

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7073109号

(P7073109)

(45)発行日 令和4年5月23日(2022.5.23)

(24)登録日 令和4年5月13日(2022.5.13)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 44 (全106頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-568143(P2017-568143)

(86)(22)出願日 平成28年6月30日(2016.6.30)

(65)公表番号 特表2018-519831(P2018-519831  
A)

(43)公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/040361

(87)国際公開番号 WO2017/004357

(87)国際公開日 平成29年1月5日(2017.1.5)

審査請求日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(31)優先権主張番号 62/187,878

(32)優先日 平成27年7月2日(2015.7.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/264,026

(32)優先日 平成27年12月7日(2015.12.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 598004424

シティ・オブ・ホープ

City of Hope

アメリカ合衆国カリフォルニア州910

10-0269,デュアーテ,イースト

・デュアーテ・ロード 1500

1500 East, Duarte Ro

ad, Duarte, Californ

ia 91010-0269, Unit

ed States of America

(74)代理人 110001173

特許業務法人川口国際特許事務所

(72)発明者 コルティレフスキ, マルチン・トマシュ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91

016、モンロビア、オークデール・ア

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチドを含む化合物及び組成物、ならびにそれらの使用法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

リンカーを介して、C C A A T / エンハンサー結合タンパク質 ( C E B P A )、p 2 1  
 または p 5 3 の二本鎖低分子活性化RNA ( s a R N A ) の一本鎖にコンジュゲートされ  
 た、配列番号7 ~ 1 8、2 9、3 0、及び9 8 ~ 1 0 1のうちの1つの配列を有するホス  
 ホロチオエート化C p Gオリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) を含む単離化合物であっ  
 て、前記 s a R N A の一本鎖が、配列番号1 ~ 6のうちの1つの配列を有し、配列番号7  
 ~ 1 8、2 9、3 0、及び9 8 ~ 1 0 1の各々が、以下の表に示される下線位置にホスホ  
 ロチオエート連結を有する、前記単離化合物。

【表 1】

配列 5' -3'	配列番号
GGTGCATCGATGCAGGGGGG	7
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	8
GGGGTCAACGTTGAGGGGGG	9
GGGGTCAACGTTGAGGGGGG	100
GGGGGACGATCGTCGGGGGGG	10
GGTGCATCGATGCAGGGGGG	11
GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG	12
GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG	101
TCCATGACGTTCCCTGATGCT	13
TCCATGACGTTCCCTGACGTT	14
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	15
TCGTCGTTGTGCTTTTGTGCTT	16
TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG	17
TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT	18
GGTGCATGCATGCAGGGGGG	29
GGT GCA T(CG/GC) ATG CAG GGGGG	30
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	98
TCCTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	99

10

20

30

## 【請求項 2】

前記ホスホロチオエート化 CpG ODN が、配列番号 8 ~ 18 及び 98 ~ 101 のうちの 1 つの配列を有する、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

前記リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレン、または置換もしくは非置換のヘテロアルキレンである、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

前記リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリーレン、または置換もしくは非置換のヘテロアリーレンである、請求項 2 に記載の化合物。

40

## 【請求項 5】

前記リンカーが、置換もしくは非置換の C<sub>1</sub> ~ C<sub>40</sub> のアルキレン、置換もしくは非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> のシクロアルキレン、置換もしくは非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換の C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> のアリーレン、または置換もしくは非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリーレンである、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

50

前記リンカーが、非置換の C<sub>1</sub> ~ C<sub>40</sub> のアルキレン、非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン、非置換の C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> のシクロアルキレン、非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキレン、非置換の C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> のアリーレン、または非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリーレンである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記リンカーが、置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキレンである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記 s a R N A が、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' フルオロ、2' - デオキシ、ユニバーサル塩基、5 - C - メチル、反転デオキシ脱塩基性残基の組み込み、及びロックド核酸から成る群から選択される化学的修飾を含む、請求項 1 に記載の化合物。 10

【請求項 9】

前記修飾が、前記 s a R N A の、末端核酸塩基に位置する、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】

前記修飾が、前記 s a R N A の、末端核酸塩基に位置しない、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 11】

前記修飾が、血清由来のヌクレアーゼから保護する、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 12】

薬学的に許容される賦形剤、及び請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物を含む、医薬組成物。 20

【請求項 13】

第 2 治療薬をさらに含む、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記第 2 治療薬が、抗腫瘍または抗がん剤、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、抗炎症剤、鎮痛剤、抗感染性剤、増殖阻害剤、免疫原性薬剤、免疫調節剤、及びケモカインから成る群から選択される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記抗がん剤が、細胞死促進薬である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記第 2 治療薬が、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、バクリタキセル、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、アレムツズマブ、B C G (カルメット・ゲラン桿菌)、ペバシズマブ、セツキシマブ、デノスマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、インターフェロン、イピリムマブ、ラパチニブ、モノメチルオーリスタチン E、メルタンシン、リツキシマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス、及びトラスツズマブ、またはそれらの 2 つ以上の組み合わせから成る群から選択される、請求項 14 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 17】

がんの治療が必要な対象において、がんを治療するための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物を含む、医薬組成物。 40

【請求項 18】

前記がんが、前立腺がん、乳がん、膠芽細胞腫、卵巣がん、肺がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、黒色腫、脳腫瘍、大腸がん、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記化合物が対象における前記がんを治療し、同時に免疫応答を刺激する、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記化合物が、配列番号 7 ~ 18 及び 98 ~ 101 のホスホロチオエート化 C p G オリゴ 50

デオキシヌクレオチド（ODN）の１つにコンジュゲートされた、CEBPA、p 2 1、もしくはp 5 3のsaRNAを含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記対象における前記がんを、同時に免疫応答を刺激することなく治療するための、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記化合物が、配列番号 2 9 ～ 3 0 のホスホロチオエート化 Cp G オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つとコンジュゲートされた、CEBPA、p 2 1、もしくはp 5 3のsaRNAを含む、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

自己免疫疾患の治療が必要な対象における、自己免疫疾患を治療するための、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記自己免疫疾患及び／または障害が、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、または全身性エリテマトーデスである、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記化合物が、前記対象における前記自己免疫疾患を、同時に免疫応答を刺激することなく治療する、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記化合物または前記組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、前記対象に投与されるように製造される、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記治療が、前記化合物または組成物の用量に依存している、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

0 . 0 0 1 m g / k g から 1 0 0 m g / k g の前記化合物が、投与されるように製造される、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

免疫応答を刺激することが必要な対象において、免疫応答を刺激するための化合物を含む医薬組成物であって、リンカーを介して、C C A A T / エンハンサー結合タンパク質（CEBPA）、p 2 1、もしくはp 5 3の二本鎖低分子活性化RNA（saRNA）の一本鎖にコンジュゲートされた、配列番号 7 ～ 1 8 及び 9 8 ～ 1 0 1 のうちの 1 つのホスホロチオエート化 Cp G オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を含む化合物であって、前記 saRNA の一本鎖が、配列番号 1 ～ 6 のうちの 1 つの配列を有し、配列番号 7 ～ 1 8、2 9、3 0、及び 9 8 ～ 1 0 1 の各々が、以下の表に示される下線位置にホスホロチオエート連結を有する、前記化合物を含有する医薬組成物。

10

20

30

40

50

【表 2】

配列 5' -3'	配列番号
GGTGCATCGATGCAGGGGGG	7
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	8
GGGGTCAACGTTGAGGGGGG	9
GGGGTCAACGTTGAGGGGGG	100
GGGGGACGATCGTCGGGGGG	10
GGTGCATCGATGCAGGGGGG	11
GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG	12
GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG	101
TCCATGACGTTCTGATGCT	13
TCCATGACGTTCTGACGTT	14
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	15
TCGTCGTTGTGCTTTTGTGCTT	16
TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG	17
TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT	18
GGTGCATGCATGCAGGGGGG	29
GGT GCA T(CG/GC) ATG CAG GGGGG	30
TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	98
TCCTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT	99

10

20

30

## 【請求項 3 0】

前記刺激が、ナチュラルキラー細胞、T細胞、B細胞または骨髄細胞の成熟、分化、もしくは増殖を含む、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3 1】

前記刺激が、T<sub>H</sub> 1 型免疫応答の増加を含む、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3 2】

前記免疫応答の刺激が、前記対象の臓器へ、樹状細胞及びCD 8 + T細胞を補充する、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

40

## 【請求項 3 3】

前記免疫応答の刺激が、前記対象における抗原提示細胞の集団を拡大する、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3 4】

前記免疫応答の刺激が、前記対象におけるがん細胞の増殖を抑制する、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3 5】

前記化合物または前記組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、前記対象に投与されるように製造された、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 36】

細胞において、C / E B P の発現を増進する方法であって、前記細胞を、インビトロまたはエキスピボで、( i ) リンカーを介して、C C A A T / エンハンサー結合タンパク質 ( C E B P A ) の二本鎖低分子活性化RNA ( s a R N A ) の一本鎖とコンジュゲートされた、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30、及び 98 ~ 101 のうちの1つの配列を有するホスホロチオエート化C p Gオリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) を含む化合物であって、前記 s a R N A の一本鎖が、配列番号 1 又は 2 のうちの1つの配列を有し、配列番号 7 ~ 18、29、30、及び 98 ~ 101 の各々が、以下の表に示される下線位置にホスホロチオエート連結を有する、前記化合物の有効量、または ( i i ) リンカーを介して、C C A A T / エンハンサー結合タンパク質 ( C E B P A ) の二本鎖低分子活性化RNA ( s a R N A ) の一本鎖とコンジュゲートされた、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30、及び 98 ~ 101 のうちの1つの配列を有するホスホロチオエート化C p Gオリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) を含む化合物であって、前記 s a R N A の一本鎖が、配列番号 1 又は 2 のうちの1つの配列を有し、配列番号 7 ~ 18、29、30、及び 98 ~ 101 の各々が、以下の表に示される下線位置にホスホロチオエート連結を有する、前記化合物を含む、前記化合物と接触させることを含む、前記方法。

10

【表 3】

配列 5' -3'	配列番号
<u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u>	7
<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	8
<u>GGGGTCAACGTTGAGGGGGG</u>	9
<u>GGGGTCAACGTTGAGGGGGG</u>	100
<u>GGGGGACGATCGTCGGGGGG</u>	10
<u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u>	11
<u>GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG</u>	12
<u>GGGG ACGACGTCGT GGGGGGG</u>	101
<u>TCCATGACGTTCTGATGCT</u>	13
<u>TCCATGACGTTCTGACGTT</u>	14
<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	15
<u>TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	16
<u>TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG</u>	17
<u>TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT</u>	18
<u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u>	29
<u>GGT GCA T (CG/GC) ATG CAG GGGGG</u>	30
<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	98
<u>TCCTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	99

20

30

40

## 【請求項 37】

細胞の増殖を阻害する方法であって、インビトロまたはエキスピボで、前記細胞を、請求

50

項 1 に記載の化合物の有効量と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 3 8】

前記細胞が、がん細胞である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記細胞が、急性骨髄性リンパ ( A M L ) 細胞、または前立腺がん細胞である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記 A M L 細胞が、骨髄からのものである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記細胞が、インビトロで培養された細胞である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

10

【請求項 4 2】

前記細胞が、エキスピボで培養された組織における細胞である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記接触ステップが、ウイルス性の形質導入を含まない、請求項 3 6 または 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

細胞が、1 ナノモル ~ 1 0 0 ナノモル濃度の前記化合物と接触する、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 5 年 7 月 2 日に出願された、米国仮特許出願第 6 2 / 1 8 7 , 8 7 8 号、及び 2 0 1 5 年 1 2 月 7 日に出願された、米国仮特許出願第 6 2 / 2 6 4 , 0 2 6 号の利益を主張し、その全体及び全ての目的に対し、その各々の内容を、本明細書に援用する。

【0 0 0 2】

A S C I I テキストファイルとして提出された、「配列リスト」、表、またはコンピュータプログラムリスト別表の参照

2 0 1 6 年 6 月 1 4 日に作成され、7 3 , 4 6 9 バイト、I B M - P C 機械フォーマット、M S - W i n d o w s オペレーティングシステムにおいて、ファイル 4 8 4 4 0 - 5 7 0 0 0 1 W O \_ S T 2 5 . T X T に記載された配列リストを、参照により本明細書に援用する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

急性骨髄性白血病は、未熟骨髄前駆細胞の蓄積により特徴付けられる。白血病誘発は、骨髄系統の分化、自己複製及び/または増殖を制御する、がん遺伝子、腫瘍抑制因子または転写因子の異常調節をもたらす。転写因子 C C A T / エンハンサー結合タンパク質 ( C / E B P ) は、顆粒球及びマクロファージの分化を促進し、ならびに造血幹細胞の自己複製を、負に調節する。緊急の顆粒球形成時及び白血病誘発時には、C / E B P は、C / E B P 及び S T A T 3 転写因子の転写活性によって、置換される。C / E B P の変異または下方調節は、A M L の患者に頻繁に観察される。低分子活性化 R N A s ( s a R N A s ) は、遺伝子発現を誘発することができる。s a R N A 及びその他のオリゴヌクレオチド治療剤の臨床応用における要因は、標的送達に困難であり、さらに核酸への免疫システムに固有の感受性により、さらに複雑化する。S T A T 3 は、がん細胞及び非悪性腫瘍関連細胞の両方で作用する。しかしながら、S T A T 3 などの転写因子を標的化することは、それらの酵素活性の欠如によって複雑であり、及び非薬理的なアプローチを必要とする。S T A T 3 を抑制するためのアンチセンス技術は、利用可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドが、細胞選択性を欠いているため、効果を限定してきた。本開示は、安定であり、及び播種性がんに対する全身投与に適している、s a R N A がコンジュゲート

40

50

した、ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドを用いて、がん、例えば、A M L を治療するための化合物、組成物、及び方法に関する。本開示はまた、ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、がん、例えば前立腺がん及び膠芽細胞腫を治療するための化合物、組成物、ならびに方法に関する。

#### 【発明の概要】

##### 【0004】

1つの態様において、現開示は、とりわけ、標的遺伝子の発現を調節するための、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 含む、単離化合物を提供する。1つの態様において、本開示は、目的とする遺伝子の、アンチセンス核酸配列または低分子活性化RNA (saRNA) にコンジュゲートした、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を含む、単離化合物を包含する。実施形態において、当該ODNは、15～30塩基長、一本鎖、部分的にまたは完全にホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチドである。

10

##### 【0005】

実施形態において、本開示の化合物は、遺伝子発現を増進させるための低分子活性化RNA (saRNA)、または遺伝子発現を抑制するためのアンチセンス配列を含む。

##### 【0006】

1つの態様において、本開示は、本開示の化合物を含む、化合物または組成物を用いて、対象における免疫応答を刺激することを伴いまたは伴わず、その化合物を含む、化合物または組成物を用いて、対象におけるがんを治療する方法を包含する。1つの態様において、本開示は、本開示のホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした、C/EBP のsaRNAを含有する化合物を含む、化合物または組成物を用いて、細胞においてC/EBP 発現を増進させる方法を包含する。1つの態様において、本開示は、本開示のホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした、STAT1～STAT6の、1つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含有する化合物を含む、化合物または組成物を用いて、転写因子であるシグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) (STAT1～STAT6) の発現を抑制する方法を包含する。

20

##### 【0007】

1つの態様において、本開示は、細胞を、当該化合物を含む、化合物または組成物の有効量に接触させることにより、その細胞の増殖を阻害する方法を包含する。

30

##### 【0008】

当該低分子活性化RNA (saRNA) は、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 - (C/EBP) を、活性化することができる。この方法には、骨髄腫、急性骨髄性白血病、前立腺がん、乳がん、膠芽細胞腫、卵巣がん、肺がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、黒色腫、脳腫瘍、大腸がん、白血病、またはリンパ腫を治療すること含む。当該組成物は、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、その対象に投与されてよい。

##### 【0009】

本開示のその他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明ならびに請求項から明らかになるであろう。

40

##### 【0010】

特にその意でないことが明示されない限り、本明細書で参照される、すべての出版物、参照、特許及び/または特許出願は、すべての目的に対し、その内容全体が、参照によって本明細書に援用される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

【図1A】図1A～1Fは、化学的に安定化された、CpG - CEBPA saRNAオリゴヌクレオチドの設計を示す。二本鎖及び一本鎖のCpG - CEBPA saRNAの配列を示す。下線は、そのコンジュゲート骨格における、ホスホロチオエート化部位であ

50

る。その 2' OMe 変性ヌクレオチドを、四角い囲み内に示し、及びイタリック体で記載し、その C3 リンカー (Glen Research) の 5 ユニットを含むリンカー位置を示し、AS は、アンチセンス鎖、SS は、センス鎖である。図 1 A は、配列番号 103 及び配列番号 2 の二本鎖を含む、コンジュゲート配列を描写する。

【図 1 B】図 1 B は、配列番号 104 及び配列番号 105 の二本鎖を含む、コンジュゲート配列を描写する。

【図 1 C】図 1 C は、配列番号 103 を含む、コンジュゲート配列を描写する。

【図 1 D】図 1 D は、配列番号 104 を含む、コンジュゲート配列を描写する。

【図 1 E】図 1 E は、配列番号 106 及び配列番号 107 の二本鎖を含む、コンジュゲート配列を描写する。

10

【図 1 F】図 1 F は、配列番号 108 及び配列番号 109 の二本鎖を含む、コンジュゲート配列を描写する。

【図 2 A】図 2 A 及び 2 B は、リアルタイム定量 PCR (qPCR) により測定された、mRNA 発現レベルの棒グラフである。

【図 2 B】図 2 A 及び 2 B は、リアルタイム定量 PCR (qPCR) により測定された、mRNA 発現レベルの棒グラフである。

【図 2 C】図 2 C 及び 2 D は、タンパク質発現レベルのウェスタンブロット画像である。野生型 (WT) または TLR9 欠損 (TLR9 KO) マウスから単離された、新鮮な骨髓細胞を、500 nM の種々の CpG - saRNA コンジュゲートの処理過程でインキュベートするか、またはリポフェクトアミン 2000 を用いた、50 nM の非コンジュゲート saRNA でトランスフェクションした。C/EBP の mRNA 及びタンパク質レベルを、それぞれ qPCR (図 2 A ~ 2 B) 及びウェスタンブロットティング (図 2 C ~ 2 D) を用いて測定した。

20

【図 2 D】図 2 C 及び 2 D は、タンパク質発現レベルのウェスタンブロット画像である。野生型 (WT) または TLR9 欠損 (TLR9 KO) マウスから単離された、新鮮な骨髓細胞を、500 nM の種々の CpG - saRNA コンジュゲートの処理過程でインキュベートするか、またはリポフェクトアミン 2000 を用いた、50 nM の非コンジュゲート saRNA でトランスフェクションした。C/EBP の mRNA 及びタンパク質レベルを、それぞれ qPCR (図 2 A ~ 2 B) 及びウェスタンブロットティング (図 2 C ~ 2 D) を用いて測定した。

30

【図 3】CpG - CEBPA saRNA が誘発する、標的のヒトがん細胞における C/EBP の転写活性を表す、棒グラフを示す。C/EBP 特異的プロモーター・ルシフェラーゼ構造を発現する、ヒト DU145 前立腺がん細胞を、そこに示すように、500 nM の種々の CpG - saRNA コンジュゲートの存在下でインキュベートするか、またはリポフェクトアミン 2000 を用いた、50 nM の非コンジュゲート saRNA でトランスフェクトした。ホタルルシフェラーゼに一致する配列を持つ、CpG - FLUC - RNA コンジュゲートを、陰性対照として使用した。72 時間以降の細胞を溶解し、及び Cignal C/EBP レポーターアッセイキット (Qiagen) を使用して、レベルを解析した。

【図 4 A】図 4 A 及び 4 B は、ヒト及びマウス細胞において、その C/EBP の mRNA での、CpG - CEBPA saRNA の、TLR9 依存効果及びタンパク質レベルを表すためのアッセイにおける、ヒト DU145 前立腺がん細胞、及び MOLM13 白血病細胞の、各々の棒グラフを示す。ヒト DU145 前立腺がん細胞 (図 4 A)、及び MOLM13 白血病細胞 (図 4 B) を、500 nM の種々の CpG - saRNA コンジュゲートの処理過程でインキュベートするか、またはリポフェクトアミン 2000 を用いた、50 nM の非コンジュゲート saRNA でトランスフェクトし、ホタルルシフェラーゼに一致する配列を持つ、CpG - FLUC - RNA コンジュゲートを、陰性対照として使用した。72 時間以降の細胞を、リアルタイム定量 PCR (qPCR) を用いた、CEBPA mRNA レベルの解析のために、単離 RNA に溶解した。

40

【図 4 B】図 4 A 及び 4 B は、ヒト及びマウス細胞において、その C/EBP の mRNA

50

Aでの、CpG - CEBPA・saRNAの、TLR9依存効果及びタンパク質レベルを表すためのアッセイにおける、ヒトDU145前立腺がん細胞、及びMOLM13白血病細胞の、各々の棒グラフを示す。ヒトDU145前立腺がん細胞（図4A）、及びMOLM13白血病細胞（図4B）を、500nMの種々のCpG - saRNAコンジュゲートの処理過程でインキュベートするか、またはリポフェクトアミン2000を用いた、50nMの非コンジュゲートsaRNAでトランスフェクトし、ホタルルシフェラーゼに一致する配列を持つ、CpG - FLUC - RNAコンジュゲートを、陰性対照として使用した。72時間以降の細胞を、リアルタイム定量PCR（qPCR）を用いた、CEBPA mRNAレベルの解析のために、単離RNAに溶解した。

【図5A】図5A～5Cは、500nMのCpG - CEBPA・saRNAコンジュゲートでインキュベートされたか、または48時間インビトロで、CEBP・saRNA単独でトランスフェクトされた、ヒトMV4 - 11AML細胞のフローサイトメトリーのスペクトルである。HLADR及び刺激分子のCD86ならびにCD40の発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した。データは、CpG - CEBPA saRNAが、インビボで免疫刺激効果を有することを示す（CD86（図5A）、CD40（図5B）、及びHLADR（図5C））。

10

【図5B】図5A～5Cは、500nMのCpG - CEBPA・saRNAコンジュゲートでインキュベートされたか、または48時間インビトロで、CEBP・saRNA単独でトランスフェクトされた、ヒトMV4 - 11AML細胞のフローサイトメトリーのスペクトルである。HLADR及び刺激分子のCD86ならびにCD40の発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した。データは、CpG - CEBPA saRNAが、インビボで免疫刺激効果を有することを示す（CD86（図5A）、CD40（図5B）、及びHLADR（図5C））。

20

【図5C】図5A～5Cは、500nMのCpG - CEBPA・saRNAコンジュゲートでインキュベートされたか、または48時間インビトロで、CEBP・saRNA単独でトランスフェクトされた、ヒトMV4 - 11AML細胞のフローサイトメトリーのスペクトルである。HLADR及び刺激分子のCD86ならびにCD40の発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した。データは、CpG - CEBPA saRNAが、インビボで免疫刺激効果を有することを示す（CD86（図5A）、CD40（図5B）、及びHLADR（図5C））。

30

【図6A】図6A～6Bは、マウスにおける同系の白血病細胞に対する、CpG - CEBPA・saRNAの用量依存効果の、折れ線グラフ及びフローサイトメトリーデータを示す。Cbfb/MYH11/Mpl白血病が樹立された後（>1%、血液中のAML細胞の1～5%の範囲で）、C57BL/6マウスに、CpG - CEBPA saRNAの様々な用量を、1日おきに2回注入し、及び最終処置後の1日で安楽死させた。図6Aは、治療前後にフローサイトメトリーを用いて評価した、末梢血中のAML細胞の割合の、折れ線グラフを示す。

【図6B】図6Bは、CpG - CEBPA saRNAが、用量依存性的方法で、骨髄及び脾臓において、AML細胞の割合を減少させることを表す、フローサイトメトリーのスペクトルを示す。種々の臓器における、GFP + cキット + AML細胞のフローサイトメトリー解析の代表的な結果を示す。

40

【図7A】図7A～7Bは、骨髄のAML細胞において、標的遺伝子発現を誘発するCpG - CEBPA saRNAの、静脈内注入の、フローサイトメトリー及びヒストグラムデータを示す。樹立されたCbfb/MYH11/Mpl白血病を持つマウスに、1mg/kgのCpG - CEBPA saRNAを使用して、1日おきに3回注入し、及び最終処置後の1日で安楽死させた。図7Aは、フローサイトメトリーの代表的な結果を示す。

【図7B】図7Bは、リアルタイムqPCRを用いて、骨髄から濃縮したcキット + AML細胞で測定した、CEBPA mRNAレベルの棒グラフを示す。

【図8A】図8A～8Bは、骨髄のAML細胞における、標的遺伝子発現を誘発するCpG - CEBPA saRNAの、静脈内注入の、折れ線グラフ及びフローサイトメトリー

50

データを示す。樹立された C b f b / M Y H 1 1 / M p l 白血病を持つマウスに、5 m g / k g の C p G - C E B P A s a R N A を使用して、1日おきに4回注入し、及び最終処置後の1日(20日目)で安楽死させた。図8Aは、治療前、治療中、及び治療後のフローサイトメトリーを用いて評価した、末梢血中の A M L 細胞の割合の、折れ線グラフを示す。

【図8B】図8Bは、実験終了時の末梢血、骨髓、及び脾臓における、A M L 細胞の割合のフローサイトメトリー解析を示す。

【図9A】図9A～9Cは、C p G - S T A T 3 A S O コンジュゲートの、代表的な配列設計及び P A G E ゲルデータを示す。図9Aに、一本鎖の C p G - S T A T 3 A S O 設計の一例を示す。ホスホロチオエート化ヌクレオチドには下線を引く。炭素リンカーの ( C H <sub>2</sub> )<sub>3</sub> ユニットは青色、S T A T 3 A S O 2 のギャップマー配列における、2' O M e 変性ヌクレオチドは赤色である。C p G - S T A T 3 A S O 2 (図9B) 及び C p G - S T A T 3 A S O 4 (図9C) コンジュゲートを、50%ヒト血清中で、37℃で最大5日間インキュベートした。次いで、そのサンプルを、7.5 M の尿素 / 20% P A G E ゲル上で溶解し、及び臭化エチジウムを用いて染色した。その代表的なゲル画像を示す。M は、DNA マーカーの位置を表す。

【図9B】図9A～9Cは、C p G - S T A T 3 A S O コンジュゲートの、代表的な配列設計及び P A G E ゲルデータを示す。図9Aに、一本鎖の C p G - S T A T 3 A S O 設計の一例を示す。ホスホロチオエート化ヌクレオチドには下線を引く。炭素リンカーの ( C H <sub>2</sub> )<sub>3</sub> ユニットは青色、S T A T 3 A S O 2 のギャップマー配列における、2' O M e 変性ヌクレオチドは赤色である。C p G - S T A T 3 A S O 2 (図9B) 及び C p G - S T A T 3 A S O 4 (図9C) コンジュゲートを、50%ヒト血清中で、37℃で最大5日間インキュベートした。次いで、そのサンプルを、7.5 M の尿素 / 20% P A G E ゲル上で溶解し、及び臭化エチジウムを用いて染色した。その代表的なゲル画像を示す。M は、DNA マーカーの位置を表す。

【図9C】図9A～9Cは、C p G - S T A T 3 A S O コンジュゲートの、代表的な配列設計及び P A G E ゲルデータを示す。図9Aに、一本鎖の C p G - S T A T 3 A S O 設計の一例を示す。ホスホロチオエート化ヌクレオチドには下線を引く。炭素リンカーの ( C H <sub>2</sub> )<sub>3</sub> ユニットは青色、S T A T 3 A S O 2 のギャップマー配列における、2' O M e 変性ヌクレオチドは赤色である。C p G - S T A T 3 A S O 2 (図9B) 及び C p G - S T A T 3 A S O 4 (図9C) コンジュゲートを、50%ヒト血清中で、37℃で最大5日間インキュベートした。次いで、そのサンプルを、7.5 M の尿素 / 20% P A G E ゲル上で溶解し、及び臭化エチジウムを用いて染色した。その代表的なゲル画像を示す。M は、DNA マーカーの位置を表す。

【図10A】図10A～10Bは、ヒトのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞による、C p G - S T A T 3 ・ A S O C y 3 のフローサイトメトリーデータを示す。ヒト前立腺がん細胞(図10A) 及び脾細胞(図10B) を、いかなるトランスフェクション試薬をも含まずに、指示濃度の蛍光標識化 C p G - S T A T 3 ・ A S O C y 3 と共に、1時間インキュベートした。がん細胞、樹状細胞(D C s、C D 1 1 c)、マクロファージ(M A C、F 4 / 8 0 + G r 1 -)、B細胞(B 2 2 0 + C D 1 1 c -)、及びT細胞(C D 3 +) による、当該オリゴヌクレオチドの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて評価した。C p G - S T A T 3 A S O C y 3 は、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞によって、急速に内在化した。

【図10B】図10A～10Bは、ヒトのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞による、C p G - S T A T 3 ・ A S O C y 3 のフローサイトメトリーデータを示す。ヒト前立腺がん細胞(図10A) 及び脾細胞(図10B) を、いかなるトランスフェクション試薬をも含まずに、指示濃度の蛍光標識化 C p G - S T A T 3 ・ A S O C y 3 と共に、1時間インキュベートした。がん細胞、樹状細胞(D C s、C D 1 1 c)、マクロファージ(M A C、F 4 / 8 0 + G r 1 -)、B細胞(B 2 2 0 + C D 1 1 c -)、及びT細胞(C D 3 +) による、当該オリゴヌクレオチドの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて評

10

20

30

40

50

価した。CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>は、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞によって、急速に内在化した。

【図11A】図11A～11Bは、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞による、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>のフローサイトメトリーデータを示す。マウスの前立腺がん細胞（図11A）及び脾細胞（図11B）を、いかなるトランスフェクション試薬をも含まずに、指示濃度の蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、1時間インキュベートした。がん細胞、樹状細胞（DCs、CD11c）、マクロファージ（MAC、F4/80+Gr1-）、B細胞（B220+CD11c-）、及びT細胞（CD3+）による、オリゴヌクレオチドの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて評価した。CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>は、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞によって、急速に内在化した。

10

【図11B】図11A～11Bは、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞による、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>のフローサイトメトリーデータを示す。マウスの前立腺がん細胞（図11A）及び脾細胞（図11B）を、いかなるトランスフェクション試薬をも含まずに、指示濃度の蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、1時間インキュベートした。がん細胞、樹状細胞（DCs、CD11c）、マクロファージ（MAC、F4/80+Gr1-）、B細胞（B220+CD11c-）、及びT細胞（CD3+）による、オリゴヌクレオチドの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて評価した。CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>は、マウスのインビトロの免疫細胞及び前立腺がん細胞によって、急速に内在化した。

20

【図12A】図12A～12Dは、インビトロの前立腺がん細胞による取り込み後の、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>の細胞内局在を表す、共焦点顕微鏡画像を示す。DU-145前立腺がん細胞を、（15分（図12A）、1時間（図12B）、2時間（図12C）、及び4時間（図12D））に示すように、500nMの蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、異なる時間でインキュベートした。DRAQ5（登録商標）による核染色後に、共焦点顕微鏡を用いて、そのコンジュゲートの細胞内局在を評価した。2つの独立した実験の1つからの、代表的な画像を示す。

【図12B】図12A～12Dは、インビトロの前立腺がん細胞による取り込み後の、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>の細胞内局在を表す、共焦点顕微鏡画像を示す。DU-145前立腺がん細胞を、（15分（図12A）、1時間（図12B）、2時間（図12C）、及び4時間（図12D））に示すように、500nMの蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、異なる時間でインキュベートした。DRAQ5（登録商標）による核染色後に、共焦点顕微鏡を用いて、そのコンジュゲートの細胞内局在を評価した。2つの独立した実験の1つからの、代表的な画像を示す。

30

【図12C】図12A～12Dは、インビトロの前立腺がん細胞による取り込み後の、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>の細胞内局在を表す、共焦点顕微鏡画像を示す。DU-145前立腺がん細胞を、（15分（図12A）、1時間（図12B）、2時間（図12C）、及び4時間（図12D））に示すように、500nMの蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、異なる時間でインキュベートした。DRAQ5（登録商標）による核染色後に、共焦点顕微鏡を用いて、そのコンジュゲートの細胞内局在を評価した。2つの独立した実験の1つからの、代表的な画像を示す。

40

【図12D】図12A～12Dは、インビトロの前立腺がん細胞による取り込み後の、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>の細胞内局在を表す、共焦点顕微鏡画像を示す。DU-145前立腺がん細胞を、（15分（図12A）、1時間（図12B）、2時間（図12C）、及び4時間（図12D））に示すように、500nMの蛍光標識化CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>と共に、異なる時間でインキュベートした。DRAQ5（登録商標）による核染色後に、共焦点顕微鏡を用いて、そのコンジュゲートの細胞内局在を評価した。2つの独立した実験の1つからの、代表的な画像を示す。

【図13A】図13A～13Dは、CpG-STAT3 ASOCY<sup>3</sup>が、アンドロゲン依存性DU-145（図13A）及びLNCaP-S17（図13B）前立腺がん細胞に

50

において、強力なSTAT3のノックダウンを誘発したことを示す、棒グラフ及び発現データである。DU-145（図13A）及びLNCap-S17（図13B）前立腺がん細胞を、500nMの種々のCpG/GpC-STAT3ASOs、非コンジュゲートSTAT3ASOs、または非標的化CpG-スクランブル化ODNと共に、インビトロで24時間インキュベートした。STAT3・mRNAの発現を、定量リアルタイムPCR（Taqman、qPCR）を用いて測定した。3連試験における、2つの独立した実験の1つからの結果を、平均±SDで示す。

【図13B】図13A～13Dは、CpG-STAT3 ASOCy3が、アンドロゲン依存性DU-145（図13A）及びLNCap-S17（図13B）前立腺がん細胞において、強力なSTAT3のノックダウンを誘発したことを示す、棒グラフ及び発現データである。DU-145（図13A）及びLNCap-S17（図13B）前立腺がん細胞を、500nMの種々のCpG/GpC-STAT3ASOs、非コンジュゲートSTAT3ASOs、または非標的化CpG-スクランブル化ODNと共に、インビトロで24時間インキュベートした。STAT3・mRNAの発現を、定量リアルタイムPCR（Taqman、qPCR）を用いて測定した。3連試験における、2つの独立した実験の1つからの結果を、平均±SDで示す。

10

【図13C】図13Cは、前立腺がん細胞における、非コンジュゲートSTAT3ASOと比較した、CpG-STAT3ASOの用量依存効果を示す。DU145細胞を、qPCRアッセイを用いて、STAT3 mRNAのレベルを分析する前に、異なる濃度のSTAT3 ASO（左パネル）またはCpG-STAT3ASO（右パネル）を用いて処置した。

20

【図13D】図13Dは、CpG-STAT3ASOが、STAT3 ASO単独よりも、より迅速にSTAT3ノックダウンを誘発したことを示す。示すように、細胞を、500nMのCpG-STAT3ASO、非コンジュゲートSTAT3ASO、または陰性対照としてのCpG-STAT3SSOで、24または48時間処置した。STAT3の活性化及びタンパク質レベルを、ウェスタンブロッティングを用いて評価した。アクチンを、負荷対照として使用した。

【図14A】図14A～14Bは、CpG-STAT3ASOコンジュゲートが、インビトロの前立腺がん細胞におけるアポトーシスの誘発において、STAT3ASOの単独よりもより有効であったことを示す、フローサイトメトリーデータである。細胞（DU-145（図14A）、及びLNCaP・S17（図14B））を、500nMの、当該CpG-STAT3 ASOコンジュゲート、当該STAT3ASO単独、または対照の非標的化コンジュゲートである、CpG-スクランブル化ODN（CpG-scbODN）と共に、24時間インキュベートした。アポトーシス細胞の割合を、7AAD及びアネキシンVでの染色後に、フローサイトメトリーを用いて測定した。

30

【図14B】図14A～14Bは、CpG-STAT3ASOコンジュゲートが、インビトロの前立腺がん細胞におけるアポトーシスの誘発において、STAT3ASOの単独よりもより有効であったことを示す、フローサイトメトリーデータである。細胞（DU-145（図14A）、及びLNCaP・S17（図14B））を、500nMの、当該CpG-STAT3 ASOコンジュゲート、当該STAT3ASO単独、または対照の非標的化コンジュゲートである、CpG-スクランブル化ODN（CpG-scbODN）と共に、24時間インキュベートした。アポトーシス細胞の割合を、7AAD及びアネキシンVでの染色後に、フローサイトメトリーを用いて測定した。

40

【図15A】図15A～15Cは、全身に注入された、CpG-STAT3ASOCy3のインビボ生体内分布の、フローサイトメトリーデータを示す。C57BL/6マウスに、5mg/kgのCy3標識化のCpG-STAT3 ASOCy3を静脈内注入し、及び3時間後に、安楽死させた。代表的な等高線図（図15Aには骨髄が描かれており、及び図15Bにはリンパ節が描かれている）は、骨髄及び末梢リンパ節からの、単一細胞の懸濁液におけるフローサイトメトリーを用いて表した、CD11b<sup>+</sup> 骨髄性細胞、またはCD11c<sup>+</sup> 樹状細胞（DCs）による、オリゴヌクレオチドの内在化を示す（n=4

50

）。

【図 15 B】図 15 A ~ 15 C は、全身に注入された、CpG - STAT3 ASO Cy3 のインビボ生体内分布の、フローサイトメトリーデータを示す。C57BL/6 マウスに、5 mg / kg の Cy3 標識化の CpG - STAT3 ASO Cy3 を静脈内注入し、及び 3 時間後に、安楽死させた。代表的な等高線図（図 15 A には骨髓が描かれており、及び図 15 B にはリンパ節が描かれている）は、骨髓及び末梢リンパ節からの、単一細胞の懸濁液におけるフローサイトメトリーを用いて表した、CD11b<sup>+</sup> 骨髓性細胞、または CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞（DCs）による、オリゴヌクレオチドの内在化を示す（n = 4）。

【図 15 C】図 15 C は、2.5 mg / kg の Cy3 標識化 CpG - STAT3・ASO Cy3 を使用して静脈内注入を行い、及びその 3 時間後に安楽死させた、樹立された RM9 前立腺腫瘍を持つ、C57BL/6 マウスを示す。そこに示すように、樹状細胞（DCs）（CD11c<sup>+</sup>）、マクロファージ（CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>）、B 細胞（CD19<sup>+</sup>）、T 細胞（CD3<sup>+</sup>）、または NK 細胞（CD49b<sup>+</sup>）によるオリゴヌクレオチドの内在化を、様々な臓器からの単一細胞の懸濁液上での、フローサイトメトリーを用いて評価した。平均 ± SEM で示す（n = 4）。

【図 16 A】図 16 A ~ 16 C は、CpG - STAT3 ASO コンジュゲートが、STAT3 を効果的に標的化し、及び TLR + B 細胞リンパ腫の生存率を低下させたことを示す、フローサイトメトリーデータ及び棒グラフである。図 16 A は、いかなるトランスフェクション試薬をも含まずに、500 nM の蛍光標識化 CpG - STAT3 ASO Cy3 と共に 1 時間インキュベートされた、非ホジキンリンパ腫 B 細胞の、フローサイトメトリーデータを示す。そのオリゴヌクレオチドの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて測定した。

【図 16 B】図 16 B は、定量リアルタイム PCR（Taqman）を用いて測定した、STAT3 mRNA の発現を示す棒グラフである。OCI-Ly3 細胞を、500 nM の、指示されたオリゴヌクレオチドと共に、24 時間インキュベートした。

【図 16 C】図 16 C は、500 nM の CpG - STAT3 ASO で、3 日間、毎日処置した、OCI-Ly3 細胞の結果を示す棒グラフである。その生存率を、XTT（第二世代のテトラゾリウム染料、（2,3-ビス-（2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル）-2H-テトラゾリウム-5-カルボキシアニリド））アッセイを用いて測定した。3 連試験における 2 つの独立した実験の 1 つからの結果を、平均 ± SEM で示す。

【図 17 A】図 17 A ~ 17 C は、CpG - STAT3 ASO による、小膠細胞及びグリオーマ細胞の特異的な取り込み、ならびに STAT3 阻害を示す、フローサイトメトリーデータ及び棒グラフである。マウス TLR9 + BV2 及び K-1uc 細胞（図 17 A）、ならびにヒトの初代グリオーマ幹様細胞（図 17 B）が、CpG - STAT3 ASO を、迅速に内在化し、及びインビトロのその非コンジュゲート STAT3 ASO を、より少ない度合いで内在化した（250 nM / 1 時間）。細胞を、250 nM の CpG - STAT3 ASO Alexa488、または非コンジュゲート STAT3 ASO Alexa488 と共に、示された時間でインキュベートし、及び Alexa488 陽性細胞の割合を、フローサイトメトリーを使用して測定した。

【図 17 B】図 17 A ~ 17 C は、CpG - STAT3 ASO による、小膠細胞及びグリオーマ細胞の特異的な取り込み、ならびに STAT3 阻害を示す、フローサイトメトリーデータ及び棒グラフである。マウス TLR9 + BV2 及び K-1uc 細胞（図 17 A）、ならびにヒトの初代グリオーマ幹様細胞（図 17 B）が、CpG - STAT3 ASO を、迅速に内在化し、及びインビトロのその非コンジュゲート STAT3 ASO を、より少ない度合いで内在化した（250 nM / 1 時間）。細胞を、250 nM の CpG - STAT3 ASO Alexa488、または非コンジュゲート STAT3 ASO Alexa488 と共に、示された時間でインキュベートし、及び Alexa488 陽性細胞の割合を、フローサイトメトリーを使用して測定した。

【図 17 C】図 17 C は、CpG - STAT3 ASO が、mRNA における STAT3 の強

力及び迅速なノックダウン、及び初代ヒトグリオーマ幹様細胞におけるタンパク質レベルを誘発することを示す。STAT3 mRNAレベルに対する、リアルタイムqPCRの代表的な結果を示す。

【図18A】図18A～18Cは、多様な送達経路を用いた投与後の、グリオーマ担持マウスにおける、CpG-STAT3阻害剤の生体内分布を示す、棒グラフ及びフローサイトメトリーデータである。図18Aは、蛍光標識化CSIsが、TLR9+GL261グリオーマ及び骨髓細胞（CD11b+F4/80<sup>LO</sup>小膠細胞、及びCD11b+Gr1+MDSCs）によるが、その非悪性脳実質によってではない、細胞の選択的なオリゴヌクレオチドの取り込みを表す、生体内分布の研究を示す。樹立された同所性腫瘍を持つマウスを、示された蛍光標識化試薬及び投与経路（単一注入、または6時間毎の3回のIV注入）を用いて、注入の3時間後に安楽死させた。腫瘍及び脳組織からの単一細胞の懸濁液を、フローサイトメトリーを用いて、蛍光細胞の割合に対して解析し、平均±SEMで示す（n=4）。

10

【図18B】図18Bは、IV注入の動物から単離された、種々の試験細胞集団における、ゲーティング戦略及び蛍光シグナルのレベルを表す、代表的なドットプロットを示す。

【図18C】図18Cは、イン・ビボのGL261腫瘍において、CpG-STAT3ASOの頭蓋内/IT注入が、STAT3ノックダウンを誘発したことを示す。マウスに、CpG-STAT3ASO（5mg/kg）の単一用量を注入した。GAPDH発現への正規化を伴った、リアルタイムqPCRを用いた、遺伝子発現解析の21時間後に、腫瘍を採取した。平均±SEMで示す（n=4）。

20

【図19A】図19A～19Eは、当該CpG-STAT3ASOの局所投与が、その遠位での腫瘍の増殖を抑え、及びPD-L1免疫チェックポイント調節を阻害することを示す。図19Aは、CpG-STAT3ASOのインビボでのコンジュゲートによる抗腫瘍効果が、STAT3ASO単独よりも、より顕著であることを示す。C57/BL6マウスに、 $2 \times 10^5$ 個のマウス前立腺がんRM9細胞を用いて、2箇所皮下注入した。腫瘍が十分に樹立された後（矢印によって示すように）、腫瘍の1つに、5mg/kgのそこに示されたコンジュゲートのCpG-STAT3ASO、STAT3ASO単独、CpG-STAT3SSOまたはPBSを、1日おきに、腫瘍内（IT）注入をして処置した。腫瘍の増殖を、示された時間ポイントで測定した。平均±SEM（n=6）で示す。

【図19B】図19Bは、STAT3ASOではなく、CpG-STAT3ASOが、遠位の未処理部位で、STAT3発現を阻害することを示す。STAT3・mRNAのレベルを、別々に処置されたマウスから採取した、全RM9腫瘍において、qPCRを用いて評価した。

30

【図19C】図19C～19Dは、CpG-STAT3ASOが、腫瘍浸潤性骨髓由来抑制細胞（MDSCs）において、STAT3活性化（図19C）及びPD-L1免疫チェックポイントの発現（図19D）を低下させることを示す。pSTAT3（右パネル）及びPD-L1表面発現（左パネル）のレベルを、示されているように、処置後のRM9腫瘍から単離されたMDSCs（CD11b+Gr1+）において、フローサイトメトリーによって評価した。代表的なヒストグラムのオーバーレイを示し、及びマウス各グループの結果をまとめた棒グラフを、平均±SEM（n=6）で示す。

40

【図19D】図19C～19Dは、CpG-STAT3ASOが、腫瘍浸潤性骨髓由来抑制細胞（MDSCs）において、STAT3活性化（図19C）及びPD-L1免疫チェックポイントの発現（図19D）を低下させることを示す。pSTAT3（右パネル）及びPD-L1表面発現（左パネル）のレベルを、示されているように、処置後のRM9腫瘍から単離されたMDSCs（CD11b+Gr1+）において、フローサイトメトリーによって評価した。代表的なヒストグラムのオーバーレイを示し、及びマウス各グループの結果をまとめた棒グラフを、平均±SEM（n=6）で示す。

【図19E】図19Eは、STAT3ASOではなく、CpG-STAT3ASOが、遠位の未処理部位で、STAT3の発現を阻害することを示す。STAT3・mRNAのレベルを、別々に処置されたマウスから採取した、全RM9腫瘍において、qPCRを用

50

いて評価した。

【図20A】図20A～20Bは、当該CpG-STATT3ASOの静脈内投与が、RM9前立腺がんの実験的骨転移モデルの完全退縮をもたらすことを示す、画像（図20A）及びフローサイトメトリーデータ（図20B）である。RM9前立腺がん細胞を、C57BL/6マウスの脛骨内に注入した。樹立された腫瘍を持つ動物を、5mg/kgのCpG-STATT3・ASOコンジュゲート、STATT3・ASO単独、またはCpG-スクランブル化ASOを、最大15日まで、毎日の点滴注入を用いて処置した。腫瘍組織量及びマウスの病態を、AmiX(Spectral)画像処理システム上での生物発光画像(BLI)、またはボディー・コンディション・スコア(BCS)の各々を使用して、モニターした（図20A）。グラフは、実験終了時、またはそのマウスが安楽せられた時点(BCS<2)での、フローサイトメトリーを用いて評価した、その骨髄におけるRM9mcherry+細胞の割合（図20B）を、平均±SEM(n=6)で示す。

10

【図20B】図20A～20Bは、当該CpG-STATT3ASOの静脈内投与が、RM9前立腺がんの実験的骨転移モデルの完全退縮をもたらすことを示す、画像（図20A）及びフローサイトメトリーデータ（図20B）である。RM9前立腺がん細胞を、C57BL/6マウスの脛骨内に注入した。樹立された腫瘍を持つ動物を、5mg/kgのCpG-STATT3・ASOコンジュゲート、STATT3・ASO単独、またはCpG-スクランブル化ASOを、最大15日まで、毎日の点滴注入を用いて処置した。腫瘍組織量及びマウスの病態を、AmiX(Spectral)画像処理システム上での生物発光画像(BLI)、またはボディー・コンディション・スコア(BCS)の各々を使用して、モニターした（図20A）。グラフは、実験終了時、またはそのマウスが安楽せられた時点(BCS<2)での、フローサイトメトリーを用いて評価した、その骨髄におけるRM9mcherry+細胞の割合（図20B）を、平均±SEM(n=6)で示す。

20

【図21】CpG-STATT3ASO阻害剤の二又作用が、ヒトのがん免疫治療の治療効果を増大できることを示している。TLR9は、腫瘍関連の骨髄細胞（マクロファージ、小膠細胞、及びG-MDSCs）のみならず、特定のがん細胞（腫瘍増殖細胞）によっても発現している。治療で誘発されたがん細胞死（例えば、CAR-T細胞治療または放射線療法後）は、腫瘍微小環境において、間接的にSTATT3を活性化し、TLR9リガンドの放出をもたらす。TLR9/STATT3のシグナル伝達は、マクロファージ/小膠細胞の分化を阻害し、一方で血管新生を刺激し、及び免疫応答を抑制する。さらに、腫瘍増殖細胞におけるSTATT3の活性化は、がんの自己複製及び治療への耐性を支えている。CSIsは、TLR9+細胞コンパートメントの両方において、STATT3の標的化を可能にし、それにより、全体として治療効果の向上を可能にする。

30

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書において提供されるのは、とりわけ、部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを標的とする、単離された化合物である。この単離化合物には、低分子活性化RNAs(sRNA)またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)にコンジュゲートされた、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)核酸配列を含む。このsRNA及び/またはASOは、2'OMe、ロック核酸で修飾されてよい。また、本明細書に提供されるのは、本明細書に開示の化合物の組成物、及びその開示された化合物または組成物を用いた、治療が必要な対象における疾患の治療法である。

40

【0013】

定義

本主題を理解する目的、及び付帯の請求項の構築のために、以下の定義が含まれる。本明細書で使用される略語は、化学及び生物学に分野において使用される、従来の意味を有する。

【0014】

特に定義されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的用語は、当業者によって通常理解されることと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., D

50

DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)を参照のこと。本明細書に記載されているものと同様のまたはそれに準ずる、任意の方法、装置及び材料が、本開示の実践において使用され得る。以下の定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を容易にするために提供されており、及び本開示の範囲を制限するものではない。

【0015】

本明細書において使用される、「低分子活性化RNA(s aRNA)」は、その平易な及び通常の意味に従って用いられ、及び遺伝子発現を活性化または誘発することができるRNAを指す。遺伝子特異的s aRNAは、標的遺伝子のプロモーターにおける配列を標的化し、及びその遺伝子の発現を誘発する。実施形態において、このs aRNAオリゴマーは、15～30塩基の二本鎖オリゴマーであってよい。当該s aRNAオリゴマーは、一本鎖のオーバーハングを伴って、部分的に二本鎖であってよい(例えば、図1A～1Fを参照)。この二本鎖は、ガイド鎖(アンチセンス、AS)及びパッセンジャー鎖(センス鎖、SS)を含む。実施形態において、当該s aRNAは、標的遺伝子の転写開始部位と比べて、ヌクレオチドが-75～+25の間の部分を標的としてよい。実施形態において、当該オリゴマーは、2'化学修飾を有してよい。実施形態において、当該オリゴマーは、血清の安定性を高める化学修飾、例えば、ホスホロチオエートのヌクレオチド間連結、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'フルオロリボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、ユニバーサル塩基ヌクレオチド、5-Cメチルヌクレオチド、反転デオキシ塩基性残基の組み込み、またはロック核酸を有してよい。

【0016】

本明細書において使用される、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)は、その平易な及び通常の意味に従って用いられ、及びその遺伝子産物の発現を低減するために、遺伝子の転写産物を標的とする、オリゴヌクレオチド指す。実施形態において、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗遺伝子Xアンチセンスオリゴヌクレオチド配列である。たとえば、STATのASOは、「抗STATアンチセンスオリゴヌクレオチド配列」を指すことができる。抗STAT1オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子1(STAT1)活性化因子のメッセンジャーRNA(mRNA)の、ヒトにおいては、そのSTAT1遺伝子によってコードされるが、翻訳レベルを低減または阻害する、オリゴヌクレオチドである。これは、STATタンパク質ファミリーの一員である。抗STAT2オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子2(STAT2)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。抗STAT3オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子3(STAT3)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。抗STAT4オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子4(STAT4)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。抗STAT5Aオリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子5A(STAT5A)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。抗STAT5Bオリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子5B(STAT5B)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。抗STAT6オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達兼転写活性化因子6(STAT6)のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳レベルを、低減または阻害するオリゴヌクレオチドである。

【0017】

実施形態において、当該オリゴマーは、2'化学修飾を有してよい。実施形態において、当該オリゴマーは、血清の安定性を高める化学修飾、例えば、ホスホロチオエートのヌクレオチド間連結、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'フルオロリボ

ヌクレオチド、2' - デオキシリボヌクレオチド、ユニバーサル塩基ヌクレオチド、5 - Cメチルヌクレオチド、反転デオキシ塩基性残基の組み込み、またはロック核酸 (LNA) を有してよい。

【0018】

本明細書において使用される用語「ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN)」とは、核酸配列、例えば、「CpG 核酸配列」、「GpC 核酸配列」、または「PS (ホスホロチオエート化) 核酸配列」を指し、それらのヌクレオチド間連結のいくつかまたは全てが、ホスホロチオエート連結を構成する。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は、15 ~ 30 塩基長の一本鎖であり、及び/または部分的にもしくは完全にホスホロチオエート化されている。部分的ホスホロチオエート化 ODN は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28のヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート連結を構成している、ODN である。配列内で、ホスホロチオエート化は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはすべてのヌクレオチドで、ひと続きになり得る。実施例において、いくつかのオリゴデオキシヌクレオチドは、ホスホロチオエート化されていない。

10

【0019】

本明細書において使用される用語「CpG 核酸配列」とは、ホスホジエステルのヌクレオチド間連結またはホスホジエステル誘導体のヌクレオチド間連結を介した、3' Gヌクレオチドに結合する5' Cヌクレオチドにおける、CpG モチーフを含む核酸を指す。実施形態において、CpG モチーフは、ホスホジエステルのヌクレオチド間連結を含む。実施形態において、CpG モチーフは、ホスホジエステル誘導体のヌクレオチド間連結を含む。実施形態において、CpG モチーフは、ホスホロチオエート連結を含む。

20

【0020】

本明細書において使用される用語「GpC 核酸配列」とは、ホスホジエステルのヌクレオチド間連結またはホスホジエステル誘導体のヌクレオチド間連結を介した、3' Cヌクレオチドに結合する5' Gヌクレオチドにおける、GpC モチーフを含む核酸を指す。実施形態において、GpC モチーフは、ホスホジエステルのヌクレオチド間連結を含む。実施形態において、GpC モチーフは、ホスホジエステル誘導体のヌクレオチド間連結を含む。実施形態において、GpC モチーフは、ホスホロチオエート連結を含む。

30

【0021】

本明細書において使用される用語「完全なホスホロチオエート化 ODN」とは、すべてのヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート連結である、オリゴヌクレオチド (例えば、CpG - ODN または GpC - ODN) を指す。

【0022】

本明細書において使用される用語「クラス A の CpG・ODN」もしくは「A クラスの CpG・ODN」、または「D 型の CpG・ODN」もしくは「クラス A の CpG・DNA 配列」とは、生物学的及び化学的に、その共通の意味に従って用いられ、及びその5'、3'、またはその両末端に、1つ以上のポリG配列、CpG モチーフを含む内部パリンドローム配列、1つ以上のホスホジエステル誘導体が結合するデオキシヌクレオチドを有する、オリゴデオキシヌクレオチドを含む、CpG モチーフを指す。実施形態において、クラス A・CpG・ODN は、その5'、3'、またはその両末端のポリG配列、CpG モチーフを含む内部パリンドローム配列、及び1つ以上のホスホジエステル誘導体が結合する、デオキシヌクレオチドを含む。実施形態において、当該ホスホジエステル誘導体は、ホスホロチオエートである。クラス A・CpG・ODN の例示には、ODN・D19、ODN・1585、ODN・2216、及び ODN・2336を含む。

40

【0023】

本明細書において使用される用語「クラス B の CpG・ODN」もしくは「B クラスの CpG・ODN」、または「K 型の CpG・ODN」もしくは「クラス B の CpG・DNA

50

配列」とは、生物学的及び化学的に、その共通の意味に従って用いられ、及びCpGモチーフを含む6merモチーフの1つ以上を含むオリゴデオキシヌクレオチド、ホスホジエステル誘導体が結合する全てのデオキシヌクレオチドを含む、CpGモチーフを指す。実施形態において、クラスB・CpG・ODNは、CpGモチーフ、及ホスホジエステル誘導体が結合する全てのデオキシヌクレオチドを含む、6merモチーフの1つ以上のコピーを含む。実施形態において、当該ホスホジエステル誘導体は、ホスホロチオエートである。実施形態において、クラスB・CpG・ODNは、CpGモチーフを含む、1つの6merモチーフを含む。実施形態において、クラスB・CpG・ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの、2つのコピーを含む。実施形態において、クラスB・CpG・ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの、3つのコピーを含む。実施形態において、クラスB・CpG・ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの、4つのコピーを含む。クラスB・CpG・ODNの例示には、ODN・1668、ODN・1826、ODN・2006、及びODN・2007を含む。

#### 【0024】

本明細書において使用される用語「クラスCのCpG・ODN」もしくは「CクラスのCpG・ODN」、または「C型のCpG・DNA配列」とは、生物学的及び化学的に、その共通の意味に従って用いられ、及びCpGモチーフを含むパリンドローム配列、及びホスホジエステル誘導体（ホスホロチオエート）が結合する全てのデオキシヌクレオチドを含む、オリゴデオキシヌクレオチドを指す。クラスC・CpG・ODNの例示には、ODN・2395、及びODNM・362を含む。

#### 【0025】

本明細書で使用される略語は、化学及び生物学の分野内で使用される、それらの従来の意味を有する。本明細書で説明される化学構造及び式は、化学分野で公知の、化学原子価の標準規則に従って構築される。

#### 【0026】

置換基が、左から右に書かれた従来の化学式で指定される場合、それらは同様に右から左へその構造を書いて得られる、化学的に同一の置換基を包含し、例えば、 $-CH_2O-$ は、 $-OCH_2-$ と等価である。

#### 【0027】

単独のまたは他の置換基の一部としての、用語「アルキル」とは、特に断りのない限り、直鎖状（すなわち、分岐していない）もしくは分岐状の非環状炭素鎖（もしくは炭素）、またはそれらの組み合わせを意味し、完全な飽和、モノもしくはボリ（多）の非飽和であってよく、及び設計された炭素原子数を有する（すなわち、 $C_1 \sim C_{10}$ は、1から10個の炭素を意味する）、二価及び多価ラジカルを含むことができる。飽和炭化水素ラジカル（例示には、非限定的に、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、（シクロヘキシル）メチルなどの基、例えば、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチルなどの同族体及び異性体を含む。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例示には、非限定的に、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2,4-ペンタジエニル、3-（1,4-ペンタジエニル）、エチニル、1-及び3-プロピニル、3-ブチニル、及びより高次の同族体ならびに異性体を含む。アルコキシは、酸素リンカー（ $-O-$ ）を介して、その分子の残りの部分に接合されたアルキルである。

#### 【0028】

単独のまたは他の置換基の一部としての、用語「アルキレン」とは、特に断りのない限り、例として、非限定的に、 $-CH_2CH_2CH_2-$ などの、アルキルから誘導される、二価のラジカルを意味する。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は、1から24の炭素原子を有する。「低級アルキル」または「低級アルキレン」とは、一般に、8またはそれ以下の炭素原子を有する、短鎖のアルキルまたはアルキレン基である。単独のまたは他の置換基の一部としての、用語「アルケニレン」とは、特に断りのない限り、アル

ケンから誘導される、二価のラジカルを意味する。

【0029】

単独のまたは他の用語との組み合わせとしての、用語「ヘテロアルキル」とは、特に断りのない限り、O、N、P、Si、及びSからなる群から選ばれる、少なくとも1つの炭素原子及び少なくとも1つのヘテロ原子を含む、安定な非環状の直鎖もしくは分枝鎖、またはそれらの組合せを意味し、ここでその窒素及び硫黄原子が、任意で酸化されていてよく、及びその窒素ヘテロ原子が、任意で四級化されていてよい。このヘテロ原子（複数可）のO、N、P、S、及びSiは、そのヘテロアルキルの任意の内部位置、またはそのアルキル基が、その分子の残りの部分に接合した位置に、配置されていてよい。例示には、非限定的に、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、及び $-\text{CN}$ を含む。例えば、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 、及び $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ のように、最大2つまたは3つまでのヘテロ原子が連続してよい。

10

【0030】

同様に、単独でまたは他の置換基の一部としての用語「ヘテロアルキレン」とは、特に断りのない限り、非限定的に、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、及び $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ によって例示される、ヘテロアルキルから誘導された、二価のラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基の場合、ヘテロはまた、その鎖のどちらか片方または両末端を占めることができる（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらに、アルキレンとヘテロアルキレンとの連結基の場合は、その連結基の方向は、その連結基の式が書かれている方向であることを意味してはいない。例えば、式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ は、 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 、及び $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ の両方を表す。上記のように、本明細書において使用されるヘテロアルキル基は、ヘテロ原子を介して、その分子の残りの部分に接合している、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}'$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、及び/または、 $-\text{NR}'\text{R}'$ などの基を包含する。「ヘテロアルキル」が列挙される場所では、 $-\text{NR}'\text{R}'$ などの、特定のヘテロアルキル基の列挙が続き、用語のヘテロアルキ及び $-\text{NR}'\text{R}'$ が、冗長または相互排他的ではないことが理解されよう。むしろ、その特定のヘテロアルキル基は、明瞭さを加えるために唱えられる。したがって、用語「ヘテロアルキル」は、 $-\text{NR}'\text{R}'$ などの、特定のヘテロアルキル基を除外していると、本明細書では解釈されてはならない。

20

30

【0031】

単独でまたはその他の用語との組み合わせとしての、用語「シクロアルキル」及び「ヘテロシクロアルキル」とは、特に断りのない限り、それぞれ「アルキル」及び「ヘテロアルキル」の、環状非芳香型を意味し、ここでその環または複素環を構成する炭素は、非水素原子との結合に参加しているすべての炭素原子価であるので、必ずしも、水素に結合されている必要はない。さらに、ヘテロシクロアルキルに対して、ヘテロ原子は、そのヘテロ環が接合している、その分子の残りの部分に、その位置を占めることができる。シクロアルキルの例示には、非限定的に、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどを含む。ヘテロシクロアルキルの例示には、非限定的に、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどを含む。単独でまたは他の置換基の一部としての、「シクロアルキレン」及び「ヘテロシクロアルキレン」とは、それぞれシクロアルキル及びヘテロシクロアルキルから誘導される、二価のラジカルを意味する。

40

【0032】

50

単独で、または他の置換基の一部としての、「ハロ」または「ハロゲン」とは、特に断りのない限り、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキル及び多価ハロアルキルを含むことを意味する。例えば、用語「ハロ(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキル」には、非限定的に、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - ブロモプロピルなどを包含する。

#### 【0033】

用語「アシル」とは、特に断りのない限り、Rが、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである、-C(O)Rを意味する。

#### 【0034】

用語「アリール」とは、特に断りのない限り、多価不飽和、芳香族、炭化水素置換基を意味し、共に縮合している（すなわち、縮合環アリール）または共有結合している（例えば、ビフェニル）、単環または複素環（好ましくは 1 から 3 環）であり得る。縮合環アリールとは、縮合環の少なくとも 1 つが、アリール環である、共に縮合した複素環を指す。用語「ヘテロアリール」とは、N、O、またはSなどの、少なくとも 1 つのヘテロ原子を含むアリール基（または環）を指し、ここでその窒素及び硫黄原子が、任意で酸化され、及びその窒素原子（複数可）が、任意で四級化されている。このように、用語「ヘテロアリール」には、縮合環ヘテロ基（すなわち、縮合環の少なくとも 1 つが、ヘテロ芳香環である、共に縮合した複素環）を含む。5, 6 - 縮合環ヘテロアリエンは、共に縮合した 2 つの環を指し、ここで 1 つの環が、5 員環であり、及びその他の環が、6 員環であり、ならびにここで少なくとも 1 つの環が、ヘテロアリール環である。同様に、6, 6 - 縮合環ヘテロアリエンは、共に縮合した 2 つの環を指し、ここで 1 つの環が、6 員環であり、及びその他の環が、6 員環であり、ならびにここで少なくとも 1 つの環が、ヘテロアリール環である。及び 6, 5 - 縮合環ヘテロアリエンは、共に縮合した 2 つの環を指し、ここで 1 つの環が、6 員環であり、及びその他の環が、5 員環であり、ならびにここで少なくとも 1 つの環が、ヘテロアリール環である。ヘテロアリール基は、炭素またはヘテロ原子を介して、その分子の残りの部分に接合され得る。アリールならびにヘテロアリール基の非限定的な例示には、フェニル、1 - ナフチル、2 - ナフチル、4 - ビフェニル、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソオキサゾリル、4 - イソオキサゾリル、5 - イソオキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリル、3 - フリル、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - ピリミジル、4 - ピリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、プリニル、2 - ベンズイミダゾリル、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル、及び 6 - キノリルを含む。上述のアリール及びヘテロアリール環系の各々についての置換基は、後述の許容される置換基群から選択される。単独でまたは他の置換基の一部としての、「アリエン」及び「ヘテロアリエン」とは、それぞれアリール及びヘテロアリールから誘導される、二価のラジカルを意味する。ヘテロアリール基の非限定的な例示には、ピリジニル、ピリミジニル、チオフェニル、チエニル、フラニル、インドリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾジオキサニル、ベンゾジオキサニル、チアナフタニル、ピロロピリジニル、インダゾリル、キノリニル、キノキサリニル、ピリドピラジニル、キナゾリノニル、ベンゾイソオキサゾニル、イミダゾピリジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾチオフェニル、フェニル、ナフチル、ビフェニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピラジニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、フリルチエニル、ピリジル、ピリミジル、ベンゾチアゾリル、プリニル、ベンズイミダゾリル、イソキノリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、ピロリル、ジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ベンゾチアジアゾリル、イソチアゾ

10

20

30

40

50

リル、ピラゾロピリミジル、ピロロピリミジル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾオキサゾリル、またはキノリルを含む。上記例示は、置換または非置換であってよく、及び上記の各ヘテロアリーの例示の二価ラジカルは、非限定的に、ヘテロアリーレンの例示である。

#### 【0035】

縮合環ヘテロシクロアルキル-アリールは、ヘテロシクロアルキルに縮合したアリールである。縮合環ヘテロシクロアルキル-ヘテロアリールは、ヘテロシクロアルキルに縮合したヘテロアリールである。縮合環ヘテロシクロアルキル-シクロアルキルは、シクロアルキルに縮合したヘテロシクロアルキルである。縮合環ヘテロシクロアルキル-ヘテロシクロアルキルは、他のヘテロシクロアルキルに縮合したヘテロシクロアルキルである。縮合環ヘテロシクロアルキル-アリール、縮合環ヘテロシクロアルキル-ヘテロアリール、縮合環ヘテロシクロアルキル-シクロアルキル、もしくは縮合環ヘテロシクロアルキル-ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して、非置換であるか、または本明細書に記載の置換基の1つ以上と置換されていてよい。

10

#### 【0036】

本明細書において使用される用語「オキソ」とは、炭素原子に二重結合した酸素を意味する。

#### 【0037】

本明細書において使用される用語「アルキルスルホニル」とは、 $-S(O_2)-R'$  を有する部分を意味し、ここで  $R'$  は、上記で定義した置換または非置換のアルキル基である。 $R'$  は、炭素（例えば、「 $C_1 \sim C_4$  アルキルスルホニル」）の、特定の数を有してよい。

20

#### 【0038】

上記の各用語（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」、及び「ヘテロアリール」）は、指示されたラジカルの、置換及び非置換の両形態を含む。ラジカルの各種類に対する好ましい置換基を、以下に提供する。

#### 【0039】

当該アルキル及びヘテロアルキルのラジカルに対する置換基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニル）は、非限定的に、ゼロから  $(2m' + 1)$  の範囲の数における、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $3OSR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C_2(RO')$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NR_2O$ 、 $R'$ 、 $-NR'NR'R''$ 、 $-ONR'R''$ 、 $-NR'C=(O)NR'R''NR'R''R''$ 、 $NO_2$  から選ばれる多様な基の1つであり得て、ここで  $m'$  は、そのようなラジカルにおける炭素原子の総数である。 $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び  $R''''$  は、それぞれ好ましくは独立して、水素、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール（例えば、1～3ハロゲンで置換されたアリール）、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、もしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が、1つ以上の  $R$  基を含む場合、例えば、それら基の1つ以上が存在する場合の、各  $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び  $R''''$  基であるように、その  $R$  基の各々が、独立して選択される。 $R'$  及び  $R''$  が、同じ窒素原子に接合している場合、それらは、窒素原子と組み合わせられて、4、5、6、または7員環を形成することができる。例えば、 $-NR'R''$  は、非限定的に、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含む。置換基の上記考察から、当業者は、用語「アルキル」は、ハロアルキル（例えば、 $-CF_3$  及び  $-CH_2CF_3$ ）、及びアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$  など）などの、水素基以外の基に結合された炭素原子を含む基を包含していることを、理解されよう。

40

50

## 【0040】

アルキルラジカルについて記述される置換基と同様に、アリール及びヘテロアリール基についての置換基は、多様であり、及び例えば、その芳香族環上の、ゼロから未結合の原子価の総数までの範囲の数における、 $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R_2'R''$ 、 $-C(=O)CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR'R''C(O)NR'R''$ 、 $2-NR'R''C(O)R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'R''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'R''$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR'NR''R'''$ 、 $-ONR'R''$ 、 $-NR'C=(O)NR'R''NR'R'''$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ( $C_1-C_4$ )アルコキシ、及びフルオロ( $C_1-C_4$ )アルキルから選択され、ならびにここで $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ が、好ましくは独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールから選ばれる。本発明の化合物が、1つ以上の $R$ 基を含む場合、例えば、それら基の1つ以上が存在する場合の、各 $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ 基であるように、その $R$ 基の各々が、独立して選択される。

## 【0041】

2つ以上の置換基は、任意でアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクロアルキル基を形成するために、結合されてよい。このような、いわゆる環形成置換基は典型的に、必ずしもそうある必要はないが、環状の基部構造に接合されたものである。1つ実施態様において、この環形成置換基は、その基部構造に隣接するように接合される。例えば、環状基部構造の隣接する環員に接合された、2つの環形成置換基は、縮合環構造を作る。他の態様において、当該環形成置換基は、その基部構造の単一の環員に結合される。例えば、環状基部構造の単一環員に結合された、2つの環形成置換基は、スピロ環構造を作る。そのうえ他の実施形態において、当該環形成置換基は、その基部構造の隣接しない環員に接合される。

## 【0042】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の2つの置換基は、任意で、式 $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$ の環を形成してよく、ここで $T$ 及び $U$ は、独立して、 $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $-CRR'-$ 、または単結合であり、及び $q$ は、0から3の整数である。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の2つの置換基は、任意で、式 $-A-(CH_2)_r-B-$ の置換基で置換されてよく、ここで $A$ 及び $B$ は、独立して、 $-CRR'-$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'-$ 、または単結合であり、及び $r$ は、1から4の整数である。このように形成された新しい環の単結合の一つは、任意で、二重結合で置換されてよい。あるいは、アリールまたはヘテロ環の隣接する原子上の2つの置換基は、任意で、式 $-(CRR')_s-X'-(C'R''R''')_t$ の置換基で置き換えられてよく、ここで $s$ は、0から3の整数であり、及び $X'$ は、 $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または $-S(O)_2NR'-$ である。当該置換基 $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 、及び $R'''$ は、好ましくは独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、及び置換もしくは非置換のヘテロアリールから選ばれる。

## 【0043】

本明細書において使用される用語「ヘテロ原子」または「環ヘテロ原子」とは、酸素( $O$ )、窒素( $N$ )、硫黄( $S$ )、リン( $P$ )、及びケイ素( $Si$ )を含むものである。

## 【0044】

本明細書において使用される「置換基」とは、( $A$ )オキソ、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_2Cl$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC=O$

$\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、及び (B)(i) オキソ、ハロゲン、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、ならびに (ii)(a) オキソ、ハロゲン、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、及び (b) オキソ、ハロゲン、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}_3$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールから選択される少なくとも 1 つの置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールから選択される少なくとも 1 つの置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールから選択される少なくとも 1 つの置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、の部分から選択される基を意味する。

#### 【0045】

本明細書において使用される「サイズ限定置換基」または「サイズ限定置換基群」とは、「置換基群」対して前述された、全ての置換基から選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$  のアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 から 20 員環のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$  のシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$  のアリールであり、及び各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリールである。

#### 【0046】

本明細書において使用される「低級置換基」または「低級置換基群」とは、「置換基群」対して前述された、全ての置換基から選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$  アルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 から 8 員環のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_3 \sim \text{C}_7$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の 3 から 7 員環のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換の  $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$  のアリールであり、及び各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の 5 から 9 員環のヘテロアリールである。

#### 【0047】

いくつかの実施形態において、本明細書の化合物において記載される各置換基は、少なくとも1つの置換基群で、置換される。より具体的には、いくつかの実施形態において、本明細書の化合物において記載される、各置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリ二レン、及び/または置換ヘテロアリ二レンは、少なくとも1つの置換基群で、置換される。その他の実施形態において、これらの群の少なくとも1つまたは全部が、少なくとも1つのサイズ限定置換基群で、置換される。その他の実施形態において、これらの群の少なくとも1つまたは全部が、少なくとも1つの低級置換基群で、置換される。

【0048】

本明細書の化合物のその他の実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルキルであってよく、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2から20員環のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリールであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリールである。本明細書の化合物のその他の実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキレンは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2から20員環のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキレンは、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のアリ二レンは、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリ二レンであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリ二レンは、置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリ二レンである。

【0049】

いくつかの実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>のアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2から8員環のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>のシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3から7員環のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリールであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5から9員環のヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキレンは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>のアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2から8員環のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキレンは、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>のシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の3から7員環のヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のアリ二レンは、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリ二レンであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリ二レンは、置換もしくは非置換の5から9員環のヘテロアリ二レンである。いくつかの実施形態において、当該化合物は、後述の実施例で説明される化学種である。

【0050】

本明細書において、2つの部分を指す場合の用語「コンジュゲートした」とは、2つの部分が結合していることを意味し、ここで2つの部分を繋ぐ結合または複数の結合が、共有または非共有性であってよい。実施形態において、その2つの部分は、互いに（例えば、直接にまたは共有結合した媒介物を介して）、共有結合している。実施形態において、当該2つの部分は、非共有結合（例えば、イオン結合（複数可）、ファンデルワール力の

10

20

30

40

50

結合（複数可）／相互作用、水素結合（複数可）、極性結合（複数可）、またはそれらの組み合わせもしくは混合物）である。

【0051】

さらに、その合成方法が、本明細書に記載されるように、種々の保護基を利用していることは、当業者には理解されよう。本明細書において使用される用語「保護された反応基」とは、一時的に遮断された特定の機能部分（例えば、酸素、硫黄、窒素及び炭素）を指し、そのため反応が、多官能性化合物における別の反応部位で、選択的に行われ得る。保護基は、当業者に公知の方法を用いた化合物の合成時の適切な段階で、導入及び除去されてよい。当該保護基は、文献で記述されているような、標準的な有機合成の方法に従って適用される（例えば、Theodora W. Green and Peter G. M. Wuts (2007) Protecting Groups in Organic Synthesis, 4th edition, John Wiley and Sons, R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989)、Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994)、及び L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) を参照のこと。その各々は、保護基に関する参照によって援用される）。特定の例示的な保護基が、本明細書に詳細に記述されるが、しかしながら、本発明は、これらの保護基に限定されるものではないことは、理解されよう。むしろ、多様な追加の保護基が、当業者に公知の方法に従って利用されてよい。

【0052】

例示的なアルコール保護基には、非限定的に、メチルエーテル、置換メチルエーテル（例えば、MOM（メトキシメチルエーテル）、MTM（メチルチオメチルエーテル）、BOM（ベンジロキシメチルエーテル）、PMBM（p-メトキシベンジロキシメチルエーテル）、任意置換のエチルエーテル、任意置換のベンジルエーテル、シリルエーテル（例えば、TMS（トリメチルシリルエーテル）、TES（トリエチルシリルエーテル）、TIPS（トリイソプロピルシリルエーテル）、TBDMs（t-ブチルジメチルシリルエーテル）、トリベンジルシリルエーテル、TBDPS（t-ブチルジフェニルシリルエーテル）、エステル（例えば、ギ酸、酢酸、安息香酸（Bz）、トリフルオロ酢酸塩、ジクロロ酢酸塩）炭酸塩、環状アセタール及びケタールを含む。実施形態において、ヒドロキシ基は、エーテル（-OR<sup>\*</sup>）またはエステル（-OC(=O)R<sup>\*</sup>）として保護されてよく、ここでR<sup>\*</sup>が、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール（例えば、1～3のハロゲンで置換されたアリール）、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。例示的な保護されたヒドロキシ基には、t-ブチルエーテル、ベンジル、ベンズヒドリル（ジフェニルメチル）、またはトリチル（トリフェニルメチル）エーテル、トリメチルシリルもしくはt-ブチルジメチルシリルエーテル、またはアセチルエステル（-OC(=O)CH<sub>3</sub>、または-OAc）などで保護されたヒドロキシ基を含む。

【0053】

例示的なアミノ保護基には、非限定的に、カルバメート（カルバミン酸メチル、カルバミン酸エチル、置換カルバミン酸エチル（例えば、Troc）、t-ブチルカルバミン酸塩（Boc）、及びカルバミン酸ベンジル（Cbz））、アミド、環状イミド誘導体、N-アルキル及びN-アリールアミン、イミン誘導体、エナミン誘導体などを含む。例えば、保護されたアミノ基には、アミド（-NR<sup>\*</sup>C(=O)R<sup>\*</sup>）またはカルバミン酸塩（-NR<sup>\*</sup>C(=O)OR<sup>\*</sup>）などで保護された、窒素基を含み、ここで各R<sup>\*</sup>は、独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、もしくは非置換のシクロアルキル、もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非

10

20

30

40

50

置換のアリール（例えば、１～３のハロゲンで置換されたアリール）、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。実施形態において、保護されたアミノ基としては、例えば、メチルアミド（ $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$ ）、カルバミン酸ベンジル（ $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ）、*t*-ブチルカルバミン酸塩（ $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ）として、９-フルオレニルメトキシアミド（ $-\text{NH Fmoc}$ ）、６-ニトロベラトリロキシアミド（ $-\text{NH Nvoc}$ ）として、２-トリメチルシリルエトキシアミド（ $-\text{NH TEOC}$ ）として、２, ２, ２-トリクロロエトキシアミド（ $-\text{NH TROC}$ ）として、アリルオキシアミド（ $-\text{NH AllOC}$ ）として、２-(フェニルスルホニル)エチルオキシアミド（ $-\text{NH Psec}$ ）として、または、適切な場合における（例えば、環状アミン）ニトロラジカルとして、である。

10

#### 【００５４】

例示的なスルフヒドリル保護基には、非限定的に、チオエーテル（ $-\text{SR}^*$ ）を含み、ここで $\text{R}^*$ が、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール（例えば、１～３のハロゲンで置換されたアリール）、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。実施形態において、保護されたスルフヒドリル基は、例えば、置換もしくは非置換のベンジルチオエーテル、*tert*-ブチルチオエーテル、４-メチルチオエーテル、トリチルチオエーテル、２-(トリメチルシリル)エチル（ $\text{TMS E}$ ）チオエーテル、２-シアノエチルチオエーテル、９-フルオレニルメチル（ $\text{Fmoc}$ ）チオエーテル、またはアセトアミドメチルエーテル（ $-\text{SCH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$ ）である。

20

#### 【００５５】

実施形態において、クリックケミストリー反応基は、アジド基、アルケン基、アミノ基、*N*-ヒドロキシスクシンイミド基、スルフヒドリル基、ジビニルスルホン誘導体、またはマレイミド誘導体であり、または含む。したがって、実施形態において、当該リンカーは、例えば、*N*-ヒドロキシスクシンイミド（ $\text{NHS}$ ）ケミストリーによるコンジュゲートに適した、保護されたアミノ基または *N*-ヒドロキシスクシンイミド基、ジビニルベンゼンスルホンとコンジュゲートすることができるスルフヒドリル基、１-アルキル-３-メチルアクリロイル（アクリロイル）塩化物またはアクリロイル誘導体とコンジュゲートすることができる、保護されたスルフヒドリル基、マレイミド誘導体とコンジュゲートすることができる、保護されたスルフヒドリル基を含む、反応基（例えばクリックケミストリーの反応基）または保護された反応基で置換される。

30

#### 【００５６】

「標識」または「検出可能部分」は、分光、光化学、生化学、免疫、化学、磁気共鳴画像処理、またはその他の物理的な手段によって、検出可能な組成物である。例えば、有用な検出可能部分には、 $^{32}\text{P}$ 、蛍光色素、電子密度試薬、酵素（例えば、 $\text{ELISA}$ で一般的に使用されるものなど）、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、微小超常磁性酸化鉄（ $\text{USPIO}$ ）ナノ粒子、 $\text{USPIO}$ ナノ粒子凝集体、超常磁性酸化鉄（ $\text{SPIO}$ ）ナノ粒子、 $\text{SPIO}$ ナノ粒子凝集体、単結晶質 $\text{SPIO}$ 、単結晶質 $\text{SPIO}$ 凝集体、単結晶質酸化鉄ナノ粒子、単結晶質酸化鉄、その他のナノ粒子造影剤、ガドリニウムキレート（ $\text{Gd-chelate}$ ）分子を含む、リポソームまたはその他の送達ベヒクル、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種（例えば、炭素-１１、窒素-１３、酸素-１５、フッ素-１８、ルビジウム-８２）、フルオロデオキシグルコース（例えば、フッ素-１８標識化の）、任意のガンマ線放出放射性核種、陽電子放出核種、放射性標識化グルコース、放射性標識化水、放射性標識化アンモニア、生体コロイド、微小気泡（例えば、アルブミン、ガラクトース、脂質、及び/またはポリマーを含む微小気泡の殻を含み、空気、重質気体（複数種可）、パーフルオロカーボン、窒素、オクタフルオロプロパン、パーフレキサン脂質マイクロスフィア、パーフルトレンなどを含む微小気泡の殻）、ヨード造影剤（例えば、イオヘキソール、イオジヘキソール、イオバーソール、イオパミドール、イオキシラン、イオプロミド、ジアトリゾ酸、メトリゾ酸、イオキサゲル酸）、

40

50

硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、またはハプテン及びタンパク質もしくは、例えば、標的ペプチドとの特異的な反応性を有するペプチドまたは抗体に、放射性標識を組み込むことにより、検出可能な他の実体を含む。検出可能部分にはまた、ナノ粒子、粒子、凝集体に封入され、追加組成物で被覆され、標的物質（例えば、本明細書に記載の化合物）に結合するように誘導される、上記組成物のいずれも含む。オリゴヌクレオチドまたはタンパク質を当該標識にコンジュゲートさせるための、本技術分野で公知の任意の方法が、例えば、Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diegoに記載される方法を用いて、取り入れられてよい。

10

**【0057】**

本明細書において使用される用語「細胞」とはまた、そのような細胞に由来する、個別の細胞、細胞株、または培養物を指す。「培養物」とは、同一または異なる種類の単離細胞を含む、組成物を指す。

**【0058】**

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関連する用語「同一の」または「同一性」パーセントとは、同じであるか、または後述のデフォルトパラメータを有する、BLASTまたはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを利用して、または手動アライメント及び目視検査（例えば、NCBIウェブサイトなどを参照）によって測定されて、同じである（すなわち、比較ウィンドウまたは指定部分にわたる最大一致に対して、比較し及びアライメントする場合、特定の部分において、約60%が同一性、好ましくは61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはより高い同一性）、アミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定のパーセントを有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。そのような配列は次いで、「実質的に同一である」と言われる。この定義はまた、試験配列の相補体を指し、またはそれに適用されてよい。この定義にはまた、欠失及び/または追加を有する配列、ならびに置換基を有するそれらを含む。以下に説明するように、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを考慮することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約10のアミノ酸または20ヌクレオチド長である部分に対して存在する。本明細書において使用される、パーセント(%)アミノ酸配列同一性は、最大の配列同一性パーセントを達成するために、必要に応じて、配列をアライメントし及びギャップを導入した後に、基準配列中のアミノ酸と同一である、候補配列中のアミノ酸の割合として定義される。配列同一性パーセントを決定する目的に対応したアライメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign(DNA STAR)ソフトウェアなどの、公に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、本技術分野内の様々な方法で達成され得る。アライメントを測定するための適切なパラメータは、比較される配列の全長にわたって、最大のアライメントを達成するために必要となるアルゴリズムを含む、公知の方法によって決定され得る。

20

30

40

**【0059】**

配列比較の場合、通常1つの配列は、比較される試験配列に対して、基準配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び基準配列がコンピュータに入力され、必要に応じてサブ配列座標が指定され、及び配列アルゴリズムのプログラムパラメータが指定される。好ましくは、デフォルトのプログラムパラメータが使用され得て、または代替パラメータが指定され得る。次に、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、その基準配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

**【0060】**

「患者」、「対象」、「治療を必要とする患者」、及び「治療を必要とする対象」は、本

50

明細書においては同義的に使用され、ならびに当該方法及び本明細書で提供される組成物を用いた投与により治療が可能となる、疾患もしくは病態に苦しむ、またはその傾向にある有機体を指す。非限定的な例示には、ヒト、その他の哺乳動物、ウシ、ラット、マウス、イヌ、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ、シカ、及びその他の哺乳類以外の動物を含む。いくつかの実施形態において、患者はヒトである。インビトロまた培養のインビトロで得られた、生物学的実体の組織、細胞及びその子孫もまた、熟考される。

【 0 0 6 1 】

本明細書において使用される用語「投与」とは、経口投与、坐剤としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病巣内、腔内、鼻腔内または皮下投与、もしくは例えば、ミニ浸透ポンプなどの、対象への低速放出装置の移植を意味する。投与は、非経口及び経粘膜的（例えば、頬、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、または経皮）な経路を含む、任意の経路による。非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、及び頭蓋内を含む。送達のその他の様式には、非限定的に、リポソーム製剤、静脈内輸液、経皮パッチなどの使用を含む。

10

【 0 0 6 2 】

用語「治療する」、「治療すること」または「治療」、及び本明細書において使用されるその他の文法的に同等なものには、疾患、病態または病候を軽減すること、抑えること、改善すること、または予防すること、追加の病候を防ぐこと、病候の根本的な代謝原因を改善または防止すること、疾患または病態を阻害すること、例えば、疾患または病態の発達を阻止すること、疾患または病態を緩和すること、疾患または病態からの回帰を起こすこと、疾患または病態によって引き起こされる状態を緩和すること、もしくは疾患または病態の病候を止めることを含み、予防を含むものである。当該用語はさらに、治療上の利点及び/または予防上の利点を達成することを含む。治療上の利点によって、治療される基礎疾患の根絶または改善がなされる。また、治療上の利点は、基礎疾患に関連する、1つ以上の生理学的な病態の根絶または改善によって達成され、その結果、その患者が、依然として基礎疾患を持つ病人であるかもしれないが、その患者に改善が観察される。

20

【 0 0 6 3 】

用語「防止する」、「防止すること」または「防止」、及び本明細書において使用されるその他の文法的に同等なものには、疾患またはその疾患の病候を、発達、発生から避け、妨害または回避すること、同様に病候の発生を減少させることを含む。当該防止は、完全に（すなわち、検出できない病態）または部分的であってよく、そのため、より少ない病候が、あたかも治療を介在させていないように、観察される。当該用語はさらに、予防的利益を含む。防止される疾患または病態に対して、当該組成物が、特定の疾患を発症する危険性のある患者に、または、この疾患の診断が行われなかったとしても、疾患の生理的病態の1つ以上を報告する患者に投与されてよい。

30

【 0 0 6 4 】

用語「阻害すること」とは、本開示の化合物または組成物が存在しない状態と比較して、影響（疾患状態、または遺伝子/タンパク質/mRNAの発現レベル）を低減することを意味する。

【 0 0 6 5 】

本明細書において使用される「試験化合物」とは、特定化された生物学的標的または経路の活性、非活性、もしくはその他の調節機能を同定するための、スクリーニング段階で用いられる実験化合物を指す。

40

【 0 0 6 6 】

「対照」または「対照実験」とは、その明白な普通の意味に従って用いられ、及びその実験の対象または試薬が、その実験の手順、試薬、または変数を省略する場合除いて、並列実験として扱われるような実験を指す。いくつかの例示において、この対照は、実験の効果を評価する場合の、比較基準として用いられる。いくつかの実施形態において、対照とは、本明細書（実施形態及び実施例を含む）に記載される化合物が存在しない場合の、タンパク質の活性の測定である。

50

## 【 0 0 6 7 】

「疾患」または「病態」とは、本明細書において提供される化合物または方法で治療される可能性がある、患者もしくは対象の、存在状態もしくは健康状態を指す。いくつかの事例において、「疾患」または「病態」は、「がん」を指す。

## 【 0 0 6 8 】

本明細書において使用される用語「がん」とは、白血病、上皮性悪性腫瘍及び非上皮性悪性腫瘍を含む、哺乳動物において見出されるがん、新生物、悪性または良性の腫瘍のすべての型を指す。例示的ながんには、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肝臓がん、腎臓がん及び膵臓がんを含む。追加の例示には、白血病（例えば急性骨髄性白血病（AML）または慢性骨髄白血病（CML））、脳のがん、肺がん、非小細胞肺がん、黒色腫、非上皮性悪性腫瘍、及び前立腺がん、子宮頸がん、胃がん、頭頸部がん、子宮がん、中皮腫、転移性骨がん、髄芽腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、悪性膵島細胞腺腫、悪性カルチノイド、膀胱がん、前がん状態の皮膚病変、精巣がん、リンパ腫、甲状腺がん、神経芽細胞腫、食道がん、尿管がん、悪性高カルシウム血症、子宮内膜がん、副腎皮質がん、内分泌及び外分泌臓器の新生物を含む。

10

## 【 0 0 6 9 】

「接触すること」は、その明白な普通の意味に従って使用され、及び少なくとも2つの異なる種（例えば、生体分子または細胞を含む化合物）が、反応、相互作用、または物理的に接触するのに十分に近位になることを可能にするプロセスを指す。しかしながら、得られる反応生成物は、その添加試薬の反応から直接に、またはその反応混合物中で作成され得る1種以上の添加試薬からの中間体から作成され得ることを理解される必要がある。いくつかの実施形態において、接触することには、本明細書に記載の化合物が、タンパク質または酵素と相互作用をすることを可能にすることを含む。

20

## 【 0 0 7 0 】

本明細書において使用される用語「表現型」及び「表現型の」とは、疾患の病候、生化学的性質、または生理学的性質の発病もしくは進行などの有機体の観察可能な特徴を指す。

## 【 0 0 7 1 】

細胞内のDNA分子の発現レベルは、その細胞内に存在する、対応するmRNAの量、またはその細胞によって作成されるDNAによってコードされる、タンパク質の量のいずれかに基づいて決定されてよい（Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.7 - 18.8）。ポリペプチドを参照として使用する場合、発現には、非限定的に、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含む、ポリペプチドの作成に関与する任意のステップを含む。発現は、タンパク質を検出するための従来の技術（例えば、ELISA、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学的など）を用いて、検出され得る。

30

## 【 0 0 7 2 】

用語「遺伝子」とは、タンパク質の産生に関与するDNAのセグメントを意味する。これには、コード領域（リーダー及びトレーラー）の前後の部分、ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含む。このリーダー、トレーラー、ならびにイントロンには、遺伝子の転写及び翻訳時に必要な、調節因子を含む。さらに、「タンパク質遺伝子産物」とは、特定の遺伝子から発現されたタンパク質である。

40

## 【 0 0 7 3 】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指しての用語「～の量」とは、成分または因子が検出された場合の量を指す。この量は、対照に対して測定され得て、例えば、その対照との関連において、特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの増加したレベルは、そのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの濃縮を表す。したがって、実施形態において、増加量は、宿主（例えば、マウス）へ、本明細書に記載のHSPCsを移植する際の、より高いレベルまたは効率を示す。当該用語は、濃縮の定量的な測定だけでなく、対照に対す

50

る相対的な増減の定性的測定をも指す。

【0074】

本明細書の記載及び請求項を通して、単語「comprise（含む）」、及びその単語のその他の形態の、「comprising（含む）」ならびに「comprises（含む）」などは、非限定的に包含していることを意味し、及び例えば、その他の成分を除外する意図はない。

【0075】

「Analog（類似体）」、「analogue（類似体）」、または「誘導体」は、化学と生物学の中で用いられる、その明白な普通の意味に従って使用され、及び他の物質（すなわち、いわゆる「参照」物質）と構造的に似ているが、しかし組成において、例えば、異なる因子の原子による1つの原子の置換において、または特定の官能基の存在において、もしくは他の官能基による1つの官能基の置換において、またはその参照物質のキラル中心の絶対立体において異なる、化学物質を指す。いくつかの実施形態において、誘導体は、薬学的に許容される物質、例えば、リン酸またリン酸塩とのコンジュゲート体であってよい。

10

【0076】

本明細書において使用される用語「塩」とは、本明細書において使用される物質の酸性または塩基性の塩を指す。許容される塩の非限定的な実例は、ミネラル酸（塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸など）の塩、有機酸（酢酸、プロピオン酸、グルタミン酸、クエン酸）の塩、及び4級アンモニウム（ヨウ化メチル、ヨウ化エチルなど）の塩である。

20

【0077】

用語「薬学的に許容される塩」とは、本明細書に記載される化合物に含まれる特定の置換基に応じて、比較的毒性のない酸または塩基で調製された、活性化合物の塩を含むものである。本開示の化合物が、比較的酸性の機能性を含む場合、塩基性付加塩は、そのような化合物の中性形態を、希釈されていない状態でまたは適切な不活性溶媒中のいずれかで、十分な量の所望の塩基に接触させることにより、得ることができる。薬学的に許容される塩基性付加塩の例示には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、またはマグネシウム塩、もしくは類似の塩を含む。本開示の化合物が、比較的塩基性の機能を含む場合、酸性付加塩は、そのような化合物の中性形態を、希釈されていない状態でまたは適切な不活性溶媒中のいずれかで、十分な量の所望の酸と接触させることにより、得ることができる。薬学的に許容される酸性付加塩の例示には、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、1水素炭酸、リン酸、1水素リン酸、2水素リン酸、硫酸、1水素硫酸、水素、または亜リン酸などの、無機酸から誘導されるもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などの、相対的に毒性のない有機酸から誘導される塩を含む。また、アルギニン酸などのアミノ酸の塩、及びグルクロン酸またはガラクトン酸などの有機酸の塩が含まれる（例えば、Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science 66:1-19 (1977) を参照）。本開示のある特定の化合物は、その化合物を、塩基性または酸性付加塩のいずれかへの変換を可能にする、塩基性及び酸性の両機能を含む。当業者に公知の、その他の薬学的に許容されるキャリアが、本開示に適している。塩は、相応する塩基を含まない形態である、水性またはその他のプロトン溶媒において、より可溶性になる傾向がある。その他のケースにおいて、当該調製は、使用前に、緩衝液と組み合わせられた、pHが4.5から5.5の範囲の、1mM～50mMのヒスチジン、0.1%～2%のショ糖、2%～7%のマンニトール中での、凍結乾燥粉末であってよい。

30

40

【0078】

したがって、本開示の化合物は、薬学的に許容される酸と共に、塩として存在してよい。本開示には、そのような塩を含む。そのような塩の例示には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、

50

酒石酸塩（例えば、（＋）酒石酸塩、（－）酒石酸塩、またはラセミ混合物を含む、それらの混合物）、コハク酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸などのアミノ酸との塩を含む。これらの塩は、当業者に公知の方法によって、調製されてよい。

【 0 0 7 9 】

「補助剤」（ラテン語の、*adiuvare*に由来し、援助するの意）は、他の物質への影響を修正する、薬理学的及び／または免疫学的物質である。

【 0 0 8 0 】

「希釈剤」（充填剤、賦形剤またはシンナーとも呼ばれる）は、希釈用の物質である。特定の流体は、容易にポンプで送り込むには粘性がありすぎ、または1つの特定点からその他へ流すには濃すぎる。この状態で、そのような流体を移送することは、経済的に実現可能ではなく、この点が、問題となり得る。この制約された移動を緩和するために、希釈剤が添加される。これにより、流体の粘度が下がり、その結果、ポンピング移送／輸送コストも減少する。

【 0 0 8 1 】

用語「投与」または「投与すること」とは、治療を必要とする個人へ、現実形態の物質または現実形態の物質を含む医薬組成物を提供する行為を指す。

【 0 0 8 2 】

「共投与する」とは、本明細書に記載の組成物が、追加療法の投与と同時に、その直前に、またはその直後に投与されることを意味する。本開示の化合物または組成物は、その患者に、単独で投与され得て、または共投与され得る。共投与は、化合物単独でのまたは併用（1つ以上の化合物または物質）での、同時もしくは逐次投与を含むものである。当該調製はまた、必要に応じて、その他の活性物質と組み合わせることができる（例えば、代謝の低下を減らすために）。

【 0 0 8 3 】

本明細書において使用される用語「逐次投与」とは、2つの物質（例えば、本明細書に記載の化合物または組成物）の投与が、同日に別々で発生し、または同日に発生しない（例えば、連続した日に発生する）ことを含む。

【 0 0 8 4 】

本明細書において使用される用語「同時投与」には、少なくとも一部において重複期間を含む。例えば、2つの薬剤（例えば、活性を有する、本明細書に記載の薬剤または薬剤のクラスのいずれか）が同時に投与される場合、それらの投与が、特定の所望の時間内に発生する。当該薬剤の投与は、同日に開始し、及び終了してよい。1つの薬剤の投与はまた、両方の薬剤が同じ日に少なくとも1回服用される限りの日（複数可）ごとに、2番目の薬剤の投与に先行することができる。同様に、1つの薬剤の投与は、両方の薬剤が同じ日に少なくとも1回服用される限り、2番目の薬剤の投与の後へ、延長することができる。生理活性剤／物質は、同時投与を含むために、毎日、同時に服用される必要はない。

【 0 0 8 5 】

本明細書において使用される「間欠投与」は、一定期間（「第1投与期間」とみなすことができる）、その後、その薬剤が服用されていないか、またはより低い維持用量で服用される期間（これ「オフ期間」とみなすことができる）、その後、その薬剤が、再び投与される期間（「第2投与期間」とみなすことができる）が続く、薬剤の投与を含む。一般的に、投与の第2段階中は、その薬剤の投与量レベルは、第1投与期間中に投与されたものと一致するが、しかし医学的な必要性に応じて、増加または減少させることができる。

【 0 0 8 6 】

本明細書において使用される用語「投与すること」とは、経口投与、坐剤としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内もしくは皮下投与、またはミニ浸透ポンプなどの、対象への低速放出装置の移植を意味する。投与は、非経口及び粘膜（例えば、頬、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、または経皮）を含む、任意の経路による。非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、及び頭蓋内を含む。送達のための様式には、非限定的に、リポソーム製剤、静脈

10

20

30

40

50

内点滴、経皮パッチなどの使用を含む。

【0087】

本明細書に開示された組成物は、アプリケーションスティック、溶液、懸濁液、乳化液、ゲル、クリーム、軟膏、ペースト、ゼリー、塗料、粉末、及びエアロゾルとして配合され、局所経路によって、経皮的に投与される。経口製剤には、患者による摂取に適した、錠剤、丸薬、粉末、糖衣錠、カプセル、液体、トローチ剤、オブラート、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などを含む。固形製剤には、粉末、錠剤、丸薬、カプセル、オブラート、坐剤、及び分散性顆粒を含む。液形態の製剤には、溶液、懸濁液及び乳化液、例えば、水または水/プロピレングリコール溶液を含む。本開示の組成物はさらに、徐放性及び/または快適性を提供するための成分を含んでいてよい。このような成分としては、高分子量、アニオン性のムコミメティックポリマー、ゲル化多糖類及び微細に分割された薬用キャリア基材を含む。これらの成分は、米国特許第4,911,920号、第5,403,841号、第5,212,162号、及び第4,861,760号に、詳細に考察されている。これらの特許の全内容は、すべての目的対して、それら全体を参照として、本明細書に援用される。本明細書に開示された組成物はまた、体内で徐放するための微小球として送達され得る。例えば、微小球は、皮下に徐々に放出される、薬物含有微小球の皮内注入を介して、(Rao, J. Bioniat er Sci. Polym. Ed. 7: 623 - 645, 1995を参照)、生分解性及び注入用ゲル製剤として(例えば、Gao Phann. Res. 12: 857 - 863, 1995を参照)、または経口投与のための微小球として(例えば、Eyles, J. Phann. Pharmacol. 49: 669 - 674, 1997を参照)、投与され得る。

【0088】

本明細書において使用される「有効量」または「治療に有効な量」とは、臨床結果を含む有益な結果などの、所望の生体効果に影響を与えるのに十分な量である。このように、「有効量」は、適用される状況に依存する。有効量は、疾患の状態、年齢、性別、及び治療されている個人の体重など、当該技術分野で公知の要因に応じて変動してよい。複数の分割用量は、毎日投与されて良く、またはその用量は、治療状況の緊急性に応じて指示されるように、それに比例して減少されてよい。さらに、この開示の組成物/配合物は、治療量を達成するために、必要に応じて頻繁に投与され得る。

【0089】

医薬組成物は、当該治療薬(例えば、実施形態または実施例を含む、本明細書に記載の物質)が、治療上有効な量で、すなわち、その意図した目的を達成するために有効な量で含有された、組成物を含んでよい。特定の適用に対する実際の有効量は、とりわけ、治療されている病態に依存するであろう。疾患の治療に対応した方法で投与される場合、そのような組成物は、所望の結果を達成するために、例えば、標的分子の活性を調節する、及び/または疾患の病態の進行を抑える、排除する、または遅らせるために有効な、治療薬の量を含む。

【0090】

哺乳動物に投与される投与量及び頻度(単一または複数回の用量)は、例えば、その哺乳動物が他の疾患に苦しんでいるかどうか、その投与経路、その受益者の体格、年齢、性別、健康、体重、体の質量指数、及び食事、治療される疾患の病候の性質及び範囲、同時治療の種類、治療される疾患からの合併症、またはその他の健康上の問題などの、多様な要因に応じて変動できる。その他の治療計画及び薬剤が、この開示の方法及び薬剤の組み合わせで使用され得る。確立された投与量(例えば、頻度及び持続期間)の調節及び操作は、当業者の能力で十分に対処される。

【0091】

本明細書に記載の任意の治療薬について、治療に有効な量は、最初に、細胞培養アッセイから決定され得る。目的濃度は、本明細書に記載の、または当該技術分野で公知の方法を用いて測定される、本明細書に記載の方法に到達できる治療薬(複数可)の濃度である。

【0092】

当該技術分野でよく知られているように、ヒトに使用する、治療の有効量はまた、動物モデルから決定され得る。例えば、ヒトの用量は、動物に有効であることが見出された濃度に到達するように、配合され得る。ヒトの投与量は、前述のように、薬効をモニターし、投与量を上方または下方に調整することによって、調節され得る。前述の方法及びその他の方法に基づいて、ヒトにおいて最大効果を達成するための用量の調節は、当業者の能力で、十分に対処される。

【 0 0 9 3 】

投与量は、その患者の要求及び取り入れられた治療薬に応じて変動してよい。患者に投与される用量は、時間をかけて、その患者に有益な治療反応をもたらすのに、適切でなければならない。その用量の規模はまた、任意の副作用の存在、性質、及び程度によって決定される。特定の状況に対する適切な投与量の決定は、開業医の技能内で対処される。一般的に、治療は、その薬剤の最小用量未満である、より少ない投与量で開始される。その後、その投与量は、その状況下での最適な効果に達するまで、少量ずつ増量される。投与量及び間隔は、治療されている特定の臨床徴候に対応して、効果的な投与薬剤のレベルを提供するために、個別に調節され得る。これによって、個々の疾患状態の重症度に見合った、治療計画が提供される。

10

【 0 0 9 4 】

成分の重量パーセントは、特に逆に明記されない限り、その成分が含まれる配合物または組成物の総重量に基づく。

【 0 0 9 5 】

本明細書に使用される「賦形剤」には、開示される物質に含まれるかまたは併用されてよい、任意のその他の物質を含み、その賦形剤は、治療的または生物学的な活性物質 / 薬剤ではない。このようにして、賦形剤は、薬学的または生物学的に許容され、もしくは関連するべきである（例えば、賦形剤は、一般に個人に非毒性でなければならない）。「賦形剤」は、1つのそのような物質を含み、及びまた多数の賦形物を含むものである。本開示の目的に対して、用語「賦形剤」及び「キャリア」は、本開示のいくつかの実施形態において互換的に用いられ、当該用語は、「安全及び効果的な医薬組成物の実践に使用される成分」であると、本明細書において定義される。

20

【 0 0 9 6 】

用語「約」とは、配合物の調製において、及び疾患または障害の治療において、その薬効を変化させない、薬剤の濃度または量における任意の最小の変化を指す。本開示の薬剤（例えば、治療用 / 活性物質）の濃度範囲に関連して、用語「約」とは、有効量または範囲であると記載された、量または範囲の任意の変動を指す。

30

【 0 0 9 7 】

範囲は、「約」1つの特定の値から、及び / または「約」他の特定の値までとして、本明細書では表現され得る。そのように範囲が表現される場合、他の態様は、1つの特定の値から、及び / またはその他の特定の値までを含む。同様に、値が近似として表現される場合には、「約」の前提を使用することにより、その特定の値が、他の態様を形成することが理解されよう。その範囲の互いの終点が、その他の終点と関係して、及びその他の終点とは無関係に、その両方において重要であることが、さらに理解されよう。また、本明細書では、開示される多数の値があり、及び各値は、その値自身に加えて、その特定の値を「約」として開示されることが、また理解されよう。この出願全体を通して、データが、多数の異なる形式で提供され、及びこのデータポイントが、終点及び開始点を、ならびにそのデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことが、また理解されよう。たとえば、仮に特定のデータポイント「10」及び特定のデータポイント「15」が開示される場合、10及び15に対して、それを上回って大きい、それ以上、それ未満、それ以下、ならびにそれらに等しいことが、10から15の間同様に開示されると考える、ことが理解されよう。2つの特定の単位間の各単位も開示されることが、また理解されよう。たとえば、仮に10及び15が開示される場合、次いで11、12、13、及び14もまた、開示される。

40

50

## 【0098】

## 化合物

1つの態様において、本開示は、目的遺伝子のアンチセンス核酸配列または低分子活性化RNA (saRNA)へコンジュゲートされた、ホスホロチオエート化デオキシヌクレオチドを含む、単離化合物を包含する。実施形態において、当該ホスホロチオエート化ODNは、15から30の塩基長、一本鎖、部分的または完全なホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチドである。実施形態において、その単離化合物は、式PODN-L-ANA(I)、またはPODN-L-saRNA(II)を有する。式(I)及び(II)において、PODNはホスホロチオエート化ODNであり、及びLは、共有結合リンカーなどのリンカーである。式(I)において、ANAは、アンチセンス核酸配列である。式(II)において、saRNAは、低分子活性化RNAである。

10

## 【0099】

実施形態において、当該単離化合物には、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)へコンジュゲートされた、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の内の1つの、連続する15核酸塩基に、約80%~100%の配列同一性を有する核酸配列を含む。実施形態において、本開示は、saRNAへコンジュゲートされた、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の内の1つの、連続する15核酸塩基に、約80%~100%の配列同一性を有する核酸配列を含む、単離化合物を提供する。実施形態において、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の内の1つの、連続する15核酸塩基に、約80%~100%の配列同一性を有する当該核酸配列は、saRNAまたはASOへコンジュゲートされた、15から30の塩基長、一本鎖、部分的または完全なホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、STATT(STATT1~STATT6)アンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態において、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、STATT3アンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態において、当該saRNAは、CEBP/、p21、またはp53のsaRNAである。

20

## 【0100】

実施形態において、本開示の当該単離化合物には、saRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)へコンジュゲートされた、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の内の1つの、連続する15核酸塩基に、約80%~85%、約85%~90%、約90%~95%、約95%~100%の配列同一性を有する核酸配列を含む。実施形態において、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の内の1つの、連続する15核酸塩基に、約80%~85%、約85%~90%、約90%~95%、約95%~100%の配列同一性を有する当該核酸配列は、saRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)へコンジュゲートされた、15から30の塩基長、一本鎖、部分的または完全なホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドを含む。

30

40

## 【0101】

本開示は、低分子活性化RNA(saRNA)またはASOへコンジュゲートされた、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を含む、単離化合物を提供する。実施形態において、本開示は、CCAAAT/エンハンサー結合タンパク質-(C/EBP)を活性化することができる、短い活性化RNA(saRNA)へコンジュゲートされた、配列番号7~18、29~30、及び98~101の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を含む。

## 【0102】

50

実施形態において、本開示は、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30、及び 98 ~ 101、ならびに s a R N A または A S O の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) 間のリンカーを伴って、その s a R N A またはその A S O へコンジュゲートされた、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30、及び 98 ~ 101 の配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) を提供する。このリンカーは、共有結合リンカーであってよい。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のアルキレン、もしくはヘテロアルキレンリンカーであり、またはそれを含む。実施形態において、s a R N A コンジュゲートされた当該核酸は、1 つ以上の置換もしくは非置換のヘテロアルキレンリンカーを含む。リンカーは、配列におけるその合成中に、追加されてよい。実施形態において、ヘテロアルキレンリンカーは、介在リン酸結合を伴って、互いに結合される。

10

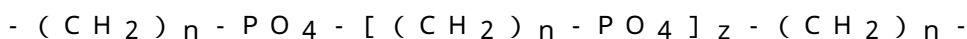
#### 【0103】

実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、または置換もしくは非置換のシクロヘテロアルキレンである。本明細書において使用される「シクロヘテロアルキレン」は、ヘテロアルキレン鎖内に、1 つ以上の 2 価の環状部分を有する、ヘテロアルキレンである。この環状部分は、置換もしくは非置換のシクロアルキン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンであってよい。実施形態において、当該環状部分は、置換もしくは非置換のリボース (例えば、ヌクレオシド) である。実施形態において、当該環状部分は、リンカーの分岐点として機能し、それによって、分岐リンカーを形成する。この環状部分の分岐点は、本明細書において提供されるコンジュゲートへ、追加の機能部分、例えば検出可能部分、薬物部分、または生体分子などへ結合するために利用されてよい。以下により詳細に説明するように、この追加の機能部分は、当該技術分野で公知のクリックケミストリー技術を用いて、結合されてよい。

20

#### 【0104】

実施形態において、当該リンカー (例えば、式 (I) 及び (II) における L) は、以下の式を有する部分であり、またはそれを含む。



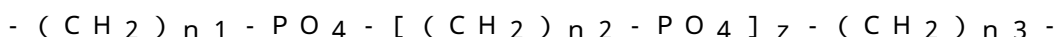
#### 【0105】

上記の式において、符号 n は、1 から 5 までの整数 (例えば、3) であり、及び符号 z は、0 から 50 までの整数 (例えば、0 から 25、0 から 10、または 0 から 5) である。実施形態において、n は、3 であり、及び z は、0 から 5、または 1 から 5 である。実施形態において、n は、3 であり、及び z は、0 から 4、または 1 から 4 である。実施形態において、n は、3 であり、及び z は、0 から 3、または 1 から 3 である。実施形態において、n は、3 であり、及び z は、3 である。

30

#### 【0106】

実施形態において、当該リンカー (例えば、式 (I) 及び (II) における L) は、以下の式を有する部分であり、またはそれを含む。



#### 【0107】

上記の式において、符号 n1、n2 及び n3 は、独立して、1 から 5 までの整数 (例えば、3) であり、及び符号 z は、0 から 50 までの整数 (例えば、0 から 25、0 から 10、または 0 から 5) である。実施形態において、n1、n2 及び n3 は、3 であり、及び z は、0 から 5、または 1 から 5 である。実施形態において、n1、n2 及び n3 は、3 であり、及び z は、0 から 4、または 1 から 4 である。実施形態において、n1、n2 及び n3 は、3 であり、及び z は、0 から 3、または 1 から 3 である。実施形態において、n1、n2 及び n3 は、3 であり、及び z は、3 である。

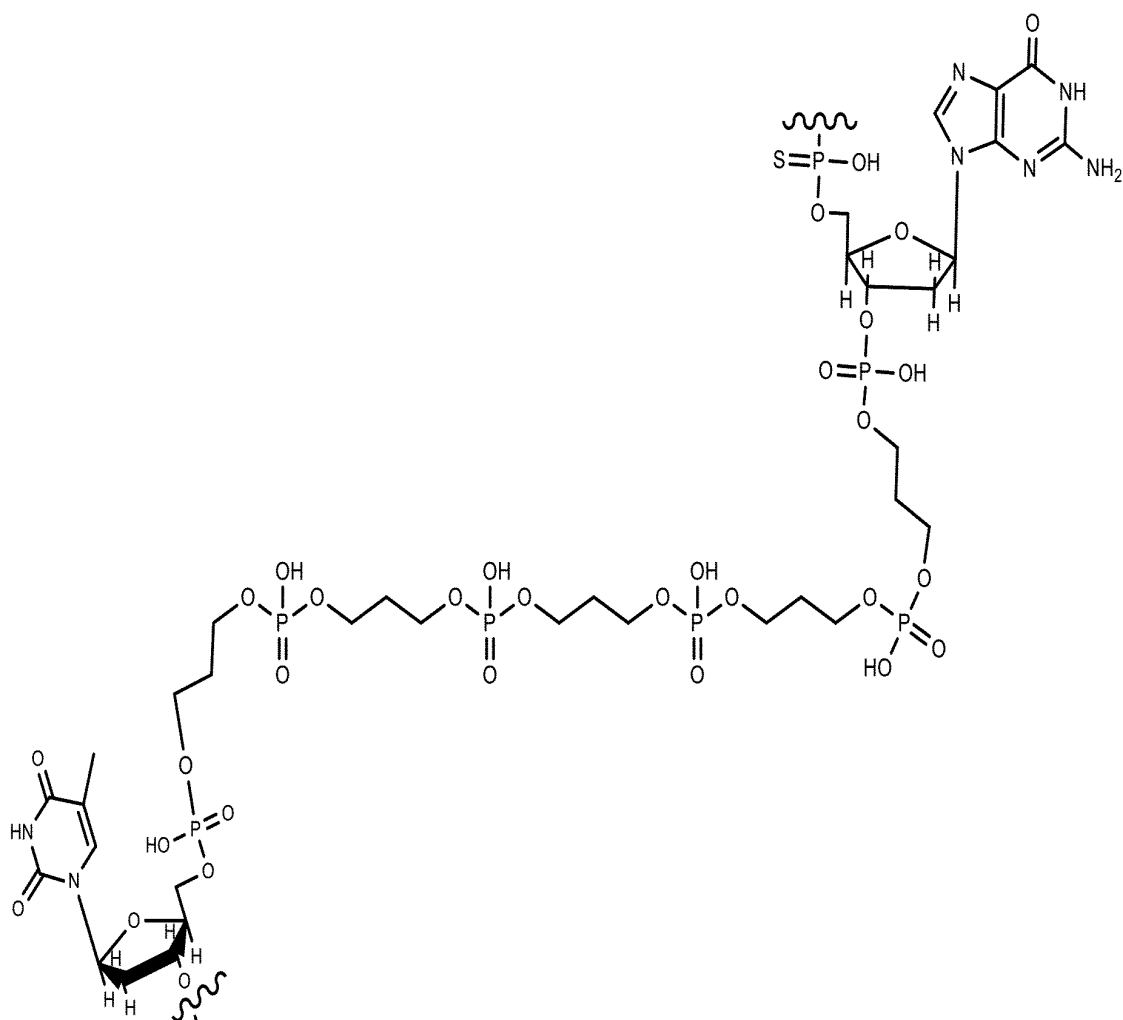
40

#### 【0108】

例えば、当該リンカーは、以下の構造を有し、ここでそのリンカーは、片末端にあるグアニンの 3' リン酸、及びその他の末端にあるチミジンの 5' リン酸と結合している。

50

【化 1】



当業者は、上記構造におけるグアニン及びチミジンは、任意の核酸モノマー／核酸塩基で置換され得ることは、直ちに理解されよう。

【 0 1 0 9 】

実施形態において、当該リンカーは、リン酸部分にコンジュゲートされた、3つの炭素（ $-OCH_2CH_2CH_2O-$ ）を有する、ヘテロアルキレンを含む。このヘテロアルキレン部分は、変動され得る（例えば、このリンカーは、2、4、5、6、7、または8つの炭素を有する、ヘテロアルキレンを含むことができる）。

【 0 1 1 0 】

実施形態において、上記のグアノシンは、当該ODN核酸配列に結合されており、及びチミジンは、当該低分子活性化RNA (s aRNA) またはASOに結合されている。

【 0 1 1 1 】

実施形態において、当該リンカー（例えば、リンカーが、ヘテロアルキレンリンカーであってよい）は、反応基（例えば、クリックケミストリー反応基）または保護反応基で置換されてよい。この反応基は、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）-s aRNA / ASO化合物を、検出可能な部分または生体分子（例えば、標的化部分）などの、本明細書で記載の追加の機能部分へコンジュゲートするために使用されてよい。

【 0 1 1 2 】

このように、当該ヘテロアルキレンリンカーには、さらなる修飾、コンジュゲート、または追加部分への結合を含んでよい。

【 0 1 1 3 】

当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s a R N A / A S O 化合物を、追加の機能部分へコンジュゲートするために使用される反応基は、生体コンジュゲート反応ケミストリーにおいて有用な、任意の適用可能な反応基であってよい。H e r m a n s o n , B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s 1996, A c a d e m i c P r e s s , I n c . , S a n D i e g o を参照のこと。

【0114】

実施形態において、当該反応基は、クリックケミストリーの反応基である。クリックケミストリーは、高速で、使いやすく、精製が簡単で、汎用性があり、部位に特異的であり、及び高い生成収率を与える、反応の一群を指す。実施形態において、4つの異なるクリック反応が可能である。(1)環化付加 - これらは、一義的には1,3-双極性環化付加を指すが、しかしまた、ヘテロ・ディールス・アルダー環化付加を含む。(2)求核的開環 - これらは、アジリジン、エポキシド、環状硫酸塩、アジリジニウムイオン、エピスルホニウムイオンなどの、歪んだヘテロ環の求電子の開環を指す。(3)非アルドール型のカルボニルケミストリー - 例示には、尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド、芳香族ヘテロ環を含む。(4)炭素 - 炭素の多重結合の付加 - 例示には、エポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシ化、スルフェニルハロゲン化物付加、ノトロシルハロゲン化物付加、及び特定のマイケル付加を含む。実施形態において、使用されるクリック反応は、1,2,3-トリアゾールを形成するための、アジドまたは末端アルキンの、Cu<sup>I</sup>触媒作用による、ヒュスゲン1,3-双極性環化付加(HDC)であってよい。実施形態において、このクリック反応は、銅を含まない反応であってよい。

10

20

【0115】

実施形態において、当該クリックケミストリーの反応基は、アジド基、アルケン基、アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、スルフヒドリル基、ジビニルスルホン誘導体、もしくはマレイミド誘導体であり、またはそれらを含む。したがって、実施形態において、当該リンカーは、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)ケミストリーによるコンジュゲートに適した、保護アミノ基またはN-ヒドロキシスクシンイミド基、ジビニルスルホンでコンジュゲートされ得るスルフヒドリル基、1-アルキル-3-メチルアクリロイル(アクリロイル)塩化物またはアクリロイル誘導体とコンジュゲートされ得る、保護スルフヒドリル基、マレイミド誘導体とコンジュゲートされ得る、保護スルフヒドリル基を含む、反応基(例えば、クリックケミストリーの反応基)または保護反応基で置換される。

30

【0116】

以下に示すのは、シクロヘテロアルキレン分岐のリンカーの構造例である。

40

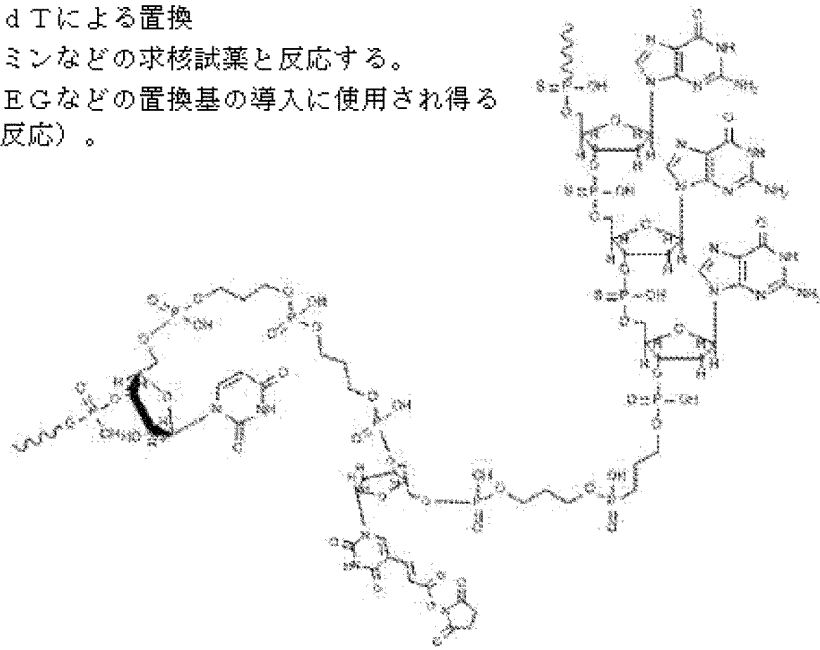
50

## 【化 2】

NHS-カルボキシー-dTによる置換

NHSエステルは、アミンなどの求核試薬と反応する。

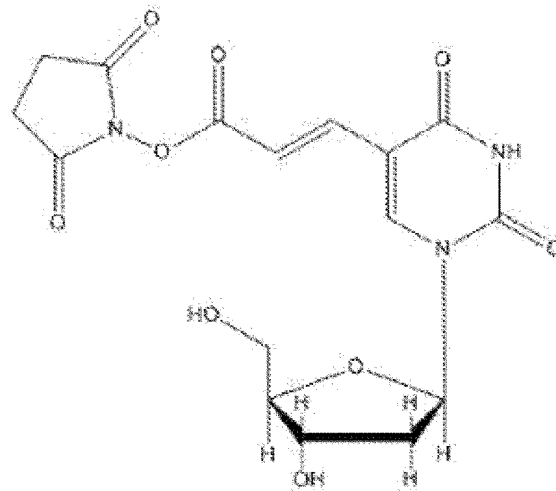
NHSエステルは、PEGなどの置換基の導入に使用され得る  
(PEG-アミンとの反応)。



10

20

NHS-カルボキシー-dT



30

## 【0117】

上に示すように、シクロヘテロアルキレン分岐のリンカーは、片末端にあるグアニンの3'リン酸、及びその他の末端にあるチミジンの5'リン酸と結合している。このシクロヘテロアルキレン分岐リンカーの部分は、分岐点であり、及び5-置換チミジンである。このチミジンは、追加の機能部分に結合するための反応基としての役割を果たすことができ、NHS部分含む反応基で、5位にて置換される。

40

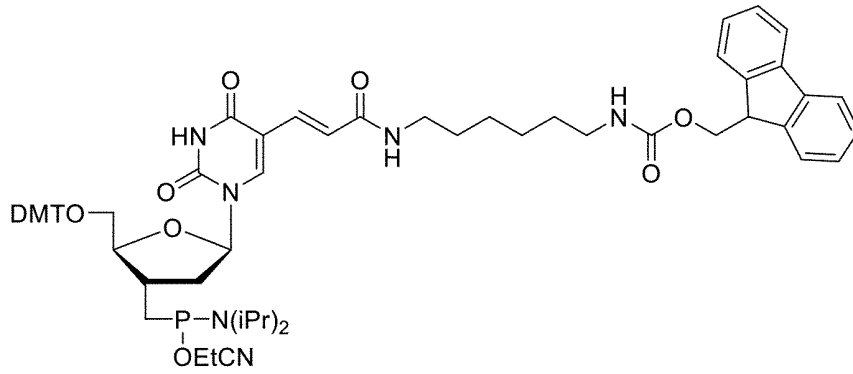
## 【0118】

反応性官能基及び保護反応性官能基を含む、部分の分岐点としての役割を果たすために使用できる化合物の追加事例を、以下に提供する。

Fmoc-アミノ修飾因子 C6dT

50

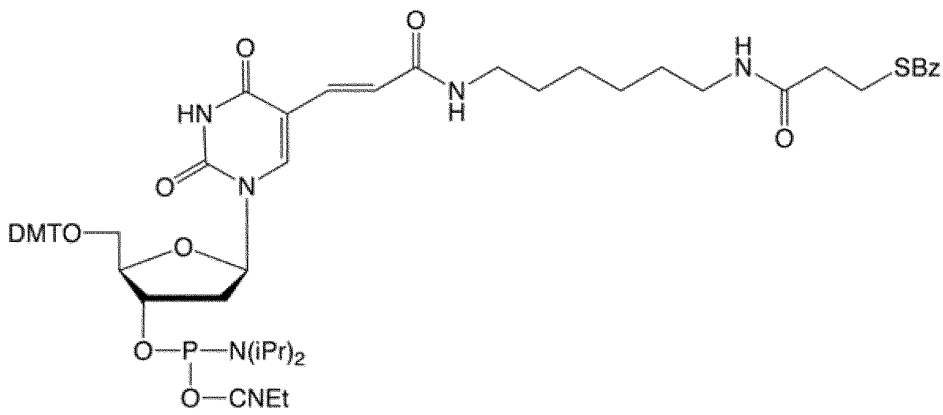
## 【化 3】



10

S - B z - チオール修飾因子 C 6 - d T

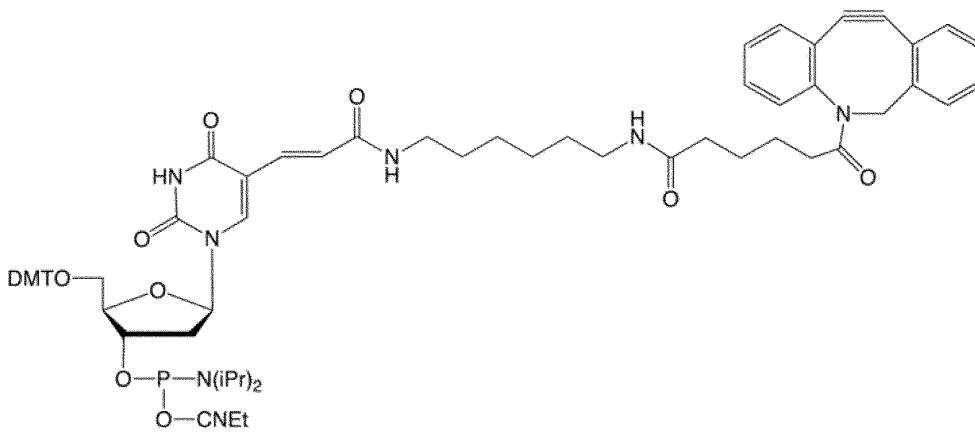
## 【化 4】



20

D B C O - d T

## 【化 5】



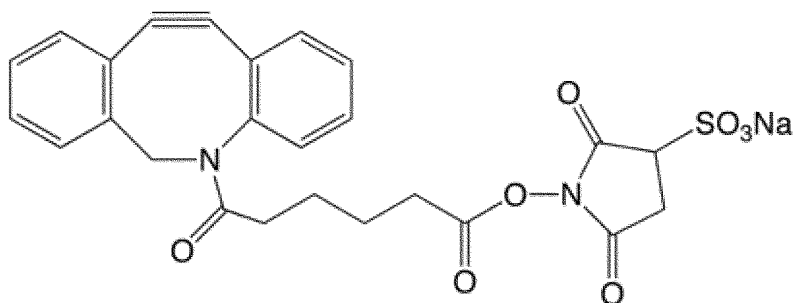
30

D B C O - スルホ - N H S エステル

40

50

## 【化 6】

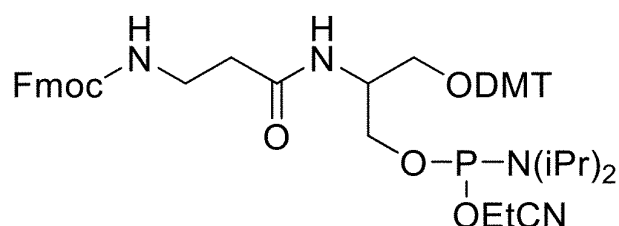


10

## 【 0 1 1 9】

実施形態において、当該リンカーの分岐点は、非環状であってよい。反応性官能基及び保護反応性官能基を含むリンカー内で、非環状部分の分岐点としての役割を果たす化合物の一例を、以下に提供する。

## 【化 7】



20

## 【 0 1 2 0】

上に説明したように、当該反応基は、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)-saRNA/ASO化合物は、検出可能な部分、治療用部分(例えば、薬剤部分)、標的化部分、または生体分子などの、追加の機能部分へコンジュゲートするために、使用されてよい。追加の機能部分には、蛍光標識、標的化合物(骨標的ビスフォスフォネート)、薬剤、または抗体を含む。実施形態において、追加部分は、化学反応性部分、検出可能部分、治療用部分(例えば、抗がん剤または抗ウイルス剤)、核酸配列、DNA配列、または核酸類似体である。実施形態において、当該検出可能な部分は、蛍光色素、電子密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、陽電子放出核種、生体コロイド、微小気泡、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である。実施形態において、追加部分は、治療用部分(例えば、抗がん剤または抗ウイルス剤)である。

30

## 【 0 1 2 1】

実施形態において、当該追加機能部分は、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。実施形態において、当該追加部分は、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>~C<sub>40</sub>のアルキル、置換もしくは非置換の2から40員環のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>のシクロアルキル、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>のアリール、または置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリールである。実施形態において、当該追加部分は、置換されたC<sub>1</sub>~C<sub>40</sub>のアルキル、置換された2から40員環のヘテロアルキル、置換されたC<sub>3</sub>~C<sub>8</sub>のシクロアルキル、置換された3から8員環のヘテロシクロアルキル、置換

40

50

された  $C_6 \sim C_{10}$  のアリール、または置換された 5 から 10 員環のヘテロアリールである。実施形態において、当該追加機能部分は、 $R^1$  置換された  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキル、 $R^1$  置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキル、 $R^1$  置換された  $C_3 \sim C_8$  のシクロアルキル、 $R^1$  置換された 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキル、 $R^1$  置換された  $C_6 \sim C_{10}$  のアリール、または  $R^1$  置換された 5 から 10 員環のヘテロアリールである。実施形態において、当該追加機能部分は、 $R^1$  置換された  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換の  $C_1 \sim C_{40}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_1 \sim C_{40}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換の  $C_3 \sim C_{21}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換の  $C_3 \sim C_{18}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換の  $C_3 \sim C_{15}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_6 \sim C_{21}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{21}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{18}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{15}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_{12} \sim C_{15}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_{12}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_{13}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_{14}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換直鎖状の  $C_{15}$  アルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、 $R^1$  置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、- (非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換直鎖状の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 5 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 10 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 15 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 20 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 30 から 40 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 35 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 30 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 25 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 20 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 10 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 50 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、- (置換された 2 から 60 員環のヘテロアルキレン) -  $R^1$  である。実施形態において、当該追加機能部分は、置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、置換された 10 から 50 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、置換された 20 から 40 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、置換された 25 から 40 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該追加機能部分は、置換された 30 から 40 員環のヘテロアルキルである。

#### 【0122】

実施形態において、追加機能部分における  $R^1$  は、検出可能部分または治療用部分である。実施形態において、追加機能部分 における  $R^1$  は、検出可能部分である。実施形態において、当該検出可能部分は、蛍光色素、電子密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニ

10

20

30

40

50

ン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、陽電子放出核種、生体コロイド、微小気泡、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、治療用部分（例えば、抗がん剤または抗ウイルス剤）である。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、Hである。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、オキソである。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、酸素である。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、硫黄である。実施形態において、追加機能部分におけるR<sup>1</sup>は、=Sである。

10

#### 【0123】

実施形態において、当該追加連結する置換基には、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンを含む。当該追加連結する置換基には、その反応基または追加部分に接合した、PEG部分を含んでよい。

#### 【0124】

実施形態において、当該リンカーには、非置換のC<sub>3</sub>アルキレン（例えば、リン酸ジエステルリンカー基によって分離される、上述のもの）を含む。実施形態において、当該リンカーは、非置換のC<sub>15</sub>アルキレンであってよい。実施形態において、当該リンカーは、非置換のC<sub>6</sub>からC<sub>16</sub>アルキレンを含む。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンであってよい。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>40</sub>のアルキレン、置換もしくは非置換の2から40員環のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレン、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリエン、または置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリエンであってよい。実施形態において、当該リンカーは、非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>40</sub>のアルキレン、非置換の2から40員環のヘテロアルキレン、非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレン、非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレン、非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリエン、または非置換の5から10員環のヘテロアリエンであってよい。実施形態において、当該リンカーは、置換された2から40員環のヘテロアルキレンであってよい。

20

30

#### 【0125】

リンカーは、結合、核酸配列、2つの核酸配列、DNA配列、2つのDNA配列、核酸類似体配列、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンであってよい。

40

#### 【0126】

実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン（例えば、リン酸ジエステルリンカー基で結合した、置換もしくは非置換のアルキレン基）、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンであるか、またはそれらを含む。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>のアルキレン、置換もしくは非置換の2から20員環のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレン、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリエン、または置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリエンで

50

ある。実施形態において、当該リンカーは、非置換の  $C_1 \sim C_{20}$  のアルキレン、非置換の 2 から 20 員環のヘテロアルキレン、非置換の  $C_3 \sim C_8$  のシクロアルキレン、非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキレン、非置換の  $C_6 \sim C_{10}$  のアリレン、または非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリレンである。実施形態において、当該リンカーは、非置換の  $C_1 \sim C_{20}$  のアルキレンである。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換の  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキレン、置換もしくは非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の  $C_3 \sim C_8$  のシクロアルキレン、置換もしくは非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換の  $C_6 \sim C_{10}$  のアリレン、または置換もしくは非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリレンである。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換の  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキレンである。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレンである。実施形態において、当該リンカーは、置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキレンである。実施形態において、当該リンカーは、アルキルリン酸塩（例えば、リン酸プロピル）を含む。実施形態において、当該リンカーは、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、アルキルリン酸塩（例えば、リン酸プロピル）から構成される。実施形態において、当該リンカーは、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、1 ～ 5 アルキルリン酸塩（例えば、リン酸プロピル）から構成される。実施形態において、当該リンカーは、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、1 ～ 4 アルキルリン酸塩（例えば、リン酸プロピル）から構成される。実施形態において、当該リンカーは、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、4 アルキルリン酸塩（例えば、リン酸プロピル）から構成される。当業者は、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、アルキルリン酸塩から構成されるリンカーは、アルキレン基よりも、1 つ多くのリン酸塩を持つことを認識されよう（例えば、両末端でリン酸塩によって、その化合物の残りの部分に結合された、4 アルキルリン酸塩から構成されるリンカーは、リン酸基とアルキル基とを交互に持つ、5 つのリン酸塩及び 4 つのアルキル基を有するであろう）。

#### 【0127】

実施形態において、saRNA は、2' O - メチル、2' - デオキシ - 2' フルオロ、2' - デオキシ、ユニバーサル塩基、5 - C - メチル、反転デオキシ脱塩基性残基の組み込み、もしくはロック核酸、またはそれらの任意の組合せ（複数可）などの、修飾を含んでよい。実施形態において、当該 saRNA は、その saRNA の末端核酸に位置する、修飾を有してよい。実施形態において、当該 saRNA は、その saRNA の末端核酸に位置する、修飾を有してなくてよい。実施形態において、当該 saRNA の修飾は、その化合物を、血清由来ヌクレアーゼから保護する。

#### 【0128】

実施形態において、当該 saRNA は、5' G A C C A G U G A C A A U G A C C G C U U 3' [ 配列番号 1 ] のガイド鎖（アンチセンスもしくは AS）配列、または配列番号 1 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列、及び 3' U U C U G G U C A C U G U U A C U G G C G 5' [ 配列番号 2 ] のパッセンジャー鎖（センス鎖もしくは SS）配列、または配列番号 2 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列を含む。配列番号 1、もしくは配列番号 1 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列、及び配列番号 2、もしくは配列番号 2 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列は、CEBP プロモーターの活性化に対して、共に saRNA を形成する。実施形態において、本開示の saRNA は、5' U A C U U G G A G A A U G A G U U G 3' [ 配列番号 3 ] のガイド鎖（AS）配列、または配列番号 3 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列、及び 3' A U G A A C C U C U U A C U C A A C C 5' [ 配列番号 4 ] のパッセンジャー鎖（SS）配列、または配列番号 4 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列を含む。配列番号 3、もしくは配列番号 3 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列、及び配列番号 4、もしくは配列番号 4 に 90% ～ 99% の相同性を有する配列は、p21 プロモーターの活性化に対して、共に saRNA を形成する。

#### 【0129】

いくつかの実施形態において、当該 *s a R N A* は、5' U U A G G A A G G C U U U C C G U A A 3' [配列番号 5] のガイド鎖 (A S) 配列、または配列番号 5 に 90% ~ 99% の相同性を有する配列、及び 3' A A U C C U U C C G A A A G G C A U U 5' [配列番号 6] のパッセンジャー鎖 (S S) 配列、もしくは配列番号 6 に 90% ~ 99% の相同性を有する配列を含む。配列番号 5、または配列番号 5 に 90% ~ 99% の相同性を有する配列、及び配列番号 6、もしくは配列番号 6 に 90% ~ 99% の相同性を有する配列は、p 5 3 プロモーターの活性化に対して、共に *s a R N A* を形成する。

#### 【0130】

実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、末端部分を有する。末端部分は、化学反応性部分、検出可能部分、治療用部分 (例えば、抗がん剤もしくは抗ウイルス剤)、核酸配列、DNA 配列、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。

10

#### 【0131】

実施形態において、末端部分は、化学反応性部分、検出可能部分、治療用部分 (例えば、抗がん剤もしくは抗ウイルス剤)、核酸配列、DNA 配列、核酸類似体、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のアルキル、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のヘテロアルキル、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のシクロアルキル、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のアリール、または R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換のヘテロアリールである。

20

#### 【0132】

実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、検出可能部分である、末端部分を含む。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、例えば、蛍光色素、電子密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、陽電子放出核種、生体コロイド、微小気泡、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分などの、末端検出可能部分を含む。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、治療用部分 (例えば、抗がん剤または抗ウイルス剤) である、末端部分を含む。

30

#### 【0133】

実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、置換もしくは非置換の C<sub>1</sub> ~ C<sub>40</sub> のアルキル、置換もしくは非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキル、置換もしくは非置換の C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> のシクロアルキル、置換もしくは非置換の 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換の C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> のアリール、または置換もしくは非置換の 5 から 10 員環のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - *s a R N A* / A S O コンジュゲートは、置換された C<sub>1</sub> ~ C<sub>40</sub> のアルキル、置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキル、置換された C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> のシクロアルキル、置換された 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキル、置換された C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> のアリール、または置換された 5 から 10 員環のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、当該末端部分は、R<sup>1</sup> 置換された C<sub>1</sub> ~ C<sub>40</sub> のアルキル、R<sup>1</sup> 置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキル、

40

50

$R^1$  置換された  $C_3 \sim C_8$  のシクロアルキル、 $R^1$  置換された 3 から 8 員環のヘテロシクロアルキル、 $R^1$  置換された  $C_6 \sim C_{10}$  のアリール、または  $R^1$  置換された 5 から 10 員環のヘテロアリールである。実施形態において、当該末端部分は、 $R^1$  置換された  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキルである。実施形態において、当該末端部分は、（非置換の  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_1 \sim C_{40}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換の  $C_3 \sim C_{21}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換の  $C_3 \sim C_{18}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_3 \sim C_{15}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_6 \sim C_{21}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{21}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{18}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_9 \sim C_{15}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_{12} \sim C_{15}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_{12}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_{13}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_{14}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、（非置換直鎖状の  $C_{15}$  のアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、 $R^1$  置換された 2 から 40 員環のヘテロアルキルである。実施形態において、当該末端部分は、-（非置換の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換直鎖状の 2 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 5 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 5 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 15 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 20 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 30 から 40 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 35 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 30 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 25 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 20 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 10 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 50 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。実施形態において、当該末端部分は、-（置換された 2 から 60 員環のヘテロアルキレン）-  $R^1$  である。

#### 【0134】

実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s aRNA / ASO コンジュゲートは、置換された 20 から 40 員環のヘテロアルキルである、末端部分を含む。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s aRNA / ASO コンジュゲートは、置換された 10 から 50 員環のヘテロアルキルである、末端部分を含む。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s aRNA / ASO コンジュゲートは、置換された 20 から 40 員環のヘテロアルキルである、末端部分を含む。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s aRNA / ASO コンジュゲートは、置換された 25 から 40 員環のヘテロアルキルである、末端部分を含む。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) - s aRNA / ASO コンジュゲートは、置換された 30 から 40 員環のヘテロアルキルである、末端部分を含む。

## 【0135】

実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートは、R<sup>1</sup>が、検出可能な部分または治療用部分である、R<sup>1</sup>基を有する末端部分を含む。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、検出可能部分である。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートにおけるR<sup>1</sup>は、蛍光色素、電子密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、陽電子放出核種、生体コロイド、微小気泡、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である、検出可能部分である。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、治療用部分(例えば、抗がん剤または抗ウイルス剤)である。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、Hである。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、オキソである。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、酸素である。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、硫黄である。実施形態において、当該ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) - s a R N A / A S O コンジュゲートの末端部分におけるR<sup>1</sup>は、= S である。

## 【0136】

実施形態において、当該化合物のODN核酸配列は、非メチル化のC p GまたはG p Cモチーフを含む。実施形態において、このC p G核酸配列は、クラスAのC p G核酸配列、クラスBのC p G核酸配列、またはクラスCのC p G核酸配列を含む。実施形態において、このG p C核酸配列は、クラスAのG p C核酸配列、クラスBのG p C核酸配列、またはクラスCのG p C核酸配列を含む。

## 【0137】

実施形態において、当該化合物は、C及びG(C p GまたはG p C)が、ホスホジエテルのヌクレオチド間連結によって結合したヌクレオチドである、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を含む。実施形態において、当該化合物は、C及びGが、ホスホジエテル誘導体のヌクレオチド間連結によって結合したヌクレオチドである、C p GまたはG p Cを含む。

## 【0138】

実施形態において、T o l l 様受容体(TLR)結合のDNA置換基は、クラスAのC p Gオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合のDNA置換基は、クラスBのC p Gオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合のDNA置換基は、クラスCのC p Gオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合のDNA置換基(例えば、TLR9結合のDNA置換基)は、A、G、C、またはT塩基及びホスホジエテル連結、及び/またはホスホジエテル誘導体連結(例えば、ホスホロチオエート連結(複数可))を伴った、デオキシリボ核酸から構成される。

## 【0139】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 当該化合物の部分配列

名称	配列 5' - 3' (下線=ホスホロチオエート連結)	配列番号
CpG (A) -ODN	<u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u>	7

名称	配列 5' - 3' (下線=ホスホロチオエート連結)	配列番号
GpC (B2) -ODN	<u>TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u>	8
ODN 1585	GGGGTCAACGTTGAGGGGGG または <u>GGGGTCAACGTTGAGGGGGG</u>	9 100
ODN 2216	<u>GGGGGACGATCGTCGGGGGG</u>	10
ODN D19	<u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u>	11
ODN 2336	<u>GGGG ACGACGTCGT</u> GGGGGG または <u>GGGG ACGACGTCGT</u> GGGGGG	12 101
ODN 1668	<u>TCCATGACGTTCCCTGATGCT</u>	13
CpG (B1) -ODN		
ODN 1826	<u>TCCATGACGTTCCCTGACGTT</u>	14
ODN 2006 (ODN7909)	<u>TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u>	15
CpG (B2) -ODN		
ODN 2007	<u>TCGTCGTTGTGCTTTTGTGCTT</u>	16
ODN 2395	<u>TCGTCGTTTTCGGCGCGGCCG</u>	17
ODN M362	<u>TCGTCGTCGTTCCGAACGACGTTGAT</u>	18
GpC (A) -ODN	<u>GGTGCATGCATGCAGGGGGG</u>	29
PS- (CpG/GpC) - ODN	GGT GCA T(CG/GC) ATG CAG GGGGG (P S - G p C - O D N の配列は、T C G において、C G よりむしろ G C を有す る)	30
CpG (B3) -ODN	<u>TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTCTT</u>	98
CpG (B4) -ODN	<u>TCCTCGTTTTGTGCTTTTGTCTT</u>	99
STAT3 AS01	<u>CTATTTGGATGTCAGC</u> <u>CTATTTGGATGTCAGC</u>	31 110
STAT3 AS02	<u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u>	32 111
STAT3 AS03	<u>TTTTCATGATGTAACT</u>	33
STAT3 AS01- 1	5' <u>CTA TTT GGA TGT CAGC</u> 3'	34
STAT3 AS02- 1	5' <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3'	35
STAT3 AS03- 1	5' <u>TTTTCATGATGTAACT</u> 3'	36
STAT3 AS04- 1	5' <u>ATCAAAGTCATCCTGGAG</u> 3'	37
STAT3 LNA AS01-1	5' <u>GCAACCTGACTTTAGT</u> 3'	38
STAT3 LNA	5' <u>GATTCTGCTAATGACG</u> 3'	39

10

20

30

40

50

名称	配列 5' - 3' (下線=ホスホロチオエート連結)	配列番号
AS02-1		
STAT3 LNA AS03-1	5' <u>TGACGGGTCTGAA</u> GTT 3'	40
STAT3 LNA AS04-1	5' <u>AGATAGCAGAAGTAGG</u> 3'	41
STAT3 LNA AS05-1	5' <u>GTCAATGCACACTTTA</u> 3'	42
STAT3 AS05	<u>AAAAAGTGCCCAGATTGCCC</u>	112
STAT3 AS06	<u>ACTCAAAC TGCCCTCCTGCT</u>	113

下線：ホスホロチオエート化（硫黄で置換された、3' 隣接リン酸上の1つの非架橋酸素）ヌクレオチド（例えば、G G G G Gは、5' - G\*G\*TG CAT CG ATG CA G G\*G\*G\*G\*G - 3' における、GG\*G\*G\*G\*Gであり、ここでこのアスタリスク（\*）は、その塩基（より正確には、ヌクレオシド）の間に位置し、及びこのホスホロチオエート化リン酸はまた、塩基間に位置する）である。

太字：2' OMe（2' -O-メチルヌクレオシド、2' -Oメチルで置換され2' 位におけるヒドロキシル）ヌクレオチド。イタリック：LNA修飾のヌクレオチド。

太字：2' OMe（2' -O-メチルヌクレオシド、2' -Oメチルで置換され2' 位におけるヒドロキシル）ヌクレオチド。イタリック：LNA修飾のヌクレオチド。

#### 【0140】

実施形態において、本開示の化合物は、本開示に記載されるように、リンカーによって結合された、CEBPA saRNA（配列番号1～2）、p21 saRNA（配列番号3～4）、またはp53 saRNA（配列番号5～6）を有する、配列番号7～18、29～30、及び98～101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の、1つの組み合わせを含む。実施形態において、本開示の化合物は、本開示に記載されるように、リンカーによって結合された、配列番号31～42、及び110～113の1つを有する、配列番号7～18、29～30、及び98～101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の、1つの組み合わせを含む。当該化合物の組み合わせの例示は、表2～4に記載される。

#### 【0141】

実施形態において、当該化合物は、エンドソームTLRを結合する。実施形態において、当該化合物は選択的に、その他のTLRにエンドソームTLRを結合する。実施形態において、当該化合物は特異的に、エンドソームTLRを結合する。実施形態において、当該化合物は、TLR3を結合する。実施形態において、当該化合物は優先的に、その他のTLRにエンドソームTLR3を結合する。実施形態において、当該化合物は特異的に、TLR3を結合する。実施形態において、当該化合物は、TLR7を結合する。実施形態において、当該化合物は優先的に、その他のTLRにTLR7を結合する。実施形態において、当該化合物は特異的に、TLR7を結合する。実施形態において、当該化合物は、TLR8を結合する。実施形態において、当該化合物は優先的に、その他のTLRにTLR8を結合する。実施形態において、当該化合物は特異的に、TLR8を結合する。実施形態において、当該化合物は、TLR9を結合する。実施形態において、当該化合物は優先的に、その他のTLRにTLR9を結合する。実施形態において、当該化合物は特異的に、TLR9を結合する。実施形態において、当該化合物は、CpGを含み、ここでC及びGは、ホスホジエステルのヌクレオチド間連鎖、またはホスホジエステル誘導体のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド間連鎖によって結合された、ヌクレオチドである。

#### 【 0 1 4 2 】

実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、クラス A の C p G オリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、クラス B の C p G オリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、クラス C の C p G オリゴ デオキシヌクレオチド ( O D N ) である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、O D N 1 5 8 5、O D N 2 2 1 6、O D N D 1 9、または O D N 2 3 3 6 である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、O D N 1 6 6 8、O D N 1 8 2 6、O D N 2 0 0 6、または O D N 2 0 0 7 である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、O D N 2 3 9 5 または O D N M 3 6 2 である。実施形態において、当該 T L R 結合 DNA 置換基は、O D N 1 5 8 5、O D N 2 2 1 6、O D N D 1 9、O D N 2 3 3 6、O D N 1 6 6 8、O D N 1 8 2 6、O D N 2 0 0 6、O D N 2 0 0 7、O D N 2 3 9 5、または O D N M 3 6 2 の誘導体である。実施形態において、O D N 1 5 8 5、O D N 2 2 1 6、O D N D 1 9、O D N 2 3 3 6、O D N 1 6 6 8、O D N 1 8 2 6、O D N 2 0 0 6、O D N 2 0 0 7、O D N 2 3 9 5、または O D N M 3 6 2 の誘導体は、1 つ以上の ( 例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 ) のヌクレオチド置換基 ( 例えば、異なるヌクレオチド間で置換された、A、C、G、または T ) を含む。実施形態において、O D N 1 5 8 5、O D N 2 2 1 6、O D N D 1 9、O D N 2 3 3 6、O D N 1 6 6 8、O D N 1 8 2 6、O D N 2 0 0 6、O D N 2 0 0 7、O D N 2 3 9 5、または O D N M 3 6 2 の誘導体は、1 つ以上 ( 例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 ) のヌクレオチド間連結の置換 ( 例えば、ホスホジエステル誘導体で置換されたホスホジエステル、またはホスホジエステルで置換されたホスホジエステル誘導体 ) を含む。実施形態において、O D N ・ 1 5 8 5、O D N ・ 2 2 1 6、O D N ・ D 1 9、O D N ・ 2 3 3 6、O D N ・ 1 6 6 8、O D N ・ 1 8 2 6、O D N ・ 2 0 0 6、O D N ・ 2 0 0 7、O D N ・ 2 3 9 5、または O D N ・ M 3 6 2 の誘導体は、1 つ以上 ( 例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、または 1 0 0 ) のヌクレオチドの欠失を含む。実施形態において、O D N 1 5 8 5、O D N 2 2 1 6、O D N D 1 9、O D N 2 3 3 6、O D N 1 6 6 8、O D N 1 8 2 6、O D N 2 0 0 6、O D N 2 0 0 7、O D N 2 3 9 5、または O D N M 3 6 2 の誘導体は、1 つ以上 ( 例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 ) のヌクレオチド付加を含む。

#### 【 0 1 4 3 】

実施形態において、当該化合物は、ホスホジエステル誘導体連結 ( 例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ホウ素、または O - メチルホスホノアミダイト連結 ) を含む。実施形態において、当該化合物は、多数のホスホジエステル誘導体連結 ( 例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ホウ素、O - メチルホスホノアミダイト連結、またはそれらの組み合わせ ) を含む。実施形態において、当該化合物は、T L R 9 結合 DNA 置換基における、ホスホジエステル誘導体連結 ( 例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ホウ素、または O

- メチルホスホノアミダイト連結)を含む。実施形態において、当該化合物は、TLR結合性核酸(エンドソームTLR-、TLR3-、TLR7-、TLR8-、またはTLR9結合性核酸)置換基における、ホスホジエステル誘導体連結(例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ハウ素、またはO-メチルホスホノアミダイト連結)を含む。

【0144】

実施形態において、当該CpG核酸配列におけるホスホジエステル誘導体連鎖は、ホスホロアミダート連結、ホスホロジアミダート連結、ホスホロチオエート連結、ホスホロジチオエート連結、ホスホノカルボン酸連結、ホスホノカルボン酸塩連結、ホスホノ酢酸連結、ホスホノギ酸連結、ホスホン酸メチル連結、ホスホン酸ハウ素連結、またはO-メチルホスホノアミダイト連結であってよい。

10

【0145】

実施形態において、当該化合物中の核酸ヌクレオチド間連結の1つ以上が、ホスホジエステル誘導体連結(例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ハウ素、またはO-メチルホスホノアミダイト連結)である(例えば、当該化合物中の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または全てのヌクレオチド間連結が、ホスホジエステル誘導体連結(例えば、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボン酸塩、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、ホスホン酸メチル、ホスホン酸ハウ素、O-メチルホスホノアミダイト連結、またはそれらの組み合わせ)である)。

20

【0146】

実施形態において、本開示は、CpGを、CEBPAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドに連結する化合物を含む。実施形態において、当該OND-saRNAは、その細胞質(及びその細胞核内に)に存在する。実施形態において、OND-アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートの核送達、そのアンチセンスオリゴヌクレオチド上のRNAseH介在作用の結果として、遺伝子発現に影響を与える。

【0147】

実施形態において、本開示は、ONDを、STATを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドに連結する化合物を含む。例えば、本開示は、表2、3、及び/または4に記載される、OND-STAT3-ASO(アンチセンス)の化合物を含む。

30

【0148】

組成物

1つの態様において、本開示は、薬学的に許容される賦形剤、及び本明細書に開示される化合物を含む、医薬組成物を提供する。実施形態において、この組成物は、第2治療薬を含む。実施形態において、この第2治療薬は、抗がん剤である。実施形態において、当該第2治療薬は、同一単位の投与量の一部、または個別単位の投与量の一部であってよい。当該第2治療薬は、表1~4に記載される化合物、またはそれらの誘導体の1つではない。

40

【0149】

実施形態において、本開示は、1つ以上の追加の抗がん治療、例えば、抗VEGF抗体、または抗STAT薬と、本開示の化合物との組み合わせを含む。抗がん治療の追加の例示には、非限定的に、手術、放射線療法(放射線治療)、生物療法、免疫療法、化学療法(例えば、テモゾロミド)、またはそれら治療法の組み合わせを含む。さらに、細胞毒性物質、抗血管新生及び抗増殖剤は、本開示の化合物を含む組成物と組み合わせて使用され得る。

【0150】

当該方法及び使用法のいずれかの特定の態様において、本開示は、がんと診断された対象に、本開示の化合物及び化学療法薬の、治療に効果的な量を投与することにより、がんを

50

治療することを含む。多様な化学療法薬は、本開示の治療法及び使用法を組み合わせ、用いられてよい。実施形態において、化学療法薬は、テモゾロミドであってよい。実施形態において、当該化学療法薬は、放射線治療と併用して、投与されてよい。

【0151】

1つの例示において、この併用治療は、別々の配合物または単一の医薬配合物を用いた同時投与、及び両方（または全ての）活性薬が、同時にそれらの生物学的活性を発揮する場合、期間があってもよいが、いずれかの順序での連続投与を含む投与を関与させてよい。このような化学療法薬の調製及び投与スケジュールは、製造者の指示に従って用いられ、または当業者によって経験的に決定されてよい。化学療法薬の調製及び投与スケジュールはまた、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)に記載されている。当該化学療法薬は、本開示の化合物または組成物の投与の前後に、またはそれと同時に与えられてよい。

10

【0152】

当該方法及び使用法のいずれかの、いくつかのその他の態様において、本開示の化合物と腫瘍療法との組み合わせに有用な、その他の治療薬には、VEGF、EGFR、ErbB3、ErbB4、STATまたはTNFなどの、腫瘍の増殖に関与するその他因子の拮抗薬を含む。時には、その対象に1つ以上のサイトカインを、さらに投与することが有益な場合がある。実施形態において、本開示の化合物または組成物は、増殖阻害剤と共に投与される。例えば、この増殖阻害剤がまず投与され、続いて本開示の化合物または組成物が投与されてよい。しかしながら、本開示の化合物または組成物の同時投与または最初の投与も、可能であり得る。この増殖阻害剤に適した投与量は、現在用いられているものであり、及びこの増殖阻害剤と、本開示の化合物との併用作用（相乗作用）により減らされてよい。

20

【0153】

本明細書における当該配合物はまた、治療されている特定の病候、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性剤で治療されている病候に対して、必要に応じて1つ以上の活性化合物が含まれていてよい。例えば、その1つの配合物中の、EGFR、VEGF（例えば、VEGF上の異なるエピトープまたは同一のエピトープを結合する抗体）、EGFR、またはErbB2に結合している薬剤を、さらに提供することが望ましい場合がある。あるいは、またはさらに、当該組成物は、化学療法薬、または細胞毒性薬を含んでいてよい。そのような分子は、意図された目的に対しての有効量で組み合わせられて、好ましい存在となる場合がある。

30

【0154】

当該方法及び使用法のいずれかの、特定の態様において、がん療法と本開示の化合物または組成物との組み合わせに対して有用な、その他の治療薬には、その他の抗血管新生剤を含む。多くの抗血管新生剤が特定され、及びCarmelietならびにJain(2000)によって記載された物を含んで、当該技術分野においては公知である。実施形態において、本開示の化合物または組成物は、その他のCEBPA拮抗薬、中和抗CEBPA抗体、CEBPAの低分子量阻害剤、及びそれらの任意の組み合わせとの併用で使用される。

40

【0155】

実施形態において、本開示は、低分子活性化RNA(sRNA)にコンジュゲートした、CpG核酸配列を含む組成物、及びSTAT結合DNA置換基にコンジュゲートした、TLR結合性核酸置換基を含む化合物を包含する。実施形態において、このSTATは、ヒトのSTAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、またはSTAT6である。実施形態において、STAT3結合DNA置換基にコンジュゲートした、TLR9結合性核酸置換基である。実施形態において、このTLR9結合性核酸置換基は、CpGモチーフを含む。実施形態において、当該TLR9結合性核酸置換基は、非メチル化CpGモチーフを含む。実施形態において、当該TLR9結合性核酸置

50

換基は、G - 4 重体を形成することができる、DNA 配列を含む。実施形態において、当該 T L R 9 結合性核酸置換基は、クラス A の C p G DNA 配列、クラス B の C p G DNA 配列、またはクラス C の C p G DNA 配列を含む。実施形態において、当該 T L R 9 結合性核酸置換基は、リンカーによって、第二 S T A T 3 結合 DNA 配列に共有結合した第一 S T A T 3 結合 DNA 配列を含む。及び

【 0 1 5 6 】

実施形態において、本開示は、C p G を、C E B P A を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドへ連結する組成物を含む。実施形態において、当該 O D N - s a R N A は、その細胞質（及びその細胞核内に）に存在する。実施形態において、O D N - アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートの核送達は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチド上における、R N a s e H 介在作用の結果として遺伝子発現に影響を与える。

10

【 0 1 5 7 】

実施形態において、本開示は、O D N を、S T A T を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドに連結する、組成物を含む。例えば、3 つの O D N - S T A T 3 - A S O（アンチセンス）コンジュゲート（C p G - O D N 及び S T A T 3 - A S O コンジュゲート）が、表 2 に記載される。

【 0 1 5 8 】

20

30

40

50

【表 2】

表 2

1	CpG (D19)- STAT3 AS01-1	PS + 3 x 2' OMe	5' <u>GGT GCA TCG ATG CAGGGGGG</u> xxxxx <u>CTATTTGGATGTCAGC</u> 3' (SEQ ID NO: 19) $x = -(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4\text{-}[(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4]_z\text{-(CH}_2)_n$ 下線部：ホスホロチオエート化（硫黄で置き換えられた1つの非架橋酸素） 太字：2' OMe（2'-O-メチルヌクレオシド。2'-Oメチルで置き換えられた2'位におけるヒドロキシル）
2	CpG (D19)- STAT3 AS02-1	PS + 5 x 2' OMe	5' <u>GGT GCA TCG ATG CAGGGGGG</u> xxxxx <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3' (SEQ ID NO: 20) $x = -(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4\text{-}[(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4]_z\text{-(CH}_2)_n$ 下線部：ホスホロチオエート化（硫黄で置き換えられた1つの非架橋酸素） 太字：2' OMe（2'-O-メチルヌクレオシド。2'-Oメチルで置き換えられた2'位におけるヒドロキシル）
3	CpG (D19)- STAT3 AS03-1	PS + 5 x 2' OMe	5' <u>GGT GCA TCG ATG CAGGGGGG</u> xxxxx <u>TTTTGCATGATGTAACCACT</u> 3' (SEQ ID NO: 21) $x = -(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4\text{-}[(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4]_z\text{-(CH}_2)_n$ 下線部：ホスホロチオエート化（硫黄で置き換えられた1つの非架橋酸素） 太字：2' OMe（2'-O-メチルヌクレオシド。2'-Oメチルで置き換えられた2'位におけるヒドロキシル）

10

20

30

## 【0159】

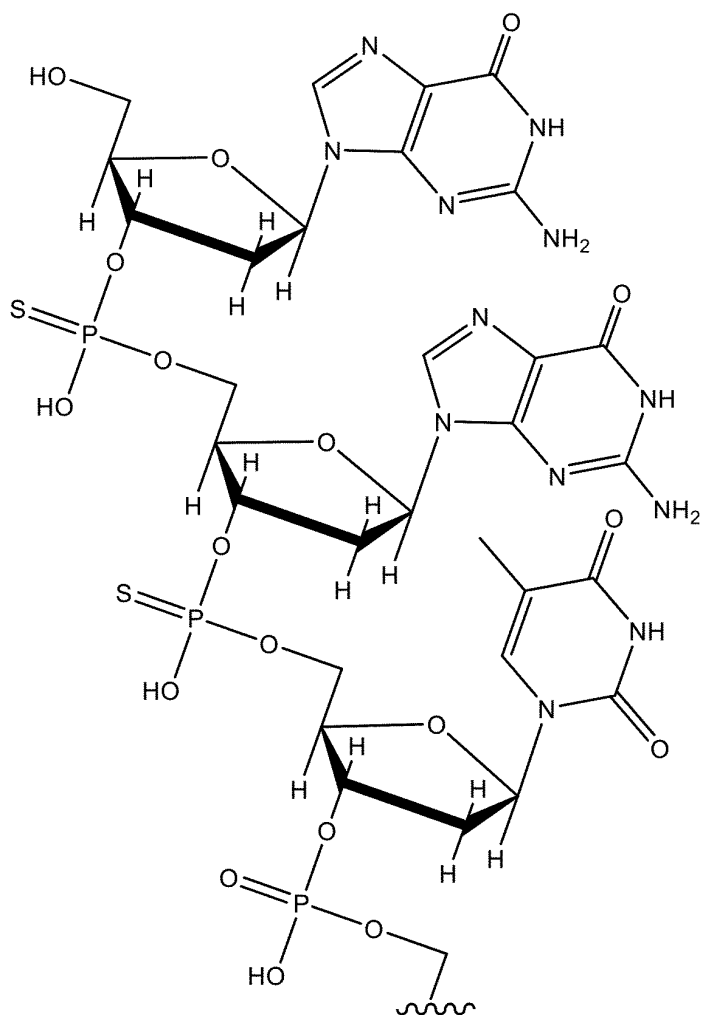
表2に「x」で表されるリンカーは、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4\text{-}[(\text{CH}_2)_n\text{-PO}_4]_z\text{-(CH}_2)_n$ であり、その符号nは、1から5（例えば、3）の整数であり、及び符号zは、0から50（例えば、0から25、0から10、または0から5）の整数である。実施形態において、nは3であり、及びzは0から5、または1から5である。実施形態において、nは3であり、及びzは0から4、または1から4である。実施形態において、nは3であり、及びzは0から3、または1から3である。実施形態において、nは3であり、及びzは3である。2' OMe（2'-O-メチルヌクレオシド、2'-Oメチルで置換された、2'位におけるヒドロキシル）、PSは、ホスホロチオエート化である。硫黄で置換された1つの非架橋酸素、PS + 3は、その修飾された配列における、3つのリン酸塩を表し、硫黄で置換された1つの非架橋酸素を有し、PS + 5は、その修飾された配列における5つのリン酸塩を表し、硫黄で置換された1つの非架橋酸素を有する。

40

## 【0160】

例えば、以下に示すように、実施形態において、当該CpG配列中の核酸は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含んでいてよい。

## 【化 8】



## 【 0 1 6 1 】

ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有する、当該 C p G 核酸配列の一部を上を示す。

## 【 0 1 6 2 】

このリンカーは、以下の構造を有してよく、当該リンカーは、一方の末端にあるグアニンの 3' リン酸と、他方の末端のチミジンの 5' リン酸とを結合し、及びそのアンチセンス部の核酸塩基は、2' OMe で修飾されていてよい。

10

20

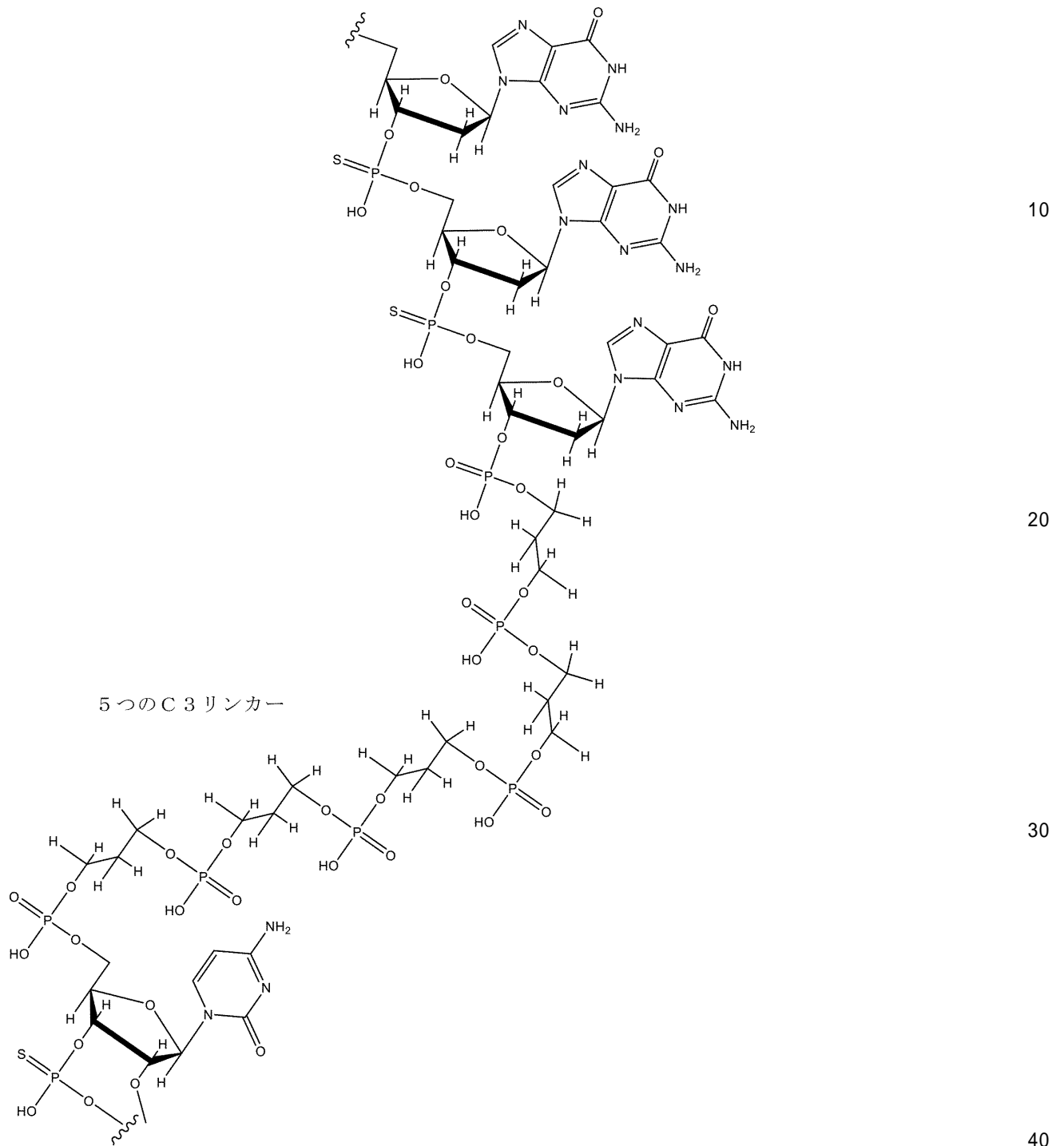
30

40

50

## 【化 9】

53



## 【0163】

上記式は、 $(CH_2)_3$  リンカーで、その3' - OH末端に連結された当該CpG核酸の一部を表し、アンチセンスRNAの5'リン酸へ連結する。

## 【0164】

当該リンカーは、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。実施形態において、リンカーは、当該TLR9結合DNA置換基と、当該STAT3結合DNA置換基とをつなぐ。実施形態において、当該リンカーは、置換もしくは非

50

置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリレン、または置換もしくは非置換ヘテロアリレンである。

【 0 1 6 5 】

実施形態において、本開示は、低分子活性化RNA ( s a RNA ) 及び表 3 に記載された化合物にコンジュゲートされた、C p G 核酸配列を含む組成物を包含する。

【 0 1 6 6 】

【表 3】

表 3：化合物及び成分配列

名称	配列 (下線：ホスホロチオエート化 (硫黄で置き換えられた、3' 隣接リン酸の 1 つの非架橋酸素) ヌクレオチド)、末端リン酸が、任意で付加され、及び 5' x が、OH 終末端を有し、ならびに 3' x が、その最終リン酸基に結合した -C <sup>6</sup> -NH <sub>2</sub> を有している終末端を除き、両末端のリン酸基に結合した x = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -PO <sub>4</sub> -[(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -PO <sub>4</sub> ] <sub>z</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> 、その他の連結は、ホスホジエステル。	配列番号
CpG (A)- STAT3dOD N	5' <u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u> -xxxxx-CATTTCCCGTAAATC-xxxx-GATTACGGGAAATG-xxxxx 3'	22
GpC (A)- STAT3dOD N	5' <u>GG*TCGATGCATGCAGGGGGG</u> -xxxxx-CATTTCCCGTAAATC-xxxx-GATTACGGGAAATG-xxxxx 3'	23
CpG (A)- スクランブル化 ODN (陰性対照)	5' <u>GGTGCATCGATGCAGGGGGG</u> -xxxxx- <u>ACTCTTGCCAATTAC</u> -xxxx-GTAATTGGCAAGAGT-xxxxx 3'	24
CpG (B2)- STAT3dOD N	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> -xxxxx-CATTTCCCGTAAATC-xxxx-GATTACGGGAAATG-xxxxx 3'	25
CpG (B2)- mutSTAT3 dODN (陰性対照)	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> -xxxxx-CATTTCCCTTAAATC-xxxx-GATTTAAGGAAATG-xxxxx 3'	26

10

20

30

40

50

名称	配列（下線：ホスホロチオエート化（硫黄で置き換えられた、3' 隣接リン酸の1つの非架橋酸素）ヌクレオチド）、末端リン酸が、任意で付加され、及び5' x が、OH 終末端を有し、ならびに3' x が、その最終リン酸基に結合した-C <sup>6</sup> -NH <sub>2</sub> を有している終末端を除き、両末端のリン酸基に結合した $x = -(CH_2)_n-PO_4-[(CH_2)_n-PO_4]_z-(CH_2)_n$ 、その他の連結は、ホスホジエステル。	配列番号
<u>CpG (B2)-</u> <u>スクラン</u> <u>ブル化</u> <u>ODN</u> <u>(陰性対</u> <u>照)</u>	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> -xxxxx- <u>ACTCTTGCCAATTAC</u> - xxxxx-GTAATTGGCAAGAGT-xxxxx 3'	27
<u>STAT3d0D</u> <u>N</u> <u>(CpG 欠失</u> <u>)</u>	5' xxxxx- <u>CATTTCCCGTAAATC</u> -xxxxx-GATTTACGGGAAATG-xxxxx 3'	28

10

20

【 0 1 6 7 】

30

40

50

【表 4】

表 4 : A S O 化合物の例示

標的部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列*		配列番号
C p G O D N 配列 (ホスホロチオエート化 A S O)		
CpG (A)-ODN- STAT3 AS01	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>CTA</u> TTT <u>GGA</u> TGT <u>CAGC</u> 3'	43
CpG (A)-ODN- STAT3 AS02	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3'	44
CpG (A)-ODN- STAT3 AS03	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>TTTTG</u> <u>CATGATGTAACCACT</u> 3'	45
CpG (A)-ODN- STAT3 AS04	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>ATC</u> AAA <u>GTC</u> ATC CTG <u>GAG</u> 3'	46
CpG (A)-ODN- STAT3 LNA AS01	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>GCA</u> ACC TGA CTT <u>TAGT</u> 3'	47
CpG (A)-ODN- STAT3 LNA AS02	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>GAT</u> TCT GCT AAT <u>GACG</u> 3'	48
CpG (A)-ODN- STAT3 LNA AS03	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>TGA</u> CGG GTC TGA <u>AGTT</u> 3'	49
CpG (A)-ODN- STAT3 LNA AS04	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>AGA</u> TAG CAG AAG <u>TAGG</u> 3'	50
CpG (A)-ODN- STAT3 LNA AS05	5' <u>GGT</u> GCA TCG ATG CAG <u>GGGGG</u> xxxxx <u>GTC</u> AAT GCA CAC <u>TTTA</u> 3'	51
CpG (B2)-ODN- STAT3 AS01	5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTxxxxx <u>CTA</u> TTT GGA <u>TGT</u> <u>CAGC</u> 3'	52

10

20

30

40

50

標的部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列*		配列番号
CpG (B2)-ODN- STAT3 AS02	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3' _	53
CpG (B2)-ODN- STAT3 AS03	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>TTTTG</u> <u>CATGATGTAACCACT</u> 3' _	54
CpG (B2)-ODN- STAT3 AS04	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>ATC AAA GTC ATC CTG GAG</u> 3' _	55
CpG (B2)-ODN- STAT3 LNA AS01	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>GCA ACC TGA CTT TAGT</u> 3' _	56
CpG (B2)-ODN- STAT3 LNA AS02	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>GAT TCT GCT AAT GACG</u> 3' _	57
CpG (B2)-ODN- STAT3 LNA AS03	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>TGA CGG GTC TGA AGTT</u> 3' _	58
CpG (B2)-ODN- STAT3 LNA AS04	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>AGA TAG CAG AAG TAGG</u> 3' _	59
CpG (B2)-ODN- STAT3 LNA AS05	5' <u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> xxxxx <u>GTC AAT GCA CAC TTTA</u> 3' _	60
G p C - O D N 配列 (ホスホロチオエート化 A S O)		
GpC (A)-ODN- STAT3 AS01	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>CTA TTT</u> <u>GGA TGT CAGC</u> 3'	61
GpC (A)-ODN- STAT3 AS02	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3'	62
GpC (A)-ODN- STAT3 AS03	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>TTTTG</u> <u>CATGATGTAA CCACT</u> 3'	63
GpC (A)-ODN- STAT3 AS04	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>ATC AAA GTC ATC CTG GAG</u> 3'	64
GpC (A)-ODN- STAT3 LNA AS01	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GCA ACC TGA CTT TAGT</u> 3'	65
GpC (A)-ODN- STAT3 LNA AS02	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GAT TCT GCT AAT GACG</u> 3'	66
GpC (A)-ODN- STAT3 LNA AS03	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>TGA CGG GTC TGA AGTT</u> 3'	67
GpC (A)-ODN- STAT3 LNA AS04	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>AGA TAG CAG AAG TAGG</u> 3'	68
GpC (A)-ODN- STAT3 LNA AS05	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GTC AAT GCA CAC TTTA</u> 3'	69
GpC (B)- ODN- STAT3 AS01	5' <u>TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u> xxxxx <u>CTA TTT</u> <u>GGA TGT CAGC</u> 3'	70
GpC (B)-ODN- STAT3 AS02	5' <u>TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u> xxxxx <u>CAGCAGATCAAGTCCAGGGA</u> 3'	71
GpC (B)-ODN-	5' <u>TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u> xxxxx <u>TTTTG</u>	72

10

20

30

40

50

標的部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列*		配列番号
STAT3 AS03	CATGATGTAACCACT 3'	
GpC(B)-ODN- STAT3 AS04	5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT xxxxx ATC AAA GTC ATC CTG GAG 3'	73
GpC(B)-ODN- STAT3 LNA AS01	5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT xxxxx GCA ACC TGA CTT TAGT 3'	74
GpC(B)-ODN- STAT3 LNA AS02	5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT xxxxx GAT TCT GCT AAT GACG 3'	75
GpC(B)-ODN- STAT3 LNA AS03	5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT xxxxx TGA CGG GTC TGA AGTT 3'	76
GpC(B)-ODN- STAT3 LNA AS04	5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT xxxxx AGA TAG CAG AAG TAGG 3'	77
P S - C p G - O D N 配列 (ホスホロチオエート化 A S O)		
PS-CpG-ODN (GGTGCATCGATGCAGGGGG) [配列番号 1 0 2]		
PS-CpG-ODN- STAT3 AS01	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx CTA TTT GGA TGT CAGC 3'	78
PS-CpG-ODN- STAT3 AS02	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx CAGCAGATCAAGTCCAGGGA 3'	79
PS-CpG-ODN- STAT3 AS03	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx TTTTG CATGATGTAA CCACT 3'	80
PS-CpG-ODN- STAT3 AS04	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx ATC AAA GTC ATC CTG GAG 3'	81
PS-CpG-ODN- STAT3 LNA AS01	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx GCA ACC TGA CTT TAGT 3'	82
PS-CpG-ODN- STAT3 LNA AS02	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx GAT TCT GCT AAT GACG 3'	83
PS-CpG-ODN- STAT3 LNA AS03	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx TGA CGG GTC TGA AGTT 3'	84
PS-CpG-ODN- STAT3 LNA AS04	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx AGA TAG CAG AAG TAGG 3'	85
PS-CpG-ODN- STAT3 LNA AS05	5' GGT GCA TCG ATG CAG GGGGG xxxxx GTC AAT GCA CAC TTTA 3'	86
P S - G p C - O D N 配列 (ホスホロチオエート化 A S O)		
PS-GpC-ODN- STAT3 AS01	5' GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG xxxxx CTA TTT GGA TGT CAGC 3'	87
PS-GpC-ODN- STAT3 AS02	5' GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG xxxxx CAGCAGATCAAGTCCAGGGA 3'	88
PS-GpC-ODN- STAT3 AS03	5' GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG xxxxx TTTTG CATGATGTAA CCACT 3'	89
PS-GpC-ODN- STAT3 AS04	5' GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG xxxxx ATC AAA GTC ATC CTG GAG 3'	90

10

20

30

40

50

標的部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列*		配列番号
PS-GpC-ODN- STAT3 LNA AS01	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GCA ACC TGA CTT TAGT</u> 3'	91
PS-GpC-ODN- STAT3 LNA AS02	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GAT TCT GCT AAT GACG</u> 3'	92
PS-GpC-ODN- STAT3 LNA AS03	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>TGA CGG GTC TGA AGTT</u> 3'	93
PS-GpC-ODN- STAT3 LNA AS04	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>AGA TAG CAG AAG TAGG</u> 3'	94
PS-GpC-ODN- STAT3 LNA AS05	5' <u>GGT GCA TGC ATG CAG GGGGG</u> xxxxx <u>GTC AAT GCA CAC TTTA</u> 3'	95

下線：ホスホロチオエート化（硫黄で置換された、3' 隣接リン酸上の1つの非架橋酸素）ヌクレオチド（例えば、G G G G G Gは、5' -G\*G\*TGCA TCGA TGC A G G\*G\*G\*G\*G-3' における、G G\*G\*G\*G\*Gであり、ここでこのアスタリスク（\*）は、その塩基（より正確には、ヌクレオシド）の間に位置し、及びこのホスホロチオエート化リン酸はまた、塩基間に位置する）である。

太字：2' OMe（2' -O-メチルヌクレオシド、2' -Oメチルで置換され2' 位におけるヒドロキシル）ヌクレオチド。イタリック：LNA修飾のヌクレオチド。

太字：2' OMe（2' -O-メチルヌクレオシド、2' -Oメチルで置換され2' 位におけるヒドロキシル）ヌクレオチド。イタリック：LNA修飾のヌクレオチド。

#### 【0168】

表3及び表4に「x」で表されるリンカーは、 $-(CH_2)_n-PO_4-[ (CH_2)_n-PO_4 ]_z-(CH_2)_n$ であり、その符号nは、1から5（例えば、3）の整数であり、及び符号zは、0から50（例えば、0から25、0から10、または0から5）の整数である。実施形態において、nは、3であり、及びzは、0から5、または1から5である。実施形態において、nは、3であり、及びzは、0から4、または1から4である。実施形態において、nは、3であり、及びzは、0から3、または1から3である。実施形態において、nは、3であり、及びzは、3である。リンカー「x」は、その連鎖に複数回（例えば、1、2、3、4、5、または6回であっても）存在してよく、ここでn及びzは、各リンカー「x」の存在に対して、独立している。

#### 【0169】

本開示は、本開示の化合物の有効用量を有する組成物を包含する。この有効用量は、その薬剤の約0.001mg/kgから約100mg/kgの間であってよい。

#### 【0170】

がんを治療し、細胞内でのC/EBPA発現を高め、細胞増殖を阻害し、及び/またはSTAT転写因子の活性を低下させるための本開示の化合物の有効用量は、その化合物の約0.001mg/kgから約0.01mg/kgの間、その化合物の約0.01mg/kgから約0.1mg/kgの間、その化合物の約0.1mg/kgから約1.0mg/kgの間、その化合物の約1.0mg/kgから約5.0mg/kgの間、その化合物の約5.0mg/kgから約10mg/kgの間、その化合物の約10mg/kgから約15mg/kgの間、その化合物の約15mg/kgから約20mg/kgの間、その化合物の約20mg/kgから約25mg/kgの間、その化合物の約25mg/kgから約30mg/kgの間、その化合物の約30mg/kgから約35mg/kgの間、その化合物の約35mg/kgから約40mg/kgの間、その化合物の約40mg/kgから

10

20

30

40

50

約 45 mg / kg の間、その化合物の約 45 mg / kg から約 50 mg / kg の間、その化合物の約 50 mg / kg から約 55 mg / kg の間、その化合物の約 55 mg / kg から約 60 mg / kg の間、その化合物の約 60 mg / kg から約 65 mg / kg の間、その化合物の約 65 mg / kg から約 70 mg / kg の間、その化合物の約 70 mg / kg から約 75 mg / kg の間、その化合物の約 75 mg / kg から約 80 mg / kg の間、その化合物の約 80 mg / kg から約 85 mg / kg の間、その化合物の約 85 mg / kg から約 90 mg / kg の間、その化合物の約 90 mg / kg から約 95 mg / kg の間、またはその化合物の約 95 mg / kg から約 100 mg / kg の間であってよい。

#### 【0171】

いくつかの態様において、本開示は、その化合物が、その組成物の約 0.1% から約 20% w / v の間であり得る、本開示の化合物の有効用量を有する、組成物を包含する。

10

#### 【0172】

例えば、本明細書に開示の化合物の有効用量は、その組成物の約 0.001% ~ 約 0.01% の間、約 0.01% ~ 約 0.1% の間、約 0.1% ~ 約 1.0% の間、約 1.0% ~ 約 2.0% の間、約 2.0% ~ 約 3.0% の間、約 3.0% ~ 約 4.0% の間、約 4.0% ~ 約 5.0% の間、約 5.0% ~ 約 6.0% の間、約 6.0% ~ 約 7.0% の間、約 7.0% ~ 約 8.0% の間、約 8.0% ~ 約 9.0% の間、約 9.0% ~ 約 10% の間、約 10% ~ 約 11% の間、約 11% ~ 約 12% の間、約 12% ~ 約 13% の間、約 13% ~ 約 14% の間、約 14% ~ 約 15% の間、約 15% ~ 約 16% の間、約 16% ~ 約 17% の間、約 17% ~ 約 18% の間、約 18% ~ 約 19% の間、または約 19% ~ 約 20% w / v の間であってよい。

20

#### 【0173】

遺伝子発現の増強または抑制の方法、及び/またはその使用方法

遺伝子発現の増強及び免疫応答の刺激

1つの態様において、本開示は、本開示の化合物及び/または組成物を伴って、発現遺伝子の発現を増強し、及び免疫応答を刺激する方法を含む。実施形態において、遺伝子発現を増強し、及び免疫応答を刺激することは、CpG配列を有するホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)とコンジュゲートしたsaRNAを用いて達成される。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)配列、例えば、配列番号7~18の1つとコンジュゲートされたC/EBPA、p21、及びp53の各々のsaRNAを用いて、C/EBPA、p21、及びp53の発現が増強され、及び免疫応答が刺激される。

30

#### 【0174】

遺伝子発現の増強及び免疫応答の刺激

1つの態様において、本開示は、免疫応答を刺激することなく、本開示の化合物及び/または組成物を用いて、発現遺伝子の発現を増強する方法を包含する。実施形態において、免疫応答を刺激することのない、遺伝子発現の増強は、本開示のGpCまたはPS配列を有する、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)配列とコンジュゲートされたsaRNAを用いて達成される。実施形態において、C/EBPA、p21、及びp53の発現が、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)配列、例えば、配列番号29~30の1つとコンジュゲートされた、C/EBPA、p21、及びp53の各々のsaRNAを用いて、免疫応答を刺激することなく増強される。

40

#### 【0175】

遺伝子発現の抑制、及び免疫応答の刺激

1つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発しながら、化合物及び/または組成物を用いて、遺伝子を抑制する方法を包含する。実施形態において、本開示は、配列番号31~42及び110~113の1つと連結された配列番号7~18及び98~101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の1つの化合物を用いて、遺伝子、例えば、STATを抑制する方法を提供する。例えば、STAT遺伝子(STAT1~STAT5の1つ)を抑制する方法は、配列番号43~60の化合物を用いて達成さ

50

れる。これらの化合物は、１時間以内のインキュベーションで、哺乳類（例えば、ヒト）の免疫細胞、前立腺がん細胞などの標的の TLR9 + 細胞による迅速な内在化を可能にする。当該化合物の取り込みは、低濃度（例えば、50 nM）で検出され得る。これらの配列は、ヌクレアーゼ耐性であり、全身投与、及び脾臓または骨髄などの遠位臓器において、TLR9 + 細胞の標的化を可能にする（図 15 A ~ 15 B）。当該化合物の静脈内（IV）注入では、その骨髄において、骨髄細胞のかなりの部分及びその末梢リンパ節において、DCs を含む骨髄細胞の相当な割合へ当該化合物が送達され得る（図 15 A ~ 15 B）。実施形態において、STAT 発現は、悪性細胞及び／または腫瘍関連免疫細胞、例えば、骨髄由来抑制細胞（MDSCs）において免疫応答を刺激しつつ、抑制される。MDSCs は、前立腺がんの進行及び乏しい患者生存に重要な役割を果たす、未熟及び潜在的な免疫抑制性骨髄細胞の異種集団である。実施形態において、STAT 発現は、同時に免疫応答を刺激しつつ、ホルモン難治性／去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）において抑制される。

10

#### 【0176】

免疫応答を刺激することのない、遺伝子発現の抑制

１つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発することなく、化合物及び／または組成物を用いて、遺伝子発現を抑制する方法を包含する。実施形態において、本開示は、化合物、例えば、配列番号 31 ~ 42 及び 110 ~ 113 の１つと連結された、例えば、配列番号 29 ~ 30 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つを用いて、遺伝子、例えば、STAT（STAT1 ~ STAT5 の１つ）を抑制する方法を提供する。例えば、STAT1 ~ STAT5 の抑制は、免疫原性効果を刺激することなく、配列番号 61 ~ 95 の化合物を用いて達成される。配列番号 78 ~ 95 の化合物は、配列番号 61 ~ 77 の化合物に比べてより高い安定性を有する。実施形態において、STAT 発現は、免疫応答を刺激することなく、悪性細胞及び／または腫瘍関連免疫細胞、例えば、骨髄由来抑制細胞（MDSCs）において抑制される。実施形態において、STAT 発現は、免疫応答を刺激することなく、ホルモン難治性／去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）において抑制される。

20

#### 【0177】

遺伝子発現を抑制し、及びアポトーシスを誘発する方法

１つの態様において、本開示は、アポトーシスを誘発しながら、本開示の化合物及び／または組成物を用いて、遺伝子発現を抑制する方法を包含する。実施形態において、本開示は、化合物、例えば、配列番号 31 ~ 42 及び 110 ~ 113 の１つと連結された、例えば、配列番号 7 ~ 18 及び 98 ~ 101 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つを用いて、遺伝子、例えば、STAT（STAT1 ~ STAT5）を抑制する方法を提供する。例えば、STAT1 ~ STAT5 を抑制する方法は、標的細胞のアポトーシスを誘発しながら、例えば、配列番号 43 ~ 60 の化合物を用いて達成される。

30

#### 【0178】

アポトーシスを誘発することなく遺伝子発現を抑制する方法

１つの態様において、本開示は、アポトーシスを誘発することなく、化合物及び／または組成物を用いて遺伝子発現を抑制する方法を包含する。実施形態において、本開示は、アポトーシスを誘発することなく、化合物、例えば、配列番号 31 ~ 42 及び 110 ~ 113 の１つと連結された、例えば、配列番号 29 ~ 30 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つを用いて、遺伝子、例えば、STAT（STAT1 ~ STAT5）を抑制する方法を提供する。例えば、STAT1 ~ STAT5 を抑制する方法は、標的細胞のアポトーシスを誘発することなく、例えば、配列番号 61 ~ 95 の化合物を用いて達成される。

40

#### 【0179】

がんの治療法

１つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発しながら、本開示の化合物及び／ま

50

たは組成物を用いてがん及び／または腫瘍を治療する方法を包含する。１つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発せずに本開示の化合物及び／または組成物を用いてがん及び／または腫瘍を治療する方法を包含する。

#### 【０１８０】

実施形態において、当該がんは、造血細胞がんであってよい。実施形態において、当該がんは、造血細胞がんではない。実施形態において、当該がんは、骨髄腫または急性骨髄性白血病である。実施形態において、当該がんは、前立腺がん（例えば、ホルモン難治性／去勢抵抗性前立腺がん（ＣＲＰＣ））、乳がん、乳がん、膠芽細胞腫、卵巣がん、肺がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、黒色腫、脳腫瘍、大腸がん、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である。

10

#### 【０１８１】

実施形態において、当該化合物または組成物は、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、対象に投与される。実施形態において、当該治療は、当該化合物または組成物の用量依存性である。実施形態において、当該化合物の約 0.001 mg/kg ~ 約 100 mg/kg が、対象に投与される。この範囲内のすべての桁数及び様々な範囲もまた、暗示される。

#### 【０１８２】

がんの治療及び免疫応答の誘発

実施形態において、本開示は、治療が必要な対象において、がんを治療する方法を提供し、その方法は、本明細書に開示される化合物を含む、化合物またはその医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む。本開示は、治療が必要な対象において、がんを治療し及び免疫応答を刺激する方法を提供し、その方法は、例えば、CEBPA s aRNA（配列番号 1 ~ 2）、p21 s aRNA（配列番号 3 ~ 4）、p53 s aRNA（配列番号 5 ~ 6）の１つ、または例えば、配列番号 31 ~ 42 及び 110 ~ 113 の STATA S O s の１つに連結された、例えば、配列番号 7 ~ 18 及び 98 ~ 101 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つの化合物を含む、化合物または医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む。

20

#### 【０１８３】

実施形態において、当該がんの治療方法には、本開示に記載のように、リンカーで結合された、例えば、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30 及び 98 ~ 101 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つと、CEBPA s aRNA（配列番号 1 ~ 2）、p21 s aRNA（配列番号 3 ~ 4）、または p53 s aRNA（配列番号 5 ~ 6）の１つとの組み合わせの化合物の、化合物または組成物を治療が必要な対象へ投与することを含む。実施形態において、当該がんの治療方法には、本開示に記載のように、リンカーで結合された、例えば、配列番号 7 ~ 18、29 ~ 30 及び 98 ~ 101 のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の１つと、例えば、配列番号 31 ~ 42 及び 110 ~ 113 の１つとの組み合わせの化合物の、化合物または組成物を治療が必要な対象へ投与することを含む。

30

#### 【０１８４】

実施形態において、当該免疫応答の刺激には、ナチュラルキラー細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞または骨髄細胞の成熟、分化、もしくは増殖を含む。実施形態において、当該免疫応答の刺激には、Ｔ<sub>H</sub>１型免疫応答の増加を含む。実施形態において、当該免疫応答の刺激には、その対象の臓器へ、樹状細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞を補充してよい。実施形態において、当該免疫応答の刺激は、対象における抗原提示細胞の集団を拡大する。実施形態において、当該免疫応答の刺激は、対象におけるがん細胞の増殖を抑制する。実施形態において、当該化合物または組成物は、免疫応答を刺激するために、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により対象に投与される。

40

#### 【０１８５】

本開示は、細胞内での C/EBP、p21、及び／または p53 の発現を増強し、及び同時に免疫原性効果を誘発する方法を提供し、その方法は、当該細胞を、CEBPA s

50

aRNA (配列番号1~2)、p21 saRNA (配列番号3~4)、及びp53 saRNA (配列番号5~6)の各々の1つに連結された、例えば、配列番号7~18及び98~101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の1つの化合物の、化合物または医薬組成物の有効量と接触させることを含む。本開示は、細胞を、CEBPA saRNA (配列番号1~2)、p21 saRNA (配列番号3~4)、及びp53 saRNA (配列番号5~6)のそれぞれの1つに連結された、例えば、配列番号7~18及び98~101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の1つの化合物の、化合物または医薬組成物の有効量と接触させることを含む、その細胞の増殖を阻害する方法を提供する。本開示は、当該細胞を、例えば、配列番号31~42及び110~113の1つに連結された、例えば、配列番号7~18及び98~101のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の1つの化合物の、化合物または医薬組成物の有効量と接触させることを含む、STAT転写因子の活性を低下させる方法を提供する。

10

#### 【0186】

実施形態において、当該細胞は、がん細胞である。実施形態において、当該細胞は、急性骨髄性リンパ(AML)細胞、または前立腺がん細胞である。実施形態において、このAML細胞は、その骨髄からのものである。実施形態において、当該細胞は、インビトロで培養された細胞であり、当該細胞は、宿主におけるインサイチュであり、当該細胞は、エクスピボで培養された組織である。実施形態において、この接触ステップは、ウイルス性形質導入を含まない。実施形態において、当該接触ステップは、ウイルス性形質導入を含まず、及び当該細胞を、本開示の化合物、または本開示の化合物を含む医薬組成物と接触させる。実施形態において、当該細胞は、当該化合物の約1ナノモルから約100ナノモルと接触する。この範囲内のすべての桁数及び様々な範囲もまた、暗示される。

20

#### 【0187】

CpG-CEBPA saRNAの静脈内注入は、C/EBPタンパク質の発現を誘発し、及び血液ならびに様々な臓器における白血病細胞の割合を、用量に依存した減少に導いた。CpG-CEBPA saRNAの2.5mg/kg及びそれ以上の繰り返し注入は、完全なAMLの根絶をもたらした。この戦略の抗腫瘍効果は、TLR9のトリガー及びC/EBPの上方調節が組み合わされた免疫刺激作用によって、さらに高められたように思われる。Cbfb/MYH11/Mpl1白血病モデルにおいて、CpG-CEBPA saRNAの点滴注入は、様々な臓器への、樹状細胞及びCD8+T細胞の補充をもたらした。したがって、CpG-CEBPA saRNAの戦略は、AML及び潜在的な前立腺がんの治療に対して、新規及び細胞選択的な戦略を提供することができる。骨髄細胞の分化におけるC/EBPの公知の役割を伴って、CpG-CEBPA saRNAは、がん細胞の増殖を抑制しながら、がん患者における抗原提示細胞の集団を拡大することを可能にするであろう。

30

#### 【0188】

当該コンジュゲートのホスホロチオエート化及び一本鎖CpG ODN部分は、標的細胞によって内在化のトリガーとなる。CpGCEBPA saRNAのエンドソームでの取り込みは、スカベンジャー受容体を介して媒介され、及びTLR9との相互作用へと導く。TLR9の活性化は、免疫刺激シグナル(シグナル1)を生成し、一方また、細胞質への当該コンジュゲートの放出を可能にする。CpG-CEBPA saRNAは最終的に、遺伝子発現過程と相互作用する核に到達し、及びそれによって、その標的遺伝子の発現へと導く。このC/EBPタンパク質は、細胞分化の転写活性因子として作用する(シグナル2)。免疫刺激及び分化シグナルの両組み合わせは、その抗原提示を高め、及び強力な抗腫瘍免疫応答をもたらす。

40

#### 【0189】

STAT3活性は、多くの場合、Toll様受容体(TLR)及びNF- $\kappa$ Bシグナル伝達から下流で、ストレス及び炎症に応答して放出されたサイトカインによって引き起こされる。このTLR9/NF- $\kappa$ B/STAT3シグナル伝達軸は、前立腺がん細胞の自己

50

複製、腫瘍形成能及び治療耐性における役割を持つ。炎症及び腫瘍形成のシグナル伝達に対応した固有の集合点として、STAT3は、骨髓由来抑制細胞(MDSCs)などの、悪性細胞及び腫瘍関連免疫細胞の両方で活性化される。このMDSCsは、前立腺がんの進行と乏しい患者生存において重要な役割を果たす、未熟及び強力な免疫抑制性骨髓細胞の異種集団である。TLR9+ 顆粒球MDSCs(G-MDSCs、Lin-HLA-DR-CD14-CD15HICD33LO)は、転移性/去勢抵抗性前立腺がん(mCRPC)に局在化した、その疾患の進行中に、前立腺がん患者の血液中に蓄積された、高度に活性化されたSTAT3を伴う細胞の集団である。実施形態において、この戦略は、例えば、骨髓性免疫細胞及びBリンパ球などの腫瘍微小環境におけるTLR9+細胞において、標的となる遺伝子を抑制するためである。実施形態において、前立腺がん及び膠芽細胞腫などの固形腫瘍における、TLR9陽性の血液悪性腫瘍及びがん幹様細胞が治療される。実施形態において、STAT発現は、免疫応答を刺激することなく、悪性細胞及び/または腫瘍関連免疫細胞、例えば、骨髓由来抑制細胞(MDSCs)において抑制される。実施形態において、STAT発現は、同時に免疫応答を刺激しながら、ホルモン難治性/去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)において抑制され、それによってCRPCが治療される。

10

#### 【0190】

免疫応答を刺激することのない、がんの治療

本開示は、治療が必要な対象において、免疫応答を刺激することなく、がんを治療する方法を提供し、その方法は、例えば、CEBPA saRNA(配列番号1~2)、p21 saRNA(配列番号3~4)、p53 saRNA(配列番号5~6)の1つ、または例えば、配列番号31~42、及び110~113のSTAT ASOsの1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの化合物を含む、化合物または医薬組成物の有効量をその対象に投与することを含む。

20

#### 【0191】

実施形態において、CEBPA saRNA(配列番号1~2)、p21 saRNA(配列番号3~4)、p53 saRNA(配列番号5~6)の1つ、または例えば、配列番号31~42、及び110~113のSTAT ASOsの1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの化合物を含む当該化合物または医薬組成物は、がんを治療するために免疫応答を刺激することなく、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、その対象へ投与される。

30

#### 【0192】

本開示は、同時に免疫原性効果を誘発すること無く、細胞においてC/EBP、p21、及び/またはp53の発現を増強する方法を提供し、その方法は、CEBPA saRNA(配列番号1~2)、p21 saRNA(配列番号3~4)、及びp53 saRNA(配列番号5~6)のそれぞれの1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの化合物の、化合物または医薬組成物の有効量を、その細胞に接触させることを含む。本開示は、同時に免疫応答を誘発すること無く、制御不能の細胞成長及び/または増殖を阻害する方法を提供し、CEBPA・saRNA(配列番号1~2)、p21・saRNA(配列番号3~4)、及びp53・saRNA(配列番号5~6)のそれぞれの1つ、または例えば、配列番号31~42、及び110~113のSTAT・ASOsの1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの化合物の、化合物または医薬組成物の有効量を、その細胞に接触させることを含む。本開示は、同時に免疫応答を誘発すること無く、細胞におけるSTAT転写因子の活性を低下させる方法を提供し、例えば、配列番号31~42、及び110~113の1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの、化合物または医薬組成物の有効量を、その細胞に接触させることを含む。実施形態において、本開示は、免疫応答を誘発することなく、例えば、配列番号31~42、及び110~113の1つに連結された、例えば、配列番号29~30の1つの化合物で、細胞、例えば、STATにおける、制御されない細胞成長及び/または増殖を阻害し、及び/またはSTAT転写因子の活性を低下させ、がんを治療する方法を提供する。

40

50

例えば、当該方法には、免疫応答を誘発しない、例えば、配列番号 61 ~ 95 の化合物を投与することを含む。実施形態において、STAT 発現は、免疫応答を刺激することなく、ホルモン難治性 / 去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) において抑制され、それによって CRPC が治療される。

#### 【0193】

腫瘍の微小環境内でのシグナル伝達クロストークの遮断

実施形態において、CpGオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) のコンジュゲート、種々の化学的に修飾された、及びヌクレアーゼ耐性のSTAT ASO配列、例えば、CpG / GpC - ODN - STAT3 ASOを有する、合成TLR9リガンドが生成される (例えば、配列番号 43 ~ 95) (表 1、2、及び 4、ならびに図 9A)。実施形態において、CpGオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) のコンジュゲート、種々の化学的に修飾された、及びヌクレアーゼ耐性のSTAT ASO配列、例えば、CpG / GpC - ODN - STAT3 ASOを有する、合成TLR9リガンド (例えば、配列番号 43 ~ 95) が、TLR9 + 細胞に投与される。実施形態において、CpG / GpCオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) のコンジュゲート、種々の化学的に修飾された、及びヌクレアーゼ耐性のSTAT ASO配列、例えば、CpG / GpC - ODN - STAT3 ASOを有する、合成TLR9リガンド (例えば、配列番号 43 ~ 95) が、対象に投与される。実施形態において、このCpG ODNの、STAT ASO、例えば、CpG / GpC - ODN - STAT3 ASOへの連結が、標的TLR9 + 細胞による迅速な内在化を可能にする。実施形態において、このCpG ODNの、STAT ASO、例えば、CpG - ODN - STAT3 ASOへの連結が、1時間以内のインキュベーション (例えば、1分、5分、10分、15分、20分、25分、30分、45分、50分、55分、または60分) で、標的TLR9 + 細胞による迅速な内在化を可能にする。TLR9 + 細胞には、ヒト及びマウス免疫細胞、ならびに前立腺がん細胞を含む (図 10A ~ 10B、及び図 11A ~ 11B)。実施形態において、ヒト及びマウス骨髓性免疫細胞による、CpG - STAT ASO、例えば、CpG - ODN - STAT3 ASO (配列番号 43 ~ 60) の取り込みは、50 nMまたはそれ以下の濃度 (例えば、1 nM、5 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、35 nM、40 nM、45 nM、または50 nM) で、検出可能である (図 10A ~ 10B、及び図 11A ~ 11B)。実施形態において、CpG - STAT ASO、例えば、CpG / GpC - ODN - STAT3 ASO (配列番号 43 ~ 95) の細胞内への取り込みは、共焦点顕微鏡を用いて検証される。実施形態において、当該コンジュゲートは、培養培地にそれを添加後の15分以内 (例えば、30秒、1分、2分、5分、10分、12分、または15分) に、標的細胞の細胞質において、検出可能である (図 12A ~ 12B)。これらのコンジュゲートの効率的な取り込みは、24時間以内のインキュベーションを伴った、DU145及びLNCaP - S17細胞におけるSTAT3ノックダウンの効能向上に対応しており、しばしば、それぞれASO単独の効果をを超えていた (図 13A ~ 13B)。実施形態において、ASOのTLR9を活性化しないGpC / ODNへのコンジュゲート (GpC - STAT3・ASO、例えば、配列番号 61 ~ 77) はまた、STAT3発現を強力に阻害する (図 13A ~ 13B)。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60) は、非コンジュゲートのSTAT3 ASOと比較して、mRNA (図 13C) 及びタンパク質 (図 13D) の両方におけるSTAT3のノックダウンの、より迅速な誘発を示す。実施形態において、CpG - STAT ASO、例えば、CpG - ODN - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の内在化及び標的のノックダウンは、グリオーマ及び小膠細胞細胞において、同様に有効である (図 17A ~ 17C)。実施形態において、STAT3 ASO単独、または対照としてのCpG - スクランブル化ODNではなく、CpG - STAT ASOコンジュゲート、例えば、CpG - ODN - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60) は、細胞において細胞死を誘発する (図 14A ~ 14B)。実施形態において、STAT3 ASO単独、または対照としてのCpG - スクランブル化ODNではなく、CpG - STAT3 ASOコンジュゲート (

10

20

30

40

50

例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、培養の 24 時間以内 (例えば、30 分、1 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間、5 時間、10 時間、12 時間、16 時間、20 時間、24 時間) に、細胞において細胞死を誘発する。実施形態において、STAT3 ASO 単独、または対照としての CpG - スクランブル化 ODN ではなく、CpG - STAT3 ASO コンジュゲート (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、オリゴヌクレオチドの存在下で、培養の 24 時間以内に、細胞において細胞死を誘発する。実施形態において、STAT3 ASO 単独、または対照としての CpG - スクランブル化 ODN ではなく、CpG - STAT3・ASO コンジュゲート (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、1 ~ 1000 nM (例えば、500 nM) 濃度でのオリゴヌクレオチドの存在下で、培養の 24 時間以内に、細胞において細胞死を誘発する。実施形態において、STAT3 ASO 単独、または対照としての CpG - スクランブル化 ODN ではなく、CpG - STAT3 ASO コンジュゲート (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、500 nM のオリゴヌクレオチドの存在下で、培養の 24 時間以内に、DU145 及び LNCaP - S17 細胞において細胞死を誘発する。

#### 【0194】

実施形態において、改善されたヌクレアーゼ耐性の CpG ASOs (例えば、配列番号 61 ~ 95) は、全身投与、及び TLR9+ 細胞の標的化を可能にする (図 15A ~ 15C、及び図 18A ~ 18C)。実施形態において、改善されたヌクレアーゼ耐性の CpG ASOs (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、全身投与、及び遠位臓器 (例えば、脾臓または骨髄) において、TLR9+ 細胞の標的化を可能にする。実施形態において、蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の 1 回の静脈内 (IV) 注入は、骨髄性細胞の大部分に、コンジュゲートを送達するのに適している (図 15A ~ 15C)。実施形態において、蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の 1 回の静脈内 (IV) 注入は、骨髄において、骨髄性細胞の 50% またはそれ以上 (例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% またはそれ以上) に送達するのに適している。実施形態において、蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の 1 回の静脈内 (IV) 注入は、樹状細胞を含む末梢リンパ節において、骨髄性細胞のかなりの部分 (例えば、25%、30%、35%、40%、45%、50% またはそれ以上) に送達するのに適している。実施形態において、蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の静脈内 (IV) 注入の繰り返し投与は、脳限局性のグリオーマ瘍において、骨髄性細胞のかなりの割合 (例えば、MDSCs の 20%、25%、または 30%) への浸透を可能にする。実施形態において、蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の 1 回の局所静脈内 (IV) 注入の投与は、その腫瘍微小環境へのほぼ完全な浸透 (例えば、75%、80%、85%、90%、95%、99.5%) を可能にする。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の投与は、TLR9+ の悪性腫瘍に対して有効に活用される。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、標的遺伝子ノックダウン及び細胞毒性を増強する (図 16A ~ 16C)。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) は、遠位の未処理箇所において、腫瘍サイズを低減する (図 19A)。実施形態において、遠位における STAT3 発現の低減は、注入部位からの CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) の放出による、全身性の効果と相関している (図 19B 及び図 19E)。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) を使用した治療は、STAT3 及び PD-L1 の免疫チェックポイント分子の発現を低減する (図 19C ~ 19D)。実施形態において、CpG - STAT3 ASO (例えば、配列番号 43 ~ 60、78 ~ 86) を使用した治療は、遠位の腫瘍部位での骨髄由来抑制細胞 (MDSCs において、STAT3 及び PD-L1 の免疫チェックポイント分子の発現を低減する。実施形態において、CpG

10

20

30

40

50

- S T A T 3 A S O (例えば、配列番号 4 3 ~ 6 0、7 8 ~ 8 6) は、全身に投与される (図 2 0 A ~ 2 0 B)。実施形態において、C p G - S T A T 3 A S O (例えば、配列番号 4 3 ~ 6 0、7 8 ~ 8 6) の投与経路は、I P (腹腔内)、P O (経口)、または I V (静脈内) であってよい。実施形態において、当該投与経路は、経皮、皮下、筋肉内、髄腔内、眼内、鼻腔内、経粘膜、唇の下、送気、腸内、坐剤、動脈内、関節内、脳内、頭蓋内、硝子体内、または脛骨内である。実施形態において、対象は、0.5 mg / kg から 5 mg / kg の C p G - S T A T 3 A S O (例えば、配列番号 4 3 ~ 6 0、7 8 ~ 8 6) を、毎日、静脈内注入されて治療される。実施形態において、C p G - S T A T 3 A S O (例えば、配列番号 4 3 ~ 6 0、7 8 ~ 8 6) による治療は、腫瘍の完全退縮を誘発する。実施形態において、C p G - S T A T 3 A S O (例えば、配列番号 4 3 ~ 6 0、7 8 ~ 8 6) による治療は、限局性腫瘍 (例えば、骨、脾臓、膀胱、膵臓、精巣、卵巣、前立腺、子宮、結腸、リンパ節、肺、脳、腎臓、肝臓、胃、大腸、小腸、食道、脊椎、頭、首、皮膚、または心臓) の完全退縮を誘発する。実施形態において、ヌクレアーゼ耐性の C p G - S T A T 3 A S O 阻害物質は、播種性 T L R 9 + 細胞において、及び寛容原性の腫瘍関連細胞において、S T A T 3 シグナル伝達の同時標的化を可能にする (図 2 1)。実施形態において、ヌクレアーゼ耐性の C p G - S T A T 3 A S O 阻害物質は、播種性 T L R 9 + 細胞において、及び寛容原性の腫瘍関連細胞 (例えば、マクロファージ、小膠細胞、T 細胞、B 細胞、または M D S C s) において、S T A T 3 シグナル伝達の同時標的化を可能にする。実施形態において、当該腫瘍微小環境内での、シグナル伝達クロストークの遮断は、がんの治療に有効である。

10

20

#### 【0195】

自己免疫疾患及び／または障害の治療方法

1 つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発することなく、本開示の化合物及び／または組成物を用いて、自己免疫疾患及び／または障害を治療する方法を包含する。実施形態において、当該方法は、免疫原性効果を誘発することなく、本開示の化合物及び／または組成物を用いた、骨髄性細胞における遺伝子の抑制を包含する。実施形態において、この骨髄性細胞は、腫瘍の微小環境内にあり、自己免疫疾患及び／または障害、もしくはがん (例えば、前立腺がん) に関与している。

#### 【0196】

実施形態において、当該方法は、免疫原性効果を誘発することなく、本開示の化合物及び／または組成物を用いた、自己免疫疾患及び／または障害 (例えば、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス (S L E)) の治療を包含する。実施形態において、当該方法は、免疫原性効果を誘発することなく、本開示の化合物及び／または組成物を用いた骨髄細胞における遺伝子の抑制を包含する。

30

#### 【0197】

本開示は、治療が必要な対象において、免疫応答を刺激することなく、自己免疫疾患 (例えば、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス (S L E)) を治療する方法を提供し、その方法は、例えば、配列番号 3 1 ~ 4 2、及び 1 1 0 ~ 1 1 3 の S T A T A S O s の 1 つに連結された、例えば、配列番号 2 9 ~ 3 0 の 1 つの化合物を含む、化合物または医薬組成物の有効量を、その対象に投与することを包含する。

40

#### 【0198】

本開示は、細胞を、例えば、配列番号 3 1 ~ 4 2 及び 1 1 0 ~ 1 1 3 の 1 つに連結された、例えば、配列番号 2 9 ~ 3 0 の 1 つの化合物または医薬組成物の有効量に接触させることを含んで、同時に免疫応答を誘発することなく、自己免疫疾患 (例えば、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス (S L E)) を治療する方法を提供する。実施形態において、本開示は、例えば、配列番号 3 1 ~ 4 2 及び 1 1 0 ~ 1 1 3 の 1 つに連結された、例えば、配列番号 2 9 ~ 3 0 の 1 つの化合物を用いて、免疫応答を誘発することなく、細胞、例えば、S T A T 1 ~ S T A T 5 において、制御不能な細胞成長及び／または増殖を阻害し、及び／または S T A T 転写因子の

50

活性を低減して、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス（SLE））を治療する方法を提供する。例えば、その方法には、免疫応答を誘発しない、例えば、配列番号 61～95 の化合物を投与することを包含する。

#### 【0199】

実施形態において、本開示は、細胞を、例えば、配列番号 31～42 及び 110～113 の 1 つに連結された、例えば、配列番号 29～30 の 1 つの化合物または医薬組成物の有効量に接触させることを含んで、同時に免疫応答を誘発することなく、クローン病を治療する方法を提供する。実施形態において、本開示は、例えば、配列番号 31～42 及び 110～113 の 1 つに連結された、例えば、配列番号 29～30 の 1 つの化合物または医薬組成物で、免疫応答を誘発することなく、クローン病を治療する方法を提供する。例えば、その方法には、免疫応答を誘発しない、例えば、配列番号 61～95 の化合物を投与することを包含する。

10

#### 【0200】

##### 対まひの治療法

1 つの態様において、本開示は、免疫原性効果を誘発するかまたはせずに、本開示の化合物及び/または組成物を投与することにより、治療が必要な対象において、対まひを治療する方法を提供する。実施形態において、当該方法は、免疫原性効果を誘発するかまたはせずに、本開示の化合物及び/または組成物で、間葉系幹細胞（MSCs）において、遺伝子を抑制することを包含する。

20

#### 【0201】

本開示は、治療が必要な対象において、免疫応答を刺激することなく、対まひを治療する方法を提供し、その方法は、例えば、配列番号 31～42 及び 110～113 の、STAT Asos の 1 つに連結された、例えば、配列番号 29～30 の 1 つの化合物を含む化合物または医薬組成物の有効量を、その対象に投与することを包含する。

#### 【0202】

本開示は、例えば、配列番号 31～42 及び 110～113 の 1 つに連結された、例えば、配列番号 7～18 及び 98～101 の 1 つのホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の化合物または医薬組成物の有効量を用いて、同時に免疫応答を誘発しながら、対まひを治療する方法を提供する。

30

#### 【0203】

##### リンカーの合成及び修飾法

実施形態において、CpG-CEBPA saRNA（SS、センス鎖）及びCEBPA saRNA（AS、アンチセンス鎖）は、4ステップを含むサイクルを用いて、合成されてよい。CpG-CEBPA saRNA（SS）及びCEBPA saRNA（AS）の完全な合成、脱保護、精製及び脱塩の後、本開示のCpG-CEBPA saRNA（SS/AS）の化合物を作成するために、その2成分は、アニールされてよい。

#### 【0204】

当該合成の開始点は、ポリスチレンベースの固相担体に、その3'酸素を介して連結された、保護されたヌクレオシドであってよい。この合成には、ヌクレオシドのホスホロアミダイトケミストリーを用いることができる。この合成サイクルには、（1）5'ヒドロキシル基の脱保護（脱トリチル化）、（2）ヌクレオチドホスホロアミダイトの、5'ヒドロキシル基へのカップリング、（3）未反応5'ヒドロキシル基のキャッピング、（4）酸化の4ステップが含まれてよい。\*ステップ（4）は、ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドの合成に対応した、硫化ステップで置き換えることができる。

40

#### 【0205】

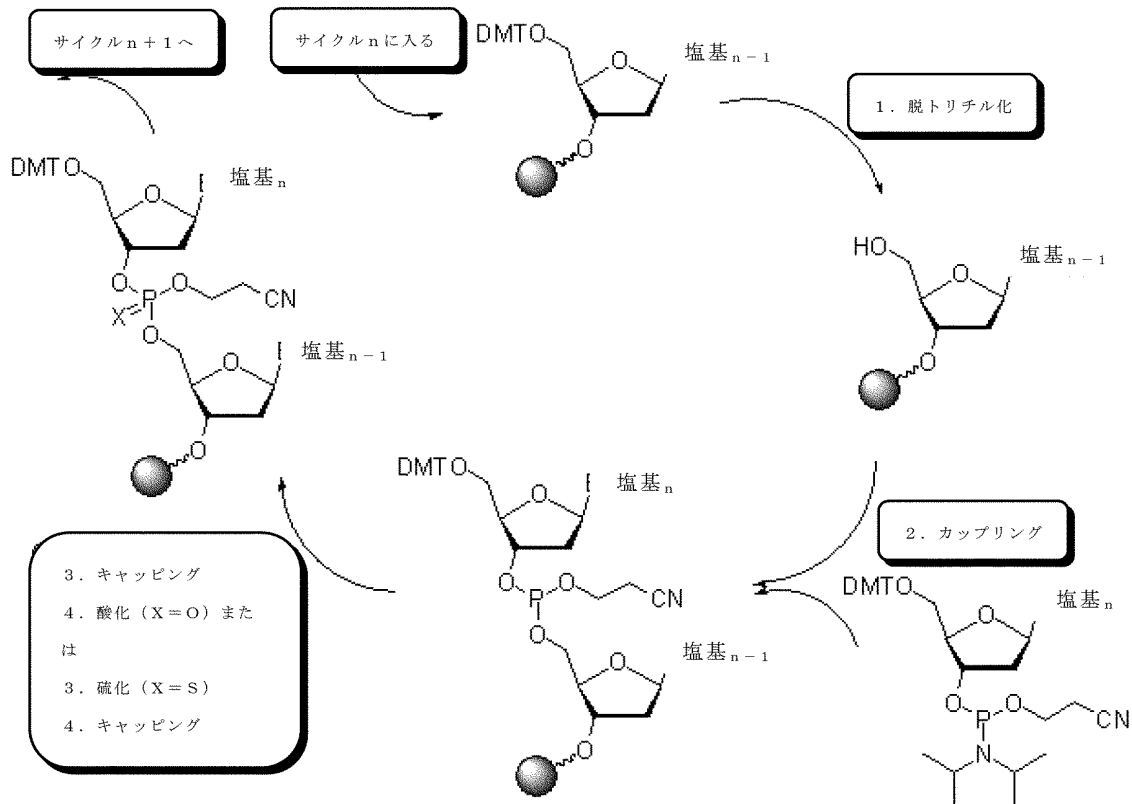
これらの4ステップは、全てのヌクレオチド成分が添加されるまで、上記の順番で繰り返すことができる。

#### 【0206】

この合成経路は、以下のスキーム1に示され得る。

50

## 【化 1 0】



スキーム 1。

## 【 0 2 0 7】

この合成プロセスのさらに詳細は、本開示の実施例 2 に記載される。

## 【 0 2 0 8】

実施形態において、当該ヘテロアルキレンリンカーは、その合成が完了した後、及びそのオリゴヌクレオチドが、なおその担体に接合している間に、さらなる修飾、コンジュゲート、または追加部分の接合を可能にする。

## 【 0 2 0 9】

実施形態において、本開示は、置換されたヘテロアルキレンリンカーを有する s a R N A にコンジュゲートした、C p G 核酸配列を含み、その合成及びそのオリゴヌクレオチドが、担体に接合している間に、さらなる修飾、コンジュゲート、または接合を可能にすることができる。

## 【 0 2 1 0】

実施形態において、当該置換されたヘテロアルキレンリンカーは、置換基へ修飾、コンジュゲート、または接合される。修飾には、元の置換基の異なる置換基への転換を含んでよい。例えば、プロモアルカン置換基は、アジドアルカンへ転換されてよい。コンジュゲートは、2つの大きな部分の結合をもたらすことができる。例えば、N H S 誘導体は、P E G - N H <sub>2</sub> とコンジュゲートされ得る。ペプチドもまた、オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされ得る、または抗体は、オリゴヌクレオチドへコンジュゲートされてよい。接合は、小分子の大きな分子への結合をもたらす得る。例えば、ビオチンの N H S エステルは、オリゴのアミノ誘導体に接合されてよい。

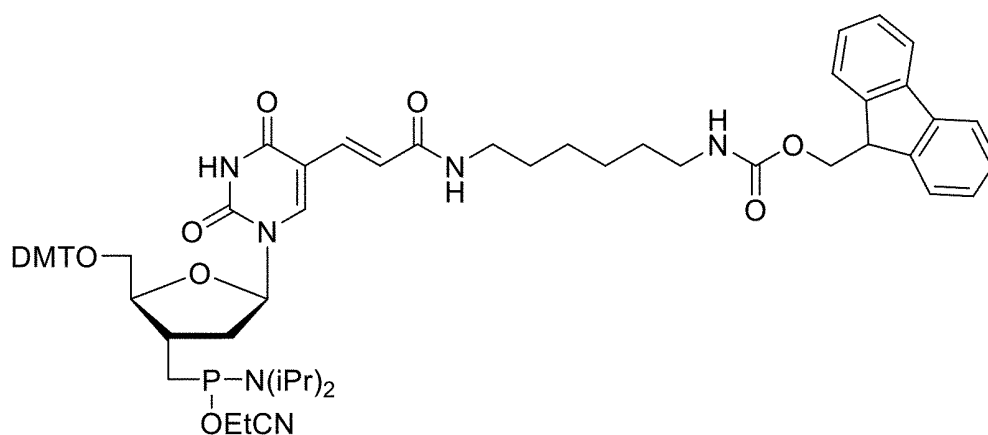
## 【 0 2 1 1】

実施形態において、本開示は、複数の異なるリンカー、複数の同一のリンカー、または以下の群から選択されるリンカーの置換を有する s a R N A にコンジュゲートした、C p G 核酸配列を含む。

N H S エステルならびにジビニルスルホンと、その類似体との反応により、機能化のため

にさらに使用できる、Fmocアミノ変性C6・dT（アミノ基の導入）。

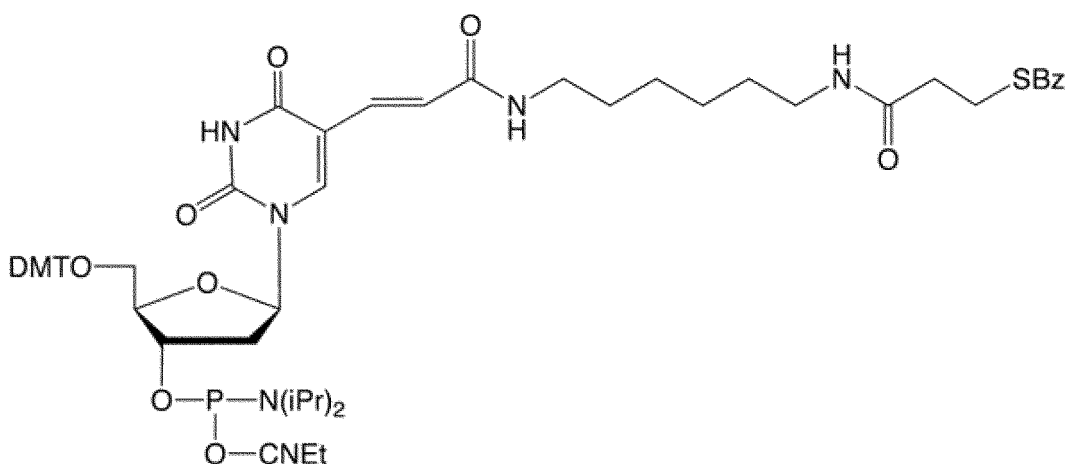
【化11】



10

ジビニルスルホンとアクリル類似体との反応により、機能化のためにさらに使用できる、S-Bz-チオール変性C6-dT（スルフヒドリル基の導入）。

【化12】

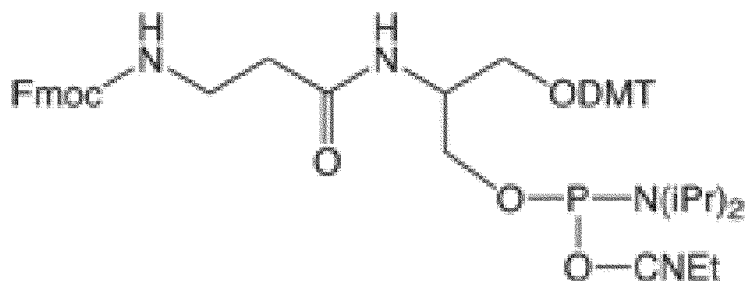


20

30

NHSエステルならびにジビニルスルホンと、その類似体との反応により、機能化のためにさらに使用できる、アミノ変性セリノールホスホロアミダイト（アミノ基の導入）。

【化13】

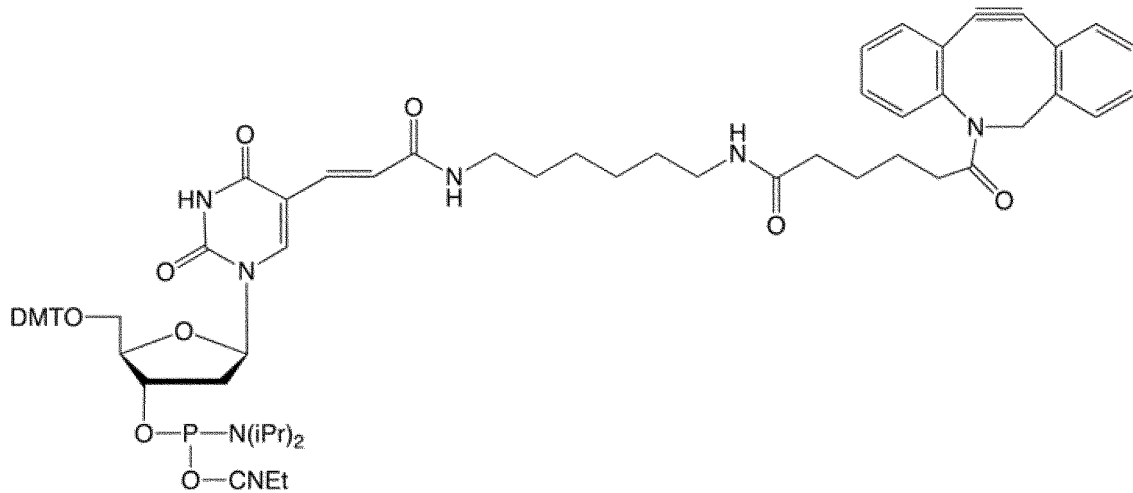


40

アジド反応物との機能化のためにさらに使用できる、DBCO-dT（アルキン、銅を含まないクリックケミストリーの導入）。

50

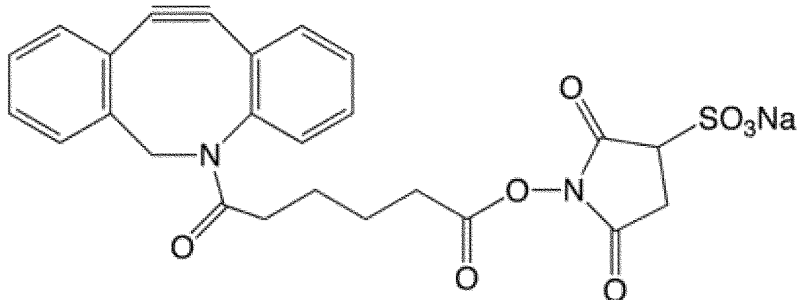
## 【化 1 4】



10

DMBCO - スルホ - NHS エステル (アミノ基との反応による、アルキン、銅を含まないクリックケミストリーの導入)。

## 【化 1 5】



20

## 【実施例】

## 【0212】

30

実施例 1：材料及び方法

CpG - CEBP - saRNA の取り込み。  $1 \times 10^5$  個の細胞を、指示された saRNA (500  $\mu$ M、最終濃度) と共に、500  $\mu$ l の培地でインキュベートした。3 時間後に、細胞を PBS で 2 回洗浄した。PBMCs を、抗 CD14 抗体及び抗 CD19 抗体で染色し、異なる細胞種による取り込みを評価した。Cy3 の取り込みレベルを、フローサイトメトリーで解析した。

## 【0213】

DU145 における CpG - saRNA (-Cy3) の局在化。  $1 \times 10^5$  個の DU145 細胞を、24 ウェルプレートのカバースリップ上に移植した。細胞が、約 60% に密集した時点で、Cy3 - 標識化 CpG - saRNA コンジュゲートを、最終濃度が 500  $\mu$ M で、その培養物に添加した。トランスフェクションの 2 時間または 24 時間後に、細胞を、1 mM の  $MgCl_2$  及び 0.1 mM の  $CaCl_2$  を含む PBS で穏やかに洗浄し、ならびに室温で 20 分間、0.25 ml の 2% パラホルムアルデヒドで固定した。次に細胞を、1 mM の  $MgCl_2$  及び 0.1 mM の  $CaCl_2$  を含む PBS で一度洗浄し、ならびに室温で 10 分間、0.1% のトリトン X-100 で透過処理した。次いで細胞を、PBS で洗浄し、500 ng/ml の Hoechst 33342 を用いて染色し、及び 10  $\mu$ l の VECTASHIELD に封入した。CpG - saRNA の局在化を、共焦点顕微鏡により評価した。

40

## 【0214】

定量リアルタイム PCR による、CEBP $\alpha$  誘発の評価。  $1 \times 10^5$  個の細胞を、2

50

4 ウェルプレートに 500  $\mu$ l の培地に移植し、及び特に指定のない限り 24 時間毎に、500  $\mu$ M の最終濃度で、指定された RNA オリゴを用いてトランスフェクションした。非 CpG コンジュゲートオリゴのトランスフェクションに対して、Opti-MEM 中の 50 nM の saRNA を、室温で 20 分間、リポフェクトアミン 2000 (1対100希釈) (Life Technologies、11668-027) と共にインキュベートし、及び 100  $\mu$ l の脂質-saRNA 複合体を添加した。トランスフェクションの 72 時間後に、細胞からの全 RNA を、製造者の指示に従って、RNeasy ミニキット (Qiagen) で精製した。iScript cDNA 合成キット (BioRad) を、逆転写に使用した。SsoAdvanced (商標) Universal Probes Supermix (Biorad) を、Taqman の定量リアルタイム PCR に使用し、及び結果を、CFX96 リアルタイム PCR 検出システム (Biorad) で定量化した。CEBPA の mRNA 発現レベルを、TBP 発現に正規化した。ヒト CEBPA に使用されたプライマー配列は、(フォワードプライマー) 5' - g a c a t c a g c g c c t a c a t c g - 3'、(リバースプライマー) 5' - g g c t g t g c t g g a a c a g g t - 3' であった。

#### 【0215】

CEBPL レポーターアッセイ。CEBPL レポーターアッセイを、製造者のプロトコル (Qiagen CCS-001L) に従って実施した。簡単に説明すると、ウェル当たり 4 X 10<sup>4</sup> 個の DU145 細胞を、2.5% の FCS だけを補充した RPMI の 150  $\mu$ l 容量で、96 ウェルプレートに播種した。0.6  $\mu$ l のリポフェクトアミン 2000、1  $\mu$ l のルシフェラーゼ、または対照のプラスミド、及び非 CpG コンジュゲート化 saRNA (最終濃度 50  $\mu$ M) を、50  $\mu$ l の OptiMem 培地 (Life Technologies) に添加した。ルシフェラーゼ、または対照のプラスミドを、一度だけトランスフェクションした。50  $\mu$ l の RPMI 培地の CpG コンジュゲート saRNA を、最終濃度 500  $\mu$ M で、24 時間毎に、ウェルに直接追加した。3 日後、細胞を穏やかに PBS で洗浄し、及び 50  $\mu$ l のパッシブ溶解緩衝液 (Promega E194A) を、各ウェルに直接追加した。次に、その溶解物を、50  $\mu$ l のルシフェラーゼアッセイ試薬 II (Promega E1910) を伴った、ウミシイタケ/ホタルのデュアルルシフェラーゼアッセイに対して、ホワイトの 96 ウェルの Optiplates (Perkin Elmer) へトランスフェクションした。次に、そのプレートを、ホタルルシフェラーゼに対して、及び次いでウミシイタケルシフェラーゼに対して測定した。値を、未処理サンプルの活性に対して正規化した。この実験は、3 通りで実施した。

#### 【0216】

MV4 ; 11 成熟化。1 X 10<sup>5</sup> 個の MV4 - 11 細胞を、リポフェクトアミン 2000 だけを用いて、一度トランスフェクションした SS / AS を除いて、24 時間毎に、指示された saRNA (終濃度が 500  $\mu$ M) でトランスフェクションした。96 時間後に、細胞を採取し、FACS 緩衝液 (2% FBS を含む PBS) で 2 回洗浄し、及び生存性マーカーとしての、hCD86 (FITC)、hCD40 (PE)、HLADR (APC) 及び 7 - AAD に特異的な抗体で染色した。発現レベルを、フローサイトメトリーにより測定した。

#### 【0217】

Cbfb / MYH11 / Mpl 誘発マウス白血病モデルの発達。Cbfb1 / 56M / Mx - Cre1 マウスを、10 世代を超えて、野生型 C57BL / 6 マウスに戻し、同系 AML モデルを生み出した。コア結合因子 - 平滑筋ミオシン重鎖の、ポリイノシン - ポリシチジル酸誘発 (In vivo gen) の発現の 2 週間後に、トロンボポエチン受容体及び GFP 遺伝子をコードする、レトロウイルス MIG - Mpl ベクターで形質導入し、移植可能な Cbfb / MYH11 / Mpl マウスの AML を作り出した。

#### 【0218】

インビボ実験。C57BL / 6 マウス (6 ~ 8 週齢) を、the National Cancer Institute (Frederick, MD) から受け入れた。動物の処

10

20

30

40

50

置 / 手順を、確立されている制度上の指導、及び Institutional Animal Care and Use Committee (COH) から、承認されたプロトコルに従って実施した。リン酸緩衝生理食塩水中の、 $1 \times 10^6$  個の C b f b / M Y H 1 1 / M p l 1 の A M L 細胞を、後眼窩注入を介して注入した。

#### 【0219】

用量試験に対して、血液中の A M L 細胞レベルが 1 % を超えた場合、骨髓に存在する A M L 細胞の 10 % ~ 20 % に相当するが、C p G - C E B P A s a R N A または C p G - F L U C - R N A の多様な用量の、1、2.5、または 5 m g / k g を、後眼窩注入を介して投与し、及び 1 日おきに、その尾から、血液を抜き出して、注入以降に循環している c - キット + / G F P + をモニターした (グループ当たり 3 ~ 4 匹のマウス)。そのマウスを、3 回目の処置後の 1 日で安楽死させ、及び脾臓と骨髓における、c - キット + / G F P + の % を、フローサイトメトリーにより解析した。

10

#### 【0220】

C p G - C E B P A - s a R N A の抗腫瘍効果を試験するために、P B L 中の G F P + A M L の % が、1 ~ 5 % に達した時点で、P B S ( 200  $\mu$  l )、C p G - F L U C R N A ( 200  $\mu$  l 中に 5 m g / k g )、または C p G - C E B P A s a R N A ( 200  $\mu$  l 中に 5 m g / k g ) を、後眼窩注入により、1 日おきに 5 回、注入した (6 ~ 8 匹のマウス / 群)。処置の過程で、P B L を、尾からの出血により取得し、及び 1 日おきに、A M L 組織量を、フローサイトメトリーで解析した (G F P 及び 7 A A D)。このマウスを、5 回目の処置後の 1 日で安楽死させ、及び脾臓ならびに骨髓を、その後の分析のために採取した。

20

#### 【0221】

C p G - S T A T 3 A S O の設計及び合成。当該 C p G - A S O s を、従来記載されているように (K o r t y l e w s k i e t a l . N a t . B i o t e c h . 2009)、C p G ( D 19 ) - O D N を S t a t 3 またはスクランブル化 A S O s へ連結することにより、DNA / RNA 合成コア (COH) 中で、合成した。

#### 【0222】

細胞。健康的な P B M C s を、C o H の D o n o r A p h a e r e s i s C e n t e r からの、I R B # 13378 で管理下の匿名ドナーから誘導した。サンプルの取得は、ヘルシンキ宣言に従って、C o H 機関レビュー委員会によって承認された。ヒト P C 3 及び D U - 145 の前立腺がん細胞を、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n から購入した。

30

#### 【0223】

フローサイトメトリー。がん細胞株及び免疫細胞の細胞外染色に対して、単一細胞の懸濁液を、非特異的な結合をブロックするために、F c I I I / I I R 特異的抗体でインキュベートし、及び次いで、C D 1 c、C D 3、C D 19、C D 303 a、F 4 / 80、G R 1、B 220 及び C D 11 c ( e B i o s c i e n c e s ) に対する、蛍光色素標識化の抗体の異なる組合せを用いて、染色した。アポトーシス細胞死を、アネキシン V アッセイにより決定した。蛍光色素データを、B D A c c u r i C 6 フローサイトメーター ( B D B i o s c i e n c e s ) 上で収集し、及び F l o w J o ソフトウェア ( T r e e S t a r ) を用いて解析した。

40

#### 【0224】

生体内分布。C 57 B L / 6 マウス (6 ~ 8 週齢) を、t h e N C I ( F r e d e r i c k , M D ) から購入した。C 57 B L / 6 マウスに、5 m g / k g の C p G - S T A T 3 C y 3 を静脈内に注入し、及び 3 時間後に安楽死させた。そのリンパ節及び骨髓を採取した。単一の細胞懸濁液を、機械的な組織分散及び記載されている ( K o r t y l e w s k i e t a l . N a t . M e d . 2005 ) ようなコラゲナーゼ D / D N a s e I 処理によって調製し、及び C D 11 b、C D 3、B 220、C D 11 c 及び F 4 / 80 抗体を使用して染色した。異なる集団による取り込みを、フローサイトメトリーにより評価した。

50

## 【0225】

定量リアルタイムPCR。全RNAを、Maxwell（登録商標）システムRNA精製キット（Promega）を用いて、培養またはインビボで増殖した腫瘍細胞から抽出し、及び次いで、iScript cDNA合成キット（Bio-Rad）を用いて、cDNAsに転写した。遺伝子発現を、Universal Probe Library（UPL、Roche）、及びSTAT3（フォワード5'-CTGCCTAGATCGGCTAGAAAC-3'、及びリバース5'-CCCTTTGTAGGAAACTTTTTC-3'）に対して、ProbeFinderソフトウェア（Roche）を用いて設計されたプライマーの特定ペア、ならびにRocheのリファレンス遺伝子アッセイを用いたTBPを利用して、解析した。配列に特異的な増幅を、CFX96リアルタイムPCR検出システム（Bio-Rad）で、解析した。そのデータを、TBPレベルに対し正規化し、及びその相対遺伝子発現レベルを、 $2^{-Ct}$ 法を用いて、算出した。

10

## 【0226】

共焦点顕微鏡。DU-145細胞を、異なる時点に対して標識化された、500nMのCpG-STAT3 ASO Cy3を使用して処置した。細胞を、20分間、2%のパラホルムアルデヒドで固定し、0.1%トリトンX-100を含むPBS中で透過処理し、及びその核酸を、5分間、DRAQ5（登録商標）を使用して染色した。スライドを、封入剤（Vector Labs、Burlingame、CA）に封入した。共焦点画像処理を、cLSM510-Meta倒立型共焦点顕微鏡（Zeiss、Thornwood、NY）の、水浸対物レンズC-Apochromat40X/1.2を使用して、実施した。画像取得に対して、LSMソフトウェアv.4.2 SP1を、及び取得後解析に対して、LSM画像ブラウザv.4.2.0121（Zeiss）を使用した。

20

## 【0227】

統計解析。対応のないt検定を利用し、両側P値を計算し、2つの処置群間の差異の統計的有意性を推定した。一元配置または二元配置ANOVAに加えて、Bonferroniのポスト試験を適用し、複数のグループ間、または腫瘍成長の動力学実験での、それぞれの違いを評価した。統計的に有意なP値を、\*\*\*は、 $p < 0.001$ 、\*\*は、 $p < 0.01$ 、及び\*は、 $p < 0.05$ のように数字で示した。データを、Prismソフトウェアv.6.01（GraphPad）を用いて解析した。

## 【0228】

実施例2：当該CpG-saRNA合成の製造プロセス

CpG-CEBPA saRNA（SS、センス鎖）及びCEBPA saRNA（AS、アンチセンス鎖）を、以下のセクションで説明するように、4ステップから成るサイクルを用いて合成した。CpG-CEBPA saRNA（SS）及びCEBPA saRNA（AS）の完全な合成、脱保護、精製及び脱塩後に、その2つの化合物をアニールし、薬剤製品CpG-CEBPA saRNA（SS/AS）を作成した。

30

## 【0229】

この合成の開始点は、ポリスチレンベースの固相担体に、その3'酸素を介して連結された、保護されたヌクレオシドであった。この合成には、ヌクレオシドのホスホロアミダイトケミストリーを用いた。当該合成サイクルは、（1）5'ヒドロキシル基の脱保護（脱トリチル化）、（2）ヌクレオチドホスホロアミダイトの、5'ヒドロキシル基へのカップリング、（3）未反応5'ヒドロキシル基のキャッピング、（4）酸化の4ステップから成る。\*ステップ（4）は、ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドの合成のために、硫化ステップで置き換えることができる。

40

## 【0230】

これらの4ステップを、全てのヌクレオチド成分が添加されるまで、上記の順番で繰り返した。

## 【0231】

この合成経路を、本開示のスキーム1に示す（前述を参照）。

## 【0232】

50

製造の第一段階（脱保護及びHPLC精製まで）を、GE、800 Centennial Avenue、Piscataway、NJ 08855-1327からの、Oligo Pilot 100及びAktapurifierを使用して、実施した。

#### 【0233】

##### 脱トリチル化

当該合成サイクルの第1ステップにおいて、その担体結合モノマーの酸不安定なジメトキシトリチル（DMT）基を、トルエン中のジクロロ酸（DCA）の5%溶液で除去した。得られたDMTカチオン発色を定量し、当該合成サイクルのカップリング効率を決定した。オレンジ色は、開裂したDMTカルボカチオンによって生成され、495nmで、可視部分で吸収された。この吸光度の強度を、カップリング効率を決定するために利用した。ほとんどの市販のDNAシンセサイザーは、各サイクルに対応した脱トリチル化の収率を測定し、及び記録するハードウェアを持ち、そのため合成の効率が、リアルタイムで監視できるようになっている。そのDNA塩基は、酸に不安定なので、脱トリチル化のステップは、完全な脱トリチル化を保証する必要があるときのみ必要である。

#### 【0234】

CpG-CEBPA saRNA (SS)の合成を、第1の3'末端ヌクレオシド、すでに固相担体に結合している2'-O-メチルウリジンで開始した。この合成に用いた固相担体は、Prime SynthesisからのLCAA-CPG担体であった。第1のヌクレオシドを、3つの炭素リンカー及びコハク酸結合を介して、担体に接合した。0.75ミリモルスケールでの合成には、92mLのサイズのカラムに収めた、19.00gの担体が必要であった。この反応からの生成物は、13gの質量増加をするはずであった。

#### 【0235】

CEBPA saRNA (AS)の合成に用いられる固相担体は、Prime SynthesisからのLCAA-CPGであった。0.75ミリモルスケールのCEBPA saRNA (AS)の合成には、46mLのサイズのカラムに収められた、9.5gの担体が必要であった。この反応からの生成物は、11gの質量増加をする。

#### 【0236】

##### カップリング

脱トリチル化後に、次に保護されたホスホロアミダイトを、その反応カラムに送達した。エチルチオテトラゾールを使用し、そのホスホロアミダイトを活性化した。2つの試薬を、その反応カラムへ送達する直前に混合した。エチルチオテトラゾール、弱酸、プロトン化したそのホスホロアミダイトの第三窒素基、及びそのジイソプロピルアミン・部分が、良好な離脱基となった。

#### 【0237】

このカップリング機構は、取り込まれた活性化モノマーの3'-O-リン上の、遊離した5'-ヒドロキシル基による求核攻撃であった。この理由から、カラム内の全く水酸基のない環境を維持することが、重要であった。これを保証するために、一般溶剤として乾燥アセトニトリルを用い、及び全ての試薬ならびに溶媒を、無水状態に維持した。これらの条件下で、カップリングの効率は非常に高く、それにより長いオリゴヌクレオチドの合成が可能になった。

#### 【0238】

##### カップリング条件

ホスホロアミダイトを、無水アセトニトリル、ACN (0.175M)、活性化因子のエチルチオテトラゾール、ETT (無水ACN中に、0.6MM)に溶解した。2.5当量 (eq) のデオキシホスホロアミダイト、2.5当量のプロパンジオールリンカーのホスホロアミダイト、及び3.0当量のリボホスホロアミダイトを使用した。DNA及びプロパンジオールに対するリサイクル時間は、3.5分、RNAに対しては、12.50分、及びリボグアノシンに対しては、12.00分であった。活性化因子対ホスホロアミダイトのv/v比は、3対2である。カップリングを、室温 (22~24 )で実施した。

#### 【0239】

## キャッピング

これらの効率測定にもかかわらず、この担体に結合されたヌクレオシドの、5'ヒドロキシル基の僅かな割合が、取り込まれた活性化モノマーにカップリングしなかった。生成物の削除を最小にするために、それらを不活性状態にして、及び精製プロセスを簡素化した。通常、ピリジン及びテトラヒドロフラン（THF）またはACNに溶解した、無水酢酸及び1-メチルイミダゾールは、延長されない5'-ヒドロキシルを「キャップ」する、アシル化剤を生成するように作用する。この5'-アセチルエステルは、すべての後続のサイクルで非反応性としてキャップされ、及び最終的なアンモニア脱保護ステップ中に除去された。キャッピングに続く、追加のACN洗浄で、合成収率が増加した。

### 【0240】

#### キャッピング条件

CAP Aは、無水ACN中の、20%1-メチル-イミダゾール溶液であり、CAP Bは、使用前に、CAP B1とCAP B2の等容量を混合して作成したものであり、ここでCAP B1は、無水ACN中の、40%無水酢酸溶液、及びCAP B2は、無水ACN中の60%2,6-ルチジン溶液であった。

### 【0241】

#### 酸化

カップリング及びキャッピングの後、そのヌクレオチド間連結は、不安定な三価の亜リン酸トリエステルであって、及びリン酸トリエステルへの酸化が必要である。このステップは、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの合成のためには硫化ステップで置き換えることができる。

### 【0242】

#### 酸化条件

酸化を、ピリジン対水が9対1の水溶液中の、0.05Mのヨウ素溶液で実施した。酸化硫化を、無水ピリジン中の、0.3Mのキサンタン水素化物溶液で実施した。

### 【0243】

#### 最終脱トリチル化

最終脱トリチル化を、トルエン中5%DCA溶液で洗浄することにより、シンセサイザー上で実施する。

### 【0244】

#### 担体の除去及び脱保護

特定の配列が構築された後、オリゴヌクレオチドは、その担体から除去（開裂）され、及び最終的には、使用前に脱保護される必要がある。合成後に、樹脂を、ACN中の20%ジエチルアミン（DEA）溶液で処理し、そのシアノエチル基の除去によりリンを脱保護した。55で60分の、600mLのメチルアミン-アンモニウム水酸化物混合液（AMA）での処理を行い、その担体から当該オリゴヌクレオチドを開裂し、及びその環外アミノ基の保護基を除去した。得られた混合物を、急速に氷中で冷却し、ろ過し、及びそのポリマー残基を、200mLのエタノール対水が1対1の水溶液で、2回洗浄した。得られた溶液を合わせて、容量フラスコに入れ、及び代表サンプルを採取し、258nmの吸光度の測定により、その収率を推定した。その後、その溶液を、減圧下で速やかに、乾燥するまで蒸発させ、秤量した。

### 【0245】

AMAを用いた、この開裂及び脱保護の後、得られた粗混合物は、リボース残基上で依然としてその2'-TBDMS保護が行われている、完全長のオリゴヌクレオチド、遊離の5'-ヒドロキシル末端を有する切断された失敗配列、及び脱保護の副産物（ベンズアミド、イソブチルアミド、アクリロニトリル、及びアセトアミド）を含んでいた。このTBDMS保護基を、塩基性フッ化物イオンによる、最終脱保護ステップで除去した。脱保護は、60で1.5時間の、700mLのトリエチルアミントリヒドロフッ化物/トリエチルアミン/DMSOが、10対2対1の混合物での処理によって、実施した。その反応を次いで、周囲温度まで冷却し、3Lのアセトンと混合し、常温で一晩放置し、及び遠心分離

10

20

30

40

50

した。その上澄み液を分離し、上清の代表サンプルを採取し ( 5 X 2 0 μ L )、減圧下で乾燥するまで蒸発させ、再溶解し、及び 2 5 8 n m で、その吸光度を測定した。当該上清に、かなりの量の生成物が存在している場合は、さらに 1 , 0 0 0 m L のアセトンを添加し、及びその混合物を、さらに 2 時間、室温で保管した。最終の遠心分離後、その上清を廃棄し、及びペレットを、真空の常温下で、乾燥するまで保管した。

#### 【 0 2 4 6 】

##### R N A 合成

R N A の化学合成は、リボースの 2 ' - ヒドロキシルでの付加的な保護基の必要性を除いて、D N A に使用される合成と同一であった。この位置は、通常、その合成中は安定している、t e r t - ブチルジメチル・シリル基で保護される。それらは、塩基性フッ化物イオンによって、最後の脱保護のステップで取り除かれた。その糖及び塩基の両方の残りの位置は、D N A と同じ方法で保護された。D N A 合成のプロトコルにおける複数の変数 - そのカップリング時間、モノマーの受渡し速度、洗浄ステップの頻度 - を調節することによって、最大 9 9 % までの段階的カップリングの効率を得られた。

#### 【 0 2 4 7 】

##### アニーリング

核酸の相補鎖をアニールするために、多数の方法を利用することができる。各ケースにおいて、その目標は、任意の二次構造を排除して、その相補鎖を変性し、及び次いで、その鎖をハイブリダイズ可能にすることである。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの効率に影響を与える、2 つの要因は、塩濃度及び温度の低下速度である。アニーリングは、その温度が、変性後にゆっくり低下する場合に、特に、そのオリゴヌクレオチドが、高い G C 含有量を有するか、またはヘアピン構造を形成する場合に、最も効率的に起きる。核酸の相補鎖のアニーリングは、次の 4 つのステップを含んでいた。

1 . 濃縮した相補的なオリゴヌクレオチドを、1 対 1 のモル比で、1 , 0 0 0 m L のナシ型丸底フラスコ中で混合した。

2 . オリゴヌクレオチドの混合物を、水で最終濃度に希釈した。

3 . 水浴を使用して、オリゴヌクレオチドをアニールした。

1 , 0 0 0 m L の丸底フラスコ中のオリゴヌクレオチドを、8 5 ° C の水浴中で、3 . 0 分間、インキュベートした。

そのフラスコを、3 7 ° C の水浴に移し、3 0 分間インキュベートした。

4 . 適切なトレイに注いだ。トレイを凍結乾燥器内に安置した。そのトレイを凍結し、及び凍結乾燥を続けた。

#### 【 0 2 4 8 】

##### プロセス制御

使用前に試薬の同一性を検証し、その合成の開始前に合成パラメータを検証した。カップリング効率を、非ブロック化ステップ後に得られた廃液の、D M T カチオンアッセイによってモニターした。その D M T 基は、そのオリゴヌクレオチドの 5 ' 末端でのヒドロキシル保護基であった。この D M T アッセイは、自動化された D N A シンセサイザーの性能に、即時フィードバックをするのに有用であった。この D M T カチオンを、その合成サイクルにおける、各々の脱トリチル化ステップで遊離させ、及び U V 吸光度測定により定量化した。当該合成のその他のパラメータとして、圧力、導電性、温度、試薬の流れ、担体と試薬の接触時間などもまた、リアルタイムで監視した。モニタリングの結果を、O l i g o P i l o t 1 0 0 の U n i c o r n ソフトウェアによって作成及び保存された、合成評価ファイルに取り込んだ。

#### 【 0 2 4 9 】

実施例 3 : 転移性前立腺がんの免疫療法における、腫瘍形成及び免疫抑制シグナル伝達の阻害剤としての、標的型 C p G - S T A T 3 A S O

S T A T 3 を標的とする、がん免疫療法

S T A T 3 転写因子は、多面的ながん遺伝子であり、及びヒトのがんにおいて一般的に活性化される、免疫抑制のマスター調節因子である。広範な証拠が、進行性前立腺がんなど

10

20

30

40

50

の腫瘍は、正常細胞とは異なり、その生存、血管新生、及び転位のために、STAT3に高度に依存していることを、示唆している(Mora, L. B. et al. *CANCER Res* 62, 6659-66(2002)、Dhir, R. et al. *Prostate* 51, 241-6(2002)、Lee, S. O. et al. *Prostate* 60, 303-9(2004)、及びHedvat, M. et al. *Cancer Cell* 16, 487-97(2009))。前立腺がんにおいて、STAT3の活性化は、腫瘍の進行を、ホルモン難治性/去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)表現型、及び乏しい患者生存に向ける結果となる。STAT3の活性は、多くの場合、Toll様受容体(TLR)及びNF- $\kappa$ Bシグナル伝達の下流で、ストレス及び炎症に応答して放出されるサイトカインによって引き起こされる。

10

#### 【0250】

TLR9/NF- $\kappa$ B/STAT3のシグナル伝達軸は、前立腺がん細胞の自己複製、腫瘍形成能及び治療耐性において、役割を果たしている。炎症性及び腫瘍形成シグナル伝達に固有の、集合点としてのSTAT3は、骨髓由来抑制細胞(MDSCs)などの、悪性細胞及び腫瘍関連免疫細胞の両方で活性化される。このMDSCsは、前立腺がんの進行及び乏しい患者生存に、極めて重要な役割を果たす、未熟で、及び強力な免疫抑制性骨髓細胞の異種集団である。

#### 【0251】

TLR9+顆粒球MDSCsの集団(G-MDSCs、Lin-HLA-DR-CD14-CD15HICD33LO)は、転移性/去勢抵抗性前立腺がん(mCRPC)への局在化からの疾患の進行中に、前立腺がん患者の血液中に蓄積する、非常に活性化されたSTAT3を有する。T細胞増殖における、これらG-MDSCsの阻害効果は、STAT3媒介のアルギナーゼ-1(ARG-1)の発現に依存し、それによってT細胞の増殖及び活性を強力に阻害する。

20

#### 【0252】

免疫及び前立腺がん細胞における、CpG ODNコンジュゲートの迅速な内在化種々の化学的修飾及びヌクレアーゼ耐性のSTAT3 ASO配列を有する、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)のコンジュゲート、合成のTLR9リガンドを生成した(表1~4、及び図9A~9C)。このCpG ODNのSTAT3 ASOへの連結によって、ヒト及びマウスの免疫細胞などの標的TLR9+細胞、ならびにインキュベーションの1時間以内の前立腺がん細胞により、迅速な内在化が可能になった(それぞれ、図10A~10B(ヒト)、及び図11A~11B(マウス))。骨髓性免疫細胞によるCpG-STAT3 ASOの取り込みは、最低50 nM濃度でも、検出可能であった(図10A~10B、及び図11A~11B)。

30

#### 【0253】

CpG-STAT3 ASOの効率的な取り込み

CpG-STAT3 ASOの細胞内取り込みを、共焦点顕微鏡により検証した。図12A~12Dに示すように、当該コンジュゲートは、培養培地にそれを添加した後の15分以内に、標的細胞の細胞質において、検出可能であった。これらのコンジュゲートの効率的な取り込みは、しばしば、それぞれのASO単独の効果をを超えて、インキュベーションの24時間以内のDU145及びLNCaP-S17細胞における、STAT3ノックダウンの改善された有効性に対応していた(図13A~13D)。TLR9(GpC-STAT3・ASO)を活性化しない、ASOのGpC ODNへのコンジュゲートはまた、STAT3の発現を強く阻害した(図13A~13D)。重要なことに、STAT3 ASO単独または対照のCpG-スクランブル化ODNのいずれでもなく、CpG-STAT3 ASOコンジュゲートだけが、500 nMのオリゴヌクレオチドの存在下で、培養の24時間以内のDU145及びLNCaP-S17細胞において、細胞死を誘発することが可能であった(図14A~14B)。

40

#### 【0254】

遠位臓器における、TLR9+細胞の全身投与及び標的化を可能にした、CpG-ASO

50

## のヌクレアーゼ耐性

改善された CpG - ASOs のヌクレアーゼ耐性は、脾臓または骨髄などの遠位臓器における、TLR9 + 細胞の全身投与及び標的化を可能にした (図 15 A ~ 15 B)。蛍光標識化された CpG - STAT3 ASO の 1 回の静脈内 (IV) 注入は、その骨髄において、骨髄細胞のかなりの部分に、及び末梢リンパ節において、DCs を含む、骨髄細胞の大部分に、当該コンジュゲートを送達した (図 15 A ~ 15 B)。ヒト B 細胞のリンパ腫細胞における実験は、CpG - STAT3 ASO 戦略が、標的遺伝子のノックダウン及び細胞毒性を高めて、その他の TLR9 + 悪性腫瘍に対して利用できることを示唆した (図 16 A ~ 16 C)。全体として、これらの結果は、新規のヌクレアーゼ耐性の CpG - STAT3・ASO 阻害剤は、播種性 TLR9 + 前立腺がん細胞及び MDSCs などの、寛容原性の腫瘍関連免疫細胞における、STAT3 シグナル伝達の同時標的化を可能にすることを示している。このような 2 つの戦略は、インビボで有効にする必要があり、腫瘍の微小環境内のシグナル伝達のクロストークの遮断に焦点を当てた、標的化がん治療への、パラダイムシフト的な免疫療法アプローチを提供する。

【0255】

### 実施例 4 : CpG - STAT3 ASO の設計及び合成

当該 CpG - ASOs を、前述のように、CpG (D19) - ODN を、Stat3 またはスクランブル SOs に連結させることにより、DNA/RNA 合成コア (COH) 中において、合成した (Kortylewski et al. Nat. Biotech. 2009)。

【0256】

健康な PBMCs を、COH の Donor Apheresis Center からの、IRB # 13378 で管理下での匿名ドナーから誘導した。サンプルの取得は、ヘルシンキ宣言に従って、当該機関のレビュー委員会によって承認された。ヒト PC3 及び DU-145 前立腺がん細胞を、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) から購入し、一方 IL-6 を安定的に発現する LNCaP-S17 を、Vaccine and Gene Institute、FL から入手した。マウスの Myc-CaP 細胞、RM1 及び RM9 を、それぞれ元のソースから入手した。ヒトの LNCaP、DU145、PC3 前立腺がん細胞を、元の ATCC から誘導し、及び認証された。ヒトの OCI-Ly3、RL、Jecko1 及び REC1B 細胞・非ホジキンリンパ腫細胞を、City of Hope から入手した。

【0257】

### フローサイトメトリー

がん細胞株及び免疫細胞の細胞外染色に対して、単一細胞の懸濁液を、Fc II/IIIR 特異的抗体と共にインキュベートし、非特異的結合を遮断し、及び次いで、CD1c、CD3、CD19、CD303a、F4/80、GR1、B220 及び CD11c (eBiosciences) に対して、蛍光標識化抗体の異なる組合せで染色した。アポトーシス細胞死を、アネキシン V アッセイによって決定した。蛍光色素データを、BD Accuri C6 フローサイトメーター (BD Biosciences) 上で収集し、及び FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いて解析した。

【0258】

全細胞の溶解物を、先に報告<sup>31</sup>したように調製し、及びチロシンリン酸化 STAT3 (Cell Signaling)、総 STAT3 (Santa Cruz) 及び - アクチン (Sigma) に特異的な抗体を用いて分析した。

【0259】

### インビボ実験

C57BL/6 マウス (6 ~ 8 週齢) を、the NCI (Frederick, MD) から購入した。動物の処置/手順を、確立された制度上の指導、及び IACUC から承認されたプロトコルに従って実施した。マウスに、 $2 \times 10^5$  個の RM9 細胞を、2 部位に皮下注入した。その腫瘍の成長を、カリパスを用いて評価した。樹立された腫瘍を持つマ

10

20

30

40

50

ウスを、様々なCpG - コンジュゲート ( 5 mg / kg ) で、毎日腫瘍内注入を用いて処置し、及び最後の処置の翌日に安楽死させた。実験用転移性マウスモデルに対して、C57BL / 6マウスに、PBS中の $2 \times 10^5$ 個のRM9-mcherry / ルシフェラーゼ細胞を、脛骨内に注入した。樹立された腫瘍を持つマウスに、CpG - コンジュゲート ( 5 mg / kg ) を、毎日、静脈内注入し、及び当該機関のガイドラインに従ったボディスコアに基づいて、または最後の処置の翌日に安楽死させた。腫瘍組織量を、生物発光画像処理 ( BLI ) を用いてモニターし、及びAmiX ( Spectral ) 画像処理システムを用いて測定した。

#### 【 0 2 6 0 】

生体内分布

C57BL / 6マウス ( 6 ~ 8 週齢 ) を、the NCI ( Frederick, MD ) から購入した。動物の処置 / 手順を、確立された制度上の指導、及びIACUCから承認されたプロトコルに従って実施した。樹立された腫瘍を持つか、または持たないC57BL / 6マウスに、5 mg / kgのCpG - STAT3Cy3を静脈内注入し、及び3時間後に安楽死させた。その腫瘍、リンパ節骨髄、脾臓、及び脳を採取した。単一細胞の懸濁液を、記述されているように ( Kortylewski et al. Nat. Med 2005 )、機械的な組織破壊及びコラゲナーゼ D / DNase I の処理によって調製し、及びCD11b、CD3、B220、CD19、CD56、CD11c、及びF4 / 80抗体を用いて染色した。異なった集団による取り込みを、フローサイトメトリーによって評価した。

#### 【 0 2 6 1 】

定量リアルタイムPCR

全RNAを、Maxwell ( 登録商標 ) システムRNA精製キット ( Promega ) を用いて、培養またはインビボで増殖した腫瘍細胞から抽出し、及び次いで、iScript cDNA合成キット ( Bio - Rad ) を用いて、cDNAsに転写した。遺伝子発現を、Universal Probe Library ( UPL, Roche )、及びSTAT3 ( フォワード5' - CTGCCTAGATCGGCTAGAAAAC - 3' [ 配列番号96 ]、及びリバース5' - CCCTTTGTAGGAACCTTTTTC - 3' [ 配列番号97 ] ) に対して、ProbeFinderソフトウェア ( Roche ) を用いて設計されたプライマーの特定ペア、ならびにRocheのリファレンス遺伝子アッセイを用いたTBPを利用して、解析した。配列に特異的な増幅を、CFX96リアルタイムPCR検出システム ( Bio - Rad ) で、解析した。そのデータを、TBPレベルに正規化し、及びその相対遺伝子発現レベルを、 $2^{-C_t}$ 法を用いて、算出した。

#### 【 0 2 6 2 】

共焦点顕微鏡

DU - 145細胞を、異なる時点に対して標識化された、500 nMのCpG - STAT3ASO-Cy3を使用して処置した。細胞を、20分間、2%のパラホルムアルデヒドで固定し、0.1%のトリトンX - 100を含むPBS中で透過処理し、及びその核を、5分間、DRAQ5 ( 商標登録 ) を使用して染色した。スライドを、封入体 ( Vector Labs, Burlingame, CA ) に封入した。共焦点画像処理を、cLSM510 - Meta倒立型共焦点顕微鏡 ( Zeiss, Thornwood, NY ) の、水浸対物レンズC - Apochromat 40X / 1.2を使用して、実施した。画像取得に対して、LSMソフトウェアv. 4.2 SP1を、及び取得後解析に対して、LSM画像ブラウザv. 4.2.0.121 ( Zeiss ) を使用した。

#### 【 0 2 6 3 】

対応のないt検定を利用し、両側P値を計算し、2つの処置群間の差異の統計的有意性を推定した。一元配置または二元配置ANOVAに加えて、Bonferroniのポスト試験を適用し、複数のグループ間、または腫瘍成長の動力学実験で、それぞれの違いを評価した。統計的に有意なP値を、\*\*\*は、 $p < 0.001$ 、\*\*は、 $p < 0.01$ 、及び\*は、 $p < 0.05$ のように数字で示した。データを、Prismソフトウェ

10

20

30

40

50

Av . 6 . 0 1 ( G r a p h P a d ) を用いて解析した。

#### 【 0 2 6 4 】

種々の化学的修飾及びヌクレアーゼ耐性の S T A T 3 A S O 配列を有する、C p G オリゴデオキシヌクレオチド ( O D N ) のコンジュゲート、合成 T L R 9 リガンドを生成した ( 表 1、2、及び 4、及び図 9 A )。この C p G O D N の S T A T 3 A S O への連結によって、ヒト及びマウスの免疫細胞などの標的 T L R 9 + 細胞、ならびにインキュベーションの 1 時間以内の前立腺がん細胞により、迅速な内在化が可能になった ( 図 1 0 A ~ 1 0 B、及び図 1 1 A ~ 1 1 B )。ヒト及びマウスの骨髄性免疫細胞による、C p G - S T A T 3 A S O の取り込みは、最低 5 0 n M 濃度でも、検出可能であった ( 図 1 0 A ~ 1 0 B、及び図 1 1 A ~ 1 1 B )。C p G - S T A T 3 A S O の細胞内取り込みを、共焦点顕微鏡により検証した。図 1 2 A ~ 1 2 D に示すように、当該コンジュゲートは、培養培地にそれを添加した後の 1 5 分以内に、標的細胞の細胞質において、検出可能であった。これらのコンジュゲートの効率的な取り込みは、しばしば、それぞれの A S O 単独の効果をを超えて、インキュベーションの 2 4 時間以内の D U 1 4 5 及び L N C a P - S 1 7 細胞における、S T A T 3 ノックダウンの改善された有効性に対応していた ( 図 1 3 A ~ 1 3 B )。T L R 9 ( G p C - S T A T 3 A S O ) を活性化しない、A S O の G p C O D N へのコンジュゲートはまた、S T A T 3 の発現を強く阻害した ( 図 1 3 A ~ 1 3 B )。この C p G - S T A T 3 A S O は、非コンジュゲート S T A T 3 A S O と比較して、m R N A ( 図 1 3 C ) 及びタンパク質 ( 図 1 3 D ) レベルの両方において、S T A T 3 ノックダウンのより迅速な誘発を示した。C p G - S T A T 3 A S O の内在化、及び標的ノックダウンはまた、グリオーマ及び小膠細胞細胞においても同様に有効であることが検証された ( 図 1 7 A ~ 1 7 C )。重要なことに、S T A T 3 A S O 単独または対照の C p G - スクランブル化 O D N のいずれでもなく、C p G - S T A T 3 A S O コンジュゲートだけが、5 0 0 n M のオリゴヌクレオチドの存在下で、培養の 2 4 時間以内の D U 1 4 5 及び L N C a P - S 1 7 細胞において、細胞死を誘発することが可能であった ( 図 1 4 A ~ 1 4 B )。

#### 【 0 2 6 5 】

改善された C p G - A S O s のヌクレアーゼ耐性は、脾臓または骨髄などの遠位臓器における、T L R 9 + 細胞の全身投与及び標的化を可能にした ( 図 1 5 A ~ 1 5 C 及び図 1 8 A ~ 1 8 C )。蛍光標識化された C p G - S T A T 3 A S O の 1 回の静脈内 ( I V ) 注入は、その骨髄において、骨髄性細胞のかなりの部分、及び末梢リンパ節において、D C s を含む骨髄細胞の大部分に、当該コンジュゲートを送達するのに十分であった ( 図 1 5 A ~ 1 5 C )。繰り返しの I V 注入は、脳限局性グリオーマにおいて、骨髄細胞のかなりの割合 ( 例えば、M D S C s の 3 0 % ) への、C p G - S T A T 3 A S O の浸透を可能にし、一方でその腫瘍の微小環境へのほぼ完全な浸透は、このオリゴヌクレオチドの、1 回の局所注入後に達成された ( 図 1 8 A ~ 1 8 C )。ヒト B 細胞のリンパ腫細胞の実験では、C p G - S T A T 3 A S O 戦略が、その他の T L R 9 + 悪性腫瘍に対して利用でき、標的遺伝子ノックダウンと細胞毒性を増進することを、示唆している ( 図 1 6 A ~ 1 6 C )。C p G - S T A T 3 A S O のインビボ効果を試験するために、我々は、悪性の同系前立腺がん、R a s - / M y c が引き起こした、及びホルモンに依存しない R M 9 腫瘍のモデルを選択した。最初の実験において、マウスの 2 箇所 of 皮下に、R M 9 腫瘍を移植し、及び 1 部位の腫瘍を、C p G - S T A T 3 A S O、S T A T 3 A S O または対照のオリゴヌクレオチドの腫瘍内注入用いて、処置した ( 図 1 9 A ~ 1 9 D )。C p G - S T A T 3 A S O 及び S T A T 3 A S O の両方が、初期に治療部位の腫瘍の増殖を阻害し、C p G - S T A T 3 A S O だけがまた、遠位の未処理箇所において、腫瘍サイズを減少させた ( 図 1 9 A )。これらの効果は、その注入部位からの C p G - S T A T 3 A S O 放出の全身性効果を示すかのように、その遠位における S T A T 3 発現の低下と相関していた ( 図 1 9 B 及び図 1 9 E )。さらに、S T A T 3 A S O ではなく、C p G - S T A T 3 A S O を使用した処置は、その遠位腫瘍部位における、骨髄由来抑制細胞 ( M D S C s ) での、S T A T 3 及び P D - L 1 免疫チェックポイント分子の発現を減少させた ( 図 1 9 C ~ 1 9 D )

。全身的に投与されたCpG-STAT3ASOの抗腫瘍効果を検証するために、骨転移前立腺腫瘍の実験的モデルを、脛骨内に移植した(図20A~20B)。腫瘍が樹立された後、マウスを、5mg/kgのCpG-STAT3ASO、STAT3ASO、対照のCpG-scrODN、またはPBSのみの、毎日の静脈内注入を使用して処置した。図20A~20Bに示すように、CpG-STAT3ASOの処置だけが、STAT3ASO及び対照のCpG-scrODNの限定的な効果と比較して、骨限局性RM9腫瘍の完全退縮を誘発した。このように、新規のヌクレアーゼ耐性CpG-STAT3ASO阻害剤は、播種性TLR9+前立腺がん細胞、及びマクロファージ/小膠細胞/MDSCsなどの、寛容原性の腫瘍関連免疫細胞における、STAT3シグナル伝達の同時標的化を可能にする(図21)。当該結果は、腫瘍の微小環境内の、シグナル伝達のクロストークの遮断に焦点を当てた、標的化がん療法に対する免疫療法アプローチが、がんの治療に効果的であり得ることを示す。

10

#### 【0266】

本開示の番号付き実施形態は、次の通りである。

1. 低分子活性化RNA(saRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)配列にコンジュゲートされた、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)配列を含む、単離化合物。

#### 【0267】

2. 前記低分子活性化RNA(saRNA)が、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP)のsaRNAである、前記化合物。

20

#### 【0268】

3. 前記ASOが、シグナル伝達兼転写活性化因子(STAT)のASOである、前記化合物。

#### 【0269】

4. 前記アンチセンス配列が、抗STAT1、抗STAT2、抗STAT3、抗STAT4、抗STAT5A、抗STAT5B、または抗STAT6オリゴヌクレオチド配列である、前記化合物。

#### 【0270】

5. さらに前記ODN配列、及び前記低分子活性化RNA(saRNA)、または前記ASOとの間のリンカーを含む、前記化合物。

30

#### 【0271】

6. 前記リンカーが、置換もしくは非置換のアルキン、または置換もしくは非置換のヘテロアルキンを含む、前記化合物。

#### 【0272】

7. 前記置換アルキンまたは置換ヘテロアルキンが、アジド基、保護アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基、及び保護スルフヒドリル基である、前記化合物。

#### 【0273】

8. 保護スルフヒドリル基を有する、前記置換アルキンまたは置換ヘテロアルキンが、ジビニルスルホン、アクリロイル、及びマレイミドから成る基から選択される部分にコンジュゲートされている、前記化合物。

40

#### 【0274】

9. 前記アクリロイル誘導体が、塩化アクリロイルである、前記化合物。

#### 【0275】

10. 前記リンカーが、ポリエチレングリコール(PEG)、またはビスフォスフォネート部分にコンジュゲートされた、置換されたアルキレン基またはヘテロアルキレン基の繰り返し単位を含む、前記化合物。

#### 【0276】

11. 前記リンカーが、3個の炭素を有する、非置換のヘテロアルキレンを含む、前記化合物。

#### 【0277】

50

12. 前記リンカーが、6から12個の炭素を有する、非置換のヘテロアルキレンを含む、前記化合物。

【0278】

13. 前記リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリエン、または置換もしくは非置換のヘテロアリエンである、前記化合物。

【0279】

14. 前記リンカーが、置換もしくは非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>40</sub>のアルキレン、置換もしくは非置換の2から40員環のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレン、置換もしくは非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリエン、または置換もしくは非置換の5から10員環のヘテロアリエンである、前記化合物。

10

【0280】

15. 前記リンカーが、非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>40</sub>のアルキレン、非置換の2から40員環のヘテロアルキレン、非置換のC<sub>3</sub>～C<sub>8</sub>のシクロアルキレン、非置換の3から8員環のヘテロシクロアルキレン、非置換のC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>のアリエン、または非置換の5から10員環のヘテロアリエンである、前記化合物。

【0281】

16. 前記リンカーが、置換された2から40員環のヘテロアルキレンである、前記化合物。

20

【0282】

17. 前記s aRNAまたは前記ASOが、化学的に修飾されている、前記化合物。

【0283】

18. 前記s aRNAまたは前記ASOが、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5'-C-メチル、反転デオキシ脱塩基性残基の組み込み、及びロックド核酸をから成る群から選択される化学的修飾を含む、前記化合物。

【0284】

19. 前記修飾が、前記s aRNAまたは前記ASOの、各々の末端核酸塩基に位置する、前記化合物。

30

【0285】

20. 前記修飾が、前記s aRNAまたは前記ASOの、各々の末端核酸塩基に位置しない、前記化合物。

【0286】

21. 前記修飾が、血清由来のヌクレアーゼから保護する、前記化合物。

【0287】

22. 前記ODN配列が、ホスホジエテル誘導体連結を含む、前記化合物。

【0288】

23. ODN核酸配列における、ホスホジエテル誘導体連結が、ホスホロアミダート連結、ホスホロジアミダート連結、ホスホロチオエート連結、ホスホロジチオエート連結、ホスホノカルボン酸連結、ホスホノカルボン酸塩連結、ホスホノ酢酸連結、ホスホノギ酸連結、ホスホン酸メチル連結、ホスホン酸ホウ素連結、またはO-メチルホスホノアミダイト連結から成る群から選ばれる、前記化合物。

40

【0289】

24. 前記ホスホジエテル誘導体連結が、ホスホロチオエート連結である、前記化合物。

【0290】

25. 薬学的に許容される賦形剤、及び条項の1つに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【0291】

26. 第2治療薬をさらに含む、前記医薬組成物。

【0292】

50

２７．前記第２治療薬が、抗腫瘍または抗がん剤、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、抗炎症剤、鎮痛剤、抗感染性剤、増殖阻害剤、免疫原性薬剤、免疫調節剤、及びケモカインから成る群から選ばれる、前記医薬組成物。

【０２９３】

２８．前記抗がん剤が、細胞死促進薬である、前記医薬組成物。

【０２９４】

２９．前記第２治療薬が、アクチノマイシンＤ／ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ドキソルビシン（ペグ化リボソーム）、エピルビシン、イダルビシン、ミトマイシン、ミトキサントロン、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、パクリタキセル、トポテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、アレムツズマブ、ＢＣＧ、ペバシズマブ、セツキシマブ、デノスマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、インターフェロン、イビリムマブ、ラパチニブ、モノメチルオーリスチンＥ（ＭＭＥＡ）、メルタンシン（ＤＭ１）、リツキシマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス、及びトラスツズマブ、またはそれらの任意の組み合わせから成る群から選ばれる、前記医薬組成物。

10

【０２９５】

３０．治療が必要な対象において、がんを治療する方法であって、前記対象に、条項１～２４の１項に記載の化合物、または条項の１つに記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

20

【０２９６】

３１．前記がんが、前立腺がん、乳がん、膠芽細胞腫、卵巣がん、肺がん、頭頸部がん、食道がん、皮膚がん、黒色腫、脳腫瘍、大腸がん、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である、前記がんの治療法。

【０２９７】

３２．前記対象における前記がんが、同時に免疫応答を刺激しながら治療される、前記がんの治療法。

【０２９８】

３３．前記化合物が、（ｉ）配列番号７～１８及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）の１つにコンジュゲートされた、ＣＥＢＰＡ、ｐ２１、もしくはｐ５３のｓａＲＮＡ、または（ｉｉ）配列番号７～１８及び９８～１０１の配列の、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）にコンジュゲートされた、配列番号３１～４２及び１１０～１１３のＳＴＡＴ ＡＳＯを含む、前記がんの治療法。

30

【０２９９】

３４．前記対象における前記がんが、同時に免疫応答を刺激することなく治療される、前記がんの治療法。

【０３００】

３５．前記化合物が、配列番号２９～３０の１つとコンジュゲートされた、ＣＥＢＰＡ、ｐ２１、もしくはｐ５３のｓａＲＮＡ、または配列番号３１～４２及び１１０～１１３のＳＴＡＴ ＡＳＯの１つを含む、前記がんの治療法。

40

【０３０１】

３６．治療が必要な対象において、自己免疫疾患を治療する方法であって、前記対象に、条項１～２４の１つに記載の化合物、または条項の１つに記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【０３０２】

３７．前記自己免疫疾患及び／または障害が、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、乾癬、また全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）である、前記自己免疫疾患の治療法。

【０３０３】

50

３８．前記対象における前記自己免疫疾患が、同時に免疫応答を刺激することなく治療される、前記自己免疫疾患の治療法。

【０３０４】

３９．前記化合物が、配列番号２９～３０の１つにコンジュゲートされた、配列番号３１～４２及び１１０～１１３のＳＴＡＴ ＡＳＯｓの１つを含む、前記自己免疫疾患の治療法。

【０３０５】

４０．前記化合物または前記組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、前記対象に投与される、前記自己免疫疾患の治療法。

【０３０６】

４１．前記治療が、前記化合物または組成物の用量に依存している、前記がんまたは自己免疫疾患の治療法。

【０３０７】

４２．約０．００１ｍｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇの前記化合物が、前記対象に投与される、前記がんまたは自己免疫疾患の治療法。

【０３０８】

４３．治療が必要な対象において、免疫応答を刺激する方法であって、前記対象に、（ｉ）ＣＥＢＰ、ｐ２１、もしくはｐ５３のｓａＲＮＡ、または（ｉｉ）配列番号の３１～４２及び１１０～１１３のＡＳＯｓにコンジュゲートされた、配列番号７～１８及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）配列の１つを含む化合物、または（ｉ）ＣＥＢＰ、ｐ２１、またはｐ５３のｓａＲＮＡ、もしくは（ｉｉ）配列番号の３１～４２及び１１０～１１３のＡＳＯｓにコンジュゲートされた、配列番号７～１８及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）配列の１つを含む化合物を含有する医薬組成物の、有効量を投与することを含む、前記方法。

【０３０９】

４４．前記刺激が、ナチュラルキラー細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞または骨髄細胞の成熟、分化、もしくは増殖を含む、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１０】

４５．前記刺激が、Ｔ<sub>H</sub>１型免疫応答の増加を含む、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１１】

４６．前記免疫応答の刺激が、前記対象の臓器へ、樹状細胞及びＣＤ８＋Ｔ細胞を補充する、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１２】

４７．前記免疫応答の刺激が、前記対象における抗原提示細胞の集団を拡大する、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１３】

４８．前記免疫応答の刺激が、前記対象におけるがん細胞の増殖を抑制する、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１４】

４９．前記化合物または前記組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアゾール、経口、または局所投与により、前記対象に投与される、前記免疫応答の刺激方法。

【０３１５】

５０．細胞において、Ｃ／ＥＢＰの発現を増進する方法であって、前記細胞を、ＣＥＢＰＡ ｓａＲＮＡとコンジュゲートされた、配列番号７～１８、２９～３０、及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）配列の１つを含む化合物、またはＣＥＢＰのｓａＲＮＡとコンジュゲートされた、配列番号７～１８、２９～３０、及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ

10

20

30

40

50

）配列の１つを含む化合物を含有する医薬組成物の、有効量と接触させることを含む、前記方法。

【０３１６】

５１．前記細胞を、条項の１つに記載の化合物、または条項の１つに記載の医薬組成物の有効量と接触させることを含む、細胞増殖を阻害する方法。

【０３１７】

５２．前記細胞を、配列番号３１～４２及び１１０～１１３のＡＳＯｓに連結された、配列番号７～１８、２９～３０、及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）配列の１つを含む化合物、または配列番号３１～４２及び１１０～１１３のＡＳＯｓに連結された、配列番号７～１８、２９～３０、及び９８～１０１のホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド（ＯＤＮ）配列の１つを含む化合物を含有する医薬組成物の、有効量と接触させることを含む、細胞においてＳＴＡＴ転写因子の活性を低下させる方法。

10

【０３１８】

５３．前記細胞が、がん細胞である、前記条項の１つに記載の方法。

【０３１９】

５４．前記細胞が、急性骨髄性リンパ（ＡＭＬ）細胞、または前立腺がん細胞である、前記方法。

【０３２０】

５５．前記ＡＭＬ細胞が、その骨髄からのものである、前記方法。

20

【０３２１】

５６．前記細胞が、インビトロで培養された細胞である、前記方法。

【０３２２】

５７．前記細胞が、宿主におけるインサイチュである、前記方法。

【０３２３】

５８．前記細胞が、エクスピボで培養された細胞である、前記方法。

【０３２４】

５９．前記接触ステップが、ウイルス性の形質導入を含まない、前記方法。

【０３２５】

６０．前記接触ステップが、ウイルス性の形質導入を含まず、及び前記細胞が、前記化合物または前記医薬組成物と接触する、前記方法。

30

【０３２６】

６１．細胞が、約１～１００ナノモル濃度の前記化合物と接触する、前記方法。

【０３２７】

その他の実施形態

本開示を、その詳細な説明と併せて記載してきたが、その一方で、前述の説明は、本開示の範囲を示し、及び限定を意図するものではなく、付帯の請求項の範囲によって定められるものであることは理解されよう。その他の態様、利点、及び修正は、以下の請求項の範囲内である。

40



【 図 1 E 】

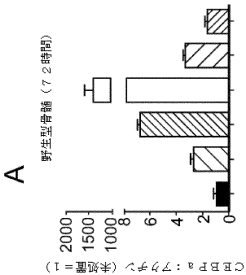


【 図 1 F 】



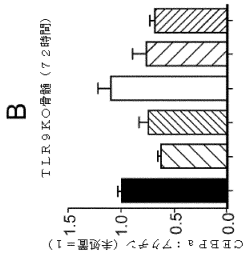
【 図 2 A 】

mRNA発現



【 図 2 B 】

mRNA発現



10

20

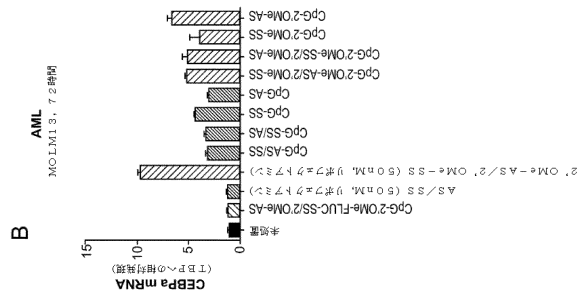
30

40

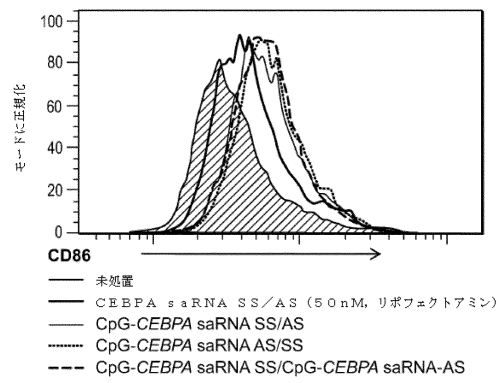
50



【図 4 B】



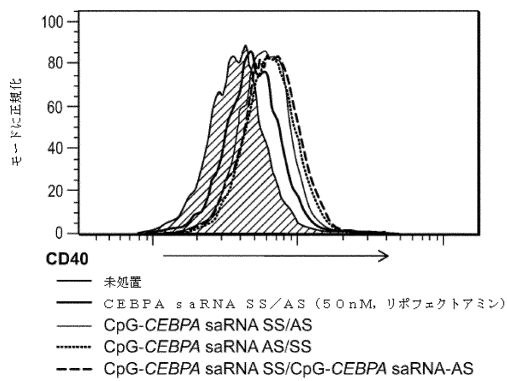
【図 5 A】



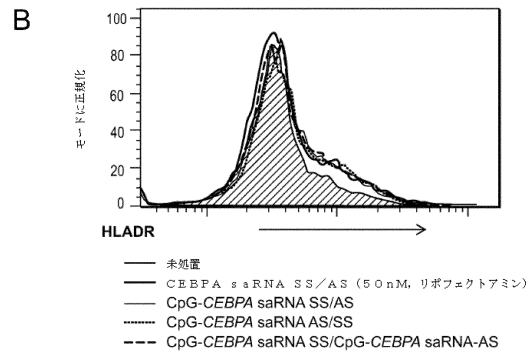
A

10

【図 5 B】



【図 5 C】



C

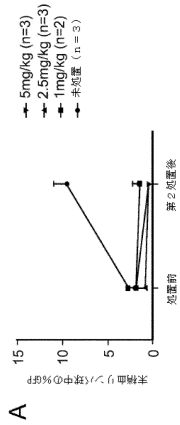
20

30

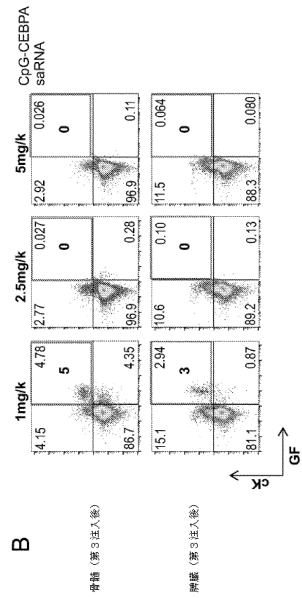
40

50

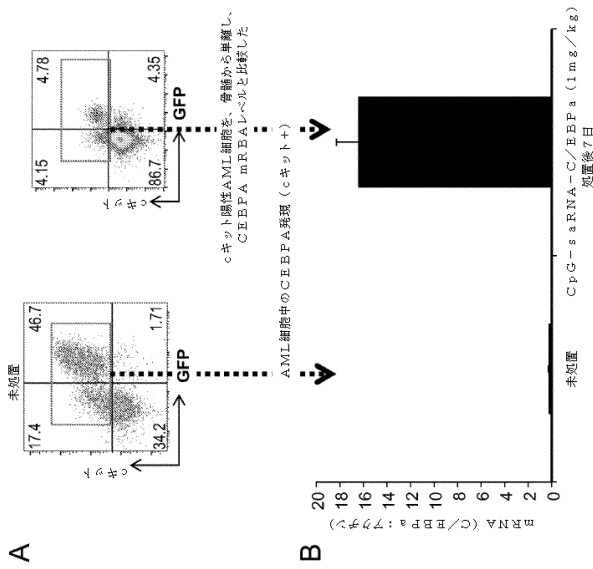
【図 6 A】



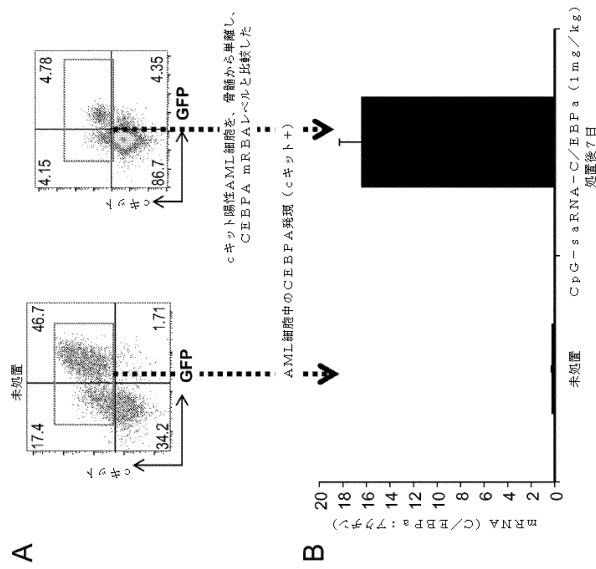
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

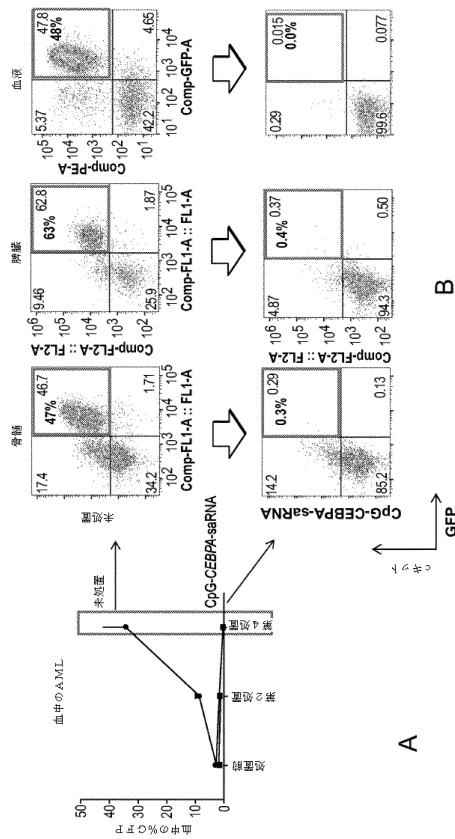
20

30

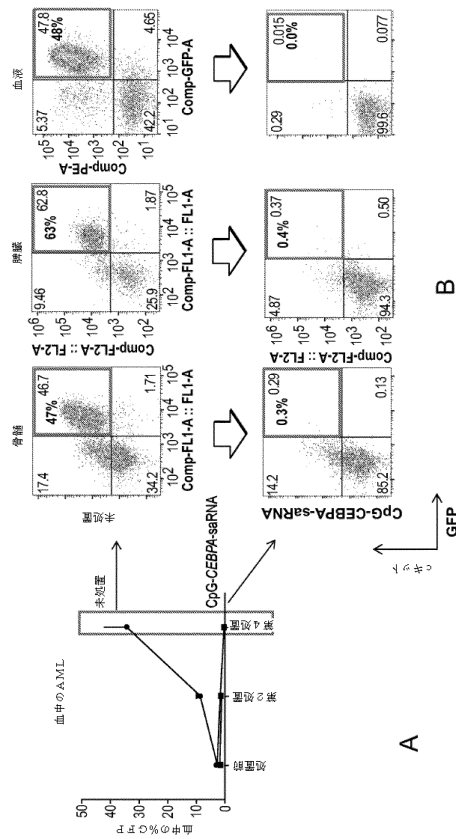
40

50

【図 8 A】



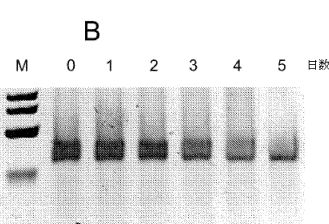
【図 8 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

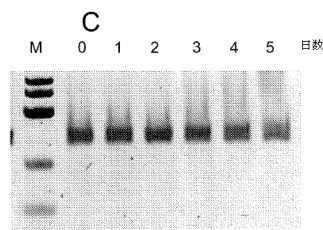
20

30

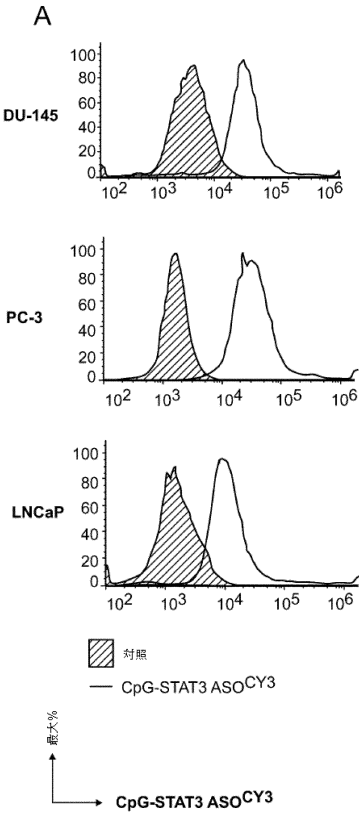
40

50

【図 9 C】



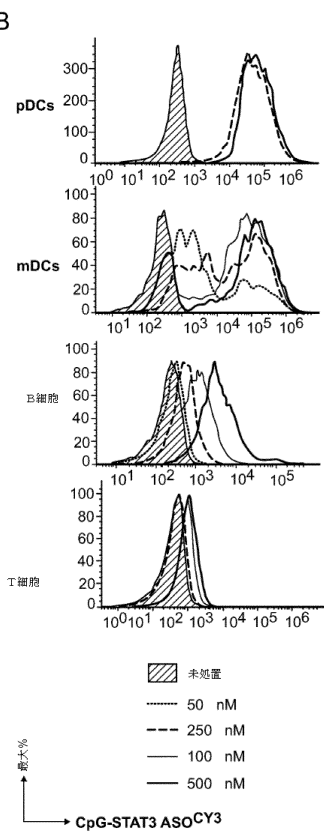
【図 10 A】



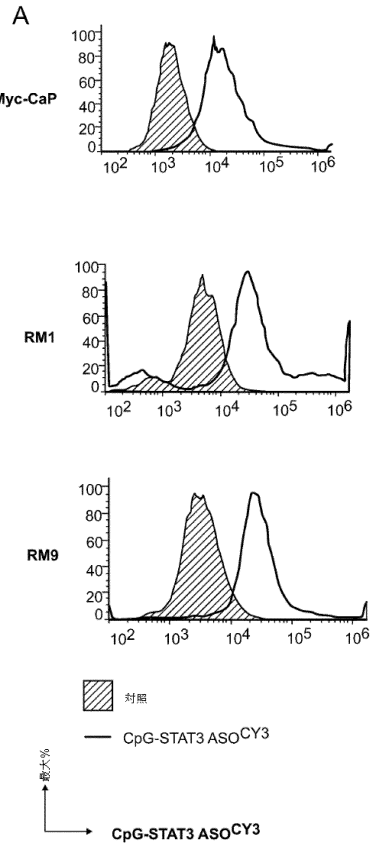
10

20

【図 10 B】



【図 11 A】

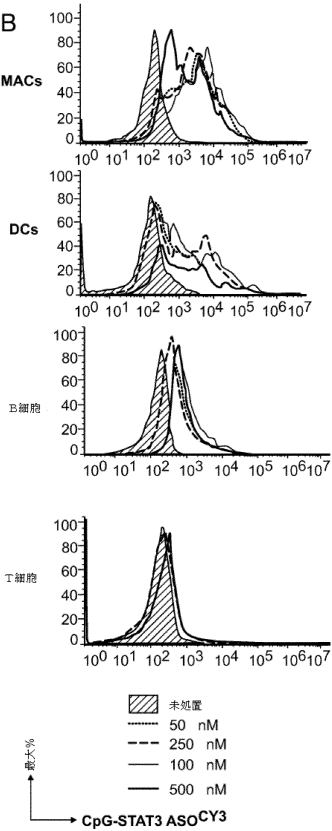


30

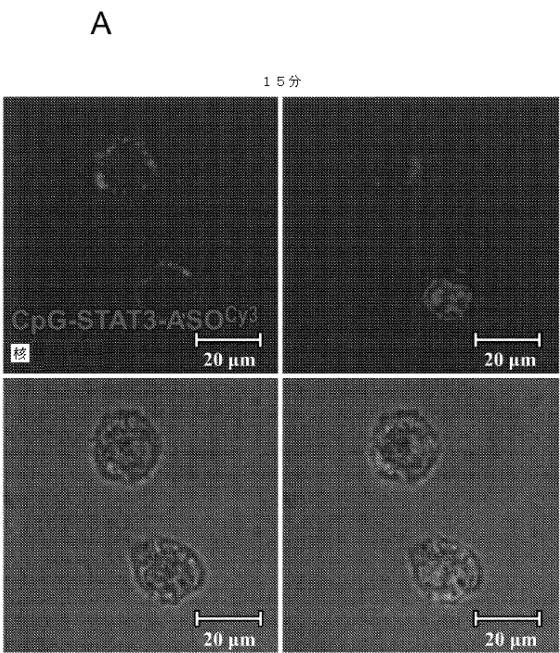
40

50

【図 1 1 B】



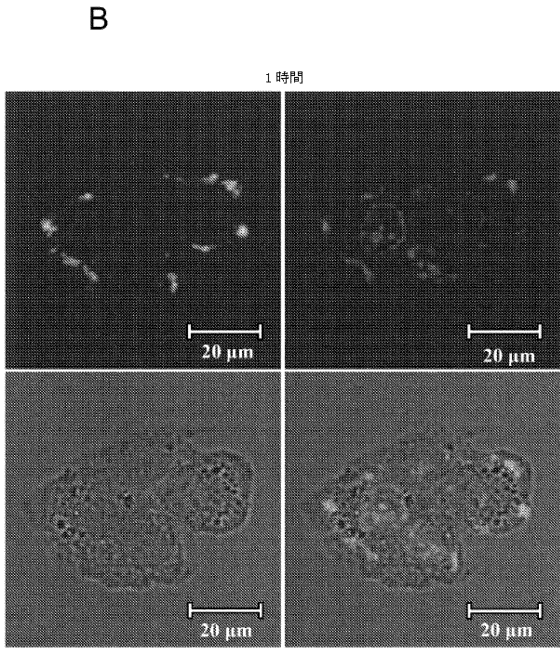
【図 1 2 A】



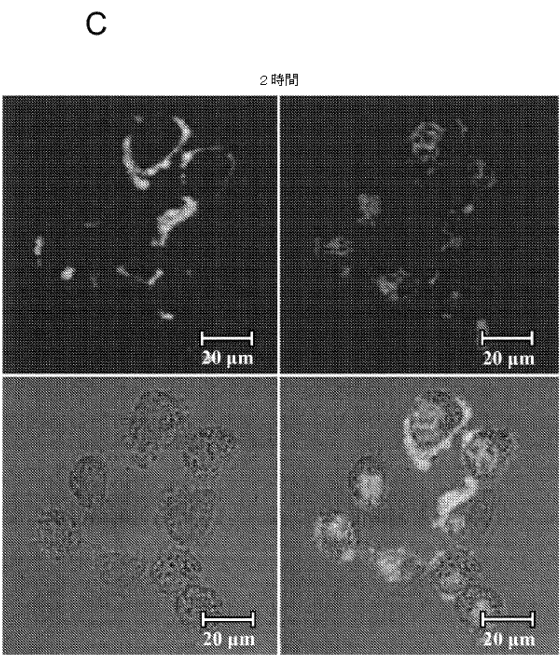
10

20

【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

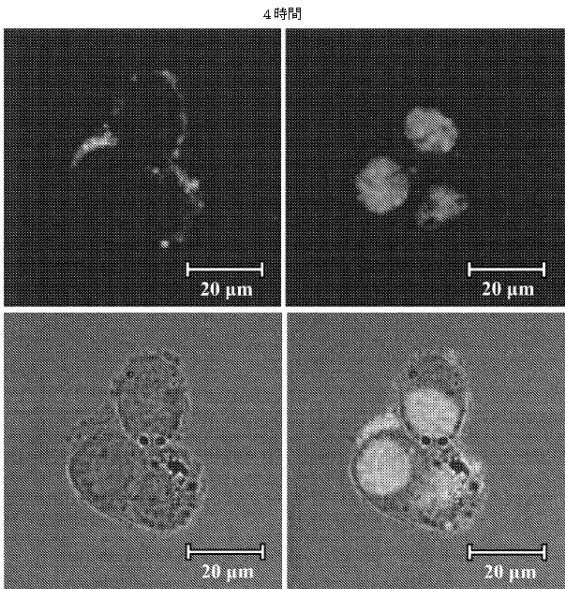


30

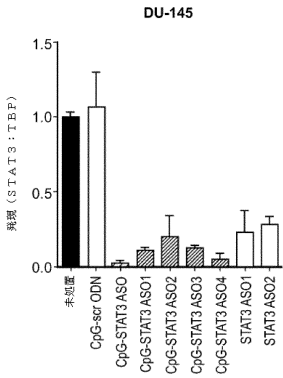
40

50

【図 1 2 D】  
D

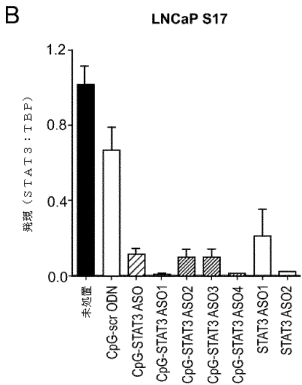


【図 1 3 A】  
A

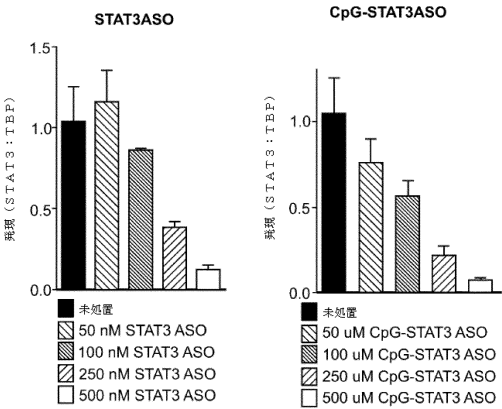


10

【図 1 3 B】  
B



【図 1 3 C】  
C

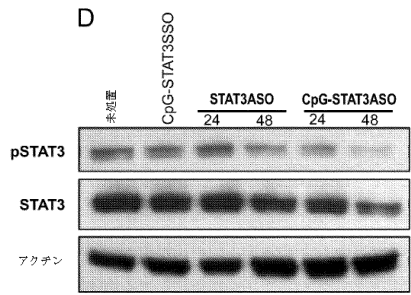


30

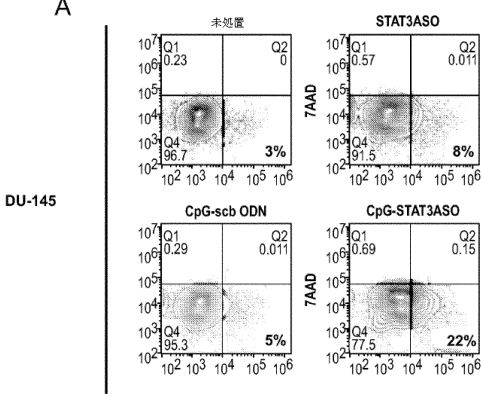
40

50

【 図 1 3 D 】

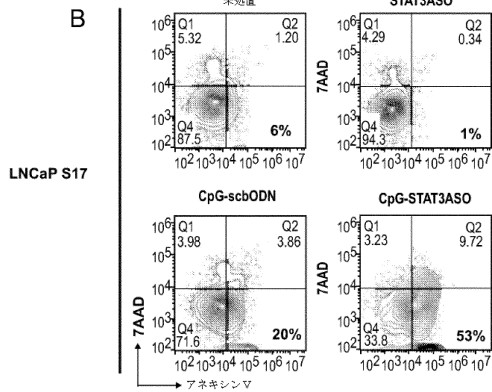


【 図 1 4 A 】

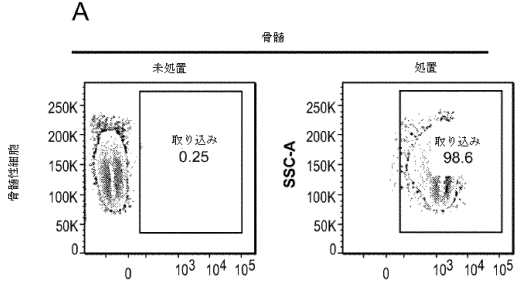


10

【 図 1 4 B 】



【 図 1 5 A 】



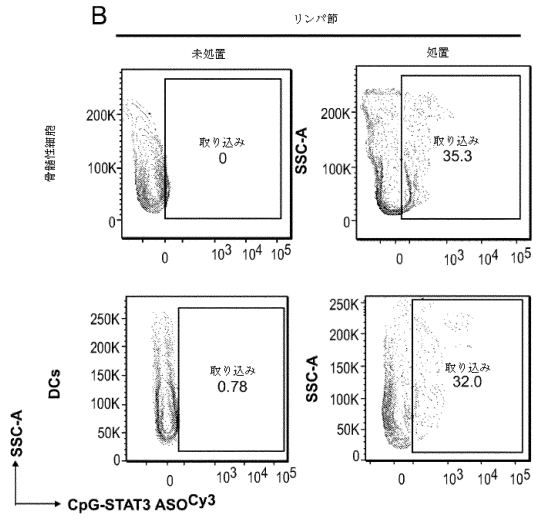
20

30

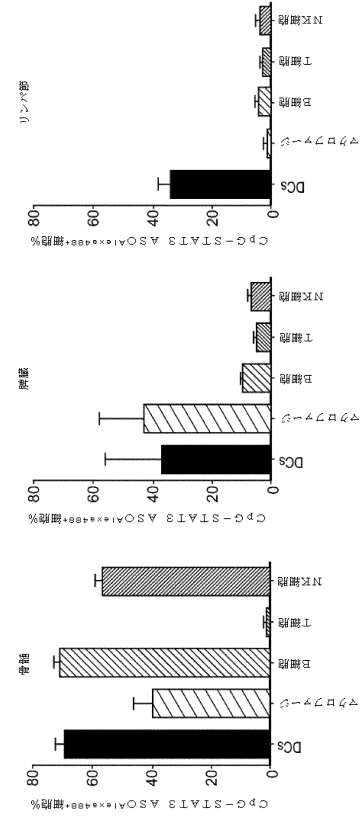
40

50

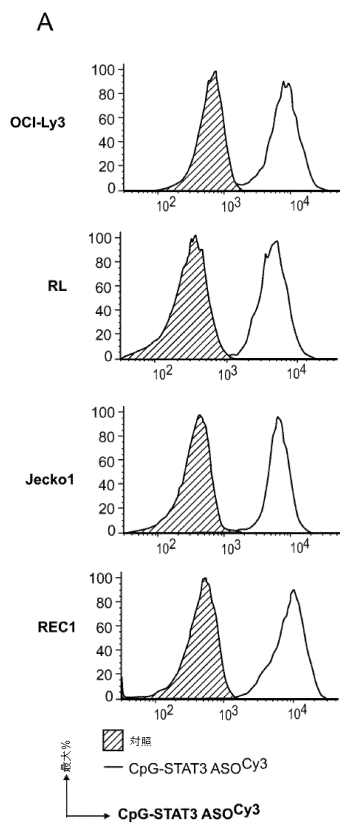
【図 15 B】



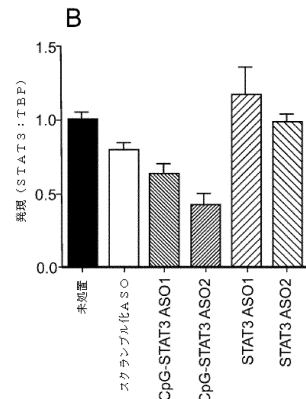
【図 15 C】



【図 16 A】



【図 16 B】



10

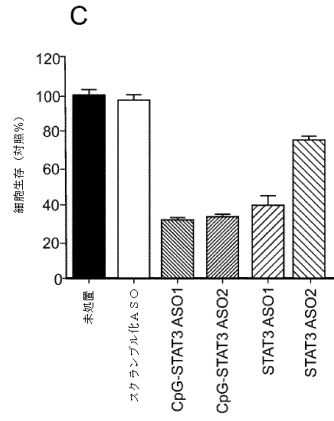
20

30

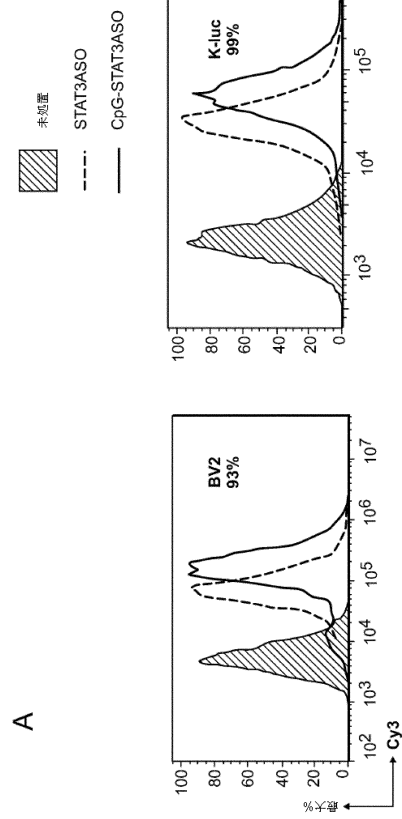
40

50

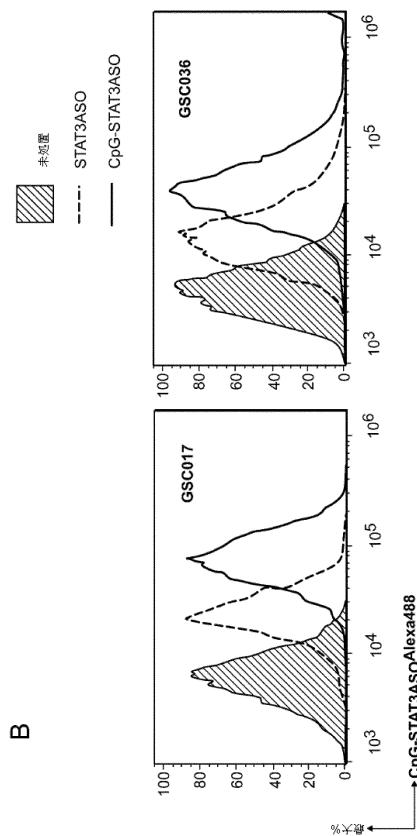
【図 16 C】



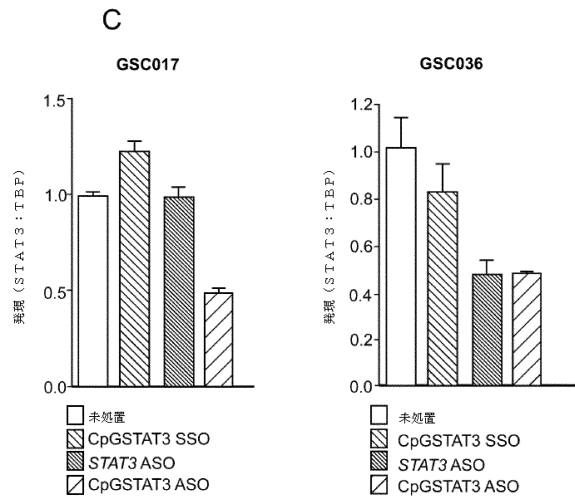
【図 17 A】



【図 17 B】



【図 17 C】



10

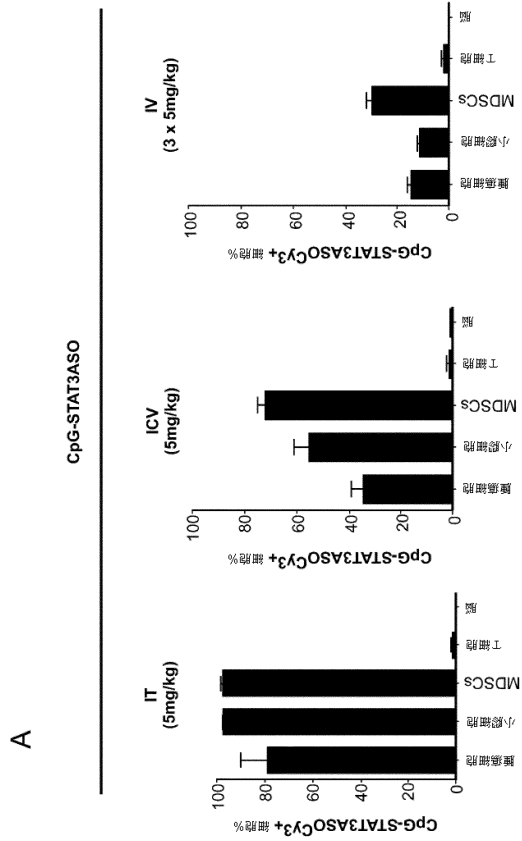
20

30

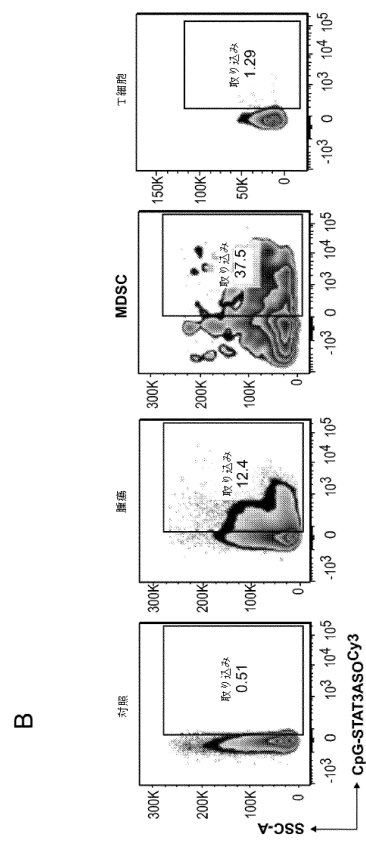
40

50

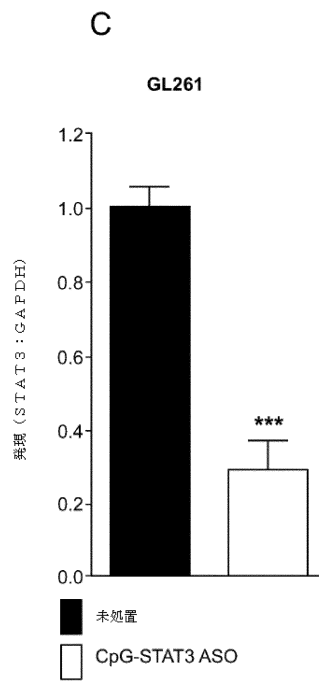
【 図 1 8 A 】



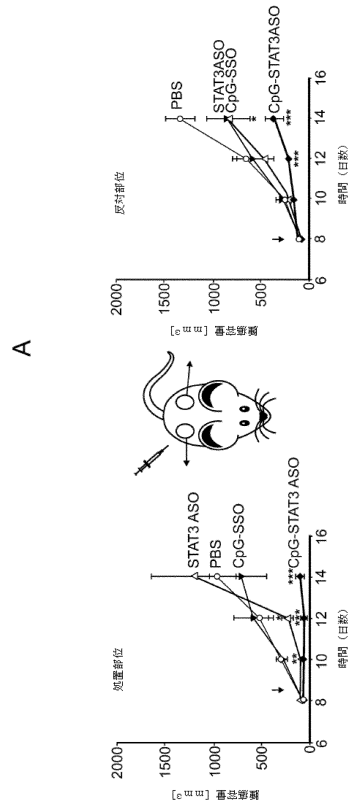
【圖 18 B】



【 図 1 8 C 】

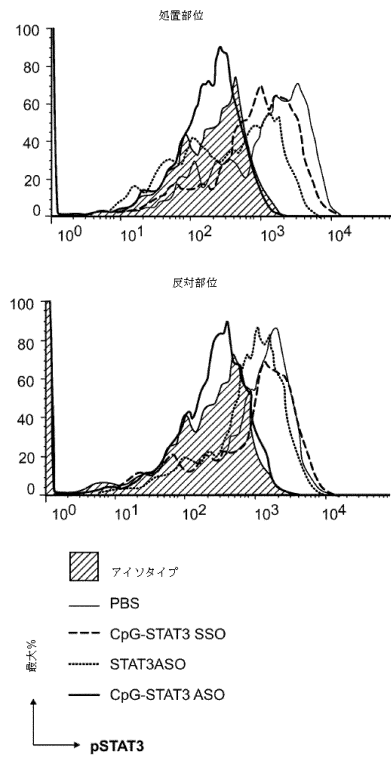


【 図 1 9 A 】



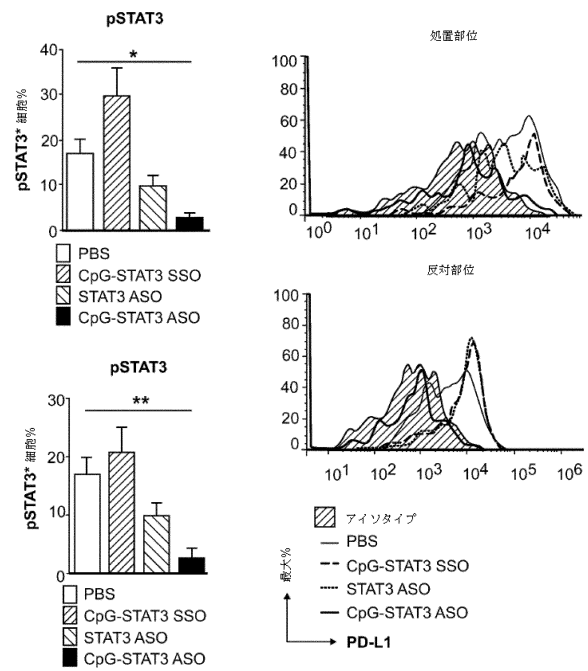
【図 19 B】

B



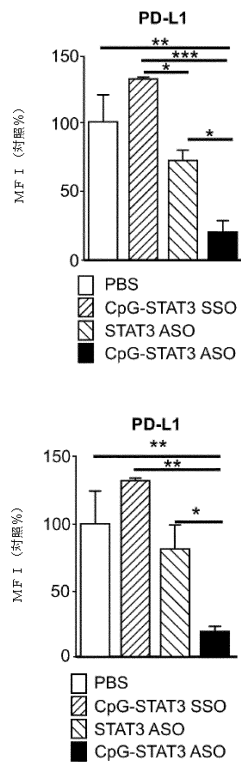
【図 19 C】

C



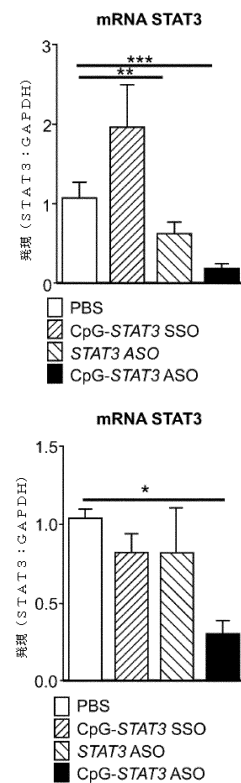
【図 19 D】

D



【図 19 E】

E



10

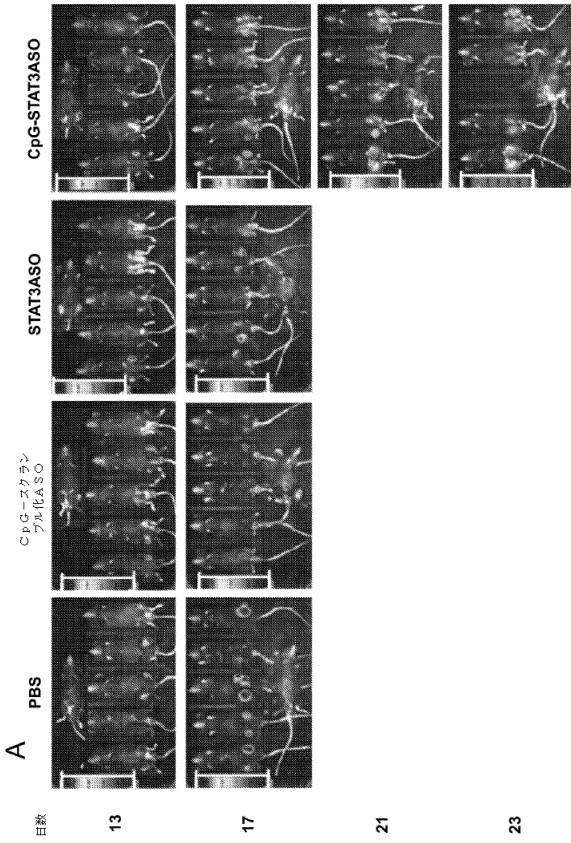
20

30

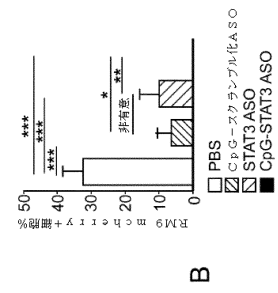
40

50

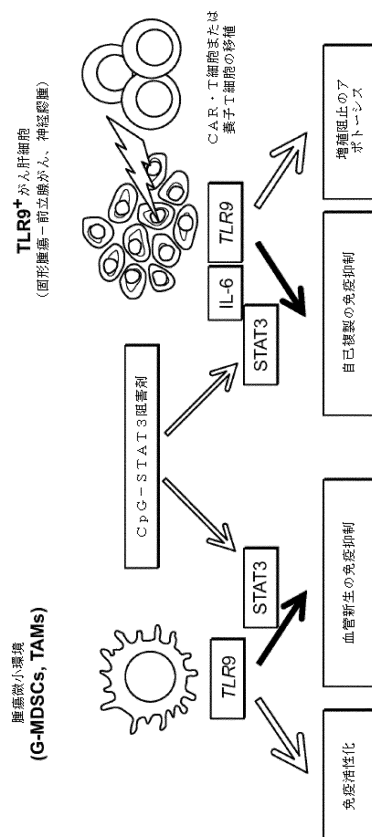
【図 20 A】



【図 20 B】



【図 21】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007073109000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/09	

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ベニュー・ 7 2 2

## (72)発明者 シフィデルスキ, ピオトル・マレク

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 1 7 7 3、サン・ディマス、ホーリーグリーン・レイン・ 1 6 2

## (72)発明者 モレイラ, デyson・フリアカ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 1 0 1 0、デュアーテ、ハイランド・アベニュー・ 1 3 1 3  
・ナンバー・ 1 4 2 3

審査官 松田 芳子

## (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 9 8 1 1 3 ( US , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )