 25分光光度計及びTNBに関する14150M-1cm-1の文献のモルε412値を用いて実行した。実験的に測定されたモルε495=58,700M-1cm-1及びRz280:495=0.428を、SAMSA-フルオレセインのために使用した。

【0656】

SEC

コンジュゲートを、Akta purifier 10システム及びDPBS:IPA(85:15)で溶出するBiosep SEC-s3000カラムを使用するSECによって分析した。コンジュゲート純度を、不純物/凝集体形態に関するコンジュゲートピークの積分によって測定した。

【0657】

SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング

天然のタンパク質及びコンジュゲートを、4~12%ビスートリスゲル及びランニング緩衝液としてのMESを用いるタンパク質ラダーに対するSDS-PAGEによる熱変性非還元及び還元条件下で分析した(200V、約40分)。LDS試料緩衝液及び希釈液としてのMOPSランニング緩衝液を含む試料を0.5mg/mLに調製した。試料を還元するために、DTTを50mMの最終濃度まで加えた。試料を90~95℃で2分間熱処理し、5μg(10μl)を各ウェルに加えた。タンパク質ラダー(10μl)を、前処理を行わずに負荷した。空のウェルを、1×LDS試料緩衝液(10μl)で満たした。ゲルに流した後、それを振盪させながらDI水(100mL)で3回洗浄した(15分、200rpm)。クーマシー染色を、ゲルをPAGE Blueタンパク質染色(30mL)で振盪によりインキュベートすることによって実施した(60分、200rpm)。過剰な染色溶液を除去し、ゲルをDI水(100mL)で2回すすぎ、DI水(100mL)で脱色した(60分、200rpm)。得られたゲルを画像化し、ImageJ(Rasband、W.S.、ImageJ、米国国立衛生研究所、Bethesda、Maryland、USA)を用いて処理した。

【0658】

TBEU-PAGE

未変性のタンパク質、コンジュゲート及びBNA標準物質を、15%TBE-尿素ゲル及びランニング緩衝液としてのTBEを用いるオリゴラダーに対するTBEU-PAGE

Eによる熱変性非還元及び還元条件下で分析した(180V、約60分)。それぞれTBE尿素試料緩衝液及び希釈液としての精製H<sub>2</sub>Oを含む試料を0.5mg/mLに調製し、BNA標準物質を20μg/mLに調製した。試料及び標準物質を、70℃で3分間熱処理し、10μlを各ウェルに加え、レーン当たり5μgのタンパク質及びコンジュゲート試料、並びに0.2μgのBNAに相当する。TE pH7.5(2μl)中の0.1μg/バンド/mLに再構成されたオリゴラダーを、前処理を行わずに負荷した。ゲルに流した後、それを振盪させながら新たに調製されたエチジウムブロマイド溶液(1μg/mL)で染色した(40分、200rpm)。得られたゲルをUV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、Bethesda、Maryland、USA)を用いて画像化及び処理した

10

【0659】

**MALDI-TOF-MS**

MALDI-TOFスペクトルを、MALDI-質量分析計(Bruker Ultraflex III)上で記録した。典型的には、ナノモル濃度からマイクロモル濃度の範囲でMilliQ水に溶解された試料を、乾燥液滴法によりアセトニトリル(試験されたMALDI-TOF-MS、Sigma)/0.1% TFA(7:3 v/v)中に溶解されたマトリックスとしてsuper-DHB(99%、Fluka)又はシナピン酸(SA、99%、Sigma-Aldrich)のいずれかを用いて標的(MTP 384 target plate polished steel TF、Bruker Daltons)上にスポットした。PepMix(ペプチド校正標準物質、Bruker Daltons)又はProteMass(タンパク質校正標準物質、Sigma-Aldrich)は、校正標準物質として働いた。

20

【0660】

三官能性リンカー-(L-ヒドラゾン-SO1861)-(L-BNAオリゴ)-(三価GalNAc)合成(図35)

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

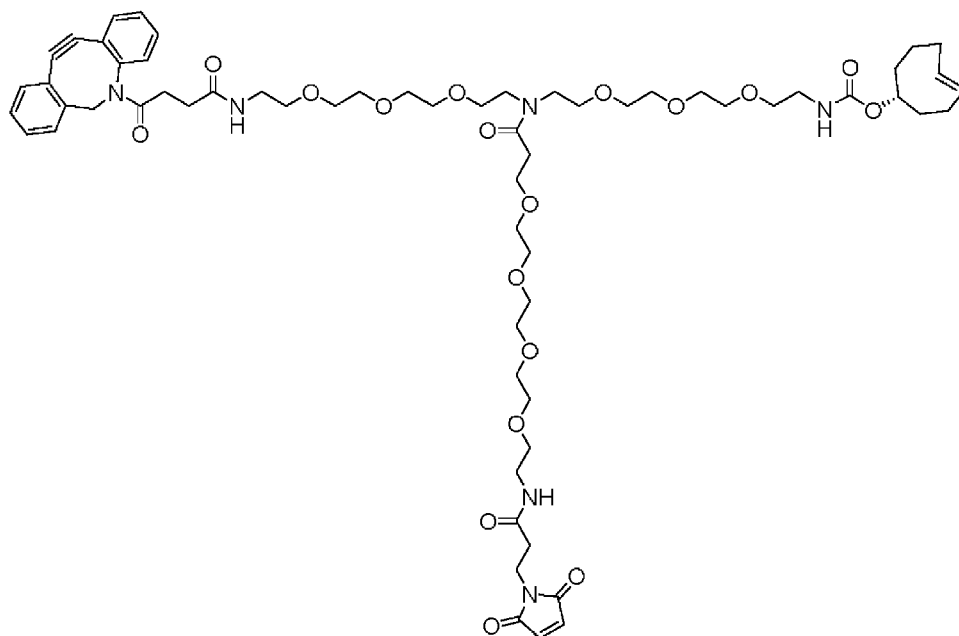
30

【0661】

40

50

【化 1 0 9】



(XXI)

10

20

【0 6 6 2】

中間体 1：

S O 1 8 6 1 - L - ヒドラゾンアジド (分子 3)

S O 1 8 6 1 (60 mg、0.032 mmol、分子 1) 及び 1 - アジド - 3, 6, 9, 12 - テトラオキサペンタデカン - 15 - ヒドラジド (39.3 mg、0.129 mmol、分子 2) に、メタノール (過乾燥、1.00 mL) 及び TFA (9.86  $\mu$ l、0.129 mmol) を加え、反応混合物を 1 分間振盪させ、室温で静置した。2 時間後、反応混合物を分取 MP - LC にかけた。<sup>1</sup> 生成物に対応する分画を直ちに一緒にプールし、冷凍し、一晚凍結乾燥して、表題化合物 (58.4 mg、84%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC - MS 99% に基づく純度。

30

LRMS (m/z) : 2150 [M - H]<sup>1-</sup>LC - MS r. t. (分) : 1.10<sup>3</sup> B

【0 6 6 3】

中間体 2：

三官能性リンカー - (L - ヒドラゾン - S O 1 8 6 1) - (TCO) - (マレイミド) (分子 5)

DMF (2.0 mL) 中の TFL - (DBCO) - (TCO) - (マレイミド) (15 mg、12.5  $\mu$ mol、分子 4) の溶液を、S O 1 8 6 1 - L - ヒドラゾンアジド (26.8 mg、12.5  $\mu$ mol、分子 3) に加えた。反応混合物を 30 分間振盪させ、室温で静置した。30 分後、反応混合物を分取 MP - LC にかけた。<sup>1</sup> 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (31.4 mg、75%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC - MS 96% に基づく純度。

40

MS (m/z) : 3354 [M - H]<sup>1-</sup>

【0 6 6 4】

中間体 3：

三価 GalNAc - チオアセテート (分子 8)

三価 GalNAc - アミンホルメート (18.7 mg、11.0  $\mu$ mol、分子 6) 及び 4 - ニトロフェニル 3 - (アセチルチオ) プロパノエート (5.90 mg、21.9  $\mu$

50

mol、分子7)を、NMM (2.41  $\mu$ L、21.9  $\mu$ mol)のDMF (0.50 mL)溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を真空で蒸発させ、残渣を水中0.1%ギ酸及びアセトニトリル中0.1%ギ酸 (9:1、v/v、1 mL)の混合物に溶解させた。得られた溶液をそのまま分取MP-LCにかけた。<sup>2B</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (13.0 mg、66%)を白色固形物として得た。LC-MS 100%に基づく純度。

LRMS (m/z): 1749 [M-43]<sup>1-</sup>、1792 [M-H]<sup>1-</sup>

LC-MS r.t. (分): 1.24<sup>1B</sup>

【0665】

中間体4:

三官能性リンカー - (L-SO1861) - (TCO) - (三価GalNAc) (分子9)

三価GalNAc-チオアセテート (13.0 mg、7.25  $\mu$ mol、分子8)をメタノール (0.50 mL)に溶解させた。次に、1Mの水酸化ナトリウム溶液 (7.98  $\mu$ L、7.98  $\mu$ mol)を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL)中のTFL-(DBCO)-(TCO)-(マレイミド) (20.6 mg、6.13  $\mu$ mol、分子5)の新たに調製した溶液へ添加した。得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>2A</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (3.83 mg、21%)を白色固形物として得た。LC-MS 89%に基づく純度。

MS (m/z): 5106 [M+H]<sup>+</sup>

【0666】

中間体5:

メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ (分子12)

ApoB#02 BNAオリゴジスルフィド (3.3 mg、0.686  $\mu$ mol、分子10)に、2.5 mMのTCEP (1.00 mL、2.5  $\mu$ mol)を含有する20 mMの重炭酸アンモニウム溶液を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を、3000 Daの分子量カットオフを有する遠心フィルタを使用することによって濾過した (30分間5000  $\times$  g、2  $\times$  0.50 mL)。次に、残渣の溶液を、2.5 mM TCEPを伴う20 mM重炭酸アンモニウム (0.50 mL)の溶液で2回洗浄し、上記の同じ条件下で毎回濾過した。次に、残渣の溶液を、20 mM重炭酸アンモニウム (1.50 mL)で希釈し、得られた混合物を、アセトニトリル (0.5 mL)中の(E)-1-(4-(2-(6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)ヒドラジンイリデン)メチル)ベンズアミド)-N-(4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)ベンジル)-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-アミド (1.36 mg、1.73  $\mu$ mol、分子11)の溶液に直接的に加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を冷凍し、一晚凍結乾燥させて、粗製の表題生成物を桃色の綿毛状の固形物として得た。粗生成物に、20 mM重炭酸アンモニウム (1.50 mL)の溶液を加え、得られた懸濁液を0.45  $\mu$ mシリンジフィルタ上で濾過した。濾液を一晚凍結乾燥させて、表題生成物 (3.4 mg、89%)を桃色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 90%に基づく純度。

MS (m/z): 5579 [M+Na]<sup>+</sup>

【0667】

三官能性リンカー - (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (分子13)

TFL-(L-ヒドラゾン-SO1861)-(TCO)-(三価GalNAc) (16.1 mg、3.15  $\mu$ mol、分子9)及びメチルテトラジン-BNAオリゴ (10.

2 mg、1.83  $\mu\text{mol}$ 、分子12)を、20 mMの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル (3 : 1、v / v、1.00 mL) 溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を冷凍して一晚凍結乾燥させた。粗組成物を20 mMの重炭酸アンモニウム (1 mL) に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取LC-MSにかけた。 $^1\text{B}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (27.2 mg、81%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 91%に基づく純度。

MS ( $m/z$ ) : 10660 [M+H]<sup>+</sup>  
[0668]

三官能性リンカー (L-ヒドラゾン-SO1861) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (分子13) の合成と同様のアプローチの使用；対照試験目的 (分子12a) のために、スクランブルされたApoBの核酸配列 (分子13a) によりApoBのBNAがBNAについて置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

[0669]

三官能性リンカー (デンドロン (L-ヒドラゾン-SO1861) 4) - (L-BNAオリゴ) - (三価GalNAc) 合成 (図36)

中間体6：

SO1861-EMCH (分子15)

SO1861 (121 mg、0.065 mmol、分子1) 及びEMCH、TFA (110 mg、0.325 mmol、分子14) に、メタノール (過剰乾燥、3.00 mL) 及びTFA (0.020 mL、0.260 mmol) を加えた。反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。1生成物に対応する分画を直ちに一緒にプールし、冷凍し、一晚凍結乾燥して、表題化合物 (120 mg、90%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 96%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ) : 2069 [M-1]<sup>-</sup>  
LC-MS r. t. (分) : 1.084

[0670]

中間体7：

デンドロン (L-SO1861) 4-アミン (分子17)

N, N' - ((9S, 19S) - 14 - (6-アミノヘキサノイル) - 1-メルカプト-9 - (3-メルカプトプロパンアミド) - 3, 10, 18-トリオキソ-4, 11, 14, 17-テトラアザトリコサン-19, 23-ジイル) ビス (3-メルカプトプロパンアミド) ホルメート (2.73 mg、3.13  $\mu\text{mol}$ 、分子16) を、20 mMのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> と0.5 mMのTCEP／アセトニトリル (3 : 1、v / v、3.00 mL) との混合物に溶解させた。次に、SO1861-EMCH (29.2 mg、0.014 mmol、分子15) を添加し、反応混合物を室温で攪拌した。1.5時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。 $^3\text{B}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (12.3 mg、43%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 97%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ) : 1517 [M-6]<sup>6-</sup>、1821 [M-5]<sup>5-</sup>、2276 [M-4]<sup>4-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 4.39<sup>5A</sup>

[0671]

中間体8

デンドロン (L-SO1861) 4-アジド (分子19)

デンドロン (SO1861) 4-アミン (6.81 mg、0.748  $\mu\text{mol}$ 、分子17) 及び1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-酸2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル (2.90 mg、7.48  $\mu\text{mol}$ 、分子18) を、DMF (1.00 mL) 中で溶解した。次に、DIPEA (1.302  $\mu\text{L}$ 、7.48  $\mu\text{mol}$ ) を加え、混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取L

10

20

30

40

50

C-M Sにかけた。 $^3\text{C}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (5.86 mg、84%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-M S 90%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ): 2344 [M-4] $^{4-}$

LC-M S r. t. (分): 4.78 $^5\text{B}$

【0672】

中間体9:

三官能性リンカー (DBCO) - (TCO) - (三価GalNAc) (分子20)

三価GalNAc-チオアセテート (13.0 mg、7.25  $\mu\text{mol}$ 、分子8) をメタノール (0.50 mL) に溶解させた。次に、1 Mの水酸化ナトリウム溶液 (7.98  $\mu\text{L}$ 、7.98  $\mu\text{mol}$ ) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、新たに調製した三官能性リンカーの20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、2.00 mL、分子4) 溶液 (7.39 mg、6.13  $\mu\text{mol}$ ) に、反応混合物を添加した。得られた混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。 $^2\text{A}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (3.83 mg、21%) を白色固形物として得た。LC-M S 89%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ): 2409 [M-546] $^{1-}$ 、2955 [M-1] $^{1-}$

LC-M S r. t. (分): 2.66 $^{1\text{B}}$

【0673】

中間体10:

三官能性リンカー (DBCO) - (L-ApoB BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (分子21)

メチルテトラジン-L-ApoB BNAオリゴ (5.82 mg、0.684  $\mu\text{mol}$ 、分子12) 及びTFL-(DBCO)-(TCO)-(三価GalNAc) (2.03 mg、0.687  $\mu\text{mol}$ 、分子20) を、20 mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-M Sにかけた。 $^4\text{C}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (3.73 mg、64%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-M Sは、正確な $m/z$ 値で複数のブロードピークを示している。

MS ( $m/z$ ): 8511 [M+H] $^{+}$

【0674】

三官能性リンカー (デンドロン (-L-ヒドラゾン-SO1861) $_4$ ) - (L-ApoB BNAオリゴ) - (三価GalNAc合成) (分子22)

TFL-(DBCO)-(L-ApoB BNAオリゴ) - (三価GalNAc) (1.16 mg、0.137  $\mu\text{mol}$ ；分子21) 及びデンドロン (-L-SO1861) $_4$ -アジド (1.39 mg、0.142  $\mu\text{mol}$ ；分子19) に、20 mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、0.5 mL) を加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を分取LC-M Sにかけた。 $^4\text{B}$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (1.36 mg、54%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-M Sに基づく純度 92% (極めてブロードなピーク)。

MS ( $m/z$ ): 18336 [M+H] $^{+}$

三官能性リンカー (デンドロン (-L-ヒドラゾン-SO1861) $_4$ ) - (L-ApoB BNAオリゴ) - (三価GalNAc合成) の合成と同様のアプローチの使用 (分子22)；対照試験目的 (分子12a) のために、スクランブルされたApoBの核酸配列 (分子22a) によりApoB BNAがBNAについて置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

【0675】

10

20

30

40

50

三官能性リンカー（デンドロン（ $-L-$ ヒドラゾン $-SO1861$ ） $_8$ ） $-$ （BNAオリゴ） $-$ （三価GalNAc）合成（図37）

中間体11：

デンドロン（ $-L-SO1861$ ） $_8$ -アミン（分子24）

（2S） $-N-[ (1S)-1-\{ [2-(6-アミノ-N-\{2-[(2S)-2,6-ビス[(2S)-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミド]ヘキサナミド]エチル}ヘキサナミド]エチル]カルバモイル\}-5-[(2S)-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミド]ペンチル]-2,6-ビス(3-スルファニルプロパンアミド)ヘキサナミドホルメート(0.52 mg、0.299  $\mu$ mol、分子23)及びSO1861-EMCH(29.2 mg、0.014 mmol、分子15)を、20 mM  $NH_4HCO_3$ と、0.5 mM TCEP/アセトニトリル(3:1、v/v、1.00 mL)との混合物に溶解し、得られた混合物を1分間振盪し、室温で静置した。30分後、TCEP(0.30 mg、1.05  $\mu$ mol)を添加し、反応混合物を1分間振盪した。次に、混合物を分取LC-MSに直接供した。 $^3B$ 生成物に対応する分画を直ちに一緒にプールし、冷凍し、一晚凍結乾燥して、表題化合物(2.17 mg、40%)を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 97%に基づく純度。$

LRMS ( $m/z$ ): 2282 [ $M-8$ ] $^{8-}$ 、2607 [ $M-7$ ] $^{7-}$

LC-MS r. t. (分): 4.41 $^{5A}$

[0676]

中間体12：

デンドロン（ $-L-SO1861$ ） $_8$ -アジド（分子25）

デンドロン（SO1861） $_8$ -アミン(19.6 mg、1.08  $\mu$ mol、分子24)及び1-アジド-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(4.17 mg、10.8  $\mu$ mol、分子18)を、DMF(1.50 mL)中で溶解した。次に、DIPEA(1.87  $\mu$ L、10.8  $\mu$ mol)を添加し、混合物を1分間振盪させ、室温で一晩静置した。反応混合物を分取LC-MSにかけた。 $^4B$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(11.7 mg、59%)を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 92%（極めてブロードなピーク）。

LRMS ( $m/z$ ): 2316 [ $M-8$ ] $^{8-}$ 、) : 2647 [ $M-7$ ] $^{7-}$

LC-MS r. t. (分): 4.29 $^{1A}$

[0677]

三官能性リンカー（デンドロン（ $-L-$ ヒドラゾン $-SO1861$ ） $_8$ ） $-$ （L-ApoB BNAオリゴ） $-$ （三価GalNAc合成）（分子26）

TFL-(DBCO)-(L-ApoB BNAオリゴ)-(三価GalNAc)(1.16 mg、0.137  $\mu$ mol; 分子21)及びデンドロン（ $-L-SO1861$ ） $_8$ -アジド(2.72 mg、0.142  $\mu$ mol; 分子25)に、20 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル(3:1、v/v、0.5 mL)を加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。 $^4B$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物(1.6 mg、42%)を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 93%（極めてブロードなピーク）。

MS ( $m/z$ ): 27655 [ $M+H$ ] $^{+}$

三官能性リンカー（デンドロン（ $-L-$ ヒドラゾン $-SO1861$ ） $_8$ ） $-$ （L-ApoB BNAオリゴ） $-$ （三価GalNAc合成）の合成と同様のアプローチの使用（分子26）；対照試験目的（分子12a）のために、スクランブルされたApoBの核酸配列（分子26a）によりApoB BNAがBNAについて置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

[0678]

三官能性リンカー－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（ＢＮＡオリゴ）－（三価ＧａｌＮＡｃ合成）（図３８）

中間体１３：

ＳＯ１８６１－Ｌ－セミカルバゾンアジド（分子２８）

ＳＯ１８６１（６０ｍｇ、０．０３２ｍｍｏｌ、分子１）及び４－（６－アジドヘキサノイル）ピペラジン－１－カルボヒドラジド（３６．５ｍｇ、０．１２９ｍｍｏｌ、分子２７）に、メタノール（過乾燥、１．００ｍＬ）及びＴＦＡ（９．８６μｌ、０．１２９ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。<sup>1</sup>生成物に対応する分画を直ちに一緒にプールし、冷凍し、一晚凍結乾燥して、表題化合物（３０ｍｇ、４４％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳ ９９％に基づく純度。

ＭＳ（ｍ／ｚ）：２１２６〔Ｍ－１〕<sup>1-</sup>

【０６７９】

中間体１４：

三官能性リンカー－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（ＴＣＯ）－（マレイミド）（分子２９）

ＤＭＦ（２．０ｍＬ）中のＴＦＬ－（ＤＢＣＯ）－（ＴＣＯ）－（マレイミド）（１５ｍｇ、１２．５μｍｏｌ、分子４）の溶液を、ＳＯ１８６１－Ｌ－アジド（２６．６ｍｇ、１２．５μｍｏｌ、分子２８）に加えた。反応混合物を３０分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。<sup>1</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（２７．５ｍｇ、６６％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳ ９６％に基づく純度。

ＭＳ（ｍ／ｚ）：３３３１〔Ｍ－１〕<sup>1-</sup>

【０６８０】

中間体１５：

三官能性リンカー－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（ＴＣＯ）－（三価ＧａｌＮＡｃ）（分子３０）

三価ＧａｌＮＡｃ－チオアセテート（１３．０ｍｇ、７．２５μｍｏｌ、分子８）をメタノール（０．５０ｍＬ）に溶解させた。次に、１Ｍの水酸化ナトリウム溶液（７．９８μＬ、７．９８μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３０分後、反応混合物を、２０ｍＭ重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ν／ν、２．００ｍＬ）中のＴＦＬ－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（ＴＣＯ）－（マレイミド）（２０．４ｍｇ、６．１３μｍｏｌ、分子２９）の新たに調製した溶液に添加した。得られた混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。２時間後、反応混合物を分取ＭＰ－ＬＣにかけた。<sup>2</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（１６．７ｍｇ、５４％）を白色固形物として得た。ＬＣ－ＭＳ ９４％に基づく純度。

ＭＳ（ｍ／ｚ）：５０８１〔Ｍ－１〕<sup>1-</sup>

【０６８１】

三官能性リンカー－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（Ｌ－ＢＮＡオリゴ）－（三価ＧａｌＮＡｃ）（分子３１）

ＴＦＬ－（Ｌ－セミカルバゾン－ＳＯ１８６１）－（ＴＣＯ）－（三価ＧａｌＮＡｃ）（１６ｍｇ、３．１５μｍｏｌ、分子３０）及びメチルテトラジン－ＢＮＡオリゴ（１０．２ｍｇ、１．８３μｍｏｌ、分子１２）を、２０ｍＭの重炭酸アンモニウム／アセトニトリル（３：１、ν／ν、１．００ｍＬ）溶液に溶解させた。反応混合物を１分間振盪させ、室温で静置した。３時間後、反応混合物を冷凍して一晚凍結乾燥させた。粗組成物を２０ｍＭの重炭酸アンモニウム（１ｍＬ）に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取ＬＣ－ＭＳにかけた。<sup>1</sup>生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物（１１．３ｍｇ、５９％）を白色の綿毛状の固形物として得た。ＬＣ－ＭＳ ９２％に基づく純度。

10

20

30

40

50

MS ( $m/z$ ) : 10638 [M+H]<sup>+</sup>

【0682】

三官能性リンカー—(L-セミカルバゾン—SO1861)—(L-BNAオリゴ)—(三価GalNAc) (分子31) の合成と同様のアプローチの使用；対照試験目的 (分子12a) のために、スクランブルされたApoBの核酸配列 (分子31a) によりApoB BNAがBNAについて置き換えられたコンジュゲートを合成した

【0683】

三官能性リンカー—デンドロン (L-セミカルバゾン—SO1861) 4—(L-BNAオリゴ)—(三価GalNAc) 合成 (図39)

中間体16：

ベンジル4—(2—(tert-ブトキシカルボニル) ヒドラジン—1—カルボニル) ピペラジン—1—カルボキシレート (分子33)

0℃のトルエン (20%、w/w、15.8mL、30.0mmol) 中のホスゲンの攪拌溶液に、1-Cbz-ピペラジン (1.93mL、10.0mmol、分子1) のジクロロメタン (25mL) 及びDIPEA (3.83mL、22.0mmol) 中溶液をゆっくり (10分間) 添加した。反応混合物を室温で攪拌した。30分後、反応混合物を真空中で蒸発させ、ジクロロメタン (2×50mL) と共蒸発させた。次に、残渣をジクロロメタン (100mL) に溶解し、得られた溶液を0℃で攪拌した。ジクロロメタン (20mL) 及びDIPEA (3.83mL、22.0mmol) 中のBocヒドラジン (2.33mL、15.0mmol) の溶液を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物をジクロロメタン (100mL) で希釈し、得られた溶液を0.5N硫酸水素カリウム溶液 (2×100mL) 及びブライン (100mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、真空中で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィ (最初に酢酸エチル—ヘプタン勾配、5：95 (v/v) で100%酢酸エチルに上昇させ、続いてDCM中10%メタノール (v/v) でフラッシュする。) によって精製して、表題化合物 (2.42g、64%) を白色の固形物として得た。LC-MS 100%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ) : 279/323/401 [M-99/M-55/M+23]<sup>1+</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.27<sup>1</sup>

【0684】

中間体17：

tert-ブチル2—(ピペラジン—1—カルボニル) ヒドラジン—1—カルボキシレート (分子34)

ベンジル4—(2—(tert-ブトキシカルボニル) ヒドラジン—1—カルボニル) ピペラジン—1—カルボキシレート (2.42g、6.39mmol、分子33) にメタノール (50mL) を加えた。混合物を加熱して透明な溶液を得た。次に、パラジウム (活性炭上10%、水で50%湿潤、1.50g) を加え、水素雰囲気下でバルーンを用いて攪拌した。1時間後、反応混合物をセライトで濾過し、濾液を真空中で蒸発させると、表題生成物 (1.56g、定量) が白色の固形物として得られた。

LRMS ( $m/z$ ) : 189/245 [M-55/M+1]<sup>1+</sup>

【0685】

中間体18：

tert-ブチル2—(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—カルボニル) ヒドラジン—1—カルボキシレート (分子36)

6-マレイミドカプロン酸 (810mg、3.84mmol、分子35)、tert-ブチル2—(ピペラジン—1—カルボニル) ヒドラジン—1—カルボキシレート (781mg、3.20mmol、分子34)、EDCI·HCl (735mg、3.84mmol) 及びOxyma Pure (591mg、4.16mmol) を、ジクロロメタン (25mL) 及びDIPEA (835μL、4.80mmol) の混合物に溶解し、反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、反応混合物を真空中で蒸発させ、残渣を酢酸エチル (5

10

20

30

40

50

0 mL) に溶解させた。得られた溶液を 0.5 N の硫酸水素カリウム溶液 (50 mL)、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (2 × 50 mL) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させて濾過し、真空で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィ (DCM-DCM 中 10% メタノール (v/v) 勾配を 100:0 から 40:60 に上昇) で精製し、表題化合物 (634 mg、45%) を白色の固形物として得た。LC-MS 97% に基づく純度。

LRMS (m/z): 338/382/460 [M-99/M-55/M+23]<sup>1+</sup>

LC-MS r. t. (分): 1.02<sup>1</sup>

【0686】

中間体 19:

SO1861-SC-Mal (分子 37)

tert-ブチル 2-(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-カルボニル)ヒドラジン-1-カルボキシレート (25.0 mg、57.1 μmol、分子 36) をジクロロメタン (500 μL) と TFA (500 μL) の混合物に溶解し、反応混合物を室温で攪拌した。30 分後、反応混合物を真空中で蒸発させ、ジクロロメタン (3 × 5 mL) 及びメタノール (5 mL) と共蒸発させた。残渣及び SO1861 (21.3 mg、11.4 μmol、分子 1) をメタノール (余分な乾燥、1.00 mL) に溶解し、得られた混合物を 1 分間振盪し、室温で静置した。4 時間後、反応混合物を分取 MP-LC に供した。<sup>2</sup> 生成物に対応する分画を直ちに一緒にプールし、冷凍し、一晚凍結乾燥させて、表題化合物 (13.7 mg、55%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 97% に基づく純度。

LRMS (m/z): 2181 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分): 2.13<sup>3</sup>

【0687】

中間体 20:

デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 4-アミン (分子 39)

N, N'-(9S, 19S)-14-(6-アミノヘキサノイル)-1-メルカプト-9-(3-メルカプトプロパンアミド)-3, 10, 18 トリオキソ-4, 11, 14, 17 テトラアザトリコサン-19, 23 ジイル)ビス(3-メルカプトプロパンアミド)ホルメート (2.73 mg、3.13 μmol、分子 38) を 1M NaOH と MeOH との混合物 (1:1、v/v、3.00 mL) に溶解し、30 分間攪拌した。次に、THF に溶解した 5 mL のトリメチルホスフィン (9.5 mg、125 μmol) を添加し、混合物を 30 分間攪拌した。次に、アセトニトリル (3:1、v/v、3.00 mL) を含む 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> に溶解した SO1861-SC-Mal (30.54 mg、0.014 mmol、分子 37) を添加し、反応混合物を室温で攪拌した。1.5 時間後、反応混合物を分取 LC-MS にかけた。<sup>3B</sup> 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (19 mg、64%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 95% に基づく純度。

MS (m/z): 9553 [M+H]<sup>+</sup>

【0688】

中間体 21:

デンドロン (L-SO1861) 4-アジド (分子 40)

デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 4-アミン (7.1 mg、0.748 μmol、分子 39) 及び 1-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-酸 2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル (2.90 mg、7.48 μmol、分子 18) を、DMF (1.00 mL) 中で溶解した。次に、DIPEA (1.302 μL、7.48 μmol) を加え、混合物を 1 分間振盪させ、室温で静置した。2 時間後、反応混合物を分取 LC-MS にかけた。<sup>3C</sup> 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (6.4 mg、87%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 93% に基づく純度。

MS ( $m/z$ ) : 9826 [M+H]<sup>+</sup>  
[0689]

中間体22:

三価GalNAc-チオール (分子41)

三価GalNAc-チオアセテート (16.2 mg、9.02  $\mu$ mol、分子8) をメタノール (500  $\mu$ L) に溶解させた。次に、1.00 Mの水酸化ナトリウム溶液 (11.0  $\mu$ L、11.0  $\mu$ mol) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>1</sup>A生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (13.1 mg、83%) を白色固形物として得た。LC-MS 98%に基づく純度。

10

LRMS ( $m/z$ ) : 1748 [M-H]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 1.78<sup>1A</sup>

[0690]

中間体23:

TFL-(DBCO)-(TCO)-(三価GalNAc) (分子20)

TFL-(DBCO)-(TCO)-(Mal) (15.0 mg、12.4  $\mu$ mol、分子4) をアセトニトリル (0.50 mL) に溶解した。次に、20 mMの重炭酸アンモニウム (1.50 mL) 溶液を添加し、得られた溶液を、そのまま三価GalNAc-チオール (22.7 mg、13.0  $\mu$ mol、分子41) に移した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させ、粗製の表題生成物を白色固形物として得た。LC-MSに基づく純度 84%。

20

LRMS ( $m/z$ ) : 2409 [M-546]<sup>1-</sup>、2955 [M-1]<sup>1-</sup>

LC-MS r. t. (分) : 2.63<sup>1B</sup>

[0691]

中間体24:

TFL-(デンドロン(L-セミカルバゾン-SO1861)4)-(TCO)-(三価GalNAc) (分子41)

デンドロン(L-セミカルバゾン-SO1861)<sub>4</sub>-アジド (5.2 mg、0.529  $\mu$ mol、分子40) 及びTFL-(DBCO)-(TCO)-(三価GalNAc) (1.5 mg、0.5  $\mu$ mol、分子20) をDMF (2.00 mL) に溶解した。混合物を10分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取LC-MSにかけた。<sup>3</sup>C生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (6.1 mg、90%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 93%に基づく純度。

30

MS ( $m/z$ ) : 12781 [M+H]<sup>+</sup>

[0692]

TFL-(デンドロン(L-セミカルバゾン-SO1861)4)-(L-BNAオリゴ)-(三価GalNAc) (分子42)

TFL-(デンドロン(L-セミカルバゾン-SO1861)4)-(TCO)-(三価GalNAc) (5.2 mg、0.41  $\mu$ mol、分子41) 及びメチルテトラジン-BNAオリゴ (2.7 mg、0.5  $\mu$ mol、分子12) を、20 mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) 溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させた。粗組成物を20 mMの重炭酸アンモニウム (1 mL) に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取LC-MSにかけた。<sup>1</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (1.8 mg、24%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 96% (位置異性体に起因する複数の(ブロード)ピーク)。

40

MS ( $m/z$ ) : 18336 [M+H]<sup>+</sup>

[0693]

50

三官能性リンカー（デンドロン（ $-L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $4$ ）-（ $L$ - $Apob$  BNAオリゴ）-（三価 $GaINAc$ 合成）の合成と同様のアプローチの使用（分子 $42$ ）；対照試験目的（分子 $12a$ ）のために、スクランブルされた $Apob$ の核酸配列（分子 $42a$ ）により $Apob$  BNAがBNAについて置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

【0694】

三官能性リンカー（デンドロン（ $-L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $8$ ）-BNAオリゴ-三価 $GaINAc$ 合成（図40）

中間体25：

デンドロン（ $L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $8$ -アミン（分子44）  
 （ $2S$ ）- $N$ -[（ $1S$ ）- $1$ -{[ $2$ -（ $6$ -アミノ- $N$ -{ $2$ -[（ $2S$ ）- $2$ ， $6$ -ビス[（ $2S$ ）- $2$ ， $6$ -ビス（ $3$ -スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミド]ヘキサンアミド]エチル}ヘキサンアミド]エチル]カルバモイル}- $5$ -[（ $2S$ ）- $2$ ， $6$ -ビス（ $3$ -スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミド]ペンチル]- $2$ ， $6$ -ビス（ $3$ -スルファニルプロパンアミド）ヘキサンアミドホルメート（ $0.61$ mg、 $0.299$  $\mu$ mol、分子43）を $1M$   $NaOH$ と $MeOH$ （ $1:1$ 、 $v/v$ 、 $3.00$ mL）との混合物に溶解し、 $30$ 分間攪拌した。次に、 $THF$ に溶解した $5$ mLのトリメチルホスフィン（ $2$ mg、 $24$  $\mu$ mol）を添加し、混合物を $30$ 分間攪拌した。次に、アセトニトリル（ $3:1$ 、 $v/v$ 、 $3.00$ mL）を含む $20$ mM  $NH_4HCO_3$ に溶解した $SO1861-SC-Mal$ （ $30.54$ mg、 $0.014$ mmol、分子37）を添加し、反応混合物を室温で攪拌した。 $1.5$ 時間後、反応混合物を分取 $LC-MS$ にかけた。 $^3B$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（ $4.6$ mg、 $81\%$ ）を白色の綿毛状の固形物として得た。 $LC-MS$   $95\%$ に基づく純度。

$MS$ （ $m/z$ ）： $19146$  [ $M+H$ ] $^+$

【0695】

中間体26：

デンドロン（ $-L$ - $SO1861$ ） $8$ -アジド（分子45）

デンドロン（ $L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $8$ -アミン（ $5.4$ mg、 $0.28$  $\mu$ mol、分子44）及び $1$ -アジド- $3,6,9,12$ -テトラオキサペンタデカン- $15$ -酸 $2,5$ -ジオキソピロリジン- $1$ -イル（ $1.1$ mg、 $2.8$  $\mu$ mol、分子18）を、 $DMF$ （ $1.00$ mL）中で溶解した。次に、 $DIPEA$ （ $1.302$  $\mu$ L）を加え、混合物を $1$ 分間振盪させ、室温で静置した。 $2$ 時間後、反応混合物を分取 $LC-MS$ にかけた。 $^3C$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（ $4.35$ mg、 $80\%$ ）を白色の綿毛状の固形物として得た。 $LC-MS$   $93\%$ に基づく純度。

$MS$ （ $m/z$ ）： $19420$  [ $M+H$ ] $^+$

【0696】

中間体27：

$TFL$ -（デンドロン（ $L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $8$ ）-（ $TCO$ ）-（三価 $GaINAc$ ）（分子46）

デンドロン（ $L$ -セミカルバゾン- $SO1861$ ） $8$ -アジド（ $10.3$ mg、 $0.529$  $\mu$ mol、分子45）及び $TFL$ -（ $DBCO$ ）-（ $TCO$ ）-（三価 $GaINAc$ ）（ $1.5$ mg、 $0.5$  $\mu$ mol、分子20）を $DMF$ （ $2.00$ mL）に溶解した。混合物を $10$ 分間振盪させ、室温で静置した。 $2$ 時間後、反応混合物を分取 $LC-MS$ にかけた。 $^3C$ 生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物（ $8.75$ mg、 $74\%$ ）を白色の綿毛状の固形物として得た。 $LC-MS$   $91\%$ に基づく純度。

$MS$ （ $m/z$ ）： $22373$  [ $M+H$ ] $^+$

【0697】

10

20

30

40

50

TFL- (デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 8) - (L-BNAオリゴ) - (三価GallNAc) (分子47)

TFL- (デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 8) - (TCO) - (三価GallNAc) (9.2mg、0.41 $\mu$ mol、分子46) 及びメチルテトラジン-BNAオリゴ (2.8mg、0.5 $\mu$ mol、分子12) を、20mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00mL) 溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を冷凍して一晩凍結乾燥させた。粗組成物を20mMの重炭酸アンモニウム (1mL) に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取LC-MSにかけた。<sup>1</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (1.26mg、11%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 97%に基づく純度。

MS (m/z): 27928 [M+H]<sup>+</sup>

三官能性リンカー (デンドロン (L-セミカルバゾン-SO1861) 8) - (L-ApoB BNAオリゴ) - (三価GallNAc合成) の合成と同様のアプローチの使用 (分子47) ; 対照試験目的 (分子12a) のために、スクランブルされたApoBの核酸配列 (分子47a) によりApoB BNAがBNAについて置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

【0698】

三価リンカー- (L-SPT001) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) 合成 (図41)

中間体28:

N- (2-ヒドロキシエチル) - 2- (4- (6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル) フェニル) アセトアミド (分子50)

メチルテトラジン-NHSエステル (30.0mg、91.7 $\mu$ mol、分子48) のDMF (1.00mL) 溶液に、エタノールアミン (11.1 $\mu$ L、0.184mmol、分子49) 及びトリエチルアミン (25.5 $\mu$ L、0.183mmol) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。1時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。<sup>1</sup>B生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晩凍結乾燥させ、表題化合物 (19.2mg、77%) を紫色の固形物として得た。LC-MS 89%に基づく純度。

LRMS (m/z): 274 [M+1]<sup>1+</sup>

LC-MS r. t. (分): 0.85<sup>2</sup>

【0699】

TFLに対するTCOブロックを以下のコンジュゲートに対して行った:

TFL- (L-ヒドラゾン-SPT001) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子51)

TFL- (デンドロン (L-ヒドラゾン-SPT001) 4) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子52)

TFL- (デンドロン (L-ヒドラゾン-SPT001) 8) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子53)

TFL- (L-セミカルバゾン-SPT001) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子54)

TFL- (デンドロン (L-セミカルバゾン-SPT001) 4) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子55)

TFL- (デンドロン (L-セミカルバゾン-SPT001) 8) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子56)

【0700】

この手順は、TFL- (L-ヒドラゾン-SPT001) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc) (分子51) について例示的に記載されている:

TFL- (L-ヒドラゾン-SPT001) - (ブロックTCO) - (三価GallNAc

) (分子51)

DMF (2.0 mL) 中の TFL- (DBCO) - (TCO) - (三価 GalNAc) (36.8 mg、12.5  $\mu$ mol、分子20) の溶液を、SO1861-L-ヒドラゾンアジド (26.8 mg、12.5  $\mu$ mol、分子3) に加えた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、N- (2-ヒドロキシエチル) - 2- (4- (6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル) フェニル) アセトアミド (4.08 mg、14.9  $\mu$ mol、分子50) を添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。30分後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。 $^{13}\text{C}$  生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (37.3 mg、56%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MSに基づく純度 96% (位置異性体起因する二重ピーク)。

10

LRMS ( $m/z$ ): 2676 [M-2] $^{2-}$

LC-MS r. t. (分): 2.23 $^{1\text{B}}$

[0701]

三価リンカー- (ブロック DBCO) - (L-BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) の合成 (図42)

中間体29:

TFL- (ブロック DBCO) - (TCO) - (三価 GalNAc) (分子58)

1-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-11-オール (2.17 mg、9.88  $\mu$ mol、分子57) の DMF (0.50 mL) 溶液を、TFL- (DBCO) - (TCO) - 三価 GalNAc (14.6 mg、4.94  $\mu$ mol、分子20) に添加した。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。2時間後、反応混合物を分取MP-LCにかけた。 $^{13}\text{C}$  生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (10.00 mg、64%) を白色固形物として得た。LC-MS 98%に基づく純度。

20

MS ( $m/z$ ): 3175 [M+H] $^{+}$

LC-MS r. t. (分): 2.33 $^{1\text{B}}$

[0702]

三価リンカー- (ブロック DBCO) - (BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) (分子59)

30

TFL- (ブロック DBCO) - (TCO) - (三価 GalNAc) (10.0 mg、3.15  $\mu$ mol、分子58) 及びメチルテトラジン-BNAオリゴ (10.0 mg、1.83  $\mu$ mol、分子12) を、20 mMの重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (3:1、v/v、1.00 mL) 溶液に溶解させた。反応混合物を1分間振盪させ、室温で静置した。3時間後、反応混合物を冷凍して一晚凍結乾燥させた。粗組成物を20 mMの重炭酸アンモニウム (1 mL) に溶解させ、得られた溶液をそのまま分取LC-MSにかけた。 $^{13}\text{B}$  生成物に相当する分画を直ちに共にプールし、冷凍して一晚凍結乾燥させ、表題化合物 (11.3 mg、72%) を白色の綿毛状の固形物として得た。LC-MS 95%に基づく純度。

LRMS ( $m/z$ ): 2149 [M-4] $^{4-}$ 、2866 [M-3] $^{3-}$

40

LC-MS r. t. (分): 2.92 $^{1\text{A}}$

[0703]

三価リンカー- (ブロック DBCO) - (BNAオリゴ) - (三価 GalNAc) (分子59) の合成と同様のアプローチの使用; 対照試験目的 (分子12a) のために、スクランブルされた A<sub>po</sub>B の核酸配列 (分子59a) により A<sub>po</sub>B BNA が BNA について置き換えられるコンジュゲートが合成され得る。

[0704]

三官能性リンカー (TFL) 方法論を適用することによって生成された全てのコンジュゲート「コンジュゲートC1」の概要を図43A及び図43Bに示す。加えて、単一の GalNAc 部分を含む本発明によるコンジュゲートが合成され、試験されている。

50

## 【0705】

## 細胞生存率アッセイ (CTG)

処置後に細胞を37℃で72時間インキュベートし、その後、細胞生存率をCTGアッセイで測定し、製造業者の指示書 (CellTiter-Glo (登録商標) 2.0細胞生存アッセイ、Promega) に従って実行した。要約すると、細胞プレートを最初に室温で30分間平衡化した。次に、120μLの処置培地を含有する各ウェルに、120μLのCTG溶液を添加した。プレートを短時間で混合し (10秒、600rpm)、暗所でおおよそ10分間、室温でインキュベートした。続いて、発光シグナルをSpectramax ID5プレートリーダー (Molecular Devices) で測定した。定量化のため、「培地のみ」のウェルのバックグラウンドシグナルを全ての他のウェルから差し引き、その後、処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルを未処置ウェルのバックグラウンド補正シグナルに対して除算する (×100) ことによって処置細胞/未処置細胞の細胞生存率の百分率を算出した。

10

## 【0706】

## ヒト初代肝細胞の処置

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

20

## 【0707】

## ApoB#02オリゴ配列

マウス及びヒトの配列適合性ApoB#02 (5'-GCattggtatTCA-3') [配列番号12] は、BNA<sup>NC</sup>オリゴヌクレオチドであり、Bio-Synthesi s Inc. において、5'-チオールC6リンカーを用いて合成され、BNA<sup>NC</sup>塩基が大文字であり、完全にホスホロチオエート化された骨格を有していた (Lewisville, Texas)。

30

## 【0708】

## 初代マウス及びヒト肝細胞からのRNA単離及び遺伝子発現分析

TRI Reagent (登録商標) 溶液 (Thermo Scientific) を製造業者の指示書に従って用いて、細胞からRNAを単離した。標準的な手順を用いて、iScript (商標) cDNA合成キット (BioRad) を使用してcDNAへの変換を行った。ApoB発現レベルと特異的肝細胞ハウスキーピング遺伝子のレベルを、表A4 (試験A) 及び表A7 (試験B) にそれぞれ列挙した特異的DNAプライマーを含む、iTaq (商標) Universal SYBR (登録商標) Green Supermix (BioRad) 及びLight Cycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) を使用する、定量的リアルタイムPCRアッセイ (qRT-PCR) を用いて測定した。apoBの発現を2つの肝細胞特異的ハウスキーピング対照mRNAと比較して測定するため、ΔCt法によって分析を行った。各分析反応を3回実施した。

40

## 【0709】

## 【表 7】

表A4.マウス初代肝細胞/肝臓組織分析のqPCR分析で使用したプライマー(試験A)

|         |     |                                  |
|---------|-----|----------------------------------|
| ApoB#02 | 順方向 | GCTAACTAAGAACCAGAAGATC [配列番号:13] |
|         | 逆方向 | TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [配列番号:14]   |
| Mm PPIA | 順方向 | GCGGCAGGTCCATCTACG [配列番号:15]     |
|         | 逆方向 | GCCATCCAGCCATTCAGTC [配列番号:16]    |
| Mm SDHA | 順方向 | GAGGAAGCACACCCTCTCAT [配列番号:17]   |
|         | 逆方向 | GGAGCGGATAGCAGGAGGTA [配列番号:18]   |

10

## 【0710】

## FACS分析

T75フラスコ中の10%ウシ胎児血清(PAN-Biotech GmbH)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(PAN-Biotech GmbH)を補充したDMEM(PAN-Biotech GmbH)に、細胞を各々の細胞株に適切な密度で播種し、コンフルエンスが90%に到達するまで72~96時間インキュベートした(5%CO<sub>2</sub>、37℃)。次に、細胞を、単一の細胞に対してトリプシン処理して(Tryple Express, Gibco Thermo Scientific)、15mLファルコンチューブに移して、遠心分離した(1400rpm、3分)。細胞ペレットを沈めたまま、上清を廃棄した。500,000個の細胞を丸底FACSチューブに移し、3mLの冷DPBS(Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>フリー、2%FBS)で洗浄した。細胞を1800rpmで3分間、4℃で遠心分離し、200μLの冷DPBS(Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>フリー、2%FBS)又は195μLの冷DPBS(Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>フリー、2%FBS)中に5μLの抗体を含有する200μLの抗体溶液に再懸濁した。トランスフェリン受容体を染色するためにPE抗ヒトCD71(#334106、Biolegend)を使用し、それに一致するアイソタイプ対照として、PEマウスIgG2a、κアイソタイプ対照FC(#400212、Biolegend)を使用した。ASGPR1受容体を染色するためにPE抗ヒトASGPR1(#130-122-963、Miltenyi)を使用し、それに一致するアイソタイプ対照としてPEマウスIgG1、アイソタイプ対照(#130-113-762、Miltenyi)を使用した。試料を4℃で30分間インキュベートした。その後、細胞を冷DPBS(Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>フリー、2%FBS)で2回洗浄し、DPBS(Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>フリー、2%FBS)中2%PFA溶液を用いて室温で20分間固定化した。細胞を冷DPBSで1回洗浄し、FACS分析のために1000μLの冷DPBS中に再懸濁した。Sysmex Cube 8フローサイトメトリーシステム(Sysmex)及びFACS Express 7 Research editionソフトウェアで試料を分析した。FACS分析の結果は、表A3にまとめられている。

20

30

## 【0711】

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

40

i. 用量投与及び生存段階。各群につき、到着しておよそ6~7週齢、投薬時には8~9週齢のC57BL/6J雄マウスを、処置群の場合は8匹(試験Aでは、ビヒクル対照群で14匹のマウス)で投与した。表A5及び表A6に従い、PBS中に製剤化した化合物又はPBS単独(ビヒクル)を、個々の体重に対応する用量容積で、尾静脈(静脈内、iv)に5mL/kgで投与した。適用可能な場合、三価(GalNAc)3-ApoBコンジュゲートの直後に三価GalNAc-SO1861(EMCH)を尾静脈(iv)に5mL/kgで同時投与した。動物を毎週計量し、最初の48時間以内は毎日2~3回、その後、試験が終了するまで少なくとも1日1回の臨床観察を実施した。

ii. 血清、肝臓組織、及び腎臓組織の採取。投与前(predose)及び指示され

50

た投与後（post-dose）時点（例えば、投与後の24時間、72時間、196時間、336時間、672時間）に血液を採取し、バイオマーカー分析のため、採取した血液から標準的な手順を用いて血清を生成した。関連する試験間の投与後の時点で、処置群当たりの時点当たり3匹の動物（試験Aのビヒクル対照群で6匹の動物）を殺して最終出血を収集し、更なる分析のために肝臓組織及び腎臓組織などの関連器官を収集した。試験終了時に、群当たり残りの2匹の動物（試験Aの対照群で4匹）を殺した。肝臓の半分と1つの腎臓とを冷凍し、組織RNA分析に使用した。

【0712】

【表8】

表 A5. 三価 GalNAc コンジュゲートのインビボ忍容性及び有効性の実験設計、試験 A

| 群  | コンジュゲート                              | 用量<br>[mg/kg] | 投与された相対<br>BNA 用量<br>[mg/kg] | 同時投与された<br>三価 GalNAc-<br>SO1861-<br>EMCH 用量<br>[mg/kg] |
|----|--------------------------------------|---------------|------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1  | PBS(ビヒクル)                            | N/A           | 0                            | N/A                                                    |
| 2  | ApoB#02 BNA                          | 0.1           | 0.1                          | N/A                                                    |
| 3  | ApoB#02 BNA                          | 1             | 1                            | N/A                                                    |
| 4  | ApoB#02 BNA                          | 2             | 2                            | N/A                                                    |
| 5  | (GalNAc)3-ApoB#02<br>BNA             | 0.1           | 0.054                        | N/A                                                    |
| 6  | (GalNAc)3-ApoB#02<br>BNA             | 1             | 0.54                         | N/A                                                    |
| 7  | (GalNAc)3-ApoB#02<br>BNA             | 0.01          | 0.0054                       | 5                                                      |
| 8  | (GalNAc)3-<br>ApoBBNA#02             | 0.1           | 0.054                        | 5                                                      |
| 9  | (GalNAc)3-SO1861<br>ApoB#02(EMCH)BNA | 1             | 0.44                         | N/A                                                    |
| 10 | (GalNAc)3-SO1861<br>ApoB#02(sc)BNA   | 1             | 0.44                         | N/A                                                    |

【0713】

10

20

30

40

50

## 【表 9】

表 A6. 三価 GalNAc コンジュゲートのインビボ忍容性及び有効性の実験設計、試験 B

| 群 | コンジュゲート                                | 用量<br>[mg/kg] | 投与された相対<br>BNA 用量[mg/kg] | 同時投与された<br>三価 GalNAc-<br>SO1861-EMCH<br>用量[mg/kg] |
|---|----------------------------------------|---------------|--------------------------|---------------------------------------------------|
| 1 | PBS(ビヒクル)                              | N/A           | 0                        | N/A                                               |
| 2 | ApoB#02 BNA                            | 2             | 2                        | N/A                                               |
| 3 | (GalNAc)3-<br>SO1861<br>ApoB#02(sc)BNA | 1             | 0.44                     | N/A                                               |
| 4 | (GalNAc)3-<br>SO1861<br>ApoB#02(sc)BNA | 0.1           | 0.044                    | N/A                                               |
| 5 | (GalNAc)3-<br>dSPT4-<br>ApoB#02(sc)BNA | 0.173         | 0.044                    | N/A                                               |
| 6 | (GalNAc)3-<br>dSPT8-<br>ApoB#02(sc)BNA | 0.265         | 0.044                    | N/A                                               |
| 7 | (GalNAc)3-<br>ApoB#02 BNA              | 1             | 1                        | 0.1                                               |
| 8 | (GalNAc)3-<br>ApoBBNA#02               | 0.1           | 0.1                      | 0.1                                               |

10

20

## 【0714】

## 肝臓組織のバイオマーカーRNA分析

製造業者の指示書に従い、TRIzol（登録商標）試薬（Thermo Scientific）を用いて、冷凍した肝臓組織からmRNAを単離した。iScript（商標）cDNA合成キット（Biorad）を用いて、cDNAへの変換を行った。ApoB発現レベルと特異的肝臓ハウスキーピング遺伝子のレベルを、表A4（試験A）及び表A7（試験B）にそれぞれ列挙した特異的DNAプライマーを含む、iTaq（商標）Universal SYBR（登録商標）Green Supermix（BioRad）及びLight Cycler 480（Roche Diagnostics、Roche Diagnostics、Switzerland）を使用する、定量的リアルタイムPCRアッセイ（qRT-PCR）を用いて測定した。apoBの発現を2つの肝臓特異的ハウスキーピング対照mRNAと比較して測定するため、 $\Delta C_t$ 法によって分析を行った。各分析反応を3回実施した。

30

## 【0715】

## 【表10】

表A7.肝臓組織のqPCR分析に使用したプライマー(試験B)

|          |     |                                    |
|----------|-----|------------------------------------|
| ApoB#02  | 順方向 | GCTAACAATAAGAACCAGAAGATC [配列番号:13] |
|          | 逆方向 | TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [配列番号:14]     |
| Mm RPS17 | 順方向 | GTGCGAGGAGATCGCCATTA [配列番号:19]     |
|          | 逆方向 | ATCCGCTTCATCAGATGCGT [配列番号:20]     |
| Mm PPIA  | 順方向 | GCGGCAGGTCCATCTACG [配列番号:15]       |
|          | 逆方向 | GCCATCCAGCCATTCAGTC [配列番号:16]      |

40

## 【0716】

50

#### バイオマーカ分析 apoBタンパク質

製造業者の指示書に従い、ApoB ELISA (ab230932、Abcam、Cambridge、UK) を用いて、マウス血清中のApoBタンパク質レベルを測定した。

【0717】

#### バイオマーカ分析 コレステロール

製造業者の指示書に従い、光度測定により、LDLコレステロールに特異的なBeckman Coulter社製の2段階のAU480アッセイキットをそれぞれ用いて、マウス血清中のLDLコレステロールを測定した。

【0718】

#### バイオマーカ分析 コレステロール

製造業者の指示書に従い、Beckman Coulter社製AU480アッセイキットを用いて（光度測定）、血清アラニントランスアミナーゼ（ALT）レベルを測定した。

【0719】

#### 結果

C57BL/6Jマウスにおける(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02のインビボ有効性（試験A）

試験Aでは、C57BL/6Jマウスを記載されているように処置し、表A5に従って投与した。この試験で使用されたコンジュゲート、(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02 (EMCH)、及び(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02 (sc)を、図35及び図38、図41及び図42に記載されるように生成した。臨床観察を記録し、有効性と忍容性とで異なるバイオマーカを分析した。

【0720】

図25に示すように、24時間後、apoBのRNAレベル、即ち遺伝子発現が、0.1mg/kgのApoB#02 BNA (ApoB#02) で処置した動物では著しく減少することがなく、1mg/kg又は2mg/kgのApoB#02 BNAをそれぞれ投与された群（全て各群につきn=3動物）では、ビヒクル投与群（n=5動物）と比較して約15%及び21%減少した。同様に、1mg/kgの用量（0.54mg/kgのApoB#02 BNAに相当する）の(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02では、24時間後の溶媒対照と比較してApoBの発現が約53%（n=3動物）減少したが、0.1mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02単独では、ビヒクルと比較して際立った減少が示されなかった（n=3）。対照的に、0.1mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02を5mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861と同時に投与した場合、apoBの発現がすでに24時間後には速やかに約69%（n=2動物）減少したが、0.01mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02では、5mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861と同時に投与した場合、ビヒクルと比較して、それでも16%（n=2動物）の小幅な減少を示している。最も注目すべきことには、1mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02 BNA（0.44mg/kgのApoB#02 BNAに対応）による処置の結果、投与の24時間後には既に対照と比較して(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02 BNA (EMCH) は約77%減少し、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02 BNA (sc) は90%減少した（両群において、各々、n=3匹の動物）。

【0721】

72時間後、投与された最高用量のApoB#02 BNA（2mg/kg）では、ビヒクル（n=5動物）と比較して39%（n=3動物）の最大の減少を示したが、1mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02では、apoB発現が68%（n=3動物）減少する結果となった。また、対照的に、10倍低い用量である0.1mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02を5mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861

10

20

30

40

50

と同時投与した場合、a p o Bの発現レベルが82%も減少する（n=3動物）結果となったが、0.1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02単独では、12%の減少（n=3動物）を示すに過ぎなかった。異なる1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N Aコンジュゲートによる処置の結果、（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N A（E M C H）については約76%の低下、（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N A（s c）については96%の低下がもたらされた（両群において、各々、n=3匹の動物）。効果は持続可能であり、336時間後のa p o Bの発現レベルが、2mg/kgのA p o B#2 B N Aの場合は30%（n=2動物）、及び1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02の場合は25%減少した。ペイロードが10倍少ない同時投与群（即ち、0.1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02+5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1）は依然として25%の減少を示した。異なる1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N Aコンジュゲートによる処置の結果、（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N A（E M C H）については約61%の低下、（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02 B N A（s c）については65%の低下がもたらされた（両群において、各々、n=3匹の動物）。結論として、ペイロードへのS O 1 8 6 1のコンジュゲーションは、効力を著しく改善する。

10

【0722】

図26が示すように、肝臓におけるa p o B R N Aの抑制的調節（図25に示す）はまた、血清中のa p o Bタンパク質の減少にも変換された。24時間後、a p o Bタンパク質レベルは、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02（n=8匹、54%）の両方について50%超低下し、同様に、同時投与群については、10倍少ない（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02+5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1、即ち0.1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02+5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（n=8匹、56%）で低下した。最も顕著には、それらは、対照と比較して、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（E M C H）群（n=8匹の動物、69%減少）及び1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（s c）群（n=8匹の動物、83%減少）について低下した（動物n=14）。72時間後、ビヒクル対照と比較して、全ての処置群がa p o Bタンパク質における低下を示したが、最も顕著な影響は、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（E M C H）群（n=5匹の動物、95%減少）及び1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（s c）群（n=5匹の動物、97%減少）について、又は、0.1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02を5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1と同時投与した場合に認められ、ほぼ90%のa p o B低下をもたらした（n=5匹の動物）。0.01mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02でさえも、5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1と同時投与した場合にA p o Bタンパク質を約25%減少させた（n=4動物）が、10倍高い用量の0.1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02は、投与して72時間後、単独でa p o Bタンパク質を35%減少させた（n=5動物）。この効果は持続的であり、分析した全ての処置群について、192時間後及び336時間後にもa p o Bタンパク質の減少が依然として観察可能であった；NB、0.1mg/kgのA p o B#02（196時間）、0.01mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B+5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（196時間及び336時間）、及び0についてのレベル。1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B+5mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（196時間）は報告されていない。192時間で、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02は47%の減少を示した（n=2匹の動物）が、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（E M C H）及び1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B#02（s c）は、それぞれ、87%及び90%の減少を示した（群当たりn=2匹の動物）。336時間で、1mg/kgの（G a l N A c）<sub>3</sub>-A p o B#02は28%の減少を示した（

20

30

40

50

n = 2 匹の動物) が、1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( E M C H )、及び 1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( s c ) は、なおもそれぞれ、66% 及び 65% の減少を示した ( 群当たり n = 2 匹の動物 )。

#### 【 0 7 2 3 】

図 2 7 が示すように、観察された血清 a p o B タンパク質の減少 ( 図 2 6 に示す ) は、血清 L D L コレステロール ( L D L - C ) レベルへと良好に変換された。24 時間後、L D L - C レベルは、ビヒクル ( n = 3 動物 ) と比較して、0.1、1、又は 2 mg / kg のいずれかの A p o B # 0 2 B N A で処置した動物 ( 各群につき n = 5 動物 ) では著しく減少しなかった。1 mg / kg の用量の標的化 ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 は、L D L - C をすでに 24 時間以内に平均で 2.7 mg / d L まで減少させたが ( n = 3 動物 )、即ち、これはビヒクル及び A p o B # 0 2 B N A 群と比較して 53% の減少であった。L D L - C の 24 時間以内の平均 2.7 mg / d L への同じ低下 ( n = 3 匹の動物 )、即ち、53% の低下が、L D L - C を 5 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 と同時投与する場合には 10 倍低い用量である 0.1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 で既に認められ、一方で、1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( E M C H ) 及び 1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( s c ) は、それぞれ、66% 及び 77% の低下を示した。72 時間後、A p o B # 0 2 B N A の最高用量 ( 2 mg / kg ) は、ビヒクル ( n = 5 匹の動物 ) と比較して、L D L - C における約 50% の低下 ( n = 3 匹の動物 ) を示したが、一方で 1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 は、72% 低下し ( n = 3 匹の動物 )、10 倍低い用量である 0.1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 + 5 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 は、更には 78% 低下した ( n = 3 匹の動物 )。1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( E M C H ) は 72% の低下を示したが、一方で 1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( s c ) では、L O D を超える L D L - C は測定可能なままでなく、即ち、対照と比較して、a p o B タンパク質における 100% の低下が認められた ( 全て n = 3 匹の動物 )。効果は永続的であり、336 時間後、L D L - C レベルは、2 mg / kg の A p o B # 0 2 B N A については約 40%、1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 及び 0.1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2 + 5 mg / kg ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 の同時投与群の両方については 48% 低下したままであり ( 全ての群について、n = 2 匹の動物 )、後者における投与されたペイロードに基づく 10 倍の改善された L D L - C 低下を示した。再び、最も顕著な低下が、74% の低下を伴った 1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( E M C H ) を有する群において観察され、1 mg / kg の ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( s c ) は 57% の低下を示した。

#### 【 0 7 2 4 】

結論として、これは、S O 1 8 6 1 との組合せにおいて、A p o B # 0 2 の効力が著しく増大し、a p o B RNA 抑制的調節、即ち C 5 7 B L / 6 J マウスの肝臓における遺伝子サイレンシング、並びに例えば、a p o B タンパク質及び L D L コレステロールなどの測定された効力の全ての「下流」血清バイオマーカを効果的に誘導していることを示す。

#### 【 0 7 2 5 】

C 5 7 B L / 6 J マウスにおける ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 のインビボ忍容性 ( 試験 A )

この試験で使用されたコンジュゲート、( G a l N A c )<sub>3</sub> - A p o B # 0 2、( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1、( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( E M C H )、及び ( G a l N A c )<sub>3</sub> - S O 1 8 6 1 - A p o B # 0 2 ( s c ) を、図 3 5、図 3 8、図 4 1、及び図 4 2) に記載されるように生成した。

#### 【 0 7 2 6 】

試験過程の間、表 A 5 に記載されるような全ての処置、用量、及び用法は、忍容性が良好であり、処置特有の有害な所見又はコンジュゲートが忍容性不良であることを示すあらゆる特有の臨床観察は示されなかった。処置群のマウスは、ビヒクルを与えられたマウスと同等に体重が増加した。血清 A L T レベルを測定し、結果を図 2 8 に示す。試験期間中、ビヒクル処置マウスの A L T レベルは各群につき平均で 4 7 ~ 6 1 U / L の範囲であった（溶媒では  $n = 5$  動物）。A L T のレベルは、異なる時点の異なる用量群で一時的に上昇し、時に各群で動物毎に変動が大きく、特定処置との相関又は用量相関を示さなかった（24 時間及び 72 時間の全ての群でそれぞれ  $n = 3$  だが、0.01 mg / kg の (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 + 5 mg / kg の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（両方の時点で  $n = 2$ ）を除く）。注目すべきことに、336 時間後、全ての投与群の A L T レベルがベースラインまで戻り、ビヒクル対照群と同等となった（全ての群で  $n = 2$ ）。

【0727】

10

結論として、このことは、A p o B # 0 2、(G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（単独で、又は (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 との組合せで）、並びに (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) 及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) が、適用される用量レジメンにおいて十分に耐容されること、特に、S O 1 8 6 1 含有コンジュゲート (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) 及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) の投与、並びに (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1 と (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 とのマウスとの同時投与が、即時の忍容性の問題を何ら有しておらず、一方では C 5 7 B L / 6 J モデルにおいて高い効力を示していることを示している。

20

【0728】

(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 のインビトロ効力

a p o B 標的化 B N A、A p o B # 0 2（配列番号 12）、及び S O 1 8 6 1-E M C H 又は S O 1 8 6 1-S C-M a l を、三価 G a l N A c ((G a l N A c)<sub>3</sub> にコンジュゲートして、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) 及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c)（図 3 5 及び図 3 8）、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1（図 4 1）及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 B N A（図 4 2）を生成し、初代ヒト肝細胞、並びに H e p G 2 (A S G P R<sup>+</sup>) 及び H u h 7 (A S G P R<sup>+</sup> / -) 細胞株に対して試験して、a p o B RNA レベルに対するそれらの影響を評価した。初代肝細胞では、この評価により、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) 及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) は、1 nM の I C 5 0（相対 A p o B # 0 2 B N A 濃度）を示したのに対して、S O 1 8 6 1 を有しない (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 B N A は 7 nM の I C 5 0（相対 A p o B # 0 2 B N A 濃度）を示し、RNA i-M A X による A p o B # 0 2 B N A トランスフェクションは I C 5 0 = 8 nM を示した。A p o B # 0 2 単独（トランスフェクション剤なし）は I C 5 0 = 400 nM を示したが、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1 は a p o B RNA レベルに何ら影響を及ぼさなかった（図 2 9 A）。この全てが、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 が、ヒト初代肝細胞における A p o B # 0 2 B N A の細胞質送達を増強することで、低 nM レベルの A p o B # 0 2 B N A オリゴにおいて約 10 倍の改善された効力をもたらすことを示している。

30

40

【0729】

H e p G 2 細胞 (A S G P R<sup>+</sup>) については、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) 及び (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) のみが、測定された濃度（それぞれ、I C 5 0 = 40 nM 及び I C 5 0 = 20 nM）で活性を示した（図 2 9 B）のに対して、H u h 7 細胞 (A S G P R<sup>+</sup> / -) では、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (E M C H) は I C 5 0 = 100 nM で活性を示し、(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) は I C 5 0 = 40 nM で活性を示した（図 2 9 C）。

50

## 【0730】

(GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4-ApoB#02及び(GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT8-ApoB#02のインビトロ効力

apoB標的化BNA、ApoB#02(配列番号12)、及びSO1861-EMCH又はSO1861-sc-Malを三価GalNAc((GalNAc)<sub>3</sub>)でコンジュゲートして(図1、図8)、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(EMCH)(図35)、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(sc)(図38)、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>4</sub>-ApoB#02(sc)((GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4-ApoB#02;図39)、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>8</sub>-ApoB#02(sc)((GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT8-ApoB#02;図40)、及び(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02BNA(図42)を生成し、コンジュゲートを初代ヒト肝細胞で試験して(図30)、apoB RNAレベルに対するそれらの影響を評価した。初代肝細胞では、この評価により、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>8</sub>-ApoB#02(sc)は1.5 nMのIC50(相対的コンジュゲート濃度)を示したのに対して、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(EMCH)、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(sc)、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>4</sub>-ApoB#02(sc)、又は(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02は、それほど強力ではなかった(5 nM~8 nMの間のIC50)ことが明らかにされた(図30)。これは、GalNAcコンジュゲート当たりのSO1861分子の増加した量がコンジュゲートの効力を増強し、それによって、apoB mRNAレベルを低下させるために必要とされるApoB#02 BNAペイロードの量を低下させることを示す。

10

20

## 【0731】

C57BL/6Jマウスにおける(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02のインビボ有効性(試験B)

試験Bでは、C57BL/6Jマウスを記載されているように処置し、表A6に従って投与した。この試験で使用したコンジュゲート、(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(sc)、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>4</sub>-ApoB#02(sc)、(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>8</sub>-ApoB#02(sc)、(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02、及び(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861を、図38、図39、図40、図41、図42に記載されるように生成した。臨床観察を記録し、有効性と忍容性とで異なるバイオマーカを分析した。

30

## 【0732】

図31が示すように、72時間後、apoB RNAレベル、即ち遺伝子発現が、ベンチマークである2 mg/kgのApoB#02 BNAにより処置される動物において低下した(対照から53%)が、しかしながら、それぞれ(1 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-ApoB#02+0.1 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861)及び1 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(sc)により投与される群においては更にいっそう低下し(それぞれ、ビヒクル対照の24%及び21%まで)、このことは、SO1861をコンジュゲートに加える場合に著しく改善された効力を示した(群当たり、n=3匹の動物)。更に、ペイロード当たりのサポニンを増加させる場合、0.1 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-SO1861-ApoB#02(sc)に含有される同じペイロード用量(0.044 mg/kgのApoB#02 BNA)に対応する、10倍少ないペイロード(0.173 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>4</sub>-ApoB#02(sc)(端的には、図31では、簡潔にするために0.1 mg/kgと称される)であって、別名(GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4-ApoB#02(sc)、又は0.265 mg/kgの(GalNAc)<sub>3</sub>-d(SO1861)<sub>8</sub>-ApoB#02(sc)、別名GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT8-ApoB#02(sc))を投与するが、それぞれ4倍及び8倍多いSO1861を投与することによって、apoB発現は、それぞれ74%及び38%まで減少したが、一方で0.1 mg/kgの

40

50

(G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) については対照の 8 9 % であり、サポニンの増加がコンジュゲートの効力を著しく増加させることを示した。サポニン量の減少 (0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1 (s c) + 0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2) は効力がより低かった (ビヒクルと比較して 7 1 % の a p o B 発現)。3 3 6 時間後、発現の抑制的調節の効果は、1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) 用量群において依然として維持され、ビヒクル対照の 4 9 % であった (n = 3 匹のマウス)。

#### 【0733】

図 3 2 が示すように、肝臓における a p o B R N A の抑制的調節 (図 3 1 に示す) はまた、血清中の a p o B タンパク質の減少にも変換された。投与前レベルは、群間で 1 5 6 μ g / m L ~ 1 9 8 μ g / m L の範囲であった (群当たり n = 8)。投与後 7 2 時間で、a p o B タンパク質レベルは、ベンチマークである 2 mg / k g の A p o B # 0 2 B N A により処置される動物において低下した (ビヒクル対照の 1 5 6 μ g / m L と比較して平均 5 7 μ g / m L) が、しかしながら、それぞれ (1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 + 0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1) 及び 1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) により投与される群においては更にいっそう低下し (それぞれ、ビヒクル対照の 1 8 μ g / m L 及び 2 1 μ g / m L まで)、このことは、S O 1 8 6 1 をコンジュゲートに加える場合に著しく改善された効力を示した (群当たり、n = 8 匹の動物)。R N A レベルと同様に、ペイロード当たりのサポニンを増加させる場合、0.1 7 3 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-d (S O 1 8 6 1) 4-A p o B # 0 2 (s c) 又は 0.2 6 5 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-d (S O 1 8 6 1) 8-A p o B # 0 2 (s c) をそれぞれ投与することによって、血清 a p o B タンパク質は、それぞれ 8 9 μ g / m L 及び 5 0 μ g / m L まで減少したが、一方で 0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) については 1 4 1 μ g / m L であったことで、サポニンの増加は、a p o B タンパク質を減少させる際のコンジュゲートの効力を著しく増加させることを示した。サポニン量の減少 (0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1 (s c) + 0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2) により、効力が低下した (1 2 2 μ g / m L の a p o B タンパク質)。3 3 6 時間後、タンパク質減少の影響は、ビヒクル対照における 1 4 3 μ g / m L と比較して、1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) 用量群において依然として保持され、5 9 μ g / m L であった (全ての群において n = 5 匹のマウス)。6 7 2 時間で、A p o B タンパク質レベルは、全ての群において 1 0 0 μ g / m L ~ 1 5 2 μ g / m L の間で変動した (n = 2 匹のマウス)。

#### 【0734】

図 3 3 が示すように、観察された血清 a p o B タンパク質の減少 (図 3 2 に示す) は、血清 L D L コレステロール (L D L - C) レベルへと良好に変換された。投与後 7 2 時間で、L D L - C レベルは、ベンチマークである 2 mg / k g の A p o B # 0 2 B N A により処置される動物において低下した (ビヒクル対照の 4 mg / d L と比較して 2 mg / d L) が、しかしながら、それぞれ (1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-A p o B # 0 2 + 0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1) 及び 1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) により投与される群においては更にいっそう低下し (それぞれ、0.7 mg / d L 及び 1.3 mg / d L まで)、このことは、S O 1 8 6 1 をコンジュゲートに加える場合に著しく改善された効力を示した (群当たり、n = 3 匹の動物)。R N A 及び a p o B タンパク質レベルと同様に、ペイロード当たりのサポニンを増加させる場合、それぞれ 0.1 7 3 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-d (S O 1 8 6 1) 4-A p o B # 0 2 (s c) 又は 0.2 6 5 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-d (S O 1 8 6 1) 8-A p o B # 0 2 (s c) を投与することによって、L D L - C は、それぞれ 2.3 mg / d L 及び 1.3 mg / d L まで低下したが、一方で、0.1 mg / k g の (G a l N A c)<sub>3</sub>-S O 1 8 6 1-A p o B # 0 2 (s c) に

いては  $4.3 \text{ mg/dL}$  であったことで、サポニンの増加は、 $\text{LDL-C}$  を低下させる際のコンジュゲートの効力を著しく増加させることを示す。サポニン量の減少 ( $0.1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861(sc)} + 0.1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-ApoB\#02}$ ) は、効力がより低かった ( $3.7 \text{ mg/dL}$  の  $\text{LDL-C}$ )。336 時間後、 $\text{LDL-C}$  低下の影響は、 $1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861-ApoB\#02(sc)}$  用量群 ( $2 \text{ mg/dL}$ ;  $n=3$  匹の動物) 及び ( $1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-ApoB\#02} + 0.1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861}$ ) において依然として保持され、この場合、 $3.3 \text{ mg/dL}$  であった ( $n=3$  匹の動物)。効果の持続性を示す; 672 時間で、 $\text{LDL-C}$  レベルは、全ての模索 (groups) において  $3 \sim 4 \text{ mg/dL}$  の間で変動した ( $n=2$  匹のマウス)。  
【0735】

10

結論として、これは、 $\text{SO1861}$  との組合せにおいて、 $\text{ApoB\#02}$  の効力が著しく増大し、 $\text{apoB RNA}$  抑制的調節、即ち  $\text{C57BL/6J}$  マウスの肝臓における遺伝子サイレンシング、並びに例えば、 $\text{apoB}$  タンパク質及び  $\text{LDL}$  コレステロールなどの測定された効力の全ての「下流」血清バイオマーカーを効果的に誘導していることを示す。

【0736】

$\text{C57BL/6J}$  マウスにおける  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861-ApoB\#02}$  のインビボ忍容性 (試験 B)

この試験で使用したコンジュゲート、 $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861-ApoB\#02(sc)}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)4-ApoB\#02(sc)}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)8-ApoB\#02(sc)}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-ApoB\#02}$ 、及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861}$  を、図 38、図 39、図 40、図 41、図 42 に記載されるように生成した。

20

【0737】

試験過程の間、表 A 6 に記載されるような全ての処置、用量、及び用法は、忍容性が良好であり、処置特有の有害な所見又はコンジュゲートが忍容性不良であることを示すあらゆる特有の臨床観察又は肉眼的な臓器形態は示されなかった。処置群のマウスは、ビヒクルを与えられたマウスと同等に体重が増加した。血清  $\text{ALT}$  レベルを測定し、結果を図 34 に示す。 $\text{ALT}$  のレベルは、 $0.173 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)4-ApoB\#02(sc)}$  群において 72 時間で一過性に増大するように見えたが、しかしながら、投与後 336 時間までにビヒクル対照のレベルに戻った; 同様に、 $\text{ALT}$  のレベルは、 $0.265 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)4-ApoB\#02(sc)}$  群において増大したが、投与後のより遅い時点においてビヒクルレベルに戻った。注目すべきことに、 $1 \text{ mg/kg}$  の  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861-ApoB\#02(sc)}$  が、最大 336 時間までの投与後の上昇を示したが、しかしながら、672 時間での  $166 \text{ U/L}$  で測定された ( $n=2$  匹のマウス)。

30

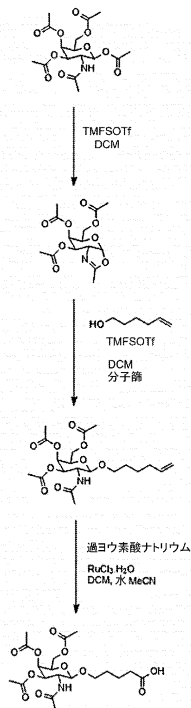
【0738】

結論として、このデータは、サポニンコンジュゲートが、適用される用量及び用量レジメンにおいて十分に忍容性であること、特に、 $\text{SO1861}$  含有コンジュゲート  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861-ApoB\#02(sc)}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)4-ApoB\#02(sc)}$ 、及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-d(SO1861)8-ApoB\#02(sc)}$  の投与、並びに  $(\text{GalNAc})_3\text{-SO1861}$  と  $(\text{GalNAc})_3\text{-ApoB\#02}$  との同時投与が、即時の忍容性の問題を何ら有しない一方で、 $\text{C57BL/6J}$  マウスモデルにおいて高い効力を示すことを示す。

40

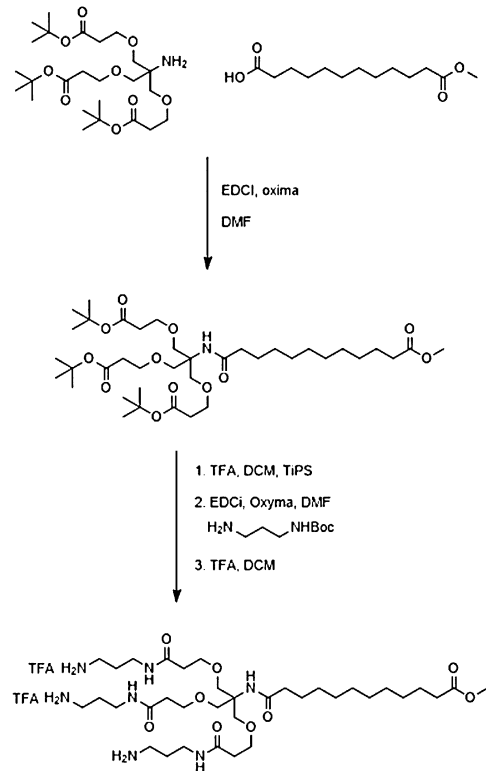
【図面】

【図 1 A】

図1  
A

【図 1 B】

B

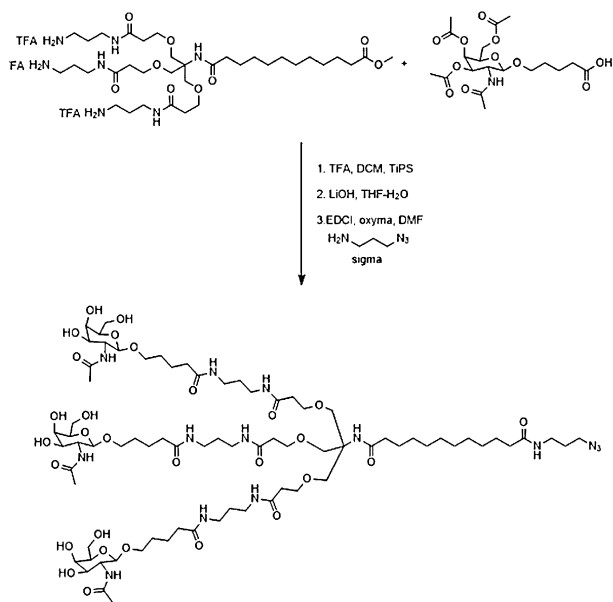


10

20

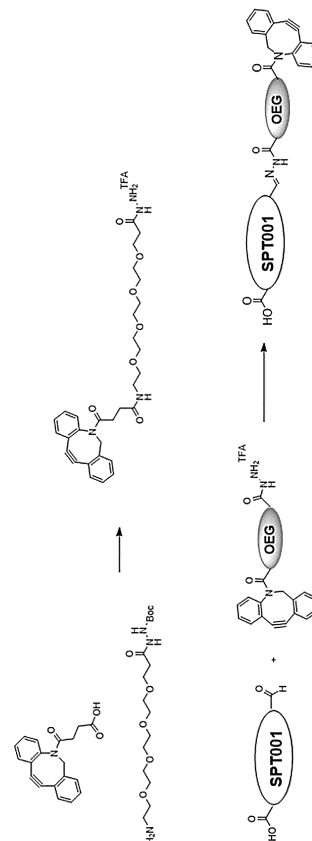
【図 1 C】

C



【図 2 A】

A



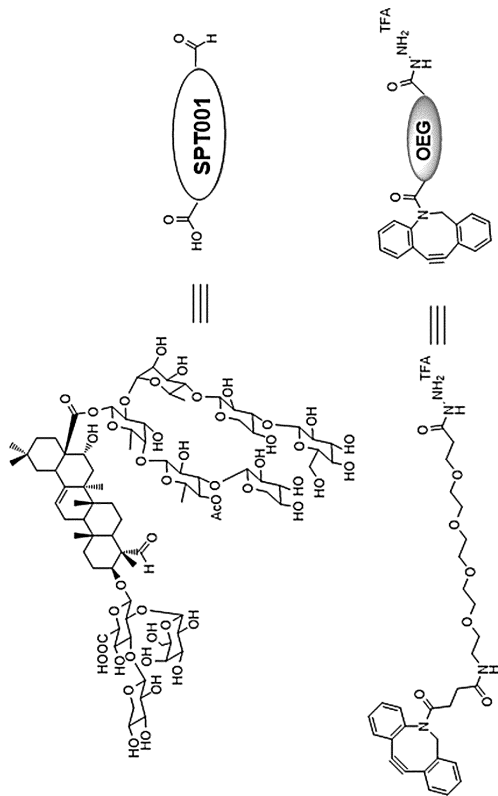
30

40

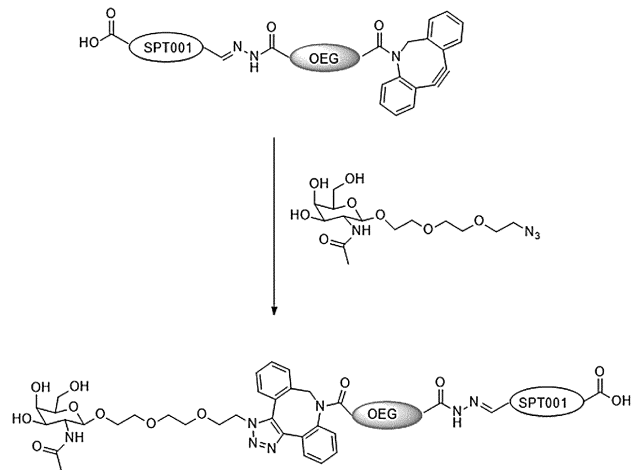
50

【図 2 B】

B



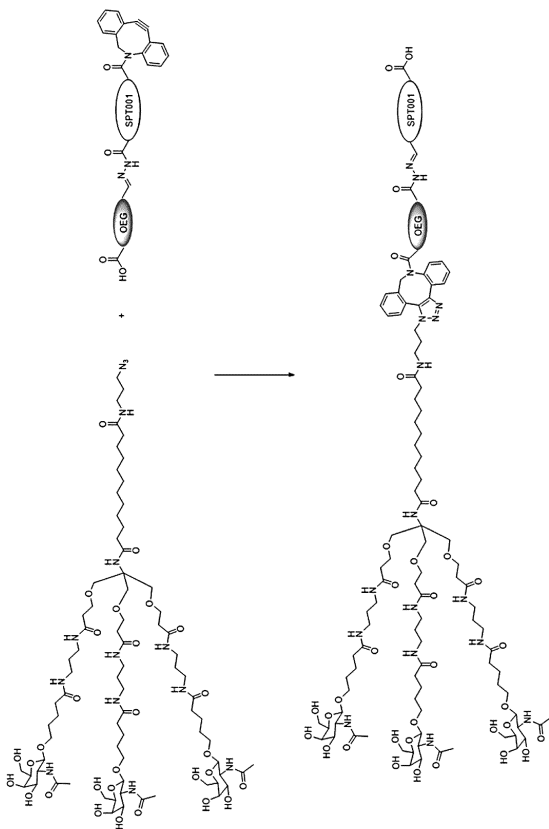
【図 3】



10

20

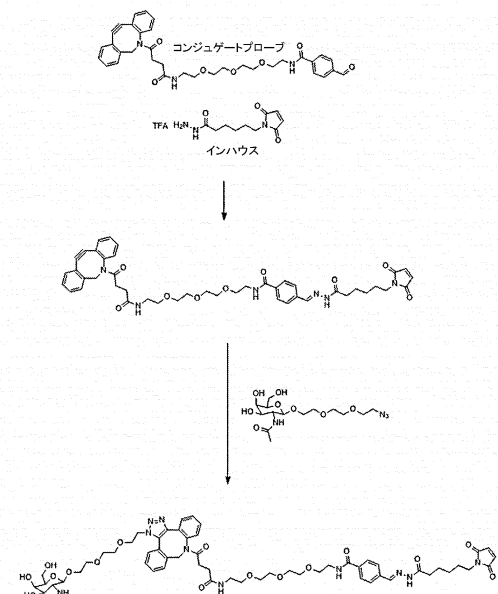
【図 4】



【図 5 A】

図5

A



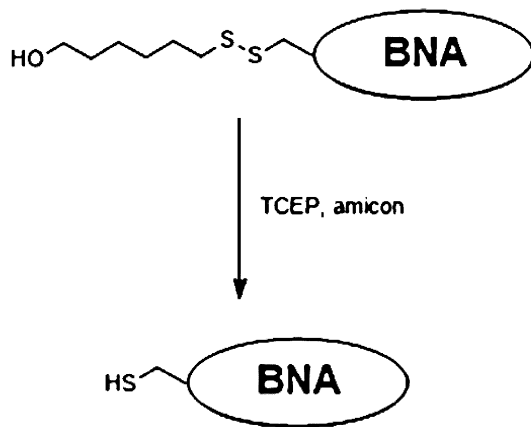
30

40

50

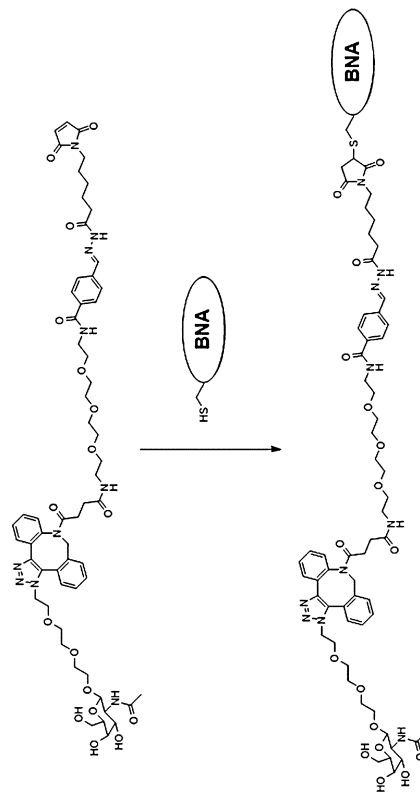
【図 5 B】

B



【図 5 C】

C

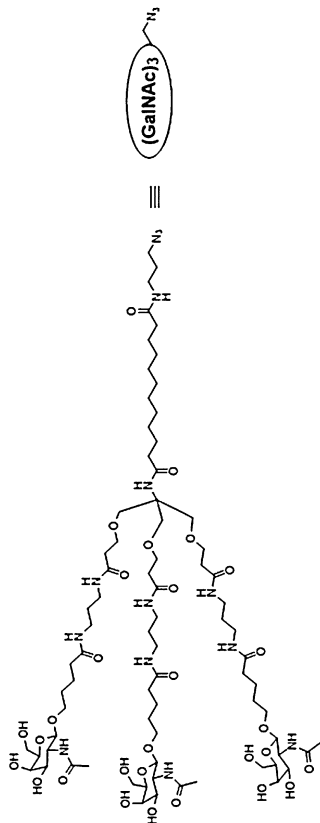


10

20

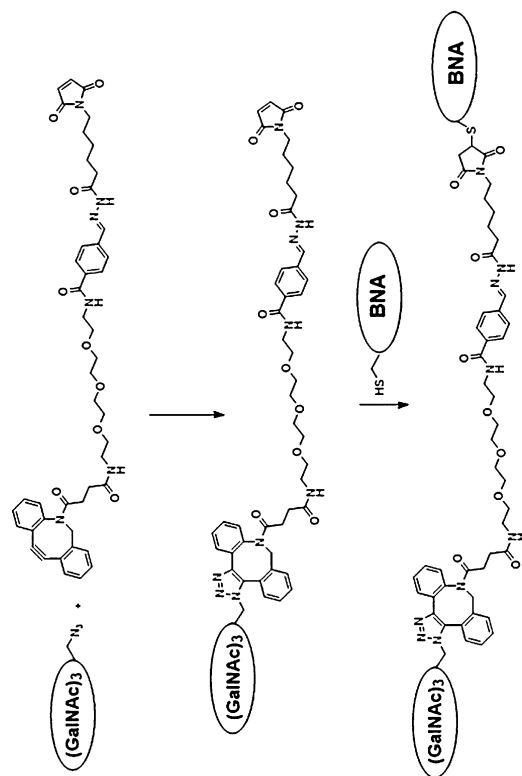
【図 6 A】

A



【図 6 B】

B

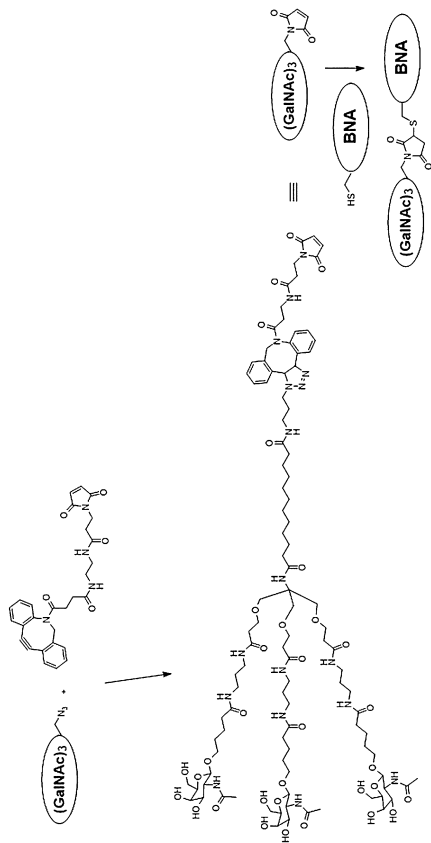


30

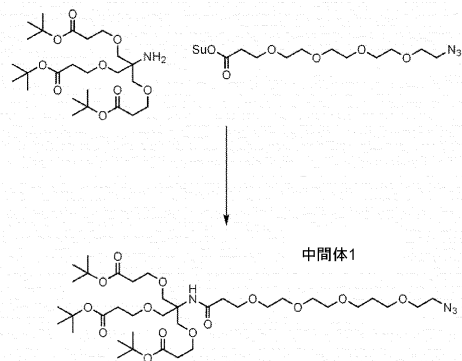
40

50

【図 7】



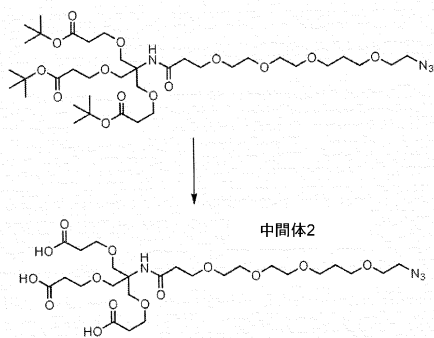
【図 8 A】

図8  
A

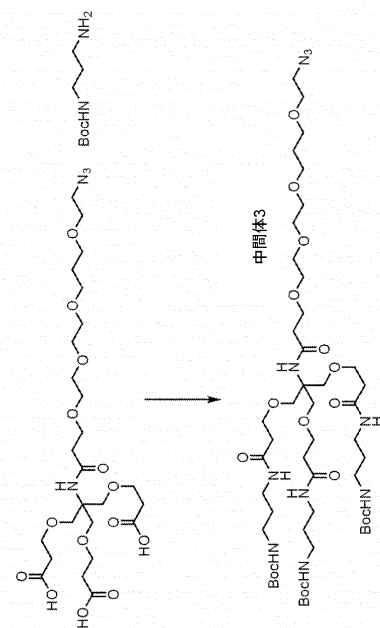
10

20

【図 8 B】

図8  
B

【図 8 C】

図8  
C

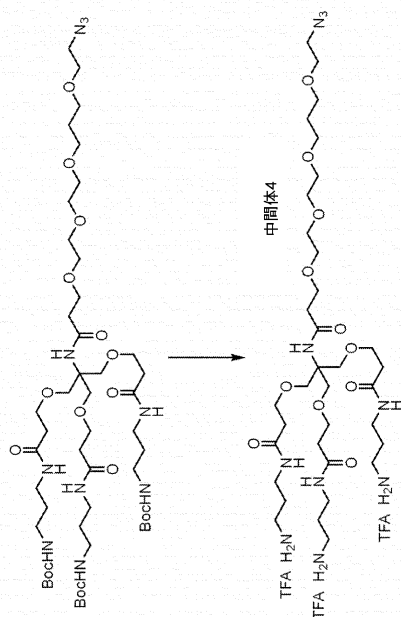
30

40

50

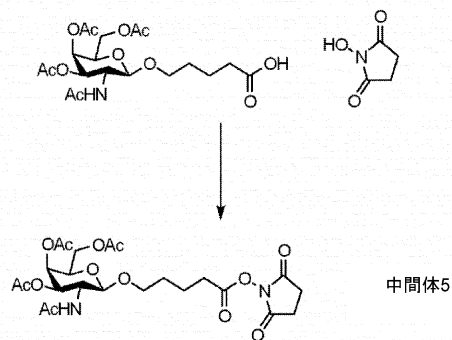
【図 8 D】

図8  
D



【図 8 E】

図8  
E

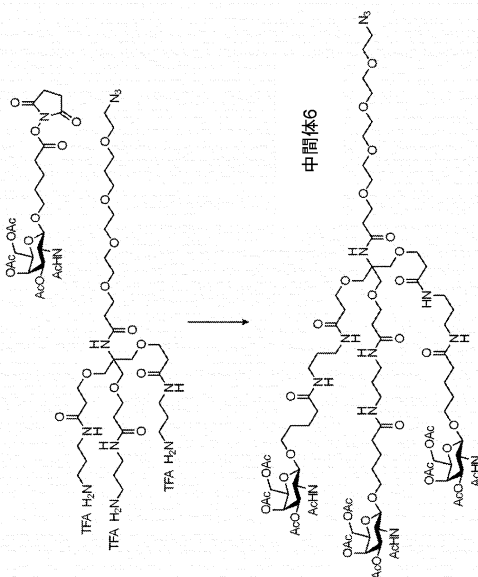


10

20

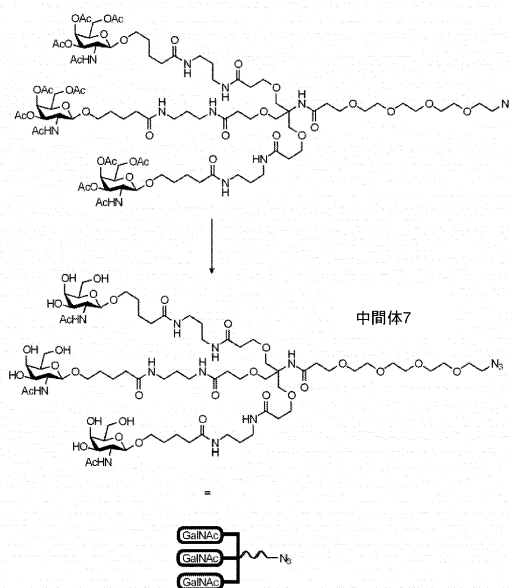
【図 8 F】

図8  
F



【図 8 G】

図8  
G



30

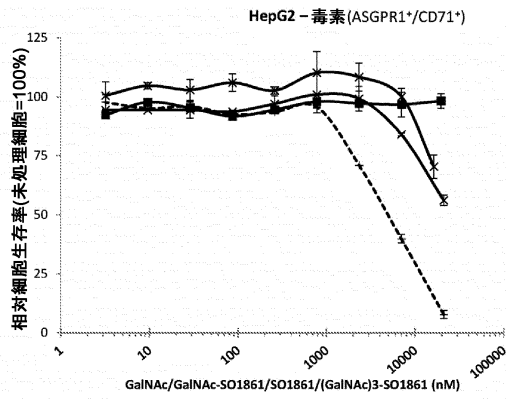
40

50

【図 9 A】

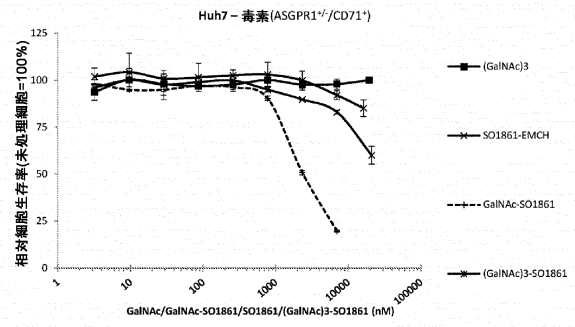
図9

A



【図 9 B】

B

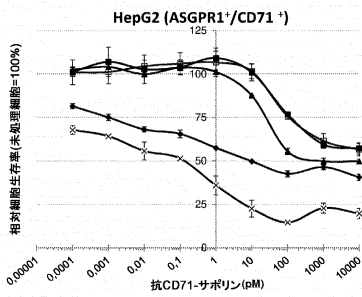


10

【図 10 A】

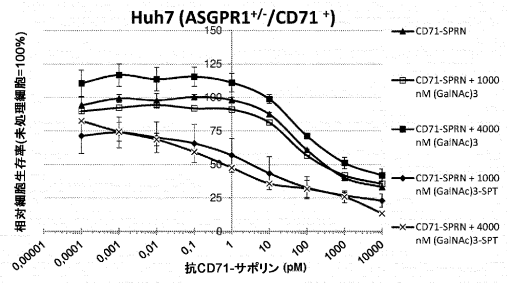
図10

A



【図 10 B】

B



20

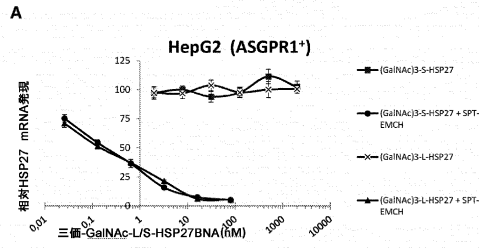
30

40

50

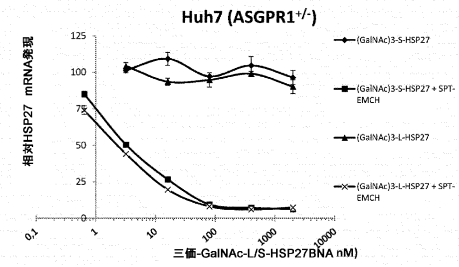
【図 1 1 A】

図11



【図 1 1 B】

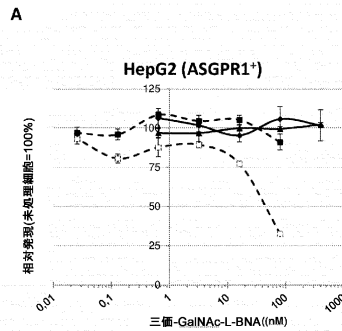
B



10

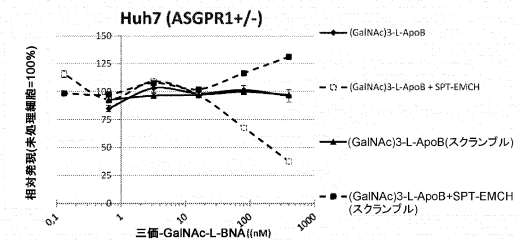
【図 1 2 A】

図12



【図 1 2 B】

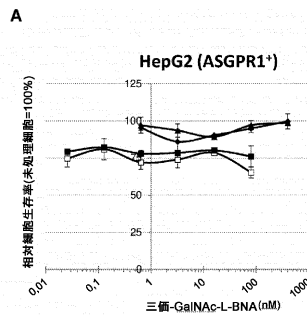
B



20

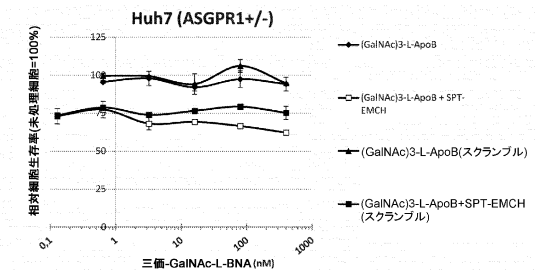
【図 1 3 A】

図13



【図 1 3 B】

B



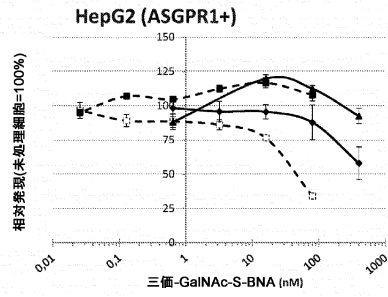
30

40

50

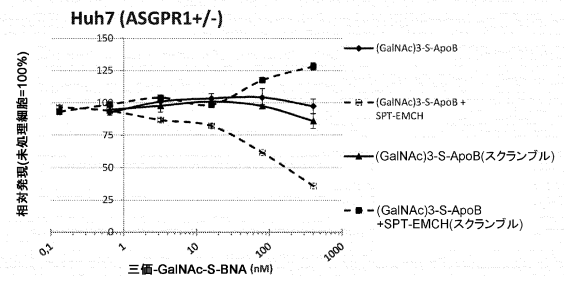
【図 1 4 A】

図14  
A



【図 1 4 B】

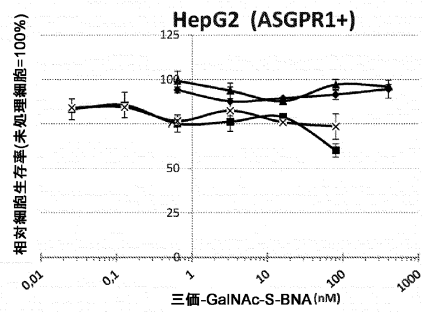
B



10

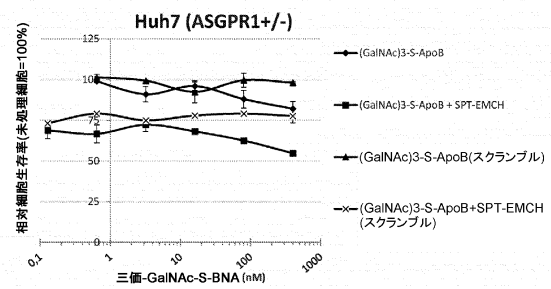
【図 1 5 A】

図15  
A



【図 1 5 B】

B



20

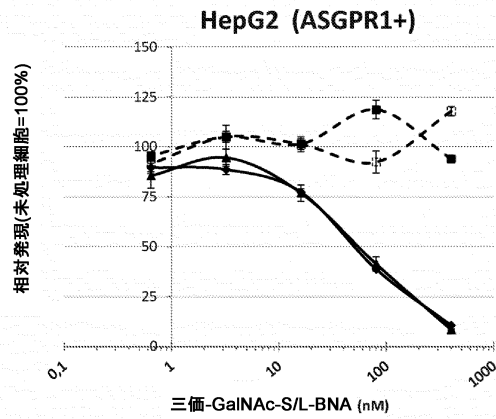
30

40

50

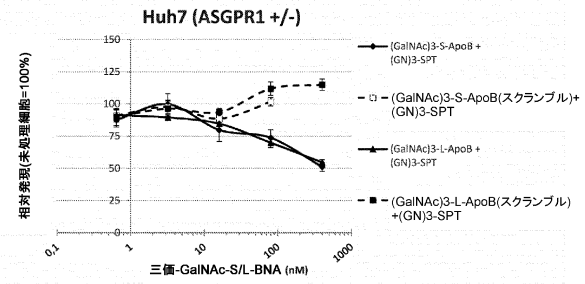
【図 16 A】

図 16  
A



【図 16 B】

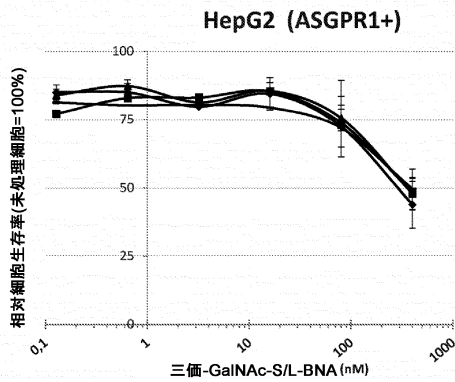
B



10

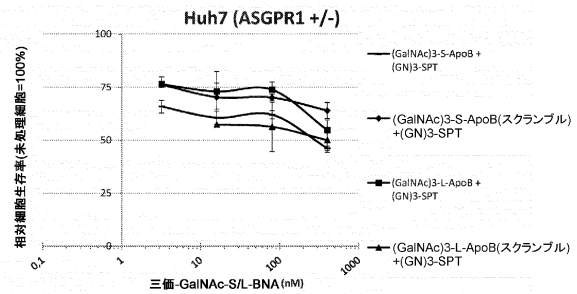
【図 16 C】

図 16  
C



【図 16 D】

図 16  
D



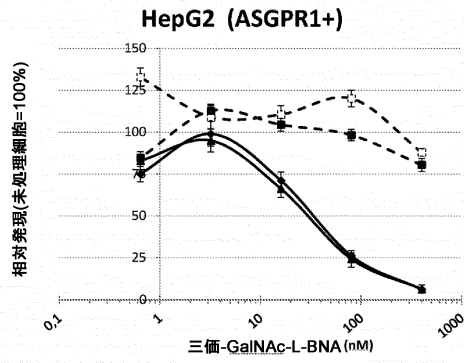
20

30

40

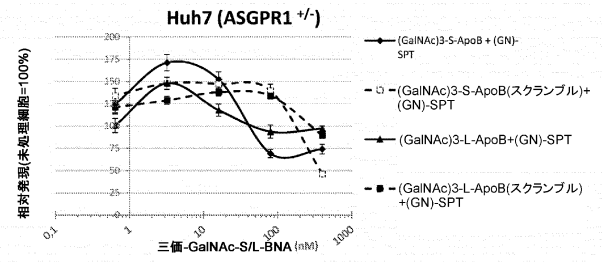
50

【図 17 A】

図17  
A

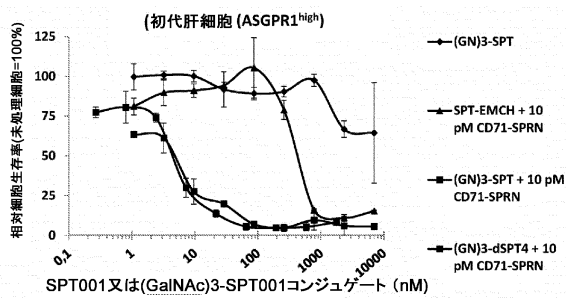
【図 17 B】

B



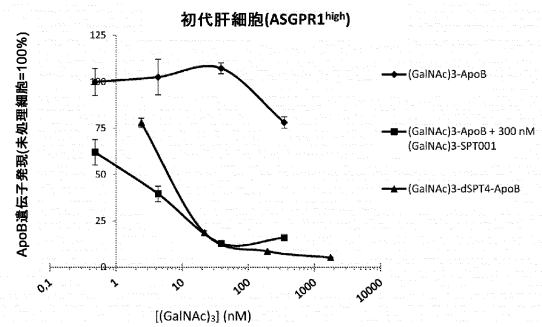
10

【図 18 A】

図18  
A

【図 18 B】

B



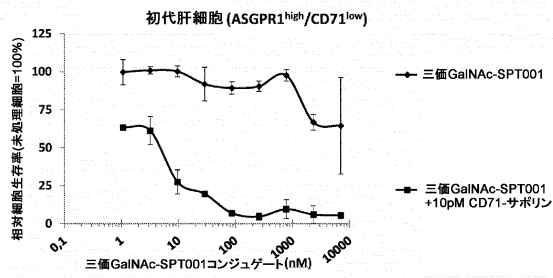
20

30

40

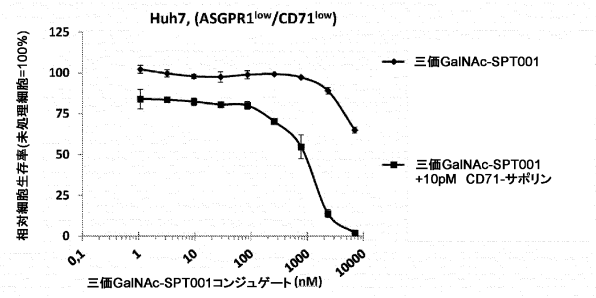
50

## 【図 19 A】

図 19  
A

## 【図 19 B】

B

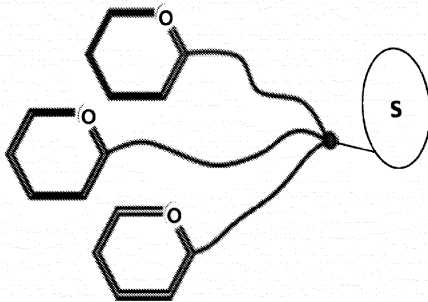


10

## 【図 19 C】

図 19  
C

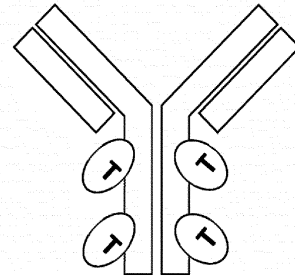
三価GalNAc-SPT001コンジュゲート



## 【図 19 D】

D

抗CD71抗体-サボリンコンジュゲート



20

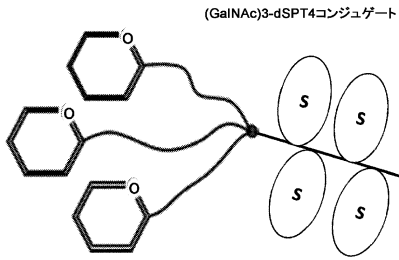
30

40

50

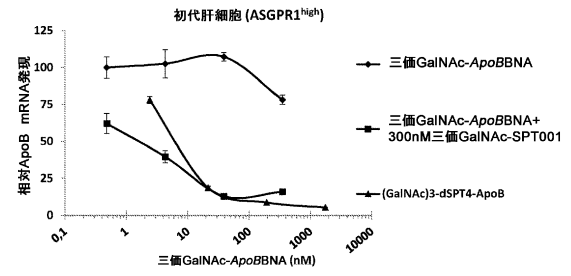
【図 19 E】

図19  
E



【図 20 A】

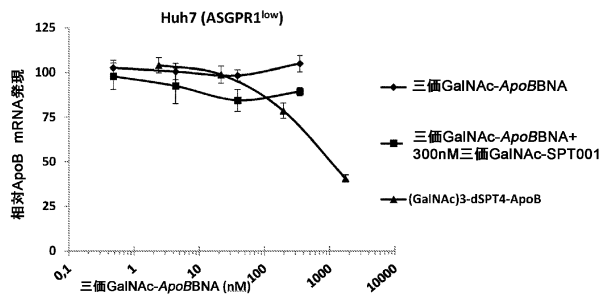
図20  
A



10

【図 20 B】

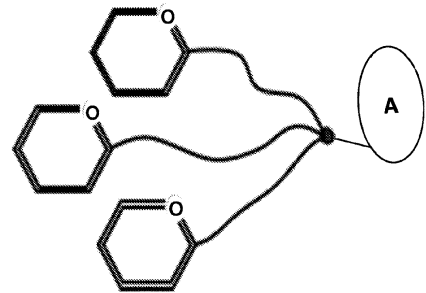
B



【図 20 C】

図20  
C

三価GalNAc-ApoBBNAコンジュゲート



30

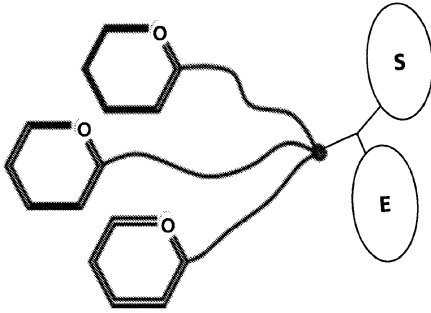
40

50

【図 20 D】

D

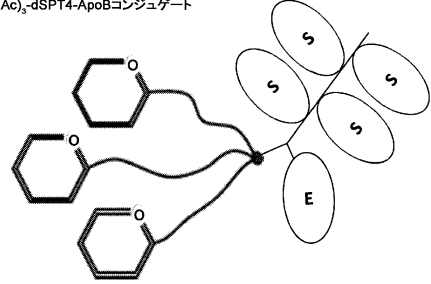
三価GalNAc-ApoBBNA-SPT001コンジュゲート



【図 20 E】

図20  
E

(GalNAc)<sub>3</sub>-dSPT4-ApoBコンジュゲート

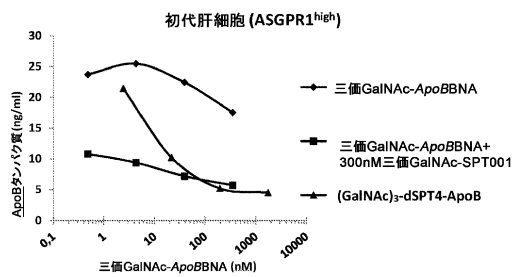


10

20

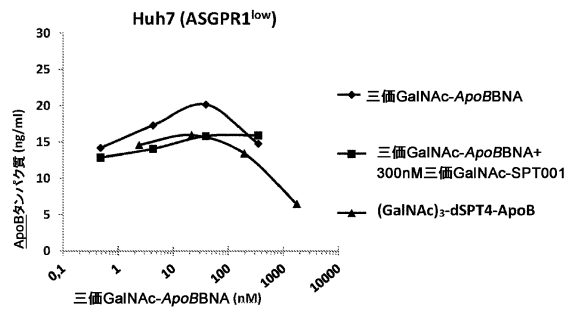
【図 21 A】

図21  
A



【図 21 B】

B



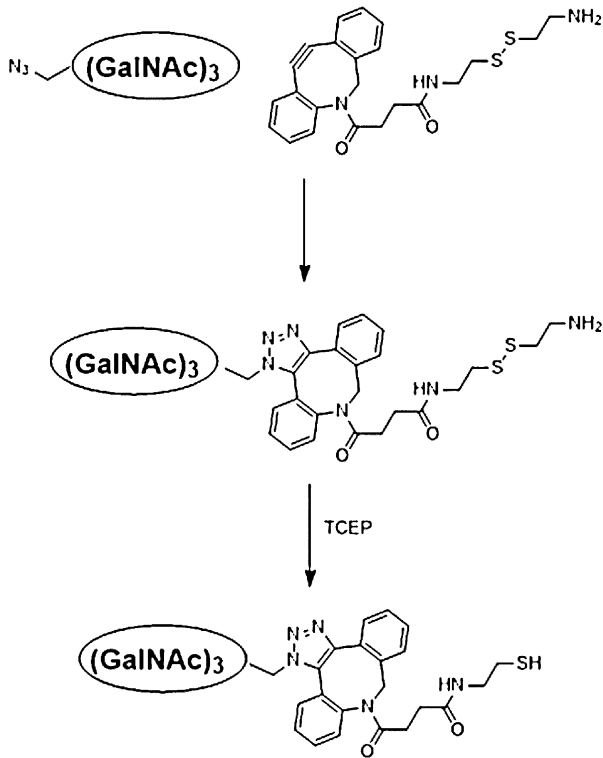
30

40

50

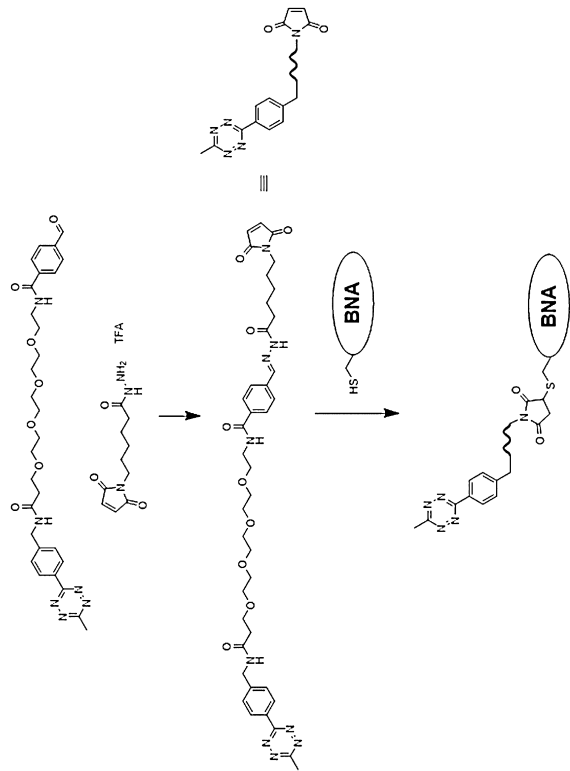
## 【図 2 2 A】

A



## 【図 2 2 B】

B

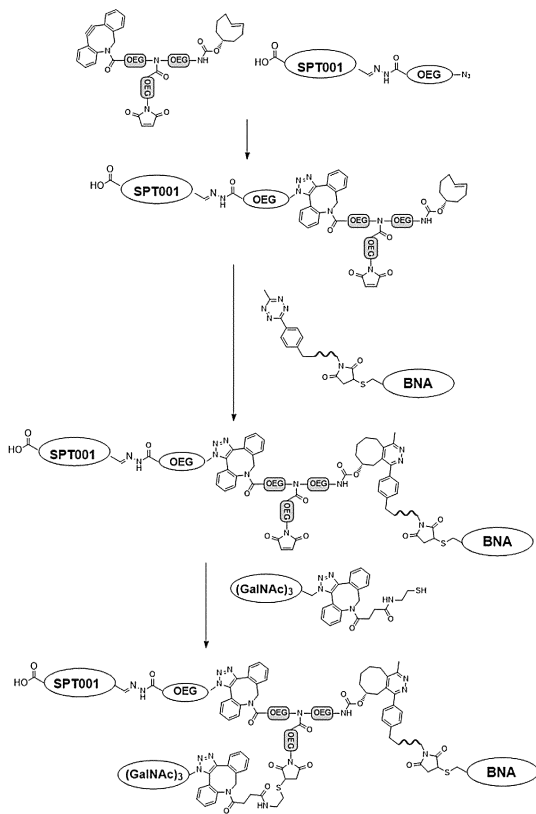


10

20

## 【図 2 2 C】

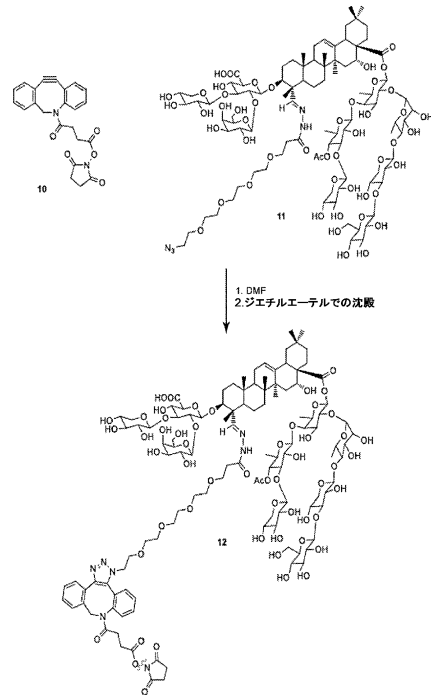
C



## 【図 2 3 A】

図23

A

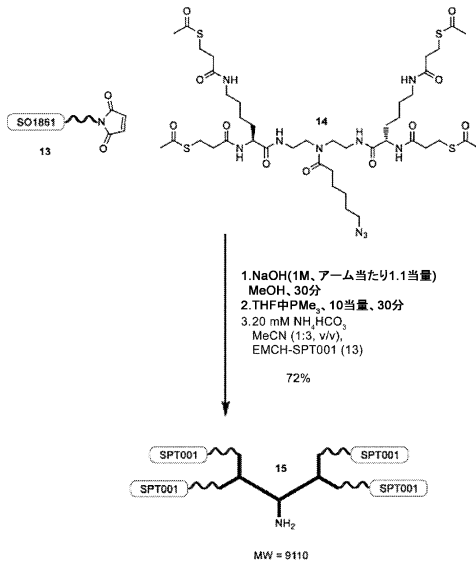


30

40

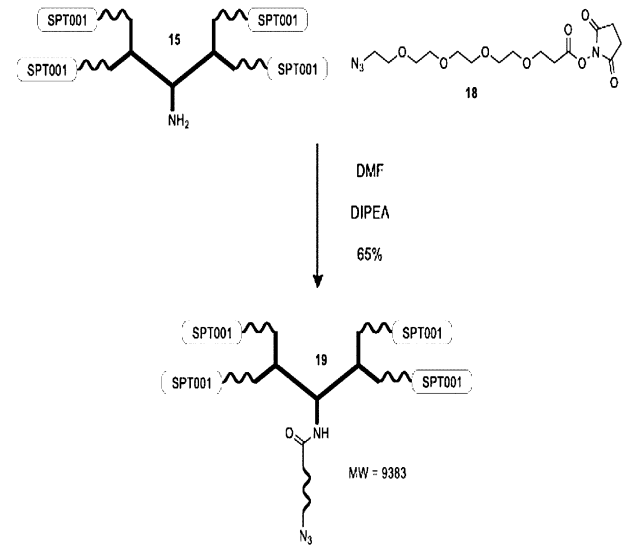
50

## 【図 2 3 B】

図23  
B

## 【図 2 3 C】

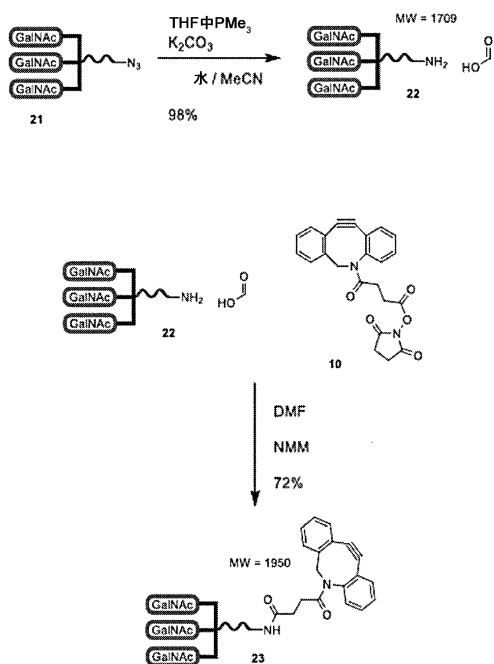
C



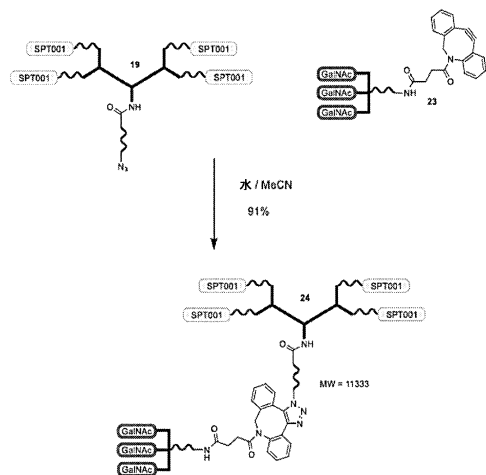
10

20

## 【図 2 3 D】

図23  
D

## 【図 2 3 E】

図23  
E

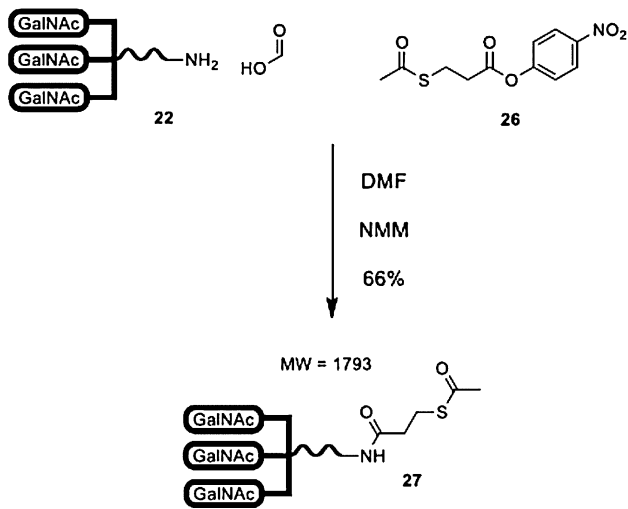
30

40

50

## 【図 24 A】

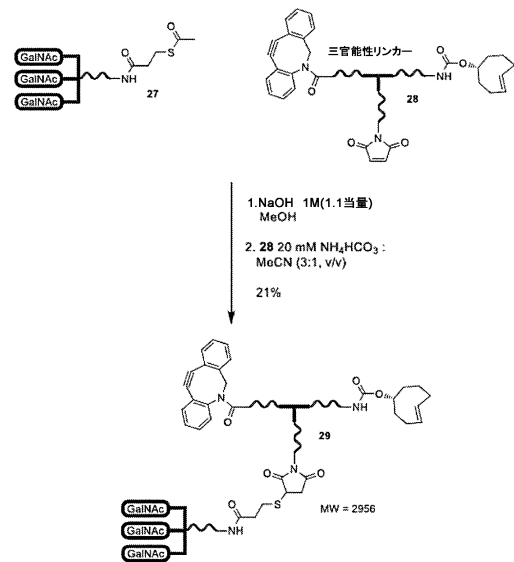
A



## 【図 24 B】

図24

B

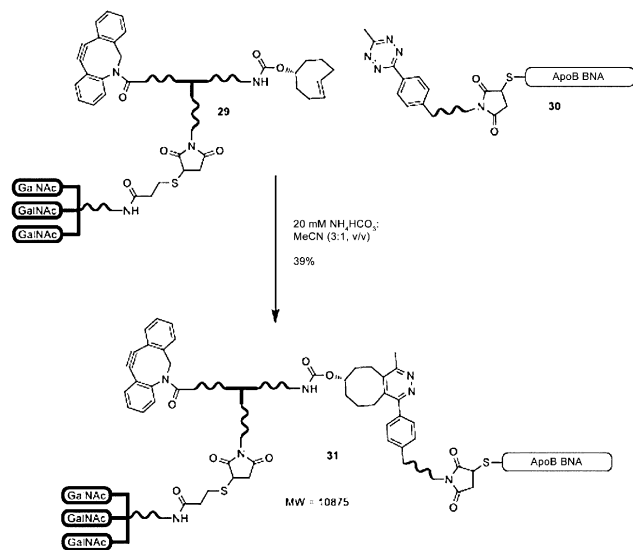


10

20

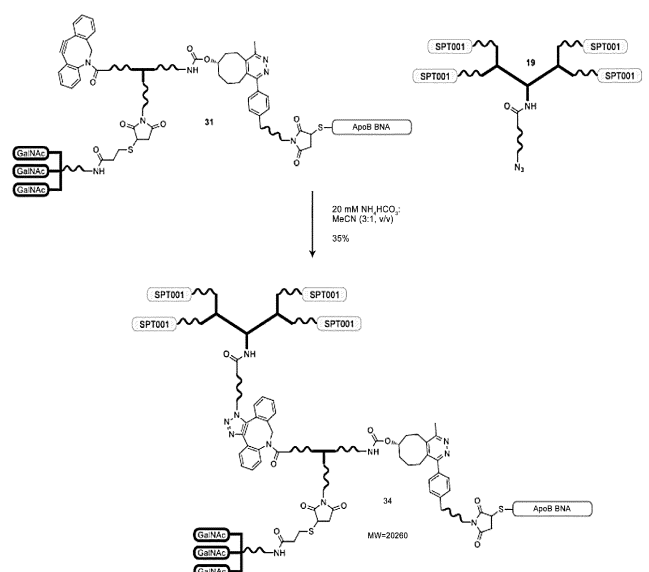
## 【図 24 C】

C



## 【図 24 D】

D



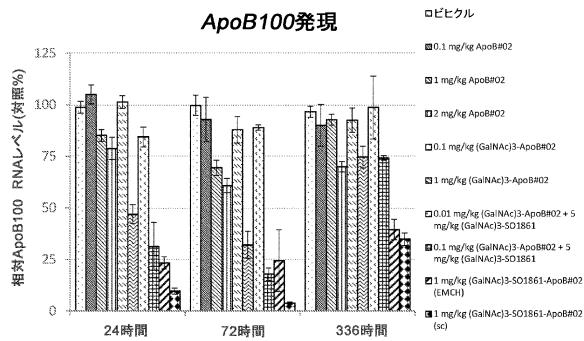
30

40

50

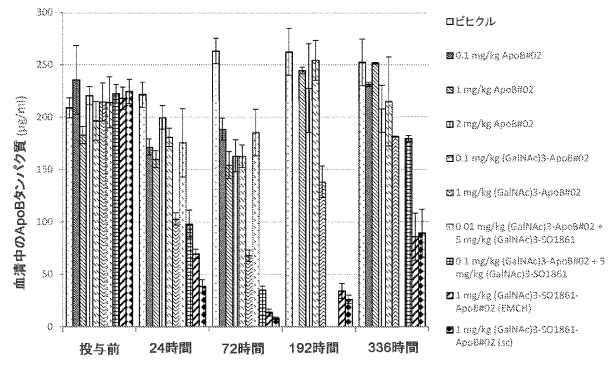
【図 25】

図25



【図 26】

図26

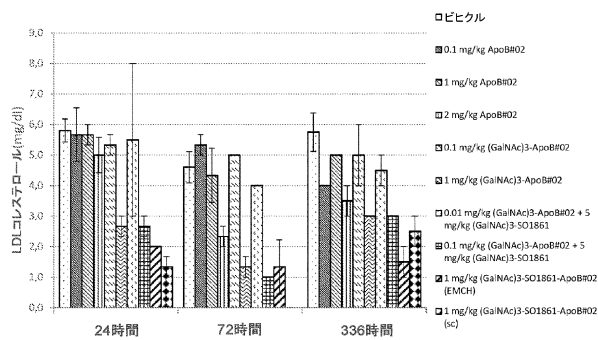


10

20

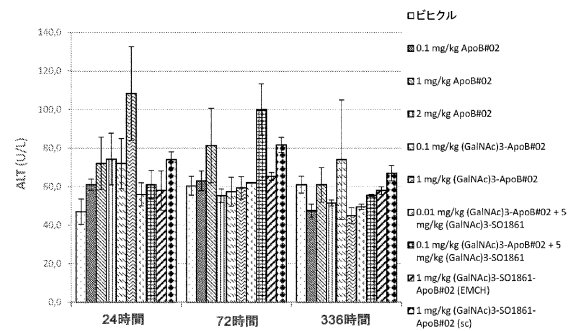
【図 27】

図27



【図 28】

図28



30

40

50

【図 29 A】

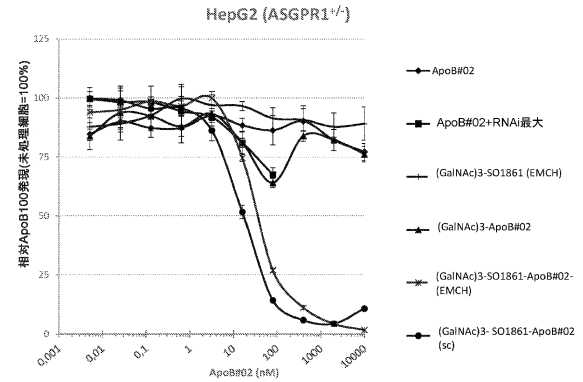
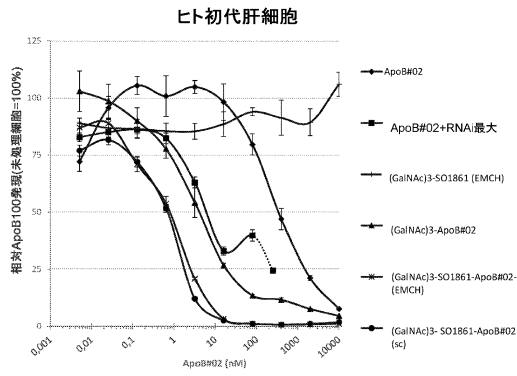
【図 29 B】

図29

B

図29

A



10

20

【図 29 C】

【図 30】

図29

C

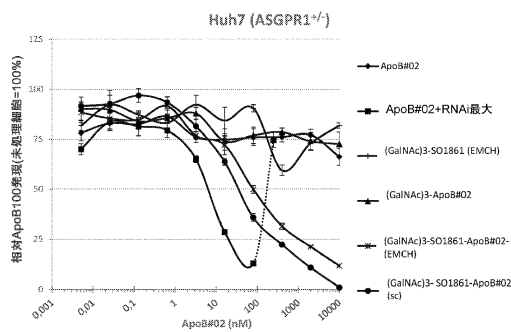
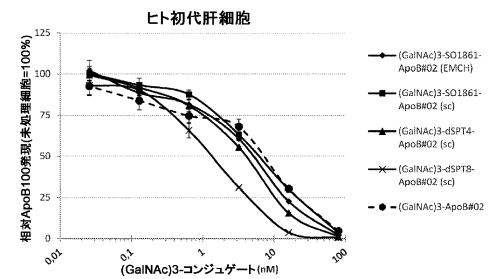


図30



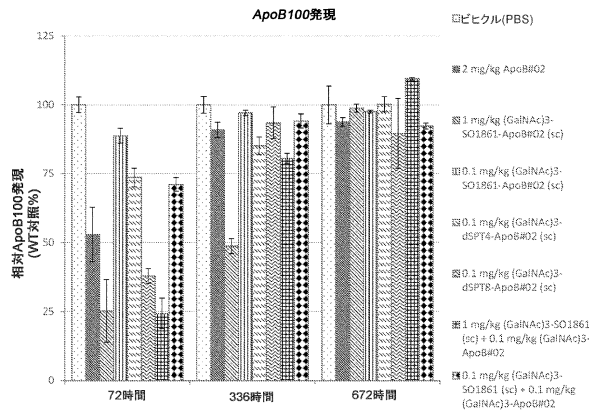
30

40

50

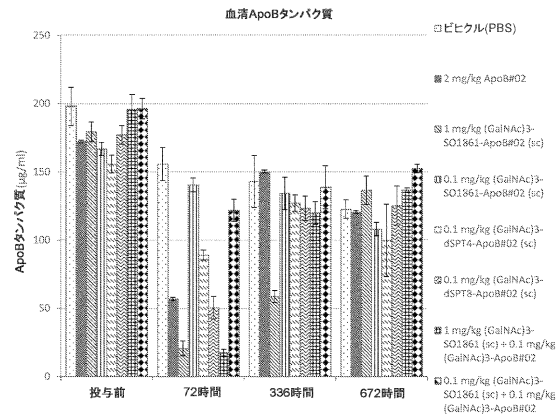
【図 3 1】

図31



【図 3 2】

図32

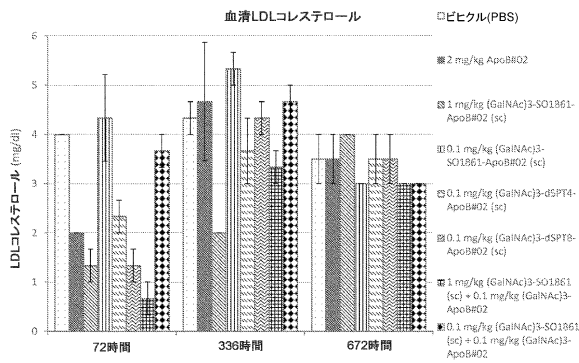


10

20

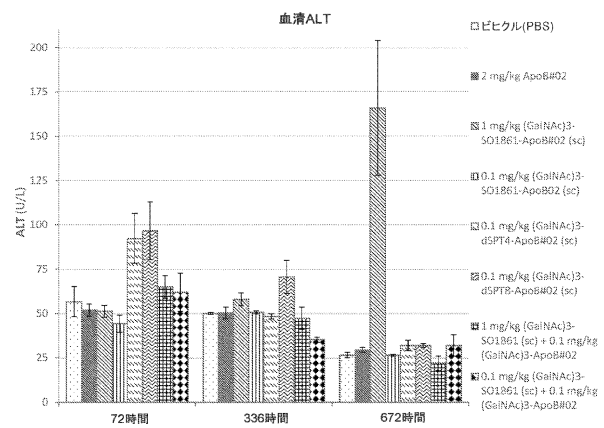
【図 3 3】

図33



【図 3 4】

図34

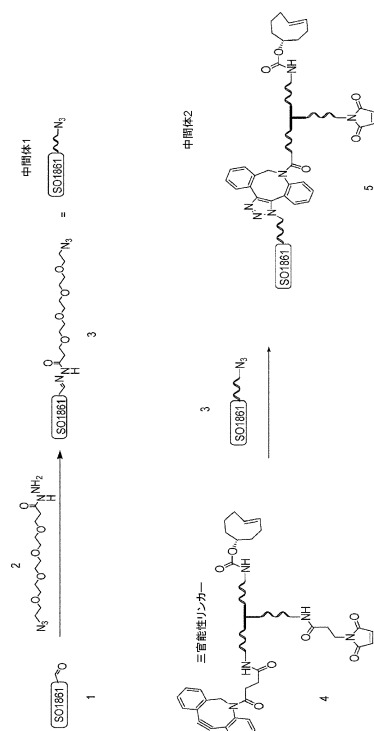


30

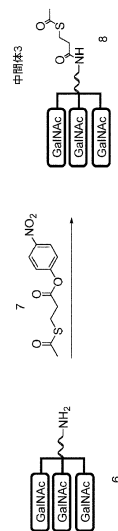
40

50

【図 3 5 A】

図 35  
A

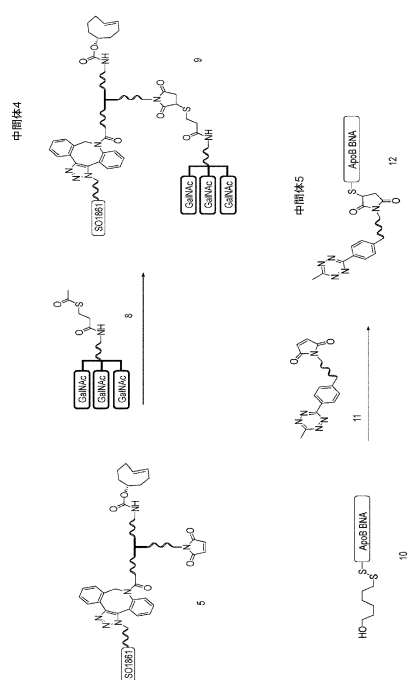
【図 3 5 B】

図 35B  
B

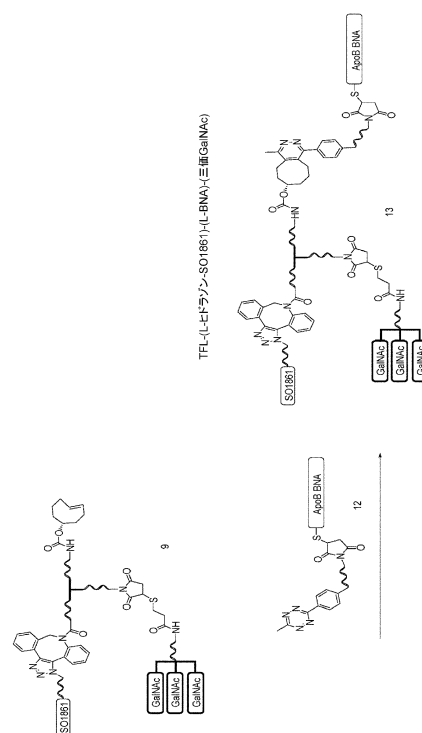
10

20

【図 3 5 C】

図 35C  
C

【図 3 5 D】

図 35D  
D

30

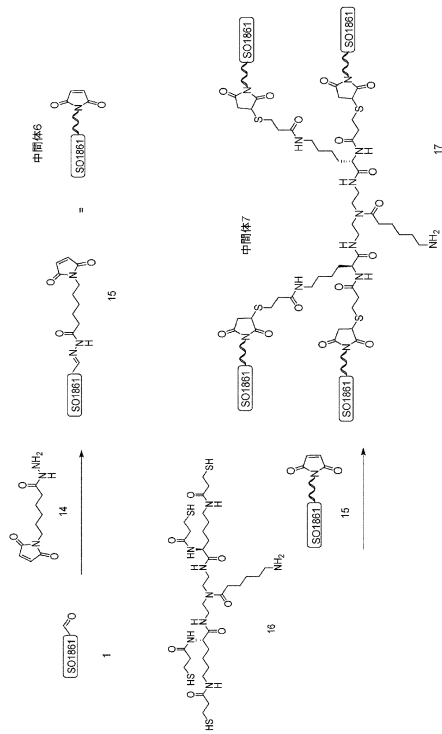
40

50

## 【図 3 6 A】

図36A

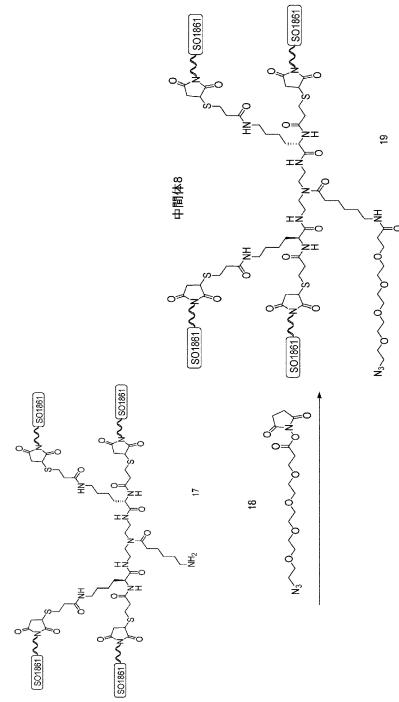
A



## 【図 3 6 B】

図36B

B



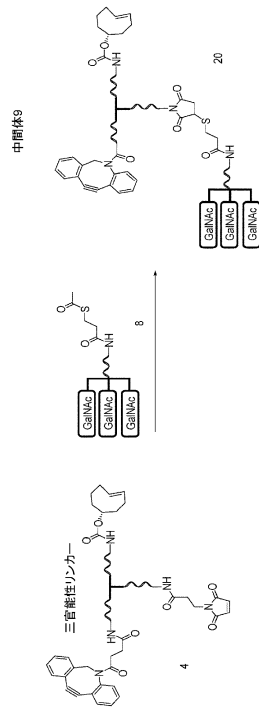
10

20

## 【図 3 6 C】

図36C

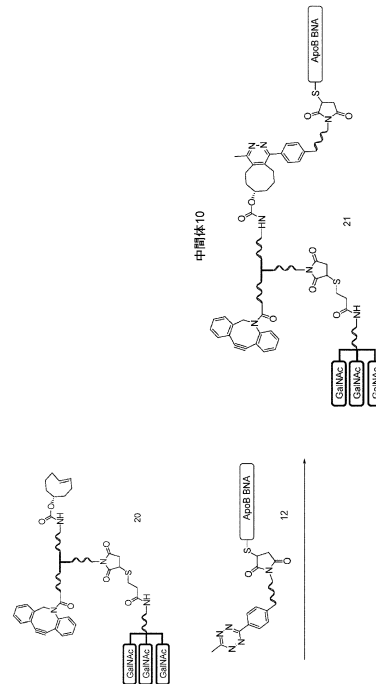
C



## 【図 3 6 D】

図36D

D

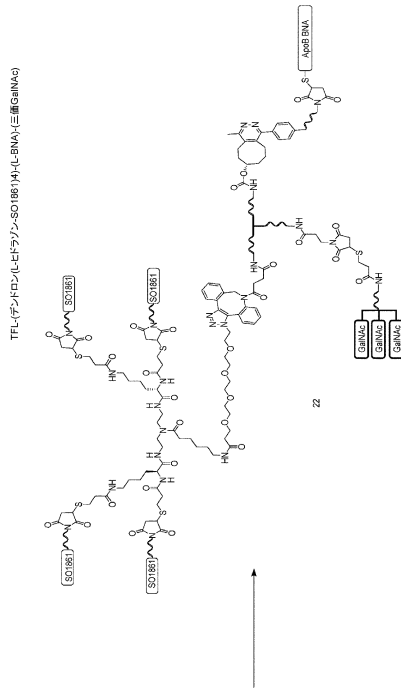


30

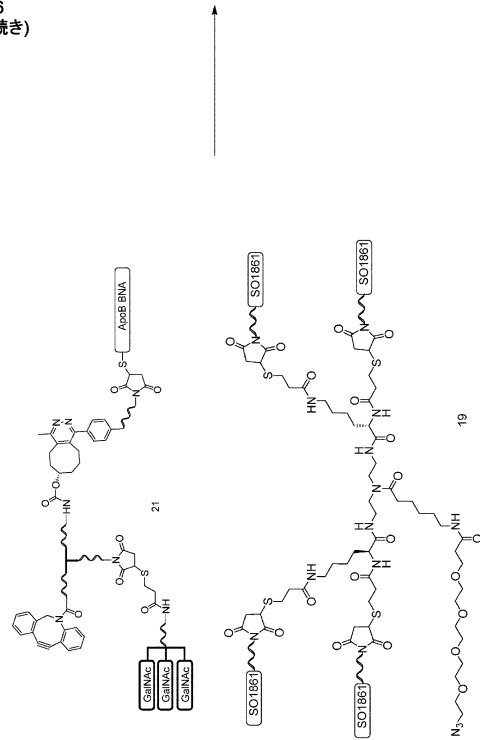
40

50

## 【図 36 E - 1】

図36  
E

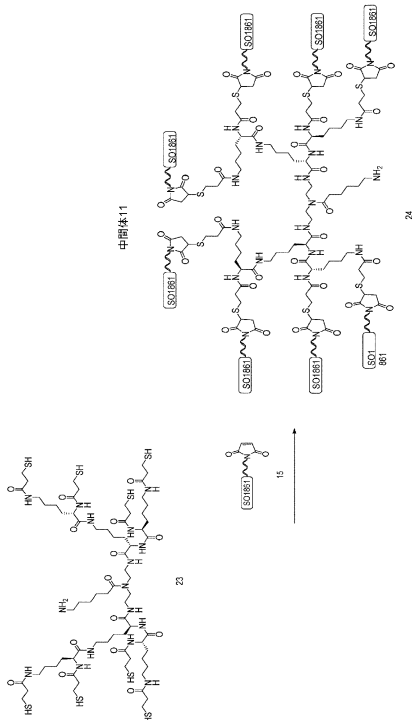
## 【図 36 E - 2】

図36  
E (続き)

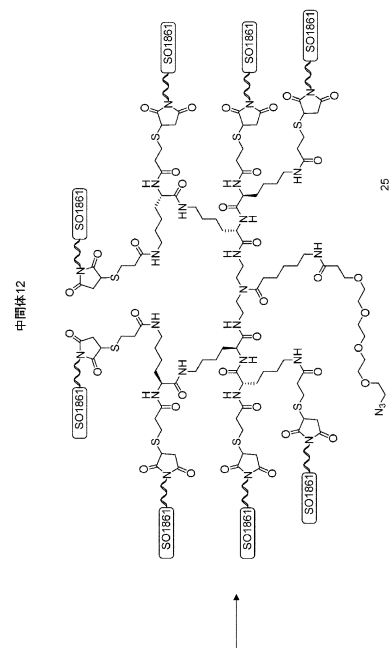
10

20

## 【図 37 A】

図37  
A

## 【図 37 B - 1】

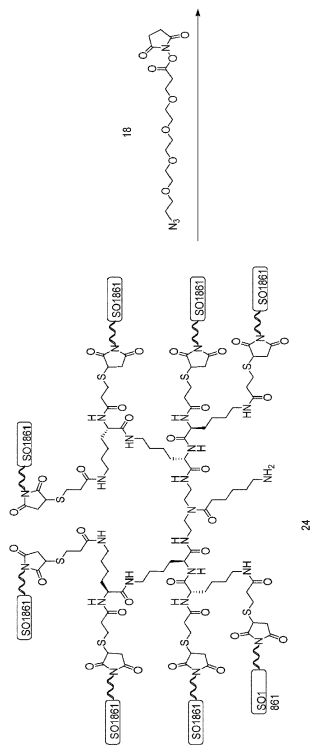
図37  
B

30

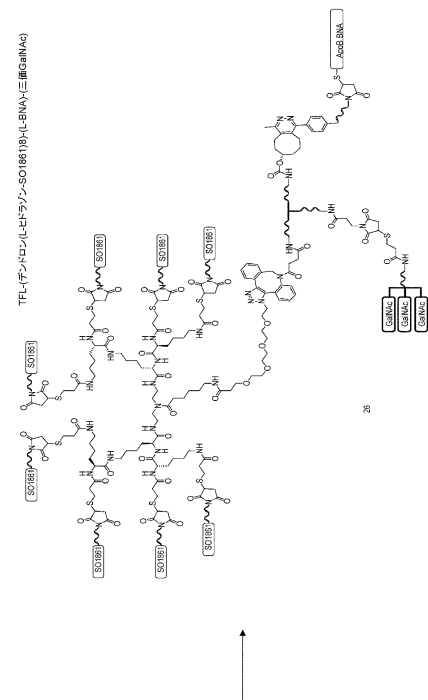
40

50

【図 3 7 B - 2】

図37  
B (続き)

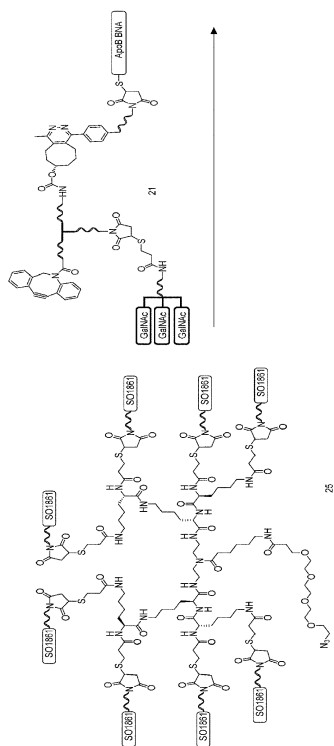
【図 3 7 C - 1】

図37  
C

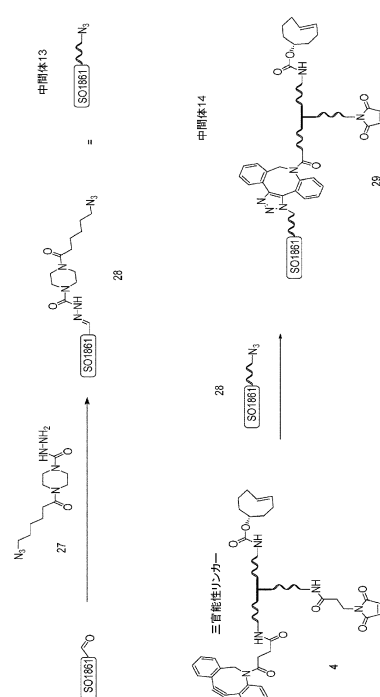
10

20

【図 3 7 C - 2】

図37  
C (続き)

【図 3 8 A】

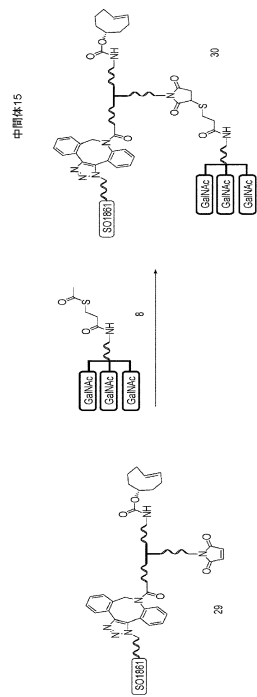
図38  
A

30

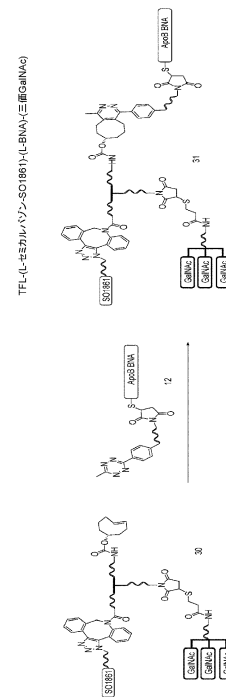
40

50

【図 38 B】

図38  
B

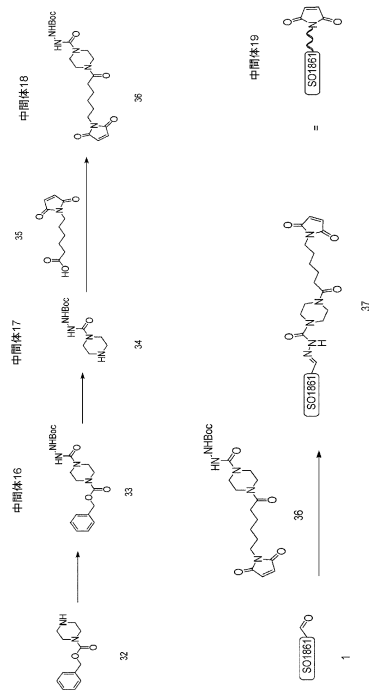
【図 38 C】

図38  
C

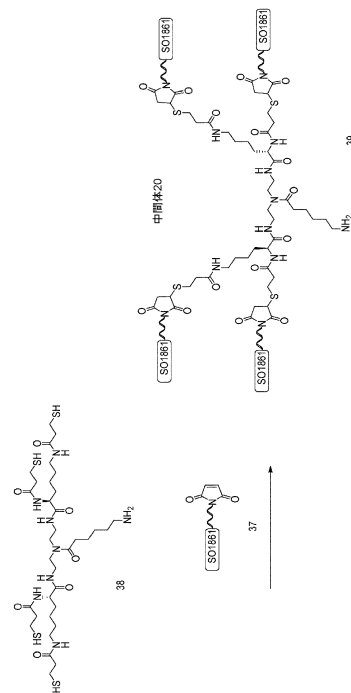
10

20

【図 39 A】

図39  
A

【図 39 B】

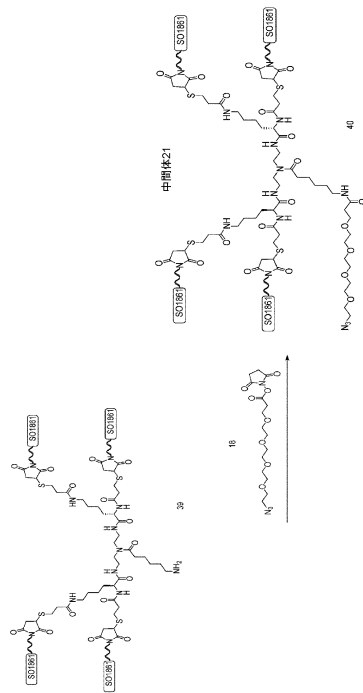
図39  
B

30

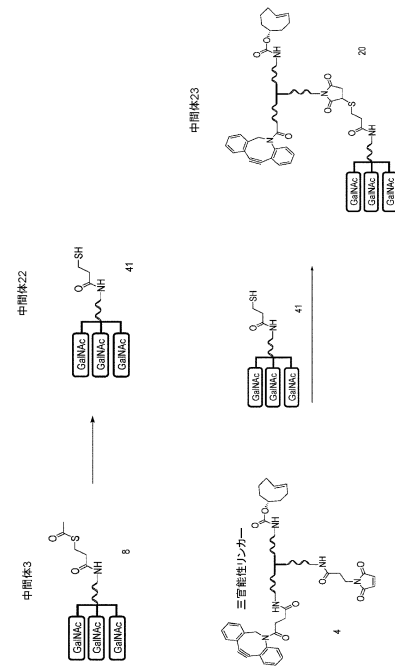
40

50

## 【図 39 C】

図39  
C

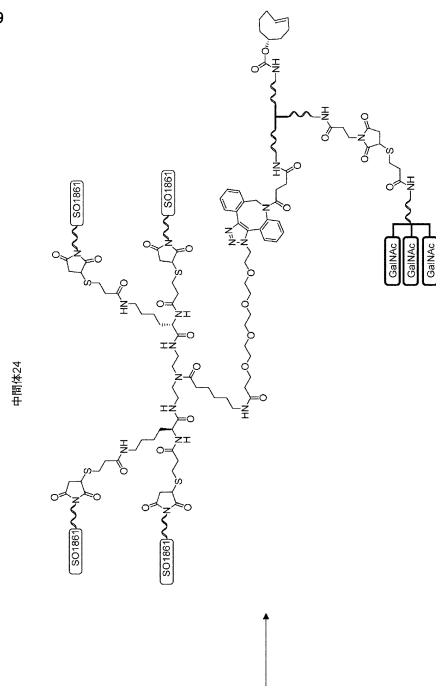
## 【図 39 D】

図39  
D

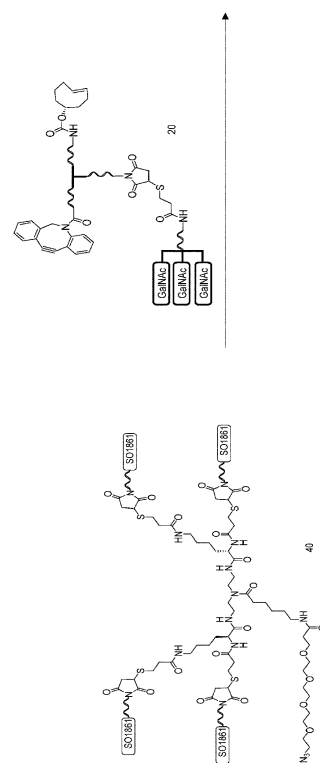
10

20

## 【図 39 E - 1】

図39  
E

## 【図 39 E - 2】

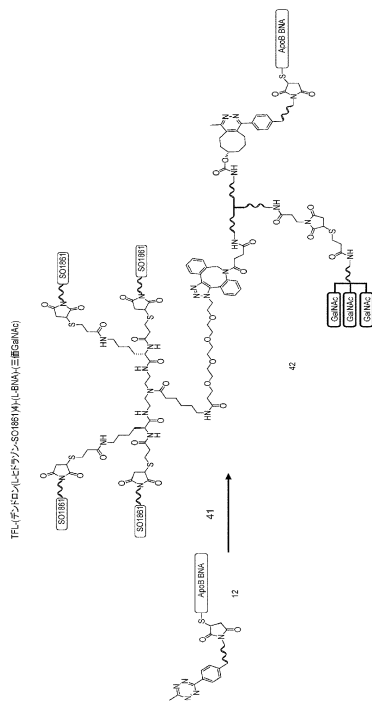
図39  
E (続き)

30

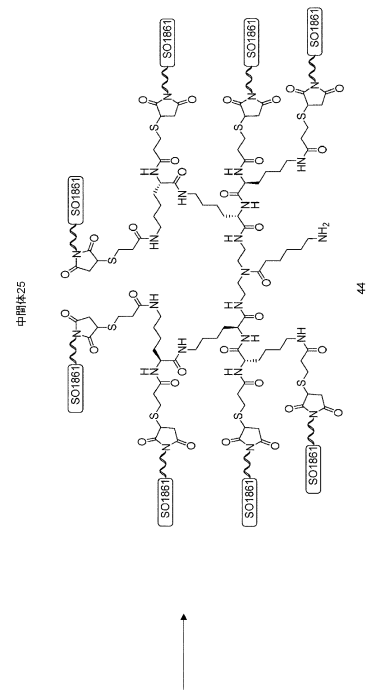
40

50

【図 39 F】

図39  
F

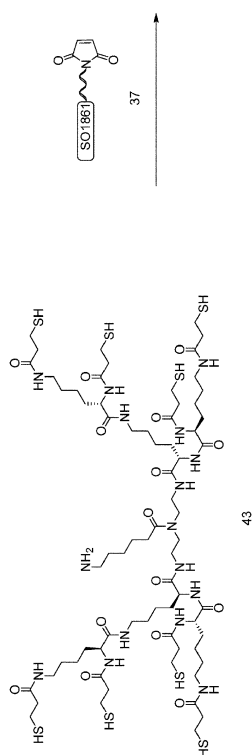
【図 40 A - 1】

図40  
A

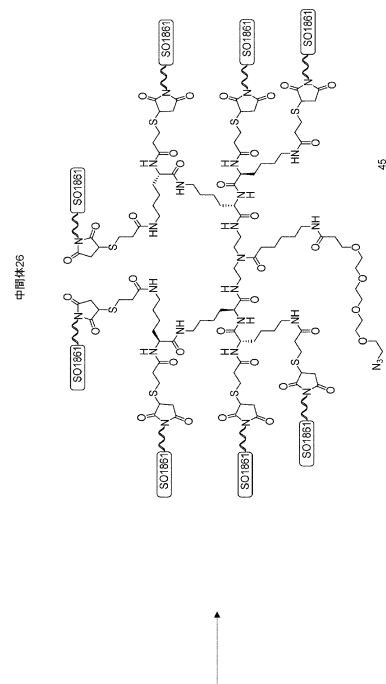
10

20

【図 40 A - 2】

図40  
A (続き)

【図 40 B - 1】

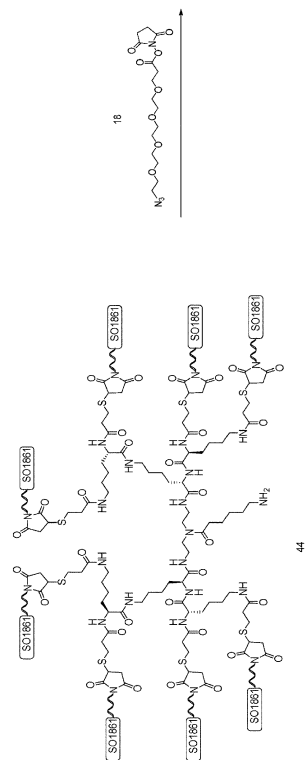
図40  
B

30

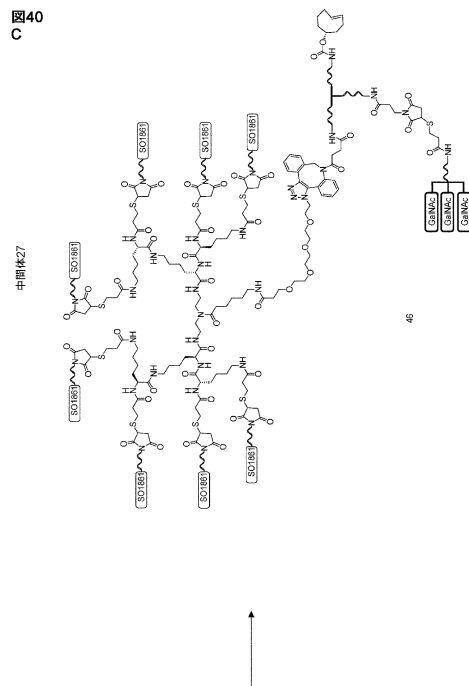
40

50

【図 40 B - 2】

図40  
B (続き)

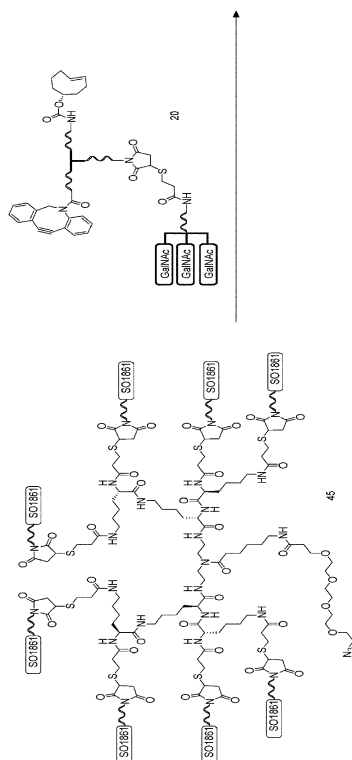
【図 40 C - 1】

図40  
C

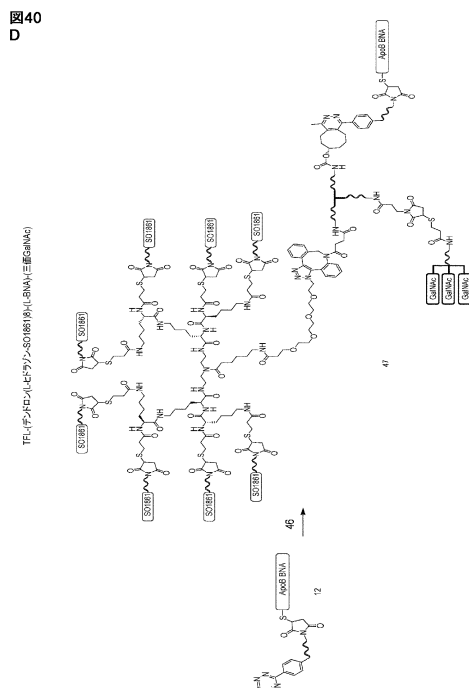
10

20

【図 40 C - 2】

図40  
C (続き)

【図 40 D】

図40  
D

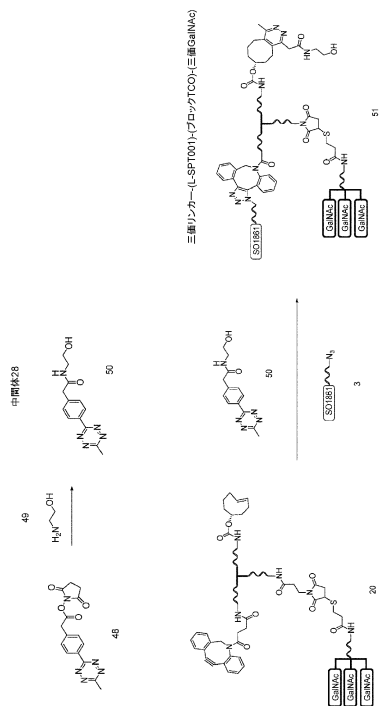
30

40

50

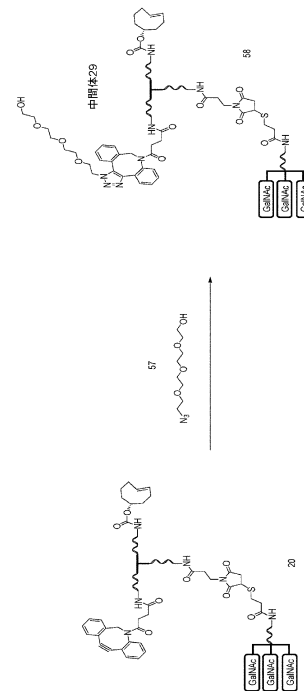
【図 4 1】

図41



【図 4 2 A】

図42A

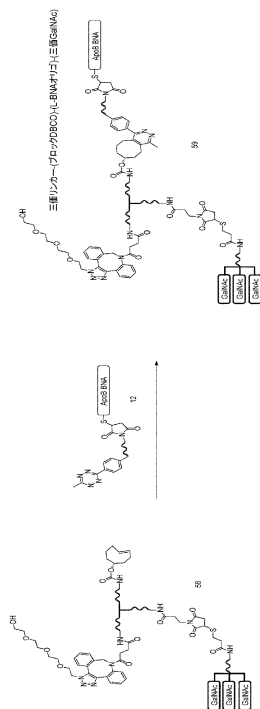


10

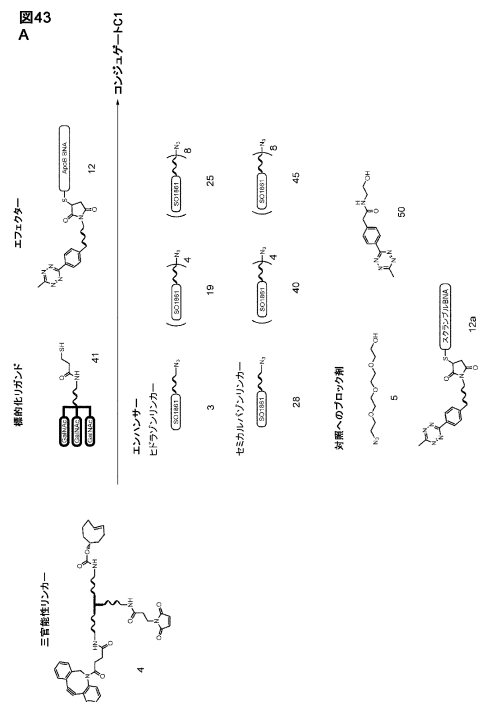
20

【図 4 2 B】

図42B



【図 4 3 A】

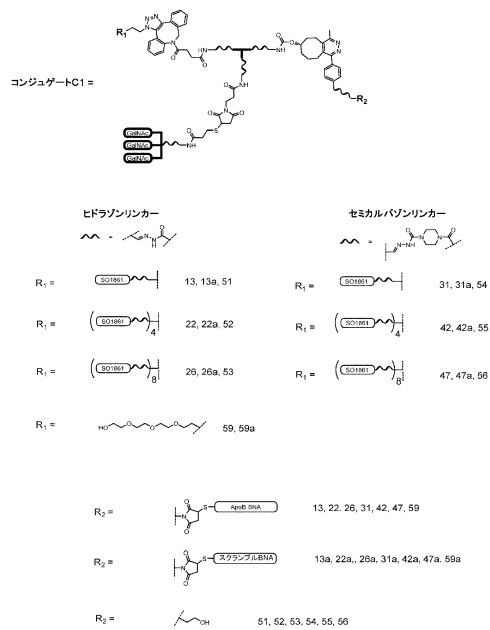
図43  
A

30

40

50

## 【図 4 3 B】

図43  
B

10

20

## 【配列表】

202354250000001.app

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年5月31日(2023.5.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) のリガンドに共有結合された少なくとも1つのサポニンを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲートであって、前記ASGPRのリガンドが、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分、好ましくは3つ又は4つのGalNAc部分、より好ましくは3つのGalNAc部分を含み、より好ましくは前記ASGPRのリガンドが (GalNAc)<sub>3</sub> トリスを含むか又はそれからなり、オリゴヌクレオチドと更に共有結合し、前記少なくとも1つのサポニンが、前記サポニンの前記アグリコンコア構造のC-23位にアルデヒド官能基を有する、12, 13-デヒドロオレアナン型のモノデスモシドの又はビデスモシドの五環性トリテルペンサポニンである、オリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項2】

前記サポニンが、以下：

20

2 アルファーヒドロキシオレアノール酸；

16 アルファー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) ；

16 アルファ, 23-ジヒドロキシオレアノール酸；

ギブソゲニン；

キラ酸；

プロトエシゲニン21 (2-メチルブタ-2-エノエート) - 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；

30

ジギトゲニン；

3, 16, 28-トリヒドロキシオレアナン-12-エン；

ギブソゲン酸、

及び

これらの誘導体

を含む群から選択されるアグリコンコア構造を含むか、

好ましくは、前記サポニンが、キラ酸及びギブソゲニン又はこれらの誘導体から選択されるアグリコンコア構造を含み、より好ましくは、前記サポニンアグリコンコア構造が、キラ酸又はその誘導体である、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

【請求項3】

・前記サポニンが、群A：

GlcA-

Glc-

Gal-

Rha- (1→2) - Ara-

Gal- (1→2) - [Xyl- (1→3)] - GlcA-

Glc- (1→2) - [Glc- (1→4)] - GlcA-

Glc- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-

Xyl- (1→2) - Ara- (1→3) - [Gal- (1→2)] - GlcA-

50

$\text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4)$   
 $) - \text{Gal} -$   
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - [\text{Glc} - (1 \rightarrow 2)] - \text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$  10  
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Ara} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$  20  
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Glc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$  30  
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) - \text{Gal} - (1 \rightarrow 2) - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 2) -$   
 $\text{GlcA} -$ 、及び

これらの誘導体

から選択される、前記アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・前記サポニンが、群 B :

$\text{Glc} -$  40  
 $\text{Gal} -$   
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$   
 $\text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{Ara} - (1 \rightarrow 3) - \text{Xyl} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Rha} -$   
 $\text{Ara} -$   
 $\text{Xyl} -$   
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R1} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R  
 1は4 E-メトキシケイ皮酸である)、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - [\text{R2} - (1 \rightarrow 4)] - \text{Fuc} -$  (ここで、R  
 2は4 Z-メトキシケイ皮酸である)、  
 $\text{Xyl} - (1 \rightarrow 4) - [\text{Gal} - (1 \rightarrow 3)] - \text{Rha} - (1 \rightarrow 2) - 4 - \text{OAc} - \text{Fu}$  50

$c-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-3,4\text{-ジ-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[R3-(\rightarrow4)]-3\text{-OAc-Fuc-}$  (ここで、R3は4E-メトキシケイ皮酸である)、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $(Ara\text{-又は}Xyl)-(1\rightarrow3)-(Ara\text{-又は}Xyl)-(1\rightarrow4)-(Rha\text{-又は}Fuc)-(1\rightarrow2)-[4\text{-OAc-(Rha\text{-又は}Fuc)-(1\rightarrow4)}]-(Rha\text{-又は}Fuc)$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc-$ 、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow4)-[Gal-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Ara/Xyl-(1\rightarrow4)-Rha/Fuc-(1\rightarrow4)-[Glc/Gal-(1\rightarrow2)]-Fuc-$ 、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[R4-(\rightarrow4)]-Fuc-$  (ここで、R4は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である)、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[R5-(\rightarrow4)]-Fuc-$  (ここで、R5は5-O-[5-O-Ara/Api-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタノイル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-メチル-オクタン酸である)、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Rha-(1\rightarrow3)]-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $Api-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-[Glc-(1\rightarrow3)]-Rha-(1\rightarrow2)-[Rha-(1\rightarrow3)]-4\text{-OAc-Fuc-}$ 、  
 $6\text{-OAc-Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[3\text{-OAc-Rha-(1\rightarrow3)}]-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[3\text{-OAc-Rha-(1\rightarrow3)}]-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-[Qui-(1\rightarrow4)]-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)-4\text{-OAc-Qui-(1\rightarrow4)}]-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[3,4\text{-ジ-OAc-Qui-(1\rightarrow4)}]-Fuc-$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $6\text{-OAc-Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-}$ 、  
 $Glc-(1\rightarrow3)-[Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)]-Rha-(1\rightarrow2)-Fuc-$ 、  
 $Xyl-(1\rightarrow3)-Xyl-(1\rightarrow4)-Rha-(1\rightarrow2)-[Xyl-(1\rightarrow3)]$

- 4 - O A c - Q u i - ( 1 → 4 ) ] - F u c - 、  
 A p i / X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - [ G l c - ( 1 → 3 ) ] - R h a -  
 ( 1 → 2 ) - [ R h a - ( 1 → 3 ) ] - 4 O A c - F u c - 、  
 A p i - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - [ G l c - ( 1 → 3 ) ] - R h a - ( 1 → 2 )  
 ) - [ R h a - ( 1 → 3 ) ] - 4 O A c - F u c - 、  
 A p i / X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - [ G l c - ( 1 → 3 ) ] - R h a -  
 ( 1 → 2 ) - [ R 6 - ( → 4 ) ] - F u c - ( ここで、R 6 は 5 - O - [ 5 - O - R h a  
 - ( 1 → 2 ) - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] -  
 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である ) ) 、  
 A p i / X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - [ G l c - ( 1 → 3 ) ] - R h a - 10  
 ( 1 → 2 ) - [ R 7 - ( → 4 ) ] - F u c - ( ここで、R 7 は 5 - O - [ 5 - O - A r a  
 / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
 - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、  
 A p i / X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - [ G l c - ( 1 → 3 ) ] - R h a -  
 ( 1 → 2 ) - [ R 8 - ( → 4 ) ] - F u c - ( ここで、R 8 は 5 - O - [ 5 - O - A r a  
 / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
 - 6 - メチル - オクタン酸である ) 、  
 A p i - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 9 - ( → 4 ) ] -  
 F u c - ( ここで、R 9 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ -  
 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸である )  
 ) 、 20  
 X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 10 - ( → 4 ) ]  
 - F u c - ( ここで、R 10 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
 - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ  
 る ) ) 、  
 A p i - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 11 - ( → 3 ) ]  
 - F u c - ( ここで、R 11 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
 - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ  
 る ) ) 、  
 X y l - ( 1 → 3 ) - X y l - ( 1 → 4 ) - R h a - ( 1 → 2 ) - [ R 12 - ( → 3 ) ] 30  
 - F u c - ( ここで、R 12 は 5 - O - [ 5 - O - A r a / A p i - 3 , 5 - ジヒドロキシ  
 - 6 - メチル - オクタノイル ] - 3 , 5 - ジヒドロキシ - 6 - メチル - オクタン酸であ  
 る ) )  
 G l c - ( 1 → 3 ) - [ G l c - ( 1 → 6 ) ] - G a l - 、及び

これらの誘導体

から選択される、前記アグリコンコア構造に結合した多糖鎖を含むか、

又は

・前記サポニンが、前記アグリコンコア構造に結合した群 A から選択される第 1 の糖鎖  
 を含み、前記アグリコンコア構造に結合した群 B から選択される第 2 の糖鎖を含む、ビデ  
 スモシドトリテルペン配糖体である、

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 4】

前記サポニンが、以下：キラヤ樹皮サポニン、ディプサコシド B、サイコサポニン A、  
 サイコサポニン D、マクラントイジン A、エスクレントシド A ( e s c u l e n t o s i  
 d e A ) 、フィトラッカゲニン、エシネート、A S 6 . 2、NP-005236、AM  
 A-1、AMR、アルファヘデリン、NP-012672、NP-017777、NP  
 -017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP  
 -018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、S A  
 1641、A E X 55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-0  
 03881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-0

17705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、SO1861、GE1741、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1862、SO1904、QS-7、QS1861、QS-7 api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21 A-apio、QS-21 A-xylo、QS-21 B-apio、QS-21 B-xylo、ベータエスシン、エスシン Ia、茶種子サポニン I、茶種子サポニン J、アッサムサポニン F、ジギトニン、プリムラ酸 1 及び AS64R、これらの立体異性体、これらの誘導体、並びにこれらの組合せからなる群から選択され、好ましくは、前記サポニンが、QS-21、QS-21 誘導体、SO1861、SO1861 誘導体、SO1832、SO1832 誘導体、SA1641、SA1641 誘導体、GE1741、GE1741 誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、前記サポニンが、QS-21 誘導体、SO1861 誘導体、SO1861、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、前記サポニンが、SO1861 誘導体若しくは SO1861、又は SO1832 誘導体若しくは SO1832 である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

#### 【請求項 5】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i. 前記サポニン誘導体が、誘導体化されたアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み；

ii. 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項 3 に記載の群 A から選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、誘導体化されたカルボキシル基を含み；

20

iii. 前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項 3 に記載の群 B から選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、誘導体化されたアセトキシ (Me (CO) O-) 基を含み；又は

iv. 前記サポニン誘導体が、誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. の任意の組合せ、好ましくは誘導体化 i.、誘導体化 ii. 及び誘導体化 iii. のうちの 2 つの誘導体化の任意の組合せを含む、

請求項 3 又は 4 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

#### 【請求項 6】

前記サポニンが、以下：SO1861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21 A、QS-21 A-apio、QS-21 A-xylo、QS-21 B、QS-21 B-apio、QS-21 B-xylo、QS-7-xylo、QS-7-apio、QS-17-apio、QS-17-xylo、QS1861、QS1862、キラヤサポニン、サポニナム・アルBUM (Saponinum album)、QS-18、Quil-A、Gyp1、ジブソシド A、AG1、AG2、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1832、SO1904、これらの立体異性体、これらの誘導体、及びこれらの組合せのいずれか 1 つ以上であり、好ましくは、前記サポニンが、QS-21、QS-21 誘導体、SO1861、SO1861 誘導体、SO1832、SO1832 誘導体、SA1641、SA1641 誘導体、GE1741、GE1741 誘導体、及びこれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、前記サポニンが、QS-21 誘導体、SO1861 誘導体、SO1861、及びこれらの組合せからなる群から選択され、最も好ましくは、前記サポニンが、SO1861 誘導体若しくは SO1861、又は SO1832 誘導体若しくは SO1832 である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

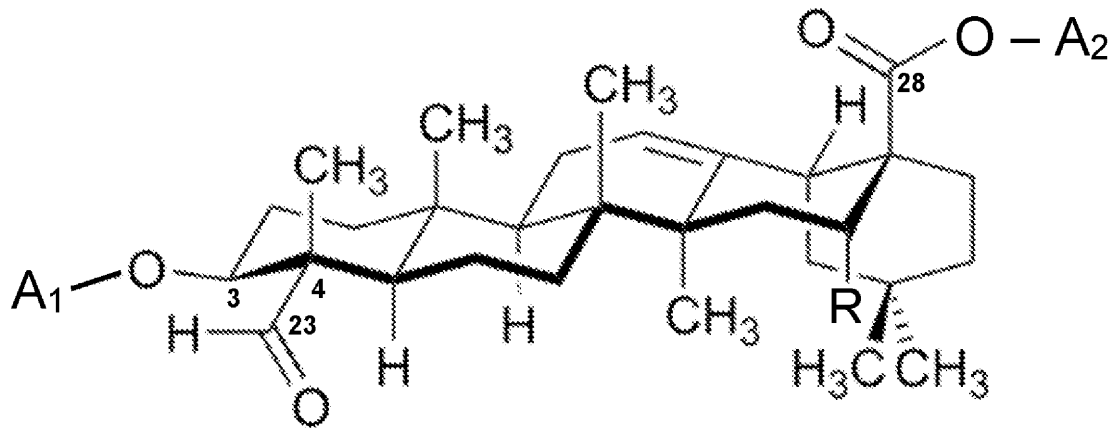
40

#### 【請求項 7】

前記サポニンが、分子 1：

50

【化 1】



(分子1)

(式中、

A<sub>1</sub>が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>1</sub>が請求項3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>1</sub>が請求項3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、A<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなり；

A<sub>2</sub>が水素、単糖又は直鎖若しくは分岐オリゴ糖を表し、好ましくはA<sub>2</sub>が請求項3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、より好ましくはA<sub>2</sub>が請求項3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、A<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ (Me (CO) O-) 基、例えば1、2、3、又は4つのアセトキシ基を含み、

式中、A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の少なくとも1つが水素でなく、好ましくはA<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の両方がオリゴ糖鎖であり；

並びに、Rがギブソゲニン内の水素又はキラ酸内のヒドロキシルである) で表され；

前記サポニン誘導体が、分子1で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. 前記キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、誘導体化されており；

ii. A<sub>1</sub>が請求項3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、A<sub>1</sub>がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が誘導体化されており；及び

iii. A<sub>2</sub>が請求項3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、A<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、A<sub>2</sub>の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が誘導体化されている

のうち少なくとも1つ、好ましくは1つ又は2つ、より好ましくは1つが存在する、請求項1～6のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項8】

A<sub>1</sub>が請求項3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、及びグルクロン酸部分を含むか若しくはそれからなり、A<sub>1</sub>のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が誘導体化されているか、並びに／又はA<sub>2</sub>が請求項3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、及びA<sub>2</sub>が少なくとも1つのアセトキシ基を含み、ここでA<sub>2</sub>の少なくとも1つのアセトキシ基が誘導体化されている、請求項7に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項9】

分子1で表される前記サポニンが、ビデスモシドトリテルペンサポニンである、請求項7又は8に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項10】

前記サポニン誘導体が、分子1で表される前記サポニンに対応し、以下の誘導体化：

i. キラ酸又はギブソゲニンのC<sub>23</sub>位のアルデヒド基が、

－ アルコールへの還元；

－  $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、それによってSO1861-ald-EMCH若しくはQS-21-ald-EMCHなどのサポニン-ald-EMCHがもたらされ、ここで、前記EMCHのマレイミド基が、任意選択的にメルカプトエタノールとのチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

－  $N$ -[ $\beta$ -マレイミドプロピオン酸]ヒドラジド（BMPH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記BMPHの前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

－  $N$ -[ $\kappa$ -マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記KMUHの前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されており、

i i .  $A_1$ が請求項3に記載の群Aから選択される糖鎖を表し、及び $A_1$ がグルクロン酸部分を含むか又はそれからなる場合、 $A_1$ のグルクロン酸部分の前記カルボキシル基が、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール（AMPD）又は $N$ -（2-アミノエチル）マレイミド（AEM）との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されており、それによってQS-21-Glu-AMPD若しくはSO1861-Glu-AMPDなどのサポニン-Glu-AMPD、又はQS-21-Glu-AEM若しくはSO1861-Glu-AEMなどのサポニン-Glu-AEMがもたらされ；並びに

i i i .  $A_2$ が請求項3に記載の群Bから選択される糖鎖を表し、 $A_2$ が少なくとも1つのアセトキシ基を含む場合、 $A_2$ の1つの糖部分又は2つ以上の糖部分のうち1つ以上、好ましくは全てのアセトキシ基が、脱アセチル化によるヒドロキシル基（HO-）への転換によって誘導体化されている

のうち少なくとも1つ、好ましくは1つ又は2つ、より好ましくは1つが存在する、請求項7～9のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項11】

$A_1$ が、Gal-（1→2）- [Xyl-（1→3）] -GlcAであり、及び／又は、 $A_2$ が、Glc-（1→3）-Xyl-（1→4）-Rha-（1→2）- [Xyl-（1→3）-4-OAc-Qui-（1→4）] -Fucであり、好ましくは分子1で表される前記サポニンが、3-O- $\beta$ -D-ガラクトピラノシル-（1→2）- [  $\beta$ -D-キシロピラノシル-（1→3）] - $\beta$ -D-グルクロピラノシルキラ酸28-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-（1→3）- $\beta$ -D-キシロピラノシル-（1→4）- $\alpha$ -L-ラムノピラノシル-（1→2）- [  $\beta$ -D-キシロピラノシル-（1→3）-4-OAc- $\beta$ -D-キノボピラノシル-（1→4）] - $\beta$ -D-フコピラノシドであり、より好ましくは前記サポニンが、以下：SO1861、SO1832、GE1741、SA1641、及びQS-21、又はこれらの誘導体、最も好ましくはSO1861若しくはその誘導体、又はSO1832誘導体若しくはSO1832のいずれか1つ以上である、請求項7～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項12】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i . 前記サポニン誘導体が、以下：

－ アルコールへの還元；

－  $N-\epsilon$ -マレイミドカプロン酸ヒドラジド（EMCH）との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、それによってSO1861-ald-EMCH若しくはQS-21-ald-EMCHなどのサポニン-ald-EMCHがもたらされ、ここで、前記EMCHのマレイミド基が、任意選択的にメルカプトエタノールとのチオエーテル結合を形成することによって誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

ー N- [β-マレイミドプロピオン酸] ヒドラジド (BMPH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記 BMPH の前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；又は

ー N- [κ-マレイミドウンデカン酸] ヒドラジド (KMUH) との反応を介したヒドラゾン結合への変換であって、ここで、前記 KMUH の前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、ヒドラゾン結合への変換；

によって誘導体化されている、アルデヒド基を含むアグリコンコア構造を含み、

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

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

i v . 前記サポニン誘導体が、誘導体化 i . 、誘導体化 i i . 及び誘導体化 i i i . の任意の組合せ、好ましくは誘導体化 i . 、誘導体化 i i . 及び誘導体化 i i i . のうちの 2 つの誘導体化の任意の組合せを含み；

好ましくは、サポニン誘導体が、アグリコンコア構造を含み、アグリコンコア構造が、EMCH との反応を介したヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基を含み、前記 EMCH の前記マレイミド基が、任意選択的に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り誘導体化される、

請求項 5 ~ 11 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 13】

前記サポニンが、サポニン誘導体であって、

i . 前記サポニン誘導体が、N-ε-マレイミドカプロン酸ヒドラジド (EMCH) との反応によるヒドラゾン結合への変換によって誘導体化されているアルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、それによって SO1861-Al d-EMCH 若しくは QS-21-Al d-EMCH などのサポニン-Al d-EMCH がもたらされ；

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

i i i . 前記サポニン誘導体が、誘導体化 i . 及び誘導体化 i i . の組合せを含む、請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 14】

前記サポニン誘導体が、アルデヒド基から構成されるアグリコンコア構造を含み、前記サポニン誘導体が、糖鎖、好ましくは請求項 3 に記載の群 A から選択される糖鎖を含み、前記糖鎖が、カルボキシル基、好ましくは N- (2-アミノエチル) マレイミド (AEM) との反応によるアミド結合への変換によって誘導体化されているグルクロン酸部分のカルボキシル基を含む、請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 15】

前記サポニンが、分子 2：

10

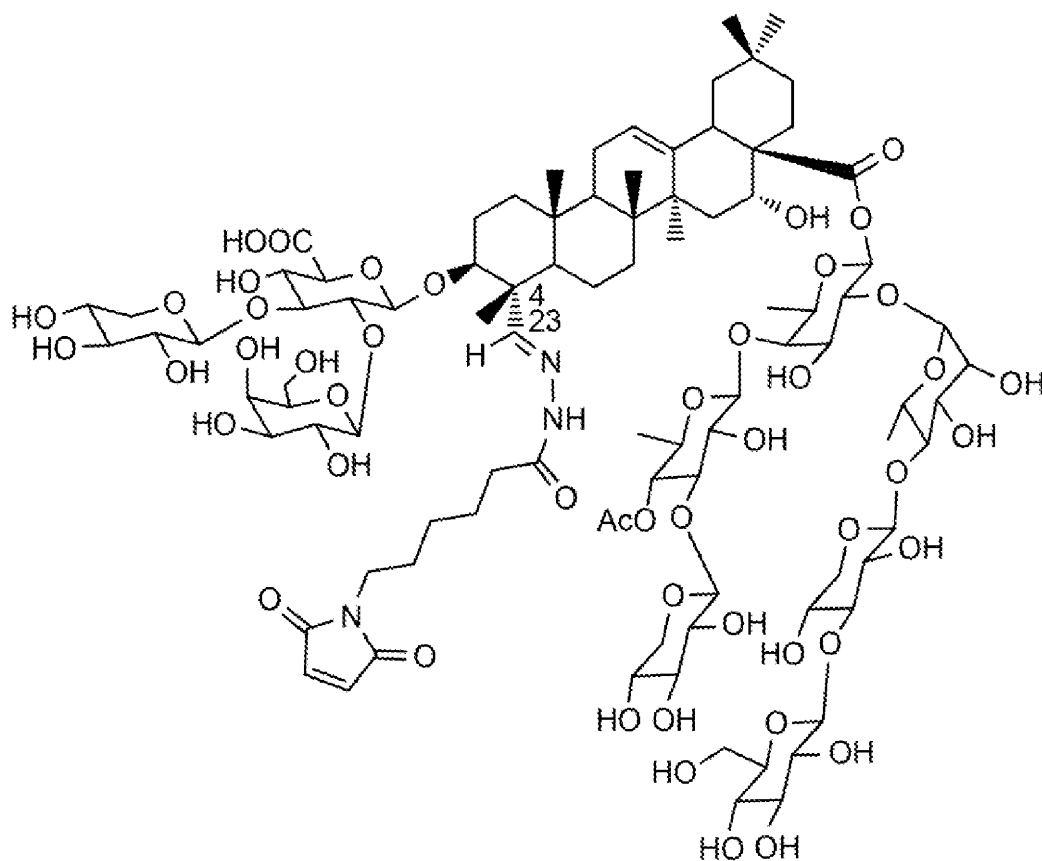
20

30

40

50

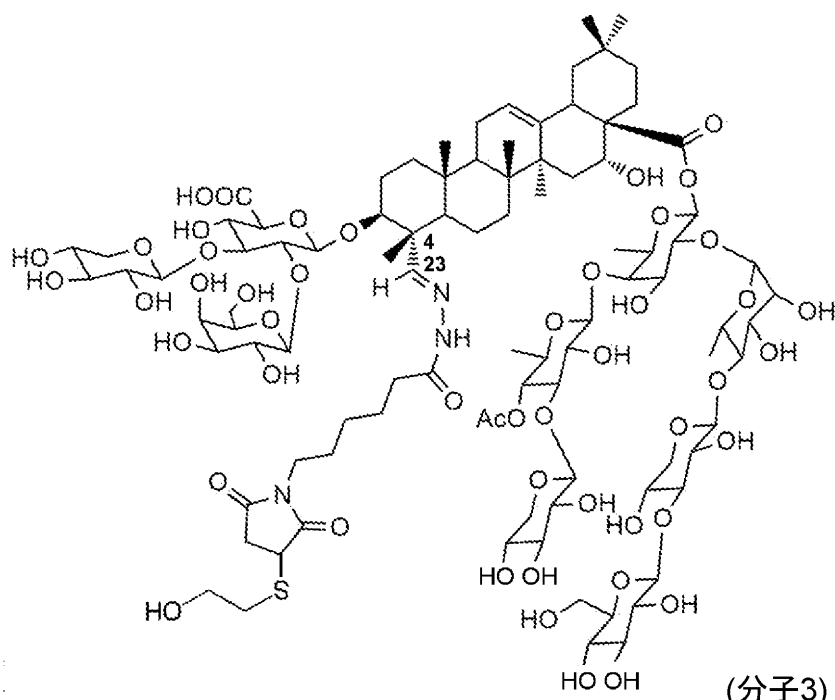
10



(分子2)

20

【化 3】



(分子3)

によって表されるサポニン誘導体である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のオリゴ

ヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つのサポニン及び前記 A S G P R のリガンドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は前記少なくとも 1 つのサポニン及び前記オリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカーを介して共有結合しており、並びに／又は前記 A S G P R のリガンド及び前記オリゴヌクレオチドが、直接若しくは少なくとも 1 つのリンカー、好ましくは前記少なくとも 1 つのサポニンを介して共有結合しており、前記 A S G P R のリガンド及び前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つのリンカーを介して連結している、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項 17】

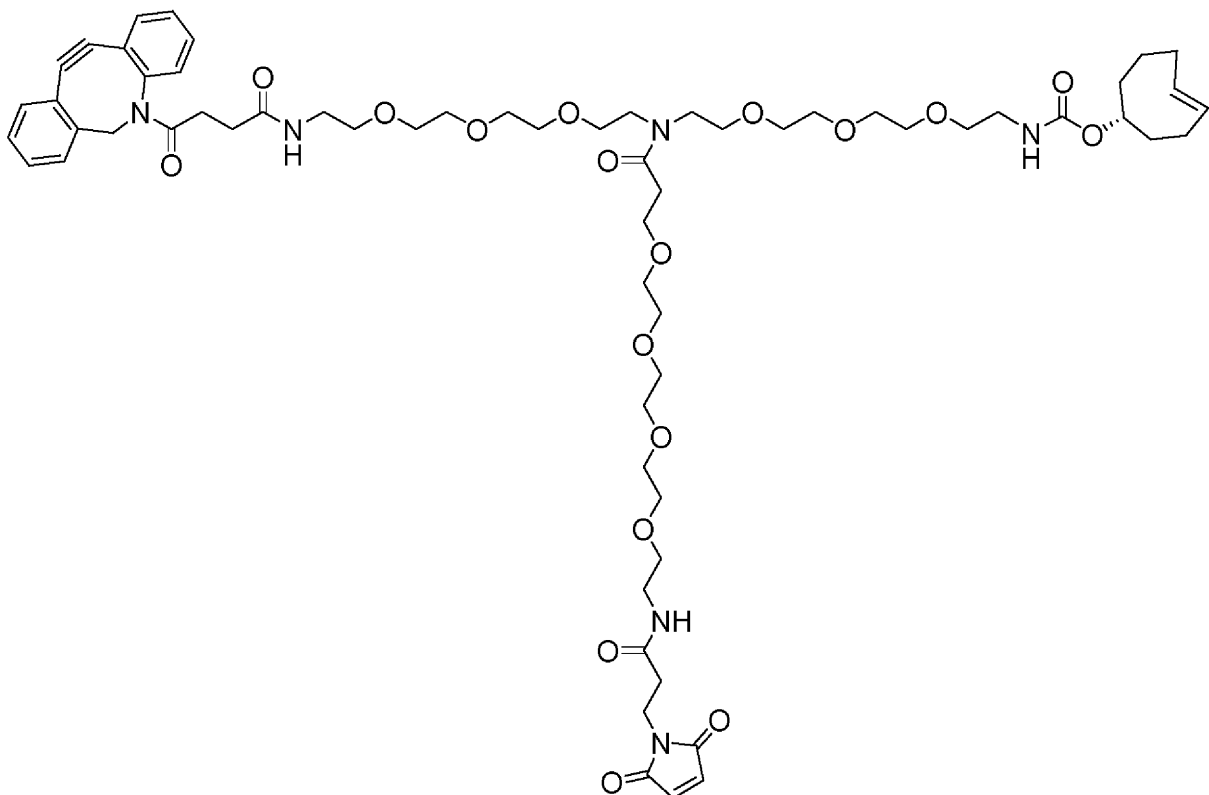
前記少なくとも 1 つの G a l N A c 部分、好ましくは 3 つの G a l N A c 部分、前記少なくとも 1 つのサポニン、好ましくは 1 ～ 16 個のサポニン部分、より好ましくは 1 個、4 個、又は 8 個のサポニン部分などの 1 ～ 8 個のサポニン部分、及び前記オリゴヌクレオチドが、三官能性リンカーを介して、好ましくは前記三官能性リンカーの別個のアームに共有結合した前記 G a l N A c 部分、前記サポニン／サポニン部分、及び前記オリゴヌクレオチドの各々と共有結合している、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 18】

前記三官能性リンカーが、式 (X X I) :

20

【化 4】



30

40

(XXI)

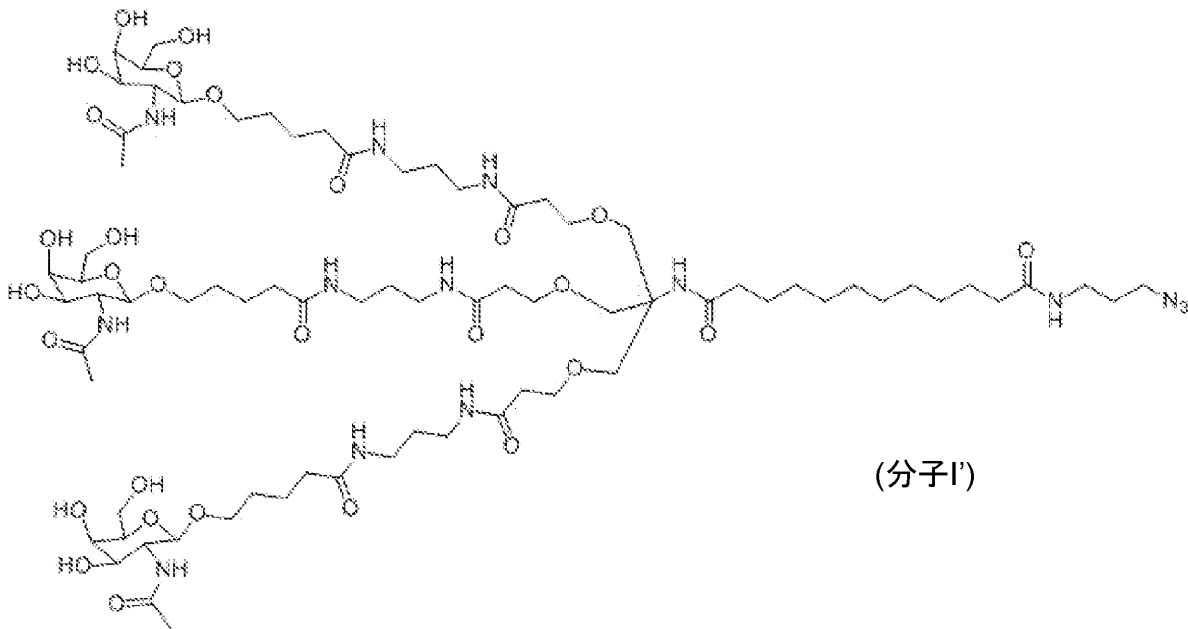
によって表される前記三官能性リンカーである、請求項 17 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 19】

前記 A S G P R のリガンドが、分子 I ' :

50

## 【化 5】



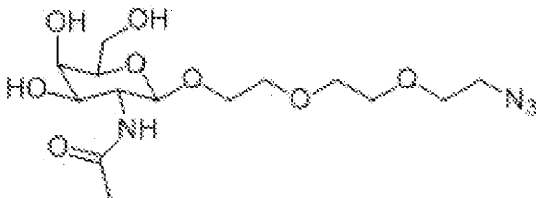
(分子I')

10

20

で表される前記 (GalNAc)<sub>3</sub> トリスであるか、又は前記 ASGPR のリガンドが、分子 II' :

## 【化 6】



(分子II')

30

によって表されるモノ-GalNAc である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 20】

前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記 ASGPR のリガンドに共有結合しており、及び／又は前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記オリゴヌクレオチドに共有結合している、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 21】

前記少なくとも 1 つのサポニンが、少なくとも 1 つの切断可能リンカーを介して前記三官能性リンカーのアームに共有結合されている、請求項 17 又は 18 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

## 【請求項 22】

前記切断可能リンカーが、酸性条件下、還元条件下、酵素条件下、及び／又は光誘起条件下で切断を受け、好ましくは、前記切断可能リンカーが、酸性条件下で切断を受けるヒドラゾン結合及びヒドラジド結合、並びに／又はタンパク質分解、例えば、カテプシン B によるタンパク質分解を受けやすい結合、並びに／又はジスルフィド結合などの還元条件下で切断を受けやすい結合から選択される切断可能な結合を含む、請求項 20 又は 21 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 23】

50

前記切断可能リンカーが、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞のエンドソーム及び／又はリソソームに存在するような酸性条件下でインビボ切断を受け、好ましくは前記切断可能リンカーが、 $\text{pH } 4.0 \sim 6.5$ 、より好ましくは  $\text{pH} \leq 5.5$  でインビボ切断を受ける、請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 24】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1、2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128、若しくは1～100のサポニン部分、又はそれらの間の任意数のサポニン部分、例えば7、9、12などのサポニン部分、好ましくは1、4、若しくは8つのサポニン部分を含む、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

【請求項 25】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1つのサポニン部分、又は4つのサポニン部分、又は8つのサポニン部分を含む、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 26】

前記サポニンが、SO1861、SO1832、又はQS-21、好ましくはSO1861又はSO1832である、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 27】

前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートが、1つ又は3つのGalNAc部分、好ましくは3つのGalNAc部分を含む、請求項 1 ～ 26 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

20

【請求項 28】

前記オリゴヌクレオチドが、BNA、異種核酸、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれか1つである、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 29】

前記オリゴヌクレオチドが、以下：低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、アンチヘアピン型マイクロRNA (miRNA)、一本鎖RNA、アプタマーRNA、二本鎖RNA (dsRNA)、アンチマイクロRNA (アンチmiRNA、アンチmiR)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、DNA、アンチセンスDNA、ロックド核酸 (LNA)、架橋型核酸 (BNA)、2'-O, 4'-アミノエチレン架橋型核酸 (BNA<sup>NC</sup>)、BNAベースのsiRNA、及びBNAベースのアンチセンスオリゴヌクレオチド (BNA-AON) のいずれか1つ以上から選択される、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

30

【請求項 30】

前記オリゴヌクレオチドが、以下：アンチmiRNA、BNA-AON又はsiRNA、例えば、化学的に修飾されたsiRNA、代謝的に安定したsiRNA、及び化学的に修飾され、代謝的に安定したsiRNAから選択される、BNAベースのsiRNAなどのいずれか1つ以上から選択される、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

40

【請求項 31】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B (apoB)、HSP27、トランスサイレチン (TTR)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシニン9型 (PCSK9)、TMPPRSS6、 $\delta$ -アミノレブリン酸シンターゼ1 (ALAS1)、アンチトロニン3 (AT3)、グリコール酸オキシダーゼ (GO)、補体成分C5 (CC5)、B型肝炎ウイルス (HBV) のX遺伝子、HBVのS遺伝子、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン (AAT)、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、C

50

EBPA、及び乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドであり、並びに／又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、異常なmiRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～30のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項32】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下の遺伝子：アポリポタンパク質B（apoB）及びHSP27のいずれか1つをサイレンシングすることができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～30のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項33】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB、HSP27、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子の発現産物、HBVのS遺伝子の発現産物、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドであるか、又は、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、発癌性miRNA（oncomiR）の阻害若しくはoncomiRの発現の抑制などのmiRNA機能を弱めるか若しくは回復させることができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項34】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項35】

前記オリゴヌクレオチドが、例えば哺乳動物細胞の内部に存在する場合、好ましくはヒト細胞の内部に存在する場合、以下のタンパク質：apoB及びHSP27のいずれか1つの発現に關与するmRNAを標的化することができるオリゴヌクレオチドである、請求項1～32のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項36】

請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、並びに任意選択により薬学的に許容される賦形剤及び／又は任意選択により薬学的に許容される希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項37】

医薬品として使用するための、請求項36に記載の医薬組成物又は請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項38】

発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBVのX遺伝子、HBVのS遺伝子、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、CEBPA、及びLDHのいずれか1つ以上と關与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するものである、請求項36に記載の医薬組成物又は請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 39】

発現産物が、以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27、apoB、TTR、PCSK9、TMPRSS6、ALAS1、AAT、miR-122、B型肝炎ウイルスHbsAg、LDHA、及びCEBPAのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、請求項36に記載の医薬組成物又は請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 40】

前記使用が、発現産物が、以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上と関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、並びに／又は以下の遺伝子：HSP27及びapoB、好ましくはapoBのいずれか1つ以上に関与する疾患若しくは健康問題の治療若しくは予防で使用するためのものである、請求項35に記載の医薬組成物、又は請求項38若しくは39に記載の使用のための請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 41】

癌、感染症疾患、ウイルス感染症、高コレステロール血症、心血管疾患、原発性高シュウ酸尿症、血友病A、血友病B、AAT関連肝疾患、急性肝性ポルフィリン症、TTR媒介性アミロイドーシス、遺伝性TTRアミロイドーシス(hATTR)、補体媒介性疾患、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠乏症、 $\beta$ -サラセミア、又は自己免疫疾患の前記治療又は予防で使用するための、請求項37～40のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 42】

子宮内膜癌、乳癌、肺癌、若しくは肝細胞癌などの癌、及び／又は高コレステロール血症、好ましくは高コレステロール血症などの心血管疾患の前記治療又は予防で使用するための、請求項37～40のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 43】

対象におけるLDLコレステロールの低下で使用するための、請求項35に記載の医薬組成物又は請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

## 【請求項 44】

請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートを細胞外から前記細胞内へと移行させ、好ましくは、その後に請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって構成される前記オリゴヌクレオチドを前記サイトゾル及び／又は前記細胞の核へ移行させるためのインビトロ又はエキスピボ方法であって、以下の工程：

a) 好ましくはヒト細胞である、ASGPR、好ましくはASGPR1をその表面に発現する細胞をもたらす工程であって、好ましくは、前記細胞が、肝臓細胞、ウイルス感染哺乳動物細胞、及び哺乳動物腫瘍細胞から選択され、好ましくは前記細胞が、ヒト細胞である、工程と、

b) 工程a)でもたらされる前記細胞へと移行する請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程と、

c) 工程a)の前記細胞を、インビトロ又はエキスピボで、好ましくは液体媒体中において、工程b)のオリゴヌクレオチドコンジュゲートと接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートの細胞外から前記細胞内への移行を引き起こし、任意選択的に好ましくは、それによってその後、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートを構成する前記オリゴヌクレオチドの前記細胞の前記サイトゾル及び／又は核内への移行を引き起こす、工程と、

を含む、インビトロ又はエキスピボ方法。

【請求項 4 5】

以下の工程：

(a) 共有結合した第 1 のリンカーを含む少なくとも 1 つのサポニン部分をもたらす工程であって、前記第 1 のリンカーが、第 2 のリンカー上の第 2 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 7 の反応性基への共有結合のための少なくとも 1 つの第 1 の反応性基を含む、工程と、

(b) 共有結合した第 3 のリンカーを含むオリゴヌクレオチドをもたらす工程であって、前記第 3 のリンカーが、第 4 のリンカー上の第 4 の反応性基又は第 7 のリンカー上の第 8 の反応性基への共有結合のための第 3 の反応性基を含む、工程と、

(c) 共有結合した第 5 のリンカーを含む少なくとも 1 つの G a l N A c 部分をもたらす工程であって、前記第 5 のリンカーが、第 6 のリンカー上の第 6 の反応性基又は前記第 7 のリンカー上の第 9 の反応性基への共有結合のための第 5 の反応性基を含む、工程と、

(d 1) 前記第 1 の反応性基と前記第 2 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 1 のリンカーを前記第 2 のリンカーへと連結させ、前記第 3 の反応性基と前記第 4 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 3 のリンカーを前記第 4 のリンカーへと連結させ、前記第 5 の反応性基と前記第 6 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 5 のリンカーを前記第 6 のリンカーへと連結させ、前記第 2 のリンカー、前記第 4 のリンカー、及び前記第 6 のリンカーと一緒に共有結合させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドをもたらす工程、

又は

(d 2) 前記第 1 の反応性基と前記第 7 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 1 のリンカーを前記第 7 のリンカーへと連結させ、前記第 3 の反応性基と前記第 8 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 3 のリンカーを前記第 7 のリンカーへと連結させ、前記第 5 の反応性基と前記第 9 の反応性基との間に共有結合を形成することにより前記第 5 のリンカーを前記第 7 のリンカーへと連結させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらす工程、

のいずれかと、

を含む、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをもたらすための方法。

【請求項 4 6】

前記第 7 のリンカーが、請求項 1 8 に記載の三官能性リンカーなどの三官能性リンカーである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記少なくとも 1 つのサポニン部分が、1 ～ 1 6 個のサポニン部分、好ましくは 1 ～ 8 個のサポニン部分、例えば 1、4、又は 8 個のサポニン部分などである、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記サポニンが、S O 1 8 6 1、S O 1 8 3 2、Q S - 2 1、又はそれらの任意の官能性誘導体、好ましくは S O 1 8 6 1 又は S O 1 8 3 2 である、請求項 4 5 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記サポニン部分又は複数の前記サポニン部分が、ヒドラゾン結合又はセミカルバゾン結合を介して共有結合している、請求項 4 5 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記少なくとも 1 つの G a l N A c 部分が、1 ～ 4 個の G a l N A c 部分、好ましくは 1 個又は 3 個の G a l N A c 部分である、請求項 4 5 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

。

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/NL2021/050549

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>INV. A61K47/54 A61K47/55 A61P35/00</b><br><b>ADD.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>A61K</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| 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)<br><b>EPO-Internal, WPI Data</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No.                                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | WO 2020/126627 A1 (SAPREME TECH B V [NL];<br>UNIV BERLIN CHARITE [DE])<br>25 June 2020 (2020-06-25)<br>claims 1, 2; examples 5, 6<br>-----                                                                                                                                                                                                    | 1-52                                                                    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | SABINE SEWING ET AL: "GalNAc Conjugation<br>Attenuates the Cytotoxicity of Antisense<br>Oligonucleotide Drugs in Renal Tubular<br>Cells",<br>MOLECULAR THERAPY: NUCLEIC ACIDS.,<br>vol. 14, 1 March 2019 (2019-03-01), pages<br>67-79, XP055762603,<br>US<br>ISSN: 2162-2531, DOI:<br>10.1016/j.omtn.2018.11.005<br>abstract<br>-----<br>-/-- | 1-52                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>14 January 2022</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br><b>25/01/2022</b> |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Authorized officer<br><b>Langer, Miren</b>                              |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/NL2021/050549

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| Y                                                    | WO 2015/071388 A1 (ROCHE INNOVATION CT COPENHAGEN AS [DK])<br>21 May 2015 (2015-05-21)<br>page 50, paragraph 1<br>claims 1-3                                                                                                                     | 1-52                  |
| Y                                                    | XU RAN ET AL: "On the origins of triterpenoid skeletal diversity", PHYTOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM , NL, vol. 65, no. 3, 9 May 2017 (2017-05-09), pages 261-291, XP085002429, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2003.11.014 abstract | 1-52                  |
| A                                                    | WO 2011/054811 A1 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; ENZON PHARMACEUTICALS INC [US] ET AL.) 12 May 2011 (2011-05-12)                                                                                                                                      | 1-52                  |
| A                                                    | BACHRAN CHRISTOPHER ET AL: "Saponins in Tumor Therapy", MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 575-584, XP055775950,                                                                                     | 1-52                  |
| A                                                    | HENDRIK FUCHS ET AL: "Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies", BIOMEDICINES, vol. 5, no. 2, 29 March 2017 (2017-03-29), page 14, XP055429235, DOI: 10.3390/biomedicines5020014                     | 1-52                  |
| A                                                    | WO 2020/126620 A2 (SAPREME TECH BV [NL]; UNIV BERLIN CHARITE [DE])<br>25 June 2020 (2020-06-25)                                                                                                                                                  | 1-52                  |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL2021/050549

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2021/050549

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2020126627 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          |
|                                           |                     | 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          |
|                                           |                     | SG 11202106612Q A          | 29-07-2021          |
|                                           |                     | SG 11202106664P A          | 29-07-2021          |
|                                           |                     | SG 11202106672S A          | 29-07-2021          |
|                                           |                     | WO 2020126064 A1           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126600 A1           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126604 A1           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126609 A2           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126610 A1           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126620 A2           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126626 A1           | 25-06-2020          |
|                                           |                     | WO 2020126627 A1           | 25-06-2020          |
| WO 2015071388 A1                          | 21-05-2015          | CA 2928349 A1              | 21-05-2015          |
|                                           |                     | CN 105722980 A             | 29-06-2016          |
|                                           |                     | EP 3068885 A1              | 21-09-2016          |
|                                           |                     | HK 1220724 A1              | 12-05-2017          |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2021/050549

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|                                           |                     | JP 2017501684 A            | 19-01-2017          |
|                                           |                     | KR 20160083876 A           | 12-07-2016          |
|                                           |                     | RU 2016122168 A            | 19-12-2017          |
|                                           |                     | US 2016289677 A1           | 06-10-2016          |
|                                           |                     | WO 2015071388 A1           | 21-05-2015          |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 2011054811                             | A1                  | 12-05-2011                 | NONE                |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 2020126620                             | A2                  | 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          |
|                                           |                     |                            | 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          |
|                                           |                     |                            | SG 11202106612Q A   |
|                                           |                     |                            | 29-07-2021          |
|                                           |                     |                            | SG 11202106664P A   |
|                                           |                     |                            | 29-07-2021          |
|                                           |                     |                            | SG 11202106672S A   |
|                                           |                     |                            | 29-07-2021          |
|                                           |                     |                            | WO 2020126064 A1    |
|                                           |                     |                            | 25-06-2020          |
|                                           |                     |                            | WO 2020126600 A1    |
|                                           |                     |                            | 25-06-2020          |
|                                           |                     |                            | WO 2020126604 A1    |
|                                           |                     |                            | 25-06-2020          |
|                                           |                     |                            | WO 2020126609 A2    |
|                                           |                     |                            | 25-06-2020          |
|                                           |                     |                            | WO 2020126610 A1    |
|                                           |                     |                            | 25-06-2020          |

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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | F I                  | テーマコード (参考) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|
| <b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>A 6 1 P 1/16</b>  |             |
| <b>A 6 1 P 3/06 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>A 6 1 P 3/06</b>  |             |
| <b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>A 6 1 P 31/12</b> |             |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>A 6 1 P 35/00</b> |             |
| <b>C 1 2 N 15/11 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>C 1 2 N 15/11</b> | <b>Z</b>    |
| (32)優先日 令和3年6月18日(2021.6.18)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                      |             |
| (33)優先権主張国・地域又は機関                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                      |             |
| オランダ(NL)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                      |             |
| (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TK),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW |                      |             |
| (72)発明者 ヘアマンズ, ガイ<br>オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフエン, アントニ ファン レーウェンフック 9,<br>ビルディング アー 1 2 - 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                      |             |
| (72)発明者 ポステル, ルーベン<br>オランダ王国, 3 7 2 1 エムアー ビルトホーフエン, アントニ ファン レーウェンフック 9,<br>ビルディング アー 1 2 - 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                      |             |
| (72)発明者 ファン デ ランゲムヒーン, ヘルムス<br>オランダ王国, 3 8 8 1 シーエル プッテン, ブルーノ ファブリクスストラート 2 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                      |             |
| (72)発明者 アサディアン ビルジャンド, マズダク<br>ドイツ連邦共和国, 1 2 1 6 5 ベルリン, ベルリクエスト 1 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                      |             |
| F ターム (参考) 4C076 AA95 CC50 EE59<br>4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA13 ZA75 ZB21 ZB26<br>ZB33 ZC33<br>4C091 AA06 BB02 CC01 DD01 EE06 FF02 FF06 GG01 HH01 JJ03<br>KK01 LL03 LL06 MM01 NN02 NN12 PA02 PA12 PB01 QQ02 QQ05<br>QQ15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                      |             |