

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-512110

(P2025-512110A)

(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z Z N A 4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/61 (2017.01)	A 6 1 K 47/61	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/07 (2006.01)	A 6 1 K 38/07	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全97頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-560625(P2024-560625)
 (86)(22)出願日 令和5年4月14日(2023.4.14)
 (85)翻訳文提出日 令和6年10月11日(2024.10.11)
 (86)国際出願番号 PCT/CN2023/088459
 (87)国際公開番号 WO2023/198200
 (87)国際公開日 令和5年10月19日(2023.10.19)
 (31)優先権主張番号 202210386579.4
 (32)優先日 令和4年4月14日(2022.4.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 202210377179.7
 (32)優先日 令和4年4月14日(2022.4.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 202210401035.0

(71)出願人 517452453
 スーチョウ リボ ライフ サイエンス カ
 ンパニー、リミテッド
 SUZHOU RIBO LIFE SC
 IENCE CO., LTD.
 中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0
 0、クンシャン シティ、ユイシャン
 タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
 1 6 8
 (74)代理人 110000729
 弁理士法人ユニアス国際特許事務所
 (72)発明者
 リャン、ツーツァイ
 中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0
 0、クンシャン シティ、ユイシャン
 タウン、ユアンフォン ロード ナンバー

最終頁に続く

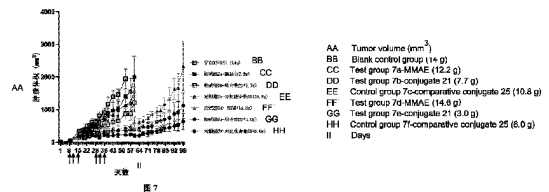
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複合体及び組成物並びに製造方法及び使用

(57)【要約】

本開示は、複合体を提供する。複合体は、1つ又は複数の送達基及び1つ又は複数の機能性基を含み、各前記送達基は、独立して、前記機能性基と共有結合を介して結合されるか、又は結合基を介して結合され、各前記機能性基は、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基から選択される。本開示に係る複合体は、腫瘍組織に効率的に標的送達することができ、それにより、腫瘍及び腫瘍関連疾患を効果的に治療することができる。

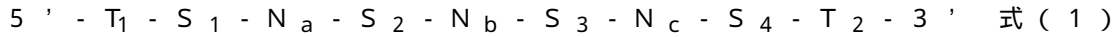
【選択図】図7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ又は複数の送達基及び1つ又は複数の機能性基を含み、前記送達基は、1つのアプタマーから1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成され、前記アプタマーは、連続したヌクレオチド配列を含み、隣接する2つのヌクレオチドを結合する基は、独立して、リン酸エステル基であるか、又は修飾基を有するリン酸エステル基であり、各ヌクレオチドは、修飾又は非修飾のA、U、C又はGのうちの1つから選択され、前記連続したヌクレオチド配列は、式(1)に示される配列を有し、



ここで、 T_1 は、1~3個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 T_2 は、0~15個のヌクレオチドからなるモチーフであり、かつ T_2 には T_1 と完全に逆相補的なモチーフが含まれておらず、

S_1 及び S_4 は、それぞれ、3~7個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 S_1 は、 S_4 と長さが同じであり、かつ完全に逆相補的であり、

N_a 及び N_c は、それぞれ、1~4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 N_a 中の各ヌクレオチドは、 N_c 中の各ヌクレオチドといずれも相補的ではなく、かつ N_a 及び N_c 中のUの総数は、 N_a 及び N_c 中の全てのヌクレオチドの総数の50%以上を占め、

S_2 及び S_3 は、それぞれ、1~4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 S_2 は、 S_3 と長さが同じであり、かつ完全に逆相補的であり、

N_b は、3~6個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 N_b の両端のヌクレオチド間は、AU又はGCの相補を形成しておらず、

各前記送達基は、独立して、前記機能性基と共有結合を介して結合されるか、又は結合基を介して結合され、各前記機能性基は、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基から選択される、複合体。

【請求項 2】

前記連続したヌクレオチド配列の長さは、18~50個のヌクレオチド、又は20~40個のヌクレオチド、又は21~36個のヌクレオチド、又は24~32個のヌクレオチドである、請求項1に記載の複合体。

【請求項 3】

T_1 は、2つのヌクレオチドからなり、或いは、 T_1 は、2つのヌクレオチドからなり、かつ少なくとも1つのCを含み、或いは、5'から3'に向かって、 ${}_1T$ は、CU、UC又はACである、請求項1又は2に記載の複合体。

【請求項 4】

T_2 は、0~10個のヌクレオチドからなり、或いは、5'から3'に向かって、 ${}_2T$ は、Uから始まる1~9個のヌクレオチドからなる、請求項1又は2に記載の複合体。

【請求項 5】

S_1 及び S_4 は、それぞれ3~5個のヌクレオチドからなり、かつ長さが同じであり、或いは、 S_1 及び S_4 によって形成された逆相補において、GC相補が全ての相補数の少なくとも40%を占めており、或いは、5'から3'に向かって、 ${}_1S$ は、GCUであり、かつ S_4 は、AGCであり、或いは、 S_1 は、GAGUであり、かつ S_4 は、GCUであり、或いは、 S_1 は、GGAUであり、かつ S_4 は、GUCUであり、或いは、 S_1 は、UAUGGであり、かつ S_4 は、CCAUGである、請求項1に記載の複合体。

【請求項 6】

前記 N_a 及び N_c 中のヌクレオチドの数の和は、2~4の整数であり、或いは、前記 N_a 及び N_c 中のヌクレオチドの数の和は、3又は4であり、かつ前記 N_a 及び N_c 中のUの数の和は、2又は3であり、或いは、5'から3'に向かって、 ${}_N$ 又は ${}_c$ は、独立して、U、UU、UC又はCUである、請求項1に記載の複合体。

【請求項 7】

S_2 及び S_3 は、それぞれ、2~3個のヌクレオチドからなり、かつ長さが同じであり

10

20

30

40

50

、或いは、 S_2 及び S_3 によって形成された逆相補には、少なくとも1つのGC相補が含まれ、或いは、5'から3'に向かって、 S_2 は、CAであり、かつ S_3 は、UGであり、或いは、 S_2 は、ACであり、かつ S_3 は、GUであり、或いは、 S_2 は、GCCであり、かつ S_3 は、GGUである、請求項1に記載の複合体。

【請求項8】

N_b は、4個又は5個のヌクレオチドからなり、或いは、5'から3'に向かって、 N_b は、GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG又はGAUCUである、請求項1に記載の複合体。

【請求項9】

前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3に示される配列を有する、請求項1に記載の複合体。 10

【請求項10】

前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号4に示されるヌクレオチド配列を有し、5'- N_6 GGAGUUCAN₁N₂N₃N₄UGN₅GUCUN₇-3' (配列番号4) ここで、 N_1 、 N_2 及び N_3 は、それぞれ独立して、A、U、C及びGのうちの1つであり、 N_4 は、U、C若しくはGであるか、又はU、C若しくはGのうちの2つからなるモチーフであり、 N_5 は、U、CU又はUUであり、 N_6 は、CU、UC又はACであり、 N_7 は、U、UU又はUUN₈であり、 N_8 は、1~15個のヌクレオチドからなるモチーフである、請求項1に記載の複合体。

【請求項11】

N_1 、 N_2 、 N_3 及び N_4 からなるモチーフ $N_1N_2N_3N_4$ は、GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG又はGAUCUのうちの1つである、請求項10に記載の複合体。 20

【請求項12】

前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号5~11のうちのいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有する、請求項10又は11に記載の複合体。

【請求項13】

N_8 は、1~8個のヌクレオチドからなるモチーフであり、或いは、5'から3'に向かって、 N_8 のヌクレオチド配列は、CCGAUCUCであり、或いは、前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号12~14のうちの1つに示される配列を有する、請求項10 30

【請求項14】

前記連続したヌクレオチド配列中の各シトシンヌクレオチドは、フルオロ修飾シトシンヌクレオチドであり、及び/又は前記連続したヌクレオチド配列中の各ウラシルヌクレオチドは、フルオロ修飾ウラシルヌクレオチドであり、或いは、前記連続したヌクレオチド配列中の各ヌクレオチドは、いずれも2'-メトキシ修飾ヌクレオチドであり、或いは、前記連続したヌクレオチド配列中の N_b 及び S_3 モチーフのうちの1つ又は複数のウラシルヌクレオチドは、修飾塩基を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項15】

前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号15~33のうちの1つに示されるヌクレオチド配列を有する、請求項14に記載の複合体。 40

【請求項16】

前記連続したヌクレオチド配列における、隣接する2つのヌクレオチドを結合する少なくとも1つの基は、チオリン酸エステル基であり、或いは、隣接する2つのヌクレオチドを結合する各基は、いずれもチオリン酸エステル基である、請求項1に記載の複合体。

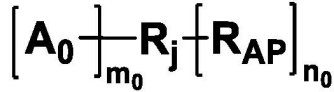
【請求項17】

前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号34~39のうちの1つに示されるヌクレオチド配列を有する、請求項16に記載の複合体。

【請求項18】

式(101)に示される構造を有し、

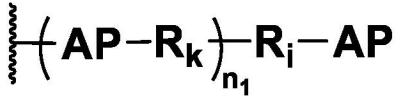
【化 1】



(1 0 1)

式中、各 R_{AP} 基は、独立して、式 (1 0 2) に示される構造を有する基であり、

【化 2】



10

(1 0 2)

式中、各 AP 基は、同じか又は異なり、独立して、1つの前記送達基を表し、 R_j 、各 R_k 又は各 R_i は、同じか又は異なり、それぞれ独立して、共有結合又は結合基を表し、かつ R_i と R_k は、両方が同時に共有結合であることはなく、各 n_1 は、それぞれ独立して、0 ~ 4 の整数を表し、

各 A_0 基は、同じか又は異なり、独立して、1つの前記機能性基を表し、 m_0 は、1 ~ 6 の整数であり、 n_0 は、1 ~ 6 の整数であり、

20

は、基が共有結合的に結合する部位を表す、請求項 17 に記載の複合体。

【請求項 19】

m_0 は、1 ~ 4 の整数であり、及び / 又は n_0 は、1 ~ 3 の整数であり、及び / 又は各 n_1 は、独立して、0 ~ 1 の整数であり、

或いは、 m_0 は 1 であり、及び / 又は n_0 は 1 であり、及び / 又は少なくとも 1 つ若しくは各 n_1 は 0 である、請求項 18 に記載の複合体。

【請求項 20】

各前記 R_k 又は各前記 R_i は、独立して、共有結合又は長さが 1 ~ 70 個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の 1 つ又は複数の炭素原子は、C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、OP(O)₂、OP(O)(S)、C₅ ~ C₈ グリコシド基、C₂ ~ C₁₀ アルケニレン基、C₂ ~ C₁₀ アルキニレン基、C₆ ~ C₁₀ アリーレン基、C₃ ~ C₁₈ ヘテロシクリレン基及び C₅ ~ C₁₀ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される 1 つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、C₁ ~ C₁₀ アルキル基、C₆ ~ C₁₀ アリール基、C₅ ~ C₁₀ ヘテロアリール基、C₁ ~ C₁₀ ハロゲン化アルキル基、-OC₁ ~ C₁₀ アルキル基、-OC₁ ~ C₁₀ アルキルフェニル基、-C₁ ~ C₁₀ アルキル-OH、-OC₁ ~ C₁₀ ハロゲン化アルキル基、-SC₁ ~ C₁₀ アルキル基、-SC₁ ~ C₁₀ アルキルフェニル基、-C₁ ~ C₁₀ アルキル-SH、-SC₁ ~ C₁₀ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁ ~ C₁₀ アルキル-NH₂、-N(C₁ ~ C₁₀ アルキル)(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-NH(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-N(C₁ ~ C₁₀ アルキル)(C₁ ~ C₁₀ アルキルフェニル基)、-NH(C₁ ~ C₁₀ アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、-CO₂H、-C(O)O(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-CON(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-CONH(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-NHC(O)(フェニル基)、-N(C₁ ~ C₁₀ アルキル)C(O)(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-N(C₁ ~ C₁₀ アルキル)C(O)(フェニル基)、-C(O)C₁ ~ C₁₀ アルキル基、-C(O)C₁ ~ C₁₀ アルキルフェニル基、-C(O)C₁ ~ C₁₀ ハロゲン化アルキル基、-OC(O)C₁ ~ C₁₀ アルキル基、-SO₂(C₁ ~ C₁₀ アルキル基)、-SO₂(フェニル基)、-SO₂(C₁ ~ C₁₀ ハロゲン化アルキル基)、-SO₂

30

40

50

NH₂、-SO₂NH(C₁~C₁₀アルキル基)、-SO₂NH(フェニル基)、-NH
HSO₂(C₁~C₁₀アルキル基)、-NH₂SO₂(フェニル基)及び-NHSO₂(
C₁~C₁₀ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の
置換基を有してもよい、請求項18又は19に記載の複合体。

【請求項21】

各n₁は、いずれも0であり、各R_iは、独立して、共有結合であるか、又は結合基の
C₁~C₂₀アルキレン基、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合
、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、1,2,3-ト
リアゾールサブユニット、ポリエチレングリコールサブユニット、ピロリジンサブユニッ
ト、2-オキソピロリジンサブユニット、フェニレン基、シクロヘキシレン基、2-スク
シンイミドサブユニット、2-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット
、ヌクレオチドサブユニットのうちの1つ又は複数の結合の組み合わせである、請求項2
0に記載の複合体。

10

【請求項22】

各R_iは、独立して、共有結合、ジスルフィド結合、プロピレンリン酸エステル基、2
-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット、又はGAUTリヌクレオチ
ドサブユニットのうちの1つ又は2つの結合の組み合わせである、請求項21に記載の複
合体。

【請求項23】

R_jは共有結合であり、m₀は1である、請求項18~22のいずれか一項に記載の複
合体。

20

【請求項24】

R_jは、結合基であり、前記結合基R_jは、主鎖部分、側鎖部分及び複合結合部を含み
、前記主鎖部分は、それぞれ、前記複合結合部及び前記側鎖部分に結合され、各前記側鎖
部分は、それぞれ、前記主鎖部分及び前記R_{AP}基に結合され、各前記複合結合部は、そ
れぞれ、前記主鎖部分及び前記機能性基A₀に結合され、

前記主鎖部分は、長さが1~70個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは
、前記直鎖アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、C(O)、NH、O、S、CH
=N、S(O)₂、OP(O)₂、C₅~C₈グリコシド基、C₂~C₁₀アルケニレン
基、C₂~C₁₀アルキニレン基、C₆~C₁₀アリーレン基、C₃~C₁₈ヘテロシクリ
レン基及びC₅~C₁₀ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置
換され、前記直鎖アルキレン基は、C₁~C₁₀アルキル基、C₆~C₁₀アリール基、
C₅~C₁₀ヘテロアリール基、C₁~C₁₀ハロゲン化アルキル基、-OC₁~C₁₀ア
ルキル基、-OC₁~C₁₀アルキルフェニル基、-C₁~C₁₀アルキル-OH、-O
C₁~C₁₀ハロゲン化アルキル基、-SC₁~C₁₀アルキル基、-SC₁~C₁₀アル
キルフェニル基、-C₁~C₁₀アルキル-SH、-SC₁~C₁₀ハロゲン化アルキル
基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁~C₁₀アルキル-NH₂、-
N(C₁~C₁₀アルキル)(C₁~C₁₀アルキル基)、-NH(C₁~C₁₀アルキル
基)、-N(C₁~C₁₀アルキル)(C₁~C₁₀アルキルフェニル基)、-NH(C₁
~C₁₀アルキルフェニル基)、シアノ、ニトロ、-CO₂H、-C(O)O(C₁~C
10アルキル基)、-CON(C₁~C₁₀アルキル基)(C₁~C₁₀アルキル基)、-
CONH(C₁~C₁₀アルキル基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁~C₁₀ア
ルキル基)、-NHC(O)(フェニル基)、-N(C₁~C₁₀アルキル)C(O)(
C₁~C₁₀アルキル基)、-N(C₁~C₁₀アルキル)C(O)(フェニル基)、-
C(O)C₁~C₁₀アルキル基、-C(O)C₁~C₁₀アルキルフェニル基、-C(
O)C₁~C₁₀ハロゲン化アルキル基、-OC(O)C₁~C₁₀アルキル基、-SO₂
(C₁~C₁₀アルキル基)、-SO₂(フェニル基)、-SO₂(C₁~C₁₀ハロゲン
化アルキル基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁~C₁₀アルキル基)、-SO₂
NH(フェニル基)、-NHSO₂(C₁~C₁₀アルキル基)、-NHSO₂(フェニ
ル基)及び-NHSO₂(C₁~C₁₀ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択され

30

40

50

るいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよく、

各前記側鎖部分は、独立して、共有結合であるか、又は長さが1～70個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、OP(O)₂、C₅～C₈グリコシド基、C₂～C₁₀アルケニレン基、C₂～C₁₀アルキニレン基、C₆～C₁₀アリーレン基、C₃～C₁₈ヘテロシクリレン基及びC₅～C₁₀ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、C₁～C₁₀アルキル基、C₆～C₁₀アリール基、C₅～C₁₀ヘテロアリール基、C₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基、-OC₁～C₁₀アルキル基、-OC₁～C₁₀アルキルフェニル基、
 -C₁～C₁₀アルキル-OH、-OC₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基、-SC₁～C₁₀アルキル基、-SC₁～C₁₀アルキルフェニル基、-C₁～C₁₀アルキル-SH、
 -SC₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、-NH₂、
 -C₁～C₁₀アルキル-NH₂、-N(C₁～C₁₀アルキル)(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -NH(C₁～C₁₀アルキル基)、-N(C₁～C₁₀アルキル)(C₁～C₁₀アルキルフェニル基)、
 -NH(C₁～C₁₀アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、-CO₂H、
 -C(O)O(C₁～C₁₀アルキル基)、-CON(C₁～C₁₀アルキル基)(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -CONH(C₁～C₁₀アルキル基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -NHC(O)(フェニル基)、-N(C₁～C₁₀アルキル)C(O)(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -N(C₁～C₁₀アルキル)C(O)(フェニル基)、-C(O)C₁～C₁₀アルキル基、
 -C(O)C₁～C₁₀アルキルフェニル基、-C(O)C₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基、
 -OC(O)C₁～C₁₀アルキル基、-SO₂(C₁～C₁₀アルキル基)、-SO₂(フェニル基)、
 -SO₂(C₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -SO₂NH(フェニル基)、-NH₂SO₂(C₁～C₁₀アルキル基)、
 -NH₂SO₂(フェニル基)及び-NH₂SO₂(C₁～C₁₀ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよく、

各前記複合結合部は、独立して、共有結合であるか、又は結合構造のC₁～C₁₀アルキレン基、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、1,2,3-トリアゾールサブユニット、ポリエチレングリコールサブユニット、ピロリジンサブユニット、2-オキソピロリジンサブユニット、フェニレン基、シクロヘキシレン基、2-スクシンイミドサブユニット、2-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット、ヌクレオチドサブユニットのうちの1つ又は複数の結合の組み合わせである、請求項18～22のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項25】

前記結合基R_j中の各前記複合結合部は、それぞれ、前記主鎖部分及び1つの前記機能性基A₀に結合され、前記側鎖部分は、n₀個であり、各側鎖部分は、それぞれ、前記主鎖部分及び1つの前記R_{AP}基に結合される、請求項24に記載の複合体。

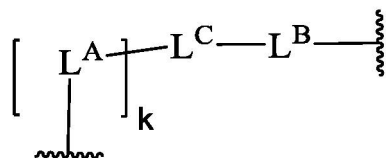
【請求項26】

全ての前記側鎖部分は、前記主鎖部分中の同じ原子に結合され、或いは、各前記側鎖部分は、前記主鎖部分中の異なる原子に結合される、請求項24又は25に記載の複合体。

【請求項27】

m₀は1であり、前記結合基R_jは、式(301)に示される構造を含み、

【化3】



式(301)

式中、 k は、1～3の整数であり、 L^C は、前記主鎖部分であり、 L^A は、前記側鎖部分であり、 L^B は、前記複合結合部であり、



は、基が共有結合的に結合する部位を表し、

前記主鎖部分 L^C は、共有結合又は2～4価、直鎖又は分岐鎖の $C_1 \sim C_{25}$ 飽和炭化水素基であり、或いは、前記飽和炭化水素基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 NH 、 O 、 S 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_5$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_5$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記飽和炭化水素基は、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $-O-C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル-OH、 $-SC_1 \sim C_5$ アルキル基、ニトロ、 $-C(O)O(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_5$ アルキル)($C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH SO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)及び $-NH SO_2$ (フェニル基)からなる群から選択される1つ又は複数の置換基を有してもよく、

各前記側鎖部分は、独立して、共有結合であるか、又は長さが1～70個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 NH 、 O 、 S 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_{18}$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル-OH、 $-OC_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル-SH、 $-SC_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル-NH₂、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル)($C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル)($C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基)、 $-NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)($C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NH SO_2$ (フェニル基)及び $-NH SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよく、

10

20

30

40

50

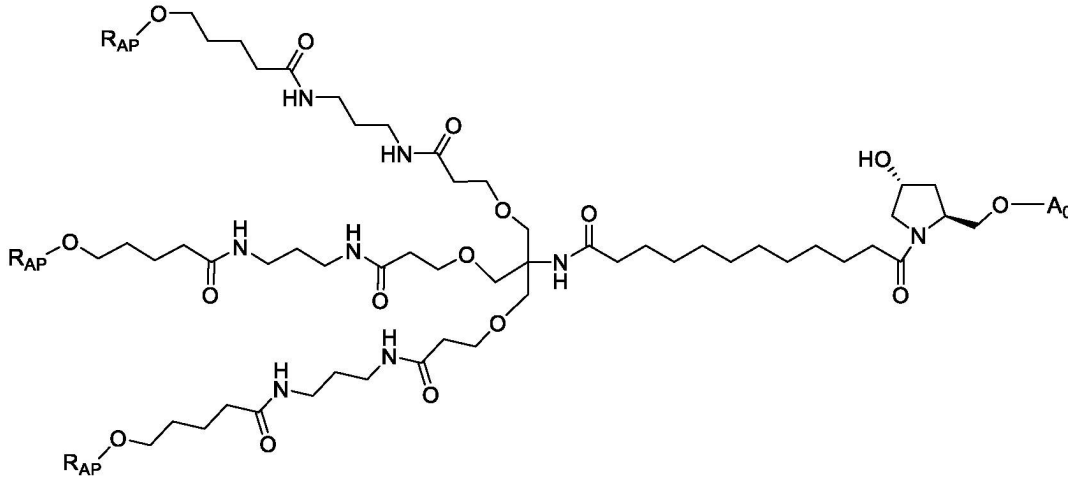
各前記複合結合部は、独立して、共有結合であるか、又は結合構造のC₁~C₁₀アルキレン基、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、1,2,3-トリアゾールサブユニット、ポリエチレングリコールサブユニット、ピロリジンサブユニット、2-オキソピロリジンサブユニット、フェニレン基、シクロヘキシレン基、2-スクシンイミドサブユニット、2-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット、ヌクレオチドサブユニットのうちの一つ又は複数の結合の組み合わせである、請求項26に記載の複合体。

【請求項28】

式(305)に示される構造を有する、請求項27に記載の複合体。

10

【化4】



20

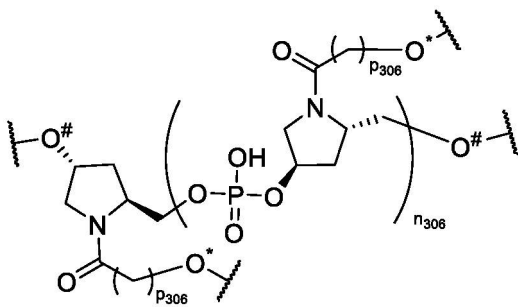
式(305)

【請求項29】

前記結合基R_jは、式(306)に示される構造を有し、

【化5】

30



式(306)

40

式中、n₃₀₆は、0~3の整数であり、各p₃₀₆は、独立して、1~6の整数であり、

~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表し、\*でマークされた酸素原子は、前記R<sub>AP</sub>基とリン酸エステル結合、エーテル結合又はエステル結合を形成し、#でマークされた酸素原子のうち少なくとも一つは、前記機能性基A<sub>0</sub>とエーテル結合、エステル結合又はリン酸エステル結合を形成して結合され、#でマークされた残りの酸素原子は、水素原子と結合してヒドロキシル基を形成するか、又はC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキル基と結合してC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>

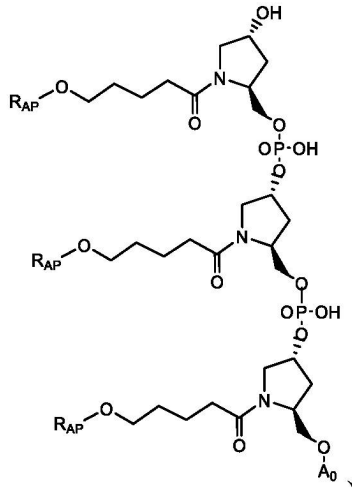
50

アルコキシ基を形成する、請求項 27 に記載の複合体。

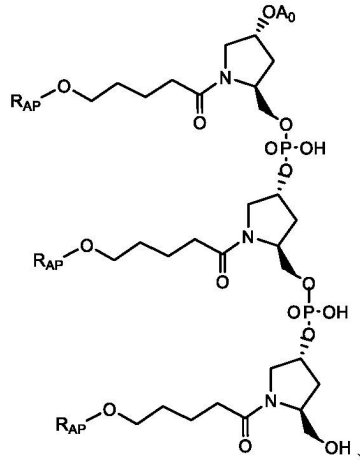
【請求項 30】

式 (307a)、(307b) 又は (307c) に示される構造を有する、請求項 29 に記載の複合体。

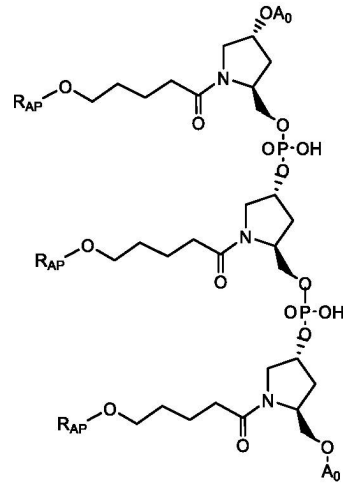
【化 6】



式 (307a)



式 (307b)



式 (307c)

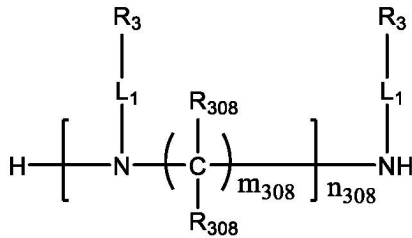
10

20

【請求項 31】

式 (308) に示される構造を有し、

【化 7】



式 (308)

式中、

$n_{308}$  は、1 ~ 10 から選択される整数であり、

各  $m_{308}$  は、独立して、2 ~ 10 から選択される整数であり、

各  $R_{308}$  は、それぞれ独立して、H、 $C_1 \sim C_{10}$  アルキル基、 $C_1 \sim C_{10}$  ハロゲン化アルキル基又は  $C_1 \sim C_{10}$  アルコキシ基であり、

各  $R_3$  は、独立して、前記機能性基  $A_0$  であるか、又は前記  $R_{AP}$  基であり、かつ少なくとも 1 つの  $R_3$  は、前記機能性基  $A_0$  であり、かつ少なくとも 1 つの  $R_3$  は、前記  $R_{AP}$  基であり、或いは、1 つの  $R_3$  は、前記機能性基  $A_0$  であり、残りの  $R_3$  は、前記  $R_{AP}$  基であり、

40

前記機能性基  $A_0$  に結合された各  $L_1$  は、前記複合結合部を表し、前記  $R_{AP}$  に結合された各  $L_1$  は、前記側鎖部分を表す、請求項 27 に記載の複合体。

【請求項 32】

各  $L_1$  は、基  $L_4 \sim L_{23}$  及びその任意の結合の組み合わせからなる群から独立して選択される、請求項 31 に記載の複合体。

【請求項 33】

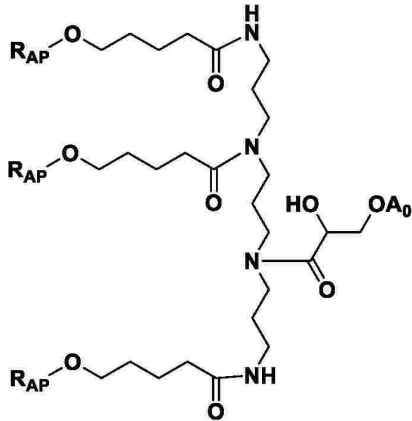
各  $L_1$  は、基  $L_4 \sim L_9$ 、 $L_{13}$ 、 $L_{14}$ 、 $L_{18}$  のうちの少なくとも 2 つの結合の組み合わせからなる群から独立して選択され、或いは、各  $L_1$  は、独立して、基  $L_4$ 、 $L_5$ 、 $L_7$ 、 $L_9$ 、 $L_{13}$ 、 $L_{14}$ 、 $L_{18}$  のうちの少なくとも 2 つの結合の組み合わせであ

50

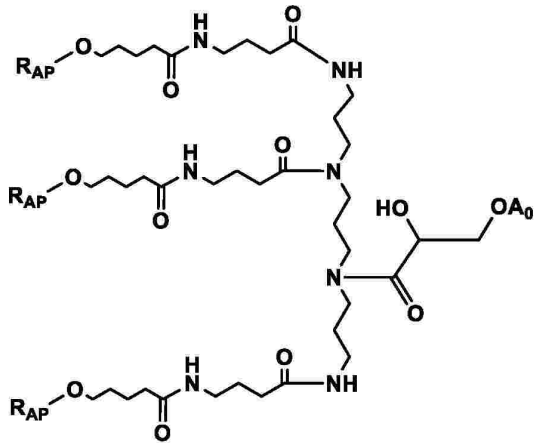


09)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)、(422)、(423)、(424)、(425)、(426)又は(427)に示される構造を有する、請求項31～39のいずれか一項に記載の複合体。

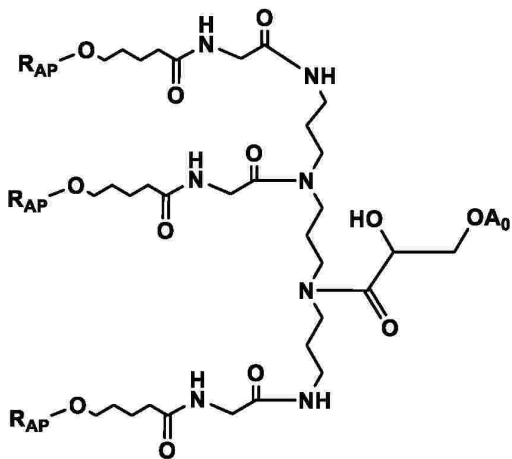
【化9】



式(403)



式(404)



式(405)

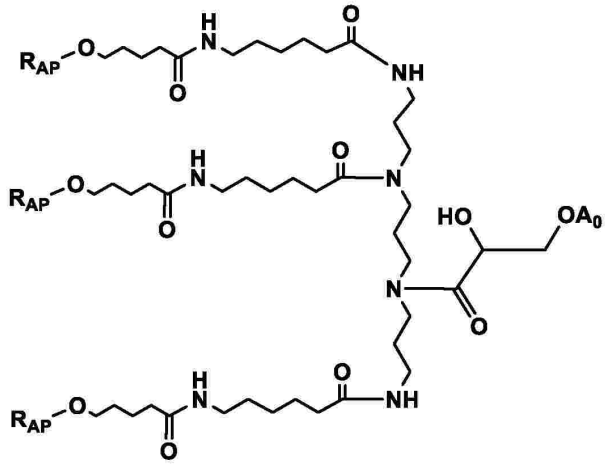
10

20

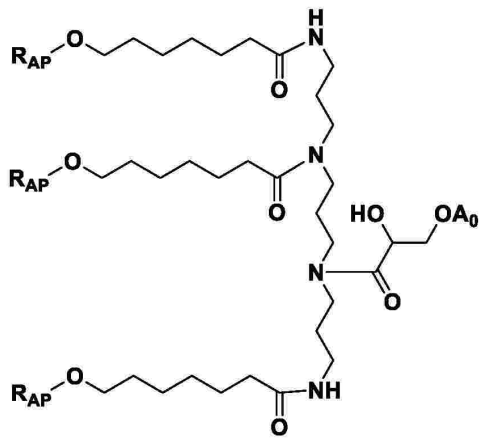
30

40

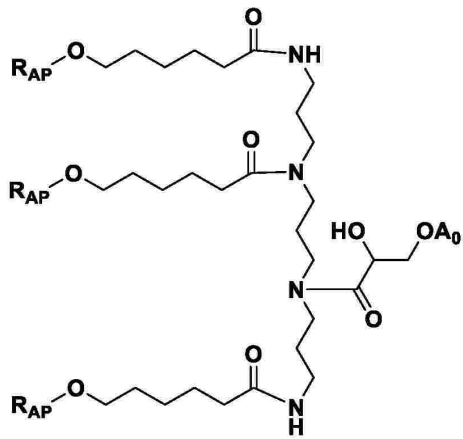
50



式 (406)



式 (407)



式 (408)

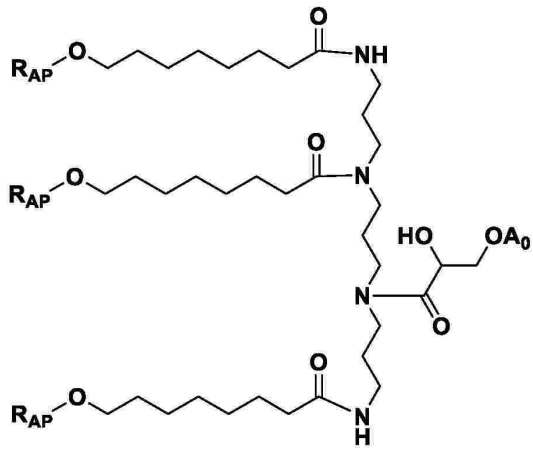
10

20

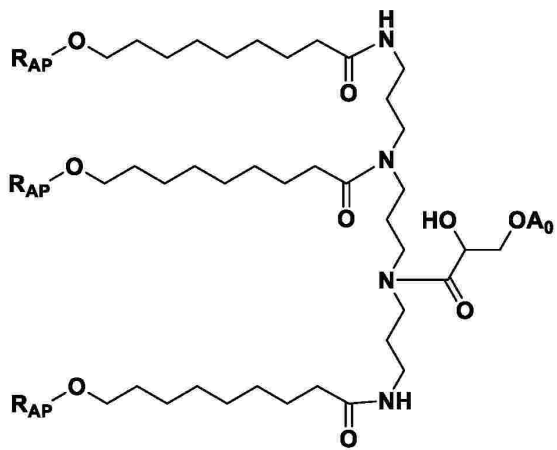
30

40

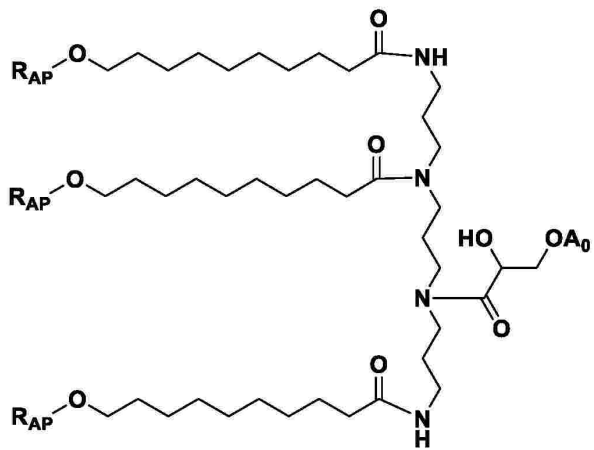
50



式 (409)



式 (410)



式 (411)

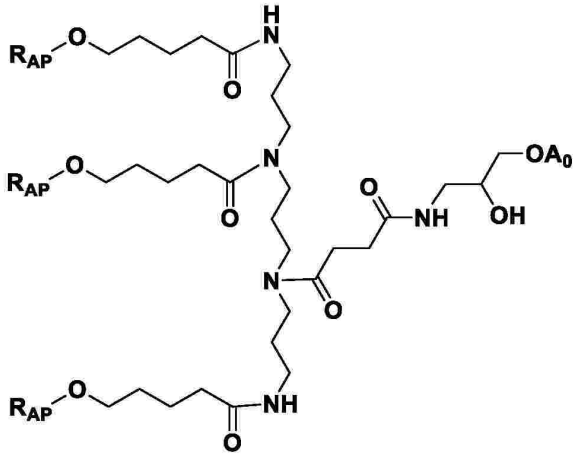
10

20

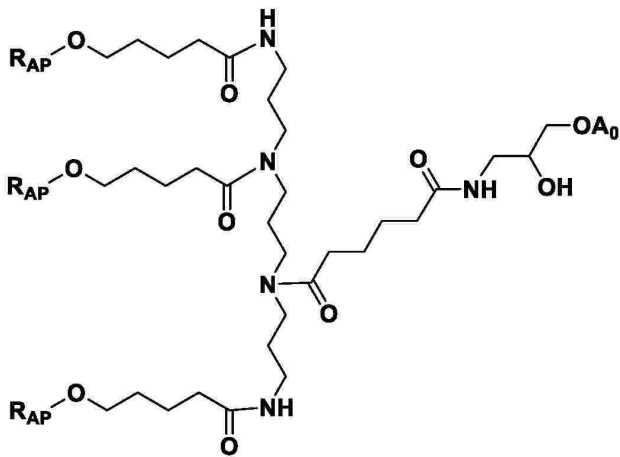
30

40

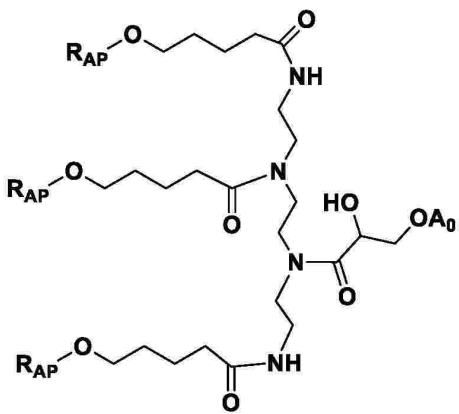
50



式 (412)



式 (413)



式 (414)

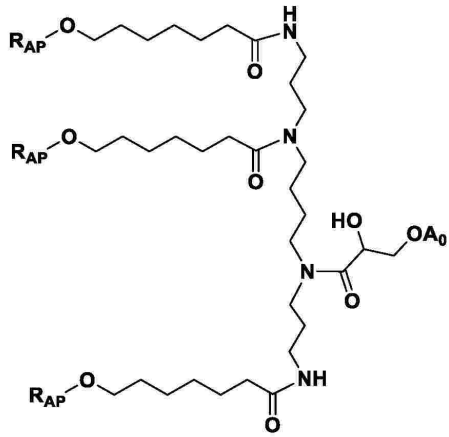
10

20

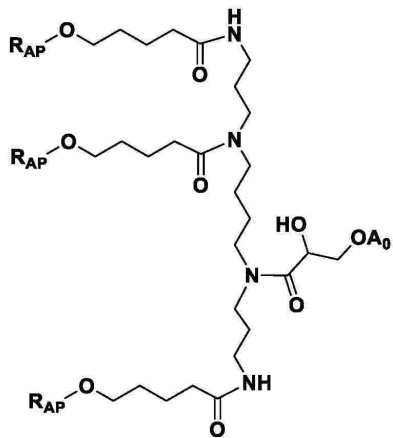
30

40

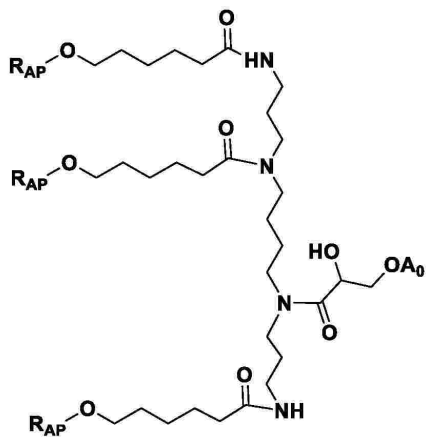
50



式 (415)



式 (416)



式 (417)

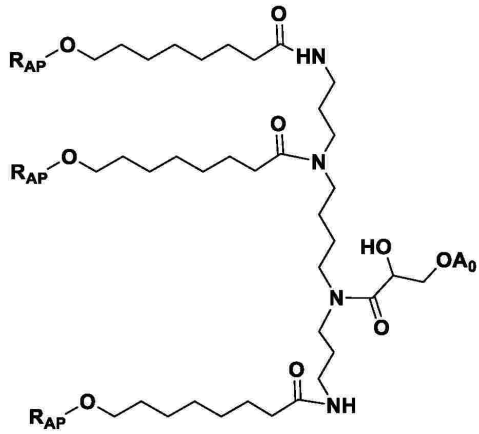
10

20

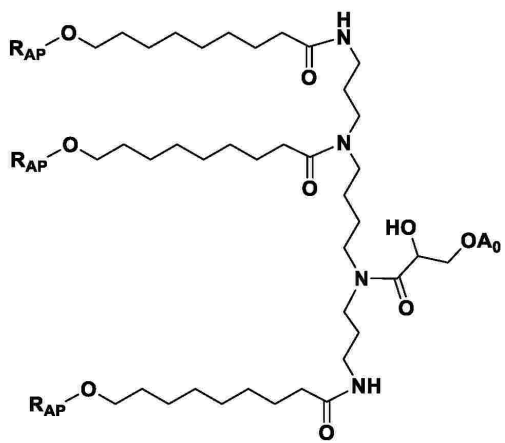
30

40

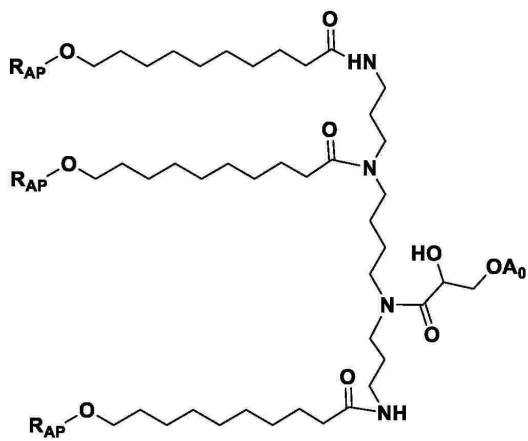
50



式 (418)



式 (419)



式 (420)

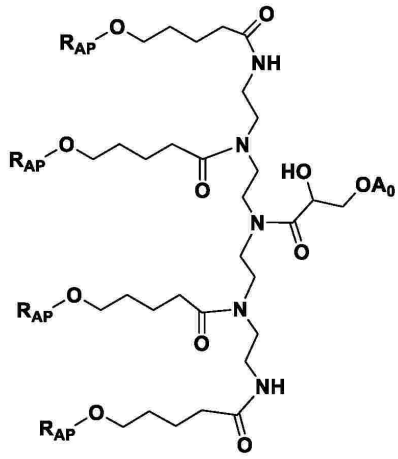
10

20

30

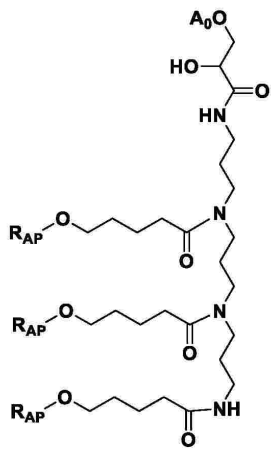
40

50



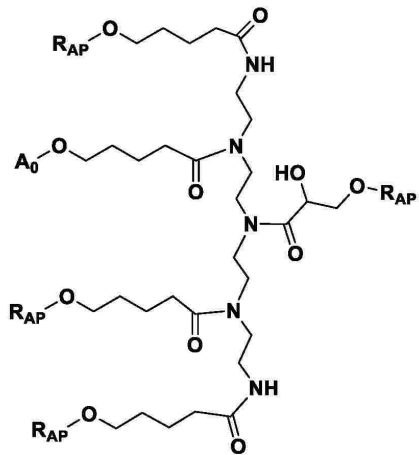
式 (421)

10



式 (422)

20

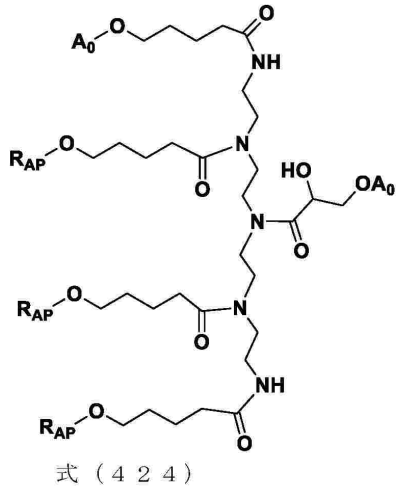


式 (423)

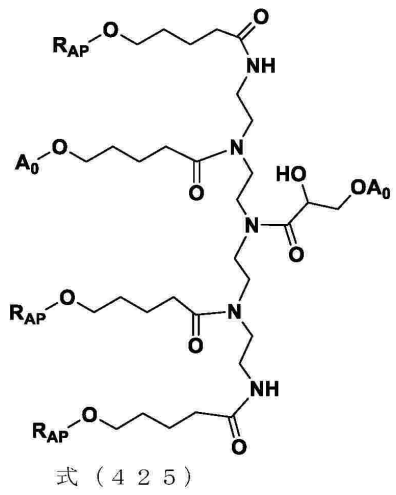
30

40

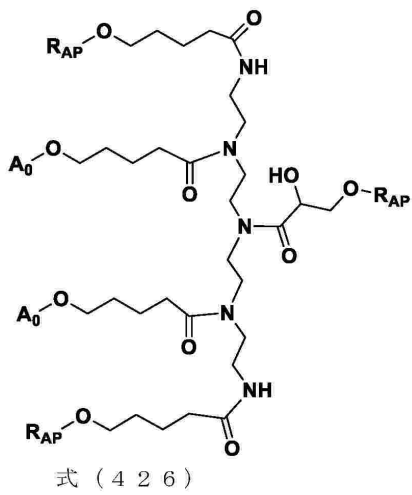
50



10



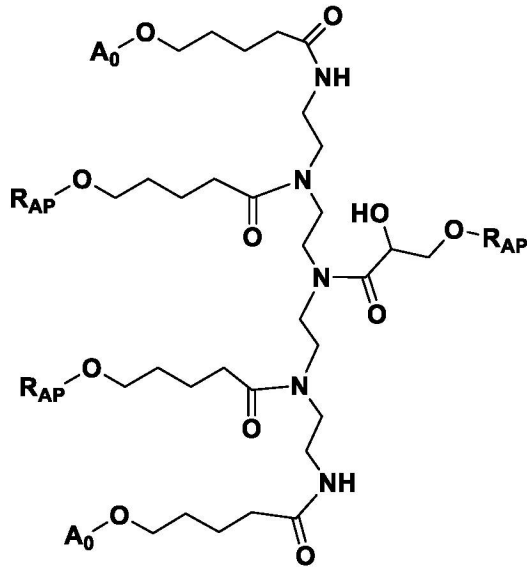
20



30

40

50



式 ( 4 2 7 )

10

## 【請求項 4 1】

R<sub>j</sub> は、ヌクレオチド配列 I 及びヌクレオチド配列 II を含み、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、5 ~ 25 個の修飾又は非修飾のヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、少なくとも部分的に逆相補的であり、前記送達基は、前記ヌクレオチド配列 I に結合され、前記機能性基は、前記ヌクレオチド配列 II に結合され、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、被験者の体内で免疫反応又は毒性反応を誘発しない、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項に記載の複合体。

20

## 【請求項 4 2】

前記送達基の 3' 末端は、リン酸エステル結合を介して前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合され、前記機能性基は、前記ヌクレオチド配列 II の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合され、或いは、前記機能性基は、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列の 3' 末端は、リン酸エステル結合を介して前記ヌクレオチド配列 II の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合される、請求項 4 1 に記載の複合体。

30

## 【請求項 4 3】

前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、長さが等しく、かついずれも 10 ~ 20 個の修飾又は非修飾のヌクレオチドであり、或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、いずれも 17 個のヌクレオチドからなり、かつ完全に逆相補的であり、或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、配列番号 40 及び配列番号 41 に示される配列

40

5' - GUACA UUCUAGA UAGCC - 3' (配列番号 40)

5' - GGCUAUCUAGAAUGUAC - 3' (配列番号 41)

を有し、

或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列

5' - GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf - 3' (配列番号 42)

5' - GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf - 3' (配列番号 43)

を有する、請求項 4 2 に記載の複合体。

50

## 【請求項 4 4】

R<sub>j</sub> は分解可能である、請求項 1 8 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の複合体。

## 【請求項 4 5】

各前記低分子治療剤基は、細胞毒素基、抗生物質基又は血管新生阻害剤から独立して選択される、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の複合体。

## 【請求項 4 6】

前記低分子治療剤基は、低分子治療剤のメトトレキサート、ドキシソルピシン、ピンカアルカロイド、オーリスタチン、カリケアミシン、メイタンシン、カンプトテシン、及びカリチアマイシンのうちの 1 つから 1 つ若しくは複数の水素原子又は 1 つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成される、請求項 4 5 に記載の複合体。

10

## 【請求項 4 7】

前記低分子治療剤基は、モノメチルオーリスタチン E (MMAE) から 1 つ若しくは複数の水素原子又は 1 つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成される基である、請求項 4 6 に記載の複合体。

## 【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の複合体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

## 【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の複合体及び / 又は請求項 4 8 に記載の医薬組成物の、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を治療する薬物の製造における使用。

20

## 【請求項 5 0】

前記腫瘍は、神経膠腫、腎臓癌、及び肺癌のうちの 1 つ又は複数である、請求項 4 9 に記載の使用。

## 【請求項 5 1】

有効量の請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の複合体及び / 又は請求項 4 8 に記載の医薬組成物を、必要な被験者に投与する工程を含む、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状の治療方法。

## 【請求項 5 2】

前記腫瘍は、神経膠腫、腎臓癌、及び肺癌のうちの 1 つ又は複数である、請求項 5 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 5 3】

請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の複合体及び / 又は請求項 4 8 に記載の医薬組成物を含む、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本開示は、アプタマーに基づく送達基及び機能性基を含む複合体並びに医薬組成物に関する。本開示はまた、これらの複合体及び医薬組成物の製造方法及び使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

40

腫瘍とは、生体が各種の腫瘍形成因子の作用下で、局所組織細胞が増殖して形成された新生物を指す。腫瘍細胞が転移して周囲組織に侵入した状態を、悪性腫瘍と称する。腫瘍を生成する由来組織細胞によって分類すると、一般的には、上皮細胞から発生する悪性腫瘍（癌）、間葉系組織細胞から発生する悪性腫瘍（肉腫）、血液幹細胞から発生する悪性腫瘍（白血病など）、神経膠細胞から発生する悪性腫瘍（神経膠腫）などに分類される。神経膠腫は、最も一般的な頭蓋内原発性悪性腫瘍であり、脳腫瘍の約 4 0 % ~ 5 0 % を占め、世界中の年発症率は、1 0 万人当たり 3 ~ 8 例である。WHO の病理学的分類基準によれば、神経膠腫は、神経上皮腫瘍に属し、例えば毛様細胞性星状細胞腫、びまん性星状細胞腫、未分化星状細胞腫、膠芽腫、乏突起膠細胞腫、未分化乏突起膠細胞腫などを含むがこれらに限定されない、複数の病理タイプを含む。

50

## 【 0 0 0 3 】

現在、本分野における腫瘍、特に神経膠腫に対する治療の重要な問題の1つは、どのように治療剤を腫瘍組織及び細胞内に特異的に送達して、これらの治療剤が適切な時間に適切な方式で、対応する治療効果を生じるようにするかということである。

## 【 0 0 0 4 】

アプタマー又は核酸アプタマーとは、低分子化合物、タンパク質、核酸、ひいては細胞、組織及び器官などの様々な標的分子に結合できる、オリゴヌクレオチド分子である。アプタマーは、「特定の分子を認識する」という重要な特性を提供することができるため、抗体と同様に生物学的技術及び治療などによく使用される。アプタマーは、試験管において設計され、化学的方法によって迅速に合成できるとともに、保存しやすく、免疫原性が低い又は免疫原性がないという優れた性質を有するため、近年、本分野の研究者から注目を集めている。しかしながら、腫瘍標的送達に適したアプタマーは、本分野において更なる開発及び使用が依然として必要とされている。

10

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 5 】

本開示の発明者らは、腫瘍細胞、特に神経膠腫細胞を特異的に標的とすることができる複合体を予想外に発見した。当該複合体は、腫瘍細胞、特に神経膠腫細胞に対して高い特異性を示し、それにより、腫瘍細胞、特に神経膠腫細胞に効果的に濃縮して効果的な標的治療を行うことができる。そこで、本発明者らは、以下の発明を行った。

20

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 6 】

一態様において、本開示は、複合体を提供する。当該複合体は、1つ又は複数の送達基及び1つ又は複数の機能性基を含み、前記送達基は、1つのアプタマーから1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成され、前記アプタマーは、連続したヌクレオチド配列を含み、隣接する2つのヌクレオチドを結合する基は、独立して、リン酸エステル基であるか、又は修飾基を有するリン酸エステル基であり、各ヌクレオチドは、修飾又は非修飾のA、U、C又はGのうちの1つから選択され、前記連続したヌクレオチド配列は、式(1)に示される配列を有し、

$$5' - T_1 - S_1 - N_a - S_2 - N_b - S_3 - N_c - S_4 - T_2 - 3' \quad \text{式(1)}$$

30

ここで、 $T_1$ は、1～3個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 $T_2$ は、0～15個のヌクレオチドからなるモチーフであり、かつ $T_2$ には $T_1$ と完全に逆相補的なモチーフが含まれておらず、

$S_1$ 及び $S_4$ は、それぞれ、3～7個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 $S_1$ は、 $S_4$ と長さが同じであり、かつ完全に逆相補的であり、

$N_a$ 及び $N_c$ は、それぞれ、1～4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 $N_a$ 中の各ヌクレオチドは、 $N_c$ 中の各ヌクレオチドといずれも相補的ではなく、かつ $N_a$ 及び $N_c$ 中のUの総数は、 $N_a$ 及び $N_c$ 中の全てのヌクレオチドの総数の50%以上を占め、

$S_2$ 及び $S_3$ は、それぞれ、1～4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 $S_2$ は、 $S_3$ と長さが同じであり、かつ完全に逆相補的であり、

40

$N_b$ は、3～6個のヌクレオチドからなるモチーフであり、かつ $N_b$ の両端のヌクレオチド間は、AU又はGCの相補を形成しておらず、

各前記送達基は、独立して、前記機能性基と共有結合を介して結合されるか、又は結合基を介して結合され、各前記機能性基は、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基から選択される。

## 【 0 0 0 7 】

別の態様において、本開示は更に、本開示に記載の複合体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 0 8 】

更に別の態様において、本開示は更に、本開示に記載の複合体及び/又は医薬組成物の

50

、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を治療する薬物の製造における使用を提供する。

【0009】

更に別の態様において、本開示は更に、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を治療する方法を提供する。前記方法は、有効量の本開示に記載の複合体及び/又は医薬組成物を、必要な被験者に投与する工程を含む。

【0010】

更に別の態様において、本開示は更に、本開示に記載の複合体及び/又は医薬組成物を含むキットを提供する。

【0011】

引用による組み込み

本明細書で言及される全ての出版物、特許及び特許出願は、各々の出版物、特許又は特許出願が特別にかつ個別に引用により本開示に組み込まれるのと同じ程度に、引用により本開示に組み込まれる。

【発明の効果】

【0012】

本開示に係る複合体及び医薬組成物は、腫瘍、特に神経膠腫組織及び細胞を標的とする優れた能力を有し、腫瘍及び腫瘍関連疾患及び/又は症状を顕著に治療又は緩和することができる。

【0013】

一態様において、本開示に係る複合体における送達基は、低分子毒素基などの各種の低分子薬物基を特異的に腫瘍組織に送達することができ、かつ優れた腫瘍阻害効果を示すことができる。例えば、本開示の複合体は、MMAEを異なる腫瘍組織に効果的に送達することができ、腫瘍標的能力を示すとともに、MMAE分子が他の組織に分布することによる毒性リスクを低減し、かつ各種の投与方式は、いずれも腫瘍体積の増加速度及び腫瘍重量を効果的に阻害することができ、これにより、本開示の複合体が腫瘍増殖を効果的に阻害できることが示されている。また、複合体の投与量を更に高めたところ、試験中の腫瘍体積がほとんど増加せず、より優れた抗腫瘍効果が示されている。

【0014】

更に、本開示の発明者らは、本開示の複合体及び/又は医薬組成物が血液脳関門を効率的に通過することができ、全身投与の場合に、脳内の神経膠腫を標的とすることができ、かつ腫瘍体積の増加を顕著に阻害し、ひいては初期体積の1/10以下に低下させ、ひいては対照群に比べて1/100以下に低下させることができることを予想外に発見した。これにより、本開示の複合体が血液脳関門を効果的に透過して脳神経膠腫を効率的に標的として進入することができ、腫瘍成長を阻害する優れた効果を有し、良好な治療コンプライアンス及び腫瘍を効率的に阻害する高い創薬可能性を示すことが示されている。

【0015】

これにより分かるように、本開示の複合体は、腫瘍増殖を顕著に効果的に阻害することができ、良好な応用の見通しを有する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A-1C】異なる複合体投与1h、24h及び48h後のマウス体内の蛍光イメージング結果を示す写真である。

【図1D】D5にマウスを殺した後の各群のマウスの腫瘍組織及び腎臓の蛍光シグナルイメージングの写真である。

【図2A-2C】異なる複合体投与1h、24h及び48h後のマウス体内の蛍光イメージング結果を示す写真である。

【図2D】D6にマウスを殺した後の各群のマウスの腫瘍組織及び腎臓の蛍光シグナルイメージングの写真である。

【図3】本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の各群のマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

10

20

30

40

50

【図4】それぞれ、異なる複合体投与後の、投与24h及び48h後のU118MGのin-situ腫瘍モデルを構築したマウス脳組織の蛍光イメージングの写真である。

【図5】本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MGのin-situ腫瘍モデルマウスにおける腫瘍光強度値の経時変化を示す折れ線グラフである。

【図6】本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MG皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

【図7】異なる濃度の本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MG皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

【図8】異なる濃度の本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MG皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

10

【図9】異なる濃度の本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、A549皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本開示の具体的な実施形態を詳細に説明する。ここで記述した具体的な実施形態は、本開示を説明し解釈するためのものに過ぎず、本開示を限定するものではないことを理解されたい。

【0018】

定義

本開示において、特に説明しない限り、A、U、C、G及びTとは、それぞれ、アデニンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド及びチミンヌクレオチドを指し、2-メチルシトシンヌクレオチドとは、シトシンヌクレオチドにおけるシトシン塩基上の2'位の水素がメチル基で置換されたヌクレオチドを指す。これらのヌクレオチドの構造は、当業者に周知である。本開示で用いられる場合、「核酸モチーフ」又は「モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドにおける核酸配列断片であり、1つ又は複数のヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態において、モチーフは、生物学的機能を有する核酸配列断片である。

20

【0019】

本開示で使用される場合、「アルキル基」とは、特定の数の炭素原子を有する直鎖と分岐鎖飽和炭化水素基を指し、前記数は、一般的に、1~20個の炭素原子、例えば、1~8個又は1~6個の炭素原子などの1~10個の炭素原子である。例えば、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基は、1~6個の炭素原子を含む直鎖及び分岐鎖アルキル基を指す。特定の数の炭素を有するアルキル残基に言及する場合、当該数の炭素を有する全ての分岐鎖及び直鎖形態を含むことを意図する。したがって、例えば、「ブチル基」は、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基及びtert-ブチル基を含むことを意味し、「プロピル」は、n-プロピル基及びイソプロピル基を含む。アルキレン基は、アルキル基のサブセットであり、アルキル基と同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

30

【0020】

本開示で用いられる場合、「アルケニル基」とは、親アルキル基の隣接する炭素原子から1分子の水素を除去して得られる炭素-炭素二重結合を1つ又は複数有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキル基を指す。当該基は、二重結合のシス又はトランス配置にあってもよい。典型的なアルケニル基としては、ビニル基と、プロパ-1-エン-1-イル、プロパ-1-エン-2-イル、プロパ-2-エン-1-イル(アリル基)、プロパ-2-エン-2-イルなどのプロペニル基と、ブタ-1-エン-1-イル、ブタ-1-エン-2-イル、2-メチルプロパ-1-エン-1-イル、ブタ-2-エン-1-イル、ブタ-2-エン-2-イル、ブタ-1,3-ジエン-1-イル、ブタ-1,3-ジエン-2-イルなどのブテニル基とを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、アルケニル基は、2~20個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、2~10個、2~8個又は2~6個の炭素原子を有する。アルケニレン基は、アルケニル基のサブセットであり、アルケニル基と同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

40

50

## 【0021】

本開示で用いられる場合、「アルキニル基」とは、親アルキル基の隣接する炭素原子から2分子の水素を除去することによって得られる炭素-炭素三重結合を1つ又は複数有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキル基を指す。典型的なアルキニル基としては、エチニル基と、プロパ-1-イン-1-イル、プロパ-2-イン-1-イルなどのプロピニル基と、ブタ-1-イン-1-イル、ブタ-1-イン-3-イル、ブタ-3-イン-1-イルなどのブチニル基とを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、アルキニル基は、2~20個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、2~10個、2~8個又は2~6個の炭素原子を有する。アルキニレン基は、アルキニル基のサブセットであり、アルキニル基と同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

10

## 【0022】

本開示で用いられる場合、「ヘテロ環基」とは、2~12個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される1~6個のヘテロ原子とを含む、安定した3~18員非芳香族環式基を指す。明細書において特に説明がない限り、ヘテロ環基は、単環、二環、三環又は四環の環系であり、縮合環又は架橋環系を含んでもよい。ヘテロ環基中のヘテロ原子は、酸化されたヘテロ原子であってもよい。1つ又は複数の窒素原子(存在する場合は、4級化された窒素原子であってもよい。ヘテロ環基は、一部飽和又は完全飽和である。ヘテロ環基は、任意の環原子を介して分子の残りの部分に結合することができる。このようなヘテロ環基の例としては、ジオキサニル基、チオフェニル[1,3]ジスルホニル基(thienyl[1,3]dithianyl)、デカヒドロイソキノリニル基、イミダゾリニル基、イミダゾリジニル基、イソチアゾリジニル基、イソオキサゾリジニル基、モルホリニル基、オクタヒドロインドール基、オクタヒドロイソインドール基、2-オキサピペラジニル基、2-オキサピペリジル基、2-オキサピロリジニル基、オキサゾリジニル基、ピペリジル基、ピペラジニル基、4-ピペリドニル基、ピロリジニル基、ピラゾリジニル基、キヌクリジニル基、チアゾリジニル基、テトラヒドロフリル基、トリスルホニル基(trithianyl)、テトラヒドロピラニル基、チオモルホリニル基(thiomorpholinyl)、チアモルホリニル基(thiamorpholinyl)、1-オキソチオモルホリニル基(1-oxo-thiomorpholinyl)及び1,1-ジオキソチオモルホリニル基(1,1-dioxo-thiomorpholinyl)を含むが、これらに限定されない。ヘテロシクリレン基は、ヘテロ環基のサブセット

20

30

## 【0023】

本開示で用いられる場合、「アリール基」とは、芳香族単環式又は多環式炭化水素環系から誘導される、環炭素原子から水素原子を除去することにより形成された基を指す。前記芳香族単環式又は多環式炭化水素環系は、水素及び6~18個の炭素原子の炭素のみを含有し、前記環系中の1つ又は複数の環は、完全不飽和であり、即ち、ヒュッケル理論に従う環状、非局在化( $4n+2$ )-電子系を含む。アリール基としては、フェニル基、フルオレニル基及びナフチル基などの基を含むが、これらに限定されない。アリーレン基は、アリール基のサブセットであり、アリール基と同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

40

## 【0024】

「ヘテロアリール基」とは、2個~17個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される1~6個のヘテロ原子とを含む、3~18員芳香環ラジカルから誘導される基を指す。本開示で用いられる場合、ヘテロアリール基は、単環、二環、三環又は四環の環系であってもよく、この環系中の1つ又は複数の環は、完全不飽和であり、即ち、ヒュッケル理論に従う環状、非局在化( $4n+2$ )-電子系を含む。ヘテロアリール基は、縮合環又は架橋環系を含む。ヘテロアリール基中のヘテロ原子は、酸化されたヘテロ原子であってもよい。1つ又は複数の窒素原子(存在する場合は、4級化された窒素原子であってもよい。ヘテロアリール基は、任意の環原子を介して分子の残りの部分に結合される。ヘテロアリール基の実例としては、アゼピニル基、アクリジニル基、ベンゾイミダゾリル基

50

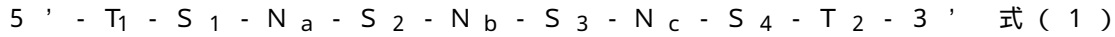
、ベンゾインドール基、1,3-ベンゾジオキサゾリル基、ベンゾフリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾ[d]チアゾリル基、ベンゾチアジアゾリル基、ベンゾ[b][1,4]ジオキセピニル基(benzo[b][1,4]dioxepiny l)、ベンゾ[b][1,4]オキサジニル基(benzo[b][1,4]oxaziny l)、1,4-ベンゾジオキサニル基(1,4-benzodioxany l)、ベンゾナフトフリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾジオキサゾリル基(benzodioxoly l)、ベンゾジオキシニル基(benzodioxiny l)、ベンゾピラニル基、ベンゾピロニル基、ベンゾフリル基、ベンゾフラノニル基、ベンゾチオフェニル基、ベンゾチエノ[3,2-d]ピリミジニル基、ベンゾトリアゾリル基、ベンゾ[4,6]イミダゾ[1,2-a]ピリジル基、カルバゾリル基、シンノリル基(cinnoliny l)、シクロペンタ[d]ピリミジニル基、6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[4,5]チエノ[2,3-d]ピリミジニル基、5,6-ジヒドロベンゾ[h]キナゾリニル基(5,6-dihydrobenzo[h]quinazoliny l)、5,6-ジヒドロベンゾ[h]シンノリニル基(5,6-dihydrobenzo[h]cinnoliny l)、6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジニル基、ジベンゾフリル基、ジベンゾチオフェニル基、フリル基、フラノニル基、フロ[3,2-c]ピリジル基、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ[d]ピリミジニル基、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ[d]ピリダジニル基、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ[d]ピリジル基、イソチアゾリル基、イミダゾリル基、インダゾリル基(indazolyl)、インドール基、イソインドール基、インドリニル基、イソインドリニル基、イソキノリル基、インドリジニル基(indoliziny l)、イソオキサゾリル基、5,8-メタノ-5,6,7,8-tetrahydroquinazoliny l)、ナフチリジニル基(naphthyridiny l)、1,6-ナフチリジノニル基(1,6-naphthyridinony l)、オキサジアゾリル基、2-オキサゼピニル基(2-oxoazepiny l)、オキサゾリル基、オキシラニル基(oxirany l)、5,6,6a,7,8,9,10,10a-オクタヒドロベンゾ[H]キナゾリニル基、1-フェニル-1H-ピロリル基、フェナジニル基、フェノチアジニル基、フェノキサジニル基、フタラジニル基(phthalaziny l)、プテリジニル基(pteridiny l)、プリニル基、ピロリル基、ピラゾリル基、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジニル基、ピリジル基、ピリド[3,2-d]ピリミジニル基、ピリド[3,4-d]ピリミジニル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、ピロリル基、キナゾリニル基、キノキサリニル基(quinoxaliny l)、キノリル基、テトラヒドロキノリル基、5,6,7,8-テトラヒドロキナゾリニル基、5,6,7,8-テトラヒドロベンゾ[4,5]チエノ[2,3-d]ピリミジニル基、6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-シクロヘプタ[4,5]チエノ[2,3-d]ピリミジニル基、5,6,7,8-テトラヒドロピリド[4,5-c]ピリダジニル基、チアゾリル基、チアジアゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、トリアジニル基、チエノ[2,3-d]ピリミジニル基、チエノ[3,2-d]ピリミジニル基、チエノ[2,3-c]プリジニル基(thieno[2,3-c]pridiny l)、及びチオフェニル基(thiophenyl/thienyl)を含むが、これらに限定されない。ヘテロアリーレン基は、ヘテロアリール基のサブセットであり、ヘテロアリール基と同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

#### 【0025】

本開示に係る複合体

一態様において、本開示は、複合体を提供する。当該複合体は、1つ又は複数の送達基及び1つ又は複数の機能性基を含み、前記送達基は、前記アプタマーから1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成され、各前記送達基は、独立して、前記機能性基と共有結合を介して結合されるか、又は結合基を介して結合され、各前記機能性基は、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基から選択され

る。共有結合又は結合基を介して機能性基を結合して複合体を形成することにより、本開示の複合体は、機能性基を腫瘍に送達することができる。本開示に係る複合体において、送達基は、アプタマーから1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成され、前記アプタマーは、連続したヌクレオチド配列を含み、隣接する2つのヌクレオチドを結合する基は、独立して、リン酸エステル基であるか、又は修飾基を有するリン酸エステル基であり、各ヌクレオチドは、修飾又は非修飾のA、U、C又はGのうちの1つから選択され、前記連続したヌクレオチド配列は、式(1)に示される配列を有し、



ここで、 $T_1$ は、1~3個のヌクレオチドからなるモチーフである。本発明者らは、 $T_1$ の存在により、本開示に係る複合体が効率的な腫瘍標的効果を示すことを発見した。いくつかの実施形態において、 $T_1$ は、2つのヌクレオチドからなり、この場合、本開示に係る複合体は、より優れた腫瘍標的能力を有する。いくつかの実施形態において、 $T_1$ は、2つのヌクレオチドからなり、かつ少なくとも1つのCを含む。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、 $T_1$ は、CU、UC、又はACである。

#### 【0026】

$T_2$ は、0~15個のヌクレオチドからなるモチーフである。本発明者らは、これらのヌクレオチドの数及び各種のヌクレオチド配列を有する $T_2$ がいずれも本開示に係る複合体の腫瘍標的能力に顕著に影響しないことを発見した。いくつかの実施形態において、 $T_2$ は、0~10個のヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かつて、 $T_2$ は、Uから始まる1~9個のヌクレオチドからなり、この場合、アプタマーは、より優れた安定性を有する可能性がある。

#### 【0027】

$T_2$ には、 $T_1$ と完全に逆相補的なモチーフが含まれていない。本開示の文脈において、「逆相補」とは、2つのヌクレオチド配列又はモチーフの間に、核酸塩基対の規則に従って水素結合を形成し、かつ一方のヌクレオチド配列又はモチーフの5'から3'に向かう各ヌクレオチドが他方のヌクレオチド配列又はモチーフの3'から5'に向かう各ヌクレオチドと塩基対を形成できることを指す。いくつかの実施形態において、「逆相補」は、AU、GC及びUGの相補のうちの1つ又は複数を含む。

#### 【0028】

$S_1$ 及び $S_4$ は、それぞれ、3~7個のヌクレオチドからなるモチーフであり、かつ $S_1$ は、 $S_4$ と長さが同じであり、かつ完全に逆相補的であり、上記 $S_1$ 及び $S_4$ モチーフを有するアプタマーは、優れた安定性を有し、腫瘍組織及び細胞を長時間にわたって標的とすることができる。いくつかの実施形態において、 $S_1$ 及び $S_4$ は、それぞれ、3~5個のヌクレオチドからなり、かつ長さが同じである。いくつかの実施形態において、 $S_1$ 及び $S_4$ により形成された逆相補において、GC相補が全ての相補数の40%以上を占め、この場合、本開示に係る複合体は、更により優れた安定性及び腫瘍標的能力を有する。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かつて、 $S_1$ は、GCUであり、かつ $S_4$ は、AGCであり、或いは、 $S_1$ は、GAGUであり、かつ $S_4$ は、GUCであり、或いは、 $S_1$ は、GGAUであり、かつ $S_4$ は、GUCUであり、或いは、 $S_1$ は、UAUGGであり、かつ $S_4$ は、CCAUGである。

#### 【0029】

$N_a$ 及び $N_c$ は、それぞれ、1~4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、 $N_a$ 中の各ヌクレオチドは、 $N_c$ 中の各ヌクレオチドといずれも相補的ではなく、かつ $N_a$ 及び $N_c$ 中のUの総数は、 $N_a$ 及び $N_c$ 中の全てのヌクレオチドの総数の50%以上を占める。上記 $N_a$ 及び $N_c$ モチーフを有するアプタマーは、優れた腫瘍組織標的能力を示す。いくつかの実施形態において、 $N_a$ 及び $N_c$ 中のヌクレオチドの数の和は、2~4の整数である。いくつかの実施形態において、 $N_a$ 及び $N_c$ 中のヌクレオチドの数の和は、3又は4であり、かつ前記 $N_a$ 及び $N_c$ 中のUの数の和は、2又は3である。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かつて、 $N_a$ 及び $N_c$ は、U、UU、UC、又はCU

である。

【0030】

S<sub>2</sub>及びS<sub>3</sub>は、それぞれ、1～4個のヌクレオチドからなるモチーフであり、S<sub>2</sub>は、S<sub>3</sub>と長さが同じであり、かつ完全に逆相補である。S<sub>2</sub>及びS<sub>3</sub>モチーフを含むことにより、本開示に係る複合体は、良好な安定性及び優れた腫瘍標的能力を示す。いくつかの実施形態において、S<sub>2</sub>及びS<sub>3</sub>は、それぞれ、2～3個のヌクレオチドからなり、かつ長さが同じである。いくつかの実施形態において、S<sub>2</sub>及びS<sub>3</sub>によって形成される逆相補は、少なくとも1つのGC相補を含み、この場合、当該逆相補は、より良好な安定性を有する。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、S<sub>2</sub>は、CAであり、かつS<sub>3</sub>は、UGであり、或いは、S<sub>2</sub>は、ACであり、かつS<sub>3</sub>は、GUであり、或いは、S<sub>2</sub>は、GCCであり、かつS<sub>3</sub>は、GGUである。

10

【0031】

N<sub>b</sub>は、3～6個のヌクレオチドからなるモチーフであり、N<sub>b</sub>の両端のヌクレオチド間は、AU又はGC相補ではない。理論に制限されることなく、上記N<sub>b</sub>モチーフを有するアプタマーは、空間的に特定の配置を保持することができ、それにより、本開示に係る複合体が腫瘍組織及び細胞を安定して効率的に標的とすることができる。いくつかの実施形態において、N<sub>b</sub>は、4～5個のヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、N<sub>b</sub>は、GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG、又はGAUCUである。

【0032】

本開示の発明者らは、上記式(1)に示される配列を有するアプタマーにより形成された送達基が、腫瘍、特に神経膠腫組織を効果的に標的とすることができ、それにより、本開示に係る複合体が腫瘍細胞に特異的に進入することができ、治療剤基を細胞レベルでより効果的に送達することができることを発見した。

20

【0033】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体において、前記連続したヌクレオチド配列の長さは、18～50個のヌクレオチド、又は20～40個のヌクレオチド、又は21～36個のヌクレオチド、又は24～32個のヌクレオチドである。これらの連続したヌクレオチドの長さを有するアプタマーにより形成される送達基及び当該送達基を含む本開示に係る複合体は、腫瘍をより容易に標的とすることができ、合成コスト及び標的効果において良好なバランスを有する。

30

【0034】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体において、連続したヌクレオチド配列は、以下の配列番号1、配列番号2、又は配列番号3に示される配列を有し、

5' - CUGCUUCAGACGUGUUAGCUU - 3' (配列番号1)

ここで、5'から3'に向かって、T<sub>1</sub>は、CUであり、S<sub>1</sub>は、GCUであり、N<sub>a</sub>は、Uであり、S<sub>2</sub>は、CAであり、N<sub>b</sub>は、GACGであり、S<sub>3</sub>は、UGであり、N<sub>c</sub>は、UUであり、S<sub>4</sub>は、AGCであり、T<sub>2</sub>は、UUであり、

5' - CUGAGUUCAGACGUGUUGCUCU - 3' (配列番号2)

ここで、5'から3'に向かって、T<sub>1</sub>は、CUであり、S<sub>1</sub>は、GAGUであり、N<sub>a</sub>は、Uであり、S<sub>2</sub>は、CAであり、N<sub>b</sub>は、GACGであり、S<sub>3</sub>は、UGであり、N<sub>c</sub>は、UUであり、S<sub>4</sub>は、GUCであり、T<sub>2</sub>は、Uであり、

40

5' - UCUAUGGCUGCCGAUCUGGUCUCCAUGUACGU - 3' (配列番号3)

ここで、5'から3'に向かって、T<sub>1</sub>は、CUであり、S<sub>1</sub>は、GAGUであり、N<sub>a</sub>は、Uであり、S<sub>2</sub>は、CAであり、N<sub>b</sub>は、GACGであり、S<sub>3</sub>は、UGであり、N<sub>c</sub>は、UUであり、S<sub>4</sub>は、GUCであり、T<sub>2</sub>は、Uである。

【0035】

いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号4に示されるヌクレオチド配列を有し、

50

5' - N<sub>6</sub> G G A G U U C A N<sub>1</sub> N<sub>2</sub> N<sub>3</sub> N<sub>4</sub> U G N<sub>5</sub> G C U C N<sub>7</sub> - 3' (配列番号4)  
 ここで、N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>及びN<sub>3</sub>は、それぞれ独立して、A、U、C及びGのうちの1つであり、N<sub>4</sub>は、U、C若しくはGであるか、又はU、C若しくはGのうちの2つからなるモチーフであり、N<sub>5</sub>は、U、C U又はU Uであり、N<sub>6</sub>は、C U、U C又はA Cであり、N<sub>7</sub>は、U、U U又はU U N<sub>8</sub>であり、N<sub>8</sub>は、1～15個のヌクレオチドからなるモチーフである。

【0036】

上記ヌクレオチド配列において、5'から3'に向かって、T<sub>1</sub>は、N<sub>6</sub>で表されるモチーフであり、S<sub>1</sub>は、G G A G Uで表されるモチーフであり、N<sub>a</sub>は、Uであり、S<sub>2</sub>は、C Aであり、N<sub>b</sub>は、N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>及びN<sub>4</sub>からなるモチーフN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>であり、S<sub>3</sub>は、U Gであり、N<sub>c</sub>は、N<sub>5</sub>で表されるモチーフであり、S<sub>4</sub>は、G C U C及びN<sub>7</sub>中の最初のヌクレオチドからなるモチーフであり、T<sub>2</sub>は、N<sub>7</sub>中の他のヌクレオチドからなるモチーフである。

【0037】

上記配列番号4に示されるヌクレオチド配列を含むアプタマーは、腫瘍、特に神経膠腫をより効果的に標的として、腫瘍組織内に濃縮することができる。

【0038】

実験検証により、配列番号4に示されるヌクレオチド配列において、N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>及びN<sub>4</sub>の上記選択が本開示に係る複合体の腫瘍標的能力に顕著に影響しないことが示されている。いくつかの実施形態において、N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>及びN<sub>4</sub>からなるモチーフN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>は、G A C G、G A C G U、G A C C G、U A C U、G U U G又はG A U C Uのうちの1つであり、これらのモチーフを含むアプタマーは、より高い腫瘍特異的標的効果を有する。

【0039】

いくつかの実施形態において、配列番号4に示されるヌクレオチド配列において、N<sub>5</sub>は、U又はU Uである。この場合、本開示に係る複合体は、腫瘍に対して優れた標的効果を有する。

【0040】

いくつかの実施形態において、前記アプタマーは、配列番号5～11のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有する。

5' - C U G G A G U U C A G A C G U G U U G C U C U U - 3' (配列番号5)

5' - C U G G A G U U C A G A C G U U G U G C U C U U - 3' (配列番号6)

5' - C U G G A G U U C A G A C C G U G U G C U C U U - 3' (配列番号7)

5' - C U G G A G U U C A G A C G U G U U G C U C U - 3' (配列番号8)

5' - A C G G A G U U C A G A C G U G U U G C U C U U - 3' (配列番号9)

5' - C U G G A G U U C A C U A C U G U U G C U C U U - 3' (配列番号10)

5' - U G G A G U U C A G U U G U G U U G C U C U U - 3' (配列番号11)

【0041】

上記ヌクレオチド配列を有する本開示に係る複合体は、腫瘍に対する高い標的効果を示す。

【0042】

いくつかの実施形態において、モチーフN<sub>8</sub>は、1～15個のヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態において、N<sub>8</sub>は、1～8個のヌクレオチドからなる。

【0043】

いくつかの実施形態において、モチーフN<sub>8</sub>の存在により、本開示に係る複合体は、体内のエキソヌクレアーゼに対してより安定し、それにより、体内で腫瘍標的効果をより長時間にわたって発揮することができる。いくつかの実施形態において、N<sub>8</sub>は、本開示に係る複合体の腫瘍に対する標的作用を増加又は維持することができる。安定性、標的性及び合成効率のバランスから考慮すると、いくつかの実施形態において、モチーフN<sub>8</sub>は、8個のヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、モ

10

20

30

40

50

チーフN<sub>8</sub>のヌクレオチド配列は、CCGAUCUCである。いくつかの実施形態において、連続したヌクレオチド配列は、配列番号12～14のうちのいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有する。

5' - CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUUC CGAUCUC - 3' (配列番号12)

5' - CUGGAGUUCAGACGUGUGCUCUUC CGAUCUC - 3' (配列番号13)

5' - CUGGAGUUCAGACC GUGUGCUCUUC CGAUCUC - 3' (配列番号14)

【0044】

前記連続したヌクレオチド配列において、5'末端ヌクレオチドのリボース5'末端及び3'末端ヌクレオチドのリボース3'末端の末端基は、独立して、ヒドロキシ基又はリン酸基であり、これらの末端基の選択は、本開示に係る複合体の標的能力を変更しない。いくつかの実施形態において、連続したヌクレオチド配列において、5'末端ヌクレオチドのリボース5'末端及び3'末端ヌクレオチドのリボース3'末端の末端基は、いずれもヒドロキシル基である。

【0045】

本開示に係る複合体において、各ヌクレオチドは、いずれも修飾又は非修飾のヌクレオチドであってもよい。一般的に、ヌクレオチドの修飾は、本開示に係る複合体の安定性及び/又は腫瘍に対する標的能力を変更する可能性がある。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における少なくとも1つのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における、隣接する2つのヌクレオチドを結合する少なくとも1つの基は、修飾基を有するリン酸エステル基である。

【0046】

ヌクレオチドの修飾は、糖への修飾、塩基への修飾、及び/又はヌクレオチドアナログによるヌクレオチドの置換を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体において、各前記修飾ヌクレオチドは、独立して、2'-ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-置換アルキル修飾ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-置換アミノ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログのうち1つである。

【0047】

本開示の文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシがフッ素で置換された、下記式(7)に示される構造を有するヌクレオチドを指す。「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログのうちから独立して選択される1つである。

【0048】

これらのリボースの2'位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチドは、当業者に周知であり、これらのヌクレオチドは、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-置換アルキル修飾ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-置換アミノ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチドのうちから選択される1つであってもよい。

【0049】

いくつかの実施形態において、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチドは、式(8)に示されるメトキシ修飾ヌクレオチド(2'-OMe)である。いくつかの実施形態において、2'-アミノ修飾ヌクレオチド(2'-NH<sub>2</sub>)は、式(9)に示される。いくつかの実施形態において、2'-デオキシリボヌクレオチド(DNA)は、式(10)に示される。

10

20

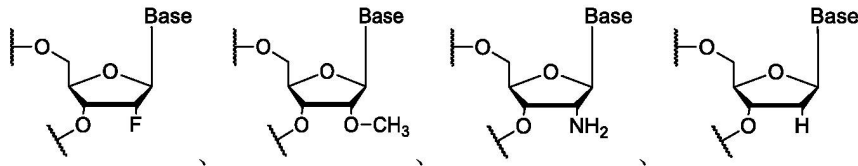
30

40

50

【 0 0 5 0 】

【 化 1 】



式 ( 7 )

式 ( 8 )

式 ( 9 )

式 ( 1 0 )

【 0 0 5 1 】

10

当業者には、ヌクレオチドの塩基を修飾する態様が種々知られている。いくつかの実施形態において、塩基修飾は、塩基に1つ又は複数のメチル基を追加することを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、チミン ( T ) は、塩基修飾ウラシル ( U ) の1種とみなされる。いくつかの実施形態において、2 - メチルシトシンは、塩基修飾シトシン ( C ) の1種とみなされる。

【 0 0 5 2 】

ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指す。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド ( bridged nucleic acid、BNAと略称される ) 又は非環式ヌクレオチドであってもよい。

20

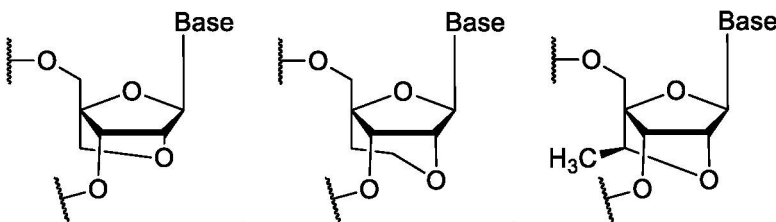
【 0 0 5 3 】

BNAとは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。BNAは、五員環、六員環又は七員環の、「固定された」C 3' - エンド糖パッキングを有する架橋構造を含んでもよい。一般的に、当該橋を当該リボースの2' -、4' - 位に導入して2' , 4' - BNAヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、BNAは、式 ( 1 2 ) に示されるLNA、式 ( 1 3 ) に示されるENA、式 ( 1 4 ) に示されるcET BNAなどであってもよい。

30

【 0 0 5 4 】

【 化 2 】



式 ( 1 2 )

式 ( 1 3 )

式 ( 1 4 )

40

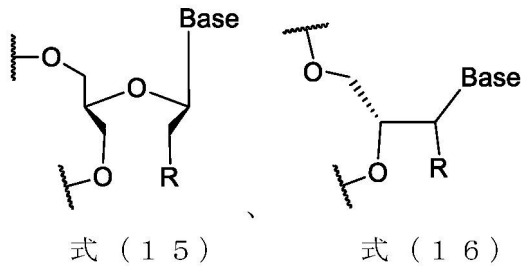
【 0 0 5 5 】

非環式ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖環が開環されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非環式ヌクレオチドは、式 ( 1 5 ) に示されるアンロック核酸 ( UNA )、式 ( 1 6 ) に示されるグリセロール核酸 ( GNA )、又はペプチド核酸 ( PNA ) であってもよい。

【 0 0 5 6 】

50

## 【化 3】



## 【0057】

10

上記式 (15) 及び式 (16) において、R は、H、OH 又はアルコキシ (O - アルキル基) から選択される。

## 【0058】

ペプチド核酸は、ポリペプチド骨格置換グリコシド - リン酸主鎖から形成されるヌクレオチドアナログである。いくつかの実施形態において、ペプチド核酸は、例えば、2 - アミノエチルグリシン結合置換グリコシド - リン酸単位から形成されるヌクレオチドアナログであってもよい。

## 【0059】

イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物を指す。いくつかの実施形態において、イソヌクレオチドは、式 (17) 又は (18) に示される、塩基がリボース環の 1' - 位から 2' - 位又は 3' - 位に移行した化合物であってもよい。

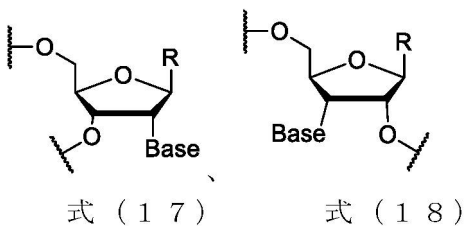
20

## 【0060】

上記式 (17) 及び式 (18) の化合物において、Base は、A、U、G、C 又は T などの核酸塩基を表し、R は、H、OH、F 又は上述した非フッ素基から選択される。

## 【0061】

## 【化 4】



30

## 【0062】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、LNA、ENA、cET、UNA 及び GNA のうちから選択される 1 つである。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、メトキシ修飾ヌクレオチドであり、文脈において、前記メトキシ修飾ヌクレオチドとは、リボースの 2' - ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

40

## 【0063】

文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」、「2' - フルオロ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の 2' - ヒドロキシ基がフッ素で置換されたヌクレオチド」及び「2' - フルオロリボースを有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドの 2' - ヒドロキシ基がフッ素で置換された、式 (7) に示される構造を有する化合物を指し、「メトキシ修飾ヌクレオチド」、「2' - メトキシ修飾ヌクレオチド」、「リボースの 2' - ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチド」及び「2' - メトキシリボースを有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドのリボース基の 2' - ヒドロキシ基がメトキシで置換された、式 (8) に示される構造を有する化合物を指す。

50

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における前記連続したヌクレオチド配列中の各シトシンヌクレオチドは、フルオロ修飾シトシンヌクレオチドであり、及び/又は前記連続したヌクレオチド配列中の各ウラシルヌクレオチドは、フルオロ修飾ウラシルヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における前記連続したヌクレオチド配列中の各ヌクレオチドは、いずれも2'-メトキシ修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における1つ又は複数のウラシルヌクレオチドは、修飾塩基を有する。いくつかの実施形態において、チミン塩基(T)は、メチル修飾ウラシル塩基(U)とみなされる。

【 0 0 6 5 】

隣接する2つのヌクレオチドを結合する基は、リン酸エステル基又は修飾リン酸エステル基であってもよい。リン酸エステル基の修飾は、例えば、リン酸エステル基中の少なくとも1つの非架橋酸素原子を硫黄原子に置換して、チオリン酸エステル基又はジチオリン酸エステル基を形成する。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体における、隣接する2つのヌクレオチドを結合する少なくとも1つの基は、チオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列中の、5'末端の最初の4つのヌクレオチドの間の、隣接する2つのヌクレオチドを結合する3つの基のうちの少なくとも1つは、チオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列中の、5'末端の最初の4つのヌクレオチドの間の、隣接する2つのヌクレオチドを結合する3つの基のうちの少なくとも2つは、チオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列中の、3'末端の最初の4つのヌクレオチドの間の、隣接する2つのヌクレオチドを結合する3つの基のうちの少なくとも2つは、チオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列中の、3'末端の最初の4つのヌクレオチドの間の、隣接する2つのヌクレオチドを結合する各基は、いずれもチオリン酸エステル基である。

【 0 0 6 6 】

上記修飾を有する本開示に係る複合体は、コストが低だけでなく、体内のリボヌクレアーゼが結合基を切断しにくくことができ、それにより、本開示に係る複合体の安定性を増加させ、ヌクレアーゼ加水分解に対する耐性をより高める。また、上記修飾送達基を含む本開示に係る複合体は、腫瘍組織及び/又は細胞を標的とする高い活性を有する。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態において、前記連続したヌクレオチド配列は、配列番号15~39のうちの1つに示されるヌクレオチド配列を有し、

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f G U f G U f U f G C f U f C f U f U f C f C f G A U f C f U f C f - 3' (配列番号15)

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f G U f G U f U f G C f U f C f U f U f - 3' (配列番号16)

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f G U f U f G U f G C f U f C f U f U f C f C f G A U f C f U f C f - 3' (配列番号17)

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f G U f U f G U f G C f U f C f U f U f - 3' (配列番号18)

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f C f G U f G U f G C f U f C f U f U f C f C f G A U f C f U f C f - 3' (配列番号19)

5'-C f U f G G A G U f U f C f A G A C f C f G U f G U f G C f U f C f U f U f - 3' (配列番号20)

5'-C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m U m C m - 3' (配列番号21)

5'-C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m

10

20

30

40

50

- G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 2 2 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m U m G m U m  
 G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m U m C m - 3 ' ( 配列番号 2 3 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m U m G m U m  
 G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 2 4 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m C m G m U m G m U m  
 G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m U m C m - 3 ' ( 配列番号 2 5 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m C m G m U m G m U m  
 G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 2 6 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m 10  
 G m C m U m C m U m - 3 ' ( 配列番号 2 7 )  
 5 ' - C m U m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m G m  
 C m U m C m U m - 3 ' ( 配列番号 2 8 )  
 5 ' - C m U m G m C m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m A m G m  
 C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 2 9 )  
 5 ' - A m C m G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m U m  
 G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 3 0 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m C m U m A m C m U m G m U m U m  
 G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 3 1 )  
 5 ' - C m U m G m G m A m G m U m U m C m A m G m U m U m G m U m G m U m U m 20  
 G m C m U m C m U m U m - 3 ' ( 配列番号 3 2 )  
 5 ' - U m C m U m A m U m G m G m C m U m G m C m C m G m A m U m C m U m G m  
 G m U m C m U m C m C m A m U m G m U m A m C m G m U m - 3 ' ( 配列番号 3 3 )  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m  
 U m G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m s U m s C m - 3 ' ( 配列番  
 号 3 4 )  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m G m U m  
 U m G m C m U m C m s U m s U m - 3 ' ( 配列番号 3 5 )  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m U m G m  
 U m G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m s U m s C m - 3 ' ( 配列番  
 号 3 6 ) 30  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m G m U m U m G m  
 U m G m C m U m C m s U m s U m - 3 ' ( 配列番号 3 7 )  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m C m G m U m G m  
 U m G m C m U m C m U m U m C m C m G m A m U m C m s U m s C m - 3 ' ( 配列番  
 号 3 8 )  
 5 ' - C m s U m s G m G m A m G m U m U m C m A m G m A m C m C m G m U m G m  
 U m G m C m U m C m s U m s U m - 3 ' ( 配列番号 3 9 )

ここで、大文字 C、G、U、A は、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字 m は、当該文字 m の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 f は、当該文字 f の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 s は、当該文字 s の左右 2 つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表す。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体は、式 ( 1 0 1 ) に示される構造を有する。

【 0 0 6 9 】

【化5】

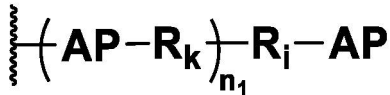


(101)

式中、各  $R_{AP}$  基は、独立して、式(2)に示される構造を有する基である。

【0070】

【化6】



10

(102)

式中、各  $AP$  基は、同じか又は異なり、独立して、1つの前記送達基を表し、各  $A_0$  基は、同じか又は異なり、独立して、1つの前記機能性基を表し、 $R_j$ 、各  $R_k$  又は各  $R_i$  は、同じか又は異なり、それぞれ独立して共有結合又は結合基を表し、かつ  $R_i$  と  $R_k$  は、両方が同時に共有結合であることはなく、 $m_0$  は、1~6の整数であり、 $n_0$  は、1~6の整数であり、各  $n_1$  は、それぞれ独立して、0~4の整数を表し、

20

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【0071】

いくつかの実施形態において、 $m_0$  は、1~6の整数であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1~6個の前記機能性基  $A_0$  を含む。送達効率及び合成コストの観点から考慮すると、いくつかの実施形態において、 $m_0$  は、1~4の整数であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1~4個の前記機能性基  $A_0$  を含む。いくつかの実施形態において、 $m_0$  は1であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1つの前記機能性基  $A_0$  を含む。

【0072】

いくつかの実施形態において、 $n_0$  は、1~6の整数であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1~6個の  $R_{AP}$  基を含む。送達効率及びコストの観点から考慮すると、いくつかの実施形態において、 $n_0$  は、1~3の整数であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1~3個の  $R_{AP}$  基を含む。いくつかの実施形態において、 $n_0$  は1であり、即ち、式(101)に示される複合体は、1つの  $R_{AP}$  基を含む。

30

【0073】

いくつかの実施形態において、各  $n_1$  は、それぞれ独立して、0~4の整数を表し、かつ  $R_i$  と  $R_k$  は、両方が同時に共有結合であることはなく、それにより、各  $R_{AP}$  基は、1~5個の送達基  $AP$  を含む。いくつかの実施形態において、各  $n_1$  は、それぞれ独立して、0~1の整数を表し、それにより、各  $R_{AP}$  基は、1~2個の送達基  $AP$  を含む。いくつかの実施形態において、 $n_0$  は1であり、かつ  $n_1$  は0であり、この場合、式(101)に示される複合体は、1つの送達基  $AP$  を含む。

40

【0074】

$R_{AP}$  基において、 $R_k$  及び  $R_i$  の役割は、送達基  $AP$  を  $R_j$  基に共有結合し、 $R_j$  基を介して機能性基  $A_0$  に結合することである。したがって、上記結合を達成でき、かつ送達基  $AP$  及び機能性基  $A_0$  の効果に悪影響を与えない任意の  $R_k$  又は  $R_i$  であれば、いずれも本発明に用いることができる。いくつかの実施形態において、各前記  $R_k$  又は各前記  $R_i$  は、独立して、長さが1~70個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH = N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $OP(O)(S)$ 、 $C_5 \sim C_8$  グリコシド基、 $C_2 \sim$

50

C<sub>10</sub>アルケニレン基、C<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルキニレン基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリーレン基、C<sub>3</sub>~C<sub>18</sub>ヘテロシクリレン基及びC<sub>5</sub>~C<sub>10</sub>ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>5</sub>~C<sub>10</sub>ヘテロアリール基、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基、-OC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基、-OC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルフェニル基、-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル-OH、-OC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基、-SC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基、-SC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルフェニル基、-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル-SH、-SC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル)(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-NH(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-N(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル)(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルフェニル基)、-NH(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-CON(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル)(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-CONH(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-NHC(O)(フェニル基)、-N(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル)C(O)(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-N(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル)C(O)(フェニル基)、-C(O)C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基、-C(O)C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルフェニル基、-C(O)C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基、-OC(O)C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-SO<sub>2</sub>(フェニル基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-SO<sub>2</sub>NH(フェニル基)、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル基)、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>(フェニル基)及び-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよい。合成コスト、難易度及び複合体の腫瘍標的効果から考慮すると、いくつかの実施形態において、各n<sub>1</sub>は、いずれも0であり、各R<sub>i</sub>は、独立して、共有結合であるか、又は結合基のC<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキレン基、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、1,2,3-トリアゾールサブユニット、ポリエチレングリコールサブユニット、ピロリジンサブユニット、2-オキソピロリジンサブユニット、フェニレン基、シクロヘキシレン基、2-スクシンイミドサブユニット、2-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット、ヌクレオチドサブユニットのうち1つ又は複数の結合の組み合わせである。

【0075】

いくつかの実施形態において、結合基R<sub>j</sub>は、当業者に知られている抗体薬物複合体に使用できる結合基を含む。結合基R<sub>j</sub>は分解可能であってもよく、分解不可能であってもよい。いくつかの実施形態において、結合基R<sub>j</sub>は分解可能であってもよい。文脈において、「分解可能」とは、本開示の複合体が腫瘍を標的とした後、結合基R<sub>j</sub>が腫瘍内の環境下及び/又は腫瘍細胞内で共有結合切断を起こし、単独の治療剤基を放出して治療効果を生成することを指す。いくつかの実施形態において、結合基R<sub>j</sub>は、活性化酵素結合基、スルファターゼ-切断可能な結合基、ガラクトース切断可能な結合基、リソソームプロテアーゼ感受性結合基、ペプチド結合基、グルクロニド結合基、酸感受性の切断可能な結合基、又はグルタチオン感受性のジスルフィド結合基のうち1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、結合基R<sub>j</sub>は、ペプチド結合基を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド結合基は、バリン-シトルリンジペプチドリンカー(Val-Cit)、アラニン-アラニンジペプチドリンカー(Ala-Ala)、バリン-アラニンジペプチドリンカー(Val-Ala)、グリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシンのテトラペプチドリンカー(Gly-Gly-Phe-Gly)のうちから選択される1つ又は複数である。いくつかの実施形態において、結合基R<sub>j</sub>は、N-サクシニリデン4-(2-ジチオピリジン)ブチレート(SPDB)、N-スクシンイミド-4-(2-チオピリジリデン)バレレート(SPP)、(S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-5-ウレイドペンタン酸(Val-Cit-PAB-OH)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(

10

20

30

40

50

S M C C ) 又は 2 - ( ホスフェート - ( C H <sub>2</sub> )<sub>6</sub> - S - ) - マレイミドカプロイル - バリン - シトルリン - p - アミノベンジルサブユニットのうちから選択される 1 つである。いくつかの実施形態において、結合基 R<sub>j</sub> は、M c k e r t i s h C M , K a y s e r V . A d v a n c e s a n d L i m i t a t i o n s o f A n t i b o d y D r u g C o n j u g a t e s f o r C a n c e r . B i o m e d i c i n e s . 2 0 2 1 J u l 2 3 ; 9 ( 8 ) : 8 7 2 . に列挙された結合基を含み、当該文献内容は、引用によりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態において、結合基 R<sub>j</sub> は、バリン - シトルリンジペプチドリンカー ( V a l - C i t ) 、ポリエチレングリコールサブユニット、イミノヘキシルサブユニット、N - スクシンイミジル基、G A U トリヌクレオチド結合基のうちの一つ又は複数を含む。いくつかの実施形態において、各 R<sub>i</sub> は、独立して、共有結合、ジスルフィド結合、ドデシレン基、バリン - シトルリンジペプチドリンカー ( V a l - C i t ) 、ポリエチレングリコールサブユニット、イミノヘキシルサブユニット、N - スクシンイミジル基、又は G A U トリヌクレオチドサブユニットのうちの一つ又は二つの結合の組み合わせである。

10

【 0 0 7 7 】

R<sub>j</sub> 基の役割は、R<sub>AP</sub> 基を機能性基 A<sub>0</sub> に結合することにより、R<sub>AP</sub> 基中の送達基 A P の腫瘍標的効果を通じて機能性基 A<sub>0</sub> を腫瘍組織及び / 又は細胞に特異的に送達することである。したがって、上記結合を実現でき、かつ送達基 A P の腫瘍標的効果及び機能性基 A<sub>0</sub> の効果に影響を与えない任意の R<sub>j</sub> 基であれば、いずれも本発明の目的を達成でき、本発明が解決しようとする技術的課題を解決することができる。いくつかの実施形態において、式 ( 1 ) に示される複合体が腫瘍組織に到達した後及び / 又は腫瘍細胞に入った後、前記 R<sub>j</sub> が分解されて、単独の機能性基 A<sub>0</sub> に対応する薬物活性分子を放出する。いくつかの実施形態において、前記 R<sub>j</sub> は、体内で分解されず、この場合、複合体における R<sub>j</sub> 基及び R<sub>AP</sub> 基の存在は、機能性基 A<sub>0</sub> が治療効果を発揮することに影響しない。

20

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、R<sub>j</sub> は共有結合であり、m<sub>0</sub> は 1 であり、この場合、式 ( 1 0 1 ) に示される複合体は、1 つの機能性基 A<sub>0</sub> 及び 1 つの R<sub>AP</sub> 基を含み、各 R<sub>AP</sub> 基は、当該機能性基 A<sub>0</sub> に直接結合される。いくつかの実施形態において、各 R<sub>AP</sub> 基は、機能性基 A<sub>0</sub> の同じ原子に結合される。いくつかの実施形態において、各 R<sub>AP</sub> 基は、機能性基 A<sub>0</sub> の異なる原子に結合される。

30

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、R<sub>j</sub> は結合基であり、前記結合基 R<sub>j</sub> は、主鎖部分、側鎖部分及び複合結合部を含む。

【 0 0 8 0 】

主鎖部分は、複合結合部と側鎖部分にそれぞれ結合される。いくつかの実施形態において、主鎖部分は、長さが 1 ~ 7 0 個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の 1 つ又は複数の炭素原子は、C ( O ) 、 N H 、 O 、 S 、 C H = N 、 S ( O )<sub>2</sub> 、 O P ( O )<sub>2</sub> 、 C<sub>5</sub> ~ C<sub>8</sub> グリコシド基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>10</sub> アルケニレン基、C<sub>2</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキニレン基、C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> アリーレン基、C<sub>3</sub> ~ C<sub>18</sub> ヘテロシクリレン基及び C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub> ヘテロアリーレン基からなる群から選択される 1 つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル基、C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> アリアル基、C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub> ヘテロアリアル基、C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> ハロゲン化アルキル基、- O C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル基、- O C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルフェニル基、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル - O H 、 - O C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> ハロゲン化アルキル基、- S C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル基、- S C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルフェニル基、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル - S H 、 - S C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、- O H 、 - S H 、 - N H<sub>2</sub> 、 - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル - N H<sub>2</sub> 、 - N ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル ) ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル基 ) 、 - N H ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル基 ) 、 - N ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキル ) ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルフェニル基 ) 、 - N H ( C<sub>1</sub> ~ C

40

50

$C_{10}$ アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_{10}$ アルキル)( $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH_2SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NH_2SO_2$ (フェニル基)及び $-NH_2SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよい。

10

## 【0081】

側鎖部分は、主鎖部分と $R_{AP}$ 基にそれぞれ結合される。いくつかの実施形態において、各側鎖部分は、独立して、共有結合であるか、又は長さが1~70個の炭素原子である直鎖アルキレン基であり、或いは、前記直鎖アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_{18}$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記直鎖アルキレン基は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル- $OH$ 、 $-OC_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル- $SH$ 、 $-SC_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキル- $NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル)( $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル)( $C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基)、 $-NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)( $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH_2SO_2(C_1 \sim C_{10}$ アルキル基)、 $-NH_2SO_2$ (フェニル基)及び $-NH_2SO_2(C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)からなる群から選択されるいずれか1つ又は複数の置換基を有してもよく、

20

30

複合結合部は、主鎖部分と機能性基 $A_0$ にそれぞれ結合される。いくつかの実施形態において、各複合結合部は、独立して、共有結合であるか、又は結合構造の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン基、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、1, 2, 3-トリアゾールサブユニット、ポリエチレングリコールサブユニット、ピロリジンサブユニット、2-オキソピロリジンサブユニット、フェニレン基、シクロヘキシレン基、2-スクシンイミドサブユニット、2-チオスクシンイミドサブユニット、アミノ酸サブユニット、ヌクレオチドサブユニットのうちの1つ又は複数の結合の組み合わせである。

40

## 【0082】

いくつかの実施形態において、前記結合基 $R_j$ 中の各前記複合結合部は、それぞれ、前記主鎖部分及び1つの前記機能性基 $A_0$ に結合され、前記側鎖部分は、 $n_0$ 個であり、各

50

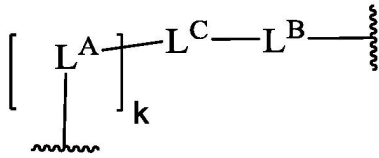
側鎖部分は、それぞれ、前記主鎖部分及び1つの前記 $R_{AP}$ 基に結合される。したがって、各機能基 $A_0$ 及び $R_{AP}$ 基は、それぞれ独立して、結合基 $R_j$ に結合される。いくつかの実施形態において、全ての側鎖部分は、主鎖部分中の同じ原子に結合され、或いは、各側鎖部分は、主鎖部分中の異なる原子に結合される。

【0083】

いくつかの実施形態において、 $m_0$ は1であり、前記結合基 $R_j$ は、式(301)に示される構造を含む。

【0084】

【化7】



10

式(301)

式中、 $k$ は、1~3の整数であり、 $L^C$ は、前記主鎖部分であり、 $L^A$ は、前記側鎖部分であり、 $L^B$ は、前記複合結合部であり、



20

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【0085】

前記主鎖部分 $L^C$ は、共有結合又は2~4価、直鎖又は分岐鎖の $C_1 \sim C_{25}$ 飽和炭化水素基であり、或いは、前記飽和炭化水素基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_5$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_5$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記飽和炭化水素基は、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $-O-C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル-OH、 $-SC_1 \sim C_5$ アルキル基、ニトロ基、 $-C(O)O(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_5$ アルキル)( $C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH SO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)及び $-NH SO_2$ (フェニル基)からなる群から選択される1つ又は複数の置換基を有してもよい。いくつかの実施形態において、 $L^C$ は、2~4価の $C_5 \sim C_{20}$ 飽和炭化水素基であり、或いは、前記飽和炭化水素基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_5$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_5$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記飽和炭化水素基は、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $-O-C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル-OH、 $-SC_1 \sim C_5$ アルキル基、ニトロ基、 $-CONH_2$ からなる群から選択される1つ又は複数の置換基を有してもよい。いくつかの実施形態において、 $L^C$ の長さは、5~30個の原子であり、前記 $L^C$ の長さは、 $L^C$ 中の $L^A$ に直接結合された原子からL

30

40

50

<sup>B</sup>に直接結合された原子までに形成された最も長い原子鎖上の連鎖原子の数を指す。構造を簡略化するために、いくつかの実施形態において、<sup>L<sup>C</sup></sup>の長さは、8～25原子である。

【0086】

前記側鎖部分<sup>L<sup>A</sup></sup>は、共有結合であるか、又は $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基であり、或いは、前記アルキレン基中の1つ又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 $C_5 \sim C_8$ グリコシド基、 $C_2 \sim C_5$ アルケニレン基、 $C_2 \sim C_5$ アルキニレン基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーレン基、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリレン基及び $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1つ又は複数で置換され、前記アルキレン基は、 $C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_5 \sim C_{10}$ ヘテロアリール基、 $-O-C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-OC_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル- $OH$ - $SC_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-SC_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル基- $SH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1 \sim C_5$ アルキル基- $NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル)( $C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-NH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル)( $C_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基)、 $-NH(C_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基)、ニトロ基、 $-C(O)O(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CON(C_1 \sim C_5$ アルキル)( $C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-NHC(O)($ フェニル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-N(C_1 \sim C_5$ アルキル) $C(O)($ フェニル基)、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-C(O)C_1 \sim C_5$ アルキルフェニル基、 $-OC(O)C_1 \sim C_5$ アルキル基、 $-SO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1 \sim C_5$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NHSO_2(C_1 \sim C_5$ アルキル基)及び $-NHSO_2$ (フェニル基)からなる群から選択される1つ又は複数の置換基を有してもよい。

【0087】

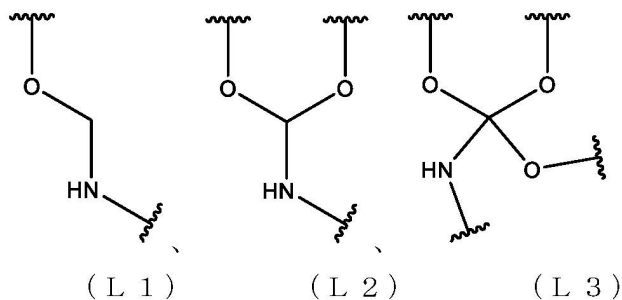
前記複合結合部<sup>L<sup>B</sup></sup>は、リン酸エステル結合、チオリン酸エステル結合、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、ジスルフィド結合のうち1～5個の結合のうち1つ又は複数の結合の組み合わせである。

【0088】

いくつかの実施形態において、 $k$ は、1～3の整数であり、<sup>L<sup>C</sup></sup>は、式(L1)～(L3)に示される基のうちいずれか1つを含み、式(L1)～(L3)に示される基中のエーテル結合を介して<sup>L<sup>A</sup></sup>部分に結合される。

【0089】

【化8】



は、基が分子の残りの部分に結合される部位を表す。いくつかの実施形態において、 $k=1$ であり、<sup>L<sup>C</sup></sup>は、式(L1)に示される基を含み、基(L1)中の $O$ 原子は、<sup>L<sup>A</sup></sup>に直接結合される。いくつかの実施形態において、 $k=2$ であり、<sup>L<sup>C</sup></sup>は、式(L2)に示される基を含み、基(L1)中の2つの $O$ 原子は、それぞれ1つの<sup>L<sup>A</sup></sup>に直接結合される。

いくつかの実施形態において、 $k = 4$ であり、 $L^C$ は、式(L3)に示される基を含み、基(L3)中の3つのO原子は、それぞれ1つの $L^A$ に直接結合される。

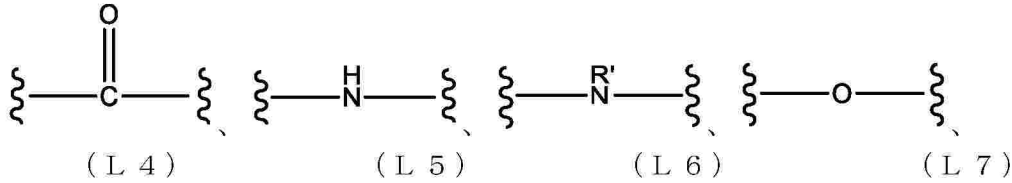
【0090】

$L^B$ は、リン酸エステル結合又はジスルフィド結合であり、

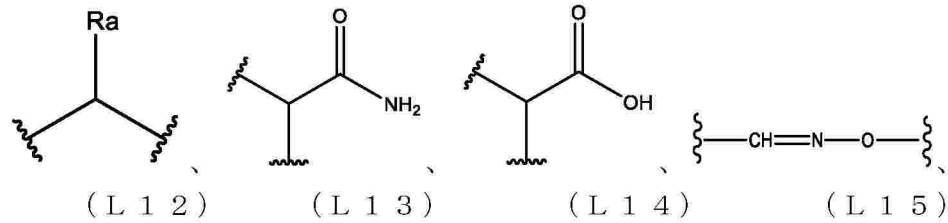
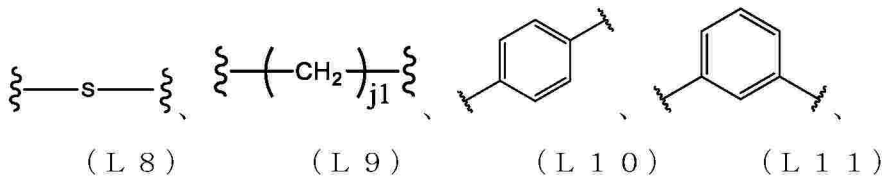
各 $L^A$ は共有結合であり、或いは、各 $L^A$ は、基(L4)~(L23)及びその結合の組み合わせからなる群から選択される。

【0091】

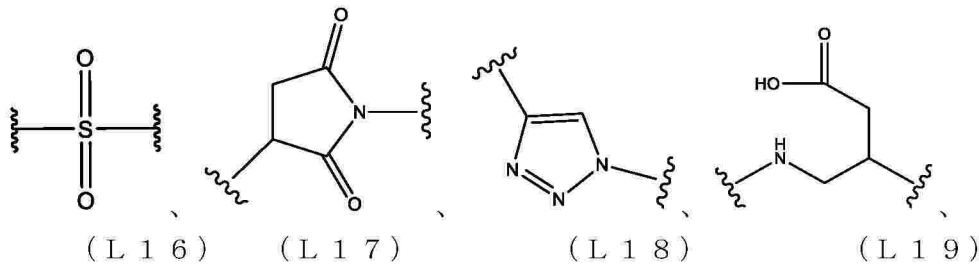
【化9】



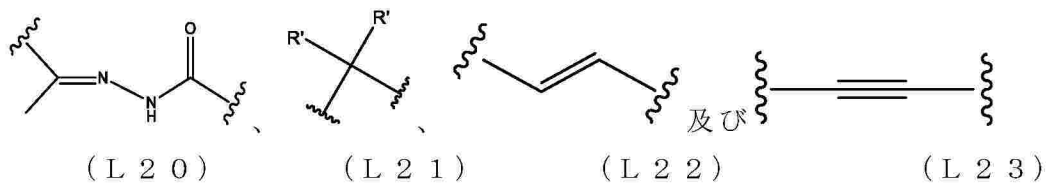
10



20



30

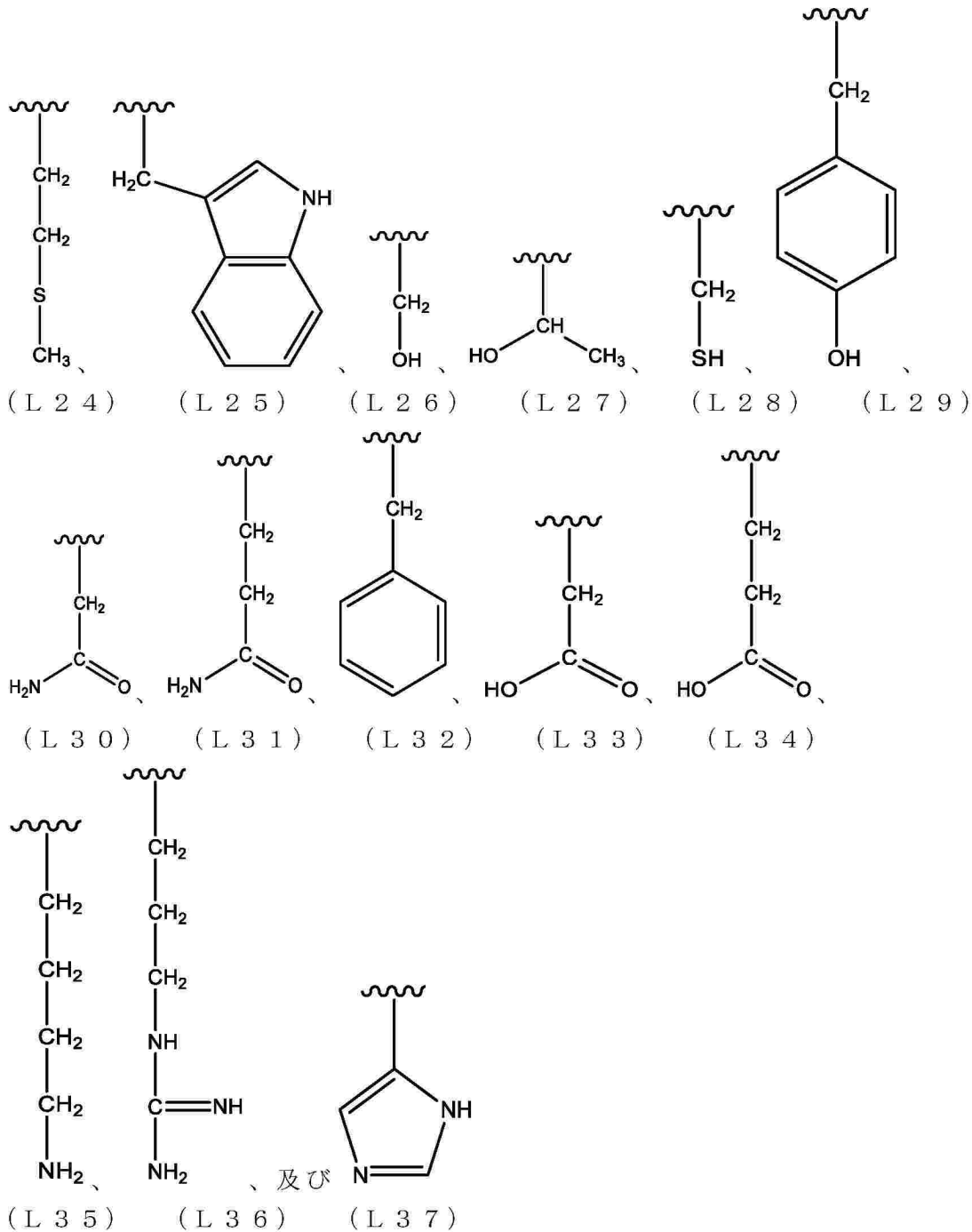


式中、各 $j_1$ は、1~10の整数であり、  
 各 $R'$ は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であり、  
 各 $R_a$ は、水素原子、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、又は基(L24)~(L37)からなる群から選択される。

40

【0092】

## 【化 1 0】



10

20

30

## 【0093】

40

いくつかの実施形態において、 $L^A$ の長さは、3～35個の原子であり、前記 $L^A$ の長さは、 $L^A$ 中の $L^C$ に直接結合された原子から $L^A$ 中の $R_{AP}$ に直接結合された原子までに形成された最も長い原子鎖上の連鎖原子の数を指す。いくつかの実施形態において、各 $L^A$ は、基(L 4)～(L 9)、(L 13)、(L 14)、(L 18)のうちの少なくとも2つの結合の組み合わせである。いくつかの実施形態において、各 $L^A$ は、基(L 4)、(L 5)、(L 7)、(L 9)、(L 13)、(L 14)、(L 18)のうちの少なくとも2つの結合の組み合わせである。

## 【0094】

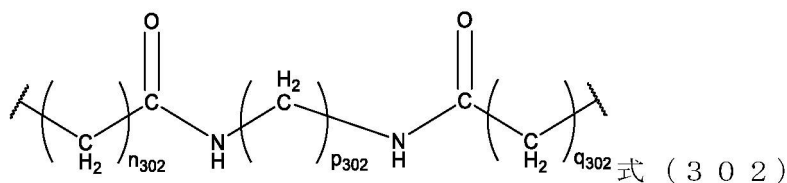
いくつかの実施形態において、 $L^A$ は、式(302)に示されるアミド結合を含む構造を有し、 $L^B$ は、式(303)に示されるN-アシルピロリジンを含む構造を有し、カル

50

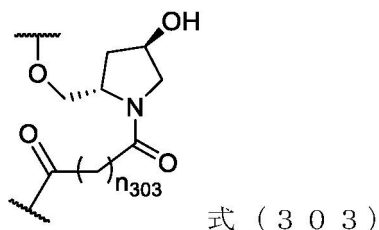
ポニル基及び酸素原子を含み、 $L^C$ は、ヒドロキシメチルアミノメタン、ジヒドロキシメチルアミノメタン又はトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく結合基である。

【0095】

【化11】



10



式中、 $n_{302}$ 、 $q_{302}$ 及び $p_{302}$ は、それぞれ独立して、2~6の整数であり、好ましくは、 $n_{302}$ 、 $q_{302}$ 及び $p_{302}$ は、それぞれ独立して、2又は3であり、 $n_{303}$ は、4~16の整数であり、好ましくは、 $n_{303}$ は、8~12の整数であり、

20

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【0096】

いくつかの実施形態において、各前記側鎖部分 $L^A$ は、それぞれ、1つの $R_{AP}$ 基とリン酸エステル結合、エーテル結合又はエステル結合を介して結合され、かつ前記主鎖部分 $L^C$ 中のヒドロキシル基の酸素原子と前記主鎖部分 $L^C$ とがエーテル結合を形成することにより結合され、前記複合結合部 $L^B$ は、式(303)におけるカルボニル基と前記主鎖部分 $L^C$ 中のアミノ基の窒素原子とがアミド結合を形成することにより結合され、かつ式(303)における酸素原子と前記機能性基 $A_0$ とがリン酸エステル結合、エーテル結合又はエステル結合を形成することにより結合される。いくつかの実施形態において、主鎖部分 $L^C$ は、ヒドロキシメチルアミノメタン、ジヒドロキシメチルアミノメタン又はトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく結合基であり、前記主鎖部分 $L^C$ は、ヒドロキシル基の酸素原子が各前記側鎖部分 $L^A$ とエーテル結合を介して結合され、アミノ基の窒素原子が前記複合結合部 $L^B$ とアミド結合を介して結合される。したがって、当該結合基 $R_j$ は、1~3個の側鎖が同じアミノメチル基の炭素原子に結合され、かつ複合結合部 $L^B$ を介して、送達基を含む $R_{AP}$ 基に結合される。

30

【0097】

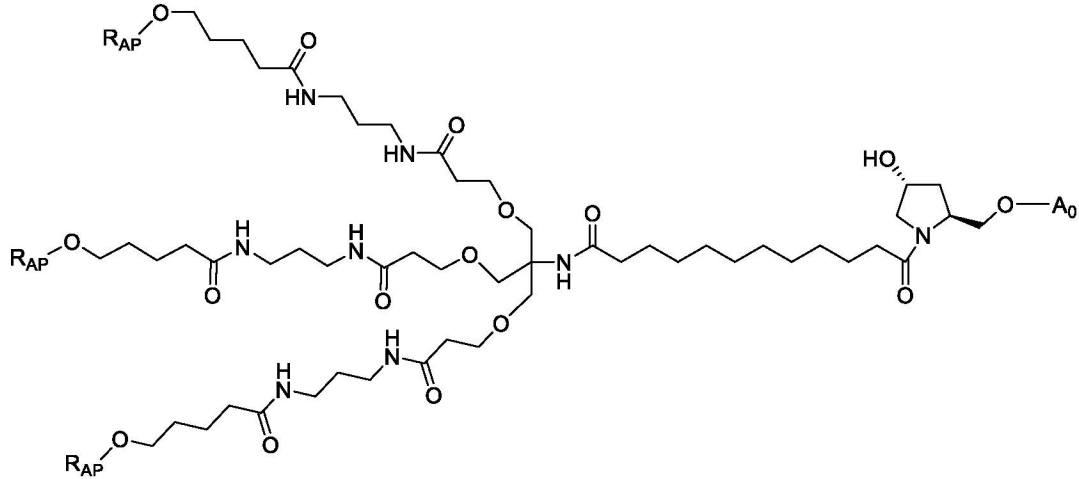
いくつかの実施形態において、前記複合体は、式(305)に示される構造を有する。

40

【0098】

50

## 【化 1 2】



10

式 ( 3 0 5 )

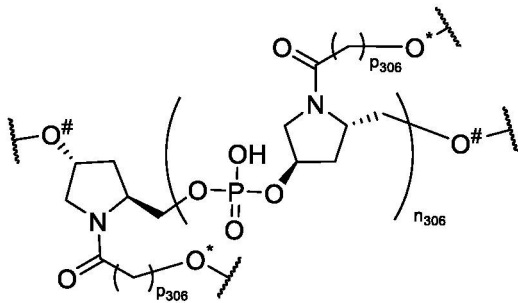
## 【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態において、前記結合基  $R_j$  は、式 ( 3 0 6 ) に示される構造を含む。

20

## 【 0 1 0 0 】

## 【化 1 3】



30

式 ( 3 0 6 )

式中、 $n_{306}$  は、0 ~ 3 の整数であり、各  $p_{306}$  は、独立して、1 ~ 6 の整数であり、

~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表し、全てのピロリジンサブユニットと任意の可能なリン酸ジエステル基により形成された結合の組み合わせは、主鎖部分を構成し、ピロリジンサブユニット中の窒素原子に結合したカルボニル基と*でマークされた酸素原子との間の原子鎖は、各側鎖部分を構成し、前記側鎖部分は、*でマークされた酸素原子が R_{AP} 基とエーテル結合を形成することにより結合され、#でマークされた酸素原子のうち少なくとも1つは、複合結合部であり、機能性基 A_0 とエーテル結合、エステル結合又はリン酸エステル結合を形成し、残りの#でマークされた酸素原子は、水素原子と結合して水酸基を形成するか、又は $C_1 \sim C_3$ アルキル基と結合して $C_1 \sim C_3$ アルコキシ基を形成する。したがって、当該結合基 R_j 中の1 ~ 3個の側鎖部分は、主鎖部分の異なる炭素原子に結合され、かつ酸素原子を介して、送達基を含む R_{AP} 基に結合される。

40

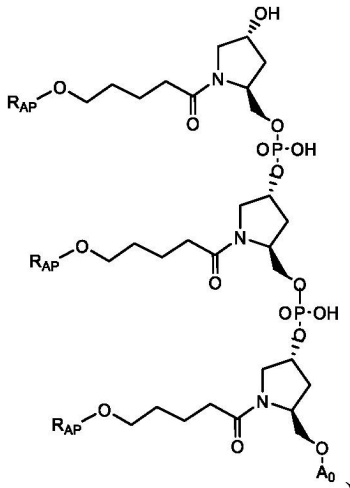
【 0 1 0 1 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体は、式 (3 0 7 a)、(3 0 7 b) 又は (3 0 7 c) に示される構造を有する。

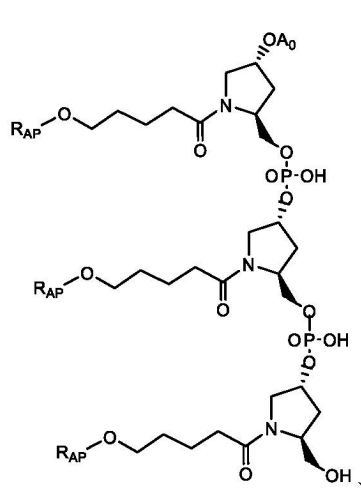
50

【 0 1 0 2 】

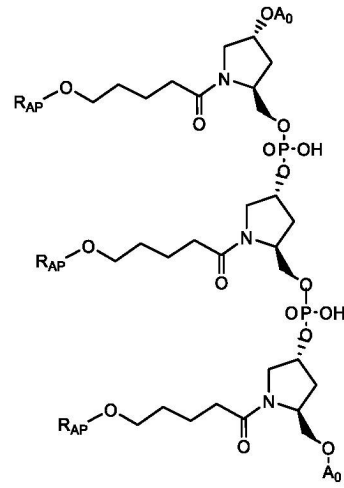
【 化 1 4 】



式 (3 0 7 a)



式 (3 0 7 b)



式 (3 0 7 c)

10

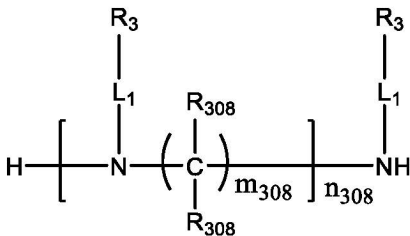
【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体は、式 (3 0 8) に示される構造を有する。

20

【 0 1 0 4 】

【 化 1 5 】



式 (3 0 8)

式中、 n_{308} は、1 ~ 10 の整数であってもよく、いくつかの実施形態において、合成の容易さ、構造 / プロセスコスト及び腫瘍細胞特異性などの多方面から総合的に考慮すると、 n_{308} は、2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施形態において、 n_{308} は、3 又は 4 である。

30

【 0 1 0 5 】

各 R_3 は、独立して、機能性基 A_0 、又は送達基 AP を含む R_{AP} 基である。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの R_3 は、機能性基 A_0 であり、かつ少なくとも 1 つの R_3 は、 R_{AP} である。いくつかの実施形態において、1 つの R_3 は、機能性基 A_0 であり、残りの R_3 は、 R_{AP} 基である。

40

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態において、各 m_{308} が 2 ~ 10 の整数から独立して選択される場合、当該複合体において、複数の送達基 AP の間の空間位置を、腫瘍細胞表面の対応する受容体との相互作用により適したものにすることが可能であると考えられ、式 (3 0 8) に示される化合物をより簡単にし、容易に合成でき、及び / 又はコストを低下させるために、本開示のいくつかの実施形態によれば、各 m_{308} は、独立して 2 ~ 5 の整数であり、いくつかの実施形態において、各 m_{308} は、いずれも等しい。

【 0 1 0 7 】

当業者であれば、各 R_{308} が H 、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $C_1 \sim C_{10}$ ハロゲン化ア

50

ルキル基及びC₁~C₁₀アルコキシ基から独立して選択される場合、式(308)に示される複合体の性質を変えずに、いずれも本開示の目的を達成できることを理解できる。いくつかの実施形態において、各R₃₀₈は、H、メチル基又はエチル基から独立して選択される。いくつかの実施形態において、各R₃₀₈は、いずれもHである。

【0108】

前記機能性基A₀に結合された各L₁は、前記複合結合部を表し、前記R_{AP}に結合された各L₁は、前記側鎖部分を表す。いくつかの実施形態において、1つのR₃は、前記機能性基A₀であり、残りのR₃は、前記R_{AP}基である。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のL₁は、前記側鎖部分として、R_{AP}基を窒素含有骨格上のN原子に結合し、他の1つ又は複数のL₁は、前記複合結合部として、機能性基A₀を窒素含有骨格上のN原子に結合する。前記窒素含有骨格は共に、結合基R_jの主鎖部分を構成する。本開示の文脈において、「窒素含有骨格」とは、式(308)に示される構造における鎖構造を指し、R₃₀₈が結合している炭素原子と、N原子とが互いに結合される。

10

【0109】

送達効率及び合成コストの観点から考慮すると、いくつかの実施形態において、各L₁の長さは、独立して、3~25個の原子である。いくつかの実施形態において、各L₁の長さは、独立して、4~15個の原子である。便宜上、L₁は、直鎖アルキレン基として定義されるが、例えば上述の取替及び/又は置換によって生じるアミノやアルケニル基で、直鎖基ではない、又は名称が異なる可能性があることは、当業者に理解される。本開示の目的のために、L₁の長さは、2つの結合点を結合する鎖における原子数である。この目的のために、前記直鎖アルキレン基の炭素原子を置換して得られた環(例えば、ヘテロシクリレン基又はヘテロアリーレン基)については、環上の結合点間の最小原子数に基づいて、鎖における当該環に対応する部分の長さを計算する。

20

【0110】

いくつかの実施形態において、L₁は、上記式L₄~L₂₃に示される基及びその任意の結合の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、各L₁は、基L₄~L₉、L₁₃、L₁₄、L₁₈のうちの少なくとも2つの結合の組み合わせからなる群から独立して選択される。いくつかの実施形態において、各L₁は、独立して、基L₄、L₅、L₇、L₉、L₁₃、L₁₄、L₁₈のうちの少なくとも2つの結合の組み合わせである。

30

【0111】

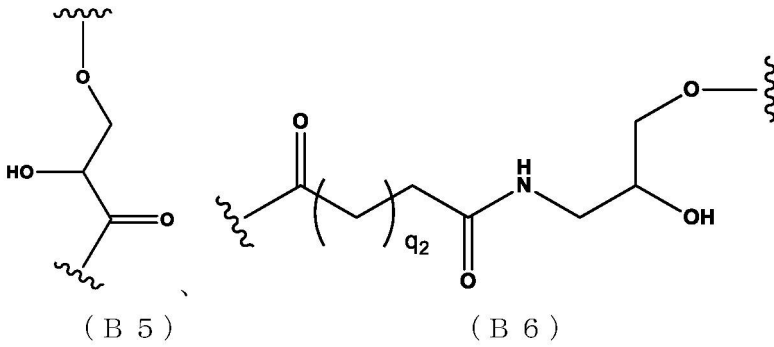
いくつかの実施形態において、式(308)に示される複合体において、各L₁には、窒素含有骨格上のN原子に結合される結合部位と、機能性基A₀又は前記R_{AP}基に結合される結合部位とがともに含まれており、窒素含有骨格上のN原子に結合される部位は、当該N原子とアミド結合を形成する。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のL₁は、B₅、B₆、B_{5'}、又はB_{6'}から選択される。

【0112】

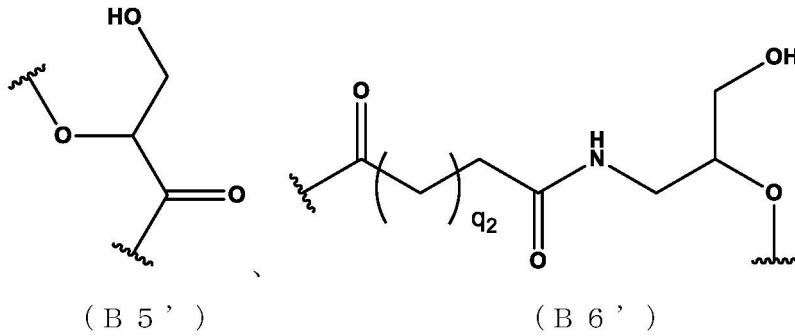
40

50

【化 1 6】



10



20

式中、



は、基が共有結合的に結合する部位を表し、 q_2 は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態において、 q_2 は、1 ~ 5 の整数である。

【0 1 1 3】

いくつかの実施形態において、各 R_{AP} 基は、1 つ又は複数の送達基を含む。いくつかの実施形態において、式 (308) に示される化合物は、複数の機能性基を含む。いくつかの実施形態において、式 (308) の化合物中の各機能性基は、同じ機能性基である。いくつかの実施形態において、式 (308) の化合物中の各機能性基は、同じ目的及び機能のための機能性基である。いくつかの実施形態において、式 (308) の化合物は、異なる目的及び機能のための異なる種類の機能性基を含む。

30

【0 1 1 4】

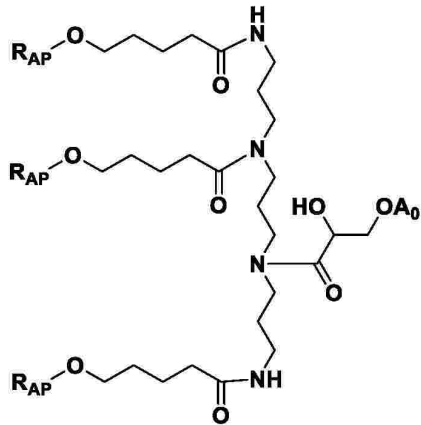
いくつかの実施形態において、前記式 (308) に示される化合物は、式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)、(422)、(423)、(424)、(425)、(426) 又は (427) に示される構造を有する。

【0 1 1 5】

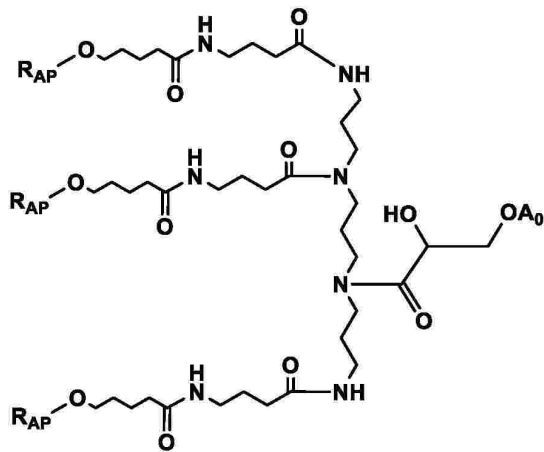
40

50

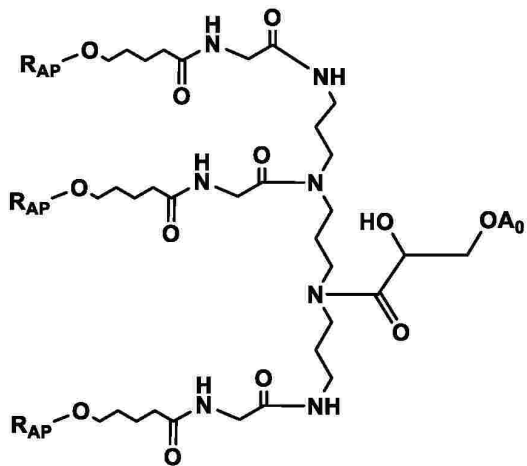
【化 1 7】



式 (403)



式 (404)



式 (405)

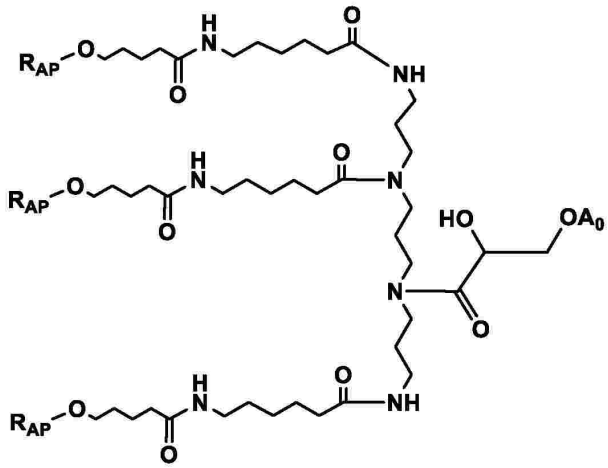
10

20

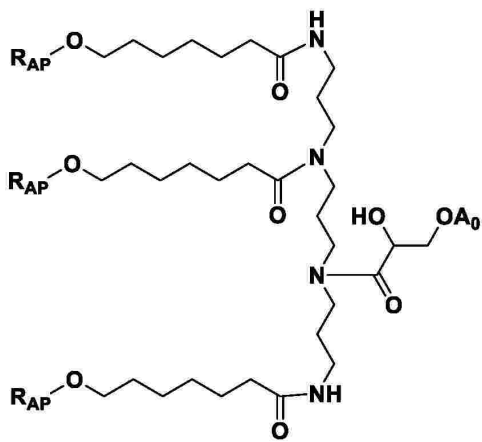
30

40

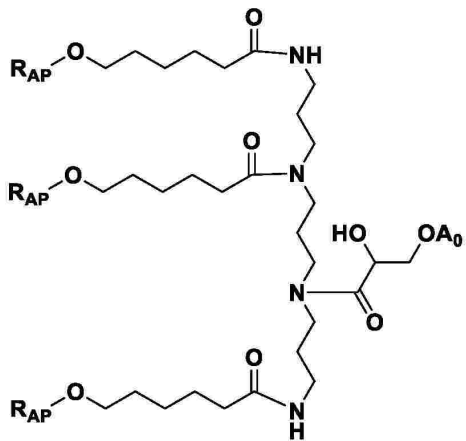
50



式 (406)



式 (407)



式 (408)

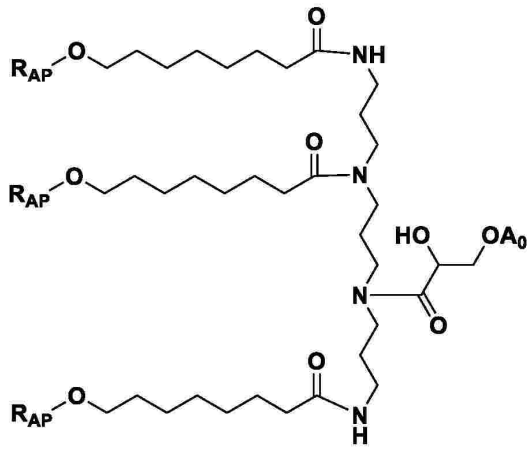
10

20

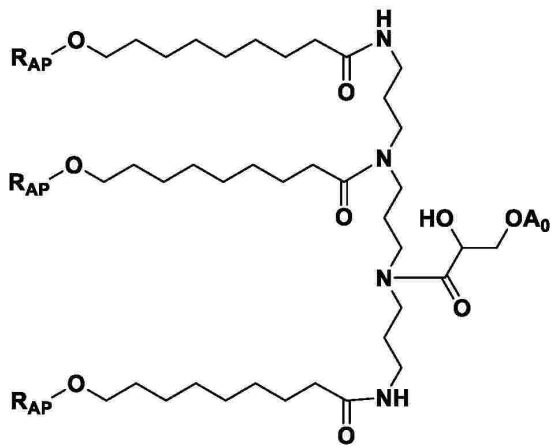
30

40

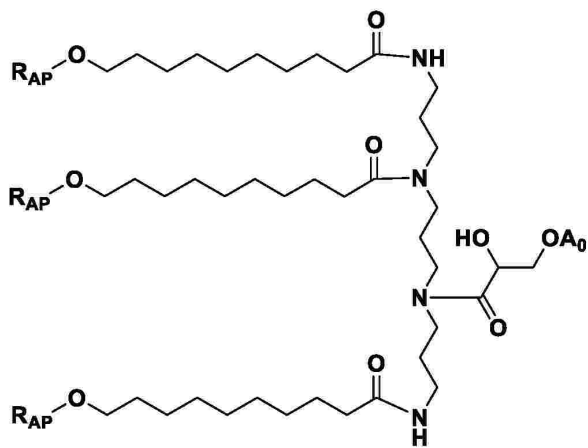
50



式 (409)



式 (410)



式 (411)

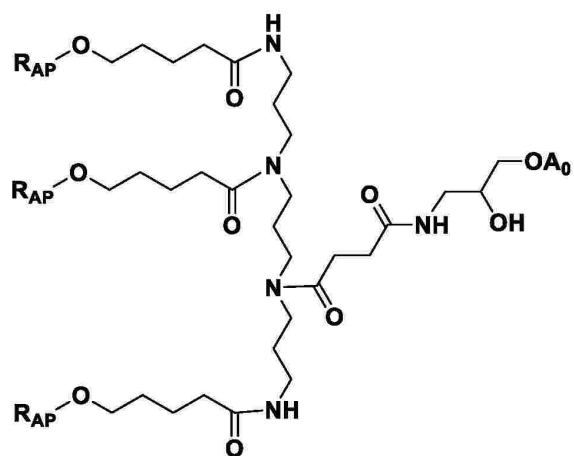
10

20

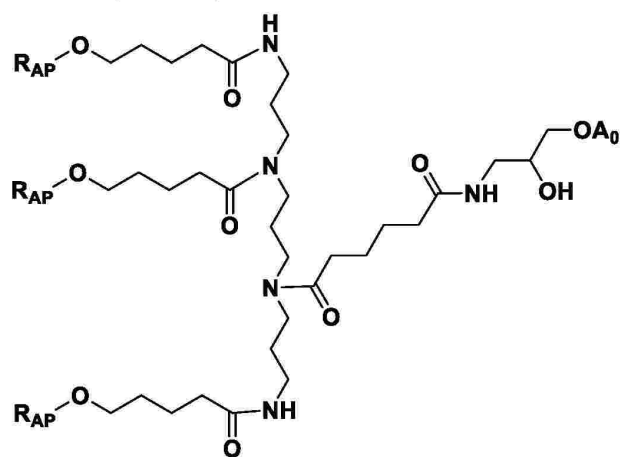
30

40

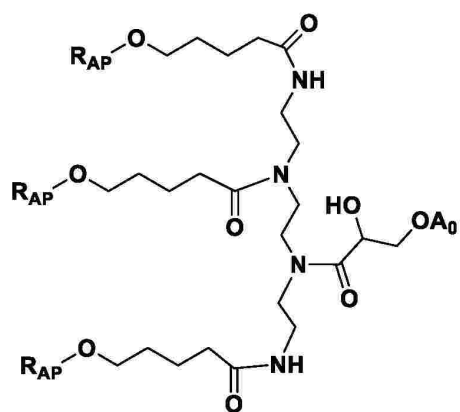
50



式 (412)



式 (413)



式 (414)

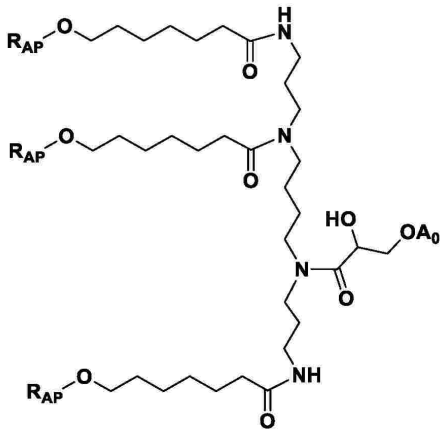
10

20

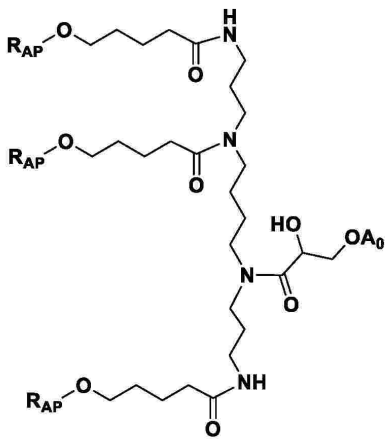
30

40

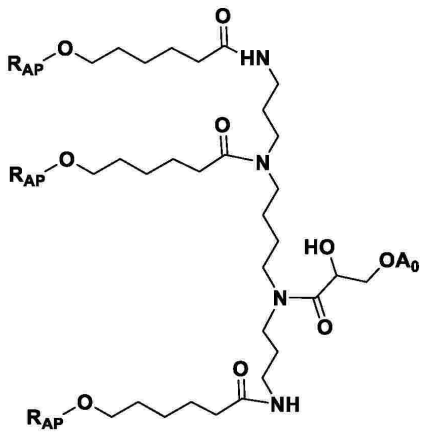
50



式 (415)



式 (416)



式 (417)

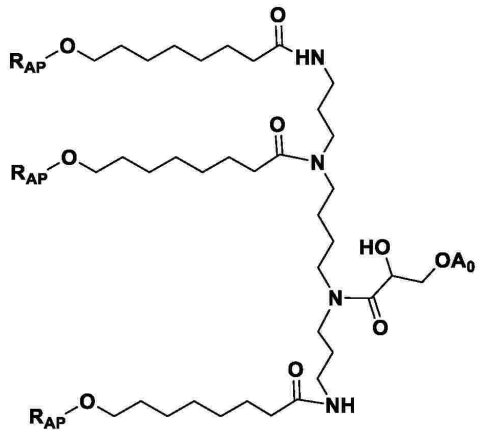
10

20

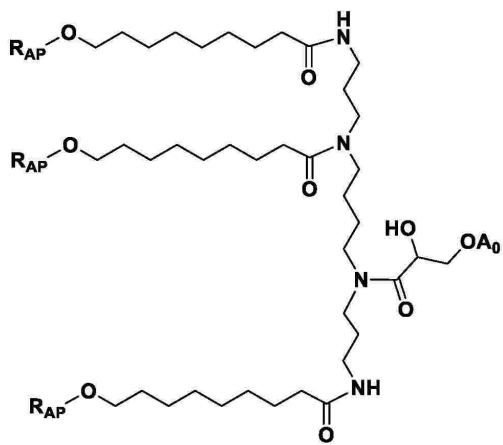
30

40

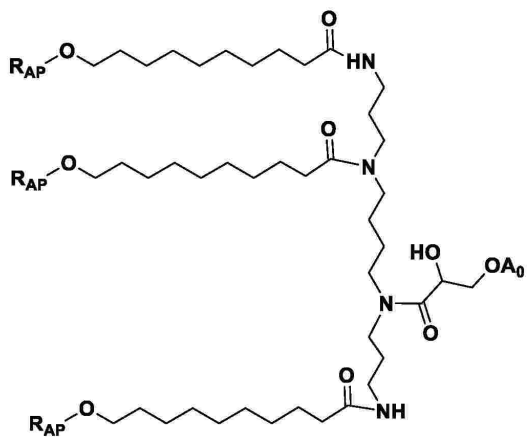
50



式 (418)



式 (419)



式 (420)

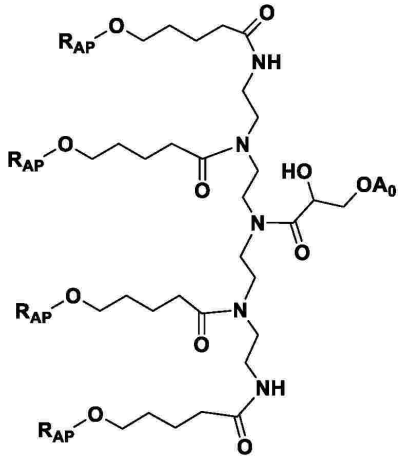
10

20

30

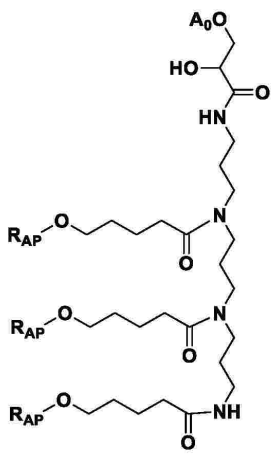
40

50



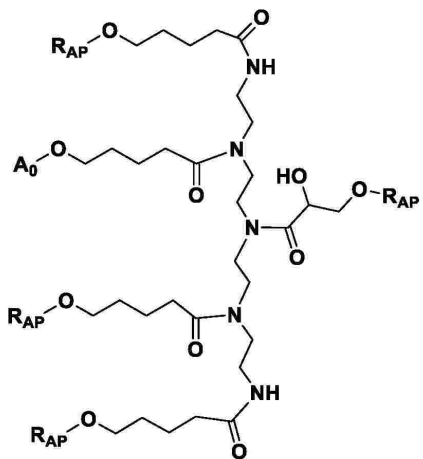
式 (421)

10



式 (422)

20

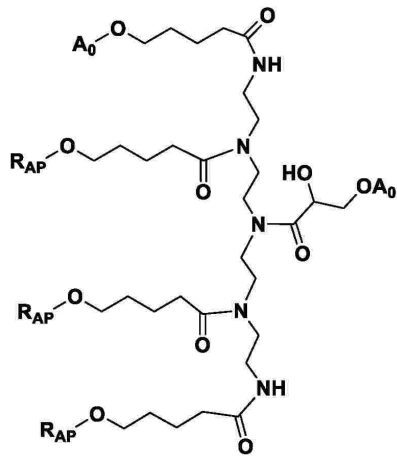


式 (423)

30

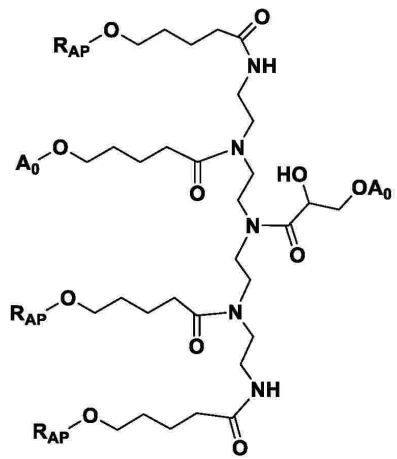
40

50



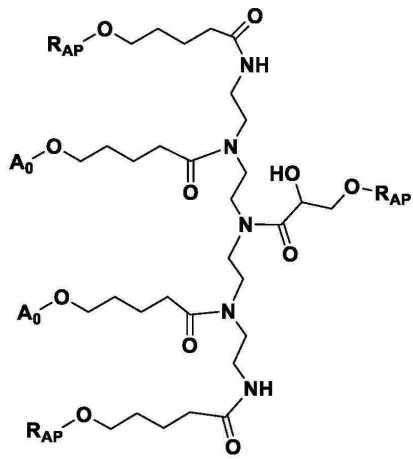
式 (4 2 4)

10



式 (4 2 5)

20

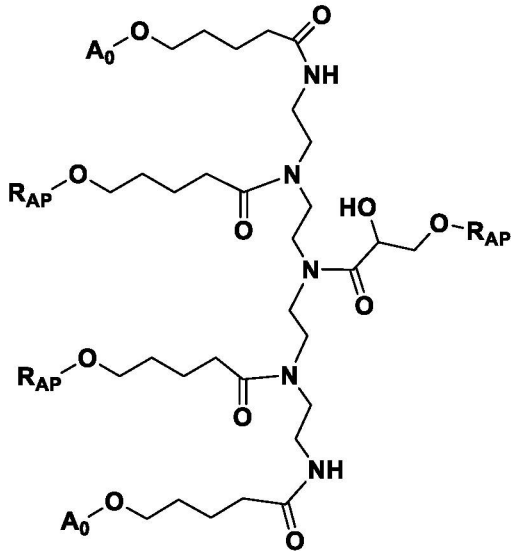


式 (4 2 6)

30

40

50



式 (4 2 7)

10

【 0 1 1 6 】

いくつかの実施形態において、結合基 R_j は、ヌクレオチド配列 I 及びヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、それぞれ、5 ~ 25 個の修飾又は非修飾のヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、少なくとも部分的に逆相補的であり、前記送達基は、前記ヌクレオチド配列 I に結合され、前記機能性基は、前記ヌクレオチド配列 I I に結合され、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、被験者の体内で免疫反応又は毒性反応を誘発しない。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、長さが等しく、かついずれも 10 ~ 20 個の修飾又は非修飾のヌクレオチドであり、或いは、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、いずれも 17 個のヌクレオチドからなり、かつ完全に逆相補的である。いくつかの実施形態において、前記送達基の 3' 末端は、リン酸エステル結合を介して前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合され、前記機能性基は、前記ヌクレオチド配列 I I の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合され、或いは、前記機能性基は、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列の 3' 末端は、リン酸エステル結合を介して前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端ヌクレオチドのリボース 5' 位に結合される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、それぞれ、配列番号 40 及び配列番号 41 に示される配列を有する。

20

30

5' - GUACA UUCUAGA UAGCC - 3' (配列番号 40)

5' - GGCUAUCUAGAAUGUAC - 3' (配列番号 41)

40

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 I I は、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列を有する。

5' - GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf - 3' (配列番号 42)

5' - GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf - 3' (配列番号 43)

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態において、前記機能性基は、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基であり、各低分子治療剤基は、細胞毒素基、抗生物質基又は血管新生阻害剤から

50

独立して選択される。低分子治療剤基を含むことにより、本開示の複合体は、当該低分子治療剤基を腫瘍に特異的に送達することができ、それにより、当該低分子治療剤基の効果により、腫瘍の疾患の進行又は症状を治療及び／又は緩和し、例えば、本開示の複合体が細胞毒素基を腫瘍に特異的に送達することにより、腫瘍における癌細胞が特異的に消滅し、それにより、細胞毒素自体の低標的性による副作用を減少させるとともに、腫瘍における癌細胞の数を顕著に減少させ、腫瘍を治療する。

【0119】

いくつかの実施形態において、前記低分子治療剤基は、以下の低分子治療剤から1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成される。前記低分子治療剤は、メトトレキサート、ドキシソルピシン、ピンカアルカロイド、オーリスタチン(MMAE及びMMAFを含む)、カリケアミシン、メイタンシン、カンプトテシン、及びカリチアマイシンから選択される。いくつかの実施形態において、前記低分子治療剤基は、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)から1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成される基である。

10

【0120】

前記機能性基は、任意の適切な方式で本開示の複合体に含まれてもよい。例えば、機能性基A₀と前記主鎖部分とを前述の複合結合部により結合することができる。

【0121】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体は、1つ又は複数の送達助剤基を更に含み、前記送達助剤基は、C₁₀~C₃₀炭化水素基、コレステロール基、リン脂質基のうちから選択される1つ又は複数である。当該送達助剤基を含むことにより、本開示に係る複合体は、中枢神経系における体内環境とより良好に適合することができ、より良好なバイオアベイラビリティを有することができ、及び／又は本開示に係る複合体を腫瘍により効率的に送達することができる。いくつかの実施形態において、前記送達助剤基は、共有結合又は結合基を介して前記送達基又は前記結合基に結合される。いくつかの実施形態において、前記送達助剤基は、前記機能性基に結合される。

20

【0122】

当業者は、任意の合理的な合成経路により本開示に係る複合体を製造することができる。

【0123】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体の合成方法は、脱保護反応の条件下で、溶媒中で、保護された複合体を脱保護試薬と接触させ、分離して本開示に係る複合体を得る工程を含む。保護された複合体は、本開示に係る複合体中の任意の活性官能基がいずれも保護基により保護されて形成された化合物である。いくつかの実施形態において、前記活性官能基は、ヒドロキシル基、アミノ基及び／又はリン酸基を含むが、これらに限定されず、前記保護基は、対応して、ヒドロキシル保護基、アミノ保護基及び／又はリン酸ヒドロキシル保護基(例えば、シアノエチル保護基)である。保護基の種類に応じて、用いられる溶媒、脱保護反応条件及び脱保護試薬を選択し決定する。いくつかの実施形態において、前記脱保護反応条件、溶媒及び脱保護試薬は、核酸固相合成に用いられる脱保護反応条件、溶媒及び試薬である。いくつかの実施形態において、前記方法は、保護された複合体をメチルアミン水溶液及びアンモニア水の混合溶液に添加する工程を含み、前記脱保護反応条件は、常温常圧下で1~5h反応させることを含む。いくつかの実施形態において、前記メチルアミン水溶液と飽和濃アンモニア水とを等体積で混合して前記混合溶液を得て、保護された複合体に対する前記溶液の用量は、0.1~10ml/μmolである。いくつかの実施形態において、前記分離は、カラムクロマトグラフィーによる精製、生成物の溶離液の収集及び溶媒の除去を含む。精製条件は、例えば、分取用イオンクロマトグラフィー精製カラムを用いて、塩化ナトリウム水溶液とリン酸ナトリウム水溶液の勾配溶離剤で溶離するものであってもよい。いくつかの実施形態において、20mMのリン酸ナトリウム(pH8.1)、水/アセトニトリル=9:1(体積比)の溶媒を溶離剤Aとし、1.5Mの塩化ナトリウム、20mMのリン酸ナトリウム(pH8.1)、水/

30

40

50

アセトニトリル = 9 : 1 (体積比) の溶媒を溶離剤 B とし、溶離剤 A : 溶離剤 B = 100 : 0 ~ 50 : 50 の溶離勾配で勾配溶離する。

【0124】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体は、式(101)に示される構造を有し、前記保護された複合体の合成方法は、有機溶媒中で、カップリング反応の条件下で、活性基 R_{x1} 及び送達基を含む化合物を、活性基 R_{x2} 及び機能性基を含む化合物と接触させ、反応させて前記保護された複合体を得る工程を含み、前記送達基は、前述のアプタマーから1つ若しくは複数の水素原子又は1つ若しくは複数の官能基を除去することにより形成され、各前記機能性基は、独立して、腫瘍に対して治療効果を有する低分子治療剤基であり、前記送達基及び機能性基のうちの任意の活性基は、いずれも保護基により保護され、前記活性基 R_{x1} 及び前記活性基 R_{x2} は、反応により共有結合又は結合基 R_j を形成可能な基である。いくつかの実施形態において、活性基 R_{x1} が結合される送達基と、活性基 R_{x2} が結合される機能性基とのモル比は、 $m_0 : n_0$ である。いくつかの実施形態において、前記送達基及び機能性基における活性基は、ヒドロキシル基、アミノ基、リン酸基のうちの1つ又は複数を含むが、これらに限定されず、前記保護基は、対応して、ヒドロキシル保護基、アミノ保護基、リン酸ヒドロキシル保護基(例えば、シアノエチル保護基)のうちの1つ又は複数である。

10

【0125】

当業者であれば、各種の方法により、活性基 R_{x1} 及び送達基を含む化合物を得ることができる。いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x1} 及び送達基を含む化合物は、ホスホアミダイト固相合成又はホスホジエステル/ホスホトリエステル液相合成などの当業者に周知の核酸合成方法により得ることができる。いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x1} 及び送達基を含む化合物は、ホスホロアミダイト固相合成法で得られ、当該方法は、ホスホロアミダイト固相合成の条件下で、オリゴヌクレオチド一本鎖中のヌクレオチドの順序に従って、ヌクレオシドモノマーを順に結合する工程を含み、少なくとも1つのヌクレオシドモノマーが活性基 R_{x1} を有するヌクレオシドモノマーであり、又は、全てのヌクレオシドモノマーを結合した後、ホスホロアミダイト固相合成法に従って、活性基 R_{x1} を有する1つのホスホロアミダイトモノマー又は保護されたホスホロアミダイトモノマーを結合し、その後、当該保護基を除去して活性基 R_{x1} を形成する工程を含む。ホスホロアミダイト固相合成法は、当業者に周知であり、その過程と条件が *Methods in Molecular Biology, vol. 288: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, P17 - P31* に詳細に開示されており、その全ての内容が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0126】

いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、縮合反応条件又はメルカプト-ジスルフィド結合交換反応の条件である。

【0127】

いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、縮合反応条件であり、前記縮合反応条件は、アシル化縮合反応条件、脱水縮合反応条件又はクリック化学反応の条件であり、活性基 R_{x1} と活性基 R_{x2} は、前記縮合反応が発生可能な基である。いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件は、アシル化縮合反応の条件であり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} は、アシル化縮合反応を発生させて R_I を形成できる基である。いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件は、脱水縮合反応の条件であり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} のうちの一方は、酸ハライド基又はカルボキシル基を含む基であり、他方は、アミノ基又はヒドロキシル基を含む基である。いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件は、クリック化学の条件であり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} のうちの一方は、アルキニル基を含む基であり、他方は、アジド基を含む基である。いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件は、Michael付加反応の条件であり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} のうちの一方は、メルカプト基を含む基であり、他方は、コハク酸イミド

40

50

基を含む基である。いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件は、N - ヒドロキスクシンイミド - カルボジイミド (NHS - EDC) 併用カップリング反応の条件であり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} のうちの一方は、N - ヒドロキスクシンイミド (NHS) を含む基であり、他方は、カルボジイミド基 (EDC) を含む基である。

【0128】

いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x1} 及び送達基を含む化合物は、カップリング反応の条件下で、活性基 R_{x0} を有するアプタマーと、クリック化学活性基及びアシル化基を含む架橋剤とを接触させることにより製造される。前記活性基 R_{x0} と前記アシル化基は、カップリング反応により共有結合を形成することにより、前記クリック化学活性基が本開示のアプタマーに結合される。

10

【0129】

いくつかの実施形態において、活性基 R_{x1} は、末端に1~3個のクリック化学活性基を含有する活性基であり、前記クリック化学活性基は、末端アルキニル基を含む。いくつかの実施形態において、前記アシル化基は、活性エステル基であり、例えば、NHSエステル基、イミノエステル基及びペンタフルオロフェニル基のうちの一つであってもよい。当業者であれば、各種の方法で前記架橋剤を得ることができ、例えば、前記アシル化基がペンタフルオロフェニル基であり、前記クリック化学基が末端アルキニル基を含む場合、前記架橋剤は、*stergaard, Michael E., et al. "Efficient synthesis and biological evaluation of 5'-GalNAc conjugated antisense oligonucleotides." Bioconjugate chemistry 26.8 (2015): 1451-1455*におけるScheme 1a (A)に記載された方法に従って製造することができ、その全ての内容が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x0} は、アミノ基である。いくつかの実施形態において、前記カップリング条件は、アルカリ性条件である。いくつかの実施形態において、前記アルカリ性条件は、弱アルカリ水溶液が存在する条件、例えば、炭酸水素ナトリウム水溶液が存在する条件である。

20

【0130】

当業者であれば、各種の方法で前記活性基 R_{x0} を有するアプタマーを得ることができ、いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x0} を有するアプタマーは、アプタマーの合成中に、対応する位置に活性基を含有するホスホロアミダイトモノマーを用いて製造される。当業者であれば、各種の方法で活性基を含有するホスホロアミダイトモノマーを得ることができる。いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x0} は、アミノ基であり、 R_{x0} を含有するホスホロアミダイトモノマーは、市販されているか、又は当業者に周知の方法で製造することができ、例えば、 R_{x0} を含有するホスホロアミダイトモノマーは、容易に市販されている6 - (トリフルオロアセチルアミノ) - ヘキシル - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホロアミダイトモノマーであってもよく、活性基 R_{x0} は、アミノ基であり、当該活性基 R_{x0} は、ホスホロアミダイト固相合成法で前記ホスホロアミダイトモノマーをオリゴヌクレオチド一本鎖に結合した後、当業者によって容易に達成可能な脱保護反応 (例えば、濃アンモニア水によるアミノリシス) によってトリフルオロアセチル保護基を除去して得られる。

30

40

【0131】

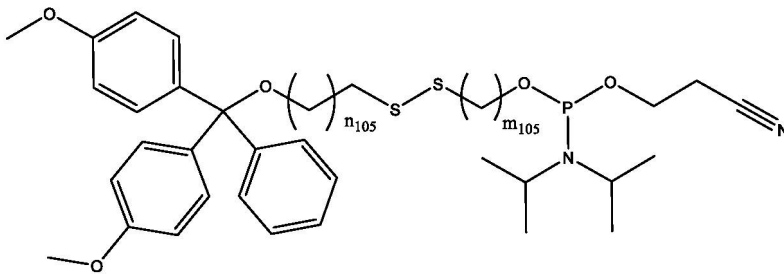
いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、メルカプト - ジスルフィド結合交換反応のうちの一つであり、前記活性基 R_{x1} 及び R_{x2} のうちの一方は、メルカプト基を含む基であり、他方は、ジスルフィド結合で結合された脱離基を含む。副反応の発生を回避するために、いくつかの実施形態において、上記活性基 R_{x1} を含有するホスホロアミダイトモノマー中の R_{x1} は、保護された R_{x1}' の形で存在しており、前記製造方法は、脱保護反応の条件下で、保護された活性基 R_{x1}' と送達基を含む製造された化合物を脱保護試薬と接触させて、分離して活性基 R_{x1} と送達基を含む化合物を得る工程を更に含む。いくつかの実施形態において、前記 R_{x1}' は、ジスルフィド結合脱離基

50

を含み、前記脱保護反応条件は、メルカプト - ジスルフィド結合交換反応条件であり、前記脱保護試薬は、ジスルフィド結合活性剤である。いくつかの実施形態において、前記ジスルフィド結合活性剤は、ジチオジピリジンである。当業者であれば、各種の方法で上記活性基 R_{x1} 又は R_{x1}' を含有するホスホロアミダイトモノマーを得ることができ、いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x1} 又は R_{x1}' を含有するホスホロアミダイトモノマーは、市販されており、例えば、式 (105) に示されるホスホロアミダイトモノマーは、市販されている。

【0132】

【化18】



式 (105)

式中、 n_{105} 及び m_{105} は、それぞれ独立して、1 ~ 10 の整数である。

【0133】

当業者であれば、各種の方法で前記活性基 R_{x2} 及び機能性基を含む化合物を得ることができる。いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、メルカプト - ジスルフィド結合交換反応条件であり、前記活性基 R_{x2} は、メルカプト基を含み、前記活性基 R_{x2} と機能性基を含む化合物は、当業者によって各種の既知の方式で得ることができ、例えば、メルカプト基を含むホスホロアミダイトモノマーを用いてホスホロアミダイト固相合成方法で製造されるか、又は市販されている。いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、ホスホロアミダイト固相合成反応条件であり、前記活性基 R_{x2} は、ホスホロアミダイト基であり、前記活性基 R_{x2} 及び機能性基を含む化合物は、例えば、容易に市販されている、ホスホロアミダイト基及び低分子治療剤基を含む化合物

であってもよい。いくつかの実施形態において、前記カップリング反応条件は、Michael 付加反応条件であり、前記活性基 R_{x2} は、N - コハク酸イミド基であり、前記活性基 R_{x2} 及び機能性基を含む化合物は、例えば、容易に市販されている、N - コハク酸イミド基及び低分子治療剤基を含む化合物

であってもよい。いくつかの実施形態において、前記活性基 R_{x1} と活性基 R_{x2} は、それぞれ、ヌクレオチド配列 I 及びヌクレオチド配列 II であり、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、5 ~ 25 個の修飾又は非修飾のヌクレオチドを含み、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、少なくとも部分的に逆相補的であり、前記送達基は、前記ヌクレオチド配列 I に結合され、前記機能性基は、前記ヌクレオチド配列 II に結合され、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、被験者の体内で免疫反応又は被験者の毒性反応を誘発せず、前記カップリング反応条件は、アニーリングして核酸二本鎖を形成する反応条件である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、いずれも 17 個のヌクレオチドからなり、かつ完全に逆相補的である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、配列番号 40 及び配列番号 41 に示される配列を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I 及び前記ヌクレオチド配列 II は、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列を有する。

【0134】

送達基は、アプタマーから 1 つ又は複数の水素原子又は官能基を除去することにより形成される。いくつかの実施形態において、連続したヌクレオチド配列の 5' 末端ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドのリボース 5' 基及び 3' 末端ヌクレオチドのリボース 3' 基は、いずれもヒドロキシル基であり、送達基は、アプタマーが 5' 末端ヌクレオチドの 5' ヒドロキシル基から 1 つの水素原子を除去することにより形成される。いくつかの実施形態において、送達基は、アプタマーが 3' 末端ヌクレオチドの 3' ヒドロキシル基から 1 つの水素原子を除去することにより形成される。いくつかの実施形態において、送達基は、アプタマーが 5' 末端ヌクレオチドから 5' ヒドロキシル基を除去することにより形成され、いくつかの実施形態において、送達基は、アプタマーが 3' 末端ヌクレオチドから 3' ヒドロキシル基を除去することにより形成される。いくつかの実施形態において、送達基は、アプタマーに含まれるヌクレオチドからリボース 2' - ヒドロキシ基を除去することにより形成される。前記アプタマーは、本分野の通常のアプタマー製造方法（例えば、核酸固相合成及び液相合成の方法）により得ることができる。核酸固相合成は、既に商用カスタマイズサービスが行われている。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチドを本開示に係る複合体に導入することができ、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを製造する方法、及び修飾ヌクレオチドをアプタマーに導入する方法も、当業者によく知られている。全ての修飾ヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品として購入されてもよく、既知の方法により製造されてもよい。

10

【0135】

いくつかの実施形態において、前記複合体は、その薬学的に許容される塩又は前駆体化合物の形態で本開示に用いられてもよい。本開示に係る文脈において、「薬学的に許容される塩」とは、薬物の安定性、溶解性及び/又はバイオアベイラビリティを増加させるために、薬物を、例えばカリウム塩、ナトリウム塩、カルボン酸塩などの、薬学的に人体に余分な副作用を与えない対応する塩に形成することを指す。「前駆体化合物」とは、それ自体が前記複合体と構造及び機能が完全に同じではないが、体内に入った後又は体液環境下で反応し、前記本開示に係る複合体を形成し、それにより、効果を発揮し、本開示に係る目的を達成することができる化合物を指す。いくつかの場合、これらの前駆体化合物は、薬物の安定性を増加させ、徐放時間を延長させ、バイオアベイラビリティを増加させるなどの効果を有する。いくつかの実施形態において、前記前駆体化合物は、人体内で反応して複合体中の全ての機能性基 A₀ を形成できる前駆体基を含む。いくつかの実施形態において、前記前駆体化合物は、複合体中の全ての活性ヒドロキシル基がアセトキシ基で置換された化合物を含む。いくつかの実施形態において、前記前駆体化合物は、プロドラッグ基を含み、前記プロドラッグ基は、複合体における前記機能性基に対応する治療剤の前駆体化合物により形成された残基である。いくつかの実施形態において、前記プロドラッグ基は、例えば、前記機能性基中のヒドロキシ基又はアミノ官能基中の活性水素がアシル基、アルキル基、又はホスホリル基で置換された基であってもよい。当業者であれば、理解できるように、これらの薬学的に許容される塩及び前駆体化合物の使用も同様に本開示に係る範囲内にある。

20

30

【0136】

医薬組成物

一態様において、本開示は、更に医薬組成物を提供する。前記医薬組成物は、本開示に係る複合体及び薬学的に許容される担体を含む。

40

【0137】

前記薬学的に許容される担体は、本分野で通常用いられる担体であってもよく、例えば、水、生理食塩水、磁性ナノ粒子 (magnetic nanoparticles、例えば、Fe₃O₄ 又は Fe₂O₃ に基づくナノ粒子)、カーボンナノチューブ (carbon nanotubes)、メソポーラスシリコン (mesoporous silicon)、リン酸カルシウムナノ粒子 (calcium phosphate nanoparticles)、ポリエチレンイミン (polyethylenimine、PEI)、ポリアミドアミン dendrimer (polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、ポリリジン (poly(L-lysine)、PLL)、キトサン (chitosan)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン

50

(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane、DOTAP)、ポリD-又はL-乳酸/グリコール酸共重合体(poly(D&L-lactic/glycolic acid) copolymer、PLGA)、ポリ(アミノエチルエチレンリン酸エステル)(poly(2-aminoethyl ethylene phosphate)、PPEEA)及びポリ(N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)(poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)、PDMAEMA)並びにこれらの誘導体のうちの1つ又は複数があるが、これらに限定されない。

【0138】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容される担体は、生理学的に許容される化合物を含み、前記化合物は、例えば、医薬組成物を安定化させるか、又は複合体及び/又は医薬組成物の吸収を増加又は減少させる役割を果たす。前記生理学的に許容される化合物は、グルコース、スクロース及び/又はデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸及び/又はグルタチオンなどの抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質、任意の共同投与物質のクリアランス又は加水分解を低減する組成物、賦形剤、安定化剤及び緩衝剤から選択される1つ又は複数である。洗浄剤は、組成物を安定化させるか、又は医薬組成物の吸収を増加又は減少させるために用いることもできる。前記生理学的に許容される化合物は、湿潤剤、乳化剤、分散剤、又は微生物の成長又は作用を防止するために特に用いられる防腐剤のうちの1つ又は複数を更に含んでもよい。前記生理学的に許容される化合物は、当業者に知られており、本開示では説明を省略する。当業者であれば、容易に理解できるように、薬学的に許容される担体及び生理学的に許容される化合物の選択は、例えば、投与経路及び任意の共同投与物質の特定の生理化学的特性に依存する。

【0139】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容される担体は、無菌であり、かつ一般的に、不要な物質を含まない。本開示に係る医薬組成物は、生理的条件に近づくために必要に応じて、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどのpH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤などの薬学的に許容される補助物質を更に含んでもよく、医薬組成物中の本開示に係る複合体の濃度は、広い範囲内で変化することができ、主に流体量、粘度、体重などに基づいて特定の投与方法に従って選択される。

【0140】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物における複合体及び薬学的に許容される担体の含有量については、特別な要件がない。いくつかの実施形態において、複合体と薬学的に許容される担体との重量比は、1:(1~500)であってもよく、いくつかの実施形態において、上記重量比は、1:(1~50)である。

【0141】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物には、薬学的に許容される他の添加剤が含まれてもよく、当該添加剤は、本分野で通常用いられる各種の製剤又は化合物のうちの1つ又は複数であってもよい。例えば、前記薬学的に許容される他の添加剤は、pH緩衝液、保護剤及び浸透圧調節剤のうちの少なくとも1つを含んでもよい。

【0142】

前記pH緩衝液は、pH7.5~8.5のトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩緩衝液及び/又はpH5.5~8.5のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、pH5.5~8.5のリン酸塩緩衝液であってもよい。

【0143】

前記保護剤は、イノシトール、ソルビトール、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース及びグルコースのうちの少なくとも1つであってもよい。前記医薬組成物の全重量を基準とし、前記保護剤の含有量は、0.01~30重量%であってもよい。

【0144】

前記浸透圧調節剤は、塩化ナトリウム及び/又は塩化カリウムであってもよい。前記浸

透圧調節剤の含有量は、前記医薬組成物の浸透圧が200～700ミリオスモル/キログラム(mOsm/kg)となるように決定される。所望の浸透圧により、当業者であれば、前記浸透圧調節剤の含有量を容易に決定することができる。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物から製造された製剤の投与中の用量は、投与方式によって調整される。

【0145】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、注射液などの液体製剤であってもよく、投与時に液体添加剤と混合して液体製剤を調製する凍結乾燥粉末注射剤であってもよい。前記液体製剤は、皮下、筋肉又は静脈注射投与に用いることができるが、これらに限定されず、穿刺注射、又は口腔吸入、又は鼻腔投与などの方式で前記医薬組成物を送達することもできるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、皮下、筋肉、静脈又は髄腔内注射投与に用いられる。

10

【0146】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、リポソーム製剤の形態であってもよい。いくつかの実施形態において、前記リポソーム製剤に用いられる薬学的に許容される担体は、アミン含有トランスフェクション化合物(以下、有機アミンともいう)、補助脂質及び/又はポリエチレングリコール化脂質を含む。前記有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質は、それぞれ中国特許出願CN103380113A(引用によりその全体を本開示に組み込む)に記載されたアミン含有トランスフェクション化合物又はその薬学的に許容される塩若しくは誘導体、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質のうちから選択される1つ又は複数であってもよい。

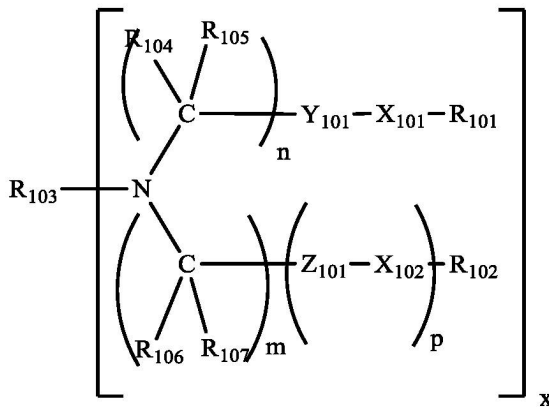
20

【0147】

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、中国特許出願CN103380113Aに記載された、式(201)に示される化合物又はその薬学的に許容される塩であってもよい。

【0148】

【化19】



30

式(201)

式中、

X₁₀₁及びX₁₀₂は、それぞれ独立して、O、S、N-A又はC-Aであり、Aは、水素又はC₁～C₂₀炭化水素鎖であり、

Y₁₀₁及びZ₁₀₁は、それぞれ独立して、C=O、C=S、S=O、CH-OH又はSO₂であり、

R₁₀₁、R₁₀₂、R₁₀₃、R₁₀₄、R₁₀₅、R₁₀₆及びR₁₀₇は、それぞれ独立して、水素、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖脂肪族基、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロ脂肪族基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール基、置換又は無置

40

50

換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリール基であり、

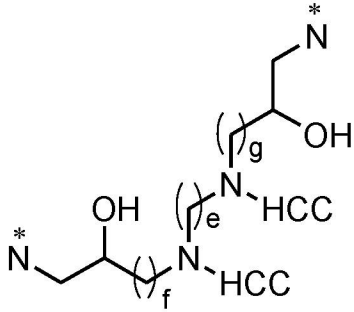
x は、1 ~ 10 の整数であり、

n は、1 ~ 3 の整数であり、m は、0 ~ 20 の整数であり、p は、0 又は 1 であり、ここで、m = p = 0 である場合、R₁₀₂ は、水素であり、

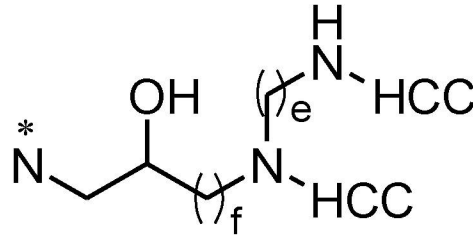
n 及び m のうちの少なくとも 1 つが 2 である場合、R₁₀₃ と式 (201) における窒素とは、式 (202) 又は式 (203) に示される構造を形成する。

【0149】

【化20】



式 (202)、



式 (203)、

10

式中、g、e 及び f は、それぞれ独立して、1 ~ 6 の整数であり、「HCC」は、炭化水素鎖を表し、各 *N は、式 (201) における窒素原子を表す。

20

【0150】

いくつかの実施形態において、R₁₀₃ は、ポリアミンである。他の実施形態において、R₁₀₃ は、ケタールである。いくつかの実施形態において、式 (201) における R₁₀₁ 及び R₁₀₂ のそれぞれは、独立して、任意に置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アルキル基又はアルケニル基であり、前記アルキル基又はアルケニル基は、3 ~ 約 20 個の炭素原子、例えば、8 ~ 約 18 個の炭素原子、及び 0 ~ 4 個の二重結合、例えば、0 ~ 2 個の二重結合を有する。

【0151】

いくつかの実施形態において、n と m のそれぞれは、独立して、1 又は 3 である場合、R₁₀₃ は、下記式 (204) ~ 式 (213) のいずれか 1 つであってもよい。

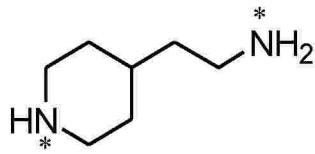
30

【0152】

40

50

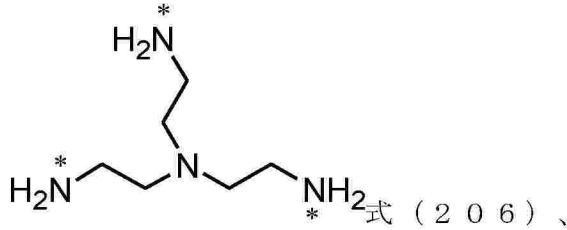
【化 2 1】



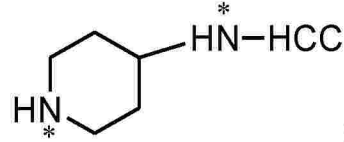
式 (204)、



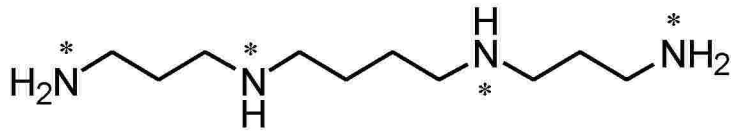
式 (205)、



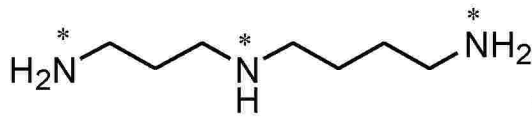
式 (206)、



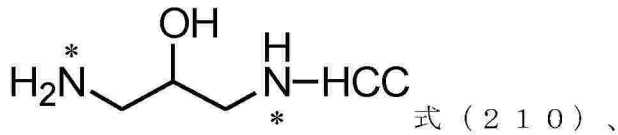
式 (207)、



式 (208)、



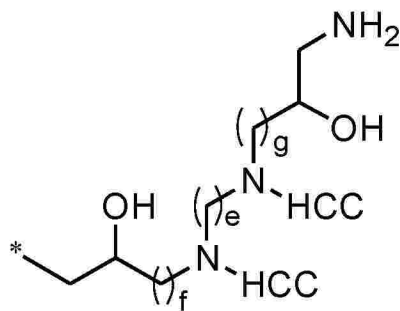
式 (209)、



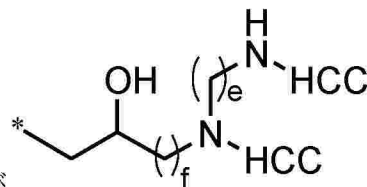
式 (210)、



式 (211)、



式 (212) 及び



式 (213)

式 (204) ~ 式 (213) において、g、e 及び f は、それぞれ独立して、1 ~ 6 の整数であり、各「HCC」は、炭化水素鎖を表し、各*は、R₁₀₃と式 (201) における窒素原子との結合可能点を示し、任意の*位置上の各Hは、式 (201) における窒素原子との結合を実現するために置換されてもよい。

40

【0153】

当業者であれば、任意の合理的な方法で式 (201) に示される化合物を得ることができる。いくつかの実施形態において、式 (201) に示される化合物は、中国特許出願 CN 103380113 A の記載により製造されてもよい。

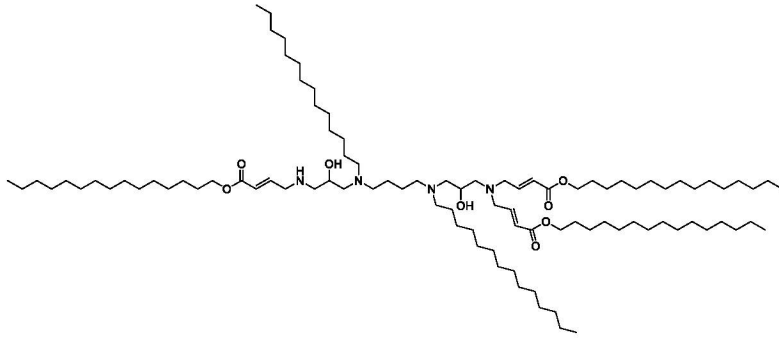
【0154】

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、式 (214) に示される有機アミン及び/又は式 (215) に示される有機アミンである。

50

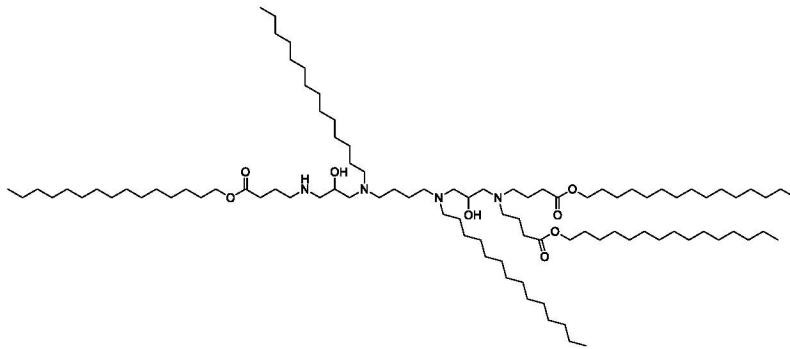
【 0 1 5 5 】

【 化 2 2 】



式 (2 1 4) 、

10



式 (2 1 5)

20

【 0 1 5 6 】

前記補助脂質は、コレステロール、コレステロールのアナログ及び/又はコレステロールの誘導体であり、

前記ポリエチレングリコール化脂質は、1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン - N - [メトキシ(ポリエチレングリコール)] - 2000である。

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物における前記有機アミン、前記補助脂質及び前記ポリエチレングリコール化脂質のモル比は、(19.7 ~ 80) : (19.7 ~ 80) : (0.3 ~ 50)であり、例えば、(50 ~ 70) : (20 ~ 40) : (3 ~ 20)であってもよい。

30

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物の粒子は、約30 nm ~ 約200 nmの平均径を有し、一般的に約40 nm ~ 約135 nmであり、より一般的には、当該リポソーム粒子の平均径は、約50 nm ~ 約120 nm、約50 nm ~ 約100 nm、約60 nm ~ 約90 nm又は約70 nm ~ 約90 nmである。例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150又は160 nmである。

40

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物における複合体と全脂質(例えば有機アミン、補助脂質及び/又はポリエチレングリコール化脂質)の重量比(重量/重量比)は、約1 : 1 ~ 約1 : 50、約1 : 1 ~ 約1 : 30、約1 : 3 ~ 約1 : 20、約1 : 4 ~ 約1 : 18、約1 : 5 ~ 約1 : 17、約1 : 5 ~ 約1 : 15、約1 : 5 ~ 約1 : 12、約1 : 6 ~ 約1 : 12又は約1 : 6 ~ 約1 : 10の範囲内にあり、例えば、本開示に係る複合体と全脂質の重量比は、約1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17又は1 : 18である。

50

【0160】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、市販時に各成分が独立して存在してもよく、使用時に液体製剤として存在してもよい。いくつかの実施形態において、本開示に係る複合体と上記薬学的に許容される担体により形成された医薬組成物は、既知の各種の方法に従って製造されてもよく、従来のアプタマー又は複合体の代わりに本開示に係る複合体を用いればよい。いくつかの実施形態において、以下の方法に従って製造されてもよい。

【0161】

有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質を上記モル比でアルコールに懸濁させ均一に混合して脂質溶液を得る。アルコールの用量は、得られた脂質溶液の総質量濃度が2～25 mg/mL、例えば、8～18 mg/mLとなるように決定される。前記アルコールは、薬学的に許容されるアルコール、例えば、室温付近で液体であるアルコール、例えば、エタノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、グリセリン、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール300、ポリエチレングリコール400のうちから選択される1つ又は複数であり、例えばエタノールであってもよい。

10

【0162】

本開示に係る複合体を緩衝塩溶液に溶解し、複合体水溶液を得る。緩衝塩溶液の濃度は、0.05～0.5 Mであり、例えば、0.1～0.2 Mであってもよく、緩衝塩溶液のpHは、4.0～5.5に調整され、例えば、5.0～5.2であってもよく、緩衝塩溶液の用量は、複合体の濃度が0.6 mg/mL以下、例えば、0.2～0.4 mg/mLとなるように決定される。前記緩衝塩は、可溶性酢酸塩、可溶性クエン酸塩のうちから選択される1つ又は複数であり、例えば、酢酸ナトリウム及び/又は酢酸カリウムであってもよい。

20

【0163】

脂質溶液と複合体水溶液を混合した後、得られた生成物を40～60 で少なくとも2分間、例えば、5～30分間インキュベートし、インキュベートしたりポソーム製剤を得る。脂質溶液と複合体水溶液との体積比は、1：(2～5)であり、例えば、1：4であってもよい。

【0164】

インキュベートしたりポソーム製剤を濃縮又は希釈し、不純物を除去し、除菌し、本開示に係る医薬組成物を得る。その物理化学的パラメータとしては、pHが6.5～8であり、封入効率が80%を下回らず、粒子径が40～200 nmであり、多分散指数が0.30を上回らず、浸透圧が250～400 mOsm/kgである。例えば、物理化学的パラメータとしては、pHが7.2～7.6であり、封入効率が90%を下回らず、粒子径が60～100 nmであり、多分散指数が0.20を上回らず、浸透圧が300～400 mOsm/kgであってもよい。

30

【0165】

ここで、濃縮又は希釈は、不純物を除去する前、不純物を除去した後又は同時に行われてもよい。不純物を除去する方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、タンジェンシャルフロー系、中空系カラムを用い、100 KDaの条件で限外濾過し、限外濾過交換溶液をpH 7.4のリン酸塩緩衝液(PBS)としてもよい。除菌方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、0.22 μmのフィルターで濾過して除菌してもよい。

40

【0166】

本開示の複合体の使用

更に別の態様において、本開示は更に、本開示に係る複合体及び/又は医薬組成物の、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を治療する薬物の製造における使用を提供する。

【0167】

更に別の態様において、本開示は更に、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を治療する方法を提供する。前記方法は、本開示に記載の複合体及び/又は医薬組成物を、必要な被験者

50

に投与する工程を含む。

【0168】

本開示に係る複合体及び／又は医薬組成物を投与することにより、本開示の方法は、腫瘍及び腫瘍関連疾患又は症状を効果的に治療することができ、かつ、本開示に係る複合体の高い特異的標的効果により、意図しない身体他の器官／組織における治療剤の分布を減少させ、潜在的な副反応を低減することができる。特に、腫瘍治療分野において一般的に用いられ、重大な副作用があることが知られている放射線療法及び／又は化学療法薬にとって、重要な意義及び顕著な価値を有する。

【0169】

本開示で用いられる用語「薬剤投与／投与」とは、複合体及び／又は医薬組成物を少なくとも部分的に所望の部位に局在化して所望の効果を生じさせる方法又は経路により、複合体及び／又は医薬組成物を被験体の体内に入れることを指す。本開示の方法に適した投与経路は、局所投与及び全身投与を含む。一般的には、局所投与により、被験体全身よりも多くの複合体及び／又は医薬組成物が特定の部位に送達されるが、全身投与により、前記複合体及び／又は医薬組成物が被験体のほぼ全身に送達される。

10

【0170】

更に、本開示の発明者らは、本開示の複合体及び／又は医薬組成物が血液脳関門を効率的に通過し、全身投与の場合に脳内の腫瘍を標的とすることができ、それにより、機能性基の送達効率を更に向上させ、コストを節約し、望ましくない副反応を低減することを予想外に発見した。

20

【0171】

本分野で既知の任意の適切な経路で被験体に投与することができ、前記経路としては、経口投与又は胃腸外経路、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、気管内投与（エアロゾル）、肺部投与、鼻部投与、直腸投与及び局所投与（口腔内投与と舌下投与を含む）を含むが、これらに限定されない。投与頻度は、1日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月又は1年に1回又は複数回であってもよい。

【0172】

本開示の前記複合体及び／又は医薬組成物の用量は、本分野における一般的な用量であってもよく、前記用量は、各種のパラメータ、特に被験体の年齢、体重及び性別により決定されてもよい。細胞培養又は実験動物で標準薬学的手順により毒性と治療効果を測定し、例えば、LD₅₀（50%の群体を死亡させる用量）及びED₅₀（定量的反応において、50%の最大反応強度を引き起こすことができる用量を指し、定性的反応において、50%の実験対象に陽性反応が発生する場合の用量を指す）を測定してもよい。細胞培養分析及び動物研究により得られたデータに基づいてヒト用量の範囲を得ることができる。

30

【0173】

本開示に記載の複合体及び／又は医薬組成物を投与する場合、例えば、雄又は雌、6～12週齢、体重18～25gのC57BL/6J又はC3H/HeNCrlVrマウスに対して、前記複合体及び／又は医薬組成物中の複合体の量で計算すると、その複合体の用量が0.001～100mg/kg体重であってもよく、いくつかの実施形態において、0.01～50mg/kg体重であり、更なる実施形態において、0.05～20mg/kg体重であり、より更なる実施形態において、0.1～15mg/kg体重であり、また更なる実施形態において、0.1～10mg/kg体重である。本開示に記載の複合体及び／又は医薬組成物を投与する場合、上記用量が好ましい。

40

【0174】

キット

本開示は、キットを提供する。前記キットは、本開示に係る複合体及び／又は医薬組成物を含む。

【0175】

いくつかの実施形態において、本開示に記載のキットは、複合体及び／又は医薬組成物を容器内で提供することができる。いくつかの実施形態において、本開示に記載のキット

50

は、薬学的に許容される賦形剤を提供する容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットには、他の成分、例えば、安定化剤又は防腐剤などが含まれてもよい。いくつかの実施形態において、本開示の前記キットは、本開示に記載の複合体及び/又は医薬組成物を提供する容器以外の他の容器に少なくとも1つの他の治療剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットは、複合体及び/又は医薬組成物と薬学的に許容される担体及び/又は添加剤又は他の成分（存在する場合）を混合するための説明書を含んでもよい。

【0176】

本開示のキットにおいて、前記複合体及び薬学的に許容される担体及び/又は添加剤、並びに前記医薬組成物、及び/又は薬学的に許容される添加剤は、任意の形態、例えば液体形態、乾燥形態又は凍結乾燥形態で提供することができる。いくつかの実施形態において、前記複合体及び薬学的に許容される担体及び/又は添加剤、並びに前記医薬組成物及び任意の薬学的に許容される添加剤は、基本的にクリーン及び/又は無菌である。いくつかの実施形態において、本開示のキットで無菌水を提供することができる。

10

【0177】

以下、実施例により本開示を更に説明するが、本開示は、これによって何ら制限されない。

【実施例】

【0178】

特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、real-time PCRなどの操作は、いずれもMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載された方法を参照して行われる。

20

【0179】

製造例1~8及び18 複合体AP1~AP8、AP18の合成

固相合成方法により、それぞれ、表1における番号がAP1~AP8及びAP18の複合体を合成し、かつ、それぞれ表1におけるAP1~AP8及びAP18に対応するヌクレオチド配列に従って、3'から5'に向かって全てのヌクレオシドモノマーを順に結合した後、固相合成方法でヌクレオシドホスホロアミダイトモノマーを結合する方式に従ってCy5ホスホロアミダイトモノマー（蘇州吉瑪公司から購入、ロット番号CY5P21H1B）を結合した。その後、ヌクレオチド配列をメチルアミン水溶液とアンモニア水の等体積混合溶液に加え、オリゴヌクレオチドに対する溶液の用量は、0.5ml/μmolであり、25℃で2h反応させ、濾過して固体を除去し、上澄み液を真空濃縮して乾燥させた。

30

【0180】

製造型イオンクロマトグラフィー精製カラム（Source 15Q）により、NaCl水溶液による勾配溶離で、製造した複合体の精製を完了した。具体的には、20mMのリン酸ナトリウム（pH8.1）、水/アセトニトリル=9:1（体積比）の溶媒を溶離剤Aとし、1.5Mの塩化ナトリウム、20mMのリン酸ナトリウム（pH8.1）、水/アセトニトリル=9:1（体積比）の溶媒を溶離液Bとし、溶離剤A:溶離剤B=100:0~50:50の溶離勾配で勾配溶離した。生成物の溶離液を回収してから合わせ、逆相クロマトグラフィー精製カラムにより脱塩し、具体的な条件としては、セファデックスカラムにより脱塩し、充填剤をセファデックスG25とし、脱イオン水で溶離した。得られた溶離液を濃縮して溶媒を除去して凍結乾燥させ、5'末端ヌクレオチドのリボース5'位がリン酸エステル基結合基を介して蛍光基Cy5に結合される複合体AP1~AP8及びAP18をそれぞれ得た。

40

【0181】

上記複合体AP1~AP8及びAP18の合成が完了した後、製造して得られた複合体を超純水（Milli-Q超純水装置製、抵抗率18.2MΩ·cm（25℃））で濃度が0.2mg/mLになるまで希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-

50

MS、Liquid Chromatography - Mass Spectrometry、Waters社から購入、型番：LCT Premier)を用いて、分子量を検出した。その結果、分子量の実測値は、理論値と一致し、これにより、目的の複合体が得られたことが示されている。

【0182】

複合体の分子量及びMS値を下記表1aに示す。

【0183】

表1a 複合体の質量分析結果

【表1】

番号	MS理論値	MS実測値
AP1	11113.51	分子イオンピーク：1850.9 (6価)、 1586.3 (7価)
AP2	11113.51	分子イオンピーク：1850.9 (6価)、 1586.3 (7価)
AP3	8173.61	8171.39
AP4	7814.38	7812.23
AP5	7455.14	7452.96
AP6	8516.85	8514.56
AP7	8414.74	分子イオンピーク：2101.9 (4価)、 1681.4 (5価)
AP8	8471.75	8469.53
AP18	10704.67	10703.27

10

20

【0184】

比較製造例9～17及び19 対照複体の比較AP9～比較AP17、比較AP19の合成

製造例1の方法に従って、表1における番号が比較AP9～比較AP17、比較AP19の複合体をそれぞれ合成し、分子量を検出して、合成された複合体を確認した。相違点は、表1における比較AP9～比較AP17、比較AP19に対応する配列にそれぞれ従って、ヌクレオシドモノマーを順に結合したのみである。それにより、5'末端ヌクレオチドのリボース5'位がリン酸エステル基結合基を介して蛍光基Cy5に結合される対照複体の比較AP9～比較AP17、比較AP19をそれぞれ得た。

30

【0185】

表1 複体のヌクレオチド配列

40

50

【表 2】

製造例	複合体	ヌクレオチド配列 5' - 3'	配列番号
製造例 1	AP 1	CY5-UmCmUmAmUmGmGmCmUmGmCmCmGmAmUmCmUmGmGmUmCmUmCmCmAmUmGmUmAmCmGmUm	33
製造例 2	AP 2	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm	21
製造例 3	AP 3	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	27
製造例 4	AP 4	CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	28
製造例 5	AP 5	CY5-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm	29
製造例 6	AP 6	CY5-AmCmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	30
製造例 7	AP 7	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmCmUmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	31
製造例 8	AP 8	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmUmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	32
比較製造例 9	比較 AP 9	CY5-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmCmUmGmUmGmUmCmCm	45
比較製造例 10	比較 AP 10	CY5-GmAmUmCmUmGmUmGmUmCmUmUmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmCm	46
比較製造例 11	比較 AP 11	CY5-GmAmUmCmGmUmGmAmCmGmAmCmUmCmUmUmGmUmCmUmGmCmUmGmUmCmCmUmGmAmUmCm	47
比較製造例 12	比較 AP 12	CY5-CmGmUmCmUmCmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmGmAm	48
比較製造例 13	比較 AP 13	CY5-GmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	49
比較製造例 14	比較 AP 14	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm	50
比較製造例 15	比較 AP 15	CY5-CmUmGmGmAmCmAmGmAmCmGmUmGmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm	51
比較製造例 16	比較 AP 16	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm	52
比較製造例 17	比較 AP 17	CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmAmGmCmUmCmGmUmGmUmGmAmUmCmUmCm	53
製造例 18	AP 18	CY5-CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGcfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf	54
比較製造例 19	比較 AP 19	CY5-UfCfUfAUfGGcfUfGcfCfGAUfCfUfGcfUfGcfUfCfUfCfAUfGUfACfGUf	44

10

20

30

【0186】

表 1 において、大文字 C、G、U、A は、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字 m は、当該文字 m の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 f は、当該文字 f の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、Cy5 は、蛍光色素基 Cy5 (Cyanine 5) 基のアプタマーにおける結合部位を表す。

40

【0187】

製造例 20 複合体 20 の合成

表 2 複合体中のヌクレオチド配列

50

【表 3】

製造例	複合体	配列	ヌクレオチド配列 5' - 3'	配列番号
製造例 20	複合体 20	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm	21
製造例 21	複合体 21	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUm	24
製造例 22	複合体 22	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm	22
製造例 23	複合体 23	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmUmUm	26
製造例 24	比較複合体 24	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmCmUmGmUmGmUmCmCm	45
製造例 25	比較複合体 25	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmGmUmCmUmCmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmGmAm	48
製造例 26	複合体 26	オリゴヌクレオチド一本鎖	MMAE-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm	29

10

20

【0188】

表 2 において、大文字 C、G、U、A は、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字 m は、当該文字 m の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、MMAE は、低分子薬物基 MMAE (モノメチルオーリスチン E) 基のアプタマーにおける結合部位を表す。

【0189】

本製造例において、以下の工程に従って複合体 20 を製造し、当該複合体 20 は、複合体 AP2 中の染料基を低分子薬物基 MMAE に置換し、前記結合基は、2 - (ホスフェート - (CH₂)₆ - S -) - マレイミドヘキサノイル - パリン - シトルリン - p - アミノベンジルサブユニットである。

30

【0190】

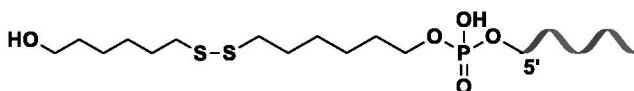
(20 - 1) オリゴヌクレオチド S1 の製造

固相合成方法により表 2 における複合体 20 中のオリゴヌクレオチド配列を合成した。相違点は、表 2 における複合体 20 に対応するオリゴヌクレオチド配列に従って、ヌクレオチドモノマーを順に結合し、固相合成中に、5' 末端の最後のヌクレオチドモノマーを結合した後、ヌクレオチドホスホロアミダイトモノマーを結合する方法に従って、HO - (CH₂)₆ - S - S - (CH₂)₆ - 基を含有するホスホロアミダイトモノマー (Honeygene Biotech 社から購入) を結合し、固相担体からオリゴヌクレオチド一本鎖を切断し、式 (20 - a) に示されるオリゴヌクレオチド一本鎖 S1 (70.00 mg、6.42 μmol) を得たことのみである。

40

【0191】

【化 23】



S1

式 (20 - a)

式中、

50

：アセトニトリル = 95 : 5 ~ 35 : 65 を移動相として勾配溶離を行った。生成物のピーク溶離液を収集し、溶媒を蒸発させて除去し、複合体 20 (55 mg、収率 56.7%) を得た。LC-MS により分子量を測定したところ、理論値が 12092.73、実測値は 12091.39 であり、実測値が理論値と一致する。これにより、当該複合体 20 が S3 に示される構造を有し、当該複合体 20 が複合体 AP2 における色素基を低分子薬物基 MMAE に置換し、かつ結合基は 2 - (ホスフェート - (CH₂)₆ - S -) - マレイミドヘキサノイル - パリン - シトルリン - p - アミノベンジルサブユニット (2 - (ホスフェート - (CH₂)₆ - S -) - MC - Val - Cit - PAB) であることが示されている。

【0195】

製造例 21 ~ 26 複合体 21 ~ 23、26 及び比較複合体 24 ~ 25 の合成

製造例 20 の方法に従って、表 2 における番号が複合体 21、複合体 22、複合体 23、比較複合体 24、比較複合体 25 及び複合体 26 をそれぞれ合成し、分子量を検出して、合成された複合体を確認した。相違点は、表 2 における複合体 21、複合体 22、複合体 23、比較複合体 24、比較複合体 25 及び複合体 2 に対応する配列にそれぞれ従って、ヌクレオシドモノマーを順に結合したことのみである。

【0196】

複合体の分子量及び MS 値を下記表 2 a に示す。

【0197】

表 2 a : 複合体の質量分析結果

【表 4】

番号	MS 理論値	MS 実測値
複合体 20	12092.73	12091.39
複合体 21	9473.03	9472.07
複合体 22	9473.03	9471.76
複合体 23	9472.05	9472.2
比較複合体 24	9473.03	9471.41
比較複合体 25	12092.73	12091.48
複合体 26	8434.37	8434.09

【0198】

実験例 1 複合体のマウス体内での標的性

本実験例は、製造された複合体 AP2、AP3 ~ 8 及び比較 AP9 ~ 比較 AP12 のマウス体内での標的性を調査した。

【0199】

10% のウシ胎児血清 (FBS、RMBIO 社) を添加した DMEM 完全培地 (MACEGENE 社、品番 CM15019) で、37 °C で、5% の CO₂ / 95% の空気を含むインキュベーターで U118MG ヒト神経膠腫細胞 (広州ジェニオバイオテック有限公司から購入) を培養した。

【0200】

対数的に成長した U118MG ヒト神経膠腫細胞を取り、(0.25% のパンクレアチン) で消化し、細胞を収集し、遠心分離して上澄みを除去し、細胞を 10% の FBS を添加した DMEM 培地に再懸濁して濃度が 1×10^8 cells/mL である細胞培養液を製造した。

【0201】

実験動物は、24 匹の 12 週齢の雌の NOD-SCID マウス (ス貝福 (北京) 生物技術有限公司から購入) である。上記細胞培養液を NOD-SCID マウスの右前肢皮下位置に接種し、接種体積を 1 匹当たり 100 μ L とし、即ち、各マウスに 1×10^7 個の細胞を接種した。注射後、マウスを 20 日間飼育し続け、U118MG 皮下腫瘍を接種したマウスを得た。

10

20

30

40

50

【0202】

D MEM培地を用いて、上記で製造されたアプタマー A P 2、A P 3 ~ 8 及び比較 A P 9 ~ 比較 A P 1 2 をそれぞれ 0 . 3 m g / m L の溶液に調製した。

【0203】

U 1 1 8 M G 細胞接種 1 4 日後に投与を開始し、投与当日を D 1 とした。実験において、尾静脈注射投与の方式で 1 日に 1 回投与し、合計 3 回投与した。

【0204】

U 1 1 8 M G 皮下腫瘍を接種した 2 4 匹のマウスをランダムに 1 2 群に分け、各群 2 匹のマウスとした。

【0205】

7 群のマウスについて、各群のうちの各マウスに A P 2、A P 3、A P 4、A P 5、A P 6、A P 7 又は A P 8 をそれぞれ投与した。単回投与容積を 1 0 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は 3 m g / k g であり、順にそれぞれ試験群 1 A ~ 1 G として記録した。

10

【0206】

他の 4 群のマウスについて、各群のうちの各マウスに比較 A P 9、比較 A P 1 0、比較 A P 1 1 又は比較 A P 1 2 をそれぞれ投与した。単回投与容積を 1 0 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は 3 m g / k g であり、順にそれぞれ対照群 1 H ~ 1 K として記録した。

【0207】

他の 1 群の 2 匹のマウスについて、各マウスに D M E M 培地を投与し、投与容積を 1 0 μ L / g マウス体重とし、ブランク対照群 1 Y として記録した。

20

【0208】

初回投与 1 h、2 4 h 及び 4 8 h 後、小動物生体光学イメージングシステム I V I S L u m i n a S e r i e s I I I を用いて各マウスに対して生体イメージングを行った。D 5 に、各群のマウスを 殺し、腫瘍組織及び腎臓を取って蛍光イメージングを行った。

【0209】

図 1 A ~ 図 1 C は、順に、それぞれ異なる複合体投与 1 h、2 4 h 及び 4 8 h 後のマウス体内の蛍光イメージング結果を示す写真であり、各写真にある 3 匹のマウスのうち最も左側の 1 匹のマウスがブランク対照群 1 Y のマウスである。図 1 A から分かるように、ブランク対照群は、いかなる蛍光シグナルも示さなかったが、これと対照的に、投与 1 h 後、各試験群及び対照群のマウスは、いずれも皮下腫瘍において蛍光シグナルを示し、図 1 B 及び 1 C から分かるように、投与 2 4 h 及び 4 8 h 後、試験群 1 A ~ 1 G のマウスのみが皮下腫瘍において強い蛍光シグナルを示したが、対照群 1 H ~ 1 K のマウスは、ほとんど蛍光シグナルを示さないか、又は弱い蛍光シグナルしか示さなかった。更に、図 1 D は、D 5 にマウスを 殺した後の、各群のマウスの腫瘍組織と腎臓の蛍光シグナルイメージングの写真であり、B l a n k は、ブランク対照群 1 5 Y を表す。図 1 D から分かるように、ブランク対照群 1 Y 及び対照群 1 H ~ 1 K のマウスの腫瘍組織は、ほとんど蛍光シグナルを示さないか、又は非常に弱い蛍光シグナルしか示さなかったが、これと対照的に、本開示の複合体を投与した試験群 1 A ~ 1 G のマウスの腫瘍組織は、いずれも強い蛍光シグナルを示すとともに、代謝器官腎臓においては微弱な蛍光シグナルしか示さなかった。これにより、対照複合体に比べて、本開示に係る複合体中の送達基を含む複合体は、腫瘍組織を安定して効率的に標的とすることができることが示されている。

30

40

【0210】

実験例 2 複合体のマウス体内での標的性

本実験例は、製造された複合体 A P 2、A P 1 及び比較 A P 1 3 ~ 比較 A P 1 7 のマウス体内での標的性を調査した。

【0211】

1 0 % のウシ胎児血清 (F B S、R M B I O 社) を添加した D M E M 完全培地 (M A C

50

GENE社、品番CM15019)で、37℃で、5%のCO₂/95%の空気を含むインキュベーターでU118MGヒト神経膠腫細胞(広州ジェニオバイオテック有限公司から購入)を培養した。

【0212】

対数的に成長したU118MGヒト神経膠腫細胞を取り、(0.25%のパンクレアチン)で消化し、細胞を収集し、遠心分離して上澄みを除去し、細胞を10%のFBSを添加したDMEM培地に再懸濁して濃度が 1×10^8 cells/mLである細胞培養液を製造した。

【0213】

実験動物は、16匹の12週齢の雄のNOD-SCIDマウス(ス貝福(北京)生物技術有限公司から購入)である。上記細胞培養液をNOD-SCIDマウスの右前肢皮下位置に接種し、接種体積を1匹当たり100 μ Lとし、即ち、各マウスに 1×10^7 個の細胞を接種した。注射後、マウスを20日間飼育し続け、U118MG皮下腫瘍を接種したマウスを得た。

10

【0214】

DMEM培地を用いて、上記で製造されたアプタマーAP2、AP1及び比較AP13~比較AP17をそれぞれ0.3mg/mLの溶液に調製した。

【0215】

U118MG細胞接種21日後に投与を開始し、投与当日をD1とした。実験において、尾静脈注射投与の方式で1日に1回投与し、合計3回投与した。

20

【0216】

U118MG皮下腫瘍を接種した16匹のマウスをランダムに8群に分け、各群2匹のマウスとした。

【0217】

2群のマウスについて、各群のうちの各マウスにAP2又はAP1をそれぞれ投与した。単回投与容積を10 μ L/gマウス体重とし、計算した単回投与量は3mg/kgであり、順にそれぞれ試験群2A~2Bとして記録した。

【0218】

他の5群のマウスについて、各群のうちの各マウスに比較AP13、比較AP14、比較AP15、比較AP16又は比較AP17をそれぞれ投与した。単回投与容積を10 μ L/gマウス体重とし、計算した単回投与量は3mg/kgであり、順にそれぞれ対照群2C~2Gとして記録した。

30

【0219】

他の1群の2匹のマウスについて、各マウスにDMEM培地を投与した。投与容積は10 μ L/gマウス体重であり、ブランク対照群2Yとして記録した。

【0220】

初回投与1h、24h及び48h後、小動物生体光学イメージングシステムIVIS Lumina Series IIIを用いて各マウスに対して生体イメージングを行った。D6に、各群のマウスを殺し、腫瘍組織及び腎臓を取って蛍光イメージングを行った。

40

【0221】

図2A~図2Cは、順に、それぞれ異なる複合体投与1h、24h及び48h後のマウス体内の蛍光イメージング結果を示す写真であり、各写真にある3匹のマウスのうち最も左側の1匹のマウスがブランク対照群2Yのマウスである。図2Aから分かるように、ブランク対照群は、いかなる蛍光シグナルも示さなかったが、これと対照的に、投与1h後、各試験群及び対照群のマウスは、いずれも皮下腫瘍において蛍光シグナルを示した。図2B及び2Cから分かるように、投与24h及び48h後、試験群2A及び2Bのマウスのみが皮下腫瘍において強い蛍光シグナルを示したが、ブランク対照群2Y及び対照群2C~2Gのマウスは、蛍光シグナルを全く示さなかった。更に、図2Dは、D6にマウスを殺した後の、各群のマウスの腫瘍組織と腎臓の蛍光シグナルイメージングの写真であ

50

り、Blankは、ブランク対照群2Yを表す。図2Dから分かるように、ブランク対照群2Y及び対照群2C～2Gのマウスの腫瘍組織は、蛍光シグナルを全く示さなかったが、これと対照的に、本開示の複合体を投与した試験群2A又は2Bのマウスの腫瘍組織は、いずれも強い蛍光シグナルを示すとともに、代謝器官腎臓においては非常に弱い蛍光シグナルしか示さなかった。これにより、対照アプタマーに比べて、式(1)に示される配列を有する各種のアプタマーは、いずれも腫瘍組織を安定して効率的に標的とすることができることが示されており、更に、これらのアプタマーにより形成された送達基を含む本開示に係る複合体が、腫瘍組織に効果的に到達できることが示されている。

【0222】

実験例3 本開示の複合体のマウス体内での活性

10

本実験例は、製造された複合体20のマウス体内での抗腫瘍活性を調査した。

【0223】

本実験のマウスは、ス貝福から購入され、生殖細胞系列は、NOD-SCIDであり、グレードは、SPFであり、性別は、いずれも雌であり、週齢は、6～8週齢であり、U118MG神経膠腫細胞は、ジェニオ社から購入された。

【0224】

対数的に成長したU118MG細胞を取り、消化して10%のウシ胎児血清(FBS、GIBCO社)のDMEM培地(MACGENE社、品番CM15019)に再懸濁して、細胞密度が 1×10^8 cells/mLに達するまで培養し、U118MG細胞を含有する培養液を得た。上記U118MG細胞を含有する培養液を各マウスの右前肢皮下位置に接種し、注射体積を100 μ Lとした。それにより、各マウスに 1×10^7 個のU118MG神経膠腫細胞を接種した。

20

【0225】

PBSを用いて、上記で製造された複合体AP2を1.94mg/mLの溶液に調製した。PBSを用いて、複合体20をそれぞれ0.625mg/mL、1.25mg/mL及び2.06mg/mLの溶液(いずれもオリゴヌクレオチドの量で計算する)に調製し、10%のDMSO+90%のPBS(体積比)の混合溶液を用いてMMAE(上海麦克林公司から購入、ロット番号C12886583)を0.038mg/mLの溶液に溶解した。

【0226】

細胞接種当日をD1とし、D8、D12、D16及びD20にそれぞれ1回投与した。

30

【0227】

36匹のマウスをランダムに以下の6群に分け、各群6匹のマウスとした。

【0228】

ブランク対照群3aについて、尾静脈注射の方式でPBSを投与し、単回投与容積を10 μ L/gとした。

【0229】

対照群3bについて、尾静脈注射の方式で上記複合体AP2溶液を投与した。単回投与容積を10 μ L/gとし、単回投与量を15.5mg/kgとした。

【0230】

対照群3cについて、尾静脈注射の方式で上記MMAE溶液を投与した。単回投与容積を10 μ L/gとし、単回投与量を0.3mg/kgとした。

40

【0231】

試験群3dについて、尾静脈注射の方式で上記濃度が0.625mg/mLの複合体20溶液を投与した。単回投与容積を10 μ L/gとし、単回投与量を5mg/kgとし(オリゴヌクレオチドの質量で計算する)、MMAEを含む用量が0.3mg/kgに相当する。

【0232】

試験群3eについて、尾静脈注射の方式で上記濃度が2.06mg/mLの複合体20溶液を投与した。単回投与容積を10 μ L/gとし、単回投与量を16.5mg/kgと

50

し（オリゴヌクレオチドの質量で計算する）、MMAEを含む用量が1 mg / kgに相当する。

【0233】

試験群3fについて、皮下注射の方式で上記濃度が1.25 mg / mLの複合体20溶液を投与した。単回投与容積を5 µL / gとし、単回投与量を5 mg / kgとし（オリゴヌクレオチドの質量で計算する）、MMAEを含む用量が0.3 mg / kgに相当する。

【0234】

[3] 検出

体外測定により腫瘍の長径及び短径を測定した。腫瘍体積を式1/2（長径×短径²）に従って計算した。D8の初回投与前に、各群の腫瘍体積を測定して平均腫瘍体積を記録し、D16から各群の腫瘍体積をそれぞれ測定して記録し、週に2回測定した。 10

【0235】

図3は、各群のマウスにおける腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。図3の結果から分かるように、PBSとAP2のみを投与したブランク対照群3aと対照群3bにおいて、腫瘍体積が急速に増加したが、MMAEのみを投与した対照群3cにおいて、腫瘍体積の増加速度が低下した。これにより、MMAE自体が腫瘍増殖に対して阻害効果を示すことが示されている。更に、MMAEの含有量が対照群3cに相当する試験群3d及び3fは、試験中に腫瘍体積がいずれも対照群3cよりも顕著に小さく、MMAEを単独で投与した対照群3cよりも優れた抗腫瘍活性を示した。これにより、本開示に係る複合体がMMAEを腫瘍組織に効果的に送達することができ、腫瘍標的能力を示すとともに、MMAE分子が他の組織に分布することによる毒性リスクを低減し、かつ各種の投与方式がいずれも腫瘍増殖を効果的に阻害することができることが示されている。また、投与量を更に増加させた試験群3eの腫瘍体積は試験期間中にほとんど増加せず、より優れた抗腫瘍効果が示されている。 20

【0236】

上記結果から明らかなように、本開示に係る複合体は、腫瘍に対して阻害効果を有する低分子薬物基を、腫瘍組織に効果的に標的送達することができ、優れた抗腫瘍活性及び用量依存効果を示すことができる。

【0237】

実験例4 複合体のU118MG細胞in-situ腫瘍モデルマウスの体内での分布 30
10%のウシ胎児血清（FBS、RMBIO社）を添加したDMEM完全培地（MACE社、品番CM15019）で、37℃で、5%のCO₂/95%の空気を含むインキュベーターでU118MGヒト神経膠腫細胞（広州ジェニオバイオテック有限公司から購入）を培養した。

【0238】

0.25 wt%のパンクレアチンで消化して細胞を収集し、上澄みを吸い出し、細胞を10%のFBSを添加したDMEM培地に再懸濁して細胞密度が4×10⁷ cells / mLである細胞培養液を製造した。

【0239】

実験動物は、6匹の12週齢の雄のNOD-SCIDマウス（ス貝福（北京）生物技術有限公司から購入）である。上記細胞培養液をNOD-SCIDマウスに接種し、マウス側脳室注射の方式で、細胞培養液をマウスの右側線条体に、AP（anteroposterior 前後/正位）：1 mm、ML（medial lateral 内側）：1.5 mm、DV（dorsal ventral 背腹側）：3.5 mmで注射し、注射体積を10 µLとし、即ち、各マウスに4×10⁵個の細胞を接種した。注射後、マウスを14日間飼育し続けた。 40

【0240】

1×DMEM培地を用いて、AP2及び比較AP19をそれぞれ0.3 mg / mL濃度（アプタマーで計算する）の複合体溶液に溶解した。4匹の前記マウスを採取し、尾静脈注射投与によって、それぞれAP2及び比較AP19溶液を注射し、全ての動物について 50

体重に応じて投与量を計算し、投与体積をいずれも $10 \mu\text{L}/\text{g}$ とし、アプタマーの量で計算すると、動物 1 匹当たりの投与量を $3 \text{mg}/\text{kg}$ とし、各群 2 匹のマウスに投与し、それぞれ試験群 4 a 及び対照群 4 b として記録した。

【0241】

2 匹のマウスのそれぞれに $10 \mu\text{L}$ の DMEM 培地を注射し、ブランク対照群 4 Y として記録した。

【0242】

投与 24 h 後、各群のマウスのうちの 1 つをそれぞれ 殺して脳組織を取り、投与 48 h 後、残りのマウスを 殺して脳組織を取り、IVIS Lumina Series III においてマウス脳組織に対して蛍光イメージングを行った。結果を図 4 に示す。 10

【0243】

図 4 は、それぞれ、ブランク対照群 4 Y、試験群 4 a 及び対照群 4 b の、投与 24 h 及び 48 h 後の U118MG の *in-situ* 腫瘍モデルを構築したマウス脳組織の蛍光イメージングの写真である。Blank は、ブランク対照群を表し、Ith は、髄腔内注射を表し、iv は、尾静脈注射を表す。図 4 の結果から分かるように、ブランク対照群及び対照 AP19 を投与した対照群 4 b は、いずれも脳内においていかなる蛍光シグナルも示しておらず、*in-situ* 腫瘍脳神経膠腫に対して顕著な標的効果がないことが示されており、これと対照的に、本開示に係る複合体を投与した試験群 4 a は、24 h 及び 48 h に、腫瘍を接種した位置においていずれも顕著な蛍光シグナルを示した。これにより、複合体 AP2 が尾静脈投与時に依然として脳神経膠腫に到達してそれを効果的に標的とすることができることが示されており、本開示に係る複合体がシステム投与の場合であっても、血液脳関門 (Blood-Brain-Barrier、BBB) を透過して脳神経膠腫に進入することが期待され、優れた標的効果及び創薬可能性を示すことも示されている。 20

【0244】

実験例 5 複合体の U118MG *in-situ* 腫瘍モデルマウスの体内での活性
実験例 4 の方法に従って、Luciferase (Photinus pyralis) レポーター遺伝子を発現する U118MG ヒト神経膠腫細胞を培養し、以下、U118MG-luc ヒト神経膠腫細胞 (南京科佰生物科技有限公司から購入) と略称する。対数的に成長した U118MG-luc ヒト神経膠腫細胞を取り、0.25 wt% のパンクレアチンで消化して細胞を収集し、遠心分離した後、上澄み液を吸い出し、無血清 DMEM 培地に細胞を再懸濁して細胞密度が $4 \times 10^7 \text{cells}/\text{mL}$ の細胞培養液を製造した。 30

【0245】

実験動物は、24 匹の 12 週齢の雄の Balb/C-nude ヌードマウス (ス貝福 (北京) 生物技術有限公司から購入) である。上記細胞培養液を Balb/C-nude ヌードマウス線条体に接種し、マウス線条体注射の方式で、細胞培養液をマウスの右側線条体に、AP (anteroposterior 前後/正位) : 1 mm、ML (medial lateral 内側) : 1.5 mm、DV (dorsal ventral 背腹側) : 3.5 mm で注射し、注射体積を $10 \mu\text{L}$ とし、即ち、各マウスに 4×10^5 個の細胞を接種した。*in-situ* 腫瘍接種後、マウスを 14 日間飼育し続けた。 40

【0246】

$1 \times \text{DMEM}$ (中科邁農 (北京) 科技有限公司から購入、ロット番号 K1902200) 培地を用いて、複合体 20 を $1 \text{mg}/\text{mL}$ の濃度 (アプタマーで計算する) の複合体溶液に溶解した。複合体 21 及び比較複合体 24 を、それぞれ $0.8 \text{mg}/\text{mL}$ 濃度 (アプタマーで計算する) の複合体溶液に溶解した。

【0247】

in-situ 腫瘍接種後 15 日目に、小動物生体光学イメージングシステム IVIS Lumina Series III を用いて、各マウスに対して生体イメージングを行い、脳蛍光強度に基づいて群分けし、各群 6 匹のマウスとし、投与当日を D1 (即ち、実 50

験 1 日目であり、以下、D 4、D 8 などは、実験 4 日目、8 日目を表し、このように類推する)とする。

【0248】

生体イメージング方法は、以下のとおりである。各マウスに10 μL/g 体重濃度で15 mg/mL の D - フルオレセイン・カリウム塩作動液 (Yeasen Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd 社から購入) を腹腔内注射し、注射 10 min 後に生体イメージング (IVIS (登録商標) Lumina III 小動物生体イメージングシステム) を行った。イメージング後、マウスの脳の蛍光領域 (ROI) を囲み、ソフトウェアにより蛍光強度 (Radiance) を測定した。この条件下で、U118MG - luc ヒト神経膠腫細胞で発現された Luciferase (Photinus pyralis) レポーター遺伝子は、蛍光応答を生成することができるため、蛍光強度は、神経膠腫細胞の増殖数を反映することができる。蛍光強度が高いほど、神経膠腫細胞の数が多いことが示されている。

10

【0249】

実験において、皮下注射投与の方式で行われ、各群のマウスにそれぞれ D 1、D 4、D 8 及び D 12 に投与した。投与前に体重を量り、体重に応じて投与した。

【0250】

試験群 5 a について、各マウスにそれぞれ複合体 2 0 を投与した。単回投与容積を 5 μL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 5 mg/kg であり、MMAE を含む用量は 0.3 mg/kg に相当する。

20

【0251】

試験群 5 b について、各マウスにそれぞれ複合体 2 1 を投与した。単回投与容積を 5 μL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 4 mg/kg であり、MMAE を含む用量は 0.3 mg/kg に相当する。

【0252】

試験群 5 c について、各マウスにそれぞれ比較複合体 2 4 を投与した。単回投与容積を 5 μL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 4 mg/kg であり、MMAE を含む用量は 0.3 mg/kg に相当する。

【0253】

ブランク対照群について、各マウスにそれぞれ D MEM 培地を投与し、単回投与容積を 5 μL/g マウス体重とした。

30

【0254】

上記方法に従って、それぞれ D 1、D 2 2、D 3 1 及び D 3 9 に各群のマウスに対して生体イメージング分析を行い、蛍光強度を測定した。結果を図 5 に示す。

【0255】

図 5 は、本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MG の in - situ 腫瘍モデルマウスにおける腫瘍蛍光強度の経時変化を示す折れ線グラフである。図 5 の結果から分かるように、投与後 D 1 に比べて、観察時間の延長に伴ってブランク対照群及び対照群の腫瘍蛍光強度 (Radiance) が明らかに上昇した。これにより、U118MG ヒト神経膠腫細胞の数が増加することが示されており、これと対照的に、本開示に係る複合体を投与した試験群 5 a 及び 5 b の腫瘍蛍光強度が明らかに低下し、低下幅が最大で 1 桁に達し、対照群に比べて 2 桁以上に達した。これにより、U118MG ヒト神経膠腫細胞の数が増加し、実験開始時に比べて開始時の 1/10 に低下し、ひいては対照群の 1% 以下に低下する可能性があることが示されている。以上より、皮下投与のみによっても、本開示に係る複合体は、血液脳関門を効果的に透過して脳神経膠腫を効率的に標的とすることができ、腫瘍成長を阻害する優れた効果を有し、良好な治療コンプライアンス及び腫瘍を効率的に阻害する高い創薬可能性を示す。

40

【0256】

実験例 6 複合体のマウス体内での U118MG 皮下腫瘍に対する阻害活性

実験例 2 の方法に従って、U118MG ヒト神経膠腫細胞 (広州ジェニオバイオテック

50

有限公司から購入)を培養した。対数的に成長したU118MGヒト神経膠腫細胞を取り、(0.25%のパンクレアチン)で消化し、細胞を収集し、遠心分離して上澄みを除去し、細胞を無血清DMEM培地に再懸濁して濃度が 1×10^8 cells/mLである細胞培養液を製造した。

【0257】

実験動物は、36匹の12週齢の雄のNOD-SCIDマウス(ス貝福(北京)生物技術有限公司から購入)である。上記細胞培養液をNOD-SCIDマウスの右側の背部の皮下位置に接種し、接種体積を1匹当たり100 μ Lとし、即ち、各マウスに 1×10^7 個の細胞を接種した。注射後、マウスを7日間飼育し続けた。

【0258】

無血清DMEM培地を用いて、複合体20を1mg/mL濃度(アプタマーで計算する)の複合体溶液に溶解した。複合体21、複合体22及び複合体23を、それぞれ0.8mg/mL濃度(アプタマーで計算する)の複合体溶液に溶解した。10%のDMSO+90%の無血清DMEM培地(体積比)を用いて、MMAEを0.06mg/mL濃度の溶液に溶解した。

【0259】

U118MG細胞接種後7日から投与を開始し、投与当日をD8とした。実験において、腹部皮下投与の方式で、それぞれD8、D12、D16及びD20に1回投与し、合計4回投与した。

【0260】

ブランク対照群6aについて、各群のマウスにそれぞれDMEMを投与し、単回投与容積を5 μ L/gマウス体重とした。

【0261】

対照群6bについて、それぞれ各群のマウスにMMAEを投与した。単回投与容積を5 μ L/gマウス体重とし、計算した単回投与量は0.3mg/kgであった。

【0262】

試験群6cについて、各マウスにそれぞれ複合体20を投与した。単回投与容積を5 μ L/gマウス体重とし、計算した単回投与量は5mg/kgであり、MMAEを含む用量は0.3mg/kgに相当する。

【0263】

3群のマウスに対して、それぞれ各群のマウスに複合体21、複合体22又は複合体23を投与した。単回投与容積をいずれも5 μ L/gマウス体重とし、計算した単回投与量は4mg/kgであり、MMAEを含む用量は0.3mg/kgに相当し、順に、それぞれ試験群6d、6e及び6fとして記録した。

【0264】

腫瘍体積をD16、D20、D25、D29、D33、D36、D41、D48、D60に測定した。体外測定により腫瘍の長径及び短径を測定した。腫瘍体積を式 $1/2$ (長径 \times 短径 2)に従って計算した。実験終了後、D60に腫瘍組織を取り、秤量した。図6は、異なる複合体投与後の、異なる日数におけるマウス腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。図6から分かるように、対照群6b又はブランク対照群に比べて、本開示の複合体を投与した試験群6c~6fのマウスの腫瘍体積及び腫瘍重量は、いずれも明らかに低下した。上記結果から明らかのように、本開示の複合体は、腫瘍組織に効果的に到達でき、優れた抗腫瘍活性を示すことができる。

【0265】

実験例7 複体の長期間隔投与によるU118MG皮下腫瘍モデルマウスの体内での活性

実験例2の方法に従って、U118MG皮下腫瘍を接種したマウス42匹を得て、注射後、マウスを飼育し続けた。

【0266】

10%のDMSO+90%の無血清DMEM培地(体積比)を用いて、MMAEを0.

10

20

30

40

50

0.3 mg/mL 濃度及び 0.01 mg/mL 濃度の溶液に溶解し、複合体 21 を 0.5 mg/mL 濃度及び 0.165 mg/mL 濃度（アプタマーで計算する）の溶液に溶解し、比較複合体 25 を 0.5 mg/mL 濃度及び 0.165 mg/mL 濃度（アプタマーで計算する）の溶液に溶解した。

【0267】

U118MG 細胞接種 7 日後、全てのマウスを 7 群にランダムに分け、各群 6 匹のマウスとし、各群のマウスに投与し、投与当日を D8 とした。実験において、腹部皮下投与の方式で、それぞれ D8、D11、D15、D29、D32 及び D36 に 1 回投与し、合計 6 回投与した。投与前に体重を量り、体重に応じて投与容積を計算した。

【0268】

ブランク対照群について、各マウスにそれぞれ DMEM 培地を投与し、単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とした。

【0269】

試験群 7a について、各マウスにそれぞれ 0.01 mg/mL 濃度の MMAE を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 0.1 mg/kg であった。

【0270】

試験群 7b について、各マウスにそれぞれ 0.165 mg/mL 濃度の複合体 21 を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 1.65 mg/kg であった（対応する MMAE 投与量を 0.1 mg/kg とした）。

【0271】

対照群 7c について、各マウスにそれぞれ 0.165 mg/mL 濃度の比較複合体 25 を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 1.65 mg/kg であった（対応する MMAE 投与量を 0.1 mg/kg とした）。

【0272】

試験群 7d について、各マウスにそれぞれ 0.03 mg/mL 濃度の MMAE を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 0.3 mg/kg であった。

【0273】

試験群 7e について、各マウスにそれぞれ 0.5 mg/mL 濃度の複合体 21 を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 5 mg/kg であった（対応する MMAE 投与量を 0.3 mg/kg とした）。

【0274】

対照群 7f について、各マウスにそれぞれ 0.5 mg/mL 濃度の比較複合体 25 を投与した。単回投与容積を 10 µL/g マウス体重とし、計算した単回投与量は 5 mg/kg であった（対応する MMAE 投与量を 0.3 mg/kg とした）。

【0275】

D1、D9、D16、D19、D21、D24、D26、D29、D32、D36、D39、D43、D47、D53、D57、D60、D64、D67、D71、D74、D78、D81、D84、D88、D92、D95 及び D99 に腫瘍体積を測定し、ブランク対照群は D53 に、試験群 7a、7b 及び対照群 7c は、D60 に測定した後に、実験を中止した。

【0276】

体外測定により腫瘍の長径及び短径を測定した。腫瘍体積を式 $1/2 \times (\text{長径} \times \text{短径}^2)$ に従って計算した。実験中止後、各群の腫瘍組織を取り、秤量して平均値を計算した。結果を図 7 に示す。

【0277】

図 7 は、異なる濃度の本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、U118MG 皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。

【0278】

10

20

30

40

50

図 7 の結果から分かるように、ブランク対照群において、腫瘍体積が急速に増加し、MMAEのみを投与した試験群において、腫瘍体積の増加速度が低下した。これにより、MMAE自体が腫瘍増殖に対して阻害効果を示すことが示されている。

【0279】

更に、試験群 7 b は、試験期間において腫瘍体積がいずれも MMAE 含有量に相当する試験群 7 a 及び対照群 7 c よりも顕著に小さく、試験群 7 e は、試験期間において腫瘍体積がいずれも MMAE 含有量に相当する試験群 7 d 及び対照群 7 f よりも顕著に小さく、MMAE 試験群 7 a 及び 7 d の単独投与及び比較複合体 25 の投与よりも優れた抗腫瘍活性を示した。実験中止後、本開示の複合体を投与したマウスにおける腫瘍重量も MMAE 群及び対照群より顕著に低かった。上記から明らかなように、本開示に係る複合体は、MMAE を腫瘍組織に効果的に送達することができ、腫瘍標的能力を示すとともに、MMAE 分子が他の組織に分布することによる毒性リスクを低減し、用量相関性及び優れた抗腫瘍効果を示す。

10

【0280】

上記結果から明らかなように、本開示に係る複合体は、腫瘍に対して阻害効果を有する低分子薬物基を、腫瘍組織に効果的に標的送達することができ、優れた抗腫瘍活性及び用量依存効果を示すことができる。

【0281】

実験例 8 複合体の U118MG 皮下腫瘍モデルマウスの体内での活性

実験例 2 の方法に従って、U118MG 皮下腫瘍を接種したマウス 42 匹を得て、注射後、マウスを飼育し続けた。

20

【0282】

10% の DMSO + 90% の無血清 DMEM 培地（体積比）で MMAE を 0.02 mg / mL 濃度の溶液に溶解し、複合体 20 及び比較複合体 25 を、0.33 mg / mL 濃度（アプタマーで計算する）の溶液に溶解し、複合体 21 及び複合体 23 を、0.26 mg / mL 濃度（アプタマーで計算する）の溶液に溶解し、複合体 26 を、0.23 mg / mL 濃度（アプタマーで計算する）の溶液に溶解した。

【0283】

U118MG 細胞を接種した 7 日後、上記接種したマウスを群分けし、各群 6 匹のマウスとし、各群のマウスに投与し、投与当日を D8 とした。投与前に体重を量り、平均体重を 20 g とし、投与容積を計算した。

30

【0284】

実験において、腹部皮下投与の方式で、それぞれ D8、D12、D15 及び D19 に 1 回投与し、合計 4 回投与した。

【0285】

ブランク対照群について、各マウスにそれぞれ DMEM 培地を投与し、単回投与容積を 100 μ L / g とした。

【0286】

試験群 8 a について、各マウスにそれぞれ MMAE を投与した。単回投与容積を 100 μ L とし、計算した単回投与量を 0.1 mg / kg とした。

40

【0287】

試験群 8 b について、各マウスにそれぞれ複合体 20 を投与した。単回投与容積を 100 μ L とし、計算した単回投与量は 1.65 mg / kg であった。

【0288】

対照群 8 c について、各マウスにそれぞれ比較複合体 25 を投与した。単回投与容積を 100 μ L とし、計算した単回投与量は 1.65 mg / kg であった。

【0289】

試験群 8 d について、各マウスにそれぞれ複合体 21 を投与した。単回投与容積を 100 μ L とし、計算した単回投与量は 1.32 mg / kg であった。

【0290】

50

試験群 8 e について、各マウスにそれぞれ複合体 2 3 を投与した。単回投与容積を 1 0 0 μ L とし、計算した単回投与量は 1 . 3 2 m g / k g であった。

【 0 2 9 1 】

試験群 8 f について、各マウスにそれぞれ複合体 2 6 を投与した。単回投与容積を 1 0 0 μ L とし、計算した単回投与量は 1 . 1 7 m g / k g であった。上記 8 b ~ 8 f 群の投与量は、いずれも 0 . 1 m g / k g の M M A E を含有することに相当する。

【 0 2 9 2 】

D 1、D 9、D 1 6、D 1 9、D 2 2、D 2 6、D 3 0、D 3 6、D 4 0、D 4 3、D 4 7、D 5 0、D 5 4、D 5 7、D 6 1、D 6 4、D 6 8 及び D 7 1 に腫瘍体積を測定した。ブランク対照群は D 5 4 に、8 a 群 (M M A E のみを投与) は D 6 4 に測定した後に、実験を中止した。

10

【 0 2 9 3 】

体外測定により腫瘍の長径及び短径を測定した。腫瘍体積を式 $1 / 2 (\text{長径} \times \text{短径}^2)$ に従って計算した。実験を中止した後、各群について腫瘍組織を取り、秤量した。結果を図 8 に示す。

【 0 2 9 4 】

図 8 は、各群のマウスにおける腫瘍体積の経時変化の折れ線グラフ及び D 7 2 での腫瘍重量を示す。図 8 の結果から分かるように、ブランク対照群の腫瘍体積が急速に増加し、他の各群の腫瘍体積の増加速度がいずれも低下したが、M M A E のみを投与した試験群 8 a 及び対照群 8 c に比べて、本開示の複合体を投与した各試験群は、M M A E の単回投与量が 0 . 1 m g / k g に相当する場合、腫瘍体積の増加速度がいずれも顕著に更に低下した。また、複合体 2 0、複合体 2 1、複合体 2 3 及び複合体 2 6 は、実験終点 D 7 2 に、試験群 8 a よりも腫瘍重量が少なくとも 5 8 % 減少し、より優れた抗腫瘍効果を示した。

20

【 0 2 9 5 】

実験例 9 複合体の A 5 4 9 皮下腫瘍モデルマウスの体内での活性

A 5 4 9 ヒト肺腺癌細胞 (広州ジェニオバイオテック有限公司から購入) を、培養条件としては 1 0 % の F B S (G i b c o、品番 1 0 0 9 9 - 1 4 1) を含む D M E M 完全培地 (M A C G E N E 社、品番 C M 1 5 0 1 9) で、3 7 ° C で、5 % の C O ₂ / 9 5 % の空気のインキュベーターで培養した。0 . 2 5 w t % のパンクレアチンで消化して細胞を収集し、上澄みを吸い出し、細胞を無血清 D M E M 培地に再懸濁して細胞密度が $1 \times 1 0^8$ cells / m L である細胞培養液を製造した。

30

【 0 2 9 6 】

実験例 2 の方法に従って、A 5 4 9 皮下腫瘍を接種したマウス 3 0 匹を得て、注射後、マウスを飼育し続けた。

【 0 2 9 7 】

無血清 D M E M 培地を用いて、複合体 2 0 及び複合体 2 1 を 1 m g / m L 濃度 (アプタマーで計算する) の複合体溶液に溶解した。比較複合体 2 4 を 0 . 8 m g / m L 濃度 (アプタマーで計算する) の複合体溶液に溶解した。1 0 % の D M S O + 9 0 % の無血清 D M E M 培地 (体積比) を用いて、M M A E を 0 . 0 6 m g / m L 濃度の溶液に溶解した。

【 0 2 9 8 】

A 5 4 9 ヒト肺癌細胞を接種した 7 日後、全てのマウスを群分けし、各群 6 匹のマウスとし、各マウスに投与し、投与当日を D 8 とした。投与前に体重を量り、マウスの体重に応じて投与容積を計算した。

40

【 0 2 9 9 】

各群のマウスを D 8、D 1 2、D 1 5 及び D 1 9 にそれぞれ 1 回投与し、合計 4 回投与した。ブランク対照群 9 a について、各群のマウスにそれぞれ D M E M を投与し、単回投与容積を 5 μ L / g マウス体重とした。

【 0 3 0 0 】

対照群 9 b について、各群のマウスにそれぞれ M M A E を投与した。単回投与容積を 5 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は 0 . 3 m g / k g であった。

50

【0301】

試験群9cについて、各マウスにそれぞれ複合体20を投与した。単回投与容積を5 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は5 mg / kg であり、MMAEを含む用量は0.3 mg / kg に相当する。

【0302】

試験群9dについて、各マウスにそれぞれ複合体21を投与した。単回投与容積を5 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は5 mg / kg であり、MMAEを含む用量は0.3 mg / kg に相当する。

【0303】

試験群9eについて、各マウスにそれぞれ比較複合体24を投与した。単回投与容積を5 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量は5 mg / kg であり、MMAEを含む用量は0.3 mg / kg に相当する。

10

【0304】

各群のマウスに、D46、D50及びD54にそれぞれ1回投与した。単回投与容積を10 μ L / g マウス体重とし、計算した単回投与量に含まれるMMAEの用量は0.6 mg / kg に相当する。

【0305】

D1、D9、D16、D19、D22、D26、D30、D36、D40、D43、D47、D50、D54及びD57に腫瘍体積を測定した。ブランク対照群は、D50に測定した後に実験を中止した。

20

【0306】

体外測定により腫瘍の長径及び短径を測定した。腫瘍体積を式 $1/2$ (長径 \times 短径²) に従って計算した。結果を図9に示す。

【0307】

図9は、異なる濃度の本開示に係る複合体又は対照化合物投与後の、A549皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍体積の経時変化を示す折れ線グラフである。図9の結果から分かるように、ブランク対照群のマウスの腫瘍体積が急速に増加し、残りの各群の腫瘍体積の増加速度がいずれも低下し、各時間帯において、複合体20及び21を投与したマウスの腫瘍体積がいずれも対照群9b及び9eよりも小さい。上記結果から明らかなように、本開示の複合体は、A549肺癌腫瘍組織に効果的に標的到達することができ、優れた抗腫瘍活性を示すことができる。

30

【0308】

以上、本開示のいくつかの実施形態を詳しく説明したが、本開示は、上記実施形態の具体的な細部に限定されず、本開示の技術的思想の範囲で、本開示の技術手段に対して複数の簡単な変形を行うことができ、これらの簡単な変形は、いずれも本開示の保護範囲に属する。

【0309】

なお、上記いくつかの実施形態に記載された各具体的な技術的特徴は、矛盾しない限り、何らかの適当な方式によって組み合わせることができる。不要な重複を避けるために、本開示は、可能な各種の組み合わせ方を別途説明しない。

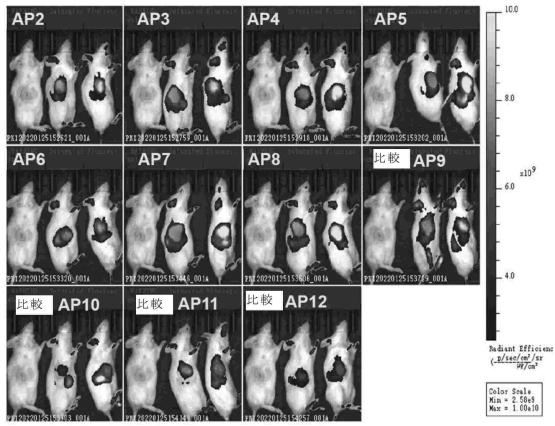
40

【0310】

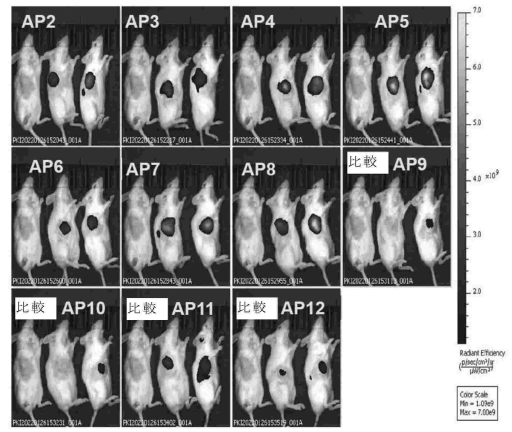
また、本開示の様々な実施形態は、任意に組み合わせることができ、本開示の思想から逸脱しない限り、本開示に開示されている内容とみなすべきである。

【 図面 】

【 図 1 A 】

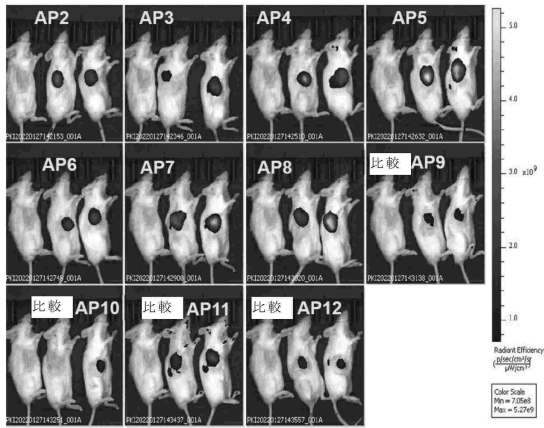


【 図 1 B 】

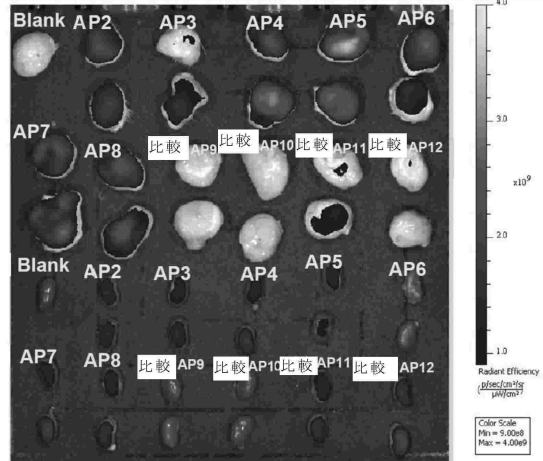


10

【 図 1 C 】



【 図 1 D 】



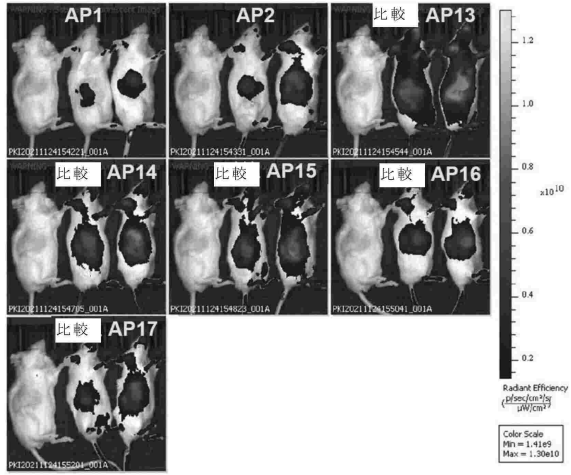
20

30

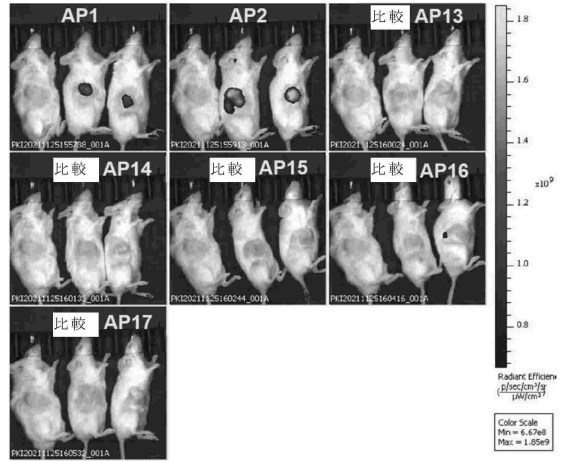
40

50

【 図 2 A 】

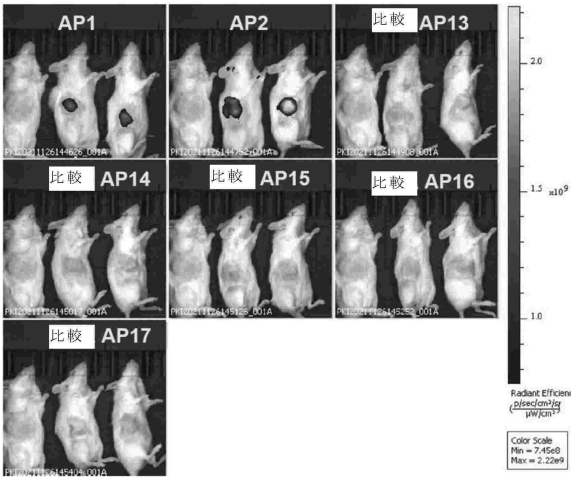


【 図 2 B 】

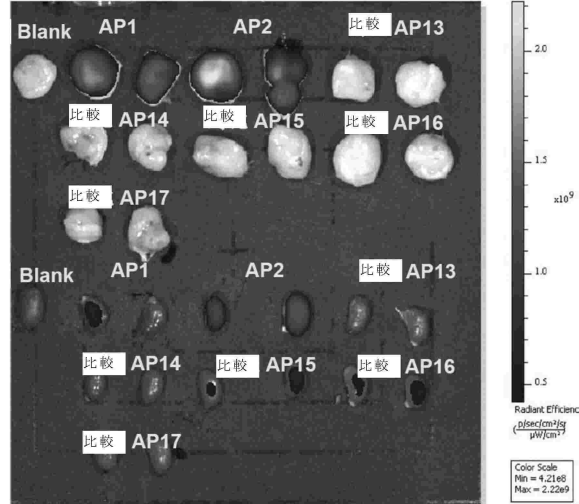


10

【 図 2 C 】



【 図 2 D 】



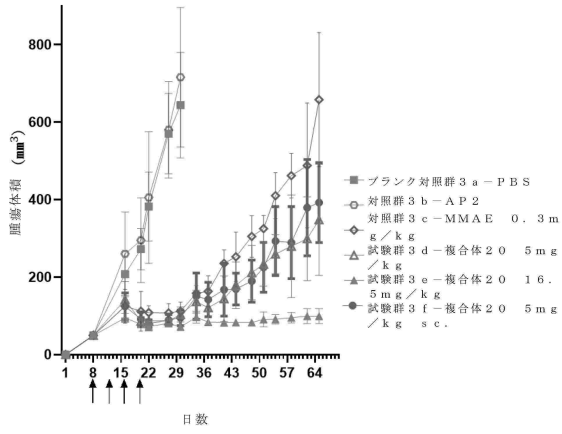
20

30

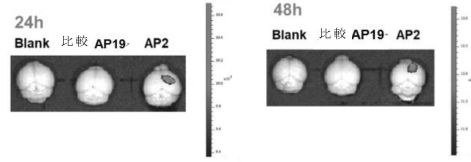
40

50

【 図 3 】

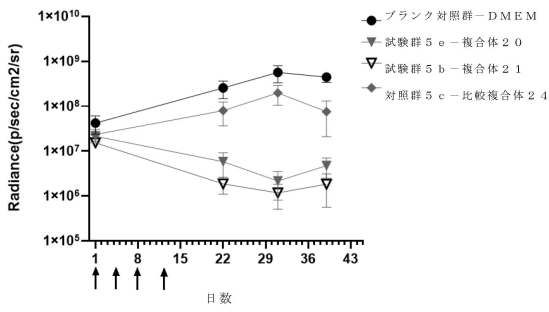


【 図 4 】

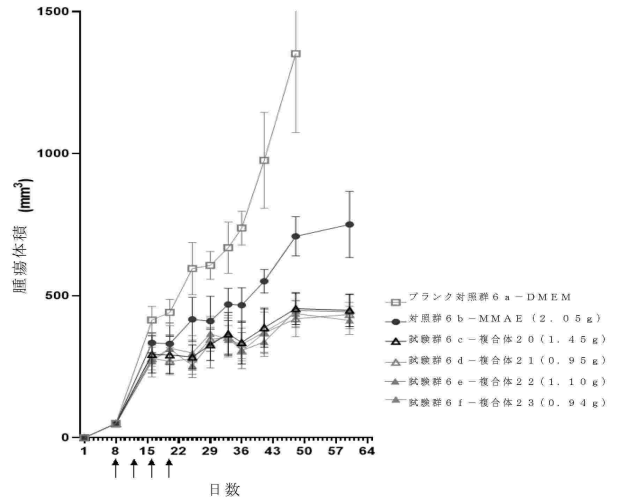


10

【 図 5 】



【 図 6 】



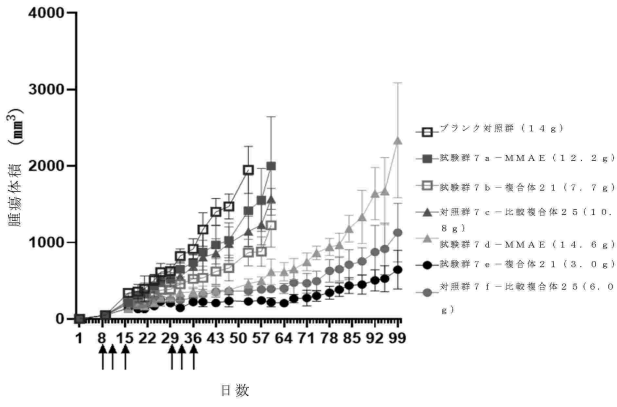
20

30

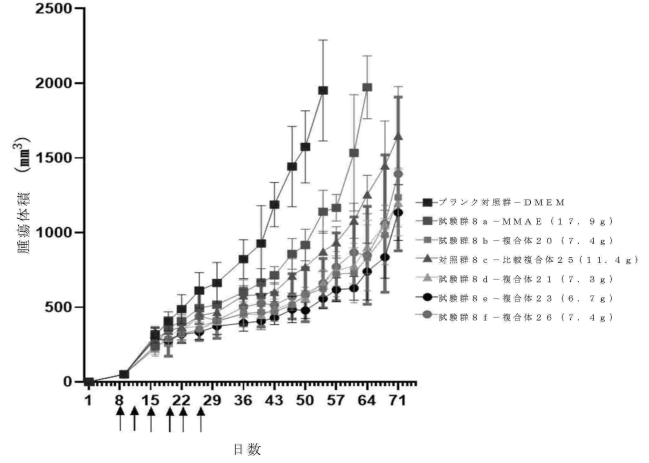
40

50

【 図 7 】

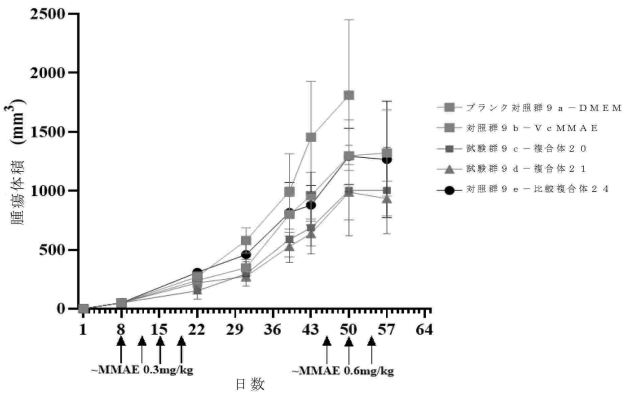


【 図 8 】



10

【 図 9 】



20

【 配列表 】

2025512110000001.xml

30

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/088459
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 47/54(2017.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K31/713(2006.01)i; C07C237/06(2006.01)i; C07C229/24(2006.01)i; A61P19/06(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/04(2006.01)i; A61B8/08(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K C12N C07C A61P A61B Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方, WANFANG; NCBI; EMBL; ISI Web of Science; 读秀学术, DUXIU ACADEMIC; Springer; STNext: 核苷酸, 诊断, 脑胶质瘤, 序列检索, sequence search, MMAE, Nucleotides, diagnostic, Glioma, Glioblastoma		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112390835 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 23 February 2021 (2021-02-23) description paragraphs [0219]-[0224], [0359]	1-50, 53
A	CN 110959011 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 03 April 2020 (2020-04-03) claims 1-114	1-50, 53
A	CN 110075295 A (IMMUNOMEDICS INC.) 02 August 2019 (2019-08-02) claims 1-24	1-50, 53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">20 July 2023</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">24 July 2023</p>
Name and mailing address of the ISA/CN <p style="text-align: center;">China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</p>		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/088459

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

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

- a. forming part of the international application as filed.
- b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/088459

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

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

- 1. Claims Nos.: **51, 52**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 51 and 52 relate to a method for treatment of tumors and tumor-related diseases or conditions, which is a disease diagnosis method practiced on a living human or animal body for the direct purpose of disease diagnosis, falls within diagnostic methods for treatment of the human or animal body, and falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which an international search is not required. 10

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/088459

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112390835	A	23 February 2021	None			
CN	110959011	A	03 April 2020	AU	2018394875	A1	09 April 2020
				TW	201929905	A	01 August 2019
				US	2020338201	A1	29 October 2020
				US	11633482	B2	25 April 2023
				JP	2021509402	A	25 March 2021
				CA	3087106	A1	04 July 2019
				ZA	202003833	B	26 January 2022
				KR	20200105812	A	09 September 2020
				EP	3732185	A1	04 November 2020
				EP	3732185	A4	10 November 2021
				RU	2020121741	A	01 February 2022
				WO	2019128611	A1	04 July 2019
CN	110075295	A	02 August 2019	CA	2914438	A1	29 January 2015
				CA	2914438	C	14 June 2022
				AU	2014293670	A1	24 December 2015
				AU	2014293670	B2	01 August 2019
				EP	3024460	A2	01 June 2016
				EP	3024460	A4	14 June 2017
				EP	3024460	B1	22 July 2020
				JP	2016534092	A	04 November 2016
				JP	6427789	B2	28 November 2018

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/088459

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. 作为国际申请的一部分提交的;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

10

2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/088459

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

- 1. 权利要求: 51、52
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
权利要求51、52涉及一种肿瘤及肿瘤相关疾病或病症的治疗方法, 是以有生命的人体或动物体为实施对象, 以诊断疾病为直接目的的疾病的诊断方法, 属于处置人体或动物体的诊断方法, 属于PCT细则39.1(iv)中所列的无需进行国际检索的情形。
- 2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
- 3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

10

20

30

40

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/088459

A. 主题的分类		10
<p>A61K 47/54(2017.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K31/713(2006.01)i; C07C237/06(2006.01)i; C07C229/24(2006.01)i; A61P19/06(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/04(2006.01)i; A61B8/08(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>		
B. 检索领域		20
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K C12N C07C A61P A61B		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		30
CNABS;CNTXT;DWPI;VEN;ENTXTC;ENTXT;WPABS;CNKI;VCN;CJFD;万方;NCBI;EMBL;ISI Web of Science;读秀学术;Springer;STNext; 核苷酸, 诊断, 脑胶质瘤, 序列检索, MMAE, Nucleotides, diagnostic, Glioma, Glioblastoma		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	
A	CN 112390835 A (苏州瑞博生物技术股份有限公司) 2021年2月23日 (2021 - 02 - 23) 说明书第[0219]-[0224]、[0359]段	1-50, 53
A	CN 110959011 A (苏州瑞博生物技术股份有限公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03) 权利要求1-114	1-50, 53
A	CN 110075295 A (免疫医疗公司) 2019年8月2日 (2019 - 08 - 02) 权利要求1-24	1-50, 53
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		40
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2023年7月20日		2023年7月24日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		杨凤娇
		电话号码 (+86) 0512-88995733

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/088459

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112390835	A	2021年2月23日	无			
CN	110959011	A	2020年4月3日	AU	2018394875	A1	2020年4月9日
				TW	201929905	A	2019年8月1日
				US	2020338201	A1	2020年10月29日
				US	11633482	B2	2023年4月25日
				JP	2021509402	A	2021年3月25日
				CA	3087106	A1	2019年7月4日
				ZA	202003833	B	2022年1月26日
				KR	20200105812	A	2020年9月9日
				EP	3732185	A1	2020年11月4日
				EP	3732185	A4	2021年11月10日
				RU	2020121741	A	2022年2月1日
				WO	2019128611	A1	2019年7月4日
CN	110075295	A	2019年8月2日	CA	2914438	A1	2015年1月29日
				CA	2914438	C	2022年6月14日
				AU	2014293670	A1	2015年12月24日
				AU	2014293670	B2	2019年8月1日
				EP	3024460	A2	2016年6月1日
				EP	3024460	A4	2017年6月14日
				EP	3024460	B1	2020年7月22日
				JP	2016534092	A	2016年11月4日
				JP	6427789	B2	2018年11月28日

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	31/706(2006.01)	A 6 1 K	31/706
A 6 1 K	31/475(2006.01)	A 6 1 K	31/475
A 6 1 K	31/7034(2006.01)	A 6 1 K	31/7034
A 6 1 K	31/537(2006.01)	A 6 1 K	31/537
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745
A 6 1 K	31/704(2006.01)	A 6 1 K	31/704

(32)優先日 令和4年4月14日(2022.4.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

1 6 8

(72)発明者 チャン、ホンイェン

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティ、ユイシャン タウン、ユアン
フォン ロード ナンバー 1 6 8

(72)発明者 カオ、シャン

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティ、ユイシャン タウン、ユアン
フォン ロード ナンバー 1 6 8

F ターム (参考)

4C076 AA95 CC27 CC41 EE59

4C084 AA01 AA02 BA01 BA10 BA14 BA23 NA13 NA14 ZB261

4C086 AA01 AA02 CB09 CB21 CB22 EA08 EA11 NA13 NA14 ZB26